



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2022년05월06일

(11) 등록번호 10-2395736

(24) 등록일자 2022년05월03일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07K 16/22 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)

A61P 27/02 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C07K 16/22 (2013.01)

A61P 27/02 (2018.01)

(21) 출원번호 10-2020-7024212(분할)

(22) 출원일자(국제) 2012년06월01일

심사청구일자 2020년09월21일

(85) 번역문제출일자 2020년08월21일

(65) 공개번호 10-2020-0102547

(43) 공개일자 2020년08월31일

(62) 원출원 특허 10-2019-7034936

원출원일자(국제) 2012년06월01일

심사청구일자 2019년12월24일

(86) 국제출원번호 PCT/US2012/040545

(87) 국제공개번호 WO 2012/167143

국제공개일자 2012년12월06일

(30) 우선권주장

61/493,230 2011년06월03일 미국(US)

(56) 선행기술조사문헌

KR1020060133604 A*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

조마 테크놀로지 리미티드

미국 94710 캘리포니아주 버클리 세븐쓰 스트리트
2910 조마 (유에스) 엘엘씨 씨/오

(72) 발명자

베딩거 대니얼

미국 94710 캘리포니아주 버클리 세븐쓰 스트리트
2910 조마 코포레이션 내

칸 쉬린 에스.

미국 94710 캘리포니아주 버클리 세븐쓰 스트리트
2910 조마 코포레이션 내

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

유미특허법인

전체 청구항 수 : 총 30 항

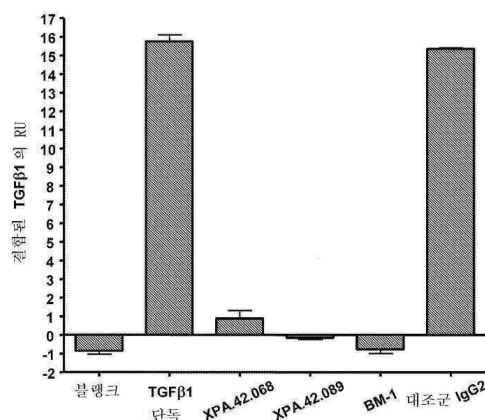
심사관 : 이현지

(54) 발명의 명칭 TGF-베타에 특이적인 항체

(57) 요약

본 개시내용은 일반적으로 TGF β 1, TGF β 2 및 TGF β 3을 포함하는 형질전환 성장 인자 베타(TGF β)에 특이적인 항체를 위한 물질 및 방법, 및 암, 눈 질환, 병증 또는 장애, 안섬유증 또는 눈의 섬유증을 포함하는 섬유증 및 TGF β 발현과 관련된 다른 병증 또는 장애를 갖는 피험체의 치료에서 이 항체의 용도에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61P 35/00 (2018.01)
A61K 2039/505 (2013.01)
C07K 2317/30 (2013.01)
C07K 2317/55 (2013.01)
C07K 2317/56 (2013.01)
C07K 2317/76 (2013.01)
C07K 2317/92 (2013.01)

(72) 발명자

미르자 아메르

미국 94710 캘리포니아주 버클리 세븐쓰 스트리트
2910 조마 코포레이션 내

나라심하 아제이 제이.

미국 94710 캘리포니아주 버클리 세븐쓰 스트리트
2910 조마 코포레이션 내

타케우치 토시히코

미국 94710 캘리포니아주 버클리 세븐쓰 스트리트
2910 조마 코포레이션 내

명세서

청구범위

청구항 1

- (a) 서열번호 19에 기재된 중쇄 CDR1 아미노산 서열;
- (b) 서열번호 20에 기재된 중쇄 CDR2 아미노산 서열;
- (c) 서열번호 21에 기재된 중쇄 CDR3 아미노산 서열;
- (d) 서열번호 22에 기재된 경쇄 CDR1 아미노산 서열;
- (e) 서열번호 23에 기재된 경쇄 CDR2 아미노산 서열; 및
- (f) 서열번호 24에 기재된 경쇄 CDR3 아미노산 서열을 포함하는,

형질전환 성장 인자 베타(transforming growth factor beta: TGF β)1, TGF β 2 및 TGF β 3에 결합하는 항체를 포함하는 억제학적 조성물로서,

상기 조성물은 대장직장암, 간세포암, 유방암, 전립선암, 췌장암, 신장암, 폐암, 섬유증성 암, 또는 섬유증성 질환의 치료를 위한 것이고,

상기 조성물은 하나 이상의 제2 물질과 함께 투여되는 것인, 억제학적 조성물.

청구항 2

- (a) 서열번호 19에 기재된 중쇄 CDR1 아미노산 서열;
- (b) 서열번호 20에 기재된 중쇄 CDR2 아미노산 서열;
- (c) 서열번호 21에 기재된 중쇄 CDR3 아미노산 서열;
- (d) 서열번호 22에 기재된 경쇄 CDR1 아미노산 서열;
- (e) 서열번호 23에 기재된 경쇄 CDR2 아미노산 서열; 및
- (f) 서열번호 24에 기재된 경쇄 CDR3 아미노산 서열을 포함하는,

형질전환 성장 인자 베타(transforming growth factor beta: TGF β)1, TGF β 2 및 TGF β 3에 결합하는 항체를 포함하는 억제학적 조성물로서,

상기 조성물은 대장직장암, 간세포암, 유방암, 전립선암, 췌장암, 신장암, 폐암, 섬유증성 암, 또는 섬유증성 질환의 치료를 위한 것이고,

상기 항체는 1 mg/kg, 3 mg/kg 또는 10 mg/kg 의 용량으로 투여되는 것인, 억제학적 조성물.

청구항 3

- (a) 서열번호 19에 기재된 중쇄 CDR1 아미노산 서열;
- (b) 서열번호 20에 기재된 중쇄 CDR2 아미노산 서열;
- (c) 서열번호 21에 기재된 중쇄 CDR3 아미노산 서열;
- (d) 서열번호 22에 기재된 경쇄 CDR1 아미노산 서열;
- (e) 서열번호 23에 기재된 경쇄 CDR2 아미노산 서열; 및
- (f) 서열번호 24에 기재된 경쇄 CDR3 아미노산 서열을 포함하는,

형질전환 성장 인자 베타(transforming growth factor beta: TGF β)1, TGF β 2 및 TGF β 3에 결합하는 항체를 포함하는 억제학적 조성물로서,

상기 조성물은 대장직장암, 간세포암, 유방암, 전립선암, 췌장암, 신장암, 폐암, 섬유증성 암, 또는 섬유증식성 질환의 치료를 위한 것이고,

상기 항체는 1000 mg 의 용량으로 투여되는 것인, 약제학적 조성물.

청구항 4

- (a) 서열번호 19에 기재된 중쇄 CDR1 아미노산 서열;
- (b) 서열번호 20에 기재된 중쇄 CDR2 아미노산 서열;
- (c) 서열번호 21에 기재된 중쇄 CDR3 아미노산 서열;
- (d) 서열번호 22에 기재된 경쇄 CDR1 아미노산 서열;
- (e) 서열번호 23에 기재된 경쇄 CDR2 아미노산 서열; 및
- (f) 서열번호 24에 기재된 경쇄 CDR3 아미노산 서열을 포함하는,

형질전환 성장 인자 베타(transforming growth factor beta: TGF β)1, TGF β 2 및 TGF β 3에 결합하는 항체를 포함하는 약제학적 조성물로서,

상기 조성물은 대장직장암, 간세포암, 유방암, 전립선암, 췌장암, 신장암, 폐암, 섬유증성 암, 또는 섬유증식성 질환의 치료를 위한 것이고,

상기 항체는 주마다, 2주마다, 3주마다, 또는 달마다 투여되는 것인, 약제학적 조성물.

청구항 5

- (a) 서열번호 19에 기재된 중쇄 CDR1 아미노산 서열;
- (b) 서열번호 20에 기재된 중쇄 CDR2 아미노산 서열;
- (c) 서열번호 21에 기재된 중쇄 CDR3 아미노산 서열;
- (d) 서열번호 22에 기재된 경쇄 CDR1 아미노산 서열;
- (e) 서열번호 23에 기재된 경쇄 CDR2 아미노산 서열; 및
- (f) 서열번호 24에 기재된 경쇄 CDR3 아미노산 서열을 포함하는,

형질전환 성장 인자 베타(transforming growth factor beta: TGF β)1, TGF β 2 및 TGF β 3에 결합하는 항체를 포함하는 약제학적 조성물로서,

상기 조성물은 대장직장암, 간세포암, 유방암, 전립선암, 췌장암, 신장암, 폐암, 섬유증성 암, 또는 섬유증식성 질환의 치료를 위한 것이고,

상기 항체는 정맥내 또는 피하로 투여되는 것인, 약제학적 조성물.

청구항 6

- (a) 서열번호 19에 기재된 중쇄 CDR1 아미노산 서열;
- (b) 서열번호 20에 기재된 중쇄 CDR2 아미노산 서열;
- (c) 서열번호 21에 기재된 중쇄 CDR3 아미노산 서열;
- (d) 서열번호 22에 기재된 경쇄 CDR1 아미노산 서열;
- (e) 서열번호 23에 기재된 경쇄 CDR2 아미노산 서열; 및
- (f) 서열번호 24에 기재된 경쇄 CDR3 아미노산 서열을 포함하는,

형질전환 성장 인자 베타(transforming growth factor beta: TGF β)1, TGF β 2 및 TGF β 3에 결합하는 항체를 포함하는 약제학적 조성물로서,

상기 조성물은 대장직장암, 간세포암, 유방암, 전립선암, 췌장암, 신장암, 폐암, 섬유증성 암, 또는 섬유증식성

질환의 치료를 위한 것이고,

상기 항체는 서열번호 6에 기재된 중쇄 가변 영역 아미노산 서열과 90% 이상 동일한 아미노산 서열 및 서열번호 8에 기재된 경쇄 가변 영역 아미노산 서열과 90% 이상 동일한 아미노산 서열을 포함하는 것인, 약제학적 조성물.

청구항 7

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 항체는 서열번호 6에 기재된 중쇄 가변 영역 아미노산 서열과 90% 이상 동일한 아미노산 서열 및 서열번호 8에 기재된 경쇄 가변 영역 아미노산 서열과 90% 이상 동일한 아미노산 서열을 포함하는 것인, 약제학적 조성물.

청구항 8

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 항체는 서열번호 6에 기재된 중쇄 가변 영역 아미노산 서열 및 서열번호 8에 기재된 경쇄 가변 영역 아미노산 서열을 포함하는 것인, 약제학적 조성물.

청구항 9

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서,

중쇄 불변 영역을 추가로 포함하고, 상기 중쇄 불변 영역은 변형 또는 비변형 IgG, IgM, IgA, IgD, IgE, 이의 단편 또는 이들의 조합인, 약제학적 조성물.

청구항 10

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서,

경쇄 불변 영역을 추가로 포함하고, 상기 경쇄 불변 영역은 변형 또는 비변형 람다 경쇄 불변 영역, 카파 경쇄 불변 영역, 이의 단편 또는 이들의 조합인, 약제학적 조성물.

청구항 11

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 항체의 하나 이상의 경쇄 프레임워크 아미노산이 다른 인간 항체 아미노산 서열로부터의 상응하는 아미노산(들)으로 대체된 것인, 약제학적 조성물.

청구항 12

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 항체가 경쇄 가변 영역에 부착된 인간 경쇄 불변 영역을 추가로 포함하는 것인, 약제학적 조성물.

청구항 13

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 항체가 TGF β 3보다 더 높은 친화도로 TGF β 1 또는 TGF β 2에 결합하는 것인, 약제학적 조성물.

청구항 14

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 항체가 TGF β 3의 활성을 중화시키는 것보다 더 높은 정도로 TGF β 1 및 TGF β 2의 활성을 중화시키는 것인, 약제학적 조성물.

청구항 15

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 항체가 상기 항체 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 무균 약제학적 조성물에 존재하는 것인, 약제학적 조성물.

청구항 16

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 항체 또는 조성물은 종양에서 자연 살해(natural killer: NK) 세포의 수를 증가시키고/시키거나, NK 세포 세포용해 활성을 개선하는 것인, 약제학적 조성물.

청구항 17

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 항체 또는 조성물은 종양에서 조절 T 세포의 수를 감소시키고/시키거나, 조절 T 세포 기능을 억제하는 것인, 약제학적 조성물.

청구항 18

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 항체 또는 조성물은 종양에서 세포독성 T 세포(cytotoxic T cell: CTL)의 수를 증가시키고/시키거나, CTL 기능을 증대시키는 것인, 약제학적 조성물.

청구항 19

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 항체는 종양에서 골수성 유래 억제 세포(myeloid-derived suppressor cell: MDSC)의 수를 감소시키고/시키거나, MDSC 기능을 억제하는 것인, 약제학적 조성물.

청구항 20

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 항체는 종양에서 수지상 세포(dendritic cell: DC)의 수를 감소시키고/시키거나, 수지상 세포의 관용 기능을 억제하는 것인, 약제학적 조성물.

청구항 21

제2항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서,

하나 이상의 제2 물질을 추가로 포함하는, 약제학적 조성물.

청구항 22

제1항에 있어서,

상기 제2 물질이 화학요법제, 세포독성제, 및 아자사이티딘으로 이루어진 군에서 선택되는 것인, 약제학적 조성물.

청구항 23

제21항에 있어서,

상기 제2 물질이 화학요법제, 세포독성제, 및 아자사이티딘으로 이루어진 군에서 선택되는 것인, 약제학적 조성물.

청구항 24

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 항체가 동결건조 제형 또는 액체 제형 내에 존재하는 것인, 약제학적 조성물.

청구항 25

제1항, 제4항, 제5항 또는 제6항 중 어느 한 항에 있어서,
상기 항체가 1 mg/kg, 3 mg/kg 또는 10 mg/kg 의 용량으로 투여되는 것인, 약제학적 조성물.

청구항 26

제1항, 제4항, 제5항 또는 제6항 중 어느 한 항에 있어서,
상기 항체가 1000 mg 의 용량으로 투여되는 것인, 약제학적 조성물.

청구항 27

제1항 내지 제3항, 제5항 또는 제6항 중 어느 한 항에 있어서,
상기 항체가 주마다, 2주마다, 3주마다, 또는 달마다 투여되는 것인, 약제학적 조성물.

청구항 28

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서,
상기 항체가 정맥내 또는 피하로 투여되는 것인, 약제학적 조성물.

청구항 29

제1항에 있어서,
상기 하나 이상의 제2 물질이 동시 또는 순차 투여되는 것인, 약제학적 조성물.

청구항 30

제21항에 있어서,
상기 하나 이상의 제2 물질이 동시 또는 순차 투여되는 것인, 약제학적 조성물.

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

발명의 설명

기술분야

- [0001] 본 발명은 일반적으로 TGF β 1, TGF β 2 및/또는 TGF β 3을 포함하는 형질전환 성장 인자 베타(transforming growth factor beta: TGF β)에 특이적인 항체에 대한 물질 및 방법, 및 암, 눈 질환, 병증 또는 장애, 눈의 섬유증 또는 안섬유증을 포함하는 섬유증 및 TGF β 발현과 관련된 다른 병증 또는 장애를 갖는 피험체의 치료에서 이 항체의 용도에 관한 것이다.

배경기술

- [0002] 형질전환 성장 인자 베타(TGF β) 단백질 패밀리는 포유동물에서 발견되는 3개의 명확한 동종체(TGF β 1, TGF β 2 및 TGF β 3)로 이루어진다. TGF β 단백질은 세포 증식성, 염증성 및 심혈관 병증을 포함하는 질환 상태에 영향을 미치는 다수의 유전자 반응을 활성화하고 조절한다. TGF β 는 원래 정상 섬유아세포를 고정 의존적 성장을 할 수 있는 세포로 형질전환시키는 이의 능력에 대해 이름 붙인 다기능성 사이토킨이다. TGF β 분자는 조혈 세포 및 종양 세포에 의해 주로 생성되고, 다양한 정상 및 신생 조직 기원 둘 다로부터의 세포의 성장 및 분화를 조절, 즉 자극하거나 억제하고(Sporn et al., Science, 233: 532 (1986)), 다양한 간질 세포의 형성 및 확장을 자극할 수 있다.

- [0003] TGF β 는 많은 증식성 및 비증식성 세포 과정, 예컨대 세포 증식 및 분화, 배아 발생, 세포의 기질 형성, 골 발생, 상처 치유, 조혈작용, 및 면역 및 염증 반응에 연관되는 것으로 공지되어 있다. 예를 들면, 문헌[Pircher et al, Biochem. Biophys. Res. Commun., 136: 30-37 (1986); Wakefield et al., Growth Factors, 1: 203-218 (1989); Roberts and Sporn, pp 419-472 in Handbook of Experimental Pharmacology eds M. B. Sporn & A. B. Roberts (Springer, Heidelberg, 1990); Massague et al., Annual Rev. Cell Biol., 6: 597-646 (1990); Singer and Clark, New Eng. J. Med., 341: 738-745 (1999)]을 참조한다. 또한, TGF β 는 장 점막의 질환의 치료 및 예방에 사용된다(WO 제2001/24813호). TGF β 는 세포독성 T 림프구(cytotoxic T cell: CTL) 억제(Ranges et al., J. Exp. Med., 166: 991, 1987, Espevik et al., J. Immunol., 140: 2312, 1988), 부진한 B 세포 림프구 생성 및 카파 경쇄 발현(Lee et al., J. Exp. Med., 166: 1290, 1987), 조혈작용의 음성 조절(Sing et al., Blood, 72: 1504, 1988), 종양 세포에 대한 HLA-DR 발현의 하향조절(Czarniecki et al., J. Immunol., 140: 4217, 1988) 및 B 세포 성장 인자에 반응하는 항원 활성화 B 림프구의 증식 억제(Petit-Koskas et al., Eur. J. Immunol., 18: 111, 1988)를 포함하는 다양한 면역학적 세포 유형에 대한 강한 면역억제 효과를 갖는 것으로 또한 공지되어 있다. 또한 미국 특허 제7,527,791호를 참조한다.

- [0004] TGF β 에 대한 항체는 미국 특허 제7,527,791호; 제7,927,593호; 제7,494,651호; 제7,369,111호; 제7,151,169호; 제6,492,497호; 제6,419,928호; 제6,090,383호; 제5,783,185호; 제5,772,998호; 제5,571,714호; 및 제7,723,486호에 기재되어 있다.

발명의 내용

- [0005] 본 개시내용은 TGF β 발현과 관련된 질환 또는 장애의 치료를 위한 방법 및 조성물을 제공한다. 본 개시내용은 TGF β 1, TGF β 2 및 TGF β 3에 결합하는 항체를 제공한다. 본 명세서에 기재된 항체가 임의의 또는 모든 TGF β 동종체에 대해 차등적 친화도를 가질 수 있다는 것이 제공된다. 추가로, 개시된 TGF β 특이적 항체가 예상치 못하게 종양에서 면역 세포를 조절한다(예를 들면, 종양에 침윤한다)는 것이 본 명세서에서 발견되었고, TGF β 발현과 관련된 종양 및 TGF β 발현과 관련된 다른 병증 또는 장애의 치료가 고려된다.

- [0006] 일 양태에서, 본 개시내용은 (a) 표 1 또는 서열 번호 13, 서열 번호 19 및 서열 번호 25에 기재된 중쇄 상보성 결정 반복부(complementary determining repeat: CDR)1 아미노산 서열 또는 1개 또는 2개의 아미노산이 변경된 이의 변이체; (b) 표 1 또는 서열 번호 14, 서열 번호 20 및 서열 번호 26에 기재된, (a)와 동일한 중쇄 가변 영역으로부터의, 중쇄 CDR2 아미노산 서열 또는 1개 또는 2개의 아미노산이 변경된 이의 변이체; 및 (c) 표 1 또는 서열 번호 15, 서열 번호 21 및 서열 번호 27에 기재된, (a)와 동일한 중쇄 가변 영역으로부터의, 중쇄 CDR3 아미노산 서열 또는 1개 또는 2개의 아미노산이 변경된 이의 변이체를 포함하는 형질전환 성장 인자 베타(TGF β)1, TGF β 2 및 TGF β 3에 결합하는 항체를 제공한다.

- [0007] 관련 양태에서, 본 개시내용은 (a) 표 1 또는 서열 번호 13, 서열 번호 19 및 서열 번호 25에 기재된 중쇄 CDR1 아미노산 서열 또는 이에 대해 적어도 70%의 동일성을 갖는 이의 변이체; (b) 표 1 또는 서열 번호 14, 서열 번호 20 및 서열 번호 26에 기재된, (a)와 동일한 중쇄 가변 영역으로부터의, 중쇄 CDR2 아미노산 서열 또는 이에 대해 적어도 70%의 동일성을 갖는 이의 변이체; 및 (c) 표 1 또는 서열 번호 15, 서열 번호 21 및 서열 번호 27

에 기재된, (a)와 동일한 중쇄 가변 영역으로부터의, 중쇄 CDR3 아미노산 서열 또는 이에 대해 적어도 70%의 동일성을 갖는 이의 변이체를 포함하는 형질전환 성장 인자 베타(TGF β)1, TGF β 2 및 TGF β 3에 결합하는 항체를 제공한다.

- [0008] 추가의 양태에서, 본 개시내용은 (a) 표 1 또는 서열 번호 13, 서열 번호 19 및 서열 번호 25에 기재된 중쇄 CDR1 아미노산 서열 또는 이에 대해 적어도 70%의 동일성을 갖는 이의 변이체; (b) 표 1 또는 서열 번호 14, 서열 번호 20 및 서열 번호 26에 기재된 독립적으로 선택된 중쇄 CDR2 아미노산 서열 또는 이에 대해 적어도 70%의 동일성을 갖는 이의 변이체; 및 (c) 표 1 또는 서열 번호 15, 서열 번호 21 및 서열 번호 27에 기재된 독립적으로 선택된 중쇄 CDR3 아미노산 서열 또는 이에 대해 적어도 70%의 동일성을 갖는 이의 변이체를 포함하는 형질전환 성장 인자 베타(TGF β)1, TGF β 2 및 TGF β 3에 결합하는 항체를 고려한다.
- [0009] 특정한 실시양태에서, 중쇄 CDR1, CDR2 또는 CDR3 아미노산 서열 중 적어도 2개가 표 1 또는 서열 번호 13 내지 15, 서열 번호 19 내지 21 및 서열 번호 25 내지 27에 기재되어 있다. 관련 실시양태에서, 중쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3 아미노산 서열 중 3개가 표 1 또는 서열 번호 13 내지 15, 서열 번호 19 내지 21 및 서열 번호 25 내지 27에 기재되어 있다.
- [0010] 몇몇 실시양태에서, 항체가 표 1 또는 서열 번호 2, 서열 번호 6 및 서열 번호 10에 기재된 중쇄 가변 영역 아미노산 서열과 적어도 85% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 것이 고려된다. 관련 실시양태에서, 항체는 표 1 또는 서열 번호 2, 서열 번호 6 및 서열 번호 10에 기재된 중쇄 가변 영역 아미노산 서열과 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 포함한다.
- [0011] 또 다른 실시양태에서, 항체는 중쇄 가변 영역에서 모든 3개의 HCDR에 대해 적어도 70% 동일한 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드 서열을 포함하고, HCDR1, HCDR2 및 HCDR3의 아미노산 서열은 서열 번호 13 내지 15, 서열 번호 19 내지 21 및 서열 번호 25 내지 27에 기재되어 있다.
- [0012] 특정한 실시양태에서, 하나 이상의 중쇄 프레임워크(framework) 아미노산은 다른 인간 항체 아미노산 서열로부터의 상응하는 아미노산(들)으로 대체된다.
- [0013] 본 명세서에 기재된 항체가 표 1 또는 서열 번호 16 내지 18, 서열 번호 22 내지 24 및 서열 번호 28 내지 30에 기재된 임의의 하나의 경쇄 CDR 아미노산 서열을 추가로 포함하는 것이 고려된다. 몇몇 실시양태에서, 항체는 표 1 또는 서열 번호 16 내지 18, 서열 번호 22 내지 24 및 서열 번호 28 내지 30에 기재된 경쇄 CDR 아미노산 서열 중 적어도 2개를 포함한다. 다른 실시양태에서, 항체는 표 1 또는 서열 번호 16 내지 18, 서열 번호 22 내지 24 및 서열 번호 28 내지 30에 기재된 경쇄 CDR 아미노산 서열 중 적어도 3개를 포함한다.
- [0014] 다른 실시양태에서, 본 명세서에 기재된 항체는 (a) 표 1 또는 서열 번호 16, 서열 번호 22 및 서열 번호 28에 기재된 경쇄 CDR1 아미노산 서열 또는 1개 또는 2개의 아미노산이 변경된 이의 변이체; (b) 표 1 또는 서열 번호 17, 서열 번호 23 및 서열 번호 29에 기재된, (a)와 동일한 경쇄 가변 영역으로부터의, 경쇄 CDR2 아미노산 서열 또는 1개 또는 2개의 아미노산이 변경된 이의 변이체; 및 (c) 표 1 또는 서열 번호 18, 서열 번호 24 및 서열 번호 30에 기재된, (a)와 동일한 경쇄 가변 영역으로부터의, 경쇄 CDR3 아미노산 서열 또는 1개 또는 2개의 아미노산이 변경된 이의 변이체를 포함한다.
- [0015] 대안적인 실시양태에서, 본 명세서에 고려되는 항체는 (a) 표 1 또는 서열 번호 16, 서열 번호 22 및 서열 번호 28에 기재된 경쇄 CDR1 아미노산 서열 또는 1개 또는 2개의 아미노산이 변경된 이의 변이체; (b) 표 1 또는 서열 번호 17, 서열 번호 23 및 서열 번호 29에 기재된 독립적으로 선택된 경쇄 CDR2 아미노산 서열 또는 1개 또는 2개의 아미노산이 변경된 이의 변이체; 및 (c) 표 1 또는 서열 번호 18, 서열 번호 24 및 서열 번호 30에 기재된 독립적으로 선택된 경쇄 CDR3 아미노산 서열 또는 1개 또는 2개의 아미노산이 변경된 이의 변이체를 포함한다.
- [0016] 특정한 실시양태에서, 경쇄 CDR1, CDR2 또는 CDR3 아미노산 서열 중 적어도 2개는 표 1 또는 서열 번호 16 내지 18, 서열 번호 22 내지 24 및 서열 번호 28 내지 30에 기재되어 있다.
- [0017] 본 명세서에 기재된 항체가 경쇄 가변 영역의 모든 3개의 LCDR에 대해 적어도 70% 동일한 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드 서열을 포함하는 것이 추가로 고려되고, LCDR1, LCDR2 및 LCDR3의 아미노산 서열은 서열 번호 16 내지 18, 서열 번호 22 내지 24 및 서열 번호 28 내지 30에 기재되어 있다.
- [0018] 일 실시양태에서, 본 명세서에 고려되는 항체는 표 1 또는 서열 번호 4, 서열 번호 8 및 서열 번호 12에 기재된 경쇄 가변 영역 아미노산 서열과 적어도 70% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 관련 실시양태에서, 항체는 표

1 또는 서열 번호 4, 서열 번호 8 및 서열 번호 12에 기재된 경쇄 가변 영역 아미노산 서열과 적어도 85% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 추가의 실시양태에서, 항체는 표 1 또는 서열 번호 4, 서열 번호 8 및 서열 번호 12에 기재된 경쇄 가변 영역 아미노산 서열과 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 항체는 표 1 또는 서열 번호 4, 서열 번호 8 및 서열 번호 12에 기재된 경쇄 가변 영역 아미노산 서열을 포함한다.

[0019] 추가의 실시양태에서, 본 명세서에 기재된 항체는 (i) 경쇄 가변 영역의 모든 3개의 LCDR에 대해 적어도 70% 동일한 아미노산 서열 및 (ii) 중쇄 가변 영역의 모든 3개의 HCDR에 대해 적어도 70% 동일한 아미노산 서열을 포함하고, LCDR1, LCDR2 및 LCDR3의 아미노산 서열은 서열 번호 16 내지 18, 서열 번호 22 내지 24 및 서열 번호 28 내지 30에 기재되어 있고, HCDR1, HCDR2 및 HCDR3의 아미노산 서열은 서열 번호 13 내지 15, 서열 번호 19 내지 21 및 서열 번호 25 내지 27에 기재되어 있다.

[0020] 다른 실시양태에서, 본 개시내용은 경쇄 가변 영역 및/또는 중쇄 가변 영역을 포함하는 형질전환 성장 인자 베타(TGF β)1, TGF β 2 및 TGF β 3에 결합하는 항체를 제공하고, (a) 경쇄 가변 영역은 적어도 서열 번호 16, 서열 번호 22 및 서열 번호 28로부터 선택된 CDR1 또는 이에 대해 적어도 80% 동일한 서열, 서열 번호 17, 서열 번호 23 및 서열 번호 29로부터 선택된 CDR2 또는 이에 대해 적어도 80% 동일한 서열 및/또는 서열 번호 18, 서열 번호 24 및 서열 번호 30으로부터 선택된 CDR3 또는 이에 대해 적어도 80% 동일한 서열을 포함하고/하거나; (b) 중쇄 가변 영역은 적어도 서열 번호 13, 서열 번호 19 및 서열 번호 25로부터 선택된 CDR1 또는 이에 대해 적어도 80% 동일한 서열, 서열 번호 14, 서열 번호 20 및 서열 번호 26으로부터 선택된 CDR2 또는 이에 대해 적어도 80% 동일한 서열 및/또는 서열 번호 15, 서열 번호 21 및 서열 번호 27로부터 선택된 CDR3 또는 이에 대해 적어도 80% 동일한 서열을 포함한다. 일 실시양태에서, 경쇄 가변 영역은 적어도 서열 번호 16으로부터 선택된 CDR1 또는 이에 대해 적어도 90% 동일한 서열, 서열 번호 17로부터 선택된 CDR2 또는 이에 대해 적어도 90% 동일한 서열 및 서열 번호 18로부터 선택된 CDR3 또는 이에 대해 적어도 90% 동일한 서열을 포함하고/하거나; 중쇄 가변 영역은 적어도 서열 번호 13으로부터 선택된 CDR1 또는 이에 대해 적어도 90% 동일한 서열, 서열 번호 14로부터 선택된 CDR2 또는 이에 대해 적어도 90% 동일한 서열 및 서열 번호 15로부터 선택된 CDR3 또는 이에 대해 적어도 90% 동일한 서열을 포함한다.

[0021] 관련 실시양태에서, 경쇄 가변 영역은 적어도 서열 번호 22로부터 선택된 CDR1 또는 이에 대해 적어도 90% 동일한 서열, 서열 번호 23으로부터 선택된 CDR2 또는 이에 대해 적어도 90% 동일한 서열 및 서열 번호 24로부터 선택된 CDR3 또는 이에 대해 적어도 90% 동일한 서열을 포함하고/하거나; 중쇄 가변 영역은 적어도 서열 번호 19로부터 선택된 CDR1 또는 이에 대해 적어도 90% 동일한 서열, 서열 번호 20으로부터 선택된 CDR2 또는 이에 대해 적어도 90% 동일한 서열 및 서열 번호 21로부터 선택된 CDR3 또는 이에 대해 적어도 90% 동일한 서열을 포함한다.

[0022] 특정한 실시양태에서, 경쇄 가변 영역은 적어도 서열 번호 28로부터 선택된 CDR1 또는 이에 대해 적어도 90% 동일한 서열, 서열 번호 29로부터 선택된 CDR2 또는 이에 대해 적어도 90% 동일한 서열 및 서열 번호 30으로부터 선택된 CDR3 또는 이에 대해 적어도 90% 동일한 서열을 포함하고/하거나; 중쇄 가변 영역은 적어도 서열 번호 25로부터 선택된 CDR1 또는 이에 대해 적어도 90% 동일한 서열, 서열 번호 26으로부터 선택된 CDR2 또는 이에 대해 적어도 90% 동일한 서열 및 서열 번호 27로부터 선택된 CDR3 또는 이에 대해 적어도 90% 동일한 서열을 포함한다.

[0023] 상기 항체 서열 중 임의의 하나의 동일성(%)이 본 명세서에 개시된 중쇄 또는 경쇄 가변 영역 또는 임의의 HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 또는 LCDR3과 적어도 70%, 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상 동일할 수 있다는 것이 고려된다.

[0024] 몇몇 실시양태에서, 본 개시내용의 항체는 중쇄 불변 영역을 추가로 포함하고, 중쇄 불변 영역은 변형 또는 비 변형 IgG, IgM, IgA, IgD, IgE, 이의 단편 또는 이들의 조합이다.

[0025] 특정한 실시양태에서, 하나 이상의 경쇄 프레임워크 아미노산이 다른 인간 항체 아미노산 서열로부터의 상응하는 아미노산(들)으로 대체된 항체가 제공된다.

[0026] 일 양태에서, 본 개시내용의 항체는 XPA.42.089, XPA.42.068 및 XPA.42.681로 이루어진 군으로부터 선택된다. XPA.42.089의 중쇄 및 경쇄 아미노산 서열은 각각 서열 번호 6 및 서열 번호 8에 기재되어 있다. XPA.42.068의 중쇄 및 경쇄 아미노산 서열은 각각 서열 번호 2 및 서열 번호 4에 기재되어 있고, XPA.42.681의 중쇄 및 경쇄 아미노산 서열은 각각 서열 번호 10 및 서열 번호 12에 기재되어 있다.

- [0027] 일 실시양태에서, 본 명세서에 기재된 항체는 상기 경쇄 가변 영역에 부착된 인간 경쇄 불변 영역을 추가로 포함한다. 몇몇 실시양태에서, 경쇄 불변 영역은 변형 또는 비변형 람다 경쇄 불변 영역, 카파 경쇄 불변 영역, 이의 단편 또는 이들의 조합이다.
- [0028] 바람직한 실시양태에서, 본 개시내용은 10-6M 이하의 친화도(Kd)로 TGF β 1, TGF β 2 및 TGF β 3에 특이적인 항체를 제공한다. 예시적인 실시양태에서, 본 명세서에 기재된 항-TGF β 항체는 10-6M, 10-7M, 10-8M, 10-9M 이하의 친화도로 TGF β 의 적어도 하나의 동종체에 결합하거나, 임의로 하나 이상의 동종체에 대해 10-6M, 10-7M, 10-8M, 10-9 M, 10-10M, 10-11M 또는 10-12M 이하의 친화도로 2개의 TGF β 동종체 또는 TGF β 1, 2 또는 3 모두에 결합한다. 다른 실시양태에서, 본 명세서에 기재된 항체는 TGF β 3에 대한 결합과 비교할 때 적어도 2배 내지 50배, 10배 내지 100배, 2배, 5배, 10배, 25배, 50배 또는 100배, 또는 20% 내지 50%, 50% 내지 100%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 또는 100% 이상의 친화도로 TGF β 1 및 TGF β 2에 결합한다(예를 들면, TGF β 1 및 TGF β 2에 우선적으로 결합한다). 대안적으로, 본 명세서에 기재된 항체는 서로 3배, 5배 또는 10배 내의 친화도로 각각의 TGF β 동종체 TGF β 1, TGF β 2 및 TGF β 3에 결합한다. 특정한 실시양태에서, 항체는 TGF β 3보다 높은 친화도로 TGF β 1 및 TGF β 2에 결합한다. 특정한 실시양태에서, 표면 플라스몬 공명 또는 KINEXA 검정에 의해 친화도를 측정한다.
- [0029] 몇몇 실시양태에서, 항체는 TGF β 3보다 높은 정도로 TGF β 1 및 TGF β 2의 활성을 중화시킨다. 몇몇 실시양태에서, TGF β 1 및 TGF β 2의 항체 중화는 TGF β 3의 중화보다 적어도 2배 내지 50배, 10배 내지 100배, 2배, 5배, 10배, 25배, 50배 또는 100배 또는 20 내지 50%, 50 내지 100%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 또는 100% 이상 강력하다. 본 명세서에 고려되는 예시적인 중화 검정은 인터류킨-11 방출 검정 및 HT-2 세포 증식 검정을 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다. 또한, 본 명세서에 개시된 항체가 TGF β 동종체를 우선적으로 억제하는지를 결정하기 위해 pSMAD 인산화 검정 또는 rhLAP 결합 검정을 포함하는 TGF β 활성 검정을 수행할 수 있다. 추가의 실시양태에서, 항체는 TGF β 3과 비교할 때 TGF β 1 및 TGF β 2에 대해 더 낮은 IC50(즉, 더 높은 결합, 더 높은 효능)을 갖는다.
- [0030] 다른 실시양태에서, 본 개시내용은 본 명세서에 기재된 중쇄 및/또는 경쇄를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 단리된 핵산 분자를 제공한다.
- [0031] 추가의 양태에서, 본 개시내용은 발현 조절 서열에 작동적으로 연결된 본 명세서에 고려되는 핵산 분자를 포함하는 발현 벡터를 제공한다. 본 개시내용의 발현 벡터 또는 핵산 분자를 포함하는 숙주 세포가 또한 고려된다. 특정한 실시양태에서, 본 개시내용은 중쇄 및 경쇄 가변 영역을 코딩하는 핵산 분자를 포함하는 숙주 세포를 제공하고, 중쇄 및 경쇄 핵산은 상이한 핵산에 의해 또는 동일한 핵산 상에 발현된다.
- [0032] 관련 양태에서, 본 개시내용은 본 명세서에 기재된 숙주 세포를 사용하여 항체를 제조하는 방법을 제공하고, 상기 방법은 적합한 조건 하에 숙주 세포를 배양하는 단계 및 상기 항체를 회수하는 단계를 포함한다. 본 명세서에 개시된 방법에 의해 제조된 항체가 또한 제공된다.
- [0033] 본 개시내용은 본 명세서에 개시된 항체 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 무균 약제학적 조성물을 추가로 고려한다.
- [0034] 다른 실시양태에서, 본 개시내용은 치료학적 유효량의 본 명세서에 고려되는 항체 또는 약제학적 조성물을 이룰 필요로 하는 피험체에게 투여하는 단계를 포함하는 TGF β 발현과 관련된 질환, 병증 또는 장애를 치료하는 방법을 제공한다. 특정한 실시양태에서, 질환, 병증 또는 장애는 암, 눈(예를 들면, 안과, 눈, 안과학 또는 안과학적) 질환, 병증 또는 장애, 섬유증과 관련된 질환, 병증 또는 장애, 예를 들면 섬유증식성 질환, 병증 또는 장애, 또는 관련 섬유증을 갖는 질환, 병증 또는 장애로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0035] 섬유증식성 질환, 관련 섬유증을 갖는 병증 또는 장애 또는 질환은 피부, 폐, 신장, 심장, 뇌 및 눈을 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는 신체 내의 임의의 장기 또는 조직에 영향을 미치는 것을 포함한다. 섬유증식성 질환, 관련 섬유증을 갖는 병증 또는 장애 또는 질환은 폐 섬유증, 특발성 폐 섬유증, 세기관지주위 섬유증, 간질성 폐 질환, 만성 폐쇄성 폐 질환(chronic obstructive pulmonary disease: COPD), 소기도병(예를 들면, 폐쇄성 모세기관지염), 폐기종, 성인 또는 급성 호흡 곤란 증후군(ARDS), 급성 폐 손상(acute lung injury: ALI), 감염성 또는 독성 물질로 인한 폐 섬유증, 신장 섬유증, 모든 병인의 사구체신염(glomerulonephritis: GN), 혈관간막(mesangial) 증식성 GN, 면역 GN 및 반월상(crescentic) GN, 사구체 경화증, 세뇨관간질성 손상, 신장 간질성 섬유증, 신장 섬유증 및 신장 간질성 섬유증의 모든 원인, 이식 수혜자의 사이클로스포린 치료를 포함하는 약물 노출의 합병증으로부터 생기는 신장 섬유증, HIV 관련 신증, 이식 신증, 당뇨병성 신장 질환, 당뇨병성

신증, 신원성 전신 섬유증, 당뇨병, 특발성 후복막 섬유증, 강피증, 간 섬유증, 과도한 반흔 및 진행성 경화증과 관련된 간 질환, 모든 병인으로 인한 간 경변증, 담도 장애, 감염으로 인한 간 기능장애, 섬유낭종성 질환, 심혈관질환, 울혈성 심부전, 확장성 심근증, 심근염, 혈관 협착 심장 섬유증, 심근경색 후의 경색후 심장 섬유증, 좌심실 비대증, 정맥 폐쇄 질환, 재협착, 혈관성형술후 재협착, 동정맥 이식 실패, 죽상동맥경화증, 고혈압, 고혈압성 심장 질환, 심장 비대증, 비대성 심근증, 심부전, 대동맥 질환, 진행성 전신 경화증; 다발성 근염; 전신 홍반성 낭창; 피부근염, 파시스트(fascist), 레이노드 증후군(Raynaud's syndrome), 류마티스 관절염, 증식성 유리체망막병증, 임의의 병인의 유리체망막병증, 안과 수술과 관련된 섬유증, 녹내장 치료, 망막 재부착, 수정체 적출 또는 임의의 유형의 누공 시술, 각막 및 결막에서의 반흔, 각막 내피에서의 섬유증, 알칼리 화상(예를 들면, 각막에 대한 알칼리 화상), 수정체낭의 백내장 수술 후 섬유증, 사시 수술에서 외안근 주의의 조직에서의 과도한 반흔, 전방 피막 백내장 및 수정체 후낭 혼탁, 눈 전방부 섬유증 질환, 각막 간질의 섬유증, 섬유증 각막 혼탁과 관련된, 섬유주 네트워크의 섬유증, 녹내장과 관련된 섬유증, 눈 후방부 섬유증 질환, 섬유혈관 반흔, 눈의 망막 또는 맥락막 맥관구조에서의 섬유증, 망막 섬유증, 망막앞 섬유증, 망막 신경교종, 망막하 섬유증, 나이 관련 황반 변성과 관련된 섬유증, 망막 및 녹내장 수술 후, 당뇨병성 망막병증에서 조직 수축과 관련된 견인성 망막 박리, 파이로니병(Peyronie's disease), 척수손상후 전신 경화증, 골다공증, 카무라티-엔겔만 질환(Camurati-Engelmann disease), 크론씨병, 반흔, 마판 증후군, 조기 난소 부전, 알츠하이머병, 파킨슨병, 수술 절제 또는 기계적 외상으로 인한 섬유증, 안과 수술과 관련된 섬유증 및 외상 또는 수술 상처로부터 생기는 상처 치유 동안 생기는 진피에서의 과도한 또는 비대성 반흔 또는 켈로이드 형성을 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다.

[0036] 예시적인 눈 질환(예를 들면, 안과, 눈, 안과학 또는 안과학적 질환), 병증 또는 장애는 섬유증식성 장애, 눈의 섬유증, 안섬유증, 망막 기능장애, 망막 기능장애와 관련된 섬유증, 습성 또는 건성 황반 변성, 증식성 유리체 망막병증, 임의의 병인의 유리체망막병증, 녹내장 치료, 망막 재부착, 수정체 적출 또는 임의의 유형의 누공 시술과 같은 안과 수술과 관련된 섬유증, 각막 및 결막에서의 반흔, 각막 내피에서의 섬유증, 알칼리 화상(예를 들면, 각막에 대한 알칼리 화상), 수정체낭의 백내장 수술 후 섬유증, 사시 수술에서 외안근 주의의 조직에서의 과도한 반흔, 전방 피막 백내장 및 수정체 후낭 혼탁, 눈 전방부 섬유증 질환, (예를 들면, 각막 혼탁과 관련된) 각막 간질의 섬유증, (예를 들면, 녹내장과 관련된) 섬유주 네트워크의 섬유증, 눈 후방부 섬유증 질환, (예를 들면, 눈의 망막 또는 맥락막 맥관구조에서의) 섬유혈관 반흔, 망막 섬유증, 망막앞 섬유증, 망막 신경교종, (예를 들면, 나이 관련 황반 변성과 관련된) 망막하 섬유증, 망막 및 녹내장 수술 후와 관련된 섬유증, 당뇨병성 망막병증에서 조직 수축과 관련된 견인성 망막 박리를 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다.

[0037] 예시적인 눈의 섬유증식성 질환, 병증 또는 장애, 눈의 섬유증, 안과 섬유증 또는 안섬유증은 증식성 유리체 망막병증, 임의의 병인의 유리체망막병증, 망막 기능장애와 관련된 섬유증, 습성 또는 건성 황반 변성과 관련된 섬유증, 녹내장 치료, 망막 재부착, 수정체 적출 또는 임의의 유형의 누공 시술과 같은 안과 수술과 관련된 섬유증, 각막 및 결막에서의 반흔, 각막 내피에서의 섬유증, 알칼리 화상과 관련된 섬유증, 수정체낭의 백내장 수술 후 섬유증, 사시 수술에서 외안근 주의의 조직의 과도한 반흔, 전방 피막 백내장 및 수정체 후낭 혼탁, 눈 전방부 섬유증 질환, (예를 들면, 각막 혼탁과 관련된) 각막 간질의 섬유증, (예를 들면, 녹내장과 관련된) 섬유주 네트워크의 섬유증, 눈 후방부 섬유증 질환, (예를 들면, 눈의 망막 또는 맥락막 맥관구조에서의) 섬유혈관 반흔, 망막 섬유증, 망막앞 섬유증, 망막 신경교종, (예를 들면, 나이 관련 황반 변성과 관련된) 망막하 섬유증, 망막 및 녹내장 수술 후와 관련된 섬유증, 당뇨병성 망막병증에서 조직 수축과 관련된 견인성 망막 박리를 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다.

[0038] 다양한 실시양태에서, 눈의 섬유증식성 질환, 병증 또는 장애는 증식성 유리체망막병증, 안과 수술과 관련된 섬유증, 수정체의 백내장 수술 후 섬유증, 각막 간질의 섬유증 및 알칼리 화상으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0039] 관련 양태에서, 본 개시내용은 치료학적 유효량의 본 명세서에 고려되는 항체 또는 약제학적 조성물을 이를 필요로 하는 피험체에게 투여하는 단계를 포함하는 암의 치료 방법을 제공한다. 특정한 실시양태에서, 암은 폐암, 전립선암, 유방암, 간세포암, 식도암, 대장직장암, 췌장암, 방광암, 신장암, 난소암, 위암, 섬유증성 암, 교종 및 흑색종으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0040] 몇몇 실시양태에서, 항체 또는 조성물은 종양에서 자연 살해(natural killer: NK) 세포의 수를 증가시킨다. 다양한 실시양태에서, 항체 또는 조성물은 NK 세포의 세포용해 활성을 증가시킨다. 예를 들면, 다양한 실시양태에서, 본 명세서에 기재된 항체 또는 조성물은 NK 세포에 의한 퍼포린 및 그랜자임 생성을 증가시킨다. 일 실시양

태에서, 항체는 XPA.42.089 또는 XPA.42.681이다.

- [0041] 다양한 실시양태에서, 본 명세서에 기재된 항체 또는 조성물은 종양에서 조절 T 세포의 수를 감소시키고/시키거나, 조절 T 세포 기능을 억제한다. 예를 들면, 다양한 실시양태에서, 본 명세서에 기재된 항체 또는 조성물은 면역 반응을 하향조절하거나 면역 반응의 자리로 이동하는 Treg의 능력을 억제한다.
- [0042] 다양한 실시양태에서, 항체 또는 조성물은 종양에서 세포독성 T 세포의 수를 증가시키고/시키거나, CTL 활성을 증대, 예를 들면 CTL 활성을 부스팅하거나, 증가시키거나, 촉진한다. 예를 들면, 다양한 실시양태에서, 본 명세서에 기재된 항체 또는 조성물은 CTL에 의한 퍼포린 및 그랜자임 생성을 증가시키고 CTL의 세포용해 활성을 증가시킨다. 일 실시양태에서, 항체는 XPA.42.068, XPA.42.089 또는 XPA.42.681이다.
- [0043] 다른 실시양태에서, 항체 또는 조성물은 종양에서 단핵구 유래 줄기 세포(myeloid-derived suppressor cell: MDSC)의 수를 감소시키고/시키거나, MDSC 기능을 억제한다. 예를 들면, 다양한 실시양태에서, 본 명세서에 기재된 항체 또는 조성물은 면역 반응을 억제하는 MDSC의 능력을 억제하고/하거나, MDSC의 면역 억제 활성을 억제하고/하거나, Treg의 확장 및/또는 기능을 촉진하는 MDSC의 능력을 억제한다. 다양한 실시양태에서, 항체는 XPA.42.089, XPA.42.068 및 XPA.42.681로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0044] 다양한 실시양태에서, 항체는 종양에서 수지상 세포(dendritic cell: DC)의 수를 감소시키고/시키거나, 수지상 세포의 관용 기능(예를 들면, 관용 효과)을 억제한다. 예를 들면, 다양한 실시양태에서, 본 명세서에 기재된 항체 또는 조성물은 CD8+ 수지상 세포의 관용 효과를 감소시킨다. 일 실시양태에서, 항체는 XPA.42.089 또는 XPA.42.681이다.
- [0045] 다른 실시양태에서, 본 개시내용은 이를 필요로 하는 피험체에게 치료학적 유효량의 본 명세서에 고려되는 항체 또는 약제학적 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 섬유증의 치료 방법을 제공한다.
- [0046] 다양한 실시양태에서, 항체를 제2 물질과 투여한다. 일 실시양태에서, 제2 물질은 세포외 기질 분해 단백질, 항 섬유화제, 수술 치료, 화학요법, 세포독성제 또는 방사선 치료로 이루어진 군으로부터 선택된다. 예시적인 제2 물질이 상세한 설명에 더 자세히 개시되어 있다.
- [0047] 다양한 실시양태에서, 치료제를 기간 간격으로, 예를 들면 시간마다, 일마다, 주마다, 2주마다, 3주마다, 달마다 또는 더 긴 간격으로 투여한다. 관련 실시양태에서, 예시적인 치료에서, 본 명세서에 개시된 항체를 약 1mg/일, 5mg/일, 10mg/일, 20mg/일, 50mg/일, 75mg/일, 100mg/일, 150mg/일, 200mg/일, 250mg/일, 500mg/일 또는 1000mg/일의 용량으로 투여할 수 있다. 이 농도를 단일 용량 형태 또는 다수의 용량으로 투여할 수 있다.
- [0048] 임의의 상기 항체를 포함하는 조성물 또는 TGFβ에 결합하는 본 개시내용의 조성물, 또는 TGFβ 발현과 관련된 본 명세서에 기재된 임의의 장애의 치료를 위한 약제 제조에서의 이의 용도가 또한 고려된다. 임의로 사용을 위한 적합한 설명서와 함께 임의의 상기 항체 또는 조성물을 포함하는 주사기, 예를 들면 단일 사용 또는 프리필드 주사기, 무균 밀봉 용기, 예를 들면 바이알, 병, 용기 및/또는 키트 또는 패키지가 또한 고려된다.
- [0049] 본 명세서에 기재된 각각의 특징 또는 실시양태 또는 조합은 임의의 본 발명의 양태의 비제한적인 예시적인 예이고, 그러므로 본 명세서에 기재된 임의의 다른 특징 또는 실시양태 또는 조합과 조합될 수 있다는 것을 의미하는 것으로 이해된다. 예를 들면, 특징이 "일 실시양태", "몇몇 실시양태", "특정한 실시양태", "추가적 실시양태", "구체적인 예시적인 실시양태" 및/또는 "다른 실시양태"와 같은 언어로 기재된 경우, 이러한 유형의 실시양태의 각각은, 모든 가능한 조합을 수록함이 없이, 본 명세서에 기재된 임의의 다른 특징 또는 특징의 조합과 조합되는 것으로 의도되는 특징의 비제한적인 예이다. 이러한 특징 또는 특징의 조합은 임의의 본 발명의 양태에 적용된다. 범위 내에 해당하는 값의 예가 개시된 경우, 임의의 이러한 예가 가능한 범위의 종점으로 고려되고, 이러한 종점 사이의 임의의 및 모든 숫자 값이 고려되고, 상부 및 하부 종점의 임의의 및 모든 조합이 포함된다.

도면의 간단한 설명

- [0050] 도 1은 TGFβ 항체에 의한 rhLAP에 대한 TGFβ1 결합의 경쟁을 나타낸 그래프이다.
- 도 2는 TGFβ 항체에 의한 세포에서의 pSMAD 신호전달의 중화를 나타낸다. (A) TGFβ1; (B) TGFβ2; (C) TGFβ3.
- 도 3은 TGFβ 항체에 의한 조절 T 세포(Treg)의 억제를 나타낸 그래프이다.

도 4는 이중이식 마우스 모델에서 TGF β 항체에 의한 종양 억제를 나타낸 그래프이다.

도 5는 이중이식 마우스 모델에서 TGF β 항체에 의한 종양 억제를 나타낸 그래프이다.

도 6은 동계 마우스 모델에서 TGF β 항체에 의한 종양 억제를 나타낸 그래프이다.

도 7은 동계 마우스 모델에서 TGF β 항체에 의한 종양 억제를 나타낸 그래프이다.

도 8은 동계 마우스 모델에서 TGF β 항체에 의한 종양 억제를 나타낸 그래프이다.

도 9는 동계 마우스 모델에서 TGF β 항체에 의한 종양 억제를 나타낸 그래프이다.

도 10은 동계 마우스 종양 모델에서 종양에서 자연 살해 세포에 대한 TGF β 항체의 생체내 효과를 나타낸 그래프이다.

도 11은 동계 마우스 모델에서 종양에서 골수성 유래 억제 세포에 대한 TGF β 항체의 생체내 효과를 나타낸 그래프이다.

도 12는 동계 마우스 종양 모델에서 종양에서 수지상 세포에 대한 TGF β 항체의 생체내 효과를 나타낸 그래프이다.

도 13은 동계 마우스 종양 모델에서 종양에서 조절 T 세포에 대한 TGF β 항체의 생체내 효과를 나타낸 그래프이다.

도 14는 동계 마우스 종양 모델에서 종양에서 세포독성 T 세포에 대한 TGF β 항체의 생체내 효과를 나타낸 그래프이다.

도 15는 NK 세포 세포유해 활성화에 대한 TGF β 항체의 실험실내 효과를 나타낸 그래프이다.

도 16은 T 세포 증식에 대한 TGF β 항체의 효과를 나타낸 그래프이다.

도 17은 그랜자임 B(GzmB)(도 17A) 및 퍼포린(도 17B)의 발현에 의해 평가된 CTL 활성화에 대한 TGF β 항체의 효과를 나타낸 그래프이다.

도 18은 TGF β 항체가 투여된 CsA 치료군 또는 대조군 동물에서 혈청 혈액 유레아 질소(BUN) 수준에 대한 TGF β 항체의 효과를 나타낸 그래프이다.

도 19는 TGF β 항체가 투여된 CsA 치료군 또는 대조군 동물의 뇨에서 이환 신장에서의 사구체 기능장애에 특징적인 알부민 축적에 대한 TGF β 항체의 효과를 나타낸 그래프이다.

도 20은 TGF β 항체가 투여된 CsA 치료군 또는 대조군 동물의 뇨에서 신장에서의 ECM 침착 및 섬유증의 정도를 반영하는 뇨 IV형 콜라겐의 수준에 대한 TGF β 항체의 효과를 나타낸 그래프이다.

도 21은 신장 조직에서 수행된 정량적 RT-PCR에 의해 평가된 섬유증과 연관된 유전자의 발현에 대한 TGF β 항체의 효과를 나타낸 그래프이다. TGF- β 1 발현(도 21A) 및 III형 콜라겐(도 21B)에 대한 효과를 TGF β 항체가 투여된 CsA 치료군 또는 대조군 동물에서 평가한다.

도 22는 TGF β 1 투여 후 망막 색소 상피(retinal pigment epithelium: RPE) 세포에서 pSMAD2 증가에 대한 TGF β 항체의 효과를 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0051] 본 개시내용은 TGF β 발현과 관련된 병증 또는 장애, 예를 들면 암 및 섬유증을 치료하기 위한 치료제를 제공한 다. 본 개시내용은 TGF β 와 상호작용하고, 예를 들면 TGF β 의 결합 파트너를 통한 신호전달과 같은 하나 이상의 이의 기능적 효과를 억제하는 분자 또는 물질을 제공한다. 본 명세서에 개시된 조성물은 유리하게는 종양에서 면역 세포 활성을 조절하는 능력을 가져, 일 양태에서, 종양의 성장에 직접적으로 또는 간접적으로 영향을 미치는 세포 집단에 영향을 미침으로써 암의 치료 방법을 제공한다.

[0052] 본 개시내용이 더 완전히 이해될 수 있도록, 여러 정의가 기재되어 있다.

[0053] 본 명세서에 사용된 "표적" 또는 "표적 항원"은 TGF β 1, TGF β 2 및 TGF β 3를 포함하는 임의의 또는 모든 TGF- β 분자를 의미한다.

[0054] 본 명세서에 사용된 "TGF β "는 TGF β 1, TGF β 2 및 TGF β 3를 포함하는 TGF β 의 임의의 하나 이상의 동종체 또는

이들의 변이체를 의미한다. 마찬가지로, 용어 "TGFβ 수용체"는, 달리 기재되지 않은 한, 적어도 하나의 TGFβ 동종체에 결합하는 임의의 수용체를 의미한다.

[0055] 본 명세서에 사용된 항표적 항체의 "원하는 생물학적 활성"은 TGFβ에 결합하고 하나 이상의 임의의 기능적 효과를 억제하는 능력이다.

[0056] 본 명세서에 사용된 "표적 발현과 관련된 병증" 또는 "장애"는 표적 활성이 해로운 병증 또는 장애이고, 고수준의 표적이 장애 또는 장애의 악화에 기여하는 인자의 병리생리학을 담당하는 것으로 보이거나, 이것으로 의심되는 질환 및 다른 장애, 및 고수준의 표적 발현이 원치않는 임상 징후 또는 증상과 관련되는 질환 및 다른 장애를 포함한다. 이러한 장애는, 예를 들면 분비된 및/또는 세포 표면 상의 표적의 수준 증가 및/또는 장애로 고통받는 피험체의 이환 세포 또는 조직에서 신호전달 증가로 입증될 수 있다. 본 명세서에 기재된 바대로, 예를 들면 표적 특이적 항체를 사용하여 표적 수준의 증가를 검출할 수 있다.

[0057] TGFβ에 결합하는 항체 물질(예를 들면, 본 개시내용의 항체)로 치료될 수 있는 TGFβ 발현과 관련된 예시적인 질환, 병증 또는 장애는 암, 예컨대 폐암, 전립선암, 유방암, 간세포암, 식도암, 대장직장암, 췌장암, 방광암, 신장암, 난소암, 위암, 섬유증성 암, 교종 및 흑색종, 눈(예를 들면, 안과, 눈, 안과학 또는 안과학적) 질환, 병증 또는 장애, 섬유증과 관련된 질환, 병증 또는 장애, 예를 들면 섬유증성식성 질환, 병증 또는 장애, 또는 관련 섬유증을 갖는 질환, 병증 또는 장애를 포함한다.

[0058] 섬유증성식성 질환, 병증 또는 장애, 또는 관련 섬유증을 갖는 질환, 병증 또는 장애는 피부, 폐, 신장, 심장, 뇌 및 눈을 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는 신체 내의 임의의 장기 또는 조직에 영향을 미치는 것을 포함한다. 섬유증성식성 질환, 병증 또는 장애, 또는 관련 섬유증을 갖는 질환은 폐 섬유증, 특발성 폐 섬유증, 세기관지주위 섬유증, 간질성 폐 질환, 만성 폐쇄성 폐 질환(COPD), 소기도병(예를 들면, 폐쇄성 모세기관지염), 폐기종, 성인 또는 급성 호흡 곤란 증후군(ARDS), 급성 폐 손상(ALI), 감염성 또는 독성 물질로 인한 폐 섬유증, 신장 섬유증, 모든 병인의 사구체신염(GN), 예를 들면 혈관관막 증식성 GN, 면역 GN 및 반월상 GN, 사구체 경화증, 세뇨관간질성 손상, 신장 간질성 섬유증, 신장 섬유증 및 신장 간질성 섬유증의 모든 원인, 이식 수혜자의 사이클로스포린 치료를 포함하는 약물 노출의 합병증으로부터 생기는 신장 섬유증, 예를 들면 사이클로스포린 치료, HIV 관련 신증, 이식 신증, 당뇨병성 신장 질환(예를 들면, 당뇨병성 신증), 신원성 전신 섬유증, 당뇨병, 특발성 후복막 섬유증, 강피증, 간 섬유증, 과도한 반흔 및 진행성 경화증과 관련된 간 질환, 예컨대 모든 병인으로 인한 간 경변증, 담도 장애, 감염으로 인한 간 기능장애, 섬유낭종성 질환, 심혈관질환, 예컨대 울혈성 심부전; 확장성 심근증, 심근염, 심근경색 후 혈관 협착 심장 섬유증(예를 들면, 경색후 심장 섬유증), 좌심실 비대증, 정맥 폐쇄 질환, 재협착(예를 들면, 혈관성형술후 재협착), 동정맥 이식 실패, 죽상동맥경화증, 고혈압, 고혈압성 심장 질환, 심장 비대증, 비대성 심근증, 심부전, 대동맥 질환, 진행성 전신 경화증, 다발성근염, 전신 홍반성 낭창, 피부근염, 파시스트, 레이노드 증후군, 류마티스 관절염, 증식성 유리체망막병증, 임의의 병인의 유리체망막병증 또는 녹내장 치료, 망막 재부착, 수정체 적출 또는 임의의 유형의 눈공시술과 같은 안과 수술과 관련된 섬유증, 각막 및 결막에서의 반흔, 각막 내피에서의 섬유증, 알칼리 화상(예를 들면, 각막에 대한 알칼리 화상), 수정체낭의 백내장 수술 후 섬유증, 사시 수술에서 외안근 주위의 조직의 과도한 반흔, 전방 피막 백내장 및 수정체 후낭 혼탁, 눈 전방부 섬유증 질환, (예를 들면, 각막 혼탁과 관련된) 각막 간질의 섬유증, (예를 들면, 녹내장과 관련된) 섬유주 네트워크의 섬유증, 눈 후방부 섬유증 질환, (예를 들면, 눈의 망막 또는 맥락막 맥관구조에서의) 섬유혈관 반흔, 망막 섬유증, 망막앞 섬유증, 망막 신경교종, (예를 들면, 나이 관련 황반 변성과 관련된) 망막하 섬유증, 망막 및 녹내장 수술 후와 관련된 섬유증, 당뇨병성 망막병증에서 조직 수축과 관련된 견인성 망막 박리, 파이로니병, 척수손상후 전신 경화증, 골다공증, 카무라티-앵겔만 질환, 크론씨병, 반흔, 마판 증후군, 조기 난소 부전, 알츠하이머병 및 파킨슨병, 수술 절제 또는 기계적 외상으로 인한 섬유증, 안과 수술과 관련된 섬유증; 및 외상 또는 수술 상처로부터 생기는 상처 치유 동안 생기는 진피에서의 과도한 또는 비대성 반흔 또는 켈로이드 형성을 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다.

[0059] 예시적인 눈 질환(예를 들면, 안과, 눈, 안과학 또는 안과학적 질환), 병증 또는 장애는 섬유증성식성 장애, 눈의 섬유증, 안섬유증, 망막 기능장애, 망막 기능장애와 관련된 섬유증, 습성 또는 건성 황반 변성, 증식성 유리체 망막병증, 임의의 병인의 유리체망막병증, 녹내장 치료, 망막 재부착, 수정체 적출 또는 임의의 유형의 눈공시술과 같은 안과 수술과 관련된 섬유증, 각막 및 결막에서의 반흔, 각막 내피에서의 섬유증, 알칼리 화상(예를 들면, 각막에 대한 알칼리 화상), 수정체낭의 백내장 수술 후 섬유증, 사시 수술에서 외안근 주위의 조직에서의 과도한 반흔, 전방 피막 백내장 및 수정체 후낭 혼탁, 눈 전방부 섬유증 질환, (예를 들면, 각막 혼탁과 관련된) 각막 간질의 섬유증, (예를 들면, 녹내장과 관련된) 섬유주 네트워크의 섬유증, 눈 후방부 섬유증 질환, (예를 들면, 눈의 망막 또는 맥락막 맥관구조에서의) 섬유혈관 반흔, 망막 섬유증, 망막앞 섬유증, 망막

신경교종, (예를 들면, 나이 관련 황반 변성과 관련된) 망막하 섬유증, 망막 및 녹내장 수술 후와 관련된 섬유증, 당뇨병성 망막병증에서 조직 수축과 관련된 견인성 망막 박리를 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다.

[0060] 예시적인 눈의 섬유증식성 질환, 병증 또는 장애, 눈의 섬유증, 안과 섬유증 또는 안섬유증은 증식성 유리체망막병증, 임의의 병인의 유리체망막병증, 망막 기능장애와 관련된 섬유증, 습성 또는 건성 황반 변성과 관련된 섬유증, 녹내장 치료, 망막 재부착, 수정체 적출 또는 임의의 유형의 눈공 시술과 같은 안과 수술과 관련된 섬유증, 각막 및 결막에서의 반흔, 각막 내피에서의 섬유증, 알칼리 화상과 관련된 섬유증, 수정체낭의 백내장 수술 후 섬유증, 사시 수술에서 외안근 주의의 조직의 과도한 반흔, 전방 피막 백내장 및 수정체 후낭 혼탁, 눈 전방부 섬유증 질환, (예를 들면, 각막 혼탁과 관련된) 각막 간질의 섬유증, (예를 들면, 녹내장과 관련된) 섬유주 네트워크의 섬유증, 눈 후방부 섬유증 질환, (예를 들면, 눈의 망막 또는 맥락막 맥관구조에서의) 섬유혈관 반흔, 망막 섬유증, 망막앞 섬유증, 망막 신경교종, (예를 들면, 나이 관련 황반 변성과 관련된) 망막하 섬유증, 망막 및 녹내장 수술 후와 관련된 섬유증, 당뇨병성 망막병증에서 조직 수축과 관련된 견인성 망막 박리를 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다.

[0061] 다양한 실시양태에서, 눈의 섬유증식성 질환, 병증 또는 장애는 증식성 유리체망막병증, 안과 수술과 관련된 섬유증, 수정체의 백내장 수술 후 섬유증, 각막 간질의 섬유증 및 알칼리 화상으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0062] "면역글로불린" 또는 "자연 항체"는 사합체 당단백질이다. 천연 면역글로불린에서, 각각의 사합체는 2개의 동일한 쌍의 폴리펩타이드 사슬로 이루어지고, 각각의 쌍은 1개의 "경쇄"(약 25kDa) 및 1개의 "중쇄"(약 50 내지 70kDa)를 갖는다. 각각의 사슬의 아미노 말단 부분은 주로 항원 인식을 담당하는 약 100개 내지 110개 또는 더 많은 아미노산의 가변 영역을 포함한다. 각각의 사슬의 카복시 말단 부분은 주로 이펙터 기능을 담당하는 불변 영역을 규정한다. 인간 경쇄는 카파(κ) 및 람다(λ) 경쇄로 분류된다. 중쇄는 뮤(μ), 델타(Δ), 감마(γ), 알파(α) 및 입실론(ϵ)으로 분류되고, 항체의 아이소타입을 각각 IgM, IgD, IgG, IgA 및 IgE로 규정한다. 경쇄 및 중쇄 내에, 가변 및 불변 영역은 약 12개 이상의 아미노산의 "J" 영역에 의해 연결되고, 중쇄는 또한 약 10개 이상의 아미노산의 "D" 영역을 포함한다. 일반적으로, 문헌[Fundamental Immunology, Ch. 7 (Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N.Y. (1989))](모든 목적을 위해 그 전문이 참조문헌으로 포함됨)을 참조한다. 온전한 면역글로불린이 2개의 결합 자리를 갖도록, 각각의 경쇄/중쇄 쌍의 가변 영역은 항체 결합 자리를 형성한다.

[0063] 각각의 중쇄는 일 말단에서 가변 도메인(VH), 이어서 다수의 불변 도메인을 갖는다. 각각의 경쇄는 일 말단에서 가변 도메인(VL) 및 이의 다른 말단에서 불변 도메인을 갖고; 경쇄의 불변 도메인은 중쇄의 제1 불변 도메인과 정렬되고, 경쇄 가변 도메인은 중쇄의 가변 도메인과 정렬된다. 특정한 아미노산 잔기는 경쇄 가변 도메인과 중쇄 가변 도메인 사이의 계면을 형성하는 것으로 생각된다(Chothia et al., J. Mol. Biol. 196:901-917, 1987).

[0064] 면역글로불린 가변 도메인은 3개의 초가변 영역 또는 CDR에 의해 연결된 비교적 보존된 프레임워크 영역(FR)의 동일한 일반 구조를 나타낸다. N 말단으로부터 C 말단으로, 경쇄 및 중쇄는 둘 다 도메인 FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 및 FR4를 포함한다. 각각의 도메인에 대한 아미노산의 배치는 면역학적 관심의 단백질 카뎃 서열(Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest) 정의(미국 국립 보건원(미국 메릴랜드주 베데스다)(1987 및 1991)) 또는 문헌[Chothia & Lesk, (J. Mol. Biol. 196:901-917, 1987); Chothia et al., (Nature 342:878-883, 1989)]에 따른다.

[0065] 항체의 초가변 영역은 항원 결합을 담당하는 항체의 CDR 아미노산 잔기를 의미한다. 초가변 영역은 CDR로부터의 아미노산 잔기[예를 들면, 카뎃 등의 문헌[Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)]에 기재된 경쇄 가변 도메인에서 24번 내지 34번(L1), 50번 내지 56번(L2) 및 89번 내지 97번(L3) 잔기 및 중쇄 가변 도메인에서 31번 내지 35번(H1), 50번 내지 65번(H2) 및 95번 내지 102번(H3) 잔기] 및/또는 초가변 루프로부터의 이 잔기(예를 들면, 문헌[Chothia et al., J. Mol. Biol. 196: 901-917 (1987)]에 기재된 경쇄 가변 도메인에서 26번 내지 32번(L1), 50번 내지 52번(L2) 및 91번 내지 96번(L3) 잔기 및 중쇄 가변 도메인에서 26번 내지 32번(H1), 53번 내지 55번(H2) 및 96번 내지 101번(H3) 잔기)를 포함한다. 이뮤노젠틱스(ImMunoGenTics: IMGT) 넘버링(Lefranc, M.-P., The Immunologist, 7, 132-136 (1999); Lefranc, M.-P. et al., Dev. Comp. Immunol., 27, 55-77 (2003))에 따라 CDR을 또한 확인하고 넘버링하며, 이는 경쇄 및 중쇄 가변 도메인에서 CDR 위치를 대략 27번 내지 38번 잔기인 CDR1; 대략 56번 내지 65번 잔기인 CDR2; 및 대략 105번 내지 116번 잔기(생식선) 또는 105번 내지 117번 잔기(지배열)인 CDR3으로 기술하고 있다. 일 실시양태에서, CDR이 본 명세서에 개시된 것과 대략 유사한

길이의 항체 중쇄 또는 경쇄의 경쇄 가변 도메인에서 대략 26번 내지 31번 잔기(L1), 49번 내지 51번 잔기(L2) 및 88번 내지 98번 잔기(L3) 및 중쇄 가변 도메인에서 대략 26번 내지 33번 잔기(H1), 50번 내지 58번 잔기(H2) 및 97번 내지 111번 잔기(H3)에 위치하는 것으로 고려된다. 그러나, 당해 분야의 당업자는 특정한 항체의 서열이 확인된 때 CDR 잔기의 실제 위치가 상기 기재된 제시된 잔기로부터 변할 수 있다는 것을 이해할 것이다.

[0066] 프레임워크 또는 FR 잔기는 초가변 영역 잔기 이외의 가변 도메인 잔기이다.

[0067] 본 명세서에 사용된 "중쇄 가변 영역"은 상기 항체 중쇄 가변 도메인의 적어도 하나의 상보성 결정 영역(CDR)을 포함하는 항체 분자의 영역을 의미한다. 중쇄 가변 영역은 상기 항체 중쇄의 1개, 2개 또는 3개의 CDR을 포함할 수 있다.

[0068] 본 명세서에 사용된 "경쇄 가변 영역"은 상기 항체 경쇄 가변 도메인의 적어도 하나의 상보성 결정 영역(CDR)을 포함하는 항체 분자의 영역을 의미한다. 경쇄 가변 영역은 항체에 따라 카파 또는 람다 경쇄일 수 있는 상기 항체 경쇄의 1개, 2개 또는 3개의 CDR을 포함할 수 있다.

[0069] 용어 "항체"는 광의로 사용되고, 원하는 생물학적 활성을 나타내는 한 완전 조립 항체, 사합체 항체, 단일클론 항체, 다중클론 항체, 다중특이적 항체(예를 들면, 이중특이적 항체), 항원에 결합할 수 있는 항체 단편(예를 들면, Fab', F'(ab)₂, Fv, 단쇄 항체, 다이아바디) 및 상기를 포함하는 재조합 펩타이드를 포함한다. "면역글로불린" 또는 "사합체 항체"는 각각 가변 영역 및 불변 영역을 포함하는 2개의 중쇄 및 2개의 경쇄로 이루어진 사합체 당단백질이다. 항원 결합 부분은 재조합 DNA 기법 또는 온전한 항체의 효소 또는 화학 절단에 의해 생성될 수 있다. 항체 단편 또는 항원 결합 부분은 특히, 항체가 원하는 생물학적 활성을 보유하는 한, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, 도메인 항체(dAb), 상보성 결정 영역(CDR) 단편, CDR 그래프팅된 항체, 단쇄 항체(scFv), 단쇄 항체 단편, 키메라 항체, 다이아바디, 트라이바디, 테트라바디, 미니바디, 선형 항체; 킬레이팅 재조합 항체, 트라이바디 또는 바이바디, 인트라바디, 나노바디, 작은 조절 면역 약물(SMIP), 항원 결합-도메인 면역글로불린 융합 단백질, 카멜라이즈드 항체, VHH 함유 항체, 또는 이들의 변이체 또는 유도체 및 1개, 2개, 3개, 4개, 5개 또는 6개의 CDR 서열과 같은 폴리펩타이드에 특이적 항원 결합을 부여하기에 적어도 충분한 면역글로불린 부분을 포함하는 폴리펩타이드를 포함한다.

[0070] "단일클론 항체"는 실질적으로 균질 항체의 집단으로부터 얻은 항체를 의미하고, 즉 집단을 포함하는 각각의 항체는 소량 존재할 수 있는 가능한 천연 돌연변이를 제외하고 동일하다.

[0071] 본 명세서에 사용된 "항체 변이체"는 기준 항체 가변 영역 도메인의 가변 영역에서 적어도 하나의 아미노산 치환, 결실 또는 삽입을 포함하는 항체 폴리펩타이드 서열을 의미한다. 변이체는 비변형 항체와 실질적으로 상동성이거나 실질적으로 동일할 수 있다.

[0072] 본 명세서에 사용된 "키메라 항체"는 통상적으로 상이한 종 유래의 2개의 상이한 항체로부터 유도된 서열을 포함하는 항체를 의미한다(예를 들면, 미국 특허 제4,816,567호 참조). 가장 통상적으로, 키메라 항체는 인간 및 설치류 항체 단편, 일반적으로 인간 불변 및 마우스 가변 영역을 포함한다.

[0073] "중화 항체"는 결합하는 표적 항원의 생물학적 기능을 제거하거나 상당히 감소시키는 항체 분자를 의미한다. 따라서, 항표적 항체의 "중화"는 효소 활성, 리간드 결합 또는 세포내 신호전달과 같은 생물학적 기능을 제거하거나 상당히 감소시킬 수 있다.

[0074] "단리된" 항체는 이의 천연 환경의 성분으로부터 확인되고 분리되고 회수된 것이다. 이의 천연 환경의 오염물질 성분은 항체에 대한 진단학적 또는 치료학적 용도를 방해하는 물질이고, 효소, 호르몬 및 다른 단백질성 또는 비단백질성 용질을 포함할 수 있다. 바람직한 실시양태에서, (1) 로우리 방법에 의해 결정할 때 95중량% 초과 항체, 가장 바람직하게는 99중량% 초과 항체로, (2) 스피닝 컵 시퀀터를 사용하여 N 말단 또는 내부 아미노산 서열의 적어도 15개의 잔기를 얻기에 충분한 정도로 또는 (3) 쿠마쉬 블루 또는 바람직하게는 은 색소를 사용하여 환원 또는 비환원 조건 하에 SDS-PAGE에 의한 동질성으로 항체를 정제한다. 항체의 천연 환경의 적어도 하나의 성분이 존재하지 않으므로, 단리된 항체는 재조합 세포 내에 인시주로 항체를 포함한다. 그러나, 보통, 단리된 항체는 적어도 하나의 정제 단계에 의해 제조된다.

[0075] 본 명세서에 사용된 "특이적으로 결합하는" 항체는 "표적 특이적"이거나, 표적에 "특이적"이거나, 표적 항원과 "면역반응성"은 유사한 항원보다 더 높은 친화도로 표적 항원에 결합하는 항체 또는 항체 물질을 의미한다. 본 개시내용의 일 양태에서, 표적 결합 폴리펩타이드, 또는 이의 단편, 변이체 또는 유도체는 다른 종, 즉 비인간 종의 표적에 대한 이의 결합 친화도와 비교하여 인간 표적에 더 높은 친화도로 결합하지만, 표적의 오솔로그를

인식하고 이에 결합하는 결합 폴리펩타이드가 범위 내에 제공된다.

- [0076] 예를 들면, 항체 또는 이의 동족 항원에 "특이적"인 이의 단편인 폴리펩타이드는 항체의 가변 영역이 검출 가능한 선도로(즉, 패밀리 구성원 사이의 국소 서열 동일성, 상동성 또는 유사성의 가능한 존재에도 불구하고, 결합 친화도의 측정 가능한 차이로 동일한 패밀리의 다른 공지된 폴리펩타이드로부터 관심 대상의 폴리펩타이드를 구별할 수 있는) 관심 대상의 폴리펩타이드를 인식하고 이에 결합한다는 것을 나타낸다. 특이적 항체가 항체의 가변 영역 밖에서, 특히 분자의 불변 영역에서 서열과의 상호작용을 통해 다른 단백질(예를 들면, S. 아우레우스 단백질 A 또는 ELISA 기법에서의 다른 항체)과 또한 상호작용할 수 있는 것으로 이해된다. 본 개시내용의 방법에서 사용하기 위한 항체의 결합 특이성을 결정하는 스크리닝 검정이 널리 공지되어 있고 당해 분야에서 일상적으로 실행된다. 이러한 검정의 이해를 위해, 문헌[Harlow et al. (Eds), Antibodies A Laboratory Manual; Cold Spring Harbor Laboratory; Cold Spring Harbor, NY (1988), Chapter 6]을 참조한다. 당해 분야에 공지된 임의의 방법을 이용하여 상기 방법에서 사용하기 위한 항체가 생성될 수 있다.
- [0077] 용어 "에피토프"는 하나 이상의 항원 결합 영역에서 선택적 결합 물질에 의해 인식되고 결합될 수 있는 임의의 분자의 부분을 의미한다. 에피토프는 보통 아미노산 또는 탄수화물 측쇄와 같은 분자의 화학 활성 표면 그룹으로 이루어지고, 특이적 3차원 구조 특성 및 특이적 전하 특성을 갖는다. 본 명세서에 사용된 에피토프는 인접 또는 비인접할 수 있다. 더욱이, 에피토프는 항체를 생성하기 위해 사용되는 에피토프와 동일한 3차원 구조를 갖지만, 항체 면역 반응을 자극하기 위해 사용되는 표적에서 발견되는 아미노산 잔기를 포함하지 않거나, 오직 일부만을 포함한다는 점에서 모방성(미모토프)일 수 있다. 본 명세서에 사용된, 미모토프는 선택적 결합 물질에 의해 결합된 에피토프와 상이한 항원으로 생각되지 않고; 선택적 결합 물질은 에피토프 및 미모토프의 동일한 3차원 구조를 인식한다.
- [0078] 용어 "유도체"는, 본 개시내용의 항체 물질 및 폴리펩타이드와 관련하여 사용될 때, 인간 단백질에서 보통 발생하지 않는 유비퀴틴화, 치료제 또는 진단제에 대한 접합, (예를 들면, 방사성 핵종 또는 다양한 효소에 의한) 라벨링, 공유 중합체 부착, 예컨대 폐길화(폴리에틸렌 글라이콜에 의한 유도체화) 및 오르니틴과 같은 아미노산의 화학 합성에 의한 삽입 또는 치환과 같은 기법에 의해 화학 변형된 폴리펩타이드를 의미한다. 유도체는 본 개시내용의 비유도체화 분자의 결합 특성을 보유한다.
- [0079] "검출 가능한 모이어티" 또는 "라벨"은 분광학, 광화학, 바이오화학, 면역화학 또는 화학 수단에 의해 검출 가능한 조성물을 의미한다. 예를 들면, 유용한 라벨은 32P, 35S, 형광성 염료, 고전자밀도 시약, (예를 들면, ELISA에서 보통 사용되는) 효소, 바이오틴-스트렙타비딘, 다이옥시게닌, 합텐 및 항혈청 또는 단일클론 항체가 이용 가능한 단백질 또는 표적에 상보적인 서열을 갖는 핵산 분자를 포함한다. 검출 가능한 모이어티는 대개 샘플에서 결합된 검출 가능한 모이어티의 양을 정량화하기 위해 이용될 수 있는 방사성, 색소생산성 또는 형광성 신호와 같은 측정 가능한 신호를 대개 생성한다.
- [0080] 용어 "치료학적 유효량"은 표적 단백질 발현과 관련된 질환의 증상 또는 징후를 경감시키거나 낮추는 데 효과적인 본 개시내용의 표적 특이적 조성물의 양을 나타내기 위해 본 명세서에 사용된다.
- [0081] 본 명세서에 방법과 관련하여 사용되는 용어 "치료한다", "치료하는" 및 "치료"는 TGFβ 발현과 관련된 사건, 질환 또는 병증의 임상 증상, 발현 또는 진행을 일시적으로 또는 영구적으로, 부분적으로 또는 완전히 제거하거나, 감소시키거나, 억제하거나, 경감시키는 것을 의미한다. 이러한 치료는 완벽히 유용할 필요는 없다.
- [0082] 본 개시내용은 표 1에 기재된 예시적인 서열, 이의 단편, 변이체 및 유도체를 포함할 수 있는 표적 특이적 항체, 상기 기재된 표적 특이적 항체를 포함하는 약제학적 제제, 약제학적 제제의 제조 방법, 및 약제학적 제제 및 화합물로 환자를 치료하는 방법을 제공한다.
- [0083] 이의 중쇄의 불변 도메인의 아미노산 서열에 따라, 면역글로불린은 IgA, IgD, IgE, IgG 및 IgM의 상이한 종류로 배정될 수 있고, 이들은 아형 또는 아이소타입, 예를 들면 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 및 IgA2으로 추가로 분할될 수 있다. 면역글로불린의 상이한 종류의 아형 구조 및 3차원 배치가 널리 공지되어 있다. 상이한 아이소타입은 상이한 이펙터 기능을 갖고; 예를 들면, IgG1 및 IgG3 아이소타입은 ADCC 활성을 갖는다. 본 명세서에 개시된 항체는, 불변 도메인을 포함하는 경우, 임의의 아형 또는 아이소타입일 수 있다.
- [0084] 본 개시내용의 항체는 하나 이상의 TGFβ 항원에 대해 약 10-5M 이하, 또는 약 10-6M 이하, 또는 약 10-7M 이하, 또는 약 10-8M 이하, 또는 약 10-9M, 10-10M, 10-11M 이하, 또는 10-12M 이하의 Kd의 결합 친화도를 나타낼 수 있다. 종래 기법을 이용하여, 예컨대 평형 투석; 표면 플라즈몬 공명(SPR) 기술(예를 들면, 바이오코어(BIAcore) 2000 기기, 제조업자가 기술한 일반 절차를 이용함); 125I 라벨링 표적 항원을 사용한 방사면역측정;

또는 하기 예에 기재되거나 당업자에게 공지된 다른 방법에 의해 이러한 친화도를 용이하게 결정할 수 있다. 예를 들면, 스카차드(Scatchard) 등의 방법(Ann N.Y. Acad. Sci., 51:660, 1949)에 의해 친화도 데이터를 분석할 수 있다.

[0085] 이의 항원에 대한 항체의 친화도를 측정하는 데 KinExA 동역학 배제 검정이 또한 유용하다. KinExA 기술은 액상과 고상 사이의 결합 사건보다는 액상 중의 결합 사건을 측정한다. 또한, 결합 사건을 측정하기 위한 많은 방법이 적어도 하나의 반응물이 부동화 또는 라벨링을 통해 변형될 것을 요하지만, KinExA 방법은 연구 중인 분자의 변형을 요하지 않는다. KinExA 방법은 현재 이용 가능한 다른 방법보다 더 넓은 범위의 결합 상수가 측정되게 하는 것으로 생각된다. KinExA 장치 및 항체 규명의 조작에 대한 추가의 설명은 제조업자(아이다호 보이시에 소재하는 사피딘 인스트루먼트즈, 인크. (Sapidyne Instruments, Inc.))로부터 이용 가능하고, 공개 문헌, 예를 들면 미국 특허 제6,664,114호 및 문헌[Darling et al., "Kinetic Exclusion Assay Technology: Characterization of Molecular Interactions." Assay and Drug Development Technologies, 2004, 2:647-657]에서 확인할 수 있다.

[0086] 형질전환 성장 인자 β

[0087] TGF β 는 성숙 TGF β 를 생성하는 분비 전에 절단된 약 400개의 아미노산(aa)의 프레프로단백질로 합성된 이황화 결합 이합체이다. "잠복성 관련 펩타이드"(LAP)로 공지된 N 말단 절단 단편은 이합체에 비공유 결합된 채 있어, TGF β 를 불활성화할 수 있다. 생체내 단리된 TGF β 는 주로 불활성 "잠복성" 형태로, 즉 LAP와 관련된 것으로 발견된다. 잠복성 TGF β 복합체는, 예를 들면 양이온 의존적 만노스-6-포스페이트/인슐린양 성장 인자 II 수용체라 칭하는 세포 표면 수용체에 대한 결합에 의해 여러 방식으로 활성화될 수 있다. LAP 내에 글라이코실화 자리에 부착된 만노스-6-포스페이트 잔기를 통해 결합이 발생한다. 수용체에 대한 결합시, TGF β 는 이의 성숙 형태로 방출된다. 이후, 성숙 활성 TGF β 는 이의 수용체에 자유로이 결합하고 이의 생물학적 기능을 발휘한다. II형 TGF β 수용체에서 주요 TGF β 결합 도메인은 19개의 아미노산 서열로 맵핑된다(Demetriou et al., J. Biol. Chem., 271:12755, 1996). 또한 미국 특허 제7,867,496호를 참조한다.

[0088] 현재, TGF β 의 5개의 공지된 동종체(TGF β 1 내지 TGF β 5; TGF β 1-3은 포유동물이고, TGF β 4는 닭에서 발견되고; TGF β 5는 개구리에서 발견됨)가 존재하고, 이들 모두 서로에 상동성인(60% 내지 80%의 동일성)이고, 약 25kDa의 동종이합체를 형성하고, 공통 TGF β 수용체(TGF β -RI, TGF β -RII, TGF β -RIIB 및 TGF β -RIII)에 작용한다. TGF β 및 TGF β 수용체의 구조적 및 기능적 양태는 당해 분야에 널리 공지되어 있다(예를 들면, 문헌[Cytokine Reference, eds. Oppenheim et al., Academic Press, San Diego, Calif., 2001]을 참조한다). TGF β 는 종 사이에 잘 보존된다. 예를 들면, 랫트 및 인간 성숙 TGF β 1의 아미노산 서열은 거의 동일하다. 또한 미국 특허 제7,867,496호를 참조한다.

[0089] TGF β 1은 생물학적 조직에서 상처 치유의 과정에서 중요한 역할을 한다(New Engl. J. Med., Vol. 331, p. 1286, 1994 및 J. Cell. Biol., Vol. 119, p. 1017, 1992). 상처가 있는 조직의 자리에서, 손상 조직을 복구하기 위해 생물학적 반응, 예컨대 염증성 세포 및 섬유아세포 세포의 침윤, 세포외 기질(ECM)의 생성 및 혈관신생 및 후속 조직 재생을 위한 세포 성장이 발생한다. 또한 미국 특허 제7,579,186호를 참조한다.

[0090] TGF β 2 결핍 마우스는 심장, 폐, 두개 안면, 사지, 척추, 눈, 눈 및 비뇨생식기 결합을 비롯한 상당한 발생 결함을 나타낸다(Dunker et al., Eur J Biol 267:6982-8, 2001). TGF β 3 결핍 마우스는 출생 후 24시간에 거의 100%의 치사율을 나타낸다. 이 마우스는 상당한 구개 손상 및 지연된 폐 발생을 나타낸다(상기 문헌[Dunker et al.]). TGF β 2는 또한 녹내장 발생(Luthen-Driscoll, Experimental Eye Res 81:1-4, 2005), 크론씨병과 관련된 섬유증(Van Assche et al., Inflamm Bowel Dis. 10:55-60, 2004), 상처 치유 및 당뇨병성 신증(Pohlert et al., Biochim Biophys Acta 1792:746-56, 2009)과 관련된다.

[0091] 많은 인간 종양(deMartin et al., EMBO J., 6: 3673 (1987), Kuppner et al., Int. J. Cancer, 42: 562 (1988)) 및 많은 종양 세포주(Derynck et al., Cancer Res., 47: 707 (1987), Roberts et al., Br. J. Cancer, 57: 594 (1988))가 TGF β 를 생성하고 정상 면역 감시를 피하는 이 종양에 대한 가능한 메커니즘을 제시하는 것을 관찰되었다.

[0092] 암에서의 TGF β 동종체 발현은 복잡하고 특정 암에서 상이한 역할을 갖는 TGF β 동종체의 상이한 조합으로 변한다. 예를 들면, 미국 특허 제7,927,593호를 참조한다. 예를 들면, TGF β 1 및 TGF β 3은 난소암 및 이의 진행에서 TGF β 2보다 큰 역할을 담당할 수 있고; TGF β 1 및 TGF β 2 발현은 더 높은 등급의 연골육종 종양에서 TGF β 3보다 높다. 인간 유방암에서, TGF β 1 및 TGF β 3은 매우 발현되고, 림프절 전이 및 양성 TGF β 3 발현을 갖는 전체 생

존 환자와 상관되는 것으로 보이는 $TGF\beta 3$ 발현은 빈약한 예후 결과를 갖는다. 그러나, 대장암에서, $TGF\beta 1$ 및 $TGF\beta 2$ 는 $TGF\beta 3$ 보다 더 매우 발현되고, 암이 없는 개인보다 더 높은 순환 수준으로 존재한다. 교종에서, $TGF\beta 2$ 는 세포 이동에 중요하다.

[0093]

$TGF\beta$ 발현은 또한 다양한 조직 섬유증, 예컨대 신경화증, 폐 섬유증 및 경변증의 발병; 및 다양한 상태, 예컨대 만성 간염, 류마티스 관절염, 혈관 재협착 및 피부의 켈로이드의 발병과 관련된다. 질환 또는 장애와 관련된 섬유증(예를 들면, 섬유증식성 질환 또는 장애)을 포함하는 고려되는 섬유증 또는 질환 또는 장애의 치료는 폐 섬유증, 특발성 폐 섬유증, 세기관지주위 섬유증, 간질성 폐 질환, 만성 폐쇄성 폐 질환(COPD), 소기도병(예를 들면, 폐쇄성 모세기관지염), 폐기종, 성인 또는 급성 호흡 곤란 증후군(ARDS), 급성 폐 손상(ALI); 감염성 또는 독성 물질로 인한 폐 섬유증, 신장 섬유증, 모든 병인의 사구체신염(GN), 예를 들면 혈관간막 증식성 GN, 면역 GN 및 반월상 GN, 사구체 경화증, 세뇨관간질성 손상, 신장 간질성 섬유증, 신장 섬유증 및 신장 간질성 섬유증의 모든 원인, 이식 수혜자의 사이클로스포린 치료를 포함하는 약물 노출의 합병증으로부터 생기는 신장 섬유증, 예를 들면 사이클로스포린 치료, HIV 관련 신증; 이식 신증, 당뇨병성 신장 질환(예를 들면, 당뇨병성 신증), 신원성 전신 섬유증, 당뇨병, 특발성 후복막 섬유증, 강피증, 간 섬유증, 과도한 반흔 및 진행성 경화증과 관련된 간 질환, 예컨대 모든 병인으로 인한 간 경변증, 담도 장애, 감염으로 인한 간 기능장애, 섬유낭종성 질환, 심혈관질환, 예컨대 울혈성 심부전; 확장성 심근증, 심근염, 혈관 협착, 심근경색 후 심장 섬유증(예를 들면, 경색후 심장 섬유증), 좌심실 비대증, 정맥 폐쇄 질환, 재협착(예를 들면, 혈관성형술후 재협착), 동정맥 이식 실패, 죽상동맥경화증, 고혈압, 고혈압성 심장 질환, 심장 비대증, 비대성 심근증, 심부전, 대동맥 질환, 진행성 전신 경화증; 다발성근염, 전신 홍반성 낭창, 피부근염, 파시스트, 레이노드 증후군, 류마티스 관절염, 증식성 유리체망막병증, 임의의 병인의 유리체망막병증, 안과 수술과 관련된 섬유증, 예컨대 녹내장 치료, 망막 기능장애와 관련된 섬유증, 망막 재부착, 수정체 적출 또는 임의의 유형의 눈공 시술, 각막 및 결막에서의 반흔, 각막 내피에서의 섬유증, 알칼리 화상과 관련된 섬유증, 수정체낭의 백내장 수술 후 섬유증, 사시 수술에서 외안근 주위의 조직의 과도한 반흔, 전방 피막 백내장 및 수정체 후낭 혼탁, 눈 전방부 섬유증 질환, (예를 들면, 각막 혼탁과 관련된) 각막 간질의 섬유증, (예를 들면, 녹내장과 관련된) 섬유주 네트워크의 섬유증, 눈 후방부 섬유증 질환, (예를 들면, 눈의 망막 또는 맥락막 맥관구조에서의) 섬유혈관 반흔, 망막 섬유증, 망막앞 섬유증, 망막 신경교종, (예를 들면, 나이 관련 황반 변성과 관련된) 망막하 섬유증, 망막 및 녹내장 수술 후, 당뇨병성 망막병증에서 조직 수축과 관련된 견인성 망막 박리, 파이로니병, 척수손상후 전신 경화증, 골다공증, 카무라티-앵겔만 질환, 크론씨병, 반흔, 마판 증후군, 조기 난소 부전, 알츠하이머병 및 파킨슨병, 수술 절제 또는 기계적 외상으로 인한 섬유증, 안과 수술과 관련된 섬유증; 및 외상 또는 수술 상처로부터 생기는 상처 치유 동안 생기는 진피에서의 과도한 또는 비대성 반흔 또는 켈로이드 형성을 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다.

[0094]

폐 섬유증 및 신경화증에서, $TGF\beta$ 의 농도는 높고, 병적 상태, 예컨대 섬유증을 진행시킨다(Yamamoto et al., *Kidney Int.* 45:916-27, 1994 및 Westergren-Thorsson et al., *J. Clin. Invest.* 92:632-7, 1993). 지속적인 조직 손상은 $TGF\beta$ 를 발현하는 신호를 계속해서 형질도입하거나, ECM에 의한 $TGF\beta$ 발현에 대한 음성 조절 신호를 억제하거나, 폐 섬유증 및 신경화증에서 상승적으로 사건 둘 다를 발생시키는 것으로 추정된다. $TGF\beta$ 의 억제제를 사용하여 섬유증 질환의 진단 및 치료에서 $TGF\beta$ 활성 및 세포의 기질 축적을 억제하는 것이 WO 제 1991/04748호, WO 제 1993/10808호 및 WO 제 2000/40227호에 개시되어 있다. 실험적 당뇨병성 신장 질환의 치료에서 중화 항-TGF-베타 항체가 사용된다(Han and Ziyadeh, *Peritoneal dialysis international*, 19 Suppl 2: S234-237 (1999)). 다양한 적응증에서 $TGF\beta$ 의 억제제의 사용을 추가로 기술한 미국 특허 7,527,791호(본 명세서에 참조문헌으로 포함됨)를 또한 참조한다.

[0095]

예시적인 눈 질환(예를 들면, 안과, 눈, 안과학 또는 안과학적 질환), 병증 또는 장애는 섬유증식성 장애, 눈의 섬유증, 안섬유증, 망막 기능장애, 망막 기능장애와 관련된 섬유증, 습성 또는 건성 황반 변성, 증식성 유리체 망막병증, 임의의 병인의 유리체망막병증, 녹내장 치료, 망막 재부착, 수정체 적출 또는 임의의 유형의 눈공 시술과 같은 안과 수술과 관련된 섬유증, 각막 및 결막에서의 반흔, 각막 내피에서의 섬유증, 알칼리 화상(예를 들면, 각막에 대한 알칼리 화상), 수정체낭의 백내장 수술 후 섬유증, 사시 수술에서 외안근 주위의 조직에서의 과도한 반흔, 전방 피막 백내장 및 수정체 후낭 혼탁, 눈 전방부 섬유증 질환, (예를 들면, 각막 혼탁과 관련된) 각막 간질의 섬유증, (예를 들면, 녹내장과 관련된) 섬유주 네트워크의 섬유증, 눈 후방부 섬유증 질환, (예를 들면, 눈의 망막 또는 맥락막 맥관구조에서의) 섬유혈관 반흔, 망막 섬유증, 망막앞 섬유증, 망막 신경교종, (예를 들면, 나이 관련 황반 변성과 관련된) 망막하 섬유증, 망막 및 녹내장 수술 후와 관련된 섬유증, 당뇨병성 망막병증에서 조직 수축과 관련된 견인성 망막 박리를 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다.

- [0096] 예시적인 눈의 섬유증식성 질환, 병증 또는 장애, 눈의 섬유증, 안과 섬유증 또는 안섬유증은 증식성 유리체망막병증, 임의의 병인의 유리체망막병증, 망막 기능장애와 관련된 섬유증, 습성 또는 건성 황반 변성과 관련된 섬유증, 녹내장 치료, 망막 재부착, 수정체 적출 또는 임의의 유형의 누공 시술과 같은 안과 수술과 관련된 섬유증, 각막 및 결막에서의 반흔, 각막 내피에서의 섬유증, 알칼리 화상과 관련된 섬유증, 수정체낭의 백내장 수술 후 섬유증, 사시 수술에서 외안근 주위의 조직의 과도한 반흔, 전방 피막 백내장 및 수정체 후낭 혼탁, 눈 전방부 섬유증 질환, (예를 들면, 각막 혼탁과 관련된) 각막 간질의 섬유증, (예를 들면, 녹내장과 관련된) 섬유주 네트워크의 섬유증, 눈 후방부 섬유증 질환, (예를 들면, 눈의 망막 또는 맥락막 맥관구조에서의) 섬유혈관 반흔, 망막 섬유증, 망막앞 섬유증, 망막 신경교종, (예를 들면, 나이 관련 황반 변성과 관련된) 망막하 섬유증, 망막 및 녹내장 수술 후와 관련된 섬유증, 당뇨병성 망막병증에서 조직 수축과 관련된 견인성 망막 박리를 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다.
- [0097] 다양한 실시양태에서, 눈의 섬유증식성 질환, 병증 또는 장애는 증식성 유리체망막병증, 안과 수술과 관련된 섬유증, 수정체의 백내장 수술 후 섬유증, 각막 간질의 섬유증 및 알칼리 화상으로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0098] **항체 폴리펩타이드**
- [0099] 본 개시내용은 표적 특이적 항체를 코딩하는 아미노산 분자를 포함한다. 예시적인 실시양태에서, 본 개시내용의 표적 특이적 항체는 인간 카파(κ) 또는 인간 람다(λ) 경쇄 또는 이로부터 유도된 아미노산 서열, 또는 인간 중쇄 또는 이로부터 유도된 서열, 또는 단쇄, 이합체, 사합체 또는 다른 형태와 함께 중쇄 및 경쇄 둘 다를 포함할 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 표적 특이적 면역글로불린의 중쇄 및 경쇄는 상이한 아미노산 분자이다. 다른 실시양태에서, 동일한 아미노산 분자는 표적 특이적 항체의 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0100] 몇몇 실시양태에서, 인간 항표적 항체의 아미노산 서열은 표 1 또는 서열 번호 4, 서열 번호 8 및 서열 번호 12에 기재된 항체 XPA.42.068, XPA.42.089 및 XPA.42.681의 성숙(즉, 손실 신호 서열) 경쇄 가변 영역(VL)의 아미노산 서열의 하나 이상의 CDR 또는 이들의 변이체(본 명세서에 기재된 CDR 그래프팅된, 변형된, 인간화, 키메라 또는 인간 조작된 항체 또는 임의의 다른 변이체 포함)를 포함한다. 몇몇 실시양태에서, VL은 임의의 하나의 상기 항체의 경쇄의 CDR1의 처음부터 CDR3의 마지막의 아미노산 서열을 포함한다.
- [0101] 일 실시양태에서, 표적 특이적 항체는 경쇄 CDR1, CDR2 또는 CDR3(LCDR1, LCDR2, LCDR3)을 포함하고, 이들 각각은 서열 번호 4, 서열 번호 8 및 서열 번호 12에 기재된 VL 영역의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 갖는 항체의 CDR1, CDR2 및 CDR3 영역으로부터 독립적으로 선택되고, 핵산은 서열 번호 4, 서열 번호 8 및 서열 번호 12에 기재된 VH 영역을 코딩하거나, 서열 번호 3, 서열 번호 7 및 서열 번호 11에 기재된 VL 영역을 코딩하는 핵산 분자에 의해 코딩된다. 일 실시양태에서, 초티아(Chothia) 넘버링에 따라 경쇄 CDR1은 대략 24번 내지 34번 잔기 유래이고, CDR2는 대략 50번 내지 56번 잔기 유래이고, CDR3은 대략 89번 내지 97번 잔기로부터 연장된다. 대안적인 실시양태에서, 중쇄 CDR이 이뮤노젠틱스(IMGt) 넘버링에 따라 대략 27번 내지 38번 잔기(CDR1); 대략 56번 내지 65번 잔기(CDR2); 및 대략 105번 내지 116번 잔기(생식선) 또는 105번 내지 117번 잔기(CDR3)에 위치하는 것으로 고려된다. 일 실시양태에서, 경쇄 CDR이 본 명세서에 개시된 것과 대략 유사한 길이의 항체 경쇄의 경쇄 가변 도메인에서 대략 26번 내지 31번 잔기(L1), 49번 내지 51번 잔기(L2) 및 88번 내지 97번 잔기(L3)에서 위치하는 것으로 고려된다. 표적 특이적 항체의 폴리펩타이드는 XPA.42.068, XPA.42.089 및 XPA.42.681로 이루어진 군으로부터 선택된 VL 영역의 아미노산 서열을 포함하는 항체의 CDR1, CDR2 및 CDR3 영역을 포함할 수 있다.
- [0102] 몇몇 실시양태에서, 인간 표적 특이적 항체는 표 1 또는 서열 번호 2, 서열 번호 6 및 서열 번호 10에 기재된 항체 XPA.42.068, XPA.42.089 및 XPA.42.681의 성숙(즉, 손실 신호 서열) 중쇄 가변 영역(VH)의 아미노산 서열의 하나 이상의 CDR 또는 이들의 변이체를 포함한다. 몇몇 실시양태에서, VH는 상기 항체의 임의의 하나의 중쇄의 CDR1의 처음부터 CDR3의 마지막의 아미노산 서열을 포함한다.
- [0103] 일 실시양태에서, 표적 특이적 항체는 중쇄 CDR1, CDR2 또는 CDR3(HCDR1, HCDR2, HCDR3)을 포함하고, 이들 각각은 서열 번호 2, 서열 번호 6 및 서열 번호 10에 기재된 VH 영역의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역을 갖는 항체의 CDR1, CDR2 및 CDR3 영역으로부터 독립적으로 선택되고, 핵산은 서열 번호 2, 서열 번호 6 및 서열 번호 10에 기재된 VH 영역을 코딩하거나, 서열 번호 1, 서열 번호 5 및 서열 번호 9에 기재된 VH 영역을 코딩하는 핵산 분자에 의해 코딩된다. 표적 특이적 항체가 중쇄 CDR1, CDR2 또는 CDR3을 포함하고, 이들 각각이 서열 번호 2, 서열 번호 6 및 서열 번호 10에 기재된 VH 영역의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역을 갖는 항체의 CDR1, CDR2 및 CDR3 영역으로부터 독립적으로 선택되는 것이 추가로 고려된다. 일 실시양태에서, 중

쇄 CDR은 쇼티아 넘버링에 따라 위치하고: CDR1은 대략 26번 내지 35번 잔기 유래이고, CDR2는 대략 50번 내지 58번 잔기이고, CDR3은 대략 95번 내지 102번(또는 95번 내지 111번 또는 95번 내지 118번) 잔기로부터 연장된다. 대안적인 실시양태에서, 이류노젠틱스(IMG) 넘버링에 따라 중쇄 CDR이 CDR1, 대략 27번 내지 38번 잔기(CDR1); 대략 56번 내지 65번 잔기(CDR2); 및 CDR3, 대략 105번 내지 116번 잔기(생식선) 또는 105번 내지 117번 잔기(CDR3)에 위치하는 것이 고려된다. 일 실시양태에서, 중쇄 CDR이 본 명세서에 개시된 것과 대략 유사한 길이의 항체 중쇄의 중쇄 가변 도메인에서 대략 26번 내지 33번 잔기(H1), 50번 내지 58번 잔기(H2) 및 97번 내지 111번 잔기(H3)에 위치하는 것이 고려된다. 표적 특이적 항체의 폴리펩타이드는 XPA.42.068, XPA.42.089 및 XPA.42.681로 이루어진 군으로부터 선택된 VH 영역의 아미노산 서열을 포함하는 항체의 CDR1, CDR2 및 CDR3 영역을 포함할 수 있다.

[0104] 다른 실시양태에서, 항체는 임의로 표 1에 기재된 바대로 쌍을 지은 상기 개시된 성숙 경쇄 가변 영역 및 상기 개시된 성숙 중쇄 가변 영역을 포함한다.

[0105] 예시적인 실시양태에서, 본 개시내용을 고려한다:

[0106] 임의로 임의의 이러한 CDR(들)에서 1개 또는 2개의 돌연변이, 예를 들면 보존적 또는 비보존적 치환을 각각 포함하고, 임의로 표 1에 기재된 바대로 쌍을 지은, 임의의 하나의 서열 번호 13, 서열 번호 19 및 서열 번호 25; 서열 번호 14, 서열 번호 20 및 서열 번호 26; 서열 번호 15, 서열 번호 21 및 서열 번호 27 및 서열 번호 16, 서열 번호 22 및 서열 번호 28; 서열 번호 17, 서열 번호 23 및 서열 번호 29; 및 서열 번호 18, 서열 번호 24 및 서열 번호 30의 임의의 1개, 2개, 3개, 4개, 5개 또는 6개의 HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 또는 LCDR3을 보유하는 단일클론 항체;

[0107] 임의로 임의의 이러한 CDR(들)에서 1개 또는 2개의 돌연변이를 포함하고, 임의로 임의의 적합한 중쇄 불변 영역, 예를 들면 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2 또는 IgE, 이들의 인간 서열 또는 이들의 하이브리드를 추가로 포함하는, 임의의 하나의 서열 번호 13, 서열 번호 19 및 서열 번호 25; 서열 번호 14, 서열 번호 20 및 서열 번호 26; 및 서열 번호 15, 서열 번호 21 및 서열 번호 27의 모든 HCDR1, HCDR2, HCDR3 또는 중쇄 가변 영역을 보유하는 단일클론 항체;

[0108] 임의로 임의의 이러한 CDR(들)에서 1개 또는 2개의 돌연변이를 포함하고, 임의로 임의의 적합한 경쇄 불변 영역, 예를 들면 카파 또는 람다 경쇄 불변 영역, 이들의 인간 서열 또는 이들의 하이브리드를 추가로 포함하는, 임의의 하나의 서열 번호 16, 서열 번호 22 및 서열 번호 28; 서열 번호 17, 서열 번호 23 및 서열 번호 29; 및 서열 번호 18, 서열 번호 24 및 서열 번호 30의 모든 LCDR1, LCDR2, LCDR3 또는 경쇄 가변 영역을 보유하는 단일클론 항체.

[0109] 몇몇 실시양태에서, 항체는 표 1에 기재된 바대로 쌍을 지은 모든 3개의 경쇄 CDR, 모든 3개의 중쇄 CDR 또는 모든 6개의 경쇄 및 중쇄의 CDR을 포함한다. 예시적인 몇몇 실시양태에서, 항체로부터의 2개의 경쇄 CDR은 상이한 항체로부터의 제3 경쇄 CDR과 조합될 수 있다. 대안적으로, 1개의 항체로부터의 LCDR1은 특히 CDR이 매우 상동성인 경우 상이한 항체로부터의 LCDR2 및 또 다른 항체로부터의 LCDR3과 조합될 수 있다. 유사하게, 항체로부터의 2개의 중쇄 CDR은 상이한 항체로부터의 제3 중쇄 CDR과 조합될 수 있거나; 1개의 항체로부터의 HCDR1은 특히 CDR이 매우 상동성인 경우 상이한 항체로부터의 HCDR2 및 또 다른 항체로부터의 HCDR3과 조합될 수 있다.

[0110] 몇몇 실시양태에서, 서열 번호 2, 서열 번호 6 및 서열 번호 10에 기재된 중쇄 가변 영역과 적어도 약 65%, 70%, 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상 동일한 아미노산 서열 및/또는 서열 번호 4, 서열 번호 8 및 서열 번호 12에 기재된 경쇄 가변 영역과 적어도 약 65%, 70%, 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상 동일한 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드를 포함하는 항체가 제공되고, 항체는 적어도 1개, 2개, 3개, 4개, 5개 또는 모든 HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 또는 LCDR3을 추가로 포함한다. 몇몇 실시양태에서, 경쇄 가변 영역에 백분율 동일성을 갖는 아미노산 서열은 1개, 2개 또는 3개의 경쇄 CDR을 포함할 수 있다. 다른 실시양태에서, 중쇄 가변 영역에 백분율 동일성을 갖는 아미노산 서열은 1개, 2개 또는 3개의 중쇄 CDR을 포함할 수 있다.

[0111] 다른 실시양태에서, 표 1에서 항체 서열의 중쇄 가변 영역에서 모든 3개의 HCDR, 서열 번호 13, 서열 번호 19 및 서열 번호 25; 서열 번호 14, 서열 번호 20 및 서열 번호 26; 및 서열 번호 15, 서열 번호 21 및 서열 번호 27에 기재된 CDR과 적어도 약 65%, 70%, 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상 동일한 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드를 포함하는 항체가

제공된다.

- [0112] 관련 실시양태에서, 표 1에서 항체 서열의 경쇄 가변 영역에서 모든 3개의 LCDR, 서열 번호 16, 서열 번호 22 및 서열 번호 28; 서열 번호 17, 서열 번호 23 및 서열 번호 29; 및 서열 번호 18, 서열 번호 24 및 서열 번호 30에 기재된 CDR과 적어도 약 65%, 70%, 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상 동일한 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드를 포함하는 항체가 제공된다.
- [0113] 추가의 실시양태에서, 표 1에서 항체 서열의 중쇄 및 경쇄 가변 영역에서 모든 6개의 CDR, 서열 번호 13, 서열 번호 19 및 서열 번호 25; 서열 번호 14, 서열 번호 20 및 서열 번호 26; 및 서열 번호 15, 서열 번호 21 서열 번호 27; 서열 번호 16, 서열 번호 22 및 서열 번호 28; 서열 번호 17, 서열 번호 23 및 서열 번호 29; 및 서열 번호 18, 서열 번호 24 및 서열 번호 30에 기재된 CDR과 적어도 약 65%, 70%, 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상 동일한 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드를 포함하는 항체가 제공된다.
- [0114] 본 개시내용의 항체는 항체의 CDR 영역에서 1개 또는 2개 이상의 아미노산 치환, 예를 들면 비보존적 또는 보존적 치환을 가질 수 있는 것으로 고려된다.
- [0115] 관련 실시양태에서, 프레임워크의 잔기는 변경된다. 변경될 수 있는 중쇄 프레임워크 영역은 중쇄 CDR 잔기를 둘러싸는 H-FR1, H-FR2, H-FR3 및 H-FR4라 칭하는 영역 내에 있고, 변경될 수 있는 경쇄 프레임워크 영역의 잔기는 경쇄 CDR 잔기를 둘러싸는 L-FR1, L-FR2, L-FR3 및 L-FR4라 칭하는 영역 내에 있다. 프레임워크 영역 내의 아미노산은 예를 들면 인간 프레임워크 또는 인간 공통 프레임워크에서 확인된 임의의 적합한 아미노산으로 대체될 수 있다.
- [0116] 예시적인 실시양태에서, 본 명세서에 기재된 항-TGF β 항체는 TGF β 1, TGF β 2 및 TGF β 3으로 이루어진 군으로부터 선택된 TGF β 의 적어도 하나의 동종체에 특이적으로 결합한다. 다른 실시양태에서, 항-TGF β 항체는 (a) TGF β 1, TGF β 2 및 TGF β 3("관 반응성 항체" 또는 "관 결합 항체"); (b) TGF β 1 및 TGF β 2; (c) TGF β 1 및 TGF β 3; 및 (d) TGF β 2 및 TGF β 3에 특이적으로 결합한다. 예시적인 실시양태에서, 본 명세서에 기재된 항-TGF β 항체는 10-6M, 10-7M, 10-8M, 10-9M, 10-10M, 10-11M 또는 10-12M 이하(더 낮은수록 더 높은 결합 친화도를 의미함)의 친화도로 TGF β 의 적어도 하나의 동종체에 결합하거나, 임의로 하나 이상의 동종체에 대해 10-6M, 10-7M, 10-8M, 10-9M 10-10M, 10-11M 또는 10-12M 이하의 친화도로 2개의 TGF β 동종체 또는 모든 TGF β 1, 2 또는 3에 결합한다. 다른 실시양태에서, 본 명세서에 기재된 항체는 TGF β 3에 대한 결합과 비교하여 적어도 2배 내지 50배, 10배 내지 100배, 2배, 5배, 10배, 25배, 50배 또는 100배, 또는 20% 내지 50%, 50% 내지 100%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 또는 100% 이상의 친화도로 TGF β 1 및 TGF β 2에 결합한다(예를 들면, TGF β 1 및 TGF β 2에 우선적으로 결합한다). 대안적으로, 본 명세서에 기재된 항체는 서로의 3배, 5배 또는 10배의 친화도로 각각의 TGF β 동종체 TGF β 1, TGF β 2 및 TGF β 3에 결합한다.
- [0117] 몇몇 실시양태에서, TGF β 1 및 TGF β 2의 항체 중화는 TGF β 3의 중화보다 적어도 2배 내지 50배, 10배 내지 100배, 2배, 5배, 10배, 25배, 50배 또는 100배, 또는 20% 내지 50%, 50% 내지 100%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 또는 100% 더 강력하다.
- [0118] XPA.42.089의 중쇄 및 경쇄 아미노산 서열은 각각 서열 번호 6 및 서열 번호 8에 기재되어 있다. XPA.42.068의 중쇄 및 경쇄 아미노산 서열은 각각 서열 번호 2 및 서열 번호 4에 기재되어 있고, XPA.42.681의 중쇄 및 경쇄 아미노산 서열은 각각 서열 번호 10 및 서열 번호 12에 기재되어 있다.
- [0119] **항체 핵산**
- [0120] 본 개시내용은 또한 표적 특이적 항체를 코딩하는 핵산 분자를 포함한다. 몇몇 실시양태에서, 상이한 핵산 분자는 표적 특이적 항체의 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 코딩한다. 다른 실시양태에서, 동일한 핵산 분자는 표적 특이적 항체의 중쇄 및 경쇄 가변 영역을 코딩한다. 일 실시양태에서, 핵산은 본 개시내용의 표적 특이적 항체 및 본 명세서에 기재된 핵산에 의해 코딩된 임의의 폴리펩타이드를 코딩한다.
- [0121] 일 양태에서, 본 개시내용의 핵산 분자는 서열 번호 4, 서열 번호 8 및 서열 번호 12에 기재된 항체 XPA.42.068, XPA.42.089 및 XPA.42.681의 VL 아미노산 서열 또는 이의 일부를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 관련 양태에서, VL 아미노산 서열은 공통 서열이다. 몇몇 실시양태에서, 핵산은 상기 항체의 경쇄 CDR의 아미노산 서열을 코딩한다. 몇몇 실시양태에서, 상기 일부는 CDR1-CDR3을 포함하는 인접 일부이다. 일 실시양태에서, 상기 일부는 적어도 1개, 2개 또는 3개의 경쇄 CDR1, CDR2 또는 CDR3 영역을, 임의로 상이한 인간

또는 인간 공통 프레임워크와 함께, 임의로 전체 3개의 CDR에서 1개 또는 2개 이하 또는 3개 이하의 돌연변이와 함께 포함한다.

- [0122] 일 실시양태에서, 본 개시내용은 임의의 하나의 서열 번호 2, 서열 번호 6 및 서열 번호 10 및 서열 번호 4, 서열 번호 8 및 서열 번호 12에 기재된 가변 영역 아미노산 서열을 갖는 기능성 단편을 포함하는 항원 결합 화합물을 제공한다. 관련 실시양태에서, 상술한 항원 결합 화합물은, 본 개시내용의 하나 이상의 CDR 서열을 포함하고 원하는 생물학적 활성을 나타내는, 완전 조립 사합체 항체, 단일클론 항체 인간화 항체; 인간 항체; 키메라 항체; 다중특이적 항체, 항체 단편, Fab, F(ab')₂; Fv; scFv 또는 단쇄 항체 단편; 다이아바디; 트라이바디, 테트라바디, 미니바디, 선형 항체; 킬레이팅 재조합 항체, 트라이바디 또는 바이바디, 인트라바디, 나노바디, 작은 조절 면역 약물(SMIP), 결합 도메인 면역글로불린 융합 단백질, 카멜라이즈드 항체, VHH 함유 항체, 또는 임의의 하나의 이들의 항체의 변이체 또는 유도체, 또는 2개 이상의 항체의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택된다. 본 개시내용의 항원 결합 화합물은 바람직하게는 표면 플라스몬 공명에 의해 측정할 때 하나 이상의 TGFβ 1, TGFβ 2 및 TGFβ 3에 대해 10⁻⁶, 10⁻⁷, 10⁻⁸, 10⁻⁹, 10⁻¹⁰, 10⁻¹¹M 이하의 결합 친화도를 보유한다.
- [0123] 일 양태에서, 본 개시내용의 항체는 각각 표 1에서 쌍을 지은 아미노산 서열 서열 번호 2, 서열 번호 6 및 서열 번호 10 및 서열 번호 4, 서열 번호 8 및 서열 번호 12에 기재된 중쇄 가변 영역 또는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 항체가 상기 아미노산 서열에 기재된 항체의 전부 또는 일부를 포함할 수 있는 것이 추가로 고려된다. 일 실시양태에서, 항체는 서열 번호 2, 서열 번호 6 및 서열 번호 10의 중쇄의 적어도 하나의 CDR1, CDR2 또는 CDR3 또는 표 1에서 쌍을 지은 서열 번호 4, 서열 번호 8 및 서열 번호 12의 경쇄의 적어도 하나의 CDR1, CDR2 또는 CDR3을 포함한다.
- [0124] 일 실시양태에서, 중쇄는 중쇄 CDR3 서열로 확인된 아미노산 서열을 포함한다. 이러한 "중쇄 CDR3 서열"(HCDR3)은 표 1 및 서열 번호 15, 서열 번호 21 및 서열 번호 27에 기재된 중쇄 CDR3 서열로 확인된 아미노산 서열을 포함한다. 대안적으로, HCDR3 서열은 표 1에서 확인된 임의의 HCDR3 아미노산 서열과 비교하여 하나 이상의 아미노산 변화(예를 들면, 치환, 삽입 또는 결실)를 포함하는 아미노산 서열을 포함한다. 바람직한 치환은 표 1의 다른 HCDR3 내에 상응하는 위치에서의 아미노산에 대한 치환을 포함한다. 대안적으로, HCDR3 서열은 본 명세서에 기재된 HCDR3의 공통 아미노산 서열을 포함할 수 있다.
- [0125] 상기 기재된 HCDR3 서열을 포함하는 중쇄는 서열 번호 13, 서열 번호 19 및 서열 번호 25 및 표 1에서 HCDR1로 확인된 임의의 아미노산 서열을 포함하는 "중쇄 CDR1 서열"(HCDR1), 서열 번호 13, 서열 번호 19 및 서열 번호 25 및 표 1에서 확인된 임의의 HCDR1과 비교하여 하나 이상의 아미노산 변화, 바람직하게는 표 1의 다른 HCDR1 내에 상응하는 위치에서 아미노산에 대한 치환을 포함하는 아미노산 서열 또는 본 명세서에 기재된 HCDR1의 공통 서열을 추가로 포함할 수 있다.
- [0126] 대안적으로, 상기 기재된 HCDR3 서열을 포함하는 중쇄는 서열 번호 14, 서열 번호 20 및 서열 번호 26 및 표 1에서 HCDR2로 확인된 임의의 아미노산 서열을 포함하는 "중쇄 CDR2 서열"(HCDR2), 서열 번호 14, 서열 번호 20 및 서열 번호 26 및 표 1에서 확인된 임의의 HCDR2와 비교하여 하나 이상의 아미노산 변화, 바람직하게는 표 1의 다른 HCDR2 내에 상응하는 위치에서 아미노산에 대한 치환을 포함하는 아미노산 서열 또는 본 명세서에 기재된 HCDR2의 공통 서열을 추가로 포함할 수 있다.
- [0127] 상기 기재된 중쇄 CDR3 서열을 포함하는 중쇄는 (a) 상기 기재된 중쇄 CDR1 서열 및 (b) 상기 기재된 본 발명의 중쇄 CDR2 서열 둘 다를 또한 포함할 수 있다.
- [0128] 본 개시내용의 일 양태는 하기 기재된 임의의 1개, 2개 및/또는 3개의 중쇄 CDR 서열을 포함하는 중쇄를 포함하는 표적 항원에 결합하는 항체를 제공한다.
- [0129] 상기 기재된 임의의 중쇄 CDR 서열은 또한 CDR의 말단에 첨가된 아미노산을 포함할 수 있다. 아미노산 유사체를 포함하는 변이체 또는 유도체의 친화도 성숙 또는 제조를 포함하는 본 발명의 항체 및 항원 결합 화합물의 변이체 및 유도체의 제조는 본 명세서에 추가로 기재되어 있다. 예시적인 변이체는 아미노산 서열 내의 상응하는 아미노산의 보존적 또는 비보존적 치환 또는 상이한 인간 항체 서열의 상응하는 아미노산에 의한 아미노산의 대체를 포함하는 것이다.
- [0130] 상기 기재된 임의의 하나의 중쇄를 포함하는 항체는 경쇄, 바람직하게는 표적 항원에 결합하는 경쇄, 가장 바람직하게는 하기 기재된 경쇄 CDR 서열을 포함하는 경쇄를 추가로 포함할 수 있다.
- [0131] 본 개시내용의 다른 양태는 하기 기재된 임의의 1개, 2개 및/또는 3개의 경쇄 CDR 서열을 포함하는 경쇄를 포함

하는 표적 항원에 결합하는 항체를 제공한다.

- [0132] 바람직하게는, 경쇄는 경쇄 CDR3 서열로 확인된 아미노산 서열을 포함한다. 이러한 "경쇄 CDR3 서열"(LCDR3)은 표 1에 및 서열 번호 18, 서열 번호 24 및 서열 번호 30 내에 경쇄 CDR3 서열로 확인된 아미노산 서열을 포함한다. 대안적으로, 경쇄 CDR3 서열은 표 1에서 확인된 임의의 경쇄 CDR3 아미노산 서열과 비교하여 하나 이상의 아미노산 변화(예를 들면, 치환, 삽입 또는 결실)를 포함하는 아미노산 서열을 포함한다. 바람직한 치환은 표 1의 다른 경쇄 CDR3 내에 상응하는 위치에서 아미노산에 대한 치환을 포함한다.
- [0133] 상기 기재된 경쇄 CDR3 서열을 포함하는 경쇄는 서열 번호 16, 서열 번호 22 및 서열 번호 28 또는 표 1에서 경쇄 CDR1로 확인된 임의의 아미노산 서열을 포함하는 "경쇄 CDR1 서열", 서열 번호 16, 서열 번호 22 및 서열 번호 28 또는 표 1에서 확인된 임의의 경쇄 CDR1과 비교하여 하나 이상의 아미노산 변화, 바람직하게는 표 1의 다른 경쇄 CDR1 내에 상응하는 위치에서 아미노산에 대한 치환을 포함하는 아미노산 서열을 추가로 포함할 수 있다.
- [0134] 대안적으로, 상기 기재된 경쇄 CDR3 서열을 포함하는 경쇄는 서열 번호 17, 서열 번호 23 및 서열 번호 29 또는 표 1에서 경쇄 CDR2로 확인된 임의의 아미노산 서열을 포함하는 "경쇄 CDR2 서열", 표 1에서 확인된 임의의 경쇄 CDR2와 비교하여 하나 이상의 아미노산 변화, 바람직하게는 서열 번호 17, 서열 번호 23 및 서열 번호 29 또는 표 1의 다른 경쇄 CDR2 내에 상응하는 위치에서 아미노산에 대한 치환을 포함하는 아미노산 서열을 추가로 포함할 수 있다.
- [0135] 관련 양태에서, 본 개시내용은 서열 번호 13 내지 15, 서열 번호 19 내지 21 및 서열 번호 25 내지 27의 적어도 하나의 HCDR 또는 서열 번호 16 내지 18, 서열 번호 22 내지 24 및 서열 번호 28 내지 30의 LCDR을 포함하는 정제된 폴리펩타이드를 고려하고, 중쇄 가변 영역의 프레임워크 영역 및 경쇄 가변 영역의 프레임워크 영역은 인간 항체로부터의 프레임워크 영역을 포함한다. 다른 실시양태에서, 중쇄 가변 영역의 프레임워크 영역 및 경쇄 가변 영역의 프레임워크 영역은 상이한 인간 항체 서열에 더 상동성인 아미노산 치환에 의해 화학적으로 변경된다. 예를 들면, 각각의 중쇄 프레임워크 영역(H-FR1-4) 내에, 중쇄 가변 영역의 적어도 1개, 적어도 2개, 적어도 3개, 적어도 4개, 적어도 5개 또는 적어도 6개의 본래 프레임워크 영역 잔기는 아미노산 치환에 의해 변경되고, 각각의 경쇄 프레임워크 영역(L-FR1-4) 내에, 경쇄 가변 영역의 적어도 1개, 적어도 2개, 적어도 3개, 적어도 4개, 적어도 5개 또는 적어도 6개의 본래 프레임워크 영역 잔기는 아미노산 치환에 의해 변경되는 것으로 고려된다.
- [0136] 상기 기재된 경쇄 CDR3 서열을 포함하는 경쇄는 (a) 상기 기재된 경쇄 CDR1 서열 및 (b) 상기 기재된 경쇄 CDR2 서열 둘 다를 또한 포함할 수 있다.
- [0137] 상기 기재된 임의의 하나의 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체는 임의로 표 1에서 기재된 바대로 쌍을 지은 중쇄 가변 영역, 바람직하게는 표적 항원에 결합하는 중쇄 가변 영역, 가장 바람직하게는 상기 기재된 중쇄 CDR 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역을 추가로 포함할 수 있다.
- [0138] 또 다른 실시양태에서, 항체는 서열 번호 2, 서열 번호 6 및 서열 번호 10으로 이루어진 군으로부터 선택된 중쇄 가변 영역 및 서열 번호 4, 서열 번호 8 및 서열 번호 12로 이루어진 군으로부터 선택된 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0139] 관련 양태에서, 핵산 분자는 서열 번호 4, 서열 번호 8 및 서열 번호 12의 경쇄 아미노산 서열을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열 또는 이의 일부를 포함한다. 일 실시양태에서, 핵산 분자는 임의의 하나의 서열 번호 3, 서열 번호 7 및 서열 번호 11의 경쇄 뉴클레오타이드 서열 또는 이의 일부를 포함한다. 본 개시내용의 핵산 분자는 서열 번호 1, 서열 번호 3, 서열 번호 5, 서열 번호 7, 서열 번호 9 및 서열 번호 11에서의 서열을 포함하는 모든 핵산 서열을 추가로 포함하고, 핵산 서열은 본 명세서에 기재된 항체의 중쇄 및 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열 또는 본 명세서에 기재되고 서열 번호 2, 서열 번호 4, 서열 번호 6, 서열 번호 8, 서열 번호 10, 서열 번호 12 및 서열 번호 13 내지 30에 기재된 임의의 HCDR 또는 LCDR을 코딩하는 유전자 코드의 다양성에 기초한 축퇴성 코돈, 및 본 명세서에 기재된 조건과 같은 매우 엄격한 조건 하에 본 명세서에 기재된 항체의 중쇄 및 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열 또는 본 명세서에 기재되고 서열 번호 2, 서열 번호 4, 서열 번호 6, 서열 번호 8, 서열 번호 10, 서열 번호 12 및 서열 번호 13 내지 30에 기재된 임의의 HCDR 또는 LCDR을 코딩하는 핵산 서열로 하이브리드화하는 핵산을 포함한다.
- [0140] 몇몇 실시양태에서, 핵산 분자는 서열 번호 4, 서열 번호 8 및 서열 번호 12에 기재된 VL 아미노산 서열과 적어도 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 VL 아미노

산 서열을 코딩한다. 본 개시내용의 핵산 분자는 본 명세서에 기재된 조건과 같은 매우 엄격한 조건 하에 서열 번호 4, 서열 번호 8 및 서열 번호 12의 경쇄 가변 영역 아미노산 서열을 코딩하는 핵산 서열로 하이브리드화하거나, 서열 번호 3, 서열 번호 7 및 서열 번호 11의 경쇄 가변 영역 핵산 서열을 갖는 핵산을 포함한다.

[0141] 본 개시내용의 핵산 분자가 임의의 하나의 항체 XPA.42.068, XPA.42.089 및 XPA.42.681의 VH 아미노산 서열을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열 또는 이의 일부를 포함하는 것이 추가로 고려된다. 몇몇 실시양태에서, 핵산은 상기 항체의 중쇄 CDR의 아미노산 서열을 코딩한다. 몇몇 실시양태에서, 상기 부분은 중쇄 CDR1-CDR3을 포함하는 인접 부분이다. 일 실시양태에서, 상기 부분은 임의로 상이한 인간 또는 인간 공통 프레임워크와 함께 및 임의로 전체 3개의 CDR에서 1개 또는 2개 이하 또는 3개 이하의 돌연변이와 함께 적어도 1개, 2개 또는 3개의 중쇄 CDR1, CDR2 또는 CDR3 영역을 포함한다.

[0142] 관련 양태에서, 핵산 분자는 서열 번호 2, 서열 번호 6 및 서열 번호 10의 중쇄 중 하나의 중쇄 아미노산 서열을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열 또는 이의 일부를 포함한다. 일 실시양태에서, 핵산 분자는 서열 번호 1, 서열 번호 5 및 서열 번호 9의 중쇄 뉴클레오타이드 서열 또는 이의 일부를 포함한다.

[0143] 몇몇 실시양태에서, 핵산 분자는 서열 번호 2, 서열 번호 6 및 서열 번호 10에 기재된 VH 아미노산 서열과 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 VH 아미노산 서열을 코딩한다. 관련 양태에서, VH 아미노산 서열은 공통 서열이다. 본 개시내용의 핵산 분자는 본 명세서에 기재된 조건과 같은 매우 엄격한 조건 하에 서열 번호 2, 서열 번호 6 및 서열 번호 10의 중쇄 가변 영역 아미노산 서열을 코딩하는 핵산 서열에 하이브리드화하거나, 임의의 하나의 서열 번호 1, 서열 번호 5 및 서열 번호 9의 중쇄 가변 영역 핵산 서열을 갖는 핵산을 추가로 포함한다.

[0144] 본 개시내용의 핵산은 XPA.42.068, XPA.42.089 및 XPA.42.681로부터 선택된 항체의 전장 경쇄 또는 중쇄를 코딩할 수 있는 것으로 추가로 고려되고, 전장 경쇄 또는 전장 중쇄는 각각 경쇄 불변 영역 또는 중쇄 불변 영역을 포함하고, 경쇄 불변 영역은 임의로 비변형 또는 변형 카파 또는 람다 영역을 포함하고, 중쇄 불변 영역은 임의의 종류의 비변형 또는 변형 불변 영역, 예컨대 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA, IgD 또는 IgE를 포함한다.

[0145] 일 양태에서, 전장 경쇄 항체는 서열 번호 4, 서열 번호 8 및 서열 번호 12에 기재된 서열을 포함한다. 전장 경쇄를 코딩하는 뉴클레오타이드는 서열 번호 4, 서열 번호 8 및 서열 번호 12의 서열 경쇄를 코딩하고, 서열 번호 3, 서열 번호 7 및 서열 번호 11에 기재된 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 것으로 추가로 고려된다.

[0146] 일 양태에서, 전장 중쇄 항체는 임의의 하나의 서열 번호 2, 서열 번호 6 및 서열 번호 10의 서열을 포함한다. 전장 중쇄를 코딩하는 뉴클레오타이드는 서열 번호 2, 서열 번호 6 및 서열 번호 10의 서열 중쇄를 코딩하고, 임의의 하나의 서열 번호 1, 서열 번호 5 및 서열 번호 9에 기재된 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 것으로 추가로 고려된다.

[0147] 추가의 실시양태에서, 본 개시내용은 경쇄 가변 영역 및/또는 중쇄 가변 영역을 포함하는 형질전환 성장 인자 베타(TGF β)1, TGF β 2 및 TGF β 3에 결합하는 항체를 제공하고, (a) 경쇄 가변 영역은 적어도 서열 번호 16, 서열 번호 22 및 서열 번호 28로부터 선택된 CDR1 또는 이에 대해 적어도 80% 동일한 서열, 서열 번호 17, 서열 번호 23 및 서열 번호 29로부터 선택된 CDR2 또는 이에 대해 적어도 80% 동일한 서열 및/또는 서열 번호 18, 서열 번호 24 및 서열 번호 30으로부터 선택된 CDR3 또는 이에 대해 적어도 80% 동일한 서열을 포함하고/하거나; (b) 중쇄 가변 영역은 적어도 서열 번호 13, 서열 번호 19 및 서열 번호 25로부터 선택된 CDR1 또는 이에 대해 적어도 80% 동일한 서열, 서열 번호 14, 서열 번호 20 및 서열 번호 26으로부터 선택된 CDR2 또는 이에 대해 적어도 80% 동일한 서열 및/또는 서열 번호 15, 서열 번호 21 및 서열 번호 27로부터 선택된 CDR3 또는 이에 대해 적어도 80% 동일한 서열을 포함한다.

[0148] 관련 실시양태에서, 경쇄 가변 영역은 적어도 서열 번호 16으로부터 선택된 CDR1 또는 이에 대해 적어도 90% 동일한 서열, 서열 번호 17로부터 선택된 CDR2 또는 이에 대해 적어도 90% 동일한 서열 및 서열 번호 18로부터 선택된 CDR3 또는 이에 대해 적어도 90% 동일한 서열을 포함하고/하거나; 중쇄 가변 영역은 적어도 서열 번호 13으로부터 선택된 CDR1 또는 이에 대해 적어도 90% 동일한 서열, 서열 번호 14로부터 선택된 CDR2 또는 이에 대해 적어도 90% 동일한 서열 및 서열 번호 15로부터 선택된 CDR3 또는 이에 대해 적어도 90% 동일한 서열을 포함한다.

[0149] 다른 실시양태에서, 경쇄 가변 영역은 적어도 서열 번호 22로부터 선택된 CDR1 또는 이에 대해 적어도 90% 동일한 서열, 서열 번호 23으로부터 선택된 CDR2 또는 이에 대해 적어도 90% 동일한 서열 및 서열 번호 24로부터 선택된 CDR3 또는 이에 대해 적어도 90% 동일한 서열을 포함하고/하거나; 중쇄 가변 영역은 적어도 서열 번호 19

로부터 선택된 CDR1 또는 이에 대해 적어도 90% 동일한 서열, 서열 번호 20으로부터 선택된 CDR2 또는 이에 대해 적어도 90% 동일한 서열 및 서열 번호 21로부터 선택된 CDR3 또는 이에 대해 적어도 90% 동일한 서열을 포함한다.

[0150] 또 다른 실시양태에서, 경쇄 가변 영역은 적어도 서열 번호 28로부터 선택된 CDR1 또는 이에 대해 적어도 90% 동일한 서열, 서열 번호 29로부터 선택된 CDR2 또는 이에 대해 적어도 90% 동일한 서열 및 서열 번호 30으로부터 선택된 CDR3 또는 이에 대해 적어도 90% 동일한 서열을 포함하고/하거나; 중쇄 가변 영역은 적어도 서열 번호 25로부터 선택된 CDR1 또는 이에 대해 적어도 90% 동일한 서열, 서열 번호 26으로부터 선택된 CDR2 또는 이에 대해 적어도 90% 동일한 서열 및 서열 번호 27로부터 선택된 CDR3 또는 이에 대해 적어도 90% 동일한 서열을 포함한다.

[0151] 예시적인 실시양태에서, 본 개시내용의 항체는 인간 카파(κ) 또는 인간 람다(λ) 경쇄 또는 이로부터 유도된 아미노산 서열, 또는 인간 중쇄 또는 이로부터 유도된 서열, 또는 단쇄, 이합체, 사합체 또는 다른 형태와 함께 중쇄 및 경쇄 둘 다를 포함한다.

[0152] 단일클론 항체

[0153] 단일클론 항체는 실질적으로 균질 항체의 집단으로부터 얻은 항체를 의미한다. 단일클론 항체는 일반적으로 매우 특이적이고, 동일한 또는 상이한 결정기(에피토프)에 지정된 상이한 항체를 통상적으로 포함하는 종래 (다중클론) 항체 생성과 반대로 단일 항원 자리에 지정될 수 있다. 이의 특이성 이외에, 단일클론 항체는 상이한 특이성 및 특성을 갖는 다른 면역글로불린으로 오염되지 않은 균질 배양물에 의해 합성된다는 점에서 유리하다.

[0154] 단일클론 항체는 문헌[Kohler et al. (Nature, 256:495-7, 1975) (Harlow & Lane; Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, New York (1988); Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp. 59-103 (Academic Press, 1986))]에 처음 기재된 하이브리도마 방법에 의해 제조될 수 있거나, 재조합 DNA 방법(예를 들면, 미국 특허 제4,816,567호 참조)에 의해 제조될 수 있다. 단일클론 항체는 또한 예를 들면 문헌[Clackson et al., (Nature 352:624-628, 1991) 및 Marks et al., (J. Mol. Biol. 222:581-597, 1991)]에 기재된 기법을 이용하여 파지 항체 라이브러리로부터 단리될 수 있다. 단일클론 항체를 제조하는 추가의 방법은 당해 분야의 당업자에게 널리 공지되어 있다.

[0155] 상기 방법에 의해 제조된 것과 같은 단일클론 항체를, 예를 들면 단백질 A-세파로스, 소수성 상호작용 크로마토그래피(HIC), 이온 교환 크로마토그래피, 하이드록시아파타이트 크로마토그래피, 겔 전기영동, 투석 및/또는 친화도 크로마토그래피와 같은 종래 면역글로불린 정제 절차에 의해 배양 배지, 복수액(ascites fluid) 또는 혈청으로부터 적절하게 분리한다.

[0156] 당해 분야에 널리 공지되고 본 명세서에 기재된 항체의 더 작은 항원 결합 단편으로서 본 개시내용의 항체를 사용할 수 있는 것이 추가로 고려된다.

[0157] 항체 단편

[0158] 항체 단편은 온전한 전장 항체의 부분, 바람직하게는 온전한 항체의 항원 결합 또는 가변 영역을 포함한다. 항체 단편의 예는 Fab, Fab', F(ab')₂, 및 Fv 단편; 다이아바디; 선형 항체; 단쇄 항체 분자(예를 들면, scFv); 다중특이적 항체 단편, 예컨대 2중 특이적, 삼중특이적 등 항체(예를 들면, 다이아바디, 트라이바디, 테트라바디); 미니바디; 킬레이팅 재조합 항체; 트라이바디 또는 바이바디; 인트라바디; 나노바디; 작은 조절 면역 단백질(SMP), 결합 도메인 면역글로불린 융합 단백질; 카멜라이즈드 항체; VHH 함유 항체; 및 항체 단편으로부터 형성된 다른 폴리펩타이드를 포함한다. 예를 들면, 문헌[Holliger & Hudson (Nat. Biotech. 23:1126-36 (2005))]을 참조한다.

[0159] 항체의 파파인 소화는 "Fab" 단편이라 불리는 2개의 동일한 항원 결합 단편, 단일 항원 결합 자리와 함께 각각 VL, VH, CL 및 CH 도메인으로 이루어진 1가 단편, 및 잔류 "Fc" 단편(이의 명칭은 용이하게 결정화하는 이의 능력을 반영함)을 생성한다. 펩신 처리는 항체의 VH 및 VL 도메인을 포함하는 2개의 "단쇄 Fv" 또는 "scFv" 항체 단편을 갖는 힌지 영역에서 이황화 결합에 의해 연결된 2개의 Fab 단편을 포함하는 2가 단편인 F(ab')₂ 단편을 생성하고, 이 도메인은 단일 폴리펩타이드 사슬에 존재한다. 바람직하게는, Fv 폴리펩타이드는 Fv가 항원 결합에 원하는 구조를 형성하게 하여 단쇄 항체(scFv)를 생성시키는 VH 도메인과 VL 도메인 사이의 폴리펩타이드 링커를 추가로 포함하고, VL 및 VH 영역은 1가 분자가 단일 단백질 사슬로서 제조되게 하는 합성 링커를 통해 1가 분자를 형성하도록 쌍을 이룬다(Bird et al., Science 242:423-426, 1988, 및 Huston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883, 1988). scFv의 개관을 위해 문헌[Pluckthun, in The Pharmacology of

Monoclonal Antibodies, vol. 1 13, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994)]을 참조한다. Fd 단편은 VH 도메인 및 CH1 도메인으로 이루어진다.

[0160] 추가의 항체 단편은 VH 도메인으로 이루어진 도메인 항체(dAb) 단편(Ward et al., Nature 341:544-546, 1989)을 포함한다. 다이아바딘은 VH 및 VL 도메인이 단일 폴리펩타이드 사슬 상에 발현되지만, 동일한 사슬 상의 2개의 도메인 사이에 쌍을 이루기에 너무 짧은 링커(따라서, 도메인이 다른 사슬의 상보성 도메인과 쌍을 이루게 하여 2개의 항원 결합 자리를 생성함)를 사용하는 2가 항체이다(예를 들면, EP 제404,097호; WO 제93/11161호; 문헌[Holliger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448, 1993, 및 Poljak et al., Structure 2:1121-1123, 1994] 참조). 다이아바딘은 이중특이적 또는 단일특이적일 수 있다.

[0161] 경쇄가 없는 기능성 중쇄 항체는 너스 샤크(Greenberg et al., Nature 374:168-73, 1995), 위베공 상어(Nuttall et al., Mol Immunol. 38:313-26, 2001) 및 낙타과(Hamers-Casterman et al., Nature 363: 446-8, 1993; Nguyen et al., J. Mol. Biol. 275: 413, 1998), 예컨대 낙타, 단봉낙타, 알파카 및 라마에서 천연이다. 항원 결합 자리는 이 동물에서 단일 도메인, VHH 도메인으로 환원된다. 이 항체는 오직 중쇄 가변 영역을 사용하여 항원 결합 영역을 형성하고, 즉 이 기능성 항체는 오직 구조 H2L2를 갖는 중쇄의 동종이합체("중쇄 항체" 또는 "HCAb"라 칭함)이다. 카멜리드 VHH는 보고에 의하면 힌지, CH2, 및 CH3 도메인을 포함하고 CH1 도메인이 결여된 IgG2 및 IgG3 불변 영역과 조합된다(상기 문헌[Hamers-Casterman et al.]). 예를 들면, 라마 IgG1은 VH가 힌지, CH1, CH2 및 CH3 도메인을 포함하는 불변 영역과 조합된 종래(H2L2) 항체 아이소타입이고, 라마 IgG2 및 IgG3은 CH1 도메인이 결여되고 경쇄를 포함하지 않는 중쇄만의 아이소타입이다. 카멜리드 VHH 도메인은 높은 친화도로 항원에 결합하고(Desmyter et al., J. Biol. Chem. 276:26285-90, 2001), 용액 중에 높은 안정성을 유지하는 것(Ewert et al., Biochemistry 41:3628-36, 2002)으로 밝혀졌다. 통상적인 VH만의 단편은 가용성 형태로 제조하기 어렵지만, 프레임워크 잔기가 더 VHH 유사하도록 변경될 때 가용성 및 특이적 결합의 개선이 얻어질 수 있다. (예를 들면, 문헌[Reichman, et al., J Immunol Methods 1999, 231:25-38] 참조) 카멜리드 중쇄를 갖는 항체를 생성하는 방법이 예를 들면 미국 특허 공보 제20050136049호 및 제20050037421호에 기재되어 있다.

[0162] 항체 중쇄의 가변 도메인은 분자량이 오직 15kDa인 가장 작은 완전 기능성 항원 결합 단편이고, 이의 전체를 나노바디라 칭한다(Cortez-Retamozo et al., Cancer Research 64:2853-57, 2004). 문헌[Conrath et al., (Antimicrob Agents Chemother 45: 2807-12, 2001)]에 기재된 면역화된 단봉 낙타로부터 또는 문헌[Revs et al, Expert Opin. Biol. Ther. 5(1):111-24 (2005)]에 기재된 재조합 방법을 이용하여 나노바디 라이브러리를 생성할 수 있다.

[0163] 이중특이적 Fab-scFv("바이바디") 및 삼중특이적 Fab-(scFv)(2)("트라이바디")의 제조는 문헌[Schoonjans et al. (J Immunol. 165:7050-57, 2000) 및 Willems et al. (J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 786:161-76, 2003)]에 기재되어 있다. 바이바디 또는 트라이바디의 경우, scFv 분자는 VL-CL(L) 및 VH-CH1(Fd) 사슬 중 하나 또는 둘 다에 융합되어, 예를 들면 트라이바디에서 2개의 scFv가 Fab의 C 말단에 융합되고, 바이바디에서 1개의 scFv가 Fab의 C 말단에 융합된다.

[0164] 펩타이드 링커(무힌지)를 통해 또는 IgG 힌지를 통해 CH3에 융합된 scFv로 이루어진 "미니바디"가 문헌[Olafsen, et al., Protein Eng Des Sel. 17(4):315-23, 2004]에 기재되어 있다.

[0165] 인트라바딘은 세포내 발현을 나타내는 단쇄 항체이고 세포내 단백질 기능을 조작할 수 있다(Biocca, et al., EMBO J. 9:101-108, 1990; Colby et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 101:17616-21, 2004). 세포내 영역 내에 항체 구성체를 보유하는 세포 신호 서열을 포함하는 인트라바딘을 문헌[Mhashilkar et al (EMBO J 14:1542-51, 1995) 및 Wheeler et al. (FASEB J. 17:1733-5, 2003)]에 기재된 바대로 제조할 수 있다. 트랜스바딘은 단백질 형질전환 도메인(PTD)이 단쇄 가변 단편(scFv) 항체와 융합된 세포 투과성 항체이다[Heng et al., (Med Hypotheses. 64:1105-8, 2005)].

[0166] 표적 단백질에 특이적인 결합 도메인 면역글로불린 융합 단백질 또는 SMIP인 항체가 추가로 고려된다. 이 구성체는 항체 이펙터 기능을 수행하는 데 필요한 면역글로불린 도메인에 융합된 항원 결합 도메인을 포함하는 단쇄 폴리펩타이드이다. 예를 들면, WO 제03/041600호, 미국 특허 공보 제20030133939호 및 미국 특허 공보 제20030118592호를 참조한다.

[0167] 하나 이상의 CDR은 분자가 면역접착이 되도록 공유로 또는 비공유로 분자에 도입될 수 있다. 면역접착은 더 큰 폴리펩타이드 사슬의 일부로서 CDR(들)을 도입할 수 있거나, CDR(들)을 다른 폴리펩타이드 사슬에 공유 결합시

킬 수 있거나, CDR(들)을 비공유로 도입시킬 수 있다. CDR은 면역접착이 관심 대상의 특정한 항원에 특이적으로 결합하도록 한다.

[0168] 따라서, 항체의 중쇄 가변 영역 또는 경쇄 가변 영역의 1개, 2개 및/또는 3개의 CDR을 포함하는 다양한 조성물 (예를 들면, 임의로, CDR 또는 반복 사이의 스페이스 아미노산 서열과 함께, 단일 CDR 단독 또는 CDR의 2, 3, 또는 다른 다수의 중열 반복으로; 또는 2개 또는 3개의 CDR 단독의 조합 또는 중열 반복으로)을 당해 분야에 공지된 기법에 의해 생성할 수 있다.

[0169] **다중특이적 항체**

[0170] 몇몇 실시양태에서, 동일한 또는 상이한 분자의 적어도 2개의 상이한 에피토프에 대해 결합 특이성을 갖는 다중 특이적(예를 들면, 이중특이적) 항표적 항체를 생성하는 것이 바람직할 수 있다. 예시적인 이중특이적 항체는 표적 분자의 2개의 상이한 에피토프에 결합할 수 있다. 대안적으로, 표적 특이적 항체 암은 세포 방어 메커니즘이 표적에 집중하도록 세포 표면 분자, 예컨대 T 세포 수용체 분자(예를 들면, CD2 또는 CD3), 또는 IgG에 대한 Fc 수용체(FcγR), 예컨대 FcγRI(CD64), FcγRII(CD32) 및 FcγRIII(CD16)에 결합하는 암과 조합될 수 있다. 표적을 발현하거나 이를 구성하는 세포에 세포독성제를 국소화하기 위해 이중특이적 항체를 또한 사용할 수 있다. 이 항체는 표적 결합 암 및 세포독성제(예를 들면, 사포린, 항-인터페론-60, 빈카 알칼로이드, 리신 A 사슬, 메토틱렉세이트 또는 방사성 동위원소 합텐)에 결합하는 암을 보유한다. 전장 항체 또는 항체 단편(예를 들면, F(ab')₂ 이중특이적 항체)으로서 이중특이적 항체를 제조할 수 있다.

[0171] 이중특이적 항체를 제조하기 위한 다른 접근법에 따르면, 재조합 세포 배양물로부터 회수된 이중이합체의 백분율을 최대화하기 위해 항체 분자의 쌍 사이의 계면이 조작될 수 있다. 바람직한 계면은 항체 불변 도메인의 CH3 도메인의 적어도 일부를 포함한다. 이 방법에서, 제1 항체 분자의 계면으로부터의 하나 이상의 작은 아미노산 측쇄는 더 큰 측쇄(예를 들면, 티로신 또는 트립토판)로 대체된다. 큰 아미노산 측쇄를 더 작은 측쇄(예를 들면, 알라닌 또는 트레오닌)로 대체하여 제2 항체 분자의 계면에서 큰 측쇄(들)에 대한 동일한 또는 유사한 크기의 상보적 "동공"이 생성된다. 이는 다른 원치않는 최종 생성물, 예컨대 동종이합체에 대해 이중이합체의 수율을 증가시키기 위한 메커니즘을 제공한다. WO 제96/27011호 참조.

[0172] 이중특이적 항체는 상호 연결 또는 "헤테로접합체" 항체를 포함한다. 예를 들면, 헤테로접합체 내의 항체 중 하나는 아비딘에 커플링될 수 있고, 다른 하나는 바이오틴에 커플링될 수 있다. 임의의 편리한 가교결합 방법을 이용하여 헤테로접합체 항체를 제조할 수 있다. 다수의 가교결합 기법과 함께 적합한 가교결합제가 당해 분야에 널리 공지되어 있고, 미국 특허 제4,676,980호에 개시되어 있다.

[0173] 항체 단편으로부터 이중특이적 항체를 생성하는 기법은 또한 문헌에 기재되어 있다. 예를 들면, 화학 결합을 이용하여 이중특이적 항체를 제조할 수 있다. 문헌[Brennan et al., (Science 229:81-83, 1985)]은 온전한 항체가 단백질분해로 분해되어 F(ab')₂ 단편을 생성하는 절차를 기술하고 있다. 이 단편은 다이티올 착화제 아비산 나트륨의 존재 하에 환원되어 인접 다이티올을 안정화시키고 분자간 이황화물 형성을 방지한다. 이후, 생성된 Fab' 단편을 티오나이트로벤조에이트(TNB) 유도체로 전환시킨다. 이후, Fab'-TNB 유도체 중 하나를 머캅토에틸 아민에 의한 환원에 의해 Fab'-티올로 전환시키고 등몰량의 다른 Fab'-TNB 유도체와 혼합하여 이중특이적 항체를 형성한다. 제조된 이중특이적 항체를 효소의 선택적 부동화를 위한 물질로서 사용할 수 있다. 추가의 다른 실시양태에서, 이. 콜라이로부터 직접 회수된 Fab'-SH 단편을 실험실내 화학 커플링하여 이중특이적 항체를 형성할 수 있다. (Shalaby et al., J. Exp. Med. 175:217-225 (1992))

[0174] 문헌[Shalaby et al., J. Exp. Med. 175:217-225 (1992)]은 완전 인간화 이중특이적 항체 F(ab')₂ 분자의 제조를 기술하고 있다. 각각의 Fab' 단편은 이. 콜라이로부터 별도로 분리되고 실험실내 화학 커플링되어 2중 특이적 항체를 형성한다. 이렇게 형성된 이중특이적 항체는 HER2 수용체를 과발현하는 세포 및 정상 인간 T 세포에 결합하고, 인간 유방 종양 표적에 대한 인간 세포독성 림프구의 용해 활성을 촉발할 수 있다.

[0175] 재조합 세포 배양물로부터 직접적으로 이중특이적 항체 단편을 제조하고 분리하는 다양한 기법이 또한 기술되어 있다. 예를 들면, 류신 지퍼를 사용하여 이중특이적 항체를 제조한다. (Kostelny et al., J. Immunol. 148:1547-1553, 1992). 포스(Fos) 및 준(Jun) 단백질로부터의 류신 지퍼 펩타이드를 유전자 융합에 의해 2개의 상이한 항체의 Fab' 부분에 연결한다. 항체 동종이합체를 힌지 영역에서 환원시켜 단량체를 형성하고 이후 재산화시켜 항체 이중이합체를 형성한다. 항체 동종이합체의 제조를 위해 이 방법을 또한 이용할 수 있다. 문헌[Hollinger et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-48, 1993)]에 기술된 "다이하바디" 기술은 이중특이적 항체 단편을 제조하기 위한 대안적인 메커니즘을 제공한다.

- [0176] 단편은 동일한 사슬 상의 2개의 도메인 사이에 쌍을 이루기에 너무 짧은 링커에 의해 경쇄 가변 영역(VL)에 연결된 중쇄 가변 영역(VH)을 포함한다. 따라서, 1개의 단편의 VH 및 VL 도메인은 다른 단편의 상보성 VL 및 VH 도메인과 쌍을 이루게 하여, 2개의 항원 결합 자리를 형성한다. 단쇄 Fv(scFv) 이합체를 사용하여 이중특이적 항체 단편을 제조하기 위한 다른 전략이 또한 보고되어 있다. 문헌[Gruber et al., J. Immunol. 152: 5368 (1994)]을 참조한다.
- [0177] 대안적으로, 이중특이적 항체는 문헌[Zapata et al. Protein Eng. 8:1057-62 (1995)]에 기재된 바대로 제조된 "선형 항체"일 수 있다. 선형 항체는 항원 결합 영역의 쌍을 형성하는 탭던 Fd 분절(VH -CH1-VH -CH1)의 쌍을 포함한다. 선형 항체는 이중특이적 또는 단일특이적일 수 있다.
- [0178] 추가의 실시양태에서, 이중특이적 항체는 킬레이팅 재조합 항체(chelating recombinant antibody: CRAb)일 수 있다. 킬레이팅 재조합 항체는 표적 항원의 인접하고 비중첩하는 에피토프를 인식하고, 에피토프 둘 다에 동시에 결합하기에 충분히 가요성이다(Neri et al., J Mol Biol. 246:367-73, 1995).
- [0179] 2 초과와 원자가를 갖는 항체가 또한 고려된다. 예를 들면, 삼중특이적 항체를 제조할 수 있다. (Tutt et al., J. Immunol. 147:60, 1991).
- [0180] **키메라 및 인간화 항체**
- [0181] 키메라 또는 인간화 항체가 모 비인간(예를 들면, 마우스) 단일클론 항체보다 인간에서 덜 면역원성이므로, 아나필락시스의 훨씬 덜한 위험을 갖는 인간의 치료에 이것을 사용할 수 있다.
- [0182] 당해 분야에 공지된 표준 절차(문헌[Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 6841-6855 (1984); 및 Boulianne et al, Nature 312, 643-646, (1984)] 참조)를 사용하여 비인간(예를 들면, 마우스) 단일클론 항체의 가변 Ig 도메인이 인간 불변 Ig 도메인에 융합된 키메라 단일클론 항체를 생성할 수 있다.
- [0183] 예를 들면, (1) 인간 프레임워크 및 불변 영역에 대한 비인간 상보성 결정 영역(CDR)의 그래프팅("CDR 그래프팅"을 통한 인간화라 당해 분야에서 칭하는 과정), (2) 전체 비인간 가변 도메인을 이식하지만, 표면 잔기의 대체에 의해 이를 인간 유사 표면으로 만드는 "클로킹(cloaking)"("비니어링(veneering)"이라 당해 분야에서 칭하는 과정), 또는 대안적으로, (3) 항원 결합 또는 단백질 폴딩에 부정적으로 영향을 미칠 것 같지 않지만, 인간 환경(예를 들면, 휴먼 엔지니어드(HUMAN ENGINEERING)(상표명))에서 면역원성을 감소시킬 것 같은 것으로 결정된 위치에서 인간 아미노산의 치환을 비롯한 다양한 방법에 의해 인간화 항체를 성취할 수 있다. 본 개시내용에서, 인간화 항체는 "인간화", "비니어링된" 및 "휴먼 엔지니어드(상표명)" 항체 둘 다를 포함한다. 이 방법은 예를 들면 문헌[Jones et al., Nature 321:522 525 (1986); Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 81:6851-6855 (1984); Morrison and Oi, Adv. Immunol., 44:65-92 (1988); Verhoeyer et al., Science 239:1534-1536 (1988); Padlan, Molec. Immun. 28:489-498 (1991); Padlan, Molec. Immunol. 31:169-217 (1994); Studnicka et al. U.S. Patent No. 5,766,886; Studnicka et al., (Protein Engineering 7: 805-814, 1994; Co et al., J. Immunol. 152, 2968-2976 (1994); Riechmann, et al., Nature 332:323-27 (1988); 및 Kettleborough et al., Protein Eng. 4:773-783 (1991)](이들 각각은 본 명세서에 참조문헌으로 포함됨)에 개시되어 있다.
- [0184] CDR 그래프팅은 마우스 중쇄 및 경쇄 가변 Ig 도메인으로부터의 하나 이상의 6개의 CDR을 인간 가변 Ig 도메인의 적절한 4개의 프레임워크 영역으로 도입하는 것을 포함한다. 이 기법(Riechmann, et al., Nature 332:323-27 (1988))은 항원과 1차 접촉하는 CDR 루프를 지지하기 위한 스캐폴드로서 보존된 프레임워크 영역(FR1-FR4)을 사용한다. 그러나, CDR 그래프팅의 단점은, 프레임워크 영역의 아미노산이 항원 결합에 기여할 수 있고, CDR 루프의 아미노산이 2개의 가변 Ig 도메인의 연결에 영향을 미칠 수 있으므로, 이것이 원래 마우스 항체보다 실질적으로 낮은 결합 친화도를 갖는 인간화 항체를 생성시킬 수 있다는 것이다. 인간화 단일클론 항체의 친화도를 유지시키기 위해, 원래 마우스 항체의 프레임워크 영역과 가장 밀접하게 닮은 인간 프레임워크 영역을 선택함으로써 그리고 항원 결합 자리의 컴퓨터 모델링에 의해 보존된 프레임워크 또는 CDR 내의 단일 아미노산의 자리 지정 돌연변이에 의해 CDR 그래프팅 기법을 개선할 수 있다(예를 들면, Co et al., J. Immunol. 152, 2968-2976 (1994)).
- [0185] **형질전환 동물로부터의 인간 항체**
- [0186] 내인성 면역글로불린 제조를 갖지 않고 인간 면역글로불린 유전자위를 포함하도록 조작된 형질전환 동물을 사용하여 표적 단백질에 대한 인간 항체를 또한 제조할 수 있다. 예를 들면, WO 제98/24893호는 동물이 내인성 중쇄

및 경쇄 유전좌위의 불활성화로 인해 기능성 내인성 면역글로불린을 생성하지 않는 인간 Ig 유전좌위를 갖는 형질전환 동물을 개시하고 있다. WO 제91/00906호는 또한 면역원에 대한 면역 반응을 봉입할 수 있는 형질전환 비영장류 포유동물 숙주를 개시하고 있고, 여기서 항체는 영장류 불변 및/또는 가변 영역을 갖고, 유전좌위를 코딩하는 내인성 면역글로불린은 치환되거나 불활성화된다. WO 제96/30498호 및 미국 특허 제6,091,001호는 포유동물에서 면역글로불린 유전좌위를 변형하기 위한, 예컨대 변형된 항체 분자를 형성하기 위해 불변 또는 가변 영역의 전부 또는 일부를 대체하기 위한 Cre/Lox 시스템의 사용을 개시하고 있다. WO 제94/02602호는 불활성화된 내인성 Ig 유전좌위 및 기능성 인간 Ig 유전좌위를 갖는 비인간 포유동물 숙주를 개시하고 있다. 미국 특허 제5,939,598호는 마우스가 내인성 중쇄가 결여되고, 하나 이상의 이중 불변 영역을 포함하는 외인성 면역글로불린 유전좌위를 발현하는 형질전환 마우스를 제조하는 방법을 개시하고 있다. 또한, 미국 특허 제6,114,598호, 제6,657,103호 및 제6,833,268호를 참조한다.

[0187] 상기 기재된 형질전환 동물을 사용하여, 면역 반응은 선택된 항원 분자로 제조될 수 있고, 항체 생성 세포는 동물로부터 제거되고 인간 단일클론 항체를 분비하는 하이브리도마를 제조하기 위해 사용될 수 있다. 면역화 프로토콜, 아유번트 등은 당해 분야에 공지되어 있고, 예를 들면 WO 제96/33735에 기재된 형질전환 마우스의 면역화에 이용된다. 이 공보는 IL-6, IL-8, TNF α , 인간 CD4, L 셀렉틴, gp39, 및 과산화 독소를 포함하는 다양한 항원 분자에 대한 단일클론 항체를 개시하고 있다. 상응하는 단백질의 생물학적 활성 또는 생리학적 효과를 억제하거나 중화시키는 능력에 대해 단일클론 항체를 시험할 수 있다. WO 제96/33735는 IL-8로 면역화된 형질전환 마우스의 면역 세포로부터 유도된 IL-8에 대한 단일클론 항체가 호중구의 IL-8 유도 기능을 차단하는 것을 개시하고 있다. 형질전환 동물을 면역화하기 위해 사용된 항원에 대한 특이성을 갖는 인간 단일클론 항체가 또한 WO 제96/34096호 및 미국 특허 출원 제20030194404호; 및 미국 특허 출원 제20030031667호에 개시되어 있다.

[0188] 단일클론 항체를 제조하기 위해 유용한 추가의 형질전환 동물은 인간 항체의 중쇄 및 경쇄를 코딩하는 재배열되지 않은 인간 항체 유전자로부터의 유전자 서열을 포함하는 미국 특허 제5,770,429호 및 문헌[Fishwild, et al. (Nat. Biotechnol. 14:845-851 (1996))]에 기재된 메다렉스 휴맵-마우스(Medarex HuMAb-MOUSE)(등록상표)를 포함한다. 휴맵-마우스(등록상표)의 면역화는 표적 단백질에 대한 완전 인간 단일클론 항체의 제조가 가능하게 한다.

[0189] 또한, 문헌[Ishida et al. (Cloning Stem Cells. 4:91-102 (2002))]은 인간 DNA의 메가염기 크기의 분절을 포함하고 전체 인간 면역글로불린(hIg) 유전좌위가 도입된 트랜스크로모 마우스(TransChromo Mouse)(티씨마우스(TCMOUSE)(상표명))를 기술하고 있다. 티씨마우스(상표명)는 IgG의 모든 하위종류(IgG1-G4)를 포함하여 hIg의 완전 다양한 레퍼토리를 갖는다. 다양한 인간 항원에 의한 티씨마우스(상표명)의 면역화는 인간 항체를 포함하는 항체 반응을 생성한다.

[0190] 또한, 문헌[Jakovovits et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:2551 (1993); Jakovovits et al., Nature, 362:255-258 (1993); Bruggermann et al., Year in Immunol., 7:33 (1993)]; 및 미국 특허 제5,591,669호, 미국 특허 제5,589,369호, 미국 특허 제5,545,807호; 및 미국 특허 공보 제20020199213호를 참조한다. 미국 특허 공보 제20030092125호는 원하는 에피토프에 동물의 면역 반응을 바이어싱하는 방법을 기재하고 있다. 실험실내 활성화 B 세포에 의해 인간 항체를 또한 생성할 수 있다(미국 특허 제5,567,610호 및 제5,229,275호 참조).

[0191] 디스플레이 기술로부터의 인간 항체

[0192] 제조할 인간 항체 유전자의 레퍼토리를 제조하는 기술 개발, 및 사상 박테리오파지의 표면 상의 코딩된 항체 단편의 디스플레이는 인간 항체를 직접적으로 제조하는 수단을 제공한다. 파지 기술에 의해 제조된 항체는 박테리아 중에 항원 결합 단편-보통 Fv 또는 Fab 단편-으로 제조되고, 따라서 이펙터 기능이 결여된다. 이펙터 기능을 2의 전략 중 하나로 도입할 수 있다: 예를 들면, 포유동물 세포에서 발현을 위해 완전 항체로, 또는 이펙터 기능을 촉발할 수 있는 제2 결합 자리를 갖는 이중특이적 항체 단편으로 단편을 조작할 수 있다.

[0193] 본 개시내용은 파지 상에 인간 항체의 라이브러리를 합성하는 단계, 표적 단백질 또는 이의 일부를 갖는 라이브러리를 스크리닝하는 단계, 표적에 결합하는 파지를 분리하는 단계 및 파지로부터 항체를 얻는 단계를 포함하는 표적 특이적 항체 또는 이의 항원 결합 일부를 제조하는 방법을 고려한다. 예의 방식으로, 파지 디스플레이 기법에서 사용하기 위한 항체의 라이브러리를 제조하기 위한 하나의 방법은 인간 면역글로불린 유전좌위를 포함하는 비인간 동물을 표적 항원 또는 이의 항원 일부로 면역화하여 면역 반응을 생성하는 단계, 면역화된 동물로부터 항체 생성 세포를 추출하는 단계; 추출된 세포로부터 RNA를 분리하는 단계, RNA를 역전사하여 cDNA를 생성하는 단계, 프라이머를 사용하여 cDNA를 증폭하는 단계, 및 파지 디스플레이 벡터로 cDNA를 삽입하여 항체가 파지 상에 발현되게 하는 단계를 포함한다. 본 개시내용의 제조할 표적 특이적 항체를 이러한 방식으로 얻을 수

있다.

- [0194] 다른 예에서, 항체 생성 세포를 비면역화된 동물로부터 추출하고, 추출된 세포로부터 RNA를 단리하고 역전사하여 cDNA를 생성하여, 프라이머를 사용하여 증폭시키고, 파지 디스플레이 벡터로 삽입하여 항체가 파지 상에 발현될 수 있다. 파지-디스플레이 과정은 사상 박테리오파지의 표면 상의 항체 래퍼토리의 디스플레이를 통한 면역 선택 및 선택의 항원에 대한 이의 결합에 의한 파지의 후속 선택을 모방한다. 이러한 하나의 기법은 이러한 접근법을 이용한 MPL 및 msk 수용체에 대한 고친화도 및 기능성 효현 항체의 단리를 기술하고 있는 WO 제 99/10494호에 기재되어 있다. 재조합 조합 항체 라이브러리, 바람직하게는 인간 림프구로부터 유도된 mRNA로부터 제조된 인간 VL 및 VH cDNA를 사용하여 제조된 scFv 파지 디스플레이 라이브러리를 스크리닝하여 본 개시내용의 항체를 단리할 수 있다. 이러한 라이브러리를 제조하고 스크리닝하는 방법론이 당해 분야에 공지되어 있다. 예를 들면, 미국 특허 제5,969,108호를 참조한다. 이는 파지 디스플레이 라이브러리를 생성하기 위한 상업적으로 구입 가능한 키트(예를 들면, 과마시아 재조합 파지 항체 시스템(Pharmacia Recombinant Phage Antibody System), 카탈로그 27-9400-01호; 및 스트라타진(Stratagene) SurfZAP.TM. 파지 디스플레이 키트, 카탈로그 240612호)이다. 항체 디스플레이 라이브러리를 생성하고 스크리닝하는 데 사용할 수 있는 다른 방법 및 시약이 또한 있다(예를 들면, 라드너(Ladner) 등의 미국 특허 제5,223,409호; 강(Kang) 등의 PCT 공보 WO 제 92/18619호; 도워(Dower) 등의 PCT 공보 WO 제91/17271호; 윈터(Winter) 등의 PCT 공보 WO 제92/20791호; 마크랜드(Markland) 등의 PCT 공보 WO 제92/15679호; 브레이틀링(Breitling) 등의 PCT 공보 WO 제93/01288호; 맥카퍼티(McCafferty) 등의 PCT 공보 WO 제92/01047호; 가라드(Garrard) 등의 PCT 공보 WO 제92/09690호; 문헌 [Fuchs et al. (1991) Bio/Technology 9:1370-1372; Hay et al. (1992) Hum. Antibod. Hybridomas 3:81-85; Huse et al. (1989) Science 246:1275-1281; McCafferty et al., Nature (1990) 348:552-554; Griffiths et al. (1993) EMBO J 12:725-734; Hawkins et al. (1992) J. Mol. Biol. 226:889-896; Clackson et al. (1991) Nature 352:624-628; Gram et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:3576-3580; Garrad et al. (1991) Bio/Technology 9:1373-1377; Hoogenboom et al. (1991) Nuc Acid Res 19:4133-4137; 및 Barbas et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:7978-7982] 참조).
- [0195] 일 실시양태에서, 원하는 특성을 갖는 표적 항원에 대해 특이적인 인간 항체를 단리하기 위해, 원하는 특이성을 갖는 항체 단편을 선택하기 위해 인간 VH 및 VL 라이브러리를 스크리닝한다. 이 방법에서 사용된 항체 라이브러리는 바람직하게는 본 명세서와 당해 분야(맥카퍼티 등의 PCT 공보 WO 제92/01047호, McCafferty et al., (Nature 348:552-554 (1990)); 및 Griffiths et al., (EMBO J 12:725-734 (1993))에 기재된 바대로 제조되고 스크리닝된 scFv 라이브러리이다. 항원으로서 표적 단백질을 사용하여 scFv 항체 라이브러리를 바람직하게는 스크리닝한다.
- [0196] 대안적으로, 항체의 Fd 단편(VH-CH1) 및 경쇄(VL-CL)를 PCR에 의해 별도로 클로닝하고 조합 파지 디스플레이 라이브러리에서 무작위로 재조합하고, 이후 특정한 항원에 대한 결합에 이 라이브러리를 선택할 수 있다. Fab 단편은 파지 표면 상에 발현되고, 즉 이를 코딩하는 유전자에 물리적으로 연결된다. 따라서, 항원 결합에 의한 Fab의 선택은 후속하여 증폭될 수 있는 Fab 코딩 서열을 동시 선택한다. 패닝이라 칭하는 절차인 항원 결합 및 재증폭의 여러 회차를 통해, 항원에 특이적인 Fab를 풍부화시키고 최종 단리시킨다.
- [0197] 1994년에, "지시 선택"이라 칭하는 항체의 인간화에 대한 접근법이 기술되어 있다. 지시 선택은 마우스 단일클론 항체의 인간화를 위한 파지 디스플레이 기법의 파워를 이용한다(문헌[Jespers, L. S., et al., Bio/Technology 12, 899-903 (1994)] 참조). 이를 위해, 마우스 단일클론 항체의 Fd 단편은 인간 경쇄 라이브러리와 조합되어 디스플레이될 수 있고, 이후 항원을 갖는 생성된 하이브리드 Fab 라이브러리를 선택할 수 있다. 이에 의해 마우스 Fd 단편은 선택을 지시하는 주형을 제공한다. 후속하여, 선택된 인간 경쇄는 인간 Fd 단편 라이브러리와 조합된다. 생성된 라이브러리의 선택은 전부 인간 Fab를 생성한다.
- [0198] 파지-디스플레이 라이브러리로부터 인간 항체를 유도하기 위한 다양한 절차가 기재되어 있다(예를 들면, 문헌 [Hoogenboom et al., J. Mol. Biol., 227:381 (1991); Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991); 미국 특허 제5,565,332호 및 제5,573,905호; Clackson, T., and Wells, J. A., TIBTECH 12, 173-184 (1994)] 참조). 특히, 파지 디스플레이 라이브러리로부터 유도된 항체의 실험실내 선택 및 진화는 강력한 도구가 될 수 있다(문헌[Burton, D. R., and Barbas III, C. F., Adv. Immunol. 57, 191-280 (1994); Winter, G., et al., Annu. Rev. Immunol. 12, 433-455 (1994)]; 미국 특허 공보 제20020004215호 및 WO 제92/01047호; 미국 특허 공보 제20030190317호; 및 미국 특허 제6,054,287호 및 제5,877,293호 참조).
- [0199] 문헌[Watkins, "Screening of Phage-Expressed Antibody Libraries by Capture Lift," Methods in Molecular

Biology, Antibody Phage Display: Methods and Protocols 178:187-193 (2002)], 및 2003년 3월 6일에 공개된 미국 특허 공보 제20030044772호는 포획 부유(lift)에 의해 파지 발현된 항체 라이브러리 또는 다른 결합 분자를 스크리닝하는 방법을 기술하고 있고, 이 방법은 고체 지지체 상의 후보자 결합 분자의 부동화를 포함한다.

- [0200] (예를 들면, M13 유전자 III을 갖는) 파지 단백질 융합으로서 발현된 하나의 사슬을 가용성 단편으로서 발현된 상보성 사슬과 연결하여 파지 표면 상에 Fv 단편이 디스플레이된다. I형 파지: fd, M13, f1, If1, lke, ZJ/Z, Ff 중 하나 및 II형 파지 Xf, Pf1 및 Pf3 중 하나와 같은 사상 파지일 수 있는 것으로 고려된다. 파지는 M13, 또는 fd 또는 이들의 유도체일 수 있다.
- [0201] 초기 인간 VL 및 VH 분절이 선택되면, 표적 결합에 대해 초기 선택된 VL 및 VH 분절의 상이한 쌍이 스크리닝되는 "믹스 앤드 매치" 실험을 바람직한 VL/VH 쌍 조합을 선택하기 위해 수행한다. 추가로, 항체의 질을 추가로 개선하기 위해, 천연 면역 반응 동안 항체의 친화도 성숙을 담당하는 생체내 체세포 돌연변이 과정과 유사한 과정으로 바람직하게는 VH 및/또는 VL의 임의의 CDR1, CDR2 또는 CDR3 영역 내에 바람직한 VL/VH 쌍(들)의 VL 및 VH 분절을 무작위로 돌연변이시킬 수 있다. 각각 VH CDR1, CDR2, 및 CDR3, 또는 VL CDR1, CDR2, 및 CDR3에 상보성인 PCR 프라이머(프라이머에 특정한 위치에서 4개의 뉴클레오타이드 염기의 랜덤 혼합물이 "스파이킹"되어 생성된 PCR 생성물이 랜덤 돌연변이가 VH 및/또는 VL CDR3 영역에 도입된 VL 및 VH 분절을 코딩함)를 사용하여 VL 및 VH 영역을 증폭하여 이 실험실내 친화도 성숙을 성취할 수 있다. 표적 항원에 대한 결합에 대해 이러한 무작위로 돌연변이된 VL 및 VH 분절을 재스크리닝할 수 있다.
- [0202] 제조한 면역글로불린 디스플레이 라이브러리로부터의 표적 특이적 항체의 스크리닝 및 단리 후, 선택된 항체를 코딩하는 핵산을 디스플레이 패키지(예를 들면, 파지 게놈)로부터 회수하고, 표준 제조한 DNA 기법에 의해 다른 발현 벡터로 서브클로닝할 수 있다. 원하는 경우, 하기 기재된 바대로 본 개시내용의 다른 항체 형태를 생성하기 위해 핵산을 추가로 조작할 수 있다. 조합 라이브러리를 스크리닝하여 단리된 제조한 인간 항체를 단리하기 위해, DNA 코딩 항체를 제조한 발현 벡터로 클로닝하고 본 명세서에 기재된 바대로 포유동물 숙주 세포에 도입한다.
- [0203] 박테리아 또는 숙주 세포의 뮤테이터 군주에서 파지 디스플레이 방법을 수행할 수 있다는 것이 고려된다. 뮤테이터 군주는 이 내부에 복제된 DNA가 이의 모 DNA와 관련하여 돌연변이되게 하는 유전 결함을 갖는 숙주 세포이다. 뮤테이터 군주의 예는 NR9046mutD5 및 NR9046 mut T1이다.
- [0204] 헬퍼 파지를 사용하여 파지 디스플레이 방법을 수행할 수 있다는 것이 또한 고려된다. 이는 결합 파지 게놈을 포함하는 세포를 감염시키기 위해 사용되고 보체 결합에 기능하는 파지이다. 결합 파지 게놈은 제거된 유전자 서열을 코딩하는 여러 기능을 갖는 파지 또는 파지미드일 수 있다. 헬퍼 파지의 예는 M13K07, M13K07 유전자 III 3호; 및 캡시드 단백질에 융합된 결합 분자를 디스플레이하거나 코딩하는 파지이다.
- [0205] H 사슬 또는 L 사슬 클론을 포함하는 개별 콜로니가 다른 사슬(L 또는 H)을 코딩하는 클론의 완전 라이브러리를 감염시키기 위해 사용되고, 생성된 2개의 사슬 특이적 결합 구성원이 이 공보에 기재된 것과 같은 파지 디스플레이 기법에 따라 선택되는, WO 제92/01047호에 개시된 계층적 이중 조합 접근법을 이용하여 파지 디스플레이 스크리닝 방법을 통해 항체를 또한 생성한다. 이 기법이 문헌[Marks et al, (Bio/Technology, 10:779-783 (1992))]에 또한 개시되어 있다.
- [0206] 효모, 미생물 및 포유동물 세포의 표면 상의 펩타이드의 디스플레이를 위한 방법이 항원 특이적 항체를 확인하기 위해 또한 사용된다. 예를 들면, 미국 특허 제5,348,867호; 제5,723,287호; 제6,699,658호; 문헌[Wittrup, Curr Op. Biotech. 12:395-99 (2001); Lee et al, Trends in Biotech. 21(1) 45-52 (2003); Surgeeva et al, Adv. Drug Deliv. Rev. 58: 1622-54 (2006)]을 참조한다. 면역계에서 B 세포에 의한 항체의 세포 표면 디스플레이를 효과적으로 모방하는 응집소와 같은 효모 단백질에 항체 라이브러리를 부착할 수 있다.
- [0207] 파지 디스플레이 방법 이외에, 리보솜 디스플레이 및 mRNA 디스플레이를 포함하는 실험실내 디스플레이 방법 및 미생물 세포 디스플레이를 이용하여 항체를 단리할 수 있다(Amstutz et al, Curr. Op. Biotech. 12: 400-05 (2001)). 리보솜 디스플레이를 이용하는 폴리펩타이드의 선택이 문헌[Hanes et al., (Proc. Natl Acad Sci USA, 94:4937-4942 (1997))] 및 카와사키(Kawasaki)에 허여된 미국 특허 제5,643,768호 및 제5,658,754호에 기술되어 있다. 리보솜 디스플레이는 항체의 신속한 대규모 돌연변이 분석에 또한 유용하다. 선택적 돌연변이 접근법은 또한 리보솜 디스플레이 기법을 이용하여 선택될 수 있는 활성이 개선된 항체를 제조하는 방법을 제공한다.
- [0208] 아미노산 서열 변이체

- [0209] 항체의 1개, 2개, 3개, 4개, 5개 및/또는 6개의 CDR을 포함하는 변형된 폴리펩타이드 조성물이 생성되는 것으로 고려되고, CDR은 표적 분자에 증가된 특이성 또는 친화도를 제공하도록 변경된다. 예를 들면, 처음에 보존적 선택(예를 들면, 비동일한 소수성 아미노산에 치환된 소수성 아미노산), 이어서 더 불유사한 선택(예를 들면, 하전된 아미노산에 치환된 소수성 아미노산)으로 치환하여 항체 CDR 내의 자리를 통상적으로 연속하여 변형시키고, 이후 표적 자리에서 결실 또는 삽입을 만들 수 있다. 예를 들면, CDR을 둘러싸는 보존된 프레임워크 서열을 사용하여, 프라이머 영역 사이에 위치한 항원 특이적 CDR 서열을 증폭하기 위해 이 공통 서열에 상보성인 PCR 프라이머를 생성한다. 뉴클레오타이드 및 폴리펩타이드 서열을 클로닝하고 발현하기 위한 기법이 당해 분야에 널리 확립되어 있다[예를 들면, 문헌[Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Edition, Cold Spring Harbor, New York (1989)] 참조]. 증폭된 CDR 서열을 적절한 플라스미드에 결합한다. 1개, 2개, 3개, 4개, 5개 및/또는 6개의 클로닝된 CDR을 포함하는 플라스미드는 CDR에 연결된 영역을 코딩하는 추가의 폴리펩타이드를 임의로 포함한다.
- [0210] 원래 항원에 대한 결합 친화도에 대해 변형된 CDR을 포함하는 항체 물질을 스크리닝한다. 추가로, 표적 항원의 활성을 중화하는 이의 능력에 대해 항체 또는 폴리펩타이드를 추가로 시험한다. 예를 들면, 표적 항원의 생물학적 활성을 방해하는 이의 능력을 결정하기 위해 실시예에 기재된 바대로 본 개시내용의 항체를 분석할 수 있다.
- [0211] 하기 더 자세히 기재된 보존적 또는 비보존적 아미노산 치환에 의해 변형을 만들 수 있다. "삽입" 또는 "결실"은 바람직하게는 약 1개 내지 20개의 아미노산, 더 바람직하게는 1개 내지 10개의 아미노산 범위이다. 재조합 DNA 기법을 이용하여 항체 폴리펩타이드 분자에서 아미노산의 치환을 체계적으로 만들고 활성에 대해 생성된 재조합 변이체를 평가하여 변이를 도입할 수 있다. 상이한 종으로부터 핵산이 다른 자리(가변 위치)에서 또는 매우 보존된 영역(불변 영역)에서 핵산 변경을 만들 수 있다. 항체 서열을 변경하고 본 개시내용에 유용한 항체 폴리펩타이드 조성물을 발현시키는 방법이 하기 더 자세히 기재되어 있다.
- [0212] 아미노산 서열 삽입은 1개의 잔기로부터 100개 이상의 잔기를 포함하는 폴리펩타이드로의 길이 범위의 아미노산 및/또는 카복실 말단 융합, 및 단일 또는 다수의 아미노산 잔기의 인트라-서열 삽입을 포함한다. 말단 삽입의 예는 N 말단 메티오닐 잔기를 갖는 항체 또는 에피토프 태그 또는 셀비지 수용체 에피토프에 융합된 항체(항체 단편 포함)를 포함한다. 항체 분자의 다른 삽입 변이체는 예를 들면 N 말단 또는 C 말단에서 항체의 혈청 반감기를 증가시키는 폴리펩타이드에 대한 융합을 포함한다.
- [0213] 용어 "태그된 에피토프"는 에피토프 태그에 융합된 항체를 의미한다. 에피토프 태그 폴리펩타이드는 이에 대한 항체가 제조될 수 있는 에피토프를 제공하기에 충분히 잔기를 갖지만, 항체의 활성을 간섭하지 않도록 충분히 짧다. 에피토프 태그는 바람직하게는 이에 대한 항체가 다른 에피토프와 실질적으로 상호 작용하지 않도록 충분히 독특하다. 적합한 태그 폴리펩타이드는 일반적으로 적어도 6개의 아미노산 잔기 및 보통 약 8개 내지 50개의 아미노산 잔기(바람직하게는 약 9개 내지 30개의 잔기)를 갖는다. 예는 감기 헤마글루티닌(HA) 태그 폴리펩타이드 및 이의 항체 12CA5(Field et al., Mol. Cell. Biol. 8: 2159-2165 (1988)); c-myc 태그 및 이에 대한 8F9, 3C7, 6E10, G4, B7 및 9E10 항체(Evan et al., Mol. Cell. Biol. 5:3610-16 (1985)); 및 단순 포진 바이러스 당단백질 D(gD) 태그 및 이의 항체(Paborsky et al., Protein Engineering 3:547-53 (1990))를 포함한다. 다른 예시적인 태그는 니켈 킬레이팅을 이용하여 라벨링된 화합물의 단리를 허용하는 폴리-히스티딘 서열, 일반적으로 대략 6개의 히스티딘 잔기이다. 당해 분야에 널리 공지되어 있고 통상 사용되는 플래그(FLAG)(등록상표) 태그(미국 뉴욕주 로체스터에 소재하는 이스트만 코닥(Eastman Kodak))와 같은 다른 라벨 및 태그가 본 개시내용에 포함된다.
- [0214] 본 명세서에 사용된 용어 "셀비지 수용체 결합 에피토프"는 IgG 분자의 생체내 혈청 반감기의 증가를 담당하는 IgG 분자(예를 들면, IgG1, IgG2, IgG3, 또는 IgG4)의 Fc 영역의 에피토프를 의미한다.
- [0215] 다른 유형의 변이체는 아미노산 치환 변이체이다. 이 변이체는 제거된 항체 분자에서 적어도 하나의 아미노산 잔기 및 그 자리에 삽입된 상이한 잔기를 갖는다. 임의의 초가변 또는 CDR 영역 또는 프레임워크 영역 내의 치환 돌연변이가 고려된다. 보존적 치환은 아미노산을 이의 종류의 다른 구성원으로 대체하는 것을 포함한다. 비보존적 치환은 이 종류의 하나의 구성원을 다른 종류의 구성원으로 대체하는 것을 포함한다.
- [0216] 관여된 잔기의 극성, 전하, 용해도, 소수화도, 친수화도 및/또는 양친매성 성질의 유사성에 기초하여 보존적 아미노산 치환을 만들 수 있다. 예를 들면, 비극성(소수성) 아미노산은 알라닌(Ala, A), 류신(Leu, L), 아이소류신(Ile, I), 발린(Val, V), 프롤린(Pro, P), 페닐알라닌(Phe, F), 트립토판(Trp, W), 및 메티오닌(Met, M)을 포함하고; 극성 중성 아미노산은 글라이신(Gly, G), 세린(Ser, S), 트레오닌(Thr, T), 시스테인(Cys, C), 티로신(Tyr, Y), 아스파라긴(Asn, N), 및 글루타민(Gln, Q)을 포함하고; 양으로 하전된(염기성) 아미노산은 아르기

닌(Arg, R), 라이신(Lys, K), 및 히스티딘(His, H)을 포함하고; 음으로 하전된(산성) 아미노산은 아스파르트산(Asp, D) 및 글루탐산(Glu, E)을 포함한다.

[0217] 항체의 적절한 입체형태를 유지시키는 데 관여하지 않은 임의의 시스테인 잔기를 또한 일반적으로 세린으로 치환하여 분자의 산화 안정성을 개선하고 비정상 가교결합을 방지할 수 있다. 반대로, 시스테인 결합(들)을 항체에 첨가하여 (특히 항체가 항체 단편, 예컨대 Fv 단편인 경우) 이의 안정성을 개선할 수 있다.

[0218] 친화도 성숙

[0219] 친화도 성숙은 일반적으로 모 항체의 CDR 내에 치환을 갖는 항체 변이체를 제조하고 스크리닝하는 것 및 모 항체에 비해 하나 이상의 개선된 생물학적 특성, 예컨대 결합 친화도를 갖는 변이체를 선택하는 것을 포함한다. 이러한 치환 변이체를 생성하기 위한 편리한 방식은 파지 디스플레이를 사용한 친화도 성숙이다. 간단히 말하면, 각각의 자리에서 모든 가능한 아미노 치환을 생성하기 위해 여러 초가변 영역 자리(예를 들면, 6개 내지 7개의 자리)를 돌연변이시킬 수 있다. 각각의 입자 내에 패키징된 M13의 유전자 III 생성물에 대한 융합으로서 사상 파지 입자로부터 1가 방식으로 이렇게 생성된 항체 변이체를 디스플레이한다. 이후, 파지 디스플레이된 변이체를 이의 생물학적 활성(예를 들면, 결합 친화도)을 위해 스크리닝한다. 예를 들면, WO 제92/01047호, WO 제93/112366호, WO 제95/15388호 및 WO 제93/19172호를 참조한다.

[0220] 현재의 항체 친화도 성숙 방법은 확률론적 및 비확률론적의 2개의 돌연변이 카테고리에 속한다. 오류 유발 PCR, 뮤테이터 박테리아 균주(Low et al., J. Mol. Biol. 260, 359-68 (1996) Irving et al., Immunotechnology 2, 127-143 (1996)), 및 포화 돌연변이(Nishimiya et al., J. Biol. Chem. 275:12813-20 (2000); Chowdhury, P. S. Methods Mol. Biol. 178, 269-85 (2002))는 확률론적 돌연변이 방법의 통상적인 예이다(Rajpal et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 102:8466-71 (2005)). 비확률론적 기법은 대개 특이적 변이체의 제한된 수집을 생성하기 위해 알라닌-스캐닝 또는 자리 지정 돌연변이를 이용한다. 여러 방법이 하기 추가로 자세히 기재되어 있다.

[0221] 패닝 방법을 통한 친화도 성숙 - 감소한 양의 항원의 존재 하에 후보자 항체의 여러 회차의 패닝을 통해 제조합 항체의 친화도 성숙을 보통 수행한다. 회차마다 항원의 양의 감소는 항원에 가장 높은 친화도로 항체를 선택하여 출발 물질의 큰 풀로부터 고친화도의 항체를 생성한다. 패닝을 통한 친화도 성숙은 당해 분야에 널리 공지되어 있고, 예를 들면 문헌[Huls et al. (Cancer Immunol Immunother. 50:163-71 (2001))]에 기재되어 있다. 파지 디스플레이 기술을 이용한 친화도 성숙의 방법은 본 명세서에서 다른 곳에 기재되어 있고 당해 분야에 공지되어 있다(예를 들면, 문헌[Daugherty et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 97:2029-34 (2000)] 참조).

[0222] 룩쓰루 돌연변이 - 룩쓰루 돌연변이(Look-through mutagenesis: LTM)(Rajpal et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 102:8466-71 (2005))는 항체 결합 자리를 신속히 맵핑하기 위한 방법을 제공한다. LTM의 경우, 항체의 모든 6개의 CDR 내의 모든 위치에서 결합에 기여하는 기능성 측쇄를 나누기 위해 20개의 천연 아미노산에 의해 제공된 주요 측쇄 화학의 대표적인 9개의 아미노산이 선택된다. LTM은 CDR 내의 위치상 일련의 단일 돌연변이를 생성하고, 각각의 "야생형" 잔기는 9개의 선택된 아미노산 중 하나에 의해 체계적으로 치환된다. 돌연변이된 CDR은 모든 변이체의 정량적 디스플레이를 금지함이 없이 복잡성 및 크기가 증가된 조합 단쇄 가변 단편(scFv) 라이브러리를 생성하도록 조합된다. 양성 선택 후, 개선된 결합을 갖는 클론을 서열결합하고, 유리한 돌연변이를 맵핑한다.

[0223] 오류 유발 PCR - 오류 유발 PCR은 상이한 선택 회차 사이의 핵산의 무작위를 포함한다. 무작위가 사용된 중합효소의 고유 오류 속도에 의해 낮은 속도에서 발생하지만, 전사 동안 높은 고유 오류 속도를 갖는 중합효소(Hawkins et al., J Mol Biol. 226:889-96 (1992))를 사용하여 오류 유발 PCR(Zaccolo et al., J. Mol. Biol. 285:775-783 (1999))에 의해 증대될 수 있다. 돌연변이 사이클 후, 당해 분야의 통상의 방법을 이용하여 항원에 대한 친화도가 개선된 클론을 선택한다.

[0224] DNA 서플링 - 핵산 서플링은 변이체 폴리뉴클레오타이드를 제조하기 위해 더 짧거나 더 작은 폴리뉴클레오타이드의 풀의 실험실내 또는 생체내 상동성 재조합을 위한 방법이다. DNA 서플링은 미국 특허 제6,605,449호, 미국 특허 제6,489,145호, WO 제02/092780호 및 문헌[Stemmer, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91:10747-51 (1994)]에 기재되어 있다. 일반적으로, DNA 서플링은 DNase I로 서플링되는 유전자의 분절화, 단편의 랜덤 하이브리드화 및 DNA 중합효소의 존재 하의 PCR에 의한 분절화 유전자의 재어셈블리 또는 충전(성적 PCR), 및 종래 PCR에 의해 재어셈블링된 생성물의 증폭의 3 단계로 이루어진다.

[0225] DNA 서플링이 사슬 반응을 역전시킨다는 점에서 이것은 오류 유발 PCR과 다르다. 오류 유발 PCR에서, 중합효소

출발 자리의 수 및 분자의 수는 지수로 증가한다. 반대로, 핵산 제어셈블리 또는 랜덤 폴리뉴클레오타이드의 서플링에서, 출발 자리의 수 및 랜덤 폴리뉴클레오타이드의 수(그러나 크기는 아님)는 시간에 따라 감소한다.

[0226] 항체의 경우에, DNA 서플링은, 예를 들면 모든 CDR1과 모든 CDR2과 모든 CDR3과의 자유 조합 연결을 허용한다. 서열의 다수의 패밀리가 동일한 반응에서 서플링될 수 있다는 것이 고려된다. 추가로, 서플링은 일반적으로 상대 순서를 보존하여, 예를 들면 CDR1은 CDR2의 위치에서 발견되지 않는다. 회귀 서플란트(shufflant)는 다수의 최고(예를 들면, 가장 높은 친화도)의 CDR을 포함하고, 이 회귀 서플란트는 이의 우수한 친화도에 기초하여 선택될 수 있다.

[0227] DNA 서플링에서 사용할 수 있는 주형 폴리뉴클레오타이드는 DNA 또는 RNA일 수 있다. 이것은 재조합되거나 제어셈블링되는 유전자 또는 더 짧거나 더 작은 폴리뉴클레오타이드의 크기에 따라 다양한 길이일 수 있다. 바람직하게는, 주형 폴리뉴클레오타이드는 50bp 내지 50kb이다. 주형 폴리뉴클레오타이드는 대개 이중 가닥이어야 한다.

[0228] 유전자 선택의 초기 단계 동안 주형 폴리뉴클레오타이드에 동일성의 영역 및 주형 폴리뉴클레오타이드의 이중성의 영역을 갖는 단일 가닥 또는 이중 가닥 핵산 폴리뉴클레오타이드를 주형 폴리뉴클레오타이드에 첨가할 수 있다는 것이 고려된다. 초기 단계 동안 2개의 상이하지만 관련된 폴리뉴클레오타이드 주형을 혼합할 수 있다는 것이 고려된다.

[0229] 알라닌 스캐닝 - 항원 결합에 상당히 기여하는 추가변 영역 잔기를 확인하기 위해 알라닌 스캐닝 돌연변이를 수행할 수 있다. Cunningham and Wells, (Science 244:1081-1085 (1989)). 잔기 또는 표적 잔기의 기(예를 들면, 하전 잔기, 예컨대 arg, asp, his, lys, 및 glu)를 확인하고, 아미노산과 항원의 상호작용에 영향을 미치는 중성 또는 음으로 하전된 아미노산(가장 바람직하게는 알라닌 또는 폴리알라닌)으로 대체한다. 이후, 치환 자리에서 또는 이에 대해 추가의 또는 다른 변이체를 도입하여 치환에 대한 기능성 감수성을 나타내는 이 아미노산 위치를 정련한다.

[0230] 컴퓨터 보조 설계 - 대안적으로, 또는 또한, 항체와 항원 사이의 접촉점을 확인하기 위해 항원-항체 복합체의 결정 구조를 분석하거나, 이러한 접촉점을 모델링하는 컴퓨터 소프트웨어를 사용하는 것이 유리할 수 있다. 이러한 접촉 잔기 및 이웃 잔기는 본 명세서에 상술한 기법에 따라 치환에 대한 후보자이다. 이러한 변이체가 생성되면, 일련의 변이체는 본 명세서에 기재된 바대로 스크리닝되고, 하나 이상의 관련 검정에서 우수한 특성을 갖는 항체가 추가의 발생을 위해 선택될 수 있다.

[0231] 대안적으로, 또는 또한, 예를 들면 공개 특허 출원 W02009/088933; W02009/088928; W02009/088924; 및 문헌 [Clackson et al., Nature 352:624-628, 1991; Marks et al., Biotechnology 10:779-783, 1992; Virnekas et al., Nucleic Acids Res. 22:5600-5607, 1994; Glaser et al., J. Immunol. 149:3903-3913, 1992; Jackson et al., J. Immunol. 154:3310-3319, 1995; Schier et al., J. Mol. Biol. 255:28-43, 1996; 및 Yang et al., J. Mol. Biol. 254:392-403, 1995](이들은 그 전문이 본 명세서에 참조문헌으로 포함됨)에 기재된 기법을 포함하는 당해 분야에 공지된 다양한 다른 친화도 성숙 기법을 이용할 수 있다.

[0232] 변경된 글라이코실화

[0233] 항체에서 발견되는 하나 이상의 탄수화물 모이어티를 결실시키는 것 및/또는 항체에 존재하지 않는 하나 이상의 글라이코실화 자리를 추가하는 것과 같은 모 항체에 대해 변형된 글라이코실화 패턴을 갖는 항체 변이체를 또한 제조할 수 있다.

[0234] 항체의 글라이코실화는 통상적으로 N 연결 또는 O 연결일 수 있다. N 연결은 아스파라긴 잔기의 측쇄에 대한 탄수화물 모이어티의 부착을 의미한다. 트라이펩타이드 서열 아스파라긴-X-세린 및 아스파라긴-X-트레오닌(여기서, X는 프롤린을 제외한 임의의 아미노산임)은 아스파라긴 측쇄에 대한 탄수화물 모이어티의 효소 부착을 위한 인식 서열이다. 폴리펩타이드 내의 이 트라이펩타이드 서열의 존재는 잠재적 글라이코실화 자리를 생성시킨다. 따라서, 아미노산 서열을 변경하여 항체에 N 연결 글라이코실화 자리를 추가하여 이것이 하나 이상의 트라이펩타이드 서열을 포함할 수 있다. O 연결 글라이코실화는 하이드록시아미노산, 대부분 보통 세린 또는 트레오닌에 대한 당 N-아세틸갈락토사민, 갈락토스, 또는 자일로스 중 하나의 부착을 의미하지만, 5-하이드록시프롤린 또는 5-하이드록시라이신을 또한 사용할 수 있다. 원래 항체의 서열에 하나 이상의 세린 또는 트레오닌 잔기를 삽입하거나 치환하여 O 연결 글라이코실화 자리를 항체에 추가할 수 있다.

[0235] Fc 글라이칸은 Fc 수용체 및 C1q에 대한 IgG의 결합에 영향을 미치고, 따라서 IgG 이펙터 기능에 중요하다. 변형된 Fc 글라이칸 및 변경된 이펙터 기능을 갖는 항체 변이체를 제조할 수 있다. 예를 들면, 변형된 말단 당,

예컨대 시알산, 코어 푸코스, 등분 N-아세틸글루코사민, 및 만노스 잔기를 갖는 항체는 Fc γ RIIIa 수용체에 대한 변경된 결합 및 변경된 ADCC 활성을 가질 수 있다. 추가의 예에서, 변형된 말단 갈락토스 잔기를 갖는 항체는 C1q에 대한 변경된 결합 및 변경된 CDC 활성을 가질 수 있다(Raju, Curr. Opin. Immunol. 20: 471-78 (2008)).

[0236] 개선된 ADCC 활성을 나타내는 푸코실화가 부재하거나 감소된 항체 분자가 또한 고려된다. 이를 수행하기 위해 다양한 방식이 당해 분야에 공지되어 있다. 예를 들면, ADCC 이펙터 활성은 CH2 도메인의 Asn-297에서 N 연결 글라이코실화의 탄수화물 구조에 의존하는 것으로 나타난 Fc γ RIII 수용체에 대한 결합의 항체 분자에 의해 중재된다. 비푸코실화 항체는 증가된 친화도로 이 수용체에 결합하고 본래 푸코실화 항체보다 더 효과적으로 Fc γ RIII 매개 이펙터 기능을 촉발한다. 예를 들면, 알파-1,6-푸코실 전달효소 효소가 녹아웃된 CHO 세포 내의 비푸코실화 항체의 재조합 제조는 100배 증가된 ADCC 활성을 갖는 항체를 생성시킨다(Yamane-Ohnuki et al., Biotechnol Bioeng. 87:614-22 (2004)). 푸코실화 경로에서 이 효소 또는 다른 효소의 활성을 감소시키는 것, 예를 들면 siRNA 또는 안티센스 RNA 치료를 통해, 효소(들)를 낮아주도록 세포주를 조작하는 것, 또는 선택적 글라이코실화 억제제와 배양하는 것(Rothman et al., Mol Immunol. 26:1113-23 (1989))을 통해 유사한 효과를 성취할 수 있다. 몇몇 숙주 세포 균주, 예를 들면 Lec13 또는 랫트 하이브리도마 YB2/0 세포주는 자연적으로 낮은 푸코실화 수준을 갖는 항체를 생성한다. (Shields et al., J Biol Chem. 277:26733-40 (2002); Shinkawa et al., J Biol Chem. 278:3466-73 (2003)). ADCC 활성을 증가시키기 위해, 예를 들면 GnTIII 효소를 과발현하는 세포에서 재조합으로 생성된 항체를 통한 등분된 탄수화물의 수준 증가를 또한 결정한다(Umana et al., Nat Biotechnol. 17:176-80 (1999)). 2개의 푸코스 잔기 중 오직 1개의 부재가 ADCC 활성을 증가시키기에 충분할 수 있는 것으로 예측된다(Ferrara et al., Biotechnol Bioeng. 93:851-61 (2006)).

[0237] **변경된 이펙터 기능을 갖는 변이체**

[0238] 항체의 다른 변형이 고려된다. 일 양태에서, 이펙터 기능과 관련하여 본 개시내용의 항체를 변형시키는 것, 예를 들면 암을 치료하는 데 있어서 항체의 유효성을 증대시키는 것이 바람직할 수 있다. 이펙터 기능을 변형시키는 하나의 방법은 시스테인 잔기(들)를 Fc 영역에서 도입하여, 이 영역에서 사슬간 이황화 결합이 형성되게 할 수 있다는 것을 교시한다. 이렇게 생성된 동종이합체 항체는 개선된 내재화 능력 및/또는 증가된 보체 매개 세포사 및 항체 의존적 세포내 세포독성(ADCC)을 가질 수 있다. 문헌[Caron et al., (J. Exp Med. 176: 1191-1195 (1992)) 및 Shopes, B. (J. Immunol. 148: 2918-2922 (1992))]을 참조한다. 문헌[Wolff et al., (Cancer Research 53: 2560-2565 (1993))]에 기재된 헤테로이작용성 가교결합제를 사용하여 증대된 항종양 활성을 갖는 동종이합체 항체를 또한 제조할 수 있다. 대안적으로, 이중 Fc 영역을 갖는 항체를 조작할 수 있어서 증대된 보체 용해 및 ADCC 능력을 가질 수 있다. 문헌[Stevenson et al., (Anti-Cancer Drug Design 3: 219-230 (1989))]을 참조한다. 또한, CDR 내의 서열은 항체가 MHC II형에 결합하도록 하고 원치않는 헬퍼 T 세포 반응을 촉발할 수 있는 것으로 나타났다. 보존적 치환은 항체가 결합 활성을 보유하지만 원치않는 T 세포 반응을 촉발하는 이의 능력을 소실하도록 할 수 있다. 또한, 컷과 가변 영역이 인간 감마 1, 감마 2, 감마 3, 및 감마 4 불변 영역과 연결된 키메라 항체를 기술하는 문헌[Steplewski et al., (Proc Natl Acad Sci U S A. 85:4852-56 (1998))]을 참조한다.

[0239] 본 개시내용의 특정한 실시양태에서, 예를 들면 종양 침투를 증가시키기 위해 온전한 항체보다 항체 단편을 사용하는 것이 바람직할 수 있다. 이런 경우에, 이의 혈청 반감기를 증가시키기 위해 항체 단편을 변형하는 것, 예를 들면 반감기를 증가시키기 위해 항체 단편에 분자, 예컨대 PEG 또는 다른 수용성 중합체, 예컨대 폴리사카라이드 중합체를 첨가하는 것이 바람직할 수 있다. 예를 들면, 항체 단편에 셀비지 수용체 결합 에피토프의 도입에 의해 이를 또한 성취할 수 있다(예를 들면, 항체 단편 내의 적절한 영역의 돌연변이 또는 펩타이드 태그로 의 에피토프의 도입(이 펩타이드 태그는 이후, 예를 들면 DNA 또는 펩타이드 합성에 의해 말단에서 또는 중간에서 항체 단편에 융합됨)에 의해)(예를 들면, WO 제96/32478호 참조).

[0240] 셀비지 수용체 결합 에피토프는 바람직하게는 Fc 도메인의 1개 또는 2개의 루프로부터의 임의의 하나 이상의 아미노산 잔기가 항체 단편의 유사 위치로 전달되는 영역을 구성한다. 훨씬 더 바람직하게는, Fc 도메인의 1개 또는 2개의 루프로부터의 3개 이상의 잔기가 전달된다. 훨씬 더 바람직하게는, 에피토프를 Fc 영역(예를 들면, IgG)의 CH2 도메인으로부터 취하고 항체의 CH1, CH3, 또는 VH 영역, 또는 하나 초과의 이 영역에 전달한다. 대안적으로, 에피토프를 Fc 영역의 CH2 도메인으로부터 취하고 항체 단편의 CL 영역 또는 VL 영역, 또는 둘 다로 전달한다. Fc 변이체 및 셀비지 수용체와의 이의 상호작용을 기술하는 국제 출원 WO 제97/34631호 및 WO 제96/32478호를 또한 참조한다.

- [0241] 따라서, 본 개시내용의 항체는 인간 Fc 부분, 인간 공통 Fc 부분, 또는 Fc 셀비지 수용체와 상호작용하는 능력을 보유하는 이의 변이체, 예컨대 이황화 결합에 관여된 시스테인이 변형되거나 제거되고/되거나, met가 N 말단에서 첨가되고/되거나, 하나 이상의 N 말단 20개의 아미노산이 제거되고/되거나, 보체와 상호작용하는 영역, 예컨대 C1q 결합 자리가 제거되고/되거나, ADCC 자리가 제거된 변이체를 포함할 수 있다[예를 들면 문헌[Sarmay et al., Molec. Immunol. 29:633-9 (1992)] 참조.
- [0242] 선행 연구는 주로 233번 내지 239번 IgG 잔기로 이루어진 낮은 힌지 영역으로 FcR에 대한 인간 및 쥐와 IgG 상의 결합 자리를 맵핑한다. 다른 연구는 추가의 광범위한 분절, 예를 들면 인간 Fc 수용체 I에 대해 Gly316-Lys338, 인간 Fc 수용체 III에 대해 Lys274-Arg301 및 Tyr407-Arg416을 제안하거나, 낮은 힌지 외부의 소수의 특이적 잔기, 예를 들면 쥐와 Fc 수용체 II와 상호작용하는 쥐와 IgG2b에 대한 Asn297 및 Glu318을 발견하였다. 인간 Fc 수용체 IIIA를 갖는 인간 IgG1 Fc 단편의 3.2Å 결정 구조의 보고는 Fc 수용체 IIIA에 대한 결합에 관여되는 IgG1 잔기 Leu234-Ser239, Asp265-Glu269, Asn297-Thr299, 및 Ala327-Ile332를 기술한다. 낮은 힌지 (Leu234-Gly237) 이외에, IgG CH2 도메인 루프 FG(잔기 326-330) 및 BC(잔기 265-271)에서의 잔기가 Fc 수용체 IIA에 대한 결합에서 역할을 하는 결정 구조에 기초하여 이것이 제안되었다. 문헌[Shields et al., (J. Biol. Chem., 276:6591-604 (2001))](그 전문이 참조문헌으로 본 명세서에 포함됨)을 참조한다. Fc 수용체 결합 자리 내의 잔기의 돌연변이는 변경된 이펙터 기능, 예컨대 변경된 ADCC 또는 CDC 활성, 또는 변경된 반감기를 생성시킬 수 있다. 상기 기재된 바대로, 잠재적 돌연변이는 하나 이상의 잔기의 삽입, 결실 또는 치환, 예컨대 알라닌에 의한 치환, 보존적 치환, 비보존적 치환, 또는 상이한 IgG 아형으로부터 동일한 위치에서 상응하는 아미노산 잔기에 의한 대체(예를 들면, 이 위치에서 IgG1 잔기를 상응하는 IgG2 잔기로 대체하는 것)를 포함한다.
- [0243] 쉴즈(Shields) 등은 모든 인간 Fc 수용체에 대한 결합에 관여하는 IgG1 잔기가 힌지에 인접한 CH2 도메인에 위치하고, 하기의 2개의 카테고리에 해당한다는 것을 기술하고 있다: 1) 모든 FcR과 직접적으로 상호작용할 수 있는 위치는 Leu234-Pro238, Ala327, 및 Pro329(및 가능하게는 Asp265)를 포함하고; 2) 탄수화물 성질 또는 위치에 영향을 미치는 위치는 Asp265 및 Asn297을 포함한다. Fc 수용체 II에 대한 결합에 영향을 미치는 추가의 IgG1 잔기는 하기와 같다: (가장 큰 효과) Arg255, Thr256, Glu258, Ser267, Asp270, Glu272, Asp280, Arg292, Ser298, 및 (더 적은 효과) His268, Asn276, His285, Asn286, Lys290, Gln295, Arg301, Thr307, Leu309, Asn315, Lys322, Lys326, Pro331, Ser337, Ala339, Ala378, 및 Lys414. A327Q, A327S, P329A, D265A 및 D270A는 결합을 감소시킨다. 모든 FcR에 대해 상기 확인된 잔기 이외에, Fc 수용체 IIIA에 대한 결합을 40% 이상 감소시키는 추가의 IgG1 잔기는 하기와 같다: Ser239, Ser267(오직 Gly), His268, Glu293, Gln295, Tyr296, Arg301, Val303, Lys338, 및 Asp376. FcRIIIA에 대한 결합을 개선하는 변이체는 T256A, K290A, S298A, E333A, K334A, 및 A339T를 포함한다. Lys414는 FcRIIA 및 FcRIIB에 대한 결합에서 40% 감소를 나타내고, Arg416은 FcRIIA 및 FcRIIIA의 경우 30% 감소를 나타내고, Gln419는 FcRIIA에 대해 30% 감소를 나타내고, FcRIIB에 대해 40% 감소를 나타내고, Lys360은 FcRIIIA에 대해 23% 개선을 나타낸다. 오직 특이적 Fc 감마 수용체(R)에 대한 결합을 개선하거나 동시에 Fc 감마 R의 하나의 유형에 대한 결합을 개선하고 다른 유형에 대한 결합을 감소시키는 것으로 발견된 IgG1의 Fc 영역 내에 여러 위치를 기술하는 문헌[Presta et al., (Biochem. Soc. Trans. 30:487-490, 2001)](본 명세서에 그 전문이 참조문헌으로 포함됨)을 또한 참조한다. 이후, Fc 감마 RIIIa에 대한 개선된 결합을 갖는 선택된 IgG1 변이체를 실험실내 항체 의존적 세포 세포독성(ADCC) 검정에서 시험하고, 이는 말초 혈액 단핵 세포 또는 자연 살해 세포가 사용될 때 ADCC 증대를 나타낸다.
- [0244] 예를 들면, 본 명세서에 그 전문이 참조문헌으로 포함된 미국 특허 제6,194,551호는 (카밋 넘버링을 사용한) 인간 IgG Fc 영역에서 329번, 331번 또는 322번 아미노산 위치에서 돌연변이를 포함하는 변경된 이펙터 기능을 갖는 변이체를 기재하고 있고, 이들 중 몇몇은 감소된 C1q 결합 또는 CDC 활성을 나타낸다. 다른 예로서, 본 명세서에 그 전문이 참조문헌으로 포함된 미국 특허 제6,737,056호는 238번, 239번, 248번, 249번, 252번, 254번, 255번, 256번, 258번, 265번, 267번, 268번, 269번, 270번, 272번, 276번, 278번, 280번, 283번, 285번, 286번, 289번, 290번, 292번, 294번, 295번, 296번, 298번, 301번, 303번, 305번, 307번, 309번, 312번, 315번, 320번, 322번, 324번, 326번, 327번, 329번, 330번, 331번, 333번, 334번, 335번, 337번, 338번, 340번, 360번, 373번, 376번, 378번, 382번, 388번, 389번, 398번, 414번, 416번, 419번, 430번, 434번, 435번, 437번, 438 또는 439번(카밋 넘버링 사용) 아미노산 위치에서 인간 IgG Fc 영역 내에 돌연변이를 포함하는 변경된 이펙터 또는 Fc-감마 수용체 결합을 갖는 변이체를 기재하고, 이들 중 몇몇은 감소된 ADCC 또는 CDC 활성과 관련된 수용체 결합 프로필을 나타낸다. 이들 중에서, 238번, 265번, 269번, 270번, 327 또는 329번 아미노산 위치에서의 돌연변이는 FcRI에 대한 결합을 감소시키는 것으로 기술되고, 238번, 265번, 269번, 270번, 292번, 294번, 295번, 298번, 303번, 324번, 327번, 329번, 333번, 335번, 338번, 373번, 376번, 414번,

416번, 419번, 435번, 438번 또는 439번 아미노산 위치에서의 돌연변이는 FcRII에 대한 결합을 감소시키는 것으로 기술되고, 238번, 239번, 248번, 249번, 252번, 254번, 265번, 268번, 269번, 270번, 272번, 278번, 289번, 293번, 294번, 295번, 296번, 301번, 303번, 322번, 327번, 329번, 338번, 340번, 373번, 376번, 382번, 388번, 389번, 416번, 434번, 435번 또는 437번 아미노산 위치에서의 돌연변이는 FcRIII에 대한 결합을 감소시키는 것으로 기술된다.

[0245] 본 명세서에 그 전문이 참조문헌으로 포함된 미국 특허 제5,624,821호는 찢과 항체의 C1q 결합 활성이 중쇄의 318번, 320번 또는 322번 아미노산 잔기를 돌연변이시켜 변경될 수 있고, 297번 잔기(Asn)의 대체가 용해 활성을 제거시킨다는 것을 보고하고 있다.

[0246] 본 명세서에 그 전문이 참조문헌으로 포함된 미국 특허 공보 제20040132101호는 240번, 244번, 245번, 247번, 262번, 263번, 266번, 299번, 313번, 325번, 328번, 또는 332번(카바트 넘버링) 아미노산 위치 또는 234번, 235번, 239번, 240번, 241번, 243번, 244번, 245번, 247번, 262번, 263번, 264번, 265번, 266번, 267번, 269번, 296번, 297번, 298번, 299번, 313번, 325번, 327번, 328번, 329번, 330번, 또는 332번(카바트 넘버링) 위치에서 돌연변이를 갖는 변이체를 기술하고, 이들 중 234번, 235번, 239번, 240번, 241번, 243번, 244번, 245번, 247번, 262번, 263번, 264번, 265번, 266번, 267번, 269번, 296번, 297번, 298번, 299번, 313번, 325번, 327번, 328번, 329번, 330번, 또는 332번 위치에서의 돌연변이는 ADCC 활성을 감소시키거나 Fc 감마 수용체에 대한 결합을 감소시킬 수 있다.

[0247] 문헌[Chappel et al. (Proc Natl Acad Sci U S A. 88:9036-40 (1991))](본 명세서에 그 전문이 참조문헌으로 포함됨)은 IgG1의 세포친화 활성이 이의 중쇄 CH2 도메인의 고유 특성이라는 것을 보고하고 있다. IgG1의 임의의 234번 내지 237번 아미노산 잔기에서의 단일 지점 돌연변이는 상당히 이의 활성을 감소시키거나 폐지한다. 모든 IgG1 234번 내지 237번 잔기(LLGG)의 IgG2 및 IgG4로의 치환이 완전 결합 활성을 복구하기 위해 필요하다. 전체 ELLGGP 서열(233번 내지 238번 잔기)을 포함하는 IgG2 항체는 야생형 IgG1보다 더 활성인 것으로 관찰되었다.

[0248] 문헌[Isaacs et al. (J Immunol. 161:3862-9 (1998))](본 명세서에 그 전문이 참조문헌으로 포함됨)은 Fc 감마 R 결합에 중요한 모티프 내의 돌연변이(프롤린에 대한 233번 글루타메이트, 발린에 대한 234번 류신/페닐알라닌, 및 알라닌에 대한 235번 류신)가 표적 세포의 결실을 완전히 방지한다. 알라닌에 대한 318번 글루타메이트 돌연변이는 마우스 IgG2b의 이펙터 기능을 제거하고 인간 IgG4의 효능을 또한 감소시킨다.

[0249] 문헌[Armour et al. (Mol Immunol. 40:585-93 (2003))](본 명세서에 그 전문이 참조문헌으로 포함됨)은 야생형 IgG1보다 적어도 10배 덜 효과적으로 Fc감마RIIa인 활성화 수용체와 반응하지만 Fc감마RIIb인 억제 수용체에 대한 이의 결합이 오직 4배 감소한 IgG1 변이체를 확인하였다. 233번 내지 236번 아미노산의 영역에서 및/또는 327번, 330번 및 331번 아미노산 위치에서 돌연변이가 만들어진다. 또한 WO 제99/58572호(그 전문이 참조문헌으로 본 명세서에 포함됨)를 참조한다.

[0250] 문헌[Xu et al. (J Biol Chem. 269:3469-74 (1994))](본 명세서에 그 전문이 참조문헌으로 포함됨)은 Ser에 대한 IgG1 Pro331의 돌연변이가 C1q 결합을 현저히 감소시키고 용해 활성을 실질적으로 제거한다는 것을 보고하고 있다. 반대로, IgG4 내의 Ser331에 대한 Pro의 치환은 IgG4 Pro331 변이체에 부분 용해 활성(40%)을 부여한다.

[0251] 문헌[Schuurman et al. (Mol Immunol. 38:1-8 (2001))](본 명세서에 그 전문이 참조문헌으로 포함됨)은 세린에 대한 Cys226인 중쇄간 결합 형성에 관여하는 힌지 시스테인 중 하나의 돌연변이가 더 안정한 중쇄간 연결을 생성시킨다는 것을 보고하고 있다. IgG1 힌지 서열 Cys-Pro-Pro-Cys에 대한 IgG4 힌지 서열 Cys-Pro-Ser-Cys의 돌연변이는 또한 중쇄 사이의 공유 상호작용을 현저히 안정화시킨다.

[0252] 문헌[Angal et al. (Mol Immunol. 30:105-8 (1993))](본 명세서에 그 전문이 참조문헌으로 포함됨)은 (IgG1 및 IgG2 내의 이 위치에서 발견된) 프롤린에 대한 IgG4 내의 241번 아미노산 위치에서 세린의 돌연변이, 및 혈청 반감기의 연장 및 원래 키메라 IgG4에 비교하여 조직 분포의 개선이 균질 항체를 생성시킨다는 것을 보고하고 있다.

[0253] 공유 변형

[0254] 항체의 공유 변형은 본 개시내용의 범위 내에 또한 포함된다. 화학 합성 또는, 적용 가능한 경우, 항체의 효소 또는 화학 절단에 의해 이것이 이루어질 수 있다. 항체의 표적화된 아미노산 잔기를 선택된 측쇄 또는 N 또는 C 말단 잔기와 반응할 수 있는 유기 유도체화 물질과 반응시킴으로써 항체의 다른 유형의 공유 변형을 분자에 도

입한다.

- [0255] 시스테이닐 잔기는 대부분 보통 α -할로아세테이트(및 상응하는 아민), 예컨대 클로로아세트산 또는 클로로아세트아마이드와 반응하여 카복시메틸 또는 카복시아미도메틸 유도체를 생성시킨다. 브로모트라이플루오로아세톤, α -브로모- β -(5-이미도조일)프로피온산, 클로로아세틸 포스페이트, N-알킬말레이미드, 3-나이트로-2-피리딜 다이설파이드, 메틸 2-피리딜 다이설파이드, p-클로로머큐리벤조에이트, 2-클로로머큐리-4-나이트로페놀, 또는 클로로-7-나이트로벤조-2-옥사-1,3-다이아졸과의 반응에 의해 시스테이닐 잔기를 또한 유도체화한다.
- [0256] 5.5 내지 7.0 pH에서 다이에틸피로카보네이트와의 반응에 의해 히스티딜 잔기를 유도체화하는데, 이 물질이 히스티딜 측쇄에 비교적 특이적이기 때문이다. 파라-브로모페닐 브로마이드가 또한 유용하고, 6.0 pH에서 0.1M 나트륨 카코딜레이트 중에 반응을 수행하는 것이 바람직하다.
- [0257] 라이시닐 및 아미노 말단 잔기는 숙신산 또는 다른 카복실산 무수물과 반응한다. 이 물질에 의한 유도체화는 라이시닐 잔기의 전하를 역전시키는 효과를 갖는다. 알파-아미노 함유 잔기를 유도체화하기 위한 다른 적합한 시약은 이미도에스터, 예컨대 메틸 피콜린이미데이트, 피리독살 포스페이트, 피리독살, 클로로보로하이드라이드, 트라이나이트로벤젠설포산, O-메틸아이소유레아, 2,4-펜탄다이온, 및 글라이옥실레이트와의 아미노기전달효소 촉진 반응을 포함한다.
- [0258] 아르기닐 잔기는 1종 또는 몇몇 종래 시약, 이들 중에서 페닐글라이옥살, 2,3-부탄다이온, 1,2-사이클로헥산다이온, 및 닐하이드린과 반응하여 변형된다. 아르기닌 잔기의 유도체화는 구아니딘 작용기의 높은 pKa 때문에 알칼리 조건 중에 반응이 수행될 것을 요한다. 더욱이, 이 시약은 라이신의 기 및 아르기닌 입실론-아미노기와 반응할 수 있다.
- [0259] 티로실 잔기의 특이적 변형을 만들 수 있고, 방향족 다이아조늄 화합물 또는 테트라나이트로메탄과의 반응에 의해 스펙트럼 라벨을 티로실 잔기로 도입하는 것이 특히 중요하다. 대부분 보통, 각각 O-아세틸 티로실 종 및 3-나이트로 유도체를 형성하기 위해 N-아세틸이미다졸 및 테트라나이트로메탄을 사용한다. 티로실 잔기를 125I 또는 131I를 사용하여 요오드화하여 방사면역측정에서 사용하기 위한 라벨링된 단백질을 제조한다.
- [0260] 카보다이이미드(R-N.dbd.C.dbd.N-R')(여기서, R 및 R'는 상이한 알킬 기임), 예컨대 1-사이클로헥실-3-(2-모르폴리닐-4-에틸) 카보다이이미드 또는 1-에틸-3-(4-아조니아-4,4-다이메틸펜틸) 카보다이이미드와의 반응에 의해 카복실 측기(아스파르틸 또는 글루타밀)를 선택적으로 변형한다. 더욱이, 암모늄 이온과의 반응에 의해 아스파르틸 및 글루타밀 잔기를 아스파라기닐 및 글루타미닐 잔기로 전환한다.
- [0261] 글루타미닐 및 아스파라기닐 잔기를 빈번히 각각 상응하는 글루타밀 및 아스파르틸 잔기로 탈아미드화한다. 이 잔기를 중성 또는 염기성 조건 하에 탈아미드화한다. 이 잔기의 탈아미드화된 형태는 본 개시내용의 범위 내에 해당한다.
- [0262] 다른 변형은 프롤린 및 라이신의 하이드록실화, 세린 또는 트레오닌 잔기의 하이드록실 기의 인산화, 라이신, 아르기닌, 및 히스티딘 측쇄의 α -아미노 기의 메틸화(T. E. Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W.H. Freeman & Co., San Francisco, pp. 79-86 (1983)), N 말단 아민의 아세틸화, 및 임의의 C 말단 카복실 기의 아미드화를 포함한다.
- [0263] 다른 유형의 공유 변형은 항체에 글라이코사이드를 화학적으로 또는 효소적으로 커플링하는 것을 포함한다. 이 절차는 이것이 N 또는 O 연결 글라이코실화에 대한 글라이코실화 능력을 갖는 숙주 세포에서 항체의 제조를 필요로 하지 않는다는 점에서 유리하다. 이용된 커플링 모드에 따라, 당(들)을 (a) 아르기닌 및 히스티딘, (b) 자유 카복실 기, (c) 자유 설프하이드릴 기, 예컨대 시스테인의 이 기, (d) 자유 하이드록실 기, 예컨대 세린, 트레오닌, 또는 하이드록시프롤린의 이 기, (e) 방향족 잔기, 예컨대 페닐알라닌, 티로신, 또는 트립토판의 이 잔기, 또는 (f) 글루타민의 아마이드 기에 부착될 수 있다. 이 방법은 WO 제87/05330호 및 문헌[Aplin and Wriston, (CRC Crit. Rev. Biochem., pp. 259-306 (1981))]에 기재되어 있다.
- [0264] 항체에 존재하는 임의의 탄수화물 모이어티의 제거는 화학적으로 또는 효소적으로 성취될 수 있다. 화학 탈글라이코실화는 화합물 트라이플루오로메탄설포산, 또는 등가 화합물에 대한 항체의 노출을 요한다. 이 처리는 연결당(N-아세틸글루코사민 또는 N-아세틸갈락토사민)을 제외한 대부분 또는 모든 당을 절단시키면서, 항체가 온전하게 한다. 화학 탈글라이코실화는 문헌[Hakimuddin, et al., (Arch. Biochem. Biophys. 259: 52 (1987))] 및 Edge et al., (Anal. Biochem. 118: 131 (1981))]에 기재되어 있다. 문헌[Thotakura et al., (Meth. Enzymol. 138: 350 (1987))]에 기재된 다양한 엔도- 및 엑소-글라이코시다제를 사용하여 항체 상의 탄수화물 모이어티의

효소 절단을 성취할 수 있다.

[0265] 항체의 다른 유형의 공유 변형은 다양한 비단백질성 중합체, 예를 들면 폴리에틸렌 글라이콜, 폴리프로필렌 글라이콜, 폴리옥시에틸화 폴리에틸렌, 폴리옥시에틸화 소르비톨, 폴리옥시에틸화 글루코스, 폴리옥시에틸화 글라이세롤, 폴리옥시알킬렌, 또는 폴리사카라이드 중합체, 예컨대 덱스트란 중 하나에 항체를 연결하는 것을 포함한다. 이러한 방법은 당해 분야에 공지되어 있고, 예를 들면 미국 특허 제4,640,835호; 제4,496,689호; 제4,301,144호; 제4,670,417호; 제4,791,192호, 제4,179,337호, 제4,766,106호, 제4,179,337호, 제4,495,285호, 제4,609,546호 또는 EP 제315 456호를 참조한다.

[0266] **유도체**

[0267] 상기 기재된 바대로, 유도체는 유비퀴틴화, 라벨링(예를 들면, 방사성 핵종 또는 다양한 효소에 의한 라벨링), 공유 중합체 부착, 예컨대 폐길화(폴리에틸렌 글라이콜에 의한 유도체화) 및 아미노산, 예컨대 오르니틴의 화학 합성에 의한 삽입 또는 치환과 같은 기법에 의해 화학적으로 변형된 폴리펩타이드를 의미한다. 이종특이적 항체와 같은 본 발명의 항체 물질의 유도체는 치료제로서 또한 유용하고, 본 명세서에서의 방법에 의해 제조될 수 있다.

[0268] 공유로, 또는 이온, 반 데르 발스 또는 수소 결합, 예를 들면 스트랩타비딘에 의해 인식된 바이오티닐화 뉴클레오타이드 또는 방사성 뉴클레오타이드의 도입을 통해 접합된 모이어티가 항체 물질에 도입되거나 부착될 수 있다.

[0269] 폴리에틸렌 글라이콜(PEG)은 항체 물질에 부착되어 생체내 더 긴 반감기를 제공할 수 있다. PEG 기는 임의의 편리한 분자량일 수 있고, 선형 또는 분지형일 수 있다. PEG의 평균 분자량은 바람직하게는 약 2킬로달톤("kD") 내지 약 100kDa, 더 바람직하게는 약 5kDa 내지 약 50kDa, 가장 바람직하게는 약 5kDa 내지 약 10kDa 범위이다. 항체 물질(예를 들면, 알데하이드, 아미노, 또는 에스터 기) 상의 반응성 기에 대한 PEG 모이어티(예를 들면, 알데하이드, 아미노, 티올, 또는 에스터 기) 상의 천연 또는 조작된 반응성 기를 통한 아실화 또는 환원성 알킬화를 통해 본 개시내용의 항체 물질에 PEG 기가 일반적으로 부착된다. 당해 분야에 널리 공지된 기법을 이용하여 항체 물질에 대한 PEG 모이어티의 첨가를 수행할 수 있다. 예를 들면, 국제 공보 WO 제96/11953호 및 미국 특허 제4,179,337호를 참조한다.

[0270] PEG에 의한 항체 물질의 결합을 보통 수상 중에 수행하고 역상 분석용 HPLC에 의해 쉽게 모니터링할 수 있다. PEG화 물질을 정제용 HPLC로 정제하고 분석용 HPLC, 아미노산 분석 및 레이저 이탈 질량 분광법에 의해 규명한다.

[0271] **항체 접합체**

[0272] 항체를 이의 "네이키드" 또는 비접합 형태로 투여할 수 있거나, 다른 치료학적 또는 진단제에 직접적으로 접합할 수 있거나, 이러한 다른 치료학적 또는 진단제를 포함하는 담체 중합체에 간접적으로 접합할 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 항체를 세포독성제, 예컨대 화학치료제, 약물, 성장 억제 물질, 독소(예를 들면, 박테리아, 진균, 식물, 또는 동물 기원의 효소적으로 활성인 독소 또는 이의 단편) 또는 방사성 동위원소(즉, 방사접합체)에 접합한다. 적합한 화학치료제는 다우노마이신, 독소루비신, 메토크렉세이트, 및 빈데신을 포함한다(상기 문헌[Rowland et al., (1986)]). 적합한 독소는 박테리아 독소, 예컨대 디프테리아 독소; 식물 독소, 예컨대 리신; 소분자 독소, 예컨대 겔다나마이신(Mandler et al J. Natl. Cancer Inst. 92(19):1573-81 (2000); Mandler et al., Bioorg. Med. Chem. Letters 10:1025-1028 (2000); Mandler et al., Bioconjugate Chem. 13:786-91 (2002)), 메이탄시노이드(EP 제1391213호; Liu et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:8618-23 (1996)), 아우리스타틴(Doronina et al., Nat. Biotech. 21: 778-84 (2003)) 및 칼리키아마이신(Lode et al., Cancer Res. 58:2928 (1998); Hinman et al., Cancer Res. 53:3336-3342 (1993))을 포함한다.

[0273] 방사성동위원소, 친화도 라벨(예컨대, 바이오틴, 아비딘 등), 효소 라벨(예컨대, 겨자무과 퍼옥시다제, 알칼리 포스파타제 등) 형광성 또는 발광 또는 생물발광 라벨(예컨대, FITC 또는 로다민 등), 상자성 원자 등을 사용하여 항체를 탈착 가능하게 라벨링할 수 있다. 이러한 라벨링을 성취하기 위한 절차는 당해 분야에 널리 공지되어 있고; 예를 들면 문헌[Sternberger, L.A. et al., J. Histochem. Cytochem. 18:315 (1970); Bayer, E.A. et al., Meth. Enzym. 62:308 (1979); Engval, E. et al., Immunol. 109:129 (1972); Goding, J.W. J. Immunol. Meth. 13:215 (1976)]을 참조한다.

[0274] 항체 모이어티의 접합은 미국 특허 제6,306,393호에 기재되어 있다. 일반 기법은 또한 문헌[Shih et al., Int. J. Cancer 41:832-839 (1988); Shih et al., Int. J. Cancer 46:1101-1106 (1990)]; 및 쉬(Shih) 등의 미국

특허 제5,057,313호에 기재되어 있다. 이 일반 방법은 산화된 탄수화물 부분을 갖는 항체 성분을 적어도 하나의 자유 아민 작용기를 갖고 복수의 약물, 독소, 킬레이터, 붕소 가수(Addend), 또는 다른 치료제가 로딩된 담체 중합체와 반응시키는 것을 포함한다. 이 반응은 최종 접합체를 형성하기 위해 제2 아민으로의 환원에 의해 안정화될 수 있는 초기 쉬프(Schiff) 염기(이민) 결합을 생성시킨다.

[0275] 담체 중합체는 예를 들면 적어도 50개의 아미노산 잔기의 폴리펩타이드 또는 아미노텍스트란일 수 있다. 약물 또는 다른 물질을 담체 중합체에 접합하기 위한 다양한 기법이 당해 분야에 공지되어 있다. 아미노텍스트란 대신 폴리펩타이드 담체를 사용할 수 있지만, 폴리펩타이드 담체는 사슬 내에 적어도 50개의 아미노산 잔기, 바람직하게는 100개 내지 5000개의 아미노산 잔기를 가져야 한다. 아미노산의 적어도 몇몇은 라이신 잔기 또는 글루타메이트 또는 아스파르테이트 잔기이어야 한다. 라이신 잔기의 펜던트 아민 및 글루타민 및 아스파르테이트의 펜던트 카복실레이트는 약물, 독소, 면역조절제, 킬레이터, 붕소 가수 또는 다른 치료제를 부착하는 데 편리하다. 적합한 폴리펩타이드 담체의 예는 생성된 로딩된 담체 및 접합체에 바람직한 용해도 특성을 부여하기 위해 폴리라이신, 폴리글루탐산, 폴리아스파르트산, 이의 중합체, 및 이 아미노산과 세린과 같은 다른 아미노산의 혼합 중합체를 포함한다. 항체가 접합될 수 있는 물질의 예는 본 명세서에 기재된 임의의 세포독성 또는 화학치료제를 포함한다.

[0276] 대안적으로, 항체 성분을 치료제와 접합함으로써 접합된 항체를 직접적으로 제조할 수 있다. 일반 절차는 치료제가 산화된 항체 성분에 직접적으로 부착된다는 것을 제외하고 간접 접합 방법과 유사하다. 예를 들면, 항체의 탄수화물 모이어티는 폴리에틸렌글라이콜에 부착되어 반감기를 연장시킬 수 있다.

[0277] 대안적으로, 치료제는 이황화 결합 형성을 통해 또는 헤테로이작용성 가교결합제, 예컨대 N-숙시닐 3-(2-피리딜다이티오)프로피오네이트(SPDP)를 사용하여 환원된 항체 성분의 힌지 영역에서 부착될 수 있다. 문헌[Yu et al., Int. J. Cancer 56:244 (1994)]. 이러한 접합에 대한 일반 기법은 당해 분야에 널리 공지되어 있다. 예를 들면, 문헌[Wong, Chemistry Of Protein Conjugation and Cross-Linking (CRC Press 1991); Upeslakis et al., "Modification of Antibodies by Chemical Methods," in Monoclonal Antibodies: Principles and Applications, Birch et al. (eds.), pages 187-230 (Wiley-Liss, Inc. 1995); Price, "Production and Characterization of Synthetic Peptide-Derived Antibodies," in Monoclonal Antibodies: Production, Engineering and Clinical Application, Ritter et al. (eds.), pages 60-84 (Cambridge University Press 1995)]을 참조한다. N-숙시이미딜-3-(2-피리딜다이티올) 프로피오네이트(SPDP), 이미노티올란(IT), 이미노에스터의 이작용성 유도체(예컨대, 다이메틸 아디피미테이트 HCL), 활성 에스터(예컨대, 다이숙시이미딜 수버레이트), 알데하이드(예컨대, 글루타르알데하이드), 바이스-아지도 화합물(예컨대, 바이스(p-아지도벤조일)헥사다이아민), 바이스-다이아조늄 유도체(예컨대, 바이스-(p-다이아조늄벤조일)-에틸렌다이아민), 다이아이스시아네이트(예컨대, 톨릴렌 2,6-다이아이스시아네이트), 및 바이스-활성 불소 화합물(예컨대, 1,5-다이플루오로-2,4-다이나이트로벤젠)과 같은 다양한 이작용성 단백질 커플링제가 당해 분야에 공지되어 있다.

[0278] 항체 융합 단백질

[0279] 항체 융합 단백질을 제조하는 방법이 당해 분야에 널리 공지되어 있다. 예를 들면, 미국 특허 제6,306,393호를 참조한다. 인터류킨-2 모이어티를 포함하는 항체 융합 단백질은 문헌[Boleti et al., Ann. Oncol. 6:945 (1995), Nicolet et al., Cancer Gene Ther. 2:161 (1995), Becker et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 93:7826 (1996), Hank et al., Clin. Cancer Res. 2:1951 (1996), 및 Hu et al., Cancer Res. 56:4998 (1996)]에 기재되어 있다. 또한, 문헌[Yang et al., (Hum. Antibodies Hybridomas 6:129 (1995))]은 F(ab')₂ 단편 및 종양 괴사 인자 알파 모이어티를 포함하는 융합 단백질을 기재하고 있다. 항체 융합 단백질의 추가의 예는 문헌[Pastan et al., Nat. Reviews Cancer 6: 559-65 (2006)]에 기재되어 있다.

[0280] 재조합 분자가 하나 이상의 항체 성분 및 독소 또는 화학치료제를 포함하는 항체-독소 융합 단백질을 제조하는 방법이 또한 당해 분야의 당업자에게 공지되어 있다. 예를 들면, 항체-슈도모나스 외독소 A 융합 단백질은 문헌[Chaudhary et al., Nature 339:394 (1989), Brinkmann et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 88:8616 (1991), Batra et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 89:5867 (1992), Friedman et al., J. Immunol. 150:3054 (1993), Wels et al., Int. J. Can. 60:137 (1995), Fominaya et al., J. Biol. Chem. 271:10560 (1996), Kuan et al., Biochemistry 35:2872 (1996), 및 Schmidt et al., Int. J. Can. 65:538 (1996)]에 기재되어 있다. 디프테리아 독소 모이어티를 포함하는 항체-독소 융합 단백질은 문헌[Kreitman et al., Leukemia 7:553 (1993), Nicholls et al., J. Biol. Chem. 268:5302 (1993), Thompson et al., J. Biol. Chem. 270:28037 (1995), 및 Vallera et al., Blood 88:2342 (1996)]에 기재되어 있다. 문헌[Deonarain et al., Tumor Targeting 1:177

(1995)]은 RNase 모이어티를 갖는 항체-독소 융합 단백질을 기재하고 있고, 문헌[Linardou et al., Cell Biophys. 24-25:243 (1994)]은 DNase I 성분을 포함하는 항체-독소 융합 단백질을 제조한다. 문헌[Wang et al., Abstracts of the 209th ACS National Meeting, Anaheim, Calif., Apr. 2-6, 1995, Part 1, BIOT005]의 항체-독소 융합 단백질에서 독소 모이어티로서 젤로닌을 사용한다. 추가의 예로서, 문헌[Dohlsten et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 91:8945 (1994)]은 스타필로코커스 장내독소-A를 포함하는 항체-독소 융합 단백질을 보고하고 있다.

[0281] 이러한 융합 단백질의 제조에서 적절히 사용되는 예시적인 독소는 리신, 아브린, 리보뉴클레아제, DNase I, 스타필로코커스 장내독소-A, 미국자리공 항바이러스 단백질, 젤로닌, 디프테린 독소, 슈도모나스 외독소, 및 슈도모나스 내독소이다. 예를 들면, 문헌[Pastan et al., Cell 47:641 (1986), 및 Goldenberg, CA--A Cancer Journal for Clinicians 44:43 (1994)]을 참조한다. 다른 적합한 독소가 당해 분야의 당업자에게 공지되어 있다.

[0282] 프로드럭(예를 들면, 펩타이드 화학치료제, WO 제81/01145호)을 활성 항암 약물로 전환하는 프로드럭 활성화 효소에 항체를 접합함으로써 본 개시내용의 항체를 ADEPT에서 또한 사용할 수 있다. 예를 들면, WO 제88/07378호 및 미국 특허 제4,975,278호를 참조한다.

[0283] ADEPT에 유용한 면역접합체의 효소 성분은 임의의 효소를 이의 더 활성의 세포독성 형태로 전환하는 방식으로 프로드럭을 활성화할 수 있는 효소를 포함한다.

[0284] 본 개시내용에서 유용한 효소는 포스페이트 함유 프로드럭을 자유 약물로 전환하기에 유용한 알칼리 포스파타제; 설페이트 함유 프로드럭을 자유 약물로 전환하기에 유용한 아릴설페타제; 비독성 5-플루오로사이토신을 항암 약물로 전환하기에 유용한 사이토신 탈아미노효소, 5-플루오로우라실; 펩타이드 함유 프로드럭을 자유 약물로 전환하기에 유용한 세라티아 프로테아제, 썬몰리신, 서브틸리신, 카복시펩티다제 및 카텡신(예컨대, 카텡신 B 및 L)과 같은 프로테아제; D-아미노산 치환기를 포함하는 프로드럭을 전환하기에 유용한 D-알라닐카복시펩티다제; 글라이코실화된 프로드럭을 자유 약물로 전환하기에 유용한 α -갈락토시다제 및 뉴라미니다제와 같은 탄수화물 절단 효소; β -락탐으로 유도체화된 약물을 자유 약물로 전환하기에 유용한 β -락타마제; 및 각각 페녹시아세틸 또는 페닐아세틸 기에 의해 이의 아민 질소에서 유도체화된 약물을 자유 약물로 전환하기에 유용한 페닐실린 V 아미다제 또는 페닐실린 G 아미다제와 같은 페닐실린 아미다제를 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다. 대안적으로, 본 개시내용의 프로드럭을 자유 활성 약물로 전환하기 위해 항체효소로서 당해 분야에 또한 공지된 효소 활성을 갖는 항체를 사용할 수 있다(예를 들면, 문헌[Massey, Nature 328: 457-458 (1987)] 참조). 중앙 세포 집단에 항체효소를 전달하기 위해 본 명세서에 기재된 바대로 항체-항체효소 접합체를 제조할 수 있다.

[0285] 상기 기재된 헤테로이작용성 가교결합 시약의 사용과 같은 당해 분야에 널리 공지된 기법에 의해 상기 효소를 항체에 공유 결합할 수 있다. 대안적으로, 당해 분야에 널리 공지된 재조합 DNA 기법을 이용하여 본 개시내용의 효소의 적어도 기능적 활성 부분에 연결된 본 개시내용의 항체의 적어도 항원 결합 영역을 포함하는 융합 단백질을 구성할 수 있다(예를 들면, 문헌[Neuberger et al., Nature 312:604-608 (1984)] 참조)

[0286] 항체의 재조합 제조

[0287] 종래 절차를 사용하여(예를 들면, 항체의 중쇄 및 경쇄를 코딩하는 유전자에 특이적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오타이드 프로브의 사용) 본 개시내용의 항체를 코딩하는 DNA를 분리하거나 서열분석할 수 있다. 보통 이것은 DNA를 클로닝하는 것 또는 바람직하게는 항체를 클로닝하는 mRNA(즉, cDNA)를 요한다. 예를 들면, 중합효소 사슬 반응(PCR) 등(예를 들면, 문헌[Sambrook et al. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Guide, Vols 1-3, Cold Spring Harbor Press; Ausubel, et al. (Eds.), Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1994)] 참조)(본 명세서에 참조문헌으로 포함됨)과 같은 표준 기법을 이용하여 클로닝 및 서열분석을 수행한다.

[0288] 특이적 조건 하에 서로에 하이브리드화하는 폴리뉴클레오타이드의 확인이 가능하게 하는 조건에서 뉴클레오타이드 프로브 반응 및 다른 뉴클레오타이드 하이브리드화 반응을 수행한다. 예시적인 이러한 세트의 조건은 하기와 같다: 42°C에서의 50% 포름아마이드, 5X SSC, 20mM Na·P04(pH 6.8) 중에 엄격한 하이브리드화; 및 55°C에서 30분 동안의 1X SSC 중의 세척. 등가 하이브리드화 조건을 계산하고/하거나 원하는 수준의 엄격도를 성취하기 위한 다른 조건을 선택하기 위한 식이 널리 공지되어 있다. 문헌[Ausubel, et al. (Eds.), Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1994), pp. 6.0.3 내지 6.4.10]에 기재된 바대로 온도 및 완충제, 또

는 염 농도의 변경을 통해 등가 엄격도의 조건을 성취할 수 있는 것으로 당해 분야에서 이해된다. 하이브리드화 조건의 변형을 경험적으로 결정하거나 프로브의 구아노신/사이토신(GC) 염기 쌍의 길이 및 백분율에 기초하여 정확히 계산할 수 있다. 하이브리드화 조건을 문헌[Sambrook, et al., (Eds.), Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, New York (1989), pp. 9.47 내지 9.51]에 기재된 바대로 계산할 수 있다.

[0289] 본 명세서에 사용된 "단리된" 핵산 분자 또는 "단리된" 핵산 서열은 (1) 핵산의 천연 공급원에서 원래 관련되는 적어도 하나의 오염물질 핵산 분자로부터 확인되고 분리된 또는 (2) 클로닝되거나, 증폭되거나, 태그되거나, 또는 그렇지 않으면 배경 핵산과 구별되고(관심 대상의 핵산의 서열이 결정될 수 있도록), 단리된 것으로 생각되는 핵산 분자이다. 단리된 핵산 분자는 형태 또는 셋팅에서 자연에서 발견되는 것과 다르다. 따라서, 단리된 핵산 분자는 천연 세포에 존재하면서 핵산 분자로부터 구별된다. 그러나, 단리된 핵산 분자는 항체를 보통 발현하는 세포에 포함된 핵산 분자를 포함하고, 예를 들면 핵산 분자는 천연 세포의 위치와 다른 염색체 위치에 있다.

[0290] 클로닝 및 서열분석에 사용된 RNA에 대한 하나의 공급원은 형질전환 마우스로부터 B 세포를 얻고 B 세포를 불멸 세포에 융합함으로써 제조된 하이브리도마이다. 하이브리도마를 사용하는 것의 이점은 이것이 쉽게 스크리닝될 수 있고, 하이브리도마가 선택된 관심 대상의 인간 단일클론 항체를 생성할 수 있다는 것이다. 대안적으로, RNA는 면역화된 동물의 B 세포(또는 전체 비장)로부터 단리될 수 있다. 하이브리도마 이외의 공급원을 사용할 때, 특이적 결합 특성을 갖는 면역글로불린 또는 면역글로불린 폴리펩타이드를 코딩하는 서열을 스크리닝하는 것이 바람직할 수 있다. 이러한 하나의 스크리닝 방법은 파지 디스플레이 기술의 사용이다. 파지 디스플레이가 추가로 본 명세서에 기재되어 있고, 또한 당해 분야에 널리 공지되어 있다. 예를 들면, 도워 등의 WO 제91/17271호, 맥카페르티 등의 WO 제92/01047호, 및 문헌[Caton and Koprowski, (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6450-54 (1990))](이들 각각 본 명세서에 참조문헌으로 포함됨)을 참조한다. 파지 디스플레이 기술을 이용하는 일 실시양태에서, 면역화된 형질전환 마우스(예를 들면, 전체 비장 cDNA)로부터의 cDNA를 단리하고, 증합효소 사슬 반응을 이용하여 CDR 영역과 같은 면역글로불린 폴리펩타이드의 부분을 코딩하는 cDNA 서열을 증폭하고, 증폭 서열을 파지 벡터에 삽입한다. 패닝과 같은 표준 기법에 의해 원하는 결합 특성을 갖는 가변 영역 펩타이드와 같은 관심 대상의 펩타이드를 코딩하는 cDNA를 확인한다.

[0291] 통상적으로 면역글로불린 폴리펩타이드의 전체 가변 영역을 코딩하는 서열을 결정하지만, CDR 코딩 부분과 같은 가변 영역의 부분을 서열분석하는 것이 때때로 적절하다. 통상적으로 서열분석된 부분은 적어도 30개 길이의 염기이고, 더 자주 가변 영역의 길이의 적어도 약 3분의 1 또는 적어도 약 2분의 1을 코딩하는 것에 기초하여 서열분석된다.

[0292] 표준 기법(예를 들면, 문헌[Sambrook et al. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Guide, Vols 1-3, Cold Spring Harbor Press, 및 Sanger, F. et al. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 5463-5467] 참조)(본 명세서에 참조문헌으로 포함됨)을 이용하여 서열분석을 수행한다. 클로닝된 핵산의 서열을 인간 면역글로불린 유전자 및 cDNA의 공개된 서열과 비교하여, 당업자는, 서열분석된 영역에 따라, (i) 면역글로불린 폴리펩타이드(중쇄의 아이소타입 포함)의 생식선 분절 이용 및 (ii) N-영역 첨가 및 체세포 돌연변이 과정으로부터 생긴 서열을 포함하는 중쇄 및 경쇄 가변 영역의 서열을 용이하게 결정할 수 있다. 면역글로불린 유전자 서열 정보의 하나의 공급원은 생물기술 정보에 대한 국립 센터(National Center for Biotechnology Information), 국립 의학 라이브러리(National Library of Medicine), 국립 건강 협회(National Institutes of Health)(미국 메릴랜드주 베테스다)이다.

[0293] 일단 단리되면, DNA는 발현 벡터에 위치하고, 이후 이것은 숙주 세포, 예컨대 이. 콜라이 세포, 유인원 COS 세포, 인간 배아 신장 293 세포(예를 들면, 293E 세포), 중국 햄스터 난소(CHO) 세포, 또는 골수종 세포(그렇지 않으면 면역글로불린 단백질을 생성하지 않음)에 형질전환되어 재조합 숙주 세포에서 단일클론 항체의 합성을 얻을 수 있다. 항체의 재조합 제조는 당해 분야에 널리 공지되어 있다.

[0294] 발현 조절 서열은 특정한 숙주 유기체에서 작동적으로 연결된 코딩 서열의 발현에 필요한 DNA 서열을 의미한다. 원핵생물에 적합한 조절 서열은, 예를 들면 프로모터, 임의로 오퍼레이터 서열, 및 리보솜 결합 자리를 포함한다. 프로모터, 폴리아데닐화 신호, 및 인핸서를 사용하기 위해 진핵 세포가 공지되어 있다.

[0295] 핵산은 다른 핵산 서열과 기능적 관계식에 놓일 때 작동적으로 연결된다. 예를 들면, 프리서열 또는 분비 리더를 위한 DNA는 폴리펩타이드의 분비에 참여하는 프리단백질로서 발현되는 경우 폴리펩타이드에 대한 DNA에 작동적으로 연결되거나; 프로모터 또는 인핸서는 서열의 전사에 영향을 미치는 경우 코딩 서열에 작동적으로 연결되거나; 리보솜 결합 자리는 번역을 촉진하도록 위치하는 경우 코딩 서열에 작동적으로 연결된다. 일반적으로, 작

동적으로 연결된 연결된 DNA 서열이 인접하고, 분비 리더의 경우에, 인접하고 리딩 상에 있다는 것을 의미한다. 그러나, 인헨서는 인접할 필요가 없다. 편리한 제한 자리에서 결찰에 의해 연결을 성취한다. 이러한 자리가 존재하지 않는 경우, 합성 올리고뉴클레오타이드 어답터 또는 링커를 종래 실행에 따라 사용한다.

[0296] 세포, 세포주, 및 세포 배양물은 대개 상호 교환적으로 사용되고, 모든 이러한 지칭은 본 명세서에서 자손을 포함한다. 형질전환체 및 형질전환된 세포는 전달 수와 관련 없이 이로부터 유도된 1차 피험체 세포 및 배양물을 포함한다. 모든 자손이 고의적인 또는 고의가 아닌 돌연변이로 인해 DNA 함량이 정확히 동일하지 않을 수 있는 것으로 또한 이해된다. 원래 형질전환된 세포에 대해 스크리닝된 것과 같은 동일한 기능 또는 생물학적 활성을 갖는 돌연변이체 자손이 포함된다. 명확한 지칭이 의도되는 경우, 이는 문맥으로부터 명확하다.

[0297] 대안적인 실시양태에서, 직접 단백질 서열분석에 의해 관심 대상의 면역글로불린의 아미노산 서열을 결정할 수 있다. 보편적 코돈표에 따라 적합한 코딩 뉴클레오타이드 서열을 설계할 수 있다.

[0298] 적절한 뉴클레오타이드 변화를 코딩 DNA에 도입함으로써, 또는 펩타이드 합성에 의해 아미노산 서열 변이체를 제조할 수 있다. 이러한 변이체는, 예를 들면 항체의 아미노산 서열 내에 잔기로부터의 결실 및/또는 이의 삽입 및/또는 이의 치환을 포함한다. 결실, 삽입, 및 치환의 임의의 조합이 최종 구성체에 도달되지만, 단 최종 구성체는 원하는 특성을 유지한다. 아미노산 변화는 또한 글라이코실화 자리의 수 또는 위치의 변경과 같이 분자의 번역후 과정을 변경할 수 있다.

[0299] 당해 분야에 공지된 다양한 방법에 의해 항체의 아미노산 서열 변이체를 코딩하는 핵산 분자를 제조한다. 이 방법은 (천연 아미노산 서열 변이체의 경우) 천연 공급원으로부터의 단리 또는 항체의 미리 제조된 변이체 또는 비변이체 버전의 올리고뉴클레오타이드 매개(또는 자리 지정) 돌연변이, PCR 돌연변이, 및 카세트 돌연변이에 의한 제조를 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다.

[0300] 본 개시내용은 또한 숙주 세포, 벡터 및 핵산을 포함하는 숙주 세포에 의해 인식된 조절 서열에 임의로 작동적으로 연결된 본 개시내용의 항체를 코딩하는 단리된 핵산, 및 핵산이 발현되도록 숙주 세포를 배양하는 것 및 임의로, 숙주 세포 배양물 또는 배양 배지로부터 항체를 회수하는 것을 포함할 수 있는 항체의 제조를 위한 제조법 기법을 제공한다. 항체 제조를 위한 다양한 시스템 및 방법이 문헌[Birch & Racher (Adv. Drug Deliv. Rev. 671-685 (2006))]에 검토되어 있다.

[0301] 항체의 재조합 제조를 위해, 이를 코딩하는 핵산을 단리하고 추가의 클로닝(DNA 증폭) 또는 발현을 위해 복제 가능한 벡터에 삽입한다. 단일클론 항체를 코딩하는 DNA를 용이하게 단리하고 종래 절차를 이용하여(예를 들면, 항체의 중쇄 및 경쇄를 코딩하는 유전자에 특이적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오타이드 프로브를 사용하여) 서열분석한다. 많은 벡터가 이용 가능하다. 벡터 성분은 일반적으로 신호 서열, 복제 기원, 하나 이상의 선택적 마커 유전자, 인헨서 요소, 프로모터, 및 전사 종결 서열 중 하나 이상을 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다.

[0302] (1) 신호 서열 성분

[0303] 직접적으로뿐만 아니라, 바람직하게는 성숙 단백질 또는 폴리펩타이드의 N 말단에서 특이적 절단 자리를 갖는 신호 서열 또는 다른 폴리펩타이드인, 이중성 폴리펩타이드와의 융합 폴리펩타이드로서 재조합으로 본 개시내용의 항체를 제조할 수 있다. 선택된 신호 서열은 바람직하게는 숙주 세포에 의해 인식되고 처리되는(즉, 신호 펩티다제에 의해 절단되는) 것이다. 원핵 숙주 세포가 자연 항체 신호 서열을 인식하고 처리하지 않는 경우, 신호 서열을 예를 들면 펩티드 분해효소(예를 들면, peIB) 알칼리 포스파타제, 페니실리나제, lpp, 또는 열 안정 장내독소 II 리더의 군으로부터 선택된 신호 서열로 치환할 수 있다. 효모 분비의 경우, 본래 신호 서열을 예를 들면 효모 인버타제 리더, α 인자 리더(사카로마이세스 및 클루이버로마이세스 α 인자 리더 포함), 또는 산 포스파타제 리더, C. 알비칸스 글루코아미라제 리더, 또는 WO 제90/13646호에 기재된 신호에 의해 치환할 수 있다. 포유동물 세포 발현에서, 포유동물 신호 서열 및 바이러스 분비 리더, 예를 들면 단순 포진 gD 신호가 이용 가능하다.

[0304] 이러한 전구체 영역에 대한 DNA는 항체를 코딩하는 DNA에 리딩 프레임 내로 결찰된다.

[0305] (2) 복제 기원 성분

[0306] 발현 및 클로닝 벡터 둘 다 벡터가 하나 이상의 선택된 숙주 세포로 복제되게 하는 핵산 서열을 포함한다. 일반적으로, 클로닝 벡터에서 이 서열은 벡터가 숙주 염색체 DNA와 독립적으로 복제되게 하고, 복제 기원 또는 자체적으로 복제하는 서열을 포함하는 것이다. 이러한 서열은 다양한 박테리아, 효모, 및 바이러스에 대해 널리 공

지되어 있다. 플라스미드 pBR322로부터의 복제 기원은 대부분의 그램 음성 박테리아에 적합하고, 2 μ 플라스미드 기원은 효모에 적합하고, 다양한 바이러스 기원은 포유동물 세포에서 클로닝 벡터에 유용하다. 일반적으로, 복제 기원 성분은 포유동물 발현 벡터에 필요하지 않다(SV40 기원이 초기 프로모터를 포함하므로 이것이 통상적으로 유일하게 사용될 수 있다).

[0307] (3) 선택적 마커 성분

[0309] *발현 및 클로닝 벡터는 또한 선택 가능한 마커라 칭하는 선택적 유전자를 포함할 수 있다. 통상적인 선택 유전자는 (a) 항생제 또는 다른 독소, 예를 들면 암피실린, 네오마이신, 메토틱세이트, 테트라사이클린, G418, 제네티신, 히스티디놀, 또는 마이코페놀산에 내성을 부여하거나, (b) 영양요구성 결핍을 보완하거나, (c) 복합 배지로부터 이용 가능하지 않은 중요한 영양소를 제공하는 단백질을 코딩한다(예를 들면, 바실리에 대해 D-알라닌 라세마제를 코딩하는 유전자).

[0310] 선택 계획의 하나의 예는 숙주 세포의 성장을 중지시키는 약물을 이용한다. 이중성 유전자에 의해 성공적으로 형질전환된 이 세포는 약물 내성을 부여하는 단백질을 생성하고 따라서 선택 섭생에 생존한다. 이러한 우세한 선택의 예는 약물 메토틱세이트, 네오마이신, 히스티디놀, 퓨로마이신, 마이코페놀산 및 하이그로마이신을 사용한다.

[0311] 포유동물 세포에 대한 적합한 선택 가능한 마커의 다른 예는 항체 코딩 핵산을 차지하기 위해 경쟁적인 세포의 확인이 가능하게 하는 것, 예컨대 DHFR, 티미딘 키나아제, 메탈로티오네인-I 및 -II, 바람직하게는 영장류 메탈로티오네인 유전자, 아데노신 탈아미노효소, 오르니틴 데카복실라제 등이다.

[0312] 예를 들면, DHFR의 경쟁적 길항제인 메토틱세이트(Mtx)를 포함하는 배양 배지 내에 모든 형질전환체를 배양하여 DHFR 선택 유전자에 의해 형질전환된 세포를 우선 확인한다. 적절한 숙주 세포는, 야생형 DHFR이 이용될 때, DHFR 활성이 결핍된 중국 햄스터 난소(CHO) 세포주이다.

[0313] 대안적으로, 아미노글라이코사이드 항생제, 예를 들면 카나마이신, 네오마이신, 또는 G418과 같은 선택 가능한 마커에 대한 선택 물질을 포함하는 배지 내에 세포 성장에 의해 본 개시내용의 항체를 코딩하는 DNA 서열에 의해 형질전환된 또는 공동 형질전환된 숙주 세포(특히 내인성 DHFR을 포함하는 야생형 숙주), 야생형 DHFR 단백질, 및 아미노글라이코사이드 3'-포스포전달효소(APH)와 같은 다른 선택 가능한 마커가 선택될 수 있다. 미국 특허 제4,965,199호를 참조한다.

[0314] 효모에서 사용하기에 적합한 선택 유전자는 효모 플라스미드 YRp7에 존재하는 trp1 유전자이다(Stinchcomb et al., Nature, 282: 39 (1979)). trp1 유전자는 ATCC 44076호 또는 PEP4-1호와 같은 트리토판에서 성장하는 능력이 결여된 효모의 돌연변이체 균주에 대한 선택 마커를 제공한다, 예를 들면, Jones, (Genetics 85:12 (1977)). 이후, 효모 숙주 세포 계통 내의 trp1 병소의 존재는 트리토판의 부재 하의 성장에 의한 변환을 검출하기 위해 효과적인 환경을 제공한다. 유사하게, Leu2-결핍 효모 균주(ATCC 20,622호 또는 38,626호)는 Leu2 유전자를 보유하는 공지된 플라스미드에 의해 보완된다. Ura3-결핍 효모 균주는 ura3 유전자를 보유하는 플라스미드에 의해 보완된다.

[0315] 또한, 클루이버로마이세스 효모의 변환을 위해 1.6 μ m 원형 플라스미드 pKD1로부터 유도된 벡터를 사용할 수 있다. 대안적으로, 재조합 송아지 키모신의 대규모 제조를 위한 발현 시스템이 문헌[K. lactis Van den Berg, (Bio/Technology, 8:135 (1990))]에 보고되어 있다. 클루이버로마이세스의 산업용 균주에 의한 성숙 재조합 인간 혈청 알부민의 분비를 위한 안정한 다중 카피 발현 벡터가 또한 개시되어 있다(Fleer et al, Bio/Technology, 9:968-975 (1991)).

[0316] (4) 프로모터 성분

[0317] 발현 및 클로닝 벡터는 보통 숙주 유기체에 의해 인식되고 항체 코딩 핵산에 작동적으로 연결된 프로모터를 포함한다. 원핵 숙주와 사용하기에 적합한 프로모터는 아라비노스(예를 들면, araB) 프로모터 포프로모터, β -락타마제 및 락토스 프로모터 시스템, 알칼리 포스파타제, 트리토판(trp) 프로모터 시스템, 및 하이브리드 프로모터, 예컨대 tac 프로모터를 포함한다. 그러나, 다른 공지된 박테리아 프로모터가 적합하다. 박테리아 시스템에서 사용하기 위한 프로모터는 또한 본 개시내용의 항체를 코딩하는 DNA에 작동적으로 연결된 샤인-달라르노(Shine-Dalgarno: S.D.) 서열을 포함한다.

[0318] 프로모터 서열은 진핵생물에 공지되어 있다. 실질적으로 모든 진핵 유전자는 전사가 개시되는 자리로부터 상류에 대략 25개 내지 30개의 염기가 위치한 AT 풍부 영역을 갖는다. 많은 유전자의 전사의 시작으로부터 상류에

70개 내지 80개의 염기가 발견된 다른 서열은 N이 임의의 뉴클레오타이드일 수 있는 CNCAAT 영역이다. 대부분의 진행 유전자의 3' 말단에서 코딩 서열의 3' 말단에 대한 폴리 A 꼬리의 첨가에 대한 신호일 수 있는 AATAAA 서열이 있다. 모든 이 서열은 진행 발현 벡터에 적절히 삽입된다.

[0319] 효모 숙주와 사용하기에 적합한 프로모터 서열의 예는 3-포스포글라이세레이트 키나아제 또는 다른 글라이콜 분해 효소, 예컨대 에놀라제, 글라이세르알데하이드-3-포스페이트 탈수소효소, 헥소키나아제, 피루베이트 데카복실라제, 포스포프рук토키나아제, 글루코스-6-포스페이트 아이소머라제, 3-포스포글라이세레이트 뮤타제, 피루베이트 키나아제, 3탄당 인산 아이소머라제, 포스포글루코스 아이소머라제, 및 글루코키나아제에 대한 프로모터를 포함한다.

[0320] 성장 조건에 의해 제어되는 전사의 추가의 이점을 갖는 유도성 프로모터인 다른 효모 프로모터는 알코올 탈수소 효소 2, 아이소사이토크롬 C, 산 포스파타제, 질소 대사작용가 관련된 변성 효소, 메탈로티오네인, 글라이세르알데하이드-3-포스페이트 탈수소효소, 및 말토즈 및 갈락토스 이용을 담당하는 효소에 대한 프로모터 영역이다. 효모 발현에 사용하기에 적합한 벡터 및 프로모터는 EP 제73,657호에 추가로 기재되어 있다. 효모 인헨서는 또한 유리하게는 효모 프로모터와 사용된다.

[0321] 포유동물 숙주 세포 내의 벡터로부터의 항체 전사는, 예를 들면 바이러스, 예컨대 아벨손 백혈병 바이러스, 폴리오마 바이러스, 계두 바이러스, 아데노바이러스(예컨대, 아데노바이러스 2), 소 유두종 바이러스, 조류 육종 바이러스, 가장 바람직하게는 거대세포 바이러스, 래트로바이러스, 간염-B 바이러스, 유인원 바이러스 40(SV40)의 계놈으로부터 얻은 프로모터, 이중성 포유동물 프로모터, 예를 들면 액틴 프로모터 또는 면역글로불린 프로모터, 열 충격 프로모터에 의해 조절되고, 단 이러한 프로모터는 숙주 세포 시스템과 상용성이다.

[0322] SV40 바이러스의 초기 및 후기 프로모터는 SV40 바이러스 복제 기원을 또한 포함하는 SV40 제한 단편으로서 편리하게 얻어진다. 인간 거대세포 바이러스의 즉각적인 초기 프로모터는 HindIII E 제한 단편으로서 편리하게 얻어진다. 벡터로서 소 유두종 바이러스를 사용하여 포유동물 숙주 내에서 DNA를 발현하기 위한 시스템은 미국 특허 제4,419,446호에 개시되어 있다. 이 시스템의 변형은 미국 특허 제4,601,978호에 기재되어 있다. 단순 포진 바이러스로부터의 티미딘 키나아제 프로모터의 조절 하에 마우스 세포에서 인간 β -인터페론 cDNA의 발현에 대해 문헌[Reyes et al., Nature 297: 598-601 (1982)]을 또한 참조한다. 대안적으로, 프로모터로서 라우스 육종 바이러스 긴 말단 반복을 사용할 수 있다.

[0323] (5) 인헨서 요소 성분

[0324] 인헨서 서열을 벡터에 삽입하여 더 고등의 진핵생물에 의한 본 개시내용의 항체를 코딩하는 DNA의 전사가 대개 증가한다. 많은 인헨서 서열이 포유동물 유전자(글로빈, 엘라타제, 알부민, 알파-태아단백질, 및 인슐린)로부터 공지되어 있다. 통상적으로, 그러나, 진핵 세포 바이러스로부터의 인헨서를 사용할 수 있다. 예는 복제 기원의 후기 사이드 상의 SV40 인헨서(bp 100 내지 270), 거대세포 바이러스 초기 프로모터 인헨서, 복제 기원의 후기 사이드 상의 폴리오마 인헨서 및 아데노바이러스 인헨서를 포함한다. 진핵 프로모터의 활성화를 위한 인헨싱 요소에 대해 문헌[Yaniv, Nature 297:17-18 (1982)]을 또한 참조한다. 인헨서는 항체 코딩 서열에 대한 5'번 또는 3'번 위치에서 벡터로 스플라이싱될 수 있지만, 바람직하게는 프로모터로부터 5'번 자리에 위치한다.

[0325] (6) 전사 종결 성분

[0326] 진핵 숙주 세포(효모, 진균, 곤충, 식물, 동물, 인간, 또는 다른 다세포 유기체로부터의 유핵 세포)에 사용되는 발현 벡터는 전사의 종결 및 mRNA의 안정화에 필요한 서열을 또한 포함한다. 이러한 서열은 진핵 또는 바이러스 DNA 또는 cDNA의 5' 및, 때때로 3' 비번역 영역으로부터 보통 이용 가능하다. 이 영역은 항체를 코딩하는 mRNA의 비번역 부분에서 폴리아데닐화 단편으로서 전사된 뉴클레오타이드 분절을 포함한다. 하나의 유용한 전사 종결 성분은 소 성장 호르몬 폴리아데닐화 영역이다. WO 제94/11026호를 참조하고 발현 벡터는 여기에 개시되어 있다. 다른 것은 마우스 면역글로불린 경쇄 전사 종결제이다.

[0327] (7) 숙주 세포의 선택 및 형질전환

[0328] 본 명세서에서의 벡터 내에 DNA를 클로닝하고 발현하기 위한 적합한 숙주 세포는 상기 기재된 원핵생물, 효모, 또는 더 고등의 진핵생물 세포이다. 이 목적에 적합한 원핵생물은 유박테리아, 예컨대 그람 음성 또는 그람 양성 유기체, 예를 들면 엔테로박테리아세아에, 예컨대 에스체리치아, 예를 들면 이. 콜라이, 엔테로박터, 에르비니아, 클레브시엘라, 프로테우스, 살모넬라, 예를 들면 살모넬라 티피뮤리움(Salmonella typhimurium), 세라티아, 예를 들면 세라티아 마르세센스(Serratia marcescans), 및 쉬겔라, 및 바실리, 예컨대 B. 서브틸리스 및 B. 리체니포르미스(licheniformis)(예를 들면, 1989년 4월 12일에 공개된 DD 제266,710호에 개시된 B. 리체니포르

미스 41 P), 슈도모나스, 예컨대 P. 에루지노사, 및 스트렙토마이세스를 포함한다. 하나의 바람직한 이. 콜라이 클로닝 숙주는 이. 콜라이 294(ATCC 31,446호)이지만, 다른 균주, 예컨대 이. 콜라이 B, 이. 콜라이 X1776(ATCC 31,537호), 및 이. 콜라이 W3110(ATCC 27,325호)이 적합하다. 이 예는 제한이라기보다는 예시이다.

[0329] 원핵생물 이외에, 진핵 미생물, 예컨대 사상 진균 또는 효모가 항체 코딩 벡터에 대한 적합한 클로닝 또는 발현 숙주이다. 사카로마이세스 세레비시아에, 또는 보통 제빵사의 효모는 더 저등의 진핵 숙주 미생물 중에서 가장 흔히 사용된다. 그러나, 스치조사카로마이세스 폼베(*Schizosaccharomyces pombe*); 클루이버로마이세스 (*Kluyveromyces*) 숙주, 예컨대, 예를 들면 K. 락티스(*lactis*), K. 프라질리스(*fragilis*)(ATCC 12,424호), K. 불가가리쿠스(*bulgaricus*)(ATCC 16,045호), K. 위커라미(*wickeramii*)(ATCC 24,178호), K. 왈티(*waltii*)(ATCC 56,500호), K. 드로소필라룸(*drosophilum*)(ATCC 36,906호), K. 테르모톨러란스(*thermotolerans*), 및 K. 막시아누스(*marxianus*); 야로이아(*yarowia*)(EP 제402,226호); 치아아 파스토르스(*Pichia pastors*)(EP 제183,070호); 칸디다; 트라이코테르마 레시아(*Trichoderma reesia*)(EP 제244,234호); 뉴로스포라 크라사(*Neurospora crassa*); 슈반니오마이세스(*Schwanniomyces*), 예컨대 슈반니오마이세스 오시덴탈리스(*Schwanniomyces occidentalis*); 및 사상 진균, 예컨대, 예를 들면 뉴로스포라, 페니실리움, 톨리포클라디움, 및 아스퍼질루스 숙주, 예컨대 A. 니둘란스 및 A. 니게르와 같은 다수의 다른 속, 종, 및 균주가 흔히 이용 가능하고 본 명세서에서 유용하다.

[0330] 글라이코실화된 항체의 발현에 적합한 숙주 세포는 다세포 유기체로부터 유도된다. 무척추동물 세포의 예는 식물 및 곤충 세포를 포함한다. 다양한 바콜로바이러스 균주 및 변이체 및 스포둡테라 프루지페르다(카테르필라), 아테스 아에집티(모기), 아테스 알보픽투스(모기), 드로소필라 멜라노가스테르(초파리), 및 봄빅스 모리와 같은 숙주로부터의 상응하는 허용 곤충 숙주 세포가 확인되었다. 아우토그라파 칼리포르니카 NPV의 L-1 변이체 및 봄빅스 모리 NPV의 Bm-5 균주와 같은 형질감염을 위한 다양한 바이러스 균주가 공공연히 이용 가능하고, 특히 스포둡테라 프루지페르다 세포의 형질감염을 위해 본 개시내용에 따라 본 명세서에서 이러한 바이러스를 바이러스로서 사용할 수 있다.

[0331] 면, 옥수수, 감자, 대두, 피투니아, 토마토, 담배, 램나(*lemna*), 및 다른 식물 세포의 식물 세포 배양물을 숙주로서 또한 사용할 수 있다.

[0332] 유용한 포유동물 숙주 세포주의 예는 중국 햄스터 난소 세포, 예컨대 CHOK1 세포(ATCC CCL61), DXB-11, DG-44, 및 중국 햄스터 난소 세포/-DHFR(CHO, Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4216 (1980)); SV40에 의해 형질전환된 원숭이 신장 CV1 세포주(COS-7, ATCC CRL 1651); 인간 배아 신장 세포주(현탁액 배양물에서의 성장을 위해 서브클로닝된 293 또는 293 세포)(Graham et al., J. Gen Virol. 36: 59, 1977); 베이비 햄스터 신장 세포(BHK, ATCC CCL 10); 마우스 세르틀리 세포(TM4, Mather, (Biol. Reprod. 23: 243-251, 1980)); 원숭이 신장 세포(CV1 ATCC CCL 70); 아프리카 그린 원숭이 신장 세포(VERO-76, ATCC CRL-1587); 인간 자궁경부암 종 세포(HELA, ATCC CCL 2); 개과 신장 세포(MDCK, ATCC CCL 34); 베팔로 랫트 간 세포(BRL 3A, ATCC CRL 1442); 인간 폐 세포(W138, ATCC CCL 75); 인간 간 세포(Hep G2, HB 8065); 마우스 유방 종양(MMT 060562, ATCC CCL51); TRI 세포(Mather et al., Annals N.Y Acad. Sci. 383: 44-68 (1982)); MRC 5 세포; FS4 세포; 및 인간 간암 세포주(Hep G2)이다.

[0333] 숙주 세포를 항체 제조를 위한 상기 기재된 발현 또는 클로닝 벡터와 형질전환하거나 형질감염시키고, 프로모터를 유도하거나, 형질전환체를 선택하거나, 원하는 서열을 코딩하는 유전자를 증폭하기 위해 적절한 대로 종래 영양소 배지 내에 배양한다. 또한, 신규한 벡터 및 선택적 마커에 의해 분리된 전사 단위의 다수의 카피에 의해 형질감염된 세포주는 표적에 결합하는 항체의 발현에 특히 유용하고 바람직하다.

[0334] (8) 배양하는 숙주 세포

[0335] 다양한 배지 내에서 본 개시내용의 항체를 제조하기 위해 사용된 숙주 세포를 배양할 수 있다. 상업적으로 구입 가능한 배지, 예컨대 햄의 F10(시그마), 최소 필수 배지((MEM)(시그마), RPMI-1640(시그마), 및 둘베코 변형 이글 배지(DMEM)(시그마))가 숙주 세포를 배양하는 데 적합하다. 또한, 문헌[Ham et al., (Meth. Enz. 58: 44, 1979), Barnes et al., Anal. Biochem. 102: 255 (1980)], 미국 특허 제4,767,704호; 제4,657,866호; 제4,927,762호; 제4,560,655호; 또는 제5,122,469호; WO 제90103430호; WO 제87/00195호; 또는 미국 특허 제30,985호에 기재된 임의의 배지를 숙주 세포를 위한 배양물 배지로서 사용할 수 있다. 임의의 배지는 호르몬 및/또는 다른 성장 인자(예컨대, 인슐린, 트랜스페린, 또는 상피 성장 인자), 염(예컨대, 염화나트륨, 칼슘, 마그네슘, 및 포스페이트), 완충제(예컨대, HEPES), 뉴클레오타이드(예컨대, 아데노신 및 티미딘), 항생제(예컨대, 겐타마이신 약물), 미량 원소(마이크로몰 범위의 최종 농도로 보통 존재하는 무기 화합물로 정의됨), 및 글루코

스 또는 등가 에너지원과 필요한 대로 보충될 수 있다. 임의의 다른 필요한 보충물질은 당해 분야의 당업자에게 공지된 적절한 농도로 또한 포함될 수 있다. 배양물 조건, 예컨대 온도, pH, 등은 발현에 선택된 숙주 세포와 이전에 사용된 것이고, 보통의 당업자에게 명확하다.

[0336] (9) 항체의 정제

[0337] 제조합 기법을 이용할 때, 항체는 주변세포질 공간에서 세포내 제조되거나, 미생물 배양물로부터 배지로 직접 분비될 수 있다. 제1 단계로서 항체가 세포내 제조되는 경우, 숙주 세포 또는 용해된 단편 중 어느 하나인 미립자 잔해물이 예를 들면 원심분리 또는 한외여과에 의해 제거된다. 문헌[Better et al. (Science 240:1041-43, 1988; ICSU Short Reports 10:105 (1990); 및 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:457-461 (1993)]은 이. 콜라이의 주변세포질 공간으로 분비된 항체를 분리하기 위한 절차를 기재하고 있다. [또한, 문헌(Carter et al., Bio/Technology 10:163-167 (1992)) 참조].

[0338] 예를 들면, 하이드록시아파타이트 크로마토그래피 양이온 또는 조류 교환 크로마토그래피, 및 친화도 크로마토그래피를 이용하여 미생물 또는 포유동물 세포로부터 제조된 항체 조성물을 정제할 수 있고, 친화도 크로마토그래피가 바람직한 정제 기법이다. 친화도 리간드로서의 단백질 A의 적합성은 항체에 존재하는 임의의 면역글로불린 Fc 도메인의 중 및 아이소타입에 따라 달라진다. 인간 $\gamma 1$, $\gamma 12$, 또는 $\gamma 4$ 중쇄에 기초한 항체를 정제하기 위해 단백질 A를 사용할 수 있다(Lindmark et al., J. Immunol. Meth. 62: 1-13, 1983). 단백질 G는 모든 마우스 아이소타입 및 인간 $\gamma 3$ 에 추천된다(Guss et al., EMBO J. 5:1567-1575 (1986)). 친화도 리간드가 부착되는 매트릭스는 가장 자주 아가로스이지만, 다른 매트릭스가 이용 가능하다. 기계적으로 안정한 매트릭스, 예컨대 조절된 기공 유리 또는 폴리(스티렌다이비닐)벤젠은 아가로스보다 성취될 수 있는 것보다 더 빠른 유속 및 더 짧은 과정 시간을 허용한다. 항체가 CH 3 도메인을 포함할 때, 베이커본드(Bakerbond) ABX(상표명) 수지(미국 뉴저지주 필립스버그에 소재하는 제이. 티. 베이커(J. T. Baker))가 정제에 유용하다. 단백질 정제에 대한 다른 기법, 예컨대 이온-교환 칼럼에서의 분별화, 에탄올 침전, 역상 HPLC, 실리카 상의 크로마토그래피, 음이온 또는 양이온 교환 수지(예컨대, 폴리아스파르트산 칼럼)에서 헤파린 세파로스(SEPHAROSE)(등록상표) 크로마토그래피 상의 크로마토그래피, 크로마토포커싱(chromatofocusing), SDS-PAGE, 및 암모늄 설페이트 침전이 회수하고자 하는 항체에 따라 또한 이용 가능하다.

[0339] 스크리닝 방법

[0340] 효과적인 치료제는 상당한 독성이 없는 효과적인 물질을 확인하는 것에 의존한다. 당해 분야에 공지된 방법에 의해 결합 친화도에 대해 항체를 스크리닝할 수 있다. 예를 들면, 문헌[Current Protocols in Molecular Biology (1999) John Wiley & Sons, NY](본 명세서에 그 전문이 참조문헌으로 포함됨)에 기재된, 예를 들면 겔 이동 검정, 웨스턴 블롯, 방사선표지 경쟁 검정, 크로마토그래피에 의한 공동 분별화, 공침전, 가교결합, ELISA 등을 이용할 수 있다.

[0341] 본 개시내용의 일 실시양태에서, 표적 항원의 활성을 조절하는 항체를 스크리닝하는 방법은 시험 항체를 표적 폴리펩타이드와 접촉시키는 것 및 항체와 표적 리간드 사이의 복합체의 존재를 검정하는 것을 포함한다. 이러한 검정에서, 리간드를 통상적으로 라벨링한다. 적합한 항온처리 후, 자유 리간드를 결합 형태로 존재하는 것으로부터 분리하고, 자유 또는 비복합체화 라벨의 양은 표적 리간드에 결합하는 특정 항체의 능력의 측정치이다.

[0342] 본 개시내용의 다른 실시양태에서, 표적 폴리펩타이드에 적합한 결합 친화도를 갖는 항체 단편 또는 CDR에 대한 고속 스크리닝을 이용한다. 간단히 말하면, 다수의 상이한 작은 펩타이드 시험 화합물을 기질 상에서 합성한다. 펩타이드 시험 항체를 표적 폴리펩타이드와 접촉시키고 세척한다. 이후, 당해 분야에 널리 공지된 방법에 의해 결합 폴리펩타이드를 검출한다. 상술한 약물 스크리닝 기법에서 사용하기 위해 플레이트에 본 개시내용의 정제된 항체를 또한 직접 코팅할 수 있다. 또한, 비중화 항체는 표적을 포획하기 위해 사용되고 이것을 고체 지지체 상에 부동화할 수 있다.

[0343] TGF β 및 항-TGF β 항체의 생물학적 활성의 중화의 평가 방법은 당해 분야에 공지되어 있다. 예를 들면, 미국 특허 제7,867,496호를 참조한다. 실험실내 바이오검정의 예는 (1) EGF의 존재 하의 부드러운 한천에서 NRK 세포의 콜로니 형성 유도(Roberts et al. (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78:5339-5343); (2) 연골질 표현형을 발현하도록 원시적 중간엽 세포의 분화 유도(Seyedin et al. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:2267-2271); (3) Mv1Lu 밍크 폐 상피 세포의 성장 억제(Danielpour et al. (1989) J. Cell. Physiol., 138:79-86) 및 BBC-1 원숭이 신장 세포(Holley et al. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:5989-5992); (4) C3H/HeJ 마우스 흉선세포의 유사분열 억제(Wrann et al. (1987) EMBO J., 6:1633-1636); (5) 랫트 L6 근원세포의 분화

억제(Florini et al. (1986) J. Biol. Chem., 261:16509-16513); (6) 피브로넥틴 생성 측정(Wrana et al. (1992) Cell, 71:1003-1014); (7) 루시퍼라제 리포터 유전자에 융합된 플라스미노겐 활성화인자 억제제 I(PAI-1) 프로모터의 유도(Abe et al. (1994) Anal. Biochem., 216:276-284); (8) 샌드위치 효소 연결 면역흡착 검정(Danielpour et al. (1989) Growth Factors, 2:61-7); 및 (9) 문헌[Singh et al. (2003) Bioorg. Med. Chem. Lett., 13(24):4355-4359]에 기재된 세포 검정을 포함한다.

[0344] 몇몇 실시양태에서, TGF β 1 및 TGF β 2의 항체 중화는 TGF β 3의 중화보다 적어도 2배 내지 50배, 10배 내지 100배, 2배, 5배, 10배, 25배, 50배 또는 100배, 또는 20% 내지 50%, 50% 내지 100%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 또는 100% 더 강력하다.

[0345] (예를 들면, TGF β 항체에 의해) TGF β 의 생물학적 활성 및 중화를 평가하는 추가의 방법은 예로 제공된다. 예를 들면, 중화를 중화 검정으로 측정할 수 있고, 이를 IC50 값으로 표시한다. 제2 분자 또는 세포 활성의 최대 생물학적 반응의 억제에 반을 이끄는 데 필요한 분자의 농도를 결정함으로써 소정의 분자에 대해 IC50 값은 계산할 수 있다. IC50이 더 낮을수록, 원하는 단백질 활성을 억제하는 분자의 효능이 더 높다. 본 명세서에 고려되는 예시적인 중화 검정은 인터류킨-11 방출 검정 및 HT-2/IL-4 세포 증식 검정을 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다. 또한, 항체가 하나의 TGF β 동중체를 우선적으로 억제하는지를 결정하기 위해 pSMAD 인산화 검정 또는 rhLAP 결합 검정을 비롯한 TGF β 활성 검정을 수행할 수 있다. 추가의 실시양태에서, 항체는 TGF β 3과 비교하여 TGF β 1 및 TGF β 2에 대해 더 낮은 IC50(즉, 더 우수한 결합, 더 높은 효능)을 갖는다.

[0346] 병용 치료

[0347] 일 실시양태에서, 본 개시내용의 항체를 본 명세서에 기재된 질환 또는 장애를 치료하는 데 유용한 제2 물질과 투여한다. 표적 항원에 대한 결합에서 효과적인 하나 초과 항체가 확인된 경우, 항체의 조합이 함께 표적 폴리펩타이드와 관련된 병증 또는 장애에 대해 훨씬 개선된 효율을 제공하도록 혼합될 수 있는 TGF β 의 상이한 동중체에 우선적으로 결합하고/하거나, 표적 항원의 상이한 에피토프에 대한 2개 이상의 항체가 고려된다. 표적 폴리펩타이드와 관련된 치료하고자 하는 병증 또는 장애로부터 고생하거나, 고생할 소인이 있는 인간 또는 포유동물에게 본 발명의 하나 이상의 항체를 포함하는 조성물을 투여할 수 있다.

[0348] 2종의 치료제의 동시 투여는 이 치료제가 이의 치료학적 효과를 발휘하는 동안 시간이 중첩되는 한, 동일한 시간에 또는 동일한 경로에 의해 이 치료제가 투여될 것이 요구되지 않는다. 상이한 일 또는 주에 투여되면서, 동시 또는 순차 투여가 고려된다.

[0349] 제2 물질은 다른 치료제, 예컨대 사이토킨, 성장 인자, 다른 표적 항원에 대한 항체, 소염제, 항응고물질, 세포외 기질 생성을 억제하는 물질, 혈압을 감소시키거나 증가시키는 물질, 콜레스테롤, 트라이글라이세라이드, LDL, VLDL, 또는 지방단백질(a)을 감소시키거나 HDL을 증가시키는 물질, 콜레스테롤 조절 단백질의 수준을 증가시키거나 감소시키는 물질, 항종양 약물 또는 분자일 수 있다. 과증식성 장애, 예컨대 암 또는 종양을 갖는 환자의 경우, 제2 치료학적 양상, 예컨대 방사선치료, 화학요법, 광역학 치료, 또는 수술과의 조합이 또한 고려된다.

[0350] 본 개시내용의 항체 및 제2 물질이 동일한 제제 내에 동시에 제공될 수 있는 것이 고려된다. 물질이 별도의 제제로 투여되고 동시에 투여되는 것이 추가로 고려되고, 동시는 서로의 30분 내에 제공되는 물질을 의미한다.

[0351] 다른 실시양태에서, 항체 조성물의 투여 전에 제2 물질을 투여한다. 투여 전은 항체의 투여 전 30분까지 항체에 의한 치료 전의 1주의 범위 내의 제2 물질의 투여를 의미한다. 항체 조성물의 투여에 후속하여 제2 물질을 투여하는 것이 추가로 고려된다. 후속 투여는 항체 투여 후 1주까지 항체 치료 후 30분으로부터의 투여를 기술하는 것으로 의도된다.

[0352] 적절한 경우, 다른 부가 치료제를 투여할 수 있는 것으로 추가로 고려된다. 예를 들면, 적절한 경우 세포외 기질 분해 단백질, 수술 치료, 화학요법, 세포독성제, 또는 방사선 치료제를 환자에게 또한 투여할 수 있다.

[0353] 항체를 예컨대 제2 물질과 조합하여 투여할 때(여기서, 제2 물질은 사이토킨 또는 성장 인자, 또는 화학치료제임), 투여는 또한 방사선치료제 또는 방사선 치료의 이용을 포함하는 것으로 추가로 고려된다. 암에 대해 치료되는 환자에게 통상적으로 제공되는 용량에서 처방의가 결정할 바대로 항체 조성물과 조합되어 투여되는 방사선 치료제를 투여한다.

[0354] 세포독성제는 세포 기능을 억제하거나 예방하고/하거나, 세포 파괴를 야기하는 물질을 의미한다. 이 용어는 방사성 동위원소(예를 들면, I131, I125, Y90 및 Re186), 화학치료제, 및 독소, 예컨대 박테리아, 진균, 식물 또

는 동물 기원의 효소 활성 독소 또는 합성 독소, 또는 이들의 단편을 포함하는 것으로 의도된다. 비세포독성제는 세포 기능을 억제하거나 예방하지 않고/않거나, 세포 파괴를 야기하지 않는 물질을 의미한다. 비세포독성제는 세포독성이도록 활성화될 수 있는 물질을 포함할 수 있다. 비세포독성제는 비드, 리포솜, 매트릭스 또는 입자(예를 들면, 미국 특허 공보 제2003/0028071호 및 제2003/0032995호(본 명세서에 참조문헌으로 포함됨) 참조)를 포함할 수 있다. 이러한 물질을 본 개시내용에 따른 항체와 접합, 커플링, 연결 또는 회합할 수 있다.

본 개시내용의 항체와 사용하기 위해 고려되는 화학치료제는 표 1에 기재된 것을 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다:

표 1

<u>알킬화제</u>	<u>천연 제품</u>
<u>질소 머스타드</u>	<u>항유사분열 약물</u>
메클로르에타민	
사이클로포스파마이드	<u>타산</u>
이포스파마이드	타클리탁셀
멜팔란	빈카 알칼로이드
클로르암부실	빈블라스틴(VLB)
	빈크리스틴
<u>나이트로소유레아</u>	비노렐빈
카르무스틴(BCNU)	탁스테테(등록상표)(도세탁셀)
로무스틴(CCNU)	에스트라무스틴
세무스틴(메틸-CCNU)	에스트라무스틴 포스페이트
<u>에틸렌이민/메틸-멜라민</u>	<u>에피도도필로톡신</u>
트라이에틸렌멜라민(TEM)	에토포사이드
트라이에틸렌 티오포스포르아마이드(티오테파)	테니포사이드
헥사메틸 멜라민(HMM, 알트레타민)	
<u>알킬 설포네이트</u>	<u>항생제</u>
부술판	악티모마이신 D
	다우노마이신(루비도-마이신)
	독소루비신(아드리아-마이신)
<u>트라이아진</u>	미톡산트로네이다루비신
다카바진(DTIC)	블레오마이신
	스플리카마이신(미트라마이신)
<u>항대사물질</u>	미토마이신C
<u>엽산 유사체</u>	닥티노마이신
메토티렉세이트	아피디콜린
트라이메트렉세이트	
페메트렉스트(대표적 항엽산)	

<u>피리미딘 유사체</u> 5-플루오로우라실 플루오로데옥시유리딘 겜시타빈 사이토신 아라비노사이드 (AraC, 사이타라빈) 5-아자사이티딘 2,2'-다이플루오로데옥시-사이티딘 <u>퓨린 유사체</u> 6-머캅토피린 6-티오구아닌 아자티오프린 2'-데옥시코포르마이신(켄토스타틴) 에리쓰로하이드록시노닐-아데닌(EHNA) 플루다라빈 포스페이트 2-클로로데옥시아데노신 (클라드리빈, 2-CdA) <u>I형 토포아이스머라제 억제제</u> 캄포테신 토포테칸 이리노테칸 <u>생물학적 반응 개질제</u> G-CSF GM-CSF	<u>효소</u> L-아스파라기나제 L-아르기나제 <u>방사선증감제</u> 메트로니다졸 미소니다졸 테스메틸미소니다졸 피모니다졸 에타니다졸 니모라졸 RSU 1069 EO9 RB 6145 SR4233 니코틴아마이드 5-브로모데옥시유리딘 5-요오도데옥시유리딘 브로모데옥시사이티딘 <u>기타 물질</u> <u>백금 배위 착체</u> 시스플라틴 카보플라틴 옥살리플라틴 안트라센다이온 미톡산트론
---	---

[0357]

<u>분화제</u> 레티노산 유도체	<u>치환 유레아</u> 하이드록시유레아
<u>호르몬 및 길항제</u> <u>아드레노코르티코스테로이드/ 길항제</u> 프레드니손 및 등가물 덱사메타손 아미노글루테티미드	<u>메틸하이드라진 유도체</u> N-메틸하이드라진(MIH) 프로카바진 <u>부신피질 억제제</u> 미토탄(<i>o,p'</i> -DDD) 아미노글루테티미드
<u>프로게스틴</u> 하이드록시프로게스테론 카프로에이트 메드록시프로게스테론 아세테이트 메게스트롤 아세테이트	<u>사이토킨</u> 인터페론(α , β , γ) 인터류킨-2
<u>에스트로겐</u> 다이에틸stil베스트롤 에티닐 에스트라디올/등가물	<u>감광제</u> 헤마토포르피린 유도체 포토프린(Photofrin)(등록상표) 벤조포르피린 유도체
<u>항에스트로겐</u> 타목시펜	Npe6 주석 에티오포르피린(SnET2) 엽록소-a 세균엽록소-a 나프탈로사이아닌 프탈로사이아닌 아연 프탈로사이아닌
<u>안드로겐</u> 테스토스테론 프로피오네이트 플루옥시메스테론/등가물	<u>방사선</u>
<u>항안드로겐</u> 플루타마이드 고나도트로핀 방출 호르몬 유사체 루프롤라이드	X선 자외선 광 감마 방사선 가시광선 적외선 방사선 마이크로파 방사선

[0358]

<u>비스테로이드성 항안드로겐</u> 플루타마이드	X선 자외선 광 감마 방사선 가시광선 적외선 방사선 마이크로파 방사선
--------------------------------	---

[0359]

[0360]

제2 물질이 항섬유화제인 것이 또한 고려된다. 예시적인 항섬유화제는 형질전환 성장 인자-베타(TGF- β)의 활성을 감소시키는 다른 물질(GC-1008(젠자임(Genzyme)/MedImmune(메디문))을 포함하지만, 이것으로 제한되지는 않음); 레르텔리무맙(CAT-152; 트라비오(Trabio), 캄브리지 항체(Cambridge Antibody)); 메텔리무맙(CAT-192, 캄브리지 항체); LY-2157299(엘리 릴라이(Eli Lilly)); 하나 이상의 TGF- β 동종체를 표적화하는 항체를 포함하는 ACU-HTR-028(옵코 헬스(Opko Health)), TGF- β 수용체 키나아제 TGFBR1(ALK5) 및 TGFBR2의 억제제, 및 수용체

신호전달 후 경로의 조절제; 케모카인 수용체 신호전달; 엔도텔린 수용체 A 및 수용체 B 둘 다를 표적화하는 억제제 및 엔도텔린 수용체 A를 선택적으로 표적화하는 것을 포함하는 엔도텔린 수용체 길항제(암브리센탄; 아보센탄; 보센탄; 클라조센탄; 다루센탄; BQ-153; FR-139317, L-744453; 마시텐탄; PD-145065; PD-156252; PD163610; PS-433540; S-0139; 시타센탄 나트륨; TBC-3711; 지보텐탄을 포함하지만, 이들로 제한되지는 않음); 연결 조직 성장 인자(CTGF)의 활성을 감소시키고 또한 다른 CTGF-중화 항체를 포함하는 물질(FG-3019, 피브로젠(FibroGen)을 포함하지만, 이들로 제한되지는 않음); 매트릭스 금속단백분해효소(MMP) 억제제(MMPI-12, PUP-1 및 티가포타이드 트라이폴루테이트를 포함하지만, 이들로 제한되지는 않음); 에블로티닙, 게피티닙, BMS-690514, 세톡시맵(이들로 제한되지는 않음)을 포함하는 상피 성장 인자 수용체(EGFR)의 활성을 감소시키는 물질, EGF 수용체를 표적화하는 항체, EGF 수용체 키나아제의 억제제, 및 수용체 신호전달 후 경로의 조절제; 혈소판 유도 성장 인자(PDGF)의 활성을 감소시키고 또한 다른 PDGF 중화 항체를 포함하는 물질(이마티닙 메실레이트(노바티스(Novartis))를 포함하지만, 이것으로 제한되지는 않음), PDGF 수용체(PDGFR)를 표적화하는 항체, PDGFR 키나아제 활성 및 수용체 신호전달 후 경로의 억제제; 혈관 내피 성장 인자(VEGF)의 활성을 감소시키고 또한 VEGF-중화 항체를 포함하는 물질(베바시주맵, BIBF-1120, CDP-791, CT-322, IMC-18F1, PTC-299, 및 라무시루맵을 포함하지만, 이들로 제한되지는 않음), VEGF 수용체 1(VEGFR1, Flt-1) 및 VEGF 수용체 2(VEGFR2, KDR)를 표적화하는 항체, VEGFR1(sFlt)의 가용성 형태 및 VEGF를 중화시키는 이의 유도체, 및 VEGF 수용체 키나아제 활성의 억제제; 혈관 내피 성장 인자, 섬유아세포 성장 인자, 및 혈소판 유도 성장 인자에 대한 수용체 키나아제를 억제하는 BIBF-1120와 같은 다수의 수용체 키나아제의 억제제; 인테그린 기능을 방해하고 또한 인테그린 표적화 항체를 포함하는 물질(STX-100 및 IMGN-388을 포함하지만, 이들로 제한되지는 않음); IL-4(AER-001, AMG-317, APG-201, 및 sIL-4R α 를 포함하지만, 이들로 제한되지는 않음) 및 IL-13(AER-001, AMG-317, 안루킨주맵, CAT-354, 신트레데킨 베수독스, MK-6105, QAX-576, SB-313, SL-102, 및 TNX-650을 포함하지만, 이들로 제한되지는 않음)의 전염증 활성을 방해하고 또한 사이토킨에 대한 중화 항체를 포함하는 물질, IL-4 수용체 또는 IL-13 수용체를 표적화하는 항체, IL-4 수용체의 가용성 형태 및 IL-4 및 IL-13 둘 다에 결합하고 이들을 중화시키는 것으로 보고된 이의 유도체, IL-13의 전부 또는 일부 및 독소 특히 슈도모나스 내독소를 포함하는 키메라 단백질, JAK-STAT 키나아제 경로를 통한 신호전달; mTor의 억제제를 포함하는 상피 중간엽 전이를 방해하는 물질(AP-23573을 포함하지만, 이것으로 제한되지는 않음); 구리, 예컨대 테트라티오몰리브데이트의 수준을 감소시키는 물질; N-아세틸 시스테인 및 테트라티오몰리브데이트를 포함하는 산화 스트레스를 감소시키는 물질; 및 인터페론 감마를 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다. 포스포다이에스테라제 4(PDE4)의 억제제(로플루밀라스트를 포함하지만, 이것으로 제한되지는 않음); 포스포다이에스테라제 5(PDE5)의 억제제(미로테나필, PF-4480682, 실데나필 시트레이트, SLx-2101, 타달라필, 우데나필, UK-369003, 바르데나필, 및 자프리나스트를 포함하지만, 이들로 제한되지는 않음); 또는 사이클로옥시게나제 및 5-리폭시게나아제 억제제를 포함하는 아라키돈산 경로의 개질제(질루톤을 포함하지만, 이것으로 제한되지는 않음)인 물질이 또한 고려된다. 포플릴 가수분해효소 억제제(1016548, CG-0089, FG-2216, FG-4497, FG-5615, FG-6513, 피브로스타틴 A(다케다(Takeda)), 루피로닐, P-1894B, 및 사피로닐을 포함하지만, 이들로 제한되지는 않음) 및 과산화소체 증식 활성화 수용체(PPAR)-감마 효현제(피오글리타존 및 로시글리타존을 포함하지만, 이들로 제한되지는 않음)를 포함하는 조직 개형 또는 섬유증을 감소시키는 화합물이 추가로 고려된다.

[0361] 고려되는 다른 특이적 항섬유화제는 렐락신, 피르페니돈, 우피로닐, 수리포닐, CAT-192, CAT-158; 암브레센탄, 텔린; FG-3019, CTGF 항체; 항-EGFR 항체; EGFR 키나아제 억제제; 타르세바; 게피티닙; PDGF 항체, PDGFR 키나아제 억제제; 글리벡; BIBF-1120, VEGF, FGF, 및 PDGF 수용체 억제제; 항-인테그린 항체; IL-4 항체; 테트라티오몰리브데이트, 구리 킬레이트화제; 인터페론-감마; NAC, 시스테인 전구체; 간세포 성장 인자(HGF); KGF; 안지오텐신 수용체 차단제, ACE 억제제, 레닌 억제제; COX 및 LO 억제제; 질루톤; 몬텔루카스트; 아바스틴; 스타틴; PDE5 억제제, 예컨대 실데나필, 우데나필, 타달라필, 바르데나필, 또는 자프리나스트; 로플루밀라스트; 에타네르셉트(엔브렐(Enbrel)); 응고촉진제; 프로스타글란딘, 예컨대 PGE2, PRX-08066, 5HT2B 수용체 길항제; 신트레데킨 베수독스, 유전 조작된 슈도모나스 외독소와 접합된 키메라 인간 IL13; 로플루밀라스트, PDE4 억제제; FG-3019, 항 연결 조직 성장 인자 인간 단일클론 항체; GC-1008, TGF- β 인간 단일클론 항체; 트레프로스티닐, 프로스타사이클린 유사체; 인터페론- α ; QAX-576, IL13 조절제; WEB 2086, PAF 수용체 길항제; 이마티닙 메실레이트; FG-1019; 수라민; 보센탄; IFN-1b; 항-IL-4; 항-IL-13; 타우린, 니아신, NF-카파카파B 안티센스 올리고뉴클레오타이드; 및 산화질소 합성효소 억제제를 포함한다.

[0362] **장어의 치료**

[0363] 다른 실시양태에서, 본 개시내용은 표적 특이적 항체를 이를 필요로 하는 환자에게 투여하여 표적 활성을 억제하는 방법을 제공한다. 본 명세서에 기재된 임의의 유형의 항체를 치료학적으로 사용할 수 있다. 예시적인 실시

양태에서, 표적 특이적 항체는 인간, 키메라 또는 인간화 항체이다. 다른 예시적인 실시양태에서, 표적은 인간 이고, 환자는 인간 환자이다. 대안적으로, 환자는 표적 특이적 항체와 상호작용하는 표적 단백질을 발현하는 포유동물일 수 있다. 수의 목적을 위해 또는 인간 질환의 동물 모델로서 항체가 상호작용하는 표적 단백질을 발현하는 비인간 포유동물(즉, 영장류)에게 항체를 투여할 수 있다. 본 개시내용의 표적 특이적 항체의 치료학적 효율을 평가하기 위해 이러한 동물 모델은 유용할 수 있다.

[0364] 일 실시양태에서, 본 개시내용은 본 명세서에 기재된 치료학적 유효량의 항체 또는 약제학적 조성물을 이를 필요로 하는 피험체에게 투여하는 것을 포함하는 TGF- β 발현과 관련된 병증 또는 장애를 치료하는 방법을 제공한다.

[0365] TGF β 에 결합하는 항체 물질(예를 들면, 본 개시내용의 항체)로 치료할 수 있는 TGF β 발현과 관련되는 예시적인 병증 또는 장애는 암, 예컨대 폐암, 전립선암, 유방암, 간세포암, 식도암, 대장직장암, 췌장암, 방광암, 신장암, 난소암, 위암, 섬유증성 암, 교종, 및 흑색종, 눈(예를 들면, 안과, 눈, 안과학 또는 안과학적) 질환, 병증 또는 장애, 섬유증과 관련된 질환, 병증 또는 장애, 예를 들면 섬유증성식성 질환, 병증 또는 장애, 또는 관련 섬유증을 갖는 질환, 병증 또는 장애를 포함한다.

[0366] 섬유증성식성 질환, 병증 또는 장애, 또는 관련 섬유증을 갖는 질환은 피부, 폐, 신장, 심장, 뇌 및 눈을 포함하는 신체(이들로 제한되지는 않음)에서 임의의 장기 또는 조직에 영향을 미치는 것을 포함한다. 섬유증성식성 질환, 병증 또는 장애, 또는 관련 섬유증을 갖는 질환은 폐 섬유증, 특발성 폐 섬유증, 세기관지주위 섬유증, 간질성 폐 질환, 만성 폐쇄성 폐 질환(COPD), 소기도병(예를 들면, 폐쇄성 모세기관지염), 폐기종, 성인 또는 급성 호흡 곤란 증후군(ARDS), 급성 폐 손상(ALI), 감염성 또는 독성 물질로 인한 폐 섬유증, 신장 섬유증, 모든 병인의 사구체신염(GN), 예를 들면 혈관관막 증식성 GN, 면역 GN, 및 반월상 GN, 사구체 경화증, 세뇨관간질성 손상, 신장 간질성 섬유증, 신장 섬유증 및 신장 간질성 섬유증의 모든 원인, 이식 수혜자의 사이클로스포린 치료를 포함하는 약물 노출의 합병증으로부터 생기는 신장 섬유증, 예를 들면 사이클로스포린 치료, HIV 관련 신증, 이식 신증, 당뇨병성 신장 질환(예를 들면, 당뇨병성 신증), 신원성 전신 섬유증, 당뇨병, 특발성 후복막 섬유증, 강피증, 간 섬유증, 과도한 반흔 및 진행성 경화증과 관련된 간 질환, 예컨대 모든 병인으로 인한 간 경변증, 담도 장애, 감염으로 인한 간 기능장애, 섬유낭종성 질환, 심혈관질환, 예컨대 울혈성 심부전; 확장성 심근증, 심근염, 혈관 협착, 심근경색 후 심장 섬유증(예를 들면, 경색후 심장 섬유증), 좌심실 비대증, 정맥 폐쇄 질환, 재협착(예를 들면, 혈관성형술후 재협착), 동정맥 이식 실패, 죽상동맥경화증, 고혈압, 고혈압성 심장 질환, 심장 비대증, 비대성 심근증, 심부전, 대동맥 질환, 진행성 전신 경화증, 다발성근염, 전신 홍반성 낭창, 피부근염, 파시스트, 레이노드 증후군, 류마티스 관절염, 증식성 유리체망막병증, 임의의 병인의 유리체망막병증 또는 안과 수술과 관련된 섬유증, 예컨대 녹내장 치료, 망막 재부착, 수정체 적출, 또는 임의의 유형의 눈공 시술, 각막 및 결막에서의 반흔, 각막 내피에서의 섬유증, 알칼리 화상(예를 들면, 각막에 대한 알칼리 화상), 수정체낭의 백내장 수술 후 섬유증, 사시 수술에서 외안근 주의의 조직의 과도한 반흔, 전방 피막 백내장 및 수정체 후낭 혼탁, 눈 전방부 섬유증 질환, (예를 들면, 각막 혼탁과 관련된) 각막 간질의 섬유증, (예를 들면, 녹내장과 관련된) 섬유주 네트워크의 섬유증, 눈 후방부 섬유증 질환, (예를 들면, 눈의 망막 또는 맥락막 맥관구조에서의) 섬유혈관 반흔, 망막 섬유증, 망막앞 섬유증, 망막 신경교종, (예를 들면, 나이 관련 황반 변성과 관련된) 망막하 섬유증, 망막 및 녹내장 수술 후, 당뇨병성 망막병증에서 조직 수축과 관련된 견인성 망막 박리, 파이로니병, 척수손상후 전신 경화증, 골다공증, 카무라티-엡겔만 질환, 크론씨병, 반흔, 마판 증후군, 조기 난소 부전, 알츠하이머병 및 파킨슨병, 수술 절제 또는 기계적 외상으로 인한 섬유증, 안과 수술과 관련된 섬유증, 및 외상 또는 수술 상처로부터 생기는 상처 치유 동안 생기는 진피에서의 과도한 또는 비대성 반흔 또는 켈로이드 형성을 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다.

[0367] 예시적인 눈 질환(예를 들면, 안과, 눈, 안과학 또는 안과학적 질환), 병증 또는 장애는 섬유증성식성 장애, 눈의 섬유증, 안섬유증, 망막 기능장애, 망막 기능장애와 관련된 섬유증, 습성 또는 건성 황반 변성, 증식성 유리체 망막병증, 임의의 병인의 유리체망막병증, 안과 수술과 관련된 섬유증, 예컨대 녹내장 치료, 망막 재부착, 수정체 적출, 또는 임의의 유형의 눈공 시술, 각막 및 결막에서의 반흔, 각막 내피에서의 섬유증, 알칼리 화상(예를 들면, 각막에 대한 알칼리 화상), 수정체낭의 백내장 수술 후 섬유증, 사시 수술에서 외안근 주의의 조직에서의 과도한 반흔, 전방 피막 백내장 및 수정체 후낭 혼탁, 눈 전방부 섬유증 질환, (예를 들면, 각막 혼탁과 관련된) 각막 간질의 섬유증, (예를 들면, 녹내장과 관련된) 섬유주 네트워크의 섬유증, 눈 후방부 섬유증 질환, (예를 들면, 눈의 망막 또는 맥락막 맥관구조에서의) 섬유혈관 반흔, 망막 섬유증, 망막앞 섬유증, 망막 신경교종, (예를 들면, 나이 관련 황반 변성과 관련된) 망막하 섬유증, 망막 및 녹내장 수술 후와 관련된 섬유증, 당뇨병성 망막병증에서 조직 수축과 관련된 견인성 망막 박리를 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다.

- [0368] 눈의 예시적인 섬유증식성 질환, 병증 또는 장애, 눈의 섬유증, 안과 섬유증 또는 안섬유증은 증식성 유리체망막병증, 임의의 병인의 유리체망막병증, 망막 기능장애와 관련된 섬유증, 습성 또는 건성 황반 변성과 관련된 섬유증, 안과 수술과 관련된 섬유증, 예컨대 녹내장 치료, 망막 재부착, 수정체 적출, 또는 임의의 유형의 눈공시술, 각막 및 결막에서의 반흔, 각막 내피에서의 섬유증, 알칼리 화상과 관련된 섬유증, 수정체낭의 백내장 수술 후 섬유증, 사시 수술에서 외안근 주위의 조직의 과도한 반흔, 전방 피막 백내장 및 수정체 후낭 혼탁, 눈 전방부 섬유증 질환, (예를 들면, 각막 혼탁과 관련된) 각막 간질의 섬유증, (예를 들면, 녹내장과 관련된) 섬유주 네트워크의 섬유증, 눈 후방부 섬유증 질환, (예를 들면, 눈의 망막 또는 맥락막 맥관구조에서의) 섬유혈관 반흔, 망막 섬유증, 망막앞 섬유증, 망막 신경교종, (예를 들면, 나이 관련 황반 변성과 관련된) 망막하 섬유증, 망막 및 녹내장 수술 후와 관련된 섬유증, 당뇨병성 망막병증에서 조직 수축과 관련된 견인성 망막 박리를 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다.
- [0369] 다양한 실시양태에서, 눈의 섬유증식성 질환, 병증, 또는 장애는 증식성 유리체망막병증, 안과 수술과 관련된 섬유증, 수정체의 백내장 수술 후 섬유증, 각막 간질의 섬유증 및 알칼리 화상으로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0370] 본 발명에 따라 항체 물질로 치료될 수 있는 예시적인 암은 암, 예컨대 폐암, 전립선암, 유방암, 간세포암, 식도암, 대장직장암, 췌장암, 방광암, 신장암, 난소암, 위암, 섬유증성 암, 교종 및 흑색종을 포함한다.
- [0371] 많은 인간 종양(deMartin et al., EMBO J., 6: 3673 (1987), Kuppner et al., Int. J. Cancer, 42: 562 (1988)) 및 많은 종양 세포주(Derynck et al., Cancer Res., 47: 707 (1987), Roberts et al., Br. J. Cancer, 57: 594 (1988))가 TGF β 를 생성하고 정상 면역 감시를 회피하는 종양에 대한 가능한 메커니즘을 제안한다는 것이 관찰되었다.
- [0372] 암에서의 TGF β 동종체 발현은 특정 암에서 상이한 역할을 갖는 TGF β 동종체의 상이한 조합으로 복잡하고 가변적이다. TGF β 분자는 종양 억제제 및 종양 프로모터 둘 다로서 작용할 수 있다. 예를 들면, 동물에서 TGF β 신호전달의 결실 또는 하향 조절은 유방암, 위암, 췌장암, 대장암 및 편평 세포 암종을 증가시킬 수 있어서, TGF β 의 존재가 종양 진행을 예방하거나 느리게 하는 데 중요하다는 것을 나타낸다(Yang et al., Trends Immunol 31:220-27, 2010). 그러나, TGF β 의 과발현은 전발암성인 것으로 공지되어 있고, 많은 종양 유형에서 발현 증가가 발견된다(상기 문헌[Yang et al.] 참조).
- [0373] 추가의 복합체가 미국 특허 제7,927,593호에 또한 공개되어 있다. 예를 들면, 상이한 TGF β 동종체는 상이한 암 유형과 더 관련되는 것으로 보인다. TGF β 1 및 TGF β 3은 TGF β 2보다 이의 진행에서 난소암에서 큰 역할을 할 수 있고; TGF β 1 및 TGF β 2 발현은 TGF β 3보다 높은 등급의 연골육종 종양에서 더 높다. 인간 유방암에서, TGF β 1 및 TGF β 3은 매우 발현되고, TGF β 3 발현은 전체 생존과 상관되며, 결절 전이 및 양성 TGF β 3 발현을 갖는 환자는 빈약한 예후 결과를 갖는다. 그러나, 대장암에서, TGF β 1 및 TGF β 2는 TGF β 3보다 높게 발현되고 암이 없는 개인보다 더 높은 순환 수치로 존재한다. 교종에서, TGF β 2는 세포 이동에 중요하다. 최근 연구로부터, TGF β 동종체가 특정 암에서 어떤 정도로 억제하는 데 가장 유용하다는 것이 명확하지 않다.
- [0374] 종양 자리로의 면역 세포의 침윤이 종양 성장에 대한 공통 기여 인자인 것으로 생각된다. 이 면역 세포 침윤물은 종양을 깨끗이 하는 것을 도와 유리한 효과를 가질 수 있지만, 종양 항원에 대한 관용성이 가능하게 하여 또한 해로운 효과일 수 있다. TGF β 가 종양에서 면역 세포의 수준에 영향을 미칠 수 있다는 것이 나타났다(예를 들면, 문헌[Yang et al., Trends Immunol 31:220-27, 2010; Flavell et al., Nature Immunol 10:554-567, 2010; Nagarau et al., Expert Opin Investig Drugs 19:77-91, 2010] 참조). 예를 들면, TGF β 는 신체로부터 종양을 깨끗이 하기 위해 종양을 침윤시키는 자연 살해 세포를 억제한다. TGF β 는 또한 종양의 청소물에 도움을 주는 세포 유형인 세포독성 T 세포 및 CD4+ 헬퍼 T 세포의 활성을 억제한다(상기 문헌[Yang] 참조). TGF β 는 또한 예를 들면 손상 자리로의 이동 및 면역 반응을 촉진하는 항원 제시를 억제하여 수지상 세포 활성을 조절하는데 있어서 역할을 한다. 수지상 세포는 TGF β 에 반응성이면서 TGF β 를 분비한다. 예를 들면, 수지상 세포는 종양을 침윤시키고 세포를 채우고, TGF β 를 분비하고 조절 T 세포를 활성화하여, 종양 청소를 결국 방지한다(상기 문헌[Flavell et al.] 참조). 추가로, 골수성 유도 억제 세포(MDSC)는 종양 진행 동안 팽창하는 골수 유도 세포이다. MDSC는 T 세포 증식을 억제하고, 수지상 세포 성숙을 억제하고, 자연 살해 세포 활성을 억제하여, 세포가 면역 반응을 회피하는 것을 돕는다(Li et al., J Immunol. 182:240-49, 2009). TGF β 는 자연 살해 세포 활성을 억제하는 데 있어서 MDSC의 효과에 기여하는 것으로 나타났다(상기 문헌[Li et al.]; Xiang et al., Int J Cancer 124:2621-33, 2009). 각각의 이 면역 과정에서의 다양한 TGF β 동종체의 역할은 불명확하다. TGF β 동종체를 선택적으로 표적화하고 이를 다양한 정도로 억제하는 것은 종양과 싸워 이를 깨끗하게 하는 숙주 면역

반응을 조절하는 데 있어서 중요할 수 있다.

- [0375] 특정한 실시양태에서, 본 명세서에 기재된 항체 또는 조성물은 종양에서 면역 세포를 조절한다. 몇몇 실시양태에서, 항체 또는 조성물은 종양에서 자연 살해(NK) 세포의 수를 증가시키고/시키거나, NK 세포의 세포용해 활성을 증가시킨다. 다양한 실시양태에서, 본 명세서에 기재된 항체 또는 조성물은 종양에서 조절 T 세포의 수를 감소시키고/시키거나, 조절 T 세포 기능을 억제한다. 예를 들면, 다양한 실시양태에서, 본 명세서에 기재된 항체 또는 조성물은 면역 반응을 하향 조절하거나 면역 반응의 자리를 이동시키는 Treg의 능력을 억제한다.
- [0376] 다양한 실시양태에서, 본 명세서에 기재된 항체 또는 조성물은 종양에서 세포독성 T 세포의 수를 증가시키고/시키거나, CTL 활성을 증대시키고, 예를 들면 CTL 활성을 부스팅하거나, 증가시키거나, 촉진시킨다. 예를 들면, 다양한 실시양태에서, 본 명세서에 기재된 항체 또는 조성물은 CTL에 의한 퍼포린 및 그랜자임 생성을 증가시키고 CTL의 세포용해 활성을 증가시킨다.
- [0377] 다양한 실시양태에서, 본 명세서에 기재된 항체 또는 조성물은 종양에서 단핵구 유래 줄기 세포(MDSC)의 수를 감소시키고/시키거나, MDSC 기능을 억제한다. 예를 들면, 다양한 실시양태에서, 본 명세서에 기재된 항체 또는 조성물은 면역 반응을 억제하는 MDSC의 능력을 억제하고/하거나, MDSC의 면역 억제 활성을 억제하고/하거나, Treg의 팽창 및/또는 기능을 촉진하는 MDSC의 능력을 억제한다.
- [0378] 다양한 실시양태에서, 본 명세서에 기재된 항체 또는 조성물은 종양에서 수지상 세포(DC)의 수를 감소시키고/시키거나, 수지상 세포의 관용 기능(예를 들면, 관용 효과)을 억제한다. 예를 들면, 다양한 실시양태에서, 본 명세서에 기재된 항체 또는 조성물은 CD8+ 수지상 세포의 관용 효과를 감소시킨다.
- [0379] 다양한 실시양태에서, 본 명세서에 기재된 임의의 항체 XPA.42.068, XPA.42.089 또는 XPA.42.681 또는 이들의 변이체는 상기 기재된 하나 이상의 면역 활성을 조절한다.
- [0380] 상기 기술된 바대로, TGF β 발현은 다양한 조직 섬유증, 예컨대 신경화증, 폐 섬유증 및 경변증의 발병; 및 만성 간염, 류마티스 관절염, 혈관 재협착, 및 피부의 켈로이드와 같은 다양한 상태의 발병과 또한 관련된다. 예시적인 몇몇 실시양태에서, 섬유증 또는 섬유증 병증을 치료하기 위해 본 명세서에 기재된 항체를 사용한다. 예시적인 섬유증 또는 섬유증 질환은 사구체신염, 성인 또는 급성 호흡 곤란 증후군(ARDS), 당뇨병, 당뇨병성 신장 질환, 간 섬유증, 신장 섬유증, 폐 섬유증, 심근경색 후 심장 섬유증, 섬유낭종성 질환, 심근경색 후 섬유증성 압, 좌심실 비대증, 폐 섬유증, 간 경변증, 정맥 폐쇄 질환, 척수 손상 후, 망막 및 녹내장 수술 후, 혈관성 형술후 재협착, 신장 간질성 섬유증, 동정맥 이식 실패 및 반흔을 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다.
- [0381] 일 실시양태에서, 상기 치료를 필요로 하는 동물에서의 이 장애 또는 병증의 치료는 본 명세서에 기재된 항체를 포함하는 유효량의 항체 또는 조성물을 동물에게 투여하는 것을 포함한다.
- [0382] 본 개시내용의 방법에 의해 치료 가능한 병증은 바람직하게는 포유동물에서 발생한다. 포유동물은, 예를 들면 인간 및 다른 영장류, 및 애완동물 또는 반려 동물, 예컨대 개 및 고양이, 실험실 동물, 예컨대 랫트, 마우스 및 래빗, 및 농장 동물, 예컨대 말, 돼지, 양 및 소를 포함한다.
- [0383] **비치료학적 용도**
- [0384] 표적에 대한 친화도 정제 물질로서 또는 표적 단백질에 대한 진단학적 검정에서, 예를 들면 특이적 세포, 조직, 또는 혈청에서 이의 발현을 검출하는 것에서 본 개시내용의 항체를 사용할 수 있다. 생체내 진단학적 검정에 항체를 또한 사용할 수 있다. 일반적으로, 이 목적을 위해 항체를 방사성 핵종(예컨대, ^{111}In , ^{99}Tc , ^{14}C , ^{131}I , ^{125}I , ^3H , ^{32}P 또는 ^{35}S)으로 라벨링하여, 면역신티그라피를 이용하여 항체를 국소화할 수 있다.
- [0385] 임의의 공지된 검정 방법, 예컨대 경쟁적 결합 검정, 직접 및 간접 샌드위치 검정, 예컨대 ELISA, 및 면역침전 검정에서 본 개시내용의 항체를 사용할 수 있다. Zola, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, pp.147-158 (CRC Press, Inc. 1987). 당해 분야에 공지된 방법을 이용하여 면역조직화학을 위해 조직 또는 세포 샘플을 라벨링하기 위해 항체 또한 사용할 수 있다.
- [0386] (제한 없이) ELISA, RIA, FACS, 조직 면역조직화학, 웨스턴 블롯 또는 면역침전을 비롯한 종래 면역검정에서 표적 특이적 항체를 사용할 수 있고, 이들 모두 당해 분야에 널리 공지된 기법이다. 인간 및 다른 포유동물에서 표적을 검출하기 위해 본 개시내용의 항체를 사용할 수 있다. 본 개시내용은 생물학적 샘플을 본 개시내용의 표적 특이적 항체와 접촉시키는 단계 및 결합 항체를 검출하는 단계를 포함하는 생물학적 샘플에서 표적을 검출하는 방법을 제공한다. 일 실시양태에서, 표적 특이적 항체를 검출 가능한 라벨로 직접 라벨링한다. 다른 실시양태에서, 표적 특이적 항체(제1 항체)를 라벨링하지 않고, 제2 항체 또는 표적 특이적 항체에 결합하는 다른 분

자를 라벨링한다. 당해 분야의 당업자에게 널리 공지된 바대로, 제1 항체의 특정 중 및 종류에 특이적으로 결합할 수 있는 제2 항체를 선택한다. 예를 들면, 표적 특이적 항체가 인간 IgG인 경우, 제2 항체는 항-인간-IgG이다. 항체에 결합할 수 있는 다른 분자는 (제한 없이) 단백질 A 및 단백질 G를 포함하고, 이들 둘 다 예를 들면 피어스 케미컬 코프(Pierce Chemical Co)로부터 상업용적으로 구입 가능하다.

[0387] 상기 개시된 면역검정이 다수의 목적에 사용되는 것으로 고려된다. 예를 들면, 표적 특이적 항체는 세포에서 또는 세포 배양물에서 세포의 표면 상에 표적을 검출하기 위해 사용되거나, 조직 배양 배지로 분비될 수 있다. 표적 특이적 항체는 세포의 표면 상의 표적의 양을 결정하기 위해 사용되거나, 다양한 화합물과 반응하는 조직 배양 배지로 분비될 수 있다. 표적 발현 또는 분비를 억제하거나 활성화하는 데 유용한 화합물을 확인하기 위해 이 방법을 이용할 수 있다. 이 방법에 따르면, 세포의 하나의 샘플을 일정 시간 동안 시험 화합물로 처리하고, 다른 샘플을 처리하지 않고 남겨 둔다. 표적의 전체 수준을 측정하는 경우, 세포를 용해시키고 상기 기재된 면역검정 중 하나를 이용하여 전체 표적 수준을 측정한다. 시험 화합물의 효과를 결정하기 위해 치료되지 않은 세포에 대해 치료된 세포의 표적의 전체 수준을 비교한다.

[0388] **라벨**

[0389] 몇몇 실시양태에서, 이의 검출을 수월하게 하기 위해 항체 물질을 라벨링한다. "라벨" 또는 "검출 가능한 moiety"는 분광학적, 광화학, 바이오화학, 면역화학, 화학, 또는 다른 물리적 수단에 의해 검출 가능한 조성물이다. 예를 들면, 본 개시내용에서 사용하기에 적합한 라벨은 방사성 라벨(예를 들면, ³²P), 형광단(예를 들면, 플루오레세인), 전자 고밀도 시약, (예를 들면, ELISA에서 보통 사용되는) 효소, 바이오틴, 다이곡시게닌, 또는 예를 들면 방사성 동위원소를 합텐 또는 펩타이드로 도입하여 검출 가능해 질 수 있거나, 합텐 또는 펩타이드와 특이적으로 반응성인 항체를 검출하기 위해 사용되는 합텐 및 단백질을 포함한다.

[0390] 본 발명에서 사용하기에 적합한 라벨의 예는 형광성 염료(예를 들면, 플루오레세인 아이소티오시아네이트, 텍사스 레드(Texas red), 로다민, 등), 방사성 동위원소(예를 들면, ³H, ¹²⁵I, ³⁵S, ¹⁴C, 또는 ³²P), 효소(예를 들면, 겨자무과 퍼옥시다제, 알칼리 포스파타제 및 ELISA에서 보통 사용되는 것), 및 비색 라벨, 예컨대 콜로이드성 금, 색유리 또는 플라스틱 비드(예를 들면, 폴리스티렌, 폴리프로필렌, 라텍스 등)을 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다.

[0391] 당해 분야에 널리 공지된 검정 방법에 따라 라벨을 원하는 성분에 직접적으로 또는 간접적으로 커플링할 수 있다. 바람직하게는, 일 실시양태에서 본 개시내용에 따라 활성 물질의 접합을 위한 아이소시아네이트 시약을 사용하여 라벨은 바이오중합체에 공유 결합한다. 본 개시내용의 일 양태에서, 라벨을 바이오중합체에 접합하여 부착된 활성 물질 없이 라벨 바이오중합체 접합체를 형성하기 위해 본 개시내용의 이작용성 아이소시아네이트 시약을 사용할 수 있다. 라벨 바이오중합체 접합체를 본 개시내용에 따른 라벨링된 접합체의 합성에 대한 중간체로서 사용할 수 있거나 바이오중합체 접합체를 검출하기 위해 사용할 수 있다. 상기 표시된 바대로, 아주 다양한 라벨을 사용할 수 있고, 라벨 선택은 필요한 감도, 검정의 원하는 성분과의 접합의 용이성, 안정성 요건, 이용 가능한 기기 및 폐기 준비에 따라 달라진다. 간접 방식에 의해 비방사성 라벨을 대개 부착한다. 일반적으로, 리간드 분자(예를 들면, 바이오틴)를 분자에 공유 결합한다. 이후, 리간드는 본래 검출 가능하거나 신호 시스템, 예컨대 검출 가능한 효소, 형광성 화합물, 또는 화학발광 화합물에 공유 결합된 다른 분자(예를 들면, 스트렙타비딘) 분자에 결합한다.

[0392] 본 개시내용의 화합물을 예를 들면 효소 또는 형광단과의 접합에 의해 신호 생성 화합물에 또한 직접적으로 결합될 수 있다. 라벨로서 사용하기에 적합한 효소는 가수분해효소, 특히 포스파타제, 에스테라제 및 글라이코시다제, 또는 옥시다타제, 특히 퍼옥시다제를 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다. 형광성 화합물, 즉 라벨로서 사용하기에 적합한 형광단은 플루오레세인 및 이의 유도체, 로다민 및 이의 유도체, 단일, 옴벨리페론 등을 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다. 적합한 형광단의 추가의 예는 에오신, TRITC-아민, 퀴닌, 플루오레세인 W, 아크리딘 옐로우, 리스아민 로다민, B 설포닐 클로라이드 에리쓰로신, 루테늄(트라이스, 바이피리디늄), 텍사스 레드, 니코틴아마이드 아데닌 다이뉴클레오타이드, 플라빈 아데닌 다이뉴클레오타이드 등을 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다. 라벨에 사용하기에 적합한 화학발광 화합물은 루시페린 및 2,3-다이하이드로프탈라진다이온, 예를 들면 루미놀을 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다. 본 개시내용의 방법에 사용할 수 있는 다양한 라벨링 또는 신호 생성 시스템의 개관을 위해, 미국 특허 제4,391,904호를 참조한다.

[0393] 라벨을 검출하는 수단이 당해 분야의 당업자에 널리 공지되어 있다. 따라서, 예를 들면 라벨이 방사성 라벨인 경우, 검출 수단은 방사선자동사진에서처럼 섬광 계수기 또는 사진 필름을 포함한다. 라벨이 형광성 라벨인 경우, 형광색소를 적절한 파장의 광으로 여기시키고 생성된 형광을 검출하여 이것을 검출할 수 있다. 전하 결합

장치(CCD) 또는 광전자 증배기 등과 같은 전자 검출기를 사용하여 형광을 가시적으로 검출할 수 있다. 유사하게, 효소에 적절한 기질을 제공하고 생성된 반응 생성물을 검출하여 효소 라벨을 검출할 수 있다. 단순히 라벨과 관련된 색상을 관찰함으로써 비색 또는 화학발광 라벨을 검출할 수 있다. 본 개시내용의 방법에서 사용하기에 적합한 다른 라벨링 및 검출 시스템은 당해 분야의 당업자에게 용이하게 명확하다. 질환 또는 건강 병증의 진단에 이러한 라벨링된 조절제 및 리간드를 사용할 수 있다.

[0394] **약제학적 조성물의 제제**

[0395] 인간 또는 시험 동물에게 본 개시내용의 항체 물질을 투여하기 위해, 하나 이상의 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 조성물에서 항체 물질을 제제화하는 것이 바람직하다. 구문 "약제학적으로 또는 약물학적으로 허용되는"은 하기 기재된 바대로 당해 분야에 널리 공지된 경로를 이용하여 투여될 때 알레르기, 또는 다른 부작용을 발생시키지 않는 분자 집단 및 조성물을 의미한다. "약제학적으로 허용되는 담체"는 임의의 및 모든 임상적으로 유용한 용매, 분산 매체, 코팅, 항박테리아제 및 항진균제, 등장화제 및 흡수 지연제 등을 포함한다.

[0396] 또한, 화합물은 물 또는 일반 유기 용매와 용매화물을 형성할 수 있다. 이러한 용매화물이 또한 고려된다.

[0397] 비경구, 피하, 복강내, 폐내, 및 비강내 및, 국소 치료에 원하는 경우, 병소내 투여를 비롯한 임의의 적합한 수단에 의해 항체를 투여한다. 비경구 점적은 정맥내, 동맥내, 복강내, 근육내, 진피내 또는 피하 투여를 포함한다. 또한, 특히 감소 용량의 항체로 펄스 점적에 의해 항체를 적절하게 투여한다. 바람직하게는, 부분적으로 투여가 간단하거나 만성인지에 따라 주사, 가장 바람직하게는 정맥내 또는 피하 주사에 의해 투약한다. 국부, 특히 경피, 경점막, 직장, 경구 또는, 예를 들면 원하는 자리에 가깝게 위치한 카테타를 통한 국소 투여를 비롯한 다른 투여 방법이 고려된다. 주사, 특히 정맥내 주사가 바람직하다.

[0398] 활성 성분으로서 본 개시내용의 항체 물질을 포함하는 본 개시내용의 약제학적 조성물은 투여 경로에 따라 약제학적으로 허용되는 담체 또는 첨가제를 포함할 수 있다. 이러한 담체 또는 첨가제의 예는 물, 약제학적 허용되는 유기 용매, 콜라겐, 폴리비닐 알코올, 폴리비닐피롤리돈, 카복시비닐 중합체, 카복시메틸셀룰로오스 나트륨, 폴리아크릴산 나트륨, 나트륨 알기네이트, 수용성 텍스트란, 카복시메틸 전분 나트륨, 펙틴, 메틸 셀룰로오스, 에틸 셀룰로오스, 잔탄 검, 아라비아 검, 카제인, 젤라틴, 한천, 다이글라이세린, 글라이세린, 프로필렌 글라이콜, 폴리에틸렌 글라이콜, 바셀린, 파라핀, 스테아릴 알코올, 스테아르산, 인간 혈청 알부민(HSA), 만니톨, 소르비톨, 락토스, 약제학적으로 허용되는 계면활성제 등을 포함한다. 사용된 첨가제는 본 개시내용의 용량 형태에 따라 적절한 대로 상기 또는 이들의 조합으로부터 선택되지만, 이들로 제한되지는 않는다.

[0399] 약제학적 조성물의 제제는 선택된 투여 경로(예를 들면, 용액, 에멀션)에 따라 달라진다. 투여하고자 하는 항체를 포함하는 적절한 조성물을 생리학적으로 허용되는 비히클 또는 담체 중에 제조할 수 있다. 용액 또는 에멀션의 경우, 적합한 담체는 예를 들면 수성 또는 알코올 용액/수용액, 에멀션 또는 현탁액, 예컨대 식염수 및 완충매질을 포함한다. 비경구 비히클은 염화나트륨 용액, 링거 텍스트로스, 텍스트로스 및 염화나트륨, 락트산염 링거 또는 고정유를 포함할 수 있다. 정맥내 비히클은 다양한 첨가제, 보존제, 또는 유체, 영양소 또는 전해질 보충제를 포함할 수 있다.

[0400] 다양한 수성 담체는 예를 들면 무균 인산염 완충 식염수 용액, 정균수, 물, 완충수, 0.4% 식염수, 0.3% 글라이신 등을 포함할 수 있고, 안정성 증대를 위한 다른 단백질, 예컨대 약한 화학 변형 등으로 처리되는 알부민, 지방단백질, 글로불린 등을 포함할 수 있다.

[0402] *원하는 정도의 순도를 갖는 항체를 동결건조 제제 또는 수용액 형태의 임의의 생리학적으로 허용되는 담체, 부형제 또는 안정화제와 혼합하여 저장을 위한 항체의 치료학적 제제를 제조한다(Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)). 허용되는 담체, 부형제, 또는 안정화제는 이용되는 용량 및 농도에서 수혜자에게 비독성이고, 완충제, 예컨대 포스페이트, 시트레이트, 및 다른 유기 산; 아스코르브산 및 메티오닌을 포함하는 항산화제; 보존제(예컨대, 옥타데실다이메틸벤질 염화암모늄; 헥사메토늄 클로라이드; 벤즈알코늄 클로라이드, 벤즈에토늄 클로라이드; 페놀, 부틸 또는 벤질 알코올; 알킬 파라벤, 예컨대 메틸 또는 프로필 파라벤; 카테콜; 레소르시놀; 사이클로헥산을; 3-펜탄올; 및 m-크레솔); 저분자량(약 10개 미만의 잔기) 폴리펩타이드; 단백질, 예컨대 혈청 알부민, 젤라틴, 또는 면역글로불린; 친수성 중합체, 예컨대 폴리비닐피롤리돈; 아미노산, 예컨대 글라이신, 글루타민, 아스파라긴, 히스티딘, 아르기닌, 또는 라이신; 모노사카라이드, 디사카라이드, 및 글루코스, 만노스, 또는 텍스트린을 포함하는 다른 탄수화물; 킬레이트화제, 예컨대 EDTA; 당, 예컨대 수크로스, 만니톨, 트레할로스 또는 소르비톨; 염 형성 반대 이온, 예컨대 나트륨; 금속 착체(예를 들면, Zn-단백질 착체); 및/또는 비이온성 계면활성제, 예컨대 트윈(TWEEN)(상표명), 플루로닉스(PLURONICS)(상

표명) 또는 폴리에틸렌 글라이콜(PEG)을 포함한다.

- [0403] 본 명세서에서의 제제는 또한 치료하고자 하는 특정한 적응증에 필요한 하나 초과와 활성 화합물, 바람직하게는 서로 부정적으로 영향을 미치지 않는 상보성 활성을 갖는 것을 포함할 수 있다. 이러한 분자는 의도하는 목적에 효과적인 양으로 적절하게 조합으로 존재한다.
- [0404] 활성 성분은 예를 들면 코아세르베이션 기법 또는 계면 중합에 의해 제조된 마이크로캡슐, 예를 들면 각각 하이드록시메틸셀룰로오스 또는 젤라틴-마이크로캡슐 및 폴리-(메틸메타크릴레이트) 마이크로캡슐 내에, 콜로이드성 약물 전달 시스템(예를 들면, 리포솜, 알부민 마이크로구, 마이크로에멀션, 나노-입자 및 나노캡슐) 내에 또는 마크로에멀션 내에 또한 포획될 수 있다. 이러한 기법은 문헌[Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)]에 개시되어 있다.
- [0405] 생체내 투여를 위해 사용되는 제제는 무균이어야 한다. 무균 여과막을 통한 여과에 의해 이를 용이하게 성취한다.
- [0406] 수성 현탁액은 활성 화합물을 수성 현탁액의 제조에 적합한 부형제와 혼합물로 포함할 수 있다. 이러한 부형제는 현탁제, 예를 들면 나트륨 카복시메틸셀룰로오스, 메틸셀룰로오스, 하이드록시프로필메틸셀룰로오스, 나트륨 알기네이트, 폴리비닐피롤리돈, 트라가칸스 겔 및 아카시아 겔이고; 분산제 또는 습윤제는 천연 포스파타이드, 예를 들면 레시틴, 또는 알킬렌 옥사이드와 지방산의 축합 생성물, 예를 들면 폴리옥시에틸렌 스테아레이트, 또는 에틸렌 옥사이드와 장쇄 지방족 알코올의 축합 생성물, 예를 들면 헵타데카에틸렌옥시세탄올, 또는 에틸렌 옥사이드와 지방산 및 헥시톨, 예컨대 폴리옥시에틸렌 소르비톨 모노올레이트로부터 유도된 부분 에스터의 축합 생성물, 또는 에틸렌 옥사이드와 지방산 및 헥시톨 무수물, 예를 들면 폴리에틸렌 소르비탄 모노올레이트로부터 유도된 부분 에스터의 축합 생성물일 수 있다. 수성 현탁액은 또한 하나 이상의 보존제, 예를 들면 에틸, 또는 n-프로필, p-하이드록시벤조에이트를 포함할 수 있다.
- [0407] 본 개시내용의 항체를 저장을 위해 동결건조하고 사용 전에 적합한 담체 내에 재구성할 수 있다. 이 기법은 종래 면역글로불린과 효과적인 것으로 나타났다. 임의의 적합한 동결건조 및 재구성 기법을 이용할 수 있다. 당해 분야의 당업자는 동결건조 및 재구성이 다양한 정도의 항체 활성 손실을 발생시킬 수 있고 사용 수준이 보상에 조정될 수 있다는 것을 이해할 것이다.
- [0408] 물 첨가에 의한 수성 현탁액의 제조에 적합한 분산성 분말 및 과립은 분산제 또는 습윤제, 현탁제 및 하나 이상의 보존제와 혼합된 활성 화합물을 제공한다. 적합한 분산제 또는 습윤제 및 현탁제는 이미 상기 언급된 것으로 예시된다.
- [0409] 이 제제 내의 항체의 농도는, 예를 들면 약 0.5중량% 미만으로부터, 보통 적어도 약 1중량% 내지 15중량%에서 또는 20중량%까지 다양하게 변할 수 있고, 선택된 특정한 투여 방식에 따라 유체 용적, 점도 등에 주로 기초하여 선택된다. 따라서, 비경구 주사에 통상적인 약제학적 조성물은 1mL의 무균 완충수 및 50mg의 항체를 포함하도록 만든다. 정맥내 점적에 통상적인 조성물은 250mL의 무균 링거액 및 150mg의 항체를 포함하도록 만든다. 비경구로 투여 가능한 조성물을 제조하는 실제 방법은 공지되어 있거나 당해 분야의 당업자에게 명확하고, 예를 들면 문헌[Remington's Pharmaceutical Science, 15th ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa. (1980)]에 더 자세히 기재되어 있다. 항체의 효과적인 용량은 투여당 체중 1kg당 0.01mg 내지 1000mg 범위이다.
- [0410] 약제학적 조성물은 무균 주사용 용액 또는 분산액의 즉석 제조를 위한 무균 주사용 수성, 유성 현탁액, 분산액 또는 무균 분말 형태일 수 있다. 상기 언급된 적합한 분산제 또는 습윤제 및 현탁제를 사용하여 당해 분야에 공지된 바에 따라 현탁액을 제제화할 수 있다. 무균 주사용 제제는 또한, 예를 들면 1,3-부탄 다이올 중의 용액으로서 비경구적으로 허용되는 비독성 희석제 또는 용매 중의 무균 주사용 용액 또는 현탁액일 수 있다. 담체는 예를 들면 물, 에탄올, 폴리올(예를 들면, 글라이세롤, 프로필렌 글라이콜, 및 액체 폴리에틸렌 글라이콜, 등), 적합한 이들의 혼합물, 식물성 오일, 링거 용액 및 등장성 염화나트륨 용액을 포함하는 용매 또는 분산 매질일 수 있다. 또한, 용매 또는 현탁 매질로서 무균 고정유를 습관적으로 사용한다. 이러한 목적을 위해, 합성 모노- 또는 다이글라이세라이드를 포함하는 임의의 완하성 고정유를 사용할 수 있다. 또한, 지방산, 예컨대 올레산은 주사용 제제에서 용도를 갖는다.
- [0411] 모든 경우에, 형태는 무균이어야 하고, 용이한 주사능이 존재하는 정도로 유체이어야 한다. 예를 들면, 코팅, 예컨대 레시틴을 사용하여, 분산액의 경우에 필요한 입자 크기의 유지에 의해 및 계면활성제를 사용하여 적절한 유체성을 유지시킬 수 있다. 이는 제조 및 저장 조건 하에 안정해야 하고, 박테리아 및 진균과 같은 미생물의 오염 작용에 보존되어야 한다. 미생물 작용의 예방은 파라벤, 클로로부탄올, 페놀, 소르브산, 티메로살 등과 같

은 다양한 항박테리아제 및 항진균제에 의해 발생할 수 있다. 많은 경우에, 등장화제, 예를 들면 당 또는 염화나트륨을 포함하는 것이 바람직하다. 주사용 조성물의 흡수 연장은 흡수 지연제, 예를 들면 알루미늄 모노스테아레이트 및 젤라틴의 조성물에서의 사용에 의해 발생할 수 있다.

[0412] 투여에 유용한 조성물을 이의 효율을 증가시키기 위해 유입 또는 흡수 인핸서와 제제화할 수 있다. 이러한 인핸서는, 예를 들면 살리실레이트, 글라이코콜레이트/리놀레이트, 글라이콜레이트, 아프로티닌, 바시트라신, SDS, 카프레이트 등을 포함한다. 예를 들면, 문헌[Fix (J. Pharm. Sci., 85:1282-1285 (1996)) 및 Oliyai and Stella (Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol., 32:521-544 (1993))]을 참조한다.

[0413] 항체 조성물은 이의 동족 수용체 또는 리간드에 대한 표적의 결합, 표적 매개 신호전달 등을 포함하는 표적 활성을 억제하기 위해 사용되는 것으로 고려된다. 특히, 조성물은 부작용이 실질적으로 없는 농도에서 억제 특성을 나타내고, 따라서 연장된 치료 프로토콜에 유용하다. 예를 들면, 항체 조성물과 더 독성인 다른 세포독성제의 동시 투여는 치료하고자 하는 병증 또는 장애의 유리한 억제를 성취할 수 있고, 환자에서 독성 부작용을 효과적으로 감소시킨다.

[0414] 또한, 본 개시내용에서 사용하도록 고려되는 조성물의 친수화도 및 소수화도의 특성이 균형을 잘 이루어 실험실 내 및 특히 생체내 사용 둘 다에 대한 이의 유용성을 증대시키고, 이러한 균형이 부족한 다른 조성물은 실질적으로 유용성이 부족하다. 특이적으로, 본 개시내용에서 사용하도록 고려되는 조성물은 신체에서의 흡수 및 생체이용률을 허용하는 수성 매질 중의 적절한 정도의 용해도를 갖고, 세포막을 횡단하는 화합물이 추정되는 작용자리로 허용하는 지질 중의 일정 정도의 용해도를 또한 갖는다. 따라서, 고려되는 항체 조성물이 표적 항원 활성의 자리로 전달될 수 있을 때 이것은 최대로 효과적이다.

[0415] 투여 및 투약

[0416] 일 양태에서, 본 개시내용의 방법은 약제학적 조성물을 투여하는 단계를 포함한다. 특정한 실시양태에서, 약제학적 조성물은 무균 조성물이다.

[0417] 치료제를 포유동물 피험체에게 직접적으로 또는 간접적으로 도입하기 위한, 주사, 경구, 섭취, 비강내, 국소, 경피, 비경구, 흡입 스프레이, 질내 또는 직장 투여(이들로 제한되지는 않음)를 포함하는, 임의의 의학적으로 허용되는 수단을 이용하여 본 개시내용의 방법을 수행한다. 본 명세서에 사용된 용어 비경구는 피하, 정맥내, 근육내, 및 낭내 주사, 및 카테타 또는 점적 기법을 포함한다. 경피, 유방내, 복강내, 척추강내, 안구뒤내, 폐내 주사에 의한 투여 및 또는 특정한 자리에서의 수술 이식이 또한 고려된다.

[0418] 일 실시양태에서, 자리로의 직접 주사에 의해 또는 제제를 내부로 전달할 수 있는 지속 전달 또는 지속 방출 메커니즘을 통해 치료를 요하는 암, 섬유증 또는 이환 조직의 자리에서 투여를 수행한다. 예를 들면, 조성물을 지속 전달할 수 있는 생체분해성 마이크로구 또는 캡슐 또는 다른 생체분해성 중합체 구성(예를 들면, 가용성 폴리펩타이드, 항체, 또는 소분자)이 암, 섬유증 또는 이환 조직 또는 장기의 자리에서 또는 그 근처에서 주입되는 본 개시내용의 제제에 포함될 수 있다.

[0419] 다수의 자리에서 환자에게 치료학적 조성물을 또한 전달할 수 있다. 다수의 투여는 동시에 가능해 지거나, 일정 시간 동안 투여될 수 있다. 특정한 경우에, 치료학적 조성물의 연속 흐름을 제공하는 것이 유리하다. 추가의 치료제를 기간 기준으로, 예를 들면 시간마다, 일마다, 주마다, 2주마다, 3주마다, 달마다, 또는 더 긴 간격으로 투여할 수 있다.

[0420] 섬유증을 치료하는 데 유용한 화학치료제 또는 물질(이들로 제한되지는 않음)을 포함하는 본 명세서에 기재된 제2 물질과 함께 항체 조성물과 같은 다수의 물질의 투여가 또한 본 개시내용에 포함된다.

[0421] 소정의 용량의 항체 조성물의 양은 치료제가 투여되는 개인의 몸집 및 치료되는 장애의 특성에 따라 달라질 수 있다. 예시적인 치료제에서, 약 1mg/일, 5mg/일, 10mg/일, 20mg/일, 50mg/일, 75mg/일, 100mg/일, 150mg/일, 200mg/일, 250mg/일, 500mg/일 또는 1000mg/일을 투여하는 것이 필요할 수 있다. 단일 용량 형태로 또는 다수의 용량으로 이 농도를 투여할 수 있다. 처음에 동물 모델에서, 이어서 임상 시험에서 표준 용량-반응 연구는 특정한 질환 상태 및 환자 집단에 대한 최적 용량을 나타낸다.

[0422] 전통적인 치료제가 본 개시내용의 치료제와 조합하여 투여되는 경우 투약을 변경하는 것이 명확하다.

[0423] 키트

[0424] 추가의 양태로서, 본 개시내용은 본 개시내용의 방법을 실행하기 위해 이의 사용을 촉진하는 방식으로 패키징된

하나 이상의 화합물 또는 조성물을 포함하는 키트를 포함한다. 일 실시양태에서, 이러한 키트는 밀봉 병 또는 용기와 같은 컨테이너에 패키징된 본 명세서에 기재된 화합물 또는 조성물(예를 들면, 표적 특이적 항체를 단독으로 또는 제2 물질과 조합하여 포함하는 조성물)을 포함하고, 라벨이 컨테이너에 부착되거나 방법을 실행하는데 있어서 화합물 또는 조성물의 사용을 기술하는 패키지에 포함된다. 바람직하게는, 화합물 또는 조성물은 단위 용량 형태로 패키징된다. 키트는 특정 투여 경로에 따라 조성물을 투여하거나 스크리닝 검정을 실행하기에 적합한 장치를 추가로 포함할 수 있다. 바람직하게는, 키트는 항체 조성물의 사용을 기술하는 라벨을 포함한다.

[0425] 본 개시내용의 추가의 양태 및 상세설명은 하기 실시예로부터 명확하고, 이는 제한이기보다는 예시로 의도된다.

[0426] 실시예

[0427] 실시예 1. 항체 파지 디스플레이 라이브러리로부터의 항-TGF β 항체의 단리

[0428] 인간 TGF β 의 활성을 중화시킬 수 있는 일련의 항체를 단리하기 위해, TGF β 단백질, TGF β 1, TGF β 2 및 TGF β 3의 3종의 아이소폼을 하기 기재된 인간 항체 파지 디스플레이 라이브러리의 패닝에 사용하였다.

[0429] 패닝:

[0430] 제조업자의 프로토콜을 이용하여 NHS-PEG4-바이오틴(미국 일리노이주 락포드에 소재하는 피어스(Pierce))으로 바이오틴닐화하여 TGF β 항원(미국 뉴저지주 로키 힐에 소재하는 페프로테크(PeproTech), 100-21호, 100-35B호, 100-36E호)을 처음에 제조하였다. 간단히 말하면, 낮은 pH 완충제에서 저장된 TGF β 항원을 20X PBS를 첨가하여 중화하여 pH가 거의 6.0이 되게 하였다. 30배 물 과량의 상기 전환성화 바이오틴을 첨가하고 혼합한 후, 20분 동안 실온에서 유지시켰다. 이후, 동일 용적의 10mM 글라이신(pH 3.0)을 첨가하고 샘플을 10mM 시트레이트 완충제(pH 3.5)에 대해 6 내지 8kDa 컷오프 투석 단위를 사용하여 즉시 투석하였다. 가용성 패닝 방법을 이용하여 Fab 파지 디스플레이 라이브러리(미국 캘리포니아주 버켈리에 소재하는 줌마(XOMA))를 바이오틴닐화 TGF β 로 패닝하였다. 각각의 TGF β 아이소폼을 별도로 3회 선택 회차로 패닝하였다. 카파 및 람다 하위라이브러리를 별도로 패닝하였다.

[0431] 파지 패닝의 제1 회차에서, 50X 라이브러리 증가(약 2×10^{12} cfu)의 라이브러리를 1ml의 5% 젓/PBS 중에 1시간 동안 얼음 상에 차단하였다. 스트렙타비딘 코팅 자기 다이내믹스(DYNABEADS)(등록상표) M-280에 차단 파지를 첨가하고 30분 동안 회전시키면서 항온처리하여 차단 파지로부터 스트렙타비딘에 대한 결합체를 탈락시켰다. 탈락 단계를 한번 더 반복하였다. 파지로부터 비드를 분리시키기 위해 자석을 사용하였다. 탈락 단계와 동시에, 30분 동안 회전시키면서 실온에서 항온처리하여 200pmole의 바이오틴닐화 TGF β 를 스트렙타비딘 코팅 자기 다이내믹스(등록상표) M-280에 결합시켰다. 결합 후, 바이오틴닐화 TGF β 비드를 5% 젓-PBS로 2회 세척하였다. 자기 스트렙타비딘 비드에 결합된 바이오틴닐화 TGF β 에 탈락 파지를 첨가하고 1.5 내지 2시간 동안 회전시키면서 항온처리하여 선택하였다. 선택 후, 비드를 PBS-0.1% 트윈으로 3회 신속히 세척한 후, PBS로 추가로 3회 신속히 세척하도록 프로그래밍된 킹피셔(Kingfisher) 자기 입자 프로세서(Thermo Scientific)를 사용하여 비결합 파지를 비드로부터 세척하였다. 100mM 트라이에틸아민 첨가에 의한 세척 단계 및 30분 동안 실온에서의 회전을 수반한 항온처리 후 결합 파지를 비드로부터 용리시켰다. 동일 용적의 1M 트라이스-HCl(pH 7.4)을 첨가하여 용리된 파지를 중화시켰다. 이후, 용리된 중화 파지를 50ml 팔콘(Falcon) 관(팔콘 352070호)에 수집하고 로그 성장하는 TG1 박테리아 세포(OD₆₀₀ 약 0.5)를 감염시키도록 사용하였다. 진탕시키지 않으면서 37°C에서 30분 동안 감염시킨 후, 진탕시키면서 90rpm에서 37°C에서 추가로 30분 동안 항온처리하였다. 세포를 100 μ g/ml 카르베니실린 및 2% 글루코스(2YTCG) 한천 바이오검정 플레이트가 보충된 2YT 배지에서 평판배양하고 30°C에서 밤새 항온처리하여 밤새 얇게 성장시켰다.

[0432] 다음 회차를 위한 유입물로서 사용하기 위한 준비로, MK07 헬퍼 파지를 사용하여 100X의 이전 회차의 유입물을 초감염으로 구조하였다. 2YTCG 배지를 이전의 패닝 회차 유입물로부터 긁어낸 세포로 접종하여 이를 수행하였다. OD_{600nm}를 출발 배양물에 측정하고 약 0.05의 출발 OD_{600nm}를 반영하도록 조정하였다. 세포가 약 0.5의 OD_{600nm}의 로그 성장 상에 도달할 때까지 세포를 진탕시키면서 37°C에서 성장시켰다. 세포를 진탕시키지 않으면서 37°C에서 30분 동안 약 20인 감염 다중도(multiplicity of infection: MOI)로 MK07(미국 마이애미주에 소재하는 뉴 잉글랜드 바이오랩스(New England Biolabs))로 감염시킨 후, 진탕시키면서 150rpm에서 37°C에서 추가로 30분 동안 항온처리하였다. 37°C에서 감염 후, 세포를 펠렛화하고 50 μ g/ml 카나마이신 및 100 μ g/ml 카르베니실린(2YTCK)이 보충된 새로운 2YT 배지로 옮겼다. 배양물을 25°C에서 밤새 성장시켰다. 파지를 원심분리에 의해 세포 및 잔해물로부터 분리하고 생성된 상청액을 회수하고, 다음 패닝 회차에 대한 유입물로서 사용하였다. 선택 풍부도를 각각의 패닝 회차에 사용된 유입물의 양 및 생성된 파지 출력물 역가로 모니터링하였다.

- [0433] 제2 및 제3 패닝 회차의 경우, 일 회차에 따른 동일한 용액 상 프로토콜을 하기 예외로 사용하였다. 2 및 3의 패닝 회차에 사용된 파지 유입물 양은 약 1.0×10^{11} cfu이다. 2 회차의 경우, 100pmole의 바이오티닐화 항원을 선택에 사용하고, 3 회차의 경우, 50pmole의 바이오티닐화 항원을 사용하였다. 선택 후 비드로부터 비결합 파지를 세척하기 위해 킹피서를 사용하였다. 2 회차에서, 2분 동안 PBS-0.1% 트윈으로 비드를 3회 세척한 후, 2분 동안 3회 반복으로 1ml의 PBS로 세척하도록 킹피서를 프로그래밍하였다. 3 패닝 회차에서, 비드를 6분 동안 PBS-0.1% 트윈으로 3회 세척한 후, PBS로 2회 4분 세척하고 1회 6분 세척하였다.
- [0434] 표준 방법에 의해 TGF β 결합체에 대한 스크리닝시 사용하기 위한 분비된 항체 단편을 포함하는 박테리아 주변 세포질 추출물을 제조하였다. 각각의 콜로니를 100 μ g/ml 카르베니실린 및 0.1% 글루코스가 보충된 2YTC 배지가 충전된 96웰 플레이트에 넣었다. 로그 성장 상에 도달할 때까지($OD_{600nm} = 0.5$) 진탕시키면서 배양물을 37 $^{\circ}$ C에서 성장시켰다. 이후, 최종 1mM IPTG를 첨가하고 진탕시키면서 25 $^{\circ}$ C에서 밤새 항온처리하여 가용성 단편 항체를 생성하도록 콜로니를 유도하였다. 1:3 용적 비의 얼음 냉각된 PPB 용액(미국 캘리포니아주 홀리스트에 소재하는 테크노바(Teknova)) 및 이중 증류수(ddH₂O)를 완전 EDTA 비함유 프로테아제 억제제 각테일 정제와 함께 첨가하는 표준 방법을 이용하여 가용성 단편 항체를 포함하는 주변세포질 추출물(PPE)을 유도 세포로부터 제조하였다. 이후, TGF- β 결합체를 스크리닝하기 위해 PPE를 사용하였다.
- [0435] 스크리닝:
- [0436] 모든 3종의 TGF β 아이소폼에 결합하는 클론을 비롯하여 TGF β 에 결합하고 이의 서열이 독특한 클론을 확인하기 위해 2개의 대안적인 스크리닝 검정 포맷을 이용하였다. 제1 스크리닝 검정을 플레이트 기반 면역-검정을 이용하고, SPR 스크리닝 방법을 이용하여 다른 스크리닝 검정을 수행하였다. 플레이트 기반 검정은 실온에서 4시간 동안 PBS 완충제 중의 1 μ g/ml에서 1 μ g/ml 항-His 항체 클론 AD.1.10(미국 미네소타주 미니애폴리스에 소재하는 알앤디 시스템즈(R&D Systems))을 갖는 코팅 불투명 384웰 화이트 EIA 플레이트를 포함하였다. 이후, 플레이트를 PBS-트윈으로 3X 세척한 후, 실온에서 1시간 동안 PBS-트윈 중의 0.5% BSA로 차단하였다. 바이오티닐화 TGF β 의 다음 30 μ l/웰을 TGF β 1 및 TGF β 2에 대한 0.1 μ g/ml와 TGF β 3에 대한 0.2 μ g/ml 사이에서 첨가하고, 차단 완충제 중에 희석하였다. 이후, 30 μ l의 주변세포질 추출물을 첨가하고, 온화한 플레이트 진탕기에서 4 $^{\circ}$ C에서 밤새 항온처리하였다. 플레이트를 PBS-트윈으로 3X 세척한 후, DELFIA 검정 희석 완충제(퍼킨엘머(PerkinElmer)) 중에 희석된 50 μ l/웰의 2.5 μ g/ml 스트렙타비딘-유로피움(SA-Eu, 퍼킨엘머)을 각각의 웰에 첨가하고, 진탕기에서 실온에서 30분 동안 항온처리하였다. 플레이트를 PBS-트윈으로 7회 세척하고, 50 μ l/웰의 DELFIA 증대 시약(퍼킨엘머)을 첨가하고, 진탕기에 실온에서 8분 동안 둔 후, 200-1200 μ s 수집 시간 및 Exc. = 345nm, Emm. = 618nm 및 컷오프 = 590nm, 고 PMT 세팅, 20회 판독/웰로 TRF 모드로 분자 장치 플렉스테이션(FlexStation) 3 플레이트 리더에서 판독하였다. 음성 PPE 대조군보다 2.1배 더 높은 신호를 갖는 샘플이 양성인 것으로 생각된다.
- [0437] 비아코어 A100 직접 결합 검정에 의해 SPR 검정을 수행하였다. 이 검정에서, 비아코어 아민 커플링 키트(미국 뉴저지주 피스카타웨이에 소재하는 귀이 헬스케어(GE Healthcare))를 사용하여 표준 아민 커플링 화학을 통해 CM5 비아코어 칩을 제조하였다. TGF β 항원을 아세테이트(pH 4.0) 중에 6 μ g/ml로 희석하고, 7분 동안(TGF β 1인 1스팟) 및 10분 동안(TGF β 2 및 TGF β 3인 2 및 4 스팟) 주사하였다. 이것은 각각의 TGF β 항원의 3400RU와 4800RU 사이에 부동화하였다. 샘플을 1M 에탄올아민으로 탈활성화하였다. 주변세포질 추출물을 HBS-EP+(테크노바)로 2mg/ml BSA와 1:1 희석하고, 0.2 μ M Millex GV 필터 플레이트(밀리포어)를 통해 여과시킨 후, 30초 헤리로 240초 동안 30 μ l/분에서 주사하였다. 각각의 PPE 주사 후 재생은 100mM HCl의 10초였다. PPE 결합 수준을 평가하기 위해 비아코어 A100 소프트웨어에서의 안정성 초기 보고점을 이용하였다. 각각의 TGF β 아이소폼에 대해 독립적으로 컷오프 수준(배경 수준보다 실질적으로 높음)을 결정하였다. RU 컷오프는 TGF β 1, TGF β 2 및 TGF β 3에 대해 각각 245, 175 및 125였다.
- [0438] 친화도 성숙:
- [0439] TGF β 3에 비해 TGF β 1 및 TGF β 2에 대해 상당히 더 높은 결합 및 중화 활성을 갖는 XPA.42.068인 하나의 항체를 TGF β 3에 대한 이의 친화도 및 효능을 증가시키기 위해 친화도 성숙으로 처리하였다. 친화도 성숙으로부터 생성된 서열 변이체의 라이브러리를 TGF β 2 및 TGF β 3을 사용하여 패닝하고, 출력물 클론을 주로 개선된 TGF β 3 결합에 대해 스크리닝하였다.
- [0440] 스크리닝을 위해, 비아코어 A100 직접 결합 검정에 의해 SPR 검정을 수행하였다. 이 검정에서, 비아코어 아민 커플링 키트를 사용하여 표준 아민 커플링 화학을 통해 CM5 비아코어 칩을 제조하였다. TGF β 항원을 아세테이트(pH 4.0) 중에 1 μ g/ml로 희석하고, 5분 동안(각각 TGF β 3 및 TGF β 1인 1 및 5 스팟) 및 8분 동안(TGF β 2인 2

스팟) 주사하였다. 이는 각각의 TGFβ의 200RU와 450RU 사이에 부동화하였다. 샘플을 1M 에탄올아민으로 탈활성화하였다. 주변세포질 추출물을 HBS-EP+로 2mg/ml BSA와 1:1 희석하고, 0.2 μM Milllex GV 필터 플레이트(밀리포어)를 통해 여과시킨 후, 600초 해리로 240초 동안 30 μl/분에서 주사하였다. 각각의 PPE 주사 후 재생은 100mM HCl의 10초였다. 표준품 공제 데이터를 작도하고 더 높은 안정성 또는 더 높은 결합 수준을 갖는 것으로 보이는 클론에 대해 육안으로 검사하였다. TGFβ3에 대해 증대된 결합을 나타내는 XPA.42.681이라 칭하는 하나의 유도체 클론이 추가의 규명 연구에 포함된다.

[0441] 선택된 클론을 IgG2 항체로서 재포맷하였다. 선택된 Fab 단편의 가변 중쇄(VH) 및 경쇄(VL)를 PCR 증폭시키고, 항체 불변 영역 서열을 포함하는 플라스미드 벡터로 클로닝하고, 표준 방법을 이용하여 293E 세포로 일시적으로 형질감염시켜 하기 기재된 연구를 포함하는 추가의 규명을 위한 물질을 생성시켰다.

[0442] 실시예 2. 결합 친화도 of TGFβ 항체의 측정

[0443] 표면 플라즈몬 공명(SPR) 기술을 이용하여 이의 결합 친화도(KD), 오프속도(kd) 및 온속도(ka)에 대해 TGFβ 아 이소폼 TGFβ1, TGFβ2 및 TGFβ3에 대해 항체를 규명하였다. 2의 방법을 이용하여 분석을 수행하였다. 하나의 방법은 항원 직접 부동화 방법이고, 여기서 TGFβ 단백질을 낮은 밀도로 표면에 부동화시키고 항체를 동역학 분석을 위해 다수의 농도에서 주사하였다. 다른 방법은 다양한 농도의 주사된 TGFβ 단백질의 주사를 이용하는 부동화 항체 방법이다.

[0444] 부동화된 항체 동역학 방법:

[0445] 비아코어 2000 시스템(쥐이 헬스케어)에서 CM4 센서 칩(쥐이 헬스케어)을 사용하였다. 부동화 전에 100mM HCl, 글라이신(pH 2.0), 50mM NaOH 및 실행 완충제의 50 μl/분 유속으로 각각 2회의 30초 주사로 칩을 전처리하였다. 부동화를 위한 실행 완충제는 10mM 헤페스, 150mM 염화나트륨, 3mM EDTA 및 0.05% 폴리소르베이트 20(테크노바)을 갖는 헤페스 완충 식염수(HBS-EP+)이다. 0.1M N-하이드록시수신이미드(NHS) 및 0.4M 1-에틸-3-(3-다이메틸아미노프로필) 카보다이이미드 하이드로클로라이드(EDC)의 새로 혼합된 1:1 용액의 10 μl/분에서 7분 주사로 칩 표면을 활성화하였다. 활성화 주사 후, 아세트이트(pH 4.5) 중의 1 μg/ml 항-TGFβ 항체를 1분 동안 10 μl/분에서 주사하고, 주사는 120RU를 표적화하였다. 표면을 차단하기 위해 1M 에탄올아민 하이드로클로라이드-NaOH(pH 8.5)의 8분을 주사하였다. 사용된 NHS, EDC 및 에탄올아민은 비아코어 아민 커플링 키트로부터 얻었다.

[0446] 1mg/ml BSA(미국 미주리주 세인트 루이스에 소재하는 시그마 알드리치(Sigma Aldrich))가 보충된 상기 HBS-EP+ 완충제의 완전 탈기 형태의 실행 완충제를 사용하여 동역학 분석을 수행하였다. 900초 해리 시간으로 4분 동안 50 μl/분에서 TGFβ 샘플 주사를 수행하였다. 각각의 TGFβ 단백질(TGFβ1, TGFβ2, TGFβ3)을 각각의 농축 시리즈를 브라케팅(bracketing)하는 블랭크와 함께 4회 주사로 10nM, 2nM, 0.4nM, 0.08nM(5배 연속 희석된 350ng/ml)에서 주사하였다. 이후, 각각 3M MgCl2 중의 100mM HCl의 3회 30초 주사, 이어서 최종 30초 블랭크 완충제 주사로 재생을 수행하였다.

[0447] 스크러버2(Scrubber2)(오스트레일리아 캠벨에 소재하는 바이올로지 소프트웨어(BioLogic Software, Campbell Australia))를 사용하여 데이터를 분석하고, 블랭크 유세포 데이터 및 평균된 브라케팅 블랭크 주사 둘 다를 공제하여 이중 참조하였다. (KD)를 오프속도(kd) 및 온속도(ka)와 동시에 피팅하여 데이터를 작도하고, 이것은 하기 표 2에 기재되어 있다. BM-1(1D11, 알앤디 시스템즈 MAB1835)이라 칭하는 이전에 측정된 비교자 항체에 대한 데이터는 또한 표 2에 포함된다. 비아코어 A100에서 BM-1 데이터를 생성하였다. 간단히 말하면, 고밀도 래빗 항-마우스 Fc CM5 칩 표면(쥐이 헬스케어)에서 BM-1 항체를 대략 100RU 밀도로 포획하였다. TGFβ 단백질을 30 μl/분으로 상기 기재된 바대로 동일한 농도로 주사하였다. 이 데이터를 이중 참조하고, 비아코어 A100 소프트웨어에서 분석하였다.

표 2

부동화 항체 및 주사된 TGFβ를 사용한 검정으로부터 얻은 친화도 데이터

항체	TGFβ1			TGFβ2			TGFβ3		
	ka {1/Ms}	kd {1/s}	KD	ka {1/Ms}	kd {1/s}	KD	ka {1/Ms}	kd {1/s}	KD
XPA.42.068	1.53E+07	9.05E-04	59 pM	1.04E+07	5.35E-04	51 pM	8.45E+06	3.84E-03	455 pM
XPA.42.089	4.40E+07	1.67E-04	3.8 pM	1.62E+07	4.14E-04	25 pM	7.70E+06	1.09E-02	1.4 nM
XPA.42.681	4.25E+07	7.20E-05	1.7 pM	1.71E+07	4.99E-05	2.9 pM	1.30E+07	7.50E-05	5.7 pM
BM-1	1.90E+07	1.40E-03	72 pM	1.10E+07	2.00E-03	170 pM	6.50E+06	3.10E-04	48 pM

[0448]

[0449] 부동화 항체를 사용하여 이 검정에서 측정된 친화도 데이터는 XPA.42.681이 TGFβ의 각각의 3종의 아이소폼에 대한 임의의 항체의 가장 강한(가장 단단한) 결합을 갖고, 또한 각각의 TGFβ 아이소폼에 유사한 친화도로 결합한다는 것을 나타낸다. 또한, 항체 XPA.42.068 및 XPA.42.089는 BM-1 항체와 비교하여 TGFβ1 및 TGFβ2 아이소폼에 유사하거나 더 강한 결합을 갖지만, BM-1 항체와 비교하거나 또는 TGFβ1 및 TGFβ2 결합에 비해 TGFβ3 아이소폼에 대해 상당히 덜한 결합을 나타낸다.

[0450] 부동화 TGFβ 친화도 방법:

[0451] 비아코어 2000 시스템에서 평면 -COOH 표면을 갖는 CM1 센서 칩(쥐이 헬스케어)을 사용하였다. 부동화 전에 100mM HCl, 글라이신(pH 2.0), 50mM NaOH, 1% SDS 및 실행 완충제의 50μl/분 유속으로 각각 2회의 30초 주사로 칩을 전처리하였다. 부동화를 위한 실행 완충제는 10mM 헤페스, 150mM 염화나트륨, 3mM EDTA 및 0.05% 폴리소르베이트 20을 갖는 헤페스 완충 식염수(HBS-EP+)이다. 0.1M N-하이드록시숙신이미드(NHS) 및 0.4M 1-에틸-3-(3-다이메틸아미노프로필) 카보다이이미드 하이드로클로라이드(EDC)의 새로 혼합된 1:1 용액의 20μl/분에서 4분 주사로 칩 표면을 활성화하였다. 활성화 주사 후, 아세테이트(pH 4.0) 중의 0.1μg/ml TGFβ 용액을 몇분 동안 20μl/분에서 주사하였다. 각각의 TGFβ를 그 자체의 유세포에서 별도의 활성화 단계에서 사용하여, 활성화 및 불활성화 블랭크로서 Fc1과 함께, TGFβ1이 Fc2에 부동화되고, TGFβ2가 Fc3에 부동화되고, TGFβ3이 Fc4에 부동화되었다. 각각의 주사 사이의 부동화 수준을 관찰하면서 일련의 1분 내지 2분 주사로서 TGFβ의 주사를 수행하였다. 각각의 TGFβ 리간드의 표적 부동화 밀도는 30RU였다. TGFβ 부동화 주사 후, 표면을 차단하기 위해 1M 에탄올아민 하이드로클로라이드-NaOH(pH 8.5)의 4분을 주사하였다. 사용된 NHS, EDC 및 에탄올아민은 비아코어 아민 커플링 키트로부터 얻고, TGFβ1, TGFβ2 및 TGFβ3은 알앤디 시스템즈로부터 얻었다.

[0452] 친화도 분석을 위해 실행 완충제를 1mg/ml BSA(시그마 알드리치(미국 미조리주 세인트 루이스))가 보충된 상기 HBS-EP+ 완충제의 완전 탈기 형태로 전환하였다. 각각의 항체를 실행 완충제 중에 5μl/ml(33.3nM)로 희석하고, 4 후속 5배 희석액을 각각에 대해 33.33nM, 6.67nM, 1.33nM, 267pM 및 53pM의 농도로 설정하여 제조하였다. 이후, 900초 해리 시간으로 50μl/분에서 4분 동안 킨젝트(Kinject) 셋팅을 이용하여 이를 주사하였다. 이후, 50μl/분에서 100mM HCl의 12μl(14.4초) 주사, 이어서 18초 완충제 주사로 재생을 수행하였다. 모든 유세포에 걸쳐 동시에 주사하고, 각각의 항체에 대해 감소하는 농도의 주사군의 각각의 세트를 브라케팅하는 블랭크 주사로 샘플을 4회 주사하였다. 이는 동일한 샘플 전에 모든 다른 농도의 모든 항체를 2회 주사하였다는 것을 의미하였다.

[0453] 스크러버2(오스트레일리아 캠벨에 소재하는 바이올로지 소프트웨어)를 사용하여 데이터를 분석하고, 블랭크 유세포 데이터 및 평균된 브라케팅 블랭크 주사 둘 다를 공제하여 이중 참조하였다. (KD)를 오프속도(kd) 및 온속도(ka)와 동시에 피팅하여 데이터를 작도하고, 이것은 하기 표 3에 기재되어 있다.

표 3

부동화 TGFβ 및 주사된 항체를 사용한 검정으로부터 얻은 친화도 데이터

항체	TGFβ1			TGFβ2			TGFβ3		
	ka {1/Ms}	kd {1/s}	KD	ka {1/Ms}	kd {1/s}	KD	ka {1/Ms}	kd {1/s}	KD
XPA.42.068	5.44E+06	1.70E-03	313 pM	7.30E+06	7.98E-04	109 pM	5.45E+06	6.96E-03	1.3 nM
XPA.42.089	5.98E+06	1.06E-03	177 pM	4.80E+06	1.39E-03	290 pM	3.40E+06	5.70E-02	>17 nM
XPA.42.681	1.14E+07	3.63E-04	82 pM	1.28E+07	3.94E-04	31 pM	1.23E+07	6.65E-04	54 pM
BM-1	1.28E+07	3.90E-03	304 pM	7.00E+06	6.84E-03	977 pM	5.05E+06	9.46E-04	188 pM

[0454]

[0455] 표 2로부터의 부동화 항체 결과와 일치하게, 부동화 항원을 사용한 검정에서 측정된 친화도 데이터(표 3)는 또한 XPA.42.681이 TGFβ의 각각의 3종의 아이소폼에 대한 임의의 항체의 가장 강한(가장 단단한) 결합을 갖고, 각각의 TGFβ 아이소폼에 유사한 친화도로 결합한다는 것을 나타낸다. 또한, XPA.42.068 및 XPA.42.089는 BM-1 항체와 비교하여 TGFβ1 및 TGFβ2 아이소폼에 유사하거나 더 강한 결합을 갖지만, BM-1 항체와 비교하거나 또는 TGFβ1 결합에 비해 TGFβ3 아이소폼에 대해 상당히 덜한 결합을 나타낸다. 부동화 항원에 대한 부동화 항체 검정을 이용하여 측정된 속도 상수의 차이는 시스템의 고유한 복잡함으로부터 생길 것이지만, 그럼에도 불구하고 각각은 비교적 높은 품질의 동역학 데이터 및 서로에 대해 항체 중에서 및 TGFβ 아이소폼에 걸쳐 결합 특성

의 일치도를 제공하였다.

[0456] 실시예 3. TGFβ 항체에 의한 수용체 경쟁의 측정

[0457] SPR 경쟁 검정에 의한 TGFβ 수용체에 대한 각각의 3종의 TGFβ 리간드의 결합을 억제하거나 차단하는 이의 능력에 대해 항체를 규명하였다. TGFβ는 세린 트레오닌 키나아제 막관통 단백질인 TGFβ II형 수용체(TGFβ-RII)를 통해 신호전달하고, 활성화에 대해 TGFβ 수용체 1형 단백질(TGFβ-R1)의 세포질 결합을 요한다. 리간드 TGFβ-R1의 결합 역할은 명확하지 않고, TGFβ-R1의 재조합 형태는 시험된 농도에서의 이 리간드의 임의의 TGFβ 1, TGFβ2 또는 TGFβ3 리간드 또는 TGFβ-RII 결합 형태에 대한 임의의 결합을 나타내지 않고, 따라서 수용체 경쟁 실험에서 평가될 수 없다. TGFβ III형 수용체(TGFβ-RIII)는 막 결합 및 수용성 형태 둘 다를 갖고, TGFβ 신호전달에 관여하는 것으로 생각되지 않는다. TGFβ-RIIb는 N 말단 근처에서 26개의 아미노산 삽입을 포함하는 스플라이스 변이체이고, 우수한 친화도로 모든 3종의 TGFβ 아이소폼에 대한 결합의 독특한 특성을 갖는다. TGFβ-RII는 TGFβ 1 및 TGFβ3 리간드에만 단단히 결합하고, TGFβ-RIII는 TGFβ2 리간드에 최고로 결합하였다.

[0458] 비아코어 2000 시스템에서 CM5 센서 칩(췌이 헬스케어)을 사용하였다. 부동화 전에 100mM HCl 및 50mM NaOH의 50μl/분 유속으로 각각 여러 회의 30초 주사로 칩을 전처리하였다. 부동화를 위한 실험 완충제는 10mM 헤페스, 150mM 염화나트륨, 3mM EDTA 및 0.05% 폴리소르베이트 20을 갖는 헤페스 완충 식염수(HBS-EP+)이다. 0.1M N-하이드록시수소이미드(NHS) 및 0.4M 1-에틸-3-(3-다이메틸아미노프로필) 카보다이이미드 하이드로클로라이드(EDC)의 새로 혼합된 1:1 용액의 10μl/분에서 7분 주사로 칩 표면을 활성화하였다. 활성화 주사 후, 아세트레이트(pH 4.5) 중의 5μg/ml TGFβ-RII, TGFβ-RIIb 또는 TGFβ-RIII(알앤디 시스템즈)을 20μl/분에서 4분 주사하고, 각각의 TGFβ 수용체에 대해 부동화된 1000-4000 RU를 생성시켰다. 이후, 표면을 차단하기 위해 1M 에탄올아민 하이드로클로라이드-NaOH(pH 8.5)의 8분을 주사하였다. 사용된 NHS, EDC 및 에탄올아민은 비아코어 아민 커플링 키트로부터 얻었다. Fc1은 활성화 및 비활성화 대조군이다.

[0459] 1mg/ml BSA가 보충된 상기 HBS-EP+ 완충제의 완전 탈기 형태의 실험 완충제를 사용하여 경쟁 검정을 수행하였다. TGFβ 리간드를 100ng/ml(10nM) 내지 40ng/ml(4nM)에서 블랭크 대조군을 제외한 모든 주사로 사용하고 10μg/ml(66.6nM)의 경쟁자 및 대조군 항체와 제조하였다. 샘플을 실온에서 40분 동안 평형이 되게 한 후, 비아코어 실험을 시작하였다. 이후, 평형된 샘플을 10μl/분에서 2분 동안 주사하였다. 50μl/분에서 9.6초(8μl) 동안 글라이신(pH 2.5)의 1회 주사로 사이클마다 재생을 수행하였다. 샘플을 적어도 2회 실행하고, 결합된 TGFβ의 수준에 대해 분석하였다.

[0460] 하기 표 4에 도시된 바대로, 항체 XPA.42.068, XPA.42.089, XPA.42.681 및 BM-1 비교자에 대한 결과는 각각의 이러한 항체가 TGFβ-RII 및 TGFβ-RIII 수용체에 대한 모든 3종의 TGFβ 리간드의 결합을 차단하고, 명확한 차이가 이루어지지 않는다는 것을 나타낸다. 이러한 수용체 경쟁 패턴은 시험된 모든 다른 항체 중에 보편적이지 않지만, 이에 대한 데이터는 본 개시내용에 기재되어 있지 않다.

표 4

수용체 경쟁 검정 EC50(nM 항체)

	XPA.42.068	XPA.42.089	XPA.42.681	BM-1
TGFβ1/TGFβ-RII	2.0E-09	1.7E-09	2.3E-09	2.4E-09
TGFβ2/TGFβ-RII	2.2E-09	1.8E-09	1.7E-09	2.8E-09
TGFβ3/TGFβ-RII	1.4E-09	3.4E-08	1.2E-09	1.6E-09
TGFβ1/TGFβ-RIII	6.0E-10	1.2E-09	2.2E-09	2.1E-09
TGFβ2/TGFβ-RIII	2.4E-09	1.6E-09	2.1E-09	2.5E-09
TGFβ3/TGFβ-RIII	1.9E-09	3.1E-08	1.1E-09	1.4E-09

[0461]

[0462] 수용체 경쟁에서 XPA.42.068, XPA.42.089, XPA.42.681 및 BM-1 항체의 효능은 다양한 TGFβ 아이소폼에 대한 이의 친화도와 일반적으로 상관된다.

[0463] 실시예 4. TGFβ 항체 중의 에피토프 경쟁의 측정

[0464] TGFβ 단백질에 대한 독립적인 또는 중첩 에피토프에 결합하는 XPA.42.068 및 XPA.42.089 항체의 능력을 평가하였다. 이 쌍 분석은 상이한 TGFβ 아이소폼 중의 다양한 항체 친화도 및 TGFβ 리간드의 공유 동종이합체화(동

중이합체 비마다 2개의 IgG에서 결합을 생성시킴(예를 들면, 자가 쌍))로 인해 간단하지 않지만, 가용성 경쟁 기반 검정이 개발되었다.

[0465] 비아코어 2000 시스템에 CM5 센서 칩(퀴아 헬스케어)을 사용하였다. 부동화 전에 100mM HCl의 50 μ l/분 유속으로 4회의 30초 주사로 칩을 전처리하였다. 부동화를 위한 실행 완충제는 10mM 헤페스, 150mM 염화나트륨, 3mM EDTA 및 0.05% 폴리소르베이트 20을 갖는 헤페스 완충 식염수(HBS-EP+)이다. 0.1M N-하이드록시숙신이미드(NHS) 및 0.4M 1-에틸-3-(3-다이메틸아미노프로필) 카보다이이미드 하이드로클로라이드(EDC)의 새로 혼합된 1:1 용액의 10 μ l/분에서 7분 주사로 칩 표면을 활성화하였다. 활성화 주사 후, 아세테이트(pH 4.5) 중의 1 μ g/ml 항체 XPA.42.089을 10 μ l/분에서 몇분 주사하였다. 주사를 모니터링하고, 순차적으로 수행하여 300RU에 매우 가까운 부동화 수준을 확립하였다. 표면을 차단하기 위해 1M 에탄올아민 하이드로클로라이드-NaOH(pH 8.5)의 8분을 주사하였다. 사용된 NHS, EDC 및 에탄올아민은 비아코어 아민 커플링 키트로부터 얻었다. Fc1은 활성화 및 비활성화 대조군이다.

[0466] 1mg/ml BSA가 보충된 상기 HBS-EP+ 완충제의 완전 탈기 형태의 실행 완충제를 사용하여 경쟁 검정을 수행하였다. TGF β 1, TGF β 2 및 TGF β 3을 0.1 μ g/ml(4nM)에서 블랭크 대조군을 제외한 모든 주사로 사용하고 20 μ g/ml(133nM)의 경쟁자 항체와 제조하였다. TGF β -RIIb-Fc 재조합 수용체(알앤디 시스템즈)은 또한 경쟁자로서 포함되었다. 샘플을 실온에서 40분 동안 평형이 되게 한 후, 비아코어 실행을 시작하였다. 이후, 평형된 샘플을 모든 유세포에 대해 30 μ l/분에서 3분 동안 주사하였다. 50 μ l/분에서 6초(5 μ l) 동안 50mM NaOH의 1 주사, 이어서 30초 완충제 주사로 사이클마다 재생을 수행하였다. 샘플을 2회 실행하고, 3분 종료시 결합된 TGF β 의 수준에 대해 분석하였다.

표 5

결합 경쟁(부동화된 XPA.42.089)

	TGF β 1	TGF β 2	TGF β 3
블랭크	-0.568	0.0655	0.3684
무 Ab	63.85	61.05	23.65
XPA.42.068	10.85	5.18	7.32
XPA.42.089	1.7	0.3635	9.77
TGF β -RIIb	-0.316	38.2	-0.378

[0467]

[0468] 상기 표 5에 도시된 바대로, 데이터는 XPA.42.068 및 XPA.42.089가 각각의 TGF β 아이소폼을 결합시키기 위해 서로에 대한 강한 경쟁을 나타낸다는 것을 나타낸다. 값은 복합체의 주사 동안 측정된 TGF β 결합의 평균 RU 또는 신호 강도를 나타낸다. 이는 복합체화된 항체가 존재할 때 신호가 크게 감소하였다는 것을 나타낸다. 주사 동안 복합체의 임의의 해리는 자유 또는 1가 결합 TGF β 가 XPA.42.089 포획 항체에 의해 결합되게 하였다. TGF β 2와의 TGF β -RIIb 상호작용이 TGF β 1 및 TGF β 3 단백질보다 훨씬 약하고 신속한 오프레이트(off-rate)은 고친화도 XPA.42.089에 대한 TGF β 2에 대해 비교적 약한 경쟁을 허용하였다. 경쟁 검정에 XPA.42.068로부터 유도된 XPA.42.681 항체를 시험하지 않는다.

[0469] 실시예 5. TGF β 항체에 의한 rhLAP 경쟁의 측정

[0470] 항체가 또한 TGF β 의 잠재 형태와 상호작용하는지 결정하기 위해 추가의 경쟁 검정을 수행하였다. TGF β 전구단 백질은 퓨린 유사 전환효소에 의해 골지체 내에서 N 말단 249개의 아미노산 잠복성 관련 펩타이드 및 C 말단 112개의 아미노산 성숙 TGF β 1로 절단된다.

[0471] 비아코어 2000 시스템에서 CM5 센서 칩(퀴아 헬스케어)을 사용하였다. 부동화 전에 100mM HCl 및 50mM NaOH의 50 μ l/분 유속으로 각각 2회의 30초 주사로 칩을 전처리하였다. 부동화를 위한 실행 완충제는 10mM 헤페스, 150mM 염화나트륨, 3mM EDTA 및 0.05% 폴리소르베이트 20을 갖는 헤페스 완충 식염수(HBS-EP+)이다. 0.1M N-하이드록시숙신이미드(NHS) 및 0.4M 1-에틸-3-(3-다이메틸아미노프로필) 카보다이이미드 하이드로클로라이드(EDC)의 새로 혼합된 1:1 용액의 10 μ l/분에서 7분 주사로 칩 표면을 활성화하였다. 활성화 주사 후, 아세테이트(pH 4.5) 중의 2 μ g/ml 재조합 인간 TGF β 1 잠복성 관련 펩타이드(rhLAP)(알앤디 시스템즈)를 4분 동안 10 μ l/분에서 주사하고, 400RU의 rhLAP를 부동화시켰다. 표면을 차단하기 위해 1M 에탄올아민 하이드로클로라이드-NaOH(pH 8.5)의 8분을 주사하였다. Fc1은 활성화 또는 불활성화 대조군이다.

[0472] 1mg/ml BSA가 보충된 상기 HBS-EP+ 완충제의 완전 탈기 형태의 실행 완충제를 사용하여 rhLAP 경쟁 검정을 수행하였다. TGFβ1을 블랭크 대조군을 제외한 모든 주사에서 0.25μg/ml(10nM)에서 사용하고, 경쟁자 및 대조군 항체의 10μg/ml(66.6nM)와 제조하였다. 샘플이 실온에서 40분 동안 평형에 도달하게 한 후, 비아코어 실행을 시작하였다. 이후, 평형된 샘플을 대조군 및 rhLAP 표면에 대해 2분 동안 40μl/분으로 주사하였다. 9.6초(16μl) 동안 100μl/분에서 100mM HCl의 2회의 주사로 매 사이클 재생을 수행하였다. 샘플을 2회 실행하고 결합 TGFβ1의 수준을 분석하였다.

[0473] rhLAP 경쟁 검정에서 항체 XPA.42.068, XPA.42.089 및 BM-1 비교자를 각각 시험하였다. XPA.42.068로부터 유도된 XPA.42.681 항체를 시험하지 않았다. 도 1에 도시된 바대로, XPA.42.068, XPA.42.089 및 BM-1은 각각 rhLAP와 높은 수준의 경쟁을 나타내어, 항체가 TGFβ의 활성 형태와 상호작용하고 잠재적 TGFβ를 인식하지 않는다는 것을 나타낸다.

[0474] 실시예 6. HT-2 검정에서 TGFβ 항체에 의한 증화의 측정

[0475] 항체가 TGFβ 아이소폼을 기능적으로 중화시키는지 결정하기 위해, 루게머(Ruegger) 등의 검정 방법(J Immunol. 144:1767-76; 1990)을 적용하고, 이에 의해 HT-2 림프구와 T 세포를 TGFβ1, TGFβ2 또는 TGFβ3의 첨가와 함께 또는 첨가 없이 성장시켰다. TGFβ 아이소폼은 세포 사이클 정지를 촉진하는 유전자의 전이활성을 통해 HT-2 세포의 IL-4 의존적 성장을 억제하였다. IL-4는 c-myc 및 GM-CSF와 같은 표적을 활성화하여 미토겐 유전자 발현 프로그램을 전이활성시키고; TGFβ 신호전달은 c-myc 및 GM-CSF 발현을 억제하는 유전자를 전이활성시켰다. TGFβ 신호전달이 중화 항체에 의해 무효되면, HT-2 세포가 증식하였다. 대사적으로 활성인 세포에 대한 관독으로서 ATP를 측정하는 셀 티터글로(CELL TITERGLO)(등록상표)(프로메가 G7571호) 생존률 검정에 의해 성장의 차이를 점수매긴다.

[0476] RPMI + 10% FBS, 10mM 헤페스, 2mM 글루타민, 50μM 2-ME 중의 1.5e4 내지 2.5e4 세포/ml에서 2일 내지 3일마다 스플릿팅하여 HT-2 림프구와 T 세포를 유지시켰다. 농축 스톱으로부터 각각의 플라스크에 새로운 재조합 마우스 IL-2(알앤디 시스템즈)를 200IU/ml로 첨가하였다. 1일에, 세포를 배지에서 세척하여 IL-2를 제거하고 2000IU/ml 재조합 마우스 IL-4(알앤디 시스템즈)로 웰마다 10,000개의 세포로 불투명 96웰 플레이트에 분배하였다. 적정 시리즈에 걸쳐 항체와 함께 또는 항체 없이 1시간 사전항온처리 후 TGFβ1, TGFβ2 또는 TGFβ3(페프로테크 100-21호, 100-35B, 100-36E)을 첨가하였다. 37℃에서 48시간 항온처리 후, 제조업자의 추천에 따라 셀 티터글로(등록상표)를 이용하여 MDS 플렉스테이션3에서 생존 세포 집단을 점수매긴다.

표 6

HT-2 세포 중화 검정

항체	TGFβ2	TGFβ1	TGFβ3
XPA.42.068	+	98.0	0.0
XPA.42.089	+	57.0	0.0
XPA.42.681	+	강력	30.3
BM-1	+	220.0	196.0

[0477]

[0478] 항체를 HT-2 검정에서 단일 10μg/ml 희석점에서 TGFβ2 활성의 중화에 대해 초기에 시험하고, 각각의 항체는 양성인 것으로 확인되었고, 항체 XPA.42.068, XPA.42.089 및 XPA.42.681은 시험된 단일점에서 BM-1 비교자 항체보다 더 높은 효능을 가졌다. 이후, TGFβ1 및 TGFβ3의 중화를 결정하고, 6점 희석 시리즈에 걸쳐 각각의 항체에 대해 IC50을 계산하였다. 다시, 각각의 XPA.42.068, XPA.42.089 및 XPA.42.681은 TGFβ1 중화와 관련하여 BM-1 비교자보다 더 높은 효능을 나타내지만, 오직 XPA.42.681이 TGFβ3 중화의 더 높은 효능을 나타내는 것으로 밝혀졌고, 따라서 TGFβ의 가장 강력한 펜-억제제이다(표 6). XPA.42.681은 이 검정에서 증대된 효능을 나타내고, 시험된 최저 농도는 TGFβ1을 상당히 억제하고, 따라서 특이적 IC50을 계산하였다.

[0479] 실시예 7. IL-11 방출 검정에서 TGFβ 항체에 의한 증화의 측정

[0480] 제2 중화 검정은 폐 섬유아세포 및 상피 세포에서 전섬유증 반응의 일부인 A549 폐 암종 세포로부터의 IL-11의 TGFβ 매개 분비를 점수매긴다. TGFβ는 또한 골로의 전이를 촉진하는 MDA-MB-231 세포로부터의 IL-11의 분비를 중재하였다. 이 검정 모델에서, TGFβ는 섬유증 및 전이성 질환에 기여하는 생물학적 반응을 중재하였다. IL-11

방출 검정을 문헌[Rapoza et al. (J Immunol. Methods 316:18-26; 2006)]로부터 적용하고, 이에 의해 A549 세포를 96웰 플레이트에 시딩하고, 다음날 세포를 TGF β 아이소폼으로 또는 이것 없이 처리하고, 중화 항체와 또는 이것 없이 예비항온처리하였다. ELISA에 의해 세포 배양물 상청액에서 IL-11 방출을 점수매긴다.

[0481] 이 검정에서, F12 + 10% 혈청에서 A549 세포를 성장시켰다. 분석일 전에, 세포를 (수용체 발현을 보유하기 위해) 베르센과 탈착하고, 96웰 평저 플레이트에 웰마다 40,000개의 세포로 시딩하였다. 다음날, 세포를 첨가하기 전에 EC80에서 TGF β 1, TGF β 2 또는 TGF β 3을 항체와 함께 또는 이것 없이 1시간 동안 희석 시리즈에 걸쳐 예비항온처리하였다. 대조군으로서, TGF β 단독, TGF β + 항-KLH-G2 대조군 항체 또는 배지 단독을 플레이트에 첨가하였다. 37℃에서 24시간 후, 상청액을 수확하고, 제조업자의 추천에 따라 IL-11 듀오 세트(Duo Set) ELISA 키트(알앤디 시스템즈)를 사용하여 ELISA에 의해 IL-11을 점수매긴다.

표 7

IL-11 방출 검정 - IC50(ng/ml)

항체	TGF β 1	TGF β 2	TGF β 3
XPA.42.068	220.5	110.5	1795.0
XPA.42.089	37.0	58.0	0.0
XPA.42.681	0.4	1.0	0.8
BM-1	292.0	498.0	12.0

[0482]

[0483] 상기 표 7에 기재된 바대로, HT-2 검정과 유사하게, IL-11 방출 검정 결과는 XPA.42.681이 각각의 3종의 TGF β 아이소폼에 대해 가장 강력한 임의의 항체이다. HT-2 검정과 반대로, XPA.42.681 항체는 IL-11 방출에 대한 용량 의존적 효과를 나타내고(IC50 결정이 가능하게 함), 또한 각각의 TGF β 아이소폼에 대해 일반적으로 유사한 IC50 값을 나타냈다. 항체 XPA.42.068 및 XPA.42.089는 또한 TGF β 1 및 TGF β 2 아이소폼의 우수한 중화(BM-1 비교자보다 강력)를 나타냈지만, BM-1 항체와 비교하여 또는 TGF β 1 및 TGF β 2의 중화에 비해 TGF β 3의 상당히 더 적은 중화를 나타냈다.

[0484] 실시예 8. pSMAD2 검정에서 TGF β 항체에 의한 중화의 측정

[0485] 항체를 추가로 규명하기 위해, TGF β RII/TGF β RI 수용체 복합체를 통한 TGF β 신호전달의 중화를 점수매기기 위해 포스포-SMAD2(pSMAD2) 검정을 개발하였다. IMDM + 10% FBS 중에 디트로이트 562 세포를 유지시켰다. 세포를 베르센과 탈착시키고, 웰마다 500,000개의 세포로 6웰 디시에 평판배양하였다. 다음날, 세포를, 항체와 함께 또는 이것 없이 1시간 동안 예비항온된 TGF β 1, TGF β 2 또는 TGF β 3에 대한 30분 노출 전에, 3시간 동안 혈청 비 함유 IMDM 중에 혈청 아사시켰다. 37℃에서 30분 후, 세포를 용해시키고, 검출에 대해 제조업자의 추천에 따라 상업용 키트(미국 마이애미주 덴버스에 소재하는 셀 시그널링 테크놀로지(Cell Signaling Technology))를 사용하여 ELISA에 의해 pSMAD2 및 전체 SMAD2를 점수매긴다. pSMAD2의 백분율을 전체 SMAD2로 정규화하고, 항-KLH 대조군에 비해 정규화된 pSMAD2(%)로부터 각각의 클론에 대해 억제율(%)을 계산하였다(도 2). T 시험(2측)은 XPA.42.681 항체가 모든 TGF β 아이소폼에 걸친 pSMAD 신호전달을 중화시키는 데 있어서 BM-1 비교자 항체보다 상당히 더 강력하다는 것을 보여준다(p<0.05). 추가로, XPA.42.068은 BM-1 비교자에 비해 TGF β 2에 대해 상당히 더 강력하다.

[0486] 실시예 9. 조절 T 세포 검정에서 TGF β 항체 활성의 측정

[0487] 내인성 TGF β 에 대한 항체의 활성을 규명하기 위해, 문헌[Tran et al. (Blood 110:2983-2990; 2007)]과 유사한 방법에 기초하여 조절 T(Treg) 세포 검정을 확립하였다. 이지스텝 T 세포 풍부 키트(EasySep T cell Enrichment)(벤쿠버주 벤쿠버에 소재하는 스템셀 테크놀로지(StemCell Technologies))를 사용하여 인간 PBMC의 냉동 바이알로부터 T 세포를 분리하였다. 10 μ g/ml에서 플레이트 결합 항-인간 CD3 항체(미국 캘리포니아주 샌디에고에 소재하는 이바이오사이언스(eBioscience)) 및 2 μ g/ml에서 가용성 항-인간 CD28 항체(이바이오사이언스)로 T 세포를 활성화하였다. 15 μ g/ml의 TGF β 항체 또는 대조군으로 세포를 또한 동시에 처리하였다. 4일 후, 4℃에서 30분 동안 항-인간 CD4-FITC(비디 바이오사이언시스) 및 항-인간 CD25-A647(미국 캘리포니아주 샌디에고에 소재하는 바이오레전드(BioLegend))로 세포를 염색하였다. 세포를 실온에서 20분 동안 FOXP3 고정 완충제(바이오레전드)로 고정하고, FOXP3 투과성 완충제(바이오레전드)로 실온에서 15분 동안 투과시켰다. 세포를 항-

인간 FOXP3-PE(바이오레전드)의 1:25 희석액으로 염색하고 비디 팩스칸토(BD FACSCanto)(상표명) 시스템에서 분석하였다. CD4+ 세포를 게이팅하고, CD4+CD25+Foxp3+ 하위집단을 플루조(Flowjo) 소프트웨어로 정량화하였다. 항체를 4 또는 5의 상이한 PBMC 도너를 사용하여 이 검정에서 평가하고, 2 도너로부터의 대표적인 데이터가 도시되어 있다(도 3).

[0488] 활성 범위가 세포 집단에서 도너 의존 차이로 인한 것으로 발견되었지만, 일반적으로, XPA.42.681 및 BM-1 비교자 항체는 Treg 세포 집단을 억제하고, XPA.42.068 및 XPA.42.089 항체는 이 검정에서 부분 활성을 제공하였다.

[0489] **실시예 10. EMT 검정에서 TGF β 항체 활성의 측정**

[0490] 상피의 중간엽으로의 전이(epithelial to mesenchymal transition: EMT)는 암 침윤 및 전이를 촉진하는 종양 세포의 재개가 가능하게 하였다. EMT 유도는 TGF β 1, TGF β 2 및 TGF β 3을 포함하는 사이토키네에 의해 발생되고, 모든 3종의 아이소폼은 조직 유형에 따라 EMT에 순차적으로 관련될 수 있다(Boyer et al., Dev. Biol. 208:530-545, 1999; Bhowmick et al., Mol. Biol. Cell 12:27-36, 2001; Camenisch et al., Dev. Biol. 248:170-181, 2002). 항체가 실험실내 이 과정을 억제하는지를 결정하기 위해, 문헌[Mani et al. (Cell 133:704-715; 2008)]과 유사하게 초대 인간 유방 상피 세포(HMEC)를 사용하여 EMT 검정을 개발하였다.

[0491] 인간 유방 상피 세포(스위스 바셀에 소재하는 론자(Lonza))를 제조업자가 추천한 바대로 MEGM 완전 배지(론자) 중에 성장시켰다. 계대배양을 위해, 세포를 트립신 분해하고, 시딩 전에 트립신 중화 용액(론자)으로 처리하였다. HMEC 세포를 8웰 챔버 슬라이스 내에서 3500 세포/cm²에서 시딩하고, 2.5ng/ml에서 TGF β 와 함께 또는 이것 없이 처리하고, 항체와 함께 또는 이것 없이 30분 동안 예비항온처리하였다. 세포를 37℃에서 8일 동안 항온처리하고, 새로운 배지 + 시약을 4일 후 첨가하였다. 8일에, 세포를 고정하고 4% 파라포름알데하이드와 실온에서 15분 동안 고정하였다. 세포를 PBS 중에 2회 세정하고, PBS + 0.25% 트라이톤 X-100 중에 10분 동안 투과화시킨 후, PBS-트윈 + 10% 염소 혈청로 30분 동안 차단하였다. 각각 항-인간 비멘틴(미국 마이애미주 덴버스에 소재하는 셀 시그널링 테크놀로지)을 사용하여 중간엽 마커에 대해 및 1:200 또는 1:500 희석 항-인간 E-카드헤린(셀 시그널링 테크놀로지)을 사용하여 상피 마커에 대해 세포를 4℃에서 밤새 염색하였다. 세포를 PBS 중에 3회 세척하고, 실온에서 1시간 동안 차단 용액 중에 희석되고 광으로부터 보호된, 적절한 제2 항체 알렉사 플루오르 488 염소 항-래빗 또는 알렉사 플루오르 568 염소 항-래빗(미국 캘리포니아주 칼스바드에 소재하는 인비트로젠(Invitrogen))과 항온처리하였다. 슬라이스를 세척하고, 형광 현미경관찰 전에 골드 안티-페이드(Gold Anti-Fade)/DAPI와 탑재하였다.

[0492] 항-KLH 대조군 항체의 존재 하의 TGF β 에 대한 HMEC 세포의 노출은, TGF β 매개 성장 정지 및 중간엽 표현형으로의 분화와 일치하는, 비멘틴 염색 증가 및 전체 세포 밀도 감소를 발생시켰다. TGF β 1 매개 EMT의 중화는 XPA.42.681, XPA.42.068 및 XPA.42.089 항체에 대한 세포 밀도 증가와 상관되는 비멘틴 염색 감소에 기초하여 명확하고, 항-KLH 대조군과 동일한 정도로는 아니지만(데이터 비도시) 비멘틴 염색이 존재하면서 BM-1 비교자에 중간 반응이 관찰되었다. 추가로, 각각의 항체는 TGF β 2에 의해 구동된 EMT를 억제하지만, BM-1 비교자 항체는 비멘틴 신호 강도, E-카드헤린 염색 및 세포 밀도 증가에 기초하여 덜 강력한 것으로 보인다. TGF β 3 매개 EMT의 중화의 경우, XPA.42.681 항체가 가장 강력하고, 이어서 BM-1 및 XPA.42.068이며, XPA.42.089는 항-KLH 대조군과 다른 것으로 보이지 않았다.

[0493] **실시예 11. 이중이식 마우스 모델에서 TGF β 항체에 의한 종양 억제**

[0495] *인간 인두암 세포주인 디트로이트 562로부터 유래한 이중이식 모델에서 종양 성장을 억제하는 이의 능력에 대해 항체 XPA.42.068 및 XPA.42.089를 평가하였다(Van Aarsen et al., Cancer Res. 68:561-70; 2008). 8주령 내지 9주령 Nu/Nu 마우스(찰스 리버 레보러토리즈(Charles River Laboratories))를 좌측 하복부 부위로 동물마다 비디 매트릭셀(BD MATRIGEL)(상표명)(1:1, 200 μ l) 중에 5x10⁶ 디트로이트 562 세포로 피하에 이식하였다. 동물을 각각 12마리의 마우스의 시험군로 무작위하였다: 항-KLH 인간 IgG2 아이소타입 대조군(10mg/kg), XPA.42.068(1, 3 또는 10mg/kg 용량), XPA.42.089(1, 3 또는 10mg/kg 용량), BM-1 비교자(3mg/kg) 또는 마우스 아이소타입 대조군 IgG1(3mg/kg). 2주마다 투약 및 종양 용적을 측정하였다(도 4). 항체 치료의 7 용량 후 마지막 용량 후(28일) 동물을 희생시켰다. 모든 측정을 위해, 일측 스튜던츠 t-시험에 의해 통계 유의성을 결정하였다.

[0496] 도 4에 도시된 바대로, XPA.42.089로 처리된 종양은 항-KLH 인간 IgG2 대조군과 비교할 때 더 높은 용량 수준의 유의차로 XPA.42.068로 처리된 종양보다 작은 경향이 있다. 종양 성장 억제율(%) (TGI)을 28일에 모든 시험군에서 IgG 대조군 항체와 비교하였다. XPA.42.068(3 및 10mg/kg), XPA.42.089(3 및 10mg/kg) 및 또한 BM-1 비교자

(3mg/kg) 치료군으로부터의 종양은 28일에 1mg/kg 치료군(P 값<0.05)보다 상당히 작았다. 추가로, 10mg/kg에서의 XPA.42.068 및 3 및 10mg/kg에서의 XPA.42.089는 터키 아노바 시험을 사용하여 IgG 대조군과 비교하여 유의차를 나타냈다(표 8).

표 8

이종이식 종양 모델에서의 종양 성장 억제

군	28일		
	TGI(%)	터키 다중 비교 아노바 p 값 P<0.05?	t-시험 일측 p 값
마우스 IgG1에 대한 3mg/kg BM-1	70.1	아니오	0.0089
항-KLH IgG2에 대한 1mg/kg XPA.42.068	21.3	아니오	0.3037
항-KLH IgG2에 대한 3mg/kg XPA.42.068	63.3	아니오	0.0339
항-KLH IgG2에 대한 10mg/kg XPA.42.068	99.8	예	0.0014
항-KLH IgG2에 대한 1mg/kg XPA.42.089	51.4	아니오	0.0948
항-KLH IgG2에 대한 3mg/kg XPA.42.089	87.3	예	0.0045
항-KLH IgG2에 대한 10mg/kg XPA.42.089	93.4	예	0.0024

항체 XPA.42.068, XPA.42.089 및 XPA.42.681을 사용하여 디트로이트 562 이종이식 모델에서의 추가의 평가를 수행하였다. 8주령 내지 9주령 Nu/Nu 마우스(찰스 리버 래보러토리즈)를 좌측 하복부 부위로 동물마다 비디 마트리젤(상표명)(1:1, 200 μ l) 중에 5x10⁶ 디트로이트 562 세포로 피하에 이식하였다. 동물을 각각 12마리의 마우스의 시험군으로 무작위하였다: 항-KLH 인간 IgG2 아이소타입 대조군(3mg/kg), XPA.42.068(1 또는 3mg/kg 용량), XPA.42.089(1 또는 3mg/kg 용량), XPA.42.681(1 또는 3mg/kg 용량), BM-1 비교자(1 또는 3mg/kg 용량). 2주마다 투약 및 종양 용적을 측정하였다(도 5). 항체 치료의 7 용량 후 마지막 용량 후(30일) 동물을 희생시켰다. 모든 측정을 위해, 일측 스튜던츠 t-시험에 의해 통계 유의성을 결정하였다.

도 5 및 표 9에 도시된 바대로, 3mg/kg에서 XPA.42.681, XPA.42.089 및 BM-1 비교자로 치료된 종양은 30일에 대조군 항체와 비교하여 TGI(%) 및 평균 종양 용적의 유의차를 나타냈다. 이들 군 사이의 비교는 터키 아노바 시험을 사용하여 유의차를 나타내지 않았다.

표 9

이종이식 종양 모델에서 종양 성장 억제

(항-KLH IgG2에 대한) 군	30일		
	TGI(%)	터키 다중 비교 아노바 p 값 p<0.05?	t-시험 일측 p 값
XPA.42.068(1mg/kg)	15.9	아니오	0.3434
XPA.42.068(3mg/kg)	42.7	아니오	0.1046
XPA.42.681(1mg/kg)	30.4	아니오	0.2183
XPA.42.681(3mg/kg)	78.7	아니오	0.0119
BM-1(1mg/kg)	20.7	아니오	0.3010
BM-1(3mg/kg)	79.3	아니오	0.0096
XPA.42.089(1mg/kg)	18.5	아니오	0.3030
XPA.42.089(3mg/kg)	81.8	아니오	0.0094

실시예 12. 동계 마우스 모델에서 TGF β 항체에 의한 종양 억제

문헌[Nam et al. (Cancer Res. 68:3915-23; 2008)]로부터 채택된 프로토콜을 이용하여 4T1 유방암 세포를 사용하여 동계 모델에서 종양 성장을 억제하는 이의 능력에 대해 항체 XPA.42.068 및 XPA.42.089를 또한 평가하였다. 8주령 Balb/c 암컷 마우스를 0일에 제4 유방 지방층에서 250,000 4T1 세포로 피하에 이식하였다. 동물을 각각 12마리의 마우스의 시험군으로 무작위하고, 항-KLH 인간 IgG2 아이소타입 대조군, XPA.42.068, XPA.42.089, BM-1 비교자 또는 마우스 아이소타입 대조군 IgG1과 함께 10mg/kg의 단일 용량 수준에서 (-1일에 시작하여) 주마다 3회 항체를 투여하였다. 실험 동안 2주마다 종양 용적을 측정하고, 데이터가 도 6에 도시되어 있다. 연구 종료 종양 용적 데이터는 XPA.42.068 및 XPA.42.089 둘 다 KLH 대조군 항체와 비교하여 종양 성장을

상당히 억제한다는 것을 나타낸다.

[0503] 추가로, 최종 연구일(23일)에 동물을 희생시키고, 종양을 제거하여 종양 중량을 결정하였다. 각각의 XPA.42.089, XPA.42.068 및 BM-1 항체는 인간 또는 마우스 대조군 항체에 비해 종양 덩어리를 상당히 감소시켰다(도 7).

[0504] 항체 XPA.42.068, XPA.42.089 및 XPA.42.681을 사용하여 4T1 동계 모델에서 추가의 평가를 수행하였다. 8주령 Balb/c 마우스를 0일에 제4 유방 지방층에서 250,000 4T1 세포로 피하에 이식하였다. 동물을 각각 12마리의 마우스의 시험군로 무작위하고, 항-KLH 인간 IgG2 아이소타입 대조군, XPA.42.068, XPA.42.089, XPA.42.681, BM-1 또는 마우스 아이소타입 대조군 IgG1과 함께 10mg/kg의 단일 용량 수준에서 (-1일에 시작하여) 주마다 3회 항체를 투여하였다. 실험 동안 2주마다 종양 용적을 측정하고, 데이터가 도 8에 도시되어 있다. 연구 종료 종양 용적 데이터는 각각의 항체 XPA.42.068, XPA.42.089, XPA.42.681 및 BM-1이 인간 또는 마우스 대조군 항체와 비교하여 종양 성장을 상당히 억제하였다는 것을 나타낸다.

[0505] 추가로, 최종 연구일(21일)에 동물을 희생시키고, 종양을 제거하여 종양 중량을 결정하였다. 각각의 XPA.42.089, XPA.42.068, XPA.42.681 및 BM-1 항체는 인간 또는 마우스 대조군 항체에 비해 종양 덩어리를 상당히 감소시켰다(도 9).

[0506] **실시예 13. 마우스 종양 모델에서 NK 세포에 대한 TGF β 항체의 생체내 효과**

[0507] TGF β 항체가 종양에 존재하는 자연 살해(NK) 세포에 대한 생체내 면역 조절 효과를 나타내는지를 평가하기 위해, 상기 4T1 동계 모델 실험에서 마우스로부터 제거된 단리된 종양을 소화시켜 단일 세포 현탁액을 생성시켰다. 간단히 말하면, 새로 수확된 종양을 저미고 HBSS 중의 2.5mg/ml 콜라게나제 II 및 2.5mg/ml 콜라게나제 IV 중에 소화시켰다(37℃에서 15분). 세포를 계수하고 PBS, 0.5% BSA, 0.1% NaN₃ 및 10 μ g/ml의 2.4G2 항-마우스 Fc 차단 항체(미국 캘리포니아주 샌디에고에 소재하는 이바리오사이언스) 중에 2e6/ml에서 재현탁시키고 4℃에서 15분 동안 항온처리하였다. 0.5% BSA로 PBS 중에 세척한 후, 세포를 유세포분석법에 의한 면역형광성 염색을 위해 접합된 항-CD335(항-NKp46) 항체(미국 캘리포니아주 샌디에고에 소재하는 바이오레전드)와 4℃에서 30분 동안 염색하였다. NKp46으로도 공지된 CD335는 CD3-CD56+ NK 세포에서 배타적으로 발현되는 세포 표면 마커이고, NK 세포에 대한 보편적 마커인 것으로 생각된다. 세포를 새로 제조된 2% 파라포름알데하이드에서 고정하고 비디 팩스칸토(상표명) 시스템에서 분석하였다. 보상을 위해 단일 색상 대조군을 또한 제조하였다. 도 10에 도시된 바대로, XPA.42.089 항체는 아이소타입 대조군 항체와 비교하여 마우스로부터 제거된 종양 내에 NK 세포 마커 NKp46(CD335)의 발현을 상당히 증가시켰다. BM-1, XPA.42.068 및 XPA.42.681 항체는 NKp46에서 유사한 증가를 나타내지 않았다.

[0508] **실시예 14. 마우스 종양 모델에서 MDSC에 대한 TGF β 항체의 생체내 효과**

[0509] TGF β 항체가 종양에 존재하는 골수성 유래 억제 세포(MDSC)(CD11b+/Gr1+)에 대한 생체내 면역 조절 효과를 나타내는지를 평가하기 위해, 4T1 동계 모델 실험에서 마우스로부터 제거된 단리된 종양을 상기 기재된 바대로 제조하고, 유세포분석법에 의한 면역형광성 염색을 위해 접합된 항-CD11b 및 항-Gr1 항체(미국 캘리포니아주 샌디에고에 소재하는 바이오레전드)와 4℃에서 30분 동안 염색하였다. α M 인테그린으로도 공지된 CD11b 및 Ly6G로도 공지된 골수성 계통 분화 항원 Gr1은 MDSC에서 공동 발현된 세포 표면 마커이다. 세포를 새로 제조된 2% 파라포름알데하이드에서 고정하고 비디 팩스칸토(상표명) 시스템에서 분석하였다. 보상을 위해 단일 색상 대조군을 또한 제조하였다. 도 11에 도시된 바대로, XPA.42.068, XPA.42.089 및 XPA.42.681 항체는 아이소타입 대조군 항체와 비교하여 마우스로부터 제거된 종양 내에 골수성 유래 억제 세포(MDSC, CD11b+/Gr1+)의 축적을 상당히 감소시켰다. BM-1 경쟁자 항체는 MDSC에서 유사한 감소를 나타내지 않았다.

[0510] **실시예 15. 마우스 종양 모델에서 수지상 세포에 대한 TGF β 항체의 생체내 효과**

[0511] TGF β 항체가 종양에 존재하는 수지상 세포(DC)에 대한 생체내 면역 조절 효과를 나타내는지를 평가하기 위해, 4T1 동계 모델 실험에서 마우스로부터 제거된 단리된 종양을 상기 기재된 바대로 제조하고, 유세포분석법에 의한 면역형광성 염색을 위해 접합된 항-CD11c 항체(미국 캘리포니아주 샌디에고에 소재하는 바이오레전드)와 4℃에서 30분 동안 염색하였다. α X 인테그린으로도 공지된 CD11c는 DC에서 발견되는 세포 표면 마커이다. 세포를 새로 제조된 2% 파라포름알데하이드에서 고정하고 비디 팩스칸토(상표명) 시스템에서 분석하였다. 보상을 위해 단일 색상 대조군을 또한 제조하였다. 도 12에 도시된 바대로, XPA.42.089 항체는 아이소타입 대조군 항체와 비교하여 마우스로부터 제거된 종양 내에 DC 마커 CD11c의 발현을 상당히 감소시켰다. BM-1, XPA.42.068 및 XPA.42.681 항체는 CD11c에서 유사한 감소를 나타내지 않았다.

[0512] **실시예 16. 마우스 종양 모델에서 조절 T 세포에 대한 TGF β 항체의 생체내 효과**

[0513] TGF β 항체가 종양에 존재하는 조절 T 세포(Treg)에 대한 생체내 면역 조절 효과를 나타내는지를 평가하기 위해, 4T1 동계 모델 실험에서 마우스로부터 제거된 단리된 종양을 상기 기재된 바대로 제조하고, 유세포분석법에 의한 면역형광성 염색을 위해 접합된 항-CD4, 항-CD25 및 항-FOXP3 항체(미국 캘리포니아주 샌디에고에 소재하는 바이오레전드)와 4℃에서 30분 동안 염색하였다. L3T4로도 공지된 CD4 및 저친화도 IL-2R α 로도 공지된 CD25 및 또한 포크헤드 박스(Forkhead box) 단백질 P3로도 공지된 FOXP3은 각각 Treg 세포에서 발견되는 세포 표면 마커이다. 세포를 새로 제조된 2% 파라포름알데하이드에서 고정하고 비디 팩스칸토(상표명) 시스템에서 분석하였다. 보상을 위해 단일 색상 대조군을 또한 제조하였다. 도 13에 도시된 바대로, XPA.42.068 항체는 아이소타입 대조군 항체와 비교하여 마우스로부터 제거된 종양 내에 Treg 세포의 축적을 상당히 감소시켰다. BM-1, XPA.42.089 및 XPA.42.681 항체는 T-reg 세포에서 유사한 감소를 나타내지 않았다.

[0514] **실시예 17. 마우스 종양 모델에서 세포독성 T 세포에 대한 TGF β 항체의 생체내 효과**

[0515] TGF β 항체가 종양에 존재하는 세포독성 T 림프구 세포(CTL)에 대한 생체내 면역 조절 효과를 나타내는지를 평가하기 위해, 4T1 동계 모델 실험에서 마우스로부터 제거된 단리된 종양을 상기 기재된 바대로 제조하고, 유세포분석법에 의한 면역형광성 염색을 위해 접합된 항-CD8 항체(미국 캘리포니아주 샌디에고에 소재하는 바이오레전드)와 4℃에서 30분 동안 염색하였다. CD8은 CTL에서 발견되는 세포 표면 마커이다. 세포를 새로 제조된 2% 파라포름알데하이드에서 고정하고 비디 팩스칸토(상표명) 시스템에서 분석하였다. 보상을 위해 단일 색상 대조군을 또한 제조하였다. 도 14에 도시된 바대로, XPA.42.068 항체는 아이소타입 대조군 항체와 비교하여 마우스로부터 제거된 종양 내에 CTL의 수준을 상당히 증가시켰다. BM-1, XPA.42.089 및 XPA.42.681 항체는 CTL에서 유사한 증가를 나타내지 않았다.

[0516] 상기 결과는 본 명세서에 개시된 항-TGF β 항체가 종양 용적 크기를 감소시키는 능력을 갖고 종양에 침윤하는 면역 세포를 조절하고 생체내 종양 성장에 기여한다는 것을 나타낸다. 이는 본 명세서에 기재된 항-TGF β 항체가 암, 특히 상기 실시예에서 임의의 하나 이상의 면역 세포가 종양 세포에 침윤하는 암의 치료에서 치료학적 이익을 제공한다는 것을 제시하였다.

[0517] **실시예 18. NK 세포 세포용해 활성의 개선**

[0518] NK 세포 세포용해 활성을 개선하는 항-TGF β 항체의 능력을 평가하기 위한, NK 세포와 생체내 종양 세포 사이의 만성 상호작용을 모방하는 자연 살해(NK) 세포 공배양물 시스템을 개발하였다. 4T1인 TGF β 생성 마우스 유방암종 세포주를 사용하였다. NK 세포를 정상 Balb/c 마우스의 비장으로부터 정제하고, 6웰 플레이트에서 IL-2(500IU/ml)의 존재 하에 48시간 동안 CFSE 라벨링된 4T1 종양 세포와 공배양하였다. 항-TGF β 및 대조군 항체를 공배양물 시스템에 첨가하고, NK 세포를 48시간 후에 수확하였다. 세포내 염색에 의해 공배양 직후 NK 세포의 IFN γ 생성을 측정하였다. NK 세포를 CFSE 음성 세포로서 분류하고, 이의 세포용해 활성을 Yac-1 종양 세포주에 대해 표준 사멸 검정에 의해 분석하였다. NK 세포를 96웰 환저 플레이트에서 20:1의 이펙터:표적(E:T) 비로 4시간 동안 CFSE 라벨링된 Yac-1 세포와 공배양하였다. 세포사를 마킹하기 위해 프로피듐 요오다이드(PI) 염색을 이용하였다.

[0519] NK 세포는 항-KLH 치료군과 비교하여 항체 치료군 중에서 증가한, 그러나 상당한 증가가 아닌 IFN γ 생성을 나타낸다. 사멸 검정에서, 20:1의 이펙터:표적 비에서, BM-1 항체 및 XPA.42.089 및 XPA.42.681 항체 둘 다 NK 세포 세포용해 활성을 상당히 개선하였다(도 15). 더욱이, XPA.42.089 및 XPA.42.681 항체 둘 다 벤치마크 비교자보다 수준 상당히 높은(P<0.0001) 97.8% 및 96.7%로 표적 종양 세포를 사멸하는 NK 세포의 능력을 증가시켰다. 이 결과는 본 개시내용의 TGF β 중화 항체가 실험실내 TGF β 생성 종양 세포와의 만성 상호작용에 의해 감소되는 NK 세포 세포용해 활성을 상당히 개선한다는 것을 나타낸다.

[0520] **실시예 19. CD8+ 수지상 세포의 관용 기능의 억제**

[0521] CD8+ 수지상 세포(DC)에 대한 TGF- β 의 관용 기능을 억제하는 항-TGF β 항체의 능력을 평가하기 위해 혼합 림프구 반응(MLR)에 기초한 실험실내 시스템을 개발하였다. MLR은 시스템에 외부 항원을 첨가함이 없이 DC 항원 제시를 시험하기 위해 사용되는 전통적인 실험이다. 정상 Balb/c 마우스로부터의 비장을 작은 단편으로 절단하고, 진탕 항온처리기 내에서 37℃에서 1시간 동안 10% RPMI 및 1mg/ml 콜라게나제 IV형 중에 항온처리하였다. EDTA를 추가로 5분 동안 첨가한 후, 용액을 나일론 메쉬를 통해 여과시켰다. CD11c+ DC를 바이오티닐화 항-CD11c 항체로 염색하고, 줄기세포 기술로부터의 바이오틴 정제 키트르 사용하여 양성 선택하였다. CD11c+ DC를 CD8 항체로 염색하였다. CD8+ 및 CD8- 집단을 비드 팩스사리아(BD FACSARIA)(상표명) 세포 분류기에서 분류하였다. CD8+

DC를 항-TGF β 항체 또는 대조군 항체와 24시간 동안 배양하고, 1:10 비로 CD8⁺ DC로 혼합하였다. T 세포를 스템셀 테크놀로지로부터의 T 세포 음성 선택 키트를 사용하여 정상 B6 비장으로부터 정제하고, CFSE로 라벨링하였다. 이후, 혼합 DC를 96웰 환저 플레이트에서 B6 T 세포와 5일 동안 공배양하였다. T 세포 증식에 의해 CD8⁺ DC의 면역 억제 기능을 평가하였다. CD8⁺ DC가 항원을 제시하는 CD8⁺ DC의 능력을 억제하는 경우, B6 T 세포가 덜 증식하였다. 항-TGF β 항체가 자가분지 TGF β 를 차단하고, CD8⁺ DC 관용 기능을 감소시키는 경우, B6 T 세포가 더 증식하였다.

[0522] 도 16에 도시된 바대로, 항-KLH 대조군과 비교하여 BM-1 치료군에 대해 T 세포 증식에서 작은 변화가 관찰되었다. 반대로, XPA.42.089 및 XPA.42.681 항체 둘 다 항-KLH 치료군과 비교하여 T 세포 증식을 상당히 증가시키고, T 세포 증식에 대한 XPA.42.681의 효과는 벤치마크 항체 BM-1과 비교하여 상당하였다. 이 데이터는, TGF- β 를 차단함으로써, 면역원성 DC에 대한 CD8⁺ DC의 관용 효과가 감소될 수 있고, 면역원성 DC에 의해 증대된 항원 제시를 제공할 수 있다는 것을 나타낸다.

[0523] **실시예 20. CTL 기능 증대**

[0524] 종양 조건 하에 CTL의 활성화를 모방하고 항-TGF β 항체에 의해 CTL 기능이 증대되는지를 결정하기 위해 실험실 내 시스템을 개발하였다. 퍼포린 및 그랜자임 B(GzmB) 염색에 의한 CD25 발현 및 기능에 의해 CTL 활성화를 평가하였다(Massague et al. Cancer Cell 8: 369-380, 2005). T 세포 음성 선택(줄기세포 기술)에 의해 정상 Balb/c 비장으로부터 T 세포를 정제하였다. MAC 비드를 미국 캘리포니아주 오번에 소재하는 밀테니 바이오테크(Miltenyi Biotec)에 의해 T 세포 활성화/확장 키트로 항-CD3 및 항-CD28 항체로 코팅하였다. T 세포 및 항-CD3 및 항-CD28 코팅 MAC 비드를 96웰 환저 플레이트에서 20 μ l의 4T1 배양물 상청액의 존재 하에 2X10⁶/ml의 농도에서 48시간 동안 1:1 비로 항-TGF β 항체 및 대조군 항체와 공배양하였다. CTL 활성화를 세포 표면에서 CD25 발현으로 평가하고, FoxP3 염색 프로토콜을 이용하여 세포내 염색으로 결정되는 바대로, GzmB(도 17A) 및 퍼포린(도 17B)의 발현으로 기능을 평가하였다.

[0525] 공개 데이터와 일치하게, 항체 치료군과 대조군 사이에 CD25 발현 변화가 관찰되지 않았다. BM-1 치료 CTL은 GzmB 및 퍼포린 발현 둘 다의 최소 변화를 나타낸다. 그러나, XPA.42.089 및 XPA.42.681 항체 둘 다 대조군 항-KLH 치료와 비교하여 CTL에서 GzmB 발현을 상당히 증가시켰다(P<0.001). 더욱이, XPA.42.089 치료 CTL에서의 GzmB 발현 증가는 비교자 BM-1보다 상당히 컸다(P<0.05). 퍼포린 발현을 위해, XPA.42.089 및 XPA.42.681 치료 CTL 둘 다 대조군 항-KLH 치료 CTL과 비교하여 퍼포린을 상당히 더 생성시켰다(P<0.05). 또한, XPA.42.681은 BM-1 비교자보다 상당히 더 CTL에서의 퍼포린 발현을 개선시켰다(P<0.05). 따라서, XPA.42.089 및 XPA.42.681 둘 다 이 실험실내 배양물 시스템에서 종양 세포로부터 분비된 TGF- β 에 의해 억제된 GzmB 및 퍼포린 둘 다의 발현을 회복시킬 수 있고, 따라서 종양 세포에 의해 생성된 TGF β 를 중화시킴으로써 CTL 기능을 부스팅하는 메커니즘을 제공할 수 있다.

[0526] **실시예 21. MDSC 및 Treg 기능의 억제**

[0527] 조절 T 세포(Treg)의 팽창 및 기능에 대한 골수성 유래 억제 세포(MDSC)의 효과 및 MDSC 및 Treg 활성을 억제하는 본 개시내용의 항-TGF β 항체의 능력을 평가하기 위해 실험실내 공배양물 시스템을 개발하였다.

[0528] MDSC는 종양에 대한 면역 반응을 억제하고, 종양 침윤 및 전이를 촉진하고, Treg(면역 반응을 하향조절하는 것으로 공지됨)의 팽창 및 기능을 촉진하는 것으로 공지되어 있다. 암컷 BALB/c 마우스를 50 μ l 1X PBS 중에 7 X 10³ 4T1 종양 세포와 복부 유선에서 접종하였다. 비장을 21일에 수확하고, 바이오틴 라벨링된 CD11b 항체 및 바이오틴 양성 선택 키트(스템셀 테크놀로지스)를 통해 MDSC를 정제하였다. 동시에, 정상 BALB/c 비장을 수확하고, T 세포를 T 세포 음성 선택 키트(스템셀 테크놀로지스)을 통해 정제하였다. 세포를 항-CD4-FITC 및 항-CD25-PE로 염색하였다. 이중 양성 세포를 팩스사리아(상표명) 세포 분류기(비디 바이오사이언스)로 분류하였다. Treg 집단을 CFSE 라벨링하고, 항-TGF β 또는 대조군 항체의 존재 하에 5일 동안 1:1 비로 4T1 종양 주사 마우스로부터의 MDSC와 공배양하였다. CFSE 분할에 의해 Treg의 팽창을 측정하였다. Treg 기능에 대한 MDSC의 효과를 평가하기 위해, 4T1 주사된 Balb/c 마우스로부터 수확된 MDSC를 CFSE-라벨링하고, 항-TGF β 또는 대조군 항체의 존재 하에 Treg와 5일 동안 공배양하였다. 공배양물로부터 Treg를 CFSE 음성 집단으로서 분류하였다. 정상 BALB/c 마우스로부터의 T 세포를 CFSE 라벨링하고, 항-CD3 및 항-CD28 비드와 2X10⁶ 세포/ml에서 평판배양하였다. 분류된 Treg를 배양물 시스템에 첨가하였다. T 세포의 CFSE 분할의 수를 분석하여 Treg의 억제 기능을 측정하였다.

[0529] **실시예 22. 마우스 모델에서 TGF β 항체에 의한 섬유증의 억제**

- [0530] 섬유증의 동물 모델에서 섬유증(예를 들면, 폐 섬유증, 신장 섬유증)을 억제하는 이의 능력에 대해 본 개시내용의 항체를 또한 평가하였다.
- [0531] 신장 섬유증
- [0532] 항-TGF β 항체를 평가하기 위해 신장 섬유증 모델을 이용하였다(Ling et al., J. Am. Soc. Nephrol. 14:377-388; 2003). 비히클 대조군으로서의 사이클로스포린 A(CsA, 30mg/kg) 또는 올리브 오일을 저염 식이(LSD, 50-100ppm NaCl)로 6주령 내지 7주령 수컷 ICR 마우스에 4주 동안 매일 피하로 주사하여 신장 섬유증 질환을 개시하였다. 대조군 마우스를 정상 식이에서 유지시키고, CsA를 받지 않았다. 항-TGF β 항체 XPA.42.089 또는 IgG 대조군 항체를 CsA 치료를 시작하기 전 1일에 시작하여 복강내로 투약하였다(2.5mg/kg, TIW). 동물을 안락사시키고, 조직학 및 신장 기능 종점의 평가를 위해 혈청, 뇨 및 신장을 수집하였다.
- [0533] 표준 기법을 이용하여 포르말린 고정 및 파라핀 포매 신장 절편(5 μ m)을 헤마톡실린-에오신(H&E) 및 마손 트라이크롬으로 염색하여 병리조직학적 검사를 수행하였다. CsA 유도 병리조직학적 변화의 평가는, 신장 절편마다 이환 부위의 백분율을 계산하는 스코어링을 비롯하여, 임의의 또는 모든 관형 손상, 간질성 침윤, 소동맥의 비후화, 세뇨관간질성 팽창 및 섬유증에 기초한 코딩된 절편의 평가의 보통 승인된 반정량적 스코어링을 포함할 수 있다(Ling et al., Am. J. Physiol. 277:F383-F390, 1999). CsA 주사된 정상 대조군 및 XPA.42.089 항체 치료 마우스로부터의 시상상합 신장 절편을 마손의 트라이크롬 염색액으로 염색하였다. CsA에 의해 유도된 섬유증 발생이 대조군 동물에서가 아니라 CsA 주사된 마우스의 세뇨관간질에서 발견되었다. CsA 치료된 마우스에서 여러 세뇨관의 루멘 직경의 증가가 관찰되었다. XPA.42.089 항체에 의한 치료는 세뇨관간질에서 관찰된 CsA 유도 섬유증의 양을 감소시키고 세뇨관 직경을 감소시켰다.
- [0534] 신장 기능장애의 임의의 또는 모든 혈청 크레아티닌, 혈액 우레아 질소 및 뇨 바이오마커에 의해 신장 기능을 또한 평가할 수 있다.
- [0535] 혈청 혈액 우레아 질소(BUN)은 신장 기능장애의 표시자이다. 이 연구에서, 음식 공급 또는 LSD 공급 대조군 마우스와 비교하여 CsA에 노출된 마우스에서 BUN이 상당히 증가하였다(도 18). XPA.42.089에 의한 치료는 IgG 대조군 항체와 비교하여 혈청 BUN을 상당히 감소시켰다.
- [0536] 알부민뇨 또는 뇨에서의 알부민 축적 증가는 이환 신장에서 사구체 기능장애의 특징이다. 이 연구에서, 뇨 알부민이 음식 공급 또는 LSD 공급 대조군 마우스에 비해 CsA 마우스에서 거의 4배 증가하였다(도 19). XPA.42.089에 의한 치료는 IgG 대조군 항체 치료 마우스와 비교하여 알부민뇨를 상당히 개선시켰다.
- [0537] 신장에서의 ECM 침착 및 섬유증의 정도를 반영하는 뇨 IV형 콜라겐의 수치가 음식 공급 또는 LSD 공급 대조군 마우스에 비해 CsA 마우스에서 상당히 증가하였다(도 20). XPA.42.089에 의한 치료는 IgG 대조군 항체와 비교하여 뇨 IV형 콜라겐을 보통으로 감소시켰다.
- [0538] 섬유증에 관여하는 유전자의 발현을 결정하기 위해 신장 조직에서 정량적 RT-PCR을 수행하였다. 제조업자의 프로토콜에 따라 RNeasy 키트(미국 메릴랜드주 게르만타운에 소재하는 퀴아젠(Qiagen))를 사용하여 전체 RNA를 신장(피질 및 수질)으로부터 분리하였다. 랜덤 프라이머 및 멀티스크라이브(multISCRIBE)(상표명) RT(미국 캘리포니아주 칼스바드에 소재하는 어플라이드 바이오시스템즈(Applied Biosystems))를 사용하여 제1 가닥 cDNA를 합성하였다. 이후, 라이트사이클러(LIGHTCYCLER) 480 실시간 PCR 시스템(미국 인디애나주 인디애나폴리스에 소재하는 로슈 어플라이드 사이언스(Roche Applied Science))에서 SYBR 그린 믹스(Green mix)(로슈)를 사용하여 2 μ l cDNA에서 정량적 RT-PCR을 수행하였다. 값을 사이클로필린으로 정규화하고, 비교용 CT 방법을 이용하여 계산하였다. TGF- β 1은 III형 콜라겐을 비롯한 ECM 단백질의 침착 및 섬유아세포 분화의 강력한 유도물질이다. TGF- β 1 발현은 대조군 마우스와 비교하여 CsA 치료된 동물에서 거의 2배였다(도 21A). XPA.42.089에 의한 치료는 IgG 대조군 항체와 비교하여 신장에서 TGF- β 1의 발현 수준을 상당히 감소시켰다. 유사한 효과가 III형 콜라겐의 발현에 관찰되었고, 보통의 증가가 CsA 치료된 마우스에서 관찰되었다(도 21B). XPA.42.089에 의한 치료는 IgG 대조군 항체 치료 마우스와 비교하여 III형 콜라겐 발현 수준을 감소시켰다.
- [0539] 폐 섬유증
- [0540] 실질적으로 문헌[Wilson et al. (J. Exp. Med. 207:535-552; 2010)]에 기재된 바대로 폐 섬유증 모델을 사용할 수 있다. C57BL/6 마우스를 안락사시키고, -1일, 3일 및 5일에 항체(예를 들면, 군마다 n=10, 500 μ g)와 함께 또는 이것 없이 식염수 중의 0.15U 블레오마이신 설페이트(미국 캘리포니아주 라즐라에 소재하는 칼바이오클(Calbiochem))로 기관내로 주입하였다. 폐 조직학, 폐 콜라겐 함량(예를 들면, 콜라겐 침착) 및 염증성 침윤의

분석을 위해 7일에 동물을 희생시켰다. 폐 조직학을 위해, 파라핀 포매 폐 조직의 5 μ m 절편을 마손의 트라이크롬으로 염색하였다. 시르콜(Sircol) 검정을 이용하여 폐에서의 기관지 폐포 세척액(BAL) 콜라겐 및 콜라겐 침착으로 측정된 폐 손상을 정량화하였다. 유세포분석법에 의해 BAL 중에 염증성 침윤을 측정하였다.

[0541] 실시예 23. TGF β 매개 안과학적 장애의 치료

[0542] 예를 들면, 눈에서의 섬유증 질환(예를 들면, 섬유증식성 상태와 관련된 질환)을 포함하는 다수의 안과학적(즉, 눈) 질환 및 병증의 치료를 위해 본 개시내용의 항-TGF- β 항체를 사용할 수 있다.

[0543] 망막 색소 상피 세포에서의 TGF β 1의 중화

[0544] 상피 표현형의 유지는 조직 항상성에 중요하다. 망막에서, 망막 색소 상피(RPE)의 탈분화는 망막 기능장애 및 섬유증을 발생시키고, TGF β 는 다수의 메커니즘에 의한 망막 탈분화에 기여하고, 이들 중 일부는 SMAD2 경로의 활성화에 따라 달라진다. pSMAD2 검정을 이용하여 RPE 세포에서 TGF β 반응의 활성화에 대응하는 이의 능력에 대해 본 개시내용의 항체를 평가하였다.

[0545] 망막 색소 상피 세포 성장 배지(론자 00195409호) 중에 망막 색소 상피(RPE) 세포(론자 194987호)를 유지시켰다. 세포를 트립신과 탈착시키고, 트립신을 중화시키고(트립신 중화 용액, 론자 CC-5002호), 세포를 펠렛화하고, 1e6세포/ml에서 재현탁시키고 6웰 디시로 100,000 내지 200,000개의 세포/웰로 평판배양하였다. 다음날, 세포를 세척하고, RPE Basal 배지(론자 00195406호)를 첨가하여 G0/G1기에서 세포를 정지시켰다. 다음날, 세포를 10 μ g/ml에서 항-TGF β 항체 XPA.42.068, XPA.42.089 및 XPA.42.681, 벤치마크 항체 BM-1 및 BM-2 또는 대조군 항-KLH-G2 항체와 함께 또는 이것 없이 5분 동안 예비항온처리된 10ng/ml TGF β 1(페프토테크 100-21호)로 처리하였다. 37 $^{\circ}$ C에서 30분 후, 세포를 새로 첨가된 1mM 페닐메틸설포닐 플루오라이드(PMSF)를 포함하는 세포 용해 완충제(미국 마이애미주 덴버스에 소재하는 셀 시그널링 테크놀로지) 중에 용해시켰다. 4 $^{\circ}$ C에서 5분 랙킹한 후, 세포를 긁어내고, 깊은 96웰 플레이트에 분배하여 얼음에서 20분 동안 용해시켰다. 용해물을 4 $^{\circ}$ C에서 5분 동안 3K로 스핀 다운하였다. 용해물을 희석하고, 포스포-SMAD2(셀 시그널링 7348호) 및 전체 SMAD2(셀 시그널링 7244호) 검출에 대해 제조업자의 추천에 따라 실행하였다.

[0546] 도 22에 도시된 바대로, TGF β 1 치료는 RPE 세포에서 pSMAD2의 둔감한 증가를 발생시키고, 이 세포는 각각의 항체 XPA.42.089, XPA.42.068 및 XPA.42.681 및 벤치마크 항체에 의해 상당히 중화되었다. 이 데이터는 XPA.42.089, 068 및 681이 RPE 세포에서 TGF β 매개 신호전달에 대응할 수 있다는 것을 제시하고, 항체가 망막 기능장애의 치료에 유용할 수 있다는 것을 나타낸다.

[0547] 증식성 유리체망막병증

[0548] 증식성 유리체망막병증(PVR)은 망막 박리 수술의 실패의 가장 흔한 원인이다. PVR은 망막 위와 밑의 유리체 내에 섬유혈관막의 형성을 특징으로 하고, 후속하여 망막 박리를 발생시킨다. PVR의 진행에 기여하는 다양한 인자 및 TGF β 가 중추적 역할을 하는 것으로 생각된다. TGF β 는 PVR 환자의 유리체에서 풍부하고, 상피의 중간엽으로의 전이(EMT) 유도, 세포의 기질 생성 자극, 세포막 수축 및 염증 유도와 같은 TGF β 의 특징적인 기능은 PVR의 진행에서 모든 음성 인자이다.

[0549] 본 개시내용의 항체의 효과를 평가하기 위해, 래빗 모델에서 실험적 PVR을 유도하였다(Oshima et al., 2002, Gene Ther. 9:1214-1220; Fastenberg et al., Gene Ther. 2002, 9:1214-1220). 성인 유색 래빗을 아이소플루란 또는 케타민 및 자일라아진의 근육내 주사로 마취시켰다. 10% 페닐에프린 하이드로클로라이드, 1% 트로피카마이드 및 1% 아트로핀 설페이트 한방울로 동공을 확장시켰다. 각각의 래빗의 한쪽 눈에 유리체를 통해 초자체강 내의 0.1ml BSS 용액 중의 5.0X10e5 래빗 결막 섬유아세포 세포를 주사하였다. 유리체 절제술은 PVR 모델을 유도하였다. 직후, BSS, 항-TGF β 항체(예를 들면, XPA.42.089, XPA.42.681, 5mg) 또는 대조군 항체(예를 들면, 항-KLH-G2)의 단일 유리체내 주사를 10마리의 동물군에 투여하고 임의로 주마다 반복하였다. 모든 주사된 눈을 1일, 3일, 5일, 7일, 10일, 14일 및 28일에 검안경으로 검사하고, PVR을 문헌[Fastenberg et al., Am. J. Ophthalmol. 93:565-572, 1982]에 기재된 임상 기준을 이용하여 6병기로 분류하였다.

[0550] 각막에 대한 알칼리 화상

[0551] 각막에 대한 알칼리 화상 형태의 안과 외상은 심각한 임상 문제점이고, 심각하고 영구적인 시각 손상을 야기하였다. 각막 세포, 즉, 각막세포 및 상피 세포의 활성화 및 염증성 세포, 예컨대 단핵구/마크로파지의 유입이 각막에서 알칼리 조직 손상 후 손상의 발병에 관여하고, 영구적인 상피 결함을 야기할 수 있다. 더욱이, 이 세포에 의해 분비된 매트릭스 금속단백분해효소(MMP, 젤라티나제)에 의한 기저막 파괴는 간질의 병원성 재양 및 천

공에 기여한다. 각막 간질의 혼탁 및 혈관신생과 함께 윤부 줄기 세포의 손상에 대한 각막 표면의 결막화(conjunctivalization)는 모두 차후 치유 단계에서 환자의 시각을 손상시켰다. 다수의 성장 인자 및 TGF- β 를 포함하는 사이토킨은 알칼리 화상 후 각막에서 발생하는 조직 파괴 및 차후 반흔에 관여하는 것으로 생각된다.

[0552] 본 개시내용의 항체의 효과를 평가하기 위해, 마우스 알칼리 화상 모델을 사용하였다(Saika et al., Am. J. Pathol. 2005, 166:1405-18). 간단히 말하면, 3 μ l의 1N 수산화나트륨 용액을 성인 C57BL/6 마우스(n = 72)의 오른쪽 눈에 적용하여 전신 및 국소 마취 둘 다 하에 안과 표면 알칼리 화상을 생성시켰다. 항-TGF- β 항체(예를 들면, XPA.42.089, XPA.42.681) 또는 대조군 항체(예를 들면, 항-KLH-G2)를 알칼리 노출 후 2시간 및 5일, 10일 및 15일에 투여하였다(n = 24/군). 각막의 플루오레세인 염색을 이용하여 표면 결함(예를 들면, 손상된 상피)을 가시화하였다. 각막 플루오레세인 검사 후, 브로모데옥시우리딘으로 라벨링한 2시간 후 안구를 적출하고 3일, 5일, 10일 및 20일에 파라핀 또는 동결절편 중의 조직학적 검사를 위해 처리하였다.

[0553] 수정체 섬유증

[0554] 손상 후, 수정체 상피 세포는 손상된 수정체에서 섬유증 조직의 형성에 기여하는 EMT를 경험하였다. 수정체 적출 및 인공 안내 렌즈 삽입 후 인간 수정체낭에서 유사한 현상이 발견된다. 이러한 EMT 관련 섬유증 반응은 남은 전방 수정체낭의 혼탁 및 수축 및 후방 수정체의 혼탁을 야기할 수 있으므로, 이것은 임상적으로 바람직하지 않다. 눈 수양액은 풍부한 TGF- β 를 포함하고, 수정체 상피 세포에서 손상 관련 EMT에서 TGF- β 에 역할이 제시되었다.

[0555] 본 개시내용의 항체의 효과를 평가하기 위해, 마우스 모델에서 실험적 각막 섬유증을 유도하였다(Saika, et al., Am J Pathol. 2004, 164:651-663). 성인 마우스(4주령 내지 6주령)를 펜토바비탈 나트륨(70mg/kg)의 복강내 주사로 마취시켰다. 산동약 및 마취제로서의 옥시부프로카인 점안액의 국소 적용 후 오른쪽 눈에서 각막 절개를 통해 26게이지 피하 주사의 날개부로 중앙 전방 수정체에 작게 절개하였다. 직후, 항-TGF β 항체(예를 들면, XPA.42.089, XPA.42.681) 또는 대조군 항체(예를 들면, 항-KLH-G2)(n = 24/군)를 연구 기간 동안 2주마다 눈에 투여하였다. 왼쪽 눈은 비손상된 대조군으로 제공되었다. 손상의 깊이는 약 300 μ m 또는 바늘의 날개부의 길이의 대략 4분의 1이어서, 수정체 파괴부 주위에 섬유증 조직을 형성시켰다. 오픈록사신 연고 주입 후, 동물을 6시간 내지 8주 동안 치유하였다. 증식 세포를 브로모데옥시우리딘의 복강내 주사로 라벨링한 후, 2시간 후 동물을 희생시키고, 분석을 위해 각각의 눈을 적출하였다.

[0556] 수술후 녹내장 수술

[0557] 녹내장 수술의 장기간 결과의 주요 결정인자는 상처 치유 반응이다. 과도한 결막 및 공막조공술 자리의 수준에서의 수술후 반흔은 빈약한 수술후 안압 관리와 관련된다. 이러한 수술에서 항증식제인 5-플루오루우라실(5-FU) 및 미토마이신 C(MMC)의 사용은 또한 세포사 및 아포토시스가 널리 퍼지게 하고, 각막 침식 및 낭포성 여과포를 야기할 수 있다.

[0558] 녹내장 수술과 관련된 이러한 조건에서 본 개시내용의 항체의 효과를 평가하기 위해, 래빗 모델을 이용하였다(Mead et al., Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2003, 44:3394-3401). 국소 마취(케타민 및 자일라진) 하에 뉴질랜드 화이트 래빗(12주령 및 14주령)의 왼쪽 눈에서 녹내장 여과 수술을 수행하였다. 부분 두께 8-0의 실크 각막 당김 봉합사를 12시에 위치시켜 상부 결막을 노출시켰다. 원개기저 결막 여과포를 올리고 연곽 뒤의 15mm의 거리로 결막하 공간의 둔적박리를 수행하였다. MVR 블레이드를 사용하여 연곽 뒤의 4mm로 시작하여 부분 두께 공막 터널을 만들고 블레이드가 전방 각막 간질에서 바로 보일 때까지 계속하였다. 이후, 캐놀라 바늘이 깨끗한 각막에서 보일 때까지, 22게이지/25mm 정맥내 캐놀라를 공막 터널을 통해 통과시켰다. 캐놀라 바늘이 전방 챔버에 들어가고, 캐놀라가 동공중간 부위로 다가가게 하고 바늘을 제거하였다. 마지막으로, 캐놀라를 손질하고 삽입점으로부터 1mm 돌출하도록 이의 공막 끝에서 경사지게 하고 10-0 나일론 봉합사를 사용하여 관을 공막 표면에 고정시켰다. 결막 절제부를 바늘에서 2개 차단 봉합사 및 중앙 메트리스형 10-0 나일론 봉합사로 봉합하여 방수로 봉합하였다. 아트로핀 설페이트 1% 및 베타메타손 인산나트륨 0.1%, 네오마이신 설페이트 0.5% 연고의 1 점안을 수술 종료시 주입하였다. 이후, 항-TGF β 항체(예를 들면, XPA.42.089, XPA.42.681) 또는 대조군 항체(예를 들면, 항-KLH-G2)(예를 들면, 5mg/ml; 16/군)의 수술후 결막하 주사(100 μ l)를 받도록 동물을 무작위로 배정하였다. 30게이지 바늘을 사용하여 국소 마취(프록시메타카인 하이드로클로라이드 0.5% 점안액, 눈마다 1점안) 하에 수술(0일) 후 2일, 3일, 4일, 7일, 9일, 11일 및 14일에 결막하 주사하였다. 위골은근의 비강 가장자리에서 연곽 뒤의 5mm에서 항체를 주사하였다. 수술 부위로부터 180°에 5-FU를 투여하였다.

[0559] 0.5% 프록시메타카인 HCl 점안액의 국소 주입 후 눈 휴대용 안압계로 양눈에서 안압을 측정하였다. 결막 외관

및 배수 부위를 관찰하였다. 수술 후 설정 시간에 차폐 관찰자가 모든 동물을 검사하였다. 양눈(대조군으로서 대측성 비치로 눈을 사용)을 0일 내지 4일 매일 평가하고, 이후 조절된 기간으로, 적어도 1주마다 2회 평가하였다. 길이, 폭 및 높이를 포함하는 여과포 특성을 캘리퍼로 측정하고 안압을 기록하였다. 결막 부위를 사분면으로 나눠 배수 여과포 혈관 특성을 등급화하고 외관을 점수매겼다(0, 무혈관; +1, 정상 혈관; +2, 충혈; 및 +3, 매우 비충혈). 전방 챔버 활성화(0, 평온; 1, 세포; 2, 피브린; 및 3, 전방 축농) 및 전방 챔버 폭 둘 다를 확인하기 위해 슬릿 램프(slit lamp) 검사를 수행하였고, 이를 깊음(+2), 얇음(+1) 또는 편평함(0)으로 기록하였다. 왼쪽 눈에 리그노카인 플루오레세인을 국소 주입한 후 각막 상피증을 기간 평가하고, 이환 각막 부위에 따라 등급화하였다(0, 무; 1, <5%; 2, <50%; 3, <75%; 4, <90%; 5, 100%까지). 1차 효율 중점으로서 여과포 생존을 취했다. 깊은 전방 챔버의 존재 하의 편평한 혈관화되고 반흔이 있는 여과포의 외관으로서 여과포 실패를 정의한다. 여과포 면적 및 높이, 전방 챔버 깊이 및 활성화, 및 사분면마다의 결막 혈관을 모두 분석하였다. 몇몇 동물로부터의 조직학적 검사(예를 들면, 결막하 콜라겐 침착)를 위해 조직을 또한 처리하였다.

[0560] 항-TGFβ 본 명세서에 개시된 항체가 눈에서 섬유증 발병 동안 TGFβ 활성을 억제하여 섬유증 침착을 감소시키고 눈의 섬유증과 관련된 증상을 개선하는 것으로 예상된다.

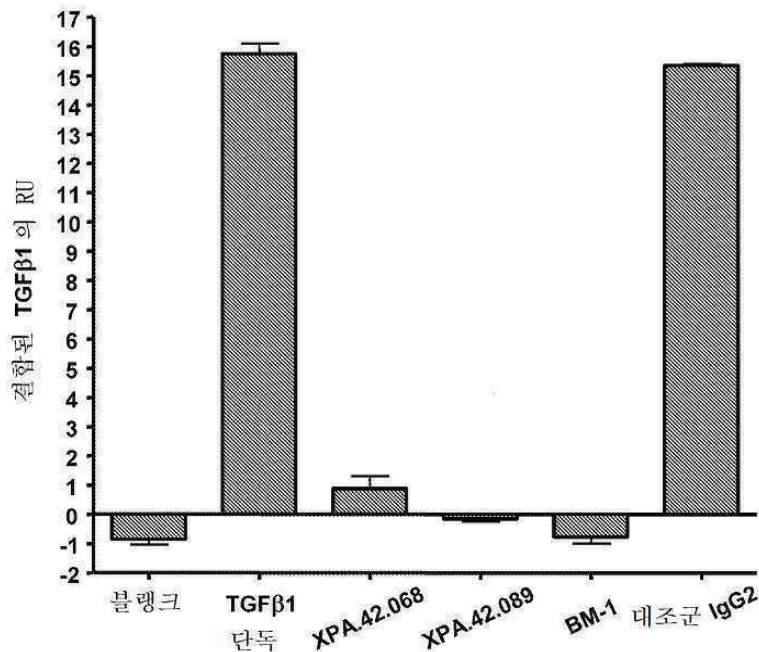
[0561] 상기 예시적인 실시예에서 본 개시내용에서의 다양한 변형 및 변경이 당해 분야의 당업자에게 일어나는 것으로 예상된다. 본 개시내용은 오직 특허청구범위에 보이는 바대로 제한된다.

부호의 설명

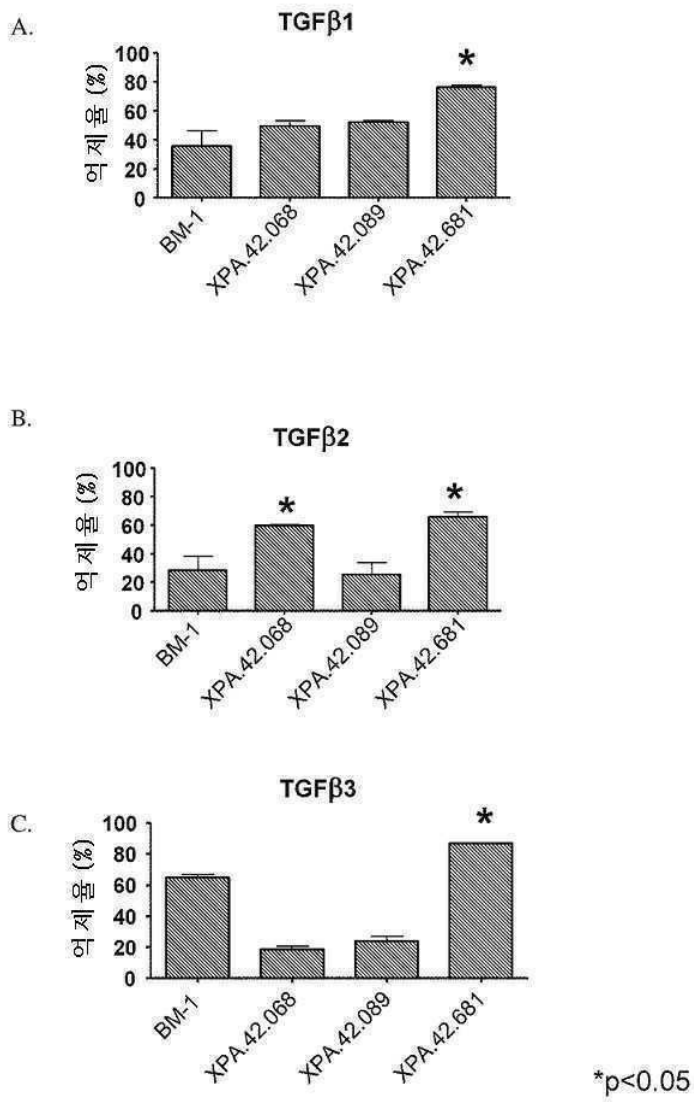
삭제

도면

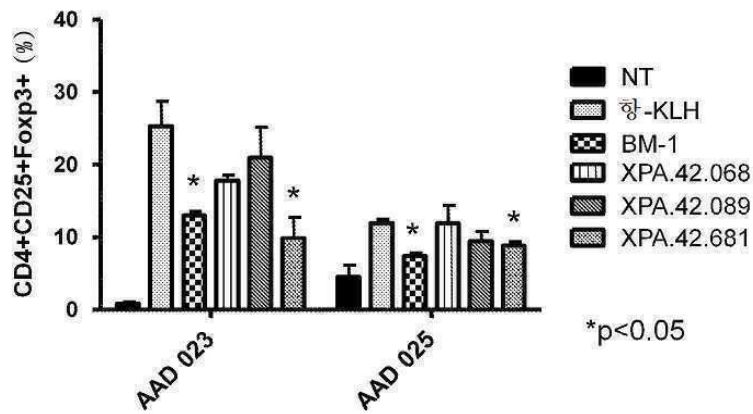
도면1



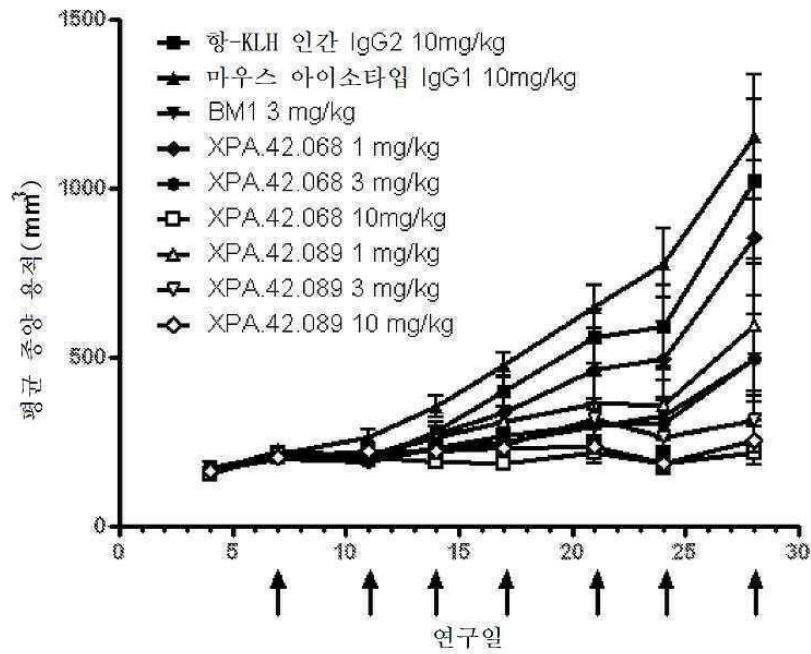
도면2



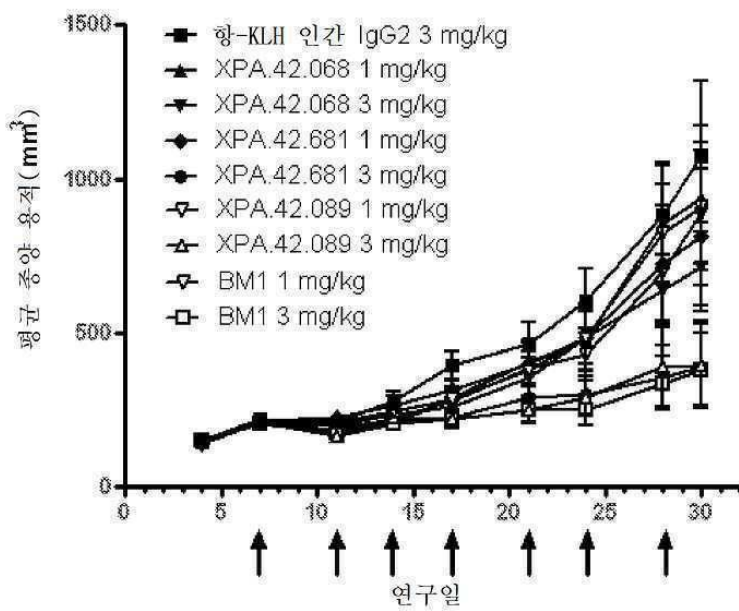
도면3



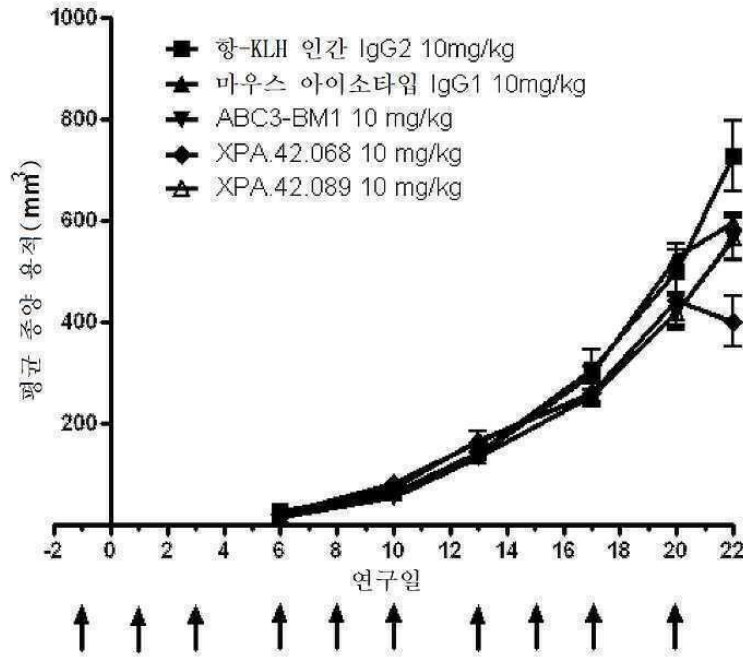
도면4



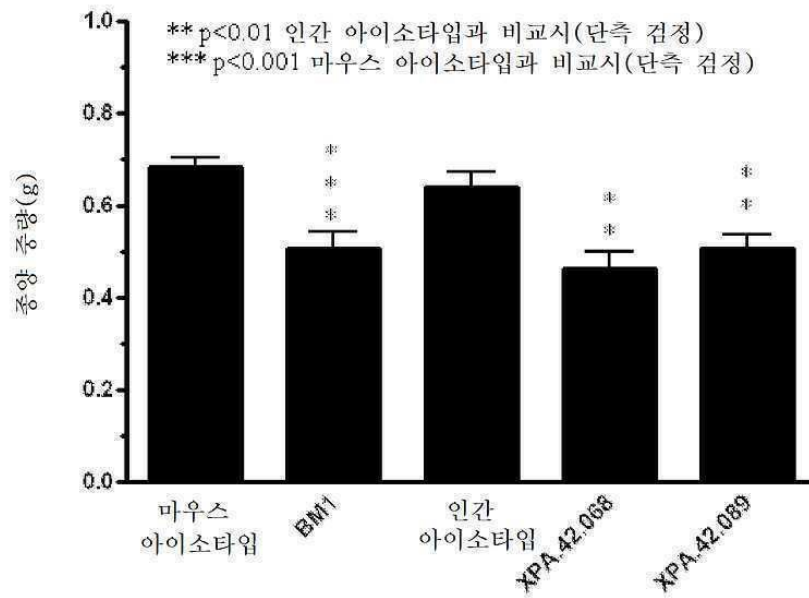
도면5



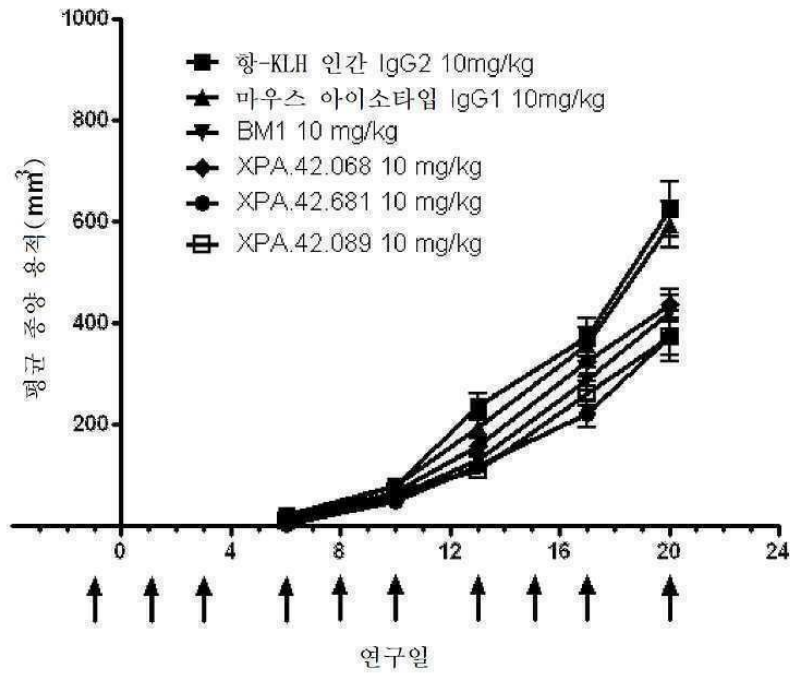
도면6



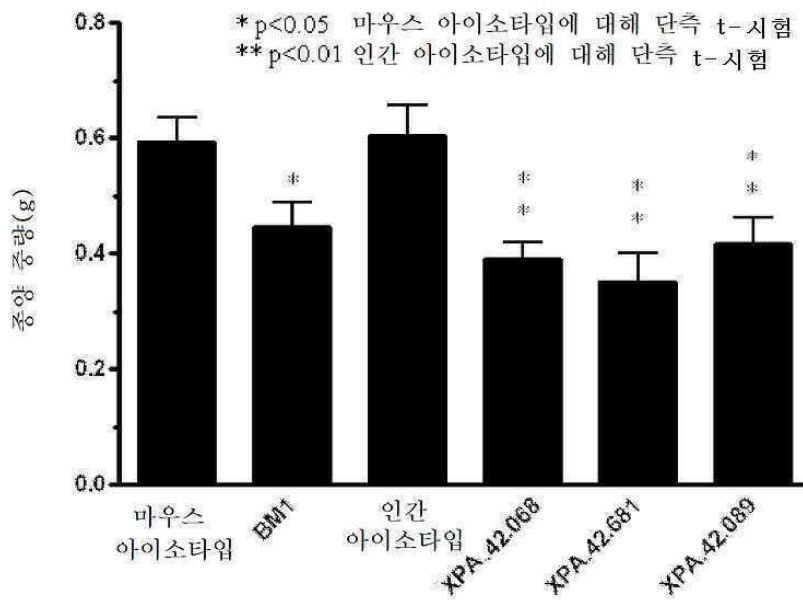
도면7



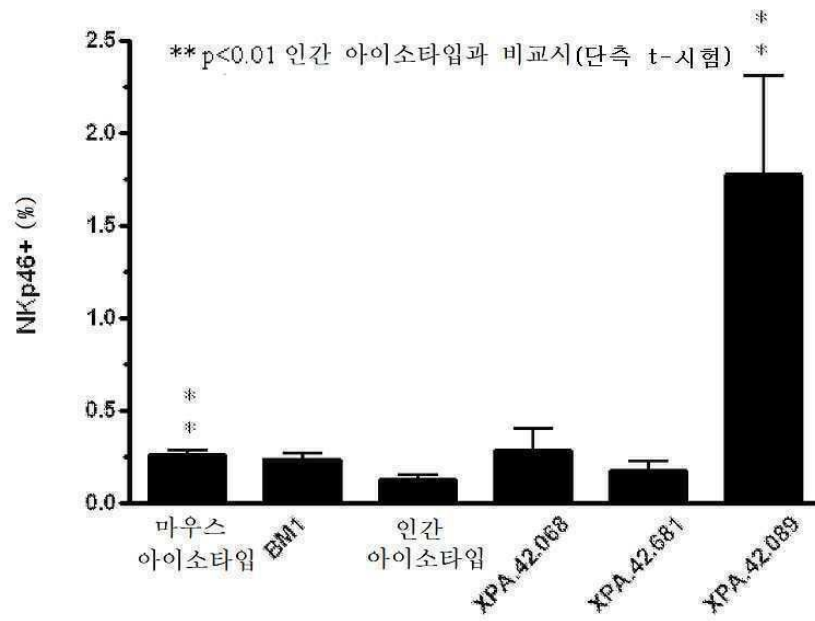
도면8



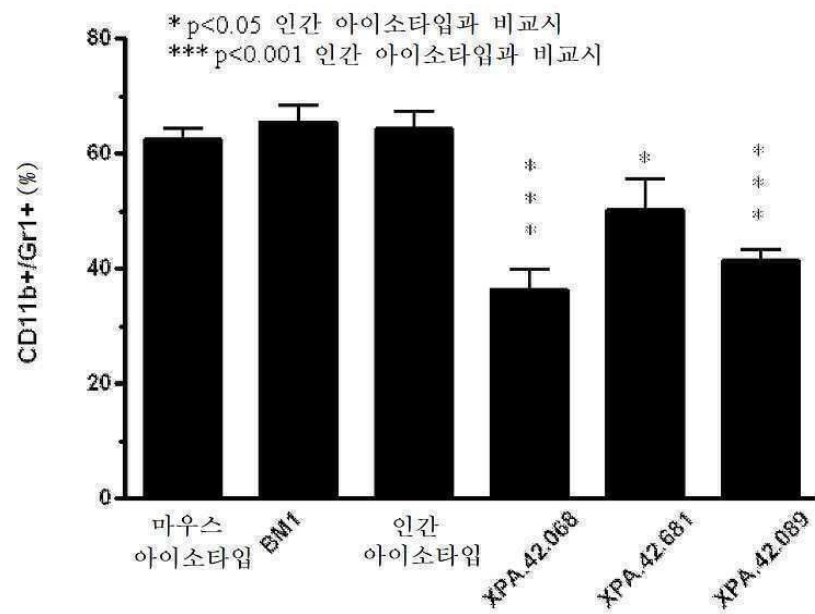
도면9



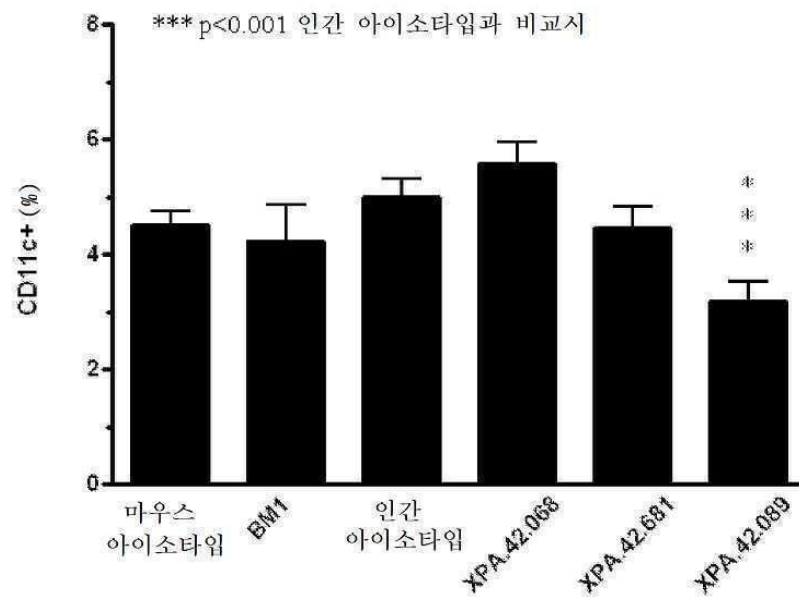
도면10



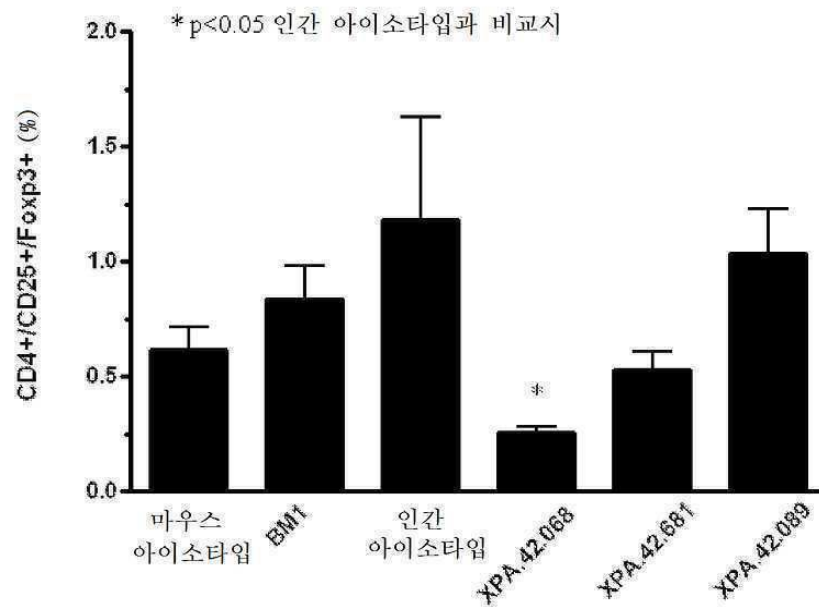
도면11



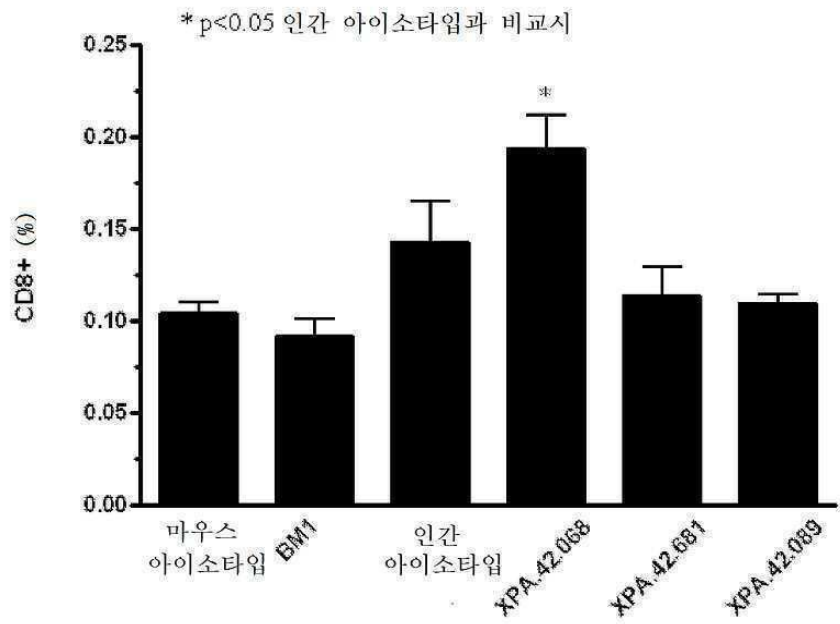
도면12



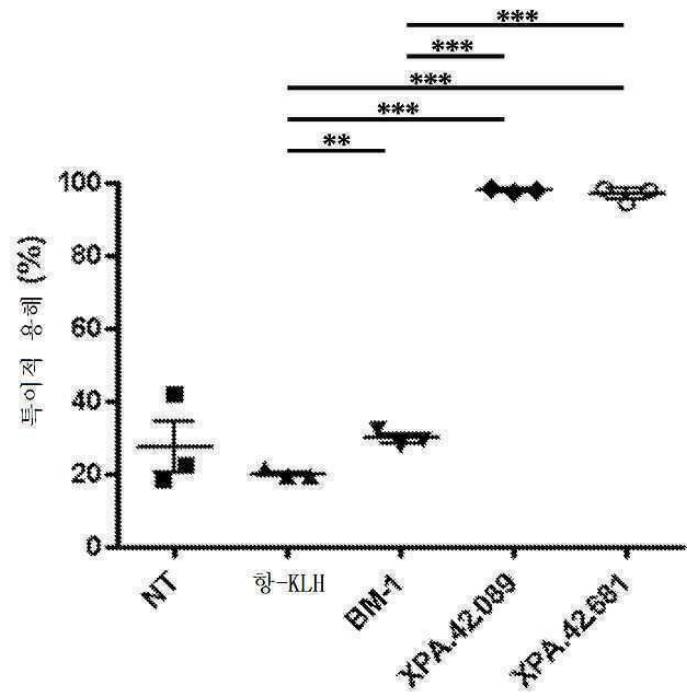
도면13



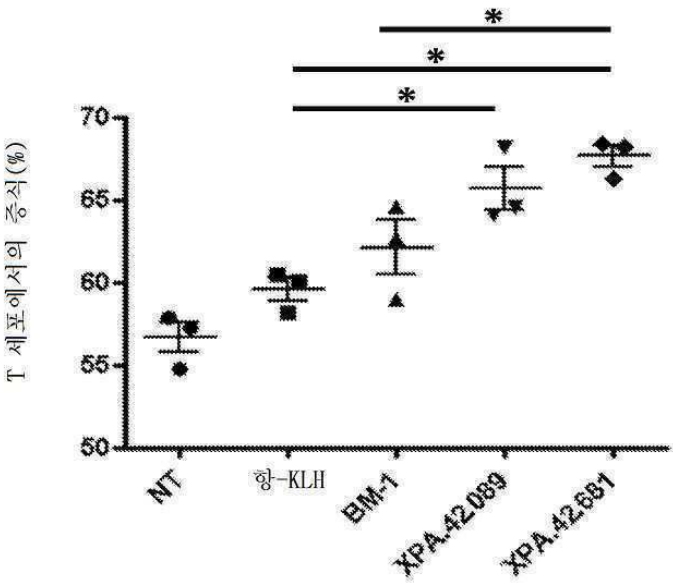
도면14



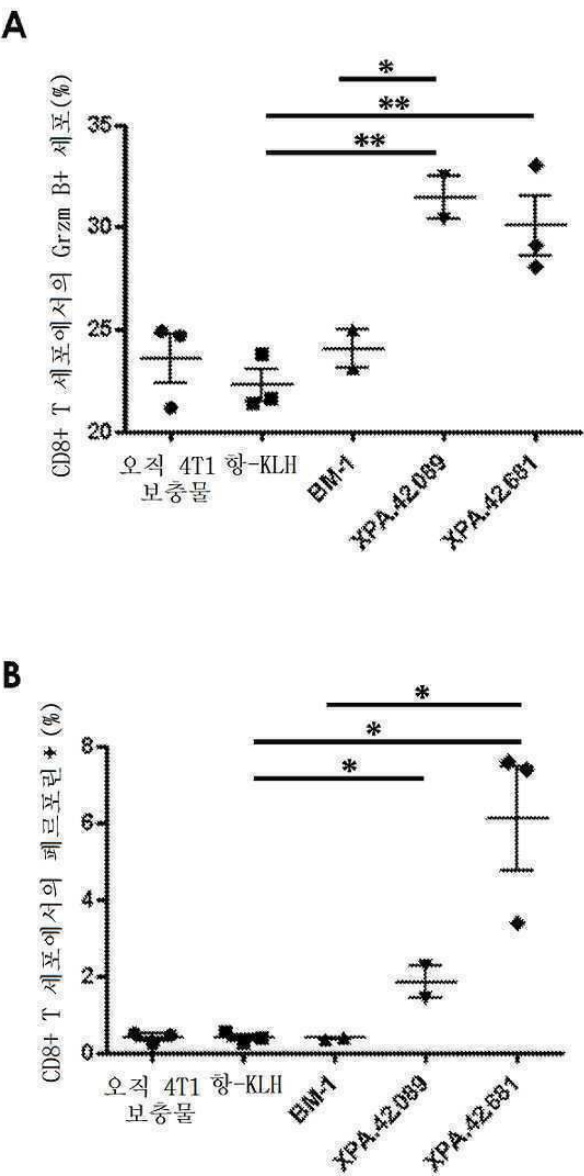
도면15



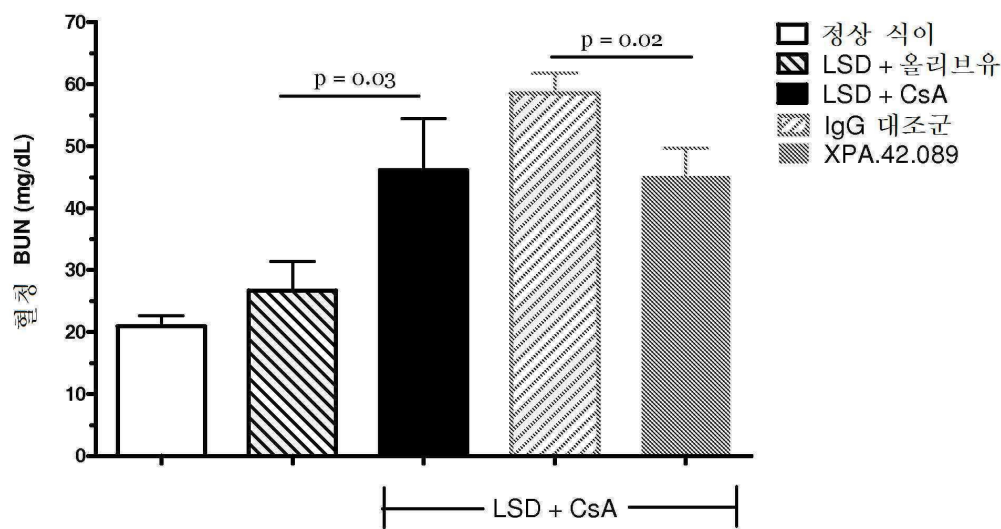
도면16



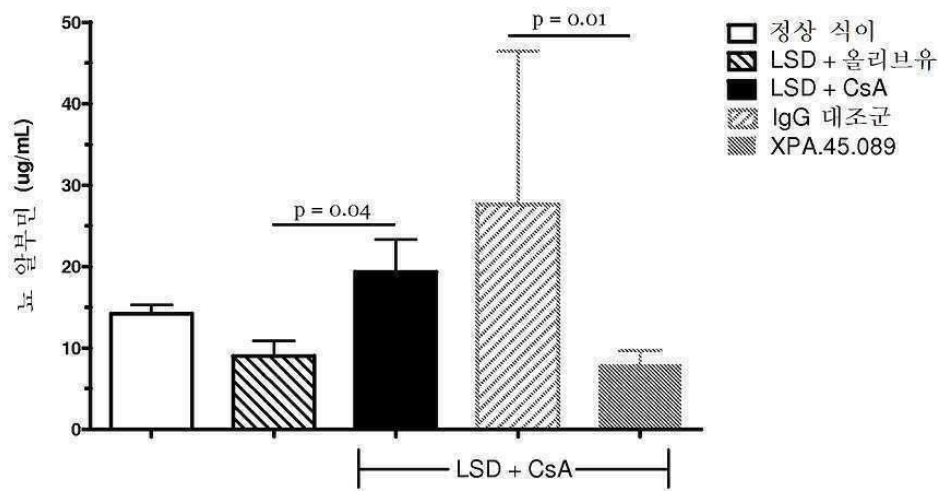
도면17



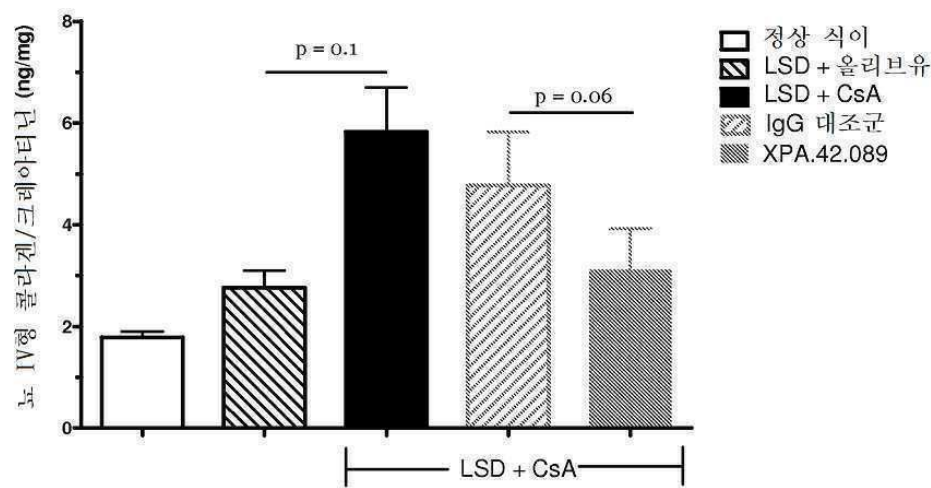
도면18



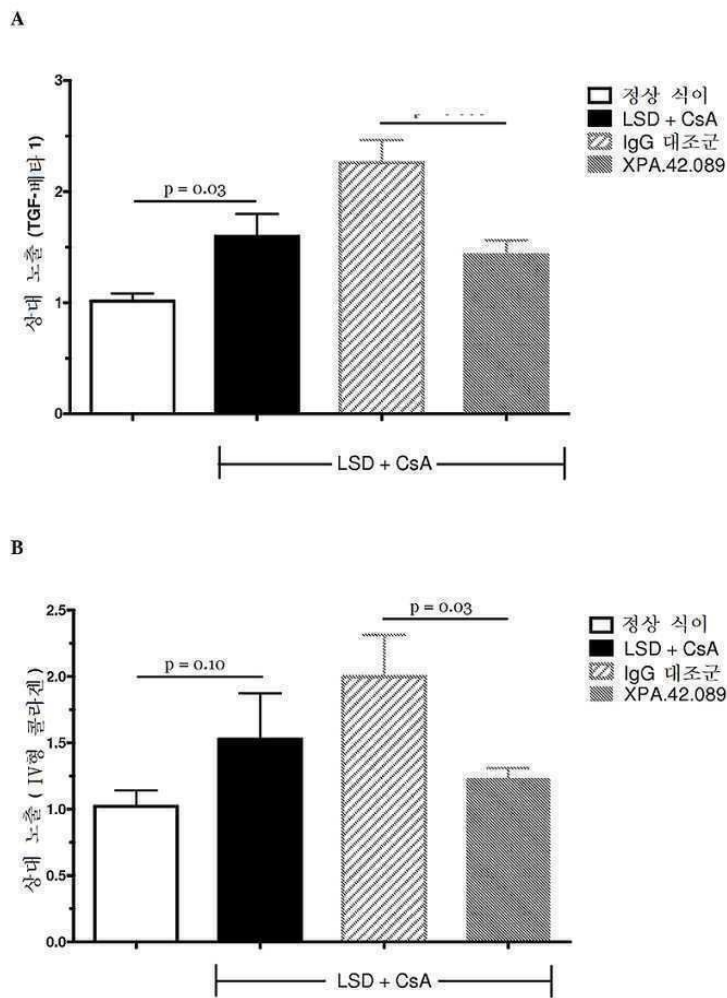
도면19



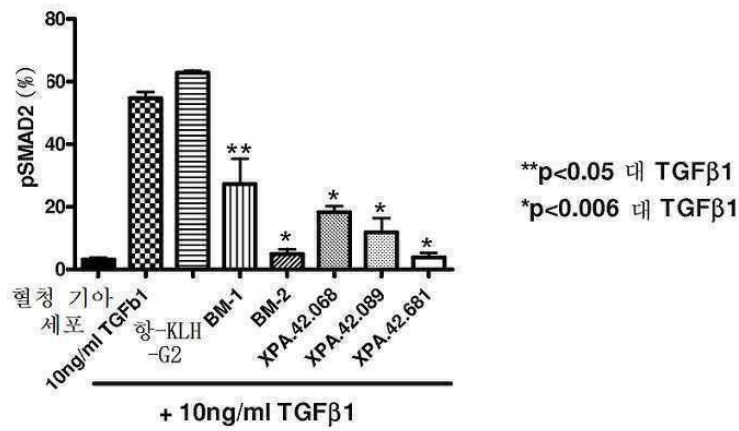
도면20



도면21



도면22



도면23a

시열 번호	클론	시열
1	XPA.42.068 중쇄 DMA 시열	caagttcagc tggctcagtc tgggcttgag gtgaagaagc ctgggctc agtcaagtc tcttgcagag ctcttgata caactcac ggcactata tgacttggc ggcagagcc ccttgcaag ggtcttgatg gatggatg atcacacta acactgttgg cacaaactat gcacagaagt ttcaaggcag ggtcacactg accagggaca gttccatcag cacagctac atgagactga gcaagctgag atctgacgac acggccgttt attacttggc gagatctac ctgtgcttgg ttccctctga tgcctttgat atctggggc aaggacacat gttcacgctc tcttca
2	XPA.42.068 중쇄 아미노산 시열	QVQVQSGAE VKRGSVNV SKAAGTET GYVHWNRQA PGQLEWNG IINPTGNTY AQRFQGNVIA TRDISISTAY NELSRLNSDD TAVYQANSE IMLVPSDAPD IIVGGTIVTV SS
3	XPA.42.068 경쇄 DMA 시열	tcttctgagc tgaactagcc accctcagtg tccgtggccc cagagaagaa ggtccagga acctgtggg ggaataaat tggactaaat agttacat gttaccagca gaggccagcc cagggccctg ttgtgtcct ctactatgct agatcagagc cttcagggat ccttgagcga ttttctgctt ccaactctgg gaacacggcc accctgacca tcaacaggt cgaagccgg gatagggccg accttttg tcaagtgtgg gataacacta gtgaacatgt gttcttcggc ggagacacc agctgacctg ccttagc
4	XPA.42.068 경쇄 아미노산 시열	SSSLTPPPSV SVAFGEKARI TGGNITGRK SVHWYQDRPG QAPVVLYXD RVRPSGIPER FSGNSNGNTA TLITIVKRG DDADYFCQVA DNTSEHVFG GGTQLTVLG
5	XPA.42.089 중쇄 DMA 시열	caagtgagag tggtagaatc tgggcttgag gtgaagaagc ctggctctc gttgaagtc tcttgcaag ctcttgagag gacttcagc agctatgcta tcaagtggc ggcagagcc ccttgacaag ggtcttgatg gatggatgg atcacctca tcttggatc agcaaatac gcacagaagt tccagggag agtcagat accggagag atccacagag cacagctac atgagactga gcaagctgag atctgagac acggccgttg attacttggc gaggagacta tggagagtic gggcccttcc gtcgtcttac tggggccag gaaaccttgg caccgtctcc tca
6	XPA.42.089 중쇄 아미노산 시열	OVALVQSGAE VKRGSVNV SKAAGTET SVATSWVRQA PGQLEWNG IIPITGNTY AQRFQGNVIA TADESTINAY NELSRLNSDD TAVYQANSE IMLVPSDAPD IIVGGTIVTV S
7	XPA.42.089 경쇄 DMA 시열	tcttctgagc tgaacagcc accctcagtg tccgtggccc cggagaagaa ggtccagga acctgtggg caaatgact tggagtaaa agtttcact gttaccagca gaagccagc cagggccctg tactgtgct ctctgaagat atctccagc cttcagggat ccttgagcga atcttgctt ccaactctgg gaacacggcc accctgacca tcaagagagt ggaagccgg gatagggccg acctatctg tcaagtggc gatggagata gtgacataa tgtcttggc actggagaca agttcacact ccttagc
8	XPA.42.089 경쇄 아미노산 시열	SVSLTPPPSV SVAFGEKARI TGGNITGRK SVHWYQDRPG QAPVVLYXD IINPTGNTY ISGNSNGNTA TLITISVNG DDADYFCQVA DNTSEHVFG GGTQLTVLG

도면23b

표 1

9	XP.A.42.681 중쇄 DNA 서열	caagttcagc tggctcagtc tgggctgag gtaagaagc ctggggcttc atgaaagtc tcctgcacag ctctcgata cacttcacc gctctgagc tgcattggtt ggcacagcc cctggacacag gctctgagtt gatggatgg atcacacctc tgcattggtt cacaactat gcacagaagt ttacagcgac gttacacatg accagcgaca cgtcctcag cacagctac atggagctga ggaagctgag atctgacgac accgctgltt atactgtgc gatactc ctggggctgg ttcctctcga tgccttgat atcggggc aaggacat ggtcacccgc tccttca	60 120 180 240 300 360
10	XP.A.42.681 중쇄 아미노산 서열	QVLVDSGAE VKRPGASVKY SCRASTGYFT GRYHWVRQA PGQGLEAMGN INPNTGTY AOFQGRVTM TRDISISAY NELSRLRSD IAVYVCARSP LMLVPSDAFD IWGGITWTV SS	60 120 122
11	XP.A.42.681 경쇄 DNA 서열	tcctatgagc tgaactcagcc accctcagtg tccgtggccc cagaaagac ggcacgatt acctgagggg gaacacacat tgaattttag agtggagact gttaccacaa gaagtcggc caggccctct tccctgctcat ctattttgat cggccccgcg cctcaggat cctcgaggga ttcccgacct ccaacttga gaacagcc accctgacca tcaagagagt cgaagccagg gatagggccg actattactg tcaagtgtgg gatagtaca gtagtatct agtcttcggc ggaagcacc agctgaccgt cctaggt	60 120 180 240 300 327
12	XP.A.42.681 경쇄 아미노산 서열	SVYLTPPSV SVAEGTKARI TCGGNIGFR SVHWYQKSG QAFVLVTFD RARESGIPER FSAASSENTA TLIRWEAG DEADYVCQVW DSDSDLVFG GGTQLTVLG	60 109
13	XP.A.42.068 - H-CDR1	GYTFGT	
14	XP.A.42.068 - H-CDR2	INPNTG	
15	XP.A.42.068 - H-CDR3	ARSLMLVPS DAFDI	
16	XP.A.42.068 - L-CDR1	NIGRKS	
17	XP.A.42.068 - L-CDR2	YDR	
18	XP.A.42.068 - L-CDR3	QVMDTSEHV	
19	XP.A.42.068 - H-CDR1	GGTSSYA	
20	XP.A.42.089 - H-CDR2	ITPIEGIA	
21	XP.A.42.089 - H-CDR3	ARGLMVRAL PSY	
22	XP.A.42.089 - L-CDR1	DIGSKS	
23	XP.A.42.089 - L-CDR2	EDI	
24	XP.A.42.089 - L-CDR3	QVMDRSDGY	
25	XP.A.42.681 - H-CDR1	GYTFGT	
26	XP.A.42.681 - H-CDR2	INPNTG	
27	XP.A.42.681 - H-CDR3	ARSLMLVPS DAFDI	
28	XP.A.42.681 - L-CDR1	NIGRKS	
29	XP.A.42.681 - L-CDR2	FDR	
30	XP.A.42.681 - L-CDR3	QVMDSDSL V	

서열목록

SEQUENCE LISTING

- <110> Bedlinger, et al.
- <120> ANTIBODIES SPECIFIC FOR TGF-BETA
- <130> 27129/45863
- <150> 61/493,230
- <151> 2011-06-03
- <160> 30
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
- <211> 366
- <212> DNA

<213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic nucleotide
 <220><221> misc_feature
 <223> Clone XPA.42.068 heavy chain
 <400> 1
 caggttcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
 tcctgcaagg ctcttgata caccttcacc ggctactata tgcactgggt gcgacaggcc 120
 cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg atcaacccta aactgggtgg cacaaactat 180
 gcacagaagt ttcagggcag ggtcaccatg accagggaca cgtccatcag cacagcctac 240
 atggagctga gcaggctgag atctgacgac acggccgttt attactgtgc gagatcattc 300
 ctgtggctgg ttccctctga tgcttttgat atctggggcc aagggaacaat ggtcaccgtc 360
 tcttca 366

<210> 2

<211> 122

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide

<220><221> MISC_FEATURE

<223>

> Clone XPA.42.068 heavy chain

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (26)..(33)

<223> H-CDR1

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (51)..(58)

<223> H-CDR2

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (97)..(111)

<223> H-CDR3

<400> 2

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

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

100 105 110
Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 3

<211> 327

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic nucleotide

<220><221> misc_feature

<223> Clone XPA.42.068 light chain

<400> 3

tcttctgagc tgactcagcc accctcagt tccgtggccc caggagagaa ggccaggatt 60

acctgtgggg ggaataacat tggacgtaaa agtgtacatt ggtaccagca gaggccaggc 120

caggcccctg ttgtggtcct ctactatgat agagtcagac cctcagggat ccctgagcga 180

ttttctggct ccaactctgg gaacacggcc accctgacca tcaccagggt cgaagccggg 240

gatgaggccg actatTTTTG tcaggtgtgg gataacacta gtgagcatgt ggtcttcggc 300

ggaggcacc agctgaccgt cctaggc 327

<210> 4

<211> 109

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide

<220><221> MISC_FEATURE

<223> Clone XPA.42.068 light chain

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (26)..(31)

<223> L-CDR1

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (49)..(51)

<223> L-CDR2

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (88)..(97)

<223> L-CDR3

<400> 4

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

1 5 10 15

Lys Ala Arg Ile Thr Cys Gly Gly Asn Asn Ile Gly Arg Lys Ser Val

20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ala Pro Val Val Val Leu Tyr

35 40 45

Tyr Asp Arg Val Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser

50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Thr Arg Val Glu Ala Gly

65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Val Trp Asp Asn Thr Ser Glu His

85 90 95

Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Gln Leu Thr Val Leu Gly

100 105

<210> 5

<211> 363

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic nucleotide

<220><221> misc_feature

<223> Clone XPA.42.089 heavy chain

<400> 5
caggtgcagc tggtagcagc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc 60
tcctgcaagg ctcttgagg caccttcagc agctatgcta tcagctgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggcttgagtg gatgggaggg atcatcccta tctttgttac agcaaactac 180
gcacagaagt tccagggcag agtcacgatt accgcggacg aatccacgag cacagcctac 240
atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gaggggacta 300
tgggaggttc gggcccttcc gtcggtctac tggggccagg gaaccctggt caccgtctcc 360

tca 363

<210> 6

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide

<220><221> MISC_FEATURE

<223> Clone XPA.42.089 heavy chain

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (26)..(33)

<223> H-CDR1

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (51)..(58)

<223> H-CDR2

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (97)..(110)

<223> H-CDR3

<400> 6

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

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

100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 7

<211> 327

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic nucleotide

<220><221> misc_feature

<223> Clone XPA.42.089 light chain

<400

$$> 7$$

tcctatgagc tgacacagcc accctcagtg tccgtggccc cgggacagac ggccagaatt	60
acctgtgggg caaatgacat tggaagtaaa agtgtccact ggtaccagca gaaggcaggc	120
caggccccctg tactggtcgt ctctgaagat atcatccggc cctcagggat ccctgagcga	180
atctctggct ccaactctgg gaacacggcc accctgacca tcagcagggt cgaagccggg	240
gatgaggccg actattactg tcaagtttgg gatagggata gtgatcaata tgtctttgga	300
actgggacca aggtcacctg cctaggc	327

<210> 8

<211> 109

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide

<220><221> MISC_FEATURE

<223> Clone XPA.42.089 light chain

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (26)..(31)

<223> L-CDR1

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (49)..(51)

<223> L-CDR2

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (88)..(97)

<223> L-CDR3

<400> 8

Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln

1 5 10 15

Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly Ala Asn Asp Ile Gly Ser Lys Ser Val

20 25 30

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

35 40 45

Glu Asp Ile Ile Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Ile Ser Gly Ser

50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly

65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Arg Asp Ser Asp Gln

85 90 95

Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly

100 105

<210> 9

<211> 366

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic nucleotide

<220><221> misc_feature

<223> Clone XPA.42.681 heavy chain

<400> 9

caggttcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60

tcctgcaagg ctcttgata caccttcacc ggetactata tgcactgggt ggcacaggcc 120

cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg atcaacccta acactggtgg cacaactat 180

gcacagaagt ttcagggcag ggtcaccatg accagggaca cgtccatcag cacagcctac 240
atggagctga gcaggctgag atctgacgac acggccgttt attactgtgc gagatcattc 300
ctgtggctgg ttccctctga tgcttttgat atctggggcc aagggacaat ggtcaccgtc 360
tcttca 366

<210> 10

<211> 122

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide

<220><221> MISC_FEATURE

<223> Clone XPA.42.681 heavy chain

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (26)..(33)

<223> H-CDR1

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (51)..(58)

<223> H-CDR2

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (97)..(111)

<223> H-CDR3

<400> 10

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gly Trp Ile Asn Pro Asn Thr Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Ser Phe Leu Trp Leu Val Pro Ser Asp Ala Phe Asp Ile Trp

100

105

110

Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser

115

120

<210> 11

<211> 327

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic nucleotide

<220><221> misc_feature

<223> Clone XPA.42.681 light chain

<400> 11

tcctatgtgc tgactcagcc accctcagt tccgtggccc caggaaagac ggccaggatt 60

acctgtgggg gaaacaacat tggatttaga agtgtgcact ggtaccaaca gaagtcaggc 120

caggcccctg tcttggtcat ctattttgat cgcgcccggc cctcagggat ccctgagcga 180

ttctctgcct ccaactctga gaacacggcc accctgacca tcaggagggt cgaagccggg 240

gatgaggccg actattactg tcaggtgtgg gatagtgaca gtgatgatct agtcttcggc 300

ggaggcaccc agctgaccgt cctaggt 327

<210> 12

<211> 109

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide

<220><221> MISC_FEATURE

<223> Clone XPA.42.681 light chain

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (26)..(31)

<223> L-CDR1

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (49)..(51)

<223> L-CDR2

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (88)..(98)

<223> L-CDR3

<400> 12

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

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

<210> 13

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide

<220><221> MISC_FEATURE

<223> Clone XPA.42.068 - H-CDR1

<400> 13

Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr Tyr
 1 5

<210> 14

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide

<220><221> MISC_FEATURE

<223> Clone XPA.42.068 - H-CDR2

<400> 14

Ile Asn Pro Asn Thr Gly Gly Thr

1 5

<210> 15

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide

<220><221> MISC_FEATURE

<223> Clone XPA.42.068 - H-CDR3

<400> 15

Ala Arg Ser Phe Leu Trp Leu Val Pro Ser Asp Ala Phe Asp Ile

1 5 10 15

<210> 16

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide

<220><221> MISC_FEATURE

<223> Clone XPA.42.068 - L-CDR1

<400> 16

Asn Ile Gly Arg Lys Ser

1 5

<210> 17

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide

<220><221> MISC_FEATURE

<223> Clone XPA.42.068 - L-CDR2

<400> 17

Tyr Asp Arg

1

<210> 18
 <211> 10
 <212>
 > PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic peptide
 <220><221> MISC_FEATURE
 <223> Clone XPA.42.068 - L-CDR3
 <400> 18
 Gln Val Trp Asp Asn Thr Ser Glu His Val
 1 5 10
 <210> 19
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic peptide
 <220><221> MISC_FEATURE
 <223> Clone XPA.42.089 - H-CDR1
 <400> 19
 Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr Ala
 1 5
 <210> 20
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic peptide
 <220><221> MISC_FEATURE
 <223> Clone XPA.42.089 - H-CDR2
 <400> 20
 Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala
 1 5
 <210> 21
 <211> 14
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide

<220><221> MISC_FEATURE

<223> Clone XPA.42.089 - H-CDR3

<400> 21

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

1 5 10

<210> 22

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide

<220><221> MISC_FEATURE

<223> Clone XPA.42.089 - L-CDR1

<400> 22

Asp Ile Gly Ser Lys Ser

1 5

<210> 23

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide

<220><221> MISC_FEATURE

<223> Clone XPA.42.089 - L-CDR2

<400> 23

Glu Asp Ile

1

<210> 24

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide

<220><221> MISC_FEATURE

<223> Clone XPA.42.089 - L-CDR3

<400> 24

Gln Val Trp Asp Arg Asp Ser Asp Gln Tyr

1 5 10

<210> 25

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide

<220><221> MISC_FEATURE

<223> Clone XPA.42-681 - H-CDR1

<400> 25

Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr Tyr

1 5

<210> 26

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide

<220><221> MISC_FEATURE

<223> Clone XPA.42-681 - H-CDR2

<400> 26

Ile Asn Pro Asn Thr Gly Gly Thr

1 5

<210> 27

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide

<220><221> MISC_FEATURE

<223> Clone XPA.42-681 - H-CDR3

<400> 27

Ala Arg Ser Phe Leu Trp Leu Val Pro Ser Asp Ala Phe Asp Ile

1 5 10 15

<210> 28

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide

<220><221> MISC_FEATURE

<223> Clone XPA.42-681 - L-CDR1

<400> 28

Asn Ile Gly Phe Arg Ser

1 5

<210> 29

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide

<220><221> MISC_FEATURE

<223> Clone XPA.42-681 - L-CDR2

<400> 29

Phe Asp Arg

1

<210> 30

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide

<220><221> MISC_FEATURE

<223> Clone XPA.42-681 - L-CDR3

<400> 30

Gln Val Trp Asp Ser Asp Ser Asp Asp Leu Val

1 5 10