



등록특허 10-2458196



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2022년10월25일
(11) 등록번호 10-2458196
(24) 등록일자 2022년10월19일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/32 (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) *C07K 16/40* (2006.01)
G01N 33/573 (2006.01) *G01N 33/574* (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C07K 16/32 (2013.01)
A61P 35/00 (2018.01)
- (21) 출원번호 10-2018-7036968
- (22) 출원일자(국제) 2017년06월21일
심사청구일자 2020년06월18일
- (85) 번역문제출일자 2018년12월19일
- (65) 공개번호 10-2019-0021244
- (43) 공개일자 2019년03월05일
- (86) 국제출원번호 PCT/EP2017/065313
- (87) 국제공개번호 WO 2017/220695
국제공개일자 2017년12월28일
- (30) 우선권주장
1610902.7 2016년06월22일 영국(GB)
- (56) 선행기술조사문헌
KR1020170099918 A
- (73) 특허권자
베르겐 테크놀로지오버포링 에이에스
노르웨이, 엔-5006 베르겐, 토르모흐렌스쥐티 .51,
빌비테센테레트 내
베르겐바이오 에이에스에이
노르웨이, 엔-5009 베르겐, 조나스 라이즈 베이
91
- (72) 발명자
미클렘 데이비드
노르웨이, 5033 베르겐, 웹스라게가튼 4비
키프리자노브 세르게이
노르웨이, 0768 오슬로, 호브세트바인 98
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
특허법인한얼

전체 청구항 수 : 총 17 항

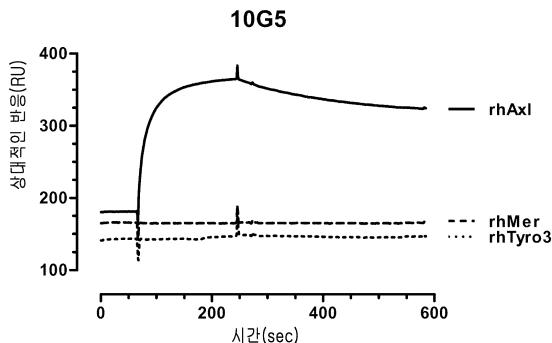
심사관 : 관희찬

(54) 발명의 명칭 항-AXL 길항성 항체

(57) 요 약

본 개시내용은 Ax1 단백질 상의 신규한 에피토프에 특이적으로 결합하는 항체에 관한 것이다. 항-Ax1 항체 제조 및 사용 방법 또한 개시한다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류

C07K 16/40 (2013.01)
G01N 33/573 (2013.01)
G01N 33/574 (2013.01)
G01N 33/6893 (2013.01)
C07K 2317/24 (2013.01)
C07K 2317/33 (2013.01)
C07K 2317/41 (2013.01)
C07K 2317/76 (2013.01)
C07K 2317/92 (2013.01)

(72) 발명자

로렌스 제임스

노르웨이, 5152 본스, 크로肯네스바이엔 10

아흐메드 라비나

노르웨이, 5096 베르겐, 요한 블릿츠 바이 20

닐슨 린

노르웨이, 5067 베르겐, 그란바이엔 11

산달 톤

노르웨이, 5009 베르겐, 모른다스바켄 1

명세서

청구범위

청구항 1

Ax1에 결합하고,

서열 번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 서열 번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인으로 이루어진 군으로부터 선택되는 항체 VH 도메인; 및

서열 번호 3의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인 및 서열 번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인으로 이루어진 군으로부터 선택되는 항체 VL 도메인을 포함하는 항체.

청구항 2

제1항에 있어서, 서열 번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 서열 번호 3의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함하는, 항체.

청구항 3

제1항에 있어서, 서열 번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 서열 번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함하는, 항체.

청구항 4

제1항에 있어서, 서열 번호 7의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 서열 번호 9의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함하는, 항체.

청구항 5

제1항에 있어서, 항체가

- (i) 항체 중쇄 불변 영역, 항체 경쇄 불변 영역, 또는 둘 다;
- (ii) 전체 항체; 또는
- (iii) 항원-결합 항체 단편을 포함하는, 항체.

청구항 6

제5항에 있어서, 전체 항체가 IgG 항체이거나; 또는 항원-결합 항체 단편이 Fv, scFv, dsFv, Fd, Fab, F(ab')₂, 미니바디, 디아바디, 단일-쇄 디아바디, 텐덤(tandem) scFv, TandAb, 비-바디(bi-body), 트리-바디, 카파(람다)-바디, SIP, 또는 SMIP인, 항체.

청구항 7

제1항에 있어서, Ax1의 Gas6에의 결합을 억제시키는, 항체.

청구항 8

검출가능한 표지, 효소, 또는 독소에, 임의로 펩티드 결합 또는 링커를 통해 접합된, 제1항의 항체를 포함하는 면역접합체.

청구항 9

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 따른 항체 또는 이의 VH 및 VL 도메인을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 단리된 핵산.

청구항 10

제9항에 따른 핵산으로 형질전환된, 단리된 숙주 세포.

청구항 11

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 따른 항체 또는 이의 VH 및 VL 도메인을 제조하는 방법으로서, 상기 항체 또는 이의 VH 또는 VL 도메인의 제조를 위한 조건하에서 상기 항체 또는 이의 VH 및 VL 도메인을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산으로 형질감염된 숙주 세포를 배양하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 12

제약상 허용되는 부형제와 함께, 제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 따른 항체 또는 이의 면역접합체를 포함하는, 섬유증성 장애를 치료하기 위한 제약 조성물로서, 섬유증성 장애가 사시, 경피증, 켈로이드, 신장기원 전신 섬유증, 폐 섬유증, 특발성 폐 섬유증 (IPF), 낭성 섬유증 (CF), 전신 경화증, 심장 섬유증, 비알콜성 지방간염 (NASH), 다른 유형의 간 섬유증, 원발성 쓸개관 간경화증, 신장 섬유증, 및 죽상동맥경화증으로 구성된 군으로부터 선택되는, 제약 조성물.

청구항 13

제12항에 있어서, 섬유증성 장애가 폐 섬유증, 심장 섬유증, 간 섬유증, 및 신장 섬유증으로 구성된 군으로부터 선택되는, 제약 조성물.

청구항 14

제12항에 있어서, 섬유증성 장애가 간 섬유증인, 제약 조성물.

청구항 15

제약상 허용되는 부형제와 함께, 제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 따른 항체 또는 이의 면역접합체를 포함하는, Ax1의 과다발현을 특징으로 하는 암을 치료하기 위한 제약 조성물.

청구항 16

제15항에 있어서, 암이 전이성 암인, 제약 조성물.

청구항 17

제15항에 있어서, 암이 유방암, 자궁경부암, 폐암 및 급성 골수 백혈병으로 구성된 군으로부터 선택되는, 제약 조성물.

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 개시내용은 Ax1 단백질에 특이적으로 결합하는 항체에 관한 것이다. 항-Ax1 항체의 제조 방법 및 항-Ax1 항체의 용도 또한 개시한다.

배경 기술

[0002]

배경

[0003]

Ax1은 비타민 K-의존성 리간드 Gas6 (성장 정지-특이 6)을 공유하는 TAM (Tyro3-Ax1-Mer) 수용체 티로신 키나제 (RTK)의 구성원이다. TAM 패밀리 RTK는 세포 생존, 증식, 자가포식, 이동, 혈관신생, 혈소판 응집, 및 자연살 세포 분화를 비롯한, 다양한 세포 반응을 조절한다. Ax1은 다수의 배아 조직에서 발현되고, 이는 중간엽 발생 및 신경 발생에 관여하는 것으로 사료되며, 성인 조직에서의 발현은 평활근 세포로 크게 제한된다 (MGI 진 익스프레션 데이터베이스(MGI Gene Expression Database); www.informatics.jax.org). Ax1 활성화는 Akt, MAP 키나제, NF- κ B, STAT 등을 비롯한, 수개의 신호 전달 경로와 연관이 있다. 원래는 만성 끌수성 백혈병 환자로부터 형질전환 유전자로서 확인된 것인 Ax1은 그 아래로 각종 고등급 암과 연관되어 왔고, 불량한 예후와 상관관계가 있는 것으로 여겨져 왔다.

[0004]

Ax1 수용체 과다발현은 다양한 고형 종양 및 끌수 백혈병에서 검출되었다 (문헌 [Linger et al., Adv Cancer Res. 100: 35, 2008]; [Linger et al., Expert Opin Ther Targets. 14:1073, 2010]).

- [0005] Ax1 발현은 악성 종양 진행과 상관관계가 있고, 췌장암 (문헌 [Song et al., 암. 117:734, 2011]), 전립샘암 (문헌 [Paccez et al., Oncogene. 32:698, 2013]), 폐암 (문헌 [Ishikawa et al. Ann Surg Oncol. 2012]; [Zhang et al., Nat Genet. 44:852, 2012]), 유방암 (문헌 [Gjerdrum, Proc natl Acad Sci USA 107:1124, 2010]), 결장암 (문헌 [Yuen et al., PLoS One, 8:e54211, 2013]) 및 급성 골수 백혈병 (AML) (문헌 [Ben-Batalla et al., Blood 122:2443, 2013])을 비롯한, 수개의 악성 종양에서 환자의 불량한 전체 생존에 대한 비의존성 예측 인자이다.
- [0006] Ax1 신호 전달은 종양 연관 대식세포에 의해 분비되는 단백질 리간드 (Gas6) (문헌 [Loges et al., Blood. 115:2264, 2010]) 또는 자가분비 기전 (문헌 [Gjerdrum, Proc natl Acad Sci USA 107:1124, 2010])에 의해 활성화되고, 이는 예컨대, PI3 키나제 (PI3K)-AKT, 특히, AKT 및 미토겐-활성화된 단백질 키나제 (MAPK) 경로를 통해 수용체 이량체화, 자기인산화 및 하류 신호전달을 구동시킨다 (문헌 [Korshunov, Clinical Science. 122:361, 2012]). 다른 티로신 키나제 수용체, 예컨대, 표피 성장 인자 수용체 (EGFR)와의 이종이량체화 또한 발생하는 것으로 보고되었다 (문헌 [Linger et al., Expert Opin Ther Targets. 14:1073, 2010]; [Meyer et al. Science Signalling 6:ra66, 2013]).
- [0007] 종양 세포에서의 Ax1의 비정상적인 활성화는 시험관내 및 생체내에서의 표적화된 치료제에 대한 후천적 약물 내성과 광범위한 연관성을 가진다 (문헌 [Zhang et al. Nat Genet. 44: 852, 2012]; [Byers et al. Clin Cancer Res. 19: 279, 2013]). Ax1-표적화제는 삼중 음성 유방암, 호르몬 저항성 전립샘암 및 폐샘암종을 비롯한, 수개의 실험상 암 모델에서 EMT/CSC 특징을 역전시킴으로써 종양 형성, 전이를 차단하고, 약물 내성 (예컨대, 에를로티닙에 대한 내성)을 역전시킨다 (문헌 [Holland et al. Cancer Res 70:1544, 2010]; [Gjerdrum, Proc natl Acad Sci USA 107:1124, 2010]; [Zhang et al. Nat Genet. 44: 852, 2012]; [Paccez et al., Oncogene. 32:698, 2013]).
- [0008] Ax1 및 항-Ax1 항체에 관한 다른 출원으로는 EP2267454A2 [발명의 명칭: Diagnosis and prevention of cancer cell invasion measuring ...Ax1 - 맥스 플랜크(Max Planck)]; WO2009063965 [발명의 명칭: anti Ax1 - 추가이파마슈티칼(Chugai Pharmaceutical)]; WO2011159980A1 [발명의 명칭: anti-Ax1 - 제넨테크(Genentech)], WO2011014457A1 [발명의 명칭: combination treatments Ax1 and VEGF antagonists - 제넨테크], 문헌 [Oncogene (2009) 28, 3442-3455, Oncogene (2010) 29, 5254-5264] [발명의 명칭: anti-Ax1 - 제넨테크]; WO2012-175691A1 [발명의 명칭: Anti Ax1 20G7-D9 - INSERM], WO2012-175692A1 [발명의 명칭: Anti Ax1 3E3-E8 - INSERM], 문헌 [Oncogene 33, 5405-5414 (20 November 2014, doi:10.1038/onc.2013.487)]; WO2009/062690A1 [발명의 명칭: anti Ax1 - U3 파마(U3 Pharma)] 및 WO2010/130751A1 [발명의 명칭: humanised anti Ax1 - U3 파마]을 포함한다.
- [0009] 상기 문헌에 기술된 항-Ax1 항체들은 다양한 특성을 가진다. 예를 들어, 문헌 [Oncogene (2009) 28, 3442-3455]에는 제넨테크로부터 3G9, 8B5, 및 12A11로 지정된 3개의 항-Ax1 항체가 기술되어 있고; 상기 저자는 상기 3가지 항체 모두가 Ax1 발현의 하향조절을 유도하는 반면, 단지 3G9 및 8B5만이 Ax1 수용체에의 리간드 결합을 차단한다고 보고하고 있다 (상기 동일 문헌, 페이지 3453, 우측 열, 상단 참조). 다수의 동일 저자에 의한 후속 논문 (문헌 [Oncogene (2010) 29, 5254-5264])에서는 리간드 결합을 차단하는 항체 (YW327.6S2)가 MDA-MB-231 이종이식편 종양 성장을 약화시킬 수 있고, 항-vEGF 치료 효과를 증진시킬 수 있지만, 12A11 항체는 그렇지 않다고 보고하고 있다 (상기 동일 문헌, 도 4 참조).
- [0010] 또 다른 예에서, 문헌 [Oncogene 33, 5405-5414 (20 November 2014, doi:10.1038/onc.2013.487)]에 기술되어 있는 'D9' 및 'E8' 항체는 성장 정지-특이 인자 6 (GAS6) 결합에는 영향을 주지 않으면서, AXL 및 그의 하류 표적 AKT의 인산화를 억제시키는 것으로 보고되며 있다 (상기 동일 문헌, 요약서 참조). 동일 저자는 또한 WO2016/091891에서 D4 항체를 기술하고 있다 (상기 공개문헌의 서열 번호 1 & 2 참조).
- [0011] 마지막 예에서, WO 2009062690 A1에 기술되어 있는 11B7 항체는 GAS6 리간드의 수용체 Ax1에의 결합을 억제시킨 것으로 보고되어 있지 않다.
- [0012] 종양발생에서의 Ax1의 역할을 고려해 볼 때, Ax1에 특이적으로 결합하는, 유익한 특성을 가진 추가의 항체를 확인하는 것이 바람직할 수 있다. 본 개시내용은 상기 항체에 관한 것이다.
- [0013] 도면의 간단한 설명
- [0014] 도 1

[0015] 재조합 인간 (rh) Ax1, rhMer 및 rhTyro3과 키메라 MAb 10G5의 상호작용을 보여주는 결합 분석으로부터의 센소그램의 중첩 플롯. 블랭크 표면 신호를 차감한 이후의 곡선이 제시되어 있다.

도 2

[0017] rhAx1, 재조합 뮤린 (rm) Ax1 및 rhTyro3으로 코팅된 센서 칩 CM5와 상호작용하는 리간드 (뮤린 MAb 10G5 및 rmGas6)의 비아코어(Biacore) 분석. 블랭크 표면 신호를 차감한 이후의 곡선이 제시되어 있다.

도 3

[0019] 재조합 인간 Ax1 (rhAx1) 및 시노몰구스 원숭이로부터의 Ax1 항원 (시노-Ax1)으로 코팅된 센서 칩 CM5와 상호작용하는 리간드 (뮤린 MAb 10G5)의 비아코어 분석. 블랭크 표면 신호를 차감한 이후의 곡선이 제시되어 있다.

도 4

[0021] 비아코어 센서 칩의 표면 상에 고정화된 rhAx1과 상호작용하는 뮤린 MAb 10G5의 동역학적 분석. 상이한 농도의 항체에 대한 (뮤린 10G5의 경우, 0.3 - 166.7 nM) 센소그램의 중첩 플롯이 제시되어 있다. BIA 이밸류에이션 (BIA evaluation) 소프트웨어 및 1:1 랭뮤어(Langmuir) 결합 모델에 따른 곡선 피팅을 이용하여 정확한 동역학적 분석을 수행하였다. 친화도 상수 (동역학적 및 안정 상태) 뿐만 아니라, 25°C에서의 항원 결합의 반감기 계산치는 하기 표 1에 제시되어 있다.

표 1

MAb	온-속도 ($k_{\text{온}} ; \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	오프-속도 ($k_{\text{오프}} ; \text{s}^{-1}$)	$K_D (\text{M})$	반감기 ($t_{1/2} ; \text{min}$)
뮤린 10G5	8.29×10^5	4.39×10^{-4}	5.30×10^{-10}	26.32 min

[0022]

도 5

[0024] 비아코어 3000을 이용한, 뮤린 MAb 10G5 (제1 샘플) 및 항-Ax1 MAb MAB154 (R&D Systems), 뮤린 항체 10G5, rhGas6 및 rmGas6 (제2 샘플) 사이의 경쟁에 관한 분석. 상이한 제2 샘플을 이용한 센소그램의 중첩 플롯이 제시되어 있다. 제1 샘플 (뮤린 10G5) 및 2nd 샘플 주입의 출발점은 화살표로 표시되어 있다.

도 6

[0026] 항-Ax1 항체가 3차원 (3D) 기관형 종양 종괴 발생에 미치는 효과. 고도의 침습성인 인간 유방 암종 세포 MDA-MB-231을 세포외 매트릭스 존재하에서 성장시키면서, 대조군 IgG (상단 중간 패널에 제시) 또는 항-Ax1 MAb (하단 패널)로 처리하여 3D 기관형 모델을 형성하였다. 양성 대조군으로서, 넉-다운 Ax1 발현 MDA-MB-231 세포가 제시되어 있다.

도 7

[0028] 항-Ax1 항체 뮤린 10G5가 확립된 3D 기관형 종양 종괴에 미치는 효과. 인간 유방 암종 세포 (MDA-MB-231)의 발생된지 9일된, 성상 형상의 3D 기관형 종괴를 72시간 동안 대조군 IgG 또는 항-Ax1 항체 뮤린 10G5로 처리하였다. 명시야를 사용하여 영상을 포착하였고; 화살표 표시는 성상 형상의 세포를 분해하는 아폽토시스성인 것을 나타낸다.

도 8

[0030] 멀티키나제 억제제 항체인 포레티닙(Foretinib)을 이용한 처리가 Ax1 수용체 발현에 미치는 효과를 나타내는 웨스턴 블롯 분석. 고도의 침습성인 인간 유방 암종 세포 MDA-MB-231을 24 hr 동안 항체 (비관련 IgG 대조군 및 항-Ax1 MAb 뮤린 10G5 및 MAb#3) 또는 포레티닙으로 처리한 후, SDS-PAA 겔 상에 로딩하였다. 액틴 단백질 수준을 로딩 대조군으로서 사용하였다.

도 9

[0032] 마우스 모노클로날 항체 뮤린 10G5 존재하의 Gas6-매개 Ax1 신호전달 억제를 나타내는 웨스턴 블롯 분석.

Ser⁴⁷³에서의 Akt의 인산화를 Ax1 활성에 대한 대용 판독물로서 사용하였다. M, 분자량 마커. 전체 세포 용해 물의 면역블롯을 항-Akt (Ser⁴⁷³), 또는 로딩 대조군으로서 항-GAPDH (글리세르알데히드 3-포스페이트 테하이드로제나제)로 프로빙하였다.

[0033] 도 10

항-Ax1 모노클로날 항체 10G5로부터 유래된 인간화 VH VL 도메인의 아미노산 서열. 중쇄 및 경쇄의 CDR 영역은 밑줄로 표시되어 있다.

[0035] 도 11

항체 10G5의 키메라 변이체 (c10G5)의 Ax1-양성 세포에의 용량-의존성 결합. 상이한 농도의 키메라 항체를 유세포 분석법으로 삼중 음성 유방암 세포주 MDA-MB-231에의 결합에 대하여 시험하였다. 각각 1:500 희석률의 마우스 IgG (H+L), 또는 1:300 희석률의 인간 IgG (H+L) (이 둘 모두 잭슨 이뮤노리서치(Jackson ImmunoResearch)로부터 입수)에 특이적인 APC-접합된 당나귀 F(ab')₂ 단편을 이용하여 결합된 키메라 항체를 검출하였다. 어큐리(Accuri) C6 유세포 분석기 (BD 바이오사이언시스(BD Biosciences))를 이용하여 세포 염색을 측정하였다. MFI, 기하 평균 형광 강도.

[0037] 도 12

키메라 항체 c10G5 및 그의 뮤린 대응물과 제조합 인간 (rh) Ax1의 상호작용을 보여주는 비아코어 결합 분석으로부터의 센소그램의 중첩 플롯. 블랭크 표면 신호를 차감한 이후의 곡선이 제시되어 있다.

[0039] 도 13

비아코어 센서 칩의 표면 상에 고정화된 rhAx1과 상호작용하는 키메라 항체 c10G5의 동역학적 분석. 상이한 농도의 항체에 대한 (c10G5의 경우, 0.3 - 166.7 nM) 센소그램의 중첩 플롯이 제시되어 있다. BIA이밸류에이션 소프트웨어 및 1:1 램프어 결합 모델에 따른 곡선 피팅을 이용하여 정확한 동역학적 분석을 수행하였다. 친화도 상수 (동역학적 및 안정 상태) 뿐만 아니라, 25°C에서의 항원 결합의 반감기 계산치는 하기 표 2에 제시되어 있다.

표 2

MAb	온-속도 (k_{on} ; M ⁻¹ s ⁻¹)	오프-속도 (k_{off} ; s ⁻¹)	K_D (M)	반감기 ($t_{1/2}$; min)
c10G5	1.64×10^6	1.69×10^{-4}	1.03×10^{-10}	68.36 min

[0041]

[0042] 도 14

키메라 항체 10G5에 의한 A549 이종이식편 종양 성장 억제. 평균 종양 크기가 100 mm³에 도달하였을 때 출발하여 주 2회에 걸쳐 항체를 20 mg/kg으로 복강내로 투여하였다. 비히클 (멸균 PBS) 또는 키메라 10G5로 처리된 군에 대한 종양 성장 곡선이 제시되어 있다. 오차 막대는 평균의 표준 오차 (SEM)를 나타낸다. 통계학적 분석은 이원 ANOVA를 사용하여 수행하였다. **, P < 0.01.

[0044] 도 15

키메라 항체 10G5에 의한 Mv4-11 이종이식편 종양 성장 억제. 평균 종양 크기가 200 mm³에 도달하였을 때 출발하여 주 2회에 걸쳐 항체를 30 mg/kg으로 복강내로 투여하였다. 비히클 (멸균 PBS) 또는 키메라 10G5로 처리된 군에 대한 종양 성장 곡선이 제시되어 있다. 오차 막대는 평균의 표준 오차 (SEM)를 나타낸다. 통계학적 분석은 이원 ANOVA를 사용하여 수행하였다. *, P < 0.05; **, P < 0.01; ****, P < 0.0001.

[0046] 도 16

실시예 16으로부터의 데이터. c10G5와 비교하였을 때 항체 글리맥스(Glymax)-c10G5는 A549 종양 성장을 유의적으로 약화시켰다 (이원 ANOVA에 의해 측정된 바, P < 0.0001). wt 및 탈포코실화된 버전의 키메라 10G5의 활성

에 있어서의 유의적인 차이는 종양 성장 억제에서의 항체-의존성 세포성 세포독성 (ADCC)의 중요성을 시사한다.

도 17

[0049] 실시예 17로부터의 데이터. 대조군과 비교하였을 때 hu10G5 H2L1 항체는 A549 종양 성장을 유의적으로 약화시켰다 (이원 ANOVA에 의해 측정된 바, $P < 0.051$); 2주 처리 후 약 25%가 억제된 것이 관찰되었다.

도 18

[0051] 실시예 18로부터의 데이터. hu10G5 (H1L1-글리맥스X(GLYMAXX)) 항체는 항-EGFR 치료적 항체 세툭시맙 (어비툭스(Erbitux))의 항-종양 효과와 유사한, 중간 정도의 항-종양 활성을 보였다. 두 항체를 조합한 결과, 이소형 대조군 처리된 동물과 비교하였을 때, 종양 성장은 유의적으로 저연되었다 (이원 ANOVA에 의해 측정된 바, $P < 0.0001$). hu10G5 (H1L1-글리맥스X) 또는 어비툭스 단독으로 처리된 군과 비교하였을 때에도 조합 효과는 유의적이었다 (이원 ANOVA에 의해 측정된 바, $P < 0.05$).

도 19

[0053] 인간화 항체 10G5 (c10G5)의 Ax1-양성 세포에의 용량-의존성 결합 (도 19a). 비아코어 센서 칩의 표면 상에 고정화된 rhAx1과 상호작용하는 인간화 항체의 동역학적 분석 (도 19b). 실험에 관한 상세한 설명은 실시예 19에서 제공된다.

도 20

[0055] 항체-사포린(Saporin) 접합체를 이용한 종양 세포 사멸. 키메라 10G5 및 2개의 인간화 10G5 변이체 비교. 실험에 관한 상세한 설명은 실시예 20에서 제공된다.

도 21

[0057] 비아코어 검정법에 의한, MAb c10G5 또는 제1 샘플로서 YW327.6S2-var 및 제2 샘플로서 MAb YW327.6S2-var 사이의 결합 경쟁을 보여주는 중첩 플롯 (도 21a).

[0058] 도 21b는 제1 샘플로서 YW327.6S2-var을 주사한 후, 이어서, 제2 샘플로서 MAbs YW327.6S2-var 또는 c10G5를 주사하였을 때의 경재 결과를 보여주는 것이다.

도 22

[0060] Gas6 또는 가교 결합 항체에 의한 Ax1 활성화가 Akt의 인산화를 유도한다. 키메라 1H12와의 가교 결합에 의한 Ax1 신호전달 자극이 재조합 Ax1 리간드 Gas6에 의한 자극보다 더욱 강력하게 Akt를 활성화시킨다 (a). mAb 1H12와의 가교 결합에 의한 Ax1 신호전달 자극은 BGB324로 억제될 수 있다 (b).

도 23

[0062] 항-Ax1 항체 10G5 및 YW327.6S2var에 의한 섬유증 마커의 억제. 각 막대 차트 x축에는 타이틀 마커의 상대적인 mRNA 발현이 기록되어 있다. y축에는 mRNA 정량화 이전에 LX2 세포와 함께 인큐베이션된 항체가 제시되어 있다: 1H12 = Ax1 자기인산화 및 활성화를 유도하는 클러스터링 항-Ax1 항체; 10G5 = 본원에 기술된 것과 같은 베르겐바이오(BerGenBio) 항-Ax1; YW327.6S2var = 본원에서 참조되는 것과 같은 제넨테크 항-Ax1.

도 24

[0064] 실시예 22에 기술된 바와 같이, 글리맥스X-c10G5로, 및 제넨테크로부터의 항-Ax1 인간 항체의 변이체 (YW327.6S2var)로 처리된 마우스에서의 개별 종양의 종양 성장을 보여주는 플롯.

[0065] -----

[0066] 본 개시내용은 기술된 사례 및 바람직한 특징의 조합이 분명하게 허용될 수 없거나, 또는 명백하게 회피되는 경우를 제외하고, 상기 조합을 포함한다.

[0067] 본원에서 사용된 색션의 표제들은 단지 조직화하기 위한 것이며, 기술된 주제를 제한하는 것으로 해석되지 않아야 한다.

[0068] 이제 본 개시내용의 사례 및 실시양태는 예로서 첨부된 도면을 참조로 하여 예시될 것이다. 추가 사례 및 실시양태는 당업자에게 자명할 것이다. 본 텍스트에서 언급된 모든 문헌은 본원에서 참조로 포함된다.

[0069] 하기 특허청구범위를 비롯한, 본 명세서 전역에 걸쳐, "포함하다(comprise)"라는 단어, 및 예컨대, "포함하다

(comprises)" 및 "포함하는(comprising)"이라는 과생어는 문맥상 달리 요구되지 않는 한, 임의의 다른 정수 또는 단계, 또는 정수들 또는 단계들의 군을 배제하는 것이 아니라, 언급된 정수 또는 단계, 또는 정수들 또는 단계들의 군을 포함하는 것을 암시하는 것으로 이해될 것이다.

[0070] 본 명세서 및 첨부된 특허청구범위에서 사용되는 바, 단수 형태 "하나"("a," "an") 및 "그"라는 것은 문맥상 달리 명백하게 명시되지 않는 한, 복수의 지시 대상을 포함한다. 범위는 본원에서 "약" 한 특정 값에서부터 및/또는 "약" 또 다른 특정 값까지로 표현될 수 있다. 상기와 같은 범위가 표현되었을 때, 또 다른 실시양태는 한 특정 값에서부터 및/또는 다른 특정 값까지를 포함한다. 유사하게, 값이 "약"이라는 선행사를 사용하여 근사치로 표현되었을 때, 특정 값은 또 다른 실시양태를 형성한다는 것을 이해할 것이다.

발명의 내용

본 발명의 개시내용

[0072] 본 발명은 Ax1 단백질에 결합하고, Ax1의 그의 리간드 Gas6에의 결합을 억제시키는 인간화 항체를 제공한다. 항체는 또한 바람직하게는 Ax1 발현을 하향조절하고/거나, Ax1 수용체 신호전달을 억제시키고/거나, 종양 성장을 억제시킨다.

[0073] 본원에서는 Ax1에 결합하고, Ax1의 그의 리간드 Gas6에의 결합을 억제시키는 상기 인간화 항체의 구체적인 2가지 예를 개시한다. 상기 항체는 본원에 개시된 GH1, GH2, GL1, 및 GL2 도메인으로부터 선택되는 가변 중쇄(VH) 및 가변 경쇄(VL) 도메인을 포함한다. 제2 실시양태에서, 항체는 GH2 및 GL1을 포함한다. 제3 실시양태에서, 항체는 GH1 및 GL2를 포함한다. 제4 실시양태에서, 항체는 GH2 및 GL2를 포함한다.

[0074] 바람직하게, 항체는 Ax1의 그의 리간드 Gas6에의 결합을 억제시킨다. 더욱더 바람직하게, 항체는 또한 Ax1 발현을 하향조절하고/거나, Ax1 수용체 신호전달을 억제시키고/거나, 종양 성장을 억제시킨다.

[0075] 본원에 기술된 항체와 동일한 CDR 및 결합 특이성을 가지는 항체가 WO2016/097370에 기술되어 있다. 그러나, 본원에 기술된 특이적인 VH 및 VL 서열을 포함하는 항체가 WO2016/097370에서 예시된 뮤린 및 키메라 항체 대비 개선된 특성을 가지는 것으로 밝혀졌다. 구체적으로, 본원에 기술된 항체는 이롭게는 WO2016/097370에서 예시된 뮤린 및 키메라 항체와 비교하였을 때, 증가된 결합 친화도 및 세포 사멸 활성을 가진다.

[0076] 본원에 개시된 항체와 WO2016/097370의 항체가 동일한 CDR 서열을 공유하는 바, 상기와 같은 개선된 특성을 놀라운 것이며, 존재할 경우, 뮤린 CDR의 그의 천연 프레임워크 밖으로 및 인간 프레임워크 내로의 전달이 항체의 결합 특성을 감소시키는 것이라고 예상할 수 있다.

[0077] 추가로, 본원에 개시된 인간화 10G5 항-Ax1 항체와 다수의 선행 기술의 항-Ax1 항체 비교를 통해 하기 이점을 비롯한, 인간화 10G5 항체의 다수의 이점이 강조된다:

[0078] · 10G5 항체는 신규한 Ax1 에피토프에 결합하며, 이를 통해 상기 항체는 선행 기술의 항체와 조합하여 사용할 수 있다는 점,

[0079] · 상기 언급된 바와 같이, 10G5는 Ax1의 그의 리간드 Gas6에의 결합을 억제시키고; 시험된 선행 기술의 항체 중 오직 YW327.6S2만이 상기 특성을 공유하였다는 점,

[0080] · Ax1 자기인산화 수준에 의해 측정된 바, 10G5와의 인큐베이션이 Ax1 활성화를 억제시키는데 반해; YW327.6S2 와의 인큐베이션은 Ax1 활성화 수준을 증가시킨다는 점,

[0081] · 섬유증성 질환 모델에서, 10G5와의 인큐베이션이 Ax1 활성화를 억제시킨데 반해; YW327.6S2var 항체와의 인큐베이션은 섬유증 마커의 발현 수준을 증가시켰다는 점,

[0082] · 10G5는 YW327.6S2보다 더 낮은 교차 반응성을 가지며 (YW327.6S2는 뮤린 Ax1과 교차 반응하는 반면, 10G5는 교차 반응하지 않는다); 이를 통해 생체내 모델에서 항체가 종양 대 숙주 세포에 대하여 미치는 효과를 분리시킬 수 있다는 점,

[0083] · 10G5는 뮤린 숙주 세포에 대해서는 어떤 영향도 미치지 않는다는 점에도 불구하고, 뮤린 이종이식편 암 모델에서 YW327.6S2와 유사한 효능을 보이고; 인간 대상체에서 10G5는 또한 추가의 치료 효과를 가지고, 숙주 세포를 표적화할 것이라는 점.

[0084] 상기 이점들은 하기에서 더욱 상세하게 논의되며, 실험에 관한 상세한 설명은 실시예 21 및 22에서 제공된다.

서열

[0086] 본원에서는 하기 서열을 개시한다 (전체 서열에 대해서는 하기의 '서열' 섹션을 참조한다):

[0087] 서열 번호 1 → 인간화 10G5 VH 도메인 GH1, 아미노산

[0088] 서열 번호 2 → 인간화 10G5 VH 도메인 GH2, 아미노산

[0089] 서열 번호 3 → 인간화 10G5 VL 도메인 GL1, 아미노산

[0090] 서열 번호 4 → 인간화 10G5 VL 도메인 GL2, 아미노산

[0091] 서열 번호 5 → 예시적인 중쇄 불변 영역, 아미노산

[0092] 서열 번호 6 → 10G5 GH1 중쇄, 아미노산

[0093] 서열 번호 7 → 10G5 GH2 중쇄, 아미노산

[0094] 서열 번호 8 → 중쇄 경쇄 불변 영역, 아미노산

[0095] 서열 번호 9 → 10G5 GL1 경쇄, 아미노산

[0096] 서열 번호 10 → 10G5 GL2 경쇄, 아미노산

[0097] 서열 번호 11 → 인간화 10G5 VH 도메인 GH1, 핵산

[0098] 서열 번호 12 → 인간화 10G5 VH 도메인 GH2, 핵산

[0099] 서열 번호 13 → 인간화 10G5 VL 도메인 GL1, 핵산

[0100] 서열 번호 14 → 인간화 10G5 VL 도메인 GL2, 핵산

[0101] 서열 번호 15 → 예시적인 중쇄 불변 영역, 핵산

[0102] 서열 번호 16 → 10G5 GH1 중쇄, 핵산

[0103] 서열 번호 17 → 10G5 GH2 중쇄, 핵산

[0104] 서열 번호 18 → 중쇄 경쇄 불변 영역, 핵산

[0105] 서열 번호 19 → 10G5 GL1 경쇄, 핵산

[0106] 서열 번호 20 → 10G5 GL2 경쇄, 핵산

[0107] 서열 번호 21 → 인간 Ax1 코딩 아미노산 서열

[0108] 서열 번호 22 → 뮤린 Ax1 코딩 아미노산 서열

[0109] 서열 번호 23 → 인간 Tyro3 코딩 아미노산 서열

[0110] 서열 번호 24 → 인간 Mer 코딩 아미노산 서열

[0111] 서열 번호 25 → 인간 Akt3 코딩 아미노산 서열

[0112] 서열 번호 26 → 인간 Gas6 코딩 아미노산 서열

[0113] 서열 번호 27 → '시노-Ax1' 코딩 아미노산 서열

[0114] 서열 번호 28 → 뮤린 10G5 VH 도메인

[0115] 서열 번호 29 → 뮤린 10G5 VL 도메인

[0116] 서열 번호 30 → 10G5 VH CDR1

[0117] 서열 번호 31 → 10G5 VH CDR2

[0118] 서열 번호 32 → 10G5 VH CDR3

[0119] 서열 번호 33 → 10G5 VL CDR1

[0120] 서열 번호 34 → 10G5 VL CDR2

- [0121] 서열 번호 35 → 10G5 VL CDR3.
-
- [0122]
- [0123] 본 발명의 한 측면에서, Ax1에 결합하고,
- [0124] 인간화 10G5 VH 도메인 GH1 (서열 번호 1), 인간화 10G5 VH 도메인 GH2 (서열 번호 2), 및 서열 번호 32의 아미노산 서열을 가지는 VH CDR3 및 임의적으로, 서열 번호 31 및 서열 번호 30으로부터 선택되는 아미노산 서열을 가지는 하나 이상의 VH CDR을 포함하는 VH 도메인으로 이루어진 군으로부터 선택되는 항체 VH 도메인; 및/또는
- [0125] 인간화 10G5 VL 도메인 GL1 (서열 번호 3), 인간화 10G5 VL 도메인 GL2 (서열 번호 4), 및 서열 번호 33, 서열 번호 34 및 서열 번호 35로부터 선택되는 아미노산 서열을 가지는 하나 이상의 VL CDR을 포함하는 VL 도메인으로 이루어진 군으로부터 선택되는 항체 VL 도메인을 포함하는 항체를 제공한다.
- [0126] 예를 들어, 항체는 서열 번호 30, 서열 번호 31 및 서열 번호 32의 아미노산 서열을 가지는 VH CDR을 포함하는 항체 VH 도메인을 포함할 수 있다. 항체는 서열 번호 33, 서열 번호 34 및 서열 번호 35의 아미노산 서열을 가지는 VL CDR을 포함하는 항체 VL 도메인을 추가로 포함할 수 있다.
- [0127] 일부 실시양태에서, 항체는 (i) 서열 번호 30, 서열 번호 31 및 서열 번호 32의 아미노산 서열을 가지는 VH CDR을 포함하는 항체 VH 도메인, 및 (ii) 서열 번호 33, 서열 번호 34 및 서열 번호 35의 아미노산 서열을 가지는 VL CDR을 포함하는 항체 VL 도메인을 포함한다.
- [0128] 한 측면에서, 본 발명은 Ax1에 결합하고, 10G5 VH (GH1) 도메인 (서열 번호 1) 또는 10G5 VH (GH2) 도메인 (서열 번호 2)을 포함하는, 단리된 항체를 제공한다. 바람직하게, 결합된 Ax1은 인간 Ax1이다.
- [0129] 일부 실시양태에서, VH (GH1) 도메인 (서열 번호 1) 또는 10G5 VH (GH2) 도메인 (서열 번호 2)은 10G5 VL (GL1) 도메인 (서열 번호 3)과 쌍을 형성하고, 이로써, 10G5 VH 및 VL 도메인을 포함하는 항체 항원 결합 부위가 형성된다.
- [0130] 일부 실시양태에서, VH (GH1) 도메인 (서열 번호 1) 또는 10G5 VH (GH2) 도메인 (서열 번호 2)은 10G5 VL (GL2) 도메인 (서열 번호 4)과 쌍을 형성하고, 이로써, 10G5 VH 및 VL 도메인을 포함하는 항체 항원 결합 부위가 형성된다.
- [0131] 일부 실시양태에서, 항체는 VH (GH1) 도메인 (서열 번호 1) 및 10G5 VL (GL1) 도메인 (서열 번호 3)을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체는 VH (GH1) 도메인 (서열 번호 1) 및 10G5 VL (GL2) 도메인 (서열 번호 4)을 포함한다.
- [0132] 바람직한 실시양태에서, 항체는 VH (GH2) 도메인 (서열 번호 2) 및 10G5 VL (GL1) 도메인 (서열 번호 3)을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체는 VH (GH2) 도메인 (서열 번호 2) 및 10G5 VL (GL2) 도메인 (서열 번호 4)을 포함한다.
- [0133] 다른 실시양태에서, 10G5 VH (GH1) 도메인 (서열 번호 1) 또는 10G5 VH (GH2) 도메인 (서열 번호 2)은 10G5 VL 이외의 다른 VL 도메인과 쌍을 형성하고; 경쇄의 무차별적 혼합(promiscuity)은 당업계에 널리 확립되어 있다.
- [0134] 일부 실시양태에서, 항체는 중쇄 불변 영역을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 중쇄 불변 영역은 서열 번호 5에 기재된 서열을 가진다.
- [0135] 따라서, 일부 실시양태에서, 본 발명은 Ax1에 결합하고, 10G5 GH1 중쇄 (서열 번호 6) 또는 10G5 GH2 중쇄 (서열 번호 7)를 포함하는 단리된 항체를 제공한다.
- [0136] 일부 실시양태에서, 항체는 경쇄 불변 영역을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 경쇄 불변 영역은 서열 번호 8에 기재된 서열을 가진다.
- [0137] 따라서, 일부 실시양태에서, 본 발명은 Ax1에 결합하고, 10G5 GL1 경쇄 (서열 번호 9) 또는 10G5 GL2 경쇄 (서열 번호 10)를 포함하는 단리된 항체를 제공한다.
- [0138] 일부 실시양태에서, 10G5 GH1 중쇄 (서열 번호 6) 또는 10G5 GH2 중쇄 (서열 번호 7)는 10G5 GL1 경쇄 (서열 번호 9)와 쌍을 형성하고, 이로써, 10G5 VH 및 VL 도메인을 포함하는 항체 항원 결합 부위가 형성된다.
- [0139] 일부 실시양태에서, 10G5 GH1 중쇄 (서열 번호 6) 또는 10G5 GH2 중쇄 (서열 번호 7)는 10G5 GL2 경쇄 (서열

번호 10)와 쌍을 형성하고, 이로써, 10G5 VH 및 VL 도메인을 포함하는 항체 항원 결합 부위가 형성된다.

[0140] 바람직한 실시양태에서, 항체는 10G5 GH2 중쇄 (서열 번호 7) 및 10G5 GL1 경쇄 (서열 번호 9)를 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 항체는 10G5 GH2 중쇄 (서열 번호 7) 및 10G5 GL2 경쇄 (서열 번호 10)를 포함한다.

[0141] 일부 실시양태에서, 항체는 10G5 GH1 중쇄 (서열 번호 6) 및 10G5 GL1 경쇄 (서열 번호 9)를 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 항체는 10G5 GH1 중쇄 (서열 번호 6) 및 10G5 GL2 경쇄 (서열 번호 10)를 포함한다.

[0142] 바람직하게, 항체는 10G5 VH 도메인 (서열 번호 12) 및 10G5 VL 도메인 (서열 번호 13)을 포함하는 항체의 Ax1 결합 도메인과 인간 Ax1에의 결합에 대하여 경쟁한다.

[0143] 바람직하게, 항체는 WO2016/097370에 기술된 바와 같이, 하이브리도마 WR-10G5-E5로부터 수득될 수 있는 항체가 결합하는 에피토프에 결합한다.

[0144] 바람직하게, 항체는 Ax1의 그의 리간드 Gas6에의 결합을 억제시킨다. 더욱더 바람직하게, 항체는 또한 Ax1 발현을 하향조절하고/거나, Ax1 수용체 신호전달을 억제시키고/거나, 종양 성장을 억제시킨다.

[0145] 항체 서열 이외에도, 본 발명에 따른 항체는 예컨대, 웨პ티드 또는 폴리웨პ티드, 예컨대, 폴딩된 도메인을 형성하거나, 또는 상기 분자에 항원에 결합할 수 있는 능력 이외의 또 다른 기능적 특징을 부여하는 다른 아미노산을 포함할 수 있다.

[0146] 본 발명의 항체는 검출가능한 표지를 보유할 수 있거나, 또는 (예컨대, 웨პти딜 결합 또는 링커를 통해) 독소 (예컨대, 세포독소), 효소, 또는 유기 모이어티에 접합될 수 있다.

[0147] 당업자는 분자를 단백질에 화학적으로 접합시키는 다수의 접근법을 알고 있다. 본 발명의 한 실시양태에서, 항체는 검출가능한, 형광 표지, 예컨대, 플루오레세인 이소티오시아네이트 (FITC)에, 또는 리포터 효소, 예컨대, 호스래디쉬 페옥시다제 (HRP)에 접합될 수 있다.

[0148] 바람직한 실시양태에서, 항체는 세포독성 약물에 접합되어 항체-약물 접합체 (ADC)를 형성한다. 항체가 제약 용도인 경우, 항체와 약물을 연결하는 결합은 바람직하게 순환 (예를 들어, 혈중 순환)에서는 안정적이지만, 일단 접합체가 세포내에서 분리되고 나면 불안정하다. 따라서, 면역접합체로서 접합된 항체는 예를 들어, 암 치료 방법에서 사용될 수 있다.

[0149] 추가 측면에서, 본 발명은 본 발명에 따른 항체, VH 도메인 및/또는 VL 도메인을 코딩하는 서열을 포함하는 단리된 핵산, 및 상기 항체, VH 도메인 및/또는 VL 도메인의 제조를 위한 조건하에서 상기 핵산을 발현시키는 단계, 및 그를 회수하는 단계를 포함하는, 본 발명에 따른 항체, VH 도메인 및/또는 VL 도메인을 제조하는 방법을 제공한다.

[0150] 본 발명에 따른 항체는 인체 또는 동물의 신체의 치료 또는 진단 방법, 예컨대, 인간 환자에게 유효량의 본 발명의 항체, 또는 그의 접합체, 또는 약물-접합체를 투여하는 단계를 포함하는, 상기 환자에서 질환 또는 장애를 치료하는 방법 (이는 예방적 치료를 포함할 수 있다)에서 사용될 수 있다. 본 발명에 따라 치료될 수 있는 병태로는 본원 다른 곳에서 논의되는 것을 포함한다.

[0151] 본 발명에 따른 항체는 예를 들어, 항체가 결합하는 세포의 존재 또는 그의 위치를 측정하기 위해 영상화 방법에서 사용될 수 있다.

[0152] 추가 측면에서, 본 발명은 본 발명에 따른 항체, 및 항체의 항원에의 결합을 측정하는 하나 이상의 시약을 포함하는 진단용 키트를 제공한다.

[0153] 본 발명의 추가 측면은 본원에 개시된 항체 VH 가변 도메인 (서열 번호 1), 항체 VH 가변 도메인 (서열 번호 2), 항체 VL 가변 도메인 (서열 번호 3), 및/또는 항체 VL 가변 도메인 (서열 번호 4)를 코딩하는 핵산, 일반적으로 단리된 핵산을 제공한다. 상기 핵산의 예는 본 명세서 8 내지 9페이지 (상기 참조)에 걸쳐 제시된 서열식별자 설명부에 기재되어 있는 바와 같이, 본원에 개시되어 있다. 예를 들어, 서열 번호 11에 기재된 서열을 가지는 핵산은 서열 번호 1에 기재된 서열을 가지는 항체 VH 가변 도메인을 코딩하고; 서열 번호 12에 기재된 서열을 가지는 핵산은 서열 번호 2에 기재된 서열을 가지는 항체 VH 가변 도메인을 코딩하고; 그 다음 번호에 대해서도 계속 그려하다.

[0154] 추가 측면은 본 발명의 핵산으로 형질전환된 숙주 세포를 제공한다.

[0155] 다른 추가 측면은 코딩 핵산으로부터 발현될 수 있도록 하는 단계를 포함하는, 항체 VH 가변 도메인을 제조하는

방법을 제공한다. 상기 방법은 상기 항체 VH 가변 도메인의 제조를 위한 조건하에서 숙주 세포를 배양하는 단계를 포함할 수 있다.

[0156] VL 가변 도메인, 및 VH 및/또는 VL 도메인을 포함하는 항체를 제조하는 유사한 방법을 본 발명의 추가 측면으로서 제공한다.

[0157] 제조 방법은 생성물의 단리 및/또는 정제 단계를 포함할 수 있다.

[0158] 제조 방법은 생성물을, 1종 이상의 추가 성분, 예컨대, 제약상 허용되는 부형제를 포함하는 조성물로 제제화하는 단계를 포함할 수 있다.

[0159] 본 발명의 상기 측면 및 다른 측면은 하기에서 추가로 상세하게 기술된다. -----

인간화 10G5 항체의 특성

Ax1에 대한 고친화도

[0160] 본원에 기술된 인간화 10G5 항체는 고친화도로 인간 Ax1에 결합한다. 표 3에 제시된 바와 같이, 인간화 항체 H1L1은 서열 번호 12의 VH 및 서열 번호 13의 VL을 포함하는 키메라 항체보다 적어도 30% 더 낮은 K_D 를 가진다. 유사하게, 인간화 항체 H2L1은 서열 번호 12의 VH 및 서열 번호 13의 VL을 포함하는 키메라 항체보다 적어도 50% 더 낮은 K_D 를 가진다.

[0161] 따라서, 본원에 기술된 인간화 10G5 항체 및 그의 변이체는 고친화도로 인간 Ax1에 결합하고; 바람직하게, 인간 Ax1은 고친화도로 결합된다. 일부 실시양태에서, 항체는 서열 번호 12의 VH 및 서열 번호 13의 VL을 포함하는 키메라 항체보다 적어도 15% 더 낮은, 예컨대, 서열 번호 12의 VH 및 서열 번호 13의 VL을 포함하는 키메라 항체보다 적어도 20%, 적어도 25%, 적어도 30%, 적어도 35%, 적어도 40%, 적어도 45%, 또는 적어도 50% 더 낮은 K_D 로 Ax1 (또는 인간 Ax1)에 결합한다. 일부 실시양태에서, 항체는 10^{-6} M 이하, 예컨대, 5×10^{-7} M 이하, 10^{-7} M 이하, 5×10^{-8} M 이하, 10^{-8} M 이하, 5×10^{-9} M 이하, 10^{-9} M 이하, 6×10^{-10} M 이하, 5×10^{-10} M 이하, 1.1×10^{-10} M 이하, 10^{-10} M 이하, 5×10^{-11} M 이하, 10^{-11} M 이하, 5×10^{-12} M 이하, 6×10^{-12} M 이하, 10^{-12} M 이하, 5×10^{-13} M 이하, 10^{-13} M 이하, 5×10^{-14} M 이하, 10^{-14} M 이하, 5×10^{-15} M 이하, 또는 10^{-15} M 이하인 K_D 로 Ax1 (또는 인간 Ax1)에 결합한다.

[0162] 일부 실시양태에서, 항체는 10^{-8} M 내지 10^{-10} M, 10^{-10} M 내지 10^{-12} , 10^{-12} M 내지 10^{-14} , 또는 10^{-14} M 내지 10^{-16} 인 K_D 로 Ax1 (또는 인간 Ax1)에 결합한다.

[0163] K_D 는 실시예 19에 기술된 바와 같이 측정 및 계산될 수 있다.

높은 세포 사멸 활성

[0164] 본원에 기술된 인간화 10G5 항체는 그의 낮은 EC₅₀ 값에 의해 입증되는 바와 같이, 높은 세포 활성을 가진다. 표 4에 제시된 바와 같이, 인간화 항체 H1L1은 서열 번호 12의 VH 및 서열 번호 13의 VL을 포함하는 키메라 항체보다 적어도 35% 더 낮은 EC₅₀을 가진다. 유사하게, 인간화 항체 H2L1은 서열 번호 12의 VH 및 서열 번호 13의 VL을 포함하는 키메라 항체보다 적어도 50% 더 낮은 EC₅₀을 가진다.

[0165] 따라서, 본원에 기술된 인간화 10G5 항체 및 그의 변이체는 고친화도로 인간 Ax1에 결합하고; 바람직하게, 인간 Ax1은 고친화도로 결합된다. 일부 실시양태에서, 항체는 서열 번호 12의 VH 및 서열 번호 13의 VL을 포함하는 키메라 항체보다 적어도 15% 더 낮은, 예컨대, 서열 번호 12의 VH 및 서열 번호 13의 VL을 포함하는 키메라 항체보다 적어도 20%, 적어도 25%, 적어도 30%, 적어도 35%, 적어도 40%, 적어도 45%, 또는 적어도 50% 더 낮은 EC₅₀을 가진다.

[0166] EC₅₀은 실시예 20에 기술된 바와 같이 측정 및 계산될 수 있다.

특이적 결합

- [0171] 일반적으로, '특이적' 및 '특이적으로 결합한다'라는 용어는 항체가 그의 특이적 결합 파트너(들) 이외의 다른 분자에는 어떤 유의적인 결합도 보이지 않는 상황을 의미하는 것으로 사용될 수 있다. 예를 들어, 인간 Ax1에 '특이적으로 결합'하는 항체는 뮤린 Ax1에 대해서는 어떤 유의적인 결합도 보이지 않을 것이다.
- [0172] 상기 용어는 또한 예컨대, 에피토프에 '특이적으로 결합'하는 항체가 인식된 에피토프를 보유하는 다양한 항원 모두에 결합할 수 있는 경우, 항체가 다수의 항원이 보유하는 특정 에피토프에 대해 특이적일 때에도 적용될 수 있다.
- [0173] 전형적으로, 특이성은 결합 검정법, 예컨대, 항원 패널을 이용하는 ELISA에 의해 측정될 수 있다.
- [0174] 본원에 기술된 10G5 항체는 고특이성으로 인간 Ax1에 결합한다. 즉, 10G5 항체는 인간 Ax1에 '특이적으로 결합 한다.' 이는
- [0175] (1) 실시예 2에서, 10G5은 인간 TAM 수용체 티로신 카나제 패밀리의 다른 구성원인, hMer 및 hTyro3으로부터 유래된 재조합 항원에는 어떤 유의적인 결합도 보이지 않고;
- [0176] (2) 실시예 3에서, 10G5는 인간 Ax1에는 강력하게 결합하지만, 뮤린 Ax1에의 결합은 보이지 않고 (이는 뮤린 및 인간 Ax1, 둘 모두에 강력하게 결합할 뿐만 아니라, (더욱 약하게) 인간 Tyro3에 결합하는 뮤린 Ax1 리간드인 뮤린 Gas 6과는 대조를 이룬다);
- [0177] (3) 실시예 4에서, 10G5는 시노몰구스 원숭이 (*마카카 파시콜라리스*(*Macaca fascicularis*))로부터의 Ax1에 강력하게 결합하는 것으로 제시된 바와 같이, 실시예에서 입증된다.
- [0178] 이러한 특이성을 통해 이롭게는 생체내 모델에서 뮤린 이종이식편에서 항체가 인간 종양 세포 대 뮤린 숙주 세포에 미치는 효과를 분리시킬 수 있다.
- [0179] 따라서, 본원에 기술된 항체는 바람직하게 영장류 Ax1에 특이적으로 결합한다. 일부 실시양태에서, 본원에 기술된 항체는 인간 및 원숭이 (예컨대, 마카카 파시콜라리스) Ax1에 특이적으로 결합한다. 한 실시양태에서, 항체는 오직 인간 Ax1에만 특이적으로 결합한다.
- [0180] 본 발명의 일부 실시양태에서, 본원에 기술된 항체는 인간 Tyro3 및/또는 인간 Mer에 어떤 유의적인 결합도 보이지 않는다. 일부 실시양태에서, 본원에 기술된 항체는 뮤린 Ax1에 어떤 유의적인 결합도 보이지 않는다. 일부 실시양태에서, 본원에 기술된 항체는 인간 Tyro3, 인간 Mer, 또는 뮤린 Ax1 중 임의의 것에 어떤 유의적인 결합도 보이지 않는다.
- [0181] 항체가 항원에 대하여 '어떤 유의적인 결합도 보이지 않는 것'에 관한 여부는 예를 들어, 실시예 2 및 3에 기술된 기법을 사용하여 당업자에 의해 쉽게 측정될 수 있다. 일부 실시양태에서, 항체가 10^{-3} M 초과, 예컨대, 10^{-2} M 초과, 10^{-1} M 초과, 또는 1 M 초과의 K_D 로 특정 항원에 결합한다면, 항체는 상기 항원에 '어떤 유의적인 결합도 보이지 않는 것'으로 간주된다. K_D 는 실시예 5에 기술된 바와 같이 측정 및 계산될 수 있다.
- [0182] Ax1/Gas6 결합 억제
- [0183] 본원에 기술된 10G5 항체는 Ax1이 그의 리간드 Gas6에 결합하는 것을 억제시킨다.
- [0184] 도 5는 실시예 6에 기술된 경쟁적 결합 검정법의 결과를 보여주는 것이다. 본 결과는 10G5로 포화된 고정화된 rhAx1에는 추후 첨가된 10G5, rhGas6 (rhAx1의 공지된 리간드), 또는 rmGas6 어느 것도 결합할 수 없다는 것을 나타낸다. 이는 10G5 및 Gas6이 결합하는 Ax1 분자의 영역이 서로 매우 인접해 있다는 것을 시사한다. 그에 반해, 10G5의 결합은 MAB154 항-Ax1 항체의 결합을 억제시키지 못했는데, 이는 10G5 및 MAB154가 Ax1 분자의 별개의 부분에 결합한다는 것을 시사하는 것이다.
- [0185] 따라서, 바람직한 실시양태에서, 본원에 기술된 항체는 Ax1의 Gas6에의 결합 (예를 들어, rhAx1의 rhGas6에의 결합)을 억제시킨다. 즉, 바람직하게, 본원에 기술된 항체는 인간 Ax1에의 결합에 대하여 인간 Gas6과 경쟁한다. 가장 바람직하게, Ax1/Gas 6 결합이 억제되면, 항체로 포화된 Ax1 샘플에 대한 Gas6의 유의적인 결합은 관찰될 수 없다 (예를 들어, 앞서 항체에 노출되지 않았던 Ax1 샘플에 대하여 관찰되는 결합의 1% 이하). Gas 6 결합 억제는 실시예 6에 기술된 경쟁적 결합 검정법을 사용하여 사정될 수 있다.
- [0186] Ax1 수용체 발현 억제

- [0187] 본 발명의 항체는 Ax1의 발현을 유의적으로 감소시킨다.
- [0188] 도 8은, MBA-MD-231 세포를 다양한 항체 중 하나와 함께 밤새도록 인큐베이션시킨 후, Ax1 발현에 대하여 시험하는 것인, 실시예 9에 기술된 웨스턴 블로트 분석의 결과를 보여주는 것이다. 본 결과는 10G5와의 인큐베이션이 세포에 존재하는 Ax1 수용체 단백질의 양을 유의적으로 감소시켰다는 것을 나타내며, 이는 10G5 항체의 결합이 Ax1 수용체의 발현을 하향조절시킨다는 것을 시사하는 것이다.
- [0189] 따라서, 바람직한 실시양태에서, 본 발명의 항체는 Ax1 수용체의 발현을 하향조절시킨다.
- [0190] 일부 실시양태에서, 본 발명의 항체는 Ax1 수용체 발현을, 항체와 접촉하지 않은, 다른 것은 동일하게 처리된 샘플에서 관찰되는 수준의 80% 미만으로 감소시킨다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 항체는 Ax1 수용체 발현을, 항체와 접촉하지 않은, 다른 것은 동일하게 처리된 샘플에서 관찰되는 수준의 70% 미만, 60% 미만, 50% 미만, 40% 미만, 30% 미만, 20% 미만, 또는 10% 미만으로 감소시킨다. Ax1 수용체 발현 수준은 실시예 9에 기술된 검정법을 사용하여 사정될 수 있고; 웨스턴 블로트 상의 밴드를 정확하게 정량화하는 방법은 다수가 당업계에 공지되어 있으며 - 예를 들어, 문헌 [Taylor et al. Mol Biotechnol. 2013; 55(3): 217-226]을 참조할 수 있다.
- [0191] 일부 실시양태에서, Ax1 수용체 발현은 신속하게 하향조절되고; 예를 들어, 일부 실시양태에서, Ax1 수용체 발현이, 항체와 접촉하지 않은, 다른 것은 동일하게 처리된 샘플에서 관찰되는 수준의 80% 미만으로 감소되는 것은 샘플을 항체와 접촉시킨 후 12시간 이내에, 예를 들어, 샘플을 항체와 접촉시킨 후 12시간 이내, 6시간 이내, 3시간 이내, 또는 1시간 이내에 관찰된다.
- [0192] 일부 실시양태에서, 항체는 Ax1 수용체 발현을 지속적으로 하향조절시킨다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 항체와 접촉된 샘플에서의 Ax1 수용체 발현 수준은 항체와 접촉하지 않은, 다른 것은 동일하게 처리된 샘플에서 관찰되는 수준의 50% 미만으로 샘플과 항체의 접촉 후 적어도 6시간 동안, 예컨대, 적어도 12시간, 적어도 24시간, 적어도 48시간, 또는 적어도 96시간 동안 유지된다.
- [0193] 이론으로 제한하고자 하지 않으면서, 관찰되는 Ax1 발현 하향조절은 세포에 의해 내재되고, 분해되는 항체/Ax1 수용체 복합체에 의해 유발되는 것으로 여겨진다. 항체, 또는 항체에 연결된 분자를 표적 세포 내로 도입시키는 것이 바람직한 적용인 경우, 항체의 내재화(internalization)는 매우 유익하다. 예를 들어, 표적이 암성 세포이고, 항체가 세포독성 약물에 연결된 경우에 그러하다.
- [0194] 따라서, 바람직한 실시양태에서, 본 발명의 항체는 Ax1 수용체 내재화율을 증가시킨다.
- [0195] 일부 실시양태에서, 본 발명의 항체는 Ax1 수용체 내재화율을, 항체와 접촉하지 않은, 다른 것은 동일하게 처리된 샘플에서 관찰되는 수준의 적어도 110%까지 증가시킨다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 항체는 Ax1 수용체 내재화율을, 항체와 접촉하지 않은, 다른 것은 동일하게 처리된 샘플에서 관찰되는 수준의 적어도 120%, 적어도 130%, 적어도 140%, 적어도 150%, 적어도 160%, 적어도 170%, 적어도 180%, 적어도 190%, 적어도 200%, 적어도 500%, 적어도 1000%까지 증가시킨다.
- [0196] Ax1 수용체 내재화 수준은 당업계에 공지된 수용체 내재화 검정법 중 어느 하나; 예를 들어, 문헌 [Koenig et al. Methods in Molecular Biology Volume 259, 2004, pp 249-273]에 기술된 방법을 사용하여 사정될 수 있다.
- [0197] Ax1 활성화 억제
- [0198] 본 발명의 항체는 Ax1 자기인산화 수준에 의해 사정되는 바와 같이, Ax1 활성화를 유의적으로 감소시킨다.
- [0199] 실시예 22는 H2L1 제제 또는 BGB324의 존재하에서 Gas6으로 자극을 받은 세포로부터의 용해물은 Gas6으로 자극을 받은 대조군 세포의 것 (0.077)보다 유의적으로 더 낮은 pAXL 판독값 (0.040, 0.055, 0.045)을 나타내었고; H2L1-에비트리아(Evitria) 및 BGB324는 특히 낮았고, 판독값은 영양을 공급받지 않은 고갈된(starved) 대조군과 유사하였다 (0.44)는 것을 보여주는 것이다.
- [0200] 그에 반해, pAx1 결과는 YW327.6S2var 항체가 Ax1 자기인산화를 강력하게 활성화시키고, YW327.6S2var은 단독으로 Gas6으로 자극을 받은 대조군 세포 (0.077)보다 더 높은 pAx1 판독값인 0.092를 보였다는 것을 나타낸다.
- [0201] 따라서, 바람직한 실시양태에서, 본 발명의 항체는 Gas6에 의한 자극 후, Ax1 자기인산화를 억제시킨다. 항체 와의 인큐베이션 후 Gas6 자극으로부터 생성되는 Ax1 자기인산화 수준은 Gas6 자극 이전의 항-Ax1 항체와 인큐베이션되지 않은 대조군 수준의 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85% 이하, 또는 90% 이하일 수 있다.

Ax1 자기인산화 수준은 실시예 22에 기술된 바와 같이 사정될 수 있다.

Ax1 수용체 신호전달 억제

본 발명의 항체는 (1) Ax1 수용체의 친연 리간드, 예컨대, Gas6에의 결합을 억제시키고, (2) Ax1 수용체의 발현을 하향조절시킨다는 관찰 결과와 일관되게, 본 발명의 항체는 Ax1 수용체 하류의, 리간드 유도된 신호전달을 억제시킨다. 이는 도 9에서 입증되며, 여기서, 10G5 항체 존재가 Ax1 리간드 Gas6 첨가시 Akt의 세린 473이 인산화되는 정도를 유의적으로 감소시킨다는 것을 알 수 있다.

따라서, 바람직한 실시양태에서 본 발명의 항체는 Ax1 활성을 억제시킨다. 억제된 활성은 구성적 Ax1 활성일 수 있다.

일부 실시양태에서, 본 발명의 항체는 Ax1 하류 신호전달, 예를 들어, 세린 473에서의 Akt의 인산화를 억제시킨다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 항체와 접촉된 샘플에서 세린 473에서의 Akt의 인산화는 항체와 접촉하지 않은, 다른 것은 동일하게 처리된 샘플에서 관찰되는 수준의 80% 미만이다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 항체와 접촉된 샘플에서 세린 473에서의 Akt의 인산화는 항체와 접촉하지 않은, 다른 것은 동일하게 처리된 샘플에서 관찰되는 수준의 70% 미만, 60% 미만, 50% 미만, 40% 미만, 30% 미만, 20% 미만, 또는 10% 미만이다. 세린 473에서의 Akt의 인산화 수준은 실시예 10에 기술된 검정법을 사용하여 사정될 수 있고; 웨스턴 블로트 상의 밴드를 정확하게 정량화하는 방법은 다수가 당업계에 공지되어 있으며 - 예를 들어, 문헌 [Taylor et al. Mol Biotechnol. 2013; 55(3): 217-226]을 참조할 수 있다.

Ax1 수용체 신호전달을 억제시킴으로써, 본 발명의 항체는 또한 Ax1-수용체 신호전달이 중요한 역할을 하는 다양한 프로세스에 영향을 줄 것으로 예상된다.

예를 들어, Ax1-수용체 신호전달은 Gas6 의존적 세포 증식을 자극시키고, 세포 사멸을 억제시키며, 이로써, 종양 성장을 지지하는 것으로 알려져 있다. Ax1-수용체 신호전달은 상피-간엽 이행 (EMT)을 자극시킴으로써 종양 전이를 촉진시킨다는 것 또한 알려져 있다.

따라서, 일부 실시양태에서, 본 발명의 항체는 예를 들어, 아폽토시스에 의해 세포 사멸을 촉진시킨다. 바람직하게, 세포는 종양 세포, 예컨대, 순환 종양 세포 또는 전이성 세포이다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 본 발명의 항체는 사멸률을, 항체와 접촉하지 않은, 다른 것은 동일하게 처리된 샘플에서 관찰되는 수준의 적어도 110%까지 증가시킨다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 항체는 사멸률을, 항체와 접촉하지 않은, 다른 것은 동일하게 처리된 샘플에서 관찰되는 수준의 적어도 120%, 적어도 130%, 적어도 140%, 적어도 150%, 적어도 160%, 적어도 170%, 적어도 180%, 적어도 190%, 적어도 200%, 적어도 500%, 적어도 1000%까지 증가시킨다. 사멸률은 예를 들어 BrdU 혼입 검정법, MTT, [³H]-티미딘 혼입 (예컨대, 탑카운트(TopCount) 검정법 (퍼킨엘머 (PerkinElmer))), 세포 생존능 검정법 (예컨대, 셀타이터-글로(CellTiter-Glo) (프로메가(Promega))), DNA 단편화 검정법, 카스파제 활성화 검정법, 트리판 블루 배제, 크로마틴 형태 검정법 등에 의해 측정된다.

일부 실시양태에서, 본 발명의 항체는 Ax1 하류 신호전달을 억제시킨다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 항체는 의존적 세포 증식을 억제시킨다.

일부 실시양태에서, 본 발명의 항체는 종양-연관된 대식세포로부터의 염증성 시토카인 발현을 억제시킨다.

섬유증성 장애 억제

Ax1 활성화, 발현, 및 수용체 신호전달을 감소시키는 데 있어서의 10G5의 입증된 특성과 일관되게, 10G5는 또한 섬유증성 질환 모델에서 염증성 및 섬유증 마커의 발현을 감소시키는 것으로도 입증되었다.

10G5가 YW327.6S2와 비교된 실시예 22에서 입증된 바와 같이, 섬유증 마커에 미치는 유익한 효과는 항-Ax1 항체의 일반적인 특징이 아니며, 다른 항-Ax1 항체는 Gas6의 Ax1에의 결합을 억제시키는 것으로 밝혀졌다.

실시예 22에서, Ax1 활성화 이전에 10G5로 처리된 세포는 일관되게 4개의 검정된 마커 모두에 대하여 자극을 받지 않은 대조군 세포와 유사한 발현 수준을 보였다. 그에 반해, YW327.6S2var 항체로 전처리한 후, Ax1 자극 후, 4개의 검정된 마커 모두에 대하여 발현 수준이 상승된 것이 관찰되었다.

따라서, 바람직한 실시양태에서, 본 발명의 항체는 섬유증성 장애 치료에 사용된다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 항체는 섬유증 마커, 예컨대, 알파-SMA, Col1A1, MCP1 및/또는 TGF-베타의 발현을 억제시키거나, 또는 감소시킨다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 항체는 섬유증 마커 알파-SMA, Col1A1, MCP1 및 TGF-베타의 발현을

억제시키거나, 또는 감소시킨다.

[0216] 종양 성장 억제

[0217] 종양 성장에서 Ax1 및 the EMT 경로의 역할과 일관되게, 본 발명의 항체는 혈액학적 및 비-혈액학적 종양, 둘 모두의 성장을 감소시키고; 이는 실시예 14 및 15에 기술된 방법을 통해 수득되는 바와 같은, 도 14 및 15에 제시된 데이터에 의해 입증된다.

[0218] 추가로, 실시예 22에서는, YW327.6S2가 인간 종양 및 숙주 뮤린 세포, 둘 모두에 대하여 활성을 띠고, 10G5는 인간 종양 세포에 대해서만 오직 활성을 띠에도 불구하고, 키메라 10G5는 마우스 이종이식편 NSCLC 모델에서 YW327.6S2와 유사한 효능을 가지는 것으로 제시되어 있다.

[0219] 따라서, 바람직한 실시양태에서, 본 발명의 항체는 예를 들어, 종양 기질 기능을 조절함으로써 종양 성장 및/또는 전이를 억제시킨다.

[0220] 일부 실시양태에서, 본 발명의 항체는 대조군 종양과 비교하여 종양 성장을 적어도 10%만큼 억제시킨다. 즉, 항체로 처리된 종양의 부피는 대조군 종양 부피의 90% 이하이다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 본 발명의 항체는 대조군 종양과 비교하여 종양 성장을 적어도 20%, 예컨대, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 또는 90%만큼 억제시킨다.

[0221] 일부 실시양태에서, 항체가 종양 성장에 미치는 효과는 실시예 14에 기술된 바와 같이 검정된다. 일부 실시양태에서, 항체가 종양 성장에 미치는 효과는 실시예 15에 기술된 바와 같이 검정된다.

[0222] 정의

[0223] 항체

[0224] 본 용어는 천연적인지, 또는 부분적으로 또는 전체적으로 합성적으로 제조되었는지에 상관없이, 면역글로불린을 기술한다. 본 용어는 또한 항체 항원-결합 도메인을 포함하는 임의의 폴리펩티드 또는 단백질을 포함한다. 항체 항원-결합 도메인을 포함하는 항체 단편은 전체 항체 (예를 들어, 정규 배열로 VH, CH1, CH2, CH3, VL, 및 CL 도메인을 포함하는 IgG 항체), 또는 표적 항원에 대한 그의 결합 활성을 보유하는, 전체 항체의 단편을 포함한다. 상기 단편은 Fv (단편 가변), Fab (단편 항체 결합) 및 F(ab')₂ 단편 뿐만 아니라, 단일 쇄 Fv 항체 (scFv), dsFv, 미니바디, 디아바디, 단일 쇄 디아바디, 탠덤(tandem) scFv, TandAb, 비-바디, 트리-바디, 카파(람다) 바디, BiTE, DVD-Ig, SIP, SMIP, 또는 DART를 포함한다. 추가로, 항체 및 그의 단편은 예를 들어, EP239400A에 기술된 바와 같은 인간화 항체일 수 있다. 예를 들어: 모노클로날 및 폴리클로날 항체, 재조합 항체, 항체의 단백질 분해 및 재조합 단편 (Fab, Fv, scFv, 디아바디), 단일-도메인 항체 (VHH, sdAb, 나노바디, IgNAR, VNAR), 및 항체-유사 특이 결합을 가지고 조작된, 항체와 관련이 없는 단백질 (항체 모방체), 예컨대, 제한하는 것은 아니지만, 하기와 같은 것이 있다:

명칭

근간:

에드넥틴(Adnectins)/모노바디 인간 피브로넥틴의

10번재 III형 도메인 (10Fn3), 10 kDa

어피바디(Affibodies)

단백질 A, Z 도메인, 6 kDa

어필린(Afilins)

인간 γ -크리스탈린/인간 유비퀴틴

(10-20 kDa)

어피틴(Affitins)

Sac7d (슬포로부스 액시도칼다리우스

(Sulfolobus acidocaldarius), 7 kDa

안티칼린(Anticalins)

리포칼린, 20 kDa

아비머(Avimers)

각종 막 수용체의 도메인, 9-18 kDa

DARPins

앙기린 반복 모티프, 14 kDa

에비바디(Evibody) 세포독성 T-림프구 항원 4 (CTLA-4), 15 kDa

피노머(Fynomers)

Fyn, SH3 도메인, 7 kDa

쿠니츠(Kunitz) 도메인 웨티드 각종 프로테아제 억제제, 6 kDa

[0225]

항체는 항체 중쇄 불변 영역 및/또는 항체 경쇄 불변 영역 모두 또는 그의 일부를 포함할 수 있다.

[0226]

원래의 항체의 특이성을 보유하는 조작된 항체 또는 키메라 분자를 제조하는 데 모노클로날 및 다른 항체를 취할 수 있고, 재조합 DNA 기술의 기법을 사용할 수 있다. 상기 기법은 항체의 면역글로불린 가변 영역, 또는 상보성 결정 영역 (CDR)을 코딩하는 DNA 단편을 다른 면역글로불린의 면역글로불린 불변 영역, 또는 불변 영역 + 프레임워크 영역을 코딩하는 유전자를 라이케이션시키는 것을 포함할 수 있다. 예를 들어, EP-A-184187, GB 2188638A 또는 EP-A-239400을 참조할 수 있다. 하이브리도마 또는 항체를 생산하는 다른 세포는, 제조되는 항체의 결합 특이성을 변경시키거나, 변경시키지 않는, 유전적 돌연변이화 또는 다른 변이의 대상이 될 수 있다.

[0227]

항체는 다수의 방식으로 변형될 수 있는 바, "항체 분자"라는 용어는 원하는 특이성을 가진 항체-유래의 항원 결합 도메인을 가진 임의의 폴리펩티드 또는 다른 분자를 포괄하는 것으로서 해석되어야 한다. 따라서, 본 용어는 천연적인지, 또는 전체적으로 또는 부분적으로 합성적인지 상관없이, 면역글로불린 결합 도메인을 포함하는 임의의 폴리펩티드를 비롯한, 항체 단편 및 유도체를 포괄한다. 그러므로, 또 다른 폴리펩티드에 융합된 면역글로불린 결합 도메인, 또는 등가물을 포함하는 키메라 분자도 포함된다. 키메라 항체의 클로닝 및 발현은 EP-A-0120694 및 EP-A-0125023에 기술되어 있다.

[0228]

전체 항체의 단편이 항원에 결합할 수 있는 기능을 수행할 수 있는 것으로 밝혀졌다. 결합 단편의 예로는 (i) VL, VH, CL 및 CH1 도메인으로 이루어진 Fab 단편; (ii) VH 및 CH1 도메인으로 이루어진 Fd 단편; (iii) 단일 항체의 VL 및 VH 도메인으로 이루어진 Fv 단편; (iv) VH 도메인으로 이루어진 dAb 단편 (문헌 [Ward, E.S. et al., Nature 341, 544-546 (1989)]); (v) 단리된 CDR 영역; (vi) 연결된 두 Fab 단편을 포함하는 2가 단편인 F(ab')₂ 단편; (vii) VH 도메인 및 VL 도메인이, 두 도메인이 회합하여 항원 결합 부위를 형성할 수 있도록 허용하는 웨티드 링커에 의해 연결되어 있는 것인, 단일 쇄 Fv 분자 (scFv) (문헌 [Bird et al., Science, 242, 423-426, 1988]; [Huston et al., PNAS USA, 85, 5879-5883, 1988]); (viii) 이중특이적 단일 쇄 Fv 이량체 (PCT/US92/09965) 및 (ix) 유전자 융합에 의해 구축된 다가 또는 다중특이적 단편인 "디아바디" (WO94/13804; [P. Holliger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 6444-6448, 1993])가 있다. Fv, scFv 또는 디아바디 분자는 VH 및 VL 도메인을 연결하는 디솔피드 브릿지의 도입에 의해 안정화될 수 있다 (문헌 [Y. Reiter et al., Nature Biotech, 14, 1239-1245, 1996]). CH3 도메인에 연결된 scFv를 포함하는 미니바디 또한 제조될 수 있다 (문헌 [S. Hu et al., Cancer Res., 56, 3055-3061, 1996]).

[0230] 항체는 이중특이적 또는 다중특이적일 수 있다. 이중특이적 항체가 사용되는 경우, 이는 다양한 방식으로 제조될 수 있는 (문헌 [Holliger, P. and Winter G. Current Opinion Biotechnol. 4, 446-449 (1993)], 예컨대, 화학적으로 또는 하이브리드 하이브리도마로부터 제조될 수 있는, 종래 이중특이적 항체일 수 있거나, 또는 상기 언급된 이중특이적 항체 단편 중 임의의 것일 수 있다. 디아바디 및 scFv는 Fc 영역 없이, 오직 가변 도메인만을 사용하여 구축될 수 있고, 이로써, 부작용, 예컨대, 항체 이펙터 기능, 또는 뮤린 기원의 항체를 사용하는 경우에는 인간-항마우스 항체 (HAMA) 반응에 기인하는 부작용을 잠재적으로 감소시킬 수 있다.

[0231] 이중특이적 전체 항체와 달리, 이중특이적 디아바디는 또한 쉽게 구축될 수 있고, 박테리아 (예컨대, 에스제리 키아 콜라이(*Escherichia coli*))에서 발현될 수 있기 때문에 특히 유용할 수 있다. 적절한 결합 특이성을 가진 디아바디 (및 다수의 다른 폴리펩티드, 예컨대, 항체 단편)는 파지 디스플레이 (W094/13804)를 사용하여 항체 라이브러리로부터 쉽게 선별될 수 있다. 디아바디의 한쪽 아암이 예를 들어, Ax1에 대한 특이성을 가진 그대로 불변 상태로 유지되어야 한다면, 나머지 다른 아암은 가변적인 라이브러리가 제조될 수 있고, 적절한 특이성을 가진 항체를 선별할 수 있다. 이중특이적 전체 항체는 "톱-인투-홀(knobs-into-holes)" 조작에 의해 제조될 수 있다 (문헌 [J. B. B. Ridgeway et al., Protein Eng., 9, 616-621, 1996]).

샘플

[0233] 본원에서 사용되는 바, "샘플"은 단일 세포 또는 세포 집단일 수 있다. 세포(들)는 정상, 건강한 세포(들)일 수 있거나, 또는 종양 세포, 예컨대, 순환 종양 세포일 수 있다.

[0234] 샘플은 생체내, 생체외, 또는 시험관내의 것일 수 있다. 예를 들어, 샘플은 생체내 종양 종괴, 또는 시험관내 세포 집단일 수 있다.

항원 결합 도메인

[0236] 이는 항원을 인식하고, 그에 특이적으로 결합하고, 항원의 일부 또는 그 모두와 상보적인 영역을 포함하는 항체 분자의 일부를 기술한다. 항원이 클 경우, 항체는 항원의 특정 일부분에만 결합할 수 있고, 상기 일부분은 에피토프로 명명된다. 항원 결합 도메인은 하나 이상의 항체 가변 도메인 (예컨대, VH 도메인으로 이루어진, 소위 Fd 항체 단편으로 불리는 것)에 의해 제공될 수 있다. 바람직하게, 항원 결합 도메인은 항체 경쇄 가변 영역 (VL) 및 항체 중쇄 가변 영역 (VH)을 포함한다.

특이적인 단백질

인간 Ax1

[0239] 본원에서 사용되는 바, '인간 Ax1'은 수용체 티로신 키나제의 인간 TAM 패밀리의 Ax1 구성원을 지칭한다. 인간 Ax1은 하기 이소폼으로 존재한다:

Ax1 이소폼	mRNA: NCBI 참조	폴리펩티드 : NCBI 참조
A	NM_001278599.1, GI:520260398, 기록 업데이트 날짜: 2014년 11월 28일 오전 12시 30분	NP_001265528.1, GI:520260399, 기록 업데이트 날짜: 2014년 11월 28일 오전 12시 30분)
B	NM_001699.5_GI: 520260376, 기록 업데이트 날짜: 2014년 11월 28일 오전 12시 30분	NP_001690.2_GI:21536468, 기록 업데이트 날짜: 2014년 11월 28일 오전 12시 30분
C	NM_021913.4_GI:520260356, 기록 업데이트 날짜: 2014년 11월 28일 오전 12시 30분	NP_068713.2_GI:21536466, 기록 업데이트 날짜: 2014년 11월 28일 오전 12시 30분(서열 번호: 21)

[0240]

[0241] 일부 실시양태에서, 인간 Ax1 폴리펩티드는 상기 제시된 이소폼 "A"에 상응한다. 일부 실시양태에서, 인간 Ax1 폴리펩티드는 상기 제시된 이소폼 "B"에 상응한다. 일부 실시양태에서, 인간 Ax1 폴리펩티드는 상기 제시된 이소폼 "C"에 상응한다.

뮤린 Ax1

[0243] 본원에서 사용되는 바, '뮤린 Ax1'은 수용체 티로신 키나제의 뮤린 TAM 패밀리의 Ax1 구성원을 지칭한다. 뮤린

Ax1은 하기 이소폼으로 존재한다:

Ax1 이소폼	mRNA: NCBI 참조	폴리펩티드 : NCBI 참조
A	NM_001190974.1, GI:300794859, 기록 업데이트 날짜: 2014년 9월 5일 오후 8시 46분	NP_001177903.1, GI:300794860, 기록 업데이트 날짜: 2014년 9월 5일 오후 8시 46분
B	<u>NM_001190975.1</u> , GI:300794883, 기록 업데이트 날짜: 2014년 9월 5일 오후 8시 46분	<u>NP_001177904.1</u> , GI:300794884, 기록 업데이트 날짜: 2014년 9월 5일 오후 8시 46분
C	<u>NM_009465.4</u> , GI:300794836, 기록 업데이트 날짜: 2014년 9월 5일 오후 8시 46분	<u>NP_033491.2</u> , GI:31542164, 기록 업데이트 날짜: 2014년 9월 5일 오후 8시 46분 (서열 번호 : 22)

[0244]

[0245] 일부 실시양태에서, 뮤린 Ax1 폴리펩티드는 상기 제시된 이소폼 "A"에 상응한다. 일부 실시양태에서, 뮤린 Ax1 폴리펩티드는 상기 제시된 이소폼 "B"에 상응한다. 일부 실시양태에서, 뮤린 Ax1 폴리펩티드는 상기 제시된 이소폼 "C"에 상응한다.

[0246]

인간 Tyro3

[0247]

본원에서 사용되는 바, '인간 Tyro3'은 수용체 티로신 키나제의 인간 TAM 패밀리의 Tyro3 구성원을 지칭한다. 일부 실시양태에서, 인간 Tyro3 폴리펩티드는 NCBI 수탁 번호 NP_006284.2, GI:27597078 (기록 업데이트 날짜: 2014년 11월 28일 오전 12시 30분) (서열 번호 23)에 상응한다. 한 실시양태에서, 인간 Tyro3 폴리펩티드를 코딩하는 핵산은 NCBI 수탁 번호 NM_006293.3, GI:295842183 (기록 업데이트 날짜: 2014년 11월 28일 오전 12시 30분)에 상응한다.

[0248]

인간 Mer

[0249]

본원에서 사용되는 바, '인간 Mer'은 수용체 티로신 키나제의 인간 TAM 패밀리의 Mer 구성원을 지칭한다. 일부 실시양태에서, 인간 Mer 폴리펩티드는 NCBI 수탁 번호 NP_006334.2, GI:66932918 (기록 업데이트 날짜: 2014년 9월 6일 오전 4시 3분) (서열 번호 24)에 상응한다. 한 실시양태에서, 인간 Mer 폴리펩티드를 코딩하는 핵산은 NCBI 수탁 번호 NM_006343, 베전 번호 NM_006343.2 GI:66932917 (기록 업데이트 날짜: 2014년 9월 6일 오전 4시 3분)에 상응한다.

[0250]

인간 Akt3

[0251]

본원에서 사용되는 바, '인간 Akt3'은 세린/트레오닌 단백질 키나제의 인간 AKT 서브패밀리의 Akt3 구성원을 지칭한다. 인간 Akt3은 하기 이소폼으로 존재한다:

Akt 3 이소폼	mRNA: NCBI 참조	폴리펩티드 : NCBI 참조
A	NM_001206729.1, GI:332078558, 기록 업데이트 날짜: 2014년 9월 6일 오전 2시 43분	NP_001193658.1, GI:332078559, 기록 업데이트 날짜: 2014년 9월 6일 오전 2시 43분(서열 번호: 25)
B	NM_005465.4, GI:332078467, 기록 업데이트 날짜: 2014년 9월 6일 오전 2시 43분	NP_005456.1, GI: 4885549, 기록 업데이트 날짜: 2014년 9월 6일 오전 2시 43분
C	NM_181690.2, GI:332078557, 기록 업데이트 날짜: 2014년 9월 6일 오전 2시 43분	NP_859029.1, GI: 32307163, 기록 업데이트 날짜: 2014년 9월 6일 오전 2시 43분

[0252]

[0253] 일부 실시양태에서, 인간 Akt 폴리펩티드는 상기 제시된 이소폼 "A"에 상응한다. 일부 실시양태에서, 인간 Akt 폴리펩티드는 상기 제시된 이소폼 "B"에 상응한다. 일부 실시양태에서, 인간 Akt 폴리펩티드는 상기 제시된 이소폼 "C"에 상응한다.

[0254] 인간 Gas6

본원에서 사용되는 바, '인간 Gas6' (성장 정지 특이 6)은 수용체 티로신 키나제의 TAM 패밀리의 리간드를 지칭한다. 일부 실시양태에서, 인간 Gas6 폴리펩티드는 NCBI 수탁 번호 NP_000811.1, GI:4557617 (기록 업데이트 날짜: 2014년 9월 6일 오전 2시 44분) (서열 번호 42)에 상응한다. 한 실시양태에서, 인간 Gas6 폴리펩티드를 코딩하는 핵산은 NCBI 수탁 번호 NM_000820.3, GI:673038877 (기록 업데이트 날짜: 2014년 9월 6일 오전 2시 44분)에 상응한다.

[0256] BSA

본원에서 사용되는 바, 'BSA'는 우혈청 알부민을 지칭한다. 일부 실시양태에서, BSA는 'A9647 - 우혈청 알부민' (시그마 알드리치(Sigma Aldrich))에 상응한다. 일부 실시양태에서, BSA는 진뱅크 수탁 번호 CAA76847, 버전 번호 CAA76847.1 GI:3336842 (기록 업데이트 날짜: 2011년 1월 7일 오전 2시 30분)에 상응한다.

[0258] 포함한다

이는 일반적으로 "포함한다(include)"는 의미로 사용되며, 즉, 하나 이상의 특징 또는 성분이 존재할 수 있다는 것이다.

[0260] 단리된

이는 본 발명의 항체, 또는 상기 항체를 코딩하는 핵산이 일반적으로 본 발명에 따라 존재하게 되는 상태를 지칭한다. 항체 및 핵산은 자연적으로 그와 함께 회합되어 있는 물질, 예컨대, 그의 천연 환경, 또는 그의 제조가 시험관내 또는 생체내에서 실시되는 재조합 DNA 기술에 의해 이루어질 때, 그의 제조가 이루어진 환경 (예컨대, 세포 배양물)에서 그와 함께 발견되는 다른 폴리펩티드 또는 핵산을 함유하지 않거나, 또는 실질적으로 함유하지 않을 것이다. 항체 및 핵산은 회석제 또는 애주번트와 함께 제제화될 수 있고, 추가로 실용적인 용도로 단리될 수 있고 - 예를 들어, 항체는 보통 면역검정법에서의 사용을 위해 마이크로타이터 플레이트를 코팅하는데 사용된다면, 젤라틴 또는 다른 담체와 혼합되거나, 또는 진단 또는 요법에서 사용될 때에는 제약상 허용되는 담체 또는 회석제와 혼합될 것이다. 항체는 천연적으로, 또는 이종성 진핵 세포 (예컨대, CHO 또는 NSO (ECACC 85110503) 세포) 시스템에 의해 글리코실화될 수 있거나, 또는 (예를 들어, 원핵 세포에서의 발현에 의해 제조될 경우) 비-글리코실화될 수 있다.

[0262] 실질적으로 기술된 바와 같은

"실질적으로 기술된 바와 같은"이라는 것은, 본 발명의 관련된 CDR 또는 VH 또는 VL 도메인이, 서열이 본원에 기술된 것인 그의 명시된 영역과 동일하거나, 또는 고도로 유사할 것이라는 것을 의미하는 것이다. "고도로 유사한"이라는 것은, CDR 및/또는 VH 또는 VL 도메인 중에서 1 내지 5개, 바람직하게 1 내지 4개, 예컨대, 1 내지 3개 또는 1 또는 2개, 또는 3 또는 4개의 아미노산 치환이 이루어질 수 있다는 것으로 고려된다.

본 발명의 항체는 항체 불변 영역 또는 그의 일부를 추가로 포함할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 항체는 CL, CH1, CH2, 및/또는 CH3 도메인 (또는 그의 임의 조합)을 포함할 수 있다. VL 도메인은 그의 C-말단 단부에서 인간 C_K 또는 C_L 쇄, 바람직하게 C_K 쇄를 포함하는 항체 경쇄 불변 도메인에 부착될 수 있다. 유사하게, VH 도메인에 기초한 항체는 그의 C-말단 단부에서 임의의 항체 이소형, 예컨대, IgG, IgA, IgE 및 IgM, 및 이소형 서브부류 중 임의의 것으로부터 유래된 면역글로불린 중쇄 모두 또는 그의 일부에 부착될 수 있다. Fc 영역, 예컨대, W099/58572에 개시된 Δnab 및 Δnac가 사용될 수 있다.

[0265] 키메라, 인간화 및 CDR-이식된 항체

본원에서 사용되는 바 "키메라" 항체 또는 "인간화" 항체 또는 "CDR-이식된" 이라는 것은 본원에 기술된 항-Ax1 항체의 임의 조합, 또는 그로부터 유래된 임의의 CDR과 비-뮤린, 바람직하게, 인간 항체로부터 유래된 하나 이상의 단백질 또는 웹티드가 조합된 것을 포함한다.

키메라 또는 인간화 항체는 CDR은 본원에 기술된 항-Ax1 항체 중 하나 이상의 것 및 적어도 일부로부터 유래되거나, 항체의 나머지 부분은 하나 이상의 인간 항체로부터 유래된 것인 항체를 포함한다. 따라서, 항체의 인간 부분은 인간에서는 실질적으로 비-면역원성인 프레임워크, CL (예컨대, C_K 또는 C_L), CH 도메인 (예컨대, CH1, CH2, CH3), 헌지 영역을 포함할 수 있다.

[0268] 인간 항체로부터 유래된 항체의 영역이 인간 항체와 100% 동일성 (identity)을 가질 필요는 없다. 바람직한 실

시양태에서, 면역원성이 무시해도 될 정도가 되게 하기 위해 가능한 한 마우스 아미노산 잔기는 거의 유지되지 않지만, 동시에 항체의 인간화를 최대화시키면서, 필요에 따라 CDR에 의해 형성되는 항원 결합 부위를 지지하기 위해 마우스 잔기가 유지될 수 있다. 상기와 같은 변형 또는 변이는 임의적으로 및 바람직하게는 비-변형된 항체와 비교하였을 때, 인간 또는 다른 종에서 면역원성을 유지 또는 감소시킨다.

[0269] 인간화 항체는 기능적으로 재배열된 인간 면역글로불린 (예컨대, 중쇄 및/또는 경쇄) 유전자를 발현할 수 있는 비-인간 동물 또는 원핵 또는 진핵 세포에 의해 제조될 수 있다는 것에 유의하여야 한다. 추가로, 항체가 단일쇄 항체일 때, 이는 천연 인간 항체에서는 발견되지 않는 링커 펩티드를 포함할 수 있다. 예를 들어, scFv는, 중쇄의 가변 영역과 경쇄의 가변 영역을 연결하는 링커 펩티드, 예컨대, 2 내지 약 20개의 글리신 또는 다른 아미노산 잔기 (바람직하게, 글리신 및 세린 잔기 (예컨대, Gly₄Ser 또는 Gly₂Ser 반복부))를 포함할 수 있다. 상기 링커 펩티드는 인간에서 비-면역원성인 것으로 간주된다. 일부 실시양태에서, 링커 길이는 12개 이상의 아미노산 길이이다.

[0270] 항체 인간화는 예를 들어, 프레임 내에서 개별 인간 프레임워크 풀에 융합된 비-인간 표적 모노클로날 항체의 6개의 CDR 모두를 포함하는 조합 라이브러리를 합성함으로써 수행될 수 있다. 모두가 공지된 중쇄 및 경쇄 쇄 인간 생식 계열 서열을 나타내는 유전자를 함유하는 인간 프레임워크 라이브러리가 사용될 수 있다. 이어서, 생성된 조합 라이브러리를 관심의 대상이 되는 항원에의 결합에 대해 스크리닝할 수 있다. 이러한 접근법을 통해 결합 활성을 모체 항체로 유지시키는 것에 있어서 완전한 인간 프레임워크의 가장 바람직한 조합을 선별할 수 있다. 이어서, 다양한 기법에 의해 인간화 항체를 추가로 최적화시킬 수 있다.

[0271] 전장의 항체 분자의 경우, 면역글로불린 유전자는 하이브리도마 세포주의 게놈 DNA 또는 mRNA로부터 수득될 수 있다. 항체 중쇄 및 경쇄를 포유동물 벡터 시스템에서 클로닝한다. 당업계에 공지된 방법을 사용하여 서열분석함으로써 어셈블리를 확인한다. 항체 구축물을 다른 인간 또는 포유동물 숙주 세포주에서 발현시킬 수 있다. 이어서, 관심의 대상이 되는 발현된 항체의 일시적인 형질감염 검정법 및 웨스턴 블로트 분석에 의해 구축물을 확인할 수 있다. 생산성이 가장 높은, 안정한 세포주를 단리시키고, 고속 검정 방법을 사용하여 스크리닝할 수 있다.

[0272] 인간화 항체, 단편 및 영역의 불변 (C) 영역을 코딩하는 인간 유전자는 공지된 방법에 의해 인간 태아 간 라이브러리로부터 유래된 것일 수 있다. 인간 C 영역 유전자는 인간 면역글로불린을 발현하고, 생산하는 것을 비롯한, 임의의 인간 세포로부터 유래된 것일 수 있다. 인간 CH 영역은 γ , μ , α , δ , ϵ , 및 그의 서브부류, 예컨대, G1, G2, G3 및 G4를 비롯한, 인간 중쇄의 공지된 부류 또는 이소형 중 임의의 것으로부터 유래된 것일 수 있다. 중쇄 이소형이 항체의 다양한 이펙터 기능을 담당하는 바, CH 도메인 선택은 원하는 이펙터 기능, 예컨대, 보체 고정, 또는 항체-의존성 세포 세포독성 (ADCC)에서의 활성에 의해 좌우될 것이다. 바람직하게, CH 도메인은 감마 1 (IgG1)로부터 유래된 것이다.

[0273] 인간 CL 영역은 인간 L 쇄 이소형, 카파 또는 람다, 바람직하게, 카파로부터 유래된 것일 수 있다.

[0274] 인간 면역글로불린 C 영역을 코딩하는 유전자는 표준 클로닝 기법에 의해 인간 세포로부터 수득된다 (문헌 [Sambrook, et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)] 및 [Ausubel et al., eds. Current Protocols in Molecular Biology (1987-1993)]). 인간 C 영역 유전자는 2가지 유형의 경쇄, 5가지 부류의 중쇄 및 그의 서브부류를 나타내는 유전자를 함유하는 공지된 클론으로부터 쉽게 이용될 수 있다.

[0275] 키메라 항체 단편, 예컨대, Fab 및 F(ab')₂는 적절히 말단절단된 키메라 중쇄 유전자를 디자인함으로써 제조될 수 있다. 예를 들어, F(ab')₂ 단편의 중쇄 부분을 코딩하는 키메라 유전자는 중쇄의 CH1 도메인 및 헌지 영역을 코딩하는 DNA 서열, 이어서, 번역 종결 코돈을 포함할 것이며, 이로써, 말단절단된 분자를 수득하게 될 것이다.

[0276] 비-인간 또는 인간 항체를 조작 또는 인간화하는 방법이 사용될 수 있고, 이는 당업계에 널리 공지되어 있다. 일반적으로, 인간화 또는 조작된 항체는 비-인간, 예컨대, 제한하는 것은 아니지만, 마우스, 래트, 토끼, 비-인간 영장류 또는 다른 포유동물인 공급원으로부터의 하나 이상의 아미노산 잔기를 가진다. 이를 인간 아미노산 잔기는 대개 "임포트(import)" 잔기로 지칭되며, 이는 전형적으로는 공지된 인간 서열의 "임포트" 가변, 불변 또는 다른 도메인으로부터 채취된다. 공지된 인간 Ig 서열은 예컨대,

www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi; www.atcc.org/phage/hdb.html;
www.sciquest.com/; www.abcam.com/; www.antibodyresource.com/onlinecomp.html;
www.public.iastate.edu/.about.pedro/research_tools.html; www.mgen.uni-heidelberg.de/SD/IT/IT.html; www.whfreeman.com/immunology/CH05/kuby05.htm;
www.library.thinkquest.org/12429/Immune/Antibody.html;
www.hhmi.org/grants/lectures/1996/vlab/;
www.path.cam.ac.uk/.about.mrc7/mikeimages.html; www.antibodyresource.com/;
mcb.harvard.edu/BioLinks/Immunology.html. www.immunologylink.com/;
pathbox.wustl.edu/.about.hcenter/index.html; www.biotech.ufl.edu/.about.hcl/;
www.pebio.com/pa/340913/340913.html; www.nal.usda.gov/awic/pubs/antibody/;
www.m.ehime-u.ac.jp/.about.yasuhiro/Elisa.html; www.biodesign.com/table.asp;
www.icnet.uk/axp/facs/davies/links.html; www.biotech.ufl.edu/.about.fccl/protocol.html; www.isac-net.org/sites_geo.html; axim1.imt.uni-marburg.de/.about.rek/AEPStart.html;
baserv.uci.kun.nl/.about.jraats/links1.html; www.recab.uni-hd.de/immuno.bme.nwvu.edu/;
www.mrc-cpe.cam.ac.uk/imt-doc/public/INTRO.html; www.ibt.unam.mx/vir/V_mice.html;
imgt.cnusc.fr:8104/; www.biochem.ucl.ac.uk/.about.martin/abs/index.html;
antibody.bath.ac.uk/; abgen.cvm.tamu.edu/lab/wwwabgen.html;
www.unizh.ch/.about.honegger/AHOseminar/Slide01.html;
www.cryst.bbck.ac.uk/.about.ubcg07s/; www.nimr.mrc.ac.uk/CC/ccaewg/ccaewg.htm;
www.path.cam.ac.uk/.about.mrc7/humanisation/TAHHP.html;
www.ibt.unam.mx/vir/structure/stat_aim.html; www.biosci.missouri.edu/smithgp/index.html;
www.cryst.bioc.cam.ac.uk/.about.fmolina/Web-pages/Pept/spottech.html;
www.jerini.de/fr_products.htm; www.patents.ibm.com/ibm.html.

[0277]

[0278] 문헌 [Kabat et al. Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Dept. Health (1983)] (이들은 각각 그 전문이 본원에서 참조로 포함된다)에 개시되어 있다.

[0279]

상기 임포트 서열은 당업계에 공지된 바와 같이, 면역원성을 감소시키는 데, 또는 결합, 친화도, 온-속도, 오프-속도, 결합도, 특이성, 반감기, 또는 임의의 다른 적합한 특징을 감소, 증진, 또는 변형시키는 데 사용될 수 있다. 일반적으로, 가변 및 불변 영역의 비-인간 서열은 인간 또는 다른 아미노산으로 대체되면서, 비-인간 또는 인간 CDR 서열 중 일부 또는 그 모두가 유지된다.

[0280]

항체는 또한 임의적으로 항원에 대한 높은 친화도 및 다른 바람직한 생물학적 특성을 유지하면서 인간화될 수 있다. 이러한 목표를 달성하기 위해, 인간화 항체는 임의적으로 모체 및 인간화 서열의 3차원 모델을 사용하여 모체 서열 및 다양한 개념적 인간화 생성물의 분석 프로세스에 의해 제조될 수 있다. 3차원 모델 면역글로불린 모델은 보편적으로 이용가능하며, 이는 당업자에게는 잘 알려져 있는 것이다. 선택된 후보 면역글로불린 서열의 가능한 3차원 입체 구조를 예시하고, 디스플레이하는 컴퓨터 프로그램이 이용가능하다. 이러한 디스플레이 검사를 통해 후보 면역글로불린 서열의 기능에서의 잔기의 가능한 역할을 분석할 수 있고, 즉, 후보 면역글로불린이 그의 항원에 결합에 결합할 수 있는 능력에 영향을 주는 잔기를 분석할 수 있다. 이러한 방식으로, FR 잔기를 선별할 수 있고, 컨센서스 및 임포터 서열로부터 조합할 수 있고, 이로써, 원하는 항체 특징, 예컨대, 표적 항원(들)에 대한 친화도 증가를 달성할 수 있다.

[0281]

일반적으로, CDR 잔기는 직접적으로 및 가장 실질적으로 항원 결합에 영향을 미치는 데 관여한다. 항체 인간화 또는 조작은 임의의 공지된 방법, 예컨대, 제한하는 것은 아니지만, 문헌 [Winter et al., Nature 321:522 (1986)]; [Riechmann et al., Nature 332:323 (1988)]; [Verhoeyen et al., Science 239:1534 (1988)]; [Sims et al., J. Immunol. 151: 2296 (1993)]; [Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196:901 (1987)]; [Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89:4285 (1992)]; [Presta et al., J. Immunol. 151:2623 (1993)], 미국 특허 번호 5,723,323, 5,976,862, 5,824,514, 5,817,483, 5,814,476, 5,763,192, 5,723,323, 5,766,886, 5,714,352, 6,204,023, 6,180,370, 5,693,762, 5,530,101, 5,585,089, 5,225,539; 4,816,567, PCT/US98/16280, US96/18978, US91/09630, US91/05939, US94/01234, GB89/01334, GB91/01134, GB92/01755; WO90/14443, WO90/14424, WO90/14430, EP 229246에 기술되어 있는 방법을 사용하여 수행될 수 있다.

[0282]

인간화 항체의 인간 불변 영역은 임의 부류 또는 이소형 (IgG, IgA, IgM, IgE, IgD 등)의 것일 수 있고, 카파

또는 람다 경쇄를 포함할 수 있다. 한 실시양태에서, 인간 불변 영역은 IgG 중쇄 또는 정의된 단편, 예를 들어, IgG 서브부류, IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 중 적어도 하나를 포함한다.

[0283] 표지된 항체

본 발명의 항체는 검출가능한 또는 기능성 표지로 표지될 수 있다. 검출가능한 표지로는 방사성 표지, 예컨대, $[^{131}\text{I}]$ 또는 $[^{99}\text{Tc}]$ 를 포함하며, 이는 방사성 면역접합체 분야에 공지된 종래 화학법을 사용하여 본 발명의 항체에 부착될 수 있다. 표지로는 또한 효소 표지, 예컨대, 호스래디쉬 페옥시다제를 포함한다. 표지로는 화학적 모이어티, 예컨대, 비오틴을 추가로 포함하며, 이는 특이적인 동족 검출가능한 모이어티, 예컨대, 표지된 아비딘 또는 스트렙트아비딘에의 결합을 통해 검출될 수 있다. 바람직하게, 표지로는 형광 표지, 예컨대, FITC를 포함한다.

[0285] 유기 모이어티

변형된 항체 및 항원-결합 단편은 항체에 직접적으로 또는 간접적으로 공유 결합된 하나 이상의 유기 모이어티를 포함할 수 있다. 본원에 기술된 항체 또는 항원-결합 단편에 결합된 각 유기 모이어티는 독립적으로 친수성 중합체 기, 지방산 기 또는 지방산 에스테르 기일 수 있다. 본원에서 사용되는 바, "지방산"이라는 용어는 모노-카르복실산 및 디-카르복실산을 포함한다. 본원에서 사용되는 바, "친수성 중합체 기"라는 용어는 옥탄보다는 물 중에서 더 큰 가용성을 띠는 유기 중합체를 지칭한다. 예를 들어, 폴리-리신은 옥탄보다는 물 중에서 더 큰 가용성을 띤다. 따라서, 폴리-리신의 공유 부착에 의해 변형된 항체는 본 개시내용에 포함된다. 본원에 기술된 항체를 변형시키는 데 적합한 친수성 중합체는 선형 또는 분지형일 수 있고, 예를 들어, 폴리-알칸 글리콜, 예컨대, 폴리에틸렌 글리콜 (PEG), 모노메톡시-폴리에틸렌 글리콜 (mPEG), PPG 등, 탄수화물 (예컨대, 텍스트란, 셀룰로스, 올리고당, 다당류 등), 친수성 아미노산의 중합체 (예컨대, 폴리-리신, 폴리-아르기닌, 폴리-아스파르테이트 등), 폴리-알칸 옥시드 (예컨대, 폴리에틸렌 옥시드, 폴리프로필렌 옥시드 등) 및 폴리비닐 피롤리돈을 포함한다. 바람직하게, 본원에 기술된 항체를 변형시키는 친수성 중합체는 별개의 문자 엔티티로서 그 문자량은 약 800 내지 약 150,000 달톤이다. 예를 들어, PEG5000 및 PEG20,000 (여기서, 밑에 기록한 숫자는 중합체의 평균 문자량 (달톤)이다)이 사용될 수 있다. 친수성 중합체 기는 1 내지 약 6개의 알킬, 지방산 또는 지방산 에스테르 기로 치환될 수 있다. 지방산 또는 지방산 에스테르 기로 치환되는 친수성 중합체는 적합한 방법을 사용하여 제조될 수 있다. 예를 들어, 아민 기를 포함하는 중합체는 지방산 또는 지방산 에스테르의 카르복실레이트에 커플링될 수 있고, 지방산 또는 지방산 에스테르 상의 활성화된 카르복실레이트 (예컨대, N,N-카르보닐 디-이미다졸로 활성화된 것)는 중합체 상의 히드록실 기에 커플링될 수 있다.

본원에 기술된 항체를 변형시키는 데 적합한 지방산 및 지방산 에스테르는 포화된 것일 수 있거나, 또는 하나 이상의 불포화 단위를 함유할 수 있다. 본원에 기술된 항체를 변형시키는 데 적합한 지방산으로는 예를 들어, n-도데카노에이트 (C12, 라우레이트), n-테트라데카노에이트 (C14, 미리스테이트), n-옥타데카노에이트 (C18, 스테아레이트), n-에이코사노에이트 (C20, 아라키데이트), n-도코사노에이트 (C22, 베헤네이트), n-트리아콘타노에이트 (C30), n-테트라콘타노에이트 (C40), 시스-8 9-옥타데카노에이트 (C18, 올레이트), 모든 시스-8 5,8,11,14-에이코사테트라에노에이트 (C20, 아라키도네이트), 옥탄디온산, 테트라데칸디온산, 옥타데칸디온산, 도코산디온산 등을 포함한다. 적합한 지방산 에스테르로는 선형 또는 분지형 저급 알킬 기를 포함하는 디카르복실산의 모노-에스테르를 포함한다. 저급 알킬 기는 1 내지 약 12개, 바람직하게, 1 내지 약 6개의 탄소 원자를 포함할 수 있다.

변형된 인간 항체 및 항원-결합 단편은 적합한 방법을 사용하여, 예컨대, 하나 이상의 변형제와의 반응에 의해 제조될 수 있다. 본원에서 사용되는 바, "변형제"라는 용어는 활성화 기를 포함하는 적합한 유기 기 (예컨대, 친수성 중합체, 지방산, 지방산 에스테르)를 의미한다. "활성화 기"는 적절한 조건하에서 제2 화학기와 반응하여 변형제와 제2 화학기 사이의 공유 결합을 형성하는 화학적 모이어티 또는 작용기이다. 예를 들어, 아민-반응성 활성화 기로는 친전자성 기, 예컨대, 토실레이트, 메실레이트, 할로 (클로로, 브로모, 플루오로, 아이오도), N-히드록시숙신이미딜 에스테르 (NHS) 등을 포함한다. 티올과 반응할 수 있는 활성화 기로는 예를 들어, 말레이미드, 아이오도아세틸, 아크릴로릴, 퍼리딜 디술피드, 5-티올-2-니트로벤조산 티올 (TNB-티올) 등을 포함한다. 알데히드 작용기는 아민- 또는 히드라지드-함유 분자에 커플링될 수 있고, 아지도 기는 3가 포스포리스 기와 반응하여 포스포르아미레이트 또는 포스포르이미드 연결부를 형성할 수 있다. 활성화 기를 분자내로 도입하는 데 적합한 방법은 당업계에 공지되어 있다 (예를 들어, 문헌 [Hernanson, G. T., Bioconjugate Techniques, Academic Press: San Diego, Calif. (1996)] 참조). 활성화 기는 유기 기 (예컨대, 친수성 중합체, 지방산, 지방산 에스테르)에 직접적으로, 또는 링커 모이어티, 예를 들어, 2가 C1-C12 기 (여기서, 하나 이

상의 탄소 원자는 헤테로원자, 예컨대, 산소, 질소 또는 황에 의해 대체될 수 있다)를 통해 결합될 수 있다. 적합한 링커 모이어티로는 예를 들어, 테트라-에틸렌 글리콜, $--(\text{CH}_2)_3--$, $--\text{NH}--(\text{CH}_2)_6--\text{NH}--$, $--(\text{CH}_2)_2--\text{NH}--$ 및 $--\text{CH}_2--\text{O}--\text{CH}_2--\text{CH}_2--\text{O}--\text{CH}_2--\text{CH}_2--\text{O}--\text{CH}--\text{NH}--$ 를 포함한다. 링커 모이어티를 포함하는 변형제는 예를 들어, 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필) 카르보디이미드 (EDC)의 존재하에서 모노-Boc-알킬디아민 (예컨대, 모노-Boc-에틸렌디아민, 모노-Boc-디아미노헥산)을 지방산과 반응시켜 유리 아민과 지방산 카르복실레이트 사이에 아미드 결합을 형성함으로써 제조될 수 있다. Boc 보호기는 트리플루오로아세트산 (TFA) 처리에 의해 생성물로부터 제거되어 1급 아민이 노출될 수 있고, 이는 기술된 바와 같은 또 다른 카르복실레이트에 커플링될 수 있거나, 또는 말레산 무수물과 반응할 수 있고, 생성된 생성물은 폐환화되어 지방산의 활성화된 말레이미도 유도체를 생성할 수 있다 (예를 들어, WO 92/16221 (톰슨(Thompson) 등) 참조).

[0289] 변형된 항체는 인간 항체 또는 항원-결합 단편을 변형제와 반응시킴으로써 제조될 수 있다. 예를 들어, 아민 반응성 변형제, 예를 들어, PEG의 NHS 에스테르를 사용함으로써 유기 모이어티를 비-부위 특이 방식으로 항체에 결합시킬 수 있다. 변형된 인간 항체 또는 항원-결합 단편은 또한 항체 또는 항원-결합 단편의 디술피드 결합 (예컨대, 쇄내 디술피드 결합)을 환원시킴으로써 제조될 수 있다. 이어서, 환원된 항체 또는 항원-결합 단편을 티올-반응성 변형제와 반응시켜 본원에 기술된 변형된 항체를 제조할 수 있다. 본원에 기술된 항체의 특이 부위에 결합된 유기 모이어티를 포함하는, 변형된 인간 항체 및 항원-결합 단편은 적합한 방법, 예컨대, 역 단백질 분해 (문헌 [Fisch et al., Bioconjugate Chem., 3:147-153 (1992)]; [Werlen et al., Bioconjugate Chem., 5:411-417 (1994)]; [Kumaran et al., Protein Sci. 6(10):2233-2241 (1997)]; [Itoh et al., Bioorg. Chem., 24(1): 59-68 (1996)]; [Capellas et al., Biotechnol. Bioeng., 56(4):456-463 (1997)]), 및 문헌 [Hermanson, G. T., Bioconjugate Techniques, Academic Press: San Diego, Calif. (1996).]에 기술된 방법을 사용하여 제조될 수 있다.

[0290] 면역접합체

[0291] 본 발명은 또한 하나 이상의 세포독성제, 예컨대, 화학요법제 또는 약물, 성장 억제제, 독소 (예컨대, 단백질 독소, 박테리아, 진균, 식물, 또는 동물 기원의 효소적으로 활성인 독소, 또는 그의 단편), 또는 방사성 동위원소에 접합된 본원의 항-Ax1 항체를 포함하는 면역접합체를 제공한다.

[0292] 한 실시양태에서, 면역접합체는, 항체가 메이탄시노이드 (미국 특허 번호 5,208,020, 5,416,064 및 유럽 특허 EP 0 425 235 B1 참조); 아우리스타틴, 예컨대, 모노메틸아우리스타틴 약물 모이어티 DE 및 DF (MMAE 및 MMAF) (미국 특허 번호 5,635,483 및 5,780,588, 및 7,498,298 참조); 돌라스타틴; 칼리키아미신 또는 그의 유도체 (미국 특허 번호 5,208,020, 5,416,064 및 유럽 특허 EP 0 425 235 B1); 미국 특허 번호 5,712,374, 5,714,586, 5,739,116, 5,767,285, 5,770,701, 5,770,710, 5,773,001, 및 5,877,296; [Hinman et al., Cancer Res. 53:3336-3342 (1993)]; 및 [Lode et al., Cancer Res. 58:2925-2928 (1998)] 참조); 안트라시클린, 예컨대, 다우노마이신 또는 독소루비신 (문헌 [Kratz et al., Current Med. Chern. 13:477-523 (2006)]; [Jeffrey et al., Bioorganic & Med. Chern. Letters 16:358- 362 (2006)]; [Torgov et al., Bioconj. Chern. 16:717-721 (2005)]; [Nagy et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:829-834 (2000)]; [Dubowchik et al., Bioorg. & Med. Chern. Letters 12:1529-1532 (2002)]; [King et al., J. Med. Chern. 45:4336-4343 (2002)]; 및 미국 특허 번호 6,630,579 참조); 메토트렉세이트; 빈데신; 탁산, 예컨대, 도세탁센, 파클리탁센, 라로탁센, 테세탁센, 및 오르타탁센; 트리코테센; 및 CC1065를 포함하나, 이에 제한되지 않는, 하나 이상의 약물에 접합되어 있는 것인, 항체-약물 접합체 (ADC)이다.

[0293] 또 다른 실시양태에서, 면역접합체는 디프테리아 독소 A 쇄, 디프테리아 독소의 비결합 활성 단편, 외독소 A 쇄 (슈도모나스 아에루기노사(*Pseudomonas aeruginosa*) 유래), 리신 A 쇄, 아브린 A 쇄, 모데신 A 쇄, 알파-사르신, 알레우리테스 포르디이(*Aleurites fordii*) 단백질, 디안틴 단백질, 피토라카 아메리카나(*Phytolaca americana*) 단백질 (P API, P APII, 및 PAP-S), 모모르디카 카란티아(*momordica charantia*) 억제제, 쿠르신, 크로틴, 사포나리아 오피시날리스(*saponaria officinalis*) 억제제, 젤로닌, 미토겔린, 레스트릭토신, 페노마이신, 에노마이신, 및 트리코테센을 포함하나, 이에 제한되지 않는, 효소적으로 활성인 독소 또는 그의 단편에 접합된, 본원에 기술된 바와 같은 항체를 포함한다.

[0294] 또 다른 실시양태에서, 면역접합체는 방사성 원자에 접합하여 방사성 면역접합체를 형성하는 본원에 기술된 바와 같은 항체를 포함한다. 다양한 방사성 동위 원소가 방사성 면역접합체 제조에 이용가능하다. 예로는 [^{211}At], [^{131}I], [^{125}I], [^{90}Y], [^{186}Re], [^{188}Re], [^{153}Sm], [^{212}Bi], [^{32}P], [^{212}Pb] 및 Lu의 방사성 동위 원소를 포

함한다. 방사성 면역접합체가 검출을 위해 사용되는 경우, 이는 신티그래프 연구를 위한 방사성 원자, 예를 들어, [⁹⁹Tc] 또는 [¹²³I], 또는, 핵 자기 공명 (NMR) 영상화 (이는 또한 자기 공명 영상화, MRI로도 공지)를 위한 스핀 표지, 예컨대, 아이오딘-123 다시, 아이오딘-131, 인듐-111, 플루오린-19, 탄소-13, 질소-15, 산소-17, 가돌리늄, 망가니즈 또는 철을 포함할 수 있다.

[0295] 항체 및 세포독성제로 이루어진 접합체는 다양한 이작용성 단백질 커플링제, 예컨대, N-숙신이미딜-3-(2-피리딜 디티오) 프로피오네이트 (SPDP), 숙신이미딜-4-(N-말레이미도메틸) 시클로헥산-1-카르복실레이트 (SMCC), 이미노티울란 (IT), 이미도에스테르의 이작용성 유도체 (예컨대, 디메틸 아디피미데이트 HC1), 활성 에스테르 (예컨대, 디숙신이미딜 수베레이트), 알데히드 (예컨대, 글루타르알데히드), 비스-아지도 화합물 (예컨대, 비스 (p-아지도벤조일)헥산디아민), 비스-디아조늄 유도체 (예컨대, 비스-(p-디아조늄벤조일)-에틸렌디아민), 디이소시아네이트 (예컨대, 톨루엔 2,6-디이소시아네이트), 및 비스-활성 플루오린 화합물 (예컨대, 1,5-디플루오로-2,4-디니트로벤젠)을 사용하여 제조될 수 있다. 예를 들어, 리신 면역독소는 문헌 [Vitetta et al., Science 238:1098 (1987)]에 기술되어 있는 바와 같이 제조될 수 있다. 탄소-14-표지된 1-이소티오시아네이토벤질-3-메틸디에틸렌 트리아민펜타아세트산 (MXDTPA)이 방사성 뉴클레오티드를 항체에 접합시키기 위한 예시적인 키레이팅제이다. WO94/11026을 참조할 수 있다. 링커는 세포에서 세포독성 약물의 방출을 촉진시키는 "절단가능한 링커"일 수 있다. 예를 들어, 산-불안정성 링커, 웹티다제-감수성 링커, 광-불안정성 링커, 디메틸 링커 또는 디슬퍼드-함유 링커 (문헌 [Chari et al., Cancer Res. 52: 127-131 (1992)]; 미국 특허 번호 5,208,020)가 사용될 수 있다.

[0296] 본원에서 면역접합체 또는 ADC가 명백하게 고려되지만, BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, 술포-EMCS, 술포-GMBS, 술포-KMUS, 술포-MBS, 술포-SIAB, 술포-SMCC, 및 술포-SMPB, 상업적으로 이용가능한 (예컨대, 피어스 바이오테크놀러지, 인크.(Pierce Biotechnology, Inc.: 미국 일리노이주 록퍼드)로부터 이용가능) SVSB (숙신이미딜-(4-비닐술폰)벤조에이트)를 포함하나, 이에 제한되지 않는 가교제 시약으로 제조된 상기 접합체로 제한되는 것은 아니다.

글리코실화 변이체

[0298] 특정 실시양태에서, 본원에서 제공하는 항체는 항체의 글리코실화 정도를 증가 또는 감소시키기 위해 변경된다. 항체에의 글리코실화 부위의 부가 또는 결실은 하나 이상의 글리코실화 부위가 생성 또는 제거될 수 있도록 아미노산 서열을 변경시킴으로써 편리하게 달성을 할 수 있다.

[0299] 항체가 Fc 영역을 포함하는 경우, 그에 부착된 탄수화물이 변경될 수 있다. 포유동물 세포에 의해 생산된 천연 항체는 전형적으로는 일반적으로 Fc 영역의 CH₂ 도메인의 Asn297에의 N-연결부에 의해 부착된 분지형 바이안테나리 올리고당을 포함한다. 예컨대, 문헌 [Wright et al. TIBTECH 15:26-32 (1997)]을 참조할 수 있다. 올리고당은 각종 탄수화물, 예컨대, 만노스, N-아세틸 글루코사민 (GlcNAc), 갈락토스, 및 시알산 뿐만 아니라, 바이안테나리 올리고당 구조의 "줄기"에서 GlcNAc에 부착된 푸코스를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 항체에서 올리고당은 특정의 특성이 개선된 항체 변이체 생성을 위해 변형될 수 있다.

[0300] 한 실시양태에서, Fc 영역에 (직접적으로 또는 간접적으로) 부착된 푸코스가 없는 탄수화물 구조를 가지는 항체 변이체를 제공한다. 예를 들어, 상기 항체 중 푸코스의 양은 1% 내지 80%, 1% 내지 65%, 5% 내지 65% 또는 20% 내지 40%일 수 있다. 푸코스의 양은 예를 들어, WO 2008/077546에 기술된 바와 같이, MALDI-TOF 질량 분석법에 의해 측정되는 바, Asn297에 부착된 모든 글리코구조체 (예컨대, 복합, 하이브리드 및 고만노스 구조체)의 총합 대비, Asn297에서 당 쇄 내의 푸스코의 평균 양을 계산함으로써 측정된다. Asn297이란, Fc 영역 중 대략 297번 위치 (Fc 영역 잔기의 Eu 넘버링)에 위치하는 아스파라긴 잔기를 지칭하지만; Asn297은 또한 항체 중 최소 서열 변이에 기인하여 297번 위치의 상류 또는 하류로부터 약 ±3개의 아미노산만큼의 거리까지, 즉, 294 내지 300번 위치에 위치할 수 있다. 상기 푸코실화 변이체는 개선된 ADCC 기능을 가질 수 있다. 예컨대, 미국 특허 공개 번호 US 2003/0157108 (프레스타, L.(Presta, L.)); US 2004/0093621 (교와 하클 코교 컴퍼니, 리미티드(Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd))을 참조할 수 있다. "탈푸코실화된" 또는 "푸코스-결핍" 항체 변이체에 관한 공개문헌의 예로는 US2003/01571; WO2000/61739; wo2001/29246; us2003/0115614; us2002/0164328; us2004/0093621; us2004/0132140; us2004/0110704; us2004/0110282; us2004/0109865; wo2003/085119; wo2003/084570; WO2005/035586; WO2005/035778; WO2005/053742; WO2002/031140; [Okazaki et al. J. Mol. Biol. 336:1239-1249 (2004)]; [Yamane-Ohnuki et al. Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004)]를 포함한다.

[0301] 탈푸코실화된 항체를 제조할 수 있는 세포주의 예로는 단백질 푸코실화가 결핍된 Lec13 CHO 세포 (문헌 [Ripka et al. Arch. Biochem. Biophys. 249:533-545 (1986)]; 미국 특허 출원 번호 US 2003/0157108 A1 (프레스타,

L.); 및 WO 2004/056312 A1 (아담스(Adams) 등), 특히, 실시예 11), 및 네아웃 세포주, 예컨대, 알파-1,6-푸코실트랜스퍼라제 유전자, FUT8, 네아웃 CHO 세포 (예컨대, 문헌 [Yamane-Ohnuki et al. Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004)]; [Kanda, Y. et al., Biotechnol. Bioeng., 94(4):680-688 (2006)]; 및 WO2003/085107 참조)를 포함한다.

[0302] 올리고당이 이분된, 예컨대, 항체의 Fc 영역에 부착된 바이안테나리 올리고당이 GlcNAc에 의해 이분된, 항체 변이체를 추가로 제공한다. 상기 항체 변이체는 감소된 푸코실화 및/또는 개선된 ADCC 기능을 가질 수 있다. 상기 항체 변이체의 예는 예컨대, WO 2003/011878 (장-마이레트(Jean-Mairet) 등); 미국 특허 번호 6,602,684 (우마나(Umana) 등); 및 US2005/0123546 (우마나 등)에 기술되어 있다. Fc 영역에 부착된 올리고당에 1개 이상의 갈락토스 잔기를 포함하는 항체 변이체 또한 제공한다. 상기 항체 변이체는 개선된 CDC 기능을 가질 수 있다. 상기 항체 변이체는 예컨대, WO 1997/30087 (파텔(Patel) 등); WO 1998/58964 (라쥬, S.(Raju, S.)); 및 WO 1999/22764 (라쥬, S.)에 기술되어 있다.

Fc 영역 변이체

[0304] 특정 실시양태에서, 하나 이상의 아미노산 변형이 본원에서 제공하는 항체의 Fc 영역 내로 도입될 수 있고, 이로써, Fc 영역 변이체가 생성될 수 있다. Fc 영역 변이체는 하나 이상의 아미노산 위치에 아미노산 변형 (예컨대, 치환)을 포함하는 인간 Fc 영역 서열 (예컨대, 인간 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 Fc 영역)을 포함할 수 있다.

[0305] 특정 실시양태에서, 본 발명은, 생체내에서 항체의 반감기가 중요하지만, 특정 이펙터 기능 (보체 고정화 및 ADCC)이 불필요하거나, 또는 유해한 경우와 같은 적용에 바람직한 후보 물질로 만드는, 모두가 아닌, 일부 이펙터 기능을 가지는 항체 변이체를 고려한다. CDC 및/또는 ADCC 활성의 감소/고갈을 확인하기 위해 시험관내 및/또는 생체내 세포독성 검정법을 수행할 수 있다. 예를 들어, 항체가 Fc γ 결합은 하지 않지만 (그러므로, 가능하게는 ADCC 활성이 없을 수 있다), FcRn 결합능을 보유한다는 것을 확인하기 위해 Fc 수용체 (FcR) 결합 검정법을 수행할 수 있다. ADCC를 매개하는 1차 세포인 NK 세포는 오직 Fc γ RIII만을 발현하지만, 단핵구는 Fc γ RI, Fc γ RII 및 Fc γ RIII를 발현한다. 조혈 세포 상의 FcR 발현은 문헌 [Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9:457-492 (1991)] 464 페이지 표 3에 요약되어 있다. 관심의 대상이 되는 분자의 ADCC 활성을 사정하는 시험관내 검정법의 비제한적인 예는 미국 특허 번호 5,500,362 (예컨대, 문헌 [Hellstrom, I. et al. Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 83:7059-7063 (1986)] 참조) 및 문헌 [Hellstrom, I. et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 82:1499-1502 (1985)]; 5,821,337 (문헌 [Bruggemann, M. et al., J. Exp. Med. 166:1351-1361 (1987)] 참조)에 기술되어 있다. 대안적으로, 비-방사성 검정 방법 (예를 들어, 유세포 분석법을 위해, ACTI™ 비-방사성 세포독성 검정법(셀테크놀러지, 인크.(CellTechnology, Inc.: 미국 캘리포니아주 마운틴 뷰)); 및 시토톡스 96(CytoTox 96)® 비-방사성 세포독성 검정법 (프로메가: 미국 위스콘신주 매디슨) 참조)이 사용될 수 있다. 상기 검정법에 유용한 이펙터 세포로는 말초 혈액 단핵구 세포 (PBMC) 및 자연살 (NK) 세포를 포함한다. 대안적으로, 또는 추가적으로, 관심의 대상이 되는 분자의 ADCC 활성을 생체내에서, 예컨대, 문헌 [Clynes et al. Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 95:652-656 (1998)]에 개시된 동물 모델에서 사정될 수 있다. 항체가 C1q에 결합하지 못하고, 따라서, 보체-의존성 세포독성 (CDC) 활성이 없다는 것을 확인하기 위해 C1q 결합 검정법 또한 수행할 수 있다. 예컨대, WO2006/029879 및 WO2005/100402의 C1q 및 C3c 결합 ELISA를 참조할 수 있다. 보체 활성화를 평가하기 위해, CDC 검정법을 수행할 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods 202:163 (1996)]; [Cragg, M.S. et al., Blood 101:1045-1052 (2003)]; 및 [Cragg, M.S. and M.J. Glennie, Blood 103:2738-2743 (2004)] 참조). 당업계에 공지된 방법을 사용하여 FcRn 결합 및 생체내 제거/반감기 Fc 측정 또한 수행할 수 있다 (예컨대, 문헌 [Petkova, S.B. et al., Int'l. Immunol. 18(12): 1759-1769 (2006)] 참조).

[0306] 이펙터 기능이 감소된 항체는 Fc 영역 잔기 238, 265, 269, 270, 297, 327 및 329 중 하나 이상의 것이 치환된 것을 포함한다 (미국 특허 번호 6,737,056). 상기 Fc 돌연변이체로는 아미노산 위치 265, 269, 270, 297 및 327 중 2개 이상의 위치에서 치환된 Fc 돌연변이체 (잔기 265 및 297이 알라닌으로 치환된 소위 "DANA" Fc 돌연변이체로 불리는 것 (미국 특허 번호 7,332,581) 포함)를 포함한다.

[0307] FcR에의 결합이 개선 또는 감소된 특정 항체 변이체가 기술되어 있다 (예컨대, 미국 특허 번호 6,737,056; WO 2004/056312, 및 문헌 [Shields et al., J. Biol. Chem. 9(2): 6591-6604 (2001)] 참조).

[0308] 특정 실시양태에서, 항체 변이체는 ADCC 활성을 개선시키는 하나 이상의 아미노산 치환, 예컨대, Fc 영역의 위치 298, 333, 및/또는 (잔기의 EU 넘버링)에서의 치환을 포함하는 FC 영역을 포함한다.

- [0309] 일부 실시양태에서, 예컨대, 미국 특허 번호 6,194,551, WO 99/51642, 및 문헌 [Idusogie et al., J. Immunol. 164: 4178-4184 (2000)]에 기술된 바와 같이, C1q 결합 및/또는 CDC 활성을 변경시키는 (즉, 개선 또는 감소시키는) 변경이 Fc 영역에서 이루어질 수 있다.
- [0310] 반감기가 연장되고, 모체 IgG의 태아로의 이동을 담당하는 신생아 Fc 수용체 (FcRn) (문헌 [Guyer et al., J. Immunol. 117:587 (1976)] 및 [Kim et al., J. Immunol. 24:249 (1994)])에의 결합이 개선된 항체는 US2005/0014934A1 (힌تون(Hinton) 등)에 기술되어 있다. 상기 항체는 Fc 영역의 FcRn에의 결합을 개선시키는 하나 이상의 치환을 Fc 영역 그 안에 포함한다. 상기 Fc 변이체로는 Fc 영역 잔기: 238, 256, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424 또는 434 중 하나 이상에서 치환된, 예컨대, Fc 영역 잔기 434가 치환된 (미국 특허 번호 7,371,826) 것을 포함한다. 또한, Fc 영역 변이체의 다른 예에 관해서는 문헌 [Duncan & Winter, Nature 322:738-40 (1988)]; 미국 특허 번호 5,648,260; 미국 특허 번호 5,624,821; 및 WO 94/29351을 참조할 수 있다.
- [0311] 시스테인 조작된 항체 변이체
- [0312] 특정 실시양태에서, 항체의 하나 이상의 잔기가 시스테인 잔기로 치환된, 시스테인 조작된 항체, 예컨대, "티오 MAb"를 생성하는 것이 바람직할 수 있다.
- [0313] 특정 실시양태에서, 치환된 잔기는 항체의 접근가능한 부위에 존재한다. 본원에서 추가로 기술되는 바와 같이, 상기 잔기를 시스테인으로 치환함으로써, 이로써, 반응성 티올 기가 항체의 접근가능한 부위에 위치하고, 항체를 다른 모이어티, 예컨대, 약물 모이어티 또는 링커-약물 모이어티에 접합시켜 면역접합체를 생성하는 데 사용될 수 있다. 특정 실시양태에서, 하기 잔기 중 임의의 하나 이상의 잔기가 시스테인으로 치환될 수 있다: 경쇄의 V205 (카바트(Kabat) 넘버링); 중쇄의 A118 (EU 넘버링); 및 중쇄 Fc 영역의 S400 (EU 넘버링). 시스테인 조작된 항체는 예컨대, 미국 특허 번호 7,521,541에 기술된 바와 같이 생성될 수 있다.
- [0314] 진단 및 치료 방법
- [0315] 본 발명의 항체는 인간 또는 동물 대상체, 바람직하게 인간에서의 진단 또는 치료 방법에서 사용하기 위한 것으로 디자인된다.
- [0316] 따라서, 본 발명의 추가 측면은 예컨대, 검출가능한 표지, 예컨대, FITC에 접합된 하나 이상의 시약과 함께, 제공하는 바와 같은 항체를 투여하는 단계를 포함하는 진단 방법을 제공한다. 제공하는 바와 같은 항체는 생검화된 조직으로부터 유래된 암 세포에 대한 신속하고, 신뢰가능한 검사 개발에서 사용될 수 있다. 예를 들어, 항체는 전이성 암 세포, 예컨대, 체액, 예컨대, 혈액 또는 림프 중에서 순환하는 것으로 관찰될 수 있는 순환 종양 세포에 대한 검사로서 사용될 수 있다. 관심의 대상이 되는 다른 암으로는 유방암, 폐암, 위암, 두부경부암, 결장직장암, 신장암, 췌장암, 자궁암, 간암, 방광암, 자궁내막암 및 전립샘암 뿐만 아니라, 림프종(예컨대, 비호지킨 림프종, NHL) 및 백혈병 (특히, 급성 골수 백혈병, AML)을 포함한다.
- [0317] 본 발명의 추가 측면은 제공하는 바와 같은 항체를 투여하는 단계를 포함하는 치료 방법, 상기 항체를 포함하는 제약 조성물, 치료 방법에서 사용하기 위한 본원에 기술된 바와 같은 항체, 본원에 기술된 특정 임상 적응증의 치료 방법에서 사용하기 위한 본원에 기술된 바와 같은 항체, 및 투여용 의약 제조에서, 예를 들어, 제약상 허용되는 부형제와 함께 항체를 제제화하는 단계를 포함하는, 의약 또는 제약 조성물 제조 방법에서 상기 항체의 용도를 제공한다.
- [0318] 임상 적응증
- [0319] 인간 Ax1에 대한 특이성이 높은 항체가 치료적 이익을 제공하는 데 사용될 수 있는 임상 적응증으로는 Ax1이 과다발현되거나, 또는 Ax1 길항작용이 임상적으로 유익한 이익을 제공하게 되는 임의의 병태를 포함한다. 이는 면역 장애, 심혈관 장애, 혈전증, 당뇨병, 면역 체크포인트 장애, 섬유증성 장애 (섬유증), 또는 중식성 질환, 예컨대, 암, 특히, 전이성 암을 포함한다. 추가로, Ax1은 다수의 상피 기원의 암에서 중요한 역할을 하는 것으로 공지되어 있다.
- [0320] 관심의 대상이 되는 섬유증성 장애로는 사시, 경피증, 켈로이드, 신장기원 전신 섬유증, 폐 섬유증, 특발성 폐 섬유증 (IPF), 낭성 섬유증 (CF), 전신 경화증, 심장 섬유증, 비알콜성 지방간염 (NASH), 다른 유형의 간 섬유증, 원발성 쓸개관 간경화증, 신장암 섬유증, 암, 및 죽상동맥경화증을 포함한다. 상기 질환에서, 조직에서의 만성 섬유증 발생은 이환된 기관의 구조를 현저히 변경시키고, 이어서, 기관 기능 결손을 유발한다. 이러한 기관에의 지속적인 마모 과정의 결과로서, 섬유증을 포함하는 다수의 질환은 대개 진행성 병태이고, 장기간의 불

량한 예후를 가진다 (문헌 [Rockey, D.C., Bell, P.D. and Hill, J.A. (2015), N. Engl. Med., Vol. 372, pp. 1138-1149] 참조).

[0321] 관심의 대상이 되는 면역 체크포인트 장애로는 만성 바이러스성 감염, 흑색종, 결장직장암, 유방암, 난소암, 비소세포 폐암 (NSCLC), 전립샘암, 신장암 세포 암, 췌장암, 식도암, 방광암, 골수종, 콩팥암, 방광암, 뇌 종양, 및 림프종을 포함한다.

[0322] 관심의 대상이 되는 암으로는 백혈병, 예컨대, 제한하는 것은 아니지만, 급성 백혈병, 급성 림프구성 백혈병, 급성 골수구성 백혈병, 예컨대, 골수모구성, 전골수구성, 골수단핵구성, 단핵구성, 적백혈병 백혈병 및 골수형성이상 증후군, 만성 백혈병, 예컨대, 제한하는 것은 아니지만, 만성 골수구성 (파립구성) 백혈병, 만성 림프구성 백혈병, 모발상 세포 백혈병; 진성 적혈구증가증; 림프종, 예컨대, 제한하는 것은 아니지만, 호지킨병, 비호지킨병; 다발성 골수종, 예컨대, 제한하는 것은 아니지만, 무증상 다발성 골수종, 비분비성 골수종, 골경화성 골수종, 혈장 세포 백혈병, 고립성 형질세포종 및 골수외성 형질세포종; 발렌스트롬 마크로글로불린혈증; 유의성이 결정되지 않은 모노클로날 감마글로불린 장애; 양성 모노클로날 감마글로불린 장애; 중쇄 질환; 뼈 및 결합 조직 육종, 예컨대, 제한하는 것은 아니지만, 뼈 육종, 골육종, 연골육종, 유잉 육종, 악성 거대 세포 종양, 뼈 섬유육종, 척삭종, 골막 육종, 연조직 육종, 혈관육종(angiosarcoma) (혈관육종(hemangiosarcoma)), 섬유육종, 카포시 육종, 평활근육종, 지방육종, 림프관육종, 전이성 암, 신경집종, 횡문근육종, 윤활막 육종; 뇌 종양, 예컨대, 제한하는 것은 아니지만, 신경교종, 교모세포종, 성상세포종, 뇌 줄기 신경교종, 뇌실막세포종, 회소돌기아교세포종, 비신경아교세포 종양, 청신경초종, 두개인두종, 수모세포종, 수막종, 송과체종, 송과체모세포종, 원발성 뇌 림프종; 유방암, 예컨대, 제한하는 것은 아니지만, 샘암종, 소엽 (소세포) 암종, 판내 암종, 수질성 유방암, 점액 유방암, 판 유방암, 유두상 유방암, 원발성 암, 파젯트병 및 염증성 유방암; 부신암, 예컨대, 제한하는 것은 아니지만, 크롬친화세포종 및 부신피질 암종; 갑상샘암, 예컨대, 제한하는 것은 아니지만, 유두상 또는 소포성 갑상샘암, 수질성 갑상샘 암종 및 수질성 갑상샘암 및 역형성 갑상샘암; GIST-위장관 기질 종양; 췌장암, 예컨대, 제한하는 것은 아니지만, 인슐린종, 가스트린종, 글루카곤종, 비포마, 소마토스타틴-분비 종양 및 카르시노이드 또는 섬 세포 종양; 뇌하수체암, 예컨대, 제한하는 것은 아니지만, 쿠싱 질환, 프로락틴-분비 종양, 말단거대증 및 요봉증; 눈암, 예컨대, 제한하는 것은 아니지만, 안구 흑색종, 예컨대, 홍채 흑색종, 맥락막 흑색종 및 섬모체 흑색종 및 망막모세포종; 질암, 예컨대, 편평 세포 암종, 샘암종 및 흑색종; 외음부암, 예컨대, 편평 세포 암종, 흑색종, 샘암종, 기저 세포 암종, 육종, 및 파젯트병; 자궁경부암, 예컨대, 제한하는 것은 아니지만, 편평 세포 암종 및 샘암종; 자궁암, 예컨대, 제한하는 것은 아니지만, 자궁내막 암종 및 자궁 육종; 난소암, 예컨대, 제한하는 것은 아니지만, 난소 상피 암종, 경계 종양, 생식 세포 종양 및 기질 종양; 식도암, 예컨대, 제한하는 것은 아니지만, 편평암, 샘암종, 낭샘암종, 점액표피양 암종, 샘편평 암종, 육종, 흑색종, 형질세포종, 사마귀모양 암종 및 귀리 세포 (소세포) 암종; 위암, 예컨대, 제한하는 것은 아니지만, 샘암종, 균상 (폴립모양), 궤양성, 표재성 확산, 미만성 확산, 악성 림프종, 지방육종, 섬유육종 및 암육종; 결장암; 직장암; 간암, 예컨대, 제한하는 것은 아니지만, 간세포 암종 및 간모세포종, 담낭암, 예컨대, 샘암종; 담관암종, 예컨대, 제한하는 것은 아니지만, 유두상, 결절 및 미만성; 폐암, 예컨대, 비소세포 폐암 (NSCLC), 편평 세포 암종 (표피모양 암종), 샘암종, 대세포 암종 및 소세포 폐암 (SCLC); 고환암, 예컨대, 제한하는 것은 아니지만, 배아 종양, 고환종, 역형성, 고전 (전형), 정모세포, 비정상피종성, 배아 암종, 기형종 암종, 음모암종 (난황낭 종양), 전립샘암, 예컨대, 제한하는 것은 아니지만, 샘암종, 평활근육종 및 횡문근육종; 생식기암, 예컨대, 음경암; 구강암, 예컨대, 제한하는 것은 아니지만, 편평 세포 암종; 기저세포암; 타액선암, 예컨대, 제한하는 것은 아니지만, 샘암종, 점막표피모양 암종 및 낭선암종; 인두암, 예컨대, 제한하는 것은 아니지만, 편평 세포암 및 사마귀모양; 피부암, 예컨대, 제한하는 것은 아니지만, 기저 세포 암종, 편평 세포 암종 및 흑색종, 표재성 확산 흑색종, 결절 흑색종, 흑색점 악성 흑색종, 말단 흑자 흑색종; 콩팥암, 예컨대, 제한하는 것은 아니지만, 신장 세포암, 투명 세포 신장 세포 암종, 샘암종, 콩팥세포암종, 섬유육종, 이행 세포암 (신우 및/또는 요관); 월름즈 종양; 방광암, 예컨대, 제한하는 것은 아니지만, 이행 세포 암종, 편평 세포암, 샘암종, 암육종을 포함한다. 추가로, 암은 점액육종, 골원성 육종, 내피육종, 림프관내피 모세포육종, 중피종, 윤활막종, 혈관모세포종, 상피 암종, 낭선암종, 기관지원성 암종, 땀샘 암종, 피지샘 암종, 유두상 암종 및 유두상 샘암종을 포함한다. 바람직하게, 암은 유방암, 흑색종, 전립샘암, 난소암, 결장직장암, 폐암 또는 신경교종 암으로부터 선택된다. 더욱 바람직하게, 암은 전이성 유방암 또는 폐암이다. 순환 종양 세포의 표적화 및 치료법이 구상된다

[0323] 전이성 암의 치료법은 원발성 종양이 위치하는 위치에 의존한다. 유방암이 폐로 퍼진 경우, 예를 들어, 유방암은 그대로 남아있고, 치료법은 현재 암이 폐에 존재한다는 사실에 의해서가 아니라, 유방 내의 전이성 암 기원에 의해 결정된다. 이 시점에서 약 5%에서는 전이성 암은 발견되지만, 원발성 종양이 확인되지 못한다. 상기

전이성 암의 치료법은 그의 기원이라기보다는 그의 위치에 의해 좌우된다. 전이성 암은 (알고 있다면) 원래의 종양의 조직에 의해 명명된다. 예를 들어, 뇌로 퍼진 유방암은 뇌로 전이된 전이성 유방암으로 명명된다.

[0324] 본 발명에 따른 항-Ax1 치료법은 Ax1이 과다발현되거나, 또는 Ax1 길항작용이 임상적으로 유익한 이익을 제공하게 되는 병태를 앓는 환자에게 뚜렷한 이익을 제공하기 위해 사용될 수 있다. 치료법은 주사 (예컨대, 정맥내 주사)에 의해, 또는 국부 전달 방법에 의해 제공될 수 있다. 제공하는 바와 같은 항체는 예를 들어, 순환 종양 세포 (CTC) 또는 다른 전이성 세포를 표적화하기 위해, 표적 조직에 또는 전신으로 제약 조성물을 직접 전달하는 데 사용될 수 있다.

[0325] 본 발명의 추가 측면에서, 대상체를 본원에서 기술된 바와 같은 항체 (또는 그의 접합체)와 접촉시키는 단계를 포함하는, 대상체에서 암 줄기 세포를 억제시키는 방법을 제공한다. 상기 방법에서 사용하기 위한 항체 및 접합체 또한 구상된다.

EGFR 길항작용

[0327] 본 발명은 또한 개체에게 유효량의, 본원에 개시된 항-Ax1 항체 중 임의의 것을 투여하여 구성적 Ax1을 억제시키는 단계를 포함하는, 구성적 Ax1 활성화를 억제시키는 방법을 제공한다.

[0328] 한 측면에서, 본 발명은 대상체가 Ax1 발현, Ax1 활성화 돌연변이 또는 Ax1 유전자 증폭을 보이는지 여부를 측정하는 단계, Ax1 활성화 돌연변이 또는 Ax1 유전자 증폭을 보이는 대상체에게 EGFR 길항체 및 본원에 기술된 항-Ax1 항체 중 임의의 것을 투여하는 단계를 포함하는, EGFR 활성화 돌연변이 또는 EGFR 유전자 증폭과 연관된 암을 앓는 대상체를 치료하는 방법으로서, 여기서, 대상체는 EGFR 길항체를 이용하는 치료법에 대한 내성 발생을 보이는 것인 방법을 제공한다.

[0329] 한 측면에서, 본 발명은 (i) EGFR 길항체로 치료받는 대상체를 모니터링하여 대상체가 Ax1 발현, Ax1 활성화 돌연변이 또는 Ax1 유전자 증폭을 발생시키는지 여부를 측정하는 단계, 및 (ii) 대상체가 Ax1 활성화 돌연변이 또는 Ax1 유전자 증폭 발생을 보인 경우, 대상체의 치료 요법을, EGFR 길항체 이외에도 본원에 기술된 항-Ax1 항체 중 임의의 것을 포함하도록 변형시키는 단계를 포함하는, EGFR 활성화 돌연변이 또는 EGFR 유전자 증폭과 연관된 암을 앓는 대상체를 치료하는 방법을 제공한다.

[0330] 한 측면에서, 본 발명은 (i) EGFR 길항체로 치료받는 대상체를 모니터링하여 대상체가 상기 억제제에 대한 내성을 발생시키는지 여부를 측정하는 단계, (ii) 대상체를 시험하여 대상체가 Ax1 발현, Ax1 활성화 돌연변이 또는 Ax1 유전자 증폭을 보이는지 여부에 관해 측정하는 단계, 및 (iii) 대상체가 Ax1 활성화 돌연변이 또는 Ax1 유전자 증폭을 보인 경우, 대상체의 치료 요법을, EGFR 길항체 이외에도 본원에 기술된 항-Ax1 항체 중 임의의 것을 포함하도록 변형시키는 단계를 포함하는, EGFR 활성화 돌연변이 또는 EGFR 유전자 증폭과 연관된 암을 앓는 대상체를 치료하는 방법을 제공한다.

[0331] 한 측면에서, 본 발명은 (i) EGFR 길항체로 치료받는 대상체 집단을 모니터링하여 치료제에 대한 내성을 발생시키는 대상체를 확인하는 단계, (ii) 내성을 띠는 대상체를 시험하여 대상체가 Ax1 발현, Ax1 활성화 돌연변이 또는 Ax1 유전자 증폭을 보이는지 여부를 측정하는 단계, 및 (iii) 대상체가 Ax1 발현, Ax1 활성화 돌연변이 또는 Ax1 유전자 증폭을 보인 경우, 대상체의 치료 요법을, EGFR 길항체 이외에도 본원에 기술된 항-Ax1 항체 중 임의의 것을 포함하도록 변형시키는 단계를 포함하는, EGFR 길항체를 평가하는 방법을 제공한다.

[0332] 한 측면에서, 본 발명은 세포를, 본원에 기술된 항-Ax1 항체 중 임의의 것 및 EGFR 길항체와 접촉시키는 단계를 포함하는, 암 세포에서 EGFR 인산화를 감소시키는 방법으로서, 여기서, 상기 암 세포는 EGFR 길항체에 대한 내성을 획득한 것이고, 여기서, 상기 세포는 Ax1 활성화 돌연변이 또는 Ax1 유전자 증폭을 포함하는 것인 방법을 제공한다.

[0333] 한 측면에서, 본 발명은 세포를, 본원에 기술된 항-Ax1 항체 중 임의의 것 및 EGFR 길항체와 접촉시키는 단계를 포함하는, 암 세포에서 PBK 매개 신호전달을 감소시키는 방법으로서, 여기서, 상기 암 세포는 EGFR 길항체에 대한 내성을 획득한 것이고, 여기서, 상기 세포는 Ax1 발현, Ax1 활성화 돌연변이 또는 Ax1 유전자 증폭을 포함하는 것인 방법을 제공한다.

[0334] 한 측면에서, 본 발명은 세포를, 본원에 기술된 항-Ax1 항체 중 임의의 것 및 EGFR 길항체와 접촉시키는 단계를 포함하는, 암 세포에서 EGFR-매개 신호전달을 감소시키는 방법으로서, 여기서, 상기 암 세포는 EGFR 길항체에 대한 내성을 획득한 것이고, 여기서, 상기 세포는 Ax1 발현, Ax1 활성화 돌연변이 또는 Ax1 유전자 증폭을 포함하는 것인 방법을 제공한다.

- [0335] 한 측면에서, 본 발명은 세포를, 본원에 기술된 항-Ax1 항체 중 임의의 것 및 EGFR 길항제와 접촉시키는 단계를 포함하는, EGFR 길항제에 대한 암 세포의 감수성을 회복시키는 방법으로서, 여기서, 상기 암 세포는 EGFR 길항제에 대한 내성을 획득한 것이고, 여기서, 상기 세포는 Ax1 발현, Ax1 활성화 돌연변이 또는 Ax1 유전자 증폭을 포함하는 것인 방법을 제공한다.
- [0336] 한 측면에서, 본 발명은 세포를, 본원에 기술된 항-Ax1 항체 중 임의의 것 및 EGFR 길항제와 접촉시키는 단계를 포함하는, 암 세포의 성장 또는 증식을 감소시키는 방법으로서, 여기서, 상기 암 세포는 EGFR 길항제에 대한 내성을 획득한 것이고, 여기서, 상기 세포는 Ax1 발현, Ax1 활성화 돌연변이 또는 Ax1 유전자 증폭을 포함하는 것인 방법을 제공한다.
- [0337] 한 측면에서, 본 발명은 세포를, 본원에 기술된 항-Ax1 항체 중 임의의 것 및 EGFR 길항제와 접촉시키는 단계를 포함하는, 암 세포의 아폽토시스를 증가시키는 방법으로서, 여기서, 상기 암 세포는 EGFR 길항제에 대한 내성을 획득한 것이고, 여기서, 상기 세포는 Ax1 발현, Ax1 활성화 돌연변이 또는 Ax1 유전자 증폭을 포함하는 것인 방법을 제공한다.
- [0338] 한 측면에서, 본 발명은 세포를, 본원에 기술된 항-Ax1 항체 중 임의의 것 및 EGFR 길항제와 접촉시키는 단계를 포함하는, EGFR 길항제에 대한 암 세포의 저항성을 감소시키는 방법으로서, 여기서, 상기 암 세포는 EGFR 길항제에 대한 내성을 획득한 것이고, 여기서, 상기 세포는 Ax1 활성화 돌연변이 또는 Ax1 유전자 증폭을 포함하는 것인 방법을 제공한다.
- [0339] 한 측면에서, 본 발명은 세포를, 본원에 기술된 항-Ax1 항체 중 임의의 것 및 EGFR 길항제와 접촉시키는 단계를 포함하는, 암 세포에서 획득한 EGFR 길항제 내성을 치료하는 방법으로서, 여기서, 상기 세포는 Ax1 활성화 돌연변이 또는 Ax1 유전자 증폭을 포함하는 것인 방법을 제공한다.
- [0340] 일부 실시양태에서, 암 세포는 임의의 EGFR-유도된 암이다. 일부 실시양태에서, 암 세포는 EGFR 활성화 돌연변이를 포함한다. 일부 실시양태에서, 암 세포는 EGFR 유전자 증폭을 포함한다. 일부 실시양태에서, EGFR 유전자 증폭은 2배 이상의 증폭이다. 일부 실시양태에서, Ax1 증폭은 2배 이상의 증폭이다. 일부 실시양태에서, 암 세포는 EGFR 길항제에 대한 내성 증가와 연관된 EGFR 유전자 돌연변이를 포함한다. 일부 실시양태에서, EGFR 길항제에 대한 내성 증가와 연관된 EGFR 유전자 돌연변이는 EGFR의 T790M 돌연변이이다.
- [0341] 일부 실시양태에서, EGFR 길항제는 소분자 치료제, 핵산 치료제, 또는 단백질 치료제이다. 일부 실시양태에서, EGFR 길항제는 항체, 안티센스 분자, 또는 소분자 키나제 억제제이다. 일부 실시양태에서, EGFR 길항제는 제피티닙, 에를로티닙, 세툭시맙, 파니투무맙으로 이루어진 군으로부터 선택되는 EGFR 키나제 억제제이다. 일부 실시양태에서, EGFR 길항제는 세툭시맙, 파니투무맙으로 이루어진 군으로부터 선택되는 항-EGFR 항체이다. 일부 실시양태에서, 핵산 치료제는 siRNA 분자이다.
- [0342] 한 측면에서, 본 발명은 대상체로부터의 암 세포 중 Ax1 발현, Ax1 활성화 돌연변이 또는 Ax1 유전자 증폭을 검출하는 단계를 포함하는, EGFR 길항제 및 본원에 기술된 항-Ax1 항체 중 임의의 것을 이용하는 치료법에 대한 후보로서 대상체를 확인하는 방법으로서, 여기서, 상기 대상체는 EGFR 길항제로 치료를 받아 왔고, 상기 EGFR 길항제에 대한 내성을 획득한 암을 앓고 있는 대상체인 것인 방법을 제공한다.
- [0343] 한 측면에서, 본 발명은 대상체로부터의 암 세포 중 Ax1 발현, Ax1 활성화 돌연변이 또는 Ax1 유전자 증폭의 존재를 검출하는 단계를 포함하고, 여기서, 상기 Ax1 발현, Ax1 활성화 돌연변이 또는 Ax1 유전자 증폭이 존재한다면, 이는 EGFR 길항제에 대한 내성을 획득할 위험이 있음을 시사하는 것인, EGFR 길항제로 치료받고 있고, 상기 EGFR 길항제에 대한 내성을 획득할 위험이 있는 대상체를 확인하는 방법을 제공한다.
- [0344] 한 측면에서, 본 발명은 대상체에게 EGFR 길항제 및 본원에 기술된 항-Ax1 항체 중 임의의 것을 투여하는 단계를 포함하는, EGFR 길항제를 이용한 치료법에 대해 내성을 띠는 암을 앓는 대상체를 치료하는 방법을 제공한다.
- [0345] 한 측면에서, 본 발명은 대상체가 Ax1 발현을 보이는지 여부, 예컨대, Ax1 수준 및/또는 활성이 상승하였는지 여부를 측정하는 단계, 및 Ax1 발현을 보인, 예컨대, Ax1 활성이 상승한 대상체에게 EGFR 길항제 및 본원에 기술된 항-Ax1 항체 중 임의의 것을 투여하는 단계를 포함하는, EGFR 활성화 돌연변이 또는 EGFR 유전자 증폭과 연관된 암을 앓는 대상체를 치료하는 방법으로서, 여기서, 상기 대상체는 EGFR 길항제를 이용한 치료법에 대해 내성 발생을 보이는 대상체인 것인 방법을 제공한다.
- [0346] 한 측면에서, 본 발명은 (i) EGFR 길항제로 치료받는 대상체를 모니터링하여 대상체가 Ax1 발현을 보이는지 여부, 예컨대, 수준 및/또는 Ax1 활성이 상승하였는지 여부를 측정하는 단계, 및 (ii) 대상체가 Ax1 발현을 보인

경우, 예컨대, Ax1 수준 및/활성이 상승한 경우, 대상체의 치료 요법을, EGFR 길항제 이외에도 본원에 기술된 항-Ax1 항체 중 임의의 것을 포함하도록 변형시키는 단계를 포함하는, EGFR 활성화 돌연변이 또는 EGFR 유전자 증폭과 연관된 암을 앓는 대상체를 치료하는 방법을 제공한다.

[0347] 한 측면에서, 한 측면에서, 본 발명은 (i) EGFR 길항제로 치료받는 대상체를 모니터링하여 대상체가 상기 억제제에 대한 내성을 발생시키는지 여부를 측정하는 단계, (ii) 대상체를 시험하여 대상체가 Ax1 발현을 보이는지 여부, 예컨대, Ax1 수준 및/활성이 상승하였는지 여부를 측정하는 단계, 및 (iii) 대상체가 상승된 Ax1 수준 및/활성을 보인 경우, 대상체의 치료 요법을, EGFR 길항제 이외에도 본원에 기술된 항-Ax1 항체 중 임의의 것을 포함하도록 변형시키는 단계를 포함하는, EGFR 활성화 돌연변이 또는 EGFR 유전자 증폭과 연관된 암을 앓는 대상체를 치료하는 방법을 제공한다.

[0348] 또 다른 측면에서, 본 발명은 세포를 EGFR 길항제 및 본원에 기술된 항-Ax1 항체 중 임의의 것과 접촉시킴으로써 (i) EGFR 길항제에 대한 암 세포의 감수성을 회복시키는 방법, (ii) EGFR 길항제에 대한 암 세포의 내성을 감소시키는 방법, 및/또는 (iii) 암 세포에서 획득한 EGFR 길항제 내성을 치료하는 방법을 제공한다.

[0349] 예시적인 실시양태에서, 암 세포는 EGFR 길항제에 대한 내성을 획득하였고, 예컨대, Ax1 유전자 중 활성화 돌연변이, Ax1 유전자 증폭, 또는 Gas6 매개된 Ax1 활성화와 연관된, Ax1 활성 및/또는 발현 수준의 상승을 포함하는 것이다. 본원에 개시된 본 방법은 암 세포의 감수성을 회복시키는 데, 내성을 감소시키는 데 및/또는 획득한 내성을 치료하는 데 사용될 수 있다.

[0350] 또 다른 측면에서, 본 발명은 세포를 EGFR 길항제 및 본원에 기술된 항-Ax1 항체 중 임의의 것과 접촉시킴으로써 암 세포의 성장 및/또는 증식을 감소시키거나, 또는 암 세포의 아폽토시스를 증가시키는 방법을 제공한다. 예시적인 실시양태에서, 암 세포는 EGFR 길항제에 대한 내성을 획득하였고, 예컨대, Ax1 유전자 중 활성화 돌연변이, Ax1 유전자 증폭, 또는 Gas6 매개된 Ax1 활성화와 연관된, Ax1 활성 및/또는 발현 수준의 상승을 포함하는 것이다.

제약 조성물

[0352] 본 발명의 항체는 보통, 항체 이외에도 1종 이상의 성분을 포함할 수 있는 제약 조성물 형태로 투여될 것이다.

[0353] 따라서, 본 발명에 따른, 및 본 발명에 따른 용도의 제약 조성물은 활성 성분 이외에도 제약상 허용되는 부형제, 담체, 완충제, 안정제 또는 당업자에게 널리 공지된 다른 물질을 포함할 수 있다. 상기 물질은 비독성이어야 하고, 활성 성분의 효능을 방해하지 않아야 한다. 담체 또는 다른 물질의 정확한 성질은, 경구 투여, 또는 주사, 예컨대, 정맥내 주사에 의한 투여일 수 있는 투여 경로에 의존할 것이다. 제약 조성물은 인간 및 수의학적 의약에서 인간용 또는 동물용 용도의 것일 수 있다.

[0354] 본원에 기술된 각종 상이한 형태의 제약 조성물을 위한 상기와 같은 적합한 부형제의 예는 문헌 ["Handbook of Pharmaceutical Excipients", 2nd Edition, (1994), Edited by A Wade and PJ Weller]에서 살펴볼 수 있다.

[0355] 치료적 용도로 허용되는 담체 또는 희석제는 제약 분야에 널리 공지되어 있고, 예를 들어, 문헌 [Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co. (A. R. Gennaro edit. 1985)]에 기술되어 있다. 적합한 담체의 예로는 락토스, 전분, 글루코스, 메틸셀룰로스, 마그네슘 스테아레이트, 만낫톨, 소르비톨 등을 포함한다. 적합한 희석제의 예로는 에탄올, 글리세롤, 물 및 완충처리된 염수를 포함한다.

[0356] 최선의 제약 담체, 부형제 또는 희석제는 의도하는 투여 경로 및 표준 제약 관행과 관련하여 선택될 수 있다. 제약 조성물은 임의의 적합한 결합제(들), 윤활제(들), 혼탁화제(들), 코팅제(들), 가용화제(들), 완충제(들), 향미제(들), 계면활성제(들), 중점제(들), 보존제(들) (항산화제 포함) 등, 및 제제가 의도되는 수혜자의 혈액과 등장성이 되게 하는 목적으로 포함되는 물질을 담체, 부형제 또는 희석제로서 또는 그 이외에 추가로 포함할 수 있다.

[0357] 적합한 결합제의 예로는 전분, 젤라틴, 천연 당, 예컨대, 글루코스, 무수 락토스, 자유 유동 락토스, 베타-락토스, 옥수수 감미제, 천연 및 합성 검, 예컨대, 아카시아, 트라가칸트 또는 알긴산 나트륨, 카르복시메틸 셀룰로스 및 폴리에틸렌 글리콜을 포함한다.

[0358] 적합한 윤활제로는 소듐 올레이트, 소듐 스테아레이트, 마그네슘 스테아레이트, 소듐 벤조에이트, 소듐 아세테이트, 염화나트륨 등을 포함한다. 보존제, 안정제, 염료 및 심지어 향미제까지도 제약 조성물 중에 제공될 수 있다. 보존제의 예로는 소듐 벤조에이트, 소르브산 및 p 히드록시벤조산의 에스테르를 포함한다. 항산화제 및

현탁화제 또한 사용될 수 있다.

- [0359] 제약 제제는 경구, 국소 (진피, 협측 및 설하 포함), 직장 또는 비경구 (피하, 진피내, 근육내 및 정맥내), 비강 및 폐 투여, 예컨대, 흡입에 의한 투여에 적합한 것을 포함한다. 제제는 적절할 경우, 개별 투여 단위로 편리하게 제공될 수 있고, 약학 분야에 널리 공지되어 있는 방법 중 임의의 방법에 의해 제조될 수 있다. 모든 방법은 활성 화합물을 액체 담체와 또는 미분된 고체 담체와, 또는 그 둘 모두와 함께 회합시킨 후, 이어서, 필요할 경우, 생성물을 원하는 제제로 성형화시키는 단계를 포함한다. 담체가 고체인 경우, 경구 투여용으로 적합한 제약 제제는 가장 바람직하게는 각각 미리 결정된 양으로 활성제를 함유하는, 단위 투약 제제, 예컨대, 볼루스, 캡슐제 또는 정제로서 제공된다. 정제는 임의적으로 하나 이상의 부성분과 함께 압착 또는 성형시킴으로써 제조될 수 있다. 압착 정제는 임의적으로 결합제, 윤활제, 불활성 희석제, 활택제, 계면활성제 또는 분산제와 함께 혼합된 예컨대, 분제 또는 과립제와 같은, 자유 유동 형태의 활성제를 적합한 기기에서 압착시킴으로써 제조될 수 있다. 성형 정제는 불활성 액체 희석제와 함께 활성제를 성형화시킴으로써 제조될 수 있다. 정제는 임의적으로 코팅될 수 있고, 코팅되지 않은 경우, 이는 임의적으로 스코어링될 수 있다. 캡슐제는 활성제를 단독으로 또는 하나 이상의 부성분과 함께 캡슐제 웰 내로 충전시킨 후, 이어서, 상기를 일반 방식으로 실링함으로써 제조될 수 있다. 카세제는 캡슐제와 유사하며, 여기서, 활성제는 임의의 부성분(들)과 함께 라이스 페이퍼 봉투에 실링된다. 활성제는 또한 예를 들어, 투여 전에 물 중에 현탁될 수 있거나, 또는 음식물에 뿌릴 수 있는, 분산 가능한 과립제로 제제화될 수 있다. 과립제는 예컨대, 사세에 패키징될 수 있다. 담체가 액체인 경우, 경구 투여용으로 적합한 제제는 수성 또는 비수성 액체 중 액제로서 또는 현탁제로서 또는 수중유 액체에 멀젼으로서 제공될 수 있다.
- [0360] 경구 투여용 제제는 방출 조절형 투여 형태, 예컨대, 활성제가 적절한 방출 조절 매트릭스 중에서 제제화되거나, 또는 적합한 방출 조절 필름으로 코팅된 정제를 포함한다. 상기 제제는 특히 예방적 용도에 편리할 수 있다.
- [0361] 담체가 고체인 경우, 직장 투여용으로 적합한 제약 제제는 가장 바람직하게는 단위 투여 좌제로 제공된다. 적합한 담체로는 코코아 버터 및 당업계에서 일반적으로 사용되는 다른 물질을 포함한다. 좌제는 편리하게는 활성제를 연화된 또는 용융된 담체(들)와 함께 혼합한 후, 냉각시키고, 몰드에서 성형화시킴으로써 형성될 수 있다.
- [0362] 비경구 투여용으로 적합한 제약 제제는 수성 또는 유지성 비히클 중의 활성제로 구성된, 멸균 액제 또는 현탁제를 포함한다.
- [0363] 주사용 제제는 볼루스 주사 또는 연속 주입용으로 그에 맞게 적합화될 수 있다. 상기 제제는 편리하게는 사용이 요구될 때까지 제제 도입 후 실링되는 단위 투약 또는 다회 투약 용기로 제공된다. 대안적으로, 활성제는 사용 전, 적합한 비히클, 예컨대, 발열원 무함유 멸균수로 구성되는 분제 형태일 수 있다.
- [0364] 활성 화합물은 또한 예컨대, 피하로 또는 근육내로 근육내 주사에 의해 또는 이식에 의해 투여될 수 있는 지속성 데포 제제로서 제제화될 수 있다. 데포 제제는 예를 들어, 적합한 중합체 또는 소수성 물질 또는 이온 교환 수지를 포함할 수 있다. 상기 지속성 제제는 특히 예방적 용도에 편리하다.
- [0365] 구강을 통한 폐 투여용으로 적합한 제제는, 활성 화합물을 함유하고, 바람직하게는 직경 범위가 0.5 내지 7 μm 인 입자가 수해자의 기관지 수상 구조로 전달될 수 있도록 제공된다. 한가지 가능성으로서, 상기와 같은 제제는 미분된 분말 형태로, 이는 흡입 장치에서 사용하기 위한 것으로, 적합하게는 예를 들어, 젤라틴으로 이루어진 관통가능한 캡슐제로 또는 대안적으로, 활성제, 적합한 액체 또는 기체 추진제 및 임의적으로 다른 성분, 예컨대, 계면활성제 및/또는 고체 희석제를 포함하는 자가 추진 제제로서 편리하게 제공될 수 있다. 적합한 액체 추진제로는 프로판 및 클로로플루오르카본을 포함하고, 적합한 기체 추진제로는 이산화탄소를 포함한다. 활성제가 용액 또는 현탁액의 소적 형태로 분배되는 자가 추진 제제는 또한 사용될 수 있다.
- [0366] 상기 자가 추진 제제는 당업계에 공지되어 있는 것과 유사하고, 확립된 방법에 의해 제조될 수 있다. 적합하게, 이는 원하는 분무 특징을 가지는 자동 기능 밸브 또는 수동식 밸브가 장착된 용기에 제공된다: 밸브는 그의 매 작동시 고정된 부피, 예를 들어, 25 내지 100 μl 씩 전달하는 계량형인 것이 이롭다.
- [0367] 추가의 가능성으로서, 활성제는 가속 기류 또는 초음파 교반을 사용하여 흡입을 위한 미세 소적 미스트를 생성하게 하는 분무기 또는 네뷸라이저에서 사용하기 위한 액제 또는 현탁제 형태의 것일 수 있다.
- [0368] 비강 투여용으로 적합한 제제는 일반적으로 폐 투여용으로 상기 기술된 것과 유사한 제제를 포함한다. 분배될 때, 상기 제제는 바람직하게는 비강내 잔류될 수 있도록 하기 위해 입자 직경이 10 내지 200 μm 범위여야 한다;

이는 적절하게는 적절한 입자 크기의 분체를 사용하거나, 적절한 벨브를 선택함으로써 달성될 수 있다. 다른 적합한 제제로는 코에 가깝게 장착된 용기로부터 콧구멍을 통한 신속한 흡입에 의해 투여하기 위한 것으로 입자 직경이 20 내지 500 μm 범위인 조분제(coarse powder) 및 수성 또는 오일성 용액 또는 혼탁액 중 0.2 내지 5% w/v의 활성제를 포함하는 점비제를 포함한다.

[0369] 제약상 허용되는 담체는 당업자에게 널리 공지되어 있고, 0.1 M 및 바람직하게, 0.05 M 포스페이트 완충제 또는 0.8% 염수를 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 추가로, 상기 제약상 허용되는 담체는 수성 또는 비수성 용액, 혼탁액 및 에멀젼일 수 있다. 비수성 용매의 예로는 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 식물성 오일, 예컨대, 올리브 오일 및 주사용 유기 에스테르, 예컨대, 에틸 올레이트가 있다. 수성 담체로는 물, 알콜/수성 용액, 에멀젼 또는 혼탁액(염수 및 완충처리된 매질)을 포함한다. 비경구용 비히클로는 염화나트륨 용액, 링거 텍스트로스, 텍스트로스 및 염화나트륨, 락테이트화된 링거 또는 고정유를 포함한다. 보존제 및 다른 첨가제, 예컨대, 항미생물제, 항산화제, 퀼레이팅제, 불활성 가스 등 또한 존재할 수 있다.

[0370] 국소 투여용으로 적합한 제제는 예를 들어, 젤제, 크림제 또는 연고제로 제공될 수 있다. 상기 제제는 예컨대, 상처 또는 궤양 표면 상에 직접 도포되거나 또는 치료하고자 하는 부위에 및 그 위에 도포될 수 있는 적합한 지지체, 예컨대, 밴드, 거즈, 메쉬 등 위에 탑재되어 있어 상처 또는 궤양 부위에 도포될 수 있다.

[0371] 치료하고자 하는 부위, 예컨대, 상처 또는 궤양 부위에 직접 분무하거나 또는 뿌릴 수 있는 액체 또는 분말 제제 또한 제공될 수 있다. 대안적으로, 담체, 예컨대, 밴드, 거즈, 메쉬 등이 제제와 함께 분무되거나, 뿌려질 수 있고, 이어서, 치료하고자 하는 부위에 도포될 수 있다.

[0372] 본 발명의 추가 측면에 따라, 활성 화합물(들)을 담체와 함께 예를 들어, 혼합하여 회합시키는 단계를 포함하는, 상기 기술된 바와 같은 제약 조성물 또는 수의학적 조성물을 제조하는 방법을 제공한다. 일반적으로, 제제는 활성제를 액체 담체 또는 미분된 고체 담체 또는 그 둘 모두와 함께 균일하고 밀접하게 회합시키고, 이어서, 필요할 경우, 생성물을 성형화시킴으로써 제공된다. 본 발명은 작용제를 제약상 또는 수의학상 허용되는 담체 또는 비히클과 함께 회합시키는 단계를 포함하는, 제약 조성물을 제조하는 방법으로까지 확장된다.

투여

[0373] 본 발명의 제약 조성물은 경구, 직장, 비강, 기관지내, 국소(협측 및 설하 포함), 질 또는 비경구(피하, 근육내, 정맥내, 동맥내 및 진피내 포함), 복강내 또는 경막내 투여에 맞게 적합화될 수 있다. 바람직하게, 제제는 정맥내로 또는 피하로 투여되는 제제이다.

[0374] 제제는 편리하게 단위 투여 형태로, 즉, 단위 용량 또는 단위 용량의 다중 또는 서브 단위를 함유하는 개별 분량의 형태로 제공될 수 있다. 예로서, 제제는 정제 형태 및 지속 방출형 캡슐제 형태일 수 있고, 이는 약학 분야에 널리 공지되어 있는 임의의 방법에 의해 제조될 수 있다.

[0375] 본 발명에서 경구 투여용 제제는 각각 미리 결정된 양으로 활성제를 함유하는 개별 단위, 예컨대, 캡슐제, 연질 캡슐제, 점액제, 카세제, 환제 또는 정제로서; 분제 또는 과립제로서; 수성 액체 또는 비수성 액체 중 활성제의 액제, 에멀젼 또는 혼탁제로서; 또는 수중유 액체 에멀젼 또는 유중수 액체 에멀젼으로서; 또는 볼루스 등으로서 제공될 수 있다. 바람직하게, 상기 조성물은 1 용량당 1 내지 250 mg 및 더욱 바람직하게, 10-100 mg의 활성 성분을 함유한다.

[0376] 경구 투여용 조성물의 경우(예컨대, 정제 및 캡슐제), "허용되는 담체"라는 용어는 비히클, 예컨대, 일반 부형제, 예컨대, 결합제, 예를 들어, 시럽, 아카시아, 젤라틴, 소르비톨, 트라가칸트, 폴리비닐피롤리돈(포비돈), 메틸셀룰로스, 에틸셀룰로스, 소듐 카르복시메틸셀룰로스, 히드록시프로필-메틸셀룰로스, 수크로스 및 전분; 충전제 및 담체, 예를 들어, 옥수수 전분, 젤라틴, 락토스, 수크로스, 미정질 셀룰로스, 카올린, 만낫톨, 이인산 칼슘, 염화나트륨 및 알긴산; 및 윤활제, 예컨대, 마그네슘 스테아레이트, 소듐 스테아레이트 및 다른 금속성 스테아레이트, 글리세롤 스테아레이트, 스테아르산, 실리콘 유체, 탈크 왁스, 오일 및 콜로이드성 실리카를 포함한다. 향미제, 예컨대, 페퍼민트, 원터그린 오일, 체리 향미제 등도 또한 사용될 수 있다. 투여 형태가 쉽게 확인될 수 있게 만드는 착색제를 첨가하는 것이 바람직할 수도 있다. 정제는 또한 당업계에 널리 공지된 방법에 의해 코팅될 수 있다.

[0377] 정제는 임의적으로 하나 이상의 부성분과 함께 압착 또는 성형시킴으로써 제조될 수 있다. 압착 정제는 임의적으로 결합제, 윤활제, 불활성 회석제, 보존제, 계면활성제 또는 분산제와 함께 혼합된 예컨대, 분제 또는 과립제와 같은, 자유 유동 형태의 활성제를 적합한 기기에서 압착시킴으로써 제조될 수 있다. 성형 정제는 불활성

액체 희석제로 습윤화된 분말형 화합물을 혼합물을 적합한 기기에서 성형화시킴으로써 제조될 수 있다. 정제는 임의적으로 코팅되거나, 스코어링될 수 있고, 활성제가 젠속으로 방출되거나, 조절식으로 방출되도록 제제화될 수 있다.

[0379] 경구 투여용으로 적합한 다른 제제로는 향미가 부가된 기재, 일반적으로, 수크로스 및 아카시아 또는 트라가칸트 중 활성제를 포함하는 로젠파; 불활성 기재, 예컨대, 젤라틴 및 글리세린 또는 수크로스 및 아카시아 중 활성제를 포함하는 향정; 및 적합한 액체 담체 중 활성제를 포함하는 구강 세척제를 포함한다.

[0380] 투여용으로 다른 형태의 것은 정맥내로, 동맥내로, 경막내로, 피하로, 진피내로, 복강내로 또는 근육내로 주사될 수 있고, 멜균 또는 멜균가능한 용액으로부터 제조되는 액제 또는 에멀젼을 포함한다. 주사가능한 형태는 전형적으로 1 용량당 10-1,000 mg, 바람직하게, 10-250 mg의 활성 성분을 함유한다.

[0381] 본 발명의 제약 조성물은 또한 좌제, 페서리, 혼탁제, 에멀젼, 로션제, 연고제, 크림제, 젤제, 분무제, 액제 또는 살포성 분제 형태일 수 있다.

[0382] 경피 투여의 대체 수단은 피부 패치의 사용에 의한 것이다. 예를 들어, 활성 성분은 폴리에틸렌 글리콜 또는 액체 파라핀의 수성 에멀젼으로 이루어진 크림제 내로 혼입될 수 있다. 활성 성분은 또한 1 내지 10중량%의 농도로 필요에 따라 안정제 및 보존제와 함께 백립 또는 백색 연질 파라핀 기재로 이루어진 연고제로 혼입될 수 있다.

[0383] 대체 제제화 전략법은 경구 또는 좌제 경로로 적합한 제제를 제공할 수 있다. 투여 경로는 치료법의 물리화학적 특징에 의해, 질환에 대한 특별한 고려 사항에 의해, 효능을 최적화시키기 위해, 또는 부작용을 최소화시키기 위해 결정될 수 있다.

[0384] 추가의 투여 모드는 유치 장치의 사전 코팅, 또는 다르게는 유치 장치 내로의 혼입을 포함하고, 이를 위해 최적 량의 항체는 적절한 실험에 의해 결정될 것이다.

[0385] 본 발명의 일부 바람직한 실시양태에서, 항체 분자는 단량체 단편, 예컨대, Fab 또는 scFv이다. 상기 항체 단편은 반감기가 비교적 짧은 특징을 가질 수 있다.

투여량

[0387] 당업계의 숙련가는 과도한 실험 없이도 대상체에게 투여하기 위한 본 조성물 중 하나의 적절한 용량을 쉽게 결정할 수 있다. 전형적으로, 의사는 개별 환자에 가장 적합한 실제 투여량을 결정할 것이며, 이는 사용되는 특정 작용제의 활성, 상기 작용제의 대상 안정성 및 작용 기간, 연령, 체중, 일반적인 건강 상태, 성별, 섭식, 투여 모드 및 횟수, 배출 속도, 약물 조합, 특정 질환의 중증도 및 개체가 받고 있는 요법을 비롯한, 다양한 인자에 따라 달라질 것이다.

[0388] 본 발명에 따라, 제공되는 조성물이 개별 환자에게 투여될 수 있다. 투여는 바람직하게, 환자에게 유익성을 보여주는 데 충분한 "치료학상 유효량"으로 이루어진다. 상기와 같은 유익성은 1종 이상의 증상을 적어도 호전시키는 것일 수 있다. 실제 투여량, 및 투여 속도 및 투여 시간 경로는 치료되는 것의 성질 및 중증도에 의존할 것이다. 치료법 처방, 예컨대, 투여량 등의 결정은 일반 의사 및 다른 의학 박사의 책임하에 있다. 항체의 적절한 용량은 당업계에 널리 공지되어 있고; 문헌 [Ledermann J.A. et al. (1991) Int. J. Cancer 47: 659-664]; [Bagschaw, K.D. et al. (1991) Antibody, Immunoconjugates and Radiopharmaceuticals 4: 915-922]를 참조할 수 있다.

[0389] 정확한 용량은 항체가 진단용인지 또는 치료용인지 여부, 치료하고자 하는 부위의 크기 및 위치, 항체 (예컨대, 전체 항체, 항체 단편 또는 디아바디)의 정확한 성질, 및 항체에 부착된 임의의 검출가능한 표지 또는 다른 분자의 성질을 비롯한, 다수의 인자에 의존할 것이다. 전형적인 항체 용량이 볼루스로서 정맥내로 투여될 수 있다. 다른 투여 모드로는 유사한 전체 누적량을 달성하기 위해 수시간에 걸쳐 정맥내 주입을 포함한다. 이는 성인 환자의 단일 치료를 위한 용량이며, 이는 아동 및 유아를 위해 비례 방식으로 조정될 수 있고, 이는 또한 분자량에 비례하여 다른 항체 포맷에 대해 조정될 수 있다. 치료는 의사의 재량대로 매일, 매주 2회, 매주, 또는 매달인 간격으로 반복될 수 있다.

[0390] 본원에 개시된 투여량은 평균 사례에 대한 예시적인 것이다. 물론 더 높거나 또는 더 낮은 투여량 범위가 합당한 개별 사례도 존재할 수 있으며, 이는 본 발명의 범주 내에 포함된다.

[0391] 본 발명에 따라, Ax1을 억제시키기 위해 유효량의 작용제가 투여될 수 있다. 물론, 상기 투여량은 작용제의 투

여 유형에 따라 추가로 변형될 수 있다. 예를 들어, 급성 요법을 위한 "유효량"을 달성하기 위해서는 비경구 투여가 바람직하다. 비록 근육내 볼루스 주사 또한 유용하기는 하지만, 물 중 5% 텍스트로스 또는 생리 식염수 중 화합물 또는 적합한 부형제를 포함하는 유사한 제제의 정맥내 주입이 가장 효과적이다. 전형적으로, 비경구 적 용량은 혈장 중 약물의 농도를, 키나제를 억제시키거나, 또는 표적 수용체를 포화시키는 데 효과적인 농도로 유지시키는 방식으로 약 0.01 내지 약 100 mg/kg; 바람직하게, 0.1 내지 20 mg/kg일 될 것이다. 작용제는 약 0.4 내지 약 400 mg/kg/일의 총 1일 용량을 달성하기 위한 수준으로 1일 1 내지 4회 투여될 수 있다. 치료학상 유효한 활성제의 정확한 양 및 상기 작용제를 최적으로 투여하는 경로는, 작용제의 혈중 수준과, 치료적 효과를 달성하는 데 요구되는 농도를 비교함으로써 당업계의 숙련가에 의해 쉽게 결정될 수 있다.

[0392] 본 발명의 작용제는 또한 약물의 농도가 본원에 개시된 치료적 지표 중 하나 이상을 달성하는 데 충분할 정도의 방식으로 환자에게 경구적으로 투여될 수 있다. 전형적으로, 작용제를 함유하는 제약 조성물은 환자 상태와 일관되는 방식으로 약 0.1 내지 약 50 mg/kg의 경구 용량으로 투여된다. 바람직하게, 경구 용량은 약 0.5 내지 약 20 mg/kg이 될 것이다.

[0393] 본 발명의 작용제는 주어진 약리학적 효과를 달성하는 데 필요한 작용제의 농도를 측정하기 위해 수개의 생물학적 검정법 중 하나로 시험될 수 있다.

조합 요법

[0395] 본 발명의 항-Ax1 항체는 치료하고자 하는 병태에 따라 단독으로, 또는 다른 치료법과 함께 조합하여 동시에 또는 순차적으로 투여될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 항체 또는 그의 접합체는 항암 단일요법으로서, 또는 하기 언급되는 바와 같은 다른 암 치료법과 함께 조합 요법으로 사용될 수 있다. 다른 치료법은 적합한 용량의 통증 완화 약물, 예컨대, 비-스테로이드성 항염증성 약물 (예컨대, 아스피린, 이부프로펜 또는 케토프로펜) 또는 아편제, 예컨대, 모르핀, 또는 항구토제의 투여를 포함할 수 있다.

조합 요법에서 사용하는 데 적합한 작용제

[0398] 이는 알킬화제, 예컨대, 알킬 술포네이트, 예컨대, 부술판;

[0399] 질소 머스타드, 예컨대, 클로람부실, 시클로포스파미드, 에스트라무스틴, 이포스파미드, 메클로레타민, 멜팔란 및 우라무스틴, 에틸렌이민 유도체, 예컨대, 티오텐파;

[0400] 니트로소우레아, 예컨대, 카무스틴, 로무스틴 및 스트렙토조토신, 트리아젠, 예컨대, 다카바진, 프로카바진 및 테모졸라마이드;

[0401] 백금 화합물, 예컨대, 시스플라틴, 카보플라틴, 옥살리플라틴, 사트라플라틴 및 피코플라틴 온나플라틴, 테트라 플라틴, 스피로플라틴, 이프로플라틴, 클로로(디에틸렌디아미노)-백금 (II) 클로라이드, 디클로로(에틸렌디아미노)-백금 (II), 디아미노(2-에틸말로나토)백금 (II), (1,2-디아미노시클로헥산)말로나토백금 (II), (4-카르복시 프탈로)-(1,2-디아미노시클로헥산)백금 (II), (1,2-디아미노시클로헥산)-(이소시트레이트)백금 (II), 및 (1,2-디아미노시클로헥산)-시스-(피루베이토)백금 (II);

[0402] 항대사산물, 예컨대, 항폴레이트제, 예컨대, 메토트렉세이트, 폐메트렉세드, 랄티트렉세드 및 트리메트렉세이트,

[0403] 피리미딘 유사체, 예컨대, 아자시티딘, 카페시타빈, 시타라빈, 에다트렉세이트, 플록수리딘, 플루오로우라실, 쟈시타빈 및 트록사시타빈;

[0404] 퓨린 유사체, 예컨대, 클라드리빈, 클로로데옥시아데노신, 크로파라빈, 플루다라빈, 메르캅토퓨린, 펜토스타틴 및 티오구아닌;

[0405] 천연 생성물, 예컨대, 항종양 항생제, 예컨대, 블레오마이신, 닥티노마이신, 미트라마이신, 미토마이신, 미토크 산트론, 포르피로마이신 및 안트라시클린, 예컨대, 다우노루비신, 독소루비신, 에피루비신, 이다루비신 및 발루 비신;

[0406] 유사분열 억제제, 예컨대, 빈카 알카로이드 빈블라스틴, 빈베시르, 빈크리스틴, 빈데신 및 비노렐빈;

[0407] 효소, 예컨대, L-아스파라기나제 및 PEG-L-아스파라기나제;

- [0408] 미세소관 중합체 안정제, 예컨대, 탁산 파클리탁셀 및 도세탁셀; 및
- [0409] 토포이소머라제 I 억제제, 예컨대, 캄프토테신 이리노테칸 및 토포테칸; 토포이소머라제 II 억제제, 예컨대, 포도필로톡신, 암사크린, 에토포시드, 테니포시드, 로속산트론 및 악티노마이신;
- [0410] 호르몬 및 호르몬 길항제, 예컨대, 안드로겐제, 예컨대, 플루옥시메스테론 및 테스토락톤,
- [0411] 항안드로겐제, 예컨대, 비칼루타미드, 시프로테론, 플루타미드 및 널루타미드;
- [0412] 코르티코스테로이드제, 예컨대, 텍사메타손 및 프레드니손;
- [0413] 아로마타제 억제제, 예컨대, 아미노글루테티미드, 아나스트로졸, 엑스메스탄, 포르메스탄 및 레트로졸;
- [0414] 에스트로겐제, 예컨대, 디에틸스틸베스트롤;
- [0415] 항에스트로겐제, 예컨대, 폴베스트란트, 랄록시펜, 타목시펜 및 토레미펜;
- [0416] 황체 형성 호르몬 방출 호르몬 (LHRH) 효능제 및 길항제, 예컨대, 아바렐릭스, 부세레린, 고세렐린, 류프롤라이드, 히스트렐린, 데슬로렐린, 나파렐린 아세테이트 및 트립토렐린;
- [0417] 프로게스틴제, 예컨대, 메드록시프로게스테론 아세테이트 및 메게스트롤 아세테이트, 및
- [0418] 갑상샘 호르몬, 예컨대, 레보티록신 및 리오티로닌;
- [0419] PKB 경로 억제제, 예컨대, 페리포신, 엔자스타우린 히드로클로라이드 및 트리시리빈;
- [0420] P13K 억제제, 예컨대, 세마포어 및 SF1126;
- [0421] mTOR 억제제, 예컨대, 라파마이신 및 유사체;
- [0422] CDK 억제제, 예컨대, 셀리시슬립, 알보시닙 및 7-히드록시스타우로스포린;
- [0423] COX-2 억제제, 예컨대, 셀레콕시브;
- [0424] HDAC 억제제, 예컨대, 트리코스타틴 A, 수베로일아닐리드 히드록삼산 및 클라미도신;
- [0425] DNA 메틸라제 억제제, 예컨대, 테모졸로미드; 및
- [0426] 기타 작용제, 예컨대, 알트레타민, 삼산화비소, 탈리도미드, 레날리도미드, 갈륨 니트레이트, 레바미솔, 미토탄, 히드록시우레아, 옥트레오티드, 프로카바진, 수라민, 광역학적 화합물, 예컨대, 메톡살렌 및 소듐 포르피며 및 프로테아좀 억제제, 예컨대, 보테조맙.
- [0427] 분자 표적화 요법제, 예컨대:
- [0428] 기능성 치료제, 예컨대, 유전자 요법제;
- [0429] 안티센스 요법제;
- [0430] 티로신 키나제 억제제, 예컨대, 애를로티닙 히드로클로라이드, 제피티닙, 이마티닙 메실레이트 및 세막사닙;
- [0431] RAF 억제제, 예컨대, 소라페닙;
- [0432] 유전자 발현 조절제, 예컨대, 레티노이드 및 렉시노이드, 예를 들어, 아다팔렌, 벡사로텐, 트랜스-레티노산, 9-시스-레티노산 및 N-(4-히드록시페닐)레틴아미드;
- [0433] 표현형-지정 요법제, 예컨대, 모노클로날 항체, 예컨대, 알렘투주맙, 베바시주맙, 세톡시맙, 이브리투모맙 티옥세탄, 리툭시맙 및 트라스투주맙;
- [0434] 면역독소, 예컨대, 엔타신, 방사성면역컨쥬게이트, 예컨대, I-토시투모맙, 및
- [0435] 암 백신.
- [0436] 생물학적 요법제, 예컨대:
- [0437] 인터페론, 예컨대, 인터페론-[알파]2a 및 인터페론-[알파]2b, 및
- [0438] 인터루킨, 예컨대, 알데스루킨, 데니루킨 디프티톡스 및 오프레베킨. Ax1 억제제, 예컨대, 1-(6,7-디히드로-5H-벤조[6,7]시클로헵타[1,2-c]피리다진-3-일)-N3-((7-(S)-피롤리딘-1-일)-6,7,8,9-테트라하이드로-5H-벤조

[7] 안눌렌-2-일)-1H-1,2,4-트리아졸-3,5-디아민 (BGB324/R428), CH5451098 (Roche) 및 PCT/US07/089177, PCT/US2010/021275 및 PCT/EP2011/004451 (본원에서 참조로 포함)에 기술된 Ax1 억제제.

[0439] 암 세포에 대하여 작용하도록 의도되는 상기 작용제 이외에도, 항암 요법은 보호제 또는 보조제, 예컨대,

[0440] 세포보호제, 예컨대, 아미포스틴 및 텍스라족산;

[0441] 포스포네이트, 예컨대, 파미드로네이트 및 콜레드론산; 및

[0442] 자극 인자, 예컨대, 에포에틴, 다베포에틴, 필그라스팀, PEG-필그라스팀 및 사르그라모스팀을 사용하는 것을 포함한다.

[0443] 다수의 조합 화학요법제 요법, 예컨대, 카보플라틴/파클리탁셀, 카페시타빈/도세탁셀, 플루오로우라실/레바미솔, 플루오로우라실/류코보린, 메토트렉세이트/류코보린 및 트라스투주맙/파클리탁셀의 조합 단독 또는 카보플라틴과의 추가의 조합 등이 당업계에 공지되어 있다.

면역 체크포인트 조절제

[0445] 본원에 개시된 항-Ax1 항체와 함께 조합하여 사용하기 위한 특히 바람직한 부류의 작용제는 면역 체크포인트 조절제 (ICM), 예컨대, 면역 체크포인트 억제제 (ICI)이다.

[0446] 면역계에서 억제 경로인 면역 체크포인트는 면역 내성을 유도하기 위해 종양에 의해 선임될 수 있다. T-세포 자극성 및 억제성 수용체 및 수지상 세포 자극성 수용체를 비롯한, 면역 체크포인트를 차단 또는 조절하고, 이로써, 암의 면역 내성을 감소 또는 역전시키는 항체를 사용하는 것이 암 연구에서 중요한 수단이 된다.

[0447] 면역 체크포인트 조절 항체 사용을 통해 조절될 수 있는 T-세포 자극성 수용체로는 D28, ICOS, 4-1BB, OX40, GITR, CD27, TWEAKR, HVEM 및 TIM-1을 포함한다. 면역 체크포인트 조절 항체 사용을 통해 조절될 수 있는 T-세포 억제성 수용체로는 PD-L1, CTLA-4, PD-1, BTLA, TIM-3, VISTA, LAG-3 및 TIGIT를 포함한다. 면역 체크포인트 조절 항체 사용을 통해 조절될 수 있는 수지상 세포 자극성 수용체로는 CD40 및 4-1BB를 포함한다.

[0448] 따라서, 본원에 개시된 항-Ax1 항체와 함께 조합하여 사용하는 데 적합한 ICM으로는 다수가 당업계에 공지되어 있는 것인, 면역 체크포인트 조절 또는 억제성 항체를 포함한다. 특히 적합한 면역 체크포인트 조절 항체로는 하기의 것을 포함한다:

[0449] CTLA-4 표적화 항체 (이필리무맙(Ipilimumab) 및 트레멜리무맙(Tremelimumab) 포함).

[0450] PD-1 표적화 항체 (펨브롤리주맙(Pembrolizumab), 니볼루맙(Nivolumab) 및 AMP-514/MEDI0680 포함).

[0451] BD-L1 표적화 항체 (MPDL3280A, MEDI4736, MSB0010718C 및 BMS-936559 포함).

[0452] 4-1BB 표적화 항체 (우렐루맙 및 PF-05082566 포함).

[0453] OX-40 표적화 항체 (MEDI6469, MEDI6383 (rOX40L) 및 MOXR0916 포함).

[0454] GITR 표적화 항체 (TRX518 포함).

[0455] CD27 표적화 항체 (CDX-1127 포함).

[0456] CD40 표적화 항체 (CP-870,893 포함).

[0457] LAG3 표적화 항체 (BMS-986016 포함).

[0458] ICM 항체의 조합이 본 발명의 항-AXL 항체와 함께 사용되는 경우, 사용되는 ICM 항체는 모두 억제성 수용체를 표적화할 수 있거나, 사용되는 ICM 항체는 모두 자극성 수용체를 표적화할 수 있거나, 억제성 수용체 및 자극성 수용체 표적화 ICM 항체 조합이 사용될 수 있다.

[0459] 그러므로, 본 개시내용은 (예를 들어, 증식성 질환, 예컨대, 암의) 치료에서 사용하기 위한, 본원에 기술된 바와 같은, Ax1에 결합하는 항체로서, 여기서, 치료는 하나 이상의 면역 체크포인트 조절 항체를 추가로 포함하는 것인 항체를 제공한다. 유사하게, 증식성 질환 (예컨대, 암) 치료용 의약의 제조에서의, 본원에 기술된 바와 같은, Ax1에 결합하는 항체로서, 여기서, 치료는 하나 이상의 면역 체크포인트 조절 항체를 추가로 포함하는 것인 항체를 제공한다. 항체는 이필리무맙, 트레멜리무맙, 펨브롤리주맙, 니볼루맙, AMP-514/MEDI0680, MPDL3280A, MEDI4736, MSB0010718C, BMS-936559, 우렐루맙, PF-05082566, MEDI6469, MEDI6383 (rOX40L), MOXR0916, TRX518, CDX-1127, CP-870,893 및 BMS-986016으로부터 선택될 수 있다. 암은 폐암, 흑색종,

유방암, 난소암 또는 암종으로부터 선택될 수 있다.

[0460] 본 발명의 화합물은 하나 이상의 면역 체크포인트 조절 항체 이전에, 하나 이상의 면역 체크포인트 조절 항체와 동시에, 또는 하나 이상의 면역 체크포인트 조절 항체 이후에 투여될 수 있다.

항-종양 항체

[0462] 본 발명의 항-Ax1 항체와 함께 조합하여 사용하는 데 특히 바람직한 또 다른 부류의 작용제는 Ax1 이외의 다른 표적에 특이적인 항-종양 항체이다. 본 발명의 항-Ax1 항체와 함께 조합하여 사용하는 데 적합한 상기 항체는 하기 표에 기술되어 있다

항원 분류	항원의 예	상기 표적에 대하여 생성된 치료적 mAb의 예	항원을 발현하는 종양 유형
조혈 분화 항원 고형 종양에 의해 발현된 당단백질	CD20	리툭시맙 이브리투모맙 티옥세탄 및 톡시투모맙	비호지킨 림프종 림프종
	CD30	브렌툭시맙 베도틴	호지킨 림프종
	CD33	겔투주맙 오조가미신	급성 골수성 백혈병
	CD52	알렙투주맙	만성 림프구성 백혈병
	EpCAM	IGN101 및 아데카투무맙	상피 종양 (유방, 결장 및 폐)
	CEA	라베투주맙	유방, 결장 및 폐 종양
	gpA33	huA33	결장직장 암종
	뮤신	펩투모맙 및 오레고보맙	유방, 결장, 폐 및 난소 종양
	TAG-72	CC49 (민레툭모맙)	유방, 결장 및 폐 종양

[0463]

항원 분류	항원의 예	상기 표적에 대하여 생성된 치료적 mAb 의 예	항원을 발현하는 종양 유형
-------	-------	----------------------------------	----------------

당지질 탄수화물 항-혈관신생 mAb 의 표적 성장 및 분화 신호전달	CAIX	cG250	신장 세포 암종
	PSMA	J591	전립샘 암종
	폴레이트-결합 단백질	MOv18 및 MORAB- 003 (파르래투주맙)	난소 종양
	강글리오시드 (예컨대, GD2, GD3 및 GM2)	3F8, ch14.18 및 KW- 2871	신경외배엽 종양 및 일부 상피 종양
	Le ⁺	hu3S193 및 IgN311	유방, 결장, 폐 및 전립샘 종양
	VEGF	베바시주맙	종양 혈관구조
	VEGFR	IM-2C6 및 CDP791	상피-유래 고형 종양
	인테그린 αVβ3	에타라시주맙	종양 혈관구조
	인테그린 α5β1	블로식시맙	종양 혈관구조
	EGFR	세톡시맙, 파니투무맙, 니모투주맙 및 806	신경교종, 폐, 유방, 결장, 및 두부경부 종양
	ERBB2	트라스투주맙 및 파투주맙	유방, 결장, 폐, 난소 및 전립샘 종양
	ERBB3	MM-121	유방, 결장, 폐, 난소 및 전립샘 종양
	MET	AMG 102, METMAB 및 SCH 900105	유방, 난소 및 폐 종양
	IGF1R	AVE1642, IMC-A12, MK- 0646, R1507 및 CP 751871	신경교종, 폐, 유방, 두부경부, 전립샘 및 갑상샘 암
	EPHA3	KB004 및 IIIA4	폐, 신장 및 결장 종양, 흑색종, 신경교종 및 혈액학상의 악성 종양
	TRAILR1	마파투무맙 (HGS-ETR1)	결장, 폐 및 혀장 종양 및 혈액학상의 악성 종양

[0464]

항원 분류	항원의 예	상기 표적에 대하여 생성된 치료적 mAb 의 예	항원을 발현하는 종양 유형
-------	-------	----------------------------------	----------------

기질 및 세포외 메트릭스 항원	TRAILR2	HGS-ETR2 및 CS- 1008	
	RANKL	테노수맙	전립샘암 및 골 전이
	FAP	시브로투주맙 및 F19	결장, 유방, 폐, 췌장, 및 두부경부 종양
테나신	81C6		신경교종, 유방 및 전립샘 종양

[0465]

[0466]

[0467] 본 명세서 전역에 걸쳐, 바람직하게, 본원에 기술된 방법은 시험관내 또는 생체외에서 수행된다. 방법은 또한 생체내에서 수행될 수 있다.

[0468]

[0469] 리포터 및 검정법

- [0470] 본 발명은 본원에서 제공하는 바와 같은 항체가 Ax1에 결합하도록, 또는 결합할 수 있도록 하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다. 언급한 바와 같이, 상기 결합은 생체내에서, 예컨대, 항체, 또는 항체를 코딩하는 핵산의 투여 이후에 이루어질 수 있거나, 또는 시험관내에서, 예를 들어, ELISA, 웨스턴 블로트 분석, 면역세포화학법, 면역조직화학법, 면역침강법 또는 친화도 크로마토그래피에서 이루어질 수 있다.
- [0471] Ax1 수용체에 결합된 항체의 양을 측정할 수 있다. 정량화는 시험 샘플 중의 항원의 양에 관한 것일 수 있고, 이는 진단학적으로 관심의 대상이 될 수 있다.
- [0472] 샘플 중 항체의 반응성은 임의의 적절한 수단에 의해 측정될 수 있다. 방사성면역검정법 (RIA)이 한가지 가능성이이다. 방사성 표지된 항원을 표지되지 않은 항원 (시험 샘플)과 혼합하고, 항체에 결합할 수 있도록 한다. 결합된 항원을 비결합 항원으로부터 물리적으로 분리시키고, 항체에 결합된 방사성 항원의 양을 측정한다. 시험 샘플 중 항원이 많으면 많을수록, 더 적은 방사성 항원이 항체에 결합하게 될 것이다. 항원 또는 리포터 분자에 연결된 유사체를 사용하는 경쟁적 결합 검정법 또한 비-방사성 항원과 함께 사용될 수 있다. 리포터 분자는 스펙트럼으로 단리되는 흡수 또는 방출 특징이 있는 형광 색소, 포스포르, 또는 레이저 염료일 수 있다. 적합한 형광 색소로는 플루오레세인, 로다민, 피코에리트린 및 텍사스 레드(Texas Red)를 포함한다. 적합한 발색성 염료는 디아미노벤자린을 포함한다.
- [0473] 다른 리포터로는 거대분자 콜로이드성 입자 또는 미립자 물질, 예컨대, 착색된 라텍스 비드, 검출가능한 신호가 직접 또는 간접적으로 시각적으로 관찰될 수 있도록, 전자적으로 검출될 수 있도록 또는 다르게 기록될 수 있도록 유발할 수 있는 자성 또는 상자성, 및 생물학적으로 또는 화학적으로 활성인 작용제를 포함한다. 이들 분자는 예를 들어, 발색 또는 변색, 또는 전기적 특성 변화를 일으키는 반응을 촉매화하는 효소일 수 있다. 이는 분자적으로 여기될 수 있고, 이로써, 에너지 상태 사이에서의 전자 전이가 특징적인 스펙트럼 흡수 또는 방출을 일으킨다. 이는 바이오센서와 함께 사용되는 화학적 엔티티를 포함할 수 있다. 비오틴/아비딘 또는 비오틴/스트렙트아비딘 및 알칼리성 포스파타제 검출 시스템이 사용될 수 있다.
- [0474] 개별 항체-리포터 접합체에 의해 발생된 신호는 샘플 (정상 및 시험) 중 관련된 항체 결합에 관한 정량가능한 절대 또는 상대 데이터를 도출해 내는 데 사용될 수 있다.
- [0475] 본 발명은 또한 경쟁 검정법, 즉, 경쟁 검정법에서 본 발명에 의해 제공되는 항체를 사용함으로써 샘플 중 항원의 수준을 측정하는 방법에서 항원 수준을 측정하기 위한 상기와 같은 항체의 용도를 제공한다. 이는 비결합 항원으로부터 결합된 항원의 물리적 분리가 요구되지 않는 경우일 수 있다. 리포터 분자를 항체에 연결함으로써, 이를 통해 결합시 물리적 또는 광학적 변화가 발생하는 것이 한가지 가능성이다. 리포터 분자는 검출가능한, 및 바람직하게, 측정가능한 신호를 직접 또는 간접적으로 생성할 수 있다. 리포터 분자의 연결은 직접 또는 간접적으로 공유적으로, 예컨대, 웹티드 결합을 통해, 또는 비공유적으로 이루어질 수 있다. 웹티드 결합을 통한 연결은 항체 및 리포터 분자를 코딩하는 유전자 융합물의 재조합 발현의 결과일 수 있다.
- [0476] 본 발명은 또한 예를 들어, 바이오센서 시스템에서 본 발명에 따른 항체를 사용함으로써 직접적으로 항원 수준을 측정하는 것을 제공한다.
- [0477] 결합 측정 모드가 본 발명의 특징은 아니며, 당업자는 그의 선호도 및 일반적인 지식에 따라 적합한 모드를 선택할 수 있다.
- [0478] 경쟁 항체
- [0479] 본 발명은 추가로 항원에 결합하고, 본원에 실질적으로 기술된 바와 같은 아미노산을 포함하는 CDR 또는 본원에 실질적으로 기술된 바와 같은 아미노산 서열을 포함하는 가변 도메인을 포함하는 항체 가변 도메인 (VH 또는 VL 중 어느 하나, 또는 그 둘 모두)을 포함하는 것, 이 둘 모두가 이루어지는 임의의 항체와 Ax1에의 결합에 대하여 경쟁하는 항체로 확장된다. 항체 사이의 경쟁은 시험관내에서 예를 들어, 동일한 에피토프 또는 중복 에피토프에 결합하는 항체를 확인할 수 있도록 하기 위해 태그가 부착되지 않은 다른 결합 구성원(들)의 존재하에서 검출될 수 있는 한 결합 구성원에 특이 리포터 분자를 태그 부착시킴으로써 쉽게 검정될 수 있다. 경쟁은 예를 들어, ELISA 또는 유세포 분석법을 사용하여 측정될 수 있다. 대안적으로, 경쟁 항체는 실시예 6에 기술된 바와 같이, 비아코어 장치를 사용하여 표면 플라스몬 공명 (SPR) 기법을 통해 확인할 수 있다.
- [0480] 또 다른 방법에서, 관심의 대상이 되는 항체에 의해 결합되는 Ax1 상의 에피토프에 결합하는 항체 (예컨대, 10G5 항체의 Ax1에의 결합을 차단하는 것)에 대해 스크리닝하기 위해, 통상의 교차 차단 검정법, 예컨대, 문헌 [Antibodies. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory. Ed Harlow and David Lane (1988)]에 기

술되어 있는 것과 같은 검정법을 수행할 수 있다.

[0481] 경쟁에 대한 시험에서, 항원의 웨პ티드 단편, 특히, 관심의 대상이 되는 에피토프를 포함하는 웨პ티드가 사용될 수 있다. 에피토프 서열과 함께 양단에 하나 이상의 아미노산을 가지는 웨პ티드가 사용될 수 있다. 상기 웨პ티드는 명시된 서열로 "본질적으로 이루진 것이다"라고 말할 수 있다. 본 발명에 따른 항체는 그의 항원에의 결합이 주어진 서열을 포함하는 웨პ티드에 의해 또는 주어진 서열을 포함함으로써 억제되도록 이루어질 수 있다. 본 시험에서, 서열과 함께 하나 이상의 아미노산을 포함하는 웨პ티드가 사용될 수 있다.

[0482] 특이 웨პ티드에 결합하는 항체는 예를 들어, 웨პ티드(들)를 이용하여 패닝함으로써 파지 디스플레이 라이브러리로부터 단리될 수 있다.

핵산, 구축물, 및 발현

[0484] 본 발명은 본 발명의 항체를 코딩하는 단리된 핵산을 추가로 제공한다. 핵산은 DNA 및 RNA를 포함한다. 바람직한 측면에서, 본 발명은 상기 정의된 바와 같은 본 발명의 CDR, VH 또는 VL 도메인을 코딩하는 핵산을 제공한다.

[0485] 본 발명은 또한 상기와 같은 1개 이상의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 플라스미드, 벡터, 전사 또는 발현 카세트 형태의 구축물을 제공한다.

[0486] 본 발명은 또한 상기와 같은 하나 이상의 구축물을 포함하는 재조합 숙주 세포를 제공한다. 그에 대한 코딩 핵산으로부터의 발현을 포함하는 것인, 코딩된 생성물을 제조하는 방법과 같이, 제공하는 바와 같은 임의의 CDR, VH 또는 VL 도메인, 또는 항체를 코딩하는 핵산은 그 자체가 본 발명의 한 측면을 형성한다. 발현은 편리하게 핵산을 함유하는 재조합 숙주 세포를 적절한 조건하에서 배양함으로써 달성될 수 있다. 발현에 의한 제조 후, VH 또는 VL 도메인, 또는 항체는 당업계에 공지된 임의의 적합한 기법을 사용하여 단리 및/또는 정제될 수 있다.

[0487] 본 발명에 따른 항체, VH 및/또는 VL 도메인, 및 코딩 핵산 분자 및 벡터는 예컨대, 그의 천연 환경으로부터 단리 및/또는 정제된 상태의 실질적으로 순수한 또는 균질인 형태로 제공될 수 있거나, 또는 핵산인 경우, 필요한 기능을 가진 폴리웨პ티드를 코딩하는 서열 이외의 다른, 기원인 되는 핵산 또는 유전자는 함유하지 않거나, 또는 실질적으로 함유하지 않는 형태로 제공될 수 있다. 본 발명에 따른 핵산은 DNA 또는 RNA 를 포함할 수 있고, 전체적으로 또는 부분적으로 합성된 것일 수 있다. 문맥상 달리 요구되지 않는 한, 본원에서 기술하는 바와 같은 뉴클레오티드 서열에 대한 언급은 명시된 서열을 포함하는 DNA 분자를 포함하고, T 대신으로 U로 치환되어 있는, 명시된 서열을 포함하는 RNA 분자를 포함한다.

[0488] 각종의 상이한 숙주 세포에서 폴리웨პ티드를 클로닝 및 발현시키기 위한 시스템이 널리 공지되어 있다. 적합한 숙주 세포로는 박테리아, 포유동물 세포, 효모, 바클로바이러스, 및 곤충 세포 시스템을 포함한다. 이종성 폴리웨პ티드 발현용으로 당업계에서 이용가능한 포유동물 세포주로는 차이니즈 햄스터 난소 세포 (CHO), HeLa 세포, 새끼 햄스터 신장 (BHK) 세포, NSO 및 SP2/0 마우스 골수종 세포, YB2/0 래트 골수종 세포, 인간 세포주 HEK-293 및 PER.C6 및 기타 많은 것들을 포함한다. 보통 바람직한 박테리아 숙주는 *E. coli*(*E. coli*)이다.

[0489] 원핵 세포, 예컨대, *E. coli*에서의 항체 및 항체 단편의 발현은 당업계에 잘 확립되어 있다. 리뷰를 위해, 예를 들어, 문헌 [Plueckthun, A. Bio/ Technology 9: 545-551 (1991)]을 참조할 수 있다. 항체 제조를 위한 옵션으로서 배양물 중에서 진핵 세포를 발현시키는 것 또한 당업자에게 이용가능하며, 리뷰를 위해, 예를 들어, 문헌 [Ref., M.E. (1993) Curr. Opinion Biotech. 4: 573-576; Trill J.J. et al. (1995) Curr. Opinion Biotech 6: 553-560]을 참조할 수 있다.

[0490] 적절하게는 프로모터 서열, 종결인자 서열, 폴리아데닐화 서열, 인핸서 서열, 마커 유전자 및 다른 서열을 비롯한, 적절한 조절 서열을 함유하는 적합한 벡터가 선택 또는 구축될 수 있다. 벡터는 적절하게는 플라스미드, 바이러스, 예컨대, 파지, 또는 파지미드일 수 있다 (문헌 [Sambrook and Russell, 2001, Molecular Cloning: a Laboratory Manual: 3rd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press]). 예를 들어, 핵산 구축물 제조, 돌연변이유발법, 서열분석, DNA의 세포 내로의 도입 및 유전자 발현, 및 단백질 분석에서 핵산 조작을 위한 다수의 공지된 기법 및 프로토콜이 문헌 [Current Protocols in Molecular Biology, Second Edition, Ausubel et al. eds., John Wiley & Sons, 1992]에 상세하게 기술되어 있다.

[0491] 따라서, 본 발명의 추가 측면은 본원에 개시된 핵산을 함유하는 숙주 세포를 제공한다. 또 다른 추가 측면은 상기 핵산을 숙주 세포 내로 도입하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다. 도입은 임의의 이용가능한 기법을 사

용할 수 있다. 진핵 세포의 경우, 적합한 기법으로는 인산칼슘 형질감염, DEAE-텍스트란, 전기천공, 리포솜-매개 형질감염, 및 레트로바이러스 또는 다른 바이러스, 예컨대, 백시니아, 곤충 세포의 경우, 바클로바이러스를 이용한 형질도입을 포함할 수 있다. 박테리아 세포의 경우, 적합한 기법으로는 염화칼슘 형질전환, 전기천공 및 박테리오파지를 이용한 형질감염을 포함할 수 있다.

[0492] 도입에 이어서, 예컨대, 유전자 발현을 위한 조건하에서 숙주 세포를 배양함으로써 핵산으로부터 발현되도록 또는 발현될 수 있도록 할 수 있다.

[0493] 한 실시양태에서, 본 발명의 핵산은 숙주 세포의 게놈 (예컨대, 염색체) 내로 통합된다. 통합은 표준 기법에 따라 게놈과의 재조합을 촉진시키는 서열을 포함함으로써 촉진될 수 있다.

[0494] 본 발명은 또한 상기 항체 또는 폴리펩티드를 발현시키기 위해 발현 시스템에서 상기 언급된 구축물을 사용하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다.

[0495] 본 발명의 측면 및 실시양태는 이제 하기 실험을 참조로 하여 실시예에 의해 예시될 것이다.

[0496] 본 명세서 어디에서든 인용된 모든 문헌들은 참조로 포함된다.

본 발명의 진술

[0498] 하기 단락은 다수의 본 발명의 구체적으로 구상되는 본 발명의 실시양태 및 조합을 기술한다.

[0499] 1. Ax1에 결합하고,

[0500] 서열 번호 32의 아미노산 서열을 가지는 VH CDR3 및 임의적으로, 서열 번호 31 및 서열 번호 30으로부터 선택되는 아미노산 서열을 가지는 하나 이상의 VH CDR을 포함하는 VH 도메인; 및/또는

[0501] 서열 번호 33, 서열 번호 34 및 서열 번호 35로부터 선택되는 아미노산 서열을 가지는 하나 이상의 VL CDR을 포함하는 VL 도메인을 포함하는 항체.

[0502] 2. 1 단락에 있어서, 서열 번호 30, 서열 번호 31 및 서열 번호 32의 아미노산 서열을 가지는 VH CDR을 포함하는 VH 도메인을 포함하는 항체.

[0503] 3. 진술 1 또는 2 중 어느 한 진술에 있어서, 서열 번호 33, 서열 번호 34 및 서열 번호 35의 아미노산 서열을 가지는 VL CDR을 포함하는 VL 도메인을 포함하는 항체.

[0504] 4. 진술 1 내지 진술 3 중 어느 한 진술에 있어서,

[0505] 10G5 VH (GH1) 도메인 (서열 번호 1) 및 10G5 VH (GH2) 도메인 (서열 번호 2)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 항체 VH 도메인; 및/또는

[0506] 10G5 VL (GL1) 도메인 (서열 번호 3) 및 10G5 VL (GL2) 도메인 (서열 번호 4)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 항체 VL 도메인을 포함하는 항체.

[0507] 5. 1 단락 내지 4 단락 중 어느 한 단락에 있어서, 10G5 VH (GH1) 도메인 (서열 번호 1)을 포함하는 항체.

[0508] 6. 1 단락 내지 5 단락 중 어느 한 단락에 있어서, 10G5 VH (GH2) 도메인 (서열 번호 2)을 포함하는 항체.

[0509] 7. 1 단락 내지 6 단락 중 어느 한 단락에 있어서, 10G5 VL (GL1) 도메인 (서열 번호 3)을 포함하는 항체.

[0510] 8. 1 단락 내지 7 단락 중 어느 한 단락에 있어서, 10G5 VL (GL2) 도메인 (서열 번호 4)을 포함하는 항체.

[0511] 9. 1 단락 내지 8 단락 중 어느 한 단락에 있어서, scFv 항체 분자를 포함하는 항체.

[0512] 10. 1 단락 내지 9 단락 중 어느 한 단락에 있어서, 항체 불변 영역을 포함하는 항체.

[0513] 11. 10 단락에 있어서, 중쇄 불변 영역이 서열 번호 5에 기재된 서열을 가지는 것인 항체.

[0514] 12. 1 단락 내지 11 단락 중 어느 한 단락에 있어서, 10G5 GH1 중쇄 (서열 번호 6)를 포함하는 항체.

[0515] 13. 1 단락 내지 12 단락 중 어느 한 단락에 있어서, 10G5 GH2 중쇄 (서열 번호 7)를 포함하는 항체.

[0516] 14. 1 단락 내지 13 단락 중 어느 한 단락에 있어서, 경쇄 불변 영역을 포함하는 항체.

[0517] 15. 14 단락에 있어서, 경쇄 불변 영역이 서열 번호 8에 기재된 서열을 가지는 것인 항체.

- [0518] 16. 1 단락 내지 15 단락 중 어느 한 단락에 있어서, 10G5 GL1 경쇄 (서열 번호 9)를 포함하는 항체.
- [0519] 17. 1 단락 내지 16 단락 중 어느 한 단락에 있어서, 10G5 GL2 경쇄 (서열 번호 10)를 포함하는 항체.
- [0520] 18. 17 단락에 있어서, 전체 항체를 포함하는 것인 항체.
- [0521] 19. 1 단락 내지 18 단락 중 어느 한 단락에 있어서, 항원에 결합할 수 있는 능력 이외에 추가의 기능적 특징을 제공하는 추가 아미노산을 포함하는 것인 항체.
- [0522] 20. 1 단락 내지 19 단락 중 어느 한 단락에 있어서, 서열 번호 12의 VH 및 서열 번호 13의 VL을 포함하는 키메라 항체보다 적어도 15% 더 낮은 K_D 로 Ax1에 결합하는 항체.
- [0523] 21. 1 단락 내지 20 단락 중 어느 한 단락에 있어서, 10^{-9} M 이하의 K_D 로 Ax1에 결합하는 항체.
- [0524] 22. 1 단락 내지 21 단락 중 어느 한 단락에 있어서, 서열 번호 12의 VH 및 서열 번호 13의 VL을 포함하는 키메라 항체보다 적어도 15% 더 낮은 EC₅₀을 가지는 항체.
- [0525] 23. 1 단락 내지 22 단락 중 어느 한 단락에 있어서, 탈포코실화된 항체.
- [0526] 24. 1 단락 내지 23 단락 중 어느 한 단락에 있어서, Ax1이 인간 Ax1인 것인 항체.
- [0527] 25. 1 단락 내지 24 단락 중 어느 한 단락에 있어서, 영장류 Ax1에 특이적으로 결합하는 항체.
- [0528] 26. 1 단락 내지 25 단락 중 어느 한 단락에 있어서,
- [0529] (i) 10^{-3} M 초파인 K_D 로 뮤린 Ax1에 결합하고/거나;
- [0530] (ii) 10^{-3} M 초파인 K_D 로 인간 Mer에 결합하고/거나;
- [0531] (iii) 10^{-3} M 초파인 K_D 로 인간 Tyro3에 결합하는 항체.
- [0532] 27. 1 단락 내지 26 단락 중 어느 한 단락에 있어서, Ax1의 Gas6에의 결합을 억제시키는 항체.
- [0533] 28. 1 단락 내지 27 단락 중 어느 한 단락에 있어서, Ax1 수용체의 발현을 하향조절하는 항체.
- [0534] 29. 28 단락에 있어서, 항체가 Ax1 수용체 발현을, 항체와 접촉하지 않은, 다른 것은 동일하게 처리된 샘플에서 관찰되는 수준의 50% 미만으로 감소시키는 것인 항체.
- [0535] 30. 28 또는 29 단락에 있어서, Ax1 수용체 발현의 하향조절이 샘플을 항체와 접촉시킨 후 12시간 이내에 관찰되는 것인 항체.
- [0536] 31. 28 단락 내지 30 단락 중 어느 한 단락에 있어서, Ax1 수용체 발현의 하향조절이 샘플과 항체의 접촉 후 적어도 24시간 동안 지속되는 것인 항체.
- [0537] 32. 1 단락 내지 31 단락 중 어느 한 단락에 있어서, Ax1 수용체 내재화율을 증가시키는 항체.
- [0538] 33. 1 단락 내지 32 단락 중 어느 한 단락에 있어서, Ax1 활성을 억제시키는 항체.
- [0539] 34. 1 단락 내지 33 단락 중 어느 한 단락에 있어서, 항체가 Ax1 자기인산화를 억제시키는 것인 항체.
- [0540] 35. 33 또는 34 단락에 있어서, 항체가 Ax1 수용체 하류 신호전달을 억제시키는 것인 항체.
- [0541] 36. 33 단락 내지 35 단락 중 어느 한 단락에 있어서, 본 발명의 항체와 접촉된 샘플에서 세린 473에서의 Akt의 인산화가 항체와 접촉하지 않은, 다른 것은 동일하게 처리된 샘플에서 관찰되는 수준의 50% 미만인 것인 항체.
- [0542] 37. 1 단락 내지 36 단락 중 어느 한 단락에 있어서, 세포 사멸률을 증가시키는 항체.
- [0543] 38. 1 단락 내지 37 단락 중 어느 한 단락에 있어서, 종양 성장을 억제시키는 항체.
- [0544] 39. 1 단락 내지 38 단락 중 어느 한 단락에 있어서, 섬유증 마커, 예컨대, 알파-SMA, Col1A1, MCP1 및/또는 TGF-베타의 발현을 감소시키는 항체.
- [0545] 40. 1 단락 내지 39 단락 중 어느 한 단락에 있어서, 임의적으로 펩티딜 결합 또는 링커를 통해 검출가능한 표

지, 효소, 또는 독소에 접합된 항체.

[0546] 41. 40 단락에 있어서, 독소가 MMAE 및 MMAF를 포함하는 군으로부터 선택되는 것인 항체.

[0547] 42. 40 단락에 있어서, 겸출가능한 표지가 FITC인 것인 항체.

[0548] 43. 1 단락 내지 42 단락 중 어느 한 단락에 있어서, 하이브리도마 WR-10G5-E5로부터 수득가능한 10G5 항체에 의해 결합되는 에피토프에 결합하는 항체.

[0549] 44. 1 단락 내지 39 단락 중 어느 한 단락에 따른 항체, 또는 항체의 항체 VH 또는 VL 도메인을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 단리된 핵산.

[0550] 45. 44 단락에 따른 핵산으로 형질전환된 숙주 세포.

[0551] 46. 40 단락에 따른 숙주 세포를 항체, 또는 항체 VH 또는 VL 도메인의 제조를 위한 조건하에서 배양하는 단계를 포함하는, 항체, 또는 항체 VH 또는 VL 도메인을 제조하는 방법.

[0552] 47. 46 단락에 있어서, 상기 항체, 또는 항체 VH 또는 VL 가변 도메인을 단리 및/또는 정제하는 단계를 추가로 포함하는 것인 방법.

[0553] 48. 46 단락 또는 47 단락에 있어서, 항체, 또는 항체 VH 또는 VL 가변 도메인을, 1종 이상의 추가 성분을 포함하는 조성물로 제제화시키는 단계를 추가로 포함하는 방법.

[0554] 49. 제약상 허용되는 부형제와 함께 1 단락 내지 39 단락 중 어느 한 단락에 따른 항체 또는 그의 면역접합체를 포함하는 조성물.

[0555] 50. 49 단락에 있어서, 면역 체크포인트 조절제, 및/또는 Ax1 이외의 다른 표적에 특이적인 항-종양 항체를 추가로 포함하는 조성물.

[0556] 51. 49 단락에 있어서, 제2 항-Ax1 항체를 추가로 포함하는 조성물로서, 여기서, 제2 항-Ax1 항체는 Ax1 결합에 대하여 하이브리도마 WR-10G5-E5로부터 수득가능한 10G5 항체와 경쟁하지 않는 것인 조성물.

[0557] 52. 50 단락에 있어서, 면역 체크포인트 조절제가 항체, 예컨대, 이필리무맙, 트레멜리무맙, 웨브롤리주맙, 니볼루맙, AMP-514/MEDI0680, MPDL3280A, MEDI4736, MSB0010718C, BMS-936559, 우렐루맙, PF-05082566, MEDI6469, MEDI6383 (rOX40L), MOXR0916, TRX518, CDX-1127, CP-870,893 또는 BMS-986016인 것인 조성물.

[0558] 53. 50 단락에 있어서, Ax1 이외의 다른 표적에 특이적인 항-종양 항체가 리툭시맙, 이브리투모맙 티옥세탄 (Ibrutumomab tiuxetan), 토시투모맙, 브렌툭시맙 베도틴(Brentuximab vedotin), 겨투주맙 오조가미신 (Gemtuzumab ozogamicin), 알렙투주맙, IGN101, 아데카투무맙(adecatumumab), 라베투주맙(Labetuzumab), huA33, 펠투모맙(Pemtumomab), 오레고보맙(oregovomab), CC49 (민레투모맙(minretumomab)), cG250, J591, MOv18, MORAb-003 (파르레투주맙(farletuzumab)), 3F8, ch14.18, KW-2871, hu3S193, IgN311, 베바시주맙, IM-2C6, CDP791, 에타라시주맙(Etaracizumab), 볼로식시맙(Volociximab), 세툭시맙, 파니투무맙, 니모투주맙 (nimotuzumab) 806, 트라스투주맙, 퍼투주맙(pertuzumab), MM-121, AMG 102, METMAB, SCH 900105, AVE1642, IMC-A12, MK-0646, R1507, CP 751871, KB004, IIIA4, 마파투무맙(Mapatumumab) (HGS-ETR1), HGS-ETR2, CS-1008, 데노수맙(Denosumab), 시브로토주맙(Sibrotuzumab), F19, 81C6으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 조성물.

[0559] 54. 1 단락 내지 42 단락 중 어느 한 단락에 있어서, 또는 49 단락 내지 53 단락 중 어느 한 단락에 있어서, 치료 방법에서 사용하기 위한 항체, 또는 조성물.

[0560] 55. 54 단락에 있어서, 섬유증성 장애를 치료하는 방법에서 사용하기 위한 항체, 또는 조성물.

[0561] 56. 54 단락에 있어서, 증식성 질환을 치료하는 방법에서 사용하기 위한 항체, 또는 조성물.

[0562] 57. 56 단락에 있어서, 증식성 질환이 암인 것인 항체 또는 조성물.

[0563] 58. 57 단락에 있어서, 암이 전이성 암인 것인 항체 또는 조성물.

[0564] 59. Ax1의 증가된 발현 또는 활성을 특징으로 하는 질환 또는 장애 치료용 의약의 제조에서 1 단락 내지 42 단락 중 어느 한 단락에 따른 항체, 또는 49 단락 내지 53 단락 중 어느 한 단락에 따른 조성물의 용도.

[0565] 60. Ax1의 증가된 발현 또는 활성을 특징으로 하는 질환 또는 장애를 앓거나, 상기 질환 또는 장애 발병 위험이

있는 환자에게 1 단락 내지 43 단락 중 어느 한 단락에 따른 항체, 또는 49 단락 내지 53 단락 중 어느 한 단락에 따른 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, Ax1의 증가된 발현 또는 활성을 특징으로 하는 질환 또는 장애를 치료하는 방법.

[0566] 61. 54 단락 내지 58 단락 중 어느 한 단락에 있어서, 또는 제60항에 있어서, 치료 방법이 1 단락 내지 41 단락 중 어느 한 단락에 따른 항체, 또는 42 단락 내지 53 단락 중 어느 한 단락에 따른 조성물을 면역 체크포인트 조절제, 및/또는 Ax1 이외의 다른 표적에 특이적인 항-종양 항체와 함께 조합하여 투여하는 단계를 포함하는 것인, 항체, 또는 방법.

[0567] 62. 60 단락에 있어서, 항체가 제약 조성물의 표적 전이성 암 세포로의 전달을 지시하는 것인 방법.

[0568] 63. Ax1의 과다발현을 특징으로 하는 질환 또는 장애 검출용 진단제 제조에서 1 단락 내지 41 단락 중 어느 한 단락에 따른 항체, 및 상기 항체의 전이성 암 세포에의 결합 측정을 허용하는 하나 이상의 시약의 용도.

[0569] 64. Ax1의 과다발현을 특징으로 하는 질환 또는 장애를 앓거나, 상기 질환 또는 장애 발병 위험이 있는 환자에게 1 단락 내지 32 단락 중 어느 한 단락에 따른 항체, 또는 49 단락 내지 53 단락 중 어느 한 단락에 따른 조성물, 및 상기 항체의 전이성 암 세포에의 결합 측정을 허용하는 하나 이상의 시약을 투여하는 단계를 포함하는, Ax1의 과다발현을 특징으로 하는 질환 또는 장애를 진단하는 방법.

[0570] 65. 1 단락 내지 41 단락 중 어느 한 단락에 따른 항체, 및 상기 구성원의 전이성 암 세포에의 결합 측정을 허용하는 하나 이상의 시약을 포함하는 진단용 키트.

[0571] 66. 1 단락 내지 41 단락 중 어느 한 단락에 따른 항체, 또는 49 단락 내지 53 단락 중 어느 한 단락에 따른 조성물을 포함하는 키트.

[0572] 67. 제약상 허용되는 부형제와 함께, 활성 성분으로서 1 단락 내지 41 단락 중 어느 한 단락에 따른 항체를 유효량으로 포함하는 제약 조성물.

실시예

실시예 1: 마우스 ANTI-AXL 모노클로날 항체의 생성

C-말단 Myc 에피토프에 융합된 전장의 인간 Ax1을 코딩하는 플라스미드로 면역 능력이 있는 NMRI 마우스 (찰스 리버(Charles River))를 면역화시킴으로써 인간 Ax1 수용체에 대한 모노클로날 항체 (MAb)를 생성하였다.

표준 프로토콜에 따라 마우스 골수종 세포와의 융합을 위해 혈액 중 rhAx1-특이적인 항체가 존재하는 것으로 보이는 마우스로부터의 비장 세포를 사용하였다. 하이브리도마 선별을 위해 히포크산틴-아미노프테린-티미딘 (HAT) 배지를 포함하는 플레이트에서 세포를 배양하였다 (웰당 10^5 개의 세포). 12일 동안 선별한 후, 생성된 14개의 하이브리도마의 상청액을 수확하고, 효소 결합 면역흡착 검정법 (ELISA) 및 유세포 분석법으로 Ax1 결합에 대해 시험하였다. 제한 희석에 의한 2차 서브클로닝 후 가장 높은 항원-결합 활성을 보인 3개의 양성 클론을 대규모 항체 제조를 위해 시험관내에서 확장시켰다. 단백질 G 친화도 크로마토그래피에 의해 세포 배양물 상청액으로부터 MAb를 정제하였다.

[0577] 유세포 분석법에서 Ax1⁺ 세포에 특이적인 결합을 보인 항체 클론 10G5를 추가의 특징 규명을 위해 선택하였다.

[0578] 유세포 분석법을 위해, 배양물 중 부착성 세포를 PBS로 세척하고, 1 min 동안 트립신 (0.25%)으로 처리하고, 완전히 분리될 수 있도록 배양 디쉬를 히팅하여 분리시켰다. 조직 플라스크에 완전 배지를 첨가한 후, 세포를 PBS로 세척함으로써 트립신을 퀸칭시켰다. 세척 단계 동안, 5 min 동안 200 g로 원심분리하여 세포를 수집하였다. 0.02% 우혈청 알부민 (BSA)을 함유하는 PBS 중 전체 농도에 대해 항체를 희석시켰다.

[0579] 실온에서 20 min 동안 10^5 개의 세포를 포함하는 200 μl 의 세포 혼탁액을 사용하여 세포 염색을 수행하였다. PBS 0.02% BSA로 2회에 걸친 세척 단계를 수행한 후, 실온에서 20 min 동안 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 APC-접합된 당나귀 항-마우스 IgG (H+L) 2차 항체 (잭슨 라보라토리즈(Jackson Laboratories), 카탈로그 번호 715-136-150)와 함께 인큐베이션된 세포를 200 μl 중에 재현탁시켰다. 염색된 세포를 PBS/0.02% BSA로 2회에 걸쳐 세척하고, BD LSR 포르테사(BD LSR Fortessa) 세포 분석기 (BD 바이오사이언시스)를 사용하여 분석하기 전, 얼음 상에서 보관하였다.

[0580] 실시예 2: 마우스 모노클로날 항체 10G5는 인간 TAM 수용체 패밀리의 다른 구성원과는 교차 반응하지 않는다

- [0581] 25°C에서 비아코어 3000 장치 (GE 헬쓰케어(GE Healthcare))를 이용하여 모든 결합 실험을 수행하였다. 인간 TAM 수용체 패밀리의 구성원인, Ax1 (rhAx1-Fc 키메라; R&D 시스템즈, 카탈로그 번호 154-AL), Mer (rhMer-Fc 키메라; R&D 시스템즈, 카탈로그 번호 891-MR) 및 Tyro3 (rhTyro3/Dtk-Fc 키메라; R&D 시스템즈, 카탈로그 번호 859-DK)의 세포의 도메인에 상응하는 가용성 재조합 항원을 각각 393.0, 303.6 및 364.0 공명 단위 (RU)의 표면 밀도로 아민 커플링을 사용하여 CM5 센서 칩 표면에 고정화시켰다. 결합 분석 위저드(wizard)를 이용하여 자동 모드로 비아코어 실험을 수행하였다. HBS-EP 완충제 (GE 헬쓰케어) 중 10 µg/mL 농도로 MAb 10G5를 함유하는 샘플을 항원이 고정화되어 있는 표면 상에 30 µl/min의 유속으로 3 min 동안 주입하였고 (회합), 이어서, 5 min 동안 해리시켰다.
- [0582] 도 1에 제시된 결과는 마우스 모노클로날 항체 10G5의 인간 Ax1에의 특이적인 결합, 및 재조합 인간 Mer 및 Tyro3 항원에의 비결합을 입증한다.
- [0583] 실시예 3: 마우스 모노클로날 항체 10G5는 마우스 AXL과는 교차 반응하지 않는다
- [0584] 25°C에서 비아코어 3000 장치 (GE 헬쓰케어)를 이용하여 결합 실험을 수행하였다. 인간 Ax1 (rhAx1-Fc 키메라; R&D 시스템즈, 카탈로그 번호 154-AL), 마우스 Ax1 (rmAx1-Fc 키메라; R&D 시스템즈, R&D 시스템즈; 카탈로그 번호 854-AX) 및 인간 Tyro3 (rhTyro3/Dtk-Fc 키메라; R&D 시스템즈, 카탈로그 번호 859-DK)에 상응하는 가용성 재조합 항원을 각각 1,308.0, 2,115.9 및 1,429.0 RU의 표면 밀도로 아민 커플링을 사용하여 CM5 센서 칩 표면에 고정화시켰다. 결합 분석 위저드를 이용하여 자동 모드로 비아코어 실험을 수행하였다.
- [0585] HBS-EP 완충제 (GE 헬쓰케어) 중 10 µg/mL 농도로 MAb 10G5 또는 재조합 마우스 (rm) Ax1-리간드 Gas6 (R&D 시스템즈, 카탈로그 번호 986-GS/CF)을 함유하는 샘플을 항원이 고정화되어 있는 표면 상에 30 µl/min의 유속으로 3 min 동안 주입하였고 (회합), 이어서, 5 min 동안 해리시켰다.
- [0586] 도 2에 제시된 결과는 인간 Ax1과 MAb 10G5의 특이적인 상호작용 및 재조합 마우스 Ax1 및 인간 Mer 항원에의 비결합을 입증한다 (도 2, 각각 상부 및 중간 패널). 그에 반해, 대조군으로서 사용된 마우스 Gas6은 인간 및 마우스 Ax1, 둘 모두에 강력하게 결합하였고, 인간 Tyro3에는 다소 더 약하게 결합하였다는 것을 입증하였다 (도 2, 하부 패널).
- [0587] 실시예 4: 마우스 모노클로날 항체 10G5는 비-인간 영장류로부터의 AXL 수용체에 특이적으로 결합한다
- [0588] 시노몰구스 원숭이로부터의 Ax1 수용체의 서열 (마카카 파시콜라리스; 서열 번호 27)을 WO2009062690A1로부터 검색하였다. 상기 서열에 기초하여, 인간 Fc와의 융합 단백질로서 CHO 세포에서의 일시적인 발현에 의해 시노-Ax1의 재조합 세포의 도메인을 생성하였다. 단백질 A-세파로스 (GE 헬쓰케어)를 사용하여 재조합 시노-Ax1-Fc를 균질화에 정제하였다. 25°C에서 비아코어 3000 장치 (GE 헬쓰케어)를 이용하여 결합 실험을 수행하였다. 인간 Ax1 (rhAx1-Fc 키메라; R&D 시스템즈, 카탈로그 번호 154-AL) 및 시노-Ax1에 상응하는 가용성 재조합 항원을 각각 775 및 880 RU의 표면 밀도로 아민 커플링을 사용하여 CM5 센서 칩 표면에 고정화시켰다. 결합 분석 위저드를 이용하여 자동 모드로 비아코어 실험을 수행하였다.
- [0589] HBS-EP 완충제 (GE 헬쓰케어) 중 10 µg/mL 농도로 MAb 10G5 또는 인간 Ax1-특이적인 MAb 5F11 (대조군)을 함유하는 샘플을 항원이 고정화되어 있는 표면 상에 30 µl/min의 유속으로 3 min 동안 주입하였고 (회합), 이어서, 5 min 동안 해리시켰다.
- [0590] 도 3에 제시된 결과는 인간 및 시노몰구스 원숭이, 둘 모두로부터의 Ax1 항원과 MAb 10G5의 강력하고, 특이적인 상호작용을 입증한다. 그에 반해, 대조군 항체 5F11은 인간 Ax1에의 강력한 결합을 보였고, 시노몰구스 원숭이로부터의 Ax1과는 교차 반응을 보이지 않았다.
- [0591] 실시예 5: 마우스 모노클로날 항체 10G5의 친화도 측정
- [0592] 25°C에서 비아코어 3000 장치 (GE 헬쓰케어)를 사용하여 표면 플라스몬 공명 측정에 의해 항-Ax1 항체 10G5의 친화도 측정을 수행하였다. 고체 항원-코팅된 표면으로서, rhAx1-Fc 키메라 (R&D 시스템즈, 카탈로그 번호 154-AL)가 190 RU의 밀도로 고정화되어 있는 센서 칩 CM5를 사용하였다.
- [0593] 동역학적 성질 측정을 위해, HBS-EP 완충제 (비아코어, 카탈로그 번호 BR-1001-88) 중 상이한 농도의 항-Ax1 항체 (0.3 내지 666.7 nM)를 3 min의 주입 시간 동안 30 µl/min 유속으로 주입한 후, 5 min의 해리 기간이 이어졌다 (완충제 단독). 각 사이클 후, 재생 용액 (10 mM HCl, 1 M NaCl)을 50 µl/min 유속으로 30 sec 동안 주입하여 표면을 재생시켰다.

- [0594] 물질 이동 대조군 실험을 통해 MAb 10G5에 대한 유의적인 물질 이동 제한은 없다는 것이 입증되었다. 농도 (MAb 10G5에 대하여 160 nM)의 한 분석물의 1, 3 또는 20 min 동안 진행된 주입 후, 해리 단계는 사실상 동일하였는 바, 추가의 연관된 반응 대조군 실험에서는 상기 항체에 대한 연관된 반응이 밝혀지지 못했다.
- [0595] BIA이벨류에이션 소프트웨어 및 1:1 행렬 결합 모델을 사용하여 동역학적 회합 (온-속도, k_{on}) 및 해리 (오프-속도, k_{off}) 속도를 계산하였다. k_{off}/k_{on} 비로서 평형 해리 상수 (K_D)를 계산하였다. 형성된 항체-항원 복합체의 반감기 ($t_{1/2}$)는 $\ln 2/k_{off}$ 비로서 계산하였다.
- [0596] 도 4에 제시된 바와 같이, 마우스 MAb 10G5는 0.53 nM의 K_D 값으로, 나노몰 이하 범위의 높은 친화도를 입증하였다.
- [0597] 실시예 6: 마우스 모노클로날 항체 10G5는 GAS6의 AXL에의 결합을 차단한다
- [0598] 수회에 걸친 사이클로 2개의 샘플을 주사하면서 비아코어 3000 장치 (GE 헬쓰케어) 및 결합 분석 위저드를 사용하여 경쟁적 결합 연구를 수행하였다. 제1 샘플로서, 포화 농도의 10G5 (160 nM 또는 24 μ g/mL)를 3 min 동안 30 μ L/min의 유속으로 (아민 커플링을 사용하여) rhAx1-Fc로 코팅된 CM5 센서 칩의 표면 상에 주입한 후, 제2 샘플 주입 전에 2.5 min 동안의 안정화 (HBS-EP 완충제 단독)가 이어졌다. 하기 제2 샘플을 사용하였다: 재조합 인간 (rh) Gas6 (R&D 시스템즈, 카탈로그 번호 885-GS), 재조합 마우스 (rm) Gas6 (R&D 시스템즈, 카탈로그 번호 986-GS/CF) 및 항-Ax1 항체 패널, 예컨대, MAB154 (R&D 시스템즈, 카탈로그 번호 MAB154), 10G5; 모두의 농도는 25 μ g/mL였다. 제2 샘플을 3 min 동안 주입한 후, 2.5 min 동안의 안정화 (완충제 단독), 및 50 μ L/min의 유속으로 재생 용액 (10 mM HC1, 1 M NaCl)을 30 sec 동안 주입함으로써 이루어지는 표면 재생이 이어졌다.
- [0599] 도 5에 제시된 결과를 통해 MAb 10G5는 Ax1 결합에 대하여 시판용 대조군 항체 MAB154 (R&D 시스템즈)와 경쟁하지 않았다는 것이 입증되었다. 그러나, 항체 10G5는 인간 및 뮤린 기원의 것 둘 모두 Ax1의 그의 리간드 Gas6에 의한 결합을 억제시킨다.
- [0600] 실시예 7: 마우스 모노클로날 항체 10G5는 3차원 (3D) 기관형 모델에서 고도의 침습성 유방 암종의 성장을 억제시킨다
- [0601] 고도의 침습성 삼중 음성 인간 유방암 세포주 MDA-MB-231 (ATCC® HTB-26™)을 권고된 조건에 따라 10% 우테아 혈청 (FBS), 글루타민 및 페니실린 및 스트렙토마이신으로 보충된 둘베코스 변형 이글 배지/영양 혼합물 F-12 햄 배지 중에서 배양하였다. 세포를 세포외 매트릭스에 배치하기 이전에 세포를 37°C에서 적어도 1시간 동안 혼탁액 중에서 전처리하여 세포 표면 상에 확실하게 항체를 적절히 결합시켰다. 세포 배양물을 매일 관찰하고, 격일로 새로 처리하였다. 항체 농도는 50-100 μ g/mL였다. 위상차 및 호프만(Hoffman) 광학, 둘 모두를 이용하는 NIKON 광학 현미경 상에서 커버슬립 3D 검정법 (35 mm 디쉬)을 영상화하였다. 이미 3일째, MAb 10G5로 처리된 세포와, 대조군 비관련 IgG로 처리된 세포의 성장 사이에 있어 차이가 있는 것으로 관찰되었다. 6일째, 대조군 처리된 세포와 비교하였을 때, 항체 10G5로 처리된 세포는 세포외 매트릭스에서 성장 및 종양 종괴 발생을 유의적으로 억제시켰다는 것이 명확해졌다 (도 6). 핵 염색 결과, MAb 10G5로 처리된 세포는 성장 억제에도 불구하고 여전히 생존 가능한 것으로 밝혀졌다. 본 실험을 통해 항-Ax1 항체 10G5가 기관형 종양 종괴 발생을 억제시킬 수 있는 잠재능을 가지고 있다는 것이 입증되었다.
- [0602] 실시예 8: 항체 10G5는 시험관내에서 3D 종양 콜로니의 형태 변화를 유도한다
- [0603] MDA-MB-231 세포를 세포외 매트릭스 상에서 성장시키고, 고도의 침습성 성상 형상의 형태를 형성할 수 있도록 하였다. 이어서, 성상 형상의 종양 종괴를 실시예 7에 기술된 바와 같이 대조군 IgG 및 항체 10G5로 처리하였다. 항체 10G5는 세포 사멸 및 DNA 단편화를 동반한 성상 패턴 분해를 유발하였다 (도 7). 본 결과를 통해 특이적인 모노클로날 항체 10G5를 사용하여 Ax1를 차단하는 것이 시험관내에서 3D 모델에서 강력한 항-종양 효과를 가진다는 것이 입증되었다.
- [0604] 실시예 9: 항체 10G5가 AXL 수용체 내재화를 유도한다
- [0605] 웨스턴 블롯 분석에 의해 상이한 항체로 처리된 MBA-MD-231 세포에서 Ax1 수용체 단백질의 발현을 조사하였다. 세포를 웰당 5×10^5 개의 세포인 밀도로 6-웰 플레이트에 시딩하고, 처리 개시 전 밤새도록 배양하였다. 세포를 이소형 대조군 (마우스 IgG2b), 100 μ g/mL 농도의 항-Ax1 항체 (10G5 및 MAb#3) 또는 0.5 μ M 농도의 (Met,

Ron, Ax1, Tie-2, 및 VEGFR2를 표적화하는) 다중키나제 억제제 포레티닙의 존재하에 20 hrs 동안 처리한 후, 5 min 동안 1,200 rpm으로 원심분리하여 수확하고, 멸균 PBS로 세척하였다. 원심분리하여 세포를 수집하고, NP40-용해 완충제 중에 재현탁시킨 후, 얼음 상에서 30 min 동안 인큐베이션시켰다. 원심분리하여 (12,000 rpm, 4°C, 5 min) 세포 용해물을 정화시키고, BCA 단백질 검정법을 사용하여 단백질 농도를 측정하였다. 35 µg의 전체 단백질을 포함하는 세포 용해물 샘플을 환원제 (라이프 테크놀러지스(Life Technologies)) 존재하에서 변성시키고, NuPAGE 10% 비스-트리스 폴리아크릴아미드 (PAA) 겔, 1.0 mm x 12 웰 (인비트로겐(Invitrogen))의 웰에 로딩하였다. 권고된 조건하에서 (라이프 테크놀러지스) 비스-트리스 SDS 전개 완충제를 사용하여 전기 영동을 수행하고, X셀™ 블롯 모듈(XCell™ Blot Module) (인비트로겐)에 대한 매뉴얼에서 2개의 겔에 기술된 바와 같이, 20% 메탄올과 함께 전달 완충제를 이용하여 PVDF 막 위로 단백질을 옮겨 놓았다. 막을 10 mL 차단 완충제, 5% 탈지유를 포함하는, TBS/0.1% 트윈20 (TBST) 중 실온에서 1 hr 동안 인큐베이션시킨 후, 항-Ax1 MAb154 (R&D 시스템즈)의 1:1,000 희석액을 함유하는 5 mL 인큐베이션 완충제 (3% 탈지유를 포함하는 TBST) 중 4°C에서 밤새도록 인큐베이션시켰다. 막을 10 mL TBST로 3회에 걸쳐 각각 5 min 동안 세척한 후, 실온에서 온화하게 회전시키면서, 5 mL 인큐베이션 완충제 중 염소-항 마우스 IgG (H+L) HRP-접합된 2차 항체(1:2000)와 함께 1 hr 동안 인큐베이션시켰다. 이후, 막을 10 mL TBST 중에서 5 min 동안 3회에 걸쳐 세척하고, 10 mL TBS 완충제로 2회에 걸쳐 세척하였다. 막을 실온에서 1 min 동안 1 mL ECL 기질과 함께 인큐베이션시켰다. 과량의 기질 용액은 흡인시키고, 케미독(ChemiDoc)™ XRS+ 영상 장치 (바이오 래드(Bio Rad)) 및 이미지 랩 소프트웨어를 이용하여 블롯을 시각화하였다. 로딩 대조군으로서, 같은 조건하에서 항-마우스 액틴 항체 (1:10,000; 시그마)를 이용한 검출을 사용하였다.

[0606] 도 8에 제시된 결과에서 비관련 IgG 또는 MAb#3으로 처리된 세포와 비교하였을 때, MAb 10G5로 처리된 세포에서 Ax1 단백질이 유의적으로 감소되었다는 것이 입증되었다. 본 결과는 MAb 10G5가 Ax1 수용체의 내재화 및 세포 내 분해를 유도한다는 것을 시사한다.

실시예 10: 항체 10G5가 리간드-유도 AXL 하류 신호전달을 차단한다

[0608] 본 실험은 인간 자궁경부암 유래의 세포주 HeLa (ATCC® CCL-2™)를 사용하여 수행하였다. 세포를 T175 플라스크에서 10% FBS, 페니실린-스트렙토마이신 및 L-글루타민으로 보충된 MEM 배양 배지 (시그마) 중에서 80%의 전면생장률까지 성장시켰다. 세포를 PBS로 세척하고, 0.25% 트립신/EDTA (시그마)로 처리하여 분리한 후, 원심분리하고, 새 배지 (MEM/0.5% FBS) 중에서 재현탁시켰다. 세포를 10% FBS로 보충된 MEM 배지 중 페트리 디쉬 (디쉬당 3 x 10⁶개의 세포)에 시딩하였다. 37°C에서 3 hrs 동안 인큐베이션시킨 후, 세포를 PBS로 세척하고, 고갈 배지 (MEM/0.5% FBS) 중에서 밤새도록 유지시켰다. 세포를 1 µg/mL 농도의 항-Ax1 항체 10G5와 함께 1 hr 동안 미리 인큐베이션시킨 후, 10 µg/mL 농도의 Ax1 리간드, 재조합 마우스 Gas6 (R&D 시스템즈)으로 20 min 동안 자극시켰다. 실시예 9에 기술된 바와 같이 세포 용해물을 제조하고, 항-포스포-Akt (Ser⁴⁷³) 항체 (셀 시그널링 (Cell Signaling))를 이용한 후, 이어서, 염소 항-토끼 호스래디쉬 페옥시다제 (잭슨 이뮤노리서치)를 이용하여 웨스턴 블롯 분석을 수행하였고; 항-포스포-Akt는 AKT1, AKT2, 및 AKT3 사이를 구별하지 못하는 바, 블롯에는 '포스포-Akt'의 전체 수준으로 나타난다. 로딩 대조군으로서 항-GAPDH 항체 (밀리포어(Millipore))를 이용한 검출을 사용하였다.

[0609] 도 9에 제시된 결과를 통해 Ax1-특이적인 리간드 Gas6이, 판독치로서 Ser⁴⁷³ 상의 Akt의 하류 인산화를 사용한 HeLa 세포에서 강력한 Ax1 신호전달을 유도하였다는 것이 입증되었다. 상기 신호전달은 항체 10G5의 존재하에서 유의적으로 감소될 수 있다.

실시예 11: 마우스 모노클로날 항체 10G5의 서열분석

[0611] 표준 조건하에서 하이브리도마 세포를 증식시켰다; 표준 프로토콜에 따라 mRNA 단리 및 cDNA 합성을 위해 5 x 10⁶개의 하이브리도마 세포를 사용하였다. 중쇄 및 경쇄 가변 영역 (각각 VH 및 VL)을 코딩하는 유전자의 PCR 증폭을 위해, 마우스 IgG 라이브러리 프라이머 세트 (프로젠(Progen: 독일 하이델베르그), 카탈로그 번호 F2010)를 사용하였다.

[0612] 하이브리도마 10G5의 경우, 상이한 프라이머 조합을 사용하여 PCR 증폭을 수행함으로써 VH 유전자에 대하여 6개의 상이한 프라이머 조합을 사용하여 이루어진 PCR로부터 12개의 서열을, 및 VL 유전자에 대하여 2개의 상이한 프라이머 조합을 사용하여 이루어진 PCR로부터 5개의 서열을 얻었다. IMGT 데이터베이스와의 뉴클레오티드 정렬에 의해 측정된 바와 같이, 상응하는 생식 계열 서열과의 가장 높은 상동성에 기초하여 클론 VH1 (B6-4) 및 V

$\kappa 1$ (F1-3)의 서열을 추가 실험을 위해 선택하였다.

[0613] 항체 10G5에 대한 VH 및 VL 도메인의 도출된 아미노산 서열은 도 10에 제시되어 있다.

[0614] 실시예 12: 키메라 모노클로날 항체 10G5 생성 및 시험

포유동물 세포 (진아트(GeneArt))에서의 발현을 위해 코돈이 최적화된 합성 유전자 생성을 위하여 뮤린 하이브리도마 10G5로부터 검색된 VH 및 VL 서열을 사용하였다. 포유동물 세포에서 항체를 제조하는 데 적합한 발현 백터에서 상기 마우스 VH 및 VL 유전자를 프레임내에서 각각 인간 IgG1 중쇄 및 경쇄 (C-카파)의 불변 도메인을 코딩하는 유전 요소와 라이게이션시켰다. 차이니즈 햄스터 난소 (CHO) 세포에서 일시적으로 발현시킨 후, 단백질 A 친화도 크로마토그래피를 사용하여 정제함으로써 키메라 (마우스 가변/인간 불변) IgG1 항체 제조를 달성하였다.

[0616] 정제된 키메라 항체 (>95% 순도)를 유세포 분석법으로 Ax1-양성 유방암 세포주 MDA-MB-231에의 결합에 대하여 분석하였다. 비교를 위해, 모체 마우스 MAb 10G5를 사용하였다. 유세포 분석법을 위해, 배양물 중 부착성 세포를 PBS로 세척하고, 1 min 동안 트립신 (0.25%)으로 처리하고, 완전히 분리될 수 있도록 배양 디쉬를 히팅하여 분리시켰다. 조직 플라스크에 완전 배지를 첨가한 후, 세포를 PBS로 세척함으로써 트립신을 퀸칭시켰다. 세척 단계 동안, 5 min 동안 200 g로 원심분리하여 세포를 수집하였다. 0.02% 우혈청 알부민 (BSA)을 함유하는 PBS 중 전체 농도에 대해 항체를 희석시켰다. 실온에서 20 min 동안 10^5 개의 세포를 포함하는 200 μl 의 세포 혼탁액을 사용하여 세포 염색을 수행하였다. 세포 결합 항체를 각각 APC-접합된 당나귀 항-인간 또는 항-마우스 IgG (H+L) F(ab')₂ 단편 (잭슨 이뮤노리서치)를 사용하여 검출하였다. PBS/0.02% BSA를 이용한 2회에 걸친 세척 단계 후, 세포를 200 μl 중에 재현탁시키고, 어큐리 C6 유세포 분석기 (BD 바이오사이언시스)에서 분석하기 전, 얼음 상에서 보관하였다. 도 11에 제시된 결과를 통해 유세포 분석법에서 키메라 항체가 Ax1-양성 MDA-MB-231 세포에 강력하게 결합한다는 것이 입증되었다.

[0617] 추가로, 비아코어 3000 장치 (GE 헬쓰케어) 및 1,308.0 RU의 표면 밀도로 인간 Ax1 (rhAx1-Fc 키메라; R&D 시스템즈, 카탈로그 번호 154-AL)로 코팅된 센서 칩 CM5를 이용하여 키메라 항체 c10G5의 Ax1-결합 특성을 시험하였다. 결합 분석 위저드를 이용하여 자동 모드로 비아코어 실험을 수행하였다. HBS-EP 완충제 (GE 헬쓰케어) 중 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도로 키메라 항체 c10G5 또는 그의 뮤린 대응물을 포함하는 샘플을 항원이 고정화되어 있는 표면상에 30 $\mu\text{l}/\text{min}$ 의 유속으로 3 min 동안 주입하였고 (회합), 이어서, 5 min 동안 해리시켰다.

[0618] 도 12에 제시된 결과를 통해 키메라 항체 c10G5는 하이브리도마 10G5로부터 유래된 상응하는 마우스 항체의 결합 프로파일과 매우 유사한 프로파일로 고정화된 Ax1에 결합한다는 것이 입증된다.

[0619] 실시예 13: 키메라 항체 10G5는 모체 마우스 항체와 동일한 친화도로 AXL에 결합한다

[0620] 25°C에서 비아코어 3000 장치 (GE 헬쓰케어)를 사용하여 표면 플라스몬 공명 측정에 의해 키메라 항-Ax1 항체 c10G5의 친화도 측정을 수행하였다. 고체 항원-코팅된 표면으로서, rhAx1-Fc 키메라 (R&D 시스템즈, 카탈로그 번호 154-AL)가 190 RU의 밀도로 고정화되어 있는 센서 칩 CM5를 사용하였다.

[0621] 동역학적 성질 측정을 위해, HHBS-EP 완충제 (비아코어, 카탈로그 번호 BR-1001-88) 중 상이한 농도의 항-Ax1 항체 (0.3 내지 333.3 nM)를 3 min의 주입 시간 동안 30 $\mu\text{l}/\text{min}$ 유속으로 주입한 후, 5 min의 해리 기간이 이루어졌다 (완충제 단독). 각 사이클 후, 재생 용액 (10 mM HCl, 1 M NaCl)을 50 $\mu\text{l}/\text{min}$ 유속으로 30 sec 동안 주입하여 표면을 재생시켰다.

[0622] 물질 이동 대조군 실험을 통해 키메라 MAb c10G5 모두에 대한 유의적인 물질 이동 제한은 없다는 것이 입증되었다.

[0623] BIA이밸류에이션 소프트웨어 및 1:1 랭듀어 결합 모델을 사용하여 동역학적 회합 (온-속도, k_{on}) 및 해리 (오프-속도, k_{off}) 속도를 계산하였다. k_{off}/k_{on} 비로서 평형 해리 상수 (K_D)를 계산하였다. 형성된 항체-항원 복합체의 반감기 ($t_{1/2}$)는 $\ln 2/k_{off}$ 비로서 계산하였다.

[0624] 도 13에 제시된 바와 같이, 키메라 MAb c10G5는 모체 뮤린 항체의 친화도 (실시예 5 참조)보다 다소 우수한 정도의, 0.10 nM K_D 값으로, 나노몰 이하 범위의 높은 친화도를 입증하였다.

[0625] 실시예 14: 키메라 항체 10G5는 인간 비소세포 폐암의 마우스 모델에서 종양 성장을 억제시킨다

- [0626] 생체내에서의 항-Ax1 키메라 항체의 항-종양 활성을 평가하기 위해, 본 발명자들은 인간 비소세포 폐암 (NSCLC)의 마우스 이종이식 모델을 사용하였다. 인간 NSCLC A549 세포 (ATCC # CCL-185) A549 세포를 시험관내에서 10% FBS, 2 mM L-글루타민, 100 U/ml 폐니실린 및 100 µg/mL 스트렙토마이신, 0.01M HEPES 완충제, 0.45% D-(+)-글루코스, 1 mM 피루브산 나트륨으로 보충된 DMEM 배지 중에서 단층 배양물로서 증식시켰다. 무혈청 배지/마트리겔 (Matrigel) (1:1) 중에 재현탁된 5×10^6 개의 A549 세포를 누드 마우스 옆구리에 피하로 (s.c.) 이식하였다. 종양 크기가 100 mm³에 도달하였을 때 (도 14에서 0일째), 동물을 무작위화하고, 4주 동안 매주 2회에 걸쳐 복강내 (i.p.) 주사에 의해 비히클 (멸균 PBS) 또는 20 mg/kg의 항-Ax1 키메라 항체 10G5로 처리하였다.
- [0627] 도 14에 제시된 바와 같이, 키메라 항체 10G5는 대조군과 비교하였을 때, A549 종양의 성장을 유의적으로 약화시켰고 (이원 ANOVA에 의해 측정된 바, $P < 0.01$); 4주 처리 후, 약 40%의 억제가 관찰되었다.
- [0628] 실시예 15: 키메라 항체 10G5는 인간 급성 골수 백혈병의 마우스 이종이식 모델에서 종양 성장을 억제시킨다
- [0629] 혈액학적 암 모델에서 항-Ax1 키메라 항체의 항-종양 활성을 평가하기 위해, 본 발명자들은 인간 급성 골수 백혈병 (AML)의 마우스 이종이식 모델을 사용하였다. 10% FBS, 2 mM L-글루타민, 100 U/ml 폐니실린 및 100 µg/mL 스트렙토마이신으로 보충된 IMDM 배지 중 혼탁액 중에서 인간 AML Mv4-11 세포 (ATCC # CRL-9591) 세포를 증식시켰다. 무혈청 IMDM 배지 및 마트리겔 (1:1)의 혼합물 중에 재현탁된 5×10^6 개의 Mv4-11 세포를 누드 마우스 옆구리에 s.c.로 이식하였다. 종양 크기가 200 mm³에 도달하였을 때 (도 15에서 0일째), 동물을 무작위화하고, 4주 동안 매주 2회에 걸쳐 i.p. 주사에 의해 비히클 (멸균 PBS) 또는 30 mg/kg의 항-Ax1 키메라 항체 10G5로 처리하였다.
- [0630] 도 15에 제시된 바와 같이, 키메라 항체 10G5는 대조군과 비교하였을 때, Mv4-11 종양의 성장을 극도로 유의적 이게 약화시켰고 (이원 ANOVA에 의해 측정된 바, $P < 0.0001$); 3주 처리 후, 약 75%의 억제가 관찰되었다.
- [0631] 실시예 16: 탈포코실화된 당조작된 c10G5 (글리맥스)는 인간 비소세포 폐암의 마우스 모델에서 c10G5와 비교하였을 때, 증강된 항-종양 효과를 나타낸다
- [0632] 네이키드 항-Ax1 항체는 표적 수용체의 특이적인 신호전달 경로를 억제시킴으로써 및/또는 그의 이펙터 기능, 예컨대, 항체-의존성 세포성 세포독성 (ADCC), 보체-의존성 세포독성 (CDC) 및/또는 항체-의존성 세포 포식작용 (ADCP)을 통해 종양 세포를 사멸시킴으로써 종양 성장을 막을 수 있다. 코어 푸코실화가 없는 항체는 유의적으로 증강된 항체-의존성 세포-매개 세포독성 (ADCC) 및 증가된 항-종양 활성 효능을 보인다.
- [0633] 키메라 항체 c10G5의 두 변이체 - wt 및 탈포코실화된 것의 항-종양 효과를 비교하기 위해, 본 발명자들은 인간 비소세포 폐암 (NSCLC)의 마우스 이종이식 모델을 사용하였다. 인간 NSCLC A549 세포 (ATCC # CCL-185) A549 세포를 10% FBS, 2 mM L-글루타민, 100 U/ml 폐니실린 및 100 µg/mL 스트렙토마이신, 0.01M HEPES 완충제, 0.45% D-(+)-글루코스, 1 mM 피루브산 나트륨으로 보충된 DMEM 배지 중에서 단층 배양물로서 증식시켰다. 무혈청 배지/마트리겔 (1:1) 중에 재현탁된 5×10^6 개의 A549 세포를 누드 마우스 옆구리에 피하로 (s.c.) 이식하였다. 종양 크기가 130 mm³에 도달하였을 때 (도 15에서 0일째), 동물을 무작위화하고, 4주 동안 매주 2회에 걸쳐 복강내 (i.p.) 주사에 의해 30 mg/kg의 항-Ax1 c10G5 또는 글리맥스-c10G5로 처리하였다.
- [0634] 도 16에 제시된 바와 같이, 항체 글리맥스-c10G5는 c10G5와 비교하였을 때, A549 종양의 성장을 유의적으로 약화시켰다 (이원 ANOVA에 의해 측정된 바, $P < 0.0001$). 키메라 10G5의 wt 및 탈포코실화된 버전의 활성에서의 유의적인 차이가 종양 성장 억제에 있어서 항체-의존성 세포성 세포독성 (ADCC)의 중요성을 시사한다.
- [0635] 실시예 17: hu10G5 H2L1이 인간 비소세포 폐암의 마우스 모델에서 종양 성장을 억제시킨다
- [0636] hu10G5 H2L1은 10G5의 인간화 변이체로서; 상기 항체는 뮤린 10G5의 CDR 및 결합 특이성을 가지지만, V-도메인 프레임워크 영역에 다수의 치환을 포함하는 것이다. 생체내에서의 hu10G5 H2L1의 항-종양 활성을 평가하기 위해, 본 발명자들은 인간 비소세포 폐암 (NSCLC)의 마우스 이종이식 모델을 사용하였다. 인간 NSCLC A549 세포 (ATCC # CCL-185) A549 세포를 시험관내에서 10% FBS, 2 mM L-글루타민, 100 U/ml 폐니실린 및 100 µg/mL 스트렙토마이신, 0.01M HEPES 완충제, 0.45% D-(+)-글루코스, 1 mM 피루브산 나트륨으로 보충된 DMEM 배지 중에서 단층 배양물로서 증식시켰다. 무혈청 배지/마트리겔 (1:1) 중에 재현탁된 5×10^6 개의 A549 세포를 SCID 마우스 옆구리에 피하로 (s.c.) 이식하였다. 종양 크기가 100 mm³에 도달하였을 때 (도 16에서 18일째), 동물을 무작위화하고, 2주 동안 매주 2회에 걸쳐 복강내 (i.p.) 주사에 의해 비히클 (시나지스(SONAGIS)) 또는 30 mg/kg의 항-Ax1 hu10G5 H2L1로 처리하였다.

- [0637] 도 17에 제시된 바와 같이, 항체 hu10G5 H2L1은 대조군과 비교하였을 때, A549 종양의 성장을 유의적으로 약화시켰고 (이원 ANOVA에 의해 측정된 바, $P < 0.051$); 2주 처리 후, 약 25%의 억제가 관찰되었다.
- [0638] 실시예 18: 당조작된 hu10G5 (H1L1-글리맥스X)는 인간 비소세포 폐암의 마우스 모델에서 항-EGFR 치료가 종양 성장에 대해 미치는 효과를 강화시킨다
- [0639] hu10G5 (H1L1-글리맥스X)는 뮤린 10G5의 CDR 및 결합 특이성을 가지는, 인간화 및 탈푸코실화된 항체이다. 생체내에서의 hu10G5 (H1L1-글리맥스X)의 항-종양 활성을 평가하기 위해, 본 발명자들은 인간 비소세포 폐암 (NSCLC)의 마우스 이종이식 모델을 사용하였다. 인간 NSCLC A549 세포 (ATCC # CCL-185) A549 세포를 시험관내에서 10% FBS, 2 mM L-글루타민, 100 U/ml 폐니실린 및 100 μ g/ml 스트렙토마이신, 0.01M HEPES 완충제, 0.45% D-(+)-글루코스, 1 mM 피루브산 나트륨으로 보충된 DMEM 배지 중에서 단층 배양물로서 증식시켰다. 무혈청 배지/마트리겔 (1:1) 중에 재현탁된 5×10^6 개의 A549 세포를 누드 마우스 옆구리에 피하로 (s.c.) 이식하였다. 종양 크기가 100 mm³에 도달하였을 때 (도 18에서 0일째), 동물을 무작위화하고, 비히클 (시나지스), 어비툭스 (20 mg/kg) 또는 hu10G5 (H1L1-글리맥스X) (15 또는 30 mg/kg) 단독으로 또는 조합하여 그를 이용하여 처리하였다. 항체를 3주 동안 매주 2회에 걸쳐 복강내 (i.p.) 주사에 의해 투여하였다.
- [0640] 도 18에 제시된 바와 같이, hu10G5 (H1L1-글리맥스X)는 항-EGFR 치료적 항체 세툭시맙 (어비툭스)의 항-종양 효과와 매우 유사한 중간 정도의 항-종양 활성을 보였다. 그러나, 단일 작용제로서 사용된 두 항체 모두, 관찰된 효과는 이소형 대조군 항체 (시나지스)로 처리된 마우스 코호트와 비교하였을 때, 통계학상 유의적이지는 않았다. 상기 두 항체를 조합한 결과, 이소형 대조군 처리된 동물과 비교하였을 때, 종양 성장은 유의적으로 저연되었다 (이원 ANOVA에 의해 측정된 바, $P < 0.0001$). hu10G5 (H1L1-글리맥스X) 또는 어비툭스 단독으로 처리된 군과 비교하였을 때 효과는 또한 유의적이었다 (이원 ANOVA에 의해 측정된 바, $P < 0.05$).
- [0641] 실시예 19: 인간화 H2L1 및 H1L1 10G5 항체의 친화도 측정
- [0642] 유세포 분석법에 의한 c10G5 대 인간화 10G5 변이체의 결합 분석. AXL+ 및 AXL- 세포 상에서의 IgG 적정.
- [0643] 유세포 분석법을 위해, 배양물 중 부착성 세포를 PBS로 세척하고, 1 min 동안 트립신 (0.25%)으로 처리하여 분리시켰다. 5 min 동안 200 g로 원심분리하여 세포를 수집하였다. 0.2% 우혈청 알부민 (BSA)을 함유하는 PBS 중 전체 농도에 대해 항체를 희석시켰다. 실온에서 30 min 동안 20,000개의 세포를 포함하는 200 μ l의 세포 혼탁액을 사용하여 세포 염색을 수행하였다. APC-접합된 당나귀 항-인간 IgG (H+L) F(ab')2 단편 (잭슨 이뮤노리서치 라보라토리즈(Jackson ImmunoResearch Laboratories) #709-136-149, 1:400 희석률)으로 세포 결합 항체를 검출하였다. PBS/ 0.2% BSA로 2회에 걸친 세척 단계를 수행한 후, 세포를 200 μ l 중에 재현탁시키고, 포르테사 유세포 분석기 (BD 바이오사이언시스)를 사용하여 분석하기 전, 얼음 상에서 보관하였다.
- [0644] 하기 표 3 및 또한 도 19a & b에 제시된 바와 같이, 인간화 10G5 항체는 나노몰 이하 범위의 높은 친화도를 입증하였다.

표 3

MAb	온-속도 (k_{on} ; M ⁻¹ s ⁻¹)	오프-속도 (k_{off} ; s ⁻¹)	K_D (M)	반감기 ($t_{1/2}$; min)
뮤린 10G5	8.29×10^5	4.39×10^{-4}	5.30×10^{-10}	26.32 min
H1L1	1.54×10^6	1.61×10^{-4}	1.05×10^{-10}	71.72 min
H2L1	2.07×10^6	1.42×10^{-4}	6.86×10^{-11}	81.36 min

- [0645]
- [0646] 실시예 20: 인간화 H2L1 및 H1L1 10G5 항체의 세포 사멸 활성
- [0647] 항체-사포린 접합체를 이용한 종양 세포 사멸. 키메라 10G5 및 2개의 인간화 10G5 변이체의 비교.
- [0648] 면역독소 생성을 위해, FabFc-ZAP 인간 접합체 (4.5 nM 최종 농도) (어드밴스드 타게팅 시스템즈(Advanced

Targeting Systems), 카탈로그 번호 IT-65)를 사용하여 키메라 MAb를 식물 독소 사포린에 비공유적으로 커플링 시켰다. Ax1-양성 종양 세포주 MDA-MB-231 (인간 삼중 음성 유방 암종)을 사용하여 chAb-사포린 내재화가 종양 세포 생존능에 미치는 효과를 시험하였다. 10 % FBS, L-글루타민 (4 mM), 스트렙토마이신 (5 µg/mL) 및 페니실린 (5 U/mL)으로 보충된 DMEM/F-12 배지 중에서 96-웰 플레이트 중 웰당 800개의 세포를 시딩하고, 16시간 동안 부착시켰다. 세포를 면역독소 chAb-사포린의 상이한 희석액을 72 hr 동안 인큐베이션시켰다. CLARIO스타 (CLARIOstar)® 마이크로플레이트 판독기 (BMG LABTECH)를 사용하여 XTT/PMS 검정법을 수행함으로써 세포의 생존능을 측정하였다.

[0649] 도 20에 제시된 결과를 통해, 피코몰 범위의 EC50 값 (50% 세포를 사멸시키는 유효 농도)을 보이는 10G5 기반 면역독소의 우수한 내재화 및 매우 강력한 세포 사멸 효능이 입증되었다.

[0650] 비접합된 사포린 및 사포린에 커플링된 이소형 대조군 항체 (인간 IgG1) (대조군 SAP)를 음성 대조군으로서 사용하였다. 50% 세포를 사멸시키는 유효 농도 (EC50, pM)가 하기 표 4에 제시되어 있다.

표 4

	ch10G5	H1L1	H2L1	사포린	대조군 SAP
EC50 (pM)	5.713	3.440	2.677	99074	3686

[0651] 실시예 21: 10G5와 선행 기술의 항-AXL 항체의 비교

[0652] 제넨테크 항체 YW327.6S2: 결합 에피토프

[0653] 직접적인 비아코어 경쟁 결합 분석을 통해 10G5는 Ax1에의 결합에 대해 제넨테크 항체 YW327.6S2와 경쟁하지 않는다는 것을 입증한다. 이는 상기 두 항체가 상이한 에피토프에 결합한다는 것을 나타낸다.

[0654] 물질/장비

[0655] 1. 항-AXL 모노클로날 항체 (모두 PBS 중):

[0656] 1) c10G5 (126, MAB-G, 에비트리아, 로트 번호 3439) 4.6 mg/mL

[0657] 2) YW327.6S2-var (153, CONTR-1, 에비트리아, 로트 번호 3537) 4.5 mg/mL

[0658] 2. Hu-Ax1-Fc (661.9 RU), hu-EGFR-Fc (548.5 RU), 모노-AXL (776.6 RU)이 고정화되어 있는 센서 칩 CM5 #5

[0659] 3. 전개 완충제 (HBS-EP) 비아코어; 카탈로그 번호 BR-1001-88; 로트 번호 10213176

[0660] 4. 플라스틱 바이알 7 mm (0.8 mL) 비아코어; 카탈로그 번호 BR-1002-12

[0661] 5. 재생 용액: 10 mM HCl, 1 M NaCl

[0662] 6. 비아코어 3000 GE 헬쓰케어

[0663] 방법

[0664] 1. 모든 항체를 HBS-EP 중에서 100 µg/mL (666.7 nM)로 희석시킨다:

[0665] 1) c10G5 25 µl + 1 mL

[0666] 2) YW327.6S2-var 37.5 µl + 1.5 mL

[0667] 2. 장치 제어 소프트웨어에서, 하기 주형을 사용한다:

[0668] 검정 원리: 직접 결합

[0669] 주입:

[0670] · 플로우 셀(들) 사용: 2개, 1개는 참조

[0671] · 유속: 30 (µl/min)

[0672] · 주입 횟수: 2회

[0674] · 제1 샘플:

[0675] ○ 주입 시간: 3 (min)

[0676] ○ 주입 후 대기: 2.5 (min)

[0677] · 제2 샘플:

[0678] ○ 주입 시간: 3 (min)

[0679] ○ 주입 후 대기: 2.5 (min)

[0680] 사이클:

[0681] 실행 순서: 임력순대로

번호	반복	제1 샘플	제2 샘플
2	1	MAb c10G5 (666.7 nM)	MAb YW327.6S2-var (666.7 nM)
5	1	MAb YW327.6S2-var (666.7 nM)	MAb YW327.6S2-var (666.7 nM)
7	1	MAb YW327.6S2-var (666.7 nM)	MAb c10G5 (666.7 nM)

[0682]

[0683] 재생:

[0684] · 단일 주입

[0685] · 재생 유속: 50 ($\mu\text{l}/\text{min}$)

[0686] · 용액: 10 mM HC1, 1 M NaCl

[0687] · 주입 시간: 30 (s)

[0688] · 니들 사전디핑 처리: 수행하지 않음

[0689] · 재생 후 안정화 시간: 2 (min)

[0690] 3. 해당일 끝에: 탈착시킨다 (3 mL BIA데졸브(BIAdesorb) 용액 1, 3 mL BIA데졸브 용액 2).

[0691] 4. 해당 주말에: 살균한다 (0.525 mL BIA디스인페린트(BIA disinfectant) 용액 + 6.475 mL ddH2O, 0.005% 계면 활성제 P20).

[0692] 5. 곡선을 텍스트 파일로서 익스포트한다. 소프트웨어 프리즘(Prism) (그래프패드(GraphPad: 미국 캘리포니아 주 샌디에고))를 사용하여 센소그램을 열고, 분석한다.

결과

[0694] 1-2 min 이내에 플래토에 도달하도록 하는 데 충분한 농도로 제1 샘플 (MAbs c10G5 또는 YW327.6S2-var)을 주입한 후, 제2 샘플로서 MAb YW327.6S2-var를 주입함으로써 경쟁 결합 분석을 수행하였다 (도 21a).

[0695] 본 실험의 제2 파트에서, 항체 YW327.6S2-var을 제1 샘플로서 주입한 후, 제2 샘플로서 항체 YW327.6S2-var 또는 c10G5를 주입하였다 (도 21b).

결론

[0697] 본 결과는 제넨테크의 항체 YW327.6S2가 c10G5 항체의 존재하에서 인간 AXL에 결합할 수 있다는 입증하였다. 그러므로, YW327.6S2 및 10G5 항체는 상이한 에피토프를 인식한다.

[0698] 10G5 및 YW327.6S2가 상이한 에피토프에 결합한다는 것과 일관되게, 10G5 및 YW327.6S2는 상이한 상 교차 반응성을 보이는데: YW327.6S2는 인간 및 뮤린 Ax1, 둘 모두와 교차 반응하는 반면 (문헌 [Oncogene (2010) 29, 5254-5264, page 5255], 좌측 칼럼 참조), 10G5는 뮤린 Ax1에는 유의적인 결합을 보이지 않는다 (실시예 3 참조).

[0699] 제넨테크 항체 YW327.6S2: 세포 사멸

[0700] 실시예 20에 기술된 바와 같이, 항체-사포린 접합체를 사용하여 종양 세포 사멸을 수행하였다. 인간화 10G5 및 YW327.6S2의 두 변이체 비교를 수행하였다. 결과는 하기 표 5에 제시되어 있다.

표 5

	H1L1	H2L1	YW327.6S2	사포린	대조군 SAP
EC50 (pM)	17.13	2.664	33.25	246564	8.981

[0701]

[0702] INSERM 항체 D9 및 E8

[0703] 10G5와 달리, 문헌 [Oncogene 33, 5405-5414 (20 November 2014, doi:10.1038/onc.2013.487)]에 기술된 'D9' 및 'E8' 항체는 GAS6의 Ax1에의 결합을 억제시키지 않는다. 이는 D9 및 E8 항체가 10G5와 동일한 에피토프에 결합하지 않는다는 것을 시사하는 것이다.

[0704] U3 파마 11B7 항체

[0705] WO 2009062690 A1에 기술된 11B7 항체는 GAS6 리간드의 수용체 Ax1에의 결합을 억제시키는 것으로 나타나지 않았다. 이는 11B7 항체가 10G5와 동일한 에피토프에 결합하지 않는다는 것을 시사하는 것이다.

[0706] 실시예 22: 10G5와 선행 기술의 항-AXL 항체의 추가 비교

[0707] 비교된 항체

[0708] 실시예 21에 기술된 항-Ax1 항체 중 일부 항체에 대해 추가 시험을 수행하였다. 시험된 항체는 하기와 같았다:

[0709] Hu10G5 (H2L1)*[†]

[0710] Hu10G5 (H2L1-prep2)*[†]

[0711] 키메라 10G5[†], WO2016/097370

[0712] YW327.6S2 [제넨테크]

[0713] 추가이 파마슈티칼 'H9-L0' 항-Ax1, US2012/0121587 (서열 번호 3 및 65)

[0714] INSERM 항-Ax1 D4, WO2016/091891 (VH=서열 번호 1, VL=서열 번호 2)

[0715] U3 파마 '11D5' 항-Ax1, WO2009/062690A1

[0716] 키메라 1H12, WO2015/193428

[0717] * 동일한 항체 서열, 상이한 제제

[0718] [†] 동일한 CDR 서열.

[0719] 결합 경쟁 결정법

[0720] 목표

[0721] 상기 항체가

[0722] (1) 동일 또는 중복 에피토프에 결합하는지 여부; 및

[0723] (2) Ax1에의 결합에 대해 Gas6과 경쟁하는지 여부를 측정하고자 한다.

[0724] 물질

[0725] 상기와 같은 항체.

[0726] rhGas6 리간드

[0727] Ax1: Hs-Ax1-Fc (638.2 RU), Mm-Ax1-Fc (334.5 RU), Rhe-Ax1-Fc (350.2 RU)가 고정화되어 있는 센서 칩

[0728] 실시예 21과 같은 완충제, 용액, 및 비아코어 장치.

[0729] 방법

[0730] 일반

[0731] 본 실험에서, 제1 항체를 포화될 때까지 결합시켰다. 이어서, 제2 항체를 적용시키고, 그의 결합 능력을 모니터링하였다.

[0732] 제2 항체가 제1 항체와 동일한 (또는 중복) 에피토프를 인식한다면, 이때 결합은 차단될 것이다. 제2 항체가 상이한 에피토프를 인식한다면, 이때 결합은 제1 항체가 존재하지 않는 것과 같은 수준으로 검출될 것이다.

[0733] HBS-EP 중에서 10 $\mu\text{g/mL}$ 로 Gas6을 사용하여 항체 결합을 차단할 수 있는 Gas6의 능력에 대해서도 또한 시험하였다.

[0734] Hs-Ax1-Fc, Mm-Ax1-Fc 및 Rhe-Ax1-Fc 표면 상에서 모든 시험을 병렬로 수행하였다.

[0735] 시험된 쌍 목록에 대해서는 도 1을 참조한다 (본 목록에서 Contr-1은 YW327.6S2var 대신 잘못 표기된 YW367이다). 모든 항체는 HBS-EP 중에 25 $\mu\text{g/mL}$ 로 존재하였다.

[0736] 단계

[0737] 1. 용액을 제조한다.

Ab/리간드	표적 농도
H2L1	25 $\mu\text{g/mL}$
YW327.6S2	25 $\mu\text{g/mL}$
INSERM	25 $\mu\text{g/mL}$
추가이	25 $\mu\text{g/mL}$
U3	25 $\mu\text{g/mL}$
Gas6	10 $\mu\text{g/mL}$
H2L1-prep2	25 $\mu\text{g/mL}$
1H12	25 $\mu\text{g/mL}$
10G5	25 $\mu\text{g/mL}$

[0738]

2. 25°C에서 비아코어 실험을 수행한다.

[0740] 3. 장치 제어 소프트웨어에서, 직접 결합을 선택하고, 하기 제시되는 바와 같은 2회의 주입을 위한 설정 환경을 선택한다.

[0741] 4. 샘플 함량 및 권고된 부피를 비아코어 소프트웨어에 의해 제안되는 명시된 랙 위치와 매칭시키면서, 적절한 시약 랙 위치에 용액을 배치한다.

[0742] 5. 주형 & 결과 파일을 저장하고 & 분석을 시작한다.

[0743] 검정 원리

[0744] 검정 원리

[0745] · 직접 결합

[0746] 주입

[0747] 플로우 셀(들) 사용: 2, 3, 4개, 1개는 참조

[0748] 유속: 20 ($\mu\text{l}/\text{min}$)

[0749] 주입 횟수: 2회

[0750] 제1 샘플:

[0751] 주입 시간: 3 (min)

[0752] 주입 후 대기: 2.5 (min)

[0753] 제2 샘플:

[0754] 주입 시간: 4 (min)

[0755] 주입 후 대기: 2.5 (min)

사이트

[0757] 실행 순서: 입력순대로

반복 제1 샘플 제2 샘플

[0759] 필요에 따라, 두 설정 모두에서 각 Ab 쌍,

[0760] 즉, 제1 A, 제2 B 및 제1 B, 제2 A 사용.

결과

[0762] 전형적인 비아코어 반응 그래프가 도 21에 제시되어 있다. 각 주입 출발점이 그의 상응하는 반응과 함께 명시되어 있다. 각 주입시에 사용된 단백질 또한 명시되어 있다. 각 시험 후 재생 단계가 성공적으로 수행되었지만, 명확하게 하기 위해 트레이스를 도 21로부터 트리밍한다.

[0763] 이전 결과와 일관되게, 오직 YW327.6S2만이 마우스 Ax1-Fc에 결합하였다. 모든 항체의 인간 Ax1-Fc 및 레소스 (Rhesus) Ax1-Fc에의 결합은 정성적으로 유사한 결과를 보였다.

[0764] 추가이 및 INSERM은 모든 조건하에서 더 약한 결합을 보였고, INSERM은 검출가능한 결합을 보이지 않았다 (이는 Ab 배치가 결함이 있다는 것을 제안하는 것이다). 추가이 결합은 결합된 에피토프를 사정하는 데 충분할 정도로 강력하였다. 하기 표에는 또 다른 단백질이 이미 고정화된 Ax1-Fc에 결합되었을 때에 제2 단백질이 결합할 수 있는 능력이 요약되어 있다. 제2 단백질의 결합이 제1 단백질 존재에 의해 영향을 받지 않는다면, 이때 제2 단백질은 독립된 에피토프를 가지는 반면, 제1 단백질이 제2 단백질의 결합을 차단한다면, 이때 에피토프는 틀림없이 중복이거나, 또는 서로 가까운 위치에 존재하는 것일 수 있다.

첨가 순서 제1/제2	제1 반응	제2 반응	독립적일 경우, 예측 반응	에피토프에 관한 결론
H2L1/H2L1	318	11.64	318	중복
H2L1/ H2L1-prep2	320	8.9	323	중복
H2L1/ YW327.6S2	308	299	291	독립적
H2L1/추가이	319	33.5	50	독립적
H2L1/INSERM	319	-13	-1	INSERM은 비결합
H2L1/U3	319	321	322	독립적
YW327.6S2 /H2L1	291	323	318	독립적
YW327.6S2 /1H12	~220	~400	~400	독립적
1H12/ YW327.6S2	~400	~300	~220	독립적
10G5 / 1H12	~170	~180	~220	독립적
1H12 / 10G5	~220	~170	~170	독립적
추가이 /H2L1	50	317	318	독립적
Inserm/H2L1	-1	319	318	INSERM은 비결합
U3/H2L1	322	320	318	독립적
H2L1-prep2/H2L1	323	13.8	318	중복
Gas6/H2L1	37	281	318	중복
Gas6/ YW327.6S2	28	265	291	중복
Gas6/추가이	24	52	50	독립적
Gas6/INSERM	21	-3	-1	INSERM은 비결합
Gas6/U3	18	333	322	독립적
Gas6/ H2L1-prep2	14	301	318	중복

[0765]

[0766] 예상대로, H2L1 및 H2L1-prep2가 동일한 항체 서열의 상이한 제제인 바, H2L1 및 H2L1-prep2는 중복 에피토프를 가지는 것이다.

[0767] H2L1 및 YW327.6S2, 또는 U3의 결합 사이에서는 어떤 경쟁도 관찰되지 않았으며, 이는 이들이 상이한 에피토프를 가진다는 것을 시사하는 것이다. 비록 추가이의 결합이 약하기는 하였지만, 이 데이터는 이 역시 H2L1과 에피토프를 공유하는 것은 아니라는 것을 제안하는 것이다.

[0768] 제1 단백질이 Gas6이었을 때, 데이터는 Gas6이 H2L1, H2L1-prep2, 및 YW327.6S2의 결합을 차단한다는 것을 시사한다. Gas6은 추가이 또는 U3의 결합은 차단하지 못한다.

[0769] 1H12 및 YW327.6S2 또는 10G5의 결합 사이에서는 어떤 경쟁도 관찰되지 않았으며, 이는 이들이 상이한 에피토프를 가진다는 것을 시사하는 것이다.

[0770] 결론

[0771] H2L1의 고정화된 Ax1-Fc에의 결합이 YW327.6S2, U3, 또는 추가이의 결합에는 어떤 영향도 미치지 않는다.

[0772] 어느 조건하에서도 INSERM의 결합은 관찰되지 않았으며, 이는 Ab 배치가 결함이 있다는 것을 제안하는 것이다.

[0773] Gas6의 고정화된 Ax1Fc에의 결합이 후속되는 H2L1, H2L1-prep2, 및 YW327.6S2의 결합을 억제시켰다. Gas 6 결합은 추가이, 또는 U3의 결합은 억제시키지 못했다.

[0774] 그러므로, H2L1에 의해 결합이 이루어지는 에피토프는 YW327.6S2, 추가이, 및 U3에 의해 결합이 이루어지는 에피토프와 상이한 것이다.

[0775] 본 검정법에서는 INSERM 항체에 대해서는 어떤 결과도 얻지 못했다. 그러나, 상기 언급된 바와 같이, 문헌 [Oncogene 33, 5405-5414 (20 November 2014, doi:10.1038/onc.2013.487)]에 기술된 INSERM 'D9' 및 'E8' 항체는 GAS6의 Ax1에의 결합을 억제시키지 않는다. 이는 D9 및 E8 항체가 H2L1 또는 YW327.6S2와 동일한 에피토

프에 결합하지 않는다는 것을 시사하는 것이다.

[0776] 따라서, 공개된 결합 데이터와 함께 조합하여 본 검정법은 H2L1 항체가 시험된 것들 중에서 신규한 에피토프에 결합하고, 추가로, Ax1-리간드 Gas6의 Ax1에의 결합을 억제시키는 단 2개의 항체 (YW327.6S2와 함께) 중 하나라는 것을 입증한다.

[0777] Ax1 활성화 억제

[0778] 목표

[0779] Ax1의 공지된 자기인산화 부위 중 하나인 티로신 866 (Y866) (다른 것으로는 Y779 및 Y821을 포함 - 문헌 [Oncotarget. 2014 Oct; 5(20): 9546-9563; doi: 10.18632/oncotarget.2542] 및 상기 문헌에서 인용된 참고문헌 참조)의 억제를 통해 사정되는 바와 같이, 각종 Ax1 억제제가 Ax1의 활성화를 어느 수준까지 감소시키는지 사정하고자 한다.

[0780] 용해물 제조

[0781] 1. 14개의 10 cm 디쉬에 HeLa 세포를 시딩한다

[0782] a. 디쉬당 3백만 개의 세포.

[0783] 2. 부착될 때까지 세포를 인큐베이션시킨다.

[0784] 3. 배지를 제거하고, PBS로 세포를 세척한다.

[0785] 4. 0.5% FBS 배지 중에서 세포에 혈청을 공급하지 않고 고갈시킨다

[0786] a. HeLa의 경우, 0.5% MEM

[0787] b. O/N (밤새도록). 적어도 24시간 동안 영양을 공급하지 않고 고갈시킴.

[0788] 5. 6 ml 신선한 0.5% MEM 중에서 1시간 동안 세포를 항-Ax1 항체와 함께 인큐베이션시킨다

[0789] a. BGB324 (CAS = 1037624-75-1, UNII = 0ICW2LX8AS): 0.2 uM

[0790] b. H2L1-에비트리아*: 50 ug/ml

[0791] c. H2L1-카탈렌트(Catalent)*: 50 ug/ml

[0792] d. YW327.6S2: 50 ug/ml

[0793] * 동일한 서열, 상이한 제제.

[0794] 6. 10 cm 디쉬당 총 배지 6 ml 중에서 0.01 ug/ml rhGas6로 명시된 플레이트를 자극시킨다

[0795] a. rhGas6 자극 0.01 ug/ml.

[0796] 7. 셋업한다: 각각의 것을 26 ml의 0.5% MEM 중에서 제조한다

[0797] # 1. 영양을 공급하지 않고 고갈시킴

[0798] # 2. rhGas6 자극 (0.01 ug/ml)

[0799] # 3. rhGas6 자극 + BGB324 0.2 uM과 함께 미리 인큐베이션시킴

[0800] # 4. rhGas6 자극 + H2L1-에비트리아: 50 ug/ml과 함께 미리 인큐베이션시킴

[0801] # 5. rhGas6 자극 + H2L1-카탈렌트: 50 ug/ml과 함께 미리 인큐베이션시킴

[0802] # 6. rhGas6 자극 + YW327.6S2 50 ug/ml과 함께 미리 인큐베이션시킴

[0803] # 7. BGB324 0.2 uM 단독

[0804] # 8. H2L1-에비트리아: 50 ug/ml 단독

[0805] # 9. H2L1-카탈렌트: 50 ug/ml 단독

[0806] # 10. YW327.6S2 50 ug/ml 단독.

[0807] 8. 열음 상에서 세포를 용해시킴으로써 반응을 중단시킨다.

[0808] 9. 냉 PBS로 세척한다.

[0809] 10. RIPA 완충제 (+ 포스파타제 억제제)를 첨가한다

[0810] a. 100 ul/디쉬.

[0811] 11. 디쉬로부터 세포를 스크랩핑한다.

[0812] 12. 열음 상에서 5-10 min 동안 인큐베이션시킨다.

[0813] 13. 13,000 rpm 5-10 min (냉) 동안 스핀 다운시킨다.

[0814] 14. 상청액을 새 퓨브로 옮겨 놓는다.

[0815] 15. ELISA에 의해 포스포-단백질을 측정한다.

ELISA 측정

[0817] 포획 항체로서 베르겐바이오의 모노클로날 마우스 항-HsAx1 항체 5F11, 및 검출 항체로서 친화성 선별된 폴리클로날 토끼 항-포스포-Ax1 항체 (pAx1-Y866-16)를 사용하는 Ax1 단백질.

물질

[0819] · 눈크 맥시소르프 96C(Nunc MaxiSorp 96C) 플레이트

[0820] · 트리스-완충처리된 염수 (TBS) pH 7.6

[0821] · 트윈 20 (시그마)

[0822] · 세척 완충제 (TBS + 0.05% 트윈 20)

[0823] · 우테아 혈청 (FBS) (시그마)

[0824] · 모노클로날 마우스 항-HsAx1 항체 5F11, 3.6 mg/ml 스톡 (베르겐바이오).

[0825] · 폴리클로날 토끼 항-Hs-포스포-Y866 Ax1 항체 pAx1-Y866-16, 1.0 mg/ml (베르겐바이오). TBS + 10% FBS 중에서 1:1000으로 희석된 희석액을 사용

[0826] · HRP-접합된 염소 항-토끼 2차 항체 (잭슨 랩스(Jackson Labs) 111-035-144). TBS + 10% FBS 중에서 1:2000으로 사용

[0827] · 재조합 인간 Ax1Fc 키메라 (Ax1Fc 표준) (R&D 시스템즈, 154-AL-100)

[0828] · 포스포-Ax1 웨티드에 접합된 재조합 인간 Ax1Fc 키메라 (pAx1Fc 표준) (베르겐바이오)

[0829] · 0.2 M 탄산나트륨 완충제 pH 9.4

[0830] · TMB 스톡 용액 (DMSO 중 10 mg/ml 3,3',5,5'-테트라메틸벤지딘 (시그마 T2885))

[0831] · 100 mM 아세트산나트륨 pH 6

[0832] · 1 M H₂SO₄

[0833] · 30% 과산화수소 용액

[0834] · 용해물: 상기와 같이 제조. HeLa 세포의 경우, 전체 단백질 농도 1.5 mg/ml가 강력한 신호를 발생시킨다.

[0835] · 450 nm에서의 흡광도를 이용하는 마이크로플레이트 판독기. 배경을 감소시키기 위해서는 (이용가능할 경우) 595 nm에서의 흡광도는 차감되어야 하고, 그 효과는 미미하다.

[0836] 임의적: 96-웰 플레이트를 세척 용액으로 빠르게 충전시키기 위해 써모 멀티드롭 콤비(Thermo Multidrop Combi).

프로토콜

플레이트 제조

- [0839] · 0.2 M 소듐 카르보네이트 비카르보네이트 (pH 9.4) 중에서 희석된 100 μl /웰의 3.6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 포획 항체 5F11을 96-웰 맥시소르프 C 플레이트에 첨가하고, 4°C에서 밤새도록 인큐베이션시킨다.
- [0840] · 웰을 트리스-완충처리된 염수 중 10% 우테아 혈청으로 완전하게 충전시키고, 플레이트를 호일로 실링하고, 37°C에서 4-5hr 동안 차단시킨다.
- [0841] 샘플 제조 및 첨가
- [0842] · 본인이 가지고 있는 용해물과 동일한 완충제 중에서 일련의 Ax1Fc 표준 및 pAx1Fc 표준을 제조한다 (대략 60 ng/ml 내지 2 pg/ml 범위, 3배 희석액).
- [0843] · 차단 용액을 플레이트로부터 폐기하고, 세척 완충제로 2회에 걸쳐 세척한다 (웰을 완전하게 충전시킨 후, 플레이트를 플리킹(flicking)함으로써 폐기한다).
- [0844] · 표준물 및 용해물 (최소 50 μl /웰, 100 μl /웰이 바람직하다)을 적절하게 웰에 첨가한다.
- [0845] · 플레이트를 실링하고, 4°C에서 밤새도록 인큐베이션시킨다.
- [0846] · 검출 항체를 첨가한다.
- [0847] · 플레이트를 세척 완충제로 2회에 걸쳐 세척한다.
- [0848] · 100 μl /웰의 검출 항체 (pAx1-Y866-16)를 첨가한다.
- [0849] · 습윤화된 챔버에서 실온하에 2-3시간 동안 인큐베이션시킨다.
- [0850] · 2차 항체를 첨가한다.
- [0851] · 플레이트를 세척 완충제로 2회에 걸쳐 세척한다.
- [0852] · 100 μl /웰 HRP-접합된 염소 항-토끼 항체를 첨가한다.
- [0853] · 습윤화된 챔버에서 실온하에 2시간 동안 인큐베이션시킨다.
- [0854] 현상
- [0855] · 신선한 기질 용액을 제조한다:
- [0856] 100 μl 10 mg/ml TMB 스톡 용액
- [0857] 10 μl 30% 과산화수소 용액
- [0858] 9.9 ml 100 mM 아세트산나트륨 pH 6
- [0859] 임의적: 1 μl 의 잔여 HRP-접합된 검출 항체 혼합물을 첨가함으로써 소량의 기질 용액을 시험한다 (단계 12). 색상은 짙은 청색으로 매우 빠르게 변색되어야 한다.
- [0860] 1. 플레이트를 세척 완충제로 3회에 걸쳐 세척한다.
- [0861] 2. 100 μl 기질 용액을 각 웰에 첨가한다.
- [0862] 3. 30 min 동안 현상시키고, 50 μl /웰 1 M H₂SO₄를 이용하여 반응을 중단시킨다.
- [0863] 4. 450 nm에서의 흡광도를 이용하여 마이크로플레이트 판독기 상에서 플레이트를 판독한다. 이용가능한 경우, 595 nm에서의 흡광도를 차감한다.

[0864]

결과

용해물	450 nm에서의 흡광도
영양을 공급받지 않은 고갈된 것	0.044
rhGas6 (0.01ug/ml)	0.077
rhGas6 + BGB324	0.045
rhGas6 + H2L1 (에비트리아)	0.04
rhGas6 + H2L1 (카탈렌트)	0.055
rhGas6 + YW327.6S2var	0.092
BGB324	0.039
H2L1 (에비트리아)	0.047
H2L1 (카탈렌트)	0.059
YW327.6S2var	0.092

[0865]

[0866] 논의

[0867]

H2L1 제제 또는 pAXL의 존재하에서 Gas6으로 자극을 받은 세포로부터의 용해물은, Gas6으로 자극을 받은 대조군 세포의 것 (0.077)보다 유의적으로 더 낮은 pAXL 판독값 (0.040, 0.055, 0.045)을 나타내었고; H2L1-에비트리아 및 BGB324는 특히 낮았고, 판독값은 영양을 공급받지 않은 고갈된 대조군과 유사하였다 (0.44).

[0868]

그에 반해, pAx1 결과는 YW327.6S2var 항체가 Ax1 자기인산화를 강력하게 활성화시키고, YW327.6S2var은 단독으로 Gas6으로 자극을 받은 대조군 세포 (0.077)보다 더 높은 pAx1 판독값인 0.092를 보였다는 것을 나타낸다.

[0869]

항체를 단독으로, 또는 Gas6과 함께 사용하여 관찰되는 유사한 판독값은 H2L1 및 YW327.6S2var이 Ax1 결합에 대하여 경쟁한다는 것을 보여주는 경쟁 연구와 일관된다.

[0870] 섬유증 검정법에서의 활성[0871] 목표

[0872]

각종 Ax1 억제제가 섬유증 모델에서 섬유증 유발 마커의 활성을 어느 수준까지 감소시키는지 사정하고자 한다. 상기 모델은 인간 기원의 간 성상 세포주인 LX2 세포를 이용하고, 세포외 기질 단백질 알파-SMA 및 Col1A1 (예를 들어, 문헌 [Matrix Biology, Volume 34, February 2014, Pages 170–178; doi.org/10.1016/j.matbio.2013.11.002] 참조), 염증유발 MCP1 (문헌 [J Interferon Cytokine Res. 2009 Jun; 29(6): 313–326; doi: 10.1089/jir.2008.0027]), 및 시토카인 TGF-베타 (염증성 배경에서 과도한 조직 손상과 연구되어 있는 것 - 문헌 [Curr Opin Pharmacol. 2009 Aug;9(4):447–53; doi: 10.1016/j.coph.2009.04.008] 참조)의 발현을 모니터링한다.

[0873] 물질 및 방법

[0874] 세포주 및 처리:

[0875]

LX2 세포를 사용하였는데; 이는 문헌 [Gut (2005) 54(1):142–51. doi: 10.1136/gut.2004.042127]에서 최초로 기술된 것과 같은, 인간 기원의 간 성상 세포의 세포주이다. LX2 세포를 통상적으로 DMEM/10% FBS 중에서 배양하였다.

[0876] 생존능 검정:

[0877]

테트라졸륨 기반 MTT 검정법을 사용하여 세포 사멸을 측정하였다. 간략하면, 웰당 대략 2×10^4 개의 세포를 96-웰 조직 배양 플레이트에 플레이팅하고, 상이한 농도의 BGB324, 키메라 1H12 Ab (W02015/193428 참조), H2L1-prep2, 및 YW327.6S2var Ab로의 o/n 적절한 o/n 처리 후, 10 μl 의 MTT 시약 (PBS 중 5 mg/ml)을 첨가하고, 플레이트를 대략 2 h 동안 인큐베이션시켰다. 그 후 배지를 제거하고, 포르마잔을 100 ul 1-프로판올로 가용화시키고, 570 및 630 nm 파장에서 분광 광도계를 이용하여 정량화하였다.

[0878]

LX2 세포에서 Ax1-의존 AKT 활성화를 차단하는 데 있어 Ax1 차단 항체가 미치는 효과:

- [0879] 세포를 DMEM/10% FBS 중에서 12-웰/플레이트 (2×10^5 개의 세포/웰)에 시딩하고, 부착시키고, >24h 동안 성장시켰다. 실험에 앞서, 세포를 DMEM w/o FBS 중에서 밤새도록 방치하고, 1시간 동안 상이한 농도 (10 - 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)의 BGB324, H2L1-prep2, 또는 YW327.6S2var 차단 항체로 전처리한 후, 미리 클러스터링된 항-Ax1 활성화 항체 (1H12 Ab, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)로 자극시켰다. 세린 473 상에서의 Akt의 인산화를 통해 Ax1 활성화를 판독하였다 (웨스턴 블롯).
- [0880] 단백질 분석:
- [0881] 세포를 항프로테아제 및 항-포스파타제 (PMSF, 소듐 오르토바나데이트, 프로테아제 억제제 카테일, 및 플루오린화나트륨)로 보충된, RIPA 완충제 (150 mM NaCl, 1.0% IGEPAL®CA-630, 0.5% 소듐 테옥시콜레이트, 0.1% SDS, 50 mM 트리스, pH 8.0., 시그마 알드리치) 중에서 용해시키고, 1x 램나이(Laemmli) 로딩 완충제로 조정하고, 초음파 처리하고, 원심분리하였다. 20-30 μl 의 샘플에 대해 8% 소듐 도데실 술페이트-폴리아크릴아미드 젤 전기영동을 수행한 후, 이를 니트로셀룰로스 막으로 옮겨 놓았다. 막을 5% BSA-FAF 중에서 차단하고, TBS 트윈 완충제 중에서 세척한 후, 피어스-ECL(Pierce-ECL) 웨스턴 블로팅 기질로 현상시켰다.
- [0882] 사용된 항체는 o/n 4°C에서 5% BSA/TBS-T 중에서 1:200인 p-AKT (p-Akt 1/2/3 (C-11)); AKT (1:200), 이어서, 항-마우스 m-IgG κ BP-HRP (1:2000, 1h, RT); 1h, RT에서 1:400인 항-AKT (Akt 1/2/3 (H-136)), 이어서, 항-토끼-IgG-HRP (1:20000, 1h, RT)였다.
- [0883] LX2 세포 활성화 특징에서 Ax1 차단 항체가 미치는 효과:
- [0884] 세포를 DMEM/10% FBS 중에서 12-웰/플레이트 (2×10^5 개의 세포/웰) 중에 시딩하고, 부착시키고, >24h 동안 성장시켰다.
- [0885] 실험에 앞서, 세포를 DMEM w/o FBS 중에서 밤새도록 방치하고, 1시간 동안 BGB324, H2L1-prep2, 또는 YW327.6S2var 차단 항체 (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)로 전처리한 후, 미리 클러스터링된 항-Ax1 활성화 항체 (키메라 1H12 Ab, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)로 자극시켰다.
- [0886] 전체 RNA를 TRI졸(TRIzol) 시약으로 단리시켰다. i스크립트 cDNA 합성 키트(iScript cDNA Synthesis Kit) (바이오래드(BioRad))를 사용하여 제조사의 설명서에 따라 전체 RNA를 상보적 DNA (cDNA)로 역전사시켰다. 하우스 키핑 유전자 18S 및 RPII를 정규화를 위한 참조 유전자로서 사용하였고, H₂O를 음성 대조군으로서 사용하였다.
- [0887] LX2 활성화 특징을 분석하기 위해, α-SMA; TGF-β, COL1A1, 및 MCP1의 mRNA 발현을 분석하였다.
- [0888] 1H12 클러스터링 항체를 이용한 Ax1 활성화
- [0889] Ax1의 활성화는 대개 Ax1를 그의 리간드인 Gas6으로 처리함으로써 달성된다. 그러나, Gas6에 대한 대안으로서, Ax1은 1H12 클러스터링 항체로 처리함으로써 강력하고, 일관되게 활성화될 수 있다.
- [0890] Gas6과 1H12를 비교해 본 결과, Akt 인산화 자극은 1H12로 처리했을 때보다 Gas6으로 처리했을 때 더 약했다 (도 22a 참조). 1H12로 자극한 것이 웨스턴 블롯 분석시, pAkt 활성에 대하여 우수한 성능을 보였고, BGB324에 대하여 뚜렷한 반응을 나타내었다 (도 22b).
- [0891] 실시예 21에 기술된 바와 같이, 1H12 항체는 YW327.6S2var 또는 H2L1-prep2 항체와 상이한 에피토프에 결합한다. 따라서, Ax1은 YW327.6S2var 또는 H2L1-prep2 Ax1 결합을 방해하지 않고, 1H12를 사용하여 활성화될 수 있다.
- [0892] 결과
- [0893] 수득된 본 결과는 도 23에 제시되어 있다.
- [0894] 논의
- [0895] 1H12 활성화 항체에의 노출 이전에 H2L1-prep2로 처리된 세포는 일관되게 4개의 검정된 마커 모두에 대하여 자극을 받지 않은 대조군 세포와 유사한 발현 수준을 보였다.
- [0896] 그에 반해, YW327.6S2var 항체로 전처리한 후, 4개의 검정된 마커 모두에 대하여 발현 수준이 상승된 것이 관찰되었다.
- [0897] NSCLC 이종이식 모델에서의 활성화

목표

[0899] 누드 마우스에서의 A549 인간 비소세포 폐 암종 (NSCLC) 이종이식 모델에서 항-Ax1 기능-차단 항체 탈포코실화된 키메라 10G5 (글리맥스X-c10G5) 및 제넨테크로부터의 항-Ax1 인간 항체의 변이체 (YW327.6S2var)의 항-종양 활성을 비교하고자 한다.

실험 방법물질

[0902] 실험 동물

[0903] 종/계통: 무스 무스콜루스(*Mus musculus*)/Hsd: 무흉선 누드-Foxn1nu

[0904] 공급원: 할란 라보라토리즈(Harlan Laboratories)

[0905] 성별: 암컷

[0906] 체중: 이식 당일 20-30 그램

[0907] 연령: 무작위화 수행 당일 적어도 6주령된 상태

[0908] 동물 식별: 케이지 번호 및 귀 노칭(ear notching).

세포 및 세포 배양

[0910] ATCC로부터의 A549 세포 (CCL-185).

[0911] 10% FBS, 2 mM L-글루타민, 100 U/mL 폐니실린 및 100 µg/mL 스트렙토마이신, 0.01 M HEPES 완충제, 0.45% D-(+)-글루코스, 1 mM 피루브산 나트륨으로 보충된 DMEM 배지.

[0912] 0.25% 트립신-EDTA, 시그마, 카탈로그 번호 SLBD8049.

[0913] 성장 인자가 감량된 BD 마트리겔TM 기저막 매트릭스(BD MatrigelTM Basement Membrane Matrix Growth Factor Reduced), BD 바이오사이언시스, 카탈로그 번호

[0914] 354230, 로트 번호 2229975.

약물

[0916] 이소형 대조군: 콜레어(Xolair)™ 오말리주맙 (노바티스 유로파마 리미티드(Novartis Europharm Ltd.: 영국); 로트 번호 S2085), 150 mg/mL.

[0917] 항-AXL 항체:

[0918] 1. 키메라 (뮤린 가변/인간 불변) 탈포코실화된 IgG1 c10G5 (MAb-G글리맥스X;

[0919] 예비트리아, 로트 번호 3556), 6.4 mg/mL.

[0920] 2. 인간 YW327.6S2var (CONTR-1; 예비트리아, 로트 번호 3537), 4.5 mg/mL.

[0921] 약물 제조:

[0922] 군당 총 9마리의 마우스에 대한 약물이 요구되고: 군당 10마리의 마우스에 대한 약물을 제조한다.

[0923] 마우스 1마리당 250 µl x 10 = 총 2.5 mL 제조.

[0924] · 글리맥스X-c10G5: 1,328 µl의 멸균 PBS와 혼합하여 1,172 µl의 6.4 mg/mL 글리맥스 스톡 용액을 회석시킴으로써 2.5 mL의 3 mg/mL 투약액을 생성한다. 항체 스톡을 -80°C에서 유지시킬 것이다. 회수시, 항체를 실온에서 해동시키고, 즉시 얼음 위에 올려 놓을 것이다. 항체 약물 투약용 용액을 투여시까지 얼음 상에서 유지시킬 것이다. 임의의 잔여 항체 약물 투약용 용액을 4°C에서 유지시킬 것이다.

[0925] · 인간 MAb YW327.6S2var: 1,667 µl의 4.5 mg/mL CONTR-1 스톡 용액을 833 µl의 멸균 PBS와 혼합하여 2.5 mL의 3 mg/mL 투약액을 생성한다. 항체 스톡을 -80°C에서 유지시킬 것이다. 회수시, 항체를 실온에서 해동시키고, 즉시 얼음 위에 올려 놓을 것이다. 항체 약물 투약용 용액을 투여시까지 얼음 상에서 유지시킬 것이다. 임의의 잔여 항체 약물 투약용 용액을 4°C에서 유지시킬 것이다.

- [0926] · 콜레어™ 오말리주맙: 3 mg/mL의 약물 투약용 용액 2.5 mL를 수득하기 위해, 50 μL의 항체 스톡을 2,490 μL의 멸균 PBS 중에서 희석시킨다. 항체 스톡 용액을 제조사의 권고에 따라 4°C에서 유지시킨다.
- [0927] 방법
- [0928] 세포 배양
- [0929] A549 세포를 10% FBS, 2 mM L-글루타민, 100 U/ml 폐니실린 및 100 μg/ml 스트렙토마이신, 0.01 M HEPES 완충제, 0.45% D-(+)-글루코스, 1mM 피루브산 나트륨으로 보충된 DMEM 배지 중에서 단층 배양물로서 유지시켰다.
- [0930] 지수 성장기 동안 세포를 수확하고, 계수한 후, 종양 접종을 수행하였다. 간략하면, 전면생장 미만인 상태(sub-confluent)로 배양된 A549 세포를 멸균 PBS로 세척하고, 0.25% (w/v) 트립신 용액을 이용하여 플라스크로부터 탈착시켰다. 탈착된 세포를 1회 세척하고, 무혈청 DMEM 배지 중에서 4×10^7 개의 세포/ml로 재현탁시키고, 성장 인자가 감량된 BD 마트리겔™ 기저막 매트릭스 중에서 1:1로 희석시켰다. 종양당 총 4×10^6 개의 세포를 주사하였다. 트립판 블루 배제를 사용하여 세포 생존능을 측정하였다.
- [0931] 피하 종양 접종
- [0932] 50% 마트리겔을 포함하는 무혈청 배지 중의 대략 4×10^7 개의 세포/ml A549 세포 0.1 ml를 각 마우스의 우측 옆 구리에 피하로 접종하였다 (에넥스(Annex) 1). 종양 평균 부피가 125 mm³에 도달하였을 때, 종양 세포 접종 후 24일 경과 시점에 A549 세포를 접종받은 마우스에 대하여 처리를 시작하였다. 각 처리군당 종양보유 마우스 9마리씩 포함하였다.
- [0933] 실험군 배정
- [0934] 처리를 시작하기 전, 동물의 체중을 측정하고, 주 2회에 걸쳐 종양 부피를 측정하였다. 종양 부피가 임의의 주어진 처리 효과에 영향을 줄 수 있기 때문에, 라틴 방격(Latin square) 방법을 사용하여 마우스를 군으로 배정하였다. 종양 부피에 기초하여 무작위화하고, 확실하게 각 동물이 주어진 처리로 배정될 확률은 동일하도록 하고, 이로써, 계통 오차는 감소되었고, 처리군은 기준선에서는 유사하도록 하였다. 45마리의 동물을 5개 처리군으로 무작위화하였다.
- [0935] 투약
- [0936] 적절한 날에 각 동물은 특정량의 이소형 대조군 항체 (콜레어™) 또는 항-Ax1 항체를 하기 용량: 30 mg/kg, 3 mg/ml로 주 2회 투여 x 5주 받았고, 38일째 안락사되었다. 투약 투여는 IP였고, 투약 부피는 30-케이지 니들에 의해 10 ml/kg이었다.
- [0937] 임상적 관찰결과
- [0938] 통상적으로 모니터링할 때, 동물을 예컨대, 운동성, 탈수, 체중 증가/손실, 눈가 점액(eye matting), 및 임의의 다른 비정상적인 효과와 같은, 종양 성장 또는 처리가 정상적인 행동에 미치는 임의의 효과에 대하여 체크하였다. 사망 및 관찰된 임상적 징후를 기록하였다. 비공복 상태에서의 체중을 매일 기록하였다.
- [0939] 종양 측정 및 종점
- [0940] 종양 측정: 주 2회에 걸쳐 캘리퍼를 이용하여 종양 크기를 2차원으로 측정하였고, 종양 부피는 하기 공식: $V = 0.5 a \times b^2$ [mm³] (여기서, a 및 b는 각각 종양의 장축 직경 및 단축 직경이다)을 사용하여 계산하였다.
- [0941] 종점:
- [0942] 깊은 마취 상태에 있을 때 마우스를 경추 탈구에 의해 희생시켰다. 각 동물에 대하여, 각 종양을 이등분하고, 하나는 액상 질소 중에서 급냉시키고, -80°C 냉동고에서 보관하고, 나머지 다른 한 부분은 4% 포름알데히드에서 고정시키고, 24 h 후 70% 에탄올로 읍기고, 추가 평가를 위해 4°C에서 보관하였다.
- [0943] 통계적 분석
- [0944] 소프트웨어 프리즘 (그래프패드: 미국 캘리포니아주 샌디에고)를 사용하여 반복 평균을 비교하기 위해 본페로니(Bonferroni) 사후 검정과 함께 이원 (시간 및 처리) ANOVA에 의해 종양 성장 곡선을 비교하였다. 군 사이의 차이는 P < 0.05일 때, 유의적인 것으로 간주되었다. 온라인 아웃라이어(Outlier) 계산기 (퀵칼크스(QuickCalcs), 그래프패드; <http://graphpad.com/quickcalcs/Grubbs1.cfm>)와 함께 그립스 검정(Grubbs' test)

을 사용하여 개별 종양 부피 비교에 의해 이상점을 검출하였다. 소프트웨어 프리즘 (그래프패드)을 사용하여 도면을 작성하였다.

[0945] 결과

[0946] 체중 변화

[0947] 38일 동안의 비하를 또는 항-AXL 항체 처리에 기인한 체중 변화를 모니터링하였다. 처리는 0일째 시작하였고, 5주 동안 주 2회에 걸쳐 수행되었다. 일반적으로, 체중이 > 20% 하락한 것은 처리가 독성을 띤다는 것을 나타내고, 이는 동물의 안락사로 진행되어야 한다. 어느 군도 독성을 시사하는 체중 감소를 보이지 않았다.

[0948] 종양 부피 변화

[0949] 글리맥스X-c10G5로, 및 제넨테크로부터의 항-Ax1 인간 항체의 변이체 (YW327.6S2var)로 처리된 마우스에서의 개별 종양의 종양 성장을 보여주는 플롯이 도 24에 제시되어 있다.

[0950] 탈포코실화된 키메라 항체 c10G5 (글리맥스X-c10G5) 및 제넨테크의 항체 YW327.6S2var로 처리된 두 동물군 모두에서 종양 성장 지연이 관찰되었다.

[0951] YW327.6S2var 군 및 글리맥스X-c10G5 군, 둘 모두에 단일의 이상점이 존재하였고, 이는 추가 분석으로부터 배제되었다 (도 24에서 별표로 표시).

[0952] 처리 31일째까지 상이한 군에 대한 종양 성장 곡선을 비교해 본 결과, YW327.6S2var 군 및 글리맥스X-c10G5 군은 이소형 대조군으로 처리된 군과 유의적인 차이가 있는 것으로 나타났다 (하기 표 참조).

일	이소형 대조군과 항-Ax1 군 사이 차이의 유의도	
	YW327.6S2var	글리맥스X-c10G5
0	비유의적 ($P > 0.05$)	비유의적 ($P > 0.05$)
3	비유의적 ($P > 0.05$)	비유의적 ($P > 0.05$)
11	비유의적 ($P > 0.05$)	비유의적 ($P > 0.05$)
13	비유의적 ($P > 0.05$)	비유의적 ($P > 0.05$)
18	$P < 0.05$	비유의적 ($P > 0.05$)
21	$P < 0.05$	$P < 0.05$
24	$P < 0.01$	$P < 0.01$
27	$P < 0.001$	$P < 0.01$
31	$P < 0.0001$	$P < 0.0001$

[0953]

[0954] 논의

[0955] 탈포코실화된 키메라 항체 c10G5는 상기 뮤린 이종이식편 NSCLC 이종이식 모델에서 제넨테크의 완전 인간 MAb YW327.6S2와 유사한 항-종양 활성을 가진다.

[0956] 상기 관찰결과는 10G5의 결합 특이성을 가지는 인간화 항체인 H2L1이 인간 대상체에서 YW327.6S2보다 효능이 더 클 수 있다는 것을 제안한다. 이에 대한 이유는 실시예 21 및 22에서 보고된 바와 같이, YW327.6S2는 뮤린 Ax1에 결합하는데 반해, 10G5는 결합하지 않기 때문이다. 따라서, YW327.6S2에 대하여 보고된 효과는 인간 이종이식편 세포 및 속주 뮤린 조직, 둘 모두에 대한 항체 작용의 결과이다. 그에 반해, 10G5에 대하여 보고된 효과는 오직 인간 이종이식편 세포에 대해서만 발휘된 항체 작용으로부터 발생된 것이다.

서열 번호: 1 [hu10G5 VH(GH1)]

EVQLVQSGAGLVQPGGSVRSCAASGYSFTDFYINWVRQAPGKGLEWIARIFPGGDNTYY
NEFKGRFTLSADTSSTAYLQLNSRAEDTAVYYCARRGLYYAMDYWGQGTDTVSS

서열 번호: 2 [hu10G5 VH(GH2)]

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSFTDFYINWVRQAPGKGLEWVARIFPGGDNTYY
NEFKGRFTLSADTSKSTAYLQMNSRAEDTAVYYCARRGLYYAMDYWGQGTDTVSS

서열 번호: 3 [hu10G5 VL(GL1)]

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSQSLVHSNGIPYLHWYQQKPGKAPKLLIYRVSNRFS
GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCSQGTHVPPTFGQGTKVEIK

서열 번호: 4 [hu10G5 VL(GL2)]

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSQSLVHSNGIPYLHWYQQKPGKAPKLLIYRVSNRFS
GVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCSQGTHVPPTFGQGTKVEIK

서열 번호: 5 [예시적인 중쇄 불변 영역]

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPALQSSG
LYSLSSVVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPS
VFLPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSREEMTKN
QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN
VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

서열 번호: 6 [10G5 GH1 중쇄]

EVQLVQSGAGLVQPGGSVRSCAASGYSFTDFYINWVRQAPGKGLEWIARIFPGGDNTYY
NEFKGRFTLSADTSSTAYLQLNSRAEDTAVYYCARRGLYYAMDYWGQGTDTVSSAS
TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPALQSSGLY
SLSSVVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF
LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR
VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSREEMTKNQ
VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV
FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

서열 번호: 7 [10G5 GH2 중쇄]

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSFTDFYINWVRQAPGKGLEWVARIFPGGDNTYY
NEFKGRFTLSADTSKSTAYLQMNSRAEDTAVYYCARRGLYYAMDYWGQGTDTVSSAS
TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPALQSSGLY
SLSSVVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF
LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR
VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSREEMTKNQ
VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV
FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

서열 번호: 8 [예시적인 경제 불변 영역]

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD
SKDSTYSLSSTTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

서열 번호: 9 [10G5 GL1 경제]

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSQSLVHSNGIPYLHWYQQKPGKAPKLLIYRVSNRFS
GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCSQGTVPPTFGQGTKEIKRTVAAPSVFIF
PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSST
LTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

서열 번호: 10 [10G5 GL2 경제]

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSQSLVHSNGIPYLHWYQQKPGKAPKLLIYRVSNRFS
GVPSRFSGSRSGTDFTLTISLQPEDFATYYCSQGTVPPTFGQGTKEIKRTVAAPSVFIF
PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSST
LTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

서열 번호: 11 [hu10G5 VII(GH1), 해산]

gagggtgcagctggcaggactggactgtgcagccaggcgatctgcagacttagtgcgcgcgttcggctacacg
ttcacccgacttttatataactggcgtacacaggccccggcaagggtcgagtgatcgctcgattttccctgggggtgacaa
cacatactacaacaaaaagtccaaaggcagggtcacccgtccgcgatactccagctaccgcatactgcactgaactcc
ctgagggcagaagacacagccgtactattgtgccaggcggggcgtactatgtatggattattggggccaggaaacctg
gtgacagtctcgagc

서열 번호: 12 [hu10G5 VII(GH2), 해산]

gagggtgcagctggaaatccggggagggtcggtgcagccagggtggcagccctgagactgtctgcgcgcgttcaggatactc
cttcaccgacttttatataactgggtcagacaggccccggcaaggccctggagtggtcgctcgattttccctggggggac
aacacatactacaacaaaaagtccaaaggcagggtcacccgtgactgtgtatctaaaagtaccgcatactgcactgaatgaat
agccgtgagggcagaggacacaggccgtactattgtgccaggcggggcgtactatgtatggattattggggacaggggacc
ctggtagacagtctcgagc

서열 번호: 13 [hu10G5 VL(GL1), 해산]

gacatccagatgacacagtctcccccagcgtgcgcctctgtgggagatagactcaccatcacatgcaggctagtcagagc
ctggtagactctaaacggcatccctaccctgcattgtatcagcagaagccaggaaagctcccaagctgtatctacagagtc
actaatcggtctctgggtcccttcgagggttagtggctcaggctccggcagactcactctgaccatccatccctgcaaccag
aggattttgcaacttactattgttagccaggcacacacgtgcctacttccgtcaggcacaaagtgcacaaattaag

서열 번호: 14 [hu10G5 VL(GL2), 해산]

gacatccagatgacacagtctcccccagcgtgcgcctctgtgggagatagactcaccatcacatgcaggctagtcagagc
ctggtagactctaaacggcatccctaccctgcattgtatcagcagaagccaggaaagctcccaagctgtatctacagagtc
actaatcggtctctgggtcccttcgagggttagtggctcaggctccggcagactcactctgaccatccatccctgcaaccag
aggattttgcaacttactattgttagccaggcacacacgtgcctacttccgtcaggcacaaagtgcacaaattaag

서열 번호: 15 [예시적인 중쇄 불변 영역, 해산]

gctagcacaaggcccctagtggtttctctggctcccttccaaatccacttctgggtgcactgtctgtggatgcctggaa
ggatattttctctggtaaccctgtgactgtctcatggactctgtgtctgacttctgggtccacacttccctgtgtcgcgtctgt
gactgtactctgtcatctgtgtactgtgccttcatctctggaaaccagacacttgcataatgtgaaccacaaccatcc

서열 번호: 16 [10G5 GH1 중쇄, 핵산]

gagggtcagctggccaggactggactggcgactggcagccaggactgtcagactgtggatgtgcgcgcgttcggctacagg
ttcacccgactttatacaactgggtcagacaggccccggcaagggtctggatgtgcgcgtatttccctgggggtgaccaa
cacatactacaacgaaaaggtaaaaggcagggtcacccgtccggcatacttccagcttaccgcatactgcacactgaactcc
ctgagggcagaagacacacggcgttactattgtccaggcggggctgtactatgtatggatttggggcaggaaaccttg
gtgacagtctcgagcgtcagcacaaggccctagtgttccctggccccccttccaaatccactctggggactgtct
gggatgcctgttgcaggattacttccgtacccgtactgtcatggaaactctgggtctgactcttgttgcacacttccctgt
gtgtcgactgttagggactgtactctgtcatctgttgcactgtgcctcttcatctggaaaccaggacactatgttgc
accacaaaaccatccaacactaaaaggacaaaaaggtaaaaccatccctgtgacaaaaccacactgtccaccatgtcc
tgccctgtactgtggaggacccctgtgtttctgttcccccacaaaaggataccctgtatgtatcttagaaccctgagggt
gacatgtgtgtggatgtgtcatggaggacccctgaggtaaattcaactgttactgtggatgtggatgtggactccacaatggc
aaaaccaaggcttagagaggaacagtacaattcaaccatcagatgttactgtgtcatggatgtggactgtgtcatggatgt
ggcaaggaaatacaagtgtaaagtctcaaaacaaggccctgcgttccaaattgagaaaacaatctcaaaaggcacaaggac
cctagggaaacccagggttccataccctgcacccctcaagagagggaaatgaccaaaaaccagggttgcctgtacatgt
aggcttctacccttgcacatgtgtggatgtggatgtcaatggacagccgtgagaaacaactacaaaaacaaccccccctgt
gttctgtatggcttcttctgtactccaaactgtactgtggacaagtgtatgtggcagcaggaaatgtttctgtcatgc
atggggctgtcataaccactacactcagaatccctgtctgttccggggaaa

서열 번호: 17 [10G5 GH2 중쇄, 핵산]

gagggtcagctgggtggaaatccggcgagggctggtcagccaggltggcagccgcctgagactgtctgcgcgcctcaggatactc
cttaccgcacttttatcaactgggtcagacaggccccccggcaaggccctggagtgggtcgctcgatctttccctggaggggac
aacacatactacaacgaaaatgtcaaaaggcagggttccccctgtactgtctgatcttctaaaatgtaccgcatactgcataatgaat
agccgtggggcagaggacacagccgtactatgtggccaggccggggctgtactatgtctatggattttggggacagggggac
ctgggtacagctcgagcgttagcacaaggccctagtgtttccctggctcccttccaaatccacttctggtgcaactgt
ctctgggatgcctggtaaggattactttctgtactgtcatggaaactctggtgctgtacttctggtgccacactttccc
tgctgtgtctgcagtctgtggactgtactctgtcatctgtgtactgtccctctcatctctggaaaccacacttgcataatgttaat
gtgtgaaccacaaccatccaacactaaaggcacaaaaaatgtggaaacccaaatctgtgacaaaacccacacctgcocccactt
gtccctggccctgaactgtggaggacccttctgtgtttctgtgtcccccacccaaaggatccctgtatctctagaacccctg
agggtgacatgtgtgtgtgtgtactgtcatggaccctggagggtcaaatcaactgtgtacgtggatggaggtggaaacttccacaat
gccaacaaaccaagcttagagggaaacagactacaatcaaccctacagactgtgtgtactgtgtgtactgtgtcatcaggattggctg
aatggcaagaatacaactgtgtaaatgtctcaaaaccaaggccctggctgtccaaatgtgaaaaacaatctcaaaaggcacaagggac
agccctaggaaaccccaagggtcaccctgtccacccctcaagagggaaatgtaccaaaaaccagggtgtccctgtacatgcctggtc
aaaggctctacccttgcacattgtgtggagtggagtcaatgtggacagccctgtgagaacaactacaacaaacaccccccctgtg
ctggattctgtatggcttcttctgtactccaaactgtactgtggacaactgttagatggcaggaaatgtctttctgtctgtcat
gtatgtggactgtctgcataaccactacactcaaaaaatccctgtctgtctcccccggaaaa

[0959]

서열 번호: 18 [경제 불변 영역, 혜산]

Cgtacggcgcggccctctgttgtcattttccccatctgatgaacagctgaaatctggactgcctctgttgtctgtgtgtgaac
aacttctaccctagaggccaaagtccagtgaaaagtggacaatgtcgagtgaggatcccaggaaatctgtactgag
caggactctaaggatagcacatactccctgtcctctactgtgacactgagaaggctgattcgagaaacacaaaagtgtacgcct
gtgaagtgcacacatcagggctgtctagtcgtgaccaaattcctcaataggggagagtgc

서열 번호: 19 [1065 GL1 경제, 혜산]

gacatccagatgacacagtctccctccagcctgagcgccctgtgggagatagagtaccatcacatgcaggcttagtcagagc
ctggtgactctaaacggcatccctacccctgtatcgacagaagccaggaaagctccaaagctgtatctacagagtc
agtaatcggtctctgggtgtccctcgagggttagtggtcaggctccgggacagactctgaccatttcattccctgcaaccag
aggatttgcaacttactattgttagccaggcacacacgtgccccctacttcggtcaggccaccaaagtcaaaattaagcgtacg
gtcgccgcccctctgtgttcatcccccattctgatgaacagctgaaatctggactgctctgtgtctgtgaacaacttct
accctagagaggccaaagtccagtgaaaagtggacaatgtctgacagtgaggaaatcccaggaaatctgtactgagcag
ctctaaggatagcacatactccctgtcctctactgtgacactgagaaggctgattcgagaaacacaaaagtgtacgcctgtgaa
gtcacacatcagggctgtctagtcgtgaccaaattcctcaataggggagagtgc

서열 번호: 20 [1065 GL2 경제, 혜산]

gacatccagatgacacagtctccctccagcctgagcgccctgtgggagatagagtaccatcacatgcaggcttagtcagagc
ctggtgactctaaacggcatccctacccctgtatcgacagaagccaggaaagctccaaagctgtatctacagagtc
gtaaatcggtctctggcgccctccagggtctccgggacagctccggaaacagactctgaccatttcattccctgcaaccag
aggatttgcaacttactattgttagccaggcacacacgtgccccctacttcggccaggaaaccaaagtgtgaaattaagcgtac
gtcgccgcccctctgtgttcatcccccattctgatgaacagctgaaatctggactgctctgtgtctgtgaacaacttct
taccctagagaggccaaagtccagtgaaaagtggacaatgtctgacagtgaggaaatcccaggaaatctgtactgagcag
ctctaaggatagcacatactccctgtcctctactgtgacactgagaaggctgattcgagaaacacaaaagtgtacgcctgtgaa
gtcacacatcagggctgtctagtcgtgaccaaattcctcaataggggagagtgc

서열 번호: 21 [인간 Ax1]

MAWRCPRMGRVPLAWCLALCGWACMAPRGTQAEESPFVGNPGNITGARGLTGLRCQL
QVQGEPPVHWRDQIILEADSTQTQVPLGEDEQDDWIVSQLRITSLSQSLDTGQQYQCL
VFLGHQTFVSQPGYVLEGPLYFLEEPEDRTVAANTPFLSCQAQGPPEPVDLLWLQDAV
PLATAPGHGPQRSLHVPGLNKTSSFSCEAHNAKGVTTSRTATITVLPQQPRNLHLVSRQPT
ELEVAWTPGLSGIYPLTHCTLQAVLSDDMGIQAGEPDPEEPLTSQASVPPHQRLGSLH
PHPTYHIRVACTSSQGPSSWTHWLPVETPEGVPLGPENISATRNGSQAFVHWQEPRAPL
QGTLLGYRLAYQGQDTPEVLMIDIGLRQEVTLQGDGSVSNLTVCVAAYTAAGDGPWSLP
VPLEAWRPQAQPVHQLVKEPSTPAFSWPWWYVLLGAVVAAACVLILALFLVHRRKETR
YGEVFEPTVERGELVRYRVRKSYSRRTTEATLNSLGISEELKELRDVMVDRHKVALGKT
LGEGEFGAVMEGQLNQDDSLKAVKTMKIAICTRSELEDFLSEAVCMKEFDHPNVMRLLGV
CFQGSERESPAPVVLPMKHDGLHSFLLYSRLGDQPVYLPTQMLVKFMADIASGMELYLS
TKRFIHRDLAARNCMLNECMSVCADFGLSKKIYNGDYYRQGRIAKMPVKWIAIESLDRVY
TSKSDVWSFGVTMWEIATRGQTPYVGENSEIYDLRQGNRLKQPADCLDGLYALMSRC
WELNPQDRPSFTELREDLENTLKALPPAQEPDEILYVNMDEGGGYPEPPGAAGGADPPTQ
PDPKDSCSCLTAAEVHPAGRYVLCPSPPAQPADRGSPAAPGQEDGA

[0960]

시열 번호: 22 [유원 Ax1]

MGRVPLAWWLALCCWGCAAHKDTQTEAGSPFVGNPGNITGARGLTGTLCLEQVQGEPP
 EVVWLRDGQILEADNTQTQVPLGEDWQDEWKVSQRLISALQLSDAGEYQCMVHLEGRT
 FVSQPGFVGLELPYFLEEPEDKAVPANTPFNLSCQAQGPPEPVTLWLQDAVPLAPVTGH
 SSQHSLQTPGLNKTSSFSCEAHNAKGVTTSRTATITVLPQRPHHLHVVSRRQPTELEVAVTP
 GLSGIYPLTHCNLQAVLSSDGVIGWLGSDDPPEPLTLQSVPPHQLRLEKLLPHTPYHIRIS
 CSSSQGPSPWTHWLPVETTEGVPLGPENVSAMRNGSQVLRWQEPRVPLQGTLLGYRL
 AYRGQDTPEVLMIDLTRTVELELRGDRPVANLTVTAYTSAGDGPWSLPVPLEPWRPG
 QQQPLHHLVSEPPPRAFWPWWYVLLGALVAAACVLALFLVHRRKKETRYGEVFEPTVE
 RGELVVRYVRKSYSRRTEATLNSLGISEELKEKLRDVMVDRHKVALGKTLGEGEFGAVM
 EGQLNQDDDSILKAVAKTMKIAICTRSELEDFLSEAVCMKEFDHPNVMRILGVCFQGSREGF
 PEPVWILPFMKHGDLHSFLYSRLGDQPVLPTQMLVKFMADIASGMELYLKRFIHDLAA
 RNCMLNNENMSVCVADFGLSKKIYNGDYYRQGRIAKMPVWKWIAIESLADRVTTSKSDVWSFG
 VTMWEIATRGQTPYPGVENSEIYDYLROGNRLKQPVDCLDGLYALMSRCWELNPRDRPSF
 AELREDLENTLKAJLPPAQEPDEILYVNMDDEGGSHLEPRGAAGGADPPTQPDPKDSCSCLTA
 ADVHSAGRYVLCPTAPGPTLSADRGCPAPPQEDGA

시열 번호: 23 [인간 Tyro3]

malrrsmrgplppplplpppprlgllalaalaslllipesaaaaglkimgapvkltvsgqgpvklnsvegmeepdiqvkvkdgavvql
 dqlyipvsqhwigflkslksversdagrywcqvedggeteisqpvwlvtvegvppftvepkdlavppnafqlsceavgppepvtiv
 wwwrgttkiggpapspsvlnvtgtqstmfseahnlkglassrtatvhqlqapnifitvlssnasvawmpgadgrallqsc
 vqvtpaqpggwevlavvvppvppftclrlvpatnyslrvcanalgpspyadwvpfqtkglapasapqnihairtdsglileweevi
 peappleplgpyklswvqdngtqdeltegtrantlgwdpqdklivrvccsvnavigcpowsqplvvsshdragqqgpphsrtsw
 vpvvlgvltalvtaaalalillrkrketrfqafdsvalmargepavhfaarsfnrerperieatldslgjdelkekledvlipeqqftlgrm
 lgkgefgsvreaqlkqedgsfvkvavkmkadlissdielefleaacmkedhphvaklvqvsrsakgrlpipmviplfmkkg
 dlhaflasrigenpnflplqtllirfmvdiacgmeylssrnfihrdaarncmciaedmtcvadfglsrkisgdyrrqgcasklpvkw
 alesladnlytvqsdvwafgvtmweimtrgqtpyagienaeiynliggnrlkqppecmedvydlmyqcwsadpkqrpsftcl
 melenilgqlsrlsasqdplyinieraeeptagslelpgrdqpsgagdgsgmgavggtspdcriltpglaeqpgqaehqp
 esplnetqrlllqqqlphssc

시열 번호: 24 [인간 Mer]

mgpaplplllgflpalwrraiteareeakpyplfpfpfpgslqtdhtpllsiphasyqpalmsfptqprphgtgnvaipqvtvesk
 plpplafkhtvgihilsehkgvkfnccisvnpnyqdtiswwkdkgellghaitqfypddevtaiiasfitsvqrsdngsyickmki
 nneevsdpiyievqqlphftkqpesmnrntafnlcqavgppevnifvvnqssrvneqekspsvltvpgltemavfscea
 hndkgltvskgvqinikaipsppftevsnstahsiliswvpgfdgysfrncsiqvkeadplsngsvmifntsalphlyqikqlqala
 nysigvscmneigwsavspwilaestegapsvaplnvtvflnessdnvdirkwmkpptkqqdgelvgyrishwqsgiskelle
 evgqngsrasrvqvhnatctvriaavtrggvgpsdpvkipahgwvdyapsstapgnadpvlifgcfcgfiliglilyislairkrv
 qetkfgnafteedselvnniakkscrraielthslgvseelqnkledvvidrnlilgkilgegefsvmegnlkqedgtslkvavkt
 mkldnssqreieeflseacmkdfshpnvirllgvciemssqqipkpmvilkpmkygdhlylsrletgpkhiplqtllkfmvdial
 gmeylsnrnflhrlaarncmlddmvcadfglskkisgdyrrqgriakmpkvwiiesladrvytsksdvwafgvtmweia
 trgmtypgvgvqnhemydylhghrlkqpedcldelyeimscwrtdpldrptfsvrlqleklleslpvrnqadviyvntqllesseg
 laqgstlapldlnidpdssiastpraaisvtaevhdskphegryilnggseeweditsapsaavtaeknsvlpgerlvngvsws
 hssmlplgsslpdellfaddssegsevlm

서열 번호: 25 [인간_Akt3]

msdvtivkegwvqkrgeyiknwrpryflktdgsfigykekpdvdplpyplnnfsvakcqlmkterpkpntfiircilqwttvierfhvd
tpeereewteaiqavadrqlqrqeeermncsptsqidnigeeemdastthhkrktmndfdylkllgkgtfgkvilvrekasgkyya
mkilkkeviiakdevahtlesrvlkntrhpfltskysfqtkdrclfvmeyvnggelfffhsrervfsedrtrfygaeivsaldylhsgkivy
rdlklenmlkdkgkitdfglckegitdaatmkfcgtpeyleaplevlednygravdwwglgvvmyemmcgrlpfynqdhekl
felilmedikfprtissaksllsgllkdpnkrlgggpdakeimrhssffgvnwqdydkklvppfkpqvtsetdtryfdeeftaqtit
tppekcqqsdcmgnwkk

서열 번호: 26 [인간_Gas6]

mapsispgpaallrapql|||||laeacalaallpareatoifirprqrrafqvfeekqghlerecveelcsreearevfendpetdyfyp
ryldcinkygspytksnsgfatcvqnlpdqctpnpcdrkgtqacqdlmgmnnfclckagwggrlcldkvnecsqenggclqichnkp
gsfhcschsgsfelssdgrtcqdecadseacgearcknlpgsyscldegfayssqekacrdvdeqlqrceqvcvnspsgsyt
chcdgrgglklsqdmtdcedilpcvpfsavkslylgrmfsqtpvirlfkrqlqptrlvaefdfrtfdpegillfagghqdswivlalra
grlelqlryngvgrvtssgpvinhgmwqfisveelarnlvikvnrdavmkiaavagdlfqperglyhlnltvgjipfhekdlvqpinprl
dgcmrswnlwngedtqietkvvnrmqcfsvtergsfypgsgfafyslymrtpldvgttestwevevvahirpaadtgvlfalwa
pdrlavplsvvalvdyhstkkllkqvlvievehtalalmeikvcdgqehvvtvslrgeatlevdgtrqsevsaaqlqerlavlerhrl
spvltfaggllpdvpvtsapvtafyrcmtlevnrlldeaaykhdsitahscppvepaaa

서열 번호: 27 [마카카 파시클라리스로부터의 Ax1; 이는 또한 본원에서 "시노 Ax1"로도 명명됨]

MAWRCPRMGRVPLAWCLALCGWVCMAPRGTQAEESPFVGNGPNITGARGLTGLRCQL
QVQGEPEVHWLRDGQILELADSTQTQVPLGEDEQDDWIVSQLRIASLQLSDAGQYQCL
VFLGHQNQFVSQPGYVGLEGPLYFLEEPEDRTVAANTPFNLSCQAQGPPEPVDLLWLQDAV
PLATAPGHGPQRNLHVPGLNKTSSFSCAEHNAKGVTTSRTATITVLPQQPRNLHLVSRQPT
ELEVAWTPGLSGIYPLTHCTLQAVLSDDMGIQAGEPDPPEEPLTLQASVPPHQRLRGSLH
PHTPYHIRVACTSSQGPSSWTHLPVETPEGVPLGPENISATRNGSQAFVHWQEPRAPL
QGTLLGYRLAYQGQDTPEVLMIDIGRQEVTLELQGDGSVSNLTCVAAFTAAGDGPWSLP
VPLEAWRPGQAQPVHQLVKETSAPAFSWPWWYILLGAVVAAACVLILALFLVHRRKKETRY
GEVFEPTVERGELVVRYVRKSYSRRTTEATLNSLGISEELKELRDVMVDRHKVALGKTL
GEGEFGAVMEGQLNQDDSIKVAVKTMKIACTRSELEDLSEAVCMKEFDHPNVMRILIGV
CFQGSERESFPAPVVFILPFMKHGDLSFLYSRLGDQPVYLPTQMLVKFMADIASMGEYLS
TKRFIHRDLAARNCMLNEENMSVCADFGLSKKIYNGDYYRQGRIAKMPVKWIAIESLDRVY
TSKSDVWSFGVTMWIAIRGQTPYPGVENSEIYDYLQRQGNRLKQPADCLDGLYALMSRC
WELNPQDRPSFTELREDLENTLKALPPAQEPDEILYVNMDEGGGYPEPPGAAGGADPPTQ
LDPKDSCSCLTSAEVHPAGRYVLCSTAPSPAQPADRGSPAAPGQEDGA

서열 번호: 28 [뮤린 10G5 VII 도메인]

QVQLQQSGAELVRPGASVKSCKASGYSFTDFYINWVRQRPGQGLEWIARIFPGGDNTYY
NEFKFGKATLTAEESSSTAYIQLSSLTSEDSAVYFCARRGLYYAMDYWGQQGISVTSS

서열 번호: 29 [뮤린 10G5 VI 도메인]

DVLMTQTPLSLPVSLGQASISCRSSQSLVHSNGIPYLHWYLQKPGQSPKLLIYRVSNRFSG
VPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFCSQGTHVPPTFGGGTKLEIK

서열 번호: 30 [10G5 VH CDR1]

GYSFTDFYIN

[0962] 서열 번호: 31[10G5 VH CDR2]

RIFPGGDNTYYNEFKFG

서열 번호: 32 [10G5 VH CDR3]

RGLYYAMDY

서열 번호: 33 [10G5 VL CDR1]

RSSQSLVHSNGIPYLH

서열 번호: 34 [10G5 VL CDR2]

RVSNRFS

]

서열 번호: 35 [10G5 VL CDR3]

SQGTHVPPT

[0963]

생물학적 기탁

[0965]

본 개시내용은 두 하이브리도마 세포주 WR-10G5-E5에 관한 것이다. 상기 세포주는 '특허 절차상의 미생물 기탁의 국제적 승인에 관한 부다페스트 조약(Budapest Treaty on the International Recognition of the Deposit of Microorganisms for the Purposes of Patent Procedure)'에 따라 기탁되었다. WR-10G5-E5 기탁에 관한 추가의 상세한 사항은 하기에서 기술되고, 이는 또한 WO2016/097370에도 개시되어 있다.

WR-10G5-E5

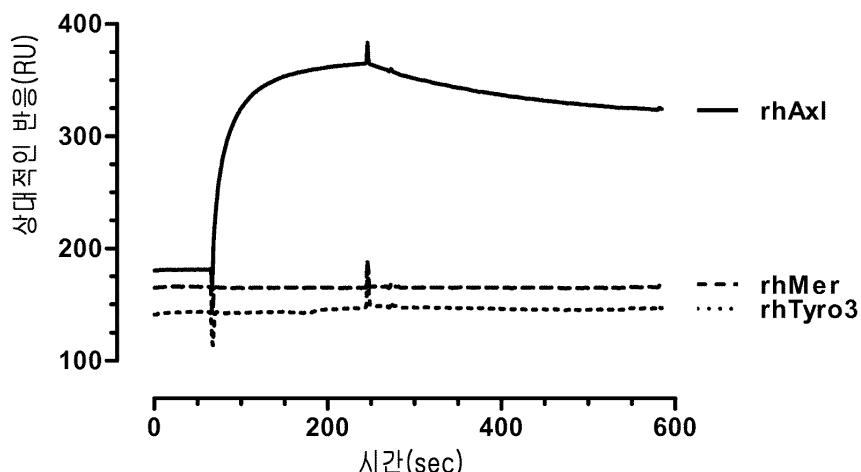
기탁 기관	→	유럽 세포 배양물 수집소 기탁 기관 (European Collection of Cell Cultures: ECACC)
		영국
		SP4 0JG
		월트셔주
		솔즈베리
		포튼 다운
		영국 공중 보건국(Public Health England)
기탁일	→	2015년 12 월 16 일
수탁 번호	→	15121602
특징	→	하이브리도마 - B-림프구; 종 - M. 무스쿨루스(<i>M.musculus</i>) (마우스); 형태 - 림프아세포; 면역원 - 인간 Axl 세포의 도메인; 면역세포 공여자 - NMRI 마우스; 무한증식 파트너 X63.Ag8.653; 생성물 Ig 부류/서브부류 - IgG1

[0966]

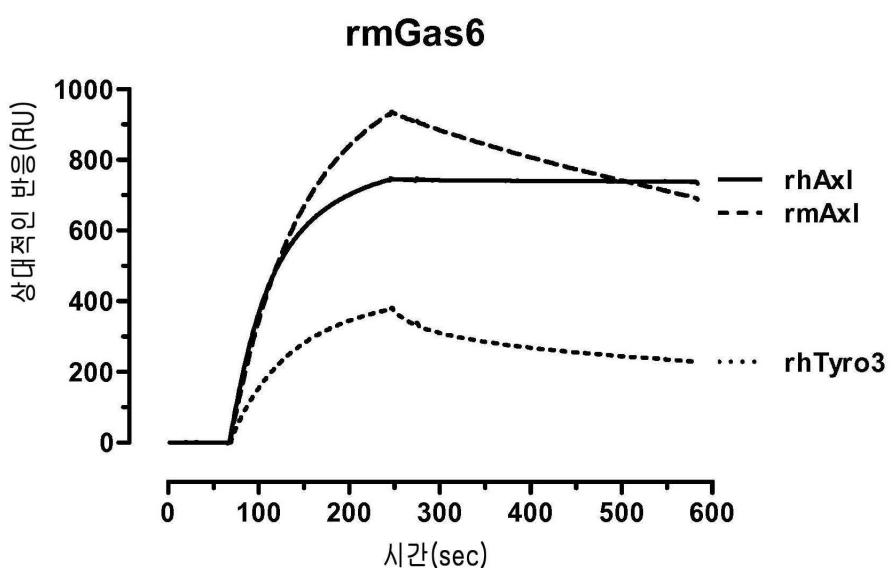
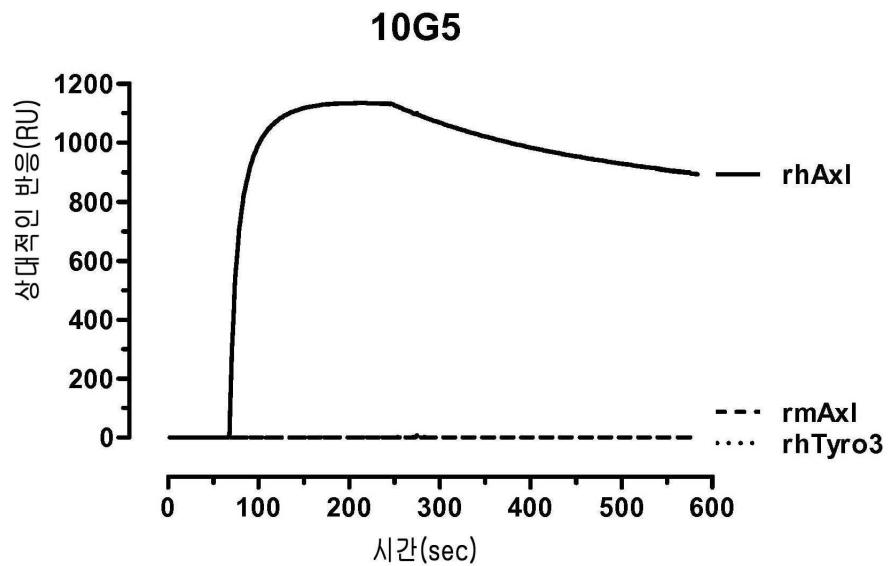
도면

도면1

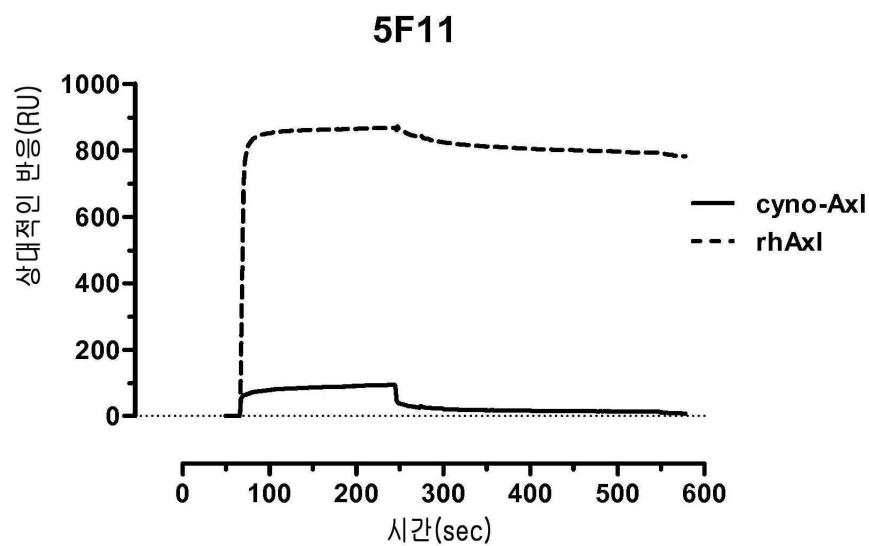
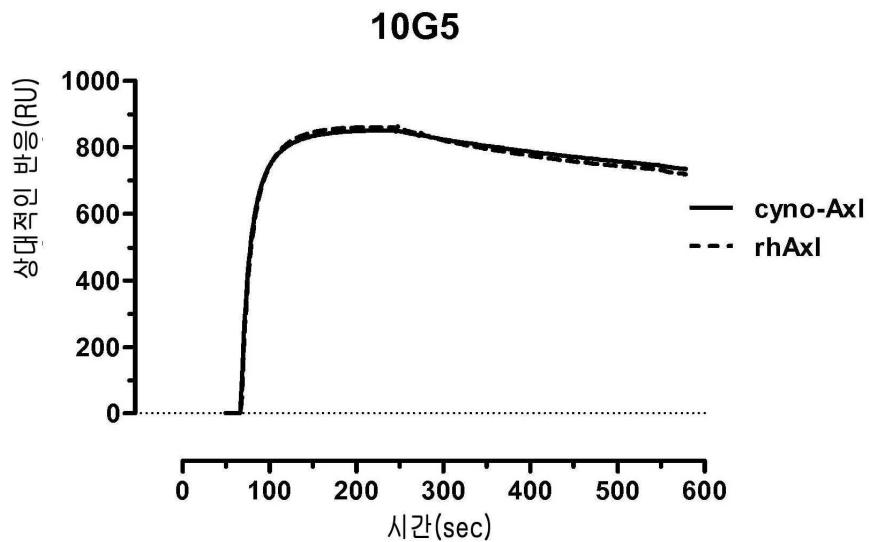
10G5



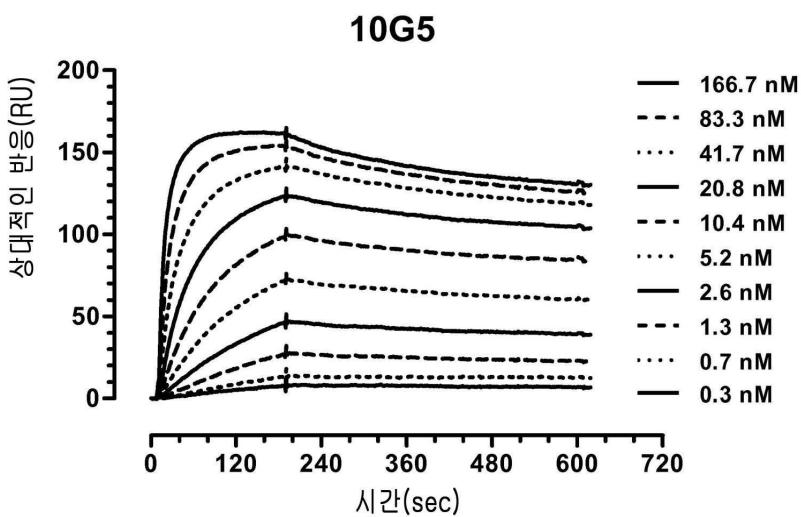
도면2



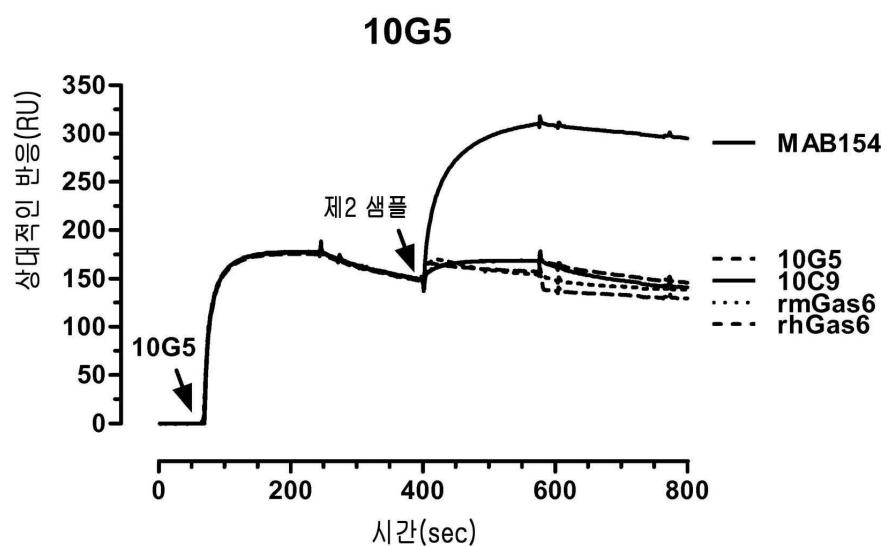
도면3



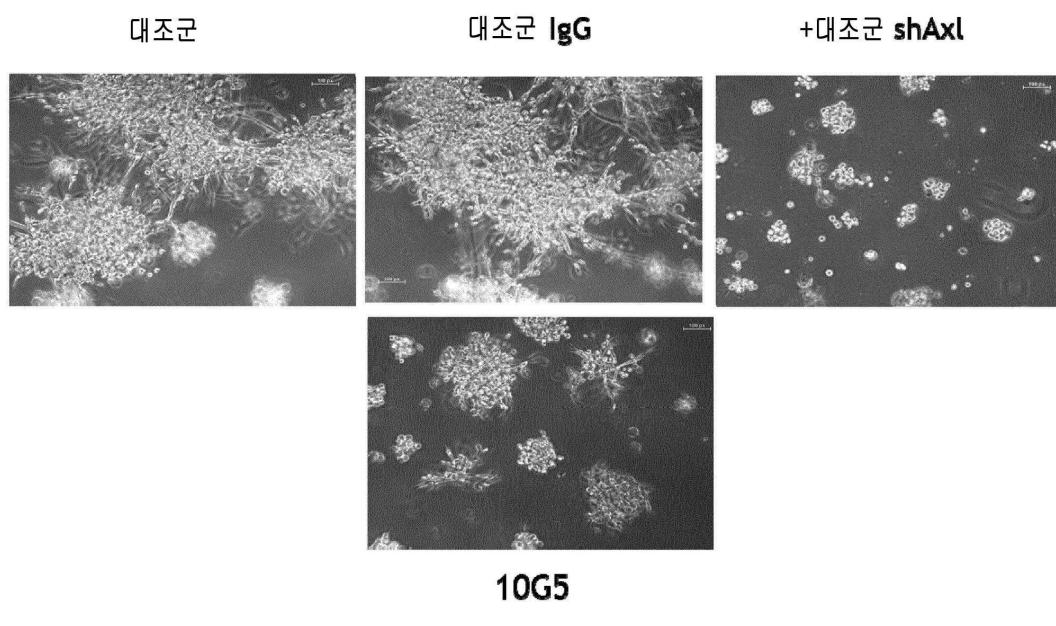
도면4



도면5

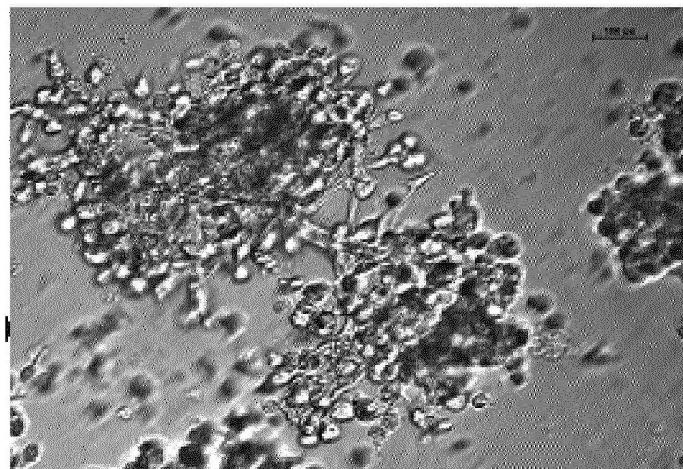


도면6

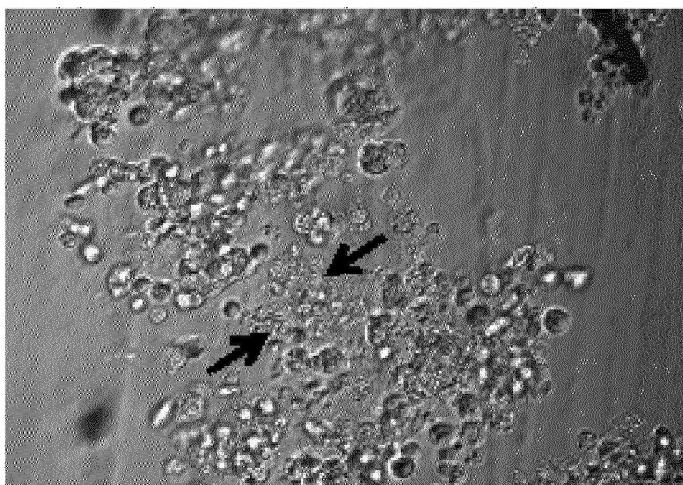


도면7

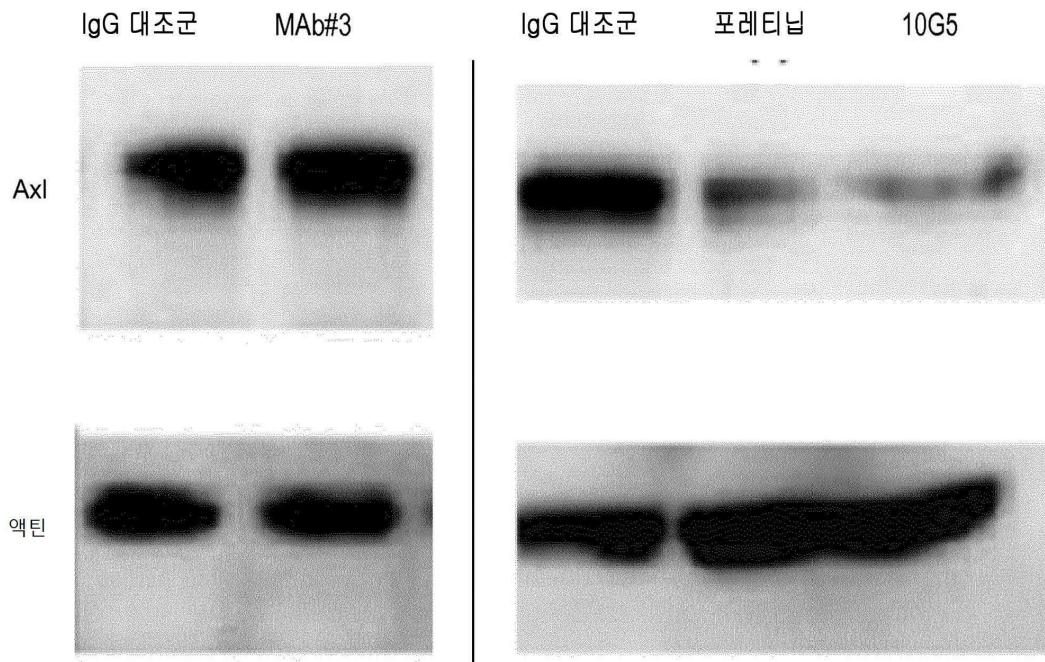
IgG 대조군



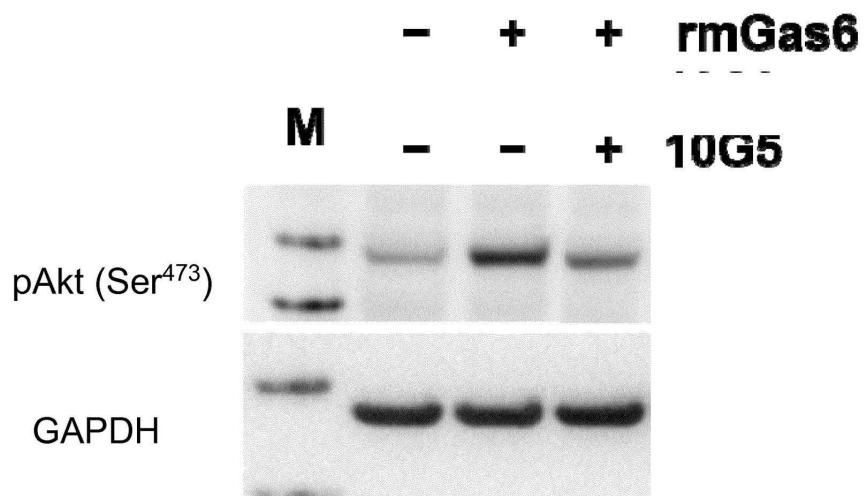
10G5



도면8



도면9



도면10

항체→인간화 10G5

VH(GH1)

EVQLVQSGAGLVQPGGSVRLS
CAASGYSFTDFYINWVRQAPGKGLEWIARIFPGGDNTYY
NEKFKGRFTLSADTSSSTAYLQLNSLRAEDTAVYYCARRGLYYAMDYWGQGTLTVSS

VH(GH2)

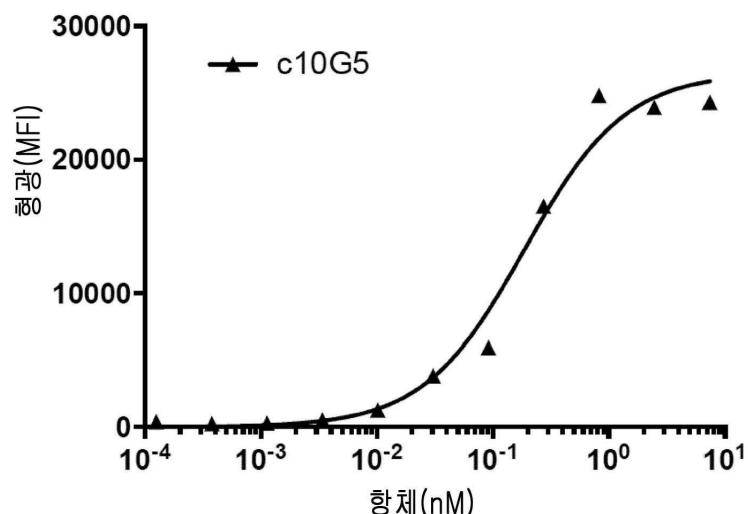
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSFTDFYINWVRQAPGKGLEWVARIFPGGDNTYY
NEKFKGRFTLSADTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRGLYYAMDYWGQGTLTVSS

VL(GL1)

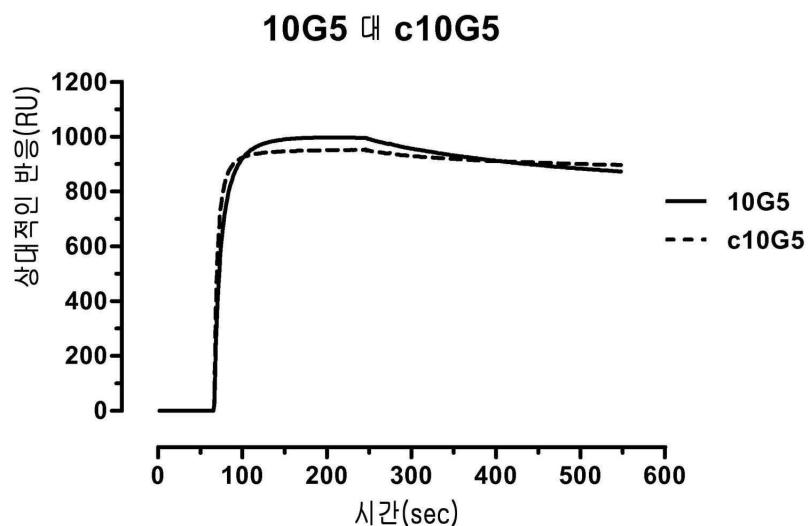
DIQMTQSPSSLSASVGDRVITCRSSQLVHSNGIPYLHWYQQKPGKAPKLLIYRVSNRFS
 GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCSQGTHVPPTFGQGTKVEIK

VL(GL2)

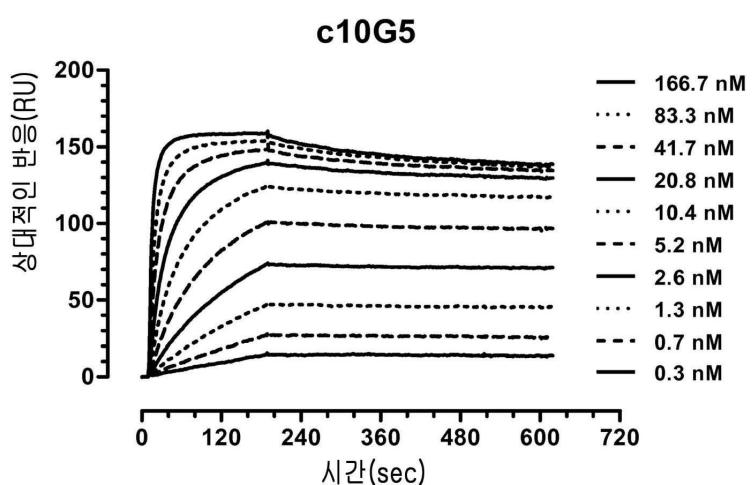
DIQMTQSPSSLSASVGDRVITCRSSQLVHSNGIPYLHWYQQKPGKAPKLLIYRVSNRFS
 GVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCSQGTHVPPTFGQGTKVEIK

도면11

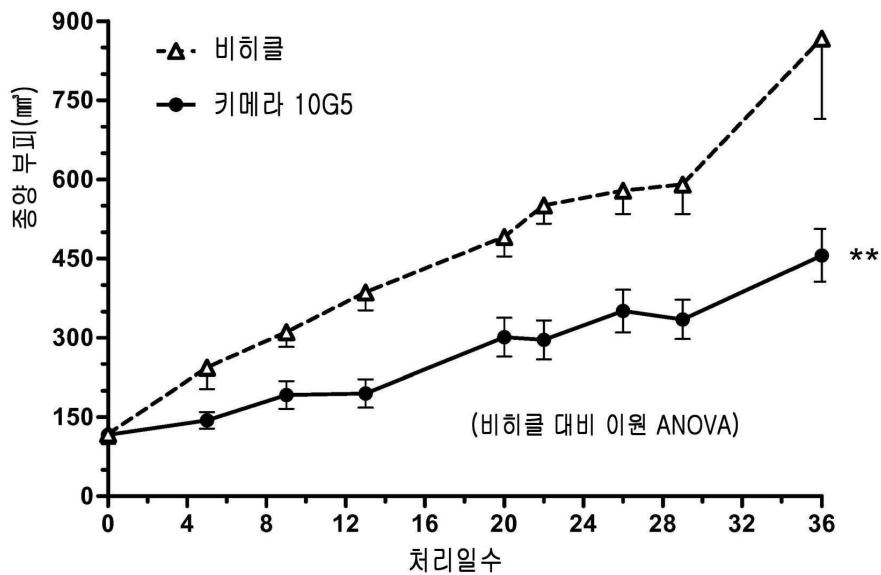
도면12



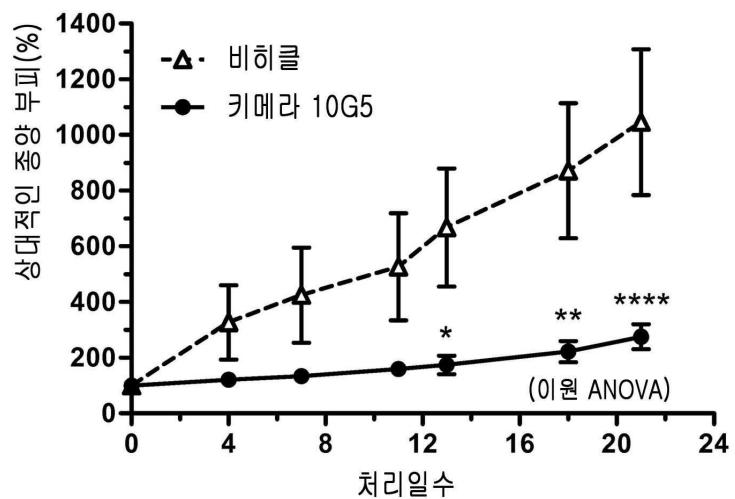
도면13



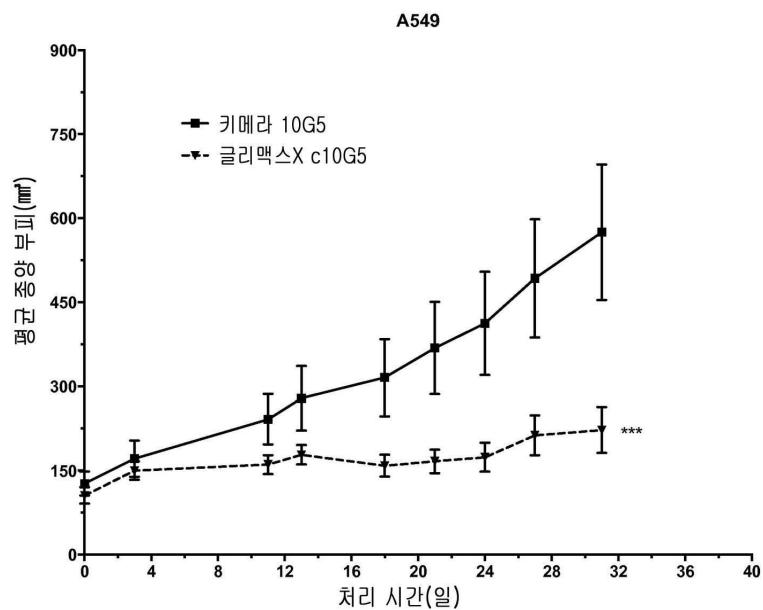
도면14



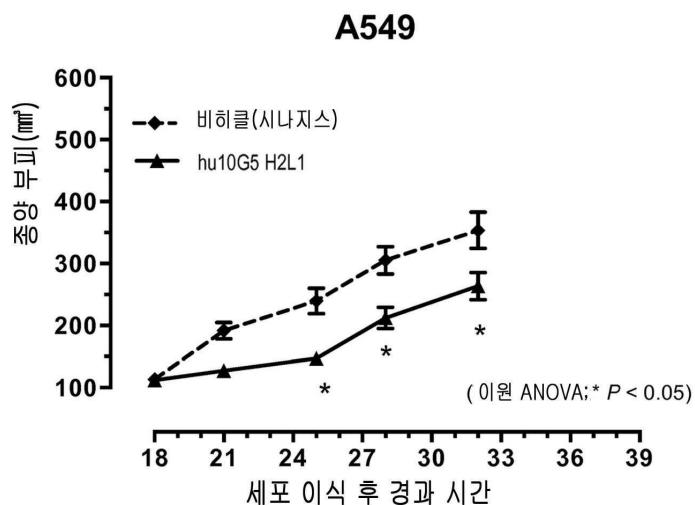
도면15



도면16

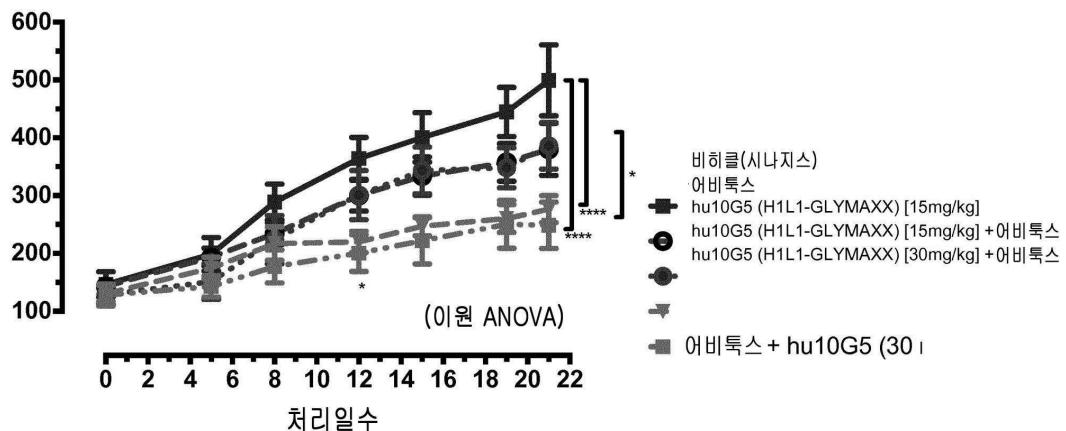


도면17



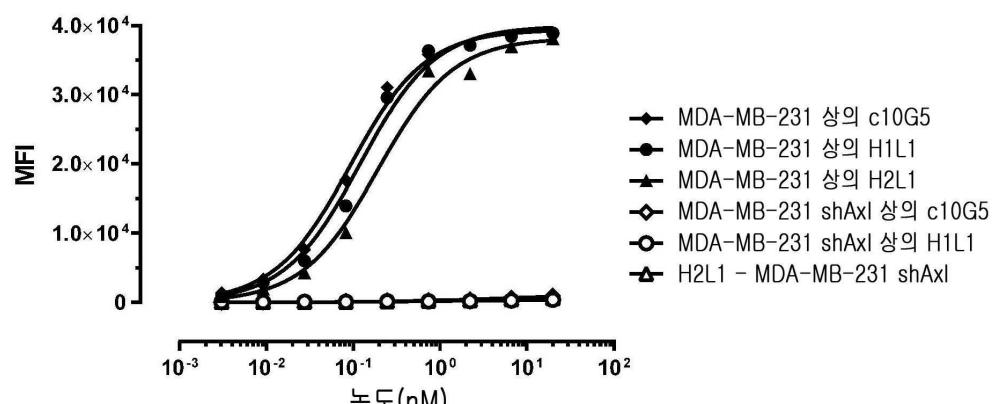
도면18

A549 NSCLC 모델

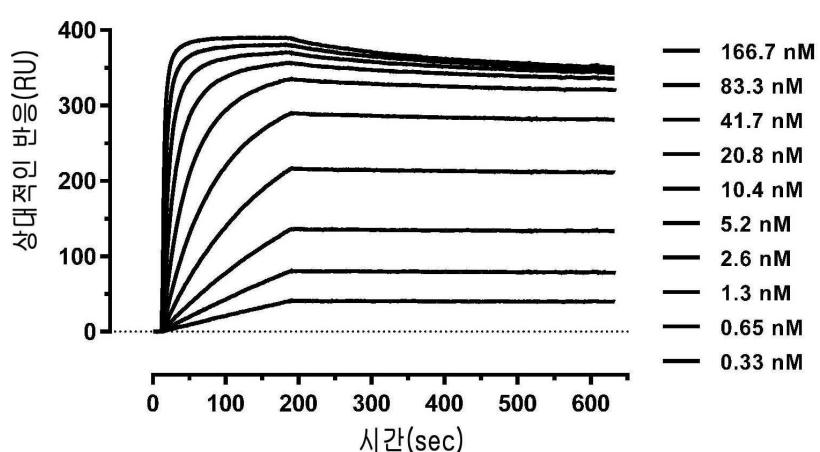


도면19

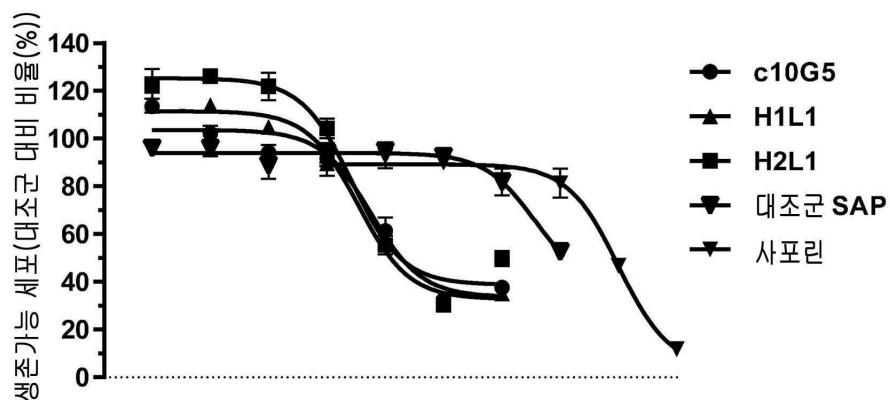
A



B



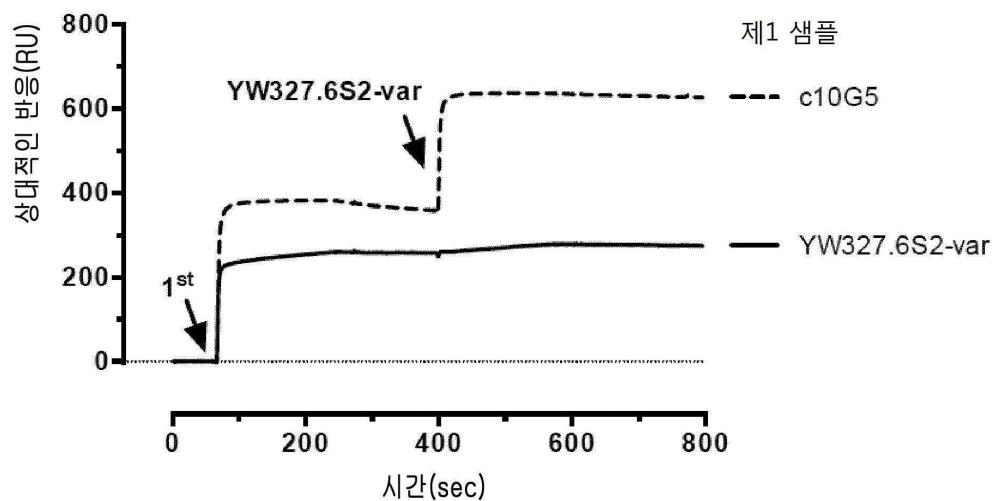
도면20



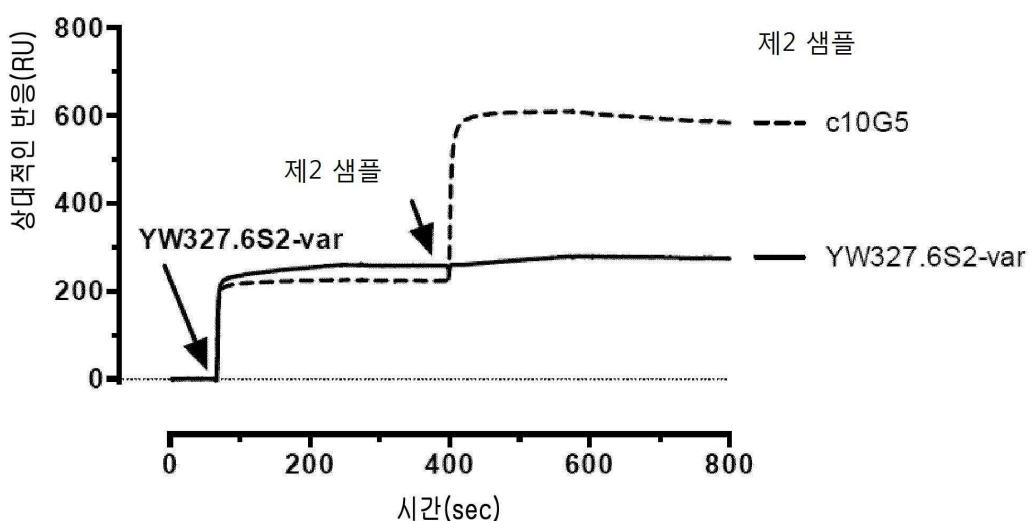
	c10G5	H1L1	H2L1	사포린	대조군 SAP
EC50	5.713	3.440	2.677	99074	3686

도면21

A



B



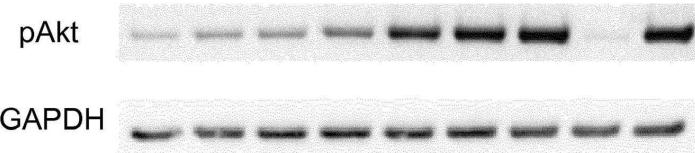
도면22

a)

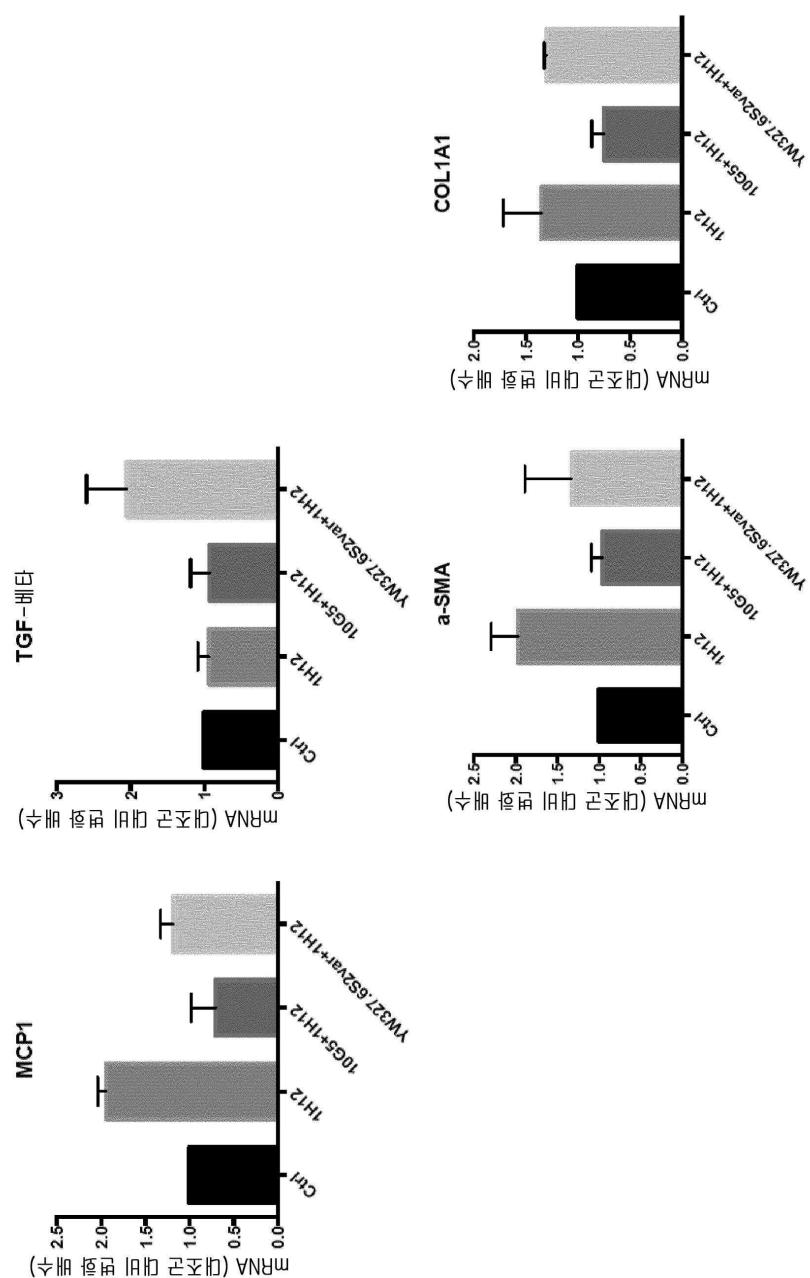
고질
가교 결합
Gas6 자극

b)

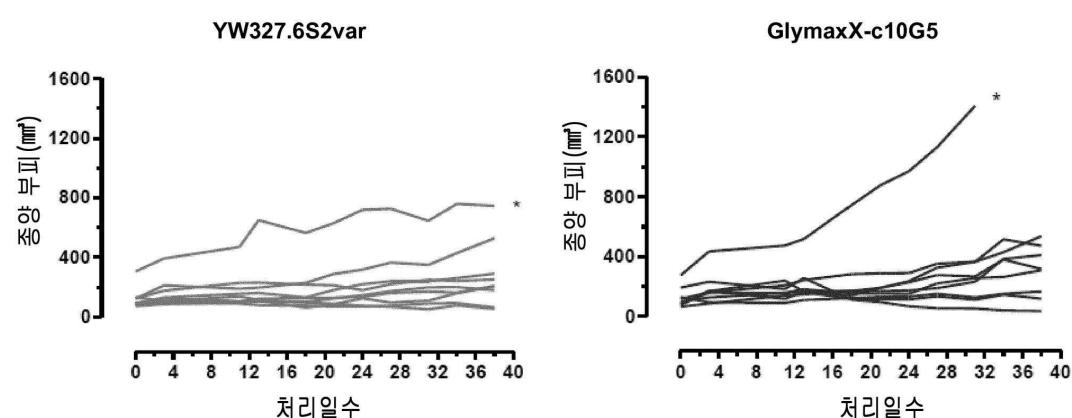
BGB324
자극



도면23



도면24



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> BERGEN TEKNOLOGIOVERFORING AS

BERGENBIO ASA

<120> ANTI-AXL ANTAGONISTIC ANTIBODIES

<130> IPA181290-GB

<150> GB1610902.7

<151> 2016-06-22

<160> 35

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> hu10G5 VH(GH1)

<400> 1

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

1 5 10 15

Ser Val Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Phe

20 25 30

Tyr Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Ala Arg Ile Phe Pro Gly Gly Asp Asn Thr Tyr Tyr Asn Glu Lys Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 2

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> hu10G5 VH(GH2)

<400> 2

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Phe

20 25 30

Tyr Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ala Arg Ile Phe Pro Gly Gly Asp Asn Thr Tyr Tyr Asn Glu Lys Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 3

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> hu10G5 VL(GL1)

<400> 3

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Asn Gly Ile Pro Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Ser Gln Gly

85 90 95

Thr His Val Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105 110

<210> 4

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> hu10G5 VL(GL2)

<400> 4

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Asn Gly Ile Pro Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Ser Gln Gly

85 90 95

Thr His Val Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105 110

<210> 5

<211> 330

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> example heavy chain constant region

<400> 5

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys

1 5 10 15

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

20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser

35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser

50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr

65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys

85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys

100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro

115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys

130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp

145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu

165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu

180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn

195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly

210	215	220	
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu			
225	230	235	240
Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr			
245	250	255	
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn			
260	265	270	
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe			
275	280	285	
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn			
290	295	300	
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr			
305	310	315	320
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys			
325	330		
<210> 6			
<211> 448			
<212> PRT			
<213> Artificial Sequence			
<220><223> 10G5 GH1 Heavy chain			
<400> 6			
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly			
1	5	10	15
Ser Val Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Phe			
20	25	30	
Tyr Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile			
35	40	45	
Ala Arg Ile Phe Pro Gly Gly Asp Asn Thr Tyr Tyr Asn Glu Lys Phe			
50	55	60	
Lys Gly Arg Phe Thr Leu Ser Ala Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr			
65	70	75	80

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

85 90 95

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

100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro

115 120 125

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly

130 135 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn

145 150 155 160

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

165 170 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser

180 185 190

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser

195 200 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr

210 215 220

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser

225 230 235 240

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

245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro

260 265 270

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala

275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val

290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Glu Tyr

305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr

325	330	335
Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu		
340	345	350
Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys		
355	360	365
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser		
370	375	380
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp		

385	390	395	400
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser			
405	410	415	
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala			
420	425	430	
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys			
435	440	445	
<210> 7			
<211> 448			
<212> PRT			
<213> Artificial Sequence			

<220><223> 10G5 GH2 Heavy chain			
<400> 7			
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly			
1	5	10	15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Phe			
20	25	30	
Tyr Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val			
35	40	45	
Ala Arg Ile Phe Pro Gly Gly Asp Asn Thr Tyr Tyr Asn Glu Lys Phe			
50	55	60	

Lys Gly Arg Phe Thr Leu Ser Ala Asp Thr Ser Lys Ser Thr Ala Tyr			
65	70	75	80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			

85	90	95
Ala Arg Arg Gly Leu Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr		
100	105	110
Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro		
115	120	125
Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly		
130	135	140
Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn		
145	150	155
Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln		
165	170	175
Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser		
180	185	190
Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser		
195	200	205
Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr		
210	215	220
His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser		
225	230	235
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg		
245	250	255
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro		
260	265	270
Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala		
275	280	285
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val		
290	295	300
Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Glu Tyr		
305	310	315
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr		
325	330	335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
 340 345 350

Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
 355 360 365

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 370 375 380

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
 385 390 395 400

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
 405 410 415

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 420 425 430

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440 445

<210> 8

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> example light chain constant region

<400> 8

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 20 25 30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 50 55 60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 65 70 75 80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

100 105

<210> 9

<211> 219

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 10G5 GL1 Light chain

<400> 9

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Asn Gly Ile Pro Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Ser Gln Gly

85 90 95

Thr His Val Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln

145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser

165 170 175

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu

180	185	190
Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser		
195	200	205
Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys		
210	215	
<210> 10		
<211> 219		
<212> PRT		
<213> Artificial Sequence		
<220><223> 10G5 GL2 Light chain		
<400> 10		
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly		
1	5	10
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser		
20	25	30
Asn Gly Ile Pro Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala		
35	40	45
Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro		
50	55	60
Ser Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile		
65	70	75
Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Ser Gln Gly		
85	90	95
Thr His Val Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys		
100	105	110
Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu		
115	120	125
Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe		
130	135	140
Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln		
145	150	155
Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser		

165	170	175
Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu		
180	185	190
Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser		
195	200	205

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210	215
-----	-----

<210> 11

<211> 354

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> hu10G5 VH(GH1) nucleic acid

<400> 11

gaggtgcagc tggccagtc cggagctgga ctggcagc caggcgatc tgtcagactg	60
agtgcgcgg cttccggcta cagtttacc gactttata tcaactgggt cagacaggcc	120
cccgcaagg gtctggatgt gatcgctcgc atttccctg ggggtgacaa cacatactac	180
aacgaaaagt tcaaaggcag gttcacccctg tccgcccata cttccagctc taccgcatac	240

ctgcaactga actccctgag ggcagaagac acagccgtt actattgtgc caggcgggc	300
ctgtactatg ctatggatta ttggggccag ggaaccctgg tgacagtctc gage	354

<210> 12

<211> 354

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> hu10G5 VH(GH2) nucleic acid

<400> 12

gaggtgcagc tgggtgaatc cggcgagggt ctggcagc caggtggcag cctgagactg	60
tcttgcccg cttcaggata ctccttacc gactttata tcaactgggt cagacaggcc	120
cccgcaagg gcctggatgt ggtcgctcgc atttccctg gaggggacaa cacatactac	180
aacgaaaagt tcaaaggcag gttcacccctg agtgctgata cttctaaaag taccgcatac	240

ctgcaaatga atagcctgag ggcagaggac acagccgtt actattgtgc caggcgggc	300
ctgtactatg ctatggatta ttggggacag gggaccctgg tgacagtctc gage	354

<210> 13

<211> 336

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> hu10G5 VL(GL1) nucleic acid

<400> 13

gacatccaga tgacacagtc tccctccagc ctgagcgct ctgtgggaga tagagtacc	60
atcacatgca ggtctagtca gagcctggtg cactctaacg gcatccccta cctgcattgg	120
tatcagcaga agccaggaa agctccaag ctgctgatct acagagtcag taatcggttc	180
tctgggtcc ctgcgagtt tagtggctca ggctccggaa cagacttcac tctgaccatt	240

tcatccctgc aaccagagga ttttgcact tactattgtt gccagggcac acacgtgcc	300
cctactttcg gtcaaggcac caaagtgcgaa attaag	336

<210> 14

<211> 336

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> hu10G5 VL(GL2) nucleic acid

<400> 14

gacatccaga tgacacagtc tccctccagc ctgagcgct ctgtggcga tcgagtcacc	60
atcacatgca ggtctagtca gagcctggtg cactctaacg gcattcccta cctgcattgg	120
tatcagcaga agccaggaaa agctccaag ctgctgatct acagagtcag taatcggttc	180
tctggcgtgc cctccaggtt ctccggta cgctccggaa cagacttcac tctgaccatt	240

tcatccctgc aaccagagga ttttgcact tactattgtt gccagggAAC acacgtgcc	300
cctactttcg gccagggAAC caaagtgcgaa attaag	336

<210> 15

<211> 990

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> example heavy chain constant region nucleic acid

<400> 15

gcttagcacaa agggccctag tgtgtttcct ctggctccct cttccaaatc cacttctgg	60
ggcactgctg ctctggatg cctggtaag gattacttc ctgaacctgt gactgtctca	120
tggaactctg gtgctctgac ttctgggtc cacacttcc ctgctgtgc gcagtctagt	180

ggactgtact ctctgtcatc tgtggtaact gtgcctt catctctgg aaccaggacc	240
tacatttata atgtgaacca caaaccatcc aacactaaag tggacaaaaa agtggAACCC	300
aaatcctgtg acaaaaccca cacctgccca cttgtcctg cccctgaact gctggagga	360
ccttcgtgt ttctgtcccc cccaaaccca aaggataccc tgatgtctc tagaaccct	420
gaggtgacat gtgtgggtt ggatgtgtct catgaggacc ctgaggtaa attcaactgg	480
tacgtggatg gagtggaagt ccacaatgcc aaaaccaagc ctagagagga acagtacaat	540
tcaacctaca gagtggtcag tgtgctgact gtgctgcata aggattggct gaatggcaag	600

gaatacagaat gtaaagtctc aaacaaggcc ctgcctgctc caattgagaa aacaatctca	660
aaggccaagg gacagccctag ggaaccccg gtctacaccc tgccaccc aagagagga	720
atgaccaaaa accaggtgtc cctgacatgc ctggtaaaag gcttctaccc ttctgacatt	780
gctgtggagt gggagtcaaa tggacagect gagaacaact acaaaacaac ccccccgtg	840
ctggattctg atggctttt ctttctgtac tccaaactga ctgtggacaa gtctagatgg	900
cagcagggga atgtctttc ttgctctgtc atgcatgagg ctctgcataa ccactacact	960
cagaaatccc tgtctctgtc tcccgggaaa	990

<210> 16

<211> 1344

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 10G5 GH1 Heavy chain nucleic acid

<400> 16

gaggtgcagc tggccagtc cggagctgga ctggcgcagc caggcgatc tgtcagactg	60
agttgcgcgg ctccggcta cagcttccacc gactttata tcaactgggt cagacaggcc	120
cccgcaagg gtctggagt gatcgctcgc atttccctg ggggtgacaa cacatactac	180
aacgaaaagt tcaaaggcag gttcacccctg tccggcata cttccagctc taccgcatac	240
ctgcaactga actccctgag ggcagaagac acagccgtgt actattgtgc caggcgggc	300

ctgtactatg ctatggatta ttggggccag ggaaccctgg tgacagtctc gagcgctagc	360
acaaaggccc ctatgtgtt tcctctggct ccctttcca aatccacttc tggtggact	420
gctgctctgg gatgcctggtaaaggattac ttccctgaaac ctgtgactgt ctcatggac	480
tctggcgtc tgaattctgg tgtccacact ttccctgtc tgctgcagtc tagtgactg	540
tactctctgt catctgtggtaa cactgtgcccttccatctc tggaaaccca gacctacatt	600
tgtaatgtga accacaaacc atccaacact aaagtggaca aaaaagtggaa acccaaattcc	660

tgtgacaaaa cccacacctg cccacacctg cctgccctg aactgctggg aggaccttct	720
gtgtttctgt tccccccaa accaaaggat accctgatga tctctagaac ccctgaggtg	780
acatgtgtgg tggtgatgt gtctcatgag gaccctgagg tcaaattcaa ctggtaacgtg	840
gatggagtgg aagtccacaa tgccaaaacc aagcctagag aggaacagta caattcaacc	900
tcacagatgg tcacgtgtct gactgtgctg catcaggatt ggctgaatgg caaggaatac	960
aagtgtaaag tctcaaacaa ggccctgcct gctccaattg agaaaacaat ctcaaaggcc	1020
aaggcacgc cttaggaaacc ccaggtctac accctgcccac cttcaagaga ggaaatgacc	1080
aaaaaccagg tgtccctgac atgcctggc aaaggcttct acccttctga cattgctgtg	1140
gagtgggagt caaatggaca gcctgagaac aactacaaaa caacccccc tgtgctggat	1200
tctgatggct cttctttct gtactccaaa ctgactgtgg acaagtcgt atggcagcag	1260
gggaatgtct ttcttgctc tgtcatgcat gaggctctgc ataaccacta cactcagaaa	1320
tccctgtctc tgtctcccg gaaa	1344
<210> 17	
<211> 1344	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> 10G5 GH2 Heavy chain nucleic acid	
<400> 17	
gagggtgcagc tggtggaatc cggcggaggg ctggtcagc caggtggcag cctgagactg	60
tcttgcgccc cttcaggata ctccttacc gactttata tcaactgggt cagacaggcc	120
cccgcaagg gcctggatgt ggtcgctcg attttccctg gaggggacaa cacatactac	180
aacgaaaagt tcaaaggcag gttcacccctg agtgctgata cttctaaaag taccgcatac	240
ctgcaaatga atagcctgag ggcagaggac acagccgtgt actattgtgc caggcgggc	300
ctgtactatg ctatggatta ttggggacag gggaccctgg tgacagtctc gagcgctagc	360
acaaaggccc ctatgtgtt tcctctggct cccttcca aatccacttc tggtggcact	420
gctgctctgg gatgcctggt gaaggattac ttccctgaac ctgtgactgt ctcatggaac	480
tctggtgctc tgacttctgg tgtccacact ttccctgctg tgctgcagtc tagtggactg	540
tactctctgt catctgtggt cactgtgcc tcttcatctc tggaaacca gacctacatt	600
tgtaatgtga accacaaaacc atccaacact aaagtggaca aaaaagtggaa acccaaattcc	660
tgtgacaaaa cccacacctg cccacacctg cctgccctg aactgctggg aggaccttct	720
gtgtttctgt tccccccaa accaaaggat accctgatga tctctagaac ccctgaggtg	780

acatgtgtgg tggtgatgt gtctcatgag gaccctgagg tcaaattcaa ctggtagtg	840
gatggagtgg aagtccacaa tgccaaaacc aagcctagag aggaacagta caattcaacc	900
tacagagtgg tcagtgtgct gactgtgctg catcaggatt ggctgaatgg caaggaatac	960
aagtgttaag tctcaaaca ggcctgcct gctccaattg agaaaacaat ctcaaaggcc	1020
aaggacagc ctagggAAC ccaggtctac accctgccac cttaagaga ggaaatgacc	1080
aaaaaccagg tgtccctgac atgcctggtc aaaggcttct accttctga cattgcttg	1140
gagtgggagt caaatggaca gcctgagaac aactacaaaa caaccccccc tgtgctggat	1200
tctgatggct ct当地tct gtactccaaa ctgactgtgg acaagtc tag atggcagcag	1260
ggaaatgtct ttcttgctc tgtcatgcat gaggctctgc ataaccacta cactcagaaa	1320
tccctgtctc tgtctccgg gaaa	1344
<210> 18	
<211> 321	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> light chain constant region nucleic acid	
<400> 18	
cgtacggtcg cggcgcccttc tgtgttcatt ttcccccat ctgatgaaca gctgaaatct	60
ggcaactgctt ctgtggctg tctgctgaac aacttctacc ctagagggc caaagtccag	120
tggaaagtgg acaatgctct gcagagtggg aattcccagg aatctgtcac tgaggcaggac	180
tctaaggata gcacatactc cctgtcctct actctgacac tgagcaagggc tgattacgag	240
aaacacaaaag tgtacgcctg tgaagtaca catcagggc tgtctagtcc tgtgaccaaa	300
tccttcaata ggggagatgt c	321
<210> 19	
<211> 657	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> 10G5 GL1 Light chain nucleic acid	
<400> 19	
gacatccaga tgacacagtc tccctccagc ctgagcgct ctgtggaga tagagtacc	60
atcacatgca ggtctagtca gagcctggtg cactctaacg gcatcccta cctgcattgg	120
tatcagcaga agccagggaa agctccaaag ctgctgatct acagagtcag taatcggttc	180

tctgggtc cttcgagggt tagtggctca ggctccggga cagacttcac tctgaccatt 240

tcatccctgc aaccagagga ttttgcact tactattgtt gcccaggcac acacgtgcc 300
cctactttcg gtcagggcac caaagtgcata attaagcgta cggtcgccgc gccttctgt 360
ttcatttcc ccccatctga tgaacagctg aaatctggca ctgcttctgt ggtctgtctg 420
ctgaacaact tctaccctag agaggccaaa gtccagtggaa aagtggacaa tgctctgcag 480
agtggaaatt cccaggaatc tgtcactgag caggactcta aggatagcac atactccctg 540
tcctctactc tgacactgag caaggctgat tacgagaaac acaaagtgtt cgcctgtgaa 600
gtcacacatc agggctgtc tagtcctgtg accaaatcct tcaatagggg agagtgc 657

<210> 20

<211> 657

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 10G5 GL2 Light chain nucleic acid

<400> 20

gacatccaga tgacacagtc tccctccagc ctgagcgct ctgtggcgaa tcgagtccacc 60
atcacatgca ggtctagtca gagcctgggtg cactctaacg gcattcctta cctgcattgg 120
tatcagcaga agccaggaaa agctcccaag ctgctgatct acagagtcag taatcggttc 180
tctggcgtgc cctccaggtt ctccgggtca cgctccggaa cagacttcac tctgaccatt 240
tcatccctgc aaccagagga ttttgcact tactattgtt gcccaggcac acacgtgcc 300
cctactttcg gccaggaaac caaagtgcata attaagcgta cggtcgccgc gccttctgt 360

ttcatttcc ccccatctga tgaacagctg aaatctggca ctgcttctgt ggtctgtctg 420
ctgaacaact tctaccctag agaggccaaa gtccagtggaa aagtggacaa tgctctgcag 480
agtggaaatt cccaggaatc tgtcactgag caggactcta aggatagcac atactccctg 540
tcctctactc tgacactgag caaggctgat tacgagaaac acaaagtgtt cgcctgtgaa 600
gtcacacatc agggctgtc tagtcctgtg accaaatcct tcaatagggg agagtgc 657

<210> 21

<211> 626

<212> PRT

<213> Homo sapiens Axl

<400> 21

Met Gly Ile Gln Ala Gly Glu Pro Asp Pro Pro Glu Glu Pro Leu Thr

1	5	10	15
Ser Gln Ala Ser Val Pro Pro His Gln Leu Arg Leu Gly Ser Leu His			
20	25	30	
Pro His Thr Pro Tyr His Ile Arg Val Ala Cys Thr Ser Ser Gln Gly			
35	40	45	
Pro Ser Ser Trp Thr His Trp Leu Pro Val Glu Thr Pro Glu Gly Val			
50	55	60	
Pro Leu Gly Pro Pro Glu Asn Ile Ser Ala Thr Arg Asn Gly Ser Gln			
65	70	75	80
Ala Phe Val His Trp Gln Glu Pro Arg Ala Pro Leu Gln Gly Thr Leu			
85	90	95	
Leu Gly Tyr Arg Leu Ala Tyr Gln Gly Gln Asp Thr Pro Glu Val Leu			
100	105	110	
Met Asp Ile Gly Leu Arg Gln Glu Val Thr Leu Glu Leu Gln Gly Asp			
115	120	125	
Gly Ser Val Ser Asn Leu Thr Val Cys Val Ala Ala Tyr Thr Ala Ala			
130	135	140	
Gly Asp Gly Pro Trp Ser Leu Pro Val Pro Leu Glu Ala Trp Arg Pro			
145	150	155	160
Gly Gln Ala Gln Pro Val His Gln Leu Val Lys Glu Pro Ser Thr Pro			
165	170	175	
Ala Phe Ser Trp Pro Trp Trp Tyr Val Leu Leu Gly Ala Val Val Ala			
180	185	190	
Ala Ala Cys Val Leu Ile Leu Ala Leu Phe Leu Val His Arg Arg Lys			
195	200	205	
Lys Glu Thr Arg Tyr Gly Glu Val Phe Glu Pro Thr Val Glu Arg Gly			
210	215	220	
Glu Leu Val Val Arg Tyr Arg Val Arg Lys Ser Tyr Ser Arg Arg Thr			
225	230	235	240
Thr Glu Ala Thr Leu Asn Ser Leu Gly Ile Ser Glu Glu Leu Lys Glu			
245	250	255	

Lys Leu Arg Asp Val Met Val Asp Arg His Lys Val Ala Leu Gly Lys

260 265 270

Thr Leu Gly Glu Gly Glu Phe Gly Ala Val Met Glu Gly Gln Leu Asn

275 280 285

Gln Asp Asp Ser Ile Leu Lys Val Ala Val Lys Thr Met Lys Ile Ala

290 295 300

Ile Cys Thr Arg Ser Glu Leu Glu Asp Phe Leu Ser Glu Ala Val Cys

305 310 315 320

Met Lys Glu Phe Asp His Pro Asn Val Met Arg Leu Ile Gly Val Cys

325 330 335

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

340 345 350

Pro Phe Met Lys His Gly Asp Leu His Ser Phe Leu Leu Tyr Ser Arg

355 360 365

Leu Gly Asp Gln Pro Val Tyr Leu Pro Thr Gln Met Leu Val Lys Phe

370 375 380

Met Ala Asp Ile Ala Ser Gly Met Glu Tyr Leu Ser Thr Lys Arg Phe

385 390 395 400

Ile His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Cys Met Leu Asn Glu Asn Met

405 410 415

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

420 425 430

Asp Tyr Tyr Arg Gln Gly Arg Ile Ala Lys Met Pro Val Lys Trp Ile

435 440 445

Ala Ile Glu Ser Leu Ala Asp Arg Val Tyr Thr Ser Lys Ser Asp Val

450 455 460

Trp Ser Phe Gly Val Thr Met Trp Glu Ile Ala Thr Arg Gly Gln Thr

465 470 475 480

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

485 490 495

Gly Asn Arg Leu Lys Gln Pro Ala Asp Cys Leu Asp Gly Leu Tyr Ala

500	505	510
Leu Met Ser Arg Cys Trp Glu Leu Asn Pro Gln Asp Arg Pro Ser Phe		
515	520	525
Thr Glu Leu Arg Glu Asp Leu Glu Asn Thr Leu Lys Ala Leu Pro Pro		
530	535	540
Ala Gln Glu Pro Asp Glu Ile Leu Tyr Val Asn Met Asp Glu Gly Gly		
545	550	555
Gly Tyr Pro Glu Pro Pro Gly Ala Ala Gly Gly Ala Asp Pro Pro Thr		
565	570	575
Gln Pro Asp Pro Lys Asp Ser Cys Ser Cys Leu Thr Ala Ala Glu Val		
580	585	590
His Pro Ala Gly Arg Tyr Val Leu Cys Pro Ser Thr Thr Pro Ser Pro		
595	600	605
Ala Gln Pro Ala Asp Arg Gly Ser Pro Ala Ala Pro Gly Gln Glu Asp		
610	615	620
Gly Ala		
625		
<210> 22		
<211> 879		
<212> PRT		
<213> Mus musculus Ax1		
<400> 22		
Met Gly Arg Val Pro Leu Ala Trp Trp Leu Ala Leu Cys Cys Trp Gly		
1	5	10
Cys Ala Ala His Lys Asp Thr Gln Thr Glu Ala Gly Ser Pro Phe Val		
20	25	30
Gly Asn Pro Gly Asn Ile Thr Gly Ala Arg Gly Leu Thr Gly Thr Leu		
35	40	45
Arg Cys Glu Leu Gln Val Gln Gly Glu Pro Pro Glu Val Val Trp Leu		
50	55	60
Arg Asp Gly Gln Ile Leu Glu Leu Ala Asp Asn Thr Gln Thr Gln Val		

65	70	75	80
----	----	----	----

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

85	90	95	
----	----	----	--

Arg Ile Ser Ala Leu Gln Leu Ser Asp Ala Gly Glu Tyr Gln Cys Met

100	105	110	
-----	-----	-----	--

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

115	120	125	
-----	-----	-----	--

Leu Glu Gly Leu Pro Tyr Phe Leu Glu Glu Pro Glu Asp Lys Ala Val

130	135	140	
-----	-----	-----	--

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

145	150	155	160
-----	-----	-----	-----

Glu Pro Val Thr Leu Leu Trp Leu Gln Asp Ala Val Pro Leu Ala Pro

165	170	175	
-----	-----	-----	--

Val Thr Gly His Ser Ser Gln His Ser Leu Gln Thr Pro Gly Leu Asn

180	185	190	
-----	-----	-----	--

Lys Thr Ser Ser Phe Ser Cys Glu Ala His Asn Ala Lys Gly Val Thr

195	200	205	
-----	-----	-----	--

Thr Ser Arg Thr Ala Thr Ile Thr Val Leu Pro Gln Arg Pro His His

210	215	220	
-----	-----	-----	--

Leu His Val Val Ser Arg Gln Pro Thr Glu Leu Glu Val Ala Trp Thr

225	230	235	240
-----	-----	-----	-----

Pro Gly Leu Ser Gly Ile Tyr Pro Leu Thr His Cys Asn Leu Gln Ala

245	250	255	
-----	-----	-----	--

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

260	265	270	
-----	-----	-----	--

Pro Glu Asp Pro Leu Thr Leu Gln Val Ser Val Pro Pro His Gln Leu

275	280	285	
-----	-----	-----	--

Arg Leu Glu Lys Leu Leu Pro His Thr Pro Tyr His Ile Arg Ile Ser

290	295	300	
-----	-----	-----	--

Cys Ser Ser Ser Gln Gly Pro Ser Pro Trp Thr His Trp Leu Pro Val

305	310	315	320
-----	-----	-----	-----

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

325 330 335

Met Arg Asn Gly Ser Gln Val Leu Val Arg Trp Gln Glu Pro Arg Val

340 345 350

Pro Leu Gln Gly Thr Leu Leu Gly Tyr Arg Leu Ala Tyr Arg Gly Gln

355 360 365

Asp Thr Pro Glu Val Leu Met Asp Ile Gly Leu Thr Arg Glu Val Thr

370 375 380

Leu Glu Leu Arg Gly Asp Arg Pro Val Ala Asn Leu Thr Val Ser Val

385 390 395 400

Thr Ala Tyr Thr Ser Ala Gly Asp Gly Pro Trp Ser Leu Pro Val Pro

405 410 415

Leu Glu Pro Trp Arg Pro Val Ser Glu Pro Pro Pro Arg Ala Phe Ser

420 425 430

Trp Pro Trp Trp Tyr Val Leu Leu Gly Ala Leu Val Ala Ala Ala Cys

435 440 445

Val Leu Ile Leu Ala Leu Phe Leu Val His Arg Arg Lys Lys Glu Thr

450 455 460

Arg Tyr Gly Glu Val Phe Glu Pro Thr Val Glu Arg Gly Glu Leu Val

465 470 475 480

Val Arg Tyr Arg Val Arg Lys Ser Tyr Ser Arg Arg Thr Thr Glu Ala

485 490 495

Thr Leu Asn Ser Leu Gly Ile Ser Glu Glu Leu Lys Glu Lys Leu Arg

500 505 510

Asp Val Met Val Asp Arg His Lys Val Ala Leu Gly Lys Thr Leu Gly

515 520 525

Glu Gly Glu Phe Gly Ala Val Met Glu Gly Gln Leu Asn Gln Asp Asp

530 535 540

Ser Ile Leu Lys Val Ala Val Lys Thr Met Lys Ile Ala Ile Cys Thr

545 550 555 560

Arg Ser Glu Leu Glu Asp Phe Leu Ser Glu Ala Val Cys Met Lys Glu

565	570	575
Phe Asp His Pro Asn Val Met Arg Leu Ile Gly Val Cys Phe Gln Gly		
580	585	590
Ser Asp Arg Glu Gly Phe Pro Glu Pro Val Val Ile Leu Pro Phe Met		
595	600	605
Lys His Gly Asp Leu His Ser Phe Leu Leu Tyr Ser Arg Leu Gly Asp		
610	615	620
Gln Pro Val Phe Leu Pro Thr Gln Met Leu Val Lys Phe Met Ala Asp		
625	630	635
Ile Ala Ser Gly Met Glu Tyr Leu Ser Thr Lys Arg Phe Ile His Arg		
645	650	655
Asp Leu Ala Ala Arg Asn Cys Met Leu Asn Glu Asn Met Ser Val Cys		
660	665	670
Val Ala Asp Phe Gly Leu Ser Lys Lys Ile Tyr Asn Gly Asp Tyr Tyr		
675	680	685
Arg Gln Gly Arg Ile Ala Lys Met Pro Val Lys Trp Ile Ala Ile Glu		
690	695	700
Ser Leu Ala Asp Arg Val Tyr Thr Ser Lys Ser Asp Val Trp Ser Phe		
705	710	715
Gly Val Thr Met Trp Glu Ile Ala Thr Arg Gly Gln Thr Pro Tyr Pro		
725	730	735
Gly Val Glu Asn Ser Glu Ile Tyr Asp Tyr Leu Arg Gln Gly Asn Arg		
740	745	750
Leu Lys Gln Pro Val Asp Cys Leu Asp Gly Leu Tyr Ala Leu Met Ser		
755	760	765
Arg Cys Trp Glu Leu Asn Pro Arg Asp Arg Pro Ser Phe Ala Glu Leu		
770	775	780
Arg Glu Asp Leu Glu Asn Thr Leu Lys Ala Leu Pro Pro Ala Gln Glu		
785	790	795
Pro Asp Glu Ile Leu Tyr Val Asn Met Asp Glu Gly Gly Ser His Leu		
805	810	815

Glu Pro Arg Gly Ala Ala Gly Gly Ala Asp Pro Pro Thr Gln Pro Asp
 820 825 830
 Pro Lys Asp Ser Cys Ser Cys Leu Thr Ala Ala Asp Val His Ser Ala
 835 840 845

Gly Arg Tyr Val Leu Cys Pro Ser Thr Ala Pro Gly Pro Thr Leu Ser
 850 855 860

Ala Asp Arg Gly Cys Pro Ala Pro Pro Gly Gln Glu Asp Gly Ala
 865 870 875

<210> 23

<211> 890

<212> PRT

<213> Homo sapiens Tyro3

<400> 23

Met Ala Leu Arg Arg Ser Met Gly Arg Pro Gly Leu Pro Pro Leu Pro
 1 5 10 15

Leu Pro Pro Pro Pro Arg Leu Gly Leu Leu Leu Ala Ala Leu Ala Ser

20 25 30

Leu Leu Leu Pro Glu Ser Ala Ala Ala Gly Leu Lys Leu Met Gly Ala
 35 40 45

Pro Val Lys Leu Thr Val Ser Gln Gly Gln Pro Val Lys Leu Asn Cys
 50 55 60

Ser Val Glu Gly Met Glu Glu Pro Asp Ile Gln Trp Val Lys Asp Gly
 65 70 75 80

Ala Val Val Gln Asn Leu Asp Gln Leu Tyr Ile Pro Val Ser Glu Gln

85 90 95

His Trp Ile Gly Phe Leu Ser Leu Lys Ser Val Glu Arg Ser Asp Ala
 100 105 110

Gly Arg Tyr Trp Cys Gln Val Glu Asp Gly Gly Glu Thr Glu Ile Ser
 115 120 125

Gln Pro Val Trp Leu Thr Val Glu Gly Val Pro Phe Phe Thr Val Glu
 130 135 140

Pro Lys Asp Leu Ala Val Pro Pro Asn Ala Pro Phe Gln Leu Ser Cys

145 150 155 160

Glu Ala Val Gly Pro Pro Glu Pro Val Thr Ile Val Trp Trp Arg Gly

165 170 175

Thr Thr Lys Ile Gly Gly Pro Ala Pro Ser Pro Ser Val Leu Asn Val

180 185 190

Thr Gly Val Thr Gln Ser Thr Met Phe Ser Cys Glu Ala His Asn Leu

195 200 205

Lys Gly Leu Ala Ser Ser Arg Thr Ala Thr Val His Leu Gln Ala Leu

210 215 220

Pro Ala Ala Pro Phe Asn Ile Thr Val Thr Lys Leu Ser Ser Ser Asn

225 230 235 240

Ala Ser Val Ala Trp Met Pro Gly Ala Asp Gly Arg Ala Leu Leu Gln

245 250 255

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

260 265 270

Ala Val Val Val Pro Val Pro Pro Phe Thr Cys Leu Leu Arg Asp Leu

275 280 285

Val Pro Ala Thr Asn Tyr Ser Leu Arg Val Arg Cys Ala Asn Ala Leu

290 295 300

Gly Pro Ser Pro Tyr Ala Asp Trp Val Pro Phe Gln Thr Lys Gly Leu

305 310 315 320

Ala Pro Ala Ser Ala Pro Gln Asn Leu His Ala Ile Arg Thr Asp Ser

325 330 335

Gly Leu Ile Leu Glu Trp Glu Glu Val Ile Pro Glu Ala Pro Leu Glu

340 345 350

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

355 360 365

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

370 375 380

Asp Pro Gln Lys Asp Leu Ile Val Arg Val Cys Val Ser Asn Ala Val

385	390	395	400
Gly Cys Gly Pro Trp Ser Gln Pro Leu Val Val Ser Ser His Asp Arg			
405	410	415	
Ala Gly Gln Gln Gly Pro Pro His Ser Arg Thr Ser Trp Val Pro Val			
420	425	430	
Val Leu Gly Val Leu Thr Ala Leu Val Thr Ala Ala Ala Leu Ala Leu			
435	440	445	
Ile Leu Leu Arg Lys Arg Arg Lys Glu Thr Arg Phe Gly Gln Ala Phe			
450	455	460	
Asp Ser Val Met Ala Arg Gly Glu Pro Ala Val His Phe Arg Ala Ala			
465	470	475	480
Arg Ser Phe Asn Arg Glu Arg Pro Glu Arg Ile Glu Ala Thr Leu Asp			
485	490	495	
Ser Leu Gly Ile Ser Asp Glu Leu Lys Glu Lys Leu Glu Asp Val Leu			
500	505	510	
Ile Pro Glu Gln Gln Phe Thr Leu Gly Arg Met Leu Gly Lys Glu			
515	520	525	
Phe Gly Ser Val Arg Glu Ala Gln Leu Lys Gln Glu Asp Gly Ser Phe			
530	535	540	
Val Lys Val Ala Val Lys Met Leu Lys Ala Asp Ile Ile Ala Ser Ser			
545	550	555	560
Asp Ile Glu Glu Phe Leu Arg Glu Ala Ala Cys Met Lys Glu Phe Asp			
565	570	575	
His Pro His Val Ala Lys Leu Val Gly Val Ser Leu Arg Ser Arg Ala			
580	585	590	
Lys Gly Arg Leu Pro Ile Pro Met Val Ile Leu Pro Phe Met Lys His			
595	600	605	
Gly Asp Leu His Ala Phe Leu Leu Ala Ser Arg Ile Gly Glu Asn Pro			
610	615	620	
Phe Asn Leu Pro Leu Gln Thr Leu Ile Arg Phe Met Val Asp Ile Ala			
625	630	635	640

Cys Gly Met Glu Tyr Leu Ser Ser Arg Asn Phe Ile His Arg Asp Leu
 645 650 655
 Ala Ala Arg Asn Cys Met Leu Ala Glu Asp Met Thr Val Cys Val Ala
 660 665 670
 Asp Phe Gly Leu Ser Arg Lys Ile Tyr Ser Gly Asp Tyr Tyr Arg Gln
 675 680 685
 Gly Cys Ala Ser Lys Leu Pro Val Lys Trp Leu Ala Leu Glu Ser Leu
 690 695 700
 Ala Asp Asn Leu Tyr Thr Val Gln Ser Asp Val Trp Ala Phe Gly Val
 705 710 715 720
 Thr Met Trp Glu Ile Met Thr Arg Gly Gln Thr Pro Tyr Ala Gly Ile
 725 730 735
 Glu Asn Ala Glu Ile Tyr Asn Tyr Leu Ile Gly Gly Asn Arg Leu Lys
 740 745 750
 Gln Pro Pro Glu Cys Met Glu Asp Val Tyr Asp Leu Met Tyr Gln Cys
 755 760 765
 Trp Ser Ala Asp Pro Lys Gln Arg Pro Ser Phe Thr Cys Leu Arg Met
 770 775 780
 Glu Leu Glu Asn Ile Leu Gly Gln Leu Ser Val Leu Ser Ala Ser Gln
 785 790 795 800
 Asp Pro Leu Tyr Ile Asn Ile Glu Arg Ala Glu Glu Pro Thr Ala Gly
 805 810 815
 Gly Ser Leu Glu Leu Pro Gly Arg Asp Gln Pro Tyr Ser Gly Ala Gly
 820 825 830
 Asp Gly Ser Gly Met Gly Ala Val Gly Gly Thr Pro Ser Asp Cys Arg
 835 840 845
 Tyr Ile Leu Thr Pro Gly Gly Leu Ala Glu Gln Pro Gly Gln Ala Glu
 850 855 860
 His Gln Pro Glu Ser Pro Leu Asn Glu Thr Gln Arg Leu Leu Leu
 865 870 875 880
 Gln Gln Gly Leu Leu Pro His Ser Ser Cys

885	890	
<210> 24		
<211> 999		
<212> PRT		
<213> Homo sapiens Mer		
<400> 24		
Met Gly Pro Ala Pro Leu Pro Leu Leu Leu Gly Leu Phe Leu Pro Ala		
1	5	10
Leu Trp Arg Arg Ala Ile Thr Glu Ala Arg Glu Glu Ala Lys Pro Tyr		
20 25 30		
Pro Leu Phe Pro Gly Pro Phe Pro Gly Ser Leu Gln Thr Asp His Thr		
35	40	45
Pro Leu Leu Ser Leu Pro His Ala Ser Gly Tyr Gln Pro Ala Leu Met		
50	55	60
Phe Ser Pro Thr Gln Pro Gly Arg Pro His Thr Gly Asn Val Ala Ile		
65	70	75
Pro Gln Val Thr Ser Val Glu Ser Lys Pro Leu Pro Pro Leu Ala Phe		
85 90 95		
Lys His Thr Val Gly His Ile Ile Leu Ser Glu His Lys Gly Val Lys		
100	105	110
Phe Asn Cys Ser Ile Ser Val Pro Asn Ile Tyr Gln Asp Thr Thr Ile		
115	120	125
Ser Trp Trp Lys Asp Gly Lys Glu Leu Leu Gly Ala His His Ala Ile		
130	135	140
Thr Gln Phe Tyr Pro Asp Asp Glu Val Thr Ala Ile Ile Ala Ser Phe		
145 150 155 160		
Ser Ile Thr Ser Val Gln Arg Ser Asp Asn Gly Ser Tyr Ile Cys Lys		
165	170	175
Met Lys Ile Asn Asn Glu Glu Ile Val Ser Asp Pro Ile Tyr Ile Glu		
180	185	190
Val Gln Gly Leu Pro His Phe Thr Lys Gln Pro Glu Ser Met Asn Val		
195	200	205

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

210 215 220
Glu Pro Val Asn Ile Phe Trp Val Gln Asn Ser Ser Arg Val Asn Glu

225 230 235 240
Gln Pro Glu Lys Ser Pro Ser Val Leu Thr Val Pro Gly Leu Thr Glu

245 250 255
Met Ala Val Phe Ser Cys Glu Ala His Asn Asp Lys Gly Leu Thr Val

260 265 270
Ser Lys Gly Val Gln Ile Asn Ile Lys Ala Ile Pro Ser Pro Pro Thr

275 280 285
Glu Val Ser Ile Arg Asn Ser Thr Ala His Ser Ile Leu Ile Ser Trp

290 295 300
Val Pro Gly Phe Asp Gly Tyr Ser Pro Phe Arg Asn Cys Ser Ile Gln

305 310 315 320
Val Lys Glu Ala Asp Pro Leu Ser Asn Gly Ser Val Met Ile Phe Asn

325 330 335
Thr Ser Ala Leu Pro His Leu Tyr Gln Ile Lys Gln Leu Gln Ala Leu

340 345 350
Ala Asn Tyr Ser Ile Gly Val Ser Cys Met Asn Glu Ile Gly Trp Ser

355 360 365
Ala Val Ser Pro Trp Ile Leu Ala Ser Thr Thr Glu Gly Ala Pro Ser

370 375 380
Val Ala Pro Leu Asn Val Thr Val Phe Leu Asn Glu Ser Ser Asp Asn

385 390 395 400
Val Asp Ile Arg Trp Met Lys Pro Pro Thr Lys Gln Gln Asp Gly Glu

405 410 415
Leu Val Gly Tyr Arg Ile Ser His Val Trp Gln Ser Ala Gly Ile Ser

420 425 430
Lys Glu Leu Leu Glu Glu Val Gly Gln Asn Gly Ser Arg Ala Arg Ile

435 440 445
Ser Val Gln Val His Asn Ala Thr Cys Thr Val Arg Ile Ala Ala Val

450	455	460
Thr Arg Gly Gly Val Gly Pro Phe Ser Asp Pro Val Lys Ile Phe Ile		
465	470	475
Pro Ala His Gly Trp Val Asp Tyr Ala Pro Ser Ser Thr Pro Ala Pro		
485	490	495
Gly Asn Ala Asp Pro Val Leu Ile Ile Phe Gly Cys Phe Cys Gly Phe		
500	505	510
Ile Leu Ile Gly Leu Ile Leu Tyr Ile Ser Leu Ala Ile Arg Lys Arg		
515	520	525
Val Gln Glu Thr Lys Phe Gly Asn Ala Phe Thr Glu Glu Asp Ser Glu		
530	535	540
Leu Val Val Asn Tyr Ile Ala Lys Lys Ser Phe Cys Arg Arg Ala Ile		
545	550	555
Glu Leu Thr Leu His Ser Leu Gly Val Ser Glu Glu Leu Gln Asn Lys		
565	570	575
Leu Glu Asp Val Val Ile Asp Arg Asn Leu Leu Ile Leu Gly Lys Ile		
580	585	590
Leu Gly Glu Gly Glu Phe Gly Ser Val Met Glu Gly Asn Leu Lys Gln		
595	600	605
Glu Asp Gly Thr Ser Leu Lys Val Ala Val Lys Thr Met Lys Leu Asp		
610	615	620
Asn Ser Ser Gln Arg Glu Ile Glu Glu Phe Leu Ser Glu Ala Ala Cys		
625	630	635
Met Lys Asp Phe Ser His Pro Asn Val Ile Arg Leu Leu Gly Val Cys		
645	650	655
Ile Glu Met Ser Ser Gln Gly Ile Pro Lys Pro Met Val Ile Leu Pro		
660	665	670
Phe Met Lys Tyr Gly Asp Leu His Thr Tyr Leu Leu Tyr Ser Arg Leu		
675	680	685
Glu Thr Gly Pro Lys His Ile Pro Leu Gln Thr Leu Leu Lys Phe Met		
690	695	700

Val Asp Ile Ala Leu Gly Met Glu Tyr Leu Ser Asn Arg Asn Phe Leu
 705 710 715 720
 His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Cys Met Leu Arg Asp Asp Met Thr
 725 730 735
 Val Cys Val Ala Asp Phe Gly Leu Ser Lys Lys Ile Tyr Ser Gly Asp
 740 745 750
 Tyr Tyr Arg Gln Gly Arg Ile Ala Lys Met Pro Val Lys Trp Ile Ala
 755 760 765
 Ile Glu Ser Leu Ala Asp Arg Val Tyr Thr Ser Lys Ser Asp Val Trp
 770 775 780
 Ala Phe Gly Val Thr Met Trp Glu Ile Ala Thr Arg Gly Met Thr Pro
 785 790 795 800
 Tyr Pro Gly Val Gln Asn His Glu Met Tyr Asp Tyr Leu Leu His Gly
 805 810 815
 His Arg Leu Lys Gln Pro Glu Asp Cys Leu Asp Glu Leu Tyr Glu Ile
 820 825 830
 Met Tyr Ser Cys Trp Arg Thr Asp Pro Leu Asp Arg Pro Thr Phe Ser
 835 840 845
 Val Leu Arg Leu Gln Leu Glu Lys Leu Leu Glu Ser Leu Pro Asp Val
 850 855 860
 Arg Asn Gln Ala Asp Val Ile Tyr Val Asn Thr Gln Leu Leu Glu Ser
 865 870 875 880
 Ser Glu Gly Leu Ala Gln Gly Ser Thr Leu Ala Pro Leu Asp Leu Asn
 885 890 895
 Ile Asp Pro Asp Ser Ile Ile Ala Ser Cys Thr Pro Arg Ala Ala Ile
 900 905 910
 Ser Val Val Thr Ala Glu Val His Asp Ser Lys Pro His Glu Gly Arg
 915 920 925
 Tyr Ile Leu Asn Gly Gly Ser Glu Glu Trp Glu Asp Leu Thr Ser Ala
 930 935 940
 Pro Ser Ala Ala Val Thr Ala Glu Lys Asn Ser Val Leu Pro Gly Glu

945	950	955	960
Arg Leu Val Arg Asn Gly Val Ser Trp Ser His Ser Ser Met Leu Pro			
965	970	975	
Leu Gly Ser Ser Leu Pro Asp Glu Leu Leu Phe Ala Asp Asp Ser Ser			
980	985	990	
Glu Gly Ser Glu Val Leu Met			
995			
<210> 25			
<211> 465			
<212> PRT			
<213> Homo sapiens Akt3			
<400> 25			
Met Ser Asp Val Thr Ile Val Lys Glu Gly Trp Val Gln Lys Arg Gly			
1	5	10	15
Glu Tyr Ile Lys Asn Trp Arg Pro Arg Tyr Phe Leu Leu Lys Thr Asp			
20	25	30	
Gly Ser Phe Ile Gly Tyr Lys Glu Lys Pro Gln Asp Val Asp Leu Pro			
35	40	45	
Tyr Pro Leu Asn Asn Phe Ser Val Ala Lys Cys Gln Leu Met Lys Thr			
50	55	60	
Glu Arg Pro Lys Pro Asn Thr Phe Ile Ile Arg Cys Leu Gln Trp Thr			
65	70	75	80
Thr Val Ile Glu Arg Thr Phe His Val Asp Thr Pro Glu Glu Arg Glu			
85	90	95	
Glu Trp Thr Glu Ala Ile Gln Ala Val Ala Asp Arg Leu Gln Arg Gln			
100	105	110	
Glu Glu Glu Arg Met Asn Cys Ser Pro Thr Ser Gln Ile Asp Asn Ile			
115	120	125	
Gly Glu Glu Glu Met Asp Ala Ser Thr Thr His His Lys Arg Lys Thr			
130	135	140	
Met Asn Asp Phe Asp Tyr Leu Lys Leu Leu Gly Lys Gly Thr Phe Gly			
145	150	155	160

Lys Val Ile Leu Val Arg Glu Lys Ala Ser Gly Lys Tyr Tyr Ala Met

165 170 175

Lys Ile Leu Lys Lys Glu Val Ile Ile Ala Lys Asp Glu Val Ala His

180 185 190

Thr Leu Thr Glu Ser Arg Val Leu Lys Asn Thr Arg His Pro Phe Leu

195 200 205

Thr Ser Leu Lys Tyr Ser Phe Gln Thr Lys Asp Arg Leu Cys Phe Val

210 215 220

Met Glu Tyr Val Asn Gly Gly Glu Leu Phe Phe His Leu Ser Arg Glu

225 230 235 240

Arg Val Phe Ser Glu Asp Arg Thr Arg Phe Tyr Gly Ala Glu Ile Val

245 250 255

Ser Ala Leu Asp Tyr Leu His Ser Gly Lys Ile Val Tyr Arg Asp Leu

260 265 270

Lys Leu Glu Asn Leu Met Leu Asp Lys Asp Gly His Ile Lys Ile Thr

275 280 285

Asp Phe Gly Leu Cys Lys Glu Gly Ile Thr Asp Ala Ala Thr Met Lys

290 295 300

Thr Phe Cys Gly Thr Pro Glu Tyr Leu Ala Pro Glu Val Leu Glu Asp

305 310 315 320

Asn Asp Tyr Gly Arg Ala Val Asp Trp Trp Gly Leu Gly Val Val Met

325 330 335

Tyr Glu Met Met Cys Gly Arg Leu Pro Phe Tyr Asn Gln Asp His Glu

340 345 350

Lys Leu Phe Glu Leu Ile Leu Met Glu Asp Ile Lys Phe Pro Arg Thr

355 360 365

Leu Ser Ser Asp Ala Lys Ser Leu Leu Ser Gly Leu Leu Ile Lys Asp

370 375 380

Pro Asn Lys Arg Leu Gly Gly Pro Asp Asp Ala Lys Glu Ile Met

385 390 395 400

Arg His Ser Phe Phe Ser Gly Val Asn Trp Gln Asp Val Tyr Asp Lys

405 410 415

Lys Leu Val Pro Pro Phe Lys Pro Gln Val Thr Ser Glu Thr Asp Thr

420 425 430

Arg Tyr Phe Asp Glu Glu Phe Thr Ala Gln Thr Ile Thr Ile Thr Pro

435 440 445

Pro Glu Lys Cys Gln Gln Ser Asp Cys Gly Met Leu Gly Asn Trp Lys

450 455 460

Lys

465

<210> 26

<211> 678

<212> PRT

<213> Homo sapiens Gas6

<400> 26

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

1 5 10 15

Gln Leu Leu Leu Leu Leu Ala Ala Glu Cys Ala Leu Ala Ala Leu

20 25 30

Leu Pro Ala Arg Glu Ala Thr Gln Phe Leu Arg Pro Arg Gln Arg Arg

35 40 45

Ala Phe Gln Val Phe Glu Glu Ala Lys Gln Gly His Leu Glu Arg Glu

50 55 60

Cys Val Glu Glu Leu Cys Ser Arg Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe Glu

65 70 75 80

Asn Asp Pro Glu Thr Asp Tyr Phe Tyr Pro Arg Tyr Leu Asp Cys Ile

85 90 95

Asn Lys Tyr Gly Ser Pro Tyr Thr Lys Asn Ser Gly Phe Ala Thr Cys

100 105 110

Val Gln Asn Leu Pro Asp Gln Cys Thr Pro Asn Pro Cys Asp Arg Lys

115 120 125

Gly Thr Gln Ala Cys Gln Asp Leu Met Gly Asn Phe Phe Cys Leu Cys

130	135	140
Lys Ala Gly Trp Gly Gly Arg Leu Cys Asp Lys Asp Val Asn Glu Cys		
145	150	155
Ser Gln Glu Asn Gly Gly Cys Leu Gln Ile Cys His Asn Lys Pro Gly		
165	170	175
Ser Phe His Cys Ser Cys His Ser Gly Phe Glu Leu Ser Ser Asp Gly		
180	185	190
Arg Thr Cys Gln Asp Ile Asp Glu Cys Ala Asp Ser Glu Ala Cys Gly		
195	200	205
Glu Ala Arg Cys Lys Asn Leu Pro Gly Ser Tyr Ser Cys Leu Cys Asp		
210	215	220
Glu Gly Phe Ala Tyr Ser Ser Gln Glu Lys Ala Cys Arg Asp Val Asp		
225	230	235
Glu Cys Leu Gln Gly Arg Cys Glu Gln Val Cys Val Asn Ser Pro Gly		
245	250	255
Ser Tyr Thr Cys His Cys Asp Gly Arg Gly Leu Lys Leu Ser Gln		
260	265	270
Asp Met Asp Thr Cys Glu Asp Ile Leu Pro Cys Val Pro Phe Ser Val		
275	280	285
Ala Lys Ser Val Lys Ser Leu Tyr Leu Gly Arg Met Phe Ser Gly Thr		
290	295	300
Pro Val Ile Arg Leu Arg Phe Lys Arg Leu Gln Pro Thr Arg Leu Val		
305	310	315
Ala Glu Phe Asp Phe Arg Thr Phe Asp Pro Glu Gly Ile Leu Leu Phe		
325	330	335
Ala Gly Gly His Gln Asp Ser Thr Trp Ile Val Leu Ala Leu Arg Ala		
340	345	350
Gly Arg Leu Glu Leu Gln Leu Arg Tyr Asn Gly Val Gly Arg Val Thr		
355	360	365
Ser Ser Gly Pro Val Ile Asn His Gly Met Trp Gln Thr Ile Ser Val		
370	375	380

Glu Glu Leu Ala Arg Asn Leu Val Ile Lys Val Asn Arg Asp Ala Val
 385 390 395 400

Met Lys Ile Ala Val Ala Gly Asp Leu Phe Gln Pro Glu Arg Gly Leu
 405 410 415

Tyr His Leu Asn Leu Thr Val Gly Ile Pro Phe His Glu Lys Asp
 420 425 430

Leu Val Gln Pro Ile Asn Pro Arg Leu Asp Gly Cys Met Arg Ser Trp
 435 440 445

Asn Trp Leu Asn Gly Glu Asp Thr Thr Ile Gln Glu Thr Val Lys Val
 450 455 460

Asn Thr Arg Met Gln Cys Phe Ser Val Thr Glu Arg Gly Ser Phe Tyr
 465 470 475 480

Pro Gly Ser Gly Phe Ala Phe Tyr Ser Leu Asp Tyr Met Arg Thr Pro
 485 490 495

Leu Asp Val Gly Thr Glu Ser Thr Trp Glu Val Glu Val Val Ala His
 500 505 510

Ile Arg Pro Ala Ala Asp Thr Gly Val Leu Phe Ala Leu Trp Ala Pro
 515 520 525

Asp Leu Arg Ala Val Pro Leu Ser Val Ala Leu Val Asp Tyr His Ser
 530 535 540

Thr Lys Leu Lys Lys Gln Leu Val Val Leu Ala Val Glu His Thr
 545 550 555 560

Ala Leu Ala Leu Met Glu Ile Lys Val Cys Asp Gly Gln Glu His Val
 565 570 575

Val Thr Val Ser Leu Arg Asp Gly Glu Ala Thr Leu Glu Val Asp Gly
 580 585 590

Thr Arg Gly Gln Ser Glu Val Ser Ala Ala Gln Leu Gln Glu Arg Leu
 595 600 605

Ala Val Leu Glu Arg His Leu Arg Ser Pro Val Leu Thr Phe Ala Gly
 610 615 620

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

625 630 635 640

Arg Gly Cys Met Thr Leu Glu Val Asn Arg Arg Leu Leu Asp Leu Asp

645 650 655

Glu Ala Ala Tyr Lys His Ser Asp Ile Thr Ala His Ser Cys Pro Pro

660 665 670

Val Glu Pro Ala Ala Ala

675

<210> 27

<211> 894

<212> PRT

<213> Macaca fascicularis Axl

<400> 27

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Glu Glu Ser Pro Phe Val Gly Asn Pro Gly Asn Ile Thr Gly Ala Arg

35 40 45

Gly Leu Thr Gly Thr Leu Arg Cys Gln Leu Gln Val Gln Gly Glu Pro

50 55 60

Pro Glu Val His Trp Leu Arg Asp Gly Gln Ile Leu Glu Leu Ala Asp

65 70 75 80

Ser Thr Gln Thr Gln Val Pro Leu Gly Glu Asp Gln Asp Asp Trp

85 90 95

Ile Val Val Ser Gln Leu Arg Ile Ala Ser Leu Gln Leu Ser Asp Ala

100 105 110

Gly Gln Tyr Gln Cys Leu Val Phe Leu Gly His Gln Asn Phe Val Ser

115 120 125

Gln Pro Gly Tyr Val Gly Leu Glu Gly Leu Pro Tyr Phe Leu Glu Glu

130 135 140

Pro Glu Asp Arg Thr Val Ala Ala Asn Thr Pro Phe Asn Leu Ser Cys

145	150	155	160
-----	-----	-----	-----

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

165	170	175
-----	-----	-----

Ala Val Pro Leu Ala Thr Ala Pro Gly His Gly Pro Gln Arg Asn Leu

180	185	190
-----	-----	-----

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

195	200	205
-----	-----	-----

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

210	215	220
-----	-----	-----

Pro Gln Gln Pro Arg Asn Leu His Leu Val Ser Arg Gln Pro Thr Glu

225	230	235	240
-----	-----	-----	-----

Leu Glu Val Ala Trp Thr Pro Gly Leu Ser Gly Ile Tyr Pro Leu Thr

245	250	255
-----	-----	-----

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

260	265	270
-----	-----	-----

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

275	280	285
-----	-----	-----

Val Pro Pro His Gln Leu Arg Leu Gly Ser Leu His Pro His Thr Pro

290	295	300
-----	-----	-----

Tyr His Ile Arg Val Ala Cys Thr Ser Ser Gln Gly Pro Ser Ser Trp

305	310	315	320
-----	-----	-----	-----

Thr His Trp Leu Pro Val Glu Thr Pro Glu Gly Val Pro Leu Gly Pro

325	330	335
-----	-----	-----

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

340	345	350
-----	-----	-----

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

355	360	365
-----	-----	-----

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

370	375	380
-----	-----	-----

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

385	390	395	400
-----	-----	-----	-----

Asn Leu Thr Val Cys Val Ala Ala Tyr Thr Ala Ala Gly Asp Gly Pro

405 410 415

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

420 425 430

Pro Val His Gln Leu Val Lys Glu Thr Ser Ala Pro Ala Phe Ser Trp

435 440 445

Pro Trp Trp Tyr Ile Leu Leu Gly Ala Val Val Ala Ala Ala Cys Val

450 455 460

Leu Ile Leu Ala Leu Phe Leu Val His Arg Arg Lys Lys Glu Thr Arg

465 470 475 480

Tyr Gly Glu Val Phe Glu Pro Thr Val Glu Arg Gly Glu Leu Val Val

485 490 495

Arg Tyr Arg Val Arg Lys Ser Tyr Ser Arg Arg Thr Thr Glu Ala Thr

500 505 510

Leu Asn Ser Leu Gly Ile Ser Glu Glu Leu Lys Glu Lys Leu Arg Asp

515 520 525

Val Met Val Asp Arg His Lys Val Ala Leu Gly Lys Thr Leu Gly Glu

530 535 540

Gly Glu Phe Gly Ala Val Met Glu Gly Gln Leu Asn Gln Asp Asp Ser

545 550 555 560

Ile Leu Lys Val Ala Val Lys Thr Met Lys Ile Ala Ile Cys Thr Arg

565 570 575

Ser Glu Leu Glu Asp Phe Leu Ser Glu Ala Val Cys Met Lys Glu Phe

580 585 590

Asp His Pro Asn Val Met Arg Leu Ile Gly Val Cys Phe Gln Gly Ser

595 600 605

Glu Arg Glu Ser Phe Pro Ala Pro Val Val Ile Leu Pro Phe Met Lys

610 615 620

His Gly Asp Leu His Ser Phe Leu Leu Tyr Ser Arg Leu Gly Asp Gln

625 630 635 640

Pro Val Tyr Leu Pro Thr Gln Met Leu Val Lys Phe Met Ala Asp Ile

645	650	655
Ala Ser Gly Met Glu Tyr Leu Ser Thr Lys Arg Phe Ile His Arg Asp		
660	665	670
Leu Ala Ala Arg Asn Cys Met Leu Asn Glu Asn Met Ser Val Cys Val		
675	680	685
Ala Asp Phe Gly Leu Ser Lys Lys Ile Tyr Asn Gly Asp Tyr Tyr Arg		
690	695	700
Gln Gly Arg Ile Ala Lys Met Pro Val Lys Trp Ile Ala Ile Glu Ser		
705	710	715
Leu Ala Asp Arg Val Tyr Thr Ser Lys Ser Asp Val Trp Ser Phe Gly		
725	730	735
Val Thr Met Trp Glu Ile Ala Thr Arg Gly Gln Thr Pro Tyr Pro Gly		
740	745	750
Val Glu Asn Ser Glu Ile Tyr Asp Tyr Leu Arg Gln Gly Asn Arg Leu		
755	760	765
Lys Gln Pro Ala Asp Cys Leu Asp Gly Leu Tyr Ala Leu Met Ser Arg		
770	775	780
Cys Trp Glu Leu Asn Pro Gln Asp Arg Pro Ser Phe Thr Glu Leu Arg		
785	790	795
800		
Glu Asp Leu Glu Asn Thr Leu Lys Ala Leu Pro Pro Ala Gln Glu Pro		
805	810	815
Asp Glu Ile Leu Tyr Val Asn Met Asp Glu Gly Gly Tyr Pro Glu		
820	825	830
Pro Pro Gly Ala Ala Gly Gly Ala Asp Pro Pro Thr Gln Leu Asp Pro		
835	840	845
Lys Asp Ser Cys Ser Cys Leu Thr Ser Ala Glu Val His Pro Ala Gly		
850	855	860
Arg Tyr Val Leu Cys Pro Ser Thr Ala Pro Ser Pro Ala Gln Pro Ala		
865	870	875
Asp Arg Gly Ser Pro Ala Ala Pro Gly Gln Glu Asp Gly Ala		
885	890	

<210> 28

<211> 118

<212> PRT

<213> Mus musculus 10G5 VH domain

<400> 28

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Tyr Ile Asn Trp Val Arg Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Ala Arg Ile Phe Pro Gly Gly Asp Asn Thr Tyr Tyr Asn Glu Lys Phe

50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Glu Glu Ser Ser Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Arg Gly Leu Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Ile

100 105 110

Ser Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 29

<211> 112

<212> PRT

<213> Mus musculus 10G5 VL domain

<400> 29

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

1 5 10 15

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

<210> 30

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 10G5 VH CDR1

<400> 30

Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Phe Tyr Ile Asn

1 5 10

<210> 31

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 10G5 VH CDR2

<400> 31

Arg Ile Phe Pro Gly Gly Asp Asn Thr Tyr Tyr Asn Glu Lys Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 32

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 10G5 VH CDR3

<400> 32

Arg Gly Leu Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr

1 5

<210> 33

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 10G5 VL CDR1

<400> 33

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly Ile Pro Tyr Leu His

1 5 10 15

<210> 34

<211

> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 10G5 VL CDR2

<400> 34

Arg Val Ser Asn Arg Phe Ser

1 5

<210> 35

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 10G5 VL CDR3

<400> 35

Ser Gln Gly Thr His Val Pro Pro Thr

1 5