



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2013년04월08일
(11) 등록번호 10-1252306
(24) 등록일자 2013년04월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/40 (2006.01) A61K 39/395 (2006.01)
C12N 9/64 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2007-7007643
(22) 출원일자(국제) 2005년10월03일
심사청구일자 2010년10월01일
(85) 번역문제출일자 2007년04월03일
(65) 공개번호 10-2007-0102470
(43) 공개일자 2007년10월18일
(86) 국제출원번호 PCT/US2005/036300
(87) 국제공개번호 WO 2006/042173
국제공개일자 2006년04월20일
(30) 우선권주장
60/615,657 2004년10월04일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
JP2002356500 A*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
제넨테크, 인크.
미합중국 캘리포니아 (우편번호 94080-4990) 사우
쓰샌프란시스코 디엔에이 웨이 1
(72) 발명자
키르히호퍼, 다니엘, 케이.
미국 94024 캘리포니아주 로스 알토스 에스. 스프
링거 로드 326
우, 얀
미국 94404 캘리포니아주 포스터 시티 챌린지 코
트 101
(74) 대리인
김영, 장수길

전체 청구항 수 : 총 11 항

심사관 : 이미옥

(54) 발명의 명칭 간세포 성장 인자 활성화제의 조정제

(57) 요약

본 발명은 간세포 성장 인자 활성화제의 기능을 조정하는 방법 및 이를 위한 조성물을 제공한다.

대표도

클론 번호	Sib 번호	H1	H2	H3	진화도
		30 31 32 33	49 50 51 52 52A 53 54 55 56 57 58	95 96 97 98 99 100 100A 100B 100C 100D 100E 100F 101 102	
33	2	T S S A	G I I N P N G G Y T N	S S R L A G A	M D Y 12 nM
35	1	T G S A	G I I N P N S G Y T D	S A R I R G	F D Y 12 nM
37	1	N S N G	G W I Y P A G G A T D	W G W G	F D Y 56 nM
39	1	N G T Y	G G I Y P A G G A T Y	W W A W P A	F D Y 6 nM
42	1	N G T W	G G I Y P A G G A T D	W R A V P S	F D Y 30 nM
49	1	T G T Y	G W I S P Y N G D T Y	D W F G F G E	F D Y 2 nM
58	1	T G S A	A I I N P N G G Y T Y	S A R F S	F D Y 1 nM
61	1	S G N W	A E I N P Y N G S T N	F Y R W S V N S V	M D Y 20 nM
74	1	T N Y W	G G I Y P A G G A T D	Y S I P A	F D Y 60 nM
75	1	S N S G	G W I Y P T G G A T D	F W W R S	F D Y 6 nM
86	1	S D S S	A R I Y P T S G N T N	G L K V P F Y A N A A	M D Y 19 nM
90	1	S G S A	A I I N P T G G Y T N	S R G H Y A	M D Y 40 nM
91	2	T G N G	A W I S P Y G G S T N	G H R V	F D Y 100 nM
95	4	N N T G	G W I Y P A G G A T D	F F P V A	F D Y 4 nM

특허청구의 범위

청구항 1

(i) a) 서열 3-5, b) 서열 6-8, c) 서열 9-11, d) 서열 21-23, e) 서열 30-32, f) 서열 36-38, 및 g) 서열 39-41로 이루어진 군으로부터 선택되는 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3 서열 조합을 포함하는 중쇄, 및

(ii) 서열 45 또는 54에 나타난 바와 같은 서열을 갖는 경쇄 가변 도메인의 CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3를 포함하는 경쇄

를 포함하고, 인간 간세포 성장 인자 활성화제 (HGFA)와 결합하고 HGFA 단백질분해 활성을 차단하며, 소분자 기질인 메탄술폰닐-D-시클로헥실알라닐-부틸-아르기닌-파라니트로아닐리드(FVIIa)의 HGFA 단백질분해를 차단하는 단리된 항체.

청구항 2

제1항에 있어서, H1, H2 및 H3 서열이 각각 서열 71, 85 및 99, 서열 72, 86 및 100, 서열 73, 87 및 101, 서열 77, 91 및 105, 서열 80, 94 및 108, 서열 82, 96 및 110, 또는 서열 83, 97 및 111인 항체.

청구항 3

제1항에 있어서, 각각 서열 21-23 또는 서열 30-32인 H1, H2 및 H3 서열을 포함하는 중쇄 CDR 서열을 포함하는 항체.

청구항 4

제2항에 있어서, H1, H2 및 H3 서열이 각각 서열 77, 91 및 105 또는 서열 80, 94 및 108인 항체.

청구항 5

제1항에 있어서, 서열 45 또는 54에 나타난 바와 같은 서열을 갖는 경쇄 가변 도메인을 포함하는 항체.

청구항 6

제1항에 있어서, 단일쇄 프로-HGF의 R494-V495 위치에서의 HGFA 절단을 차단하는 항체.

청구항 7

제1항에 있어서, HGF/c-met 신호 전달을 억제하는 항체.

청구항 8

제7항에 있어서, 세포 증식을 억제하는 항체.

청구항 9

제7항에 있어서, 혈관형성을 억제하는 항체.

청구항 10

제1항에 있어서, HGFA 효소 활성의 알로스테릭 (allosteric) 억제제인 항체.

청구항 11

제1항에 있어서, HGFA 효소 활성의 완전한 또는 부분적인 경쟁적 억제제인 항체.

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

명세서

[0001] 관련 출원

[0002] 본 출원은 37 CFR 1.53(b)(1) 하에 출원된 정규출원으로서, 2004년 10월 4일자로 출원되었으며 그의 전문이 본원에 참고로 도입되는 미국 가특허원 제60/615,657호를 35 USC 119(e) 하에 우선권으로 주장한다.

기술분야

[0003] 본 발명은 일반적으로, 분자 생물학 및 성장 인자 조절 분야에 관한 것이다. 보다 구체적으로, 본 발명은 간세포 성장 인자 활성화제 기능의 조정제, 및 이러한 조정제의 용도에 관한 것이다.

배경기술

[0004] 간세포 성장 인자 (HGF)는 수용체 티로신 키나제 Met를 활성화시킴으로써 세포 증식, 이동, 혈관형성, 생존 및 형태발생을 증진시킨다 (참고문헌 8, 9). 정상적인 생리 기능에 있어서의 그의 중요성 이외에도, HGF/Met 경로는 침습성 종양 성장과 종양 전이에 있어 밀접한 영향을 끼쳐 왔다 (8). HGF는 세린 프로테아제 플라스미노겐과 고도로 유사하고, N-도메인 및 4개의 크링글 (Kringle) 도메인을 함유하는 α -쇄와, 키모트립신-유사 프로테아제와 상동성인 β -쇄로 구성된다. 이는 불활성 단일 쇠 전구체 (프로-HGF)로서 세포외 매트릭스 내로 분비되고, 생물학적으로 적격인 디설파이드-연결된 α/β 이종-이량체를 형성하기 위해서는 Arg494 - Val495에서 활성화 절단시킬 필요가 있다 (10-13). 이러한 단계는 프로-HGF 전환성 세린 프로테아제, 예를 들어 간세포 성장 인자 활성화제 (HGFA)에 의해 매개된다 (14). HGFA는 세포 표면-발현된 쿠니츠 (Kunitz)-유형 억제제, 예를 들어 2개의 간세포 성장 인자 활성화제 억제제 스플라이스 변이체 HAI-1 (16-17) 및 HAI-1B (15)에 의해 억제되고 HAI-2 (18)에 의해 억제된다. HAI-2 [태반 비쿠닌 (placental bikunin)으로서 공지되기도 함] (19)는 또한, 인자 XIa와 혈장 칼리크레인 (kallikrein)을 강력하게 억제하는 반면 (20), HAI-1B는 억제 활성을 거의 또는 전혀 나타내지 않는다 (15). 따라서, 세포외 매트릭스 내의 프로-HGF 풀의 생물학적 유용성은 프로-HGF 전환효소, 예를 들어 HGFA 및 그들의 억제제의 활성화에 의해 조절된다.

[0005] 프로-HGF를 활성화시키기 위해서는 HGFA와 같은 전환효소에 의해 절단시켜야 하기 때문에, HGFA 기능 및/또는 이와 그의 기질과의 상호 작용을 조정하는 것이 효과적인 치료 방법인 것으로 입증될 수 있었다. 이와 관련하여, HGFA의 활성을 조정할 수 있고/있거나 HGFA와 특이적으로 상호 작용할 수 있는 임상적으로 관련된 작용제를 확인하는 것이 명백히 필요하다. 본 발명은 이러한 필요성을 충족시켜 주고 기타 이점을 제공해준다.

[0006] 본원에 인용된 모든 참고 문헌 (특허원 및 간행물 포함)은 그의 전문이 본원에 참고로 도입된다.

[0007] 발명의 기술

[0008] 본 발명은 간세포 성장 인자 활성화제 (HGFA)의 기능을 조정함으로써, HGFA 활성화의 생리적 효과를 조정하기 위한 방법, 조성물, 키트 및 제조품을 제공한다. HGFA 기능의 조정은 본원에 기재된 바와 같은 항체를 사용함으로써 달성할 수 있다.

- [0009] 본 발명은 HGFA 기능을 조정하기 위해 사용할 수 있는 조정제 분자를 제공한다. 한 양태에서, HGFA 기능은 HGFA 활성 (예: 단백질분해 활성)을 억제함으로써 조정된다. 일반적으로, 본 발명의 조정제 분자는 본원에 기재된 바와 같은 항체를 포함한다. 조정제 분자는 직접적으로 조정을 수행할 수 있거나 (예를 들어, HGFA와 결합하여 HGFA 단백질분해 활성을 방해함으로써 이루어짐) 또는 간접적으로 조정을 수행할 수 있다 (예를 들어, HGFA 단백질분해 활성을 방해할 수 있는 활성제를 조직 또는 세포 내에서 HGFA로 표적화/지시함으로써 이루어짐). 한 양태에서, 본 발명은 HGFA와 결합하는 항체를 포함하는 길항제 분자를 제공한다. 한 양태에서, 이러한 길항제가 HGFA와 결합하면, HGFA 단백질분해 활성이 방해된다. 한 양태에서, 상기 길항제가 HGFA와 결합하면, HGFA에 의한 HGF의 활성화가 방해된다. 한 양태에서, 상기 항체는 HGFA의 활성 부위와 결합한다. 한 양태에서, 항체는 HGFA 활성 부위 이외의 위치 [예: 부위외 (exosite)]에서 HGFA와 결합한다. 한 양태에서, HGFA 활성 부위 이외의 위치에서 항체가 HGFA와 결합하면, HGFA와 그의 기질 분자 간의 상호 작용이 억제된다. 한 양태에서, HGFA 활성 부위 이외의 위치에서 항체가 HGFA와 결합하면, HGFA 단백질분해 활성이 억제된다.
- [0010] 한 국면에서, 본 발명은 HGF/c-met 신호 전달 경로를 붕괴시키는 길항제를 제공한다. 예를 들어, 본 발명은 프로HGF의 HGFA 절단 (예를 들어, R494-V495 위치에서의 절단)을 억제하는 분자를 제공한다. 이러한 분자는 그의 억제 기능을 수 많은 방식으로 발휘할 수 있는데, 이에 는 그의 활성 부위 및/또는 활성 부위 이외의 부위 (예: 부위외)에서 HGFA와 결합하여, 프로HGF의 HGFA 절단이 억제되도록 하는 것이 포함되지만, 이에 제한되지 않는다. 상기 분자는 HGFA와 복합체를 형성한 형태로 결합하거나 복합체를 형성하지 않은 형태로 결합할 수 있다. 상기 분자는 HGF 활성화 과정의 한 가지 이상 국면을 방해함으로써 그의 억제 기능을 발휘할 수도 있다. 예를 들어, 한 양태에서는 본 발명의 길항제 분자가 HGFA-프로HGF 복합체와 결합하여, 프로HGF의 절단이 억제되도록 한다. 한 양태에서는, 상기 분자가 프로HGF 또는 HGFA와 결합하면 (단독으로 또는 복합체 형태로), HGFA에 의한 절단에 이어 HGF의 방출이 억제된다. 한 양태에서, 본 발명의 길항제 분자는 c-met에 대한 HGF의 결합을 억제하지 않는다. 예를 들어, 한 양태에서는 본 발명의 길항제 분자가 아메리칸 타입 컬처 컬렉션 (American Type Culture Collection) 승인 번호 ATCC HB-11894 하에 기탁된 하이브리도마 세포주 (하이브리도마 1A3.3.13) 또는 HB-11895 하에 기탁된 하이브리도마 세포주 (하이브리도마 5D5.11.6)에 의해 생산된 항체와 유사한 억제 및/또는 결합 능력을 지닌 항체 또는 그의 단편이 아니다. 한 양태에서, 본 발명의 길항제 분자는 HGF/c-met 활성화와 연관된 생물학적 활성을 억제한다.
- [0011] 한 국면에서, 본 발명은 서열 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30, 33, 36, 39 또는 42의 서열을 포함하는 CDR-H1 영역을 포함하는 항체를 제공한다. 한 국면에서, 본 발명은 서열 4, 7, 10, 13, 16, 19, 22, 25, 28, 31, 34, 37, 40 또는 43의 서열을 포함하는 CDR-H2 영역을 포함하는 항체를 제공한다. 한 국면에서, 본 발명은 서열 5, 8, 11, 14, 17, 20, 23, 26, 29, 32, 35, 38, 41 또는 44의 서열을 포함하는 CDR-H3 영역을 포함하는 항체를 제공한다. 한 양태에서, 본 발명은 서열 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30, 33, 36, 39 또는 42의 서열을 포함하는 CDR-H1 영역과, 서열 4, 7, 10, 13, 16, 19, 22, 25, 28, 31, 34, 37, 40 또는 43의 서열을 포함하는 CDR-H2 영역을 포함하는 항체를 제공한다. 한 양태에서, 본 발명은 서열 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30, 33, 36, 39 또는 42의 서열을 포함하는 CDR-H1 영역과, 서열 5, 8, 11, 14, 17, 20, 23, 26, 29, 32, 35, 38, 41 또는 44의 서열을 포함하는 CDR-H3 영역을 포함하는 항체를 제공한다. 한 양태에서, 본 발명은 서열 4, 7, 10, 13, 16, 19, 22, 25, 28, 31, 34, 37, 40 또는 43의 서열을 포함하는 CDR-H2 영역과, 서열 5, 8, 11, 14, 17, 20, 23, 26, 29, 32, 35, 38, 41 또는 44의 서열을 포함하는 CDR-H3 영역을 포함하는 항체를 제공한다. 한 양태에서, 본 발명은 서열 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30, 33, 36, 39 또는 42의 서열을 포함하는 CDR-H1 영역, 서열 4, 7, 10, 13, 16, 19, 22, 25, 28, 31, 34, 37, 40 또는 43의 서열을 포함하는 CDR-H2 영역, 및 서열 5, 8, 11, 14, 17, 20, 23, 26, 29, 32, 35, 38, 41 또는 44의 서열을 포함하는 CDR-H3 영역을 포함하는 항체를 제공한다.
- [0012] 한 국면에서, 본 발명은 다음 중의 1개 이상, 2개 이상, 또는 3개 모두를 포함하는 항체를 제공한다:
- [0013] (i) 서열 3의 서열을 포함하는 CDR-H1 서열;
- [0014] (ii) 서열 4의 서열을 포함하는 CDR-H2 서열;
- [0015] (iii) 서열 5의 서열을 포함하는 CDR-H3 서열.
- [0016] 한 국면에서, 본 발명은 다음 중의 1개 이상, 2개 이상, 또는 3개 모두를 포함하는 항체를 제공한다:
- [0017] (i) 서열 6의 서열을 포함하는 CDR-H1 서열;
- [0018] (ii) 서열 7의 서열을 포함하는 CDR-H2 서열;

- [0019] (iii) 서열 8의 서열을 포함하는 CDR-H3 서열.
- [0020] 한 국면에서, 본 발명은 다음 중의 1개 이상, 2개 이상, 또는 3개 모두를 포함하는 항체를 제공한다:
- [0021] (i) 서열 9의 서열을 포함하는 CDR-H1 서열;
- [0022] (ii) 서열 10의 서열을 포함하는 CDR-H2 서열;
- [0023] (iii) 서열 11의 서열을 포함하는 CDR-H3 서열.
- [0024] 한 국면에서, 본 발명은 다음 중의 1개 이상, 2개 이상, 또는 3개 모두를 포함하는 항체를 제공한다:
- [0025] (i) 서열 12의 서열을 포함하는 CDR-H1 서열;
- [0026] (ii) 서열 13의 서열을 포함하는 CDR-H2 서열;
- [0027] (iii) 서열 14의 서열을 포함하는 CDR-H3 서열.
- [0028] 한 국면에서, 본 발명은 다음 중의 1개 이상, 2개 이상, 또는 3개 모두를 포함하는 항체를 제공한다:
- [0029] (i) 서열 15의 서열을 포함하는 CDR-H1 서열;
- [0030] (ii) 서열 16의 서열을 포함하는 CDR-H2 서열;
- [0031] (iii) 서열 17의 서열을 포함하는 CDR-H3 서열.
- [0032] 한 국면에서, 본 발명은 다음 중의 1개 이상, 2개 이상, 또는 3개 모두를 포함하는 항체를 제공한다:
- [0033] (i) 서열 18의 서열을 포함하는 CDR-H1 서열;
- [0034] (ii) 서열 19의 서열을 포함하는 CDR-H2 서열;
- [0035] (iii) 서열 20의 서열을 포함하는 CDR-H3 서열.
- [0036] 한 국면에서, 본 발명은 다음 중의 1개 이상, 2개 이상, 또는 3개 모두를 포함하는 항체를 제공한다:
- [0037] (i) 서열 21의 서열을 포함하는 CDR-H1 서열;
- [0038] (ii) 서열 22의 서열을 포함하는 CDR-H2 서열;
- [0039] (iii) 서열 23의 서열을 포함하는 CDR-H3 서열.
- [0040] 한 국면에서, 본 발명은 다음 중의 1개 이상, 2개 이상, 또는 3개 모두를 포함하는 항체를 제공한다:
- [0041] (i) 서열 24의 서열을 포함하는 CDR-H1 서열;
- [0042] (ii) 서열 25의 서열을 포함하는 CDR-H2 서열;
- [0043] (iii) 서열 26의 서열을 포함하는 CDR-H3 서열.
- [0044] 한 국면에서, 본 발명은 다음 중의 1개 이상, 2개 이상, 또는 3개 모두를 포함하는 항체를 제공한다:
- [0045] (i) 서열 27의 서열을 포함하는 CDR-H1 서열;
- [0046] (ii) 서열 28의 서열을 포함하는 CDR-H2 서열;
- [0047] (iii) 서열 29의 서열을 포함하는 CDR-H3 서열.
- [0048] 한 국면에서, 본 발명은 다음 중의 1개 이상, 2개 이상, 또는 3개 모두를 포함하는 항체를 제공한다:
- [0049] (i) 서열 30의 서열을 포함하는 CDR-H1 서열;
- [0050] (ii) 서열 31의 서열을 포함하는 CDR-H2 서열;
- [0051] (iii) 서열 32의 서열을 포함하는 CDR-H3 서열.
- [0052] 한 국면에서, 본 발명은 다음 중의 1개 이상, 2개 이상, 또는 3개 모두를 포함하는 항체를 제공한다:
- [0053] (i) 서열 33의 서열을 포함하는 CDR-H1 서열;
- [0054] (ii) 서열 34의 서열을 포함하는 CDR-H2 서열;

- [0055] (iii) 서열 35의 서열을 포함하는 CDR-H3 서열.
- [0056] 한 국면에서, 본 발명은 다음 중의 1개 이상, 2개 이상, 또는 3개 모두를 포함하는 항체를 제공한다:
- [0057] (i) 서열 36의 서열을 포함하는 CDR-H1 서열;
- [0058] (ii) 서열 37의 서열을 포함하는 CDR-H2 서열;
- [0059] (iii) 서열 38의 서열을 포함하는 CDR-H3 서열.
- [0060] 한 국면에서, 본 발명은 다음 중의 1개 이상, 2개 이상, 또는 3개 모두를 포함하는 항체를 제공한다:
- [0061] (i) 서열 39의 서열을 포함하는 CDR-H1 서열;
- [0062] (ii) 서열 40의 서열을 포함하는 CDR-H2 서열;
- [0063] (iii) 서열 41의 서열을 포함하는 CDR-H3 서열.
- [0064] 한 국면에서, 본 발명은 다음 중의 1개 이상, 2개 이상, 또는 3개 모두를 포함하는 항체를 제공한다:
- [0065] (i) 서열 42의 서열을 포함하는 CDR-H1 서열;
- [0066] (ii) 서열 43의 서열을 포함하는 CDR-H2 서열;
- [0067] (iii) 서열 44의 서열을 포함하는 CDR-H3 서열.
- [0068] 서열 3 내지 44의 아미노산 서열은 도 1에 나타난 바와 같은 개개의 CDR (즉, H1, H2 또는 H3)을 기준으로 하여 번호가 부여되었는데, 이러한 번호부여는 다음에 기재되는 바와 같은 카바트 (Kabat) 번호부여 시스템에 따른 것이다.
- [0069] 한 양태에서, 본 발명의 항체는 도 1B, 1C 및 1D에 제시된 각 클론에 대한 H1 서열 (서열 71-84), H2 서열 (서열 85-98) 및/또는 H3 서열 (서열 99-112) 중의 1개 이상, 2개 이상, 또는 3개 모두의 서열을 포함하는 중쇄 가변 도메인 CDR 서열(들)을 포함한다.
- [0070] 한 국면에서, 본 발명은 도 1A, 1B, 1C 및 1D에 제시된 바와 같은 중쇄 CDR 서열을 포함하는 항체를 제공한다. 몇몇 양태에서는, 이들 항체가 다음 서열 45에 제시된 바와 같은 인간화 4D5 항체 (huMAb4D5-8) (헤르셉틴 (HERCEPTIN®
-) ; 공급처: Genentech, Inc., South San Francisco, CA, USA) [참고: 미국 특허 제6,407,213호 및 Lee et al., J. Mol. Biol. (2004), 340(5): 1073-93]의 경쇄 가변 도메인을 추가로 포함한다:
- Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val
 Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln
 Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Glu Ser Gly
 Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser
 Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Pro Pro
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr (서열 45)
- [0071]
- [0072] 한 양태에서는, huMAb4D5-8 경쇄 가변 도메인 서열이 위치 30, 66 및 91 (각각 이탤릭체로 진하게 표시된 바와 같은 Asn, Arg 및 His) 중의 1개 이상의 위치에서 변형된다. 한 양태에서는, 이와 같이 변형된 huMAb4D5-8 서열이 위치 30에서 Ser, 위치 66에서 Gly 및/또는 위치 91에서 Ser을 포함한다. 따라서, 한 양태에서 본 발명의 항체는 다음 서열 54에 나타난 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함한다:
- 1 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val
 Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys
 Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro
 Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln
 Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Thr Thr Pro Pro Thr Phe
 Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys 107 (서열 54)
- [0073]
- [0074] (CDR 잔기에는 밑줄이 쳐져 있음)
- [0075] huMAb4D5-8을 기준으로 하여 치환된 잔기가 이탤릭체로 진하게 표시되었다.
- [0076] 본 발명의 항체는 적합한 모든 골격 및/또는 경쇄 가변 도메인 서열을 추가로 포함할 수 있는데, 단 HGFA 결합

활성이 실질적으로 유지되어야 한다. 예를 들어, 몇몇 양태에서는 이들 항체가 인간 아군 III 중쇄 골격 컨센서스 서열을 추가로 포함한다. 이들 항체의 한 양태에서는, 골격 컨센서스 서열이 위치 71, 73 및/또는 78에서의 치환을 포함한다. 이들 항체의 몇몇 양태에서는, 위치 71이 A이고/이거나, 위치 73이 T이고/이거나 위치 78이 A이다. 한 양태에서는, 이들 항체가 인간화 4D5 항체 (huMAb4D5-8) (헤르셉틴®

; 공급처: Genentech, Inc., South San Francisco, CA, USA) [참고: 미국 특허 제6,407,213호 및 Lee et al., J. Mol. Biol. (2004), 340(5): 1073-93]의 중쇄 가변 도메인 골격 서열을 포함한다. 한 양태에서는, 인간화 4D5-8 항체가 미국 특허 제6,407,213호에 기재된 바와 같다. 한 양태에서는, 이들 항체가 인간 κ I 경쇄 골격 컨센서스 서열을 추가로 포함한다. 한 양태에서는, 이들 항체가 인간화 4D5 항체 (huMAb4D5-8) (헤르셉틴®

; 공급처: Genentech, Inc., South San Francisco, CA, USA) [참고: 미국 특허 제6,407,213호 및 Lee et al., J. Mol. Biol. (2004), 340(5): 1073-93]의 경쇄 가변 도메인 서열 (서열 45), 또는 서열 54에 제시된 바와 같은 그의 변형된 변이체를 포함한다.

[0077] 한 양태에서, 본 발명의 항체는 골격 서열이 서열 46, 47, 48 및 49의 서열 (각각 FR1, FR2, FR3, 및 FR4), 및 도 1A, 1B, 1C 및/또는 1D에 제시된 바와 같은 CDR H1, H2 및 H3 서열을 포함하는 중쇄 가변 도메인을 포함한다. 한 양태에서, 본 발명의 항체는 골격 서열이 서열 50, 51, 52 및 53의 서열 (각각 FR1, FR2, FR3, 및 FR4), 및 서열 54에 제시된 바와 같은 CDR L1, L2 및 L3 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함한다.

[0078] 한 양태에서, 본 발명의 항체는 골격 서열이 서열 59, 60, 61 및 62의 서열 (각각 FR1, FR2, FR3, 및 FR4) (도 1E), 및 도 1에 제시된 바와 같은 CDR H1, H2 및 H3 서열을 포함하는 중쇄 가변 도메인을 포함한다. 한 양태에서, 본 발명의 항체는 골격 서열이 서열 55, 56, 57 및 58의 서열 (각각 FR1, FR2, FR3, 및 FR4) (도 1E), 및 서열 54에 제시된 바와 같은 CDR L1, L2 및 L3 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함한다.

[0079] 한 양태에서, 본 발명의 항체는 골격 서열이 서열 67, 68, 69 및 70의 서열 (각각 FR1, FR2, FR3, 및 FR4) (도 1F), 및 도 1A, 1B, 1C 및/또는 1D에 제시된 바와 같은 CDR H1, H2 및 H3 서열을 포함하는 중쇄 가변 도메인을 포함한다. 한 양태에서, 본 발명의 항체는 골격 서열이 서열 63, 64, 65 및 66의 서열 (각각 FR1, FR2, FR3, 및 FR4) (도 1F), 및 서열 54에 제시된 바와 같은 CDR L1, L2 및 L3 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함한다.

[0080] 한 국면에서, 본 발명은 HGFA에 대한 결합을 놓고 상기 언급된 항체들 중의 어느 것과도 경쟁하는 항체를 제공한다. 한 국면에서, 본 발명은 상기 언급된 항체들 중의 어느 것과도 동일한 HGFA 상의 에피토프와 결합하는 항체를 제공한다. 한 양태에서, 본 발명의 항체는 친화성 성숙된, 인간화, 키메라 또는 인간 항체이다. 한 양태에서, 본 발명의 항체는 항체 단편 (본원에 기재된 바와 같음), 또는 실질적으로 완전한 길이의 항체이다. 한 양태에서, 본 발명의 항체는 야생형 Fc 영역 또는 그의 변이체를 포함한다. 한 양태에서, 본 발명의 항체는 IgG (예: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), IgM, IgE 또는 IgD이다.

[0081] 한 국면에서, 본 발명의 길항제 분자는 세포독성제와 같은 독소에 연결된다. 이들 분자/물질은 부가제/증강제, 예를 들어 방사선 및/또는 화학요법제와 병용해서 제제화 또는 투여할 수 있다.

[0082] 본 발명은 또한, HGF/c-met 신호 전달 축의 조절이상과 연관된 질병 상태를 조정하는데 유용한 방법 및 조성물을 제공한다. 따라서, 한 국면에서 본 발명은 대상체에게, 프로HGF의 HGFA 절단을 억제시킴으로써 c-met 활성화를 조정하는 본 발명의 조정제 분자를 투여하는 것을 포함하는, 이러한 대상체에게서 c-met 활성화를 조정하는 방법을 제공한다. 한 국면에서, 본 발명은 특정 대상체에게, 프로HGF의 HGFA 절단을 억제시킴으로써 c-met 활성화를 억제하는 본 발명의 조정제 분자를 투여하는 것을 포함하는, 이러한 대상체에게서 c-met 활성화와 연관된 병리학적 질환을 치료하는 방법을 제공한다. 한 양태에서는, 본 발명의 조정제 분자가 HGFA와 결합하는 항체이다.

[0083] HGF/c-met 신호 전달 경로는 여러 가지 생물학적 및 생리적 기능, 예를 들어 세포 성장 자극 (예: 세포 증식, 세포 생존, 세포 이동, 세포 형태발생) 및 혈관형성에 관여한다. 따라서, 또 다른 국면에서 본 발명은 세포 또는 조직을 본 발명의 길항제와 접촉시킴으로써, c-met 활성화와 연관된 세포 증식을 억제하는 것을 포함하는, c-met 활성화된 세포 성장 (예: 증식 및/또는 생존)을 억제하는 방법을 제공한다. 또 다른 국면에서, 본 발명은 비정상적인 혈관형성과 연관된 질환이 있는 대상체, 세포 및/또는 조직에게 본 발명의 길항제를 투여함으로써 혈관형성을 억제하는 것을 포함하는, 혈관형성을 억제하는 방법을 제공한다.

[0084] 한 국면에서, 본 발명은 질병, 예를 들어 암, 종양, 세포 증식성 장애, 면역 (예: 자가면역) 질환 및/또는 혈관

형성 관련 장애를 치료적 및/또는 예방적 처치하기 위한 약물을 제조하는데 있어서의, 본 발명의 조정제 분자의 용도를 제공한다.

- [0085] 한 국면에서, 본 발명은 질병, 예를 들어 암, 종양, 세포 증식성 장애, 면역 (예: 자가면역) 질환 및/또는 혈관 형성 관련 장애를 치료적 및/또는 예방적 처치하기 위한 약물을 제조하는데 있어서의, 본 발명의 핵산의 용도를 제공한다.
- [0086] 한 국면에서, 본 발명은 질병, 예를 들어 암, 종양, 세포 증식성 장애, 면역 (예: 자가면역) 질환 및/또는 혈관 형성 관련 장애를 치료적 및/또는 예방적 처치하기 위한 약물을 제조하는데 있어서의, 본 발명의 발현 벡터의 용도를 제공한다.
- [0087] 한 국면에서, 본 발명은 질병, 예를 들어 암, 종양, 세포 증식성 장애, 면역 (예: 자가면역) 질환 및/또는 혈관 형성 관련 장애를 치료적 및/또는 예방적 처치하기 위한 약물을 제조하는데 있어서의, 본 발명의 숙주 세포의 용도를 제공한다.
- [0088] 한 국면에서, 본 발명은 질병, 예를 들어 암, 종양, 세포 증식성 장애, 면역 (예: 자가면역) 질환 및/또는 혈관 형성 관련 장애를 치료적 및/또는 예방적 처치하기 위한 약물을 제조하는데 있어서의, 본 발명의 제조품의 용도를 제공한다.
- [0089] 한 국면에서, 본 발명은 질병, 예를 들어 암, 종양, 세포 증식성 장애, 면역 (예: 자가면역) 질환 및/또는 혈관 형성 관련 장애를 치료적 및/또는 예방적 처치하기 위한 약물을 제조하는데 있어서의, 본 발명의 키트의 용도를 제공한다.
- [0090] 한 국면에서 본 발명은 세포 또는 조직을 유효량의 본 발명의 조정제 분자와 접촉시킴으로써, c-met 활성화와 연관된 세포 증식을 억제하는 것을 포함하는, c-met 활성화된 세포 증식을 억제하는 방법을 제공한다.
- [0091] 한 국면에서, 본 발명은 대상체에게 유효량의 본 발명의 조정제 분자를 투여하는 것을 포함하는, 이러한 대상체에게서 c-met 활성화의 조절이상과 연관된 병리학적 질환을 치료하는 방법을 제공한다.
- [0092] 한 국면에서, 본 발명은 c-met 또는 간세포 성장 인자, 또는 둘 다를 발현하는 세포를 본 발명의 조정제 분자와 접촉시킴으로써, 이러한 세포의 성장 억제를 유발시키는 것을 포함하는, 상기 c-met 또는 간세포 성장 인자, 또는 둘 다를 발현하는 세포의 성장을 억제하는 방법을 제공한다. 한 양태에서는, 상기 세포가 (예를 들어, 주변 분비 효과를 통하여) 상이한 세포에 의해 발현된 HGF와 접촉한다.
- [0093] 한 국면에서, 본 발명은 c-met 또는 간세포 성장 인자, 또는 둘 다를 발현하는 세포를 포함하는 암성 종양이 있는 포유류에게, 유효량의 본 발명의 조정제 분자를 투여함으로써, 이러한 포유류를 유효하게 치료하는 것을 포함하는, 상기 포유류를 치료적으로 치료하는 방법을 제공한다. 한 양태에서는, 상기 세포가 (예를 들어, 주변 분비 효과를 통하여) 상이한 세포에 의해 발현된 HGF와 접촉한다.
- [0094] 한 국면에서, 본 발명은 치료를 필요로 하는 대상체에게 유효량의 본 발명의 조정제 분자를 투여함으로써, HGFA의 발현 또는 활성 증가와 연관된 세포 증식성 장애를 유효하게 치료 또는 예방하는 것을 포함하는, 이러한 세포 증식성 장애를 치료 또는 예방하는 방법을 제공한다. 한 양태에서는, 상기 증식성 장애가 암이다.
- [0095] 한 국면에서, 본 발명은 치료를 필요로 하는 대상체에게 유효량의 본 발명의 조정제 분자를 투여함으로써, c-met 또는 간세포 성장 인자, 또는 둘 다의 발현 또는 활성 증가와 연관된 세포 증식성 장애를 유효하게 치료 또는 예방하는 것을 포함하는, 이러한 세포 증식성 장애를 치료 또는 예방하는 방법을 제공한다. 한 양태에서는, 상기 증식성 장애가 암이다.
- [0096] 한 국면에서, 본 발명은 세포를 유효량의 본 발명의 조정제 분자와 접촉시킴으로써, 이러한 세포의 성장을 억제하는 것을 포함하는, 상기 세포의 성장을 억제하는 방법 (이러한 세포의 성장은 적어도 부분적으로는, HGFA의 성장 증강 효과에 좌우된다)을 제공한다. 한 양태에서는, 상기 세포가 (예를 들어, 주변분비 효과를 통하여) 상이한 세포에 의해 발현된 HGF와 접촉한다.
- [0097] 한 국면에서, 본 발명은 세포를 유효량의 본 발명의 조정제 분자와 접촉시킴으로써, 이러한 세포의 성장을 억제하는 것을 포함하는, 상기 세포의 성장을 억제하는 방법 (이러한 세포의 성장은 적어도 부분적으로는, c-met 또는 간세포 성장 인자, 또는 둘 다의 성장 증강 효과에 좌우된다)을 제공한다. 한 양태에서는, 상기 세포가 (예를 들어, 주변분비 효과를 통하여) 상이한 세포에 의해 발현된 HGF와 접촉한다.
- [0098] 한 국면에서, 본 발명은 세포를 유효량의 본 발명의 조정제 분자와 접촉시킴으로써, 종양을 유효하게 치료하는

것을 포함하는, 포유류에서 종양을 치료적으로 처치하는 방법 (이러한 종양의 성장은 적어도 부분적으로는, HGFA의 성장 증강 효과에 좌우된다)을 제공한다. 한 양태에서는, 상기 세포가 (예를 들어, 주변분비 효과를 통하여) 상이한 세포에 의해 발현된 HGF와 접촉한다.

[0099] 한 국면에서, 본 발명은 세포를 유효량의 본 발명의 조정제 분자와 접촉시킴으로써, 종양을 유효하게 처치하는 것을 포함하는, 포유류에서 종양을 치료적으로 처치하는 방법 (이러한 종양의 성장은 적어도 부분적으로는, c-met 또는 간세포 성장 인자, 또는 둘 다의 성장 증강 효과에 좌우된다)을 제공한다. 한 양태에서는, 상기 세포가 (예를 들어, 주변분비 효과를 통하여) 상이한 세포에 의해 발현된 HGF와 접촉한다.

[0100] 본 발명의 방법을 사용하여, 예를 들어 HGF의 HGFA 활성화와 연관된 HGF 활성 증가를 통하여, 적합한 어떠한 병리학적 상태, 예를 들어 HGF/c-met 신호 전달 경로의 조절이상과 연관된 세포 및/또는 조직에 영향을 미칠 수 있다. 한 양태에서는, 본 발명의 방법에서 표적화되는 세포가 암 세포이다. 예를 들어, 암 세포는 유방암 세포, 결장직장암 세포, 폐암 세포, 유두암종 세포 (예: 갑상선의 유두암종 세포), 결장암 세포, 췌장암 세포, 난소암 세포, 자궁경부암 세포, 중추 신경계암 세포, 골원성 육종 세포, 신 암종 세포, 간세포 암종 세포, 방광암 세포, 전립선암 세포, 위 암종 세포, 두경부 편평 암종 세포, 흑색종 세포 및 백혈병 세포로 이루어진 군 중에서 선택된 것일 수 있다. 한 양태에서는, 본 발명의 방법에서 표적화되는 세포가 과증식성 및/또는 과형성성 세포이다. 한 양태에서는, 본 발명의 방법에서 표적화되는 세포가 이형성성 세포이다. 또 다른 양태에서는, 본 발명의 방법에서 표적화되는 세포가 전이성 세포이다.

[0101] 본 발명의 방법은 부가의 치료 단계를 추가로 포함할 수 있다. 예를 들어, 한 양태에서는, 본 발명의 방법이 표적화된 세포 및/또는 조직 (예: 암 세포)을 방사선 처치 또는 화학요법에 노출시키는 단계를 추가로 포함한다.

[0102] 본원에 기재된 바와 같이, HGF/c-met 활성화는 중요한 생물학적 과정인데, 이러한 과정의 조절에 이상이 오면 수 많은 병리학적 질환이 유발된다. 따라서, 본 발명의 방법의 한 양태에서는 표적화되는 세포 (예: 암 세포)가, HGF/c-met의 활성화가 동일한 조직 기원의 정상 세포와 비교해서 증강되는 세포이다. 한 양태에서는, 본 발명의 방법이 표적화된 세포의 사멸을 유발시킨다. 예를 들어, 본 발명의 조정제 분자와 접촉시키면, 세포가 c-met 경로를 통하여 신호를 전달할 수 없게 되므로, 세포 사멸을 유발시킬 수 있다.

[0103] c-met 활성화 (및 이에 따른 신호 전달)의 조절이상은 수 많은 세포성 변화, 예를 들어 HGF (c-met의 동족 리간드) 및/또는 HGFA의 과발현 및/또는 HGFA에 의한 HGF의 활성화 증가로부터 비롯될 수 있다. 따라서, 몇몇 양태에서 본 발명의 방법은 HGFA, c-met 및 간세포 성장 인자 중의 하나 이상이 동일한 기원의 정상 조직과 비교해서 보다 풍부하게 발현되고/되거나 존재하는 조직 (예: 암)을 표적화하는 것을 포함한다. HGF 또는 c-met-발현성 세포는 각종 공급원으로부터, 즉 자가분비 또는 주변분비 방식으로 HGFA에 의해 조절될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 방법의 한 양태에서는, 표적화된 세포가 (예를 들어, 주변분비 효과를 통하여) 상이한 세포에 의해 발현된 HGFA에 의해 활성화된 간세포 성장 인자와 접촉/결합한다. 상기 상이한 세포는 동일하거나 상이한 조직 기원의 세포일 수 있다. 한 양태에서는, 표적화된 세포가 (예를 들어, 자가분비 효과/루프를 통하여) 표적화된 세포 그 자체에 의해 발현된 HGFA에 의해 활성화된 HGF와 접촉/결합한다.

[0104] 한 국면에서, 본 발명은 본 발명의 하나 이상의 조정제 분자와, 담체를 포함하는 조성물을 제공한다. 한 양태에서는, 담체가 제약상 허용 가능하다.

[0105] 한 국면에서, 본 발명은 본 발명의 조정제 분자를 코딩하는 핵산을 제공한다. 한 양태에서는, 본 발명의 핵산이 항체 또는 그의 단편이거나 이를 포함하는 조정제 분자를 코딩한다.

[0106] 한 국면에서, 본 발명은 본 발명의 핵산을 포함하는 벡터를 제공한다.

[0107] 한 국면에서, 본 발명은 본 발명의 핵산 또는 벡터를 포함하는 숙주 세포를 제공한다. 벡터는 어떠한 유형의 벡터, 예를 들어 발현 벡터와 같은 재조합 벡터일 수 있다. 각종 숙주 세포를 사용할 수 있다. 한 양태에서는, 숙주 세포가 원핵 세포, 예를 들어 이. 콜라이 (*E. coli*)이다. 한 양태에서는, 숙주 세포가 진핵 세포, 예를 들어 포유류 세포 [예: 중국산 햄스터 난소 (CHO) 세포]이다.

[0108] 한 국면에서, 본 발명은 본 발명의 조정제 분자의 제조 방법을 제공한다. 예를 들어, 본 발명은 항체 (또는 그의 단편)을 코딩하는 본 발명의 재조합 벡터를 적합한 숙주 세포에서 발현시키고, 이러한 항체를 회수하는 것을 포함하는, 상기 항체 (또는 그의 단편)이거나 이를 포함하는 조정제 분자를 제조하는 방법을 제공한다.

[0109] 한 국면에서, 본 발명은 용기; 및 이러한 용기 내에 함유된 조성물 (이러한 조성물은 본 발명의 하나 이상의 조

정제 분자를 포함한다)을 포함하는 제조품을 제공한다. 한 양태에서는, 상기 조성물이 본 발명의 핵산을 포함한다. 한 양태에서는, 조정제 분자를 포함하는 조성물이 담체 (몇몇 양태에서는, 제약상 허용 가능하다)를 추가로 포함한다. 한 양태에서는, 본 발명의 제조품이 이러한 조성물 (예를 들어, 조정제 분자)을 대상체에게 투여하는 것에 관한 지시 사항을 추가로 포함한다.

[0110] 한 국면에서, 본 발명은 본 발명의 하나 이상의 조정제 분자를 포함하는 조성물을 포함하는 제1 용기와, 완충제를 포함하는 제2 용기를 포함하는 키트를 제공한다. 한 양태에서는, 완충제가 제약상 허용 가능하다. 한 양태에서는, 조정제 분자를 포함하는 조성물이 담체 (몇몇 양태에서는, 제약상 허용 가능하다)를 추가로 포함한다. 한 양태에서는, 키트가 이러한 조성물 (예를 들어, 조정제 분자)을 대상체에게 투여하는 것에 관한 지시 사항을 추가로 포함한다.

[0111] 한 국면에서, 본 발명은 시험용 조직 세포 샘플을 본 발명의 항체와 접촉시켜 이러한 샘플 중의 HGFA의 수준을 결정함으로써, 항체에 의해 결합된 HGFA가 샘플 중의 HGFA의 존재 및/또는 양을 표시하는 것을 포함하는, 질병을 진단하는 방법을 제공한다. 또 다른 국면에서, 본 발명은 시험용 조직 세포 샘플을 본 발명의 항체와 접촉시켜 이러한 시험용 샘플 중의 HGFA의 수준을 결정함으로써, 샘플 중에 존재하는 HGFA의 양을 결정하는 것을 포함하는 (시험용 샘플 중의 HGFA의 수준이 시험용 샘플과 동일한 세포 기원의 정상 조직을 포함하는 대조군 샘플과 비교해서 더 높다는 것은, 개개인이 질병에 걸릴 위험이 있다는 지표이다), 개개인이 질병에 걸릴 위험이 있는지를 결정하는 방법을 제공한다. 본 발명의 방법의 한 양태에서는, 시험용 샘플 중의 항체에 의해 결합된 HGFA의 양에 의해 표시된 HGFA 폴리펩티드의 양에 기초하여 HGFA의 수준을 결정한다. 상기 방법에 이용된 항체는 임의로, 탐지 가능하게 표시시키거나, 고체 지지체에 부착할 수 있다.

[0112] 한 국면에서, 본 발명은 본 발명의 항체를 체액 (예: 혈액)에 존재하는 HGFA에 결합시키는 방법을 제공한다.

[0113] 또 다른 국면에서, 본 발명은 본 발명의 항체가 HGFA와 결합하고 이들 사이에 결합이 이루어지도록 하는데 적합한 조건 하에, HGFA를 발현하고/하거나 HGFA에 대해 반응성인 세포를 상기 항체와 접촉시키는 것을 포함하는, 본 발명의 항체를, HGFA를 발현하고/하거나 HGFA에 대해 반응성인 세포와 결합시키는 방법에 관한 것이다. 한 양태에서는, 상기 항체가 세포 상의 HGFA와 결합하면, HGFA 생물학적 기능이 억제된다. 한 양태에서는, 상기 항체가 HGFA와 그의 기질 분자와의 상호 작용을 억제하지 않는다. 한 양태에서는, 상기 항체가 세포 상의 HGFA 분자와 결합하고, 또 다른 분자 (예: 프로-HGF)가 HGFA 분자와 결합하는 것을 억제한다.

[0114] 한 국면에서, 본 발명은 숙주에게, 본 발명의 항체와 연결되는 형태의 치료제를 투여함으로써, 이러한 치료제를 숙주 내의 HGFA-관련된 조직으로 표적화하는 것을 포함하는, 상기 치료제를 상기 숙주 내의 HGFA-관련된 조직으로 표적화하는 방법을 제공한다. 한 양태에서는, HGFA와 결합하는 항체가 세포 (시험관내 또는 생체내) 상에 위치한 HGFA와 특이적으로 결합할 수 있는데, 예를 들어 HGFA가 세포 표면 상에 존재한다.

발명의 상세한 설명

[0127] 발명의 실시 방식

[0128] 본 발명은 간세포 성장 인자 활성화제 기능의 조정제를 포함하는 방법, 조성물, 키트 및 제조품 (이러한 조정제의 사용 방법 포함)을 제공한다.

[0129] 이들 방법, 조성물, 키트 및 제조품에 관한 상세 내역이 본원에 제공된다.

[0130] 일반적인 기술

[0131] 본 발명의 실시는 달리 언급되지 않는 한, 당해 분야의 기술 수준 내에 있는 통상적인 분자 생물학 기술 (재조합 기술 포함), 미생물학, 세포 생물학, 생화학 및 면역학 기술을 이용할 것이다. 이러한 기술은, 예를 들어 다음 문헌에 보다 상세히 설명되어 있다 [참고: "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", second edition (Sambrook et al., 1989); "Oligonucleotide Synthesis" (M. J. Gait, ed., 1984); "Animal Cell Culture" (R. I. Freshney, ed., 1987); "Methods in Enzymology" (Academic Press, Inc.); "Current Protocols in Molecular Biology" (F. M. Ausubel et al., eds., 1987, and periodic updates); "PCR: The Polymerase Chain Reaction", (Mullis et al., ed., 1994); "A Practical Guide to Molecular Cloning" (Perbal Bernard V., 1988); "Phage Display: A Laboratory Manual" (Barbas et al., 2001)].

[0132] 정의

[0133] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "간세포 성장 인자 활성화제" 또는 "HGFA"는 야생형 HGFA와 유사한 방식으로 프

로HGFA 절단할 수 있는 천연 서열 폴리펩티드, 폴리펩티드 변이체, 및 천연 서열 폴리펩티드 및 폴리펩티드 변이체의 단편 (본원에 추가로 정의된다)을 포괄한다. 본원에 기재된 HGFA 폴리펩티드는 각종 공급원, 예를 들어 인간 조직 유형 또는 또 다른 공급원으로부터 분리되거나, 또는 재조합 또는 합성 방법에 의해 제조되는 것일 수 있다. 용어 "HGFA", "HGFA 폴리펩티드", "HGFA 효소", 및 "HGFA 단백질"에는 또한, 본원에 기재된 바와 같은 HGFA 폴리펩티드의 변이체가 포함된다.

[0134] "천연 서열 HGFA 폴리펩티드"는 천연으로부터 유래된 상응하는 HGFA 폴리펩티드와 동일한 아미노산 서열 (예: 도 7에 제시된 서열)을 갖는 폴리펩티드를 포함한다. 한 양태에서는, 천연 서열 HGFA 폴리펩티드가 서열 1의 아미노산 서열 (도 7 참고; 상단 서열)을 포함한다. 이러한 천연 서열 HGFA 폴리펩티드는 천연으로부터 분리할 수 있거나, 또는 재조합 또는 합성 수단에 의해 생성될 수 있다. 용어 "천연 서열 HGFA 폴리펩티드"에는 구체적으로, 특이적 HGFA 폴리펩티드의 천연 발생적 절단 또는 분비된 형태 (예: 세포의 도메인 서열), 상기 폴리펩티드의 천연 발생적 변이체 형태 (예: 대체 스플라이싱된 형태) 및 천연 발생적 대립유전자성 변이체가 포괄된다.

[0135] "HGFA 폴리펩티드 변이체", 또는 그의 변이물은 본원에 기재된 바와 같은 천연 서열 HGFA 폴리펩티드 서열과의 아미노산 서열 동일률이 약 80% 이상인 것으로 본원에 정의된 바와 같은 HGFA 폴리펩티드, 일반적으로 활성 HGFA 폴리펩티드를 의미한다. 이러한 HGFA 폴리펩티드 변이체에는, 예를 들어 하나 이상의 아미노산 잔기가 천연 아미노산 서열의 N- 또는 C-말단에 부가되거나 결실된 HGFA 폴리펩티드가 포함된다. 통상적으로, HGFA 폴리펩티드 변이체는 본원에 기재된 바와 같은 천연 서열 HGFA 폴리펩티드 서열과의 아미노산 서열 동일률이 약 80% 이상, 또 다른 한편으로는 약 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 이상일 것이다. 통상적으로, HGFA 폴리펩티드 변이체는 길이가 약 10개 이상 아미노산, 또 다른 한편으로는 길이가 약 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 510, 520, 530, 540, 550, 560, 570, 580, 590, 600개 이상 아미노산이다. 임의로, HGFA 폴리펩티드 변이체는 천연 HGFA 폴리펩티드 서열과 비교해서 1개 이하의 보존적 아미노산 치환, 또 다른 한편으로는 천연 HGFA 폴리펩티드 서열과 비교해서 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10개 이하의 보존적 아미노산 치환을 지닐 것이다.

[0136] 펩티드 또는 폴리펩티드 서열과 관련한 "아미노산 서열 동일률 (%)"은 서열들을 정렬하고 필요한 경우 갭을 도입하여 최대 서열 동일률을 달성하며, 서열 동일성의 일부로서 어떠한 보존적 치환도 고려하지 않은 후에, 특이적 펩티드 또는 폴리펩티드 서열 내의 아미노산 잔기와 동일한 후보 서열 내의 아미노산 잔기 비율 (%)로서 규정된다. 아미노산 서열 동일률 (%)을 결정하기 위한 정렬은 예를 들어, 공개적으로 입수 가능한 컴퓨터 소프트웨어, 예를 들어 BLAST, BLAST-2, ALIGN, 또는 메갈라인 (Megalign) (DNASTAR) 소프트웨어를 사용하여 당해 분야의 기술 수준 내의 각종 방식으로 달성할 수 있다. 당업자는 정렬을 측정하기에 적당한 파라미터를 결정할 수 있는데, 이에에는 비교하고자 하는 완전한 길이의 서열 전반에 걸쳐 최대 정렬을 달성하는데 필요한 모든 알고리즘이 포함된다. 그러나, 본원의 목적상 아미노산 서열 동일률 (%) 값은 서열 비교용 컴퓨터 프로그램 ALIGN-2를 사용하여 생성시키는데, ALIGN-2 프로그램에 대한 완전한 원시 코드는 다음 표 A에 제공된다. ALIGN-2 서열 비교용 컴퓨터 프로그램은 제넨테크, 인코포레이티드 (Genentech, Inc.)에 의해 만들어졌고, 다음 표 A에 나타난 원시 코드는 미국 저작권국 (U.S. Copyright Office, Washington D.C., 20559)에 사용자 문서로 출원되었는데, 이는 미국 저작 등록 번호 TXU510087로 등록되었다. ALIGN-2 프로그램은 제넨테크, 인코포레이티드 (소재지: South San Francisco, California)를 통하여 공개적으로 입수 가능하거나, 또는 다음 도 8에 제공된 원시 코드로부터 편집할 수 있다. ALIGN-2 프로그램은 UNIX 작동 시스템, 바람직하게는 디지털 UNIX V4.0D 상에서 사용하도록 편집되어야 한다. 모든 서열 비교 파라미터가 ALIGN-2 프로그램에 의해 설정되고 이는 달라지지 않는다.

[0137] 아미노산 서열 비교를 위해 ALIGN-2를 이용하는 상황 하에서는, 소정의 아미노산 서열 B에 대한, 이와와 또는 이에 대향한 소정의 아미노산 서열 A의 아미노산 서열 동일률 (%) (달리 언급하면, 소정의 아미노산 서열 B에 대한, 이와와 또는 이에 대향한 특정의 아미노산 서열 동일률 (%))을 갖거나 포함하는 소정의 아미노산 서열 A로서 표현될 수 있다)은 다음과 같이 계산한다:

[0138] $100 \times \text{분율 } X/Y$

[0139] 상기에서, X는 A와 B의 프로그램 정렬에서 서열 정렬 프로그램 ALIGN-2에 의해 동일한 대응물로서 점수가 매겨진 아미노산 잔기의 수이고; Y는 B 중의 아미노산 잔기의 총 수이다. 아미노산 서열 A의 길이가 아미노산 서열

B의 길이와 동일하지 않은 경우에는, B에 대한 A의 아미노산 서열 동일률 (%)이 A에 대한 B의 아미노산 서열 동일률 (%)과 동등하지 않다는 것을 인지해야 할 것이다.

[0140] 달리 구체적으로 언급되지 않는 한, 본원에서 사용된 모든 아미노산 서열 동일률 (%) 값은 ALIGN-2 컴퓨터 프로그램을 사용하여 바로 앞 단락에서 기재된 바와 같이 수득한다.

표 A

```
/*
*
* C-C increased from 12 to 15
* Z is average of EQ
* B is average of ND
* match with stop is _M; stop-stop = 0; J (joker) match = 0
*/
#define _M    -8    /* value of a match with a stop */

int    _day[26][26] = {
/*    A B C D E F G H I J K L M N O P Q R S T U V W X Y Z */
/* A */    { 2, 0, -2, 0, 0, -4, 1, -1, -1, 0, -1, -2, -1, 0, _M, 1, 0, -2, 1, 1, 0, 0, -6, 0, -3, 0},
/* B */    { 0, 3, -4, 3, 2, -5, 0, 1, -2, 0, 0, -3, -2, 2, _M, -1, 1, 0, 0, 0, 0, -2, -5, 0, -3, 1},
/* C */    {-2, -4, 15, -5, -5, -4, -3, -3, -2, 0, -5, -6, -5, -4, _M, -3, -5, -4, 0, -2, 0, -2, -8, 0, 0, -5},
/* D */    { 0, 3, -5, 4, 3, -6, 1, 1, -2, 0, 0, -4, -3, 2, _M, -1, 2, -1, 0, 0, 0, -2, -7, 0, -4, 2},
/* E */    { 0, 2, -5, 3, 4, -5, 0, 1, -2, 0, 0, -3, -2, 1, _M, -1, 2, -1, 0, 0, 0, -2, -7, 0, -4, 3},
/* F */    {-4, -5, -4, -6, -5, 9, -5, -2, 1, 0, -5, 2, 0, -4, _M, -5, -5, -4, -3, -3, 0, -1, 0, 0, 7, -5},
/* G */    { 1, 0, -3, 1, 0, -5, 5, -2, -3, 0, -2, -4, -3, 0, _M, -1, -1, -3, 1, 0, 0, -1, -7, 0, -5, 0},
/* H */    {-1, 1, -3, 1, 1, -2, -2, 6, -2, 0, 0, -2, -2, 2, _M, 0, 3, 2, -1, -1, 0, -2, -3, 0, 0, 2},
/* I */    {-1, -2, -2, -2, -2, 1, -3, -2, 5, 0, -2, 2, 2, -2, _M, -2, -2, -2, -1, 0, 0, 4, -5, 0, -1, -2},
/* J */    { 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, _M, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0},
/* K */    {-1, 0, -5, 0, 0, -5, -2, 0, -2, 0, 5, -3, 0, 1, _M, -1, 1, 3, 0, 0, 0, -2, -3, 0, -4, 0},
/* L */    {-2, -3, -6, -4, -3, 2, -4, -2, 2, 0, -3, 6, 4, -3, _M, -3, -2, -3, -3, -1, 0, 2, -2, 0, -1, -2},
/* M */    {-1, -2, -5, -3, -2, 0, -3, -2, 2, 0, 0, 4, 6, -2, _M, -2, -1, 0, -2, -1, 0, 2, -4, 0, -2, -1},
```

```

/* N */    { 0, 2,-4, 2, 1,-4, 0, 2,-2, 0, 1,-3,-2, 2,_M,-1, 1, 0, 1, 0, 0,-2,-4, 0,-2, 1},
/* O */    { _M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,
0,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M},
/* P */    { 1,-1,-3,-1,-1,-5,-1, 0,-2, 0,-1,-3,-2,-1,_M, 6, 0, 0, 1, 0, 0,-1,-6, 0,-5, 0},
/* Q */    { 0, 1,-5, 2, 2,-5,-1, 3,-2, 0, 1,-2,-1, 1,_M, 0, 4, 1,-1,-1, 0,-2,-5, 0,-4, 3},
/* R */    { -2, 0,-4,-1,-1,-4,-3, 2,-2, 0, 3,-3, 0, 0,_M, 0, 1, 6, 0,-1, 0,-2, 2, 0,-4, 0},
/* S */    { 1, 0, 0, 0, 0,-3, 1,-1,-1, 0, 0,-3,-2, 1,_M, 1,-1, 0, 2, 1, 0,-1,-2, 0,-3, 0},
/* T */    { 1, 0,-2, 0, 0,-3, 0,-1, 0, 0, 0,-1,-1, 0,_M, 0,-1,-1, 1, 3, 0, 0,-5, 0,-3, 0},
/* U */    { 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0,_M, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0},
/* V */    { 0,-2,-2,-2,-2,-1,-1,-2, 4, 0,-2, 2, 2,-2,_M,-1,-2,-2,-1, 0, 0, 4,-6, 0,-2,-2},
/* W */    { -6,-5,-8,-7,-7, 0,-7,-3,-5, 0,-3,-2,-4,-4,_M,-6,-5, 2,-2,-5, 0,-6,17, 0, 0,-6},
/* X */    { 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0,_M, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0},
/* Y */    { -3,-3, 0,-4,-4, 7,-5, 0,-1, 0,-4,-1,-2,-2,_M,-5,-4,-4,-3,-3, 0,-2, 0, 10,-4},
/* Z */    { 0, 1,-5, 2, 3,-5, 0, 2,-2, 0, 0,-2,-1, 1,_M, 0, 3, 0, 0, 0, 0,-2,-6, 0,-4, 4}
};

/*
*/

#include <stdio.h>
#include <ctype.h>

#define MAXJMP      16      /* max jumps in a diag */
#define MAXGAP      24      /* don't continue to penalize gaps larger than this */
#define JMPS        1024    /* max jmps in an path */
#define MX          4       /* save if there's at least MX-1 bases since last jmp */

#define DMAT        3       /* value of matching bases */
#define DMIS        0       /* penalty for mismatched bases */
#define DINS0       8       /* penalty for a gap */
#define DINS1       1       /* penalty per base */
#define PINS0       8       /* penalty for a gap */
#define PINS1       4       /* penalty per residue */

struct jmp {
    short            n[MAXJMP]; /* size of jmp (neg for dely) */
    unsigned short x[MAXJMP]; /* base no. of jmp in seq x */
};

```

```

);                                /* limits seq to 2^16 -1 */

struct diag {
    int      score;      /* score at last jmp */
    long     offset;     /* offset of prev block */
    short    ijmp;       /* current jmp index */
    struct jmp jp;       /* list of jmps */
};

struct path {
    int      spc;        /* number of leading spaces */
    short    n[JMPs];    /* size of jmp (gap) */
    int      x[JMPs];    /* loc of jmp (last elem before gap) */
};

char        *ofile;      /* output file name */
char        *namex[2];   /* seq names: getseqs() */
char        *prog;       /* prog name for err msgs */
char        *seqx[2];    /* seqs: getseqs() */
int         dmax;        /* best diag: nw() */
int         dmax0;       /* final diag */
int         dna;         /* set if dna: main() */
int         endgaps;     /* set if penalizing end gaps */
int         gapx, gapy;   /* total gaps in seqs */
int         len0, len1;   /* seq lens */
int         ngapx, ngapy; /* total size of gaps */
int         smax;        /* max score: nw() */
int         *xbm;        /* bitmap for matching */
long        offset;      /* current offset in jmp file */
struct diag *dx;         /* holds diagonals */
struct path pp[2];       /* holds path for seqs */

char        *calloc(), *malloc(), *index(), *strcpy();
char        *getseq(), *g_calloc();

```

[0143]

```

/* Needleman-Wunsch alignment program
*
* usage: progs file1 file2
* where file1 and file2 are two dna or two protein sequences.
* The sequences can be in upper- or lower-case and may contain ambiguity
* Any lines beginning with ';', '>' or '<' are ignored
* Max file length is 65535 (limited by unsigned short x in the jmp struct)
* A sequence with 1/3 or more of its elements ACGTU is assumed to be DNA
* Output is in the file "align.out"
*
* The program may create a tmp file in /tmp to hold info about traceback.
* Original version developed under BSD 4.3 on a vax 8650
*/
#include "nw.h"
#include "day.h"

static _dbval[26] = {
    1,14,2,13,0,0,4,11,0,0,12,0,3,15,0,0,0,5,6,8,8,7,9,0,10,0
};

static _pbval[26] = {
    1, 2[(1<<('D'-'A'))](1<<('N'-'A')), 4, 8, 16, 32, 64,
    128, 256, 0xFFFFFFFF, 1<<10, 1<<11, 1<<12, 1<<13, 1<<14,
    1<<15, 1<<16, 1<<17, 1<<18, 1<<19, 1<<20, 1<<21, 1<<22,
    1<<23, 1<<24, 1<<25[(1<<('E'-'A'))](1<<('Q'-'A'))
};

main(ac, av)                                main
{
    int    ac;
    char   *av[];

    prog = av[0];
    if (ac != 3) {

```

[0144]

```

    fprintf(stderr, "usage: %s file1 file2\n", prog);
    fprintf(stderr, "where file1 and file2 are two dna or two protein sequences.\n");
    fprintf(stderr, "The sequences can be in upper- or lower-case\n");
    fprintf(stderr, "Any lines beginning with ';' or '<' are ignored\n");
    fprintf(stderr, "Output is in the file 'align.out'\n");
    exit(1);
}
namex[0] = av[1];
namex[1] = av[2];
seqx[0] = getseq(namex[0], &len0);
seqx[1] = getseq(namex[1], &len1);
xbm = (dna)? _dbval : _pbval;

endgaps = 0;          /* 1 to penalize endgaps */
ofile = "align.out";  /* output file */

nw();                /* fill in the matrix, get the possible jmps */
readjmps();          /* get the actual jmps */
print();             /* print stats, alignment */

cleanup(0);          /* unlink any tmp files */
}

/* do the alignment, return best score: main()
* dna: values in Fitch and Smith, PNAS, 80, 1382-1386, 1983
* pro: PAM 250 values
* When scores are equal, we prefer mismatches to any gap, prefer
* a new gap to extending an ongoing gap, and prefer a gap in seqx
* to a gap in seq y.
*/
nw()                                nw
{
    char      *px, *py;              /* seqs and ptrs */
    int       *ndely, *dely;         /* keep track of dely */

```

[0145]

```

int      ndelx, delx;    /* keep track of delx */
int      *tmp;           /* for swapping row0, row1 */
int      mis;            /* score for each type */
int      ins0, ins1;     /* insertion penalties */
register  id;             /* diagonal index */
register  ij;             /* jmp index */
register  *col0, *col1;   /* score for curr, last row */
register  xx, yy;        /* index into seqs */

dx = (struct diag *)g_calloc("to get diags", len0+len1+1, sizeof(struct diag));

ndely = (int *)g_calloc("to get ndely", len1+1, sizeof(int));
dely = (int *)g_calloc("to get dely", len1+1, sizeof(int));
col0 = (int *)g_calloc("to get col0", len1+1, sizeof(int));
col1 = (int *)g_calloc("to get col1", len1+1, sizeof(int));
ins0 = (dna)? DINS0 : PINS0;
ins1 = (dna)? DINS1 : PINS1;

smax = -10000;
if (endgaps) {
    for (col0[0] = dely[0] = -ins0, yy = 1; yy <= len1; yy++) {
        col0[yy] = dely[yy] = col0[yy-1] - ins1;
        ndely[yy] = yy;
    }
    col0[0] = 0;    /* Waterman Bull Math Biol 84 */
}
else
    for (yy = 1; yy <= len1; yy++)
        dely[yy] = -ins0;

/* fill in match matrix
*/
for (px = seqx[0], xx = 1; xx <= len0; px++, xx++) {
    /* initialize first entry in col
    */
    if (endgaps) {

```

[0146]

```

    if (xx == 1)
        col1[0] = delx = -(ins0+ins1);
    else
        col1[0] = delx = col0[0] - ins1;
    ndelx = xx;
}
else {
    col1[0] = 0;
    delx = -ins0;
    ndelx = 0;
}

...nw

for (py = seqx[1], yy = 1; yy <= len1; py++, yy++) {
    mis = col0[yy-1];
    if (dna)
        mis += (xbm[*px-'A']&xbm[*py-'A'])? DMAT : DMIS;
    else
        mis += _day[*px-'A'][*py-'A'];

    /* update penalty for del in x seq;
     * favor new del over ongong del
     * ignore MAXGAP if weighting endgaps
     */
    if (endgaps || ndely[yy] < MAXGAP) {
        if (col0[yy] - ins0 >= dely[yy]) {
            dely[yy] = col0[yy] - (ins0+ins1);
            ndely[yy] = 1;
        } else {
            dely[yy] -= ins1;
            ndely[yy]++;
        }
    } else {
        if (col0[yy] - (ins0+ins1) >= dely[yy]) {
            dely[yy] = col0[yy] - (ins0+ins1);

```

[0147]

```

        ndely[yy] = 1;
    } else
        ndely[yy]++;
}

/* update penalty for del in y seq;
 * favor new del over ongong del
 */
if (endgaps || ndelx < MAXGAP) {
    if (col1[yy-1] - ins0 >= delx) {
        delx = col1[yy-1] - (ins0+ins1);
        ndelx = 1;
    } else {
        delx -= ins1;
        ndelx++;
    }
} else {
    if (col1[yy-1] - (ins0+ins1) >= delx) {
        delx = col1[yy-1] - (ins0+ins1);
        ndelx = 1;
    } else
        ndelx++;
}

/* pick the maximum score; we're favoring
 * mis over any del and delx over dely
 */

```

...nw

```
id = xx - yy + len1 - 1;
```

[0148]

```

if (mis >= delx && mis >= dely[yy])
    col1[yy] = mis;
else if (delx >= dely[yy]) {
    col1[yy] = delx;
    ij = dx[id].ijmp;
    if (dx[id].jp.n[0] && (!dna || (ndelx >= MAXJMP
    && xx > dx[id].jp.x[ij]+MX) || mis > dx[id].score+DINS0)) {
        dx[id].ijmp++;
        if (++ij >= MAXJMP) {
            writejmps(id);
            ij = dx[id].ijmp = 0;
            dx[id].offset = offset;
            offset += sizeof(struct jmp) + sizeof(offset);
        }
        dx[id].jp.n[ij] = ndelx;
        dx[id].jp.x[ij] = xx;
        dx[id].score = delx;
    }
    else {
        col1[yy] = dely[yy];
        ij = dx[id].ijmp;
        if (dx[id].jp.n[0] && (!dna || (ndely[yy] >= MAXJMP
        && xx > dx[id].jp.x[ij]+MX) || mis > dx[id].score+DINS0)) {
            dx[id].ijmp++;
            if (++ij >= MAXJMP) {
                writejmps(id);
                ij = dx[id].ijmp = 0;
                dx[id].offset = offset;
                offset += sizeof(struct jmp) + sizeof(offset);
            }
            dx[id].jp.n[ij] = -ndely[yy];
            dx[id].jp.x[ij] = xx;
            dx[id].score = dely[yy];
        }
    }
}

```

[0149]

```

        if (xx == len0 && yy < len1) {
            /* last col
            */
            if (endgaps)
                col1[yy] -= ins0+ins1*(len1-yy);
            if (col1[yy] > smax) {
                smax = col1[yy];
                dmax = id;
            }
        }
    }
    if (endgaps && xx < len0)
        col1[yy-1] -= ins0+ins1*(len0-xx);
    if (col1[yy-1] > smax) {
        smax = col1[yy-1];
        dmax = id;
    }
    tmp = col0; col0 = col1; col1 = tmp;
}
(void) free((char *)ndely);
(void) free((char *)dely);
(void) free((char *)col0);
(void) free((char *)col1);
}

/*
*
* print() -- only routine visible outside this module
*
* static:
* getmat() -- trace back best path, count matches: print()
* pr_align() -- print alignment of described in array p[]: print()
* dumpblock() -- dump a block of lines with numbers, stars: pr_align()
* nums() -- put out a number line: dumpblock()
* putline() -- put out a line (name, [num], seq, [num]): dumpblock()
* stars() -- put a line of stars: dumpblock()
* stripname() -- strip any path and prefix from a seqname

```

[0150]

```

*/

#include "nw.h"

#define SPC 3
#define P_LINE 256 /* maximum output line */
#define P_SPC 3 /* space between name or num and seq */

extern _day[26][26];
int olen; /* set output line length */
FILE *fx; /* output file */

print()
{
    int lx, ly, firstgap, lastgap; /* overlap */

    if ((fx = fopen(ofile, "w")) == 0) {
        fprintf(stderr, "%s: can't write %s\n", prog, ofile);
        cleanup(1);
    }
    fprintf(fx, "<first sequence: %s (length = %d)\n", namex[0], len0);
    fprintf(fx, "<second sequence: %s (length = %d)\n", namex[1], len1);
    olen = 60;
    lx = len0;
    ly = len1;
    firstgap = lastgap = 0;
    if (dmax < len1 - 1) { /* leading gap in x */
        pp[0].spc = firstgap = len1 - dmax - 1;
        ly -= pp[0].spc;
    }
    else if (dmax > len1 - 1) { /* leading gap in y */
        pp[1].spc = firstgap = dmax - (len1 - 1);
        lx -= pp[1].spc;
    }
    if (dmax0 < len0 - 1) { /* trailing gap in x */
        lastgap = len0 - dmax0 - 1;

```

[0151]

```

        lx -= lastgap;
    }
    else if (dmax0 > len0 - 1) { /* trailing gap in y */
        lastgap = dmax0 - (len0 - 1);
        ly -= lastgap;
    }
    getmat(lx, ly, firstgap, lastgap);
    pr_align();
}

/*
 * trace back the best path, count matches
 */
static
getmat(lx, ly, firstgap, lastgap)                                getmat
    int    lx, ly; /* "core" (minus endgaps) */
    int    firstgap, lastgap; /* leading trailing overlap */
{
    int    nm, i0, i1, siz0, siz1;
    char    outx[32];
    double    pct;
    register    n0, n1;
    register char    *p0, *p1;

    /* get total matches, score
     */
    i0 = i1 = siz0 = siz1 = 0;
    p0 = seqx[0] + pp[1].spc;
    p1 = seqx[1] + pp[0].spc;
    n0 = pp[1].spc + 1;
    n1 = pp[0].spc + 1;

    nm = 0;

```

[0152]

```

while ( *p0 && *p1 ) {
    if (siz0) {
        p1++;
        n1++;
        siz0--;
    }
    else if (siz1) {
        p0++;
        n0++;
        siz1--;
    }
    else {
        if (xbm[*p0-'A']&xbm[*p1-'A'])
            nm++;
        if (n0++ == pp[0].x[i0])
            siz0 = pp[0].n[i0++];
        if (n1++ == pp[1].x[i1])
            siz1 = pp[1].n[i1++];
        p0++;
        p1++;
    }
}

/* pct homology:
 * if penalizing endgaps, base is the shorter seq
 * else, knock off overhangs and take shorter core
 */
if (endgaps)
    lx = (len0 < len1)? len0 : len1;
else
    lx = (lx < ly)? lx : ly;
pct = 100.*((double)nm)/((double)lx);
fprintf(fx, "\n");
fprintf(fx, "<%d match%s in an overlap of %d: %.2f percent similarity\n",
        nm, (nm == 1)? "" : "es", lx, pct);

```

[0153]

```

fprintf(fx, "<gaps in first sequence: %d", gapx);
...getmat
if (gapx) {
    (void) sprintf(outx, " (%d %s%s)",
        ngapx, (dna)? "base": "residue", (ngapx == 1)? "" : "s");
    fprintf(fx, "%s", outx);

    fprintf(fx, ", gaps in second sequence: %d", gapy);
    if (gapy) {
        (void) sprintf(outx, " (%d %s%s)",
            ngapy, (dna)? "base": "residue", (ngapy == 1)? "" : "s");
        fprintf(fx, "%s", outx);
    }
    if (dna)
        fprintf(fx,
            "\n<score: %d (match = %d, mismatch = %d, gap penalty = %d + %d per base)\n",
            smax, DMAT, DMIS, DINS0, DINS1);
    else
        fprintf(fx,
            "\n<score: %d (Dayhoff PAM 250 matrix, gap penalty = %d + %d per residue)\n",
            smax, PINS0, PINS1);
    if (endgaps)
        fprintf(fx,
            "<endgaps penalized. left endgap: %d %s%s, right endgap: %d %s%s\n",
            firstgap, (dna)? "base" : "residue", (firstgap == 1)? "" : "s",
            lastgap, (dna)? "base" : "residue", (lastgap == 1)? "" : "s");
    else
        fprintf(fx, "<endgaps not penalized\n");
}

static nm;          /* matches in core -- for checking */
static lmax;        /* lengths of stripped file names */
static ij[2];       /* jmp index for a path */
static nc[2];       /* number at start of current line */

```

[0154]

```

static      ni[2];          /* current elem number -- for gapping */
static      siz[2];
static char  *ps[2];        /* ptr to current element */
static char  *po[2];        /* ptr to next output char slot */
static char  out[2][P_LINE]; /* output line */
static char  star[P_LINE]; /* set by stars() */

/*
 * print alignment of described in struct path pp[]
 */
static
pr_align()                                pr_align
{
    int      nn;      /* char count */
    int      more;
    register i;

    for (i = 0, lmax = 0; i < 2; i++) {
        nn = stripname(namex[i]);
        if (nn > lmax)
            lmax = nn;

        nc[i] = 1;
        ni[i] = 1;
        siz[i] = ij[i] = 0;
        ps[i] = seqx[i];
        po[i] = out[i];
    }

    for (nn = nm = 0, more = 1; more; ) {                                ...pr_align
        for (i = more = 0; i < 2; i++) {
            /*
             * do we have more of this sequence?
             */
            if (!*ps[i])
                continue;

```

[0155]

```

more++;

if (pp[i].spc) { /* leading space */
    *po[i]++ = ' ';
    pp[i].spc--;
}
else if (siz[i]) { /* in a gap */
    *po[i]++ = '-';
    siz[i]--;
}
else { /* we're putting a seq element
    */
    *po[i] = *ps[i];
    if (islower(*ps[i]))
        *ps[i] = toupper(*ps[i]);
    po[i]++;
    ps[i]++;

    /*
    * are we at next gap for this seq?
    */
    if (ni[i] == pp[i].x[ij[i]]) {
        /*
        * we need to merge all gaps
        * at this location
        */
        siz[i] = pp[i].n[ij[i]]++;
        while (ni[i] == pp[i].x[ij[i]])
            siz[i] += pp[i].n[ij[i]]++;
    }
    ni[i]++;
}
}
if (++nn == olen || !more && nn) {
    dumpblock();
}

```

[0156]

```

        for (i = 0; i < 2; i++)
            po[i] = out[i];
        nn = 0;
    }
}

/*
 * dump a block of lines, including numbers, stars: pr_align()
 */
static
dumpblock()                                dumpblock
{
    register    i;

    for (i = 0; i < 2; i++)
        *po[i]-- = '\0';

    ...dumpblock

    (void) putc('\n', fx);
    for (i = 0; i < 2; i++) {
        if (*out[i] && (*out[i] != ' ' || *(po[i]) != ' ')) {
            if (i == 0)
                nums(i);
            if (i == 0 && *out[1])
                stars();
            putline(i);
            if (i == 0 && *out[1])
                fprintf(fx, star);
            if (i == 1)
                nums(i);
        }
    }
}

```

[0157]

```

/*
 * put out a number line: dumpblock()
 */
static
nums(ix)                                nums
{
    int    ix;    /* index in out[] holding seq line */

    char    nline[P_LINE];
    register    i, j;
    register char    *pn, *px, *py;

    for (pn = nline, i = 0; i < lmax+P_SPC; i++, pn++)
        *pn = ' ';
    for (i = nc[ix], py = out[ix]; *py; py++, pn++) {
        if (*py == ' ' || *py == '-')
            *pn = ' ';
        else {
            if (i%10 == 0 || (i == 1 && nc[ix] != 1)) {
                j = (i < 0)? -i : i;
                for (px = pn; j; j /= 10, px--)
                    *px = j%10 + '0';
                if (i < 0)
                    *px = '-';
            }
            else
                *pn = ' ';
            i++;
        }
    }
    *pn = '\0';
    nc[ix] = i;
    for (pn = nline; *pn; pn++)
        (void) putc(*pn, fx);
    (void) putc('\n', fx);
}

```

[0158]

```

/*
 * put out a line (name, [num], seq, [num]): dumpblock()
 */
static
putline(ix)                               putline
    int    ix;                            {

                                           ...putline

    int     i;
    register char  *px;

    for (px = namex[ix], i = 0; *px && *px != ':'; px++, i++)
        (void) putc(*px, fx);
    for (; i < lmax+P_SPC; i++)
        (void) putc(' ', fx);

    /* these count from 1:
     * ni[] is current element (from 1)
     * nc[] is number at start of current line
     */
    for (px = out[ix]; *px; px++)
        (void) putc(*px&0x7F, fx);
    (void) putc('\n', fx);
}

/*
 * put a line of stars (seqs always in out[0], out[1]): dumpblock()
 */
static
stars()                                   stars
{
    int     i;
    register char  *p0, *p1, cx, *px;

```

[0159]

```

if (!*out[0] || (*out[0] == ' ' && *(po[0]) == ' ') ||
    !*out[1] || (*out[1] == ' ' && *(po[1]) == ' '))
    return;
px = star;
for (i = lmax+P_SPC; i; i--)
    *px++ = ' ';

for (p0 = out[0], p1 = out[1]; *p0 && *p1; p0++, p1++) {
    if (isalpha(*p0) && isalpha(*p1)) {

        if (xbm[*p0-'A'] & xbm[*p1-'A']) {
            cx = '*';
            nm++;
        }
        else if (!dna && _day[*p0-'A'][*p1-'A'] > 0)
            cx = '.';
        else
            cx = ' ';

    }
    else
        cx = ' ';

    *px++ = cx;
}
*px++ = '\n';
*px = '\0';
}

```

```

/*
 * strip path or prefix from pn, return len: pr_align()
 */
static

```

[0160]

```

stripname(pn)
    char    *pn;    /* file name (may be path) */
{
    register char    *px, *py;

    py = 0;
    for (px = pn; *px; px++)
        if (*px == '/')
            py = px + 1;
    if (py)
        (void) strcpy(pn, py);
    return(strlen(pn));
}

/*
 * cleanup() -- cleanup any tmp file
 * getseq() -- read in seq, set dna, len, maxlen
 * g_calloc() -- calloc() with error checkin
 * readjumps() -- get the good jumps, from tmp file if necessary
 * writejumps() -- write a filled array of jumps to a tmp file: nw()
 */
#include "nw.h"
#include <sys/file.h>

char    *jname = "/tmp/homgXXXXXX";    /* tmp file for jumps */
FILE    *fj;

int    cleanup();    /* cleanup tmp file */
long    lseek();

/*
 * remove any tmp file if we blow
 */
cleanup(i)

```

stripname

cleanup

[0161]

```

        int    i;
    {
        if (fj)
            (void) unlink(jname);
        exit(i);
    }

/*
 * read, return ptr to seq, set dna, len, maxlen
 * skip lines starting with ';', '<', or '>'
 * seq in upper or lower case
 */
char *
getseq(file, len)                                getseq
    char    *file; /* file name */
    int     *len; /* seq len */
{
    char    line[1024], *pseq;
    register char    *px, *py;
    int     natgc, tlen;
    FILE    *fp;

    if ((fp = fopen(file, "r")) == 0) {
        fprintf(stderr, "%s: can't read %s\n", prog, file);
        exit(1);
    }
    tlen = natgc = 0;
    while (fgets(line, 1024, fp)) {
        if (*line == ';' || *line == '<' || *line == '>')
            continue;
        for (px = line; *px != '\n'; px++)
            if (isupper(*px) || islower(*px))
                tlen++;
    }
    if ((pseq = malloc((unsigned)(tlen+6))) == 0) {
        fprintf(stderr, "%s: malloc() failed to get %d bytes for %s\n", prog, tlen+6, file);

```

[0162]

```

        exit(1);
    }
    pseq[0] = pseq[1] = pseq[2] = pseq[3] = '\0';

    ...getseq

    py = pseq + 4;
    *len = tlen;
    rewind(fp);

    while (fgets(line, 1024, fp)) {
        if (*line == ';' || *line == '<' || *line == '>')
            continue;
        for (px = line; *px != '\n'; px++) {
            if (isupper(*px))
                *py++ = *px;
            else if (islower(*px))
                *py++ = toupper(*px);
            if (index("ATGCU", *(py-1)))
                natgc++;
        }
    }
    *py++ = '\0';
    *py = '\0';
    (void) fclose(fp);
    dna = natgc > (tlen/3);
    return(pseq+4);
}

char *
g_calloc(msg, nx, sz)                                g_calloc
{
    char *msg;    /* program, calling routine */
    int nx, sz;    /* number and size of elements */

    char *px, *calloc();

```

[0163]

```

        if ((px = calloc((unsigned)nx, (unsigned)sz)) == 0) {
            if (*msg) {
                fprintf(stderr, "%s: g_calloc() failed %s (n=%d, sz=%d)\n", prog, msg, nx,
sz);
                exit(1);
            }
        }
        return(px);
    }

/*
 * get final jmps from dx[] or tmp file, set pp[], reset dmax: main()
 */
readjmps()                                readjmps
{
    int          fd = -1;
    int          siz, i0, i1;
    register     i, j, xx;

    if (fj) {
        (void) fclose(fj);
        if (((fd = open(jname, O_RDONLY, 0)) < 0) {
            fprintf(stderr, "%s: can't open() %s\n", prog, jname);
            cleanup(1);
        }
    }

    for (i = i0 = i1 = 0, dmax0 = dmax, xx = len0; ; i++) {
        while (1) {
            for (j = dx[dmax].ijmp; j >= 0 && dx[dmax].jp.x[j] >= xx; j--)
                ;

            ...readjmps

            if (j < 0 && dx[dmax].offset && fj) {
                (void) lseek(fd, dx[dmax].offset, 0);
                (void) read(fd, (char *)&dx[dmax].jp, sizeof(struct jmp));
            }
        }
    }
}

```

[0164]

```

        (void) read(fd, (char *)&dx[dmax].offset, sizeof(dx[dmax].offset));
        dx[dmax].jmp = MAXJMP-1;
    }
    else
        break;
}
if (i >= JMPS) {
    fprintf(stderr, "%s: too many gaps in alignment\n", prog);
    cleanup(1);
}
if (j >= 0) {
    siz = dx[dmax].jp.n[j];
    xx = dx[dmax].jp.x[j];
    dmax += siz;
    if (siz < 0) { /* gap in second seq */
        pp[1].n[i1] = -siz;
        xx += siz;
        /* id = xx - yy + len1 - 1
        */
        pp[1].x[i1] = xx - dmax + len1 - 1;
        gapy++;
        ngapy -= siz;
/* ignore MAXGAP when doing endgaps */
        siz = (-siz < MAXGAP || endgaps)? -siz : MAXGAP;
        i1++;
    }
    else if (siz > 0) { /* gap in first seq */
        pp[0].n[i0] = siz;
        pp[0].x[i0] = xx;
        gapx++;
        ngapx += siz;
/* ignore MAXGAP when doing endgaps */
        siz = (siz < MAXGAP || endgaps)? siz : MAXGAP;
        i0++;
    }
}
}

```

[0165]

```

        else
            break;
    }

    /* reverse the order of jmps
    */
    for (j = 0, i0--; j < i0; j++, i0--) {
        i = pp[0].n[j]; pp[0].n[j] = pp[0].n[i0]; pp[0].n[i0] = i;
        i = pp[0].x[j]; pp[0].x[j] = pp[0].x[i0]; pp[0].x[i0] = i;
    }
    for (j = 0, i1--; j < i1; j++, i1--) {
        i = pp[1].n[j]; pp[1].n[j] = pp[1].n[i1]; pp[1].n[i1] = i;
        i = pp[1].x[j]; pp[1].x[j] = pp[1].x[i1]; pp[1].x[i1] = i;
    }
    if (fd >= 0)
        (void) close(fd);
    if (fj) {
        (void) unlink(jname);
        fj = 0;
        offset = 0;
    }

}

/*
 * write a filled jmp struct offset of the prev one (if any): nw()
 */
writejumps(ix)                                writejumps
{
    int    ix;

    char    *mktemp();

    if (!fj) {
        if (mktemp(jname) < 0) {
            fprintf(stderr, "%s: can't mktemp() %s\n", prog, jname);
            cleanup(1);
        }

        if ((fj = fopen(jname, "w")) == 0) {
            fprintf(stderr, "%s: can't write %s\n", prog, jname);
            exit(1);
        }
    }

    (void) fwrite((char *)&dx[ix].jp, sizeof(struct jmp), 1, fj);
    (void) fwrite((char *)&dx[ix].offset, sizeof(dx[ix].offset), 1, fj);
}

```

[0166]

[0167]

[0168]

본원에 사용된 바와 같은 용어 "백터"는 이와 연결된 또 다른 핵산을 수송할 수 있는 핵산 분자를 지칭한다. 한 가지 유형의 백터가 "플라스미드"인데, 이는 부가의 DNA 절편을 연결시킬 수 있는 환상 이중 가닥 DNA 루프를 지칭한다. 또 다른 유형의 백터는 파아지 (phage) 백터이다. 또 다른 유형의 백터는 바이러스성 백터인데, 여기서는 부가의 DNA 절편을 바이러스성 계놈 내로 연결할 수 있다. 특정의 백터는 이들이 도입되는 숙주 세포 내에서 자기 복제할 수 있다 (예를 들어, 세균성 복제 기점을 갖는 세균성 백터 및 에피솜성 포유류 백터). 기타 백터 (예: 비-에피솜성 포유류 백터)는 숙주 세포 내로의 도입시 이러한 숙주 세포의 계놈 내로 통합됨으로써, 숙주 계놈과 함께 복제할 수 있다. 더우기, 특정 백터는 이들이 작동적으로 연결된 유전자의 발현을 지시

할 수 있다. 이러한 벡터가 본원에서 "재조합 발현 벡터 (또는 간단히, "재조합 벡터")로서 지칭된다. 일반적으로, 재조합 DNA 기술에 유용한 발현 벡터는 종종 플라스미드 형태이다. 본 명세서에서, "플라스미드" 및 "벡터"는 상호 교환적으로 사용될 수 있는데, 이는 플라스미드가 가장 흔히 사용되고 있는 벡터 형태이기 때문이다.

[0169] 본원에서 상호 교환적으로 사용되는 바와 같은 "폴리뉴클레오타이드" 또는 "핵산"은 어떠한 길이의 뉴클레오타이드의 중합체를 지칭하고, 이에 DNA 및 RNA가 포함된다. 뉴클레오타이드는 데옥시리보뉴클레오타이드, 리보뉴클레오타이드, 변형된 뉴클레오타이드 또는 염기, 및/또는 그들의 유사체, 또는 DNA 또는 RNA 폴리머라제에 의해 또는 합성 반응에 의해 중합체 내로 도입될 수 있는 모든 기질일 수 있다. 폴리뉴클레오타이드는 변형된 뉴클레오타이드, 예를 들어 메틸화 뉴클레오타이드 및 그들의 유사체를 포함할 수 있다. 존재하는 경우, 뉴클레오타이드 구조에 대한 변형은 중합체의 어셈블리 전 또는 후에 부여될 수 있다. 뉴클레오타이드 서열은 비-뉴클레오타이드 성분에 의해 중단될 수 있다. 폴리뉴클레오타이드는 합성 후에, 예를 들어 표지와 접합에 의해 추가로 변형시킬 수 있다. 기타 유형의 변형에는, 예를 들어 "캡 (cap)", 하나 이상의 천연 발생적 뉴클레오타이드의 유사체로의 치환, 뉴클레오타이드간 변형, 예를 들어 전하를 띠지 않은 연쇄물 (예: 메틸 포스포네이트, 포스포트리에스테르, 포스포아미데이트, 카바메이트 등)을 수반한 것 및 전하를 띤 연쇄물 (예: 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트 등)을 수반한 것, 펜던트 부분, 예를 들어 단백질 (예: 뉴클레아제, 독소, 항체, 신호 펩티드, 폴리-L-리신 등)을 함유하는 것, 삽입제 (예: 아크리딘, 프소랄렌 등)을 수반한 것, 킬레이트제 (예: 금속, 방사성 금속, 붕소, 산화적 금속 등)를 함유하는 것, 알킬화제를 함유하는 것, 변형된 연쇄물 (예: 알파 아노머성 핵산 등)을 수반하는 것 뿐만 아니라 변형되지 않은 형태의 폴리뉴클레오타이드(들)가 포함된다. 추가로, 당에 통상적으로 존재하는 모든 히드록실기는, 예를 들어 포스포네이트기, 포스포에이트기로 대체될 수 있거나, 표준 보호기에 의해 보호될 수 있거나, 또는 부가의 뉴클레오타이드에 대한 부가의 연쇄물을 제조하도록 활성화될 수 있거나, 또는 고체 또는 반고체 지지체와 접합시킬 수 있다. 5' 및 3' 말단의 OH를 인산화시키거나, 또는 탄소수 1 내지 20의 유기 캡핑기 부분 또는 아민으로 치환시킬 수 있다. 기타 히드록실을 또한 유도체화하여 표준 보호기를 수득할 수 있다. 폴리뉴클레오타이드는 또한, 일반적으로 당해 분야에 공지되어 있는 유사한 형태의 리보스 또는 데옥시리보스 당, 예를 들어 2'-O-메틸-, 2'-O-알릴, 2'-플루오로- 또는 2'-아지도-리보스, 카복실성 당 유사체, .알파.-아노머성 당, 에피머성 당, 예를 들어 아라비노스, 크실로스 또는 리복스, 피라노스 당, 푸라노스 당, 세도헥스로스, 아크릴성 유사체 및 아염기성 뉴클레오시드 유사체, 예를 들어 메틸 리보시드를 함유할 수 있다. 하나 이상의 포스포디에스테르 연쇄물을 대체 연결기로 대체시킬 수 있다. 이들 대체 연결기에는 포스페이트를 P(O)S ("티오에이트"), P(S)S ("디티오에이트"), (O)NR₂ ("아미데이트"), P(O)R, P(O)OR', CO 또는 CH₂ ("포름아세탈") [여기서, R 또는 R' 각각은 독립적으로, H이거나 또는 임의로 에테르 (-O-) 연쇄를 함유하는 치환되거나 치환되지 않은 알킬 (1-20C), 알릴, 알케닐, 시클로알킬, 시클로알케닐 또는 아르알킬이다]로 대체시킨 양태들이 포함되지만, 이에 제한되지 않는다. 폴리뉴클레오타이드 내의 모든 연쇄물이 반드시 동일할 필요는 없다. 앞서의 설명은 본원에 지칭된 모든 폴리뉴클레오타이드 (RNA 및 DNA 포함)에 적용된다.

[0170] 본원에 사용된 바와 같은 "올리고뉴클레오타이드"는 일반적으로 뉴클레오타이드 약 200개 미만인지는 하지만 반드시 그렇지 않은 짧은 길이를 가지며, 일반적으로는 단일 가닥이고, 일반적으로 합성된 것인 폴리뉴클레오타이드를 지칭한다. 용어 "올리고뉴클레오타이드" 및 "폴리뉴클레오타이드"는 상호 배타적이지 않다. 폴리뉴클레오타이드에 관한 상기 설명이 올리고뉴클레오타이드에도 동등하고도 완전히 적용 가능하다.

[0171] "단리된" 항체는 그의 천연 환경의 구성 성분인 것으로 확인되며, 이러한 환경으로부터 격리 및/또는 회수시킨 것이다. 그의 천연 환경의 오염 성분은 항체에 대한 진단적 또는 치료적 용도를 방해할 수도 있는 물질인데, 이에 효소, 호르몬, 및 기타 단백질성 또는 비-단백질성 용질이 포함될 수 있다. 바람직한 양태에서는, 항체를 (1) 로리 (Lowry) 방법에 의해 결정된 바와 같이 항체의 95 중량% 초과, 가장 바람직하게는 99 중량% 초과로 정제시키거나, (2) 스피닝 컵 시퀀세이터 (spinning cup sequenator)의 사용에 의해 N-말단 또는 내부 아미노산 서열의 15개 이상의 잔기를 수득하기에 충분한 정도로 정제시키거나, 또는 (3) 쿠마시 블루, 또는 바람직하게는 은 염색 (silver stain)을 이용하여 환원성 또는 비환원성 조건 하에 SDS-PAGE에 의해 균질하도록 정제할 것이다. 단리된 항체에는 재조합 세포 내의 계내 항체가 포함되는데, 이는 항체의 천연 환경의 적어도 하나의 성분이 존재하지 않을 것이기 때문이다. 그러나, 통상적으로 단리된 항체는 한 가지 이상의 정제 단계에 의해 제조될 것이다.

[0172] 용어 "카바트에서와 같은 가변 도메인 잔기 번호부여" 또는 "카바트에서와 같은 아미노산 위치 번호부여", 및 그의 변수들은 문헌 [참고: Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)]에서의 항체 편집에서 중쇄 가

변 도메인 또는 경쇄 가변 도메인에 대해 사용된 번호부여 시스템을 지칭한다. 이러한 번호부여 시스템을 사용하여, 실제적인 선형 아미노산 서열은 가변 도메인의 FR 또는 CDR의 단축, 또는 이러한 FR 또는 CDR 내로의 삽입에 상응하는 적은 또는 부가의 아미노산을 함유할 수 있다. 예를 들어, 중쇄 가변 도메인은 H2의 잔기 52 다음에 단일 아미노산 삽입물 (카바트에 따르는 잔기 52a), 및 중쇄 FR 잔기 82 다음에 삽입된 잔기 (예: 카바트에 따르는 잔기 82a, 82b, 및 82c 등)를 포함할 수 있다. 카바트 잔기의 번호부여는 항체 서열의 상동성 영역에서 "표준" 카바트 번호부여된 서열과 정렬함으로써 소정의 항체에 대해 결정할 수 있다. 달리 언급되지 않는 한, 본원에서 모든 아미노산 위치의 번호부여는 카바트 번호부여 시스템에 따른다.

[0173] "인간 컨센서스 골격"은 인간 면역글로불린 VL 또는 VH 골격 서열의 선별시 가장 흔히 발생하는 아미노산 잔기를 나타내는 골격이다. 일반적으로, 인간 면역글로불린 VL 또는 VH 서열의 선별은 가변 도메인 서열 아군으로부터이다. 일반적으로, 이러한 서열 아군은 카바트 등에서의와 같은 아군이다. 한 양태에서, VL에 대한 아군은 카바트 등에서의와 같은 아군 카파 I이다. 한 양태에서는, VH에 대한 아군이 카바트 등에서의와 같은 아군 III이다.

[0174] "VH 아군 III 컨센서스 골격"은 카바트 등의 가변 중쇄 아군 III 내의 아미노산 서열로부터 수득한 컨센서스 서열을 포함한다. 한 양태에서는, VH 아군 III 컨센서스 골격 아미노산 서열이 다음 서열 각각의 적어도 일부 또는 전부를 포함한다: EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (서열 46)-H1-WVRQAPGKGLEWV (서열 47)-H2-RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC (서열 48)-H3-WGQGTILVTSS (서열 49).

[0175] "VL 아군 I 컨센서스 골격"은 카바트 등의 가변 경쇄 카파 아군 I 내의 아미노산 서열로부터 수득한 컨센서스 서열을 포함한다. 한 양태에서는, VL 아군 I 컨센서스 골격 아미노산 서열이 다음 서열 각각의 적어도 일부 또는 전부를 포함한다:

[0176] DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (서열 50)-L1-WYQQKPGKAPKLLIY (서열 51)-L2-GVPSRFGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC (서열 52)-L3-FGQGTKVEIK (서열 53).

[0177] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "간세포 성장 인자" 또는 "HGF"는 달리 구체적으로 또는 문맥상 나타내지 않는 한, 다음 과정이 발생하도록 하는 조건 하에 HGF/c-met 신호 전달 경로를 활성화할 수 있는 천연 또는 변이체 (천연 발생적이든 합성이든 간에) HGF 폴리펩티드를 지칭한다. 용어 "야생형 HGF"는 일반적으로, 천연 발생적 HGF 단백질의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 지칭한다. 용어 "야생형 HGF 서열"은 일반적으로, 천연 발생적 HGF에서 발견되는 아미노산 서열을 지칭한다.

[0178] 용어 "항체" 및 "면역글로불린"은 가장 광범위한 의미로 상호 교환적으로 사용되고, 이에 는 모노클로날 항체 (예: 완전한 길이 또는 본래의 모노클로날 항체), 폴리클로날 항체, 다가 항체, 다중-특이적 항체 (예: 목적하는 생물학적 활성을 나타내는 이중-특이적 항체)가 포함되고, 이에 는 또한 특정의 항체 단편 (본원에 보다 상세히 기재된 바와 같음)이 포함될 수 있다. 항체는 인간, 인간화 및/또는 친화성 성숙된 항체일 수 있다.

[0179] "항체 단편"은 본래의 항체의 단지 일부 만을 포함하는데, 이러한 일부는 바람직하게, 본래의 항체 내에 존재하는 경우에 이러한 일부와 통상적으로 연관된 기능들 중의 적어도 한 가지 기능, 바람직하게는 대부분 또는 모든 기능을 보유하고 있다. 한 양태에서는, 항체 단편이 본래의 항체의 항원 결합 부위를 포함하므로, 항원과 결합할 수 있는 능력을 보유하고 있다. 또 다른 양태에서는, 항체 단편, 예를 들어 Fc 영역을 포함하는 항체 단편이, 본래의 항체 내에 존재하는 경우에 Fc 영역과 통상적으로 연관된 생물학적 기능들, 예를 들어 FcRn 결합성, 항체 반감기 조정, ADCC 기능 및 보체 결합성 중의 적어도 한 가지 기능을 보유하고 있다. 한 양태에서는, 항체 단편이 본래의 항체와 실질적으로 유사한 생체내 반감기를 갖는 1가 항체이다. 예를 들어, 이러한 항체 단편은 단편에 생체내 안정성을 부여해 줄 수 있는 Fc 서열과 연결된 항원 결합성 암 (arm) 상에 포함될 수 있다.

[0180] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "모노클로날 항체"는 실질적으로 동질적 항체 집단, 즉 집단을 차지하고 있는 개개의 항체가, 미량으로 존재할 수 있는 가능한 천연 발생적 돌연변이물을 제외하고는 동일한 집단으로부터 수득한 항체를 지칭한다. 모노클로날 항체는 고도로 특이적이어서, 단일 항원에 대항하여 지시된다. 더우기, 전형적으로 상이한 결정기 (에피토프)에 대항하여 유도된 상이한 항체를 포함하는 폴리클로날 항체 제제와는 달리, 각각의 모노클로날 항체는 항원 상의 단일 결정기에 대항하여 유도된다.

[0181] 본원에서의 모노클로날 항체에는 구체적으로, 중쇄 및/또는 경쇄 일부가 특별한 종으로부터 유래되거나 특별한 항체 부류 또는 아부류에 속하는 항체 내의 상응하는 서열과 동일하거나 이와 상동성인 반면, 나머지 쇄(들)는 또 다른 종으로부터 유래되거나 또 다른 항체 부류 또는 아부류에 속하는 항체 내의 상응하는 서열과 동일하거나 이와 상동성인 "키메라" 항체 뿐만 아니라 목적하는 생물학적 활성을 나타내는 상기 항체의 단편이 포함된다

[참고: 미국 특허 제4,816,567호; Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 6851-6855 (1984)].

- [0182] "인간화" 형태의 비-인간 (예: 뮤린) 항체는 비-인간 면역글로불린으로부터 유래된 최소 서열을 함유하는 키메라 항체이다. 대부분의 경우, 인간화 항체는, 수용자의 추가변 영역으로부터의 잔기를 목적하는 특이성, 친화성 및 능력을 보유하고 있는 비-인간 중 (공여자 항체), 예를 들어 마우스, 랫트, 토끼 또는 비-인간 영장류의 추가변 영역으로부터의 잔기로 대체시킨 인간 면역글로불린 (수용자 항체)이다. 몇몇 경우에는, 인간 면역글로불린의 골격 영역 (FR) 잔기를 상응하는 비-인간 잔기로 대체시킨다. 더우기, 인간화 항체는 수용자 항체 또는 공여자 항체에서 발견되지 않는 잔기를 포함할 수 있다. 이들 변형은 항체 성능을 추가로 정련시키기 위해 만들어진다. 일반적으로, 인간화 항체는 1개 이상, 전형적으로는 2개의 가변 도메인을 실질적으로 모두 포함할 것이며, 여기서 모든 또는 실질적으로 모든 추가변 루프는 비-인간 면역글로불린에 상응하고, 모든 또는 실질적으로 모든 FR은 인간 면역글로불린 서열의 것이다. 인간화 항체는 임의로, 면역글로불린 불변 영역, 전형적으로는 인간 면역글로불린의 불변 영역의 적어도 일부를 포함할 것이다. 추가의 상세 내역에 관해서는 다음 문헌을 참고할 수 있다 [참고: Jones et al., *Nature*, 321: 522-525 (1986); Reichmann et al., *Nature*, 332: 323-329 (1988); and Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2: 593-596 (1992)]. 다음 참고 문헌 및 이에 인용된 참고 문헌을 또한 참고할 수 있다 [참고: Vaswani and Hamilton, *Ann. Allergy, Asthma & Immunol.* 1: 105-115 (1998); Harris, *Biochem. Soc. Transactions* 23: 1035-1038 (1995); Hurle and Gross, *Curr. Op. Biotech.* 5:428-433 (1994)].
- [0183] "인간 항체"는 인간에 의해 생성된 항체의 아미노산 서열에 상응하고/하거나 본원에 기재된 바와 같은 인간 항체를 제조하기 위한 모든 기술을 이용하여 만든 아미노산 서열을 보유하고 있는 항체이다. 인간 항체의 정의에서는 구체적으로, 비-인간 항원 결합성 잔기를 포함하는 인간화 항체가 배제된다.
- [0184] "친화성 성숙된" 항체는 변경(들)을 나타내지 않는 모 항체와 비교해서 항원에 대한 항체의 친화성을 개선시켜주는, 하나 이상의 CDR에서 한 가지 이상의 변경을 수반한 항체이다. 바람직한 친화성 성숙된 항체는 표적 항원에 대한 나노몰 또는 심지어 피코몰 친화도를 지닐 것이다. 친화성 성숙된 항체는 당해 분야에 공지된 과정에 의해 생성된다. 문헌 [참고: Marks et al., *Bio/Technology*, 10:779-783 (1992)]에는 VH 및 VL 도메인 셔플링 (shuffling)에 의한 친화성 성숙이 기재되어 있다. CDR 및/또는 골격 잔기의 무작위 돌연변이 유발이 다음 문헌에 기재되어 있다 [참고: Barbas et al., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 91:3809-3813 (1994); Scier et al., *Gene* 169:147-155 (1995); Yelton et al., *J. Immunol.* 155:1994-2004 (1995); Jackson et al., *J. Immunol.* 154 (7):3310-9 (1995); and Hawkins et al., *J. Mol. Biol.* 226:889-896 (1992)].
- [0185] "차단성" 항체 또는 "길항제" 항체는 이와 결합하는 항원의 생물학적 활성을 억제 또는 저하시키는 것이다. 바람직한 차단성 항체 또는 길항제 항체는 항원의 생물학적 활성을 실질적으로 또는 완전히 억제시킨다.
- [0186] 본원에 사용된 바와 같은 "작동제" 항체는 관심있는 폴리펩티드의 기능적 활성들 중의 한 가지 이상 활성을 모방하는 항체이다.
- [0187] "장애"는 본 발명의 물질/분자 또는 방법을 이용한 처치 (치료)로부터 이득을 얻을 수 있는 모든 질환이다. 이에는 만성 및 급성 장애 또는 질병 (포유류가 문제의 장애에 걸리기 쉬운 병리학적 질환 포함)이 포함된다. 본원에서 치료하고자 하는 장애의 비-제한적 예에는 악성 및 양성 종양; 비-백혈병 및 림프계 악성 종양; 신경원성, 신경교성, 성상세포성, 시상하부 및 기타 선상, 대식세포성, 상피성, 간질성 및 포배강성 장애; 및 염증성, 면역학적 및 기타 혈관형성 관련 장애가 포함된다.
- [0188] 용어 "세포 증식성 장애" 및 "증식성 장애"는 몇몇 비정상적인 세포 증식 정도와 연관되는 장애를 지칭한다. 한 양태에서는, 세포 증식성 장애가 암이다.
- [0189] 본원에 사용된 바와 같은 "종양"은 악성이든 양성이든지 간에 모든 종양성 세포 성장 및 증식을 지칭하고, 모든 전암성 및 암성 세포 및 조직을 지칭한다. 용어 "암", "암성", "세포 증식성 장애", "증식성 장애" 및 "종양"은 본원에 지칭된 바와 같이 상호 배타적이지 않다.
- [0190] 용어 "암" 및 "암성"은 전형적으로 조절되지 않는 세포 성장/증식을 특징으로 하는 포유류에게서의 생리적 상태를 지칭하거나 이를 기재한 것이다. 암의 예에는 암종, 림프종, 모세포종, 육종 및 백혈병이 포함되지만, 이에 제한되지 않는다. 이러한 암의 보다 특정한 예에는 편평 세포 암, 소세포 폐암, 비소세포 폐암, 폐의 선암종, 폐의 편평 암종, 복막암, 간세포암, 위장암, 췌장암, 교모세포종, 자궁경부암, 난소암, 간암, 방광암, 간세포암, 유방암, 결장암, 결장직장암, 자궁내막 또는 자궁 암종, 타액선 암종, 신장암, 간암, 전립선암, 외음부암, 갑상선암, 간 암종, 및 각종 유형의 두경부암이 포함된다.

- [0191] 혈관형성의 조절이상은 본 발명의 조성물 및 방법에 의해 치료할 수 있는 많은 장애를 유발시킬 수 있다. 이들 장애에는 비-종양성 및 종양성 질환 둘 다 포함된다. 종양성 질환에는 상기 언급된 질환이 포함되지만, 이에 제한되지 않는다. 비-종양성 질환에는, 예를 들어 바람직하지 못하거나 이상한 비대증, 관절염, 류마티스성 관절염 (RA), 건선, 건선성 반점, 사르코이드증 (sarcoidosis), 아테롬성 경화증, 아테롬성 경화성 반점, 당뇨병성 및 기타 증식성 망막병증, 예를 들어 미숙아 망막병증, 후수정체 섬유증증식증, 신생혈관성 녹내장, 연령 관련 황반 변성, 당뇨병성 황반 부종, 각막 신생혈관증식, 각막 이식편 신생혈관증식, 각막 이식편 거부, 망막/유모막 신생혈관증식, 전방각 신생혈관증식 (홍색증), 안과 신생혈관 질환, 혈관성 재발 협착증, 동정맥 기형 (AVM), 수막증, 혈관종, 혈관섬유종, 갑상선 과형성 [그레이브 병 (Grave's disease) 포함], 각막 및 기타 조직 이식, 만성 염증, 폐 염증, 급성 폐 손상/ARDS, 폐혈증, 원발성 폐 고혈압, 악성 폐 삼출, 뇌 부종 (예를 들어, 급성 발작/폐쇄성 두부 손상/외상과 연관된 부종), 활막 염증, RA에서의 판누스 (pannus) 형성, 골화성 근육염, 비대성 뼈 형성, 골관절염 (OA), 난치성 복수, 다낭성 난소 질환, 자궁내막증, 제3 유체 공간형성 질환 (체강염, 구획 증후군, 화상, 장 질환), 자궁 근종, 조산, 만성 염증, 예를 들어 IBD [크론병 (Crohn's disease) 및 궤양성 결장염], 신 동종이식편 거부, 염증성 장 질환, 신 증후군, 바람직하지 못하거나 이상한 조직 덩어리 성장 (비-암), 혈우병성 관절, 비대성 흉터, 모발 성장 억제, 오슬러-웨버 (Osler-Weber) 증후군, 화농성 육아종, 후수정체 섬유증증식증, 피부 경화증, 트라코마 (trachoma), 혈관 부착, 활막염, 피부염, 자간전증, 복수, 심낭 삼출 (예를 들어, 심막염과 연관된 삼출), 및 흉막 삼출이 포함되지만, 이에 제한되지 않는다.
- [0192] 본원에서의 "자가면역 질환"은 개개인 자신의 조직으로부터 유발되어 자신의 조직에 대하여 유도된 비-악성 질환 또는 장애이다. 본원에서의 자가면역 질환에서는 구체적으로, 악성 또는 암성 질병 또는 질환이 배제되고, 특히 B 세포 림프종, 급성 림프아구성 백혈병 (ALL), 만성 림프구성 백혈병 (CLL), 모발 세포 백혈병 및 만성 골수아구성 백혈병이 배제된다. 자가면역 질환 또는 장애의 예에는 염증 반응, 예를 들어 염증성 피부 질환, 예를 들면, 건선 및 피부염 (예: 아토피성 피부염); 전신성 피부 경화증 및 경화증; 염증성 장 질환 (예: 크론병 및 궤양성 결장염)과 연관된 반응; 호흡기 장애 증후군 (성인 호흡기 장애 증후군, ARDS 포함); 피부염; 수막염; 뇌염; 포도막염; 결장염; 사구체신염; 알레르기성 질환, 예를 들어 습진 및 천식, 및 T 세포 침윤과 만성 염증 반응과 관련된 기타 질환; 아테롬성 경화증; 백혈구 부착 결핍증; 류마티스성 관절염; 전신성 홍반성 루푸스 (SLE); 당뇨병 (예: 유형 I 당뇨병 또는 인슐린 의존성 당뇨병); 다발성 경화증; 레이노이드 (Reynaud) 증후군; 자가면역성 갑상선염; 알레르기성 뇌척수염; 쇼그렌 증후군 (Sjogren's syndrome); 유년성 발병 당뇨병; 및 결핵, 사르코이드증, 다발성 근염, 육아종증 및 혈관염에서 전형적으로 발견되는 사이토킨 및 T-림프구에 의해 매개된 급성 및 지연형 과민증과 연관된 면역 반응; 악성 빈혈 [애디슨병 (Addison's disease)]; 백혈구 누출과 관련된 질환; 중추 신경계 (CNS) 염증 장애; 다발성 기관 손상 증후군; 용혈성 빈혈 [한랭글로불린혈증 또는 콤브스 (Coombs) 양성 빈혈 포함]; 중증 근무력증; 항원-항체 복합체 매개된 질환; 항-사구체 기저막 질환; 항-인지질 증후군; 알레르기성 신경염; 그레이브 병; 람버트-이튼 (Lambert-Eaton) 근무력증 증후군; 수포성 유사천포창; 천포창; 자가면역성 다발성 내분비병증; 라이터병 (Reiter's disease); 근육강직 증후군; 베체트병 (Behcet disease); 거세포성 동맥염; 면역 복합 신염; IgA 신병증; IgM 다발신경병증; 면역 혈소판감소성 자반증 (ITP) 또는 자가면역성 저혈소판증 등이 포함되지만, 이에 제한되지 않는다.
- [0193] 본원에 사용된 바와 같은 "치료 (처치)"는 치료하고자 하는 개개인 또는 세포의 천연 과정을 변경시키기 위해 임상적으로 간섭하는 것을 지칭하고, 이는 임상 병리 상태가 진행되는 동안 또는 이를 예방하기 위해 수행할 수 있다. 목적하는 치료 효과에는 질병의 발생 또는 재발을 예방하고, 증상을 완화시키며, 질병에 따른 모든 직접 또는 간접적인 병리학적 결과를 저하시키며, 전이를 예방하고, 질병 진행 속도를 감소시키며, 질병 상태를 경감 또는 일시적 완화시키며, 진정시키거나 예후를 개선시키는 것이 포함된다. 몇몇 양태에서는, 본 발명의 항체를 사용하여 질병 또는 장애 발생을 지연시킨다.
- [0194] "유효량"은 필요한 시간 동안 및 투여량에서, 목적하는 치료적 또는 예방적 결과를 달성하는데 유효한 양을 지칭한다.
- [0195] 본 발명의 물질/분자, 작동제 또는 길항제의 "치료상 유효량"은 개개인의 질병 상태, 연령, 성별 및 체중, 및 개개인에게서 목적하는 반응을 유도시킬 수 있는 본 발명의 물질/분자, 작동제 또는 길항제의 능력과 같은 요인들에 따라서 다양할 수 있다. 치료상 유효량은 또한, 본 발명의 물질/분자, 작동제 또는 길항제의 치료상 이로인 효과가 이러한 물질/분자, 작동제 또는 길항제의 어떠한 독성이나 해로운 효과도 능가하는 양이다. "예방상 유효량"은 필요한 시간 동안 및 투여량에서, 목적하는 예방적 결과를 달성하는데 유효한 양을 지칭한다. 반드시 그런 것은 아니지만 전형적으로, 예방적 용량은 질병이 발생하기에 앞서 또는 질병의 초기 단계에서 대상체에게 사용되기 때문에, 예방상 유효량은 치료상 유효량보다 적을 것이다.

- [0196] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "세포독성제"는 세포의 기능을 억제 또는 방지하고/하거나 세포의 파괴를 유발시키는 물질을 지칭한다. 이 용어에는 방사성 동위원소 (예: At²¹¹, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹², P³², 및 Lu의 방사성 동위원소), 화학요법제, 예를 들어 메토틱세이트, 아드리아미신, 빈카 알칼로이드 (빈크리스틴, 빈블라스틴, 에토포시드), 독소루비신, 멜팔란, 미토마이신 C, 클로람부실, 다우노루비신 또는 기타 삼입제, 효소 및 그의 단편, 예를 들어 핵산 분해 효소, 항생제, 및 독소, 예를 들어 세균, 진균, 식물 또는 동물 기원의 효소적 활성 독소 또는 소분자 독소 (그의 단편 및/또는 변이체 포함), 및 다음에 기재되는 각종 항종양 또는 항암제가 포함된다. 기타 세포독성제가 다음에 기재된다. 살종양제는 종양 세포를 파괴시킨다.
- [0197] "화학요법제"는 암을 치료하는데 유용한 화학적 화합물이다. 화학요법제의 예에는 알킬화제, 예를 들어 티오테라피 및 시톡산(CYTOXAN[®])
-) 시클로포스파미드; 알킬 설포네이트, 예를 들어 부설판, 임프로설판 및 피포설판; 아지리딘, 예를 들어 벤조도파, 카르보쿠온, 메투레도파, 및 우레도파; 에틸렌이민 및 메틸라멜라민, 예를 들어, 알트레타민, 트리에틸렌멜라민, 트리에틸렌포스포르아미드, 트리에틸렌티오포스포르아미드 및 트리메틸올로멜라민; 아세토게닌 (특히, 블라타신 및 블라타시논); 델타-9-테트라히드로칸나비놀 (드로나비놀, 마리놀(MARINOL[®]
-)); 베타-라파콘; 라파콜; 콜키신; 베톨린산; 캄프토테신 [합성적으로 유사한 토포테칸 (히캄틴(HYCANTIN[®]
-)), CPT-11 (이리노테칸, 캄프토사르(CAMPTOSAR[®]
-)), 아세틸캄프토테신, 스코폴렉틴, 및 9-아미노캄프토테신 포함]; 브리오스타틴; 칼리스타틴; CC-1065 (그의 아도젤레신, 카르젤레신 및 비젤레신 합성 유사체 포함); 포도필로톡신; 포도필린산; 테니포시드; 크립토피신 (특히 크립토피신 1 및 크립토피신 8); 둘라스타틴; 두오카르마이신 (합성 유사체 KW-2189 및 CBI-TMI 포함); 엘레우테로빈; 판크라티스타틴; 사르코딕티인; 스폰지스타틴; 질소 머스타드, 예를 들어 클로람부실, 클로르나파진, 콜로포스파미드, 에스트라무스틴, 이포스파미드, 메클로르에타민, 메클로르에타민 옥사이드 히드로클로라이드, 멜팔란, 노벤비킨, 페네스테린, 프레드니무스틴, 트로포스파미드, 우라실 머스타드; 니트로소우레아, 예를 들어 카르무스틴, 클로로조토신, 포테무스틴, 로무스틴, 니무스틴, 및 라님무스틴; 항생제, 예를 들어 엔디인 (enediynes) 항생제 [예를 들어, 칼리케아미신, 특히 칼리케아미신 감마II 및 칼리케아미신 오메가I1 (참고: Agnew, *Chem Int'l. Ed. Engl.* 33: 183-186 (1994))]; 디네미신 (디네미신 A 포함); 에스페라미신; 뿐만 아니라 네오카르지노스타틴 발색단 및 관련 색단백질 엔디인 항생제 발색단], 아클라시노마이신, 악티노마이신, 아우트라마이신, 아자세린, 블레오마이신, 캅티노마이신, 카라비신, 카르미노마이신, 카르지노필린, 크로모마이시니스, 닥티노마이신, 다우노루비신, 데토루비신, 6-디아조-5-옥소-L-노르루이신, 독소루비신 [아드리아마이신(ADRIAMYCIN[®]
-), 모르폴리노-독소루비신, 시아노모르폴리노-독소루비신, 2-피롤리노-독소루비신, 독소루비신 HCl 리포솜 주사제 (독실(DOXIL[®]
-)) 및 데옥시독소루비신 포함], 에피루비신, 에소루비신, 이다루비신, 마르셀로마이신, 미토마이신 (예: 미토마이신 C), 미코페놀산, 노갈라마이신, 올리보마이신, 페폴로마이신, 포트피로마이신, 푸로마이신, 쿠엘라마이신, 로도루비신, 스트렙토니그린, 스트렙토조신, 투베르시딘, 우베니멕스, 지노스타틴, 조루비신; 항대사제, 예를 들어 메토틱세이트, 젬시타빈 (젬자르(GEMZAR[®]
-)), 테가푸르 (우프토랄(UFTORAL[®]
-)), 카페시타빈 (젤로다(XELODA[®]
-)), 에포틸론, 및 5-플루오로우라실 (5-FU); 엽산 유사체, 예를 들어 데노프테린, 메토틱세이트, 프테로프테린, 트리메트렉세이트; 퓨린 유사체, 예를 들어 플루다라빈, 6-머캅토피린, 티아미프린, 티오구아닌; 피리미딘 유사체, 예를 들어 안시타빈, 아자시티딘, 6-아자우리딘, 카르모푸르, 시타라빈, 디데옥시우리딘, 독시플루리딘, 에노시타빈, 플록수리딘; 안드로겐, 예를 들어 칼루스테론, 드로모스타놀론 프로피오네이트, 에피티오스타놀, 메피티오스탄, 테스토라톤; 항부신제, 예를 들어 아미노글루테티미드, 미토탄, 트릴로스탄; 엽산 보충물, 예를 들어 프롤린산; 아세글라톤; 알도포스파미드 글리코시드; 아미노레볼린산; 에닐우라실; 암사크린; 베스트라부실; 비산트렌; 에다트라세이트; 데포파민; 데메콜신; 디아지쿠온; 엘프르니틴; 엘리프티늄 아세테이

트; 에토글루시드; 질산갈륨; 히드록시우레아; 렌티난; 로니다이닌; 마이탄시노이드, 예를 들어 마이탄신 및 안사미토신; 미토구아존; 미톡산트론; 모피단몰; 니트라에린; 펜토스타틴; 페나메트; 피라루비신; 로속산트론; 2-에틸히드라지드; 프로카르바진; PSK[®]

다당류 복합체 (공급처: JHS Natural Products, Eugene, OR); 라족산; 리족신; 시조피란; 스피로게르마늄; 테누아존산; 트리아지쿠온; 2,2',2"-트리클로로트리에틸아민; 트리코테센 (특히, T-2 독소, 베라쿠린 A, 로리딘 A 및 안구이딘); 우레탄; 빈데신 (엘디신(ELDISINE)[®]

), 필데신(FILDESIN)[®]

)); 다카르바진; 만노무스틴; 미토브로니톨; 미토락톨; 피포브로만; 가시토신; 아라비노시드 ("Ara-C"); 티오테파; 탁소이드, 예를 들어 파클리탁셀 (탁솔(TAXOL)[®]

)), 파클리탁셀의 알부민-공학 처리시킨 나노입자 제제 (아브락산(ABRAXANE[™])), 및 독세탁셀 (탁소테레(TAXOTERE)[®]

)); 클로란부실; 6-티오구아닌; 머캅토피린; 메토크렉세이트; 백금 유사체, 예를 들어 시스플라틴 및 카르보플라틴; 빈블라스틴 (벨반(VELBAN)[®]

)); 백금; 에토포시드 (VP-16); 이포스파미드; 미톡산트론; 빈크리스틴 (온코빈(ONCOVIN)[®]

)); 옥살리플라틴; 류코보빈; 비노렐빈 (나벨빈(NAVELBINE)[®]

)); 노반트론; 에다트렉세이트; 다우노마이신; 아미노프테린; 이반드로네이트; 토포이소머라제 억제제 RFS 2000; 디플루오로메틸오르니틴 (DMFO); 레티노이드 (예: 레티노산); 및 상기 언급된 제제의 제약상 허용 가능한 염, 산 또는 유도체 뿐만 아니라 상기 제제의 2가지 이상 병용물, 예를 들어 CHOP (이는 시클로포스파미드, 독소루비신, 빈크리스틴 및 프레드니솔론의 병용 요법에 대한 약어이다), 및 폴폭스(FOLFOX) (이는 5-FU 및 류코보빈과 병용된 옥살리플라틴 (엘록사틴(ELOXATIN[™]))을 이용한 치료 섭생에 대한 약어이다)이 포함된다.

[0198] 상기 정의에는 또한, 암의 성장을 증진시킬 수 있는 호르몬의 효과를 조절, 감소, 차단 또는 억제하는 작용을 하고, 종종 전신성 치료 형태인 항호르몬제가 포함된다. 이들은 호르몬 자체일 수 있다. 이의 예에는 항에스트로겐제 및 선택적 에스트로겐 수용체 조절제 (SERM)가 포함되는데, 예를 들어 타목시펜 (놀바텍스(NOLVADEX)[®]

) 타목시펜 포함), 랄록시펜 (에비스타(EVISTA)[®]

)), 드롤록시펜, 4-히드록시타목시펜, 트리옥시펜, 케옥시펜, LY117018, 오나프리스톤 및 토레미펜 (파레스톤(FARESTON)[®]

)); 항프로게스테론제; 에스트로겐 수용체 하향 조절제 (ERD); 에스트로겐 수용체 길항제, 예를 들어 폴베스트란트 (파슬로텍스(FASLODEX)[®]

)); 난소를 저해하거나 난소의 활동을 정지시키는 기능을 하는 작용제, 예를 들어 황체형성 호르몬 방출 호르몬 (LHRH) 작동제, 예를 들어 루프롤리드 아세테이트 (루프론(LUPRON)[®]

) 및 엘리가드(ELIGARD)[®]

)), 고세렐린 아세테이트, 부세렐린 아세테이트 및 트리프테렐린; 기타 항안드로겐제, 예를 들어 플루타미드, 닐루타미드 및 비칼루타미드; 및 부신에서의 에스트로겐 생성을 조절하는 효소 아로마타제를 억제하는 아로마타제 억제제, 예를 들어 4(5)-이미다졸, 아미노글루테티미드, 메게스트롤 아세테이트 (메가세(MEGASE)[®]

)), 엑세메스탄 (아로마신(AROMASIN)[®]

)), 포르메스타니에, 파드로졸, 보로졸 (리비소르(RIVISOR)[®]

)), 레트로졸 (페마라(FEMARA)[®]

)) 및 아나스트로졸 (아리미덱스(ARIMIDEX®

))이 포함된다. 또한, 상기 화학요법제의 정의에는 비스포스포네이트, 예를 들어 클로드로네이트 (예: 보네포스(BONEFOS®

) 또는 오스탁(OSTAC®

)), 에티드로네이트 (디드로칼(DIDROCAL®

)), NE-58095, 졸레드론산/졸레드로네이트 (조메타(ZOMETA®

)), 알렌드로네이트 (포사맥스(FOSAMAX®

)), 파미드로네이트 (아레디아(AREDIA®

)), 틸루드로네이트 (스켈리드(SKELID®

)), 또는 리세드로네이트 (악토넬(ACTONEL®

)); 뿐만 아니라 트록사시타빈 (1,3-디옥솔란 뉴클레오시드 시토신 유사체); 안티센스 올리고뉴클레오티드, 특히 이상한 세포 증식에 밀접한 영향을 미치는 신호 전달 경로에 있어 유전자, 예를 들어 PKC-알파, Raf, H-Ras 및 표피 성장 인자 수용체 (EGF-R)의 발현을 억제하는 안티센스 올리고뉴클레오티드; 백신, 예를 들어 테라토펜(THERATOPE®

) 백신 및 유전자 요법 백신, 예를 들면, 알로벡틴(ALLOVECTIN®

) 백신, 류벡틴(LEUVECTIN®

) 백신 및 백신(VAXID®

) 백신; 토포이소머라제 1 억제제 (예: 루르토테칸(LURTOTECAN®

)); rmRH (예: 아바렐릭스(ABARELIX®

)); 라파티니브 디토실레이트 (GW572016으로서 공지되기도 한 ErbB-2 및 EGFR 이중 티로신 키나제 소분자 억제제); COX-2 억제제, 예를 들어 셀레코시브 (셀레브렉스(CELEBREX®

); 4-(5-(4-메틸페닐)-3-(트리플루오로메틸)-1H-피라졸-1-일)벤젠설포나미드; 및 이들의 제약상 허용 가능한 염, 산 또는 유도체가 포함된다.

[0199]

본원에 사용된 경우의 "성장 억제제"는 시험관내 또는 생체 내에서 그의 성장이 HGF/c-met 활성화에 의존적인 세포의 성장을 억제하는 화합물 또는 조성물을 지칭한다. 따라서, 성장 억제제는 S 상의 HGF/c-met-의존적 세포 비율을 상당히 저하시키는 것일 수 있다. 성장 억제제의 예에는 (S 상 이외의 위치에서) 세포 주기 진행을 차단시키는 작용제, 예를 들어 G1 정지와 M-상 정지를 유도시키는 작용제가 포함된다. 전통적인 M-상 차단제에는 빈카 (빈크리스틴 및 빈블라스틴), 타산, 및 토포이소머라제 II 억제제, 예를 들어 독소루비신, 에피루비신, 다우노루비신, 에토포시드 및 블레오마이신이 포함된다. G1을 정지시키는 작용제가 또한 S-상 정지로까지 영향을 미치는데, 예를 들어 DNA 알킬화제, 예를 들면, 타목시펜, 프레드니손, 다카르바진, 메클로르에타민, 시스플라틴, 메토포렉세이트, 5-플루오로우라실 및 ara-C가 있다. 추가의 정보는 다음 문헌을 참고할 수 있다 [참고: The Molecular Basis of Cancer, Mendelsohn and Israel, eds., Chapter 1, entitled "Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs" by Murakami et al. (WB Saunders: Philadelphia, 1995), especially p. 13]. 타산 (파클리탁셀 및 도세탁셀)은 모두 주목 (yew tree)으로부터 유래된 항암 약물이다. 유럽산 주목으로부터 유래된 도세탁셀 (탁소테레®

, 공급처: Rhone-Poulenc Rorer)는 파클리탁셀 (탁솔(TAXOL®

), 공급처: Bristol-Myers Squibb)의 반합성 유사체이다. 파클리탁셀과 도세탁셀은 튜불린 (tubulin) 이량체로

부터 미소관 (microtubulin)의 어셈블리를 증진시키고, 탈중합을 방지함으로써 미소관을 안정화시켜 세포에서의 유사분열을 억제시킨다.

[0200] "독소루비신"은 안트라사이클린 항생제이다. 독소루비신의 정식 화학 명칭은 (8S-시스)-10-[(3-아미노-2,3,6-트리데옥시- α -L-릭소-헥사피라노실)옥시]-7,8,9,10-테트라히드로-6,8,11-트리히드록시-8-(히드록시아세틸)-1-메톡시-5,12-나프타센디온이다.

[0201] 백터, 숙주 세포 및 재조합 방법

[0202] 본 발명의 항체를 재조합 생성하기 위해, 이를 코딩하는 핵산을 분리하고, 이를 복제 가능한 백터 내로 삽입하여 추가로 클로닝하거나 (DNA의 증폭) 또는 발현시킨다. 상기 항체를 코딩하는 DNA는 통상적인 과정을 사용하여 (예를 들어, 항체의 중쇄와 경쇄를 코딩하는 유전자와 특이적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오타이드 프로브를 사용함으로써) 용이하게 분리 및 서열 분석한다. 많은 백터가 입수 가능하다. 백터의 선택은 부분적으로, 사용하고자 하는 숙주 세포에 따라 좌우된다. 일반적으로, 선호되는 숙주 세포는 원핵성 또는 진핵성 (일반적으로 포유류) 기원의 세포이다.

[0203] 원핵성 숙주 세포를 이용한 항체의 생성:

[0204] 백터 구축

[0205] 본 발명의 항체의 폴리펩티드 성분을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드 서열은 표준 재조합 기술을 사용하여 수득할 수 있다. 목적하는 폴리뉴클레오타이드 서열은 항체 생산 세포, 예를 들어 하이브리도마 세포로부터 분리 및 서열 분석할 수 있다. 또 다른 한편, 폴리뉴클레오타이드는 뉴클레오타이드 합성기 또는 PCR 기술을 사용하여 합성할 수 있다. 일단 수득되면, 폴리펩티드를 코딩하는 서열을, 원핵성 숙주에서 이중 폴리뉴클레오타이드를 복제 및 발현할 수 있는 재조합 백터 내로 삽입한다. 당해 분야에서 입수 가능하고 공지되어 있는 많은 백터가 본 발명의 목적을 위해 사용할 수 있다. 적당한 백터의 선택은 백터 내로 삽입하고자 하는 핵산의 크기와, 이러한 백터로 형질전환시키고자 하는 특정한 숙주 세포에 따라 주로 좌우될 것이다. 각 백터는 그의 기능 (이중 폴리뉴클레오타이드의 증폭 또는 발현, 또는 둘 다) 및 그것이 거주하는 특정한 숙주 세포와의 상용성에 따라서, 각종 성분들을 함유한다. 이러한 백터 성분에는 일반적으로, 복제 기점, 선별 마커 유전자, 프로모터, 리보솜 결합 부위 (RBS), 신호 서열, 이중 핵산 삽입물 및 전사 종결 서열이 포함되지만, 이에 제한되지 않는다.

[0206] 일반적으로, 숙주 세포와 상용성인 종으로부터 유래되는 제어 서열 및 레플리콘을 함유하는 플라스미드 백터를 이들 숙주와 연계해서 사용한다. 이러한 백터는 형질전환된 세포에서 표현형 선별을 제공해줄 수 있는 서열을 만들 뿐만 아니라 통상적으로 복제 부위를 수반하고 있다. 예를 들어, 이. 콜라이는 전형적으로, 이. 콜라이 종으로부터 유래된 플라스미드인 pBR322를 사용하여 형질전환시킨다. pBR322는 앰피실린 (Amp) 및 테트라사이클린 (Tet) 내성을 코딩하는 유전자를 함유하므로, 형질전환된 세포를 확인하기 위한 용이한 수단을 제공해준다. pBR322, 그의 유도체, 또는 기타 미생물성 플라스미드 또는 박테리오파아지는, 내인성 단백질의 발현을 위해 미생물성 유기체에 의해 사용될 수 있는 프로모터를 함유할 수도 있거나, 또는 이러한 프로모터를 함유하도록 변형시킬 수 있다. 특별한 항체의 발현을 위해 사용된 pBR322 유도체의 예가 다음 문헌에 상세히 기재되어 있다 [참고: Carter et al., 미국 특허 제5,648,237호].

[0207] 또한, 숙주 유기체와 상용성인 제어 서열 및 레플리콘을 함유하는 파아지 백터를, 이들 숙주와 연계해서 형질전환성 백터로서 사용할 수 있다. 예를 들어, 감수성 숙주 세포 (예: 이. 콜라이 LE392)를 형질전환시키는데 사용할 수 있는 재조합 백터를 제조하는데 있어 박테리오파아지, 예를 들어 λ GEM.TM.-11을 활용할 수 있다.

[0208] 본 발명의 발현 백터는 폴리펩티드 성분 각각을 코딩하는, 2개 이상의 프로모터-시스트론 (cistron) 쌍을 포함할 수 있다. 프로모터는 그의 발현을 조정하는 시스트론에 대해 상단 (5')에 위치한 비해독 조절 서열이다. 원핵성 프로모터는 전형적으로 2가지 부류, 즉 유도성 및 구성성으로 나누어진다. 유도성 프로모터는 배양 조건 상의 몇 가지 변화, 예를 들어 영양분의 존재 또는 부재, 또는 온도 상의 변화에 반응하여 그의 제어 하에 시스트론의 증가된 수준의 전사를 개시시키는 프로모터이다.

[0209] 각종의 잠재적 숙주 세포에 의해 인식된 수 많은 프로모터가 널리 공지되어 있다. 선별된 프로모터는 제한 효소 분해를 통하여 공급원 DNA로부터 프로모터를 제거할 수 있고, 이와 같이 단리된 프로모터 서열을 본 발명의 백터 내로 삽입함으로써, 경쇄 또는 중쇄를 코딩하는 시스트론 DNA에 작동적으로 연결될 수 있다. 천연 프로모터 서열과 많은 이중 프로모터 둘 다를 사용하여 표적 유전자의 증폭 및/또는 발현을 지시할 수 있다. 몇몇 양태에서는, 이중 프로모터가 활용되는데, 이는 이들이 일반적으로, 천연 표적 폴리펩티드 프로모터와 비교해서

보다 큰 전사 수준을 허용해주고, 발현된 표적 유전자를 보다 높은 수율로 산출시키기 때문이다.

- [0210] 원핵성 숙주의 경우에 사용하기 적합한 프로모터에는 PhoA 프로모터, β -갈락타마제 및 락토스 프로모터 시스템, 트립토판 (trp) 프로모터 시스템 및 하이브리드 프로모터, 예를 들어 tac 또는 trc 프로모터가 포함된다. 그러나, 세균에서 기능적인 기타 프로모터 (예를 들어, 기타 공지된 세균성 또는 과아지 프로모터)가 또한 적합하다. 그들의 뉴클레오타이드 서열이 공개되었기 때문에, 당업자는 요구되는 어떠한 제한 부위도 공급해주는 적응인자 또는 링커를 사용하여 표적 경쇄 및 중쇄를 코딩하는 시스트론에 상기 서열을 작동적으로 연결시킬 수 있다 [참고: Siebenlist et al.(1980) Cell, 20: 269].
- [0211] 본 발명의 한 국면에서, 재조합 벡터 내의 각 시스트론은 발현된 폴리펩티드가 막을 가로질러 전위되도록 지시하는 분비 신호 서열 성분을 포함한다. 일반적으로, 이러한 신호 서열은 벡터의 한 성분일 수 있거나, 또는 벡터 내로 삽입되는 표적 폴리펩티드 DNA의 일부일 수 있다. 본 발명의 목적상 선택된 신호 서열은 숙주 세포에 의해 인식되고 프로세싱되는 (즉, 신호 펩티다제에 의해 절단되는) 것이어야 한다. 이중 폴리펩티드에 대한 본래의 신호 서열을 인식 및 프로세싱하지 않는 원핵성 숙주 세포의 경우에는, 신호 서열을 예를 들어, 알칼리성 포스파타제, 페니실리나제, Ipp, 또는 열-안정한 장독소 II (STII) 리더, LamB, PhoE, PelB, OmpA 및 MBP로 이루어진 군 중에서 선택된 원핵성 신호 서열로 치환시킨다. 본 발명의 한 양태에서는, 발현 시스템의 양 시스트론에 사용된 신호 서열이 STII 신호 서열 또는 그의 변이체이다.
- [0212] 또 다른 국면에서, 본 발명에 따르는 면역글로불린의 생성은 숙주 세포의 세포질에서 일어날 수 있으므로, 각 시스트론 내에 분비 신호 서열이 존재할 필요는 없다. 이와 관련하여, 면역글로불린 경쇄 및 중쇄를 발현하고, 폴딩한 다음 어셈블리하여 세포질 내에 기능적 면역글로불린을 형성시킨다. 특정의 숙주 균주 (예: 이. 콜라이 trxB⁻ 균주)는 디설파이드 결합 형성에 선호되는 세포질 조건을 제공함으로써, 발현된 단백질 소단위체의 적당한 폴딩과 어셈블리가 이루어질 수 있도록 한다 [참고: Proba and Pluckthun Gene, 159:203 (1995)].
- [0213] 본 발명은 발현된 폴리펩티드 성분들의 정량적 비를 조정하여, 분비되어 적절하게 어셈블리된 본 발명의 항체의 수율을 최대화할 수 있는 발현 시스템을 제공한다. 이러한 조정은 폴리펩티드 성분들에 대한 해독 강도를 동시에 조정함으로써 적어도 부분적으로 수행한다.
- [0214] 해독 강도를 조정하기 위한 한 가지 기술이 미국 특허 제5,840,523호 (Simmons et al.)에 기재되어 있다. 이러한 접근법은 시스트론 내의 해독 개시 영역 (TIR)의 변이체를 활용한다. 소정의 TIR에 대해서는, 일정 범위의 해독 강도를 지닌 일련의 아미노산 또는 핵산 서열 변이체를 창출시킴으로써, 특이적 쇄의 목적하는 발현 수준을 위해 상기 인자를 조정시킬 수 있는 편리한 수단을 제공할 수 있다. TIR 변이체는 아미노산 서열을 변경시킬 수 있는 코돈 변화를 가져다 주는 통상적인 돌연변이 유발 기술에 의해 생성시킬 수 있긴 하지만, 뉴클레오타이드 서열 상의 침묵 변화가 바람직하다. TIR 내에서의 변경에는, 예를 들어 신호 서열 상의 변경과 함께, 샤인-달가르노 (Shine-Dalgarno) 서열의 수 또는 공간 상의 변경이 포함될 수 있다. 돌연변이체 신호 서열을 생성시키기 위한 한 가지 바람직한 방법은 신호 서열의 아미노산 서열은 변화시키지 않는 (즉, 변화는 침묵 변화이다) 코딩 서열의 맨 처음에 "코돈 뱅크"를 생성시키는 것이다. 이는 각 코돈의 제3 뉴클레오타이드 위치를 변화시킴으로써 달성시킬 수 있으며; 부가적으로, 루이신, 세린 및 아르기닌과 같은 몇몇 아미노산은 상기 뱅크를 만드는데 있어 복잡성을 부가해줄 수 있는 다중 제1 및 제2 위치를 갖는다. 이러한 돌연변이 유발 방법은 문헌 [참고: Yansura et al. (1992) METHODS: A Companion to Methods in Enzymol., 4: 151-158]에 상세히 기재되어 있다.
- [0215] 바람직하게는, 내부에 각 시스트론에 대한 일정 범위의 TIR 강도를 지닌 벡터 세트를 생성시킨다. 이러한 제한된 세트는 각종 TIR 강도 조합 하에 목적하는 항체 생성물을 산출시킬 뿐만 아니라 각 쇄의 발현 수준 비교를 제공해준다. TIR 강도는 미국 특허 제5,840,523호 (Simmons et al.)에 상세히 기재된 바와 같은 리포터 유전자의 발현 수준을 정량화함으로써 결정할 수 있다. 해독 강도 비교를 기준으로 하여, 본 발명의 발현 벡터 구조물에 조합될 목적하는 개개의 TIR을 선별한다.
- [0216] 본 발명의 항체를 발현하는데 적합한 원핵성 숙주 세포에는 원시세균 (Archaeobacteria) 및 유박테리아 (Eubacteria), 예를 들어 그람-음성 또는 그람-양성 유기체가 포함된다. 유용한 세균의 예에는 에스케리차 (Escherichia), 예를 들어 이. 콜라이 (E. coli), 바실루스 (Bacillus), 예를 들어 비. 서브틸리스 (B. subtilis), 엔테로박테리아 (Enterobacteria), 슈도모나스 (Pseudomonas) 종, 예를 들면, 피. 애루기노사 (P. aeruginosa), 살모넬라 티피무리움 (Salmonella typhimurium), 세라티아 마르세스칸스 (Serratia marcescans), 클렙시엘라 (Klebsiella), 프로테우스 (Proteus), 쉬겔라 (Shigella), 리조비아 (Rhizobia), 비트레오실라 (Vitreoscilla), 또는 파라코쿠스 (Paracoccus)가 포함된다. 한 양태에서는, 그람-음성 세포를 사용한다. 한

양태에서는, 이. 콜라이 세포를 본 발명에 대한 숙주로서 사용한다. 이. 콜라이 균주의 예에는 W3110 [참고: Bachmann, *Cellular and Molecular Biology*, vol. 2 (Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1987), pp. 1190-1219; ATCC 기탁 번호 27,325] 및 그의 유도체, 예를 들어 유전자형 W3110 $\Delta fhuA$ ($\Delta tonA$) $ptr3 lac Iq lacL8 \Delta ompT \Delta (nmpc-fepE) degP41 kan^R$

을 갖는 균주 33D3이 포함된다 [참고: 미국 특허 제5,639,635호]. 기타 균주 및 그의 유도체, 예를 들어 이. 콜라이 294 (ATCC 31,446), 이. 콜라이 B, 이. 콜라이_X 1776 (ATCC 31,537) 및 이. 콜라이 RV308 (ATCC 31,608)이 또한 적합하다. 이들 예는 제한적이라기 보다는 예시적이다. 규정된 유전자형을 지닌 상기 언급된 세균의 유도체를 구축하는 방법은 당해 분야에 공지되어 있고, 예를 들어 문헌 [참고: Bass et al., *Proteins*, 8:309-314 (1990)]에 기재되어 있다. 세균 세포 내에서 레플리콘의 복제 가능성을 고려하여 적당한 세균을 선택하는 것이 일반적으로 필요하다. 예를 들어, 레플리콘을 공급하기 위해 널리 공지된 플라스미드, 예를 들어 pBR322, pBR325, pACYC177, 또는 pKN410을 사용하는 경우에 숙주로서 이. 콜라이, 세라티아 또는 살모넬라 종을 사용하는 것이 적합할 수 있다. 전형적으로, 숙주 세포는 최소량의 단백질분해성 효소를 분비해야 하고, 부가의 프로테아제 억제제가 세포 배양물에 도입되는 것이 요망될 수 있다.

[0217] 항체 생성

[0218] 숙주 세포를 상기 언급된 발현 벡터로 형질전환시키고; 프로모터를 유도하거나, 형질전환체를 선별하거나 또는 목적하는 서열을 코딩하는 유전자를 증폭시키기에 적당한 바 대로 변형시킨 통상적인 영양 배지에서 배양한다.

[0219] 형질전환은 DNA를 원핵성 숙주 내로 도입하여, 이러한 DNA가 염색체의 요소로서 복제 가능하거나 또는 염색체성 통합물에 의해 복제 가능하도록 하는 것을 의미한다. 사용된 숙주 세포에 따라서, 형질전환은 이러한 세포에 적당한 표준 기술을 사용하여 수행한다. 염화칼슘을 이용한 칼슘 처리는 일반적으로, 실제적인 세포-벽 장벽을 함유하는 세균성 세포에 대해 사용한다. 또 다른 형질전환 방법은 폴리에틸렌 글리콜/DMSO를 이용한다. 사용된 또 다른 기술은 전기천공이다.

[0220] 본 발명의 폴리펩티드를 생성시키기 위해 사용된 원핵성 세포는 당해 분야에 공지되어 있고 선별된 숙주 세포의 배양을 위해 적합한 배지에서 성장시킨다. 적합한 배지의 예에는 필수 영양분 보충물이 부가된 루리아 육즙 (LB)이 포함된다. 몇몇 양태에서는, 상기 배지가 또한, 발현 벡터 구축을 기초로 하여 선택된 선별 작용제를 함유하여, 이러한 발현 벡터를 함유하는 원핵성 세포의 성장을 선택적으로 허용해 준다. 예를 들어, 앰피실린 내성 유전자를 발현하는 세포의 성장을 위해 앰피실린을 배지에 가한다.

[0221] 탄소, 질소 및 무기 인산염 공급원 이외의 모든 필수 보충물이, 단독으로 도입되거나 또는 또 다른 보충물 또는 배지 (예: 복합 질소원)과의 혼합물로서 도입된 적당한 농도로 포함될 수 있다. 임의로, 배양 배지가 글루타치온, 시스테인, 시스타민, 티오글리콜레이트, 디티오에리트릴 및 디티오트레이톨로 이루어진 군 중에서 선택된 하나 이상의 환원제를 함유할 수 있다.

[0222] 원핵성 숙주 세포를 적합한 온도 하에 배양한다. 예를 들어, 이. 콜라이 성장에 바람직한 온도 범위는 약 20°C 내지 약 39°C, 보다 바람직하게는 약 25°C 내지 약 37°C, 보다 더 바람직하게는 약 30°C이다. 배지의 pH는 주로 숙주 유기체에 따라서 약 5 내지 약 9 범위 내의 모든 pH 값일 수 있다. 이. 콜라이의 경우, pH가 바람직하게는 약 6.8 내지 약 7.4, 보다 바람직하게는 약 7.0이다.

[0223] 유도성 프로모터가 본 발명의 발현 벡터에 사용되는 경우에는, 이러한 프로모터의 활성화에 적합한 조건 하에서 단백질 발현을 유도시킨다. 본 발명의 한 국면에서는, 폴리펩티드의 전사를 제어하기 위해 PhoA 프로모터를 사용한다. 따라서, 형질전환된 숙주 세포를, 유도를 위해 인산염-제한 배지에서 배양한다. 바람직하게는, 이러한 인산염-제한 배지가 C.R.A.P. 배지이다 [참고: 예를 들어, Simmons et al., *J. Immunol. Methods* (2002), 263: 133-147]. 당해 분야에 공지된 바와 같이, 이용된 벡터 구조물에 따라서 각종의 기타 유도제를 사용할 수 있다.

[0224] 한 양태에서는, 본 발명의 발현된 폴리펩티드가 숙주 세포의 주변세포질 (periplasm) 내로 분비되어, 이로부터 회수된다. 단백질 회수는 전형적으로, 미생물을 일반적으로 삼투압 속, 초음파 처리 또는 용해와 같은 수단에 의해 붕괴시키는 것을 포함한다. 세포가 일단 붕괴되면, 세포 부스러기 또는 완전 세포를 원심분리 또는 여과함으로써 제거할 수 있다. 단백질을, 예를 들어 친화성 수지 크로마토그래피함으로써 추가로 정제할 수 있다. 또 다른 한편, 단백질을 배양 배지 내로 수송하고, 이 안에서 분리시킬 수 있다. 세포를 배양물로부터 제거하고, 배양 상등액을 여과시킨 다음, 생성된 단백질의 추가 정제를 위해 이를 농축시킬 수 있다. 발현된 폴리펩

티드를, 통상적으로 공지된 방법, 예를 들어 폴리아크릴아미드 겔 전기영동 (PAGE) 및 웨스턴 블롯 (Western blot) 검정을 이용하여 추가로 분리 및 확인할 수 있다.

[0225] 본 발명의 한 국면에서는, 항체를 발효 공정에 의해 대량으로 생성시킬 수 있다. 각종 대규모 공급-배치식 발효 과정이 재조합 단백질 생성을 위해 이용 가능하다. 대규모 발효기는 용량이 1,000 리터 이상, 바람직하게는 약 1,000 내지 100,000 리터이다. 이들 발효기는 산소 및 영양분, 특히 글루코스 (바람직한 탄소/에너지원)을 분배시키기 위해 진탕기 임펠러를 사용한다. 소규모 발효는 일반적으로, 용적이 대략 100 리터 이하인 발효기 내에서의 발효를 지칭하는데, 이는 약 1 리터 내지 약 100 리터 범위일 수 있다.

[0226] 발효 공정에서는, 단백질 발현 유도가 전형적으로, 세포를 적합한 조건 하에 목적 밀도, 예를 들어 약 180 내지 220의 OD₅₅₀으로 성장 (이 단계에서는 세포가 초기 정지 상에 있다)시킨 후에 개시된다. 당해 분야에 공지되어 있고 상기 언급된 바와 같이, 이용된 벡터 구조물에 따라서 각종 유도제를 사용할 수 있다. 유도시키기에 앞서, 세포를 보다 단기간 동안 성장시킬 수 있다. 세포를 통상적으로 약 12 내지 50 시간 동안 유도시키지만, 보다 길거나 짧은 유도 시간을 사용할 수도 있다.

[0227] 본 발명의 폴리펩티드의 생산 수율과 질을 추가로 개선시키기 위해, 각종 발효 조건을 변형시킬 수 있다. 예를 들어, 분비된 항체 폴리펩티드의 적당한 어셈블리와 폴딩을 개선시키기 위해, 샤프론 (chaperone) 단백질, 예를 들어 Dsb 단백질 (DsbA, DsbB, DsbC, DsbD 및/또는 DsbG) 또는 FkpA (샤프론 활성을 지니고 있는 펩티딜프로필 시스,트랜스-이소머라제)를 과발현하는 부가의 벡터를 사용하여 숙주 원핵성 세포를 공동-형질전환시킬 수 있다. 샤프론 단백질은 세균성 숙주 세포에서 생성된 이종 단백질의 적당한 폴딩과 용해도를 촉진시키는 것으로 입증되었다 [참고: Chen et al. (1999) J. Bio. Chem., 274: 19601-19605; 미국 특허 제6,083,715호 (Georgiou et al.); 미국 특허 제6,027,888호 (Georgiou et al.); Bothmann and Pluckthun (2000) J. Biol. Chem., 275: 17100-17105; Ramm and Pluckthun (2000) J. Biol. Chem., 275: 17106-17113; Arie et al. (2001) Mol. Microbiol., 39: 199-210].

[0228] 발현된 이종 단백질 (특히, 단백질분해적으로 민감한 단백질)의 단백질분해를 최소화하기 위해서는, 단백질분해성 효소가 결핍된 특정 숙주 균주를 본 발명에 사용할 수 있다. 예를 들어, 숙주 세포 균주를 변형시켜, 공지된 세균성 프로테아제, 예를 들어 프로테아제 III, OmpT, DegP, Tsp, 프로테아제 I, 프로테아제 Mi, 프로테아제 V, 프로테아제 VI 및 그들의 조합물을 코딩하는 유전자에서 유전적 돌연변이(들)를 수행할 수 있다. 몇몇 이. 콜라이 프로테아제-결핍성 균주가 이용 가능하고, 이는 예를 들어, 문헌 [참고: Joly et al. (1998) 상기 참고; 미국 특허 제5,264,365호 (Georgiou et al.); 미국 특허 제5,508,192호 (Georgiou et al.); Hara et al., Microbial Drug Resistance, 2: 63-72 (1996)]에 기재되어 있다.

[0229] 한 양태에서는, 단백질분해성 효소가 결핍되고 하나 이상의 샤프론 단백질을 과발현하는 플라스미드로 형질전환시킨 이. 콜라이 균주를 본 발명의 발현 시스템에서 숙주 세포로서 사용한다.

[0230] 항체 정제

[0231] 한 양태에서는, 본원에서 생성된 항체 단백질을 추가로 정제하여, 추가의 검정과 사용을 위해 실질적으로 균질한 제제를 수득한다. 당해 분야에 공지된 표준 단백질 정제 방법을 이용할 수 있다. 다음 과정은 적합한 정제 과정의 예들이다: 면역친화성 또는 이온 교환 칼럼 상에서의 분획화, 에탄올 침전, 역상 HPLC, 실리카 또는 양이온-교환 수지, 예를 들어 DEAE 상에서의 크로마토그래피, 크로마토포커싱 (chromatofocusing), SDS-PAGE, 황산암모늄 침전, 및 예를 들어, 세파텍스 G-75를 이용한 겔 여과.

[0232] 한 국면에서는, 본 발명의 완전한 길이의 항체 생성물의 면역친화성 정제를 위해, 고체 상에 고정된 단백질 A를 사용한다. 단백질 A는 항체의 Fc 영역과 고 친화성으로 결합하는, 스탕필로코쿠스 아우레아스 (*Staphylococcus aureas*)로부터의 41 kD 세포벽 단백질이다 [참고: Lindmark et al (1983) J. Immunol. Meth. 62:1-13]. 단백질 A가 고정되는 고체 상은 바람직하게, 유리 또는 실리카 표면을 포함하는 칼럼, 보다 바람직하게는 제어 공극 유리 칼럼 또는 규산 칼럼이다. 몇몇 적용 분야에서는, 오염물의 비-특이적 부착을 방지하기 위해, 상기 칼럼을 글리세롤과 같은 시약으로 피복시켰다.

[0233] 정제 제1 단계로서, 상기 언급된 바와 같은 세포 배양물로부터 유래된 제제를 단백질 A 고정된 고체 상에 적용하여, 관심있는 항체가 단백질 A와 특이적으로 결합할 수 있게 한다. 이어서, 상기 고체 상을 세척하여 이러한 고체 상과 비-특이적으로 결합된 오염물을 제거한다. 최종적으로, 관심있는 항체를 용출에 의해 고체 상으로부터 회수한다.

- [0234] 진핵성 숙주 세포를 이용한 항체의 생성
- [0235] 박터 성분에는 일반적으로, 다음 중의 하나 이상이 포함되지만, 이에 제한되지 않는다: 신호 서열, 복제 기점, 하나 이상의 마커 유전자, 증강인자(enhancer) 요소, 프로모터, 및 전사 종결 서열.
- [0236] (i) 신호 서열 성분
- [0237] 진핵성 숙주 세포에 사용하기 위한 박터는 신호 서열, 또는 관심있는 성숙한 단백질 또는 폴리펩티드의 N-말단에 특이적 절단 부위를 갖는 기타 폴리펩티드를 함유할 수도 있다. 선별된 이중 신호 서열은 바람직하게는, 숙주 세포에 의해 인식되고 프로세싱되는 (즉, 신호 펩티다제에 의해 절단되는) 것이다. 포유류 세포 발현에서는, 포유류 신호 서열 뿐만 아니라 바이러스성 분비 리더, 예를 들어 단순 포진 gD 신호를 이용할 수 있다.
- [0238] 이러한 전구체 영역에 대한 DNA가 관독 프레임으로 본 발명의 항체를 코딩하는 DNA에 연결된다.
- [0239] (ii) 복제 기점
- [0240] 일반적으로, 복제 기점 성분은 포유류 발현 박터에 필요치 않다. 예를 들어, SV40 기점이 전형적으로 사용될 수 있는데, 이는 단지 이것이 초기 프로모터를 함유하기 때문이다.
- [0241] (iii) 선별 유전자 성분
- [0242] 발현 및 클로닝 박터는 선별성 마커로 명명되기도 하는 선별 유전자를 함유할 수 있다. 전형적인 선별 유전자는 (a) 항생제 또는 기타 독소, 예를 들어 앰피실린, 네오마이신, 메토틱렉세이트 또는 테트라사이클린에 대한 내성을 부여해주는 단백질; (b) 적절한 경우, 영양요구성 결핍증을 보충해주는 단백질; 또는 (c) 복합 배지로부터 입수 가능하지 않은 중요한 영양분을 공급해 주는 단백질을 코딩한다.
- [0243] 선별 도식의 한 가지 예는 숙주 세포의 성장을 중지시키기 위한 약물을 활용한다. 이중 유전자를 이용하여 성공적으로 형질전환시킨 세포는 약물 내성을 부여해 주는 단백질을 생산하므로, 선별 접생에서 살아 남는다. 이러한 우성 선별의 예들은 약물 네오마이신, 미코페놀산 및 히그로마이신을 이용한다.
- [0244] 포유류 세포에 적합한 선별성 마커의 또 다른 예는 항체 핵산을 수용하기에 적절한 세포를 확인시켜 줄 수 있는 것인데, 예를 들면 DHFR, 티미딘 키나제, 메탈로티오네인-I 및 -II, 바람직하게는 영양류 메탈로티오네인 유전자, 아데노신 데아미나제, 오르니틴 데카복실라제 등이 있다.
- [0245] 예를 들어, DHFR 선별 유전자로 형질전환시킨 세포는 먼저, 형질전환체 모두를 DHFR의 경쟁적 길항제인 메토틱렉세이트 (Mtx)를 함유하는 배양 배지에서 배양함으로써 확인한다. 야생형 DHFR이 이용되는 경우에 적당한 숙주 세포는, DHFR 활성이 결핍된 중국산 햄스터 난소 (CHO) 세포주 (예: ATCC CRL-9096)이다.
- [0246] 또 다른 한편, 항체, 야생형 DHFR 단백질 및 또 다른 선별성 마커, 예를 들어 아미노글리코시드 3'-포스포트랜스퍼라제 (APH)를 코딩하는 DNA 서열로 형질전환시켰거나 공동-형질전환시킨 숙주 세포 (특히, 내인성 DHFR을 함유하는 야생형 숙주)는, 선별성 마커, 예를 들어 아미노글리코시드성 항생제 (예: 카나마이신, 네오마이신 또는 G418)에 대한 선별제를 함유하는 배지에서 세포 성장시킴으로써 선별할 수 있다 [참고: 미국 특허 제 4,965,199호].
- [0247] (iv) 프로모터 성분
- [0248] 발현 및 클로닝 박터는 통상적으로, 숙주 유기체에 의해 인식되고 항체 폴리펩티드 핵산에 작동적으로 연결되는 프로모터를 함유한다. 진핵생물에 대한 프로모터 서열이 공지되어 있다. 사실상 모든 진핵성 유전자는, 전사가 개시되는 부위로부터 대략 25 내지 30개 염기 상단에 위치한 AT-풍부 영역을 갖는다. 많은 유전자의 전사 개시 부위로부터 70 내지 80개 염기 상단에서 발견된 또 다른 서열은 CNCAAT 영역인데, 여기서 N은 어떠한 뉴클레오티드일 수 있다. 대부분의 진핵성 유전자의 3' 말단에는 AATAAA 서열이 존재하는데, 이는 폴리 A 말미부를 코딩 서열의 3' 말단에 부가하기 위한 신호일 수 있다. 이들 서열 모두는 진핵성 발현 박터 내로 적합하게 삽입된다.
- [0249] 포유류 숙주 세포에서 박터로부터의 항체 폴리펩티드 전사는, 예를 들어 폴리오마 바이러스, 조류폭스 (fowlpox) 바이러스, 아데노바이러스 (예: 아데노바이러스 2), 소의 유두종 바이러스, 조류 육종 바이러스, 시토메갈로바이러스, 레트로바이러스, B형 간염 바이러스 및 원숭이 바이러스 40 (SV40) 등의 바이러스 계통으로부터 수득한 프로모터, 이중 포유류 프로모터, 예를 들어 악틴 프로모터 또는 면역글로불린 프로모터, 및 열-속

프로모터에 의해 제어되는데, 단 이들 프로모터는 숙주 세포 시스템과 상용성 (화합성)이어야 한다.

[0250] SV40 바이러스의 초기 및 후기 프로모터는 SV40 바이러스성 복제 기점을 함유하기도 하는 SV40 제한 단편으로서 편리하게 수득된다. 인간 시토크로마리 바이러스의 즉발형 프로모터는 HindIII E 제한 단편으로서 편리하게 수득된다. 벡터로서 소의 유두종 바이러스를 사용하여 포유류 숙주에서 DNA를 발현하기 위한 시스템이 미국 특허 제4,419,446호에 기재되어 있다. 이러한 시스템의 변형이 미국 특허 제4,601,978호에 기재되어 있다. 단순 포진 바이러스로부터의 티미딘 키나제 프로모터의 제어 하에 마우스 세포에서 인간 β -인터페론 cDNA를 발현하는 것에 관해서는 다음 문헌을 참고할 수 있다 [참고: Reyes et al., Nature, 297:598-601 (1982)]. 또 다른 한편, 라우스 (Rous) 육종 바이러스 장-말단 반복 서열을 프로모터로서 사용할 수 있다.

[0251] (v) 증강인자 요소 성분

[0252] 고등 진핵생물에 의해 본 발명의 항체 폴리펩티드를 코딩하는 DNA를 전사하는 것은 종종, 증강인자 서열을 벡터 내로 삽입함으로써 증가된다. 많은 증강인자 서열이 현재 포유류 유전자로부터 공지되어 있다 (글로빈, 엘라스 타제, 알부민, α -태아단백질 및 인슐린). 그러나, 전형적으로는, 진핵성 세포 바이러스로부터의 증강인자가 사용될 것이다. 이의 예에는 복제 기점 뒤쪽 (bp 100-270)의 SV40 증강인자, 시토크로마리 바이러스 초기 프로모 터 증강인자, 복제 기점의 뒤쪽의 폴리오마 증강인자, 및 아데노바이러스 증강인자가 포함된다. 진핵성 프로 모 터 활성화를 위한 증강 요소에 관해서는 다음 문헌을 참고할 수 있다 [참고: Yaniv, Nature, 297:17-18 (1982)]. 증강인자는 본 발명의 항체 폴리펩티드 코딩 서열에 대한 5' 또는 3' 위치에서 벡터 내로 스플라이싱 될 수 있지만, 바람직하게는 프로모터로부터의 5' 부위에 위치한다.

[0253] (vi) 전사 종결 성분

[0254] 진핵성 숙주 세포에 사용된 발현 벡터는 또한, 전사를 종결시키고 mRNA를 안정화시키는데 필요한 서열을 함유할 것이다. 이러한 서열은 진핵성 또는 바이러스성 DNA 또는 cDNA의 비해독 영역의 5' 말단, 및 종종 3' 말단으로 부터 통상 이용 가능하다. 이들 영역은 항체를 코딩하는 mRNA의 비해독 부분에서 폴리아데닐화 단편으로서 전 사된 뉴클레오티드 절편을 함유한다. 한 가지 유용한 전사 종결 성분은 소의 성장 호르몬 폴리아데닐화 영역이 다 [참고: WO 94/11026; 및 이에 기재된 발현 벡터].

[0255] (vii) 숙주 세포의 선별 및 형질전환

[0256] 본원 내의 벡터에서 DNA를 클로닝 또는 발현하는데 적합한 숙주 세포에는 본원에 기재된 고등 진핵생물 세포 (척추동물 숙주 세포 포함)가 포함된다. 척추동물 세포를 배양하여 증식시키는 것이 (조직 배양) 통상적인 과 정이 되었다. 유용한 포유류 숙주 세포주의 예는 SV40에 의해 형질전환된 원숭이 신장 CV1 주 (COS-7, ATCC CRL 1651); 현탁 배양 하에 성장하도록 서브클로닝된 인간 배아 신장주 293 세포 [참고: Graham et al., J. Gen Virol. 36:59 (1977)]; 유아 햄스터 신장 세포 (BHK, ATCC CCL 10); 중국산 햄스터 난소 세포/-DHFR [CHO; 참고: Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 77: 4216 (1980)]; 마우스 세르톨리 (sertoli) 세포 [TM4; 참고: Mather, Biol. Reprod. 23: 243-251 (1980)]; 원숭이 신장 세포 (CV1 ATCC CCL 70); 아프리카산 그린 원 승이 신장 세포 (VERO-76, ATCC CRL-1587); 인간 자궁경부 암종 세포 (HELA, ATCC CCL 2); 개의 신장 세포 (MDCK, ATCC CCL 34); 버팔로 랫트 간 세포 (BRL 3A, ATCC CRL 1442); 인간 폐 세포 (W138, ATCC CCL 75); 인 간 간 세포 (Hep G2, HB 8065); 마우스 유방 종양 (MMT 060562, ATCC CCL51); TRI 세포 [참고: Mather et al., Annals N. Y. Acad. Sci. 383: 44-68 (1982)]; MRC 5 세포; FS4 세포; 및 인간 간세포암 주 (Hep G2)이다.

[0257] 숙주 세포를 항체 생성을 위해 상기 언급된 발현 또는 클로닝 벡터로 형질전환시키고; 프로모터를 유도하거나, 형질전환체를 선별하거나 또는 목적하는 서열을 코딩하는 유전자를 증폭시키기에 적당한 배 대로 변형시킨 통상 적인 영양 배지에서 배양한다.

[0258] (viii) 숙주 세포 배양

[0259] 본 발명의 항체를 생성시키기 위해 사용된 숙주 세포는 각종 배지에서 배양할 수 있다. 시판용 배지, 예를 들 면 햄스 (Ham's) F10 (공급처: Sigma), 최소 필수 배지 [(MEM); 공급처: Sigma], RPMI-1640 (공급처: Sigma), 및 돌백코 변형 이글 배지 [(DMEM); 공급처: Sigma]가 상기 숙주 세포를 배양하는데 적합하다. 또한, 다음 문 헌에 기재된 배지 중의 어떠한 것도 숙주 세포에 대한 배양 배지로서 사용할 수 있다 [참고: Ham et al., Meth. Enz. 58: 44 (1979); Barnes et al., Anal. Biochem. 102: 255 (1980); 미국 특허 제4,767,704호; 제 4,657,866호; 제4,927,762호; 제4,560,655호; 또는 제5,122,469호; WO 90/03430; WO 87/00195; 또는 미국 특허 제(제)30,985호]. 이들 배지 모두는 필요에 따라, 호르몬 및/또는 기타 성장 인자 (예: 인슐린, 트랜스페린, 또는 표피 성장 인자), 염 (예: 염화나트륨, 칼슘, 마그네슘 및 인산염), 완충제 (예: HEPES), 뉴클레오티드

(예: 아테노신 및 티미딘), 항생제 (예: 겐타마이신(GENTAMYCIN™) 약물), 미량 원소 (마이크로몰 범위의 최종 농도로 통상 존재하는 무기 화합물로서 정의됨), 및 글루코스 또는 등가 에너지원으로 보충시킬 수 있다. 당업자에게 공지되어 있는 기타 모든 필수 보충물이 적당한 농도로 포함될 수도 있다. 배양 조건, 예를 들어 온도, pH 등은 발현을 위해 선별된 숙주 세포와 함께 이미 사용되고 있는 것이고, 이는 당업자에게 명백할 것이다.

[0260] (ix) 항체의 정제

[0261] 제조합 기술을 사용하는 경우, 항체를 세포내적으로 생성시킬 수 있거나 또는 배지 내로 직접 분비할 수 있다. 항체가 세포내적으로 생성되는 경우에는, 제1 단계로서 숙주 세포 또는 용해된 단편의 미세 부스러기를, 예를 들어 원심분리 또는 한외여과에 의해 제거한다. 항체가 배지 내로 분비되는 경우에는, 이러한 발현 시스템으로부터의 상등액을 먼저 일반적으로, 시판용 단백질 농축 필터, 예를 들어 아미콘 (Amicon) 또는 밀리포어 펠리콘 (Millipore Pellicon) 한외여과 장치를 사용하여 농축시킨다. 프로테아제 억제제, 예를 들어 PMSF를 전술된 단계들 중의 어느 단계에 포함시켜 단백질 분해를 억제시킬 수 있고, 항생제를 포함시켜 우발적 오염물의 성장을 방지시킬 수 있다.

[0262] 세포로부터 제조된 항체 조성물은, 예를 들어 히드록실아파타이트 크로마토그래피, 겔 전기영동, 투석, 및 친화 크로마토그래피를 이용하여 정제할 수 있는데, 친화 크로마토그래피가 바람직한 정제 기술이다. 단백질 A가 친화성 리간드로서 적합한지의 여부는 항체에 존재하는 모든 면역글로불린 Fc 도메인의 중 및 이소형에 좌우된다. 단백질 A를 사용하여 인간 $\gamma 1$, $\gamma 2$, 또는 $\gamma 4$ 중쇄에 의거하여 항체를 정제할 수 있다 [참고: Lindmark et al., J. Immunol. Meth. 62: 1-13 (1983)]. 단백질 G는 모든 마우스 이소형과 인간 $\gamma 3$ 에 권장된다 [참고: Guss et al., EMBO J. 5: 15671575 (1986)]. 친화성 리간드가 부착되는 매트릭스는 가장 흔히는 아가로스지만, 기타 매트릭스도 이용 가능하다. 기계적으로 안정적인 매트릭스, 예를 들어 제어 공극 유리 또는 폴리(스티렌디비닐)벤젠은 아가로스를 이용하여 달성될 수 있는 것보다 더 신속한 유속 및 보다 짧은 처리 시간을 허용해 준다. 항체가 C₃ 도메인을 포함하는 경우, 베이커본드 (Bakerbond) ABX™ 수지 (공급처: J. T. Baker, Phillipsburg, NJ)가 정제에 유용하다. 단백질을 정제하기 위한 기타 기술, 예를 들어 이온 교환 칼럼 상에서의 분획화, 에탄올 침전, 역상 HPLC, 실리카 상에서의 크로마토그래피, 헤파린 SEPHAROSE™ 상에서의 크로마토그래피, 음이온 또는 양이온 교환 수지 (예: 폴리아스파르트산 칼럼) 상에서의 크로마토그래피, 크로마토 포커싱, SDS-PAGE, 및 황산암모늄 침전을, 회수하고자 하는 항체에 따라서 이용하기도 한다.

[0263] 예비 정제 단계(들) 후, 관심있는 항체와 오염물을 포함하는 혼합물을 대상으로 하여, 바람직하게는 저염 농도 (예: 약 0 내지 0.25 M 염)에서 수행된 pH 약 2.5 내지 4.5 용출 완충제를 사용하여 낮은 pH의 소수성 상호 작용 크로마토그래피할 수 있다.

[0264] 활성 검증

[0265] 본 발명의 항체는 당해 분야에 공지된 각종 검정에 의해 그들의 물리적/화학적 특성과 생물학적 기능에 관해 성상 확인할 수 있다.

[0266] 정제된 면역글로불린은 일련의 검정, 예를 들어 N-말단 서열 분석, 아미노산 분석, 비-변성 크기 배제 고압 액체 크로마토그래피 (HPLC), 질량 분광법, 이온 교환 크로마토그래피 및 파파인 분해 등에 의해 추가로 성상 확인할 수 있다.

[0267] 본 발명의 특정 양태에서는, 본원에서 생성된 면역글로불린을 대상으로 하여, 그들의 생물학적 활성을 알아보기 위해 분석한다. 몇몇 양태에서는, 본 발명의 면역글로불린을 대상으로 하여, 그들의 항원 결합성 활성에 관해 시험한다. 당해 분야에 공지되어 있고 본원에서 사용될 수 있는 항원 결합성 검정에는 웨스턴 블롯과 같은 기술을 사용하는 모든 직접 또는 경쟁적 결합 검정, 방사성 면역검정, ELISA (효소 결합 면역흡착 검정), "샌드위치" 면역검정, 면역침전 검정, 형광성 면역검정, 및 단백질 A 면역검정이 포함되지만, 이에 제한되지 않는다. 예시되는 항원 결합성 검정이 다음 실시예 섹션에 제공된다.

[0268] 한 양태에서, 본 발명은 모든 효과기 기능은 아니지만, 몇몇 효과기 기능을 보유하고 있으므로, 생체 내에서의 항체의 반감기가 중요하긴 하지만 특정의 효과기 기능 (예: 보체 및 ADCC)이 불필요하거나 해로운 많은 적용 분야에서 바람직한 후보가 되는 변형된 항체를 고려한다. 특정 양태에서는, 이로써 생성된 면역글로불린의 Fc 활성을 측정하여, 단지 목적하는 특성 만이 유지되도록 한다. 시험관내 및/또는 생체내 세포독성 검정을 수행하여 CDC 및/또는 ADCC 활성의 저하/고갈을 확인할 수 있다. 예를 들어, Fc 수용체 (FcR) 결합 검정을 수행하여, 항체에게 Fc γ R결합성은 결여되지만 (이로써 ADCC 활성이 결여되는 것으로 추정됨), FcRn 결합 능력은 보유하도록 할 수 있다. ADCC를 매개하는데 있어 주요 세포인 NK 세포는 Fc γ RIII 만을 발현하는 반면, 단핵구는 Fc γ

RI, Fc γ RII 및 Fc γ RIII를 발현한다. 조혈 세포 상에서의 FcR 발현은 문헌 [참고: Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol 9: 457-92 (1991)]의 464면의 표 3에 요약되어 있다. 관심있는 분자의 ADCC 활성을 평가하기 위한 시험관내 검정의 예가 미국 특허 제5,500,362호 또는 제5,821,337호에 기재되어 있다. 이러한 검정에 유용한 효과기 세포에는 말초혈 단핵 세포 (PBMC) 및 천연 킬러 (NK) 세포가 포함된다. 또 다른 한편 또는 부가적으로, 관심있는 분자의 ADCC 활성은 생체 내에서, 예를 들어 문헌 [참고: Clynes et al. PNAS (USA) 95:652-656 (1998)]에 기재된 바와 같은 동물 모델에서 평가할 수 있다. C1q 결합 검정을 또한 수행하여 항체가 C1q와 결합할 수 없으므로 CDC 활성이 결여된다는 사실을 확인할 수 있다. 보체 활성화를 평가하기 위해, 예를 들어 문헌 [참고: Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods 202:163 (1996)]에 기재된 바와 같은 CDC 검정을 수행할 수 있다. FcRn 결합성 및 생체내 청소/반감기 결정은 또한, 당해 분야에 공지된 방법을 사용하여 수행할 수 있다.

[0269] 인간화 항체

[0270] 본 발명은 인간화 항체를 포괄한다. 비-인간 항체를 인간화시키기 위한 각종 방법이 당해 분야에 공지되어 있다. 예를 들어, 인간화 항체는 비-인간 공급원으로부터 도입된 하나 이상의 아미노산 잔기를 갖는다. 이들 비-인간 아미노산 잔기는 종종 "유입 (import)" 잔기로서 지칭되는데, 이는 전형적으로 "유입" 가변 도메인으로부터 취한다. 인간화는 필수적으로, 인간 항체의 상응하는 서열을 초가변 영역 서열로 대체함으로써, 다음 문헌의 방법에 따라서 수행할 수 있다 [참고: Winter and co-workers (Jones et al. (1986) Nature 321:522-525; Riechmann et al. (1988) Nature, 332:323-327; Verhoeven et al. (1988) Science, 239:1534-1536]. 따라서, 이러한 "인간화" 항체는 실질적으로 덜한 본래의 인간 가변 도메인을 비-인간 종으로부터의 상응하는 서열로 대체시킨 키메라 항체 [참고: 미국 특허 제4,816,567호]이다. 실제로, 인간화 항체는 전형적으로, 몇몇 초가변 영역 잔기와 가능하게는 몇몇 FR 잔기를 설치류 항체 내의 유사한 부위로부터의 잔기로 대체시킨 인간 항체이다.

[0271] 인간화 항체를 제조하는데 사용될, 경쇄 및 중쇄 둘 다의 인간 가변 도메인의 선택이 항원성을 저하시키는데 있어 매우 중요하다. 소위 "최량 적합 (best-fit)" 방법에 따르면, 설치류 항체의 가변 도메인 서열을 공지된 인간 가변 도메인 서열의 전체 라이브러리에 대항하여 스크리닝한다. 설치류의 서열에 가장 근접한 인간 서열을 인간화 항체에 대한 인간 골격으로서 허용하였다 [참고: Sims et al. (1993) J. Immunol. 151:2296; Chothia et al. (1987) J. Mol. Biol. 196:901]. 또 다른 방법은 경쇄 또는 중쇄의 특정한 아군의 모든 인간 항체의 컨센서스 서열로부터 유래된 특별한 골격을 이용한다. 동일한 골격을 여러 개의 상이한 인간화 항체에 사용할 수 있다 [참고: Carter et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285; Presta et al. (1993) J. Immunol., 151:2623].

[0272] 항원에 대한 높은 친화성과 기타 바람직한 생물학적 특성을 유지하고 있는 항체로 인간화시키는 것이 추가로 중요하다. 이를 달성하기 위한 한 가지 방법에 따르면, 모 서열과 인간화 서열의 3차원적 모델을 이용하여 모 서열과 각종 개념적 인간화 생성물의 분석 공정에 의해 인간화 항체를 제조한다. 3차원적 면역글로불린 모델은 통상적으로 입수 가능하고, 당업자에게 널리 알려져 있다. 선택된 후보 면역글로불린 서열의 추정상의 3차원적 입체 형태 구조를 예시하고 디스플레이하는 컴퓨터 프로그램도 입수 가능하다. 이들 디스플레이를 검사하여, 후보 면역글로불린 서열의 기능에 있어 잔기의 예상 역할을 분석할 수 있는데, 즉 후보 면역글로불린이 그의 항원과 결합할 수 있는 능력에 영향을 미치는 잔기를 분석할 수 있다. 이러한 방식으로, FR 잔기를 선별하고, 이를 수용자 및 유입 서열과 합하여, 목적하는 항체 특징, 예를 들어 표적 항원(들)에 대한 증가된 친화성을 달성하도록 한다. 일반적으로, 초가변 영역 잔기는 항원 결합성에 영향을 미치는데 있어 직접적이면서도 가장 실제로 관여한다.

[0273] 항체 변이체

[0274] 한 국면에서, 본 발명은 Fc 영역을 포함하는 Fc 폴리펩티드의 계면에 변형을 포함하는 항체를 제공하는데, 이러한 변형은 이중-이량체화를 촉진 및/또는 증진시켜 준다. 이들 변형은 특정 돌기를 제1 Fc 폴리펩티드 내로 도입하고, 특정 강 (cavity)을 제2 Fc 폴리펩티드 내로 도입하는 것을 포함하는데, 이러한 돌기는 제1 Fc 폴리펩티드와 제2 Fc 폴리펩티드의 복합체 형성을 증진시키도록 상기 강 내에 위치 가능하다. 이들 변형을 수반하는 항체의 생성 방법은, 예를 들어 미국 특허 제5,731,168호에 기재된 바와 같이 당해 분야에 공지되어 있다.

[0275] 몇몇 양태에서는, 본원에 기재된 항체의 아미노산 서열 변형(들)이 고려된다. 예를 들어, 항체의 결합 친화성 및/또는 기타 생물학적 특성을 개선시키는 것이 요망될 수 있다. 항체의 아미노산 서열 변이체는 적당한 뉴클레오타이드 변화를 항체 핵산 내로 도입하거나, 또는 펩티드 합성에 의해 제조한다. 이러한 변형에는, 예를 들어

항체의 아미노산 서열 내의 잔기로부터의 결실, 및/또는 잔기 내로의 삽입 및/또는 잔기의 치환이 포함된다. 모든 결실, 삽입 및 치환 조합을 만들어 최종 구조물에 도달시키는데, 단 이러한 최종 구조물은 목적하는 특징을 보유하고 있어야 한다. 아미노산 변경은 대상 항체 아미노산 서열이 만들어지는 시점에 이러한 서열 내에 도입할 수 있다.

[0276] 돌연변이를 위한 바람직한 위치인 항체의 특정 잔기 또는 영역을 확인하는데 유용한 방법은 문헌 [참고: Cunningham and Wells (1989) Science, 244: 1081-1085]에 기재된 바와 같은 소위 "알라닌 스캐닝 돌연변이 유발"인데, 여기서는 특정 잔기, 또는 표적 잔기 군을 확인하고 (예를 들어, arg, asp, his, lys, 및 glu 등의 잔기를 띠는 잔기), 이를 중성 또는 음전하를 띠는 아미노산 (가장 바람직하게는, 알라닌 또는 폴리알라닌)으로 대체시켜, 상기 아미노산과 항원 간의 상호 작용에 영향을 미친다. 이어서, 이러한 치환에 대한 기능적 민감도를 입증하는 아미노산 위치는 치환 부위에 추가의 또는 기타 변이체를 도입함으로써 정련시킨다. 따라서, 아미노산 서열 변이를 도입하기 위한 부위가 예정되긴 하였지만, 돌연변이 자체의 특성이 예정될 필요는 없다. 예를 들어, 소정의 부위에서의 돌연변이의 성능을 분석하기 위해, ala 스캐닝 또는 무작위 돌연변이 유발을 표적 코돈 또는 영역에서 수행하고, 발현된 면역글로불린을 대상으로 하여 목적하는 활성에 대해 스크리닝한다.

[0277] 아미노산 서열 삽입물에는 단일 또는 다중 아미노산 잔기의 서열내 삽입물 뿐만 아니라 1개 잔기에서부터 수 백 개 이상의 잔기를 함유하는 폴리펩티드까지 길이의 아미노- 및/또는 카복실-말단 융합물이 포함된다. 말단 삽입물의 예에는 N-말단 메티오닐 잔기를 수반한 항체, 또는 세포독성 폴리펩티드와 융합된 항체가 포함된다. 항체 분자의 기타 삽입형 변이체에는 항체의 N- 또는 C-말단과 효소와의 융합물 (예를 들어, ADEPT), 또는 항체의 혈청 반감기를 증가시키는 폴리펩티드와의 융합물이 포함된다.

[0278] 또 다른 유형의 변이체는 아미노산 치환형 변이체이다. 이들 변이체에서는 항체 분자 내의 1개 이상의 아미노산 잔기를 상이한 잔기로 대체시켰다. 치환형 돌연변이 유발을 위한 가장 관심있는 부위에는 추가변 영역이 포함되지만, FR 변경물도 또한 고려된다. 보존적 치환이 "바람직한 치환"이란 표제 하에 표 1에 나타나 있다. 이러한 치환으로 인해 생물학적 활성 상의 변화가 이루어진다면, 표 1에서 "예시적인 치환"으로 명명되거나 아미노산 부류와 관련하여 다음에 추가로 기재되는 바와 같은 보다 실제적인 변화를 도입하고 생성물을 스크리닝할 수 있다.

표 1

본래의 잔기	예시적인 치환	바람직한 치환
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; Norleucine	Leu
Leu (L)	Norleucine; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Norleucine	Leu

[0279]

[0280] 항체의 생물학적 특성 면에 있어서의 실질적인 변형은 (a) 치환 부위에서 폴리펩티드 주쇄의 구조를, 예를 들어

시트 또는 나선 입체 형태로서 유지시키는 데에 대한 그의 효과, (b) 표적 부위에서 분자의 전하 또는 소수성을 유지시키는 데에 대한 그의 효과, 또는 (c) 측쇄의 벌크를 유지시키는 데에 대한 그의 효과 측면에서 상당히 상이한 치환을 선택함으로써 달성한다. 아미노산은 그들의 측쇄 특성 면에서의 유사성에 따라서 분류될 수 있다 [참고: A. L. Lehninger, in Biochemistry, second ed., pp. 73-75, Worth Publishers, New York (1975)]:

[0281] (1) 비-극성: Ala (A), Val (V), Leu (L), Ile (I), Pro (P), Phe (F), Trp (W), Met (M)

[0282] (2) 전하를 띠지 않은 극성: Gly (G), Ser (S), Thr (T), Cys (C), Tyr (Y), Asn (N), Gln (Q)

[0283] (3) 산성: Asp (D), Glu (E)

[0284] (4) 염기성: Lys (K), Arg (R), His (H)

[0285] 또 다른 한편, 천연 발생적 잔기는 공통의 측쇄 특성을 기초로 하여 다음 군으로 나눌 수 있다:

[0286] (1) 소수성: norleucine, Met, Ala, Val, Leu, Ile;

[0287] (2) 중성 친수성: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;

[0288] (3) 산성: Asp, Glu;

[0289] (4) 염기성: His, Lys, Arg;

[0290] (5) 쇠 배향에 영향을 미치는 잔기: Gly, Pro;

[0291] (6) 방향족: Trp, Tyr, Phe.

[0292] 비-보존적 치환은 이들 부류 중의 하나의 구성원을 또 다른 부류의 구성원으로 교환시키는 것을 수반할 것이다. 이러한 치환된 잔기는 보존적 치환 부위, 또는 보다 바람직하게는 나머지 (비-보존적) 부위 내로 도입할 수도 있다.

[0293] 한 가지 유형의 치환형 변이체는 모 항체 (예: 인간화 또는 인간 항체)의 하나 이상의 추가변 영역 잔기를 치환시키는 것을 포함한다. 일반적으로, 이로써 생성된 추가의 개발을 위해 선택된 변이체(들)는, 이들을 생성시킨 모 항체와 비교해서 개선된 생물학적 특성을 지닐 것이다. 이러한 치환형 변이체를 생성시키기 위한 편리한 방식은 파아지 디스플레이를 이용하는 친화 돌연변이 방법을 포함한다. 간략하게 언급하면, 몇 가지 추가변 영역 부위 (예를 들어, 6 내지 7개 부위)를 돌연변이시켜 각 부위에 가능한 모든 아미노산 치환을 생성시킨다. 이로써 생성된 항체를, 각 입자 내에 패키징된 M13의 유전자 III 생성물에 대한 융합물로서 필라멘트상 파아지 입자로부터 디스플레이한다. 이어서, 이와 같이 파아지-디스플레이된 변이체를 대상으로 하여, 본원에 기재된 바와 같은 그들의 생물학적 활성 (예: 결합 친화성)에 대해 스크리닝한다. 변형시키기 위한 후보 추가변 영역 부위를 확인하기 위해, 알라닌 스캐닝 돌연변이 유발을 수행하여 항원 결합성에 상당히 기여하는 추가변 영역 잔기를 확인할 수 있다. 또 다른 한편, 또는 부가적으로, 항원-항체 복합체의 결정 구조를 분석하여 항체와 항원 간의 접촉점을 확인하는 것이 유리할 수 있다. 이러한 접촉 잔기 및 이와 이웃하는 잔기는 본원에서 상세히 설명된 기술에 따라서 치환시키기 위한 후보이다. 이러한 변이체가 일단 생성되면, 변이체 패널을 대상으로 하여 본원에 기재된 바와 같이 스크리닝하고, 한 가지 이상의 관련 검정에서 탁월한 특성을 지닌 항체를 추가 개발을 위해 선별할 수 있다.

[0294] 항체의 아미노산 서열 변이체를 코딩하는 핵산 분자는 당해 분야에 공지된 각종 방법에 의해 제조한다. 이들 방법에는 천연 공급원으로부터의 분리 방법 (천연 발생적 아미노산 서열 변이체의 경우), 또는 앞서 제조된 변이체 또는 항체의 비-변이체 버전을 올리고뉴클레오티드-매개된 (또는 부위-지시된) 돌연변이 유발, PCR 돌연변이 유발 및 카세트 돌연변이 유발시킴으로써 제조하는 방법이 포함되지만, 이에 제한되지 않는다.

[0295] 본 발명의 면역글로불린 폴리펩티드의 Fc 영역에 하나 이상의 아미노산 변형을 도입함으로써, Fc 영역 변이체를 생성시키는 것이 요망될 수 있다. 이러한 Fc 영역 변이체는 힌지 시스테인을 포함한 하나 이상의 아미노산 위치에서의 특정 아미노산 변형 (예: 치환)을 포함하는 인간 Fc 영역 서열 (예: IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 Fc 영역)을 포함할 수 있다.

[0296] 본 명세서와 당해 분야의 교시에 따라서, 몇몇 양태에서는 본 발명의 방법에 사용된 항체가 야생형 대응물 항체와 비교해서, 예를 들어 Fc 영역에서 하나 이상의 변형을 포함할 수 있다. 그럼에도 불구하고, 이들 항체는 그들의 야생형 대응물과 비교해서 치료적 유용성을 위해 요구되는 바와 실질적으로 동일한 특징을 보유할 것이다. 예를 들어, 특정의 변형이 Fc 영역에서 이루어져, 예를 들어 W099/51642에 기재된 바와 같이 C1q 결합성 및/또

는 보체 의존적 세포독성 (CDC)이 변경될 수 있을 것이다 (즉, 개선되거나 저하됨). Fc 영역 변이체의 기타 예에 관해서는 또한 다음 문헌을 참고할 수 있다 [참고: Duncan & Winter Nature 322:738-40 (1988); 미국 특허 제5,648,260호; 미국 특허 제5,624,821호; 및 W094/29351].

[0297] 면역접합체

[0298] 본 발명은 또한, 세포독성제, 예를 들어 화학요법제, 약물, 성장 억제제, 독소 (예: 세균, 진균, 식물 또는 동물 기원의 효소적 활성 독소, 또는 그의 단편), 또는 방사성 동위원소 (즉, 방사성접합체)와 접합된 항체를 포함하는 면역접합체 또는 항체-약물 접합체 (ADC)에 관한 것이다.

[0299] 세포독성제 또는 세포증식 억제제, 즉 암 치료시 종양 세포를 사멸시키거나 억제하기 위한 약물을 국소 전달하기 위해 항체-약물 접합체를 사용하게 되면 [참고: Syrigos and Epenetos (1999) Anticancer Research 19:605-614; Niculescu-Duvaz and Springer (1997) Adv. Drg Del. Rev. 26:151-172; 미국 특허 제4,975,278호], 이론적으로는 상기 약물 부분을 종양에 표적화 전달할 수 있고 종양 내에 약물이 세포내 축적되게 할 수 있는데, 상기 약물 작용제를 접합시키지 않은 채로 전신 투여하게 되면, 제거시키고자 하는 종양 세포 뿐만 아니라 정상 세포에 대해서도 허용 가능하지 않은 수준의 독성이 야기될 수 있다 [참고: Baldwin et al., (1986) Lancet pp. (Mar. 15, 1986):603-05; Thorpe, (1985) "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review, "in Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, A. Pinchera et al. (eds), pp. 475-506]. 따라서, 최소 독성을 나타내면서 최대 효능을 나타내고자 하였다. 폴리클로날 항체와 모노클로날 항체 둘 다가 이들 전략에 유용한 것으로 보고되었다 [참고: Rowland et al., (1986) Cancer Immunol. Immunother. 21: 183-87]. 이들 방법에 사용된 약물에는 다우노마이신, 독소루비신, 메토틱세이트, 및 빈데신 포함된다 [Rowland et al., (1986) 상기 참고]. 항체-독소 접합체에 사용된 독소에는 세균성 독소, 예를 들어 디프테리아 독소, 식물 독소, 예를 들어 리신 (ricin), 소분자 독소, 예를 들어 젤다나마이신 (geldanamycin) [참고: Mandler et al (2000) Jour. of the Nat. Cancer Inst. 92 (19):1573-1581; Mandler et al (2000) Bioorganic & Med. Chem. Letters 10: 1025-1028; Mandler et al (2002) Bioconjugate Chem. 13: 786-791], 마이탄시노이드 [참고: EP 1391213; Liu et al., (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 8618-8623], 및 칼리케아미신 [참고: Lode et al (1998) Cancer Res. 58: 2928; Hinman et al (1993) Cancer Res. 53: 3336-3342]이 포함된다. 독소는 투불린 결합, DNA 결합 또는 토포이소머라제 억제제를 포함한 기전에 의해 자신의 세포독성 및 세포증식 억제 효과를 발휘할 수 있다. 몇몇 세포독성 약물은 큰 항체 또는 단백질 수용체 리간드와 접합될 때 불활성화되거나 덜 활성을 나타내는 경향이 있다.

[0300] 제발린(ZEVALIN®)

) [이브리투모마브 티옥세탄 (ibritumomab tiuxetan), 공급처: Biogen/Idec]은 정상 및 악성 B 림프구의 표면 상에 발견된 CD20 항원에 대하여 유도된 무린 IgG1 카파 모노클로날 항체와, 티오우레아 링커-길레이트제에 의해 결합된 ¹¹¹In 또는 ⁹⁰Y 방사성 동위원소로 구성된 항체-방사성 동위원소 접합체이다 [참고: Wiseman et al (2000) Eur. J. Nucl. Med. 27(7):766-77; Wiseman et al (2002) Blood 99 (12):4336-42; Witzig et al (2002) J. Clin. Oncol. 20 (10):2453-63; Witzig et al (2002) J. Clin. Oncol. 20(15): 3262-69]. 제발린이 B-세포 비호지킨 림프종 (NHL)에 대항한 활성을 지니고 있긴 하지만, 이를 투여하게 되면 대부분의 환자에게서 중증의 혈구감소증이 장기간 나타난다. 칼리케아미신과 연결된 hu CD33 항체로 구성된 항체-약물 접합체인 밀로타르그(MYLOTARG™)[젬투주마브 오조가미신 (gemtuzumab ozogamicin); 공급처: Wyeth Pharmaceuticals]은 주사에 의해 급성 골수성 백혈병을 치료하기 위한 것으로 2000년에 승인되었다 [참고: Drugs of the Future (2000) 25 (7):686; 미국 특허 제4970198호; 제5079233호; 제5585089호; 제5606040호; 제5693762호; 제5739116호; 제5767285호; 제5773001호]. 디설파이드 링커 SPP를 통하여 마이탄시노이드 약물 부분 DM1에 연결된 huC242 항체로 구성된 항체-약물 접합체인 칸투주마브 메르탄신 [Cantuzumab mertansine (공급처: Immunogen, Inc.)]을 대상으로 하여, CanAg를 발현하는 암, 예를 들어 결장암, 췌장암, 위암 등을 치료하기 위한 제II상 시험이 진행되고 있다. MLN-2704 (공급처: Millennium Pharm., BZL Biologics, Immunogen Inc.)는 마이탄시노이드 약물 부분 DM1에 연결된 항-전립선 특이적 막 항원 (PSMA) 모노클로날 항체로 구성된 항체 약물 접합체로서, 현재 전립선 종양의 잠재적 치료를 위해 개발 중이다. 아우리스타틴 펩티드인 아우리스타틴 E (AE) 및 모노메틸아우리스타틴 (MMAE) [돌라스타틴의 합성 유사체]을 키메라 모노클로날 항체 cBR96 (암종 상의 루이스 Y에 특이적임) 및 cAC10 (혈액학적 악성 종양 상의 CD30에 특이적임) [참고: Doronina et al (2003) Nature Biotechnology 21(7):778-784]에 접합시켰고, 이는 치료제 개발 중에 있다.

[0301] 이러한 면역접합체를 생성시키는데 유용한 화학요법제가 상기 언급되었다. 사용될 수 있는 효소적 활성 독소

및 그의 단편에는 디프테리아 A쇄, 디프테리아 독소의 비-결합성 활성 단편, 외독소 A쇄 [슈도모나스 에루기노사 (*Pseudomonas aeruginosa*)로부터 유래됨], 리신 A쇄, 아브린 A쇄, 모데신 A쇄, 알파-사르신, 알레우리티스 포르디이 (*Aleurites fordii*) 단백질, 디안틴 단백질, 피톨라카 아메리카나 (*Phytolacca americana*) 단백질 (PAPI, PAPII, 및 PAP-S), 모모르디카 카란티아 (*Momordica charantia*) 억제제, 쿠르신 (curcin), 크로틴 (crotin), 사파오나리아 오피시날리스 (*Saponaaria officinalis*) 억제제, 켈로닌, 미토켈린, 레스트릭토신, 페노마이신, 에노마이신 및 트리코테센이 포함된다. 각종 방사성핵종이 방사성접합된 합체 생성을 위해 이용 가능하다. 이의 예에는 ^{212}Bi , ^{131}I , ^{131}In , ^{90}Y 및 ^{186}Re 가 포함된다. 각종 이관능성 단백질 커플링제, 예를 들어 N-석신이미딜-3-(2-피리딜티올)프로피오네이트 (SPDP), 이미노티올란 (IT), 이미도에스테르의 이관능성 유도체 (예를 들면, 디메틸 아디피미데이트 HCl), 활성 에스테르 (예: 디석신이미딜 수베레이트), 알데히드 (예: 글루타르알데히드), 비스-아지도 화합물 [예: 비스 (p-아지도벤조일)핵산디아민], 비스-디아조늄 유도체 [예: 비스-(p-디아조늄벤조일)-에틸렌디아민], 디이소시아네이트 (예: 톨루엔 2,6-디아소시아네이트), 및 비스-활성 불소 화합물 (예: 1,5-디플루오로-2,4-디니트로벤젠)을 사용하여, 항체와 세포독성제의 접합체를 만든다. 예를 들어, 리신 면역독소를 문헌 [참고: Vitetta et al., *Science*, 238: 1098 (1987)]에 기재된 바와 같이 제조할 수 있다. 탄소-14-표지된 1-이소티오시아네이트벤젠-3-메틸디에틸렌 트리아민펜타아세트산 (MX-DTPA)이, 방사성뉴클레오티드를 항체에 접합시키기 위한 킬레이트제의 한 예이다 [참고: WO 94/11026].

[0302] 항체와 하나 이상의 소분자 독소, 예를 들어 칼리케아미신, 마이탄시노이드, 트리코테센 및 CC1065, 및 독소 활성을 지닌 이들 독소의 유도체의 접합체가 또한 본원에 고려된다.

[0303] 마이탄신 및 마이탄시노이드

[0304] 한 양태에서는, 본 발명의 항체 (완전한 길이 또는 단편)를 하나 이상의 마이탄시노이드 분자에 접합시킨다.

[0305] 마이탄시노이드는 투볼린 중합 반응을 억제함으로써 작용하는 핵분열 억제제이다. 마이탄신은 동아프리카산 관목 마이테누스 세라타 (*Maytenus serrata*)로부터 처음 분리하였다 [참고: 미국 특허 제3,896,111호]. 연속해서, 특정 미생물이 마이탄시노이드, 예를 들어 마이탄시놀 및 C-3 마이탄시놀 에스테르를 생산하는 것으로 밝혀졌다 [참고: 미국 특허 제4,151,042호]. 합성 마이탄시놀 및 그의 유도체 및 유사체가, 예를 들어 미국 특허 제4,137,230호; 제4,248,870호; 제4,256,746호; 제4,260,608호; 제4,265,814호; 제4,294,757호; 제4,307,016호; 제4,308,268호; 제4,308,269호; 제4,309,428호; 제4,313,946호; 제4,315,929호; 제4,317,821호; 제4,322,348호; 제4,331,598호; 제4,361,650호; 제4,364,866호; 제4,424,219호; 제4,450,254호; 제4,362,663호; 및 제4,371,533호 (이들 각각의 전문이 본원에 참고로 도입된다)에 보고되었다.

[0306] 마이탄시노이드-항체 접합체

[0307] 그들의 치료 지수를 개선시키기 위한 시도로, 마이탄신 및 마이탄시노이드를 종양 세포 항원과 특이적으로 결합하는 항체와 접합시켰다. 마이탄시노이드를 함유하는 면역접합체 및 그들의 치료적 용도가, 예를 들어 문헌 [참고: 미국 특허 제5,208,020호, 제5,416,064호 및 유럽 특허 EP 0 425 235 B1; 이들 각각의 전문이 본원에 참고로 도입된다]에 기재되어 있다. 문헌 [참고: Liu et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:8618-8623 (1996)]에는 인간 결장직장암에 대하여 유도된 모노클로날 항체 C242와 연결된 DM1로 명명된 마이탄시노이드를 포함하는 면역접합체가 기재되었다. 이러한 접합체는 배양된 결장암 세포에 대하여 고도로 세포독성인 것으로 밝혀졌으며, 생체내 종양 성장 검정에서 항종양 활성을 나타내었다. 문헌 [참고: Chari et al., *Cancer Research* 52: 127-131 (1992)]에는 마이탄시노이드를 디설파이드 링커를 통하여, 인간 결장암 세포주 상의 항원과 결합하는 뮤린 항체 A7과 접합시키거나, 또는 HER-2/neu 종양형성 유전자와 결합하는 또 다른 뮤린 모노클로날 항체 TA.1과 접합시켰다. TA.1-마이탄시노이드 접합체의 세포독성을, 세포당 3×10^5 개 HER-2 표면 항원을 발현하는 인간 유방암 세포주 SK-BR-3 상에서 시험관내 시험하였다. 이러한 약물 접합체는 자유 마이탄시노이드 약물과 유사한 세포독성도를 달성하였는데, 이는 항체 분자당 마이탄시노이드 분자의 수를 증가시킴으로써 증가시킬 수 있었다. A7-마이탄시노이드 접합체는 마우스에서 낮은 전신 세포독성을 나타내었다.

[0308] 항체-마이탄시노이드 접합체 (면역접합체)

[0309] 항체-마이탄시노이드 접합체는 이러한 항체 또는 마이탄시노이드 분자의 생물학적 활성은 상당히 감소시키지 않으면서 항체를 마이탄시노이드 분자에 화학적으로 연결시킴으로써 제조한다. 항체 분자당 평균 3 내지 4개의 마이탄시노이드 분자가 접합되는 것이, 항체의 기능이나 용해도에 불리한 영향을 미치지 않으면서도 표적 세포의 세포독성을 증강시키는데 효능이 있는 것으로 밝혀지긴 하였지만, 심지어 항체당 1개의 독소 분자도 있는 그 대로의 (노출된) 항체를 사용하는 것에 비해 세포독성을 증강시키는 것으로 예상된다. 마이탄시노이드는 당해

분야에 널리 공지되어 있고, 공지된 기술에 의해 합성할 수 있거나 천연 공급원으로부터 분리할 수 있다. 적합한 마이탄시노이드가, 예를 들어 미국 특허 제5,208,020호, 및 상기 인용된 기타 특허 및 비특허 공보에 기재되어 있다. 바람직한 마이탄시노이드는 방향족 환 내에서 변형되거나 마이탄시놀 분자의 기타 위치에서 변형된 마이탄시놀 및 마이탄시놀 유사체, 예를 들어 각종 마이탄시놀 에스테르이다.

[0310] 항체-마이탄시노이드 접합체를 제조하기 위한 많은 연결성 기, 예를 들어 문헌 [참고: 미국 특허 제5,208,020호 또는 EP 특허 제0 425 235 B1호; 및 Chari et al., *Cancer Research* 52: 127-131 (1992)]에 기재된 것들이 당해 분야에 공지되어 있다. 이러한 연결성 기에는 상기 언급된 특허에 기재된 바와 같은 디설파이드기, 티오에테르기, 산 불안정 기, 광불안정 기, 펩티다제 불안정 기, 또는 에스테라제 불안정 기가 포함되는데, 디설파이드기 및 티오에테르기가 바람직하다.

[0311] 항체와 마이탄시노이드의 접합체는 각종 이관능성 단백질 커플링제, 예를 들어 N-석신이미달-3-(2-피리딜티오)프로피오네이트 (SPDP), 석신이미달-4-(N-말레이미도메틸)시클로헥산-1-카복실레이트, 이미노티올란 (IT), 이미도에스테르의 이관능성 유도체 (예를 들면, 디메틸 아디피미데이트 HCl), 활성 에스테르 (예: 디석신이미달 수베레이트), 알데히드 (예: 글루타르알데히드), 비스-아지도 화합물 [예: 비스-(p-아지도벤조일)핵산디아민], 비스-디아조늄 유도체 [예: 비스-(p-디아조늄벤조일)-에틸렌디아민], 디이소시아네이트 (예: 톨루엔 2,6-디이소시아네이트), 및 비스-활성 불소 화합물 (예: 1,5-디플루오로-2,4-디니트로벤젠)을 사용하여 만들 수 있다. 디설파이드 연쇄를 제공하는데 특히 바람직한 커플링제에는 N-석신이미달-3-(2-피리딜티오)프로피오네이트 (SPDP) [참고: Carlsson et al., *Biochem. J.* 173:723-737 (1978)] 및 N-석신이미달-4-(2-피리딜티오)펜타노에이트 (SPP)가 포함된다.

[0312] 링커는 연결물 유형에 따라서 각종 위치에서 마이탄시노이드 분자에 부착시킬 수 있다. 예를 들어, 에스테르 연쇄는 통상적인 커플링 기술을 이용하여 히드록실기와 반응시킴으로써 형성시킬 수 있다. 이러한 반응은 히드록실기를 갖는 C-3 위치, 히드록시메틸로 변형시킨 C-14 위치, 히드록실기로 변형시킨 C-15 위치, 및 히드록실기를 갖는 C-20 위치에서 일어날 수 있다. 바람직한 양태에서는, 상기 연쇄가 마이탄시놀 또는 마이탄시놀 유사체의 C-3 위치에서 형성된다.

[0313] 칼리케아미신

[0314] 관심있는 또 다른 번역접합체는 하나 이상의 칼리케아미신 분자와 접합된 항체를 포함한다. 칼리케아미신 계열의 항생제는 이중 가닥 DNA 절단물을 피코몰 이하 농도로 생성시킬 수 있다. 칼리케아미신 계열의 접합체를 제조하는 방법에 관해서는 미국 특허 제5,712,374호, 제5,714,586호, 제5,739,116호, 제5,767,285호, 제5,770,701호, 제5,770,710호, 제5,773,001호, 제5,877,296호 (American Cyanamid Company)를 참고할 수 있다. 사용될 수 있는 칼리케아미신의 구조적 유사체에는 γ_1^I , α_2^I , α_3^I , N-아세틸- γ_1^I , PSAG 및 Θ_1^I 이 포함되지만, 이에 제한되지 않는다 [참고: Hinman et al., *Cancer Research*, 53: 3336-3342 (1993), Lode et al., *Cancer Research*, 58: 2925-2928 (1998); 및 전술된 American Cyanamid의 미국 특허들]. 항체와 접합될 수 있는 또 다른 항종양 약물은 항염산제인 QFA이다. 칼리케아미신과 QFA 둘 다는 세포내 작용 부위를 갖고 있고 혈장 막을 용이하게 교차하지 않는다. 따라서, 항체 매개된 내재화를 통한 이들 작용제의 세포성 섭취는 그들의 세포독성 효과를 상당히 증강시켜 준다.

[0315] 기타 세포독성제

[0316] 본 발명의 항체와 접합될 수 있는 기타 항종양제에는 BCNU, 스트렙토조이신 (streptozocin), 빈크리스틴 및 5-플루오로우라실, 미국 특허 제5,053,394호, 제5,770,710호에 기재되고 집합적으로 LL-E33288 복합체로 공지된 계열의 작용제 뿐만 아니라 에스페라미신스 (esperamicins) [참고: 미국 특허 제5,877,296호]가 포함된다.

[0317] 사용될 수 있는 효소적 활성 독소 및 그의 단편에는 디프테리아 A 쇄, 디프테리아 독소의 비-결합성 활성 단편, 외독소 A 쇄 [슈도모나스 에루기노사로부터 유래됨], 리신 A 쇄, 아브린 A 쇄, 모데신 A 쇄, 알파-사르신, 알레우리테스 포르티이 단백질, 디안틴 단백질, 피톨라카 아메리카나 단백질 (PAPI, PAPII, 및 PAP-S), 모모르디카 카란티아 억제제, 쿠르신, 크로틴, 사파오나리아 오피시달리스 억제제, 겔로닌, 미토겔린, 레스트릭토신, 페노마이신, 에노마이신 및 트리코테센이 포함된다 [참고: 1993년 10월 28일자로 공개된 WO 93/21232].

[0318] 본 발명은 항체와, 핵산분해 활성을 지닌 화합물 (예를 들어, 리보뉴클레아제 또는 DNA 엔도뉴클레아제, 예를 들어 데옥시리보뉴클레아제; DNase) 간에 형성된 번역접합체를 추가로 고려한다.

[0319] 종양을 선택적으로 파괴시키기 위해, 항체가 고도의 방사성 원자를 포함할 수 있다. 각종 방사성 동위원소가

방사성접합된 항체 생성을 위해 이용 가능하다. 이의 예에는 At^{211} , I^{131} , I^{125} , Y^{90} , Re^{186} , Re^{188} , Sm^{153} , Bi^{212} , P^{32} , Pb^{212} 및 Lu의 방사성 동위원소가 포함된다. 접합체를 탐지용으로 사용하는 경우에는, 접합체가 섬광조영 연구를 위해서는 방사성 원자, 예를 들어 ^{99m}Tc 또는 I^{123} 을 포함할 수 있거나, 또는 핵자기 공명 (NMR) 영상화 (자기 공명 영상화, mri로서 공지되기도 함)를 위해서는 스핀 표지, 예를 들어 요오드-123, 요오드-131, 인듐-111, 붐소-19, 탄소-13, 질소-15, 산소-17, 가돌리늄, 망간 또는 철을 포함할 수 있다.

[0320] 방사성 표지 또는 기타 표지를 공지된 방식으로 접합체에 혼입시킬 수 있다. 예를 들어, 펩티드는 생합성할 수 있거나, 또는 수소 대신, 예를 들어 붐소-19를 포함하는 적합한 아미노산 전구체를 이용하는 화학적 아미노산 합성에 의해 합성할 수 있다. ^{99m}Tc 또는 I^{123} , Re^{186} , Re^{188} 및 In^{111} 등의 표지를 펩티드 내의 시스테인 잔기를 통하여 부착시킬 수 있다. 이트륨-90은 리신 잔기를 통하여 부착시킬 수 있다. IODOGEN 방법 [참고: Fraker et al (1978) Biochem. Biophys. Res. Commun. 80: 49-57]을 사용하여 요오드-123을 혼입시킬 수 있다. 문헌 [참고: "Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy" (Chatal, CRC Press 1989)]에는 기타 방법이 상세히 기재되어 있다.

[0321] 각종 이관능성 단백질 커플링제, 예를 들어 N-석신이미딜-3-(2-피리딜디티올)프로피오네이트 (SPDP), 석신이미딜-4-(N-말레이미도메틸)시클로헥산-1-카복실레이트, 이미노티올란 (IT), 이미도에스테르의 이관능성 유도체 (예를 들면, 디메틸 아디피미데이트 HCl), 활성 에스테르 (예: 디석신이미딜 수베레이트), 알데히드 (예: 글루타르알데히드), 비스-아지도 화합물 [예: 비스 (p-아지도벤조일)헥산디아민], 비스-디아조늄 유도체 [예: 비스-(p-디아조늄벤조일)-에틸렌디아민], 디이소시아네이트 (예: 톨루엔 2,6-디이소시아네이트), 및 비스-활성 붐소 화합물 (예: 1,5-디플루오로-2,4-디니트로벤젠)을 사용하여, 항체와 세포독성제의 접합체를 만들 수 있다. 예를 들어, 리신 면역독소를 문헌 [참고: Vitetta et al., *Science*, 238: 1098 (1987)]에 기재된 바와 같이 제조할 수 있다. 탄소-14-표지된 1-이소티오시아네이트벤질-3-메틸디에틸렌 트리아민펜타아세트산 (MX-DTPA)이, 방사성뉴클레오타이드를 항체에 접합시키기 위한 키레이트제의 한 예이다 [참고: WO 94/11026]. 이러한 링커는 세포에서 세포독성 약물의 방출을 촉진시켜 주는 "절단 가능한 링커"일 수 있다. 예를 들어, 산-불안정 링커, 펩티다제-민감성 링커, 광불안정 링커, 디메틸 링커 또는 디설파이드 함유 링커 [참고: Chari et al., *Cancer Research*, 52: 127-131 (1992); 미국 특허 제5,208,020호]를 사용할 수 있다.

[0322] 본 발명의 화합물은 특별히, 가교제 시약: BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, 설폰-EMCS, 설폰-GMBS, 설폰-KMUS, 설폰-MBS, 설폰-SIAB, 설폰-SMCC, 및 설폰-SMPB, 및 SVSB (석신이미딜-(4-비닐설폰)벤조에이트) [공급처: Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL, U.S.A]을 사용하여 제조된 ADC를 고려하지만, 이에 제한되지 않는다 [참고: pages 467-498, 2003-2004 Applications Handbook and Catalog].

[0323] 항체-약물 접합체의 제조

[0324] 본 발명의 항체 약물 접합체 (ADC)에서는, 항체 (Ab)를 하나 이상의 약물 부분 (D), 예를 들어 항체당 약 1 내지 약 20개 약물 부분에 링커 (L)를 통하여 접합시킨다. 화학식 I의 ADC는 다음을 포함한, 당업자에게 공지된 유기 화학 반응, 조건 및 시약을 이용하여 여러 경로에 의해 제조할 수 있다: (1) 항체의 친핵기를 2가 링커 시약과 반응시켜, 공유 결합을 통하여 Ab-L을 형성시킨 다음, 이를 약물 부분 D와 반응시키는 방법; 및 (2) 약물 부분의 친핵기를 2가 링커 시약과 반응시켜, 공유 결합을 통하여 D-L을 형성시킨 다음, 이를 항체의 친핵기와 반응시키는 방법:

화학식 I

[0325] $Ab-(L-D)_p$

[0326] 항체 상의 친핵기에는 (i) N-말단 아민기; (ii) 측쇄 아민기, 예를 들어 리신; (iii) 측쇄 티올기, 예를 들어 시스테인; 및 (iv) 당 히드록실 또는 아미노기 (여기서, 항체가 당화된다)가 포함되지만, 이에 제한되지 않는다. 아민, 티올 및 히드록실기는 친핵성이고, 반응하여 링커 부분 및 링커 시약 상의 친전자기, 예를 들어 (i) 활성 에스테르, 예를 들면, NHS 에스테르, HOBt 에스테르, 할로포르메이트 및 산 할라이드; (ii) 알킬 및 벤질 할라이드, 예를 들면, 할로아세트아미드; (iii) 알데히드, 케톤, 카복실 및 말레이미드기와 공유 결합을 형성할 수 있다. 특정 항체는 환원 가능한 쇠간 디설파이드, 즉 시스테인 브릿지를 갖는다. 항체를 환원제,

예를 들어 DTT (디티오프레이톨)로 처리함으로써, 링커 시약과의 접합을 위해 반응성이 되도록 할 수 있다. 이로써, 각 시스템인 브릿지는 이론적으로, 2개의 반응성 티올 친핵체를 형성할 것이다. 아민을 티올로 전환시켜 주는, 리신과 2-아미노티올란 [트라우트 (Traut) 시약]과의 반응을 통하여 부가의 친핵기를 항체 내로 도입할 수 있다.

[0327] 링커 시약 또는 약물 상의 친핵성 치환체와 반응할 수 있는 친전자성 부분을 도입하도록 항체를 변형시킴으로써, 본 발명의 항체-약물 접합체를 또한 생성시킬 수 있다. 당화 항체의 당을, 예를 들어 펄로오데이트 산화 시약으로 산화시켜 링커 시약 또는 약물 부분의 아민기와 반응할 수 있는 알데히드 또는 케톤기를 형성할 수 있다. 이로써 생성된 이민 슈프 (Schiff) 염기 기는 안정한 연쇄를 형성할 수 있거나, 또는 예를 들어, 수산화붕소 시약에 의해 환원시켜 안정한 아민 연쇄를 형성시킬 수 있다. 한 양태에서는, 당화 항체의 탄수화물 부분을 갈락토스 옥시다제 또는 나트륨 메타-퍼요오데이트와 반응시키면, 약물 상의 적당한 기와 반응할 수 있는 단백질 내에 카보닐 (알데히드 및 케톤) 기가 생성될 수 있다 [참고: Hermanson, *Bioconjugate Techniques*]. 또 다른 양태에서는, N-말단 세린 또는 트레오닌 잔기를 함유하는 단백질을 나트륨 메타-퍼요오데이트와 반응시키면, 제1 아미노산 대신 알데히드가 생성될 수 있다 [참고: Geoghegan & Stroh, (1992) *Bioconjugate Chem.* 3: 138-146; US 5362852]. 이러한 알데히드는 약물 부분 또는 링커 친핵체와 반응할 수 있다.

[0328] 마찬가지로, 약물 부분 상의 친핵기에는 링커 부분 및 링커 시약 상의 친전자기, 예를 들어 (i) 활성 에스테르, 예를 들면, NHS 에스테르, HOBt 에스테르, 할로포르메이트 및 산 할라이드; (ii) 알킬 및 벤질 할라이드, 예를 들면, 할로아세트아미드; (iii) 알데히드, 케톤, 카복실 및 말레이미드기와 공유 결합을 형성하기 위해 반응할 수 있는, 아민, 티올, 히드록실, 히드라지드, 옥심, 히드라진, 티오세미카바존, 히드라진 카복실레이트, 및 아릴히드라지드기가 포함되지만, 이에 제한되지 않는다.

[0329] 또 다른 한편, 항체와 세포독성제를 포함하는 융합 단백질을, 예를 들어 재조합 기술 또는 펩티드 합성에 의해 만들 수 있다. 일정 길이의 DNA는 접합체의 목적하는 특성을 파괴시키지 않는 링커 펩티드를 코딩하는 영역에 의해 격리되거나 또는 서로 인접해 있는 접합체의 두 부분을 코딩하는 각각의 영역을 포함할 수 있다.

[0330] 또 다른 양태에서는, 항체를 중앙 예비표적화에 활용하기 위해 "수용체" (예: 스트렙타비딘)에 접합시킬 수 있는데, 이러한 항체-수용체 접합체를 환자에게 투여한 다음, 제거제 (clearing agent)를 사용하여 결합되지 않은 접합체를 순환시 제거하고, 이어서 세포독성제 (예: 방사성뉴클레오타이드)와 접합되는 "리간드" (예: 아비딘)을 투여한다.

[0331] 항체 유도체

[0332] 본 발명의 항체는 당해 분야에 공지되어 있고 용이하게 입수 가능한 부가의 비단백질성 부분을 함유하도록 추가로 변형시킬 수 있다. 바람직하게, 항체를 유도체화하는데 적합한 부분은 수용성 중합체이다. 수용성 중합체의 비-제한적 예에는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG), 에틸렌 글리콜/프로필렌 글리콜의 공중합체, 카복시메틸셀룰로스, 텍스트란, 폴리비닐 알코올, 폴리비닐 피롤리돈, 폴리-1,3-디옥솔란, 폴리-1,3,6-트리옥산, 에틸렌/말레산 무수물 공중합체, 폴리아미노산 (단독중합체 또는 무작위 공중합체), 및 텍스트란 또는 폴리(n-비닐 피롤리돈) 폴리에틸렌 글리콜, 프로필렌 글리콜 단독중합체, 폴리프로필렌 옥사이드/에틸렌 옥사이드 공중합체, 폴리옥시 에틸화 폴리올 (예: 글리세롤), 폴리비닐 알코올, 및 그들의 혼합물이 포함되지만, 이에 제한되지 않는다. 폴리에틸렌 글리콜 프로피온알데히드는 그의 수중 안정성으로 인해 제조하는데 있어 이점을 지닐 수 있다. 중합체는 어떠한 분자량일 수도 있고, 분지되거나 분지되지 않을 수 있다. 항체에 부착된 중합체의 수는 다양할 수 있고, 1개 초과 중합체가 부착되는 경우에는, 이들이 동일하거나 상이한 분자일 수 있다. 일반적으로, 유도체화에 사용된 중합체의 수 및/또는 유형은 항체 유도체가 규정된 조건 하의 요법에 사용되든 아니든지 간에, 개선시키고자 하는 항체의 특별한 특성이나 기능 등을 고려하여 결정할 수 있다.

[0333] 제약 제제

[0334] 본 발명의 항체를 포함하는 치료 제제는, 목적하는 순도를 지닌 항체를 임의의 생리적으로 허용 가능한 담체, 부형제 또는 안정화제 [참고: Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)]와 혼합하여, 수성 용제, 동결건조되거나 기타 건조된 제제 형태로 저장하기 위해 제조한다. 허용 가능한 담체, 부형제 또는 안정화제는 이용된 투여량 및 농도에서 수용자에게 무독성이고, 이에는 완충제, 예를 들어 인산염, 시트레이트, 히스티딘 및 기타 유기 산; 항산화제, 예를 들어 아스코르브산 및 메티오닌; 방부제 (예: 옥타데실 디메틸벤질 암모늄 클로라이드; 헥사메토늄 클로라이드; 벤즈알코늄 클로라이드; 벤즈에토늄 클로라이드; 페놀,

부틸 또는 벤질 알코올; 알킬 파라벤, 예를 들어 메틸 또는 프로필 파라벤; 카테콜; 레소르시놀; 시클로헥산을; 3-펜탄올; 및 m-크레솔); 저분자량 (약 10개 미만 잔기) 폴리펩티드; 단백질, 예를 들어 혈청 알부민, 젤라틴 또는 면역글로불린; 친수성 중합체, 예를 들어 폴리비닐피롤리돈; 아미노산, 예를 들어 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 히스티딘, 아르기닌 또는 리신; 당당류, 이당류 및 기타 탄수화물, 예를 들어 글루코스, 만노스, 또는 텍스트린; 킬레이트제, 예를 들어 EDTA; 당, 예를 들어 슈크로스, 만니톨, 트레할로스 또는 솔비톨; 염 형성 반대-이온, 예를 들어 나트륨; 금속 착물 (예: Zn-단백질 착물); 및/또는 비이온성 계면활성제, 예를 들어 트윈 (TWEENTM), 플루로닉스 (PLURONICSTM) 또는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)이 포함된다.

[0335] 본원에서의 제제는 치료하고자 하는 특정한 적응증에 대해 필요한 만큼의 한 가지 이상의 활성 화합물, 바람직하게는 서로에게 불리한 영향을 미치지 않는 상보적 활성을 지닌 한 가지 이상의 활성 화합물을 함유할 수도 있다. 이러한 분자들은 의도한 목적에 유효한 양으로 병용해서 존재하는 것이 적합하다.

[0336] 활성 성분을, 예를 들어 액적형성 (coacervation) 기술 또는 계면 중합에 의해 제조된 미소캡슐, 예를 들어 히드록시메틸셀룰로스 또는 젤라틴 미소캡슐 및 폴리-(메틸메타크릴레이트) 미소캡슐; 콜로이드상 약물 전달 시스템 (예를 들면, 리포솜, 알부민 미소구, 마이크로에멀션, 나노-입자 및 나노-캡슐); 또는 매크로에멀션 내에 포착시킬 수도 있다. 이러한 기술은 문헌 [참고: Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)]에 기재되어 있다.

[0337] 생체내 투여에 사용하고자 하는 제제는 멸균성이어야만 한다. 이는 멸균성 여과 막을 통하여 여과시킴으로써 용이하게 달성된다.

[0338] 지속 방출 제제를 제조할 수 있다. 지속 방출 제제의 적합한 예에는 본 발명의 면역글로불린을 함유하는 고형 소수성 중합체의 반투과성 매트릭스가 포함되는데, 이러한 매트릭스는 성형품, 예를 들어 필름 또는 미소캡슐 형태이다. 지속 방출 매트릭스의 예에는 폴리에스테르, 히드로겔 [예를 들면, 폴리(2-히드록시에틸-메타크릴레이트) 또는 폴리(비닐알코올)], 폴리락티드 [참고: 미국 특허 제3,773,919호], L-글루탐산과 γ-에틸-L-글루타메이트의 공중합체, 비분해성 에틸렌-비닐 아세테이트, 분해성 락트산-글리콜산 공중합체, 예를 들어 루프론 데포트 (LUPRON DEPOTTM) (락트산-글리콜산 공중합체 및 루프롤리드 아세테이트로 구성된 주사용 미소구), 및 폴리-D-(-)-3-히드록시부티르산이 포함된다. 에틸렌-비닐 아세테이트 및 락트산-글리콜산과 같은 중합체가 100일 간에 걸친 분자 방출을 가능케 하지만, 특정의 히드로겔은 보다 단기간 동안 단백질을 방출한다. 피막화된 면역글로불린이 체내에 장시간 동안 잔존할 경우, 이들은 37°C 하 수분에 대한 노출 결과로서 변성 또는 응집되어, 생물학적 활성이 상실될 수 있고 면역원성 상의 변화가 가능해진다. 관련 기전에 따라서, 안정화를 위한 합리적 전략을 고안할 수 있다. 예를 들어, 응집 기전이 티오-디설파이드 교환을 통한 분자간 S-S 결합 형성인 것으로 밝혀지면, 설프히드릴 잔기를 변형시키고, 산성 용액으로부터 동결건조시키며, 수분 함량을 제어하고, 적당한 부가제를 사용하며 특이적 중합체 매트릭스 조성을 전개함으로써, 안정화를 달성시킬 수 있다.

[0339] 특정 양태에서, 세포독성제와 접합된 항체를 포함하는 면역접합체를 환자에게 투여한다. 몇몇 양태에서는, 면역접합체 및/또는 이와 결합하는 항원은 세포에 의해 내재화되어, 이것과 결합하는 표적 세포를 사멸시키는데 있어서의 면역접합체의 치료적 효능을 증가시켜 준다. 한 양태에서는, 세포독성제가 표적 세포 내의 핵산을 표적으로 하거나 이를 방해한다. 이러한 세포독성제의 예에는 본원에서 언급된 모든 화학요법제 (예: 마이탄시노이드 또는 칼리케아미신), 방사성 동위원소, 또는 리보뉴클레아제 또는 DNA 엔도뉴클레아제가 포함된다.

[0340] 본 발명의 항체는 단독으로 사용하거나 또는 기타 요법의 조성물과 병용해서 사용할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 항체는 또 다른 항체, 화학요법제(들) (화학요법제의 콕테일 포함), 기타 세포독성제(들), 항-혈관형성제(들), 사이토킨, 및/또는 성장 억제제(들)와 함께 투여할 수 있다. 본 발명의 항체가 종양 성장을 억제하는 경우에는, 종양 성장을 또한 억제하는 한 가지 이상의 기타 치료제(들)와 병용하는 것이 특히 바람직할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 항체는 전이성 유방암을 치료하는데 있어서의 항-ErbB 항체 (예: 헤르셉틴[®]

항-HER2 항체) 및/또는 VEGF 활성을 차단시키는 항-VEGF 항체와 병용할 수 있다. 또 다른 한편, 또는 부가적으로, 환자에게 병용 방사선 요법 (예: 방사성 표지된 작용제, 예를 들어 항체를 이용한 요법 또는 외부 빔 조사)을 적용할 수 있다. 이러한 병용 요법에는 병용 투여 (여기서는, 2가지 이상 작용제가 동일하거나 별도의 제제 내에 포함된다) 및 별도 투여 (여기서는, 본 발명의 항체 투여를 보조 요법(들) 투여 이전, 및/또는 투여 후에 수행할 수 있다)가 포함된다.

[0341] 본 발명의 항체 (및 보조 치료제)는 적합한 모든 수단, 예를 들어 비경구, 피하, 복강내, 폐내, 및 비내 투여하고, 국소적으로 치료하고자 하는 경우에는, 병변내 투여한다. 비경구 주입에는 근육내, 정맥내, 동맥내, 복강

내 또는 피하 투여가 포함된다. 또한, 항체는, 특히 항체 용량을 감소시키면서 펄스 주입에 의해 투여하는 것이 적합하다. 부분적으로는 투여가 단기인지 만성인지에 따라서, 예를 들어 주사에 의한 적합한 모든 경로, 예를 들면, 정맥내 또는 피하 주사에 의해 투여할 수 있다.

[0342] 본 발명의 항체 조성물은 우수한 의료 행위에 일관되는 방식으로 제제화, 투약 및 투여될 것이다. 이러한 맥락에서 고려해야 하는 요인에는 치료하고자 하는 특정 질환, 치료하고자 하는 특정 포유류, 개개 환자의 임상 상태, 질병의 원인, 작용제 전달 부위, 투여 방법, 투여 스케줄, 및 의사에게 공지된 기타 요인들이 포함된다. 본 발명의 항체를, 문제의 질환을 예방 또는 치료하기 위해 현재 사용되고 있는 한 가지 이상의 작용제와 함께 반드시 제제화할 필요는 없지만, 임의로 제제화할 수 있다. 이러한 기타 작용제의 유효량은 제제 내에 존재하는 본 발명의 항체의 양, 질환 또는 치료 유형, 및 상기 논의된 기타 요인들에 의해 좌우된다. 이들은 일반적으로, 지금까지 사용된 바와 동일한 투여량과 투여 경로로 사용되거나, 또는 지금까지 이용된 투여량의 약 1 내지 99%이다.

[0343] 질병을 예방 또는 치료하는데 적당한 본 발명의 항체 투여량 (단독으로 사용되거나, 또는 화학요법제와 같은 기타 작용제와 병용하는 경우에 적당한 투여량)은 치료하고자 하는 질병의 유형, 항체의 유형, 질병의 중증도 및 과정, 항체가 예방적 용도로 투여되는지 아니면 치료적 용도로 투여되는지의 여부, 기존의 요법, 환자의 임상 병력 및 항체에 대한 반응, 및 담당 의사의 판단에 좌우될 것이다. 항체는 환자에게 1회 투여하거나 일련의 치료 기간 내내 투여하는 것이 적합하다. 질병의 유형과 중증도에 따라서, 1회 이상의 별도 투여이든지 아니면 연속적인 주입이든지 간에, 항체 약 1 $\mu\text{g/kg}$ 내지 약 15 mg/kg (예: 0.1 mg/kg 내지 10 mg/kg)이 환자에게 투여하기 위한 초기 후보 투여량이다. 전형적인 1일 투여량은 상기 언급된 요인들에 따라서 약 1 $\mu\text{g/kg}$ 내지 100 mg/kg 이상의 범위일 수 있다. 수 일에 걸쳐 반복 투여하는 경우에는, 질환에 따라서 목적하는 질병 증상 억제가 나타날 때까지 치료를 지속한다. 항체의 한 가지 예시 투여량은 약 0.05 mg/kg 내지 약 10 mg/kg의 범위일 것이다. 따라서, 약 0.5 mg/kg, 2.0 mg/kg, 4.0 mg/kg 또는 10 mg/kg (또는 그들의 조합량) 용량을 1회분 이상 환자에게 투여할 수 있다. 이러한 용량은 간헐적으로, 예를 들어 매주 또는 3주 마다 투여할 수 있다 (예를 들면, 환자에게 항체를 약 2 내지 20회분, 예를 들면, 약 6회분으로 투여할 수 있다). 초기에는 보다 많은 부하 용량을 투여한 다음, 그 보다 적은 용량을 1회분 이상 투여할 수 있다. 예시 투여 섭생은 항체를 초기 부하 용량 약 4 mg/kg으로 투여한 다음, 매주 약 2 mg/kg의 유지 용량으로 투여하는 것을 포함한다. 그러나, 기타 투여량 섭생도 유용할 수 있다. 이러한 요법의 진행 과정은 통상적인 기술 및 검정에 의해 용이하게 모니터링할 수 있다.

[0344] 제조품

[0345] 본 발명의 또 다른 국면에서는, 상기 언급된 질환을 치료, 예방 및/또는 진단하는데 유용한 물질을 함유하는 제조품이 제공된다. 본 발명의 제조품은 용기, 및 이러한 용기와 연합되거나 그 위의 라벨 또는 패키지 삽입물을 포함한다. 적합한 용기에는, 예를 들어 병, 바이알, 주사기 등이 포함된다. 용기는 각종 재료, 예를 들어 유리 또는 플라스틱으로부터 형성할 수 있다. 용기는 상기 질환을 치료, 예방 및/또는 진단하는데 유효한 조성물만을 보유하고 있거나, 또는 이러한 조성물을 상기와 같이 유효한 또 다른 조성물과 병용해서 보유하고 있고, 멸균성 유입 포트를 가질 수 있다 (예를 들어, 상기 용기는 피하 주사 바늘에 의해 뚫을 수 있는 마개를 갖는 정맥내 용제 봉지 또는 바이알일 수 있다). 조성물 내의 적어도 한 가지 활성제는 본 발명의 항체이다. 라벨 또는 패키지 삽입물은 해당 조성물이 선택 질환, 예를 들어 암을 치료하는데 사용된다는 것을 표시한다. 더우기, 본 발명의 제조품은 (a) 그 내부에 특정 조성물을 함유하고 있는 제1 용기 (이 조성물은 본 발명의 항체를 포함한다); 및 (b) 그 내부에 특정 조성물을 함유하고 있는 제2 용기 (이 조성물은 추가의 세포독성제를 포함한다)를 포함할 수 있다. 이러한 본 발명의 양태에서의 제조품은 상기 제1 및 제2 항체 조성물을 사용하여 특정 질환, 예를 들어 암을 치료할 수 있다는 것을 표시한 패키지 삽입물을 추가로 포함할 수 있다. 또 다른 한편, 또는 부가적으로, 본 발명의 제조품은 제약상 허용 가능한 완충제, 예를 들어 계균성 주사용 수 (BWWFI), 인산염 완충 식염수, 링거액 및 텍스트로스 용액을 포함하는 제2 (또는 제3) 용기를 추가로 포함할 수 있다. 상업적 및 사용자 측면에서 바람직한 기타 재료, 예를 들어 기타 완충액, 희석제, 충전제, 바늘 및 주사기를 추가로 포함할 수 있다.

[0346] 다음은 본 발명의 방법 및 조성물의 예이다. 상기 제공된 일반적인 설명이 제시되는 한, 각종의 기타 양태들이 실시될 수 있다는 것을 인지해야 한다.

실시예

- [0347] **재료 및 방법**
- [0348] **시약**
- [0349] 옥수수 트립신 억제제는 공급처 [Haematologic Technologies (Essex Junction, VT)]로부터의 것이고, HGFA에 대한 발색 기질인 스펙트로자임 (Spectrozyme®)
- [0350] fVIIa는 공급처 [American Diagnostica (Stamford, CT)]로부터의 것이다. 가용성 HAI-1B (sHAI-1B)는 중국 산 햄스터 난소 세포에서 발현되었고, 기존에 (1)에 보고된 바와 같이 정제하였다. 쿠니츠 도메인 억제제 IV-49C는 기존에 (2)에 보고되었다 (공급처: Genentech, Inc., South San Francisco). 인간 재조합 HGFA (HGFA)은 기존에 (1)에 보고된 바와 같이 바콜로바이러스 (baculovirus) 발현 시스템에서 발현하였다.
- [0351] 프로HGF 활성화 검정
- [0351] 요오도젠 (Iodogen)을 이용한 프로HGF 표지화 및 프로HGF 활성화 검정을 기존에 (1,3)에 보고된 바와 같이 수행하였다. 간략하게 언급하면, HGFA를 실온에서 15분 동안 HNC 완충액 (20 mM Hepes, pH 7.5, 150 mM NaCl, 5 mM CaCl₂) 중의 항-HGFA 항체 또는 sHAI-1B와 함께 예비항온 배양한 후, HNC 완충액 중의 ¹²⁵I-표지된 프로HGF를 가하고 37°C 하에 4시간 동안 항온 배양하였다. 최종 혼합물 중의 반응물 농도는 다음과 같다: 2 nM HGFA, 0.05 mg/ml ¹²⁵I-표지된 프로HGF, 0.1 mg/ml 항-HGFA 항체, 1 μM sHAI-1B. 4시간 후, 분취액을 꺼내고, 이를 환원제 디티오트레이톨 (BIO-Rad)을 수반한 샘플 완충액 (공급처: Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)에 가하였다. 간단히 가열시킨 후, 샘플 (레인당 대략 10⁶ cpm)을 4 내지 20% 구배 폴리아크릴아미드 겔 (공급처: Invitrogen Corp., Carlsbad, CA) 상으로 부하하였다. 전기영동 후, 건조시킨 겔을 X선 필름 (X-OMAT AR, Eastman Kodak Company, Rochester, NY) 상에 10 내지 20분 동안 노출시켰다. 필름을 현상하고 (Kodak M35A X-OMAT 프로세서), 스캐닝한 다음 (Umax S-12, Umax Data Systems, Inc., Fremont, CA), Adobe V.6.0 포토샵 소프트웨어 (공급처: Adobe Systems Inc., San Jose, CA)를 이용하여 추가로 처리하였다.
- [0352] BIA코어 실험
- [0353] HGFA에 대한 항-HGFA 항체의 결합 친화성은 BIA코어 3000 기기 (공급처: Biacore, Inc.) 상에서 표면 플라즈몬 공명 측정함으로써 결정하였다. 재포맷된 완전한 길이의 항-HGFA IgG1을 300 공명 단위 (RU) 밀도로 파이오니어 (Pioneer) CM5 센서 칩의 유동 세포 상에 고정시켰다. 제조업자에 의해 제공된 프로토콜을 사용하여 아미노기를 통하여 무작위로 커플링함으로써 고정화를 달성하였다. 1 μM 내지 8 nM 범위의 일련의 용액을 2배씩 증분하여 주사함으로써 상기 표면에 대한 HGFA의 결합성에 대한 센서그램을 기록하였다. 기준 세포로부터의 신호를 관찰된 센서그램으로부터 공제하였다. 제조업자에 의해 공급된 소프트웨어를 사용하여 1:1 랑귀르 (Langmuir) 결합성 모델에 따르는 데이터를 비선형 회귀 분석함으로써 역학 상수를 계산하였다. 경쟁 실험에서는, HGFA (70 nM)를 각종 농도의 sHAI-1B (4 nM 내지 300 nM) 또는 IV-49C (11 nM 내지 300 nM) 또는 소분자 HGFA 활성 부위 결합제 (220 nM 내지 10 μM)와 함께 예비항온 배양하였다. 실온에서 60분 동안 항온 배양한 후, 효소-억제제 혼합물을 상기 유동 세포에 주사하고, 센서그램을 기록하였다.
- [0354] HGFA 효소 억제 검정
- [0355] 항체 또는 sHAI-1B를 실온에서 20분 동안 HBSA 완충액 (20 mM Hepes, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.5 mg/ml BSA, 5 mM CaCl₂) 중의 HGFA (최종 농도 5 nM)와 함께 항온 배양하였다. 스펙트로자임 fVIIa (200 μM 최종 농도, K_M = 200 μM)을 가하고 405 nm에서의 흡광도 상의 선형 증가 속도를 역학 미세판 판독기 (공급처: Molecular Devices, Sunnyvale, CA) 상에서 측정하였다. 효소 활성 억제를 억제되지 않은 활성의 분획 활성 (vi/vo)으로서 표현하였다.
- [0356] **결과 및 토의**
- [0357] **파아지 디스플레이에 의한 항-HGFA 항체의 확인**
- [0358] 항체를 확인하는 한 가지 방법은 파아지 항체 라이브러리를 통해서이다 [참고: 예를 들어 Lee et al. (4)]. HGFA에 대항한 항체를 확인하기 위해, 본 발명자들은 기존에 보고된 인간 합성 파아지미드 항체 라이브러리 (F(ab')₂ 라이브러리)를 사용하여 패닝 4회전을 수행하였다. 판을 5 μg/웰의 HGFA로 피복하였다. 본 발명자들은 각 회전 후 세척 10회 내지 40회로 세척 엄격도를 증가시켰다. 본 발명자들은 패닝 3회전 후에 증강을 관찰

하였다. 패닝 4회전 후, ELISA 검정을 위해 95개 클론을 골라내었다. 서열 분석한 후, 67개의 독특한 클론이 HGFA와 특이적으로 결합하는 것으로 밝혀졌다. 스폿 경쟁 ELISA 후, 정제된 파아지를 사용하여 24개 클론을 추가로 성장 확인하여 IC₅₀ 값을 측정하였는데, 이는 표준 파아지 경쟁 ELISA를 사용하여 결정하였다. IC₅₀ 값이 < 100 nM인 14개의 독특한 클론을 PRK-인간 IgG1 벡터 내로 서브클로닝하였다. 이들 클론에 대한 CDR 서열이 도 1에 열거되어 있다. 항-HGFA 클론의 중쇄 및 경쇄 (문헌 [참고: Lee et al. (4)]에 기재된 바와 같은 인간화 4D5 항체로부터 유래됨)를 포유류 293 세포 내로 공동-형질감염시켰다. 1주 후, 혈청-무함유 상등액을 수거하고, 단백질을 A 친화 크로마토그래피를 사용하여 항체를 정제하였다.

[0359] 완전한 길이의 항-HGFA 항체에 의한 HGFA 효소 활성의 억제

[0360] 선택된 항체를 표준 재조합 기술에 의해 완전한 길이의 항체 (IgG)로서 재포맷하였다. 이들 완전한 길이의 항체를, ¹²⁵I-표지된 프로HGF를 사용하여 거대 분자상 기질 활성화 검정에서 조사하였다. 4시간 동안 실험하는 동안, HGFA는 프로HGF를 2-쇄 HGF로 완전히 전환시켰고, 이러한 반응은 기존의 보고서 (1)와 일관되게 1 μM sHAI-1B (도 2A)에 의해 억제될 수 있었다. 항체 #49를 제외하고는 (도 1), 0.67 μM의 시험 농도에서 시험된 모든 항-HGFA 항체가 프로HGF 전환을 상당히 억제시켰다 (도 2). 부가의 실험 결과, #58이 0.03 μM 정도로 낮은 농도에서도 프로HGF 전환을 억제하였다는 것이 밝혀졌다 (도 3). 이들 결과와 부합되게, 항체 #58은 1.3 nM의 IC₅₀을 나타내는, 소형 합성 기질 스펙트로자임 fVIIa에 대한 HGFA 효소 활성을 가장 강력하게 억제한 반면, 항체 #49는 500 nM에서도 억제하지 못하였다 (도 8). 더우기, 프로HGF 활성화 검정에서 이들의 비교적 약한 억제 활성과 일치하게, 항체 #39, #86, #90 및 #95는 발색 기질 검정에서 동등한 수준으로 보다 약한 활성을 지녔고 IC₅₀ > 500 nM을 나타내었다 (도 8). 3가지 항체 #42, #61, 및 #74 또한, 0.67 μM에서 프로HGF 전환을 거의 완전히 억제하였음에도 불구하고, 비교적 약한 억제 (IC₅₀ > 500 nM)를 나타내었다 (도 8). 흥미롭게도, 항체 #75는 그의 억제 활성이 항체 #58에 의해 달성된 완전한 억제와 비교해서 대략 70% 억제에서 안정 수준에 도달하였다는 점에서 독특한 억제 역학을 나타내었다 (도 4).

[0361] 항체 #75 및 #58의 억제 기전

[0362] 항체 #75에 의해 거대분자상 기질 프로세싱이 완전히 억제되었다는 측면에서 보면, 이러한 항체가 소형 합성 기질에 대한 HGFA 효소 활성을 완전히 중화시킬 수 없다는 것은, 항체 #75가 활성 부위 외부에 위치하거나 또는 활성 부위와 근접하여 위치한 기능상 중요한 HGFA 영역과 결합한다는 사실을 제안하였다. 이와는 달리, 항체 #58은 HGFA에 의한 거대분자상 기질 프로세싱과 소형 기질 프로세싱 둘 다를 강력히 억제하였다. 이들 항체의 억제 기전에 관해 보다 상세히 고찰하기 위해, 공지된 각종 활성 부위 억제제를 이용한 경쟁 결합 연구를 수행하였다. 사용된 3가지 HGFA 활성 부위 억제제는 기존에 보고된 바이-쿠니츠 도메인 억제제 sHAI-1B (1)인데, 단일 쿠니츠 도메인 억제제 IV-49C (2) 및 소분자 HGFA 활성 부위 결합제이다. IV-49C는 알츠하이머 (Alzheimer)의 β-단백질 전구체 억제제 (APPI)로부터 유래된 62개 아미노산 쿠니츠 도메인이고, 조직 인자/인자 VIIa 복합체의 특이적 억제제이다 (2). 본 발명자들은 IV-49C가 또한 0.079 μM의 IC₅₀을 나타내는, HGFA 효소 활성의 강력한 억제제인 반면, 소분자 HGFA 활성 부위 결합제는 도 5에 도시된 바와 같이 0.8 μM의 IC₅₀ (K_i = 0.4 μM)으로 억제하였다는 사실을 밝혀내었다.

[0363] 고정화 항체 #58에 대한 HGFA의 K_d는 아마이드분해 검정에 의해 결정된 친화도 (도 8)와 유사하게 1.3 nM였다 (도 9). BIA코어 측정 결과, sHAI-1B, IV-49C 및 소분자 HGFA 활성 부위 결합제는 #58에 대한 HGFA 결합을 억제한 것으로 나타났다. 이는 #58이 HGFA의 활성 부위와 직접적으로 결합하거나 또는 활성 부위에 대한 알로스테리 (allosteric) 영향을 발휘한다는 것을 제안하였다.

[0364] 항체 #75는 HGFA에 대한 결합성 (도 6E; 도 9)이 #58 보다 약하였다. 더우기, 소분자 HGFA 활성 부위 결합제는 항체 #75에 대한 HGFA 결합성에 대해 전혀 영향을 미치지 않았는데, 이는 항체 #75가 활성 부위의 '코어' 영역과 결합하지 않았다는 것을 시사한다. 흥미롭게도, 항체 #75는 HGFA 아마이드분해 활성을 부분적으로 억제하였는데, 이는 #75 에피토프가 활성 부위 외부에 존재하는 경우일지라도, 이들 두 부위 간에는 분자상으로 연결되어야만 한다는 것을 제안하고 있다. 이는 항체 #75 결합성에 대한 sHAI-1B 및 IV-49C의 부분적 효과를 설명해줄 것이다 (도 9; 도 6F,G).

[0365] 항체 #75와 유사하게, 2개의 항체 #74 및 #61은 또한 소분자 활성 부위 결합제의 존재 하에 HGFA와 결합한 반면 (도 9), 쿠니츠 도메인 억제제는 HGFA 결합을 방해하였다. 이러한 결과는 #74 및 #61의 에피토프가 HGFA의 활

성 부위 외부에 존재한다는 것을 제안하였다. 항체 #61, #74 및 #75가, 거대분자상 기질 상호 작용에 중요한 HGFA 부위의 영역과 결합하거나, 또는 이들 항체가 활성 부위 영역의 입체 형태에 알로스테리적으로 영향을 미치는 것으로 추론할 수 있다. 구조상 관계가 있는 세린 프로테아제 인자 VIIa에서는, 중요한 부위의 영역이 활성 부위와 칼슘 결합성 루프 사이에 위치한다 (5). 인자 VIIa 부위의 영역과 결합하는 펩티드 뿐만 아니라 항체는 거대분자상 기질 프로세싱의 강력한 억제제이다 (6,7). 예를 들어, 펩티드성 억제제 E76의 결합성은 '활성화 도메인' 루프들 중의 하나에서 입체형태적 변화를 유발시킴으로써 기질 상호 작용 부위를 봉쇄시켰다 (7). 또한, 이들 변화는 활성 부위에서 알로스테리 효과를 유도시켰는데, 이는 E-76 펩티드가 활성 부위 영역 외부에서의 결합에도 불구하고 아미드분해 활성을 억제하였다는 관찰 결과를 설명해준다.

[0366] 바이오티닐화 항체 #75 및 #58을 사용한 부가의 경쟁 결합 실험은 #75 및 #58이 HGFA 상에 중복 에피토프를 갖고 있다는 것을 시사하였다 (데이터는 제시되지 않음). 효소 역학 연구 결과, #58이 경쟁적 억제제이고 #75는 부분 경쟁적 억제제 (즉, 단순한 교차 쌍곡선 경쟁적 억제제)라는 사실이 추가로 입증되었다 (데이터는 제시되지 않음). 취합해 보면, 이들 결과는 양 항체가 HGFA 활성 부위 외부와 결합하고 이들 항체가 HGFA 효소 활성의 알로스테리 억제제라는 사실을 제안하고 있다.

[0367] 참고 문헌에 관한 부분 목록

1. Kirchhofer D, Peek M, Li W, Stamos J, Eigenbrot C, Kadkhodayan S, Elliott JM, Corpuz RT, Lazarus RA, Moran P. Tissue expression, protease specificity, and Kunitz domain functions of hepatocyte growth factor activator inhibitor-1B (HAI-1B), a new splice variant of HAI-1. *J. Biol. Chem.* 2003;278:36341-36349.
2. Dennis MS, Lazarus RA. Kunitz domain inhibitors of tissue factor-factor VIIa II. Potent and specific inhibitors by competitive phage selection. *J. Biol. Chem.* 1994;269:22137-22144.
3. Peek M, Moran P, Mendoza N, Wickramasinghe D, Kirchhofer D. Unusual proteolytic activation of pro-hepatocyte growth factor by plasma kallikrein and coagulation factor XIa. *J. Biol. Chem.* 2002;277:47804-47809.
4. Lee CV, Liang W-C, Dennis MS, Eigenbrot C, Sidhu SS, Fuh G. High-affinity human antibodies from phage-displayed synthetic Fab libraries with a single framework scaffold. *J. Mol. Biol.* 2004;340.
5. Dickinson CD, Kelly CR, Ruf W. Identification of surface residues mediating tissue factor binding and catalytic function of the serine protease factor VIIa. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1996;93:14379-14384.
6. Dickinson CD, Shobe J, Ruf W. Influence of cofactor binding and active site occupancy on the conformation of the macromolecular substrate exosite of factor VIIa. *J. Mol. Biol.* 1998;277:959-971.
7. Dennis MS, Eigenbrot C, Skelton NJ, Ultsch MH, Santell L, Dwyer MA, O'Connell MP, Lazarus RA. Peptide exosite inhibitors of factor VIIa as anticoagulants. *Nature.* 2000;404:465-470.
8. Birchmeier, C., Birchmeier, W., Gherardi, E., and Vande Woude, G. F. (2003) *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 4, 915-925
9. Trusolino, L., and Comoglio, P. M. (2002) *Nature Rev. Cancer* 2, 289-300
10. Hartmann, G., Naldini, L., Weidner, K. M., Sachs, M., Vigna, E., Comoglio, P. M., and Birchmeier, W. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 11574-11578
11. Lokker, N. A., Mark, M. R., Luis, E. A., Bennett, G. L., Robbins, K. A., Baker, J. B., and Godowski, P. J. (1992) *EMBO J* 11, 2503-2510
12. Naka, D., Ishii, T., Yoshiyama, Y., Miyazawa, K., Hara, H., Hishida, T., and Kitamura, N. (1992) *J. Biol. Chem.* 267, 20114-20119
13. Gak, E., Taylor, W. G., Chan, A. M.-L., and Rubin, J. S. (1992) *FEBS Lett.* 311, 17-21
14. Miyazawa, K., Shimomura, T., Kitamura, A., Kondo, J., Morimoto, Y., and Kitamura, N. (1993) *J. Biol. Chem.* 268, 10024-10028
15. Kirchhofer, D., Peek, M., Li, W., Stamos, J., Eigenbrot, C., Kadkhodayan, S., Elliott, J. M., Corpuz, R. T., Lazarus, R. A., and Moran, P. (2003) *J. Biol. Chem.* 278, 36341-36349
16. Shimomura, T., Denda, K., Kitamura, A., Kawaguchi, T., Kito, M., Kondo, J., Kagaya, S., Qin, L., Takata, H., Miyazawa, K., and Kitamura, N. (1997) *J. Biol. Chem.* 272, 6370-6376
17. Lin, C.-Y., Anders, J., Johnson, M., and Dickson, R. B. (1999) *J. Biol. Chem.* 274, 18237-18242

[0368]

18. Kawaguchi, T., Qin, L., Shimomura, T., Kondo, J., Matsumoto, K., Denda, K., and Kitamura, N. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 27558-27564
19. Marlor, C. W., Delaria, K. A., Davis, G., Muller, D. K., Greve, J. M., and Tamburini, P. P. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 12202-12208
20. Delaria, K. A., Muller, D. K., Marlor, C. W., Brown, J. E., Das, R. C., Rocznik, S. O., and Tamburini, P. P. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 12209-12214

[0369]

도면의 간단한 설명

[0115]

도 1(A): 항-HGFA 항체의 중쇄 CDR 루프 서열. 이 도면은 중쇄 CDR 서열 H1, H2, 및 H3을 도시한 것이다. 경쇄 서열은 인간화 4D5 서열이다 [참고: Lee et al., 상기 참고]. 서열 번호부여는 다음과 같다: 클론 33 (CDRH1은 서열 3이고; CDRH2는 서열 4이며; CDRH3은 서열 5이다); 클론 35 (CDRH1은 서열 6이고; CDRH2는 서열 7이며; CDRH3은 서열 8이다); 클론 37 (CDRH1은 서열 9이고; CDRH2는 서열 10이며; CDRH3은 서열 11이다); 클론 39 (CDRH1은 서열 12이고; CDRH2는 서열 13이며; CDRH3은 서열 14이다); 클론 42 (CDRH1은 서열 15이고; CDRH2는 서열 16이며; CDRH3은 서열 17이다); 클론 49 (CDRH1은 서열 18이고; CDRH2는 서열 19이며; CDRH3은 서열 20이다); 클론 58 (CDRH1은 서열 21이고; CDRH2는 서열 22이며; CDRH3은 서열 23이다); 클론 61 (CDRH1은 서열 24이고; CDRH2는 서열 25이며; CDRH3은 서열 26이다); 클론 74 (CDRH1은 서열 27이고; CDRH2는 서열 28이며; CDRH3은 서열 29이다); 클론 75 (CDRH1은 서열 30이고; CDRH2는 서열 31이며; CDRH3은 서열 32이다); 클론 86 (CDRH1은 서열 33이고; CDRH2는 서열 34이며; CDRH3은 서열 35이다); 클론 90 (CDRH1은 서열 36이고; CDRH2는 서열 37이며; CDRH3은 서열 38이다); 클론 91 (CDRH1은 서열 39이고; CDRH2는 서열 40이며; CDRH3은 서열 41이다); 클론 95 (CDRH1은 서열 42이고; CDRH2는 서열 43이며; CDRH3은 서열 44이다). 아미노산 위치는 다음에 기재되는 바와 같은 카바트 번호부여 시스템에 따라서 번호가 부여된 것이다. IC50 값은 또한 마지막 (우측) 칼럼에 표시된다.

[0116]

(B), (C) 및 (D): 항-HGFA 항체의 중쇄 CDR 루프 서열.

[0117]

(E) 및 (F): 예시적인 골격 영역 서열. (E): HuMAb4D5-8 골격 영역 서열. (F): 변형을 포함하는 HuMAb4D5-8 골격 영역 서열.

[0118]

도 2: 항-HGFA 항체에 의한 HGFA-매개된 프로HGF 활성화의 억제. HGFA를 37°C 하에 4시간 동안 ¹²⁵I-표지된 프로HGF 및 항-HGFA 항체와 함께 항은 배양하였다. 반응물 농도는 50 µg/ml 프로HGF, 2 nM HGFA 및 0.1 mg/ml (0.67 µM) 항체이다.

[0119]

분취액을 환원성 조건 하에 SDS-PAGE에 의해 분석하였다. 가용성 HAI-1B (sHAI-1B)를 1 µM 최종 농도로 대조군 억제제로서 사용하였다. A. 레인 1: (t=0)반응 개시시 취한 분취액, 레인 2: 억제제 없음, 레인 3: sHAI-1B (1 µM), 레인 4: #33, 레인 5: #35, 레인 6: #39, 레인 7: #49, 레인 8: #74, 레인 9: #61. B. 레인 1: #42, 레인 2: #91, 레인 3: 58, 레인 4: #37, 레인 5: #75, 레인 6: #90, 레인 7: #86, 레인 8: #95.

[0120]

도 3: 항체 #58에 의한 HGFA-매개된 프로HGF 전환의 강력한 억제. 3가지 상이한 농도의 항체 #58과 비-차단성 항체 #49를, 도 1에 기재된 바와 같이 수행된 ¹²⁵I-표지된 프로HGF 전환 실험에 사용하였다. 레인 1: (t=0) 반응 개시시 취한 분취액, 레인 2: 억제제 없음, 레인 3: sHAI-1B (1 µM), 레인 4: 0.67 µM Ab#49, 레인 5: 0.13 µM Ab#49, 레인 6: 0.03 µM Ab#49, 레인 7: 0.67 µM Ab#58, 레인 8: 0.13 µM Ab#58, 레인 9: 0.03 µM Ab#58.

[0121]

도 4: 항-HGFA 항체 58 및 75에 의한 HGFA 아미드분해 활성의 농도-의존적 억제. 각종 농도의 항체를 실온에서 20분 동안 HBSA 완충액 중의 HGFA (5 nM 최종 농도)와 함께 항은 배양하였다. 스펙트로자임 (Spectrozyme®) fVIIa (200 µM 최종 농도, K_M = 200 µM)을 부가한 후, 기질 활성화의 선형 속도를 역학 미세판 판독기 상에서 측정하였다. 효소 활성의 억제를 억제되지 않은 활성의 분획 활성 (v_i/v_o)으로서 표현하였다.

[0122]

도 5: IV-49C 및 소분자 활성 부위 결합제/억제제에 의한 HGFA 아미드분해 활성의 억제. 각종 농도의 억제제를 실온에서 20분 동안 HBSA 완충액 중의 HGFA (IV-49C의 경우에는 2.5 nM이고, 소분자의 경우에는 5 nM이다)와 함께 항은 배양하였다. 스펙트로자임 fVIIa 활성화의 효소 억제를 도 4에 기재된 바와 같이 측정하였다. A. 특이적 인자 XIIa 억제제 옥수수 트립신 억제제 (흰색 환)와 비교한 쿠니즈 도메인 억제제 IV-49C (검은색 환)에 의한 억제. B. 소분자 억제제 (검은색 삼각형)에 의한 억제.

[0123] 도 6: 항-HGFA 항체 #58 및 #75에 대한 HGFA 결합의 표면 플라즈몬 공명 측정. 항-HGFA 항체 (완전한 길이의 IgG1)를 BIA코어 칩 상에 고정하고, 각종 농도의 HGFA로부터 결합 데이터를 수집하였다. 경쟁 결합 연구를 위해, HGFA (70 nM)를 각종 농도의 sHAI-1B, IV-49C 또는 소분자 활성 부위 결합체와 함께 예비향은 배양하였다. A - D: (A) 억제제의 부재 하에, 또는 (B) sHAI-1B, (C) FV-49C 및 (D) 소분자 활성 부위 결합체의 존재 하에, 항체 #58에 대한 HGFA의 결합. E - H: (E) 억제제의 부재 하에, 또는 (F) sHAI-1B, (G) IV-49C 및 (H) 소분자 활성 부위 결합체의 존재 하에, 항체 #75에 대한 HGFA의 결합.

[0124] 도 7: 인간 (상단; 서열 1) 및 뮤린 (하단; 서열 2) HGFA 단백질 서열.

[0125] 도 8: 각종 항-HGFA 항체에 의한 HGFA 효소 활성의 억제와 관계된 데이터를 나타낸 표.

[0126] 도 9: 항-HGFA 항체에 대한 HGFA의 결합과 관계된 데이터를 나타낸 표.

도면

도면1A

클론 번호	서열 번호	H1	H2	H3	친화도
33	2	TSSA	GIIINPNNGGYTTN	SSRLAG A	12 nM
35	1	TGSA	GIIINPNNSGYTTD	SARIRG	12 nM
37	1	NSNG	GIIINPNAGGATD	WGWG	56 nM
39	1	NGTY	GIIINPNAGGATY	WAWPA	6 nM
42	1	NGTW	GIIINPNAGGATY	WRAVP S	30 nM
49	1	TGTY	GIIINPNNGGDTY	DWFGFG E	2 nM
58	1	TGSA	GIIINPNNGGYTTY	SARF S	1 nM
61	1	SGNW	GIIINPNNGGSTN	FYRWS V	20 nM
74	1	TNYW	GIIINPNAGGATD	YSIP A	60 nM
75	1	NSNG	GIIINPNAGGATD	FWWRS	6 nM
86	1	SDSS	GIIINPNAGGATN	GLKVP F	19 nM
90	1	SGSA	GIIINPNAGGATN	SRGHYA	40 nM
91	2	TGNG	GIIINPNAGGATN	GHRV	100 nM
95	4	NNTG	GIIINPNAGGATN	F F P V A	4 nM

도면 1B

클론 번호	H1										
	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	서열
33	G	F	N	I	T	S	S	A	I	H	71
35	G	F	N	I	T	G	S	A	I	H	72
37	G	F	N	I	N	S	N	G	I	H	73
39	G	F	N	I	N	G	T	Y	I	H	74
42	G	F	N	I	N	G	T	W	I	H	75
49	G	F	N	I	T	G	T	Y	I	H	76
58	G	F	N	I	T	G	S	A	I	H	77
61	G	F	N	I	S	G	N	W	I	H	78
74	G	F	N	I	T	N	Y	W	I	H	79
75	G	F	N	I	S	N	S	G	I	H	80
86	G	F	N	I	S	D	S	S	I	H	81
90	G	F	N	I	S	G	S	A	I	H	82
91	G	F	N	I	T	G	N	G	I	H	83
95	G	F	N	I	N	N	T	G	I	H	84

도면1C

출발번호	H2																		시연
	49	50	51	52	52a	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	
33	G	I	I	N	P	N	G	G	Y	T	N	Y	A	D	S	V	K	G	85
35	G	I	I	N	P	N	S	G	Y	T	D	Y	A	D	S	V	K	G	86
37	G	W	I	Y	P	A	G	G	A	T	D	Y	A	D	S	V	K	G	87
39	G	G	I	Y	P	A	G	G	A	T	Y	Y	A	D	S	V	K	G	88
42	G	G	I	Y	P	A	G	G	A	T	D	Y	A	D	S	V	K	G	89
49	G	W	I	S	P	Y	N	G	D	T	Y	Y	A	D	S	V	K	G	90
58	A	I	I	N	P	N	G	G	Y	T	Y	Y	A	D	S	V	K	G	91
61	A	E	I	N	P	Y	N	G	S	T	N	Y	A	D	S	V	K	G	92
74	G	G	I	Y	P	A	G	G	A	T	D	Y	A	D	S	V	K	G	93
75	G	W	I	Y	P	T	G	G	A	T	D	Y	A	D	S	V	K	G	94
86	A	R	I	Y	P	T	S	G	N	T	N	Y	A	D	S	V	K	G	95
90	A	I	I	N	P	T	G	G	Y	T	N	Y	A	D	S	V	K	G	96
91	A	W	I	S	P	Y	G	G	S	T	N	Y	A	D	S	V	K	G	97
95	G	W	I	Y	P	A	G	G	A	T	D	Y	A	D	S	V	K	G	98

도면ID

출문번호	H3	93	94	95	96	97	98	99	100	a	b	c	d	e	f	101	102	서열
		A	R	S	S	R	L	A	G	A				M	D	Y		99
33	A	R	S	S	A	R	I	R	G					F	D	Y		100
35	A	R	S	A	R	I	R	G						F	D	Y		101
37	A	R	W	G	W	G								F	D	Y		102
39	A	R	W	W	A	W	P	A						F	D	Y		103
42	A	R	W	R	A	V	P	S						F	D	Y		104
49	A	R	D	W	F	G	F	G	E					F	D	Y		105
58	A	R	S	A	R	F	S							F	D	Y		106
61	A	R	F	Y	R	W	S	V	N	S	V			M	D	Y		107
74	A	R	Y	S	I	P	A							F	D	Y		108
75	A	R	F	W	W	R	S							F	D	Y		109
86	A	R	G	L	K	V	P	F	Y	A	N	A	A	M	D	Y		110
90	A	R	S	R	G	H	Y	A						M	D	Y		111
91	A	R	G	H	R	V								F	D	Y		112
95	A	R	F	F	P	V	A							F	D	Y		

경색의 골격 서열

LC-FR1	1 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val 23 Thr Ile Thr Cys (서열 55)
LC-FR2	35 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr (서열 56)
LC-FR3	57 Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile 88 Ser Ser Leu Gln Pro Gln Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys (서열 57)
LC-FR4	98 Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Gln Ile Lys (서열 58)
중쇄의 골격 서열	
HC-FR1	1 Glu Val Gln Leu Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg 25 Leu Ser Cys Ala Ala Ser (서열 59)
HC-FR2	36 Trp Val Arg Gln Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Gln Trp Val (서열 60)
HC-FR3	66 Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn 83a 83b 83c 92 Ser Leu Arg Ala Gln Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys (서열 61)
HC-FR4	103 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser (서열 62)

경쟁의 골격 서열

LC-FR1 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys (49/63)²³

LC-FR2
35 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr (서열 64)
49

LC-FR3 57 Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys (사) 88 (65)

LC-FR4 ⁹⁸ Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys ¹⁰⁷ (서열 66)

중세의 골격 서열

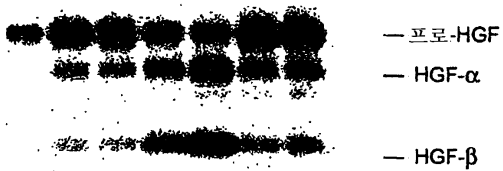
HC-FR1 1 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu
 25
Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser (서열 67)

HC-FR2 Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val (서열 68)

HC-FR3 66 Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn 83
83a 83b 83c 92
Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys (49 69)

HC-FR4	103	113
	Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser (서열 70)	

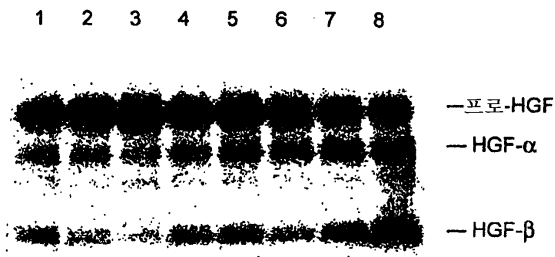
1 2 3 4 5 6 7 8 9



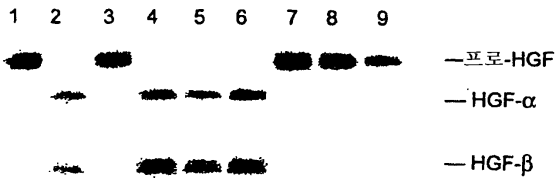
도면1F

도면2A

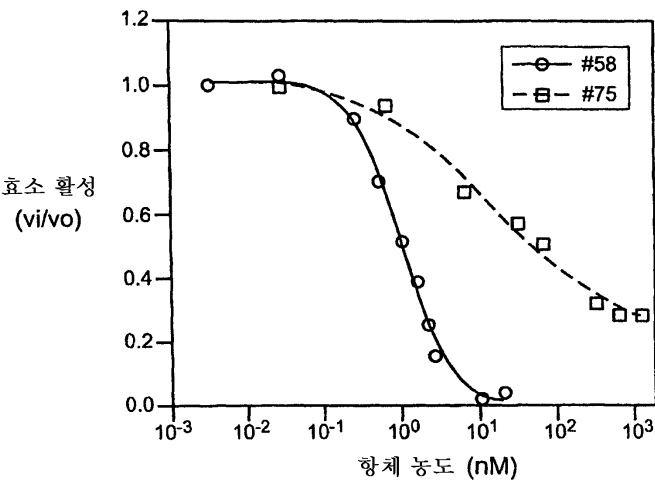
도면2B



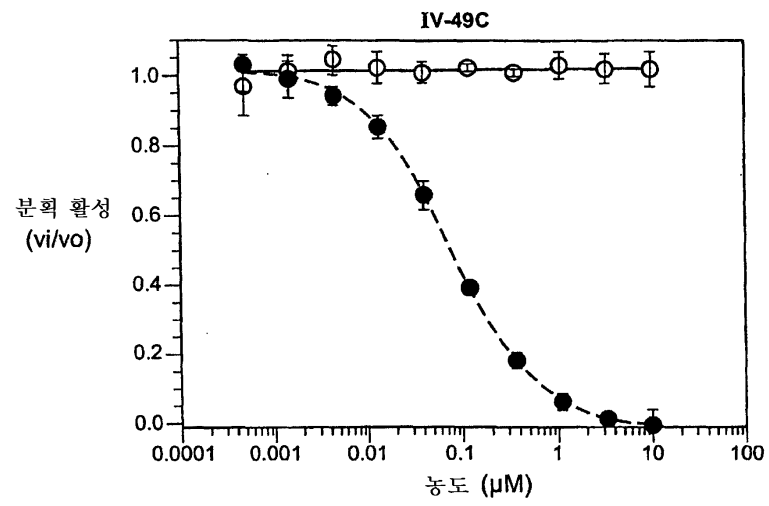
도면3



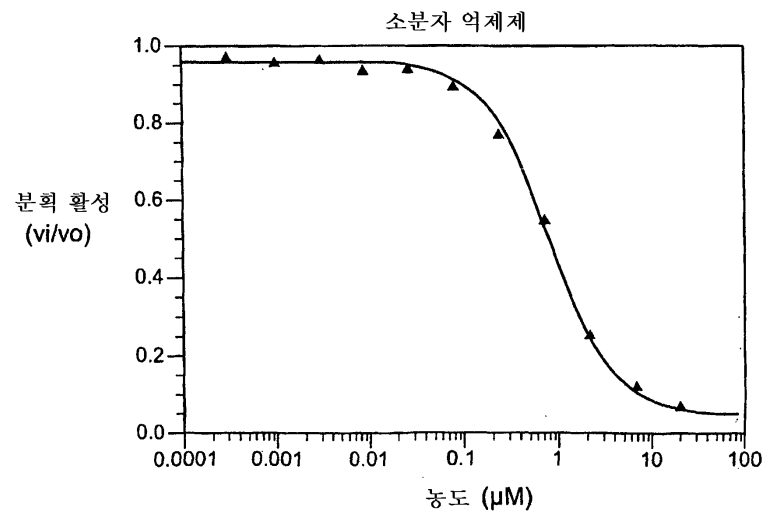
도면4



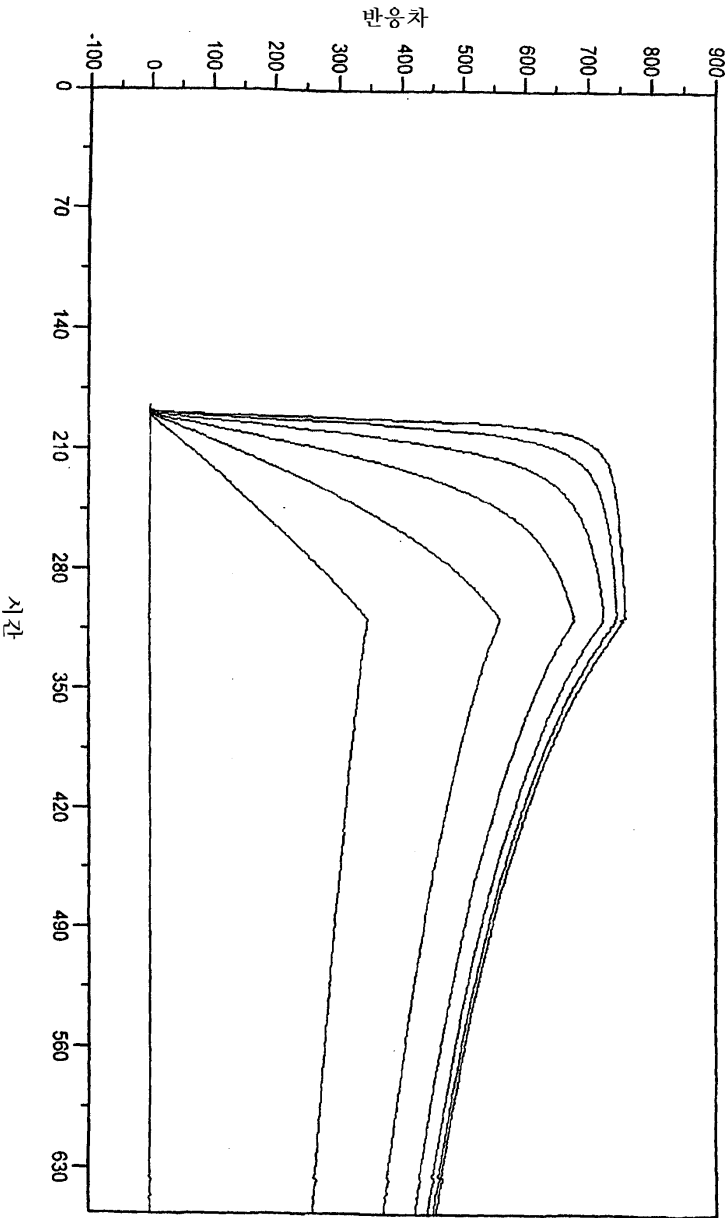
도면5A



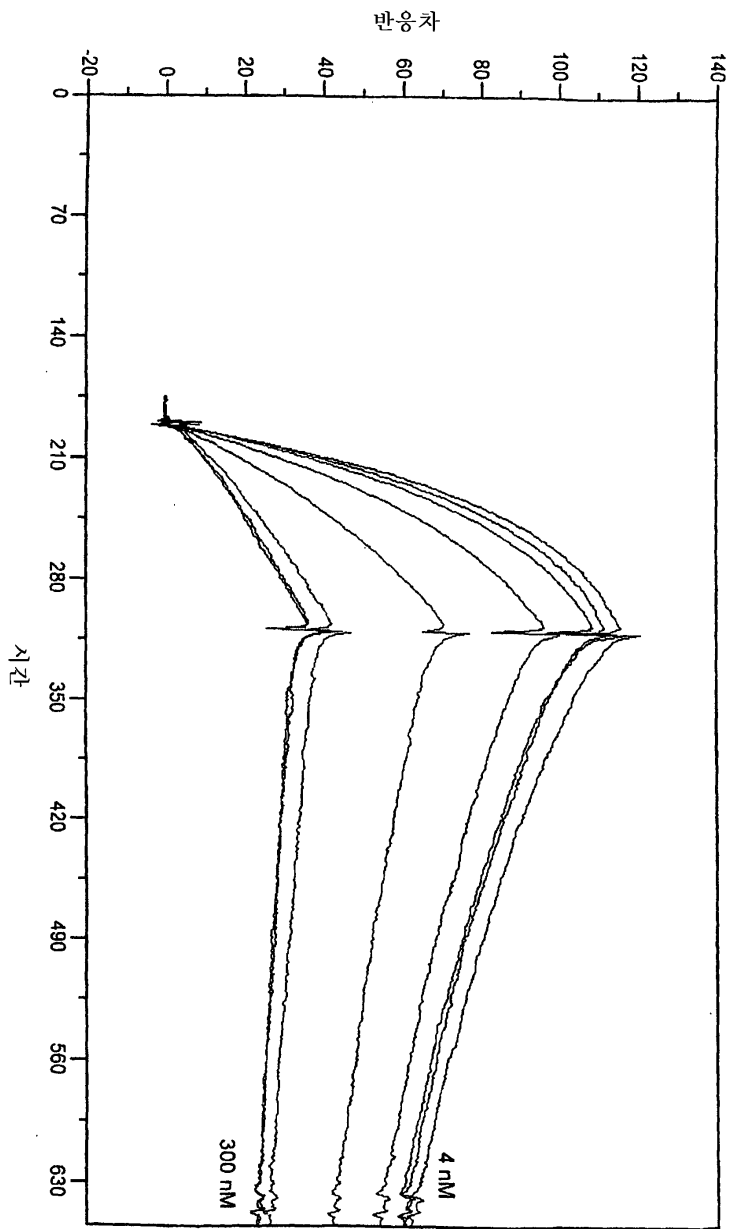
도면5B



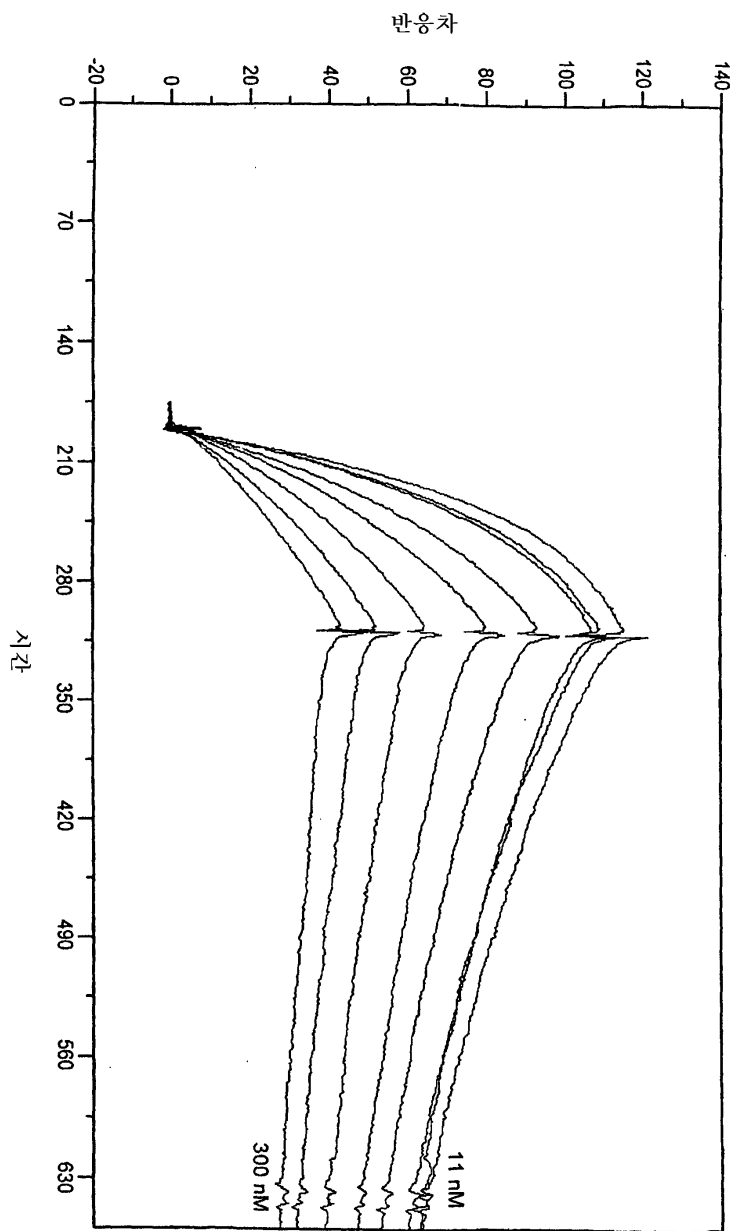
도면6A



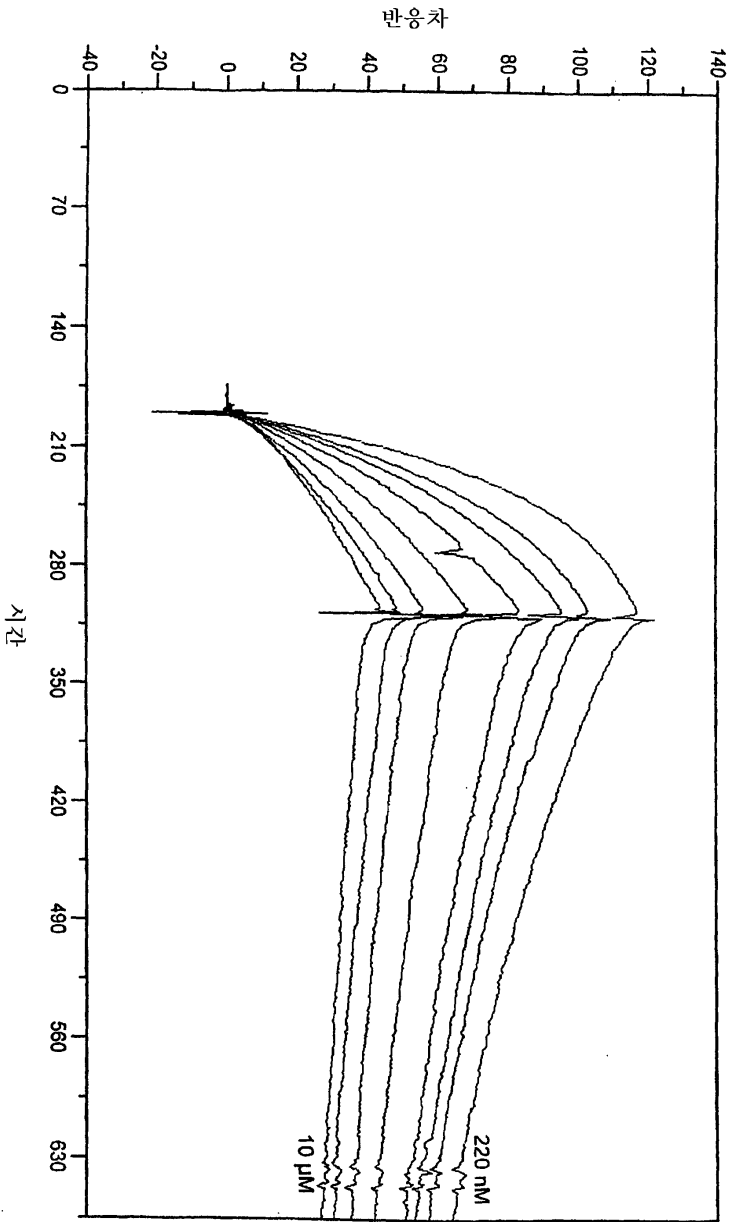
도면6B



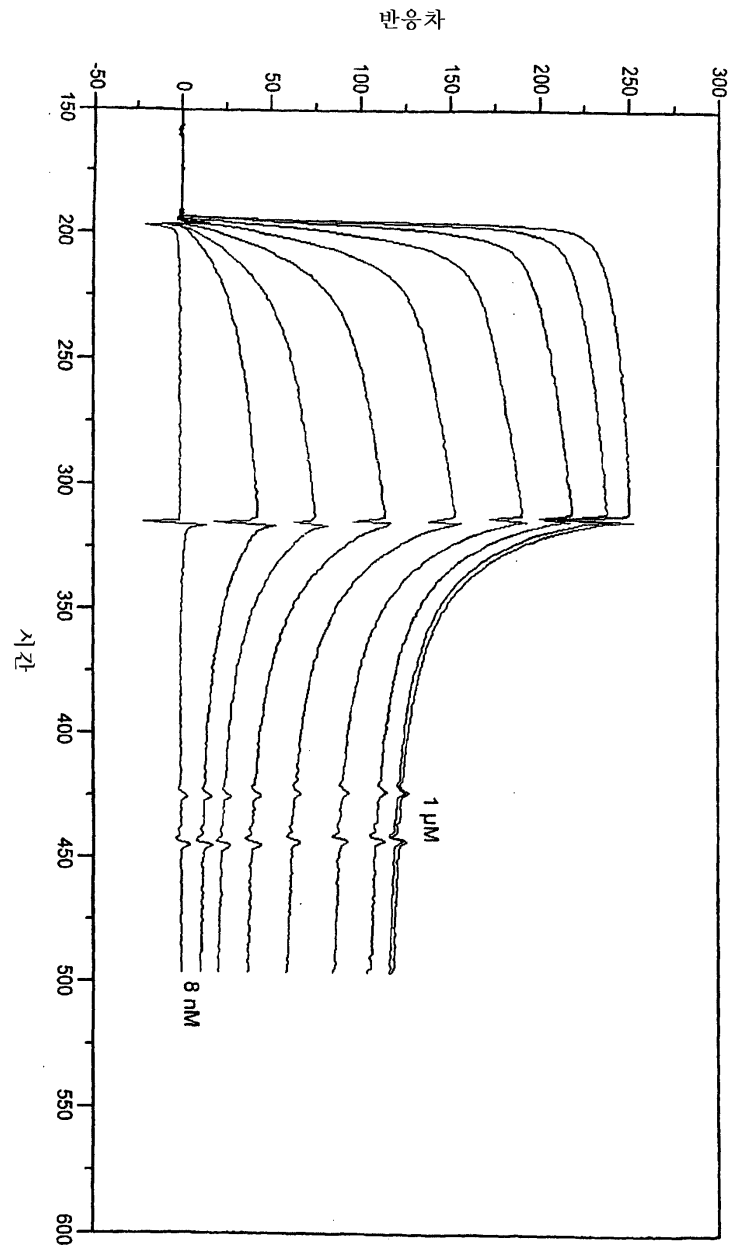
도면6C



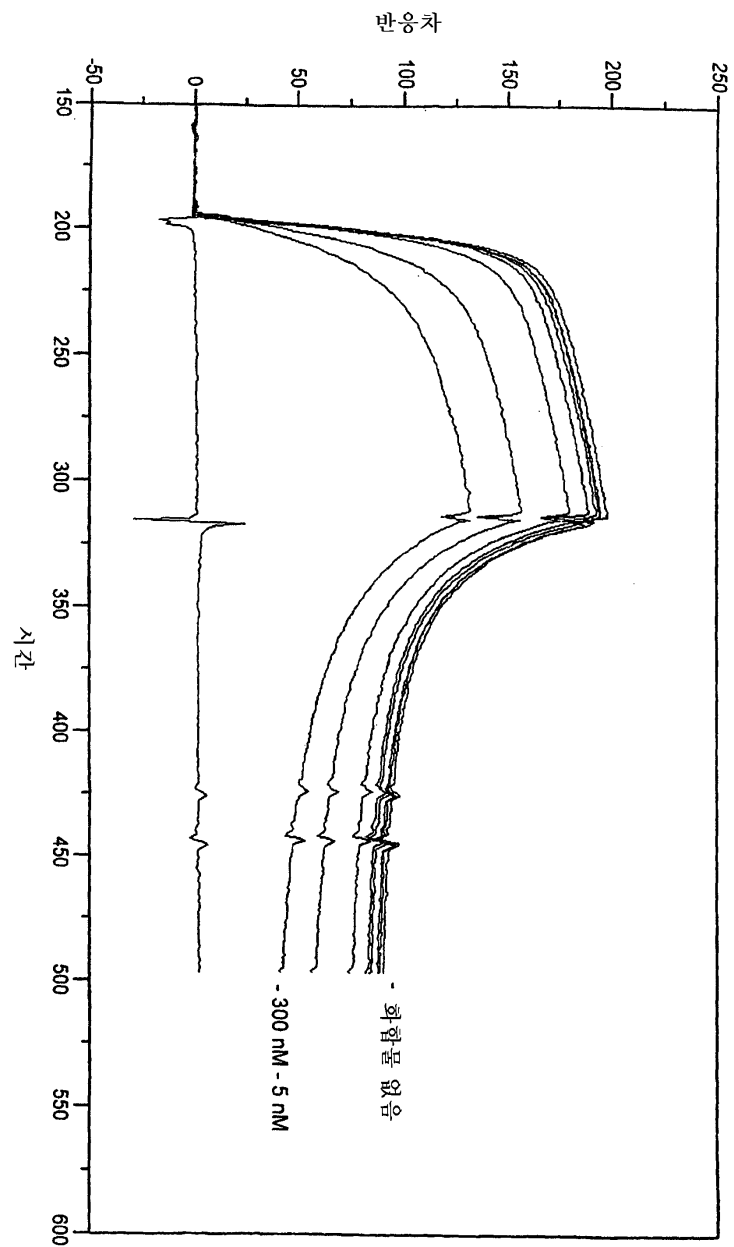
도면6D



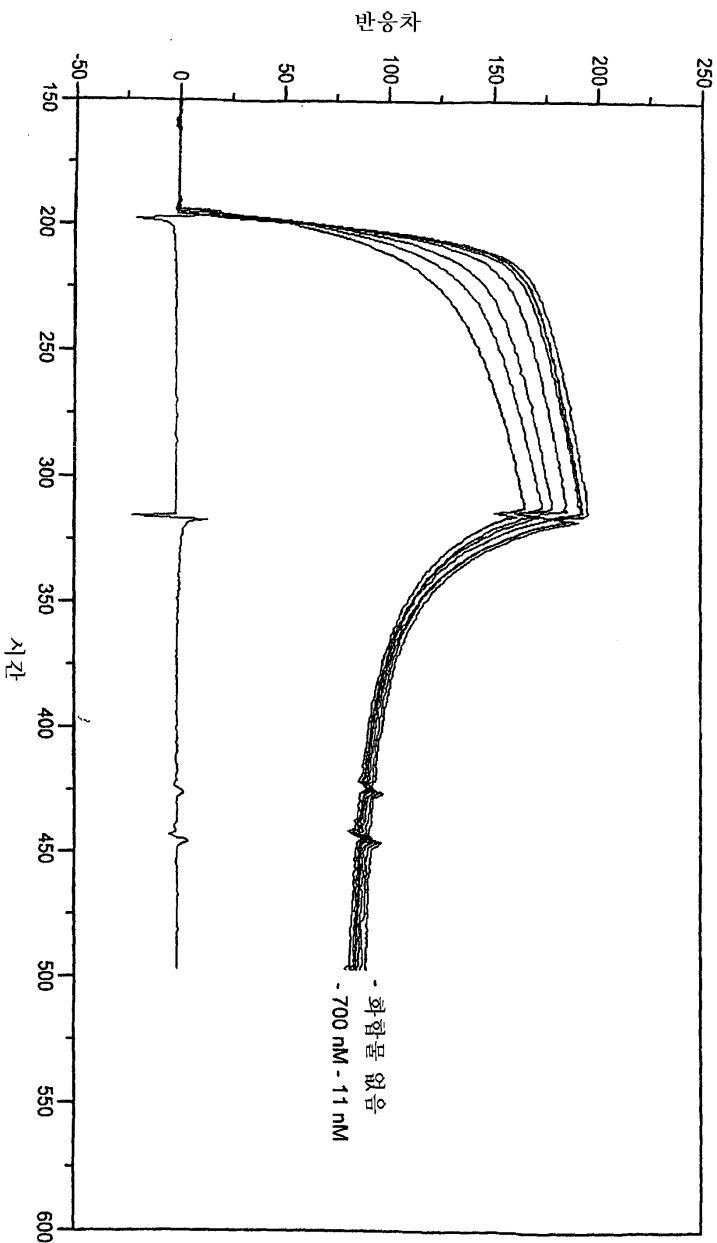
도면6E



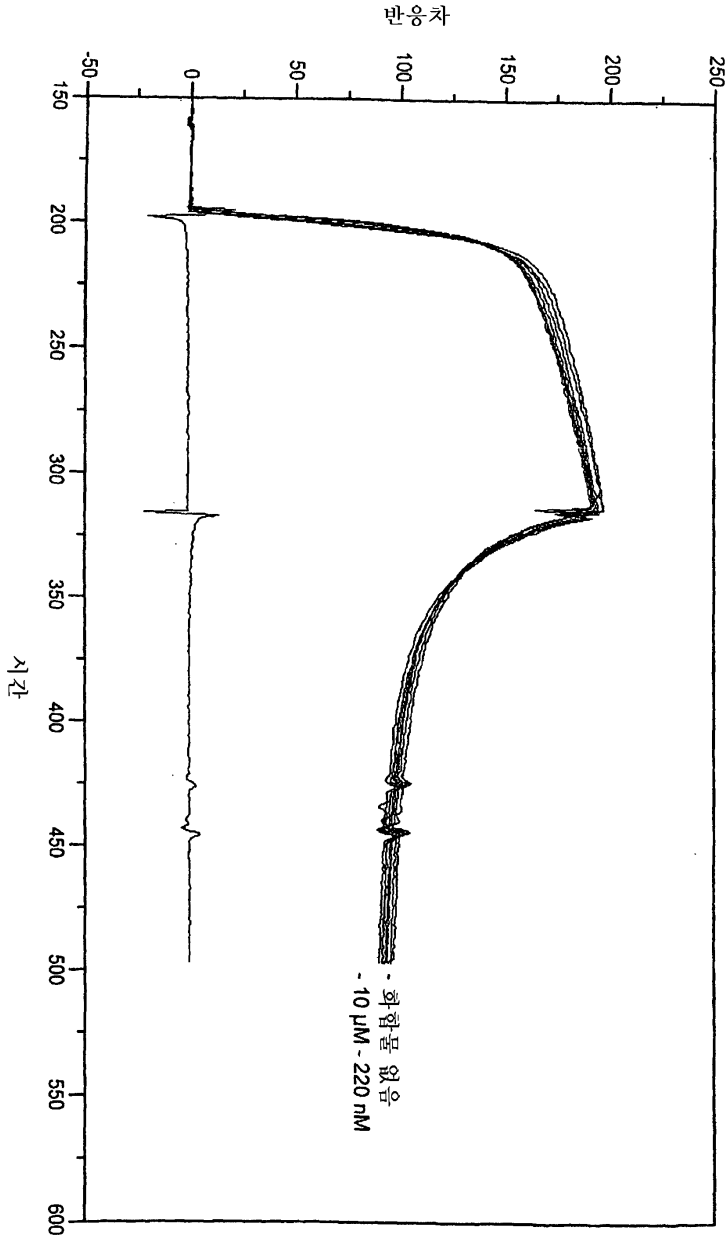
도면 6F



도면6G



도면6H



도면7

huHGFA	1	MGRWAWVPSPWPPPGLGPFLLLLLLLLPRGFQFQPGGNRTESFEPNAT	50
muHGFA	1	MGRQAWISSLCPLPRPCPF-LLLLLLLVPRGAQPLAGRNHTEPPGPNT	49
huHGFA	51	ATPAIPTIILVTS--VTSETPATSAPEAEGPOSGLPPPRAVPSSSSPPOA	98
muHGFA	50	ATPIVTPTIIPVITSGNVSTSTESAPEAETEGPQSERYPSS--SSSPPGG	95
huHGFA	99	QALTEEDGRPCRFPRYGGRMHLHCTSEGSAAHKKWCATTNNYDRDRAWGYC	148
muHGFA	96	QVLTESGQPCRFPRYGGRMHLHCTSEGSAAHKKWCATTNNYDRDRAWGYC	145
huHGFA	149	VEATTPPGGPAALDPCASGPCLNNGSCSNTOQDPOSYHCSCPRAFTGKDCG	198
muHGFA	146	AEVTLPEVEGPAILDPCASWPCLNNGTCSSTHHDGSHYHCSCPLAFTGKDCG	195
huHGFA	199	TEKCFDETRYEYLEGGDRWARVRQGHAVEQCECFGGRTWCETGTRHTACLS	248
muHGFA	196	TEKCFDETRYEYFEVGDHWARVSEGHVEQCGCEGARCEDTHTHTACLS	245
huHGFA	249	PCLNNGTCHLIVATGTTVCACPGFAGRLCNIEPDERCFLNGTGYPGVA	298
muHGFA	246	PCLNNGTCHLIVGTTVCACPGFAGRLCNIEPDERCFLNGTEYRGVA	295
huHGFA	299	STASGGLSCLAWNSDLYQELHVDVGAALGLGPHAYCRNPDNDERPW	348
muHGFA	296	STASGGLSCLAWNSDLYQELHVDVGAALGLGPHAYCRNPDNDERPW	345
huHGFA	349	CYVVKDSALSWEYCRLEACESLTRVQ-LSPDLLATLPEPASPGRQACGR	397
muHGFA	346	CYVVKDNALSWEYCRLTACESTLARVHSQTPETLALLPESSAPAVRPCTCGKR	395
huHGFA	398	HKKRTFLRPRIIGSSSLPGSHPWLAITYIGDSFCAGSLVHTCWNVSAH	447
muHGFA	396	HKKRTFLRPRIIGSSSLPGSHPWLAITYIGDSFCAGSLVHTCWNVSAH	445
huHGFA	448	CFSHSPRDSIVTVLGQHFFNRRTDVTQTTFGIEKYIPYTLYSVFNPSDHD	497
muHGFA	446	CFANSPRDSITTVLGQHFFNRRTDVTQTTFGIEKYIPYTLYSVFNPNHD	495
huHGFA	498	LVLIRLKKKGDRCATTRSOQVOPICLPEPGSTFPAIGHKCOIAGWGHLDENV	547
muHGFA	496	LVLIRLKKKGDRCAVRSQFVQPICLPELAGSSEFTGHKCOIAGWGHMDENV	545
huHGFA	548	SGYSLSLREALVPLVADHKCSSPEVYGADISPNMLCAGYFDCKSDACQGD	597
muHGFA	546	SGYSLSLREALVPLVADHKCSSPEVYGADISPNMLCAGYFDCKSDACQGD	595
huHGFA	598	SGGPLIACEKNGVAYLYGIISWGDGGRLLHKGVYTRVANYVDMINDRIRP	647
muHGFA	596	SGGPLIACEKNGVAYLYGIISWGDGGRLLHKGVYTRVANYVDMINDRIRP	645
huHGFA	648	PRRLVAPSS	655
muHGFA	646	PKRPPVATSS	653

도면8

항 HGFA 항체에 의한 HGFA 효소 활성의 억제

항체 번호	발색 기질 검정 ^a IC ₅₀ (nM)	670nM 항체에서의 거대분자상 기질 프로HGF 억제 ^b
33	15.3	**
35	21.3	**
37	334	**
39	>500	*
42	>500	**
49	>500	N.I.
58	1.3	***
61	>500	**
74	>500	**
75	32.6	**
86	>500	*
90	203	**
91	169	**
95	>500	*

^a기질은 0.2mM (대략 K_M)의 스펙트로자임 (Spectrozyme®) fVIIa이다

^b단일쇄 HGF 밴드의 소멸을 기초로 한 억제제의 정량적 평가

*, 약한 억제, ** 강력한 억제, *** 매우 강력한 억제; N.I., 억제 없음

도면9

항-HGFA 항체에 대한 HGFA의 결합성

항-HGFA 파아지 항체	파아지 ELISA에 의한 친화도 IC ₅₀ (nM)	BIA코어에 의한 친화도 K _D (nM)	IV49에 의한 HGFA 결합 억제	소분자에 의한 HGFA 결합 억제	sHAI-1B에 의한 HGFA 결합 억제
58	2	1.3	++	++	++
75	6	100	+/-	-	+/-
37	56	ND ^a	+/-	+/-	ND ^a
74	60	ND ^a	+/-	-	+/-
42	30	ND ^a	+	+/-	+
61	20	ND ^a	+	-	+

++, +: >50% 억제

+/-: 20-50% 억제

-: <20% 억제

[HGFA]: 70 nM

[경쟁인자]: 상기 보고된 KD의 10배에서 시작하여, 2배 희석씩 감소한다

^aND, 결정되지 않음

서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> Genentech, Inc.

<120> MODULATORS OF HEPATOCYTE GROWTH FACTOR ACTIVATOR

<130> P2179R1 PCT

<140> PCT/US2005/036300

<141> 2005-10-03

<150> US 60/615,657

<151> 2004-10-04

<160> 112

<210> 1

<211> 655

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met	Gly	Arg	Trp	Ala	Trp	Val	Pro	Ser	Pro	Trp	Pro	Pro	Pro	Gly
1				5					10					15

Leu	Gly	Pro	Phe	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Pro
				20				25					30

Arg	Gly	Phe	Gln	Pro	Gln	Pro	Gly	Gly	Asn	Arg	Thr	Glu	Ser	Pro
				35					40					45

Glu	Pro	Asn	Ala	Thr	Ala	Thr	Pro	Ala	Ile	Pro	Thr	Ile	Leu	Val
				50					55					60

Thr	Ser	Val	Thr	Ser	Glu	Thr	Pro	Ala	Thr	Ser	Ala	Pro	Glu	Ala
				65					70					75

Glu	Gly	Pro	Gln	Ser	Gly	Gly	Leu	Pro	Pro	Pro	Pro	Arg	Ala	Val
				80					85					90

Pro	Ser	Ser	Ser	Ser	Pro	Gln	Ala	Gln	Ala	Leu	Thr	Glu	Asp	Gly
				95					100					105

Arg	Pro	Cys	Arg	Phe	Pro	Phe	Arg	Tyr	Gly	Gly	Arg	Met	Leu	His
				110					115					120

Ala	Cys	Thr	Ser	Glu	Gly	Ser	Ala	His	Arg	Lys	Trp	Cys	Ala	Thr
				125					130					135

Thr	His	Asn	Tyr	Asp	Arg	Asp	Arg	Ala	Trp	Gly	Tyr	Cys	Val	Glu
				140					145					150

Ala Thr Pro Pro Pro Gly Gly Pro Ala Ala Leu Asp Pro Cys Ala
155 160 165

Ser Gly Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Ser Asn Thr Gln Asp
170 175 180

Pro Gln Ser Tyr His Cys Ser Cys Pro Arg Ala Phe Thr Gly Lys
185 190 195

Asp Cys Gly Thr Glu Lys Cys Phe Asp Glu Thr Arg Tyr Glu Tyr
200 205 210

Leu Glu Gly Gly Asp Arg Trp Ala Arg Val Arg Gln Gly His Val
215 220 225

Glu Gln Cys Glu Cys Phe Gly Gly Arg Thr Trp Cys Glu Gly Thr
230 235 240

Arg His Thr Ala Cys Leu Ser Ser Pro Cys Leu Asn Gly Gly Thr
245 250 255

Cys His Leu Ile Val Ala Thr Gly Thr Thr Val Cys Ala Cys Pro
260 265 270

Pro Gly Phe Ala Gly Arg Leu Cys Asn Ile Glu Pro Asp Glu Arg
275 280 285

Cys Phe Leu Gly Asn Gly Thr Gly Tyr Arg Gly Val Ala Ser Thr
290 295 300

Ser Ala Ser Gly Leu Ser Cys Leu Ala Trp Asn Ser Asp Leu Leu
305 310 315

Tyr Gln Glu Leu His Val Asp Ser Val Gly Ala Ala Ala Leu Leu
320 325 330

Gly Leu Gly Pro His Ala Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Asn Asp Glu
335 340 345

Arg Pro Trp Cys Tyr Val Val Lys Asp Ser Ala Leu Ser Trp Glu

350	355	360
Tyr Cys Arg Leu Glu Ala Cys Glu Ser Leu Thr Arg Val Gln Leu		
365	370	375
Ser Pro Asp Leu Leu Ala Thr Leu Pro Glu Pro Ala Ser Pro Gly		
380	385	390
Arg Gln Ala Cys Gly Arg Arg His Lys Lys Arg Thr Phe Leu Arg		
395	400	405
Pro Arg Ile Ile Gly Gly Ser Ser Ser Leu Pro Gly Ser His Pro		
410	415	420
Trp Leu Ala Ala Ile Tyr Ile Gly Asp Ser Phe Cys Ala Gly Ser		
425	430	435
Leu Val His Thr Cys Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys Phe Ser		
440	445	450
His Ser Pro Pro Arg Asp Ser Val Ser Val Val Leu Gly Gln His		
455	460	465
Phe Phe Asn Arg Thr Thr Asp Val Thr Gln Thr Phe Gly Ile Glu		
470	475	480
Lys Tyr Ile Pro Tyr Thr Leu Tyr Ser Val Phe Asn Pro Ser Asp		
485	490	495
His Asp Leu Val Leu Ile Arg Leu Lys Lys Lys Gly Asp Arg Cys		
500	505	510
Ala Thr Arg Ser Gln Phe Val Gln Pro Ile Cys Leu Pro Glu Pro		
515	520	525
Gly Ser Thr Phe Pro Ala Gly His Lys Cys Gln Ile Ala Gly Trp		
530	535	540
Gly His Leu Asp Glu Asn Val Ser Gly Tyr Ser Ser Ser Leu Arg		
545	550	555

Glu Ala Leu Val Pro Leu Val Ala Asp His Lys Cys Ser Ser Pro
560 565 570

Glu Val Tyr Gly Ala Asp Ile Ser Pro Asn Met Leu Cys Ala Gly
575 580 585

Tyr Phe Asp Cys Lys Ser Asp Ala Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly
590 595 600

Pro Leu Ala Cys Glu Lys Asn Gly Val Ala Tyr Leu Tyr Gly Ile
605 610 615

Ile Ser Trp Gly Asp Gly Cys Gly Arg Leu His Lys Pro Gly Val
620 625 630

Tyr Thr Arg Val Ala Asn Tyr Val Asp Trp Ile Asn Asp Arg Ile
635 640 645

Arg Pro Pro Arg Arg Leu Val Ala Pro Ser
650 655

<210> 2

<211> 653

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 2

Met Gly Arg Gln Ala Trp Ile Ser Ser Leu Cys Pro Leu Pro Arg
1 5 10 15

Pro Cys Pro Phe Leu Leu Leu Leu Leu Leu Val Val Pro Arg
20 25 30

Gly Ala Gln Pro Gln Ala Gly Arg Asn His Thr Glu Pro Pro Gly
35 40 45

Pro Asn Val Thr Ala Thr Pro Val Thr Pro Thr Ile Pro Val Ile
50 55 60

Ser Gly Asn Val Ser Thr Ser Thr Glu Ser Ala Pro Ala Ala Glu
65 70 75

Thr	Glu	Gly	Pro	Gln	Ser	Glu	Arg	Tyr	Pro	Pro	Pro	Ser	Ser	Ser	80	85	90
Ser	Pro	Pro	Gly	Gly	Gln	Val	Leu	Thr	Glu	Ser	Gly	Gln	Pro	Cys	95	100	105
Arg	Phe	Pro	Phe	Arg	Tyr	Gly	Gly	Arg	Met	Leu	His	Ser	Cys	Thr	110	115	120
Ser	Glu	Gly	Ser	Ala	Tyr	Arg	Lys	Trp	Cys	Ala	Thr	Thr	His	Asn	125	130	135
Tyr	Asp	Arg	Asp	Arg	Ala	Trp	Gly	Tyr	Cys	Ala	Glu	Val	Thr	Leu	140	145	150
Pro	Val	Glu	Gly	Pro	Ala	Ile	Leu	Asp	Pro	Cys	Ala	Ser	Trp	Pro	155	160	165
Cys	Leu	Asn	Gly	Gly	Thr	Cys	Ser	Ser	Thr	His	Asp	His	Gly	Ser	170	175	180
Tyr	His	Cys	Ser	Cys	Pro	Leu	Ala	Phe	Thr	Gly	Lys	Asp	Cys	Gly	185	190	195
Thr	Glu	Lys	Cys	Phe	Asp	Glu	Thr	Arg	Tyr	Glu	Tyr	Phe	Glu	Val	200	205	210
Gly	Asp	His	Trp	Ala	Arg	Val	Ser	Glu	Gly	His	Val	Glu	Gln	Cys	215	220	225
Gly	Cys	Met	Glu	Gly	Gln	Ala	Arg	Cys	Glu	Asp	Thr	His	His	Thr	230	235	240
Ala	Cys	Leu	Ser	Ser	Pro	Cys	Leu	Asn	Gly	Gly	Thr	Cys	His	Leu	245	250	255
Ile	Val	Gly	Thr	Gly	Thr	Ser	Val	Cys	Thr	Cys	Pro	Leu	Gly	Tyr	260	265	270
Ala	Gly	Arg	Phe	Cys	Asn	Ile	Val	Pro	Thr	Glu	His	Cys	Phe	Leu	275	280	285

Gly Asn Gly Thr Glu Tyr Arg Gly Val Ala Ser Thr Ala Ala Ser
290 295 300

Gly Leu Ser Cys Leu Ala Trp Asn Ser Asp Leu Leu Tyr Gln Glu
305 310 315

Leu His Val Asp Ser Val Ala Ala Ala Val Leu Leu Gly Leu Gly
320 325 330

Pro His Ala Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Lys Asp Glu Arg Pro Trp
335 340 345

Cys Tyr Val Val Lys Asp Asn Ala Leu Ser Trp Glu Tyr Cys Arg
350 355 360

Leu Thr Ala Cys Glu Ser Leu Ala Arg Val His Ser Gln Thr Pro
365 370 375

Glu Ile Leu Ala Ala Leu Pro Glu Ser Ala Pro Ala Val Arg Pro
380 385 390

Thr Cys Gly Lys Arg His Lys Lys Arg Thr Phe Leu Arg Pro Arg
395 400 405

Ile Ile Gly Gly Ser Ser Ser Leu Pro Gly Ser His Pro Trp Leu
410 415 420

Ala Ala Ile Tyr Ile Gly Asn Ser Phe Cys Ala Gly Ser Leu Val
425 430 435

His Thr Cys Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys Phe Ala Asn Ser
440 445 450

Pro Pro Arg Asp Ser Ile Thr Val Val Leu Gly Gln His Phe Phe
455 460 465

Asn Arg Thr Thr Asp Val Thr Gln Thr Phe Gly Ile Glu Lys Tyr
470 475 480

Val Pro Tyr Thr Leu Tyr Ser Val Phe Asn Pro Asn Asn His Asp

485 490 495

Leu Val Leu Ile Arg Leu Lys Lys Lys Gly Glu Arg Cys Ala Val
500 505 510

Arg Ser Gln Phe Val Gln Pro Ile Cys Leu Pro Glu Ala Gly Ser
515 520 525

Ser Phe Pro Thr Gly His Lys Cys Gln Ile Ala Gly Trp Gly His
530 535 540

Met Asp Glu Asn Val Ser Ser Tyr Ser Asn Ser Leu Leu Glu Ala
545 550 555

Leu Val Pro Leu Val Ala Asp His Lys Cys Ser Ser Pro Glu Val
560 565 570

Tyr Gly Ala Asp Ile Ser Pro Asn Met Leu Cys Ala Gly Tyr Phe
575 580 585

Asp Cys Lys Ser Asp Ala Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu
590 595 600

Val Cys Glu Lys Asn Gly Val Ala Tyr Leu Tyr Gly Ile Ile Ser
605 610 615

Trp Gly Asp Gly Cys Gly Arg Leu Asn Lys Pro Gly Val Tyr Thr
620 625 630

Arg Val Ala Asn Tyr Val Asp Trp Ile Asn Asp Arg Ile Arg Pro
635 640 645

Pro Lys Arg Pro Val Ala Thr Ser
650

<210> 3

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 3

Thr Ser Ser Ala

<210> 4

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 4

Gly Ile Ile Asn Pro Asn Gly Gly Tyr Thr Asn
5 10

<210> 5

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 5

Ser Ser Arg Leu Ala Gly Ala Met Asp Tyr
5 10

<210> 6

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 6

Thr Gly Ser Ala

<210> 7

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 7

Gly Ile Ile Asn Pro Asn Ser Gly Tyr Thr Asp
5 10

<210> 8

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 8

Ser Ala Arg Ile Arg Gly Phe Asp Tyr
5

<210> 9

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 9

Asn Ser Asn Gly

<210> 10

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 10

Gly Trp Ile Tyr Pro Ala Gly Gly Ala Thr Asp
5 10

<210> 11
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Synthetic

<400> 11
 Trp Gly Trp Gly Phe Asp Tyr
 5

<210> 12
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Synthetic

<400> 12
 Asn Gly Thr Tyr

<210> 13
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Synthetic

<400> 13
 Gly Gly Ile Tyr Pro Ala Gly Gly Ala Thr Tyr
 5 10

<210> 14
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Synthetic

<400> 14
 Trp Trp Ala Trp Pro Ala Phe Asp Tyr

<210> 15
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 15
Asn Gly Thr Trp

<210> 16
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 16
Gly Gly Ile Tyr Pro Ala Gly Gly Ala Thr Asp
5 10

<210> 17
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 17
Trp Arg Ala Val Pro Ser Phe Asp Tyr
5

<210> 18
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 18
Thr Gly Thr Tyr

<210> 19
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 19
Gly Trp Ile Ser Pro Tyr Asn Gly Asp Thr Tyr
 5 10

<210> 20
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 20
Asp Trp Phe Gly Phe Gly Glu Phe Asp Tyr
 5 10

<210> 21
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 21
Thr Gly Ser Ala

<210> 22
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 22

Ala Ile Ile Asn Pro Asn Gly Gly Tyr Thr Tyr
5 10

<210> 23

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 23

Ser Ala Arg Phe Ser Phe Asp Tyr
5

<210> 24

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 24

Ser Gly Asn Trp

<210> 25

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 25

Ala Glu Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Ser Thr Asn
5 10

<210> 26

<211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Synthetic

<400> 26
 Phe Tyr Arg Trp Ser Val Asn Ser Val Met Asp Tyr
 5 10

<210> 27
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Synthetic

<400> 27
 Thr Asn Tyr Trp

<210> 28
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Synthetic

<400> 28
 Gly Gly Ile Tyr Pro Ala Gly Gly Ala Thr Asp
 5 10

<210> 29
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Synthetic

<400> 29
 Tyr Ser Ile Pro Ala Phe Asp Tyr

<210> 30
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 30
Ser Asn Ser Gly

<210> 31
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 31
Gly Trp Ile Tyr Pro Thr Gly Gly Ala Thr Asp
5 10

<210>	32
<211>	8
<212>	PRT
<213>	Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 32
Phe Trp Trp Arg Ser Phe Asp Tyr
5

<210>	33
<211>	4
<212>	PRT
<213>	Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 33
Ser Asp Ser Ser

<210> 34
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 34
Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Ser Gly Asn Thr Asn
 5 10

<210> 35
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 35
Gly Leu Lys Val Pro Phe Tyr Ala Asn Ala Ala Met Asp Tyr
 5 10

<210> 36
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 36
Ser Gly Ser Ala

<210> 37
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 37

Ala Ile Ile Asn Pro Thr Gly Gly Tyr Thr Asn
5 10

<210> 38

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 38

Ser Arg Gly His Tyr Ala Met Asp Tyr
5

<210> 39

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 39

Thr Gly Asn Gly

<210> 40

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 40

Ala Trp Ile Ser Pro Tyr Gly Gly Ser Thr Asn
5 10

<210> 41

<211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Synthetic

<400> 41
 Gly His Arg Val Phe Asp Tyr
 5

<210> 42
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Synthetic

<400> 42
 Asn Asn Thr Gly

<210> 43
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Synthetic

<400> 43
 Gly Trp Ile Tyr Pro Ala Gly Gly Ala Thr Asp
 5 10

<210> 44
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Synthetic

<400> 44
 Phe Phe Pro Val Ala Phe Asp Tyr

5

<210> 45
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Synthetic

<400> 45
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
 1 5 10 15

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn
 20 25 30

Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
 35 40 45

Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser
 50 55 60

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 Gln Gln
 80 85 90

His Tyr Thr Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
 95 100 105

Ile Lys Arg Thr

<210> 46
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Synthetic

<400> 46

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
20 25

<210> 47

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 47

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
5 10

<210> 48

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 48

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
1 5 10 15

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 49

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 49

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
5 10

<210> 50
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Synthetic

<400> 50
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
 1 5 10 15

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
 20

<210> 51
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Synthetic

<400> 51
 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
 1 5 10 15

<210> 52
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Synthetic

<400> 52
 Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
 1 5 10 15

Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr
 20 25 30

Tyr Cys

<210> 53
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Synthetic

<400> 53
 Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 5 10

<210> 54
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Synthetic

<400> 54
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
 1 5 10 15

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser
 20 25 30

Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
 35 40 45

Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser
 50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly 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 Gln Gln
 80 85 90

Ser Tyr Thr Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
 95 100 105

Ile Lys

<210> 55

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 55

Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val
1				5				10					15	

Gly	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys
				20			

<210> 56

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 56

Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr
1				5				10					15	

<210> 57

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 57

Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Arg	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe
1				5				10					15	

Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

20

25

30

Tyr Cys

<210> 58

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 58

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
5 10

<210> 59

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 59

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
20 25

<210> 60

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 60

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
5 10

<210> 61
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Synthetic

<400> 61
 Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu
 1 5 10 15

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 20 25 30

<210> 62
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Synthetic

<400> 62
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 5 10

<210> 63
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Synthetic

<400> 63
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
 1 5 10 15

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
 20

<210> 64
 <211> 15
 <212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 64

Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr
1				5					10					15

<210> 65

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 65

Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe
1				5					10					15

Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr
				20					25					30

Tyr Cys

<210> 66

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 66

Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys
				5					10

<210> 67

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 67

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly
1				5						10				15

Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser
				20					25

<210> 68

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 68

Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
				5					10			

<210> 69

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 69

Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	Leu
1				5					10					15

Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				20					25					30

<210> 70

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 70
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 5 10

<210> 71
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Synthetic

<400> 71
 Gly Phe Asn Ile Thr Ser Ser Ala Ile His
 5 10

<210> 72
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Synthetic

<400> 72
 Gly Phe Asn Ile Thr Gly Ser Ala Ile His
 5 10

<210> 73
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Synthetic

<400> 73
 Gly Phe Asn Ile Asn Ser Asn Gly Ile His
 5 10

<210> 74
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 74

Gly Phe Asn Ile Asn Gly Thr Tyr Ile His
5 10

<210> 75

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 75

Gly Phe Asn Ile Asn Gly Thr Trp Ile His
5 10

<210> 76

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 76

Gly Phe Asn Ile Thr Gly Thr Tyr Ile His
5 10

<210> 77

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 77

Gly Phe Asn Ile Thr Gly Ser Ala Ile His
5 10

<210> 78

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 78

Gly Phe Asn Ile Ser Gly Asn Trp Ile His
5 10

<210> 79

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 79

Gly Phe Asn Ile Thr Asn Tyr Trp Ile His
5 10

<210> 80

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 80

Gly Phe Asn Ile Ser Asn Ser Gly Ile His
5 10

<210> 81

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 81

Gly Phe Asn Ile Ser Asp Ser Ser Ile His
5 10

<210> 82
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Synthetic

<400> 82
 Gly Phe Asn Ile Ser Gly Ser Ala Ile His
 5 10

<210> 83
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Synthetic

<400> 83
 Gly Phe Asn Ile Thr Gly Asn Gly Ile His
 5 10

<210> 84
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Synthetic

<400> 84
 Gly Phe Asn Ile Asn Asn Thr Gly Ile His
 5 10

<210> 85
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Synthetic

<400> 85
 Gly Ile Ile Asn Pro Asn Gly Gly Tyr Thr Asn Tyr Ala Asp Ser

1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 86
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Synthetic

<400> 86
 Gly Ile Ile Asn Pro Asn Ser Gly Tyr Thr Asp Tyr Ala Asp Ser
 1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 87
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Synthetic

<400> 87
 Gly Trp Ile Tyr Pro Ala Gly Gly Ala Thr Asp Tyr Ala Asp Ser
 1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 88
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Synthetic

<400> 88

Gly Gly Ile Tyr Pro Ala Gly Gly Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser
1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 89
<211> 18
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 89
Gly Gly Ile Tyr Pro Ala Gly Gly Ala Thr Asp Tyr Ala Asp Ser
1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 90
<211> 18
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 90
Gly Trp Ile Ser Pro Tyr Asn Gly Asp Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser
1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 91
<211> 18
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 91

Ala	Ile	Ile	Asn	Pro	Asn	Gly	Gly	Tyr	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser
1				5					10					15

Val Lys Gly

<210> 92

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 92

Ala	Glu	Ile	Asn	Pro	Tyr	Asn	Gly	Ser	Thr	Asn	Tyr	Ala	Asp	Ser
1				5					10					15

Val Lys Gly

<210> 93

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 93

Gly	Gly	Ile	Tyr	Pro	Ala	Gly	Gly	Ala	Thr	Asp	Tyr	Ala	Asp	Ser
1				5					10					15

Val Lys Gly

<210> 94

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 94

Gly	Trp	Ile	Tyr	Pro	Thr	Gly	Gly	Ala	Thr	Asp	Tyr	Ala	Asp	Ser
1				5					10					15

Val Lys Gly

<210> 95

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 95

Ala	Arg	Ile	Tyr	Pro	Thr	Ser	Gly	Asn	Thr	Asn	Tyr	Ala	Asp	Ser
1				5					10					15

Val Lys Gly

<210> 96

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 96

Ala	Ile	Ile	Asn	Pro	Thr	Gly	Gly	Tyr	Thr	Asn	Tyr	Ala	Asp	Ser
1				5					10					15

Val Lys Gly

<210> 97

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 97

Ala	Trp	Ile	Ser	Pro	Tyr	Gly	Gly	Ser	Thr	Asn	Tyr	Ala	Asp	Ser
1				5					10					15

Val Lys Gly

<210> 98

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 98

Gly	Trp	Ile	Tyr	Pro	Ala	Gly	Gly	Ala	Thr	Asp	Tyr	Ala	Asp	Ser
1				5					10					15

Val Lys Gly

<210> 99

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 99

Ala	Arg	Ser	Ser	Arg	Leu	Ala	Gly	Ala	Met	Asp	Tyr
				5					10		

<210> 100

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 100

Ala Arg Ser Ala Arg Ile Arg Gly Phe Asp Tyr
5 10

<210> 101
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 101
Ala Arg Trp Gly Trp Gly Phe Asp Tyr
5

<210> 102
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 102
Ala Arg Trp Trp Ala Trp Pro Ala Phe Asp Tyr
5 10

<210> 103
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 103
Ala Arg Trp Arg Ala Val Pro Ser Phe Asp Tyr
5 10

<210> 104
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 104

Ala Arg Asp Trp Phe Gly Phe Gly Glu Phe Asp Tyr
5 10

<210> 105

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 105

Ala Arg Ser Ala Arg Phe Ser Phe Asp Tyr
5 10

<210> 106

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 106

Ala Arg Phe Tyr Arg Trp Ser Val Asn Ser Val Met Asp Tyr
5 10

<210> 107

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 107

Ala Arg Tyr Ser Ile Pro Ala Phe Asp Tyr
5 10

<210> 108

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 108

Ala	Arg	Phe	Trp	Trp	Arg	Ser	Phe	Asp	Tyr
				5					10

<210> 109

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 109

Ala	Arg	Gly	Leu	Lys	Val	Pro	Phe	Tyr	Ala	Asn	Ala	Ala	Met	Asp
1				5					10					15

Tyr

<210> 110

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 110

Ala	Arg	Ser	Arg	Gly	His	Tyr	Ala	Met	Asp	Tyr
				5					10	

<210> 111

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 111

Ala Arg Gly His Arg Val Phe Asp Tyr
5

<210> 112

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 112

Ala Arg Phe Phe Pro Val Ala Phe Asp Tyr
5 10