



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년06월17일  
(11) 등록번호 10-2265757  
(24) 등록일자 2021년06월10일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C12N 15/10 (2017.01) A61K 38/17 (2006.01)  
C07K 14/575 (2006.01) C12N 15/63 (2006.01)  
C12N 9/16 (2006.01) C12N 9/50 (2006.01)  
C12P 21/00 (2006.01) G01N 33/543 (2006.01)  
G01N 33/68 (2006.01)
- (52) CPC특허분류  
C12N 15/102 (2013.01)  
A61K 38/17 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2019-7004366(분할)  
(22) 출원일자(국제) 2010년03월09일  
심사청구일자 2019년03월04일
- (85) 번역문제출일자 2019년02월14일  
(65) 공개번호 10-2019-0018556  
(43) 공개일자 2019년02월22일  
(62) 원출원 특허 10-2018-7006589  
원출원일자(국제) 2010년03월09일  
심사청구일자 2018년03월16일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2010/026611  
(87) 국제공개번호 WO 2010/104821  
국제공개일자 2010년09월16일
- (30) 우선권주장  
61/209,489 2009년03월09일 미국(US)
- (56) 선행기술조사문헌  
US20050100985 A1  
US20070009930 A1  
PROTEIN SCIENCE. 2004, vol. 13, no. 2, pp. 494-503.
- (73) 특허권자  
바이오아트라, 인코퍼레이티드  
미국, 캘리포니아 92121, 샌디에이고, 스위트 100, 토레야나 로드 11085
- (72) 발명자  
쇼트, 제이, 엠.  
미국, 캘리포니아 92014, 비아 에스페리아 델 마르 12985  
창, 화이, 웬  
미국, 캘리포니아 92069, 샌 마르코스 새도 힐스 드라이브 1318  
프레이, 거하드  
미국, 캘리포니아 92129, 샌 디에고, 비아 씨마 벨라 13768
- (74) 대리인  
박경제

전체 청구항 수 : 총 14 항

심사관 : 김정희

(54) 발명의 명칭 **미락 단백질**

(57) 요약

본 발명은, 정상 생리학적 조건에서 가역적으로 또는 비가역적으로 비활성화되는 야생형 항체, 특히 치료용 단백질로부터 조건 활성 항체를 생성하는 방법에 관한 것이다. 예를 들어, 진화된 단백질은 사실상 체온에서는 비활성이지만, 더 낮은 온도에서는 활성이다.

(52) CPC특허분류

*C07K 14/57545* (2013.01)

*C07K 14/57563* (2013.01)

*C12N 15/1058* (2013.01)

*C12N 15/63* (2013.01)

*C12N 9/16* (2013.01)

*C12N 9/50* (2013.01)

*C12P 21/00* (2013.01)

*G01N 33/54306* (2013.01)

*G01N 33/6845* (2013.01)

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

b) pH 7.2 내지 pH 7.6의 범위에서의 표적에 대한 결합 활성보다 a) pH 6.4 내지 pH 6.8의 범위에서의 상기 표적에 대한 결합 활성이 더 큰 변형 단백질을 생체 외에서 선택 및 확인하는 방법에 있어서, 상기 방법은:

1) a) pH 6.4 내지 pH 6.8의 범위에서의 표적에 대한 복수의 변형 단백질들의 결합 활성을 사람 혈청의 존재하에 시험하고, b) pH 7.2 내지 pH 7.6의 범위에서의 상기 표적에 대한 상기 복수의 변형 단백질들의 결합 활성을 사람 혈청의 존재하에 시험하는 단계로서,

상기 복수의 변형 단백질들의 모(母) 단백질과 비교하여 상기 복수의 변형 단백질들 중 각각은 아미노산 잔기 또는 잔기들의 아미노산 치환, 삽입 또는 결실을 포함하며,

상기 복수의 변형 단백질들 중 각각은 a) 및 b)중 각각에서 시험이 이루어지는, 시험 단계;

2) a)에서의 상기 복수의 변형 단백질들 중 각각의 결합 활성을 b)에서의 결합 활성과 비교하는 단계; 및

3) b)에서보다 a)에서의 결합 활성이 더 큰 변형 단백질을 상기 복수의 변형 단백질들로부터 선택 및 확인하는 단계를 포함하는,

변형 단백질을 생체 외에서 선택 및 확인하는 방법.

#### 청구항 2

제1항에 있어서,

a)에서의 pH는 6.7인,

변형 단백질을 생체 외에서 선택 및 확인하는 방법.

#### 청구항 3

제1항에 있어서,

1) 내지 3) 단계들을 추가적으로 반복함으로써, b)에서의 결합 활성보다 a)에서 증가된 결합 활성을 나타내는 원래의 3) 단계에서 선택된 변형 단백질의 더 변형된 단백질이 얻어지는 단계를 더 포함하는,

변형 단백질을 생체 외에서 선택 및 확인하는 방법.

#### 청구항 4

삭제

#### 청구항 5

삭제

#### 청구항 6

제1항에 있어서,

상기 모 단백질과 비교하여 상기 복수의 변형 단백질들 중 각각은 단일 아미노산 치환 또는 2개 이상의 아미노산 치환들을 포함하는,

변형 단백질을 생체 외에서 선택 및 확인하는 방법.

#### 청구항 7

제1항에 있어서,

상기 복수의 변형 단백질들은 상기 모 단백질로부터 생성되어 각각의 변형 단백질이 a) 및 b)중 각각에서 시험

이 이루어지고,

상기 모 단백질과 비교하여 각각의 변형 단백질은 단일 아미노산 치환을 포함하며,

상기 모 단백질의 각각의 변형 위치에서 아미노산은 상기 변형 위치에 있는 원래 아미노산 외의 1개 내지 19개의 다른 아미노산들로 치환됨으로써, 각각의 변형 단백질이 서로 다른 아미노산 치환을 포함하고,

상기 모 단백질의 길이를 따라 각각의 위치에서의 또는 그 중 선택된 부분에서의 모든 아미노산이 치환되는,

변형 단백질을 생체 외에서 선택 및 확인하는 방법.

#### 청구항 8

제1항에 있어서,

상기 복수의 변형 단백질들 중 각각은 아미노산 치환을 포함하고,

상기 아미노산 치환은 아르기닌(Arg), 히스티딘(His) 및 리신(Lys) 중에서 선택된 아미노산으로의 치환인,

변형 단백질을 생체 외에서 선택 및 확인하는 방법.

#### 청구항 9

제1항에 있어서,

상기 복수의 변형 단백질들의 결합 활성은 면역 검정에 의해 측정되는,

변형 단백질을 생체 외에서 선택 및 확인하는 방법.

#### 청구항 10

제9항에 있어서,

상기 면역 검정은 ELISA를 포함하는,

변형 단백질을 생체 외에서 선택 및 확인하는 방법.

#### 청구항 11

제1항에 있어서,

상기 복수의 변형 단백질들은 표면 디스플레이를 이용하여 표현되는,

변형 단백질을 생체 외에서 선택 및 확인하는 방법.

#### 청구항 12

제1항에 있어서,

상기 표적은 검출 가능하게 표지(label)되거나 검출될 수 있는,

변형 단백질을 생체 외에서 선택 및 확인하는 방법.

#### 청구항 13

제12항에 있어서,

상기 표적은 형광으로 표지되거나 형광으로 표지된 이차 시약에 의해 검출되는,

변형 단백질을 생체 외에서 선택 및 확인하는 방법.

#### 청구항 14

제13항에 있어서,

상기 결합 활성은 형광활성세포분류기(FACS)를 이용하여 검출 또는 측정되는,

변형 단백질을 생체 외에서 선택 및 확인하는 방법.

#### 청구항 15

제1항에 있어서,  
상기 표적은 수용체 또는 그 부분인,  
변형 단백질을 생체 외에서 선택 및 확인하는 방법.

#### 청구항 16

제15항에 있어서,  
상기 표적은 수용체이며, 상기 수용체는 종양 항원인,  
변형 단백질을 생체 외에서 선택 및 확인하는 방법.

#### 청구항 17

삭제

#### 청구항 18

삭제

#### 청구항 19

삭제

### 발명의 설명

### 기술 분야

#### [0001] 관련 출원 정보

[0002] 이 출원은, 미국을 제외한 모든 국가를 지정하기 위해 출원인으로 미국 유한회사인 BioAtla, LLC와, 미국만을 지정하기 위해 출원인으로 모두 미국 국적인 Jay M. Short, Hwai Wen Chang, 독일 국적인 Gerhard Frey의 이름으로, PCT 국제 특허 출원으로 2010년 3월 9일 출원되고, 2009년 3월 9일 출원된 미국 가특허 출원 제 61/209,489호에 대한 우선권을 주장하며, 그 전체 내용은 본 명세서에 참조로 포함되어 있다.

[0003] 이 발명은, 단백질 진화(protein evolution)와 활성(activity) 분야에 관한 것이다. 구체적으로, 본 발명은, 정상 생리학적 조건에서 가역 또는 비가역적으로 비활성되는, 야생형 항체(특히, 치료용 단백질)로부터 조건 활성 항체를 생성하는 방법에 관한 것이다. 예를 들어, 진화된 단백질은 사실상 체온에서는 비활성이지만, 이보다 낮은 온도에서는 활성이다.

### 배경 기술

[0004] 다양한 특징을 위한 단백질, 특히, 예를 들어, 효소를 상이한 조건에서 작업 동안 안정화되도록 진화시키기 위한 가능성을 기술한 많은 문헌이 있다. 예를 들어, 효소는 활성을 변동시키면서, 더 높은 온도에서 안정화되도록 진화되어 왔다. 고온에서 활성 개선이 있는 경우에, 개선의 실질적 부분은 Q10 룰에 의해 공통적으로 기술되는 더 높은 온도 활성의 결과이며, 효소의 경우에 매 10℃의 증가에 대해 산출량이 배가되는 것으로 평가된다. 그 외에, 분자의 야생형 온도 활성과 같은 정상 작업 조건에서 탈안정화되는 자연 발생 돌연변이의 예가 존재한다. 온도 돌연변이체에 대해, 이들 돌연변이체는 더 낮은 온도에서 활성이지만, 대표적으로 야생형 분자와 비교하여 감소된 수준에서 활성이다 (또한, 대표적으로 Q10 또는 유사한 룰에 의해 유도되는 활성 감소에 의해 기술된다).

[0005] 조건적으로 활성화되는, 예를 들어, 사실상 야생형 조건에서 비활성이지만, 야생형 조건과 동일하거나 이보다 우수한 수준에서 야생형 조건과 상이한 조건에서 활성이거나, 특정 미시적 환경 요인에서 활성화되거나 비활성화되거나, 시간 경과에 따라 활성화되거나 비활성화되는 유용한 분자를 생성하는 것이 바람직하다. 온도 이외에, 단백질이 진화되거나 최적화될 수 있는 다른 조건은 pH, 삼투압, 삼투질 농도, 산화 및 전해질 농도를 포함한다. 진화 동안 최적화될 수 있는 다른 바람직한 특성은 화학적 저항성, 및 단백질분해 저항성을

포함한다.

[0006] 분자를 진화시키거나 조작하기 위한 많은 방법이 발표되어 있다. 그러나, 야생형 작업 조건에서 단백질을 비활성 또는 사실상 비활성(10% 미만의 활성 및 특히 1% 활성)이 되도록 조작 또는 진화시키면서, 새로운 조건에서 야생형 조건과 동일하거나 보다 우수한 활성을 유지하는 것은 탈안정화 돌연변이(들)가 탈안정화 효과에 반대 작용을 하지 않는 활성 증가 돌연변이와 동시 존재하는 것을 필요로 한다. 탈안정화는 Q10과 같은 표준 룰에 의해 예측되는 효과보다 높은 단백질의 활성을 감소시키며, 따라서 예를 들어, 더 낮은 온도에서 효율적으로 작업하는 단백질을 진화시키는 능력을 감소시키면서, 정상 작업 조건 하에 비활성화되어 미락 단백질로 언급되는 예측되지 않은 새로운 부류의 단백질을 생성하는 것으로 예측된다.

[0007] 본 출원 전반에서, 저자 및 일자에 의해 다양한 공보가 참조된다. 본원에 기술되고 청구된 설명의 일자로 당업자에게 공지된 최신 기술을 더 충분히 기술하기 위해 이들 공보의 설명의 전체 내용이 참조로 인용된다.

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0008] 본 발명은, 조건 활성 항체를 제조하는 방법을 제공하고, 상기 방법은, 야생형 항체를 선택하는 단계; 하나 이상의 진화 기술을 사용하여 야생형 항체를 부호화하는 DNA를 진화시켜서 돌연변이 DNA를 생성하는 단계; 돌연변이 DNA를 발현시켜서 돌연변이 항체를 얻는 단계; 돌연변이 항체 및 야생형 항체를 정상 생리학적 조건 하에 검정하고 비정상 생리학적 조건 하에 검정하는 단계; 및 조건 활성 항체를 (a) 야생형 항체와 비교하여 정상 생리학적 조건 하의 검정에서 활성의 감소 및 (b) 야생형 항체와 비교하여 비정상 생리학적 조건 하의 검정에서 활성의 증가를 나타내는 돌연변이 항체로부터 선택하는 단계를 포함한다. 다양한 양상에서, 정상 생리학적 조건은 온도, pH, 삼투압, 삼투질 농도, 산화 및 전해질 농도 중 하나 이상으로부터 선택된다. 특정 양상에서, 정상 생리학적 조건은 온도이며; 조건 활성 항체가 정상 생리학적 온도에서 사실상 비활성이지만, 정상 생리학적 온도보다 낮은 비정상 온도에서는 활성이다. 다른 양상에서, 조건 활성 항체는 정상 생리학적 조건에서 가역적으로 또는 비가역적으로 비활성화된다. 하나의 특정 양상에서, 단백질은 정상 생리학적 조건에서 가역적으로 비활성화된다. 대안적으로, 조건 활성 항체는 2가지 이상의 상이한 생리학적 조건에서 가역적으로 또는 비가역적으로 활성의 변동을 나타내는 단백질로부터 선택된다.

### 과제의 해결 수단

[0009] b) pH 7.2 내지 pH 7.6의 범위에서의 표적에 대한 결합 활성보다 a) pH 6.4 내지 pH 6.8의 범위에서의 상기 표적에 대한 결합 활성이 더 큰 변형 단백질을 생체 외에서 선택 및 확인하는 방법에 있어서, 본 발명의 다른 실시예에 따른 변형 단백질을 생체 외에서 선택 및 확인하는 방법은:

1) a) pH 6.4 내지 pH 6.8의 범위에서의 표적에 대한 복수의 변형 단백질들의 결합 활성을 사람 혈청의 존재하에 시험하고, b) pH 7.2 내지 pH 7.6의 범위에서의 상기 표적에 대한 상기 복수의 변형 단백질들의 결합 활성을 사람 혈청의 존재하에 시험하는 단계로서,

상기 복수의 변형 단백질들의 모(母) 단백질과 비교하여 상기 복수의 변형 단백질들 중 각각은 아미노산 잔기 또는 잔기들의 아미노산 치환, 삽입 및/또는 결실을 포함하며,

상기 복수의 변형 단백질들 중 각각은 a) 및 b)중 각각에서 시험이 이루어지는, 시험 단계;

2) a)에서의 상기 복수의 변형 단백질들 중 각각의 결합 활성을 b)에서의 결합 활성과 비교하는 단계; 및

3) b)에서보다 a)에서의 결합 활성이 더 큰 변형 단백질을 상기 복수의 변형 단백질들로부터 선택 및 확인하는 단계를 포함한다.

본 발명의 바람직한 실시예에 따르면, a)에서의 pH는 6.7이다.

일 실시예에서, 야생형 항체(wild-type antibody)는 효소이다. 특정 양상에서, 야생형 항체는, 조직 플라스미노겐 활성화제, 스트렙토키나아제, 우로키나아제, 레닌, 및 히알루로니다아제로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0010] 다른 실시예에서, 야생형 항체는, 칼시토닌 유전자 관련 펩티드(CGRP), 성분 P(SP), 뉴로펩티드 Y(NPY), 혈관활성 펩티드(VIP), 바소프레신, 및 안지오테닌으로부터 선택된다.

[0011] 다른 실시예에서, 생체 단백질은 항체이다.

[0012] 다른 실시예에서, 본 발명은 조건 활성 생체 반응 조절제를 제조하는 방법을 제공하고, 상기 방법은, 염증 반응 매개체를 선택하는 단계; 상기 매개체에 대한 야생형 항체를 확인하는 단계; 돌연변이 항체들을 발생시키기 위해 상기 야생형 항체를 진화시키는 단계; 제1 조건에서 상기 야생형 항체에 관련된 상기 매개체에 대한 감소된 결합을 나타내고 제2 조건에서 상기 야생형 항체에 관련된 상기 매개체에 대한 증가된 결합 친화성을 나타내는 돌연변이체들에 대한 상기 돌연변이 항체들을 별도로 선택하여 선택된-돌연변이체들(selected-mutants)을 확인하는 단계; 및 상기 선택된-돌연변이체들의 중쇄 및 경쇄를 재조합시켜서 재조합된 돌연변이체들을 생성하는 단계; 상기 제1 조건에서 상기 야생형 항체에 관련된 상기 매개체에 대한 감소된 결합을 나타내고 상기 제2 조건에서 상기 야생형 항체에 관련된 상기 매개체에 대한 증가된 결합 친화성을 나타내는 돌연변이체들에 대한 상기 재조합된 돌연변이체들을 선별하여 상기 조건 활성 생체 반응 조절제를 확인하는 단계를 포함한다. 하나의 양상에서, 염증 반응 매개체는, IL-6, IL-6 수용체, TNF-알파, IL-23 및 IL-12로부터 선택된다. 또 다른 양상에서, 제1 및 제2 조건은 pH, 삼투압, 삼투질 농도, 산화 및 전해질 농도의 조건들로부터 선택된다.

[0013] 다른 실시예에서, 본 발명은 조건 활성 항체 및 약제학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 약제 조성물을 제공한다.

### 발명의 효과

[0014] 본 발명은, 조건 활성 항체(conditionally active antibody)를 제조하는 방법을 제공하는 효과를 갖는다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0015] 본원에 제공된 예의 이해를 용이하게 하기 위해, 특정의 자주 발생하는 방법 및/또는 용어가 기술될 것이다.

[0016] 측정된 양과 관련하여 본원에 사용되는 바와 같이, "약"이라는 용어는 측정을 이루고 측정의 대상 및 사용되는 측정 기기의 정밀도에 상응하여 일정 수준의 주의를 경험하는 당업자에 의해 예측되는 측정된 양의 정상 변화를 의미한다. 다른 식으로 나타내지 않은 한은, "약"은 제공되는 값의  $\pm 10\%$ 의 변화를 의미한다.

[0017] "제제(agent)"라는 용어는, 화합물, 화합물의 혼합물, 공간적으로 편재된 화합물의 배열(예를 들어, VLSIPS 펩티드 배열, 폴리뉴클레오티드 배열, 및/또는 조합 소분자 배열), 생체 거대분자, 박테리오파지 펩티드 디스플레이 라이브러리, 박테리오파지 항체(예를 들어, scFv) 디스플레이 라이브러리, 폴리솜 펩티드 디스플레이 라이브러리, 또는 박테리아, 식물, 균류, 또는 동물(특정 포유동물) 세포 또는 조직과 같은 생체시료로부터 제조되는 추출물을 나타내기 위해 본원에 사용된다. 제제는 하기에 기술되는 선별 검정예의 포함에 의해 잠재적 효소 활성에 대해 평가된다. 제제는 하기에 기술된 선별 검정예의 포함에 의해 조건 활성 생체 치료용 효소로서 잠재적 활성에 대해 평가된다.

[0018] 제한 자리에서 "모호한 염기 요건"은, 가장 완전한 정도로 특정되지 않는 뉴클레오티드 염기 요건을 의미하며, 즉, 특정 염기(예를 들어, 비제한적인 예시에서, A, C, G 및 T로부터 선택되는 특정 염기)가 아니라, 오히려 2개 이상의 염기 중 어느 하나일 수 있다. 염기에서 모호성을 나타내기 위해 해당 분야 및 본원에 사용되는 공통 허용되는 약칭은, R=G 또는 A; Y=C 또는 T; M=A 또는 C; K=G 또는 T; S=G 또는 C; W=A 또는 T; H=A 또는 C 또는 T; B=G 또는 T 또는 C; V=G 또는 C 또는 A; D=G 또는 A 또는 T; N=A 또는 C 또는 G 또는 T를 포함한다.

[0019] 본원에 사용되는 바와 같이, "아미노산"이라는 용어는, 바람직하게는 유기 또는 대안적으로 펩티드 결합의 일부로서 축합 후에 아미노기( $-NH_2$ ) 및 카복시기( $-COOH$ )를 함유하는 임의의 유기 화합물을 의미한다. "20개의 자연적으로 부호화된 폴리펩티드-생성 알파-아미노산"은, 당분야에서 이해되고, 알라닌(ala 또는 A), 아르기닌(arg 또는 R), 아스파라긴(asn 또는 N), 아스파르트산(asp 또는 D), 시스테인(cys 또는 C), 글루탐산(glu 또는 E), 글루타민(gln 또는 Q), 글리신(gly 또는 G), 히스티딘(his 또는 H), 이소류신(ile 또는 I), 류신(leu 또는 L), 리신(lys 또는 K), 메티오닌(met 또는 M), 페닐알라닌(phe 또는 F), 프롤린(pro 또는 P), 세린(ser 또는 S), 트레오닌(thr 또는 T), 트립토판(trp 또는 W), 티로신(tyr 또는 Y), 및 발린(val 또는 V)을 의미한다.

[0020] "증식(amplification)"이라는 용어는, 폴리뉴클레오티드의 복제의 수가 증가됨을 의미한다.

[0021] "키메라 특성(chimeric property)"을 갖는 분자는, 1) 제1 기준 분자에 대해 부분적이고 부분적으로 비상동성이면서; 2) 동시에 제2 기준 분자에 대해 부분적이고 부분적으로 비상동성이며; 3) 동시에 하나 이상의 부가적 기준 분자에 대해 부분적이고 부분적으로 비상동성일 가능성을 배제하지 않는 분자이다. 비제한적인 실시예에서, 키메라 분자는 부분적 분자 서열의 재집합을 조립함으로써 제조될 수 있다. 비제한적 양상에서, 키메라 폴리뉴클레오티드 분자는 합성된 키메라 폴리뉴클레오티드가 복수의 템플릿을 가질



정도로 복수의 분자 템플릿을 사용하여 키메라 폴리뉴클레오타이드를 합성함으로써 제조될 수 있다.

- [0022] 본원에 사용되는 바와 같이, "동족(cognate)"이라는 용어는, 종 사이에 진화적으로 그리고 기능적으로 관련된 유전자 서열을 의미한다. 예를 들어, 비제한적이지만, 사람 게놈에서, 사람 CD4 유전자는 마우스 3d4 유전자에 대한 동족 유전자이며, 이는 이들 2개의 유전자의 서열 및 구조가 이들이 고도로 상동성이며 2개의 유전자가 모두 MHC 클래스 II-제한 항원 인식을 통해 T 세포 활성화를 신호화하는 데에 작용하는 단백질을 부호화하기 때문이다.
- [0023] 본원에 사용되는 바와 같이, "비교 윈도우(comparison window)"라는 용어는, 20개 이상의 인접 뉴클레오타이드 위치의 개념적 분절을 의미하고, 여기에서 폴리뉴클레오타이드 서열은 20개 이상의 인접 뉴클레오타이드의 기준 서열에 필적할 수 있으며, 비교 윈도우에서 폴리뉴클레오타이드 서열의 부분은 2개의 서열의 최적 정렬을 위해 기준 서열(추가 또는 결실을 포함하지 않음)과 비교하여 20% 이하의 추가 또는 결실(즉, 갭)을 포함할 수 있다. 비교 윈도우를 정렬시키기 위한 서열의 최적 정렬은 스미스(Smith)의 국소적 상동성 알고리즘(Smith and Waterman, 1981, "Comparison of biosequence", Adv Appl Math, 2:482-489; Smith and Waterman, 1981, "Overlapping genes and information theory", J Theor Biol, 91:379-380; Smith and Waterman, J Mol Biol, "Identification of common molecular subsequence", 1981, 147:195-197; Smith et al., 1981, "Comparative biosequence metrics", J Mol Evol, 18:38-46), 니들맨(Needleman)의 상동성 정렬 알고리즘(Needleman and Wunsch, 1970, "A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins" J Mol Biol, 48(3):443-453), 피어슨(Pearson)의 유사성 방법의 검색(Pearson and Lipman, 1988, "Improved tools for biological sequence comparison", Proc Nat Acad Sci USA, 85:2444-2448), 이들 알고리즘의 전산화 실행(GAP, BESTFIT, FASTA, and TFASTA in the Wisconsin Genetics Software Package Release 7.0, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis.), 또는 검사에 의해 수행될 수 있고, 여러 방법에 의해 생성된 최선의 정렬(즉, 비교 윈도우보다 최고 비율의 상동성을 결과함)이 선택된다.
- [0024] "조건 활성 항체(conditionally active antibody)"라는 용어는, 하나 이상의 정상 생리학적 조건 하에서 모 야생형 항체보다 활성이 높거나 낮은 야생형 항체의 변종 또는 돌연변이체를 의미한다. 조건 활성 단백질은 또한 체내의 선택된 영역에서 활성을 나타내고/나타내거나 비정상 또는 허용 생리학적 조건 하에 증가된 또는 감소된 활성을 나타낸다. 정상 생리학적 조건은 대상에 대한 투여 자리에서 또는 작용 자리의 조직 또는 기관에서 정상 범위 내에 있는 것으로 고려되는 온도, pH, 삼투압, 삼투질 농도, 산화 및 전해질 농도의 조건이다. 비정상 생리학적 조건은 조건에 대해 정상적으로 허용 가능한 범위로부터 벗어난 조건이다. 하나의 양상에서, 조건 활성 항체는 사실상 야생형 조건에서 비활성이지만, 야생형 조건에서 동일하거나 이보다 우수한 수준에서 야생형 조건과 상이한 조건에서 활성이다. 예를 들어, 하나의 양상에서, 진화된 조건 활성 항체는 사실상 체온에서 비활성이지만, 더 낮은 온도에서는 활성이다. 또 다른 양상에서, 조건 활성 항체는 야생형 조건에서 가역적으로 또는 비가역적으로 비활성화된다. 추가의 양상에서, 야생형 항체는 치료용 단백질이다. 또 다른 양상에서, 조건 활성 항체는 약물 또는 치료제로서 사용된다. 또 다른 양상에서, 단백질은 예를 들어, 간을 통한 통과 후에 또는 신장에서 발견되는 더 낮은 pH 환경에서와 같이 고도로 산소화된 혈액 중에서 더 활성이거나 덜 활성이다.
- [0025] "보존성 아미노산 치환(conservative amino acid substitution)"은, 유사한 측쇄를 갖는 잔기의 호환성을 의미한다. 예를 들어, 지방족 측쇄를 갖는 일 군의 아미노산은 글리신, 알라닌, 발린, 류신 및 이소류신이고; 지방족-히드록실 측쇄를 갖는 일 군의 아미노산은 세린 및 트레오닌이고; 아미드 함유 측쇄를 갖는 일 군의 아미노산은 아스파라긴 및 글루타민이고; 방향족 측쇄를 갖는 일 군의 아미노산은 페닐알라닌, 티로신 및 트립토판이고; 염기성 측쇄를 갖는 일 군의 아미노산은 리신, 아르기닌 및 히스티딘이고; 황 함유 측쇄를 갖는 일 군의 아미노산은 시스테인 및 메티오닌이다. 바람직한 보존성 아미노산 치환 군은 발린-류신-이소류신, 페닐알라닌-티로신, 리신-아르기닌, 알라닌-발린 및 아스파라긴-글루타민이다.
- [0026] "상응하다"라는 용어는, 본원에서 폴리뉴클레오타이드 서열이 기준 폴리뉴클레오타이드 서열의 전부 또는 일부에 대해 상동성이거나(즉, 동일하고, 엄격히 진화적으로 관련되지 않음), 폴리펩티드 서열이 기준 폴리펩티드 서열과 동일함을 의미한다. 대조적으로, 용어 "상보성"은 본원에서 상보성 서열이 기준 폴리뉴클레오타이드 서열의 전부 또는 일부에 대해 상동성임을 의미한다. 예를 들어, 뉴클레오타이드 서열 "TATAC"은 기준 "TATAC"에 상응하고, 기준 서열 "GTATA"에 대해 상보성이다.
- [0027] "분해 효과적인(degrading effective)"이라는 용어는, 양은 효소와 접촉하지 않은 기질과 비교하여 기질의 50% 이상을 가공하는 데에 필요한 효소의 양을 의미한다.
- [0028] 본원에 사용되는 바와 같이, "한정된 서열 프레임워크"라는 용어는, 비-랜덤 기준으로, 일반적으로 실험적 데이



터 또는 구조적 데이터를 기준으로 선택되는 한정된 서열의 세트이며; 예를 들어, 한정된 서열 프레임워크는 . 베타.-시트 구조를 생성하는 것으로 예측되는 아미노산 서열의 세트를 포함할 수 있거나, 다른 변종 중에서 류신 지퍼 헵타드 반복 모티브, 아연-핑거 도메인을 포함할 수 있다. "한정된 서열 케르날"은 제한된 범위의 변동성을 포함하는 서열의 세트이다. (1) 20개의 통상적인 아미노산의 완전 랜덤 10-머 서열이 (20)<sup>10</sup> 개 서열 중 임의의 것일 수 있으며, (2) 20개의 통상적인 아미노산의 수도랜덤 10-머 서열이 (20)<sup>10</sup> 개 서열 중 임의의 것일 수 있지만 특정 위치 및/또는 전체에서 특정 잔기에 대한 바이어스를 나타낼 것이며, (3) 한정된 서열 케르날은 각각의 잔기 위치가 허용 가능한 20개의 통상적인 아미노산 (및/또는 허용 가능한 비통상적인 아미노/이미노산) 중 임의의 것인 것으로 허용되는 경우에 서열의 서브세트이다. 한정된 서열 케르날은 일반적으로 변종 및 비변종 잔기 위치를 포함하고/거나, 분절적으로, 또는 개별적으로 선택된 라이브러리 멤버의 전체 길이에 걸쳐 아미노산 잔기의 규정된 서브세트 등으로부터 선택된 잔기를 포함할 수 있는 변종 잔기 위치를 포함한다. 한정된 서열 케르날은 아미노산 서열 또는 폴리뉴클레오타이드 서열을 의미할 수 있다. 예시적이고 비제한적으로, N이 A, T, G, 또는 C를 나타내고; K가 G 또는 T를 나타내고; M이 A 또는 C를 나타내는 서열 (NNK)<sub>10</sub> 및 (NNM)<sub>10</sub>이 한정된 서열 케르날이다.

[0029] DNA의 "분해(digestion)"는, DNA 중의 특정 서열에서만 작용하는 제한 효소에 의한 DNA의 촉매 분해를 의미한다. 본원에 사용되는 다양한 제한 효소는 시판용이며, 이들의 반응 조건, 보조인자 및 다른 요건이 당업자에게 공지된 바와 같이 사용된다. 분석을 위해, 대표적으로 1 $\mu$ g의 플라스미드 또는 DNA 단편이 약 20 $\mu$ l의 완충제 용액 중의 약 2 단위의 효소와 사용된다. 플라스미드 구성을 위해 DNA 단편을 단리시키기 위해, 대표적으로 5 내지 50 $\mu$ g의 DNA가 더 큰 용량으로 20 내지 250 단위의 효소에 의해 분해된다. 특정 제한 효소를 위한 적절한 완충제 및 기질의 양은 제조업자에 의해 명시된다. 37°C에서 약 1시간의 인큐베이션 시간이 원래 사용되지만, 공급자의 지시에 따라 변할 수 있다. 분해 후에, 반응은 겔 상에서 직접 전기영동되어 바람직한 단편을 단리시킨다.

[0030] "직접 결찰(directional ligation)"은, 폴리뉴클레오타이드의 5' 말단 및 3' 말단이 바람직한 결찰 배향을 특정하기 위해 충분히 상이한 결찰을 의미한다. 예를 들어, 2개의 평할 말단을 갖는 다른 식으로 처리되지 않고 분해되지 않은 PCR 생성물은 대표적으로, 다중 클로닝 자리에서 평할말단을 생성하도록 분해된 클로닝 벡터 내로 결찰되는 경우에 바람직한 결찰 배향을 갖지 않을 것이며; 따라서, 직접 결찰은 대표적으로 이들 환경 하에 나타나지 않는다. 대조적으로, 직접 결찰은 5' EcoR I-처리 말단 및 3' BamH I를 갖는 분해된 PCR 생성물이 EcoR I 및 BamH I에 의해 분해된 다중 클로닝 자리를 갖는 클로닝 벡터 내로 결찰되는 경우에 나타날 것이다.

[0031] "DNA 서플링"이라는 용어는, 실질적으로 상동성이지만 동일하지 않은 서열들 사이의 재조합을 나타내기 위해 본원에 사용되며, 일부 실시예에서, DNA 서플링은 cer/lox 및/또는 f1p/frt 시스템 등을 통해서와 같이 비-상동성 재조합을 통한 크로스오버를 수반할 수 있다. DNA 서플링은 랜덤 또는 비-랜덤일 수 있다.

[0032] "약물(drug)" 또는 "약물 분자"라는 용어는, 사람 또는 동물 몸에 투여되는 경우 사람 또는 동물 몸에 대한 유익한 효과를 갖는 성분을 포함하는 치료제를 의미한다. 바람직하게는, 치료제는 사람 또는 동물 몸에서 한 가지 이상의 증상, 질병 또는 이상 질환을 치료, 치유 또는 경감시키거나 킬 수 있는 사람 또는 동물 몸체의 건강을 향상시킬 수 있는 성분을 포함한다.

[0033] "유효량"은, 일부 기간에 걸쳐 투여되는 생체에서 질환을 치료하거나 예방하며, 예를 들어, 바람직한 투여 간격 동안 치료 효과를 제공하기 위해 효과적인 조건 활성 항체 또는 단편의 양이다.

[0034] 본원에 사용되는 바와 같이, "전해질"이라는 용어는, 전하를 수반하는 혈액 또는 다른 체액 중의 미네랄을 규정하기 위해 사용된다. 예를 들어, 하나의 양상에서, 정상 생리학적 조건 및 비정상 생리학적 조건은 "전해질 농도"의 조건일 수 있다. 하나의 양상에서, 시험하려는 전해질 농도는 이온화된 칼슘, 나트륨, 칼륨, 마그네슘, 염화물, 중탄산염 및 인산염 농도 중 하나 이상으로부터 선택된다. 예를 들어, 하나의 양상에서, 혈청 칼슘의 정상 범위는 8.5 내지 10.2mg/dL이다. 상기 양상에서, 비정상 혈청 칼슘 농도는 정상 범위보다 높거나 낮은 범위로부터 선택될 수 있다. 또 다른 예에서, 하나의 양상에서, 혈청 염화물의 정상 범위는 96~106 밀리당량/리터(mEq/L)이다. 상기 양상에서, 비정상 혈청 염화물 농도는 정상 범위보다 높거나 낮은 범위로부터 선택될 수 있다. 또 다른 예에서, 하나의 양상에서, 혈청 마그네슘의 정상 범위는 1.7~2.2mg/dL이다. 상기 양상에서, 비정상 혈청 마그네슘 농도는 정상 범위보다 높거나 낮은 범위로부터 선택될 수 있다. 또 다른 예에서, 하나의 양상에서, 혈청 인의 정상 범위는 2.4 내지 4.1mg/dL이다. 상기 양상에서, 비정상 혈청 인 농도는 정상 범위보다 높거나 낮은 범위로부터 선택될 수 있다. 또 다른 예에서, 하나의 양상에서, 혈청 또는 혈액 나트륨의 정상 범위는

135 내지 145 mEq/L이다. 상기 양상에서, 비정상 혈청 또는 혈액 나트륨 농도는 정상 범위보다 높거나 낮은 범위로부터 선택될 수 있다. 또 다른 예에서, 하나의 양상에서, 혈청 또는 혈액 칼륨의 정상 범위는 3.7 내지 5.2 mEq/L이다. 상기 양상에서, 비정상 혈청 또는 혈액 칼륨 농도는 정상 범위보다 높거나 낮은 범위로부터 선택될 수 있다. 추가의 양상에서, 혈청 중탄산염의 정상 범위는 20 내지 29 mEq/L이다. 상기 양상에서, 비정상 혈청 또는 혈액 중탄산염 농도는 정상 범위보다 높거나 낮은 범위로부터 선택될 수 있다. 상이한 양상에서, 중탄산염 수준은 혈액에서 정상 수준의 산도(pH)를 나타내기 위해 사용될 수 있다. "전해질 농도"라는 용어는, 또한 혈액 또는 혈장과는 다른 조직 또는 체액 중의 특정 전해질의 조건을 규정하기 위해 사용될 수 있다. 이 경우에, 정상 생리학적 조건은 조직 또는 체액에 대한 임상적으로 정상 범위인 것으로 고려된다. 상기 양상에서, 비정상 조직 또는 체액 전해질 농도는 정상 범위보다 높거나 낮은 범위로부터 선택될 수 있다.

[0035] 본 발명에 사용되는 바와 같이, "에피토프(epitope)"라는 용어는, 효소-특이적 항체와 같은 항체의 파라토프가 결합한, 효소 폴리펩티드와 같은 항원에 대한 항원결정기를 의미한다. 항원결정기는 일반적으로 아미노산 또는 당 측쇄와 같은 분자의 화학적 활성 표면 군으로 구성되며, 특정 3차원 구조적 특징, 및 특정 하전 특징을 가질 수 있다. 본원에 사용되는 바와 같이 "에피토프"는 항체의 변동 영역 결합체와 상호작용하는 결합 상호작용을 생성시킬 수 있는 항원 또는 다른 거대분자의 부분을 의미한다. 대표적으로, 이러한 결합 상호작용은 CDR의 하나 이상의 아미노산 잔기와 분자간 접촉으로서 나타난다.

[0036] 본원에 사용되는 바와 같이, "효소"는, 특정 촉매 특성을 갖는 단백질이다. 예를 들어, 기질 농도, pH, 온도 및 억제제의 존재 또는 부재와 같은 인자는 촉매작용의 속도에 영향을 줄 수 있다. 대표적으로, 야생형 효소에 대해, Q10(온도계수)는 10℃ 온도 상승에 따른 반응 속도의 증가를 설명한다. 야생형 효소에 대해, Q10 = 2 내지 3이며; 즉, 반응 속도는 매 10℃ 온도 증가에 따라 2배 또는 3배가 된다. 고온에서, 단백질은 변성된다. 효소 최적 값과 약간 상이한 pH 값에서, 효소 및 아마도 기질 분자의 전하에서 작은 변화가 일어난다. 이온화의 변화는 기질 분자의 결합에 영향을 줄 수 있다. 극한 pH 수준에서, 효소는 변성을 발생시킬 것이며, 여기에서 활성 자리는 변형되고, 기질 분자는 더 이상 조정되지 않을 것이다.

[0037] 본원에 사용되는 바와 같이, "진화(evolution)", 또는 "진화하는(evolving)"이라는 용어는, 신규 폴리펩티드를 부호화하는 신규 폴리뉴클레오티드를 생성하기 위한 돌연변이 유발의 하나 이상의 방법을 의미하며, 신규 폴리펩티드는 자체로 개선된 생체 분자이고/분자이거나 다른 개선된 생체 분자의 생성에 기여한다. 특정의 비제한적인 양상에서, 본 발명은 모 야생형 항체로부터의 조건 활성 항체의 진화에 관한 것이다. 하나의 양상에서, 예를 들어, 진화는 본원에 참조로 인용된 미국 특허 출원 공고 2009/0130718에 기술된 비확률론적 폴리뉴클레오티드 특징화 및 비확률론적 자리-유도 지점 돌연변이 유발 둘 모두를 수행하는 방법에 관한 것이다. 보다 구체적으로는, 본 발명은 야생형 효소 모 분자와 비교하여 정상 생리학적 조건에서 감소된 활성을 나타내고 야생형 효소와 비교하여 하나 이상의 비정상 생리학적 조건 하에 증강된 활성을 나타내는 조건 활성 생체 효소의 진화 방법을 제공한다.

[0038] 기준 폴리펩티드를 언급시 "단편(fragment)", "유도체(derivative)", 및 "유사체(analog)"라는 용어는, 기준 폴리펩티드와 최소한 본질적으로 동일한 하나 이상의 생물학적 기능 또는 활성을 보유하는 폴리펩티드를 포함한다. 더욱더, 용어 "단편", "유도체" 또는 "유사체"는 분해에 의해 변경되어 현저히 더 높은 활성을 갖는 숙성 효소를 생성시킬 수 있는 저활성 프로단백질과 같은 "프로폼" 분자에 의해 예시된다.

[0039] "완전 범위의 단일 아미노산 치환"이 각각의 아미노산 위치에서 표시되는, 자손 폴리펩티드의 세트를 템플릿 폴리펩티드로부터 생성하기 위한 방법이 제공된다. 본원에 사용되는 바와 같이, "완전 범위의 단일 아미노산 치환"은 본원에 기술된 바와 같이 20개의 자연적으로 부호화된 폴리펩티드-생성 알파-아미노산과 관련된다.

[0040] "유전자(gene)"라는 용어는, 폴리펩티드 사슬을 생성하는 데에 수반되는 DNA의 분절을 의미하며; 이는 개별적 부호화 분절(엑손) 사이의 개재 서열(인트론)뿐만 아니라, 부호화 영역(리더 및 트레일러) 전후에 있는 영역을 포함한다.

[0041] 본원에 사용되는 바와 같이, "유전적 불안정성"은, 일반적으로 반복된 서열의 손실을 통한 서열 단순화를 수반하는 환원성 이벤트의 과정을 통해 고도의 반복 서열이 손실되려는 자연적 경향을 의미한다. 결찰은 반복체의 하나의 복제 및 반복체 사이의 모든 것의 손실을 수반하려는 경향이 있다.

[0042] "비상동성(heterologous)"이라는 용어는, 하나의 단일-가닥 핵산 서열이 또 다른 단일-가닥 핵산 서열 및 이의 보체에 잡종형성할 수 없음을 의미한다. 따라서, 비상동성의 부분은 폴리뉴클레오티드의 영역을 의미하거나, 폴리뉴클레오티드는 또 다른 핵산 또는 폴리뉴클레오티드에 잡종형성할 수 없는 이들의 서열 내의 부분 또는 영역

을 갖는다. 이러한 영역 또는 부분은 예를 들어, 돌연변이의 부분이다.

- [0043] "상동성(homologous)" 또는 "부분 상동성(homeologous)"이라는 용어는, 하나의 단일-가닥 핵산 서열이 상보성 단일-가닥 핵산 서열에 잡종형성할 수 있음을 의미한다. 잡종형성 정도는 서열들 사이의 동일성의 정도 및 나중 에 논의되는 바와 같은 온도 및 염 농도와 같은 잡종형성 조건을 포함하는 많은 인자에 의존할 수 있다. 바람직 하게는, 동일성의 영역은 약 5 bp 초과, 더욱 바람직하게는, 동일성의 영역은 10 bp 초과이다.
- [0044] 본 발명의 이점은, "산업 분야"(또는 산업적 공정)으로 확대되며, 이 용어는 엄밀한 의미의 상업적 산업에서의 분야(또는 단순히 산업) 및 비상업적인 산업 분야(예를 들어, 비영리 기관에서의 생물의학 연구)를 포함하도록 사용된다. 적절한 분야는 진단, 의약, 농업, 제조 및 학계의 영역에서의 분야를 포함한다.
- [0045] "동일한" 또는 "동일성"이라는 용어는, 2개의 핵산 서열이 동일한 서열 또는 상보성 서열을 가짐을 의미한다. 따라서, "동일성의 부분"은 폴리뉴클레오티드 또는 전체 폴리뉴클레오티드의 영역 또는 부분이 또 다른 폴리뉴 클레오티드의 부분과 동일하거나 상보성임을 의미한다.
- [0046] "단리된(isolated)"이라는 용어는, 물질이 이의 기원 환경(예를 들어, 이것이 자연 발생인 경우에는 자연 환경)으로부터 제거됨을 의미한다. 예를 들어, 살아있는 동물 중에 존재하는 자연 발생 폴리뉴클레오티드 또는 효 소는 단리되지 않지만, 자연계에 동시 존재하는 물질의 일부 또는 전부로부터 분리된 동일한 폴리뉴클레오티드 또는 효소는 단리된다. 이러한 폴리뉴클레오티드는 벡터의 부분일 수 있고/있거나 이러한 폴리뉴클레오티드 또 는 효소는 조성물의 부분일 수 있으며, 이러한 벡터 또는 조성물은 자연 환경의 부분이 아니다.
- [0047] "단리된 핵산"이라는 용어는, 이것이 유도되는 유기체의 자연 발생 게놈에 존재하는 경우에, 이것이 정상적으로 바로 인접한 5' 및 3' 측면 서열과 바로 인접하지 않는 핵산, 예를 들어, DNA 또는 RNA 분자를 규정하기 위해 사용된다. 따라서, 이 용어는 예를 들어, 플라스미드 또는 바이러스 벡터와 같은 벡터 내로 혼입되는 핵산; 비 상동성 세포의 게놈(또는, 자연 발생하는 자리와는 상이한 자리에서, 상동성 세포의 게놈) 내로 혼입되는 핵산; 및 분리 분자, 예를 들어, PCR 증식 또는 제한 효소 분해에 의해 생성되는 DNA 단편 또는 생체 외 전사에 의해 생성되는 RNA 분자로서 존재하는 핵산을 기술하는 것이다. 이 용어는 또한, 예를 들어, 융합 단백질의 생성에 사용될 수 있는 추가의 폴리펩티드 서열을 부호화하는 하이브리드 유전자의 부분을 생성하는 재조합 핵산을 기 술하는 것이다.
- [0048] 본원에 사용되는 바와 같이, "리간드"는, 특정 수용체에 의해 인식되는 랜덤 펩티드 또는 가변성 분절 서열과 같은 분자를 의미한다. 당업자가 인식할 바와 같이, 분자(또는 거대분자 착물)는 수용체 및 리간드 둘 모두일 수 있다. 일반적으로, 더 낮은 분자량을 갖는 결합 파트너는 리간드로 언급되고, 더 높은 분자량을 갖는 결합 파트너는 수용체로서 언급된다.
- [0049] "결찰(ligation)"은, 2개의 이중 가닥 핵산 단편 사이의 포스포디에스테르 결합을 생성하는 공정을 의미한다 (Sambrook et al., (1982). *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, Cold Spring Harbour Laboratory, Cold Spring Harbor, NY., p. 146; Sambrook et al., *Molecular Cloning: a Laboratory manual*, 2<sup>nd</sup> Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989). 다른 식으로 제공되지 않는 한, 결찰은 결찰시키려는 0.5 $\mu$ g의 대략적 등몰량의 DNA 단편당 10 단위의 T4 DNA 라가아제("라가아제")를 사용하는 공지된 완충제 및 조건을 사용하여 수 행될 수 있다.
- [0050] 본원에 사용되는 바와 같이, "링커(linker)" 또는 "스페이서(spacer)"는, DNA 결합 단백질 및 랜덤 펩티드와 같 은 2개의 분자를 연결하는 분자 및 분자의 군을 의미하며, 예를 들어, 2개의 분자를 바람직한 배열로 위치시키 는 역할을 하여, 랜덤 펩티드가 DNA 결합 단백질로부터 최소 입체 장애로 수용체에 결합하게 된다.
- [0051] 본원에 사용되는 바와 같이, "미세환경"은, 몸체의 조직 또는 영역의 다른 영역으로부터의 일정한 또는 일시적 인 물리적 또는 화학적 차이를 갖는 조직 또는 몸체의 임의의 부분 또는 영역을 의미한다.
- [0052] 본원에 사용되는 바와 같이, "진화된 분자 특성"은 폴리뉴클레오티드 서열로 구성되는 분자, 폴리펩티드 서열로 구성되는 분자, 및 부분적으로는 폴리뉴클레오티드 서열 및 부분적으로는 폴리펩티드 서열로 구성되는 분자에 대한 언급을 포함한다. 진화된 분자 특성의 특히 적합하지만 비제한적인 예는 온도; 염도; 삼투압; pH; 산화, 및 글리세롤, DMSO, 청정제, 및/또는 반응 환경에서 접촉이 이루어지는 임의의 다른 분자 종의 농도에 관련된 것과 같은 특정 조건에서의 단백질 활성을 포함한다. 진화된 분자 특성의 추가적인, 특히 적합하지만 비제한적 인 예는, 저장 중 직면할 수 있는 특정 환경에 대한 특정 노출 시간 후 존재하는 안정성, 예를 들어, 잔류 분자 특성의 양을 포함한다.

- [0053] "돌연변이(mutation)"라는 용어는, 야생형 핵산 서열의 서열 변동 또는 펩티드의 서열 변동을 의미한다. 이러한 돌연변이는 이행 또는 변위와 같은 점돌연변이일 수 있다. 돌연변이는 결실, 삽입 또는 중복일 수 있다.
- [0054] 본원에 사용되는 바와 같이, 변성 "N,N,G/T" 뉴클레오티드 서열은 32개의 가능한 삼중선을 나타내고, 여기에서 "N"은 A, C, G 또는 T일 수 있다.
- [0055] 대상물에 적용되는 것과 같이 본원에 사용되는 "자연 발생"이라는 용어는, 대상물이 자연 발견될 수 있다는 사실을 의미한다. 예를 들어, 자연 발생원으로부터 단리될 수 있는 유기체(바이러스 포함) 중에 존재하고, 실험실에서 사람에 의해 의도적으로 변경된 폴리펩티드 또는 폴리뉴클레오티드 서열은 자연 발생적이다. 일반적으로, 자연 발생이라는 용어는, 종에 대해 대표적인 바와 같이 비-병리학적(비-질환) 개체 중에 대상물이 존재함을 의미한다.
- [0056] 본원에 사용되는 바와 같이, "정상 생리학적 조건", 또는 "야생형 작업 조건"은, 피실험자의 투여 자리 또는 작용 자리에서 정상 범위 내에 있는 것으로 고려되는 온도, pH, 삼투압, 삼투질 농도, 산화 및 전해질 농도의 조건이다.
- [0057] 본원에 사용되는 바와 같이, "핵산 분자"는, 각각 단일-가닥 또는 이중-가닥인 지에 의존하여 하나 이상의 염기 또는 하나의 염기쌍으로 구성된다. 더욱더, 핵산 분자는 비제한적으로 핵산 분자, 즉 RNA, DNA, 게놈 핵산, 비-게놈 핵산, 자연 발생 및 비자연 발생 핵산 및 합성 핵산의 군에 의해 예시되는 바와 같이, 배타적으로 또는 키메라적으로 뉴클레오티드 함유 분자의 임의의 군에 속할 수 있다. 이는 비제한적 예로, 미토콘드리아, 리보솜 RNA, 및 자연 발생 성분과 함께 자연 발생이 아닌 하나 이상의 성분으로 키메라적으로 구성되는 핵산 분자와 같은 임의의 세포기관과 관련된 핵산을 포함한다.
- [0058] 또한, "핵산 분자"는, 비제한적으로 아미노산 및 당에 의해 예시되는 바와 같이 부분적으로 하나 이상의 비-뉴클레오티드계 성분을 함유할 수 있다. 따라서, 예를 들어, 비제한적으로, 부분적으로 뉴클레오티드계 및 부분적으로 단백질계인 리보자임이 "핵산 분자"로 고려된다.
- [0059] 그 외에, 예를 들어, 비제한적으로, 방사성 또는 대안적으로 비-방사성 표지와 같은 검출성 부분으로 표지된 핵산 분자가 또한 "핵산 분자"로 고려된다.
- [0060] 용어 "특정 효소를 부호화하는 핵산 서열" 또는 "특정 효소의 DNA 부호화 서열" 또는 "특정 서열을 부호화하는 뉴클레오티드 서열" 및 다른 동의 용어는, 적절한 조절 서열의 조절하에 위치하는 경우에 효소로 전사되고 번역되는 DNA 서열을 의미한다. "프로모터 서열"은 세포에서 RNA 폴리머라아제를 결합시키고 하류(3' 방향) 부호화 서열의 전사를 개시할 수 있는 DNA 조절 영역이다. 프로모터는 DNA 서열의 부분이다. 상기 서열 영역은 이의 3' 말단에서 출발 코돈을 갖는다. 프로모터 서열은 최소 수의 염기를 포함하며, 이는 백그라운드 위에서 검출할 수 있는 수준에서 전사를 개시하기 위해 필요한 요소이다. 그러나, RNA 폴리머라아제가 서열에 결합하고, 전사가 출발 코돈(프로모터를 갖는 3' 말단)에서 개시된 후에, 전사는 하류에서 3' 방향으로 진행한다. 프로모터 서열 내에서 RNA 폴리머라아제의 결합을 위해 반응성인 전사 개시 자리(편의상 뉴클레아제 S1과의 맵핑에 의해 규정됨) 및 단백질 결합 도메인(일치 서열)이 발견될 것이다.
- [0061] 용어 "효소(단백질)를 부호화하는 핵산" 또는 "효소(단백질)를 부호화하는 DNA" 또는 "효소(단백질)를 부호화하는 폴리뉴클레오티드" 및 다른 동의 용어는, 단지 효소에 대한 부호화 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드, 및 추가의 부호화 및/또는 비-부호화 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다.
- [0062] 바람직한 일 실시예에서, "특정 핵산 분자 중"은, 비제한적으로 이의 일차 서열에 의해 예시되는 바와 같이 이의 화학적 구조에 의해 규정된다. 다른 바람직한 실시예에서, 특정 "핵산 분자 중"은 핵산 종의 기능에 의해 또는 핵산 종으로부터 유도되는 생성물의 기능에 의해 규정된다. 따라서, 비제한적 예로, "특정 핵산 분자 중"은 이의 발현된 생성물에 기인하는 활성 또는 특성을 포함하는, 이에 기인하는 하나 이상의 활성 또는 특성에 의해 규정될 수 있다.
- [0063] "작업 핵산 샘플을 핵산 라이브러리로 조립하는 것"의 정의는, 벡터 내로의 결찰 및 숙주의 형질전환에 의해서와 같이, 핵산 샘플을 벡터계 수집물 내로 혼입시키는 공정을 포함한다. 적절한 벡터, 숙주, 및 다른 시약 및 이들의 특정 비제한적 예의 설명이 하기에 제공된다. "작업 핵산 샘플을 핵산 라이브러리로 조립하는 것"의 정의는 또한 어댑터에 대한 결찰에 의해서와 같이, 핵산 샘플을 비-벡터계 수집물 내로 혼입시키는 공정을 포함한다. 바람직하게는, 어댑터는 PCR 프라이머로 어닐링되어 PCR의 증식을 촉진시킬 수 있다.
- [0064] 이에 따라, 비제한적인 실시예에서, "핵산 라이브러리"는 하나 이상의 핵산 분자의 벡터계 수집물로 구성된다.



다른 바람직한 실시예에서, "핵산 라이브러리"는 핵산 분자의 비-벡터계 수집물로 구성된다. 다른 바람직한 실시예에서, "핵산 라이브러리"는 부분적으로는 벡터계이고 부분적으로는 비-벡터계인 핵산 분자의 조합된 수집물로 구성된다. 바람직하게는, 라이브러리를 포함하는 분자의 수집물은 개별적 핵산 분자 중에 따라 검색되거나 분리될 수 있다.

[0065] 본 발명은, "핵산 구성물" 또는 대안적으로 "뉴클레오티드 구성물" 또는 대안적으로 "DNA 구성물"을 제공한다. "구성물"이라는 용어는, 선택적으로 벡터 또는 벡터의 부분과 같은 하나 이상의 추가의 분자 부분에 화학적으로 결합될 수 있는 폴리뉴클레오티드(예를 들어, 효소 폴리뉴클레오티드)와 같은 분자를 기술하기 위해 본원에 사용된다. 특정하지만 비제한적인 양상에서, 뉴클레오티드 구성물은 숙주 세포의 형질전환에 적합한 DNA 발현 구성물에 의해 예시된다.

[0066] "올리고뉴클레오티드"(또는 동의어로 "올리고")는, 화학적으로 합성될 수 있는 단일 가닥 폴리데옥시뉴클레오티드 또는 2개의 상보성 폴리데옥시뉴클레오티드 가닥을 의미한다. 이러한 합성 올리고뉴클레오티드는 5' 인산염을 갖거나 갖지 않을 수 있다. 갖지 않은 것은 키나아제의 존재하에 ATP에 인산염을 첨가하지 않으면서 또 다른 올리고뉴클레오티드로 결합되지 않을 것이다. 합성 올리고뉴클레오티드는 탈인산화되지 않은 단편으로 결합될 것이다. 폴리머라아제에 증식(PCR에 의해서와 같은)을 달성하기 위해, 일렬, "연속적으로, 최소한 제1 상동성 서열, 변성 N,N,G/T 서열 및 제2 상동성 서열로 구성되는 32-배 변성 올리고뉴클레오티드"가 언급된다. 상기 문맥에 사용되는 바와 같이, "상동성"은 폴리머라아제에 증식되는 올리고와 모 폴리뉴클레오티드 사이의 상동성에 관련된다.

[0067] 본원에 사용되는 바와 같이, "작동 가능하게 연결된"이라는 용어는, 기능적 관계로의 폴리뉴클레오티드 요소의 연결을 의미한다. 핵산은 또 다른 핵산 서열과의 기능적 관계로 위치하는 경우에 "작동 가능하게 연결된다". 예를 들어, 프로모터 또는 인핸서는 이것이 부호화 서열의 전사에 영향을 주는 경우에 부호화 서열에 작동 가능하게 연결된다. "작동 가능하게 연결된"은 연결되는 DNA 서열이 대표적으로 인접하고, 2개의 단백질 부호화 영역을 결합하는 것이 필요한 경우, 인접하고 판독 프레임에 있는 것을 의미한다.

[0068] 부호화 서열은, RNA 폴리머라아제가 2개의 부호화 서열을 단일 mRNA로 전사시킨 후, 부호화 서열 둘 모두로부터 유도되는 아미노산을 갖는 단일 폴리펩티드로 번역되는 경우에 또 다른 부호화 서열에 "작동 가능하게 연결된다". 부호화 서열은 발현된 서열이 궁극적으로 처리되어 바람직한 단백질을 생성하는 한은, 서로 인접할 필요는 없다.

[0069] 본원에 사용되는 바와 같이, "모 폴리뉴클레오티드 세트"라는 용어는, 하나 이상의 뚜렷한 폴리뉴클레오티드 종류로 구성되는 세트이다. 일반적으로, 상기 용어는 바람직하게는 모 세트의 돌연변이 유발에 의해 얻어지는 자손 폴리뉴클레오티드 세트에 관련하여 사용되며, 이 경우에, "어미", "출발" 및 "템플릿"이라는 용어는 호환적으로 사용된다.

[0070] "환자(patient)" 또는 "피실험자(subject)"라는 용어는, 치료의 대상인 동물, 예를 들어, 사람과 같은 포유동물을 의미한다. 피실험자 또는 환자는 수컷 또는 암컷일 수 있다.

[0071] 본원에 사용되는 바와 같이, "생리학적 조건"이라는 용어는, 온도, pH, 삼투압, 이온 강도, 점도, 및 생존 유기체와 양립할 수 있고/있거나 대표적으로 생존 배양 효모 세포 또는 포유동물 세포 중에서 세포 내에 존재하는 유사 생화학적 파라미터를 의미한다. 예를 들어, 대표적 실험실 배양 조건 하에 성장한 효모 세포 중의 세포내 조건은 생리학적 조건이다. 생체 외 전사 각테일에 대한 적합한 생체 외 반응 조건은 일반적으로 생리학적 조건이다. 일반적으로, 생체 외 생리학적 조건은 50~200 mM NaCl 또는 KCl, pH 6.5~8.5, 20~45°C 및 0.001~10 mM 2가 양이온(예를 들어,  $Mg^{++}$ ,  $Ca^{++}$ ); 바람직하게는 약 150 mM NaCl 또는 KCl, pH 7.2~7.6, 5 mM 2가 양이온을 포함하며, 종종, 0.01~1.0% 비특이적 단백질(예를 들어, BSA)을 포함한다. 비이온성 청정제(Tween, NP-40, Triton X-100)는 종종 일반적으로 약 0.001 내지 2%, 대표적으로 0.05~0.2%(v/v)로 존재할 수 있다. 특정 수성 조건은 통상적인 방법에 따라 전문가에 의해 선택될 수 있다. 일반적 안내에 대해, 하기의 완충된 수성 조건이 적용될 수 있다: 2가 양이온(들) 및/또는 금속 킬레이터 및/또는 비이온성 청정제 및/또는 막 분획 및/또는 발포방지제 및/또는 신탄렌트의 첨가와 함께, 10~250 mM NaCl, 5~50 mM Tris HCl, pH 5~8. 정상 생리학적 조건은 온도, pH, 삼투압, 삼투질 농도, 투여 자리에서 또는 작용 자리에서 환자 또는 피실험자 중의 생체내 산화 및 전해질 농도의조건을 의미하며, 환자에서 정상 범위 내에 있는 것으로 고려된다.

[0072] 표준 컨벤션(5' 내지 3')이 이중 가닥 폴리뉴클레오티드의 서열을 기술하기 위해 본원에 사용된다.

[0073] 본원에 사용되는 바와 같이, "개체군(population)"이라는 용어는, 폴리뉴클레오티드, 부분 또는 폴리뉴클레오티

드 또는 단백질과 같은 성분들의 수집물을 의미한다. "혼합된 개체군"은 핵산 또는 단백질의 동일한 패밀리에 속하지만(즉, 관련되지만) 이들의 서열(즉, 동일하지 않은) 및 그에 따른 이들의 생물학적 활성이 상이한 성분들의 수집물을 의미한다.

[0074] "프로폼(pro-form)"을 갖는 분자는 도중에 하나 이상의 공유결합 및 비공유결합 화학적 변형(예를 들어, 보조인자 등과 관련된 글리코실화, 단백질분해성 분열, 이합체화 또는 올리고머화, 온도-유도 또는 pH-유도 형태 변화) 중 임의의 조합을 일으켜서 기준 프로폼 분자와 비교하여 특성 차이(예를 들어, 활성의 증가)를 갖는 더 성숙된 분자 형태를 달성하는 분자를 의미한다. 2가지 이상의 화학적 변형(예를 들어, 2개의 단백질분해성 분열, 또는 단백질분해성 분열과 탈글리코실화)가 성숙 분자의 생성 도중에 구별되는 경우, 기준 전구체 분자는 "사전 프로폼" 분자로 언급될 수 있다.

[0075] 본원에 사용되는 바와 같이, "수도랜덤(pseudorandom)"이라는 용어는, 예를 들어, 또 다른 위치에서 잔기 가변성의 정도가 잔기 변동의 정도와 같이 제한된 가변성을 갖는 서열의 세트를 의미하지만, 임의의 수도랜덤 위치는 어느 정도의 잔기 변동이 허용되지만 국한적이다.

[0076] 본원에 사용되는 바와 같이, "유사 반복 단위(quasi-repeated unit)"는, 재집합하려는 반복체를 의미하며, 정의에 의해 동일하지 않다. 실제로, 방법은 동일한 출발 서열의 돌연변이 유발에 의해 생성되는 실시적으로 동일한 부호화 단위뿐만 아니라, 일부 영역에서 현저히 갈라질 수 있는 유사한 또는 관련된 서열의 재집합에 대해 제안된다. 그러나, 서열이 상기 방법에 의해 재집합하기에 충분한 상동성을 함유하는 경우, 이들은 "유사 반복" 단위로 언급될 수 있다.

[0077] 본원에 사용되는 바와 같이, "랜덤 펩티드 라이브러리"는, 랜덤 펩티드의 세트를 부호화하는 폴리뉴클레오티드 서열의 세트, 및 이들 폴리뉴클레오티드 서열의 세트에 의해 부호화된 랜덤 펩티드의 세트, 및 이들 랜덤 펩티드를 함유하는 융합 단백질을 의미한다.

[0078] 본원에 사용되는 바와 같이, "랜덤 펩티드 서열"은, 2개 이상의 아미노산 단량체로 이루어지고, 구성되고 확률론적 또는 랜덤 공정에 의해 구성되는 아미노산 서열을 의미한다. 랜덤 펩티드는 불변성 서열을 포함할 수 있는 프레임워크 또는 스캐폴딩 모티프를 포함할 수 있다.

[0079] 본원에 사용되는 바와 같이, "수용체"는, 소정의 리간드에 대한 친화성을 갖는 분자를 의미한다. 수용체는 자연 발생 또는 합성 분자일 수 있다. 수용체는 비변경 상태로 또는 다른 종과의 집합체로서 사용될 수 있다. 수용체는 직접 또는 특정 결합 성분을 통해 결합 원에 공유결합으로 또는 비공유결합으로 부착될 수 있다. 수용체의 예는 특정 항원결정기(바이러스, 세포, 또는 다른 물질에 대한 것과 같은)과 반응성인 단클론성 항체 및 항원결정체를 포함하는 항체, 세포막 수용체, 착물 탄수화물 및 글리코단백질, 효소 및 호르몬 수용체를 포함하지만 이들로 제한되지는 않는다.

[0080] "재조합(recombinant)" 효소는, 재조합 DNA 기술에 의해 생성되는, 즉, 바람직한 효소를 부호화하는 외인성 DNA 구성물에 의해 형질전환된 세포로부터 생성되는 효소를 의미한다. "합성" 효소는 화학적 합성에 의해 제조되는 것이다.

[0081] "관련 폴리뉴클레오티드"라는 용어는, 폴리뉴클레오티드의 영역 또는 부분이 동일하고 폴리뉴클레오티드의 영역 또는 부분이 비상동성을 의미한다.

[0082] 본원에 사용되는 바와 같이, "환원 재집합(reductive reassortment)"은, 반복된 서열에 의해 매개되는 결실(및/또는 삽입) 이벤트를 통해 축적되는 분자 다양성의 증가를 의미한다.

[0083] 2개 이상의 폴리뉴클레오티드 사이의 서열 관계를 기술하기 위해 하기의 용어가 사용된다: "기준 서열," "비교 윈도우," "서열 동일성," "서열 동일성의 비율" 및 "실질적 동일성".

[0084] "기준 서열"은, 서열 비교에 대한 기준으로 사용되는 한정된 서열이고; 기준 서열은 예를 들어, 서열목록에 주어진 전장 cDNA 또는 유전자 서열의 분절로서 더 큰 서열의 서브세트일 수 있거나, 완전 cDNA 또는 유전자 서열을 포함할 수 있다. 일반적으로, 기준 서열은 길이상 20개 이상의 뉴클레오티드, 자주 길이상 25개 이상의 뉴클레오티드, 및 종종 길이상 50개 이상의 뉴클레오티드이다. 2개의 폴리뉴클레오티드는 각각 (1) 2개의 폴리뉴클레오티드 사이에서 유사한 서열(즉, 완전 폴리뉴클레오티드 서열의 일부분)을 포함하고, (2) 2개의 폴리뉴클레오티드 사이에서 갈라지는 서열을 추가로 포함할 수 있으므로, 2개(또는 그 이상)의 폴리뉴클레오티드 사이의 서열 비교는 대표적으로 서열 유사성의 국소 영역을 동일하고 비교하기 위해 "비교 윈도우" 상에서 2개의 폴리뉴클레오티드의 서열을 비교함으로써 수행된다.

- [0085] 본원에 사용되는 바와 같이, "반복 지수(RI)"는, 클로닝 벡터에 함유된 유사 반복 단위의 복제물의 평균 수이다.
- [0086] "제한 자리(restricted site)"라는 용어는, 제한 효소의 작용의 징후에 대해 필요하고 촉매 분해의 자리를 포함하는 인식 서열을 의미한다. 분열의 자리는 낮은 모호성 서열(즉, 제한 자리의 발생의 빈도수의 주요 결정인자를 함유하는 서열)을 포함하는 제한 자리의 일부 내에 함유되거나 함유되지 않을 수 있는 것으로 인식된다. 따라서, 많은 경우에, 적절한 제한 자리는 내부 분열 자리(예를 들어, EcoR I 자리 중의 G/AATTC in the) 또는 바로 인접한 분열 자리(예를 들어, EcoR II 자리 중의 /CCWGG)를 갖는 낮은 모호성 서열만을 함유한다. 다른 경우에, 적절한 제한 효소[예를 들어, Eco57 I 자리 또는 CTGAAG(16/14)]는 내부 분열 자리(예를 들어, Eco57 I 자리의 N.sub.16 부분에서)를 갖는 낮은 모호성 서열(예를 들어, Eco57 I 자리 중의 CTGAAG 서열)을 함유한다. 효소(예를 들어, 제한 효소)가 폴리뉴클레오티드를 "분열시키는" 것으로 여겨지는 경우, 이는 제한 효소가 폴리뉴클레오티드의 분열을 촉매하거나 촉진시키는 것을 의미하는 것으로 이해된다.
- [0087] 비제한적 양상에서, "선택성 폴리뉴클레오티드"는, 5' 종단 영역(또는 말단 영역), 중간 영역(즉 내부 또는 중심 영역) 및 3' 종단 영역(또는 말단 영역)으로 구성된다. 상기 양상에서 사용되는 바와 같이, 5' 종단 5' 폴리뉴클레오티드 말단(또는 5' 폴리뉴클레오티드 말단) 쪽에 위치하는 영역이며; 따라서 이는 부분적으로 또는 전체적으로 폴리뉴클레오티드의 5' 부분에 위치한다. 또한, 3' 종단 3' 폴리뉴클레오티드 말단(또는 3' 폴리뉴클레오티드 말단) 쪽에 위치하며; 따라서 이는 부분적으로 또는 전체적으로 폴리뉴클레오티드의 3' 부분에 위치한다. 상기 비제한적인 예시에 사용되는 바와 같이, 임의의 2개의 영역 사이에 또는 심지어는 모든 3개의 영역 중에서 서열 중첩이 있을 수 있다.
- [0088] "서열 동일성"이라는 용어는, 2개의 폴리뉴클레오티드가 비교의 윈도우 상에서 동일함(즉, 뉴클레오티드별로)를 의미한다. 용어 "서열 동일성의 비율은 비교 윈도우 상에서 2개의 최적으로 정렬된 서열을 비교하고, 동일한 핵산 염기(예를 들어, A, T, C, G, U, 또는 I)가 2개의 서열 모두에서 발생하는 위치의 수를 결정하여 매칭된 위치의 수를 수득하고, 매칭된 위치의 수를 비교의 윈도우에서의 위치의 총수(즉, 윈도우 크기)로 나누고, 결과 값에 100을 곱하여 서열 동일성의 비율을 수득함으로써 계산된다. 본원에 사용되는 바와 같이 상기 "실질적 동일성"은 폴리뉴클레오티드 서열의 특징을 나타내며, 여기에서 폴리뉴클레오티드는 25 내지 50개의 뉴클레오티드의 비교 윈도우의 기준 서열과 비교하여 80% 이상의 서열 동일성, 바람직하게는 85% 이상의 동일성, 종종 90 내지 95%의 서열 동일성, 및 가장 공통적으로 99% 이상의 서열 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 서열 동일성의 비율은 기준 서열을 비교의 윈도우 상의 기준 서열의 총 20% 이하의 결실 또는 추가를 포함할 수 있는 폴리뉴클레오티드 서열과 비교함으로써 계산된다.
- [0089] 당분야에 공지된 바와 같이, 2개의 효소 사이의 "유사성"은 하나의 효소의 아미노산 서열 및 이의 보존된 아미노산 치환체를 제2 효소의 서열과 비교함으로써 결정된다. 유사성은 당분야에 널리 공지된 방법, 예를 들어, BLAST 프로그램(Basic Local Alignment Search Tool at the National Center for Biological Information)에 의해 결정될 수 있다.
- [0090] 한 쌍의 분자(예를 들어, 항체-항원 쌍 또는 핵산 쌍)의 구성요소는 이들이 다른 비특이적 분자보다 더 큰 친화성으로 서로 결합하는 경우 서로 "특이적으로 결합하는" 것으로 여겨진다. 예를 들어, 비특이적 단백질보다 더 효율적으로 결합하는 항원에 대해 발생하는 항체는 항원에 특이적으로 결합하는 것으로 기술된다 {유사하게는, 핵산 프로브는 이것이 염기쌍 상호작용에 의해 표적과의 특이적 듀플렉스를 생성하는 경우에 핵산 표적에 특이적으로 결합하는 것으로 기술될 수 있다(상기 참조)}.
- [0091] "특이적 혼성(specific hybridization)"은, 본원에서 제1 폴리뉴클레오티드와 제2 폴리뉴클레오티드(예를 들어, 제1 폴리뉴클레오티드와 구별되지만 실질적으로 동일한 서열을 갖는 폴리뉴클레오티드) 사이에서의 하이브리드의 생성으로서 규정되며, 실질적으로 관련되지 않은 폴리뉴클레오티드 서열은 혼합물 중에서 하이브리드를 생성하지 않는다.
- [0092] "특이적 폴리뉴클레오티드"라는 용어는, 특정 말단 및 특정 핵산 서열을 갖는 폴리뉴클레오티드를 의미한다. 하나의 폴리뉴클레오티드가 제2 폴리뉴클레오티드의 일부와 동일한 서열을 갖지만 상이한 말단을 갖는 2개의 폴리뉴클레오티드는 2개의 상이한 특이적 폴리뉴클레오티드를 포함한다.
- [0093] "엄격한 혼성 조건"은 혼성이 서열들 사이의 동일성이 90% 이상, 바람직하게는 동일성이 95% 이상, 및 가장 바람직하게는 동일성이 97% 이상인 경우에 일어날 것임을 의미한다(참조: 본원에 참조로 인용된 Sambrook et al., Molecular Cloning: a Laboratory manual, 2<sup>nd</sup> Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989).



- [0094] 효소 폴리펩티드의 서열과 "실질적으로 동일한" 서열을 갖는 폴리펩티드가 또한 본 발명에 포함된다. "실질적으로 동일한" 아미노산 서열은 보존성 아미노산 치환, 예를 들어, 동일한 클래스의 또 다른 서열에 대한 하나의 아미노산의 치환(예를 들어, 또 다른 서열에 대한 이소류신, 발린, 류신 또는 메티오닌과 같은 하나의 소수성 아미노산의 치환, 또는 리신에 대한 아르기닌, 아스파르트산에 대한 글루탐산 또는 아스파라긴에 대한 글루타민)의 치환과 같은 또 다른 서열에 대한 하나의 극성 아미노산의 치환)에 의해서만 기준 서열과 상이한 서열이다.
- [0095] 또한, "실질적으로 동일한" 아미노산 서열은, 특히 이러한 치환이 분자의 활성 자리가 아닌 자리에서 일어나는 경우에 하나 이상의 비-보존성 치환, 결실 또는 삽입에 의해, 그리고 폴리펩티드가 본질적으로 이의 작용 특성을 보유한다는 전제하에, 기준 서열과 상이한 서열이다. 예를 들어, 하나 이상의 아미노산은 효소 폴리펩티드로부터 결실되어, 이의 생물학적 활성을 현저히 변경시키지 않으면서 폴리펩티드의 구조의 변형을 결과할 수 있다. 예를 들어, 효소 생체 활성을 위해 필요하지 않은 아미노- 또는 카르복시-종단 아미노산은 제거될 수 있다. 이러한 변형은 더 작은 활성 효소 폴리펩티드의 발달을 결과할 수 있다.
- [0096] 본 발명은 "실질적으로 순수한 효소"를 제공한다. "실질적으로 순수한 효소"라는 용어는, 본원에서 다른 단백질, 지질, 탄수화물, 핵산, 및 자연 발생적으로 관련하지 않은 다른 생체시료가 실질적으로 없는 폴리펩티드(예를 들어, 효소 폴리펩티드, 또는 이들의 단편)과 같은 분자를 기술하기 위해 사용된다. 예를 들어, 폴리펩티드와 같은 실질적으로 순수한 분자는 관심있는 분자의 60 건조 중량% 이상일 수 있다. 폴리펩티드의 순도는 예를 들어, 폴리아크릴아미드 겔 전기영동(예를 들어, SDS-PAGE), 칼럼 크로마토그래피(예를 들어, 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC)) 및 아미노-종단 아미노산 서열 분석을 포함하는 표준 방법을 사용하여 결정될 수 있다.
- [0097] 본원에 사용되는 바와 같이, "실질적으로 순수한"은, 대상 종이 존재하는 우세한 종(즉, 몰 기준으로, 이는 조성물 중의 임의의 다른 개별적 거대분자 종 보다 더 풍부함)임을 의미하며, 바람직하게는 실질적으로 정제된 분획은 대상 종이 존재하는 모든 거대분자 종의 약 50% 이상(몰 기준으로)을 포함하는 조성물이다. 일반적으로, 실질적으로 순수한 조성물은 조성물 중에 존재하는 모든 거대분자 종의 약 80 초과 내지 90%를 포함할 것이다. 가장 바람직하게는, 대상 종은 본질적 동종성까지 정제되며(오염물질 종은 통상적인 검출 방법에 의해 조성물 중에서 검출될 수 없음), 여기에서 조성물은 본질적으로 단일 거대분자 종으로 구성된다. 용매 종, 소분자(<500 달톤) 및 원소 이온 종은 거대분자 종으로 고려되지 않는다.
- [0098] "치료(treating)"라는 용어는, (1) 상태, 장애 또는 질환으로 고통받거나 이들에 걸리기 쉬울 수 있지만 상태, 장애 또는 질환의 임상적 또는 준임상적 증상을 경험하거나 나타내는 동물에서 발달하는 상태, 장애 또는 질환의 발생을 예방하거나 지연시키는 것; (2) 상태, 장애 또는 질환을 억제하는 것(즉, 질환의 발달, 또는 이의 하나 이상의 임상적 또는 준임상적 증상의 유지 치료의 경우에 이의 재발을 정지, 감소 또는 지연시키는 것); 및/또는 (3) 질환을 완화시키는 것(즉, 상태, 장애 또는 질환, 또는 이의 임상적 또는 준임상적 증상 중 하나 이상의 퇴행을 유발하는 것)을 포함한다. 치료하려는 환자에 대한 이점은 통계적으로 현저하거나 최소한 환자 또는 의사에게 인지될 수 있다.
- [0099] 본원에 사용되는 바와 같이, "가변성 분절(variable segment)"이라는 용어는, 랜덤, 수도랜덤 또는 규정된 케르날 서열을 포함하는 발생기 펩티드의 일부를 의미한다. "가변성 분절"은 랜덤, 수도랜덤, 또는 규정된 케르날 서열을 포함하는 발생기 펩티드의 일부를 의미한다. 가변성 분절은 변종 및 불변 잔기 위치 둘 모두를 포함할 수 있고, 변종 잔기 위치에서의 잔기 변동의 정도는 제한될 수 있으며; 두 가지 선택은 모두 의사의 재량으로 선택된다. 대표적으로, 가변성 분절은 더 길거나 항체 단편, 핵산 결합 단백질, 수용체 단백질 등과 같은 항체 부분 또는 수용체 단백질을 포함할 수도 있지만, 가변성 분절은 길이가 약 5 내지 20개(예를 들어, 8 내지 10개)의 아미노산 잔기일 수 있다.
- [0100] "변종(variant)"이라는 용어는, 야생형 항체 모 분자의 하나 이상의 염기쌍, 코돈, 인트론, 엑손, 또는 아미노산 잔기(각각)에서 변경된 본 발명의 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드를 의미한다. 변종은 예를 들어, 오류 유발 PCR, 서플링, 올리고뉴클레오티드-유도 돌연변이 유발, 어셈블리 PCR, 성적 PCR 돌연변이 유발, 생체내 돌연변이 유발, 카세트 돌연변이 유발, 반복 양상불 돌연변이 유발, 지수 양상불 돌연변이 유발, 자리-특이적 돌연변이 유발, 유전자 재조합, 포화 돌연변이 유발 및 이들의 조합과 같은 방법을 포함하는 임의의 수의 수단에 의해 생성될 수 있다. 예를 들어, 온도, pH, 삼투압, 삼투질 농도, 산화 및 전해질 농도의 하나 이상의 조건의 정상 생리학적 조건에서 야생형 항체와 비교하여 감소된 활성; 및 비정상 생리학적 조건에서의 증강된 활성을 갖는 변종 단백질이 본원에 기술된다. 변종은 또한, 야생형 항체와 비교하여 증강된 화학적 저항성 및 단백질분해 저항성의 특성을 위해 선택될 수 있다.
- [0101] 본원에 사용되는 바와 같이, "야생형(wild-type)"이라는 용어는, 폴리뉴클레오티드가 어떠한 돌연변이도 포함하

지 않음을 의미한다. "야생형 단백질", "야생형 단백질", "야생형 항체(wild-type antibody)" 또는 "야생형 항체"은 자연에서 발견되는 활성의 수준에서 활성이 되고 자연에서 발견되는 아미노산 서열을 포함할 자연으로부터 단리될 수 있는 단백질을 의미한다. 용어 "모 분자" 및 "표적 단백질"이 또한 야생형 항체를 의미한다.

[0102] "작업 샘플"에서와 같이, "작업(working)"이라는 용어는, 예를 들어, 단순히 하나가 작업인 샘플이다. 또한, "작업 분자"는 예를 들어, 하나가 작업인 분자이다.

[0103] 본 발명은, 야생형 조건에서 가역적으로 또는 비가역적으로 비활성화되지만, 야생형 조건과 동일하거나 동등한 수준에서 비정상 생리학적 조건에서 활성인 새로운 분자를 생성하기 위해 단백질을 조작하거나 진화시키는 방법에 관한 것이다. 이들 새로운 단백질은 본원에서 "미락(Mirac)" 단백질로 언급된다. 미락 단백질은 숙주 내에서 짧거나 제한된 기간 동안 활성인 신규 치료제의 개발에 특히 유용하다. 이는 주어진 투여량에서 단백질의 확장된 조작이 숙주에 유해하지만, 바람직한 치료를 수행하기 위해 제한된 활성이 필요한 경우에 특히 유용하다. 유익한 응용의 예는 고 투여량에서 국소용 또는 전신적 치료, 고 농도에서 국소 치료를 포함한다. 생리학적 조건하의 비활성화는 단백질의 투여량 및 비활성화 속도의 조합에 의해 결정될 수 있다. 상기 조건에 근거한 비활성화는 촉매 활성이 비교적 단기간 내에 실질적 네거티브 효과를 유발하는 경우에 효소 치료제를 위해 특히 중요하다.

[0104] 본 발명은 또한, 시간에 따라 가역적으로 또는 비가역적으로 활성화되거나 비활성화되거나, 체내의 특정 기관(예를 들어, 방광 또는 신장)을 포함하는 체내에서의 특정 미세 환경에 있는 경우에만 활성화되거나 비활성화된다는 점에서, 야생형 분자와 상이한 새로운 분자를 생성하기 위해 단백질을 조작하거나 진화시키는 방법에 관한 것이다.

[0105] 표적 야생형 항체

[0106] 임의의 치료용 단백질은 조건 활성 항체의 생성을 위한 표적 단백질 또는 야생형 항체로서 사용될 수 있다. 하나의 양상에서, 표적 단백질은 야생형 효소이다. 현재 사용되는 치료용 효소는 혈전의 치료에 사용되는 우로키나아제 및 스트렙토키나아제; 및 다른 약물의 흡수 및 분산을 개선시키기 위한 에주벤트로서 사용되는 히알루로니다아제를 포함한다. 하나의 양상에서, 조건 활성 항체의 생성을 위해 선택되는 야생형 항체는 야생형 항체 또는 효소와 관련된 유해 부작용을 방지하거나 최소화시키기 위해 현재 사용되는 치료용 효소일 수 있다. 대안적으로, 치료제로서 현재 사용되지 않는 효소는 조건 활성 항체의 생성을 위해 선택될 수 있다. 특정 비제한적인 예는 하기에 추가로 상세히 기술될 것이다.

[0107] 치료용 단백질은 다양한 질환 또는 의학적 상태를 치료하기 위해 단독으로 또는 다른 치료제와 함께 의학에 사용될 수 있는 단백질이다. 본 발명의 조건 활성 항체는 순환계 장애, 관절염, 다발성 경화증, 자가면역 장애, 암, 피부질환의 치료를 포함하는 하나 이상의 지시에서의 사용 및 다양한 진단방식에서의 사용에 적합할 수 있다. 단백질 및 지시에 의존하여, 조건 활성 생체 효소 단백질은 하기에 기술되는 바와 같이 비경구용, 국소용 또는 경구용 제형으로 투여될 수 있다.

[0108] 순환계 장애-혈전증 및 혈전 용해 치료

[0109] 혈전증(혈전)은 순환계 중에서 생성되는 혈액 구성 성분으로부터 유도되는 고형체로서 규정된다. 혈전증은 혈액 응고 인자, 혈소판, 적혈구, 및 혈관벽과의 상호작용을 수반하는 일련의 이벤트에 의해 생성된다. 혈소판은 신부전을 유발할 수 있는 혈소판, 피브린 및 포집된 혈액 세포의 혈관내 응집체이다. 혈류를 방해하거나 차단함으로써, 혈전증은 산소 공급의 하류 조직을 허용하지 않는다. 혈전증의 단편(색전)은 더 작은 혈관을 파괴하고 막을 수 있다. 동맥 혈전증 생성은 암 또는 응고인자 결핍, 또는 스텐트 또는 카테터와 같은 이물체와 같이 근본적인 협착증-아테롬성 동맥경화증, 저유량 상태-심장 기능, 과응고성을 포함하는 다양한 인자 중 임의의 것에 의해 침전될 수 있다. 동맥 허혈을 유도하는 혈전증은 사지 또는 조직 상처, 급성 심근경색증(AMI), 뇌졸중, 절단, 또는 장경색을 결과할 수 있다. 질병률 및 사망율의 주요 원인은 동맥 혈전(관상 동맥 혈전 및 뇌 동맥 혈전) 및 폐 혈전의 생성이다. 정맥 혈전증 생성은 외상과 같은 내피 상처로 인해 일어나고, 예를 들어, 부동성 또는 과응고성으로 인해 정제되지만, 아테롬성 동맥경화증은 인자가 아니다. 치료 방법은 기계적 혈전 절제술, 약물기계적 혈전 절제술 및 혈전용해술을 포함한다. 혈전증 치료는 혈전의 생성을 최소화시키고 제거에 도움을 주기 위해 사용된다.

[0110] 혈전증 치료는 혈소판 활성화를 억제하는 항혈소판제의 사용, 항응고 치료, 및/또는 혈전을 분해하기 위한 혈전 용해 치료를 포함한다. 항혈소판제의 예는 아스피린, 디피리다몰 및 티클로피딘을 포함한다. 항응고제의 예는 헤파린, 와파린, 히루딘, 및 활성화된 사람 단백질 C를 포함한다. 혈전 용해제의 예는 조직 플라스미노겐 활성

제 (tPA)/tPA 변종, 우로키나아제 및 스트렙토키나아제를 포함한다. 혈전 용해제는 촉매적 작용 방식을 나타낸다.

[0111] 급성 심근경색증에서 혈전 용해 치료가 널리 확립된다. 혈전 용해제의 사용은 표준 응급 치료가 된다. 효과적인 지라도, 이들 생성물은 환자의 약 50%에서만 완전한 관류를 달성하며, 부작용은 출혈의 위험(특히 뇌출혈) 및 고혈압을 포함한다. 손상된 또는 병에 걸린 혈관으로부터의 혈전의 분해는 "섬유소용해" 또는 "섬유소용해 공정"으로 불린다. 섬유소용해는 단백질 플라스미노겐을 활성화시켜서 플라스민을 생성하는 플라스미노겐 활성화제에 의한 단백질분해 공정이다. 플라스민은 혈전의 피브린 가닥을 단백질분해적으로 분해시켜서 혈전을 용해시킨다. 피브린 특정 플라스미노겐 활성화제는 조직 플라스미노겐 활성화제 또는 변종을 포함한다. 비-특이적 플라스미노겐 활성화제는 스트렙토키나아제 및 우로키나아제를 포함할 수 있다.

[0112] 특정한 공통 사용된 혈전 용해 치료는 여러 가지 이용할 수 있는 조직 플라스미노겐 활성화제(tPA) 변종 중 하나를 이용한다. 예를 들어, 사용이 사전 승인된 tPA 계 생성물 변종은 알테플라제(rt-PA), 레테플라제(r-PA) 및 테넥테플라제(TNK). tPA 변종에 대해 승인된 용도는, 예를 들어, AMI 후의 심실 기능의 개선, 울혈성 심부전의 발병의 감소 및 AMI와 관련된 사망율의 감소를 위한 급성 심근경색증, 신경학적 기능 회복을 개선하고 장애의 발생을 감소시키기 위한 어른의 허혈성 뇌졸중의 관리, 급성 폐색전증의 감퇴 및 불안정한 혈역학에 의해 동반되는 폐색전증의 감퇴를 위한 어른의 급성 거대 폐색전증의 관리를 포함한다.

[0113] 다른 공통 사용된 혈전 용해 치료제는 우로키나아제를 이용한다. 우로키나아제는 말초혈관질환의 관리에 사용되는 표준 용해제이다.

[0114] 스트렙토키나아제는 사람 플라스미노겐에 결합하고 이를 활성화시킬 수 있는 여러 가지 종의 연쇄상구균에 의해 분비되는 단백질이다. 스트렙토키나아제와 사람 플라스미노겐의 착물은 결합 분열을 통해 활성화시켜서 플라스민을 생성시킴으로써 다른 비결합 플라스미노겐을 가수분해적으로 활성화시킬 수 있다. 플라스미노겐의 일반적 활성화는 Arg561-Val562 결합의 단백질분해를 통하는 것이다. Val562의 아미노기는 Asp740과의 염-다리를 생성하며, 이는 형태 변화를 유발시켜서 활성 프로테아제 플라스민을 생성시킨다. 플라스민은 혈액 중에서 생성되어 혈전의 주된 구성 성분인 피브린을 분해시킨다.

[0115] 스트렙토키나아제는 일부 경우에 심근경색증(심근경색), 폐색전증(폐 혈전) 및 심부정맥혈전증(다리 혈전)의 효과적인 혈전 용해 약물 치료제로서 사용된다. 스트렙토키나아제는 섬유소용해제로서 불리는 일 군의 약물 치료제에 속한다. 스트렙토키나아제는 심근경색의 발병 후에 가능한 한 빨리 제공되어 심장벽의 동맥 중의 혈전을 용해시키고 심근에 대한 손상을 감소시킨다. 스트렙토키나아제는 박테리아 생성물로서, 몸체는 단백질에 대한 면역성을 축적시키는 능력을 갖는다. 따라서, 상기 생성물이 효과적이지 않을 수 있거나 알레르기 반응을 유발할 수 있으므로, 상기 생성물은 제1 투여로부터 4일 후에 다시 제공되지 않아야 하는 것으로 추천되었다. 이를 이유로, 이는 일반적으로 단지 제1 심근경색 후에 제공되고, 추가의 혈전증 이벤트가 대표적으로 조직 플라스미노겐 활성화제(TPA)로 치료된다. 스트렙토키나아제는 또한 종종 수술후 유착을 방지하기 위해 사용된다.

[0116] 스트렙토키나아제의 부작용은 출혈(중대한 그리고 사소한), 고혈압 및 호흡저하, 및 가능한 알레르기 반응을 포함한다. 그 외에, 혈소판 기능을 변경시키는 제제인 항응고제(예를 들어, 아스피린, 다른 NSAID, 디피리다몰)은 출혈의 위험을 증가시킬 수 있다.

[0117] 혈전용해제의 투여는 일반적으로 주입 또는 볼러스 정맥내 투여에 의해; 또는 기계적 주입 시스템에 의해 이루어진다. 역효과는 심각한 두개내, 위장, 후복막, 또는 심막 출혈을 포함할 수 있다. 출혈이 일어나는 경우, 투여는 즉시 중단되어야 한다.

[0118] 본 발명의 특정 실시예에서, tPA, 스트렙토키나아제 또는 우로키나아제는 표적, 또는 야생형 항체로서 선택된다.

[0119] 일 실시예에서, 본 발명의 방법은 정상 생리학적 조건보다 낮은 비정상 온도 조건에서 높은 활성; 및 정상 생리학적 조건(예를 들어, 37°C)에서 실질적 비활성화 또는 비활성화를 갖는 조건 활성 재조합 또는 합성 스트렙토키나아제 변종을 선택하기 위해 사용된다. 하나의 양상에서, 비정상 온도 조건은 실온, 예를 들어, 20~25°C이다. 또 다른 양상에서, 본 발명은 뇌졸중 또는 심근경색을 치료하는 방법을 제공하며, 혈전을 제거하기 위해 뇌졸중 또는 심근경색 환자에게 고투여량 조건 활성 스트렙토키나아제 변종을 투여하는 것을 포함하는 방법이 과도한 출혈을 방지하기 위해 스트렙토키나아제 변종의 빠른 비활성화를 허용한다.

[0120] 순환계 장애-레닌/안지오텐신

- [0121] 레닌-안지오텐신계는 혈압 및 수분(유체) 균형을 조절하는 호르몬계이다. 신장은 혈액량이 낮은 경우에 레닌을 분비시킨다. 레닌은 간으로부터 분비되는 안지오텐시노젠을 펩티드 안지오텐신 I로 가수분해하는 효소이다. 안지오텐신 I은 폐에서 내피-결합 안지오텐신 전환 효소(ACE)에 의해 대부분의 혈관활성 펩티드인 안지오텐신 II로 추가로 분열된다. 안지오텐신 II는 혈액 혈관을 수축시켜서 혈압을 증가시킨다. 그러나, 안지오텐신 II는 또한 부신피질로부터의 호르몬 알도스테론의 분비를 자극한다. 알도스테론은 신장의 세관이 나트륨 및 수분의 재흡수를 증가시키도록 한다. 이는 혈압을 또한 증가시키는 체내의 유체의 용량을 증가시킨다. 과활성 레닌-안지오텐신계는 혈관수축 및 나트륨 및 수분의 보유를 유도한다. 이들 효과는 고혈압을 유도한다. 상기 시스템에서 상이한 단계를 중단시켜서 혈압을 저하시키는 많은 약물이 있다. 이들 약물은 높은 혈압(고혈압), 심부전, 신부전, 및 당뇨병의 유해 효과를 조절하기 위한 주요 방식이다.
- [0122] 저혈량성 쇼크는 심한 혈액 및/또는 유체 손실이 심장을 산소화된 혈액에 의해 체내 세포를 적절하게 관류시킬 수 없도록 만드는 응급 질환이다. 혈액 손실은 외상, 손상 및 내부 출혈로부터 일어날 수 있다. 순환 혈액의 양은 화상, 설사, 과도한 발한 또는 구토로부터의 과도한 유체 손실로 인해 감소될 수 있다. 저혈량성 쇼크의 증상은 불안, 차갑고 축축한 피부, 착란, 신속한 호흡, 또는 무의식을 포함한다. 시험은 저혈압, 저체온 및, 및 약하거나 힘이 없을 수 있는 신속한 맥박을 포함하는 쇼크의 징후를 나타낸다. 치료는 정맥내 유체; 혈액 또는 혈액 생성물; 쇼크에 대한 치료; 및 혈압 및 심박출량을 증가시키기 위한 도파민, 도부타민, 에피네프린 및 노르에피네프린과 같은 약물 치료를 포함한다.
- [0123] 일 실시예에서, 본 발명은 저혈량성 쇼크에 걸린 환자에서 정상 생리학적 온도에서 가역적으로 비활성화되지만, 비정상적 더 낮은 온도에서 재활성화되는 조건 활성 재조합 레닌 변종을 선택하는 방법을 제공한다. 조건 활성 단백질은 저혈량성 쇼크를 치료하여 체내의 유체의 용량을 증가시키고 혈압을 증가시키기 위해 사용될 수 있다.
- [0124] 순환계 장애-레이노 현상
- [0125] 레이노 현상(RP)은, 손가락, 발가락 및 경우에 따라 다른 사지의 변색을 유발하는 혈관 경련 장애이다. 정동적 스트레스 및 감기가 현상의 고전적 유발자이다. 냉온에 노출되는 경우, 손발은 열을 손실한다. 손가락 및 발가락에 대한 혈액 공급은 정상적으로 심부 체온을 보존하는 것으로 입증되었다. 혈류는 손발의 피부 하의 소혈동맥의 좁아짐에 의해 감소된다. 스트레스는 체내에서 감기와 유사한 반응을 유발한다. 레이노에서, 정상 반응은 과장된다. 상태는 동통, 변색, 및 감기 및 저림의 느낌을 유발할 수 있다. 현상은 각각의 영역에 대한 혈액 공급을 감소시키는 혈관 경련의 결과이다. 레이노 질환(일차 레이노 현상)에서, 질환은 특발성이다. 레이노 증후군(이차 레이노)에서, 현상은 일부 다른 유발 요인에 의해 유발된다. 소-온도 기율기의 측정은 일차 형태와 이차 형태 사이를 구별하기 위한 하나의 틀이다. 일차 형태는 이차 형태로 진행할 수 있으며, 심한 경우에, 이차 형태는 손끝의 괴사 또는 괴저로 진행할 수 있다.
- [0126] 레이노 현상은 감기 또는 정동적 스트레스에 대한 반응의 과장이다. 일차 RP는 본질적으로 미세혈관 경련에 의해 매개된다. 교감신경계의 과활성화는 말초혈관의 극단적인 혈관수축을 유발하여 저산소증을 유도한다. 만성 재발의 경우는 피하 조직 및 근육의 아트로피를 결과할 수 있다. 이는 또한 드물게는 궤양 및 허혈성 괴저를 결과할 수 있다.
- [0127] 레이노 현상에 대한 통상적 치료 방법은 혈액 혈관을 확장시키고 순환을 촉진시키는 처방 약물 치료를 포함한다. 이들은 니페디핀 또는 딜티아젠프과 같은 칼슘 통로 차단제; 프라조신 또는 독사조신과 같은 혈관을 수축시키는 호르몬인 노르에피네프린의 작용에 대응하는 알파 차단제; 및 니트로글리세린 크림과 같은 혈관을 이완시키기 위한 혈관확장제, 또는 안지오텐신 II 억제제 로사탄, 실데나필, 또는 프로스타글란딘을 포함한다. 선택성 세로토닌 재흡수 억제제인 플루옥세틴 및 다른 항우울성 약물 치료제는 심리학적 스트레스 요인으로 인한 에피소드의 빈도수 및 심각도를 감소시킬 수 있다. 이들 약물은 두통, 플러싱 및 발목 부종과 같은 부작용을 유발할 수 있다. 약물은 또한 시간에 따라 효과를 상실할 수 있다.
- [0128] 피부 혈관수축 및 혈관확장의 조절은 아드레날린성 및 비-아드레날린성과 같은 변경된 교감신경 활성 및 많은 신경 조절제, 및 REDOX 신호 및 RhoA/ROCK 경로와 같은 다른 신호를 수반한다. 피부에서 혈관 평활근 세포(vSMC)의 혈관수축은 알파1 및 알파2 부신 수용체에 의해 매개되는 노르에피네프린에 의해 활성화되는 것으로 여겨진다. 알파2C-ARs는 이들이 자극에 반응하고 이들 반응의 신호가 RhoA/Rho키나아제(ROCK) 신호 경로를 수반하는 경우에 트랜스 Golgi로부터 vSMC의 세포 표면으로 상호전좌된다. 피부 동맥에서 차가운 자극은 vSMC 미토콘드리아에서 반응성 산소 종(ROS)의 즉시 생성을 결과한다. ROS는 RhoA/ROCK 경로를 통한 REDOX 신호에 수반된다. RhoA는 GTP-결합 단백질이며, 이의 역할은 vSMC에서 이행 및 세포 수축과 같은 액틴-미오신 의존성 공정의 조절이다. RP에서의 가능한 수반을 갖는 맥관 구조에서 공지된 기능을 갖는 비-아드레날린성 뉴로펩티드는 칼시



토닌 유전자 관련 펩티드(CGRP), 성분 P(SP), 뉴로펩티드 Y(NPY), 및 혈관활성 장 펩티드(VIP)를 포함한다 (Fonseca et al., 2009, "Neuronal regulators and vascular dysfunction in Raynaud's phenomenon and systemic sclerosis", Curr. Vasc. Pharmacol. 7:34-39).

[0129] RP에 대한 새로운 치료제는 알파-2c 아드레날린성 수용체 차단제, 단백질 티로신 키나아제 억제제, Rho-키나아제 억제제 및 칼시토닌 유전자 관련된 펩티드를 포함한다.

[0130] 칼시토닌 유전자 관련된 펩티드(CGRP)는 펩티드의 칼시토닌 패밀리의 구성요소이며, 2개의 형태, 즉 알파-CGRP 및 베타-CGRP로 존재한다. 알파-CGRP는 칼시토닌/CGRP 유전자의 대안적 재배열로부터 생성되는 37- 아미노산 펩티드이다. CGRP는 말초 및 중추 신경 세포에서 생성되는 대부분의 풍부 펩티드 중 하나이다. 이는 강한 펩티드 혈관확장제이고, 동통의 전달에 작용할 수 있다. 편두통은 CGRP 수준의 증가와 관련된 공통적인 신경 질환이다. CGRP는 두개내 혈액 혈관을 확장시키고 혈관통증을 전달한다. CGRP 수용체 대항물질이 편두통에 대한 치료제로서 시험되었다(Arulmani et al., 2004, "Calcitonin gene-related peptide and its role in migraine pathophysiology", Eur. J. Pharmacol. 500(1-3): 315-330). 3가지 이상의 수용체 아류형이 확인되었으며, CGRP는 G 단백질-결합 수용체를 통해 작용하며, 이 수용체의 존재 및 기능의 변화는 다양한 조직에서 펩티드의 효과를 조절한다. 수용체를 통한 CGRP의 신호 전달도입은 2개의 보조 단백질, 즉 수용체 활성 변경 단백질 1(RAMP1) 및 수용체 성분 단백질(RCP)에 의존한다(Ghatta 2004, Calcitonin gene-related peptide: understanding its role. Indian J. Pharmacol. 36(5): 277-283). 도플러 유속측정기(LDF)를 사용하여, 레이노 현상을 갖는 환자, 및 유사한 많은 연령 및 성별 매칭 대조군에 대한 3가지 혈관확장제, 즉 내피-의존성 혈관확장제 아테노신 트리포스페이트(ATP), 내피-비의존성 혈관확장제 프로스타시클린(에포프로스테놀; PGI<sub>2</sub>), 및 CGRP의 정맥내 주입의 효과의 하나의 연구는 CGRP가 레이노 환자에서 피부 혈류의 상승에 의해 얼굴 및 손의 플러싱을 유도하는 반면, 대조군에서 CGR는 단지 얼굴에서 플러싱을 유발하였음을 입증하였다. PGI<sub>2</sub>는 2가지 군 모두의 손 및 얼굴에서 혈류의 상승을 유발하였다. ATP는 환자의 손 또는 얼굴에서 혈류의 임의의 현저한 변화를 유발하지 않지만, 혈류를 대조군의 표면 까지 증가시켰다(Shawket et al., 1989, "Selective supersensitivity to Calcitonin gene-related peptide in the hands in Raynaud's phenomenon". The Lancet, 334(8676): 1354-1357). 하나의 양상에서, 야생형 항체 표적 분자는 CGRP이다.

[0131] 일 실시예에서, 본 발명은 정상 생리학 온도에서 가역적으로 비활성화되지만 손가락에서 비정상적으로 더 낮은 온도에서 재활성화되도록 레이노 증후군과 관련된 단백질의 조건 활성 재조합 단백질 변종을 선택하는 방법을 제공한다. 조건 활성 단백질은 레이노 현상을 치료하고, 낮은 순환으로 인한 손가락 기능의 손실을 예방하거나 감소시키기 위해 사용될 수 있다.

[0132] 순환계 장애- 바소프레신

[0133] 아르기닌 바소프레신{AVP, 바소프레신, 항이뇨 호르몬(ADH)}은 조직 투과성에 영향을 줌으로써 신장의 세관에서 분자의 재흡수를 조절하는 대부분의 포유동물에서 발견된 펩티드 호르몬이다. 바소프레신의 가장 중요한 역할 중 하나는 체내의 수분 보유를 조절하는 것이다. 고농도에서, 이는 적당한 혈관수축을 도입시킴으로써 혈압을 상승시킨다. 바소프레신은 증가된 소변 삼투질 농도(증가된 농도) 및 감소된 수분 배출을 결과하는 3가지 효과를 갖는다. 첫 번째로, 바소프레신은 신장에서의 집합관 세포의 수분의 투과성의 증가를 유발시켜서, 더 적은 용량의 농축된 소변의 수분 재흡수 및 배출을 허용한다(항이뇨). 이는 아쿠아포린-2 수분 통로의 삽입을 통해 집합관 세포의 선단 막 내로 일어난다. 두 번째로, 바소프레신은 요소의 집합관의 내부 수질 부분의 투과성의 증가를 유발시켜서, 수질 간질 내로의 증가된 재흡수를 허용한다. 세 번째로, 바소프레신은 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-2Cl<sup>-</sup>-공수송체의 활성을 증가시켜 헨리 고리의 굽은 오름세관에서의 나트륨 및 염화물 재흡수의 자극을 유발한다. NaCl 재흡수는 역류 증가의 공정을 수행하며, 이는 수질 집합관에서 아쿠아포린 매개 수분 재흡수에 대한 삼투기울기를 제공한다.

[0134] 신장의 집합관을 둘러싸는 고장성 간질액은 수분의 제거를 위해 높은 삼투압을 제공한다. 아쿠아포린으로 불리는 단백질로 이루어진 막관통 통로는 혈장 막에 삽입되어, 수분에 대한 이의 투과성을 크게 증가시킨다. 개방되면, 아쿠아포린 통로는 수분의 30억 분자를 각각의 세컨드를 통해 통과시킨다. 아쿠아포린-2 통로의 삽입은 바소프레신에 의한 신호화를 필요로 한다. 바소프레신은 집합관의 세포의 기저측 표면 상에서 수용체(수용체)에 결합한다. 호르몬의 결합은 세포 내에서 cAMP의 상승 수준을 자극한다. 상기 "제2 메신저"는 집합관 세포의 선단 표면에서 아쿠아포린-2 통로의 삽입에서 궁극적인 일련의 이벤트를 개시한다. 아쿠아포린은 수분 네프론 밖으로 이동시켜서, 생성 소변으로부터 역으로 혈류 내로 재흡수되는 수분의 양을 증가시킨다.

[0135] 뇌하수체로부터 바소프레신의 방출에 대한 주요 자극은 혈장의 증가된 삼투질 농도이다. 땀흘리는 것과 같이 몸

체를 탈수시키는 것은 혈액의 삼투압을 크게 증가시키고, V2 수용체에 대한 바소프레신을 아쿠아포린-2 경로로 회전시킨다. 결과적으로, 0.5 ℓ/일만큼 적은 양의 소변이 원래의 180 ℓ/일의 신여과액을 유지시킬 수 있다. 소변 중의 염의 농도는 혈액 중의 염의 농도보다 4배 만큼 높다. 혈액이 다량의 수분을 섭취하는 것으로부터 일어나는 바와 같이 너무 희석되는 경우에, 바소프레신 분비는 억제되고, 아쿠아포린-2 통로는 엔도시토시스에 의해 세포 내로 역으로 취해진다. 그 결과, 혈액의 농도의 1/4만큼 적은 염 농도를 갖는 다량의 수분 요소가 형성된다.

[0136] AVP에 대한 감소된 바소프레신 방출 또는 감소된 신장 감수성은 고나트륨혈증(증가된 혈액 나트륨 농도), 다뇨증(과다 소변 생성) 및 조갈증(갈증)을 특징으로 하는 질환인 요붕증을 유도한다.

[0137] 고 농도의 AVP 분비(부적절한 항이뇨 호르몬의 증후군, SIADH) 및 결과된 저나트륨혈증(낮은 혈액 나트륨 수준)이 뇌 질환 및 폐의 질환(소세포폐암종)에서 일어난다. 주변 수술 기간에, 수술 스트레스 및 일부 공통 사용된 약물 치료제(예를 들어, 마취제, 신토시논, 진토제)의 효과는 유사한 상태의 과다 바소프레신 분비를 유도한다. 이는 수술 동안 완전한 저나트륨혈증을 유발할 수 있다.

[0138] 바소프레신 작용물질은 다양한 질환에 치료용으로 사용되며, 이의 장기 작용 합성 유사체 테스모프레신은 낮은 바소프레신 분비를 특징으로 하는 질환에서뿐만 아니라, 출혈(폰빌레브란트병의 일부 형태) 및 극한 경우에는 어린이에 의한 유뇨증의 조절을 위해 사용된다. 테를리프레신 및 관련된 유사체는 특정 질환에서 혈관수축제로서 사용된다. 바소프레신 주입은 고투여량의 수축촉진제(예를 들어, 도파민 또는 노르에피네프린)에 반응하지 않는 패혈쇼크 환자에서 관리의 제2 라인으로서 사용되어 왔다. 바소프레신 수용체 대항물질은 바소프레신 수용체에서 작용에 간섭하는 제제이다. 이들은 저나트륨혈증의 치료에 사용될 수 있다.

[0139] 일 실시예에서, 본 발명은 정상 생리학적 삼투압에서 가역적으로 비활성화되지만 혈액 중의 비정상 삼투압에서 재활성화되도록 바소프레신 반응에 수반되는 단백질의 조건 활성 생물학적 재조합 또는 합성 단백질 변종을 선택하는 방법을 제공한다. 또 다른 실시예에서, 바소프레신 반응에 수반되는 단백질이 변종은 저나트륨혈증 질환 하에서 활성화되지만, 정상 혈청 나트륨 농도에서 비활성화된다. 하나의 양상에서, 저나트륨혈증 질환은 혈청 나트륨이 135 mEq/L 미만인 질환이다.

[0140] 안-안지오스타틴

[0141] 안지오스타틴은 여러 가지 동물 종에서의 자연 발생 단백질이다. 이는 내인성 혈관신생 억제제로서 작용한다(즉, 이는 새로운 혈액 혈관의 성장을 차단한다). 안지오스타틴은 내피 세포 증식 및 이형의 억제를 통해 종양 세포 성장 및 전이를 억제할 수 있다. 안지오스타틴은 플라스민의 38 kD 단편(이는 자체적으로 플라스미노겐의 단편임)이다. 안지오스타틴은 플라스미노겐의 크링글 1 내지 3을 포함한다. 안지오스타틴은, 예를 들어, 포스포글리세레이트 키나아제에 의한 세포의 이화물질 결합 감소 수반하는 플라스미노겐의 자기 분해 분열에 의해 생성된다. 안지오스타틴은 또한, MMP2, MMP 12 및 MMP9를 포함하는 상이한 매트릭스 메탈로프로테이나아제(MMPs) 및 세린 단백질 분해 효소(호중구 엘라스타아제, 트립신-특이적 항원(PSA))에 의해 플라스미노겐으로부터 분열될 수 있다. 생체내 안지오스타틴은 종양 성장을 억제하고, 실험적 전이를 휴면 상태로 유지시킨다. 안지오스타틴은 일차 종양 및 다른 염증 및 변성 질환을 갖는 동물에서 상승한다.

[0142] 안지오스타틴은 안지오모틴 및 내피 세포 표면 ATP 신타아제를 포함하는 많은 단백질, 및 또한 인테그린, 아넥신 II C-메트 수용체, NG2-프로테오글리칸, 조직-플라스미노겐 활성화제, 황산 콘드로이틴 글리코단백질, 및 CD26를 결합시키는 것으로 공지되어 있다. 하나의 연구는 강한 항혈관생성 활성을 갖는 TH1 시토카인인 IL-12가 안지오스타틴 활성의 매개체임을 입증한다 (Albin", J. Translational Medicine. Jan. 4, 2009, 7:5). 안지오스타틴 내피 세포 표면 상에서 ATP 신타아제를 결합시키고 억제한다. ATP 신타아제는 또한 다양한 암 세포의 표면에 발생한다. 종양 세포 표면 ATP 신타아제는 낮은 세포의 pH에서 활성이며; 종양 미세환경의 특징이다. 안지오스타틴은 산성 세포의 pH(pHe)에서 종양 세포 표면 ATP 신타아제 활성에 영향을 주는 것으로 밝혀졌다. 낮은 세포의 pH에서, 안지오스타틴은 직접 항종양제이다. 낮은 pH에서, 안지오스타틴 및 항-베타-아단위 항체는 A549 암 세포의 세포내 산성화, 및 낮은 수준의 세포의 ATP 신타아제를 갖는 종양 세포에 부재하는 직접 독성을 유도한다. 종양 세포 독성의 메커니즘은 세포 표면 ATP 신타아제의 억제로 인한 세포내 pH 자유화에 의존하는 것으로 가정된다(Chi and Pizzo, "Angiostatin is directly cytotoxic to tumor cells at low extracellular pH: a mechanism dependent on cell surface-associated ATP synthase", Cancer Res., 2006, 66(2): 875-82).

[0143] 일 실시예에서, 본 발명은 정상 생리학적 혈액 pH에서 야생형 안지오스타틴보다 덜 활성이지만 낮은 pH에서 증강된 활성을 나타내는 조건 활성 안지오스타틴 변종의 확인을 위한 방법을 제공한다. 하나의 양상에서, 낮은 pH

는 약 pH 7.2 미만이다. 특정 양상에서, 낮은 pH는 약 pH 6.7이다.

[0144] 한 가지 양상에서, 조건 활성 안지오스타틴 변종은 항암제로서 제형화되고 이용될 수 있다.

[0145] 조직 투과성-히알루로니다아제의 증강

[0146] 히알루로니다아제는 히알루론산을 분해하는 효소의 종류이다. 사이 장벽의 주 구성 성분인 히알루론산의 분해를 촉매 작용하여, 히알루로니다아제는 히알루론산의 점도를 저하시키고, 이를 통해 조직 투과성을 증가시킨다. 이는 이들의 분산 및 운반을 가속시키기 위해 약물과 함께 의약으로서 사용된다. 대부분의 공통적인 응용은 국소 마취제와 함께 사용되는 안과 수술이다. 동물 유도 히알루로니다아제는 히다아제™(PrimaPharm Inc.; Akorn me), 비트라제(ISTA Pharmaceuticals) 및 암파스타제(Amphastar Pharmaceuticals)를 포함한다. 사람 재조합 히알루로니다아제는 현재 다른 약물의 흡수를 증가시키기 위한 애주버트; 하이포더모시클리스(유체의 피하 주입); 방사선비투과성체제의 재흡수를 개선시키기 위한 피하 요로조영법에서의 부속물로서 승인되었다(Hylenex; Halozyme Therapeutics, Inc.; Baxter Healthcare Corp.). 일 실시예에서, 히알루로니다아제는 조건 활성 항체의 제조를 위해 야생형 항체(모 분자)로서 사용될 수 있다. 히알루로니다아제는 암 전이 및 아마도 혈관신생에서 역할을 할 수 있으며; 따라서 이들 효소에 대한 과노출은 유해할 수 있다. 하나의 양상에서, 조건 활성 생체 히알루로니다아제 단백질은 정상 생리학적 온도에서 비가역적으로 또는 가역적으로 비활성화되지만, 정상 생리학적 온도보다 낮은 특정 온도 범위에서 야생형 히알루로니다아제의 수준과 동일하거나 초과하는 수준에서 활성이 된다.

[0147] 자가면역 질환-조건 활성 생체 반응 조절제

[0148] 류머티스성 관절염은 관절 염증 및 및 관절의 진행성 파괴를 갖는 종창을 유도하는 비정상 면역 메커니즘을 특징으로 하는 자가면역 질환이다. RA는 또한 피부, 결합 조직 및 체내 기관에 영향을 줄 수 있다. 통상적 치료제는 비-스테로이드성 항-염증 약물(NSAIDS), COX-2 억제제, 및 메토크세이트와 같은 질환 조절 항류마티스 약물(DMARDs)을 포함한다. 통상적 치료 양상 중 어느 것도 특히 장기 사용을 위해 이상적이지 않다.

[0149] 염증 매개체를 표적하는 생체 반응 조절제는 류머티스성 관절염 및 다른 자가면역 질환의 치료에 대한 비교적 새로운 시도를 제공한다. 이러한 생체 반응 조절제는 IL-6, IL-6 수용체, TNF-알파, IL-23 및 IL-12와 같은, 다양한 염증 매개체에 대한 항체 또는 이들의 활성 부분을 포함한다.

[0150] 제1 생체 반응 조절제의 일부는 RA의 발병에 수반되는 친-염증 시토카인인 종양 괴사 인자 알파(TNF-α)를 표적하는 약물 치료제이다. 여러 가지 항-TNF-알파 약물 치료제가 현재 RA의 치료를 위해 시판되고 있다. 예를 들어, Enbrel®(이타너셉트, Amgen)이 TNF-알파 차단제이다. 이타너셉트는 사람 IgG1의 Fc 부분에 결합된 사람 75 킬로달톤(p75) 종양 괴사 인자 수용체(TNFR)의 세포외 리간드-결합 부분으로 구성된 이합체 융합 단백질이다. 이타너셉트의 Fc 성분은 IgG1의 CH1 도메인이 아닌 CH2 도메인, CH3 도메인 및 힌지 영역을 함유한다. 이타너셉트는 중국 햄스터 난소(CHO) 포유동물 세포 발현 시스템에서 생성된다. 이는 934개의 아미노산 및 약 150 킬로달톤의 명백한 분자량으로 구성된다. Enbrel®은 류머티스성 관절염, 건선 관절염, 강직성 척추염 및 판형건선을 치료하기 위해 사용된다. Enbrel®의 심각한 부작용은 결핵, 진균감염, 기회병원균으로 인한 박테리아 또는 바이러스 감염을 포함한다. 패혈증이 또한 발생한다. 림프종, 또는 다른 악성 종양이 또한 보고되었다.

[0151] 레미케이드®(인플릭스맵)은 사람 불변성 및 쥐과 가변성 영역으로 구성된 키메라 항-TNF-알파 IgGkI 단클론성 항체이다. 레미케이드는 정맥내 주사에 의해 투여되며, 류머티스성 관절염, 건선, 크론병, 궤양성 대장염 및 강직성 척추염을 치료하기 위해 사용된다. 레미케이드의 부작용은 심각한 감염 또는 패혈증, 및 드물게는 특정 T-세포 림프종을 포함한다. 다른 부작용은 간독성, 특정 심한 혈액학적 이벤트, 과민성 반응 및 특정 심한 신경학적 이벤트를 포함한다.

[0152] 다른 생체 반응 조절제는 인간화 항-인터류킨-6(IL-6) 수용체 항체를 포함한다. IL-6은 RA에서 염증, 종창 및 관절 손상의 원인이 되는 시토카인이다. 하나의 인간화 항-IL-6 수용체 항체인 악템라(토실리주맵, Roche)는 류머티스성 관절염을 갖는 어른 환자를 치료하기 위해 FDA 및 유럽 연합 집행 기관에 의해 승인되었다. 악템라는 또한 RA 및 청소년 특발성 관절염(sJIA)의 치료를 위해 일본에서 승인되었다. Phase III 연구는 단일치료제로서 악템라, 또는 MTX 또는 다른 DMARD와의 조합물에 의한 치료가 다른 치료제와 비교하여 RA의 징후 및 증상을 감소시키는 입증하였다. 악템라는 수용체에 대한 IL-6의 결합을 경쟁적으로 차단하는 인간화 항-사람 IL-6 수용체 단클론성 항체이다. 따라서, 이는 관절액 농밀화 및 판누스 생성을 유도하는 IL-6의 증식 효과를 억제한다.



악템라의 심각한 부작용은 수가지 경우의 과민증을 포함하는 심각한 감염 및 과민성 반응을 포함한다. 다른 부작용은 상기도 감염, 두통, 비인두염, 고혈압 및 증가된 ALT를 포함한다.

[0153] 또 다른 공통적인 자가면역 질환은 건선이다. 과활성 면역계는 건선 피부 플라크에서 발견된 2개의 시토카인 단백질인 높은 수준의 IL-12 및 IL-23을 유도할 수 있다. IL-12 및 IL-23은 자연 발생 킬러 세포 활성화 및 CD4+ T-세포 분화 및 활성화와 같은 염증 및 면역 반응에 수반된다.

[0154] 완만한 또는 심한 건선에 대한 하나의 치료는 IL-12 및 IL-23 시토카인의 p40 아단위에 대한 인간화 IgGIk 단클론성 항체인 스텔라라™(우스테키누맙, Centocor Ortho Biotech, Inc.)의 피하 주사를 수반한다. 스텔라라는 플라크 두께, 스케일링 및 적열 상태와 같은 건선 플라크와 관련된 특정 증상으로부터의 경감을 제공하는 것으로 입증되었다. 스텔라라에 대한 제형은 수용액 중의 L-히스티딘 및 L-히스티딘 모노히드로클로라이드 일수화물, 폴리소르베이트 80 및 수크로오스를 포함한다. 스텔라라™의 사용은 면역계에 영향을 주며, 결핵을 포함하는 감염, 및 박테리아, 균류 또는 바이러스에 의해 유발되는 감염의 기회를 증가시키고, 특정 유형의 암의 위험을 증가시킨다.

[0155] 생체 반응 조절제의 부작용은 현저하며, 환자 내로의 주사 후에 부분적으로 고 수준으로 유발되어 환자가 심각한 감염이 되거나 사망하기 쉬워진다. 이는 상기 중요한 클래스의 약물과 관련된 주된 부작용이다. 하나의 대항은 주사 후의 긴 치료 효과를 제공하기 위해 필요한 항체의 투여량으로부터 높은 초기 수준의 활성을 방지하는 것이다.

[0156] 일 실시예에서, 본 발명은 주사 후의 긴 치료 효과를 제공하기 위해 필요한 항체의 투여량으로부터 고 수준의 활성을 방지하는, 조건 활성 생체 반응 매개체, 또는 이들의 단편을 제조하는 방법을 제공한다. 본 발명의 방법은 실온과 같은 투여 조건에서 비활성이지만, 체온에서 서서히 재접히는(가역적으로 또는 비가역적으로), IL-6, IL-6 수용체, TNF-알파, IL-23 및 IL-12와 같은 염증 매개체에 대한 항체를 설계하는 데에 사용될 수 있다. 이들 항체 또는 이들의 단편은 초기 주사 시에 비활성이지만, 주사 후에 혈액에 노출될 경우에 수시간 내지 수일에 걸쳐 재접히거나 재활성화된다. 이는 더 높은 투여량, 및 감소된 부작용을 갖는 긴 반감기(또는 투여 사이의 기간)를 허용한다.

[0157] 하나의 양상에서, 본 발명은 실온과 같은 투여 조건에서 비활성이지만, 체온에서 서서히 재접히는(가역적으로 또는 비가역적으로) 염증 매개체에 대한 조건 활성 항체, 또는 이들의 단편의 제조 방법을 제공한다. 방법은 하기의 단계를 포함한다. 염증 매개체를 선택하는 단계. 하이브리도마를 통해 염증 매개체에 대한 항체를 확인하기 위해 선별하는 단계. 항-염증 매개체 항체를 인간화시키는 단계. 항-염증 매개체 항체를 진화시키고, 2가지 이상의 조건, 예를 들어, 실온 및 37°C 이상과 같은 2가지 이상의 온도 조건에서 결합을 위해 별도로 선택하고; 야생형에 비해 제1 조건에서 비활성이지만 제2 조건에서 야생형 항체 활성(결합)에 비해 증가된 활성(예를 들어, 결합)을 나타내는 돌연변이를 선택하는 단계. 중쇄 및 경쇄 변동에서 확인되는 성숙-돌연변이체는 중쇄 및 경쇄 내에서 뿐만 아니라, 중쇄 및 경쇄의 조합 관련을 통해 재조합된다. 이들 재조합된 중쇄 및 경쇄의 선별은 2가지 조건, 예를 들어, 실온 및 37°C 이상에서 반복된다. 그 외에, 재조합된 항체 또는 단편은 저장 및 생리학적 조건 하에서 활성 및 안정성에 대해 선별될 수 있다.

[0158] 대안적으로, 염증 매개체에 대한 야생형 항체는 공지된 항체 또는 이들의 변종 또는 활성 단편이다.

[0159] 하나의 양상에서, 제1 및 제2 조건은 pH, 삼투압, 삼투질 농도, 산화 및 전해질 농도의 조건으로부터 선택된다. 또 다른 양상에서, 염증 매개체는 IL-6, IL-6 수용체, TNF-알파, IL-23 및 IL-12로부터 선택된다.

[0160] 다른 양상에서, 본 발명은 실온과 같은 투여 조건에서 비활성이지만, 체온에서 서서히 재접히는(가역적으로 또는 비가역적으로) IL-6에 대한 조건 활성 항체, 또는 이들의 단편의 제조 방법을 제공한다. 방법은 하기의 단계를 포함한다. IL-6에 대한 항체에 대해 완전 사람 라이브리리를 선별하는 단계. IL-6 항체를 진화시키고, 실온 및 37°C 이상에서 분자에 대해 별도로 선택하는 단계; 야생형에 비해 실온에서 비활성이지만 야생형 항체 활성(결합)에 비해 증가된 활성(예를 들어, 결합)을 나타내는 돌연변이를 선택하는 단계. 중쇄 및 경쇄 변동에서 확인되는 성숙-돌연변이체는 중쇄 및 경쇄 내에서 뿐만 아니라 중쇄 및 경쇄의 조합 관련을 통해 재조합된다. 이들 재조합된 중쇄 및 경쇄의 선별은 실온 및 더 높은 온도에서 반복된다. 그 외에, 재조합된 항체 또는 단편은 저장 및 생리학적 조건 하에서 활성 및 안정성에 대해 시험된다.

[0161] 이에 따라 확인되고 생성된 조건 활성 항-IL-6 항체는 통상적인 생체 반응 조절제 항-IL-6 항체의 투여와 비교하여 부작용의 심각성의 감소로 이를 필요로 하는 환자에 대한 유효량의 투여에 의해 류머티스성 관절염 또는

건선과 같은 자가면역 질환을 치료하기 위한 방법에 사용될 수 있다. 이 방법의 하나의 장점은 수주 또는 수개월에 걸친 반감기 클리어런스가 뒤따르는 현재의 고 수준의 생체 반응 조절제 약물에 비해 치료 기간 동안 약물의 양의 평활함 또는 평준화를 허용한다는 점이다.

[0162] 야생형 항체를 부호화시켜서 돌연변이의 라이브러리를 생성하는 DNA를 진화시키기 위해 하나 이상의 돌연변이 유발 기술이 사용되며; 돌연변이 DNA가 발현되어 돌연변이 항체의 라이브러리를 생성하고; 라이브러리가 정상 생리학적 조건 및 하나 이상의 비정상 생리학적 조건 하에 선별 검정된다. 조건 활성 항체는 (a) 야생형 항체와 비교하여 정상 생리학적 조건에서 검정에서의 활성의 감소, 및 (b) 야생형 항체와 비교하여 비정상 생리학적 조건 하에 검정에서의 활성의 증가 둘 모두를 나타내는 단백질로부터 선택된다. 대안적으로, 조건 활성 항체는 2가지 이상의 상이한 생리학적 조건에서 가역적으로 또는 비가역적으로 활성의 변화를 나타내는 단백질로부터 선택된다.

[0163] 모 분자로부터의 진화된 분자의 생성

[0164] 야생형 조건에서의 활성과 동일하거나 더 우수하게 유지되는 비-야생형 조건에서의 활성을 갖는 야생형 조건에서의 활성의 감소를 위해 돌연변이 유발 및 개별적 돌연변이에 대한 선별의 공정을 통해 미락(Mirac) 단백질이 생성될 수 있다.

[0165] 본 발명은 자연 발생 활성으로부터 변경된 생체 활성을 갖는, 효소 활성을 갖는 폴리펩티드를 부호화하는 핵산 변종을 생성하기 위한 방법을 제공하며, 방법은, (a) (i) 상이한 뉴클레오티드를 하나 이상의 뉴클레오티드로 치환하는 것으로서, 뉴클레오티드가 자연 발생 또는 비-자연 발생 뉴클레오티드를 포함하는 것; (ii) 하나 이상의 뉴클레오티드를 결실시키는 것, (iii) 하나 이상의 뉴클레오티드를 추가하는 것, 또는 (iv) 이들의 임의의 조합에 의해 핵산을 변경시키는 것을 포함한다. 하나의 양상에서, 비-자연 발생 뉴클레오티드는 이노신을 포함한다. 또 다른 양상에서, 방법은 추가로, 변경된 효소 활성에 대해 변경된 핵산에 의해 부호화된 폴리펩티드를 검정하여 변경된 효소 활성을 갖는 폴리펩티드를 부호화하는 변경된 핵산(들)을 확인하는 것을 포함한다. 하나의 양상에서, 단계 (a)의 변경은 PCR, 오류 유발 PCR, 서플링, 올리고뉴클레오티드-유도 돌연변이 유발, 어셈블리 PCR, 성적 PCR 돌연변이 유발, 생체내 돌연변이 유발, 카세트 돌연변이 유발, 반복 양상불 돌연변이 유발, 지수 양상불 돌연변이 유발, 자리-특이적 돌연변이 유발, 유전자 재조합, 유전자 자리 포화 돌연변이 유발, 라가아제 사슬 반응, 생체 외 돌연변이 유발, 라가아제 사슬 반응, 올리고뉴클레오티드 합성, 임의의 DNA-생성 기술 및 이들의 조합에 의해 이루어진다. 또 다른 양상에서, 방법은 추가로 변경 단계 (a)의 하나 이상의 반복을 포함한다.

[0166] 본 발명은 2가지 이상의 핵산으로부터 폴리뉴클레오티드를 제조하는 방법을 추가 제공하고, 상기 방법은, (a) 2가지 이상의 핵산 사이의 동일성의 영역 및 다양성의 영역을 확인하는 단계로서, 핵산 중 하나 이상이 본 발명의 핵산을 포함하는 단계; (b) 서열에서 2가지 이상의 핵산 중 2가지 이상에 상응하는 올리고뉴클레오티드의 세트를 제공하는 단계; 및 (c) 폴리머라아제로 올리고뉴클레오티드를 연장시켜서 폴리뉴클레오티드를 제조하는 단계를 포함한다.

[0167] 돌연변이 유발의 임의의 기술은 본 발명의 여러 실시예에서 사용될 수 있다. 확률론적 또는 랜덤 돌연변이 유발은 모 분자가 돌연변이(변경 또는 변동)되어 예정되지 않은 돌연변이(들)를 갖는 자손 분자의 세트를 얻는 경우에 의해 예시된다. 따라서, 생체 외 확률론적 돌연변이 유발 반응에서, 예를 들어, 달성되는 돌연변이의 실제 특성에 대해 그리고 또한 생성되는 생성물에 대해 불확실성(무작위성)이 있기보다는, 생성이 예정되지 않은 특정의 예정된 생성물은 없다. 확률론적 돌연변이 유발은 달성되는 돌연변이(들)가 무작위하거나 예정되지 않은 경우에 오류 유발 PCR 및 확률론적 서플링과 같은 공정으로 분명해진다. 변종 형태는 제1 변종 형태의 오류 유발 PCR 또는 교정 활성이 결여된 폴리머라아제의 사용(Liao(1990) Gene 88: 107-111)과 같은 오류 유발 전사에 의해, 또는 돌연변이 유발 유전자 변형(돌연변이 유발 유전자 숙주 세포는 하기에 더 상세히 설명되며, 일반적으로 널리 공지되어 있음)에서 제1 형태의 복제에 의해 생성될 수 있다. 돌연변이 유발 유전자 변형은 불일치 복구의 기능에서 손상된 임의의 유기체에서의 임의의 돌연변이체를 포함할 수 있다. 이들은 mutS, mutT, mutH, mutL, ovrD, dcm, vsr, umuC, umuD, sbcB, recJ 등의 돌연변이 유전자 생성물을 포함한다. 손상은 유전적 돌연변이, 대립형질 대체, 작은 화합물 또는 발현된 안티센스 RNA와 같은 첨가된 시약에 의한 선택성 억제, 또는 다른 기술에 의해 달성된다. 손상은 언급된 유전자의 손상, 또는 임의의 유기체에서의 상동성 유전자의 손상일 수 있다.

[0168] 출발 분자로부터 대안적 단백질을 생성하기 위해 널리 사용되는 현재의 돌연변이 유발 방법은 올리고뉴클레오티드-유도 돌연변이 유발 기술, 오류 유발 폴리머라아제 사슬 반응(오류 유발 PCR) 및 카세트 돌연변이 유발이며,

여기에서, 최적화하려는 특정 영역은 합성적으로 돌연변이 유발된 올리고뉴클레오타이드로 대체된다. 이들 경우에, 많은 돌연변이체 자리는 원래의 서열에서 특정 자리의 둘레에서 생성된다.

- [0169] 올리고뉴클레오타이드-유도 돌연변이에서, 짧은 서열은 합성적으로 돌연변이 유발된 올리고뉴클레오타이드로 대체된다. 올리고뉴클레오타이드-유도 돌연변이 유발에서, 폴리뉴클레오타이드의 짧은 서열은 제한 효소 분해를 사용하여 폴리뉴클레오타이드로부터 제거되고, 원래의 서열로부터 다양한 염기가 변경된 합성 폴리뉴클레오타이드로 대체된다. 폴리뉴클레오타이드 서열은 화학적 돌연변이 유발에 의해 변경될 수 있다. 화학적 돌연변이원은, 예를 들어, 아황산수소나트륨, 아질산, 히드록실아민, 히드라진 또는 포름산을 포함한다. 뉴클레오타이드 전구체의 유사체인 다른 제제는 니트로소구아니딘, 5-브로모우라실, 2-아미노푸린 또는 아크리딘을 포함한다. 일반적으로, 이들 제제는 뉴클레오타이드 전구체 대신에 PCR 반응에 첨가되어 서열을 돌연변이시킨다. 프로플라빈, 아크리플라빈, 퀴나크린 등과 같은 삽입체가 또한 사용될 수 있다. 폴리뉴클레오타이드 서열의 랜덤 돌연변이 유발이 또한 X-선 또는 자외선에 의한 방사선조사에 의해 달성될 수 있다. 일반적으로, 이렇게 돌연변이 유발된 플라스미드 폴리뉴클레오타이드는 E. coli 내로 도입되고, 하이브리드 플라스미드의 푸울 또는 라이브러리로서 번식된다.
- [0170] 오류 유발 PCR은 낮은-충실도 중합 조건을 사용하여 긴 서열에 걸쳐 무작위로 저 수준의 점돌연변이를 도입시킨다. 알려지지 않은 서열의 단편의 혼합물에서, 오류 유발 PCR이 사용되어 혼합물을 돌연변이 유발할 수 있다.
- [0171] 카세트 돌연변이 유발에서, 단일 템플릿의 서열 블록은 대표적으로(부분적으로) 무작위된 서열에 의해 대체된다 {Reidhaar-Olson J F and Sauer R T: Combinatorial cassette mutagenesis as a probe of the informational content of protein sequences. Science 241(4861): 53-57, 1988}.
- [0172] 대안적으로, 비확률론적 또는 비-랜덤 돌연변이 유발의 임의의 기술이 본 발명의 여러 실시예에 사용될 수 있다. 비확률론적 돌연변이 유발은 모 분자가 돌연변이(변경 또는 변동)되어 하나 이상의 예정된 돌연변이를 갖는 자손 분자를 얻는 경우에 의해 예시된다. 일부 양에서 배경 생성물의 존재는 분자 처리가 일어나는 경우에 많은 반응에서 실제이고, 이들 배경 생성물의 존재는 예정된 생성물을 갖는 돌연변이 유발 공정의 비확률론적 성질로부터 손상되지 않은 것으로 인지된다. 자리-포화 돌연변이 유발 및 합성 결찰 재조합은 예정된 생성물(들)의 실제 화학적 구조(들)가 예정된 경우에 돌연변이 유발 기술의 일례이다.
- [0173] 자리-포화 돌연변이 유발의 하나의 방법은 본원에 참조로 인용된 미국 특허 출원 공고 2009/0130718에 기술되어 있다. 방법은 템플릿 폴리뉴클레오타이드의 코돈에 상응하는 변성 프라이머의 세트를 제공하고, 폴리머라아제 연장을 수행하여 변성 프라이머에 상응하는 서열을 함유하는 자손 폴리뉴클레오타이드를 생성시킨다. 자손 폴리뉴클레오타이드는 유도된 진화를 위해 발현되고 선별된다. 상세하게는, 이는 자손 폴리뉴클레오타이드의 세트를 생성하는 방법으로서, (a) 템플릿 폴리펩티드 서열을 부호화하는 복수의 코돈을 각각 포함하는 템플릿 폴리뉴클레오타이드의 복제물을 제공하는 단계; 및 (b) 템플릿 폴리뉴클레오타이드의 각각의 코돈에 대해, (1) 변성 프라이머의 세트를 제공하는 단계로서, 각각의 프라이머가 템플릿 폴리뉴클레오타이드의 코돈에 상응하는 변성 코돈 및 템플릿 폴리뉴클레오타이드의 코돈에 인접한 서열에 상동성인 하나 이상의 인접 서열을 포함하는 단계; (2) 프라이머를 템플릿 폴리뉴클레오타이드의 복제물로 어닐링시키는 조건을 제공하는 단계; 및 (3) 템플릿을 따라 프라이머로부터 폴리머라아제 연장 반응을 수행하여, 어닐링된 프라이머의 변성 코돈에 상응하는 서열을 각각 함유하는 자손 폴리뉴클레오타이드를 생성시켜서, 자손 폴리뉴클레오타이드의 세트를 생성하는 단계를 수행하는 단계를 포함한다.
- [0174] 자리-포화 돌연변이 유발은 핵산의 유도된 진화, 및 관심 있는 핵산 활성(들) 및/또는 특정 단백질, 특히 효소의 활성(들)과 같은 관심 있는 결과된 활성(들)에 대해 진화된 핵산을 함유하는 클론의 선별에 관한 것이다.
- [0175] 상기 기술에 의해 제공되는 돌연변이 유발된 분자는 탄수화물, 지질, 핵산 및/또는 단백질 성분을 함유하는 생체 분자를 포함하는 점돌연변이를 갖는 키메라 분자(들)를 가질 수 있으며, 이들의 특징의 비제한적 예는 항생제, 항체, 효소, 및 스테로이드 및 비-스테로이드성 호르몬을 포함한다.
- [0176] 자리 포화 돌연변이 유발은, 일반적으로, 1) 하나 이상의 조상 또는 모 생성 템플릿(들)으로부터 돌연변이 유발되어 하나 이상의 점돌연변이, 추가, 결실 및/또는 키메라화를 달성하는 분자(들)의 자손 세대(폴리뉴클레오타이드 서열로 이루어진 분자, 폴리펩티드 서열로 이루어진 분자, 및 부분적으로는 폴리뉴클레오타이드 서열 및 부분적으로는 폴리펩티드 서열로 이루어진 분자 포함)를 제조하는 단계; 2) 바람직하게는 고처리 방법을 사용하여, 관심 있는 하나 이상의 특성(효소 활성의 개선 또는 안정성 또는 신규 화학 요법 효과의 증가)에 대해 자손 세대 분자(들)를 선별하는 단계; 3) 선택적으로 모 및/또는 자손 세대 분자에 대한 카탈로그 구조 및/또는 기능적 정보를 얻는 단계; 및 4) 선택적으로 단계 1) 내지 3) 중 임의의 단계를 반복하는 단계의 방법에 관한 것이다.
- [0177] 자리 포화 돌연변이 유발에서, 모든 코돈(또는 동일한 아미노산을 부호화하는 변성 코돈의 모든 종류)이 각각의

코돈 위치에서 나타날 수 있을 정도로, 3개 이하의 인접 점돌연변이(즉, 새로운 코돈을 포함하는 상이한 염기)의 하나 이상의 세트를 각각 갖는 폴리뉴클레오타이드의 자손 세대가 (예를 들어, 모 폴리뉴클레오타이드 템플릿으로부터) 생성되며, "코돈 자리-포화 돌연변이 유발"로 불린다. 폴리뉴클레오타이드의 상기 자손 세대에 상응하고 이에 의해 부호화되어, 또한 하나 이상의 단일 아미노산 점돌연변이를 각각 갖는 자손 폴리펩티드가 생성된다. 바람직한 양상에서, 폴리펩티드를 따라 각각의 그리고 모든 아미노산 위치에서 19개의 자연 발생적으로 부호화된 폴리펩티드-생성 알파-아미노산 치환 각각에 대해 하나의 이러한 돌연변이 폴리펩티드가 생성되며, "아미노산 자리-포화 돌연변이 유발"로 불린다. 이는, 모 폴리펩티드를 따라, 각각의 모든 아미노산 위치에 대해, 원래의 아미노산을 포함하는 총 20개의 뚜렷한 자손 폴리펩티드, 또는 잠재적으로, 20개의 자연 부호화된 아미노산 대신에 또는 이외에 추가 아미노산이 사용되는 경우 21개의 뚜렷한 자손 폴리펩티드를 제공한다.

[0178] 재조합, 및 보다 구체적으로, 부분 상동성의 영역을 함유하는 폴리뉴클레오타이드 서열의 생체내 재집합의 방법에 의해 폴리펩티드를 부호화하는 폴리뉴클레오타이드를 제조하고, 폴리뉴클레오타이드를 조립하여 하나 이상의 폴리뉴클레오타이드를 생성하고 유용한 특성을 갖는 폴리펩티드(들)의 생성을 위해 폴리뉴클레오타이드를 선별하기 위한 방법을 수반하는 을 수반하는 다른 돌연변이 유발 기술이 또한 사용될 수 있다.

[0179] 다른 양상에서, 돌연변이 유발 기술은 세포의 자연 발생 특성을 이용하여, 분자를 재조합하고/하거나 상동성의 반복 또는 연속 서열 처리 영역의 서열의 복잡성 및 정도를 감소시키는 환원 공정을 중개한다.

[0180] 증강된 활성을 갖는 생체 활성 하이브리드 폴리펩티드를 부호화하는 하이브리드 폴리뉴클레오타이드를 생성하기 위한 방법을 제공하기 위해 다양한 돌연변이 유발 기술이 단독으로 또는 조합하여 사용될 수 있다. 이들 및 다른 목적을 달성하기 위해, 본 발명의 하나의 일면에 따라, 폴리뉴클레오타이드를 적합한 숙주 세포 내로 도입시키고, 하이브리드 폴리뉴클레오타이드를 생성하는 조건 하에 숙주 세포를 성장시키기 위한 방법이 제공되었다.

[0181] 키메라 유전자(Chimeric genes)는 제한 효소(들)에 의해 생성되는 양립할 수 있는 점착성 말단을 사용하여 2개의 폴리뉴클레오타이드 단편을 연결시킴으로써 제조되며, 여기에서 각각의 단편은 분리 조상(또는 모) 분자로부터 유도된다. 또 다른 예는 단일 자리-돌연변이 유발된 폴리펩티드에 대해 부호화하는 단일 자손 폴리뉴클레오타이드를 생성하기 위해 모 폴리뉴클레오타이드에서 단일 코돈 위치의 돌연변이 유발(즉, 코돈 치환, 추가, 또는 결실을 달성하기 위해)이다.

[0182] 추가로, 유전자의 하이브리드, 및 생체내 재조합의 랜덤 방법, 및 플라스미드 상에서 상동성이지만 잘린 유전자들 사이의 재조합을 발생시키기 위해 생체내 자리 특정 재조합 시스템이 이용되고 있다. 돌연변이 유발은 또한 중첩 연장 및 PCR에 의해 보고되었다.

[0183] 비-랜덤 방법이 더 많은 점돌연변이 및/또는 키메라화를 달성하기 위해 사용되고 있으며, 예를 들어, 템플릿 분자에서의 특이적 구조적 그룹(예를 들어, 특이적 단일 아미노산 위치, 또는 2개 이상의 아미노산 위치로 이루어지는 서열)에 기능적으로 기여하고, 돌연변이의 특정 그룹을 분류하고 비교하기 위해, 돌연변이의 특정 그룹 내에서 모든 분자 종을 생성하기 위해 포괄적 또는 철저한 방법이 사용되고 있다.

[0184] 하나 이상의 모 분자로부터 분자의 새로운 집단(라이브러리)를 생성하기기 위해 진화의 상기 및 다른 방법 중 임의의 방법이 본 발명에 사용될 수 있다.

[0185] 일단 형성되면, 구성물은 발표된 프로토콜에 따라 아가로오스 겔 상에서 크기 분별되고, 클로닝 벡터 내에 삽입되고, 적절한 숙주 세포 내로 형질감염될 수 있거나 아닐 수 있다.

[0186] 진화된 분자의 발현

[0187] 돌연변이체 분자의 라이브러리가 생성되면, DNA는 일상적인 분자 생물학적 기술을 사용하여 발현될 수 있다. 따라서, 단백질 발현은 다양한 공지된 방법을 사용하여 유도될 수 있다.

[0188] 예를 들어, 간략하게, 야생형 유전자는 본원에서 제시된 것과 같은 임의의 다양한 랜덤 또는 비-랜덤 방법을 사용하여 진화될 수 있다. 돌연변이 DNA 분자는 표준 분자 생물학적 기술을 사용하여 플라스미드 DNA와 같은 벡터 DNA로 분해되고 결합된다. 개별적 돌연변이체를 함유하는 벡터 DNA는 표준 프로토콜을 사용하여 박테리아 또는 다른 세포로 형질전환된다. 이는 고처리 발현 및 선별에 대해 96-웰 트레이와 같은 다중 웰 트레이의 개별적 웰에서 수행될 수 있다. 공정은 각각의 돌연변이체 분자에 대해 반복된다.

[0189] 기술된 바와 같이 선택되고 단리된 폴리뉴클레오타이드는 적합한 숙주 세포 내로 도입된다. 적합한 숙주 세포는 재조합 및/또는 환원 재집합을 수행할 수 있는 임의의 세포이다. 선택된 폴리뉴클레오타이드는 바람직하게는 이미 적절한 대조 서열을 포함하는 벡터 내에 있다. 숙주 세포는 포유동물 세포와 같은 고등 진핵세포, 또는 효모 세



포와 같은 하등 진핵세포일 수 있거나, 바람직하게는, 숙주 세포는 박테리아 세포와 같은 원핵세포일 수 있다. 숙주 세포 내로의 구성물의 도입은 칼슘 인산염 형질감염, DEAE-텍스트란 매개 형질감염, 또는 전기영동(예를 들어, Ecker and Davis, 1986, Inhibition of gene expression in plant cells by expression of antisense RNA, Proc Natl Acad Sci USA, 83: 5372-5376)에 의해 수행될 수 있다.

[0190] 사용될 수 있는 발현 벡터의 대표적인 예로는, 바이러스 입자, 바콜로바이러스, 파지, 플라스미드, 파지미드, 오스미드, 포스미드, 박테리아 인위 염색체, 바이러스 DNA(예를 들어, 백시니아, 아데노바이러스, 파울 폭스 바이러스, 가상과전병 바이러스, 및 SV40의 유도체), P1계 인위 염색체, 효모 플라스미드, 효모 인위 염색체, 및 관심 있는 특정 숙주에 대해 특이적인 임의의 다른 벡터(간균, 아스페르길루스 및 효모와 같은)이 언급될 수 있다. 따라서, 예를 들어, DNA는 폴리펩티드를 발현시키기 위한 다양한 발현 벡터 중 임의의 하나에 포함될 수 있다. 이러한 벡터는 염색체, 비-염색체 및 합성 DNA 서열을 포함한다. 많은 수의 적합한 벡터가 당업자에게 공지되어 있으며, 시판용이다. 예를 들어, 하기의 벡터가 제공된다: 박테리아: pQE 벡터(Qiagen), pBluescript 플라스미드, pNH 벡터, 람다-ZAP 벡터(Stratagene); ptrc99a, pKK223-3, pDR540, pRIT2T(Pharmacia); 진핵생물: pXT1, pSG5(Stratagene), pSVK3, pBPV, pMSG, pSVLVS40(Pharmacia). 그러나, 임의의 다른 플라스미드 또는 다른 벡터가 이들이 숙주에서 복제되거나 생존할 수 있는 한 사용될 수 있다. 낮은 복제수 또는 높은 복제수 벡터가 본 발명에 사용될 수 있다.

[0191] 발현 벡터 중의 DNA 서열은 적절한 발현 대조 서열(들)(프로모터)에 조작적으로 연결되어 RNA 합성을 유도한다. 특정 명칭의 박테리아 프로모터는 lacZ, T3, T7, gpt, 람다 PR, PL 및 trp를 포함한다. 진핵생물 프로모터는 즉각 초기 CMV, HSV 티미딘 키나아제, 초기 및 후기 SV40, 레트로바이러스로부터의 LTR, 및 마우스 메탈로티오네인-1을 포함한다. 적절한 벡터 및 프로모터의 선택은 당업자의 수준 내에 있다. 발현 벡터는 또한 번역 개시를 위한 리보솜 결합 자리 및 전사 종결자를 포함한다. 벡터는 또한 발현을 증식시키기 위한 적절한 서열을 포함할 수 있다. 프로모터 영역은 클로람페니콜 트랜스퍼라아제(CAT) 벡터 또는 선택성 마커를 갖는 다른 벡터를 사용하여 임의의 바람직한 유전자로부터 선택될 수 있다. 그 외에, 발현 벡터는 바람직하게는 진핵세포 배양에 대한 디히드로폴산 환원 효소 또는 네오마이신 내성 또는 E. coli에서 테트라시클린 또는 암피실린 내성과 같은 형질전환된 숙주 세포의 선택을 위한 표현형 특성을 제공하기 위한 하나 이상의 선택성 마커 유전자를 함유한다.

[0192] 따라서, 본 발명의 다른 양상에서, 신규 폴리뉴클레오티드 환원 재조합의 공정에 의해 생성될 수 있다. 방법은, 연속 서열(원래의 부호화 서열)을 함유하는 구성물의 생성, 적절한 벡터 내로 이들의 삽입, 및 적절한 숙주 세포 내로 이들의 후속 도입을 포함한다. 개별적 분자 동일성의 재조합은 상동성의 구성물 처리 영역 중의 연속 서열 사이에서, 또는 유사 반복 단위 사이에서 조합 공정에 의해 일어난다. 재조합 공정은 반복된 서열의 복잡성 및 정도를 재조합 및/또는 감소시키고, 신규 분자 중의 생성을 결과한다. 재조합의 속도를 증가시키기 위해 다양한 처리가 적용될 수 있다. 이들은 자외선 또는 DNA 손상 화학물질에 의한 처리 및/또는 증가된 수준의 "유전적 불안정성"을 나타내는 숙주 세포주의 사용을 포함할 수 있다. 따라서, 재조합 공정은 유사 반복 서열의 상동성 재조합 또는 자연 발생 특성을 수반하여 이들의 고유 진화를 유도할 수 있다.

[0193] 한 가지 양상에서, 숙주 유기체 또는 세포는 그람음성세균, 그람양성세균 또는 진핵생물을 포함한다. 본 발명의 다른 양상에서, 그람음성세균은 대장균 또는 슈도모나스 플루오르센스를 포함한다. 본 발명의 다른 양상에서, 그람양성세균은, 스트렙토미세스 디베르사, 락토바실러스 가세리, 락토코쿠스 락티스, 락토코쿠스 크레모리스, 또는 간균 서브틸리스를 포함한다. 본 발명의 또 다른 양상에서, 진핵생물은, 사카로미세스 세레비시아에, 쉬조사카로미세스 폼베, 피키아 파스토리스, 클루베로미세스 락티스, 한세놀라 폴리모르파 또는 아스페르길루스 니체르를 포함한다. 적절한 숙주의 대표적인 예로, E. coli, 스트렙토미세스, 살모넬라 트리피무린과 같은 박테리아 세포; 효모와 같은 진균 세포; 드로소필라 S2 및 스포도테라 Sf9와 같은 곤충 세포; CHO, COS 또는 보우스 흑색종과 같은 동물 세포; 아데노바이러스; 및 식물 세포가 언급될 수 있다. 적절한 숙주의 선택은 본원의 설명으로부터 당업자의 범위 내에 있는 것으로 간주된다.

[0194] 재조합 단백질을 발현시키기 위해 사용될 수 있는 다양한 포유동물 세포 배양 시스템과 특히 관련하여, 포유동물 발현계의 예는, "SV40-transformed simian cell support the replication of early SV40 mutants"(Gluzman, 1981)에 기술된 원숭이 신장 섬유아세포의 COS-7 라인, 및 양립할 수 있는 벡터를 발현시킬 수 있는 다른 세포주, 예를 들어, C127, 3T3, CHO, HeLa 및 BHK 세포주를 포함한다. 포유동물 발현 벡터는 복제의 기원, 적합한 프로모터, 및 인핸서, 및 또한 임의의 필요한 리보솜 결합 자리, 폴리아데닐레화 자리, 스플라이스 공여체 및 수용체 자리, 전사 종단 서열, 및 5' 측면 비전사 서열을 포함할 것이다. SV40 스플라이스 및

폴리아데닐레화 자리로부터 유도되는 DNA 서열이 사용되어 필요한 비전사 유전적 요소를 제공할 수 있다.

- [0195] 세포는 번식되고, "환원 재집합"이 수행된다. 환원 재집합 공정은 바람직한 경우 DNA 손상의 도입에 의해 자극될 수 있다. 생체내 재집합은 박테리아에서 일반적으로 "RecA-의존성" 현상으로 관찰되는 "재조합"으로서 총괄적으로 언급되는 "분자간" 공정에 초점을 둔다. 본 발명은 서열을 재조합 및 재집합하기 위한 숙주 세포의 재조합 공정, 결실에 의해 세포에서 유사 반복 서열의 복잡성을 감소시키기 위한 환원성 공정을 대개하기 위한 세포의 능력에 의존할 수 있다. "환원 재집합"의 상기 공정은 "분자내" RecA-비의존성 공정에 의해 일어난다. 말단은 가능한 조합 내로의 분자의 재집합을 결과한다.
- [0196] 관심 있는 폴리뉴클레오티드를 함유하는 숙주 세포는 프로모터를 활성화하거나, 형질전환체를 선택하거나 유전자를 증식시키기 위해 적절하게 변형된 통상적인 영양 배지에서 배양될 수 있다. 온도, pH 등과 같은 배양 조건은 발현을 위해 선택된 숙주 세포와 함께 이전에 사용된 것이며, 당업자에게 명백해질 것이다.
- [0197] 단백질 발현은 다양한 공지된 방법에 의해 유도될 수 있으며, 많은 유전적 시스템이 단백질 발현의 유도를 위해 발표되어 있다. 예를 들어, 적절한 시스템을 사용하여, 유도제의 추가는 단백질 발현을 유도할 것이다. 세포는 원심분리에 의해 펠렛화되고, 상등액이 제거된다. 주변세포질 단백질은 DNase, RNase 및 리소자임에 의해 세포를 인큐베이팅시켜 부화될 수 있다. 원심분리 후, 새로운 단백질을 함유하는 상등액은 새로운 다중 웰 트레이로 전달되고, 검정 전에 저장된다.
- [0198] 세포는 대표적으로 원심분리에 의해 수확되고, 물리적 또는 화학적 수단에 의해 차단되며, 생성된 미정제 추출물은 추가의 정제를 위해 유지된다. 단백질의 발현을 위해 사용되는 미생물 세포는 동결-해동 사이클링, 초음파 분해, 기계적 분열, 또는 세포 용해제의 사용을 포함하는 임의의 편리한 방법에 의해 차단될 수 있다. 이러한 방법은 당업자에게 널리 공지되어 있다. 발현된 폴리펩티드 또는 이들의 단편은, 황산암모늄 또는 에탄올 침전, 산 추출, 음이온 또는 양이온 교환 크로마토그래피, 포스포셀룰로오스 크로마토그래피, 소수성 상호작용 크로마토그래피, 친화성 크로마토그래피, 하이드록시아파타이트 크로마토그래피, 및 렉틴 크로마토그래피를 포함하는 방법에 의해 재조합 세포 배양액으로부터 회수되고 정제될 수 있다. 단백질 리폴딩 단계는 필요에 따라 폴리펩티드의 배열을 완결시키는 데에 사용될 수 있다. 바람직한 경우, 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC)가 최종 정제 단계를 위해 사용될 수 있다.
- [0199] 바람직한 활성을 갖는 것으로 확인된 클론은 증강된 활성을 갖는 효소를 부호화하는 폴리뉴클레오티드 서열을 확인하기 위해 서열화될 수 있다.
- [0200] 이러한 라이브러리로부터 확인된 폴리펩티드는, 치료, 진단, 연구 및 관련된 용도를 위해 사용될 수 있고/있거나 서플링 및/또는 선택의 하나 이상의 추가의 사이클로 처리될 수 있다. 본 발명은 길이가 10개 이상의 아미노산이인 조건 활성 항체의 단편을 제공하며, 단편은 활성을 갖는다.
- [0201] 본 발명은 효소 활성을 갖는 코돈-최적화 폴리펩티드 또는 이들의 단편을 제공하고, 코돈 사용은 특정 유기체 또는 세포에 대해 최적화된다. 문헌 (Narum et al., "Codon optimization of gene fragments encoding Plasmodium falciparum merzoite proteins enhances DNA vaccine protein expression and immunogenicity in mice". Infect. Immun. 2001 December, 69(12): 7250-3)에 마우스 시스템에서 코돈-최적화가 기술되어 있다. 문헌 (Outchkourov et al., "Optimization of the expression of Equistatin in Pichia pastoris, protein expression and purification", Protein Expr. Purif. 2002 February; 24(1): 18-24)에는 효모 시스템에서의 코돈-최적화가 기술되어 있다. 문헌 (Feng et al., "High level expression and mutagenesis of recombinant human phosphatidylcholine transfer protein using a synthetic gene: evidence for a C-terminal membrane binding domain" Biochemistry 2000 Dec. 19, 39(50): 15399-409)에는 E. coli에서의 코돈-최적화가 기술되어 있다. 문헌 (Humphreys et al., "High-level periplasmic expression in Escherichia coli using a eukaryotic signal peptide: importance of codon usage at the 5' end of the coding sequence", Protein Expr. Purif. 2000 Nov. 20(2):252-64)에는 임의의 코돈 사용이 E. coli에서 분비에 영향을 주는지 기술되어 있다.
- [0202] 조건 활성 항체의 진화는 편리한 고처리 선별 및 선택 공정의 이용성에 의해 도움을 줄 수 있다.
- [0203] 확인되면, 본 발명의 폴리펩티드 및 펩티드는 합성이거나, 재조합적으로 생성된 폴리펩티드일 수 있다. 펩티드 및 단백질은 생체 외 또는 생체내에서 재조합적으로 발현될 수 있다. 본 발명의 펩티드 및 폴리펩티드는 당분야에 공지된 임의의 방법에 의해 제조되고 단리될 수 있다. 발명의 폴리펩티드 및 펩티드는 또한 전체적으로 또는 부분적으로, 당분야에 널리 공지된 화학적 방법을 사용하여 합성될 수 있다 {참조예: Caruthers (1980) "New

chemical methods for synthesizing polynucleotides", Nucleic Acids Res. Symp. Ser. 215-223; Horn (1980), "Synthesis of oligonucleotides on cellulose. Part II: design and synthetic strategy to the synthesis of 22 oligodeoxynucleotides coding for Gastric Inhibitory Polypeptide (GIP)1", Nucleic Acids Res. Symp. Ser. 225-232; Banga, A. K., Therapeutic Peptides and Proteins, Formulation, Processing and Delivery Systems (1995) Technomic Publishing Co., Lancaster, Pa}. 예를 들어, 펩티드 합성은 다양한 고체 상 기술을 사용하여 수행될 수 있고 {참조예: Roberge(1995) "A strategy for a convergent synthesis of N-linked glycopeptides on a solid support", Science 269:202; Merrifield (1997) "Concept and early development of solid-phase peptide synthesis", Methods Enzymol. 289:3-13}, 자동화된 합성은, 예를 들어, 제조업자에 의해 제공되는 지시에 따라 ABI 43 IA 펩티드 합성기(Perkin Elmer)를 사용하여 달성될 수 있다.

[0204]

본 발명의 펩티드 및 폴리펩티드는 또한 글리코실화될 수 있다. 글리코실화는 화학적으로 또는 세포 생합성 메커니즘에 의해 번역 후에 첨가될 수 있으며, 후자는 공지된 글리코실화 모티브의 사용을 통함시키며, 이는 서열에 대해 자생적이거나, 펩티드로서 첨가되거나 핵산 부호화 서열 중에 첨가될 수 있다. 글리코실화는 O-결합되거나 N-결합될 수 있다.

[0205]

상기 규정된 바와 같이 본 발명의 펩티드 및 폴리펩티드는 "미메틱" 및 "펩티도미메틱" 형태를 모두 포함한다. "미메틱" 및 "펩티도미메틱"이라는 용어는, 본 발명의 폴리펩티드의 실질적으로 동일한 구조 및/또는 기능적 특징을 갖는 합성 화합물을 의미한다. 미메틱은 전체적으로 아미노산의 합성의 비-자연 발생 유사체로 구성될 수 있거나, 부분적으로 자연 발생 펩티드 아미노산 및 부분적으로 아미노산의 비-자연 발생 유사체의 키메라 분자이다. 미메틱은 또한 치환이 또한 미메틱의 구조 및/또는 활성을 실질적으로 변경시키지 않는 한, 임의의 양의 자연 발생 아미노산 보존성 치환을 통함시킬 수 있다. 보존성 변종인 본 발명의 폴리펩티드와 마찬가지로, 일상적 실험은 미메틱이 본 발명의 범위 내에 있으며, 즉 그 구조 및/또는 기능이 실질적으로 변경되지 않음을 결정할 것이다.

[0206]

본 발명의 폴리펩티드 미메틱 조성물은 비-자연 발생 구조적 성분의 임의의 조합을 함유할 수 있다. 대안적 양상에서, 본 발명의 미메틱 조성물은 하기 3가지 그룹 중 하나 또는 전부를 포함한다: a) 자연 발생 아미드 결합("펩티드 결합") 연결과는 상이한 잔기 연결 그룹; b) 자연 발생 아미노산 잔기를 대신하는 비-자연 발생 잔기; 또는 c) 이차 구조적 모방을 유도하는 잔기, 즉 이차 구조, 예를 들어, 베타 터언, 감마 터언, 베타 시트, 알파 헬릭스 배열 등을 유도하거나 안정화시키기 위한 잔기. 예를 들어, 본 발명의 폴리펩티드는 이의 잔기의 전부 또는 일부가 자연 발생 펩티드 결합과 상이한 화학적 수단에 의해 결합되는 경우 미메틱을 특징으로 할 수 있다. 개별적 펩티도미메틱 잔기는, 예를 들어, 글루타알데히드, N-히드록시숙신이미드 에스테르, 이작용성 말레이미드, N,N'-디시클로헥실카르보디이미드(DCC) 또는 N,N'-디이소프로필카르보디이미드(DIC)와 같은 펩티드 결합, 다른 화학적 결합 또는 결합 수단에 의해 결합될 수 있다. 통상적 아미드 결합("펩티드 결합") 연결에 대한 대안일 수 있는 결합 그룹은 예를 들어, 케모메틸렌{예를 들어,  $--C(.dbd.O)--NH--$ 에 대한  $--C(.dbd.O)--CH.sub.2--$ }, 아미노메틸렌( $CH.sub.2-NH$ ), 에틸렌, 올레핀( $CH.dbd.CH$ ), 에테르( $CH.sub.2-O$ ), 티오에테르( $CH.sub.2-S$ ), 테트라졸( $CN.sub.4--$ ), 티아졸, 레트로아미드, 티오아미드 또는 에스테르를 포함한다 (참조예: Spatola(1983) in Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides and Proteins, Vol. 7, pp 267-357, "Peptide backbone Modification," Marcell Dekker, N. Y.).

[0207]

본 발명의 폴리펩티드는 또한 자연 발생 아미노산 잔기 대신에 비-자연 발생 잔기의 전부 또는 일부를 함유함으로써 미메틱을 특징으로 할 수 있다. 비-자연 발생 잔기는 과학 및 특허 문헌에 잘 기술되어 있으며; 자연 발생 아미노산 잔기의 미메틱 및 가이드라인으로 유용한 여러 가지 대표적인 비-자연 발생 조성물이 아래 기술되어 있다. 방향족 아미노산의 미메틱은, 예를 들어, D- 또는 L-나프틸알라닌; D- 또는 L-페닐글리신; D- 또는 L-2 티에네일알라닌; D- 또는 L- 1-, 2-, 3- 또는 4-피레네일알라닌; D- 또는 L-3 티에네일알라닌; D- 또는 L-(2-피리디닐)-알라닌; D- 또는 L-(3-피리디닐)-알라닌; D- 또는 L-(2-피라지닐)-알라닌; D- 또는 L-(4-이소프로필)-페닐글리신; D-(트리플루오로메틸)-페닐글리신; D-(트리플루오로메틸)-페닐알라닌; D-p-플루오로-페닐알라닌; D- 또는 L-p- 비페닐페닐알라닌; D- 또는 L-p-메톡시-비페닐페닐알라닌; D-또는 L-2-인돌 (알킬)알라닌; 및 D- 또는 L-알킬라닌에 의해 치환시킴으로써 생성될 수 있으며, 여기에서 알킬은 치환 또는 비치환 메틸, 에틸, 프로필, 헥실, 부틸, 펜틸, 이소프로필, 이소-부틸, 이차-이소틸, 이소-펜틸, 또는 비-산성 아미노산일 수 있다. 비-자연 발생 아미노산의 방향족 고리는, 예를 들어, 티아졸릴, 티오펜릴, 피라졸릴, 벤즈이미다졸릴, 나프틸, 푸라닐, 피롤릴 및 피리딜 방향족 고리를 포함한다.

[0208]

산성 아미노산의 미메틱은, 예를 들어, 음전하; (포스포노)알라닌; 황산화된 트레오닌을 유지하면서 비-카르복시레이트 아미노산에 의한 치환에 의해 생성될 수 있다. 카르복시 사이드 그룹(예를 들어, 아스파르틸 또는 글



루타밀)이 또한 예를 들어, 1-시클로헥실-3(2-모르폴리닐-(4-에틸) 카르보다이미드 또는 1-에틸-3(4-아조니아-4,4-디메틸펜틸) 카르보다이미드와 같은 카르보다이미드 ( $R'-N-C-N-R'$ )와의 반응에 의해 선택적으로 변형될 수 있다. 아스파르틸 또는 글루타밀은 또한 암모늄 이온과의 반응에 의해 아스파라길 및 글루타미닐 잔기로 전환될 수 있다. 염기성 아미노산의 미메틱은, 예를 들어, (리신 및 아르기닌 이외에) 아미노산 오르니틴, 시트룰린, 또는 (구아니딘)-아세트산 또는 (구아니딘)알킬-아세트산에 의한 치환에 의해 생성될 수 있으며, 여기에서 알킬은 상기 규정되어 있다. 아스파라긴 또는 글루타민에 대해 니트릴 유도체(예를 들어, COOH 대신에 CN-잔기를 함유함)이 치환될 수 있다. 아스파라길 및 글루타미닐 잔기는 상응하는 아스파르틸 또는 글루타밀 잔기로 탈아노화될 수 있다. 아르기닌 잔기 미메틱은 예를 들어, 바람직하게는 알칼리성 조건 하에서, 아르기닐을 예를 들어, 페닐닐글리콜살, 2,3-부탄디온, 1,2-시클로-헥산디온 또는 닌히드린을 포함하는 하나 이상의 통상적인 시약과 반응시킴으로써 생성될 수 있다. 티로신 잔기 미메틱은 티로실을, 예를 들어, 방향족 디아조늄 화합물 또는 테트라니트로메탄과 반응시킴으로써 생성될 수 있다. N-아세틸이미다졸 및 테트라니트로메탄은 각각 O-아세틸 트리오실 중 및 3-니트로 유도체를 생성하기 위해 사용될 수 있다. 시스테인 잔기 미메틱은 시스테이닐 잔기를 예를 들어, 2-클로로아세트산 또는 클로로아세트아미드와 같은 알파-할로아세테이트 및 상응하는 아민과 반응시킴으로써 생성되어 카르복시메틸 또는 카르복시아미도메틸 유도체를 제공할 수 있다. 시스테인 잔기 미메틱은 또한 시스테이닐 잔기를 예를 들어, 브로모-트리플루오로아세톤, 알파-브로모-베타-(5-이미다졸)프로피온산; 클로로아세틸 포스페이트, N-알킬말레이미드, 3-니트로-2-피리딜 이황화물; 메틸 2-피리딜 이황화물; p-클로로머큐리벤조에이트; 2-클로로머큐리-4-니트로페놀; 또는 클로로-7-니트로벤조-옥사-1,3-디아졸과 반응시킴으로써 생성될 수 있다. 리신 미메틱은 리시닐을 예를 들어, 숙신산 또는 다른 카르복시산 무수물과 반응시킴으로써 생성될 수 있다 (아미노 종단 잔기는 변경될 수 있다). 리신 및 다른 알파-아미노 함유 잔기 미메틱은 또한 메틸 피롤리니미데이트와 같은 이미도에스테르, 피리독살 인산염, 피리독살, 클로로보로하이드라이드, 트리니트로-벤젠술포산, O-메틸이소우레아, 2,4-펜탄디온과의 반응, 및 글리콜레이트와의 트랜스아미다다제-촉매 반응에 의해 생성될 수 있다. 메티오닌의 미메틱은 예를 들어, 메티오닌 술포시드와의 반응에 의해 생성될 수 있다. 프롤린의 미메틱은 예를 들어, 피페콜산, 티아졸리딘 카르복시산, 3- 또는 4-히드록시프롤린, 데히드로프롤린, 3- 또는 4-메틸프롤린, 또는 3,3-디메틸프롤린을 포함한다. 히스티딘 잔기 미메틱은 히스티딜을 예를 들어, 디에틸파라카아보네이트 또는 파라-브로모페나실 브로마이드와 반응시킴으로써 생성될 수 있다. 다른 미메틱은 예를 들어, 프롤린 및 리신의 히드록실화; 세틸 또는 트레오닐 잔기의 히드록실기의 포스포릴화; 리신, 아르기닌 및 히스티딘의 알파-아미노기의 메틸화; N-종단 아민의 아세틸화; 주 사슬 아미드 잔기의 메틸화 또는 N-메틸 아미노산에 의한 치환; 또는 C-종단 카르복시기의 아미드화에 의해 생성되는 것을 포함한다.

[0209] 본 발명의 폴리펩티드의 잔기, 예를 들어, 아미노산은 또한 반대 키랄리티의 아미노산(또는 펩티도미메틱 잔기)에 의해 치환될 수 있다. 따라서, L-배열에서 자연 발생적으로 생성되는 임의의 아미노산(이는 또한 화학적 실재물의 구조에 의존하여 R 또는 S로서 언급될 수 있음)은 D-아미노산으로서 언급되는 반대 키랄리티의 동일한 화학적 구조적 형태 또는 펩티도미메틱의 아미노산으로 치환될 수 있지만, 또한 R- 또는 S-형으로서 언급될 수 있다.

[0210] 본 발명은 또한 번역 후 공정(post-translational processing)과 같은 자연 발생 공정(예를 들어, 포스포릴화, 아실화 등)에 의해 또는 화학적 변형 기술에 의해 본 발명의 폴리펩티드를 변형시키기 위한 방법을 제공한다. 변형은 펩티드 골격, 아미노산 결사슬 및 아미노 또는 카르복시 종단을 포함하여 폴리펩티드 중 어디에서나 일어날 수 있다. 동일한 유형의 변형이 소정의 폴리펩티드 내의 여러 개의 자리에서 동일한 또는 변동 정도로 존재할 수 있음이 인지될 것이다. 또한, 소정의 폴리펩티드는 많은 유형의 변형을 가질 수 있다. 변형은, 아세틸화, 아실화, PEG화, ADP-리보실화, 아미드화, 플라빈의 공유결합, 헤모 잔기의 공유결합, 뉴클레오티드 또는 뉴클레오티드 유도체의 공유결합, 지질 또는 지질 유도체의 공유결합, 포스파티딜리노시톨의 공유결합, 교차결합 고리화, 이황화물 결합 생성, 탈메틸화, 공유 교차결합의 생성, 시스테인의 생성, 피로글루타메이트의 생성, 포르밀화, 감마-카르복시화, 글리코실화, GPI 앵커 생성, 히드록실화, 요오드화, 메틸화, 미리스토일화, 산화, 페길화, 단백질분해 공정, 포스포릴화, 페닐화, 라세미화, 셀레노일화, 황산화, 및 아르기닐화와 같은 단백질에 대한 아미노산의 트랜스퍼-RNA 매개 첨가를 포함한다 {참조예: Creighton, T. E., *Proteins Structure and Molecular Properties* 2nd Ed., W. H. Freeman and Company, New York (1993); *Posttranslational Covalent Modification of Proteins*, B. C. Johnson, Ed., Academic Press, New York, pp. 1-12 (1983)}.

[0211] 고체상 화학적 펩티드 합성 방법이 또한 본 발명의 폴리펩티드 또는 단편을 합성시키기 위해 사용될 수 있다. 이러한 방법은 1960년 초부터 당분야에 공지되어 있으며 (Merrifield, R. B., "Solid-phase synthesis.I. The synthesis of a tetrapeptide", *J. Am. Chem. Soc.*, 85:2149-2154, 1963) (Stewart, J. M. and Young, J. D., *Solid Phase Peptide Synthesis*, 2nd Ed., Pierce Chemical Co., Rockford, Ill., pp. 11-12), 최근 시판용

실험실 펩티드 설계 및 합성 키트(Cambridge Research Biochemicals)에 사용된다. 이러한 시판용 실험실 키트는 일반적으로 문헌(H. M. Geysen et al., "Use of peptide synthesis to probe viral antigens for epitopes to a resolution of a single amino acid," Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 81:3998 (1984))의 기술을 이용하였으며, 단일 플레이트에 모두 연결된 많은 "로드" 또는 "핀"의 팁 상에서 펩티드를 합성시키는 것을 제공한다. 이러한 시스템이 이용되는 경우에, 로드 또는 핀의 플레이트는 핀 또는 로드의 팁에 적절한 아미노산을 부착 또는 고정하기 위한 용액을 함유하는, 상응하는 웰 또는 저장기의 제2 플레이트 내로 변환되고 삽입된다. 이러한 고정 단계, 즉, 적절한 용액 내로 로드 및 로드를 변환하고 삽입하는 것을 반복함으로써, 아미노산은 바람직한 펩티드 내로 축적된다. 또한, 많은 이용할 수 있는 Fmoc 펩티드 합성 시스템이 이용될 수 있다. 예를 들어, 폴리펩티드 또는 단편의 어셈블리는 Applied Biosystems, Inc. Model 431A™ 자동화 펩티드 합성기를 사용하여 고정 지지체 상에서 수행될 수 있다. 이러한 장치는 직접 합성에 의해 또는 다른 공지된 기술을 사용하여 커플링될 수 있는 일련의 단편의 합성에 의해 본 발명의 펩티드에 대한 쉬운 접근을 제공한다.

[0212] 합성 폴리펩티드 또는 이들의 단편은, 황산암모늄 또는 에탄올 침전, 산 추출, 음이온 또는 양이온 교환 크로마토그래피, 포스포셀룰로오스 크로마토그래피, 소수성 상호작용 크로마토그래피, 친화성 크로마토그래피, 하이드록시아파타이트 크로마토그래피 및 액틴 크로마토그래피를 포함하는 공지된 방법에 의해 회수되고 정제될 수 있다. 필요에 따라, 폴리펩티드의 배열을 완결시키기 위해 단백질 리폴딩 단계가 사용될 수 있다. 바람직한 경우, 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC)가 최종 정제 단계를 위해 사용될 수 있다.

[0213] 본 발명은 단백질 변종 중 하나 이상을 포함하는 조건 활성 단백질 변종 제조물 또는 제형을 제공하며, 제조물은 액체이거나 건조할 수 있다. 단백질 제형은 선택적으로 완충제, 보조인자, 제2 또는 추가의 단백질, 또는 하나 이상의 부형제를 포함한다. 하나의 양상에서, 제형은 비정상 또는 비-생리학적 조건 하에서 활성이지만, 예를 들어, 온도, pH, 또는 삼투압, 산화 또는 삼투질 농도의 정상 생리학적 조건 하에서 덜 활성이거나 비활성인 치료용의 조건 활성 항체로서 이용된다.

[0214] 재조합 또는 합성의 조건 활성 항체를 위해 표준 정제 기술이 사용될 수 있다.

[0215] 가역 또는 비가역성 돌연변이체를 확인하기 위한 돌연변이체의 선별

[0216] 바람직한 분자를 확인하는 것은 대부분 허용 조건 및 야생형 조건에서 단백질 활성을 측정함으로써 직접 수행된다. 활성의 가장 큰 비(허용/야생형)를 갖는 돌연변이체가 선택될 수 있으며, 점돌연변이의 과돌연변이가 표준 방법을 사용하여 개별적 돌연변이를 조합시킴으로써 생성된다. 조합된 과돌연변이 항체 라이브러리는 허용 조건과 야생형 조건 사이에서 가장 큰 미분적 활성을 나타내는 단백질에 대해 선별된다.

[0217] 상등액의 활성은 다양한 방법을 사용하여, 예를 들어, 형광 검정과 같은 고처리 활성 검정을 사용하여 선별되어 어떠한 특징적인 하나의 바람직한 조건(온도, pH 등)에서도 민감성인 단백질 돌연변이체를 확인할 수 있다. 예를 들어, 일시적 민감성 돌연변이체를 선별하기 위해, 각각의 개별적 돌연변이체의 효소 또는 항체 활성은 시판용 기질을 사용하여, 더 낮은 온도(25℃와 같은)와 원래의 단백질이 작용하는 온도(37℃와 같은)에서 결정된다. 반응은 초기에 96-웰 검정과 다중 웰 검정 방식으로 수행되고, 14ml 판 방식과 같은 상이한 방식을 사용하여 확인될 수 있다.

[0218] 본 발명은 추가로 효소를 확인하기 위한 선별 검정을 제공하며, 검정은, (a) 복수의 핵산 또는 폴리펩티드를 제공하는 단계; (b) 복수로부터 효소 활성에 대해 시험하려는 폴리펩티드 캔디데이트를 수드하는 단계; (c) 캔디데이트를 효소 활성에 대해 시험하는 단계; 및 (d) 비정상 또는 비-생리학적 조건 하에서 증가된 효소 활성, 및 예를 들어, 온도, pH, 산화, 삼투질 농도, 전해질 농도 또는 삼투압의 정상 생리학적 조건 하에서 야생형 효소 단백질과 비교하여 감소된 효소 활성을 나타내는 폴리펩티드 캔디데이트를 확인하는 단계를 포함한다.

[0219] 한 가지 양상에서, 방법은, 조건 생체 활성에 대해 캔디데이트를 시험하기 전에 핵산 또는 폴리펩티드 중 하나 이상을 변경시키는 단계를 더 포함한다. 또 다른 양상에서, 단계 (c)의 시험은, 숙주 세포 또는 숙주 유기체에서 폴리펩티드의 개선된 발현에 대해 시험하는 것을 더 포함한다. 추가 양상에서, 단계 (c)의 시험은, 약 pH 3 내지 약 pH 12의 pH 범위 내에서 효소 활성에 대해 시험하는 것을 더 포함한다. 추가 양상에서, 단계 (c)의 시험은, 약 pH 5 내지 약 pH 10의 pH 범위 내에서 효소 활성에 대해 시험하는 것을 더 포함한다. 추가 양상에서, 단계 (c)의 시험은, 약 pH 6 내지 약 pH 8의 pH 범위 내에서 효소 활성에 대해 시험하는 것을 더 포함한다. 추가 양상에서, 단계 (c)의 시험은, pH 6.7 및 pH 7.5에서 효소 활성에 대해 시험하는 것을 더 포함한다. 또 다른 양상에서, 단계 (c)의 시험은, 약 4℃ 내지 약 55℃의 온도 범위에서 효소 활성에 대해 시험하는 것을 더 포함한다. 또 다른 양상에서, 단계 (c)의 시험은, 약 15℃ 내지 약 47℃의 온도 범위 내에서 효소 활성에 대해 시험

하는 것을 더 포함한다. 단계 (c)의 시험은, 약 20℃ 내지 약 40℃의 온도 범위에서 효소 활성화에 대해 시험하는 것을 더 포함한다. 또 다른 양상에서, 단계 (c)의 시험은, 약 25℃ 및 약 37℃의 온도 범위에서 효소 활성화에 대해 시험하는 것을 더 포함한다. 또 다른 양상에서, 단계 (c)의 시험은, 정상 삼투압 및 비정상(포지티브 또는 네거티브) 삼투압 하에서 효소 활성화에 대해 시험하는 것을 더 포함한다. 또 다른 양상에서, 단계 (c)의 시험은, 정상 전해질 농도 및 비정상(포지티브 또는 네거티브) 전해질 농도 하에서 효소 활성화에 대해 시험하는 것을 더 포함한다. 시험될 전해질 농도는, 칼슘, 나트륨, 칼륨, 마그네슘, 염화물, 중탄산염 및 인산염 농도 중 하나로 부터 선택된다. 또 다른 양상에서, 단계 (c)의 시험은, 안정화된 반응 생성물을 결과하는 효소 활성화에 대해 시험하는 것을 더 포함한다.

[0220] 또 다른 양상에서, 본 발명은 효소 활성을 갖는 본 발명의 폴리펩티드 또는 이들의 단편에 특이적으로 결합하는 정제된 항체를 제공한다. 하나의 양상에서, 본 발명은 효소 활성을 갖는 폴리펩티드에 특이적으로 결합하는 항체의 단편을 제공한다.

[0221] 항체 및 항체-계 선별 방법

[0222] 본 발명은 본 발명의 효소에 특이적으로 결합하는 단리된 또는 재조합 항체를 제공한다. 이들 항체는 본 발명의 효소 또는 관련된 폴리펩티드를 단리, 확인, 정량화하기 위해 사용될 수 있다. 이들 항체는 본 발명의 범위 내에 있는 다른 폴리펩티드 또는 다른 관련된 효소를 단리시키기 위해 사용될 수 있다. 항체는 효소의 활성 자리에 결합하도록 설계될 수 있다. 따라서, 본 발명은 본 발명의 항체를 사용하여 효소를 억제하는 방법을 제공한다.

[0223] 항체는 면역침전, 염색, 면역친화성 칼럼 등에 사용될 수 있다. 바람직한 경우, 특정 항원을 부호화하는 핵산 서열은 면역화 후, 폴리펩티드 또는 핵산의 단리, 증식 또는 본 발명의 배열 상에서 폴리펩티드의 클로닝 및 부동화에 의해 생성될 수 있다. 대안적으로, 본 발명의 방법은 변경시키려는 세포에 의해 생성되는 항체의 구조를 변경시키기 위해 사용될 수 있으며, 예를 들어, 항체의 친화성은 증가되거나 감소될 수 있다. 더욱더, 항체를 제조하고 변경시키는 능력은 본 발명의 방법에 의해 세포 내로 조작되는 표현형일 수 있다.

[0224] 항체(다클론성과 단클론성)를 생성하고 단리시키는 면역화의 방법은 당업자에게 공지되어 있으며, 과학 및 특허 문헌에 기술되어 있다 (참조예: Coligan, CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY, Wiley/Greene, NY (1991); Stites (eds.) BASIC AND CLINICAL IMMUNOLOGY (7th ed.) Lange Medical Publications, Los Altos, Calif. ("Stites"); Goding, MONOCLONAL ANTIBODIES: PRINCIPLES AND PRACTICE (2d ed.) Academic Press, New York, N. Y. (1986); Kohler (1975) "Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity", Nature 256:495; Harlow (1988) ANTIBODIES, A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Publications, New York). 항체는 또한 동물을 사용하는 통상적 생체내 방법 이외에, 예를 들어, 파지 디스플레이 라이브러리를 발현시키는 재조합 항체 결합 자리를 사용하여 생체 외에서 생성될 수 있다 {Hoogenboom (1997) "Designing and optimizing library selection strategies for generating high-affinity antibodies", Trends Biotechnol. 15:62-70; and Katz (1997) "Structural and mechanistic determinants of affinity and specificity of ligands discovered or engineered by phage display", Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 26:27-45}.

[0225] 폴리펩티드 또는 펩티드는 폴리펩티드, 예를 들어, 효소에 특이적으로 결합하는 항체를 생성하기 위해 사용될 수 있다. 생성된 항체는 면역친화성 크로마토그래피 공정에 사용되어, 폴리펩티드를 단리시키거나 정제하거나, 폴리펩티드가 생체 샘플 중에 존재하는 지를 결정할 수 있다. 이러한 공정에서, 추출물과 같은 단백질 제조물, 또는 생체 샘플은 본 발명의 폴리펩티드 중 하나에 특이적으로 결합할 수 있는 항체와 접촉한다.

[0226] 면역친화성 공정에서, 항체는 비드 또는 다른 칼럼 매트릭스와 같은 고체 지지체에 부착된다. 단백질 제조물은 항체가 본 발명의 폴리펩티드 중 하나에 특이적으로 결합하는 조건 하에서 항체와 접촉하게 된다. 비-특이적 결합 단백질을 제거하기 위한 세척 후에, 특이적 결합 폴리펩티드는 용리된다.

[0227] 항체에 결합하기 위한 생체 샘플 중의 단백질의 능력은 당업자에게 익숙한 다양한 공정 중 임의의 공정을 사용하여 결정될 수 있다. 예를 들어, 결합은 형광제, 효소 표지 또는 방사성 동위 원소와 같은 검출성 표지로 항체를 표지함으로써 결정될 수 있다. 대안적으로, 샘플에 대한 항체의 결합은 이러한 검출성 표지를 위에 갖는 이차 항체를 사용하여 검출될 수 있다. 특정 검정은 ELISA 검정, 샌드위치 검정, 방사면역검정 및 Western Blots를 포함한다.

[0228] 본 발명의 폴리펩티드에 대해 생성된 다클론성 항체는 동물 내로의 폴리펩티드의 직접 주사에 의해, 또는 폴리

펩티드를 비-사람 동물에 투여함으로써 얻어질 수 있다. 이렇게 얻어진 항체는 폴리펩티드 자체를 결합시킬 것이다. 상기 방식으로, 심지어는, 폴리펩티드의 단편만을 부호화하는 서열도 전체 자연 발생 폴리펩티드에 결합할 수 있는 항체를 생성하기 위해 사용될 수 있다. 이러한 항체는 사익 폴리펩티드를 발현시키는 세포로부터 폴리펩티드를 단리시키기 위해 사용될 수 있다.

[0229] 단클론성 항체의 제조를 위해, 연속 세포주 배양액에 의해 생성되는 항체를 제공하는 임의의 기술이 사용될 수 있다. 예는, 하이브리도마 기술, 트리오마 기술, 사람 B-세포 하이브리도마 기술, 및 EBV-하이브리도마 기술을 포함한다 {참조예: Cole (1985) in Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96}.

[0230] 단일 사슬 항체의 생성을 위해 설명된 기술(참조예: 미국 특허 제 4,946,778호)은 본 발명의 폴리펩티드에 대한 단일 사슬 항체를 생성하도록 조정될 수 있다. 대안적으로, 유전자이식 마우스는 이들 폴리펩티드 또는 이들의 단편에 대한 인간화 항체를 발현시키기 위해 사용될 수 있다. 본 발명의 폴리펩티드에 대해 생성되는 항체는 다른 유기체 및 샘플로부터 유사한 폴리펩티드(예를 들어, 효소)를 선별하기 위해 사용될 수 있다. 이러한 기술에서, 유기체로부터의 폴리펩티드는 항체와 접촉하고, 항체에 특이적으로 결합하는 이들 폴리펩티드가 검출된다. 상기 기술된 공정 중 임의의 공정은 항체 결합을 검출하기 위해 사용될 수 있다.

[0231] 선별 방법 및 "온라인" 관측 장치

[0232] 본 발명의 방법을 실시하는 경우, 본 발명의 폴리펩티드 및 핵산과 함께, 예를 들어, 효소 활성에 대해 폴리펩티드를 선별하고, 본 발명의 폴리펩티드에 결합하는 항체에 대해, 본 발명의 핵산에 혼성되는 핵산에 대해, 효소 활성의 잠재적 조절자, 예를 들어, 활성제 또는 억제제로서 화합물을 선별하고, 본 발명의 폴리펩티드를 발현시키는 세포를 선별하기 위한 것 등을 위해 다양한 장치 및 방법이 사용될 수 있다.

[0233] 배열, 또는 "바이오칩"

[0234] 본 발명의 핵산 또는 폴리펩티드는 부동화되거나, 한 배열에 적용될 수 있다. 배열은 본 발명의 핵산 또는 폴리펩티드에 결합하거나 이의 활성을 조절하기 위한 능력에 대해 조성물(예를 들어, 소분자, 항체, 핵산 등)의 라이브리리를 선별하고 관측하기 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, 본 발명에의 하나의 양상에서, 관측되는 파라미터는 효소 유전자의 전사 발현이다. 세포의 전사물 중 하나 이상 또는 전부는 배열 또는 "바이오칩" 상에서의 부동화된 핵산에 대한 혼성에 의해, 세포의 전사물, 또는 세포의 전사물을 대표하거나 이에 상보적인 핵산을 포함하는 샘플의 혼성화에 의해 측정될 수 있다. 마이크로칩 상에서 핵산의 "배열"을 사용함으로써, 세포의 전사물의 일부 또는 전부는 동시에 정량화될 수 있다. 대안적으로, 게놈 핵산을 포함하는 배열은 또한 본 발명의 방법에 의해 제조된 새로 조작된 변형물의 유전자형을 결정하기 위해 사용될 수 있다. 폴리펩티드 배열은 또한 복수의 단백질을 동시에 정량화시키기 위해 사용될 수 있다. 본 발명은 "마이크로어레이" 또는 "핵산 배열" 또는 "폴리펩티드 배열" 또는 "항체 배열" 또는 "바이오칩" 또는 이들의 변형으로서 또한 언급되는 임의의 공지된 "배열"에 의해 실시될 수 있다. 배열은 포괄적으로 복수의 "스폿" 또는 "표적 요소"이며, 각의 표적 요소는 샘플 분자, 예를 들어, mRNA 전사물에 특이적으로 결합하기 위한 기질 표면의 규정된 부분 상에서 부동화된 규정된 양의 하나 이상의 생체 분자, 예를 들어, 올리고뉴클레오타이드를 포함한다.

[0235] 본 발명의 방법을 실시하는 데 있어서, 배열을 제조하고 사용하는 임의의 공지된 배열 및/또는 방법은, 예를 들어, 하기 문헌에 기술된 바와 같이 전체적으로 또는 부분적으로 통합되거나 변동될 수 있다 (미국 특허 번호 6,277,628; 6,277,489; 6,261,776; 6,258,606; 6,054,270; 6,048,695; 6,045,996; 6,022,963; 6,013,440; 5,965,452; 5,959,098; 5,856,174; 5,830,645; 5,770,456; 5,632,957; 5,556,752; 5,143,854; 5,807,522; 5,800,992; 5,744,305; 5,700,637; 5,556,752; 5,434,049; 예를 들어, WO 99/51773; WO 99/09217; WO 97/46313; WO 96/17958 참조; 예를 들어, Johnston (1998) "Gene chips: Array of hope for understanding gene regulation", Curr. Biol. 8:R171-R174; Schummer (1997) "Inexpensive Handheld Device for the Construction of High-Density Nucleic Acid Arrays", Biotechniques 23:1087-1092; Kern (1997) "Direct hybridization of large-insert genomic clones on high-density gridded cDNA filter arrays", Biotechniques 23:120-124; Solinas-Toldo (1997) "Matrix-Based Comparative Genomic Hybridization: Biochips to Screen for Genomic Imbalances", Genes, Chromosomes & Cancer 20:399-407; Bowtell (1999) "Options Available-From Start to Finish~for Obtaining Expression Data by Microarray", Nature Genetics Supp. 21:25-32 참조. 공개 미국 특허 출원 번호 제20010018642; 20010019827; 20010016322; 20010014449; 20010014448; 20010012537; 20010008765호 참조).



[0236] 모세혈관 배열

[0237] GIGA매트릭스™(Diversa Corporation, San Diego, Calif.)와 같은 모세혈관 배열이 본 발명의 방법에 사용될 수 있다. 본 발명의 핵산 또는 폴리펩티드는 모세혈관 배열을 포함하는 배열에 대해 부동화되거나 적용될 수 있다. 배열은 본 발명의 핵산 또는 폴리펩티드에 결합하거나 그 활성을 조절하기 위한 능력에 대해 조성물의 라이브러리(예를 들어, 소분자, 항체, 핵산 등)를 선별하거나 관측하기 위해 사용될 수 있다. 모세혈관 배열은 샘플을 보유하고 선별하기 위한 또 다른 시스템을 제공한다. 예를 들어, 샘플 선별 장치는 인접 모세혈관의 배열로 생성되는 복수의 모세혈관을 포함할 수 있으며, 각각의 모세혈관은 샘플을 유지시키기 위한 루멘을 규정하는 하나 이상의 벽을 포함한다. 장치는 배열 중의 인접 모세혈관 사이에 배치된 사이 재료, 및 사이 재료 내에서 생성되는 하나 이상의 기준 표지를 추가로 포함할 수 있다. 모세혈관이 모세혈관의 배열에서 결합되도록 조정된 샘플을 선별하기 위한 모세혈관은 샘플을 유지시키기 위한 루멘을 규정하는 제1 벽 및 샘플을 여기하기 위해 루멘에 제공된 여기 에너지를 여과시키기 위해 여과 재료로 생성된 제2 벽을 포함할 수 있다. 폴리펩티드 또는 핵산, 예를 들어, 리간드는 모세혈관 배열의 모세혈관의 일부 이상 내로 제1 성분 내로 도입될 수 있다. 모세혈관 배열의 각각의 모세혈관은 제1 성분을 유지시키기 위한 루멘을 규정하는 하나 이상의 벽을 포함할 수 있다. 제1 성분 뒤로 모세혈관 내로 기포가 도입될 수 있다. 제2 성분이 모세혈관 내로 도입될 수 있으며, 제2 성분은 기포에 의해 제1 성분으로 분리된다. 관심 있는 샘플은 모세혈관 배열의 모세혈관 내로 검출성 입자로 표지된 제1 액체로서 도입될 수 있으며, 모세혈관 배열의 각각의 모세혈관은 제1 액체 및 검출성 입자를 유지시키기 위한 루멘을 규정하는 하나 이상의 벽을 포함하고, 하나 이상의 벽은 하나 이상의 벽에 검출성 입자를 결합시키기 위해 결합 재료로 코팅된다. 방법은 추가로 제1 액체를 모세혈관으로부터 제거하는 것을 포함하는 단계로서, 결합된 검출성 입자가 모세혈관 내에서 유지되는 단계, 및 제2 액체 모세혈관 내로 도입시키는 단계를 포함할 수 있다. 모세혈관 배열은 루멘을 규정하는 하나 이상의 외부 벽을 포함하는 복수의 개별적 모세혈관을 포함할 수 있다. 모세혈관의 외부 벽은 함께 융합되는 하나 이상의 벽일 수 있다. 유사하게는, 벽은 액체 또는 샘플의 보유를 위한 루멘을 형성하는 한은, 원통형, 정사각형, 육각형 또는 임의의 다른 기하학적 형태인 루멘을 규정할 수 있다. 모세혈관 배열의 모세혈관은 서로 근위에 보유되어 평면 구조를 생성시킬 수 있다. 모세혈관은 융합되고(예를 들어, 모세혈관이 유리로 이루어지는 경우), 접착되고, 결합되고 또는 나란히 고정됨으로써 서로 결합될 수 있다. 모세혈관 배열은 임의의 수의 개별적 모세혈관, 예를 들어, 100 내지 4,000,000개의 모세혈관으로 생성될 수 있다. 모세혈관 배열은 함께 결합된 약 100,000개 이상의 개별적 모세혈관을 갖는 미세 적정 플레이트를 생성시킬 수 있다.

[0238] 약제 조성물

[0239] 본 발명은, (a) 조건 활성 항체; 및 (b) 적합한 담체 또는 희석제를 포함하는 하나 이상의 조성물을 제공한다. 본 발명은 또한 (a) 본원에 기술된 바와 같이 핵산을 부호화하는 조건 활성 항체; 및 (b) 적합한 담체 또는 희석제를 포함하는 하나 이상의 조성물을 제공한다. 담체 또는 희석제는 선택적으로 공지된 담체 또는 희석제에 따라 약제학적으로 허용될 수 있다. 조성물은 선택적으로 하나 이상의 추가 화합물, 단백질 또는 조성물을 추가로 포함할 수 있다.

[0240] 조건 활성 항체는 약제학적으로 허용 가능한 염의 형태로 존재할 수 있다. 약제학적으로 허용 가능한 염은, 일반적으로, 예를 들어, 나트륨, 칼륨, 칼슘 등의 염 및 프로카인, 디벤질아민, 에틸렌디아민, 에탄올아민, 메틸글루카민, 타우린 등의 아민 염, 및 염산염과 같은 산부가염, 및 염기성 아미노산 등을 포함하는, 제약 산업에서의 치료용 단백질의 염으로서 사용될 수 있음을 의미한다.

[0241] 본 발명은 추가로 당분야에 공지되고/공지되거나 본원에 기술된 바와 같이, 세포, 조직, 기관, 동물 또는 환자에서 하나 이상의 모 분자 관련 질환을 조절하고 치료하기 위해, 그리고/또는 관련된 질환 전에, 후속하여 또는 도중에 치료적 유효량을 투여하기 위한 하나 이상의 조건 활성 항체 방법 또는 조성물을 제공한다. 따라서, 본 발명은 유효량의 본 발명의 하나 이상의 조건 활성 항체를 포함하는 조성물을 세포, 조직, 기관 또는 동물과 접촉시키거나 이에 투여하는 것을 포함하여, 세포, 조직, 기관 또는 동물에서 야생형 항체와 관련된 질환을 진단하거나 치료하기 위한 방법을 제공한다. 방법은 선택적으로 추가로, 세포, 조직, 기관 또는 동물에 0.001~50mg/kg의 본 발명의 조건 활성 항체의 유효량을 사용하는 것을 포함할 수 있다. 방법은, 선택적으로 비경구, 피하, 근육내, 정맥내, 관절강내, 기관지내, 복부내, 낭내, 연골내, 강내, 복강내, 소뇌내, 대뇌뇌실내, 결장내, 경관내, 위내, 간내, 심근내, 골절내, 골반내, 심막내, 복강내, 흉막내, 전립선내, 허파내, 직장내, 신장내, 망막내, 척수내, 활막내, 흉내, 자궁내, 방광내, 볼러스, 질, 직장, 구강, 설하, 비강내, 또는 경피로부터 선택된 하나 이상의 방식에 의한 접촉 및 투여를 사용하는 것을 더 포함할 수 있다. 방법은 선택적으로 추가로, 조

건 활성 항체 접촉 또는 투여 전에, 동시에 또는 후에, 검출성 표지 또는 리포터, TNF 대항물질, 항류우머티즘 약, 근육 이완제, 진경제, 비-스테로이드 항-염증 약물(NSAK), 진통제, 마취제, 진정제, 국소 마취제, 신경근 차단제, 항미생물제, 항건선제, 코르티코스테로이드, 동화 스테로이드, 에리스로포이에틴, 면역제, 면역 글로불린, 면역억제제, 성장 호르몬, 호르몬 대체 약물, 방사성 의약품, 항우울제, 항정신병약, 흥분제, 친신 약물 치료제, 베타 작용물질, 흡입 스테로이드, 에피네프린 또는 이의 유사체, 세포독성 또는 다른 항암제, 메토타렉세이트와 같은 항-대사물질, 또는 항증식제 중 하나 이상으로부터 선택되는 유효량의 하나 이상의 화합물 또는 단백질을 포함하는 하나 이상의 조성물을 투여하는 것을 포함한다.

[0242] 본 발명은 추가로 당분야에 공지되고/공지되거나 본원에 기술된 바와 같이 세포, 조직, 기관, 동물 또는 환자에서 그리고/또는, 관련된 질환 전에, 후속하여 또는 도중에 하나 이상의 야생형 항체 관련된 질환을 진단하기 위한 하나 이상의 조건 활성 항체 방법을 제공한다.

[0243] 약제학적으로 허용 가능한 담체는 부분적으로, 투여되는 조성물에 의해서 뿐만 아니라 조성물을 투여하기 위해 사용되는 특정 방법에 의해서 결정된다. 따라서, 본 발명의 약제 조성물의 매우 다양한 적합한 제형이 있다. 다양한 수성 담체, 예를 들어, 완충된 식염 등이 사용될 수 있다. 이들 용액은 무균성이며, 일반적으로 바람직한 물질을 함유하지 않는다. 이들 조성물은 통상적인 널리 공지된 살균 기술에 의해 살균될 수 있다. 조성물은 pH 조절제 및 완충제, 독성 조절제 등, 예를 들어, 아세트산나트륨, 염화나트륨, 염화칼륨, 염화칼슘, 락트산나트륨 등과 같은 대략적 생리학적 조건에 필요한 바와 같은 약제학적으로 허용 가능한 보조제 성분을 함유할 수 있다. 이들 제형 중의 조건 활성 항체의 농도는 넓게 변할 수 있으며, 선택된 특정 투여 방식 및 환자의 필요성에 따라 유체 부피, 점도, 체중 등을 기준으로 일차적으로 선택될 것이다.

[0244] 경구용 투여에 적합한 제형은, (a) 수분, 식염 또는 PEG 400과 같은 희석제 중에 현탁된 유효량의 패키징된 핵산과 같은 액체 용액; (b) 액체, 고체, 과립 또는 젤라틴으로서 예정된 양의 활성 성분을 각각 함유하는 캡슐제, 사체 또는 정제; (c) 적절한 액체 중의 현탁액; 및 (d) 적합한 에멀션으로 구성된다. 경구 투여를 위한 본 발명의 약제 조성물 및 제형은 적절하고 적합한 투여양으로 본 발명에 널리 공지된 약제학적으로 허용 가능한 담체를 사용하여 제형화될 수 있다. 이러한 담체는 약제를 환자에 의한 섭취에 적합한 정제, 알약, 분말, 드라제, 캡슐제, 액체, 캔디, 젤, 시럽, 슬러리, 현탁액 등으로서 단위 투여 형태로 제형화될 수 있도록 한다. 경구용의 약제 조성물은 바람직한 경우에 적합한 추가 화합물을 첨가한 후에, 생성된 혼합물을 분쇄시키고 과립의 생성물을 가공함으로써 고체 부형제로서 제형화되어 정제 또는 드라제 코어를 얻을 수 있다. 적합한 고체 부형제는 탄수화물이거나, 단백질 충전제는, 예를 들어, 락토오스, 수크로오스, 만니톨 또는 소르비톨을 포함하는 당; 밀, 쌀, 감자 또는 다른 식물로부터의 전분; 메틸 셀룰로오스, 히드록시프로필메틸 셀룰로오스, 또는 나트륨 카르복시-메틸셀룰로오스와 같은 셀룰로오스; 아라비아 검 및 트래거컨트 검을 포함하는 검; 및 단백질, 예를 들어, 젤라틴 및 콜라겐을 포함한다. 교차결합된 폴리비닐 피롤리돈, 한천, 알긴산, 또는 알긴산나트륨과 같은 이의 염과 같은 붕해제 또는 용해제가 첨가될 수 있다. 정제 형태는 락톤, 수크로오스, 만니톨, 소르비톨, 인산칼슘, 옥수수 전분, 감자 전분, 트래거컨트, 미세결정 셀룰로오스, 아카시아, 젤라틴, 콜로이드성 이산화규소, 크로스캐셀로오스 나트륨, 탈크, 스테아르산마그네슘, 스테아르산 중 하나 이상, 및 다른 부형제, 착색제, 충전제, 결합제, 희석제, 완충제, 습윤제, 방부제, 방향제, 염료, 붕해제, 및 약제학적으로 허용 가능한 담체를 포함할 수 있다.

[0245] 본 발명은, 수성 현탁액을 제조하기 위해 적합한 부형제와 혼합하여 조건 활성 항체를 포함하는 수성 현탁액을 제공한다. 이러한 부형제는, 나트륨 카르복시메틸셀룰로오스, 메틸셀룰로오스, 히드록시프로필메틸셀룰로오스, 알긴산나트륨, 폴리비닐피롤리돈, 트래거컨트 검 및 아카시아 검과 같은 현탁제, 자연 발생 포스파타이드(예를 들어, 레시틴)와 같은 분산제 또는 습윤제, 알킬렌 산화물과 지방산의 축합 생성물(예를 들어, 폴리옥시에틸렌 스테아레이트), 에틸렌 산화물과 긴 사슬 지방족 알코올의 축합 생성물(예를 들어, 헵타데카에틸렌 옥시세탄올), 에틸렌 산화물과 지방산 및 헥시톨로부터 유도된 부분 에스테르의 축합 생성물(예를 들어, 폴리옥시에틸렌 소르비톨 모노올레에이트), 또는 에틸렌 산화물과 지방산 및 헥시톨 무수물로부터 유도된 부분 에스테르의 축합 생성물(예를 들어, 폴리옥시에틸렌 소르비탄 모노올레에이트)을 포함한다. 수성 현탁액은 또한 에틸 또는 n-프로필 p-히드록시벤조에이트와 같은 하나 이상의 방부제, 하나 이상의 방향제 및 수크로오스, 아스파르트 또는 사카린과 같은 감미료를 함유할 수 있다. 제형은 삼투질 농도를 위해 조절될 수 있다.

[0246] 캔디 형태는 향미료 중의 활성 성분, 일반적으로 수크로오스 및 아카시아 및 트래거컨트, 및 활성 성분 이외에 당분야에 공지된 담체를 함유하는 젤라틴 및 글리세린 및 수크로오스 및 아카시아 에멀션, 젤 등과 같은 비활성 염기 중의 활성 성분을 포함하는 드롭을 포함할 수 있다. 경구 투여되는 경우에, 조건 활성 항체는 분해로부터 보호되어야 하는 것으로 인지된다. 이는 대표적으로 조건 활성 항체를 조성물과 착화시켜서 이를 산성 및 효소

적 가수분해에 대해 저항성이 되도록 하거나, 조건 활성 항체를 리포솜과 같은 적절한 저항성 담체 중에 패키징 시킴으로써 달성된다. 단백질을 분해로부터 보호하는 수단은 당분야에 널리 공지되어 있다. 약제 조성물은 예를 들어, 리포솜 중에, 또는 활성 성분의 느린 방출을 제공하는 제형 중에서 캡슐화될 수 있다.

[0247] 패키징된 조건 활성 항체는 단독으로 또는 다른 적합한 성분과 조합하여, 흡입을 통해 투여하려는 에어로졸 제형(예를 들어, 이들은 "분무"될 수 있음)으로 제조될 수 있다. 에어로졸 제형은 디클로로디플루오로메탄, 프로판, 질소 등과 같은 가압된 허용 가능한 추진제 내에 위치할 수 있다. 직장 투여용으로 적합한 제형은 예를 들어, 좌제 기제와 함께 패키징된 핵산으로 구성된 좌제를 포함한다. 적합한 좌제 기제는 자연 발생 또는 합성 트리글리세라이드 또는 파라핀 탄화수소를 포함한다. 그 외에, 또한 패키징된 핵산과, 예를 들어, 액체 트리글리세라이드, 폴리에틸렌 글리콜 및 파라핀 탄화수소를 포함하는 기제의 조합물로 구성되는 젤라틴 직장 캡슐제를 사용하는 것이 가능하다.

[0248] 본 발명의 피부 또는 국소용 운반 조성물은 조건 활성 항체 이외에, 크림, 연고, 용액 또는 하이드로겔 제형 중의 약제학적으로 허용 가능한 담체, 및 첨가된 성분이 치료용 단백질의 운반에 악영향을 주지 않는 한은 다른 화합물을 포함할 수 있다. 통상적인 약제학적으로 허용 가능한 에멀션, 계면활성제, 현탁제, 산화방지제, 삼투증강제, 연장제, 희석제 및 방부제가 또한 첨가될 수 있다. 수용성 중합체가 또한 담체로서 사용될 수 있다.

[0249] 예를 들어, 관절내(관절에서), 정맥내, 근육내, 피내, 복강내 및 피하 경로에 의해서와 같은 비경구 투여용으로 적합한 제형은 산화방지제, 완충제, 세균 발육 저지제, 및 제형을 의도된 수용자와 등장성으로 만드는 용질을 함유할 수 있는 수성 및 비수성 등장성 무균 주사액, 및 현탁제, 용해제, 농조화제, 안정화제 및 방부제를 포함할 수 있는 수성 및 비수성 무균 현탁액을 포함한다. 본 발명의 실시에서, 조성물은 예를 들어, 정맥내 주입, 경구용, 국소용, 복강내, 방광내 또는 척추 강내에 의해 투여될 수 있다. 하나의 양상에서, 비경구용 투여 방식은 조건 활성 항체를 포함하는 조성물에 대한 바람직한 투여 방법이다. 조성물은 단위 투여 형태로 편리하게 투여될 수 있으며, 예를 들어, Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co. Easton Pa., 18<sup>th</sup> Ed., 1990에 기술된 바와 같이, 제약 분야에 널리 공지된 방법 중 임의의 방법에 의해 제조될 수 있다. 정맥내 투여용 제형은 무균수 또는 식염, 폴리에틸렌 글리콜과 같은 폴리알킬렌 글리콜, 식물성 오일, 수소화된 나프탈렌 등과 같은 약제학적으로 허용 가능한 담체를 함유할 수 있다 (미국 특허 제 4,318,905호).

[0250] 조건 활성 항체를 포함하는 패키징된 조성물의 제형은 앰플 및 바이알과 같은 단일 투여량 또는 다중 투여량 밀폐 용기 중에 제공될 수 있다. 주사액 및 현탁액은 무균 분말, 과립, 및 사전에 기술된 종류의 정제로부터 제조될 수 있다.

[0251] 본 발명은 또한 본 발명에 따라 하나 이상의 야생형 항체 관련 질환의 진단을 위한 하나 이상의 조건 활성 항체 조성물, 운반 장치 및/또는 방법을 제공한다.

[0252] 또한, 하나 이상의 조건 활성 항체 및 하나 이상의 약제학적으로 허용 가능한 담체 또는 희석제를 포함하는 조성물이 제공된다. 조성물은 선택적으로 추가로, 검출성 표지 또는 리포터, 세포독성 또는 다른 항암제, 메토트렉세이트와 같은 항-대사물질, 항증식제, 시토키인, 또는 시토키인 대항물질, TNF 대항물질, 항류우머티즘약, 근육 이완제, 진정제, 비-스테로이드 항-염증 약물(NSAID), 진통제, 마취제, 진정제, 국소 마취제, 신경근 차단제, 항미생물제, 항건선제, 코르티코스테로이드, 동화 스테로이드, 에리스로포이에틴, 면역제, 면역 글로불린, 면역억제제, 성장 호르몬, 호르몬 대체 약물, 방사성 의약품, 항우울제, 항정신병약, 흥분제, 천신 약물 치료제, 베타 작용물질, 흡입 스테로이드, 에피네프린 또는 유사체 중 하나 이상으로부터 선택되는 유효량의 하나 이상의 화합물 또는 단백질을 포함한다.

[0253] 또한, 본 발명의 하나 이상의 조건 활성 항체를 포함하는 의료 장치가 제공되며, 장치는 비경구, 피하, 근육내, 정맥내, 관절강내, 기관지내, 복부내, 낭내, 연골내, 강내, 복강내, 소뇌내, 대뇌저실내, 결장내, 경관내, 위내, 간내, 심근내, 골절내, 골반내, 심막내, 복강내, 흉막내, 전립선내, 허파내, 직장내, 신장내, 망막내, 척수내, 활막내, 흉내, 자궁내, 방광내, 볼러스, 질, 직장, 구강, 설하, 비강내, 또는 경피로부터 선택되는 하나 이상의 방식에 의해 하나 이상의 조건 활성 항체를 접촉하거나 투여하기에 적합하다.

[0254] 추가 양상에서, 본 발명은 제1 용기 중의 동결 건조 형태의 본 발명의 하나 이상의 조건 활성 항체 또는 단편, 및 무균수, 무균 완충 수분, 또는 수성 희석제 중의 페닐, m-크레졸, p-크레졸, o-크레졸, 크레졸크레졸, 벤질알코올, 페닐수은 아질산염, 페녹시에탄올, 포름알데히드, 크레졸부탄올, 마그네슘 염화물, 알킬과라벤, 펜잘코늄 염화물, 벤제토늄 염화물, 나트륨 데히드로아세테이트 및 티메로살, 또는 이들의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 방부제를 포함하는 제2 용기를 포함하는 키트를 제공한다. 하나의 양상에서, 키트에



서, 제1 용기 중의 조건 활성 항체 또는 특정 부분 또는 변종의 농도는 제2 용기의 함유물에 의해 0.1mg/ml 내지 약 500mg/ml의 농도로 재구성된다. 또 다른 양상에서, 제2 용기는 등장제를 더 포함한다. 또 다른 양상에서, 제2 용기는 생리학적으로 허용 가능한 완충제를 더 포함한다. 하나의 양상에서, 본 발명은 키트에 제공되고 투여 전 재구성되는 제형을 이를 필요로 하는 환자에게 투여하는 것을 포함하여, 하나 이상의 야생형 항체 매개 질환을 치료하는 방법을 제공한다.

[0255] 또한, 패키징 재료, 및 본 발명의 하나 이상의 조건 활성 항체의 용액 또는 동결 건조 형태를 포함하는 용기를 포함하는, 사람 약제학적 또는 진단 용도를 위한 제조 물품이 제공된다. 제조 물품은 선택적으로 비경구, 피하, 근육내, 정맥내, 관절강내, 기관지내, 복부내, 낭내, 연골내, 강내, 복강내, 소뇌내, 대뇌뇌실내, 결장내, 경관내, 위내, 간내, 심근내, 골질내, 골반내, 심막내, 복강내, 흉막내, 전립선내, 허파내, 직장내, 신장내, 망막내, 척수내, 활막내, 흉내, 자궁내, 방광내, 볼러스, 질, 직장, 구강, 설하, 비강내, 또는 경피 운반 장치 또는 시스템의 부품으로서 용기를 포함한다.

[0256] 본 발명은 추가로 본원에 기술된 임의의 설명을 제공한다.

[0257] 예 1: 온도 돌연변이체에 대한 다중벽 검정(예를 들어, 96-웰 검정)의 일반적 설명:

[0258] 형광 기질을 적절한 기간 동안 야생형 및 새로운 더 낮은 반응 온도(예를 들어, 상기 언급된 바와 같이 37℃ 또는 25℃) 둘 모두에서 다중벽 플레이트의 각각의 웰에 첨가하였다. 적절한 여기 및 방출 스펙트럼(예를 들어, 320 nm 여기/405 nm 방출)에서 형광 플레이트 리더에서 형광을 측정함으로써 형광을 검출하였다. 상대 형광 단위(RFU)를 결정하였다. 야생형 분자 및 플라스미드/백터 형질전환된 세포로부터의 상등액을 포지티브 및 네거티브 대조군으로서 사용하였다. 각각의 샘플, 반응 온도, 및 포지티브 및 네거티브 대조군에 대해 중복 반응을 수행하였다.

[0259] 더 낮은 온도에서 활성이고(예를 들어, 25℃에서 활성인 돌연변이체), 야생형 온도에서 활성이 감소되어(예를 들어, 37℃에서 활성의 10%, 20%, 30%, 40% 또는 그 이상의 감소), 약 1.1보다 높거나 동일한 활성의 비(예를 들어, 25℃ 또는 37℃에서의 활성의 비(25℃/37℃)가 1.1보다 높거나 동일함)를 갖는 돌연변이체를 추정상 일차 온도 민감성 히트(hit)인 것으로 간주할 수 있다. 이들 추정상 일차 온도 민감성 히트를 동일한 검정을 사용하여 재선별하여 임의의 일차 히트를 확인하였다.

[0260] 예 2: 온도 돌연변이체에 대해 활성의 확인을 위한 상이한 검정 방식(예를 들어, a 14-mL 검정)의 일반적 설명:

[0261] 온도 민감성 일차 히트로서 확인된 돌연변이체를 14mL 배양 관에서 발현시키고, 이들의 효소 활성을 야생형(예를 들어, 37℃) 및 더 낮은 온도(예를 들어, 25℃)에서 측정하였다. 단백질을 다중벽 방식에 대해 상기 기술된 바와 같이 발현시키고 정제하였으며, 단, 발현은 다중벽(96-웰 플레이트) 방식과는 상이한 방식(14mL 관)으로 수행하였다.

[0262] 각각의 돌연변이체 상등액을 다중벽 플레이트, 예를 들어, a 96-웰 마이크로플레이트로 전달하였다. 형광 기질을 필요한 기간 동안 지시된 반응 온도(야생형, 더 낮은 온도)에서 각각의 관에 첨가하였다. 야생형 분자를 포지티브 대조군으로서 사용하고, 백터만으로 형질전환시킨 세포로부터의 상등액을 네거티브 대조군으로서 사용하였다. 적절한 방출 스펙트럼(예를 들어, 320 nm 여기/405 nm 방출)에서 형광 플레이트 리더에서 형광을 측정함으로써 형광을 검출하였다. 상대 형광 단위(RFU)를 결정하였다. 각각의 샘플, 반응 온도, 및 포지티브 및 네거티브 대조군에 대해 중복 반응을 수행하였다.

[0263] 더 낮은 온도(예를 들어, 25℃)에서 활성이지만, 야생형(예를 들어, 37℃)에서 30% 이상 감소된 활성을 나타내어, 더 낮은 온도(예를 들어, 25℃) 대 야생형 온도(예를 들어, 37℃)에서의 활성의 비가 1.5와 동일하거나 더 높은 돌연변이체를 온도 민감성 히트로서 확인하였다.

[0264] 더 낮은 온도(예를 들어, 25℃)에서의 돌연변이체의 활성을 야생형 온도(예를 들어, 37℃)에서의 야생형 분자의 활성과 비교하였다. 분자가 1 초과, 바람직하게는 2 또는 2 초과와 같은 활성에 의해 제시되지 바와 같이 더 낮은 온도(예를 들어, 25℃)에서 야생형 분자보다 활성이 높고, 돌연변이체가 야생형 온도(37℃)에서 야생형 분자와 비교할 때에 활성의 전체적인 감소를 나타내는 경우, 온도 민감성 돌연변이체의 표현형을 확인할 수 있다.

[0265] 예 3: 발견된 히트의 추가의 진화의 일반적 설명:

[0266] 바람직한 경우, 새로운 조합 변종 라이브러리를 모두로부터 또는 사전에 확인한 선택된 돌연변이체 히트로부터 생성시켰다. 새로운 라이브러리를 선택된 돌연변이체 각각에 대한 아미노산 변종의 모든 가능한 조합을 함유하

도록 설계하고 새로운 히트에 대해 설명한 바와 같이 재선별하였다.

[0267] 예 4: 온도의 감소 후의 효소 활성의 가역성의 일반적 설명:

[0268] 온도 민감성의 진화된 돌연변이체를 추가로 검정하여, 효소 활성 더 낮은 온도(예를 들어, 25℃)에서의 효소 활성이 돌연변이체를 승온에 노출시킨 후에 더 낮은 온도(예를 들어, 25℃)로 환원시킴으로써 가역성인지 또는 비가역성인지를 결정할 수 있다. 온도 민감성 돌연변이체를 간략하게 기술된 바와 같이 예를 들어, 14ml 배양 관에서 임의의 바람직한 방식으로 발현시켰다. 돌연변이체를 야생형 온도(예를 들어, 37℃) 및 다른 온도를 포함하는 여러 가지 조건 하에서 이들의 활성에 대해 시험하고, 후속적으로 필요한 더 낮은 온도(예를 들어, 25℃)에 재노출시켰다. 더 낮은 온도에서 활성이고, 더 높은 온도 또는 야생형 온도로 상승되는 경우에 감소된 활성(즉, 더 낮은 온도에서의 활성 대 더 높은 온도에서의 활성의 비는 1 이상, 1.5 이상, 또는 2 이상임)을 나타내고, 더 낮은 온도로 다시 저하되는 경우에 기준 활성을 나타내는 돌연변이체를 "가역성 히트"로서 스코어를 매겼다. 더 낮은 온도에서 활성이고, 더 높은 온도 또는 야생형 온도로 상승되는 경우에 감소된 활성(즉, 더 낮은 온도에서의 활성 대 더 높은 온도에서의 활성의 비는 1 이상, 1.5 이상, 또는 2 이상임)을 나타내고, 더 낮은 온도로 다시 저하되는 경우에 최소한 동일한 양의 감소된 활성을 나타내는 돌연변이체를 "비가역성 히트"로서 스코어를 매겼다.

[0269] 예 5: 조건 활성 안지오스타틴 변종을 선별하기 위한 재료 및 방법

[0270] 조건 활성 안지오스타틴 변종을 선별하기 위한 재료 및 방법은 본원에 참조로 인용된 문헌 {Chi and Pizzo, "Angiosatin is directly cytotoxic to tumor cell at low extracellular pH: a mechanism dependent on cell surface-associated ATP synthase", cancer Res. 2006; 66(2): 875-882}으로부터 조정할 수 있다.

[0271] 재료. 사람 플라스미노겐으로부터 유도한 야생형 안지오스타틴 크렁글 1 내지 3을 Calbiochem(Darmstadt, Germany)으로부터 입수하고, 무균 PBS 중에서 재구성하였다. ATP 신타아제의 촉매 베타-아단위에 대해 유도된 다클론성 항체 유도된 다클론성 항체를 생성하고, 소의 F1 ATP 신타아제 아단위를 사전에 공지된 바와 같이 정제할 수 있다 (Moser et al., "Angiostatin binds ATP synthase on the surface of human endothelial cells", Proc Natl Acad Sci USA 1999;96:2811-6; Moser et al. "Endothelial cell surface F1-FO ATP synthase is active in ATP synthesis and is inhibited by angiostatin", Proc Natl Acad Sci USA;2001;98:6656-61). 카리포라이드를 무균수 중에 용해시키고 무균 여과시켰다.

[0272] 세포 배양. A549(폐 암종 조직으로부터 유도되는 사람 상피 세포주), 또는 대안적 암 세포주(DU145, LNCaP, 또는 PC-3 세포)를, 예를 들어, ATCC로부터 얻을 수 있다. 사람 태줄 정맥 내피 세포(HUVEC)를 공지된 바와 같이 사람 태줄 정맥으로부터 분리시킬 수 있다 (Grant et al., "Matrigel induces thymosin h 4 gene in differentiating endothelial cells", J Cell Sci 1995;108:3685-94). HUVEC 세포를 세포 표면 상에서 ATP 신타아제를 발현시키는 세포주로서 포지티브 대조군으로서 사용할 수 있다. 세포를 1% 페니실린 스트렙토마이신 및 10% 혈청 대체 매질 3(Sigma, St. Louis, MO)을 사용하여 DMEM(Life Technologies, Carlsbad, CA) 중에서 배양시켜서 플라스미노겐의 존재를 최소화시킬 수 있다. 낮은-pH(6.7) 배지를 중탄산염을 5% CO<sub>2</sub>에서 10 mmol/L로 감소시키고, 34 mmol/L NaCl로 보충하여 17% CO<sub>2</sub> 조건 하에 22 mmol/L 중탄산염 배지의 삼투질 농도 또는 인큐베이션을 유지시킬 수 있다. 사용되는 pH를 저하시키는 방법은 실험적 제한 및 검정에 의해 변할 수 있다.

[0273] 유동 세포 분석법. ATP 신타아제가 중앙 세포주의 세포 표면 상에서 작용하는 것을 보장하기 위해, 유동 세포 분석법 실험을 수행할 수 있다. 예를 들어, A549 세포주를 0, 12, 24, 48 및 72 시간 동안 저산소증(0.5% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub> 균형) 대 산소 정상 상태(21% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>) 하에 변동 pH 배지(10, 22 및 44 mmol/L 중탄산염 DMEM)에서 배양할 수 있다 생세포를 차단시키고, 항-아단위 항체로 인큐베이팅, 세척, 차단시키고, 이차 염소 항-토끼 항체-FITC(Southern Biotech, Birmingham, AL)로 인큐베이팅시키고, 다시 세척할 수 있으며, 모든 단계를 4℃에서 수행하였다. 요오드화 프로피듐(BD Biosciences, San Jose, CA)을 모든 샘플로 인큐베이팅시켜, 면역되지 않은 막을 갖는 세포를 식별할 수 있다. 10,000개 세포 중 FITC의 평균 형광 세기를 FACSCalibur 유동 세포 분석기(Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ)에 의해 정량화시킬 수 있고, 요오드화 프로피듐이 흡수된 세포를 배제시켜 CELLQuest 소프트웨어(BD Biosciences) 상에서 미토콘드리아 ATP 신타아제의 검출을 제거할 수 있다.

[0274] 세포 표면 ATP 생성 검정. 96-웰 플레이트 중의 A549 또는 1-LN 세포(웰당 60,000개)를 배지로 다시 채우고, 37℃, 5% CO<sub>2</sub>에서 30분 동안 안지오스타틴, 안지오스타틴 변종, 항-베타-아단위 항체, 소 혈청 알부민으로 상승된 토끼 IgG(Organon Teknika, West Chester, PA), 피세아탄놀(포지티브 대조군으로 사용되는 ATP 신타아제 F1의

공지된 억제제, Sigma), 또는 배지 단독으로 처리하였다. 그 다음, 세포를 20초 동안 0.05 mmol/L ADP로 인큐베이션시켰다. 상등액을 분리해내고, 공지된 바와 같이 (23) CellTiterGlo 발광 검정(Promega, Madison, WI)에 의해 ATP 생성에 대해 검정하였다. 세포 용해물을 유사하게 분석하여, ATP의 세포내 풀이 임의의 조건 하에 변하지 않음을 확인할 수 있다. 기록은 Luminoskan Ascent(Thermo Labsystems, Helsinki, Finland)에서 이루어질 수 있다. 데이터를 각각의 독립적 실험에 대해 결정된 표준을 기준으로 ATP의 몰로 표현하였다.

[0275] 세포 증식 검정. 암세포주에 대한 안지오테스틴의 효과를 혈청-유리 배지 중에서 3-(4,5-디메틸티아졸-2-일)-5-(3-카르복시메톡시페닐)-2-(4-술포페닐)-2H-테트라졸리움, 내부 염(MTS) 증식 검정으로 평가하였다. 안지오테스틴의 존재 또는 부재 하에 37°C 및 5% CO<sub>2</sub>에서 20시간 동안 인큐베이션 후에 96-웰 마이크로플레이트의 각각의 웰에서의 상대적 세포수를 제조업자의 프로토콜에 따라 Aqueous One Cell Proliferation Assay(Promega)를 사용하여 결정할 수 있다. 배지 pH를 중탄산염 농도를 통해 5% CO<sub>2</sub>로 조절할 수 있다.

[0276] 세포 독성의 평가. 세포 사멸 및 세포 감퇴를 정량화하기 위해, 시토졸로부터 상등액 내로 방출된 락테이트 데히드로게나아제(LDH)의 활성을 Cytotoxicity Detection kit(Roche, Indianapolis, IN)를 사용하여 측정할 수 있다. 안지오테스틴, 안지오테스틴 변종, 항-베타-아단위 항체, 토끼 IgG, 카리포르라이드, 및 Triton X(포지티브 대조군으로서 투과하기 위해 사용되는 청정제)로 처리한 암 세포(예를 들어, A549 세포)(웰당 5,000개)를 각각 중성 및 낮은 pH 조건에서 37°C 및 5% CO<sub>2</sub> 또는 17% CO<sub>2</sub>에서 15시간 동안 인큐베이션시킬 수 있다. 세포 독성의 지수를, 네 차례의 시험된 샘플로부터의 평균 흡수도를 동일한 pH 배지에 상응하는 네 차례의 비처리 샘플로부터의 평균 흡수도에 의해 나눔으로써 계산할 수 있다.

[0277] 세포 괴사 및 아포토시스의 평가. 안지오테스틴 유도 세포 사멸의 방식을 결정하기 위해, 히스톤-DNA ELISA를 수행할 수 있다. A549 세포(웰당 5,000개)에 대한 안지오테스틴, 안지오테스틴 변종, 항-베타-아단위 항체, 토끼 IgG, 및 카리포르라이드의 효과를 핵의 히스톤-DNA 단편의 검출에 의존하는 ELISA 아포토시스 및 괴사 검정(Roche)을 사용하여 결정할 수 있다. 아포토시스 또는 괴사를 각각, 제제의 존재 또는 부재 하에 37°C에서 15시간의 인큐베이션 후 네 차례 샘플의 세포 용해물 또는 상등액으로부터 결정하였다. 아포토시스 또는 괴사 지수를, 네 차례의 시험된 샘플로부터의 평균 흡수도를 동일한 pH 배지에 상응하는 네 차례의 비처리 샘플로부터의 평균 흡수도에 의해 나눔으로써 계산할 수 있다. 배지 pH를 5% CO<sub>2</sub> 또는 17% CO<sub>2</sub>에서 인큐베이션에 의해 조절할 수 있다.

[0278] 세포내 pH(pHi) 측정. pHi를 유리 커버슬립을 갖는 35-mm 마이크로웰 디시(MatTek, Ashland, MA) 상에 펼쳐진 세포에서 형광을 측정할 수 있다. 세포를 성장 인자-감소 페놀-레드 프리 Matrigel(BD Biosciences) 상에 펼칠 수 있다. 밤샘 성장 후에, 배지를 바꿀 수 있고, 세포를 15분 동안 pH-민감성 형광 염료 cSNARF(Molecular Probes, Eugene, OR)로 로딩한 후, 새로운 배지에서 20분 동안 회수하였다. 세포를 방출 스펙트럼의 1시간 수집 동안 37°C, 5% CO<sub>2</sub>에서 현미경 스테이지에 설치하고, 이로부터 pHi를 각각 7 내지 15개 세포를 함유하는 필드로부터 기술된 바와 같이 계산할 수 있다 (Wahl ML, Grant DS. "Effects of microenvironmental extracellular pH and extracellular matrix proteins on angiostatin's activity and on intracellular pH", Gen Pharmacol 2002;35:277-85). 스펙트럼 수집의 출발에서, 배지를 디시로부터 제거할 수 있으며, 세포를 pH 억제제 안지오테스틴, 항-베타-아단위, 토끼 IgG, 또는 카리포르라이드, 나트륨-양성자 교환 억제제의 존재 또는 부재 하에 1ml의 새로운 배지로 챌린징할 수 있다. 배지 pH를 상기 기술된 바와 같이, 고정된 %CO<sub>2</sub>에 의해 중탄산염 농도에 의해 조절될 수 있다.