



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2015년12월31일

(11) 등록번호 10-1581279

(24) 등록일자 2015년12월23일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07K 16/18 (2006.01) *A61K 39/395* (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01) *C12N 15/63* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2009-7010728

(22) 출원일자(국제) 2007년10월26일

심사청구일자 2012년10월25일

(85) 번역문제출일자 2009년05월26일

(65) 공개번호 10-2010-0043137

(43) 공개일자 2010년04월28일

(86) 국제출원번호 PCT/US2007/082647

(87) 국제공개번호 WO 2008/070344

국제공개일자 2008년06월12일

(30) 우선권주장

60/854,971 2006년10월27일 미국(US)

(56) 선행기술조사문현

WO2006078336 A2

US6534323 A

US6881546 A

US6858383 A

(73) 특허권자

엘파스, 인크.

미국 92121-3249 캘리포니아주 샌 디에고 페리스
스퀘어 스위트 에이 6335

(72) 발명자

사바디니, 로저, 에이.

미국 92040 캘리포니아주 레이크사이드 멜 솔 로
드 12509

가랜드, 월리암, 에이.

미국 92672 캘리포니아주 산 클레멘테 비아 콜리
브리 310

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

양영준, 양영환

전체 청구항 수 : 총 20 항

심사관 : 안규정

(54) 발명의 명칭 스피고신-1-포스페이트 결합을 위한 조성물 및 방법

(57) 요약

본 발명은 항-S1P 작용제, 예를 들어, 인간화 모노클로날 항체, 및 S1P의 검출 또는 S1P와 관련된 질환 또는 용태의 치치를 위한 이의 용도에 관한 것이다.

(72) 발명자

한센, 제네비에브

미국 92127 캘리포니아주 샌 디에고 샌 안토니오
로즈 코트 17050

존스, 스티븐, 타란

영국 더블유디7 8에이지 하트포드셔 래들렛 크리스
트처치 크레센트 1

윌리암즈, 다비드, 가레스

영국 케이티18 7엘와이 서레이 앱솔 화이트 호스
드라이브 56

명세서

청구범위

청구항 1

S1P에 특이적으로 반응하고, 하나 이상의 중쇄 가변 도메인 및 하나 이상의 경쇄 가변 도메인을 포함하며, 여기서

A. 각각의 중쇄 가변 도메인은

- (i) 서열 DHTIH (서열 13)의 제1 아미노산 잔기 서열;
- (ii) 서열 AISPRHDITKYNEMFRG (서열 31)의 제2 아미노산 잔기 서열; 및
- (iii) 서열 GGFYGSTIWFDF (서열 15)의 제3 아미노산 잔기 서열

을 포함하고,

B. 각각의 경쇄 가변 도메인은

- (i) 서열 ITTIDIDDDMN (서열 10)의 제1 아미노산 잔기 서열;
- (ii) 서열 EGNILRP (서열 11)의 제2 아미노산 잔기 서열; 및
- (iii) 서열 LQSDNLPFT (서열 12)의 제3 아미노산 잔기 서열

을 포함하는,

단리된 인간화 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 2

제1항에 있어서, 2개의 중쇄 가변 도메인 및 2개의 경쇄 가변 도메인을 포함하는, 단리된 인간화 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 3

제1항에 있어서,

- A. 각각의 중쇄 가변 도메인이 ATCC 등록번호 PTA-8421 내의 벡터 pATH1009 내 중쇄 유전자에 의해 코딩되는 중쇄 가변 도메인과 동일한 중쇄 가변 도메인 아미노산 서열을 포함하고,
- B. 각각의 경쇄 가변 도메인이 ATCC 등록번호 PTA-8421 내의 벡터 pATH1009 내 경쇄 유전자에 의해 코딩되는 경쇄 가변 도메인과 동일한 경쇄 가변 도메인 아미노산 서열을 포함하는 것인,
단리된 인간화 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 4

제1항에 있어서,

- A. 각각의 중쇄가 ATCC 등록번호 PTA-8421 내의 벡터 pATH1009 내 중쇄 유전자에 의해 코딩되는 중쇄 가변 도메인과 동일한 중쇄 가변 도메인 아미노산 서열을 포함하고,
- B. 각각의 경쇄가 ATCC 등록번호 PTA-8421 내의 벡터 pATH1009 내 경쇄 유전자에 의해 코딩되는 경쇄 가변 도메인과 동일한 경쇄 가변 도메인 아미노산 서열을 포함하는 것인,
단리된 인간화 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 5

제1항에 따른 인간화 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 발현을 코딩하며,

- A. 인간화 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 중쇄 폴리펩티드(들)을 코딩하는 유전자 및 프로모터를 포함하는

제1 발현 카세트; 및

- B. 인간화 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 경쇄 폴리펩티드(들)을 코딩하는 유전자 및 프로모터를 포함하는 제2 발현 카세트를 포함하는,
단리된 핵산 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서, 제1 및 제2 발현 카세트를 포함하는 플라스미드를 포함하는 단리된 핵산 조성물.

청구항 7

제5항에 따른 단리된 핵산 조성물로 형질감염된 숙주 세포.

청구항 8

제1항에 있어서,

- A. 각각의 중쇄가 ATCC 등록번호 PTA-8422 하에 기탁된 CHO 세포주 LH1 275에 의해 발현되는 항체의 중쇄 가변 도메인과 동일한 중쇄 가변 도메인을 포함하고;
B. 각각의 경쇄가 ATCC 등록번호 PTA-8422 하에 기탁된 CHO 세포주 LH1 275에 의해 발현되는 항체의 경쇄 가변 도메인과 동일한 경쇄 가변 도메인을 포함하는 것인,
단리된 인간화 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 9

제1항에 있어서,

- A. 각각의 중쇄가 ATCC 등록번호 PTA-8422 하에 기탁된 CHO 세포주 LH1 275에 의해 발현되는 항체의 중쇄와 동일한 중쇄를 포함하고;
B. 각각의 경쇄가 ATCC 등록번호 PTA-8422 하에 기탁된 CHO 세포주 LH1 275에 의해 발현되는 항체의 경쇄와 동일한 경쇄를 포함하는 것인,
단리된 인간화 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 10

S1P에 특이적으로 반응하며, CDRL1 (서열 10), CDRL2 (서열 11) 및 CDRL3 (서열 12)을 특징으로 하는 초가변 상보성 결정 영역 (CDR)을 포함한 인간화 경쇄 가변 도메인, 및 CDRH1 (서열 13), CDRH2 (서열 31) 및 CDRH3 (서열 15)을 특징으로 하는 초가변 CDR을 포함한 인간화 중쇄 가변 도메인을 포함하는, 단리된 인간화 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 11

S1P에 특이적으로 반응하는 인간화 항체를 코딩하며, 아미노산 서열이 서열 10, 서열 11 및 서열 12인 CDR 웨프티드를 코딩하는 경쇄 유전자를 코딩하는 제1 유전자, 및 아미노산 서열이 서열 13, 서열 31 및 서열 15인 CDR 웨프티드를 코딩하는 중쇄 유전자를 코딩하는 제2 유전자를 포함하는 플라스미드.

청구항 12

아미노산 서열이 서열 10, 서열 11 및 서열 12인 CDR 웨프티드를 코딩하는 경쇄 유전자를 코딩하는 제1 유전자, 및 아미노산 서열이 서열 13, 서열 31 및 서열 15인 CDR 웨프티드를 코딩하는 중쇄 유전자를 코딩하는 제2 유전자를 포함하는 플라스미드.

청구항 13

제12항에 따른 플라스미드로 형질감염되고, 항체를 발현할 수 있는 재조합 숙주 세포.

청구항 14

제7항에 있어서, ATCC 등록번호 PTA-8421 하에 기탁된 숙주 세포.

청구항 15

제7항에 있어서, CHOK1SV 세포인 숙주 세포.

청구항 16

제15항에 있어서, 명칭 LH1 275를 가지고 ATCC 등록번호 PTA-8422 하에 기탁된 세포주인, 숙주 세포.

청구항 17

S1P에 특이적으로 반응하고, 하나 이상의 중쇄 가변 도메인 및 하나 이상의 경쇄 가변 도메인을 포함하며, 여기서

A. 각각의 중쇄는

(i) 아미노산 서열 EVQLVQSGAEVKPGESLKISQCSFGYIFIDHTIHWMRQMPGQGLE
WMGAISPRHDITKYNEMFRGQVTISADKSSSTAYLQWSSLKASDTAMYFCARGGFYGSTIWFDFWGQGTMTVSS (서열 32, 잔기 20 내지 140 포함)을 갖는 아미노산 서열; 또는

(ii) 상기 A(i) 아미노산 서열과 80% 이상 서열 동일성을 갖는 아미노산 잔기 서열이되, 아미노산 잔기 서열 DHTIH (서열 13)을 포함하는 제1 CDR, 아미노산 잔기 서열 AISPRHDITKYNEMFRG (서열 31)을 포함하는 제2 CDR; 및 아미노산 잔기 서열 GGFYGSTIWFDF (서열 15)을 포함하는 제3 CDR

을 포함하는 중쇄 가변 도메인을 포함하고,

B. 각각의 경쇠는

(i) 아미노산 서열 ETTVTQSPSFLSASVGDRVITCITTIDDDDMNWQQEPG
KAPKLLISEGNILRPGVPSPRFSSSGYGTDFLTISKLQPEDFATYYCLQSDNLPFTFGQGTKLEIK (서열 33, 잔기 21 내지 127 포함)을 갖는 아미노산 잔기 서열; 또는

(ii) 상기 B(i) 아미노산 서열과 80% 이상 서열 동일성을 갖는 아미노산 잔기 서열이되, 아미노산 잔기 서열 ITTTDIDDDMN (서열 10)을 포함하는 제1 CDR, 아미노산 잔기 서열 EGNILRP (서열 11)을 포함하는 제2 CDR; 및 아미노산 잔기 서열 LQSDNLNPFT (서열 12)을 포함하는 제3 CDR

을 포함하는 경쇠 가변 도메인을 포함하는,

단리된 인간화 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 18

제1항 내지 제4항, 제8항 내지 제10항 및 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 인간화 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 하나 이상의 아미노산 잔기가 글리코실화된 것인, 단리된 인간화 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 19

제1항 내지 제4항, 제8항 내지 제10항 및 제17항 중 어느 한 항에 따른 단리된 인간화 항체 또는 이의 항원 결합 단편 및 제약상 허용가능한 담체를 포함하는, 암, 염증성 장애, 뇌혈관 질환, 심혈관 질환, 안구 장애, 섬유증, 또는 병적 혈관형성과 관련된 질환 또는 장애를 치료하기 위한 제약 조성물로서, 여기서 병적 혈관형성과 관련된 질환 또는 장애는 종양 성장, 종양 침습, 종양 전이, 맥락막 혈관신생, 연령-관련 황반 변성, 당뇨병성 망막병증 (DR), 미숙아 망막병증 (ROP), 허혈성 망막병증 (IR), 겹상적혈구 망막병증, 망막 정맥 폐쇄 질환, 각막 이식 거부, 신생혈관 녹내장, 콘택트 렌즈 과도착용, 각막의 단순 헤르페스, 따 헤르페스 또는 원충 감염, 의상편, 갑엽성 포도막엽, 만성 망막 박리, 레이저 손상, 또는 망막 혈관종성 증식인 제약 조성물.

청구항 20

제19항에 있어서. 암구 장애가 역령-관련 황반 변성인 제약 조성물.

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

청구항 58

삭제

청구항 59

삭제

청구항 60

삭제

청구항 61

삭제

청구항 62

삭제

청구항 63

삭제

청구항 64

삭제

청구항 65

삭제

청구항 66

삭제

청구항 67

삭제

청구항 68

삭제

청구항 69

삭제

청구항 70

삭제

청구항 71

삭제

청구항 72

삭제

청구항 73

삭제

청구항 74

삭제

청구항 75

삭제

청구항 76

삭제

청구항 77

삭제

청구항 78

삭제

청구항 79

삭제

발명의 설명

[0001]

관련 출원

[0002]

본 출원은 2006년 10월 27일에 출원된 가출원 일련 번호 60/854,971 (대리인 관리 번호 LPT-3010-PV)을 우선권으로 청구하고, 상기 가출원의 내용은 모든 목적을 위해 전체적으로 거명에 의해 본원에 포함된다.

[0003]

서열 목록

[0004]

본 출원은 이와 동시에 제출된 서열 목록과 함께 출원되었고, 이러한 서열 목록을 포함하여, 상기 서열 목록은 적용 가능한 규칙 및 절차에 따라 제조되어 파일로 저장되었다. 이러한 서열 목록은 모든 목적을 위해 거명에 의해 본원에 포함된다.

[0005]

발명의 배경

기술 분야

[0006]

1. 기술 분야

[0007] 본 발명은 스팽고신-1-포스페이트 (S1P)에 결합하는 작용제, 특히 생리학적 조건 하에 S1P에 특이적으로 반응성인 인간화 모노클로날 항체, 항체 단편, 및 항체 유도체에 관한 것이다. 이같은 작용제는 이를 함유하는 제약 조성물의 전달을 통해 다양한 질환 또는 장애의 치료 및/또는 예방에서 사용될 수 있다.

[0008] 하기의 설명은 본 발명을 이해하는데 유용할 수 있는 정보를 포함한다. 이는 본원에서 제공된 임의의 정보, 또는 본원에서 구체적으로 또는 함축적으로 언급된 임의의 간행물이 현재 청구된 발명에 대한 종래 기술이거나 또는 심지어 이러한 발명에 특별히 관련된다는 것을 승인하지는 않는다.

배경기술

2. 배경기술

생체활성 신호전달 지질

[0011] 현재 지질 및 이의 유도체는 세포막 내의 그저 단순한 구조적 요소로서 또는 β -산화, 해당작용 또는 기타 대사 프로세스를 위한 에너지 공급원으로서가 아니라 의학 연구를 위한 중요한 표적으로 중요한 표적으로 인식된다. 특히, 특정한 생체활성 지질들은 동물 및 인간 질환에서 중요한 신호전달 매개물로서 기능한다. 형질막의 지질의 대부분은 오로지 구조적인 역할만을 하지만, 이들 중 소수는 세포외 자극을 세포 내로 중계하는데 수반된다. "지질 신호전달"은 세포막 지질을 2차 매신저로 사용하는 다수의 세포성 신호 변환 경로 중 임의의 것, 뿐만 아니라 지질 신호전달 분자와 이러한 분자 자신의 특이적 수용체의 직접적인 상호작용을 지칭한다. 지질 신호전달 경로는 성장 인자에서 염증성 사이토카인까지 이르는 다양한 세포외 자극에 의해 활성화되고, 세포 운명 결정 예컨대 세포자멸사, 분화 및 증식을 조절한다. 점점 더 많은 생체활성 지질들이 확인되고 이들의 작용이 특성화되기 때문에 생체활성 지질 신호전달의 연구는 집중적인 과학 연구의 분야이다.

[0012] 생체활성 지질의 예로는 에이코사노이드 (카나비노이드, 류코트리엔, 프로스타글란딘, 리폭신, 에폭시에이코사트리엔산, 및 이소에이코사노이드 포함), 비-에이코사노이드 카나비노이드 매개물, 인지질 및 이의 유도체 예컨대 포스파티드산 (PA) 및 포스파티딜글리세롤 (PG), 혈소판 활성화 인자 (PAF) 및 카르디오리핀, 뿐만 아니라 라이소인지질 예컨대 라이소포스파티딜 콜린 (LPC) 및 다양한 라이소포스파티드산 (LPA)이 포함된다. 생체활성 신호전달 지질 매개물에는 스팽고지질 예컨대 스팽고마이엘린, 세라마이드, 세라마이드-1-포스페이트, 스팽고신, 스팽고실폴스포릴 콜린, 스팽가닌, 스팽가닌-1-포스페이트 (디히드로-S1P) 및 스팽고신-1-포스페이트가 또한 포함된다. 스팽고지질 및 이의 유도체는 중요한 세포성 프로세스에 대한 다면발현성 효과가 있는 일군의 세포외 및 세포내 신호전달 분자를 나타낸다. 생체활성 신호전달 지질의 또다른 예로는 포스파티딜세린 (PS), 포스파티딜이노시톨 (PI), 포스파티딜에탄올아민 (PEA), 디아실글리세리드 (DG), 술파티드, 장글리오시드, 및 세레브로시드가 포함된다.

[0013] 스팽고지질은 초기의 불가사의한 성질로 인해 스팽크스를 따라서 명명된 독특한 클래스의 지질이다. 스팽고지질은 초기에는 세포막의 1차적인 구조적 성분으로서 특성화되었지만, 최근의 연구들은 스팽고지질이 세포성 신호전달 및 조절 분자로 또한 작용한다는 것을 가리킨다 ([Hannun, et al., Adv. Lipid Res. 25:27-41, 1993]; [Speigel, et al., FASEB J. 10:1388-1397, 1996]; [Igarashi, J. Biochem 122:1080-1087, 1997]; [Hla, T. (2004). Semin Cell Dev Biol, 15, 513-2]; [Gardell, S.E., Dubin, A.E. & Chun, J. (2006). Trends Mol Med, 12, 65-75]). 스팽고지질은 세포성 신호전달 및 조절 분자로서 또한 작용하는 세포막의 1차적인 구조적 성분이다 ([Hannun and Bell, Adv. Lipid Res. 25: 27-41, 1993]; [Igarashi, J. Biochem 122: 1080-1087, 1997]). 스팽고지질 신호전달 매개물인 세라마이드 (CER), 스팽고신 (SPH) 및 스팽고신-1-포스페이트 (S1P)가 가장 광범위하게 연구되었고, 최근에는 심혈관계, 혈관형성 및 종양 생물학에서의 이의 역할이 인정되었다 ([Claus, et al., Curr Drug Targets 1: 185-205, 2000]; [Levade, et al., Circ. Res. 89: 957-968, 2001]; [Wang, et al., J. Biol. Chem. 274: 35343-50, 1999]; [Wascholowski and Giannis, Drug News Perspect. 14: 581-90, 2001]; [Spiegel, S. & Milstien, S. (2003). Sphingosine-1-phosphate: an enigmatic signaling lipid. Nat Rev Mol Cell Biol, 4, 397-407]).

[0014] 스팽고지질 대사의 리뷰를 위해, [Liu, et al., Crit Rev. Clin. Lab. Sci. 36:511-573, 1999] 참조. 스팽고마이엘린 신호전달 경로의 리뷰를 위해, [Hannun, et al., Adv. Lipid Res. 25:27-41, 1993]; [Liu, et al., Crit. Rev. Clin. Lab. Sci. 36:511-573, 1999]; [Igarashi, J. Biochem. 122:1080-1087, 1997]; [Oral, et al., J. Biol. Chem. 272:4836-4842, 1997]; 및 [Spiegel et al., Biochemistry (Moscow) 63:69-83, 1998] 참조.

[0015] S1P는 세포 증식의 매개물이고, 생존 경로의 활성화를 통해 세포자멸사로부터 세포를 보호한다 ([Maceyka, et

al. (2002), BBA, vol. 1585: 192–201], 및 [Spiegel, et al. (2003), Nature Reviews Molecular Cell Biology, vol. 4: 397–407]). CER/SPH 수준과 S1P 간의 균형이 세포가 사망 경로 내로 지시되는지 또는 세포 자멸사로부터 보호되는지 여부를 결정하는 가변저항기 메커니즘을 제공하는 것으로 제안되었다. 가변저항기 메커니즘의 주요 조절 효소는 스팽고신 키나제 (SPHK)이고, 이의 역할은 사망-촉진 생체활성 신호전달 지질 (CER/SPH)을 성장-촉진 S1P로 전환시키는 것이다. S1P에는 2가지 운명이 있다: S1P는 S1P를 포스포에탄올아민 및 핵사데카날로 분해하는 S1P 리아제(lase)에 의해 분해될 수 있거나, 또는 멀 통상적으로, S1P 포스파타제에 의해 SPH로 가수분해된다.

[0016] S1P의 다면발현성 생물학적 활성은 내피 분화 유전자 (EDG)로 원래 알려졌던 G 단백질-커플링 수용체 (GPCR)의 패밀리를 통해 매개된다. 5가지 GPCR이 고-친화력 S1P 수용체 (S1PR)로 확인되었다: S1P₁/EDG-1, S1P₂/EDG-5, S1P₃/EDG-3, S1P₄/EDG-6, 및 S1P₅/EDG-8만이 1998년에 확인되었다 ([Lee, et al., 1998]). S1P에 의해 유발된 다수의 응답들은 여러 이종삼량체성 G 단백질 (G_{q/-}, G_i, G₁₂₋₁₃) 및 Rho 패밀리의 소형 GTPase에 커플링된다 ([Gardell, et al., 2006]).

[0017] 성인에서, S1P은 혈소판 ([Murata et al., 2000]) 및 비만 세포로부터 방출되어, 상처 치유를 촉진하고 염증성 응답에 참여하기 위한 유리 S1P의 국소적인 펠스 (S1PR의 K_d를 초과하는데 충분함)를 생성시킨다. 정상적인 조건 하에, 혈장 내의 전체 S1P는 꽤 높다 (300–500 nM); 그러나, 대부분의 S1P가 혈청 단백질, 특히 지질단백질 (예를 들어, HDL>LDL>VLDL) 및 일부만에 의해 '완충'될 수 있어, 생체-이용가능한 S1P (또는 S1P의 유리 분획)은 S1PR을 뚜렷하게 활성화시키는데 충분하지 않은 것으로 가정되었다 ([Murata et al., 2000]). 그렇지 않은 경우, 부적합한 혈관형성 및 염증이 초래될 것이다. S1P의 세포내 작용이 또한 제안되었다 (예를 들어, [Spiegel S, Kolesnick R (2002), Leukemia, vol. 16: 1596–602]; [Suomalainen, et al (2005), Am J Pathol, vol. 166: 773–81] 참조).

[0018] 세포 표면 S1P 수용체의 광범위한 발현은 S1P가 증식, 부착, 수축, 운동성, 형태형성, 분화, 및 생존이 포함되는 다양한 스펙트럼의 세포성 응답에 영향을 미치도록 한다. 이러한 응답 스펙트럼은 세포 및 조직 시스템 내의 S1P 수용체의 중첩된 또는 독특한 발현 패턴에 좌우되는 것으로 보인다. 또한, 혈소판-유래 성장 인자 (PDGF), 혈관 내피 성장 인자 (VEGF), 및 염기성 섬유모세포 성장 인자 (bFGF)가 포함되는 성장 인자 신호전달 경로와 S1P 경로 간의 혼선이 최근에 입증되었다 (예를 들어, [Baudhuin, et al. (2004), FASEB J, vol. 18: 341–3] 참조). S1P를 수반하는 다양한 세포성 프로세스의 조절은 특히 뉴런 신호전달, 혈관긴장도, 상처 치유, 면역 세포 트래피킹(trafficking), 생식, 및 심혈관 기능에 대한 특별한 영향이 있다. 이러한 시스템 내의 S1P의 내인성 수준의 변경은 암, 염증, 혈관형성, 심장 질환, 천식, 및 자가면역 질환이 포함되는 여러 병리생리학적 용태를 유도하는 해로운 효과가 있을 수 있다.

[0019] 심혈관 질환, 뇌혈관 질환 및 다양한 암이 포함되는 다양한 질환 및 장애의 치료에 대한 최근의 신규 접근법은, 단독으로 또는 다른 치료와 조합하여, 생물학적으로 이용가능한 S1P의 수준을 감소시키는 것을 수반한다. 스팽고지질 대사 경로의 주요 효소, 예컨대 SPHK를 표적으로 하는 스팽고지질-기반 치료 전략이 제안되었지만, 지질 매개물 S1P 자체의 방해는 주로 이러한 지질 표적을 직접적으로 완화시키는 것에서의 어려움, 특히 먼저 S1P 표적에 대한 항체를 상승시키는 것 및 그 후 이를 검출하는 것에서의 어려움으로 인해 현재까지 강조되지 않았다.

[0020] 최근, S1P에 특이적인 항체의 생성이 기술되었다. 예를 들어, 동일한 출원인의 미국 특허 출원 일련 번호 20070148168; WO2007/053447 참조한다. 이같은 항체 (예를 들어, 혈청으로부터 S1P를 선택적으로 흡착할 수 있음)는 세포외 S1P를 중화시키는 분자 스폰지로서 작용한다. 동일한 출원인의 미국 특허 번호 6,881,546 및 6,858,383 및 미국 특허 출원 일련 번호 10/029,372를 또한 참조한다. Lpath, Inc.가 개발하고 상기 열거된 특정 특허 또는 특허 출원에 기술된 뮤린(murine) 모노클로날 항체 (mAb)인 스팽고맙(SPHINGOMAB)TM는 인간 질환 모델에서 효과적인 것으로 나타났다. 일부 상황에서, 특히 인간 (인간-항-마우스 항체 (HAMA) 응답이 일어날 수 있음)에서의 치료적 사용에 대해, 인간화 항체가 뮤린 항체에 비해 바람직 할 수 있다. 이같은 응답은 결합 활성을 중화시킴으로써 및/또는 신체 내에서의 순환으로부터 항체를 급속하게 소거시킴으로써 항체의 유효성을 감소시킬 수 있다. 또한 HAMA 응답은 마우스 항체의 후속 투여 시 독성을 야기할 수 있다.

[0021] 인간화 항-S1P 항체가 개발되어 본원에서 기술된다. 이러한 항체는 S1P 결합, S1P 중화 및 S1P와 관련된 질환 상태의 조정에서의 효능의 관점에서 뮤린 mAb의 모든 장점이 있지만, 인간 환경에서 사용되는 경우의 뮤린 mAb의 잠재적인 단점은 없을 것으로 예상된다. 하기의 실시예들에 기술된 바와 같이, 실제로 이러한 인간화 항체 (LT1009 또는 소넵시주맙(sonepcizumab)으로 지칭됨)는 질환의 동물 모델에서 어버이 (뮤린) 항체보다 더 큰 활

성을 나타냈다.

3. 정의

[0022]

본 발명을 상세하게 기술하기 전에, 본 발명의 문맥에서 사용된 여러 용어들이 정의될 것이다. 이러한 용어들에 더하여, 필요한 경우 기타 용어들이 명세서 내의 다른 곳에서 정의된다. 본원에서 달리 명확하게 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 업계 용어들은 업계에서 인정되는 의미를 가질 것이다. 상충되는 경우, 정의가 포함되는 본 명세서가 제어할 것이다.

[0023]

"면역-유래 모이어티(moiety)"는 임의의 항체 (Ab) 또는 면역글로불린 (Ig)을 포함하고, 면역글로불린 유전자로부터 유래되거나 이를 모델로 하거나 이에 의해 코딩되는 임의 형태의 펩티드, 폴리펩티드, 또는 항원 또는 에피토프에 결합할 수 있는 이같은 펩티드 또는 폴리펩티드의 단편을 지칭한다 (예를 들어, [Immunobiology, 5th Edition, Janeway, Travers, Walport, Shlomchik (editors), Garland Publishing (2001)] 참조). 본 발명에서, 항원은 생체활성 지질 분자이다.

[0024]

"항-S1P 항체" 또는 "S1P에 대해 반응성인 면역-유래 모이어티"는 S1P에 결합하는 임의의 항체 또는 항체-유래 분자를 지칭한다. 이러한 정의로부터 이해될 바와 같이, 항체 또는 면역-유래 모이어티는 폴리클로날 또는 모노클로날일 수 있고, 다양한 수단을 통해 생성될 수 있고/있거나 인간 대상을 포함하는 동물로부터 단리될 수 있다.

[0025]

"생체활성 지질"은 지질 신호전달 분자를 지칭한다. 일반적으로, 생체활성 지질은 이의 신호전달 효과를 발휘할 때 생체막 내에 있지 않고, 즉 이같은 지질 종이 생체막 (예를 들어, 세포막, 세포소기관의 막 등) 내의 일부 지점에 존재할 수 있지만, 생체막과 회합된 경우에는 이같은 지질 종은 "생체활성 지질"이 아니고, 그보다는 "구조적 지질" 분자이다. 세포외 및/또는 세포내 신호전달을 매개하고, 따라서 분화, 이동, 증식, 분비, 생존 및 기타 프로세스를 조정함으로써 많은 유형의 세포의 기능을 제어하는데 수반된다는 점에서 생체활성 지질은 구조적 지질 (예를 들어, 막-결합 인지질)과 구별된다. 생체 내에서, 생체활성 지질은 세포외액 내에서 발견될 수 있고, 여기서 다른 분자, 예를 들어 혈청 단백질 예컨대 알부민 및 지질단백질과 복합체를 형성할 수 있거나, 또는 "유리" 형태일 수 있고, 즉 또다른 분자 종과 복합체를 형성하지 않을 수 있다. 세포외 매개물로서, 일부 생체활성 지질은 막-결합 이온 채널 또는 G-단백질-커플링 수용체를 활성화시킴으로써 세포 신호전달을 변경시키고, 차례로 상기 채널 또는 수용체는 세포 기능 또는 생존에서의 변화를 초래하는 복잡한 신호전달 시스템을 활성화시킨다. 세포내 매개물로서, 생체활성 지질은 세포내 성분 예컨대 효소 및 이온 채널과 직접 상호작용함으로써 작용을 발휘할 수 있다. 생체활성 지질의 대표적인 예로는 LPA 및 S1P가 포함된다.

[0026]

용어 "치료제"는 혈관형성 및/또는 혈관신생, 예를 들어, 눈 질환 및 용태와 관련되거나 이의 기초를 이루는 병리학의 일부인 CNV 및 BV 성숙, 부종, 혈관 투과성 및 섬유증, 섬유발생 및 흉터생성을 완화하는 작용제를 의미한다.

[0027]

용어 "조합 요법"은 지시된 치료 효과를 달성하기 위해 2가지 이상의 상이한 요법을 제공하는 것을 수반하는 치료 계획을 지칭한다. 예를 들어, 조합 요법은 2가지 이상의 화학적으로 상이한 활성 성분, 예를 들어, 항-LPA 항체 및 항-S1P 항체의 투여를 수반할 수 있다. 별법적으로, 조합 요법은 생체활성 지질에 대해 반응성인 면역-유래 모이어티의 투여 및 하나 이상의 또다른 화학요법제의 투여를 수반할 수 있다. 별법적으로, 조합 요법은 항-지질 항체의 투여와 함께 또다른 처치, 예컨대 방사선조사 요법 및/또는 수술의 전달을 수반할 수 있다. 또한, 조합 요법은 항-지질 항체의 투여와 함께 하나 이상의 또다른 생물학적 작용제 (예를 들어, 항-VEGF, TGF β , PDGF, 또는 bFGF 작용제), 화학요법제 및 또다른 처치 예컨대 방사선조사 및/또는 수술을 수반할 수 있다. 2가지 이상의 상이한 활성 성분을 사용하는 조합 요법의 정황에서, 활성 성분은 동일한 조성물의 일부로서 또는 상이한 조성물로서 투여될 수 있는 것으로 이해된다. 별도의 조성물로서 투여되는 경우, 상이한 활성 성분들을 포함하는 조성물들은 동시에 또는 상이한 시간에, 동일한 경로 또는 상이한 경로에 의해, 동일한 투약 계획 또는 상이한 투약 계획을 사용하여 투여될 수 있고, 이들은 모두 특정 정황이 요구하는 바 및 주치의의 결정에 따른다. 유사하게, 하나 이상의 항-지질 항체 종, 예를 들어, 항-LPA 항체 (단독 또는 하나 이상의 화학요법제와 조합됨)가, 예를 들어, 방사선조사 및/또는 수술과 조합되는 경우, 약물(들)은 수술 또는 방사선조사 처치 전 또는 후에 전달될 수 있다.

[0028]

"항-S1P 작용제"는 S1P에 특이적으로 반응성인 임의의 작용제를 지칭하고, S1P 및 이의 변이체에 결합하는 항체 또는 항체-유래 분자 또는 비-항체-유래 모이어티를 포함한다.

[0029]

"합텐"은 합텐에의 접합을 위해 개조됨으로써 합텐이 면역원성이도록 하는 분자를 지칭한다. 합텐 분자의 대표

적인 비-제한적 클래스는 단백질이고, 이의 예로는 알부민, 키홀 림펫 혈모시아닌, 혜마글루타닌, 과상풍 및 디프테리아 특소이드가 포함된다. 본 발명에 따라 사용하기에 적절한 합텐 분자의 기타 클래스 및 예는 당업계에 공지되어 있다. 이러한 합텐, 뿐만 아니라 추후에 발견 또는 발명되는 천연 발생 또는 합성 합텐이 본 발명에 따른 용도를 위해 개조될 수 있다.

[0031] 용어 "화학요법제"는 항암 및 기타 항-과증식 작용제를 의미한다. 간단하게, "화학요법제"는 세포 및 조직을 파괴하도록 의도된 화학물질을 지칭한다. 이같은 작용제에는 (1) DNA를 손상시키는 작용제 및 DNA 합성을 억제하는 작용제: 안트라사이클린 (독소루비신, 도노루비신, 에피루비신), 알킬화제 (벤다무스틴, 부술판, 카르보플라틴, 카르무스틴, 시스플라틴, 클로람부실, 시클로포스파미드, 다카르바진, 혼사메틸멜라민, 이포스파미드, 로무스틴, 메클로르에타민, 멜팔란, 미토탄, 마이토마이신, 피포브로만, 프로파르바진, 스트렙토조신, 티오텐파, 및 트리에틸렌멜라민), 백금 유도체 (시스플라틴, 카르보플라틴, 시스 디아민디클로로플라티늄), 텔로머라제 및 토포이소머라제 억제제 (캄프토사르(Camptosar)), (2) 투불린-탈중합제: 탁소이드 (파클리탁셀(Paclitaxel), 도세탁센, BAY 59-8862), (3) 항-대사물 예컨대 카페시타빈, 클로로테옥시아데노신, 시타라빈 (및 이의 활성화 형태, ara-CMP), 사이토신, 아라비노시드, 다카바진, 플록수리딘, 플루다라빈, 5-플루오로우라실, 5-DFUR, 쟈시타빈, 히드록시우레이, 6-메르캅토피린, 메토트렉세이트, 펜토스타틴, 트리메트렉세이트, 및 6-티오구아닌 (4) 항-혈관형성제 (아바스틴(Avastin), 탈리도미드, 수니티닙, 레날리도미드), 혈관 파괴제 (플라보노이드/플라본, DMXAA, 콤브레타스타틴 유도체 예컨대 CA4DP, ZD6126, AVE8062A 등), (5) 생물제제 예컨대 항체 또는 항체 단편 (헤르셉틴(Herceptin), 아바스틴(Avastin), 파노렉스(Panorex), 리툭산(Rituxan), 제발린(Zevalin), 마일로타르그(Mylotarg), 캄파트(Campath), 벡사르(Bexar), 에르비툭스(Erbtux), 루센티스(Lucentis)), 및 (6) 내분비 요법: 아로마타제 억제제 (4-히드록시안드로스텐디온, 엑세메스탄, 아미노글루테티미드, 아나스트로졸, 레토졸), 항-에스트로겐 (타목시펜(Tamoxifen), 토레미핀(Toremifine), 라옥시펜(Raoxifene), 파슬로덱스(Faslodex)), 스테로이드 예컨대 텍사메타손, (7) 면역조정제: 사이토카인 예컨대 IFN-베타 및 IL2), 인테그린, 기타 부착 단백질 및 매트릭스 메탈로프로테이나제에 대한 억제제), (8) 히스톤 데아세틸라제 억제제, (9) 신호변환 억제제 예컨대 이매티닙 (글리벡(Gleevec))과 같은 티로신 키나제의 억제제, (10) 열 충격 단백질의 억제제, (11) 레티노이드 예컨대 올-트랜스(all trans) 레티노산, (12) 성장 인자 수용체 또는 성장 인자 자체의 억제제, (13) 항-유사분열 화합물 예컨대 나벨빈, 파클리탁센(Paclitaxel), 탁소테레, 빈블라스틴, 빈크리스틴, 빈데신, 및 비노렐빈, (14) 항-염증제 예컨대 COX 억제제 및 (15) 세포 주기 조절제, 예를 들어, 체크 포인트 조절제 및 텔로머라제 억제제가 포함되지만 이에 한정되지는 않는다.

[0032] 본원에서 사용된 용어 "스핑고지질"은 하기의 화합물들을 포함하지만 이에 한정되지 않는, 스핑고지질로 공지된 당업계의 화합물들의 클래스를 지칭한다 (하기의 괄호 안의 알파벳-숫자식 문자열로 지시되는 링크를 함유하는 사이트로서 <http://www.lipidmaps.org>를 참조하고, 상기 링크는 상응하는 화합물에 대한 화학식, 구조 정보 등을 함유한다):

[0033] 스팍고이드 염기 [SP01]

[0034] 스팍그-4-애닌 (스팡고신) [SP0101]

[0035] 스팍가닌 [SP0102]

[0036] 4-히드록시스팡가닌 (파이토스팡고신) [SP0103]

[0037] 스팍고이드 염기 상동체 및 변이체 [SP0104]

[0038] 스팍고이드 염기 1-포스페이트 [SP0105]

[0039] 라이소스팡고마이엘린 및 라이소글리코스팡고지질 [SP0106]

[0040] N-메틸화 스팍고이드 염기 [SP0107]

[0041] 스팍고이드 염기 유사체 [SP0108]

[0042] 세라마이드 [SP02]

[0043] N-아실스팡고신 (세라마이드) [SP0201]

[0044] N-아실스팡가닌 (디히드로세라마이드) [SP0202]

[0045] N-아실-4-히드록시스팡가닌 (파이토세라마이드) [SP0203]

- [0046] 아실세라마이드 [SP0204]
- [0047] 세라마이드 1-포스페이트 [SP0205]
- [0048] 포스포스핑고지질 [SP03]
- [0049] 세라마이드 포스포콜린 (스핑고마이엘린) [SP0301]
- [0050] 세라마이드 포스포에탄올아민 [SP0302]
- [0051] 세라마이드 포스포이노시톨 [SP0303]
- [0052] 포스포노스핑고지질 [SP04]
- [0053] 중성 글리코스핑고지질 [SP05]
- [0054] 단순 Glc 시리즈 (GlcCer, LacCer 등) [SP0501]
- [0055] GalNAcb1-3GalA1-4Galb1-4Glc- (글로보(Glubo) 시리즈) [SP0502]
- [0056] GalNAcb1-4Galb1-4Glc- (강글리오(Ganglio) 시리즈) [SP0503]
- [0057] Galb1-3GlcNAcb1-3Galb1-4Glc- (락토(Lacto) 시리즈) [SP0504]
- [0058] Galb1-4GlcNAcb1-3Galb1-4Glc- (네오락토(Neolacto) 시리즈) [SP0505]
- [0059] GalNAcb1-3GalA1-3Galb1-4Glc- (이소글로보(Isoglubo) 시리즈) [SP0506]
- [0060] GlcNAcb1-2ManA1-3Manb1-4Glc- (몰루(Mollu) 시리즈) [SP0507]
- [0061] GalNAcb1-4GlcNAcb1-3Manb1-4Glc- (아르트로(Arthro) 시리즈) [SP0508]
- [0062] Ga1- (갈라(Gala) 시리즈) [SP0509]
- [0063] 기타 [SP0510]
- [0064] 산성 글리코스핑고지질 [SP06]
- [0065] 강글리오시드 [SP0601]
- [0066] 술포글리코스핑고지질 (술파티드) [SP0602]
- [0067] 글루쿠로노스핑고지질 [SP0603]
- [0068] 포스포글리코스핑고지질 [SP0604]
- [0069] 기타 [SP0600]
- [0070] 염기성 글리코스핑고지질 [SP07]
- [0071] 양쪽성 글리코스핑고지질 [SP08]
- [0072] 아르세노스핑고지질 [SP09]
- [0073] 본 발명은 과증식성 장애 예컨대 암 및 심혈관 또는 뇌혈관 질환 및 장애 및 다양한 눈 장애 (하기에 더욱 상세하게 기술됨)의 치료 또는 예방에 유용한 항-스핑고지질 S1P 작용제를 제공한다. 특히, 본 발명은 S1P 및 이의 변이체에 관한 것이고, 여기에는 스피ング고신-1-포스페이트 [스피ング-1-포스페이트; D-에리트로-스핑고신-1-포스페이트; 스피그-4-에닌-1-포스페이트; (E,2S,3R)-2-아미노-3-히드록시-옥타데크-4-에녹시]포스폰산 (AS 26993-30-6)]; 디히드로스핑고신-1-포스페이트 [스피ング가닌-1-포스페이트; [(2S,3R)-2-아미노-3-히드록시-옥타데وك사]포스폰산; D-에리트로-디히드로-D-스핑고신-1-포스페이트 (CAS 19794-97-9)]로 정의되는 DHS1P; 스핑고실포스포릴콜린, 라이소스핑고마이엘린, 스핑고실포스포콜린, 스핑고신 포스포릴콜린, 에타나미늄인 SPC; 2-(((2-아미노-3-히드록시-4-옥타데케닐)옥시)히드록시포스피닐)옥시)-N,N,N-트리메틸-, 클로라이드, (R-(R*,S*-E))), 2-[[[(E,2R,3S)-2-아미노-3-히드록시-옥타데크-4-에녹시]-히드록시-포스포릴]옥시에틸-트리메틸-아자늄 클로라이드 (CAS 10216-23-6)가 포함되지만, 이에 한정되지는 않는다.
- [0074] 본원에서 사용된 용어 "에피토프" 또는 "항원 결정인자"는, 달리 지시되지 않는 한, 항-S1P 작용제가 이에 대해 반응성인 S1P의 영역을 지칭한다.

[0075] 용어 "과증식성 장애"는 암 또는 신생물 및 양성 종양을 초래하는 기관 및 조직 세포의 제어되지 않은 성장이 포함되지만 이에 한정되지 않는, 제어되지 않은 세포 증식과 관련된 질환 및 장애를 지칭한다. 내피 세포와 관련된 과증식성 장애는 혈관형성 질환 예컨대 혈관종, 자궁내막증, 비만, 연령-관련 황반 변성 및 다양한 망막병증, 뿐만 아니라 죽상동맥경화증의 처치에서 스텐트삽입의 결과로 재협착을 야기하는 내피 세포 및 평활근 세포의 증식을 초래할 수 있다. 섬유모세포를 수반하는 과증식성 장애 (예를 들어, 섬유발생)에는 과도한 흉터생성 (예를 들어, 섬유증)의 장애 예컨대 연령-관련 황반 변성, 심근 경색증과 관련된 심장 리모델링 및 기능상실, 과도한 상처 치유 예컨대 수술 또는 손상의 결과로 통상적으로 발생하는 것, 첼로이드, 및 섬유양 종양 및 스텟팅(stenting)이 포함되지만, 이에 한정되지는 않는다.

[0076] 본 발명의 조성물은 스팽고지질을 기반으로 하는 요법에서 사용된다. "요법"은 질환, 장애 또는 신체적 외상의 예방 및/또는 치료를 지칭한다.

[0077] "심혈관 요법"은 심장 요법, 뿐만 아니라 심혈관계와 관련된 기타 질환, 예컨대 심장 질환의 예방 및/또는 치료를 포함한다. 용어 "심장 질환"은 심장 또는 심근 조직을 수반하는 임의 유형의 질환, 장애, 외상 또는 수술처치를 포함한다. 심근 조직의 저산소증 및/또는 혀혈, 및/또는 심장 기능상실과 관련된 심장 질환이 특히 흥미롭다. 혀혈로부터 초래될 수 있는 심장 질환의 한 유형은 재관류 손상이고, 예컨대 항-응고제, 혈전용해제 또는 항-협심증 의약이 요법에서 사용되는 경우 또는 심장 혈관이 혈관성형술 또는 심장 동맥 이식에 의해 수술로 개방되는 경우에 발생할 수 있는 것이다. 본 발명이 지시될 수 있는 또 다른 유형의 심장 질환은 심장 동맥 질환 (CAD)이고, 이는 혀혈의 통상적인 원인인 동맥경화증, 특히 죽상동맥경화증으로부터 발생할 수 있다. CAD에는 안정형 또는 불안정형 협심증과 같은 증상이 있고, 심근 경색증 (MI) 및 급성 심장사에 이를 수 있다. 특히 흥미로운 용태에는 심근 혀혈; 급성 심근 경색증 (AMI); 심장 동맥 질환 (CAD); 급성 관동맥 증후군 (ACS); 스텟팅이 있거나 없는 경피 혈관재형성 (관상동맥 혈관성형술) 동안 또는 이의 결과로서 발생할 수 있는 심장 세포 및 조직 손상; 관상동맥 우회 이식(CABG) 또는 인간에서 혀혈성 또는 혀혈성/재관류 손상을 야기할 수 수 있는 기타 수술 또는 의학 시술 또는 요법; 및 심혈관 외상이 포함되지만, 이에 한정되지는 않는다. 용어 "심장 기능상실"에는 급성 심근 경색증, 심근염, 심근병증, 울혈성 심장 기능상실, 패혈성 쇼크, 심장 외상 및 특별성 심장 기능상실이 포함된다. 심장 기능상실을 초래하는 혀혈성 용태의 스펙트럼은 급성 관상동맥 증후군 (ACS)으로 지칭된다.

[0078] 용어 "심장치료제"는 심장 및 심근 질환 및 장애에 의해 야기되거나 이와 관련된 질환 및 장애에 대해 치료적인 작용제를 지칭한다.

[0079] "뇌혈관 요법"은 뇌의 혀혈 및/또는 저산소증과 관련된 질환 및 장애의 예방 및/또는 치료에 대해 지시된 요법을 지칭한다. 심장 기능상실이 비제한적으로 포함되는 심장 질환으로부터 초래된 포괄적인 혀혈로부터 초래된 뇌의 혀혈 및/또는 저산소증이 특히 흥미롭다.

[0080] 용어 "스팡고지질 대사물"은 스팽고지질이 이로부터 제조되는 화합물, 뿐만 아니라 특정 스팽고지질의 분해로부터 초래되는 화합물을 지칭한다. 바꿔 말하면, "스팡고지질 대사물"은 스팽고지질 대사 경로에서 수반되는 화합물이다. 대사물에는 대사 전구물질 및 대사 생성물이 포함된다. 용어 "대사 전구물질"은 스팽고지질이 이로부터 제조되는 화합물을 지칭한다. 특히 흥미로운 대사 전구물질에는 SPC, 스팡고마이엘린, 디히드로스팡고신, 디히드로세라마이드 및 3-케토스팡가닌이 포함되지만, 이에 한정되지는 않는다. 용어 "대사 생성물"은 스팡고지질의 분해로부터 초래되는 화합물, 예컨대 포스포릴콜린 (예를 들어, 포스포콜린, 콜린 포스페이트), 유리 지방산이 포함되는 지방산, 및 핵사데카날 (예를 들어, 팔미트알데하يد)를 지칭한다.

[0081] 본원에서 사용된 용어 "치료적"은 질환 또는 장애의 처치의 전체 스펙트럼을 포함한다. 본 발명의 "치료"제는 위험이 있는 것으로 확인될 수 있는 표적 개체에 대해 디자인된 절차 (약리유전학)가 혼입된 것을 포함하여 예방적 또는 방지적인 방식으로, 또는 개선적 또는 치유적인 방식으로 작용할 수 있거나, 또는 치료될 질환 또는 장애의 하나 이상의 증상의 진행 속도 또는 정도를 느리게 하도록 작용할 수 있거나, 또는 필요한 시간, 임의의 불쾌감 또는 통증의 발생 또는 정도, 또는 질환, 장애 또는 신체적 외상으로부터의 회복과 관련된 신체적 제한을 최소화하도록 작용할 수 있거나, 또는 다른 요법 및 처치에 대한 보조제로서 사용될 수 있다.

[0082] "처치"는 치료적 처치 및 예방적 또는 방지적 수단 모두를 지칭한다. 처치가 필요한 대상에는 이미 장애가 있는 대상, 뿐만 아니라 장애를 방지하려는 대상이 포함된다.

[0083] 용어 "조합 요법"은 지시된 치료 효과를 달성하기 위해 2가지 이상의 상이한 요법을 제공하는 것을 수반하는 치료 계획을 지칭한다. 예를 들어, 조합 요법은 2가지 이상의 화학적으로 상이한 활성 성분, 예를 들어, 신속하

게 작용하는 화학요법제 및 항-지질 항체의 투여를 수반할 수 있다. 별법적으로, 조합 요법은 항-지질 항체 및 /또는 하나 이상의 화학요법제의 투여를 단독으로 또는 또 다른 처치, 예컨대 방사선조사 요법 및/또는 수술의 전달과 함께 수반할 수 있다. 또한, 조합 요법은 항-지질 항체의 투여와 함께 하나 이상의 또 다른 생물학적 작용제 (예를 들어, 항-VEGF, TGF β , PDGF, 또는 bFGF 작용제), 화학요법제 및 또 다른 처치 예컨대 방사선조사 및 /또는 수술을 수반할 수 있다. 2가지 이상의 상이한 활성 성분을 사용하는 조합 요법의 정황에서, 활성 성분은 동일한 조성물의 일부로서 또는 상이한 조성물로서 투여될 수 있는 것으로 이해된다. 별도의 조성물로서 투여되는 경우, 상이한 활성 성분들을 포함하는 조성물들은 동시에 또는 상이한 시간에, 동일한 경로 또는 상이한 경로에 의해, 동일한 투약 계획 또는 상이한 투약 계획을 사용하여 투여될 수 있고, 이들은 모두 특정 정황이 요구하는 바 및 주치의의 결정에 따른다. 유사하게, 하나 이상의 항-지질 항체 종, 예를 들어, 항-LPA 항체 (단독 또는 하나 이상의 화학요법제와 조합됨)가, 예를 들어, 방사선조사 및/또는 수술과 조합되는 경우, 약물(들)은 수술 또는 방사선조사 처치 전 또는 후에 전달될 수 있다.

[0084] "단독요법"은 단일 용량으로 투여되든지 또는 경시적으로 수회의 용량으로 투여되든지, 1가지의 치료적으로 효과적인 화합물의 전달을 기초로 하는 처치 계획을 지칭한다.

[0085] "신생물" 또는 "암"은 비정상적이고 제어되지 않은 세포 성장을 지칭한다. "신생물", 또는 종양 또는 암은 세포 성장의 비정상적이고, 조절되지 않으며, 혼란스러운 증식이고, 일반적으로 암으로 지칭된다. 신생물은 양성 또는 악성일 수 있다. 파괴성 성장, 침습 및 전이의 성질이 있는 경우, 신생물은 악성 또는 암성이다. 침습은 주변 조직의 침윤 또는 파괴에 의한 신생물의 국소적인 확산을 지칭하고, 전형적으로, 조직의 경계를 규정하는 바닥판을 파괴함으로써, 종종 신체의 순환계에 진입한다. 전이는 림프 또는 혈관에 의한 종양 세포의 살포를 전형적으로 지칭한다. 전이는 장액강, 또는 지주막하 공간 또는 기타 공간을 통한 직접적인 확장에 의한 종양 세포의 이동을 또한 지칭한다. 전이 프로세스를 통해, 신체의 다른 영역으로의 종양 세포 이동으로 최초의 출현 부위로부터 떨어진 영역에서 신생물이 수립된다.

[0086] 처치 목적을 위한 "포유동물"은 인간, 가축 및 농장 농물, 및 동물원, 운동 또는 애완 동물, 예컨대 개, 말, 고양이, 소 등을 포함하는, 포유동물로 분류되는 임의의 동물을 지칭한다. 바람직하게는, 포유동물은 인간이다.

[0087] 일반적으로 "천연 항체" 및 "천연 면역글로불린"은 2개의 동일한 경쇄 (L) 및 2개의 동일한 중쇄 (H)로 구성된, 약 150,000 달톤의 이종사량체성 당단백질이다. 각각의 경쇄는 1개의 디슬피드 공유 결합에 의해 중쇄에 연결되고, 디슬피드 연결의 개수는 여러 면역글로불린 이소타입의 중쇄들 간에 상이하다. 또한 각각의 중쇄 및 경쇄는 규칙적인 간격의 사슬내 디슬피드 다리를 갖는다. 각각의 중쇄는 다수의 불변 도메인이 이어지는 가변 도메인 (V_H)을 한쪽 말단에 갖는다. 각각의 경쇄는 한쪽 말단에 가변 도메인 (V_L)을 갖고 다른쪽 말단에 불변 도메인을 갖는다; 경쇄의 불변 도메인은 중쇄의 첫번째 불변 도메인과 정렬되고, 경쇄 가변 도메인은 중쇄의 가변 도메인과 정렬된다. 특정 아미노산 잔기가 경쇄 가변 도메인과 중쇄 가변 도메인 사이의 계면을 형성하는 것으로 여겨진다.

[0088] 용어 "가변"은 프레임워크 및 CDR (다르게는 초가변 영역으로 또한 알려짐)을 포함하고, 가변 도메인의 특정 부분이 항체들 간에서 서열이 크게 상이하고 각각의 특정 항체의 자신의 특정 항원에 대한 결합 및 특이성에서 사용된다는 사실을 지칭한다. 그러나, 가변성은 항체의 가변 도메인 전반에 걸쳐 고르게 분포되지 않다. 이는 경쇄 및 중쇄 가변 도메인 모두에서 초가변 영역으로 칭해지는 3개의 절편에 집중된다. 가변 도메인의 더욱 고도로 보존된 부분은 프레임워크 영역 (FR)으로 칭해진다. 천연 중쇄 및 경쇄 각각의 가변 도메인은 3개의 초가변 영역에 의해 연결된, β -시트 형상을 주로 채택한 4개의 FR (각각 FR1, FR2, FR3 및 FR4)을 포함하고, 상기 초가변 영역은 β -시트 구조를 연결하고 일부 경우에는 β -시트 구조의 일부를 형성하는 루프를 형성한다. 각각의 사슬 내의 초가변 영역은 FR에 의해 매우 근접하게 함께 유지되고, 다른 사슬로부터의 초가변 영역들과 함께 항체의 항원-결합 부위를 형성하는데 기여한다 ([Kabat, et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991), pp 647-669] 참조). 불변 도메인은 항체가 항원에 결합하는 것에 직접적으로 수반되지는 않지만, 항체-의존적 세포형 독성에서의 항체의 참여와 같은 다양한 이펙터 기능을 나타낸다.

[0089] 본원에 사용된 용어 "초가변 영역"은 항원 결합을 담당하는 항체의 아미노산 잔기를 지칭한다. 초가변 영역은 "상보성 결정 영역" 또는 "CDR"로부터의 아미노산 잔기 (예를 들어, 경쇄 가변 도메인 내의 잔기 24-34 (L1), 50-56 (L2) 및 89-97 (L3), 및 중쇄 가변 도메인 내의 31-35 (H1), 50-65 (H2) 및 95-102 (H3); [Kabat, et al. (1991), 상기 문헌]) 및/또는 "초가변 루프"로부터의 잔기 (예를 들어, 경쇄 가변 도메인 내의 잔기 26-32 (L1), 50-52 (L2) 및 91-96 (L3) 및 중쇄 가변 도메인 내의 26-32 (H1), 53-55 (H2) 및 96-101 (H3);

[Chothia and Lesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)]를 포함한다. "프레임워크" 또는 "FR" 잔기는 본원에서 정의된 초가변 영역 잔기 이외의 가변 도메인 잔기이다.

[0090] 항체를 파파인(papain)으로 소화시키면 "Fab" 단편이라고 칭해지는, 각각 단일 항원-결합 부위를 갖는 2개의 동일한 항원-결합 단편과, 나머지 "Fc" 단편이 생산되는데, Fc라는 명칭은 이의 쉽게 결정화되는 능력을 반영한 것이다. 펩신으로 처리하면 2개의 항원 결합 부위를 갖고 여전히 항원과 교차결합할 수 있는 $F(ab')_2$ 단편이 산출된다.

[0091] "Fv"는 완전한 항원-인식 부위 및 항원-결합 부위를 함유하는 최소 항체 단편이다. 이러한 영역은 1개의 중쇄 가변 도메인과 1개의 경쇄 가변 도메인이 단단한 비공유결합으로 회합되어 있는 이량체로 구성된다. 각각의 가변 도메인의 3개의 초가변 영역이 상호작용하여 V_H-V_L 이량체의 표면 상에 항원-결합 부위를 규정하는 것은 이러한 형상 내이다. 총괄적으로, 6개의 초가변 영역이 항원-결합 특이성을 항체에 부여한다. 그러나, 단일 가변 도메인 (또는 항원에 특이적인 3개의 초가변 영역만을 포함한 Fv의 절반)도, 비록 전체 결합 부위보다는 낮은 친화력이지만, 항원을 인식하고 이에 결합하는 능력을 갖는다.

[0092] Fab 단편은 경쇄의 불변 도메인 및 중쇄의 제1 불변 도메인 (CH1)을 또한 함유한다. Fab' 단편은, 항체 힌지 (hinge) 영역으로부터의 1개 이상의 시스테인(들)을 포함하는 중쇄 CH1 도메인의 카르복실 말단에 몇개의 잔기들이 부가되어 있어서 Fab 단편과 다르다. Fab'-SH는 불변 도메인의 시스테인 잔기(들)이 유리 티올 기를 갖는 Fab'에 대한 본원에서의 명칭이다. $F(ab')_2$ 항체 단편은 힌지 시스테인이 사이에 있는 Fab' 단편들의 쌍으로서 본래 생산되었다. 항체 단편들의 기타 화학적 커플링 또한 공지되어 있다.

[0093] 임의의 척추동물 종으로부터의 항체 (면역글로불린)의 "경쇄"는 불변 도메인의 아미노산 서열을 기초로 하여, 카파 (κ) 및 람다 (λ)로 칭해지는 명백하게 상이한 2가지 유형 중의 하나로 지정될 수 있다.

[0094] 중쇄의 불변 도메인의 아미노산 서열에 따라, 면역글로불린은 여러 클래스로 지정될 수 있다. 현재, 면역글로불린에는 IgA, IgD, IgE, IgG 및 IgM의 주요 5개 클래스가 있고, 이들 중 몇몇은 서브클래스(subclass) (이소 타입(isotype)), 예를 들어 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 및 IgA2로 추가로 분류될 수 있다. 상이한 클래스의 면역글로불린에 상응하는 중쇄 불변 도메인은 각각 알파, 델타, 엡실론, 감마 및 뮤로 칭해진다. 상이한 클래스의 면역글로불린의 서브유닛 구조 및 3차원 형상을 주지되어 있다.

[0095] 본원에서의 용어 "항체"는 가장 넓은 의미로 사용되고, 구체적으로 모노클로날 항체 (전장 모노클로날 항체 포함), 폴리클로날 항체, 다중특이적 항체 (예를 들어, 이중특이적 항체), 항체 단편, 및 어버이 항체의 CDR (또는 항원 결합 활성이 유지된 이의 변이체)을 이용하는 결합체를 구체적으로 포함한다. 항체는 어버이 항체의 하나 이상의 원하는 활성을 유지하는 것으로 본원에서 정의된다. 원하는 활성에는 항원에 특이적으로 결합하는 능력, 시험관내에서 증식을 억제하는 능력, 생체내에서 혈관형성을 억제하는 능력, 및 시험관 내에서 사이토카인 프로파일을 변경시키는 능력이 포함될 수 있다. "항체 단편"은 전장 항체의 일부분, 일반적으로 이의 항원 결합 도메인 또는 가변 도메인을 포함한다. 항체 단편의 예로는 Fab, Fab', $F(ab')_2$ 및 Fv 단편; 디아바디 (diabody); 선형 항체; 단일쇄 항체 분자; 및 항체 단편들로부터 형성된 다중특이적 항체가 포함된다.

[0096] 본원에서 사용된 용어 "모노클로날 항체"는 실질적으로 균질한 항체들의 집단으로부터 수득된 항체를 지칭하고, 예를 들어, 집단을 이루는 개별적인 항체들은 미량으로 존재할 수 있는 가능한 천연 발생 돌연변이를 제외하고는 동일하다. 모노클로날 항체는 단일 항원 부위에 대해 지시되어 고도로 특이적이다. 또한, 여러 결정인자 (에피토프)에 대해 지시된 여러 항체를 전형적으로 포함하는 통상적인 (폴리클로날) 항체 제제와는 달리, 각각의 모노클로날 항체는 항원 상의 단일 결정인자에 대해 지시된다. 수식어구 "모노클로날"은 실질적으로 균질한 항체 집단으로부터 수득되는 항체의 특성을 가리키고, 임의의 특정한 방법에 의한 항체 생산을 필요로 하는 것으로 해석되어서는 안된다. 예를 들어, 본 발명에 따라 사용될 모노클로날 항체는 [Kohler, et al., Nature 256:495 (1975)]에 최초로 기술된 하이브리도마 방법에 의해 제조될 수 있거나, 또는 재조합 DNA 방법 (예를 들어, 미국 특허 번호 4,816,567 참조)에 의해 제조될 수 있다. "모노클로날 항체"는, 예를 들어, [Clackson et al., Nature, 352:624-628 (1991)] 및 [Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991)]에 기술된 기술을 이용하여 과지 항체 라이브러리로부터 또한 단리될 수 있다.

[0097] 본원에서의 모노클로날 항체에는 중쇄 및/또는 경쇄의 일부분은 특정 종으로부터 유래되거나 특정 항체 클래스 또는 서브클래스에 속하는 항체의 상응하는 서열과 동일하거나 상동성이고, 사슬(들)의 나머지부분은 또 다른 종으로부터 유래되거나 또 다른 항체 클래스 또는 서브클래스에 속하는 항체의 상응하는 서열과 동일하거나 상동성

인 "키메라" 항체 (면역글로불린), 뿐만 아니라 원하는 생물학적 활성을 나타내는 한 이같은 항체의 단편이 특히 포함된다 (미국 특허 번호 4,816,567; 및 [Morrison, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855 (1984)]).

[0098] 비-인간 (예를 들어, 뮤린) 항체의 "인간화" 형태는 비-인간 면역글로불린으로부터 유래된 최소 서열을 함유하는 키메라 항체이다. 대부분의 부분에 대해서, 인간화 항체는 인간 면역글로불린 (수용자 항체)이고, 이때 수용자의 초가변 영역 잔기가 원하는 특이성, 친화력 및 능력이 있는 마우스, 래트, 토끼 또는 비-인간 영장류와 같은 비-인간 종의 초가변 영역 잔기 (도너 항체)로 대체된다. 일부 경우에, 인간 면역글로불린의 프레임워크 영역 (FR) 잔기가 상응하는 비-인간 잔기로 대체된다. 또한, 인간화 항체는 수용자 항체에서 또는 도너 항체에서 발견되지 않는 잔기를 포함할 수 있다. 이러한 변형은 항체의 성능을 더욱 정련시키기 위해 이루어진다. 일반적으로, 인간화 항체는 1개 이상, 전형적으로는 2개의 가변 도메인을 실질적으로 모두 포함하고, 여기서 모든 또는 실질적으로 모든 초가변 영역은 비-인간 면역글로불린의 것들에 상응하고 모든 또는 실질적으로 모든 FR은 인간 면역글로불린 서열의 것들이다. 임의로, 인간화 항체는 면역글로불린 불변 영역 (Fc)의 적어도 일부, 전형적으로는 인간 면역글로불린의 것을 또한 포함할 것이다. 추가적인 상세사항은 [Jones, et al., Nature 321:522-525 (1986)]; [Reichmann, et al., Nature 332:323-329 (1988)]; 및 [Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596 (1992)] 및 WO2006105062 (Hansen) 참조.

[0099] "단일쇄 Fv" 또는 "sFv" 항체 단편은 단일 폴리펩티드 사슬 내에 존재하는 항체의 V_H 및 V_L 도메인을 포함한다. 일반적으로, sFv 폴리펩티드는 sFv가 항원 결합을 위한 원하는 구조를 형성할 수 있도록 하는 V_H 도메인과 V_L 도메인 간의 폴리펩티드 링커를 추가로 포함한다. sFv의 리뷰를 위해서는, [Pluckthun, The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994)] 참조.

[0100] 용어 "디아바디"는 동일한 폴리펩티드 사슬 (V_H-V_L) 내의 경쇄 가변 도메인 (V_L)에 연결된 중쇄 가변 도메인 (V_H)을 포함하는, 2개의 항원-결합 부위를 갖는 소형 항체 단편을 지칭한다. 동일한 사슬 상의 두 도메인 간에 쌍을 형성하도록 하기에는 너무 짧은 링커를 사용함으로써, 도메인은 또다른 사슬의 상보적 도메인과 쌍을 이루어 2개의 항원-결합 부위를 생성하도록 강요된다. 디아바디는, 예를 들어, EP 404,097; WO 93/11161; 및 [Hollinger, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448 (1993)]에 더욱 상세하게 기술되어 있다.

[0101] 본 출원 전반에 걸쳐 사용된 "선형 항체"라는 표현은 [Zapata, et al., Protein Eng., 8(10):1057-1062 (1995)]에 기술된 항체를 지칭한다. 간략하게, 이러한 항체는 한쌍의 항원 결합 영역을 형성하는 한쌍의 직렬 Fd 절편 ($V_H-C_H1-V_H-C_H1$)을 포함한다. 선형 항체는 이중특이적 또는 단일특이적일 수 있다.

[0102] 본원에서 "변이체" 항-스핑고지질 항체는 어버이 항체 서열에서의 하나 이상의 아미노산 잔기(들)의 부가, 결실 및/또는 치환에 의해 "어버이" 항-스핑고지질 항체 아미노산 서열과 아미노산 서열이 상이하고, 어버이 항-결합 항체의 하나 이상의 원하는 활성이 유지된 분자를 지칭한다. 원하는 활성에는 항원에 특이적으로 결합하는 능력, 시험관내에서 증식을 억제하는 능력, 생체내에서 혈관형성을 억제하는 능력, 및 시험관 내에서 사이토카인 프로파일을 변경시키는 능력이 포함될 수 있다. 한 실시양태에서, 변이체는 어버이 항체의 하나 이상의 초가변 영역(들) 내에 하나 이상의 아미노산 치환(들)을 포함한다. 예를 들어, 변이체는 어버이 항체의 하나 이상의 초가변 영역 내에 하나 이상, 예를 들어 약 1개 내지 약 10개, 바람직하게는 약 2개 내지 약 5개의 치환을 포함할 수 있다. 통상적으로, 변이체의 아미노산 서열은 어버이 항체 중쇄 또는 경쇄 가변 도메인 서열과의 아미노산 서열 동일성이 50% 이상, 더욱 바람직하게는 65% 이상, 더욱 바람직하게는 75% 이상, 더욱 바람직하게는 80% 이상, 더욱 바람직하게는 85% 이상, 더욱 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95% 이상일 것이다. 이러한 서열에 대한 동일성 또는 상동성은 서열들을 정렬하고, 필요하다면 갭(gap)을 도입하여, 최대 백분율의 서열 동일성을 달성한 후의 어버이 항체 잔기와 동일한 후보 서열 내의 아미노산 잔기의 백분율로 본원에서 정의된다. 항체 서열 내로의 N-말단, C-말단 또는 내부 확장, 결실, 또는 삽입은 서열 동일성 또는 상동성에 영향을 미치는 것으로 해석된다. 변이체는 스팅고지질에 결합하는 능력을 유지하고, 바람직하게는 어버이 항체보다 우수한 활성이 있다. 예를 들어, 변이체에서 결합 친화력이 더 강할 수 있고, 혈관형성을 감소시키고 /시키거나 종양 진행을 정지시키는 능력이 강화되었을 수 있다. 이같은 원하는 성질 (예를 들어 더 적은 면역 원성, 더 긴 반감기, 강화된 안정성, 강화된 효능)을 분석하기 위해, 예를 들어, Fab 형태의 변이체를 Fab 형태의 어버이 항체와, 또는 전장 형태의 변이체를 전장 형태의 어버이 항체와 비교하여야 하는데, 이는 항-스핑고지질 항체의 형식이 본원에 개시된 생물학적 활성 분석법에서 항체의 활성에 영향을 미치는 것으로 발견되었기

때문이다. 본원에서 특히 흥미로운 변이체 항체는 하나 이상의 원하는 활성의 적어도 약 5%, 바람직하게는 적어도 약 10%, 25%, 59%, 또는 그 이상을 나타내는 것일 수 있다. 바람직한 변이체는 어버이 항체와 비교하여 시험관 내에서 측정했을 때 우수한 생물물리학적 성질이 있거나 시험관내에서 또는 생체내에서 측정했을 때 우수한 생물학적 활성이 있는 것이다.

[0103] 본원에서의 "어버이" 항체는 변이체의 제조에 사용된 아미노산 서열에 의해 코딩되는 것이다. 바람직하게는, 어버이 항체에는 인간 프레임워크 영역이 있고, 존재하는 경우에는 인간 항체 불변 영역(들)이 있다. 예를 들어, 어버이 항체는 인간화 항체 또는 인간 항체일 수 있다.

[0104] "단리된" 항체는 천연 환경의 성분으로부터 확인 및 분리 및/또는 회수된 것이다. 이의 천연 환경의 오염 성분은 항체에 대한 진단 또는 치료 용도를 방해하는 물질이고, 효소, 호르몬 및 기타 단백질성 또는 비-단백질성 용질을 포함할 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 항체는 (1) 로우리(Lowry) 방법으로 측정시 95 중량% 초파의 항체, 가장 바람직하게는 99 중량% 초파로, (2) 스피닝 컵 서열분석기를 사용함으로써 N-말단 또는 내부 아미노산 서열의 잔기 15개 이상을 수득하는데 충분한 정도로, 또는 (3) 쿠마시(Coomassie) 블루 또는 바람직하게는 은 염색을 사용하는 환원 또는 비-환원 조건 하에서의 SDS-PAGE에 의한 균질성으로 정제될 것이다. 단리된 항체에는 재조합 세포 내의 계내 항체가 포함되는데, 이는 항체의 천연 환경의 1가지 이상의 성분이 존재하지 않을 것이기 때문이다. 그러나, 통상적으로, 단리된 항체는 1회 이상의 정제 단계에 의해 제조될 것이다.

[0105] 본원에서 사용된 "표지"라는 단어는 항체에 직접적으로 또는 간접적으로 접합된 검출가능한 화합물 또는 조성물을 지칭한다. 표지는 자체가 검출가능할 수 있거나 (예를 들어, 방사성 동위원소 표지 또는 형광 표지), 또는 효소 표지의 경우에는 검출가능한 기질 화합물 또는 조성물의 화학적 변형을 촉매할 수 있다.

[0106] "고체 상"은 본 발명의 항체가 부착될 수 있거나, 또는 항체 또는 기타 항-S1P 결합 시약이 다른 방식으로 고정될 수 있는 비-수성 매트릭스를 의미한다. 본원에서 포함되는 고체 상의 예로는 유리 (예를 들어, 제어형 다공성 유리), 다당류 (예를 들어, 아가로스), 폴리아크릴아미드, 폴리스티렌, 폴리비닐 알콜 및 실리콘으로 부분적으로 또는 전체적으로 형성된 것들이 포함된다. 특정 실시양태에서, 환경에 따라, 고체 상은 분석 플레이트의 웰을 포함할 수 있고, 또한 다르게는 정제 컬럼 (예를 들어, 친화성 크로마토그래피 컬럼)이다. 이러한 용어는 개별적인 업자들의 불연속 고체 상, 예컨대 미국 특허 번호 4,275,149에 기술된 것들을 또한 포함한다.

[0107] "리포솜"은 약물 (예컨대 본원에 개시된 항-스핑고지질 항체 및, 임의로, 화학요법제)을 포유동물에게 전달하는 데 유용한, 다양한 유형의 지질, 인지질 및/또는 계면활성제로 구성된 소포이다. 리포솜의 성분은, 생체막의 지질 배열과 유사하게, 이중 형성으로 일반적으로 배열된다. "단리된" 핵산 분자는 항체 핵산의 천연 공급원 내에서 통상적으로 회합되는 1가지 이상의 오염 핵산 분자로부터 확인 및 분리된 핵산 분자이다. 단리된 핵산 분자는 천연에서 발견되는 형태 또는 환경 이외의 것이다. 따라서 단리된 핵산 분자는 천연 세포 내에 존재하는 핵산 분자와 구별된다. 그러나, 단리된 핵산 분자는, 예를 들어, 핵산 분자가 천연 세포와 상이한 염색체 위치에 있는 경우, 항체를 통상적으로 발현하는 세포 내에 함유된 핵산 분자를 포함한다.

[0108] 용어 "제어 서열"은 특정 숙주 생물에서 작동가능하게 연결된 코딩 서열의 발현에 필요한 DNA 서열을 지칭한다. 원핵생물에 적절한 제어 서열은, 예를 들어, 프로모터를 포함하고, 임의로는 오퍼레이터(operator) 서열, 및 리보솜 결합 부위를 포함한다. 진핵생물 세포는 프로모터, 폴리아데닐화 신호 및 인핸서(enhancer)를 이용하는 것으로 공지되어 있다.

[0109] 핵산은 또다른 핵산 서열과 기능적 관계에 놓일 때 "작동가능하게 연결"된다. 예를 들어, 전서열(presequence) 또는 분비 리더에 대한 DNA가 폴리펩티드의 분비에 참여하는 전단백질(preprotein)로서 발현되는 경우에 상기 DNA가 상기 폴리펩티드에 대한 DNA에 작동가능하게 연결된 것이거나, 프로모터 또는 인핸서가 코딩 서열의 전사에 영향을 끼치는 경우에 프로모터 또는 인핸서가 상기 코딩 서열에 작동가능하게 연결된 것이거나, 또는 리보솜 결합 부위가 번역을 용이하게 하도록 배치된 경우에 리보솜 결합 부위가 코딩 서열에 작동가능하게 연결된 것이다. 일반적으로, "작동가능하게 연결된"은 연결될 DNA 서열들이 인접하고, 분비 리더의 경우에는 인접하고 판독 상 내에 있다는 것을 의미한다. 그러나, 인핸서는 인접할 필요가 없다. 연결은 편리한 제한 부위에서 결찰에 의해 달성된다. 이같은 부위가 존재하지 않는 경우, 합성 올리고뉴클레오티드 어댑터 또는 링커가 통상적인 관례에 따라 사용된다.

[0110] 본원에서 사용된 "세포", "세포주", 및 "세포 배양물"이라는 표현들은 상호교환가능하게 사용되고, 이같은 명칭 모두는 자손을 포함한다. 따라서, "형질전환체" 및 "형질전환된 세포"라는 단어는 1차 대상 세포 및 계대 횟수와 관련없이 이로부터 유래된 배양물을 포함한다. 의도적인 또는 의도적이지 않은 돌연변이로 인해, 모든 자손

이 DNA 함량이 정확하게 동일하지 않을 수 있다는 것이 또한 이해된다. 원래의 형질전환된 세포에서 스크리닝된 것과 동일한 기능 또는 생물학적 활성이 있는 돌연변이체 자손이 포함된다. 별개의 명칭이 의도되는 경우, 문맥으로부터 명백할 것이다.

[0111] 본 발명에 따른 "특허가능한" 조성물, 프로세스, 기계 또는 제조품은 대상이 분석이 수행되는 시점에 특허가능성에 대한 모든 법정 요건을 만족시킨다는 것을 의미한다. 예를 들어, 신규성, 진보성 등과 관련하여, 추후의 조사에서 하나 이상의 청구항이 신규성, 진보성 등을 부정할 하나 이상의 실시양태를 포함하는 것으로 드러나는 경우, "특허가능한" 실시양태에 대한 정의에 의해 한정되는 청구항(들)은 특허불가능한 실시양태(들)을 명확하게 배제한다. 또한, 본원에 첨부된 청구항들은 가장 넓은 논리적인 범주를 제공할 뿐만 아니라, 이들의 유효성을 보존하는 것으로 해석되어야 한다. 게다가, 특허가능성에 대한 하나 이상의 법정 요건이 보정되는 경우, 또는 본 출원이 출원되거나 특허로 허여된 시점에서 첨부된 청구항들 중 하나 이상의 유효성이 질의되는 시점으로 특허가능성에 대한 특정 법정 요건이 만족되는지 여부를 평가하기 위한 기준이 변화되는 경우, 청구항들은 이러한 상황 하에 (1) 이들의 유효성을 보존하고 (2) 가장 넓은 논리적인 해석을 제공하는 방식으로 해석되어야 한다.

[0112] 용어 "제약상 허용가능한 염"은 본 출원의 작용제 및 화합물의 생물학적 유효성 및 성질이 유지되고, 생물학적으로 또는 다른 방식으로 바람직하지 않지 않은 염을 지칭한다. 많은 경우에, 본 발명의 작용제 및 화합물은 전하를 띠는 기, 예를 들어, 전하를 띠는 아미노 및/또는 카르복실 기 또는 이와 유사한 기의 존재에 의해 산 및/또는 염기 염을 형성할 수 있다. 제약상 허용가능한 산 부가염은 무기 및 유기 산으로부터 제조될 수 있고, 제약상 허용가능한 염기 부가염은 무기 및 유기 염기로부터 제조될 수 있다. 제약상 허용가능한 염의 리뷰를 위해, [Berge, et al. (1977) J. Pharm. Sci., vol. 66, 1-19] 참조.

[0113] "다수"는 1개 초과를 의미한다.

[0114] 용어 "분리된", "정제된", 단리된" 등은 샘플을 보유하는 용기 내에 함유된 샘플의 하나 이상의 성분이 용기 내에 존재하는 하나 이상의 다른 샘플 성분으로부터 물리적으로 제거되거나 이의 존재 면에서 퇴색되거나 또는 제거 또는 회색되었음을 의미한다. 분리 또는 정제 단계 동안 제거 또는 회색될 수 있는 샘플 성분에는 화학적 반응 생성물, 미반응 화학물질, 단백질, 탄수화물, 지질 및 미결합 분자가 포함된다.

[0115] 용어 "종"은 다양한 문맥, 예를 들어, 특정 종의 화학요법제에서 본원에서 사용된다. 각각의 문맥에서, 이러한 용어는 특정 문맥에서 언급된 부류의 화학적으로 구별되지 않는 문자들의 집단을 지칭한다.

[0116] "특이적으로 회합한다" 및 "특이적 회합" 등은 2개의 문자들 간의 특이적이고 무작위적이지 않은 상호작용을 지칭하고, 이러한 상호작용은 문자들 간의 적합한 화학적 또는 문자성 상호작용을 허용하는 구조적, 소수성/친수성 및/또는 정전기적 양상에 좌우된다.

[0117] "대상" 또는 "환자"는 본 발명의 문자에 의해 달성될 수 있는 처치를 필요로 하는 동물을 지칭한다. 본 발명에 따라 처치될 수 있는 동물에는 척추동물이 포함되고, 포유동물 예컨대 소파, 개파, 말파, 고양이파, 양파, 돼지파 및 영장류 (인간 및 비-인간 영장류 포함) 동물이 특히 바람직한 예이다.

[0118] "치료적 유효량" (또는 "유효량")은 대상 또는 환자에게 투여되는 경우 처치를 달성하는데 충분한 활성 성분, 예를 들어, 본 발명에 따른 작용제의 양을 지칭한다. 따라서, 본 발명에 따른 조성물의 치료적 유효량을 구성하는 것은 당업자에게 의해 용이하게 결정될 수 있다. 눈 요법의 문맥에서, "치료적 유효량"은 눈 질환 또는 용태와 상관된 하나 이상의 유전자의 발현에서의 증가 또는 감소, 세포자멸사 또는 기타 세포 사망 경로의 유도, 증상에서의 임상 개선, 비정상적인 혈관신생 또는 염증에서의 감소 등이 포함되는, 눈 질환 또는 용태의 처치와 관련된 하나 이상의 파라메터에서 객관적으로 측정된 변화를 일으키는 양이다. 물론, 치료적 유효량은 처치될 특정 대상 및 용태, 대상의 체중 및 연령, 질환 용태의 중증도, 선택된 특정 화합물, 이어지는 투약 계획, 투여 시간조정, 투여 방식 등에 따라 변할 것이고, 이를 모두는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다. 조합 요법의 상황에서, 특정 활성 성분의 치료적 유효량을 구성하는 것은 단독요법 (즉, 활성 성분으로서 하나의 화학 본체만을 사용하는 치료 계획)으로서 투여되는 활성 성분의 치료적 유효량을 구성하는 것과 다를 수 있다는 것이 이해될 것이다.

[0119] 질환 또는 장애의 "처치" 또는 이를 "처치하는"이라는 용어는 질환 또는 장애에 대한 예방 또는 보호 (즉, 임상 정후가 발달되지 않도록 함); 질환 또는 장애의 억제 (즉, 임상 정후의 발달을 정지시키거나 저해함); 및/또는 질환 또는 장애의 경감 (즉, 임상 정후의 퇴행을 야기함)을 포함한다. 이해될 바와 같이, 질환 또는 장애의 "방지" 및 "저해"를 구별하는 것이 항상 가능하지는 않은데, 궁극적인 귀납적 이벤트 또는 이벤트들이 미지이거나

나 잠재성일 수 있기 때문이다. 따라서, 용어 "예방"은 "방지" 및 "저해" 모두를 포함하는 "처치" 유형을 구성하는 것으로 이해될 것이다. 따라서 용어 "처치"는 "예방"을 포함한다.

[0120] 용어 "치료 계획"은 화학요법 약물, 방사선조사 요법, 수술, 유전자 요법, DNA 백신 및 요법, siRNA 요법이 포함되는 안티센스(antisense)-기반 요법, 항-헬관형성 요법, 면역요법, 골수 이식, 앱타머(aptamer) 및 기타 생물제제 예컨대 항체 및 항체 변이체, 수용체 미끼 및 기타 단백질-기반 치료제를 사용하는 질환 또는 장애의 임의의 처치를 의미한다.

발명의 개요

[0121] 본 발명은 스팽고지질에 대한 강한 결합 친화력, 스팽고신-1-포스페이트 (S1P)에 결합하여 이를 중화시키는 능력, 특히 생리학적 환경 (예를 들어, 살아 있는 조직, 혈액 등)에서 및 생리학적 조건 하에에서의 이러한 능력을 포함하는 치료적 및/또는 진단적 관점에서의 원하는 성질이 있는 항체 및 항-스파고지질 항체 변이체를 포함하는, 특히 가능한 인간화 항-스파고지질 작용제, 뿐만 아니라 이소형, 변이체, 이성체, 및 관련 화합물에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 S1P에 대해 지시된 항체, 특히 모노클로날 항체, 더욱 특히 인간화 모노클로날 항체 및 이의 변이체에 관한 것이다. 바람직하게는, 이같은 항체 및 변이체는 이같은 화합물로의 처치가 필요한 것으로 알려졌거나 추측되는 대상에게 투여하기에 적절한 제약 조성물 내에 포함된다. 조성물에 더하여, 본 발명은 이같은 조성물을 포함하는 키트, 이같은 항-S1P 항체 및 변이체의 제조 방법, 및 이같은 작용제를 사용하는 처치 방법을 또한 제공한다.

[0123] 한 실시양태에서, 새롭게 확인된 바람직한 서열, 특히 중쇄에 대한 서열 27 및 서열 35 및 경쇄에 대한 서열 30 및 서열 37의 가변 도메인을 포함하는 단리된 항-S1P 항체 중쇄 및 경쇄가 제공된다. 또 다른 실시양태에서, 생리학적 조건 하에 스팽고신-1-포스페이트 (S1P)에 대해 반응성이이고, 본원의 다른 곳에서 상술된 CDR 서열과의 아미노산 서열 동일성이 50% 이상 내지 100% (100 % 포함)인 하나 이상의 CDR 웹티드를 포함하는 항-S1P 작용제가 제공된다.

[0124] 한 실시양태에서, 본 발명에 따른 항-스파고지질 항체에는 ITTTIDDDMN (서열 10; CDRL1), EGNILRP (서열 11; CDRL2) 및 LQSDNLPFT (서열 12; CDRL3)의 아미노산 서열을 갖는 초가변 상보성 결정 영역 (CDR)을 포함하는 경쇄 가변 도메인이 있다. 바람직하게는, 중쇄 가변 도메인은 DHTIH (서열 13; CDRH1), GGFYGSTIWFDF (서열 15; CDRH3) 및 CISPRHDITKYNEMFRG (서열 14; CDRH2) 또는 AISPRHDITKYNEMFRG (서열 31; CDRH2)의 아미노산 서열을 갖는 CDR을 포함한다. 본 발명의 특히 바람직한 실시양태에서, S1P에 결합하여 이를 중화시키는 능력을 CDR이 유지하는 방식으로 하나 이상의 CDR이 프레임워크 내로 그래프트(graft)된다. 하기의 예에 한정되지 않으면서, 프레임워크는 CDR에 바로 플랭킹(flanking)된 항체 경쇄 및 중쇄의 인간 서열을 나타낼 수 있지만, S1P에 대한 결합에서의 인간화 항체의 성능 특성 또는 항체의 효능, 안정성, 발현, 생물학적 반감기, 용해도, 면역원성, 약물분포 및 보관 기관을 강화시키는 다른 특성을 최적화하는 방식으로 CDR을 제시하는 임의의 구조를 또한 나타낼 수 있다.

[0125] 바람직하게는, 3개의 중쇄 초가변 CDR 영역이 인간 프레임워크 영역 내에 제공되고, 예를 들어, FR1-CDRH1-FR2-CDRH2-FR3-CDRH3-FR4의 식으로 표시되는 인접 서열로서 제공된다.

[0126] 본 발명은 서열 27로 본원에서 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 항-스파고지질 항체 중쇄 가변 도메인을 추가로 제공한다. 한 특히 유용한 중쇄 가변 도메인 서열은 하기 실시예 12에 기술된 인간화 항체의 것이고, 서열 32의 중쇄 가변 도메인 서열을 포함한다. 이같은 바람직한 중쇄 가변 도메인 서열은, 예를 들어, 서열 33으로 본원에서 표시되는 경쇄 가변 도메인 서열을 포함하는 폴리펩티드와, 또는 생성된 분자가 스팽고지질에 결합하는 한 또 다른 경쇄 가변 도메인 서열과 조합될 수 있다.

[0127] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 서열 17로 본원에서 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 인간화 항-스파고지질 항체 경쇄 가변 도메인을 제공한다. 한 실시양태에서, 한 유용한 경쇄 가변 도메인 서열은 하기 실시예 12의 인간화 항체의 것이고, 서열 30 또는 서열 37의 경쇄 가변 도메인 서열을 포함한다.

[0128] 한 바람직한 실시양태에서, 본 발명은 서열 37의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 및 서열 35의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄가 있는 인간화 항-스파고지질 항체를 제공한다.

[0129] 경쇄 가변 도메인은 CDRL1 (서열 10), CDRL2 (서열 11), 및 CDRL3 (서열 12)의 아미노산 서열을 갖는 초가변 영역을 포함할 수 있다. 바람직하게는, 3개의 경쇄 초가변 영역이 인간 프레임워크 영역 내에 제공되고, 예를 들어, FR1-CDRL1-FR2-CDRL2-FR3-CD-RL3-FR4의 식으로 표시되는 인접 서열로서 제공된다. .

[0130] 본 발명은 어버이 항-스핑고지질 항체의 변이체를 또한 제공하고, 바람직하게는 이때 어버이 항체는 인간화 또는 인간 항-스핑고지질 항체이다. 이같은 변이체는 스팅고지질, 특히 S1P에 결합하고, 어버이 항-스핑고지질 항체의 중쇄 또는 경쇄 가변 도메인의 초가변 영역 내에 아미노산 치환을 포함한다. 바람직하게는 이같은 변이체에는 항-스핑고지질 항체의 하나 이상의 초가변 영역(들) 내에 하나 이상의 치환(들)이 있다. 한 실시양태에 따르면, 어버이 항체의 중쇄 가변 도메인 내에 치환(들)이 있다. 예를 들어, 아미노산 치환(들)이 중쇄 가변 도메인의 CDRH1 및/또는 CDRH3 내에 있을 수 있다. 이러한 초가변 영역들 양쪽 모두에 치환이 있을 수 있다. 이같은 "친화력 성숙" 변이체는 어버이 항-스핑고지질 항체 (이로부터 변이체가 생성됨)보다 더욱 강하게 스팅고지질에 결합하는 것으로 본원에서 설명된다. 예를 들어, 친화력 성숙에 의해 생산된 항체는 K_d 값이 어버이 항-스핑고지질 항체의 값보다 현저하게 작을 수 있다.

[0131] 친화력 성숙의 대표적인 예는 뮤린 항-S1P CDR이 그래프트된 인간 IgG 카파 경쇄 및 중쇄 프레임워크를 변경시키는 것을 수반한다. 이로서 자신의 표적 리간드, 즉 S1P에 대한 인간화 항체의 친화력 증가가 초래된다. 또 다른 실시양태에서, 하나 이상의 CDR이 인간 IgG 프레임워크 이외의 아미노산 서열에 의해 지지될 수 있다. 초가변 CDR 영역 내의 아미노산 서열 또는 서열들을 변경시키는 것에 의한 친화력 성숙은 상기 기술된 항체 성능 및/또는 특성을 개선시키기 위해 수행될 수 있다. 이러한 형태의 친화력 성숙의 예가 하기 실시예 12에서 제시되고, 이때 중쇄 CDR 내의 시스테인 잔기가 부위-지정 돌연변이유발에 의해 알라닌 잔기로 변화되어, S1P-결합 친화력 및 안정성에서의 상당한 증가가 초래되었다. 한 이같은 중쇄 변이체에서, 가변 영역은 서열 27의 아미노산 서열을 포함하였다. 임의로, CDRH2 내의 이같은 중쇄 가변 도메인 서열이 경쇄 가변 도메인, 예를 들어, 서열 17의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인, 또는 바람직하게는 서열 30의 경쇄 가변 도메인 아미노산 서열과 조합될 수 있다.

[0132] 다양한 항-S1P 분자가 본원에서 구현된다. 예를 들어, 항-S1P 작용제는 항체, 항체 유도체, 또는 비-항체-유래 모이어티일 수 있다. 예를 들어, 항-S1P 작용제는 전장 항체 (예를 들어, 무손상 인간 Fc 영역을 갖는 항체) 또는 항체 단편 (예를 들어, Fab, Fab', 또는 $F(ab')_2$ 분자), 키메라 항체, 인간화 항체, 인간 항체, 또는 친화력 성숙 항체가 포함되는 항체일 수 있다. 본 발명을 제한하지 않으면서, 이같은 항-S1P 작용제는 항체 안정성, 반감기, 효능, 약물분포 및/또는 면역원성을 개선시키거나 다르게는 이를 변경시키도록 생산될 수 있다. 예를 들어, 인간화 Fc 도메인의 아미노산 조성을 변경시켜, 이의 면역원성 또는 기타 성능 특성을 개선 시킬 수 있다.

[0133] 또 다른 실시양태에서, 항-S1P 작용제가 중합체, 방사선헥종, 화학요법제, 및 검출제와 같은 모이어티에 접합될 수 있다.

[0134] 특정한 바람직한 실시양태에서, 항-S1P 작용제가 담체 예컨대 제약상 허용가능한 담체와 함께 제형된다. 한 실시양태에서, 항-S1P 작용제가 제2 작용제 예컨대 항체, 항체 단편, 항체 유도체, 항체 변이체, 항-S1P 작용제 이외의 치료제, 또는 S1P 이외의 분자에 결합할 수 있는 작용제와 조합된다.

[0135] 본 발명은 다양한 중쇄 및 경쇄 서열 및 CDR을 포함하는, 본 발명에 따른 항체, 항체 변이체, 및 단편의 다양한 성분을 코딩하는 단리된 핵산 분자를 또한 제공한다. 이러한 핵산 분자를 함유하는 벡터 및 숙주 세포가 또한 제공된다. 바람직한 아미노산 서열, 예컨대 CDR 서열 또는 항체 경쇄 및/또는 중쇄 서열 중 하나 이상을 포함하는 단리된 폴리펩티드가 추가로 제공된다.

[0136] 본 발명의 바람직한 실시양태에서, 각각의 중쇄 및 각각의 경쇄 내에 정확하게 규정된 CDR 서열을 함유하는 단리된 항체 분자가 제공된다. 한 이같은 실시양태에서, 단리된 항체 분자는 인간화 항체 분자이다.

[0137] S1P와 반응성이고 하나 이상의 바람직한 CDR 서열을 함유하는 리간드 결합 요소가 있는 다가 결합 분자가 또한 제공된다. 이러한 다가 분자는 S1P와 반응성인 리간드 결합 요소를 적어도 1개, 1000개 이상까지 함유할 수 있다. 원한다면, 상이한 리간드와 반응성인 리간드 결합 요소가 또한 포함될 수 있고, 각각 S1P와 반응성이지만 하나 이상의 특성 (예를 들어, 분자 구조, 결합 친화력 등)에서 다른 S1P 결합 요소와 상이한 여러 리간드 결합 요소 종도 포함될 수 있다.

[0138] 비정상적인 수준, 특히 상승된 수준의 S1P와 상관되는 질환 또는 장애의 치료 또는 예방 방법이 또한 제공된다. 일반적으로, 이같은 방법은 이같은 처치를 필요로 하는 대상, 예컨대 인간에게 본 발명의 항-S1P 조성물들 중 하나를 투여하는 것을 포함한다. 이같은 방법에 의한 처치를 받을 수 있는 질환 또는 장애에는 암, 염증성 장애, 뇌혈관 질환, 심혈관 질환, 눈 장애, 과도한 섬유발생과 관련된 질환 및 장애, 및 병적 혈관형성과 관련된

질환 및 장애가 포함된다. 항-S1P 조성물은 또다른 치료제 또는 치료 계획과 조합되어 또한 투여될 수 있다.

[0139] 관련된 양상은 과증식성 장애의 치료 또는 예방을 위한 치료 계획의 독성을 감소시키는 방법에 관한 것이다. 이같은 방법은 과증식성 장애를 치료 또는 예방하기 위한 치료 계획의 투여 전에, 투여 동안에 또는 투여 후에 과증식성 장애를 앓고 있는 대상에게 유효량의 본 발명에 따른 작용제 (또는 다수의 상이한 작용제 종들)를 투여하는 것을 포함한다. 바람직한 실시양태에서, 항체 및 치료 계획은 부가적인 효과를 갖고, 치료 계획에 항체를 부가하는 것은 치료 계획의 투여량을 감소시켜서, 치료와 관련된 독성을 감소시킬 수 있다.

[0140] 본 발명의 또다른 양상은 본 발명의 항-S1P 작용제에 대한 진단 용도에 관한 것이다. 한 진단 용도에서, 본 발명은 표적 스팽고지질이 샘플 내에 존재하는지를 결정하는 방법을 제공한다. 일반적으로, 이같은 방법은 특정 스팽고지질 (즉, "표적" 스팽고지질)을 함유하는 것으로 추측되는 샘플 (예컨대 체액 또는 조직 생검 샘플)을 본 발명의 항-스파고지질 항체와 같은 항-S1P 작용제에 노출시키고, 비정상적인 수준 (즉, 질환, 용태 또는 장애와 관련되거나 상관되는 수준)의 표적 스팽고지질 (예를 들어, S1P)이 샘플 내에 존재하는지 여부를 결정함으로써 수행된다. 특정한 이러한 용도에 대해, 항체 및 이의 사용에 대한 지침서를 함유하는 키트가 제공된다.

[0141] 본 발명의 또다른 양상은 항-S1P 작용제의 제조 방법에 관한 것이다. 이같은 작용제의 바람직한 예로는 항체, 항체 변이체, 및 항체 유도체 (예를 들어, 항체 단편)가 포함된다. 바람직한 실시양태에서, 특히 하나 이상의 폴리펩티드를 포함하는 항-S1P 작용제에 관한 실시양태에서, 세포주와 같은 생물학적 생산 시스템이 바람직하다. 물론, 합성 화학 방법 또한 사용될 수 있다.

[0142] 본 발명의 이러한 양상 및 실시양태 및 기타 양상 및 실시양태가 하기의 섹션에서 더욱 상세하게 논의된다. 본 발명의 상기 및 기타 양상은 하기의 상세한 설명, 첨부된 도면, 및 청구항으로부터 더욱 명백해질 것이다. 본 원에 개시된 것들과 유사하거나 등가인 방법 및 물질이 본 발명의 실행 또는 테스트에서 사용될 수 있지만, 적절한 방법 및 물질이 하기에 기술된다. 또한, 하기의 물질, 방법 및 예는 단지 설명적인 것이고, 제한적인 것으로 의도되지 않는다.

발명의 상세한 설명

발명의 상세한 설명

1. 화합물

[0158] [0159] [0160] 본 발명은 생체활성 지질 S1P와 특이적으로 반응성인 특정 항-S1P 작용제, 특히 면역-유래 모이어티 (항체 포함)인 작용제를 기술한다; 바꾸어 말하면, 항-S1P 작용제가 반응하는 생체활성 지질은 S1P이다.

[0161] 항체 분자 또는 면역글로불린은 2가지 상이한 종류의 폴리펩티드 사슬로 일반적으로 구성된, 분자량이 약 150 kDa인 대형 당단백질 분자이다. "중쇄" (H)로 명명된 1개의 폴리펩티드 사슬은 약 50 kDa이다. "경쇄" (L)로 명명된 또다른 폴리펩티드는 약 25 kDa이다. 각각의 면역글로불린 분자는 일반적으로 2개의 중쇄 및 2개의 경쇄로 구성된다. 2개의 중쇄는 디슬피드 결합에 의해 서로 연결되고, 디슬피드 결합의 개수는 여러 면역글로불린 이소타입의 중쇄들 간에 다르다. 각각의 경쇄는 1개의 디슬피드 공유 결합에 의해 중쇄에 연결된다. 임의의 소정의 천연 발생 항체 분자에서, 2개의 중쇄 및 2개의 경쇄는 2개의 동일한 항원-결합 부위를 지니면서 동일하고, 따라서 2가인 것으로 언급되며, 즉 2개의 동일한 분자에 동시에 결합하는 수용력을 갖는다.

[0162] 임의의 천연 동물 종으로부터의 항체 분자의 "경쇄"는 불변 도메인의 아미노산 서열을 기초로 하여, 카파 (k) 및 람다 (λ)의 명백하게 상이한 2가지 유형 중의 하나로 지정될 수 있다. 2가지 유형의 경쇄의 비율은 종마다 다르다. 예를 들어, 평균 k 대 λ 비율은 마우스에서는 20:1인 반면, 인간에서는 2:1이고, 소에서는 1:20이다.

[0163] 임의의 천연 동물 종으로부터의 항체 분자의 "중쇄"는 불변 도메인의 아미노산 서열을 기초로 하여, 5가지의 명백하게 상이한 유형들 중 하나로 지정될 수 있다. 일부 이소타입에는 여러 서브타입이 있다. 면역글로불린의 5가지 주요 클래스는 면역글로불린 M (IgM), 면역글로불린 D (IgD), 면역글로불린 G (IgG), 면역글로불린 A (IgA), 및 면역글로불린 E (IgE)이다. IgG는 가장 풍부한 이소타입이고, 5가지 서브클래스 (인간의 경우 IgG1, 2, 3, 및 4)가 있다. Fc 단편 및 헌지 영역은 상이한 이소타입의 항체들 간에 상이하고, 따라서 이의 기능성 성질을 결정한다. 그러나, 도메인들의 전반적인 구성을 모든 이소타입에서 유사하다.

[0164] 용어 "가변 영역"은 항체 분자 또는 이의 단편의 N-말단 부분을 지칭한다. 일반적으로, 4개의 사슬 각각에 항원-결합 부위에 기여하는 아미노 말단 내의 가변 (V) 영역, 및 이소타입을 결정하는 불변 (C) 영역이 있다. 경

체는 다수의 비-공유결합 상호작용 및 디슬피드 결합에 의해 중쇄에 결합되고, 중쇄 및 경쇄의 V 영역들이 항체 분자의 각각의 팔에서 쌍을 이루어, 2개의 동일한 항원-결합 부위가 생성된다. 일부 아미노산 잔기는 경쇄와 중쇄 가변 도메인들 사이에서 계면을 형성하는 것으로 여겨진다 ([Kabat, et al. (1991), Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, National Institute of Health, Bethesda, Md.] 및 [Clothia et al. (1985), J. Mol. Biol., vol 186: 651] 참조).

[0165] 중요하게는, 가변성은 항체의 가변 도메인 전반에 걸쳐 균일하게 분포되지 않고, 경쇄 가변 도메인 및 중쇄 가변 도메인 양쪽 모두 내의 "상보성-결정 영역" (CDR) 또는 "초가변 영역"으로 칭해지는 3개의 절편 내에 집중된다. 가변 도메인의 더욱 고도로 보존된 부분은 "프레임워크 영역" (FR)으로 칭해진다. 천연 중쇄 및 경쇄 각각의 가변 도메인은 3개의 초가변 영역에 의해 연결된 4개의 FR 영역을 포함한다. 각각의 사슬 내의 CDR은 FR 영역에 의해 매우 근접하게 함께 유지되고, 다른 사슬로부터의 CDR들과 함께 항체의 항원-결합 부위를 형성한다 ([Kabat, et al. (1991), Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, National Institute of Health, Bethesda, Md.] 참조). 총괄적으로, 6개의 CDR이 항원에 대한 항체 분자의 결합 성질에 기여한다. 그러나, 단일 가변 도메인 (또는 항원에 특이적인 3개의 CDR만을 포함한 Fv의 절반)도 항원을 인식하고 이에 결합하는 능력을 갖는다 ([Pluckthun (1994), The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315] 참조).

[0166] 용어 "불변 도메인"은 항체 중쇄 또는 경쇄의 C-말단 영역을 지칭한다. 일반적으로, 불변 도메인은 항원에 대한 항체 분자의 결합 성질에서 직접적으로 수반되지 않지만, 항체-의존적 세포형 독성에서의 항체의 참여와 같은 다양한 이펙터 기능을 나타낸다. 여기서, "이펙터 기능"은 면역계의 단백질과 Fc 도메인 간의 분자성 상호작용에 의한 면역 세포의 동원에 의해 매개되는 항체의 여러 생리학적 효과 (예를 들어, 읍소닌화, 세포 용해, 비만 세포, 호염기구 및 호산구 탈파립, 및 기타 프로세스)를 지칭한다. 중쇄의 이소타입이 항체의 기능성 성질을 결정한다. 이의 특수한 기능적 성질은 중쇄의 카르복시-말단 부분에 의해 부여되고, 경쇄와 관련되지 않는다.

[0167] 본원에서 사용된 "항체 단편"은 무손상 항체의 항원 결합 부위 또는 가변 영역을 포함하는 무손상 항체의 일부분을 지칭하고, 이때 이러한 일부분에는 무손상 항체의 Fc 영역의 불변 중쇄 도메인 (예를 들어, CH2, CH3, 및 CH4)이 없을 수 있다. 별법적으로, 불변 중쇄 도메인 (예를 들어, CH2, CH3, 및 CH4)의 일부분이 "항체 단편"에 포함될 수 있다. 항체 단편의 예는 항원 결합이 유지된 단편이고, 여기에는 Fab, Fab', F(ab')2, Fd, 및 Fv 단편; 디아바디; 트리아바디(triabody); 단일쇄 항체 분자 (sc-Fv); 미니바디(minibody), 나노바디(nanobody), 및 항체 단편들로부터 형성된 다중특이적 항체가 포함된다. 예를 들어, Fab 단편은 경쇄의 불변 도메인 및 중쇄의 제1 불변 도메인 (CH1)을 또한 함유한다.

[0168] 용어 "변이체"는 하나 이상의 아미노산 잔기 또는 변형에 의해 항체의 천연 아미노산 서열과 상이한 아미노산 서열을 지칭한다. 천연 또는 어버이 또는 야생형 아미노산 서열은 천연에서 발견되는 항체의 아미노산 서열을 지칭한다. 항체 분자의 "변이체"에는 초가변 또는 CDR 영역, Fc 영역, Fab 영역, CH1 도메인, CH2 도메인, CH3 도메인, 및 헌지 영역이 포함되는, 경쇄 및/또는 중쇄의 가변 영역 또는 불변 영역에서의 변화가 포함되지만, 이에 한정되지는 않는다.

[0169] 용어 "특이적"은 항체가 이의 표적 에피토프에 선택적으로 결합하는 것을 지칭한다. 소정의 셋트의 조건 하에 원하는 항원에 대한 항체의 결합을 관련되지 않은 항원 또는 유사 항원 또는 항원 혼합물에 대한 항체의 결합과 비교함으로써 결합 특이성에 대해 항체 분자를 테스트할 수 있다. 바람직하게는, 본 발명에 따른 항체에는 관련되지 않은 항체, 또는 심지어는 표적 항원의 유사체에 대한 상당한 결합이 없을 것이다. 여기서, 용어 "항원"은 항원에 결합하는 항체 분자 또는 면역-유래 모이어티가 인식하여 결합하는 분자를 지칭한다. 항체가 결합하는 항체의 특정 부분은 "에피토프"로 명명된다. "합텐"은 담체 분자, 예를 들어, 단백질, 폴리에틸렌 글리콜 (PEG), 콜로이드성 금, 실리콘 비드 등에 부착되었을 때만 대부분의 환경 하에 면역 응답을 도출할 수 있는 (즉, 항원으로서 작용할 수 있는) 소형 분자를 지칭한다. 담체는 혼자서는 또한 면역 응답을 도출하지 않는 것일 수 있다.

[0170] 용어 "항체"는 가장 넓은 의미로 사용되고, 모노클로날, 폴리클로날, 다중특이적 (예를 들어, 항체의 각각의 팔이 상이한 에피토프 또는 동일하거나 상이한 항원과 반응성인 경우의 이중특이적), 미니바디, 이종접합체, 디아바디, 트리아바디, 키메라, 및 합성 항체, 뿐만 아니라 원하는 결합 성질 및/또는 생물학적 활성이 있는, 항원에 특이적으로 결합하는 항체 단편을 포함한다.

[0171] 용어 "모노클로날 항체" (mAb)는 질질적으로 균질한 항체들의 집단으로부터 수득된 항체, 또는 유사한 항체들의

집단을 지칭하고, 임의의 특정 방법에 의한 항체의 생산을 필요로 하는 것으로 해석되지 않아야 한다. 예를 들어, 모노클로날 항체는 [Kohler 및 Milstein (1975), Nature, vol 256: 495-497]에 최초로 기술된 하이브리도마 방법에 의해, 또는 재조합 DNA 방법에 의해 제조될 수 있다.

[0172] 용어 "키메라" 항체 (또는 면역글로불린)는 특정 종으로부터 유래되거나 특정 항체 클래스 또는 서브클래스에 속하는 항체의 상응하는 서열과 동일하거나 상동성인 중쇄 및/또는 경쇄를 포함하고, 사슬(들)의 나머지부분은 또 다른 종으로부터 유래되거나 또 다른 항체 클래스 또는 서브클래스에 속하는 항체의 상응하는 서열과 동일하거나 상동성인 분자, 뿐만 아니라 원하는 생물학적 활성을 나타내는 한 이같은 항체의 단편을 지칭한다 ([Cabilly et al. (1984), 하기 문헌]; [Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81:6851]).

[0173] 용어 "인간화 항체"는 비-인간 (예를 들어, 뮤린) 항체, 뿐만 아니라 인간 항체로부터의 서열을 함유하는 항체의 형태를 지칭한다. 인간화 항체는 항체의 결합 및/또는 생물학적 활성을 현저하게 변경시키지 않는 동일하거나 상이한 종으로부터의 비-천연 잔기 또는 보존적 아미노산 치환을 포함할 수 있다. 이같은 항체는 비-인간 면역글로불린으로부터 유래된 최소 서열을 함유하는 키메라 항체이다. 대부분의 부분에 대해서, 인간화 항체는 인간 면역글로불린 (수용자 항체)이고, 이때 수용자의 상보성 결정 영역 (CDR)으로부터의 잔기가 원하는 성질이 있는 마우스, 래트, 낙타, 소, 염소 또는 토끼와 같은 비-인간 종의 CDR로부터의 잔기 (도너 항체)로 대체된다. 또한, 인간화 항체는 수용자 항체에서 또는 수입된(imported) CDR 또는 프레임워크 서열에서 발견되지 않는 잔기를 포함할 수 있다. 이러한 변형은 항체 성능을 더욱 정련시키고 최대화하기 위해 이루어진다. 따라서, 일반적으로, 인간화 항체는 1개 이상, 한 양상에서는 2개의 가변 도메인을 모두 포함할 것이고, 여기서 모든 또는 실질적으로 모든 초가변 루프는 비-인간 면역글로불린의 것에 상응하고, 모든 또는 실질적으로 모든 FR 영역은 인간 면역글로불린 서열의 것이다. 임의로, 인간화 항체는 면역글로불린 불변 영역 (Fc)의 적어도 일부, 또는 인간 면역글로불린의 것을 또한 포함할 것이다. 예를 들어, 미국 특허 번호 4,816,567 (Cabilly 등); 유럽 특허 번호 0,125,023 B1 (Cabilly 등); 미국 특허 번호 4,816,397 (Boss 등); 유럽 특허 번호 0,120,694 B1 (Boss 등); WO 86/01533 (Neuberger, M. S. 등); 유럽 특허 번호 0,194,276 B1 (Neuberger, M. S.); 미국 특허 번호 5,225,539; 유럽 특허 번호 0,239,400 B1 (Winter); 유럽 특허 출원 번호 0,519,596 A1 (Padlan, E. A.); [Queen et al. (1989) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA, vol 86:10029-10033)] 참조.

[0174] 용어 "이중특이적 항체"는 적어도 2개의 상이한 에피토프에 대한 결합 성질이 있는 항체 또는 모노클로날 항체를 지칭할 수 있다. 한 실시양태에서, 에피토프들은 동일한 항원으로부터의 것이다. 또 다른 실시양태에서, 에피토프들은 2개의 상이한 항원으로부터의 것이다. 이중특이적 항체의 제조 방법은 당업계에 공지되어 있다. 예를 들어, 2개의 면역글로불린 중쇄/경쇄 쌍의 공동-발현을 사용하여 이중특이적 항체를 재조합에 의해 생산할 수 있다. 별법적으로, 이중특이적 항체를 화학적 연결을 사용하여 제조할 수 있다. 이중특이적 항체에는 이중 특이적 항체 단편이 포함된다.

[0175] 용어 "이종접합체 항체"는 2개의 공유결합으로 연결된 항체를 지칭한다. 이같은 항체는 가교체를 사용하는 것을 포함하여 합성 단백질 화학에서의 공지된 방법을 사용하여 제조할 수 있다. 본원에서 사용된 용어 "접합체"는 하나 이상의 항체 단편(들) 또는 결합 모이어티가 하나 이상의 중합체 분자(들)에 공유 결합으로 부착되어 형성된 분자를 지칭한다.

[0176] 용어 "생물학적으로 활성인"은 원하는 에피토프에 결합할 수 있고, 어떻게 해서든 생물학적 효과를 발휘할 수 있는 항체 또는 항체 단편을 지칭한다. 생물학적 효과에는 성장 신호의 조절, 항-세포자멸사 신호의 조절, 세포자멸사 신호의 조절, 이펙터 기능 케스케이드의 조절, 및 기타 리간드 상호작용이 포함되지만 이에 한정되지는 않는다.

[0177] 용어 "재조합 DNA"는 인간에 의해 조작, 생성 또는 변형된 핵산 및 이로부터 발현된 유전자 생성물을 지칭한다. "재조합" 폴리펩티드 또는 단백질은 재조합 DNA 기술에 의해 생산된, 예를 들어, 원하는 폴리펩티드 또는 단백질을 코딩하는 외인성 DNA 구축물에 의해 형질전환된 세포로부터 생산된 폴리펩티드 또는 단백질이다. "합성" 폴리펩티드 또는 단백질은 화학 합성에 의해 제조된 것이다.

[0178] 용어 "발현 카셋트"는 구조적 유전자 (즉, 단백질 코딩 서열, 예컨대 본 발명의 항체)와 혼화성인 숙주 내에서 이같은 유전자의 발현에 영향을 미칠 수 있는 뉴클레오티드 분자를 지칭한다. 발현 카셋트는 폴리펩티드-코딩 서열과 작동적으로 연결되고, 임의로 기타 서열, 예를 들어, 전사 종결 신호와 연결된 프로모터를 적어도 포함한다. 발현을 달성하는데 필요하거나 도움이 되는 추가적인 조절 요소, 예를 들어, 인핸서가 사용될 수 있다. 따라서, 발현 카셋트는 플라스미드, 발현 벡터, 재조합 바이러스, 임의 형태의 재조합 "네이키드(naked) DNA" 벡터 등을 포함한다.

[0179] 항체의 공급원은 본원에 예시된 것들 (예를 들어, 뮤린 및 인간화 뮤린 항체)에 한정되지 않는다. 항체는 포유류 종 (예를 들어, 마우스, 래트, 낙타, 소, 염소, 말, 기니 피그, 햄스터, 양 및 토끼) 및 조류 (오리, 닭)가 포함되는 다수의 종에서 상승될 수 있다. 상승된 항체는 자신이 상승된 동물과 상이한 종으로부터 유래될 수 있다. 예를 들어, XenoMouse™ (Abgenix, Inc., Fremont CA)은 완전히 인간형인 인간 모노클로날 항체를 생산한다. 특정 목적을 위해, 천연 인간 항체, 예컨대 S1P 자가항체의 역ガ를 나타낼 수 있는 개체로부터 단리된 S1P에 대한 자가항체가 사용될 수 있다. 별법적으로, 인간 항체 서열 라이브러리를 사용하여, 인간 서열을 포함하는 항체를 생성시킬 수 있다.

2. 용도

[0180] [0181] 본 발명은 하나 이상의 바람직하지 않은 생체활성 지질, 또는 이의 전구물질 또는 대사물의 활성 또는 농도를 변경시키는 하나 이상의 치료제를 사용하여, 특정 질환 및 용태를 치료 또는 예방하기 위한 조성물 및 방법에 관한 것이다. 본 발명의 치료 방법 및 조성물은 특정한 바람직하지 않은 생체활성 지질의 유효 농도, 즉, 절대, 상대, 유효 및/또는 이용가능한 농도 및/또는 활성을 변화시킴으로써 작용한다. 생체활성 지질의 유효 농도를 저하시키는 것은 표적 지질 또는 이의 바람직하지 않은 효과 (하류 효과 포함)를 "중화시키는" 것으로 언급될 수 있다. 여기서, "바람직하지 않은"은 질환 프로세스에서 수반되는 것, 예를 들어, 신호전달 분자로서 수반되는 것으로 인해, 또는 과량으로 존재하는 경우 질환에 기여하는 생체활성 지질의 바람직하지 않은 양으로 인해 바람직하지 않은 생체활성 지질을 지칭한다.

[0182] 어떠한 특정한 이론에 결합되기를 원치 않으면서, 부적합한 농도의 S1P 및/또는 이의 대사물 또는 하류 이펙터가 다양한 질환 및 장애의 발달을 야기하거나 이에 기여할 수 있는 것으로 여겨진다. 따라서, 특히 특정 표적 지질, 예를 들어, S1P 또는 이의 변이체의 생체내 유효 농도를 감소시킴으로써, 조성물 및 방법을 사용하여 이러한 질환 및 장애를 처치할 수 있다. 특히, 본 발명의 조성물 및 방법이 비정상적인 혈관신생, 혈관형성, 섬유발생, 섬유증, 흉터생성, 염증, 및 면역 응답을 적어도 부분적으로 특징으로 하는 질환을 처치하는데 유용한 것으로 여겨진다.

[0183] 본 발명에 따라 처치될 수 있는 여러 클래스의 질환의 예가 하기에 기술된다. 다수의 질환 및 용태가 다중 병리학적 프로세스 (예를 들어, 병리학적 혈관신생과 흉터생성 양쪽 모두)를 적어도 부분적으로 특징으로 한다는 것과 본원에서 제공된 분류는 서술적인 편의를 위한 것이고 본 발명을 제한하지 않는다는 것이 이해될 것이다.

S1P 및 과증식성 장애

[0184] [0185] 본 발명의 한 양상은 과증식성 장애를 처치하는 방법에 관한 것이다. 이러한 방법은 의도된 용도가 필요로 하는 바와 같이, S1P 활성을 방해하는 작용제를 포함하고, 바람직하게는 이를 제약상 또는 수의학상 허용가능한 담체 내에 포함하는 조성물을 치료적 유효량으로 S1P-관련 과증식성 장애를 앓는 것으로 알려졌거나 추측되는 포유동물 (예를 들어, 소, 개, 말, 양 또는 돼지 동물, 특히 인간)에게 투여하는 것을 포함한다. S1P-관련 과증식성 장애에는 신생물, 내피 세포 증식과 관련된 장애, 및 섬유발생과 관련된 장애가 포함된다. 가장 빈번하게는, 신생물은 암일 것이다. 내피 세포 증식과 관련된 전형적인 장애는 혈관형성-의존적 장애, 예를 들어, 고형 종양에 의해 야기되는 암, 혈액학적 종양, 및 연령-관련 황반 변성이다. 섬유발생과 관련된 장애에는 비정상적인 심장 리모델링을 수반하는 장애, 예컨대 심장 기능상실이 포함된다.

[0186] 다양한 조직 및 기관의 세포가 비정상적인 폐단의 성장, 증식, 이동, 신호전달, 노쇠 및 사망을 나타내는 다수의 과증식성 장애가 공지되어 있다. 이러한 질환들 중 일부를 다루기 위해 수많은 처치가 개발되었지만, 다수는 현존 기술로 여전히 주로 처치불능인 한편, 또 다른 경우에는, 처치가 이용가능하지만 종종 최적 미만이고 드물게 치유적이다.

[0187] 암은 아마도 가장 광범위하게 인식되는 클래스의 과증식성 장애를 나타낸다. 암은 파괴적인 클래스의 질환이고, 종합적으로, 사망률이 심혈관 질환에 버금간다. 다수의 암은 분자 수준에서 완전히 이해되지 않는다. 결과적으로, 암은 미국 정부 및 제약 회사 양쪽 모두의 연구 및 개발 프로그램의 주요 초점이다. 암과 싸우는 것을 돋기 위한 전례없는 R&D 노력 및 다수의 유용한 치료제의 생산이 초래되었다.

[0188] 불행하게도, 거대한 양의 암 연구가 암에 의해 야기되는 상당한 손상을 극복하는데 충분하지 않았다. 여전히 백만가지의 새로운 암 사례가 매년 진단되고, 미국에서만 50만명을 초과하여 사망한다. 이는 암에 대한 새로운 치료제를 발견하기 위해 거대한 노력이 투입되었음에도 불구하고, 질환과 싸우기 위한 효과적인 치료제가 여전히 포착하기 어렵다는 극적인 증거이다.

[0189]

현재 암은 수술, 방사선조사 및 화학요법의 3가지 유형의 요법 중 하나 또는 이들의 조합으로 주로 치료된다. 수술은 질환 조직의 덩어리 제거를 수반한다. 특정 부위, 예를 들어, 유방, 결장 및 피부에 위치하는 종양을 제거하는데 수술이 때때로 효과적이지만, 다른 영역, 예컨대 골격에 위치하는 종양의 처치 또는 백혈병과 같은 파종성 신생물성 용태의 치료에서는 사용될 수 없다. 방사선조사 요법은 살아 있는 조직을 노출된 세포의 사망 또는 손상을 야기하는 이온화 방사선에 노출시키는 것을 수반한다. 방사선조사 요법으로부터의 부작용은 급성 및 일시성일 수 있지만, 그밖의 것은 비가역적일 수 있다. 화학요법은 세포 복제 또는 세포 대사의 파괴를 수반한다.

[0190]

추가적인 손상은 현재의 치료제는 일반적으로 독성 및 심각한 부작용의 형태로 환자에 대한 상당한 결점을 수반한다는 것이다. 따라서, 최근 많은 집단들이 암과의 전쟁에서 싸우기 위한 새로운 접근법을 찾으려고 시작하였다. 이러한 새로운 소위 "혁신적인 요법"은 유전자 요법 및 모노클로날 항체와 같은 치료적 단백질을 포함한다.

[0191]

암의 치료를 위해 임상에서 사용된 최초의 모노클로날 항체는 1997에 출시된 리툭산(Rituxan) (리툭시맙)이고, 이는 치료제로서의 생체특이적 모노클로날 항체의 유용성을 나타냈다. 따라서, 놀라울 것 없이, 그 후로 암에 대해 처방되는 6개를 포함하여 16개의 또다른 모노클로날 항체가 임상 사용에 대해 허가되었다. 이러한 제품들의 성공, 뿐만 아니라 소형 분자와 비교하여 모노클로날 항체를 개발하기 위한 비용 및 시간의 감소로, 모노클로날 항체 치료제가 소형 분자에 이어서 약물 후보물의 두번째로 큰 카테고리가 되었다. 또한, 소형 분자 치료제와 비교하여 항체의 경교한 특이성은 효능 및 독성의 관점에서 주요 장점인 것으로 입증되었다. 암에 대해서만, 현재 270개를 초과하는 산업용 항체 R&D 프로젝트가 있고, 50개를 초과하는 회사가 새로운 암 항체 치료제를 개발하는데 참가하고 있다. 결과적으로, 모노클로날 항체가 암의 처치에서 주요 선수가 될 준비가 되어 있고, 암 치료제 시장에서의 몫이 증가될 것으로 추정된다.

[0192]

종양 성장 및 생존을 촉진하는 세포의 매개물의 확인이 암의 이환률 및 사망률을 감소시킬 치료적 개입을 발견하는데 있어서 결정적인 단계이다. 하기 기술된 바와 같이, 스팽고지질 신호전달 캐스케이드의 주요 성분인 스팽고신-1-포스페이트 (S1P)가 다면발현성, 종양형성성 성장 인자인 것으로 간주되었다. S1P는 세포 증식, 세포 생존, 및 전이를 자극함으로써 종양 성장을 촉진한다. S1P는 내피 세포가 종양 내에서 새로운 혈관을 형성할 때 내피 세포의 이동 및 생존을 자극함으로써 종양 혈관형성을 또한 촉진한다. 모두 합쳐서, S1P는 암 진행에 기여하는 이벤트들의 증식성, 전-혈관형성성, 및 항-세포자멸사성 순서를 개시시킨다. 따라서, 생체내에서 S1P 수준을 조정하는, 특히 감소시키는 요법은 암의 처치에서 효과적일 것이다.

[0193]

스팡고신 키나제 (SPHK)가 종양 성장을 촉진하는 세포의 스팽고지질 신호전달 분자인 스팽고신-1-포스페이트 (S1P)를 생산하는 최근에 확인된 종양유전자라는 것이 연구에서 증명되었다. 종양 세포 증식 및 전이와 관련된 S1P의 성장 인자 작용, 뿐만 아니라 S1P의 전-혈관형성성 효과에 의해 종양 성장이 직접적 및 간접적 양쪽 모두로 촉진된다. 본 출원인은 S1P를 선택적으로 흡수하여, 종양 부피 및 전이 잠재력에서의 예상되는 감소와 함께 이러한 종양 성장 인자의 세포의 농도를 저하시킬 뿐만 아니라, 동시에 차단되지 않으면 성장 중인 종양에 영양을 공급할 새로운 혈관 형성을 차단하는 치료적 분자 스폰지로 사용될 수 있는 생체특이적 모노클로날 항-S1P 항체 (항-S1P mAb)를 생산하였다. 분자 흡수 개념의 예상되는 성공은 암의 치료에 대한 혁신적인 접근법을 나타낼 것이다. 하기의 단락에서 설명되는 바와 같이, 본 출원인은 중요한 종양 성장 인자인 스팽고신-1-포스페이트 (S1P)에 대한 mAb를 개발하였다. 본 출원인은 이러한 항체가 다수의 암 유형과 관련된 증식, 전이 잠재력 및 혈관형성, 및 따라서 일반적으로 암, 뿐만 아니라 질환에 동반되는 종양 혈관형성을 감소시키는데 효과적일 수 있을 것으로 믿는다.

[0194]

천연 형태의 스팽고마이엘리나제 (nSMase)는 스팽고지질 신호전달 경로의 주요 초기 성분이다 ([Chatterjee, Adv. Lipid Res. 26: 25-46, 1993]; [Liu, Obein, and Hannun, Semin. Cell Dev. Biol. 8: 311-322, 1997]). nSMase는 알칼리성 SMase, 산성 SMase, 아연-의존적 산성 SMase, 마그네슘-의존적 중성 SMase, 및 마그네슘-비의존적 중성 SMase가 포함되는 적어도 5가지 클래스의 SMase 중 하나일 뿐이다 ([Liu, Obein, and Hannun, Semin. Cell Dev. Biol. 8: 311-322, 1997]). nSMase 클래스는 통상적으로 표면 막과 회합되고 ([Das, Cook, and Spence, Biochim Biophys Acta 777: 339-342, 1984]; [Dobrowsky, Cell Signal 12: 81-90., 2000]), 세포 자멸사를 야기하는 다양한 자극, 예컨대 전-염증성 사이토카인, 종양 괴사 인자 알파 (TNF α) ([Segui, et al., J. Clin. Invest. 108: 143-151, 2001]), T 세포 수용체 ([Tonnetti, et al., J. Exp. Med 189: 1581-1589, 1999]), 이온화 방사선조사 ([Haimovitz-Friedman, et al., J. Exp. Med 180: 525-535, 1994]) 및 안트라사이클린 항-신생물성 작용제 ([Andrieu-Abadie, et al., FASEB J. 13: 1501-1510, 1999])에 의해 활성화될 수 있다. 종양 괴사 인자 알파 (TNF α)는 nSMase ([Adam, et al., J. Bio Chem 271: 14617-14622, 1996];

[Dressler, Mathias, and Kolesnick, Science 255: 1715-1718, 1992]; [Kim, et al., J. Biol. Chem. 266:1: 484-489, 1991]; [Kronke, Chem Phys Lipids 102: 157-66., 1999]; [Yanaga and Watson, FEBS Letters 314: 297-300, 1992]), CER 생산 ([Kronke, Chem Phys Lipids 102: 157-66., 1999]) 및 암 세포주 ([Andrieu-Abadie, et al., FASEB J. 13: 1501-1510, 1999]; [Hannun and Obein, Trends in Biol. Sci. 20: 72-76, 1995]; [Kolesnick, trends Biochem Sci 24: 224-5, 1999]; [Obeid, et al., Science 259: 1769-1771, 1993])를 포함하는 다수의 세포 유형에서의 세포자멸사 ([Rath and Aggarwal, J. Clin. Immuno. 19: 350-364, 1999]; [Robaye, et al., Am J Pathol 138: 447-453, 1991]; [Takeda et al., Int. Immunol. 5: 691-694, 1993])의 주지된 활성화제이고, nSMase의 활성화는 TNF α 유도 세포자멸사에 결정적인 것으로 나타났다 ([Luberto, et al., J. Biol. Chem. 277: 41128-41139, 2002]; [Segui, et al., J. Clin. Invest. 108: 143-151, 2001]). 그 결과, nSMase 또한 약물 개발용 표적으로 제안되었다 ([Wascholowski and Giannis, Drug News Perspect. 14: 581-90, 2001]).

[0195] 스팽고지질 신호전달 분자인 S1P는 스팽고신 키나제 (SPHK)의 작용을 통해 SPH로부터 생산된다. 키나제의 2가지 이소형인 SPHK1 및 SPHK2가 확인되었다 ([Liu, J Biol Chem 275: 19513-20, 2000]; [Nava, et al., Exp Cell Res 281: 115-127, 2002]). CER 및 SPH는 통상적으로 세포자멸사와 관련되지만, 반대로 S1P는 세포 증식 및 생존 경로 활성화의 매개물이다 ([An, Ann N Y Acad Sci 905: 25-33, 2000]; [Maceyka, et al., BBA 1585: 193-201, 2002]; [Zhang, et al., J. Cell Biol. 114: 155-167, 1991]). 이는 이전에는 Edg 수용체로 알려진 S1P/LPA 수용체 패밀리에 속하는 G 단백질-커플링 수용체 (GPCR)의 셋트를 활성화시킬 수 있는 세포외 매개물로서 최근에 이해되었다 ([An, Ann N Y Acad Sci 905: 25-33, 2000]; [An, Goetzl, and Lee, J. cell biochem 30/31: 147-157, 1998]; [Lee, et al., Science 279: 1552-1555, 1998]; [Okamoto, et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 260: 203-208, 1999]); 그러나, S1P의 세포내 작용 또한 제안되었다 ([Van Brocklyn, et al., J. Cell Biol. 142: 229-240, 1998]). 또한, CER/SPH 수준 대 S1P 간의 균형이 세포가 사망 경로로 보내지는지 또는 세포자멸사로부터 보호되는지 여부를 결정하는 가변저항기 메커니즘을 제공하는 것으로 제안되었다 ([Kwon, et al., J Biol Chem 276: 10627-10633, 2001]; [Maceyka, et al., BBA 1585: 193-201, 2002]; [Pyne, Biochem J. 349: 385-402, 2000]). 가변저항기 메커니즘의 주요 조절 효소는 SPHK이고, 이의 역할은 사망-촉진 스팽고지질 (CER/SPH)을 성장-촉진 S1P로 전환시키는 것이다.

[0196] SPHK를 종양유전자로 최초로 제안한 랜드마크 연구는 키나제로 안정적으로 형질감염된 NIH-3T3 섬유모세포가 증가된 S1P 생산을 동반하는 강화된 세포 증식을 나타냈음을 증명한 아텔레이드의 그룹이 발표하였다 ([Vadas and Gamble, Circ. Res. 79: 1216-1217, 1996]; [Xia et al., Curr Biol 10: 1527-1530, 2000]). 또한, SPHK 과 발현률은 형질감염된 세포가 통상적으로 나타내는 성질인 접촉 억제를 벗어났다. 이러한 관찰은 S1P가 선택된 인간 암 세포주의 전이 잠재력을 강화시킨다는 최근의 보고와 일관적이다 ([Igarashi, Ann. N.Y. Acad. Sci. 845: 19-31, 1998]; [Takuwa, Biochim Biophys Acta. 1582: 112-120, 2002]). 또한, 형질감염체는 NOD/SCID 마우스 내로 피하 주사되었을 때 종양을 생산하였다. 이러한 결과들은 복강내로 제공된 SPHK의 소형 분자 억제 제가 JC 유방 선암종 세포가 피하 주사된 SCID 마우스에서 종양 부피를 감소시킬 수 있었음을 나타내는 연구에서 최근에 입증되었다 ([French, et al., Cancer Res 63: 5962-5969, 2003]). 의미심장하게, SPHK가 신규 종양유전자일 수 있다는 개념이 SPHK가 다수의 고형 종양, 예컨대 유방, 결장, 폐, 난소, 위, 자궁, 신장 및 직장의 종양에서 과발현되었다는 발견에 의해 확고해졌다 ([French et al. (2003), 상기 문헌]). 또한, SPHK 소형 분자 억제제로 처리되는 경우 여러 인간 종양-유래 세포주가 세포자멸사로 구동될 수 있고, 이의 유효성은 S1P 수준을 감소시키는 능력에 의해 설명될 수 있는 것으로 증명되었다. 모두 합쳐서, 이러한 발견은 S1P가 종양 세포 자체에 의해 생산되었을 것 같은 성장 인자이고, S1P의 농도를 저하시키는 것은 성장 인자 철회시 나타나는 세포자멸사를 야기할 수 있다는 것을 증명한다.

S1P 및 종양 혈관형성

[0198] 혈관형성은 기존의 혈관계로부터 새로운 혈관이 형성되는 프로세스이다. 혈관형성은 여러 생리학적 프로세스에서 결정적인 역할을 하고, 종양 성장, 침습 및 전이가 포함되는 다양한 장애의 발병기전에 연루된다. 새로운 혈관이 비-암성 세포와 비교하여 종양 세포에 성장 장애를 제공하면서, 고형 및 혈중 종양과 관련된 혈관형성 프로세스 (종양 혈관형성)는 종양형성 및 질환 진행의 중대한 성분인 것으로 간주된다. 따라서, 혈관형성의 임상 제어는 암 및 기타 혈관형성-의존적 질환의 치료를 위한 결정적인 성분이다. 혈관 내피 세포 (EC)는 암 세포처럼 쉽게 돌연변이되지 않기 때문에 항-혈관형성성 치료제가 특히 매력적이다; 결과적으로, EC는 암 세포보다 장기 요법에 대한 저항성을 덜 얻어서, 치료제에 대한 양호한 잠재적인 표적으로 만들 것이다.

[0199] 여러 성장 인자들이 암성 혈관형성에 연루되었다. 생체지질 스팽고신-1-포스페이트 (S1P)는 암에 중요한 다수

의 세포성 프로세스의 매개물인 것으로 발견되었다. S1P는 대부분의 효과를 S1P₁₋₅로 지정된 G-단백질-커플링 수용체 패밀리에 대한 특이적 리간드로서 발휘한다. 이러한 수용체들은 혈관 형성 및 혈관 성숙, 세포 이동, 및 림프구 트래피킹을 조절한다. S1P와 반대로, S1P에 대한 전구물질인 스팽고신 및 세라마이드는 성장 정지 및 세포자멸사와 관련되었다. 마지막으로, S1P와 기타 전-혈관형성성 성장 인자 예컨대 VEGF, EGF, PDGF, bFGF 및 IL-8 간에 복합적인 혼선이 있다. S1P는, 수용체 S1P₁에 결합함으로써, 성장 인자 수용체 티로신 키나제, 예컨대 VEGFR, EGFR, 및 PDGFR에서 발견되는 것을 교차활성화시킨다. 혈관형성-의존적 종양에서의 S1P의 중요성은 S1P가 암 치치에 대한 특별한 표적이도록 한다. 이러한 관찰을 기초로, 세포의 S1P를 중화시키는 항체 접근법은 종양 성장을 지지하는데 필요한 영양소 및 산소의 부수적인 손실과 함께 혈관 형성 억제의 결과로서 인간에서 암 진행에서의 현저한 감소를 초래할 수 있다. 또한, 최근의 연구는 다수의 혈관형성 억제제가 초기 종양에서 원격 부위로의 암 확산의 완화를 또한 보조할 수 있는 항-침습성 및 항-전이성 화합물로서 또한 작용할 수 있다는 것을 시사한다.

[0200]

S1P를 가장 강력한 전-혈관형성성 작용제 중 하나로 연루시키는 증거들은 S1P를 VEGF 및 bFGF와 같은 작용제와 직접적으로 비교하는 연구로부터 나타난다. S1P는 인간 정맥 내피 세포 (HUVEC)의 DNA 합성 및 화학주성 운동성을 자극하면서, 다세포 구조의 분화를 유도하고, 이를 모두는 초기 혈관 형성에서의 S1P의 역할을 시사한다 ([Argraves, et al., 2004]; [Lee et al., 1999]; [Liu, et al., 2000]). 또한, S1P는 골수-유래 EC 전구물질의 혈관신생 부위로의 이동을 촉진한다 ([Annabi, et al., 2003]). S1P₁을 과발현하는 세포는 항-혈관형성성 작용제인 탈리도미드 및 네오바스탯(Neovastat)에 저항성이다 ([Annabi et al., 2003]). 게다가, S1P와 기타 전-혈관형성성 성장 인자 예컨대 VEGF, EGF, PDGF, bFGF 및 IL-8 간에 실질적인 혼선이 존재하는 것으로 증명되었다. 예를 들어, S1P는 EGF ([Shida, et al., 2004]) 및 VEGF2 수용체 ([Spiegel & Milstien, 2003])를 교차활성화시키고, VEGF는 S1P₁ 수용체 발현을 상향조절시킨다 ([Igarashi, et al., 2003]). 또한, S1P₁ 및 "VEGF 축"을 통해 작용하는 S1P는 뒷다리 혈관형성 및 혈관신생에 필요하다 ([Chae, et al., 2004]).

[0201]

암에 대한 항-혈관형성성 접근법은 세포독성 화학요법에 대한 보조제로서 결장암을 치치하기 위한 항-혈관형성 약물인 베바시주맙(Avastin®, Genentech)의 최근의 FDA 허가에 의해 매우 진보되었다.

[0202]

S1P에 대한 결합 친화력 및 특이성이 높은 항-S1P 뮤린 MAb LT1002가 최근에 개발되었다. LT1002는 인간 암의 여러 동물 모델에서 종양 진행 및 관련된 혈관형성을 현저하게 느리게 하는 것으로 나타났다. 게다가, LT1002는 연령-관련 황반 변성 (AMD)에 대한 혈관형성의 잘 확립된 모델에서 맥락막 혈관신생 (CNV) 병변 형성을 감소시켰다. CNV는 브루크 막 및 망막 색소 상피의 이상이 있는 질환에서 발생한다. 이러한 유형의 가장 통상적인 질환은 노인 환자에서의 심각한 시력 상실의 가장 우세한 원인인 AMD이다. 이러한 결과는 LT1002에 (1) 종양 세포 성장에 대한 직접적인 효과, (2) 혈관 내피 세포에 대한 간접적인 항-혈관형성성 효과, 및 (3) 기타 전-혈관형성성 성장 인자의 방출 및 작용을 방지하는 간접적인 항-혈관형성성 효과가 포함되는 여러 작용 메커니즘이 있다는 것을 시사한다.

[0203]

S1P가 종양 혈관형성에 기여한다는 가장 직접적인 생체내 증거는 문자성 흡수에 의해 세포의 S1P를 중화시키도록 디자인된 뮤린 모노클로날 항체 (mAb)에 초점을 둔 최근의 간행물로부터 나타난다 ([Visentin, et al., 2006]). HUVEC을 사용한 다양한 시험관내 분석법에서, 항-S1P mAb는 관 형성, 혈관 내피 세포의 이동 및 세포 사망으로부터의 보호 (각각 S1P에 의해 유도됨)를 중화시켰다. S1P는 마우스 내로 이식된 매트리겔 플리그 내로의 새로운 모세혈관 성장을 증가시켰고, 이러한 효과는 항-S1P mAb의 전신 투여에 의해 중화되었다. mAb는 뮤린 매트리겔 플리그 분석법에서 bFGF- 및 VEGF-유도 혈관형성을 실질적으로 중화시켰고, 항체는 S1P가 자극한, 종양 세포로부터의 전-혈관형성성 사이토카인 (VEGF, IL-8, IL-6) 방출을 시험관 내에서 및 생체 내에서 완화시켰다. 중요하게는, 동소이식으로 놓인 인간 암 세포가 이종이식된 마우스는 항-S1P mAb 처리 시 종양 진행의 실질적인 지연을 나타냈다. 이는 인간 유방, 난소 및 폐 암의 뮤린 모델, 및 뮤린 흑색종의 한 동종이식 모델에서 증명되었다 ([Visentin, et al., 2006]).

[0204]

안전하고 효율적인 치료제인 것으로 나타났기 때문에, 모노클로날 항체 (mAb)를 다양한 질환 및 장애의 치료적 치치로서 사용하는 것이 급속하게 증가하고 있다. 허가된 치료적 mAb에는 아바스틴(Avastin)®, 에르비툭스(Erbitux)®, 및 리툭산(Rituxan)®이 포함된다. 추가적인 mAb들이 다양한 질환에 대한 임상 개발의 각종 단계에 있고, 대다수는 다양한 형태의 암을 표적으로 한다. 일반적으로, 모노클로날 항체는 비-인간 포유동물에서 생성된다. 그러나, 주로 인간 환자가 뮤린 항체에 대한 자신의 항체 응답을 개시한다는 사실로 인해, 뮤린

모노클로날 항체의 치료적 유용성이 제한된다. 이러한 응답, 소위 HAMA (인간 항-마우스 항체) 응답으로 뮤린 mAb의 궁극적인 중화 및 신속한 제거가 초래된다. 이러한 제한은 뮤린 항체의 "인간화"로 칭해지는 프로세스의 발달로 극복되었다. 인간화는 투여된 치료적 MAb에 대한 면역 응답의 발달을 크게 감소시키고, 이에 의해 HAMA의 결과인 반감기 및 치료 효능의 감소를 방지한다. 대부분의 부분에 대해, 인간화 프로세스는 뮤린 상보성 결정 영역 (CDR)을 인간 면역글로불린의 프레임워크 영역 (FR) 내로 그래프팅시키는 것으로 구성된다. 이러한 전략은 "CDR 그래프팅"으로 칭해진다. 최초의 그래프트된 구축물에서 손실된 친화력을 다시 얻기 위해 인간 FR 내의 선별된 잔기의 뮤린 아미노산 잔기로의 "역돌연변이"가 종종 필요하다.

[0205] mAb의 제작은 단백질 자체의 변이성으로부터 저지되는 복합적인 프로세스이다. mAb의 변이성은 단백질 골격 및 /또는 탄수화물 모이어티에 국소화될 수 있다. 비균질성은 별법적인 디슬퍼드 짹지움의 형성, 탈아미드화 및 이소아스파르틸 잔기의 형성, 메티오닌 및 시스테인 산화, N-말단 글루타민 잔기의 피로글루타메이트로의 고리화, 및 포유류 카르복시펩ти다제에 의한 C-말단 라이신의 부분적인 효소 분해에 기인할 수 있다. 항체 분자의 성질을 개선시키기 위해, 예컨대 안정성, 프로테아제에 대한 저항성, 응집 거동을 강화시키고, 이종성 시스템에서의 발현 수준을 강화시키기 위해 통상적으로 항체 분자가 조작된다.

[0206] 본원에서, S1P에 대한 뮤린 MAb의 인간화가 기술된다. 전체적인 전략은 LT1002로부터의 6개의 CDR을 인간 프레임워크 내로 그래프팅시키는 것으로 구성되었다. 항체 성능을 추가로 정련하고 최적화하도록 추가적인 변형이 조작되었다. 인간화 MAb는 LT1002와 동일한 특성을 제시하였고, 따라서 임상 시험에서 테스트하기에 적절하다.

S1P 및 섬유증

[0208] 섬유모세포, 특히 근육섬유모세포는 세포성 손상 및 염증에 응답한 흉터 형성에서의 주요 세포 요소이다 ([Tomasek, et al. (2002), Nat Rev Mol Cell Biol, vol 3: 349-63], 및 [Virag and Murry (2003), Am J Pathol, vol 163: 2433-40]). 근육섬유모세포에 의한 콜라겐 유전자 발현은 리모델링의 홀마크이고, 흉터 형성에 필요하다 ([Sun and Weber (2000), Cardiovasc Res, vol 46: 250-6], 및 [Sun and Weber (1996), J Mol Cell Cardiol, vol 28: 851-8]). S1P는 섬유모세포 이동 및 증식을 활성화시키면서 콜라겐 생산을 증가시킴으로써 상처 치유를 촉진한다 ([Sun, et al. (1994), J Biol Chem, vol 269: 16512-7]). 손상된 세포에 의해 국소적으로 생산된 S1P는 리모델링 및 흉터 형성과 관련된 부적응성 상처 치유를 초래할 수 있다. 따라서, S1P 억제제가 비정상적인 섬유발생 또는 섬유증을 적어도 부분적으로 특징으로 하는 질환 또는 용태에서 유용한 것으로 여겨진다. 본원에서, "섬유발생"은 섬유모세포의 과도한 활성 또는 개수로 정의되고, "섬유증"은 과도한 또는 부적합한 콜라겐 생성 및 흉터생성에 이르는 섬유모세포의 과도한 활성 또는 개수, 망막 박리와 같은 병리에 이르는 생리학적 조직 구조의 파괴 및/또는 매트릭스의 부적합한 수축, 또는 기관 기능의 손상에 이르는 기타 프로세스로 정의된다.

[0209] S1P 및 섬유모세포 콜라겐 발현: S1P는 휴지 섬유모세포가 흉터 형성 동안 강화된 콜라겐 발현을 나타내는 활성 근육섬유모세포로 분화되는 것을 촉진한다 ([Urata, et al. (2005), Kobe J Med Sci, vol 51: 17-27]). 흉터 생성 구역 내로의 섬유모세포의 증식 및 이동과 동시에, 근육섬유모세포가 오스테오콘틴 및 피브로넥틴으로 주로 구성된 일시적인 과립형 네트워크를 침착시킨다 ([Sun and Weber (2000), Cardiovasc Res, vol 46: 250-6]). 리모델링이 진행됨에 따라, 일시적인 매트릭스가 흡수되고, 콜라겐 네트워크가 확립된다 ([Sun and Weber (2000), Cardiovasc Res, vol 46: 250-6]). 본 발명가들은 S1P가 근육섬유모세포에 의한 콜라겐 생산을 촉진한다는 것을 증명하였다. 주지된 섬유성 매개물인 TGF β 는, 아마도 S1P의 작용을 통해, 여러 전-섬유성 단백질을 상향 조절시키고, 섬유모세포를 근육섬유모세포로 전환시키고, 염증성 단백질 발현을 자극하는 것으로 나타났다 ([Squires, et al. (2005), J Mol Cell Cardiol, vol 39: 699-707] 및 [Butt, Laurent and Bishop (1995), Eur J Cell Biol, vol 68: 330-5]). 섬유모세포가 근육섬유모세포로 TGF β 자극에 의해 분화되는 것에서 연루된 신호전달 분자인 TIMP1의 상향조절이 SPHK1에 대한 siRNA에 의해 차단되고 ([Yamanaka, et al., J Biol Chem. 2004 Dec 24;279(52):53994-4001]), 이는 인간화 버전의 항-S1P 항체가 TGF β 의 전-섬유성 효과를 완화할 수 있을 뿐만 아니라 S1P 자체의 섬유발생성 효과를 완화할 수 있음을 시사한다.

[0210] 부적응성 흉터생성을 최소화하는 것은 눈 및 심혈관 질환, 상처 치유, 및 경피증을 포함하지만 이에 한정되지 않는 섬유성 질환 및 용태의 치치에 유용한 것으로 여겨진다.

경피증의 치치를 위한 항-S1P 항체

[0212] 본 발명의 조성물 및 방법은 비정상적인 혈관신생, 혈관형성, 섬유발생, 섬유증, 흉터생성, 염증, 및 면역 응답을 적어도 부분적으로 특징으로 하는 장애 및 질환을 치치하는데 유용할 것이다. 한 이같은 질환은

경피증이고, 이는 전신 경화증으로 또한 지칭된다.

[0213] 경피증은 피부의 비후 또는 흉터생성을 야기하는 자가면역 질환이고, 때때로 폐, 심장 및/또는 신장을 포함하는 신체의 다른 영역을 수반한다. 경피증은 피부 및 신체의 기타 기관에서의 흉터 조직의 형성 (섬유증)을 특징으로 하고, 이는 수반된 영역의 비후 및 견고화에 이를 수 있으며, 결과적으로 기능이 감소될 수 있다. 현재, 경피증 협회에 따르면 약 300,000명의 미국인에게 경피증이 있다. 감염된 사람들의 1/3 이하에게는 광범위하게 확산된 질환이 있는 반면, 나머지 2/3에는 주로 피부 증상이 있다. 질환이 폐에 영향을 미치고 흉터생성을 야기하면, 폐가 확장되어야 하는만큼 더 이상 확장될 수 없기 때문에 호흡이 제한될 수 있다. 호흡 능력을 측정하기 위해, 의사들은 강제 폐활량 (FVC)을 평가하는 장치를 사용한다. FVC가 예상 기록의 50% 미만인 사람들에서, 경피증과 관련된 폐 질환으로부터의 10년 사망률은 약 42%이다. 사망률이 이처럼 높은 한가지 이유는 효과적인 치치가 현재 이용가능하지 않다는 것이다.

[0214] 본 출원의 실시예에 기술된 바와 같이, 기존의 증거들은 S1P가 부적응성 흉터생성 및 리모델링과 관련된 섬유모세포 활성화, 증식 및 결과적인 증가된 섬유모세포 활성에 기여할 수 있는 전-섬유성 성장 인자라는 것을 가리킨다. 또한, 피부 및 기타 유형의 섬유모세포의 활성에서의 S1P의 잠재적인 역할이 증명되었다. 예를 들어, 생체활성 지질이 뮤린 피부 섬유모세포의 이동을 자극하는 것으로 나타났고 ([Hama, et al., J Biol Chem. 2004 Apr 23;279(17):17634-9]), 인간 피부 섬유모세포는 여러 S1P 수용체 서브타입을 발현한다 ([Zhang, et al., Blood. 1999 May 1;93(9):2984-90]). 섬유모세포 활성에 대한 S1P의 여러 직접적인 효과에 더하여, S1P는 섬유모세포 활성에 대한 많은 잠재적인 간접적인 효과가 있을 수 있다. 예를 들어, S1P는 다른 주지된 전-섬유성 인자, 예컨대 TGF- β 및 혈소판-유래 성장 인자 (PDGF)의 작용을 용이하게 할 수 있다. TGF- β 는 섬유증에 대한 가장 광범위하게 연구되고 인식되어 있는 기여인자들 중 하나이다 ([Desmouliere, et al., J Cell Biol 122: 103-111, 1993]). TGF- β 는 SphK1 발현 및 활성을 상향조절시켜, ECM 분해를 억제하는 단백질인 메탈로프로테이나제 1 (TIMP-1)의 조직 억제제의 증가된 발현에 이른다 ([Yamanaka, et al., J Biol Chem 279: 53994-54001, 2004]). TIMP-1의 증가된 발현은 심장 기능상실 환자에서의 확장기 기능장애 및 사이질 섬유증에 연결된다 ([Heymans, et al., Am J Pathol 166: 15-25, 2005]). 역으로, S1P는 TGF- β 의 발현 및 방출을 자극한다 ([Norata, et al., Circulation 111: 2805-2811, 2005]). S1P와 PDGF 간의 혼선의 명료한 증거가 또한 존재한다. S1P는 PDGF의 발현을 직접적으로 자극한다 ([Usui, et al., J Biol Chem 279: 12300-12311, 2004]). 또한, S1P₁ 수용체 및 PDGF 수용체는 서로 결합하고, 이들의 회합이 다양한 세포 유형의 증식 및 이동에 기여하는 하류 신호전달의 PDGF 활성화에 필요하다 ([Long, et al., Prostaglandins Other Lipid Mediat 80: 74-80, 2006]; [Baudhuin et al., Faseb J 18: 341-343, 2004]). 따라서, 섬유증에 대한 TGF- β 및 PDGF의 효과는 부분적으로 S1P 신호전달 경로와의 혼선에 기인할 수 있다. 따라서, 본 발명의 조성물 및 방법은, 특히 특정한 표적 지질, 예를 들어, S1P의 생체내 유효 농도를 감소시킴으로써, 경피증을 치치하는데 사용될 수 있다.

[0215] 전신 경피증은 PDGF 수용체에 대한 자극성 자가항체에 의해 악화되는 것으로 생각되고 ([Baroni, et al., N Engl J Med. 2006 v354(25):2667-76]), PDGF 수용체는 TGF- β 에 응답하여 경피증 섬유모세포에서 상향조절된다 ([Yamakage, et al., J Exp Med. 1992 May 1;175(5):1227-34]). S1P, PDGF 및 TGF- β 신호전달 시스템 간의 실질적인 혼선으로 인해, S1P 생체활성을 항-S1P 작용제 (예를 들어, 항-S1P mAb)로 차단하는 것은 PDGF 및 TGF- β 의 전-경화성 효과를 간접적으로 완화할 수 있다. 또한, 이같은 항-S1P 작용제로의 치치는 질환 진행에 기여하는 피부 및 기타 형태의 섬유모세포에 대한 S1P의 직접적인 효과를 완화함으로서 경피증 환자에게 이로울 수 있다.

S1P 및 눈 질환 및 용태

[0216] 병적 또는 비정상적 혈관형성/혈관신생, 비정상적 리모델링, 섬유증 및 흉터생성 및 염증이 망막 및 눈 질환 예컨대 연령-관련 황반 변성 (AMD), 당뇨병성 망막병증 (DR)과 관련되어, 그리고 미숙아 망막병증 (ROP) 및 기타 발달 장애에서 발생하고 ([Eichler, et al. (2006), Curr Pharm Des, vol 12: 2645-60]), 뿐만 아니라 눈에 대한 감염 및 기계적 손상의 결과이다 ([Ciulla, et al. (2001), Curr Opin Ophthalmol, vol 12: 442-9] 및 [Dart et al (2003), Eye, vol 17: 886-92]). S1P에 대한 항체가 병적 또는 비정상적 혈관형성/혈관신생, 비정상적 리모델링, 섬유증, 및 흉터생성 또는 염증이 질환에 대한 성분인 눈 질환을 치치하는데 유용할 것이다.

눈의 혈관형성/혈관신생:

[0219] 병적인 눈 혈관형성은 다양한 임상 용태에서의 설명의 주요 원인이다. 맥락막 혈관신생 (CNV)이 다수의 눈 질환에서 발생하고, 그중 삼출성 또는 "습윤" 형태의 AMD가 가장 우세하다. 집단이 점점 더 노화된 결과로서,

AMD는 현대 사회의 유행병이고, 60세를 초과하는 환자들에서 서구 사회에서 실명의 주요 원인이다. AMD에 의해 야기되는 시력 상실의 유행에도 불구하고, 단지 몇 가지의 요법 (대부분 항-VEGF를 기반으로 함)만이 AMD의 진행을 느리게 할 수 있고, 심지어 더 적은 요법이 시력 상실을 돌이킬 수 있다 ([Bylsma and Guymer (2005), Clin Exp Optom., vol 88: 322-34], [Gryziewicz (2005), Adv Drug Deliv Rev, vol 57: 2092-8], 및 [Liu and Regillo (2004), Curr Opin Ophthalmol, vol 15: 221-6]). 따라서, 병적 혈관신생에 대한 새로운 치치법을 발견하는 것이 극도로 중요하다.

[0220]

AMD는 비정상적인 혈관형성/혈관신생, 비정상적인 리모델링, 섬유증 및 흉터생성, 및 염증과 관련된 눈 용태를 기술하는데 있어서 예시적인 목적으로만 본원에서 사용되고, 상기 용태는 본원에서 개시되고 청구된 바와 같은 또다른 눈 질환 및 장애에서 발견된다. AMD는 연령-관련 병적 변화를 수반한다 ([Tezel, Bora, and Kaplan (2004), Trends Mol Med, vol 10: 417-20] 및 [Zarbin (2004), Arch Ophthalmol, 122: 598-614]). 여러 요법들이 존재하지만, AMD의 정확한 병인 및 발병기전은 여전히 잘 이해되지 않는다. 노화는 누적되는 산화성 손상, 브루크 막의 비후 및 드루젠(drusen) 형성과 관련된다. 산화 스트레스로 망막 색소 상피 (RPE) 세포에 대한 손상이 초래되고, 일부 경우에는 맥락막모세혈관층에 대한 손상이 초래된다 ([Zarbin (2004), Arch Ophthalmol, vol 122: 598-614], 및 [Gorin, et al. (1999), Mol Vis., vol 5: 29]). RPE에 대한 손상은 브루크 막 및 맥락막 내에서의 만성 염증성 응답을 유도한다 ([Johnson et al. (2000), Exp Eye Res., vol 70: 441-9]). 이러한 손상 및 염증은 CNV 및 위축증을 자극함으로써 망막 손상을 일으키고 강화시킨다 ([Zarbin (2004), Arch Ophthalmol, vol 122: 598-614], 및 [Witmer, et al. (2003), Prog Retin Eye Res, vol 22: 1-29]). CNV로 결함이 있고 누출성인 혈관 (BV)이 초래되고, 이는 상처로 인식되기 쉽다 ([Kent and Sheridan (2003), Mol Vis, vol 9: 747-55]). 상처 치유가 맥락막으로부터 발생하고, 브루크막 및 RPE를 통과하여 망막 하 공간을 침습한다. 상처 치유 응답은 전형적인 초기 염증 응답, 두드러진 혈관형성성 응답 및 조직 형성에 이은 모든 수반된 요소들의 말기 단계 성숙을 특징으로 한다. 상처 리모델링은 광수용체 및 RPE를 비가역적으로 손상시킬 수 있어서, 항-혈관형성성 요법 이상의 것으로 CNV를 치치하는 것을 정당화한다 ([La Cour, Kiilgaard, and Nissen (2002), Drugs Aging, vol 19: 101-33.12]).

[0221]

개별적 또는 총괄적인 CNV-관련 섬유증, 부종 및 염증의 결과로서의 정상적인 망막 및 망막하 구조에서의 변동은 AMD-관련 시력 상실에 이른다 ([Tezel and Kaplan (2004), Trends Mol Med, vol 10: 417-20], 및 [Ambati, et al. (2003), Surv Ophthalmol, vol 48: 257-93]). 삼출성 AMD와 관련된 다중 세포성 및 사이토카인 상호작용은 효과적인 치치법에 대한 연구를 매우 복잡하게 한다. CNV 및 부종은 항-VEGF 치료제로 부분적으로 관리할 수 있지만, 흉터 형성 및 염증을 완화하기 위한 가능한 치치법은 충분하게 다루어지지 않았다 ([Bylsma and Guymer (2005), Clin Exp Optom, vol 88: 322-34], 및 [Pauleikhoff (2005), Retina, vol 25: 1065-84]). 신생혈관 복합체가 계속 그대로인 한, 항-VEGF 작용제로 치치된 환자에서의 경우인 것으로 나타나는 바와 같이, 망막하 섬유증 및 추후의 시력 상실에 대한 가능성이 지속된다.

[0222]

항-VEGF-A 요법은 삼출성 AMD의 치치에서 최근의 상당한 진전을 나타낸다. 그러나, 165가지 이소형의 VEGF-A를 선택적으로 억제하는 고친화력 앱타머인 PEGAPTANIB으로의 III상 VISION 시험은 평균적인 환자가 계속 시력을 상실하였고, 오직 작은 비율의 환자만이 시력을 회복하였음을 나타냈다 ([Gragoudas, et al. (2004), N Engl J Med, vol 351: 2805-16]). 항체 단편 RANIBIZUMAB으로의 모든 이소형의 VEGF-A의 억제 (pan-VEGF 억제)는 더욱 더 인상적인 결과를 산출하였다 ([Brown, et al., N Eng Med (2006), vol. 355:1432-44], [Rosenfeld, et al. N Eng J Med (2006), vol. 355:1419-31]). 2년 MARINA 시험 및 1년 ANCHOR 시험은 환자의 약 40%가 약간의 시력 회복을 달성하였음을 나타냈다. 이러한 결과들은 삼출성 AMD를 치치하는 능력에서의 주요 진전을 나타내지만, 환자의 60%에서는 시력 개선이 없었음을 또한 나타낸다. 또한, 이러한 환자들은 엄격하게 정의된 포함 및 배제 기준을 충족시키지 않았다. 더 많은 환자 집단에서의 결과는 덜 로버스트(robust)할 수 있다.

[0223]

CNV의 발달 및 궁극적으로 광수용체 파괴에 이르는 프로세스에서의 다른 단계를 표적으로 하는 추가적인 치료제를 개발하는 것이 여전히 뚜렷하게 요구된다. 먼저, 맥락막 BV의 성장은 VEGF만이 아니라 다수의 매개물의 조직화된 상호작용을 수반하여, 전체 프로세스를 조정 또는 억제하는 기회를 제공한다 ([Gragoudas, et al. (2004), N Engl J Med, vol 351: 2805-16]). 두번째로, 삼출성 AMD는 혈관 및 혈관외 성분으로 구성된다. 혈관 성분에는 혈관 내피 세포 (EC), EC 전구물질 및 혈관주위세포가 포함된다. 체적면에서 가장 큰 성분인 것으로 보이는 혈관외 성분은 염증성, 아교 및 망막 색소 상피 (RPE) 세포 및 섬유모세포로 구성된다. 양쪽 성분 중 어느 하나로부터 조직 손상이 초래될 수 있다. 병적 프로세스의 이러한 기타 양상은 현재의 항-VEGF 치치법으로 다루어지지 않는다. AMD와 관련된 혈관형성성 케스케이드의 추가적인 요소를 표적화하는 것은 요법에 대한 더욱 효과적이고 상승작용적인 접근법을 제공할 수 있다 ([Spaide, RF (2006), Am J Ophthalmol, vol 141:

149-156]).

[0224] 눈 질환에서의 염증:

염증, 구체적으로 대식세포 및 보체 시스템 ([Klein, et al. (2005), Science, vol 308: 385-9]; 및 [Hageman, et al. (2005), Proc Natl Acad Sci U S A, vol 102: 7227-32])이 삼출성 AMD의 발병기전에서 중요한 역할을 한다는 증거가 증가하고 있다. 수술로 절제된 맥락막 신생혈관 막의 조직병리학은 대식세포가 거의 보편적으로 존재한다는 것을 나타냈다 ([Grossniklaus, et al. (1994), Ophthalmology, vol 101: 1099-111], 및 [Grossniklaus, et al. (2002), Mol Vis, vol 8: 119-26]). 세포를 손상시킬 수 있고 브루크 막을 분해할 수 있을 뿐만 아니라 전-혈관형성성 사이토카인을 방출시킬 수 있는 효소의 분비를 포함하는 다중 효과에 의해 ([Otani, et al. (1999), Ophthalmol Vis Sci, vol 40: 1912-20], 및 [Amin, Puklin, and Frank (1994), Invest Ophthalmol Vis Sci, vol 35: 3178-88]), 대식세포가 CNV 형성 및 번식을 매개하는데 활동적인 역할을 할 수 있다는 증거가 늘고 있다 ([Grossniklaus, et al. (2003), Mol Vis, vol 8: 119-26]; [Espinosa-Heidmann, et al. (2003), Invest Ophthalmol Vis Sci, vol 44: 3586-92]; [Oh, et al. (1999), Invest Ophthalmol Vis Sci, vol 40: 1891-8]; [Cousins, et al. (2004), Arch Ophthalmol, vol 122: 1013-8]; [Forrester (2003), Nat Med, vol 9: 1350-1], 및 [Tsutsumi, et al. (2003), J Leukoc Biol, vol 74: 25-32]). 손상 부위에서, 대식세포가 활성화의 미세형태학적 정후, 예컨대 탈과립을 나타낸다 ([Oh, et al. (1999), Invest Ophthalmol Vis Sci, vol 40: 1891-8], 및 [Trautmann et al. (2000), J Pathol, vol 190: 100-6]). 따라서, 맥락막 신생혈관 복합체 내로의 대식세포 침윤을 제한하는 분자가 CNV 형성을 제한하는 것을 도울 수 있을 것으로 여겨진다.

[0226] 눈 질환에서의 맥락막 혈관신생 및 혈관 성숙:

산소 및 영양소를 염증 세포에 전달하고, 잔해물 제거를 보조하기 때문에, 혈관형성은 정상적인 상처 치유의 필수 성분이다 ([Lingen (2001), Arch Pathol Lab Med, vol 125: 67-71]). 진행성 혈관형성은 2가지 별개의 프로세스로 구성된다: 단계 I: 근처의 자극에 응답하여 혈관 EC가 모세혈관의 첨단부로 이동하고, 여기서 증식하여 관강 구조를 형성하는 단계; 및 단계 II: 혈관 네트워크의 가지치기 및 혈관구조의 최적화 ([Guo, et al. (2003), Am J Pathol, vol 162: 1083-93]).

[0227] 단계 I: 혈관신생. 혈관형성은 거의 항상 상처 치유를 돋는다. 그러나, 제어되지 않는 경우, 새로운 혈관은 통상적으로 결함이 있고, 누출, 출혈, 및 염증을 촉진한다. 전-혈관형성성 GF를 표적화함으로써 기능장애성이 고 누출성인 BV를 감소시키는 것은 AMD의 진행을 느리게하는 약간의 능력을 나타낸다 ([Pauleikhoff (2005), Retina, vol 25: 1065-84.14], 및 [van Wijngaarden, Coster, and Williams (2005), JAMA, vol 293: 1509-13]).

[0228] 단계 II: 혈관 성숙 및 약물 탈감작. 실제 CNV 병변은 현저하게 퇴축되지 않기 때문에, Pan-VEGF 억제는 망막 내 및 망막하 부종의 해소를 초래하는 항-투과성 작용을 통해 자신의 이로운 효과를 대부분 발휘하는 것으로 보인다. 현저한 CNV 퇴축의 결여는, 부분적으로, 혈관주위세포 피복으로 인한 새롭게 형성된 혈관의 성숙의 결과일 수 있다. 혈관주위세포의 존재는 항-VEGF 작용제에 대한 저항성을 부여하고 이러한 작용제의 혈관형성을 억제하는 능력을 손상시키는 것으로 보인다 ([Bergers and Song (2005), Neuro-oncol, vol 7: 452-64]; [Yamagishi and Imaizumi (2005), Int J Tissue React, vol 27: 125-35]; [Armulik, Abramsson and Betsholtz (2005), Circ Res, vol 97: 512-23]; [Ishibashi et al. (1995), Arch Ophthalmol, vol 113: 227-31]). 혈관 주위세포 동원에 대한 억제 효과가 있는 작용제는 혈관 채널 어셈블리 및 맥락막 신생혈관 채널의 성숙을 과정으로써 항-혈관형성 작용제에 대한 민감도를 영속시킬 것이다.

[0229] 혈관 네트워크의 리모델링은 영양학적 요구사항을 충족시키도록 혈관 (BV) 밀도를 조정하는 것을 수반한다 ([Gariano and Gardner (2005), Nature, 438: 960-6]). BV 미숙 기간은 새로운 혈관이 기능을 하고 있지만 혈관주위세포 코팅은 아직 획득하지 못한 기간에 상응한다 ([Benjamin, Hemo, and Keshet (1998), Development, 125: 1591-8], 및 [Gerhardt and Betsholtz (2003), Cell Tissue Res, 2003, 314: 15-23]). 이러한 지연은 망막 또는 맥락막의 영양학적 요구사항에 따라 발달 중인 혈관구조의 미세한 조율에 대한 유연성의 창을 제공하는데 필수적이다.

[0230] 생체활성 지질 스팽고신-1-포스페이트 (S1P), VEGF, PDGF, 안지오포이에틴 (Ang) 및 기타 성장 인자 (GF)는 혈관 성장을 증대시키고, 평활근 세포 (SMC) 및 혈관주위세포를 새롭게 생겨난 혈관의 리모델링을 촉진하는 나이브 혈관에 동원시킨다 ([Allende and Proia (2002), Biochim Biophys Acta, vol 582: 222-7]; [Gariano and

Gardner (2005), *Nature*, vol 438: 960-6]; [Grosskreutz, et al. (1999), *Microvasc Res*, vol 58: 128-36]; [Nishishita, and Lin (2004), *J Cell Biochem*, vol 91: 584-93], 및 [Erber, et al. (2004), *FASEB J*, vol 18: 338-40.32]). 동맥 평활근 세포의 이동 및 탈분화로부터 또는 EC 발아 시점에 중간엽 전구물질의 원위기 분화에 의해 대부분 생성되었을 혈관주위세포가 EC와 친밀하게 회합하고 이를 외장(ensheathing)하여, 전반적인 혈관 성숙기 및 생존이 초래된다 ([Benjamin, Hemo, and Keshet (1998), *Development*, vol 125: 1591-8]). 최근의 연구는 S1P, 및 S1P1 수용체가 세포-표면 트래피킹 및 세포-세포 부착 분자 N-카드레린의 활성화에서 수반된다는 것을 나타냈다 ([Paik, et al. (2004), *Genes Dev*, vol 18: 2392-403]). N-카드레린은 안정적인 혈관상(血管床)의 발달을 촉진하는, EC, 혈관주위세포 및 벽 세포 간의 상호작용에 필수적이다 ([Gerhardt and Betsholtz (2003), *Cell Tissue Res*, vol 314: 15-23]). S1P1 유전자의 전체적인 결실은 배아 발달 동안 BV 안정화에 필요한 신생 BV의 비정상적인 벽 세포 외장을 초래한다 ([Allende and Proia (2002), *Biochim Biophys Acta*, vol 1582: 222-7]). S1P1에 대한 siRNA의 국소적인 주입은 종양 이종이식 모델에서 혈관 안정화를 억제한다 ([Chae, et al. (2004), *J Clin Invest*, vol 114: 1082-9]). 트랜스제닉 마우스 연구는 VEGF 및 PDGF-B가 새로운 BV의 성숙 및 안정화를 촉진한다는 것을 나타냈다 ([Guo, et al. (2003), *Am J Pathol*, 162: 1083-93], 및 [Gariano and Gardner (2005), *Nature*, vol 438: 960-6.50]). VEGF는 Ang-1 (mRNA 및 단백질)을 상향조절시킨다 ([Asahara, et al. (1998), *Circ Res*, vol 83: 233-40]). Ang-1은 혈관주위세포에 의한 내피-주변 지지를 동원하고 유지하는데 있어서 주요한 역할을 한다 ([Asahara, et al. (1998), *Circ Res*, vol 83: 233-40]). VEGF의 안내 주사는 EC 얼기의 혈관주위세포 피복을 가속화시킨다 ([Benjamin, Hemo, and Keshet (1998), *Development*, vol 125: 1591-8]). PDGF-B 결핍 마우스 배아는 미세혈관 혈관주위세포가 없고, 이는 부종, 미세동맥류 및 치사성 출혈에 이른다 ([Lindahl, et al. (1997), *Science*, vol 277: 242-5]). 뮤린 출생전 연구는 혈관상 성숙의 완전한 VEGF- 및 PDGF-자극에 추가적인 신호가 필요하다는 것을 나타냈다. 상기 언급된 S1P의 교차-활성화를 기초로, 이러한 인자는 S1P일 수 있다 ([Erber et al. (2004), *FASEB J*, vol 18: 338-40]). 혈관 안정화 및 성숙은 VEGF 및 기타 GF 철회의 유연성 손실 및 복귀 부재, 및 항-혈관형성성 요법에 대한 저항성과 관련된다 ([Erber, et al. (2004), *FASEB J*, vol 18: 338-40], 및 [Hughes and Chan-Ling (2004), *Invest Ophthalmol Vis Sci*, vol 45: 2795-806]). 혈관형성 억제제에 대한 BV의 저항성은 성숙 혈관을 초기에 안정화시키는 혈관주위세포, 및 요법 적용시 미성숙 혈관으로 동원되는 것들에 의해 부여된다 ([Erber, et al. (2004), *FASEB J*, vol 18: 338-40]). 미성숙 EC의 외장 후, EC를 전-세포자멸사성 작용제로부터 보호하는 보상성 생존 인자 (Ang-1 및 PDGF-B)를 혈관주위세포가 발현한다.

[0232] 눈 질환에서의 부종 및 혈관 투과성:

CNV 막은 혈관내 내용물을 주위의 공간 새로 누출시켜 망막하 출혈, 삼출물 및 체액 축적을 초래하는 경향이 있는 유창 혈관 EC로 구성된다 ([Gerhardt and Betsholtz (2003), *Cell Tissue Res*, vol 14: 15-23]). 수년 동안 CNV 조직 자체가, 더욱 최근에는 망막내 혈관신생이 AMD와 관련된 시력 감소를 초래하는 것으로 연루되었다. 그러나, 현재는 혈관 투과성 (VP)에서의 증가 및 이어지는 혈액 망막 장벽 (BRB)의 파괴에 의해 야기된 황반 부종이 AMD 및 기타 눈 질환과 관련된 시력 상실 (당뇨병과 관련된 실명 포함)에서 주요한 역할을 하는 것으로 생각된다. [Hughes and Chan-Ling (2004), *Invest Ophthalmol Vis Sci*, vol 45: 2795-806]; [Felinski and Antonetti (2005), *Curr Eye Res*, vol 30: 949-57]; [Joussen, et al. (2003), *FASEB J*, vol 17: 76-8], 및 [Strom, et al. (2005), *Invest Ophthalmol Vis Sci*, vol 46: 3855-8]. 특히, 당뇨병성 망막병증 (DR) 및 당뇨병성 황반 부종 (DME)은 당뇨병 환자에서의 통상적인 미세혈관 합병증이고, 당뇨병과 관련된 실명의 가장 통상적인 원인이다. DME는 증가된 미세혈관 투과성으로부터 초래된다. [Joussen, et al. (2003), *FASEB J*, vol 17: 76-8]. 공동으로, 이들은 노동 연령 집단에서의 새로운 실명의 가장 통상적인 원인이다. S1P를 표적으로 하는 항체와 같은 화합물이 이러한 용태들에 치료적으로 유용할 것으로 여겨진다.

[0234] 본 발명에 따라 처치될 수 있는 여러 클래스의 눈 질환의 예가 하기에 기술된다. 다수의 질환 및 용태가, 적어도 부분적으로, 다중 병리학적 프로세스 (예를 들어, 병리학적 혈관신생 및 흉터생성 양쪽 모두)를 특징으로 한다는 것과 본원에서 제공된 분류는 서술적인 편의를 위한 것이고 본 발명을 제한하지 않는다는 것이 이해될 것이다.

a. 병적 혈관신생과 관련된 허혈성 망막병증 및 망막앞 및/또는 망막하 막 형성을 특징으로 하는 질환

허혈성 망막병증 (IR)은 손상된 망막 혈류를 특징으로 하는 다양한 군의 장애이다. IR의 예로는 당뇨병성 망막 병증 (DR), 미숙아 망막병증 (ROP), 겹상적혈구 망막병증 및 망막 정맥 폐쇄 질환이 포함된다. 모든 이러한 장애들은 병리학적 망막 혈관신생의 VEGF-구동 증식과 관련될 수 있고, 이는 궁극적으로 안내 출혈, 망막앞 막 형성 및 견인성 망막 박리에 이를 수 있다. 황반 주름 또는 셀로판 망막병증으로 또한 칭해지는 특발성 망막앞

막 (ERM)은 망막 구조의 왜곡에 2차적으로 시력 감소를 야기할 수 있다. 이러한 막은 수술에 의한 제거에도 불구하고 종종 재발하고, 망막 허혈과 종종 관련된다. VEGF 및 이의 수용체가 ERM에 국소화된다. 증식성 당뇨병성 망막병증, 증식성 유리체망막병증, 및 황반 주름과 관련되어 막 내에 VEGF가 존재하는 것은 이러한 사이토카인이 허혈성 망막 질환에서의 혈관형성 및 증식성 유리체망막 장애에서의 막 성장에서 중요한 역할을 한다는 것을 추가로 시사한다. 게다가, VEGF 수용체 VEGFR1 및 VEGFR2가 ERM 내의 세포에서 또한 확인된다. 이러한 데 이터는 VEGF가 혈관 및 무혈관 ERM의 진행에 기여할 수 있는 자가분비성 및/또는 주변분비성 자극인자일 수 있다는 것을 나타낸다. PDGF 및 이의 수용체 ([Robbins, et al. (1994), Invest Ophthalmol Vis Sci; vol 35: 3649-3663])가 증식성 망막 질환이 있는 눈에서 기술되었다 ([Cassidy, et al. (1998), Br J Ophthalmol; vol 82: 181-85], 및 [Freyberger, et al. (2000), Exp Clin Endocrinol Diabetes, vol 108: 106-109]). 이러한 발견들은 PDGF 리간드 및 수용체가 상이한 기원의 증식성 망막의 막들에 광범위하게 존재한다는 것을 시사하고, PDGF로의 자가분비성 및 주변분비성 자극이 ERM 발병기전에서 수반될 수 있다는 것을 시사한다. TGF 염색 및 면역반응성에 의해 나타나는 바와 같이, 형질전환 성장 인자- β (TGF- β)가 ERM의 형성에 수반된다 ([Pournaras, et al. (1998), Klin Monatsbl Augenheilkd, vol 212: 356-358]). 게다가, TGF- β 수용체 II가 당뇨병성 및 PVR 막의 ERM의 근육섬유모세포에서 발현된다. 이러한 결과들은 망막 및 ERM 내의 다중 세포 유형에서 생산된 TGF- β 가 PVR, 당뇨병성 및 2차 ERM의 처치를 위한 매력적인 표적이라는 것을 시사한다. 인터루킨-6 (IL-6)은 증식성 당뇨병성 망막병증 (PDR)에서 인간 유리체 내에서 증가되는 것으로 보고되었고 ([La Heij, et al. (2002), Am J Ophthal, 134: 367-375]), 한 연구에서는, 연구된 당뇨병성 ERM의 100%가 IL-6 단백질을 발현하였다 ([Yamamoto, et al. (2001) Am J Ophthal, vol 132: 369-377]).

[0237]

염기성 섬유모세포 성장 인자 (bFGF)의 외인성 투여가 내피 증식 및 VEGF 발현을 유도하는 것으로 나타났다 ([Stavri, et al. (1995), Circulation, vol 92: 11-14]). 이러한 관찰과 일치하여, bFGF 농도가 PDR 환자로부터의 유리체 샘플에서 증가된다 ([Sivalingam, et al. (1990), Arch Ophthalmol, vol 108: 869-872], 및 [Boulton, et al. (1997), Br J Ophthalmol, vol 81: 228-233]). bFGF는 ERM의 형성에서 또한 수반되고 ([Hueber, et al. (1996), Int. Ophthalmol, vol 20: 345-350]), 이때 연구된 10개의 PDR 막 중 8개에서 bFGF가 나타났다. 또한, 이러한 연구가들은 상응하는 수용체인 FGFR1에 대한 양성 염색을 발견하였다. bFGF에 대한 면역반응성이 비-혈관성 특발성 ERM에서 또한 증명되었다. 이러한 결과들로, 혈관성 ERM 및 무혈관성 ERM 양쪽 모두의 형성에 bFGF가 연루되었다. [Harada, et al. (2006), Prog in Retinal and Eye Res, vol 25: 149-164]. ROP 환자의 혈청에서 상승된 bFGF가 또한 검출되었다 ([Becerril, et al. (2005), Ophthalmology, vol 112, 2238]).

[0238]

S1P 및 S1P와 VEGF, bFGF, PDGF, TGF- β 및 IL-6의 상호작용의 공지된 다면발현성 효과 하에, S1P에 결합하거나, 이를 길항하거나, 이의 효과 또는 생산을 억제하는 작용제가 혈관성 또는 무혈관성 ERM 형성을 특징으로 하는 허혈성 망막병증 및 후안부 질환에서의 병적 망막 혈관신생을 억제하는데 효과적일 것으로 여겨진다. 비정상적인 혈관신생 또는 혈관형성을 적어도 부분적으로 특징으로 하는 기타 눈 용태에는 연령-관련 황반 변성, 각막 이식 거부, 신생혈관 녹내장, 콘택트 렌즈 과도착용, 각막 감염 (단순 헤르페스, 띠 헤르페스 및 원충 감염 포함), 익상편, 감염성 포도막염, 만성 망막 박리, 레이저 손상, 겹상적혈구 망막병증, 정맥 폐쇄성 질환, 맥락막 혈관신생, 망막 혈관종성 증식, 및 특발성 결절성 맥락막 혈관병증이 포함된다.

[0239]

b. 증식성 유리체망막병증 (PVR).

[0240]

자발적인 열공 망막 박리 후 및 외상성 망막 박리 후 PVR이 관찰된다. 이는 망막 박리 수술 실패의 주요 원인이다. 이는 망막의 양쪽 측면, 후방 유리체 표면 및 유리체 기저부 상에서의 세포막의 성장 및 수축을 특징으로 한다. 눈에서의 이러한 과도한 흉터 조직 발달은 견인성 망막 박리의 발달에 이를 수 있고, 따라서 증식성 유리체망막병증 (PVR)의 방지 또는 억제에 대해 지시된 처치법은 망막 박리 관리의 논리적인 원리이다. 조직병리학적으로, PVR은 과도한 콜라겐 생산, 수축 및 세포성 증식을 특징으로 한다 ([Michels, Retinal Detachment 2nd Edition. Wilkinsin CP, Rice TA Eds, Complicated types of retinal detachment, pp 641-771, Mosby St Louis 1997]). PVR 막에서 확인된 세포 유형에는 주로 망막 색소 상피 세포, 섬유모세포, 대식세포 및 혈관 내피 세포가 포함된다 ([Jerdan, et al. (1989), Ophthalmology, vol 96: 801-10], 및 [Vidinova, et al. (2005), Klin Monatsbl Augenheilkd; vol 222:568-571]). 이러한 과도한 흉터생성 반응의 병태생리학은 혈소판 유래 성장 인자 (PDGF), 형질전환 성장 인자 (TGF) 베타, 염기성 섬유모세포 성장 인자 (bFGF), 인터루킨-6 (IL)-6, 및 인터루킨-8 (IL)-8이 포함되는 다수의 사이토카인에 의해 매개되는 것으로 보인다 ([Nagineni, et al. (2005), J Cell Physiol, vol 203: 35-43]; [La Heij, et al (2002), Am J Ophthalmol, 134: 367-75]; [Planck, et al. (1992), Curr Eye Res; vol 11: 1031-9]; [Canataroglu et al. (2005) Ocul Immunol

Inflamm; vol 13: 375-81], 및 [Andrews, et al. (1999), Ophthalmol Vis Sci; vol 40: 2683-9]). 이러한 사이토카인들의 억제는 시기적절한 방식으로 제공되는 경우 PVR의 발달을 방지하는 것을 돋거나 또는 이의 중증도를 제한할 수 있다 ([Akiyama, et al (2006), J Cell Physiol, vol 207:407-12], 및 [Zheng, et al (2003), Jpn J Ophthalmolm, vol 47:158-65]).

스핑고신-1-포스페이트 (S1P)는 다면발현성 효과가 있는 생체활성 라이소지질이다. 이는 전-혈관형성성이고, 전-염증성이며 (대식세포 및 비만 세포의 동원을 자극함), 전-섬유성 (흉터 형성을 자극함)이다. S1P는 일반적으로 중식 및 이동하도록 세포를 자극하고, 항-세포자멸사성이다. S1P는 수많은 사이토카인 및 성장 인자와의 상호작용을 통해 이러한 생물학적으로 다양한 기능을 달성한다. 모노클로날 항체 (스핑고펩)을 통한 S1P의 억제는 혈관 내피 성장 인자 (VEGF), bFGF, IL-6, 및 IL-8의 기능을 차단하는 것으로 나타났다 ([Visentin, B et al. (2006), Cancer Cell, vol 9: 1-14]). S1P가 S1P₁ 수용체에 결합하는 것은 PDGF 생산을 또한 증가시킬 수 있다; 따라서 S1P에 결합하는 작용제는 PDGF 생산을 감소시킬 것으로 또한 예상될 것이다 ([Milstien and Spiegel (2006), Cancer Cell, vol 9:148-150]). 하기 실시예에 나타난 바와 같이, 시험관내 S1P가 인간 RPE 세포를 PVR에서 보이는 유형과 비슷한 근육섬유모세포-유사 표현형으로 전환시키는 것으로 나타났다. PVR에서 보이는 과도한 흉터생성을 궁극적으로 초래하는 병태생리학 및 이러한 동일한 주요 매개물들에 대한 S1P의 공지된 효과 하에, S1P에 결합하거나, 이를 길항하거나, 이의 효과 또는 생산을 억제하는 작용제가 PVR의 발달 및 눈에 대한 이의 심하게 손상성인 효과를 제거하거나 최소화하는데 효과적일 것으로 여겨진다.

c. 포도막염.

포도막염은 눈의 포도막의 염증성 장애이다. 이는 눈의 앞쪽 (전방) 또는 뒤쪽 (후방) 또는 양쪽 모두에 영향을 미칠 수 있다. 이는 병인론에서 특발성 또는 전염성일 수 있고, 시력에 위협적일 수 있다. 특발성 포도막염은 안구 전방에서의 증가된 CD4+ 밸현과 관련되었다 ([Calder, et al. (1999), Invest Ophthalmol Vis Sci, vol 40: 2019-24]). 데이터는 포도막염의 발병기전에서의 T 립프구 및 이의 화학유인물질 IP-10의 병적 역할을 또한 시사한다 ([Abu El-Asrar (2004), Am J Ophthalmol, vol 138: 401-11]). 급성 전방 포도막염에서의 기타 케모카인에는 대식세포 염증성 단백질, 단핵구 화학유인물질 단백질-1 및 IL-8이 포함된다. 아마도 이러한 사이토카인들은 급성 전방 포도막염에서의 백혈구 동원에서 결정적인 역할을 할 것이다. [Verma, et al. (1997), Curr Eye Res; vol 16; 1202-8]. S1P 신호전달 케스케이드의 심원성이고 다면발현성이 효과 하에, 생체활성 지질의 유효 농도를 감소시키는 스펑고맵 및 기타 면역 모이어티가 포도막염과 관련된 안내 염증을 감소시키거나 조정하는 효과적인 방법으로 작용할 것으로 여겨진다.

d. 굴절 교정 수술.

각막 상처 치유 응답은 안정성 및 효율의 주요 결정인자이기 때문에 굴절 교정 수술 절차와 특히 관련된다. 이러한 절차는 근시, 원시 및 난시의 처치를 위해 수행된다. 레이저 원위치 각막절삭가공성형술 (LASIK) 및 굴절 교정 각막절제술 (PRK)은 가장 통상적인 굴절 교정 절차이지만, 합병증을 극복하기 위한 시도에서 다른 절차들이 개발되었다. 이러한 합병증에는 과교정, 부족교정, 퇴행, 및 기질 불투명화가 특히 포함된다. 다수의 통상적인 합병증들은 치유 응답과 관련되고, 수술에 대한 생물학적 응답을 근원으로 한다. 각막 생물학에서의 가장 큰 난점 중 하나는 섬유증보다는 재생을 통해 조직 회복을 촉진하는 것이다. 재생과 섬유증 간의 선택은 섬유모세포 활성화의 제어에 달려있는 것으로 여겨진다 ([Stramer, et al (2003), Invest Ophthalmol Vis Sci; vol 44: 4237-4246], 및 [Fini (1999) Prog Retin Eye Res, vol 18: 529-551]). 수술 또는 손상 1-2주 후에 근육 섬유모세포로 칭해지는 세포가 상피하 기질에서 나타날 수 있다. 아마도 근육섬유모세포는 TGF- β 의 영향 하에 각막세포로부터 유래될 것이다 ([Jester, et al. (2003), Exp Eye Res, vol 77: 581-592]). 각막 혼탁 및 기질 흉터생성은 감소된 각막 투명도를 특징으로 하고, 섬유모세포 및 근육섬유모세포 생성과 관련될 수 있다. 원위치 및 시험관내 연구는 TGF- β 및 PDGF가 근육섬유모세포 분화를 자극하는데 중요하다는 것을 시사하였다 ([Folger, et al. (2001), Invest Ophthalmol Vis Sci; 42: 2534-2541]). 특정 환경 하에서의 LASIK 후 중심 계면에서 혼탁이 주목될 수 있다. 여기에는 광범위 충판 각막염, 도넛-형상 플랩, 및 계면에서의 상피 잔해물의 유지가 포함된다. 이들 각각은 상피 세포에서 활성화된 각막세포로의 TGF- β 의 접근 증가와 관련될 것이다 ([Netto, et al. (2005), Cornea, vol 24: 509-522]). 아마도 퇴행은 높아진 상피-기질 상처 치유 상호작용 예컨대 각막 섬유모세포 및 또는 근육섬유모세포에 의한 상피 조정 성장 인자의 증가된 생산에 기인할 것이다 ([Netto, et al. (2005), 상기 문헌]). 국소적인 항-TGF- β 항체로 TGF- β 가 수용체에 결합하는 것을 억제하는 것은 PRK에 의해 유도된 혼탁을 감소시키는 것으로 나타났다 [Jester, et al. (1997), Cornea, vol 16: 177-187]. 섬유성 프로세스 및 TGF- β 에 대한 항-생체활성 지질 항체의 공지된 효과 하에, 본 발명가들은 이러한

한 항체가 콜절 교정 수술의 합병증 예컨대 혼탁, 기질 흉터생성 및 퇴행 중 일부를 치료하는 것을 도울 수 있을 것으로 믿는다.

e. 녹내장 여과 수술에서의 조정.

전통적으로 녹내장은 상승된 안압이 시각 신경에 대한 손상을 야기하고 궁극적으로 시야 또는 시력을 손상시키는 질환으로 생각된다. 정상적인 압력의 환경 하에 시각 신경 손상이 발생할 수 있는 또 다른 형태의 녹내장 또는 소위 "정상 안압 녹내장"이 존재한다. 다수의 환자에 대해, 의약이 이러한 질환을 제어할 수 있지만, 어떤 이들에게는 눈 내에 샛길이 수술에 의해 생성되어 체액이 배수되도록 하는 녹내장 여과 수술이 필요하다. 이는 섬유주절제술, 의학 장치의 이식 또는 또 다른 수술적 개입 방법을 통해 달성될 수 있다. 섬유모세포의 증식 및 궁극적으로 흉터생성을 특징으로 하는 상처 치유 프로세스로 인해 녹내장 여과 수술이 실패한다. 5-플루오로우라실 및 미토마이신 C와 같은 항-대사물이 후속 흉터생성을 감소시킬 수 있다; 그러나, 이러한 약물을 사용하더라도, 장기 추적은 수술 실패가 여전히 심각한 임상 문제점이라는 것을 나타낸다 ([Mutsch and Grehn (2000), Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol; vol 238: 884-91], 및 [Fontana, et al. (2006), Ophthalmology, vol 113: 930-936]). 인간 테논낭(Tenon's capsule) 섬유모세포의 연구는 이들에게 bFGF 및 PDGF 및 TGF- β 를 합성하는 능력이 있다는 것과 이러한 성장 인자들이 시술의 실패에 기여하는, 녹내장 여과 수술 후의 조직 복구 프로세스에 연루된다는 것을 나타냈다. [Trpathi, et al. (1996), Exp Eye Res, vol 63: 339-46]. 추가적인 연구에서, 이러한 성장 인자들이 여과후 상처 응답에 또한 연루되었다. [Denk, et al. (2003), Curr Eye Res; vol 27: 35-44]에서, 여러 이소형의 PDGF가 녹내장 여과 수술 후 테논낭 섬유모세포의 증식의 주요 자극인자인 한편, TGF- β 는 테논낭 섬유모세포의 근육섬유모세포로의 형질전환에 필수적인 것으로 결론지어졌다. 본 발명 가들은 S1P가 인간 테논낭/결막 섬유모세포 내에 존재한다는 것과 S1P가 상처 치유 응답에서 강하게 발현된다는 것을 나타냈다. S1P는 여러 섬유모세포 세포 유형의 전-섬유성 기능 및 근육섬유모세포 표현형으로의 형질전환 및 콜라겐 생산을 또한 자극한다. S1P 및 S1P와 bFGF, PDGF, 및 TGF- β 의 공지된 상호작용의 특이적 다면발현성 효과 하에, S1P에 결합하거나, 이를 길항하거나, 이의 효과 또는 생산을 억제하는 작용제가 녹내장 수술의 실패에 이르는 상처 치유 및/또는 섬유성 응답을 조정하는데 효과적일 것이고, 성공적인 수술 결과를 강화시키는 효과적인 치료 방법일 것으로 여겨진다. 이러한 작용제가, 예를 들어, 유리체내 또는 결막하 주사를 통해 또는 국소적으로 투여될 수 있는 것으로 구현된다.

f. 각막 이식.

각막 이식 (전층 각막이식술 (PK))은 인간에서 가장 성공적인 조직 이식 절차이다. 그러나, 미국에서 매년 수 행되는 47,000회의 각막 이식술 중에서, 각막 동종이식 거부가 여전히 각막 이식 실패의 선도적인 원인이다 ([Ing, et al. (1998), Ophthalmology, vol 105: 1855-1865]). 현재, 면역억제 및 면역조정이 전도유망한 접근법일 수 있지만, 동종이식 거부를 막는 능력이 불충분하다. 최근, CD4(+) T 세포가 각막 동종이식편의 거부에서 헬퍼 세포가 아니라 이펙터 세포로 직접적으로 기능한다는 것이 발견되었다. [Hegde, et al. (2005), Transplantation, vol 79: 23-31]. 뮤린 연구에서, 거부가 진행되고 있는 각막의 기질에서 증가된 개수의 중성구, 대식세포 및 비만 세포가 나타났다. 대식세포가 주요 침윤성 세포 유형이었고, T-세포, 비만 세포 및 중성구가 뒤를 이었다. 고위험 각막 이식에서의 초기 캐모카인 발현은 IL-8의 마우스 유사체 (대식세포 염증성 단백질-2) 및 단핵구 화학주성 단백질-1 (MCP-1)였다 ([Yamagami, et al. (2005), Mol Vis, vol 11, 632-40]).

FTY720 (FTY)은 림프구 트래피킹을 변경시켜, 말초 혈액 림프구감소증 및 림프절 내의 증가된 림프구 카운트를 초래함으로써 작용하는 신규 면역억제성 약물이다. FTY는 림프구 상에 발현된 S1P 수용체들 중 일부에 결합함으로써 자신의 면역-조정 효과를 매개한다 ([Bohler, et al. (2005), Transplantation, vol 79: 492-5]). 이러한 약물은 경구 투여되고, 단일 경구 용량이 말초 림프구 카운트를 30-70%만큼 감소시켰다. FTY는 T-세포 하위집단인 CD4(+) 세포를 CD8(+) 세포보다 더 많이 감소시켰다. [Bohler, et al. (2004), Nephrol Dial Transplant, vol 19: 702-13]. 경구 투여되었을 때, FTY로 처리된 마우스는 동종이식 각막 이식편 생존의 상당한 연장을 나타냈다. [Zhang, et al. (2003), Transplantation, vol 76: 1511-3]. 각막 이종이식의 래트-대-마우스 모델에서 FTY 경구 처리는 또한 현저하게 거부를 지연시켰고, 거부 중증도를 감소시켰다 ([Sedlakova, et al. (2005), Transplantation, vol 79, 297-303]). S1P 신호전달의 효과를 조정하는 것이 각막 이식편 생존을 개선시킬 수 있음을 시사하는 데이터와 조합된 동종이식 거부의 공지된 발병기전 하에, 생체활성 지질의 유효 농도를 감소시키는 면역 모이어티, 예를 들어, 스팽고맵이, 예를 들어 면역 응답을 감소시킴으로써, 동종 이식편 거부와 같은 면역학적 용태의 처리에 또한 유용할 것이고, 따라서 PK 후 각막 이식편 생존을 개선시킬 것으로 여겨진다. 전신 투여에 더하여, 국소 투여, 예를 들어, 국부적인 눈주위 또는 안내 전달을 통한 투여가

가능하다는 부가적인 장점이 이러한 약물에 또한 있을 수 있다.

[0251] 염증성 또는 면역 성분이 있는 기타 눈 질환에는 만성 유리체염, 감염 (단순 헤르페스, 따 헤르페스 및 원충 감염 포함), 및 눈 히스토플라스마증이 포함된다.

[0252] g. 흉터생성을 특징으로 하는 전안부 질환.

[0253] 생체활성 지질에 표적화된 항체로의 처치는 눈의 전방 부분의 흉터생성을 특징으로 하는 여러 용태에 이로운 것으로 또한 여겨진다. 여기에는 하기의 용태들이 포함된다:

i. 외상

[0255] 각막은, 눈의 가장 전방에 있는 구조물로서, 공기로 운반되는 파편에서 둔기 외상 (기계적 외상을 초래할 수 있음)까지에 이르는 다양한 위험에 노출된다. 각막 및 눈의 전방 표면은 수술로부터의 또 다른 형태의 외상, 및 화학적 손상 예컨대 산 및 알칼리 손상에 또한 노출될 수 있다. 이러한 유형의 손상의 결과는 압도적일 수 있고, 종종 각막 및 결막 흉터생성 검구유착 형성에 이른다. 게다가, 각막 혈관신생이 뒤이어 일어날 수 있다. 중성구 축적, 중성구의 류코트리엔 방출, 및 인터루킨-1 및 인터루킨-6의 존재는 염증성 세포의 연속적인 파도를 동원하는 작용을 하고 ([Sotozono, et al. (1997), Curr Eye Res, vol 19: 670-676]), 이러한 세포는 각막에 침윤하여 단백질분해성 효소를 방출시키며, 이는 각막 조직의 추가적인 손상 및 파손 및 각막 용해에 이른다. 게다가, 각막 및 결막 섬유모세포가 활성화되고 침습하며, 콜라겐 침착 및 섬유증에 이른다. 과도한 염증 및 흉터생성의 바람직하지 않은 효과가 TGF- β 에 의해 촉진된다. [Saika, et al. (2006), Am J Pathol vol 168, 1848-60]. 이러한 프로세스는 각막 투명도의 상실 및 시력 손상에 이른다. 알칼리 화상 각막의 뮤린 모델에서, 저하된 중성구 침윤물 및 감소된 섬유증이 포함되는 감소된 염증으로 더욱 빠르고 더욱 완전한 치유가 초래되었다 ([Ueno, et al. (2005), Ophthalmol Vis Sci, vol 46: 4097-106]).

ii. 눈의 반흔성 유사천포창 (OCP)

[0257] OCP는 주로 결막에 영향을 미치는 만성 반흔성 (흉터-형성) 자가면역 질환이다. 이러한 질환은 변함없이 공격적이고, 예후가 꽤 불량하다. 이의 최종 단계에서, 결막 흉터생성 및 관련된 각막병증이 양측성 실명에 이른다. 조직학적으로, 결막은 점막밀 흉터생성 및 만성 염증을 나타내고, 이때 비만 세포 참여가 의외로 크다 ([Yao, et al. (2003), Ocul Immunol Inflamm, vol 11: 211-222]). 자가항원은 자가항체의 형성에 이른다. 자가항체가 자가항원에 결합하는 것은 CD4 (헬퍼) 세포가 CD8 (억제인자) 세포보다 수적으로 꽤 우세한 T 림프 구의 침윤과 함께 복합적인 시리즈의 이벤트를 추진한다. 또한, 대식세포 및 비만 세포 침윤, 뿐만 아니라 전-염증성 및 전-섬유성 사이토카인의 방출이 뒤이어 일어난다. 사이토카인-유도 결막 섬유모세포 증식 및 활성화가 초래되고, 결과적으로 상피하 섬유증이 초래된다 (하기의 실시예 참조). OCP 환자에서의 결막 섬유증에서의 TGF- β 및 IL-1의 역할이 연구에서 나타났다 ([Razzaque, et al. (2004), Invest Ophthalmol Vis Sci, vol 45: 1174-81]).

iii. 스티븐스 존슨 증후군 (SJS) 및 독성 표피 괴사용해 (TEN)

[0259] SJS 및 TEN은 의약에 대한 생명을 위협하는 불리한 반응이다. 이러한 2가지의 관련된 용태들의 눈 후유증은 심각할 수 있고, 안구 및 안검 결막, 눈꺼풀, 및 각막의 병적 변화를 수반할 수 있다. 약물 및 감염이 가장 통상적인 촉진성 인자이다. 만성적인 눈 발견물에는 흉터생성, 검구유착 형성, 및 결막의 반흔 (초기의 염증성 프로세스의 결과)이 포함된다. 이는 눈꺼풀속말림 형성, 속눈썹증, 및 눈물막의 불안정에 이른다. 눈 표면의 파손은 각막 흉터생성, 혈관신생에 이르고, 심한 경우에는 각질화에 이른다. OCP에서와 같이, 결막의 상피하 섬유증이 발생한다. 약물 또는 감염에 대한 격렬한 자가면역 림프구 응답이 SJS/TEN의 발달에서 역할을 하는 것으로 여겨진다. [Harilaos, et al. (2005), Erythema Multiforme, Stevens Johnsons Syndrome, and Toxic Epidermal Necrolysis, in Cornea 2nd edition. Krachmer, Mannis, Holland eds. Elsevier Mosby Philadelphia]. SJS에서의 침윤성 세포 집단에는 대식세포, CD4 양성 T 세포, 및 CD8 양성 T 세포가 포함된다. 이러한 세포 집단은 화학적 손상에서 보이는 것들과 유사하다. [Kawasaki, et al. (2000), J Ophthalmol, vol 84: 1191-3].

iv. 익상편

[0261] 익상적으로, 익상편은 눈꺼풀사이 틈새에서 발생하는 살집성 혈관 덩어리로 나타난다. 익상편의 몸체는 살집성 섬유혈관 덩어리이다. 활성 익상편은 현저한 혈관 충혈 및 진행성 성장을 특징으로 한다. 이는 안구에 단단하게 부착된다. 진전된 경우에, 익상편이 각막 상으로 침입하고, 시축 내에서의 각막 투명도 상실에 2차적인 시

력 상실 또는 불규칙 난시를 야기할 수 있다. 증상면에서, 환자는 이물질 감각, 눈물흘림, 및 흐려보임을 겪을 수 있다. 조직병리학은 고유질의 상피하 결합 조직의 유리질화, 증가된 개수의 섬유모세포 및 증가된 비만 세포를 나타낸다. [Butrus, et al. (1995), Am J Ophthalmol, vol 119: 236-237]. 익상편의 관리는 여전히 문제성이다. 수술 절제가 종종 수행되지만, 재발율이 높다 ([Krag, et al. (1992), Acta Ophthalmol, vol 70: 530]). 익상편의 재발률을 낮추는 것을 돋기 위해, 다양한 약리 보조제 예컨대 미토마이신-C 및 다우노루비신이 사용되었다. 이들이 도움이 될 수 있지만, 장기 데이터가 한정되고, 공막 얇아짐 및 각막 융해와 관련될 수 있다. [Dougherty, et al. [(1996), Cornea, vol 15: 537-540], 및 [Lee, et al. (2001), Cornea, vol 20: 238-42]는, 최초로, VEGF가 익상편의 발달에서 중요한 역할을 할 수 있다는 것을 증명하고 익상편의 상피에서 VEGF 및 산화질소를 확인하였다. 이러한 연구가들은 이들뿐만 아니라 다른 사이토카인들이 익상편의 섬유혈관성 내성장 특징을 초래하는 것으로 가정하였다. 1차 및 재발 익상편 양쪽 모두에서의 염기성 FGF 및 TGF-베타 1의 존재가 증명되었고 ([Kira, et al. (1998), Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, vol 236: 702-8]), 공개된 형태계측학적 및 면역조직화학적 증거들이 혈관형성이 익상편의 형성에서 역할을 할 수 있다는 개념을 추가로 지지하였다 ([Marcovich, et al (2002), Curr Eye Res, vol 25:17-22]). 또 다른 연구에서, IL-6 및 IL-8, 뿐만 아니라 VEGF가 익상편 발달에 관련될 수 있는 매개물로서 연구되었다 ([Di Girolamo, et al. (2006), Invest Ophthalmol Vis Sci, vol 47: 2430-7]). 익상편 형성 및 성장에 대한 효과적인 작용제는 수술적 개입에 대한 요구를 줄이거나 재발률을 감소시킬 수 있다.

[0262] 섬유발생, 섬유증 또는 흉터생성 성분이 있는 기타 눈 질환 및 용태에는 AMD, 당뇨병성 망막병증, 미숙아 망막병증, 겹상적혈구 망막병증, 허혈성 망막병증, 망막 정맥 폐쇄 질환, 및 콘택트렌즈 과도착용이 포함된다.

[0263] 요약하면, 과도한 흉터생성이 다수의 눈 및 비-눈 질환 및 용태의 근원적인 성분이다. S1P와 같은 생체활성 지질이 이러한 프로세스에서 역할을 하고, 이러한 작용제의 농도를 줄이기 위한 항체-관련 처치가 처치를 받는 환자에게의 치료적 이익에 이를 것이다. 한 실시양태에서, 생체활성 지질의 억제제, 특히 S1P 및/또는 이의 변이체에 대해 지시된 모노클로날 항체가 수술성 및 외상성 상처 치유 응답을 조정하는데 유용할 것으로 여겨진다.

섬유증, 섬유발생 및 흉터 형성:

[0265] 망막하 섬유증의 형성은 광수용체에 대한 비가역적인 손상 및 영구적인 시력 상실에 이른다. 신생혈관 복합체가 계속 그대로인 한, 항-VEGF 작용제로 처치된 환자에서의 경우인 것으로 나타나는 바와 같이, 망막하 섬유증 및 추후의 시력 상실에 대한 가능성성이 지속된다. RANIBIZUMAB (루센티스(Lucentis)®)의 PRONTO 연구의 개정판에서, 시력을 잃은 환자들은 망막하 섬유증 또는 RPE 파열 중 어느 하나의 결과로 그렇게 되었음이 발견되었다. 섬유모세포 침윤 및 콜라겐 침착의 정도를 줄일 수 있는 작용제가 유용할 것이다.

[0266] 섬유모세포, 특히 근육섬유모세포는 세포성 상해 및 염증에 응답한 흉터 형성에서의 주요 세포성 요소이다 ([Tomasek, et al. (2002), Nat Rev Mol Cell Biol, vol 3: 349-63], 및 [Virag and Murry (2003), Am J Pathol, vol 163: 2433-40]). 근육섬유모세포에 의한 콜라겐 유전자 발현은 리모델링의 홀마크이고, 흉터 형성에 필요하다 ([Sun and Weber (2000), Cardiovasc Res, vol 46: 250-6], 및 [Sun and Weber (1996), J Mol Cell Cardiol, vol 28: 851-8]). S1P는 섬유모세포 이동 및 증식을 활성화시키면서 콜라겐 생산을 증가시킴으로써 상처 치유를 촉진한다 ([Sun, et al. (1994), J Biol Chem, vol 269: 16512-7]). 손상된 세포에 의해 국소적으로 생산된 S1P는 리모델링 및 흉터 형성과 관련된 부적응성 상처 치유를 초래할 수 있다. 따라서, S1P 억제제가 비정상적인 섬유발생 또는 섬유증을 적어도 부분적으로 특징으로 하는 질환 또는 용태에서 유용한 것으로 여겨진다.

[0267] 망막하 섬유증의 형성은 광수용체에 대한 비가역적인 손상 및 영구적인 시력 상실에 이른다. 신생혈관 복합체가 계속 그대로인 한, 항-VEGF 작용제로 처치된 환자에서의 경우인 것으로 나타나는 바와 같이, 망막하 섬유증 및 추후의 시력 상실에 대한 가능성성이 지속된다.

[0268] S1P의 중화에 의해 부적응성 흉터 형성을 최소화시키는 것은 망막하 섬유증 및 이어지는 광수용체 손상의 정도를 제한함으로써 이로울 수 있고 시력에서의 비가역적인 상실을 방지할 수 있다. S1P가 삼출성 AMD와 관련된 부적응성 망막 리모델링의 초기 및 후기 단계 양쪽 모두에 기여할 수 있다는 것을 시사하는 증거들이 증가하고 있다. S1P에는 명백한 비-VEGF 의존적 전-혈관형성성 효과가 있다. 또한 S1P는 섬유모세포, EC, 혈관주위세포 및 염증성 세포가 포함되는 여러 세포 유형의 이동, 증식 및 생존을 자극한다 - 삼출성 AMD 및 기타 눈 장애의 다중 부적응성 프로세스에 참여하는 것과 동일한 세포. S1P는 삼출성 AMD의 발병기전에 연루된 VEGF, bFGF, PDGF, 및 기타 성장 인자 (GF)의 생산 및 활성화에 연결된다. 마지막으로, S1P는 항-혈관형성 작용제에 대한 감수성의 손실에 이르는 프로세스인 나이브 혈관구조의 성숙을 조정할 수 있다. S1P의 작용을 억제하는 것은

궁극적으로 AMD-관련 시력 상실에 이르는 복합적인 프로세스 및 여러 단계를 다루기 위한, 독점적으로 항-VEGF 접근법에 비해 상당한 장점을 제공할 수 있거나 이와 함께 상승작용적으로 작용할 수 있는, 삼출성 AMD에 대한 효과적인 치료적 처치일 수 있다.

[0269]

AMD에 대한 현재 선호되는 치료 양식에는 루센티스(Lucentis)® 및 오프-라벨(off-label) 아바스틴(Avastin)®(Genentech, Inc.)이 포함되고, 이들은 모두 단일 성장 인자(VEGF-A)를 표적으로 하고, 실제 맥락막 신생혈관(CNV) 병변은 현저하게 퇴화되지 않기 때문에, 대부분의 이로운 효과를 망막하 및 망막내 부종의 해소를 초래하는 항-투과성 작용을 통해 발휘하는 것으로 보인다. 그러나, 삼출성 AMD-관련 시력 상실은 CNV-유도 망막하 및 망막내 부종으로만 인한 것이 아니다. CNV, 망막하 섬유증, 부종 및 염증 모두에 의해 총괄적으로 야기된 망막 및 망막하 구조의 병적 파괴 및 리모델링이 AMD와 관련된 시력 상실을 초래한다. 이러한 다중 원인은 루센티스™을 포함하는 이용가능한 처치법에 의해 다루어지지 않는다. 따라서, 시력 상실을 야기하는 다중 메커니즘을 처치할 수 있는 치료제가, 단독요법으로서 또는 또 다른 작용제 예컨대 항-VEGF 작용제(예를 들어, 루센티스® 또는 아바스틴®)와 조합되어, 매우 유용할 것이다.

[0270]

따라서, 임의의 특정 이론에 제한되기를 원치 않으면서, 바람직하지 않은 스팽고지질 예컨대 S1P, 및/또는 하나 이상의 이의 대사물의 수준이 부적합한 염증, 섬유증 및/또는 혈관형성이 질환의 발병기전에 수반되는 다양한 눈 질환 및 장애의 발달을 야기하거나 이에 기여하는 것으로 여겨진다. 항-S1P 항체가 임상적으로 유용할 것 같은 눈의 질환 및 용태에는 당뇨병성 망막병증, 미숙아 망막병증, 당뇨병성 황반 부종, PVR, 전안부 질환 및 연령-관련 황반 부종(습식 및 건식 양쪽 모두), 및 녹내장에서의 섬유주절제술 또는 밸브 이식과 같은 시술 후 가 포함된다.

[0271]

경피증의 치치를 위한 항-S1P 항체

[0272]

본 발명의 조성물 및 방법은 비정상적인 혈관신생, 혈관형성, 섬유발생, 섬유증, 흉터생성, 염증, 및 면역 응답을 적어도 부분적으로 특징으로 하는 장애 및 질환을 치치하는데 유용할 것이다. 한 이같은 질환은 경피증이고, 이는 전신 경화증으로 또한 지칭된다.

[0273]

경피증은 피부의 비후 또는 흉터생성을 야기하는 자가면역 질환이고, 때때로 폐, 심장 및/또는 신장을 포함하는 신체의 다른 영역을 수반한다. 경피증은 피부 및 신체의 기타 기관에서의 흉터 조직의 형성(섬유증)을 특징으로 하고, 이는 수반된 영역의 비후 및 견고화에 이를 수 있으며, 결과적으로 기능이 감소될 수 있다. 현재, 경피증 협회에 따르면 약 300,000명의 미국인에게 경피증이 있다. 감염된 사람들의 1/3 이하에게는 광범위하게 확산된 질환이 있는 반면, 나머지 2/3에는 주로 피부 증상이 있다. 질환이 폐에 영향을 미치고 흉터생성을 야기하면, 폐가 확장되어야 하는만큼 더 이상 확장될 수 없기 때문에 호흡이 제한될 수 있다. 호흡 능력을 측정하기 위해, 의사들은 강제 폐활량(FVC)을 평가하는 장치를 사용한다. FVC가 예상 기록의 50% 미만인 사람들에서, 경피증과 관련된 폐 질환으로부터의 10년 사망률은 약 42%이다. 사망률이 이처럼 높은 한가지 이유는 효과적인 치치가 현재 이용가능하지 않다는 것이다.

[0274]

임의의 특정 이론에 제한되기를 원치 않으면서, S1P 및/또는 이의 대사물과 같은 지질의 부적합한 농도가 경피증의 발달을 야기하거나 이에 기여할 수 있는 것으로 여겨진다. 따라서, 본 발명의 조성물 및 방법은, 특히 특정한 표적 지질, 예를 들어, S1P의 생체내 유효 농도를 감소시킴으로써, 경피증을 치치하는데 사용될 수 있다.

[0275]

본 출원의 다른 곳에 기술된 바와 같이, 기존의 증거들은 S1P가 부적응성 흉터생성 및 리모델링과 관련된 섬유모세포 활성화, 증식 및 결과적인 증가된 섬유모세포 활성에 기여할 수 있는 전-섬유성 성장 인자라는 것을 가리킨다. S1P 생체활성을 항-S1P 작용제(예를 들어, 항-S1P mAb)로 차단하는 것은 PDGF 및 TGF- β 의 전-경화성 효과를 간접적으로 완화할 수 있다. 또한, 이같은 항-S1P 작용제로의 치치는 질환 진행에 기여하는 피부 및 기타 형태의 섬유모세포에 대한 S1P의 직접적인 효과를 완화함으로서 경피증 환자에게 이로울 수 있다.

[0276]

심혈관 및 뇌혈관 장애

[0277]

임의의 특정 이론에 제한되기를 원치 않으면서, 바람직하지 않은 스팽고지질 예컨대 CER, SPH, 또는 S1P, 및/또는 하나 이상의 이의 대사물이 심장 혀혈 동안 또는 후에 예컨대 재관류 손상 및 결과적인 심장 리모델링 및 심장 기능상실 동안 심장 기능장애를 직접적으로 초래할 수 있다.

[0278]

스팡고지질 예컨대 S1P가 간 조직의 섬유발생 및 상처 치유([Davaille, et al., J. Biol. Chem. 275:34268-34633, 2000]; [Ikeda, et al., Am J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. 279:G304-G310, 2000]), 상처난 혈관구조의 치유([Lee, et al., Am. J. Physiol. Cell Physiol. 278:C612-C618, 2000]), 및 기타 질환 상태, 또는 이같은 질환과 관련된 이벤트, 예컨대 암, 혈관형성 및 염증([Pyne, et al., Biochem. J. 349:385-402,

2000])에서 수반되기 때문에, 본 발명의 조성물 및 방법이 심장 질환뿐만 아니라 이러한 질환들을 처치하는데 또한 적용될 수 있다.

[0279] 이는 심장 또는 기타 비-뇌 공급원으로부터 유래된 스팽고지질이 뇌졸중에 기여할 수 있다는 것을 시사한다. 결과적으로, 스팽고지질 생산 및/또는 작용을 방해하는 것이 뇌졸중, 특히 혈관 질환, 죽상동맥경화증, 및 심장 장애에 의해 야기된 뇌졸중을 완화시키는데 이로울 수 있다. 최근의 증거는 외인성으로 투여된 S1P가 혈액-뇌 장벽을 통하여 뇌 혈관수축을 촉진한다는 것을 시사한다 ([Tosaka, et al., 뇌졸중 32: 2913-2919. 2001]).

[0280] 심장 허혈 (즉, 심장으로의 혈액 공급의 결핍) 과정에서의 초기 이벤트는 천연 발생 화합물 스팽고신의 심장 근육에 의한 과도한 생산이고, 또다른 대사물, 특히 S1P가 심장 조직 자체에 의해 또는 심장 스팽고지질 생산 및 이어지는 혈액에서의 전환의 결과로 혈액 성분에 의해 또한 생산되는 것으로 시사되었다. 본 발명은 특이적인 간화 모노클로날 항체로 S1P를 중화하는 방법을 제공한다. 따라서, 본 발명은 주요 스팽고지질인 S1P의 혈액 및 조직 수준을 감소시키기 위한 간화 항-스파고지질 항체 및 관련된 조성물 및 방법을 제공한다. 이같은 항체는, 예를 들어, 전혈 내의 바람직하지 않은 스팽고지질에 결합하여 이의 유효 농도를 저하시키는데 유용하다.

[0281] 본 발명의 치료 방법 및 조성물은, 이러한 요법이 특정한 바람직하지 않거나, 독성이거나 심장독성인 스팽고지질의 상대 농도, 절대 농도 또는 이용가능한 농도(들)을 변화시킬 수 있다는 것을 가리키기 위해, "스파고지질을 기초로 하는" 것으로 언급된다. "독성 스팽고지질"은 세포의 괴사 및/또는 세포자멸사를 야기 또는 강화할 수 있거나, 또는 다르게는 기관 또는 조직 (일부 경우에는 특정 조직 또는 기관에서 발견되는 특정한 세포 유형 포함)의 기능을 손상 (예를 들어, 과도한 섬유증을 통해 손상시킴)시킬 수 있는 임의의 스팽고지질을 지칭한다. "심장독성 스팽고지질"은 직접적으로 또는 간접적으로 부적응성 흉터생성 (섬유발생)을 통해 심장 기능상실을 촉진하고, 심장근육세포, 심장 뉴런 등이 포함되지만 이에 한정되지 않는, 심장에서 발견되거나 심장과 관련된 세포의 수축력 감소 상태를 야기하거나 이의 괴사 및/또는 세포자멸사를 야기 또는 강화하고/하거나, 스팽고지질 및/또는 이의 대사물의 수축력 감소성, 부정맥성 심장 혈관수축/연축 효과로 인한 심장 기능의 상실을 야기 할 수 있는 독성 스팽고지질이다. "바람직하지 않은 스팽고지질"에는 독성 및 심장독성 스팽고지질, 뿐만 아니라 독성 및 심장독성 스팽고지질의 대사물, 특히 대사 전구물질이 포함된다. 특히 흥미로운 바람직하지 않은 심장독성 및/또는 독성 스팽고지질에는 세라마이드 (CER), 세라마이드-1-포스페이트 (C1P), 스팽고신-1-포스페이트 (S-1-P), 디히드로-S1P (DHS1P), 스팽고실폴스포릴 콜린 (SPC), 스팽고신 (SPH; D(+)-에리트로-2-아미노-4-트랜스-옥타데칸-1,3-디올, 또는 스팽가닌) 및 다양한 대사물이 포함되지만, 이에 한정되지는 않는다.

[0282] 저산소증 및 재산소화에 대한 심장 근육세포의 가장 빠른 응답들 중 하나는 중성 스팽고마이엘리나제의 활성화 및 세라마이드의 축적인 것으로 공지되어 있다. [Hernandez, et al. (2000), Circ. Res. 86:198-204, 2000]. SPH는 다양한 세포 유형에서 세포자멸사성 세포 사망에서의 초기 신호전달 이벤트를 매개하는 것으로 연루되는 것으로 알려졌다 ([Ohta, et al., FEBS Letters 355:267-270, 1994]; [Ohta, et al., Cancer Res. 55:691-697, 1995]; [Cuvelier, et al., Nature 381:800-803, 1996]). 저산소증의 심장독성 효과는 스팽고지질 생산으로부터 및/또는 기타 대사물 (예를 들어, 양성자, 칼슘, 및 특정 유리 라디칼) 또는 신호전달 분자 (예를 들어, MAP 키나제, 카스파제)의 부적합한 생산으로부터 부분적으로 초래되는 것으로 가정된다.

[0283] S1P는 혈소판 내에 저장되고, 인간 혈장 및 혈청의 정상적인 구성물이다 ([Yatomi, et al., J. Biochem. 121:969-973, 1997]). S1P는 심장 혈관수축제이고, 개의 심장에 대한 또다른 생물학적 효과가 있다. [Sugiyama, et al. (2000), Cardiovascular Res. 46:119-125]. 죽상동맥경화증에서의 S1P의 역할이 주장되었다 ([Siess, et al., IUBMB Life 49:161-171, 2000]). 이는 HDL의 보호 효과가 S1P 생산을 차단하는 것에 기인한다는 증거를 포함하는 또다른 데이터에 의해 지지되었다 ([Xia, et al., PNAS 95:14196-14201, 1988]; [Xia, et al., J Biol Chem 274:33143-33147, 1999]).

[0284] 세라마이드의 대사 전구물질인 스팽고마이엘린이 저산소증이 적용된 실험 동물에서 증가되는 것으로 보고되었다 ([Sergeev, et al., Kosm. Biol. Aviakosm. Med. (Russian) 15:71-74, 1981]). 또다른 연구에서, 근육 세포의 내막이 다량의 SPH 및 스팽고마이엘린을 함유하는 것으로 보고되었다 ([Sumnicht, et al., Arch. Biochem. Biophys. 215:628-637, 1982]; [Sabbadini, et al., Biochem. Biophys. Res. Comm. 193:752-758, 1993]). 실험 동물을 푸모니신B 진균류 독소로 처리하면, 심장에 대한 동시에 발생하는 수축력 감소성 효과와 함께 SPH 및 DHSPH (S1P는 측정되지 않음)의 혈청 수준 증가가 초래되었다 ([Smith, et al., Toxicological Sciences 56:240-249, 2000]).

기타 질환 또는 용태

[0286]

혈관신생, 혈관형성, 비정상적인 섬유발생, 섬유증 및 흉터생성, 및 염증 및 면역 응답이 포함되는 다수의 프로세스에서 생체활성 지질 신호전달이 수반되기 때문에, 이러한 생체활성 지질의 억제제가 이러한 프로세스들 중 하나 이상과 관련된 다양한 질환 및 용태에서 유용할 것으로 여겨진다. 이같은 질환 및 용태는 전신성일 수 있거나 (예를 들어, 전신성 경피증), 또는 하나 이상의 특정한 신체 시스템, 부분 또는 기관 (예를 들어, 피부, 폐, 심혈관계 또는 눈)에 국소화될 수 있다.

[0287]

환자 내의 바람직하지 않은 스팽고지질의 양을 제어하는 한가지 방식은 하나 이상의 스팽고지질에 결합함으로써 유리 상태의 바람직하지 않은 스팽고지질의 수준을 감소시키는 치료적 "스폰지"로 작용하는 하나 이상의 인간화 항-스파고지질 항체를 포함하는 조성물을 제공하는 것이다. 화합물이 "유리" 상태인 것으로 지칭되면, 이러한 화합물은 자신의 바람직하지 않은 효과를 발휘하는 부위 또는 부위들에 도달하는 것으로부터 어떠한 방식으로도 제한되지 않는다. 전형적으로, 유리 화합물은 유리 화합물의 작용 부위(들)이거나 이를 함유하거나, 또는 이로 부터 화합물이 자신의 작용 부위(들)로 자유롭게 이동할 수 있는 혈액 및 조직 내에 존재한다. 또한 유리 화합물은 화합물을 바람직하지 않은 화합물로 전환시키는 임의의 효소에 의해, 작용되도록 이용가능할 수 있다.

[0288]

임의의 특정 이론에 제한되기를 원치 않으면서, 바람직하지 않은 스팽고지질 예컨대 SPH 또는 S1P, 및/또는 하나 이상의 이의 대사물의 수준이 심장 및 심장근육 질환 및 장애의 발달을 야기하거나 이에 기여하는 것으로 여겨진다.

[0289]

스파고지질이 간 조직의 섬유발생 및 상처 치유 ([Davaille, et al., J. Biol. Chem. 275:34268-34633, 2000]; [Ikeda, et al., Am J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol 279:G304-G310, 2000]), 상처난 혈관구조의 치유 ([Lee, et al., Am. J. Physiol. Cell Physiol. 278:C612-C618, 2000]), 및 기타 질환 상태 또는 장애, 또는 이같은 질환 또는 장애와 관련된 이벤트, 예컨대 암, 혈관형성, 과도한 섬유증과 관련된 각종 눈 질환 및 염증 ([Pyne, et al., Biochem. J. 349:385-402, 2000])에서 또한 수반되기를 때문에, 본 발명의 조성물 및 방법이 심장 및 심장근육 질환 및 장애뿐만 아니라 이러한 질환 및 장애를 치치하는데 적용될 수 있다.

[0290]

스파고지질을 기초로 하는 요법 중 한 형태는 바람직하지 않은 독성 스팽고지질의 실제 농도, 상대 농도 및/또는 이용가능한 생체내 농도를 감소시키기 위해 스팽고지질의 대사 경로를 조작하는 것을 수반한다. 본 발명은 질환, 장애 또는 신체적 외상을 치료 또는 예방하기 위한 조성물 및 방법을 제공하고, 이때 인간화 항-스파고지질 항체가 환자에게 투여되어, 바람직하지 않은 독성 스팽고지질, 또는 이의 대사물에 결합한다.

[0291]

이같은 인간화 항-스파고지질 항체는 질환, 장애 또는 신체적 외상의 치치가 포함되는 다양한 목적에 유용한 제약 조성물 내에 제형될 수 있다. 하나 이상의 본 발명의 인간화 항-스파고지질 항체를 포함하는 제약 조성물이 이같은 치치를 위해 키트 및 의학 장치 내로 흡입될 수 있다. 의학 장치는 본 발명의 제약 조성물을 이를 필요로 하는 환자에게 투여하는데 사용될 수 있고, 본 발명의 한 실시양태에 따라, 이같은 장치를 포함하는 키트가 제공된다. 이같은 장치 및 키트는 본 발명의 제약 조성물의 일상적인 투여 (자가 투여 포함)를 위해 디자인될 수 있다. 이같은 장치 및 키트는 응급 사용, 예를 들어, 앰뷸런스 또는 응급실에서의 사용, 또는 수술 동안의 사용, 또는 손상이 가능하지만 완벽한 의료 대처가 즉각적으로 준비되지 않을 수 있는 활동 (예를 들어, 하이킹 및 캠핑, 또는 전투 상황)에서의 사용을 위해 또한 디자인될 수 있다.

[0292]

투여 방법

[0293]

상이한 제형 및 장치를 사용하는 다양한 경로에 의해 본 발명의 작용제 및 조성물을 투여함으로써 본원에 논의된 질환 용태에 대한 치치가 달성될 수 있다. 적절한 제약상 허용가능한 희석제, 담체 및 부형제는 당업계에 주지되어 있다. 당업자는 임의의 특정 치치 프로토콜에 대해 투여되는 양이 쉽게 결정될 수 있다는 것을 이해 할 것이다. 적절한 양은 10 µg/용량 내지 10 g/용량, 바람직하게는 10 mg/용량 내지 1 g/용량의 범위 내에 속 할 것으로 예상될 수 있다.

[0294]

전신, 피하, 피내, 점막 (흡입 포함) 및 국소 투여가 포함되지만 이에 한정되지 않는 기술에 의해 약물 물질이 투여될 수 있다. 점막은 신체의 내부 공동의 안쪽을 이루는 상피 조직을 지칭한다. 예를 들어, 점막은 입, 식도, 위, 장 및 항문이 포함되는 소화관; 비강 통로, 기관, 기관지 및 폐가 포함되는 기도를 포함한다. 본 명세서의 목적을 위해, 점막은 눈의 외부 표면, 즉 각막 및 결막을 또한 포함한다. 국소 투여 (전신 투여와 반대됨)가 유리할 수 있는데, 이러한 점근법은 잠재적인 전신 부작용을 제한할 수 있지만, 여전히 치료 효과를 허용하기 때문이다.

[0295]

본 발명에서 사용된 제약 조성물은 용액, 에멀션 및 리포솜-함유 제형을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다. 이러한 조성물은 미리 형성된 액체, 자가-에멀션화 고체 및 자가-에멀션화 반고체를 포함하지만 이에 한정되지

않는 다양한 성분들로부터 생성될 수 있다.

[0296] 본 발명에서 사용된 제약 제형은 제약 산업에 주지된 통상적인 기술에 따라 제조될 수 있다. 이같은 기술은 활성 성분을 제약 담체(들) 또는 부형제(들)와 회합시키는 단계를 포함한다. 특히 조성물이 인간에서의 치료 용도로 의도되는 경우, 바람직한 담체에는 제약상 허용가능한 것들이 포함된다. 비-인간 치료 용도 (예를 들어, 반려 동물, 가축, 어류 또는 가금류의 처치)를 위해, 수의학적으로 허용가능한 담체가 사용될 수 있다. 일반적으로, 제형은 활성 성분과 액체 담체 또는 미세하게 분쇄된 고체 담체 또는 양쪽 성분을 균일하고 밀접하게 회합시킨 후, 필요하다면 생성물을 성형함으로써 제조된다.

[0297] 본 발명의 조성물은 정제, 캡슐, 액체 시럽, 연질 젤, 좌약, 및 판장제와 같은, 그러나 이에 한정되지 않는 다수의 가능한 투약 형태 중 임의의 것으로 제형될 수 있다. 또한 본 발명의 조성물은 수성, 비-수성 또는 혼합 매질 내의 혼탁액으로 제형될 수 있다. 수성 혼탁액은 소듐 카르복시메틸셀룰로스, 소르비톨 및/또는 텍스트란이 예를 들어 포함되는, 혼탁액의 점도를 증가시키는 물질을 추가로 함유할 수 있다. 혼탁액은 안정화제를 또한 함유할 수 있다.

[0298] 한 실시양태에서, 제약 조성물은 발포체로서 제형되어 사용될 수 있다. 제약 발포체에는 에멀션, 마이크로에멀션, 크림, 젤리 및 리포솜과 같은, 그러나 이에 한정되지 않는 제형이 포함된다.

[0299] 기본적으로 성질이 유사하지만, 이러한 제형들은 최종 생성물의 성분 및 경도가 다르다. 이같은 조성물 및 제형의 제조에 대한 노하우는 제약 및 제형 분야의 당업자에게 일반적으로 공지되어 있고, 본 발명의 조성물의 제형에 적용될 수 있다.

[0300] 한 실시양태에서, 예를 들어, 국소 점적제 또는 연고, 눈주위 주사 (전방부 또는 유리체 내로 앞방내 주사)를 통해, 이식된 저장소를 통해, 또는 주사 또는 경구 투여에 의해 전신성으로 면역-유래 모이어티가 눈에 전달될 수 있다. 사용된 항체의 품질은 당업자에 의해 쉽게 결정될 수 있다.

[0301] 치료제를 눈에 전달하는 것에 대한 전통적인 접근법은 국소 적용, 전신 투여 후의 눈 내로의 재분포, 또는 직접적인 안내/눈주위 주사를 포함한다 ([Sultana, et al. (2006), Current Drug Delivery, vol 3: 207-217]; [Ghate and Edelhauser (2006), Expert Opinion, vol 3: 275-287]; 및 [Kaur and Kanwar (2002), Drug Develop Industrial Pharmacy, vol 28: 473-493]). 항-S1P 또는 기타 항-생체활성 지질 항체 치료제가 이러한 접근법들 중 임의의 것과 함께 사용될 수 있지만, 모두 특정한 지각 장점 및 단점이 있다. 국소 점적제는 편리 하지만, 주로 코눈물관 배수로 인해 셋겨져 버려서, 적용된 약물의 5% 미만이 눈의 전안부 내로 전달되고, 이러한 용량 중 더 작은 분획이 안구의 후안부로 전달된다. 점적제 이외에, 스프레이가 또 다른 국소 투여 방식을 제공한다. 세번째 방식으로, 시력 흐려짐 및 눈꺼풀의 매팅(matting)이 문제가 될 수 있지만, 안과용 연고 또는 에멀션이 제형과 눈 표면의 접촉 시간을 연장시키기 위해 사용될 수 있다. 눈 장애를 치료하기 위한 치료제의 전신 투여는 전신을 약물의 잠재적인 독성에 노출시키기 때문에, 이같은 국소 접근법이 여전히 바람직하다.

[0302] 연령-관련 황반 변성, 당뇨병성 망막병증, 전방 포도막염, 및 녹내장이 미국 및 기타 선진국에서 시력 상실의 선도적인 원인이기 때문에, 눈의 후안부 처치가 의학적으로 중요하다. [Myles, et al. (2005), Adv Drug Deliv Rev; 57: 2063-79]. 약물을 후안부에 전달하는 가장 효율적인 방식은 편평부분을 통한 유리체내 주사이다. 그러나, 직접적인 주사는 숙련된 의사가 전달을 달성하는 것을 필요로 하고, 다수의 환자에서 처치를 제한하는 불안을 야기할 수 있다. 결막하, 눈뒤, 눈둘레 및 후방 테논낭 주사를 포함하는 접근법인 눈주위 주사는 유리체내 주사보다 다소 덜 침습성이다. 반복 및 장기 유리체내 주사는 합병증, 예컨대 유리체 출혈, 망막 박리, 또는 안내염을 야기할 수 있다.

[0303] 지속형 또는 체어형 방출 시스템, 예컨대 (a) 눈에 대한 약물의 체어 방출을 제공하는 눈 삽입물 (용해성, 침식성, 비-침식성 또는 히드로겔-기반), 각막 보호구, 예를 들어, 콜라겐-기반 봉대 및 콘택트 렌즈, (b) 눈에서 젤 형태로 전환됨으로써 눈에서의 약물의 약간의 지속적인 효과를 제공하는, 점적제로서의 투여 용이성을 제공하는 원위치 젤형성 시스템, (c) 표적화된 전달, 생체적합성, 및 시력 흐려짐으로부터의 자유의 장점을 제공하는 소포 시스템 예컨대 리포솜, 니오솜(niosome)/디스콤(discome) 등, (d) 눈에서의 더욱 양호한 잔류를 제공하는 점막부착 시스템, (e) 전구약물, (f) 투과 인핸서, (g) 동결건조된 담체 시스템, (h) 입상물질, (i) 서브마이크론 에멀션, (j) 이온삼투요법, (k) 덴드리머(dendrimer), (l) 생체부착성 미세구체가 포함되는 미세구체, (m) 나노구체 및 기타 나노입자, (n) 콜라솜, 및 (o) 상기 언급된 시스템들 중 하나 이상을 조합하여 추가적인, 심지어 상승작용적인 이로운 효과를 제공하는 약물 전달 시스템이 포함되는, 더욱 새로운 눈 전달 시스템 중 하나를 사용하여 항-생체활성 지질 항체 처치가 또한 투여될 수 있다 ([Sultana, et al. (2006), Current Drug

Delivery, vol 3: 207-217]; 및 [Ghate and Edelhauser (2006), Expert Opinion, vol 3: 275-287]). 대부분의 이러한 접근법들은 눈의 전안부를 표적으로 하고, 전안부 질환을 치치하는데 이로울 수 있다. 그러나, 지질의 분자량이 비교적 낮아서 눈 내에서의 지질의 상당한 이동을 허용할 것이기 때문에, 이러한 접근법들 중 하나 이상은 눈의 후방 영역 내의 생체활성 지질 농도에 영향을 미치는데 여전히 유용할 수 있다. 또한, 눈의 전방 영역 내로 도입된 항체가, 특히 더 낮은 분자량의 항체 변이체 예컨대 Fab 단편으로 제작된다면, 눈을 통과하여 이동할 수 있을 수 있다. 후안부에 대한 지속형 약물 전달 시스템 예컨대 허가되었거나 개발 중인 것들 (상기 참고문헌 참조)을 또한 사용할 수 있다.

[0304] 이전에 언급된 바와 같이, 후방 망막, 맥락막, 및 황반의 질환의 치치는 의학적으로 매우 중요하다. 이와 관련하여, 경공막 이온삼투요법 ([Eljarrat-Binstock and Domb (2006), Control Release, 110: 479-89])이 중요한 진전이고, 항체를 눈의 후안부에 전달하는 효과적인 방식을 제공할 수 있다.

[0305] 제형된 항체에 다양한 부형제가 또한 부가되어, 요법의 성능을 개선시키거나, 요법을 더욱 편리하게 하거나, 또는 제형된 항체가 이의 의도되고 허가된 목적을 위해서만 사용된다는 것을 명백하게 확실하게 할 수 있다. 부형제의 예로는 pH를 제어하기 위한 화학물질, 항균제, 항체 효능의 손실을 방지하기 위한 방부제, 제형을 식별하기 위한 눈 전용 염료, 제형 내의 항체의 농도를 증가시키기 위한 안정화제, 투과 강화제, 및 등장성 및/또는 점도를 조정하기 위한 작용제의 사용이 포함된다. 항체의 반감기를 연장하기 위해 억제제, 예를 들어, 프로테아제의 억제제가 첨가될 수 있다. 한 실시양태에서, 눈에 대한 적절한 pH의 포스페이트-완충 염수를 포함하는 용액으로 유리체내 주사에 의해 항체가 눈에 전달된다.

[0306] 전구약물이 산출되도록 항-S1P 작용제 (예를 들어, 인간화 항체)가 또한 화학적으로 변형될 수 있고, 이는 상기 기술된 제형 또는 장치들 중 하나로 투여된다. 그후, 활성 형태의 항체가 내인성 효소의 작용에 의해 방출된다. 본 출원에서 고려되는 가능한 눈 효소는 각종 사이토크롬 p450, 알데하يد 환원효소, 케톤 환원효소, 에스테라제 또는 N-아세틸-β-글루코사마이다제이다. 항체에 대한 또 다른 화학적 변형은 이의 분자량을 증가시킬 수 있고, 그 결과, 눈에서의 항체의 체류 시간을 증가시킨다. 이같은 화학적 변형의 예는 PEG화 ([Harris and Chess (2003), Nat Rev Drug Discov; 2: 214-21])이고, 이러한 프로세스는 일반적일 수 있거나 또는 디슬피드 ([Shaunak, et al. (2006), Nat Chem Biol; 2:312-3]) 또는 티올 ([Doherty, et al. (2005), Bioconjug Chem; 16: 1291-8])과 같은 관능기에 특이적일 수 있다.

[0307] 본원에서의 하기의 실시예는 스팽고지질에 대한 강한 결합 친화력을 포함하여 치료 관점에서의 원하는 성질이 있는 인간화 및 변이체 항-스파고지질 항체의 생산을 기술한다. 특히, 본 발명은 S1P 및 이의 변이체에 관한 것이고, 여기에는 스팽고신-1-포스페이트 [스파크겐-1-포스페이트; D-에리트로-스파고신-1-포스페이트; 스팽그-4-에닌-1-포스페이트; (E,2S,3R)-2-아미노-3-히드록시-옥타데크-4-에녹시]포스폰산 (AS 26993-30-6)]으로 정의되는 S1P 자체; 디히드로스파고신-1-포스페이트 [스파크가닌-1-포스페이트; [(2S,3R)-2-아미노-3-히드록시-옥타데크시]포스폰산; D-에리트로-디히드로-D-스파고신-1-포스페이트 (CAS 19794-97-9)]로 정의되는 DHS1P; 스팽고실포스포릴 콜린, 라이소스파고마이엘린, 스팽고실포스포콜린, 스팽고신 포스포릴콜린, 에타나미늄인 SPC; 2-(((2-아미노-3-히드록시-4-옥타데카닐)옥시)히드록시포스파닐)옥시)-N,N,N-트리메틸-, 클로라이드, (R-(R*,S*-(E))), 2-[(E,2R,3S)-2-아미노-3-히드록시-옥타데크-4-에녹시]-히드록시-포스포릴]옥시에틸-트리메틸-아자늄 클로라이드 (CAS 10216-23-6)가 포함될 수 있다.

항체 생성 및 특성화

[0309] 하기의 본원의 실시예에 기술된 바와 같이 항체 친화력을 결정할 수 있다. 바람직한 인간화 또는 변이체 항체는 약 1×10^{-7} M 이하, 바람직하게는 약 1×10^{-8} M 이하, 가장 바람직하게는 약 5×10^{-9} M 이하의 K_d 값으로 스팽고지질에 결합하는 항체이다.

[0310] 스팽고지질에 대한 결합 친화력이 강한 항체 이외에, 치료적 관점에서 이로운 또 다른 성질이 있는 인간화 또는 변이체 항체를 선별하는 것이 또한 바람직하다. 예를 들어, 항체는 혈관형성을 감소시키고 종양 진행을 변경시키는 것일 수 있다. 바람직하게는, 직접적 결합 ELISA 분석법에서 측정했을 때, 항체는 유효 농도 50 (EC50) 값이 약 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이하, 바람직하게는 약 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이하, 가장 바람직하게는 약 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이하이다. 바람직하게는, 1 μM 의 S1P의 존재 하에 세포 분석법에서 측정했을 때, 항체의 유효 농도 값은 약 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이하, 바람직하게는 약 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이하, 가장 바람직하게는 약 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이하이고, 예를 들어, 이러한 농도에서, 항체는 시험 관내에서의 스팽고지질-유도 IL-8 방출을 적어도 10%만큼 억제할 수 있다. 바람직하게는, 레이저 화상 후 CNV 동물 모델에서 측정했을 때, 항체의 유효 농도 값은 약 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이하, 바람직하게는 약 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이하, 가장 바

람직하게는 약 $0.1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 이하이고, 예를 들어, 이러한 농도에서, 항체는 생체 내에서의 스팽고지질-유도 혈관신생을 적어도 50%만큼 억제할 수 있다.

[0311] 본 발명의 항-스핑고지질 항체의 활성을 결정하기 위한 분석법에는 하기의 실시예에 나타난 바와 같은 ELISA 분석법이 포함된다.

[0312] 바람직하게는, 인간화 또는 변이체 항체는 치료적 유효량의 항체를 인간 환자에게 투여했을 때 면역원성 응답을 도출하지 못한다. 면역원성 응답이 도출되는 경우, 바람직하게는, 응답은 항체로 치치된 환자에게 항체가 치료적 이점을 여전히 제공하도록 하는 것일 것이다.

[0313] 본 발명의 한 실시양태에 따르면, 인간화 항-스핑고지질 항체는 본원에서 정의된 바와 같은 "에피토프"에 결합한다. 당해 항체가 결합한 스팽고지질 상의 에피토프에 결합하는 항체 (예를 들어, 당해 항체가 스팽고지질에 결합하는 것을 차단하는 항체)를 스크리닝하기 위해, [Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow and David Lane (1988)]에 기술된 것과 같은 일상적인 교차-차단 분석법을 수행할 수 있다. 별법적으로, 에피토프 지도작성 (예를 들어, [Champe, et al. [J. Biol. Chem. 270:1388-1394 (1995)]에 기술됨)을 수행하여, 항체가 당해 에피토프에 결합하는지 여부를 결정할 수 있다.

[0314] 본 발명의 항체에는 화학식 FR1-CDRH1-FR2-CDRH2-FR3-CDRH3-FR4로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 도메인이 있고, 상기 식에서 "FR1-4"는 4개의 프레임워크 영역을 나타내고, "CDRH1-3"은 항-스핑고지질 항체 가변 중쇄 도메인의 3개의 초가변 영역을 나타낸다. FR1-4는 하기 실시예에서와 같은 "컨센서스(consensus) 서열" (예를 들어, 인간 면역글로불린의 중쇄 또는 경쇄의 클래스, 서브클래스 또는 서브그룹의 가장 통상적인 아미노산)로부터 유래될 수 있거나, 또는 개별적인 인간 항체 프레임워크 영역으로부터 또는 상이한 프레임워크 영역 서열들의 조합물로부터 유래될 수 있다. 다수의 인간 항체 프레임워크 영역 서열이, 예를 들어, [Kabat, et al., 상기 문헌]에 편집되어 있다. 한 실시양태에서, 가변 중쇄 FR은 [Kabat, et al., 상기 문헌]에 편집된 바와 같은 인간 면역글로불린 서브그룹의 컨센서스 서열에 의해 제공된다. 바람직하게는, 인간 면역글로불린 서브그룹은 인간 중쇄 서브그룹 III (예를 들어, 서열 16)이다.

[0315] 바람직하게는 인간 가변 중쇄 FR 서열에는 하나 이상의 치환이 있고, 예를 들어, 인간 FR 잔기가 상응하는 비-인간 잔기 ("상응하는 비-인간 잔기")는 인간 서열과 비-인간 서열이 정렬되었을 때 당해 인간 잔기와 카밧 (Kabat) 위치 번호가 동일한 비-인간 잔기를 의미한다)로 교체되지만, 비-인간 잔기로의 교체가 필수적이지는 않다. 예를 들어, 상응하는 비-인간 잔기 이외의 교체 FR 잔기가 과지 디스플레이에 의해 선별될 수 있다. 대표적인 치환될 수 있는 가변 중쇄 FR 잔기에는 FR 잔기 번호 37H, 49H, 67H, 69H, 71H, 73H, 75H, 76H, 78H, 및 94H (본원에서 카밧 잔기 번호매김이 사용됨) 중 임의의 하나 이상이 포함된다. 바람직하게는, 이러한 잔기들 중 2개 이상, 또는 3개 이상, 또는 4개 이상이 치환된다. FR 치환의 특히 바람직한 조합은 49H, 69H, 71H, 73H, 76H, 78H, 및 94H이다. 중쇄 초가변 영역과 관련하여, 이들은 바람직하게는 하기 표 2에 열거된 아미노산 서열을 갖는다.

[0316] 본원에서의 바람직한 실시양태의 항체에는 화학식 FR1-CDRL1-FR2-CDRL2-FR3-CDRL3-FR4로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인이 있고, 상기 식에서 "FR1-4"는 4개의 프레임워크 영역을 나타내고, "CDRL1-3"은 항-스핑고지질 항체 가변 경쇄 도메인의 3개의 초가변 영역을 나타낸다. FR1-4는 하기 실시예에서와 같은 "컨센서스 서열" (예를 들어, 인간 면역글로불린의 중쇄 또는 경쇄의 클래스, 서브클래스 또는 서브그룹의 가장 통상적인 아미노산)로부터 유래될 수 있거나, 또는 개별적인 인간 항체 프레임워크 영역으로부터 또는 상이한 프레임워크 영역 서열들의 조합물로부터 유래될 수 있다. 한 바람직한 실시양태에서, 가변 경쇄 FR은 [Kabat, et al., 상기 문헌]에 편집된 바와 같은 인간 면역글로불린 서브그룹의 컨센서스 서열에 의해 제공된다. 바람직하게는, 인간 면역글로불린 서브그룹은 인간 카파 경쇄 서브그룹 I (예를 들어, 서열 17)이다.

[0317] 바람직하게는 인간 가변 경쇄 FR 서열에 치환이 있고, 예를 들어, 인간 FR 잔기가 상응하는 마우스 잔기로 교체되지만, 비-인간 잔기로의 교체가 필수적이지는 않다. 예를 들어, 상응하는 비-인간 잔기 이외의 교체 잔기가 과지 디스플레이에 의해 선별될 수 있다. 대표적인 치환될 수 있는 가변 경쇄 FR 잔기에는 F4, Y36, Y49, G64, S67을 포함하지만 이에 한정되지 않는 FR 잔기 번호들 중 임의의 하나 이상이 포함된다.

[0318] CDR과 관련하여, 바람직하게는 이들은 하기 표 2에 열거된 아미노산 서열을 갖는다.

[0319] 본원에서 흥미로운 인간화 항-스핑고지질 항체의 생성 방법이 하기에 더욱 상세하게 설명된다.

A. 항체 제조

[0321] 비-인간 항-스핑고지질 항체를 인간화시키고 항-스핑고지질 항체의 변이체를 생성시키는 방법이 하기의 실시예에 기술된다. 항-스핑고지질 항체를 인간화시키기 위해, 비-인간 항체 출발 물질이 제조된다. 변이체가 생성되는 경우, 어버이 항체가 제조된다. 이같은 비-인간 항체 출발 물질 및 어버이 항체를 생성시키기 위한 대표적인 기술이 하기 섹션에서 기술될 것이다.

[0322] (i) 항원 제조.

[0323] 항체의 생산에 사용될 스팅고지질 항원은, 예를 들어, 무손상 스팅고지질 또는 스팅고지질의 일부분 (예를 들어, "에피토프"를 포함하는 스팅고지질 단편)일 수 있다. 항체를 생성시키는데 유용한 또다른 형태의 항원이 당업자에게 명백할 것이다. 항체를 생성시키는데 사용된 스팅고지질 항원이 하기의 실시예에서 기술된다. 한 실시양태에서, 항원은 스팅고지질의 유도체화 형태이고, 단체 단백질과 회합될 수 있다.

[0324] (ii) 폴리클로날 항체.

[0325] 폴리클로날 항체는 관련 항원 및 애주번트(adjuvant)의 다중 피하 (sc) 또는 복강내 (ip) 주사에 의해 동물에서 바람직하게 상승된다. 이관능성 또는 유도체화 작용제, 예를 들어 말레이이미도벤조일 술포숙신이미드 에스테르 (시스테인 잔기를 통한 접합), N-히드록시숙신이미드 (라이신 잔기를 통한 접합), 글루타르알데히드, 숙신산 무수물, SOCl_2 , 또는 $\text{R}^1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$ (식중, R 및 R^1 은 상이한 알킬기이다)을 사용하여, 면역화될 종에서 면역원성인 단백질, 예를 들어 키홀 림펫 혜모시아닌, 혈청 알부민, 소 티로글로불린 또는 대두 트립신 억제제에 관련 항원을 접합시키는 것이 유용할 수 있다.

[0326] 예를 들어, 100 μg 또는 5 μg 의 단백질 또는 접합체 (각각 토키 또는 마우스에 대해)를 3배 용량의 프로인트 (Freund) 완전 애주번트와 합하고, 이 용액을 다중 부위에 피하 주사함으로써, 항원, 면역원성 접합체 또는 유도체에 대해 동물들을 면역화시킨다. 1개월 후, 프로인트 완전 애주번트 내의 웨티드 또는 접합체를 원래 양의 0.1 내지 0.2배로 다중 부위에 피하 주사하여 동물을 부스팅(boosting)시킨다. 7 내지 14일 후, 동물에서 채혈하여, 혈청을 항체 역가에 대해 분석한다. 역자가 정체기(plateau)에 도달할 때까지 동물을 부스팅시킨다. 바람직하게는, 상이한 단백질에 및/또는 상이한 가교 시약을 통해 접합된 동일한 항원의 접합체로 동물을 부스팅시킨다. 접합체는 또한 재조합 세포 배양에서 단백질 융합물로서 제조될 수 있다. 또한, 백반과 같은 응집제를 적절하게 사용하여 면역 응답을 강화시킬 수 있다.

[0327] (iii) 모노클로날 항체.

[0328] 모노클로날 항체는 [Kohler, et al., Nature, 256:495 (1975)]에 최초로 기술된 하이브리도마 방법을 사용하여 제조할 수 있거나, 또는 재조합 DNA 방법 (예를 들어, 미국 특허 번호 4,816,567 참조)을 포함하는 또다른 적절한 방법으로 제조할 수 있다. 하이브리도마 방법에서는, 마우스 또는 기타 적절한 숙주 동물, 예컨대 햄스터 또는 붉은털 원숭이를 상기 기술된 바와 같이 면역화시켜, 면역화에 사용된 단백질에 특이적으로 결합할 항체를 생산하거나 생산할 수 있는 립프구를 유발시킨다. 별법적으로, 립프구를 시험관내에서 면역화시킬 수 있다. 그 후, 적절한 융합제, 예컨대 폴리에틸렌 글리콜을 사용하여 립프구를 골수종 세포와 융합시켜 하이브리도마 세포가 형성된다 ([Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp. 59-103 (Academic Press, 1986)]).

[0329] 이렇게 제조된 하이브리도마 세포를 융합되지 않은 어버이 골수종 세포의 성장 또는 생존을 억제하는 하나 이상의 물질을 바람직하게는 함유하는 적절한 배양 배지에 파종하여 성장시킨다. 예를 들어, 어버이 골수종 세포에 하이포잔틴 구아닌 포스포리보실 트랜스퍼라제 (HGPRT 또는 HPRT) 효소가 없는 경우, 하이브리도마용 배양 배지는 전형적으로 하이포잔틴, 아미노프테린 및 티미딘을 포함할 것이며 (HAT 배지), 이러한 물질들은 HGPRT-결핍 세포의 성장을 방지한다.

[0330] 바람직한 골수종 세포는 효율적으로 융합되고, 선별된 항체-생산 세포에 의한 높은 수준의 안정적인 항체 생산을 지지하며, HAT 배지와 같은 배지에 감수성이 있는 것이다. 특히 바람직한 골수종 세포주는 뮤린 골수종 세포주, 예컨대 <Salk Institute Cell Distribution Center (San Diego, Calif. USA)>로부터 입수가능한 MOP-21 및 M.C.-11 마우스 종양으로부터 유래된 것, 및 <American Type Culture Collection (Rockville, Md. USA)>으로부터 입수가능한 SP-2 또는 X63-Ag8-653 세포이다. 인간 골수종 및 마우스-인간 혜테로골수종 세포주 또한 인간 모노클로날 항체의 생산을 위해 기술되어 있다 ([Kozbor, J. Immunol., 133:3001 (1984)]; [Brodeur, et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)]).

- [0331] 하이브리도마 세포가 성장하는 배양 배지를 항원에 대해 지시된 모노클로날 항체의 생산에 대해 분석한다. 바람직하게는, 하이브리도마 세포에 의해 생산된 모노클로날 항체의 결합 특이성을 면역침전에 의해 또는 시험관내 결합 분석법, 예컨대 방사선면역분석법 (RIA) 또는 효소-결합 면역흡착 분석법 (ELISA)으로 측정한다.
- [0332] 모노클로날 항체의 결합 친화력을, 예를 들어, [Munson, et al., Anal. Biochem., 107:220 (1980)]의 스캐차드 (Scatchard) 분석에 의해 결정할 수 있다.
- [0333] 원하는 특이성, 친화성 및/또는 활성의 항체를 생산하는 하이브리도마 세포를 확인한 후, 클론을 한계 희석 절차에 의해 서브클로닝하고, 표준 방법에 의해 성장시킬 수 있다 ([Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp.59-103 (Academic Press, 1986)]). 이러한 목적에 적절한 배양 배지는, 예를 들어, D-MEM 또는 RPMI-1640 배지를 포함한다. 또한, 하이브리도마 세포를 동물에서 복수 종양으로서 생체내 성장시킬 수 있다.
- [0334] 서브클론에 의해 분비된 모노클로날 항체는 예를 들어 단백질 A-세파로스, 히드록실아파타이트 크로마토그래피, 젤 전기영동, 투석 또는 친화성 크로마토그래피와 같은 통상적인 면역글로불린 정제 절차에 의해 배양 배지, 복수액 또는 혈청으로부터 적절하게 분리된다.
- [0335] 통상적인 절차 (예를 들어, 모노클로날 항체의 중쇄 및 경쇄를 코딩하는 유전자에 특이적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오티드 프로브를 이용함)을 이용하여 모노클로날 항체를 코딩하는 DNA를 쉽게 단리하고 서열분석한다. 하이브리도마 세포는 이같은 DNA의 바람직한 공급원으로 기능한다. 일단 단리되면, DNA를 발현 백터 내로 넣을 수 있고, 그 후 이러한 백터를 형질감염되지 않으면 면역글로불린 단백질을 생산하지 않는 대장균 세포, 원숭이 COS 세포, 차이니즈 햄스터 난소 (CHO) 세포 또는 골수종 세포와 같은 숙주 세포 내로 형질감염시켜, 재조합 숙주 세포에서의 모노클로날 항체의 생산을 수득한다. 항체의 재조합 생산은 하기에 더욱 상세하게 기술될 것이다.
- [0336] (iv) 인간화 및 아미노산 서열 변이체.
- [0337] 하기의 실시예 12는 항-스핑고지질 항체의 인간화를 위한 절차를 기술한다. 인간화를 위한 일반적인 방법이, 예를 들어, US5861155, US19960652558, US6479284, US20000660169, US6407213, US19930146206, US6639055, US20000705686, US6500931, US19950435516, US5530101, US5585089, US19950477728, US5693761, US19950474040, US5693762, US19950487200, US6180370, US19950484537, US2003229208, US20030389155, US5714350, US19950372262, US6350861, US19970862871, US5777085, US19950458516, US5834597, US19960656586, US5882644, US19960621751, US5932448, US19910801798, US6013256, US19970934841, US6129914, US19950397411, US6210671, US6329511, US19990450520, US2003166871, US20020078757, US5225539, US19910782717, US6548640, US19950452462, US5624821, 및 US19950479752에 기술되어 있다. 특정 실시양태에서, 이러한 인간화 항체들의 아미노산 서열 변이체를 생성시키는 것이 바람직할 수 있고, 특히 이들이 인간화 항체의 결합 친화력 또는 기타 생물학적 성질을 개선시키는 경우에 그러하다. 실시예 12는 어버이 항체에 비해 친화력이 강화된 항-스핑고지질 항체의 아미노산 서열 변이체를 생성시키기 위한 방법론을 기술한다.
- [0338] 항-스핑고지질 항체 DNA 내로 적합한 뉴클레오티드 변화를 도입함으로써, 또는 웨티드 합성에 의해, 항-스핑고지질 항체의 아미노산 서열 변이체가 제조된다. 이같은 변이체는, 예를 들어, 본원의 실시예의 항-스핑고지질 항체의 아미노산 서열 내의 잔기의 결실 및/또는 삽입 및/또는 치환을 포함한다. 최종 구축물이 원하는 특성을 갖는다는 조건하에 결실, 삽입 및 치환의 임의 조합이 이루어져 최종 구축물에 도달된다. 또한 아미노산 변화는 글리코실화 부위의 수 또는 위치를 변화시키는 것과 같이 인간화 또는 변이체 항-스핑고지질 항체의 변역후 프로세스를 변경시킬 수 있다.
- [0339] 돌연변이유발에 바람직한 위치인 항-스핑고지질 항체의 특정 잔기 또는 영역을 확인하기 위한 유용한 방법은, [Cunningham and Wells, Science, 244:1081-1085 (1989)]에 기술된 바와 같이 "알라닌-스캐닝 돌연변이유발"로 칭해진다. 여기서, 잔기 또는 표적 잔기들의 군이 확인되고 (예를 들어, arg, asp, his, lys, 및 glu와 같은 전하를 띠는 잔기), 중성 아미노산 또는 음성 전하를 띠는 아미노산 (가장 바람직하게는 알라닌 또는 폴리알라닌)으로 치환되어, 아미노산과 스팅고지질 항원과의 상호작용에 영향을 미친다. 그 후, 치환에 대해 기능적 감수성을 나타내는 아미노산 위치가 치환 부위에 또는 치환 부위에 대해 추가적인 또는 다른 변이체를 도입함으로써 정련된다. 따라서, 아미노산 서열 변이를 도입하기 위한 부위는 미리 결정되지만, 돌연변이 그 자체의 성질을 미리 결정할 필요는 없다. 예를 들어, 소정의 부위에서 돌연변이의 성과를 분석하기 위해, 표적 코돈 또는 영역에서 ala 스캐닝 또는 무작위 돌연변이유발을 수행하고, 발현된 항-스핑고지질 항체 변이체를 원하는 활성

에 대해 스크리닝한다. 아미노산 서열 삽입에는 길이 범위가 하나의 잔기 내지 100개 이상의 잔기를 함유하는 폴리펩티드에 이르는 아미노- 및/또는 카트복실-말단 융합, 뿐만 아니라 단일 또는 다수 아미노산 잔기의 서열 내 삽입이 포함된다. 말단 삽입의 예로는 N-말단 메티오닐 잔기가 있는 항-스핑고지질 항체 또는 에피토프 태그(tag)에 융합된 항체가 포함된다. 항-스핑고지질 항체 분자의 또 다른 삽입 변이체에는 항체의 혈청 반감기를 증가시키는 폴리펩티드 또는 효소가 항-스핑고지질 항체의 N- 또는 C-말단에 융합된 것이 포함된다.

[0340] 또 다른 유형의 변이체는 아미노산 치환 변이체이다. 이러한 변이체에서는 항-스핑고지질 항체 분자 내의 하나 이상의 아미노산 잔기가 제거되고, 상이한 잔기가 그 자리에 삽입된다. 치환성 돌연변이유발에 가장 흥미로운 부위에는 초가변 영역이 포함되지만, FR 변경 또한 구현된다. 보존적 치환이 바람직한 치환이다. 이같은 치환으로 생물학적 활성이 변하게 되면, 하기에서 "대표적 치환"으로 명명된 또는 아미노산 클래스와 관련하여 하기에 추가로 기술되는 바와 같은 더욱 실질적인 변화가 도입될 수 있고, 생성물을 스크리닝하게 된다.

표 1

[0341]

대표적인 아미노산 잔기 치환	
아미노산 잔기 (기호)	대표적 치환
Ala (A)	val; leu; ile val
Arg (R)	lys; gln; asn lys
Asn (N)	gln; his; asp, lys; gln arg
Asp (D)	glu; asn glu
Cys (C)	ser; ala ser
Gln (Q)	asn; glu asn
Glu (E)	asp; gln asp
Gly (G)	ala ala
His (H)	asn; gln; lys; arg arg
Ile (I)	leu; val; met; ala; leu phe; 노르류신
Leu (L)	노르류신; ile; val; ile met; ala; phe
Lys (K)	arg; gln; asn arg
Met (M)	leu; phe; ile leu
Phe (F)	leu; val; ile; ala; tyr tyr
Pro (P)	ala ala
Ser (S)	thr thr
Thr (T)	ser ser
Trp (W)	tyr; phe tyr
Tyr (Y)	trp; phe; thr; ser phe
Val (V)	ile; leu; met; phe; leu ala; 노르류신

[0342] 항체의 생물학적 성질에 있어서의 실질적인 변화는 (a) 예를 들어 시트 또는 나선 형상과 같은, 치환 영역 내의 폴리펩티드 골격의 구조, (b) 표적 부위에서의 분자의 전하 또는 소수성, 또는 (c) 측쇄의 부피(bulk)를 유지하는 것에 대한 효과가 현저하게 상이한 치환을 선별함으로써 달성된다. 천연 발생 잔기는 공통적인 측쇄 성질을 기초로 하기 군으로 분류될 수 있다:

[0343] (1) 소수성: 노르류신, met, ala, val, leu, ile;

[0344] (2) 중성 친수성: cys, ser, thr;

[0345] (3) 산성: asp, glu;

[0346] (4) 염기성: asn, gln, his, lys, arg;

[0347] (5) 사슬 배향에 영향을 미치는 잔기: gly, pro; 및

[0348] (6) 방향족: trp, tyr, phe.

[0349] 비-보존적 치환은 이들 클래스 중의 하나의 구성원을 다른 클래스로 교환하는 것을 수반할 것이다.

[0350] 인간화 또는 변이체 항-스핑고지질 항체의 적당한 형상을 유지하는데 수반되지 않는 임의의 시스테인 잔기가 또

한 치환되어 분자의 산화적 안정성이 개선되고 비정상적인 가교가 방지될 수 있다. 역으로, 시스테인 결합(들)이 항체에 부가되어 이의 안정성이 개선될 수 있다 (특히, 항체가 Fv 단편과 같은 항체 단편인 경우).

[0351] 치환 변이체의 한 유형에는 어버이 항체 (예를 들어, 인간화 또는 인간 항체)의 1개 이상의 초가변 영역 잔기가 치환되는 것이 수반된다. 일반적으로, 추가적인 개발용으로 선별된 생성된 변이체(들)는 이들이 생성되는 어버이 항체에 비해 생물학적 성질이 개선될 것이다. 이같은 치환 변이체를 생성시키는 간편한 방법은 파지 디스플레이를 이용한 친화력 성숙을 수반한다. 간략하게, 몇몇 CDR 부위 (예를 들어, 6 내지 7개 부위)가 각각의 부위에서 모든 가능한 아미노 치환이 생성되도록 돌연변이된다. 이렇게 생성된 항체 변이체가 필라멘트형 파지 입자로부터 각각의 입자 내에 폐기장된 M13의 유전자 III 생성물에 대한 융합물로서 필라멘트형 파지 입자로부터 1가 방식으로 디스플레이된다. 이어서, 파지-디스플레이된 변이체를 본원에 개시된 바와 같이 이의 생물학적 활성 (예를 들어, 결합 친화력)에 대해 스크리닝한다. 변형에 대한 후보 초가변 영역 부위를 확인하기 위해, 알라닌-스캐닝 돌연변이 유발법을 수행하여 항원 결합에 유의하게 기여하는 초가변 영역 잔기를 확인할 수 있다. 별법적으로 또는 추가적으로, 항원-항체 복합체의 결정 구조를 분석하여 항체와 스팽고지질 사이의 접촉 위치를 확인하는 것이 유리할 수 있다. 이같은 접촉 잔기와 이웃 잔기는 본원에서 상술된 기술에 따른 치환에 대한 후보물이다. 일단 이같은 변이체가 생성되면, 변이체들의 폐널을 본원에 기술된 바와 같이 스크리닝하고, 한가지 이상의 관련 분석법에서 탁월한 성질이 있는 항체를 추가적인 개발용으로 선택할 수 있다.

[0352] 항체의 아미노산 변이체의 또다른 유형은 항체의 원래의 글리코실화 패턴을 변경시킨다. 변경은 항체에서 발견되는 하나 이상의 탄수화물 모이어티를 결실시키는 것 및/또는 항체에 존재하지 않는 하나 이상의 글리코실화 부위를 부가하는 것을 의미한다.

[0353] 항체의 글리코실화는 전형적으로 N-연결 또는 O-연결된다. N-연결은 탄수화물 모이어티가 아스파라긴 잔기의 측쇄에 부착된 것을 지칭한다. 트리펩티드 서열 아스파라긴-X-세린 및 아스파라긴-X-트레오닌 (식중 X는 프롤린을 제외한 임의의 아미노산이다)은 탄수화물 모이어티를 아스파라긴 측쇄에 효소적으로 부착시키기 위한 가장 통상적인 인식 서열이다. 따라서, 이러한 트리펩티드 서열 중 하나가 폴리펩티드에 존재함으로써 잠재적인 글리코실화 부위가 생성된다. O-연결된 글리코실화는 당 N-아세틸갈اكت오사민, 갈اكت오스 또는 자일로스 중의 하나가 헤드록시아미노산, 가장 통상적으로는 세린 또는 트레오닌에 부착되는 것을 지칭하지만, 5-헤드록시프롤린 또는 5-헤드록시라이신 또한 사용될 수 있다.

[0354] 항체에 글리코실화 부위를 부가하는 것은 항체가 하나 이상의 상기 기술된 트리펩티드 서열을 함유하도록 아미노산 서열을 변경시킴으로써 편리하게 달성된다 (N-연결된 글리코실화 부위의 경우). 또한 변경은 원래의 항체의 서열에 대한 하나 이상의 세린 또는 트레오닌 잔기의 부가 또는 치환에 의해 달성될 수 있다 (O-연결된 글리코실화 부위의 경우).

[0355] 항-스팡고지질 항체의 아미노산 서열 변이체를 코딩하는 핵산 분자는 당업계에 공지된 다양한 방법에 의해 제조된다. 이러한 방법에는 천연 공급원으로부터의 단리 (천연 발생 아미노산 서열 변이체의 경우), 또는 올리고뉴클레오티드-매개 (또는 부위-지정) 돌연변이유발, PCR 돌연변이유발 및 항-스팡고지질 항체의 앞서 제조된 변이체 또는 비-변이체 버전의 카세트 돌연변이유발에 의한 제조가 포함되지만, 이에 한정되지는 않는다.

(v) 인간 항체.

[0357] 인간화의 대안으로서, 인간 항체가 생성될 수 있다. 예를 들어, 면역화 시, 내인성 면역글로불린 생산의 부재 하에 인간 항체의 전체 레퍼토리를 생산할 수 있는 트랜스제닉 동물 (예를 들어, 마우스)을 생산하는 것이 현재 가능하다. 예를 들어, 키메라 및 생식계열 돌연변이 마우스에서 항체 중쇄 연결 영역 (J_H) 유전자를 동형접합 결실시키면 내인성 항체의 생산이 완전히 억제된다는 것이 기술되었다. 인간 생식계열 면역글로불린 유전자 어레이를 이같은 생식계열 돌연변이 마우스에게 전달하면, 항원 챠린지 시 인간 항체가 생산될 것이다. 예를 들어, [Jakobovits, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:2551 (1993)]; [Jakobovits, et al., Nature, 362:255-258(1993)]; [Brugermann, et al., Year in Immuno., 7:33 (1993)]; 및 미국 특허 번호 5,591,669, 5,589,369 및 5,545,807 참조. 파지-디스플레이 라이브러리로부터 인간 항체가 또한 유래될 수 있다 ([Hoogenboom, et al., J. Mol. Biol., 227:381 (1991)]; [Marks, et al., J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991)]; 및 미국 특허 번호 5,565,332 및 5,573,905). 상기 논의된 바와 같이, 시험관내 활성화 B 세포 (예를 들어, 미국 특허 번호 5,567,610 및 5,229,275 참조)에 의해 또는 또다른 적절한 방법에 의해 인간 항체가 또한 생성될 수 있다.

(vi) 항체 단편.

[0359] 특정 실시양태에서, 인간화 또는 변이체 항-스핑고지질 항체는 항체 단편이다. 항체 단편의 생산을 위하여 다양한 기술이 개발되었다. 전통적으로, 이러한 단편들은 무순상 항체의 단백질분해성 소화를 통해 유도되었다 (예를 들어, [Morimoto, et al., Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117 (1992)] 및 [Brennan et al., Science 229:81 (1985)] 참조). 그러나, 현재 이러한 단편들이 재조합 숙주 세포에 의해 직접적으로 생산될 수 있다. 예를 들어, Fab'-SH 단편이 대장균으로부터 직접 회수되고 화학적으로 커플링되어 F(ab')₂ 단편이 형성될 수 있다 ([Carter, et al., Bio/Technology 10:163-167 (1992)]). 또 다른 실시양태에서, F(ab')₂ 분자의 어셈블리를 촉진하도록 류신 지퍼 GCN4를 사용하여 F(ab')₂가 형성된다. 또 다른 접근법에 따르면, Fv, Fab 또는 F(ab')₂ 단편이 재조합 숙주 세포 배양물로부터 직접적으로 단리될 수 있다. 항체 단편의 생산을 위한 또 다른 기술들이 당업자에게 명백할 것이다.

[0360] (vii) 다중특이적 항체.

[0361] 일부 실시양태에서, 2개 이상의 상이한 에피토프에 대한 결합 특이성이 있는 다중특이적 (예를 들어, 이중특이적) 인간화 또는 변이체 항-스핑고지질 항체를 생성시키는 것이 바람직할 수 있다. 대표적인 이중특이적 항체는 스핑고지질의 2개의 상이한 에피토프에 결합할 수 있다. 별법적으로, 항-스핑고지질 팔이 상이한 분자에 결합하는 팔과 합쳐질 수 있다. 이중특이적 항체는 전장 항체 또는 항체 단편 (예를 들어, F(ab')₂ 이중특이적 항체)으로 제조될 수 있다.

[0362] 이중특이적 항체를 제조하기 위한 또 다른 접근법에 따르면, 한 쌍의 항체 분자 사이의 경계면을 조작하여 재조합 세포 배양물로부터 회수되는 이종이량체의 백분율을 최대화할 수 있다. 바람직한 경계면은 항체 불변 도메인의 C_H3 도메인의 적어도 일부를 포함한다. 이러한 방법에서, 제1 항체 분자의 경계면으로부터의 1개 이상의 작은 아미노산 측쇄가 보다 큰 측쇄 (예를 들어, 타이로신 또는 트립토판)로 대체된다. 큰 아미노산 측쇄를 더 작은 아미노산 측쇄 (예를 들어, 알라닌 또는 트레오닌)로 대체함으로써 큰 측쇄(들)에 대한 동일하거나 유사한 크기의 보상 "공동(cavity)"이 제2 항체 분자의 경계면 상에 생성된다. 이는 동종이량체와 같은 다른 바람직하지 않은 최종-생성물에 비해 이종이량체의 수율을 증가시키는 메커니즘을 제공한다. 예를 들어, 미국 특허 번호 5,731,168 참조.

[0363] 이중특이적 항체에는 가교된 또는 "이종접합체" 항체가 포함된다. 예를 들어, 이종접합체 내의 항체들 중 하나는 아비딘에 커플링되고, 다른 하나는 비오틴에 커플링될 수 있다. 임의의 편리한 가교 방법을 이용하여 이종접합체 항체가 제조될 수 있다. 다수의 가교 기술과 함께, 적절한 가교제가 당업계에 주지되어 있고, 예를 들어, 미국 특허 번호 4,676,980에 개시되어 있다.

[0364] 항체 단편으로부터 이중특이적 항체를 생성시키는 기술이 또한 문현에 기술되어 있다. 예를 들어, 화학적 연결을 이용하여 이중특이적 항체를 제조할 수 있다. [Brennan et al., Science 229:81 (1985)]에는 무순상 항체를 단백질분해적으로 절단시켜 F(ab')₂ 단편을 생성시키는 방법이 기술되어 있다. 이러한 단편을 디티올 치화제인 아비산나트륨의 존재하에 환원시켜, 인접한 디티올들을 안정화시키고 분자간 디슬피드 형성을 방지한다. 그 후 생성된 Fab' 단편을 티오니트로벤조에이트 (TNB) 유도체로 전환시킨다. 그 후 Fab'-TNB 유도체 중 하나를 메르캅토에틸아민으로의 환원에 의해 Fab'-티올로 재전환시키고 등물량의 다른 Fab'-TNB 유도체와 혼합하여 이중특이적 항체를 형성시킨다. 생산된 이중특이적 항체를 효소의 선택적 고정을 위한 작용제로서 사용할 수 있다. 또 다른 추가적인 실시양태에서, 대장균으로부터 직접 회수된 Fab'-SH 단편들이 이중특이적 항체가 형성되도록 시험관내에서 화학적으로 커플링될 수 있다. [Shalaby, et al., J. Exp. Med. 175:217-225 (1992)].

[0365] 재조합 세포 배양물로부터 직접적으로 이중특이적 항체 단편을 제조 및 단리하기 위한 다양한 기술이 또한 기술되었다. 예를 들어, 류신 지퍼를 사용하여 이중특이적 항체가 생산되었다. [Kostelny, et al., J. Immunol. 148(5):1547-1553 (1992)]. Fos 및 Jun 단백질로부터의 류신 지퍼 웨პ티드가 2개의 상이한 항체의 Fab' 부분에 유전자 융합에 의해 연결되었다. 항체 동종이량체가 한지 영역에서 환원되어 단량체가 형성된 후, 다시 산화되어 항체 이종이량체가 형성되었다. 이러한 방법은 항체 동종이량체의 생산에 또한 이용될 수 있다. [Hollinger, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448 (1993)]에 기술된 "디아바디" 기술은 이중특이적 항체 단편의 별법적인 제조 메커니즘을 제공하였다. 단편은 동일한 사슬 상의 두 도메인이 쌍을 이루게 하기에는 너무 짧은 링커에 의해 경쇄 가변 도메인 (V_L)에 연결된 중쇄 가변 도메인 (V_H)을 포함한다. 따라서, 한 단편의 V_H 및 V_L 도메인이 또 다른 단편의 상보적인 V_H 및 V_L 도메인과 쌍을 이루도록 강요됨으로써, 2개의 항체 결합 부위가 형성된다. 단일쇄 Fv (sFv) 이량체를 사용하여 이중특이적 항체 단편을 제조하기 위한 또 다른 전

략이 또한 보고되었다. 예를 들어, [Gruber, et al., J. Immunol. 152:5368 (1994)] 참조. 별법적으로, 이종 특이적 항체는 [Zapata, et al. Protein Eng. 8(10):1057-1062 (1995)]에 예를 들어 기술된 바와 같이 생산된 "선형 항체"일 수 있다.

[0366] 2가를 초과하는 항체가 구현된다. 예를 들어, 삼중특이적 항체를 제조할 수 있다. [Tutt et al., J. Immunol. 147:60 (1991)].

[0367] 팔 당 하나 이상의 결합 부위를 포함하는 본 발명의 항체 (또는 중합체 또는 폴리펩티드)는 본원에서 "다가" 항체로 지칭될 것이다. 예를 들어, 본 발명의 "2가" 항체는 Fab 또는 이의 단편 당 2개의 결합 부위를 포함하는 한편, 본 발명의 "3가" 폴리펩티드는 Fab 또는 이의 단편 당 3개의 결합 부위를 포함한다. 본 발명의 다가 중합체에서, 팔 당 2개 이상의 결합 부위는 동일하거나 상이한 항원에 결합할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 다가 폴리펩티드의 2개 이상의 결합 부위가 동일한 항원에 대해, 예를 들어 상기 항원의 동일한 부분 또는 에피토프에 대해, 또는 상기 항원의 2개 이상의 동일하거나 상이한 부분 또는 에피토프에 대해 지시될 수 있고/있거나, 상이한 항원에 대해 지시될 수 있고/있거나, 이의 조합이 가능하다. 따라서, 본 발명의 2가 폴리펩티드는, 예를 들어, 2개의 동일한 결합 부위를 포함할 수 있거나, 항원의 제1 부분 또는 에피토프에 대해 지시된 제1 결합 부위 및 상기 항원의 동일한 부분 또는 에피토프에 대해 또는 상기 항원의 다른 부분 또는 에피토프에 대해 지시된 제2 결합 부위를 포함할 수 있거나, 또는 항원의 제1 부분 또는 에피토프에 대해 지시된 제1 결합 부위 및 상이한 항원에 대해 지시된 제2 결합 부위를 포함할 수 있다. 그러나, 상기의 기술로부터 명백할 바와 같이, 본 발명의 다가 폴리펩티드는 동일한 항원 또는 상이한 항원에 대해 지시된 임의의 개수의 결합 부위를 포함할 수 있다는 점에서, 본 발명은 여기에 한정되지 않는다.

[0368] Fab 또는 이의 단편 당 2개 이상의 결합 부위를 함유하고, 이때 1개 이상의 결합 부위는 제1 항원에 대해 지시되고, 제2 결합 부위는 제1 항원과 상이한 제2 항원에 대해 지시된 본 발명의 항체 (또는 중합체 또는 폴리펩티드)는 "다중특이적"으로 또한 지칭될 것이다. 따라서, "이종특이적" 중합체는 제1 항원에 대해 지시된 1개 이상의 부위 및 제2 항원에 대해 지시된 1개 이상의 제2 부위를 포함하는 한편, "삼중특이적"은 제1 항원에 대해 지시된 1개 이상의 결합 부위, 제2 항원에 대해 지시된 1개 이상의 추가적인 결합 부위, 및 제3 항원에 대해 지시된 1개 이상의 추가적인 결합 부위를 포함하는 중합체이다. 따라서, 가장 단순한 형태로, 본 발명의 이종특이적 폴리펩티드는 본 발명의 2가 폴리펩티드 (Fab 당)이다. 그러나, 상기의 기술로부터 명백할 바와 같이, 본 발명의 다중특이적 폴리펩티드는 2개 이상의 상이한 항원에 대해 지시된 임의의 개수의 결합 부위를 포함할 수 있다는 점에서, 본 발명은 여기에 한정되지 않는다.

(viii) 기타 변형물.

[0369] 인간화 또는 변이체 항-스핑고지질 항체의 기타 변형물들이 구현된다. 예를 들어, 본 발명은 세포독성제 예컨대 독소 (예를 들어, 박테리아, 진균류, 식물 또는 동물 기원의 효소적으로 활성인 독소, 또는 이의 단편), 또는 방사성 동위원소 (예를 들어, 방사성접합체)에 접합된 본원에 기술된 항체를 포함하는 면역접합체에 또한 관련된다. 다양한 이관능성 단백질 커플링제 예컨대 N-숙신이미딜-3-(2-파리딜디티올)프로페오네이트 (SPDP), 이미노티울란 (IT), 이미도에스테르의 이관능성 유도체 (예컨대 디메틸 아디프이미데이트 HC1), 활성 에스테르 (예컨대 디숙신이미딜 수베레이트), 알데히드 (예컨대 글루타르알데히드), 비스-아지도 화합물 (예컨대 비스(p-아지도벤조일) 헥산디아민), 비스-디아조늄 유도체 (예컨대 비스-(p-디아조늄벤조일)-에틸렌디아민), 디이소시아네이트 (예컨대 톨루엔 2,6-디이소시아네이트), 및 비스-활성 플루오르 화합물 (예컨대 1,5-디플루오로-2,4-디니트로벤젠)을 사용하여 접합체가 제조된다.

[0371] 본원에 개시된 항-스핑고지질 항체는 면역리포솜으로 또한 제형될 수 있다. 항체를 함유하는 리포솜은 당업계에 공지된 방법에 의해, 예컨대 [Epstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:3688 (1985)]; [Hwang, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4030 (1980)]; 및 미국 특허 번호 4,485,045 및 4,544,545에 기술된 방법에 의해 제조된다. 순환 시간이 강화된 리포솜이 미국 특허 번호 5,013,556에 개시되어 있다. 예를 들어, 포스파티딜 콜린, 콜레스테롤 및 PEG-유도체화 포스파티딜에탄올아민 (PEG-PE)을 포함하는 지질 조성물을 사용하여 역상 증발 방법에 의해 리포솜이 생성될 수 있다. 규정된 세공 크기의 필터를 통해 리포솜을 압출하여 원하는 직경의 리포솜이 산출된다. 디솔피드 상호교환 반응을 통해 [Martin, et al., J. Biol. Chem. 257:286-288 (1982)]에 기술된 바와 같이 본 발명의 항체의 Fab' 단편이 리포솜에 접합될 수 있다. 또 다른 활성 성분이 리포솜 내에 임의로 함유될 수 있다.

[0372] 당업계에 주지된 기술 예컨대 상기 논의된 이종이관능성 가교 시약의 사용에 의해 효소 또는 기타 폴리펩티드가 항-스핑고지질 항체에 공유결합으로 결합될 수 있다. 별법적으로, 본 발명의 효소의 적어도 기능적으로 활성인

부분에 연결된 본 발명의 항체의 항원 결합 영역을 적어도 포함하는 융합 단백질이 당업계에 주지된 재조합 DNA 기술을 사용하여 구축될 수 있다 (예를 들어, [Neuberger, et al., Nature 312:604-608 (1984)] 참조).

[0373] 본 발명의 특정 실시양태에서, 예를 들어, 표적 조직 및 세포의 투과를 증가시키기 위해, 무손상 항체보다는 항체 단편을 사용하는 것이 바람직할 수 있다. 이러한 경우에, 항체의 혈청 반감기를 증가시키기 위해 항체 단편을 변형시키는 것이 바람직할 수 있다. 이는, 예를 들어, 살비지(salvage) 수용체 결합 에피토프를 항체 단편 내로 혼입시킴 (예를 들어, 항체 단편 내의 적합한 영역의 돌연변이에 의해, 또는 에피토프를 웨티드 태그 내로 혼입시킨 후, 태그를 항체 단편의 어느 한쪽 말단 또는 중간에 융합시킴으로써 (예를 들어, DNA 또는 웨티드 합성에 의해))으로써 달성될 수 있다.

[0374] 인간화 또는 변이체 항-스핑고지질 항체의 공유 결합 변형이 또한 본 발명의 범주 내에 포함된다. 이는 화학적 합성에 의해 또는 적용가능하다면 항체의 효소적 또는 화학적 절단에 의해 이루어질 수 있다. 항체의 표적화된 아미노산 잔기를 선별된 측쇄 또는 N- 또는 C-말단 잔기와 반응할 수 있는 유기 유도체화제와 반응시킴으로써 항체의 공유결합 변형의 또다른 유형이 분자 내로 도입된다. 폴리웨티드의 대표적인 공유결합 변형이 미국 특허 번호 5,534,615 (거명에 의해 본원에 명확하게 포함됨)에 기술되어 있다. 항체의 바람직한 유형의 공유결합 변형은 항체를 미국 특허 번호 4,640,835; 4,496,689; 4,301,144; 4,670,417; 4,791,192 또는 4,179,337에 기재된 방식으로 다양한 비-단백질성 중합체 중 하나, 예를 들어 폴리에틸렌 글리콜, 폴리프로필렌 글리콜, 또는 폴리옥시알킬렌에 연결시키는 것을 포함한다.

B. 벡터, 숙주 세포 및 재조합 방법

[0376] 본 발명은 인간화 또는 변이체 항-스핑고지질 항체를 코딩하는 단리된 핵산, 이러한 핵산을 포함하는 벡터 및 숙주 세포, 및 이러한 항체의 생산을 위한 재조합 기술을 또한 제공한다.

[0377] 항체의 재조합 생산을 위해, 이를 코딩하는 핵산을 단리하여, 추가적인 클로닝 (DNA의 증폭) 또는 발현을 위한 복제가능한 벡터 내로 삽입할 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 예를 들어, 미국 특허 번호 5,204,244에 기술된 바와 같이, 상동 재조합에 의해 항체가 생산될 수 있다. 통상적인 절차를 사용하여 (예를 들어, 항체의 중쇄 및 경쇄를 코딩하는 유전자에 특이적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오티드 프로브를 사용함으로써), 모노클로날 항체를 코딩하는 DNA가 쉽게 단리되고 서열분석된다. 다수의 벡터가 이용가능하다. 벡터 성분은, 예를 들어, 미국 특허 번호 5,534,615에 기술된 바와 같이, 신호 서열, 복제 기원, 하나 이상의 마커 유전자, 인핸서 요소, 프로모터, 및 전사 종결 서열 중 하나 이상을 일반적으로 포함하지만, 이에 한정되지는 않는다.

[0378] 본원에서의 벡터 내의 DNA의 클로닝 또는 발현을 위한 적절한 숙주 세포는 상기 기술된 원핵생물, 효모, 또는 고급 진핵생물 세포이다. 이러한 목적을 위한 적절한 원핵생물에는 유박테리아(eubacteria), 예컨대 그람-음성 또는 그람-양성 생물, 예를 들어, 장내세균 예컨대 에제리키아(Escherichia), 예를 들어, 대장균, 엔테로박테리(Enterobacter), 에르위니아(Erwinia), 클레브시엘라(Klebsiella), 프로테우스(Proteus), 살모넬라(Salmonella), 예를 들어, 살모넬라 타이피무리움(Salmonella typhimurium), 세라티아(Serratia), 예를 들어, 세라티아 마르세스칸스(Serratia marcescans), 및 시겔라(Shigella), 뿐만 아니라 바실러스(Bacillus) 예컨대 바실러스 서브틸리스(B. subtilis) 및 바실러스 리케니포르미스(B. licheniformis) (예를 들어, 바실러스 리케니포르미스 41P), 슈도모나스(Pseudomonas) 예컨대 슈도모나스 아에루기노사(P. aeruginosa), 및 스트렙토마이세스(Streptomyces)가 포함된다. 한 바람직한 대장균 클로닝 숙주는 대장균 294 (ATCC 31,446)이지만, 다른 균주 예컨대 대장균 B, 대장균 X1776 (ATCC 31,537), 및 대장균 W3110 (ATCC 27,325)도 적절하다. 이러한 예들은 제한적이기보다는 예시적이다.

[0379] 원핵생물에 더하여, 진핵생물 미생물 예컨대 필라멘트형 진균 또는 효모가 항-스핑고지질 항체를 코딩하는 벡터에 대한 적절한 클로닝 또는 발현 숙주이다. 사카로마이세스 세레비지애 또는 통상적인 베이커(baker) 효모가 저급 진핵생물 숙주 미생물들 중에서 가장 통상적으로 사용된다. 그러나, 스키조사카로마이세스 품베(Schizosaccharomyces pombe); 클루이베로마이세스(Kluyveromyces) 숙주, 예를 들어, 클루이베로마이세스 락티스(K. lactis), 클루이베로마이세스 프라길리스(K. fragilis) (ATCC 12,424), 클루이베로마이세스 불가리쿠스(K. bulgaricus) (ATCC 16,045), 클루이베로마이세스 위케라미이(K. wickeramii) (ATCC 24,178), 클루이베로마이세스 왈티이(K. waltii) (ATCC 56,500), 클루이베로마이세스 드라소필라룸(K. drosophilae) (ATCC 36,906), 클루이베로마이세스 테르모톨레란스(K. Thermotolerans), 및 클루이베로마이세스 마르시아누스(K. marxianus); 야로위아(yarrowia) (EP 402,226); 피치아 파스토리스(Pichia pastoris) (EP 183,070); 칸디다(Candida); 트리코데르마 리시아(Trichoderma reesia) (EP 244,234); 뉴로스포라 크라사(Neurospora crassa); 슈완니오마이세스(Schwanniomyces) 예컨대 슈완니오마이세스 오시텐탈리스(Schanniomyces occidentalis); 및

필라멘트형 진균, 예를 들어, 뉴로스포라(Neurospora), 페니실리움(Penicillium), 톨리포클라디움(Tolypocladium), 및 아스페르길루스(Aspergillus) 속주 예컨대 아스페르길루스 니둘란스(A. nidulans) 및 아스페르길루스 니게르(A. niger)와 같은 다수의 또다른 속, 종, 및 계통이 통상적으로 이용가능하고 본원에서 유용하다.

[0380] 글리코실화 항-스핑고지질 항체의 발현을 위한 적절한 숙주 세포는 다세포 생물로부터 유래된다. 무척추동물 세포의 예로는 식물 및 곤충 세포가 포함된다. 스포돕테라 프루기페르다(Spodoptera frugiperda) (모충), 아에데스 아에집티(Aedes aegypti) (모기), 아에데스 알보피كت스(Aedes albopictus) (모기), 드로소필라 멜라노가스테르(Drosophila melanogaster) (과일파리), 및 봄비克斯 모리(Bombyx mori)와 같은 숙주로부터의 수많은 배脲로바이러스 균주 및 변이체, 및 상응하는 증식허용성 곤충 숙주 세포가 확인되어 있다. 다양한 형질감염용 바이러스 균주, 예를 들어, 오토그래파 칼리포니카(Autographa californica) NPV의 L-1 변이체 및 봄비克斯 모리 NPV의 Bm-5 균주가 공개적으로 입수 가능하고, 이같은 바이러스들은, 특히 스포돕테라 프루기페르다 세포의 형질 감염을 위해, 본 발명에 따라 본원에서 바이러스로 사용될 수 있다. 면, 옥수수, 감자, 대두, 페튜니아, 토마토 및 담배의 식물 세포 배양물 또한 숙주로서 사용될 수 있다.

[0381] 그러나, 척추동물 세포가 가장 흥미롭고, 배양물 (조직 배양물)에서의 척추동물 세포의 증식은 일상적인 절차가 되어 있다. 유용한 포유류 숙주 세포주의 예는 SV40으로 형질전환된 원숭이 신장 CV1 세포주 (COS-7, ATCC CRL 1651); 인간 배아 신장 세포주 (293 또는 혼탁액 배양에서의 성장을 위해 서브클로닝된 293 세포, [Graham, et al., J. Gen Virol. 36:59 (1977)]); 베이비 햄스터 신장 세포 (BHK, 예를 들어, ATCC CCL 10); 차이니즈 햄스터 난소 세포/-DHFR (CHO, [Urlaub, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216 (1980)]); 마우스 세르톨리 (sertoli) 세포 (TM4, [Mather, Biol. Reprod. 23:243-251 (1980)]); 원숭이 신장 세포 (CV1 ATCC CCL 70); 아프리카 녹색 원숭이 신장 세포 (VERO-76, ATCC CRL-1587); 인간 자궁경부암종 세포 (HeLa, ATCC CCL 2); 개 신장 세포 (MDCK, ATCC CCL 34); 버팔로 래트(buffalo rat) 간 세포 (BRL 3A, ATCC CRL 1442); 인간 폐 세포 (W138, ATCC CCL 75); 인간 간 세포 (Hep G2, HB 8065); 마우스 유방 종양 (MMT 060562, ATCC CCL51); TRI 세포 ([Mather, et al., Annals N.Y. Acad. Sci. 383:44-68 (1982)]); MRC 5 세포; FS4 세포; 및 인간 간세포암 세포주 (Hep G2)이다.

[0382] 숙주 세포를 항-스핑고지질 항체의 생산을 위한 발현 또는 클로닝 벡터로 형질전환시키고, 프로모터 유도, 형질 전환체 선별 또는 원하는 서열을 코딩하는 유전자의 증폭에 적합하게 변형된 통상적인 영양 배지에서 배양한다.

[0383] 본 발명의 항-스핑고지질 항체를 생산하는데 사용된 숙주 세포는 다양한 배지에서 배양될 수 있다. 시판되는 배지 예컨대 햄(Ham) F10 (Sigma), 최소 필수 배지 ((MEM), (Sigma), RPMI-1640 (Sigma), 및 둘째코 변형 이글 배지 ((DMEM), Sigma)가 숙주 세포를 배양하는데 적절하다. 또한, [Ham, et al., Meth. Enz. 58:44 (1979)], [Barnes, et al., Anal. Biochem. 102:255 (1980)], 미국 특히 번호 4,767,704; 4,657,866; 4,927,762; 4,560,655; 또는 5,122,469; WO 1990/03430; WO 87/00195; 또는 미국 특히 Re.30,985에 기술된 배지들 중 임의 것을 숙주 세포에 대한 배양 배지로 사용할 수 있다. 임의의 이러한 배지에 필요하다면 호르몬 및/또는 기타 성장 인자 (예컨대 인슐린, 트랜스페린, 또는 표피 성장 인자), 염 (예컨대 염화나트륨, 칼슘, 마그네슘 및 포스페이트), 완충제 (예컨대 HEPES), 뉴클레오티드 (예컨대 아데노신 및 티미딘), 항생제 (예컨대 GENTAMYCIN™ 약물), 미량원소 (마이크로몰 범위의 최종 농도로 일반적으로 존재하는 무기 화합물로 정의됨), 및 글루코스 또는 등가의 에너지 공급원이 보충될 수 있다. 임의의 기타 필요한 보충물이 당업자에게 공지된 적합한 농도로 또한 포함될 수 있다. 배양 조건, 예컨대 온도, pH 등은 발현에 선택된 숙주 세포와 함께 기존에 사용된 것들이고, 당업자에게 명백할 것이다.

[0384] 재조합 기술을 사용하는 경우, 항체는 세포 내에서 생산되거나, 원형질막 주위공간 내에서 생산되거나, 또는 배지 내로 직접 분비될 수 있다. 항체가 세포 내에서 생산되는 경우, 첫번째 단계로서, 숙주 세포 또는 용해된 단편인 입상물질 잔해물을, 예를 들어, 원심분리 또는 초여과에 의해 제거한다. [Carter, et al., Bio/Technology 10:163-167 (1992)]에는 대장균의 원형질막 주위공간으로 분비된 항체를 단리하는 절차가 기술되어 있다. 간략하게, 세포 페이스트를 아세트산나트륨 (pH 3.5), EDTA, 및 페닐메틸су포닐플루오라이드 (PMSF)의 존재 하에 약 30분 동안 용해시킨다. 세포 잔해물을 원심분리에 의해 제거할 수 있다. 항체가 배지 내로 분비되는 경우, 일반적으로 이같은 발현 시스템으로부터의 상등액을 시판되는 단백질 농축 필터, 예를 들어, Amicon 또는 Millipore Pellicon 초여과 유닛을 사용하여 먼저 농축시킨다. 단백질분해를 억제하기 위해 프로테아제 억제제 예컨대 PMSF가 임의의 상기 단계에서 포함될 수 있고, 우발적인 오염물의 성장을 방지하기 위해 항생제가 포함될 수 있다.

[0385]

세포로부터 제조된 항체 조성물을, 예를 들어, 히드록실아파타이트 크로마토그래피, 젤 전기영동, 투석, 및 친화성 크로마토그래피를 사용하여 정제할 수 있고, 친화성 크로마토그래피가 바람직한 정제 기술이다. 친화성 리간드로서의 단백질 A의 적합성은 항체에 존재하는 임의의 면역글로불린 Fc 도메인의 종 및 이소타입에 좌우된다. 단백질 A를 사용하여 인간 중쇄를 기초로 하는 항체를 정제할 수 있다 ([Lindmark, et al., J. Immunol. Meth. 62:1-13 (1983)]). 단백질 G는 모든 마우스 이소타입 및 인간 γ 3에 대해 권장된다 ([Guss, et al., EMBO J. 5:15671575 (1986)]). 친화성 리간드가 부착되는 매트릭스는 거의 대부분 아가로스이지만, 다른 매트릭스도 이용가능하다. 기계적으로 안정적인 매트릭스 예컨대 제어형 다공성 유리 또는 폴리(스티렌디비닐)벤젠은 아가로스로 달성할 수 있는 것보다 유속이 더 빠르게 하고 처리 시간이 더 짧게 한다. 항체가 C_{H3} 도메인을 포함하는 경우, Bakerbond ABX™ 수지 (J. T. Baker (Phillipsburg, NJ))가 정제에 유용하다. 회수될 항체에 따라 기타 단백질 정제 기술 예컨대 이온-교환 컬럼 상에서의 분획화, 에탄올 침전, 역상 HPLC, 실리카 상에서의 크로마토그래피, 헤파린 SEPHAROSE™ 상에서의 크로마토그래피, 음이온 또는 양이온 교환 수지 (예컨대 폴리아스파르트산 컬럼) 상에서의 크로마토그래피, 크로마토포커싱, SDS-PAGE, 및 황산암모늄 침전이 또한 이용가능하다.

[0386]

임의의 예비 정제 단계(들) 후에, 당해 항체 및 오염물을 포함하는 혼합물을 pH 약 2.5-4.5의 용출 완충제를 사용하는 낮은 pH 소수성 상호작용 크로마토그래피에 적용시킬 수 있고, 이는 바람직하게는 낮은 염 농도 (예를 들어, 약 0-0.25M 염)에서 수행된다.

[0387]

C. 제약 제형

[0388]

본 발명의 항체 또는 면역-유래 모이아티의 치료적 제형은 원하는 정도의 순도를 갖는 항체를 임의의 제약상 허용가능한 담체, 부형제 또는 안정화제 (예를 들어, [Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)] 참조)와 혼합함으로써 동결건조 제형 또는 수용액의 형태로 보관용으로 제조된다. 허용가능한 담체, 부형제 또는 안정화제는 사용된 투여량 및 농도에서 수용자에게 비독성이고, 포스페이트, 시트레이트, 및 기타 유기산과 같은 완충제; 아스코르브산 및 메티오닌이 포함되는 항산화제; 방부제 (예컨대 옥타데실디메틸벤질 암모늄 클로라이드; 헥사메토늄 클로라이드; 벤즈알코늄 클로라이드, 벤즈에토늄 클로라이드; 폐놀, 부틸 또는 벤질 알콜; 알킬 파라벤 예컨대 메틸 또는 프로필 파라벤; 카테콜; 레소르시놀; 시클로헥사놀, 3-펜타놀; 및 m-크레졸); 저분자량 (약 10개 미만의 잔기)의 폴리펩티드; 단백질, 예컨대 혈청 알부민, 젤라틴 또는 면역글로불린; 친수성 중합체 예컨대 폴리비닐피롤리돈; 아미노산 예컨대 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 히스티딘, 아르기닌 또는 라이신; 글루코스, 만노스 또는 텍스트린이 포함되는 단당류, 이당류 및 기타 탄수화물; 킬레이트화제 예컨대 EDTA; 당 예컨대 수크로스, 만니톨, 트레할로스 또는 소르비톨; 염-형성 카운터 이온 예컨대 나트륨; 금속 착물 (예를 들어, Zn-단백질 착물); 및/또는 비-이온성 계면활성제 예컨대 TWEEN™, PLURONICST™ 또는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)을 포함한다.

[0389]

본원에서의 제형은 치료될 특정 적응증에 필요하다면 1가지를 초과하는 활성 화합물, 바람직하게는 서로에게 역효과를 일으키지 않는 보완적인 활성이 있는 것들을 또한 함유할 수 있다. 이같은 분자는 의도된 목적에 효과적인 양으로 조합되어 적절하게 존재한다.

[0390]

활성 성분은 코아세르베이션(coacervation) 기술에 의해 또는 계면 중합에 의해 예를 들어 제조된 마이크로캡슐, 예를 들어, 각각 히드록시메틸셀룰로스 또는 젤라틴-마이크로캡슐 및 폴리-(메틸메타크릴레이트) 마이크로캡슐 내에, 클로이드성 약물 전달 시스템 (예를 들어, 리포솜, 일부민 마이크로스피어, 마이크로에멀션, 나노입자 및 나노캡슐) 내에, 또는 마크로에멀션 내에 포획될 수 있다. 이같은 기술은 [Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)]에 개시되어 있다.

[0391]

생체내 투여에 사용될 제형은 반드시 무균성이어야 한다. 이는 예를 들어 무균 여과막을 통한 여과에 의해 용이하게 수행된다.

[0392]

서방성 제제가 제조될 수 있다. 서방성 제제의 적절한 예로는 항체를 함유하는 고체 소수성 중합체의 반투과성 매트릭스가 포함되고, 이 매트릭스는 성형품, 예를 들어, 필름 또는 마이크로캡슐의 형태이다. 서방성 매트릭스의 예로는 폴리에스테르, 히드로겔 (예를 들어, 폴리(2-히드록시에틸-메타크릴레이트) 또는 폴리(비닐알콜)), 폴리락티드 (미국 특허 번호 3,773,919), L-글루탐산과 γ -에틸-L-글루타메이트의 공중합체, 비-분해성 에틸렌-비닐 아세테이트, 분해성 락트산-글리콜산 공중합체 예컨대 Lupron Depot™ (락트산-글리콜산 공중합체 및 루프롤리드 아세테이트로 구성된 주사용 마이크로스피어), 및 폴리-D-(-)-3-히드록시부티르산이 포함된다. 예컨대 에틸렌-비닐 아세테이트 및 락트산-글리콜산과 같은 중합체는 100일을 초과하여 분자를 방출할 수 있는 반면,

특정 히드로겔은 단백질을 더 짧은 기간 동안 방출한다. 캡슐화된 항체가 신체 내에서 장기간 동안 유지되는 경우, 37°C에서 습도에 노출된 결과로 항체가 변성되거나 응집되어, 생물학적 활성의 손실 및 면역원성의 가능한 변화가 초래될 수 있다. 수반된 메커니즘에 따라 안정화를 위한 합리적인 전략이 고안된다. 예를 들어, 응집 메커니즘이 티오-디슬퍼드 교환을 통한 분자간 S-S 결합 형성인 것으로 발견되면, 술프히드릴 잔기를 변화 시킴, 산성 용액으로부터 동결건조시킴, 수분 함량을 제어함, 적합한 첨가제를 사용함, 및 특정 중합체 매트릭스 조성물을 개발함에 의해 안정화가 달성될 수 있다.

[0393] D. 항체에 대한 비-치료적 용도

본 발명의 항체는 친화력 정제 작용제로 사용될 수 있다. 이러한 목적에서, 당업계에 주지된 기술을 사용하여, Sephadex 수지 또는 여과지와 같은 고체 상 위에 항체를 고정한다. 고정된 항체를 정제될 스팽고지질을 함유하는 샘플과 접촉시킨 후, 적절한 용매로 세정하면, 상기 용매는 고정된 항체에 결합된 스팽고지질 이외의 샘플 내의 모든 물질을 실질적으로 제거할 것이다. 마지막으로, 지지체를 항체로부터 스팽고지질을 방출시킬 또 다른 적절한 용매, 예컨대 글리신 완충제 (예를 들어, pH 3 내지 pH 5.0)로 세정한다.

항-스팡고지질 항체는 스팽고지질에 대한 진단 분석법, 예를 들어, 특정 세포, 조직 (예컨대 생검 샘플) 또는 체액 내에서의 스팽고지질의 발현을 검출하기 위한 분석법에서 또한 유용할 수 있다. 이같은 진단 방법은 심혈관 또는 뇌혈관 질환 또는 장애의 진단에서 유용할 수 있다.

진단 용도를 위해, 전형적으로 항체가 검출가능한 모이어티로 표지될 것이다. 다수의 표지가 이용가능하고, 이는 하기의 카테고리로 일반적으로 분류될 수 있다:

(a) 방사성동위원소, 예컨대 ^{35}S , ^{14}C , ^{125}I , ^3H , 및 ^{131}I . 예를 들어, [Current Protocols in Immunology, Volumes 1 and 2, Coligan et al., Ed. Wiley-Interscience, New York, N.Y., Pubs. (1991)]에 기술된 기술을 사용하여 항체를 방사성동위원소로 표지할 수 있고, 방사성을 센스 계수를 사용하여 측정할 수 있다.

(b) 형광 표지 예컨대 희토류 칼레이트 (유로퓸 칼레이트) 또는 플루오레세인 및 이의 유도체, 로다민 및 이의 유도체, 단실, 리사민(Lissamine), 피코에리트린 및 텍사스 레드(Texas Red)가 이용가능하다. 예를 들어, [Current Protocols in Immunology, 상기 문헌]에 개시된 기술을 사용하여, 형광 표지를 항체에 접합시킬 수 있다. 형광계를 사용하여 형광을 정량할 수 있다.

(c) 다양한 효소-기질 표지가 이용가능하다. 예를 들어, 미국 특허 번호 4,275,149는 이들 중 일부의 리뷰를 제공한다. 일반적으로 효소는 발색성 기질의 화학적 변경을 촉매하고, 다양한 기술을 사용하여 이를 측정할 수 있다. 예를 들어, 효소는 기질에서 색 변화를 촉매할 수 있고, 이를 분광광도계로 측정할 수 있다. 별법적으로, 효소는 기질의 형광 또는 화학발광을 변경시킬 수 있다. 형광의 변화를 정량하기 위한 기술은 상기 기술되어 있다. 화학발광성 기질은 화학 반응에 의해 전기적으로 여기된 후, 측정 (예를 들어, 화학발광분석기를 사용하여 측정)할 수 있는 빛을 방출할 수 있거나, 또는 형광 수용체에 에너지를 공여한다. 효소 표지의 예로는 루시페라제 (예를 들어, 개똥벌레 루시페라제 및 박테리아 루시페라제; 미국 특허 번호 4,737,456), 루시페린, 2,3-디하이드로프탈리진디온, 말레이트 탈수소효소, 요소분해효소, 과산화효소 예컨대 양고추냉이 과산화효소 (HRPO), 알칼리성 포스파타제, 베타-갈락토시다제, 글루코아밀라제, 리소자임, 당류 산화효소 (예를 들어, 글루코스 산화효소, 갈락토스 산화효소, 및 글루코스-6-포스페이트 탈수소효소), 혜데로시클리옥시다제 (예를 들어 요산분해효소 및 잔틴 산화효소), 락토퍼옥시다제, 마이크로퍼옥시다제 등이 포함된다. 효소를 항체에 접합시키는 기술은 [O'Sullivan, et al., Methods for the Preparation of Enzyme-Antibody Conjugates for use in Enzyme Immunoassay, in Methods in Enzym. (ed J. Langone & H. Van Vunakis), Academic press, New York, 73:147-166 (1981)]에 기술되어 있다.

[0400] 효소-기질 조합의 예로는, 예를 들어, 하기의 것들이 포함된다:

[0401] (i) 양고추냉이 과산화효소 (HRPO)와 기질로서의 수소 과산화효소 (이때 수소 과산화효소는 염료 전구물질 (예를 들어, 오르토페닐렌 디아민 (OPD) 또는 3,3', 5,5'-테트라메틸 벤지딘 히드로클로라이드 (TMB))를 산화시킴);

[0402] (ii) 알칼리성 포스파타제 (AP)와 발색성 기질로서의 파라-나트로페닐 포스페이트; 및

[0403] (iii) β -D-갈락토시다제 (β -D-Gal)와 발색성 기질 (예를 들어, p-나트로페닐- β -D-갈락토시다제) 또는 형광성 기질 4-메틸움벨리페릴- β -D-갈락토시다제.

[0404] 다수의 기타 효소-기질 조합이 당업자에게 입수 가능하다. 이들의 일반적인 리뷰를 위해서, 미국 특허 번호 4,275,149 및 4,318,980 참조.

[0405] 때때로, 표지는 항체에 간접적으로 접합된다. 당업자는 이를 달성하는 다양한 기술을 알고 있을 것이다. 예를 들어, 항체는 비오틴과 접합될 수 있고, 상기 언급된 표지의 광범위한 3가지 카테고리 중 임의의 것이 아비딘에 접합될 수 있거나, 또는 반대로 접합될 수 있다. 비오틴은 아비딘에 선택적으로 결합하고, 따라서 표지가 이러한 간접적인 방식으로 항체에 접합될 수 있다. 별법적으로, 표지와 항체의 간접적인 접합을 달성하기 위해서, 항체가 소형 핵텐(예를 들어, 디옥신)과 접합되고, 상기 언급된 여러 유형의 표지 중 하나가 항-핵텐 항체(예를 들어, 항-디옥신 항체)와 접합된다. 따라서, 표지와 항체의 간접적인 접합을 달성할 수 있다.

[0406] 본 발명의 또다른 실시양태에서, 항-스핑고지질 항체가 표지될 필요가 없고, 항-스핑고지질 항체에 결합하는 표지된 항체를 사용하여 이의 존재를 검출할 수 있다.

[0407] 본 발명의 항체는 임의의 공지된 분석 방법, 예컨대 경쟁적 결합 분석법, 직접적 및 간접적 샌드위치 분석법, 및 면역침전 분석법에서 사용될 수 있다. 예를 들어, [Zola, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, pp.147-158 (CRC Press, Inc. 1987)] 참조.

[0408] 경쟁적 결합 분석법은 제한된 양의 항체와의 결합에 대해 테스트 샘플 분석물과 경쟁하는 표지된 기준물의 능력에 의존한다. 테스트 샘플 내의 스핑고지질의 양은 항체에 결합되는 기준물의 양에 반비례한다. 결합되는 표준물의 양을 결정하는 것을 용이하게 하기 위해, 항체에 결합된 기준물 및 분석물이 결합되지 않은 기준물 및 분석물로부터 편리하게 분리될 수 있도록, 일반적으로 항체는 경쟁 전 또는 후에 불용성이다.

[0409] 샌드위치 분석법은 검출될 단백질의 상이한 면역원성 부분 또는 에피토프에 각각 결합할 수 있는 2개의 항체를 사용하는 것을 수반한다. 샌드위치 분석법에서, 테스트 샘플 분석물이 고체 지지체 상에 고정된 1차 항체에 결합된 후, 2차 항체가 분석물에 결합하여, 불용성의 3-부분 복합체가 형성된다. 예를 들어, 미국 특허 번호 4,376,110 참조. 2차 항체는 자체가 검출 가능한 모이어티로 표지될 수 있거나(직접적 샌드위치 분석법), 또는 검출 가능한 모이어티로 표지된 항-면역글로불린 항체를 사용하여 측정될 수 있다(간접적 샌드위치 분석법). 예를 들어, 샌드위치 분석법의 한가지 유형은 ELISA 분석법이고, 이러한 경우 검출 가능한 모이어티는 효소이다.

[0410] 면역조직화학을 위해, 혈액 또는 조직 샘플은 신선하거나 동결된 것일 수 있거나, 또는 파라핀에 매립되어 보존 제 예컨대 포르말린으로 고정될 수 있다.

[0411] 항체는 생체내 진단 분석법에 또한 사용될 수 있다. 일반적으로, 결합된 표적 분자가 면역섬광조영술을 사용하여 국소화될 수 있도록, 항체가 방사선핵종(예컨대 ^{111}In , ^{99}Tc , ^{14}C , ^{131}I , ^{125}I , ^3H , ^{32}P , 또는 ^{35}S)으로 표지된다.

E. 진단 키트

[0413] 편의상, 본 발명의 항체는 진단 분석법을 수행하기 위한 지침서와 함께 키트, 예를 들어, 미리 결정된 양의 시약들의 포장 조합물 내에서 제공될 수 있다. 항체가 효소로 표지되는 경우, 키트는 효소가 필요로 하는 기질 및 보조인자(예를 들어, 검출 가능한 발색단 또는 형광단)를 포함할 것이다. 또한, 기타 첨가제 예컨대 안정화제, 완충제(예를 들어, 차단 완충제 또는 용해 완충제) 등이 포함될 수 있다. 각종 시약들의 상대적인 양은 분석법의 감도를 실질적으로 최적화하는 시약들의 용액 내 농도를 제공하기 위해 광범위하게 변할 수 있다. 특히, 시약은 용해 시 적합한 농도의 시약 용액을 제공할 부형제를 포함하는 건조 분말(일반적으로 동결건조됨)로서 제공될 수 있다.

F. 항체에 대한 치료적 용도

[0415] 치료적 용도를 위해, 본 발명의 항-스핑고지질 항체는 상기 논의된 것들과 같은 제약상 허용 가능한 투여 형태로 포유동물, 바람직하게는 인간에게 투여되고, 여기에는 볼루스(bolus)로서의 정맥내 투여 또는 일정 기간에 걸친 연속 주입, 근육내, 복강내, 뇌척수내, 피하, 관절내, 윤활막내, 수막강내, 경구, 국소 또는 흡입 경로에 의해 인간에게 투여될 수 있는 것들이 포함된다.

[0416] 질환의 예방 또는 치료를 위해, 항체의 적합한 투여량은 상기 정의된 바와 같은 처치될 질환의 유형, 질환의 종증도 및 경과, 항체가 예방 또는 치료 목적으로 투여되는지 여부, 기준의 요법, 환자의 임상 병력 및 항체에 대한 응답, 및 주치의의 재량에 좌우될 것이다. 항체는 한번에 또는 일련의 처치에 걸쳐 환자에게 적절하게 투여된다.

[0417] 질환의 유형 및 중증도에 따라, 예를 들어, 1회 이상의 별도의 투여에 의한 것인 또는 연속 주입에 의한 것인 든, 약 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 내지 50 mg/kg (예를 들어, 0.1-20 mg/kg)의 항체가 환자에게 투여하기 위한 초기 후보 투여량이다. 전형적인 일일 또는 일주일 투여량은 상기 언급된 인자들에 따라 약 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 내지 약 20 mg/kg 이상의 범위일 수 있다. 수 일 이상에 걸친 반복 투여를 위해, 용태에 따라, 처치는 질환 증상의 원하는 억제가 일어날 때까지 일반적으로 지속될 것이다. 그러나, 또다른 투여량 계획이 유용할 수 있다. 이러한 요법의 진행은 통상적인 기술 및 분석법 (예를 들어, 방사선촬영 영상화 포함)에 의해 쉽게 모니터링된다.

[0418] 본 발명의 또다른 실시양태에 따르면, 항체를 이러한 목적에 효과적인 또다른 작용제, 예컨대 항암 화학요법 약물에 연속적으로 또는 이와 조합하여 투여함으로써 질환의 예방 또는 치료에서의 항체의 유효성이 개선될 수 있다. 이같은 또다른 작용제는 투여될 조성물 내에 존재할 수 있거나, 또는 별도로 투여될 수 있다. 또다른 작용제에 연속적으로 또는 이와 조합되어 항체가 적절하게 투여된다.

G. 제조품

[0419] 본 발명의 또다른 실시양태에서, 상기 기술된 장애의 치치에 유용한 물질들을 함유하는 제조품이 제공된다. 제조품은 용기 및 표지를 포함한다. 적절한 용기에는, 예를 들어, 병, 바이알, 주사기, 및 시험관이 포함된다. 다양한 물질 예컨대 유리 또는 플라스틱으로부터 용기가 형성될 수 있다. 용기는 용태를 처리하는데 효과적인 조성물을 보유하고, 멀균 접근 포트(port)가 있을 수 있다 (예를 들어, 용기는 피하주사 바늘이 관통가능한 마개가 있는 정맥내 용액 백 또는 바이알일 수 있다). 조성물 내의 활성 작용제는 항-스핑고지질 항체이다. 용기 상의 또는 용기와 합쳐진 표지는 조성물이 선택된 용태를 처리하는데 사용된다는 것을 가리킨다. 제조품은 제약상 허용가능한 완충제, 예컨대 포스페이트-완충 염수, 링거액 및 렉스트로스 용액을 포함하는 제2 용기를 추가로 포함할 수 있다. 제조품은 기타 완충제, 회석제, 필터, 바늘, 주사기, 및 사용 지침서가 있는 포장 삽입물을 포함하여, 상업용 및 사용자 관점에서 바람직한 기타 물질을 추가로 포함할 수 있다.

[0420] 본 발명이 하기의 실시예를 참조로 더욱 양호하게 이해될 것이고, 이러한 실시예는 단지 본 발명을 실행하기 위해 현재 공지된 최상의 양식을 설명하도록만 의도된다. 본 발명의 범주가 이에 한정되는 것으로 간주되지 않는다.

실시예

실시예

실시예 1: S1P에 대한 뮤린 모노클로날 항체 (스핑고펩™; LT1002)

[0424] 한가지 유형의 치료적 항체가 바람직하지 않은 스피고지질에 특이적으로 결합하여, 예를 들어, (1) 바람직하지 않은 효과 예컨대 심장독성 효과, 종양형성성 효과 또는 혈관형성성 효과를 촉진할 바람직하지 않은 독성 스피고지질의 유효 농도 (및/또는 이의 대사 전구물질의 농도)를 저하시키는 것; (2) 바람직하지 않은 독성, 종양형성성 또는 혈관형성성 스피고지질이 세포 수용체에 결합하는 것을 억제하는 것, 및/또는 따라서 이같은 수용체에 결합하는데 이용가능한 스피고지질의 농도를 저하시키는 것과 같은 이로운 효과를 달성한다. 이같은 치료 효과의 예로는 이용가능한 S1P의 유효 생체내 혈청 농도를 저하시킴으로써 S1P의 종양형성성 및 혈관형성성 효과 및 MI 후의 심장 기능상실, 암 또는 섬유발생성 질환에서의 이의 역할을 차단하거나 또는 적어도 제한하는 것이 포함되지만, 이에 한정되지는 않았다.

[0425] S1P의 필수 구조 요소를 담체 분자 예컨대 KLH에 가교시킬 수 있는 반응성 기를 함유하도록 티올화 S1P를 합성하였다. 면역화 전에, 티오-S1P 유사체를 표준 프로토콜을 사용하여 단백질 담체 (예를 들어, KLH)에 IOA 또는 SMCC 가교를 통해 접합시켰다. SMCC는 1차 아민 및 술프히드릴 기와 반응하는 이종이관능성 가교제이고, 바람직한 가교제를 나타낸다.

[0426] 스위스 웹스터(Swiss Webster) 또는 BALB-C 마우스를 주사 당 50 μg 의 면역원 (티올화-S1P 및 KLH의 SMCC 중개 접합체)으로 2개월의 기간에 걸쳐 4회 면역화시켰다. 혈청 샘플을 2차, 3차 및 4차 면역화 2주 후에 수집하고, 직접적 ELISA에 의해 항-S1P 항체의 존재에 대해 스크리닝하였다. 이어서, 높은 역가의 항체를 나타낸 동물로부터의 자라를 사용하여, 표준 용합 절차에 따라 하이브리도마를 생성시켰다. 생성된 하이브리도마를 전면성장 까지 성장시킨 후, ELISA 분석을 위해 세포 상동액을 수집하였다. 면역화된 55마리의 마우스 중, 8마리가 S1P에 대해 응답성인 항체의 상당한 혈청 역가를 나타내는 양호한 응답물이었다. 이어서, 확립된 절차에 따라 이러한 마우스들의 자라 및 골수종 세포를 사용하여 융합을 수행하였다. 그후, 생성된 1,500개의 하이브리도마를 직접적 ELISA에 의해 스크리닝하여, 287개의 양성 하이브리도마가 산출되었다. 직접적 ELISA에 의해 스크리닝

된 이러한 287개의 하이브리도마 중에서, 159개가 양호한 역가를 나타냈다. 그후, 159개의 하이브리도마 각각을 24웰 플레이트 내로 확장시켰다. 그후, 확장된 하이브리도마의 세포-컨디셔닝 배지를 다시 스크리닝하여, 당해 항체를 분비할 수 있는 안정적인 하이브리도마를 확인하였다. 역가가 가장 높은 60개의 안정적인 하이브리도마에 대해 경쟁적 ELISA를 수행하였다.

[0427] 스크리닝된 55마리의 마우스 및 거의 1,500개의 하이브리도마 중에서, 진정한 모노클로날 항체를 궁극적으로 생성시키는데 필요한 한계 희석 클로닝에 무방한 성능 특성을 나타낸 1개의 하이브리도마가 발견되었다. 이러한 프로세스로 47개의 클론이 생성되었고, 이들 중 대다수는 S1P 항체를 생산하는데 양성인 것으로 생각되었다. 이러한 47개의 클론 중에서, 6개를 24웰 플레이트 내로 확장시키고, 이어서 경쟁적 ELISA에 의해 스크리닝하였다. 양성으로 유지된 4개의 클론으로부터, 1개를 선택하여 S1P 모노클로날 항체의 대규모 생산을 시작하였다. SCID 마우스에게 이러한 세포를 주사하고, 생성된 복수를 단백질 A로 정제하여 (50% 수율), 내독소 수준에 대해 분석하였다 (<3 EU/mg). 1회 라운드의 복수 생산에 대해, 50마리의 마우스에게 주사하여, 총 125 mL의 복수가 생산되었다. 항체는 IgG1 카파로 이소타입이 결정되었고, HPLC에 의해 >95% 순수한 것으로 생각되었다. 20 mM 인산나트륨 + 150 mM 염화나트륨 (pH 7.2) 내에서 항체를 제조하였고, -70°C에서 보관하였다. 이러한 항체는 LT1002 또는 스펑고맵™으로 칭해진다.

[0428] 양성 하이브리도마 클론 (클론 306D326.26으로 칭해짐)이 ATCC에 기탁되었고 (안전 기탁 보관 번호 SD-5362), 이는 S1P에 대해 지시된 최초의 뮤린 mAb를 나타낸다. 이러한 클론은 "인간화" 항체 변이체의 생성에 사용될 수 있는 항체 중쇄 및 경쇄의 가변 영역, 뿐만 아니라 키메라 항체를 구축하는데 필요한 서열 정보를 또한 함유한다.

[0429] S1P-특이적 항체에 대한 혈청 및 세포 상동액의 스크리닝은 항원으로 티올화 SIP 유사체를 사용하는 직접적 ELISA에 의한 스크리닝이었다. 1차 인큐베이션 동안 50 μl의 샘플 (혈청 또는 세포 상동액)을 동일한 부피의 PBS/0.1% 트윈(Tween)-20 (PBST)으로 희석한 것을 제외하고는, 표준 ELISA를 하기 기술된 바와 같이 수행하였다. 결합 완충제 (33.6 mM Na₂CO₃, 100 mM NaHCO₃; pH 9.5) 내의 BSA에 접합된 화학적으로 합성된 티올화-S1P 0.1 μg으로 코팅된 96웰 고결합 ELISA 플레이트 (Costar)에서 ELISA를 수행하였다. 티올화-S1P-BSA를 ELISA 플레이트 웰 내에서 37°C에서 1시간 동안 또는 4°C에서 하룻밤 동안 인큐베이션하였다. 그후, 플레이트를 PBS (137 mM NaCl, 2.68 mM KC1, 10.14 mM Na₂HPO₄, 1.76 mM KH₂PO₄; pH 7.4)로 4회 세정하고, PBST로 1시간 동안 실온에서 차단하였다. 1차 인큐베이션 단계를 위해, 75 μl의 샘플 (측정될 S1P를 함유함)을 PBST에서 희석된 0.1 μg/mL 항-S1P mAb 25 μl와 함께 인큐베이션하고, ELISA 플레이트의 웰에 첨가하였다. 각각의 샘플을 3중 웰에서 수행하였다. 실온에서 1시간 동안 인큐베이션한 후, ELISA 플레이트를 PBS로 4회 세정하고, 100 μl/웰의 0.1 μg/mL HRP 염소 항-마우스 2차 항체 (Jackson Immunoresearch)와 함께 실온에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 그후, 플레이트를 PBS로 4회 세정하고, 테트라메틸벤지딘 (Sigma)에 1-10분 동안 노출시켰다. 동일한 부피의 1M H₂SO₄를 첨가함으로써 검출 반응을 정지시켰다. EL-X-800 ELISA 플레이트 판독기 (Bio-Tech)를 사용하여 450 nm에서의 측정에 의해 샘플의 광학 밀도를 결정하였다.

[0430] 교차 반응성에 대해, 하기의 변경을 제외하고 경쟁적 ELISA를 상기 기술된 바와 같이 수행하였다. 1차 인큐ベ이션은 경쟁물 (S1P, SPH, LPA 등) 및 비오틴-접합 항-S1P mAb로 구성되었다. 정제된 모노클로날 항체의 비오틴화는 EZ-Link Sulfo-NHS-Biotinylation 키트 (Pierce)를 사용하여 수행하였다. 키트 프로토콜에 따라 비오틴 혼입이 결정되었고, 항체 당 비오틴 분자가 7 내지 11개 범위였다. 경쟁물은 하기와 같이 제조하였다: 지질 스톡을 초음파처리하고, 아르곤 하에 건조시킨 후, DPBS/BSA [DPBS (Invitrogen 14040-133) 내의 1 mg/mL의 지방산이 없는 BSA (Calbiochem)]에서 재구성시켰다. 정제된 항-S1P mAb를 필요에 따라 PBS/0.5% 트리톤 (Triton) X-100에서 희석하였다. 경쟁물 3 : 항체 1이 생성되도록 경쟁물 및 항체 용액을 함께 혼합하였다. HRP-접합 스트렙타비딘 2차 항체 (Jackson Immunoresearch)를 사용하여 신호를 생성시켰다.

[0431] 경쟁적 ELISA 데이터 (도 1, 패널 A에 제시됨)의 또다른 양상은 항-S1P mAb가 티올화-S1P 유사체를 경쟁 실험에서 첨가된 천연 S1P와 구별할 수 없었음을 나타내는 것이다. 어떠한 이중 결합도 없이 유사체가 구축되었기 때문에 데이터는 항체가 어떠한 산화 생성물도 인식하지 않는다는 것을 또한 나타낸다. 항-S1P mAb를 이중 결합을 함유하는 천연 생성물에 대해 또한 테스트하였고, 이를 48시간 동안 실온에서 착색시켰다. 천연 S1P의 역상 HPLC를 이전에 보고된 방법 ([Deutschman, et al. (July 2003), Am Heart J., vol. 146(1):62-8])에 따라 수행하였고, 결과는 체류 시간에서의 차이를 나타내지 않았다. 추가로, 도 1, 패널 A에서 제시된 각종 지질에 대한 모노클로날 항체의 결합 특성의 비교는 항체가 인식하는 에피토프가 천연 S1P의 이중 결합 영역 내의 탄화수소 사슬을 수반하지 않는다는 것을 가리킨다. 반면에, 모노클로날 항체가 인식하는 에피토프는 스펑고신 염기 골

격상의 아미노 알콜 + 유리 포스페이트를 함유하는 영역이다. 유리 포스페이트가 콜린과 연결되면 (SPC의 경우), 결합이 다소 감소되었다. 아미노 기가 지방산으로 에스테르화되면 (C1P의 경우), 항체 결합이 관찰되지 않았다. 스팽고신 아미노 알콜 골격이 글리세롤 골격으로 교체되면 (LPA의 경우), SIP-특이적 모노클로날 결합을 나타내지 않았다. 이러한 에피토프 지도작성 데이터는 모노클로날 항체가 인식하는 에피토프가 S1P 상에 오직 1개만 있고, 이러한 에피토프는 S1P의 독특한 극성 머리 기에 의해 정의된다는 것을 가리킨다.

[0432]

ELISA 측정을 사용한 유사한 실험에서, 적절한 대조군 물질을 평가하여, 이러한 항-S1P 모노클로날 항체가 단백질 담체 또는 가교제 중 하나를 인식하지 않는다는 것을 확실히 하였다. 예를 들어, 티올화-S1P를 BSA에 접합시키는 것에서 정상적인 가교제 SMCC를 ELISA에서의 레이다운(leydown) 물질로서 IOA로 교환하였다. IOA가 사용되었을 때, 항체의 결합 특성이 BSA-SMCC-티올화-S1P가 사용되었을 때와 거의 동일하였다. 유사하게, KLH를 레이다운 물질로서 티올화-S1P와 복합체를 형성하는 물질로서의 BSA로 교환하였다. 이러한 실험에서, 항체의 결합 특성에서의 현저한 차이가 또한 없었다.

[0433]

결합 키네틱: 자신의 수용체 또는 다른 모이어티에 대한 S1P의 결합 친화력은 지질의 성질로 인해 전통적으로 문제점이었다. 많은 문제점들이 지질의 불용성과 관련되었다. BIACore 측정을 위해, S1P를 BIACore 칩에 직접적으로 고정시킴으로써 이러한 문제점들이 극복되었다. 그후, 항체를 칩의 표면 상에 유동시키고, 광학 밀도에서의 변경을 측정하여, S1P에 대한 항체의 결합 특성을 결정하였다. 항체의 2가 결합 성질을 우회하기 위해, S1P를 낮은 밀도로 칩 상에 코팅하였다. 추가적으로, 칩을 다양한 농도의 S1P (7, 20, 및 1000 RU)로 코딩하였고, 항체 결합 데이터를 전체적으로 1:1 상호작용 모델에 맞췄다. 도 2에 제시된 결과는 S1P에의 3가지 상이한 밀도에서의 S1P에 대한 모노클로날 항체의 결합으로 인한 광학 밀도에서의 변화를 나타낸다. 전반적으로, S1P에 대한 모노클로날 항체의 친화력은 매우 높은 것으로 결정되었고, 결합 데이터를 분석하는데 1가 또는 2가 결합 모델이 사용되었는지에 따라, 약 88 피코몰 (pM) 내지 99 nM 범위였다.

[0434]

실시예 2: ELISA 분석법

[0435]

1. 정량적 ELISA

[0436]

미량역가 ELISA 플레이트 (Costar, 카탈로그 번호 3361)를 1M 카르보네이트 완충제 (pH 9.5)에 희석된 토끼 항-마우스 IgG, F(ab')₂ 단면 특이적 항체 (Jackson, 315-005-047)로 1시간 동안 37°C에서 코팅하였다. 1차 인큐베이션을 위해, 비-특이적 마우스 IgG 또는 인간 IgG, 전체 분자의 희석물 (검정 곡선을 위해 사용됨) 및 측정될 샘플을 웰에 첨가하였다. 플레이트를 세정하고, 100 μl/웰의 HRP-접합 염소 항-마우스 (H+L) 1:40,000 희석물 (Jackson, 카탈로그 번호 115-035-146)와 함께 1시간 동안 37°C에서 인큐베이션하였다. 세정 후, 효소 반응을 테트라메틸벤지딘 (Sigma, 카탈로그 번호 T0440)으로 검출하고, 1M H₂SO₄를 첨가하여 정지시켰다. 광학 밀도 (OD)를 450 nm에서 Thermo Multiskan EX를 사용하여 측정하였다. 미가공 데이터를 분석을 위해 GraphPad 소프트웨어로 옮겼다.

[0437]

2. 직접적 ELISA

[0438]

미량역가 ELISA 플레이트 (Costar, 카탈로그 번호 3361)를 1M 카르보네이트 완충제 (pH 9.5)에 희석된 LPA-BSA로 1시간 동안 37°C에서 코팅하였다. 플레이트를 PBS (137 mM NaCl, 2.68 mM KCl, 10.1 mM Na₂HPO₄, 1.76 mM KH₂PO₄; pH 7.4)로 세정하고, PBS/BSA/트윈-20으로 1시간 동안 실온에서 또는 하룻밤 동안 4°C에서 차단하였다. 테스트할 샘플을 0.4 μg/ml, 0.2 μg/ml, 0.1 μg/ml, 0.05 μg/ml, 0.0125 μg/ml, 및 0 μg/ml로 희석하고, 100 μl를 각각의 웰에 첨가하였다. 플레이트를 세정하고, 100 μl/웰의 HRP-접합 염소 항-마우스 (1:20,000 희석물) (Jackson, 카탈로그 번호 115-035-003)와 함께 1시간 동안 실온에서 인큐베이션하였다. 세정 후, 효소 반응을 테트라메틸벤지딘 (Sigma, 카탈로그 번호 T0440)으로 검출하고, 1M H₂SO₄를 첨가하여 정지시켰다. 광학 밀도 (OD)를 450 nm에서 Thermo Multiskan EX를 사용하여 측정하였다. 미가공 데이터를 분석을 위해 GraphPad 소프트웨어로 옮겼다.

[0439]

3. 경쟁 분석법

[0440]

mAb의 특이성을 ELISA 분석법에서 테스트하였다. 미량역가 ELISA 플레이트 (Costar, 카탈로그 번호 3361)를 1M 카르보네이트 완충제 (pH 9.5)에 희석된 18:0 LPA-BSA로 37°C에서 1시간 동안 코팅하였다. 플레이트를 PBS (137 mM NaCl, 2.68 mM KCl, 10.1 mM Na₂HPO₄, 1.76 mM KH₂PO₄; pH 7.4)로 세정하고, PBS/BSA/트윈-20으로 1시간 동안 실온에서 또는 하룻밤 동안 4°C에서 차단하였다. 1차 인큐베이션을 위해, 0.4 μg/ml 항-LPA mAb 및 지

정된 양의 (14:0, 16:0, 18:0, 18:1, 18:2 및 20:4) LPA, DSPA, 18:1 LPC (라이소포스파티딜콜린), S1P, 세라마이드 및 세라마이드-1-포스페이트를 ELISA 플레이트의 웰에 첨가하고, 37°C에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 플레이트를 세정하고, 100 μl /웰의 HRP-접합 염소 항-마우스 (1:20,000 희석물) (Jackson, 카탈로그 번호 115-035-003) 또는 HRP 접합 염소 항-인간(HH) 1:50,000 희석물 (Jackson, 카탈로그 번호 109-035-003)과 함께 1시간 동안 실온에서 인큐ベ이션하였다. 세정 후, 효소 반응을 테트라메틸벤지딘으로 검출하고, 1M H_2SO_4 를 첨가하여 정지시켰다. 광학 밀도 (OD)를 450 nm에서 Thermo Multiskan EX를 사용하여 측정하였다. 미가공 데이터를 분석을 위해 GraphPad 소프트웨어로 옮겼다.

[0441] 실시예 3: 스팽고맵 뮤린 mAb은 S1P에 대해 고도로 특이적이다

경쟁적 ELISA에서 다른 생체활성 지질과 비교하여 S1P에 대한 스팽고맵의 특이성이 나타났다. 스팽고맵은 S1P의 직접적인 대사 전구물질인 스팽고신 (SPH), 또는 S1P와 구조적 및 기능적으로 유사한 중요한 세포외 신호전달 분자인 라이소포스파티드산 (LPA)에 대해 교차반응성을 나타내지 않았다. 스팽고맵은 세라마이드-1-포스페이트 (C1P), 디히드로스팡고신 (DH-SPH), 포스파티딜 세린 (PS), 포스파티딜 에탄올아민 (PE), 또는 스팽고마이엘린 (SM)이 포함되는 또 다른 구조적으로 유사한 지질 및 대사물을 인식하지 않았다. 스팽고맵은 디히드로스팡고신-1-포스페이트 (DH-S1P)와 교차반응하였고, 더 적은 정도로 스팽고실포릴 콜린 (SPC)과 교차반응하였다 (도 3).

[0443] 실시예 4: 스팽고맵이 CNV의 뮤린 모델에서 CNV 및 흉터 형성을 현저하게 감소시킨다

암컷 C57BL6/J 마우스의 브루크 막을 레이저-유도 파열시키고, 마우스에게 2 μl 의 생리식염수에 희석된 0.5 μg 의 스팽고맵 또는 이소타입-매칭 비-특이적 (NS) 항체를 투여하였다. 레이저 파열 14일 및 28일 후에 마우스를 희생시켰다.

CNV 병변을 유도하기 위해, 안과용 트로피카미드 (0.5%) 및 페닐에프린 (2.5%)으로 동공을 확장시켰다. 커버글래스를 눈 위에 놓았다. 50 μm 스팽 크기로 150 mW에서 100 msec 펄스를 전달하도록 설정된 슬릿 램프에 커플링된 Oculight GL 532 nm (Iridex Corporation, Mountain View, CA)를 사용하여, 9시, 12시 및 3시 위치에서 시신경유두로부터 약 50 μm 에 위치한 오른쪽 눈의 3개의 사분원에서 브루크 막을 파열시켰다. 모든 사례에서 왼쪽 눈은 손상되지 않은 대조군으로서 작용하였다. 기포가 회합되지 않은 임의의 병변 또는 융합성이 된 병변은 분석에서 제외하였다.

CNV 병변 크기를 측정하기 위해, 공막-맥락막-RPE 복합체의 맥락막 플랫마운트(flatmount)를 제조하고, 혈관구조 (리시누스 코뮤니스 응집소 I; 적색) 및 혈관주위세포 (CD140b; 녹색)에 대해 염색하였다. RGB Spot 고해상도 디지털 카메라 및 레이저 스캐닝 공초점 현미경 (BioRad MRC 1024, BioRad Corporation, Temecula, CA)과 함께 형광 Zeiss Axioplan 2를 사용하여 디지털 영상을 포착하였다. 부피 분석을 위해, z-시리즈 포착을 사용하였고, z-시리즈 전반에 걸친 병변 면적의 합계에 z 두께 (4 μm)를 곱하여, 병변 부피를 수득하였다.

콜라겐 침착을 평가하기 위해, 공막-맥락막-RPE 복합체를 매이슨 트리크롬으로 염색하였다. 공막-맥락막-RPE 복합체를 파라핀에 매립한 후, 6 마이크로미터의 두께로 연속적으로 절편화하였다. 병변 당 약 30개의 절편이 평가되었다. CNV 병변 부피에 대해 기술된 것과 유사한 방식으로 콜라겐 침착 부피의 정량을 계산하였다.

포착된 디지털 영상을 ImageJ 소프트웨어 (Research Services Branch, National Institutes of Health, Bethesda, MD)를 사용하여 형태계측적으로 평가하였다. 도 4A는 스팽고맵이 뮤린 CNV 병변 형성 모델에서 브루크 막을 레이저-유도 파열시키고 나서 14일 및 28일 후에 맥락막 혈관신생을 극적으로 감소시킨다는 것을 나타낸다. 도 4B는 스팽고맵이 브루크 막을 레이저-유도 파열시키고 나서 28일 후 CNV 병변 형성과 관련된 섬유증을 현저하게 감소시킨다는 것을 나타낸다.

[0449] 실시예 5: 스팽고맵이 내피 세포 이동 및 관 형성의 억제를 포함하는 다중 메커니즘을 통해 혈관신생을 억제한다

S1P은 인간 배꼽 정맥 내피 세포 (HUVEC)의 이동을 촉진하고, 매트리겔 및 기타 분석법에서, 시험관내에서 드노보(de novo) BV 형성을 촉진한다; 스팽고맵은 S1P의 이러한 효과를 중화할 수 있다. [Visentin et al. (Cancer Cell 2006 Mar;9(3):225-38)]에 기술된 바와 같이 실험을 수행하였다. 도 5A의 데이터는 GF-감소 트리겔 상에 과종된 HUVEC이 S1P의 존재 하에 다중 혈관-유사 구조물을 형성하였고, S1P의 부재 하에 또는 스팽고맵 및 S1P와 공동-인큐베이션되었을 때 혈관-유사 구조를 형성하는데 실패하였음을 시사한다. 도 5B의 데이터는 매트리겔 화학침습 분석법에서, 처리되지 않은 HUVEC, 또는 스팽고맵과 함께 인큐베이션된 HUVEC에 비해

2-2.5배로 HUVEC 이동을 자극하는 $0.1\text{-}1 \mu\text{M}$ S1P의 강력한 능력을 시사한다. 공동으로, 이러한 연구들은 스팽고맵이 EC에 대한 S1P의 전-혈관형성성 효과를 효율적으로 완화할 수 있다는 것을 나타낸다.

[0451] 실시예 6: 스팽고맵이 생체 내에서의 S1P, VEGF 및 bFGF의 효과의 완화를 포함하는 다중 메커니즘을 통해 혈관신생을 억제한다

S1P가 피하 이식된 매트리젤 플러그 내로의 내피 모세혈관 성장을 증가시켰음을 나타내는 생체내 연구를 기초로, 본 발명가들은 스팽고맵이 생체내에서 디노보 BV 형성을 감소시킬 수 있을 것으로 추측하였다. 이를 연구하기 위해, 본 발명가들은 혈관신생에 대한 생체내 매트리젤 플러그 분석법을 사용하였다. 한 실험 셋트에서, 매트리젤에 $1 \mu\text{M}$ S1P, $0.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ bFGF 또는 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ VEGF 중 하나를 보충한 후, 마우스 ($n=4$) 내로 정맥 내 주사하였다. 10일 후, 마우스를 헤파린으로 처리하고, 성장 중인 BV를 형성하는 혈관 EC가 발현한 부착 분자에 결합하는 형광 렉틴인 이소렉틴(Isolectin) B4-FITC를 주사하였다. 그후, 플러그를 절제하고, OCT에서 동결시키고, 절편화하여, FITC-염색 BV에 대해 검토하였다. 도 6A의 데이터는, bFGF 또는 VEGF를 함유하는 플러그와 비교하여 S1P를 함유하는 플러그에서의 FITC-염색 BV의 막대한 양으로 입증되는 바와 같이, S1P가 bFGF 또는 VEGF ([Lee, et al., (1999), Biochem Biophys Res Commun., vol 264: 743-50])보다 생체내 혈관신생의 더욱 강력한 자극인자라는 것을 나타낸다.

그후, 플러그들의 절편을 EC 침윤의 평가를 위해 혜모톡실린 & 에오신으로 염색하였다 (도 6B). EC의 침윤은 혈관신생에서의 결정적인 단계이다. S1P를 함유하는 플러그에서는 매트리젤 단독 플러그와 비교하여 EC 침윤이 3배 증가하였다. 본 발명가들은 다른 세포 유형 예컨대 면역 세포가 또한 염색될 수 있다는 것을 인지하였지만, 세포 침윤은 EC인 것으로 가정된다. 48시간마다 스팽고맵이 전신 투여 (플러그 이식 1일 전에 시작됨)된 마우스는 S1P이 매트리젤 플러그에 첨가된 경우에도 감소된 양의 EC 침윤을 나타냈다. 이러한 결과는 생체내 EC 침윤을 억제하는 스팽고맵의 능력을 나타낸다.

혈액 및 주변 조직으로부터의 내인성 S1P가 상처에 전-혈관형성성 자극을 공급할 수 있다. 상처 내의 내인성 S1P를 감소시키는 스팽고맵의 능력을 연구하였다. 최적으로 자극된 플러그 ($0.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ bFGF 또는 $10 \text{ mg}/\text{ml}$ VEGF로 자극된 매트리젤)을 마우스 내로 이식하였다. 매트리젤 이식 1일 전에 시작하여 48시간마다 마우스에게 $25 \text{ mg}/\text{kg}$ 스팽고맵 또는 염수를 복강내 주사하였다. 각각의 처리군 (매트리젤, 매트리젤 + GF, 또는 매트리젤 + GF 및 투여된 스팽고맵)은 최소 6마리의 마우스로 구성되었다. 10일 후, 마우스를 헤파린으로 처리하고, 이소렉틴 B4-FITC를 주사하고, 플러그를 절제하고, OCT 동결 배지에 매립하고, 절편화하였다. 미세혈관 밀도를 도 6C에 나타난 바와 같이 렉틴-FITC 염색 혈관에 의해 정성적으로 평가하였다. BV 염색이 대조군 (미처리) 플러그에서는 산발성이 반면, bFGF 또는 VEGF를 함유하는 플러그는 혈관화의 현저한 증거를 나타냈다. 스팽고맵으로 처리된 마우스로부터의 플러그는 염수-처리 마우스로부터의 bFGF 또는 VEGF 플러그와 비교하여 BV 형성에서의 현저한 감소를 나타냈다. 염색된 혈관의 정량은 염수로 처리된 동물과 비교하여 스팽고맵으로 처리된 동물로부터의 VEGF- 또는 bFGF-함유 플러그의 혈관신생에서 5 내지 8.5배의 감소를 각각 나타냈다 (도 6C). 이러한 평가는 미세혈관화를 강화시키는 내인성 혈청 및 조직 S1P의 능력, 뿐만 아니라 내인성 S1P의 전-혈관형성성 효과를 중화시키는 스팽고맵의 능력을 또한 나타낸다.

[0455] 실시예 7: 스팽고맵이 생체내 흉터 형성을 억제한다

S1P는 섬유모세포 이동, 증식 및 콜라겐 생산을 활성화시킴으로서 상처 치유에 깊게 기여한다; 스팽고맵은 이러한 효과를 중화시킨다. 다중 유형의 섬유모세포를 사용하는 여러 연구에서, 상처 치유를 촉진하는 S1P의 능력이 확증되었다: 1) 표준 방법을 사용하는 ^3H -티미딘 혼입에 의해 측정된 바와 같이 S1P는 스위스-3T3 섬유모세포 증식을 증가시켰고 (도 7A); 2) S1P는 표준 소창 치유 분석법에서 심장 섬유모세포의 이동을 촉진하였고 (도 7B); 3) 면역형광 현미경에 의해 지시되는 바와 같이 S1P는 콜라겐 1a GFP 리포터가 있는 트랜스제닉 마우스로부터 단리된 심장 섬유모세포에 의한 콜라겐 발현을 촉진하였으며 (도 7C); 4) 면역블롯 분석을 사용한 근육섬유모세포 마커 단백질인 평활근 액틴의 증가된 발현에 의해 지시되는 바와 같이, S1P는 WI-38 폐 섬유모세포의 근육섬유모세포 (흉터 리모델링에서 활성인 세포)로의 분화를 유도하였다 (도 7D). 각각의 이러한 분석법에서, 스팽고맵이 S1P를 중화하였다. 눈 섬유모세포가 S1P 및 스팽고맵에 유사하게 응답할 것으로 예상된다. 심혈관 질환과 AMD의 신생혈관 병변 간의 유사성 (흉터 리모델링 및 이어지는 부적응성 섬유성 조직 형성 포함)이 주목되었다 ([Vine, et al. (2005), Ophthalmology., vol 112: 2076-80] 및 [Seddon and Chen (2004), Int Ophthalmol Clin., vol 44: 17-39]); 따라서, 스팽고맵에는 심혈관계에서 나타난 것과 유사한 눈 혈관신생 및 흉터생성에 대한 효과가 있을 것으로 여겨진다.

마우스의 좌측 하행 심장 동맥의 결찰을 통한 영구적인 심근 경색증 (MI) 후의 심장 흉터 형성을 감소시키는 것

에 대한 스팽고맵의 효능을 연구에서 평가하였다. 수술 48시간 후에 25 mg/kg 스팽고맵 또는 염수의 전신 투여를 시작하였다. 초기 리모델링 단계 동안 정상적인 수복성 흉터 형성이 일어나도록 하고, MI 직후 이로운 S1P-자극 혈관형성을 허용하도록 48시의 항체 투여가 선택되었다. 경색 2주 후, 마우스를 희생시키고, 섬유증을 심장 조직의 매이슨 트리크롬 염색에 의해 평가하였다. 스팽고맵 처리를 받은 동물들은 혈관주위 섬유증의 거의 완전한 폐지를 나타냈다 (도 7, 사진). 임의의 비-특이적 상처-치유 응답에 대한 대조군으로서, 모의(sham) 동물을 심장 동맥 결찰 없이 개흉시켰다 (도 7E).

실시예 8: S1P가 눈 상피 세포 및 섬유모세포의 수축성 흉터 조직-생산 근육섬유모세포로의 전환을 촉진한다

[0458] 병리학적 조직 섬유증 (흉터 형성)은 연령-관련 황반 변성, 당뇨병성 망막병증, 미숙아 망막병증, 중식성 유리체망막병증 및 녹내장 수술 결과를 포함하는 다수의 눈 장애의 1차적인 기여 인자이다.

[0459] [0460] 다수의 이러한 장애에서, 순환 성장 인자 및 케모카인이 정상적인 눈 세포가 "근육섬유모세포"로 명명된 섬유수축성 흉터 조직-생산 세포로 전환되는 것을 촉진한다. 정상적으로, 근육섬유모세포는 수술 후의 상처 치유 응답의 일부로서 조직 복구를 담당한다. 그러나, 근육섬유모세포의 변형된 개수 및 기능이 간, 피부, 폐, 신장, 심장 및 눈에서의 병리학적 흉터 조직 형성을 특징으로 하는 질환에서 연루된다. 눈에서, 망막 색소 상피 (RPE) 세포의 근육섬유모세포 표현형으로의 전환은 섬유-수축성 막의 형성에 연결되고, 이는 망막 박리 및 이어지는 시력 손상을 야기한다. 또한, 눈 섬유모세포의 근육섬유모세포 전환은 눈 손상 후 비정상적인 흉터 조직 생산을 초래하여, 이어서 시력 상실에 이를 수 있다. 근육모세포 형성을 촉진하는 다수의 눈 내의 순환 단백질 인자가 확인되었지만, 이러한 프로세스에서의 라이소지질 예컨대 S1P의 역할에 관해서 알려진 것이 없다. 따라서, 본 발명가들은 여러 인간 눈 세포주의 근육섬유모세포 전환에 대한 S1P의 효과를 시험하였다. 도 8에 나타난 바와 같이, S1P는 인간 망막 색소 상피 세포 (도 8A) 및 인간 결막 섬유모세포 (도 8B)에서 α -평활근 액틴 (α -SMA; 근육섬유모세포 마커)의 생산을 자극하였다. 이러한 데이터는 S1P가 눈 상피 세포 및 섬유모세포가 망막 박리, 눈 섬유증 및 이어지는 시력 손상에 기여할 수 있는 수축성 흉터 조직-생산 근육섬유모세포로 전환되는 것을 촉진하는 순환 화학 인자들의 환경 중에 있다는 것을 최초로 나타낸다.

[0461] 이러한 실험에서, α -SMA 발현을 촉진하는 S1P의 능력은 망막 색소 상피 세포와 결막 섬유모세포 간에 농도 의존적인 방식으로 상이하였다. 나타난 바와 같이, α -SMA 발현에서의 현저한 증가가 상피 세포에서 0.001 μ M 농도에서 관찰되었고, 그후, 이는 10 μ M 농도에서 기저 수준으로 감소되었다. 반면에, α -SMA 발현에서의 현저한 증가가 결막 섬유모세포에서는 10 μ M 농도에서만 관찰되었다. 이러한 차이는 섬유모세포와 비교하여 상피 세포에서의 증가된 S1P 수용체 발현으로부터 초래되는 것으로 여겨진다. 증가된 S1P 수용체 발현 수준으로 인해, 망막 색소 상피 세포는 낮은 농도에서 S1P에 더욱 민감할 것이다. 반면에, 높은 S1P 수준에서는, 수용체가 감작되거나, 또는 가능하게는 심지어 내재화되어, S1P에 의한 감소된 자극에 이른다.

[0462] 콜라겐은 신체 내의 모든 조직을 지지하는 1차적인 구조 단백질들 중 하나이고, 흉터 조직의 주요 성분 중 하나이다. 비-병리학적 환경에서, 섬유모세포에 의한 콜라겐 생산과 특정 효소에 의한 분해 간의 균형을 통해 조직 내의 전체 콜라겐 함량이 유지된다. 증가된 수준의 흉터 조직을 수반하는 다수의 장애는, 부분적으로, 흉터 형성에 필요한 콜라겐의 분해를 억제하는 생리적 및 분자성 프로세스로부터 초래된다. 흉터 조직 형성을 촉진하는 S1P의 능력이 콜라겐 분해를 억제함으로써 기관 내의 흉터 조직의 순수 증가에 이르게 하는 이의 능력으로부터 초래될 수 있는 것으로 가정되었다. 따라서, 인간 결막 섬유모세포 내의 플라스미노겐 활성화제 억제제 (PAI-1)의 발현에 대한 S1P의 효과를 시험하였다. 증가된 PAI-1 발현은 결합 조직의 단백질분해성 분해에서의 감소와 상관되고, 증가된 흉터생성을 수반하는 여러 섬유성 질환과 관련되어 상향조절된다. 도 8C에 나타난 바와 같이, S1P는 용량-의존적 방식으로 PAI-1 발현을 자극하였다. 이러한 데이터는 분해를 억제하는 단백질을 발현을 자극함으로써 흉터 조직 형성을 또한 촉진할 수 있다는 것을 시사하여, S1P가 눈 질환과 관련된 병리학적 흉터생성을 촉진하고 유지시키는 여러 기계적 경로를 통해 기능한다는 것을 시사한다.

실시예 9: 스팽고맵이 염증성 및 면역 세포 침유를 억제한다

[0463] [0464] 염증은 리모델링 프로세스에서의 1차 응답이다. 이는 혀혈 및 세포성 손상 양쪽 모두에 의해 유발되고, 사이토카인 발현의 상향조절을 초래하며, 상기 사이토카인은 죽은 세포의 포식작용 및 염증성 응답의 추가적인 상향조절을 위해 손상된 영역으로의 대식 세포 및 중성구의 이동을 자극한다 ([Jordan, et al.(1999), Cardiovasc Res., vol 43: 860-78]). 비만 세포 또한 염증성 응답의 중요한 세포성 매개물이다. 비만 세포로부터 방출된 S1P는 염증의 실험 동물 모델에서 보이는 다수의 불리한 응답을 담당한다 ([Jolly, et al (2004), J Exp Med., vol 199: 959-70] 및 [Jolly et al (2005), Blood,, vol 105: 4736-42]).

[0465]

CNV 및 CVD에서의 면역 응답 및 염증성 응답의 유사성을 기초로, 상처 내로의 면역 세포 침윤을 완화하는 스팽고맵의 효능을 AMD 동안의 이러한 손상을 완화하는데 있어서의 스팽고맵의 잠재적인 효과의 지표로서 뮤린 경색 모델에서 평가하였다 ([Vine, et al. (2005), Ophthalmology, vol 112: 2076-80]; 및 [Seddon and Chen (2004), Int Ophthalmol Clin., vol 44: 17-39]). MI 4일 후, 대식세포 및 비만 세포 침윤을 위험 영역 내에서 각각 MAC-1 및 MCG35 항체를 사용하여 평가하였다. 스팽고맵은 염증성 대식세포 (도 9A) 및 비만 세포 (도 9B)의 밀도를 극적으로 감소시켰고, 이는 스팽고맵이 AMD 동안의 면역 및 염증성 손상을 중화시킬 수 있다는 것을 시사한다.

[0466]

실시예 10: S1P 뮤린 모노클로날 항체 (LT1002; 스팽고맵)의 가변 도메인의 클로닝 및 특성화

[0467]

본 실시예에서는 S1P에 대한 뮤린 mAb의 클로닝이 보고된다. 전반적인 전략은 경쇄 (VL) 및 중쇄 (VH) 양쪽 모두의 뮤린 가변 도메인을 클로닝하는 것으로 구성되었다. 306D VH의 컨센서스 서열은 불변 영역 단편이 감마 2b 이소타입과 일치함을 나타낸다. 뮤린 가변 도메인들을 경쇄의 불변 도메인 (CL) 및 중쇄의 불변 도메인 (CH1, CH2, 및 CH3)과 함께 클로닝하여, 키메라 항체 구축물이 생성되었다.

[0468]

1. 뮤린 mAb의 클로닝

[0469]

항-S1P 하이브리도마 세포주 306D326.1 (ATCC#SD-5362)로부터의 클론을 DMEM (둘베코 변형 이글 배지 + GlutaMAX™ I, 4500 mg / l D-글루코스, 피루브산나트륨; Gibco/Invitrogen, Carlsbad, CA, 111-035-003), 10% FBS (무균성 태아 클론 I, Perbio Science), 및 1X 글루타민/페니실린/스트렙토마이신 (Gibco/Invitrogen)에서 성장시켰다. RNeasy Mini 키트 (Qiagen, Hilden Germany)를 기초로 하는 절차를 사용하여 전체 RNA를 10^7 개의 하이브리도마 세포로부터 단리하였다. 제조업자의 프로토콜 (제1 가닥 합성 키트, Amersham Biosciences)에 따라 RNA를 사용하여 제1 가닥 cDNA를 생성시켰다.

[0470]

MHV7 프라이머 (MHV7: 5'-ATGGRATGGAGCkgGRTCTTMTCTT-3' [서열 1])를 IgG2b 불변 영역 프라이머 MHCG1/2a/2b/3 혼합물 (MHCG1: 5'-CAGTGGATAGACAGATGGGG-3' [서열 2]; MHCG2a: 5'-CAGTGGATAGACCGATGGGC-3' [서열 3]; MHCG2b: 5'-CAGTGGATAGACTGATGGGG-3' [서열 4]; MHCG3: 5'-CAAGGGATAGACAGATGGGC-3' [서열 5])와 조합하여 사용하여 면역글로불린 중쇄 가변 영역 (VH) cDNA를 PCR에 의해 증폭시켰다. 반응 생성물을 TOPO-TA cloning® 키트 및 서열을 사용하여 pCR2.1®-TOPO® 벡터 (Invitrogen) 내로 결찰시켰다. 그후, 중쇄의 가변 도메인을 이러한 벡터로부터 PCR에 의해 증폭시키고, Hind III 및 Apa I 단편으로서 HCMV 프로모터, 리더 서열 및 감마-1 불변 영역을 함유하는 발현 벡터 pG1D200 (미국 특허 번호 7,060,808 참조) 또는 pG4D200 (동일) 내로 삽입 및 결찰시켜, 플라스미드 pG1D200306DVH를 생성시켰다 (도 10). 306D V_H의 컨센서스 서열 (하기에 제시됨)은 불변 영역 단편이 감마 2b 이소타입과 일치하였음을 나타냈다.

[0471]

유사하게, MKV 20 프라이머 (5'-GTCTCTGATTCTAGGCC-3' [서열 6])를 카파 불변 영역 프라이머 MKC (5'-ACTGGATGGTGGGAAGATGG-3' [서열 7])와 조합하여 사용하여 면역글로불린 카파 사슬 가변 영역 (VK)을 증폭시켰다. 이러한 반응의 생성물을 TOPO-TA cloning® 키트 및 서열을 사용하여 pCR2.1®-TOPO® 벡터 내로 결찰시켰다. 그후, 경쇄의 가변 도메인을 PCR에 의해 증폭시킨 후, Bam HI 및 Hind III 단편으로서 HCMV 프로모터, 리더 서열, 및 인간 카파 불변 도메인을 함유하는 발현 벡터 pKN100 (미국 특허 번호 7,060,808 참조) 내로 삽입하여, 플라스미드 pKN100306DVK를 생성시켰다.

[0472]

중쇄 및 경쇄 플라스미드 pG1D200306DVH + pKN100306DVK를 DH4a 박테리아 내로 형질전환시키고, 글리세롤 내에 보관하였다. 대규모 플라스미드 DNA를 제조업자 (Qiagen, 내독소가 없는 MAXIPREP™ 키트)가 기술한 바와 같이 제조하였다. Qiagen의 퀴아프렙 (QIAprep) 스핀 미니프렙 키트 또는 엔도프리 (EndoFree) 플라스미드 메가/맥시 키트를 사용하여 정제된 DNA 샘플을 ABI 3730x1 자동화 서열분석기를 사용하여 서열분석하였고, 상기 분석기는 형광 신호를 상응하는 핵염기 서열로 또한 번역한다. 수득된 서열이 중첩되도록 5' 및 3' 말단에서 프라이머들을 디자인하였다. 프라이머의 길이는 염기 18-24개였고, 바람직하게는, GC 함량이 50%였고 예상되는 이량체 또는 2차 구조가 없었다. 스팽고맵™으로부터의 마우스 V_H 및 V_L 도메인에 대한 아미노산 서열은 각각 서열 8 및 9이다 (표 2). CDR 장기 ([Kabat, EA (1982), Pharmacol Rev, vol. 34: 23-38 참조)가 표 2에서 밀줄그어지고, 표 3에서 하기에 별도로 제시된다.

표 2

뮤린 mAb 스피고맵™으로부터의 V_H 및 V_L 도메인

마우스 V_H 도메인	QAHLQQSDAELVKPGASVKISCKVSGFIFIDHTIHWMKQRPEQG LEWIGCISPRHDITKYNEMFRGKATLTADKSSTTAYIQVNNSLTF EDSAVYFCARGGFYGSTIWFDFWGQGTTLTVS	서열 8
마우스 V_L 도메인	ETTVTQSPASLSMAIGEKVTIRCITTTDIDDDMNWFQOKPGEPPNLLISE GNILRPGVPSRFSSSGYGTDFLFTIENMLSEDVADYYCLQSDNL_PFTFGS GTKLEIK	서열 9

[0473]

표 3

마우스 V_H 및 V_L 도메인의 마우스 스피고맵™ CDR 서열

V_L CDR	CDR
ITTTDIDDDMN (서열 10)	CDR1
EGNILRP (서열 11)	CDR2
LQSDNLPFT (서열 12)	CDR3
V_H CDR	
DHTIH (서열 13)	CDR1
CISPRHDITKYNEMFRG (서열 14)	CDR2
GGFYGSTIWFDF (서열 15)	CDR3

[0474]

[0475] 여러 키메라 항체 가변 (V_H 및 V_L) 도메인의 아미노산 서열들이 표 4에서 비교된다. 이러한 변이체들을 Lonza 발현 벡터에서 클로닝하였다. 뮤린 V_H 및 V_L 도메인의 서열을 사용하여, 어떤 프레임워크 잔기가 인간화 항체 내로 혼입되어야 하는지를 결정하기 위한 분자 모델을 구축하였다.

표 4

V_H 변이체	인간화 항-S1P 항체 변이체로부터의 인간화 V_H 및 V_L 도메인의 아미노산 서열
PATH200	
서열 16	mgstailalllavlggvsevqlvalgasgavkkgeslkliscqsfgyifidhtihwvrrmpggglewmngcisprrhditkyn
PATH201f.....m.....j.....m.....
PATH202f.....m.....j.....m.....
PATH203i.....i.....i.....i.....
PATH204f.....f.....m.....i.....
PATH205f.....m.....i.....
PATH206a.....f.....m.....i.....
PATH207m.....a.....a.....
이어지는 서열	
PATH200 이어짐	emfrgqvitisadksstaylorlqssikasdtamyfcarggfygstiwtdfwoggtmvttssastkgps
PATH201
PATH202
PATH203
PATH204
PATH205a.1.....
PATH206a.1.....
PATH207

[0476]

표4 이어 짐	
Vi	변이 케
pATH300 (서열 17)	mdmrvpaqlqlilllwlp гаретти tqspfslasavgdrvtticittddamwyqgepgkapkliyegnirpgv
pATH301
pATH302 f
pATH303 v
pATH304
pATH305 v
pATH306 v
pATH308 v
pATH309 s
이어지는 서열	
pATH300 이어짐	psrfsgsgsqtdftlisklpedfatyyclqsdnlptffoggkleikrewip
pATH301
pATH302
pATH303 -
pATH304
pATH305 --
pATH306 s
pATH308 s ..y ..
pATH309 s ..y ..

[0477]

[0478]

상응하는 뉴클레오티드 서열이 표 5에서 제시된다:

표 5

pATH 및 CDR 서열

명칭	서열	서열 번호
CDR1 V _L :	ataaccaccactgatattgtatgtatgtatgaac	18
CDR2 V _L :	gaaggcaatattcttcgtccct	19
CDR3 V _L :	ttgcagagtataacttaccattcacg	20
CDR1 V _H :	gaccatacttcac	21
CDR2 V _H :	tgtatttctcccaagacatgatattactaaatacatgatggatgttcaggggc	22
CDR3 V _H :	ggggggttctacggtagtactatctggtttgacttt	23
CDR2 V _H (pATH 207):	gctatttctcccaagacatgatattactaaatacatgatggatgttcaggggc	24
pATH200 뉴클레오티드 서열	cgccaagcttgcgcaccatgggtcaaccgcacatcctgcgcctctctcg gctgttctccaaaggagtctgtccggagggtgcagctggcgactctggaggcag aggtaaaaaagccggggaggtctcaagatctctgtcagagtttggatata atcttatgcaccatacttcactgggtgcgcagatgcggggcaaggcctg gagttggatgtatattctcccaagacatgatattactaaatacatgatggatgtca ggggccaggcaccatctcagccgacaagtcgcagcgcaccgcctacttgc atggagacgcctgaaggcctcgagacaccgcgtatattctgtcgagag gggggttctacggtagtactatctggtttgactttggggcaagggacaatgt gtcaccgtcttcagccctccacaaggccatcg	25
pATH207 뉴클레오티드 서열	cgccaagcttgcgcaccatgggtcaaccgcacatcctgcgcctctctcg gctgttctccaaaggagtctgtccggagggtgcagctggcgactctggaggcag aggtaaaaaagccggggaggtctcaagatctctgtcagagtttggatata atgcaccatacttcactggatgcgcagatgcggggcaaggcctgaggatg gatggggctatattctcccaagacatgatattactaaatacatgatggatgtca ggggccaggcaccatctcagccgacaagtcgcagcgcaccgcctacttgc gttggagcagctgaaggcctcgagacaccgcgtatattctgtcgagag gggggttctacggtagtactatctggtttgactttggggcaagggacaatgt caccgtcttcagccctccacaaggccatcg	26
pATH207 아미노산 서열	mgstailalllavlqvgvcsevqlvqsgaevkkpgeslkiscqsfgiyifidhi hwmrqmpqglewmqaisprhditky nemfrgqvtisadkssstaylq wsslksd tamyfcarggfysti wfdwgqqtmtvssastkgps	27
pATH300 뉴클레오티드 서열	cgccaagcttgcgcaccatggacatgagggccccgtcagctctcg gctcctgtctgtccgtcccaagggtgcacatgtgaaacgcacactcaccgc tctccatcttcctgtctgcacatctgttagggagacagactcaccatcacataacca ccactgatattgtatgtatgatataactgttatcagcaggaaaccaggaaaagc ccctaagctctgtatctatgaaaggcaatattctctgtctgggtccatcaag gttcacgcgcagtggtatctgcacagattcacttcaccatcagaatattgc agcctgaagatttgcaacttattactgttgcagatgtataacttaccatcag ttcggccaagggaccaagctggagatcaaactgtgagtgatcccgc	28
pATH308 뉴클레오티드 서열	cgccaagcttgcgcaccatggacatgagggccccgtcagctctcg gctcctgtctgtccgtcccaagggtgcacatgtgaaacgcacactcaccgc gttccatcttcctgtctgcacatctgttagggagacagactcaccatcactgcata accaccaactgatattgtatgtatgatataactgttatcgcacaggaaaccaggaa aagcccctaagctctgtatctccgaaggcaatattctctgtctgggtccat caagattcagcgcagtggtatggcagatgtataacttaccatcagcaaa ttcgcactgtcaagatttgcaacttattactgttgcagatgtataacttaccatt cactttcggccaagggaccaagctggagatcaaactgtgagtgatcccgc	29
pATH308 아미노산 서열	mrvpaqllglilllwlp garcettvtqspfslasavgrv titcittiddmn wfqepgkapkllisegnirlpvgpvpsrfsssgygtdf tltisklqpedfatyycl qsdnlptfgqgtkleik	30

[0479]

2. 키메라 항체의 발현 및 결합 성질

pG1D200306DVH + pKN100306DVK 양쪽 모두의 중쇄 및 경쇄 플라스미드를 DH4a 박테리아 내로 형질전환시키고, 글리세롤 내에 보관하였다. 대규모 플라스미드 DNA를 제조업자 (Qiagen, 내독소가 없는 MAXIPREP™ 키트 카탈로그 번호 12362)가 기술한 바와 같이 제조하였다.

비-인간 포유류 시스템에서의 항체 발현을 위해, 플라스미드들을 각각의 플라스미드 10 μg 을 사용하여 전기천공 (0.7 $\text{m}\ell$, 10^7 개의 세포/ $\text{m}\ell$)에 의해 아프리카 녹색 원숭이 신장 섬유모세포 세포주 COS 7 내로 형질감염시켰다. 형질감염된 세포를 8 $\text{m}\ell$ 의 성장 배지에 4일 동안 풀레이팅하였다. 키메라 306DH1 × 306DVK-2 항체가 일시적으로 공동-형질감염된 COS 세포 컨디셔닝 배지에서 1.5 $\mu\text{g}/\text{m}\ell$ 로 발현되었다. S1P에 대한 이러한 항체의 결합을 S1P ELISA를 사용하여 측정하였다.

키메라 항체의 발현 수준을 하기와 같이 정량적 ELISA에서 결정하였다. 미량역가 플레이트 (Nunc MaxiSorp 면역플레이트, Invitrogen)를 PBS 내에 희석된 0.4 $\mu\text{g}/\text{m}\ell$ 염소 항-인간 IgG 항체 (Sigma, St. Louis, MO)의 100

μl 분취량으로 코팅하고, 4°C에서 하룻밤 동안 인큐베이션하였다. 그후, 플레이트를 200 μl /웰의 세정 완충제 (1 × PBS, 0.1% TWEEN)로 3회 세정하였다. 각각의 희석된 혈청 샘플 또는 융합 상등액의 200 μl 분취량을 독소로 코팅된 플레이트로 옮기고, 37°C에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 완충 세정제로의 6회의 세정 후, 염소 항-인간 카파 경쇄 과산화효소 접합체 (Jackson Immuno Research)를 각각의 웰에 1:5000 희석으로 첨가하였다. 1시간 동안 실온에서 반응을 수행하고, 플레이트를 세정 완충제로 6회 세정하고, 150 μl 의 K-BLUE 기질 (Sigma)을 각각의 웰에 첨가하고, 암실에서 실온에서 10분 동안 인큐베이션하였다. 50 μl 의 RED STOP 용액 (SkyBio Ltd.)을 첨가함으로써 반응을 정지시키고, 흡광도를 Microplate Reader 3550 (Bio-Rad Laboratories Ltd.)을 사용하여 655 nm에서 측정하였다. 항체 결합 분석법으로부터의 결과가 도 11에 제시된다.

[0484] 3. 293F 발현

[0485] 중쇄 및 경쇄 플라스미드를 Top 10 대장균 (One Shot Top 10 화학적 수용성 대장균 세포 (Invitrogen, C4040-10)) 내로 형질전환시키고, 글리세롤 내에 보관하였다. 대규모 플라스미드 DNA를 제조업자 (Qiagen, 내독소가 없는 MAXIPREP™ 키트 카탈로그 번호 12362)가 기술한 바와 같이 제조하였다.

[0486] 인간 시스템에서의 항체 발현을 위해, 플라스미드들을 인간 배아 신장 세포주 293F (Invitrogen) 내로 293fectin (Invitrogen)을 사용하여 형질감염시키고, 배양을 위해 293F-FreeStyle Media (Invitrogen)를 사용하였다. 경쇄 및 중쇄 플라스미드를 양쪽 모두 0.5 g/ml로 형질감염시켰다. 10^6 개의 세포/ml의 세포 밀도로 형질감염을 수행하였다. 형질감염 3일 후, 상등액을 25°C, 1100 rpm에서 5분 동안의 원심분리에 의해 수집하였다. 정량적 ELISA에 의해 발현 수준을 정량하였고 (이전의 실시예 참조), 이는 키메라 항체에 대해 약 0.25-0.5 g/ml이었다.

[0487] 4. 항체 정제

[0488] 0.5 ml/분으로 단백질 A/G 컬럼 (Pierce, 카탈로그 번호 53133) 상에 배양 상등액을 통과시킴으로써 배양 상등액으로부터 모노클로날 항체를 정제하였다. 이동상은 1× Pierce IgG 결합 완충제 (카탈로그 번호 21001) 및 0.1 M 글리신 pH 2.7 (Pierce, 용출 완충제, 카탈로그 번호 21004)로 구성되었다. 0.1 M 글리신 내의 항체 수집물을 1 M 포스페이트 완충제 (pH 8.0)로 10 % (v/v)로 희석하여, pH를 중화시켰다. IgG₁ 수집물을 풀링 (pooling)하고, 1× PBS (Pierce Slide-A-Lyzer Cassette, 3,500 MWCO, 카탈로그 번호 66382)에 대해 철저하게 투석하였다. 용출물을 Centricon YM-3 (10,000 MWCO Amicon 카탈로그 번호 4203)을 사용하여 2,500 rcf에서의 1시간 동안의 원심분리에 의해 농축하였다. 시판되는 골수종 IgG₁ 모액을 기준물로 사용하여 상기 기술된 바와 같이 정량적 ELISA에 의해 항체 농도를 결정하였다. 모노클로날 항체 이소타입 결정 키트 (Sigma, ISO-2)를 사용하여 ELISA에 의해 mAb의 중쇄 유형을 결정하였다.

[0489] 5. S1P에 대한 항체 변이체들의 상대적인 결합

[0490] 하기의 표 6은 돌연변이체와 키메라 항체의 비교 분석을 나타낸다. 이러한 결과들을 생성시키기 위해, 결합된 항체를 HRP와 접합된, 마우스 또는 인간 IgG에 특이적인 2차 항체에 의해 검출하였다. 발색성 반응을 측정하여, 광학 밀도 (OD)로 보고하였다. 항체의 패널의 농도는 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 였다. 2차 항체와 S1P-코팅 매트릭스 단독의 상호작용은 검출되지 않았다.

표 6

키메라 항-S1P 항체의 변이체들의 SIP에 대한 상대적인 결합

가변 도메인	돌연변이	플라스미드	결합
HC	키메라	pATH50 + pATH10	1.5
	CysAla	pATH50 + pATH11	2
		pATH50 + pATH	
	CysSer	12	0.6
LC	CysArg	pATH50 + pATH14	0.4
	CysPhe	pATH50 + pATH16	2
	MetLeu	pATH53 + pATH10	1.6

[0492] 6. 표면 플라즈몬 공명 (SPR)에 의한 결합 키네тика 결정

[0493] 모든 결합 데이터는 Biacore 2000 광학 바이오센서 (Biacore AB, Uppsala Sweden) 상에서 수집되었다. S1P를 말레이미드 CM5 센서 칩에 커플링시켰다. 먼저, CM5 칩을 NHS/EDC의 등가 혼합물로 수분 동안 활성화시킨 후,

에틸디아민으로 7분 동안 차단시켰다. 이어서, 술포-MBS (Pierce Co.)를 HBS 러닝(running) 완충제 (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 0.005% p20, pH 7.4) 내의 0.5 mM의 농도로 표면 상에 통과시켰다. S1P를 HBS 러닝 완충제 내에 0.1 mM의 농도로 희석하고, 상이한 길이의 시간 동안 주입하여, 2개의 상이한 밀도의 S1P 표면 (305 및 470 RU)을 생성시켰다. 이어서, mAb에 대한 결합 데이터를 마우스, 201308, 201309, 및 207308 항체 각각에 대해 16.7 nM, 50.0 nM, 50.0 nM, 16.7 nM, 및 16.7 nM에서 시작하는 3배 희석 시리즈를 사용하여 수집하였다.

[0494] 각각의 농도를 이중으로 테스트하였다. 50 mM NaOH로 표면을 재생시켰다. 모든 데이터를 25°C에서 수집하였다. 기준 표면, 뿐만 아니라 블랭크(blank) 주입을 사용하여 응답 데이터를 프로세싱하였다. 데이터 세트 (2번 테스트된 각각의 변이체 및 2개의 표면으로부터의 응답)를 상호작용 모델에 피팅시켜, 결합 파라미터를 수득하였다. 상이한 mAb 농도로부터의 데이터를 1:1 (마우스) 또는 1:2 (변이체) 상호작용 모델을 사용하여 전체적으로 피팅시켜, 겉보기 결합 속도 상수를 결정하였다. 팔호 안의 숫자는 마지막 자리수에서의 오차를 가리킨다.

실시예 11: S1P에 대한 키메라 mAb

[0495] 본원에서 사용된 용어 "키메라" 항체 (또는 "면역글로불린")는 특정 종으로부터 유래되거나 특정 항체 클래스 또는 서브클래스에 속하는 항체의 상응하는 서열과 동일하거나 상동성인 중쇄 및/또는 경쇄를 포함하고, 사슬 (들)의 나머지부분은 또 다른 종으로부터 유래되거나 또 다른 항체 클래스 또는 서브클래스에 속하는 항체의 상응하는 서열과 동일하거나 상동성인 문자, 뿐만 아니라 원하는 생물학적 활성을 나타내는 한 이같은 항체의 단편을 지칭한다 ([Cabilly, et al., 상기 문헌]; [Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81:6851 (1984)]).

[0496] 특정 하이브리도마 (ATCC 안전 기탁 보관 번호 SD-5362)로부터의 뮤린 항체의 활성 S1P 결합 영역을 함유하는 가변 영역 (Fv)을 인간 IgG1 면역글로불린의 Fc 영역과 함께 사용하여 S1P에 대한 키메라 항체가 생성되었다. Fc 영역은 인간 항체의 CL, CHL, 및 CH3 도메인을 함유하였다. 특정 방법에 제한되지 않으면서, 인간 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, 또는 IgM의 Fc 영역으로부터 키메라 항체가 또한 생성될 수 있었다. 당업자가 이해할 바와 같이, 뮤린 항-S1P mAb의 상보성 결정 영역 (CDR, 예를 들어 CDR1-4)을 인간 항체 프레임워크 영역 (예를 들어, Fr1, Fr4 등) 예컨대 IgG1의 프레임워크 영역과 그레프팅시킴으로써 "인간화" 항체가 생성될 수 있다. 도 11은 레이다운 물질로서 티올화-S1P를 사용하는 직접적 ELISA에서의 키메라 및 완전 뮤린형 mAb의 결합을 나타낸다.

[0497] 도 11에 제시된 직접적 ELISA 실험에 대해, S1P에 대한 키메라 항체는 완전 뮤린형 모노클로날 항체와 결합 특성이 유사하였다. 결합 완충제 (33.6 mM Na₂CO₃, 100 mM NaHCO₃; pH 9.5) 내의 BSA에 접합된 화학적으로 합성된 티올화-S1P 0.1 µg으로 코팅된 96웰 고결합 ELISA 플레이트 (Costar)에서 ELISA를 수행하였다. 티올화-S1P-BSA를 ELISA 플레이트에서 37°C에서 1시간 동안 또는 4°C에서 하룻밤 동안 인큐베이션하였다. 그후, 플레이트를 PBS (137 mM NaCl, 2.68 mM KC1, 10.14 mM Na₂HPO₄, 1.76 mM KH₂PO₄; pH 7.4)로 4회 세정하고, PBST로 1시간 동안 실온에서 차단하였다. 1차 인큐베이션 단계를 위해, 75 µl의 샘플 (측정될 S1P를 함유함)을 PBST에서 희석된 0.1 µg/ml 항-S1P 모노클로날 항체 25 µl와 함께 인큐베이션하고, ELISA 플레이트의 웰에 첨가하였다. 각각의 샘플을 3중 웰에서 수행하였다. 실온에서 1시간 동안 인큐베이션한 후, ELISA 플레이트를 PBS로 4회 세정하고, 100 µl/웰의 0.1 µg/ml HRP 염소 항-마우스 2차 항체 (Jackson Immunoresearch)와 함께 실온에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 그후, 플레이트를 PBS로 4회 세정하고, 테트라메틸벤자린 (Sigma)에 1-10분 동안 노출시켰다. 동일한 부피의 1M H₂SO₄를 첨가함으로써 검출 반응을 정지시켰다. EL-X-800 ELISA 플레이트 판독기 (Bio-Tech)를 사용하여 450 nm에서의 측정에 의해 샘플의 광학 밀도를 결정하였다.

[0498] 또다시, 면역화된 동물의 혈청 내 또는 항체-생산 세포 예컨대 하이브리도마의 세포-컨디셔닝 배지 (예를 들어, 상등액) 내의 항체 역가를 측정하는 바람직한 방법은 ELISA 플레이트를 단백질 담체 예컨대 BSA에 공유결합으로 연결된 표적 리간드 (예를 들어, S1P, LPA 등의 티올화 유사체)로 코팅하는 것을 수반한다.

[0499] 특정 방법 또는 예에 한정되지 않으면서, 또 다른 지질 표적 예컨대 LPA, PAF, 세라마이드, 술파티드, 세레브로시드, 카르디오리핀, 포스포티딜세린, 포스포티딜이노시톨, 포스파티드산, 포스포티딜콜린, 포스파티딜에탄올아민, 에이코시노이드, 및 기타 류코트리엔 등에 대해 키메라 항체가 생성될 수 있었다. 또한, 원한다면, 이러한 지질들 중 다수가 또한 글리코실화 및/또는 아세틸화될 수 있었다.

[0501] 실시예 12: 인간화 항-S1P 모노클로날 항체 LT1009 (소냅시주맙)의 생성 및 특성화

S1P에 특이적으로 결합하는 뮤린 항-S1P 모노클로날 항체 306D (LT1002; 스팽고맙™)는 다양한 동물 모델에서 혈관형성 및 종양 성장을 강력하게 억제하는 것으로 나타났다. 하기 논의된 바와 같이, 뮤린 CDR를 내부에 그래프트시키기 위한 인간 프레임워크에 대한 서열 동일성 및 상동성 검색, 및 일부 프레임워크 역돌연변이를 안내하기 위한 컴퓨터-생성 모델을 사용하여 LT1002를 인간화시켰다. 2개의 변이체 HuMAbHCLC₃ (LT1004) (경쇄 내에 3개의 역돌연변이가 있음) 및 HuMAbHCLC₅ (LT1006) (경쇄 내에 5개의 역돌연변이가 있음)가 나노몰 범위의 결합 친화력을 나타냈다. 인간화 변이체의 생물물리학적 및 생물학적 성질을 개선시키기 위해 추가적인 조작을 수행하였다. HCDR2 내의 유리-시스테인 잔기가 알라닌으로 교체된 인간화 변이체 HuMAbHC_{CysAla}LC₃ (LT1007) 및 HuMAbHC_{CysAla}LC₅ (LT1009)는 피코몰 범위의 결합 친화력을 나타냈다. 모든 인간화 변이체가 연령-관련 황반 변성 (AMD)의 맥락막 혈관신생 (CNV) 모델에서 혈관형성을 억제하였고, 이때 어버이 뮤린 항체와 비교하여 HuMAbHC_{CysAla}LC₅ (LT1009)가 우수한 안정성 및 생체내 효능을 나타냈다. 변이체 huMAbHCcysalaLC₅ (LT1009)를 소냅시주맙™으로 명명하였다.

a. 항-S1P 항체에 대한 인간화 디자인

뮤린 mAb LT1002 (스팡고맙™)의 가변 도메인을 CDR 그래프팅 (Winter, 미국 특허 번호 5,225,539)을 통해 인간화시켰다. [Kabat et al. 1991]에 기술된 바와 같은 서열 초가변성을 기초로 CDR 잔기가 확인되었다.

이러한 연구에서, 구조 정렬 프로그램 (SR v7.6)을 사용하여 IMGT 및 카밧 데이터베이스 내의 인간 항체의 상동성 검색을 기초로 적절한 어셉터 구조를 선별하였다. 첫번째 단계는 버니어(Vernier) ([Foote, J. & Winter, G. Antibody framework residues affecting the conformation of the hypervariable loops. J Mol. Biol. 224, 487-499 (1992)]), 정규(Canonical) ([Morea, et al., Antibody modeling: implications for engineering and design, Methods 20, 267-279 (2000)]) 및 VH-VL 계면 ([Chothia, C., Novotny, J., Bruccoleri, R., & Karplus, M. Domain association in immunoglobulin molecules. The packing of variable domains. J Mol. Biol. 186, 651-663 (1985)]) 잔기에서 프레임워크에서의 서열 동일성이 높고, 동일한 정규 클래스 및/또는 길이의 CDR이 있는 인간 프레임워크 (FR)를 확인하기 위해, 각각 LT1002 VH 및 VL 단백질 서열로 이러한 인간 중쇄 가변 (VH) 및 경쇄 가변 (VL) 서열 데이터베이스를 질의하는 것이었다. 마우스 항체의 개별적인 정렬된 잔기들에 대한 이러한 라이브러리의 각각의 구성원의 동일성을 프로그램을 사용하여 계산하였다. 마우스 FR과 가장 동일한 FR 서열이 있는 인간 서열을 확인하여, 인간 "어셉터" 서열의 초기 선발후보 목록을 만들었다. 버니어, 정규 및 VH-VL 계면 (VCI) 잔기에서 마우스 항체에 대한 동일성이 가장 높은 서열들을 또한 계산하였다. 인간과 마우스 간의 이러한 위치들에서의 차이를 보존적 및 비-보존적 치환으로 분류하여, 최상의 프레임워크 선택에 LT1002로부터의 가장 낮은 개수의 비-보존적 VCI 차이가 있도록 하였다. LT1002의 CDR 루프 L3 및 H1가 정규 구조로 분류될 수 있었다. 이러한 L3 및 H1 구조를 사용하여, 동일한 정규 구조가 있는 인간 항체 FR을 선별하였다. 분류되지 않은 CDR에 대해, 마우스 항체와 CDR 길이가 동일한 인간 프레임워크를 선별하려 시도하였다. 이론적 근거는 CDR 루프 구조는 CDR 루프 서열 자체뿐만 아니라, 기초를 이루는 프레임워크 잔기 (정규 잔기)에 또한 좌우된다는 것이다. 따라서, 정규 CDR 구조 및/또는 CDR 길이가 매칭되는 인간 프레임워크는 그래프트된 마우스 CDR을 가장 적합한 배향으로 보유하여, 항원 결합 친화력을 유지할 것이다. 인간 프레임워크 서열의 선택에 의해 CDR H3을 제외한 모든 CDR에 대해 이것이 달성되었다. 추가적으로, 일반적이지 않은 시스테인 또는 프롤린 잔기가 있는 프레임워크는 가능하면 제외하였다. 이러한 계산을 중쇄 및 경쇄 서열에 대해 별도로 수행하였다. 마지막으로, 최적으로 매칭된 서열들 내의 프레임워크 영역 전반에 걸친 개별적인 서열 차이를 비교하였다. 상기의 비교 계산에 최적으로 페팅된 인간 항체들 중에서, 항체 AY050707 및 AJ002773이 각각 경쇄 및 중쇄에 대한 가장 적합한 인간 프레임워크 제공물로 선별되었다.

두번째 단계는 LT1002의 가변 영역의 분자성 모델을 생성시키고, 항원 결합에 영향을 미칠 수 있지만 버니어, 정규 및 계면 잔기의 군에는 포함되지 않은 FR 잔기를 확인하는 것이었다. 어떻게 다양한 FR 잔기들이 CDR 루프의 형상에 영향을 미치는지 및 이의 반대를 더욱 잘 이해하기 위해 그래프트 도너 및 어셉터 가변 도메인의 다수의 구조적 특색들을 시험하였다. CDR에 영향을 미칠 것 같은 LT1002 내의 보존되지 않은 FR 잔기가 버니어 및 정규 정의 (상기 참조)로부터 확인되었고, 따라서 인간 FR의 여러 잔기가 원래의 뮤린 아미노산으로 복구되었다 (역돌연변이).

b. 돌연변이유발

[0508]

QuikChange 부위지정 돌연변이유발 키트 (Stratagene, 카탈로그 #200524)를 사용하여 가변 도메인 서열에서의 돌연변이를 생성하였다. 50 ng의 이중 가닥 DNA 주형, 2.5 U의 PfuUltre HF DNA 중합효소 및 이의 상응하는 완충제 (Stratagene, 카탈로그 #200524), 10 mM dNTP 믹스 및 125 ng의 각각의 돌연변이유발성 올리고뉴클레오티드 (5 mM 트리스-HCl (pH 8.0)에 혼탁됨), 및 0.1 mM EDTA로 개별적인 반응들을 수행하였다. 95°C에서 30초 동안 첫번째 변성을 수행한 후, 95°C에서 30초, 55°C에서 60초 및 68°C에서 8분의 증폭이 16 사이클 진행되었다. 온도 사이클링 후, 최종 반응물을 37°C에서 1시간 동안 DpnI 소화로 소화시켜, 메틸화 어버이 DNA를 제거하였다. 생성된 돌연변이체를 수용성 XL1-Blue 대장균 내로 형질전환시키고, 50 µg/ml 앰피실린을 함유하는 LB-한천 상에 플레이팅하였다. 그후, 콜로니를 서열분석에 의해 점검하였다. 그후, 각각의 돌연변이를 1 리터 진탕 플라스크에서 배양하고, 엔도프리(EndoFree) 플라스미드 정제 키트 (Qiagen, 카탈로그 #12362)를 사용하여 정제하였다.

[0509]

c. 인간화 항체 변이체의 생성

[0510]

LT1002의 가변 도메인을 중쇄 및 카파 사슬의 인간 불변 영역을 함유한 벡터 내로 클로닝함으로써 마우스-인간 키메라 항체 (chMAb S1P)를 구축하여, 포유류 세포 내로 전장 항체의 발현을 허용하였다. LT1002 V_H로부터의 카밧 CDR 1, 2 및 3이 AJ002773의 어셉터 프레임워크 내로 그래프트된 결과로 인간화 중쇄가 생성되었다. AJ002773에 대한 가장 가까운 생식계열 유전자는 VH5-51였고, 이의 리더 서열이 인간화 중쇄 변이체 내로 리더 서열로서 흡입되었다. VH5-51 리더 서열이 있는, LT1002 V_H의 첫번째 인간화 버전인 pATH200의 단백질 서열이 표 4에서 제시된다. LT1002의 V_H 도메인의 경우, 위치 2, 27, 37, 48, 67 및 69에서의 잔기는 베니어 잔기이거나 V_H 및 V_L 도메인의 계면에 있었고, CDR 배향에 영향을 미칠 것 같았다. 위치 37은 V_H 도메인과 V_L 도메인 간의 계면에 결정적인 것으로 보였다. 인간 프레임워크 내의 이러한 위치들에서의 잔기를 상응하는 위치에서 발견된 뮤린 잔기로 역돌연변이시켰다. 돌연변이 V37M, M48I 및 Y27F를 개별적으로 테스트하였다. 1가지 버전 (pATH205)은 V67A + I69L와 함께 3개의 돌연변이 모두를 함유하였고, 또다른 버전 (pATH206)은 모든 5개의 돌연변이 + V2A를 함유하였다.

[0511]

LT1002 V_L로부터의 카밧 CDR 1, 2 및 3이 AY050707의 어셉터 프레임워크 내로 그래프트된 결과로 인간화 경쇄가 생성되었다. AY050707에 대한 가장 가까운 생식계열 유전자는 L11이었고, 이의 리더 서열이 인간화 경쇄 구축물 내로 흡입되었다. pATH300 (LT1002 경쇄)의 단백질 및 DNA 서열은 각각 서열 17 및 28이다 (아미노산 서열에 대해 표 4 참조). V_L의 경우, 4개의 보존되지 않은 베니어 위치 4, 36, 49, 64가 CDR 루프의 구조를 지지하는데 수반되기 때문에 뮤린 잔기로의 역돌연변이에 대해 선별되었다. LT1002의 분자 모델의 정밀검사는 Tyr 67이 CDR 표면에 가깝고, 항원 결합면을 향해 배향되며, S1P와 상호작용할 수 있음을 시사하였다. 따라서, S67Y 역돌연변이가 나중의 인간화 버전에 추가되었다. 2개의 돌연변이가 별도로 도입되어, Y49S 또는 Y36F를 함유하는 2개의 버전이 생성되었다. 돌연변이들이 하기와 같이 조합된 여러 버전이 생성되었다: (Y49S, F4V), (Y49S, Y36F), (Y49S, Y36F, F4V), (Y49S, G64S), (Y49S, Y36F, F4V, G64S), (Y49S, Y36F, F4V, G64S, S67Y), (Y49S, G64S, S67Y).

[0512]

d. 인간화된 선도 후보물의 선별

[0513]

기본적인 그래프트 버전 (pATH 200 및 pATH 300) 및 역돌연변이를 함유하는 모든 변이체의 가변 영역을 인간 V_H 또는 V_L 불변 영역을 함유하는 발현 벡터 내로 클로닝하였다. 모든 인간화 변이체들을 키메라 (chMAb) 항체와 동일한 조건 하에 포유류 세포에서 생산하였고, ELISA에 의해 S1P에의 결합에 대해 테스트하였다. 수율은 인간화 변이체에 대해서 약 10-20 mg/l, chMAb S1P에 대해서 0.3-0.5 mg/l였다. 환원 조건 하에서의 SDS-PAGE는 경쇄 및 중쇄의 예상 질량과 일치하는 25 kDa 및 50 kDa에서 2개의 밴드를 높은 순도 (>98%)로 나타냈다. 비-환원 조건 하에서는 약 150k의 예상 질량으로 단일 밴드가 관찰되었다. 어버이 마우스 항체와 동일한 가변 영역을 함유하고, 인간화 항체와 동일한 불변 영역을 보유하며, 따라서 동일한 ELISA 프로토콜을 사용하여 검출할 수 있었기 때문에, chMAb를 인간화 항체 결합 분석법에서 기준물로 사용하였다.

[0514]

6개의 뮤린 CDR이 돌연변이되지 않은 인간 프레임워크 내로 그래프트된 최초의 인간화 항체는 S1P에 대한 어떠한 검출가능한 결합도 나타내지 않았다 (도 11). 키메라 중쇄와 회합된, 4개의 역돌연변이 (Y49S, Y36F, F4V 및 G64S)를 함유하는 카파 경쇄는 ELISA에 의해 측정 시 S1P에 대한 준최적 결합을 나타냈다. 위치 Y67에서의 추가적인 돌연변이의 흡입은 결합을 현저하게 개선시켰다. 키메라 중쇄와 회합된, 역돌연변이 Y49S, Y36F, F4V, G64S 및 S67Y를 함유한 버전 pATH308 및 역돌연변이 Y49S, G64S 및 S67Y를 함유한 버전 pATH309 양쪽 모

두 ELISA에 의해 결정 시 키메라 항체와 유사하게 S1P에 결합한 항체를 생성시켰다. 2개의 돌연변이 Y36F 및 F4V는 S1P 결합의 관점에서 필요한 역돌연변이로 간주되지 않았다. VL 프레임워크 내에서의 3 내지 5개의 역돌연변이의 조작이 활성을 복구하는데 필요하였다.

[0515] 키메라 경쇄와 회합된, 중쇄의 인간 프레임워크 내로의 버니어 역돌연변이 V37M의 혼입이 키메라 항체와 유사한 결합 거동을 복구시키는데 충분하였다 (도 11).

[0516] 요약하면, LT1002 V_H 도메인의 인간화는 뮤린 프레임워크 서열로부터의 오직 1개의 아미노산만을 필요로 하는 반면, 뮤린 V_L 프레임워크 도메인에서는, 뮤린 어버이 LT1002와 등가인 결합을 달성하기 위해 3개 또는 5개의 뮤린 잔기가 유지되어야 했다.

e. 인간화된 선도 후보물의 최적화

[0518] 뮤린 항-S1P 항체는 중쇄의 CDR2 내에 유리 시스테인 잔기 (Cys50)를 함유하고, 이는 항체 분자의 약간의 불안정성을 잠재적으로 야기할 수 있다. 부위 지정 돌연변이유발을 사용하여, 시스테인 잔기가 알라닌 (huMAbHCcysalaLC₃) (pATH207), 글리신 (huMAbHCcysalaLC₃), 세린 (huMAbHCcysserLC₃), 및 페닐알라닌 (huMAbHCcyspheLC₃)으로 치환된 pATH201의 변이체를 생성시켰다. 또한 시스테인 돌연변이체 중쇄를 5개의 역돌연변이를 함유하는 인간화 경쇄 (pATH 308)와 함께 테스트하였다 (huMAbHCcysalaLC₃ = LT1009). 변이체들을 모두 유류 세포에서 발현시킨 후, 시험관내 분석법의 폐널에서 특성화하였다. 중요하게, 인간화 변이체의 발현율이 chMAb S1P에 대한 것보다 현저하게 높았다.

f. 인간화된 선도 후보물의 심층 특성화

[0520] i. 특이성. 인간화 변이체를 S1P 및 여러 기타 생체지질에 대한 경쟁적 ELISA 분석법 (도 1)에서 특이성에 대해 테스트하였다. 이러한 분석법은 에피토프 지도작성을 허용하는 추가적인 이점이 있었다. 인간화 항체 LT1009는 S1P의 직접적인 대사 전구물질인 스팽고신 (SPH), 또는 S1P와 구조적 및 기능적으로 유사한 중요한 세포외 신호전달 분자인 라이소포스파티드산 (LPA)에 대해 교차반응성을 나타내지 않았다. 또한, rhuMAb S1P는 세라마이드 (CER), 세라마이드-1-포스페이트 (C1P)가 포함되는 또 다른 구조적으로 유사한 지질 및 대사를 인식하지 않았다. 그러나, 예상대로, LT1009는 S1P의 유리 포스페이트 기가 콜린 잔기에 묶여 있는 지질인 스팽고실 포스포콜린 (SPC)과 교차반응하였다. 중요하게, 모든 인간화 변이체들이 마우스 항체에 필적하는 특이성 프로파일을 나타냈다.

[0521] ii. 결합 친화력. S1P가 코팅된 칩에 대한 IgG 결합의 Biacore 측정은 변이체 LT1004 또는 LT1006이 도 11에 제시된 바와 같이 chMAb S1P와 유사한 낮은 나노몰 범위의 결합 친화력을 나타냈음을 제시하였다. 시스테인 잔기가 알라닌으로 교체된 인간화 변이체 LT1007 및 LT1009은 뮤린 어버이 LT1002 (스팡고맵™)과 유사한 피코몰 범위의 결합 친화력을 나타냈다.

[0522] iii. 안정성. 인간화 변이체들을 고온에서의 자극(challenge) 후 안정성에 대해 테스트하였다. 상등액을 60°C 내지 74°C 범위의 온도에 적용함으로써 모든 인간화 변이체에 대해 열적 언풀딩(unfolding) 변이의 대략적인 중간점 (T_m)을 결정하였다. 50°C 내지 80°C 사이의 광범위한 온도에서의 열-자극(thermochallenging) 후 뮤린 항체 분자에 대해 관찰된 변성 프로파일을 기초로 이러한 온도가 선택되었다. 각각의 변이체의 결합 성질을 열-자극 전후에 결정하였다. 뮤린 항체는 65°C의 T_m 을 나타냈다. 변이체 huMAbHCcysalaLC₅ (LT1009)는 모든 다른 변이체와 비교하여 우수한 T_m 을 나타냈다. 표 7은 선도 인간화 후보물 및 이들의 특성을 나타낸다.

표 7

선도 인간화 SIP mAb 후보물 및 특성

종체 및 경쇄 내의 돌연변이수가 지시된다.
설명 퀄럼은 종체 및 경쇄의 신원을 제공한다

mAb	설명	종체에서의 돌연변이		경쇄에서의 돌연변이		시험관내 활성	
		CDR	프레임-워크	CDR	프레임-워크	결합 전화력 (K_D)	특이성 (ELISA)
LT1002	뮤린 mAb 스팽고웹	N/A	N/A	N/A	N/A	0.026 ± 0.000 nM	높음
LT1004	HuHCLC ₃ pATH201HC pATH309LC	0	1	0	3	1.060 ± 0.010 nM	높음
LT1006	HuHCLC ₅ pATH201HC pATH308LC	0	1	0	5	0.690 ± 0.010 nM	높음
LT1007	HuHCcysalaLC ₃ pATH207HC pATH309LC	1	1	0	3	0.0414 ± 0.0004 nM	
LT1009	HuHCcysalaLC ₅ pATH207HC pATH308LC	1	1	0	5	0.056 ± 0.001 nM	높음

[0523]

iv. 서열

[0525] 천연 발생 항체와 같이, LT1009는 각각의 항체 분자를 이루는 2개의 경쇄 폴리펩티드 각각 및 2개의 종체 폴리펩티드 각각 내에 3개의 상보성 결정 영역 (각각 "CDR")를 포함한다. 이러한 6개의 CDR 각각의 아미노산 서열이 바로 아래에 제공된다 ("VL"은 면역글로불린 경쇄의 가변 영역을, "VH"는 면역글로불린 종체의 가변 영역을 가리킨다):

[0526] CDR1 VL: ITTTDIDDDMN [서열 10]

[0527] CDR2 VL: EGNILRP [서열 11]

[0528] CDR3 VL: LQSDNLPFT [서열 12]

[0529] CDR1 VH: DHTIH [서열 13]

[0530] CDR3 VH: GGFYGSTIWFDF [서열 15]

[0531] CDR2 VH: AISPRHDITKYNEMFRG [서열 31]

[0532] LT1009의 종체 및 경쇄 폴리펩티드에 대한 뉴클레오티드 및 아미노산 서열이 바로 아래에 열거된다:

[0533] LT1009 HC 가변 도메인의 아미노산 서열 [서열 32]:

```

1  mewswvflff lsvttgvhse vqlvqsgaev kkpge slkis cqsfgyifid
51  htihwmrqmp gqglewmgai sprhditkyn emfrgqvtis adkssstaylor
101 qwsslkasdt amyfcarggf ygstiwfdfw gggtmvttvss

```

[0534] LT1009 LC 가변 도메인의 아미노산 서열 [서열 33]:

```

1  ms vptqvlg lllwltdarc ettvtqspsf lsasvgdrvt itcitttdid
51  ddmnwfqqep gkapkllise gnilrpqvpvps rfsssgyqtd ftltisklqp
101 edfatyyclq sdnlpftfqq gtleik

```

LT1009 HC 뉴클레오티드 서열 [서열 34]:

1 aaggcttgcgg ccaccatgga atggagctgg gtgttcctgt tctttctgtc
51 cgtgacccaa ggcgtcgcat ctgggtgcga ctggctgcag ctggacag
101 aggtaaaaaa gcccggggag tctcttgcaga ttcttcgtca gagtttggaa
151 tacatcttta tcgaccatac tattcaactgg atgcggcaga tgccggcca
201 aggccgtggg tggatgggggg ctatcttcgc cagacatgtt attactaaat
251 aacaatggat gtteaggggg caggttgcacca ttcttcgtca gagtttggaa
301 agaccgcctt acttgcgtgg gagcagctgg aaggcttcgg acaccgcatt
351 gtatcttgcgt gcgagggggg gtttctacgg tagtactatc tggtttgact
401 ttggggccaa aggacatacg tcaacggctt ctccacgttc caccacggca
451 cccatcggtt ccccccttgcg accttcgttca aagggacactt ctggggcac
501 ageggccctg ggcttcgttcaaggactt ctccccggaa ccggtgacgg
551 tggctgtggaa ctccacggcc ctggaccacgg gggttgcacac ccctccgggt
601 gtcttcacgtt ccttcggactt ctatccctc acgacgtgg tgacgtgtcc
651 ctccacgggtt tggggcaccac agacccatcatc ctgcacgttca aatccacaa
701 ccacggcaacac caagggtggac aaggaggtt gttggagggcc agacccaggaa
751 ggggggttctt ctgggtggaa ccaggcttc cgcttcgttcc tgacgtcc
801 ccggctatgc atggccatgc cagggtggac agggacggcc ccgttgcet
851 ttccacccggaa ggcttcgtcc cggcccaactt atgctcagggg agagggttctt
901 ctgggtttttt cccacgggtt tggggcaggca cggctgttgc gggcttaccc
951 caggcccttcg acacaaaagggg cggatgtgtt ggttgcacgg tggcaaggg
1001 catatccggg aggaccccttc ccgttgcactt agccccacccca aaaggccaaa
1051 ctcttcacatc cttcgttcgac gacacccatctt ctcccttcggat attccatgt
1101 ctccaaatctt tcttcgttca gagcccaat tttttttttt aacttcacaaa
1151 tggccacccgtt gcccacggtaa ggccacccgg ggttgcggccctt ccacgttca
1201 gggggacagg tggcccttagag tagtctgttccat ccagggttgc gcccacgg
1251 ggttgcgttca cgttccacccat ctttttttttccatccacgg ttttttttttcc
1301 gggacccgttca gtcttcgttccatccacgg ttttttttttccatccacgg
1351 tctccggcgc cccttgggttccatccacgg ttttttttttccatccacgg
1401 gacccttgggg tcaagttaa ctgggttgcgtt gacggcgctgg aggttgcata
1451 tgcaagaaa aaggccgggggg aggacggatca caccacgttccatccacgg
1501 ttcacgttccatccatccacgg ttttttttttccatccacgg
1551 aagtgttccatccacgg ttttttttttccatccacgg
1601 ctccaaatgggg aacgggtgggg ccgttgggggtt gggggccatccatccacgg
1651 ggccggctggcc cccaccccttc tggccgttgcgtt gacggcgctgg
1701 tggcccttaca gggcggccccc gagaaccacca ggttgcata
1751 cccggggggggatccatccacgg ttttttttttccatccacgg
1801 ggcttcgttccatccacgg gatccatccatccacgg
1851 ggagaaacaaatccatccacgg
1901 ttttttttttccatccacgg
1951 aacgttttttccatccacgg
2001 ccggccatccatccacgg

```
1 mewswvflff lsvttgvhse vqlvqsgaev kkpgeslkis cqsfgyifd
51 htihmrqmp ggglewmagai sprhditkyn emfrgvtis adkssstayl
100 qssslkasdt amyfcarggf ygstdtwdw gggtmvtss astkgpsvf
151 lapsskstsg gtaalgcblk dfyfppevtvs wnsaltsgv htfpavlgss
201 glysllsvt vpssslgtqt yiccnvhkps ntkvdkrvap ellggpsvfl
251 fppkpkdtlm istrpevtcv vvdvhshedpe vfkvnwyvdvg evhnaktrk
301 eeqnystyrv vs1vlthqo wlkngeykck vsnknlpapi etikskaqgg
351 prepqvytlp psreemtknq vs1tclvkgf ypsdiavewe sngqpenyy
401 tppplvdsdg sfflyskltv dksrwwqgnv fscsvmheal hnhytqksls
451 lsck
```

LTM1000-1.0.1-2024051013315313-2024051013315313-2024051013315313

LT1000 LC table 3b 1995 [1995-2011]

설명 12: 신경회 C1B-A1 세션 및 결과

본 실험에는 샘플 학생 20명, 스피커 10명, 흐름 페인트 (SIP)에 놓은 칠칠색으로 경화되는 캐릭터 모니터링

날 항체 (LT1009; 소냅시주맙™)의 생산을 기술한다. LT1009는 2개의 동일한 경쇄 및 2개의 동일한 중쇄로 구성된 전장 IgG1k 이소타입 항체이고, 전체 분자량은 150kDa이다. 중쇄는 N-연결 글리코실화 부위를 함유한다. 다당류 구조의 성질은 아직 결정되지 않았지만, 코어(core) 푸코스가 있는 복합적인 2축각성 구조인 것으로 예측된다. 우세할 당형태(glycoform)의 성질은 현재 알려져 있지 않다. 중쇄의 불변 도메인 내의 라이신 잔기의 존재로 인해 일부 C-말단 비균질성이 예상된다. 2개의 중쇄는 2개의 사슬간 디숤피드 결합을 통해 서로 공유함으로 커플링되고, 이는 인간 IgG1의 구조와 일치한다.

[0547] 원래 LT1009는 S1P로 면역화된 마우스로부터 생성된 하이브리도마를 사용하여 생산된 뮤린 모노클로날 항체 (LT1002; 스피고맙™)로부터 유래되었다. 뮤린 항체의 인간화는 6개의 뮤린 CDR을 뮤린 어버이 항체에 대한 구조 유사성으로 선별된 인간 항체 프레임워크의 CDR 대신에 삽입하는 것을 수반하였다. 인간화 항체를 조작하기 위해 프레임워크 내에서 일련의 치환이 이루어졌다. 이러한 치환은 역돌연변이로 정해지고, 인간 잔기를 항원과 항체의 상호작용에서 상당한 역할을 하는 뮤린 잔기로 교체한다. 최종 인간화 버전은 중쇄의 가변 도메인의 인간 프레임워크 내의 1개의 뮤린 역돌연변이 및 경쇄의 가변 도메인의 인간 프레임워크 내의 5개의 뮤린 역돌연변이를 함유한다. 또한, 중쇄의 CDR #2 내에 존재하는 1개의 잔기가 알라닌 잔기로 치환되었다. 이러한 치환은 항체 분자의 안정성 및 효능을 증가시키는 것으로 나타났다.

[0548] 인간화 가변 도메인을 론자 GS 유전자 발현 시스템을 사용하여 클로닝하여, 플라스미드 pATH1009가 생성되었다. 이러한 발현 시스템은 항체 유전자의 불변 도메인 및 선별성 마커 글루타민 신테타제 (GS)를 보유하는 발현 벡터로 구성되었다. GS는 글루타메이트 및 암모니아로부터의 글루타민의 생합성을 담당하는 효소이다. 항체 유전자 및 선별성 마커 양쪽 모두를 보유하는 벡터가 무혈청 배지에서의 성장에 대해 개조된 특허받은 차이니즈 햄스터 난소 (CHOK1SV) 숙주 세포주 내로 형질감염되었고, 이러한 벡터는 외인성 글루타민 없이 세포가 생존하도록 하기 위해 충분한 글루타민을 제공한다. 또한, 특이적 GS 억제제인 메티오닌 술폭시민 (MSX)을 배지에 보충하여, 벡터가 제공하는 GS 활성이 있는 세포주만이 생존할 수 있도록 내인성 GS 활성을 억제하였다. 형질감염된 세포를 MSX의 존재 하에 글루타민이 없는 배지에서 성장하는 능력으로 선별하였고, 단리물을 LT1009의 높은 수준의 분비에 대해 선별하였다. 그후, 독성학 연구 및 임상 개발을 위한 물질이 독소(tox) 및 임상 개발용으로 생산되었다.

[0549] ATCC 기탁: pATH1009 플라스미드를 함유하는 대장균 StB12가 아메리칸 타입 컬쳐 컬렉션(American Type Culture Collection)에 기탁되었다 (기탁 번호 PTA-8421). DNA 플라스미드 pATH1009로 형질감염된 CHO 세포주 LH1 275 또한 아메리칸 타입 컬쳐 컬렉션에 기탁되었다 (기탁 번호 PTA-8422).

실시예 14: 인간화 mAb의 제작

[0550] 전형적으로, 생산 공정에는 3단계가 수반된다: 종자 트레인, 접종원 트레인, 및 생산 배양. 모든 단계에서 무혈청 시약 및 저-단백질 세포 배양 성장 배지를 사용하였다. 종자 트레인을 개시시키기 위해, 제조용 세포 은행으로부터의 세포를 사용하였다; 세포를 3일 내지 4일마다 하위배양하고, 종자 트레인 배양에서의 규정된 기간 후, 접종 트레인을 개시시켰다. 바람직하게는, 세포를 생산 단계로의 도입을 위해 확장시키는데 비-선별 배지 (MTX가 없는 배지)가 사용되었다. 증가되는 부피의 용기 내로의 일련의 하위배양에 의해 세포를 확장시켰다. 접종원 트레인에서의 특정 일수의 날에, 생산 단계가 개시되었다. 200 ℓ, 400 ℓ, 2000 ℓ, 또는 20000 ℓ 부피의 생물반응기에서 생산 배양을 수행하였다. 생물반응기의 예가 하기와 같았다.

[0552] 생물반응기의 예: 2 ℓ 생물반응기로부터의 규모 증진이 먼저 Applikon 15 ℓ 진탕 탱크로 진행된 후, 50 ℓ 생물반응기, 200 ℓ 생물반응기, 최종적으로 2000 ℓ 생물반응기로 진행되었다 (모두 동일한 규모로 건설됨). 이러한 탱크들의 특성은 하기와 같았다:

[0553] 제조업자: ABEC, Inc.

[0554] ASME, Section VIII Pressure Vessel Code로 제작됨. 접촉 표면은 316L SS임.

[0555] 바닥 오프셋 드라이브, ABEC 디자인

[0556] 저전단 임펠러 316LSS, 15-20 마이크로인치로 마모되고, 부동태화됨. 직경 ~1/2의 용기 직경.

[0557] 제어: Allen Bradley Control Logic PLC 및 Versa 시야 오퍼레이터 인터페이스.

[0558] 진탕: Allen Bradley 센서, RPM 제어를 위한 VFI에 대한 출력값의 A-B PLC 제어

[0559] 온도: 이중 제어 100 ohm 백금 RTD 센서, A-B PLC 제어 가열, 냉각 및 증기 밸브 및 재순환 펌프. 생물반응기

가 비워지면 자동 멀균 사이클.

[0560] pH: Ingold 센서, 젤 충전, 가압성, CO₂ 살포의 A-B PLC 제어

[0561] 용해 산소: Ingold 폴라로그래피 전극 센서, O₂ 살포의 A-B PLC 제어.

[0562] 공기 및 기체 흐름: 센서는 공기, O₂, N₂ 및 CO₂ 살포에 대한 Four Brooks Thermal Mass Flowmeters이고, Brooks 열선이 공기 오버레이를 또한 공급한다; pH 오토, DO 오토에 대한 기체 흐름의 A-B PLC 제어, 또는 A-B PLC를 통한 모든 기체 흐름의 수동 제어.

[0563] 용기 압력: 센서는 Rosemount 위생용 다이아프램 유형 변환기이고, 제어는 변환기의 A-B PLC 제어 및 배압 제어 밸브이다.

[0564] 프로그램가능 로직 제어기 (PLC: Programmable Logic Controller): 지시된 바와 같은 프로세스들의 순차적인 루프 제어를 위한 Allen Bradley Control Logix System. 소프트웨어: PLC 프로그래밍은 Rockwell 소프트웨어 (Allen Bradley) RS Logix 5000을 사용한다.

[0565] 인간-기계 인터페이스 (HMI: Human Machine Interface): 국소적인 오퍼레이터 인터페이스는 이더넷을 통한 PLC 와의 통신을 위한 Allen Bradley HMI Verso View Industrial 컴퓨터 및 통합형 FPD/터치 스크린 엔트리를 기초로 한다. 소프트웨어는 Rockwell 소프트웨어 RS View 32이다.

[0566] 생산 프로세스의 예.

[0567] 온도, 용해 산소 및 pH를 제어하면서 스테인레스 생물반응기를 교반하였다.

[0568] 파종 밀도는 최적의 수율에 대해 결정되었다.

[0569] 무혈청 배지가 전형적으로 사용되었다.

[0570] 전형적으로, 페드-배치(fed-batch) 프로세스.

[0571] 전형적으로, 온도 이동이 있었다.

[0572] 생물반응기에서의 배양 기간은 8 내지 14일로 예상되었다.

[0573] 수화 시점에서의 생육력은 한정되었다.

[0574] 여과에 의해 수화물이 정화되었다.

[0575] 정화 후에, 그리고 정제 전에 수화물을 2-8°C에서 보관하였다.

실시예 15: 인간화 mAb의 대규모 정제

[0576] [0577] 약물 물질 정제 공정은 전형적으로 4단계로 구성되었다: 단백질 A 크로마토그래피, 음이온 교환 크로마토그래피 (Q 세파로스), 양이온 교환 크로마토그래피 (CM 세파로스), 및 초여과/투석여과 (UF/DF). 일반적으로 친화성 컬럼이 수화 및 정화 후의 첫번째 단계였다. 이러한 컬럼에서는 고정된 단백질 A 수지가 전형적으로 사용되었다. 이러한 친화성 단계에서 숙주 세포 단백질 및 DNA와 관련하여 항체가 정제되었다. 잠재적인 바이러스를 불활성화시키기 위해, 전형적으로 용출물을 바이러스 불활성화 공정에 적용한 후, 음이온 교환 크로마토그래피 단계에 적용하여 숙주 세포 단백질, DNA, 단백질 A, 및 잠재적인 바이러스를 감소시켰다. 이어서, 숙주 세포 단백질 및 항체 응집물의 나머지 양을 추가로 감소시키기 위한 양이온 교환 크로마토그래피 단계가 전형적으로 사용되었다. 마지막으로, 풀을 투석여과하고, 추가로 농축시킨다.

[0578] 대표적인 정제 공정:

[0579] 단백질 A 컬럼 전에 수화물을 농축하고 완충제를 교환할 수 있었다. 공정의 다음 단계는 단백질 A 컬럼 친화성 크로마토그래피였다. 결합된 항체가 낮은 pH의 완충제로 용출되었다. 바이러스를 불활성화시키기 위해, 단백질 A 용출물을 일정 기간 동안 유지시켰다.

[0580] 공정의 다음 단계는 항체 생성물을 통과하고 DNA 및 숙주 세포 단백질과 같은 오염물을 컬럼 수지에 결합하는 조건 하에서의 Q(+) 컬럼 상에서의 이온-교환 크로마토그래피일 수 있었다.

[0581] 공정의 다음 단계는 오염물이 컬럼을 통과하는 조건 하에서의 S(-) 컬럼 상에서의 2차 이온-교환 크로마토그래피일 수 있었다. 소수성 상호작용 컬럼 단계를 S(-) 컬럼 단계 대신 사용할 수 있었다. 공정의 다음 단계는 DV20 또는 플라노바(Planova) 필터를 사용하는 나노여과 바이러스 제거 단계일 수 있었다. 생성물이 필터를 통

과하였다. 공정의 최종 단계는 최종 약물 물질 제형 완충제 내로의 투석여과 및 표적 단백질 농도를 달성하기 위한 초여과였다.

[0582] 실시예 16: 뮤린 항-S1P 항체의 인간화 변이체의 생물학적 활성

[0583] 시험관내 세포 분석법

도 12에 제시된 바와 같이 화학요법제의 존재 하에 종양 세포 생존을 변경시키는 능력에 대해 인간화 항체를 테스트하였다. SKOV3 종양 세포를 세포자멸사성 실행물인 카스파제-3의 활성화에 의해 종양 세포 사멸을 유도하는 화학요법제인 탁솔에 노출시켰다. S1P는 미처리 대조군 세포와 비교하여 탁솔-유도 카스파제-3 활성화 및/ 또는 세포 사망을 감소시킬 수 있었다. 제조업자 (Promega, 카탈로그 번호 G7792)가 권장하는 바와 같이 세포 자멸사 분석법을 수행하였다. 간략하게, A549 세포 (2500개의 세포/웰)를 96웰 플레이트에 과종하고, 처리 전에 80% 전면성장으로 성장시켰다. 그후, 세포를 48시간 동안 맥코이(McCoy) 배지에서 0.1-1 mM 파클리탁셀 (Sigma, 카탈로그 번호 T 7409), 0.1-1 μ M S1P 및 1 μ g/ml의 항-S1P mAb로 또는 이들 없이 처리하였다. 48시간 후, 카스파제 분석법 완충제를 세포에 첨가하였다. 상등액 내의 카스파제-3 활성을 Apo-One 균질성 카스파제-3/7 분석 키트 (Promega, 카탈로그 번호 G7792)에 의해 제조업자의 프로토콜에 따라 측정하였다. 카스파제-3/7 활성을 비히클로 처리된 세포에 대한 형광 신호에서의 증가 배수로 표현되었다.

[0585] 카스파제-3 활성화가 S1P의 존재 하에 항-S1P mAb의 첨가에 의해 증가되었고, 이는 S1P의 보호성 항-세포자멸사 효과가 항체에 의한 S1P의 선택적인 흡수에 의해 제거되었음을 시사하였다. 인간화 항체 변이체인 huMAbHCLC₃ (LT1004) 및 huMAbHCLC₅ (LT1006) 양쪽 모두 LT1002와 비교하여 우수한 활성을 나타냈다. 동시에, 모든 변이체를 암 세포로부터의 S1P-유도 사이토카인 방출에 대한 효과에 대해 테스트하였다. S1P는 암 세포로부터 세포-컨디셔닝 배지 내로 IL-8의 상당한 방출을 유발하는 것으로 공지되어 있다. 마우스 대조군 항-S1P mAb의 첨가는 농도-의존적인 방식으로 난소암 세포로부터의 IL-8 방출을 감소시켰다. 2개의 인간화 변이체 huMAbHCcys1aLC₃ (LT1007) 및 huMAbHCcys1aLC₅ (LT1009)는 HuMAbHCLC₃ (LT1004) 및 huMAbHCLC₅ (LT1006)와 비교하여 IL-8 방출의 더욱 양호한 감소를 나타냈다.

[0586] 실시예 17: 혈관신생의 동물 모델에서의 뮤린 mAb (스평고맵) 대 인간화 mAb (소냅시주맵)의 생체내 효능

[0587] 맥락막 혈관신생 (CNV)은 브루크막에서의 파괴를 통해 맥락막으로부터 기원하는, 눈 내의 망막 색소 상피 하부 (RPE-하부) 또는 망막하 공간으로의 새로운 혈관의 성장을 지칭한다. CNV는 황반 변성 및 기타 눈 용태에서의 시력 상실의 주요 원인이다. S1P에 대한 mAb들의 평가를 위해 본 실시예에서 CNV의 마우스 모델이 사용되었다.

[0588] 인간화 항체 및 뮤린 항체를 도 13에 제시된 바와 같이 AMD의 CNV 동물 모델에서 혈관신생을 억제하는 능력에 대해 비교하였다. 마우스에게 0.5 μ g의 뮤린 (Mu; LT1002), 인간화 변이체 [LC3 (LT1004), LC5 (LT1006), HCcysLC3 (LT 1007) 및 HCcysLC5 (LT1009)] 또는 비-특이적 mAb (NS)를 유리체내 투여에 의해 2회 (제0일 및 제6일) 투여한 후, 브루크 막을 레이저로 파열시켰다. 레이저 수술 14일 후 마우스를 회생시켰다. 대조군 마우스는 수성 완충제 (PBS) 또는 이소타입-매칭 비-특이적 항체로 처리하였다. CNV 면적의 측정에 의해 평가했을 때 인간화 변이체 중 3개가 뮤린 항체와 본질적으로 동등하게 혈관형성을 억제하였다. CNV 병변 부피는 평균 + SEM로 표시된다. 경쇄 내에 5개의 역돌연변이를 함유하고 중쇄의 CDR2 내에 시스테인 돌연변이가 있는 인간화 변이체 (huMAbHCcysLC₅; LT1009)가 혈관신생을 현저하게 억제하였다. 이러한 차이는 통계학적으로 고도로 유의하였다.

[0589] CNV의 유도를 위해, 무균성 염수 내의 케타민 (14 mg/kg) 및 자일라진 (30 mg/kg)의 혼합물을 체중 20 g 당 5 μ l의 용량으로 복강내 투여하여 마우스를 마취시켰다. 그후, 각각 1방울의 안과용 트로피카미드 (0.5%) 및 폐닐에프린 (2.5%)으로 마우스의 동공을 확장시켰다. 50 μ m 스팟 크기로 150 mW에서 100 msec 펄스를 전달하도록 설정된 슬릿 램프에 커플링된 아르곤 녹색 안과용 레이저 (Oculight GL 532 nm, Iridex Corporation, Mountain View, CA)를 사용하여, 9시, 12시 및 3시 위치에서 시신경유두로부터 약 50 μ m에 위치한 오른쪽 눈의 3개의 사분원에서 브루크 막을 파열시켰다. 모든 사례에서 왼쪽 눈은 손상되지 않은 대조군으로서 작용하였다.

[0590] CNV 병변의 형태계측 및 부피측정을 하기와 같이 측정하였다. CNV를 레이저로 유도하고 나서 2주 뒤에, 동물들을 케타민-자일라진 혼합물의 과잉투여에 의해 안락사시킨 후, 기준에 기술된 바와 같이 ([Sengupta et al., 2003]), PBS (pH 7.5) 내의 4% 파라포름알데히드 (고정제) 6 ml를 심장 천자를 통해 전신에 관류시켰다. 그후, 눈을 적출하고, 가장자리에 대해 1 mm 후방에서 27g 바늘을 찌르고, 실온에서 1시간 동안 고정제에 함침시킨 후, 30분 동안의 PBS 내의 함침에 의해 2회 세정하였다. 그후, 눈을 절개하여, 망막 색소 상피, 맥락막모

세혈관층 및 공막으로 구성된 후안부를 단리하였다. 그후, 이러한 조직을 투과성하게 만들고, 로다민-접합 리시누스 코뮤니스 응집소 I (백터 Laboratories, Burlingame, CA)과 반응시켜, 기존에 기술된 바와 같이 ([Sengupta et al., 2003]; [Sengupta et al., 2005]), CNV 병변을 검출하였다. 그후, 후방부 컵을 4-7개의 방사상 슬라이스로 절단하고, RGB Spot 고해상도 디지털 카메라 및 레이저 스캐닝 공초점 현미경 (BioRad MRC 1024, BioRad Corporation, Temecula, CA)과 함께 형광 Zeiss Axioplan 2에 의해 디지털 영상을 포착하기 위해 Vectashield 항-퇴색(fade) 매질 (Vector Laboratories, Burlingame, VT)을 접적하여 현미경 슬라이드 상에 편평하게 마운팅하였다.

[0591] 포착된 디지털 영상을 ImageJ 소프트웨어 (Research Services Branch, National Institutes of Health, Bethesda, MD)를 사용하여 형태계측적으로 평가하였다. 영상들을 하기와 같이 적색 및 녹색 채널의 분석을 위해 개별적인 RGB 채널들로 분할하였다: 1) 특정 목표물 및 현미경에 대한 검정을 적용하여, 픽셀-대-길이 비율을 설정하였다; 2) Otsu 알고리즘을 사용하여 역치를 적용하였다; 3) 영상은 이중으로 만들었다; 4) 전체 병변 면적을 포함하도록 관심 영역 (ROI)의 윤곽을 그렸다; 5) ROI 내의 역치 수준을 초과하는 픽셀 면적을 정량하기 위해 입자 분석을 수행하였다. 부피측정 분석을 위해, z-시리즈 포착이 사용된 것을 제외하고는 프로세스는 상기 기술된 것과 유사하였다. z-시리즈 전반에 걸친 병변 면적의 합계에 z 두께 (전형적으로 4 μm)를 곱하여, 병변 부피를 수득하였다.

[0592] 이러한 모델에서 테스트된 약물 제품은 LT1002 (S1P에 대한 뮤린 mAb; 스팽고맵™); LT1004 (인간화 mAb), LT1006 (인간화 mAb), LT1007 (인간화 mAb) 및 LT1009 (인간화 mAb; 소냅시주맙™)였다. 염수 비허를 및 비-특이적 항체 (NSA) 대조군이 또한 포함되었다. 도 13에 나타난 바와 같이, 뮤린 mAb LT1002 (스팡고맵™) 및 인간화 mAb LT1009 (소냅시주맙™) 양쪽 모두 이러한 CNV 마우스 모델에서 병변 크기를 현저하게 감소시켰다. 테스트된 모든 mAb가 병변 크기의 약 80-98% 감소를 나타냈고, 이는 모든 경우에 유의하였다 (염수에 대해 $p<0.001$). 더욱이, LT1007 및 LT1009 또한 비-특이적 항체 대조군과 비교하여 현저한 억제 ($p<0.05$)를 나타냈다. 병변 크기의 억제 백분율은 대략적으로 LT1002 (뮤린)에 대해 80%, LT1004 (인간화)에 대해 82%, LT1006에 대해 81%, LT1009에 대해 99%였다. 따라서, LT1009가 혈관신생의 이러한 생체내 모델에서 가장 활성인 인간화 mAb 변이체였다.

실시예 18: 소냅시주맙 용량 응답의 결정

[0593] 마우스 ($n=10$)에게 레이저에 의해 브루크 막의 파열을 유도하기 하루 전에 상승 용량의 소냅시주맙 (0.05, 0.5, 1.0 또는 3.0 $\mu\text{g}/\text{눈}$) 또는 고용량의 비-특이적 (NS) 항체 (3.0 $\mu\text{g}/\text{눈}$)를 양측성으로 유리체내에 단일 주사하였다. 레이저 파열 14일 후, 마우스를 마취하고, 플루오레세인-표지 텍스트란을 관류시키고, CNV 병변 크기의 분석을 위해 맥락막 플랫마운트를 제조하였다.

[0594] 이러한 연구에서, 희생 직전에 동물에게 플루오레세인-표지 텍스트란을 관류시키는, CNV 면적을 정량하기 위한 또 다른 인가된 방법을 사용하여 CNV 억제에 대한 소냅시주맙 투약 용량 및 투약 간격의 효과를 시험하였다. 소냅시주맙은 CNV 면적에서 용량-의존적 감소를 유도하여, 3.0 $\mu\text{g}/\text{눈}$ 의 용량에서 약 50%의 최대 억제를 초래하였다. 이러한 감소는 유의하였다 (쌍을 이루지 않은 t-테스트를 사용하여 비-특이적 항체 대조군과 비교하여 $p < 0.0001$). 투약 빈도 연구에서, 14일 연구에 걸쳐 단일 시점 (제0일) 또는 다중 시점 (제0일 및 제7일)에 소냅시주맙으로 처리된 군들 간에 유사한 효능이 관찰되었다.

[0595] 소냅시주맙 처리 (3.0 $\mu\text{g}/\text{눈}$)에서 나타난 약 50%의 최대 억제는 VEGF-트랩(Trap) (4.92 $\mu\text{g}/\text{눈}$)에 의한 CNV 면적에서의 감소를 나타내는, 동일한 연구원에 의해 수행된 동일한 모델에서의 기존에 보고된 데이터에 필적하였다. [Saishin, et al. J Cell Physiol, 2003. 195(2): p. 241-8]. "트랩" (Regeneron Pharmaceuticals, Inc.)은 2개의 독특한 수용체 성분 및 Fc 영역으로 칭해지는 항체 분자의 Fc 영역 간의 융합물이고, Regeneron은 눈 질환 및 암에 대해 VEGF-트랩을 추적하고 있다. 이러한 2개의 독립적인 연구의 비교는 소냅시주맙에 의한 CNV 병변 크기의 감소가 VEGF-트랩으로 관찰된 것보다 점수가 20% 더 높았음을 나타낸다. 따라서, 이러한 데이터는 CNV의 뮤린 모델에서의 병변 형성을 감소시키는 항-S1P 요법의 능력에 관한 본 발명가들의 예비적인 발견을 입증할 뿐만 아니라, 또한, CNV 병변 형성을 억제하는 인간화 항체 소냅시주맙의 증가된 효능을 설명하고, 항-투과성 효과의 통찰을 제공한다.

실시예 19: 미숙아 당막병증의 뮤린 모델에서 당막 혈관신생의 발달을 감소시키는 것에서의 소냅시주맙의 효능

[0596] C57BL/6 마우스 ($n=7$)를 생후 제7일에 75% 산소 내에 놓고, 생후 제12일에 실내 공기로 돌려보내고, 한쪽 눈에 3 μg 의 소냅시주맙을, 반대쪽 눈에 비허클을 안내 주사하였다. 제17일에, 마우스에게 FITC로 표지된 항-PECAM

항체를 안내 주사하고, 8시간 후, 마우스를 안락사시키고, 눈을 제거하여 PBS-완충 포르말린에 실온에서 5분 동안 고정시켰다. 망막을 절개하고, 0.25% 트리톤 X-100을 함유하는 포스페이트-완충 염수로 세정하고, 전체를 마운팅하였다. 슬라이드를 Nikon 형광 현미경으로 관찰하였고, 망막 당 망막 NV의 면적을 영상 분석에 의해 측정하였다.

[0599] 뮤린 레이저 파열 모델에서 관찰된 CNV 감소와 일관되게, 본 발명가들은 미숙아 망막병증 (ROP)의 뮤린 모델에서 CNV에서의 극적인 감소를 관찰하였다. 소냅시주맙 (3.0 $\mu\text{g}/\text{눈}$)의 유리체내 투여로 염수 대조군과 비교하여 망막 혈관신생에서 거의 4배의 감소가 초래되었다. 이러한 데이터로, 허혈을 통해 또는 브루크 막의 파열을 통해 유도되든지 망막 및 맥락막 혈관상 양쪽 모두에서 병리학적 눈 혈관형성을 억제하는 소냅시주맙의 효능이 증명되었다.

실시예 20: 매트리겔 플러그 분석법에서의 VEGF-유도 혈관형성에 대한 소냅시주맙의 효과

[0600] [Staton, et al., Int J Exp Pathol, 2004. 85(5): p. 233-48]에 기술된 바와 같이 GFR 매트리겔 플러그 분석을 사용하여 생체내 혈관신생이 수행되었다. 4-6주령 nu/nu 마우스의 왼쪽 옆구리에 500 μl 의 빙냉 GFR 매트리겔을 주사하였다. GFR 매트리겔을 단독으로 (대조군), 또는 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 헤파린이 보충된 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ VEGF의 첨가 후에 주사하였다. 군은 대조군 및 소냅시주맙 처리에 대해 3마리의 동물로 구성되었다. GFR 매트리겔을 이식하기 하루 전에 동물들을 염수 또는 소냅시주맙 (10 mg/kg)으로 처리하였고, 실험 기간 동안 72시간마다 용량을 복강내 투여하였다. 12일 후, 동물들을 희생시켰다; 플러그를 절제하고, 즉각적으로 아연 및 포르말린이 없는 고정제에 하룻밤 동안 함침시키고, 파라핀에 매립하여 절편화하였다 (5 μm). 그후, 파라핀에 매립된 절편을 CD31 (Pharmingen)에 대해 염색하였다. 디지털 카메라로 20 \times 확대로 영상 (절편 당 9개의 영상, 플러그 당 3개의 절편)을 사진찍은 후, CD31 양성을 PhotoShop 6.0 프로그램으로 정량하고, ImageJ에 의해 혈관형성 점수 (픽셀²)로 나타냈다.

[0601] 소냅시주맙의 항-혈관형성 효과가 이러한 매트리겔 플러그 분석법에서 명백하였다. 예상대로, 광범위한 혈관신생 (소냅시주맙 또는 VEGF이 없는 미처리 대조군에서 보이는 것의 약 5.75 \times)이 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ VEGF가 보충된 매트리겔 플러그에서 유도되었다. 중요하게, 매트리겔 주사 전에 소냅시주맙을 전신 복강내 처리하면, 세포증식성 및 미세혈관 밀도에서의 이러한 VEGF-자극 증가의 거의 80%가 방지되었다. 이러한 감소는 유의하였고 (VEGF 단독과 비교하여 $p<0.05$), 동물에게 전신 투여되는 경우 소냅시주맙의 강력한 항-혈관형성 활성을 확증하며, 소냅시주맙이 VEGF-유도 혈관형성을 현저하게 억제할 수 있다는 것을 강력하게 시사한다. 이러한 발견은 S1P 항체가 뮤린 동소 유방암 모델에서 VEGF를 포함하는 여러 혈관형성성 인자의 혈청 수준을 감소시킨 Lpath의 종양학 프로그램으로부터의 데이터와 일관된다.

[0602] AMD와 관련된 혈관 성장의 주요 성분은 성장 중인 내피판을 외장하고 지지하는 혈관주위세포의 동원이다. [Jo, et al., Am J Pathol, 2006. 168(6): p. 2036-53]. 트랜스제닉 마우스 연구는 VEGF 및 PDGF-B가 혈관 성숙 및 안정화에 이르는 혈관주위세포의 침윤 및 분화를 자극하는 주요 인자라는 것을 나타냈다. [Guo, et al., Am J Pathol, 2003. 162(4): p. 1083-93]; [Benjamin, L.E., I. Hemo, and E. Keshet, Development, 1998. 125(9): p. 1591-8]. 중요하게, S1P는 VEGF 및 PDGF의 교차-활성화를 촉진한다. 따라서, 이러한 성장 인자들을 간접적으로 중화시키는 소냅시주맙의 능력은 소냅시주맙이 AMD 동안의 비정상적인 혈관 성장을 방지할 수 있음을 시사한다.

실시예 21: 소냅시주맙이 브루크 막의 레이저 파열 후의 혈관 누출을 현저하게 억제한다

[0603] 혈관 누출 억제 (상기 제시된 바와 같은 혈관신생 억제에 더하여)를 위해 투여된 소냅시주맙의 효능을 브루크 막의 레이저 파열의 뮤린 모델에서 평가하였다.

[0604] C57BL/6 마우스 ($n=10$)의 각각의 눈 내의 3곳에서 브루크 막을 레이저로 파열시키고, 한쪽 눈에는 3 μg 의 소냅시주맙을, 반대쪽 눈에는 비히클을 안내 주사하였다. 레이저 파열 1주일 후, 마우스에게 체중 1 g 당 12 μl 의 1% 플루오레세인 소듐을 복강내 주사하고, 5분 후에 안락사시켰다. 눈을 제거하고, PBS-완충 포르말린에 실온에서 5분 동안 고정시켰다. 그후, 망막을 절개하고, 세정하고, 1차 항-PECAM-1과 함께 인큐베이션하였다. 그후, 망막을 세정하고, 2차 항체 (로디민과 접합된 염소 항-래트 IgG)와 함께 인큐베이션한 후, 편평하게 마운팅시켰다.

[0605] CNV 병변 면적의 정량을 PECAM-1 염색에 의해 측정하였다. 혈관 누출의 정량을 플루오레세인 소듐 염색에 의해 측정하였다. CNV로부터의 누출의 총면적 = CNV + 누출 (녹색) - CNV의 면적 (적색). 값들은 $n = 10$ 마리의 마우스/군에 대한 평균 \pm SEM을 나타낸다. 맥락막 혈관신생의 면적 (PECAM-1에 의해 염색됨)은 LT1009로 처리된

동물에 대해 약 0.015 mm³, 염수로 처리된 대조군 동물에 대해 약 0.03 mm³였다. 이는 혈관신생에서의 50% 감소였다 (p=0.018). 맥락막 혈관신생으로부터의 누출의 면적 (플루오레세인에 의해 염색됨)은 LT1009로 처리된 동물에 대해 약 0.125 mm², 염수로 처리된 대조군 동물에 대해 약 0.2 mm²였다. 이는 대략적으로 혈관 누출에서의 38% 감소였다 (p=0.017).

[0608] 3.0 µg/눈의 소냅시주맙 또는 PBS 대조군으로 처리된 마우스에서의 맥락막 혈관신생 및 혈관 누출에서의 감소의 대표적인 면역조직화학적 영상이 이러한 결과와 일관적이었다. 따라서, CNV를 감소시키는 것에 더하여, 소냅시주맙은 브루크 막의 레이저 파열 후의 혈관 누출을 현저하게 감소시켰다. 시력 상실에서 주요한 역할을 하는 망막 부종은 (i) AMD에서의 맥락막 신생혈관 누출 및 (ii) 당뇨병에서의 혈액-망막 장벽의 파괴와 관련된다. [Gerhardt, H. and C. Betsholtz, Cell Tissue Res., 2003, 314(1): p. 15-23]. 소냅시주맙은 눈에서의 병리학적 혈관 형성 뿐만 아니라, 망막 부종을 초래하는 혈관 누출을 감소시킨다. 이러한 발견은 마우스에게 플루오레세인-표지 텍스트란을 관류시킨 CNV-면적-정량 실험으로부터 생성된 데이터와 일관적이다. 이러한 방법을 통한 CNV 정량은 확실하게 혈관 투과성에 의해 영향을 받는다. 고도로 유리한 결과들이 맥락막 혈관상에서의 항-투과성 효과에 대해 논쟁된다. 이러한 데이터 하에, 본 발명가들은 소냅시주맙에 단독요법일 잠재력이 있는 것으로 믿는다. 현재의 pan-VEGF-A 차단제와의 상승작용성 효과의 가능성이 또한 존재한다.

실시예 22: SIP에 대한 항체로의 처리 후 망막에서의 대식세포 침윤의 감소

[0609] 연령-관련 황반 변성 (AMD)은 선명한 중심 시력이 점진적으로 파괴되는 노화와 관련된 질환이다. 황반 변성에는 2가지 주요 유형이 있다. 건식 또는 위축성 형태가 AMD 사례의 85-90%를 차지하고, 습식 형태의 AMD는 비정상적인 혈관의 성장을 특징으로 한다. 주로 황반 영역 내의 열화되고 있는 조직으로부터의 침착물 또는 잔해물로부터 드루젠크로 알려진 황색을 띠는 얼룩이 축적되기 시작할 때 건식 황반 변성이 진단된다. 점진적인 중심 시력 상실이 발생할 수 있다. 가장 유행성인 위축성 (건식) 형태의 AMD에 대한 효과적인 처치가 없다. 광수용체 세포 아래에 있고, 정상적으로는 이러한 광-감각 세포에 중요한 대사성 지지를 제공하는 망막 색소 상피 (RPE)에서의 이상에 의해 위축성 AMD가 촉발된다. RPE 기능장애에 2차적으로, 황반 간체(rod) 및 추체(cone)가 변성되어, 비가역적인 시력 상실에 이른다. 산화 스트레스, 허혈, 드루젠크로의 형성, 리포푸신의 축적, 국소적인 염증 및 반응성 신경아교증은 위축성 AMD의 발병기전에 연루된 병적 프로세스를 나타낸다. 이러한 프로세스들 중에서, 염증이 조직 손상에 대한 주요 기여인자로 드러나고 있다. 건식 AMD 환자의 황반 내로의 대식세포 침윤이 손상성 염증 응답의 중요한 성분인 것으로 나타났다. 따라서, 대식세포 침윤의 억제는 황반 조직 손상을 감소시킬 것이기 때문에, 대식세포 침윤을 완화시킬 수 있는 작용제는 유용한 치료제일 것이다. 이같은 작용제는 건식 AMD가 습식 AMD로 전환되는 속도를 또한 감소시킬 수 있다.

[0610] 허혈성 및 염증성 망막병증의 모델에서, 현재 항-SIP 항체로의 처리 후 대식세포 침윤의 55% 억제가 나타났다. 잘 확립된 뮤린 산소 유도 망막병증 모델 (미숙아 망막병증 (ROP) 모델로 또한 알려짐)을 사용하여 이러한 데이터가 생성되었다. 구체적으로, C57BL/6 마우스를 생후 제7일에 75% 산소 내에 놓고, 생후 제12일에 실내 공기로 돌려보내고, 한쪽 눈에 3 µg의 인간화 항-SIP 항체 (LT1009, 소냅시주맙™)을, 반대쪽 눈에 비히클을 안내 주사하였다. 생후 제17일에, 마우스에게 F4/80 (pan-대식세포 마커)에 대한 FITC-표지 항체를 안내 주사하고, 8시간 후, 마우스를 안락사시켰다. 안구를 제거하여 PBS-완충 포르말린에 실온에서 5분 동안 고정시켰다. 망막을 절개하고, 0.25% 트리톤 X-100을 함유하는 포스페이트-완충 염수로 세정하고, 전체를 마운팅하였다. 슬라이드를 Nikon 형광 현미경으로 관찰하였고, 망막 대식세포를 정량하였다. 결과가 하기 표 8에 제시된다.

표 8

SIP에 대한 인간화 모노클로날 항체로의 처리에 의한
망막에서의 대식세포 침윤 감소

망막 당 대식세포의 #		대식세포 밀도에서의 감소%	
염수 대조군	SIP 항체	염수 대조군	SIP 항체
2513 ± 115	1136 ± 33	100 ± 0.5	55.4 ± 1.3
P<0.001		P<0.0001	

[0611] 이러한 데이터 및 건식 AMD의 발병기전에서의 대식세포의 공지된 역할을 기초로, 항-SIP 항체가 건식 AMD의 치

치를 위한 효과적인 치료제를 나타내는 것으로 여겨진다.

[0614] 실시예 23: 25-75 mg/kg LT1009 (단독, 및 아바스틴 또는 파클리탁셀과의 조합물)로의 처리에 대한 누드 NCr 마우스에서의 SC COLO205 결장직장 종양 이종이식편의 응답

본 연구의 목적은 암컷 Ncr (nu/nu) 마우스에 피하 이식 (sc)되어 확립된 인간 결장직장 (COLO205) 암종 종양의 진행을 지연시키는, 단독 LT1009 및 또다른 항암제와 조합된 LT1009의 효능을 결정하는 것이었다.

[0616] 누드 마우스에게 생체내 계대로부터의 COLO 205 종양을 마우스 당 1개의 단편으로 오른쪽 옆구리 근처에 피하 이식하였다. 각각의 실험 내의 60마리의 마우스에서 크기가 약 100 내지 200 mm³ 범위인 종양이 확립되었을 때 모든 처리를 시작하였다. 그후, 마우스 (n=10마리/군)를 25 mg/kg LT1009, 50 mg/kg LT1009, 40 mg/kg 아바스틴, 50 mg/kg LT1009 + 40 mg/kg 아바스틴, 15 mg/kg 파클리탁셀 또는 비히클 (염수)로 처리하였다. 25 또는 50 mg/kg LT1009 및 염수는 실험 기간 동안 체중 20 g 당 0.1 mL의 부피로 3일마다 한번씩 복강내 투여하였다. 아바스틴은 7일에 한번의 스케줄로 40 mg/kg/용량의 투여량으로 체중 20 g 당 0.1 mL의 부피로 주사하여 정맥내 투여하였다. 파클리탁셀 (양성 대조군)은 하루에 한번×5 스케줄로 15 mg/kg/용량의 투여량으로 체중 10 g 당 0.1 mL의 부피로 주사하여 정맥내 투여하였다. 제21일에, 25 mg/kg LT1009의 용량을 실험 기간 동안 75 mg/kg LT1009로 증가시켰다.

[0617] 사망률에 대해 동물을 매일 관찰하였다. 처리 첫번째 날에 시작하고 연구 종결일을 포함하여, 종양 치수 및 체중을 일주일에 2번 수집하였다. 각각의 연구의 비히클-처리 대조군에서의 종양 중앙값이 약 4,000 mg에 도달했을 때, 연구를 종결하였다. 각각의 동물로부터의 종양을 수확하고, 습식 중량을 기록하고, CD-31 염색에 의한 미세혈관 밀도 (MVD)의 결정을 위해 종양을 프로세싱하였다. 타원형 구체에 관한 식 ($I \times w^2 / 2 = \text{mm}^3$ (식중 I 및 w 는 각각의 측정에서 수집된 더 큰 치수 및 더 작은 치수를 지칭한다)을 사용하고, 단위 밀도 ($1 \text{ mm}^3 = 1 \text{ mg}$)를 가정하여, 종양 중량 (mg)을 계산하였다.

표 9

측정치의 숫자 요약-Colo205

처리	최종 종양 중량 (mg)	비히클로 처리된 마우스와 비교된 감소 %	
		비히클	비교된 감소 %
50 mg/kg LT1009	3047.25	-	
25/75 mg/kg	2071.17	32%	
LT1009	2465.60	20%	
아바스틴	1967.90	35%	
아바스틴 + 50 mg/kg			
LT1009	1614.40	48%	
파클리탁셀	0	100%	

[0618]

[0619] 최종 종양 중량에 의해 측정했을 때 50 mg/kg LT1009는 염수로 처리된 동물로부터의 종양과 비교하여 32%만큼 종양 진행을 실질적으로 억제하였다 ($p<0.018$). 25/75 mg/kg LT1009 또한 최종 종양 중량을 20%만큼 감소시키는데 효과적이었다; 그러나, 이러한 감소는 통계적으로 유의하지 않았다. 50 mg/kg LT1009는 최종 종양 중량을 감소시키는데 아바스틴만큼 효과적이었다 (각각 32% 대 35% 감소). LT1009과 아바스틴의 조합은 염수로 처리된 동물과 비교하여 종양 중량에서의 48% 감소를 나타내어, 한쪽 작용제 단독보다 더욱 효과적이었다. 따라서, LT1009 및 아바스틴의 효과는 부가적인 것으로 보인다. 양성 대조군인 파클리탁셀은 예비-확립된 종양을 완전하게 제거하였다.

[0620] 실시예 24: 50 mg/kg LT1009 (단독, 및 아바스틴 및 5-FU와의 조합물)로의 처리에 대한 누드 NCr 마우스에서의 SC HT29 결장직장 종양 이종이식편의 응답

본 연구의 목적은 암컷 무흉선 NCr-nu/nu 마우스에 피하 이식된 인간 HT29 결장 종양 이종이식편에 대한, 단독 LT1009 및 또다른 항암제와 조합된 LT1009의 항-종양 효능을 결정하는 것이었다.

[0622] 누드 마우스에게 생체내 계대로부터의 HT29 종양을 마우스 당 1개의 단편으로 오른쪽 옆구리 근처에 피하 이식하였다. 각각의 실험 내의 60마리의 마우스에서 크기가 약 100 내지 200 mm³ 범위인 종양이 확립되었을 때 모든 처리를 시작하였다. 처리 군 당 10마리의 마우스가 있었다. 50 mg/kg LT1009 및 염수는 실험 기간 동안 체중 20 g 당 0.1 mL의 부피로 2일마다 한번씩 복강내 투여하였다. 75 mg/kg 5-FU 및 20 mg/kg 아바스틴은 4일에 한번의 스케줄로 각각 75 mg/kg/용량 및 20 mg/kg/용량의 투여량으로 체중 10 g 당 0.1 mL의 부피로 주사하여 복

강내 및 정맥내 투여하였다. LT1009의 최초 용량은 정맥내 투여된 100 mg/kg으로 구성되었다.

[0623] 사망률에 대해 동물을 매일 관찰하였다. 처리 첫번째 날에 시작하고 연구 종결일을 포함하여, 종양 치수 및 체중을 일주일에 2번 수집하였다. 각각의 연구의 비히클-처리 대조군에서의 종양 중앙값이 약 4,000 mg에 도달했을 때, 연구를 종결하였다. 각각의 동물로부터의 종양을 수확하고, 습식 중량을 기록하고, CD-31 염색에 의한 MVD의 결정을 위해 종양을 프로세싱하였다. 타원형 구체에 관한 식 $(I \times w^2)/2 = \text{mm}^3$ (식중 I 및 w 는 각각의 측정에서 수집된 더 큰 치수 및 더 작은 치수를 지칭한다)을 사용하고, 단위 밀도 ($1 \text{ mm}^3 = 1 \text{ mg}$)를 가정하여, 종양 중량 (mg)을 계산하였다.

표 10

최종 종양 중량 - HT29

처리	최종 종양 중량 (mg)	유의성 (p-값)	비히클로 처리된 마우스와 비교된 감소 %
비히클	2723.67	-	-
LT1009	2390.63	1.00	13%
아바스틴	1927.44	0.39	30%
LT1009 + 아바스틴	1624.90	0.001	41%
5-FU	1963.71	0.099	28%
LT1009 + 5-FU	1948.00	0.049	29%

[0624]

[0625] 종양 중량에 의해 측정했을 때, 염수로 처리된 동물로부터의 종양과 비교하여 50 mg/kg LT1009는 종양 진행을 13%만큼 감소시켰고, 아바스틴은 종양 중량을 30%만큼 감소시켰다. LT1009과 아바스틴의 조합은 염수로 처리된 동물과 비교하여 종양 중량에서 통계학적으로 유의한 41% 감소를 나타내어, 한쪽 작용제 단독보다 더욱 효과적이었다. 5-FU로의 처리는 종양 중량을 28%만큼 감소시켰다. 5-FU는 최종 종양 중량의 29% 억제를 나타내어, LT1009와 최소 부가 효과를 나타냈다.

실시예 25: 50 mg/kg LT1009 (단독, 또는 파클리탁셀과의 조합물)로의 처리에 대한 누드 NCr 마우스에서의 SC DU145 전립선 종양 이종이식편의 응답

[0626] 본 연구의 목적은 암컷 Ncr (nu/nu) 마우스에 피하 이식 (sc)되어 확립된 인간 전립선 (DU145) 암종 종양의 진행을 지연시키는, 단독 LT1009 및 또다른 항암제와 조합된 LT1009의 효능을 결정하는 것이었다.

[0627] [0628] 누드 마우스에게 생체내 계대로부터의 DU145 종양을 마우스 당 1개의 단편으로 오른쪽 옆구리 근처에 피하 이식 하였다. 각각의 실험 내의 60마리의 마우스에서 크기가 약 100 내지 200 mm³ 범위인 종양이 확립되었을 때 모든 처리를 시작하였다. 그후, 마우스 (n=10마리/군)를 50 mg/kg LT1009, 20 mg/kg 아바스틴, 7.5 mg/kg 파클리탁셀, 50 mg/kg LT1009 + 20 mg/kg 아바스틴, 50 mg/kg LT1009 + 7.5 mg/kg 파클리탁셀 또는 비히클 (염수)로 처리하였다. 50 mg/kg LT1009 및 염수는 실험 기간 동안 체중 20 g 당 0.1 ml의 부피로 2일마다 한번씩 복강내 투여하였다. 파클리탁셀 및 아바스틴은 각각 하루에 한번×5 및 4일에 한번 7.5 mg/kg/용량 및 20 mg/kg/용량으로 체중 10 g 당 0.1 ml의 부피로 주사하여 정맥내 및 복강내 투여하였다. LT1009의 최초 용량은 정맥내 투여된 100 mg/kg으로 구성되었다.

[0629] 연구 과정 동안, 3개의 축에서 피하 종양을 측정하고 부피를 계산함으로써 종양 성장을 모니터링하였다. 연구 말기에, 최종 종양 중량 및 부피를 결정한 후, 마우스를 희생시키고, 종양을 수확하였다. 그후, 종양의 미세혈관 밀도 (MVD)를 CD-31 염색에 의해 결정하였다.

표 11

측정치의 숫자 요약 - DU145

처리	최종 종양 중량 (mg)	유의성 (p-값)	비히클로 처리된 마우스와 비교된 감소 %
비히클	2703	-	-
LT1009	2242	0.00	28%
아바스틴	578	0.00	79%
LT1009 + 아바스틴	676	0.00	75%
파클리탁셀	539	0.00	80%
LT1009 + 파클리탁셀	373	0.00	84%

[0630]

[0631] 최종 종양 중량에 의해 측정했을 때 50 mg/kg LT1009은 28%만큼 종양 진행을 유의하게 감소시켰다 ($p<0.00$). 아바스틴 및 파클리탁셀 또한 염수로 처리된 동물로부터의 종양과 비교하여 80%만큼 최종 종양 중량을 유의하게 감소시켰다 ($p<0.00$). 최종 종양 부피에 의해 측정했을 때, LT1009는 아바스틴 또는 파클리탁셀의 항-종양 활성을 유의하게 증가시키지 않았다.

[0632] 실시예 26: 25 mg/kg 또는 50 mg/kg LT1009 (단독, 및 보르테조밉(Bortezomib)과의 조합물)로의 처리에 대한 CB17 SCID 마우스에서의 RPMI 8226 인간 골수종 종양 이종이식편의 응답

[0633] 본 연구의 목적은 암컷 CB17 SCID 마우스에 피하 이식된 인간 RPMI 인간 골수종 종양 이종이식편에 대한, 단독 LT1009 및 항암제 보르테조밉과 조합된 LT1009의 항-종양 효능을 평가하는 것이었다.

[0634] 누드 마우스 (CB17 SCID, 4-5주령, 체중 18-22 gm, Harlan으로부터 수득된 암컷 마우스)에게 조직 배양으로부터 수확된 RPMI 8226 세포를 피하 주사하였다 (약 1×10^7 개의 세포/마우스). 종양이 약 100 mm³ 크기로 성장하였을 때, 동물들을 종양 크기에 의해 처리군 및 대조군 (10마리의 마우스/군)으로 쌍으로 매칭시켰다. 최초의 투약은 매칭 후 제1일에 시작하였다. 모든 군의 동물들에게 체중을 기준으로 투약하였다 (0.01 mL/g; 10 mL/kg). 비히클 내의 LT1009는 연구를 완료할 때까지 3일마다 한번씩 복강내 (IP) 주사에 의해 투여하였다 (말기까지 3 일에 한번). 보르테조밉은 6회의 처리에 대해 3일에 한번씩 꼬리 정맥을 통한 정맥내 주사에 의해 주사하였다 (3일에 한번×6). 음성 대조군으로서 작용하기 위해, LT1009 비히클 (0.9% 염수)을 말기까지 3일에 한번의 스케줄로 복강내 투여하였다.

[0635] 제1일에 시작하여 연구를 완료할 때까지 개별적인 종양 부피 및 군 평균 종양 부피 ± SEM을 일주일에 두번씩 기록하였다. 각각의 군에 대한 최종 평균 종양 부피 ± SEM을 연구 완료 시에 보고하였다; 부분적인 종양 퇴행 또는 완전한 종양 퇴행이 있는 동물 또는 기술적인 사망 또는 약물-관련 사망이 있는 동물은 이러한 계산으로부터 삭제하였다.

표 12

최종 종양 부피 - RPMI

처리	최종 종양 중량 (mg)	비히클로 처리된 마우스와 비교된 감소 %	
		비히클	보르테조眇
비히클	2083	0	
보르테조眇	1664	20%	
25 mg/kg LT1009	1860	11%	
50 mg/kg LT1009	1978	5%	
50 mg/kg LT1009 + 보르테조眇	1832	12%	

* * *

[0636] [0637]

[0638] 본원에서 기술되고 청구된 모든 조성물 및 방법은 본 명세서의 견지에서 과도한 실험 없이 제조되고 실행될 수 있다. 본 발명의 조성물 및 방법이 바람직한 실시양태의 관점에서 기술되었지만, 조성물 및 방법에 변동이 가능할 수 있다는 것이 당업자에게 명백할 것이다. 당업자에게 명백한 모든 이같은 유사한 대용물 및 변형은 첨부된 청구항에 의해 정의되는 바와 같은 본 발명의 취지 및 범주 내에 속하는 것으로 간주된다.

[0639] 명세서에서 언급된 모든 특허, 특히 출원 및 간행물은 본 발명이 속하는 업계의 당업자의 수준을 나타낸다. 모든 특허, 특히 출원 및 간행물 (우선권 및 기타 이익이 청구되는 것들 포함)은 각각의 개별적인 간행물이 거명에 의해 포함되는 것으로 명확하게, 그리고 개별적으로 지시되는 것과 동일한 정도로 거명에 의해 본원에 포함된다.

[0640] 적절하게 본원에서 설명적으로 기술된 발명은 본원에 구체적으로 개시되지 않은 임의의 요소(들)의 부재 하에서 실행될 수 있다. 따라서, 예를 들어, 본원에서의 각각의 경우에, 용어 "포함하는", "본질적으로 구성되는" 및 "구성되는" 중 하나가 나머지 2개의 용어 중 하나로 교체될 수 있다. 사용된 용어 및 표현은 제한적인 것이 아니라 설명의 관점으로 사용되고, 제시되고 기술된 양상 또는 이의 일부분의 임의의 등가물을 이같은 용어 및 표현의 사용에서 배제하려는 의도는 없으며, 청구된 본 발명의 범주 내에서 다양한 변형이 가능한 것으로 인식된다. 따라서, 본 발명이 바람직한 실시양태 및 선택적인 양상에 의해 구체적으로 개시되었지만, 본원에 개시된 개념의 변형 및 변동이 당업자에 의해 재구분될 수 있다는 것과 이같은 변형 및 변동이 첨부된 청구항에 의해 정의되는 바와 같은 본 발명의 범주 내에 속하는 것으로 간주된다는 것을 이해하여야 한다.

도면의 간단한 설명

도면의 간단한 설명

[0143] 본 출원은 컬러로 제작된 도면을 하나 이상 포함한다. 컬러 도면(들)이 있는 본 출원의 복사본은 요청시 필요한 비용을 지불하면 제공될 것이다. 각각의 도면의 간략한 요약이 하기에 제공된다.

[0145] 도 1. 도 1에는 2개의 패널 A 및 B가 있다. 패널 A는 비오틴-접합 항-S1P 모노클로날 항체에 대해 경쟁하는 S1P, SPH, LPA, SPC, 및 기타 구조적으로 유사한 생체지질에 대한 경쟁적 ELISA의 결과를 그래프로 도해한다. 이러한 결과는 항체가 S1P에 대해 특이적 및 감수성이고, 구조적으로 유사한 생체활성 지질을 인식하지 않는다는 것을 가리킨다. 하기 실시예 1에 논의된 바와 같이, 결합된 항체는 HRP와 접합된, 마우스 또는 인간 IgG에 특이적인 2차 항체로 검출되었다. 광학 광도 (OD)로서 발색 반응이 측정되어 보고되었다. 경쟁에 사용된 지질의 농도가 X축 상에 표시된다. S1P로 코팅된 매트릭스 단독과 2차 항체의 상호작용이 없음을 검출할 수 있었다 (데이터는 제시되지 않음). 패널 B는 패널 A에 열거된 S1P와 유사한 생체활성 지질들의 구조를 나타낸다.

[0146] 도 2. 이러한 도면은 여러 키메라 및 재조합 인간화 항-S1P 항체 변이체의 결합 성질을 나타낸다. 키메라 항체 (pATH10 + pATH50)에 대한 S1P 결합을 ELISA 결합 분석법에서 2가지 버전의 인간화 항-S1P 모노클로날 항체 (pATH201 + pATH308) 및 (pATH201 + pATH309)와 비교하였다. pATH308은 5개의 뮤린 역돌연변이가 있는 인간화 경쇄이고, pATH309는 프레임워크 영역 내에 3개의 역돌연변이가 있는 인간화 경쇄이다. 인간화 중쇄 (pATH20 1)는 프레임워크 영역 내에 오직 1개의 뮤린 역돌연변이만을 함유한다.

[0147] 도 3은 스팽고맵이 S1P에 고도로 특이적이라는 것을 나타내는 그래프이다. 경쟁적 ELISA를 사용하여 생성된 데이터인 그래프는 기타 생체활성 지질과 비교하여 S1P에 대한 스팽고맵의 특이성을 나타낸다. 스팽고맵은 S1P의 직접적인 대사 전구물질인 스팽고신 (SPH), 또는 S1P와 구조적 및 기능적으로 유사한 중요한 세포외 신호전달 분자인 라이소포스파티드산 (LPA)에 대해 교차반응성을 나타내지 않았다. 스팽고맵은 세라마이드-1-포스페이트 (C1P), 디히드로스팡고신 (DH-SPH), 포스파티딜 세린 (PS), 포스파티딜 에탄올아민 (PE), 또는 스팽고마이엘린 (SM)이 포함되는 또다른 구조적으로 유사한 지질 및 대사물을 인식하지 않았다. 스팽고맵은 디히드로스팡고신-1-포스페이트 (DH-S1P)와 교차반응하였고, 더 적은 정도로 스팽고실폴릴 콜린 (SPC)과 교차반응하였다. S1P에 대한 스팽고맵의 친화력 (Kd)은 대부분의 치료 항체, 특히 기타 분자 스폰지보다 훨씬 더 높은 100 pM 미만이었다.

[0148] 도 4. 도 4에는 2개의 부분 A 및 B가 있다. 이러한 도면에 제시된 데이터가 생성된 실험이 하기 실시예 4에 상술된다. 간략하게, 이러한 데이터는 스팽고맵이 눈 병변에서 CNV 및 흉터 형성을 감소시켰음을 나타낸다. 마우스를 스팽고맵 또는 이소타입-매칭 비-특이적 모노클로날 항체로 처리하였다. 브루크(Bruchs) 막의 레이저 파열에 의해 CNV 병변이 유도되었다. 혈관화에 대해 로다민-접합 리시누스 코뮤니스(*R. communis*) 응집소 I (A), 또는 콜라겐 흉터 형성에 대해 매이슨 트리크롬(Masson's Trichrome) (B)으로 염색된 각각의 처리 군으로부터의 병변의 대표적인 영상 및 그래프가 제시된다. 도 4A는 스팽고맵이 뮤린 CNV 병변 형성 모델에서 브루크 막을 레이저-유도 파열시키고 나서 14일 및 28일 후에 맥락막 혈관신생을 극적으로 감소시킨다는 것을 나타낸다. 도 4B는 스팽고맵이 브루크 막을 레이저-유도 파열시키고 나서 28일 후 CNV 병변 형성과 관련된 섬유증을 현저하게 감소시킨다는 것을 나타낸다.

[0149] 도 5. 도 5에는 2개의 패널 A 및 B가 있다. 패널 A에서, S1P는 HUVEC 관 형성의 유도를 통해 혈관신생을 촉진하는 것으로 나타나고, 이는 스팽고맵에 의해 감소된다. 패널 5A는 관 형성을 평가하기 위해 매트리겔 (Matrigel) 상에 파종되어 6시간 동안 인큐베이션된 HUVEC의 4장의 현미경사진을 나타낸다. 패널 5B는 매트리겔 침습 챔버에서 6시간 동안 1 μM S1P ± 스팽고맵 (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)으로 처리된 HUVEC에 대한 데이터를 나타낸다. 매트리겔 막으로 이동한 세포의 수를 5개의 독립적인 필드에서 계수하였다.

[0150] 도 6. 도 6은 스팽고맵을 사용하여 수행된 하기의 실시예 6에 기술된 실험에 대한 여과장의 사진 (A) 및 그래프 (B 및 C)를 포함한다. 스팽고맵은 S1P-, VEGF- 및 bFGF-유도 혈관신생을 중화시킨다. 도 6A는 매트리겔 플러그 ± 지시된 성장 인자의 절편으로부터의 여러 대표적인 FITC-염색 혈관의 사진을 나타낸다. 도 6B는 S1P가 내피 세포 (EC) 침윤을 자극한다는 것을 나타낸다. 도 6C는 혈관신생의 지표물로서의 VEGF 또는 bFGF로 자극된 매트리겔 플러그로부터의 상대적인 형광의 정량을 나타낸다. 1 또는 25 mg/kg의 스팽고맵으로 마우스를 전신 처리하였을 때 S1P, VEGF, 및 bFGF의 효과가 억제되었다.

[0151] 도 7은 A-E로 표지된 5개의 그래프, 및 2개의 컬러 사진을 나타낸다. 항-S1P 모노클로날 항체 스팽고맵을 사용하여 이러한 데이터가 생성되었다. 실험 상세사항에 대해서는 하기의 실시예 7 참조. 간략하게, 이러

한 데이터는 스팽고맵이 S1P-자극 흉터 형성을 중화한다는 것을 나타낸다. 이러한 실험에서, 섬유모세포를 혈청-고갈시킨 후, 0, 0.1, 0.5, 또는 $1 \mu\text{M}$ S1P $\pm 1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 스팽고맵으로 12-24시간 동안 처리하였다. 데이터는 3H-티미딘 혼입에 의해 측정된 S1P-자극 스위스 3T3 섬유모세포 증식 (A), 스크래치 분석법에서의 뮤린 심장 섬유모세포 이동 (B), 콜라겐-GFP를 발현하는 트랜스제닉(transgenic) 마우스로부터의 단리된 심장 섬유모세포에서의 콜라겐 유전자 발현 (상대적 형광) (C), 및 감소된 세포 증식 및 증가된 α -SMA 발현으로 측정된 근육섬유모세포로의 WI-38 세포 분화 (D)를 나타낸다. 스팽고맵은 각각의 이러한 S1P 효과를 중화하였다. 스팽고맵은 영구적인 심근 경색증의 뮤린 모델에서 생체내에서 혈관주위 섬유증을 감소시켰다 (E).

[0152] 도 8에는 3개의 패널 8A, 8B, 및 8C가 있다. 이러한 데이터는 S1P가 눈 상피 세포 및 섬유모세포의 수축성 흉터 조직-생산 근육섬유모세포로의 형질전환을 촉진한다는 것을 나타낸다. 하기 실시예 8에 기술된 바와 같이, 여러 인간 눈 세포주의 근육섬유모세포 형질전환에 대한 S1P의 효과를 시험하였다. S1P는 인간 망막 색소 상피 세포 (도 8A) 및 인간 결막 섬유모세포 (도 8B)에서 α -평활근 액틴 (α -SMA; 근육섬유모세포 마커)의 생산을 자극하는 것으로 확인되었다. 이러한 데이터는 S1P가 눈 상피 세포 및 섬유모세포의 수축성 흉터 조직-생산 근육섬유모세포로의 형질전환을 촉진하는 인자들 중 하나라는 것을 최초로 나타낸다. 인간 결막 섬유모세포 내의 플라스미노겐 활성화 억제제 (PAI-1)의 발현에 대한 S1P의 효과를 또한 시험하였다. 증가된 PAI-1 발현은 결합 조직의 단백질분해성 분해에서의 감소와 상관되고, 증가된 흉터생성을 수반하는 여러 섬유성 질환과 관련되어 상향조절된다. 도 8C에 나타난 바와 같이, S1P는 용량-의존적 방식으로 PAI-1 발현을 자극한다.

[0153] 도 9는 스팽고맵으로 칭해지는 항-S1P 모노클로날 항체를 사용하여 생성된 실험 데이터를 나타내는 2개의 막대 그래프 A 및 B를 나타낸다. 스팽고맵은 생체 내에서 면역-세포 상처 침윤을 감소시켰다. 마우스에게 MI를 적용시키고, 수술 48시간 후 염수 또는 $25 \text{ mg}/\text{kg}$ 스팽고맵으로 처리한 후, 제4일에 희생시켰다. 스팽고맵은 상처 내로의 대식세포 (A) 및 비만 세포 (B) 침윤을 감소시켰다. 데이터는 염수로 처리된 값의 배수 감소로 표시된다.

[0154] 도 10에는 2개의 패널 10A 및 10B가 있다. 각각의 패널은 뮤린 항-S1P 모노클로날 항체 V_L 및 V_H 도메인의 발현을 위한 클로닝 벡터의 지도를 나타낸다. 도 10A는 V_L 도메인의 클로닝을 위한 pKN100 벡터의 지도이다. 도 10A는 V_H 도메인의 클로닝을 위한 pG1D200 벡터의 지도이다.

[0155] 도 11은 여러 뮤린, 키메라 및 재조합 인간화 항-S1P 항체의 결합 성질을 나타내는 데이터를 제시한다. 마우스 (muMAbS1P; 사각형 데이터 포인트들로부터 생성된 곡선) 및 키메라 (chMAb S1P; 삼각형 데이터 포인트들로부터 생성된 곡선)에 대한 S1P 결합을 ELISA 결합 분석법에서 1차 버전의 인간화 항체 (pATH200 + pATH300; 역삼각형 데이터 포인트들로부터 생성된 곡선)와 비교하였다.

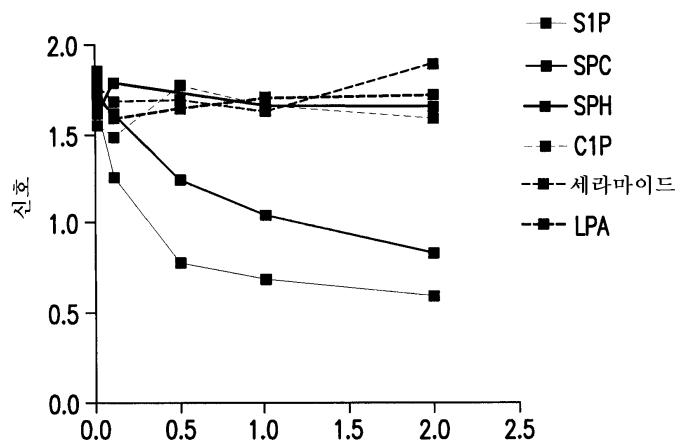
[0156] 도 12에는 여러 인간화 모노클로날 항체 변이체를 사용하여 수행된 시험관내 세포 분석법으로부터의 데이터를 나타내는 2개의 패널 A 및 B가 있다. 패널 A는 S1P가 SKOV3 세포를 택솔(Taxol)-유도 세포자멸사로부터 보호하는 것을 인간화 mAb가 방지할 수 있다는 것을 나타낸다. 하기 실시예 16에 기술된 바와 같이, SKOV3 세포를 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 농도의 huMAbHCLC₃ (309), huMAbHCLC₅ (308), muMAb S1P (muMAb), 또는 비-특이적 IgG1 (NS)과 함께 500 nM S1P의 존재 또는 부재 하에 48시간 동안 500 nM 택솔 (Tax)로 처리하였다. 값들은 각각의 데이터 포인트에 대해 삼중으로 실행된 평균 \pm SEM ($n=3$)으로 표시된다. "NT"는 처리되지 않았음을 의미하고, "Veh"은 비히클 단독을 가리킨다. 패널 B는 S1P 및 여러가지 상이한 항-S1P 모노클로날 항체 중 하나 또는 대조군 모노클로날 항체로 처리된 난소암 (OVCAR3) 세포에서의 IL-8 분비를 나타낸다. 하기 실시예 16에 상세하게 기술된 실험에서, 100,000개의 OVCAR3 세포/웰을 하룻밤 동안 고갈시키고, 1 uM S1P를 단독 배양 배지 또는 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 의 비-특이적 항체 (NS), pATH201+pATH309 (LC3), pATH201+pATH308 (LC5), pATH207+pPATH309 (cysLC3), pATH207+pPATH308 (cysLC5), 및 $0.1 \mu\text{g}/\text{ml}$ (M0.1), $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ (M1) 또는 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ (M10)의 항-S1P 뮤린 항체와 함께 예비-인큐베이션된 배양 배지에 첨가하였다. 22시간의 인큐베이션 후, 세포 상등액을 수집하고, R&D system의 Quantikine 인간 CXCL8/IL-8 키트를 사용하여 ELISA에 의해 IL-8 분비를 측정하였다. 도면에서, "NT"는 처리되지 않은 세포를 지칭한다.

[0157] 도 13은 CNV 동물 모델에서 마우스 항-S1P 모노클로날 항체 및 대조군과 비교된 여러 인간 모노클로날 항체 변이체의 생체내 효능을 나타낸다. 하기 실시예 17에 기술된 바와 같이, 이러한 실험에서, 마우스에게 $0.5 \mu\text{g} \times 2$ (제0일 및 제6일)의 뮤린 (Mu) 항-S1P 모노클로날 항체, 여러 인간화 항-S1P 모노클로날 항체 변이체 (즉, 변이체 LC3, LC5, HCcysLC3, 및 HCcysLC5), 또는 비-특이적 모노클로날 항체 (NS)를 유리체내 투여에 의해 투여한 후, 브루크 막을 레이저로 파열시켰다. 레이저 수술 14일 후 마우스를 희생시켰다. 공막-RPE-막

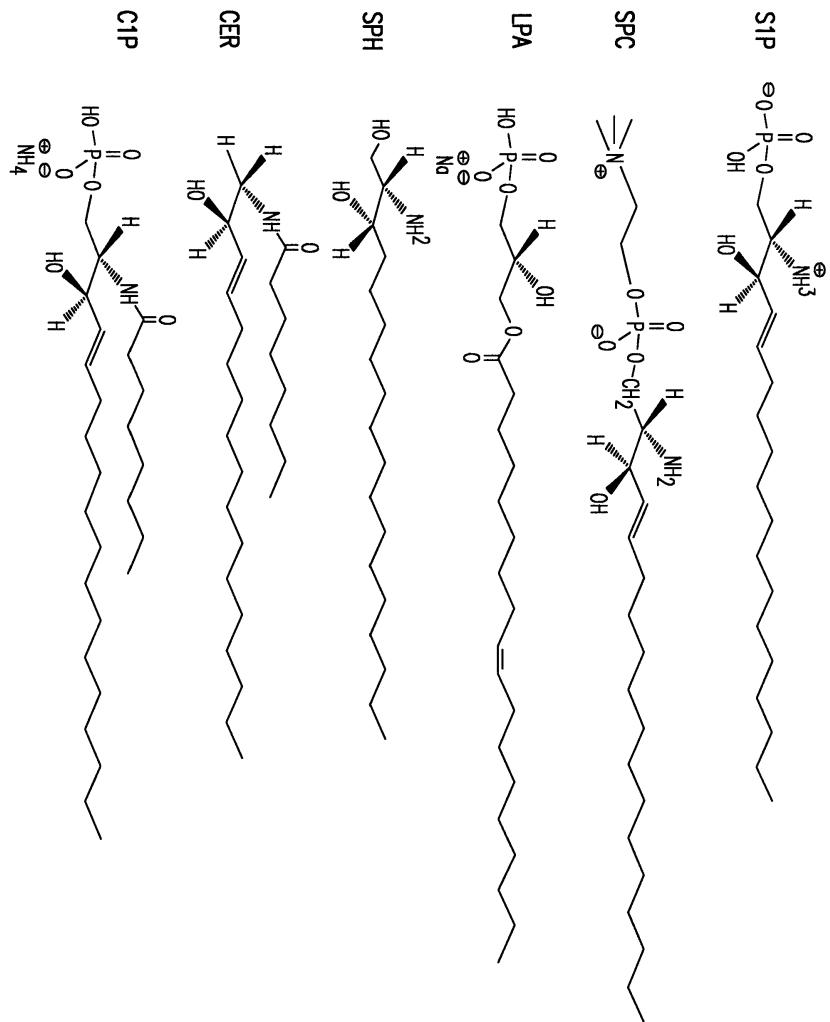
락막 복합체를 절개하고, 로다린-접합 리시누스 코뮤니스 응집소 I 항체로 염색하였다. CNV 병변 부피가 평균 \pm SEM로 표시된다.

도면

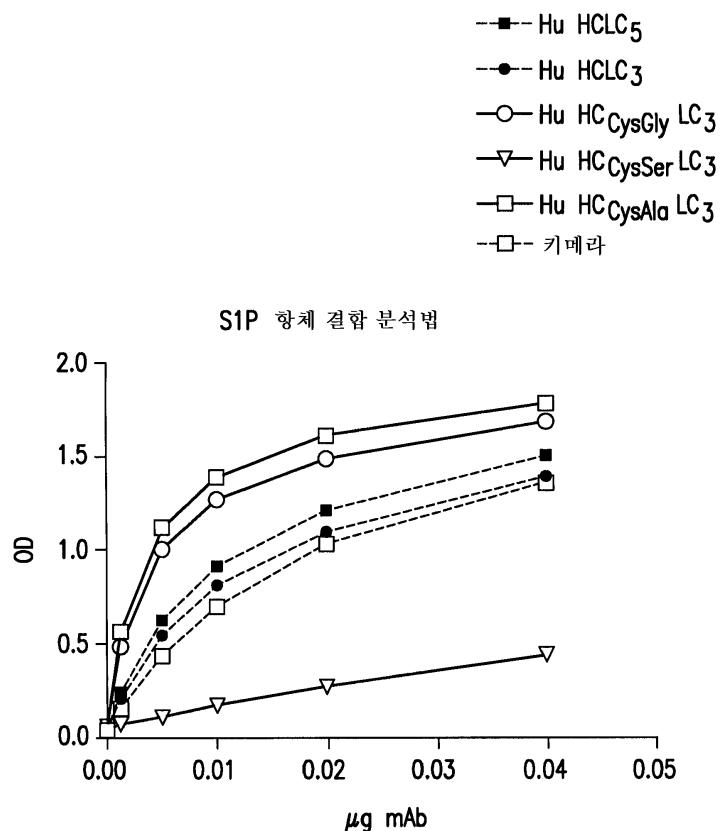
도면 1A



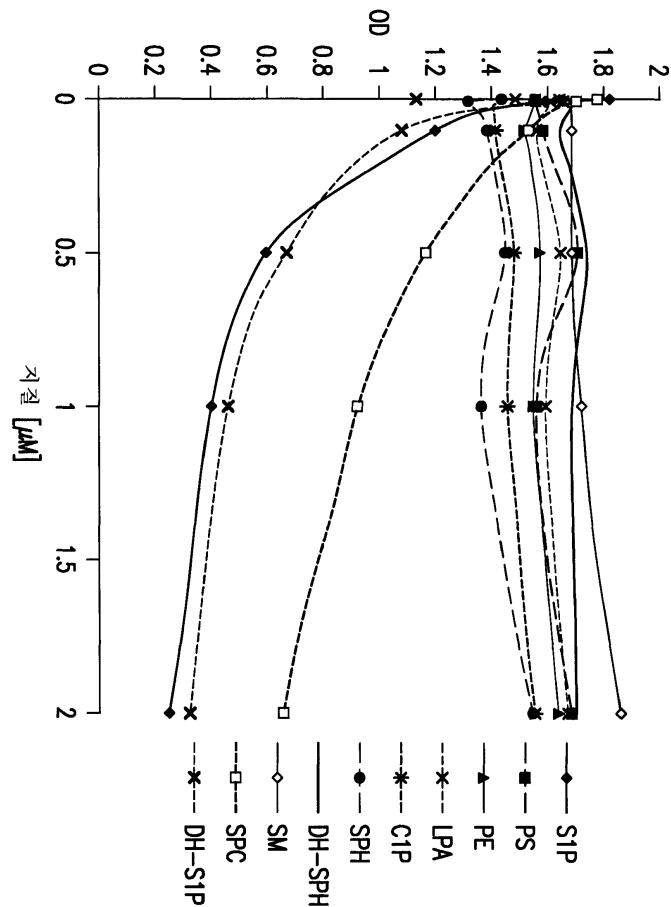
도면1B



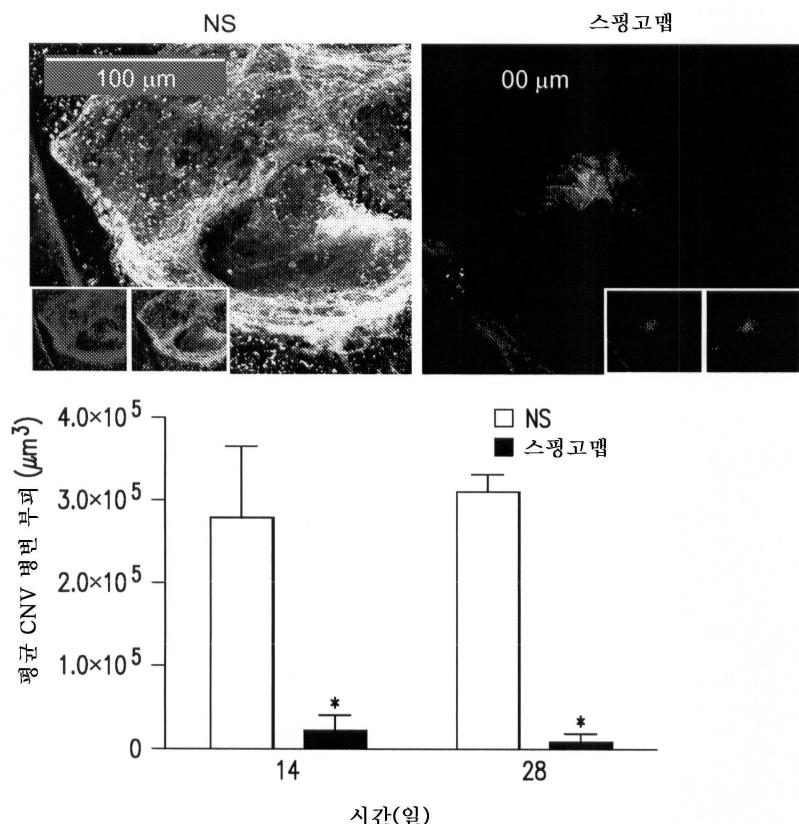
도면2



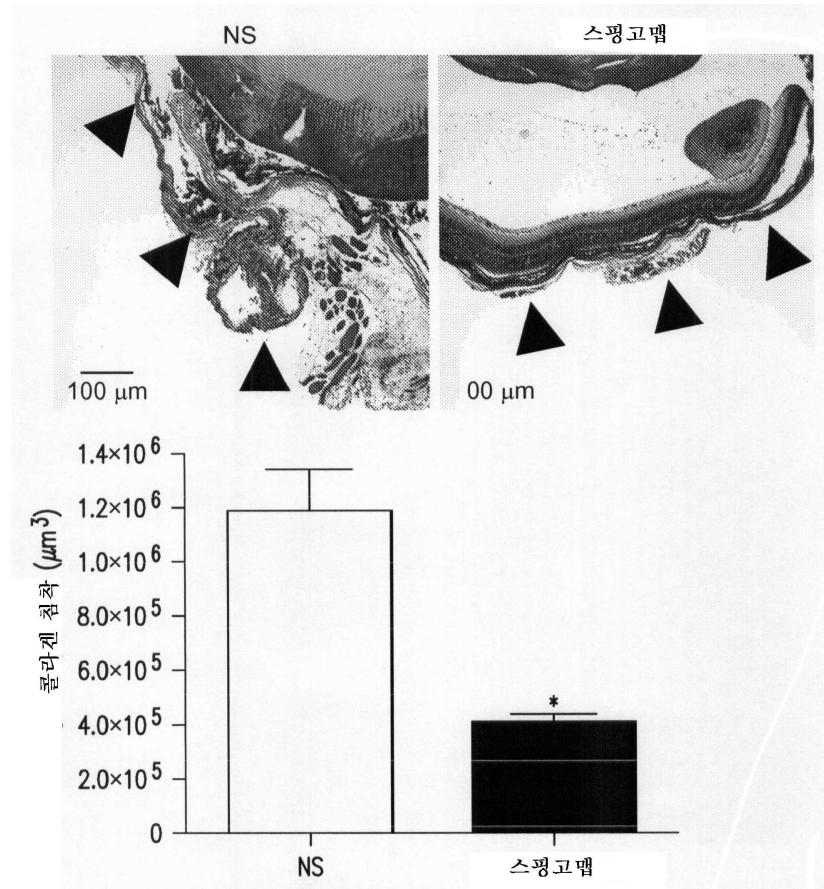
도면3



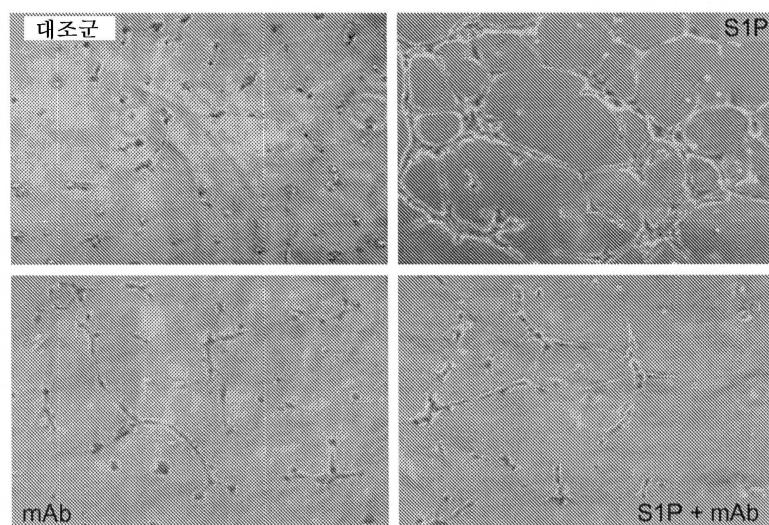
도면4A



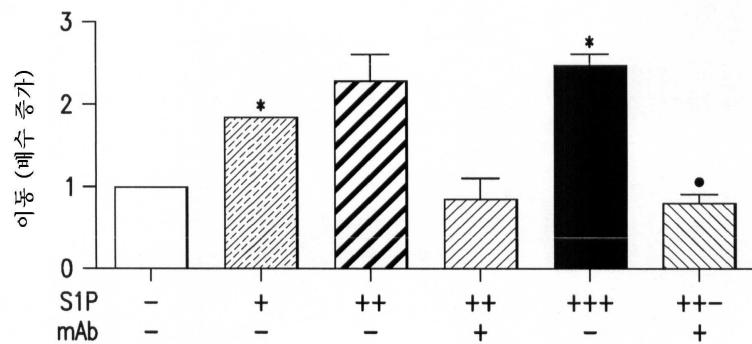
도면4B



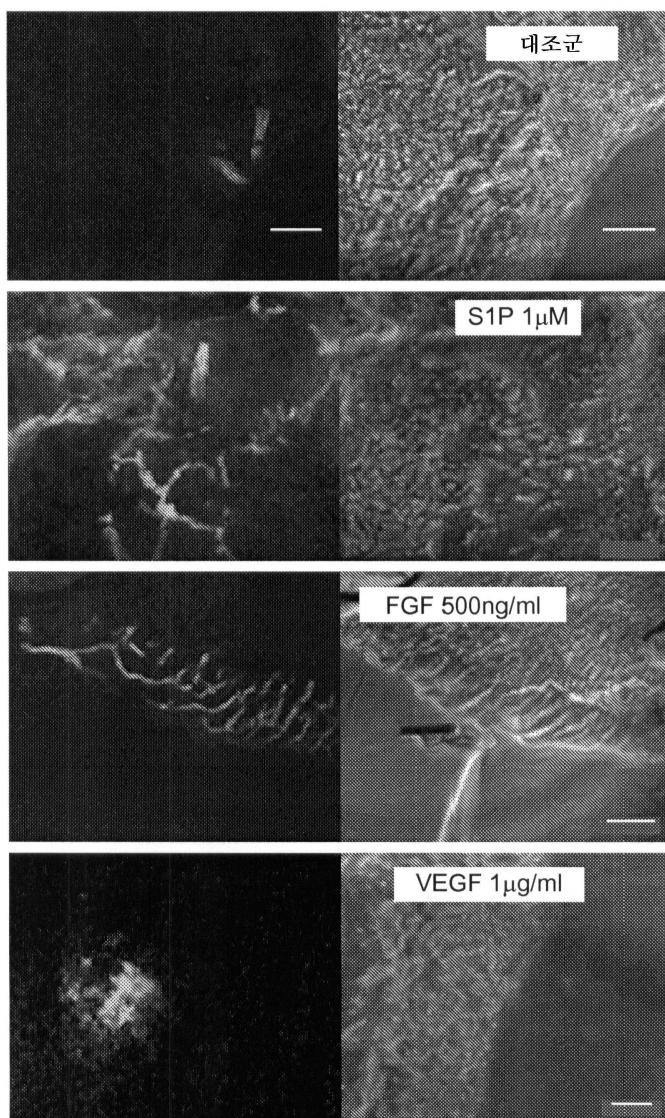
도면5A



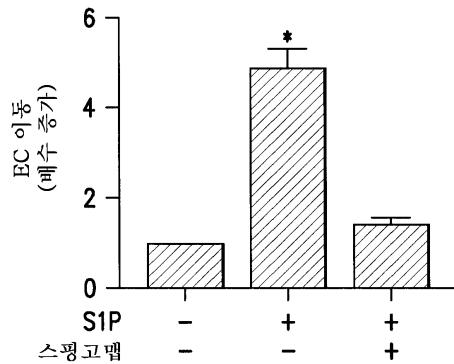
도면5B



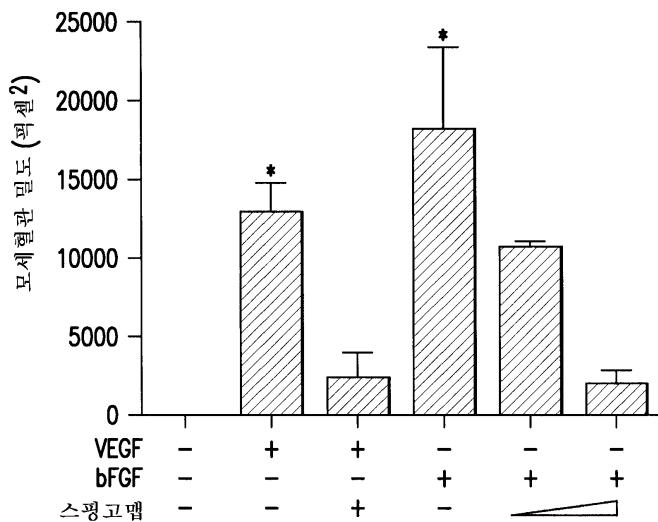
도면6A



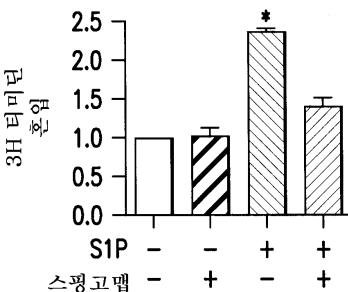
도면6B



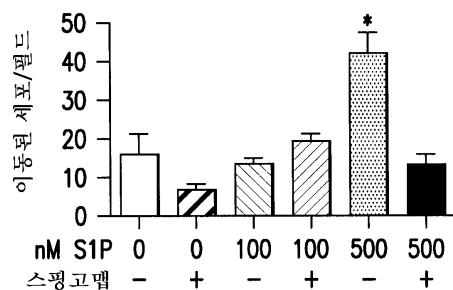
도면6C



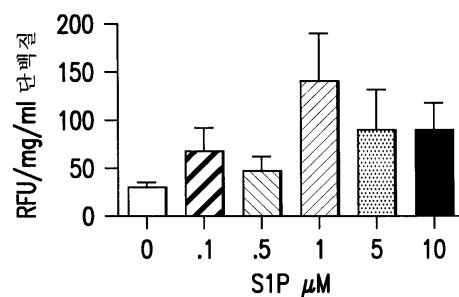
도면7A



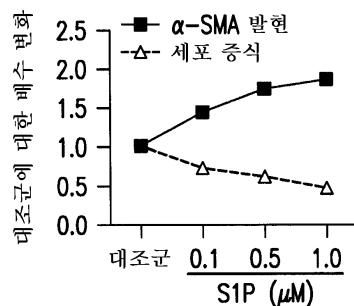
도면7B



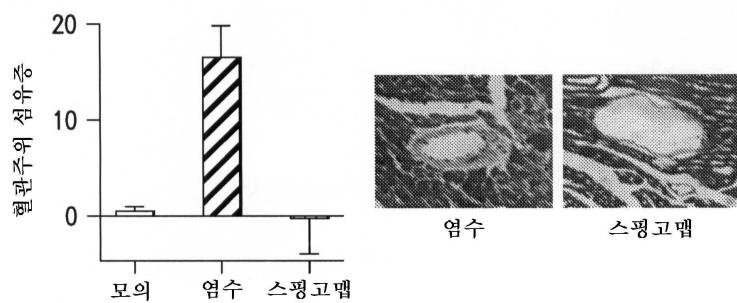
도면7C



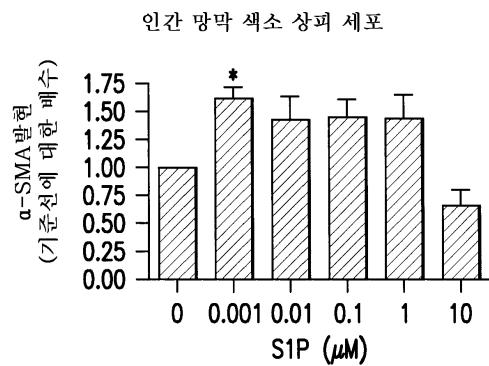
도면7D



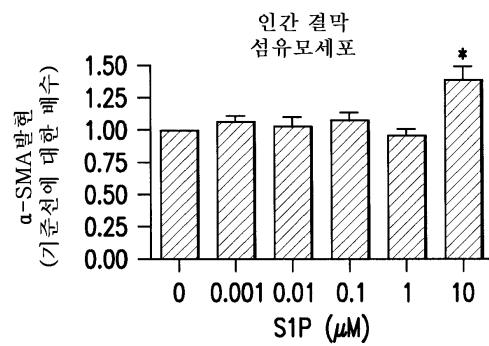
도면7E



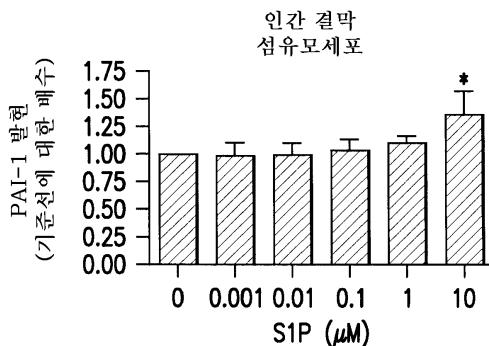
도면8A



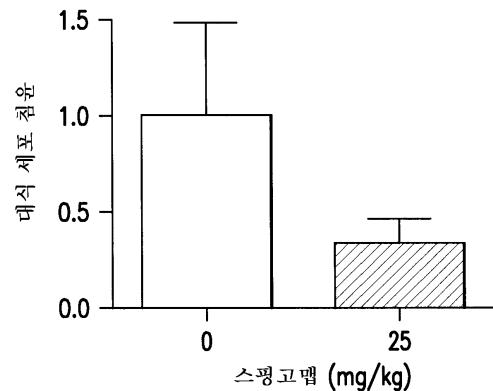
도면8B



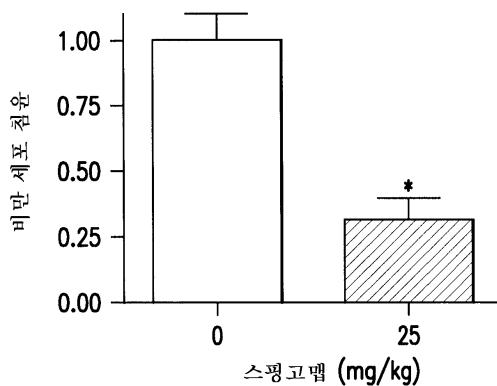
도면8C



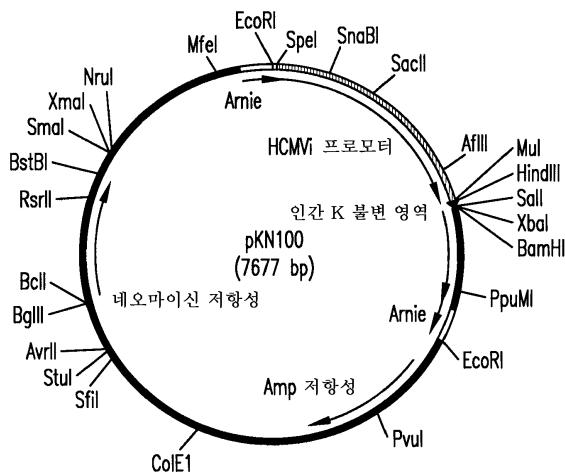
도면9A



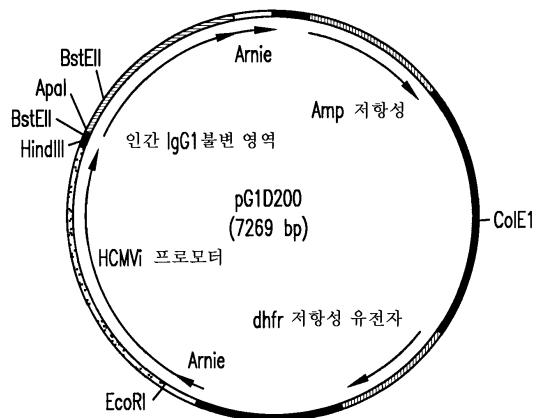
도면9B



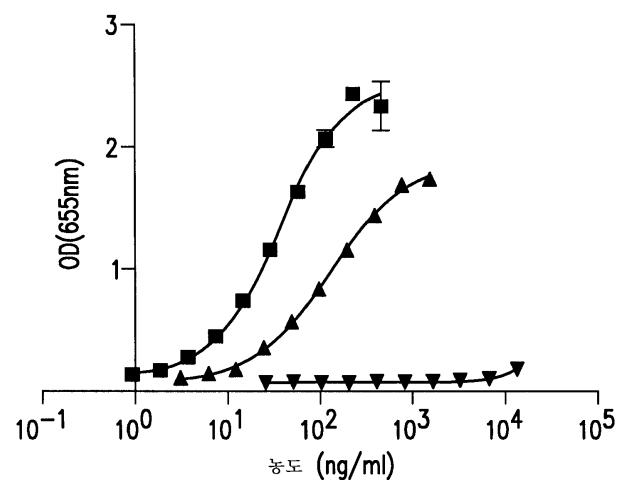
도면 10A



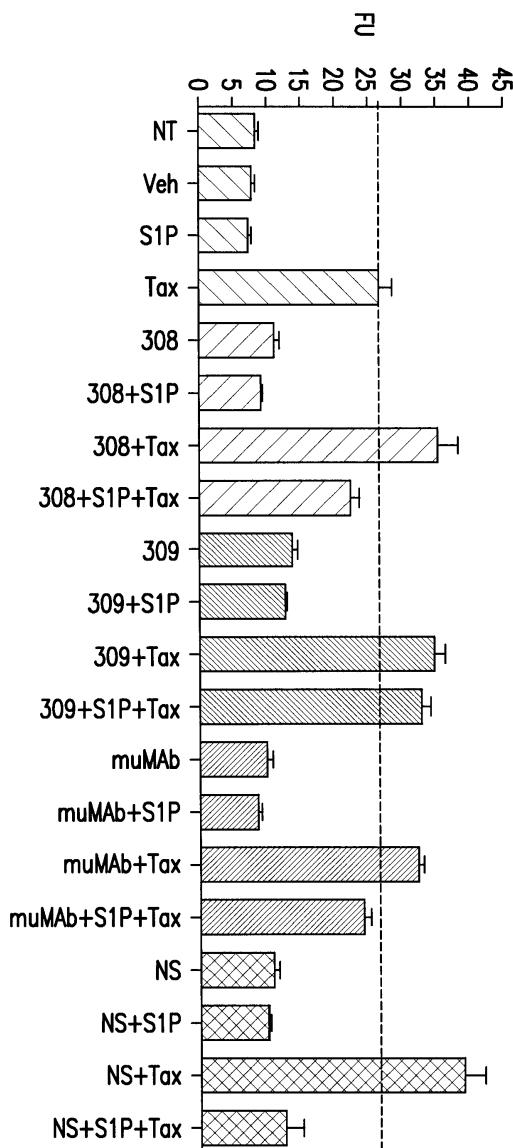
도면10B



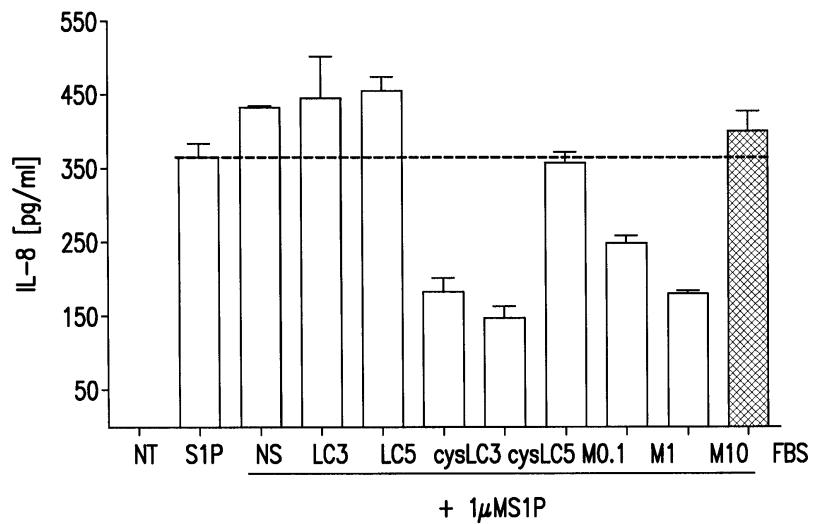
도면11



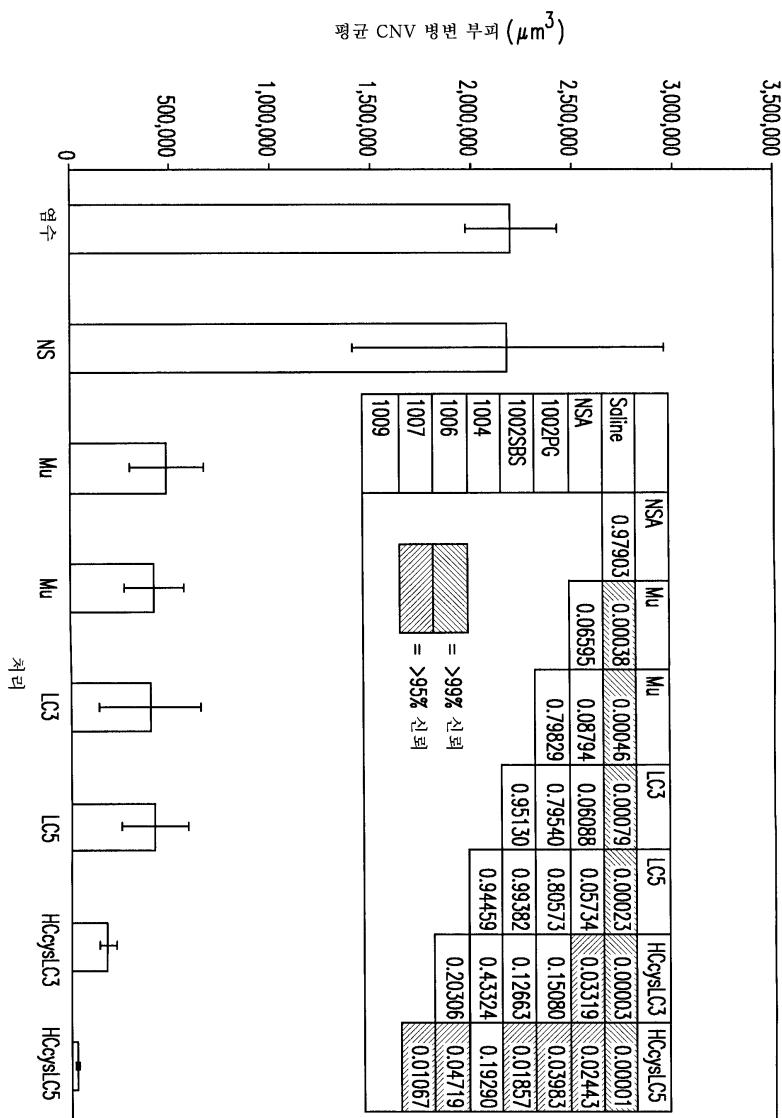
도면12A



도면12B



도면13



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> Lpath, Inc.

Sabbadini, Roger
Garland, William A.
Hansen, Genevieve
Jones, Steven Tarran

Williams, David

<120> COMPOSITIONS AND METHODS FOR BINDING SPHINGOSINE-1-PHOSPHATE

<130> LPT-3010-PC

<150> 60/854,971

<151> 2006-10-27

<160> 37

<170> PatentIn version 3.4

<210> 1

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 1

atggratgga gckggrtctt tmtctt

26

<210> 2

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer

<400> 2

cagtggatag acagatgggg g

21

<210> 3

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 3

cagtggatag accgatgggg c

21

<210> 4

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 4

cagtggatag actgatgggg g

21

<210> 5

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 5

caagggatag acagatgggg c 21

<210> 6

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 6

gtctctgatt ctagggca 18

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 7

actggatggt ggaaagatgg 20

<210> 8

<211> 120

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 8

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

1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Val Ser Gly Phe Ile Phe Ile Asp His

20 25 30

Thr Ile His Trp Met Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Cys Ile Ser Pro Arg His Asp Ile Thr Lys Tyr Asn Glu Met Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

Ile Gln Val Asn Ser Leu Thr Phe Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys

85 90 95

Ala Arg Gly Gly Phe Tyr Gly Ser Thr Ile Trp Phe Asp Phe Trp Gly

100 105 110

Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser

115 120

<210> 9

<211> 107

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 9

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

1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Ile Arg Cys Ile Thr Thr Asp Ile Asp Asp Asp

20 25 30

Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Glu Pro Pro Asn Leu Leu Ile

35 40 45

Ser Glu Gly Asn Ile Leu Arg Pro Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Ser

50 55 60

Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Leu Phe Thr Ile Glu Asn Met Leu Ser

65 70 75 80

Glu Asp Val Ala Asp Tyr Tyr Cys Leu Gln Ser Asp Asn Leu Pro Phe

85 90 95

Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100

105

<210> 10

<211> 11

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 10

Ile Thr Thr Asp Ile Asp Asp Asp Met Asn

1

5

10

<210> 11

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 11

Glu Gly Asn Ile Leu Arg Pro

1 5

<210> 12

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 12

Leu Gln Ser Asp Asn Leu Pro Phe Thr

1 5

<210> 13

<211> 5

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 13

Asp His Thr Ile His

1 5

<210> 14

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 14

Cys Ile Ser Pro Arg His Asp Ile Thr Lys Tyr Asn Glu Met Phe Arg

1 5 10 15

Gly

<210> 15

<211> 12

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 15

Gly Gly Phe Tyr Gly Ser Thr Ile Trp Phe Asp Phe

1 5 10

<210> 16

<211> 147

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Humanized murine antibody variable domains

<400> 16

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Pro Gly Glu Ser Leu Lys Ile Ser Cys Gln Ser Phe Gly Tyr Ile Phe

35 40 45

Ile Asp His Thr Ile His Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Gln Gly Leu

50 55 60

Glu Trp Met Gly Cys Ile Ser Pro Arg His Asp Ile Thr Lys Tyr Asn

65 70 75 80

Glu Met Phe Arg Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ser Ser

85 90 95

Thr Ala Tyr Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met

100 105 110

Tyr Phe Cys Ala Arg Gly Gly Phe Tyr Gly Ser Thr Ile Trp Phe Asp

115 120 125

Phe Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys

130

135

140

Gly Pro Ser

145

<210> 17

<211> 134

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Humanized murine antibody variable domains

<400> 17

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

1

5

10

15

Leu Pro Gly Ala Arg Cys Glu Thr Thr Leu Thr Gln Ser Pro Ser Phe

20

25

30

Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ile Thr Thr

35 40 45

Thr Asp Ile Asp Asp Asp Met Asn Trp Tyr Gln Gln Glu Pro Gly Lys

50 55 60

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

65 70 75 80

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr

85 90 95

Ile Ser Lys Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln

100 105 110

Ser Asp Asn Leu Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile

115 120 125

Lys Arg Glu Trp Ile Pro

130

<210> 18

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Humanized murine mAb CDR nucleotide sequence

<400> 18

ataaccacca ctgatattga tcatgtatcg aac 33

<210> 19

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Humanized murine mAb CDR nucleotide sequence

<400> 19

gaaggcaata ttcttcgtcc t

21

<210> 20

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Humanized murine mAb CDR nucleotide sequence

<400> 20

ttgcagatg ataacttacc attcacg

27

<210> 21

<211> 13

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Humanized murine mAb CDR nucleotide sequence

<400> 21

gaccataactt cac

13

<210> 22

<211> 51

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Humanized murine mAb CDR nucleotide sequence

<400> 22

tgtatttctc ccagacatga tattactaaa tacaatgaga tgttcagggg c

51

<210> 23

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Humanized murine mAb CDR nucleotide sequence

<400> 23

ggggggttct acggtagtac tatctggttt gacttt

36

<210> 24

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Humanized murine mAb CDR nucleotide sequence

<400> 24

ggggggttct acggtagtac tatctggttt gacttt

36

<210> 25

<211> 455

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Humanized murine mAb nucleotide sequence

<400> 25

cgccaagctt gccgccacca tgggtcaac cgccatcctc gccctcctcc tggctgttct 60

ccaaggagtc tgttccgagg tgcatgttgt gcagtctgga gcagaggtga aaaagcccg 120

ggagtctctg aagatctcct gtcagagttt tggatacatc tttatcgacc atacttact 180

gggtgcgcca gatgcccggg caaggcctgg agtggatgtg tatttctccc agacatgata 240

ttactaaata caatgagatg ttcatggggcc aggtcaccat ctcagccgac aagtccagca 300

gcaccgccta ctgcgtgg agcagcctga aggccctgg caccgcctg tatttctgtg 360

cgagaggggg gttctacggt agtactatct ggttgactt ttggggccaa gggacaatgg 420

tcaccgtctc ttcatgcctcc accaaggggcc catcg 455

<210> 26

<211> 452

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Humanized murine mAb nucleotide sequence

<400> 26

cgccaagctt gccgccacca tgggtcaac cgccatcctc gccctctcc tggctgttct 60

ccaaggagtc tgttccgagg tgcagctggc gcagcttgaa gcagaggtaaaaagcccg 120

ggagtctctg aagatctcct gtcagagttt tggatacatc gaccataactt cactggatgc 180

gccagatgcc cggcaaggc ctggagtgaa tggggctat ttctcccaga catgatatta 240

ctaaatacaa tgagatttc agggccagg tcaccatctc agccgacaag tccagcagca 300

ccgcctactt gcagtggagc agcctgaagg cctcgacac cgccatgtat ttctgtgcga 360

gaggggggtt ctacggtagt actatctggc ttgacttttggccaaaggacaatggtca 420

ccgtctttc agcctccacc aaggccccat cg 452

<210> 27

<211> 147

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Humanized murine mAb sequence

<400> 27

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Pro Gly Glu Ser Leu Lys Ile Ser Cys Gln Ser Phe Gly Tyr Ile Phe

35 40 45

Ile Asp His Thr Ile His Trp Met Arg Gln Met Pro Gly Gln Gly Leu

50 55 60

Glu Trp Met Gly Ala Ile Ser Pro Arg His Asp Ile Thr Lys Tyr Asn

65 70 75 80

Glu Met Phe Arg Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ser Ser

85 90 95

Thr Ala Tyr Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met

100 105 110

Tyr Phe Cys Ala Arg Gly Gly Phe Tyr Gly Ser Thr Ile Trp Phe Asp

115 120 125

Phe Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys

130 135 140

Gly Pro Ser

145

<210> 28

<211> 419

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Humanized murine mAb sequence

<400> 28

cgc caagctt gcc gcca ccca tgg acat gag ggt ccc cgct cag ct cct gg gg ct cct gct 60

gct ctgg ctc ccagg tgcca gat gt gaa ac gac act ca g cag t ctcc at ctt cct gtc 120

tgc at ctg tga gg aga ca g a g tc accat cac at a acca cca ctg at att ga tg at gat atg 180

aact ggta tc agc agga acc aggaa agcc ccta agct cc tgat ctat ga agg caat att 240

ctt cgt ctc tg ggt ccc atc aagg tt cagc ggc agt ggat ctgg cacaga ttt cact ctc 300

accatcagca aattgcagcc tgaagatTTT gcaacttatt actgtttgca gagtgataac 360

ttaccattca cgTCggcca agggaccaag ctggagatca aacgtgagtg gatcccgc 419

<210> 29

<211> 407

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Humanized murine mAb sequence

<400> 29

cGCCAAGCTT GCCGCCACCA TGGACATGAG GGTCCCCGCT CAGTCCTGG GGTCCTGCT 60

GCTCTGGCTC CCAGGGCCA GATGTGAAAC GACAGTGACG CAGTCTCCAT CCTTCCTGTC 120

TGCAATCTGTA GGAGACAGAG TCACCATCAC TTGCATAACC ACCACTGATA TTGATGATGA 180

TATGAACTGG TTCCAGCAGG AACCAGGGAA AGCCCCTAAG CTCTGTATCT CCAGAAGGCAA 240

TATTCTTCGT CCTGGGGTCC CATCAAGATT CAGCAGCAGT GGATATGGCA CAGATTCAC 300

tctcaccatc agcaaattgc agcctgaaga ttttgcact tattactgtt tgccagagtga 360

taacttacca ttcatcttcg gccaggac caagctggag atcaaac 407

<210> 30

<211> 126

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Humanized murine mAb sequence

<400> 30

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

1 5 10 15

Gly Ala Arg Cys Glu Thr Thr Val Thr Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ser

20 25 30

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

35 40 45

Ile Asp Asp Asp Met Asn Trp Phe Gln Glu Pro Gly Lys Ala Pro Lys

50 55 60

Leu Leu Ile Ser Glu Gly Asn Ile Leu Arg Pro Gly Val Pro Ser Arg

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Leu Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

115 120 125

<210> 31

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Humanized murine mAb sequence

<400> 31

Ala Ile Ser Pro Arg His Asp Ile Thr Lys Tyr Asn Glu Met Phe Arg

1

5

10

15

Gly

<210> 32

<211> 140

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Humanized murine mAb sequence

<400> 32

Met Glu Trp Ser Trp Val Phe Leu Phe Leu Ser Val Thr Thr Gly

1 5 10 15

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

20 25 30

Pro Gly Glu Ser Leu Lys Ile Ser Cys Gln Ser Phe Gly Tyr Ile Phe

35 40 45

Ile Asp His Thr Ile His Trp Met Arg Gln Met Pro Gly Gln Gly Leu

50 55 60

Glu Trp Met Gly Ala Ile Ser Pro Arg His Asp Ile Thr Lys Tyr Asn

65 70 75 80

Glu Met Phe Arg Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ser Ser

85 90 95

Thr Ala Tyr Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met

100 105 110

Tyr Phe Cys Ala Arg Gly Gly Phe Tyr Gly Ser Thr Ile Trp Phe Asp

115 120 125

Phe Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser

130 135 140

<210> 33

<211> 127

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Humanized murine mAb sequence

<400> 33

Met Ser Val Pro Thr Gln Val Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp Leu Thr

1 5 10 15

Asp Ala Arg Cys Glu Thr Thr Val Thr Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ser

20 25 30

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

35 40 45

Ile Asp Asp Asp Met Asn Trp Phe Gln Gln Glu Pro Gly Lys Ala Pro

50 55 60

Lys Leu Leu Ile Ser Glu Gly Asn Ile Leu Arg Pro Gly Val Pro Ser

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Asn Leu Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

115 120 125

<210> 34

<211> 2034

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Humanized murine mAb sequence

<400> 34

aagcttgccg ccaccatgga atggagctgg gtgttcctgt tccttctgtc cgtgaccaca 60

ggcgtgcatt ctgagggtgca gctgggtgcag tctggagcag aggtgaaaaa gcccggggag 120

tctctgaaga tctcctgtca gagtttgga tacatctta tcgaccatac tattcactgg 180

atgcgccaga tgcccgggca aggctggag tggatggggg ctatttctcc cagacatgat 240

attactaaat acaatgagat gttcaggggc caggtcacca tctcagccga caagtccagc 300

agcaccgcct acttgcagt gaggcagctg aaggccctgg acaccgcct gtatttctgt 360

gcgagagggg gggttctacgg tagtactatc tggtttgact ttggggcca agggacaatg 420

gtcaccgtct cttagcctc caccaaggc ccatcggtct tccccctggc accctcctcc 480

aagagcacct ctggggcac agcggccctg ggctgcctgg tcaaggacta ctccccgaa 540

ccgggtgacgg tgtcgtggaa cttaggcgc ctgaccageg gcgtgcacac ctcccgct 600

gtcctacagt ctcaggact ctactccctc agcagcgtgg tgaccgtgcc ctccagcagc 660

ttggcaccct agacctacat ctgcaacgtg aatcacaagc ccagcaacac caaggtggac 720

aagagagttg gtgagaggcc agcacaggga gggagggtgt ctgctggaag ccaggctcag 780

cgctcctgcc tggacgcata cggttatgc agtcccagtc cagggcagca aggcaggccc 840

cgtctgcctc ttacccgga ggcctctgcc cgccccactc atgctcagg agagggctt 900

ctggctttt ccccaggctc tggcaggca caggctaggt gcccctaacc caggccctgc 960

acacaaaggg gcaggtgctg ggctcagacc tgccaagagc catabcggg aggaccctgc 1020

ccctgaccta agcccacccc aaaggccaaa ctctccactc cctcagctcg gacaccccttct 1080

ctcctcccaag attccagtaa ctcccaatct tctctctgca gagcccaaatttctgtgacaa 1140

aactcacaca tgcccacccgt gcccaggtaa gccagccag gcctgccttcccttccctcaag 1200

gcgggacagg tgcccttagag tagcctgcat ccagggacag gccccagccg ggtgctgaca 1260

cgtccaccccttcc catctttcc tcagcacctg aactcctgggg gggaccgtca gtcttcctct 1320

tccccccaaa acccaaggac accctcatga tctccggac ccctgaggta acatgcgtgg 1380

tggtgacgt gagccacgaa gaccctgagg tcaagttaa ctggtagtgc gacggcgtgg 1440

aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcacg taccgtgtgg 1500

tcagcgtcttcc caccgtctcg caccaggact ggctaatgg caaggagttac aagtgcagg 1560

tctccaacaa agccctccca gccccatcg agaaaaccat ctccaaagcc aaagggtggga 1620

cccgtaggggt gcgaggggcca catggacaga ggccggctcg gcccaccctc tgccctgaga 1680

gtgaccgctg taccaacctc tgtccctaca gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc 1740

ctgccccat cccgggagga gatgaccaag aaccaggta gcctgacctg cctggtcaa 1800

ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag tggagagca atggcagcc ggagaacaac 1860

tacaagacca cgcccccgt gctggactcc gacggctct tcttcctcta tagcaagctc 1920

accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg aacgtttct catgctccgt gatgcatgag 1980

gctctgcaca accactacac gcagaagagc ctctccctgt ctccggtaa atag 2034

<210> 35

<211> 455

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Humanized murine mAb sequence

<400> 35

Met Glu Trp Ser Trp Val Phe Leu Phe Phe Leu Ser Val Thr Thr Gly

1 5 10 15

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

20 25 30

Pro Gly Glu Ser Leu Lys Ile Ser Cys Gln Ser Phe Gly Tyr Ile Phe

35 40 45

Ile Asp His Thr Ile His Trp Met Arg Gln Met Pro Gly Gln Gly Leu

50 55 60

Glu Trp Met Gly Ala Ile Ser Pro Arg His Asp Ile Thr Lys Tyr Asn

65 70 75 80

Glu Met Phe Arg Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ser Ser

85 90 95

Thr Ala Tyr Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met

100 105 110

Tyr Phe Cys Ala Arg Gly Gly Phe Tyr Gly Ser Thr Ile Trp Phe Asp

115 120 125

Phe Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Ala Pro

225 230 235 240

Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

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

290 295 300

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp

305 310 315 320

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu

325 330 335

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg

340 345 350

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys

355 360 365

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp

370 375 380

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys

385 390 395 400

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

405 410 415

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser

420 425 430

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser

435 440 445

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

450 455

<210> 36

<211> 720

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Humanized murine mAb sequence

<400> 36

aagcttgccg ccaccatgtc tgtgcctacc caggtgctgg gactgctgct gctgtggctg 60

acagacgccc gctgtgaaac gacagtgacg cagtctccat ctttcctgtc tgcatacgta 120

ggagacagag tcaccatcac ttgcataacc accactgata ttgatgatga tatgaactgg 180

ttccagcagg aaccagggaa agcccctaag ctcctgatct ccgaaggcaa tattttcg 240

cctgggtcc catcaagatt cagcagcagt ggatatggca cagatttac tctcaccatc 300

agcaaattgc agcctgaaga ttttcaact tattactgtt tgcatgtga taacttacca 360

ttcactttcg gccaagggac caagctggag atcaaacgta cggtgctgc accatctg 420

ttcatcttcc cgccatctga tgagcagttg aaatctggaa ctgcctctgt tgtgtgcctg 480

ctgaataact tctatcccg agaggccaaa gtacagtgga aggtggataa cggccctccaa 540

tcggtaact cccaggagag tgtcacagag caggacagca aggacagcac ctacagcctc 600

agcagcaccc tgacgctgag caaagcagac tacgagaaac acaaagtcta cgcctgcgaa 660

gtcacccatc agggccctgag ctgcggcgtc acaaagagct tcaacagggg agagtgttag 720

<210> 37

<211> 234

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Humanized murine mAb sequence

<400> 37

Met Ser Val Pro Thr Gln Val Leu Gly Leu Leu Leu Trp Leu Thr

1

5

10

15

Asp Ala Arg Cys Glu Thr Thr Val Thr Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ser

20

25

30

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

35

40

45

Ile Asp Asp Asp Met Asn Trp Phe Gln Gln Glu Pro Gly Lys Ala Pro

50

55

60

Lys Leu Leu Ile Ser Glu Gly Asn Ile Leu Arg Pro Gly Val Pro Ser

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Asn Leu Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180

185

190

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

195

200

205

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro

210

215

220

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

225

230