



(19) 대한민국특허청(KR)
 (12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2013년09월03일
 (11) 등록번호 10-1254815
 (24) 등록일자 2013년04월09일

(51) 국제특허분류(Int. C1.)	(73) 특허권자
A61K 39/395 (2006.01) A61K 38/18 (2006.01)	제넨테크, 임크.
C07K 16/00 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)	미합중국 캘리포니아 (우편번호 94080-4990) 사우
(21) 출원번호 10-2007-7003872	쓰샌프란시스코 디엔에이 웨이 1
(22) 출원일자(국제) 2005년07월19일	(72) 발명자
심사청구일자 2010년07월19일	페라라, 나폴레온
(85) 번역문제출일자 2007년02월16일	미국 94109 캘리포니아주 샌프란시스코 퍼시픽 애
(65) 공개번호 10-2007-0043010	비뉴 2090 #704
(43) 공개일자 2007년04월24일	거버, 한스-피터
(86) 국제출원번호 PCT/US2005/025734	미국 94107 캘리포니아주 샌프란시스코 테네시 스
(87) 국제공개번호 WO 2006/014729	트리트 #5 1121
국제공개일자 2006년02월09일	리앙, 시아오, 후안
(30) 우선권주장	미국 94065 캘리포니아주 레드우드 시티 펠리칸
60/589,782 2004년07월20일 미국(US)	레이인 24
(56) 선행기술조사문헌	(74) 대리인
[CANCER RESEARCH 63, 6651-6657, October 15, 2003]	김영, 장수길
전체 청구항 수 : 총 40 항	심사관 : 임혜준
(54) 발명의 명칭 안지오포이에틴-유사 4 단백질의 저해제, 배합물, 그의용도	

(57) 요 약

안지오포이에틴-유사 4 단백질의 조절제와 함께 질환 및 병적 상태의 치료에서 상기의 사용 방법을 제공한다. ANGPTL4 길항제 및 다른 치료제, 예로서, 항암제의 조합물, 및 암에 걸리기 쉽거나 그로 진단받은 포유동물, 또는 재발성 종양 성장 또는 재발성 암 세포 성장으로 진단받은 포유동물의 치료에서 상기의 사용 방법 또한 제공한다.

특허청구의 범위

청구항 1

유효량의 항암제 및 유효량의 안지오포이에틴-유사 4 단백질 (ANGPTL4) 길항제를 포함하며, 조합된 유효량은 종양 성장 또는 암 세포의 성장을 차단하거나 저하시키는 것인, 대상자에서 종양 성장 또는 암 세포의 성장을 차단하거나 저하시키기 위한 제약 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 대상자가 인간인 제약 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 항암제가 항-혈관신생제를 포함하는 것인 제약 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서, 항-혈관신생제가 VEGF 길항제인 제약 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서, VEGF 길항제가 항-VEGF 항체인 제약 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서, 항-VEGF 항체가 인간화된 A4.6.1인 제약 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서, ANGPTL4 길항제가 항-ANGPTL4 항체인 제약 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서, 항-ANGPTL4 항체가 ANGPTL4 (184-406)에 결합하는 것인 제약 조성물.

청구항 9

제1항에 있어서, ANGPTL4 길항제가 항- α V β 5 항체인 제약 조성물.

청구항 10

제5항, 제7항 및 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 항체가 인간화된 항체인 제약 조성물.

청구항 11

제1항에 있어서, ANGPTL4 길항제가 SiRNA 분자를 포함하는 것인 제약 조성물.

청구항 12

제11항에 있어서, SiRNA 분자가 ANGPTL4-SiRNA 분자인 제약 조성물.

청구항 13

제12항에 있어서, ANGPTL4-SiRNA 분자가 ANGPTL4를 코딩하는 핵산의 DNA 서열을 표적화하며, DNA 서열이 적어도 GTGGCCAAGCCTGCCCGAAGA (서열번호 3)를 포함하는 것인 제약 조성물.

청구항 14

제1항에 있어서, 종양 또는 암 세포에 투여하기 위한 제3의 항암제를 추가로 포함하는 제약 조성물.

청구항 15

제14항에 있어서, 제3의 항암제가 화학요법제인 제약 조성물.

청구항 16

제14항에 있어서, 제3의 항암제가 다른 혈관신생 저해제인 제약 조성물.

청구항 17

a) 유효량의 항암제를 대상자로부터 분리한 종양 또는 암 세포에 투여하고;

b) 유효량의 안지오포이에틴-유사 4 단백질 (ANGPTL4) 길항제를 대상자로부터 분리한 종양 또는 암 세포에 투여하는 것을 포함하며,

조합된 유효량은 종양 성장 또는 암 세포의 성장을 차단하거나 저하시키는 것인, 종양 성장 또는 암 세포의 성장을 차단하거나 저하시키는 시험관내(*in vitro*) 또는 생체외(*ex vivo*) 방법.

청구항 18

제17항에 있어서, 투여 단계 (a) 및 (b)가 순차적으로 실시되는 것인 방법.

청구항 19

제17항에 있어서, 투여 단계 (a) 및 (b)가 동시에 실시되는 것인 방법.

청구항 20

제17항에 있어서, 투여 단계 (a) 및 (b)가 순차적으로 및 동시에 둘 다에 의해 실시되는 것인 방법.

청구항 21

제17항에 있어서, 투여 단계가 임의의 순서대로 실시되는 것인 방법.

청구항 22

유효량의 안지오포이에틴-유사 4 (ANGPTL4) 길항제를 포함하며, 유효량의 ANGPTL4 길항제는 항암제를 이용한 암 요법을 받은 적이 있거나 받고 있는 대상자에게 투여되었을 때 간 종양을 제외한 재발성 종양의 성장 또는 간암 세포를 제외한 재발성 암 세포의 성장을 차단하거나 저하시키는 것인, 상기 대상자에서 간 종양을 제외한 재발성 종양의 성장 또는 간암 세포를 제외한 재발성 암 세포의 성장을 차단하거나 저하시키기 위한 제약 조성물.

청구항 23

제22항에 있어서, 항암제가 하나 이상의 화학요법제인 제약 조성물.

청구항 24

제22항에 있어서, 항암제가 항-혈관신생제를 포함하는 것인 제약 조성물.

청구항 25

제24항에 있어서, 항-혈관신생제가 항-VEGF 저해제를 포함하는 것인 제약 조성물.

청구항 26

제25항에 있어서, 항-VEGF 저해제가 항-VEGF 항체인 제약 조성물.

청구항 27

제26항에 있어서, 항-VEGF 항체가 인간화된 A4.6.1인 제약 조성물.

청구항 28

제22항에 있어서, ANGPTL4 길항제가 항-ANGPTL4 항체인 제약 조성물.

청구항 29

제22항에 있어서, ANGPTL4 길항제가 항- α V β 5 항체인 제약 조성물.

청구항 30

제26항, 제28항 및 제29항 중 어느 한 항에 있어서, 항체가 인간화된 항체인 제약 조성물.

청구항 31

제22항에 있어서, ANGPTL4 길항제가 siRNA 분자를 포함하는 것인 제약 조성물.

청구항 32

제31항에 있어서, siRNA 분자가 ANGPTL4-siRNA 분자인 제약 조성물.

청구항 33

제32항에 있어서, ANGPTL4-SiRNA 분자가 ANGPTL4를 코딩하는 핵산의 DNA 서열을 표적화하며, DNA 서열이 적어도 GTGGCCAAGCCTGCCCGAAGA (서열번호 3)를 포함하는 것인 제약 조성물.

청구항 34

제22항에 있어서, 항암제인 추가의 약제를 추가로 포함하는 제약 조성물.

청구항 35

안지오포이에틴-유사 4 (ANGPTL4) (184-406)에 결합하는 항체인 ANGPTL4 길항제를 유효량으로 포함하며, 유효량은 대상자에서 간 종양을 제외한 종양의 성장 또는 간암 세포를 제외한 암 세포의 성장을 차단하거나 저하시키는 것인, 대상자에서 간 종양을 제외한 종양의 성장 또는 간암 세포를 제외한 암 세포의 성장을 차단하거나 저하시키기 위한 제약 조성물.

청구항 36

제35항에 있어서, 상기 대상자가 인간인 제약 조성물.

청구항 37

ANGPTL4 (184-406)에 결합하는 항체 및 VEGF 길항제를 포함하는, 대상자에서 종양의 성장 또는 암 세포의 성장을 차단하거나 저하시키기 위한 조성물.

청구항 38

ANGPTL4를 코딩하는 핵산의 DNA 서열을 표적화하는 ANGPTL4-SiRNA 분자를 포함하며, DNA 서열이 적어도 GTGGCCAAGCCTGCCCGAAGA (서열번호 3)를 포함하는 것인, 대상자에서 간 종양을 제외한 종양의 성장 또는 간암 세포를 제외한 암 세포의 성장을 차단하거나 저하시키기 위한 조성물.

청구항 39

제1 양의 항-혈관신생제, 제2 양의 안지오포이에틴-유사 4 (ANGPTL4) 제제 및 약제학적으로 허용가능한 담체, 비히클, 또는 희석제, 및 용기를 포함하는, 대상자에서 종양의 성장 또는 암 세포의 성장을 차단하거나 저하시키기 위한 키트.

청구항 40

제1의 단위 투여 형태 중 일정량의 항-혈관신생제 및 약제학적으로 허용가능한 담체, 비히클 또는 희석제; 제2의 단위 투여 형태 중 일정량의 안지오포이에틴-유사 4 (ANGPTL4) 길항제 및 약제학적으로 허용가능한 담체, 비히클 또는 희석제; 및 용기를 포함하는, 대상자에서 종양의 성장 또는 암 세포의 성장을 차단하거나 저하시키기 위한 키트.

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

명세서

[0001]

관련 출원

[0002] 본 출원은 섹션 119(e)하에 2004년 7월 20일 출원된 미국 가출원번호 제 60/589,782호 (상기 명세서 전체의 내용은 본 명세서에서 인용된다)의 우선권 및 잇점을 주장한다.

기술 분야

[0003] 본 발명은 일반적으로 인간 질환 및 병적 상태, 예로서, 암의 치료에 관한 것이다. 본 발명은 안지오포이에틴-유사 4 단백질 (ANGPTL4)의 저해제 및 다른 치료제와 ANGPTL4의 저해제의 배합물, 및 질환 또는 병적 상태의 진단 및 치료를 위한 상기 조성물의 사용 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0004] 미국에서는 암이 사망의 주된 원인이 된다. 다양한 유형의 요법을 사용함으로써 암을 치료하였다. 예를 들면, 수술법을 사용함으로써 암성 또는 사망성 조직을 제거한다. 고형 종양을 수축시켜 수행되는 방사선요법, 및 신속하게 분할세포를 사멸시키는 화학요법을 암 요법으로서 사용한다.

[0005] 1971년 포크맨(Folkman)은 항-혈관신생이 유용한 항암 전략법일 수 있다고 제안하였다 [Folkman, N. Engl. J. Med. 285, 1182-1186 (1971)]. 혈관신생은 선재하는 혈관 및/또는 순환 내피 줄기 세포로부터의 새로운 혈관구조의 발생이다 (예로서, [Ferrara & Alitalo, Nature Medicine 5(12):1359-1364 (1999)] 참조). 혈관신생은 1) 단백질 분해 효소 방출 후, 국소 발생지의 세포외기질 분해, 2) 모세혈관 내피 세포의 증식, 및 3) 혈관신생 자극으로의 모세혈관 세관의 유주로 구성된 일련의 반응 과정이다 [Ferrara et al. Endocrine Rev. 13:18-32 (1992)].

[0006] 배아 및 출생후 발생의 정상적인 생리학적 과정이 진행되는 동안 새로운 혈관의 성장이 필수 조건이다 (예로서, [Folkman and Klagsbun Science 235:442-447 (1987)] 참조). 선재하는 모세혈관으로부터의 새로운 혈관의 상기와 같은 증식은 추가로 제한하는 것은 아니지만, 종양, 증식성 망막병증, 연령-관련 황반 변성, 건성, 염증, 당뇨병, 및 류마티스 관절염 (RA)을 포함하는 다양한 질환의 발병에 중요한 역할을 한다 (예로서, [Ferrara, Recent Prog. Horm. Res. 55:15-35 (2000), discussion 35-6] 참조). 혈관신생의 주목할 만한 생리학적 및 병적 중요성과 관련하여, 다수의 업적들을 통해 상기 진행 과정을 조절할 수 있는 인자가 해명되었다. 혈관신생 진행 과정은 전- 및 항-혈관신생 분자 사이의 균형에 의해 조절되고, 다양한 질환, 특히, 암에서는 실패한다고 제안되었다 (예로서, [Carmeliet and Jain Nature 407:249-257 (2000)] 참조).

[0007] 예를 들면, 혈관신생은 혈관 내피 성장 인자-A (VEGF, 혈관 투과 인자 (VPF)로서도 공지되어 있음) 및 섬유모 세포 성장 인자 (FGF)와 같은 분비된 인자에 의존한다 (예로서, [Ferrara and Davis-Smyth Endocrine Rev. 18:4-25 (1997)]; 및 [Ferrara J. Mol. Med. 77:527-543 (1999)] 참조). 혈관신생 및 혈관형성에서 혈관신생 인자인 것 외에도, 다면발현성 성장 인자로서 VEGF는 다른 생리학적 진행 과정, 예로서, 내피 세포 생존, 혈관 투과 및 확장, 단핵구 화학주성 및 칼슘 유입에서 다양한 생물학적 효능을 나타낸다 [Ferrara and Davis-Smyth (1997), 상기 동일]. 또한, 몇몇 비-내피 세포 타입, 예로서, 망막 색소 상피 세포, 이자관 세포 및 슈반 세포에 대한 VEGF의 분열촉진성 효능에 대한 연구가 보고되었다 (예로서, [Guerrin et al. J. Cell Physiol. 164:385-394 (1995)]; [Oberg-Welsh et al. Mol. Cell. Endocrinol. 126:125-132 (1997)]; 및 [Sondell et al. J. Neurosci. 19:5731-5740 (1999)] 참조).

[0008] VEGF는 태반 성장 인자 (PIGF), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D 및 VEGF-E를 포함하는 유전자 계열에 속한다. 상기 리간드는 내피 세포상에 발현된 티로신 키나제 수용체에 결합하고 결찰한다. 예를 들면, VEGF 티로신 키나제 수용체 계열은 Flt1 (VEGF-R1) (리간드 VEGF, VEGF-B 및 PIGF와 결합), Flk1/KDR (VEGF-R2) (VEGF, VEGF-C, VEGF-D, 및 VEGF-E와 결합), 및 Flt4 (VEGF-R3) (VEGF-C 및 VEGF-D와 결합)를 포함한다 (예로서, [Ferrara et al., Nature Medicine 9(6):669-676 (2003)]; 및 [Robinson & Stringer, Journal of Cell Science, 114(5):853-65 (2001)] 참조).

- [0009] 안지오포이에틴은 혈관내피에 대한 또 다른 성장 인자 군이다 (예로서, [Davis et al., *Cell*, 87:1161-1169 (1996)]; [Suri et al., *Cell*, 87:1171-1180 (1996)]; [Maisonpierre et al. *Science* 277:55-60 (1997)]; 및 [Valenzuela et al., *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 96: 1904-1909 (1999)] 참조). 안지오포이에틴은 아마도 혈관구조의 리모델링, 성숙 및 안정화를 조절함으로써 작용할 수 있는 동안 VEGF가 혈관 발생에서 작용하는, 안지오포이에틴은 VEGF와 상보적이고 동등한 양식으로 작용하는 것으로 보인다 (예로서, [Holash et al., *Oncogene* 18:5356-5362 (1999)] 참조). 안지오포이에틴 1, 안지오포이에틴 2, 안지오포이에틴 3 및 안지오포이에틴 4는 내피 세포상에서 발견되는 수용체인 티로신 키나제 Tie2 (Tek로서도 공지되어 있다) 수용체에 결합한다 (예로서, [Ward & Dumont, *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 13:19-27 (2002)] 참조). 또한, Tie1 오르판 수용체(orphan receptor)도 존재한다.
- [0010] 혈관신생은 성장 인자에 의존할 뿐만 아니라, 세포외기질내 존재하는 그의 리간드에 결합하는, 인테그린을 포함하는 세포 부착 분자 (CAMs)에 의해 영향을 받는다 (예로서, [Ferrara & Alitalo, *Nature Medicine* 5(12):1359-1364 (1999)]; 및 [Carmeliet, *Nature Medicine*, 6(3):389-395 (2000)] 참조). 인테그린은 세포간극 및 기저막에서 발견되는 세포외기질 단백질과의 세포 부착 및 세포외기질 단백질상의 유주를 촉진시킨다. 세포 부착 단백질의 인테그린 계열은 적어도 22개의 $\alpha\beta$ 이종이량체(heterodimer) 조합물에서 발현되는 적어도 18개의 α 및 8개의 β 서브유니트로 구성된다 (예로서, [Byzova et al., *Mol. Cell.*, 6(4):851-860 (2000)]; 및 [Hood and Cheresh, *Nature Reviews*, 2:91-99 (2002)] 참조). 이중, 적어도 6개의 ($\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$, $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_2\beta_1$, $\alpha_v\beta_1$ 및 $\alpha_1\beta_1$)의 조합물은 혈관신생과 관련되어 있다 (예로서, [Hynes and Bader, *Thromb. Haemost.*, 78(1):83-87 (1997)]; 및 [Hynes et al., *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 32(5):501-510 (1999)] 참조). 동물 모델에서 특이적인 부착 수용체를 코딩하는 다양한 유전자의 불활성화 또는 차단 항체의 투여가 내피 세포의 혈관신생에 대한 중요한 효능을 가졌다 (예로서, [Elicieri and Cheresh, *Mol. Med.*, 4:741-750 (1998)] 참조).
- [0011] 이들 분자는 암 요법에 대한 표적이 되었다. 예를 들면, 병적 상태에서 혈관신생의 1차 조절자로서 VEGF를 인식하는 것이 VEGF 활성을 차단하는 것에 대하여 다수가 시도될 수 있도록 하였다. 저해성 항-VEGF 수용체 항체, 가용성 수용체 작제물, 안티센스 전략법, VEGF에 대한 RNA 앱타머 및 저분자 VEGF 수용체 티로신 키나제 (RTK) 저해제 모두가 VEGF 신호화를 방해하는데 사용되는 것으로 제안되었다 (예로서, [Siemeister et al. *Cancer Metastasis Rev.* 17:241-248 (1998)] 참조). 항-VEGF 중화 항체는 무모(nude) 마우스에서 다양한 인간 종양 세포주의 성장을 억제하고 ([Kim et al. *Nature* 362:841-844 (1993)]; [Warren et al. *J. Clin. Invest.* 95:1789-1797 (1995)]; [Borgstrom et al. *Cancer Res.* 56:4032-4039 (1996)]; 및 [Melnyk et al. *Cancer Res.* 56:921-924 (1996)] 참조), 허혈성 망막 질병의 모델에서 안내(intraocular) 혈관신생을 저해하는 것으로 나타났다([Adamis et al. *Arch. Ophthalmol.* 114:66-71 (1996)]). 실제로, 인간화된 항-VEGF 항체, 베바시주맙 (아바스틴(AVASTIN)[®], 제넨테크(Genentech))은 전이성 직장결장 암에 대한 제 1선의 요법으로서 US FDA로부터 허가를 받았다 (예로서, [Ferrara et al., *Nature Reviews Drug Discovery*, 3:391-400 (2004)] 참조).
- [0012] 그러나, 현재의 암 치료법이 항상 최적의 것은 아니다. 대개, 단일 요법 타입이 병적 상태를 완전하게 억제시킬 수는 없다. 예를 들면, 외과적 수술은 대개 모든 암성 성장을 제거할 수 없다. 예를 들면, 암은 약물 또는 치료법에 대한 내성을 발생시키기 때문에 다른 암 치료법, 예로서, 화학요법은 다수의 부작용을 갖고 있고/거나 요법은 효능이 없다. VEGF 또는 VEGR 수용체, 또는 Tie2 수용체 시스템의 저해는 때때로 종양 성장을 완전하게 억제시키지 못했다 (예로서, [Gerber et al., *Cancer Research*, 60:6253-6258 (2000)]; [Ferrara et al., *Nature Reviews:Drug Discovery*, 3:391-400 (2004)]; [Millauer et al., *Nature* 367, 576-579 (1994)]; [Kim et al., *Nature* 362: 841-844 (1993)]; [Millauer et al., *Cancer Res.* 56:1615-1620 (1996)]; [Goldman et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:8795-8800 (1998)]; [Asano et al., *Cancer Research*, 55:5296-5301 (1995)]; [Warren et al., *J. Clin. Invest.*, 95:1789-1797 (1995)]; [Fong et al., *Cancer Res.* 59:99-106 (1999)]; [Wedge et al., *Cancer Res.* 60:970-975 (2000)]; [Wood et al. *Cancer Res.* 60:2178-2189 (2000)]; [Siemeister et al., *Cancer Res.* 59:3185-3191 (1999)]; [Lin et al., *J. Clin. Invest.* 103:159-165 (1999)]; [Lin et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:8829-8834 (1998)]; 및 [Siemeister et al., *Cancer Res.* 59, 3185-3191, (1999)] 참조).
- [0013] 따라서, 신규하고 더욱 효능이 있는, 암을 조절하는 요법이 절박하게 요구되고 있다. 하기 기술의 개발을 통해 자명화되는 바, 본 발명은 상기 및 그외의 다른 필요성에 초점을 맞추고 있다.
- [0014] **발명의 요약**

- [0015] 본 발명은 안지오포이에틴-유사 4 단백질 (ANGPTL4)의 저해제 및 질환 및 병적 상태를 치료하기 위한, 예를 들면, 종양 성장 또는 암 세포 성장을 차단하거나 저하시키고, 재발성 종양 성장을 차단하거나 저하시키는 등의 것을 하기 위한 상기 저해제의 사용 방법에 관한 것이다. 본 발명은 ANGPTL4의 저해제 및 항암제의 배합물, 및 종양 성장을 저해하기 위한 상기 배합물의 사용 방법을 제공한다. 본 발명은 또한 ANGPTL4의 저해제 및 혈관신생 저해제의 배합물, 및 암 성장 및/또는 혈관신생을 포함하는 질병, 예로서, 종양성 (예로서, 종양 성장) 및 비종양성 질병을 저해하기 위한 상기 배합물의 사용 방법을 제공한다.
- [0016] ANGPTL4의 조절제, 예로서, ANGPTL4의 길항제 또는 작용제가 제공된다. 본 발명의 ANGPTL4 길항제는 ANGPTL4의 활성을 저해하거나 저하시키는 분자이다. ANGPTL4 저해제는 직접 또는 간접으로 ANGPTL4 활성을 저해하는 저분자 물질, 폴리뉴클레오티드, 안티센스 분자, RNA 앱타며, ANGPTL4 또는 그의 수용체 폴리펩티드에 대한 리보자임, 폴리펩티드, ANGPTL4의 길항제 변이체, 단리된 단백질, 재조합 단백질, 항체, 또는 그의 컨쥬게이트 또는 융합 단백질을 포함할 수 있다. 특정 실시태양에서, ANGPTL4의 길항제는 ANGPTL4와 결합하는 항체를 포함한다. 본 발명의 특정 실시태양에서, 길항제 ANGPTL4 항체는 ANGPTL4 단백질의 특이적인 부서열(subsequence) 또는 부위, 예로서, N-말단, N-말단 꼬인-코일(coiled-coil) 영역, C-말단, C-말단 섬유소원-유사 영역, 또는 인간 ANGPTL4의 ANGPTL4 (1-183), ANGPTL4 (23-183), ANGPTL4 (1 내지 약 162), ANGPTL4 (약 162-406), ANGPTL4 (23-406), 또는 ANGPTL4 (184-406) 아미노산 부서열, 및/또는 뮤린 ANGPTL4의 mANGPTL4 (1-183), mANGPTL4 (23-183), mANGPTL4 (1 내지 약 165), mANGPTL4(23 내지 약 165), mANGPTL4 (23-410) 또는 mANGPTL4 (184-410) 아미노산 부서열에 결합함으로써 ANGPTL4의 활성을 저해하거나 저하시키는 항체이다. 다른 부서열은 또한, 제한하는 것은 아니지만, 예로서, hANGPTL4의 40-183, 60-183, 80-183, 100-183, 120-183, 140-183, 40-406, 60-406, 80-406, 100-406, 120-406, 140-406, 및 160-406 및, 예로서, mANGPTL4의 40-183, 60-183, 80-183, 100-183, 120-183, 140-183, 40-410, 60-410, 80-410, 100-410, 120-410, 140-410 및 160-410을 포함한다. 본 발명의 특정 실시태양에서, ANGPTL4의 길항제는 항- $\alpha_v\beta_5$ 항체, 예로서, 길항제 항- $\alpha_v\beta_5$ 항체를 포함한다. 특정 실시태양에서, 본 발명의 항체는 인간화된 항체이다. 본 발명의 특정 실시태양에서, ANGPTL4 길항제는 SiRNA 분자이다. 실시태양에서, SiRNA 분자는 분자가 ANGPTL4를 코딩하는 핵산의 DNA 서열 (예로서, GTGGCCAAGCCTGCCCGAAGA (서열번호 3))을 표적화하는 ANGPTL4-SiRNA 분자이다.
- [0017] 종양 성장 또는 암 세포의 성장을 차단하거나 저하시키는 방법을 제공한다. 특정 실시태양에서, 본 발명은 유효량의 안지오포이에틴-유사 4 (ANGPTL4) 길항제를 종양 또는 암 세포에 투여하는 것을 포함한다. 또 다른 실시태양에서, ANGPTL4 길항제는 길항제 항- $\alpha_v\beta_5$ 항체이다. 유효량은 종양 성장 또는 암 세포의 성장을 차단하거나 저하시킨다. 종양 세포 유주를 저해하는 방법 또한 제공한다. 예를 들면, 방법은 유효량의 ANGPTL4 길항제를 종양 세포에 투여하여 그의 유주를 저해하는 것을 포함한다. 본 발명의 실시태양에서, ANGPTL4 길항제를 투여하는 것이 전이를 저해한다.
- [0018] 추가의 치료제, 예로서, 하나 이상의 항암제, 동일하거나 상이항 항체에 대한 다중 항체, 하나 이상의 항-혈관신생제 또는 저해제, 통증약 등을 ANGPTL4 길항제와 배합하고/하거나 함께 투여할 수 있다. 추가의 치료법, 예로서, 외과 수술, 방사선조사 등 또한 실시할 수 있거나 본 발명의 방법 또는 조성물에서 종양 및/또는 암 세포에 투여할 수 있다. 본 발명은 또한 배합 조성물, 예로서, 항암제 (예로서, 항-혈관신생제 등), ANGPTL4 길항제, 및 담체 (예로서, 약제학적으로 허용가능한 담체)를 포함하는 조성물을 제공한다.
- [0019] 항암제는 제한하는 것은 아니지만, 예로서, 본 분야에 공지되어 있는 항암제 및 본원에 기술된 것을 포함한다. 특정 실시태양에서, 항암제는 하나 이상의 항-혈관신생제, 예로서, VEGF 길항제 또는 저해제 등을 포함한다. 실시태양에서, VEGF 길항제는 항-VEGF 항체 또는 그의 활성 단편 (예로서, 인간화된 A4.6.1, 아바스틴® 등)을 포함한다. 특정 실시태양에서, 항암제는 하나 이상의 화학요법제를 포함한다.
- [0020] 종양 성장 또는 암 세포의 성장을 차단하거나 저하시키는 병용 방법을 제공한다. 특정 실시태양에서, 방법은 유효량의 항암제를 종양 또는 암 세포에 투여하는 것, 및 유효량의 ANGPTL4 길항제를 종양 또는 암 세포에 투여하는 것을 포함한다. 다르게는, 또는 추가로, 유효량의 항암제 (예로서, 항-혈관신생제 등) 및 유효량의 ANGPTL4 길항제를 포함하는 배합 조성물을 투여할 수 있다. 배합된 유효량은 종양 성장 또는 암 세포의 성장을 차단하거나 저하시킨다.
- [0021] 재발성 종양 성장 또는 재발성 암 세포 성장을 차단하거나 저하시키는 방법 또한 제공한다. 본 발명의 특정 실시태양에서, 대상자는 적어도 하나의 항암제를 사용하는 암 요법을 받았거나, 현재 받고 있고, 대상자는 유효량의 ANGPTL4 길항제를 투여받는다. 유효량의 ANGPTL4 길항제를 투여하는 것이 재발성 종양 성장 또는 재발성 암

세포 성장을 차단하거나 저하시킨다. 특정 실시태양에서, 대상자는 ANGPTL4 길항체를 사용하는 요법을 받았거나, 현재 받고 있고, 대상자는 유효량의 항암제 (예로서, 항-헬관신생제)를 투여받고, 여기에서, 유효량의 항암제를 투여하는 것이 재발성 종양 성장 또는 재발성 암 세포 성장을 차단하거나 저하시킨다.

[0022] 전형적으로, 종양 또는 암 세포는 대상자내 존재한다. 특정 실시태양에서, 대상자는 적어도 하나의 항암제를 사용하는 암 요법을 현재 받고 있거나, 받을 것이다. 전형적으로, 대상자는 포유동물이다 (예로서, 인간). 특정 실시태양에서, 본 발명의 제제를 대상자에 투여한다. 투여 또는 수술 단계는 임의의 순서대로 실시할 수 있다. 실시태양에서, 순차적으로 실시한다. 또다른 실시태양에서, 동시에 실시한다. 다르게는, 또는 추가로, 상기 단계들은 임의의 순서로 순차적으로 및 동시에 둘 모두를 병용하여 실시할 수 있다.

[0023] ANGPTL4 조절제의 키트 또한 제공한다. 특정 실시태양에서, 키트는 ANGPTL4 길항체, 약제학적으로 허용가능한 담체, 비히클, 또는 희석제, 및 용기를 포함한다. 실시태양에서, 키트는 제 1의 양으로 항암제 (예로서, 항-헬관신생제 등), 제 2의 양으로 ANGPTL4 길항체 및 약제학적으로 허용가능한 담체, 비히클, 또는 희석제, 및 용기를 포함한다. 또다른 실시태양에서, 키트는 제 1의 단위 제형내 일정량의 항암제 (예로서, 항-헬관신생제 등) 및 약제학적으로 허용가능한 담체, 비히클, 또는 희석제; 제 2의 단위 제형내 일정량의 ANGPTL4 길항체 및 약제학적으로 허용가능한 담체, 비히클, 또는 희석제; 및 용기를 포함한다. 그의 사용 설명서 또한 포함할 수 있다.

발명의 상세한 설명

[0037] 정의

[0038] 본 발명을 상세히 설명하기에 앞서, 물론 다양할 수 있는 본 발명을 특정의 조성물 또는 생물학적 시스템으로 제한하는 것이 아님을 이해하여야 한다. 또한, 본원에서 사용되는 용어는 오직 특정의 실시태양만을 설명하기 위한 것이며, 제한하고자 하는 것이 아님을 이해하여야 한다. 본 명세서 및 첨부되는 청구범위에서 사용되는 바, 단수 형태 ("하나"("a"), "하나"("an") 및 "그"("the"))는 내용을 달리 정확하게 명시하지 않는 한 복수의 것도 포함한다. 따라서, 예를 들면, "하나의 문자"에 대한 언급은 임의로 2개 이상의 상기 문자 조합 등을 포함한다.

[0039] 달리 정의하지 않는 한, 본원에서 사용되는 모든 과학적 용어 및 기술적 용어는 그들이 포함되는 분야에서 보편적으로 사용되는 것과 동일한 의미를 갖는 것으로 이해된다. 본 발명의 목적을 위해, 하기 용어를 하기에 정의 한다.

[0040] 용어 "ANGPTL4" 또는 "Angpt14"는 안지오포이에틴-유사 4 폴리펩티드 또는 단백질, 그와 함께 그의 자연발생적으로 발생된 대립 형태, 분비된 형태, 및 프로세싱된(processed) 형태를 언급한다. 예를 들면, 인간으로부터의 ANGPTL4는 406 아미노산 단백질인 반면, 마우스 ANGPTL4는 410 아미노산 단백질이다. 용어 "ANGPTL4"는 또한 예로서, N-말단 단편, 꼬인-코일 영역, C-말단 단편, 섬유소원-유사 영역, 인간 안지오포이에틴-유사 4 단백질의 아미노산 1-183, 23-183, 1 내지 약 162, 23 내지 약 162, 23-406, 184-406, 약 162-406, 또는 23-184, 및 뮤린 안지오포이에틴-유사 4 단백질의 아미노산 1-183, 23-183, 1 내지 약 165, 23 내지 약 165, 23-410, 또는 184-410을 포함하는, 폴리펩티드의 단편 (예로서, 부서열, 절단된 형태 등)을 언급하기 위해 사용된다. 다른 단편은 제한하는 것은 아니지만, 예로서, hANGPTL4의 40-183, 60-183, 80-183, 100-183, 120-183, 140-183, 40-406, 60-406, 80-406, 100-406, 120-406, 140-406, 및 160-406 및, 예로서, mANGPTL4의 40-183, 60-183, 80-183, 100-183, 120-183, 140-183, 40-410, 60-410, 80-410, 100-410, 120-410, 140-410 및 160-410을 포함한다. ANGPTL4의 상기와 같은 임의의 형태에 대한 언급은 또한 본 출원에서 예로서, "ANGPTL4 (23-406)," "ANGPTL4 (184-406)," "ANGPTL4 (23-183)," "mANGPTL4 (23-410)," "mANGPTL4 (184-410)" 등 (여기에서, m은 뮤린 서열을 나타낸다)에 의해 동정될 수 있다. 단편 천연(native) ANGPTL4에 대한 아미노산 위치는 천연 ANGPTL4 서열에서 제시되는 바와 같이 번호화된다. 예를 들면, 단편 ANGPTL4에서 아미노산 위치 22번 (Ser)은 또한 천연 인간 ANGPTL4에서 위치 22번 (Ser)이다 (예로서, 도 2 참조). 일반적으로, 단편 천연 ANGPTL4는 생물학적 활성을 갖는다.

[0041] 용어 "ANGPTL4 조절제"는 ANGPTL4 또는 그의 발현을 활성화시킬 수 있는 문자, 예로서, 작용제, 또는 ANGPTL4의 활성 또는 그의 발현을 저해할 수 있는 문자, 예로서, 길항제 (또는 저해제)를 언급한다. ANGPTL4 작용제는 항체 및 활성 단편을 포함한다. ANGPTL4 길항제는 ANGPTL4 활성, 예로서, 세포 증식 또는 성장, 유주, 부착 또는 대사, 예로서, 지질 조절, 또는 ANGPTL4 수용체, 예로서, $\alpha_v\beta_5$ 에 결합하는 그의 결합을 포함하는 그의 발현을 중화, 차단, 저해, 폐기, 저하 또는 방해할 수 있는 문자를 언급한다. ANGPTL4 길항제는, 예로서, 항-ANGPTL4

항체 및 그의 항원-결합 단편, ANGPTL4에 특이적으로 결합하여 하나 이상의 수용체와 그의 결합을 격리시키는 수용체 분자 및 유도체, 항-ANGPTL4 수용체 항체 및 ANGPTL4 수용체 길항제, 예로서, 수용체의 저분자 저해제를 포함한다. 다른 ANGPTL4 길항제로서 또한 ANGPTL4의 길항제 변이체, 안티센스 분자 (예로서, ANGPTL4-SiRNA), RNA 앱타머, 및 ANGPTL4 또는 그의 수용체에 대한 리보자임을 포함한다. 특정 실시태양에서, 길항제 ANGPTL4 항체는 ANGPTL4의 특이적인 부서열 또는 부위, 예로서, N-말단 단편, 꼬인-코일 영역, C-말단 단편, 섬유소원-유사 영역, 인간 안지오포이에틴-유사 4 단백질의 아미노산 1-183, 23-183, 1 내지 약 162, 23 내지 약 162, 23-406, 184-406, 또는 23-184, 및 뮤린 안지오포이에틴-유사 4 단백질의 아미노산 1-183, 23-183, 1 내지 약 165, 23 내지 약 165, 23-410, 또는 184-410에 결합함으로써 ANGPTL4의 활성을 저해시키거나 저하시키는 항체이다. 다른 단편으로는 제한하는 것은 아니지만, 예로서, hANGPTL4의 40-183, 60-183, 80-183, 100-183, 120-183, 140-183, 40-406, 60-406, 80-406, 100-406, 120-406, 140-406, 및 160-406 및, 예로서, mANGPTL4의 40-183, 60-183, 80-183, 100-183, 120-183, 140-183, 40-410, 60-410, 80-410, 100-410, 120-410, 140-410 및 160-410을 포함한다.

[0042] 용어 "항-ANGPTL4 항체"는 충분한 친화성 및 특이성을 갖고 ANGPTL4에 결합하는 항체이다. 본 발명의 항-ANGPTL4 항체는 ANGPTL4 활성이 관여하고 있는 질환 또는 상태를 표적으로 하고 방해하는 치료제로서 사용될 수 있다. 일반적으로, 항-ANGPTL4 항체는 통상 다른 ANGPTL4 동족체, 예로서, ANGPTL3에는 결합하지 않을 것이다.

[0043] 용어 "VEGF" 및 "VEGF-A"는 렁(Leung) 등에 의해 ([Science, 246:1306 (1989), Houck et al. *Mol. Endocrin.*, 5:1806 (1991)] 및 [Robinson & Stringer, *Journal of Cell Science*, 144(5):853-865 (2001)])에 기술된 바와 같이 165-아미노산 혈관 내피 세포 성장 인자 및 관련된 121-, 145-, 183-, 189-, 및 206- 아미노산 혈관 내피 세포 성장 인자와 함께 그의 자연발생적으로 발생된 대립 형태 및 프로세싱된 형태를 언급하기 위하여 상호교환적으로 사용된다. 용어 "VEGF"는 또한 예로서, 165-아미노산 인간 혈관 내피 세포 성장 인자의 아미노산 8 내지 109 또는 1 내지 109을 포함하는 폴리펩티드의 단편을 언급하기 위하여 사용된다. VEGF의 상기와 같은 임의의 형태에 대한 언급은 또한 본 출원에서 예로서, "VEGF (8-109)," "VEGF (1-109)" 또는 "VEGF165"에 의해 확인될 수 있다. 천연 VEGF의 "단편"에 대한 아미노산 위치는 천연 VEGF 서열에서 제시되는 바와 같이 번호화된다. 예를 들면, 천연 VEGF의 단편에서 아미노산 위치 17번 (메티오닌)은 또한 천연 VEGF 위치 17번 (메티오닌)이다. 천연 VEGF의 단편은 천연 VEGF에 필적하는, KDR 및/또는 FIt-1 수용체에 대한 결합 친화성을 가질 수 있다.

[0044] "항-VEGF 항체"는 충분한 친화성 및 특이성을 갖고 VEGF에 결합하는 항체이다. 본 발명의 항-VEGF 항체는 VEGF 활성이 관여하고 있는 질환 또는 상태를 표적으로 하고 방해하는 치료제로서 사용될 수 있다. 일반적으로, 항-VEGF 항체는 통상 다른 VEGF 동족체, 예로서, VEGF-B 또는 VEGF-C, 또는 다른 성장 인자, 예로서, PIGF, PDGF 또는 bFGF에는 결합하지 않을 것이다. (예로서, 미국 특허 제 6,582,959호, 제 6,703,020호; WO98/45332; WO 96/30046; WO94/10202; EP 0666868B1; 미국 특허출원 제 20030206899호, 제 20030190317호, 제 20030203409호, 및 제 20050112126호; [Popkov et al., *Journal of Immunological Method* 288:149-164 (2004)]; 및 변리사 서류 번호 P2072R1 참조). "rhuMAb VEGF" 또는 "아바스틴™"으로도 공지되어 있는 항-VEGF 항체 "베바시주맙 (BV)"은 [Presta et al. *Cancer Res.* 57:4593-4599 (1997)]에 따라 생성된 재조합 인간화된 항-VEGF 모노클로날 항체이다. 인간 VEGF와 그의 수용체의 결합을 차단하는 뮤린 항-hVEGF 모노클로날 항체 A.4.6.1으로부터의 항원-결합 상보성 결정 부위 및 돌연변이화된 인간 IgG1 프레임워크 부위를 포함한다. 대부분의 프레임워크 부위를 포함하는, 베바시주맙의 아미노산 서열 중 대략 93%는 인간 IgG1로부터 유래하고, 상기 서열 중 약 7%는 뮤린 항체 A4.6.1로부터 유래한다. 베바시주맙의 분자량은 약 149,000 달톤이고 글리코실화되어 있다. 베바시주맙 및 다른 인간화된 항-VEGF 항체는 추가로 2005년 2월 26일에 허여된 미국 특허번호 제 6,884,879호에 기술되어 있다.

[0045] "VEGF 길항제"는 그의 하나 이상의 VEGF 수용체와의 결합을 포함하는 VEGF 활성을 중화, 차단, 저해, 폐기, 저하 또는 방해할 수 있는 분자를 언급한다. VEGF 길항제는 항-VEGF 항체 및 그의 항원-결합 단편, VEGF에 특이적으로 결합하여 하나 이상의 수용체와 그의 결합을 격리시키는 수용체 분자 및 유도체, 항-VEGF 수용체 항체 및 VEGF 수용체 길항제, 예로서, VEGFR 티로신 키나제의 저분자 저해제, 및 융합 단백질, 예로서, VEGF-Trap (리제너론(Regeneron)), VEGF₁₂₁-겔로닌 (페레진(Peregrine))을 포함한다. VEGF 길항제로서 VEGF의 길항제 변이체, VEGF에 대한 안티센스 분자, RNA 앱타머, 및 VEGF 또는 VEGF 수용체에 대한 리보자임도 포함한다.

[0046] "천연 서열" 폴리펩티드는 자연으로 유래된 폴리펩티드와 동일한 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드를 포함한다. 따라서, 천연 서열 폴리펩티드는 임의의 포유동물로부터 자연발생적으로 발생된 폴리펩티드의 아미노산 서열을

가질 수 있다. 상기의 천연 서열 폴리펩티드는 자연으로부터 분리할 수 있거나 재조합 또는 합성 수단에 의해 생산할 수 있다. 용어 "천연 서열" 폴리펩티드는 구체적으로 자연발생적으로 절단되거나 분비된 형태의 폴리펩티드 (예로서, 세포외 영역 서열), 자연발생적으로 발생된 변이체 형태 (예로서, 다르게 스플라이싱된 형태) 및 자연발생적으로 발생된 폴리펩티드의 대립 변이체를 포함한다.

[0047] "폴리펩티드 쇄"는 비공유 상호작용 또는 디설파이드 결합에 대조되는 펩티드 결합(들)에 의해 그의 각각의 영역이 다른 영역(들)에 연결되어 있는 폴리펩티드이다.

[0048] 폴리펩티드 "변이체"는 상응하는 천연 서열 폴리펩티드와 적어도 약 80%의 아미노산 서열 일치도(identity)를 갖는 생물학적으로 활성인 폴리펩티드를 의미한다. 상기의 변이체로서는 예를 들면, 하나 이상의 아미노산 (자연발생적으로 발생된 아미노산 및/또는 자연발생적으로 발생되지 않은 아미노산) 잔기가 폴리펩티드의 N- 및/또는 C-말단에서 침가되거나, 결실되어 있는 폴리펩티드를 포함한다. 대개, 변이체는 천연 서열 폴리펩티드와 적어도 약 80%의 아미노산 서열 일치도, 또는 적어도 약 90%의 아미노산 서열 일치도, 또는 적어도 약 95% 이상의 아미노산 서열 일치도를 가질 것이다. 변이체는 또한 전형적으로 생물학적으로 활성인 천연 서열의 폴리펩티드 단편 (예로서, 부서열, 절단 등)을 포함한다.

[0049] 본원에서 "아미노산 서열 일치도의 퍼센트 (%)"는 서열을 정렬시키고, 필요한 경우에는 최대 서열 일치도의 퍼센트를 얻기 위해서는 캡을 도입하고, 임의의 보존성 치환을 서열 일치도의 일부분으로서 간주하지 않은 후, 선별된 서열에서의 아미노산 잔기와 일치하는 후보물질 서열에서의 아미노산 잔기의 퍼센트로서 정의된다. 아미노산 서열 일치도의 퍼센트를 측정하기 위한 목적에서의 정렬은 본 분야의 기술내 포함된 다양한 방법으로, 예를 들면, 공공연하게 이용될 수 있는 컴퓨터 소프트웨어, 예로서, BLAST, BLAST-2, ALIGN, ALIGN-2 또는 Megalign (DNASTAR) 소프트웨어를 사용하여 달성될 수 있다. 본 분야의 기술자는 비교되는 전장의 서열에 대하여 최대 정렬을 달성하기 위해 요구되는 임의의 알고리즘을 비롯한 정렬 측정을 위한 적절한 파라미터를 결정할 수 있다. 그러나, 본원에서의 목적을 위해, 아미노산 서열 일치도 값 (%)은 서열 비교 컴퓨터 프로그램 ALIGN-2를 사용함으로써 하기에 기술된 바와 같이 수득된다. ALIGN-2 서열 비교 컴퓨터 프로그램은 제넨테크, 인코포레이티드에 의해 제작되었고, 워싱턴 D.C., 20559에 소재하는 미국 저작국에 미국 저작권 등록번호 TXU510087하에 등록된 사용자 문서화와 함께 제출되었고, 캘리포니아주 사우쓰 샌프란시스코에 소재하는 제넨테크, 인코포레이티드를 통해 공연히 이용될 수 있다. ALIGN-2 프로그램은 사용을 위해 UNIX 운영 체제, 예로서, 디지털 UNIX V4.0D상에서 컴파일되어야 한다. 모든 서열 비교 파라미터는 ALIGN-2 프로그램에 의해 세팅되고 바뀌지 않는다.

[0050] 본원에서의 목적을 위해, 지정된 아미노산 서열 B (다르게는, 지정된 아미노산 서열 B에의, 그와의, 또는 그에 대한 특정의 아미노산 서열 일치도 (%))를 갖거나 포함하는 지정된 아미노산 서열 A로서 표현될 수 있다)에의 (to), 그와의, 또는 그에 대한(against) 지정된 아미노산 서열 A의 아미노산 서열 일치도 (%)는 하기와 같이 산출된다:

[0051] 100 x 분수 X/Y

[0052] (여기에서, X는 A 및 B의 당해 프로그램 정렬에서 서열 정렬 프로그램 ALIGN-2에 의해 일치하는 매치로서 점수화된 아미노산 잔기의 갯수이고, Y는 B에서 아미노산 잔기의 총 갯수이다). 아미노산 서열 A의 길이는 아미노산 서열 B의 길이와 동일하지 않고, B에 대한 A의 아미노산 서열 일치도 (%)는 A에 대한 B의 아미노산 서열 일치도 (%)와 동일하지 않을 것임을 인식할 것이다.

[0053] 본원에서 사용되는 용어 "ANGPTL4 변이체"는 상기 기술된 바와 같은 변이체 및/또는 천연 ANGPTL4 서열내 하나 이상의 아미노산 돌연변이를 포함하는 ANGPTL4를 언급한다. 임의로, 하나 이상의 아미노산 돌연변이는 아미노산 치환(들)을 포함한다. 본 발명에서 사용하기 위한 ANGPTL4 및 그의 변이체는 본원에 잘 공지되어 있는 다양한 방법에 의해 제조할 수 있다. ANGPTL4의 아미노산 서열 변이체는 ANGPTL4 DNA에서의 돌연변이화에 의해 제조할 수 있다. 상기의 변이체는, 예를 들면, ANGPTL4의 아미노산 서열, 예로서, ATCC 기탁번호 209284하에 기탁된 핵산에 의해 코딩된 인간 아미노산 서열, 또는 도 2에 제시한 것내의 잔기로부터의 결실, 그로의 삽입 또는 그의 치환을 포함한다. 원하는 활성을 갖는 최종 작제물을 얻기 위해 결실, 삽입, 및 치환을 임의로 조합할 수 있다. 변이체를 코딩하는 DNA에서 제조되는 돌연변이는 서열을 리딩 프레임 바깥쪽에 배치시키지 않아야 하고, 바람직하게, 2차 mRNA 구조를 생산할 수 있는 상보성 부위를 형성시키지 않을 것이다. EP 75,444A.

[0054] ANGPTL4 변이체는 임의로 천연 ANGPTL4를 코딩하는 DNA내 뉴클레오티드의 특정부위 돌연변이화(site-directed mutagenesis), 과지 디스플레이 기술에 의해 변이체를 코딩하는 DNA를 생산한 후, 재조합 세포 배양물에서 DNA를

발현시켜 제조한다.

- [0055] 아미노산 서열 변이를 도입하는 부위는 미리 결정되는 반면, 본질적으로(per se) 돌연변이는 미리 결정될 필요는 없다. 예를 들면, 지정 부위에서 돌연변이의 수행능을 최적화하기 위해서 무작위 돌연변이화는 최적의 원하는 활성 조합을 위해 선별된 표적 코돈 또는 부위 및 발현된 ANGPTL4 변이체에서 수행될 수 있다. 공지된 서열을 갖는 DNA내 미리 결정된 부위에서의 치환 돌연변이를 형성하는 기술은 잘 공지되어 있고, 예를 들면, 부위-특이성 돌연변이화이다. 본원에 기술된 ANGPTL4 변이체의 제조는 파지 디스플레이 기술에 의해, 예로서, PCT 공개 WO 00/63380에 기술되어 있는 것에 의해 달성될 수 있다.
- [0056] 상기의 클론을 선별한 후, 돌연변이화된 단백질 부위를 제거되고 단백질 생산을 위한 적절한 벡터, 일반적으로, 적절한 숙주의 형질전환을 위해 사용될 수 있는 타입의 발현 벡터에 배치할 수 있다.
- [0057] 아미노산 서열 결실은 일반적으로 약 1 내지 30개의 잔기, 임의로 1 내지 10개의 잔기, 임의로 1 내지 5개 이하의 잔기를 범위로 하고, 전형적으로 인접한다.
- [0058] 아미노산 서열 삽입은 잔기 하나로부터 본질적으로 길이에 제한이 없는 폴리펩티드의 아미노- 및/또는 카복실-말단 융합 뿐만 아니라, 단일 또는 다중 아미노산 잔기의 서열내(intrasequence) 삽입을 포함한다. 서열내 삽입 (즉, 천연 ANGPTL4 서열내의 삽입)은 일반적으로, 1 내지 10개의 잔기, 임의로 1 내지 5개, 또는 임의로 1 내지 3개의 범위일 수 있다. 말단 삽입의 예로서는 숙주에 대하여 이종인지 또는 동종인지간에, 재조합 숙주로부터의 분비를 촉진시키기 위한 N-말단로의 시그널 서열의 융합을 포함한다.
- [0059] 추가의 ANGPTL4 변이체는 천연 ANGPTL4 중 적어도 하나의 아미노산 잔기가 제거되고 그 위치에 상이한 잔기가 삽입된 것이다. 본 발명의 실시태양에서, ANGPTL4 변이체는 ANGPTL4의 162번 및/또는 164번에서의 치환 또는 mANGPTL4의 169번에서의 치환을 포함한다. 상기 치환은 표 1에 나타낸 것에 따라 형성될 수 있다. ANGPTL4 변이체는 또한 본원에 기술된 바와 같은 자연발생되지 않은 아미노산을 포함할 수 있다.
- [0060] 아미노산은 그의 측쇄의 성질에서의 유사성에 따라 분류될 수 있다 ([A. L. Lehninger, *in Biochemistry*, second ed., pp. 73-75, Worth Publishers, New York (1975)]):
- [0061] (1) 비극성: Ala (A), Val (V), Leu (L), Ile (I), Pro (P), Phe (F), Trp (W), Met (M)
- [0062] (2) 무전하 극성: Gly (G), Ser (S), Thr (T), Cys (C), Tyr (Y), Asn (N), Gln (Q)
- [0063] (3) 산성: Asp (D), Glu (E)
- [0064] (4) 염기성: Lys (K), Arg (R), His (H)
- [0065] 다르게는, 자연발생적으로 발생된 잔기는 통상의 측쇄 성질에 기초하여 군으로 분류될 수 있다:
- [0066] (1) 소수성: 노르류신, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- [0067] (2) 중성 친화성: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
- [0068] (3) 산성: Asp, Glu;
- [0069] (4) 염기성: His, Lys, Arg;
- [0070] (5) 쇄 배향성(orientation)에 영향을 주는 잔기: Gly, Pro;
- [0071] (6) 방향성: Trp, Tyr, Phe.

표 1

원(original) 잔기	일례의 치환체	바람직한 치환체
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala

His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; 노르류신	Leu
Leu (L)	노르류신; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (s)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; 노르류신	Leu

[0074] "자연발생적으로 발생된 아미노산 잔기" (즉, 유전자 코드에 의해 코딩되는 아미노산 잔기)는 알라닌 (Ala); 아르기닌 (Arg); 아스파라긴 (Asn); 아스파르트산 (Asp); 시스테인 (Cys); 글루타민 (Gln); 글루탐산 (Glu); 글리신 (Gly); 히스티딘 (His); 이소류신 (Ile); 류신 (Leu); 리신 (Lys); 메티오닌 (Met); 페닐알라닌 (Phe); 프롤린 (Pro); 세린 (Ser); 트레오닌 (Thr); 트리토판 (Trp); 티로신 (Tyr); 및 발라닌 (Val)으로 구성된 군으로부터 선별될 수 있다. "자연발생적으로 발생되지 않은 아미노산 잔기"는 상기 열거한 자연발생적으로 발생된 아미노산 잔기 이외의, 폴리펩티드 쇄 중 인접한 아미노산 잔기(들)과 공유결합할 수 있는 잔기를 언급한다. 자연발생적으로 발생되지 않은 아미노산 잔기의 일례로는 예로서, 노르류신, 오르니틴, 노르발린, 호모세린 및 다른 아미노산 잔기 유사체, 예로서, ([Ellman et al., *Meth. Enzym.* 202:301-336 (1991)] & 미국 특허출원 공개 제 20030108885호 및 제 20030082575 호])에 기술된 것을 포함한다. 간단하게, 본 방법은 자연발생적으로 발생되지 않은 아미노산 잔기를 사용하여 억제자 tRNA를 활성화시킨 후, 시험판내 또는 생체내에서 RNA를 전사하고 해독하는 것을 포함한다 (예로서, 미국 특허출원 공개 제 20030108885호 및 제 20030082575호; [Noren et al., *Science* 244:182 (1989)]; 및 [Ellman et al., 상기 동일] 참조).

[0075] "단리된" 폴리펩티드는 그의 자연 환경의 성분으로부터 동정되고 분리되고/거나 회수된 것이다. 그의 자연 환경의 오염원 성분은 폴리펩티드에 대한 진단 또는 치료적 용도를 방해하는 물질이고, 효소, 호르몬, 및 다른 단백질성 또는 비단백질성 용질을 포함할 수 있다. 특정 실시태양에서, 폴리펩티드는 (1) 라우리(Lowry) 방법에 의해 측정된 바와 같이, 95중량% 초파, 또는 99중량% 초파의 폴리펩티드로, (2) 회전식 컵 서열 분석기 (spinning cup sequenator)의 사용에 의해 N-말단 또는 내부 아미노산 서열 중 적어도 15개의 잔기를 수득하기에 충분한 정도로, 또는 (3) 쿠마시 블루(Coomassie blue), 또는 은 염색을 사용하는 환원 또는 비환원성 조건 하에서 SDS-PAGE에 의한 균일성으로 정제될 것이다. 폴리펩티드의 자연 환경 중 적어도 하나의 성분이 존재하지 않기 때문에 단리된 폴리펩티드는 재조합 세포내 동소의 폴리펩티드를 포함한다. 그러나, 대개, 단리된 폴리펩티드는 적어도 하나의 정제 단계에 의해 정제될 것이다.

[0076] 용어 "항체"는 가장 광범위한 의미로 사용되고, 원하는 생물학적 활성을 나타내는 한, 모노클로날 항체 (전장 또는 무손상 모노클로날 항체 포함), 폴리클로날 항체, 다가 항체, 다중특이성 항체 (예로서, 이중특이성 항체), 및 항체 단편 (하기 참조)을 포함한다.

[0077] 달리 언급하지 않는 한, 표현 "다가 항체"는 본 명세서 전체에서 3개 이상의 항원 결합 부위를 포함하는 항체를 언급하기 위해서 사용된다. 다가 항체는 전형적으로 3개 이상의 항원 결합 부위를 갖도록 공학처리되고 일반적으로 천연 서열 IgM 또는 IgA 항체는 아니다.

[0078] "항체 단편"은 일반적으로 무손상 항체의 항원 결합 부위를 포함하고, 이로써 항원에 결합하는 능력을 보유하는, 무손상 항체의 일부만을 포함한다. 본 정의에 포함되는 항체 단편의 일례로 (i) VL, CL, VH 및 CH1 영역을 갖는 Fab 단편; (ii) CH1 영역의 C-말단에 하나 이상의 시스테인 잔기를 갖는 Fab 단편인 Fab' 단편; (iii) VH 및 CH1 영역을 갖는 Fd 단편; (iv) CH1 영역의 C-말단에 하나 이상의 시스테인 잔기를 갖고 VH 및 CH1 영역을 갖는 Fd' 단편; (v) 항체의 단일 암(arm) 중 VL 및 VH 영역을 갖는 Fv 단편; (vi) VH 영역으로 구성된 dAb 단편 [Ward et al., *Nature* 341, 544-546 (1989)]; (vii) 단리된 CDR 부위; (viii) 헌지 부위에 디설파이드 브릿지에 의해 연결된 2개의 Fab' 단편을 포함하는 2가 단편인 $F(ab')_2$ 단편; (ix) 단쇄 항체 분자 (예로서, 단쇄 Fv; scFv) ([Bird et al., *Science* 242:423-426 (1988)]; 및 [Huston et al., *PNAS* (USA)

85:5879-5883 (1988)]; (x) 동일한 폴리펩티드 쇄내 경쇄 가변 영역 (VL)에 연결된 중쇄 가변 영역 (VH)을 포함하는, 2개의 항원 결합 부위를 포함하는 "디아바디(diabody)" (예로서, EP 404,097; WO 93/11161; 및 [Hollinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993)] 참조); (xi) 상보성 경쇄 폴리펩티드와 함께 한쌍의 항원 결합 부위를 형성하는 한쌍의 텐덤 Fd 세그먼트 (VH-CH1-VH-CH1)을 포함하는 "선형 항체" ([Zapata et al., *Protein Eng.* 8(10): 1057-1062 (1995)]; 및 미국 특허번호 제 5,641,870호)를 포함한다.

[0079] 본원에서 사용되는 바, 용어 "모노클로날 항체"는 실질적으로 동질성인 항체 군집으로부터 수득된 항체, 즉, 최소량으로 존재할 수 있는 있음직한 자연발생적으로 발생된 돌연변이를 제외하고 군집을 포함하는 개개의 항체들은 일치한다. 모노클로날 항체는 단일 항체에 대하여 고도로 특이성이다. 추가로, 전형적으로 상이한 결정기 (에피토프)에 대한 상이한 항체를 포함하는 폴리클로날 항체 시료와는 대조적으로, 각각의 모노클로날 항체는 항원상의 단일 결정기에 대한 것이다. 수식어구 "모노클로날"은 임의의 특정 방법에 의해 항체를 생산하기 위해 요구되는 것으로서 해석되지 않는다. 예를 들면, 본 발명에 따라 사용되는 모노클로날 항체는 최초로 [Kohler et al., *Nature* 256:495 (1975)]에 기술된 하이브리도마 방법에 의해 제조될 수 있거나, 재조합 DNA 방법에 의해 제조될 수 있다 (예로서, 미국 특허번호 제 4,816,567호 참조). "모노클로날 항체"는 또한, 예를 들면, ([Clackson et al., *Nature* 352:624-628 (1991)] 또는 [Marks et al., *J. Mol. Biol.* 222:581-597 (1991)])에 기술된 기술을 사용하여 파지 항체 라이브러리로부터 단리될 수 있다.

[0080] 본원에서 모노클로날 항체는 특이적으로 중쇄 및/또는 경쇄 부분은 특정 종으로부터 유래하거나 특정 항체 부류 또는 하위 부류(subclass)에 속하는 항체내 상응하는 서열과 일치하거나 그와 상동성이 반면, 쇄(들) 중 잔여부는 또 다른 종으로부터 유래하거나 또 다른 항체 부류 또는 하위 부류에 속하는 항체, 및 상기 항체의 단편과 일치하거나 그와 상동성이 되, 그들은 원하는 생물학적 활성을 나타내는 "키메라" 항체를 포함한다 (미국 특허번호 제 4,816,567호; 및 [Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6851-6855 (1984)]).

[0081] 인간이 아닌(non-human) (예로서, 뮤린) 항체의 "인간화된" 형태는 인간이 아닌 면역글로불린으로부터 유래된 최소의 서열을 포함하는 키메라 항체이다. 대개의 경우, 인간화된 항체는 수혜자의 과가변 부위로부터의 잔기가 원하는 특이성, 친화성 및 수용능을 갖는 인간이 아닌 종 (공여자 항체), 예로서, 마우스, 래트, 래빗 또는 인간이 아닌 영장류의 과가변 부위로부터의 잔기로 대체된 인간 면역글로불린 (수혜자 항체)이다. 몇몇의 일례에서, 인간 면역글로불린의 프레임워크 부위 (FR) 잔기는 상응하는 인간이 아닌 잔기로 대체된다. 추가로, 인간화된 항체는 수혜자 항체 또는 공여자 항체에서 발견되지 않는 잔기를 포함할 수 있다. 추가로 항체 수행능을 개량시키기 위하여 상기의 변형을 수행한다. 일반적으로, 인간화된 항체는 실질적으로 적어도 하나의, 및 전형적으로 2개의 가변 영역 모두를 포함하되, 여기에서, 모든 또는 실질적으로 모든 과가변 루프는 인간이 아닌 면역글로불린의 것과 일치하고, 모든 또는 실질적으로 모든 FRs는 인간 면역글로불린 서열의 것이다. 인간화된 항체는 또한 임의로 면역글로불린 불변 부위 (Fc) 중 적어도 일부, 전형적으로, 인간 면역글로불린의 것을 포함할 것이다. 추가의 설명을 위해, ([Jones et al., *Nature* 321:522-525 (1986)]; [Riechmann et al., *Nature* 332:323-329 (1988)]; 및 [Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992)])을 참조한다.

[0082] "인간 항체"는 인간에 의해 생산된 항체의 것과 일치하는 아미노산 서열을 갖는 것이고/거나 본원에 기술된 바와 같은 인간 항체를 제조하기 위한 임의의 기술을 사용하여 제조되는 것이다. 상기의 인간 항체에 대한 정의는 특이적으로 인간이 아닌 항원-결합 잔기를 포함하는 인간화된 항체는 제외시킨다. 인간 항체는 본 분야에 공지된 다양한 기술을 사용하여 생산될 수 있다. 실시태양에서, 인간 항체는 인간 항체를 발현시키는 파지 라이브러리로부터 선별된다 ([Vaughan et al., *Nature Biotechnology* 14:309-314 (1996); Sheets et al., *PNAS (USA)* 95:6157-6162 (1998)]; [Hoogenboom and Winter, *J. Mol. Biol.* 227:381 (1991)]; [Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222:581 (1991)]). 인간 항체는 또한 형질전환 동물, 예로서, 내인성 면역글로불린 유전자가 부분적으로 또는 완전하게 불활성화된 마우스내로 인간 면역글로불린 유전자좌(loci)를 도입함으로써 제조할 수 있다. 시험감염(challenge)시, 인간 항체 생산이 관찰되고, 이는 유전자 재배열, 어셈블리 및 항체 레퍼토리를 포함하는 모든 면에서 인간에서 관찰되는 것과 매우 유사하다. 상기 접근법은 예를 들면, 미국 특허번호 제 5,545,807호; 제 5,545,806호; 제 5,569,825호; 제 5,625,126호; 제 5,633,425호; 제 5,661,016호, 및 하기의 과학 공개문헌: [Marks et al., *Bio/Technology* 10: 779-783 (1992)]; [Lonberg et al., *Nature* 368: 856-859 (1994)]; [Morrison, *Nature* 368:812-13 (1994)]; [Fishwild et al., *Nature Biotechnology* 14: 845-51 (1996)]; [Neuberger, *Nature Biotechnology* 14: 826 (1996)]; [Lonberg and Huszar, *Intern. Rev. Immunol.* 13:65-93 (1995)])에 기술되어 있다. 다르게는, 인간 항체는 표적 항원에 대한 항체를 생산하는 인간 B 림프구의 불멸화에 의해 제조할 수 있다 (상기 B 림프구는 개체로부터 회수될 수 있거나 시험관내에서 면역화될 수 있다) (예로서, [Cole et al., *Monoclonal Antibody and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, p. 77 (1985)];

[Boerner et al., *J. Immunol.*, 147 (1):86-95 (1991)]; 및 미국 특허번호 제 5,750,373호 참조).

- [0083] 용어 "가변"은 가변 영역의 특정 부분이 항체중의 서열에서 광범위하게 상이하고 그의 특정 항원에 대한 각각의 특정 항체의 결합 및 특이성에 사용된다는 사실을 언급한다. 그러나, 가변성은 항체의 가변 영역에 걸쳐 균일하게 분포하는 것은 아니다. 경쇄 및 중쇄 가변 영역 둘 모두에서 과가변 부위로 명명되는 3개의 세그먼트에 집중되어 있다. 더욱 고도로 보존성이 가변 영역 부분을 프레임워크 부위 (FRs)로 명명한다. 천연 중쇄 및 경쇄의 가변 영역 각각은 주로 베타-쉬트 구조를 채택하고, 3개의 과가변 부위에 의해 연결되어 있으며, 베타-쉬트 구조의 일부분을 연결하고, 몇몇 경우에는, 그를 형성하는 루프를 형성하는 4개의 FRs를 포함한다. 각 쇄에서 과가변 부위는 FRs에 의해 다른 쇄로부터의 과가변 부위와 함께 아주 근접하게 결합하고, 항체의 항원-결합 부위의 형성의 원인이 된다 ([Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)] 참조). 불변 영역은 항체와 항원의 결합에 직접 관여하지 않지만, 다양한 효과가 작용, 예로서, 항체-의존 세포-매개 세포독성 (ADCC)에서의 항체 관여를 나타낸다.
- [0084] 본원에서 사용되는 경우, 용어 "과가변 부위"는 항원-결합을 초래하는 항체의 아미노산 잔기를 언급한다. 과가변 부위는 일반적으로 "상보성 결정 부위" 또는 "CDR"로부터의 아미노산 잔기 (예로서, 경쇄 가변 영역 중 잔기 24-34 (L1), 50-56 (L2) 및 89-97 (L3) 및 중쇄 가변 영역 중 31-35 (H1), 50-65 (H2) 및 95-102 (H3); ([Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)]) 및/또는 "과가변 루프"로부터의 잔기 (예로서, 경쇄 가변 영역 중 잔기 26-32 (L1), 50-52 (L2) 및 91-96 (L3), 및 중쇄 가변 영역 중 26-32 (H1), 53-55 (H2) 및 96-101 (H3); ([Chothia and Lesk *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)])를 포함한다. "프레임워크 부위" 또는 "FR" 잔기는 본원에서 정의된 바와 같은 과가변 부위 잔기 이외의 가변 영역 잔기이다.
- [0085] 그의 중쇄의 불변 영역중의 아미노산 서열에 따라, 무손상 항체를 상이한 "부류"로 지정할 수 있다. 5개: IgA, IgD, IgE, IgG, 및 IgM의 무손상 항체 주요 부류가 존재하고, 이중 수개는 추가로 "하위 부류" (동종형), 예로서, IgG₁ (비-A 및 A 알로타입 포함), IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA, 및 IgA₂로 분류될 수 있다. 상이한 부류의 항체에 상응하는 중쇄 불변 영역은 각각 α , δ , ϵ , γ , μ 로 명명된다. 상이한 부류의 면역글로불린의 서브유니트 구조 및 3차 구조는 잘 공지되어 있다.
- [0086] 임의의 척추동물 종으로부터의 항체의 경쇄는 그의 불변 영역의 아미노산 서열에 기초하여 카파 (6) 및 람다 (8)로 명명되는, 2개의 명확하게 상이한 타입 중 하나로 지정될 수 있다.
- [0087] 용어 "Fc 부위"는 무손상 항체의 과파인 분해에 의해 형성될 수 있는 면역글로불린 중쇄의 C-말단 부위를 정의하기 위하여 사용된다. Fc 부위는 천연 서열 Fc 부위 또는 변이체 Fc 부위일 수 있다. 면역글로불린 중쇄의 Fc 부위의 경계는 다양할 수 있지만, 인간 IgG 중쇄 Fc 부위는 일반적으로 위치 Cys226 주위, 또는 위치 Pro230의 아미노산 잔기로부터 Fc 부위의 카복실-말단으로 확장되도록 정의된다. 면역글로불린의 Fc 부위는 일반적으로 2개의 불변 영역, CH2 영역 및 CH3 영역을 포함하고, 임의로 CH4 영역을 포함한다.
- [0088] 본원에서 Fc 부위의 폴리펩티드 쇄 2개 중 하나는 "Fc 부위 쇄"를 의미한다.
- [0089] 인간 IgG Fc 부위의 "CH2 영역" ("Cg2" 영역으로도 언급됨)은 일반적으로 위치 231번 주위의 아미노산 잔기로부터 위치 340번 주위의 아미노산 잔기로 확장된다. CH2 영역은 또다른 영역과는 밀접하게 쌍을 이루지 않는다는 점에서 유일하다. 오히려, 2개의 N-연결된 분지형 탄수화물 쇄가 무손상 천연 IgG 분자의 2개의 CH2 영역 사이에 배치된다. 탄수화물이 영역-영역 짹형성(pairing)에 대한 치환체를 제공할 수 있고 CH2 영역의 안정화를 도울 수 있다는 점에서 주시되어 왔다 [Burton, *Molec. Immunol.* 22:161-206 (1985)]. 본원에서 CH2 영역은 천연 서열 CH2 영역 또는 변이체 CH2 영역일 수 있다.
- [0090] "CH3 영역"은 Fc 부위에서 CH2 영역으로의 잔기 C-말단의 확장을 포함한다 (즉, IgG의 위치 341번 주위의 아미노산 잔기로부터 위치 447번 주위의 아미노산 잔기로의 확장). 본원에서 CH3 부위는 천연 서열 CH3 영역 또는 변이체 CH3 영역일 수 있다 (예로서, 그의 하나의 쇄에 도입된 "돌기(protuberance)"를 포함하고 그의 다른 쇄에 상응하는 도입된 "캐비티(cavity)"를 포함하는 CH3 영역; 본원에서 참고문헌으로서 인용되는 것으로 표시된 미국 특허번호 제 5,821,333호 참조). 상기 변이체 CH3 영역을 사용하여 본원에 기술되어 있는 다중특이성 (예로서, 이중특이성) 항체를 제조할 수 있다.
- [0091] "힌지 부위"는 일반적으로 인간 IgG1의 Glu216 주위, 또는 Cys226 주위로부터 Pro230 주위로 확장된 것으로서 정의된다 [Burton, *Molec. Immunol.* 22:161-206 (1985)]. 다른 IgG 동종형의 힌지 부위는 동일한 위치에서 중

쇄간(inter-heavy chain) S-S 결합을 형성하는 첫번째 및 마지막 시스테인 잔기를 배치시켜 IgG1 서열과 함께 정렬될 수 있다. 본원에서 헌지 부위는 천연 서열 헌지 부위 또는 변이체 헌지 부위일 수 있다. 변이체 헌지 부위의 2개의 폴리펩티드 쇄는 일반적으로 폴리펩티드 쇄당 적어도 하나의 시스테인 잔기를 보유하고, 이로써, 변이체 헌지 부위의 2개의 폴리펩티드 쇄는 2개의 쇄 사이에 디설파이드 결합을 형성할 수 있다. 본원의 바람직한 헌지 부위는 천연 서열 인간 헌지 부위, 예로서, 천연 서열 인간 IgG1 헌지 부위이다.

[0092] "작용성 Fc 부위"는 천연 서열 Fc 부위의 적어도 하나의 "효과기 작용"을 갖는다. 일례의 "효과기 작용"은 C1q 결합; 보체 의존성 세포독성 (CDC); Fc 수용체 결합; 항체-의존 세포-매개 세포독성 (ADCC); 포식작용; 세포 표면 수용체 (예로서, B 세포 수용체; BCR)의 하향 조절 등을 포함한다. 상기 효과기 작용은 일반적으로 Fc 부위가 결합 영역 (예로서, 항체 가변 영역)과 결합할 것을 요구하고 상기의 항체 효과기 작용을 평가하기 위해 본 분야에 공지된 다양한 분석법을 사용하여 평가할 수 있다.

[0093] "천연 서열 Fc 부위"는 자연적으로 발견된 Fc 부위의 아미노산 서열과 일치하는 아미노산 서열을 포함한다.

[0094] "변이체 Fc 부위"는 적어도 하나의 아미노산 변형에 의해 천연 서열 Fc 부위의 것과 상이한 아미노산 서열을 포함한다. 특정 실태태양에서, 변이체 Fc 부위는 천연 서열 Fc 부위 또는 모 폴리펩티드의 Fc 부위와 비교되는, 적어도 하나의 아미노산 치환, 예로서, 천연 서열 Fc 부위에서 또는 모 폴리펩티드의 Fc 부위에서 약 1 내지 약 10개의 아미노산 치환, 및 바람직하게, 약 1 내지 약 5개의 아미노산 치환을 갖는다. 본원에서 변이체 Fc 부위는 전형적으로, 예로서, 천연 서열 Fc 부위 및/또는 모 폴리펩티드의 Fc 부위와 적어도 약 80%의 서열 일치도, 또는 그와 적어도 약 90%의 서열 일치도, 또는 그와 적어도 약 95% 이상의 서열 일치도를 갖는다.

[0095] "항체-의존 세포-매개 세포독성" 및 "ADCC"는 Fc 수용체 (FcRs)를 발현시키는 비특이성 세포독성 세포 (예로서, 자연 살상 (NK) 세포, 중성구, 및 포식세포)가 표적 세포상의 결합 항체를 인식한 후, 표적 세포를 분해시키는 세포-매개 반응을 언급한다. ADCC를 매개하는 1차 세포인 NK 세포는 Fc γ RIII만을 발현시키는 반면, 단핵구는 Fc γ RI, Fc γ RII 및 Fc γ RIII을 발현시킨다. 조혈 세포상의 FcR 발현은 [Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-92 (1991)]의 464쪽 표 3에 요약되어 있다. 관심의 대상이 되는 분자의 ADCC 활성을 평가하기 위해서 예를 들면, 미국 특허번호 제 5,500,362호 또는 제 5,821,337호에 기술되어 있는 시험관내 ADCC 분석법을 실시할 수 있다. 상기 분석법에 대한 유용한 효과기 세포는 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC) 및 자연 살상 (NK) 세포를 포함한다. 다르게는, 또는 추가로, 관심의 대상이 되는 분자의 ADCC 활성을 생체내에서, 예를 들면, 동물 모델, 예로서, [Clynes et al., *PNAS (USA)* 95:652-656 (1998)]에 기술된 것에서 평가할 수 있다.

[0096] "인간 효과기 세포"는 하나 이상의 FcRs를 발현시키고 효과기 작용을 실행하는 백혈구이다. 전형적으로, 세포는 적어도 Fc γ RIII을 발현시키고 효과기 작용을 실행한다. ADCC를 매개하는 인간 백혈구의 일례로 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC), 자연 살상 (NK) 세포, 단핵구, 세포독성 T 세포 및 중성구를 포함하고; PBMCs 및 NK 세포가 일반적으로 바람직하다. 효과기 세포는 그의 천연 공급원, 예로서, 본원에 기술된 바와 같은 혈액 또는 PBMCs로부터 단리될 수 있다.

[0097] 용어 "Fc 수용체" 및 "FcR"은 항체의 Fc 부위에 결합하는 수용체를 기술하기 위하여 사용된다. 바람직한 FcR은 천연 서열 인간 FcR이다. 또한, 바람직한 FcR은 IgG 항체 (감마 수용체)와 결합하고, 당해 수용체의 대립 변이체 및 다르게는, 스플라이싱된 형태를 포함하는, Fc γ RI, Fc γ RII, 및 Fc γ RIII 하위 부류의 수용체를 포함한다. Fc γ RII 수용체는 주로 그의 세포질 영역이 상이한 유사한 아미노산 서열을 갖는 Fc γ RIIA ("활성화 수용체") 및 Fc γ RIIB ("저해성 수용체")를 포함한다. 활성화 수용체 Fc γ RITA는 그의 세포질 영역내 면역수용체 티로신-기초 활성화 모티프 (ITAM)를 포함한다. 저해성 수용체 Fc γ RIB는 그의 세포질 영역내 면역수용체 티로신-기초 저해 모티프 (ITIM)를 포함한다 ([Daeron, *Annu. Rev. Immunol.* 15:203-234 (1997)] 참조). FcRs는 ([Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-92 (1991)]; [Capel et al., *Immunomethod* 4:25-34 (1994)]; 및 [de Haas et al., *J. Lab. Clin. Med.* 126:330-41 (1995)])에서 리뷰된다. 미래에 확인될 것을 포함하는 다른 FcRs도 본원에서 용어 "FcR"로서 포함된다. 용어는 또한 모체 IgGs를 태아로 옮기는 기능을 하는 신생아 수용체, FcRn도 포함한다 ([Guyer et al., *J. Immunol.* 117:587 (1976)]; 및 [Kim et al., *J. Immunol.* 24:249 (1994)]).

[0098] "보체 의존성 세포독성" 및 "CDC"는 보체 존재하의 표적 분해를 언급한다. 보체 활성화 경로는 보체 시스템의 제 1 성분과 동족 항원에 결합된 분자 (예로서, 항체)와의 결합에 의해 개시된다. 보체 활성화를 평가하기 위해 CDC 분석법, 예로서, [Gazzano-Santoro et al., *J. Immunol. Method* 202:163 (1996)]에 기술된 것을 실시할 수 있다.

- [0099] "성숙한 친화성을 갖는(affinity matured)" 항체는 변형(들)을 갖지 않는 모 항체와 비교하여 항원에 대한 항체의 친화성이 개선된, 그의 하나 이상의 CDRs에 하나 이상의 변형을 갖는 것이다. 바람직한 성숙한 친화성을 갖는 항체는 표적 항원에 대하여 나노몰랄 또는 피코몰랄까지의 친화성을 가질 것이다. 성숙한 친화성을 갖는 항체는 본 분야에 공지된 방법에 의해 생산된다. [Marks et al. *Bio/Technology* 10:779-783 (1992)]에는 VH 및 VL 영역 셔플링에 의한 친화성 성숙이 기술되어 있다. CDR 및/또는 프레임워크 잔기의 무작위 돌연변이화는 ([Barbas et al. *Proc Nat. Acad. Sci. USA* 91:3809-3813 (1994)]; [Schier et al. *Gene* 169:147-155 (1995)]; [Yelton et al. *J. Immunol.* 155:1994-2004 (1995)]; [Jackson et al., *J. Immunol.* 154(7):3310-9 (1995)]; 및 [Hawkins et al., *J. Mol. Biol.* 226:889-896 (1992)])에 기술되어 있다.
- [0100] 본원에서 "가요성 링커"는 웨티드 결합(들)에 의해 연결된 2개 이상의 아미노산 잔기를 포함하는 웨티드를 언급하고, 그에 의해 연결된 2개의 폴리웨티드 (예로서, 2개의 Fd 부위)에 더욱 회전성인 자유(rorational freedom)를 제공한다. 상기의 회전성 자유는 가요성 링커에 의해 연결된 2개 이상의 항원 결합 부위가 더욱 효과적으로 각 표적 항원(들)에 접근할 수 있도록 한다. 적절한 가요성 링커 웨티드 서열의 일례로 gly-ser, gly-ser-gly-ser, ala-ser, 및 gly-gly-gly-ser를 포함한다.
- [0101] "이량화 영역"은 적어도 2개의 아미노산 잔기 (일반적으로, 시스테인 잔기) 또는 적어도 2개의 웨티드 또는 폴리웨티드 (동일하거나, 상이한 아미노산 서열을 가질 수 있다)의 결합(association)에 의해 형성된다. 웨티드 또는 폴리웨티드는 다른 공유 및/또는 비공유 결합(들)을 통해 서로서로 상호작용한다. 본원에서 이량화 영역의 일례로 Fc 부위; 헌지 부위; CH3 영역; CH4 영역; CH1-CL 쌍; 본원에서 참고문헌으로서 특별히 인용하고 있는 미국 특허번호 제 5,821,333호에 기술되어 있는 바와 같이 공학처리된 "마디(knob)" 및/또는 "돌출(protruberance)"을 포함하는 "경계면"; 류신 지퍼 (예로서, jun/fos 류신 지퍼, ([Kostelney et al., *J. Immunol.*, 148: 1547-1553 (1992)] 참조)); 또는 효모 GCN4 류신 지퍼; 이소류신 지퍼; 수용체 이량체 쌍 (예로서, 인터루킨-8 수용체 (IL-8R); 및 인테그린 이종이량체, 예로서, LFA-1 및 GPIIb/IIIa), 또는 그의 이량화 부위(들); 이량체 리간드 폴리웨티드 (예로서, 신경 성장 인자 (NGF), 뉴로트로핀-3 (NT-3), 인터루킨-8 (IL-8), 혈관 내피 성장 인자 (VEGF), VEGF-C, VEGF-D, PDGF 구성원(members), 및 뇌-유도 향신경성 인자 (BDNF); ([Arakawa et al. *J. Biol. Chem.* 269(45): 27833-27839 (1994)] 및 [Radziejewski et al. *Biochem.* 32(48): 1350 (1993)] 참조), 또는 그의 이량화 부위(들); 디설파이드 결합(들)을 형성할 수 있는 시스테인 잔기쌍; 웨티드 또는 폴리웨티드 사이에 디설파이드 결합(들)을 형성할 수 있도록 각각 적어도 하나의 시스테인 잔기 (예로서, 약 1, 2 또는 3개 내지 약 10개의 시스테인 잔기)를 포함하는 웨티드 또는 폴리웨티드 쌍 (이하, "합성 헌지"); 및 항체 가변 영역을 포함한다. 본원에서 가장 바람직한 이량화 영역은 Fc 부위 또는 헌지 부위이다.
- [0102] 항체의 "작용성 항원 결합 부위"는 표적 항원과 결합할 수 있는 것이다. 항원 결합 부위의 항원 결합 친화성은 항원 결합 부위가 유래되는 모 항체만큼 강할 필요는 없지만, 항원과 결합할 수 있는 능력은 항체와 항원의 결합을 평가하기 위해 공지되어 있는 다양한 방법 중 어느 하나를 사용하여 측정될 수 있어야 한다. 또한, 본원에서 다가 항체의 항원 결합 부위 각각의 항원 결합 친화성은 양적으로 동일할 필요는 없다. 본원에서 다량체 항체의 경우, 작용성 항원 결합 부위의 수는 초원심분리를 사용하여 평가할 수 있다. 본 분석 방법에 따라, 다량체 항체에 대한 상이한 비의 표적 항원을 화합시키고 복합체(complexes)의 평균 분자량은 상이한 수의 작용성 결합 부위를 가정하면서 산출한다. 상기 이론치를 수득한 실제 실험치와 비교하여 작용성 결합 부위의 수를 평가한다.
- [0103] 지정된 항체의 "생물학적 특징"을 갖는 항체는 동일한 항원과 결합하는 다른 항체와 식별되는 상기 항체의 생물학적 특징들 중 하나 이상을 갖는 것이다.
- [0104] 관심의 대상이 되는 항체와 결합하는 항원상의 에피토프에 결합하는 항체를 선별하기 위하여, 예로서, [Antibody, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow and David Lane (1988)]에 기술된 것과 같은 루틴한 교차-차단(cross-blocking) 분석법을 실시할 수 있다.
- [0105] 하나 이상의 추가의 치료제와 "병용하는" 투여는 동시(동시 발생) 및/또는 임의의 순서로 연속 투여하는 것을 포함한다.
- [0106] 치료 목적을 위한 "포유동물"은 인간, 가축 및 농경용 가축, 및 동물원 동물, 운동 경기용 동물, 또는 애완 동물, 예로서, 개, 말, 고양이, 소, 양, 돼지 등을 포함하는 포유동물로 분류된 임의의 동물을 언급하고, 전형적으로, 포유동물은 인간이다.
- [0107] "질병"은 본 발명의 분자를 사용한 요법으로부터 이익을 얻는 임의의 상태이다. 포유동물이 문제의 질병에 걸

리기 쉽게 하는 병적 상태를 포함하는 만성 및 급성 질병 또는 질환을 포함한다. 본원에서 치료하고자 하는 질병의 비제한적인 예로서, 종양, 양성 및 악성 종양; 혈관 종양; 비대; 백혈병 및 림프구악성 종양; 신경 세포, 아교 세포, 별아교 세포, 시상하부 및 다른 샘, 포식 세포, 상피성, 매트릭스 및 포배강(blastocoelic) 질병; 및 염증성, 혈관신생 및 면역 질병, 부적절하고, 비정상적이고, 과도하고/하거나 병적 혈관화 및/또는 혈관 투과성으로부터 유발된 혈관 질병의 임의의 형태를 포함한다.

- [0108] 용어 "유효량" 또는 "치료학적 유효량"은 포유동물에서 질환 또는 질환을 치료하기에 유효한 약물의 양을 언급한다. 암의 경우, 유효량의 약물은 암 세포의 수를 감소시킬 수 있고; 종양 크기를 축소시킬 수 있고; 말초 기관으로 암 세포가 침윤되는 것을 저해시킬 수 있고 (즉, 어느 정도까지 감소시키고, 전형적으로는 정지시킬 수 있고); 종양 전이를 저해시킬 수 있고 (즉, 어느 정도까지 감소시키고, 전형적으로는 정지시킬 수 있고); 어느 정도까지 종양 성장을 저해시킬 수 있고/거나; 상기 질병과 관련된 하나 이상의 증상을 어느 정도까지 완화시킬 수 있다. 약물이 성장을 막고/거나 현존하는 암 세포를 사멸시킬 수 있다는 점에서 이는 세포증식억제성 및/또는 세포독성을 수 있다. 암 요법의 경우, 생체내에서의 효능은 예를 들면, 생존 기간, 질환 진행 시간 (TTP), 반응속도 (RR), 반응 기간, 및/또는 삶의 질을 평가하며 측정할 수 있다.
- [0109] "치료"는 치료학적 요법 및 예방학적 또는 예방 조치 둘 모두를 언급한다. 치료를 필요로 하는 것은 이미 질병에 걸린 것 뿐만 아니라, 예방하고자 하는 질환에 있는 것을 포함한다.
- [0110] 본원에서 ANGPTL4 분자와 관련하여, 용어 "생물학적 활성" 및 "생물학적으로 활성인" 것은 특이적으로 결합하고 세포 반응, 예로서, 증식, 부착, 유주, 지질 조절 등을 조절하는 분자의 능력을 언급한다. 세포 반응은 또한 ANGPTL4 수용체, 예로서, $\alpha_v\beta_5$ 인테그린 수용체를 통해 매개되는 것을 포함하고, 제한하는 것은 아니지만, 부착, 유주, 및/또는 증식을 포함한다. 이와 관련하여, 용어 "조절"은 증진 및 저해 둘 모두를 포함한다. 본 발명의 분자는 또한 ANGPTL4 수용체, 예로서, $\alpha_v\beta_5$ 인테그린 수용체의 작용제 및 길항제를 포함한다.
- [0111] 본원에서 사용되는 바, "비대"는 종양 형성을 포함하지 않는 자연적 성장과는 무관한, 기관 또는 구조의 질량 증가로서 정의된다. 기관 또는 조직의 비대는 개체 세포의 질량 증가 (진성 비대), 또는 조직을 구성하는 세포 수의 증가 (증식) 중 어느 하나, 또는 둘 모두에 기인한다.
- [0112] 용어 "암" 및 "암성"은 전형적으로 비조절성 세포 성장을 특징으로 하는 포유동물의 생리학적 상태를 언급하거나 그를 기술한다. 암의 예로서, 제한하는 것은 아니지만, 암종, 림프종, 모세포종, 육종, 및 백혈병 또는 림프구악성 종양을 포함한다. 상기 암의 더욱 구체적인 예로서, 신장 또는 콩팥암, 유방암, 결장 암, 직장 암, 직장결장 암, 소세포 폐암, 비-소세포 폐암, 폐의 샘암종 및 폐의 편평 세포암종을 포함하는 폐암, 편평 세포암 (예로서, 편평상피 세포 암), 자궁 암, 난소 암, 전립샘 암, 간 암, 방광 암, 복강암, 간세포 암, 위장암을 포함하는 위(gastric) 또는 위(stomach) 암, 이자 암, 머리 및 목 암, 아교모세포종, 망막모세포종, 성상세포종, 난포막종, 남성배세포종, 간암, 비호지킨 림프종 (NHL), 다발골수종 및 급성 혈액 악성 종양을 포함하는 혈액 악성 종양, 자궁내막 또는 자궁 암종, 자궁내막증, 섬유육종, 용모막암종, 침샘 암종, 외음부 암, 갑상선 암, 식도 암종, 간 암종, 항문 암종, 음경 암종, 코인두 암종, 후두 암종, 카포시 육종, 흑색종, 피부 암종, 신경집종, 회소돌기아교세포종, 신경모세포종, 횡문근육종, 골원성 육종, 평활근육종, 요로 암종, 갑상선 암종, 월름즈 종양 뿐만 아니라, B-세포 림프종 (저등급/소포성 비-호지킨 림프종 (NHL); 소림프구 (SL) NHL; 중등급/소포성 NHL; 중등급 산재성 NHL; 고등급 면역모세포 NHL; 고등급 림프모구 NHL; 고등급 비분활성(small non-cleaved) 소세포 NHL; 벌키(bulky) 질환 NHL; 외투(mantle) 세포 림프종; AIDS-관련 림프종; 및 발렌스트롬 마크로글로불린혈증 포함); 만성 림프성 백혈병 (CLL); 급성 림프모구 백혈병 (ALL); 모발상 세포 백혈병; 만성 골수모세포 백혈병; 및 이식후의 림프세포 증식 질병 (PTLD) 뿐만 아니라, 모반증과 관련된 비정상적인 혈관 증식, 부종 (예로서, 뇌종양과 관련된 것), 및 메이그스 증후군을 포함한다.
- [0113] 용어 "항-종양성 조성물"은 적어도 하나의 활성 치료제, 예로서, "항암제"를 포함하는, 암을 치료하는데 유용한 조성물을 언급한다. 치료제 (항암제)의 예로서, 제한하는 것은 아니지만, 예로서, 화학요법제, 성장 저해제, 세포독성제, 방사선 요법에 사용되는 약제, 항-혈관신생제, 세포자사제, 항-튜브린제, 독소, 및 암을 치료하는 다른 약제, 예로서, 항-VEGF 중화 항체, VEGF 길항제, 항-HER-2, 항-CD20, 및 상피 성장 인자 수용체 (EGFR) 길항제 (예로서, 티로신 키나제 저해제), HER1/EGFR 저해제, 엘로티닙, COX-2 저해제 (예로서, 셀레콕시브), 인터페론, 사이토카인, 하나 이상의 ErbB2, ErbB3, ErbB4, 또는 VEGF 수용체(들)과 결합하는 길항제 (예로서, 중화 항체), 혈소판-유래 성장 인자 (PDGF) 및/또는 줄기 세포 인자 (SCF)에 대한 수용체 티로신 키나제를 위한 저해제 (예로서, 이마티닙 메실레이트 (글리벡(Gleevec)[®] 노파르티스(Novartis)), TRAIL/Apo2, 및 다른 생체활

성 및 규이 화학제 등을 포함한다. 그의 배합물 또한 본 발명에 포함된다.

[0114] 본원에서 사용되는 바, 용어 "세포독성제"는 세포 작용을 저해하거나 방해하고/하거나 세포 파괴를 일으키는 물질을 언급한다. 상기 용어는 방사성 동위원소 (예를 들면, ²¹¹At, ¹³¹I, ¹²⁵I, ⁹⁰Y, ¹⁸⁶Re, ¹⁸⁸Re, ¹⁵³Sm, ²¹²Bi, ³²P 및 Lu의 방사성 동위원소), 화학 요법제 및 독소, 예를 들면, 세균, 진균, 식물 또는 동물 기원의 효소 활성 독소 또는 소분자 독소, 그의 단편 및/또는 변이체를 포함한다.

[0115] 본원에서 사용되는 바, 용어 "성장 저해제"는 시험관내 및/또는 생체내에서 세포의 성장을 저해하는 화합물 또는 조성물을 언급한다. 따라서, 성장 저해제는 S기에서의 세포(%)를 현저히 감소시키는 것일 수 있다. 성장 저해제의 일례로 세포 주기 진행 (S기 이외의 경우)을 차단시키는 약제, 예로서, G1 정지 및 M-기 정지를 포함하는 약제를 포함한다. 종래의 M-기 차단제는 빈카스 (빈크리스틴 및 빈블라스틴), 탁솔®, 및 topo II 저해제, 예로서, 독소루비신, 에피루비신, 다우노루비신, 에토포사이드, 및 블레오마이신을 포함한다. G1을 정지시키는 약제는 S-기 정지로 넘쳐흐르는 것, 예를 들면, DNA 알킬화제, 예로서, 타목시펜, 프레드니손, 다카바진, 메클로레타민, 시스플라틴, 메토트렉세이트, 5-플로로우라실, 및 ara-C를 포함한다. 추가의 정보는 [The Molecular Basis of Cancer, Mendelsohn and Israel, eds., Chapter 1, entitled "Cell cycle regulation, oncogene, and anti종양성 drugs" by Murakami et al. (WB Saunders: Philadelphia, 1995), especially p. 13]에서 찾아 볼 수 있다.

[0116] "화학요법제"는 암 요법에 유용한 화학적 화합물이다. 화학요법제의, 예로서 알킬화제, 예로서, 티오테파 및 사이톡산(CYTOXAN)® 사이클로스포스파미드; 알킬 살포네이트, 예로서, 부설판, 임프로설판 및 피포설판; 아지리딘, 예로서, 벤조도파, 카르보쿠온, 메투레도파 및 우레도파; 알트레타민, 트리에틸렌멜라민, 트리에틸렌포스포르아미드, 트리에틸렌티오포스포르아미드 및 트리메틸올로멜라민을 포함하는 에틸렌이민 및 메틸아멜라민; 아세토제닌 (특히, 불라타신 및 불라타시논); 멜타-9-테트라하이드로칸나비놀 (드로나비놀, 마리놀(MARINOL)®); 베타-라파콘; 라파콜; 콜키신; 베타린산; 캄토테신 (합성 유사체 토포테칸 (히캄틴(HYCAMTIN)®, CPT-11 (이리노테칸, 캄프토사(CAMPTOSAR)®), 아세틸캄토테신, 스코폴렉틴, 및 9-아미노캄토테신 포함); 브리오스타틴; 칼리스타틴; CC-1065 (그의 아도젤레신, 카르겔레신 및 비겔레신 합성 유사체 포함); 포도필로톡신; 포도필린산; 네티포시드; 크립토파이신 (특히, 크립토파이신 1 and 크립토파이신 8)]; 돌라스타틴; 듀오카르마이신 (합성 유사체, KW-2189 및 CB1-TM1 포함); 엘레우테로빈; 판크라티스트틴; 사코딕티인; 스폰기스타틴; 질소 머스타드, 예를 들면, 클로람부실, 클로르나파진, 콜로포스파미드, 에스트라무스틴, 이포스파미드, 메클로레타민, 메클로레타민 옥시드 하이드로클로라이드, 멜팔란, 노벰비신, 페네스테린, 프레드니무스틴, 트로포스파미드, 우라실 머스타드; 니트로스우레아, 예를 들면, 카르무스틴, 클로로조토신, 포테무스틴, 로무스틴, 니무스틴, 및 라니무스틴; 항생제, 예로서, 에네디이네 항생제 (예로서, 칼시케아미신, 특히, 칼시케아미신 감마II 및 칼시케아미신 오메가I1 (예로서, [Agnew, Chem Int'l. Ed. Engl., 33: 183-186(1994)] 참조); 디네미신 A를 포함하는 디네미신; 에스페라미신; 및 네오카르지노스타틴 발색단 및 관련 발색단백질 에네디이네 항생제 발색단), 아클라시노마이신, 악티노마이신, 아우트라마이신, 아자세린, 블레오마이신, 카크티노마이신, 카라비신, 카르미노마이신, 카르지노필린, 크로모마이신, 닉티노마이신, 다우노루비신, 테토루비신, 6-디아조-5-옥소-L-노르루이신, 독소루비신 (아드리아마이신(ADRIAMYCIN)®, 모르풀리노-독소루비신, 시아노모르풀리노-독소루비신, 2-피롤리노-독소루비신, 독소루비신 HCl 리포좀 인젝션 (독실(DOXIL)® 및 테옥시독소루비신 포함), 에피루비신, 에소루비신, 이다루비신, 마르셀로마이신, 미토마이신, 예로서, 미토마이신 C, 미코페놀산, 노갈라마이신, 올리보마이신, 페플로마이신, 포트페로마이신, 푸로마이신, 쿠엘라마이신, 로도루비신, 스트렙토니그린, 스트렙토조신, 투베르시딘, 우베니맥스, 지노스타틴, 조루비신; 항-대사물질, 예를 들면, 메토트렉세이트, 쟈시타빈 (젬자(GEMZAR)®), 테가푸르 (우프토랄(UFTORAL)®), 캡사이타빈 (젤로다(XELODA)®), 에포티론, 및 5-플루오로우라실 (5-FU); 엽산 유사체, 예를 들면, 데노프데린, 메토트렉세이트, 프테로프데린, 트리메트렉세이트; 퓨린 유사체, 예를 들면, 플루다라빈, 6-메르캅토푸린, 티아미프린, 티오구아닌; 피리미딘 유사체, 예를 들면, 안시타빈, 아자시티딘, 6-아자우리딘, 카르모푸르, 시타라빈, 디데옥시우리딘, 독시플루리딘, 에노시타빈, 플록스우리딘; 안드로겐, 예를 들면, 칼루스테론, 드로모스타놀론 프로페오네이트, 에피티오스타놀, 메피티오스탄, 테스톨릭톤; 항-아드레날, 예를 들면, 아미노글루테티미드, 미토坦, 트릴로스탄; 엽산 공급원, 예를 들면, 프롤린산; 아세글라톤; 알도포스파미드 글리코시드; 아미노레볼린산; 에닐우라실; 암사크린; 베스트라부실; 비산트렌; 에다트락세이트; 데포파민; 데메콜신; 디아지쿠온; 엘포르니틴; 엘리프티늄 아세테이트; 에포티론; 에토클루시드; 갈륨 니트레이트; 하이드록시우레아; 렌티난; 로니다민; 메이탄시노이드, 예로서, 메이탄신 및 암사미토신; 미토구아존; 미토크산트론; 모피다몰; 니트라크린; 웬토스타틴; 페나메트; 피라루비신; 로속산트론; 포도필린산; 2-에틸하이드라지드; 프로카르바진; PSK®; 폴리사카라이드 복합체 (오레곤주 유진에 소재하는 JHS 내

츄럴 프로덕트(JHS Natural Products)); 라족산; 라족신; 시조피란; 스피로게르마늄; 테누아존산; 트리아지쿠온; 2,2',2'''-트리클로로트리에틸아민; 트리코테센(특히, T-2 톡신, 베르라쿠린 A, 로리딘 A 및 안구이딘); 우레탄; 빈데신(엘디신(ELDISINE)®, 필데신(FILDESIN)®); 다카르바진; 만노무스틴; 미토브로니톨; 미토락톨; 피포브로만; 가시토신; 아라비노시드("Ara-C"); 티오텐파; 탁소이드, 예를 들면, 탁솔(TAXOL)®; 과클리탁셀(아브락산(ABRAXANE)™)의 일부민 공학처리된 나노입자 제제, 및 독세탁셀(탁소텔(TAXOTERE)®); 클로람부실; 6-티오구아닌; 머캅토푸린; 메토트렉세이트; 백금 유사체, 예를 들면, 시스플라틴 및 카르보플라틴; 빈블라스틴(벨반(VELBAN)®); 백금; 에토포시드(VP-16); 이포스파미드; 미톡산트론; 빈크리스틴(온코빈(ONCOVIN)®); 옥살리플라틴; 퓨코보빈; 비노렐빈(나벨빈(NAVELBINE)®); 노반트론; 에다트렉세이트; 다우노마이신; 아미노프테린; 이반드로네이트; 토포아이소머라제 저해제 RFS 2000; 디플루오로메틸오르니틴(DMFO); 레티노산; 상기 중 임의의 것의 약제학적으로 허용가능한 염, 산 또는 유도체; 상기의 것 중 2개 이상의 배합물, 예로서, CHOP(사이클로포스파마이드, 독소루비신, 빈크리스틴, 및 프레드니솔론의 배합 요법의 약어), 및 FOLFOX(5-FU 및 류코보빈과 배합된 옥살리플라틴(엘록사틴(ELOXATIN)™)을 사용하는 치료 요법에 대한 약어)를 포함한다.

[0117] 또한, 암의 성장을 촉진시킬 수 있는 호르몬의 효능을 조절하거나, 저하시키거나 차단하거나 저해하는 작용을 하고, 주로 전신성(systemic), 또는 전신(whole-body) 요법의 형태로 존재하는 항-호르몬제도 본 정의에 포함된다. 이는 호르몬 그 자체일 수 있다. 예로서, 항-에스트로겐 및 선택적 에스트로겐 수용체 조절제(SERMs), 예를 들면, 타목시펜(놀바덱스(NOLVADEX)®, 타목시펜 포함), 랄록시펜(에비스타(EVISTA)®, 드롤록시펜, 4-하이드록시타목시펜, 트리옥시펜, 케옥시펜, LY1 17018, 오나프리스톤, 및 토레미펜(파레스톤(FARESTON)®); 항-프로게스테론; 에스트로겐 수용체 하향-조절제(ERDs); 난소를 억제시키거나 차단하는 작용을 하는 제제, 예를 들면, 황체 형성 호르몬-방출 호르몬(LHRH) 작용제, 예로서, 류프로리드 아세테이트(루프론(LUPRON)® 및 엘리가드(ELIGARD)®), 고세레린 아세테이트, 부세레린 아세테이트 및 트립테레린; 다른 항-안드로겐, 예로서, 플루타미드, 닐루타미드 및 비칼루타미드; 및 부신에서 에스트로겐 생산을 조절하는, 효소 아로마타제를 저해하는 아로마타제 저해제, 예로서, 4(5)-이미다졸, 아미노글루테티미드, 메계스트롤 아세테이트(메가세(MEGASE)®), 엑스메스탄(아로마신(AROMASIN)®), 포르메스타니에, 파드로졸, 보로졸(리비소르(RIVISOR)®), 레트로졸(페마라(FEMARA)®), 및 아나스트로졸(아리미덱스(ARIMIDEX)®)를 포함한다. 추가로, 화학요법제의 정의에는 비스포스포네이트, 예로서, 클로드로네이트(예를 들면, 보네포스(BONEFOS)® 또는 오스탁(OSTAC)®), 에티드로네이트(디드로칼(DIDROCAL)®), NE-58095, 졸레드론산/졸레드로네이트(조메타(ZOMETA)®), 알렌드로네이트(포사막스(FOSAMAX)®), 파미드로네이트(아레디아(AREDIA)®), 틸루드로네이트(스키리드(SKELID)®), 또는 리세드로네이트(액토넬(ACTONEL)®); 뿐만 아니라, 트록사시타빈(1,3-디옥솔란 뉴클레오시드 시토신 유사체); 안티센스 올리고뉴클레오티드, 특히, 비정상적인 세포 증식에 연루된 신호화 경로에서 유전자 발현을 저해하는 것, 예를 들면, PKC-알파, Raf, H-Ras, 및 상피 성장 인자 수용체(EGF-R); 백신, 예로서, 테라토프(THERATOPE) 백신 및 유전자 요법 백신, 예를 들면, 알로벡틴(ALLOVECTIN) 백신, 류벡틴(LEUVECTIN) 백신, 및 박시드(VAXID) 백신; 토포이소머라제 1 저해제(예로서, 루르토텍칸(LURTOTECAN)®); rmRH(예로서, 아바릴릭스(ABARELIX)®); 라파티닙 디토실레이트(GW572016으로도 공지되어 있는 ErbB-2 및 EGFR 이중 티로신 키나제 저분자 저해제); COX-2 저해제, 예로서, 셀레콕시브(세레브렉스(CELEBREX)®); [4-(5-(4-메틸페닐)-3-(트리플루오로메틸)-1H-피라졸-1-일) 벤젠설플론아미드; 및 상기 중 임의의 것의 약제학적으로 허용가능한 염, 산 또는 유도체가 포함된다.

[0118] 용어 "사이토카인"은 하나의 세포 군집에 의해 방출되는, 세포간 매개체로서 또다른 세포에 작용하는 단백질에 대한 일반명이다. 이러한 사이토카인의, 예로서 림포카인, 모노카인, 및 종래의 폴리펩티드 호르몬이다. 사이토카인 중 예를 들면, 성장 호르몬, 예로서, 인간 성장 호르몬, N-메티오닐 인간 성장 호르몬, 및 소 성장 호르몬; 부갑상샘 호르몬; 티록신; 인슐린; 프로인슐린; 릴액신; 프로릴액신; 당단백질 호르몬, 예로서, 여포 자극 호르몬(FSH), 갑상샘 자극 호르몬(TSH), 및 황체 형성 호르몬(LH); 간 성장 인자; 섬유모세포 성장 인자; 프로락틴; 태반 락토겐; 종양 피사 인자-알파 및 -베타; 물러관-저해 물질; 마우스 생식샘자극호르몬-관련펩티드; 인히빈; 액티빈; 혈관 내피 성장 인자(예로서, VEGF, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E); 태반 유래성 성장 인자(PDGF); 혈소판 유래 성장 인자(PDGF, 예로서, PDGFA, PDGFB, PDGFC, PDGFD)]; 인테그린; 트롬보포이에틴(TPO); 신경 성장 인자, 예로서, NGF-알파; 혈소판-성장 인자; 형질전환 성장 인자(TGFs) 예로서, TGF-알파 및 TGF-베타; 인슐린-유사 성장 인자-I 및 -II; 에리트로포이에틴(EPO); 골유도 인자; 인터페론, 예로서, 인터페론-알파, -베타 및 -감마, 결장 자극 인자(CSFs), 예로서, 대식구-CSF(M-CSF); 과립구-대식구-CSF(GM-CSF); 및 과립구-CSF(G-CSF); 인터루킨(ILs), 예로서, IL-I, IL-1알파, IL-1베타, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IL-19, IL-20-

IL-30; 세크레토글로빈/우테로글로빈; 온코스타틴 M (OSM); 종양 괴사 인자, 예로서, TNF-알파 또는 TNF-베타; 및 LIF 및 키트 리간드 (KL)를 포함하는 다른 폴리펩티드 인자를 포함한다. 본원에서 사용되는 바, 용어 사이토카인은 천연 공급원 또는 재조합 세포 배양물로부터의 단백질 및 천연 서열 사이토카인의 생물학적 활성 등가물을 포함한다.

[0119] 본 출원에서 사용된 용어 "프로드럭"은 모 약물에 비해 종양 세포에 대한 세포 독성이 작고 효소적으로 활성화되거나 보다 활성인 모 형태로 전환될 수 있는 약제학적으로 활성인 물질의 전구체 또는 유도체 형태를 언급한다 (예로서, [Wilman, "Prodrugs in Cancer Chemotherapy", *Biochemical Society Transactions*, 14:375-382, 615th Meeting, Belfast(1986)] 및 [Stella et al., "Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery", *Directed Drug Delivery*, Borchardt et al., (ed.), pp. 247-276, Humana Press (1985)] 참조). 본 발명의 프로드럭으로는 제한하는 것은 아니지만, 보다 활성인 세포 무독성 약물로 전환될 수 있는 포스페이트-함유 프로드럭, 티오포스페이트-함유 프로드럭, 설페이트-함유 프로드럭, 켈티드-함유 프로드럭, D-아미노산-변형 프로드럭, 글리코실화된 프로드럭, 베타-락탐-함유 프로드럭, 임의로 치환된 페녹시아세트아미드-함유 프로드럭 또는 임의로 치환된 페닐아세트아미드-함유 프로드럭, 5-플루오로시토신 및 다른 5-플루오로우리딘 프로드럭을 포함한다. 본 발명에서 사용하기 위한 프로드럭 형태로 유도체화될 수 있는 세포 독성 약물의, 예로는 제한하는 것은 아니지만, 상기 기술된 화학 요법제를 포함한다.

[0120] "혈관신생 인자 또는 제제"는 혈관 발생을 자극하는, 예로서, 혈관신생, 내피 세포 성장, 혈관의 안정성, 및/또는 혈관형성 등을 증진시키는 성장 인자이다. 예를 들면, 혈관신생 인자는 제한하는 것은 아니지만, 예로서, VEGF 및 VEGF 계열 구성원, PDGF, PDGF 계열, 섬유모세포 성장 인자 계열 (FGFs), TIE 리간드 (안지오포이에틴), 에프린, ANGPTL3, ANGPTL4 등을 포함한다. 또한, 상처 치유를 가속화시키는 인자, 예로서, 성장 호르몬, 인슐린-유사 성장 인자-I (IGF-I), VIGF, 상피 성장 인자 (EGF), CTGF 및 그의 계열의 구성원, 및 TGF- α 및 TGF- β 를 포함한다 (예로서, [Klagsbrun and D'Amore, *Ann. Rev. Physiol.*, 53:217-39 (1991)]; [Streit and Detmar, *Oncogene*, 22:3172-3179 (2003)]; [Ferrara & Alitalo, *Nature Medicine* 5(12):1359-1364 (1999)]; [Tonini et al., *Oncogene*, 22:6549-6556 (2003) (예로서, 혈관신생 인자가 열거된 표 1)]; 및 [Sato Int. J. Clin. Oncol., 8:200-206 (2003)] 참조).

[0121] "항-혈관신생제" 또는 "혈관신생 저해제"는 혈관신생, 혈관형성, 또는 원치않는 혈관 투과성을 직접 또는 간접적으로 저해하는 소분자 물질, 폴리뉴클레오티드, 폴리펩티드, 단리된 단백질, 재조합 단백질, 항체, 또는 그의 커뮤게이트 또는 융합 단백질을 언급한다. 예를 들면, 항-혈관신생제는 상기 정의된 바와 같은 혈관신생제에 대한 항체 또는 다른 길항체, 예로서, VEGF에 대한 항체, VEGF 수용체에 대한 항체, VEGF 수용체 신호화를 차단하는 소분자 (예로서, PTK787/ZK2284, SU6668)를 포함한다. 항-혈관신생제는 또한 천연 혈관신생 저해제, 예로서, 안지오스타틴, 엔도스타틴 등을 포함한다 (참조, 예로서, [Klagsbrun and D'Amore, *Ann. Rev. Physiol.*, 53:217-39 (1991)]; [Streit and Detmar, *Oncogene*, 22:3172-3179 (2003) (예로서, 악성 흑색종의 항-혈관신생 요법에 대하여 열거된 표 3)]; [Ferrara & Alitalo, *Nature Medicine* 5(12):1359-1364 (1999)]; [Tonini et al., *Oncogene*, 22:6549-6556 (2003) (예로서, 항혈관신생 인자가 열거된 표 2)]; 및 [Sato Int. J. Clin. Oncol., 8:200-206 (2003) (예로서, 임상 실험에 사용된 항혈관신생 인자가 열거된 표 1)] 참조).

[0122] 본원에서 사용되는 바, 단어 "표지"는 폴리펩티드에 직접 또는 간접적으로 커뮤게이션되는 검출가능한 화합물 또는 조성물을 언급한다. 표지는 그 자체로서 검출가능하거나 (예로서, 방사성동위원소 표지 또는 형광 표지), 효소적 표지의 경우에는, 검출가능한 기질 화합물 또는 조성물의 화학적 변화를 촉매화시킬 수 있다.

[0123] "단리된" 핵산 분자는 대개 폴리펩티드 핵산의 천연 공급원 중 적어도 하나의 오염원 핵산 분자와 결합하고 그로부터 동정되고 그로부터 분리된 핵산 분자이다. 단리된 핵산 분자는 자연에서 발견되는 형태 또는 세팅의 것 이외의 것이다. 따라서, 단리된 핵산 분자는 자연발생적 세포에 존재하는 핵산 분자와는 구별된다. 그러나, 단리된 핵산 분자는 대개 예를 들면, 핵산 분자가 자연발생적 세포의 것과 상이한 염색체 위치에 존재하는 폴리펩티드를 발현시키는 세포내 포함된 핵산 분자를 포함한다.

[0124] 표현 "조절 서열"은 특정 숙주 유기체에서 작동가능하게 연결된 코딩 서열의 발현을 위해 필요한 DNA 서열을 언급한다. 원핵생물에 적절한 조절 서열은 예를 들면, 프로모터, 임의로 작동 서열, 및 리보좀 결합 부위를 포함한다. 진핵 세포는 프로모터, 폴리아데닐화 시그널, 및 인핸서를 사용하는 것으로 공지되어 있다.

[0125] 핵산은 또다른 핵산 서열과 작용상 관계를 위해 배치될 때 "작동가능하게 연결된다." 예를 들면, 전서열 (presequence) 또는 분비 리더에 대한 DNA는 폴리펩티드의 분비에 관여하는 전단백질(preprotein)로서 발현되는 경우에는 폴리펩티드에 대한 DNA에 작동가능하게 연결되고; 프로모터 또는 인핸서는 서열의 전사에 작용하는 경

우에는 코딩 서열에 작동가능하게 연결되고; 리보좀 결합 부위는 해독을 촉진시키기 위하여 배치될 경우에는 코딩 서열에 작동가능하게 연결된다. 일반적으로, "작동가능하게 연결"은 연결되는 DNA 서열은 인접하고, 분비리더의 경우에는 인접하고 판독상(reading phase)에 존재하는 것을 의미한다. 그러나, 인핸서는 인접할 필요는 없다. 연결은 용이한 제한 부위에서의 결찰에 의해 수행된다. 상기 부위가 존재하지 않을 경우, 합성 올리고뉴클레오티드 또는 링커가 종래 실행법에 따라 사용된다.

- [0126] 본원에서 사용되는 바, 표현 "세포," "세포주," 및 "세포 배양물"은 상호교환적으로 사용되고, 모든 명칭은 그 자손을 포함한다. 따라서, 단어 "형질전환체" 및 "형질전환된 세포"는 1차 대상자 세포 및 전이 횟수와 상관없이 그로부터 유래된 배양물을 포함한다. 또한, 의도하거나 의도하지 않은 돌연변이화에 기인하여 모든 자손의 DNA 함량은 정확하게 일치할 수 없음을 이해해야 한다. 본래대로 형질전환된 세포에서 선별된 것과 동일한 작용 또는 생물학적 활성을 갖는 돌연변이체 자손이 포함된다. 상이한 명칭을 의도할 경우, 문맥상 명확히 할 것이다.

[0127] ANGPTL4

- [0128] 안지오포이에틴-유사 4 단백질 (ANGPTL4)은 분비된 단백질이고 안지오포이에틴 계열의 구성원이다. 또한, 간섬유소원/안지오포이에틴-관련 단백질 (HFARP) [Kim et al., *Biochem. J.* 346:603-610 (2000)], PGAR (PPAR γ 안지오포이에틴 관련 단백질) [Yoon, et al., *Mol. Cell Biol.*, 20:5343-5349 (2000)], 공복 유도성 지방 인자 (FIAF) [Kerten et al., *J. Biol. Chem.*, 275:28488-28493 (2000)]; 안지오포이에틴-관련 단백질 (ARP-4); NL2 (미국 특허번호 제 6,348,350호; 제 6,372,491호; 및 제 6,455,496호 참조); 및 Ang6으로서 공지되어 있다.

- [0129] 인간으로부터의 ANGPTL4 단백질은 406 아미노산 단백질인 반면 (예로서, 미국 특허 제 6,348,350호, 제 6,372,491호 & 제 6,455,496호), 마우스 ANGPTL4는 410 아미노산 단백질이다 [Kim et al., *Biochem. J.* 346:603-610(2000)]. 마우스 및 인간은 아미노산 수준에 있어 약 75%의 일치도를 공유한다 [Kim et al., *Biochem. J.* 346:603-610(2000)]. ANGPTL4는 시그널 웨티드, 3개의 효능있는 N-당화 부위, 및 분자내 디설파이드 결합에 관여할 수 있는 4개의 시스테인을 갖는다. 예를 들면, ANGPTL4는 예로서, **도 3, 패널 A**에 도시한 바와 같은 고차 분자 구조를 형성한다 (예로서, [Ge et al., *J. Biol. Chem.*, 279(3):2038-2045 (2004)]; [Ge et al., *J. Lipid Res.* 45:2071-2079 (2004)]; 및 [Mandard et al., *J. of Biol. Chem.*, 279(33):34411-34420 (2004)] 참조). ANGPTL4는 또한 단백분해적으로 프로세싱될 수 있다 (예로서, [Ge et al., *J. Biol. Chem.*, 279(3):2038-2045 (2004)]; 및 [Mandard et al., *J. of Biol. Chem.*, 279(33):34411-34420 (2004)] 참조). 본원에 기술하고 있는 바와 같이, ANGPTL4의 R162G 및 R164E의 치환은 SDS-Ge1상에서 야생형 (또는 천연) 단백질보다 더욱 고분자로 진행하는 변이체 ANGPTL4를 초래한다 (**도 3, 패널 B** 참조).

- [0130] 안지오포이에틴 계열의 보존 부위는 꼬인-코일 영역 및 C-말단 섬유소원 (FBN)-유사 영역을 포함한다 (예로서, [Kim et al., *Biochem. J.* 346:603-610 (2000)] 참조). ANGPTL4는 조절 방식으로 단백분해적으로 프로세싱되어 C-말단 섬유소원-유사 영역을 유리시킨다고 제안되었다 (예로서, [Ge et al., *J. Biol. Chem.*, 279(3):2038-2045 (2004)] 참조). 안지오포이에틴 계열의 다른 구성원은 안지오포이에틴 1, 안지오포이에틴 2 및 안지오포이에틴 3/안지오포이에틴 4를 포함하고, 이는 Tie2 수용체에 결합한다 (예로서, [Davis et al., *Cell* 87, 1161-1169 (1996)]; [Maisonnier et al., *Science* 277, 55-60 (1997)]; [Valenzuela et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 1904-1909 (1999)]; 및 미국 특허번호 제 5,521,073호; 제 5,650,490호; 및 제 5,814,464호 참조). 안지오포이에틴 1 및 4는 Tie2 수용체에 대한 작용제인 반면, 안지오포이에틴 2 및 3은 Tie2 수용체에 대한 길항제 (및 가능하게는, 작용제)인 것으로 보인다 (예로서, [Folkman & D'Amore, *Cell*, 87:1153-1155 (1996)]; [Suri et al., *Cell*, 87:1171-1180 (1996)]; [Maisonnier et al., *Science* 277:55-60 (1997)]; 및 [Ward & Dumont, *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 13:19-27 (2002)] 참조).

- [0131] 상기 계열의 또 다른 구성원인 안지오포이에틴-유사 3 단백질 (ANGPTL3)은 인테그린 $\alpha_v\beta_3$ 에 결합하는 혈관신생 인자이다 (예로서, 2003년 11월 20일 공개된 미국 특허출원 제 20030215451호, 및 [Camenisch et al., *J. Biol. Chem.*, 277(19):17281-17290 (2002)] 참조). ANGPTL3은 수용체 Tie2에 결합하지 않는 것으로 나타났다 [Camenisch et al., *Journal of Biol. Chem.* 277(19):17281-17290 (2002)]. ANGPTL3은 또한 혈장 지질 수준 조절제이다 (예로서, [Koishi et al., *Nat. Genetics* 30:151-157 (2002)] 참조).

- [0132] ANGPTL4는 인테그린 $\alpha_v\beta_5$ 에 결합한다 (예로서, **도 11, 12 및 13**을 참조한다). 인테그린 $\alpha_v\beta_5$ 는 비트로넥틴을 포함하는 세포외기질 단백질, 및 DeI-1에 대한 수용체이다 (예로서, [Stupack and Cheresh, *Journal of Cell Science* 115:3729-3738 (2002)] 참조). 알파 v-인테그린은 종양 진행 및 전이와 관련되어 있다 (예로서,

[Marshall, J F and Hart, I R *Semin. Cancer Biol.* 7(3): 129-38 (1996)] 참조). 또한, 혈관신생시 알파 v-인 테그린의 역할도 제시되어 있다 (예로서, [Eliceiri, B P and Cheresh, D A *Molecular Medicine* 4: 741-750 (1998)] 참조). 예를 들면, $\alpha_v\beta_5$ 에 대한 모노클로날 항체는 래빗 각막 및 닭의 융모막 요막 모델에서 VEGF-유도성 혈관신생을 저해하는 것으로 나타났다 (예로서, [M. C. Friedlander, et al., *Science* 270:1500-1502 (1995)] 참조). $\alpha_v\beta_3$ 및 $\alpha_v\beta_5$ 의 길항체는 또한 성장-인자 및 종양-유도성 혈관신생을 저해하는 것으로 나타났다 (예로서, [Eliceiri and Cheresh, *Current Opinion in Cell Biology*, 13:563-568 (2001)] 참조).

[0133] 본 발명은 안지오파이에틴-유사 4 단백질 (ANGPTL4)의 조절제, 예로서, 작용제 또는 길항제의 조성물 및 상기 조절제와 다른 치료제의 배합물을 제공한다. 예를 들면, ANGPTL4의 길항제와 항암제의 배합물 및 종양 성장 또는 암 세포의 성장을 차단하거나 저하시키는데 있어 그의 사용 방법을 제공한다. 본 발명은 또한 ANGPTL4의 길항제 및/또는 다른 항암제를 사용하여 재발성 종양 성장 또는 재발성 암 세포 성장을 차단하거나 저하시키는 방법을 제공한다. ANGPTL4의 길항제의 조성물 및 항-혈관신생제의 배합물 및 종양성 또는 비-종양성 질병의 신생 혈관증식을 차단하거나 저하시키는데 있어 그의 사용 방법 또한 제공한다.

[0134] ANGPTL4 조절제 및 그의 용도

[0135] ANGPTL4의 조절제는 ANGPTL4의 활성을 조절하는 분자, 예로서, 작용제 및 길항제이다. 용어 "작용제"는 ANGPTL4의 펩티드 및 비-펩티드 유사체를 언급하기 위해, 및 특이적으로 ANGPTL4 분자에 결합하는 항체를 언급하기 위해 사용되되, 단, 상기는 천연 ANGPTL4 수용체 (예로서, $\alpha_v\beta_5$)를 통해 신호를 전달하는 능력을 갖는다. 용어 "작용제"는 ANGPTL4 수용체 (예로서, $\alpha_v\beta_5$)의 생물학적 작용과 관련하여 정의된다. 특정 실시 태양에서, 작용제는 상기에서 정의된 바와 같은 천연 ANGPTL4의 생물학적 활성, 예로서, 세포의 증식, 유주, 및 /또는 부착 증진 및/또는 지질 항상성의 조절을 갖는다.

[0136] 용어 "길항제"는 ANGPTL4 또는 그의 수용체, 예로서, $\alpha_v\beta_5$ 와 결합하는 능력을 갖는지와는 상관없이, ANGPTL4의 생물학적 활성을 저해할 수 있는 능력을 갖는 분자를 언급하기 위하여 사용된다. 따라서, ANGPTL4 또는 그의 수용체와 결합하는 능력을 갖는 길항제로서 항-ANGPTL4 및 항- $\alpha_v\beta_5$ 항체를 포함한다. 길항제 ANGPTL4는 예로서, ANGPTL4의 활성, 예로서, ANGPTL4의 부착, 유주, 증식, 및/또는 지질 항상성 활성의 조절에 의해 평가될 수 있다. $\alpha_v\beta_5$ 인테그린 수용체 활성과 관련하여, $\alpha_v\beta_5$ 인테그린 수용체 조절제는 본 분야에 공지된 방법에 의해 측정될 수 있다. 예를 들면, [J. W. Smith et al. in *J. Biol. Chem.* 265:12267-12271 (1990)]에 기술된 방법을 사용할 수 있다.

[0137] 치료학적 용도

[0138] ANGPTL4는 암 표적물로서 관련성을 갖는다. 몇몇 종양 세포에서 발현될 때 ANGPTL4는 시험관내 및 생체내에서 종양 세포 증식을 유발한다 (예로서, 도 4, 도 5, 도 7 및 도 8, 패널 A, 및 패널 B를 참조한다). ANGPTL4가 항-혈관신생 인자, 예로서, 항-VEGF 항체를 사용하여 치료되는 종양에서 발현되는 경우, 종양은 성장하는 능력을 유지할 수 있다 (예로서, 도 8, 패널 C를 참조한다). ANGPTL4는 또한 종양 세포 유주를 유발한다 (예로서, 도 9를 참조한다). 콩팥암에서는 상향조절되는 것으로 나타났다 (예로서, 변리사 서류 번호 P5032R1; WO 02/07941] 및 [Le Jan et al., *American Journal of Pathology*, 162(5):1521-1528 (2003)] 참조). 추가로, ANGPTL4는 혈관신생 인자 전구체(proangiogenic factor)로서 (예로서, [S. Le Jan et al., *Am. J. Pathol.*, 162(5):1521-1528 (2003) 참조), 암 요법의 표적이 된다. VEGF과 같이 [Shweiki et al., *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 92:768-772 (1995)] 참조) ANGPTL4 발현은 저산소증 반응으로 증가한다 (예로서, [Le Jan et al., *American Journal of Pathology*, 162(5): 1521-1528 (2003)] 참조).

[0139] ANGPTL4는 다양한 조건하에서 종양 세포, 예로서, A673 세포에 결합한다 (예로서, 도 6, 패널 A 및 B). 예로서, 도 4, 패널 A 및 패널 B에 나타낸 바와 같이, ANGPTL4를 발현시키는 발현 작제물로 세포가 형질도입되었을 경우, ANGPTL4는 시험관내에서 몇몇 종양 세포 성장을 자극시킨다. 도 4, 패널 C는 또한 ANGPTL4로 형질도입된 COS7 세포로부터의 조건 배지를 첨가하는 것이 A673 세포의 증식을 유도한다는 것을 도시화하고 있다. 도 7, 패널 A 및 B를 참조한다. ANGPTL4가 배양 접시상에 피복되었을 경우, ANGPTL4는 A673 증식의 세포 증식을 유도하지만, 신장 상피 세포, 콩팥 혈관간 세포 또는 HUVEC의 세포 증식은 유도하지 않는다. ANGPTL4는 또한 종양 세포의 세포 유주를 유도한다. 예로서, 도 9를 참조한다.

[0140] ANGPTL4는 주로 지방 조직, 태반, 간 및 신장에서 발현되고 ob/ob (렙틴 넉아웃(knockout)) 및 db/db (렙틴 수용체 넉아웃) 마우스에서 상향조절된다 (예로서, [Yoon et al., *Mol. Cell. Biol.* 20:5343-5349 (2000)]; [Kim

et al., *Biochem. J.*, 346:603-610 (2000)]; [Kersten et al., *J. Biol. Chem.*, 275:28488-28493 (2000)]; 및 [Le Jan et al., *American Journal of Pathology* 162(5):1521-1528 (2003)] 참조). ANGPTL4는 또한 지질 조절제 및 지질단백질 리파제의 저해제인 것으로 보고되었다 (예로서, [Yu et al., *PNAS USA* 102(5):1767-1772 (2005)]; [Yoshida et al., *J. Lipid Res.* 43:1770-1772 (2002)]; 및 [Wiesner et al., *J. Endocrinology* 180:R1-R6 (2004)] 참조). ANGPTL4 발현은 또한 지방 조직에서 PPAR 감마 및 알파에 의해 유도되고, 굽주림에 의해 유도된다. 또한 전-지방세포(pre-adipocyte) 및 간세포 증식, 및/또는 혈청내 트리글리세리드 및 콜레스테롤 수준 조절에 따른 전-지방세포 세포 유주를 조절한다 (미국 특허출원 제 60/589,875호, 및 동시 출원된 변리사 서류 P2156R1 (모든 목적을 위해 인용됨) 참조). 연구원들은 혈관신생과 지방형성과의 관계를 보고하였다 (예로서, [Sierra-Honigmann et al., "Biological Action of Leptin as an angiogenic factor" *Science* 281 : 1683-1686; (1998)]; [Rupnick et al., "Adipose Tissue mass can be regulated through the vasculature" *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 99(16): 10730-10735 (2002)]; 및 [Fukumura et al., "Paracrine Regulation of angiogenesis and Adipocyte differentiation During In vivo Adipogenesis." *Circ. Res.* 93:e88-e97 (2003)] 참조).

[0141] 본 발명에 따라 ANGPTL4 조절제 및/또는 ANGPTL4 조절제 및 다른 치료제의 배합물을 사용하여 다양한 종양 또는 비종양성 상태를 치료할 수 있다고 사료된다. 실시태양에서, ANGPTL4 조절제, 예로서, ANGPTL4의 길항제를 사용하여 암 세포 또는 종양 성장을 저해한다. 예를 들면, 도 10, 패널 A 및 B에 나타낸 바와 같이, 항-ANGPTL4 폴리클로날 항체는 용량에 의존하는 방식으로 종양 세포 성장을 저해하였다. ANGPTL4는 종양 세포의 유주를 유발할 수 있다 (예로서, 도 9를 참조한다). 본 발명에 따라 ANGPTL4 길항제는 또한 종양의 전자를 저해하기 위하여 사용될 수 있다고 사료된다. ANGPTL4는 또한 전-지방세포의 유조를 유도한다 (미국 특허출원 제 60/589,875호, 및 동시 출원된 변리사 서류 P2156R1 (모든 목적을 위해 인용됨) 참조). 특정 실시태양에서, 하나 이상의 항암제는 암 세포 또는 종양 성장을 저해하기 위하여 ANGPTL4 길항제와 함께 투여될 수 있다. 본원의 명칭, 병용 요법 단락을 참조한다.

[0142] 치료하고자 하는 종양성 질병의 예로서, 제한하는 것은 아니지만, 용어 "암" 및 "암성" 하에 본원에서 기술된 것을 포함한다. 본 발명의 길항제를 사용하는 요법에 대하여 검사를 받을 수 있는 비-종양성 상태로서 제한하는 것은 아니지만, 예로서, 원치않거나 비정상적인 비대, 관절염, 류마티스 관절염 (RA), 건성, 건선 플라크, 사르코이드증, 죽상동맥경화증, 죽상경화판, 심근경색증으로부터의 부종, 당뇨 및 미숙아 망막병증을 포함하는 다른 증식성 망막병증, 수정체 후부 섬유 증식증, 신생혈관증식 녹내장, 연령-관련 황반 변성, 당뇨성 황반 부종, 각막 신생혈관증식, 각막 이식 신생혈관증식, 각막 이식 거절, 망막/맥락막 신생혈관증식, 각(angle)의 신생혈관증식 (피부홍조), 눈 신생혈관증식 질환, 혈관 재협착, 동정맥 기형 (AVM), 수막종, 혈관종, 혈관섬유종, 갑상선 과다형성 (그레이브스병 포함), 각막 및 다른 조직 이식, 만성 염증, 폐 염증, 급성 폐 손상/ARDS, 폐혈증, 원발성 폐 고혈압증, 악성 폐 삼출, 대뇌 부종 (예로서, 급성 뇌졸증/폐쇄성 두부 손상/외상과 관련), 윤활막 염증, RA에서 판누스 형성, 골화 근육염, 과다 골 형성, 골관절염 (OA), 무반응성 복수, 다낭성 난소병, 자궁내막증, 3차의 간견을 두고 있는 체액성 질환 (이자염, 구획 증후군, 화상, 장 질환), 자궁 섬유증, 조숙 산통, 만성 염증, 예로서, IBD (크론병 및 케양성 대장염), 콩팥 동종이식 거절, 염증성 장 질환, 신증후군, 원치않거나 비정상적인 조직 덩어리 성장 (비-암), 비만, 지방 조직 덩어리 성장, 혈우병성 관절병증, 비대 흉터, 모발 성장 저해, 오시에라-웨버(Osier-Weber) 증후군, 화농성 육아종 수정체 후부 섬유 증식증, 공피증, 트라코마, 혈관 부착, 윤활막염, 피부염, 전자간증, 복수, 심낭 삼출 (예로서, 심장막염과 관련된 것), 및 흉막 삼출을 포함한다.

[0143] ANGPTL4의 조절제, 예로서, ANGPTL4의 작용제 또는 활성화제는 병적 질병의 요법을 위해 사용될 수 있다. ANGPTL4의 조절제, 예로서, ANGPTL4의 작용제는 혈관신생 또는 신생혈관증식 및/또는 비대이 바람직한 병적 질병으로서, 제한하는 것은 아니지만, 예로서, 혈관 외상, 상처, 열창, 절개, 화상, 궤양 (예로서, 당뇨성 궤양, 압력 궤양, 혈우병성 궤양, 정맥류성 궤양), 조직 성장, 체중 증가, 말초 동맥 질환, 분만 유도, 모발 성장, 수포성 표피박리증, 망막 위축, 골절, 뼈 척추골 융합, 반달연골 열상(meniscal tears) 등 (미국 특허출원 제 60/589,875호, 및 동시 출원된 변리사 서류 P2156R1 (모든 목적을 위해 인용됨) 참조)의 요법을 위해 사용될 수 있다.

[0144] 병용 요법

[0145] 상기 언급한 바와 같이, 본 발명은 ANGPTL4 길항제가 또다른 요법으로 투여되는 병용 요법을 제공한다. 예를 들면, ANGPTL4 길항제는 다양한 종양성 또는 비-종양성 상태를 치료하기 위하여 항암 치료제 또는 항-신생혈관증식 치료제와 배합되어 사용된다. 종양성 또는 비-종양성 상태는 비정상이거나 원치않은 혈관신생과 관련된

병적 질병을 특징으로 한다. ANGPTL4 길항제는 동일 조성물 또는 분리된 조성물로 상기 목적을 위해 유효한 또 다른 약제와 연속적으로 또는 배합하여 투여될 수 있다. 다르게는, 또는 추가로, 다중 ANGPTL4의 저해제는 투여될 수 있다.

[0146] 본 발명의 길항제 및/또는 약제의 투여는 예를 들면, 동일하거나 상이한 투여 경로를 사용하여 단일 조성물 또는 2개 이상의 분리의 조성물로서 동시에 수행될 수 있다. 다르게는, 또는 추가로, 투여는 임의의 순서로 순차적으로 수행될 수 있다. 특정 실시태양에서, 2개 이상의 조성물 사이에는 수분(minutes) 내지 수일(days), 수주(weeks) 내지 수개월(months) 범위의 간격이 존재할 수 있다. 예를 들면, 항암제를 먼저 투여하고, ANGPTL4 저해제를 투여할 수 있다. 그러나, 동시 투여 또는 ANGPTL4 저해제를 먼저 투여하는 것도 사료된다.

[0147] ANGPTL4 길항제와 배합하여 투여되는 치료제의 유효량은 의사 또는 수의사의 재량에 있다. 치료하고자 하는 상태를 최대로 관리하기 위해서 용량 투여 및 조절을 수행한다. 용량은 추가로 사용하고자 하는 치료제의 타입 및 치료하고자 하는 특정 환자와 같은 인자에 따라 달라질 것이다. 항암제를 위한 적절한 용량은 현재 사용되고 있는 것이고 항암제 및 ANGPTL4 길항제의 병용 효과 (상승 작용)에 기인하여 감소될 수 있다. 특정 실시태양에서, 저해제 배합물은 단일 저해제의 효능을 증가시킨다. 용어 "증가시킨다는 것"은 통상의 또는 허가받은 용량의 치료제의 효능을 향상시킨다는 것을 언급한다. 본원의 명칭 **약제학적 조성물 단락**을 참조한다.

[0148] 전형적으로, ANGPTL4 길항제 및 항암제는 병적 질병, 예로서, 종양 성장 또는 암 세포의 성장을 차단하거나 저하시키기 위해서 동일하거나 유사한 질환에 적절하다.

[0149] 암과 관련된 항혈관신생 요법은 종양 성장을 유지시키기 위하여 영양분의 제공을 요구하는 종양 혈관의 발생을 저해하는 것을 목적으로 하는 암 요법 전략법이다. 혈관신생은 원발성 종양 성장 및 전이 모두에 관여하기 때문에, 본 발명에 의해 제공되는 항혈관신생 요법은 원발성 부위에서 종양의 종양성 성장을 저해할 수 있고 속발성 부위에서 종양의 전이를 방해함으로써 다른 치료제에 의한 종양 공격을 허용할 수 있다.

[0150] 본원에 열거된, 예로서, 정의부에 열거되어 있는 것을 포함하는 다수의 항-혈관신생제가 확인되었고 예로서, ([Carmeliet and Jain, *Nature* 407:249-257 (2000)]; [Ferrara et al., *Nature Reviews:Drug Discovery*, 3:391-400 (2004)]; 및 [Sato Int. J. Clin. Oncol, 8:200-206 (2003)] 참조)에 의해 본 분야에 공지되어 있다. 미국 특허출원 US20030055006를 참조한다. 실시태양에서, ANGPTL4 길항제는 항-VEGF 중화 항체 (또는 단편) 및/또는 제한하는 것은 아니지만, 예를 들면, 가용성 VEGF 수용체 (예로서, VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, 뉴로필린 (예로서, NRP1, NRP2)) 단편, VEGF 또는 VEGFR을 차단할 수 있는 앱타머, 중화 항-VEGFR 항체, VEGFR 티로신 키나제의 저분자 저해제 (RTK), VEGF에 대한 안티센스 전략, VEGF 또는 VEGF 수용체에 대한 리보자임, VEGF의 길항제 변이체; 및 그의 임의의 배합물을 포함하는 또다른 VEGF 길항제 또는 VEGF 수용체 길항제와 배합하여 사용된다. 다르게는, 또는 추가로, 2개 이상 혈관신생 저해제는 환자에 함께 투여될 수 있다. 특정 실시태양에서, 하나 이상의 추가의 치료제, 예로서, 항암제는 ANGPTL4 길항제 및 항-혈관신생제와 배합되어 투여될 수 있다.

[0151] 본 발명의 특정 일면으로, 본 발명의 길항제와 함께 병용 종양 요법에 사용하기에 유용한 다른 치료제는 다른 암 요법, (예로서, 수술, 방사선 요법 (예로서, 방사선조사 또는 방사능 물질 투여 포함), 화학요법, 본원에 열거되고 본 분야에 공지되어 있는 항암제를 사용하는 요법, 또는 그의 조합)을 포함한다. 다르게는, 또는 추가로, 본원에 기술된 동일하거나 2개 이상의 상이한 항원과 결합하는 2개 이상의 항체는 환자에 공투여될 수 있다. 때때로, 하나 이상의 사이토카인을 환자에 투여하는 것이 이로울 수 있다.

화학요법제

[0153] 특정 일면으로, 본 발명은 암에 걸리기 쉽거나 암으로 진단받은 환자에게 유효량의 ANGPTL4의 저해제 및/또는 혈관신생 저해제(들) 및 하나 이상의 화학요법제를 투여하여 종양 성장 또는 암 세포의 성장을 차단하거나 저하시키는 방법을 제공한다. 다양한 화학요법제가 본 발명의 병용 요법으로 사용될 수 있다. 주시되는 화학요법제의 일례로 비제한적인 것에 대해서는 본원의 "정의부"에 열거되어 있다.

[0154] 본 분야의 본 분야의 기술자에게 이해되는 바와 같이, 화학요법제의 적정 용량은 일반적으로 화학요법제가 단독으로 투여되거나 다른 화학요법제와 배합되어 함께 투여되는 임상 요법에서 이미 사용되고 있는 것의 범위이다. 치료하고자 하는 상태에 따라 용량을 변화시킬 수 있다. 요법제를 투여하는 의사는 개체 대상자에 적절한 투여량을 결정할 수 있다.

재발성 종양 성장

- [0156] 본 발명은 또한 재발성 종양 성장 또는 재발성 암 세포 성장을 저해하거나 예방하기 위한 방법 및 조성물을 제공한다. 예를 들면, 도 8, 패널 C에는 종양이 또한 ANGPTL4을 발현시킬 때 요법으로부터 벗어나는 (예, 재발성의 한가지 타입) 항-VEGF 항체 (아바스틴으로 치료하는 종양의 능력을 도시적으로 도시화되어 있다).
- [0157] 환자가 현재 이용가능한 하나 이상의 요법 (예로서, 암 요법, 예로서, 화학요법, 방사선 요법, 수술, 호르몬 요법 및/또는 생물학적 요법/면역요법, 특히, 특정 암을 위한 표준 치료학적 요법)을 경험하거나 상기를 사용하여 치료받고 있는 경우의 상태가 환자를 치료하기에는 임상적으로 부적절하거나 환자가 요법으로부터 더이상 임의의 유익한 효능을 얻지 못하여 본 환자들이 추가의 유효한 요법을 필요로 하는 것을 기술하기 위해서 재발성 종양 성장 또는 재발성 암 세포 성장을 사용한다. 본원에서 사용되는 바, 상기 어구는 또한 "비반응성/무반응성" 환자의 상태를 언급할 수 있고, 예로서, 이는 요법에 반응한 환자가 다시 부작용으로 고생하고, 내성을 나타내고, 상기 요법에는 반응하지 않고 요법에 대하여 만족스럽게 반응하지 않는 환자를 기술한다. 다양한 실시태양에서, 암은 암의 수가 현저하기 감소하지 않거나 증가되거나, 종양 크기가 현저히 감소하시 않거나 증가하거나, 암세포의 크기 또는 갯수에 있어 추가로 감소하지 못한 재발성 종양 성장 또는 재발성 암 세포 성장이다. 암세포가 재발성 종양 성장 또는 재발성 암 세포 성장인지에 대해서는 상기와 관련하여 "재발성" 또는 "무반응성" 또는 "비반응성"으로 본 분야에서 허용되고 있는 의미를 사용하여 암 세포에 대한 요법의 효능을 분석하기 위한 본 분야에 공지되어 있는 임의의 방법에 의해 생체내 또는 시험관내에서 결정될 수 있다.
- [0158] 본 발명은 대상자의 재발성 종양 성장 또는 재발성 암 세포 성장을 차단하거나 저하시키기 위해 본 발명의 하나 이상의 ANGPTL4 길항체를 투여하여 대상자에 재발성 종양 성장 또는 재발성 암 세포 성장을 차단하거나 저하시키는 방법을 제공한다. 특정 실시태양에서, ANGPTL4 길항체는 암 치료제에 이어 투여될 수 있다. 특정 실시태양에서, ANGPTL4는 암 요법과 동시에 투여된다. 다르게는, 또는 추가로, ANGPTL4 길항체 요법은 또다른 암 요법과 교대로, 임의로 순서로 실시될 수 있다. 본 발명은 또한 암에 걸리기 쉬운 환자에서 암의 개시 또는 재발을 예방하기 위해 하나 이상의 ANGPTL4 저해성 항체를 투여하는 방법을 포함한다. 일반적으로, 대상자는 암 요법을 동시에 경험하였거나 경험할 것이다. 실시태양에서, 암 요법은 항-혈관신생제를 사용하는 요법이다. 항-혈관신생제는 본 분야에 공지되어 있는 것 및 본원의 정의부에서 발견되는 것을 포함한다. 실시태양에서, 항-혈관신생제는 항-VEGF 중화 항체 또는 단편 (예로서, 인간화된 A4.6.1, 아바스틴® (캘리포니아주 남부 샌프란시스코에 소재하는 제넨테크), Y0317, M4, G6, B20, 2C3 등)이다 (예로서, 미국 특허 제 6,582,959호, 제 6,884,879호, 제 6,703,020호; WO98/45332; WO 96/30046; WO94/10202; EP 0666868B1; 미국 특허출원 제 20030206899호, 제 20030190317호, 제 20030203409호, 및 제 20050112126호; [Popkov et al., *Journal of Immunological Method* 288: 149-164 (2004)]; 및 변리서 서류번호 PR2072-4 참조). 추가의 약제는 재발성 종양 성장 또는 재발성 암 세포 성장을 차단하거나 저하시키기 위한 ANGPTL4 길항제와 병용하여 투여될 수 있다 (예로서, 본원의 명칭 병용 요법 단락 참조)
- [0159] 실시태양에서, 본 발명의 ANGPTL4 길항제, 또는 ANGPTL4 발현을 저하시키는 다른 치료제는 특정 생물학적 제제, 호르몬제, 방사선제 및 화학요법제에 대한 암 세포의 내성 또는 저하된 감작성을 역전시켜 하나 이상의 상기 제제들에 대한 암 세포를 재감작시키기 위해 투여된 후, 전이를 예방하는 것을 포함한, 암을 치료하거나 관리하기 위하여 투여 (또는 계속적으로 투여)될 수 있다.
- [0160] **항체**
- [0161] 본 발명의 항체는 항-ANGPTL4 및 항-ANGPTL4 단편 항체, 항-혈관신생제 또는 혈관신생 저해제인 항체, 항암제인 항체, ANGPTL4 수용체에 대한 항체, 예로서, 항- $\alpha_v\beta_5$ 항체, 또는 본원에 기술된 다른 항체를 포함한다. 항체의 일례로, 예로서, 폴리클로날, 모노클로날, 인간화된, 단편, 다중특이성, 헤테로컨쥬게이션된, 다가, 이펙토 작용(effecto function) 등의 항체를 포함한다.
- [0162] **폴리클로날 항체**
- [0163] 본 발명의 항체는 폴리클로날 항체를 포함할 수 있다. 폴리클로날 항체를 제조하는 방법은 본 분야의 기술자에게 공지되어 있고, 예를 들면, 본 발명의 항체에 대한 폴리클로날 항체는 관련 항원 및 애주번트의 1회 또는 다중의 피하 (sc) 또는 복강 (ip) 주사에 의해 동물에서 생성된다. 이완능성 물질 또는 유도체화 물질, 예를 들면, 말레이미도벤조일 설포숙신이미드에스테르 (시스테인 잔기를 통한 컨쥬게이션), N-히드록시숙신이미드 (리신 잔기를 통해), 글루타르알데히드, 숙신산 무수물, SOCl_2 , 또는 $\text{R}^1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$ (여기서, R 및 R^1 은 다른 알킬기이다)을 사용하여 관련 항원을 면역화될 종에서 면역원성인 단백질, 예를 들면, 키홀 림펫 혜모시아닌, 혈청 알부민, 소 티로글로불린 또는 콩 트립신 저해제와 컨쥬게이션시키는 것이 유용할 수 있다.

- [0164] 예를 들면, 단백질 또는 켄쥬게이트 100 μg 또는 5 μg (각각 토끼 또는 마우스에 대해)과 이들 양의 3배에 해당하는 프로인트 완전 애주번트를 배합하고 이 용액을 여러 부위에 피부내로 주사함으로써 동물을 항원, 면역원성 켄쥬게이트 또는 유도체에 대하여 면역화시킨다. 그로부터 1개월 후, 프로인트 완전 애주번트 중 펩티드 또는 켄쥬게이트의 원래 양의 1/5 내지 1/10을 여러 부위에 피하주사하여 동물을 항원 자극시킨다. 7일 내지 14일 후에, 동물을 채혈하여 혈청을 항체 역가에 대하여 분석한다. 역가 정체시까지 동물을 항원 자극시킨다. 전형적으로, 다른 단백질에 켄쥬게이션되고/거나 다른 가교체에 의해 켄쥬게이션된 동일한 항원의 켄쥬게이트로 항원 자극시킨다. 켄쥬게이트는 또한 재조합 세포배양에서 단백질 융합체로서 제조될 수 있다. 또한, 명반과 같은 응집제는 적합하게는 면역반응을 증진시키기 위해 사용된다.
- [0165] **모노클로날 항체**
- [0166] 본원에 기술된 항원에 대한 모노클로날 항체는 [Kohler et al., *Nature*, 256:495 (1975)]에 최초로 기술된 하이브리도마 방법을 이용하여 제조할 수 있거나 재조합 DNA 방법 (미국 특허번호 제 4,816,567호)에 의해 제조할 수 있다.
- [0167] 하이브리도마 방법에서, 마우스 또는 다른 적절한 숙주 동물, 예를 들면, 햄스터 또는 짧은꼬리 원숭이는 면역화에 사용되는 단백질과 특이적으로 결합하는 항체를 생산하거나 생산할 수 있는 림프구를 유도하기 위해 상기 언급된 바와 같이 면역화된다. 다르게는, 림프구는 시험관내에서 면역화될 수 있다. 이어서, 폴리에틸렌 글리콜과 같은 적절한 융합제를 사용하여 림프구를 골수종 세포와 융합시켜 하이브리도마 세포를 형성시킨다 [Goding, *Monoclonal Antibodies. Principles and Practice*, pp. 59-103 (Academic Press, 1986)].
- [0168] 이렇게 하여 제조된 하이브리도마 세포를 전형적으로 비융합된 모 골수종 세포의 증식 또는 생존을 저해하는 하나 이상의 물질을 포함하는 적절한 배양 배지에 심고 배양한다. 예를 들면, 모 골수종 세포에 효소인 하이포크산틴 구아닌 포스포리보실 트랜스퍼라제 (HGPRT 또는 HPRT)가 결여되어 있다면, 하이브리도마를 위한 배양 배지는 전형적으로 HGPRT-결핍 세포의 증식을 억제하는 물질인 하이포크산틴, 아미노프테린 및 티미딘을 포함할 것이다 (HAT 배지).
- [0169] 전형적인 골수종 세포는 효과적으로 융합하고, 선별된 항체-생산 세포에 의한 항체의 안정된 높은 수준의 생산을 지지하며, HAT 배지와 같은 배지에 감수성인 세포이다. 이를 중에서, 바람직한 골수종 세포주는 뮤린 골수종 세포주, 예를 들면, 미국 캘리포니아주 샌디에고에 소재하는 솔크 인스티튜트 셀 디스트리뷰션 센터(Salk Institute Cell Distribution Center)로부터 이용가능한 MOPC-21 및 MPC-11 마우스 종양으로부터 유래된 것들 및 미국 메릴랜드주 로크빌에 소재하는 아메리칸 타입 컬처 콜렉션(American Type Culture Collection)으로부터 이용가능한 SP-2 또는 X63-Ag8-653 세포로부터 유래된 것들이다. 인간 골수종 세포주 및 마우스-인간 이종 골수종 세포주는 또한 인간 모노클로날 항체의 생산을 위한 것으로도 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)]).
- [0170] 하이브리도마 세포가 배양되는 배양 배지를 예로서, ANGPTL4, $\alpha_v\beta_5$, 또는 혈관신생 분자에 대한 모노클로날 항체 생산에 대하여 분석한다. 하이브리도마 세포에 의해 생산된 모노클로날 항체의 결합 특이성은 면역 침전법 또는 시험관내 결합 분석법, 예를 들면, 방사성면역 분석법 (RIA) 또는 효소-결합 면역흡착 분석법 (ELISA)에 의해 측정할 수 있다. 상기 기술 및 분석법은 본 분야에 공지되어 있다. 모노클로날 항체의 결합 친화성은, 예를 들면, [Munson et al., *Anal Biochem.*, 107:220 (1980)]의 스캐처드(Scatchard) 분석법에 의해 측정할 수 있다.
- [0171] 원하는 특이성, 친화성 및/또는 활성을 갖는 항체를 생산하는 하이브리도마 세포를 동정한 후, 제한 회석 방법에 의해 클론을 서브클로닝하고 표준 방법에 의해 배양할 수 있다 [Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp. 59-103 (Academic Press, 1986)]. 이러한 목적에 적절한 배양 배지로는, 예를 들면, D-MEM 또는 RPMI-1640 배지가 포함된다. 추가로, 하이브리도마 세포는 동물에서 복수 종양으로서 생체내에서 배양될 수 있다.
- [0172] 서브클론에 의해 분비되는 모노클로날 항체는 적합하게는, 예를 들면, 단백질 A-세파로스(Sepharose), 하이드록실아파타이트 크로마토그래피, 겔 전기영동, 투석 또는 친화성 크로마토그래피 등의 통상의 면역글로불린 정제 방법에 의해 배양 배지, 복수액 또는 혈청으로부터 분리된다.
- [0173] 모노클로날 항체는 또한 재조합 DNA 방법, 예로서, 미국 특허번호 제 4,816,567호에 기술된 것과 같은 것에 의해 제조될 수 있다. 모노클로날 항체를 코딩하는 DNA는 통상의 방법에 의해 (예를 들면, 모노클로날 항체의 중

쇄 및 경쇄를 코딩하는 유전자에 특이적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오티드 프로브를 사용하여) 쉽게 단리하고 서열화된다. 하이브리도마 세포는 그러한 DNA의 공급원으로서의 역할을 한다. 일단 단리되면, DNA를 발현 벡터에 위치시킬 수 있으며, 이어서 달리 면역글로불린 단백질을 생산하지 않는 이. 콜라이(*E. coli*) 세포, 원숭이 COS 세포, 차이니즈 햄스터 난소(CHO) 세포 또는 골수종 세포와 같은 숙주 세포에 형질감염시켜 재조합 숙주 세포에서 모노클로날 항체를 합성한다. 항체의 재조합 생산은 하기에 더욱 상세히 기술될 것이다.

[0174] 또다른 실시태양에서, 항체 또는 항체 단편은 [McCafferty et al., *Nature*, 348: 552-554 (1990)]에 기재된 기술을 사용하여 생성된 항체 파지 라이브러리로부터 단리될 수 있다. [Clackson et al., *Nature*, 352: 624-628 (1991)] 및 [Marks et al., *J. Mol Biol.*, 222: 581-597 (1991)])에는 파지 라이브러리를 사용하여 각각 뮤린 및 인간 항체를 단리시키는 것이 기술되어 있다. 후속 문헌에는 쇄 셔플링(chain shuffling) [Marks et al., *Biol. Technology*, 10:779-783 (1992)] 뿐만 아니라, 매우 큰 파지 라이브러리를 제작하기 위한 방법인 조합 감염 및 생체내 재조합 [Waterhouse et al., *Nuc. Acids. Res.*, 21: 2265-2266 (1993)]이 기재되어 있다. 따라서, 이들 기술은 모노클로날 항체의 단리를 위한 종래의 모노클로날 항체 하이브리도마 기술에 대하여 실시가능한 대안이다.

[0175] 또한, 예를 들면, DNA는 상동 뮤린 서열 대신에 인간 중쇄 및 경쇄 불변 영역을 코딩하는 서열을 치환시킴으로써 (미국 특허 제 4,816,567호; [Morrison et al., *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 81:6851 (1984)]), 또는 비-면역글로불린 폴리펩티드에 대한 코딩 서열의 전체 또는 일부를 면역글로불린 코딩 서열에 공유 결합시킴으로써 변형시킬 수 있다.

[0176] 전형적으로, 상기 비-면역글로불린 폴리펩티드는 항체의 불변 영역에 대하여 치환되거나, 항체의 하나의 항원-결합 부위의 가변 영역에 대하여 치환되어 하나의 항원에 대한 특이성을 갖는 하나의 항원-결합 부위 및 다른 항원에 대한 특이성을 갖는 다른 항원-결합 부위를 포함하는 키메라성 2가 항체를 생성시킬 수 있다.

인간화된 항체 및 인간 항체

[0177] 본 발명의 항체는 인간화된 항체 또는 인간 항체를 포함할 수 있다. 인간화된 항체는 인간이 아닌 공급원으로부터 유래된 항체에 도입된 하나 이상의 아미노산 잔기를 갖는다. 이들 인간이 아닌 아미노산 잔기는 종종 "임포트(import)" 잔기로 불리며, 전형적으로 "임포트" 가변 영역으로부터 얻어진다. 인간화는 인간 항체의 상응하는 서열 대신에 설치류 CDRs 또는 CDR 서열을 치환함으로써 본질적으로 윈터(Winter)와 동료들의 방법 ([Jones et al., *Nature*, 321:522-525 (1986)]; [Riechmann et al., *Nature*, 332:323-327(1988)]; [Verhoeyen et al., *Science*, 239:1534-1536(1988)])에 따라 수행할 수 있다. 따라서, 이러한 "인간화된" 항체는 실질적으로 보다 적은 무순상 인간 가변 영역이 인간이 아닌 종으로부터의 상응하는 서열에 의해 치환된 키메라 항체 (미국 특허 제 4,816,567호)이다. 실제로, 인간화된 항체는 전형적으로 일부 CDR 잔기 및 가능하게는 일부 FR 잔기가 설치류 항체의 유사 부위로부터의 잔기로 치환된 인간 항체이다.

[0178] 인간화된 항체를 제조하는데 사용될 인간 경쇄 가변 영역과 인간 중쇄 가변 영역 사이의 선별은 항원성을 감소시키는데 매우 중요하다. 소위 "가장 적절한" 방법에 따르면, 공지된 인간 가변-영역 서열의 전체 라이브러리에 대하여 설치류 항체의 가변 영역의 서열을 선별한다. 이후, 설치류의 서열과 가장 근접한 인간 서열을 인간화된 항체를 위한 인간 프레임워크 부위(FR)로 채택한다 ([Sims et al., *J. Immunol.*, 151:2296(1993)]; [Chothia et al., *J. Mol. Biol.*, 196:901(1987)]). 다른 방법은 경쇄 또는 중쇄의 특정 서브그룹의 모든 인간 항체의 공통 서열로부터 유도된 특정한 프레임워크 부위를 사용한다. 여러가지 다른 인간화된 항체에 대해 동일한 프레임워크를 사용할 수 있다 ([Carter et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285(1992)]; [Presta et al., *J. Immunol.*, 151: 2623(1993)]).

[0179] 추가로, 항체가 항원에 대한 고친화성 및 다른 유리한 생물학적 성질을 보유하도록 인간화하는 것도 중요하다. 본 목적을 달성하기 위해, 전형적인 방법에 따라, 모 서열 및 인간화 서열의 3차원 모델을 사용한, 모 서열 및 다양한 이론상 인간화 산물의 분석 방법으로 인간화된 항체를 제조한다. 3차원 면역글로불린 모델은 보편적으로 이용가능하고 본 분야의 기술자에게 공지되어 있다. 선별된 후보 면역글로불린 서열의 가능한 3차원 구조를 설명하고 보여주는 컴퓨터 프로그램을 이용할 수 있다. 이러한 디스플레이를 조사하면 후보 면역글로불린 서열의 기능화에 있어서의 잔기의 가능한 역할 분석, 즉, 후보 면역글로불린이 그의 항원에 결합하는 능력에 영향을 주는 잔기의 분석을 가능케 한다. 이 방식으로, 수혜자 서열 및 임포트 서열로부터 FR 잔기를 선별하고 조합하여 표적 항원(들)에 대하여 증가된 친화성과 같은 원하는 항체의 특성을 얻을 수 있다. 일반적으로, CDR 잔기는 항원 결합에 영향을 주는데 직접적으로, 그리고 가장 실질적으로 관여한다.

[0181] 다르게는, 면역화시, 내인성 면역글로불린 생성의 부재하에 인간 항체의 전체 레파토리를 생산할 수 있는 형질 전환 동물 (예를 들면, 마우스)을 생성하는 것도 현재 가능하다. 예를 들면, 키메라 및 배선 돌연변이주 마우스에서 항체 중쇄 결합 부위(J_H) 유전자를 동형접합 결실시키면 내인성 항체 생산이 완전히 억제된다는 것이 기술된 바 있다. 상기와 같은 배선 돌연변이주 마우스내로 인간 생식 세포주 면역글로불린 유전자 배열이 전달되면 항원 시험감염시 인간 항체가 생산될 것이다 (예로서, [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 [Duchosal et al., *Nature* 355:258 (1992)] 참조). 인간 항체는 또한 파지-디스플레이 라이브러리로부터 유래할 수 있다 ([Hoogenboom et al., *J. Mol. Biol.*, 227:381 (1991)]; [Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991)]; [Vaughan et al., *Nature Biotech* 14:309 (1996)]).

[0182] 또한, 파지 디스플레이 라이브러리 ([Hoogenboom and Winter, *J. Mol Biol.*, 227:381 (1991)]; [Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222:581 (1991)])를 포함하는 본 분야에 공지되어 있는 다양한 기술을 사용하여 인간 항체를 생산할 수 있다. 이 기술에 따라, 항체 V 영역 유전자를 M13 또는 fd와 같은 선형 박테리오파지의 주요 코트 단백질 또는 소수 코트 단백질 유전자내로 인-프레임으로 클로닝하고 상기 파지 입자의 표면상에 기능성 항체 단편으로 디스플레이한다. 상기 선형 입자가 파지 계놈의 싱글 스트랜드 DNA 카피를 함유하기 때문에, 항체의 기능적 성질을 기준으로 한 선별은 상기 성질을 나타내는 항체를 코딩하는 유전자도 선별할 수 있게 한다. 따라서, 파지는 B 세포의 일부 성질을 모사한다. 파지 디스플레이는 다양한 포맷으로 수행할 수 있다 (예를 들면, [Johnson, Kevin S. and Chiswell, David J., *Current Opinion in Structural Biology* 3:564-571 (1993) 참조). V-유전자 세그먼트의 수개의 공급원을 파지 디스플레이에 사용할 수 있다. 예를 들면, 클락슨 [Clackson et al., *Nature*, 352:624-628 (1991)]은 면역화된 마우스의 비장으로부터 유래한 V 유전자의 작은 무작위 조합 라이브러리로부터 얻은 다양한 배열의 항-옥사졸론 항체를 단리시켰다. 면역화되지 않은 인간 공여자로부터 얻은 V 유전자의 레파토리를 제작하고, 본질적으로 ([Marks et al., *J. Mol Biol.*, 222:581-597(1991)], 또는 [Griffith et al., *EMBO J.* 12:725-734(1993)])에 기술된 기술에 따라 다양한 배열의 항원 (자가-항원을 포함함)에 대한 항체를 단리시킬 수 있다. 미국 특허 제 5,565,332호 및 제 5,573,905호도 참조한다. 콜(Cole) 등 및 보에르너(Boerner) 등의 기술 또한 인간 모노클로날 항체의 제조에 이용될 수 있다 ([Cole et al., *Monoclonal Antibody and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, p. 77 (1985)] 및 [Boerner et al., *J. Immunol.*, 147(1):86-95 (1991)]). 인간 항체는 또한 시험관내 활성화된 B 세포에 의해 생성될 수 있다 (미국 특허 제 5,567,610호 및 제 5,229,275호 참조).

[0183] 항체 단편

[0184] 항체 단편 또한 본 발명에 포함된다. 항체 단편을 생산하기 위한 다양한 기술이 개발되었다. 종래에, 이를 단편은 무손상 항체의 단백질 분해 절단을 통해 유도되었다 (예로서, [Morimoto et al., *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24:107-117(1992)] 및 [Brennan et al., *Science*, 229:81(1985)] 참조). 그러나, 이를 단편은 현재 재조합 숙주 세포에 의해 직접 생산할 수 있다. 예를 들면, 항체 단편을 상기 논의된 항체 파지 라이브러리로부터 단리시킬 수 있다. 다르게는, Fab'-SH 단편을 이. 콜라이로부터 직접 회수하여 F(ab')₂ 단편에 화학적으로 커플링시킬 수 있다 [Carter et al., *Bio/Technology* 10:163-167(1992)]. 또 다른 방법에 따라, F(ab')₂ 단편을 숙주 세포 배양물로부터 직접 단리시킬 수 있다. 항체 단편을 생산하기 위한 다른 기술은 본 분야의 기술자에게 자명할 것이다. 다른 실시태양에서, 선별된 항체는 단일 쇄 Fv 단편 (scFv)이다. WO 93/16185; 미국 특허 제 5,571,894호; 및 미국 특허 제 5,587,458호를 참조한다. Fv 및 sFv는 불변 부위가 결여된 무손상 결합 부위를 갖는 유일한 종이고; 따라서, 생체내에서 사용하는 동안 저하된 비특이적 결합에 적절하다. SFv 융합 단백질을 작제하여 sFv의 아미노 또는 카복시 말단에서 효과기 단백질의 융합물을 수득할 수 있다 ([Antibody Engineering, ed. Borrebaeck, 상기 동일] 참조). 항체 단편은, 예를 들면, 미국 특허 제 5,641,870호에 기술된 바와 같은 "선형 항체"일 수도 있다. 이러한 선형 항체 단편은 단일특이성 또는 이중특이성일 수 있다.

[0185] 다중특이성 항체 (예로서, 이중특이성)

[0186] 본 발명의 항체는 또한 예로서, 적어도 2개의 상이한 항원에 대한 결합 특이성을 갖는 다중특이성 항체를 포함한다. 상기 분자는 일반적으로 단지 2개의 항원에 결합하는 반면 (즉, 이중 특이성 항체, BsAbs), 추가의 특이성을 갖는 항체, 예로서, 삼중특이성 항체는 본원에서 사용되는 경우, 상기 표현에 포함된다. BsAbs의 일례로 종양 세포 항원에 대한 하나의 암(arm)과 세포독성 유발 분자에 대한 다른 암을 갖는 것, 예로서, 항-Fc γ RI/항

-CD15, 항-p185^{HER2}/Fc γ RIII (CD16), 항-CD3/항-악성 B-세포 (1D10), 항-CD3/항-p185^{HER2}, 항-CD3/항-p97, 항-CD3/항-콩팥 세포 암종, 항-CD3/항-OVCAR-3, 항-CD3/L-D1 (항-결장 암종), 항-CD3/항-멜라닌세포 자극 호르몬 유사체, 항-EGF 수용체/항-CD3, 항-CD3/항-CAMA1, 항-CD3/항-CD19, 항-CD3/MoV18, 항-신경 세포 부착 분자 (NCAM)/항-CD3, 항-엽산 결합 단백질 (FBP)/항-CD3, 항-판(pan) 암종 관련 항원 (AMOC-31)/항-CD3; 종양 항원에 특이적으로 결합하는 하나의 암과 독소에 결합하는 하나의 암을 갖는 BsAbs, 예로서, 항-사포린/항-Id-1, 항-CD22/항-사포린, 항-CD7/항-사포린, 항-CD38/항-사포린, 항-CEA/항-리신 A 쇄, 항- 인터페론-α (IFN-α)/항-하이브리도마 이디오타입, 항-CEA/항-빈카 알칼로이드; 효소 활성 프로드럭을 전환시키는 BsAbs, 예로서, 항-CD30/항-알칼리성 인산분해 효소 (미토마이신 포스페이트 프로드럭이 미토마이신 알코올로 전환되는 것을 촉진 시킴); 섬유소 용해 물질로서 사용될 수 있는 BsAbs, 예로서, 항-섬유소/항-조직 플라스미노겐 활성제 (tPA), 항-섬유소/항-유로키나제형 플라스미노겐 활성제 (uPA); 면역 복합체를 세포 표면 수용체에 표적화시키기 위한 BsAbs, 예로서, 항-저밀도 지질단백질 (LDL)/항-Fc 수용체 (예로서, Fc γ RI, Fc γ RII 또는 Fc γ RIII); 감염 질환 요법에 사용하기 위한 BsAbs, 예로서, 항-CD3/항-단순 헤르페스 바이러스 (HSV), 항-T-세포 수용체:CD3 복합체/항-인플루엔자, 항-Fc γ R/항-HIV; 시험관내 또는 생체내에서 종양 검출을 위한 BsAbs, 예로서, 항-CEA/항-EOTUBE, 항-CEA/항-DPTA, 항-p185^{HER2}/항-합텐; 백신 애주번트로서 BsAbs; 및 진단 도구로서의 BsAbs, 예로서, 항-래빗 IgG/항-페리틴, 항-홍당무 과산화효소 (HRP)/항-호르몬, 항-소마토스타틴/항-물질 P, 항-HRP/항-FITC, 항-CEA/항-β-갈락토시다제를 포함한다. 삼중특이성 항체의 일례로 항-CD3/항-CD4/항-CD37, 항-CD3/항-CD5/항-CD37 및 항-CD3/항-CD8/항-CD37을 포함한다. 이중특이성인 항체는 전장 항체 또는 항체 단편 (예로서, F(ab')₂ 이중특이성 항체)로서 제조될 수 있다.

[0187] 이중특이성 항체를 제조하는 방법은 본 분야에 공지되어 있다. 전장의 이중특이성 항체에 대한 종래 생산 방법은 상이한 특이성을 갖는 2개의 면역글로불린 중쇄-경쇄 쌍을 함께 발현시키는 것을 기초로 한다 [Milstein et al., *Nature*, 305:537-539(1983)]. 면역글로불린 중쇄와 경쇄의 무작위 분류로 인해, 이들 하이브리도마 (쿼드로마(quadroma))는 10개의 상이한 항체 분자의 잠재적 혼합물을 생성시키는데, 이들중의 단지 1개만이 정확한 이중특이성 구조를 지니고 있다. 통상적으로 친화 크로마토그래피 단계에 의해 행해지는, 정확한 분자의 정체는 다소 번거로운 과정이며, 산물 수율은 낮다. 유사한 방법이 WO 93/08829, 및 [Traunecker et al., *EMBO J.*, 10:3655-3659 (1991)]에 기술되어 있다.

[0188] 상이한 방법에 따라서, 원하는 결합 특이성 (항체-항원 결합 부위)을 갖는 항체 가변 영역을 면역글로불린 불변 영역 서열에 융합시킨다. 이러한 융합은 바람직하게 헌지, CH2 및 CH3 부위의 적어도 일부를 포함하는 면역글로불린 중쇄 불변 영역을 포함한다. 이러한 융합물 중 적어도 하나에 존재하는, 경쇄 결합에 필요한 부위를 함유하는 제 1 중쇄 불변 부위 (CH1)를 갖는 것이 바람직하다. 면역글로불린 중쇄 융합물을 코딩하고, 경우에 따라, 면역글로불린 경쇄를 코딩하는 DNA를 분리의 발현 벡터내로 삽입하고, 이들을 적절한 숙주 유기체내로 함께 형질 감염시킨다. 이로써, 작제에 사용된 동등하지 않은 비율의 3가지 폴리펩티드 쇄가 최적의 수율을 제공하는 실시태양에서 이들 3가지 폴리펩티드 단편의 상호 비율을 조절하는데 큰 가용성을 제공한다. 그러나, 동등한 비율의 적어도 2개의 폴리펩티드 쇄의 발현이 고수율을 가져다주는 경우 또는 이러한 비율이 특별한 유의성이 없는 경우에는, 3가지 폴리펩티드 쇄 중 2개 또는 이를 모두에 대한 코딩 서열을 하나의 발현 벡터내에 삽입하는 것이 가능하다.

[0189] 이러한 접근법의 하나의 실시태양에서, 이중특이성 항체는 하나의 암에 제 1 결합 특이성을 갖는 하이브리드 면역글로불린 중쇄와, 다른 암에 하이브리드 면역글로불린 중쇄-경쇄 쌍 (제 2 결합 특이성을 제공해 줌)으로 구성된다. 이러한 비대칭 구조가, 원치않는 면역글로불린 쇄 조합물로부터의 원하는 이중특이성 화합물의 분리를 용이하게 해 주는 것으로 밝혀졌는데, 이는 면역글로불린 경쇄가 이러한 이중특이성 분자의 절반에만 존재함으로 인해 용이한 분리 방법이 제공되기 때문이다. 이러한 방법은 WO 94/04690에 기술되어 있다. 이중특이성 항체 생성에 대한 추가의 설명을 위해, 예를 들면, [Suresh et al., *Methods in Enzymology*, 121:210 (1986)]을 참조한다.

[0190] W096/27011에 기술된 또 다른 접근법에 따르면, 항체 분자쌍 간의 경계면을 공학처리하여 재조합 세포 배양물로부터 회수되는 이종이량체의 비율(%)을 최대화할 수 있다. 바람직한 계면은 항체 불변 영역의 C_H3 영역의 적어도 일부를 포함한다. 이러한 방법에서는, 제 1 항체 분자의 계면으로부터의 하나 이상의 작은 아미노산 측쇄를 보다 큰 측쇄 (예로서, 티로신 또는 트립토판)로 대체시킨다. 큰 측쇄(들)와 동일하거나 유사한 크기의 보상 "캐비티"는 큰 아미노산 측쇄를 보다 작은 아미노산 (예로서, 알라닌 또는 트레오닌)으로 대체시킴으로써 제 2 항체 분자의 계면상에서 생성된다. 이로써, 기타 원치않는 최종 산물, 예로서, 동종이량체에 비해 이종이량체

의 수율을 증가시키는 기작을 제공한다.

- [0191] 항체 단편으로부터 이중특이성 항체를 생산하는 기술 또한 본 문헌에 기술되어 있다. 예를 들면, 이중특이성 항체는 화학적 연결을 사용하여 제조할 수 있다. 브레넌(Brennan) 등 [Brennan *Science*, 229: 81 (1985)]은 무손상 항체를 단백질 분해 효소로 절단하여 $F(ab')_2$ 단편을 생산하는 방법을 기술하였다. 이들 단편은 디티올 치화제, 소듐 아르세나이트(sodium arsenite)의 존재하에서는 환원됨으로써 인접한 디티올을 안정화시키고 분자내 디설파이드 형성을 막는다. 이어서, 생성된 Fab' 단편은 티오니트로벤조에이트 (TNB) 유도체로 전환된다. 이어서, Fab' -TNB 유도체 중 하나는 머캅토에틸아민을 사용하는 환원에 의해 Fab' -티올로 재전환되고 동량의 다른 Fab' -TNB 유도체와 혼합함으로써 이중특이성 항체를 형성한다. 생산된 이중특이성 항체는 효소의 선별적 고정화에 대한 제제로서 사용될 수 있다.
- [0192] 최근의 발전을 통해 화학적으로 커플링하여 이중특이성 항체를 형성할 수 있는 Fab' -SH 단편을 이.콜라이로부터 직접 회수하는 것이 촉진되었다. [Shalaby et al., *J. Exp. Med.*, 175: 217-225 (1992)]에는 전제적으로 인간화된 이중특이성 항체 $F(ab')_2$ 분자를 생산하는 것이 기술되어 있다. 각각의 Fab' 단편은 이.콜라이로부터 별개로 분비되고 시험관내에서 직접 화학적으로 커플링시켜 이중특이성 항체를 형성하였다. 그렇게 형성된 이중특이성 항체는 VEGF 수용체를 과다발현시키는 세포 및 정상의 인간 T 세포에 결합할 수 있을 뿐만 아니라, 인간 유방 종양 표적에 대한 인간 세포독성 림프구의 용해 활성을 유발할 수도 있었다.
- [0193] 제조합 세포 배양물로부터 직접 이중특이성 항체 단편을 제조하고 단리시키는 다양한 기술 또한 기술되어 있다. 예를 들면, 이중특이성 항체는 류신 지퍼를 사용하여 생산되었다 [Kostelny et al., *J. Immunol.*, 148(5): 1547-1553 (1992)]. Fos 및 Jun 단백질로부터의 류신 지퍼 웨პ티드는 유전자 융합에 의해 2개의 상이한 항체의 Fab' 부분에 연결되었다. 항체 동종이량체는 헌지 부위에서 환원되어 단량체를 형성한 후, 다시 산화되어 항체 이종이량체를 형성하였다. 상기 방법은 또한 항체 동종이량체의 생산에 사용될 수 있다. [Hollinger et al., *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993)]에 기술된 "디아바디" 기술은 이중특이성 항체 단편을 제조하는 대체 기작을 제공하였다. 단편은 동일한 쇄상의 2개의 영역 사이에 쌍을 이루기에는 너무 짧은 링커에 의해 경쇄 가변 영역에 연결된 중쇄 가변 영역 (V_H)을 포함한다. 따라서, 하나의 단편 중 V_H 및 V_L 영역은 또 다른 단편의 상보적인 V_L 및 V_H 영역과 쌍을 이루도록 강요되고, 이로써, 2개의 항원-결합 부위를 형성하게 된다. 단일-쇄 Fv (sFv) 이량체를 사용함으로써 이중특이성 항체 단편을 제조하는 또 다른 전략법 또한 보고되었다 ([Gruber et al., *J. Immunol.*, 152:5368 (1994)] 참조).
- [0194] 2 초과의 결합가를 갖는 항체가 주시되고 있다. 예를 들면, 삼중특이성 항체를 제조할 수 있다 [Tutt et al. *J. Immunol.* 147: 60 (1991)].
- [0195] **헤테로컨쥬게이트 항체**
- [0196] 이중특이성 항체는 본 발명의 항체인 가교결합된 항체 또는 "헤테로컨쥬게이트" 항체를 포함한다. 예를 들면, 헤테로컨쥬게이트에서 항체 중 하나는 아비딘과 커플링할 수 있고, 다른 것은 바이오텐과 할 수 있다. 상기 항체는 예를 들면, 원치않는 세포에 대한 면역계 세포를 표적화하기 위해 (미국 특허번호 제 4,676,980호), 및 HIV 감염 요법 (WO 91/00360, WO 92/200373, 및 EP 03089)을 위해 제안되었다. 헤테로컨쥬게이트 항체는 임의의 용이한 가교결합 방법을 사용하여 제조할 수 있다. 적절한 가교제는 본 분야에 잘 공지되어 있고, 다수의 가교결합 기술과 함께 미국 특허번호 제 4,676,980호에 기술되어 있다.
- [0197] **다가 항체**
- [0198] 본 발명의 항체는 다가 항체를 포함한다. 다가 항체는 항체가 결합하는 항원을 발현시키는 세포에 의해 2가 항체보다 더욱 신속하게 내재화 (및/또는 이화(catabolize))될 수 있다. 본 발명의 항체는 항체의 폴리펩티드 쇄를 코딩하는 핵산의 재조합 발현에 의해 용이하게 생산될 수 있는, 3개 이상의 항원 결합 부위 (예로서, 4가 항체)를 갖는 다가 항체 (IgM 부류 이외의 것이다)일 수 있다. 다가 항체는 이량화 영역 및 3개 이상의 항원 결합 부위를 포함할 수 있다. 바람직한 이량화 영역은 Fc 부위 또는 헌지 부위를 포함한다 (또는 그로 구성된다). 상기 시나리오에서, 항체는 Fc 부위 및 Fc 부위에 대한 3개 이상의 항원 결합 부위 아미노-말단을 포함할 것이다. 본원에서 바람직한 다가 항체는 3개 내지 약 8개, 그러나, 바람직하게는 4개의 항원 결합 부위를 포함한다 (또는 그로 구성된다). 다가 항체는 적어도 하나의 폴리펩티드 쇄 (및 적어도 2개의 폴리펩티드 쇄)를 포함하는 반면, 폴리펩티드 쇄(들)는 2개 이상의 가변 영역을 포함한다. 예를 들면, 폴리펩티드 쇄(들)는 $VD1-(X1)_n-VD2-(X2)_n-Fc$ (여기에서, $VD1$ 은 제 1 가변 영역이고, $VD2$ 는 제 2 가변 영역이며, Fc 는 Fc 부위 중 하

나의 폴리펩티드 쇄이고, X₁ 및 X₂는 아미노산 또는 폴리펩티드를 나타내고, n은 0 또는 1이다)를 포함할 수 있다. 예를 들면, 폴리펩티드 쇄(들)은 VH-CH1-가요성 링커-VH-CH1-Fc 부위 쇄; 또는 VH-CH1-VH-CH1-Fc 부위 쇄를 포함할 수 있다. 본원에서 다가 항체는 바람직하게 적어도 2개의 (및 바람직하게 4개) 경쇄 가변 영역 폴리펩티드를 추가로 포함한다. 본원에서 다가 항체는 예를 들면, 약 2개 내지 약 8개의 경쇄 가변 영역 폴리펩티드를 포함할 수 있다. 본원에서 주시되는 경쇄 가변 영역 폴리펩티드는 경쇄 가변 영역을 포함하고, 대개는 CL 영역을 추가로 포함한다.

[0199] 효과기 작용 공학처리

예를 들면, 암 치료에서 항체의 유효성을 증진시키기 위해, 효과기 작용과 관련된 본 발명의 항체를 변형시키는 것이 바람직할 수 있다. 예를 들면, 시스테인 잔기(들)을 Fc 부위에 도입하여 상기 부위에서 쇄간(interchain) 디설파이드 결합이 가능하도록 할 수 있다. 이렇게 생성된 동종이량체 항체는 개선된 내재화능 및/또는 증가된 보체-매개성 세포 사멸 및 항체-의존 세포 세포독성 (ADCC)을 가질 수 있다 ([Caron et al, J. Exp Med. 176:1191-1195 (1992)] 및 [Shopes, B. J. Immunol. 148:2918-2922 (1992)] 참조). 항-종양 활성이 증진된 동종이량체 항체는 또한 [Wolff et al. Cancer Research 53 :2560-2565 (1993)]에 기술된 바와 같이 이종이관성 가교제를 사용하여 제조될 수 있다. 다른계는, 항체를 이중 Fc 부위를 갖는 것으로 공학처리할 수 있고, 이로써, 보체 용해 및 ADCC 수행능을 증진시킬 수 있다 ([Stevenson et al. Anti-Cancer Drug Design 3:219-230 (1989)] 참조). 항체의 혈청내 반감기를 증가시키기 위해 예를 들면, 미국 특허 제 5,739,277호에 기술된 바와 같이 구제(salvage) 수용체 결합 에피토프를 항체 (특히, 항체 단편)내로 흔입시킬 수 있다. 본원에서 사용되는 바, 용어 "구제 수용체 결합 에피토프"는 IgG 분자의 생체내의 혈청내 반감기 증가의 원인이 되는 IgG 분자 (예로서, IgG₁, IgG₂, IgG₃ 또는 IgG₄)의 Fc 부위의 에피토프를 언급한다.

[0201] 면역컨쥬게이트

본 발명은 세포독성제, 예로서, 화학요법제, 독소 (예로서, 세균, 진균, 식물 또는 동물 기원의 효소적으로 활성인 독소 또는 그의 단편), 또는 방사성 동위원소 (즉, 방사성컨쥬게이트(radioconjugate))와 컨쥬게이션된 본원에 기술된 항체를 포함하는 면역컨쥬게이트를 포함한다. 다양한 방사선핵종이 방사성컨쥬게이트된 항체 생산에 이용될 수 있다. 예를 들면, 제한하는 것은 아니지만, 예로서, ²¹¹At, ¹³¹I, ¹³¹In, ⁹⁰Y, ¹⁸⁶Re을 포함한다.

[0203] 상기 면역컨쥬게이트 생성에 유용한 화학요법제는 상기에 기술되어 있다. 예를 들면, BCNU, 스트렙토조신, 빈크리스틴, 5-플루오로우라실, 미국 특허 제 5,053,394호, 제 5,770,710호에 기술된, 총괄적으로 LL-E33288 착화합물로서 공지되어 있는 제제 계열, 에스페라마이신 (미국 특허 제 5,877,296호) 등 (본원의 화합요법제에 대한 정의도 참조한다)은 항-ANGPTL4, 항- $\alpha_v\beta_5$ 또는 항-혈관신생 항체 또는 그의 단편과 컨쥬게이션될 수 있다.

[0204] 종양의 선택적 파괴를 위해, 항체는 고도의 방사능 원자를 포함할 수 있다. 다양한 방사성 동위원소를 방사성 컨쥬게이션된 항-ANGPTL4 또는 항-혈관신생 항체 또는 그의 단편의 생산을 위해 이용할 수 있다. 일례로, 제한하는 것은 아니지만, 예로서, ²¹¹At, ¹³¹I, ¹²⁵I, ⁹⁰Y, ¹⁸⁶Re, ¹⁸⁸Re, ¹⁵³Sm, ²¹²Bi, ³²P, ¹¹¹In, 및 Lu의 방사성 동위원소 등을 포함한다. 진단용으로서 컨쥬게이트를 사용할 경우, 섭광조영술 연구를 위한 방사능 원자, 예를 들면, ^{99m}tc 또는 ¹²³I, 또는 핵자기공명 (NMR) 영상 (자기공명영상, MRI으로도 공지되어 있음)을 위한 스픬 표지, 예로서, 요오드-123, 요오드-131, 인듐-111, 불소-19, 탄소-13, 질소-15, 산소-17, 가돌리늄, 마그네슘 또는 철을 포함할 수 있다.

[0205] 방사선- 또는 다른 표지를 공지된 방법으로 컨쥬게이트에 흔입시킬 수 있다. 예를 들면, 웨პ티드를 생합성시킬 수 있거나 예를 들면, 수소 대신 불소-19를 포함하는 적절한 아미노산 전구체를 사용하여 화학적 아미노산 합성에 의해 합성할 수 있다. 표지, 예로서, ^{99m}tc 또는 ¹²³I, ¹⁸⁶Re, ¹⁸⁸Re 및 ¹¹¹In은 웨პ티드 중 시스테인 잔기를 통해 부착될 수 있다. 이트륨-90은 리신 잔기를 통해 부착될 수 있다. IODOGEN 방법 [Fraker et al (1978) Biochem. Biophys. Res. Commun. 80: 49-57 (1978)]을 사용하여 요오드-123를 흔입시킬 수 있다. 예로서, 다른 방법을 상세한 설명하는 [Monoclonal Antibody in Immunoscintigraphy (Chatal, CRC Press 1989)]을 참조한다.

[0206] 효소적으로 활성인 독소 및 사용될 수 있는 그의 단편은 디프테리아 A 쇄, 디프테리아 독소의 비결합 활성 단편, 외독소 A 쇄 (슈도모나스 아에루기노사(*Pseudomonas aeruginosa*)로부터 유래됨), 리신 A 쇄, 아브린 A 쇄, 모데신 A 쇄, 알파-사르신, 알레우리테스 포르디이(*Aleurites fordii*) 단백질, 디안틴 단백질, 파이토라카

아메리카나(*Phytolaca americana*) 단백질 (PAPI, PAP II 및 PAP-S), 모모르디카 카란티아 저해제, 쿠르신, 크로틴, 사파오나리아 오피시날리스 저해제, 겔로닌, 미토겔린, 레스트릭토신, 폐노마이신, 네오마이신 및 트리코테센을 포함한다 (예를 들면, 1993년 10월 28일 공개된 WO 93/21232 참조).

[0207] 항체와 세포독성제와의 컨쥬게이트는 다양한 이관능성 단백질 커플링제, 예를 들면, N-숙신이미딜-3-(2-피리딜디티올) 프로피오네이트 (SPDP), 숙신이미딜-4-(N-말레이미도메틸) 사이클로헥산-1-카르복실레이트, 이미노티올란 (IT), 이미도에스테르의 이관능성 유도체 (예로서, 디메틸 아디프이미레이트 HCL), 활성 에스테르 (예로서, 디숙신이미딜 수베레이트), 알데하이드 (예로서, 글루타르알데하이드), 비스-아지도 화합물 (예로서, 비스-(p-아지도벤조일) 헥산디아민), 비스-디아조늄 유도체 (예로서, 비스-(p-디아조늄벤조일)-에틸렌디아민), 디이소시아네이트 (예로서, 톨리엔 2,6-디이소시아네이트) 및 비스-활성 불소 화합물 (예로서, 1,5-디플루오로-2,4-디니트로벤젠)을 사용하여 제조할 수 있다. 예를 들면, 리신 면역독소는 문헌 [Vitetta et al. *Science* 238:1098 (1987)]에 기재된 바와 같이 제조할 수 있다. 탄소-14-표지된 1-이소티오시아네이토벤질-3-메틸디에틸렌 트리아민펜타아세트산 (MX-DPTA)은 항체에 대한 방사선핵종의 컨쥬게이션을 위한 일례의 퀄레이트화제이다 (WO 94/11026 참조). 링커는 세포내에서 세포독성 약물의 방출을 촉진시키는 "절단가능한 링커"일 수 있다. 예를 들면, 산-불안정 링커, 웹티다제-감수성 링커, 디메틸 링커 또는 디설파이드-함유 링커 ([Chari et al. *Cancer Research* 52:127-131(1992)]; 미국 특허번호 제 5,208,020호 참조)를 사용할 수 있다.

[0208] 다르게는, 예로서, 재조합 기술 또는 웹티드 합성에 의해 항-ANGPTL4, 항- $\alpha_v\beta_5$, 또는 항-혈관신생 항체 및 세포독성제를 포함하는 응합 단백질을 제조할 수 있다. 일정 길이의 DNA는 서로서로 인접하거나 컨쥬게이트의 원하는 성질을 파괴하지 않는 링커 웹티드를 코딩하는 부위에 의해 분리된, 컨쥬게이트중의 2개의 부위를 코딩하는 각 부위를 포함할 수 있다.

[0209] 특정 실시태양에서, 항체는 항체-수용체 컨쥬게이트를 환자에 투여한 후, 제거제를 사용하여 순환으로부터 결합하지 않은 컨쥬게이트를 제거한 후, 세포독성제 (예로서, 방사선핵종)에 컨쥬게이션된 "리간드" (예로서, 아비딘)를 투여하는 종양의 예비표적화에 사용하기 위해 "수용체" (예로서, 스트렙트아비딘)에 컨쥬게이션된다. 특정 실시태양에서, 면역컨쥬게이트는 항체와 핵산분해 활성을 갖는 화합물 (예로서, 리보뉴클레아제 또는 DNA 엔도뉴클레아제, 예로서, 테옥시뉴클레아제; Dnase) 사이에서 형성된다.

메이탄신(maytansine) 및 메이탄시노이드(maytansinoids)

[0211] 본 발명은 하나 이상의 메이탄시노이드 분자와 컨쥬게이션된 본 발명의 항체를 제공한다. 메이탄시노이드는 튜불린 중합반응을 저해함으로써 작용하는 유사분열 저해제이다. 메이탄신은 최초로 동아프리카 관목 멤이테누스 세라타(*Maytenus serrata*)로부터 단리되었다 (미국 특허번호 제 3,896,111호). 이후, 특정 미생물 또한 메이탄시노이드, 예로서, 메이탄시놀 및 C-3 메이탄시놀 에스테르를 생산한다는 것이 발견되었다 (미국 특허번호 제 4,151,042호). 합성 메이탄시놀 및 그의 유도체 및 유사체가 예를 들면, 미국 특허번호 제 4,137,230호; 제 4,248,870호; 제 4,256,746호; 제 4,260,608호; 제 4,265,814호; 제 4,294,757호; 제 4,307,016호; 제 4,308,268호; 제 4,308,269호; 제 4,309,428호; 제 4,313,946호; 제 4,315,929호; 제 4,317,821호; 제 4,322,348호; 제 4,331,598호; 제 4,361,650호; 제 4,364,866호; 제 4,424,219호; 제 4,450,254호; 제 4,362,663호; 및 제 4,371,533호에 기술되어 있다.

[0212] 항-ANGPTL4, 항- $\alpha_v\beta_5$, 또는 항-혈관신생 항체는 항체 또는 메이탄시노이드 분자의 생물학적 활성을 현저히 감소시키지 않으면서 메이탄시노이드 분자에 컨쥬게이션된다. 정확하게 1개의 독소/항체 분자가 네이키드(naked) 항체에 대하여 세포독성을 증진시킬 것으로 예상되었지만, 항체 분자당 평균 3-4개의 컨쥬게이션된 메이탄시노이드 분자가 항체의 작용 또는 가용성에 대한 부작용없이 표적 세포의 세포독성을 증진시키는 효능을 나타내었다. 메이탄시노이드는 본 분야에 잘 공지되어 있고 공지된 기술에 의해 합성할 수 있거나 천연 공급원으로부터 단리될 수 있다. 적절한 메이탄시노이드는 예를 들면, 미국 특허번호 제 5,208,020호, 및 본원의 상기에서 언급한 다른 특허 및 비특허 공개문헌에 기술되어 있다. 실시태양에서, 메이탄시노이드는 메이탄시놀 및 방향족 환 또는 메이탄시놀 분자의 다른 위치에서 변형된 메이탄시놀 유사체, 예로서, 다양한 메이탄시놀 에스테르일 수 있다.

[0213] 본 분야에는 항체-메이탄시노이드 컨쥬게이트를 제조하기 위한 다수의 연결기(linking group)가 공지되어 있고, 예를 들면, 미국 특허번호 제 5,208,020호 또는 유럽 특허 0425 235 B1, 및 [Chari et al., *Cancer Research* 52:127-131 (1992)]에 기술된 것을 포함한다. 연결기는 상기-확인된 특허에 기술된 바와 같은 디설파이드기, 티오에테르기, 산에 불안정한(acid labile) 기, 광분해성 기, 웹티다제에 불안정한 기, 또는 에스터라제에 불안

정한 기를 포함하고, 디설파이드 및 티오에테르기가 바람직하다.

[0214] 항체 및 메이탄시노이드의 컨쥬케이트는 다양한 이관능성 단백질 커플링제, 예를 들면, N-숙신이미딜-3-(2-페리딜디티올) 프로피오네이트 (SPDP), 숙신이미딜-4-(N-말레이미도메틸) 사이클로헥산-1-카르복실레이트, 이미노티울란 (IT), 이미도에스테르의 이관능성 유도체 (예로서, 디메틸 아디프이미데이트 HCL), 활성 에스테르 (예로서, 디숙신이미딜 수베레이트), 알데하이드 (예로서, 글루타르알데하이드), 비스-아지도 화합물 (예로서, 비스-(p-아지도벤조일) 헥산디아민), 비스-디아조늄 유도체 (예로서, 비스-(p-디아조늄벤조일)-에틸렌디아민), 디이소시아네이트 (예로서, 톨리엔 2,6-디이소시아네이트) 및 비스-활성 불소 화합물 (예로서, 1,5-디플루오로-2,4-디니트로벤젠)을 사용하여 제조할 수 있다. 전형적인 커플링제로서는 디설파이드 결합을 제공하는 N-숙신이미딜-3-(2-페리딜디티올) 프로피오네이트 (SPDP) [Carlsson et al., *Biochem. J.* 173:723-737 [1978]] 및 N-숙신이미딜-4-(2-페리딜티오)펜타노에이트 (SPP)를 포함한다.

[0215] 결합 타입에 따라 링커는 메이탄시노이드 분자의 다양한 위치에 부착될 수 있다. 예를 들면, 통상의 커플링 기술을 사용하여 하이드록실기와 반응함으로써 에스테르 결합이 형성될 수 있다. 반응은 하이드록실기를 갖는 C-3번 위치, 하이드록시메틸로 변형된 C-14번 위치, 하이드록실기로 변형된 C-15번 위치, 및 하이드록실기로 변형된 C-20번 위치에서 발생할 수 있다. 결합은 메이탄시놀 또는 메이탄시놀 유사체의 C-3번 위치에서 형성된다.

칼리케아미신(calicheamicin)

[0216] 관심의 대상이 되는 또 다른 면역컨쥬케이트는 하나 이상의 칼리케아미신 분자에 컨쥬케이션된 본 발명의 항체를 포함한다. 항생제 중 칼리케아미신 계열은 서브-피코몰 농도로 더블-스트랜드 DNA 손상을 유발할 수 있다. 칼리케아미신 계열의 컨쥬케이트를 제조를 위해 미국 특허 제 5,712,374호, 제 5,714,586호, 제 5,739,116호, 제 5,767,285호, 제 5,770,701호, 제 5,770,710호, 제 5,773,001호, 제 5,877,296호 (모두 아메리칸 시아나미드 컴퍼니(American Cyanamid Company)의 특허임)를 참조한다. 사용될 수 있는 칼리케아미신의 구조적 유사체로서, 제한하는 것은 아니지만, 칼리케아미신의 구조적 유사체에는 γ_1^I , α_2^I , α_3^I , N-아세틸- γ_1^I , PSAG 및 Θ_1^I 을 포함한다 ([Hinman et al., *Cancer Research* 53:3336-3342 (1993)], [Lode et al., *Cancer Research* 58:2925-2928 (1998)] 및 아메리칸 시아나미드 컴퍼니의 상기 미국 특허). 항체가 컨쥬케이션될 수 있는 또 다른 항-종양 약물은 안티폴레이트인 QFA이다. 칼리케아미신과 QFA 둘 모두는 세포내 작용 부위를 갖고, 이들은 원형질막을 용이하게 통과하지 못한다. 그러므로, 항체에 의해 매개되는 내재화를 통해 이를 제제를 세포내로 흡수시키면 이들의 세포독성 효과가 크게 상승된다.

다른 항체 변형

[0217] 본원에서는 상기 항체의 다른 변형도 주시된다. 예를 들면, 항체는 다양한 비단백질성 중합체 중 하나, 예로서, 폴리에틸렌 글리콜, 폴리프로필렌 글리콜, 폴리옥시알킬렌, 또는 폴리에틸렌 글리콜 및 폴리프로필렌 글리콜의 공중합체에 연결될 수 있다. 항체는 또한 코아세르베이션 (coacervation) 기술 또는 계면 중합 반응 (예를 들면, 각각 하이드록시메틸셀룰로스 또는 젤라틴-미소캡슐 및 폴리-(메틸메타크릴레이트) 미소캡슐)에 의해 제조된 미소캡슐 내에 넣어 콜로이드성 약물 전달 시스템 (예를 들면, 리포좀, 알부민 미소구, 마이크로에멀젼, 나노-입자 및 나노-캡슐) 또는 마크로에멀젼의 형태로 제조될 수 있다. 이러한 기술은 [*Remington's Pharmaceutical Sciences*, 16th edition, Oslo, A., Ed., (1980)]에 기술되어 있다.

리포좀 및 나노입자

[0220] 본 발명의 폴리펩티드는 리포좀으로 제제화할 수도 있다. 예를 들면, 본 발명의 항체는 면역리포좀으로 제제화될 수도 있다. 항체를 포함하는 리포좀을 본 분야에 공지된 방법, 예로서, ([Epstein et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82:3688 (1985)]; [Hwang et al., *Proc. Natl Acad. Sci USA*, 77:4030 (1980)]; 및 미국 특허번호 제 4,485,045호 및 제 4,544,545호)에 기술된 방법에 의해 제조한다. 순환 시간이 증가된 리포좀은 미국 특허 제 5,013,556호에 기술되어 있다. 일반적으로, 리포좀 제형 및 용도는 본 분야의 기술자에게 공지되어 있다.

[0221] 특히 유용한 리포좀은 포스파티딜콜린, 콜레스테롤 및 PEG-유도체화 포스파티딜에탄올아민(PEG-PE)을 함유하는 지질 조성물을 사용하여 역상 증발법에 의해 제조할 수 있다. 정해진 공극 크기의 필터를 통해 리포좀을 밀어내어 소정의 직경을 갖는 리포좀을 수득한다. [Martin et al., *J. Biol. Chem.*, 257:286-288 (1982)]에 기술된 바와 같이, 디설파이드 교환 반응을 통해 본 발명의 항체의 Fab' 단편을 리포좀에 컨쥬케이션시킬 수 있다. 임의로는, 화학요법제 (예로서, 독소루비신)를 리포좀내에 포함시킨다 (참조 [Gabizon et al., *J.*

National Cancer Inst., 81(19):1484 (1989)].

[0223] 다른 용도

본 발명의 항체는 다양한 유용성을 갖는다. 예를 들면, 항-ANGPTL4 항체는 암 발견을 위해 (예로서, 콩팥 암의 발견시) 특이적인 세포, 조직, 또는 혈청내 그의 발현을 검출하는 것과 같은 ANGPTL4에 대한 진단 분석법에 사용될 수 있다. 실시태양에서, ANGPTL4 항체는 본원에서 제공된 방법을 사용하는 요법에 대한 환자 군집, 예로서, ANGPTL4이 발현되거나, ANGPTL4 수준이 증가하였거나, ANGPTL4 수준에 대하여 민감성이 암을 갖는 환자를 선별하는데 사용된다. 본 분야에 공지된 다양한 진단 분석 기술, 예로서, 경쟁 결합 분석법, 직접 또는 간접 샌드위치 분석법 및 이질 또는 동질 상에서 수행되는 면역침전 분석법을 사용할 수 있다 [Zola, *Monoclonal Antibody: A Manual of Techniques*, CRC Press, Inc. (1987) pp. 147-158]. 진단 분석법에서 사용하는 항체를 검출가능한 부위로 표지할 수 있다. 검출가능한 부위는 검출가능한 시그널을 직접 또는 간접적으로 제시할 수 있어야 한다. 예를 들면, 검출가능한 부위는 방사성 동위 원소, 예로서, ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S , 또는 ^{125}I , 형광 또는 화학적 발광 화합물, 예로서, 형광물질 이소티오시아네이트, 로다민, 또는 루시페린, 또는 효소, 예로서, 알칼리성 인산분해효소, 베타-갈락토시다아제 또는 홍당무 과산화효소일 수 있다. 본 분야에 공지된 항체와 검출가능한 부위를 전유게이션시키는 임의의 방법을 사용할 수 있고, 이는 ([Hunter et al., *Nature*, 144:945 (1962)]; [David et al., *Biochemistry*, 13:1014 (1974)]; [Pain et al., *J. Immunol. Meth*, 40:219 (1981)]; 및 [Nygren, *J. Histochem. And Cytochem.*, 30:407 (1982)])에 기술된 방법을 포함한다.

[0225] 항-ANGPTL4 항체는 또한 재조합 세포 배양물 또는 천연 공급원으로부터의 ANGPTL4 또는 ANGPTL4 단편의 친화성 정제에 유용하다. 상기 공정에서, ANGPTL4에 대한 항체를 본 발명에 잘 공지되어 있는 방법을 사용하여 적절한 지지체, 예로서, 세파덱스(Sephadex) 수지 또는 여과지상에 고정시킨다. 이어서, 고정된 항체를 정제하고자 하는 ANGPTL4를 포함하는 샘플과 접촉시킨 후, 고정된 항체에 결합한 ANGPTL4를 제외한 샘플중의 모든 물질을 실질적으로 제거하는 적절한 용매로 지지체를 세척한다. 최종적으로, 항체로부터 ANGPTL4를 유리시키는 또 다른 적절한 용매로 지지체를 세척한다.

[0226] 본 발명의 폴리펩티드에 대한 공유 변형(covalent modification)

[0227] 본 발명의 폴리펩티드, 예로서, 폴리펩티드 길항체 단편, 융합 분자 (예로서, 면역융합 분자), 본 발명의 항체의 공유 변형이 본 발명의 범주내 포함된다. 화학적 합성 또는 적용가능하다면, 폴리펩티드의 효소적 또는 화학적 절단에 의해 제조될 수 있다. 폴리펩티드의 표적화된 아미노산 잔기를 선별된 측쇄 또는 N- 또는 C-말단 잔기와 반응할 수 있는 유기 유도화제와 반응시키거나, 변형된 아미노산 또는 자연발생되지 않은 아미노산을 신장성(growing) 폴리펩티드 쇄내로 도입시킴으로써 다른 타입의 폴리펩티드 공유 변형을 분자내 도입시킨다 (예로서, [Ellman et al. *Meth. Enzym.* 202:301-336 (1991)]; [Noren et al. *Science* 244:182 (1989)]; 및 미국 특허출원 공개번호 제 20030108885호 및 제 20030082575호 참조).

[0228] 가장 보편화된 시스테이닐 잔기는 α -할로아세테이트 (및 상응하는 아민), 예로서, 클로로아세트산 또는 클로로아세트아미드와 반응하여 카복시메틸 또는 카복시아미도메틸 유도체를 제공한다. 시스테이닐 잔기는 또한 브로모트리플루오로아세톤, α -브로모- β -(5-이미도조일)프로피온산, 클로로아세틸 포스페이트, N-알킬말레이미드, 3-나트로-2-피리딜 디설파이드, 메틸 2-피리딜 디설파이드, p-클로로머큐리벤조에이트, 2-클로로머큐리-4-나트로페놀, 또는 클로로-7-나트로벤조-2-옥사-1,3-디아졸과의 반응에 의해 유도화된다.

[0229] 디에틸피로카보네이트는 히스티딜 측쇄에 대하여 상대적으로 특이적이기 때문에 히스티딜 잔기는 pH 5.5-7.0의 상기 시약과 반응함으로써 유도화된다. 파라-브로모페나실 브로마이드 또한 유용하고; 상기 반응은 전형적으로 pH 6.0의 0.1 M 소듐 카코딜레이트에서 실시된다.

[0230] 리시닐 및 아미노-말단 잔기는 숙신산 또는 다른 카복실산 무수물과 반응한다. 상기 시약과의 유도화는 리시닐 잔기의 전하를 가역화시키는 효과를 갖는다. α -아미노-포함 잔기를 유도화시키는 다른 적절한 시약으로서 이미도에스테르 예로서, 메틸 피콜린이미데이트, 피리독살 포스페이트, 피리독살, 클로로보로하이드라이드, 트리니트로벤젠설폰산, O-메틸리소우레아, 2,4-펜탄디온, 및 글리옥실산과의 촉매화된 반응을 위한 아미노전이효소를 포함한다.

[0231] 아르기닐 잔기는 하나 또는 수개의 종래의 시약, 그들 중 폐닐글리옥살, 2,3-부탄디온, 1,2-사이클로헥산디온, 및 닌히드린과의 반응에 의해 변형된다. 구아닌дин 판능기의 pK_a 가 높기 때문에 아르기닌 잔기의 유도화는 반응을 알칼리성 조건하에서 실시할 것을 요한다. 추가로, 상기 시약은 리신기 뿐만 아니라 아르기닌 엡실론-아미

노기와 반응할 수 있다.

- [0232] 특히 관심의 대상이 되는 것으로, 방향족 디아조늄 화합물 또는 테트라니트로메탄과의 반응에 의해 스펙트럼 표지를 티로실 잔기내로 도입할 때 티로실 잔기를 특이적으로 변형시킬 수 있다. 가장 보편적으로, N-아세틸이미디졸 및 테트라니트로메탄을 사용하여 각각 0-아세틸 티로실 종 및 3-니트로 유도체를 형성한다. ^{125}I 또는 ^{131}I 를 사용하여 티로실 잔기를 요오드화시켜 방사면역측정법에서 사용하기 위한 표지된 단백질을 제조한다.
- [0233] 카보디이미드 ($\text{R}-\text{N}=\text{C}=\text{N}-\text{R}'$) (여기에서, R 및 R'은 상이한 알킬기이다), 예로서, 1-사이클로헥실-3-(2-모르폴리닐-4-에틸) 카보디이미드 또는 1-에틸-3-(4-아조니아-4,4-디메틸펜닐) 카보디이미드와의 반응에 의해 카복실 측쇄기 (아스파тиль 또는 글루타밀)는 선별적으로 변형된다. 추가로, 아스파티ль 및 글루타밀 잔기는 암모늄 이온과의 반응에 의해 아스파라기닐 및 글루타미닐 잔기로 전환된다.
- [0234] 빈번하게 글루타미닐 및 아스파라기닐 잔기는 각각 상응하는 글루타밀 및 아스파티릴 잔기로 탈아미드화된다. 상기 잔기는 중성 또는 염기성 조건하에서 탈아미드화된다. 상기 잔기의 탈아미드화된 형태는 본 발명의 범주에 포함된다.
- [0235] 다른 변형으로서 프롤린 및 리신의 하이드록실화, 세릴 또는 트레오닐 잔기의 하이드록실기의 인산화, 리신, 아르기닌, 및 히스티딘 측쇄의 α -아미노기의 메틸화 [T.E. Creighton, *Protein: Structure and Molecular Properties*, W.H. Freeman & Co., San Francisco, pp. 79-86 (1983)], N-말단 아민의 아세틸화, 및 임의의 C-말단 카복실기의 아미드화를 포함한다.
- [0236] 또다른 타입의 공유 변형으로서 글리코시드를 본 발명의 폴리펩티드에 화학적으로 또는 효소적으로 커플링시키는 것을 포함한다. 상기 방법들은 N- 또는 O-연결된 글라이코실화에 대한 글라이코실화 능력을 갖는 숙주 세포에서 폴리펩티드의 생산을 요하지 않는다는 점에서 유리하다. 사용되는 커플링 모드에 따라, 당(들)은 (a) 아르기닌 및 히스티딘, (b) 유리 카복실기, (c) 유리 설프하이드릴기, 예로서, 시스테인의 것, (d) 유리 하이드록실기, 예로서, 세린, 트레오닌, 또는 하이드록시프롤린의 것, (e) 방향족 잔기, 예로서, 페닐알라닌, 티로신, 또는 트립토판의 것, 또는 (f) 글루타민의 아미드기에 부착할 수 있다. 상기 방법은 1987년 9월 11일에 공개된 WO 87/05330, 및 [Aplin and Wriston, *CRC Crit. Rev. Biochem.*, pp. 259-306 (1981)]에 기술되어 있다.
- [0237] 본 발명의 폴리펩티드에 존재하는 임의의 탄수화물 부위의 제거는 화학적으로 또는 효소적으로 수행될 수 있다. 화학적 탈글라이코실화는 화합물 트리플루오로메탄설폰산, 또는 동등한 화합물에 대한 폴리펩티드의 노출을 필요로 한다. 상기 요법은 연결 당 (N-아세틸글루코사민 또는 N-아세틸갈اكت오사민)을 제외한 대부분 또는 모든 당을 절단시키면서, 폴리펩티드는 무손상 상태로 놓아둔다. 화학적 탈글라이코실화는 ([Hakimuddin, et al. *Arch. Biochem. Biophys.* 259:52 (1987)] 및 [Edge et al. *Anal. Biochem.*, 118:131 (1981)])에 기술되어 있다. 예로서, 항체상의 탄수화물 부위의 효소적 절단은 [Thotakura et al. *Meth. Enzymol.* 138:350 (1987)]에 기술된 바와 같이 다양한 엔도- 및 엑소-글리코시다제의 사용에 의해 수행될 수 있다.
- [0238] 본 발명의 폴리펩티드의 또다른 타입의 공유 변형은 미국 특허번호 제 4,640,835호; 제 4,496,689호; 제 4,301,144호; 제 4,670,417호; 제 4,791,192호 또는 제 4,179,337호에 설명된 방식으로 다양한 비단백질성 중합체 중 하나, 예로서, 폴리에틸렌 글리콜, 폴리프로필렌 글리콜, 또는 폴리옥시알킬렌에 폴리펩티드를 연결시키는 것을 포함한다.
- [0239] **벡터, 숙주 세포 및 재조합 방법**
- [0240] 본 발명의 폴리펩티드는 용이하게 수득할 수 있는 재료 및 기술을 사용하여 재조합적으로 생산할 수 있다.
- [0241] 본 발명의 폴리펩티드, 예로서, ANGPTL4 또는 항-ANGPTL4 항체, 항- $\alpha_v\beta_5$ 항체 또는 항-혈관신생 항체, 예로서, 항-VEGF 항체의 재조합 생산을 위해 그를 코딩하는 핵산을 단리시키고 추가의 클로닝 (DNA의 증폭) 또는 발현을 위해 복제가능한 벡터내로 삽입시킨다. 본 발명의 폴리펩티드를 코딩하는 DNA를 용이하게 단리시키고 통상의 방법을 사용하여 서열화한다. 예를 들면, 모노클로날 항체를 코딩하는 DNA를 단리시키고, 예로서, 항체의 중쇄 및 경쇄를 코딩하는 유전자에 특이적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오티드 프로브를 사용하여 서열화한다. 다수의 벡터가 이용될 수 있다. 벡터 성분으로서 제한하는 것은 아니지만, 일반적으로 하기 중 하나 이상을 포함한다: 시그널 서열, 복제 기점, 하나 이상의 마커 유전자, 인핸서 요소, 프로모터, 및 전사 종결 서열.
- [0242] **시그널 서열 성분**

- [0243] 본 발명의 폴리펩티드는 직접적으로 재조합 생산될 수 있을 뿐만 아니라, 이종 폴리펩티드와의 융합 폴리펩티드로서 재조합 생산될 수 있고, 이는 전형적으로 시그날 서열 또는 성숙한 단백질 또는 폴리펩티드의 N-말단에 특이적인 절단 부위를 갖는 다른 폴리펩티드이다. 전형적으로 선별된 이종 시그날 서열은 숙주 세포에 의해 인식되고 프로세싱 (즉, 시그날 펩티다제에 의해 절단됨)되는 것이다. 천연 폴리펩티드 시그날 서열을 인식하지 못하고 프로세싱하지 못하는 원핵생물 숙주 세포의 경우, 시그날 서열은 예를 들면, 알칼리성 인산분해효소, 페니실린 분해효소, lpp, 또는 내열성 장독소 II 리더 군으로부터 선별되는 원핵 시그날 서열에 의해 치환된다. 효모에서의 분비를 위해, 천연 시그날 서열은 예로서, 효모 역전효소 리더, α 인자 리더 (사카로마이세스 (*Saccharomyces*) 및 클루이베로마이세스 (*Kluyveromyces*) α-인자 리더 포함), 또는 산성 인산 분해효소 리더, 씨. 알비칸스 (*C. albicans*) 글루코아밀라제 리더, 또는 WO 90/13646에 기술된 시그날에 의해 치환될 수 있다. 포유동물 세포 발현에서, 포유동물 시그날 서열 뿐만 아니라 분비 리더, 예를 들면, 단순 헤르페스 gD 시그날이 이용가능하다.
- [0244] 상기 전구체 부위에 대한 DNA는 리딩 프레임에서 본 발명의 폴리펩티드를 코딩하는 DNA에 결찰된다.
- [0245] **복제 성분의 기원**
- [0246] 발현 및 클로닝 벡터 둘 모두는 하나 이상의 선별된 숙주 세포에서 벡터를 복제시킬 수 있는 핵산 서열을 포함한다. 일반적으로 클로닝 벡터에서 상기 서열은 숙주 염색체 DNA와 상관없이 벡터를 복제시킬 수 있는 것이고, 복제 기점 또는 자동 복제 서열을 포함한다. 상기 서열은 다양한 박테리아, 효모 및 바이러스에 대해 공지되어 있다. 플라스미드 pBR322로부터의 복제 기점은 대부분의 그람 음성 박테리아에 적합하고, 2 μ 플라스미드 복제 기점은 효모에 적합하고, 다양한 바이러스 복제 기점 (SV40, 폴리오마, 아데노바이러스, VSV 또는 BPV)은 포유동물 세포에서 벡터를 클로닝하는 데 유용하다. 일반적으로, 복제 기점 성분은 포유동물 발현 벡터에 대해서는 필요하지 않다 (SV40 기점은 단지 조기 프로모터를 포함하기 때문에 전형적으로 사용될 수 있다).
- [0247] **선별 유전자 성분**
- [0248] 발현 및 클로닝 벡터는 선별가능한 마커로서도 명명되는 선별 유전자를 포함한다. 예를 들면, 바실러스 (*Bacillus*)의 경우, D-알라닌 라세마제를 코딩하는 유전자와 같은 전형적인 선별 유전자는 (a) 항생제 또는 다른 독소, 예를 들어, 앰피실린, 네오마이신, 메토트렉세이트 또는 테트라사이클린에 대한 내성을 부여하는 단백질, (b) 영양요구성 결함을 보완하는 단백질 또는 (c) 복합 배지로부터 이용할 수 없는 중요한 영양물질을 공급하는 단백질을 코딩한다.
- [0249] 일례의 선별 방식에서는 숙주 세포의 성장을 정지시키는 약물을 사용한다. 이종 유전자를 사용하여 성공적으로 형질전환된 세포는 약물 내성을 부여하는 단백질을 생산하고, 이로써 선별 요법에서 살아남는다. 상기의 우성 선별의 예들은 약물 네오마이신, 피코페놀산 및 하이그로마이신을 사용한다.
- [0250] 포유동물 세포에 적절한 선별가능한 마커의 또 다른 예는 항체 핵산을 수용할 수 있는 세포를 동정할 수 있도록 하는 것, 예를 들어, DHFR 또는 티미딘 키나제, 메탈로티오네인-I 및 -II, 전형적으로, 영장류 메탈로티오네인 유전자, 아데노신 디아미나제, 오르니틴 디카르복실라제 등이다.
- [0251] 예를 들면, DHFR 선별 유전자로 형질전환된 세포는 먼저 DHFR의 경쟁 길항제인 메토트렉세이트 (Mtx)를 포함하는 배양 배지에 형질전환체 모두를 배양함으로써 동정된다. 야생형 DHFR를 사용할 경우, 적절한 숙주 세포는 DHFR 활성이 부족한 차이니즈 햄스터 난소 (CHO) 세포주이다.
- [0252] 다른 개는, 본 발명의 폴리펩티드, 야생형 DHFR 단백질을 코딩하는 DNA 서열, 및 다른 선별가능한 마커, 예로서, 아미노글리코시드 3'-포스포트랜스퍼라제 (APH)를 코딩하는 DNA 서열로 형질전환 또는 공-형질전환된 숙주 세포 (특히, 내인성 DHFR을 포함하는 야생형 숙주)는 선별가능한 마커에 대한 선별 인자, 예로서, 아미노글리코사이드 항생제, 예로서, 카나마이신, 네오마이신, 또는 G418을 포함하는 배지중의 세포 성장에 의해 선별될 수 있다. 미국 특허번호 제 4,965,199호를 참조한다.
- [0253] 효모에 사용하기에 적절한 선별 유전자는 효모 플라스미드 Yrp7에 존재하는 *trp1* 유전자이다 [Stinchcomb et al., *Nature*, 282:39 (1979)]. *trp1* 유전자는 트립토판을 이용해 성장하는 능력이 결여된 효모의 변이주, 예를 들어, ATCC 44076 또는 PEP4-1에 대한 선별 마커를 제공한다 [Jones, *Genetics*, 85: 12 (1977)]. 이어서, 효모 숙주 세포 게놈내 *trp1* 병변의 존재는 트립토판 부재하의 성장에 의한 형질전환을 검출하기에 유효한 환경을 제공한다. 유사하게, *Leu2*-결여된 효모 균주 (ATCC 20,622 또는 38,626)는 *Leu2* 유전자를 수반하는 공지된 플라스미드에 의해 보충된다.

[0254] 추가로, 1.6 μm 환상 플라스미드 pKD1로부터 유래된 벡터를 사용하여 클루이베로마이세스(*Kluyveromyces*) 효모를 형질전환시킬 수 있다. 다르게는, 재조합 송아지 키모신의 대규모 생산을 위한 발현 시스템은 *K. lactis*에 대해 보고되어 있다 [Van den Berg, *Bio/Technology*, 8:135 (1990)]. 산업상의 클루이베로마이세스(*Kluyveromyces*) 균주에 의한 성숙한 재조합 인간 혈청 알부민의 분비를 위한 안정한 다중-카피 발현 벡터 또한 기술되어 있다 [Fleer et al, *Bio/Technology*, 9:968-975 (1991)].

[0255] 프로모터 성분

[0256] 발현 및 클로닝 벡터는 일반적으로 숙주 유기체에 의해 인식되고 본 발명의 폴리펩티드를 코딩하는 핵산에 작동 가능하게 연결되어 있는 프로모터를 포함한다. 원핵생물 숙주와 함께 사용하기에 적절한 프로모터는 *phoA* 프로모터, β -락타마제 및 락토스 프로모터 시스템, 알칼리성 인산분해효소, 트립토판 (*trp*) 프로모터 시스템, 및 하이브리드 프로모터, 예로서, *tac* 프로모터를 포함한다. 그러나, 다른 공지된 박테리아 프로모터도 적절하다. 박테리아 시스템에서 사용하기 위한 프로모터는 또한 본 발명의 폴리펩티드를 코딩하는 DNA에 작동 가능하게 연결된 샤인-달가노(Shine-Dalgarno) (S.D.) 서열을 포함할 것이다.

[0257] 프로모터 서열은 진핵생물에 대하여 공지되어 있다. 실제로, 모든 진핵생물 유전자는 전사가 개시되는 부위로부터 대략 25 내지 30개 염기만큼의 상류에 위치하는 AT가 풍부한 부위를 갖는다. 다수의 유전자의 전사 개시로부터 70 내지 80개 염기만큼의 상류에서 발견되는 또다른 서열은 CNCAAT 부위 (여기에서, N은 임의의 뉴클레오티드일 수 있다)이다. 대부분의 진핵생물 유전자의 3' 말단에는 코딩 서열의 3' 말단에 폴리 A를 첨가하기 위한 시그날일 수 있는 AATAAA 서열이 존재한다. 상기 서열 모두는 진핵생물 발현 벡터내로 적절하게 삽입된다.

[0258] 효모 숙주와 함께 사용하기 위한 적절한 프로모터 서열의 예로서, 3-포스포글리세레이트 키나제 또는 다른 해당 효소, 예로서, 에놀라제, 글리세르알데히드-3-포스페이트 탈수소효소, 핵소키나제, 피루베이트 탈카복실라제, 포스포프룩토키나제, 글루코오스-6-포스페이트 이소머라제, 3- 포스포글리세레이트 뮤타제, 피루베이트 키나제, 트리오스포스페이트 이소머라제, 포스포글루코오스 이소머라제, 및 글루코키나제에 대한 프로모터를 포함한다.

[0259] 성장 조건하에 조절되는 전사의 추가적인 잇점을 갖는 유도가능한 프로모터인 다른 효모 프로모터는 알코올 탈수소효소 2, 이소시토크롬 C, 산성 인산분해효소, 질소 대사물과 관련된 분해 효소, 메탈로티오네인, 글리세르알데히드-3-포스페이트 탈수소효소, 및 말토스 및 갈락토스 사용을 담당하는 효소에 대한 프로모터 부위이다. 효모 발현에 사용하기 위한 적절한 벡터 및 프로모터는 추가로 EP 73,657에 기술되어 있다. 효모 인핸서 또한 효모 프로모터와 함께 유리하게 사용된다.

[0260] 포유동물 숙주 세포에서 벡터로부터의 본 발명의 폴리펩티드의 전사는 예를 들면, 바이러스, 예로서, 폴리오마바이러스, 조류폭스 바이러스, 아데노바이러스 (예로서, 아데노바이러스 2), 소 유두종 바이러스, 조류 육종 바이러스, 시토메갈로바이러스, 레트로바이러스, B형 간염 바이러스 및 전형적으로, 원숭이 바이러스 40 (SV40)의 게놈으로부터 수득된 프로모터에 의해, 이종 포유동물 프로모터, 예로서, 액틴 프로모터 또는 면역글로불린 프로모터로부터, 열-쇼크 프로모터로부터 조절되되, 단, 상기 프로모터들은 숙주 세포 시스템과 적합성을 나타낸다.

[0261] SV40 바이러스의 조기 및 후기 프로모터는 SV40 바이러스의 복제 기점도 포함하는 SV40 제한 단편으로서 용이하게 수득된다. 인간 시토메갈로바이러스의 직전(immediate early) 프로모터는 HindIII E 제한 단편로서 용이하게 수득된다. 벡터로서 소 유두종 바이러스를 사용하는 포유동물 숙주에서 DNA를 발현시키는 시스템은 미국 특허 번호 제 4,419,446호에 기술되어 있다. 상기 시스템에 대한 변형은 미국 특허번호 제 4,601,978호에 기술되어 있다. 단순 헤르페스 바이러스로부터 유래된 티미딘 키나제 프로모터의 조절하에서 마우스 세포 중 인간 β -인터페론 cDNA를 발현시키는 것에 대하여는 [Reyes et al., *Nature* 297:598- 601 (1982)]를 참조한다. 다르게는, 라우스 육종 바이러스의 장쇄 말단 리피트는 프로모터로서 사용될 수 있다.

[0262] 인핸서 요소 성분

[0263] 고등 진핵생물에 의한 본 발명의 폴리펩티드를 코딩하는 DNA의 전사는 자주 인핸서 서열을 벡터내로 삽입시킴으로써 증가한다. 다수의 인핸서 서열은 현재 포유동물 유전자 (글로빈, 엘라스타제, 알부민, α -태아단백, 및 인슐린)로부터 공지되었다. 전형적으로, 진핵생물 세포 바이러스로부터의 인핸서를 사용할 것이다. 일례로, 복제 기점 (bp 100-270)의 후발 측(late side)상의 SV40 인핸서, 시토메갈로바이러스 조기 프로모터 인핸서, 복제 기점의 후발 측상의 폴리오마 인핸서, 및 아데노바이러스 인핸서를 포함한다. 진핵생물 프로모터의 활성화에 대한 인핸서 요소에 대하여는 [Yaniv, *Nature* 297:17-18 (1982)]를 참조한다. 인핸서는 폴리펩티드-코딩

서열에 대하여 위치 5'번 또는 3번'에서 벡터로 스플라이싱될 수 있지만, 전형적으로 프로모터로부터의 5'번 부위에 위치한다.

[0264] 전사 종결 성분

[0265] 진핵생물 숙주 세포 (효모, 진균, 곤충, 식물, 동물, 인간, 또는 다른 다세포 유기체로부터의 유핵 세포)에서 사용되는 발현 벡터는 또한 전사를 종결시키고 mRNA를 안정시키는데 필요한 서열을 포함할 것이다. 상기 서열은 보편적으로 진핵생물 또는 바이러스 DNAs 또는 cDNAs의 5'번 및, 때때로, 3'번의 비해독 부위로부터 이용가능하다. 상기 부위는 본 발명의 폴리펩티드를 코딩하는 mRNA의 비해독 부위에서 폴리아데닐화된 부위로서 전사되는 뉴클레오티드 세그먼트를 포함한다. 하나의 유용한 전사 종결 성분은 소 성장 호르몬 폴리아데닐화 부위이다. WO94/11026 및 본원에 기술된 발현 벡터를 참조한다.

[0266] 숙주 세포의 선별 및 형질전환

[0267] 본원의 벡터에서 본 발명의 폴리펩티드를 코딩하는 DNA를 클로닝하거나 발현시키는 데 적절한 숙주 세포는 상기 기술된 원핵생물, 효모, 또는 고등 진핵생물이다. 본 목적에 적절한 원핵생물은 유박테리아, 예로서, 그람-음성 또는 그람-양성 유기체, 예를 들면, 엔테로박테리아세(Enterobacteriaceae), 예로서, 에스케리키아(Escherichia), 예로서, 이. 콜라이(E. coli), 엔테로박터(Enterobacter), 어웨니아(Erwinia), 클렙시엘라(Klebsiella), 프로테우스(Proteus), 살모넬라(Salmonella), 예로서, 살모넬라 티피뮤리움(Salmonella typhimurium), 세라티아(Serratia), 예로서, 세라티아 마르세스칸스(Serratia marcescans), 및 시겔라(Shigella) 뿐만 아니라, 바실러스(Bacilli), 예로서, B. 섭틸러스(B. subtilis) 및 B. 리케니포미스(B. licheniformis) (예로서, 1989년 4월 12일 공개된 DD 266,710에 기술되어 있는 B. 리케니포미스(B. licheniformis) 41P), 슈도모나스(Pseudomonas), 예로서, P. 애루지노사(P. aeruginosa), 및 스트렙토마이세스(Streptomyces)를 포함한다. 다른 균주, 예로서, 이. 콜라이 B, 이. 콜라이 X1776 (ATCC 31,537), 및 이. 콜라이 W3110 (ATCC 27,325)도 적절하지만, 전형적으로, 이. 콜라이 클로닝 숙주는 이. 콜라이 294 (ATCC 31,446)이다. 상기 일례는 제한하기 보다는 설명하기 위한 것이다.

[0268] 원핵생물 외에도, 진핵 미생물, 예로서, 선형 진균 또는 효모가 본 발명의 폴리펩티드-코딩 벡터에 대하여 적절한 클로닝 또는 발현 숙주이다. 사카로마이세스 세레비제(Saccharomyces cerevisiae), 또는 통상의 베이커 효모가 하등의 진핵 숙주 미생물중에서 가장 보편적으로 사용된다. 그러나, 다수의 다른 속, 종, 및 균주가 보편적으로 이용될 수 있고 본원에서 유용하며, 예로서, 시조사카로미세스 푼베(Schizosaccharomyces pombe); 클루이베로마이세스(Kluyveromyces) 숙주, 예로서, K. 락티스(K. lactis), K. 프라질리스(K. fragilis) (ATCC 12,424), K. 불가리커스(K. bulgaricus) (ATCC 16,045), K. 위커라미이(K. wickeramii) (ATCC 24,178), K. 왈티이(K. waltii) (ATCC 56,500), K. 드로소필라루(K. drosophilae)(ATCC 36,906), K. 써모톨레란스(K. thermotolerans), 및 K. 마르시아누스(K. marxianus); 야로위아(yarrowia) (EP 402,226); 피키아 파스토리스(Pichia pastoris) (EP 183,070); 칸디다(Candida); 트리코데르마 리지아(Trichoderma reesia) (EP 244,234); 뉴로스포라 크라사(Neurospora crassa); 슈와니오마이세스(Schwanniomyces), 예로서, 슈와니오마이세스 옥시덴탈리스(Schwanniomyces occidentalis); 및 사상 진균, 예로서, 뉴로스포라(Neurospora), 페니실리움(Penicillium), 톨리포클라디움(Tolypocladium), 및 아스퍼길러스 (Aspergillus) 숙주, 예로서, A. 니둘란스(A. nidulans) 및 A. 니거(A. niger)이다.

[0269] 본 발명의 글리코실화된 폴리펩티드의 발현을 위해 적절한 숙주 세포는 다세포 유기체로부터 유래된다. 무척추세포의 예로서, 식물 및 곤충 세포를 포함한다. 다수의 배콜로바이러스 균주 및 변이체 및 숙주, 예로서, 스포돕테라 프루지페르다(Spodoptera frugiperda) (모충), 아에데스 아에기프티(Aedes aegypti) (모기), 아에데스 알보피크투스(Aedes albopictus) (모기), 드로소필라 멜라노개스터(Drosophila melanogaster) (과일파리), 및 봄비克斯 모리(Bombyx mori)로부터의 상응하는 증식허용 곤충 숙주 세포가 동정되었다. 형질감염을 위한 다양한 바이러스 균주를 공공연하게 이용할 수 있고, 예를 들면, 오토그래파 캘리포니카(Autographa californica) NPV의 L-1 변이체 및 봄비克斯 모리 NPV의 Bm-5 균주이고, 상기 바이러스는 본 발명에 따라 본원에서의 바이러스로서, 특히, 스포돕테라 프루지페르다 세포의 형질감염을 위해 사용될 수 있다. 면, 옥수수, 감자, 콩, 페튜니아, 토마토 및 담배의 식물 세포 배양물 또한 숙주로서 사용할 수 있다.

[0270] 그러나, 척추동물 세포가 가장 관심의 대상이 되고, 배양물 (조직 배양물) 중 척수동물 세포의 증식은 루틴한 방법이 되었다. 유용한 포유동물 숙주 세포주의 일례는 SV40로 형질전환된 원숭이 신장 CV1 세포주(1line) (COS-7, ATCC CRL 1651); 인간 배아 신장 세포주 (현탁 배양물에서 성장을 위해 서브클로닝된 293 또는 293 세포, [Graham et al, J. Gen Virol. 36:59 (1977)]); 베이비 햄스터 신장 세포 (BHK, ATCC CCL 10); 차이니즈

햄스터 난소 세포/-DHFR (CHO, [Urlaub et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216 (1980)]); 마우스 셀토리 (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 자궁 암종 세포 (HELA, ATCC CCL 2); 개 신장 세포 (MDCK, ATCC CCL 34); 베팔로 래트 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 NY. Acad. Sci.* 383:44-68 (1982)]; MRC 5 세포; FS4 세포; 및 인간 간암 세포주 (Hep G2)를 포함한다.

[0271] 숙주 세포는 본 발명의 생산의 폴리펩티드에 대한 상기-기술된 발현 또는 클로닝 벡터로 형질전환되고 프로모터를 유도하거나, 형질전환체를 선별하거나 바람직한 서열을 코딩하는 유전자를 증폭시키기에 적절하게 변형된 종래의 영양 배지에서 배양된다.

[0272] 숙주 세포의 배양

[0273] 본 발명의 폴리펩티드를 생산하기 위하여 사용되는 숙주 세포를 다양한 배지에서 배양할 수 있다. 상업적으로 이용가능한 배지, 예로서, Ham's F10 (시그마(Sigma)), 최소 기본 배지 ((MEM), (시그마), RPMI-1640 (시그마), 및 둘베코의 변형된 이글 배지(Dulbecco's Modified Eagles' medium) ((DMEM), 시그마)는 숙주 세포를 배양하는데 적절하다. 추가로, ([Ham et al., *Meth. Enz.* 58:44 (1979)], [Barnes et al., *Anal. Biochem.* 102:255 (1980)], 미국 특허번호 제 4,767,704호; 제 4,657,866호; 제 4,927,762호; 제 4,560,655호; 또는 제 5,122,469호; WO 90/03430; WO 87/00195; 또는 미국 특허등록번호 제 30,985호)에 기술된 임의의 배지를 숙주 세포용 배지로서 사용할 수 있다. 상기 배지 중 임의의 것을 필요에 따라 호르몬 및/또는 다른 성장 인자 (예로서, 인슐린, 트랜스페린, 또는 상피 성장 인자), 염 (예로서, 염화나트륨, 칼슘, 마그네슘, 및 인산염), 완충액 (예로서, HEPES), 뉴클레오티드 (예로서, 아데노신 및 티미딘), 항생제 (예로서, 젠타마이신 (GENTAMYCIN)TM 약물), 미량원소 (일반적으로, 마이크로몰 범위의 최종 농도로 존재하는 무기 화합물로서 정의됨), 및 글루코오스 또는 동등한 에너지원으로 보충할 수 있다. 임의의 다른 필수 보충제(supplements) 또한 본 분야의 기술자에게 공지되어 있는 적절한 농도로 포함될 수 있다. 배양 조건, 예로서, 온도, pH 등을 발현을 위해 선별된 숙주 세포와 함께 앞서 사용된 것이고, 본 분야의 임의의 기술자에게는 자명할 것이다.

[0274] 폴리펩티드 정제

[0275] 재조합 기술을 사용할 때, 본 발명의 폴리펩티드, 예로서, ANGPTL4, 본 발명의 항체, 예로서, 항-ANGPTL4 항체, 항- $\alpha_v\beta_5$ 항체 또는 항-혈관신생 문자 항체는 원형질막 주위 공간내에서 세포내 생산될 수 있거나 배지내로 직접 분비될 수 있다. 본 발명의 폴리펩티드를 배양 배지 또는 숙주 세포 분해물로부터 회수할 수 있다. 막에 결합한 경우, 적절한 세정액 (예로서, 트리톤(Triton)-X 100)을 사용하거나 효소적 절단에 의해 유리될 수 있다. 본 발명의 폴리펩티드의 발현에 사용되는 세포는 다양한 물리적 또는 화학적 수단, 예로서, 냉동-해동 사이클링, 초음파 처리, 기계적 파쇄, 또는 세포 분해제에 의해 파쇄될 수 있다.

[0276] 재조합 세포 단백질 또는 폴리펩티드로부터 본 발명의 폴리펩티드를 정제하는 것이 바람직할 수 있다. 하기의 방법이 적절한 정제 방법의 일례이다: 이온-교환 칼럼상의 분별; 에탄올 침전; 역상 HPLC; 실리카상의 크로마토그래피, 혜파린상의 크로마토그래피, 음이온 또는 양이온 교환 수지 (예로서, 폴리아스파르트산 칼럼 등)상의 세파로스(SEPHAROSE)TM 크로마토그래피; 크로마토포커싱(chromatofocusing); SDS-PAGE; 황산암모늄 침전; 예를 들면, 세파 덱스(Sephadex) G-75를 사용하는 겔 여과; 오염원, 예로서, IgG를 제거하기 위한 단백질 A 세파로스 칼럼; 및 본 발명의 폴리펩티드의 에피토프-표지된 형태와 결합하는 금속 퀄레이트화 칼럼. 다양한 단백질 정제 방법을 사용할 수 있고 상기 방법은 본원에 공지되어 있고 예를 들면, [Deutscher, *Methods in Enzymology*, 182 (1990)]; [Scopes, *Proteins Purification: Principles and Practice*, Springer- Verlag, New York (1982)])에 기술되어 있다. 선별된 정제 단계(들)는 예를 들면, 사용되는 생산 공정의 성질 및 생산되는 본 발명의 특정 폴리펩티드에 의존할 것이다.

[0277] 예를 들면, 세포로부터 제조된 항체 조성물은 예를 들면, 하이드록실라파타이트 크로마토그래피, 겔 전기영동, 투석, 및 친화성 크로마토그래피를 사용하여 정제할 수 있고, 친화성 크로마토그래피가 전형적인 정제 기술이다. 친화성 리간드로서 단백질 A의 적합성을 항체에 존재하는 임의의 면역글로불린 Fc 영역의 동종형 및 종에 의존한다. 단백질 A를 사용하여 인간 $\gamma 1$, $\gamma 2$, 또는 $\gamma 4$ 중쇄에 기초하는 항체를 정제할 수 있다 [Lindmark et al., *J. Immunol. Meth.* 62:1-13 (1983)]. 단백질 G는 모든 마우스 동종형 및 인간 $\gamma 3$ 에 대하여 권고된다 [Guss et al., *EMBO J.* 5:15671575 (1986)]. 친화성 리간드가 부착되는 매트릭스는 대체로 아가로스 이지만, 다른 매트릭스도 이용가능하다. 기계적으로 안정한 매트릭스, 예로서, 조절형 다공성 유리 또는 폴리(스티렌디비닐)벤젠은 아가로스를 사용하여 달성될 수 있는 것보다 유속을 가속화시키고 프로세싱 시간을 단축

시킬 수 있다. 항체가 C_h3 영역을 포함하는 경우, 베이커본드(Bakerbond) ABX™ 수지 (뉴저지주 필립스버그에 소재하는 J. T. 배어커(J. T. Baker))가 정제를 위해 유용하다. 단백질 정제를 위한 다른 기술, 예로서, 상기 기술된 것 또한 회수하고자 하는 항체에 따라 이용가능하다. 이. 콜라이의 원형질막 주위공간으로 분비되는 항체를 단리시키기 위한 방법을 기술하는 [Carter et al, *Bio/Technology* 10:163-167 (1992)]를 참조한다.

[0278] 약제학적 조성물

[0279] 본 발명의 폴리펩티드, 본 발명의 분자, 및 그의 배합물 및 본 발명에 따라 사용되는 본원에 기술된 것의 치료학적 제제를 원하는 순도를 갖는 폴리펩티드(들)를 임의의 약제학적으로 허용가능한 담체, 부형제 또는 안정화제와 혼합하여 [*Remington's Pharmaceutical Sciences* 16th edition, Osol, A. Ed. [1980]] 동결건조된 제형 또는 수용액 형태로 저장용으로서 제조한다. 허용가능한 담체, 부형제, 또는 안정화제는 사용되는 농도 및 용량에서 수혜자에 대하여 비독성이고, 완충액, 예로서, 포스페이트, 시트레이트, 및 다른 유기산; 아스코르브산 및 메티오닌을 포함하는 항산화제; 방부제 (예로서, 옥타데실디메틸벤질 암모늄 클로라이드; 헥사메토늄 클로라이드; 벤잘코늄 클로라이드, 벤제토늄 클로라이드; 페놀, 부틸 또는 벤질 알코올; 알킬 파라벤, 예로서, 메틸 또는 프로필 파라벤; 카테콜; 레조르시놀; 사이클로헥사놀; 3-펜타놀; 및 m-크레졸); 저분자 (약 10개 미만의 잔기) 폴리펩티드; 단백질, 예로서, 혈청 알부민, 젤라틴, 또는 면역글로불린; 친수성 중합체, 예로서, 폴리비닐피로리돈; 아미노산 예로서, 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 히스티딘, 아르기닌, 또는 리신; 단당류, 이당류, 및 글루코오스, 만노스, 또는 텍스티린을 포함하는 다른 탄수화물; 퀸레이트 시약, 예로서, EDTA; 당, 예로서, 수크로스, 만낫톨, 트레할로스 또는 소르비톨; 염-형성 카운터-이온, 예로서, 나트륨; 금속 치화합물 (예로서, Zn-단백질 치화합물); 및/또는 비-이온성 계면활성제, 예로서, 트윈™, 플루로닉스(PLURONICS)™ 또는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)을 포함한다.

[0280] 활성 성분은 또한 코아세르베이션 기술 또는 계면 중합 반응에 의해 제조된 미소캡슐, 예를 들면, 각각 하이드록시메틸셀룰로스 또는 젤라틴-미소캡슐 및 폴리-(메틸메타크릴레이트) 미소캡슐 내로 포획되어 콜로이드성 약물 전달 시스템 (예를 들면, 리포좀, 알부민 미소구, 마이크로에멀젼, 나노-입자 및 나노-캡슐) 또는 마크로에멀젼의 형태로 제조될 수 있다. 이러한 기술은 [*Remington's Pharmaceutical Sciences*, 16th edition, Oslo, A., Ed., (1980)]에 기술되어 있다.

[0281] 생체내 투여를 위해 사용하고자 하는 제형은 멸균되어야 한다. 이는 멸균 여과막을 통한 여과에 의해 용이하게 수행된다.

[0282] 서방형 방출 제제를 제조할 수 있다. 서방형 방출 제제의 적절한 일례로 본 발명의 폴리펩티드를 포함하는 고형 소수성 중합체의 반투과성 매트릭스를 포함하고, 상기 매트릭스는 성형품, 예로서, 필름, 또는 마이크로캡슐의 형태로 존재한다. 서방형 방출 매트릭스의 일례로 폴리에스테르, 하이드로겔 (예를 들면, 폴리(2-하이드록시에틸-메타크릴레이트), 또는 폴리(비닐알코올)), 폴리락티드 (미국 특허번호 제 3,773,919호), L-글루탐산 및 γ-에틸-L-글루타메이트의 공중합체, 비분해성 에틸렌-비닐 아세테이트, 분해 가능한 락트산-글리콜산 공중합체, 예로서, 루프론 드팻(LUPRON DEPOT)™ (락트산-글리콜산 공중합체 및 린프로리드 아세테이트로 구성된 주사가능한 미소구), 및 폴리-D(-)-3-하이드록시부티르산을 포함한다. 중합체, 예로서, 에틸렌-비닐 아세테이트 및 락트산-글리콜산은 100일 이상의 기간동안 분자를 유리시킬 수 있는 반면, 특정 하이드로겔은 단기간동안 단백질을 유리시킨다. 캡슐화된 항체가 장기간 체내 남아있는 경우, 37°C에서 수분에 노출된 결과로서 변성되거나 응집할 수 있고, 이로써 생물학적 활성을 손실되고 면역원성도 변할 수 있다. 관여하는 기작에 따라 안정화시키기 위한 합리적인 전략법을 고안할 수 있다. 예를 들면, 응집 기작이 티오-디설파이드 교환을 통한 분자내 S-S 결합 형성인 것으로 밝혀진다면, 설프하이드릴 잔기의 변형, 산성 용액으로부터의 동결건조, 적절한 첨가제를 사용하는 수분 함량의 조절, 및 특정 중합체 조성물의 개발에 의해 안정화는 달성될 수 있다. 예로서, 중합전해질 피복을 갖는 캡슐에 대해 기술하고 있는 미국 특허번호 제 6,699,501호를 참조한다.

[0283] 추가로, 본 발명의 제제 (ANGPTL4, ANGPTL4 작용제 또는 ANGPTL4 길항제)를 유전자 요법에 의해 대상자에게 도입할 수 있다는 것도 주시되고 있다. 유전자 요법은 핵산을 대상자에게 투여함으로써 실시되는 요법을 언급한다. 유전자 요법 적용시, 유전자는 치료학적으로 유효한 유전자 산물의 생체내 합성을 달성하기 위해, 예를 들면, 결손 유전자의 대체를 위해 세포내로 도입된다. "유전자 요법"은 지속 효과가 단일 요법에 달성되는 통상적인 유전자 요법, 및 치료학적으로 유효한 DNA 또는 mRNA의 1회 투여 또는 반복적 투여를 포함하는 유전자 치료제의 투여 둘 모두를 포함한다. 안티센스 RNAs 및 DNAs를 생체내의 특정 유전자 발현을 차단하는 치료제로서 사용할 수 있다. 예로서, 본원에 기술된 Ad-ANGPTL4-SiRNA를 참조한다. 단체 안티센스 올리고뉴클레오티드는 세포막에 의해 흡수가 제한되기 때문에 그의 세포내 농도가 낮음에도 불구하고 단체 안티센스 올리고뉴클레오티드

드가 저해제로서 작용하는 세포내로 임포트될 수 있다는 것은 이미 밝혀져 있다 [Zamecnik et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:4143-4146 (1986)]. 올리고뉴클레오티드는 예로서, 음전하 포스포디에스테라제 기를 비전하성 기로 치환함으로써 변형될 수 있다. 유전자 요법의 방법에 대한 일반 개관을 위해서는 예를 들면, ([Goldspiel et al., *Clinical Pharmacy* 12:488-505 (1993)]; [Wu and Wu *Biotherapy* 3:87-95 (1991)]; [Tolstoshev *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 32:573-596 (1993)]; [Mulligan *Science* 260:926-932 (1993)]; [Morgan and Anderson *Ann. Rev. Biochem.* 62:191-217 (1993)]; 및 [May *TIBTECH* 11:155-215 (1993)])을 참조한다. 사용할 수 있는, 재조합 DNA 기술 분야에서 보편적으로 공지되어 있는 방법은 ([Ausubel et al. eds. (1993) *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, NY]; 및 [Kriegler (1990) *Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual*, Stockton Press, NY]에 기술되어 있다.

[0284] 핵산을 생육성 세포내로 도입시키는데 이용할 수 있는 다양한 기술이 존재한다. 핵산을 시험관내에서 배양된 세포로 전달하는지, 생체내에서 의도하는 숙주 세포로 전달되는지에 따라 기술이 달라진다. 시험관내에서 핵산을 포유동물 세포내로 전달하기에 적절한 기술은 리포좀, 전기천공, 미세주입, 세포 융합, DEAE-덱스트란, 인산 칼슘 침전법 등의 사용을 포함한다. 현재의 바람직한 생체내 유전자 전달 기술은 바이러스 (전형적으로, 레트로바이러스) 벡터를 사용하는 형질감염 및 바이러스 코트 단백질-리포좀 매개성 형질감염을 포함한다 [Dzau et al., *Trends in Biotechnology* 11, 205-210 (1993)]. 예를 들면, 생체내 핵산 전달 기술은 바이러스 벡터 (예로서, 아데노바이러스, 단순 헤르페스 I 바이러스, 렌티바이러스, 레트로바이러스, 또는 아데노-관련 바이러스)를 사용하는 형질감염 및 지질-기초 시스템 (예를 들면, 유전자의 지질-매개성 전달을 위해 유용한 지질은 DOTMA, DOPE 및 DC-Chol이다)을 포함한다. 유전자 요법에서 바이러스 벡터를 사용하는 것의 일례는 [Clowes et al., *J. Clin. Invest.* 93:644-651 (1994)]; [Kiern et al., *Blood* 83:1467-1473 (1994)]; [Salmons and Gunzberg *Human Gene Therapy* 4:129-141 (1993)]; [Grossman and Wilson *Curr. Opin. in Genetics and Development* 3:110-114 (1993)]; [Bout et al., *Human-Gene-Therapy* 5:3-10 (1994)]; [Rosenfeld et al., *Science* 252:431-434 (1991)]; [Rosenfeld et al., *Cell* 68:143-155 (1992)]; [Mastrangeli et al., *J. Clin. Invest.* 91:225-234 (1993)]; 및 [Walsh et al., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med* 204:289-300 (1993)]에서 찾아볼 수 있다.

[0285] 몇몇의 경우, 표적 세포를 표적화하는 제제, 예로서, 세포 표면 막 단백질 또는 표적 세포에 특이적인 항체, 표적 세포상의 수용체에 대한 리간드 등을 핵산 공급원에 제공하는 것이 바람직할 수 있다. 리포좀이 사용하는 경우, 세포내이입과 관련된 세포 표면 막 단백질에 결합하는 단백질은 예로서, 캡시드 단백질 또는 특정 세포 타입에 대하여 친화성(tropic)을 띤 그의 단편, 순환시 내재화되는 단백질에 대한 항체, 세포내 국소화를 표적화하고 세포내 반감기를 증진시키는 단백질을 표적화하고/하거나 그의 흡수를 촉진시키기 위해 사용될 수 있다. 수용체-매개성 세포내이입의 기술은 예를 들면, ([Wu et al., *J. Biol. Chem.* 262, 4429-4432 (1987)]; 및 [Wagner et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 3410-3414 (1990)])에 기술되어 있다. 유전자 마킹 및 유전자 요법 프로토콜의 개관을 위해 [Anderson et al., *Science* 256, 808-813 (1992)]를 참조한다.

0286] 용량 및 투여

[0287] 본 분야의 분자는 예로서, 볼루스로서 정맥내 투여 또는 일정 기간에 걸친 연속 주입, 근육내, 복강내, 뇌척수내, 피하, 관절내, 윤활막내, 경막내, 경구, 국소, 또는 흡입식 경로, 및/또는 피하 투여와 같은 공지된 방법에 따라 인간 환자에게 투여된다.

[0288] 특정 실시태양에서, 본 발명의 요법은 ANGPTL4 길항제 및 하나 이상의 항암제, 예로서, 항-혈관신생제의 병용 투여를 포함한다. 실시태양에서, 추가의 항암제, 예로서, 하나 이상의 상이한 항-혈관신생제, 하나 이상의 화학요법제 등이 존재한다. 본 발명은 또한 동일한 항원에 대한 다중 저해제, 예로서, 동일한 항원에 대한 다중 항체 또는 상이한 암 활성 분자에 대한 다중 항체의 투여도 주시하고 있다. 실시태양에서, 상이한 화학요법제의 칙테일은 ANGPTL4 길항제 및/또는 하나 이상의 항-혈관신생제와 함께 투여된다. 병용 투여는 분리의 제형 또는 단일 약제학적 제형을 사용하는 공투여 및/또는 임의의 순서에 따른 연속 투여를 포함한다. 예를 들면, ANGPTL4 길항제는 항암제 투여 이전, 이후에 이루어지거나 그와 교대로 이루어질 수 있거나, 그와 함께 동시에 제공될 수 있다. 실시태양에서, 둘 모두의 (또는 모두) 활성제가 동시에 그의 생물학적 활성을 발휘하는 기간이 존재한다.

[0289] 질환의 예방 또는 치료를 위한, ANGPTL4 길항제의 적절한 용량은 상기 기술된 바와 같은 치료하고자 하는 질환 타입, 질환의 중증도 및 경과 과정, 저해제가 예방 또는 치료적 목적으로 투여되었는지 여부, 사전 요법, 환자의 임상 병력 및 저해제에 대한 반응, 및 주치의의 처방에 따라 달라질 것이다. 저해제는 1회 또는 일련의 요법으로 환자에게 적절히 투여된다. 병용 치료 요법에서, 본 발명의 조성물은 치료학적 유효량으로 또는 치료학

적 상승량으로 투여된다. 본원에서 사용되는 바, 치료학적 유효량은 본 발명의 조성물의 투여 및/또는 ANGPTL4 길항제 및 하나 이상의 다른 치료제의 공투여가 표적화하는 질환 또는 상태를 저하시키거나 저해할 수 있도록 한다. 약제의 배합물을 투여하는 것의 효과는 부가적일 수 있다. 실시태양에서, 투여 결과로서 상승 효과가 있다. 치료학적 상승량은 특정-질환과 관련된 상태 또는 증상을 상승적으로 또는 현저히 저하시키거나 제거하기에 필요한 ANGPTL4 길항제 및 하나 이상의 다른 치료제, 예로서, 혈관신생 저해제의 양이다.

[0290] 예를 들면, 하나 이상의 분리 투여, 또는 연속 주입에 의한 것인지와는 상관없이, 질환 타입 및 중증도에 따라, 약 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 내지 50 mg/kg (예로서, 0.1-20 mg/kg)의 ANGPTL4 길항제 또는 혈관신생 저해제가 투여를 위한 초기의 후보 용량이 된다. 전형적인 1일 용량은 상기 언급한 인자에 따라 약 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 내지 약 100 mg/kg 이상 범위일 것이다. 수일 또는 그 이상의 기간에 걸쳐 반복 투여를 하기 위해서는, 상태에 따라 질환 증상이 원하는 대로 억제될 때까지 요법은 지속된다. 그러나, 다른 용량의 요법이 유용할 수 있다. 전형적으로, 필요한 생물학적 효능을 제공할 수 있는 용량(들)에 도달할 때까지 의사는 본 발명의 분자(들)를 투여할 것이다. 본 발명의 요법의 진행은 통상적인 기술 및 분석법에 의해 용이하게 모니터된다.

[0291] 예를 들면, 혈관신생 저해제, 예로서, 항-VEGF 항체, 예로서, 아바스틴® (제넨테크)에 대한 제제 및 투여 스케줄은 제조자의 설명에 따라 사용될 수 있거나 당해 진료의에 의해 실험적으로 결정될 수 있다. 또 다른 일례로, 상기 화학요법제에 대한 제제 및 투여 스케줄은 제조자의 설명에 따라 사용될 수 있거나 당해 진료의에 의해 실험적으로 결정될 수 있다. 화학요법에 대한 제제 및 투여 스케줄은 또한 [Chemotherapy Service Ed., M.C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, MD (1992)]에 기술되어 있다.

요법의 효능

[0293] 본 발명의 요법의 효능은 종양성 또는 비-종양성 질병을 평가하는데 보편적으로 사용되는 다양한 종점(endpoint)에 의해 측정될 수 있다. 예를 들면, 암 요법은 예로서, 제한하는 것은 아니지만, 종양 퇴화, 종양 중량 감소 또는 크기의 축소, 진행 시간, 생존 기간, 진행되지 않는 생존(progression free survival), 전체 반응 속도, 반응 기간, 및 삶의 질에 의해 평가될 수 있다. 본원에 기술된 항- 혈관신생제는 종양 혈관구조를 표적화하되 종양성 세포 그 자체로서는 필수적으로 표적화하는 것이 아니기 때문에 그들은 유일한 항암제 부류를 나타내고, 따라서, 유일한 약물에 대한 임상 반응의 정의 및 대책법을 필요로 할 수 있다. 예를 들면, 2차원 분석에서 종양이 50% 초과로 축소되는 것이 반응을 나타내는 표준 컷-오프(cut-off)이다. 그러나, 본 발명의 저해제는 원발성 종양을 축소시키지 않으면서 전이성 확산을 저해할 수 있거나, 단순하게 정지성 종양(tumoristatic) 효과를 발휘할 수 있다. 따라서, 예를 들면, 혈관신생의 혈장 또는 뇌 마커의 측정 및 방사선 영상을 통한 반응의 측정을 포함하는, 요법의 효능을 측정하는 접근법을 사용할 수 있다.

[0294] 실시태양에서, 본 발명은 비-종양성 또는 종양성 질병, 예로서, 암에 걸리기 쉽거나, 상기로 진단받은 인간 환자의 생존 기간을 연장시키기 위하여 사용될 수 있다. 생존 기간은 최초의 약물 투여시부터 사망시까지의 시간으로서 정의된다. 일면에서, 본 발명의 ANGPTL4 길항제는 하나 이상의 항암제와 함께 배합되어 투여되고, 이로써, 오직 단일 타입의 요법에 의한 것과 비교할 때 환자의 생존 기간은 효과적으로 연장되고, 예로서, 단일 타입의 요법과 비교할 때, 약 5%까지 연장되거나, 약 10%까지 연장되거나, 약 20%까지 연장되거나, 약 30%까지 연장되거나, 약 40%까지 연장되거나, 약 50%까지 연장된다.

[0295] 또 다른 실시태양에서, 본 발명은 비-종양성 또는 종양성 질병, 예로서, 암에 걸리기 쉽거나, 상기로 진단받은 인간 환자의 무진행 생존 기간(progression free survival)을 연장시키는 방법을 제공한다. 질환 진행 시간은 약물 투여시부터 질환 진행시까지의 시간으로서 정의된다. 하나의 실시태양에서, ANGPTL4 길항제 및 하나 이상의 항암제를 사용하는 본 발명의 병용 요법은 단독의 항암 요법과 비교할 때 적어도 약 2개월, 적어도 약 4개월, 적어도 약 6개월, 적어도 약 8개월, 1년 이상까지 무진행 생존 기간을 현저히 연장시킨다.

[0296] 또 다른 실시태양에서, 본 발명의 요법은 암에 걸리기 쉽거나, 상기로 진단받은 인간 환자로서 다양한 치료제로 치료받은 인간 환자군에서 반응율을 현저히 증가시킨다. 반응율은 요법에 반응하는 치료받은 환자이 퍼센트로서 정의된다. 본 발명의 실시태양에서, ANGPTL4 길항제 및 하나 이상의 항암제를 사용하는 본 발명의 병용 요법은 단일 타입의 암 요법 (예로서, 화학요법만)으로 치료된 군과 비교할 때 당해 치료를 받은 환자군에서는 반응율이 현저히 증가하고, 여기에서, 예로서, 0.010 미만, 또는 0.005 미만, 또는 0.001 미만의 카이-제곱 p-값(Chi-square p-value)을 갖는다.

[0297] 일면으로, 본 발명은 암에 걸리기 쉽거나, 상기로 진단받은 인간 환자 또는 환자군에서 반응 지속시간을 증가시키는 방법을 제공한다. 반응 지속시간은 초기 반응시부터 질환 진행시까지의 시간으로서 정의된다. 본 발명의

특정 실시태양인 ANGPTL4 길항제 및 하나 이상의 항암제를 사용하는 본 발명의 병용 요법에서, 통계학상 유의적으로 반응 지속시간은 예로서, 적어도 2개월, 적어도 4개월, 적어도 6개월 증가할 수 있다.

[0298] 제품

[0299] 본 발명의 또다른 실시태양에서, 상기 기술된 질병의 치료에 유용한 물질들을 포함하는 제품이 제공된다. 제품은 용기, 표지 및 포장 삽입물(package insert)을 포함한다. 적절한 용기는 예를 들면, 병, 바이알, 주사기 등을 포함한다. 용기는 다양한 물질, 예로서, 유리 또는 플라스틱으로부터 제조될 수 있다. 용기는 상태의 치료에 유효한 조성물을 담고 있고 무균 접근 포트를 가질 수 있다 (예를 들면, 용기는 피하주사 바늘에 의해 관통 가능한 정지 장치(stopper)를 갖는 수액(intravenous solution) 백 또는 바이알일 수 있다). 조성물 중 적어도 하나의 활성제는 ANGPTL4 조절제이다. 용기상의 또는 용기에 부착된 표지는 조성물이 특상의 상태 치료를 위해 사용된다는 것을 제시한다. 제품은 추가로 약제학적으로-허용가능한 완충액, 예로서, 인산염-완충처리된, 링거액 및 텍스트로스 용액을 포함하는 제 2의 용기를 포함할 수 있다. 추가로, 추가의 활성제, 다른 완충액, 희석제, 충진제, 바늘, 및 주사기를 포함하는, 상업상 및 사용자의 견지에서 바람직할 수 있는 다른 물질을 포함할 수 있다.

[0300] 물질의 기탁

[0301] 하기 물질은 미국 버지니아주 20110-2209 마나사스 유니버시티 불르바드 10801에 소재하는 아메리칸 타입 컬쳐 콜렉션(American Type Culture Collection) (ATCC)에 기탁되었다:

[0302]

물질	ATCC 기탁번호	기탁일
ANGPTL4 (NL-DNA 22780-1078)	209284	97년 9월 18일
하이브리도마 세포주 생산	ATCC HB-10709	91년 3월 29일
항체 A4.6.1		

[0303] 특허절차상 미생물기탁의 국제적승인에 관한 부다페스트 조약의 조항 및 그(부다페스트 조약)의 규칙하에 기탁이 이루어졌다. 기탁된 생육성 배양물을 기탁일로부터 30년동안 보관할 것을 보장한다. 기탁물은 부다페스트 조약의 조항하에 ATCC에 의해 이용될 수 있고, 제넨테크, 인코포레이티드와 ATCC 사이의 동의하에서, 관련된 미국 특허의 발행시 또는 공중에 임의의 미국 또는 외국 특허출원 공개시 공중은 배양물의 자손에 대한 영구적이고 비제한적인 입수 가능성을 보장받고, 어느 것이 최초의 것이든지 간에, 35 USC § 122 및 그에 준하는 특허청장의 명령(특별히 886 OG 638에 관한 37 CFR § 1.14 포함)에 따라 미국 특허청에 의해 그에 대한 권한이 부여되도록 결정되어진 것에 대한 자손의 입수 가능성을 보장받는다.

[0304]

본 출원의 수탁자는 적절한 조건하에 배양하였을 때 기탁물의 배양물이 죽거나 유실되거나 파괴할 경우, 통지시 즉시 본 기탁물은 동일물의 또다른 것으로 대체될 것이라는 것에 동의하였다. 특허법에 따라 임의의 정부 지배하에 부여받은 권리에 위배하여 본 발명을 실시할 수 있는 실시권으로서 기탁물의 입수 가능성을 해석하고자 하는 것은 아니다.

실시 예

[0305]

본원에 기술된 기탁, 실시예 및 실시태양은 단지 설명하기 위함이고 그의 관련된 다양한 변형 및 변화는 본 분야의 기술자에게 제안될 것이며 첨부되는 청구 범위의 범주 및 본 출원의 정신 및 범위내 포함된다는 것을 이해하여야 한다. 실시예에서 언급되는 상업적으로 이용가능한 시약은 달리 언급하지 않는 한, 제조자의 설명서에 따라 사용하였다.

[0306]

실시예 1: ANGPTL4는 종양 세포 증식 및 세포 유주를 자극한다

[0307]

아데노바이러스 벡터의 생성 및 형질도입: 아데노바이러스 작제물은 본질적으로 제조자에 의해 기술된 바와 같이, Not1-Not1 cDNA 삽입체를 스트라테이진(Stratagene) (캘리포니아주 라호야에 소재)으로부터의 Ad-easy 벡터 작제 키트의 폴리링커 부위로 클로닝하여 작제하였다 (예, [Hesser et al., *Blood*, 104(1): 149-158 (2004)] 참조).

[0308]

hANGPTL4(23-406) (*PUR9384*), *mANGPTL4(184-410)-IgG* (*PUR9388*) 및 *mANGPTL4(23-410)* (*PUR9452*) 단일 플래그 표지된(*single flag tagged*) 단백질의 생성: 수거한 세포 배양물을 밤새도록 항-플래그(flag) M2 수지 (시그마

(Sigma) #A-2220)상에 통과시켰다. PBS를 사용하여 기준선까지 칼럼을 세척한 후, 50mM 시트르산나트륨 (pH 3.0)으로 용출시켰다. 상기 용량을 아미콘(Amicon)-15 10,000MWCO (밀리포어(Millipore) #UFC901024)상에서 농축시켰다. 최종 단계로서 1mM HCl/수퍼(Super) Q H₂O로 투석시키고 0.2μm 여과하였다. 4-20% 트리스/글리신 (인비트로겐(Invitrogen) #EC6028박스) SDS 페이지 젤 +/- 10mM DTT를 사용하여 순도를 측정하였다. 매스 스펙(Mass Spec) 또는 에드만(Edman) n-말단 서열화에 의해 정확한 단백질을 동정하였다.

[0309] n-말단 플래그 표지에 연속하여 n-말단 hu Fc 표지에 의한 ANGPTL4(184-406)-IgG (PUR 9441)의 생성: 수거한 세포 배양물을 밤새도록 ProSep A (애머샴(Amersham) #113111835)에 통과시켰다. PBS를 사용하여 기준선까지 칼럼을 세척하였다. 이어서, 4개의 칼럼 용량 0.5M TMAC/PBS (pH 7.5)에 의한 세척 단계 후, 기준선까지의 PBS 세척으로 이어졌다. 용출 단계는 50mM 시트르산나트륨 (pH 3.0) 범프였다. 상기 용량을 아미콘-15 10,000MWCO (밀리포어 #UFC901024)상에서 농축시켰다. 최종 단계는 1mM HCl/수퍼 Q H₂O로의 투석 및 0.2μm 여과였다. 4-20% 트리스/글리신 (인비트로겐#EC6028박스) SDS 페이지 젤 +/- 10mM DTT를 사용하여 순도를 측정하였다. 질량 스펙 또는 에드만 n-말단 서열화에 의해 정확한 단백질을 동정하였다. 재조합 단백질 또한 본 분야에 공지된 표준 기술을 사용하여 제조할 수 있었다.

[0310] Ad=ANGPTL4-SiRNA의 생성: 전장의 hANGPTL4 서열에 기초하여 4개의 효능있는 ANGPTL4-SiRNA 분자 (퀘이아젠(Qiagen))를 생성하였다. hANGPTL4 발현을 저해할 수 있는 SiRNA의 능력에 기초하여 하나의 ANGPTL4-SiRNA를 선별하였다. 이는 ANGPTL4 중 하기의 DNA 표적 서열 GTGGCCAAGCCTGCCGAAGA (서열번호 3), 예로서, r(GGCCAAGCCUGCCCCGAAGAUU) (서열번호 4) 및/또는 r(UUCUCCGGCAGGCUCUUGGCCAC) (서열번호 5)를 표적화하였다. SiRNA를 RNA 프로모터, 예로서, H1 프로모터 (진스크립트(GenScript))를 포함하는 CMVpShuttle- H1.1 전달 벡터내로 클로닝하였다. 이어서, SiRNA 발현 카세트를 클로닝하여 아데노바이러스 AdhANGPTL4-SiRNA 작제물을 생성하였다. 예를 들면, 아데노바이러스 작제물은 본질적으로 제조자에 의해 기술된 바와 같이, Not1-Not1 cDNA 삽입체를 스트라테이진(Stratagene) (캘리포니아주 라호야에 소재)으로부터의 Ad-easy 벡터 작제 키트의 폴리링커 부위로 클로닝하여 작제하였다 (예로서, [Hesser et al., *Blood*, 104(1): 149-158 (2004)] 참조).

[0311] 항-플래그(FLAG) 항체를 사용하여 웨스턴 블로팅 분석법에 의해 ANGPTL4의 발현을 확인하였다. 하나의 강력하게 발현되는 클론을 선별하고 제조자의 설명에 따라 역가를 증폭시켰다. 바이러스 시료를 CsCl 원심분리에 의해 정제하고 PCR에 의해 복귀 변이체(revertant)에 대하여 시험하였다. 제조자의 설명에 따라 96 웰 세포 분해 실험에 의해 바이러스 역가를 측정하였다. E1 및 E3 부위가 결실된 Ad5 계놈을 포함하는 AdEasy 벡터를 사용하여 BJ5183 전기능이 있는(electro competent) 박테리아에서 상기 벡터를 공급받은 pShuttleCMV-lacZ와 함께 재조합하였다. 재조합된 AdEasy 플라스미드를 숙주 HEK293 세포내로 일시적으로 형질감염시켜 1차 바이러스 저장액을 제조하였다. HEK293 세포에서 아데노바이러스 저장액을 추가로 증폭시키고, 제조자에 의해 기술된 바와 같이, CsCl 구배 정제 방법을 사용하여 정제하였다. 엘리자(Elisa) 분석법에 의해 아데노바이러스 작업 역가를 수득하였다.

[0312] mANGPTL4의 생성: 전장의 mANGPTL4(1-410)를 코딩하는 핵산을 포함하는 작제물로 293개의 세포를 일시적으로 형질감염시켰다. 상동액으로부터 mANGPTL4를 정제하고 실험에 사용하였다.

[0313] 시험관내 종양 세포 증식: ANGPTL4가 시험관내에서 인간 A673 횡문근육종 종양 세포 (HTB 1598) 증식을 자극하였다. 도 4, 패널 A를 참조한다. 앞서 기술된 바와 같이, Ad-ANGPTL4, Ad-LacZ, Ad-Angpt13의 아데노바이러스 작제물을 생성하였다 [Hesser et al, *Blood*, 104(1):149-158 (2004)]. 아데노바이러스-ANGPTL4 작제물 (Ad-ANGPTL4), 대조군으로서 아데노바이러스-LacZ 작제물 (Ad-LacZ) 또는 아데노바이러스-ANGPTL3 작제물 (Ad-Angpt13)을 100의 감염다중도로 포함하는 작제물로 A673 세포를 형질도입시켰다. 5% FCS 고 글루코오스 DMEM 중 A673 세포를 3일간 배양한 후, 세포를 계수하였다. 도 4, 패널 A에 나타낸 바와 같이, Ad-ANGPTL4는 종양 세포 증식을 자극하였다. Ad-LacZ 대조군과 비교하여 Ad-ANGPTL4로 처리된 세포에서는 약 2배 초과의 세포수가 증가된 것으로 나타났다. Ad-ANGPTL4는 또한 대조군과 비교하여 약 3배의 MCF7 세포 (인간 유방 샘암종) 증식, 약 2배의 TK10 세포 (콩팥 세포 암 세포주)의 증식, 및 약 1.5배의 A549 세포 (인간 폐암종) 증식을 자극하였다. Ad-ANGPTL4는 또한 U87MG 세포의 증식을 자극하였다. 아데노바이러스-ANGPTL4 작제물 (Ad-ANGPTL4 (2)), 대조군으로서 아데노바이러스-LacZ 작제물 (Ad-LacZ (1)) 또는 아데노바이러스 ANGPTL4-SiRNA 작제물 (3)을 500의 감염다중도로 포함하는 작제물로 세포 (A673, U87MG, 4T-1, 또는 Caki)를 형질도입시키고, 이에 대해서는 도 4, 패널 B를 참조한다. 5% FCS 고 글루코오스 DMEM 중 세포를 2-3일간 배양한 후, 세포를 계수하였다.

[0314] ANGPTL4로 형질도입된 COS 세포로부터의 적응용 배지(conditioned media)는 또한 A673 세포의 증식을 유도하였

다. **도 4, 패널 C**를 참조한다. 아데노바이러스 작제물 (Ad-ANGPTL4-(2), Ad-LacZ (1) 또는 -Ad-Angpt1-3(3))로 형질도입된 간세포 (Hepa) (A), 인간 미세혈관 내피 세포 (HMEC) 세포 (B), 또는 COS7 (C)로부터의 적응용 배지 (상등액)를 A673 세포에 가하였다. 5% FCS 고 글루코오스 DMEM 중 세포를 4일간 배양한 후, 세포를 계수하였다. **도 4, 패널 C**에 나타낸 바와 같이, COS 세포 + Ad-ANGPTL4로부터의 상등액은 대조군, 및 예로서, Hepa 세포 및 HMVEC 세포과 같은 다른 세포 타입으로부터의 다른 상등액과 비교하여 종양 세포 증식을 자극한다.

[0315] **배양 접시상에 피복되었을 때의 ANGPTL4 활성: ANGPTL4에 의한 A673 세포의 증식은 또한 배양 접시상에 단백질을 피복시킴으로써 조사하였다.** 플레이트를 피복시키지 않거나, 다양한 농도의, 예로서, 0.3 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 3.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 또는 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 뮤린 ANGPTL4, LZ-hANGPTL4, 섬유결합소, 대조군 단백질인 NL4, IgG-hANGPTL4 (184-406), mAngpt13, hAngpt13, mANGPTL4 (23-410), Lz-hANGPTL4 (184-406), Fc-hANGPTL4 (184-406) 또는 BSA로 피복시켰다. 96-웰 평평한-바닥 플레이트 (덴마트 넌크에 소재하는 맥시소르프(MaxiSorp))를 4°C에서 밤새도록 피복시켰다. 인간 A673 종양 세포를 수거하고 5% FCS를 포함하는 HG-DMEM 배지에서 10^5 세포/ ml 로 희석시켰다. 200 μl 중 세포 혼탁액 (10^4 세포/웰)을 피복된 웰에 가하고 선택된 시간동안 플레이트를 37°C에서 인큐베이션 시켰다. 부착하지 못한 세포를 PBS로 세척하여 제거하고 크리스탈 바이올렛 또는 란데그렌(Landegren)의 PNAG 방법을 사용하여 세포 부착을 측정하였다 ([Landegren, U. (1984) *J. Immunol. Method* 67:379-388] 참조). 결과는 각 3개의 웰의 평균 OD₅₅₀ 또는 OD₄₀₅ 값으로 나타낸다.

[0316] 유사하게, 인간의 제 1 제정맥(umbilical vein) 내피 세포 (HUVEC), 인간 제대 또는 인간 신장 (캠브렉스(Cambrex))로부터 단리된 상피 (epi) 및 혈관간 (mesa) 세포를 회수하고 동일한 조건을 사용하여 시험하였다. 증식 분석법을 위해, 제조자 (캠브렉스)에 의해서 각 세포 타입에 대하여 공급된 배지를 사용하였다. ANGPTL4는 신장 상피 세포, 콩팥 혈관간 세포 또는 인간 제정맥 내피 세포 (HUVEC)의 증식은 유도하지 않은 것으로 나타났지만, A673의 증식은 유도하는 것으로 나타났다 (**도 5**).

[0317] **A673 세포에 결합하는 ANGPTL4의 FACS 분석법:** 인간 A673 세포와 ANGPTL4의 결합을 FACS 분석법에 의해 조사하였다. A673 세포를 500,000 내지 1×10^6 세포/샘플 웰로 10 cm 배양 접시에 플레이팅하였다. FACS 전날 세포를 분배하였다. 세포를 PBS로 1회에 걸쳐 세척한 후, PBS 중 10 ml의 20 mM EDTA를 가하고 10 내지 20분동안 인큐베이션 시켰다. 20분 후, 세포를 플레이트로부터 긁어 내었다(scrape). PBS 중 10 ml의 5% FCS를 가하고 세포를 50 ml의 팔콘(Falcon) 관으로 전달시켰다. 세포를 4°C에서 5분동안 1.8 Krpm에서 회전시켰다. 상등액을 제거하고 세포를 PBS 중 1 ml의 5% FCS에 재현탁시켰다. 1 μg 의 단백질을 함유하는 5 ml의 FACS 관으로 100 μl 의 세포 혼탁액을 분배하고 30분 이상의 시간동안 얼음상에서 인큐베이션 시켰다. 하기 단백질을 사용하였다: mANGPTL4 (23-410), PUR 9452, 0.428 mg/ml (2 μl /샘플); hANGPTL4 (23-406), PUR 9384, +/- 90 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (10 μl /샘플); hANGPTL4 (184-406)-IgG, PUR 9441, 1.5 mg/ml (1 μl /샘플); 및 대조군 플래그(FLAG)-BAP (시그마) 0.1 mg/ml (2 μl /샘플). 인큐베이션 시킨 후, 관을 얼음상에서 PBS 중 5 ml의 5% FCS로 충진시켰다. 세포를 2 Krpm에서 5분동안 회전시켰다. 상등액을 제거하였다. 항-플래그(FLAG)-FITC 항체 (시그마)를 가하고 (2 μl 의 항체 (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 저장액) 5분 이상의 시간동안 얼음상에서 인큐베이션 시켰다. 항체의 최종 농도는 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 였다. PBS 중 5 ml의 5% FCS를 가하고 세포를 4°C에서 5분동안 1.8 Krpm에서 회전시켰다. 상등액을 제거하고 세포를 얼음상에서 5% FCS를 포함하는 0.25 ml PBS에서 재현탁시켰다. 수용체의 내재화를 막기 위해 0.05% 아지드화나트륨도 존재할 수 있다. 1 μl 의 1:50 희석된 프로페디움 요오드화물 (PI) 저장액을 샘플마다 가할 수 있다. 이어서, 세포를 FACS시켰다. 다양한 형태의 ANGPTL4, 인간 및 뮤린 ANGPTL4는 다양한 조건하에 (**도 6, 패널 B**), 정상산소증, 저산소증 (0% O₂, 24시간동안), 또는 PMA (200 nM, 24시간동안)에서 A673 세포 (**도 6, 패널 A**)에 결합하였다. 저산소증 실험의 경우, 세포를 24시간동안 37°C 5% CO₂하에, 24시간동안 95% N₂ 인큐베이터에서 인큐베이션 시켰다. 다르게는, 세포를 200 nM의 포르볼 에스테르 (PMA)의 존재하에 37°C 인큐베이터에서 5% CO₂ 및 정상산소증 조건하에서 활성화시켰다.

[0318] **ANGPTL4를 발현시키는 세포로부터의 적응용 배지:** ANGPTL4를 발현시키는 세포로부터의 적응용 배지를 사용하거나 재조합 ANGPTL4를 가할 때, A673 세포의 증식을 조사하였다. 아데노바이러스 작제물 (Ad-ANGPTL4 (2), Ad-LacZ(1) 또는 Ad-LacZ + mANGPTL4 (23-410) (3) (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$))로 형질도입된 COS7로부터의 500 μl 의 적응용 배지 (상등액)를 A673 세포에 가하였다. 5% FCS, 고 글루코오스 DMEM를 포함하는 배지에서 7일동안 세포를 배양한 후, 세포를 계수하였다. 재조합 ANGPTL4를 5% FCS를 포함하는 배지에 가하고 4일동안 세포를 배양하여 A673 증식도 조사하였다. 첨가하지 않거나 (1), 완충액 대조군 (2), mANGPTL4 (23-410) (2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) (3), hANGPTL4

(23-406) (2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (4), IgG-hANGPTL4 (184-406) (2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (5) 또는 hIgG-mANGPTL4 (184-410) (2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (6)을 지정된 농도로 배지에 가하였다. 5% FCS, 고 글루코오스 DMEM를 포함하는 배지에서 세포를 4일동안 배양한 후 (도 7, 패널 B), 세포를 계수하였다. ANGPTL4를 발현시키는 세포로부터의 적응용 배지 또는 재조합 단백질이 첨가된 배지에 의한 A673 세포의 증식은 세포 밀도에 의존할 수 있다. **도 7, 패널 A** (지정 조건하에서 7일동안 배양시켰을 때의 세포 증식) 및 **패널 B** (지정 조건하에서 4일동안 배양시켰을 때의 세포 증식)를 참조한다.

[0319] **ANGPTL4는 세포 유주를 유도한다:** 본 발명자는 뮤린 4T-1 종양 세포의 세포 유주를 유도하는 ANGPTL4의 능력을 조사하였다. 공극이 3 μm 인 HTS 다중웰 조직 배양 삽입체 (뉴저지주에 소재하는 벡톤 디킨슨(Becton Dickinson))를 사용하여 (예로서, [Camenisch, et al., *J. Biol. Chem.*, 277(19):17281-17290 (2002)] 참조)에 기술된 바와 같이 세포 이동성을 측정하였다. hANGPTL4 (1-406)를 50/50/0.1% BSA에서 5, 1 및 0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 희석하였다. 양성 대조군으로서, 막을 10% 우테아 혈청 (FCS) 함유 배지 또는 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 재조합 인간 PDGF-BB (R&D 시스템)와 함께 인큐베이션시켰다. 50/50/0.1% BSA를 음성 대조군으로서 사용하였다. 마우스 4T1 종양 세포를 PBS로 3회에 걸쳐 세척하고, 수거하고, 50/50/0.1% BSA 중 약 10^5 세포/ mL 로 혼탁시켰다. 하기 세포 시료를 시험하였다 (여기에서, mANGPTL4는 NL2로 나타낸다).

4T1	
50/50/0.1% BSA	NL2 5 μg
+10% FBS	NL2 0.5 μg
+10% FBS	NL2 0.2 μg
50/50/0.1% BSA	PDGF-BB 0.1 μg

[0321] 시료를 바닥 챔버에 가하고 시료를 37°C에서 19시간동안 인큐베이션시켰다.

[0322] 세포 혼탁액 ($250 \mu\text{l}$)을 상부 챔버에 가하고 세포가 5% CO_2 습윤화된 인큐베이터에서 밤새도록 37°C에서 유주 할 수 있도록 하였다. 인큐베이션시킨 후, 배지를 상단 및 바닥 챔버 둘 모두로부터 흡인시키고, 막의 하부 표면으로 유주한 세포를 메탄올로 고정시키고 (30분동안 4°C에서 400 μl 의 MeOH로 고정, MeOH를 제거하고 40분 동안 대기건조시킴) YO-PRO-1 요오드화물 (오레곤주에 소재하는 몰레큘라 프로브스(Molecular Probes)) (10 μm 의 (1 mM 저장액으로부터의 1:100) 400 μl YO-PRO-1 요오드화물)로 염색시켰다. 오픈랩(Openlab) 소프트웨어 (매사추세츠주에 소재하는 임프로비전(Improvision))을 사용하여 20배 확대율로 현미경 시야당 평균 세포 갯수를 통해 유주 결과를 측량하였다.

[0323] 또다른 실험에서, ANGPTL4는 4T-1 종양 세포의 유주와 함께 A673 세포의 유주를 유도하는 것으로 밝혀졌다. mANGPTL4를 50/50/0.1% BSA중에서 6, 1.5 및 0.375 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 희석시켰다. 양성 대조군으로서, 막을 10% 우테아 혈청 (FCS) 함유 배지 또는 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 재조합 인간 PDGF-BB (R&D 시스템)와 함께 인큐베이션시켰다. 50/50/0.1% BSA를 음성 대조군으로서 사용하였다. 4T-1 및 A673 세포를 회수하고 50/50/0.1% BSA (2×10^5 세포/ mL)로 재현탁시켰다. 하기 세포 시료를 시험하였다 (여기에서, mANGPTL4는 NL2로 나타낸다).

4T1		A673	
50/50/0.1% BSA	NL2 6 μg	50/50/0.1% BSA	NL2 6 μg
+10% FBS	NL2 1.5 μg	+10% FBS	NL2 1.5 μg
+10% FBS	NL2 0.375 μg	+10% FBS	NL2 0.375 μg
50/50/0.1% BSA	PDGF-BB 0.1 μg	50/50/0.1% BSA	NL2 0.375 μg

[0325] 시료를 $750 \mu\text{l}$ 중 바닥 챔버에 가하고 시료를 37°C에서 19시간동안 인큐베이션시켰다.

[0326] 세포 혼탁액 ($250 \mu\text{l}$) (5×10^4)를 상부 챔버에 가하고 세포가 5% CO_2 습윤화된 인큐베이터에서 밤새도록 37°C에서 유주 할 수 있도록 하였다. 인큐베이션시킨 후, 배지를 상단 및 바닥 챔버 둘 모두로부터 흡인시키고, 막의 하부 표면으로 유주한 세포를 메탄올로 고정시키고 (30분동안 4°C에서 400 μl 의 MeOH로 고정, MeOH를 제거하고 40분동안 대기건조시킴) YO-PRO-1 요오드화물 (오레곤주에 소재하는 몰레큘라 프로브스) (10 μm 의 (1 mM 저장액으로부터의 1:100) 400 μl YO-PRO-1 요오드화물)로 염색시켰다. 오픈랩(Openlab) 소프트웨어 (매사추세츠주에 소재하는 임프로비전)을 사용하여 20배 확대율로 현미경 시야당 평균 세포 갯수를 통해 유주 결과를 측량하였다.

액으로부터의 1:100) 400 μl YO-PRO-1 요오드화물)로 염색시켰다. 오픈랩 소프트웨어 (매사추세츠주에 소재하는 임프로비전(Improvision))을 사용하여 20배 확대율로 현미경 시야당 평균 세포 갯수를 통해 유주 결과를 측정하였다. (1)은 혈청이 첨가되지 않은 것이고, (2)는 10% 우태아 혈청 (FCS)이고, (3)은 PDGF-BB이고, (4)는 ANGPTL4인 **도 9**를 참조한다. ANGPTL4 및 10% FCS 둘 모두를 사용하여 A673 및 4T-1 세포를 유주시켰다. 따라서, ANGPTL4에 대한 길항체를 사용하여, 예로서, 하나의 이론에 국한되지 않고, 종양 세포의 유주를 방해함으로써 전이를 저해할 수 있다.

[0327] *ANGPTL4는 생체내에서 종양 크기를 증가시킨다:* 인간 A673 횡문근육종 세포 (HTB 1598)를 앞서 기술된 바와 같이 배양하였다 ([Kim et al., Nature 362:841-844 (1993)]; 및 [Gerber et al., Cancer Research, 60:6253-6258 (2000)]). 마트리겔(Matrigel) 중 5×10^6 A673 세포를 베이지색의 무모 마우스 (할란 스프라귀 다우레이 (Harlan Sprague Dawley))의 등쪽 옆구리쪽 부위에 s.c.로 주사하여 이종이식을 확립시켰다. 아데노바이러스 작제물을 1, 7 및 14일째 1×10^8 플라크 형성 단위 (PFU)로, 종양내 (IT), q7d 주사하였다. 28-케이지 니들 및 0.5 ml 투베르쿨린 주사기를 사용하여 상기 측 내지 그 밑으로부터 종양 덩어리로 직접 주사하였다. 아데노바이러스 작제물은 아데노바이러스-ANGPTL4 작제물 (Ad-ANGPTL4), 대조군으로서 아데노바이러스-LacZ 작제물 (Ad-LacZ) 또는 아데노바이러스-ANGPTL3 작제물 (Ad-Angpt13)이다. 종양 이식 후 상이한 날에 종양 크기를 측정하였다. 격일로 종양 크기를 측정하고 종양 부피는 타원체 부피 공식 ($\pi/6 \times L \times W \times H$ (여기에서, L은 길이이고, W는 너비이고, H는 높이이다)을 사용하여 산출하였다 [Tomayko & Reynolds, Cancer Chemother. Pharmacol, 24:148-154 (1989)]. **도 8**에 나타낸 바와 같이, 종양 크기 (**폐널 A**) 및 질량 (**폐널 B**)은 Ad-LacZ 또는 Ad-Angpt13 작제물과 비교하여 A673 세포 및 아데노바이러스-ANGPTL4 작제물 (Ad-ANGPTL4)를 주사한 마우스에서 통계학적으로 증가하였다 ($P<0.0001$).

실시예 2: ANGPTL4로 처리된 종양의 항-VEGF 요법으로부터 이탈하려는 경향

[0329] ANGPTL4는 항-혈관신생제, 예로서, 항-VEGF (예로서, 아바스틴® (사우쓰 샌프란시스코에 소재하는 제넨테크)로 처리된 종양에서 종양 세포 증식을 자극하였다. **도 8, 폐널 C**를 참조한다. 인간 A673 횡문근육종 세포 (HTB 1598)를 앞서 기술된 바와 같이 배양하였다 ([Kim et al., Nature 362:841- 844 (1993)]; 및 [Gerber et al., Cancer Research, 60:6253-6258 (2000)]). 마트리겔 중 5×10^6 A673 세포를 베이지색의 무모 마우스 (할란 스프라귀 다우레이)의 등쪽 옆구리쪽 부위에 s.c.로 주사하여 이종이식을 확립시켰다. 아데노바이러스 작제물을 1, 7, 14, 21, 및 28일째 1×10^8 플라크 형성 단위 (PFU)로, 종양내 (IT), q7d 주사하였다. 아데노바이러스 작제물은 아데노바이러스-ANGPTL4 작제물 (Ad-ANGPTL4), 대조군으로서 아데노바이러스-LacZ 작제물 (Ad-LacZ) 또는 아데노바이러스-ANGPTL3 작제물 (Ad-Angpt13)이었다. 또한, 마우스를 주당 2회에 걸쳐 5 mg/kg의 아바스틴® (제넨테크)로 ip 처리하였다. 28-케이지 니들 및 0.5 ml 투베르쿨린 주사기를 사용하여 상기 측 내지 그 밑으로부터 종양 덩어리로 직접 주사하였다. 격일로 종양 크기를 측정하고 종양 부피는 타원체 부피 공식 ($\pi/6 \times L \times W \times H$ (여기에서, L은 길이이고, W는 너비이고, H는 높이이다)을 사용하여 산출하였다 [Tomayko & Reynolds, Cancer Chemother. Pharmacol, 24:148-154 (1989)]. **도 8, 폐널 C**에 나타낸 바와 같이, 아바스틴® 요법과 병용된, Ad-LacZ 또는 Ad-Angpt13 작제물을 포함하는 세포를 주사맞은 마우스와 비교하여, 아데노바이러스-ANGPTL4 작제물 (Ad-ANGPTL4)를 주사맞은 마우스에서는, 비록 아바스틴®으로 처리되었을지라도 종양 크기는 증가하였다.

실시예 3: ANGPTL4에 결합하는 항체는 종양 세포 성장을 저해한다

[0331] ANGPTL4의 생물학적 활성, 예로서, 종양 세포의 증식을 저해하는 항-ANGPTL4 항체의 능력을 시험하였다. 10% FCS을 포함하는 배지 중 12개의 웰 플레이트상에 1×10^4 개의 종양 세포 (예로서, HeLa-S3, Caki, U87MG, 293, A673, HM7 및 Calu 6)/웰을 플레이팅하였다. 5% CO₂ 습윤화된 인큐베이터에서 밤새도록 37°C에서 세포를 인큐베이션시켰다. 배지를 5% FCS로 교체하고 (단, 10% FCS중에 존재하는 Calu 6 세포는 제외) 1, 2.5, 5, 또는 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 항-hANGPTL4 항체 또는 항-Dscr을 웰에 가하거나 어느 항체도 가지 않았다. 플레이트를 37°C 하에 5% CO₂ 습윤화된 인큐베이터에 놓았다. 항-hANGPTL4 항체를 첨가한 후, 2일 또는 3일째 세포를 계수하였다. 항-ANGPTL4 항체는 HeLa-S3, Caki U87MG, 293, A673, 및 Calu 6의 세포 성장을 저해하였지만, HM7 세포는 저해하지 못했다. **도 10, 폐널 A 및 B**를 참조한다.

실시예 4: ANGPTL4에 결합하는 항체의 제조

[0333] 폴리클로날 항체 및 모노클로날 항체를 생산하는 기술은 본 분야에 공지되어 있고 본원에 기술되어 있다. 사용

할 수 있는 항원 (또는 면역원)으로서는 본 발명의 정제된 단백질, 단백질 단편, 상기 단백질을 포함하는 융합 단백질, 및 세포 표면상에 재조합 단백질 및/또는 단백질 단편을 발현시키는 세포를 포함한다. 과도한 실험 없이도 본 분야의 기술자에 의해 항원을 선별할 수 있다.

[0334] 프로인트 완전 애주번트에서 유화된 항원을 사용하여 마우스, 예로서, Balb/c를 면역화하고, 1-100 마이크로그램의 양으로 마우스, 예로서, Balb/c에 피하 또는 복강내 주사하였다. 다르게는, 항원을 MPL-TDM 애주번트 (몬테나주 해밀톤에 소재하는 리비 이뮤노케미칼 리서치(Ribi Immunochemical Research))에서 유화시키고 동물의 뒷다리 발바닥에 주사하였다. 이어서, 10 내지 12일이 경과한 후, 선별된 애주번트에서 유화된 추가의 항원을 사용하여 면역화된 마우스를 항원 자극하였다. 이후, 몇주동안 마우스를 또한 추가의 면역 주사로 항원 자극 할 수 있었다. 항체를 검출하는 ELISA 분석법을 시험하기 위해 안와 후방의 출혈을 통해 마우스로부터 혈청 샘플을 주기적으로 수득할 수 있었다.

[0335] 적절한 항체 역사를 검출한 후, 항체에 대하여 "양성"인 동물에 제공된 리간드의 최종 정맥 주사를 사용하여 주사할 수 있었다. 3일 내지 4일이 경과한 후, 마우스를 희생시키고 지라 세포를 회수하였다. 이어서, 지라 세포를 ATCC, No. CRL 1597로부터 이용가능한, 예로서, P3X63AgU.1과 같은 선별된 뮤린 골수종 세포주에 융합시켰다 (35% 폴리에틸렌 글리콜을 사용). 상기 융합을 통해 하이브리도마 세포를 생성한 후, HAT (히포키산틴, 아미노프테린, 및 티미딘) 배지를 함유하는 96 웰 조직 배양 플레이트에 플레이팅시켜 융합되지 않은 세포, 골수종 하이브리드, 및 지라 세포 하이브리드의 증식은 저해하였다.

[0336] 하이브리도마 세포는 항원에 대한 반응에 대하여 ELISA에서 선별될 것이다. 본원에서 ANGPTL4에 대하여 원하는 모노클로날 항체를 분비하는 "양성" 하이브리도마 세포를 결정하는 것은 충분히 본 분야의 기술자의 역량내에 존재한다.

[0337] 양성 하이브리도마 세포를 동계(syngeneic) Balb/c 마우스내로 복강내 주사하여 항-ANGPTL4 모노클로날 항체를 함유하는 복수를 생산할 수 있다. 다르게는, 하이브리도마 세포를 조직 배양 플라스크 또는 회전병에서 배양할 수 있다. 황산암모늄 침전법에 이어서 겔 배제 크로마토그래피를 사용하여 복수 중 생산된 모노클로날 항체를 정제할 수 있다. 다르게는, 단백질 A 또는 단백질 G와 항체의 결합에 기초하는 친화성 크로마토그래피를 사용할 수 있다.

[0338] 예를 들면, 1일, 40일 및 70일째 이. 콜라이에서 생성된 500 μg 의 재조합 인간 ANGPTL4 단백질 (23-406)을 사용하여 래빗을 면역화함으로써 폴리클로날 래빗 항체를 생성하였다. 면역화시킨 후 80일 및 120일째 혈청을 회수하고 단백질-A 세파넥스 칼럼에 의해 항체를 정제하였다.

실시예 5: 차단 또는 중화 항체

[0340] 본 분야에 공지된 다양한 기술, 예로서, ELISA에 의해 본원에 기술된 항원에 대한 항체를 동정할 수 있다. 예를 들면, 플레이트를 관심의 대상이 되는 폴리펩티드, 예로서, ANGPTL4 또는 그의 단편으로 피복시키고, 상기 폴리펩티드, 예로서, AANGPTL4에 대하여 생성된 항체와 함께 인큐베이션시킬 수 있다 (예로서, 미국 특허 제 6,348,350호, 제 6,372,491호 및 제 6,455,496호에 기술된 것 참조). 결합한 항체는 다양한 방법에 의해 검출할 수 있다.

[0341] 길항체 (예로서, 차단 또는 중화) 항체는 경쟁 분석법 및/또는 활성 분석법에 의해 동정할 수 있다. 예를 들면, ANGPTL4의 발현은 종양 세포 증식, 유주, 부착 또는 $\alpha_v\beta_5$ 와의 결합을 자극한다. 종양 세포 증식 (예로서, 도 10, 패널 A 및 B를 참조한다), 유주, 부착 (예로서, 도 12를 참조한다) 또는 $\alpha_v\beta_5$ (매사추세츠 스왑프스코트 37K에 소재하는 유에스바이올로지칼(USbiological))와의 결합 (예로서, 도 13, 패널 B 및 C를 참조한다)을 차단하는 항체의 능력에 의해 ANGPTL4에 대한 차단 또는 중화 항체의 결정을 나타낼 수 있다. 예를 들면, A673 횡문근육종 세포를 플레이팅하고 항-ANGPTL4 항체, 또는 대조군 항체 또는 PBS와 함께 Ad-hANGPTL4로 형질도입된 COS7 세포로부터의 상등액과 함께 인큐ベ이션시킬 수 있다. 몇일후, 세포를 트립신화하고 계수할 수 있다. 세포의 갯수를 감소시키는 항체는 차단 또는 중화 항체로서 동정된다. ANGPTL4는 또한 종양 세포의 세포 유주를 유도하고 프로-혈관신생 인자인 것으로 나타났다 (예로서, [Le Jan et al., *American Journal of Pathology*, 164(5): 1521-1528 (2003)] 참조). 따라서, 종양 세포 유주 분석법, 및/또는 혈관신생 분석법, 예로서, CAM 분석법에서 ANGPTL4와 함께 항체를 사용하여 ANGPTL4에 대한 차단 또는 중화 항체는 동정 할 수 있다.

[0342] 종양 성장을 차단 또는 저하시키거나, 암 세포 성장을 차단 또는 저하시키는데 사용될 수 있는, ANGPTL4에 대한

차단 또는 중화 항체는 또한 상기 기술된 바와 같은 배양물 및/또는 베이지색/무모 마우스 연구에서 종양 세포를 사용함으로써 동정할 수 있다. 예를 들면, 종양 세포를 무모 마우스에 주사할 수 있다. 종양 성장이 확립된 후 다양한 시점에 주당 1회 또는 2회에 걸쳐 다양한 용량의 차단 또는 중화 ANGPTL4 항체, 항체 대조군, 또는 PBS를 마우스에 복강내 주사할 수 있다. 종양 크기는 매주 측정할 수 있고, 연구 종결시 종양을 절개하고 질량을 측정할 수 있다. 마우스에서 종양 성장을 차단하거나 감소시키는 차단 또는 중화 ANGPTL4 항체가 동정된다.

[0343] 종양 성장을 차단 또는 저하시키거나, 암 세포 성장을 차단 또는 저하시키는 ANGPTL4 항체 및 항-혈관신생제의 배합물을 상기 기술된 바와 같은 배양물 및/또는 베이지색/무모 마우스 연구에서 종양 세포를 사용함으로써 동정할 수 있다. 상기 기술한 바와 같이, 종양 세포를 무모 마우스에 주사할 수 있다. 종양 성장이 확립된 후 다양한 시점에 주당 1회 또는 2회에 걸쳐 다양한 용량의 다양한 용량의 ANGPTL4 길항체 및 항암제, 예로서, 항-혈관신생제, 예로서, 항-VEGF 항체, 또는 ANGPTL4 길항체, 또는 항암제, 또는 항체 대조군, 또는 PBS의 배합물을 마우스에 복강내 주사할 수 있다. 종양 크기는 매주 측정할 수 있고, 연구 종결시 종양을 절개하고 질량을 측정할 수 있다. 마우스에서 종양 성장을 차단 또는 감소시키거나, 대조군 또는 단일 제제만의 의한 것과 비교하여 종양 성장의 차단 또는 감소를 증진시키는 ANGPTL4 길항체 및 항암제의 병용 요법이 동정된다.

[0344] 실시예 6: ANGPTL4 변이체

[0345] 제조자의 프로토콜에 따라 표준 돌연변이화 키트(예로서, 퀄체인저 XL 특정부위 돌연변이화 키트(QuikChange XL Site-Directed Mutagenesis Kit) (캘리포니아주 칼즈베드에 소재하는 인비트로겐))를 사용하여 변이체 ANGPTL4를 제조하였다. 인간 ANGPTL4 서열에서 2개의 아미노산을 치환시켰다(예로서, 도 2를 참조한다). 위치 162번 및 164번(R162G 및 R164E)에서 치환됨으로써 RKR은 GKE로 바뀌었다. ANGPTL4 단백질(L280 플라스미드, aa 1-406) 또는 변이체 ANGPTL4를 일시적으로 형질감염된 COS-7 세포의 상등액으로 단리시켰다. 정제하기 위하여 상등액을 니켈 칼럼상에 로딩시켰다. 항-플래그(FLAG)-HRP 항체를 사용하여 웨스턴 블롯에 의해 단백질을 검출하였다. 도 3, 패널 B를 참조한다. 치환하고 변이체 ANGPTL4를 천연 또는 야생형 ANGPTL4 단백질과 비교하였을 때, 웨스턴 블로팅에 의해 변이체 ANGPTL4는 천연 ANGPTL4보다 고분자인 것으로 밝혀졌다. 천연 단백질의 위치 162번 및 164번에서 RKR로부터 GKE로의 치환은 ANGPTL4의 단백질 분해를 저해시켰다.

[0346] 실시예 7: ANGPTL4는 $\alpha_v\beta_5$ 인테그린에 결합한다

[0347] 안지오포이에틴은 그의 섬유소원(FBN)-유사 영역을 통해 내피 세포 특이성 티로신 키나제 수용체 Tie2에 결합함으로써 혈관신생을 조절하는, 분비된 인자이다. 분비된 리간드 계열에 존재하는 꼬인-코일 영역은 리간드(ligand) 올리고중합화(oligomerization)에 필수적인 것으로 밝혀졌다(예로서, [Procopio et al., *J. Biol. Chem.*, 274:30196-201(1999)] 참조).

[0348] 안지오포이에틴과 유사하게, ANGPTL3 및 ANGPTL4는 각각 N-말단 시그널 펩티드에 이어 꼬인-코일 영역 및 C-말단 FBN-유사 영역으로 구성된, 분비된 당단백질이다. ANGPTL3은 FBN-유사 영역을 통해 $\alpha_v\beta_3$ 에 결합하는 것으로 결정되었다. 본 발명자는 ANGPTL4가 $\alpha_v\beta_5$ 에 결합한다고 결정하였다. ANGPTL4 피복된 플레이트에 결합하거나 부착할 수 있는 능력에 대하여 $\alpha_v\beta_5$ 인테그린으로 안정하게 형질감염된 293-1953 세포주를 시험하였다. 세포를 회수하고 PBS, 1% BSA, 1 mM CaCl₂ 및 1 mM MgCl₂를 함유하는 무혈청 배지에서 10^5 세포/ml로 희석하였다. 37°C에서 15분동안 세포를 항-인테그린 $\alpha_v\beta_5$ 항체(MAB 1961(캘리포니아주 테메클라에 소재하는 케미콘(Chemicon)) 또는 펩티드와 함께, 또는 그를 포함하지 않고 사전에 인큐ベ이션시켰다. 제조합 mANGPTL4, BSA 또는 비트로넥틴(1 μg, 3 μg, 10 μg, 또는 30 μg/ml)을 밤새도록 4°C에서 넌크 맥시소프(Nunc Maxisorp) 96-웰 평평한-바닥 마이크로티터 플레이트상에 피복시키고 1.5시간동안 37°C에서 인산염 완충처리된 염수(PBS)(pH 7.4) 중 200 μl의 3% BSA로 차단하였다. 세포 혼탁액(5×10^4 세포/100 μl/웰(5×10^5 /ml))을 피복된 웰에 가하고 플레이트를 5.5시간동안 37°C에서 인큐ベ이션시켰다. 비부착 세포를 PBS 세척에 의해 제거하고 세포 부착은 200 μl의 CyQuant GD Dye(몰레큘라 프로브스(인비트로겐 디텍션 테크놀로지스(Invitrogen detection Technologies))(캘리포니아주 칼즈베드)) (1:400)/세포 분해 완충액을 가하여 측정하고 2-5분동안 인큐ベ이션시켰다. 480 nm 여기 및 520 nm 방출 최대값을 사용하여 샘플 형광을 측정하였다. 란데그렌(Lanndegren)의 PNAG 방법 또한 사용할 수 있다(예로서, [Landegren, *J. Immunol. Method*, 67:379-388(1984)] 참조). $\alpha_v\beta_5$ 를 발현시키는 세포는 음성 대조군인 BSA와 비교하여 ANGPTL4 및 양성 대조군인 비트로넥틴(매사추세츠 스왑스코트에 소재하는 유에스바이올로지칼)에 부착하는 것으로 나타났다. 도 11을

참조한다.

- [0349] $\alpha_v\beta_5$ 인테그린이 ANGPTL4 세포 부착을 매개하는데 충분한지를 결정하기 위하여 세포 부착 분석에서 부착을 저해할 수 있는 그의 능력에 대하여 차단 항체를 시험하였다. 단백질 피복된 (BSA (1), 비트로넥틴 (2) 또는 ANGPTL4(3)) 웰과 함께 인큐베이션시키기 전에 작용성 차단 항체 (항- $\alpha_v\beta_5$ 항체 (MAB 1961 (MAB 1961 (캘리포니아주 테메큘라에 소재하는 케미콘) 또는 항-hANGPTL4 항체)를 293-1953 세포에 가하였다. 도 12를 참조한다. 항- $\alpha_v\beta_5$ 및 항-ANGPTL4 항체는 ANGPTL4 세포 부착 활성을 과괴시켰다.
- [0350] ANGPTL4가 $\alpha_v\beta_5$ 에 결합하는지를 확인하기 위하여 추가의 실험을 실시하였다. mANGPTL4, IgG-hANGPTL4-N말단 (1-183) 및/또는 IgG-hANGPTL4-C말단 (184-406)이 $\alpha_v\beta_5$ (매사추세츠 스왑스코트 37K에 소재하는 유에스바이올로지칼) 피복된 플레이트에 결합하는지를 검출하기 위하여 ELISA 실험을 실시하였다. 피복 완충액과 함께 100 μl /웰의 인테그린 $\alpha_v\beta_5$ 회석제 ($1\mu\text{g}/\text{ml}$ 피복 완충액(50 mM 탄산염/중탄산염 (pH 9.6)))를 4°C 에서 밤새도록 인큐ベ이션시켰다. 플레이트를 세척 완충액 (PBS (pH 7.4), 0.05% 트윈(Tween)-20)을 사용하여 3회에 걸쳐 세척하고, 완만하게 교반시키면서 100 μl /웰의 차단 완충액 (PBS (pH 7.4), 0.5% BSA)를 실온에서 1시간동안 가하였다. 다양한 양 ($0, 0.070\mu\text{g}, 0.22 \mu\text{g}, 0.66 \mu\text{g}, 2 \mu\text{g}$, 또는 $6 \mu\text{g}$)의 샘플, mANGPTL4, IgG-hANGPTL4-N말단 (1-183) 및/또는 IgG-hANGPTL4-C말단 (184-406)을 샘플 완충액 (0.5% BSA, 50 mM Tris (pH 7.4), 0.05% 트윈 20, 1 mM MnCl₂, $50 \mu\text{M}$ CaCl₂, $50 \mu\text{M}$ MgCl₂, 100 mM NaCl)에서 제조하고 30분동안 인큐ベ이션시켰다. 샘플을 플레이트 (상기 인큐베이션된 양 중 $100\mu\text{l}$ /웰)에 가하고 완만하게 교반시키면서 실온에서 2시간동안 인큐베이션시켰다. 플레이트를 완충액을 사용하여 세척하고 분석 완충액 (PBS (pH 7.4), 0.5% BSA, 0.05% 트윈 20) 중 100 μl /웰 항-플래그(Flag)-호스래디쉬 퍼록시다아제 (HRP) ($100 \text{ ng}/\text{ml}$) (잭슨(Jackson), #109-036-098)를 가하고 완만하게 교반시키면서 실온에서 1시간동안 인큐베이션시켰다. 플레이트를 세척하였다. 100 μl /웰의 테트라메틸벤지딘 (TMB) (모스 인코포레이티드(Moss, Inc.))을 가하고 실온에서 우수한 색상이 발색될 때 까지 플레이트에서 인큐베이션시켰다. 100 μl /웰 종결 용액 (1 M H₃PO₄)을 가하여 반응을 종결시켰다. 플레이트를 630 nm 에서 판독하였다. 약간 더 많은 IgG-hANGPTL4-C말단이 플레이트에 결합하긴 했지만, mANGPTL4, IgG-hANGPTL4-N말단 및 IgG-hANGPTL4-C-말단은 $\alpha_v\beta_5$ 피복된 플레이트에 결합하였다. 도 13, 폐널 A를 참조한다.
- [0351] 항-ANGPTL4 항체는 ANGPTL4가 $\alpha_v\beta_5$ 피복된 플레이트에 결합하는 것을 저해한다. ELISA 실험을 실시하였다. 피복 완충액과 함께 100 μl /웰의 인테그린 $\alpha_v\beta_5$ 회석제 ($1\mu\text{g}/\text{ml}$ 피복 완충액(50 mM 탄산염/중탄산염 (pH 9.6)))를 4°C 에서 밤새도록 인큐베이션시켰다. 플레이트를 세척 완충액 (PBS (pH 7.4), 0.05% 트윈-20)을 사용하여 3회에 걸쳐 세척하고, 완만하게 교반시키면서 100 μl /웰의 차단 완충액 (PBS (pH 7.4), 0.5% BSA)을 실온에서 1시간동안 가하였다. 샘플 완충액 (0.5% BSA, 50 mM Tris (pH 7.4), 0.05% 트윈 20, 1 mM MnCl₂, $50 \mu\text{M}$ CaCl₂, $50 \mu\text{M}$ MgCl₂, 100 mM NaCl) 중 $0.6 \mu\text{g}$ 내지 $6.0 \mu\text{g}$ 의 샘플, mANGPTL4, IgG-hANGPTL4-N말단 (1-183) 및/또는 IgG-hANGPTL4-C말단 (184-406)을 항-ANGPTL4 항체 ($1.5 \mu\text{g}$) 또는 항-Dscr ($1.5 \mu\text{g}$)과 함께 30분동안 인큐베이션시켰다. 인큐베이션시킨 후, 완만하게 교반시키면서 100 μl /웰의 샘플 +/- 항체를 플레이트와 함께 실온에서 2시간동안 인큐베이션시켰다. 플레이트를 완충액을 사용하여 세척하고 분석 완충액 (PBS (pH 7.4), 0.5% BSA, 0.05% 트윈 20) 중 100 μl /웰 항-플래그(Flag)-HRP ($100 \text{ ng}/\text{ml}$)을 가하고 완만하게 교반시키면서 실온에서 1시간동안 인큐베이션시켰다. 플레이트를 세척하고 100 μl /웰의 TMB를 가하고 실온에서 우수한 색상이 발색될 때 까지 플레이트에서 인큐베이션시켰다. 100 μl /웰 종결 용액 (1 M H₃PO₄)을 가하여 반응을 종결시켰다. 플레이트를 630 nm 에서 판독하였다. 항-ANGPTL4 항체는 항-Dscr 항체, 5G7 모노클로날 항체 또는 배지와 비교하여 $\alpha_v\beta_5$ 피복된 플레이트에 결합하는 mANGPTL4, IgG-hANGPTL4-N말단 및 IgG-hANGPTL4-C말단의 양을 감소시켰다. 도 13, 폐널 B를 참조한다.
- [0352] 또다른 실험에서, ANGPTL4와 인테그린 $\alpha_v\beta_5$ 의 결합을 ELISA으로 나타내었다. 본 실험에서는, $80 \mu\text{l}$ /웰의 hANGPTL4-C 말단, 비트로넥틴 또는 BSA ($5\mu\text{g}/\text{ml}$)를 피복 완충액 (50 mM 탄산염/중탄산염 (pH 9.6)) 중 플레이트에 가하고 4°C 에서 밤새도록 인큐베이션시켰다. 플레이트를 세척하고 (세척 완충액: PBS (pH 7.4), 0.05% 트윈-20), 배지, 항-hANGPTL4 항체 ($15 \mu\text{g}/100 \mu\text{l}$), 또는 항-Dscr 항체 ($15 \mu\text{g}/100 \mu\text{g}$)와 함께 100 μl /웰의 차단 완충액 (PBS (pH 7.4), 0.5% BSA)을 가하고 완만하게 교반시키면서 실온에서 1시간동안 인큐베이션시켰다. 플레이트를 세척하고 $\alpha_v\beta_5$ $100 \mu\text{l}$ ($3-9 \mu\text{g}/\text{ml}$)를 가하고 완만하게 교반시키면서 실온에서 2시간동안 인큐베이-

션시켰다. 플레이트를 세척하고 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ (1:1000)의 항- $\alpha_v\beta_5$ 항체 (케미콘) ($5 \mu\text{g}/100\mu\text{l}$)을 분석 완충액 (PBS (pH 7.4), 0.5% BSA, 0.05% 트윈 20)에 가하고 완만하게 교반시키면서 실온에서 1시간동안 인큐베이션시켰다. 인큐베이션시킨 후, 플레이트를 세척하고 $100 \mu\text{l}/\text{웰}$ 호스래디쉬 퍼록시다아제 (HRP) 항-마우스 (1:5000)를 분석 완충액에 가하였다. 플레이트를 세척하고 $100 \mu\text{l}/\text{웰}$ 의 테트라메틸벤지딘 (TMB)을 가하고 우수한 색상이 발색될 때까지 실온에서 인큐베이션시켰다. $100 \mu\text{l}/\text{웰} 1 \text{ M H}_3\text{PO}_4$ 를 사용하여 반응을 종결시키고 플레이트를 630 nm 에서 판독하였다. $\alpha_v\beta_5$ 는 ANGPTL4 (레인 1) 및 비트로넥트린 (레인 4) 피복된 플레이트에 결합하였다. 항-ANGPTL4 항체 (레인 2)에 의해 결합이 차단되었지만, 대조군 항체 항-Dscr이 사용된 경우 (레인 3) 또는 대조군 단백질이 플레이트상에 피복된 경우 (레인 5)에는 그렇지 않았다. 도 13, 패널 C를 참조한다.

[0353] 따라서, 본 발견을 통해 재조합 ANGPTL4가 $\alpha_v\beta_5$ 인테그린에 특이적으로 결합한다는 것이 입증되었다.

[0354] 본 명세서는 본 분야의 기술자가 본 발명을 실시함에 있어 충분하다고 판단된다. 본원에 기술된 일례 및 실시태양은 단지 설명하기 위한 것임을 이해한다. 기탁된 실시태양은 본 발명의 특정 일면의 단독 일례로서 의도되기 때문에 본 발명은 기탁된 작제물에 의한 범주로 제한하고자 하는 것은 아니고, 기능상 동등한 임의의 작제물도 본 발명의 범주내 포함된다. 본원의 물질의 기탁은 설명서가 그 이상의 최고의 것을 비롯한 본 발명의 임의의 일면을 실시할 수 있도록 하는데는 부적절하다거나, 대표되는 특정 예시로 본 청구 범위의 범주를 제한하는 것으로서도 해석되지 않는다는 승인된 사실을 포함하는 것은 아니다. 실제로, 본원에 나타낸 것 및 기술된 것 외의 본 발명의 다양한 변형은 상기 설명으로부터 본 분야의 기술자에게 자명할 것이며 이는 첨부된 청구항의 범주내 포함될 것이다. 본원에서 인용된 모든 공개문헌, 특허, 및 특허출원의 전체 내용은 모든 목적을 위해 본 명세서에서 참조로 인용된다.

도면의 간단한 설명

[0024] 도 1은 인간 ANGPTL4의 핵산 서열 (서열번호: 1)을 도시한다.

[0025] 도 2는 인간 ANGPTL4의 아미노산 서열 (서열번호: 2)을 도시한다.

[0026] 도 3, 패널 A는 디티오틴레이톨 (DTT)의 존재하에 (10 mM) 또는 부재하에서 SDS 폴리아크릴아마이드 젤 전기영동 (SDS-PAGE) (4-20%)에서 분리된, 정제된 재조합 뮤린 ANGPTL4 (23-410)를 도시한다. 도 3, 패널 B는 SDS 젤상에서 분리되고 웨스턴 블로팅에 의해 검출된 야생형 (레인 1) 및 변이체 hANGPTL4 (레인 2) (여기에서, 변이체 hANGPTL4는 R162G 및 R164E 치환을 갖는다)를 도시한다.

[0027] 도 4, 패널 A, B, 및 C는 ANGPTL4가 A673 종양 세포를 자극하고 (패널 A 및 B) U87MG 종양 세포 (패널 B)는 ANGPTL4 발현 작제물을 사용하는 종양 세포의 형질도입에 의해, 및 ANGPTL4 발현 작제물 (2)로 형질도입된 COS 세포 (C)로부터의 적응용 배지에 의해 증식한다는 (패널 C) 것을 도시한다. 패널 B에서, 종양 세포는 (1) ANGPTL4 발현 작제물 대조군, (2) Ad-ANGPTL4 발현 작제물 또는 (3) Ad-SiRNA ANGPTL4 작제물로 형질도입된다. 패널 C에서, A673 종양 세포 증식은 (1) LacZ 발현 작제물, (2) ANGPTL4 발현 작제물 또는 (3) ANGPTL3 발현 작제물로 형질도입된 Hepa (A), HMVEC (B) 또는 COS 세포 (C)로부터의 적응용 배지에 의해 실시된다.

[0028] 도 5는 mANGPTL4 가 배양 디쉬상에 피복될 때 A673 종식을 자극시키는 것을 도식적으로 도시한다.

[0029] 도 6, 패널 A 및 B는 A673 종양 세포와 다양한 형태의 ANGPTL4의 결합 (패널 A) 및 다양한 조건하에서의 결합 (패널 B)를 도시한다.

[0030] 도 7, 패널 A 및 B는 7일 (패널 A) 또는 4일 (패널 B)동안 배양하였을 때, ANGPTL4를 함유하는 배지를 사용한 A673 종식을 도시한다. 패널 A에서, (1)은 AdLacZ 발현 작제물 대조군이고, (2)는 Ad-hANGPTL4 발현 작제물이고, (3)은 AdLacZ 발현 작제물 및 rmANGPTL4이다. 패널 B에서, (1)은 첨가하지 않은 것이고, (2)는 완충액 대조군이고, (3)은 mANGPTL4 ($2.5 \mu\text{g}/\text{ml}$)이고, (4)는 hANGPTL4 ($2.5 \mu\text{g}/\text{ml}$)이고, (5)는 IgG-hANGPTL4 ($2.5 \mu\text{g}/\text{ml}$)이고 (6)은 hIgG-mANGPTL4 ($2.5 \mu\text{g}/\text{ml}$)이다.

[0031] 도 8, 패널 A, B 및 C는 ANGPTL4가 생체내 종양 성장을 촉진시키고 (패널 A 및 패널 B) 아데노바이러스-ANGPTL4 작제물을 종양내 투여받은 종양에서 예로서, 항-VEGF 항체 (아바스틴®) (사우쓰 샌프란시스코에 소재하는 제넨테크)를 사용하는 항-종양 요법으로부터 이탈하려는 경향을 촉진시킨다 (패널 C)는 것을 도시한다. 패널 A 및 C는 종양 크기(cm^3) 대 종양 이식후 경과일 수를 나타낸다. 패널 B는 이식 후 20일째 이종이식받은 A673 종양의 질량을 나타낸다.

- [0032] **도 9**는 ANGPTL4가 종양 세포인 A673 및 4T-1의 세포 유주를 유도하는 것을 도시하고, 여기에서, (1)은 혈청이 첨가되지 않은 것이고, (2)는 10% 우테아 혈청 (FCS)이고, (3)은 PDGF-BB이고, (4)는 ANGPTL4이다.
- [0033] **도 10,** **패널 A** 및 **B**는 항-hANGPTL4 항체가 종양 세포 성장을 저해하는 것을 도시하고 (예로서, **패널 A** (HeLa-S3 및 Caki 세포) 및 **패널 B** (U87MG, 293 및 A673 세포)), 여기에서, (1)은 항-hANGPTL4 항체이고, (2)는 항-다운 증후군에 중요한 부위 1 단백질 (Dscr) 항체 대조군이고, (3)은 아무것도 첨가되지 않은 것이고, 여기에서, 막대 그래프 하단의 수는 항체 농도 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)를 제시한다.
- [0034] **도 11**은 하단에 표시된 농도 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)의 ANGPTL4 또는 비트로넥틴로 피복된 플레이트와 293-1953 ($\alpha_v\beta_5$) 세포의 부착을 도시하고, 여기에서, BSA는 대조군으로서 사용된다.
- [0035] **도 12**는 항- $\alpha_v\beta_5$ 및 항-hANGPTL4 항체가 ANGPTL4 세포 부착 활성을 파괴한다는 것을 도시하고, 여기에서, (1)은 BSA이고, (2)는 비트로넥틴이고, 및 (3)은 ANGPTL4이다.
- [0036] **도 13,** **패널 A, B** 및 **C**는 인테그린 $\alpha_v\beta_5$ 과 ANGPTL4의 결합을 도시한다. **패널 A**는 표시된 양을 사용하여 $\alpha_v\beta_5$ 피복된 플레이트와 단백질 (mANGPTL4, hANGPTL4-N_{말단}, 또는 hANGPTL4-C_{말단})의 결합을 도시한다. **패널 B**는 항-hANGPTL4 항체와 함께 $\alpha_v\beta_5$ 피복된 플레이트와 단백질 (mANGPTL4, hANGPTL4-N_{말단}, 또는 hANGPTL4-C_{말단})의 결합을 도시한다. **패널 C**는 $\alpha_v\beta_5$ 와 ANGPTL4의 결합을 도시하고, 여기에서, (1)은 플레이트상에 피복된 hANGPTL4-C_{말단}이고, (2)는 플레이트상에 피복되고 항-hANGPTL4와 인큐베이션된 hANGPTL4-C_{말단}이고, (3)은 플레이트상에 피복되고 항-Dscr와 인큐베이션된 hANGPTL4-C_{말단}이고, (4)는 플레이트상에 피복된 비트로넥틴이고 (5)는 $\alpha_v\beta_5$ 첨가한 플레이트상에 피복된 BSA이다.

도면

도면1A

서열 번호 :1:

GCCGAGCTGA GCGGATCCTC ACATGACTGT GATCCGATTC TTTCCAGCGG 50
 CTTCTGCAAC CAAGCGGGTC TTACCCCCGG TCCTCCGCGT CTCCAGTCCT 100
 CGCACCTGGA ACCCCAACGT CCCCAGAGT CCCCGAATCC CCGCTCCCAG 150
 GCTACCTAAG AGGATGAGCG GTGCTCCGAC GGCGGGGCA GCCCTGATGC 200
 TCTGCGCCGC CACCGCCGTG CTACTGAGCG CTCAGGGCGG ACCCGTGCAG 250
 TCCAAGTCGC CGCGCTTTGC GTCTGGGAC GAGATGAATG TCCCTGGCGCA 300
 CGGACTCCTG CAGCTCGGCC AGGGGCTGCG CGAACACGCG GAGCGCACCC 350
 GCAGTCAGCT GAGCGCGCTG GAGCGGCCG TGAGCGCGTG CGGGTCCGCC 400
 TGTCAGGGAA CCGAGGGGTC CACCGACCTC CCGTTAGCCC CTGAGAGCCG 450
 GGTGGACCCCT GAGGTCCCTTC ACAGCCTGCA GACACAACTC AAGGCTCAGA 500
 ACAGCAGGAT CCAGCAACTC TTCCACAAGG TGGCCCAGCA GCAGCGGCAC 550
 CTGGAGAAGC AGCACCTGCG AATTCAAGCAT CTGCAAAGCC AGTTTGGCCT 600
 CCTGGACCAC AAGCACCTAG ACCATGAGGT GGCCAAGCCT GCCCGAAGAA 650
 AGAGGCTGCC CGAGATGGCC CAGCCAGTTG ACCCGGCTCA CAATGTCAGC 700
 CGCCTGCCACC GGCTGCCAG GGATTGCCAG GAGCTGTTCC AGGTTGGGGA 750
 GAGGCAGAGT GGACTATTTG AAATCCAGCC TCAGGGTCT CCGCCATTTC 800
 TGGTGAACCTG CAAGATGACC TCAGATGGAG GCTGGACAGT AATTCAAGGG 850
 CGCCACGATG GCTCAGTGGA CTTCAACCAG CCCTGGGAAG CCTACAAGGC 900
 GGGGTTTGGG GATCCCCACG GCGAGTTCTG GCTGGGTCTG GAGAAGGTGC 950
 ATAGCATCAC GGGGGACCGC AACAGCCGCC TGGCCGTGCA GCTGCGGGAC 1000
 TGGGATGGCA ACGCCGAGTT GCTGCAGTTC TCCGTGCACC TGGGTGGCGA 1050
 GGACACGGCC TATAGCCTGC AGCTCACTGC ACCCGTGGCC GGCCAGCTGG 1100
 GCGCCACCCAC CGTCCCCACCC AGCGGCCTCT CCGTACCCCTT CTCCACTTGG 1150
 GACCAGGATC ACGACCTCCG CAGGGACAAG AACTGCGCCA AGAGCCTCTC 1200

도면1B

TGGAGGCTGG TGGTTTGGCA CCTGCAGCCA TTCCAACCTC AACGGCCAGT 1250
 ACTTCGGCTC CATCCCACAG CAGCGGCAGA AGCTTAAGAA GGGAAATCTTC 1300
 TGGAAAGACCT GGCGGGGCCG CTACTACCCG CTGCAGGCCA CCACCATGTT 1350
 GATCCAGCCC ATGGCAGCAG AGGCAGCCTC CTAGCGTCCT GGCTGGGCCT 1400
 GGTCCCAGGC CCACGAAAGA CGGTGACTCT TGGCTCTGCC CGAGGGATGTG 1450
 GCCGTTCCCT GCCTGGGCAG GGGCTCCAAG GAGGGGCCAT CTGGAAACTT 1500
 GTGGACAGAG AAGAAGACCA CGACTGGAGA AGCCCCCTTT CTGAGTGCAG 1550
 GGGGGCTGCA TCCGTTGCCT CCTGAGATCG AGGCTGCAGG ATATGCTCAG 1600
 ACTCTAGAGG CGTGGACCAA GGGGCATGGA GCTTCACTCC TTGCTGGCCA 1650
 GGGAGTTGGG GACTCAGAGG GACCACITGG GGCCAGCCAG ACTGGCCTCA 1700
 ATGGCGGACT CAGTCACATT GACTGACGGG GACCAGGGCT TGTGTGGGTC 1750
 GAGAGCGCCC TCATGGTGCT GGTGCTGTTG TGTGTAGGTC CCCTGGGGAC 1800
 ACAAGCAGGC GCCAATGGTA TCTGGCGGA GCTCACAGAG TTCTTGGAAAT 1850
 AAAAGCAACC TCAGAACACAC 1869

도면2A

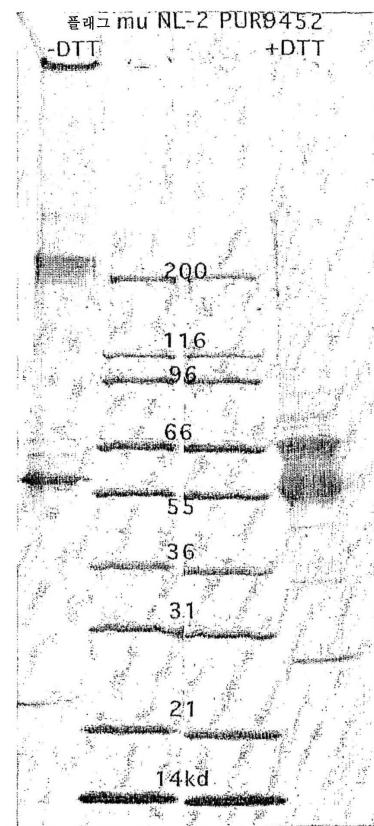
서열 번호 :2:

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

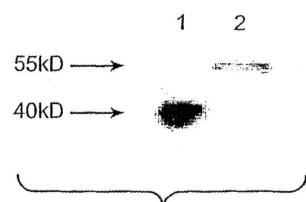
도면2B

Trp Glu Ala Tyr Lys Ala Gly Phe Gly Asp Pro His Gly Glu Phe
 245 250 255
 Trp Leu Gly Leu Glu Lys Val His Ser Ile Thr Gly Asp Arg Asn
 260 265 270
 Ser Arg Leu Ala Val Gln Leu Arg Asp Trp Asp Gly Asn Ala Glu
 275 280 285
 Leu Leu Gln Phe Ser Val His Leu Gly Gly Glu Asp Thr Ala Tyr
 290 295 300
 Ser Leu Gln Leu Thr Ala Pro Val Ala Gly Gln Leu Gly Ala Thr
 305 310 315
 Thr Val Pro Pro Ser Gly Leu Ser Val Pro Phe Ser Thr Trp Asp
 320 325 330
 Gln Asp His Asp Leu Arg Arg Asp Lys Asn Cys Ala Lys Ser Leu
 335 340 345
 Ser Gly Gly Trp Trp Phe Gly Thr Cys Ser His Ser Asn Leu Asn
 350 355 360
 Gly Gln Tyr Phe Arg Ser Ile Pro Gln Gln Arg Gln Lys Leu Lys
 365 370 375
 Lys Gly Ile Phe Trp Lys Thr Trp Arg Gly Arg Tyr Tyr Pro Leu
 380 385 390
 Gln Ala Thr Thr Met Leu Ile Gln Pro Met Ala Ala Glu Ala Ala
 395 400 405
 Ser
 406

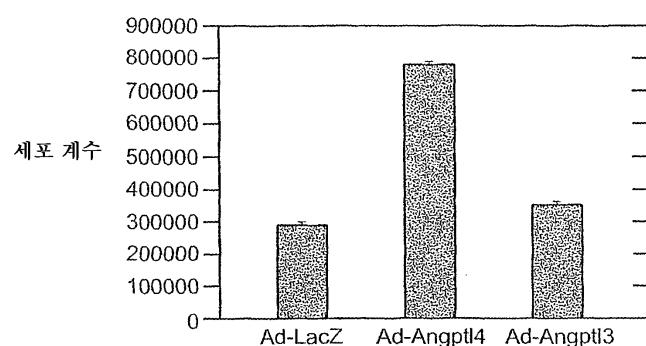
도면3A



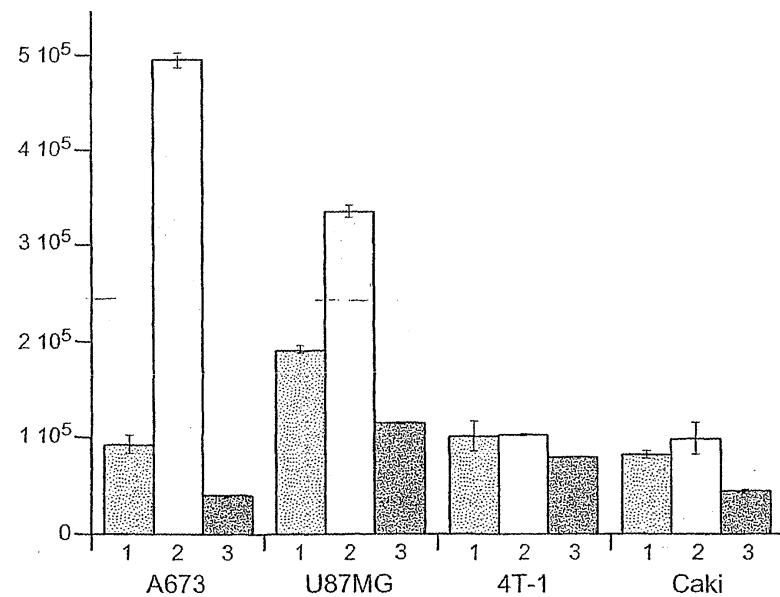
도면3B



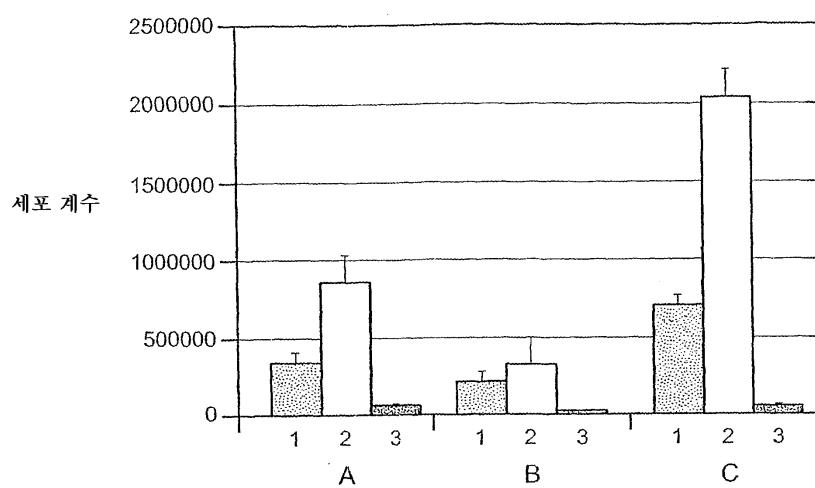
도면4A



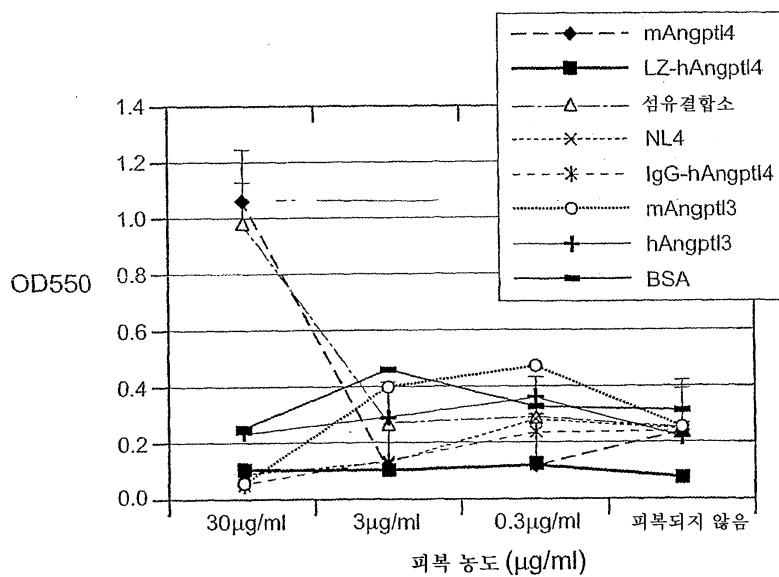
도면4B



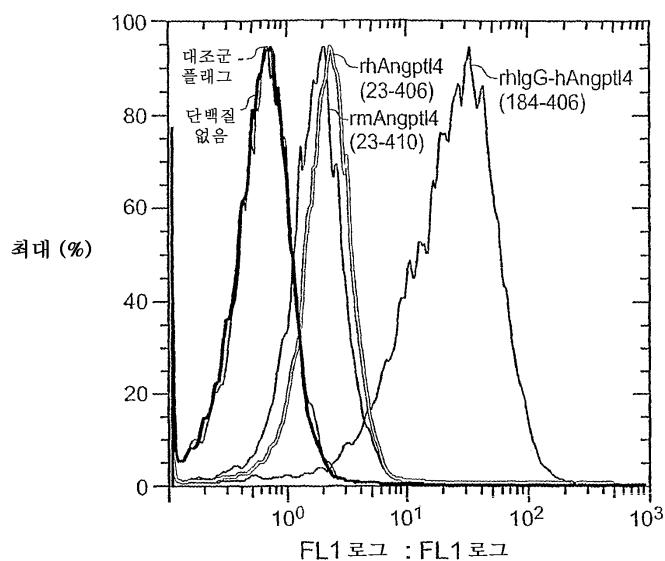
도면4C



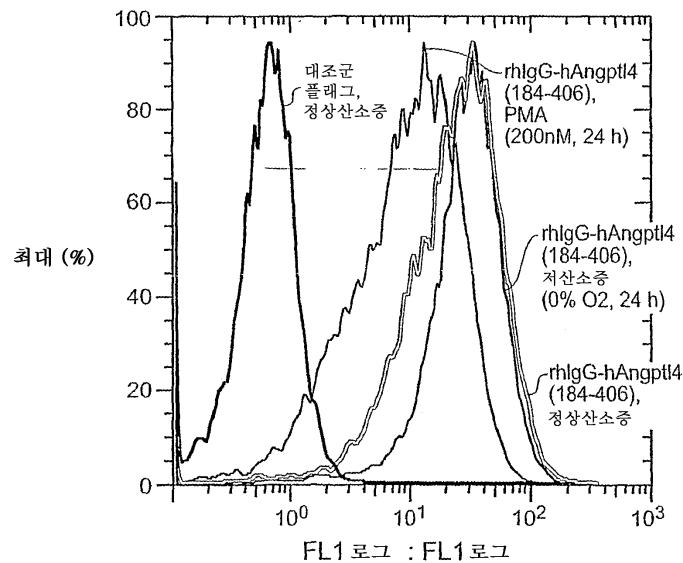
도면5



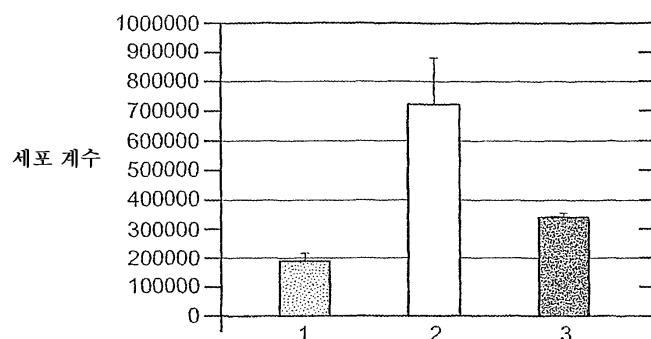
도면6A



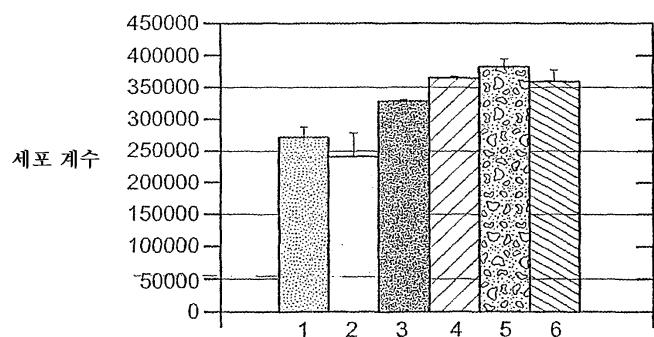
도면6B



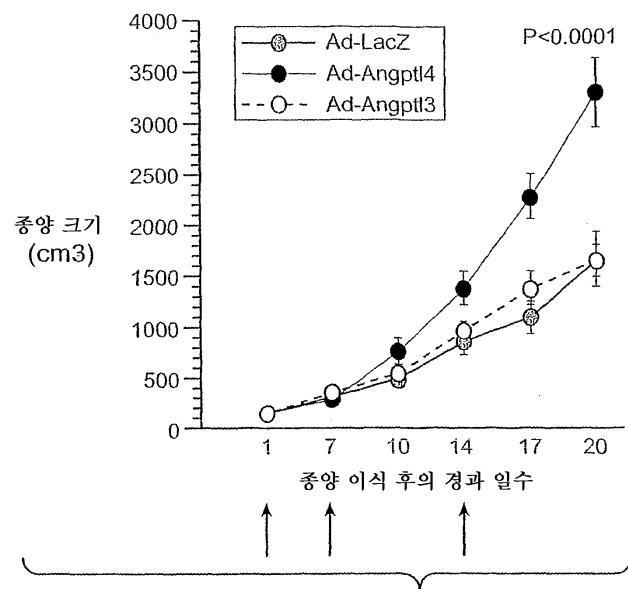
도면7A



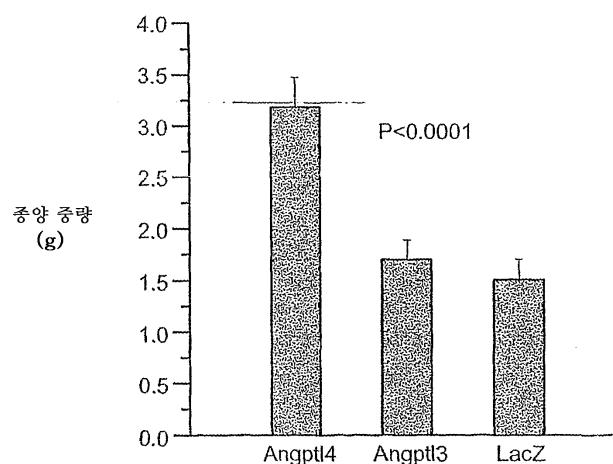
도면7B



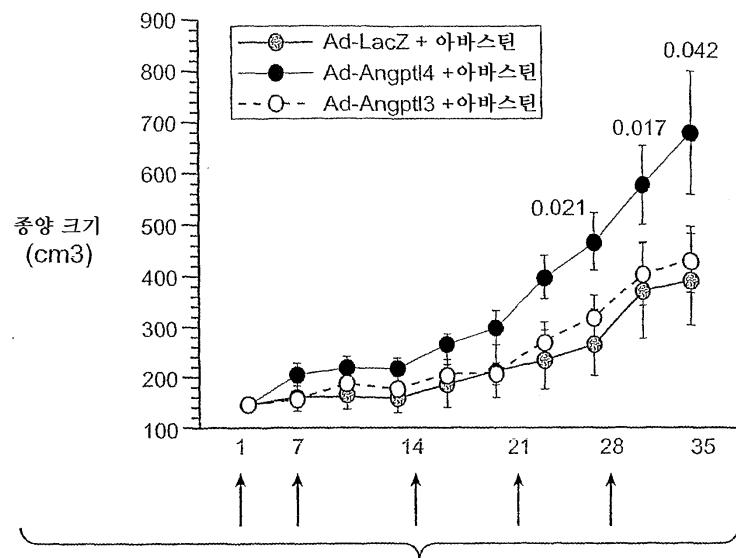
도면8A



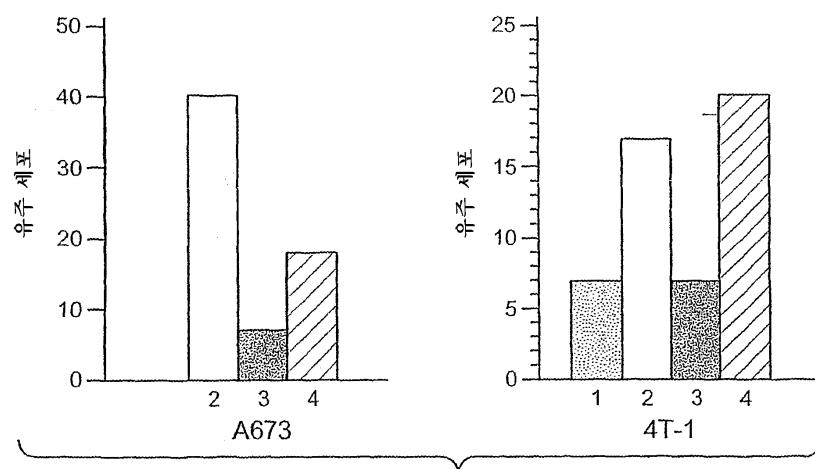
도면8B



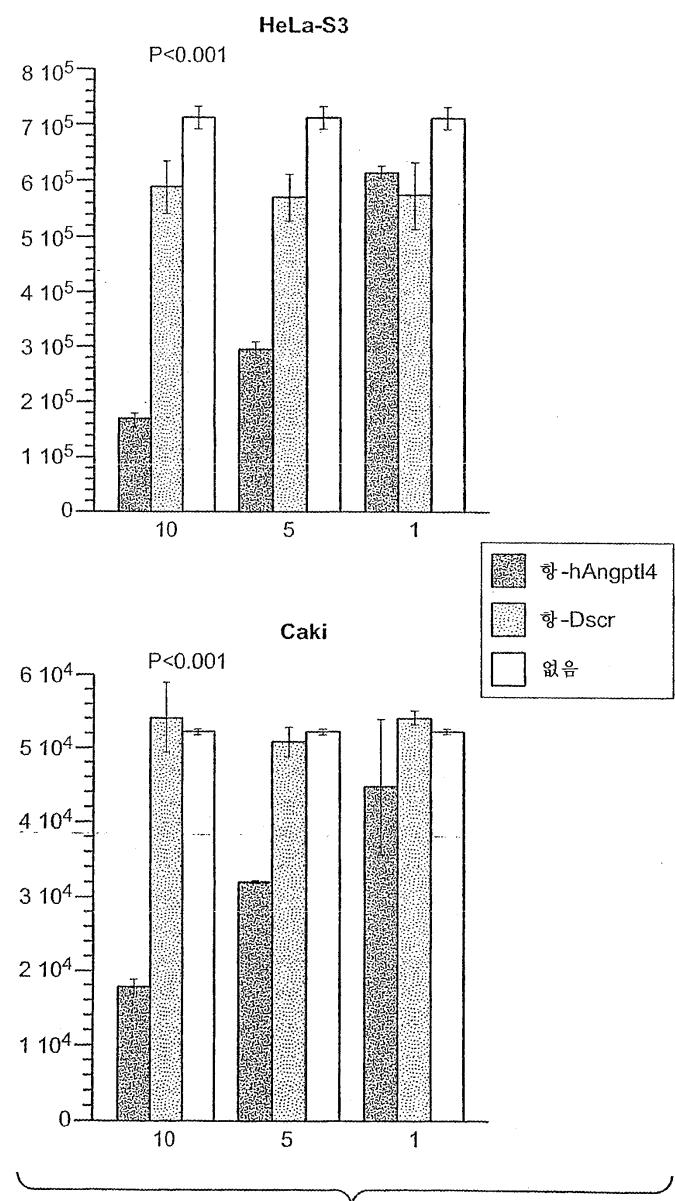
도면8c



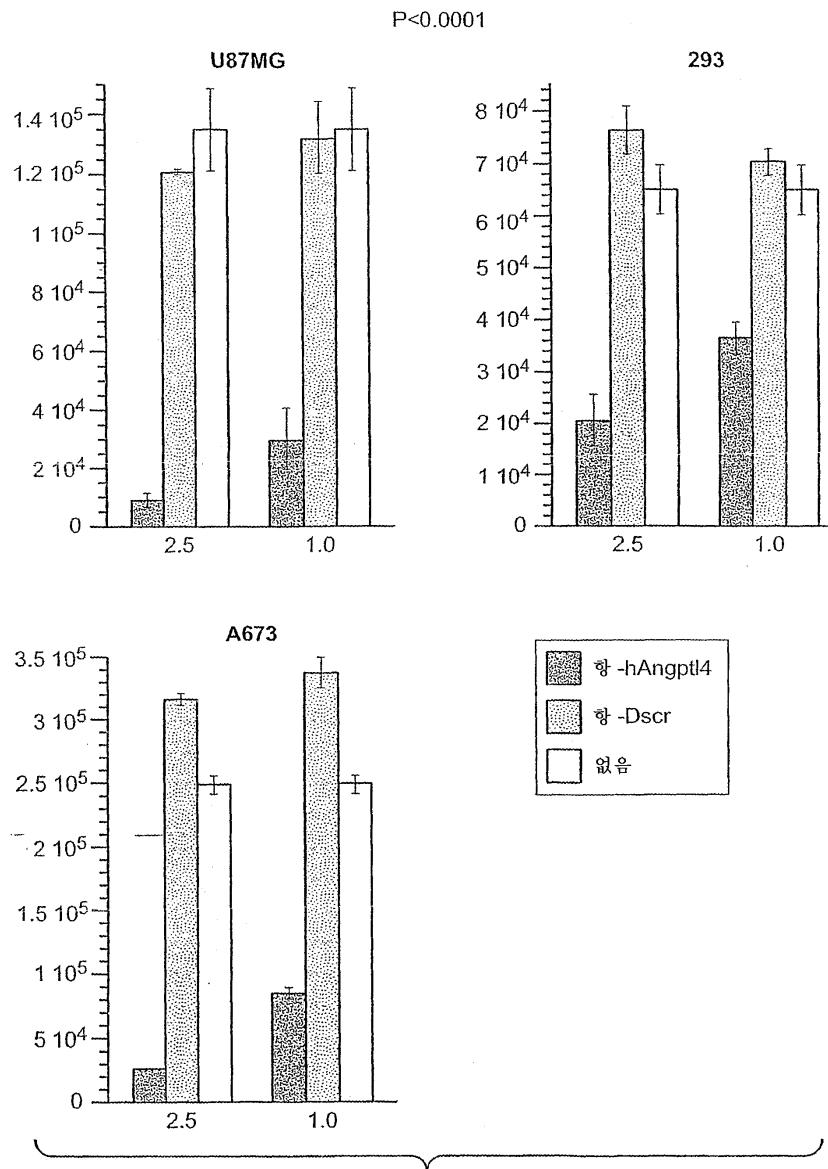
도면9



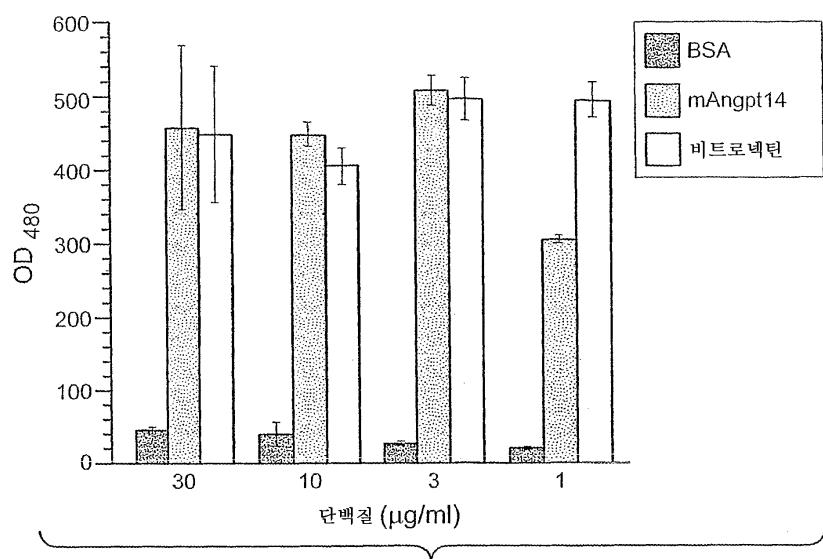
도면10A



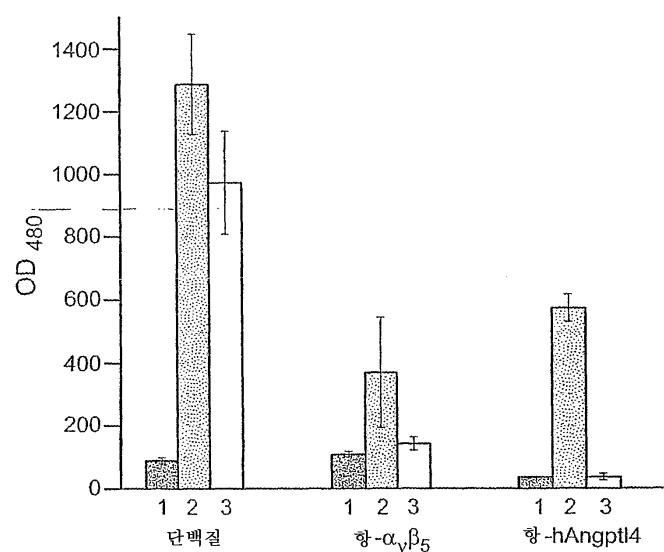
도면10B



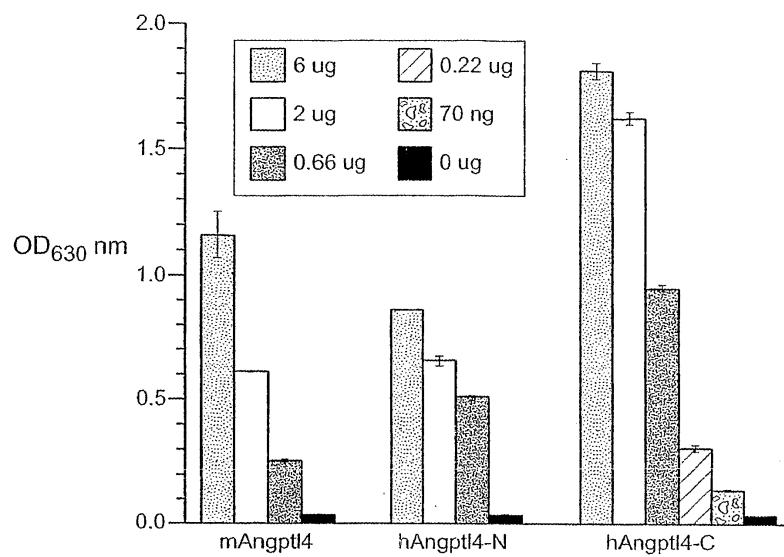
도면11



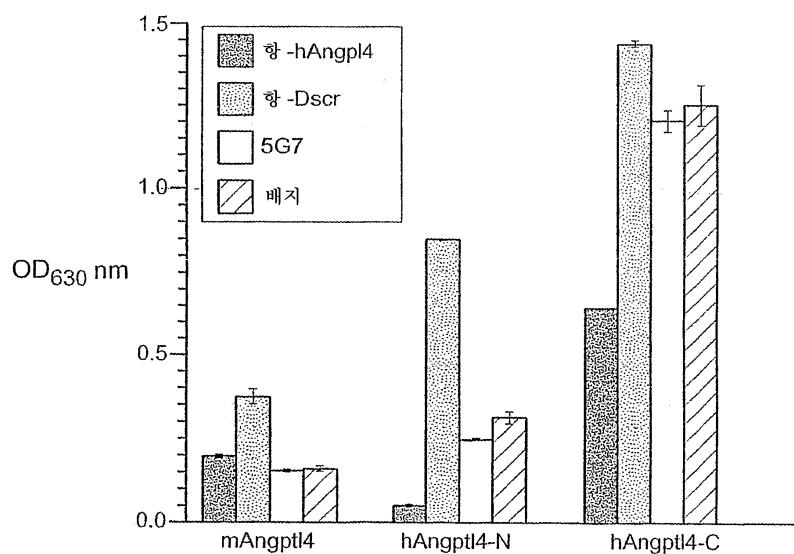
도면12



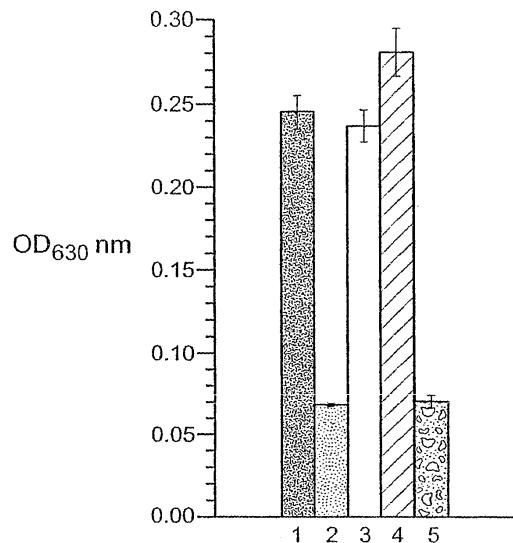
도면13A



도면13B



도면13C



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> Genentech, Inc.

Gerber, Hanspeter

Ferrara, Napoleone

Liang, Xiao Huan

<120> INHIBITORS OF ANGIOPOIETIN LIKE 4 PROTEIN,
COMBINATIONS, AND THEIR USE

<130> P2144R1PCT

<140> PCT/US2005/025734

<141> 2005 07 19

<150> US 60/589,782

<151> 2004 07 20

<160> 5

<210> 1

<211> 1869

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

gccgagctga gcggatcctc acatgactgt gatccgattc tttccagcgg 50
 cttctgcaac caaggggtc ttaccccggt tcctccgcgt ctccagtctt 100
 cgcacctgga accccaacgt ccccgagagt ccccgaaatcc ccgcgtccag 150
 gctacctaag aggatgagcg gtgctccgac ggccggggca gccctgatgc 200
 tctgcgccgc caccggcgtg ctactgagcg ctcagggcgg acccggtcag 250
 tccaagtgcg cgcgtttgc gtcctggac gagatgaatg tcctggcga 300
 cggactcctg cagctggcc aggggctgagc cgaacacgagc gagcgcaccc 350
 gcagtcagct gagcgcgtg gagcggcgcc tgagcgcgtg cgggtccgccc 400
 tgtcagggaa ccgaggggtc caccgaccc cgcgttagcc ctgagagccg 450
 ggtggaccct gaggtccccc acagcctgca gacacaactc aaggctcaga 500
 acagcaggat ccagcaactc ttccacaagg tggcccgac gcagcggcac 550
 ctggagaagc agcacctgca aattcagcat ctgcaaagcc agtttggcct 600
 cctggaccac aagcacctag accatgaggt gccaaggct gcccgaagaa 650
 agaggctgcc cgagatggcc cagccagttt acccggtca caatgtcagc 700
 cgccctgcacc ggctgcccag ggattgccag gagctgttcc aggttgggaa 750
 gaggcagagt ggactatttga aatccagcc tcaggggtctt ccgcattttt 800
 tggtaacttgca agatgacc tcagatggag gctggacagt aattcagagg 850
 cgccacgtg gtcgtggcc acccaaccgg ccctggaaag cctacaaggc 900
 ggggttggg gatccccacg gcgagttctg gctgggtctg gagaagggtgc 950
 atagcatcac gggggaccgc aacagccgac tggccgtca gctgcgggac 1000

tggatggca acgccgagtt gctgcagttc tccgtgcacc tgggtggcga 1050

ggacacggcc tatagcctgc agctcaactgc acccggtggcc ggccagctgg 1100

gcccacccac cgtccccaccc agcggcctct ccgtaccctt ctccacttgg 1150

gaccaggatc acgacacctcg cagggacaag aactgcgcca agagcctctc 1200

tggaggctgg tggttggca cctgcagcca ttccaacctc aacggccagt 1250

acttcgctc catcccacag cagcggcaga agcttaagaa ggaaatcttc 1300

tggaagacct ggcggggccg ctactacccg ctgcaggcca ccaccatgtt 1350

gatccagccc atggcagcag aggccgcctc ctgcgtcct ggctggcct 1400

ggtcccaggc ccaccaaaga cggtgactct tggctctgcc cgaggatgtg 1450

gccgttccct gcctggcag gggctccaag gagggccat ctggaaactt 1500

gtggacagag aagaagacca cgactggaga agccccctt ctgagtgcag 1550

ggggcgtgca tgcgtgcct cctgagatcg aggctgcagg atatgctcag 1600

actctagagg cgtggaccaa gggcatgga gttcactcc ttgtggcga 1650

gggagttggg gactcagagg gaccacttg ggccagccag actggcctca 1700

atggcggact cagtacatt gactgacggg gaccaggct tggtggc 1750

gagagcggcc tcatggtgc ggtgctgtig tgttaggtc ccctgggac 1800

acaagcaggc gccaaatggta tctggcggga gtcacagag ttcttggaaat 1850

aaaagcaacc tcagaacac 1869

<210> 2

<211> 406

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> unsure

<222> 221

<223> unknown amino acid

<400> 2

Met	Ser	Gly	Ala	Pro	Thr	Ala	Gly	Ala	Ala	Leu	Met	Leu	Cys	Ala
1														15

Ala	Thr	Ala	Val	Leu	Leu	Ser	Ala	Gln	Gly	Gly	Pro	Val	Gln	Ser
														30
20								25						

Lys	Ser	Pro	Arg	Phe	Ala	Ser	Trp	Asp	Glu	Met	Asn	Val	Leu	Ala
														45
35							40							

His	Gly	Leu	Leu	Gln	Leu	Gly	Gln	Gly	Leu	Arg	Glu	His	Ala	Glu
														60
50								55						

Arg	Thr	Arg	Ser	Gln	Leu	Ser	Ala	Leu	Glu	Arg	Arg	Leu	Ser	Ala
														75
65							70							

Cys	Gly	Ser	Ala	Cys	Gln	Gly	Thr	Glu	Gly	Ser	Thr	Asp	Leu	Pro
														90
80								85						

Leu	Ala	Pro	Glu	Ser	Arg	Val	Asp	Pro	Glu	Val	Leu	His	Ser	Leu
														105
95								100						

Gln	Thr	Gln	Leu	Lys	Ala	Gln	Asn	Ser	Arg	Ile	Gln	Gln	Leu	Phe
														120
110								115						

His	Lys	Val	Ala	Gln	Gln	Gln	Arg	His	Leu	Glu	Lys	Gln	His	Leu
														135
125								130						

Arg	Ile	Gln	His	Leu	Gln	Ser	Gln	Phe	Gly	Leu	Leu	Asp	His	Lys
														150
140								145						

His	Leu	Asp	His	Glu	Val	Ala	Lys	Pro	Ala	Arg	Arg	Lys	Arg	Leu
														165
155								160						

Pro	Glu	Met	Ala	Gln	Pro	Val	Asp	Pro	Ala	His	Asn	Val	Ser	Arg
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

170 175 180

Leu His Arg Leu Pro Arg Asp Cys Gln Glu Leu Phe Gln Val Gly
185 190 195

Glu Arg Gln Ser Gly Leu Phe Glu Ile Gln Pro Gln Gly Ser Pro
200 205 210

Pro Phe Leu Val Asn Cys Lys Met Thr Ser Xaa Gly Gly Trp Thr
215 220 225

Val Ile Gln Arg Arg His Asp Gly Ser Val Asp Phe Asn Arg Pro
230 235 240

Trp Glu Ala Tyr Lys Ala Gly Phe Gly Asp Pro His Gly Glu Phe
245 250 255

Trp Leu Gly Leu Glu Lys Val His Ser Ile Thr Gly Asp Arg Asn
260 265 270

Ser Arg Leu Ala Val Gln Leu Arg Asp Trp Asp Gly Asn Ala Glu
275 280 285

Leu Leu Gln Phe Ser Val His Leu Gly Gly Glu Asp Thr Ala Tyr
290 295 300

Ser Leu Gln Leu Thr Ala Pro Val Ala Gly Gln Leu Gly Ala Thr
305 310 315

Thr Val Pro Pro Ser Gly Leu Ser Val Pro Phe Ser Thr Trp Asp
320 325 330

Gln Asp His Asp Leu Arg Arg Asp Lys Asn Cys Ala Lys Ser Leu
335 340 345

Ser Gly Gly Trp Trp Phe Gly Thr Cys Ser His Ser Asn Leu Asn
350 355 360

Gly Gln Tyr Phe Arg Ser Ile Pro Gln Gln Arg Gln Lys Leu Lys
365 370 375

Lys Gly Ile Phe Trp Lys Thr Trp Arg Gly Arg Tyr Tyr Pro Leu
380 385 390

Gln Ala Thr Thr Met Leu Ile Gln Pro Met Ala Ala Glu Ala Ala
395 400 405

Ser
406

<210> 3
<211> 21
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 3
gtggccaaggc ctgccccgaag a 21

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

<220>
<223> sequence is synthesized

<400> 4
ggccaaggccu gccccgaagau u 21

<210> 5
<211> 21
<212> RNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> sequence is synthesized

<400> 5
ucuuucgggca ggcuuggcca c 21