



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2010-0065162  
(43) 공개일자 2010년06월15일

(51) Int. Cl.

C07K 16/18 (2006.01) C12N 15/63 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2010-7006513

(22) 출원일자(국제출원일자) 2008년09월25일

심사청구일자 없음

(85) 번역문제출일자 2010년03월25일

(86) 국제출원번호 PCT/US2008/077622

(87) 국제공개번호 WO 2009/042746

국제공개일자 2009년04월02일

(30) 우선권주장

60/975,471 2007년09월26일 미국(US)

(71) 출원인

제넨테크, 인크.

미합중국 캘리포니아 (우편번호 94080-4990) 사우  
쓰샌프란시스코 디엔에이 웨이 1

(72) 발명자

리양, 웨이-칭

미국 94404 캘리포니아주 포스터 시티 시 스프레  
이 레인 #112 840

플로우만, 그레고리 디.

미국 94070 캘리포니아주 샌 카를로스 체스트너트  
스트리트 1386

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

양영준, 위혜숙

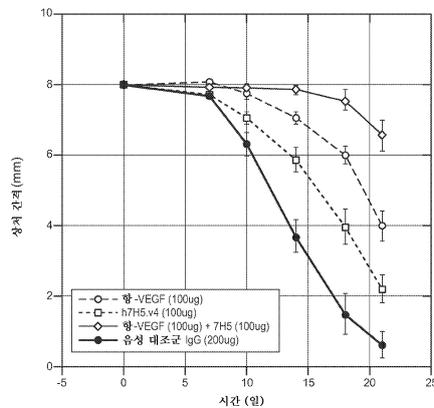
전체 청구항 수 : 총 36 항

(54) 신규한 항체

(57) 요약

본 발명은 암을 치료하고 질병에서 비정상적 혈관신생을 억제하는 것을 포함하는, 혈관신생 및/또는 혈관 투과성을 억제하기 위한, VEGF 길항제 및 신규한 항- $\alpha 5\beta 1$  항체의 용도에 관한 것이다. 본 발명은 또한 신규한 항- $\alpha 5\beta 1$  항체를 포함하는 조성물 및 키트와 그의 제조 및 사용 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도11



(72) 발명자

**유, 안**

미국 94404 캘리포니아주 포스터 시티 블리스 스트리트 1160

**예, 웨이관**

미국 94404 캘리포니아주 포스터 시티 발켄턴 스트리트 119

---

**특허청구의 범위**

**청구항 1**

(1) 아미노산 서열 KASQ-N/S-VGSDVA (서열 10)를 포함하는 LHVR1, (2) 아미노산 서열 STSYRYS (서열 11)를 포함하는 LHVR2 및 (3) 아미노산 서열 QQY-N/S-SYPFT (서열 12)를 포함하는 LHVR3을 포함하는 경쇄 가변 도메인 서열, 및 (1) 아미노산 서열 GYTF-T/S-DYYLY (서열 13)를 포함하는 HHVR1, (2) 아미노산 서열 GISPS-N/S-GGTF-N/A-D-N/A-FE-N/G (서열 14)를 포함하는 HHVR2 및 (3) 아미노산 서열 DAYGDWYFDV (서열 15)를 포함하는 HHVR3을 포함하는 중쇄 가변 도메인 서열을 포함하는 항- $\alpha 5\beta 1$  항체.

**청구항 2**

서열 1, 2, 3 또는 4 중 어느 하나에 제시된 서열 또는 그의 변이체를 갖는 경쇄 가변 도메인 및 서열 5, 6, 7, 8 또는 9 중 어느 하나에 제시된 서열 또는 그의 변이체를 갖는 중쇄 가변 도메인을 포함하는 항- $\alpha 5\beta 1$  항체.

**청구항 3**

제2항에 있어서, 경쇄 가변 도메인이 서열 3에 제시된 서열을 갖고, 중쇄 가변 도메인이 서열 8에 제시된 서열을 갖는 것인 항체.

**청구항 4**

제2항에 있어서, 중쇄 가변 도메인의 변이체 서열이 30, 48, 49, 54, 60, 62, 65, 66, 67 및 69로 이루어지는 군 중에서 선택되는 잔기에서 아미노산 치환을 포함하는 것인 항체.

**청구항 5**

제2항에 있어서, 경쇄 가변 도메인이 28, 46 및 92로 이루어지는 군 중에서 선택되는 잔기에서 아미노산 치환을 포함하는 것인 항체.

**청구항 6**

제4항에 있어서, 아미노산 치환이 T30S, I48V, G49S, N54S, N60A, N62A, N62S, N65G, K66R, A67F 및 L69I로 이루어지는 군 중에서 선택되는 것인 항체.

**청구항 7**

제5항에 있어서, 경쇄 가변 도메인이 N28S, T46L 및 N92S로 이루어지는 군 중에서 선택되는 아미노산 치환을 포함하는 것인 항체.

**청구항 8**

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 알파V베타3 또는 알파V베타5 또는 알파V베타1에 결합하지 않는 항체.

**청구항 9**

제1항에 있어서, 인간 IgG의 Fc 서열을 포함하는 항체.

**청구항 10**

제9항에 있어서, 인간 IgG가 hIgG1 또는 hIgG4인 항체.

**청구항 11**

제9항에 있어서, 항체 의존성 세포 세포독성 (ADCC) 효과가 기능이 없는 Fc 서열을 포함하는 항체.

**청구항 12**

제11항에 있어서, Fc 서열이 D265A 치환을 포함하는 것인 항체.

**청구항 13**

제1항에 있어서, Fab, Fab', F(ab)'<sub>2</sub>, 단일쇄 Fv (scFv), Fv 단편, 디아바디 (diabody) 및 선형 항체로 이루어지는 군 중에서 선택되는 항체.

**청구항 14**

제1항에 있어서, 다중특이적 항체인 항체.

**청구항 15**

제1항에 있어서, 치료제에 컨쥬게이팅된 항체.

**청구항 16**

제15항에 있어서, 치료제가 세포독성제, 방사성 동위원소 및 화학요법제로 이루어지는 군 중에서 선택되는 것인 항체.

**청구항 17**

제1항에 있어서, 표지에 컨쥬게이팅된 항체.

**청구항 18**

제17항에 있어서, 표지가 방사성 동위원소, 형광 염료 및 효소로 이루어지는 군 중에서 선택되는 것인 항체.

**청구항 19**

제1항의 항체를 코딩하는 단리된 핵산 분자.

**청구항 20**

제19항의 핵산 분자를 코딩하는 발현 벡터.

**청구항 21**

제20항의 발현 벡터를 포함하는 세포.

**청구항 22**

제21항의 세포를 배양하는 것, 및 세포 배양액으로부터 항체를 회수하는 것을 포함하는 항체의 생산 방법.

**청구항 23**

제1항의 항체 및 제약상 허용되는 담체를 포함하는 조성물.

**청구항 24**

제1항의 항체를 환자로부터의 샘플과 접촉시키는 것,  $\alpha 5\beta 1$  단백질에 결합된 항- $\alpha 5\beta 1$  항체를 검출하는 것을 포함하는, 환자로부터의 샘플에서  $\alpha 5\beta 1$  단백질을 검출하는 방법.

**청구항 25**

제24항에 있어서, 항체가 면역조직화학 분석 (IHC) 또는 ELISA 분석에서 사용되는 것인 방법.

**청구항 26**

대상에서 혈관신생 및/또는 혈관 투과성 또는 누출을 억제하기 위한 의약의 제조에 있어서 제1항에 따른 항체의 용도.

**청구항 27**

비정상적 혈관신생 또는 혈관 투과성 또는 누출이 존재하는 대상의 질병을 치료하기 위한 의약의 제조에 있어서 제1항에 따른 항체의 용도.

**청구항 28**

VEGF 길항제 및 제1항의 항- $\alpha 5\beta 1$  항체를 투여하는 것을 포함하는, 질병에 걸린 대상에서 혈관신생 및/또는 혈관 투과성 또는 누출을 억제하는 방법.

**청구항 29**

VEGF 길항제 및 제1항의 항- $\alpha 5\beta 1$  항체를 투여하는 것을 포함하는, 대상에서 암을 치료하는 방법.

**청구항 30**

VEGF 길항제 및 제1항의  $\alpha 5\beta 1$  항체를 투여하는 것을 포함하는, 대상에서 안질환을 치료하는 방법.

**청구항 31**

VEGF 길항제 및 제1항의  $\alpha 5\beta 1$  항체를 투여하는 것을 포함하는, 대상에서 자가면역 질병을 치료하는 방법.

**청구항 32**

제30항에 있어서, 대상이 질병에 걸리지 않은 대상으로부터의 조직에 비해 이환된 조직에서 상승된  $\alpha 5\beta 1$  수준을 나타내지 않는 것인 방법.

**청구항 33**

제28항 내지 제32항 중 어느 한 항에 있어서, 대상에게 항-신생물제, 화학요법제, 성장 억제제 및 세포독성제로 이루어지는 군 중에서 선택되는 치료제를 추가로 투여하는 방법.

**청구항 34**

제28항 내지 제32항 중 어느 한 항에 있어서, VEGF 길항제가 인간 VEGF에 대한 결합에 있어서 아바스틴(등록상표) 항체에 의해 경쟁적으로 억제될 수 있는 것인 방법.

**청구항 35**

제34항에 있어서, VEGF 길항제가 아바스틴(등록상표) 항체인 방법.

**청구항 36**

VEGF 길항제, 제1항의 항체 및 제약상 허용되는 억제제를 포함하는 조성물.

**명세서**

**기술분야**

[0001] <관련 출원>

[0002] 본원은 그 전체 내용이 모든 목적을 위해 본원에 참고로 포함된, 2007년 9월 26일 출원된 미국 특허 가출원 60/975,471을 기초로 한 우선권을 주장한다.

[0003] 본 발명은 신규한  $\alpha 5\beta 1$  항체, 상기 항체를 포함하는 조성물 및 키트, 및 상기 항체를 사용하는 방법에 관한 것이다.

**배경기술**

[0004]  $\alpha 5\beta 1$  인테그린은 그의 주요 리간드인 피브로넥틴을 통해 세포-세포 및 세포-ECM 상호작용을 매개하는 세포막 당단백질이다.  $\alpha 5\beta 1$  인테그린은 세포 이동, 분화 및 생존에서 중요한 역할을 수행한다.  $\alpha 5\beta 1$  인테그린의 수준은 중앙 혈관 내피 (예를 들어, 위장, 결장직장, 간세포, 자궁경부 및 유방암종) 및 다른 혈관신생성 혈관

에서 상승한다.  $\alpha 5\beta 1$  인테그린은 혈관신생 동안 벽세포의 내피세포와의 회합 및 내피 세포의 기질의 조립을 조정한다. 따라서,  $\alpha 5\beta 1$  인테그린은 혈관신생의 억제, 및 VEGF 길항제의 효과에 대한 세포의 민감화를 위한 유용한 표적이다.

[0005] 따라서, 당업계에서는  $\alpha 5\beta 1$  인테그린을 표적화하기 위한 조성물 및 방법이 필요하다. 본 발명은 상기 필요성 및 다른 필요성을 충족시킨다.

**발명의 내용**

**과제의 해결 수단**

[0006] <발명의 개요>

[0007] 본 발명은 7H5 하이브리도마로부터 생산된 항체로부터 유도된 신규한 항- $\alpha 5\beta 1$  항체, 상기 신규한 항- $\alpha 5\beta 1$  항체를 포함하는 키트 및 조성물, 및 그의 제조 및 사용 방법에 관한 것이다. 본 발명의 항- $\alpha 5\beta 1$  항체는 7H5 하이브리도마로부터 생산된 항체에 비해  $\alpha 5\beta 1$ 에 대해 개선된 결합을 보인다. 그러한 항체는 인간화 항체를 포함한다. 다른 실시태양에 따르면, 신규한 항- $\alpha 5\beta 1$  항체는 환자 또는 환자 샘플에서  $\alpha 5\beta 1$ 을 검출하기 위해 비제한적으로 치료제 또는 형광 염료 또는 다른 마커와 같은 다른 엔티티(entity)에 컨쥬게이팅될 수 있다. 상기 신규한  $\alpha 5\beta 1$  항체는 다양한 치료 및 진단 방법에서 사용될 수 있다. 예를 들어, 그러한 항- $\alpha 5\beta 1$  항체는 비정상적 혈관신생, 신생물, 안질환 및 자가면역 질병을 치료하는데 사용될 수 있다. 그러한 항체는 상기 항체를 환자 또는 환자 샘플 내의  $\alpha 5\beta 1$  단백질에 접촉시키고,  $\alpha 5\beta 1$  단백질에 결합된 항- $\alpha 5\beta 1$  항체를 정성적으로 또는 정량적으로 결정함으로써, 환자 또는 환자 샘플에서  $\alpha 5\beta 1$  단백질을 검출하기 위해 사용될 수 있다.

[0008] 한 실시태양에 따르면, 본 발명의 항- $\alpha 5\beta 1$  항체는 (1) 아미노산 서열 KASQ-N/S-VGSDVA (서열 10)를 포함하는 LHVR1, (2) 아미노산 서열 STSYRYS (서열 11)를 포함하는 LHVR2 및 (3) 아미노산 서열 QQY-N/S-SYPFT (서열 12)를 포함하는 LHVR3을 포함하는 경쇄 가변 도메인 서열을 포함한다. 다른 실시태양에 따르면, 본 발명의 항- $\alpha 5\beta 1$  항체는 (1) 아미노산 서열 GYTF-T/S-DYYLY (서열 13)를 포함하는 HHVR1, (2) 아미노산 서열 GISPS-N/S-GGTF-N/A-D-N/A-FE-N/G (서열 14)를 포함하는 HHVR2 및 (3) 아미노산 서열 DAYGDWYFDV (서열 15)를 포함하는 HHVR3을 포함하는 중쇄 가변 도메인 서열을 포함한다.

[0009] 다른 실시태양에 따르면, 본 발명의 항- $\alpha 5\beta 1$  항체는 서열 1의 서열 또는 그의 변이체를 갖는 경쇄 가변 도메인, 및 서열 6의 서열 또는 그의 변이체를 갖는 중쇄 가변 도메인을 포함한다. 한 실시태양에 따르면, 중쇄 가변 도메인의 변이체 서열은 30, 48, 49, 54, 60, 62, 65, 66, 67 및 69 (카바트(Kabat) 넘버링 시스템)로 이루어지는 군 중에서 선택되는 잔기에서 아미노산 치환을 포함한다. 다른 실시태양에 따르면, 경쇄 가변 도메인의 변이체 서열은 28, 46 및 92 (카바트 넘버링 시스템)로 이루어지는 군 중에서 선택되는 잔기에서 아미노산 치환을 포함한다. 한 실시태양에 따르면, 중쇄 가변 도메인은 T30S, I48V, G49S, N54S, N60A, N62A, N62S, N65G, K66R, A67F 및 L69I (카바트 넘버링 시스템)로 이루어지는 군 중에서 선택되는 아미노산 치환을 포함한다. 한 실시태양에 따르면, 경쇄 가변 도메인은 N28S, T46L 및 N92S (카바트 넘버링 시스템)로 이루어지는 군 중에서 선택되는 아미노산 치환을 포함한다.

[0010] 또한, 본 발명은 서열 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 및 9로 이루어지는 군 중에서 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 포함하는 조성물에 관한 것이다. 다른 실시태양에 따르면, 조성물은 서열 1의 경쇄 가변 도메인 서열 및 서열 5의 중쇄 가변 도메인 서열을 포함하는 항체를 포함한다. 다른 실시태양에 따르면, 조성물은 서열 2의 경쇄 가변 도메인 서열 및 서열 6의 중쇄 가변 도메인 서열을 포함하는 항체를 포함한다. 다른 실시태양에 따르면, 조성물은 서열 2의 경쇄 가변 도메인 서열 및 서열 7의 중쇄 가변 도메인 서열을 포함하는 항체를 포함한다. 다른 실시태양에 따르면, 조성물은 서열 3의 경쇄 가변 도메인 서열 및 서열 8의 중쇄 가변 도메인 서열을 포함하는 항체를 포함한다. 다른 실시태양에 따르면, 조성물은 서열 4의 경쇄 가변 도메인 서열 및 서열 9의 중쇄 가변 도메인 서열을 포함하는 항체를 포함한다.

[0011] 또다른 실시태양에 따르면, 본 발명은 VEGF 길항제 및 본 발명의 항- $\alpha 5\beta 1$  항체를 투여하는 단계(들)을 포함하는, 대상에서 암을 치료하는 방법을 제공한다. 하나의 바람직한 실시태양에 따르면, 암은 VEGF 길항제 요법에 반응성이다. 다른 실시태양에서, 노인성 황반변성(AMD)에 걸린 대상에서 습식 노인성 황반변성을 비롯한 노인성 황반변성(AMD)을 치료하는 방법은 치료 유효량의 VEGF 길항제 및 본 발명의 항- $\alpha 5\beta 1$  항체를 투여하는 단계(들)을 포함한다. 또다른 실시태양에서, 대상에서 자가면역 질병을 치료하는 방법은 치료 유효량의 VEGF 길

항체 및 항- $\alpha 5\beta 1$  항체를 투여하는 단계(들)을 포함한다.

[0012] 한 실시태양에서, 치료할 대상에게 초기에 VEGF 길항제를 투여한 후, 본 발명의 항- $\alpha 5\beta 1$  항체로 치료할 수 있다. 다른 실시태양에서, 대상은 VEGF 길항제 및 본 발명의 항- $\alpha 5\beta 1$  항체를 사용하여, 둘 중 어느 한 약물을 사용할 때의 치료 사이클 내에서 치료한다. 다른 실시태양에 따르면, 대상을 대상이 VEGF 길항제 치료에 비반응성일 때까지 VEGF 길항제로 치료한 후, 대상을 본 발명의 항- $\alpha 5\beta 1$  항체로 치료한다. 하나의 특정 실시태양에서, 대상을 암이 비-침습성이거나 초기 단계일 때 VEGF 길항제로 치료하고, 암이 침습성일 때에 본 발명의 항- $\alpha 5\beta 1$  항체로 치료한다. 다른 실시태양에서, 본 발명의 항- $\alpha 5\beta 1$  항체로 치료되는 대상은 질병에 걸리지 않은 대상으로부터의 조직에 비해 이환된 조직 내의  $\alpha 5\beta 1$  수준이 상승된다. 이 경우에, 방법은 VEGF 길항제로 치료한 후 대상에서, 예를 들어, 이환된 조직에서  $\alpha 5\beta 1$ 을 검출하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 한 실시태양에 따르면, 침습성 암은 전이된 암이다. 다른 실시태양에 따르면, 초기 단계 암은 보조 요법 (예를 들어, 화학요법 또는 수술 제거)에 의해 치료되는 암이다.

[0013] 하나의 바람직한 실시태양에서, 대상은 비정상적 혈관신생이 있는 질병에 걸려 있다. 다른 실시태양에 따르면, 질병은 암, 면역 질병 또는 안질환으로 이루어지는 군 중에서 선택된다. 하나의 바람직한 실시태양에 따르면, 질병은 고형 종양, 전이성 종양, 연조직 종양, 안구 신생혈관형성이 있는 질병, 비정상적 혈관신생이 있는 염증성 질병, 대상에게 이식한 후에 발생하는 질병, 및 섬유혈관성 조직의 이상 증식이 있는 질병으로 이루어지는 군 중에서 선택된다. 또다른 바람직한 실시태양에 따르면, 암은 유방암 (전이성 유방암 포함), 자궁경부암, 결장직장암 (전이성 결장직장암 포함), 폐암 (비-소세포 폐암 포함), 비-호지킨 (Hodgkin) 림프종 (NHL), 만성 림프성 백혈병, 신세포암, 전립선암, 예를 들어 호르몬 불응성 전립선암, 간암, 두경부암, 흑색종, 난소암, 중피종, 연조직암, 위장관 간질 종양, 다형성 아교모세포종 및 다발성 골수종으로 이루어지는 군 중에서 선택된다. 또다른 바람직한 실시태양에 따르면, 질병은 망막병증, 노인성 황반변성 (예를 들어, 습식 AMD), 당뇨병성 황반부종, 망막 정맥 폐쇄 (RVO), 및 건식 AMD/지도형 위축 (geographic atrophy) (습식 AMD로의 진행의 예방을 위해), 조홍; 건선, 염증성 신장병, 용혈성 요독 증후군, 당뇨병성 신병증 (예를 들어, 증식성 당뇨병성 망막병증), 관절염 (예를 들어, 건선성 관절염, 골관절염, 류마티스 관절염), 염증성 장 질환, 만성 염증, 만성 망막 박리, 만성 포도막염, 만성 유리체염, 각막 이식편 거부, 각막 신생혈관형성, 각막 이식편 신생혈관형성, 크론 (Crohn) 병, 근시, 안구 신생혈관 질병, 파제트 (Paget) 병, 유사천포창, 다발 동맥염, 레이저-수술후 방사상 각막절제, 망막 신생혈관형성, 쇼그렌 (Sogren) 증후군, 궤양성 대장염, 이식편 거부, 폐렴, 신 증후군, 부종, 악성 종양과 관련된 복수, 뇌졸중, 혈관섬유종 및 신생혈관 녹내장으로 이루어지는 군 중에서 선택된다. 한 실시태양에서, 대상에게 항-신생물제, 화학요법제 및 세포독성제로 이루어지는 군 중에서 선택되는 치료제를 추가로 투여한다.

[0014] 본 발명의 하나의 바람직한 실시태양에 따르면, 항- $\alpha 5\beta 1$  항체로 치료할 대상은 VEGF 길항제 치료 후에 재발되거나, VEGF 길항제 치료에 불응성으로 된 대상이다. 다른 실시태양에 따르면, 본 발명의 항- $\alpha 5\beta 1$  항체 및 VEGF 길항제로 치료할 대상은 전이성 암에 걸리거나, 이전에 보조 요법으로 치료받은 대상이다. 한 실시태양에서, 후보 환자는 이리노테칸과 같은 화학요법제에 재발성, 불응성 또는 내성이다. 그러한 질병의 예는 전이성 결장직장암, 재발성 전이성 결장직장암, 전이성 유방암, 재발성 전이성 유방암, 전이성 HER2+ 유방암, 보조 (adjuvant) 유방암, 보조 HER2+ 유방암, 전이성 췌장암, 보조 결장암, 보조 비-소세포 폐암, 보조 직장암, 보조 비-소세포 폐암, 전이성 비-소세포 폐암, 전이성 난소암, 전이성 신세포암 및 보조 신세포암을 포함하고 이로 제한되지 않는다.

[0015] 한 실시태양에 따르면, 본원에서 설명되는 질병에 걸린 대상에게 VEGF 길항제를 사용한 질병의 치료 후에 유지요법을 실시하고, 여기서 유지 요법은 본 발명의 항- $\alpha 5\beta 1$  항체를 단독으로 또는 VEGF 길항제와 순차적으로 또는 동시에 투여하는 것이다.

[0016] 하나의 바람직한 실시태양에 따르면, VEGF 길항제는 항체, 면역어드헤신, 펩티바디 (peptibody), 소분자 및 엄격한 조건 하에 VEGF를 코딩하는 핵산 분자에 혼성화하는 핵산 (예를 들어, 리보자임, siRNA 및 앵타머 (aptamer))으로 이루어지는 군 중에서 선택될 수 있다. 하나의 바람직한 실시태양에 따르면, VEGF 길항제는 항체이다. 다른 실시태양에 따르면, 항체는 모노클로날 항체이다. 하나의 바람직한 실시태양에 따르면, 항-VEGF 항체는 인간 VEGF에 대한 결합에 대해 아바스틴 (Avastin)(등록상표) 항체에 의해 경쟁적으로 억제될 수 있다. 다른 실시태양에 따르면, 항-VEGF 항체는 인간, 인간화 또는 키메라 (chimera) 항체이다. 하나의 특정 실시태양에 따르면, 항-VEGF 항체는 아바스틴(등록상표) 항체이다. 다른 실시태양에 따르면, 항-VEGF 항체는 Fab, Fab', F(ab)'<sub>2</sub>, 단일쇄 Fv (scFv), Fv 단편; 디아바디 (diabody) 및 선형 항체로 이루어지는 군 중에서 선택된

다. 다른 실시태양에 따르면, VEGF 길항제는 VEGF에 결합하고 본 발명의 항- $\alpha 5\beta 1$  항체의 중쇄 및 경쇄 가변 도메인을 포함하는 이중특이적 항체이다.

[0017] 하나의 바람직한 실시태양에 따르면, 본 발명의 항- $\alpha 5\beta 1$  항체는 인간 IgG의 Fc 부분을 포함하는 항체이다. 다른 실시태양에 따르면, 본 발명의 항- $\alpha 5\beta 1$  항체는 인간 IgG1 또는 hIgG4의 CH1, CH2 및 CH3 도메인을 포함한다. 하나의 바람직한 실시태양에 따르면, 항- $\alpha 5\beta 1$  항체는 인간화 항체이다. 하나의 특정 실시태양에 따르면, 항- $\alpha 5\beta 1$  항체는 7H5 항체 또는 그의 키메라 또는 인간화 항체이다. 다른 실시태양에 따르면, 항- $\alpha 5\beta 1$  항체는 Fab, Fab', F(ab)'<sub>2</sub>, 단일쇄 Fv (scFv), Fv 단편; 디아바디 및 선형 항체로 이루어지는 군 중에서 선택된다. 다른 실시태양에 따르면, 본 발명의 항- $\alpha 5\beta 1$  항체는 VEGF 및  $\alpha 5\beta 1$ 에 결합하는 이중특이적 항체이고, VEGF 길항제이다. 또다른 실시태양에 따르면, 본 발명의 항- $\alpha 5\beta 1$  항체는 변경된 효과기 기능을 갖는다. 한 실시태양에 따르면, 항- $\alpha 5\beta 1$  항체는 항체 의존성 세포 세포독성 (ADCC) 또는 보체 의존성 세포 세포독성 (CDC) 활성을 저하시키거나 억제하도록 변경된다 (예를 들어, 항체의 Fc 부분을 코딩하는 핵산 서열을 변경함으로써). 또다른 실시태양에 따르면, 항- $\alpha 5\beta 1$  항체는 인간에서 그의 반감기가 증가하거나 감소하도록 변경되었다 (예를 들어, 항체의 Fc 부분을 코딩하는 핵산 서열을 변경함으로써).

[0018] 한 실시태양에 따르면,  $\alpha 5\beta 1$  항체는 세포독성제 또는 화학요법제에 컨쥬게이팅된다. 다른 실시태양에 따르면, 세포독성제는 방사성 동위원소 또는 독소이다.

[0019] 본 발명은 VEGF 길항제, 본 발명의  $\alpha 5\beta 1$  항체, 및 제약상 허용되는 담체를 포함하는 조성물을 제공한다. 또한, 본 발명은 VEGF 길항제로 치료된 바 있는 대상에서  $\alpha 5\beta 1$ 을 검출하기 위한 사용설명서를 포함하는 제품을 제공한다.

**도면의 간단한 설명**

[0020] 도 1은 항-인테그린  $\alpha 5\beta 1$  클론 7H5에 관하여 다음 항체의 경쇄 가변 도메인의 서열의 정렬을 도시한 것이다: 쥐 7H5의 CDR을 그라프팅한 것에 기초한 인간화 7H5 항체 (h7H5.v1) (서열 1), h7H5.v1의 CDR-L1, -L3 및 -H2 내의 잔기의 교체에 기초한 인간화 7H5 항체 (h7H5.v2, 서열 2), 및 h7H5.v2에 대한 프레임워크 변형에 기초한 인간화 7H5 항체 (h7H5.v4 (서열 3) 및 h7H5.v5 (서열 4)). h7H5.v3 경쇄 가변 도메인의 서열은 서열 2와 동일하다.

도 2는 항-인테그린  $\alpha 5\beta 1$  클론 7H5에 관하여 다음 항체의 중쇄 가변 도메인의 서열의 정렬을 도시한 것이다: 쥐 7H5의 CDR을 그라프팅한 것에 기초한 인간화 7H5 항체 (h7H5.v1) (서열 5), h7H5.v1의 CDR-L1, -L3 및 -H2 내의 잔기의 교체에 기초한 인간화 7H5 항체 (h7H5.v2) (서열 6), 및 h7H5.v2에 대한 프레임워크 변형에 기초한 인간화 7H5 항체 (h7H5.v4 (서열 8) 및 h7H5.v5 (서열 9)). h7H5.v3 중쇄 가변 도메인의 서열은 h7H5.v2와 동일하되, N62S 아미노산 돌연변이를 갖는다 (서열 7로 지정된 h7H5.v3 VH 서열).

도 3은 인간 인테그린  $\alpha 5\beta 1$ 에 대한 키메라 7H5-IgG 및 인간화 7H5.v1-IgG의 BIACORE(등록상표) 분석 결과를 도시한 것이다. (a) 키메라 7H5-IgG 및 인간화 7H5.v1-IgG를 450 RU (반응 단위)의 CM5 센서 칩의 2개의 상이한 유동 셀 (flow cell)에 고정하고, 300 nM에서 0.29 nM까지 2배 연속 희석시킨 인간 인테그린  $\alpha 5\beta 1$ 을 센서 칩을 통해 주입하여, 25°C에서 결합 친화도 및 운동학을 결정하였다. (b) 인간 인테그린  $\alpha 5\beta 1$ 을 800 RU의 CM5 센서 칩에 고정하고, 200 nM에서 0.2 nM까지 2배 연속 희석시킨 키메라 7H5-IgG 및 인간화 7H5.v1-IgG를 센서 칩을 통해 주입하여, 25°C에서 결합 친화도 및 운동학을 결정하였다.

도 4는 파지 상에 1가 Fab 형태로서 디스플레이된 인간화 7H5.v1 단일 점 돌연변이체 클론에 대하여 인간 인테그린  $\alpha 5\beta 1$ 에 대한 파지 IC50을 결정하기 위한 파지 경쟁 ELISA를 도시한 것이다.

도 5는 모 클론 h7H5.v1의 각각의 단일 점 돌연변이체에 대한 결합 친화도 (IC50)의 상대적인 변화 배수의 요약 을 도시한 것이다.

도 6은 파지 상에 1가 Fab 형태로서 디스플레이된 인간화 7H5.v1 다수 치환 클론에 대해 인간 인테그린  $\alpha 5\beta 1$ 에 대한 파지 IC50을 결정하기 위해 파지 경쟁 ELISA를 도시한 것이다. 2개의 제1 변이체를 강조된 바와 같이 도 5로부터의 선택에 기초하여 생성하였다. 전체적으로, 6개의 모든 변이체가 보유하고 약간 개선된 결합 친화도를 보였고; 따라서, 지시된 바와 같은 2개의 변이체 h7H5.v2 및 h7H5.v3이 CDR-H2의 위치 65에서 글라이신 치환을 포함하도록 선택되었다.

도 7은 인간 인테그린  $\alpha 5\beta 1$ 에 대하여 인간화 7H5.v1, v2 및 v3-IgG의 BIACORE(등록상표) 분석 결과를 도시한 것이다. 인간화 7H5.v1, v2 및 v3-IgG를 450 RU (반응 단위)의 CM5 센서 칩의 3개의 상이한 유동 셀에 고정하

고, 300 nM에서 0.29 nM까지 2배 연속 희석시킨 인간 인테그린  $\alpha_5\beta_1$ 을 센서 칩을 통해 주입하여, 25°C에서 결합 친화도 및 운동학을 결정하였다. 인간화 7H5.v2는 오프율 (off-rate)에서 가장 큰 결합 친화도 개선을 나타낸다.

도 8은 파지 상에 1가 Fab 형태로서 디스플레이된 인간화 7H5.v2 프레임워크 변형 클론에 대해 인간 인테그린  $\alpha_5\beta_1$ 에 대한 파지 IC50을 결정하기 위한 파지 경쟁 ELISA를 도시한 것이다. 대부분의 프레임워크 치환은 각각 글라이신을 세린으로 및 알라닌을 류신으로 변화시킨 중쇄의 위치 49 및 78을 제외하고는 h7H5.v2에 비해 유사한 결합 친화도를 보였다.

도 9는 인간 인테그린  $\alpha_5\beta_1$ 에 대한 인간화 7H5.v2, v4 및 v5-IgG의 BIAcore(등록상표) 분석 결과를 도시한 것이다. (a) 인간화 7H5.v2, v4 및 v5-IgG를 450 RU (반응 단위)의 CM5 센서 칩의 3개의 상이한 유동 셀에 고정하고, 300 nM에서 0.29 nM까지 2배 연속 희석시킨 인간 인테그린  $\alpha_5\beta_1$ 을 센서 칩을 통해 주입하여 25°C에서 결합 친화도 및 운동학을 결정하였다. (b) 인간 인테그린  $\alpha_5\beta_1$ 을 800 RU의 CM5 센서 칩에 고정하고, 200 nM에서 0.2 nM까지 2배 연속 희석시킨 인간화 7H5.v2, v4 및 v5-IgG를 센서 칩을 통해 주입하여 25°C에서 결합 친화도 및 운동학을 결정하였다. 두 형식 모두에서, 인간화 7H5.v4는 인간화 7H5.v2에 비해 유사한 결합 친화도를 보였다.

도 10은 h7H5.v2 및 항-VEGF의 조합물의 투여가 항-VEGF 단독의 항-혈관신생 효과를 향상시킴을 입증하는, 피부 상처 치유 실험의 결과를 도시한 것이다.

도 11은 h7H5.v4 및 항-VEGF의 조합물의 투여가 항-VEGF 단독의 항-혈관신생 효과를 향상시킴을 입증하는, 피부 상처 치유 실험의 결과를 도시한 것이다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

- [0021] I. 도입
- [0022] 본 발명은  $\alpha_5\beta_1$  인테그린에 결합하는 신규한 항체의 확인에 기초한 것이다.  $\alpha_5\beta_1$  항체는 모노클로날 항체 7H5로부터 유도되고, 다양한 치료 및 진단 방법에서 사용될 수 있다. 예를 들어,  $\alpha_5\beta_1$  항체는 비정상적 혈관 신생, 신생물, 안질환 및 자가면역 질병을 치료하는 데에서 단독으로 또는 다른 물질과 조합으로 사용될 수 있다. 항체는 또한 환자에  $\alpha_5\beta_1$  단백질에 대한 항체를 투여하고 환자로부터의 샘플에서  $\alpha_5\beta_1$  단백질에 결합된 항- $\alpha_5\beta_1$  항체를 검출함으로써 (예를 들어, 생체 내에서 또는 생체 외에서), 또는 항체를 환자로부터의 샘플과 접촉시키고  $\alpha_5\beta_1$  단백질에 결합된 항- $\alpha_5\beta_1$  항체를 정성적으로 또는 정량적으로 검출함으로써 환자 또는 환자 샘플에서  $\alpha_5\beta_1$  단백질을 검출하기 위해 사용될 수 있다.
- [0023] II. 정의
- [0024] "알파5베타1" 또는 " $\alpha_5\beta_1$ " 또는 "a5b1" 또는 " $\alpha_5\beta_1$ "은 2개의 상이한 단백질 (즉, 서브유닛 알파5 및 베타1)을 포함하는 인테그린이다.  $\alpha_5\beta_1$ 은 피브로넥틴, L1-CAM 및 피브리노겐에 결합하는 것으로 나타났다.  $\alpha_5\beta_1$  인테그린은 또한 매우 후기 활성화(Very Late Activation)-5, VLA-5, 알파5베타1, CD49e/CD29, 피브로넥틴 수용체, FNR 및 GPIc-IIa로서 알려져 있다. 바람직한 실시태양에 따르면,  $\alpha_5\beta_1$ 은 인간  $\alpha_5\beta_1$ 이다.
- [0025] "알파5"는 본원에서 CD49e,  $\alpha_5$ , 인테그린 알파5 서브유닛, VLA-5 알파 서브유닛, GPIc-IIa의 IC 서브유닛, 및 FNR 알파 사슬과 서로 교환가능하게 사용되고,  $\alpha_5\beta_1$  인테그린의 하나의 서브유닛을 나타낸다. 알파5는 그들의 세포질 도메인 내에서 상이한, 선택적 스플라이싱 (alternative splicing) (A-D)에 의해 생성된 4개의 이소형을 갖는다. 알파5의 인간 이소형에 대한 아미노산 서열은 예를 들어 각각 Genbank 기탁 번호 X07979, U33879, U33882 및 U33880에서 볼 수 있다.
- [0026] "베타1"은 또한 CD29, 베타1, 혈소관 GPIIa; VLA-베타 사슬; 베타-1 인테그린 사슬, CD29; FNRB; MDF2; VLAB; GPIIA; MSK12 및 VLA5B로 불린다. 인간 베타1의 아미노산 서열은 예를 들어 Genbank 기탁 번호 X06256에서 볼 수 있다.
- [0027] 본원에서 사용되는 용어 "VEGF"는 165개 아미노산의 인간 혈관 내피세포 성장 인자와 관련 121개, 189개 및 206개 아미노산의 인간 혈관 내피세포 성장 인자 (문헌 ([Leung et al. Science, 246:1306 (1989)] 및 [Houck et al. Mol. Endocrin., 5:1806 (1991)])에 기재된 바와 같은)를 그의 자연 발생하는 대립유전자 및 처리된 형태

와 함께 나타낸다. 용어 "VEGF"는 또한 비-인간종, 예를 들어 마우스, 래트 또는 영장류의 VEGF를 나타낸다. 때때로, 특정 종의 VEGF는 인간 VEGF의 경우 hVEGF, 쥐 VEGF의 경우 mVEGF 등과 같은 용어로 표시한다. 용어 "VEGF"는 또한 165개 아미노산의 인간 혈관 내피세포 성장 인자의 아미노산 8 내지 109 또는 1 내지 109를 포함하는 폴리펩티드의 말단 절단된 (truncated) 형태를 지칭하도록 사용된다. 그러한 임의의 형태의 VEGF에 대한 언급은 본원에서 예를 들어 "VEGF (8-109)", "VEGF (1-109)" 또는 "VEGF<sub>165</sub>"에 의해 확인할 수 있다. "말단 절단된" 천연 VEGF에 대한 아미노산 위치는 천연 VEGF 서열에 나타낸 바와 같이 넘버링된다. 예를 들어, 말단 절단된 천연 VEGF의 아미노산 위치 17 (메티오닌)은 천연 VEGF의 위치 17 (메티오닌)이다. 말단 절단된 천연 VEGF는 천연 VEGF에 필적할만한 KDR 및 Flt-1 수용체에 대한 결합 친화도를 갖는다. 바람직한 실시태양에 따르면, VEGF는 인간 VEGF이다.

[0028] "VEGF 길항제"는 VEGF 또는 하나 이상의 VEGF 수용체 또는 이들을 코딩하는 핵산에 대한 그의 결합을 포함하여, VEGF 활성을 중화, 차단, 억제, 제거, 감소 또는 방해할 수 있는 분자를 나타낸다. 바람직하게는, VEGF 길항제는 VEGF 또는 VEGF 수용체에 결합한다. VEGF 길항제는 항-VEGF 항체 및 그의 항원 결합 단편, VEGF 및 VEGF 수용체에 결합하고 리간드-수용체 상호작용을 차단하는 폴리펩티드 (예를 들어, 면역억제제, 펩티바디), 항-VEGF 수용체 항체 및 VEGF 수용체 길항제, 예를 들어 VEGFR 티로신 키나제의 소분자 억제제, VEGF에 결합하는 앵타머, 및 엄격한 조건 하에 VEGF 또는 VEGF 수용체를 코딩하는 핵산 서열에 혼성화하는 핵산 (예를 들어, RNAi)을 포함한다. 하나의 바람직한 실시태양에 따르면, VEGF 길항제는 VEGF에 결합하고, 시험관 내에서 VEGF-유도된 내피세포 증식을 억제한다. 하나의 바람직한 실시태양에 따르면, VEGF 길항제는 VEGF 또는 VEGF 수용체에, 비-VEGF 또는 비-VEGF 수용체보다 더 큰 친화도로 결합한다. 하나의 바람직한 실시태양에 따르면, VEGF 길항제는 VEGF 또는 VEGF 수용체에 1 μM 내지 1 pM의 Kd로 결합한다. 또다른 바람직한 실시태양에 따르면, VEGF 길항제는 VEGF 또는 VEGF 수용체에 500 nM 내지 1 pM로 결합한다.

[0029] 바람직한 실시태양에 따르면, VEGF 길항제는 폴리펩티드, 예를 들어 항체, 펩티바디, 면역억제제, 소분자 또는 앵타머로 이루어지는 군 중에서 선택된다. 바람직한 실시태양에서, 항체는 항-VEGF 항체, 예를 들어 아바스틴(등록상표) 항체 또는 항-VEGF 수용체 항체, 예를 들어 항-VEGFR2 또는 항-VEGFR3 항체이다. VEGF 길항제의 다른 예는 VEGF-Trap, Mucagen, PTK787, SU11248, AG-013736, Bay 439006 (소라페닙), ZD-6474, CP632, CP-547632, AZD-2171, CDP-171, SU-14813, CHIR-258, AEE-788, SB786034, BAY579352, CDP-791, EG-3306, GW-786034, RWJ-417975/CT6758 및 KRN-633을 포함한다.

[0030] "항-VEGF 항체"는 충분한 친화도 및 특이성으로 VEGF에 결합하는 항체이다. 바람직하게는, 본 발명의 항-VEGF 항체는 VEGF 활성이 관련되는 질병 또는 병태를 표적으로 하여 이를 회복시키고자 할 때 치료제로서 사용될 수 있다. 항-VEGF 항체는 대체로 다른 VEGF 상동체, 예를 들어 VEGF-B 또는 VEGF-C에 결합하지 않고, 다른 성장 인자, 예를 들어 PlGF, PDGF 또는 bFGF에도 결합하지 않을 것이다. 바람직한 항-VEGF 항체는 하이브리도마 ATCC HB 10709에 의해 생산된 모노클로날 항-VEGF 항체 A4.6.1과 동일한 에피토프에 결합하는 모노클로날 항체이다. 보다 바람직하게는, 항-VEGF 항체는 문헌 [Presta et al. (1997) Cancer Res. 57:4593-4599]에 따라 생성된 재조합 인간화 항-VEGF 모노클로날 항체, 예를 들어 베바치주맵 (BV; 아바스틴(등록상표))으로 알려진 항체를 포함하고 이로 제한되지 않는다. 다른 실시태양에 따르면, 사용할 수 있는 항-VEGF 항체는 WO 2005/012359에 개시된 항체를 포함하고 이로 제한되지 않는다. 한 실시태양에 따르면, 항-VEGF 항체는 WO 2005/012359의 도 24, 25, 26, 27 및 29에 개시된 임의의 하나의 항체 (예를 들어, G6, G6-23, G6-31, G6-23.1, G6-23.2, B20, B20-4 및 B20.4.1)의 가변 중쇄 및 가변 경쇄 구역을 포함한다. 또다른 바람직한 실시태양에서, 라니비주맵으로 알려진 항-VEGF 항체는 안질환, 예를 들어 당뇨병 망막병증 및 습식 AMD를 위해 투여되는 VEGF 길항제이다.

[0031] "rhuMab VEGF" 또는 "아바스틴(등록상표)"으로도 알려진 항-VEGF 항체 "베바치주맵 (BV)"은 문헌 [Presta et al. (1997) Cancer Res. 57:4593-4599]에 따라 생성된 재조합 인간화 항-VEGF 모노클로날 항체이다. 이는 돌연변이된 인간 IgG1 프레임워크 구역, 및 그의 수용체에 대한 인간 VEGF의 결합을 차단하는 쥐 항-hVEGF 모노클로날 항체 A.4.6.1로부터의 항원 결합 상보성 결정 구역을 포함한다. 대부분의 프레임워크 구역을 포함하는 베바치주맵의 약 93%의 아미노산 서열은 인간 IgG1로부터 유래하고, 약 7%의 서열은 쥐 항체 A4.6.1로부터 유래한다. 베바치주맵은 분자 질량이 약 149,000 달톤이고 글리코실화된다. 다른 항-VEGF 항체는 미국 특허 6,884,879 및 WO 2005/044853에 기재된 항체를 포함한다.

[0032] 항-VEGF 항체 라니비주맵 또는 LUCENTIS(등록상표) 항체 또는 rhuFab V2는 인간화, 친화도-성숙된 (matured) 항-인간 VEGF Fab 단편이다. 라니비주맵은 표준 재조합 기술 방법에 의해 이. 콜라이 (E. coli) 발현 벡터 내

에서 및 세균 발효에 의해 생산된다. 라니비주맙은 글리코실화되지 않고, 분자 질량이 약 48,000 달톤이다. W098/45331 및 U.S. 2003/0190317을 참조한다.

- [0033] 7H5로서 공지된 알파5/베타1 모노클로날 항체는 2006년 3월 7일에 ATCC에 7H5.4.2.8 (ATCC No. PTA-7421)로서 기탁되었다.
- [0034] 표적 상의 겹치는 또는 유사한 영역에의 결합을 특징으로 하는 분자, 예를 들어 항체는 경쟁적 억제/결합 분석에 의해 확인할 수 있다.
- [0035] 한 실시태양에서, HUVEC 또는  $\alpha_5\beta_1$ 을 발현하는 다른 세포는 경쟁적 억제 분석에서 사용되고, FACS는 서로에 관하여 2개의 항- $\alpha_5\beta_1$  항체의 결합 장소를 평가하기 위해 사용된다. 예를 들어, HUVEC 세포를 원뿔형 튜브에서 세척하고, 1000 rpm에서 5분 동안 원심분리할 수 있다. 펠렛은 대개 2회 세척한다. 이어서, 세포를 재현탁하고, 계수하고, 사용시까지 얼음 상에 유지할 수 있다. 100  $\mu\text{l}$ 의 제1 항- $\alpha_5\beta_1$  항체 (예를 들어, 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도 또는 더 낮은 농도에서 시작하여)를 웰에 첨가할 수 있다. 다음으로, 웰당 100  $\mu\text{l}$  (예를 들어,  $20 \times 10^5$  세포)의 세포를 첨가하고 얼음 상에서 30분 동안 인큐베이팅할 수 있다. 다음으로, 100  $\mu\text{l}$ 의 비오틴화 항- $\alpha_5\beta_1$  항체 (5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  원액)를 각각의 웰에 첨가하고 얼음 상에서 30분 동안 인큐베이팅할 수 있다. 이어서, 세포를 세척하고, 1000 rpm에서 5분 동안 펠렛화한다. 상등액을 흡인 여과한다. 2차 시약 R-피코에리스틴 키뉴제이팅된 스트렙타비딘 (잭슨 (Jackson) 016-110-084)을 웰에 첨가한다 (1:1000으로 100  $\mu\text{l}$ ). 다음으로, 플레이트를 호일에 싸고 얼음 상에서 30분 동안 인큐베이팅할 수 있다. 인큐베이션 후에, 펠렛을 세척하고, 1000 rpm에서 5분 동안 펠렛화할 수 있다. 펠렛은 재현탁하고 FACS 분석을 위해 미량역가 튜브에 옮길 수 있다.
- [0036] "혈관신생 인자 또는 혈관신생제"는 혈관의 발생을 자극하는, 예를 들어 혈관신생, 내피세포 성장, 혈관 안정성 및/또는 혈관생성 등을 촉진하는 성장 인자이다. 예를 들어, 혈관신생 인자는 예를 들어 VEGF 및 VEGF 패밀리, PlGF, PDGF 패밀리의 멤버, 섬유아세포 성장 인자 패밀리 (FGF), TIE 리간드 (엔지오포이에틴), 에프린, Del-1, 섬유아세포 성장 인자: 산성 (aFGF) 및 염기성 (bFGF), 폴리스타틴, 파립구 콜로니-자극 인자 (G-CSF), 간세포 성장 인자 (HGF)/산란 인자 (SF), 인터루킨-8 (IL-8), 렙틴, 미드카인, 태반 성장 인자, 혈소관 유래 내피세포 성장 인자 (PD-ECGF), 혈소관 유래 성장 인자, 특히 PDGF-BB 또는 PDGFR-베타, 플레이오토로핀 (PTN), 프로그래놀린, 프로리페린, 전환 성장 인자-알파 (TGF-알파), 전환 성장 인자-베타 (TGF-베타), 종양 괴사 인자-알파 (TNF-알파), 혈관 내피 성장 인자 (VEGF)/혈관 투과 인자 (VPF) 등을 포함하고 이로 제한되지 않는다. 또한, 혈관신생 인자는 상처 치유를 촉진하는 인자, 예를 들어 성장 호르몬, 인슐린-유사 성장 인자-I (IGF-I), VIGF, 상피 성장 인자 (EGF), CTGF 및 그의 패밀리의 멤버, 및 TGF-알파 및 TGF-베타를 포함한다 (예를 들어, 문헌 [Klagsbrun and D'Amore, *Annu. 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) (예를 들어 공지의 혈관신생 인자를 나열하는 표 1)]; 및 [Sato *Int. J. Clin. Oncol.*, 8:200-206 (2003)] 참조).
- [0037] 본 발명에 따른 항-VEGF 항체에 대한 "Kd" 또는 "Kd 값"은 한 바람직한 실시태양에서, 비표지된 VEGF의 적정 시리즈의 존재 하에 최소 농도의 ( $^{125}\text{I}$ )-표지된 VEGF (109)로 Fab를 평형화시킨 후 결합된 VEGF를 항-Fab 항체-코팅된 플레이트로 포획함으로써 VEGF에 대한 Fab의 용액 결합 친화도를 측정하는, 하기 분석에서 설명되는 바와 같이 항체의 Fab 버전 및 VEGF 분자를 사용하여 수행된 방사성 표지된 VEGF 결합 분석 (RIA)에 의해 측정된다 (Chen, et al., (1999) *J. Mol Biol.* 293:865-881). 분석 조건을 확립하기 위해서, 미량역가 플레이트 (다이넥스 (Dynex))를 50 mM 탄산나트륨 (pH 9.6) 중의 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 포획 항-Fab 항체 (카펠 랩스 (Cappel Labs))와 함께 밤새 코팅한 후, PBS 중의 2% (w/v) 소 혈청 알부민으로 2 내지 5시간 동안 실온 (약 23°C)에서 차단한다. 비흡착 플레이트 (닝크 (Nunc) #269620)에서, 100 pM 또는 26 pM [ $^{125}\text{I}$ ] VEGF (109)를 목적하는 Fab, 예를 들어 Fab-12의 연속 희석액과 혼합한다 (Presta et al., (1997) *Cancer Res.* 57:4593-4599). 이어서, 목적하는 Fab를 밤새 인큐베이팅하지만; 인큐베이팅은 평형이 도달하는 것을 확실하게 하기 위해 65시간 동안 계속할 수 있다. 이후, 혼합물을 1시간 동안 실온에서 인큐베이팅하기 위해 포획 플레이트에 이송한다. 이어서, 용액을 제거하고, 플레이트를 PBS 중의 0.1% Tween-20으로 8회 세척한다. 플레이트를 건조시킬 때, 150  $\mu\text{l}$ /웰의 섬광제 (scintillant) (MicroScint-20; 팩카드 (Packard))를 첨가하고, 플레이트를 Topcount 감마 계수기 (팩카드)로 10분 동안 계수한다. 최대 결합의 20% 이하를 제공하는 각각의 Fab의 농도를 경쟁 결합 분석을 위해 선택한다. 다른 실시태양에 따르면, Kd 또는 Kd 값은 약 10의 반응 단위 (RU)의 고정된 hVEGF (8-109)

CM5 칩을 사용하여 25°C에서 BIAcore™-2000 또는 BIAcore™-3000 (비아코어, 인크. (BIAcore, Inc., 미국 뉴저지주 피스카타웨이))를 사용하여 표면 플라즈몬 공명 분석에 의해 측정한다. 간단히 설명하면, 카르복시메틸화 텍스트란 바이오센서 칩 (CM5, 비아코어, 인크.)을 제조사의 지시에 따라 N-에틸-N'-(3-디메틸아미노프로필)-카르보디이미드 염산염 (EDC) 및 N-히드록시숙신이미드 (NHS)로 활성화시킨다. 인간 VEGF를 10 mM 아세트산나트륨 (pH 4.8)을 사용하여 5 µg/ml (약 0.2 µM)으로 희석한 후, 약 10 반응 단위 (RU)의 커플링된 단백질을 달성하기 위해서 5 µl/분의 유속으로 주입한다. 인간 VEGF를 주입한 후에, 1M 에탄올아민을 주입하여 미반응군을 차단한다. 운동학 측정을 위해, Fab의 2배 연속 희석액 (0.78 nM 내지 500 nM)을 약 25 µl/분의 유속으로 25°C에서 0.05% Tween 20을 함유하는 PBS (PBST) 내에 주입한다. 회합율 ( $k_{on}$ ) 및 해리율 ( $k_{off}$ )은 회합 및 해리 센소그램의 동시 설치에 의해 단순 일-대-일 랭그뮤어 (Langmuir) 결합 모델 (BIAcore 평가 소프트웨어 버전 3.2)을 사용하여 계산한다. 평형 해리 상수 ( $K_d$ )는 비율  $k_{off}/k_{on}$ 으로서 계산하였다 (예를 들어, 문헌 [Chen, Y., et al., (1999) J. Mol Biol 293:865-881] 참조). 온-레이트가 상기 표면 플라즈몬 공명 분석에 의해  $10^6 M^{-1}S^{-1}$ 을 초과하면, 온-레이트는 분광계, 예를 들어 정지-유동 설치 분광분석기 (아비브 인스트루먼트 (Aviv Instruments)) 또는 교반 큐벳이 존재하는 8000-시리즈 SLM-Aminco 분광광도계 (써모스펙트로닉 (ThermoSpectronic))에서 측정할 때 증가하는 농도의 인간 VEGF 단백질 형태 (8-109) 또는 마우스 VEGF의 존재 하에, PBS (pH 7.2) 중의 20 nM 항-VEGF 항체 (Fab 형태)의 25°C에서의 형광 방출 강도 (여기 = 295 nm; 방출 = 340 nm, 16 nm 밴드 통과)의 증가 또는 감소를 측정하는 형광 쉐이팅 기술을 사용하여 결정할 수 있다. 표적으로서  $\alpha 5\beta 1$ 을 사용하여 항- $\alpha 5\beta 1$  Fab 또는 항체의  $K_d$ 를 결정하기 위해 유사한 결합 분석을 수행할 수 있다.

[0038] 본원에서 사용될 때, 치료할 대상은 포유동물 (예를 들어, 인간, 비-인간 영장류, 래트, 마우스, 소, 말, 돼지, 양, 염소, 개, 고양이 등)이다. 대상은 임상 환자, 임상 시험 자원자, 실험 동물 등이다. 대상은 암, 면역 질환, 또는 비정상적 혈관신생이 있는 임의의 다른 질병에 걸린 것으로 의심되거나 걸릴 위험이 있거나, 암, 면역 질환, 또는 비정상적 혈관신생이 있는 임의의 다른 질병으로 진단받을 수 있다. 암, 면역 질환 또는 비정상적 혈관신생을 보이는 임의의 다른 질병을 위한 많은 진단 방법 및 이들 질병의 임상 서술은 당업계에 공지되어 있다. 하나의 바람직한 실시태양에 따르면, 본 발명에 따라 치료되는 대상은 인간이다.

[0039] 용어 "비정상적 혈관신생"은 이환된 상태에서 또는 이환된 상태를 야기하도록 새로운 혈관이 과도하게 또는 달리 부적절하게 성장할 때 (예를 들어, 의학적 관점에서 바람직하지 않은 혈관신생의 위치, 타이밍, 정도 또는 발현) 발생한다. 일부 경우에, 과도하거나 비제어되거나 달리 부적절한 혈관신생은 이환된 상태의 악화에 작용하거나 이환된 상태, 예를 들어 암, 특히 혈관형성된 고형 종양 및 전이성 종양 (결장, 폐암 (특히 소세포 폐암) 또는 전립선암 포함), 안구 혈관신생에 의해 야기되는 질병, 특히 당뇨병 실명, 망막병증, 일차성 당뇨병 망막증 또는 노인성 황반변성, 맥락막 신생혈관형성 (CNV), 당뇨병 황반 부종, 병적 근시, 폰 히펠-린다우 (von Hippel-Lindau) 질병, 눈의 히스토플라스마증 (histoplasmosis), 중심 망막 정맥 폐쇄 (CRVO), 각막 신생혈관형성, 망막 신생혈관형성 및 조홍; 건선, 건선성 관절염, 혈관모세포종, 예를 들어 혈관종; 염증성 신장 질환, 예를 들어 사구체신염, 특히 메산지움증식성 사구체신염, 용혈성 요독 증후군, 당뇨병 신염 또는 고혈압성 신경화증; 다양한 염증성 질환, 예를 들어 관절염, 특히 류마티스성 관절염, 염증성 장 질환, 건선, 유육종증, 폐쇄성 동맥경화증 및 이식후 발생하는 질병, 자궁내막증 또는 만성 천식, 및 70종 이상의 다른 병태를 일으키는 새로운 혈관 성장이 존재할 때 발생한다. 신생 혈관은 이환된 조직에 영양을 공급하고, 정상 조직을 파괴할 수 있고, 암의 경우에 신생 혈관은 종양 세포가 혈류 내로 빠져나가 다른 장기에 존재하게 할 수 있다 (종양 전이). 본 발명에서는 상기 언급한 질병의 발생 위험이 있는 환자의 치료를 고려한다.

[0040] "비정상적 혈관 투과성"은 이환된 상태에서 또는 이환된 상태를 야기하도록 혈관과 혈관외 구획 사이의 유체, 분자 (예를 들어, 이온 및 영양물질) 및 세포 (예를 들어, 림프구)의 유동이 과도하거나 부적절할 때 (예를 들어, 의학적 관점에서 바람직하지 않은 혈관 투과성의 위치, 타이밍, 정도 또는 발현) 발생한다. 비정상적 혈관 투과성은 맥관계를 통한 이온, 물, 영양물질, 또는 세포의 과도하거나 달리 부적절한 "누출"을 일으킬 수 있다. 일부 경우에, 과도하거나 비제어되거나 달리 부적절한 혈관 투과성 또는 혈관 누출은 예를 들어 뇌 종양을 포함한 종양과 연관된 부종을 포함하는 질병 상태; 악성 종양과 연관된 복수; 메이그스 (Meigs) 증후군; 폐렴; 신증후군; 심낭 삼출; 흉막 삼출; 심혈관 질환, 예를 들어 심근 경색 및 뇌졸중 후의 병태와 연관된 투과성 등을 악화하거나 유도한다. 본 발명에서는 비정상적 혈관 투과성 또는 누출과 연관된 질병 및 질환을 발병하였거나 발병할 위험이 있는 환자를 치료하는 것을 고려한다.

[0041] 본 발명의 항체 또는 폴리펩티드의 투여 후보인 다른 환자는 섬유혈관성 조직의 비정상적 증식, 장미 여드름, 후천성 면역결핍 증후군, 동맥폐색증, 아토피성 각막염, 세균성 레양, 베체트 (Bechet) 병, 혈액계 종양, 경동

맥 폐쇄성 질환, 맥락막 신생혈관형성, 만성 염증, 만성 망막 박리, 만성 포도막염, 만성 유리체염, 콘택트렌즈 과착용증후군, 각막 이식편 거부반응, 각막 신생혈관형성, 각막 이식편 신생혈관형성, 크론병, 일스 (Eales) 병, 유행성 각결막염, 진균성 케양, 단순 포진 감염, 대상 포진 감염, 고점도 증후군, 카포시 (Kaposi) 육종, 백혈병, 지질 변성증, 라임 (Lyme) 병, 주변 각질용해, 무렌 (Mooren) 케양, 나병 이외의 항산균 감염, 근시, 안구 신생혈관병, 시신경 소와, 오슬러-웨버 (Osler-Weber) 증후군, 오슬로-웨버-렌두 병, 골관절염, 과제트 병, 주변 포도막염, 유사천포창, 소수포증, 다발 동맥염, 레이저 치료후 합병증, 원충 감염증, 탄성섬유가황색 증, 건성 익상편 각막염, 방사상 각막절개, 망막 신생혈관형성, 미숙아 망막병증, 수정체위 섬유증식, 사르코이드, 공막염, 겸상 적혈구성 빈혈, 쇼그렌 증후군, 고형 종양, 스타가르츠 (Stargarts) 질환, 스티븐 존슨 (Steven's Johnson) 질환, 상윤부 각막염, 매독, 전신성 루푸스, 테리엔 (Terrien) 변연 각막변성, 톡스포자충 증, 외상, 유잉 (Ewing) 육종의 종양, 신경모세포종의 종양, 골육종의 종양, 망막모세포종의 종양, 횡문근육종의 종양, 케양성 대장염, 정맥 폐쇄증, 비타민 A 결핍증 및 베게너 (Wegener) 유육종증, 당뇨와 연관된 바람직하지 않은 혈관신생, 기생충 질환, 비정상적 상처 치유, 수술, 상해 또는 외상 이후 비대증, 모발 성장의 억제, 배란 및 황체 형성의 억제, 착상의 억제 및 배아 발달의 억제가 있거나 발병할 위험이 있다.

[0042] 항-혈관신생 요법은 이식 거부, 폐렴, 신 증후군, 자간전증, 예를 들어 심막염에 관련된 심낭 삼출, 및 흉막 삼출, 바람직하지 않은 혈관 투과성 또는 혈관 누출의 특징이 있는 질병 및 질환, 예를 들어, 뇌종양 연관 부종, 악성종양 연관 복수, 메이그스 증후군, 폐렴, 콩팥 증후군, 심낭 삼출, 흉막 삼출, 심혈관 질환, 예를 들어 심근 경색 및 뇌졸중 후의 병태와 연관된 투과성 등의 일반적인 치료에 유용하다.

[0043] 본 발명에 따른 다른 혈관신생-의존성 질병은 혈관섬유종 (출혈이 발생하기 쉬운 혈관의 비정상적 혈액), 신생 혈관 녹내장 (안내 혈관 성장), 동정맥 기형 (동맥과 정맥 사이의 비정상 소통), 불유합 골절 (치유되지 않는 골절), 죽상경화관 (동맥의 경화), 화농육아종 (혈관으로 이루어진 통상적인 피부 병변), 공피증 (결합 조직 질병의 한 형태), 혈관종 (혈관으로 이루어진 종양), 트라코마 (제3세계 실명의 주요 원인), 혈우병성 관절, 혈관 협착 및 비대 흉터 (비정상적 흉터 형성)를 포함한다.

[0044] "치료"는 치료적 처치 및 예방 또는 억제적 조치를 모두 나타낸다. 치료를 필요로 하는 대상은 이미 질환이 발생한 대상 및 질환 예방이 필요한 대상을 포함한다.

[0045] 용어 "재발생", "재발" 또는 "재발된"은 질병 소실의 임상 평가 후에 암 또는 질병의 복귀를 나타낸다. 원거리 전이 또는 국소 재발생의 진단이 재발로 간주될 수 있다.

[0046] 용어 "불응성" 또는 "내성"은 치료에 반응하지 않는 암 또는 질병을 나타낸다.

[0047] 용어 "보조 요법"은 1차 요법, 대체로 수술 이후 제공되는 치료를 나타낸다. 암 또는 질병에 대한 보조 요법은 면역 요법, 화학요법, 방사선 요법 또는 호르몬 요법을 포함할 수 있다.

[0048] 용어 "유지 요법"은 선행 치료의 효과를 유지하는 것을 돕도록 제공되는 계획된 재치료를 나타낸다. 유지 요법은 암을 관해 상태로 유지하는 것을 돕거나 질병 진행에 무관하게 특정한 요법에 대한 반응을 연장하기 위해 종종 제공된다.

[0049] 용어 "침습성 암"은 시작하는 조직 층을 넘어 정상 주위 조직으로 확산한 암을 나타낸다. 침습성 암은 전이성 이거나 전이성이 아닐 수 있다.

[0050] 용어 "비-침습성 암"은 아주 초기의 암 또는 기원 조직을 넘어 확산하지 않은 암을 나타낸다.

[0051] 용어 "무진행 생존"은 종양학에서 치료 동안 및 치료 후에 암이 성장하지 않는 시간 길이를 나타낸다. 무진행 생존은 환자가 완전 반응 또는 부분 반응을 경험한 시간의 양, 및 환자가 안정한 질병을 경험한 시간의 양을 포함한다.

[0052] 용어 "진행성 질병"은 종양학에서 치료를 시작한 이래로 질량의 증가 또는 종양에서 확산으로 인한 20% 초과 종양 성장을 나타낼 수 있다.

[0053] "질환"은 항체를 사용한 치료가 유익할 임의의 병태이다. 예를 들어, 포유동물은 비정상적 혈관신생 (과도하거나 부적절하거나 비제어된 혈관신생) 또는 비정상적 혈관 투과성 또는 누출로 고생하거나 그에 대한 예방을 필요로 한다. 질환은 포유동물이 문제가 되는 질환에 걸리기 쉬운 병리적 상태를 포함한 만성 및 급성의 질환 또는 질병을 포함한다. 본원에서 치료할 질환의 비제한적인 예는 악성 및 양성 종양; 비-백혈병 및 림프구양 악성 종양; 뉴런, 신경교, 성상세포, 시상하부 및 다른 선, 대식세포, 상피, 기질 및 포배강 질환; 및 염증성, 혈

관신생성 및 면역학적 질환을 포함한다.

[0054] 용어 "암" 및 "암성"은 일반적으로 비조절된 세포 성장을 특징으로 하는 포유동물의 생리학적 상태를 나타내거나 설명한다. 암의 예는 암종, 림프종, 모세포종, 육종 및 백혈병을 포함하고 이로 제한되지 않는다. 그러한 암의 보다 특정한 예는 편평세포암, 아교모세포종, 자궁경부암, 난소암, 간암, 방광암, 간종양, 유방암, 결장암, 결장직장암, 자궁내막암종, 침샘 암종, 신장암, 신세포암, 전립선암, 외음부암, 갑상선암, 간세포암종, 두경부암, 직장암, 결장직장암, 폐암, 예를 들어 소세포 폐암, 비-소세포 폐암, 폐의 선암종 및 폐의 편평세포 암종, 편평세포암 (예를 들어 상피 편평세포암), 전립선암, 복막암, 간세포암, 위장 또는 위암, 예를 들어 위장관암, 췌장암, 아교모세포종, 망막모세포종, 별아교세포종, 난포막종, 남성배세포종, 간종양, 혈액암, 예를 들어 비-호지킨 림프종 (NHL), 다발성 골수종 및 급성 혈액암, 자궁내막 또는 자궁 암종, 자궁내막증, 섬유육종, 용모막 암종, 침샘 암종, 외음부암, 갑상선암, 식도 암종, 간세포 암종, 향문 암종, 음경 암종, 비인두 암종, 후두 암종, 카포시 육종, 흑색종, 피부 암종, 신경초종, 희소돌기아교세포종, 신경모세포종, 횡문근육종, 골 육종, 평활근육종, 요로 암종, 갑상선 암종, 윌름 (Wilm) 종양, 및 B 세포 림프종 (저등급/여포성 비-호지킨 림프종 (NHL); 작은 림프구 (SL) NHL; 중등급/여포성 NHL; 중등급 미만성 NHL; 고등급 면역모세포 NHL; 고등급 림프모구 NHL; 고등급 작은 비-절단된 세포 NHL; 큰 종양 (bulky disease) NHL; 외투 세포 림프종; AIDS-관련 림프종; 및 발덴스트롬 (Waldenstrom) 마크로글로불린혈증 포함); 만성 림프구 백혈병 (CLL); 급성 림프모구 백혈병 (ALL); 모세포 (Hairy cell) 백혈병; 만성 골수모세포성 백혈병; 및 이식후 림프 증식성 질환 (PTLD), 및 모반증과 연관된 비정상 혈관 증식, 및 메이그스 증후군을 포함한다.

[0055] 본원에서 사용될 때 "종양"은 악성이든 양성이든 모든 신생물성 세포 성장 및 증식, 및 모든 전-암성 및 암성 세포 및 조직을 나타낸다.

[0056] 용어 "항-신생물 조성물" 또는 "항-신생물제"는 적어도 하나의 활성 치료제, 예를 들어 "항암제"를 포함하는, 암 치료에 유용한 조성물을 의미한다. 치료제 (항암제)의 예는 예를 들어 화학요법제, 성장 억제제, 세포독성제, 방사선 요법에 사용되는 물질, 항혈관신생제, 세포사멸제, 항-튜블린제 및 다른 암 치료제, 예를 들어 항-HER-2 항체, 항-CD20 항체, 외피 성장 인자 수용체 (EGFR) 길항제 (예를 들어, 티로신 키나제 억제제), HER1/EGFR 억제제 (예를 들어 에르로티닙 (Tarceva™), 혈소판 유래 성장 인자 억제제 (예를 들어, 글리벡 (Gleevec)™ (이마티닙 메실레이트)), COX-2 억제제 (예를 들어, 셀레콕시브), 인터페론, 시토킨, 다음 표적 ErbB2, ErbB3, ErbB4, PDGFR-베타, BAFF, BR3, APRIL, BCMA 또는 VEGF 수용체(들) 중 하나 이상에 결합하는 길항제 (예를 들어, 중화 항체), TRAIL/Apo2, 및 다른 생물활성 및 유기 화학 물질 등을 포함하고 이로 제한되지 않는다. 이들의 조합물도 또한 본 발명에 포함된다.

[0057] 본원에서 사용될 때 "성장 억제제"는 시험관 내에서 및/또는 생체 내에서 세포의 성장 또는 증식을 억제하는 화합물 또는 조성물을 나타낸다. 따라서, 성장 억제제는 S기에서 세포의 비율을 유의하게 감소시키는 것일 수 있다. 성장 억제제의 예는 (S기 이외의 다른 시기에) 세포 주기 진행을 차단하는 물질, 예를 들어 G1 정지 및 M기 정지를 유도하는 물질을 포함한다. 전통적인 M기 차단제는 빈카 (빈크리스틴 및 빈블라스틴), TAXOL(등록상표), 및 토포 II 억제제, 예를 들어 독소루비신, 에피루비신, 다우노루비신, 에토포시드 및 블레오마이신을 포함한다. G1을 정지시키는 물질, 예를 들어 DNA 알킬화제, 예를 들어 타목시펜, 프레드니손, 다카르바진, 메클로레타민, 시스플라틴, 메토티렉세이트, 5-플루오로우라실 및 아라-C는 S기 정지로 이어질 수 있다. 추가의 정보는 문헌 [The Molecular Basis of Cancer, Mendelsohn and Israel, eds., Chapter 1] (영문 명칭 "Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs") (Murakami et al., (WB Saunders: Philadelphia, 1995), 특히 p.13)에서 볼 수 있다.

[0058] 본원에서 사용되는 용어 "세포독성제"는 세포 기능을 억제하거나 방지하고/하거나 세포 파괴를 일으키는 물질을 나타낸다. 상기 용어는 방사성 동위원소 (예를 들어  $I^{131}$ ,  $I^{125}$ ,  $Y^{90}$  및  $Re^{186}$ ), 화학요법제, 및 세균, 진균, 식물 또는 동물 기원의 효소 활성 독소와 같은 독소, 또는 그의 단편을 포함하고자 의도된다.

[0059] "화학요법제"는 암의 치료에 유용한 화학적 화합물이다. 화학요법제의 예는 암의 치료에 유용한 화학적 화합물을 포함한다. 화학요법제의 예는 알킬화제, 예를 들어 티오테파 및 CYTOXAN(등록상표) 시클로스포스파미드; 알킬 술포네이트, 예를 들어 부술판, 임프로술판 및 피포술판; 아지리딘, 예를 들어 벤조도파, 카르보쿠온, 메트우레도파 및 우레도파; 에틸렌이민 및 메틸아멜라민, 예를 들어 알트레타민, 트리에틸렌멜라민, 트리에틸렌포스포라미드, 트리에틸렌티오포스포라미드 및 트리메틸올로멜라민; 아세토게닌 (특히 블라타신 및 블라타시논); 캄프토테신 (합성 유사체 토포테칸 포함); 브리오스타틴; 칼리스타틴; CC-1065 (그의 아도젤레신, 카르젤레신 및 비젤레신 합성 유사체 포함); 크립토포신 (특히 크립토포신 1 및 크립토포신 8); 둘라스타틴; 듀오카르마이신

(합성 유사체 KW-2189 및 CB1-TM1 포함); 엘류테로빈; 판크라티스타틴; 사르코닥티인; 스폰지스타틴; 질소 머스타드, 예를 들어 클로람부실, 클로르나파진, 클로로포스파미드, 에스트라무스틴, 이포스파미드, 메클로레타민, 메클로레타민 옥시드 염산염, 멜팔란, 노벤펌친, 페네스테린, 프레드니무스틴, 트로포스파미드, 우라실 머스타드; 니트로스우레아, 예를 들어 카르무스틴, 클로로조토신, 포테무스틴, 로무스틴, 니무스틴 및 라니무스틴; 항생제, 예를 들어 에네디인 항생제 (예를 들어 칼리케아미신, 특히 칼리케아미신 감마II 및 칼리케아미신 오메가 I1 (예를 들어 [Agnew, Chem Intl. Ed. Engl., 33:183-186 (1994)] 참조); 다이네미신, 예를 들어 다이네미신 A; 비스포스포네이트, 예를 들어 클로드로네이트; 에스페라미신; 및 네오키리노스타틴 발색단 및 관련 발색단 백질 에네디인 항생 발색단), 아클라시노마이신, 악티노마이신, 아우트라마이신, 아자세린, 블레오마이신, 각티노마이신, 카라비신, 카르미노마이신, 카르지노필린, 크로모마이신, 닥티노마이신, 다우노루비신, 데토루비신, 6-디아조-5-옥소-L-노르류신, ADRIAMYCIN(등록상표) 독소루비신 (모르폴리노-독소루비신, 시아노모르폴리노-독소루비신, 2-피롤리노-독소루비신 및 데옥시독소루비신 포함), 에피루비신, 에소루비신, 이다루비신, 마르셀로마이신, 미토마이신, 예를 들어 미토마이신 C, 미코페놀산, 노갈라마이신, 올리보마이신, 페플로마이신, 포트피로마이신, 푸로마이신, 쿠엘라마이신, 로도루비신, 스트랩토니그린, 스트랩토조신, 튜베르시딘, 우베니맥스, 지노스타틴, 조루비신; 항-대사체, 예를 들어 메토티렉세이트 및 5-플루오로우라실 (5-FU); 염산 유사체, 예를 들어 테노프테린, 메토티렉세이트, 프테로프테린, 트리메트렉세이트; 퓨린 유사체, 예를 들어 플루다라빈, 6-머캅토푸린, 티아미프린, 티오구아닌; 피리미딘 유사체, 예를 들어 안시타빈, 아자시티딘, 6-아자우리딘, 카르모푸르, 시타라빈, 디테옥시우리딘, 독시플루리딘, 에노시타빈, 플록스우리딘; 안드로겐, 예를 들어 칼루스테론, 드로모스타놀론 프로피오네이트, 에피티오스타놀, 메피티오스탄, 테스토락톤; 항-아드레날, 예를 들어 아미노글루테티미드, 미토탄, 트리로스탄; 염산 보충제, 예를 들어 포플린산; 아세글라톤; 알도포스파미드 글리코사이드; 아미노레볼린산; 에닐우라실; 암사크린; 베스트라부실; 비산트렌; 에다트락세이트; 테포파민; 데메콜신; 디아지쿠온; 엘포르니틴; 엘립티늄 아세테이트; 에포틸론; 에토글루시드; 질산갈륨; 히드록시우레아; 켈티난; 로니다이닌; 메이탄시노이드, 예를 들어 메이탄신 및 안사미토신; 미토구아존; 미톡산트론; 모피단물; 니트라에린; 펜토스타틴; 페나메트; 피라루비신; 로속산트론; 포도필린산; 2-에틸히드라지드; 프로카르바진; PSK(등록상표) 다당류 복합체 (제이에이치에스 내처럴 프로덕츠 (JHS Natural Products, 미국 오레곤주 유진)); 라족산; 리족신; 시조피란; 스피로게르마늄; 테누아존산; 트리아지쿠온; 2,2',2"-트리클로로트리에틸아민; 트리코테센 (특히 T-2 독소, 베라쿠린 A, 로리딘 A 및 안구이딘); 우레탄; 빈데신; 다카르바진; 만노무스틴; 미토브로니톨; 미토락톨; 피포브로만; 가시토신; 아라비노시드 ("Ara-C"); 시클로포스파미드; 티오테파; 탁소이드, 예를 들어 TAXOL(등록상표) 파클리탁셀 (브리스톨-마이어스 스кви브 온콜로지 (Bristol-Myers Squibb Oncology, 미국 뉴저지주 프린스턴)); ABRAXANE™ 파클리탁셀의 Cremophor-미함유, 알부민-조작 나노입자 제제 (아메리칸 파마슈티칼 파트너스 (American Pharmaceutical Partners, 미국 일리노이주 샐름버그)), 및 TAXOTERE(등록상표) 독세탁셀 (롱-벨랑 로러 (Rhone-Poulenc Rorer, 프랑스 안토니)); 클로람부실; GEMZAR(등록상표) 겐시타빈; 6-티오구아닌; 머캅토푸린; 메토티렉세이트; 백금 유사체, 예를 들어 시스플라틴 및 카르보플라틴; 빈블라스틴; 백금; 에토포시드 (VP-16); 이포스파미드; 미톡산트론; 빈크리스틴; NAVELBINE(등록상표) 비노렐빈; 노반트론; 테니포시드; 에다트렉세이트; 다우노마이신; 아미노프테린; 젤로다; 이반드로네이트; 이리노테칸 (Camptosar, CPT-11) (이리노테칸과 5-FU 및 류코보린의 치료 요법 포함); 토포이소머라제 억제제 RFS 2000; 디플루오로메틸오르니틴 (DMFO); 레티노이드, 예를 들어 레티노산; 카페시타빈; 콤프레타스타틴; 류코보린 (LV); 옥살리플라틴 (옥살리플라틴 치료 요법 (FOLFOX) 포함); 세포증식을 감소시키는 PKC-알파, Raf, H-Ras 및 EGFR의 억제제 (예를 들어, 에르노티닙 (Tarceva™) 및 임의의 상기 물질의 제약상 허용되는 염, 산 또는 유도체를 포함한다.

[0060]

또한, 화학요법제는 종양에 대한 호르몬 작용을 조절하거나 억제하는 작용을 하는 항-호르몬제, 예를 들어 항-에스트로겐 및 선택적 에스트로겐 수용체 조절제 (SERM), 예를 들어 타목시펜 (NOLVADEX(등록상표) 타목시펜 포함), 알록시펜, 드롤록시펜, 4-히드록시타목시펜, 트리옥시펜, 케옥시펜, LY117018, 오나프리스톤 및 FARESTON(등록상표) 토레미펜; 부신에서 에스트로겐 생산을 조절하는 효소 아로마타제를 억제하는 아로마타제 억제제, 예를 들어 4(5)-이미다졸, 아미노글루테티미드, MEGASE(등록상표) 메게스트롤 아세테이트, AROMASIN(등록상표) 엑세메스탄, 포르메스탄, 파드로졸, RIVISOR(등록상표) 보로졸, FEMARA(등록상표) 레트로졸, 및 ARIMIDEX(등록상표) 아나스트로졸; 및 항-안드로겐, 예를 들어 플루타미드, 닐루타미드, 비칼루타미드, 류프롤리드 및 고세렐린; 및 트록사시타빈 (1,3-디옥솔란 뉴클레오시드 시토신 유사체); 안티센스 올리고뉴클레오티드, 특히 이상 (abherent) 세포 증식에 관여하는 신호전달 경로에서 유전자의 발현을 억제하는 것, 예를 들어 PKC-알파, Raf 및 H-Ras; 리보자임, 예를 들어 VEGF 발현 억제제 (예를 들어 ANGIOZYME(등록상표) 리보자임) 및 HER2 발현 억제제; 백신, 예를 들어 유전자 요법 백신, 예를 들어 ALLOVECTIN(등록상표) 백신, LEUVECTIN(등록상표) 백신 및 VAXID(등록상표) 백신; PROLEUKIN(등록상표) rIL-2; LURTOTECAN(등록상표) 토포이소머라제 1 억제제;

ABARELIX(등록상표) rmRH; 비노렐빈 및 에스페라미신 (미국 특허 4,675,187 참조) 및 이들의 제약상 허용되는 염, 산 또는 유도체를 포함한다.

- [0061] 본원에 사용되는 용어 "전구약물"은 모약물에 비해 이화된 세포에 대한 세포독성이 적고 보다 활성의 모형태로 효소 활성화되거나 전환될 수 있는, 제약상 활성 물질 (예를 들어, 소분자)의 전구체 또는 유도체 형태를 나타낸다 (예를 들어, 문헌 [Wilman, "Prodrugs in Cancer Chemotherapy" Biochemical Society Transactions, 14, pp. 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. 247-267, Humana Press (1985)] 참조). 본 발명의 전구약물은 보다 활성의 세포독성의 유리 약물로 전환될 수 있는, 포스페이트-함유 전구약물, 티오포스페이트-함유 전구약물, 술페이트-함유 전구약물, 펩티드-함유 전구약물, D-아미노산-변형 전구약물, 글리코실화 전구약물,  $\beta$ -락탐-함유 전구약물, 임의 치환된 페녹시아세트아미드-함유 전구약물 또는 임의 치환된 페닐아세트아미드-함유 전구약물, 5-플루오로시토신 및 다른 5-플루오로우리딘 전구약물을 포함하고 이로 제한되지 않는다. 본 발명에 사용하기 위한 전구약물 형태로 유도될 수 있는 세포독성 약물의 예는 상기한 화학요법제를 포함하고 이로 제한되지 않는다.
- [0062] 본원에서 개시되는 다양한 폴리펩티드를 설명하기 위해 사용될 때 "단리된"은 폴리펩티드가 발현된 세포 또는 세포 배양액으로부터 확인 및 분리되고/되거나 회수된 폴리펩티드를 의미한다. 그의 천연 환경의 오염 성분은 일반적으로 폴리펩티드의 진단 또는 치료 용도를 방해할 물질이고, 효소, 호르몬 및 다른 단백질성 또는 비단백질성 용질을 포함할 수 있다. 바람직한 실시태양에서, 폴리펩티드는 (1) 스피닝 컵 (spinning cup) 서열분석기를 사용하여 N-말단 또는 내부 아미노산 서열의 적어도 15개의 잔기를 얻기에 충분한 수준까지, 또는 (2) 쿠마시 (Coomassie) 블루 또는 바람직하게는 은 염색을 사용하여 환원 또는 비환원 조건 하에 SDS-PAGE에 의해 균질할 때까지 정제될 것이다. 단리된 폴리펩티드는 폴리펩티드의 천연 환경의 적어도 한 성분도 존재하지 않을 것이기 때문에 재조합 세포 내의 계내 폴리펩티드를 포함한다. 그러나, 통상적으로, 단리된 폴리펩티드는 적어도 하나의 정제 단계에 의해 제조될 것이다.
- [0063] "단리된" 폴리펩티드-코딩 핵산 또는 다른 폴리펩티드-코딩 핵산은 폴리펩티드-코딩 핵산의 천연 공급원에서 그와 통상적으로 회합되는 적어도 하나의 오염 핵산 분자로부터 확인되고 분리된 핵산 분자이다. 단리된 폴리펩티드-코딩 핵산 분자는 그가 자연에서 발견되는 형태 또는 상황 이외의 것이다. 따라서, 단리된 폴리펩티드-코딩 핵산 분자는 천연 세포 내에 존재하는 바와 같은 특이적 폴리펩티드-코딩 핵산 분자와 구별된다. 그러나, 단리된 폴리펩티드-코딩 핵산 분자는 예를 들어, 핵산 분자가 천연 세포와 상이한 염색체 위치에 존재하는 경우에 통상적으로 폴리펩티드를 발현하는 세포 내에 함유된 폴리펩티드-코딩 핵산 분자를 포함한다.
- [0064] 용어 "조절 서열"은 특정 숙주 유기체 내에서 작동가능하게 연결된 코딩 서열의 발현에 필요한 DNA 서열을 나타낸다. 원핵세포에 적합한 조절 서열은 예를 들어 프로모터, 임의로 오퍼레이터 서열, 및 리보솜 결합 부위를 포함한다. 진핵 세포는 프로모터, 폴리아데닐화 신호, 및 인핸서를 이용하는 것으로 알려져 있다.
- [0065] 핵산은 다른 핵산 서열과 기능적 관계로 놓일 때 "작동가능하게 연결된다". 예를 들어, 예비 서열 (presequence) 또는 분비 리더용 DNA는 폴리펩티드의 분비에 참여하는 예비 단백질로서 발현되는 경우에 폴리펩티드용 DNA에 작동가능하게 연결되고; 프로모터 또는 인핸서는 서열의 전사에 영향을 주는 경우에 코딩 서열에 작동가능하게 연결되고; 또는 리보솜 결합 부위는 번역을 촉진하도록 배치되는 경우에 코딩 서열에 작동가능하게 연결된다. 일반적으로, "작동가능하게 연결된"은 연결되는 DNA 서열이 인접하고, 분비 리더의 경우에 인접하고 리딩 페이스 (reading phase)인 것을 의미한다. 그러나, 인핸서는 인접해야할 필요가 없다. 연결은 편리한 제한 부위에서 라이게이션에 의해 달성된다. 그러한 부위가 존재하지 않는 경우에, 합성 올리고뉴클레오티드 어댑터 (adaptor) 또는 링커가 통상 실무에 따라 사용된다.
- [0066] 본원에서 규정될 때 "엄격한 조건" 또는 "고엄격성 조건"은 (1) 세척을 위해 낮은 이온 강도 및 높은 온도의 사용, 예를 들어 50°C에서 0.015 M 염화나트륨/0.0015 M 시트르산나트륨/0.1% 소듐 도데실 술페이트; (2) 혼성화 동안 변성제의 사용, 예를 들어 42°C에서 포름아미드, 예를 들어 50% (v/v) 포름아미드 + 0.1% 소 혈청 알부민/0.1% Ficoll/0.1% 폴리비닐피롤리돈/50 mM 인산나트륨 버퍼 (pH 6.5) + 750 mM 염화나트륨, 75 mM 시트르산나트륨; 또는 (3) 42°C에서 0.2 x SSC (염화나트륨/시트르산나트륨) 내에서 10분 세척, 이어서 55°C의 EDTA 함유 0.1 x SSC로 이루어지는 10분의 고엄격성 세척과 함께, 42°C에서 50% 포름아미드, 5 x SSC (0.75 M NaCl, 0.075 M 시트르산나트륨), 50 mM 인산나트륨 (pH 6.8), 0.1% 피로인산나트륨, 5 x 덴하르트 (Denhardt) 용액, 초음파 처리된 연어 정자 DNA (50  $\mu$ g/ml), 0.1% SDS, 및 10% 텍스트란 술페이트를 사용하는 밤새 혼성화에 의해 확인될 수 있다.

- [0067] 본원에서 설명되는 아미노산 서열은 달리 특정되지 않으면 연속적 아미노산 서열이다.
- [0068] 본원에서 사용될 때 용어 "면역어드헤신"은 이종 단백질 ("어드헤신")의 결합 특이성을 면역글로불린 불변 도메인의 효과기 기능과 조합한 항체-유사 분자를 지칭한다. 구조적으로, 면역어드헤신은 항체의 항원 인식 및 결합 부위 이외의, 목적하는 결합 특이성을 갖는 아미노산 서열 (즉, "이중성")과 면역글로불린 불변 도메인 서열의 융합체를 포함한다. 면역어드헤신 분자의 어드헤신 부분은 일반적으로 수용체 또는 리간드, 예를 들어 VEGFR 또는 피브로넥틴 리간드의 결합 부위를 적어도 포함하는 인접 아미노산 서열이다. 면역어드헤신 내의 면역글로불린 불변 도메인 서열은 임의의 면역글로불린, 예를 들어 IgG-1, IgG-2, IgG-3, 또는 IgG-4 서브타입, IgA (IgA-1 및 IgA-2 포함), IgE, IgD 또는 IgM으로부터 얻을 수 있다. 면역글로불린의 Fc 부분에 융합된 표적에 특이적으로 결합하는 서열의 파지 디스플레이 선택으로부터 유도된 서열을 종종 포함하는 펩티마드는 본원에서 면역어드헤신으로 간주될 수 있다.
- [0069] 용어 "항체"는 가장 넓은 의미로 사용되고, 구체적으로 예를 들어 단일 모노클로날 항체 (작용제, 길항제, 및 중화 항체 포함), 다중에피토프 특이성을 갖는 항체 조성물, 폴리클로날 항체, 단일쇄 항-항체, 및 천연 폴리펩티드에 특이적으로 결합하고/하거나 본 발명의 생물학적 활성 또는 면역학적 활성을 보이는 한 항체의 단편 (아래 참조)을 포함한다. 한 실시태양에 따르면, 항체는 표적 단백질의 올리고머 형태, 예를 들어 삼량체 형태에 결합한다. 다른 실시태양에 따르면, 항체는 그의 결합이 본 발명의 모노클로날 항체 (예를 들어, 본 발명의 기탁된 항체 등)에 의해 억제될 수 있는 단백질에 특이적으로 결합한다. 항체의 "기능성 단편 또는 유사체"라는 어구는 그가 칭하는 항체와 공통되는 정성적 생물학적 활성을 갖는 화합물이다. 예를 들어, 본 발명의 항체의 기능성 단편 또는 유사체는 VEGF 또는  $\alpha 5\beta 1$ 에 특이적으로 결합할 수 있는 것일 수 있다. 한 실시태양에서, 항체는 세포 증식을 유도하는 VEGF의 능력을 방지하거나 실질적으로 감소시킬 수 있다.
- [0070] "단리된" 항체는 그의 천연 환경의 성분으로부터 확인 및 분리되고/되거나 회수된 것이다. 그의 천연 환경의 오염 성분은 항체의 진단 또는 치료 용도를 방해하는 물질이고, 효소, 호르몬 및 다른 단백질성 또는 비단백질성 용질을 포함할 수 있다. 바람직한 실시태양에서, 항체는 (1) 로우리 (Lowry) 방법에 의해 측정할 때 항체의 95 중량% 초과, 가장 바람직하게는 99 중량% 초과 수준까지, (2) 스피닝 컵 서열분석기를 사용하여 N-말단 또는 내부 아미노산 서열의 적어도 15개의 잔기를 얻기에 충분한 수준까지, 또는 (3) 쿠마시 블루 또는 바람직하게는 은 염색을 사용하여 환원 또는 비환원 조건 하에 SDS-PAGE에 의해 균질할 때까지 정제될 것이다. 단리된 항체는 항체의 천연 환경의 적어도 한 성분도 존재하지 않을 것이기 때문에 재조합 세포 내의 계내 항체를 포함한다. 그러나, 통상적으로, 단리된 항체는 적어도 하나의 정제 단계에 의해 제조될 것이다.
- [0071] 기본 4개 사슬의 항체 단위는 2개의 동일한 경쇄 (L)와 2개의 동일한 중쇄 (H)로 이루어진 이종사량체 당단백질이다 (IgM 항체는 J 사슬로 불리는 추가의 폴리펩티드와 함께 5개의 기본 이종사량체 단위로 구성되고, 따라서 10개의 항원 결합 부위를 포함하는 한편, 분비된 IgA 항체는 중합되어 J 사슬과 함께 2-5개의 기본 4개 사슬 단위를 포함하는 다량 회합체를 형성할 수 있다). IgG의 경우에, 4개 사슬 단위는 일반적으로 약 150,000 달톤이다. 각각의 L 사슬은 하나의 공유 디설피드 결합에 의해 H 사슬에 연결되는 한편, 2개의 H 사슬은 H 사슬 이소형에 따라 하나 이상의 디설피드 결합에 의해 서로에 연결된다. 각각의 H 및 L 사슬은 또한 규칙적으로 이격된 사슬내 디설피드 다리를 갖는다. 각각의 H 사슬은 N-말단에서 가변 도메인 ( $V_H$ ), 이어서 각각의  $\alpha$  및  $\gamma$  사슬에 대해 3개의 불변 도메인 ( $C_H$ ) 및  $\mu$  및  $\epsilon$  이소형에 대해 4개의  $C_H$  도메인을 갖는다. 각각의 L 사슬은 N-말단에서 가변 도메인 ( $V_L$ ), 이어서 그의 다른 단부에 불변 도메인 ( $C_L$ )을 갖는다.  $V_L$ 은  $V_H$ 와 정렬되고,  $C_L$ 은 중쇄의 제1 불변 도메인 ( $C_H1$ )과 정렬된다. 특정 아미노산 잔기는 경쇄 및 중쇄 가변 도메인 사이의 계면을 형성하는 것으로 생각된다.  $V_H$  및  $V_L$ 의 페어링은 함께 단일 항원 결합 부위를 형성한다. 상이한 클래스의 항체의 구조 및 특성에 대해서는 예를 들어, 문헌 [BASIC AND CLINICAL IMMUNOLOGY, 8th edition, Daniel P. Stites, Abba I. Terr and Tristram G. Parslow (eds.), Appleton & Lange, Norwalk, CT, 1994, page 71 and Chapter 6]을 참조한다.
- [0072] 임의의 척추동물종에서 유래한 L 사슬은 그들의 불변 도메인의 아미노산 서열을 기초로 하여, 카파 및 람다로 불리는 2개의 분명하게 구분되는 종류 중 하나로 지정될 수 있다. 그들의 중쇄의 불변 도메인 ( $C_H$ )의 아미노산 서열에 따라, 면역글로불린은 상이한 클래스 또는 이소형으로 지정될 수 있다. 5개 클래스의 면역글로불린, 즉, 각각  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\gamma$ ,  $\epsilon$  및  $\mu$ 로 명명된 중쇄를 갖는 IgA, IgD, IgE, IgG 및 IgM이 존재한다.  $\gamma$  및  $\alpha$  클래스는  $C_H$  서열 및 기능의 비교적 작은 차이를 기초로 하여 서브클래스로 추가로 나누어질 수 있고, 예를 들어 인

간은 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 및 IgA2의 서브클래스를 발현한다.

- [0073] 용어 "가변"은 가변 도메인의 특정 세그먼트가 항체들 사이에서 서열이 크게 상이함을 나타낸다. V 도메인은 항원 결합을 매개하고, 그의 특정 항원에 대한 특정 항체의 특이성을 규정한다. 그러나, 가변성은 가변 도메인의 110개 아미노산 범위에 걸쳐 균등하게 분포되지 않는다. 대신에, V 영역은 각각 9-12개 아미노산 길이의 "초가변 구역"으로 불리는 고가변성의 보다 짧은 구역에 의해 이격된, 15-30개 아미노산의 프레임워크 영역 (FR)으로 불리는 비교적 비가변적 스트레치로 구성된다. 천연 중쇄 및 경쇄의 가변 도메인은 루프 연결부를 형성하고 일부 경우에 베타-시트 구조의 일부를 형성하는 3개의 초가변 구역에 의해 연결되는, 주로 베타-시트 입체 형태를 취하는 4개의 FR을 각각 포함한다. 각 사슬 내의 초가변 구역은 FR에 의해 매우 근접하게 함께 유지되고, 다른 사슬의 초가변 구역과 함께 항체의 항원 결합 부위 형성에 기여한다 ([Kabat et al., SEQUENCES OF PROTEINS OF IMMUNOLOGICAL INTEREST, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)] 참조). 불변 도메인은 항체의 항원 결합에 직접 관여하지 않지만, 상이한 효과기 기능, 예를 들어 항체 의존성 세포 세포독성 (ADCC)에서 항체의 참여를 보인다.
- [0074] 본원에서 사용되는 용어 "초가변 구역"은 항원 결합에 필요한 항체의 아미노산 잔기를 의미한다. 초가변 구역은 일반적으로 "상보성 결정 구역" 또는 "CDR"로부터의 아미노산 잔기 (예를 들어,  $V_L$ 의 대략 잔기 24-34 (L1), 50-56 (L2) 및 89-97 (L3), 및  $V_H$ 의 대략 31-35B (H1), 50-65 (H2) 및 95-102 (H3) (한 실시태양에서 H1은 대략 31-35임) (Kabat et al., 상기 문헌) 및/또는 "초가변 루프"로부터의 잔기 (예를 들어,  $V_L$ 의 잔기 26-32 (L1), 50-52 (L2) 및 91-96 (L3), 및  $V_H$ 의 26-32 (H1), 53-55 (H2) 및 96-101 (H3); [Chothia and Lesk J. Mol. Biol. 196: 901-917 (1987)])를 포함한다. 본 발명에서 HVR 구역은 다음 위치를 포함한다: 경쇄 가변 도메인의 24-36 (LHVR1), 46-56 (LHVR2) 및 89-97 (LHVR3), 및 중쇄 가변 도메인의 26-35 (HHVR1), 47-65 (HHVR2) 및 93-102 (HHVR3)를 포함한다 (카바트 넘버링 시스템, [Kabat et al., 상기 문헌 1991]).
- [0075] 본 명세서와 청구의 범위 전체에서, 가변 도메인 내의 잔기 (대략 경쇄의 잔기 1-107 및 중쇄의 잔기 1-113)를 언급하기 위해 카바트 넘버링 시스템이 일반적으로 사용된다 (예를 들어, 문헌 [Kabat et al., 상기 문헌] 참조). "EU 넘버링 시스템" 또는 "EU 색인 (index)"은 일반적으로 면역글로불린 중쇄 불변 구역 내의 잔기를 언급하기 위해 사용된다 (예를 들어, 명백하게 본원에 참고로 포함된 문헌 [Kabat et al., 상기 문헌 (1991)]에 보고된 EU 색인 참조). 본원에서 달리 언급하지 않으면, 항체의 가변 도메인 내의 잔기 번호에 대한 언급은 카바트 넘버링 시스템에 의한 잔기 넘버링을 의미한다. 본원에서 달리 언급하지 않으면, 항체의 불변 도메인 내의 잔기 번호에 대한 언급은 EU 넘버링 시스템에 의한 잔기 넘버링을 의미한다.
- [0076] 본원에서 사용되는 용어 "모노클로날 항체"는 실질적으로 균질한 항체 집단으로부터 수득된 항체를 말하는데, 즉 이러한 집단을 구성하는 개개의 항체는 소량으로 존재할 수도 있는, 가능한 자연 발생 돌연변이를 제외하고는 동일하다. 모노클로날 항체는 단일 항원 부위에 대해 작용하며, 특이성이 높다. 또한, 상이한 결정자 (에피토프)에 대해 작용하는 상이한 항체를 포함하는 폴리클로날 항체 제제에 비해, 각각의 모노클로날 항체는 항원 상의 단일 결정자에 대해 작용한다. 그들의 특이성에 추가로, 모노클로날 항체는 이들이 다른 항체에 의해 오염되지 않은 상태로 합성될 수 있다는 점에서 유리하다. 변경 표현 "모노클로날"은 임의의 특정 방법에 의한 항체 제조를 필요로 하는 것으로서 생각하지 않아야 한다. 예를 들어, 본 발명에 유용한 모노클로날 항체는 문헌 [Kohler et al., Nature, 256:495 (1975)]에 처음 설명된 하이브리도마 방법에 의해 제조될 수 있거나, 또는 세균, 진핵 동물 또는 식물 세포에서 재조합 DNA 방법을 사용하여 제조될 수 있다 (예를 들어, 미국 특허 4,816,567 참조). 또한, "모노클로날 항체"는 문헌 [Clackson et al., Nature, 352:624-628 (1991)], [Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991)]에 기재된 기술 또는 하기 실시예에 제시된 방법을 사용하여 파지 항체 라이브러리로부터 단리될 수 있다.
- [0077] 본원에서 모노클로날 항체는 본 발명의 생물학적 활성을 보이는 한, 중쇄 및/또는 경쇄의 일부가 특정 종에서 유래하거나 특정 항체 클래스 또는 서브클래스에 속하는 항체의 대응하는 서열과 동일하거나 상동성이고 사슬 (들)의 나머지는 다른 종에서 유래하거나 다른 항체 종류 또는 서브클래스에 속하는 항체의 대응하는 서열과 동일하거나 상동성인 "키메라" 항체 및 상기 항체의 단편을 포함한다 (미국 특허 4,816,567; 및 문헌 [Morrison et al. PNAS USA 81:6851-6855 (1984)] 참조). 본원에서 목적하는 키메라 항체는 비-인간 영장류 (예, 구세계 원숭이, 유인원 등)에서 유래한 가변 도메인 항원 결합 서열 및 인간 불변 구역 서열을 포함하는 "영장류화 (primatized)" 항체를 포함한다.
- [0078] "무손상" 항체는 항원 결합 부위 뿐만 아니라  $C_L$  및 적어도 중쇄 불변 도메인  $C_H1$ ,  $C_H2$  및  $C_H3$ 을 포함하는 항체

이다. 불변 도메인은 천연 서열 불변 도메인 (예를 들어 인간 천연 서열 불변 도메인) 또는 그의 아미노산 서열 변이체일 수 있다. 바람직하게는, 무손상 항체는 하나 이상의 효과기 기능을 갖는다.

- [0079] "항체 단편"은 바람직하게는 그의 항원 결합 또는 가변 구역을 포함하는 무손상 항체의 일부를 포함한다. 항체 단편의 예는 Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> 및 Fv 단편; 디아바디; 선형 항체 (미국 특허 5,641,870, 실시예 2; 문헌 [Zapata et al., Protein Eng, 8(10): 1057-1062 [1995]] 참조); 단일쇄 항체 분자; 및 항체 단편으로부터 형성된 다중특이적 항체를 포함한다.
- [0080] 표현 "선형 항체"는 일반적으로 문헌 [Zapata et al., Protein Eng., 8 (10): 1057-1062 (1995)]에 기재된 항체를 의미한다. 간단히 설명하면, 상기 항체는 상보적인 경쇄 폴리펩티드와 함께 한 쌍의 항원 결합 구역을 형성하는 한 쌍의 탠덤 Fd 세그먼트 (V<sub>H</sub>-C<sub>H1</sub>-V<sub>H</sub>-C<sub>H1</sub>)를 포함한다. 선형 항체는 이중특이적 또는 단일특이적일 수 있다.
- [0081] 항체를 파파인으로 분해하면, "Fab" 단편으로 언급되는 2개의 동일한 항원 결합 단편 및 잔여 "Fc" 단편이 생성되고, 이 명칭은 그의 쉽게 결정화되는 능력을 반영한다. Fab 단편은 전체 L 사슬과 H 사슬의 가변 구역 도메인 (V<sub>H</sub>), 및 하나의 중쇄의 제1 불변 도메인 (C<sub>H1</sub>)으로 구성된다. 각각의 Fab 단편은 항원 결합에 대해 1가이고, 즉, 단일 항원 결합 부위를 갖는다. 항체의 펩신 처리는, 2가 항원 결합 활성을 갖는 2개의 디설피드 연결 Fab 단편에 거의 대응하고 여전히 항원에 가교결합할 수 있는 하나의 큰 F(ab')<sub>2</sub> 단편을 생성시킨다. Fab' 단편은 항체 힌지 구역으로부터 하나 이상의 시스테인을 포함하는 C<sub>H1</sub> 도메인의 카르복시 말단에 추가의 몇 개의 잔기를 갖는다는 점에서 Fab 단편과 상이하다. Fab'-SH는 본원에서 불변 도메인의 시스테인 잔기(들)이 유리 티올기를 포함하는 Fab'의 명칭이다. F(ab')<sub>2</sub> 항체 단편은 본래 그들 사이에 힌지 시스테인을 갖는 한쌍의 Fab' 단편으로서 생성되었다. 항체 단편의 다른 화학적 커플링도 당업계에서 공지되어 있다.
- [0082] Fc 단편은 디설피드에 의해 함께 유지되는 두 H 사슬의 카르복시 말단 부분을 포함한다. 항체의 효과기 기능은 Fc 구역 내의 서열에 의해 결정되고, 이 구역은 또한 특정 종류의 세포에서 발견되는 Fc 수용체 (FcR)에 의해 인식되는 부분이다.
- [0083] "변이체 Fc 구역"은 본원에서 규정되는 바와 같은 적어도 하나의 "아미노산 변형"에 의해 천연 서열 Fc 구역의 것과 상이한 아미노산 서열을 포함한다. 바람직하게는, 변이체 Fc 구역은 천연 서열 Fc 구역 또는 모 폴리펩티드의 Fc 구역과 비교시에, 적어도 하나의 아미노산 치환, 예를 들어, 천연 서열 Fc 구역에서 또는 모 폴리펩티드의 Fc 구역에서 약 1 내지 약 10개의 아미노산 치환, 바람직하게, 약 1 내지 약 5개의 아미노산 치환을 갖는다. 한 실시태양에서, 변이체 Fc 구역은 본원에서 천연 서열 Fc 구역과 적어도 약 80%의 상동성, 적어도 약 85%의 상동성, 적어도 약 90%의 상동성, 적어도 약 95%의 상동성, 또는 적어도 약 99%의 상동성을 가질 것이다. 다른 실시태양에 따르면, 변이체 Fc 구역은 본원에서 모 폴리펩티드의 Fc 구역과 적어도 약 80%의 상동성, 적어도 약 85%의 상동성, 적어도 약 90%의 상동성, 적어도 약 95%의 상동성, 또는 적어도 약 99%의 상동성을 가질 것이다.
- [0084] 용어 "Fc 구역-포함 폴리펩티드"는 Fc 구역을 포함하는 폴리펩티드, 예를 들어 항체 또는 면역어드헤신 (하기 정의 참조)을 의미한다. Fc 구역의 C-말단 라이신 (EU 넘버링 시스템에 따른 잔기 447)은 예를 들어 폴리펩티드의 정제 동안 또는 폴리펩티드를 코딩하는 핵산의 재조합 처리에 의해 제거될 수 있다. 따라서, 본 발명에 따른 Fc 구역을 갖는 폴리펩티드, 예를 들어 항체를 포함하는 조성물은 모든 K447 잔기가 제거된 폴리펩티드 집단, K447 잔기가 제거되지 않은 폴리펩티드 집단, 또는 K447 잔기가 존재하거나 존재하지 않는 폴리펩티드의 혼합물을 갖는 폴리펩티드 집단을 포함할 수 있다.
- [0085] "Fv"는 완전한 항원-인식 및 항원-결합 부위를 함유하는 최소 항체 단편이다. 상기 단편은 강한 비공유 회합 상태의 하나의 중쇄 및 하나의 경쇄 가변 구역 도메인의 이량체로 이루어진다. 이들의 폴딩으로부터, 두 도메인은 항원 결합을 위한 아미노산 잔기를 제공하고 항체에 항원 결합 특이성을 부여하는 6개의 초가변 루프 (각각 H 및 L 사슬로부터 3개의 루프)를 생성시킨다. 그러나, 단일 가변 도메인 (또는 항원에 특이적인 3개의 CDR만을 포함하는 Fv의 절반)이라도 전체 결합 부위보다 더 낮은 친화도이지만 항원을 인식하고 결합하는 능력을 갖는다.
- [0086] "sFv" 또는 "scFv"로도 약칭되는 "단일쇄 Fv"는 V<sub>H</sub> 및 V<sub>L</sub> 항체 도메인을 포함하는 항체 단편이고, 여기서 이들 도메인은 단일 폴리펩티드 사슬로 연결된다. 바람직하게는, sFv 폴리펩티드는 sFv가 항원 결합에 요구되는 구

조를 형성하게 하는 폴리펩티드 링커를  $V_H$  도메인과  $V_L$  도메인 사이에 추가로 포함한다. sFv 검토에 대해서는, 문헌 [Pluckthun in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, Vol. 113, Rosenberg and Moore eds. Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994)]; [Borrebaeck 1995, 하기 문헌]을 참조한다.

[0087] 용어 "디아바디"는  $V$  도메인의 사슬 내가 아니라 사슬간 페어링이 달성되어 2가 단편, 즉, 2개의 항원 결합 부위를 갖는 단편을 생성하도록,  $V_H$  및  $V_L$  도메인 사이에 짧은 링커 (약 5-10개 잔기)를 사용하여 sFv 단편 (상기 단락 참조)을 구성함으로써 제조된 작은 항체 단편을 나타낸다. 이중특이적 디아바디는 2개의 "교차 (crossover)" sFv 단편의 이중이량체이고, 여기서 2개의 항체의  $V_H$  및  $V_L$  도메인은 상이한 폴리펩티드 사슬 상에 존재한다. 디아바디는 예를 들어 EP 404,097; WO 93/11161; 문헌 [Hollinger et al., PNAS USA 90: 6444-6448 (1993)]에 보다 상세히 설명되어 있다.

[0088] 비-인간 (예를 들어, 설치류) 항체의 "인간화" 형태는 비-인간 항체에서 유래한 최소 서열을 함유하는 키메라 항체이다. 대부분의 경우에, 인간화 항체는 수여체의 초가변 구역의 잔기가 목적하는 항체 특이성, 친화도 및 능력을 갖는 비-인간 종 (공여 항체), 예를 들어 마우스, 래트, 토끼 또는 비인간 영장류의 초가변 구역의 잔기로 교체된 인간 면역글로불린 (수여 항체)이다. 일부 경우에, 인간 면역글로불린의 프레임워크 구역 (FR) 잔기가 대응하는 비-인간 잔기로 교체된다. 또한, 인간화 항체는 수여 항체 또는 공여 항체에서 발견되지 않는 잔기를 포함할 수 있다. 상기 변형은 항체 성능을 더욱 개선하기 위한 것이다. 일반적으로, 인간화 항체는 적어도 하나, 대개 2개의 가변 도메인을 실질적으로 모두 포함할 것이고, 여기서 모든 또는 실질적으로 모든 초가변 루프는 비-인간 면역글로불린의 초가변 루프에 대응하고, 모든 또는 실질적으로 모든 FR은 인간 면역글로불린 서열의 FR이다. 또한, 인간화 항체는 임의로 적어도 일부의 면역글로불린 불변 구역 (Fc), 대개 인간 면역글로불린의 Fc를 포함할 것이다. 보다 상세한 내용은 문헌 [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.

[0089] "중 의존성 항체"는 제2 포유동물종의 항원의 상동체에 대한 것보다 제1 포유동물종의 항원에 대해 보다 강한 결합 친화도를 갖는 것이다. 통상적으로, 중 의존성 항체는 인간 항원 (즉, 결합 친화도 (Kd) 값이 약  $1 \times 10^{-7}$  M 이하, 약  $1 \times 10^{-8}$  M 이하, 또는 약  $1 \times 10^{-9}$  M 이하)에 "특이적으로 결합"하지만, 제2 비인간 포유동물종의 항원의 상동체에 대한 결합 친화도는 인간 항원에 대한 그의 결합 친화도보다 적어도 약 50배, 또는 적어도 약 500배, 또는 적어도 약 1000배 더 약하다. 중 의존성 항체는 상기 정의한 항체의 임의의 다양한 형태일 수 있지만, 바람직하게는 인간화 또는 인간 항체이다.

[0090] 상기 실시태양에서, "비-표적" 단백질에 대한 폴리펩티드, 항체, 길항제 또는 조성물의 결합 정도는 형광 활성화 세포 분류 (FACS) 분석 또는 방사성 면역침전 (RIA)에 의해 측정시에, 그의 특정 표적 단백질에 대한 폴리펩티드, 항체, 길항제 또는 조성물의 결합의 약 10% 미만일 것이다. 폴리펩티드, 항체, 길항제 또는 조성물의 표적 분자에 대한 결합에 대해, 특정 폴리펩티드 또는 특정 폴리펩티드 표적 상의 에피토프에 대한 "특이적 결합" 또는 "특이적으로 결합하는" 또는 "특이적인"은 비-특이적인 상호작용과 측정가능하게 상이한 결합을 의미한다. 특이적 결합은 예를 들어 일반적으로 결합 활성을 갖지 않는 유사한 구조의 분자인 대조 분자의 결합에 비교하여 분자의 결합을 결정함으로써 측정할 수 있다. 예를 들어, 특이적인 결합은 표적과 유사한 대조 분자, 예를 들어, 과량의 표지되지 않은 표적과의 경쟁에 의해 결정될 수 있다. 이 경우에, 특이적인 결합은 프로브에 대한 표지된 표적의 결합이 과량의 비표지된 표적에 의해 경쟁적으로 억제될 경우에 표시된다. 본원에서 사용되는 특정 폴리펩티드 또는 특정 폴리펩티드 표적 상의 에피토프에 대한 "특이적 결합" 또는 "특이적으로 결합하는" 또는 "특이적인"은 표적에 대한 Kd가 적어도 약  $10^{-4}$  M, 적어도 약  $10^{-5}$  M, 적어도 약  $10^{-6}$  M, 적어도 약  $10^{-7}$  M, 적어도 약  $10^{-8}$  M, 적어도 약  $10^{-9}$  M, 다르게는 적어도 약  $10^{-10}$  M, 적어도 약  $10^{-11}$  M, 적어도 약  $10^{-12}$  M 인 분자로 설명될 수 있다. 한 실시태양에서, 용어 "특이적 결합"은 분자가 실질적으로 임의의 다른 폴리펩티드 또는 폴리펩티드 에피토프에 결합하지 않으면서 특정 폴리펩티드 또는 특정 폴리펩티드 상의 에피토프에 결합하는 것을 나타낸다.

[0091] 항체 "효과기 기능"은 항체의 Fc 구역 (천연 서열 Fc 구역 또는 아미노산 서열 변이체 Fc 구역)에 기인한 생물학적 활성을 의미하고, 항체 이소형에 따라 상이하다. 항체 효과기 기능의 예는 C1q 결합 및 보체 의존성 세포 세포독성; Fc 수용체 결합; 항체 의존성 세포 매개 세포독성 (ADCC); 포식작용; 세포 표면 수용체의 하향 조절; 및 B 세포 활성화를 포함한다. "천연 서열 Fc 구역"은 자연에서 발견되는 Fc 구역의 아미노산 서열과 동일한

아미노산 서열을 포함한다. Fc 서열의 예는 예를 들어 문헌 [Kabat et al., 상기 문헌 (1991)] (이로 제한되지 않음)에 기재되어 있다.

- [0092] 본원에서 확인되는 폴리펩티드 및 항체 서열에 관하여, "아미노산 서열 동일성 비율 (%)" 또는 "상동성 비율"은 서열을 정렬시킨 후 비교되는 폴리펩티드 내의 아미노산 잔기와 동일한 후보 서열 내의 아미노산 잔기의 백분율로서 본원에서 정의되고, 임의의 보존적 치환은 서열 동일성의 일부로 간주한다. 아미노산 서열 동일성 비율을 결정하기 위한 정렬은 당업자에게 공지된 다양한 방법, 예를 들어 공개된 컴퓨터 소프트웨어, 예를 들어 BLAST, BLAST-2, ALIGN 또는 Megalign (DNASTAR) 소프트웨어를 사용하여 달성할 수 있다. 당업자는 비교되는 서열의 전체 길이에 걸친 최대 정렬의 달성에 필요한 임의의 알고리즘을 포함하는, 정렬을 측정하기 위한 적절한 파라미터를 결정할 수 있다. 그러나, 본원의 목적을 위해, 아미노산 동일성 비율값(%)은 서열 비교 컴퓨터 프로그램 ALIGN-2를 사용하여 얻는다. ALIGN-2 서열 비교 컴퓨터 프로그램은 제넨테크, 인크. (Genentech, Inc.) 소유로서, 소스 코드는 미국 저작권국 (U.S. Copyright Office, 미국 워싱턴 디. 씨. 20559)에 사용자 제출서류로 출원되어 미국 저작권 TXU510087 하에 등록되었다. ALIGN-2 프로그램은 제넨테크, 인크. (미국 캘리포니아주 사우스 샌 프란시스코)로부터 공개적으로 입수가 가능하다. ALIGN-2 프로그램은 UNIX 운영 체제, 바람직하게는 디지털 UNIX V4.0D에서 사용하기 위해 컴파일링되어야 한다. 모든 서열 비교 파라미터는 ALIGN-2 프로그램에 의해 설정되고, 변하지 않는다.
- [0093] 용어 "Fc 수용체" 또는 "FcR"은 항체의 Fc 구역에 결합하는 수용체를 설명한다. 한 실시태양에서, 본 발명의 FcR은 IgG 항체 (감마 수용체)에 결합하고 상기 수용체의 대립 유전자 변이체 및 선택적으로 스플라이싱된 형태를 포함하여 Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RII 및 Fc $\gamma$ RIII 서브클래스의 수용체를 포함하는 것이다. Fc $\gamma$ RII 수용체는 Fc $\gamma$ RIIA ("활성화 수용체") 및 Fc $\gamma$ RIIB ("억제 수용체")를 포함하고, 이들은 그의 세포질 도메인에서 주로 상이한 유사한 아미노산 서열을 갖는다. 활성화 수용체 Fc $\gamma$ RIIA는 그의 세포질 도메인에 면역수용체 티로신계 활성화 모티프 (ITAM)를 포함한다. 억제 수용체 Fc $\gamma$ RIIB는 그의 세포질 도메인에 면역수용체 티로신계 억제 모티프 (ITIM)를 포함한다 (문헌 [M. in Daeron, Annu. Rev. Immunol. 15:203-234 (1997)] 참조). 상기 용어는 동종 이인자형, 예를 들어 Fc $\gamma$ RIIIA 동종이인자형, 즉 Fc $\gamma$ RIIIA-Phe158, Fc $\gamma$ RIIIA-Val158, Fc $\gamma$ RIIA-R131 및/또는 Fc $\gamma$ RIIA-H131을 포함한다. FcR은 문헌에 검토되어 있다 ([Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol 9:457-92 (1991)]; [Capel et al., Immunomethods 4:25-34 (1994)]; 및 [de Haas et al., J. Lab. Clin. Med. 126:330-41 (1995)]). 미래에 확인되는 것을 포함하여 다른 FcR이 본원의 용어 "FcR"에 포함된다. 이 용어는 또한 모체 IgG의 태아로의 전달을 담당하는 신생아의 수용체인 FcRn을 포함한다 ([Guyer et al., J. Immunol. 117:587 (1976)] 및 [Kim et al., J. Immunol. 24:249 (1994)]).
- [0094] 용어 "FcRn"은 신생아의 Fc 수용체 (FcRn)를 의미한다. FcRn은 구조적 적합 복합체 (MHC)와 구조적으로 유사하고,  $\beta$ 2-마이크로글로불린에 비공유 결합된  $\alpha$ -사슬로 구성된다. 신생아의 Fc 수용체인 FcRn의 다중 기능은 문헌 [Ghetie and Ward (2000) Annu. Rev. Immunol. 18, 739-766]에서 검토된 바 있다. FcRn은 모체로부터 태아로의 면역글로불린 IgG의 수동 전달 및 혈청 IgG 수준의 조절에서 일정 기능을 수행한다. FcRn은 세포 내에서 및 세포를 가로질러 세포흡수된 (pinocytosed) 무손상 형태의 IgG에 결합하여 수송하고 이를 불완전 분해 (default degradative) 경로로부터 구제하는 샬비지 (salvage) 수용체로서 작용할 수 있다.
- [0095] WO 00/42072 (Presta) 및 문헌 [Shields et al. J. Biol. Chem. 9(2): 6591-6604 (2001)]에서는 FcR에 대한 결합이 개선되거나 감소된 항체 변이체를 설명하고 있다. 상기 문헌의 내용은 본원에 참고로 구체적으로 포함된다.
- [0096] 인간 IgG Fc 구역의 "CH1 도메인" ("H1" 도메인의 "C1"로도 언급됨)은 대체로 대략 아미노산 118 내지 대략 아미노산 215 (EU 넘버링 시스템)에 해당한다.
- [0097] "힌지 구역"은 일반적으로 인간 IgG1의 Glu216으로부터 Pro230으로 확장된 것으로서 규정된다 [Burton, Molec. Immunol. 22:161-206 (1985)]. 다른 IgG 이소형의 힌지 구역은 중쇄간 S-S 결합을 형성하는 첫번째 및 마지막 시스테인 잔기를 동일한 위치에 배치시켜 IgG1 서열과 함께 정렬될 수 있다.
- [0098] Fc 구역의 "보다 낮은 힌지 구역"은 통상 힌지 구역에 바로 C-말단인 잔기의 스트레치, 즉 Fc 구역의 잔기 233 내지 239로서 정의된다. 선행 보고에서, FcR 결합은 일반적으로 IgG Fc 구역의 보다 낮은 힌지 구역 내의 아미노산 잔기에 따른 것이었다.
- [0099] 인간 IgG Fc 구역의 "CH2 도메인" ("H2" 도메인의 "C2"로도 언급됨)은 대체로 대략 아미노산 231 내지 대략 아미노산 340에 해당한다. C<sub>H2</sub> 도메인은 다른 도메인과 밀접하게 페어링되지 않는다는 점에서 특유한 것이다.

오히려, 2개의 N-연결된 분지쇄 탄수화물이 무손상 천연 IgG 분자의 2개의 CH2 도메인 사이에 삽입된다. 탄수화물이 도메인-도메인 페어링에 대한 대안을 제공하고 CH2 도메인의 안정화를 도울 수 있는 것으로 추정되었다 (Burton, Molec. Immunol. 22:161-206 (1985)).

- [0100] "CH3 도메인" ("C2" 또는 "H3" 도메인으로도 불림)은 Fc 구역 내의 CH2 도메인에 C-말단인 잔기의 스트레치 (즉, 대략 아미노산 잔기 341 내지 항체 서열의 C-말단, 일반적으로 IgG의 아미노산 잔기 446 또는 447)를 포함한다.
- [0101] "기능성 Fc 구역"은 천연 서열 Fc 구역의 "효과기 기능"을 갖는다. 예시적인 "효과기 기능"은 C1q 결합; 보체의존성 세포 세포독성; Fc 수용체 결합; 항체 의존성 세포 매개 세포 독성 (ADCC); 포식작용; 세포 표면 수용체 (예를 들어 B 세포 수용체; BCR)의 하향 조절 등을 포함한다. 상기 효과기 기능은 일반적으로 Fc 구역이 결합 도메인 (예를 들어 항체 가변 도메인)과 결합할 것을 필요로 하고, 예를 들어 본원에서 개시되는 바와 같은 다양한 분석을 사용하여 평가될 수 있다.
- [0102] "C1q"는 면역글로불린의 Fc 구역에 대한 결합 부위를 포함하는 폴리펩티드이다. C1q는 2개의 세린 프로테아제, 즉 C1r 및 C1s와 함께 보체 의존성 세포 세포독성 (CDC) 경로의 제1 성분인 복합체 C1을 형성한다. 인간 C1q는 예를 들어 퀴델 (Quidel, 미국 캘리포니아주 샌 디에고)로부터 구입할 수 있다.
- [0103] 용어 "결합 도메인"은 다른 분자에 결합하는 폴리펩티드의 구역을 의미한다. FcR의 경우에, 결합 도메인은 Fc 구역에 대한 결합을 담당하는 그의 폴리펩티드 사슬의 일부 (예를 들어 그의 알파 사슬)를 포함할 수 있다. 유용한 한 결합 도메인은 FcR 알파 사슬의 세포외 도메인이다.
- [0104] FcR 결합 친화도 또는 ADCC 활성이 "변경된" 변이체 IgG Fc를 갖는 항체 또는 펩티바디는 모 폴리펩티드 또는 천연 서열 Fc 구역을 포함하는 폴리펩티드에 비해 향상되거나 감소된 FcR 결합 활성 (예를 들어, Fc $\gamma$ R 또는 FcRn) 및/또는 ADCC 활성을 갖는 것이다. FcR에 대한 "증가된 결합을 보이는" 변이체 Fc는 모 폴리펩티드 또는 천연 서열 IgG Fc보다 더 높은 친화도 (예를 들어, 더 낮은 겔보기 Kd 또는 IC50 값)로 적어도 하나의 FcR에 결합한다. 일부 실시태양에 따르면, 모 폴리펩티드에 비해 결합의 향상은 약 3배, 바람직하게는 약 5, 10, 25, 50, 60, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 또는 500배, 또는 약 25% 내지 100%의 결합 향상이다. FcR에 대한 "감소된 결합을 보이는" 폴리펩티드 변이체는 모 폴리펩티드보다 더 낮은 친화도 (예를 들어, 더 높은 겔보기 Kd 또는 더 높은 IC50 값)로 적어도 하나의 FcR에 결합한다. 모 폴리펩티드에 비해 결합의 감소는 약 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60% 또는 이보다 큰 결합의 감소일 수 있다.
- [0105] "항체 의존성 세포 매개 세포독성" 또는 "ADCC"는 특정 세포독성의 세포 (예를 들어 천연 킬러 (NK) 세포, 호중구 및 대식세포)에 존재하는 Fc 수용체 (FcR)에 결합된 분비된 Ig가, 상기 세포독성의 효과기 세포가 항원 보유 표적 세포에 특이적으로 결합한 후, 표적 세포를 세포독소로 사멸시키도록 만드는 세포독성의 한 형태를 의미한다. 항체는 세포독성 세포를 "무장"시키고, 상기 메카니즘으로 상기 세포를 치사시키는데 절대적으로 필요하다. ADCC를 매개하는 1차 세포인 NK 세포는 Fc $\gamma$ RIII만을 발현하고, 단핵구는 Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RII 및 Fc $\gamma$ RIII을 발현한다. 조혈세포 상의 FcR 발현은 문헌 [Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol., 9:457-92 (1991)]의 464 페이지 표 3에 요약되어 있다. 관심있는 분자의 ADCC 활성을 평가하기 위해서, 미국 특허 5,500,362 또는 5,821,337 또는 하기 실시예에 기재된 바와 같은 시험관 내 ADCC 분석을 수행할 수 있다. 상기 분석에 유용한 효과기 세포는 말초혈 단핵 세포 (PBMC) 및 천연 킬러 (NK) 세포를 포함한다. 별법으로, 또는 추가로, 관심있는 분자의 ADCC 활성은 생체 내에서, 예를 들어 문헌 [Clynes et al., PNAS (USA) 95:652-656 (1998)]에 개시된 동물 모델에서 평가할 수 있다.
- [0106] 인간 효과기 세포의 존재 하에 야생형 IgG Fc를 갖는 폴리펩티드 또는 모 폴리펩티드보다 더 효과적으로 항체 의존성 세포 매개 세포 독성 (ADCC)을 매개하거나 "증가된 ADCC를 보이는" 변이체 Fc 구역을 포함하는 폴리펩티드는 분석에서 변이체 Fc 구역을 갖는 폴리펩티드 및 야생형 Fc 구역을 갖는 폴리펩티드 (또는 모 폴리펩티드)의 양이 본질적으로 동일할 때 시험관 내에서 또는 생체 내에서 ADCC를 실질적으로 보다 효과적으로 매개하는 것이다. 일반적으로, 그러한 변이체는 본원에서 개시되는 바와 같은 시험관내 ADCC 분석을 사용하여 확인될 것이지만, 예를 들어 동물 모델 등에서 ADCC 활성을 결정하기 위한 다른 분석 또는 방법도 고려된다. 한 실시태양에서, 바람직한 변이체는 야생형 Fc (또는 모 폴리펩티드)보다 약 5배 내지 약 100배, 예를 들어 약 25 내지 약 50배 더 효과적으로 ADCC를 매개한다.
- [0107] "보체 의존성 세포 세포독성" 또는 "CDC"는 보체의 존재 하에 표적 세포의 용해를 의미한다. 전통적인 보체 경로의 활성화는 보체 시스템의 제1 성분 (C1q)을 동족 (cognate) 항원에 결합된 항체 (적절한 서브클래스의)에

결합시킴으로써 개시된다. 보체 활성화를 평가하기 위해서, 예를 들어 문헌 [Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods 202: 163 (1996)]에 기재된 CDC 분석을 수행할 수 있다.

- [0108] 변경된 Fc 구역 아미노산 서열을 갖고 C1q 결합 능력이 증가 또는 감소된 폴리펩티드 변이체는 미국 특허 6,194,551 및 WO 99/51642에 기재되어 있다. 이들 특허 공개의 내용은 본원에 참고로 구체적으로 포함된다 (또한, 문헌 [Idusogie et al. J. Immunol. 164: 4178-4184 (2000)] 참조).
- [0109] "인간 효과기 세포"는 하나 이상의 FcR을 발현하고 효과기 기능을 수행하는 백혈구이다. 한 실시태양에 따르면, 세포는 적어도 Fc $\gamma$ R1을 발현하고 ADCC 효과기 기능을 수행한다. ADCC를 매개하는 인간 백혈구의 예는 말초혈 단핵 세포 (PBMC), 천연 킬러 (NK) 세포, 단핵구, 세포독성 T 세포 및 호중구를 포함하고, PBMC 및 NK 세포가 바람직하다. 효과기 세포는 그의 천연 공급원, 예를 들어 본원에 기재된 바와 같이 혈액 또는 PBMC 으로부터 분리할 수 있다.
- [0110] FcRn에 대한 결합을 측정하는 방법은 공지되어 있고 (예를 들어, 문헌 [Ghetie 1997], [Hinton 2004]), 또한 하기 실시예에서 설명된다. 생체 내에서 인간 FcRn에 대한 결합 및 인간 FcRn 고친화도 결합 폴리펩티드의 혈청 반감기는 예를 들어 인간 FcRn을 발현하는 트랜스제닉 마우스 또는 형질감염된 인간 세포주에서, 또는 Fc 변이체 폴리펩티드가 투여된 영양류에서 분석될 수 있다. 한 실시태양에서, 구체적으로 변이체 IgG Fc를 갖는 본 발명의 항- $\alpha 5\beta 1$  항체는 야생형 IgG Fc를 갖는 폴리펩티드에 비해 적어도 2배, 적어도 5배, 적어도 10배, 적어도 50배, 적어도 60배, 적어도 70배, 적어도 80배, 적어도 100배, 적어도 125배, 적어도 150배 더 증가된, 인간 FcRn에 대한 결합 친화도를 보인다. 특정 실시태양에서, 인간 FcRn에 대한 결합 친화도는 약 170배 증가한다.
- [0111] FcRn에 대한 결합 친화도에 대해, 한 실시태양에서, 폴리펩티드의 EC50 또는 결합기 Kd (pH 6.0에서)는 1  $\mu$ M 미만, 보다 바람직하게는 100 nM 이하, 보다 바람직하게는 10 nM 이하이다. 한 실시태양에서, Fc $\gamma$ R1 (F158; 즉, 저-친화도 이소형)에 대한 증가된 결합 친화도에 대해, EC50 또는 결합기 Kd는 10 nM 이하이고, Fc $\gamma$ R1 (V158; 고-친화도 이소형)에 대해, EC50 또는 결합기 Kd는 3 nM 이하이다. 다른 실시태양에 따르면, 대조 항체 (예를 들어, Herceptin(등록상표) 항체)에 비교할 때 항체의 Fc 수용체에 대한 결합의 감소는, 시험 항체 및 대조 항체 결합 곡선의 중간 지점에서의 흡광도 값의 비 (예를 들어,  $A_{450 \text{ nm}}(\text{항체})/A_{450 \text{ nm}}(\text{대조군 Ab})$ )가 40% 이하일 경우에 대조 항체에 비해 유의한 것으로 간주될 수 있다. 다른 실시태양에 따르면, 대조 항체 (예를 들어, Herceptin(등록상표) 항체)에 비교할 때 항체의 Fc 수용체에 대한 결합의 증가는, 시험 항체 및 대조 항체 결합 곡선의 중간 지점에서의 흡광도 값의 비 (예를 들어,  $A_{450 \text{ nm}}(\text{항체})/A_{450 \text{ nm}}(\text{대조군 Ab})$ )가 125% 이상일 경우에 대조 항체에 비해 유의한 것으로 간주될 수 있다.
- [0112] "모 폴리펩티드" 또는 "모 항체"는 그로부터 변이체 폴리펩티드 또는 항체가 발생하고 그에 대해 변이체 폴리펩티드 또는 항체가 비교되는 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드 또는 항체이다. 일반적으로, 모 폴리펩티드 또는 모 항체는 본원에서 개시된 하나 이상의 Fc 구역 변형이 결합되어 있고, 본원에서 개시된 폴리펩티드 변이체에 비해 효과기 기능이 상이하다. 모 폴리펩티드는 천연 서열 Fc 구역 또는 기존의 아미노산 서열 변형 (예를 들어 부가, 결실 및/또는 치환)을 갖는 Fc 구역을 포함할 수 있다.
- [0113] 본 발명의 항체는 파지 디스플레이로부터 유도될 수 있다. 본원에서 사용되는 "라이브러리"는 다수의 항체 또는 항체 단편 서열, 또는 상기 서열을 코딩하는 핵산을 의미하고, 상기 서열은 본 발명의 방법에 따라 상기 서열 내로 도입되는 변이체 아미노산의 조합물과는 상이하다.
- [0114] "파지 디스플레이"는 변이체 폴리펩티드를 파지, 예를 들어 필라멘트성 파지 입자의 표면 상에 코트 단백질의 적어도 일부에 융합 단백질로서 디스플레이시키는 기술이다. 파지 디스플레이의 유용성은 랜덤화된 단백질 변이체의 큰 라이브러리를 표적 항원에 고친화도로 결합하는 서열에 대해 신속하고 효율적으로 분류할 수 있다는 점에 있다. 파지 상의 펩티드 및 단백질 라이브러리의 디스플레이는 특이적 결합 특성을 갖는 것을 수백만 개의 폴리펩티드 중에서 스크리닝하기 위해 사용되어 왔다. 다가 파지 디스플레이 방법은 필라멘트성 파지의 유전자 III 또는 유전자 VIII에 대한 융합을 통해 작은 랜덤 펩티드 및 작은 단백질의 디스플레이에 사용되어 왔다 ([Wells and Lowman, Curr. Opin. Struct. Biol., 3: 355-362 (1992)] 및 본원에서 인용된 문헌). 1가 파지 디스플레이에서, 단백질 또는 펩티드 라이브러리는 유전자 III 또는 그의 일부에 융합되고, 파지 입자가 1가 피의 융합 단백질을 디스플레이하거나 또는 전혀 디스플레이하지 않도록 야생형 유전자 III 단백질의 존재 하에 낮은 수준으로 발현된다. 갈망 (avidity) 효과는 분류가 본질적인 리간드 친화도를 기초로 하도록 다가 파지에 비해 감소하고, DNA 조작을 단순화하는 파지미드 벡터가 사용된다 ([Lowman and Wells, Methods: A companion to Methods in Enzymology, 3: 205-0216 (1991)] 참조).

- [0115] "파지미드"는 세균의 복제 기점, 예를 들어 ColE1, 및 박테리오파지의 내부유전자간 (intergenic) 구역의 1카피를 갖는 플라스미드 벡터이다. 파지미드는 필라멘트성 박테리오파지 및 람다상 (lambdoid) 박테리오파지를 포함하여 임의의 공지의 박테리오파지에 대해 사용될 수 있다. 또한, 플라스미드는 일반적으로 항생제 내성의 선택가능 마커를 포함할 것이다. 상기 벡터 내에 클로닝된 DNA 세그먼트는 플라스미드로서 증식할 수 있다. 상기 벡터를 포함하는 세포에는 파지 입자의 생성에 필요한 모든 유전자가 제공되고, 플라스미드의 복제 방식은 플라스미드 DNA의 한 가닥의 다수의 카피를 생성시키고 파지 입자를 패키징하도록 롤링 씨클 (rolling circle) 복제로 변경된다. 파지미드는 감염성 또는 비감염성 파지 입자를 형성할 수 있다. 이 용어는 이중성 폴리펩티드가 파지 입자의 표면에 디스플레이되도록 유전자 융합으로서 이중성 폴리펩티드 유전자에 연결된 파지 코트 단백질 유전자 또는 그의 단편을 포함하는 파지미드를 포함한다.
- [0116] 용어 "파지 벡터"는 이중 유전자를 포함하고 복제가 가능한 박테리오파지의 이중가닥 복제 형태를 의미한다. 파지 벡터는 파지 복제 및 파지 입자 형성을 허용하는 파지 복제 기점을 갖는다. 파지는 바람직하게는 필라멘트성 박테리오파지, 예를 들어 M13, f1, fd, Pf3 파지 또는 그의 유도체, 또는 람다상 파지, 예를 들어 람다, 21, phi80, phi81, 82, 424, 434 등, 또는 그의 유도체이다.
- [0117] 폴리펩티드, 예를 들어 펩티마디, 면역어드헤신, 항체 및 짧은 펩티드의 공유 변형이 본 발명의 범위 내에 포함된다. 하나의 종류의 공유 변형은 폴리펩티드의 표적화된 아미노산 잔기를, 폴리펩티드의 선택된 측쇄 또는 N- 또는 C-말단 잔기와 반응할 수 있는 유기 유도체화제와 반응시키는 것을 포함한다. 2관능성 물질을 사용한 유도체화는 예를 들어 항체를 정제하기 위한 방법에서 사용하기 위한 수불용성 지지체 매트릭스 또는 표면에 폴리펩티드를 가교결합시키기 위해, 및 그 반대를 위해 유용하다. 일반적으로 사용되는 가교결합제는 예를 들어 1,1-비스(디아조아세틸)-2-페닐에탄, 글루타르알데히드, N-히드록시숙신이미드 에스테르, 예를 들어 4-아지도살리실산을 갖는 에스테르, 동종2관능성 이미도에스테르, 예를 들어 디숙신이미딜 에스테르, 예를 들어 3,3'-디티오비스(숙신이미딜프로피오네이트), 2관능성 말레이미드, 예를 들어 비스-N-말레이미도-1,8-옥탄 및 메틸-3-[(p-아지도페닐)디티오]프로피오이미데이트와 같은 물질을 포함한다.
- [0118] 다른 변형은 글루타미닐 및 아스파라기닐 잔기의 각각 대응하는 글루타미 및 아스파르틸 잔기로의 탈아미드화, 프롤린 및 라이신의 히드록실화, 세틸 또는 트레오닐 잔기의 히드록실기의 인산화, 라이신, 아르기닌, 및 히스티딘 측쇄의  $\alpha$ -아미노기의 메틸화 [T.E. Creighton, Proteins: Structure and Molecular Properties, W.H. Freeman & Co., San Francisco, pp. 79-86 (1983)], N-말단 아민의 아세틸화, 및 임의의 C-말단 카르복실기의 아미드화를 포함한다.
- [0119] 다른 변형은 독소의 길항제, 예를 들어 메이탄신 및 메이탄시노이드, 칼리케아미신 및 다른 세포독성제에 대한 킨주게이션을 포함한다.
- [0120] 폴리펩티드의 공유 변형에 대한 다른 종류는 미국 특허 4,640,835; 4,496,689; 4,301,144; 4,670,417; 4,791,192 또는 4,179,337에 제시된 방식으로 다양한 비단백질성 중합체, 예를 들어, 폴리에틸렌 글리콜 (PEG), 폴리프로필렌 글리콜, 또는 폴리옥시알킬렌 중의 하나에 폴리펩티드를 연결시키는 것을 포함한다.
- [0121] 또한, 본 발명의 폴리펩티드는 유리할 경우, 다른 이중성 폴리펩티드 또는 아미노산 서열 (예를 들어, 면역어드헤신 또는 펩티마디)에 융합된 폴리펩티드를 포함하는 키메라 분자를 형성하는 방식으로 변형될 수도 있다.
- [0122] 한 실시태양에서, 상기 키메라 분자는 예를 들어 인간 면역결핍 바이러스 TAT 단백질의 단백질 형질도입 도메인을 사용하여, 다양한 조직으로, 보다 특히 뇌 혈관 장벽을 가로질러 전달하기 위해 폴리펩티드를 표적화하는 단백질 형질도입 도메인과 폴리펩티드의 융합체를 포함한다 (Schwarze et al., 1999, Science 285: 1569-72).
- [0123] 다른 실시태양에서, 그러한 키메라 분자는 항-태그 항체가 그에 대해 선택적으로 결합할 수 있는 에피토프를 제공하는 태그 폴리펩티드와 폴리펩티드의 융합체를 포함한다. 에피토프 태그는 일반적으로 폴리펩티드의 아미노- 또는 카르복실-말단에 위치한다. 그러한 에피토프-태깅된 형태의 폴리펩티드의 존재는 태그 폴리펩티드에 대한 항체를 사용하여 검출할 수 있다. 또한, 에피토프 태그를 제공함으로써 항-태그 항체 또는 에피토프 태그에 결합하는 다른 종류의 친화도 매트릭스를 사용한 친화도 정제에 의해 폴리펩티드를 쉽게 정제할 수 있다. 다양한 태그 폴리펩티드와 그들의 각각의 항체는 당업계에 잘 알려져 있다. 그 예는 폴리-히스티딘 (poly-his) 또는 폴리-히스티딘-글라이신 (poly-his-gly) 태그; flu HA 태그 폴리펩티드 및 그의 항체 12CA5 [Field et al., Mol. Cell. Biol. 8:2159-2165 (1988)]; c-myc 태그 및 그에 대한 8F9, 3C7, 6E10, G4, B7 및 9E10 항체 [Evan et al., Molecular and Cellular Biology, 5:3610-3616 (1985)]; 및 단순 포진 바이러스 당단백질 D (gD) 태그 및 그의 항체 [Paborsky et al., Protein Engineering. 3(6):547-553 (1990)]를 포함한다. 다른 태

그 폴리펩티드는 Flag-펩티드 [Hopp et al., BioTechnology, 6:1204-1210 (1988)]; KT3 에피토프 펩티드 [Martin et al., Science, 255:192-194 (1992)]; α-튜블린 에피토프 펩티드 [Skinner et al., J. Biol. Chem. 266:15163-15166 (1991)]; 및 T7 유전자 10 단백질 펩티드 태그 [Lutz-Freyermuth et al., PNAS USA, 87:6393-6397 (1990)]를 포함한다.

- [0124] 다른 실시태양에서, 키메라 분자는 면역글로불린 또는 면역글로불린의 특정 구역과 폴리펩티드의 융합체를 포함할 수 있다. 2가 형태의 키메라 분자 (예를 들어 "면역어드레신")에 대해, 상기 융합체는 IgG 분자의 Fc 구역에 대한 것일 수 있다. 본 발명의 Ig 융합체는 Ig 분자 내의 적어도 하나의 가변 구역 대신에 대략 인간의 잔기 94-243, 잔기 33-53 또는 잔기 33-52를 포함하거나 상기 잔기만을 포함하는 폴리펩티드를 포함한다. 특히 바람직한 실시태양에서, 면역글로불린 융합체는 IgG1 분자의 힌지, CH2 및 CH3, 또는 힌지, CH1, CH2 및 CH3 구역을 포함한다. 면역글로불린 융합체의 생산에 대해서는 미국 특허 5,428,130을 참조한다.
- [0125] 본 발명은 재발 종양 성장 또는 재발 암 세포 성장을 억제하거나 예방하기 위한 방법 및 조성물을 제공한다. 다양한 실시태양에서, 암은, 암 세포의 수가 유의하게 감소되지 않았거나, 증가하였거나, 또는 종양 크기가 유의하게 감소하지 않았거나 증가하였거나, 또는 암 세포의 크기 또는 수를 추가로 감소시키지 못한 재발 종양 성장 또는 재발 암 세포 성장이다. 암 세포가 재발 종양 성장 또는 재발 암 세포 성장인지의 여부는 암 세포의 치료 효과를 분석하기 위해 당업계에 공지된 임의의 방법에 의해 생체 내에서 또는 시험관 내에서 결정될 수 있다. 항-VEGF 치료제에 내성인 종양은 재발 종양 성장의 예이다.
- [0126] 본원에서 개시되는 폴리펩티드, 항체, 길항제 또는 조성물의 "유효량"은 구체적으로 언급된 목적을 달성하기에 충분한 양이다. "유효량"은 언급한 목적과 관련하여 공지된 방식으로 실험적으로 결정될 수 있다.
- [0127] 용어 "치료 유효량"은 포유동물 (즉, 환자)에서 질병 또는 질환의 "치료"에 효과적인 본 발명의 항체, 폴리펩티드 또는 길항제의 양을 지칭한다. 암의 경우에, 약물의 치료 유효량은 암 세포의 수를 감소시키고; 종양 크기 또는 중량을 감소시키고; 말초 장기 내로 암 세포의 침윤을 억제하고 (즉, 어느 정도 지연시키고 바람직하게는 정지시킴); 종양 전이를 억제하고 (즉, 어느 정도 지연시키고 바람직하게는 정지시킴); 종양 성장을 어느 정도 억제하고/하거나 암과 연관된 하나 이상의 증상을 어느 정도 경감시킬 수 있다. 약물이 암세포 성장을 억제하고/하거나 존재하는 암세포를 사멸시킬 정도로, 상기 약물은 세포증식 억제성 및/또는 세포독성일 수 있다. 한 실시태양에서, 치료 유효량은 성장 억제량이다. 다른 실시태양에서, 치료 유효량은 환자의 생존을 연장시키는 양이다. 다른 실시태양에서, 치료 유효량은 환자의 무진행 생존을 개선시키는 양이다.
- [0128] 상처 치유의 경우에, 용어 "유효량" 또는 "치료 유효량"은 대상에서 상처 치유를 촉진 또는 개선하기에 효과적인 약물의 양을 나타낸다. 치료 용량은 환자에 대해 치료 효과를 보이는 용량이고, 치료 용량 미만의 용량은 치료되는 환자에 대해 치료 효과를 보이지 않는 용량이다.
- [0129] "만성 상처"는 치유되지 않는 상처를 나타낸다 (예를 들어, [Lazarus et al., Definitions and guidelines for assessment of wounds and evaluation of healing, Arch. Dermatol. 130:489-93 (1994)]). 만성 상처는 예를 들어, 동맥 궤양, 당뇨병 궤양, 압력 궤양, 정맥 궤양 등을 포함하고 이로 제한되지 않는다. 급성 상처는 만성 상처로 발달할 수 있다. 급성 상처는 예를 들어, 열 손상, 외상, 수술, 광범한 피부암의 절제, 심부 진균 및 세균 감염, 혈관염, 공포증, 천포창, 독성 표피 괴사 등에 의해 유발된 상처를 포함하고 이로 제한되지 않는다 (예를 들어, [Buford, Wound Healing and Pressure Sores, HealingWell.com, (2001년 10월 24일 공개)] 참조). "정상 상처"는 정상 상처 치유 복구를 겪는 상처를 나타낸다.
- [0130] 본 발명의 폴리펩티드, 항체, 길항제 또는 조성물의 "성장 억제량"은 세포, 특히 종양, 예를 들어 암 세포의 성장을 시험관 내에서 또는 생체 내에서 억제할 수 있는 양이다. 신생물성 세포 성장을 억제하기 위한 본 발명의 폴리펩티드, 항체, 길항제 또는 조성물의 "성장 억제량"은 공지된 방식으로 또는 본원에 제시된 예에 의해 실험적으로 결정할 수 있다.
- [0131] 본 발명의 폴리펩티드, 항체, 길항제 또는 조성물의 "세포독성량"은 세포, 특히 종양, 예를 들어 암 세포를 시험관 내에서 또는 생체 내에서 파괴할 수 있는 양이다. 신생물성 세포 성장을 억제하기 위한 본 발명의 폴리펩티드, 항체, 길항제 또는 조성물의 "세포독성량"은 실험적으로 및 당업계에 공지된 방법에 의해 결정할 수 있다.
- [0132] 본원에서 사용되는 "자가면역 질병"은 개체의 자기 자신의 조직 또는 동시 분리계 (co-segregate)로부터 자기 조직에 대해 발생하는 질병 또는 질환 또는 그의 증상 또는 그로부터 발생하는 병태이다. 자가면역 질병 또는 질환의 예는 다음을 포함하고 이로 제한되지 않는다: 관절염 (류마티스성 관절염, 예를 들어 급성 관절염, 만성

류마티스성 관절염, 통풍 관절염, 급성 통풍 관절염, 만성 염증성 관절염, 퇴행성 관절염, 감염성 관절염, 라임 (Lyme) 관절염, 증식성 관절염, 건선성 관절염, 척추 관절염, 및 연소성 발병 류마티스성 관절염, 골관절염, 만성 진행성 관절염, 변형 관절염, 만성 원발성 다발관절염, 반응성 관절염, 및 강직 척추염), 염증성 과다증식성 피부병, 건선, 예를 들어 반상 건선, 물방울 모양 건선, 농포성 건선, 및 손톱 건선, 피부염, 예를 들어 접촉 피부염, 만성 접촉 피부염, 알레르기 피부염, 알레르기 접촉 피부염, 포진피부염, 및 아토피 피부염, x-연결 과다 IgM 증후군, 두드러기, 예를 들어 만성 알레르기 두드러기 및 만성 특발성 두드러기, 예를 들어 만성 자가면역 두드러기, 다발근육염/피부근염, 연소성 피부근염, 독성 표피괴사, 공피증 (진신성 공피증 포함), 경화증, 예를 들어 진신성 경화증, 다발성 경화증 (MS), 예를 들어 척수-눈 MS, 원발성 진행성 MS, 및 재발 완화형 MS, 진행성 진신성 경화증, 죽상동맥경화증, 동맥경화증, 범발성 경화증, 및 실조성 경화증, 염증성 장 질환 (IBD) (예를 들어, 크론병, 대장염, 예를 들어 켈양성 대장염, 켈양 대장염, 현미경적 대장염, 교원질성 대장염, 용종 대장염, 괴사 소장대장염, 및 경벽성 대장염, 및 자가면역 염증성 장 질환), 괴저농피증, 결절홍반, 원발성 경화 췌관염, 상공막염), 호흡 곤란 증후군, 예를 들어 성인 또는 급성 호흡 곤란 증후군 (ARDS), 수막염, 포도막의 전부 또는 일부의 염증, 홍채염, 맥락막염, 자가면역 혈액학적 질환, 류마티스 척추염, 급성 난청, IgE-매개 질환, 예를 들어 과민증 및 알레르기 및 아토피 비염, 뇌염, 예를 들어 랏무센 (Rasmussen) 뇌염 및 변연 및 /또는 뇌간 뇌염, 포도막염, 예를 들어 앞포도막염, 급성 앞포도막염, 육아종성 포도막염, 비육아종성 포도막염, 수정체항원성 포도막염, 뒤포도막염, 또는 자가면역 포도막염, 신 증후군이 있거나 없는 사구체신염 (GN), 예를 들어 만성 또는 급성 사구체신염, 예를 들어 원발성 GN, 면역 매개 GN, 막 GN (막 신병증), 특발성 막 GN 또는 막 증식성 GN (MPGN), 예를 들어 타입 I 및 타입 II, 및 급속 진행성 GN, 알레르기 질환, 알레르기 반응, 습진, 예를 들어 알레르기 또는 아토피 습진, 천식, 예를 들어 기관지성 천식, 기관지 천식, 및 자가면역 천식, T 세포의 침윤 및 만성 염증 반응을 수반하는 질환, 만성 폐 염증성 질환, 자가면역 심근염, 백혈구 부착 결핍, 진신 홍반성 루푸스 (SLE) 또는 진신 홍반성 에리테마토데스 (erythematodes), 예를 들어 피부 SLE, 아급성 피부 홍반 루푸스, 신생아 루푸스 증후군 (NLE), 과중상 홍반성 루푸스, 루푸스 (예를 들어 신장염, 뇌염, 소아, 비-신장, 신장외, 원반상 탈모증), 연소성 발병 (타입 I) 당뇨병, 예를 들어 소아 인슐린-의존형 당뇨병 (IDDM), 성인 발병 당뇨병 (타입 II 당뇨병), 자가면역 당뇨병, 특발성 요붕증, 시토킨 및 T-림프구에 의해 매개되는 급성 및 지연형 과민증과 관련된 면역 반응, 결핵, 사코이드증, 육아종증, 예를 들어 림프종모양 육아종증, 베게너 (Wegener) 육아종증, 무과립구증, 혈관염, 예를 들어 맥관염 (예를 들어 대혈관 맥관염 (예를 들어 류마티스성 다발성 근육통 및 거대세포 (Takayasu) 동맥염), 중형 혈관 맥관염 (예를 들어 가와사키 (Kawasaki) 병 및 다발성 결절 동맥염), 현미경적 다발 동맥염, CNS 맥관염, 괴사, 피부, 또는 과민성 맥관염, 진신성 괴사 맥관염, 및 ANCA-관련 맥관염, 예를 들어 처크-스트라우스 (Churg-Strauss) 맥관염 또는 증후군 (CSS)), 일시적 동맥염, 재생불량 빈혈, 자가면역 재생불량 빈혈, 콤즈 (Coombs) 양성 빈혈, 다이아몬드 블랙팬 (Diamond Blackfan) 빈혈, 용혈 빈혈 또는 면역 용혈 빈혈, 예를 들어 자가면역 용혈 빈혈 (AIHA), 악성 빈혈 (anemia perniciosa), 애디슨 (Addison)병, 진정 적혈구계 빈혈 또는 무형성 (PRCA), 팩터 VIII 결핍증, A형 혈우병, 자가면역 호중구 감소증, 범혈구감소증, 백혈구 감소증, 백혈구 혈구 누출을 수반하는 질병, CNS 염증성 질환, 다발성 장기 손상 증후군, 예를 들어 패혈증, 외상 또는 출혈에 2차적인 질환, 항원-항체 복합체 매개 질환, 항-사구체 기저막 질환, 항-인지질 항체 증후군, 알레르기 신경염, 베체트 또는 베게트 (Behcet) 병, 캐슬만 (Castleman) 증후군, 굿파스처 (Goodpasture) 증후군, 레이노 증후군, 쇼그렌 증후군, 스티븐스-존슨 (Stevens-Johnson) 증후군, 천포창, 예를 들어 낙엽상 천포창 및 피부 유천포창, 천포창 (심상성 천포창, 낙엽상 천포창, 점막 유천포창 및 홍반 천포창 포함), 자가면역 다발성 내분비 장애, 라이터 (Reiter) 병 또는 증후군, 면역 복합체 신장염, 항체-매개 신장염, 만성 신경병증, 예를 들어 IgM 다발 신경병증 또는 IgM-매개 신경병증, 저혈소판증 (예를 들어 심근경색 환자에 의해 발생), 예를 들어 혈전성 혈소판 감소성 자반병 (TTP) 및 자가면역 또는 면역-매개 저혈소판증, 예를 들어 특발성 혈소판 감소성 자반병 (ITP), 예를 들어 만성 또는 급성 ITP, 정소 및 난소의 자가면역 질병, 예를 들어 자가면역 고환염 및 난소염, 원발성 갑상선 기능 저하증, 부갑상선 기능 저하증, 자가면역 내분비 질환, 예를 들어 갑상선염, 예를 들어 자가면역 갑상선염, 하시모토 (Hashimoto) 병, 만성 갑상선염 (하시모토 갑상선염), 또는 아급성 갑상선염, 자가면역 갑상선 질환, 특발성 갑상선 기능 저하증, 그레이브 (Grave) 병, 다분비선 증후군, 예를 들어 자가면역 다분비선 증후군 (또는 다분비선 내분비병증 증후군), 부신생물 증후군, 예를 들어 신경학적 부신생물 증후군, 예를 들어 램버트-이튼 (Lambert-Eaton) 근무력증 증후군 또는 이튼-램버트 증후군, 근강직 증후군, 뇌척수염, 예를 들어 알레르기 뇌척수염 및 실험적 알레르기성 뇌척수염 (EAE), 중증 근육 무력증, 소뇌변성, 신경근강직증, 안진전 또는 안진전 근경련 증후군 (OMS), 및 감각 신경병증, 쉬한 (Sheehan) 증후군, 자가면역 간염, 만성 간염, 루푸스양 간염, 거대세포 간염, 만성 활성 간염 또는 자가면역 만성 활성 간염, 림프양 간질 폐렴, 폐쇄세기관지염 (비-이식) 대 NSIP, 길랑-바레 (Guillain-Barre) 증후군, 버거 (Berger) 병 (IgA 신병증), 특발성 IgA 신병증, 선상 IgA

피부병, 원발성 담관 경화증, 폐경화, 자가면역 장병증 증후군, 만성 소화장애증, 복강 질환, 비열대스프루 (글루텐 장병증), 불응성 스프루, 특발성 스프루, 한랭글로불린혈증, 근위축 측삭 경화증 (ALS; 루게릭 (Lou Gehrig) 병), 관상동맥 질환, 자가면역 내이 질환 (AIED), 자가면역 청력 상실, 안진전 근경련 증후군 (OMS), 다발연골염, 예를 들어 불응성 또는 재발된 다발연골염, 폐포단백증, 아밀로이드증, 공막염, 비-암성 림프구증가증, 모노클로날 B 세포 림프구증가증 (예를 들어, 양성 모노클로날 감마글로불린병증 및 유의성 비결정 모노클로날 감마글로불린병증 (MGUS))을 포함하는 원발성 림프구증가증, 말초 신경병증, 부신생물 증후군, 채널병증, 예를 들어 간질, 편두통, 부정맥, 근육 질환, 난청, 실명, 주기적 마비, 및 CNS의 채널병증, 자폐증, 염증성 근염, 국소 분절 사구체 경화증 (FSGS), 내분비 눈병증, 포도막막염, 맥락막막염, 자가면역 간질환, 섬유근육통, 다발성 내분비 부진, 슈미트 (Schmidt) 증후군, 부신염, 위 위축, 초로 치매, 탈수초성 질환, 예를 들어 자가면역 탈수초성 질환, 당뇨병성 신병증, 드레슬러 (Dressler) 증후군, 원형탈모증, CREST 증후군 (석회증, 레이노드 (Raynaud) 현상, 식도 운동이상, 손발가락경화증, 및 모세혈관확장증), 남성 및 여성 자가면역 불임, 혼합결합조직병, 샤가스 (Chagas) 병, 류마티스열, 습관성 유산, 농부폐, 다형 홍반, 심장절개술후 증후군, 쿠싱 (Cushing) 증후군, 새 사육가 폐, 알레르기 육아종 혈관염, 양성 림프구 혈관염, 알포트 (Alport) 증후군, 폐포염, 예를 들어 알레르기 폐포염 및 섬유화 폐포염, 간질 폐 질환, 수혈 반응, 나병, 말라리아, 리슈만편모충증, 파동편모충증, 주혈흡충증, 회충증, 아스페르길루스증, 샘터 (Sampter) 증후군, 카플란 (Caplan) 증후군, 뎅기, 심내막염, 심내막 심근섬유증, 미만성 간질성 폐섬유증, 간질 폐 섬유증, 특발성 폐섬유증, 낭성 섬유증, 안구내염, 장기 용기성 홍반, 태아적모구증, 호산구성 근막염, 술만 (Shulman) 증후군, 펠티 (Felty) 증후군, 사상충증, 섬모체염, 예를 들어 만성 섬모체염, 이시성 섬모체염, 홍채섬모체염, 또는 푸크 (Fuch) 섬모체염, 헤노흐-셴라인 (Henoch-Schonlein) 자색반, 인간 면역결핍 바이러스 (HIV) 감염, 에코바이러스 감염, 심근병증, 알츠하이머 (Alzheimer) 병, 파보바이러스 감염, 풍진 바이러스 감염, 백신처리후 증후군, 선천 풍진 감염, 엡스타인-바 (Epstein-Barr) 바이러스 감염, 볼거리, 에반 (Evan) 증후군, 자가면역 생식선 부진, 시덴함 (Sydenham) 무도병, 연쇄상구균 감염후 신장염, 폐쇄성 혈전혈관염, 갑상선 기능 항진증, 척수매독, 맥락막염, 거대세포 다발근육통증, 내분비 눈병증, 만성 과민성 폐렴, 건조 각막결막염, 유행성 각막결막염, 특발성 신장염 증후군, 미소 병변 신병증, 양성 가족성 및 허혈-재관류 손상, 망막 자가면역, 관절 염증, 기관지염, 만성 폐쇄성 기도 질환, 규폐증, 아프타, 아프타 구내염, 동맥경화성 질환, 아스페르미오게네스 (aspermiogenesis), 자가면역 용혈, 보크 (Boeck) 병, 한랭글로불린혈증, 뒤피트렌 (Dupuytren) 구축, 수정체 파민 안내염, 알레르기성 장염, 나병결절홍반, 특발성 안면마비, 만성 피로 증후군, 류마티스성 열, 함만-리치 (Hamman-Rich) 병, 감각신경성 난청, 발작성 혈색소뇨증, 성선 기능저하증, 국한성 회장염, 백혈구 감소증, 전염 단핵구증, 횡단척수염, 원발성 특발성 점액부종, 신장증, 교감성 안염, 육아종성 교환염, 췌장염, 급성 다발 신경근염, 괴저농괴증, 퀴베인 (Quervain) 갑상선염, 후천성 비장 위축, 항정자 항체에 의한 불임, 비-악성 흉선종, 백반증, SCID 및 엡스타인-바 바이러스-연관 질환, 후천성 면역 결핍 증후군 (AIDS), 기생충 질환, 예를 들어 리슈만편모충, 독성 쇼크 증후군, 식중독, T 세포 침윤, 백혈구-부착 결핍, 시토킨 및 T-림프구에 의해 매개되는 급성 및 지연형 과민증과 관련된 면역 반응을 수반하는 병태, 백혈구 혈구 누출을 수반하는 질병, 다발성 장기 손상 증후군, 항원-항체 복합체 매개 질환, 항사구체 기저막 질환, 알레르기 신경염, 자가면역 다발성 내분비 장애, 난소염, 원발성 점액부종, 자가면역 위축 위염, 교감성 안염, 류마티스병, 혼합결합조직 질환, 신 증후군, 췌도염, 다발성 내분비 부진, 말초 신경병증, 자가면역 다분비신 증후군 타입 I, 성인 발병 특발성 부갑상선 기능 저하증 (AOIH), 전체탈모증, 확장 심근병증, 후천적 수포성 표피박리증 (EBA), 혈색소침착증, 심근염, 신 증후군, 원발성 경화슬개관염, 화농성 또는 비화농성 동염, 급성 또는 만성 동염, 사골, 전두, 상악, 또는 접형동염, 호산구-관련 질환, 예를 들어 호산구 증가증, 폐 침윤 호산구 증가증, 호산구 증가증-근육통 증후군, 로플러 (Loffler) 증후군, 만성 호산구성 폐렴, 열대성 폐 호산구 증가증, 기관지폐렴성 아스페르길루스증, 아스페르길루스증, 또는 호산구를 포함하는 육아종, 과민증, 음성혈청 척추관절염, 다발성 내분비 자가면역 질환, 경화슬개관염, 공막, 상공막, 만성 점막 피부 칸디다증, 브루톤 (Bruton) 증후군, 유아의 일과성 감마글로불린 저혈증, 위스콧-올드리히 (Wiskott-Aldrich) 증후군, 운동실조 모세혈관확장증, 교원병과 연관된 자가면역 질환, 류마티스, 신경학적 질환, 허혈 재관류 질환, 혈압 반응의 감소, 혈관 기능이상, 혈관확장증, 조직 손상, 심혈관 허혈, 통각과민, 뇌 허혈 및 혈관신생을 수반하는 질환, 알레르기 과민성 질환, 사구체신염, 재관류 손상, 심근 또는 다른 조직의 재관류 손상, 급성 염증성 성분을 갖는 피부병, 급성 화농성 수막염 또는 다른 중추신경계 염증성 질환, 과립구 수혈-연관 증후군, 시토킨 유발 독성, 급성 중증 염증, 만성 난치성 염증, 신우염, 폐경화, 당뇨 망막병증, 당뇨병 대동맥 질환, 말단동맥 과다증식, 소화 궤양, 관막염 및 자궁내막증.

[0133] 용어 "검출하는"은 물질의 존재 또는 부재를 결정하거나, 물질의 양을 정량하는 것을 포함하도록 의도된다. 따라서, 상기 용어는 정성적 및 정량적 결정을 위한 본 발명의 물질, 조성물 및 방법의 사용을 나타낸다. 일반적인

으로, 검출을 위해 사용되는 특정 기술은 본 발명의 실시예 중요하지 않다.

[0134] 예를 들어, 본 발명에 따른 "검출하는"은  $\alpha 5$  유전자 생성물,  $\beta 1$  유전자 생성물 (예를 들어, mRNA 분자), 또는  $\alpha 5$  또는  $\alpha 5\beta 1$  폴리펩티드의 존재 또는 부재;  $\alpha 5$  또는  $\alpha 5\beta 1$  폴리펩티드의 수준 또는 표적에 결합된 양의 변화;  $\alpha 5$  또는  $\alpha 5\beta 1$  폴리펩티드의 생물학적 기능/활성의 변화를 관찰하는 것을 포함할 수 있다. 일부 실시태양에서, "검출하는"은 야생형  $\alpha 5$  또는  $\alpha 5\beta 1$  수준 (예를 들어, mRNA 또는 폴리펩티드 수준)을 검출하는 것을 포함할 수 있다. "검출하는"은 대조군에 비해 10% 내지 90%의 임의의 값, 또는 30% 내지 60%의 임의의 값, 또는 100% 초과 변화 (증가 또는 감소)를 정량하는 것을 포함할 수 있다. "검출하는"은 2배 내지 10배 이상, 예를 들어, 100배 이하 또는 초과 임의의 값의 변화를 정량하는 것을 포함할 수 있다.

[0135] 본원에서 사용되는 "표지"는 항체에 직접 또는 간접적으로 컨쥬게이팅되는 검출가능 화합물 또는 조성물을 나타낸다. 표지 자체는 홀로 검출가능성일 수 있거나 (예를 들어, 방사성 동위원소 표지 또는 형광 표지), 효소적 표지의 경우에, 검출가능한 기질 화합물 또는 조성물의 화학적 변경을 촉매할 수 있다.

[0136] **III. 항- $\alpha 5\beta 1$  항체**

[0137] 인간  $\alpha 5\beta 1$ 에 결합하고, 인간  $\alpha 5\beta 1$ 에 대한 항- $\alpha 5\beta 1$  항체의 결합을 경쟁적으로 억제할 수 있는 항체를 본원에서 제공한다. 따라서, 본 발명의 한 실시태양에서는 서열 1, 2, 3 또는 4 중 어느 하나에 제시된 가변 경쇄 (VL) 서열 및 서열 5, 6, 7, 8 또는 9 중 어느 하나에 제시된 가변 중쇄 (VH) 도메인 서열을 포함하는 항체를 제공한다. 기탁된 하이브리도마의 항체의 인간 또는 키메라 형태가 또한 고려된다.

[0138] 한 실시태양에 따르면, 항체는 인간  $\alpha 5\beta 1$ 에 500 nM 내지 1 pM의 Kd로 결합한다. 다른 실시태양에 따르면, 항체는 알파V베타3 또는 알파V베타5 또는 알파V베타1에 결합하지 않는다. 다른 실시태양에 따르면, 항체는 인간 IgG, 예를 들어, 인간 IgG1 또는 인간 IgG4의 Fc 서열을 포함한다. 다른 실시태양에서, Fc 서열은 종종 Fc 수용체 (FcR)에 대한 그들의 결합에 관련되는 항체 의존성 세포 세포독성 (ADCC) 효과기 기능이 결핍되도록 변경되거나 달리 변화된다. 효과기 기능을 변경할 수 있는 Fc 서열에 대한 변화 또는 돌연변이의 많은 예가 존재한다. 예를 들어, WO 00/42072 및 문헌 [Shields et al. J. Biol. Chem. 9(2):6591-6604 (2001)]에서는 FcR에 대한 결합이 개선되거나 감소된 항체 변이체를 설명하고 있다. 상기 문헌의 내용은 본원에 참고로 구체적으로 포함된다. 항체는 Fab, Fab', F(ab)'<sub>2</sub>, 단일쇄 Fv (scFv), Fv 단편; 디아바디 및 선형 항체 형태로 존재할 수 있다. 또한, 항체는  $\alpha 5\beta 1$ 에 결합하고  $\alpha 5\beta 1$  길항제이지만, 또한 하나 이상의 다른 표적 (예를 들어, VEGF)에 결합하여 그들의 기능을 억제하는 다중특이적 항체일 수 있다. 항체는 치료제 (예를 들어, 세포독성제, 방사성 동위원소 및 화학요법제), 또는 영상화에 의해 환자 샘플 내에서 또는 생체 내에서  $\alpha 5\beta 1$ 을 검출하기 위한 표지 (예를 들어, 방사성 동위원소, 형광 염료 및 효소)에 컨쥬게이팅될 수 있다.

[0139] 항- $\alpha 5\beta 1$  항체를 코딩하는 핵산 분자, 하나의 또는 두 가변 도메인을 코딩하는 핵산 분자를 포함하는 발현 벡터, 및 상기 발현 벡터를 포함하는 세포가 또한 고려된다. 이들 항체는 본원에서 설명되는 요법에서, 및 환자 샘플 내에서 (예를 들어, FACS, 면역조직화학 (IHC), ELISA 분석) 또는 환자에서  $\alpha 5\beta 1$  단백질을 검출하기 위해 사용될 수 있다.

[0140] **A. 모노클로날 항체**

[0141] 모노클로날 항체는 예를 들어, 하이브리도마 방법, 예를 들어 문헌 [Kohler and Milstein, Nature, 256:495 (1975)]에 설명된 방법을 이용하여 제조할 수 있거나, 재조합 DNA 방법 (미국 특허 4,816,567)에 의해 제조할 수 있거나, 하기 실시예에서 본원에 설명된 방법에 의해 생산할 수 있다. 하이브리도마 방법에서, 햄스터, 마우스, 또는 다른 적절한 숙주 동물을 일반적으로 면역화제로 면역화시켜, 면역화제에 특이적으로 결합할 항체를 생산하거나 생산할 수 있는 림프구를 유도시킨다. 별법으로, 림프구를 시험관 내에서 면역화시킬 수 있다.

[0142] 면역화제는 일반적으로 관심있는 단백질의 폴리펩티드 또는 융합 단백질, 또는 단백질을 포함하는 조성물을 포함할 것이다. 일반적으로, 인간 기원의 세포가 요망되는 경우에는 말초 혈액 림프구 ("PBL")를 사용하고, 비-인간 포유동물 공급원이 요망되는 경우에는 비장 세포 또는 림프절 세포를 사용한다. 이어서, 림프구를 적합한 융합제, 예를 들어 폴리에틸렌 글리콜을 사용하여 불멸화 세포주와 융합시켜, 하이브리도마 세포를 형성한다 (Goding, MONOCLONAL ANTIBODIES: PRINCIPLES AND PRACTICE (New York: Academic Press, 1986), pp. 59-103). 불멸화 세포주는 대체로 형질전환된 포유동물 세포, 특히 설치류, 소, 및 인간 기원의 골수종 세포이다. 대체로, 래트 또는 마우스 골수종 세포주가 사용된다. 하이브리도마 세포를 바람직하게는 융합되지 않은 불멸화 세포의 성장 또는 생존을 억제하는 하나 이상의 물질을 함유하는 적합한 배양 배지 내에서 배양할 수 있다. 예를 들어, 모 세포가 효소 하이포잔틴 구아닌 포스포리보실 트랜스퍼라제 (HGPRT 또는 HPRT)가 결핍되는 경우에, 하

이브리도마에 대한 배양 배지에는 대개 HGPRT-결핍 세포의 성장을 방지하는 물질인 하이포잔틴, 아미노프테린 및 티미딘이 포함될 것이다 ("HAT 배지").

[0143] 바람직한 불멸화 세포주는 효율적으로 융합하고, 선택된 항체-생산 세포에 의한 항체의 안정한 고수준 발현을 지지하고, HAT 배지와 같은 배지에 감수성인 세포주이다. 보다 바람직한 불멸화 세포주는 쥐 골수종 주이고, 이는 예를 들어, 솔크 인스티튜트 셀 디스트리뷰션 센터 (Salk Institute Cell Distribution Center, 미국 캘리포니아주 샌디에고) 및 어메리칸 타입 컬처 컬렉션 (American Type Culture Collection, 미국 버지니아주 매나서스)로부터 입수할 수 있다. 인간 골수종 및 마우스-인간 이종골수종 세포주가 또한 인간 모노클로날 항체의 생산을 위해 설립되었다 ([Kozbor, J. Immunol., 133:3001 (1984)]; [Brodeur et al., MONOCLONAL ANTIBODY PRODUCTION TECHNIQUES AND APPLICATIONS (Marcel Dekker, Inc.: New York, 1987) pp. 51-63]).

[0144] 이어서, 하이브리도마 세포가 배양되는 배양 배지를 폴리펩티드에 대해 생성된 모노클로날 항체의 존재에 대해 분석할 수 있다. 하이브리도마 세포에 의해 생산된 모노클로날 항체의 결합 특이성은 면역침전 또는 시험관내 결합 분석, 예를 들어 방사성 면역분석 (RIA) 또는 효소-연결 면역흡착 분석 (ELISA)에 의해 결정할 수 있다. 그러한 기술 및 분석은 당업계에 공지되어 있다. 모노클로날 항체의 결합 친화도는 예를 들어, 문헌 [Munson and Pollard, Anal. Biochem., 107:220 (1980)]의 스캐차드 (Scatchard) 분석에 의해 결정할 수 있다.

[0145] 목적하는 하이브리도마 세포를 확인한 후, 클론을 제한 희석 절차에 의해 서브클로닝하고 표준 방법에 의해 성장시킬 수 있다 ([Goding, 상기 문헌]). 이 목적을 위해 적합한 배양 배지는 예를 들어, 돌베코 (Dulbecco) 변형 이글 (Eagle) 배지 및 RPMI-1640 배지를 포함한다. 별법으로, 하이브리도마 세포를 포유동물 내에서 복수액으로서 생체 내에서 성장시킬 수 있다.

[0146] 서브클론에 의해 분비된 모노클로날 항체를 통상적인 면역글로불린 정제 절차, 예를 들어, 단백질 A-세파로스, 히드록실아파타이트 크로마토그래피, 겔 전기영동, 투석, 또는 친화도 크로마토그래피에 의해 배양 배지 또는 복수액으로부터 분리하고 정제할 수 있다.

[0147] 모노클로날 항체는 또한 재조합 DNA 방법, 예를 들어 미국 특허 4,816,567에 설명된 방법에 의해 제조할 수 있다. 본 발명의 모노클로날 항체를 코딩하는 DNA는 통상적인 절차를 이용하여 (예를 들어, 쥐 항체의 중쇄 및 경쇄를 코딩하는 유전자에 특이적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오티드 프로브를 사용함으로써) 쉽게 분리하고 서열 결정할 수 있다. 본 발명의 하이브리도마 세포는 그러한 DNA의 바람직한 공급원으로서 역할을 한다. 일단 분리되면, DNA를 발현 벡터 내로 넣을 수 있고, 이어서, 이를 달리 면역글로불린 단백질을 생산하지 않는 원숭이 COS 세포, 차이니스 햄스터 난소 (CHO) 세포, 또는 골수종 세포와 같은 숙주 세포 내로 형질감염시켜, 재조합 숙주 세포 내에서 모노클로날 항체의 합성을 일으킨다. DNA는 또한 예를 들어, 상동성 쥐 서열 대신에 인간 중쇄 및 경쇄 불변 도메인에 대한 코딩 서열을 치환함으로써 (미국 특허 4,816,567; [Morrison et al., 상기 문헌]) 또는 면역글로불린 코딩 서열에 비-면역글로불린 폴리펩티드에 대한 코딩 서열 전부 또는 일부를 공유 연결함으로써 변형시킬 수 있다. 그러한 비-면역글로불린 폴리펩티드는 본 발명의 항체의 불변 도메인을 치환할 수 있거나, 본 발명의 항체의 하나의 항원-결합 부위의 가변 도메인을 치환하여 키메라 2가 항체를 생성할 수 있다.

[0148] 항체는 1가 항체일 수 있다. 1가 항체를 제조하는 방법은 당업계에 공지되어 있다. 예를 들어, 하나의 방법은 면역글로불린 경쇄 및 변형된 중쇄의 재조합 발현을 포함한다. 중쇄는 일반적으로 중쇄 가교결합을 방지하도록 Fc 구역 내의 임의의 위치에서 말단 절단된다. 별법으로, 관련 시스템 잔기는 다른 아미노산 잔기로 치환되거나, 가교결합을 방지하도록 결실시킬 수 있다.

[0149] 1가 항체를 제조하기 위해 시험관내 방법이 또한 적합하다. 그의 단편, 특히 Fab 단편을 생산하기 위한 항체의 소화는 당업계에 공지된 기술을 이용하여 달성할 수 있지만 이로 제한되지 않는다.

[0150] **B. 인간 및 인간화 항체**

[0151] 항체는 인간화 항체 또는 인간 항체일 수 있다. 비-인간 (예를 들어, 쥐) 항체의 인간화 형태는 일반적으로 비-인간 면역글로불린에서 유래한 최소 서열을 함유하는 키메라 면역글로불린, 면역글로불린 사슬 또는 그의 단편 (예를 들어 Fv, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, 또는 항체의 다른 항원-결합 하위서열)이다. 인간화 항체는 수여자의 CDR의 잔기가 목적하는 특이성, 친화도 및 능력을 갖는 비-인간종 (공여 항체), 예를 들어 마우스, 래트 또는 토끼의 CDR의 잔기로 치환된 인간 면역글로불린 (수여 항체)을 포함한다. 일부 경우에, 인간 면역글로불린의 Fv 프레임워크 잔기는 대응하는 비-인간 잔기로 치환된다. 또한, 인간화 항체는 수여 항체 또는 도입된 CDR 또는 프레임워크 서열에서 발견되지 않는 잔기를 포함할 수 있다. 일반적으로, 인간화 항체는 적어도 하나, 일반적인

로 2개의 가변 도메인을 실질적으로 모두 포함할 수 있고, 여기서 모든 또는 실질적으로 모든 CDR 구역은 비-인간 면역글로불린의 구역에 대응하고, 모든 또는 실질적으로 모든 FR 구역은 인간 면역글로불린 컨센서스 서열의 구역에 대응한다. 인간화 항체는 바람직하게는 또한 면역글로불린 불변 구역 (Fc)의 적어도 일부, 일반적으로 인간 면역글로불린의 일부를 포함할 것이다 ([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)]).

[0152] 비-인간 항체를 인간화시키는 일부 방법은 당업계 및 하기 실시예에 설명되어 있다. 일반적으로, 인간화 항체는 그 내부에 비-인간 공급원으로부터의 하나 이상의 아미노산 잔기가 도입된 것이다. 이들 비-인간 아미노산 잔기는 "도입 (import)" 잔기로서 종종 언급되고, 이는 일반적으로 "도입" 가변 도메인으로부터 취한다. 한 실시태양에 따르면, 인간화는 본질적으로 인간 항체의 대응하는 서열을 설치류 CDR 또는 CDR 서열로 대체함으로써 윈터 (Winter) 등의 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)])을 따라 수행할 수 있다. 따라서, 그러한 "인간화" 항체는 무손상 인간 가변 도메인보다 실질적으로 더 작은 도메인이 비-인간종의 대응하는 서열로 대체된 항체 (미국 특허 4,816,567)이다. 실제로, 인간화 항체는 일부 CDR 잔기 및 가능하게는 일부 FR 잔기가 설치류 항체의 유사 부위로부터의 잔기로 대체된 인간 항체이다.

[0153] 인간화에 대한 대안으로서, 인간 항체를 생성시킬 수 있다. 예를 들어, 면역화시에 내인성 면역글로불린 생산의 부재 하에 인간 항체의 전체 레퍼토리를 생산할 수 있는 트랜스제닉 동물 (예를 들어, 마우스)을 현재 생산할 수 있다. 예를 들어, 키메라 및 생식계열 (germ-line) 돌연변이체 마우스의 항체 중쇄 연결 구역 (J<sub>H</sub>) 유전자 동종접합성 결실은 내인성 항체 생성을 완전히 억제하는 것으로 설명되었다. 그러한 생식계열 돌연변이체 마우스 내로 인간 생식계열 면역글로불린 유전자 어레이를 전달하면 항원 시험 접종시에 인간 항체를 생산할 것이다 (예를 들어, 문헌 [Jakobovits et al., PNAS USA. 90:2551 (1993)]; [Jakobovits et al., Nature, 362:255-258 (1993)]; [Bruggemann et al., Year in Immunol. 7:33 (1993)]; 미국 특허 5,545,806, 5,569,825, 5,591,669; 5,545,807; 및 WO 97/17852 참조). 별법으로, 인간 항체는 인간 면역글로불린 로커스를 트랜스제닉 동물, 예를 들어 내인성 면역글로불린 유전자가 부분적으로 또는 완전히 불활성화된 마우스에 도입함으로써 제조할 수 있다. 시험 접종시에, 유전자 재배열, 회합 및 항체 레퍼토리를 포함하여 모든 면에서 인간에서 관찰된 것과 근접하게 유사한 인간 항체 생산이 관찰된다. 이러한 방법은 예를 들어 미국 특허 5,545,807; 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425 및 5,661,016, 문헌 [Marks et al., Bio/Technology 10:779-783 (1992)]; [Lonberg et al., Nature 368:856-859 (1994)]; [Morrison, Nature, 368:812-813 (1994)]; [Fishwild et al., Nature Biotechnology 14:845-851 (1996)]; [Neuberger, Nature Biotechnology 14:826 (1996)]; [Lonberg and Huszar, Intern. Rev. Immunol., 13:65-93 (1995)]에 기재되어 있다.

[0154] 별법으로, 파지 디스플레이 기술 (McCafferty et al., Nature 348: 552-553 [1990])을 사용하여, 비면역화된 공여체로부터의 면역글로불린 가변 (V) 도메인 유전자 레퍼토리로부터 인간 항체 및 항체 단편을 시험관 내에서 생산할 수 있다. 상기 기술의 한 실시태양에 따르면, 항체 V 도메인 유전자는 필라멘트형 박테리오파지, 예를 들어 M13 또는 fd의 주 또는 부 코트 단백질 유전자 내로 인-프레임으로 클로닝되고, 파지 입자의 표면 상에 기능성 항체 단편으로서 디스플레이된다. 파지 디스플레이는 예를 들어 하기 실시예 섹션에서 설명되거나 또는 예를 들어 문헌 [Johnson, Kevin S. and Chiswell, David J., Current Opinion in Structural Biology 3: 564-571 (1993)]에 검토된 다양한 방식으로 수행할 수 있다. V-유전자 세그먼트의 복수의 공급원을 파지 디스플레이에 사용할 수 있다. 문헌 [Clackson et al., Nature, 352:624-628 (1991)]에서는 면역화된 마우스의 비장으로부터 유래된 V 유전자의 작은 무작위 조합 라이브러리로부터 항-옥사졸론 항체의 다양한 어레이를 단리하였다. 비면역화된 인간 공여체로부터 V 유전자의 레퍼토리를 제조할 수 있고, 항원 (자가항원 포함)의 다양한 어레이에 대한 항체는 본질적으로 문헌 [Marks et al., J. Mol. Biol. 222:581-597 (1991)], 또는 [Griffith et al., EMBO J. 12:725-734 (1993)]에 기재된 기술에 따라 단리할 수 있다 (또한, 미국 특허 5,565,332 및 5,573,905 참조).

[0155] 상기 논의한 바와 같이, 인간 항체는 또한 시험관 내에서 활성화된 B 세포에 의해 생성될 수도 있다 (미국 특허 5,567,610 및 5,229,275 참조).

[0156] 또한, 인간 항체는 파지 디스플레이 라이브러리를 포함하여 당업계에 공지된 다양한 기술을 사용하여 제조할 수 있다 ([Hoogenboom and Winter, J. Mol. Biol., 227:381 (1991)]; [Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581 (1991)]). 또한, 인간 모노클로날 항체의 제조를 위해 콜(Cole) 등 및 보르너(Boerner) 등의 기술을 이용할 수 있다 (문헌 [Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, p. 77 (1985)]);

[Boerner et al., J. Immunol., 147(1):86-95 (1991)] 참조).

**[0157] C. 다중특이적 항체**

**[0158]** 다중특이적 항체는 2개 이상의 상이한 항원에 대한 결합 특이성을 갖는 모노클로날, 바람직하게는 인간 또는 인간화 항체이다 (예를 들어, 이중특이적 항체는 적어도 2개의 항원에 대한 결합 특이성을 갖는다). 예를 들어, 결합 특이성의 하나는  $\alpha 5\beta 1$  단백질에 대한 것이고, 다른 하나는 임의의 다른 항원에 대한 것이다. 하나의 바람직한 실시태양에 따르면, 다른 항원은 세포-표면 단백질 또는 수용체 또는 수용체 서브유닛이다. 예를 들어, 세포-표면 단백질은 천연 킬러 (NK) 세포 수용체일 수 있다. 따라서, 한 실시태양에 따르면, 본 발명의 이중특이적 항체는  $\alpha 5\beta 1$ 과 VEGF 모두에 결합할 수 있다.

**[0159]** 이중특이적 항체를 제조하기 위한 적합한 방법은 당업계에 공지되어 있다. 예를 들어, 이중특이적 항체의 재조합 생산은 2개의 면역글로불린 중쇄/경쇄 쌍의 동시발현에 기초하고, 여기서 2개의 중쇄는 상이한 특이성을 갖는다 (Milstein and Cuello, Nature, 305: 537-539 (1983)). 면역글로불린 중쇄 및 경쇄의 랜덤 분류 때문에, 이들 하이브리도마 (콰드로마 (quadroma))는 그 중에서 하나만 정확한 이중특이적 구조를 갖는 10개의 상이한 항체 분자의 잠재적인 혼합물을 생산한다. 정확한 분자의 정제는 대체로 친화도 크로마토그래피 단계에 의해 달성한다. 유사한 절차가 WO93/08829 및 문헌 [Traunecker et al., EMBO, 10:3655-3659 (1991)]에 개시되어 있다.

**[0160]** 목적하는 결합 특이성 (항체-항원 결합 부위)을 갖는 항체 가변 도메인이 면역글로불린 불변 도메인 서열에 융합된다. 융합은 바람직하게는 힌지의 적어도 일부, CH2 및 CH3 구역을 포함하는 면역글로불린 중쇄 불변 도메인을 사용한다. 융합체의 적어도 하나에 존재하는, 경쇄 결합에 필요한 부위를 함유하는 제1 중쇄 불변 구역 (CH1)을 갖는 것이 바람직하다. 면역글로불린 중쇄 융합체 및, 필요한 경우 면역글로불린 경쇄를 코딩하는 DNA를 별개의 발현 벡터 내에 삽입하고, 적합한 숙주 유기체 내로 동시형질감염시킨다. 이중특이적 항체를 생성하는 추가의 상세한 내용에 대해서는 예를 들어 문헌 [Suresh et al., Methods in Enzymology, 121:210 (1986)]을 참조한다.

**[0161]** 이중특이적 항체 단편을 재조합 세포 배양액으로부터 직접 제조하고 단리하기 위한 다양한 기술이 또한 설명되었다. 예를 들어, 이중특이적 항체는 류신 지퍼 (zipper)를 사용하여 생산되었다 (Kostelny et al., J. Immunol., 148(5): 1547-1553 (1992)). Fos 및 Jun 단백질로부터의 류신 지퍼 펩티드가 유전자 융합에 의해 2개의 상이한 항체의 Fab' 부분에 연결되었다. 항체 동종이량체는 힌지 구역에서 환원되어 단량체를 형성한 다음, 재산화되어 항체 이종이량체를 형성하였다. 상기 방법은 항체 동종이량체의 생산에도 사용될 수 있다. 문헌 [Hollinger et al., PNAS USA, 90:6444-6448 (1993)]에 기재된 "디아바디" 기술은 이중특이적 항체 단편의 제조를 위한 다른 메카니즘을 제공하였다. 이 단편은 동일한 사슬 상의 두 개의 도메인 사이에 페어링을 허용하기에는 너무 짧은 링커에 의해  $V_L$ 에 연결된  $V_H$ 를 포함한다. 따라서, 한 단편의  $V_H$  및  $V_L$  도메인은 다른 단편의 상보성  $V_L$  및  $V_H$  도메인과 페어링하도록 강제되고, 이에 의해 2개의 항원 결합 부위를 형성한다. 단일쇄 Fv (sFv) 이량체를 사용한 이중특이적 항체 단편의 다른 제조 전략도 보고된 바 있다 ([Gruber et al., J. Immunol., 152:5368 (1994)] 참조).

**[0162]** 3개 이상의 항체가 고려된다. 예를 들어, 삼중특이적 항체를 제조할 수 있다 (Tutt et al. J. Immunol. 147: 60 (1991)).

**[0163] D. 이중컨주게이트 항체**

**[0164]** 이중컨주게이트 항체는 2개의 공유 연결된 항체로 이루어진다. 예를 들어, 상기 항체는 면역계 세포를 원치 않는 세포에 표적화시키기 위해 (미국 특허 4,676,980), 및 HIV 감염의 치료를 위해 (WO 91/00360, WO 92/200373 및 EP 03089) 제안되었다. 항체는 가교결합제를 수반하는 것을 포함하여 합성 단백질 화학에 공지된 방법을 사용하여 시험관 내에서 제조할 수 있음이 고려된다. 예를 들어, 면역독소는 디술피드 교환 반응을 사용하여 또는 티오에테르 결합을 형성하여 제조할 수 있다. 상기 목적에 적합한 시약의 예는 이미노티올레이트 및 메틸-4-머캅토부티르이미데이트 및 예를 들어 미국 특허 4,676,980에 개시된 것을 포함한다.

**[0165] E. 효과기 기능 조작**

**[0166]** 예를 들어 암 치료시에 항체의 효과를 향상시키기 위해 효과기 기능에 관하여 본 발명의 항체를 변형시키는 것이 바람직할 수 있다. 예를 들어, 시스템인 잔기(들)이 Fc 구역 내에 도입되어, 상기 구역 내에서의 사슬간 디술피드 결합을 형성할 수 있다. 이와 같이 생성된 동종이량체 항체는 개선된 내재화 능력 및/또는 증가된 보체

매개 세포 사멸 및 항체 의존성 세포 세포독성 (ADCC)을 보일 수 있다 ([Caron et al., J. Exp. Med., 176:1191-1195 (1992)] 및 [Shopes, J. Immunol. 148:2918-2922 (1992)] 참조). 향상된 항-종양 활성을 갖는 동종이량체 항체도 문헌 [Wolff et al., Cancer Research 53:2560-2565 (1993)]에 기재된 바와 같은 이중2관능성 가교결합기를 사용하여 제조할 수 있다. 별법으로, 이중 Fc 구역을 갖는 항체가 조작되어 향상된 보체 용해 및 ADCC 능력을 가질 수 있다 ([Stevenson et al., Anti-Cancer Drug Design. 3:219-230 (1989)] 참조).

[0167] Fc 구역 서열 내의 돌연변이 또는 변경은 FcR 결합을 개선시키기 위해서 실시될 수 있다 (예를 들어, Fc $\gamma$ R, FcRn). 한 실시태양에 따르면, 본 발명의 항체는 천연 IgG 또는 모 항체에 비해, ADCC, CDC, 및 개선된 FcRn 결합으로 이루어지는 군 중에서 선택되는 적어도 하나의 변경된 효과기 기능을 갖는다. 몇 개의 유용한 특이적인 돌연변이의 예는 예를 들어 문헌 [Shields, RL et al. (2001) JBC 276(6)6591-6604]; [Presta, L.G., (2002) Biochemical Society Transactions 30(4):487-490]; 및 WO 00/42072에 기재되어 있다.

[0168] 한 실시태양에 따르면, Fc 수용체 돌연변이는 다음으로 이루어지는 군 중에서 선택되는 적어도 하나의 위치에서의 치환이다: Fc 구역의 238, 239, 246, 248, 249, 252, 254, 255, 256, 258, 265, 267, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 301, 303, 305, 307, 309, 312, 315, 320, 322, 324, 326, 327, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 335, 337, 338, 340, 360, 373, 376, 378, 382, 388, 389, 398, 414, 416, 419, 430, 434, 435, 437, 438 또는 439 (여기서, Fc 구역의 잔기 넘버링은 EU 넘버링 시스템에 따름). 일부 실시태양에서, Fc 수용체 돌연변이는 D265A 치환이다. 일부 실시태양에서, Fc 수용체 돌연변이는 N297A 치환이다. 추가의 적합한 돌연변이는 미국 특허 7,332,581에 제시되어 있다.

[0169] **F. 면역컨쥬게이트**

[0170] 본 발명은 또한 세포독성제, 예를 들어 화학요법제, 독소 (예를 들어, 세균, 진균, 식물, 또는 동물 기원의 효소 활성 독소, 또는 그의 단편), 또는 방사성 동위원소 (즉, 방사성 컨쥬게이트)에 컨쥬게이팅된 항체를 포함하는 면역컨쥬게이트에 관한 것이다.

[0171] 상기 면역컨쥬게이트의 생성에 유용한 화학요법제는 상기에서 설명한 바 있다. 사용할 수 있는 효소 활성 독소 및 그의 단편은 디프테리아 A 사슬, 디프테리아 독소의 비결합 활성 단편, 외독소 A 사슬 (슈도모나스 애틀리노사 (*Pseudomonas aeruginosa*)로부터 유래됨), 리신 A 사슬, 아브린 A 사슬, 모데신 A 사슬, 알파-사르신, 알류리테스 포르디아 (*Aleurites fordii*) 단백질, 디안틴 단백질, 피톨라카 아메리카나 (*Phytolacca americana*) 단백질 (PAPI, PAPII, 및 PAP-S), 모모르디카 카란티아 (*Momordica charantia*) 억제제, 쿠르신, 크로틴, 사파오나리아 오피시날리스 (*Saponaaria officinalis*) 억제제, 겔로닌, 미토겔린, 레스트릭토신, 페노마이신, 에노마이신 및 트리코테센을 포함한다. 방사성 컨쥬게이팅된 항체의 생산을 위해 다양한 방사선 핵종이 이용가능하다. 그 예는 <sup>212</sup>Bi, <sup>131</sup>I, <sup>131</sup>In, <sup>90</sup>Y, 및 <sup>186</sup>Re를 포함한다.

[0172] 항체 및 세포독성제의 컨쥬게이트는 다양한 2기능성 단백질-커플링제, 예를 들어 N-숙신이미딜-3-(2-피리디디티오) 프로피오네이트 (SPDP), 이미노티올란 (IT), 이미도에스테르의 2기능성 유도체 (예를 들어 디메틸 아디피미데이트 HCl), 활성 에스테르 (예를 들어 디숙신이미딜 수베레이트), 알데히드 (예를 들어 글루타르알데히드), 비스-아지도 화합물 (예를 들어 비스(p-아지도벤조일) 핵산디아민), 비스-디아조늄 유도체 (예를 들어 비스-(p-디아조늄벤조일)-에틸렌디아민), 디이소시아네이트 (예를 들어 톨루엔 2,6-디이소시아네이트), 및 비스-활성 불소 화합물 (예를 들어 1,5-디플루오로-2,4-디니트로벤젠)을 사용하여 제조한다. 예를 들어, 리신 면역독소는 문헌 [Vitetta et al., Science. 238:1098 (1987)]에 기재된 바와 같이 제조할 수 있다. 탄소-14-표지된 1-이소티오시아나토벤질-3-메틸디에틸렌 트리아민펜타아세트산 (MX-DTPA)은 방사성 뉴클레오티드를 항체에 컨쥬게이션시키기 위한 예시적인 킬레이팅제이다. WO 94/11026을 참조한다.

[0173] 또다른 실시태양에서, 항체를 종양 예비표적화에 활용하기 위해 "수용체" (예를 들어, 스트렙타비딘)에 컨쥬게이팅할 수 있고, 여기서 항체-수용체 컨쥬게이트를 환자에게 투여한 다음, 소실제를 사용하여 결합되지 않은 컨쥬게이트를 순환계로부터 제거한 후, 세포독성제 (예를 들어, 방사성 뉴클레오티드)에 컨쥬게이팅된 "리간드" (예를 들어, 아비딘)를 투여한다.

[0174] **G. 면역리포솜**

[0175] 본원에 개시된 항체는 또한 면역리포솜으로서 제제화될 수 있다. 항체를 함유하는 리포솜은 문헌 ([Epstein et al., PNAS USA, 82:3688 (1985)]; [Hwang et al., PNAS USA, 77: 4030 (1980)]; 미국 특허 4,485,045 및 4,544,545)에 기재된 것과 같은 당업계에 공지된 방법에 의해 제조된다. 향상된 순환 시간을 갖는 리포솜은 미

국 특허 5,013,556에 개시되어 있다.

[0176] 특히 유용한 리포솜은 포스파티딜콜린, 콜레스테롤 및 PEG-유도체화된 포스파티딜에탄올아민 (PEG-PE)을 포함하는 지질 조성물을 사용하여 역상 증발법에 의해 생성할 수 있다. 리포솜은 목적하는 직경을 갖는 리포솜을 수득하도록 규정된 공극 크기의 필터를 통해 압출된다. 본 발명의 항체의 Fab' 단편은 디술피드 상호교환 반응을 통해 문헌 [Martin et al., J. Biol. Chem. 257: 286-288 (1982)]에 기재된 바와 같이 리포솜에 컨쥬게이팅할 수 있다. 항-신생물제, 성장 억제제, 또는 화학요법제 (예를 들어 독소루비신)도 임의로 리포솜 내에 함유된다 ([Gabizon et al., J. National Cancer Inst. 81(19):1484 (1989)] 참조).

[0177] **IV. 항-α5β1 항체를 사용하는 치료 방법**

[0178] 본 발명의 항-α5β1 항체는 예를 들어 암, 안질환, 및 면역 질환 (예를 들어, 자가면역 질환)을 포함하는, 비정상적 혈관신생 및/또는 혈관 투과성 또는 누출을 수반하는 질병 및 질환의 치료를 위해 대상 (예를 들어, 포유동물, 예를 들어 인간)에게 투여될 수 있다. 투여는 예를 들어 정맥내, 근육내, 또는 피하를 포함하는 임의의 적합한 경로에 의해 실시될 수 있다.

[0179] 일부 실시태양에서, 본 발명의 항-α5β1 항체는 비정상적 혈관신생 및/또는 혈관 투과성 또는 누출을 수반하는 질병 또는 질환의 치료를 위해 제2, 제3 또는 제4 물질 (예를 들어, 항신생물제, 성장 억제제, 세포독성제, 또는 화학요법제 포함)과 조합되어 투여된다. 일부 실시태양에서, 항-α5β1 항체는 추가의 물질에 컨쥬게이팅된다.

[0180] 일부 실시태양에서, 항-α5β1 항체는 VEGF 길항제와 조합되어 투여된다. 항-α5β1 항체 및 추가의 물질 (예를 들어, VEGF 길항제)은 동시에 또는 순차적으로 투여할 수 있다. 별법으로, 대상은 VEGF 길항제로 처리된 후, α5β1 길항제를 투여할 수 있고, 예를 들어 대상은 VEGF 길항제 처리에 비반응성일 때까지 VEGF 길항제로 처리된 후, α5β1 길항제로 처리된다. 한 실시태양에 따르면, 대상을 암이 비-침습성일 때 VEGF 길항제로 처리한 후, 암이 침습성일 때 α5β1 길항제로 처리한다. 비-이환된 환자 또는 대조군에 비해, 자연적으로 또는 VEGF 길항제 치료에 반응하여 상승된 α5β1 수준을 경험하는 일부 환자는 특히 상기 조합 요법에 반응성일 수 있다. 치료제 (예를 들어, 항-신생물제, 화학요법제, 성장 억제제 및 세포독성제)를 추가로 포함하는 조합도 고려된다. 예를 들어, 화학요법 (예를 들어, 이리노테칸) 및 α5β1 길항제로 치료되는, 또는 화학요법 및 α5β1 길항제로 치료된 바 있는 환자는 VEGF 길항제 요법으로부터 도움을 받을 수 있다. 별법으로, 화학요법 및 VEGF 길항제로 치료된 바 있는 환자는 α5β1 길항제 요법으로부터 도움을 받을 수 있다. 하나의 바람직한 실시태양에서, 항-VEGF 항체는 아바스틴(등록상표) 항체이다. 다른 바람직한 실시태양에서, 항-α5β1 항체는 본원에서 설명되는 항-α5β1 항체이다. VEGF 길항제, α5β1 길항제 및, 임의로, 화학치료제를 포함하는 키트가 고려된다.

[0181] 암 치료는 예를 들어 종양 퇴화, 종양 중량 또는 크기 감소, 진행시까지의 소요 시간, 생존 기간, 무진행 생존, 총 반응 속도, 반응 기간, 삶의 질, 단백질 발현 및/또는 활성 (이로 제한되지 않음)에 의해 평가될 수 있다. 본원에서 설명되는 항-혈관신생제는 종양 맥관계를 표적으로 하고 반드시 신생물성 세포 자체를 표적으로 하지는 않기 때문에, 특유한 종류의 항암 약물을 나타내고, 따라서 약물에 대한 임상 반응의 특유한 척도 및 정의를 필요로 할 수 있다. 예를 들어, 2차원 분석에서 50% 초과 종양 감소는 반응을 선언하기 위한 표준 컷-오프 (cut-off)이다. 그러나, 본 발명의 α5β1 길항제 및 VEGF 길항제는 1차 종양의 감소를 보이지 않으면서 전이성 확산의 억제를 유도할 수 있거나, 또는 단순히 종양 증식 억제 효과만을 보일 수 있다. 따라서, 예를 들어, 혈관신생의 혈장 또는 소변 마커의 측정 및 방사선 영상을 통한 반응의 측정을 포함하는, 요법의 효능을 결정하기 위한 방법을 사용할 수 있다.

[0182] 치료되는 증상 및 관련 분야의 숙련의가 잘 알고 있는 투약과 관련된 인자에 따라, 본 발명의 항체는 독성 및 부작용을 최소화하면서 증상 치료에 효능을 보이는 투여량으로 투여될 것이다. 암, 자가면역 질병 또는 면역결핍 질병의 치료를 위해, 치료상 효과적인 투여량은 예를 들어 50 mg/용량 내지 2.5 g/m<sup>2</sup>일 수 있다. 한 실시태양에서, 투여되는 투여량은 약 250 mg/m<sup>2</sup> 내지 약 400 mg/m<sup>2</sup> 또는 500 mg/m<sup>2</sup>이다. 다른 실시태양에서, 투여량은 약 250-375 mg/m<sup>2</sup>이다. 또다른 실시태양에서, 투여량 범위는 275-375 mg/m<sup>2</sup>이다.

[0183] 노인성 황반변성 (AMD)의 치료에 대한 평가는 추가의 시력 상실 속도의 감소 또는 추가의 시력 상실의 예방을 포함하고, 이로 제한되지 않는다. AMD 치료를 위해, 생체내 효능은 예를 들어 다음 중 하나 이상에 의해 평가될 수 있다: 기준선으로부터 요구되는 시간까지 최대 교정 시력 (BCVA)의 평균 변화의 평가, 기준선에 비해 요

구되는 시간에서 15 글자 시력표 (letter) 미만의 시력을 잃는 대상의 비율의 평가, 기준선에 비해 요구되는 시간에서 15 글자 시력표 이상의 시력을 얻는 대상의 비율의 평가, 요구되는 시간에서 20/2000의 스넬렌 근시가 (Snellen equivalent) 또는 이보다 낮은 시력을 갖는 대상의 비율 평가, NEI 시력 기능의 설문 (Visual Functioning Questionnaire)의 평가, 플루오레세인 혈관조영술에 의해 평가되는 요구되는 시간에서의 CNV 크기 및 CNV 누출량의 평가 등.

[0184] **V. 제약 제제**

[0185] 항- $\alpha 5\beta 1$  항체는 투여에 적합하도록 적합한 담체 또는 부형제로 제제화될 수 있다. 항체의 적합한 제제는 목적하는 정도의 순도를 갖는 항체를 선택적인 제약상 허용되는 담체, 부형제 또는 안정화제 (Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980))와 혼합하여 동결건조 제제 또는 수용액의 형태로 제조한다. 허용되는 담체, 부형제 또는 안정화제는 사용되는 투여량 및 농도에서 수여자에게 무독성이고, 버퍼, 예를 들어 포스페이트, 시트레이트 및 다른 유기산; 항산화제, 예를 들어 아스코르브산 및 메티오닌; 방부제 (예를 들어 옥타데실디메틸벤질 암모늄 클로라이드; 헥사메트늄 클로라이드; 벤즈알코늄 클로라이드; 페놀, 부틸 또는 벤질 알콜; 알킬 파라벤, 예를 들어 메틸 또는 프로필 파라벤; 카테콜; 레소르시놀; 시클로헤사놀; 3-펜타놀; 및 m-크레졸); 저분자량 (약 10개 미만의 잔기) 폴리펩티드; 단백질, 예를 들어 혈청 알부민, 젤라틴, 또는 변역글로불린; 친수성 중합체, 예를 들어 폴리비닐피롤리돈; 아미노산, 예를 들어 글라이신, 글루타민, 아스파라긴, 히스티딘, 아르기닌, 또는 라이신; 단당류, 이당류, 및 다른 탄수화물, 예를 들어 글루코스, 만노스, 또는 텍스트린; 킬레이팅제, 예를 들어 EDTA; 당, 예를 들어 수크로스, 만니톨, 트레할로스 또는 소르비톨; 염 형성 반대 이온, 예를 들어 나트륨; 금속 착체 (예를 들어, Zn-단백질 착체); 및/또는 비이온계 계면활성제, 예를 들어 TWEEN™, PLURONICS™ 또는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)을 포함한다. 예시적인 항체 제제는 본원에 참고로 포함된 WO98/56418에 기재되어 있다. 피하 투여에 적합한 동결건조된 제제는 WO97/04801에 기재되어 있다. 상기 동결건조된 제제는 적합한 희석제를 사용하여 높은 단백질 농도로 재구성될 수 있고, 재구성된 제제는 본원에서 치료할 포유동물에 피하 투여될 수 있다.

[0186] 본원에서 제제는 또한 치료되는 특정 증상에 필요한 2종 이상의 활성 화합물, 바람직하게는 서로 유해한 영향을 주지 않는 보완 활성을 갖는 것을 포함할 수 있다. 예를 들어, 추가로 항-신생물제, 성장 억제제, 세포독성제, 또는 화학요법제를 제공하는 것이 바람직할 수 있다. 이들 분자는 의도하는 목적에 효과적인 양으로 함께 존재하는 것이 적합하다. 상기 물질의 유효량은 제제에 존재하는 항체의 양, 질병 또는 질환 또는 치료법의 종류 및 상기 논의된 바와 같은 다른 요인에 따라 결정된다. 이들은 일반적으로 본원에서 설명되는 바와 동일한 투여량 및 투여 경로로 또는 지금까지 사용되어 온 투여량의 약 1 내지 99%로 사용된다.

[0187] 활성 성분은 또한 예를 들어 액적 형성 기술 또는 계면 중합에 의해 제조되는 마이크로캡슐, 예를 들어 각각 콜로이드성 약물 전달계 (예를 들어, 리포솜, 알부민 미세구, 마이크로에멀전, 나노입자 및 나노캡슐) 또는 마이크로에멀전 내의 히드록시메틸셀룰로스 또는 젤라틴-마이크로캡슐 및 폴리(메틸메타크릴레이트) 마이크로캡슐 내에 포획될 수 있다. 이러한 기술은 문헌 [Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)]에 기술되어 있다.

[0188] 지연 방출 제제를 제조할 수 있다. 지연 방출 제제의 적합한 예는 성형 용품, 예를 들어 필름 또는 마이크로캡슐의 형태인 길항제 함유 고상 소수성 중합체의 반투과성 매트릭스를 포함한다. 지연 방출 매트릭스의 예는 폴리에스테르, 히드로겔 (예를 들어, 폴리(2-히드록시에틸-메타크릴레이트), 또는 폴리(비닐알콜)), 폴리락티드 (미국 특허 3,773,919), L-글루탐산과 감마 에틸-L-글루타메이트의 공중합체, 비-분해성 에틸렌-비닐 아세테이트, 분해성 락트산-글리콜산 공중합체, 예를 들어 LUPRON DEPOT™ (락트산-글리콜산 공중합체 및 류프롤라이드 아세테이트로 이루어진 주사가능 미세구), 및 폴리-D-(-)-3-히드록시부티르산을 포함한다.

[0189] 본 발명의 폴리펩티드 및 항체 또는 조성물을 세포 내로 전달하기 위해 리포펙틴 또는 리포솜이 사용될 수 있다. 항체 단편이 사용될 경우, 표적 단백질의 결합 도메인에 특이적으로 결합하는 최소의 억제 단편이 바람직하다. 예를 들어, 항체의 가변-구역 서열을 기초로 하여, 표적 단백질 서열에 결합하는 능력을 보유하는 펩티드 분자를 설계할 수 있다. 상기 펩티드는 화학적으로 합성되고/되거나 재조합 DNA 기술에 의해 생산될 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Marasco et al., PNAS USA, 90: 7889-7893 (1993)] 참조).

[0190] 활성 성분은 또한 예를 들어 액적 형성 기술 또는 계면 중합에 의해 제조되는 마이크로캡슐, 예를 들어 각각 콜로이드성 약물 전달계 (예를 들어, 리포솜, 알부민 미세구, 마이크로에멀전, 나노입자 및 나노캡슐) 또는 마이크로에멀전 내의 히드록시메틸셀룰로스 또는 젤라틴-마이크로캡슐 및 폴리(메틸메타크릴레이트) 마이크로캡슐 내에 포획될 수 있다. 이러한 기술은 문헌 [Remington's PHARMACEUTICAL SCIENCES, 상기 문헌]에 기술되어 있다

다.

[0191] 지연 방출 제제를 제조할 수 있다. 지연 방출 제제의 적합한 예는 성형 용품, 예를 들어 필름 또는 마이크로캡슐의 형태인 항체 함유 고상 소수성 중합체의 반투과성 매트릭스를 포함한다. 지연 방출 매트릭스의 예는 폴리에스테르, 히드로겔 (예를 들어, 폴리(2-히드록시에틸-메타크릴레이트), 또는 폴리(비닐알콜)), 폴리아크티드 (미국 특허 3,773,919), L-글루탐산과 감마 에틸-L-글루타메이트의 공중합체, 비-분해성 에틸렌-비닐 아세테이트, 분해성 락트산-글리콜산 공중합체, 예를 들어 LUPRON DEPOT™ (락트산-글리콜산 공중합체 및 류프롤라이드 아세테이트로 이루어진 주사가능 미세구), 및 폴리-D-(-)-3-히드록시부티르산을 포함한다. 중합체, 예를 들어 에틸렌-비닐 아세테이트 및 락트산-글리콜산은 100일에 걸쳐 분자의 방출을 가능하게 하지만, 특정 히드로겔은 보다 단기간 동안 단백질을 방출한다. 캡슐화된 항체가 장기간 동안 신체 내에 유지될 때, 항체는 37°C에서 습기에 노출되어 변성 또는 응집하여 생물학적 활성을 상실하고, 가능하게는 면역원성이 변경될 수 있다. 합리적인 전략은 수반되는 메카니즘에 따라 안정화를 고안할 수 있다. 예를 들어, 티오-디설피드 상호 교환을 통해 분자간 S-S 결합 형성이 되도록 하는 응집 메카니즘이 밝혀질 경우, 안정화는 술포히드릴 잔기의 변형, 산성 용액으로부터의 동결건조, 습기 함량의 조절, 적절한 첨가제의 사용 및 특이적 중합체 매트릭스 조성물의 개발에 의해 달성할 수 있다.

[0192] 생체내 투여를 위해 사용되는 제제는 멸균되어야 한다. 이는 멸균 여과막을 통한 여과에 의해 쉽게 달성된다.

[0193] **VI. 항-α5β1 항체를 사용한 진단 및 영상화 방법**

[0194] α5β1 폴리펩티드에 특이적으로 결합하는 표지된 항-α5β1 항체, 및 그의 유도체 및 유사체는 α5β1의 발현, 이상 발현 및/또는 활성과 연관된 질병 및/또는 질환의 검출, 진단 또는 모니터링을 위해 진단 목적으로 사용될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 항-α5β1 항체는 계내, 생체내, 생체외, 및 시험관내 진단 분석 또는 영상화 분석에 사용될 수 있다.

[0195] α5β1 폴리펩티드의 발현을 검출하는 방법은 (a) 본 발명의 하나 이상의 항체를 사용하여 개체의 세포 (예를 들어, 조직) 또는 체액에서 폴리펩티드의 발현을 분석하고, (b) 유전자 발현 수준을 표준 유전자 발현 수준과 비교하는 것을 포함하고, 여기서 표준 발현 수준에 비해 분석되는 유전자 발현 수준의 증가 또는 감소는 이상 발현을 나타낸다.

[0196] 본 발명의 추가의 실시태양은 동물 (예를 들어, 포유동물, 예를 들어 인간)에서 α5β1의 발현 또는 이상 발현과 연관된 질병 또는 질환을 진단하는 방법을 포함한다. 이 방법은 포유동물에서 α5β1 분자의 검출을 포함한다. 한 실시태양에서, VEGF 길항제의 투여 후에, 진단은 (a) 유효량의 표지된 항-α5β1 항체를 포유동물에게 투여하고, (b) 투여 후에, 표지된 α5β1 항체가 α5β1 분자가 발현되는 대상의 부위에 우선적으로 집중될 수 있도록 (그리고, 비결합된 표지된 분자가 배경 수준으로 소실되도록) 일정 시간 동안 기다리고; (c) 배경 수준을 결정하고; (d) 대상에서 표지된 분자를 검출하는 것을 포함하고, 여기서 표지된 분자가 배경 수준 이상으로 검출되면, 이것은 α5β1의 발현 또는 이상 발현과 연관된 특정 질병 또는 질환이 대상에 존재함을 나타낸다. 배경 수준은 표지된 분자의 검출된 양을 특정 시스템에 대해 이전에 결정된 표준 값과 비교하는 것을 포함하는 다양한 방법에 의해 결정될 수 있다.

[0197] 본 발명의 항-α5β1 항체는 당업자에게 공지된 전통적인 면역조직학적 방법을 사용하여 생물학적 샘플 내의 단백질 수준을 분석하기 위해 사용될 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Jalkanen, et al., J. Cell. Biol. 101:976-985 (1985)]; [Jalkanen, et al., J. Cell. Biol. 105:3087-3096 (1987)] 참조). 단백질 유전자 발현의 검출에 유용한 다른 항체-기반 방법은 면역분석, 예를 들어 효소-연결 면역흡착 분석 (ELISA) 및 방사성 면역분석 (RIA) 을 포함한다. 적합한 항체 분석 표지는 당업계에 공지되어 있고, 효소 표지, 예를 들어, 글루코스 옥시다제; 방사성 동위원소, 예를 들어 요오드 (<sup>131</sup>I, <sup>125</sup>I, <sup>123</sup>I, <sup>121</sup>I), 탄소 (<sup>14</sup>C), 황 (<sup>35</sup>S), 트리튬 (<sup>3</sup>H), 인듐 (<sup>115m</sup>In, <sup>113m</sup>In, <sup>112</sup>In, <sup>111</sup>In), 및 테크네튬 (<sup>99</sup>Tc, <sup>99m</sup>Tc), 티탈륨 (<sup>201</sup>Ti), 갈륨 (<sup>68</sup>Ga, <sup>67</sup>Ga), 팔라듐 (<sup>103</sup>Pd), 몰리브덴 (<sup>99</sup>Mo), 제논 (<sup>133</sup>Xe), 불소 (<sup>18</sup>F), <sup>153</sup>Sm, <sup>177</sup>Lu, <sup>159</sup>Gd, <sup>149</sup>Pm, <sup>140</sup>La, <sup>175</sup>Yb, <sup>166</sup>Ho, <sup>90</sup>Y, <sup>47</sup>Sc, <sup>186</sup>Re, <sup>188</sup>Re, <sup>142</sup>Pr, <sup>105</sup>Rh, <sup>97</sup>Ru; 루미놀; 및 형광 표지, 예를 들어 플루오레세인 및 로다민, 및 비오틴을 포함한다.

[0198] 당업계에 공지된 기술을 본 발명의 표지된 항체에 적용할 수 있다. 상기 기술은 2기능성 컨쥬게이팅제의 사용을 포함하고, 이로 제한되지 않는다 (예를 들어, 미국 특허 5,756,065; 5,714,631; 5,696,239; 5,652,361; 5,505,931; 5,489,425; 5,435,990; 5,428,139; 5,342,604; 5,274,119; 4,994,560; 및 5,808,003 참조).

[0199] 하나의 특정 실시태양에 따르면, α5β1 폴리펩티드 발현 또는 과다발현은 세포의 표면 상에 존재하는 α5β1의

수준을 평가함으로써 (예를 들어, 항- $\alpha 5\beta 1$  항체를 사용하는 면역조직화학 분석을 통해) VEGF 길항제 치료제의 투여 후에 진단 또는 예후 분석에서 결정된다. 별법으로, 또는 추가로, 예를 들어  $\alpha 5\beta 1$ -코딩 핵산 또는 그의 상보체에 대응하는 핵산 기반 프로브를 사용하는 형광 계내 혼성화 (FISH; 1998년 10월 공개된 W098/45479 참조), 서던 브로팅, 노던 블로팅, 또는 중합효소 연쇄 반응 (PCR) 기술, 예를 들어 실시간 정량적 PCR (RT-PCR)을 통해 세포 내의  $\alpha 5\beta 1$  폴리펩티드-코딩 핵산 또는 mRNA의 수준을 측정할 수 있다. 또한,  $\alpha 5\beta 1$  과다 발현은 예를 들어 항체 기반 분석 (또한, 예를 들어, 1990년 6월 12일 등록된 미국 특허 4,933,294; 1991년 4월 18일 공개된 W091/05264; 1995년 3월 28일 등록된 미국 특허 5,401,638; 및 문헌 [Sias et al., J. Immunol. Methods 132:73-80 (1990)] 참조)을 사용하여 생물학적 유체, 예를 들어 혈청 내의 발산된 항원을 측정하여 연구할 수 있다. 상기 분석에 추가로, 다양한 생체내 및 생체의 분석을 당업자는 이용할 수 있다. 예를 들어, 포유동물의 신체 내의 세포를 검출가능 표지, 예를 들어, 방사성 동위원소로 임의로 표지된 항체에 노출시킨 후, 예를 들어, 방사성의 외부 스캐닝에 의해 또는 항체에 기노출된 포유동물로부터 얻은 샘플 (예를 들어, 생검 또는 다른 생물학적 샘플)의 분석에 의해, 항체의 세포에 대한 결합을 평가할 수 있다.

[0200] VII. 제품 및 키트

[0201] 본 발명의 다른 실시태양은 암 (예를 들어 종양), 안질환 (예를 들어, 습식 AMD) 또는 자가면역 질병 및 관련 병태의 치료에 유용한 물질을 함유하는 제품이다. 제품은 용기, 및 용기 위에 있거나 용기와 연합된 라벨 또는 포장 삽입물을 포함한다. 적합한 용기에는 예를 들어 병, 바이알, 주사기 등이 포함된다. 용기는 각종 재료, 예를 들어 유리 또는 플라스틱으로부터 형성될 수 있다. 일반적으로, 용기는 병태 치료에 효과적인 조성물을 보유하고 있고, 멸균 유입 포트를 가질 수 있다 (예를 들어, 용기는 피하 주사 바늘에 의해 뚫을 수 있는 마개를 갖는 정맥내 용액 백 또는 바이알일 수 있다). 조성물 내의 적어도 하나의 활성제는 본 발명의 VEGF 길항제 또는  $\alpha 5\beta 1$  길항제 또는 VEGF 작용제 또는  $\alpha 5\beta 1$  작용제이다. 라벨 또는 포장 삽입물은 조성물이 특정 병태 치료를 위해 사용됨을 나타낸다. 라벨 또는 포장 삽입물은 환자에게 항체 조성물의 투여를 위한 사용설명서를 추가로 포함할 것이다. 본원에서 설명되는 조합 요법제를 포함하는 제품 및 키트도 고려된다.

[0202] 포장 삽입물은 치료 제품의 사용에 관한 적응증, 용도, 투여량, 투여, 금기 및/또는 경고 사항에 대한 정보를 포함하는, 치료 제품의 상업적 포장에 통상적으로 포함되는 사용설명서를 의미한다. 한 실시태양에서, 포장 삽입물은 조성물이 비-호지킨 림프종을 치료하기 위해 사용되는 것을 나타낸다.

[0203] 추가로, 제품은 제약상 허용되는 버퍼, 예를 들어 주사용 정균수 (BWFI), 포스페이트 완충 염수, 링거액 및 텍스트로스 용액을 포함하는 제2 용기를 추가로 포함할 수 있다. 제품은 상업적 및 사용자 측면에서 바람직한 기타 물질, 예를 들어 기타 버퍼, 희석제, 필터, 바늘 및 주사기를 추가로 포함할 수 있다.

[0204] 임의로 제품과 함께 다양한 목적을 위해, 예를 들어, 환자에서  $\alpha 5\beta 1$  및/또는 VEGF의 단리 또는 검출을 위해 유용한 키트를 또한 제공한다.  $\alpha 5\beta 1$ 의 단리 및 정제를 위해, 키트는 비드 (예를 들어, 세파로스 비드)에 커플링된 항- $\alpha 5\beta 1$  항체를 포함할 수 있다. 시험관 내에서, 예를 들어 ELISA 또는 웨스턴 블롯에서  $\alpha 5\beta 1$  및/또는 VEGF의 검출 및 정량을 위한 항체를 포함하는 키트를 제공할 수 있다. 제품에서와 마찬가지로, 키트는 용기, 및 용기 위에 있거나 용기와 연합된 라벨 또는 포장 삽입물을 포함한다. 예를 들어, 용기는 본 발명의 적어도 하나의 항- $\alpha 5\beta 1$  항체를 포함하는 조성물을 보유한다. 예를 들어, 희석제 및 버퍼, 대조 항체를 함유하는 추가의 용기가 포함될 수 있다. 라벨 또는 포장 삽입물은 조성물에 대한 설명 및 의도하는 시험관 내 또는 진단 용도에 대한 사용설명서를 제공할 수 있다.

[0205] 실시예에 언급되는 시판 시약은 달리 지시하지 않으면 제조자의 지시에 따라 사용하였다. 다음의 실시예 및 명세서 전체에서 ATCC 기탁 번호로 확인되는 세포의 공급처는 아메리칸 타입 컬처 컬렉션이다. 달리 주지하지 않으면, 본 발명에서는 상기에 및 다음 교과서 ([Sambrook et al., 상기 문헌]; [Ausubel et al., CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY (Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y., 1989)]; [Innis et al., PCR PROTOCOLS: A GUIDE TO METHODS AND APPLICATIONS (Academic Press, Inc.: N.Y., 1990)]; [Harlow et al., ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL (Cold Spring Harbor Press: Cold Spring Harbor, 1988)]; [Gait, OLIGONUCLEOTIDE SYNTHESIS (IRL Press: Oxford, 1984)]; [Freshney, ANIMAL CELL CULTURE, 1987]; [Coligan et al., CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY, 1991])에 기재된 것과 같은 재조합 DNA 기술의 표준 절차를 이용한다.

[0206] 본원에서 인용되는 모든 공개문 (특허 및 특허 출원 포함), 구체적으로 예를 들어 미국 특허 가출원 60/784,704 (2006년 3월 21일 출원), 미국 특허 가출원 60/785,330 (2006년 3월 22일 출원); 및 미국 특허 가출원 60/871,743 (2006년 12월 22일 출원)은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.



노물 미만 수준으로 약간 개선하였음을 나타낸다.

- [0220] (3) 인간화 7H5.v2의 프레임워크 변형
- [0221] 다음 위치가 돌연변이되었다: h7H5.v2에서 경쇄 위치 46 (T46L), 중쇄 위치 48 (I48V), 49 (G49S), 66 (K66R), 67 (A67F), 69 (L69I) 및 78 (A78L). 추가로, 중쇄 위치 30 (T30S)이 또한 돌연변이되었다.
- [0222] 각각의 위치에서 돌연변이는 별개의 올리고뉴클레오티드를 사용하는 쿼터 돌연변이유발에 의해 생성하였다. 모든 변이체를 평가하기 위해 파지 경쟁 ELISA를 사용하였다. 1가 Fab는 파지 상에 디스플레이되었다. 인간 인테그린  $\alpha 5\beta 1$ 에 대한 결합 친화도 (IC50)를 결정하였다. 도 8은 중쇄 위치 49 (G49S) 및 78 (A78L)에서 변화가 있는 2개의 변이체를 제외하고는, 대부분의 돌연변이가 여전히 모 클론에 비해 동일한 수준의 결합 친화도를 유지하였음을 보여준다.
- [0223] 따라서, 인간화 7H5.v4 및 v5는 경쇄 위치 46 (T46L), 중쇄 위치 30 (T30S), 48 (I48V), 66 (K66R), 67 (A67F) 및 69 (L69I)의 모든 돌연변이를 포함시키고, 중쇄 위치 49에서만 상이하게 함으로써 생성하였다. 두 변이체에 대한 결합 친화도를 BIAcore 기기를 사용하여 결정하였다. 도 9는 h7H5.v4가 그의 모 클론인 인간화 7H5.v2와 동일한 수준의 결합 친화도를 유지하였음을 보여준다.
- [0224] (4) 파지 경쟁 ELISA
- [0225] MAXISORP™ 미량역가 플레이트를 제조한 인간 인테그린  $\alpha 5\beta 1$  (R&D)으로 PBS 중 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 밤새 코팅한 후, PBST 버퍼 (PBS 중 0.5% BSA 및 0.05% Tween 20)으로 1시간 동안 실온에서 차단하였다. 배양 상등액으로부터의 파지를 연속 희석시킨 인간 인테그린  $\alpha 5\beta 1$ 과 함께 PBST 버퍼 내에서 조직-배양 미량역가 플레이트에서 1시간 동안 인큐베이팅하고, 그 후 결합되지 않은 파지를 포획하기 위해 80  $\mu\text{l}$ 의 혼합물을 표적-코팅된 웰에 15분 동안 이송하였다. 플레이트를 PBT 버퍼 (PBS 중 0.05% Tween 20)으로 세척하고, HRP-컨쥬게이팅된 항-M13 (아머샴 파마시아 바이오테크 (Amersham Pharmacia Biotech))를 40분 동안 첨가하였다 (PBST 버퍼 중 1:5000). 플레이트를 PBT 버퍼로 세척하고, 테트라메틸벤지딘 기질 (키르케가아드 앤 페리 래보라토리스 (Kirkegaard and Perry Laboratories, 미국 매릴랜드주 게이터스버그))을 첨가하여 발색시켰다. 파지 IC<sub>50</sub>을 결정하기 위해 450 nm에서 흡광도를 용액 내의 표적 농도의 함수로서 플로팅하였다. 이는 파지의 표면 상에 디스플레이된 Fab 클론에 대한 친화도 추정치로서 사용되었다.
- [0226] (5) IgG 생산 및 BIAcore 실험에 의한 항체 친화도 결정
- [0227] 관심있는 클론 (키메라 7H5, 인간화 7H5.v1, v2, v3, v4, 및 v5)을 인간 IgG1 pRK 벡터 내로 재형성시키고 (Carter et al., PNAS USA, 89:4285-4289 (1992)), CHO 세포 내에서 일시적으로 발현시키고, 단백질 A 친화도 크로마토그래피로 정제하였다.
- [0228] 친화도 결정은 BIACORE™-3000 기기를 사용하는 표면 플라즈몬 공명에 의해 수행하였다. 고정화는 제조자가 제공하는 프로토콜을 사용하여 아미노기를 통한 랜덤 커플링에 의해 달성하였다. 인간 인테그린  $\alpha 5\beta 1$ 에 대한 항체에 대한 결합 운동학을 연구하기 위해 2가지 상이한 방식을 작동하였다. 도 3a, 7, 및 9a에서, 항체를 CM5 센서 칩 상에 대략 450 반응 단위 (RU)로 고정시키고, PBT 버퍼 (PBS 중 0.05% Tween 20) 내의 2배 연속 희석시킨 농도의 인간 인테그린  $\alpha 5\beta 1$  (300 nM 내지 0.29 nM)을 30  $\mu\text{l}/\text{min}$ 의 유동 속도로 25°C에서 주입하였다. 도 3b 및 9b에서, 인간 인테그린  $\alpha 5\beta 1$ 을 CM5 센서 칩 상에 대략 800 RU로 고정시키고, PBT 버퍼 (PBS 중 0.05% Tween 20) 내의 2배 연속 희석시킨 농도의 항체 (200 nM 내지 0.2 nM)를 30  $\mu\text{l}/\text{min}$ 의 유동 속도로 25°C에서 주입하였다. 각각의 주입 후에, 칩을 10 mM 글라이신-HCl 버퍼 (pH 1.7)를 사용하여 재생하였다. 결합 반응은 블랭크 (blank) 유동 셀로부터 RU를 공제하여 교정하였다. 회합율 ( $k_{on}$ ) 및 해리율 ( $k_{off}$ )은 단순 일-대-일 랭그뮐어 결합 모델 (BIAcore 평가 소프트웨어 버전 3.2)을 사용하여 계산하였다. 평형 해리 상수 ( $K_d$ )는 비율  $k_{off}/k_{on}$ 으로서 계산하였다.
- [0229] (6) 피부 상처 치유 분석
- [0230] 뉴질랜드 화이트 (New Zealand White) 토끼를 인간화 7H5 항체의 효능을 입증하기 위해 연구에서 사용하였다. 무균 기술을 이용하여, 원형 8 mm 생검 펀치 (punch)를 사용하여 귀 연골의 깊이로 상처를 생성하고, 아래에 놓인 연골막을 골막 분리와 미세 가위로 제거하였다. 각각의 상처의 육안 형태를 연구 끝까지 매일 모니터링하였다. 상처 간격 측정치를 제0, 7, 14, 21 및 28일에 취하였다. 모든 동물을 제28일에 안락사시켰다. 2 세트의 피부 상처 치유 실험을 수행하였다.

- [0231] 제1 세트에서는 군당 5마리 동물 및 동물당 2개의 상처를 이용하여 다음의 연구군을 사용하였다: (1) 음성 대조군 IgG (1일당 200  $\mu\text{g}/30 \mu\text{l}$ /상처); (2) h7H5.v2 (1일당 100  $\mu\text{g}/30 \mu\text{l}$ /상처); (3) 항-VEGF 항체 (1일당 100  $\mu\text{g}/30 \mu\text{l}$ /상처); 및 (4) 항-VEGF 항체 (1일당 100  $\mu\text{g}/15 \mu\text{l}$ /상처)와 조합한 h7H5.v2 (1일당 100  $\mu\text{g}/15 \mu\text{l}$ /상처). 항체를 국소 적용하였다. 도 10에, (1) h7H5.V2 단독 또는 항-VEGF 단독의 투여가 상처 치유를 억제하고; (2) h7H5.v2 및 항-VEGF 항체의 조합 투여는 상처 치유에 대한 항-VEGF 항체 단독의 효과를 향상시킴을 입증하는 결과를 도시한다.
- [0232] 제2 세트 실험에서는 군당 5마리 동물 및 동물당 2개의 상처를 이용하여 다음의 연구군을 사용하였다: (1) 음성 대조군 IgG (1일당 200  $\mu\text{g}/30 \mu\text{l}$ /상처); (2) h7H5.v4 (1일당 100  $\mu\text{g}/30 \mu\text{l}$ /상처); (3) 항-VEGF 항체 (1일당 100  $\mu\text{g}/30 \mu\text{l}$ /상처); 및 (4) 항-VEGF 항체 (1일당 100  $\mu\text{g}/15 \mu\text{l}$ /상처)와 조합한 h7H5.v4 (1일당 100  $\mu\text{g}/15 \mu\text{l}$ /상처). 항체를 국소 적용하였다. 도 11에, (1) h7H5.V4 또는 항-VEGF 단독의 투여가 상처 치유를 억제하고; (2) h7H5.v4 및 항-VEGF 항체의 조합 투여는 상처 치유에 대한 항-VEGF 항체 단독의 효과를 향상시킴을 입증하는 결과를 도시한다.
- [0233] 본원에서 인용되는 모든 공개문 (예를 들어, 특허, 특허 출원 공개, 및 Genbank 기탁 번호 포함)은 그 전체가 모든 목적으로, 각각의 언급이 구체적으로 및 개별적으로 참조로 포함하는 것과 같이 본원에 참조로 포함된다.

### 수탁번호

[0234]

기탁기관명 : 아메리칸 타입 컬처 콜렉션

수탁번호 : PTA7421

수탁일자 : 20060307

h7H5.v1, v2, v3, v4 및 v5의 경계 가변 도메인 서열 정렬

카바트# 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37

카바트-CDR11  
 쿼리아-CDR11  
 접속-CDR11

h7H5.v1 D I Q N T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C K A S Q N V G S D V A W Y Q  
 h7H5.v2 D I Q N T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C K A S Q S V G S D V A W Y Q  
 h7H5.v3 D I Q N T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C K A S Q S V G S D V A W Y Q  
 h7H5.v4 D I Q N T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C K A S Q S V G S D V A W Y Q  
 h7H5.v5 D I Q N T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C K A S Q S V G S D V A W Y Q

카바트# 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74

카바트-CDR12  
 쿼리아-CDR12  
 접속-CDR12

h7H5.v1 Q K P G K A P K T L I Y S T S Y R Y S G V P S R F S G S G S G T D F T L T  
 h7H5.v2 Q K P G K A P K T L I Y S T S Y R Y S G V P S R F S G S G S G T D F T L T  
 h7H5.v3 Q K P G K A P K T L I Y S T S Y R Y S G V P S R F S G S G S G T D F T L T  
 h7H5.v4 Q K P G K A P K L L I Y S T S Y R Y S G V P S R F S G S G S G T D F T L T  
 h7H5.v5 Q K P G K A P K L I I Y S T S Y R Y S G V P S R F S G S G S G T D F T L T

카바트# 75 76 77 78 79 80 81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100 101 102 103 104 105 106 107 108

카바트-CDR13  
 쿼리아-CDR13  
 접속-CDR13

h7H5.v1 I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q I N S Y P F T F G Q G T K V E I K R 서열 1  
 h7H5.v2 I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q Y S S Y P F T F G Q G T K V E I K R 서열 2  
 h7H5.v3 I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q Y S S Y P F T F G Q G T K V E I K R 서열 3  
 h7H5.v4 I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q Y S S Y P F T F G Q G T K V E I K R 서열 4  
 h7H5.v5 I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q Y S S Y P F T F G Q G T K V E I K R 서열 4

도면 1도면

도면2

h7H5.v1, v2, v3, v4 및 v5의 중쇄 가변 도메인 서열 정렬

카바트# 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40

h7H5.v1, v2, v3, v4 및 v5의 중쇄 가변 도메인 서열 정렬

카바트# 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40

h7H5.v1 E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G Y F F F D Y Y L Y W V R Q A

h7H5.v2 E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G Y F F F D Y Y L Y W V R Q A

h7H5.v3 E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G Y F F F D Y Y L Y W V R Q A

h7H5.v4 E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G Y F F F D Y Y L Y W V R Q A

h7H5.v5 E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G Y F F F D Y Y L Y W V R Q A

카바트# 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 A 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79

h7H5.v1 P G K G L E W I G G I S P S N G G T T F N D N F E N K A T L S V D K S K N T A Y

h7H5.v2 P G K G L E W I G G I S P S S G G T T F A D A F E R G K A T L S V D K S K N T A Y

h7H5.v3 P G K G L E W I G G I S P S S G G T T F A D S F E R G K A T L S V D K S K N T A Y

h7H5.v4 P G K G L E W I G G I S P S S G G T T F A D A F E R G R F T I S V D K S K N T A Y

h7H5.v5 P G K G L E W I G G I S P S S G G T T F A D A F E R G R F T I S V D K S K N T A Y

카바트# 80 81 82 A B C 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100 A B 101 102 103 104 105 106 107

h7H5.v1 L Q M N S L R A E D T A V Y Y C T R D A Y G D W Y F D V W G Q G T F 시열 5

h7H5.v2 L Q M N S L R A E D T A V Y Y C T R D A Y G D W Y F D V W G Q G T F 시열 6

h7H5.v3 L Q M N S L R A E D T A V Y Y C T R D A Y G D W Y F D V W G Q G T F 시열 7

h7H5.v4 L Q M N S L R A E D T A V Y Y C T R D A Y G D W Y F D V W G Q G T F 시열 8

h7H5.v5 L Q M N S L R A E D T A V Y Y C T R D A Y G D W Y F D V W G Q G T F 시열 9

도면3a

BIAcore 결합 운동학 분석

항-a5β1 hIgG BIAcore 분석 (리간드: hIgG1; 분석물: a5β1)

항체	인간 인테그린 α5β1		
	kon(10 <sup>5</sup> M <sup>-1</sup> S <sup>-1</sup> )	koff(10 <sup>-4</sup> S <sup>-1</sup> )	Kd(nM)
키메라 7H5	0.51	2.2	4.31
h7H5.v1	0.49	1.8	3.67

도면3b

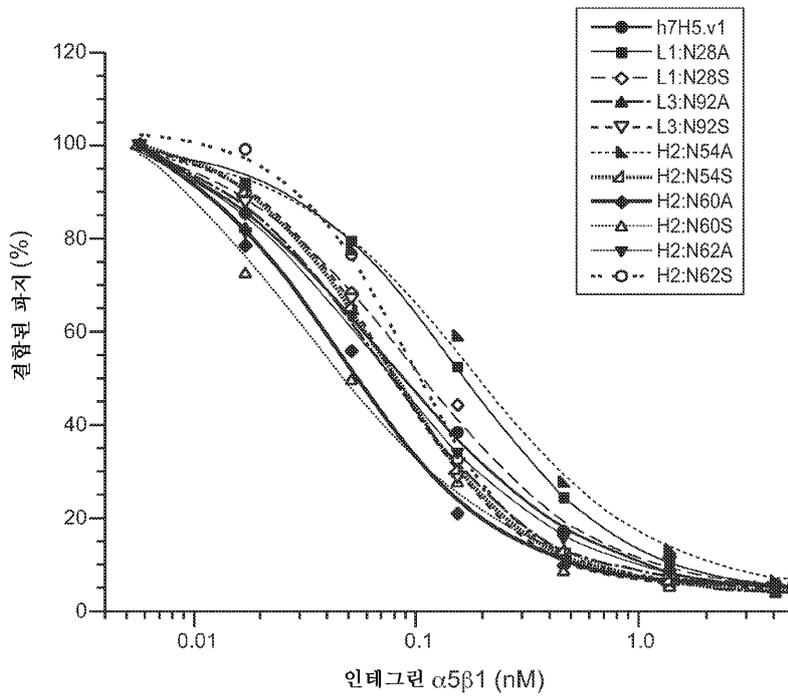
BIAcore 결합 운동학 분석

항-a5β1 hIgG BIAcore 분석 (리간드: a5β1; 분석물: hIgG1)

항체	인간 인테그린 α5β1 (R&D)		
	kon(10 <sup>5</sup> M <sup>-1</sup> S <sup>-1</sup> )	koff(10 <sup>-4</sup> S <sup>-1</sup> )	Kd(nM)
키메라 7H5	6.9	2.8	0.41
h7H5.v1	8.7	2.0	0.23

도면4

h7H5.v1 변이체의 파지 경쟁 ELISA

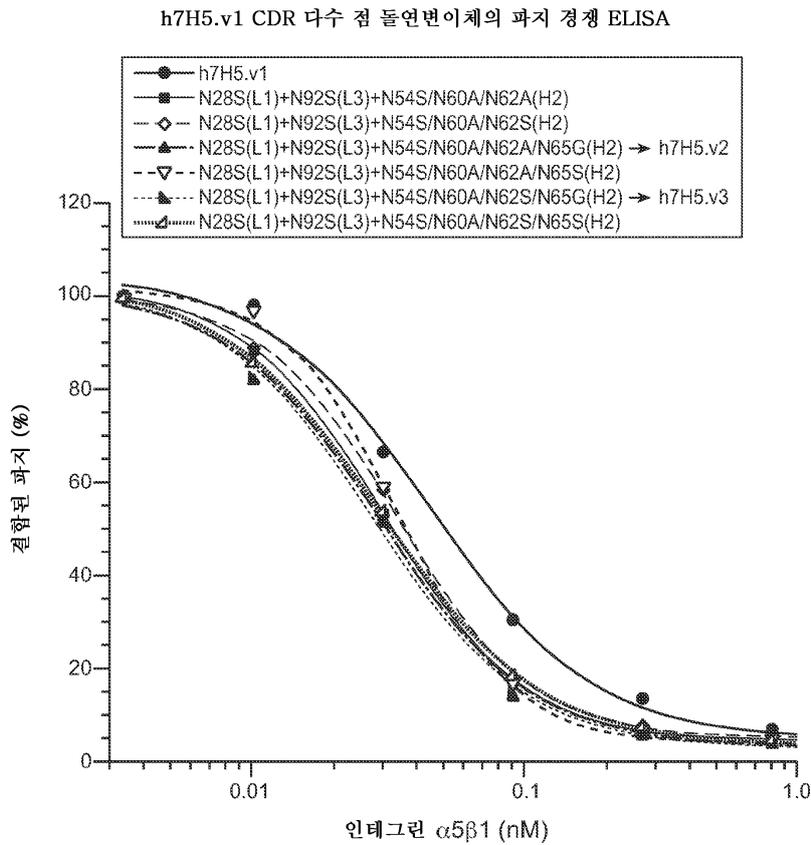


도면5

h7H5.v1 변이체 단일 점 돌연변이체 분석의 요약

Fab-파지	h7H5.v1에 대한 상대 배수	인간 항체 내의 우세율 (%)
CDR-L1:N28A	↓ 2.1	<1
CDR-L1:N28S	↓ 1.3	33
CDR-L3:N92A	1	<1
CDR-L3:N92S	1	12
CDR-H2:N54A	↓ 2.4	<1
CDR-H2:N54S	1	26
CDR-H2:N60A	↑ 1.6	54
CDR-H2:N60S	↑ 2.5	14
CDR-H2:N62A	1	<1
CDR-H2:N62S	↓ 1.3	75

도면6



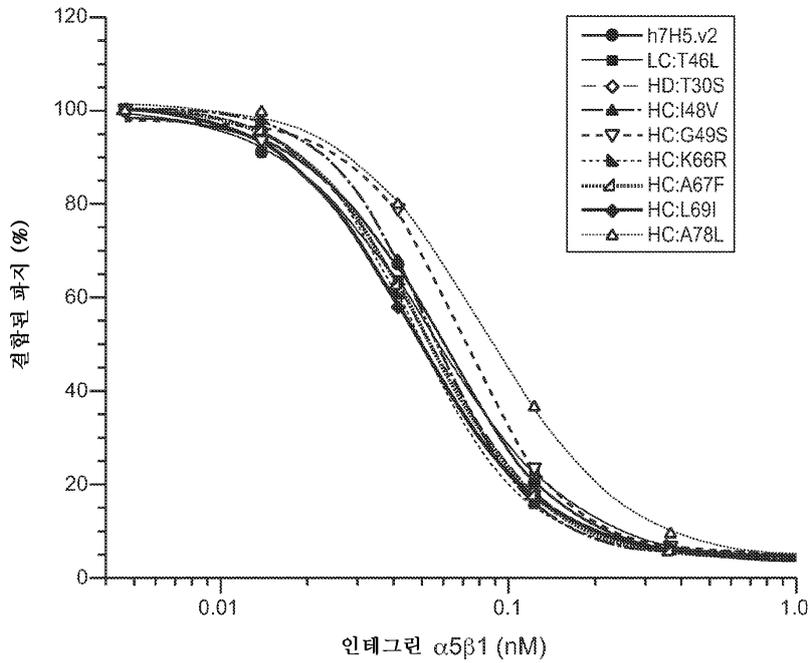
도면7

h7H5.v1, v2 및 v3의 BIAcore 결합 운동학 분석

항- $\alpha 5\beta 1$ hIgG BIAcore 분석 (리간드: hIgG1; 분석물: $\alpha 5\beta 1$ )			
항체	인간 인테그린 $\alpha 5\beta 1$		
	$k_{on}(10^5 M^{-1} S^{-1})$	$k_{off}(10^{-4} S^{-1})$	Kd(nM)
h7H5.v1	0.43	0.82	1.91
h7H5.v2	0.81	0.62	0.77
h7H5.v3	0.70	0.75	1.07

도면8

h7H5.v2 프레임워크 변이체의 파지 경쟁 ELISA



도면9a

h7H5.v2, v4 및 v5의 BIAcore 결합 운동학 분석

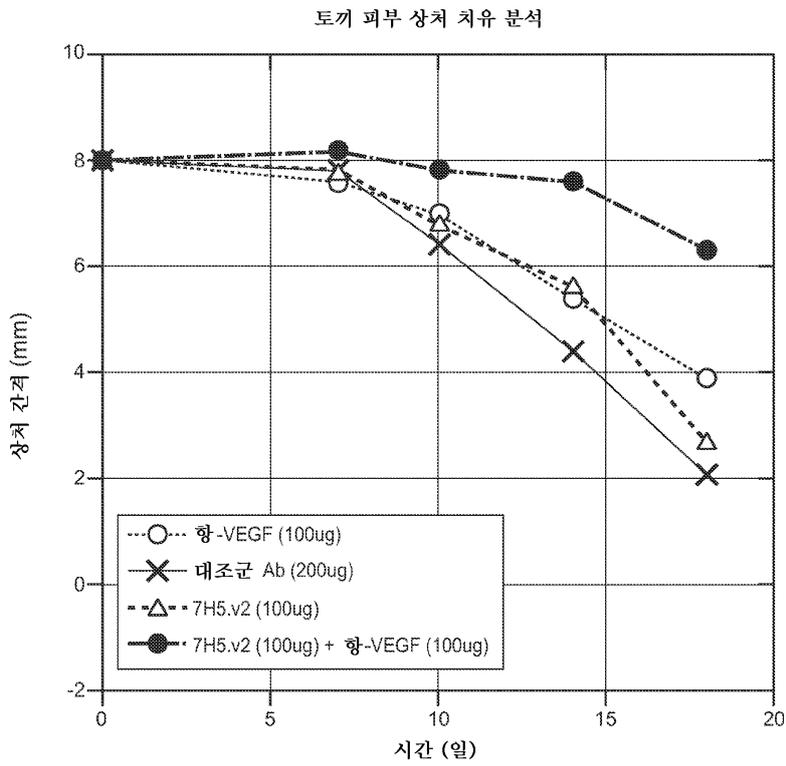
항-α5β1 hIgG BIAcore 분석 (리간드: hIgG1; 분석물: α5β1)			
항체	인간 인테그린 α5β1		
	kon(10 <sup>5</sup> M <sup>-1</sup> S <sup>-1</sup> )	koff(10 <sup>-4</sup> S <sup>-1</sup> )	Kd(nM)
h7H5.v2	0.83	0.64	0.77
h7H5.v4	0.75	0.55	0.73
h7H5.v5	0.69	0.67	0.97

도면9b

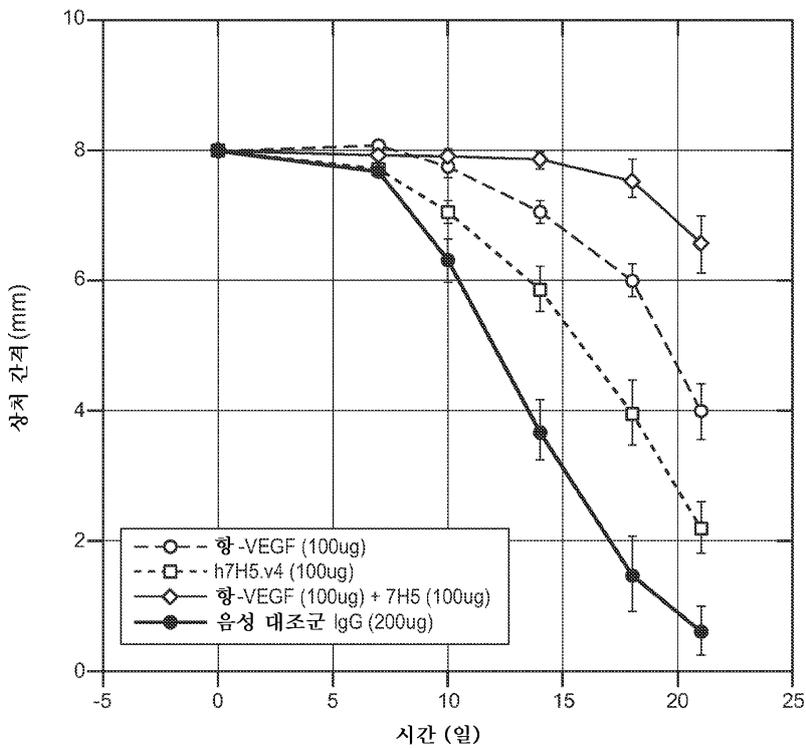
h7H5.v2, v4 및 v5의 BIAcore 결합 운동학 분석

항-α5β1 hIgG BIAcore 분석 (리간드: α5β1; 분석물: hIgG1)			
항체	인간 인테그린 α5β1		
	kon(10 <sup>5</sup> M <sup>-1</sup> S <sup>-1</sup> )	koff(10 <sup>-4</sup> S <sup>-1</sup> )	Kd(nM)
h7H5.v2	14.0	1.5	0.11
h7H5.v4	9.3	1.3	0.14
h7H5.v5	6.6	1.7	0.26

도면10



도면11



서열 목록

Sequence Listing

<110> GENENTECH, INC.

Liang, Wei-Ching

Wu, Yan

Plowman, Gregory D.

Ye, Weilan

<120> NOVEL ANTIBODIES

<130> P2460R1 WO

<150> US 60/975,471

<151> 2007-09-26

<160> 15

<210> 1

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> V-region

<400> 1

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

1 5 10 15

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly

20 25 30

Ser Asp Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys

35 40 45

Thr Leu Ile Tyr Ser Thr Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro Ser

50 55 60

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

65 70 75

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

80 85 90

Tyr Asn Ser Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu

95 100 105

Ile Lys Arg

<210> 2

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> V-region

<400> 2

```

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
  1           5           10           15
Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Gly
           20           25           30
Ser Asp Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys

           35           40           45
Thr Leu Ile Tyr Ser Thr Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro Ser
           50           55           60
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
           65           70           75
Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
           80           85           90
Tyr Ser Ser Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
           95           100          105

```

Ile Lys Arg

<210> 3

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> V-region

<400> 3

```

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
  1           5           10           15
Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Gly
           20           25           30
Ser Asp Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys

```



<210> 5

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> V-region

<400> 5

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

1 5 10 15  
Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr

20 25 30  
Asp Tyr Tyr Leu Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu

35 40 45  
Glu Trp Ile Gly Gly Ile Ser Pro Ser Asn Gly Gly Thr Thr Phe

50 55 60  
Asn Asp Asn Phe Glu Asn Lys Ala Thr Leu Ser Val Asp Lys Ser

65 70 75

Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp  
80 85 90

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Arg Asp Ala Tyr Gly Asp Trp Tyr  
95 100 105

Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr  
110

<210> 6

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> V-region

<400> 6

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

1 5 10 15

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

20 25 30  
 Asp Tyr Tyr Leu Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu  
 35 40 45  
 Glu Trp Ile Gly Gly Ile Ser Pro Ser Ser Gly Gly Thr Thr Phe  
 50 55 60  
 Ala Asp Ala Phe Glu Gly Lys Ala Thr Leu Ser Val Asp Lys Ser  
 65 70 75  
 Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp

80 85 90  
 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Arg Asp Ala Tyr Gly Asp Trp Tyr  
 95 100 105  
 Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr

110

<210> 7

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> V-region

<400> 7

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly  
 1 5 10 15  
 Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr

20 25 30  
 Asp Tyr Tyr Leu Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu  
 35 40 45  
 Glu Trp Ile Gly Gly Ile Ser Pro Ser Ser Gly Gly Thr Thr Phe  
 50 55 60  
 Ala Asp Ser Phe Glu Gly Lys Ala Thr Leu Ser Val Asp Lys Ser  
 65 70 75  
 Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp  
 80 85 90

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Arg Asp Ala Tyr Gly Asp Trp Tyr



Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser  
 20 25 30  
 Asp Tyr Tyr Leu Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu  
 35 40 45  
 Glu Trp Val Ser Gly Ile Ser Pro Ser Ser Gly Gly Thr Thr Phe  
 50 55 60  
 Ala Asp Ala Phe Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Val Asp Lys Ser  
 65 70 75  
 Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp  
 80 85 90  
 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Arg Asp Ala Tyr Gly Asp Trp Tyr  
 95 100 105

Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr  
 110

<210> 10

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Sequence is Synthesized

<220><221> Unsure

<222> 5

<223> Xaa is Asn or Ser

<400> 10

Lys Ala Ser Gln Xaa Val Gly Ser Asp Val Ala  
 5 10

<210> 11

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> V-region

<400> 11

Ser Thr Ser Tyr Arg Tyr Ser  
 5

<210> 12

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Sequence is Synthesized

<220><221> Unsure

<222> 4

<223> Xaa is Asn or Ser

<400> 12

Gln Gln Tyr Xaa Ser Tyr Pro Phe Thr

5

<210> 13

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<220><221> Xaa

<222> 5

<223> Xaa is Thr or Ser

<400> 13

Gly Tyr Thr Phe Xaa Asp Tyr Tyr Leu Tyr

5

10

<210> 14

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Xaa1 is Asn or Ser

<220><221> Other...

<222> 12

<223> Xaa2 is Asn or Ala

<220><221> Other...

<222> 14

<223> Xaa3 is Asn or Ala

<220><221> Other...

<222> 17

<223> Xaa4 is Asn or Gly

<400> 14

Gly Ile Ser Pro Ser Xaa Gly Gly Thr Thr Phe Xaa Asp Xaa Phe

1 5 10 15

Glu Xaa

<210> 15

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> V-region

<400> 15

Asp Ala Tyr Gly Asp Trp Tyr Phe Asp Val

5 10