



(19)대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(51) 。 Int. Cl. (45) 공고일자 2007년01월29일  
A61K 38/19 (2006.01) (11) 등록번호 10-0674528  
(24) 등록일자 2007년01월19일

(21) 출원번호	10-2001-7016748	(65) 공개번호	10-2002-0016856
(22) 출원일자	2001년12월27일	(43) 공개일자	2002년03월06일
심사청구일자	2005년06월21일		
변역문 제출일자	2001년12월27일		
(86) 국제출원번호	PCT/US2000/017579	(87) 국제공개번호	WO 2001/00832
국제출원일자	2000년06월26일	국제공개일자	2001년01월04일

(81) 지정국

국내특허 : 알바니아, 아르메니아, 오스트리아, 오스트레일리아, 아제르바이잔, 보스니아 헤르체고비나, 바베이도스, 불가리아, 브라질, 벨라루스, 캐나다, 스위스, 중국, 쿠바, 체코, 독일, 덴마크, 에스토니아, 스페인, 핀란드, 영국, 그루지야, 헝가리, 이스라엘, 아이슬란드, 일본, 케냐, 키르기스스탄, 북한, 대한민국, 카자흐스탄, 세인트루시아, 스리랑카, 리베이라, 레소토, 리투아니아, 룩셈부르크, 라트비아, 몰도바, 마다가스카르, 마케도니아공화국, 몽고, 말라위, 멕시코, 노르웨이, 뉴질랜드, 슬로베니아, 슬로바키아, 타지키스탄, 투르크멘, 터키, 트리니다드토바고, 우크라이나, 우간다, 우즈베키스탄, 베트남, 폴란드, 포르투갈, 루마니아, 러시아, 수단, 스웨덴, 싱가포르, 아랍에미리트, 안티구와바부다, 코스타리카, 도미니카, 알제리, 모로코, 탄자니아, 남아프리카, 벨리제, 모잠비크, 그라나다, 가나, 감비아, 크로아티아, 인도네시아, 인도, 시에라리온, 세르비아 앤 몬테네그로, 짐바브웨,

AP ARIPO특허 : 케냐, 레소토, 말라위, 수단, 스와질랜드, 우간다, 시에라리온, 가나, 감비아, 짐바브웨, 모잠비크, 탄자니아,

EA 유라시아특허 : 아르메니아, 아제르바이잔, 벨라루스, 키르기스스탄, 카자흐스탄, 몰도바, 러시아, 타지키스탄, 투르크멘,

EP 유럽특허 : 오스트리아, 벨기에, 스위스, 독일, 덴마크, 스페인, 프랑스, 영국, 그리스, 아일랜드, 이탈리아, 룩셈부르크, 모나코, 네덜란드, 포르투갈, 스웨덴, 핀란드, 사이프러스,

OA OAPI특허 : 부르키나파소, 베닌, 중앙아프리카, 콩고, 코트디부아르, 카메룬, 가봉, 기니, 말리, 모리타니, 니제르, 세네갈, 차드, 토고, 기니 비사우,

(30) 우선권주장 60/141,342 1999년06월28일 미국(US)

(73) 특허권자 제넨테크, 인크.  
미합중국 캘리포니아 (우편번호 94080-4990) 사우쓰샌프란시스코 디엔에이 웨이 1

(72) 발명자 아쉬케나지,아비,제이.  
미국94402캘리포니아주샌마테오테리타운스트리트1456

하이모위츠,사라  
미국94133캘리포니아주샌프란시스코비아펠링게티44

켈리,로버트,에프.  
미국94066캘리포니아주샌브루노샌펠리페애비뉴1029

쿠메니스, 이피게니아  
미국 94306 캘리포니아주 팔로알토 파크볼러바드 3820 아파트먼트 6

룽, 수잔  
미국 94403 캘리포니아주 샌마테오 쿠에스타 애비뉴 609

오코넬, 마크  
미국 94127 캘리포니아주 샌프란시스코 테레시타 볼러바드 692

페이, 로저  
미국 94022 캘리포니아주 로스앨토스 리디코트 드라이브 14153

샤로크, 자라  
미국 94116 캘리포니아주 샌프란시스코 소텔로 애비뉴 24

시몬스, 로라  
미국 94010 캘리포니아주 벨링검 그로브 애비뉴 1313

(74) 대리인

주성민  
김영

심사관 : 임혜준

전체 청구항 수 : 총 44 항

---

## (54) 2가 금속 이온을 사용한 Apo-2 리간드 제조 방법

---

### (57) 요약

Apo-2 리간드 및 2가 금속 이온을 사용한 Apo-2 리간드의 제제를 제조하는 방법들이 제공된다. 이러한 2가 금속 이온은 아연 및 코발트를 포함하고, Apo-2 리간드 삼량체 형성 및 안정성을 개선시킨다. 올리고뉴클레오타이드-지정 돌연변이 유발을 사용하여 동정된 Apo-2 리간드 변이체 폴리펩티드와 함께, Apo-2 리간드의 결정 구조가 또한 제공된다.

### 특허청구의 범위

#### 청구항 1.

제제중에 존재하는 하나 이상의 2가 금속 이온의 농도가 Apo-2 리간드에 대해 2배 미만의 몰비인, Apo-2 리간드 및 하나 이상의 2가 금속 이온을 포함하는 제제.

#### 청구항 2.

제 1 항에 있어서, 상기 하나 이상의 2가 금속 이온이 아연 또는 코발트를 포함하는 제제.

#### 청구항 3.

제 2 항에 있어서, 상기 하나 이상의 2가 이온이 아연을 포함하는 제제.

#### 청구항 4.

제 3 항에 있어서, 상기 아연이 염화아연, 아세트산아연, 황산아연, 탄산아연 및 시트르산아연으로 구성된 군에서 선택되는 제제.

#### 청구항 5.

제 1 항에 있어서, 상기 제제가 제약학적으로 허용가능한 제제인 제제.

#### 청구항 6.

제 1 항에 있어서, 상기 Apo-2 리간드가 도 1 (서열 번호 1)의 아미노산 114-281을 포함하는 제제.

#### 청구항 7.

제 1 항에 있어서, 상기 Apo-2 리간드가 도 1 (서열 번호 1)의 아미노산 1-281 또는 그의 생물학적 활성 단편 또는 변이체를 포함하는 제제.

#### 청구항 8.

제 1 항에 있어서, 상기 제제가 약 6 내지 약 9의 pH를 갖는 제제.

#### 청구항 9.

제 8 항에 있어서, 상기 제제가 약 7 내지 약 7.5의 pH를 갖는 제제.

#### 청구항 10.

제 1 항에 있어서, 상기 제제가 수성 제제인 제제.

#### 청구항 11.

제 1 항에 있어서, 상기 제제가 동결건조된 제제인 제제.

#### 청구항 12.

Apo-2 리간드 및 하나 이상의 2가 금속 이온을 포함하고, 제제에 존재하는 상기 하나 이상의 2가 금속 이온의 농도가 상기 Apo-2 리간드에 대해 2배 이상의 몰비인 제제.

#### 청구항 13.

Apo-2 리간드 폴리펩티드를 유효량의 하나 이상의 2가 금속 이온에 노출시키는 것을 포함하는, Apo-2 리간드 삼량체의 형성을 증진시키는 방법.

#### 청구항 14.

Apo-2 리간드, 유효량의 하나 이상의 2가 금속 이온, 및 제약학적으로 허용가능한 담체를 혼합하는 것을 포함하는, Apo-2 리간드의 제약학적으로 허용가능한 제제를 제조하는 방법.

#### 청구항 15.

Apo-2 리간드 폴리펩티드를 유효량의 하나 이상의 2가 금속 이온에 노출시키는 것을 포함하는, 디설파이드-결합된 Apo-2 리간드 이량체의 형성을 감소시키는 방법.

#### 청구항 16.

(a) Apo-2 리간드 폴리펩티드를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 함유한 복제가능한 벡터를 포함하는 숙주 세포를 제공하는 단계; (b) 하나 이상의 2가 금속 이온의 유효량을 함유하는 배양 배지를 제공하는 단계; (c) Apo-2 리간드를 발현하기에 충분한 조건하에서 배양 배지중에 숙주 세포를 배양하는 단계; 및 (d) 숙주 세포 또는 배양 배지로부터 Apo-2 리간드를 회수하는 단계를 포함하는, Apo-2 리간드의 제조 방법.

#### 청구항 17.

제 16 항에 있어서, 상기 숙주 세포가 이.콜리인 방법.

#### 청구항 18.

제 16 항에 있어서, 상기 하나 이상의 2가 금속 이온이 아연을 포함하는 방법.

#### 청구항 19.

제 18 항에 있어서, 상기 아연이 황산아연을 포함하는 방법.

#### 청구항 20.

제 16 항에 있어서, 상기 하나 이상의 2가 금속 이온이 코발트를 포함하는 방법.

#### 청구항 21.

제 20 항에 있어서, 상기 코발트가 염화코발트를 포함하는 방법.

#### 청구항 22.

제 18 항에 있어서, 상기 아연이 약 50 마이크로몰 내지 약 250 마이크로몰의 농도로 배양 배지에 존재하는 방법.

### 청구항 23.

제 16 항에 있어서, 상기 복제가능한 벡터가 하나 이상의 tRNA 분자를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 방법.

### 청구항 24.

제 23 항에 있어서, 상기 복제가능한 벡터가 pAPAp2-P2RU 벡터인 방법.

### 청구항 25.

제 16 항에 있어서, 상기 Apo-2 리간드가 도 1 (서열 번호 1)의 아미노산 114-281을 포함하는 방법.

### 청구항 26.

제 16 항에 있어서, 상기 Apo-2 리간드가 도 1 (서열 번호 1)의 아미노산 1-281 또는 그의 생물학적 활성 단편 또는 변이체를 포함하는 방법.

### 청구항 27.

(a) Apo-2 리간드를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 함유한 복제가능한 벡터를 포함하는 숙주 세포를 제공하는 단계; (b) 배양 배지를 제공하는 단계; (c) Apo-2 리간드를 발현하기에 충분한 조건하에서 배양 배지중에 숙주 세포를 배양하는 단계; (d) 숙주 세포 또는 배양 배지로부터 Apo-2 리간드를 회수하는 단계; 및 (e) 유효량의 하나 이상의 2가 금속 이온의 존재하에서 Apo-2 리간드를 정제하는 단계를 포함하는, Apo-2 리간드의 제조 방법.

### 청구항 28.

제 27 항에 있어서, 단계 (e)에서, 상기 Apo-2 리간드가 하나 이상의 2가 금속 이온 및 환원제의 존재하에서 정제되는 방법.

### 청구항 29.

제 27 항에 있어서, 상기 Apo-2 리간드가 도 1 (서열 번호 1)의 아미노산 114-281을 포함하는 방법.

### 청구항 30.

제 27 항에 있어서, 상기 Apo-2 리간드가 도 1 (서열 번호 1)의 아미노산 1-281 또는 그의 생물학적 활성 단편 또는 변이체를 포함하는 방법.

### 청구항 31.

(a) 배양된 원핵 숙주 세포에서 발현된 Apo-2 리간드를 분리하는 단계; (b) 상기 분리된 Apo-2 리간드를 하나 이상의 2가 금속 이온 및 환원제를 함유하는 완충 용액에 노출시키는 단계; 및 (c) 분리된 Apo-2 리간드를 회수하는 단계를 포함하는, 원핵 세포 배양물로부터 Apo-2 리간드를 회수하는 방법.

### 청구항 32.

제 31 항에 있어서, 단계 (b)에서, 상기 하나 이상의 2가 금속 이온이 아연 및 코발트로 구성된 군에서 선택되고, 상기 환원제가 DTT 및 BME로 구성된 군에서 선택되는 방법.

### 청구항 33.

제 31 항에 있어서, 단계 (c)에서, 상기 Apo-2 리간드를 양이온 크로마토그래피 지지체, 히드록시아파타이트 지지체 및 소수성 크로마토그래피 지지체에 순차적으로 접촉시킴으로써 상기 Apo-2 리간드가 회수되는 방법.

### 청구항 34.

제 33 항에 있어서, 상기 양이온성 크로마토그래피 지지체가 SP-세파로스, CM-세파로스, 및 마크로-프레프 세라믹 HS 수지로 구성된 군에서 선택되는 방법.

### 청구항 35.

제 33 항에 있어서, 상기 소수성 크로마토그래피 지지체가 페닐 아가로스, 부틸 아가로스, TSK 수지 및 토요펠 수지로 구성된 군에서 선택되는 방법.

### 청구항 36.

천연 서열 Apo-2 리간드와는 상이하고 도 1 (서열 번호 1)에서의 잔기 위치(들)에 다음 아미노산 치환: R130A; N134A; L136A; S138A; N140A; N143A; S153A; E155A; R158A; R170A; K179A; R191A; Q193A; E195A; K197D; K201A; N202A; D203A; Y213A; D218A; Y240A; K251A; S259A; D267A; D269A 중 하나 이상을 갖는 아미노산 서열을 포함하는, 분리된 Apo-2 리간드 변이체 폴리펩티드.

### 청구항 37.

천연 서열 Apo-2 리간드와는 상이하고 도 1 (서열 번호 1)에서의 잔기 위치(들)에 다음 아미노산 치환: S141A, K142A, S159A, H264A 중 하나 이상을 갖는 아미노산 서열을 포함하는, 분리된 Apo-2 리간드 변이체 폴리펩티드.

### 청구항 38.

천연 서열 Apo-2 리간드와는 상이하고 도 1 (서열 번호 1)에서의 잔기 위치(들)에 다음 아미노산 치환: R149A; C230S; C230A; Q205A; V207A; Y216A; E236A; Y237A 중 하나 이상을 갖는 아미노산 서열을 포함하는, 분리된 Apo-2 리간드 변이체 폴리펩티드.

### 청구항 39.

제 36 항의 Apo-2 리간드 변이체를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 단리된 핵산.

#### 청구항 40.

제 39 항의 핵산을 포함하는 벡터.

#### 청구항 41.

제 40 항의 벡터를 포함하는 숙주 세포.

#### 청구항 42.

pAPAPo2-P2RU 벡터.

#### 청구항 43.

제 42 항의 벡터를 포함하는 숙주 세포.

#### 청구항 44.

제 31 항에 있어서, 상기 숙주 세포가 이.콜리인 숙주 세포.

#### 청구항 45.

삭제

#### 청구항 46.

삭제

#### 청구항 47.

삭제

#### 청구항 48.

삭제

#### 명세서

##### 기술분야

본 발명은 아연 또는 코발트와 같은 2가 금속 이온을 사용하여 Apo-2 리간드 및 Apo-2 리간드 제제를 형성하는 방법에 관한 것이다. 개선된 Apo-2L 삼량체 형성 및 안정성을 갖는 Apo-2 리간드 및 Apo-2 리간드 제제의 용도가 또한 제공된다. 본 발명은 또한 Apo-2 리간드 변이체, 특히 알라닌 치환 변이체에 관한 것이다.

##### 배경기술

포유동물에서의 세포 수의 조절은, 부분적으로, 세포 증식과 세포 사멸 간의 균형에 의해 결정되는 것으로 생각된다. 때때로 괴사 세포 사멸이라고 일컬어지는, 세포 사멸의 한가지 형태는 전형적으로 일부 외상 또는 세포 손상에서 비롯된 병리학적인 형태의 세포 사멸로서 특징지어진다. 이와 반대로, 규칙적으로 또는 조절된 방식으로 통상 진행되는 또다른 "생리적" 형태의 세포 사멸이 존재한다. 이러한 규칙적이거나 조절된 형태의 세포 사멸은 종종 "아포토시스(apoptosis)"라고 일컬어진다 (예를 들어, 문헌 [Barr 등, Bio/Technology, 12:487-493 (1994)]; Steller 등, Science, 267:1445-1449 (1995)] 참조). 아포토시스적인 세포 사멸은, 면역 체계에서의 배아 발생 및 클론 선택을 포함한 많은 생리적 과정에서 자연적으로 발생한다 [Itoh 등, Cell, 66:233-243 (1991)].

종양 괴사 인자- $\alpha$  ("TNF- $\alpha$ "), 종양 괴사 인자- $\beta$  ("TNF- $\beta$ " 또는 "림포톡신- $\alpha$ "), 림포톡신- $\beta$  ("LT- $\beta$ "), CD30 리간드, CD27 리간드, CD40 리간드, OX-40 리간드, 4-1BB 리간드, Apo-1 리간드 (또한 Fas 리간드 또는 CD95 리간드라 불리운다), Apo-2 리간드 (또한 TRAIL, AIM-1 또는 AGP-1이라 불리운다), 및 Apo-3 리간드 (또한 TWEAK라 불리운다)와 같은 다양한 분자들이 사이토카인의 종양 괴사 인자 ("TNF") 과의 요소로서 동정되었다 [예를 들어, Gruss 및 Dower, Blood, 85: 3378-3404 (1995); Pitti 등, J.Biol.Chem., 271:12687-12690 (1996); Wiley 등, Immunity, 3:673-682 (1995); Browning 등, Cell, 72:847-856 (1993); Armitage 등, Nature, 357:80-82 (1992), WO 97/01633, 1997년 1월 16일 공개; WO 97/25428, 1997년 7월 17일 공개; WO 97/46686, 1997년 12월 11일 공개; WO 97/33899, 1997년 9월 18일 공개, Marsters 등, Curr.Biol., 8:525-528 (1998); Chicheportiche 등, Biol.Chem., 272:32401-32410 (1997) 참조]. 이러한 분자 중에서, TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ , CD30 리간드, 4-1BB 리간드, Apo-1 리간드, Apo-2 리간드(TRAIL) 및 Apo-3 리간드 (TWEAK)가 아포토시스적 세포 사멸에 연관되는 것으로 보고되었다. 이러한 TNF 과 사이토카인에 의해 매개되는 여러 세포 반응의 유도는, 특정한 세포 수용체에 대한 결합에 의해 개시되는 것으로 생각된다. 대략 55 kDa (TNFR1) 및 75 kDa (TNFR2)의 2개의 상이한 TNF 수용체들이 동정되었으며 [Hohman 등, J.Biol.Chem., 264:14927-14934 (1989); Brockhaus 등, Proc. Natl. Acad. Sci., 87:3127-3131 (1990); EP 417,563, 1991년 3월 20일 공개], 양쪽 수용체 유형에 상응하는 인간 및 마우스 cDNA들이 단리 및 특징화되었다 [Loetscher 등, Cell, 61:351 (1990); Schall 등, Cell, 61, 361 (1990); Smith 등, Science, 248:1019-1023 (1990); Lewis 등, Proc. Natl. Acad. Sci., 88:2830-2834 (1991); Goodwin 등, Mol. Cell. Biol., 11:3020-3026 (1991)]. 광범위한 다형태가 양쪽 TNF 수용체 유전자와 연관된다 [예를 들어, Takao 등, Immunogenetics, 37:199-203 (1993)]. 양쪽 TNFR들은 세포외, 경막 및 세포내 영역을 포함한 전형적인 세포 표면 수용체 구조를 공유한다. 양쪽 수용체의 세포외 부분은 또한 가용성 TNF-결합 단백질로서 자연적으로 발견되었다 [Nophar, Y. 등, EMBO J., 9:3269 (1990); 및 Kohno, T. 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:8331 (1990)]. 재조합 가용성 TNF 수용체의 클로닝은 문헌 [Hale 등, J.Cell.Biochem. Supplement 15F, 1991, p.113 (P424)]에 보고되어 있다.

유형 1 및 유형 2 TNFRs (TNFR1 및 TNFR2)의 세포외 부분은, NH<sub>2</sub>-말단으로부터 시작하여, 1 내지 4로 명명되는 4개 시스테인-풍부 도메인 (CRDs)의 반복 아미노산 서열 패턴을 함유한다. 각각의 CRD는 약 40개 아미노산 길이이며, 잘 보존된 위치에 4 내지 6개 시스테인 잔기를 함유한다 [Schall 등, 상동; Loetscher 등, 상동; Smith 등, 상동; Nophar 등, 상동; Kohno 등, 상동]. TNFR1에서, 4개의 CRD들의 대략적인 경계는 다음과 같다: CDR1 - 14 내지 약 53의 아미노산; CRD2 - 약 54 내지 약 97의 아미노산; CRD3 - 약 98 내지 약 138의 아미노산; CRD 4 - 약 139 내지 약 167의 아미노산. TNFR2에서, CRD1는 아미노산 17 내지 약 54을 포함하고; CRD2 - 약 55 내지 약 97의 아미노산; CRD3 - 약 98 내지 약 140의 아미노산; 및 CRD4 - 약 141 내지 약 179의 아미노산을 포함한다 [Banner 등, Cell, 73:431-435 (1993)]. 리간드 결합에서의 CRD의 잠재적인 역할은 문헌 [Banner 등, 상동]에 또한 기재되어 있다.

CRDs의 유사한 반복 패턴은, p75 신경 성장 인자 수용체 (NGFR) [Johnson 등, Cell, 47:545 (1986); Radeke 등, Nature, 325:593 (1987)], B 세포 항원 CD40 [Stamenkovic 등, EMBO J., 8:1403 (1989)], T 세포 항원 OX40 [Mallet 등, EMBO J., 9:1063 (1990)] 및 Fas 항원 [Yonehara 등, J.Exp.Med., 169:1747-1756 (1989) 및 Itoh 등, Cell, 66:233-243 (1991)]을 포함하여, 몇몇 다른 세포-표면 단백질에 존재한다. CRD는 또한 쇼프(Shope)와 점액종 폭스바일러스의 가용성 TNFR (sTNFR)-유사 T2 단백질에서 발견된다 [Upton 등, Virology, 160:20-29 (1987); Smith 등, Biochem.Biophys.Res.Commun., 176:335 (1991); Upton 등, Virology, 184:370 (1991)]. 이러한 서열의 최상의 정렬은 시스테인 잔기의 위치가 잘 보존되었음을 나타내는 것이다. 이러한 수용체들은 때때로 일괄하여 TNF/NGF 수용체 상과의 요소라고 일컬어진다. p75NGFR에 관한 최근의 연구는, CRD1의 결실 [Welcher, A.A. 등, Proc.Natl.Acad.Sci. USA, 88:159-163 (1991)] 또는 이러한 도메인에서의 5-아미노산 삽입 [Yan,H 및 Chao,M.V., J.Biol.Chem., 266:12099-12104 (1991)]이 NGF 결합에 거의 또는 아무런 영향을 미치지 않는다는 것을 나타내었다 [Yan,H. 및 Chao,M.V., 상동]. p75NGFR은 그의 CDR4와 경막 영역 사이에서 약 60개의 아미노산의 프롤린-풍부 신장부를 함유하



며, 이는 NGF 결합에 연관되지 않는다 [Peetre, C. 등, Eur.J.Hematol., 41:414-419 (1988); Seckinger, P. 등, J.Biol.Chem., 264:11966-11973 (1989); Yan, H. 및 Chao, M.V., 상동]. 유사한 프롤린-풍부 영역이 TNFR2에서 발견되지만 TNFR1에서는 발견되지 않는다.

림포톡신- $\alpha$ 을 제외하고, 지금까지 동정된 TNF 과 리간드들은 그의 C-말단이 세포외에 있는 유형 II 경막 단백질이다. 이와 반대로, 지금까지 동정된 TNF 수용체 (TNFR) 과의 대부분의 수용체들은 유형 I 경막 단백질이다. 그러나, TNF 리간드와 수용체 과 양쪽 모두에서, 과 요소들 간에 확인된 상동성은 주로 세포의 도메인 ("ECD")에서 발견된다. TNF-, Apo-1 리간드 및 CD40 리간드를 포함한, 몇몇 TNF 과 사이토카인들은 세포 표면에서 단백질분해에 의해 절단되고; 각각의 경우에 얻어지는 단백질은 전형적으로 가용성 사이토카인으로서 작용하는 동종삼량체 분자를 형성한다. 또한, TNF 수용체 과 단백질들은 통상 단백질분해에 의해 절단되어, 동족 사이토카인의 억제제로서 작용할 수 있는 가용성 수용체 ECDs를 방출한다.

최근들어, TNFR 과의 다른 요소들이 동정되었다. 이러한 새로 동정된 TNFR 과의 요소들은 CAR1, HVEM 및 오스테오포테게린 (OPG)을 포함한다 [Brojatsch 등, Cell, 87:845-855 (1996); Montgomery 등, Cell, 87:427-436 (1996); Marsters 등, J.Biol.Chem., 272:14029-14032 (1997); Simonet 등, Cell, 89:309-319 (1997)]. 다른 공지된 TNFR-유사 분자와 달리, 시모네트(Simonet)등의 상기 문헌은 OPG가 소수성의 경막에 걸쳐있는 서열을 함유하지 않음을 보고하고 있다. OPG는 하기 언급되는 바와 같이 데코이(decoy) 수용체로서 작용하는 것으로 생각된다.

TNF/NGF 수용체 과의 다른 새로운 요소가 마우스에서 동정되었으며, 이 수용체는 "글루코코르티코이드-유도 종양 괴사인 수용체 과-연관 유전자"로서 GITR이라 불리운다 [Nocentini 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:6216-6221 (1997)]. 마우스 GITR 수용체는 흉선, 비장 및 림프절로부터의 정상 마우스 T 림프구에서 발견되는 228개 아미노산 유형의 I 경막 단백질이다. 항-CD3 항체, Con A 또는 포르볼 12-미리스테이트 13-아세테이트로 활성화될 때, 마우스 GITR 수용체의 발현이 T 림프구에서 유도되었다.

문헌 [Marsters 등, Curr. Biol., 6:750 (1996)]에는, 세포외 시스테인-풍부 반복에서 TNFR 과와 유사성을 나타내고, 세포질 사멸 도메인 서열을 함유한다는 점에서 TNFR1 및 CD95와 비슷한, 전체 길이 천연 서열 인간 폴리펩티드 (Apo-3이라 명명됨)가 기재되어 있다 (또한 문헌 [Masters 등, Curr. Biol., 6:1669 (1996)] 참조). Apo-3은 또한 다른 연구자들에게 DR3, wsl-1, TRAMP, 및 LARD이라 불리워진다 [Chinnaiyan 등, Science, 274:990 (1996); Kiston 등, Nature, 384:372(1996); Bodmer 등, Immunity, 6:79 (1997); Screaton 등, Proc.Natl.Sci., 94:4615-4619 (1997)].

팬(Pan) 등은 "DR4"라고 불리워지는 다른 TNF 수용체 과 요소를 개시하고 있다 [Pan 등, Science, 276:111-113 (1997)]. DR4는 세포 자살 장치와 교전할 수 있는 세포질 사멸 도메인을 함유하는 것으로 보고되었다. 팬 등은 DR4가 Apo-2 리간드 또는 TRAIL로서 공지된 리간드에 대한 수용체인 것으로 생각된다고 개시하고 있다.

문헌 [Sheridan 등, Science, 277:818-821 (1997)] 및 [Pan 등, Science, 277:815-818 (1997)]에는, Apo-2 리간드 (TRAIL)에 대한 수용체로 생각되는 다른 분자가 기재되어 있다. 이 분자는 DR5라고 불리워진다 (이것은 또한 Apo-2; TRAIL-R2, TRICK2 또는 KILLER [Screaton 등, Curr.Biol., 7:693-696 (1997); Walczak 등, EMBO J., 16:5386-5387 (1997); Wu 등, Nature Genetics, 17:141-143 (1997)]라고도 불리워진다). DR4와 유사하게, DR5는 세포질 사멸 도메인을 함유하고, 아포토시스를 신호전달할 수 있는 것으로 보고되어 있다.

또 다른 사멸 도메인-함유 수용체 DR6가 최근 동정되었다 [Pan 등, FEBS Letters, 431:351-356 (1998)]. 4개의 추정상의 세포외 도메인과 세포질 사멸 도메인을 함유하는 것 이외에, DR6는 세포질 영역에서 프롤린-풍부 모티프와 중복하는 추정상의 류신-지퍼 서열을 함유하는 것으로 생각된다. 프롤린-풍부 모티프는, 많은 세포내 시그널-도입 분자에서 발견되는 src-상동성-3 도메인에 결합하는 서열과 유사하다.

최근 동정된 TNFR 과 요소의 다른 군은 "데코이(decoy) 수용체"라 불리우며, 이는 신호전달 도입제라기 보다는 억제제로서 작용하는 것으로 생각된다. 이 군은 DCR1 (또한 TRID, LIT 또는 TRAIL-R3이라 불리운다) [Pan 등, Science, 276:111-113 (1997); Sheridan 등, Science, 277:818-821 (1997); McFarlane 등, J.Biol.Chem., 272:25417-25420 (1997); Schneider 등, FEBS Letters, 416:329-334 (1997); Degli-Esposti 등, J.Exp.Med., 186:1165-1170 (1997); 및 Mongkolsapaya 등, J.Immunol., 160:3-6 (1998)] 및 DCR2 (또한 TRUNDD 또는 TRAIL-R4라 불리운다) [Marsters 등, Curr. Biol., 7:1003-1006 (1997); Pan 등, FEBS Letters, 424:41-45 (1998); Degli-Esposti 등, Immunity, 7:813-820 (1997)], 이들 둘다 세포 표면 분자이다. 뿐만 아니라, OPG [Simonet 등, 상동] 및 DCR3 [Pitti 등, Nature, 396:699-703 (1998)]( 이들 둘다 분비된 가용성 단백질이다.)을 포함한다.

사이토카인 및 그들의 수용체의 TNF 과를 검토하기 위해서는, 문헌 [Ashkenazi 등, Science, 281:1305-1308 (1998); Golstein, Curr.Biol., 7:750-753 (1997); 및 Gruss 및 Dower, 상동]을 참조한다.

아연 결합 부위는 다양한 계면을 포함하는 특정 단백질에서의 단백질-단백질 상호작용에서 구조적인 역할을 하는 것으로 밝혀졌으며 [Feese 등, Proc.Natl.Acad.Sci., 91:3544-3548 (1994); Somers 등, Nature, 372:478-481 (1994); Raman 등, Cell, 95:939-950 (1998)], 앞서 구조적으로 특징화된 TNF 과의 요소들 (CD40 리간드, TNF- $\alpha$  또는 TNF- $\beta$ )중 어느 것도 금속을 결합하지 않는다. 인간 성장 호르몬 (hGH)과 같은 여러 호르몬의 제제에서 아연과 같은 금속 이온의 용도는 문헌에 설명되어 있다 (예를 들어 1992년 10월 15일 공개된 WO 92/17200 참조). 수용체에 대한 hGH 결합에서의 아연 관련은 WO 92/03478호 (1992년 3월 5일 공개)에 기재되어 있다. 인터페론- $\alpha$  이량체 및 인터페론- $\beta$ 이량체에서 아연 결합의 역할은 각각 문헌[Walter 등, Structure, 4:1453-1463 (1996)] 및 문헌 [Karpusas 등, Proc. Natl. Acad. Sci., 94:11813-11818 (1997)]에 보고되어 있다.

아연과 같은 각종 금속 이온의 구조 및 생물학적 역할은 당 기술분야에 검토되어 있으며, 예를 들어 문헌 [Christianson 등, Advanced in Protein Chemistry, 42:281-355 (1991)]을 참조한다.

### 발명의 요약

본 발명은, Apo-2 리간드 또는 Apo-2 리간드를 함유하는 제제의 제조 방법 또는 공정에서 하나 이상의 2가 금속 이온을 포함시키면, Apo-2 리간드 삼량체의 수율 및 안정성이 증가된다는 연구결과를 기초로 한다. 현재, 이러한 하나 이상의 2가 금속 이온을 포함시키면, 재조합 세포 배양물에서 발현시에 Apo-2 리간드 또는 Apo-2L 삼량체 집합의 접힘(folding)을 개선시킬 수도 있는 것으로 생각된다. 산화적 환경에서, Apo-2L 단량체 상의 유리 시스테인은 분자간 디설파이드 다리 결합을 형성할 수 있고, 이는 독립적인 Apo-2L 이량체 뿐만 아니라 Apo-2L의 삼량체 형태 내의 디설파이드-결합된 Apo-2L 이량체 종을 유발한다. Apo-2L 이량체의 형성은 Apo-2L의 응집, 침전 및/또는 불활성화를 일으킬 수도 있다. 여기에 기재된 방법 및 제제에서 2가 금속 이온의 존재는 이러한 디설파이드 결합 형성을 막을 수도 있다. Apo-2L 삼량체의 합성 및 조립 과정 동안 2가 금속 이온을 포함시키면, 적절히 접혀진 동중삼량체 Apo-2L의 축적 및 회수를 더욱 개선시킬 수도 있는 것으로 보인다. 본 출원인들은, Apo-2 리간드 삼량체가 디설파이드-결합된 Apo-2L 이량체에 비해 (포유 동물 암 세포에서의 세포독 활성에서) 대략 10배 이상 활성임을 알아내었다.

본 발명의 설명은 주로 Apo-2 리간드에 관한 것이지만, 다양한 기타 단백질의 삼량체를 형성 또는 안정화하기 위해 2가 금속 이온을 사용하는 것도 의도된다. 이러한 기타 단백질은 특히 생물학적 활성을 위해 삼량체 형성을 필요로 하는 단백질, 예를 들어 TNF 과의 각종 요소들을 포함한다.

한가지 구현양태에서, 본 발명은 하나 이상의 2가 이온을 사용하여 Apo-2 리간드를 형성하는 방법을 제공한다. 이 방법은, Apo-2 리간드를 코딩하는 핵산을 함유하는 복제가능한 벡터를 포함한 숙주 세포를 제공하고, 하나 이상의 2가 금속 이온을 함유하는 배양 배지를 제공하고, Apo-2 리간드를 발현하기에 충분한 조건하에서 배양 배지에서 숙주 세포를 배양하고, 숙주 세포 또는 세포 배양 배지로부터 Apo-2 리간드를 회수하는 단계를 포함한다. 임의로, 하나 이상의 2가 금속 이온이 회수 또는 정제 공정 동안 사용된다.

다른 구현양태에서, 본 발명은 Apo-2 리간드 및 하나 이상의 2가 금속 이온을 포함하는 제제를 제공한다. 조성물은 예를 들어 포유동물 암 세포에서의 아포토시스를 유도 또는 자극하는데 유용한 제약학적으로 허용가능한 제제일 수도 있다.

본 발명의 다른 구현양태는 하나 이상의 2가 금속 이온을 함유하는 Apo-2 리간드 제제를 포함한 제품 및 키트를 제공한다. 제품 및 키트는 용기, 용기 위의 라벨, 및 용기내에 함유된 제제를 포함한다. 용기 위의 라벨은 제제가 어떠한 치료적 또는 비-치료적 용도에 사용될 수 있는지를 나타낸다. 제제는 Apo-2 리간드 및 하나 이상의 2가 금속 이온을 함유한다.

다른 구현양태에서, 본 발명은 본 명세서에 기재된 방법에 따라 형성된 Apo-2 리간드 폴리펩티드를 제공한다. 이러한 Apo-2 리간드 폴리펩티드는 도 1 (서열 번호 1)의 아미노산 114-281, 도 1 (서열 번호 1)의 아미노산 1-281, 뿐만 아니라 생물학적 활성 단편 또는 그의 변이체를 포함할 수도 있다.

또 다른 구현양태에서, 본 발명은 Apo-2 리간드 변이체를 제공한다. 특히, 본 발명은 Apo-2 리간드의 천연 서열 (도 1; 서열 번호 1)에서 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하는 Apo-2 리간드 변이체를 제공한다. 알려진 치환을 포함하는 Apo-2 리간드 변이체가 하기 표 I에 제공된다. 본 발명은 또한 Apo-2L 변이체를 코딩하는 핵산 분자 및 Apo-2L 변이체를 코딩하는 핵산 분자를 함유하는 벡터 및 숙주 세포를 제공한다.

## 발명의 상세한 설명

### 정의

용어 "Apo-2 리간드", "Apo-2L" 및 "TRAIL"은, 도 1에 나타난 아미노산 서열 (서열 번호 1)의 아미노산 잔기 114-281 (경계 포함), 95-281 (경계 포함), 잔기 92-281 (경계 포함), 잔기 91-281 (경계 포함), 잔기 41-281 (경계 포함), 잔기 15-281 (경계 포함) 또는 잔기 1-281 (경계 포함), 뿐만 아니라 상기 서열의 생물학적 활성 단편, 상기 서열의 결실, 삽입 또는 치환 변이체를 포함한 폴리펩티드 서열을 일컫기 위해 사용된다. 하나의 구현양태에서, 폴리펩티드 서열은 도 1 (서열 번호 1)의 잔기 114-281을 포함한다. 임의로, 폴리펩티드 서열은 도 1 (서열 번호 1)의 잔기 92-281 또는 잔기 91-281을 포함한다. Apo-2L 폴리펩티드는 도 1 (서열 번호 2)의 천연 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩될 수도 있다. 임의로, 잔기 Pro 119 (도 1; 서열 번호 2)를 코딩하는 코돈은 "CCT" 또는 "CCG"일 수도 있다. 다른 바람직한 구현양태에서, 단편 또는 변이체는 생물학적으로 활성이고, 상기 서열의 어느 하나와 약 80 % 이상의 아미노산 서열 동일성, 더욱 바람직하게는 약 90 % 이상의 서열 동일성, 더욱 더 바람직하게는 95 % 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상 또는 99% 이상의 서열 동일성을 갖는다. 정의는 천연 아미노산의 적어도 하나가 알려진 잔기에 의해 치환된 Apo-2 리간드의 치환 변이체를 포함한다. 바람직한 치환 변이체는 하기 표 I에 나타난 하나 이상의 잔기 치환을 포함한다. 정의는 또한 Apo-2 리간드 원천으로부터 단리되거나 재조합 또는 합성 방법에 의해 제조된 천연 서열 Apo-2 리간드를 포함한다. 본 발명의 Apo-2 리간드는 WO 97/01633 (1997년 1월 16일 공개) 및 WO 97/25428 (1997년 7월 17일 공개)에 개시된 Apo-2 리간드 또는 TRAIL이라 불리는 폴리펩티드를 포함한다. 용어 "Apo-2 리간드" 또는 "Apo-2L"은 일반적으로 폴리펩티드의 단량체, 이량체 또는 삼량체 형태를 포함하는 Apo-2 리간드의 형태를 일컫기 위해 사용된다. 다른 구체적인 언급이 없는 한, Apo-2L 서열에서 아미노산 잔기의 모든 번호매김은 도 1 (서열 번호 1)에 따른 번호매김을 사용한다. 예를 들면, "D203" 또는 "Asp203"이란 도 1 (서열 번호 1)에 제공된 서열에서의 위치 203에 있는 아스파르트산 잔기를 말하는 것이다.

용어 "Apo-2 리간드 세포외 도메인" 또는 "Apo-2 리간드 ECD"란 경막 및 세포질 도메인이 필수적으로 없는 Apo-2 리간드의 형태를 말한다. 통상, ECD는 1% 미만의 경막 및 세포질 도메인을 갖고, 바람직하게는 0.5% 미만의 이러한 도메인을 갖는다. 용어 "Apo-2 리간드 단량체" 또는 "Apo-2L 단량체"는 Apo-2L의 세포외 도메인 서열의 공유결합 사슬을 말하는 것이다.

용어 "Apo-2 리간드 이량체" 또는 "Apo-2L 이량체"는 디설파이드 결합을 통해 공유 결합으로 연결된 2개의 Apo-2L 단량체를 말하는 것이다. 여기에서 사용된 용어는 독립적인 Apo-2L 이량체 및 Apo-2L의 삼량체 형태내에 있는 Apo-2L 이량체 (즉, 다른 Apo-2L 단량체와 결합됨)를 포함한다.

용어 "Apo-2L 리간드 삼량체" 또는 "Apo-2L 삼량체"는 비-공유결합으로 결합된 3개의 Apo-2L 단량체를 말하는 것이다.

"TNF 과 요소"는, 넓은 의미로, 구조 또는 기능면에서 종양 괴사 인자(TNF)와 일부 유사성을 공유하는 여러 폴리펩티드들을 일컫기 위해 사용된다. TNF 과의 폴리펩티드와 연관된 일부 구조적 및 기능적 특징은 당 기술분야에 공지되어 있으며, 예를 들어 상기 본 발명의 배경기술 부분에 설명되어 있다. 이러한 폴리펩티드는 당 기술분야에서 TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ , CD40 리간드, CD30 리간드, CD27 리간드, OX-40 리간드, 4-1BB 리간드, Apo-1 리간드 (또한, Fas 리간드 또는 CD95 리간드라고도 불리워짐), Apo-2 리간드 (또한, TRAIL이라고도 불리워짐), Apo-3 리간드 (또한 TWEAK라고도 불리워짐), APRIL, OPG 리간드 (또한 RANK 리간드, ODF 또는 TRANCE 라고도 불리워짐) 및 TALL-1 (또한 BlyS, BAFF 또는 THANK라고도 불리워짐)으로 불리워지는 폴리펩티드들을 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다. [참조, 예를 들어 Gruss 및 Dower, Blood, 85:3378-3404 (1995); Pitti 등, J.Biol.Chem., 271:12687-12690 (1996); Wiley 등, Immunity, 3:673-682 (1995); Browning 등, Cell, 72:847-856 (1993); Armitage 등, Nature, 357:80-82 (1992), WO 97/01633 (1997년 1월 16일 공개); WO 97/25428 (1997년 7월 17일 공개); Marsters 등, Curr.Biol., 8:525-528 (1998); Chicheportiche 등, Biol.Chem., 272:32401-32410 (1997); Hahne 등, J.Exp.Med., 188:1185-1190 (1998); WO 98/28426 (1998년 7월 2일 공개); WO 98/46751 (1998년 10월 22일 공개); WO 98/18921 (1998년 5월 7일 공개); Moore 등, Science, 285:260-263 (1999); Shu 등, J.Leukocyte Biol., 65:680 (1999); Schneider 등, J.Exp.Med., 189:1747-1756 (1999); Mukhopadhyay 등, J.Biol.Chem., 274:15978-15981 (1999) 참조].

여기에서 사용된 용어 "태그화(tagged) 에피토프"란 "태그(tag) 폴리펩티드"에 융합된 Apo-2 리간드 또는 그의 일부를 포함하는 키메라 폴리펩티드를 일컫는 것이다. 태그 폴리펩티드는, 항체가 형성될 수 있는 에피토프를 제공하기에 충분하지

만 Apo-2 리간드의 활성을 방해하지 않을 정도로 충분히 짧은 잔기를 갖는다. 또한, 태그 폴리펩티드는 바람직하게는 상당히 특유하므로, 항체가 다른 에피토프와 실질적으로 교차 반응하지 않는다. 적절한 태그 폴리펩티드는 일반적으로 6개 이상의 아미노산 잔기, 통상 약 8 내지 약 50 개의 아미노산 잔기 (바람직하게는, 약 10 내지 약 20 개 잔기)를 갖는다.

용어 "2가 금속 이온"이란 2개의 양 전하를 가진 금속 이온을 일컫는 것이다. 본 발명에서 사용하기 위한 2가 금속 이온의 예는 아연, 코발트, 니켈, 카드뮴, 마그네슘 및 망간을 포함하지만, 이에 한정되지는 않는다. 사용될 수 있는 이러한 금속의 특정한 형태는 상기 언급된 2가 금속 이온의 염산염, 아세트산염, 탄산염, 시트르산염 및 황산염 형태와 같은 염 형태 (예를 들어, 제약학적으로 허용가능한 염 형태)를 포함한다. 본 발명에서 사용하기 위해 바람직한 2가 금속 이온은 아연, 더욱 바람직하게는 염 형태인 황산아연이다. 여기에 기재된 2가 금속 이온은 바람직하게는 예를 들어 (1) 원하는 기간에 걸쳐 Apo-2L 삼량체의 저장 안정성을 향상시키거나, (2) 재조합 세포 배양물 또는 정제 방법에서 Apo-2L 삼량체의 생성 또는 수율을 향상시키거나, (3) Apo-2L 삼량체의 용해도를 증가 (또는 응집을 감소)시키거나, 또는 (4) Apo-2L 삼량체 형성을 증가시키기에 충분한 농도 또는 양 (예를 들어, 유효량)으로 사용된다.

본 명세서에 개시된 여러 단백질을 설명하기 위해 사용될 때, "단리된"이란 그의 자연 환경의 성분으로부터 동정 및 분리되고 (되거나) 회수된 단백질을 의미한다. 그의 자연 환경의 오염 성분은 전형적으로 단백질을 위한 진단 또는 치료 용도를 방해하는 물질이고, 이는 효소, 호르몬 및 기타 단백질성 또는 비-단백질성 용질을 포함할 수도 있다. 바람직한 구현양태에서, 단백질을 (1) 회전 겔 서열분석기를 사용하여 N-말단의 15개 이상 잔기 또는 내부 아미노산 서열을 획득하기에 충분한 정도까지, 또는 (2) 쿠마시에(Coomassie) 블루 또는 바람직하게는 은 염색을 사용하여 비-환원 또는 환원 조건하에서 SDS-PAGE에 의해 균질한 정도까지 정제한다. 단리된 단백질은, Apo-2 리간드 자연 환경에 적어도 하나의 성분이 존재하지 않기 때문에, 재조합 세포내에서 원 위치에 단백질을 포함한다. 그러나, 통상, 단리된 단백질은 하나 이상의 정제 단계에 의해 제조된다.

"단리된" Apo-2 리간드 핵산 분자는, Apo-2 리간드 핵산의 천연 원천에서 통상 연관되는 하나 이상의 오염 핵산으로부터 동정 및 분리된 핵산 분자이다. 단리된 Apo-2 리간드 핵산 분자는 자연에서 발견되는 형태 또는 상태 이외의 것이다. 따라서, 단리된 Apo-2 리간드 핵산 분자는 그것이 천연 세포에 존재할 때의 Apo-2 리간드 핵산 분자와 구별된다. 그러나, 단리된 Apo-2 리간드 핵산 분자는, 예를 들어 핵산 분자가 천연 세포의 것과 상이한 염색체 위치에 존재하는 경우, 통상 Apo-2 리간드를 발현하는 세포에 함유된 Apo-2 리간드 핵산 분자를 포함한다.

본 발명에서 동정된 서열에 있어서 "퍼센트(%) 아미노산 서열 동일성"은, 필요한 경우 최대 % 서열 동일성을 달성하기 위해 서열을 정렬하고 간극을 도입한 후에, Apo-2 리간드 서열내의 아미노산 잔기와 동일한 후보 서열에 있는 아미노산 잔기의 퍼센트로서 정의되며, 이때 보존적 치환은 서열 동일성의 일부로서 인정되지 않는다. 퍼센트 아미노산 서열 동일성을 결정하기 위한 정렬은, 비교되는 전체-길이 서열상에서 최대의 정렬을 얻기 위해 필요한 계산법을 배정하는 것을 포함하여, 정렬을 측정하기 위해 적절한 매개변수를 결정할 수 있는 당 분야의 기술 범위내의 다양한 방식으로 달성될 수 있다. 여기에서는 이 목적을 위하여, 서열 비교 컴퓨터 프로그램인 게네테크 인코포레이티드 (Genentech, Inc.)에 의해 만들어진 ALIGN-2, 및 미국 워싱턴 디시 20559의 US 저작권 사무소에서 사용자 참고서류로 제출되고 미국 저작권 등록번호 TXU510087로 등록된 원시코드를 사용하여, 퍼센트 아미노산 동일성 값을 구할 수 있다. ALIGN-2 프로그램은 미국 캘리포니아주 사우스 샌프란시스코의 게네테크 인코포레이티드를 통해 공개적으로 입수가 가능하다. 모든 서열 비교 매개변수는 ALIGN-2 프로그램에 의해 설정되며 변화되지 않는다.

용어 "조절 서열"이란 특정 숙주 유기체에서 작동적으로 연결된 코딩 서열의 발현에 필요한 DNA 서열을 말한다. 원핵세포에 적절한 조절 서열은 예를 들어 프로모터, 임의로 오퍼레이터 서열, 및 리보솜 결합 부위를 포함한다. 진핵 세포는 프로모터, 폴리아데닐화 시그널 및 인핸서를 이용하는 것으로 공지되어 있다.

핵산은 다른 핵산 서열과 기능적 관계에 놓일 때 "작동적으로 결합된" 것이다. 예를 들어, 예비서열 또는 분비 리더를 위한 DNA는, 이것이 폴리펩티드의 분비에 참여하는 예비단백질로서 발현된다면, 폴리펩티드를 위한 DNA에 작동적으로 연결된 것이고; 프로모터 또는 인핸서는 이것이 서열의 전사에 영향을 미친다면 코딩 서열에 작동적으로 연결된 것이고; 또는 리보솜 결합 부위는 이것이 번역을 촉진하기 위해 위치할 경우 코딩 서열에 작동적으로 연결된 것이다. 일반적으로, "작동적으로 연결된"이란, 연결되는 DNA 서열이 인접해 있고 분비 리더의 경우에는 해독 단계에서 인접해 있음을 의미하는 것이다. 그러나, 인핸서는 인접해 있어서는 안된다. 편리한 제한효소 부위에서의 결합에 의해 연결이 이루어진다. 이러한 부위가 존재하지 않는다면, 합성 올리고뉴클레오타이드 어댑터 또는 링커가 통상적인 방식에 따라 사용된다.

본 명세서에서의 목적을 위한 "생물학적으로 활성화" 또는 "생물학적 활성화"는 (a) 생체내 또는 생체외에서 하나 이상의 포유동물 암 세포 또는 바이러스-감염 세포 유형의 아포토시스를 유도 또는 자극하는 능력을 갖거나; (b) 항체를 유발할 수 있는, 다시말해서 면역원성이거나; (c) Apo-2L에 대한 수용체를 결합 및/또는 자극할 수 있거나; 또는 (d) 천연 또는 자연 발생 Apo-2L 폴리펩티드의 활성을 보유하는 것을 의미한다.

용어 "아포토시스" 및 "아포토시스 활성화"는 넓은 의미로 사용되며, 전형적으로 세포질의 응축, 혈장 막 미소융모의 소실, 핵의 분절화, 염색체 DNA의 붕괴 또는 미토콘드리아 기능의 소실을 포함하여, 하나 이상의 특징적인 세포 변화를 수반하는 포유동물에서의 규칙적 또는 조절된 형태의 세포 사멸을 일컫는 것이다. 이러한 활성화는 예를 들어 세포 생존율 분석, FACS 분석 또는 DNA 전기영동에 의해 결정 및 측정될 수 있다.

용어 "암", "암성" 또는 "악성"이란, 전형적으로 조절되지 않는 세포 성장을 특징으로 하는 포유동물에서의 생리적 상태를 일컫거나 설명하는 것이다. 암의 예는 암종, 림프종, 백혈병, 아세포종 및 육종을 포함하지만, 이에 한정되지는 않는다. 이러한 암의 더욱 특별한 예는 편평세포암종, 소-세포 폐암, 비-소 세포 폐암, 신경교종, 위장암, 신장암, 난소암, 간암, 결장직장암, 자궁내막암, 신장암, 전립선암, 갑상선암, 신경아세포종, 췌장암, 다형성교아종, 경부암, 위암, 방광암, 간암, 유방암, 결장암, 및 머리와 목의 암을 포함한다.

여기에서 사용된 용어 "치료하는", "치료" 및 "치료법"은 치유 요법, 예방 요법 및 방지 요법을 말하는 것이다.

여기에서 사용된 용어 "포유동물"이란 인간, 소, 말, 개 및 고양이를 포함하여 포유동물로서 분류되는 임의의 포유동물을 말하는 것이다. 본 발명의 바람직한 구현양태에서, 포유동물은 인간이다.

## II. 본 발명의 조성물 및 방법

TNF 리간드 과에 관련된 신규의 사이토카인, 즉 여기에서 "Apo-2 리간드"로 동정된 사이토카인이 기재되어 있다. 인간 Apo-2 리간드의 예측된 성숙 아미노산 서열은 281개 아미노산을 함유하며, 약 32.5 kDa의 계산된 분자량을 갖는다. 시그널 서열의 부재 및 내부 소수성 영역의 존재는, Apo-2 리간드가 유형 II 경막 단백질임을 시사하는 것이다. 가용성 세포의 도메인 Apo-2 리간드 폴리펩티드가 또한 기재되어 있다. 예를 들어, 1997년 7월 17일 공개된 WO 97/25428호 참조. Apo-2L 치환 변이체가 더욱 기재되어 있다. 생물학적 활성을 가진 다양한 치환 변이체 분자를 동정하기 위해 알라닌 스캐닝 기술이 이용되었다. Apo-2 리간드의 특정한 치환 변이체는, 하나 이상의 아미노산이 알라닌 잔기에 의해 치환된 것을 포함한다. 이러한 치환 변이체는 예를 들어 "D203A", "D218A" 및 "D269A"로 동정된다. 이러한 명명법은, 위치 203, 218 및/또는 269 (도 1 (서열 번호 1)에 나타난 번호매김을 사용)에서의 아스파르트산 잔기가 알라닌 잔기로 치환된 Apo-2 리간드 변이체를 나타내기 위해 사용된다. 임의로, Apo-2L 변이체는 하기 표 I에 열거된 하나 이상의 알라닌 치환을 포함할 수도 있다.

Apo-2 리간드의 세포의 도메인의 X-선 결정 구조가 본 발명에서 제공되며, 그의 수용체 접촉 영역의 지도를 제공하기 위해 알라닌-스캐닝 돌연변이유발을 수행하였다. Apo-2 리간드에 대해 수득된 구조는, 동중삼량체 단백질이, Apo-2 리간드 삼량체 분자의 3개 소단위의 상호작용을 조정하는 신규의 2가 금속 이온 (아연)을 함유하고 있음을 드러낸다.

Apo-2L의 X-선 구조는 TNF-알파의 모델을 사용하여 분자 치환에 의해 결정되며 [Eck 등, *J.Biol.Chem.*, 264:17595-17605 (1989)], 3.9 Å (114-281 잔기 형태) 및 1.3 Å (D218A 변이체에 대해; 91-281 형태)으로 세분된다. TNF 과의 다른 요소와 유사하게, Apo-2L은 구상 삼량체를 형성하기 위해 대략 5100 Å<sup>2</sup> (단량체 당 1700 Å<sup>2</sup>)을 차지하는 3개의 젤리 롤 단량체로 이루어진 조밀한 삼량체를 포함하는 것으로 보인다. 코어 베타-스트랜드의 위치는 TNF 과의 다른 구조적으로 특징화된 요소들인 TNF-알파 [Eck 등, 상동; Jones 등, *Nature*, 338:225-228 (1989)], TNF-베타 [Eck 등, *J.Biol.Chem.*, 267:2119-2122 (1992)], 및 CD40L [Karpusas 등, *Structure*, 3:1031-1039 (1995)]에 비해 더욱 잘 보존되었으며, TNF-알파 또는 TNF-베타의 코어 스트랜드에 비해 0.8 Å의 r.m.s.d.를 갖는다. Apo-2L 삼량체 계면에서의 어느 잔기도, 현재 공지되어 있는 모든 인간 TNF 과 요소의 서열에 대해 절대적으로 보존된 것으로 보이지 않는다; 그러나, 이러한 잔기의 소수성 화학 특성은 보존된다 (도 3 참조). Apo-2L 삼량체 계면에서의 보존된 잔기는 염기 근처 (삼량체의 가장 넓은 부분)와 3점 축을 따라 집괴를 이룬다. Cys230의 주변에 있는 Apo-2L 삼량체 계면의 꼭대기 근처에서, 구조물이 분기하는 것으로 보이고, 190과 230의 루프의 입체배치는 각각의 구조에서 변화될 수 있다.

베타-스캐폴드(scaffold) 코어와 반대로, 루프 및 수용체 결합 표면의 구조는 TNF 과 요소들 중에서 상당히 다양하다. Apo-2 리간드의 구조와 TNF-알파, TNF-베타 및 CD40L의 구조 사이의 한가지 차이는 스트랜드 A 및 A' 사이의 연결이

다. TNF-알파, TNF-베타 및 CD40L에서, 스트랜드 A 다음에 조밀한 루프가 존재한다. Apo-2 리간드에서, 15-잔기 삽입은 이 루프를 길게하고 그의 입체배치를 변경시킨다. 루프의 첫번째 부분 (잔기 131-141)은 불규칙적인 반면, 루프의 두번째 부분 (잔기 142-154)은 하나의 단량체-단량체 계면으로부터의 분자의 표면을 그의 C-말단 부위에서 CD40L과 비슷한 입체배치를 가진 그 다음의 것 (도 2A 참조)에 교차시킨다.

본 출원인은 놀랍게도, 신규의 2가 금속 이온 (아연) 결합 부위가 삼량체화 계면의 꼭대기 근처에 묻혀있음을 알아내었다. TNF 과 요소들은 서열 분석에 의해 Cys230에 대해 3개의 군: (1) Cys230에 상응하는 위치에서의 시스테인 잔기가, 금속 이온과의 상호작용을 방해하는 디설파이드 다리결합을 형성할 수 있는 인접한 루프 (Apo-2L에서의 194-203 루프)에 있는 다른 시스테인을 동반하는, TNF-알파 및 Fas 리간드와 같은 단백질, (2) Cys230에 상응하는 시스테인을 갖지않은 단백질 (예컨대, TNF-베타 및 OPGL), 및 (3) Cys 230에 상응하는 단지 한 개의 시스테인 잔기를 갖는 단백질로 나뉘어질 수 있다. Apo-2L 및 다른 종에서의 그의 오르소그는 후자의 기준 (다시말해서, 단지 Cys230만을 갖는 단백질)을 충족하며, 삼량체 표면에서 2가 금속 이온을 결합하는 것으로 기대된다. Apo-2L에서 Cys230 바로 앞의 주 사슬의 입체배치는, TNF-알파 및 CD40L과 같은 TNF 과 요소를 함유한 디설파이드와는 상이하다. Apo-2L에서, Cys230의 부 사슬은 그것으로부터 떨어진 대신에 계면을 향해 배향된다.

각각의 Apo-2L 단량체에서의 Cys230 잔기는 삼량체 축을 향해 안쪽으로 위치하며, 내부 용매 분자와 함께 2가 금속 이온을 배위한다. 이러한 2가 금속 이온 결합 부위는 아연 결합 부위에 적절한 결합 및 각을 가진 약간 뒤틀린 사면체 형태를 나타내며, 용매가 전혀 접근할 수 없다 (도 2B 참조). 결합된 금속의 정체는 유도적 커플링된 플라즈마 원자 방출 분광법 (ICP-AES)을 사용하여 확인되었다 (실시예 5 참조). ICP-AES를 사용한 Cd, Co, Zn, Ni 및 Cu에 대한 정량 분석에서, Apo-2L 삼량체 분자 당 0.79몰의 Zn 및 0.06몰의 Co가 검출되었으며, 이는 그 구조에서 결합된 이온이 대략 1 대 1 몰비의 아연임을 증명하는 것이다 (실시예 5 참조). 이러한 부위의 중요성은, Cys230의 알라닌 치환에 의해 8배 이상의 저하된 아포토시스 활성이 얻어진다는 관찰에 의해 증명되었다 (실시예 7 참조). 더욱이, 킬레이트화 시약에 대한 투석에 의해 Apo-2L로부터 결합된 금속을 제거하면, DR5 친화력에서 7배 감소되고 아포토시스 활성에서 90 배 이상 저하되는 결과가 얻어졌다 (실시예 6 참조). Zn의 제거시에, 시스테인은 산화되기 쉬워지고, 저하된 아포토시스 활성을 가진 디설파이드-결합된 Apo-2L 이량체가 형성되었다. 금속 결합 부위가 Apo-2L 삼량체 구조내에 묻혀있는 것으로 보이고 수용체를 접촉하는 것으로 기대되지 않기 때문에, 데이트는 2가 금속 이온 결합이 삼량체 구조 및 Apo-2L의 안정성을 유지시키는데 중요할 수도 있음을 시사한다.

Apo-2 리간드의 수용체 결합 부위를 지도화하기 위하여, 수용체 결합 및 생물학적 활성을 위해 중요한 아미노산 잔기를 알라닌-스캐닝 돌연변이유발에 의해 동정하였다 [Cunningham 등, *Science*, 244:1081-1085 (1989)]. Arg149, Gln205, Val207, Tyr216, Glu236 또는 Tyr237에서의 단일 알라닌 치환은, 생물분석시에 아포토시스 활성에 있어서 5-배 이상의 저하를 일으켰으며, 수용체에 대한 저하된 친화력을 나타내었다 (실시예 3 및 4 참조). DR4, DR5 및 DcR2에 대한 Apo-2L 결합은 잔기 Gln205, Tyr216, Glu236 또는 Tyr237에서 알라닌 치환에 의해 가장 영향을 많이 받았으며, 이에 의해 모든 3개의 수용체에 대해 5-배 이상 저하된 친화력이 얻어졌다. 감소된 아포토시스 활성을 가진 모든 변이체들은 DR4 또는 DR5 (또는 양쪽 모두)에 대해 손상된 결합을 나타내었으며, 이는 아포토시스 활성을 위해서는 수용체 결합이 요구됨을 시사하는 것이다.

잔기 Asp218 및 Asp269에서의 알라닌 치환에 의해, 증가된 아포토시스 활성을 가진 Apo-2L 변이체가 얻어졌다 (실시예 4 참조). 잔기 Asp218은 아포토시스 활성을 위해 필요한 잔기중의 하나인 Tyr216 근처에 위치한다. 저 분할 Apo-2L 구조 (114-281 형태)에 대한 비교는, 216-220 루프의 입체배치가 D218A 돌연변이의 존재에 의해 상당히 변화되는 것으로 보이지 않음을 시사하는 것이다.

돌연변이유발 분석 결과를 Apo-2L 삼량체 구조로 지도화할 때, 수용체 결합 및 생물학적 활성을 위한 Apo-2L 상의 기능적 에피토프는, TNF-β에 유사한 2개의 단량체 (도 5 참조)의 결합에 의해 형성된 표면 위에 존재하는 것으로 밝혀졌다. 단량체-단량체 계면에서의 얇은 홈은 양쪽 단량체와 함께 결합 부위에 기여하는 수용체 결합 부위를 형성한다. TNF-α에서의 잔기 Arg32, Tyr87, 및 Asp143 (Apo-2L 잔기 Arg158, Tyr216 및 Asp267에 상응)은 또한 TNF 수용체 결합에 기여한다 [Goh 등, *Protein Engineering*, 4:785-791 (1991)]. 반대로, TNF-α의 잔기들 (Apo-2L의 Gln205, Glu236 및 Tyr237에 상응)은 TNFR 결합에서 단지 작은 역할만을 한다. 따라서, TNF-α에 있어서, 삼량체 구조의 기저가 수용체 결합에 가장 중요하게 기여하는 반면, Apo-2L에서는, 중요한 수용체 결합 잔기가 삼량체 구조의 꼭대기에 존재한다. Apo-2L은, 그의 표적 수용체와의 상호작용을 위해 더욱 크고 더욱 연장된 접촉면을 갖고 있다는 점에서, 공지된 구조의 TNF 과 요소들 중에서 독특한 것으로 보인다. 바람직한 Apo-2L 변이체는 Arg149, Gln205, Val207, Tyr216, Glu236 및/또는 Tyr237에 상응하는 위치에서 천연 잔기 (다시말해서 변이되지 않은 잔기)를 포함하는 것으로 생각된다.

하기 설명은 Apo-2 리간드 코딩 핵산을 함유하는 벡터로 형질전환 또는 형질이입된 숙주 세포를 배양하고, 세포 배양물로부터 폴리펩티드를 회수함으로써 Apo-2 리간드를 제조하는 방법에 관한 것이다.

Apo-2 리간드를 코딩하는 DNA는, Apo-2 리간드 mRNA를 갖고 있고 검출가능한 수준으로 그것을 발현시키는 것으로 생각되는 조직으로부터 제조된, 임의의 cDNA 라이브러리로부터 수득될 수 있다. 따라서, 인간 Apo-2 리간드 DNA는 인간 조직으로부터 제조된 cDNA 라이브러리, 예컨대 WO 97/25428에 기재된 인간 태반 cDNA의 박테리오파지 라이브러리로부터 편리하게 얻어질 수 있다. 또한, Apo-2 리간드-코딩 유전자는 게놈 라이브러리로부터 또는 올리고뉴클레오티드 합성에 의해 수득될 수도 있다.

라이브러리는 해당 유전자 또는 그에 의해 코딩되는 단백질을 동정하기 위해 고안된 프로브 (예컨대, Apo-2 리간드에 대한 항체 또는 적어도 약 20-80 염기의 올리고뉴클레오티드)로 선별될 수 있다. 선택된 프로브에 의한 cDNA 또는 게놈 라이브러리의 선별은 표준 절차, 예컨대 문헌 [Sambrook 등, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)]에 기재된 절차를 사용하여 수행될 수 있다. Apo-2 리간드를 코딩하는 유전자를 단리하기 위한 대안적인 수단은 PCR 방법을 사용하는 것이다 [Sambrook 등, 상동; Dieffenbach 등, PCR Primer: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995)].

Apo-2 리간드의 아미노산 서열 단편 또는 변이체는, 적절한 뉴클레오티드 변화를 Apo-2 리간드 DNA내에 도입하거나, 또는 원하는 Apo-2 리간드 폴리펩티드의 합성에 의해 제조될 수 있다. 이러한 단편 또는 변이체는 세포내 영역, 경막 영역 또는 세포외 영역 내에서 또는 그의 한쪽 또는 양쪽 말단에서 잔기의 삽입, 치환 및/또는 결실을 나타내거나, 또는 도 1 (서열 번호 1)에서 전체 길이 Apo-2 리간드에 대해 나타난 아미노산 서열의 삽입, 치환 및/또는 결실을 나타낸다. 최종 구축물이 예를 들어 본 명세서에 정의된 바람직한 생물학적 활성 또는 아포토시스 활성을 갖는 한, 삽입, 치환 및/또는 결실의 임의의 조합을 행하여 최종 구축물을 얻을 수 있다. 바람직한 구현양태에서, 단편 또는 변이체는 Apo-2 리간드의 세포내, 경막 또는 세포외 도메인에 대해 여기에서 동정된 서열 또는 Apo-2 리간드의 전체 길이 서열과 약 80% 이상의 아미노산 서열 동일성, 더욱 바람직하게는 약 90% 이상의 서열 동일성, 더욱 더 바람직하게는 적어도 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 서열 동일성을 갖는다. 또한, 아미노산 변화는 Apo-2 리간드의 번역후 프로세싱을 변경시킬 수도 있으며, 예를 들어 글리코실화의 수 또는 위치를 변화시키거나 막 고정 특징을 변경시킬 수도 있다.

상기 기재된 Apo-2 리간드 서열에서의 변이는, 미국 특허 5,364,934호에 개시된 보존적 및 비-보존적 돌연변이를 위한 기술 및 지침을 사용하여 이루어질 수 있다. 이들은 올리고뉴클레오티드-매개 (부위-특이적) 돌연변이유발, 알라닌 스캐닝 및 PCR 돌연변이유발을 포함한다.

인접 서열을 따라 하나 이상의 아미노산을 동정하기 위해 스캐닝 아미노산 분석을 사용할 수 있다. 바람직한 스캐닝 아미노산은 비교적 작고 중성인 아미노산이다. 이러한 아미노산은 알라닌, 글리신, 세린 및 시스테인을 포함한다. 이 군 중에서 알라닌이 전형적으로 바람직한 스캐닝 아미노산인데, 그 이유는 이것은 베타-탄소 이외의 측쇄를 제거하고 변이체의 주쇄 입체배치를 덜 변경시키기 때문이다 [Cunningham 등, Science, 244:1081 (1989)]. 또한, 알라닌이 전형적으로 바람직한데, 그 이유는 가장 일반적인 아미노산이기 때문이다. 또한, 이것은 묻혀있고 노출된 위치 양쪽 모두에서 종종 발견된다 [Creighton, The Proteins (W.H.Freeman & Co., NY); Chothia, J.Mol.Biol., 150:1 (1976)].

본 발명의 특별한 Apo-2L 변이체는 하기 표 I에 제공된 하나 이상의 열거된 알라닌 치환을 포함하는 Apo-2L 폴리펩티드를 포함한다. 이러한 Apo-2L 변이체는 전형적으로 적어도 하나 이상의 아미노산에서 천연 Apo-2L 아미노산 서열 (예컨대, Apo-2L의 전체 길이 또는 성숙한 형태 또는 그의 세포외 도메인 서열에 대하여 도 1: 서열 번호 1에서 제공된 것)과는 상이한 비-자연 발생 아미노산 서열을 포함한다. 임의로, 천연 Apo-2L에 비해, Apo-2L 변이체에서 상이한 하나 이상의 아미노산들은 표 I에 나타난 것과 같은 아미노산 치환(들)을 포함한다. 본 발명의 Apo-2L 변이체들은 도 1 (서열 번호 1)의 잔기 91-281, 92-281, 95-281 또는 114-281을 포함하고 표 I에 열거된 하나 이상의 아미노산 치환을 갖는 가용성 Apo-2L 변이체를 포함한다. 바람직한 Apo-2L 변이체들은 도 1 (서열 번호 1)의 잔기 91-281, 92-281, 85-281 또는 114-281을 포함하고, 수용체 결합과 같은 생물학적 활성을 향상시키는 표 I에 열거된 하나 이상의 아미노산 치환을 갖는 변이체를 포함한다.

본 발명의 범위에 포함된 Apo-2 리간드 서열에서의 변이는 아미노-말단 유도체 또는 변형된 형태에 관한 것이다. 이러한 Apo-2 리간드 서열은, 폴리펩티드 서열의 N-말단에서, 메티오닌 또는 변형된 메티오닌 (예컨대, 포르밀 메티오닐 또는 기타 봉쇄된 메티오닐 중)을 갖는 본 명세서에 기재된 임의의 Apo-2 리간드 폴리펩티드를 포함한다.



천연 또는 변이 Apo-2 리간드를 코딩하는 핵산 (예, cDNA 또는 게놈 DNA)은 추가의 클로닝을 위해 (DNA의 증폭) 또는 발현을 위해 복제가능한 벡터내에 삽입될 수도 있다. 다양한 벡터들이 공개적으로 입수가능하다. 벡터 성분들은 일반적으로 하나 이상의 하기 성분: 시그날 서열, 복제 개시점, 하나 이상의 마커 유전자, 인핸서 원소, 프로모터 및 전사 종료 서열 (이들의 각각은 하기에 설명된다)을 포함하지만 이에 한정되지는 않는다. 사용될 수도 있는 임의의 시그날 서열, 복제 개시점, 마커 유전자, 인핸서 원소 및 전사 터미네이터 서열은 당 기술분야에 공지되어 있으며, WO 97/25428호에 더욱 상세히 설명되어 있다.

발현 및 클로닝 벡터는, 통상 숙주 유기체에 의해 인식되고 Apo-2 리간드 핵산 서열에 작동적으로 연결된 프로모터를 함유한다. 프로모터는, 이들이 작동적으로 연결된 특정한 핵산 서열, 예컨대 Apo-2 리간드 핵산 서열의 전사 및 번역을 조절하는 구조 유전자(일반적으로, 약 100 내지 1000 bp 이내)의 개시 코돈에 대해 상류 (5')에 위치하는 비번역 서열이다. 이러한 프로모터는 전형적으로 2개 부류, 즉 유도성 및 구성성으로 나뉜다. 유도성 프로모터는 일부 배양 조건의 변화, 예를 들어 영양분의 존재 또는 부재 또는 온도의 변화에 대한 반응에서 그들의 조절하에 DNA로부터 증가된 수준의 전사를 개시시키는 프로모터이다. 현재, 다양한 잠재적인 숙주 세포에 의해 인식되는 다수의 프로모터가 공지되어 있다. 이러한 프로모터들은, 제한효소 소화에 의해 원천 DNA로부터 프로모터를 제거하고 단리된 프로모터 서열을 벡터내에 삽입함으로써, Apo-2 리간드 코딩 DNA에 작동적으로 연결된다. 천연 Apo-2 리간드 프로모터 서열 및 다수의 이중 프로모터 양쪽모두가 Apo-2 리간드 DNA의 증폭 및/또는 발현을 지시하기 위해 사용될 수도 있다.

원핵 및 진핵 숙주에서 사용하기에 적절한 프로모터들이 당 기술분야에 공지되어 있으며, WO 97/25428호에 더욱 상세히 기재되어 있다.

이.콜리내에서 가용성 Apo-2L의 바람직한 제조 방법은, 생성물 발현의 조절을 위해 유도성 프로모터를 사용한다. 조절가능한 유도성 프로모터를 사용하면, 생성물 발현의 유도에 앞서 원하는 세포 밀도까지 세포를 생육시킬 수 있고, 숙주에 의해 허용되지 않을 수도 있는 상당한 양의 생성물을 축적할 수 있다.

본 출원인은, Apo-2L (형태 114-281)의 발현을 위해 3개의 유도성 프로모터 체계 (T7 폴리머라제, trp 및 알칼리성 포스파타제 (AP))를 평가하였다. 이러한 3개 프로모터의 각각을 사용하면, 상당한 양의 가용성, 생물학적 활성 Apo-2L 삼량체가 수집된 세포 페이스트로부터 회수된다. 시험된 이들 3개의 유도성 프로모터 체계 중에서 AP 프로모터가 바람직한데, 그 이유는 수집된 세포 페이스트에서 더욱 엄격한 프로모터 조절 및 더욱 높은 세포 밀도와 역가가 얻어지기 때문이다.

하나 이상의 상기 기재된 성분들을 함유하는 적절한 벡터들은 표준 결찰 기술을 사용하여 구축된다. 단리된 플라스미드 또는 DNA 단편을 절단하고, 맞추고, 필요한 플라스미드를 생성하기에 바람직한 형태로 재-결찰시킨다.

구축되는 플라스미드내의 정확한 서열을 확인하기 위한 분석을 위해, 결찰 혼합물을 사용하여 이.콜리 K12 균주 294 (ATCC 31,446)을 형질전환시킬 수 있고, 적절하다면, 암피실린 또는 테트라사이클린 내성에 의해 성공적인 형질전환체를 선택할 수 있다. 형질전환체로부터의 플라스미드를 제조하고, 제한 엔도뉴클레아제 소화에 의해 분석하고(하거나), 당 기술분야에 공지된 표준 기술을 사용하여 서열결정한다 (예를 들어 문헌 [Messing 등, Nucleic Acids Res., 9:309 (1981); Maxam 등, Methods in Enzymology, 65: 499 (1980)] 참조).

포유동물 세포에서 DNA 코딩 Apo-2 리간드의 일시적 발현을 제공하는 발현 벡터가 사용될 수도 있다. 일반적으로, 일시적 발현은 숙주 세포에서 효율적으로 복제될 수 있는 발현 벡터의 사용과 관련되며, 그 결과 숙주 세포는 발현 벡터의 다수의 카피를 축적하고 다시말해서 발현 벡터에 의해 코딩되는 다량의 목적하는 폴리펩티드를 합성한다 [Sambrook 등, 상동]. 적절한 발현 벡터 및 숙주 세포를 포함하는 일시적 발현 체계는, 클로닝된 DNA에 의해 코딩된 폴리펩티드를 편리하게 분명히 동정할 수 있도록 할 뿐만 아니라, 원하는 생물학적 또는 생리적 성질을 가진 폴리펩티드를 빠르게 선별할 수 있도록 한다. 따라서, 생물학적 활성 Apo-2 리간드인 Apo-2 리간드의 유사체 및 변이체를 동정하는 목적을 위해서, 일시적 발현 체계가 본 발명에서 특히 유용하다.

재조합 척추동물 세포 배양물에서 Apo-2 리간드의 합성에 적용하기에 적합한 다른 방법, 벡터 및 숙주 세포가 문헌 [Gething 등, Nature, 293:620-625 (1981); Mantei 등, Nature, 281:40-46 (1979); EP 117,060 및 EP 117,058]에 기재되어 있다.

벡터에서 DNA를 클로닝 또는 발현하기에 적합한 숙주 세포는 원핵세포, 효모 또는 고등 진핵 세포를 포함한다. 이러한 목적을 위해 적절한 원핵세포는 그람-음성 또는 그람-양성 유기체와 같은 진성세균, 예를 들어 엔테로박테리아세 (Enterobacteriaceae), 예컨대 에스케리키아(Escherichia) (예. 이.콜리), 엔테로박터(Enterobacter), 에르위니아



(Erwinia), 클레브시엘라(Klebsiella), 프로테우스(Proteus), 살모넬라(Salmonella) (예, 살모넬라 타이피무리움(Salmonella typhimurium)), 세라티아(Serratia) (예, 세라티아 마르세스칸스(Serratia marcescans)) 및 시겔라(Shigella), 뿐만아니라 바실리(Bacilli), 예컨대 바실러스 서브틸리스(B.subtilis) 및 바실러스 리케니포르미스(B.licheniformis) (예, 1989년 4월 12일 공개된 DD 266,710호에 개시된 B.리케니포르미스 41P), 슈도모나스(Pseudomonas), 예컨대 P.아에루기노사(P.aeruginosa) 및 스트렙토마이세스(Streptomyces)를 포함하지만, 이에 한정되지는 않는다. 바람직하게는, 숙주 세포는 최소량의 단백질을 분비해야 한다.

이.콜리는 본 발명에서 사용하기 위해 바람직한 숙주 세포이다. 이.콜리는 특히 글리코실화 요건을 갖지 않는 20kd 크기 이하의 폴리펩티드인 Apo-2 리간드 (형태 114-281)의 발현을 위해 특히 적합하다. 생산 숙주로서, 이.콜리는 비교적 높은 세포 밀도로 배양될 수 있으며, 비교적 다량의 이중 단백질을 생성할 수 있다.

원핵세포 이외에도 추가로, 사상진균 또는 효모와 같은 진핵 미생물이 Apo-2 리간드-코딩 벡터를 위해 적절한 클로닝 또는 발현 숙주이다. 글리코실화 Apo-2 리간드의 발현을 위해 적합한 숙주 세포는 다세포 유기체로부터 유래된다. CHO 세포를 포함하여, 이러한 모든 숙주 세포의 예가 WO 97/25428호에 더욱 기재되어 있다.

숙주 세포를 형질이입하고 바람직하게는 Apo-2 리간드 생성을 위해 상기 기재된 발현 또는 클로닝 벡터로 형질전환시키고, 적절한 경우 프로모터의 도입을 위해 변형된 영양 배지중에 배양시키고, 형질전환체를 선택하거나, 또는 원하는 서열을 코딩하는 유전자를 증폭시킨다.

형질이입이란, 임의의 코딩 서열이 사실상 발현되든지 아니든지간에, 숙주 세포에 발현 벡터가 도입되는 것을 말한다. 다수의 형질이입 방법, 예를 들어  $CaPO_4$  및 일렉트로포레이션(electroporation)이 당업자에게 공지되어 있다. 숙주 세포내에서 이러한 벡터의 작동의 징후가 일어날 때, 일반적으로 성공적인 형질이입으로 인정된다.

형질전환이란, 유기체내에 DNA를 도입시켜 염색체의 요소로서 또는 염색체 필수요소에 의해 DNA를 복제시키는 것을 의미한다. 사용되는 숙주 세포에 의존하여, 이러한 세포에 적절한 표준 기술을 사용하여 형질전환을 수행한다. 원핵세포 또는 실질적으로 세포벽 장벽을 함유하는 다른 세포를 위하여, 문헌 [Sambrook 등, 상동]에 기재된 것과 같은 염화칼슘을 사용하는 칼슘 처리법, 또는 일렉트로포레이션이 일반적으로 사용된다. 문헌 [Shaw 등, Gene, 23:315 (1983)] 및 WO 89/05859 (1989년 6월 29일 공개)에 기재된 바와 같이, 특정한 식물 세포의 형질전환을 위해서는 아그로박테리움 투메파시엔스로의 감염이 사용된다. 또한, 1991년 1월 10일 공개된 WO91/00358호에 기재된 바와 같이, 초음파 처리법을 사용하여 식물을 형질이입시킬 수도 있다.

이러한 세포벽을 갖지 않는 포유동물 세포를 위해서는, 문헌 [Graham 및 van der Eb, Virology, 52:456-457 (1978)]에 기재된 인산칼슘 침전법이 사용될 수도 있다. 포유동물 숙주 세포 체계 형질전환의 개략적인 측면은 미국 특허 4,399,216호에 기재되어 있다. 효모내로의 형질전환은 전형적으로 문헌 [Van Solingen 등, J.Bact., 130:946 (1977)] 및 [Hsiao 등, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 76:3829 (1979)]의 방법에 따라 수행된다. 그러나, 세포내로 DNA를 도입하기 위한 다른 방법, 예컨대 핵 미소주입법, 일렉트로포레이션, 비손상 세포와의 세균 원형질체 융합법, 또는 다량이온(polycation), 예를 들어 폴리브렌, 폴리오르니틴이 사용될 수도 있다. 포유동물 세포의 형질전환을 위한 다양한 기술에 관해서는 문헌 [Keown 등, Methods in Enzymology, 185:527-537 (1990)] 및 [Mansour 등, Nature, 336:348-352 (1988)]을 참조한다.

Apo-2 리간드를 생성하기 위해 사용되는 원핵 세포는 문헌 [Sambrook 등, 상동]에 일반적으로 기재된 바와 같이 적절한 배양 배지에서 배양될 수도 있다. 이.콜리를 배양하기 위해 사용될 수도 있는 배양 배지의 특정한 형태는 하기 실시예에 더욱 기재된다. Apo-2 리간드를 생성하기 위해 사용되는 포유동물 숙주 세포를 각종 배양 배지에서 배양할 수도 있다.

통상적으로 입수가가능한 배양 배지의 예는 햄스(Ham's)F10 (시그마(Sigma)), 최소 필수 배지 ("MEM", 시그마), RPMI-1640 (시그마) 및 둘베코의 개질된 이글스 배지 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium "DMEM", 시그마)를 포함한다. 이러한 배지들은 필요에 따라 호르몬 및/또는 기타 성장 인자 (예컨대 인슐린, 트랜스페린, 또는 표피 증식 인자), 염류 (예컨대 염화나트륨, 칼슘, 마그네슘, 및 인산염), 완충액 (예컨대 HEPES), 뉴클레오시드 (예컨대, 아데노신 및 티미딘), 항생 물질 (예컨대 겐타마이신(Gentamycin)<sup>TM</sup> 약물), 미량 원소 (통상 마이크로몰 범위에서 최종 농도로 존재하는 무기 화합물로서 정의됨), 및 글루코스 또는 균등한 에너지 원으로 보충될 수도 있다. 다른 필요한 보충성분들이 당업자에게 공지된 적절한 농도로 포함될 수도 있다. 배양 조건, 예컨대 온도, pH 등은 발현을 위해 선택된 숙주 세포에서 앞서 사용된 조건이며, 당업자에게 명백할 것이다.

일반적으로, 포유동물 세포 배양물의 생산성을 최대화하기 위한 원리, 프로토콜 및 실제 기술은 문헌 [Mammalian Cell Biotechnology: A Practical Approach, M.Butler, ed. (IRL Press, 1991)]에서 찾아볼 수 있다.

본 발명에 따르면, 하나 이상의 2가 금속 이온이 전형적으로 숙주 세포를 배양 또는 발효시키기 위한 배양 배지에 첨가되거나 포함될 것이다. 2가 금속 이온은 바람직하게는 저장 안정성을 향상시키거나, 용해도를 증가시키거나 또는 하나 이상의 아연 이온에 의해 배워진 안정한 Apo-2L 삼량체를 형성하는 것을 돕기에 충분한 농도로, 배양 배지에 존재하거나 여기에 첨가된다. 첨가될 수 있는 2가 금속 이온의 양은 부분적으로는 배양물 중의 숙주 세포 밀도 또는 2가 금속 이온에 대한 잠재적인 숙주 세포 감수성에 의존된다. 배양물 중의 더욱 높은 숙주 세포 밀도에서, 2가 금속 이온의 농도를 증가시키는 것이 유리할 수도 있다. 숙주 세포에 의한 생성물 발현 동안에 또는 그 후에 2가 금속 이온이 첨가된다면, 숙주 세포에 의한 생성물 발현이 증가함에 따라 2가 금속 이온 농도를 조절하거나 증가시키는 것이 바람직할 수도 있다. 일반적으로, 통상적으로 구입가능한 세포 배양 배지에 존재할 수도 있는 2가 금속 이온의 아주 적은 수준으로는 안정한 삼량체 형성을 이루는데 충분하지 않을 수 있는 것으로 생각된다. 따라서, 여기에 기재된 바와 같이, 2가 금속 이온의 추가의 양을 첨가하는 것이 바람직하다.

배양물 내의 숙주 세포의 생육 단계 동안에 2가 금속 이온이 첨가된다면, 숙주 세포 생육에 악영향을 미치거나 부정적인 영향을 미치지 않는 농도로 2가 금속 이온을 배양 배지에 첨가하는 것이 바람직하다. 진탕 플라스크 배양에서, 1 mM 이상의 농도로 첨가된  $ZnSO_4$ 가 숙주 세포 밀도를 더욱 낮게 할 수 있는 것으로 관찰되었다. 당업자라면, 세균 세포가 세포 기질과 금속 이온 착물을 형성함으로써 금속 이온을 효과적으로 봉쇄할 수 있음을 이해할 것이다. 즉, 세포 배양물에서, 생육 단계 후에 (바람직한 숙주 세포 밀도가 달성된 후에) 또는 숙주 세포에 의한 생성물 발현 직전에, 선택된 2가 금속 이온을 배양 배지에 첨가하는 것이 바람직하다. 충분한 양의 2가 금속 이온이 확실히 존재하도록 하기 위하여, 생성물 발현 단계 동안에 추가의 2가 금속 이온을 세포 배양 배지에 첨가하거나 공급할 수도 있다.

배양 배지 중의 2가 금속 이온 농도는 숙주 세포에 해롭거나 독성일 수도 있는 농도를 초과해서는 안된다. 숙주 세포 이.콜리를 사용하는 본 발명의 방법에서, 배양 배지 중의 2가 금속 이온의 농도는 약 1 mM (바람직하게는,  $\leq 1$  mM)을 넘지 않는 것이 바람직하다. 더욱 더 바람직하게는, 배양 배지 중의 2가 금속 이온 농도는 약 50 마이크로몰 내지 약 250 마이크로몰이다. 가장 바람직하게는, 이러한 방법에서 사용되는 2가 금속 이온은 황산아연이다. 금속 이온과 Apo-2 리간드 삼량체가 1:1 몰비로 존재할 수 있는 양으로 세포 배양물에 2가 금속 이온을 첨가하는 것이 바람직하다.

2가 금속 이온을 임의의 허용가능한 형태로 세포 배양물에 첨가할 수 있다. 예를 들면, 물을 사용하여 금속 이온의 용액을 제조할 수 있고, 2가 금속 이온 용액을 배양 배지에 첨가 또는 공급할 수 있다.

본 발명의 한가지 구현양태에서, 선택된 Apo-2L (형태 114-281)이 이.콜리에서 발현되고, 세포 배양물의 배양 또는 발효 동안에, 약 40~50 gm/L 건조 세포 중량에서 배양물에 대해 약 1.0 내지 3.0 밀리몰/L-min의 산소 흡수율로 세포 활성이 수행되도록 공정 매개변수를 설정한다. 새로 합성된 초기 Apo-2L 폴리펩티드는, 적절한 단백질 접힘 및 Apo-2L 단량체의 삼량체화를 위해 충분한 시간을 갖는 것이 바람직하다. 발효 공정의 생육 단계는 바람직하게는 30 °C에서 수행된다. 생성물 발현의 개시 직전에, 공정 온도 조절 설정점은 30 °C로 유지될 수도 있거나 또는 나머지 발효 동안에 25 °C로 하향 이동된다. 임의로, 세포 배양물에서 세포 밀도를 증가시키는 것이 바람직할 수도 있고, 그에 따라 상기 언급된 매개변수를 조절 (또는 증가)시킬 수도 있다. 예를 들면, 용적 수율을 증가시키기 위하여 세포 배양물 중의 세포 밀도를 증가시키는 것이 유리할 수도 있다. 당업자라면, 당 기술분야에 공지된 일상적인 기술을 사용함으로써, 세포 밀도를 증가시키고 원한다면 상기-언급된 매개변수를 증가시킬 수 있다.

Apo-2L의 발현은, 적절히 표지화된 프로브를 사용하여, 여기에 제공된 서열을 기초로 하여 예를 들어 통상적인 서던 블롯팅, mRNA의 전사를 정량화하기 위한 노던 블롯팅 [Thomas, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:5201-5205 (1980)], 돛트 블롯팅 (DNA 분석), 또는 특정부 하이브리드형성에 의해 시료중에서 직접적으로 측정될 수도 있다. 다양한 표지가 사용될 수도 있으며, 가장 일반적으로 방사능, 특히  $^{32}P$ 가 사용된다. 그러나, 폴리뉴클레오타이드 내로의 도입을 위해 비오틴-변형된 뉴클레오타이드를 사용하는 것과 같은, 다른 기술들이 또한 사용될 수도 있다. 이어서, 비오틴은 아비딘 또는 항체에 결합하기 위한 부위로서 작용하며, 이것은 방사성뉴클레오타이드, 형광체 또는 효소와 같은 다양한 종류의 표지로 표지화될 수도 있다. 대안적으로, DNA 이중선, RNA 이중선, 및 DNA-RNA 하이브리드 이중선 또는 DNA-단백질 이중선을 포함하여, 특정한 이중선을 인식할 수 있는 항체가 사용될 수도 있다. 또한, 항체를 표지화할 수도 있고, 이중선이 표면에 결합된 경우 분석을 수행할 수도 있으며, 따라서 표면에 이중선이 형성될 때, 이중선에 결합된 항체의 존재가 검출될 수 있다.

대안적으로, 유전자 생성물의 발현을 직접적으로 정량화하기 위하여, 면역학적 방법, 예컨대 세포 또는 조직 부분의 면역조직화학적 염색, 및 세포 배양물 또는 체액의 분석에 의해 유전자 발현을 측정할 수도 있다. 면역조직화학적 염색 기술을 사용하여 전형적으로 탈수 및 고정화에 의해 세포 시료를 제조한 다음, 표지가 예컨대 효소적 표지, 형광 표지, 발광 표지 등과 같이 통상 육안 검출가능한 경우에, 이것을 결합된 유전자 생성물에 특이적인 표지화된 항체와 반응시킨다.

면역조직화학적 염색 및/또는 시료액의 분석을 위해 유용한 항체는 단클론성 또는 다클론성일 수도 있고, 임의의 포유동물에서 제조될 수도 있다. 편리하게는, 천연 Apo-2 리간드 폴리펩티드에 대항하여 또는 여기에 제공된 DNA 서열에 기초한 합성 펩티드에 대항하여 또는 Apo-2 리간드 DNA에 융합되고 특정한 항체 에피토프를 코딩하는 외인성 서열에 대항하여 항체를 제조할 수도 있다.

Apo-2 리간드는, 분비 시그널 없이 직접적으로 생성될 때 숙주 세포 용해물로부터 회수될 수도 있긴 하지만, 분비된 폴리펩티드로서 배양 배지로부터 회수되는 것이 바람직하다. Apo-2 리간드가 막-결합된 상태이라면, 적절한 계면활성제 용액(예, 트리톤-X 100)을 사용하여 막으로부터 이것을 방출시킬 수 있거나, 효소적 절단에 의해 세포의 영역을 방출시킬 수도 있다.

Apo-2 리간드가 하나의 인간 유래 이외의 재조합 세포에서 생성될 때, Apo-2 리간드는 인간 유래의 단백질 또는 폴리펩티드를 갖지 않는다. 그러나, Apo-2 리간드에 대해 실질적으로 균질한 제제를 얻기 위해서는, 통상 재조합 세포 단백질 또는 폴리펩티드로부터 Apo-2 리간드를 회수 또는 정제하는 것이 필요하다. 첫번째 단계로서, 배양 배지 또는 용해물을 원심분리하여 입상 세포 단편을 제거할 수도 있다. 그 후, 적절한 정제 절차의 예들로서 하기 절차: 이온 교환 컬럼 상에서의 분별; 에탄올 침전; 역상 HPLC; 실리카 또는 DEAE 또는 CM과 같은 양이온 교환 수지 상의 크로마토그래피; 크로마토포커싱(Chromatofocusing); SDS-PAGE; 황산암모늄 침전; 예를 들어 세파텍스 G-75를 사용한 겔 여과; IgG와 같은 오염물을 제거하기 위한 정용여과(diafiltration) 및 단백질 A 세파로스 컬럼을 사용하여, Apo-2 리간드를 오염 가용성 단백질 및 폴리펩티드로부터 정제한다. 바람직한 구현양태에서, Apo-2 리간드를 친화성 크로마토그래피에 의해 분리할 수 있다. 변이에 의해 야기되는 실질적인 특성 변화를 고려하여, 잔기가 결실, 삽입 또는 치환된 Apo-2 리간드 단편 또는 변이체를 천연 Apo-2 리간드에서와 동일한 방식으로 회수한다. 예를 들면, 다른 단백질 또는 폴리펩티드, 예컨대 세균 또는 바이러스성 항원과의 Apo-2 리간드 융합물을 제조하면 정제가 용이하게 되고; 융합 폴리펩티드를 흡착하기 위해서 항원에 대한 항체를 함유하는 면역친화성 컬럼을 사용할 수 있다.

정제 동안에 단백질 분해를 억제하기 위해 페닐 메틸 술폰일 플루오라이드(PMSF)와 같은 프로테아제 억제제가 유용할 수도 있고, 외래 오염물의 생육을 방지하기 위해 항생물질을 포함시킬 수도 있다. 당업자라면, 재조합 세포 배양물에서의 발현시에 Apo-2 리간드 또는 그의 변이체의 특징 변화를 설명하기 위해서는, 천연 Apo-2 리간드를 위해 적절한 정제 방법에 변형을 가하는 것이 필요할 수도 있음을 이해할 것이다.

이러한 정제 단계 동안에, 2가 금속 이온-함유 용액 또는 하나 이상의 2가 금속 이온을 함유하는 정제 재료(예컨대, 크로마토그래피 매질 또는 지지체)에 회수된 Apo-2L을 노출시키는 것이 바람직할 수도 있다. 바람직한 구현양태에서, 2가 금속 이온 및/또는 환원제가 Apo-2L의 회수 또는 정제 동안에 사용된다. 임의로, 2가 금속 이온 및 환원제, 예컨대 DTT 또는 BME 둘다를 Apo-2L의 회수 또는 정제 동안에 사용할 수도 있다. 회수 또는 정제 동안에 2가 금속 이온을 사용하면, Apo-2L 삼량체의 안정성이 제공되거나 세포 배양 단계중에 형성된 Apo-2L 삼량체를 보존할 수 있는 것으로 생각된다.

원핵 숙주 세포(가장 바람직하게는 세균 숙주 세포)로부터 발현된 Apo-2L을 회수 및 정제하기 위한 바람직한 방법은 하기 단계: (a) 이.콜리 세포로부터 Apo-2L(세포내)을 추출하고; (b) 2가 금속 이온 및/또는 환원제를 포함하는 완충용액에 적절히 접힌 Apo-2L을 안정화시키고; (c) 연속적으로 양이온 교환제, 히드록시아파타이트 및 소수성 상호작용 크로마토그래피를 사용하는 크로마토그래피에 의해 Apo-2L을 정제하고; (d) 2가 금속 이온 및/또는 환원제를 포함하는 완충용액 중에서 각각의 크로마토그래피 지지체로부터 Apo-2L을 선택적으로 용출시키는 단계를 포함한다. 이 방법에서 사용되는 2가 금속 이온 및 환원제는 Zn 황산염, Zn 염화물, Co 황산염, DTT 및 BME, 더욱 바람직하게는 Zn 황산염 또는 DTT를 포함할 수도 있다. 이러한 회수 및 정제 공정의 더욱 더 상세한 설명은 하기 실시예 8에 주어진다.

상기 언급된 바와 같이, 본 발명의 이러한 방법은 Apo-2L 이외에도, 삼량체화 형태로 사용될 때 개선된 활성을 갖거나 활성을 위해 단백질의 삼량체화가 필요한 여러 다른 단백질을 위해 적용가능하고 유용하다.

또한, Apo-2 리간드 및 하나 이상의 2가 금속 이온을 포함하는 제제가 본 발명에 의해 제공된다. 이러한 제제는 저장(및 Apo-2L 삼량체화의 유지) 뿐만 아니라 치료적 투여를 위해 특히 적절하다. 바람직한 제제는 Apo-2L 및 아연 또는 코발트를 포함한다. 더욱 바람직하게는, 제제는 금속이 단백질에 대해 2배 몰비 미만으로 존재하는 Apo-2L 및 아연 또는 코발

트 용액을 포함한다. 수성 현탁액을 원한다면, 제제내의 2가 금속 이온이 단백질에 대해 2배 몰비 이상일 수도 있다. 본 출원인은, 황산아연을 사용하면, Apo-2L (형태 114-281)이 침전되고 제제내의 약 100 mM 농도의 황산아연에서 수성 현탁액을 형성한다는 것을 알아내었다. 당업자라면, 2배 몰비 이상에서, 금속이 제제에 해가 될 수 있거나 치료적 제제로서 바람직하지 못한 2가 금속 이온 농도의 상한선이 제제내에 존재할 수도 있음을 이해할 것이다.

공지된 기술에 의해 제제를 제조할 수도 있다. 예를 들면, Apo-2L 제제는 겔 여과 컬럼상의 완충액 교환에 의해 제조될 수도 있다.

전형적으로, 제약학적으로 허용가능한 염의 적절한 양을 제제중에서 사용하여 제제를 등장성으로 만든다. 제약학적으로 허용가능한 담체의 예는 식염수, 링거액 및 텍스트로스 용액을 포함한다. 제제의 pH는 바람직하게는 약 6 내지 약 9이고, 더욱 바람직하게는 약 7 내지 약 7.5이다. 바람직하게는, 아연이 Apo-2L에 확실히 결합되도록 하기 위하여 pH를 선택한다. pH가 너무 높거나 너무 낮으면, 아연은 Apo-2L에 결합된 상태를 유지하지 못하며, 그 결과 Apo-2L의 이량체가 형성되는 경향이 있다. 예를 들어 투여 경로 및 Apo-2 리간드와 2가 금속 이온의 농도에 의존하여, 특정한 담체가 더욱 바람직할 수도 있다는 것은 당업자에게 명백할 것이다.

Apo-2L의 치료적 조성물은 적절한 정도의 순도를 가진 원하는 Apo-2L 분자를 임의의 제약학적으로 허용가능한 담체, 부형제 또는 안정화제와 혼합함으로써 [Remington's Pharmaceutical Sciences, 제 16 판, Oslo, A. 편저 (1980)], 동결건조된 제제, 수용액 또는 수현탁액의 형태로 제조될 수 있다. 허용가능한 담체, 부형제 또는 안정화제는 사용되는 투여량 및 농도에서 수용자에게 비독성인 것이 바람직하며, 트리스(Tris), HEPES, PIPES, 인산염, 시트르산염 및 기타 유기산과 같은 완충액; 아스코르브산 및 메티오닌을 포함한 산화방지제, 보존제 (예컨대, 옥타데실디메틸벤질 암모늄 클로라이드; 헥사메토늄 클로라이드; 벤즈알코늄 클로라이드, 벤즈에토늄 클로라이드; 페놀, 부틸 또는 벤질 알코올; 메틸 또는 프로필 파라벤과 같은 알킬 파라벤; 카테콜; 레조르시놀; 시클로헥산올; 3-펜타놀; 및 m-크레졸); 저 분자량 (약 10개 잔기 미만) 폴리펩티드; 단백질, 예컨대 혈청 알부민, 젤라틴, 또는 면역글로블린; 친수성 중합체, 예컨대 폴리비닐피롤리돈; 아미노산, 예컨대 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 히스티딘, 아르기닌 또는 리신; 당당류, 이당류, 및 글루코스, 만노스 또는 텍스트린을 포함한 기타 탄수화물; 슈크로스, 만니톨, 트레할로스 또는 소르비톨과 같은 당류; 나트륨과 같은 염-형성 반대이온; 및/또는 TWEEN<sup>TM</sup>, PLURONICS<sup>TM</sup> 또는 폴리에틸렌 글리콜(PEG)과 같은 비-이온성 계면활성제를 포함한다.

이러한 담체의 추가의 예는 이온 교환제, 알루미늄, 스테아르산알루미늄, 레시틴, 혈청 단백질, 예컨대 인간 혈청 알부민, 완충액 물질, 예컨대 글리신, 소르빈산, 소르빈산칼륨, 포화 식물성 지방산들의 부분 글리세라이드 혼합물, 물, 염류, 또는 전해질, 예컨대 황산프로타민, 인산수소이소나트륨, 인산수소칼륨, 염화나트륨, 콜로이드 실리카, 삼규산마그네슘, 폴리비닐피롤리돈 및 셀룰로스-기재 물질을 포함한다. 국소 형태 또는 겔-기재 형태를 위한 담체는 소듐 카르복시메틸셀룰로스 또는 메틸셀룰로스과 같은 다당류, 폴리비닐피롤리돈, 폴리아크릴레이트, 폴리옥시에틸렌-폴리옥시프로필렌-블록 중합체, 폴리에틸렌 글리콜 및 목재 왁스 알코올을 포함한다. 모든 투여를 위하여, 통상적인 저류조(depot) 형태가 적절하게 사용된다. 이러한 형태는 예를 들어 미소캡슐, 나노캡슐, 리포솜, 고약, 흡입 형태, 코 스프레이, 설하 정제, 및 서방성 제제를 포함한다.

제제내의 Apo-2 리간드의 유효 투여량은 경험적으로 결정될 수 있으며, 이러한 결정을 행하는것은 당 기술범위내이다. Apo-2 리간드의 유효 투여량 또는 양은 1일당 체중 kg당 약 1 마이크로그램 내지 약 100 mg 또는 그 이상의 범위일 수 있다. 투여량의 중간(Interspecies) 증감은 예를 들어 문헌 [Mordenti 등, Pharmaceut. Res., 8:1351 (1991)]에 개시된 바와 같이 당 기술분야에 공지된 방식으로 수행될 수 있다. 당업자라면, 투여되어야 하는 Apo-2 리간드의 투여량이 예를 들어 Apo-2 리간드를 수여받는 포유동물, 투여 경로, 및 포유동물에 투여되는 기타 약물 또는 요법에 따라 변할 수 있음을 이해할 것이다.

생체내 투여를 위해 사용되는 Apo-2L은 멸균상태이어야 한다. 이것은 동결건조 및 복원에 앞서 또는 그 후에 살균 여과막을 통해 여과함으로써 쉽게 달성된다. Apo-2L은 통상 동결건조된 형태로 또는 전신 투여된다면 용액으로 보관될 것이다. 동결건조된 형태로 존재한다면, 사용 시기에 적절한 희석제로 복원하기 위해 다른 성분과 조합하여 Apo-2L을 전형적으로 제형한다. Apo-2L의 액체 제형의 예는, 피하 주사를 위해 단일투여 바이알내에 충전된 멸균, 투명, 무색의 비보존된 용액이다.

치료적 Apo-2L 제제를 일반적으로, 멸균된 접근 입구를 가진 용기, 예를 들어 정맥 주사액 주머니 또는 피하 주사 바늘에 의해 뚫을 수 있는 마개를 가진 바이알내에 넣는다. 제제는 바람직하게는 반복된 정맥 (i.v.), 피하 (s.c.), 근육내 (i.m.) 주사 또는 주입으로서, 또는 비내 또는 폐내 전달을 위해 적절한 에어로졸 제제로서 바람직하게 투여된다 (폐내 전달을 위해서는 예를 들어 EP 257,956호를 참조한다).

Apo-2L은 또한 서방성 제제의 형태로 투여될 수 있다. 서방성 제제의 적절한 예는 단백질을 함유하는 고체 소수성 중합체의 반투과성 기질을 포함하고, 이때 기질은 성형품, 예를 들어 필름 또는 미소캡슐의 형태이다. 서방성 기질의 예는 폴리에스테르, 히드로겔 (예를 들어, 문헌 [Langer 등, J.Biomed.Master.Res., 15:167-277 (1981)] 및 [Langer, Chem.Tech., 12:98-105 (1982)]에 기재된 폴리(2-히드록시에틸-메타크릴레이트) 또는 폴리(비닐알콜), 폴리락티드 (미국 특허 3,773,919호, EP 58,481호), L-글루탐산과 감마 에틸-L-글루타메이트의 공중합체 (Sidman 등, Biopolymers, 22:547-556 (1983)), 비-분해성 에틸렌-비닐 아세테이트 (Langer 등, 상동), 분해성 락트산-글리콜산 공중합체, 예컨대 루프론 데포우(Lupron Depot) (락트산-글리콜산 공중합체 및 류프롤리드 아세테이트로 구성된 주사가능한 미소구), 및 폴리-D-(-)-3-히드록시부티르산 (EP 133,988)을 포함한다.

여기에 기재된 Apo-2L 및 그의 제제는 각종 치료 및 비-치료적 용도에서 사용될 수 있다. 이러한 용도 중에는 각종 암 (상기 제시됨) 및 바이러스성 질병의 치료 방법이 포함된다. 이러한 치료 및 비-치료적 용도는 예를 들어 WO 97/25428호 및 WO 97/01633호에 기재되어 있다.

여기에 기재된 질병의 진단 또는 치료를 위해 유용한 Apo-2L을 함유하는 키트와 같은 제품은 적어도 용기 및 라벨을 포함한다. 적절한 용기는 예를 들어 병, 바이알, 주사기 및 시험관을 포함한다. 용기는 유리 또는 플라스틱과 같은 각종 재료로부터 형성될 수도 있다. 용기는 병의 진단 또는 치료를 위해 효과적인 Apo-2L 제형을 보유하며, 멸균된 접근 입구를 가질 수도 있다 (예를 들어, 용기는 정맥 주사액 주머니 또는 피하 주사 바늘에 의해 구멍뚫을 수 있는 마개를 가진 바이알일 수도 있다). 용기 위의 라벨 또는 용기와 조합된 라벨은, 제제가 선택된 병을 진단 또는 치료하기 위해 사용된다는 것을 나타낸다. 제품은 제약학적으로 허용가능한 완충액, 예컨대 포스페이트-완충 염수, 링거액, 및 텍스트로스 용액과 같은 제약학적으로 허용가능한 완충액을 포함하는 제 2의 용기를 더욱 포함할 수도 있다. 기타 완충액, 희석액, 필터, 바늘, 주사기 및 사용 지시를 가진 포장 삽입물을 포함하여, 시판 및 사용자 관점에서 요망되는 다른 물질들을 더욱 포함할 수도 있다. 제품은 상기 기재된 것과 같은 다른 활성 약제를 가진 제2 또는 제3의 용기를 더욱 포함할 수도 있다.

하기 실시예들은 단지 예증 목적을 위해 제공된 것일 뿐, 어떠한 방식으로든 본 발명의 범위를 제한하려는 의도는 없다.

본 명세서에 인용된 모든 특허 및 참고문헌은 그 전체가 본 명세서에서 참조를 위해 포함된 것이다.

## 실시예

실시예에서 언급된 통상적으로 입수가 가능한 시약들은 다른 지시가 없는 한 제조업자의 지시에 따라 사용되었다. 하기 실시예 및 명세서 전체에서 ATCC 수탁 번호로 확인된 세포들의 기원은 미국 버지니아주 마나사스의 아메리칸 타입 컬렉션이다.

### 실시예 1

#### Apo-2L 변이체의 발현 및 정제

Apo-2L의 알라닌 치환 변이체들을, trp 프로모터의 제어하에서 Apo-2L의 91-281 아미노산 형태의 세포내 이.콜리 발현을 위해 고안된, 플라스미드(pAPOK5) (도 13 참조)의 올리고뉴클레오타이드-지정 돌연변이유발 [Kunkel 등, Proc. Natl. Acad. Sci., 82:488-492 (1985); Kunkel, Methods in Enzymology, 154:367-382 (1987)]에 의해 구축하였다. trp 프로모터를 보유하는 플라스미드 pS1162내로 Apo-2L cDNA (코딩 잔기 91-281)을 클론화하기 위해 PCR을 사용함으로써 pAPOK5를 구축하였다. 돌연변이된 플라스미드로 형질전환된 이.콜리 균주 294를, 250 ml M9 배지 + 100  $\mu$ M ZnSO<sub>4</sub>중에서 37 °C에서 중간-대수기로 생육시키고, 25  $\mu$ g/ml 베타-인돌 아크릴산의 첨가에 의해 발현을 유발하고, 배양액을 30 °C에서 밤새 생육시켰다. 세포를 원심분리에 의해 수집하고 동결시켰다.

세포 펠렛을 6 부피 0.1M 트리스-HCl pH 8, 0.2 M NaCl, 5 mM DTT, 1mM EDTA에 균질화시키고, 니켈로 충전된 킬레이트화 hiTRAP 컬럼 (파르마시아(Pharmacia))상에서 IMAC에 의해 가용성 분획으로부터 Apo-2L을 분리하였다. Apo-2L은 고정화된 금속에 대해 약한 친화력을 가지며, 낮은 농도의 이미다졸로 용출될 수 있었다. SP hiTRAP 컬럼 (파르마시아)상에서 양이온 교환 크로마토그래피에 의해 최종 정제를 수득하였다. 정제된 Apo-2L 변이체의 농도는 1.4 mg<sup>-1</sup> ml cm<sup>-1</sup>의 e<sub>280</sub>을 사용하여 흡광도 측정에 의해 결정되었다.

올리고뉴클레오타이드-지정 돌연변이유발에 의해 동정된 Apo-2L 변이체를 하기 표 I에 기재한다.

[표 I]

Apo-2L 변이체a의 수용체 결합 및 아폽토시스 활성 비율 (변이체/야생형)

	DR4-IgG K <sub>D</sub>	DR5-IgG K <sub>D</sub>	DcR2-IgG K <sub>D</sub>	아폽토시스 ED <sub>50</sub>
Δ아연	6.3	6.6	11.2	90.0
R130A	3	2.7	1.3	1.9
N134A	1.0	0.8	1.0	1.5
L136A	3.3	1.5	1.4	0.8
S138A	2.1	1.3	2.2	1.2
N140A	1.4	1.9	0.9	1.1
S141A	2.3	1.3	2.4	1.3
K142A	2.6	1.9	2.7	2.0
N143A	2.1	2.0	1.3	1.5
R149A	1.8	2.2	1.6	3.5
S153A	2.3	1.2	2.1	0.9
E155A	1.6	2	1.4	2.5
R158A	2.4	1.3	6.5	1.4
S159A	4.7	2.2	3.4	0.9
R170A	1.1	2.2	0.6	0.9
K179A	0.9	0.9	1.1	2.0
R191A	7.8	3.9	3.2	2.2
Q193A	1.7	1.1	1.2	2.2
E195A	4.6	1.4	2.6	0.8
K197D	2	2.1	2.9	1.1
K201A	4.3	2.7	10	2.5
N202A	2.5	2.5	1.9	3.2
D203A	1.5	1.1	0.6	0.5
Q205A	13.1	6.3	10.8	690
V207A	2.2	2.8	2.1	5.6
Y213A	1.3	1	1.5	1.2
Y216A	14.5	8.9	9.0	320
D218A	1.3	1.9	1.1	0.3
C230S	4.1	7.1	6.7	8.0
E236A	6.0	9.8	8.4	10.8
Y237A	7.3	5.0	48	8.3
Y240A	1.8	0.8	1.8	1.1
K251A	1.9	2	2.4	0.8
S259A	4.3	2.0	1.4	3.3
H264A	1.9	2.0	1.4	3.1
D267A	5.7	1.9	5.5	1.11
D269A	1.7	0.5	0.9	0.2

a 표시된 값은 변이체 대 야생형의 비를 나타낸다. 야생형 Apo-2L (잔기 91-281)에 대하여, DR4-IgG, DR5-IgG 및 DcR2-IgG에 대한 K<sub>d</sub> 값은 0.8±0.3 nM, 0.9±0.4 nM 및 0.3±0.2 nM이다. 야생형 Apo-2L (잔기 91-281)은 아폽토시스 분석에서 24 ±3.1 ng/mL의 ED50을 제공하는 반면, Apo-2L의 114-281 형태는 약간 더 활성이고 16.0±3.6 ng/mL의 ED50을 제공하였다. 야생형 값으로부터 2배 변화만이 유의한 것으로 간주되었다.

## 실시예 2

### Apo-2L의 결정학적 분석

Apo-2L (아미노산 잔기 114-281)의 결정을, 50% peg 2K MME의 웰 용액 위에 존재하는 40μl 단백질 (20 mM 트리스 중의 2.6 mg/mL, pH 8.0), 20μl 50 mM 트리스 pH 8.0 및 10μl 8% peg 2K MME를 함유한 70μl 방울 중에서 20 °C에서 성장시켰으며, 이것은 비대칭 단위 내에 2개의 단량체 및 단위 세포 상수 a=72.5, c=140Å을 갖고 실온에서 3.9 Å으로 회절되는 공간군(spacegroup) P63의 요소이었다. D218A 변이체의 결정 (실시예 1 참조)을, 32% MPD의 웰 용액 위에 존재하는 4μl의 4% MPD 및 10μl 단백질 (20 mM 트리스 중의 1.7 mg/mL, pH 7.5)을 함유한 14μl 방울 내에서 4 °C에서 성장시켰으며, 이것은 비대칭 단위당 하나의 단량체를 갖고 단위 세포 매개변수 66.4, c=197.7 Å을 가지며 싱크로트론 복사로 -180 °C에서 1.3 Å으로 회절되는 공간군 R32의 요소이었다. MAR 검출기가 장착되고 덴조/스캐일팩 (DENZO/SCALEPACK)으로 처리되는 리가꾸 (Rigaku) 회전 양극 X-선 발생기 상에서, Apo-2L (잔기 114-281) 결정에 대해 3.9

Å으로 회절되고 D218A 변이체에 대해 1.9 Å으로 회절되는 데이터 세트를 측정하였다 [Otwinski 등, Proceedings of the CCP4 Study Weekend: Data Collection and Processing (Sawyer 등 편저), pp.56-62 영국 데어스베리의 데어스베리 레보러토리(Daresbury Laboratory), 1993]. D218A 변이체에 대한 1.3Å 데이터 세트를 아르곤 내셔널 랩스(Argonne National Labs)에서 어드밴스드 포톤 소스(Advanced Photon Source)로 측정하고 HKL2000/스캐일팩으로 처리하였으며, 이는 6.4% (1.35~1.30 Å에서 34%)의 R<sub>sym</sub>, 100% 완전성, 12배의 중복성 및 I/<I>=12.4를 갖고 있었다.

천연 Apo-2L의 구조는 아모르(Amore) 프로그램[Acta Cryst., D50:760-763 (1994)]을 이용하여 TNF-α (pdb code 1TNF)에 근거한 모델을 사용한 분자 배치에 의해 해석되었고, R<sub>free</sub>가 35%까지 엄격한 2중 비-결정학적 구속을 이용해 재정렬되었다 [Brunger, X-PLOR:version3.1, Yale Press, New Haven 1987]. 이 구조는 R<sub>free</sub>가 25%까지 1.9Å의 데이터셋에 대응해 재정렬되었고, 최종적으로 Refmac과 SHELXL [Sheldrick et al., Methods in Enzymology, pp. 319-343, Academic Press, San Diego 1997]을 이용해 양호한 기하학적 구조 (rmsd 결합 0.011Å, rmsd각 1.7°)와 함께 R<sub>free</sub>=22% 및 R<sub>factor</sub>=20%인 1.3Å의 데이터에 대응해 재정렬되었다. 모든 잔기는 라마찬드란(Ramachandran) 좌표상의 허용된 영역에 위치한다. 재정렬 과정 중, 28 시그마 전자 밀도 피크가 삼량체 축의 Cys230에 관계된 대칭 사이에서 발견되었다. 이 밀도는 아연 이온으로 모델화되었고 10의 B-인자로 정정되었다. 삼량체 축 상의 염소이온은 아연의 4번째 리간드로 존재한다고 생각된다. 최종모형은 잔기 120-130, 142-194, 203-281과 170 개의 용매분자, 1개의 아연이온, 1개의 염소이온으로 구성되어있다. 잔기 91-119, 131-141 및 195-202는 불규칙적이다. 몇몇 결정의 N-말단의 서열은 N-말단이 손상을 입지 않았음을 입증하는 한편, 출발물질의 질량분광법은 출발물질이 완전한 길이임을 보여주고 있다.

결정학적 데이터의 요약은 도 2C에 나타낸다.

### 실시예 3

#### Apo-2L 변이체의 수용체 결합 친화력의 결정

파르마시아 BIA 코어 1000 상에서 표면 플라스몬 공명 (SPR) 측정으로부터, 고정화된 수용체 이뮤노어드헤신스(immunoadhesins)로의 Apo-2L 변이체 (표 I 참조)의 결합을 위한 해리 상수 (Kd)를 결정하였다.

각각 WO 98/51793 (1998년 11월 19일 공개) 및 WO99/10484 (1999년 3월 9일 공개)에 기재된 바와 같이 DR5-IgG (또한 Apo-2-IgG로서 일컬어짐) 및 DcR2-IgG 수용체 이뮤노어드헤신스(immunoadhesins)를 제조하였다. DR4-IgG를 다음과 같이 제조하였다. 성숙한 DR4 ECD 서열 (아미노산 1-218; Pan 등, 상동)을 Flag 시그널 서열의 하류에 있는 pCMV-1 Flag 벡터 (코닥(Kodak)) 하류에 클로닝하고, 앞서 기재된 바와 같이 인간 면역글로블린 G1 중쇄의 CH1, 경첩부 및 Fc 영역에 융합시켰다 [Aruffo 등, Cell, 61:1303-1313 (1990)]. 인간 293 세포내로의 일시적 형질입자에 의해 이뮤노어드헤신스(immunoadhesin)을 발현시키고, 문헌 [Ashkenazi 등, Proc.Natl.Acad.Sci., 88:10535-10539 (1991)]에 기재된 바와 같이, 단백질 A 친화성 크로마토그래피에 의해 세포 상층액으로부터 정제하였다.

아민 결합 화학 (파르마시아 바이오센서)을 사용하여, 수용체 이뮤노어드헤신스(immunoadhesin) 단백질을 센서 칩 표면에 1000 - 2000 공명 단위의 수준으로 결합시켰다. 15.6 nM 내지 500 nM 범위의 농도에서 2배 증분으로 Apo-2L 결합에 대해 센서그램을 기록하였다. 반응속도 상수를 비-선형 조절 분석에 의해 결정하고 이를 사용하여 결합 상수를 계산하였다.

결과를 표 I에 나타낸다.

### 실시예 4

#### 시험관내에서 Apo-2L 변이체의 아포토시스 활성

형광 염료의 대사 전환으로부터 세포 생존도를 측정하는 생물검정을 사용하여 Apo-2L 변이체의 아포토시스 활성을 결정하였다. 0.1% BSA를 함유하는 RPMI-1640 배지 (기브코)에서 Apo-2L (형태 114-281) 또는 Apo-2L 변이체(표 I 참조)의 연속 2배 희석액을 만들고, 각각의 희석액의 50μl를 96-웰 팔콘(Falcon) 조직 배양 마이크로평판의 각각의 웰에 옮겼다. 50μl의 SK-MES-1 인간 폐 암종 세포 (ATCC HTB58) (RPMI-1640, 0.1% BSA)를 2×10<sup>4</sup> 세포/웰의 밀도로 첨가하였다. 이 혼합물을 37 °C에서 24 시간동안 배양하였다. 20 시간째에, 25μl의 알라마르 블루(Alamar Blue) (미국 오하이오



주 웨스트레이크, 아큐메드 인코포레이티드 (AccuMed, Inc.))를 첨가하였다. 530 nm에서 여기시에 590 nm에서의 상대 형광을 측정함으로써 세포수를 결정하였다. 세포 생존도에서 50% 감소를 제공하는 Apo-2L의 농도인, ED<sub>50</sub>을 계산하기 위해 적합한 4 매개변수를 사용함으로써 이러한 데이터를 분석하였다.

잔기 Arg149, Gln205, Val207, Tyr216, Glu236 또는 Tyr237에서의 단일 알라닌 치환은 생물검정에서 아포토시스 활성을 5 배 이상 감소시키는 결과를 가져오고, DR4, DR5 및 DcR2에 대해 저하된 친화력을 나타내었다 (표 I). 이러한 수용체에 대한 Apo-2L 결합은 Gln205, Tyr216, Glu236 및 Tyr237의 알라닌 치환에 의해 가장 영향을 많이 받으며, 이들 모두는 3개 모든 수용체에 대한 친화력을 5배 이상 저하시켰다. 또한, 감소된 아포토시스 활성을 가진 Apo-2L 변이체 모두는 DR4 또는 DR5 (또는 양쪽 모두)에 대해 손상된 결합을 나타내고, 이는 수용체-결합이 생물학적 효과를 위해 필요함을 시사하는 것이다. Asp218 또는 Asp269의 알라닌 치환은 아포토시스 활성에서 2 배 이상의 증가를 가져왔다. 대부분의 알라닌 치환은 DR4 및 DR5 결합 양쪽 모두에 대해 유사한 효과를 갖는 것이 주목할 만하고, 단지 예외는 Gln193, Glu195, Ser259, His264 및 Asp267의 돌연변이이며, 이들 모두는 DR4 결합에 대해 5 배 이상의 효과를 가지지만 (친화력 저하) DR5 결합에 대해서는 단지 작거나 무시할만한 효과를 갖는다. DcR2-결합에서의 변화는 DR4-결합에서 관찰되는 효과에 필적하는 경향이 있다. 저하된 아포토시스 활성은 감소된 DR5-결합과 가장 밀접하게 관련되는 것으로 보이며, 이는 Apo-2L 투여에 대한 반응에서 SK-MES의 사멸 신호전달에 DR5가 필요함을 시사하는 것이다.

## 실시예 5

### Apo-2L의 금속 함량을 결정하기 위한 원소 및 정량 분석

유도적으로 결합된 플라스마 원자 방출 분광법(ICP-AES)을 사용하여 Apo-2L의 원소 분석을 수행하였다. 이 결정을 위하여, 20 mM 트리스 pH 7.5중에 제형된 Apo-2L (WO97/25428호에 개시된 방법을 사용하여 이.콜리에서 생성된 잔기 114-281; 여기에 기재된 방법에 따라 발효 또는 정제하는 동안 추가량의 2가 금속 이온을 첨가하지 않았다)의 2mg/mL 용액을 사용하였다. 이 시료내 및 제형 완충액의 일부 내의 Cd, Co, Zn, Ni 및 Cu의 수준을 결정하였다.

[표 II]

시료	Cd	Co	Zn	Ni	Cu
완충액	-0.058	-0.090	-0.098	-0.098	-0.082
Apo-2L	-0.058	0.199	1.712	-0.108	-0.075

Apo-2L에 결합된 금속은 Zn 및 Co이었다 (표 II). 계산된 몰비는 Apo-2L 삼량체 1 몰당 0.79 몰 및 Apo-2L 삼량체 1 몰당 0.06몰의 Co이었다. 이러한 데이터는 Apo-2L이 삼량체당 하나의 아연 결합 분위를 갖고 있음을 나타낸다. 부위는 Apo-2L의 제조에서 85% 금속으로 차있었다.

## 실시예 6

### 킬레이트화 시약을 사용하여 Apo-2L로부터 결합된 아연을 제거하는 효과

결합된 아연을 제거하기 위해 Apo-2L(형태 114-281)의 시료를 킬레이트화 시약으로 처리하였다. 시료를 먼저 50 mM EDTA를 각각 1000 부피로 두번 교환하여 투석시킨 다음, 2 mM 1,10-페난트롤린을 1000 부피로 두번 교환하여 투석하고, 마지막으로 금속-비함유 20 mM 트리스 pH 7.5의 1000 부피에 대해 투석하였다. 킬레이트화 처리 전 및 처리 후에, 시료를 수용체-결합, 금속 함량 및 아포토시스 활성에 대해 분석하였다. 수용체 결합을 실시예 3에 기재된 바와 같이 측정하고, ICP-AES에 의해 금속 함량을 결정하고, 실시예 4에 기재된 바와 같이 아포토시스 활성을 분석하였다. ICP-AES는 투석 절차가 결합된 아연을 제거하였음을 나타내었다. 이 처리 후에, 수용체 친화력이 상당히 감소되었으며 (표 I), 아포토시스 활성은 90-배 저하되었다 (도 4).

AVIV 장치 (미국 뉴저지주 레이크우드) 모델 202 분광편광계 상에서 환상 2색 스펙트럼을 기록하였다. 0.5 nm의 단계 크기, 5 초의 평균 시간, 및 1 cm의 행로길이를 가진 석영 직사각형 큐벳을 사용하여 250 내지 200 nm에서 스펙트럼을 스캐



닝하였다. 단백질 농도는 PBS를 함유하는 용액 중에서 2  $\mu$ M이었다. 도 6에 나타난 바와 같이, Apo-2L (형태 114-281)은 높은 베타-시트 함량을 가진 단백질의 전형적인 CD 스펙트럼을 제공한다. 결합된 아연을 제거하면, 2색 피크의 강도가 저하되고, 이는 베타-시트 함량이 감소되었음을 시사하는 것이다.

Apo-2L (형태 114-281)의 열 안정성에 미치는 아연 제거 효과를 측정하기 위하여 원편광 이색성을 사용하였다. 이러한 실험은 또한 1cm 석영 직사각 큐벳 및 2  $\mu$ M의 단백질 농도를 사용하였다. 시료를 30 °C에서 100 °C로 가열함에 따라 225 nm에서 원편광 이색성이 검출되었다. 이 온도에서 1 분동안 시료를 평형화한 후에, 2 °C 증가량으로 측정치를 취하였다. 타원율(CD) 및 다이노드 전압을 둘다 기록하고, 다이노드 전압의 온도 의존성을 도 7에 그래프화하였다. 다이노드 전압은 시료의 흡광도에 비례한다. 시료 가열 시 다이노드 전압의 증가는 단백질의 응집을 반영하는 것이다. 225nm에서의 타원율 감소에 의해 나타나는 바와 같이, 다이노드 전압에서의 증가가 2차구조의 손실과 동시에 일어났다. 이러한 데이터는, 약 75°C에서 일어나는 전이 중간점(T<sub>m</sub>)에서의 열변성 시에 Apo-2L(형태 114-281)이 응집됨을 시사하는 것이다. 결합된 아연을 제거하면, 열변성을 위한 T<sub>m</sub>이 약 54°C로 크게 저하된다. 이러한 데이터는, 결합된 아연의 동종 삼량체 Apo 2-L의 구조와 안정성을 유지하는데 필요함을 나타낸다.

## 실시예 7

### 돌연변이에 의한 Apo-2L로부터 아연 결합 부위의 제거 효과

실시예 1에 기재된 바와 같이 올리고뉴클레오티드-지정 돌연변이유발을 사용하여 Apo-2L (형태 91-281)의 Cys230을 Ala 또는 Ser으로 대체하였다. 이어서, 변이 단백질을 발현시키고, 실시예 1에 기재된 바와 같이 정제하였다. 표 I에 나타난 바와 같이, Apo-2L (형태 91-281)의 C230A 및 C230S 돌연변이체 양쪽 모두는 수용체-결합 친화력이 저하되었고 아포토시스 활성이 상당히 감소되었다. Apo-2L x-선 구조는 Cys230이 묻혀있는 잔기임을 나타내고, 따라서 이는 복합체 형성시에 수용체를 직접적으로 접촉하기 쉽지 않기 때문에, 이러한 데이터는 Cys230의 돌연변이가 동종삼량체 Apo-2L의 구조 또는 안정성에서의 변화에 의해 활성에 간접적으로 영향을 미친다는 것을 시사한다.

## 실시예 8

### Zn의 첨가는 가용성 Apo-2 리간드 생성물 추적 및 회수를 향상시킨다

#### A. 알칼리성 포스파타제 프로모터에 의해 조절되는 Apo-2L (아미노산 잔기 114-281) 발현

pAPAp2-P2RU (도 12 참조)는 pro2 및 argU에 의해 코딩되는 tRNA 및 Apo-2L (아미노산 잔기 114-281)의 공동발현을 코딩한다. pBR322-기본 플라스미드 [Sutcliffe, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 43:77-90 (1978)] pAPAp2-P2RU를 사용하여 이.콜리에서 Apo-2L을 생성하였다. Apo-2L의 발현을 위해 필요한 전사 및 번역 서열은, 플라스미드 phGH1 [Chang 등, *Gene*, 55:189-196 (1987)]에 대해 기재된 바와 같이, 알칼리성 포스파타제 프로모터 및 trp 샤인-달가르노(Shine-Dalgarno)에 의해 제공된다. Apo-2L(형태 114-281)에 대한 코딩 서열은 프로모터 및 샤인-달가르노 서열의 하류에 위치하고, 개시 메티오닌앞에 있다. 가능성있는 부수적인 구조를 제거하기 위하여, 잔기 Pro119를 코딩하는 코돈을 "CCT" 대신에 "CCG"로 바꾸는 것을 제외하고는, 코딩 서열은 Apo-2L (도 1)의 잔기 114-281 (도 1에 나타냄)을 코딩하는 뉴클레오티드를 포함한다. 전사 터미네이트에 대한 램다를 코딩하는 서열 [Scholtissek 등, *Nucleic Acids Res.*, 15:3185 (1987)]이 Apo-2L 코딩 서열의 뒤에 온다. 추가로, 이 플라스미드는 또한 tRNA's pro2 [Komine 등, *J.Mol.Biol.*, 212: 579-598 (1990)] 및 argU/dnaY [Garcia 등, *Cell*, 45:453-459 (1986)]의 발현을 위한 서열을 포함한다. 이러한 유전자들은 이.콜리 w3110으로부터 PCR에 의해 클로닝되고 전사 터미네이터 서열에 대한 램다의 하류에 위치하였다. 이 플라스미드는 생산 숙주 상에 테트라사이클린 및 암피실린 내성을 둘다 부여한다.

Apo-2 리간드 및 tRNA's의 공동발현을 위한 생산 숙주로서 균주 43E7 (이.콜리 W3110 fhuA(tonA) phoA  $\Delta$ (argF-lac) ptr3 degP kanS ompT ilvG+)을 사용하였다. 43E7의 컴피던트 세포를 제조하고, 표준 절차를 사용하여 pAPAp2-P2RU로 형질전환하였다. 20  $\mu$ g/ml 테트라사이클린 (LB+ Tet20)을 함유하는 LB 평판으로부터 형질전환체를 집어내고, 도말-정제하고, 20  $\mu$ g/ml 테트라사이클린을 가진 LB 브로쓰중에서 30 °C 진탕기/배양기에서 생육시킨 다음, -80 °C에서 DMSO중에서 보관하였다.

새로 해동시킨 보존 배양액 바이알을 사용하여 멸균 배지를 접종함으로써 진탕 플라스크 접종물을 제조하였다. 적절한 항생물질을 배지에 포함시키고, 플라스미드가 보존되도록 선택적인 압력을 제공하였다. 진탕 플라스크 배지 조성물을 표 III에 나타낸다. 플라스크 배양액을 약 30°C (28°C - 32°C)에서 14 내지 18 시간동안 진탕시키면서 배양하였다. 이어서, 이 배양액을 사용하여 생산 발효 용기에 접종하였다. 접종 부피는 배지의 초기 부피의 0.1% 내지 10%이었다.

[표 III]

진탕 플라스크 배지 조성	
성분	양/리터
테트라사이클린	4-20 mg
트립톤	8-12 g
효모 추출물	4-6 g
염화나트륨	8-12 g
인산나트륨, pH7용액으로 첨가	4-6 밀리몰

표 IV에 주어진 생산 배지에서 Apo-2L의 생산을 수행하였다. 발효 공정을 약 30℃ (28℃ - 32℃) 및 약 7.0 (6.5 - 7.5) 로 조절된 pH에서 수행하였다. 배양액에 산소를 적절히 전달하기 위하여 통기 속도 및 교반 속도를 설정하였다. 포스페이트 고갈에 의해 유도되는 생성물 발현 개시 시에, 공정 온도를 30℃에서 25℃로 변화시켰다. 발효 공정에 걸쳐, 호기 조건을 유지시키면서, 그의 탄소요건을 충족시키기 위해 컴퓨터 계산법을 기초로 하여 세포 배양액에 글루코스를 공급하였다.

발효 공정 동안에 ZnSO<sub>4</sub>의 2회 배지 첨가를 수행하였다. 첫번째 첨가는 생성물 발현의 유도 직전에 수행되었다. 두번째 첨가는 생산 기간의 대략 중간점에서 수행되었다. 이 실시예에서, 약 80~120 OD<sub>550</sub>의 배양액 광학 밀도 및 접종 후 약 28 시간째에 첨가를 수행하였다. 각각의 배지에 금속 이온을 첨가하는 것과 함께, 충분한 양의 100 mM ZnSO<sub>4</sub>를 첨가하여 약 50-100 마이크로몰 (최종 농도)을 달성하였다.

발효를 약 34 내지 45 시간동안 진행시킨 다음, 이후의 생성물 회수 평가를 위해 브로쓰로부터 세포 페이스트를 수집하였다.

[표 IV]

AP 프로모터 발현 체계를 위한 생산 배지 조성	
성분	양/리터
테트라사이클린	4-20 mg
글루코스 <sup>a</sup>	10-250 g
황산암모늄 <sup>a</sup>	2-8 g
인산나트륨, 일염기성, 이수화물 <sup>a</sup>	1-5 g
인산칼륨, 이염기성 <sup>a</sup>	1-5 g
인산칼륨, 일염기성 <sup>a</sup>	0-5 g
시트르산나트륨, 이수화물 <sup>a</sup>	0.5-5 g
염화칼륨	0-5 g
황산마그네슘, 7수화물 <sup>a</sup>	1.0-10 g
발포방지제	0-5 ml
염화제2철, 6수화물 <sup>a</sup>	20-200 mg
황산아연, 7수화물 <sup>a</sup>	0.2-20 mg
염화코발트, 6수화물 <sup>a</sup>	0.2-20 mg
몰리브덴산나트륨, 이수화물 <sup>a</sup>	0.2-20 mg
황산구리, 5수화물 <sup>a</sup>	0.2-20 mg
붕산 <sup>a</sup>	0.2-20 mg
황산망간, 이수화물 <sup>a</sup>	0.2-20 mg
카제인 가수분해물 <sup>a</sup>	5-25 g
효모 추출물 <sup>a</sup>	5-25 g

a 이 성분들의 일부를 발효 동안에 배양물에 공급할 수도 있다. 필요에 따라, pH를 조절하기 위해 수산화암모늄을 첨가하였다.

발효 공정의 기간에 걸쳐 브로쓰 시료를 취하였다. 20 OD<sub>550</sub>의 세포 밀도로 희석된 브로쓰 시료의 1 ml로부터 세포를 원심분리에 의해 수집하고, 얻어진 세포 펠릿을 분석시 까지 -20℃에서 보관하였다. 세포 펠릿을 해동시키고, 0.5 ml의 추출 완충액 (50 mM HEPES, pH 8.0, 50 mM EDTA 및 0.2 mg/ml 암탐 난백 리소자임)에 재현탁시키고, 기계적으로 붕괴시켜 세포질로부터 생성물을 방출하였다. 세포 용해물로부터 원심분리에 의해 고형물을 제거한 다음, 정제된 용해물을 삼량체 정량화를 위해 다이오넥스 프로팩(Dionex ProPac) IEX HPLC 컬럼상에 부하하였다. HPLC 분석 방법은, 25 분에 걸쳐 0.5 ml/분의 유량으로 25 mM 포스페이트 (pH 7.5) 완충액 중에서 1M NaCl의 5% 내지 22% 구배를 사용하여, 오염 이.콜리 단백질을 분리해내었다.

동결된 세포 페이스트를 해동시키고, 추출 완충액 (100 mM Hepes 완충액, pH 8.0, 50 mM EDTA, 5 mM DTT)중에 재현탁시켰다. 기계적 균질화기를 통해 세포 현탁액을 여러번 통과시켜 세포질 격질로부터 Apo-2L 생성물을 방출시킨 다음, 0.2% PEI (최종 농도)를 첨가하고, 원심분리에 의해 고형물을 제거하였다. 정제된 용해물을 H<sub>2</sub>O로 1:1 (v/v)로 희석시키고, pH를 7.2로 조절한 후, 50 mM Hepes/0.05% 트리톤/1 mM DTT pH7.2의 3-4 컬럼 부피로 예비-평형화시킨 MPHS 컬럼 (바이오래드(BioRad))상에 부하하였다. 2-3 컬럼 부피의 평형 완충액으로 세척하는 단계를 행한 다음 평형 완충액 중의 0.1 M NaCl로 두번째 세척 단계를 거친 후, 평형 완충액 중의 0.1 M 내지 0.8 M NaCl 구배의 6 컬럼 부피를 사용하여 MPHS 컬럼으로부터 Apo-2L 단백질을 용출시켰다. 컬럼 용출 분획을 수집하고, 분석하고, 적절한 분획을 모아서 @ 4~8 °C에서 보관하였다.

발효 동안에 Apo-2L 축적물을 분석하면, ZnSO<sub>4</sub> 첨가가 세포 생육에 상당한 영향을 미치지 않는다는 것을 알 수 있었다. 매질 중의 포스페이트가 고갈될 때, 전형적으로 접종 후 약 15 내지 25 시간에, Apo-2 리간드의 생성이 시작되었다. 도 8은, 시간 경과에 따른, IEX HPLC 방법에 의해 검출된 가용성 Apo-2L 삼량체의 축적을 나타낸다. ZnSO<sub>4</sub>가 첨가된 배양액은 마이너스-ZnSO<sub>4</sub> 대조군에 비하여 세포 용해물 시료에서 더욱 높은 생성물 농도를 갖고 있었다.

초기 포획 단계 (IEX 크로마토그래피와 관련)에서 생성물 회수의 분석(도 9)은, ZnSO<sub>4</sub> 첨가의 부재 및 존재하에 수행된 발효로부터 세포 용해물의 MPHS 크로마토그래피의 용출 프로파일을 나타낸다. 초기 통과 및 세척 단계 후에, 2개의 주요 피크 (피크 A 및 피크 B)가 분해되었다. SDS-PAGE 분석에 의해, 양쪽 피크는 주로 Apo-2L로 구성되었음을 알 수 있다.

양쪽 피크로부터의 정제된 물질을 제조하고 생물학적 활성 및 안정성을 분석하였다. 이러한 연구로부터 수득된 결과는, 피크 A가 Apo-2L 생성물의 더욱 안정한 풀(pool)인 반면 피크 B는 시간에 걸쳐 응집되는 경향이 크다는 것을 제시하였다. 불안정성을 최소화하기 위하여, 추가의 회수에서 피크 B를 배제하였다. 각각의 피크 하에서 적분된 면적을 나타내는 잘라낸 부분을 측량함으로써 피크 A 대 피크 B의 비율을 산출하였다. 표 V에 표로 나타낸 결과는, 피크 A로서 마이너스-ZnSO<sub>4</sub> 경우에서의 평균 약 45%로부터 플러스-ZnSO<sub>4</sub> 경우에서의 약 80% 까지 Apo-2L의 퍼센트 변화를 나타내며, 회수 가능한 풀에서 Apo-2L 생성물의 양이 상당히 증가함을 나타낸다.

**[표 V]**

전개 ID	ZnSO <sub>4</sub> 첨가	크로마토그래피 규모	피크 A%	피크 B%
SAP02-113	없음	0.66 × 15.5 cm	41.6	58.4
LAP02-4	없음	4.4 × 41.5 cm	50.4	49.6
SAP02-138	있음	0.66 × 17.0 cm	78.8	21.2

B. trp 프로모터에 의해 조절되는 Apo-2L (아미노산 잔기 114-281) 발현

PS1346.Apo2L.0 플라스미드 구축: Apo-2L의 잔기 114-281을 코딩하는 DNA (개시 메티오닌 코돈 앞에 위치)를 pS1346 플라스미드 벡터내에 삽입하였다. pS1346 플라스미드는 pHGH207-1 [DeBoer 등, Promoters: Structure and Function, Praeger, New York, pp.462-481 (1982)] 이고, Apo-2L 코딩 서열의 하류에서 전사 터미네이터에 대한 람다를 함유한다[Scholtissek 등, Nucleic Acids Res., 15: 3185(1987)].

리간드 발현이 trp 프로모터에 의해 조절되는 경우, Apo-2 리간드(아미노산 잔기 114-281)의 발현을 위한 생산 숙주로서 균주 54C2 (이.콜리 W3110 fhuA(tonA) lon galE rpoHts(htpRts) clpP lacIq)를 사용하였다. 54C2의 컴피턴트 세포를 제조하고, 표준 절차를 사용하여 pS1346.Apo2L.0으로 형질전환시켰다. 20 µg/ml의 테트라사이클린을 함유하는 LB 평판 (LB+ Tet20)으로부터 형질전환체를 집어내고, 도말 정제하고, 20 µg/ml의 테트라사이클린을 가진 LB 브로쓰중에서 30℃ 진탕기/배양기에서 생육시킨 다음, -80℃에서 DMSO에 보관하였다.

매질 조성물내의 약간의 조절 (표 VI), 유도제 인돌 3-아크릴산(IAA)의 첨가 및 공정 길이를 제외하고는, AP-프로모터 발현 체계에 대해 상기 기재된 것과 같은 유사한 발효 매개변수 하에서, 생산 유기체 54C2/pS1346.Apo2L.0을 사용하여 수행된 실험을 실행하였다. 초기 생육 단계 동안에 프로모터 활성을 억제하기 위하여 트립토판을 초기 매질에 첨가하였다. 브로쓰의 세포 밀도가 약 30 OD<sub>550</sub>에 이르렀을때 30℃로부터 25℃로 온도를 변화시켰다. 브로쓰의 세포 밀도가 약 55 OD<sub>550</sub>에 이르렀을때 유도제를 첨가하였다. ZnSO<sub>4</sub> 첨가가 이루어진 실험에서, 충분한 양의 100 mM ZnSO<sub>4</sub> 용액을 25 OD<sub>550</sub>의 세포 밀도 및 접종후 24 시간째에 첨가하여 약 50 ~ 100 µM의 최종 농도를 달성하였다. 세포 페이스트를 유도제 첨가 후 6 시간에 수집하고, -20℃ 내지 -80℃에서 보관하였다.

[표 VI]

trp 프로모터 발현 체계를 위해 필요한 AP 프로모터 발현 체계의 생산 배지 첨가 성분	
성분	양/리터
L-이소류신	0.5-1 g
트립토판	0.1-5 g

40~60 OD<sub>550</sub>에 이른 후에, trp 프로모터 체계에 대한 세포 생육은 느렸다. IAA 첨가로 유도하기 전에 Apo-2 리간드의 발현은 상당히 불완전하였으며, 이는 아마도 생육 문제의 원인으로 생각되었다. 세포 생육 프로파일은 ZnSO<sub>4</sub> 첨가의 부재 및 존재하에서 필적하였다. 도 10은 시간 경과에 따라 IEX HPLC 방법에 의해 검출되는 가용성 Apo-2L 삼량체의 축적을 나타낸다. ZnSO<sub>4</sub> 첨가와 함께 실행시에 가용성 Apo-2L의 축적이 계속 증가되고, 세포 용해물 시료에서 더욱 높은 생성물 농도가 달성되었다.

#### C. 2가 금속 이온/DTT를 사용한 이.콜리로부터의 Apo-2L (아미노산 잔기 114-281) 회수 및 정제

이.콜리로부터 Apo-2L의 회수 및 정제에서 하기 프로토콜을 사용할 수도 있다. 먼저, 세포를 균질화하고 다음과 같이 추출을 수행한다. 동결된 수집된 에스케리키아 콜리 세포를 6 부피의 추출 완충액 (100 mM HEPES/5 mM DTT (또는 DTT 대신에 5 mM Zn 황산염), pH 8.0)에 현탁시키거나, 또는 완전 세포 브로쓰를 5 mM DTT (또는 DTT 대신에 5mM Zn 황산염) @ pH 8.0으로 조절하였다. 현탁액을 2-8℃에서 1 시간동안 완전히 혼합한 다음, 균질화기(미국 매사추세츠 에버렛의 가울린 코포레이션(Gaulin Corporation))에서 균질화하였다. 파괴된 세포 현탁액을 0.2% PEI에서 1-2 시간동안 응집시키고, BTPX205 (스웨덴 알파 라발 세퍼레이션 에이비(Alfa Laval Separation AB) 연속 공급물 원심분리에 의해 원심분리시키고, 깊이 여과(depth filtration)에 의해 정화시켰다.

추출 후에, Apo-2L을 다음과 같이 정제하였다. 정화된 세포 현탁액 (추출물)을 동일 부피의 H<sub>2</sub>O/0.1% 트리톤-100으로 상태조절하고 pH를 7.2로 맞추으로써 마크로-프레프(Macro-Prep) 세라믹 고 S (MP-HS) 크로마토그래피를 수행하였다. 상태조절된 추출물을, 50 mM HEPES/0.05% 트리톤-100/1mM DTT (또는 100 µM Zn 황산염), pH7.2에 평형화시킨 MP-HS 양이온 교환기 (미국 캘리포니아주 헤르쿨레스 바이오-래드) 컬럼에 부하시켰다 (상기 2개 단계에서, SP-세파로스 웨스트 플로우 (SP-Sepharose Fast Flow) (스웨덴 아마섬 파르마시아(Amersham Pharmacia))를 대안적으로 사용

할 수도 있다). 비-결합 단백질을 통과시키고, 평형 완충액으로 기준선 @A280까지 세척함으로써 이를 제거하였다. 컬럼을 3 컬럼 부피의 0.1M NaCl/평형 완충액으로 세척하였다. Apo-2L을, 평형 완충액중에서 0.1M로부터 0.8M까지 염화나트륨의 직선형 8 컬럼-부피 구배를 사용하여 용출시켰다.

MP-HA의 푸울을 동일 부피의 1.0M 황산암모늄/50 mM 트리스/1 mM DTT (또는 100μM Zn 황산염), pH7.5로 상태조절한 다음, 0.5 M 황산암모늄/50 mM 트리스/1 mM DTT (또는 100μM Zn 황산염) pH 7.5중에 평형화된 페닐-세파로스 FF (스웨덴 아머삼 파르마시아)의 컬럼상에 부하하였다. (0.5 M 황산암모늄의 대체물로서, 0.6M 황산나트륨이 사용될 수도 있다). 컬럼을 평형 완충액으로 세척하고, 컬럼 유출액중에 Apo-2L을 수집하였다.

이어서, Apo-2L을 한외여과 및 G-25 겔 여과 (스웨덴 아머삼 파르마시아) 크로마토그래피에 의해 처리하였다. 페닐-세파로스의 푸울을 TFF 한외여과 (미국 매사추세츠 베드포드, 밀리포어(Millipore))로 농축하고, 20 mM 트리스/8 % 트레할로스, pH7.5로 G-25 겔 여과 컬럼상에서 처리하였다 (대안으로서, 물질을 정용여과에 의해 처리할 수도 있다). Apo-2L의 최종 순도를 SDS-PAGE, SEC-HPLC 및 아미노산 서열 분석에 의해 결정할 수도 있다.

## 실시예 9

염화코발트의 첨가는 가용성 Apo-2 리간드 생성물 축적 및 회수를 개선시킨다

알칼리성 포스파타제 프로모터에 의해 조절되는 Apo-2L (아미노산 잔기 114-281) 발현

Zn 이외의 금속 이온, 즉 염화코발트의 첨가가 Apo-2L (아미노산 잔기 114-281) 생성물 축적에 미치는 효과를 연구함에 있어서, 실시예 8A에 기재된 것과 동일한 생산 유기체, 배지 조성, 발효 조건 및 시료 분석을 사용하였다. 100 mM ZnSO<sub>4</sub> 대신에 H<sub>2</sub>O중의 100 mM CoCl<sub>2</sub>의 용액을 사용하고, 각각 2회 첨가에서 50~100 μM의 최종 농도에 이르도록 충분한 양을 첨가하였다.

도 11은 발효 과정 동안에 가용성 Apo-2L 축적에 미치는 CoCl<sub>2</sub>의 첨가의 장점을 나타낸다. ZnSO<sub>4</sub> 첨가 실험과 유사하게, 중요한 것은 아니지만, 가용성 Apo-2L 생성물의 높은 축적 속도가 IEX HPLC 분석 방법에 의해 검출되었다. 데이터는, Apo-2L의 조립된 삼량체를 안정화시키는 능력의 결과로서, 특정한 금속 이온의 첨가가 일반적으로 가용성 Apo-2L 축적을 개선시킨다는 것을 증명한다.

## 실시예 10

Apo-2L 제형에 대한 각종 금속 이온의 영향

20 mM 트리스, 8% 트레할로스, 0.01% 트윈20, pH7.5 제제 중에서, 5 mM의 금속 염 (이들 각각은 하기 표 VII에서 인용된다; 금속 대 단백질의 100:1 몰비)과 함께 5℃에서 24 시간동안 50μl Apo-2L (형태 114-281)을 배양시킴으로써 시험관내 분석을 수행하였다. 이어서, 실시예 4에 기재된 바와 같이 SK-MES 분석을 사용하여 아포토시스 활성화에 대해 시료를 평가하였다.

표 VII에 EC50 (또는 50%의 세포를 죽이는 Apo-2L 농도)을 나타낸다 (ng/ml의 단위). 표 VII에 나타낸 바와 같이, 배양액에 Zn 아세트산염 및 Zn 황산염의 첨가는 Apo-2L 활성을 증진시킨다.

[표 VII]

첨가된 금속	생검 EC50
대조군	19.0±1.9 (n=3)
아세트산Mn	19.8
염화Mn	19.9
아세트산Fe	32.5
아세트산Co	25.9
염화Co	17.9
황산Co	16.7

아세트산Ni	18.7
아세트산Cu	844
염화Cu	984
황산Cu	774
아세트산Ag	20
아세트산Zn	12.3
염화Zn	17.2
황산Zn (100:1)	9.3±1.2 (n=3)
(10:1)	10.0±0 (n=2)
(1:1)	11.5±0.7 (n=2)

## 실시예 11

### Apo-2 리간드 제제 안정성에 대한 아연 금속 이온의 영향

실시예 8B에 나타난 바와 같이, MPHS 양이온 교환기를 사용한 정제 공정에서의 첫번째 단계는 2개의 피크 A 및 B를 제공한다. 2개 피크의 저장 안정성을 조사하기 위하여, 이.콜리 발현된 생성물 (trp 프로모터를 가진 pS1346.ApoL.0을 사용)로부터 Apo-2L (형태 114-281)을 추출하고, MPHS 양이온 교환기에 의해 정제하였다. MPHS 피크 A를 MP-히드록시아파타이트 및 페닐-세파로스 FF에 의해 더욱 정제한 다음, G-25 겔 여과를 사용하여 처리하였다. MP-히드록시아파타이트, 페닐-세파로스 FF 및 Ni-NTA 슈퍼플로우에 의해 MPHS 피크 B를 정제한 다음, 20 mM 트리스, 8% 트레할로스, 0.01% 트윈20, pH7.5내로 G-25 겔 여과 상에서 처리하였다. 시료를 3 cc 유리 바이알내에 멸균 충전시키고, 테플론 코팅된 그레이부틸 마개로 밀봉하였다. 정제되고 처리된 피크 A 및 B의 저장 안정성을 표 VIII에 기재된 시간 (주일("wk") 또는 개월("mo")) 및 온도 (°C)에서 평가하였다.

[표 VIIIa]

피크A	SDS-SEC %M	SDS-SEC %D	SEC % 회수	SEC %상량체	RP% 주요	EC50
1주일, -70°C	ND	ND		98.60	78.10	
1주일, 37°C	ND	ND	96.7	98.2	73.60	
2개월, -70°C	88.85	7.50		93.93	74.52	
2개월, 30°C	84.90	10.58	65.07	94.03	53.98	
6개월, -70°C	93.00	5.80			ND	11.1
6개월, 5°C	87.00	9.44	100		ND	14.8
6개월, 30°C	80.00	8.68	76		ND	67.8

[표 VIIIb]

피크A	SDS-SEC %M	SDS-SEC %D	SEC % 회수	SEC %상량체	RP% 주요	EC50
1주일, -70°C	ND	ND		98.70	75.3	
1주일, 37°C	ND	ND	101.1	98.3	61.4	
2개월, -70°C	94.03	3.79		90.00	65.77	
2개월, 30°C	94.12	4.54	46.07	94.12	32.185	
6개월, -70°C	82.00	11.25			ND	10.3
6개월, 5°C	73.50	17.00	92		ND	12.6
6개월, 30°C	47.00	23.20	38		ND	사멸



표 VIII은, 다른 것들 중에서, 퍼센트 단량체 (% M) 및 퍼센트 이량체 (% D)를 나타내고; "ND"란 결정되지 않은 값을 말한다. 피크 A는 0 일째에 피크 B에 비해 약간 적은 이량체 및 기타 불순물을 포함하였다. 표 VIII에서 볼 수 있듯이, 30°C에서 더욱 다량의 침전 (2 개월 지점에서 대략 40% 이상)에 의해 평가된 바와 같이, 피크 B가 더욱 열 불안정성이 밝혀졌다. 심지어 5 °C에서도, 피크 B는 피크 A에 비해 대략 2 배 더 이량체 형성되기 쉬웠다. 피크 A 및 B의 생화학 분석은, 각각의 안정성 특성을 제외하고는, 각각의 물질이 생화학적으로 균등함을 나타내었다. 피크 B의 낮은 안정성은 부적절한 (삼량체) 조립 또는 낮은 아연 함량에 관련될 수 있는 것으로 생각된다 (피크 A - 0.83 몰비의 아연 대 단백질; 및 피크 B - 0.7 몰비의 아연 대 단백질).

### 도면의 간단한 설명

도 1은 인간 Apo-2 리간드 cDNA의 뉴클레오티드 서열 (서열 번호 2) 및 그의 유도된 아미노산 서열 (서열 번호 1)을 나타낸다. 뉴클레오티드 위치 447 (서열 번호 2)에서의 "N"은 뉴클레오티드 염기가 "T" 또는 "G"일 수도 있음을 나타내기 위해 사용된다.

도 2는 Apo-2L의 결정 구조를 제공한다. 도 2A는 3 겹 축을 따른 삼량체의 개략도를 나타낸다. 각각의 단량체는 동일하다. 규칙적인 단백질 구조가 잔기 120에서 시작되고, 잔기 195-201에서와 같이 잔기 131-141은 불규칙하다 (점선으로 나타냄). 대칭 관계인 3개의 시스테인과 용매 리간드를 포함하는 아연 결합 부위는 공간 충전 도형으로 표시되어 있다. 도 2B는 아연 결합부위의 교차 시각 입체 근접 영상을 보여주고 있다; 아연-황 거리는 2.3 Å이고 아연-용매 결합거리는 2.3 Å이면서, S<sub>γ</sub>-아연-S<sub>γ</sub>간의 각은 112°이고 S<sub>γ</sub>-아연-용매 각은 107°를 이루고 있다. 도 2(및 5)는 몰스크립트(Molscript) 프로그램 [Kraulis 등, *J. Appl. Cryst.*, 24:946-950 (1991)]과 래스터(Raster)3D 프로그램 [Merritt 등, *Acta Cryst.*, D50:869-873 (1994)]으로 만들어 졌다. 도 2C는 실시예 2에 설명된 실험으로부터 얻어진 결정구조 데이터를 요약한 것이다.

도 3은 선택된 TNF과 요소:Apo2L (서열 번호 1); TNF-β (서열 번호 3); TNF-α (서열 번호 4); CD40L (서열 번호 5); FasL (서열 번호 6); RANKL (서열 번호 7)의 서열 정렬이다. 서열 윗쪽의 화살표는 Apo2L에서의 베타-사슬을 나타낸다. 정렬된 서열 윗쪽 번호는 도 1 (서열 번호 1)의 Apo2L의 서열번호에 상응한다.

도 4는 아연 결합 부위의 기능적 중요성을 보여주는 생물분석 데이터이다. SK-MES-1 세포 생존도는, 여러 농도에서의 Apo-2L (형태 114-281) 또는 아연을 제거하기 위해 킬레이트제로 처리된 Apo-2L (형태 114-281)를 밤새 배양한 후 대사 활성을 형광분석법으로 분석한 결과를 통해 결정되었다.

도 5는 돌연변이 분석 결과를 Apo-2L의 공간충진모델에 표시한 것이다. 삼량체는 도 2에서와 같이 배향되었다. 알라닌에 돌연변이를 일으켰을 때 5배 이상의 생활성 감소를 보이는 잔기를 표시하였고 검게 칠하였다. 돌연변이된 다른 잔기는 중간 정도로 어둡게 나타내었고 이러한 잔기 중 많은 것들이 표시되었다.

도 6은 결합된 아연을 제거하기 전 후의 Apo-2L (형태 114-281)의 원편광 이색성 스펙트럼이다.

도 7은 225nm에서 원편광 이색성으로 관찰된 아연 제거 전후의 Apo-2L의 열 변성 결과이다. 다이노드 전압은 Apo-2L의 2 마이크로몰 용액의 값이다.

도 8은 AP 프로모터를 이용한 이.콜리 발현 체계에서 가용성 Apo-2L 생성물의 축적(gm/L)에 미치는 ZnSO<sub>4</sub> 첨가의 효과 (시간에 따른)이다.

도 9는 ZnSO<sub>4</sub>의 존재 또는 부재하에서 행해진 이.콜리 발현 체계(실시예 8)로부터 얻어진 세포 용해물의 MPHS 크로마토그래피의 용출 곡선이다.

도 10은 trp 프로모터를 이용한 이.콜리 발현 체계에서 가용성 Apo-2L 생성물 축적(gm/L)에 미치는 ZnSO<sub>4</sub> 첨가의 효과 (시간에 따른)이다.

도 11는 AP 프로모터를 이용한 이.콜리 발현 체계에서 가용성 Apo-2L 생성물의 축적(gm/L)에 미치는 CoCl<sub>2</sub> 첨가의 효과 (시간에 따른)이다.

도 12는 pAPAp2-P2RU 플라스미드 구조이다.

도 13은 pAPOK5 플라스미드 구조이다.

도면

도면1

```

1  TTTCCCTCACTGACTATATAAGATAGAGAAGAGGCGCTTCAGTGCAGCCGCTGCGCTGCTGACTTACAGCAGCTCAGACTCAGAGATC
1  ATGCTATGATGGAGGTCACAGGGGGGAGCCAGCTGGGACAGACTGGCGTGTGATCTTCAACAGTGCCTGCAGTCTCTGT
1  MetAlaMetMetGluValGlnGlyProSerLeuGlnThrCysValLeuIleValIlePheThrValLeuLeuGlnSerLeuGly
181 GTGCGTGAACCTTACGCTGACTTTACCAACGAGCTGAAAGCAGATGACAGGACAAAGTACTCCAAAAGTGCGATTGCTTTCTTAAAGAA
31 ValAlaValThrTyrValTyrPheThrAsnGluLeuGlnMetGlnAspLysTyrSerLysSerGlyIleAlaCysPheLeuLysGlu
271 GATGACAGTTATTGGGACCCCAATGACGAGAGAGATATACAGCCCGCTGCGCAAGTCAAGTGCGCAACTCCGCTCAGCTCGTTAGAAAG
61 AspAspSerTyrTrpAspProAsnAspGluGluSerMetAsnSerProCysTrpGlnValLysTrpGlnLeuArgGlnLeuValArgLys
361 ATGATTTTGAGAACCTCTGAGGAAACCATTTCTACAGTTCACAGAAAGCAACAATATTCTCTCCCTAGTGAGAGAAAGGTCNCAG
91 MetIleLeuArgThrSerGlnGluThrIleSerThrValGlnGlnLysGlnGlnAsnIleSerProLeuValArgGluArgGlyProGln
451 AGAGTAGCAGCTCACATACTGGGACCCAGAGAGAGAGAACACACATGTGCTCTCTCCAACTCCAAAGATGAAGAAGGCTGGCGCCGCA
121 ArgValAlaAlaHisIleThrGlyThrArgGlyArgSerAsnThrLeuSerSerProAsnSerLysAsnGlnLysAlaLeuGlyArgLys
541 ATAACTCCGGAATCATCAGAGAGTGGGCAATTCATTCCTGAGCACTTGCACTTGAGGAATGGTGAACCTGCTCATCCATGAATAAGG
151 IleAsnSerTrpGluSerSerArgSerGlyHisSerPheLeuSerAsnLeuHisLeuArgAsnGlyGluLeuValIleHisGlnLysGly
631 TTTTACTACATCTATTCCCAACATACCTTTCGATTTCAGAGAGAAATAAAGAAACACAAAGACGAAACAAATGTCGCAATATATT
181 PheTyrTyrIleTyrSerGlnThrTyrPheArgPheGlnGlnIleLysGlnAsnThrLysAsnAspLysGlnMetValGlnTyrIle
721 TACAATACACAGTTATCCCTGACCCTATATTGTGATGAAGAGCTAGCAATAGTGTGCTTAAGATGCAGAAATATGACTCTAT
211 TyrLysTyrThrSerTyrProAspProIleLeuMetLysSerAlaArgAsnSerCysTrpSerLysAspAlaGlnTyrGlyLeuTyr
811 TCCATCTATCAAGGGGATATTGAGCGTTAAGGAAATGACAGATTTTGTCTGTAACAATGAGCAGCTGATAGACATGAGCATT
241 SerIleTyrGlnGlyIlePheGlnLeuLysGlnAsnAspArgIlePheValSerValThrAsnGlnHisLeuIleAspMetAspHis
901 GAGCCAGTTTTCGCGGCGCTTTTAGTGGCTAACCTGGAAAGAAAGCAATTAACCTCAAGTGACTATTCAAGTTTTCAGGAT
271 GluAlaSerPhePheGlyAlaPheLeuValGlySerP
991 GATACACTATGAAGATGTTCAAAAAATCTGACCCAAAACAACAACAGAAA

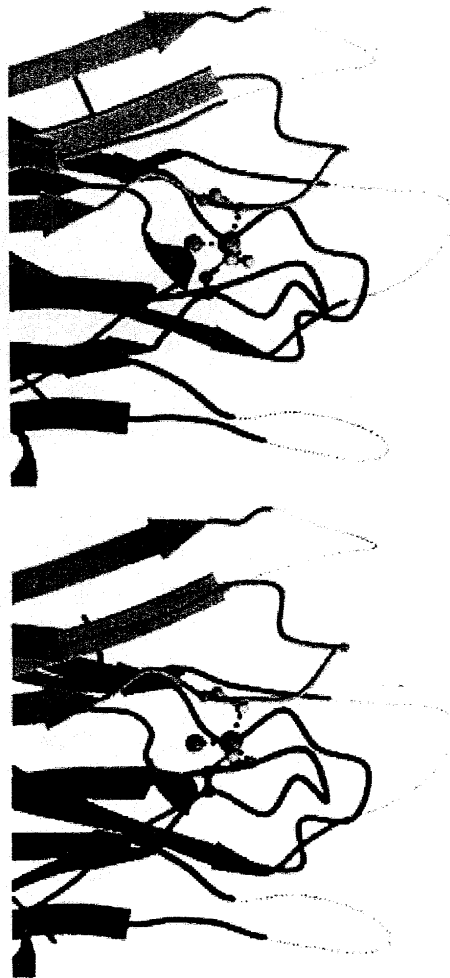
```



도면2A



도면2B



도면2C

결정학적 분석 데이터

	<u>Apo-2L (114-281)</u>	<u>Apo-2L (91-281) D218A</u>	<u>Apo-2L (91-281) D218A</u>
결정 공간군	P6 <sub>3</sub>	R32	R32
단위 격자 (Å)	a=72.5 c=140	a=66.4 c=197.6	a=66.4 c=197.7
해상도 (Å)	3.9	1.9	1.3
커버리지 (%)	94 (96)	93 (99)	100 (100)
<I/σ(I)>	5.9	10.1	12.4
고유번호 (hkl)	3589	12680	41840
리턴던시	4.9	4.3	12.1
R <sub>symm</sub> (%)	15.4 (34)	6.2 (27)	6.4 (34)
ASU내의 프로토타입 수	2	1	1
정제			
R <sub>cryst</sub> (%)	33.8	20	
R <sub>free</sub> (%)	27.6	22	
결합길이 표준편차 (Å)	0.009	0.015	0.007
결합각 표준편차 (°)	1.79	2.0	1.41
평균 B 값	—	14	14
물 분자 수	0	170	

$R_{symm} = \sum_h \sum_i (I_{hi} - \langle I_h \rangle) / \sum_h I$  (I<sub>h</sub>는 브래그 지수 h의 대칭성 관련 반사의 i회

관찰의 평균 구조 인자 강도)

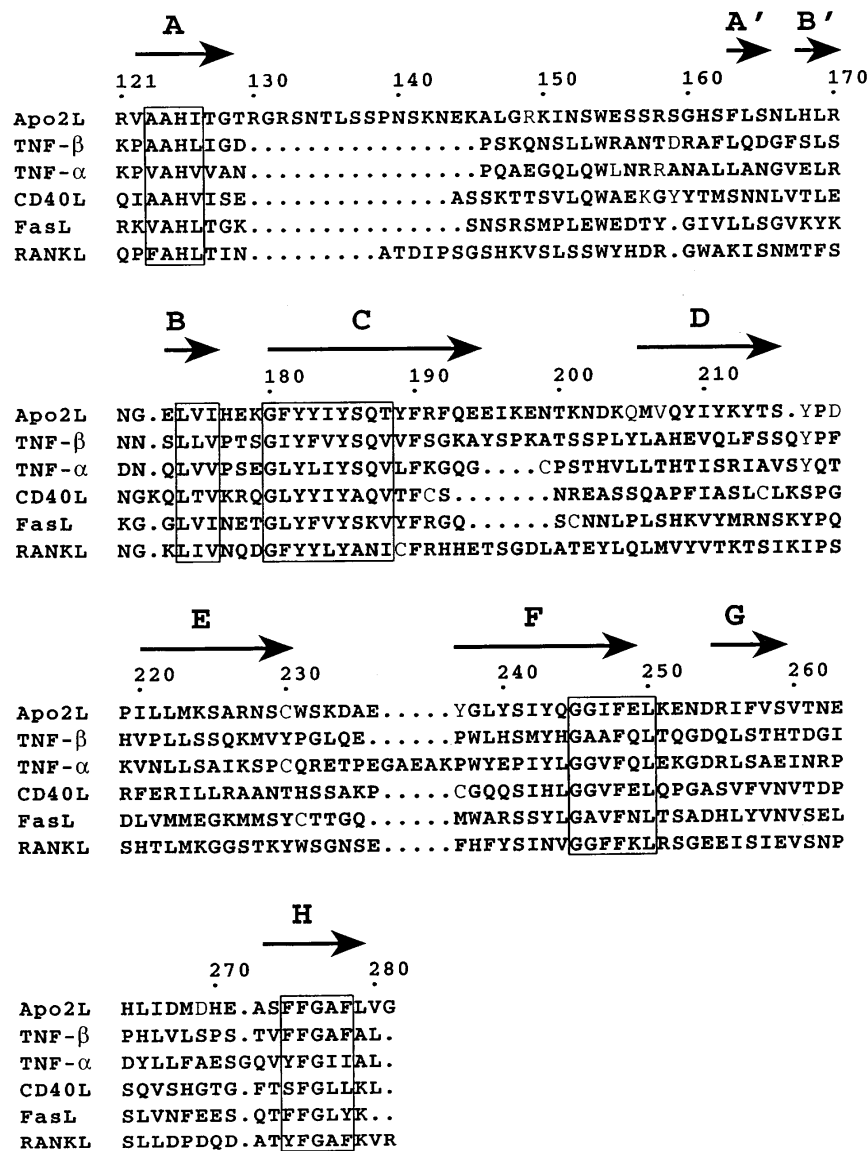
$R_{cryst} = \sum_h \sum_i |F_{obs} - F_{calc}| / \sum_i |F_{obs}|$  (F<sub>obs</sub> 및 F<sub>calc</sub>는 관찰 및 계산 구조 인자 진폭)

$R_{free} = \sum_{(hkl) \in \tau} |F_{obs(hkl)} - k| F_{(hkl)}| / \sum_{(hkl) \in \tau} |F_{obs(hkl)}|$  (정제 과정에서 τ조의 반사를 생략)

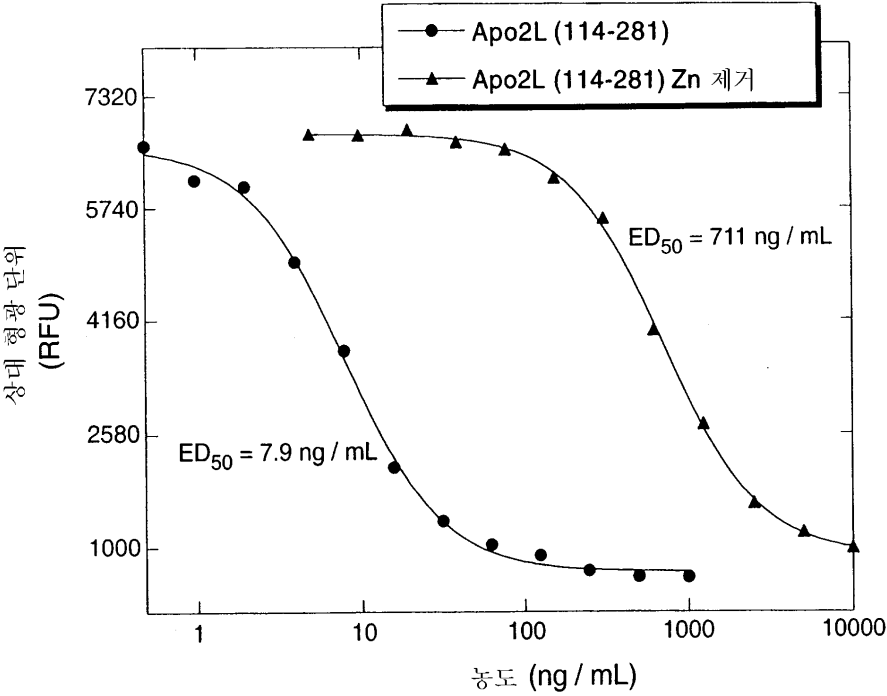
데이터 중 10%는 R<sub>free</sub> 계산을 위해 τ조에 포함시키고 정제시에는 포함시키지 않음.

괄호 안의 숫자는 최고 해상도 셀에 대한 것임.

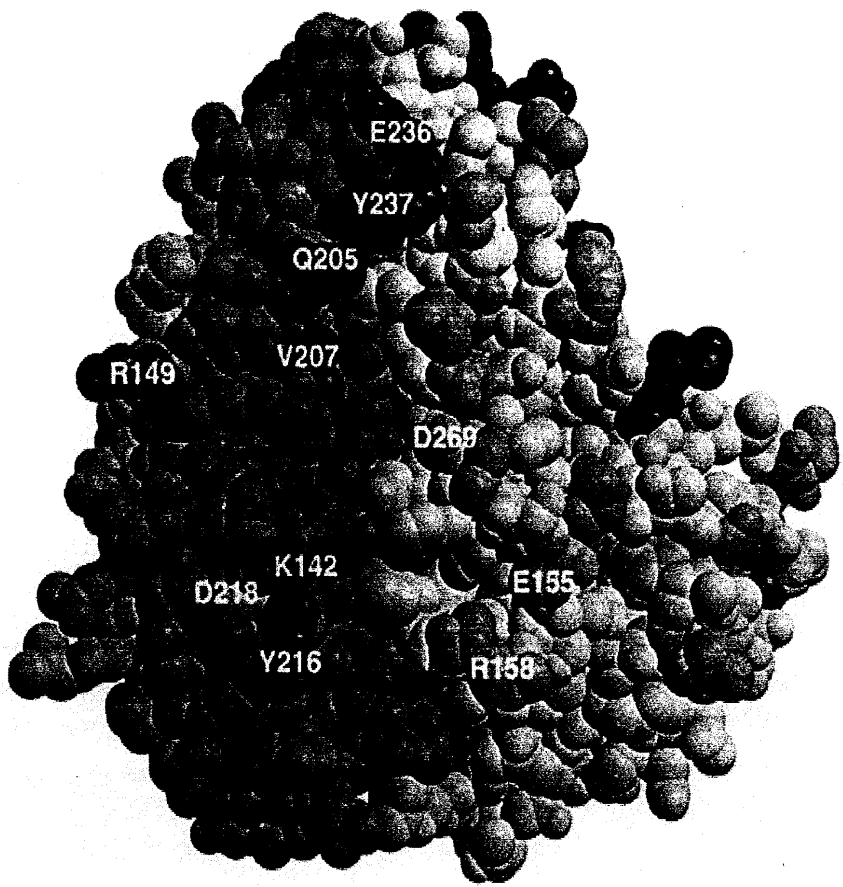
도면3



도면4

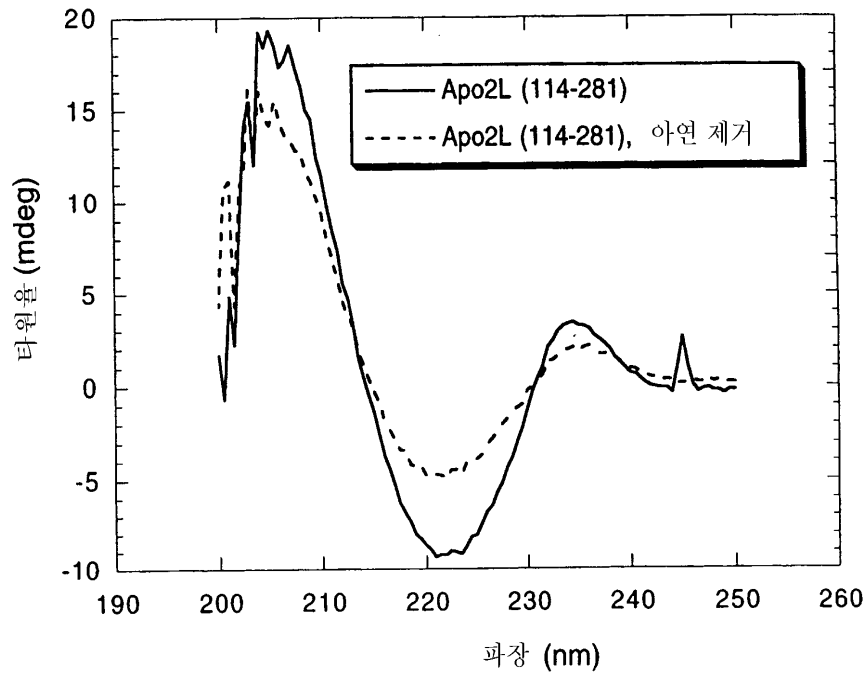


도면5



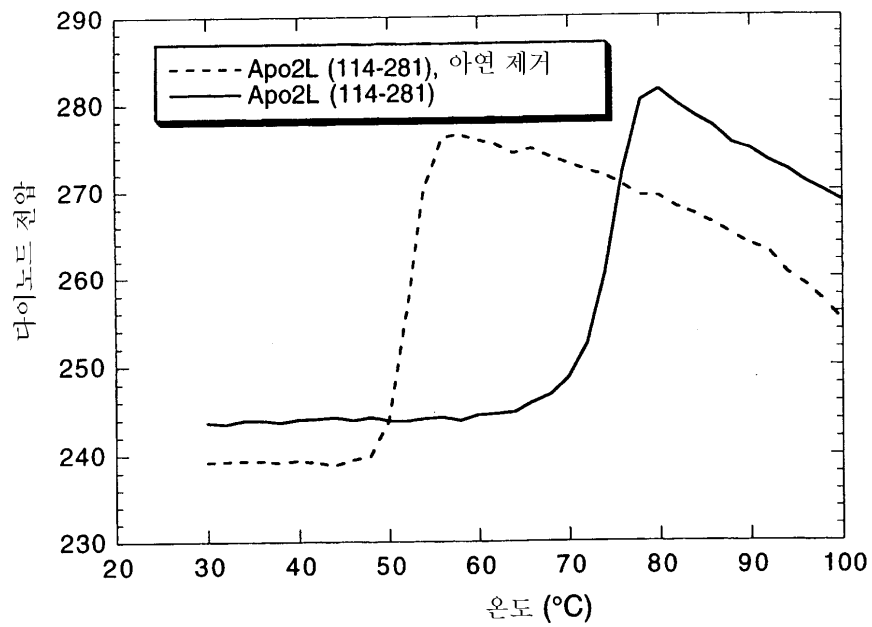
도면6

원편광 이색성 스펙트럼

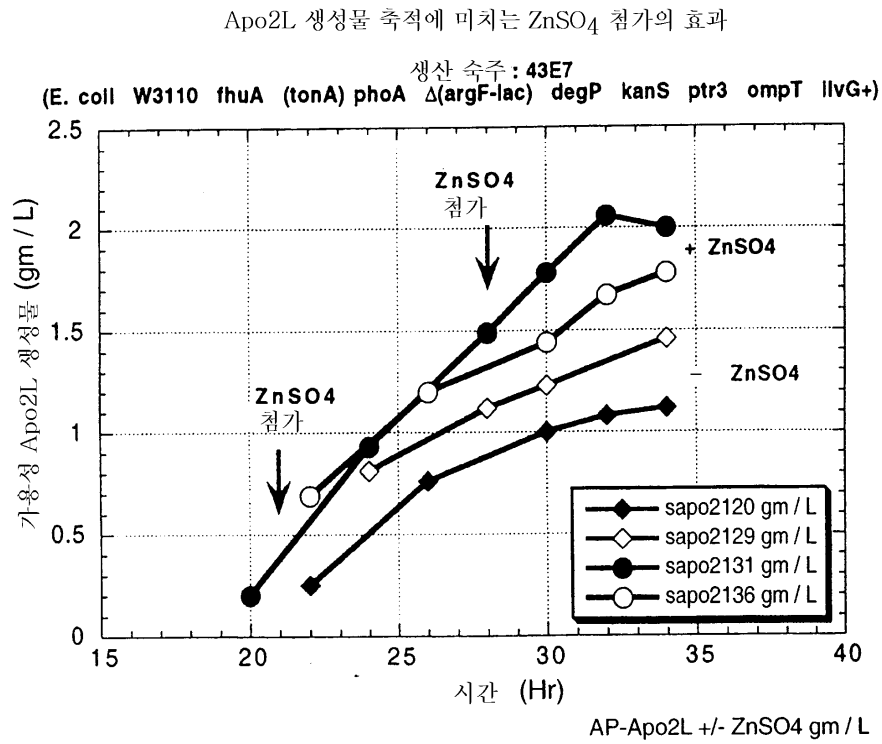


도면7

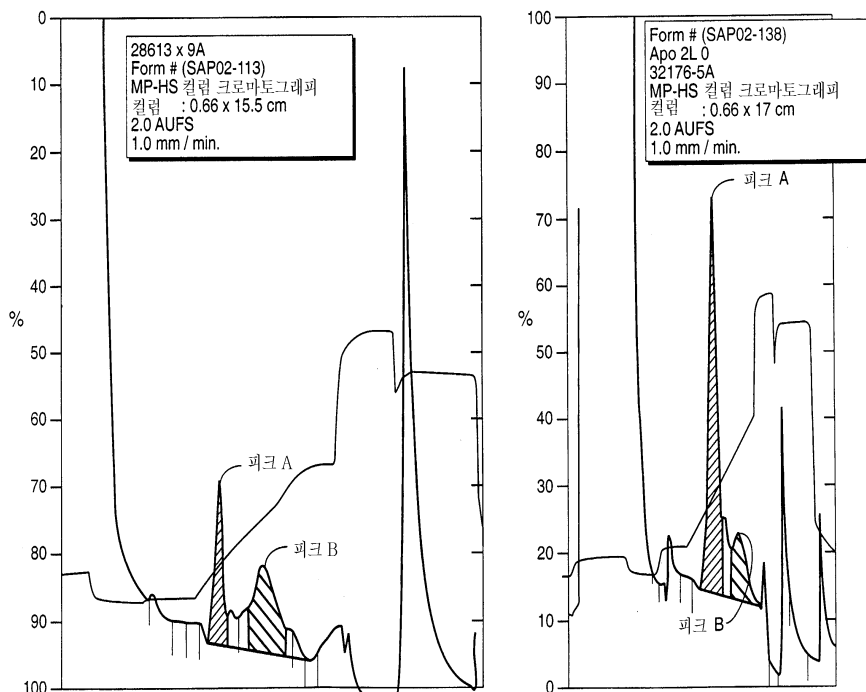
안정성에 대한 아연 제거의 영향:  
CD에 의한 열변성



도면8

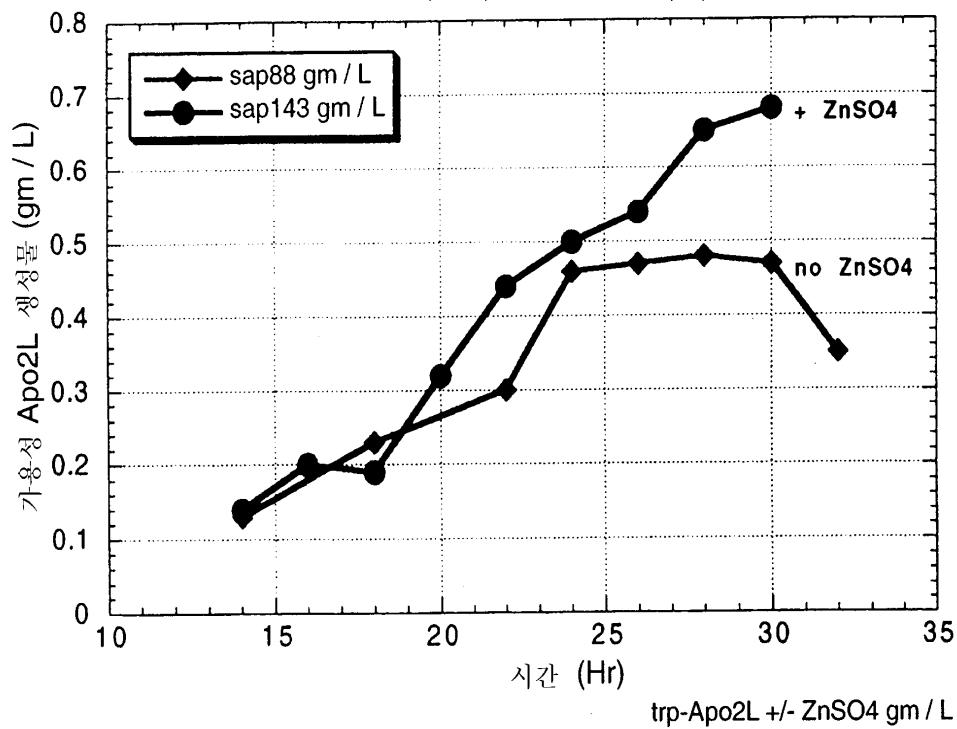


도면9



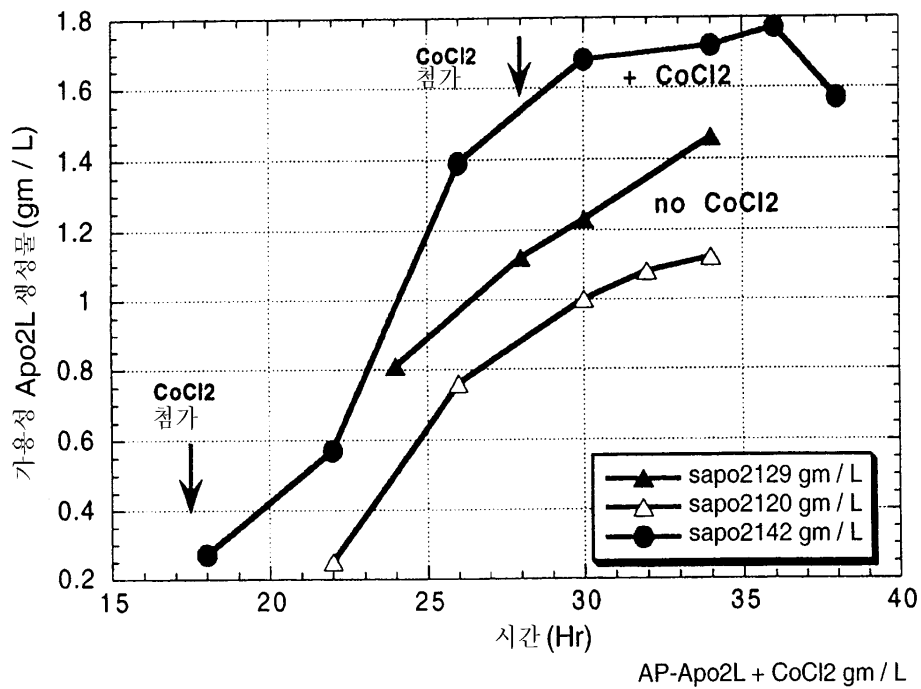
도면10

Apo2L 생성물 축적에 미치는  $ZnSO_4$  첨가의 효과  
(이.콜리 발현용 프로모터 사용)



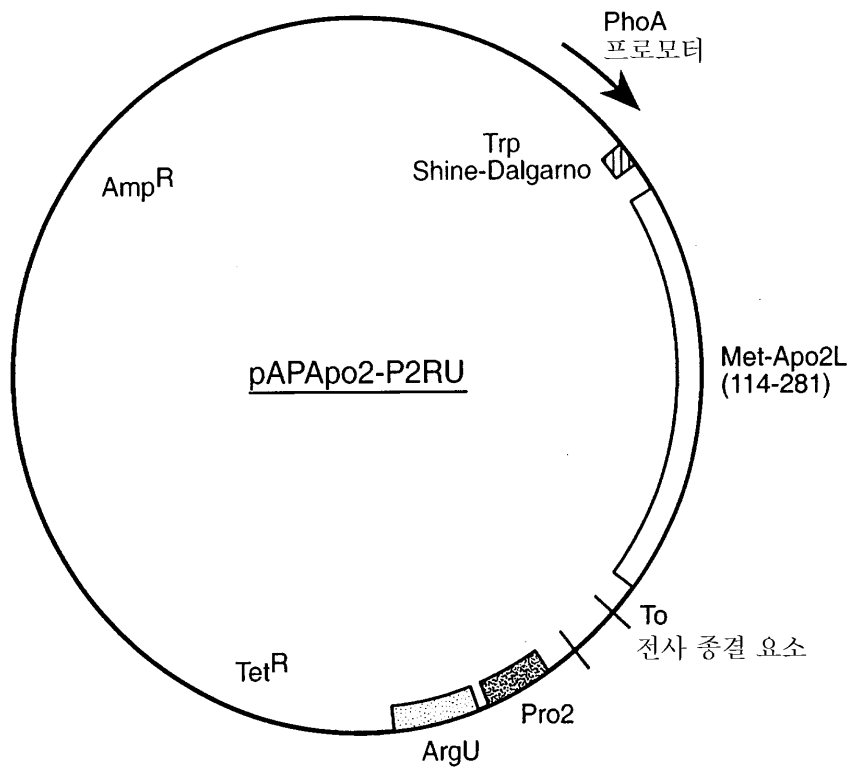
도면11

Apo2L 생성물 축적에 미치는  $CoCl_2$  첨가의 효과

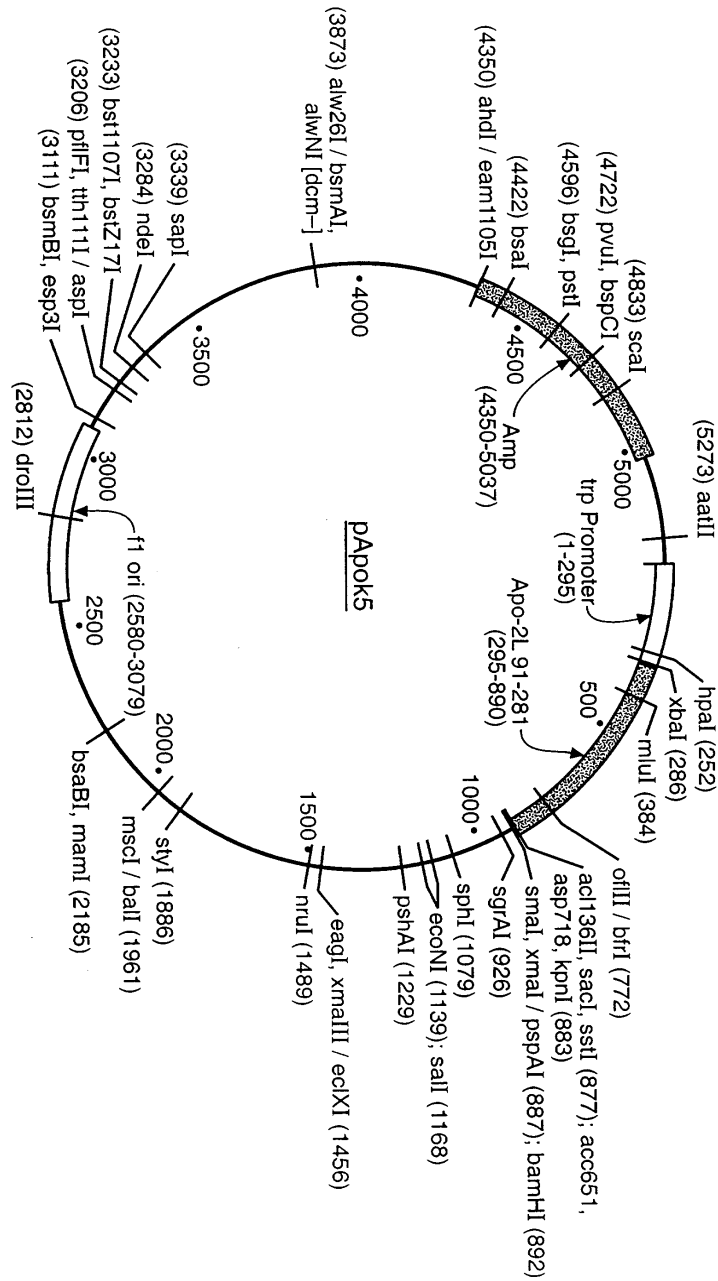




도면12



도면13



## 서열목록

- <110> Genentech, Inc.
- <120> METHODS FOR MAKING APO-2 LIGAND USING DIVALENT METAL IONS
- <130> P1761R1PCT
- <140> PCT/US00/17579
- <141> 2000-06-26
- <150> US 60/141,342
- <151> 1999-06-28
- <160> 7
- <210> 1
- <211> 281

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

```

Met Ala Met Met Glu Val Gln Gly Gly Pro Ser Leu Gly Gln Thr
  1              5              10              15
Cys Val Leu Ile Val Ile Phe Thr Val Leu Leu Gln Ser Leu Cys
              20              25              30
Val Ala Val Thr Tyr Val Tyr Phe Thr Asn Glu Leu Lys Gln Met
              35              40              45
Gln Asp Lys Tyr Ser Lys Ser Gly Ile Ala Cys Phe Leu Lys Glu
              50              55              60
Asp Asp Ser Tyr Trp Asp Pro Asn Asp Glu Glu Ser Met Asn Ser
              65              70              75
Pro Cys Trp Gln Val Lys Trp Gln Leu Arg Gln Leu Val Arg Lys
              80              85              90
Met Ile Leu Arg Thr Ser Glu Glu Thr Ile Ser Thr Val Gln Glu
              95              100             105
Lys Gln Gln Asn Ile Ser Pro Leu Val Arg Glu Arg Gly Pro Gln
              110             115             120
Arg Val Ala Ala His Ile Thr Gly Thr Arg Gly Arg Ser Asn Thr
              125             130             135
Leu Ser Ser Pro Asn Ser Lys Asn Glu Lys Ala Leu Gly Arg Lys
              140             145             150
Ile Asn Ser Trp Glu Ser Ser Arg Ser Gly His Ser Phe Leu Ser
              155             160             165
Asn Leu His Leu Arg Asn Gly Glu Leu Val Ile His Glu Lys Gly
              170             175             180
Phe Tyr Tyr Ile Tyr Ser Gln Thr Tyr Phe Arg Phe Gln Glu Glu
              185             190             195
Ile Lys Glu Asn Thr Lys Asn Asp Lys Gln Met Val Gln Tyr Ile
              200             205             210
Tyr Lys Tyr Thr Ser Tyr Pro Asp Pro Ile Leu Leu Met Lys Ser
              215             220             225
Ala Arg Asn Ser Cys Trp Ser Lys Asp Ala Glu Tyr Gly Leu Tyr
              230             235             240
Ser Ile Tyr Gln Gly Gly Ile Phe Glu Leu Lys Glu Asn Asp Arg
              245             250             255
Ile Phe Val Ser Val Thr Asn Glu His Leu Ile Asp Met Asp His
              260             265             270
Glu Ala Ser Phe Phe Gly Ala Phe Leu Val Gly
              275             280

```

<210> 2

<211> 1042

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> VARIATION

<222> 447

<223> N CAN BE T OR G

<400> 2

```

tttcctcact gactataaaa gaatagagaa ggaagggctt cagtgaccgg 50
ctgcctggct gacttacagc agtcagactc tgacaggatc atggctatga 100

```

```

tggaggtcca ggggggaccc agcctgggac agacctgcgt gctgatcgtg 150
atcttcacag tgctcctgca gtctctctgt gtggctgtaa cttacgtgta 200
ctttaccaac gagctgaagc agatgcagga caagtactcc aaaagtggca 250
ttgcttgttt cttaaaaagaa gatgacagtt attgggaccc caatgacgaa 300
gagagtatga acagcccctg ctggcaagtc aagtggcaac tccgtcagct 350
cgttagaaaag atgatttttga gaacctctga ggaaaccatt tctacagttc 400
aagaaaagca acaaaatatt tctcccctag tgagagaaaag aggtccncag 450
agagtagcag ctacacataac tgggaccaga ggaagaagca acacattgtc 500
ttctccaaac tccaagaatg aaaaggctct gggccgcaaa ataaactcct 550
gggaatcatc aaggagtggg cattcattcc tgagcaactt gcacttgagg 600
aatggtgaac tggatcatcca tgaaaaaggg ttttactaca tctattccca 650
aacatacttt cgatttcagg aggaaataaa agaaaacaca aagaacgaca 700
aacaatgggt ccaatatatt tacaaataca caagttatcc tgaccctata 750
ttgttgatga aaagtgctag aaatagttgt tgggtctaaag atgcagaata 800
tggactctat tccatctatc aagggggaat atttgagctt aaggaaaatg 850
acagaatttt tgtttctgta acaaatgagc acttgataga catggaccat 900
gaagccagtt ttttcggggc ctttttagtt ggctaactga cctggaaaga 950
aaaagcaata acctcaaagt gactattcag ttttcaggat gatacactat 1000
gaagatgttt caaaaaatct gaccaaaca aacaaacaga aa 1042

```

<210> 3

<211> 144

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

```

Lys Pro Ala Ala His Leu Ile Gly Asp Pro Ser Lys Gln Asn Ser
  1                5                10                15
Leu Leu Trp Arg Ala Asn Thr Asp Arg Ala Phe Leu Gln Asp Gly
                20                25                30
Phe Ser Leu Ser Asn Asn Ser Leu Leu Val Pro Thr Ser Gly Ile
                35                40                45
Tyr Phe Val Tyr Ser Gln Val Val Phe Ser Gly Lys Ala Tyr Ser
                50                55                60
Pro Lys Ala Thr Ser Ser Pro Leu Tyr Leu Ala His Glu Val Gln
                65                70                75
Leu Phe Ser Ser Gln Tyr Pro Phe His Val Pro Leu Leu Ser Ser
                80                85                90
Gln Lys Met Val Tyr Pro Gly Leu Gln Glu Pro Trp Leu His Ser
                95                100               105
Met Tyr His Gly Ala Ala Phe Gln Leu Thr Gln Gly Asp Gln Leu
                110               115               120
Ser Thr His Thr Asp Gly Ile Pro His Leu Val Leu Ser Pro Ser
                125               130               135
Thr Val Phe Phe Gly Ala Phe Ala Leu
                140

```

<210> 4

<211> 147

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

```

Lys Pro Val Ala His Val Val Ala Asn Pro Gln Ala Glu Gly Gln
  1                5                10                15
Leu Gln Trp Leu Asn Arg Arg Ala Asn Ala Leu Leu Ala Asn Gly

```

20	25	30
Val Glu Leu Arg Asp Asn Gln Leu Val Val Pro Ser Glu Gly Leu		
35	40	45
Tyr Leu Ile Tyr Ser Gln Val Leu Phe Lys Gly Gln Gly Cys Pro		
50	55	60
Ser Thr His Val Leu Leu Thr His Thr Ile Ser Arg Ile Ala Val		
65	70	75
Ser Tyr Gln Thr Lys Val Asn Leu Leu Ser Ala Ile Lys Ser Pro		
80	85	90
Cys Gln Arg Glu Thr Pro Glu Gly Ala Glu Ala Lys Pro Trp Tyr		
95	100	105
Glu Pro Ile Tyr Leu Gly Gly Val Phe Gln Leu Glu Lys Gly Asp		
110	115	120
Arg Leu Ser Ala Glu Ile Asn Arg Pro Asp Tyr Leu Asp Phe Ala		
125	130	135
Glu Ser Gly Gln Val Tyr Phe Gly Ile Ile Ala Leu		
140	145	

<210> 5

<211> 141

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Gln Ile Ala Ala His Val Ile Ser Glu Ala Ser Ser Lys Thr Thr		
1	5	10
Ser Val Leu Gln Trp Ala Glu Lys Gly Tyr Tyr Thr Met Ser Asn		
20	25	30
Asn Leu Val Thr Leu Glu Asn Gly Lys Gln Leu Thr Val Lys Arg		
35	40	45
Gln Gly Leu Tyr Tyr Ile Tyr Ala Gln Val Thr Phe Cys Ser Asn		
50	55	60
Arg Glu Ala Ser Ser Gln Ala Pro Phe Ile Ala Ser Leu Cys Leu		
65	70	75
Lys Ser Pro Gly Arg Phe Glu Arg Ile Leu Leu Arg Ala Ala Asn		
80	85	90
Thr His Ser Ser Ala Lys Pro Cys Gly Gln Gln Ser Ile His Leu		
95	100	105
Gly Gly Val Phe Glu Leu Gln Pro Gly Ala Ser Val Phe Val Asn		
110	115	120
Val Thr Asp Pro Ser Gln Val Ser His Gly Thr Gly Phe Thr Ser		
125	130	135
Phe Gly Leu Leu Lys Leu		
140		

<210> 6

<211> 137

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Arg Lys Val Ala His Leu Thr Gly Lys Ser Asn Ser Arg Ser Met		
1	5	10
Pro Leu Glu Trp Glu Asp Thr Tyr Gly Ile Val Leu Leu Ser Gly		
20	25	30
Val Lys Tyr Lys Lys Gly Gly Leu Val Ile Asn Glu Thr Gly Leu		

```

                35                40                45
Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Val Tyr Phe Arg Gly Gln Ser Cys Asn
                50                55                60
Asn Leu Pro Leu Ser His Lys Val Tyr Met Arg Asn Ser Lys Tyr
                65                70                75
Pro Gln Asp Leu Val Met Met Glu Gly Lys Met Met Ser Tyr Cys
                80                85                90
Thr Thr Gly Gln Met Trp Ala Arg Ser Ser Tyr Leu Gly Ala Val
                95                100               105
Phe Asn Leu Thr Ser Ala Asp His Leu Tyr Val Asn Val Ser Glu
                110               115               120
Leu Ser Leu Val Asn Phe Glu Glu Ser Gln Thr Phe Phe Gly Leu
                125               130               135
Tyr Lys
<210> 7
<211> 152
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 7
Gln Pro Phe Ala His Leu Thr Ile Asn Ala Thr Asp Ile Pro Ser
  1                5                10                15
Gly Ser His Lys Val Ser Leu Ser Ser Trp Tyr His Asp Arg Gly
                20                25                30
Trp Ala Lys Ile Ser Asn Met Thr Phe Ser Asn Gly Lys Leu Ile
                35                40                45
Val Asn Gln Asp Gly Phe Tyr Tyr Leu Tyr Ala Asn Ile Cys Phe
                50                55                60
Arg His His Glu Thr Ser Gly Asp Leu Ala Thr Glu Tyr Leu Gln
                65                70                75
Leu Met Val Tyr Val Thr Lys Thr Ser Ile Lys Ile Pro Ser Ser
                80                85                90
His Thr Leu Met Lys Gly Gly Ser Thr Lys Tyr Trp Ser Gly Asn
                95                100               105
Ser Glu Phe His Phe Tyr Ser Ile Asn Val Gly Gly Phe Phe Lys
                110               115               120
Leu Arg Ser Gly Glu Glu Ile Ser Ile Glu Val Ser Asn Pro Ser
                125               130               135
Leu Leu Asp Pro Asp Gln Asp Ala Thr Tyr Phe Gly Ala Phe Lys
                140               145               150
Val Arg

```