(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2015년05월26일
(11) 등록번호 10-1523127
(24) 등록일자 2015년05월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01) *A61K 39/395* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) *C12N 15/13* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2011-7022283
(22) 출원일자(국제) 2010년03월23일
심사청구일자 2012년02월20일
(85) 번역문제출일자 2011년09월23일
(65) 공개번호 10-2011-0129923
(43) 공개일자 2011년12월02일
(86) 국제출원번호 PCT/US2010/028291
(87) 국제공개번호 WO 2010/111254
국제공개일자 2010년09월30일
(30) 우선권주장
61/163,241 2009년03월25일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
WO2008060645 A2*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
제넨테크, 인크.
미합중국 캘리포니아 (우편번호 94080-4990) 사우쓰샌프란시스코 디엔에이 웨이 1
(72) 발명자
리앙, 웨이-칭
미국 94404 캘리포니아 포스터 시티 멘헤이든 코트 342
플로우먼, 그레고리, 디.
미국 94070 캘리포니아 산 카를로스 체스트넛 스트리트 1386
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
양영준, 이귀동

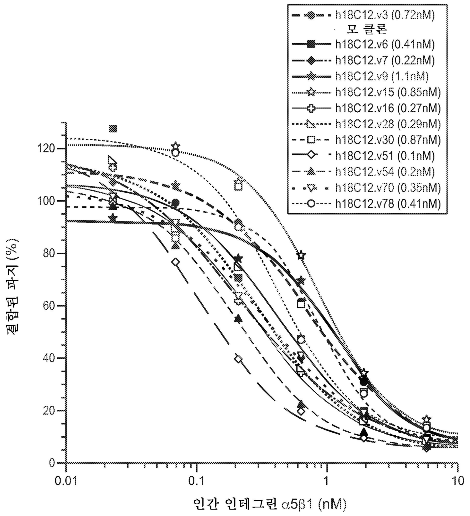
전체 청구항 수 : 총 28 항 심사관 : 이수정

(54) 발명의 명칭 **신규 항-α5β1 항체 및 그의 용도**

(57) 요 약

본 발명은 신규한 항-α5β1 항체, 상기 항체를 포함하는 조성물 및 키트, 및 상기 항체의 제조 및 사용 방법을 제공한다.

대 표 도 - 도4



(72) 발명자
유, 야
미국 94404 캘리포니아 포스터 시티 블라이드 스트리트 1160
예, 웨일란
미국 94404 캘리포니아 포스터 시티 바컨틴 스트리트 119

명 세 서

청구범위

청구항 1

VL 도메인이 서열 3 내지 8 중 어느 하나를 포함하고, VH 도메인이 서열 11 내지 14 중 어느 하나를 포함하는 항-$\alpha_5\beta_1$ 항체.

청구항 2

제1항에 있어서, VL 도메인이 서열 8을 포함하고, VH 도메인이 서열 14를 포함하는 항체.

청구항 3

TLSSQHSTYTIG (서열 21)를 포함하는 CDR-L1; LNSDSSHNKGS (서열 8의 잔기 50-60)를 포함하는 CDR-L2; 및 AAYYAYGYV (서열 30)를 포함하는 CDR-L3을 포함하는 VL 도메인; 및

GFTFSARWIY (서열 14의 잔기 26-35)를 포함하는 CDR-H1; GIKTKPAIYATEYADSVKG (서열 14의 잔기 50-68)를 포함하는 CDR-H2; 및 LTGMKYFDY (서열 14의 잔기 101-109)를 포함하는 CDR-H3을 포함하는 VH 도메인

을 포함하는 항-$\alpha_5\beta_1$ 항체.

청구항 4

서열 21을 포함하는 CDR-L1; 서열 8의 잔기 49-61을 포함하는 CDR-L2; 및 서열 30을 포함하는 CDR-L3을 포함하는 VL 도메인; 및

서열 14의 잔기 26-35를 포함하는 CDR-H1; 서열 14의 잔기 50-65을 포함하는 CDR-H2; 및 서열 14의 잔기 95-102를 포함하는 CDR-H3을 포함하는 VH 도메인

을 포함하는 항-$\alpha_5\beta_1$ 항체.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 인간, 인간화, 키메라, 이중특이적 또는 다중특이적 항체인 항체.

청구항 6

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, $\alpha_5\beta_1$에 결합하는 항체 단편인 항체.

청구항 7

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 전장 IgG1 항체인 항체.

청구항 8

제7항에 있어서, N297A 치환을 포함하는 Fc 부분을 포함하는 항체.

청구항 9

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 항체를 코딩하는 단리된 핵산 분자.

청구항 10

제9항의 핵산을 포함하는 숙주 세포.

청구항 11

항-$\alpha_5\beta_1$ 항체가 생산되도록 제10항의 숙주 세포를 배양하는 것을 포함하는, 항-$\alpha_5\beta_1$ 항체의 생성 방법.

청구항 12

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 항체 및 세포독성제를 포함하는 면역접합체.

청구항 13

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 검출가능한 표지를 더 포함하는 항체.

청구항 14

제13항에 있어서, 검출가능한 표지가 방사성동위원소, 형광 염료 및 효소로 이루어진 군으로부터 선택된 구성원인 항체.

청구항 15

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 항체를 포함하는, 암, 비정상적인 혈관신생 또는 혈관 투과성을 특징으로 하는 안구 질환 또는 비정상적인 혈관신생 또는 혈관 투과성을 특징으로 하는 자가면역 질환을 갖는 개체를 치료하기 위한 제약 조성물.

청구항 16

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 항체를 포함하는, 혈관신생을 억제하기 위한 제약 조성물.

청구항 17

(a) 제13항의 항체를 $\alpha_5\beta_1$ 단백질을 함유하는 것으로 의심되는 샘플과 접촉시키는 것; 및

(b) 항-$\alpha_5\beta_1$ 항체와 $\alpha_5\beta_1$ 단백질 간의 복합체 형성을 검출하는 것

을 포함하는, $\alpha_5\beta_1$ 단백질을 함유하는 것으로 의심되는 샘플에서 $\alpha_5\beta_1$ 단백질을 검출하는 방법.

청구항 18

제17항에 있어서, 샘플이 비정상적인 혈관신생, 비정상적인 혈관 투과성 또는 누출, 또는 비정상적인 혈관신생 및 비정상적인 혈관 투과성 또는 누출과 연관된 질환을 갖는 것으로 진단된 환자로부터의 것인 방법.

청구항 19

제15항에 있어서, 암이 결장직장암, 폐암, 유방암, 신세포암 및 교모세포종으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 제약 조성물.

청구항 20

제15항에 있어서, 비정상적인 혈관신생 또는 혈관 투과성을 특징으로 하는 안구 질환이 망막병증, 연령-관련 황반 변성, 각막 신생혈관형성, 각막 이식 신생혈관형성, 망막 신생혈관형성 및 신생혈관 녹내장으로 이루어진 군으로부터 선택된 구성원인 제약 조성물.

청구항 21

제15항에 있어서, VEGF 길항제를 더 포함하는 제약 조성물.

청구항 22

제21항에 있어서, VEGF 길항제가 항-VEGF 항체인 제약 조성물.

청구항 23

제22항에 있어서, 항-VEGF 항체가 베바시주맙인 제약 조성물.

청구항 24

제21항에 있어서, VEGF 길항제가 항-$\alpha_5\beta_1$ 항체 이전에 투여되는 것인 제약 조성물.

청구항 25

제21항에 있어서, VEGF 길항제 및 항-$\alpha_5\beta_1$ 항체가 동시에 투여되는 것인 제약 조성물.

청구항 26

제21항에 있어서, 개체가 VEGF 길항제 치료에 반응하지 않을 때까지 우선 VEGF 길항제로 치료된 후에 항-$\alpha_5\beta_1$ 항체로 치료되는 것인 제약 조성물.

청구항 27

제21항에 있어서, 항신생물제, 화학요법제, 성장 억제제 및 세포독성제로 이루어진 군으로부터 선택된 치료제를 더 포함하는 제약 조성물.

청구항 28

(a) 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 항-$\alpha_5\beta_1$ 항체; 및

(b) 사용 지침서

를 포함하는, VEGF 길항제로 치료된 대상체에서 $\alpha_5\beta_1$을 검출하기 위한 키트.

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] <관련 출원에 대한 상호 참조>

[0002] 본 출원은 그 전체 개시내용이 모든 목적을 위해 본원에 참고로 도입된, 2009년 3월 25일 출원된 미국 특허 가출원 제61/163241호를 우선권 주장한다.

[0003] <본 발명의 분야>

[0004] 본 발명은 신규한 $\alpha_5\beta_1$ 항체, 상기 항체를 포함하는 조성물 및 키트, 및 상기 항체의 사용 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0005] α5β1 인테그린은 그의 주요 리간드인 피브로넥틴을 통해 세포-ECM 상호작용을 매개하는 세포막 당단백질이다. α5β1 인테그린은 세포 이동, 분화 및 생존에서 중요한 역할을 수행한다. α5β1 인테그린의 수준은 종양 혈관 내피 (예를 들어, 위장, 결장직장, 간세포, 자궁경부 및 유방 암종) 및 다른 혈관신생성 혈관에서 상승한다. α5β1 인테그린은 혈관신생 동안 벽세포의 내피세포와의 회합 및 내피 세포외 기질의 조립을 조정한다. 따라서, α5β1 인테그린은 혈관신생의 억제, 및 VEGF 길항제의 효과에 대한 세포의 감작을 위한 유용한 표적이다.

[0006] 따라서, 당업계에서는 α5β1 인테그린을 표적화하기 위한 조성물 및 방법이 필요하다. 본 발명은 상기 필요성 및 다른 필요성을 충족시킨다.

발명의 내용

[0007] <발명의 개요>

[0008] 본 발명은 모노클로날 항체 18C12로부터 유래된 신규한 항-$\alpha_5\beta_1$ 항체, 상기 신규한 항-$\alpha_5\beta_1$ 항체를 포함하는 키트 및 조성물, 및 이들의 제조 및/또는 사용 방법을 제공한다.

[0009] 본 발명의 한 실시양태는 TL-S/T-S/P/T-Q/N-H-F/S-T/I-Y-K/T-I-G/D/S (서열 15)를 포함하는 CDR-L1; L/I-N/T-S-D/H/S-G/S-S/L/T-H/Y-N/K/Q/I-K/T-G/A-D/S/V (서열 16)을 포함하는 CDR-L2; G/A-S/A/Y-S/Y-Y-S/A/Y-S/Y/T-GY-V/I (서열 17)을 포함하는 CDR-L3을 포함하는 VL 도메인; 및 GFTFS-N/A-RW-I/V-Y (서열 18)을 포함하는 CDH-H1; GIKTKP-N/A/T-I/R-YAT-E/Q-YADSVKG (서열 19)를 포함하는 CDR-H2; 및 L/V-TG-M/K-R/K-YFDY (서열 20)을 포함하는 CDR-H3을 포함하는 VH 도메인을 포함하는 항-$\alpha_5\beta_1$ 항체를 제공한다. 일부 실시양태에서, 항-$\alpha_5\beta_1$ 항체는 각각 도 3에 열거된 서열을 포함하는 CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3을 포함하는 포함하는 VL 도메인 및 각각 도 3에 열거된 서열을 포함하는 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3을 포함하는 VH 도메인, 즉 서열 21, 22, 23 또는 24에 열거된 서열을 포함하는 CDR-L1, 서열 25, 26, 27 또는 28에 열거된 서열을 포함하는 CDR-L2, 및 서열 29, 30, 31 또는 32에 열거된 서열을 포함하는 CDR-L3을 포함하는 VL 도메인; 및 서열 34 또는 35에 열거된 서열을 포함하는 CDR-H1, 서열 36 또는 37에 열거된 서열을 포함하는 CDR-H2, 및 서열 38, 39 또는 40에 열거된

서열을 포함하는 CDR-H3을 포함하는 VH 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항-$\alpha_5\beta_1$ 항체는 서열 3 내지 8 중 어느 하나를 포함하는 VL 도메인 및 서열 11 내지 14 중 어느 하나를 포함하는 VH 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항-$\alpha_5\beta_1$ 항체는 서열 4를 포함하는 VL 도메인 및 서열 11을 포함하는 VH 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항-$\alpha_5\beta_1$ 항체는 서열 5를 포함하는 VL 도메인 및 서열 12를 포함하는 VH 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항-$\alpha_5\beta_1$ 항체는 서열 6을 포함하는 VL 도메인 및 서열 13을 포함하는 VH 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항-$\alpha_5\beta_1$ 항체는 서열 7을 포함하는 VL 도메인 및 서열 13을 포함하는 VH 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항-$\alpha_5\beta_1$ 항체는 서열 8을 포함하는 VL 도메인 및 서열 14를 포함하는 VH 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항-$\alpha_5\beta_1$ 항체는 인간, 인간화 또는 키메라 항체이다. 한 실시양태에서, 항-$\alpha_5\beta_1$ 항체는 모노클로날 항체이다. 일부 실시양태에서, 항-$\alpha_5\beta_1$ 항체는 $\alpha_5\beta_1$ 인테그린에 대한 결합에 대해 18C12 항체와 경쟁한다. 일부 실시양태에서, 모노클로날 항체는 키메라 항체이다. 일부 실시양태에서, 항-$\alpha_5\beta_1$ 항체는 $\alpha_5\beta_1$에 결합하는 항체 단편이다. 일부 실시양태에서, 항-$\alpha_5\beta_1$ 항체는 Fab, Fab', F(ab)'$_2$, 단일-쇄 Fv (scFv), Fv 단편; 디아바디 및 선형 항체로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 항-$\alpha_5\beta_1$ 항체는 전장 IgG1 또는 전장 IgG4이다. 일부 실시양태에서, 항-$\alpha_5\beta_1$ 항체는 이중특이적 항체 또는 다중특이적 항체이다. 일부 실시양태에서, 이중특이적 항체는 VEGF 및 $\alpha_5\beta_1$에 결합하고, VEGF 길항제이다. 일부 실시양태에서, 항-$\alpha_5\beta_1$ 항체는 변경된 이펙터 기능을 갖는다. 일부 실시양태에서, 항-$\alpha_5\beta_1$ 항체는 (예를 들어, 항체의 Fc 부분을 코딩하는 핵산 서열을 변경시킴으로써) 항체-의존성 세포 세포독성 (ADCC) 또는 보체 의존성 세포독성 (CDC) 활성을 감소 또는 방해하도록 변경된다. 일부 실시양태에서, 항체의 Fc 부분은 N297A 치환을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항-$\alpha_5\beta_1$ 항체는 (예를 들어, 항체의 Fc 부분을 코딩하는 핵산 서열을 변경시킴으로써) 인간에서의 그의 반감기를 증가 또는 감소시키도록 변형된다. 일부 실시양태에서, $\alpha_5\beta_1$ 항체는 다른 물질 (예를 들어, 치료제 또는 검출가능한 표지)에 접합된 면역접합체의 일부이다. 일부 실시양태에서, 치료 물질은 세포독성제 (예를 들어, 방사성 동위원소, 독소, 성장 억제제, 또는 화학요법제)이다. 일부 실시양태에서, 검출가능한 표지는 형광 염료, 방사성동위원소 또는 효소이다.

[0010] 본 발명의 추가의 실시양태는 본원에 기재된 임의의 항-$\alpha_5\beta_1$ 항체를 코딩하는 핵산 분자, 상기 핵산을 포함하는 발현 벡터, 및 상기 핵산을 포함하는 숙주 세포를 제공한다. 본 발명의 다른 추가의 실시양태는 본원에 기재된 임의의 항-$\alpha_5\beta_1$ 항체를 생성하는 방법을 제공하고, 이 방법은 상기 항체가 생성되도록 숙주 세포를 배양하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 숙주 세포로부터 항체를 회수하는 것을 더 포함한다.

[0011] 본 발명의 추가의 실시양태는 본 발명의 $\alpha_5\beta_1$ 항체 및 제약상 허용되는 담체를 포함하는 제약 조성물을 제공한다. 일부 실시양태에서, 제약 조성물은 예를 들어 VEGF 길항제를 포함하는, 적어도 1, 2, 3, 4가지 이상의 추가의 작용제(들)을 더 포함한다. 일부 실시양태에서, 추가의 작용제(들)은 세포독성제, 화학요법제, 성장 억제제 또는 항혈관신생제로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, VEGF 길항제는 항-VEGF 항체이다. 일부 실시양태에서, 항-VEGF 항체는 베바시주맙이다. 본 발명은 또한 (예를 들어, VEGF 길항제로 치료된 대상체에서) $\alpha_5\beta_1$을 검출하기 위한 지침을 포함하는 제품 및 키트를 제공한다.

[0012] 본 발명의 또 다른 실시양태는 비정상적인 혈관신생, 혈관 투과성 또는 혈관 누출과 연관된 질환 또는 장애를 앓고 있는 대상체를 치료하는 방법을 제공한다. 상기 방법은 치료 유효량의 본원에 기재된 항-$\alpha_5\beta_1$ 항체를 상기 대상체에게 투여하여 질환 또는 장애를 (예를 들어, 비정상적인 혈관신생, 혈관 투과성 또는 혈관 누출을 부분적으로 또는 완전하게 억제함으로써) 치료하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, VEGF 길항제가 또한 대상체에게 투여된다. 일부 실시양태에서, VEGF 길항제 및 항-$\alpha_5\beta_1$ 항체는 동시에 투여된다. 일부 실시양태에서, VEGF 길항제 및 항-$\alpha_5\beta_1$ 항체는 순차적으로 투여된다. 일부 실시양태에서, 질환 또는 장애는 VEGF 길항제 요법에 반응성이다. 일부 실시양태에서, 질환 또는 장애는 암, 면역 질환 또는 안구 질환으로부터 선택된다. 한 실시양태에 따라, 질환 또는 장애는 고형 종양, 전이성 종양, 연조직 종양, 안구 신생혈관형성이 있는 질환, 비정상적인 혈관신생이 있는 염증성 질환, 대상체에게 이식한 후에 발생하는 질환, 및 섬유혈관 조직의 비정상적인 증식이 있는 질환으로부터 선택된다. 또 다른 실시양태에 따라, 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 (호르몬 불응성 전립선암 포함), 간암, 두경부암, 흑색종, 난소암, 중

피종, 연조직암, 위장관 간질 종양, 다형성 교모세포종 및 다발성 골수종으로부터 선택된다. 또 다른 실시양태에 따라, 질환은 망막병증, 연령-관련 황반 변성 (예를 들어, 습성 AMD), 당뇨성 황반 부종, 망막 정맥 폐쇄 (RVO), 및 건식 AMD/지도형 위축증 (습성 AMD로의 진행의 예방을 위해), 조홍; 건선, 염증성 신장병, 용혈성 요독 증후군, 당뇨성 신병증 (예를 들어, 증식성 당뇨성 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 질환, 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, 졸중, 혈관섬유종 및 신생혈관 녹내장으로부터 선택된다. 한 실시양태에서, 상기 방법은 추가의 치료제 (예를 들어, 항신생물제, 화학요법제, 성장 억제제 또는 세포독성제)를 대상체에게 투여하는 것을 더 포함한다.

[0013] 본 발명의 또 다른 실시양태는 치료 유효량의 VEGF 길항제 및 항-$\alpha_5\beta_1$ 항체를 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 대상체에서 암을 치료하는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, VEGF 길항제 및 항-$\alpha_5\beta_1$ 항체는 동시에 투여된다. 일부 실시양태에서, VEGF 길항제 및 항-$\alpha_5\beta_1$ 항체는 순차적으로 투여된다. 일부 실시양태에서, 암은 VEGF 길항제 요법에 반응성이다.

[0014] 본 발명의 추가의 실시양태는 치료 유효량의 VEGF 길항제 및 항-$\alpha_5\beta_1$ 항체를 연령-관련 황반 변성 (AMD)을 앓고 있는 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 상기 대상체에서 AMD (예를 들어, 습성 연령-관련 황반 변성 포함)를 치료하는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, VEGF 길항제 및 항-$\alpha_5\beta_1$ 항체는 동시에 투여된다. 일부 실시양태에서, VEGF 길항제 및 항-$\alpha_5\beta_1$ 항체는 순차적으로 투여된다. 또 다른 실시양태에서, 치료 유효량의 VEGF 길항제 및 $\alpha_5\beta_1$ 길항제를 동시에 또는 순차적으로 투여하는 단계를 포함하는, 대상체에서 자가면역 질환을 치료하는 방법이 제공된다.

[0015] 일부 실시양태에서, VEGF 길항제가 처음에 치료될 대상체에게 투여되고, 항-$\alpha_5\beta_1$ 항체가 후속적으로 대상체에게 투여된다. 일부 실시양태에서, VEGF 길항제 및 $\alpha_5\beta_1$ 길항제가 대상체에게 동시에 투여된다. 일부 실시양태에서, 항-$\alpha_5\beta_1$ 항체 VEGF 길항제가 처음에 치료될 대상체에게 투여되고, VEGF 길항제가 후속적으로 대상체에게 투여된다. 일부 실시양태에서, 대상체가 VEGF 길항제 치료에 반응하지 않을 때까지 대상체를 VEGF 길항제로 치료하고, 이어서 대상체를 항-$\alpha_5\beta_1$ 항체로 치료한다. 한 특정 실시양태에서, 암이 비-침습성 또는 초기 단계일 때 대상체를 VEGF 길항제로 치료하고, 암이 침습성일 때 대상체를 항-$\alpha_5\beta_1$ 항체로 치료한다. 또 다른 실시양태에서, 항-$\alpha_5\beta_1$ 항체로 치료한 대상체는 질환을 앓고 있지 않은 대상체로부터의 조직 또는 비이환된 조직과 비교하여 이환된 조직에서 상승된 $\alpha_5\beta_1$ 수준을 갖는다. 이 경우에, 방법은 VEGF 길항제로 치료한 후 대상체에서, 예를 들어 이환된 조직에서 $\alpha_5\beta_1$을 검출하는 단계를 더 포함할 수 있다. 한 실시양태에 따라, 침습성 암은 전이된 암이다. 또 다른 실시양태에 따라, 초기 단계 암은 보조 요법 (예를 들어, 화학요법 또는 수술 제거)에 의해 치료되는 암이다.

[0016] 본 발명의 한 실시양태에 따라, 항-$\alpha_5\beta_1$ 항체로 치료할 대상체는 VEGF 길항제 치료 후에 재발되거나, 또는 VEGF 길항제 치료에 불응성으로 된 대상체이다. 또 다른 실시양태에 따라, 항-$\alpha_5\beta_1$ 항체 및 VEGF 길항제로 치료할 대상체는 전이성 암을 앓고 있거나, 또는 이전에 보조 요법으로 치료받은 대상체이다. 한 실시양태에서, 후보 환자는 이리노테칸과 같은 화학요법제에 재발성, 불응성 또는 내성이다. 이러한 질환의 예는 전이성 결장직장암, 재발성 전이성 결장직장암, 전이성 유방암, 재발성 전이성 유방암, 전이성 $HER2^+$ 유방암, 보조 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 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

[0017] 한 실시양태에 따라, 본원에 기재된 질환을 앓고 있는 대상체에게 VEGF 길항제를 사용한 질환의 치료 후에 유지 요법을 투여하고, 여기서 유지 요법은 $\alpha_5\beta_1$ 길항제를 단독으로 또는 VEGF 길항제와 순차적으로 또는 동시에 투여하는 것이다.

[0018] 일부 실시양태에서, VEGF 길항제는 항체, 이뮤노어드헤신, 펩티바디, 소분자, 및 엄격한 조건하에 VEGF를 코딩하는 핵산 분자에 혼성화하는 핵산 (예를 들어, 리보자임, siRNA 및 압타머)으로부터 선택된다. 일부 실시양태

에서, VEGF 길항제는 항체 (예를 들어, 모노클로날 항체)이다. 한 실시양태에 따라, 항-VEGF 항체는 아바스틴 (Avastin)® 항체에 의해 인간 VEGF에 대한 결합으로부터 경쟁적으로 억제될 수 있다. 또 다른 실시양태에 따라, 항-VEGF 항체는 인간, 인간화 또는 키메라 항체이다. 한 특정 실시양태에 따라, 항-VEGF 항체는 아바스틴® 항체이다. 또 다른 실시양태에 따라, 항-VEGF 항체는 Fab, Fab', $F(ab)'_2$, 단일-쇄 Fv (scFv), Fv 단편; 디아바디 및 선형 항체로 이루어진 군으로부터 선택된다. 또 다른 실시양태에 따라, VEGF 길항제는 VEGF 및 $\alpha_5\beta_1$ 모두에 결합하는 이중특이적 항체이고, 또한 $\alpha_5\beta_1$ 길항제이다.

[0019] 본 발명의 추가의 실시양태는 $\alpha_5\beta_1$ 단백질을 함유할 것으로 의심되는 샘플에서 $\alpha_5\beta_1$ 단백질을 검출하는 방법을 제공한다. 상기 방법은 (1) 본원에 기재된 항체를 상기 샘플과 접촉시키는 것; 및 항-$\alpha_5\beta_1$ 항체 및 $\alpha_5\beta_1$ 단백질 사이의 복합체 형성을 검출하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 샘플은 비정상적인 혈관신생, 비정상적인 혈관 투과성 및/또는 혈관 누출을 특징으로 하는 질환을 갖는 것으로 진단된 환자로부터의 것이다.

[0020] 상기 및 다른 본 발명의 실시양태가 하기 상세한 설명에 추가로 기재된다.

도면의 간단한 설명

[0021] 도 1a 및 1b는 하기에 대한 경쇄 가변 도메인의 서열의 정렬을 도시한다: 인간 람다 III; 햄스터 18C12; 키메라 18C12.v.1.1; h18C12.v3; h18C12.v6; h18C12.v6.1.Lam3; h18C12.v6.2Lam3; 및 h18C12.v6.1.5.

도 2a 및 2b는 하기에 대한 중쇄 가변 도메인의 서열의 정렬을 도시한다: 햄스터 18C12; h18C12.v3; h18C12.v6; h18C12.v6.1.Lam3; h18C12.v6.2Lam3; 및 h18C12.v6.1.5.

도 3은 h18C12.v3 및 h18C12.v3 친화도 성숙 변이체 h18C12.v6; h18C12.v7; h18C12.v9; h18C12.v15; h18C12.v16; h18C12.v28; h18C12.v30; h18C12.v51; h18C12.v54; h18C12.v70; 및 h18C12.v78의 CDR 서열을 도시한다.

도 4는 인간 $\alpha_5\beta_1$ 인테그린에 대한 h18C12.v3 모 클론, 및 18C12 친화도 성숙 변이체 h18C12.v6; h18C12.v7; h18C12.v9; h18C12.v15; h18C12.v16; h18C12.v28; h18C12.v30; h18C12.v51; h18C12.v54; h18C12.v70; 및 h18C12.v78의 결합을 입증하는 파지 경쟁 ELISA의 결과를 도시한다.

도 5는 인간 $\alpha 5\beta 1$ 인테그린에 대한 h18C12.v3 모 클론 및 h18C12.v3 친화도 성숙 변이체 h18C12.v6; h18C12.v15; h18C12.v54; 및 h18C12.v70의 결합의 비아코어(BIACORE)® 분석의 결과를 도시한다.

도 6은 인간 $\alpha_5\beta_1$ 인테그린에 대한 키메라 18C12 및 h18C12.v6.1.Lam3의 결합의 비아코어® 분석의 결과를 도시한다.

도 7은 h18C12.v6.1 클론 h18C12.v6.1.1, h18C12.v6.1.2, h18C12.v6.1.3, h18C12.v6.1.4, 및 h18C12.v6.1.5의 결합의 비아코어® 분석의 결과를 도시하고, 각각의 h18C12.v6.1 클론에 대해 위치 50a, 50b, 50c 및 50d에서의 CDR-L2 서열을 열거한다.

도 8은 키메라 18C12 및 h18C12.v6.1이 피브로넥틴에 대한 U937 세포의 결합을 방해하는 능력을 비교하는 피브로넥틴 결합 분석의 결과를 도시한다.

도 9는 햄스터 18C12 및 h18C12.v6.1.5가 피브로넥틴에 대한 U937 세포의 결합을 방해하는 능력을 비교하는 피브로넥틴 결합 분석의 결과를 도시한다.

도 10은 햄스터 18C12 및 h18C12.v6.1.5가 피브로넥틴에 대한 $\alpha_5\beta_1$의 결합을 방해하는 능력을 비교하는 피브로넥틴 결합 분석의 결과를 도시한다.

도 11은 키메라 18C12 및 h18C12.v6.1이 피브로넥틴 상에서의 HUVEC 세포의 이동을 방해하는 능력을 측정하는 HUVEC 이동 분석의 결과를 도시한다.

도 12는 h18C12.v6.1.5 +/- 항-VEGF가 생존을 향상시키는 능력을 측정하는 종양 이종이식 분석의 결과를 도시한다.

도 13은 h18C12.v6.1.5 +/- 항-VEGF가 종양 부담을 감소시키는 능력을 측정하는 종양 이종이식 분석의 결과를

도시한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0022] I. 도입부

[0023] 본 발명은 $\alpha_5\beta_1$ 인테그린에 결합하는 신규한 항체의 확인에 기초한 것이다. $\alpha_5\beta_1$ 항체는 모노클로날 항체 18C12로부터 유도되고, 다양한 치료 및 진단 방법에서 사용될 수 있다. 예를 들어, $\alpha_5\beta_1$ 항체는 비정상적인 혈관신생, 신생물, 안구 질환 및 자가면역 질환을 치료하는 데에서 단독으로 또는 다른 물질과 조합으로 사용될 수 있다. 항체는 또한 환자에게 $\alpha_5\beta_1$ 단백질에 대한 항체를 투여하고 환자로부터의 샘플에서 $\alpha_5\beta_1$ 단백질에 결합된 항-$\alpha_5\beta_1$ 항체를 검출함으로써 (예를 들어, 생체내에서 또는 생체외에서), 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.

[0024] II. 정의

[0025] "알파5베타1" 또는 "α5β1" 또는 "a5b1" 또는 "$\alpha_5\beta_1$"은 두가지 상이한 단백질 (즉, 하위단위 알파5 및 베타1)을 포함하는 인테그린이다. α5β1은 피브로넥틴, L1-CAM 및 피브리노겐에 결합하는 것으로 밝혀졌다. α5β1 인테그린은 또한 매우 후기 활성화(Very Late Activation)-5, VLA-5, 알파5베타1, CD49e/CD29, 피브로넥틴 수용체, FNR 및 GPIc-IIa로서 알려져 있다. 실시양태에 따라, α5β1은 인간 α5β1이다.

[0026] "알파5"는 본원에서 CD49e, α5, 인테그린 알파5 하위단위, VLA-5 알파 하위단위, GPIc-IIa의 IC 하위단위, 및 FNR 알파 쇄와 서로 교환가능하게 사용되고, $\alpha_5\beta_1$ 인테그린의 하나의 하위단위를 나타낸다. 알파5는 그의 세포질 도메인 내에서 다양한 대안적 스플라이싱에 의해 생성된 4개의 이소형 (A-D)을 갖는다. 알파5의 인간 이소형에 대한 아미노산 서열은 예를 들어 각각 진뱅크(Genbank) 기탁 번호 X07979, U33879, U33882 및 U33880에서 찾아볼 수 있다.

[0027] "베타1"은 또한 CD29, 베타1, 혈소판 GPIIa; VLA-베타 쇄; 베타-1 인테그린 쇄, CD29; FNRB; MDF2; VLAB; GPIIA; MSK12 및 VLA5B로 불린다. 인간 베타1의 아미노산 서열은 예를 들어 진뱅크 기탁 번호 X06256에서 찾아볼 수 있다.

[0028] 본원에 사용된 용어 "VEGF"는 문헌 [Leung et al. Science, 246:1306 (1989)] 및 [Houck et al. Mol. Endocrin., 5:1806 (1991)]에 기재된 바와 같이, 165-아미노산 인간 혈관 내피 세포 성장 인자 및 관련 121-, 189-, 및 206-아미노산 인간 혈관 내피 세포 성장 인자를 그의 천연 발생 대립유전자 및 프로세싱된 형태와 함께 나타낸다. 용어 "VEGF"는 또한 비-인간 종, 예를 들어 마우스, 래트 또는 영장류로부터의 VEGF를 나타낸다. 때때로, 특정 종으로부터의 VEGF는 인간 VEGF의 경우에는 hVEGF, 뮤린 VEGF의 경우에는 mVEGF 등과 같은 용어로 표시된다. 용어 "VEGF"는 또한 165-아미노산 인간 혈관 내피 세포 성장 인자의 아미노산 8 내지 109 또는 아미노산 1 내지 109를 포함하는 폴리펩티드의 말단절단 형태를 나타내는데 사용된다. VEGF의 임의의 상기 형태들에 대한 언급은 본 출원에서 예를 들어 "VEGF (8-109)", "VEGF (1-109)" 또는 "$VEGF_{165}$"에 의해 확인될 수 있다. "말단절단된" 천연 VEGF에 대한 아미노산 위치는 천연 VEGF 서열에 표시된 바와 같이 넘버링된다. 예를 들어, 말단절단된 천연 VEGF에서의 아미노산 위치 17 (메티오닌)은 또한 천연 VEGF에서의 위치 17 (메티오닌)이다. 말단절단된 천연 VEGF는 KDR 및 Flt-1 수용체에 대해 천연 VEGF와 대등한 결합 친화도를 갖는다. 실시양태에 따라, VEGF는 인간 VEGF이다.

[0029] "VEGF 길항제"는 VEGF 활성 (그의 VEGF 또는 하나 이상의 VEGF 수용체 또는 이를 코딩하는 핵산에 대한 결합성 포함)을 중화, 차단, 억제, 폐기, 저하 또는 방해할 수 있는 분자를 나타낸다. 바람직하게, 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, 이뮤노어드헤신, 펩티바디); 항-VEGF 수용체 항체 및 VEGF 수용체 길항제, 예를 들어 VEGFR 티로신 키나제의 소분자 억제제; VEGF에 결합하는 압타머; 및 엄격한 조건하에 VEGF 또는 VEGF 수용체를 코딩하는 핵산 서열과 혼성화하는 핵산 (예를 들어, RNAi)을 포함한다. 한 실시양태에 따라, VEGF 길항제는 VEGF에 결합하고, 시험관내에서 VEGF-유도된 내피 세포 증식을 억제한다. 한 실시양태에 따라, VEGF 길항제는 VEGF 또는 VEGF 수용체에 비-VEGF 또는 비-VEGF 수용체보다 큰 친화도로 결합한다. 한 실시양태에 따라, VEGF 길항제는 VEGF 또는 VEGF 수용체에 1 μM 내지 1 pM의

Kd로 결합한다. 또 다른 실시양태에 따라, VEGF 길항제는 VEGF 또는 VEGF 수용체에 500 nM 내지 1 pM으로 결합한다.

[0030] 실시양태에 따라, VEGF 길항제는 폴리펩티드, 예를 들어 항체, 펩티바디, 이뮤노어드헤신, 소분자 또는 압타머로 이루어진 군 중으로부터 선택된다. 실시양태에서, 항체는 항-VEGF 항체, 예를 들어 아바스틴® 항체 또는 항-VEGF 수용체 항체, 예를 들어 항-VEGFR2 또는 항-VEGFR3 항체이다. VEGF 길항제의 다른 예는 VEGF-트랩, 무카젠 (Mucagen), PTK787, SU11248, AG-013736, Bay 439006 (소라페닙: sorafenib), 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.

[0031] "항-VEGF 항체"는 VEGF에 충분한 친화도 및 특이성으로 결합하는 항체이다. 바람직하게, 본 발명의 항-VEGF 항체는 VEGF 활성이 관여하는 질환 또는 상태를 표적화하고 간섭하는 치료제로서 사용될 수 있다. 항-VEGF 항체는 통상적으로 다른 VEGF 상동체, 예를 들어 VEGF-B 또는 VEGF-C에도 결합하지 않을 것이고, 다른 성장 인자, 예를 들어 PlGF, PDGF 또는 bFGF에도 결합하지 않을 것이다. 항-VEGF 항체는 하이브리도마 ATCC HB 10709에 의해 생성되는 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 항체인데, 이는 베바시주맙 (BV; 아바스틴®)으로서 공지된 항체를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 또 다른 실시양태에 따라, 사용될 수 있는 항-VEGF 항체는 WO 2005/012359에 개시된 항체를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 한 실시양태에 따라, 항-VEGF 항체는 WO 2005/012359의 도 24, 25, 26, 27 및 29에 개시된 항체 중 어느 하나의 가변 중쇄 및 가변 경쇄 영역을 포함한다 (예를 들어, G6, G6-23, G6-31, G6-23.1, G6-23.2, B20, B20-4 및 B20.4.1). 또 다른 실시양태에서, 라니비주맙으로 공지된 항-VEGF 항체는 안구 질환, 예를 들어 당뇨성 망막병증 및 습성 AMD를 위해 투여되는 VEGF 길항제이다.

[0032] "rhuMAb VEGF" 또는 "아바스틴®"으로서 공지되기도 한 항-VEGF 항체 "베바시주맙 (BV)"은 문헌 [Presta et al. (1997) Cancer Res. 57:4593-4599]에 따라 생성된 재조합 인간화 항-VEGF 모노클로날 항체이다. 이것은 돌연변이된 인간 IgG1 프레임워크 영역, 및 인간 VEGF의 그의 수용체에 대한 결합을 차단하는 뮤린 항-hVEGF 모노클로날 항체 A.4.6.1로부터의 항원-결합 상보성-결정 영역을 포함한다. 베바시주맙의 아미노산 서열의 대략 93% (대부분의 프레임워크 영역 포함)는 인간 IgG1로부터 유래되고, 서열의 약 7%는 뮤린 항체 A4.6.1로부터 유래된다. 베바시주맙은 분자량이 약 149,000 달톤이고 글리코실화된다. 다른 항-VEGF 항체는 미국 특허 제6,884,879호 및 WO 2005/044853에 기재된 항체를 포함한다.

[0033] 항-VEGF 항체 라니비주맙 또는 루센티스(LUCENTIS)® 항체 또는 rhuFab V2는 인간화, 친화도-성숙 항-인간 VEGF Fab 단편이다. 라니비주맙은 표준 재조합 기술 방법에 의해 이. 콜라이 (E. coli) 발현 벡터 내에서 및 박테리아 발효에 의해 생산된다. 라니비주맙은 글리코실화되지 않고 분자량이 약 48,000 달톤이다. WO98/45331 및 U.S. 2003/0190317을 참조한다.

[0034] 표적 상의 중첩되거나 또는 유사한 영역에 대한 결합을 특징으로 하는 분자, 예를 들어 항체는 경쟁적 억제/결합 분석에 의해 확인할 수 있다.

[0035] 한 실시양태에서, 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 스피닝할 수 있다. 펠릿은 통상적으로 2회 세척하였다. 이어서, 세포를 재현탁하고, 계수하고, 사용시까지 얼음 상에 유지할 수 있다. 100 ㎕의 제1 항-$\alpha_5\beta_1$ 항체 (예를 들어, 1 ㎍/ml 농도 또는 더 낮은 농도에서 시작하여)를 웰에 첨가할 수 있다. 다음으로, 웰 하나 당 100 ㎕ (예를 들어, 20 x 10^5개 세포)의 세포를 첨가하고 얼음 상에서 30분 동안 인큐베이션할 수 있다. 다음으로, 100 ㎕의 비오티닐화 항-$\alpha_5\beta_1$ 항체 (5 ㎍/ml 원액)를 각각의 웰에 첨가하고 얼음 상에서 30분 동안 인큐베이션할 수 있다. 이어서, 세포를 세척하고, 1000 rpm에서 5분 동안 펠릿화한다. 상청액을 흡인 여과하였다. R-피코에리트린 접합된 스트렙타비딘 (잭슨 (Jackson) 016-110-084)을 웰에 첨가한다 (1:1000으로 100 ㎕). 다음으로, 플레이트를 호일에 싸고 얼음 상에서 30분 동안 인큐베이션할 수 있다. 인큐베이션 후에, 펠릿을 세척하고, 1000 rpm에서 5분 동안 펠릿화할 수 있다. 펠릿은 재현탁하고 FACS 분석을 위해 마이크로타이터 튜브로 옮길 수 있다.

[0036] "혈관신생 인자 또는 작용제"는 혈관의 발생을 자극하는데 관여하는, 예를 들어 혈관신생, 내피 세포 성장, 혈

관의 안정성 및/또는 혈관형성 등을 촉진하는 성장 인자 또는 그의 수용체이다. 예를 들어 혈관신생 인자는, 예를 들어 VEGF 및 VEGF 계열의 구성원 및 그의 수용체 (VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGFR1, VEGFR2 및 VEGFR3), PlGF, PDGF 계열, 섬유모세포 성장 인자 계열 (FGF), TIE 리간드 (안지오포이에틴, ANGPT1, ANGPT2), TIE1, TIE2, 에프린, Bv8, 델타-유사 리간드 4 (DLL4), Del-1, 섬유모세포 성장 인자: 산성 (aFGF) 및 염기성 (bFGF), FGF4, FGF9, BMP9, BMP10, 폴리스타틴, 과립구 콜로니-자극 인자 (G-CSF), GM-CSF, 간세포 성장 인자 (HGF)/산란 인자 (SF), 인터류킨-8 (IL-8), CXCL12, 렙틴, 미드카인, 뉴로필린, NRP1, NRP2, 태반 성장 인자, 혈소판-유래 내피 세포 성장 인자 (PD-ECGF), 혈소판-유래 성장 인자, 특히 PDGF-BB, PDGFR-알파 또는 PDGFR-베타, 플레이오트로핀 (PTN), 프로그라눌린, 프롤리페린, 형질전환 성장 인자-알파 (TGF-알파), 형질전환 성장 인자-베타 (TGF-베타), 종양 괴사 인자-알파 (TNF-알파), Alk1, CXCR4, Notch1, Notch4, Sema3A, Sema3C, Sema3F, Robo4 등을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 이것은 혈관신생을 촉진하는 인자, 예컨대 ESM1 및 페를리칸을 더 포함할 것이다. 이것은 또한 상처 치유를 가속화하는 인자, 예컨대 성장 호르몬, 인슐린-유사 성장 인자-I (IGF-I), VIGF, 표피 성장 인자 (EGF), EGF-유사 도메인, 멀티플 7 (EGFL7), CTGF 및 그의 계열의 구성원, 및 TGF-알파 및 TGF-베타를 포함할 것이다. 예를 들어, 문헌 [Klagsbrun and D'Amore (1991) Annu. Rev. Physiol. 53:217-39]; [Streit and Detmar (2003) Oncogene 22:3172-3179]; [Ferrara & Alitalo (1999) Nature Medicine 5(12):1359-1364]; [Tonini et al. (2003) Oncogene 22:6549-6556] (예를 들어, 공지된 혈관신생 인자를 열거한 표 1); 및 [Sato (2003) Int. J. Clin. Oncol. 8:200-206]을 참조한다.

[0037] "항혈관신생제" 또는 "혈관신생 억제제"는 혈관신생, 혈관형성, 또는 바람직하지 않은 혈관 투과성을 직접적으로 또는 간접적으로 억제하는 적은 분자량의 물질, 폴리뉴클레오티드 (예를 들어, 억제성 RNA (RNAi 또는 siRNA) 포함), 폴리펩티드, 단리된 단백질, 재조합 단백질, 항체, 또는 이들의 접합체 또는 융합 단백질을 나타낸다. 항혈관신생제는 혈관신생 인자 또는 그의 수용체에 결합하고 이것의 혈관신생 활성을 차단하는 작용제를 포함한다는 것을 이해해야 한다. 예를 들어, 항혈관신생제는 상기 정의된 바와 같은 혈관신생제에 대한 항체 또는 다른 길항제, 예를 들어 VEGF-A 또는 VEGF-A 수용체 (예를 들어, KDR 수용체 또는 Flt-1 수용체)에 대한 항체, 항-PDGFR 억제제, VEGF 수용체 신호전달을 차단하는 소분자 (예를 들어, PTK787/ZK2284, SU6668, 수텐트 (SUTENT)®/SU11248 (수니티닙 말레이트), AMG706, 또는 예를 들어 국제 특허 출원 WO 2004/113304에 기재된 것들)이다. 항혈관신생제는 하기 제제들: VEGF 억제제, 예를 들어 VEGF-특이적 길항제, EGF 억제제, EGFR 억제제, 에르비툭스® (세툭시맙, 임클론 시스템즈, 인크.(ImClone Systems, Inc.), 미국 뉴저지주 브랜치버그), 벡티빅스® (파니투무맙, 암젠(Amgen), 미국 캘리포니아주 싸우전드 오크스), TIE2 억제제, IGF1R 억제제, COX-II (시클로옥시게나제 II) 억제제, MMP-2 (매트릭스-메탈로프로테이나제 2) 억제제, 및 MMP-9 (매트릭스-메탈로프로테이나제 9) 억제제, CP-547,632 (화이자 인크.(Pfizer Inc.), 미국 뉴욕주), 액시티닙 (화이자 인크.; AG-013736), ZD-6474 (아스트라제네카(AstraZeneca)), AEE788 (노파르티스(Novartis)), AZD-2171), VEGF 트랩 (리제네론(Regeneron)/아벤티스(Aventis)), 바타라닙 (또한, PTK-787, ZK-222584로도 알려져 있음: 노파르티스 & 셰링 A G(Schering A G)), 마쿠젠(Macugen) (페갑타닙 옥타소듐, NX-1838, EYE-001, 화이자 인크./길레드(Gilead)/아이테크(Eyetech)), IM862 (사이트란 인크.(Cytran Inc.), 미국 워싱턴주 커클랜드); 및 리보자임 (Ribozyme: 미국 콜로라도주 볼더) 및 키론(Chiron: 미국 캘리포니아주 에머리빌)으로부터 입수한 합성 리보자임인 안지오자임, 및 이들의 조합물을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 다른 혈관신생 억제제는 트롬보스폰딘1, 트롬보스폰딘2, 콜라겐 IV 및 콜라겐 XVIII를 포함한다. VEGF 억제제는 미국 특허 제6,534,524호 및 제6,235,764호 (둘 모두의 전문이 모든 목적을 위해 본원에서 참고로 도입된다)에 개시되어 있다. 항혈관신생제는 또한 천연 혈관신생 억제제, 예를 들어 안지오스타틴, 엔도스타틴 등을 포함한다. 예를 들어, 문헌 [Klagsbrun and D'Amore (1991) Annu. Rev. Physiol. 53:217-39]; [Streit and Detmar (2003) Oncogene 22:3172-3179] (예를 들어, 악성 흑색종에서의 항혈관신생 요법을 열거한 표 3); [Ferrara & Alitalo (1999) Nature Medicine 5(12):1359-1364]; [Tonini et al. (2003) Oncogene 22:6549-6556] (예를 들어, 공지된 항혈관신생 인자를 열거한 표 2); 및 [Sato (2003) Int. J. Clin. Oncol. 8:200-206] (예를 들어, 임상 시험에서 사용된 항혈관신생제를 열거한 표 1)을 참조한다.

[0038] 용어 "항혈관신생 요법"은 항혈관신생제를 투여하는 것을 포함하는, 혈관신생을 억제하는데 유용한 요법을 나타낸다.

[0039] 본 발명에 따른 항체 항-VEGF 항체에 대한 "Kd" 또는 "Kd 값"은 한 실시양태에서, VEGF에 대한 Fab의 용액 결합 친화도를 측정하는, 하기 분석에 의해 기재되는 바와 같이 항체의 Fab 버전 및 VEGF 분자를 사용하여 수행된 방사성 표지된 VEGF 결합 분석 (RIA)에 의해 또는 비표지된 VEGF의 적정 시리즈의 존재하에 최소 농도의 (^{125}I)-표

지된 분자 VEGF (109)로 Fab를 평형화시킨 후 결합된 VEGF를 항-Fab 항체-코팅된 플레이트로 포획함으로써 측정된다 (문헌 [Chen, et al., (1999) J. Mol Biol 293:865-881]). 이러한 분석에 대한 조건을 확립시키기 위해, 마이크로타이터 플레이트 (다이넥스(Dynex))를 50 mM 탄산나트륨 (pH 9.6) 중의 5 ㎍/ml의 포획성 항-Fab 항체 (카펠 랩스(Cappel Labs))로 밤새 코팅한 후, 실온 (대략 23℃)에서 2 내지 5시간 동안 PBS 중의 2% (w/v) 소혈청 알부민으로 차단한다. 비-흡착 플레이트 (넌크 #269620)에서 100 pM 또는 26 pM [^{125}I]VEGF(109)를 관심 Fab (예를 들어, Fab-12)의 연속 희석물과 혼합한다 (문헌 [Presta et al., (1997) Cancer Res. 57:4593-4599]). 이어서, 관심 Fab를 밤새 인큐베이션하지만, 확실히 평형에 도달하게 하기 위해서는 65시간 동안 계속 인큐베이션할 수 있다. 그 후, 혼합물을 포획 플레이트로 옮겨서 실온에서 1시간 동안 인큐베이션한다. 이어서, 용액을 제거하고, 플레이트를 PBS 중의 0.1% 트윈-20으로 8회 세척하였다. 플레이트를 건조시키고, 150 ㎕/웰의 섬광제 (마이크로신트(MicroScint)-20, 패커드(Packard))를 첨가하고, 플레이트를 탑카운트(Topcount) 감마 계수기 (패커드)에서 10분 동안 계수한다. 최대 결합의 20% 이하를 제공하는 각 Fab의 농도를 선택하여 경쟁적 결합 분석에 사용한다. 또 다른 실시양태에 따라, Kd 또는 Kd 값을 25℃에서 약 10 반응 단위 (RU)의 고정된 표적 분자 hVEGF (8-109) CM5 칩으로 비아코어™-2000 또는 비아코어™-3000 (비아코어, 인크.(BIAcore, Inc.), 미국 뉴저지주 피스카타웨이)을 사용한 표면 플라스몬 공명 분석으로 측정한다. 간략하게 설명하면, 카르복시메틸화 덱스트란 바이오센서 칩 (CM5, 비아코어 인크.)을 공급업체의 지침에 따라 N-에틸-N'-(3-디메틸아미노프로필)-카르보디이미드 히드로클로라이드 (EDC) 및 N-히드록시숙신이미드 (NHS)로 활성화시킨다. 인간 VEGF를 10 mM 아세트산나트륨 (pH 4.8)을 사용하여 5 ㎍/ml (약 0.2 μM)로 희석한 후에 커플링된 단백질 대략 10 반응 단위 (RU)가 달성되도록 5 ㎕/분의 유속으로 주입한다. 인간 VEGF 주입 후, 1M 에탄올아민을 주입하여 반응하지 않은 기를 차단한다. 동역학 측정을 위해, Fab의 2-배 연속 희석액 (0.78 nM 내지 500 nM)을 약 25 ㎕/분의 유속으로 25℃에서 0.05% 트윈 20을 갖는 PBS (PBST) 내에서 주입한다. 결합 속도 (k_{on}) 및 해리 속도 (k_{off})는 결합 및 해리 센서그램을 동시 핏팅함으로써 단순 일-대-일 랭뮤어(Langmuir) 결합 모델 (비아코어 평가 소프트웨어 버전 3.2)을 사용하여 계산한다. 평형 해리 상수 (Kd)는 k_{off}/k_{on} 비로 계산한다. 예를 들어, 문헌 [Chen, Y., et al., (1999) J. Mol Biol 293:865-881]을 참조한다. 상기 표면 플라스몬 공명 분석에 의한 결합속도(on-rate)가 $10^6\ M^{-1}S^{-1}$을 초과하는 경우, 결합속도는 분광계, 예를 들어 정지-유동 설치 분광광도계 (아비브 인스트루먼츠(Aviv Instruments)) 또는 8000-시리즈 SLM-아민코(Aminco) 분광광도계 (써모스펙트로닉(ThermoSpectronic)) (교반 큐벳이 장착됨)에서 측정할 때 증가하는 농도의 인간 VEGF 단쇄 형태 (8-109) 또는 마우스 VEGF의 존재하에 PBS (pH 7.2) 중 20 nM 항-VEGF 항체 (Fab 형태)의 25℃에서의 형광 방출 강도 (여기 = 295 nm, 방출 = 340 nm, 16 nm 통과 대역)의 증가 또는 감소를 측정하는 형광 켄칭(quenching) 기술을 이용하여 결정할 수 있다. 표적으로서 α5β1을 사용하여 항-α5β1 Fab 또는 항체의 Kd를 결정하기 위해 유사한 결합 분석을 수행할 수 있다.

[0040] 본원에 사용된 치료하고자 하는 대상체는 포유동물 (예를 들어, 인간, 비-인간 영장류, 랫트, 마우스, 암소, 말, 돼지, 양, 염소, 개, 고양이 등)이다. 대상체는 임상 환자, 임상 시험 자원자, 실험용 동물 등일 수 있다. 대상체는 암, 면역 질환, 또는 비정상적인 혈관신생이 있는 임의의 다른 질환에 걸린 것으로 의심되거나 걸릴 위험이 있거나, 암, 면역 질환, 또는 비정상적인 혈관신생이 있는 임의의 다른 질환으로 진단받을 수 있다. 암, 면역 질환 또는 비정상적인 혈관신생을 보이는 임의의 다른 질환을 위한 많은 진단 방법 및 이들 질환의 임상 서술은 당업계에 공지되어 있다. 한 실시양태에 따라, 본 발명에 따라 치료할 대상체는 인간이다.

[0041] "비정상적인 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 기여하거나 이환된 상태, 예를 들어 암, 특히 혈관형성된 고형 종양 및 전이성 종양 (결장암, 폐암 (특히 소세포 폐암) 또는 전립선암 포함), 안구 혈관신생에 의해 야기되는 질환, 특히 당뇨성 실명, 망막병증, 원발성 당뇨성 망막증 또는 연령-관련 황반 변성, 맥락막 신생혈관형성 (CNV), 당뇨성 황반 부종, 병적 근시, 폰 히펠-린다우 (von Hippel-Lindau) 질환, 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, 당뇨성 신염 또는 고혈압성 신경화증; 다양한 염증성 질환, 예를 들어 관절염, 특히 류마티스성 관절염, 염증성 장 질환, 건선, 유육종증, 폐쇄성 동맥경화증 및 이식후 발생하는 질환, 자궁내막증 또는 만성 천식, 및 70종 초과의 다른 상태를 일으키는 새로운 혈관 성장이 존재할 때 발생한다. 신규한 혈관은 병든 조직에 양분을 공급하고, 정상 조직을 파괴하

고, 암의 경우, 신규한 혈관은 종양 세포가 순환계 내로 벗어나서 다른 기관에 머무르게 할 수 있다 (종양 전이). 본 발명은 상기 언급된 질환이 발생할 위험이 있는 환자를 치료하는 것을 고려한다.

[0042] "비정상적인 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. 비정상적인 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 질환 상태; 악성 종양과 연관된 복수; 메이그스 (Meigs) 증후군; 폐렴; 신 증후군; 심낭 삼출; 흉막 삼출; 심혈관 질환, 예를 들어 심근 경색 및 졸중 후의 상태와 연관된 투과성 등을 악화하거나 유도한다. 본 발명에서는 비정상적인 혈관 투과성 또는 누출과 연관된 질환 및 장애가 발병하였거나 발병할 위험이 있는 환자를 치료하는 것을 고려한다.

[0043] 본 발명의 항체 또는 폴리펩티드의 투여 후보인 다른 환자는 섬유혈관성 조직의 비정상적인 증식, 장미 여드름, 후천성 면역결핍 증후군, 동맥폐쇄증, 아토피성 각막염, 세균성 궤양, 베체트 (Bechet) 병, 혈액계 종양, 경동맥 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 궤양, 단순 포진 감염, 대상체 포진 감염, 고점도 증후군, 카포시 (Kaposi) 육종, 백혈병, 지질 변성증, 라임 (Lyme) 병, 주변 각질융해, 무렌 (Mooren) 궤양, 나병 이외의 항산균 감염, 근시, 안구 신생혈관병, 시신경 소와, 오슬러-웨버 (Osler-Weber) 증후군, 오슬로-웨버-렌두 병, 골관절염, 파제트병, 주변 포도막염, 유사천포창, 소수포증, 다발 동맥염, 레이저 치료후 합병증, 원충 감염증, 탄성섬유가황색종, 건성 익상편 각막염, 방사상 각막절개, 망막 신생혈관형성, 미숙아 망막병증, 수정체뒤 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, 톡소포자충증, 외상, 유잉 (Ewing) 육종의 종양, 신경모세포종의 종양, 골육종의 종양, 망막모세포종의 종양, 횡문근육종의 종양, 궤양성 대장염, 정맥 폐쇄증, 비타민 A 결핍증 및 베게너 (Wegener) 유육종증, 당뇨와 연관된 바람직하지 않은 혈관신생, 기생충 질환, 비정상적인 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.

[0044] 항혈관신생 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 질환 및 장애, 예를 들어 종양 (예를 들어, 뇌 종양 포함) 연관 부종, 악성종양 연관 복수, 메이그스 증후군, 폐렴, 콩팥 증후군, 심낭 삼출, 흉막 삼출, 심혈관 질환, 예를 들어 심근 경색 및 졸중 후의 상태와 연관된 투과성 등의 일반적인 치료에 유용하다.

[0045] 본 발명에 따르는 다른 혈관신생 의존성 질환은 혈관섬유종 (출혈을 일으키기 쉬운 비정상적인 혈관), 신생혈관 녹내장 (안구에서의 혈관 성장), 동정맥 기형 (동맥과 정맥 간의 비정상적인 소통), 유착 결여 골절 (치유되지 않을 골절), 아테롬성 경화성 플라크 (동맥의 경화), 화농성 육아종 (혈관으로 구성된 통상의 피부 병변), 피부 경화증 (결합 조직 질환 형태), 혈관종 (혈관으로 구성된 종양), 트라코마 (제3 세계에서 실명의 주요 원인), 혈우병성 관절, 혈관 부착 및 비대성 반흔 (비정상적인 반흔 형성)을 포함한다.

[0046] 본원에 사용된 "치료" (및 그의 문법적 변형, 예컨대 "치료하다" 또는 "치료하는")는 진단 및/또는 치료 목적을 위해 화합물 또는 제약 조성물을 투여하는 것을 나타낸다. "질환을 치료하다" 또는 "치료적 처치"를 위한 사용은 이미 질환을 앓고 있는 대상체에게 대상체의 상태를 개선시키기 위해 치료를 투여하는 것을 나타낸다. 치료의 바람직한 효과는 질환 재발 방지, 징후의 경감, 질환의 임의의 직접 또는 간접적인 병리적 결과의 감소, 전이 방지, 질환 진행 속도의 감소, 질환 상태의 개선 또는 완화, 및 차도 및 개선된 예후를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 항체는 질환의 발생을 지연시키거나 또는 질환의 진행을 느리게 하기 위해 사용된다. 바람직하게는, 대상체는 아래 기재된 임의의 특징적인 징후의 확인 또는 본원에 기재된 진단 방법의 사용에 기초하여 비정상적인 혈관신생을 갖는 질환을 앓고 있는 것으로 진단된다. "질환을 예방하다"는 아직 질병에 걸리지 않았으나, 특정 질환이 발생하기 쉽거나 또는 다르게는 특정 질환이 발생할 위험이 있는 대상체의 예방적 치료를 나타낸다. 바람직하게는, 대상체는 본원에 기재된 진단 방법을 사용하여 비정상적인 혈관신생을 갖는 질환이 발생할 위험이 있는 것으로 결정된다.

[0047] "치료하는 또는 개선하는"은 상태 또는 상태의 징후가 시작되기 전에 또는 후에 개선되는 것을 의미한다. 동등한 치료되지 않은 대조군과 비교하여, 임의의 표준 기술에 의해 측정된 바와 같이 이러한 개선 또는 치료의 정

도는 적어도 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% 또는 100%이다.

[0048] 용어 "재발생", "재발" 또는 "재발된"은 질환 소실의 임상 평가 후에 암 또는 질환의 복귀를 나타낸다. 원거리 전이 또는 국소 재발생의 진단이 재발로 간주될 수 있다.

[0049] "불응성"은 치료에 대한 질환 또는 상태의 내성 또는 비-반응성을 나타낸다 (예를 들어, 제공되는 치료에도 불구하고 신생물 형질 세포의 수가 증가함). 특정 실시양태에서, 용어 "불응성"은 VEGF 길항제, 항혈관신생제 및/또는 화학요법 치료를 포함하나 이에 제한되지는 않은 임의의 이전 치료에 대한 내성 또는 비-반응성을 나타낸다. 특정 실시양태에서, 용어 "불응성"은 VEGF 길항제, 항혈관신생제 및/또는 화학요법 치료를 포함하는 임의의 이전의 치료에 대한 질환 또는 상태의 고유의 비-반응성을 나타낸다. 특정 실시양태에서, VEGF 길항제는 항-VEGF 항체이다.

[0050] "재발된"은 상기 병든 상태로의 환자의 병의 회귀, 특히 명백한 회복 또는 부분적 회복후 증상의 복귀를 나타낸다. 특정 실시양태에서, 재발된 상태는 VEGF 길항제, 항혈관신생제 및/또는 화학요법 치료를 포함하나 이에 제한되지는 않은 이전 치료 전의 질병으로 복귀하는 과정 또는 질병으로의 복귀를 나타낸다. 특정 실시양태에서, 재발된 상태는 VEGF 길항제, 항혈관신생제 및/또는 화학요법 치료를 포함하는 암 요법에 대한 초기의 강한 반응 후에 질병으로 복귀하는 과정 또는 질병으로의 복귀를 나타낸다. 특정 실시양태에서, VEGF 길항제는 항-VEGF 항체이다.

[0051] 용어 "보조 요법"은 1차 요법, 일반적으로 수술 이후 제공되는 치료를 나타낸다. 암 또는 질환에 대한 보조 요법은 면역 요법, 화학요법, 방사선 요법 또는 호르몬 요법을 포함할 수 있다.

[0052] 용어 "유지 요법"은 선행 치료의 효과를 유지하는 것을 돕도록 제공되는 계획된 재치료를 나타낸다. 유지 요법은 암을 관해 상태로 유지하는 것을 돕거나 질환 진행에 무관하게 특정한 요법에 대한 반응을 연장하기 위해 종종 제공된다.

[0053] 용어 "침습성 암"은 시작하는 조직 층을 넘어 정상 주위 조직으로 확산한 암을 나타낸다. 침습성 암은 전이성이거나 전이성이 아닐 수 있다.

[0054] 용어 "비-침습성 암"은 아주 초기의 암 또는 기원 조직을 넘어 확산하지 않은 암을 나타낸다.

[0055] 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 질환을 경험한 시간의 양을 포함한다.

[0056] 용어 "진행성 질환"은 종양학에서 치료를 시작한 이래로 질량의 증가 또는 종양에서 확산으로 인한 20% 초과의 종양 성장을 나타낼 수 있다.

[0057] "장애"는 항체를 사용한 치료가 유익할 임의의 상태이다. 예를 들어, 포유동물은 비정상적인 혈관신생 (과도하거나 부적절하거나 비제어된 혈관신생) 또는 비정상적인 혈관 투과성 또는 누출을 앓고 있거나 그에 대한 예방을 필요로 한다. 이것은 포유동물이 해당 장애에 걸리기 쉽게 하는 병리 상태를 포함하는, 만성 및 급성 장애 또는 질환을 포함한다. 본원에서 치료하고자 하는 장애의 비제한적 예는 악성 및 양성 종양; 비-백혈병 및 림프계 악성 종양; 뉴런, 신경교, 성상 세포, 시상 하부 및 다른 과립상, 대식 세포성, 표피성, 간질성 및 포배강 장애; 및 염증성, 혈관신생 및 면역학적 장애를 포함한다.

[0058] 용어 "암" 및 "암성"은 조절되지 않는 세포 성장을 전형적인 특징으로 하는 포유동물에서의 생리적 상태를 지칭하거나 기재한다. 암의 예는 암종, 림프종, 아세포종, 육종 및 백혈병을 포함하지만 이에 제한되지는 않는다. 이러한 암의 보다 특정한 예는 편평세포암, 교모세포종, 자궁경부암, 난소암, 간암, 방광암, 간종양, 유방암, 결장암, 결장직장암, 자궁내막암종, 침샘 암종, 신장암, 신세포암, 전립선암, 외음부암, 갑상선암, 간세포 암종, 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, 교모세포종, 망막모세포종, 별아교세포종, 난포막종, 남성배세포종, 간종양, 혈액암, 예를 들어 비-호지킨 림프종 (NHL), 다발성 골수종 및 급성 혈액암, 자궁내막 또는 자궁 암종, 자궁내막증, 섬유육종, 융모막 암종, 침샘 암종, 외음부암, 갑상선암, 식도 암종, 간세포 암종, 항문 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.

[0059] 본원에서 사용된 "종양"은 모든 신생물성 세포 성장 및 증식 (악성 또는 양성 여부와 상관 없음), 및 모든 전-암성 및 암성 세포 및 조직을 나타낸다.

[0060] 용어 "항신생물 조성물" 또는 "항신생물제"는 하나 이상의 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 작용제, 항혈관신생제, 세포사멸제, 항-튜불린제 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, 에를로티닙 (타르세바(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 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 이들의 조합물도 또한 본 발명에 고려된다.

[0061] 본원에서 사용될 때 "성장 억제제"는 시험관내에서 및/또는 생체내에서 세포의 성장 또는 증식을 억제하는 화합물 또는 조성물을 나타낸다. 따라서, 성장 억제제는 S기에서 세포의 백분율(%)을 유의하게 감소시키는 것일 수 있다. 성장 억제제의 예는 세포 주기 진행을 (S기 이외의 다른 단계에) 차단하는 작용제, 예컨대 G1 정지 및 M기 정지를 유도하는 작용제를 포함한다. 전통적인 M기 차단제는 빈카 (빈크리스틴 및 빈블라스틴), 탁솔(TAXOL)®, 및 토포 II 억제제, 예컨대 독소루비신, 에피루비신, 다우노루비신, 에토포시드 및 블레오마이신을 포함한다. G1을 정지시키는 작용제, 예를 들어 DNA 알킬화제, 예컨대 타목시펜, 프레드니손, 다카르바진, 메클로레타민, 시스플라틴, 메토트렉세이트, 5-플루오로우라실 및 ara-C는 S기 정지로까지 이어질 수도 있다. 추가의 정보는 문헌 [The Molecular Basis of Cancer, Mendelsohn and Israel, eds., Chapter 1, entitled "Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs" by Murakami et al. (WB Saunders: Philadelphia, 1995)] (특히, p. 13)에서 찾아볼 수 있다.

[0062] 본원에서 사용된 용어 "세포독성제"는 세포의 기능을 억제 또는 저해하고/하거나 세포의 파괴를 야기하는 물질을 나타낸다. 상기 용어는 방사성 동위원소 (예를 들어, I^{131}, I^{125}, Y^{90} 및 Re^{186}), 성장 억제제, 화학요법제, 및 독소, 예컨대 박테리아, 진균, 식물 또는 동물 기원의 효소 활성 독소, 또는 그의 단편을 포함한다.

[0063] "화학요법제"는 암 치료에 유용한 화학적 화합물이다. 화학요법제의 예는 암 치료에 유용한 화학적 화합물을 포함한다. 화학요법제의 예는 알킬화제 예컨대 티오테파 및 사이톡산(CYTOXAN)® 시클로스포스파미드; 알킬 술포네이트 예컨대 부설판, 임프로설판 및 피포설판; 아지리딘 예컨대 벤조도파, 카르보쿠온, 메투레도파, 및 우레도파; 알트레타민, 트리에틸렌멜라민, 트리에틸렌포스포르아미드, 트리에틸렌티오포스포르아미드 및 트리메틸롤로멜라민이 포함되는, 에틸렌이민 및 메틸라멜라민; 아세토게닌 (특히 불라타신 및 불라타시논); 캄토테신 (합성 유사체 토포테칸 포함); 브리오스타틴; 칼리스타틴; CC-1065 (이의 아도젤레신, 카르젤레신 및 비젤레신 합성 유사체 포함); 크립토파이신 (특히 크립토파이신 1 및 크립토파이신 8); 돌라스타틴; 듀오카르마이신 (합성 유사체인 KW-2189 및 CB1-TM1 포함); 엘레우테로빈; 판크라티스타틴; 사르코딕타인; 스폰지스타틴; 질소 머스타드 예컨대 클로람부실, 클로르나파진, 클로로포스파미드, 에스트라무스틴, 이포스파미드, 메클로레타민, 메클로레타민 옥시드 히드로클로라이드, 멜팔란, 노벰비친, 페네스테린, 프레드니무스틴, 트로포스파미드, 우라실 머스타드; 니트로스우레아 예컨대 카르무스틴, 클로로조토신, 포테무스틴, 로무스틴, 니무스틴, 및 라니무스틴; 항생제 예컨대 엔다이인 항생제 (예를 들어, 칼리키아마이신, 특히 칼리키아마이신 감마1I 및 칼리키아마이신 오메가I1 (예를 들어, 문헌 [Agnew, Chem Intl. Ed. Engl., 33: 183-186 (1994)] 참조); 디네미신 (디네미신 A 포함); 비스포스포네이트, 예를 들어 클로드로네이트; 에스페라미신 및; 네오카르지노스타틴 발색단 및 관련 색소단백질 엔다이인 항생제 발색단), 아클라시노마이신, 악티노마이신, 아우트라마이신, 아자세린, 블레오마이신, 칵티노마이신, 카라비신, 카르미노마이신, 카르지노필린, 크로모마이시니스, 닥티노마이신, 다우노루비신, 데토루비신, 6-디아조-5-옥소-L-노르류신, 아드리아마이신(ADRIAMYCIN)® 독소루비신 (모르폴리노-독소루비신, 시아노모르폴리노-독소루비신, 2-피롤리노-독소루비신 및 데옥시독소루비신 포함), 에피루비신, 에소루비신, 이다루비신, 마르셀로마이신, 미토마이신 (예를 들어, 미토마이신 C), 미코페놀산, 노갈라마이신, 올리

보마이신, 페플로마이신, 포트피로마이신, 푸로마이신, 쿠엘라마이신, 로도루비신, 스트렙토니그린, 스트렙토조신, 투베르시딘, 우베니멕스, 지노스타틴, 조루비신; 항대사물, 예를 들어 메토트렉세이트 및 5-플루오로우라실 (5-FU); 엽산 유사체, 예를 들어 데노프테린, 메토트렉세이트, 프테로프테린, 트리메트렉세이트; 퓨린 유사체, 예를 들어 플루다라빈, 6-메르캅토퓨린, 티아미프린, 티오구아닌; 피리미딘 유사체, 예를 들어 안시타빈, 아자시티딘, 6-아자우리딘, 카르모푸르, 시타라빈, 디데옥시우리딘, 독시플루리딘, 에노시타빈, 플록수리딘; 안드로겐, 예를 들어 칼루스테론, 드로모스타놀론 프로피오네이트, 에피티오스타놀, 메피티오스탄, 테스토락톤; 항부신제, 예를 들어 아미노글루테티미드, 미토탄, 트릴로스탄; 엽산 보충물, 예를 들어 프롤린산; 아세글라톤; 알도포스파미드 글리코시드; 아미노레불린산; 에닐우라실; 암사크린; 베스트라부실; 비산트렌; 에다트락세이트; 데포파민; 데메콜신; 디아지쿠온; 엘포르니틴; 엘리프티늄 아세테이트; 에포틸론; 에토글루시드; 질산갈륨; 히드록시우레아; 렌티난; 로니다이닌; 마이탄시노이드, 예를 들어 마이탄신 및 안사미토신; 미토구아존; 미톡산트론; 모피단몰; 니트라에린; 펜토스타틴; 페나메트; 피라루비신; 로속산트론; 포도필린산; 2-에틸히드라지드; 프로카르바진; PSK® 폴리사카라이드 복합체 (JHS 내추럴 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 탁솔® 파클리탁셀 (브리스톨-마이어스 스퀴브 옹콜로지(Bristol-Myers Squibb Oncology), 미국 뉴저지주 프린스턴), 아브락산(ABRAXANE)™ 크레모포르-무함유, 파클리탁셀의 알부민-조작된 나노입자 제제 (아메리칸 파마슈티칼 파트너스(American Pharmaceutical Partners), 미국 일리노이주 샴버그), 및 탁소테레(TAXOTERE)® 도세탁셀 (론-프랑 롤러(Rhone-Poulenc Rorer), 프랑스 안토니); 클로란부실; 겜자르(GEMZAR)® 겜시타빈; 6-티오구아닌; 메르캅토퓨린; 메토트렉세이트; 백금 유사체, 예를 들어 시스플라틴 및 카르보플라틴; 빈블라스틴; 백금; 에토포시드 (VP-16); 이포스파미드; 미톡산트론; 빈크리스틴; 나벨빈(NAVELBINE)® 비노렐빈; 노반트론; 테니포시드; 에다트렉세이트; 다우노마이신; 아미노프테린; 크셀로다; 이반드로네이트; 이리노테칸 (캄프토사르(Camptosar), CPT-11) (이리노테칸과 5-FU 및 류코보린과의 치료 처방 포함); 토포이소머라제 억제제 RFS 2000; 디플루오로메틸오르니틴 (DMFO); 레티노이드 (예를 들어, 레티노산); 카페시타빈; 콤브레타스타틴; 류코보린 (LV); 옥살리플라틴 (옥살리플라틴 치료 처방 (폴폭스(FOLFOX)) 포함); 세포 증식을 저하시키는 PKC-알파, Raf, H-Ras 및 EGFR (예를 들어, 에를로티닙 (타르세바)™)의 억제제; 및 상기 언급된 임의의 것의 제약상 허용되는 염, 산 또는 유도체를 포함한다.

[0064] 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 (놀바덱스(NOLVADEX)® 타목시펜 포함), 랄록시펜, 드롤록시펜, 4-히드록시타목시펜, 트리옥시펜, 케옥시펜, LY117018, 오나프리스톤 및 파레스톤(FARESTON)·토레미펜; 부신에서 에스트로겐 생산을 조절하는 효소 아로마타제를 억제하는 아로마타제 억제제, 예를 들어 4(5)-이미다졸, 아미노글루테티미드, 메가세(MEGASE)® 메게스트롤 아세테이트, 아로마신(AROMASIN)® 엑세메스탄, 포르메스탄, 파드로졸, 리비조르(RIVISOR)® 보로졸, 페마라(FEMARA)® 레트로졸, 및 아리미덱스(ARIMIDEX)® 아나스트로졸; 및 항-안드로겐, 예를 들어 플루타미드, 닐루타미드, 비칼루타미드, 류프롤리드 및 고세렐린; 및 트록사시타빈 (1,3-디옥솔란 뉴클레오시드 시토신 유사체); 안티센스 올리고뉴클레오티드, 특히 이상 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, 안지오자임(ANGIOZYME)® 리보자임) 및 HER2 발현 억제제; 백신, 예를 들어 유전자 요법 백신, 예를 들어 알로벡틴(ALLOVECTIN)® 백신, 류벡틴(LEUVECTIN)® 백신 및 백시드(VAXID)® 백신; 프로류킨(PROLEUKIN)® rIL-2; 루르토테칸(LURTOTECAN)® 토포이소머라제 1 억제제; 아바렐릭스(ABARELIX)® rmRH; 비노렐빈 및 에스페라미신 (미국 특허 제4,675,187호 참조) 및 상기 언급된 임의의 것의 제약상 허용되는 염, 산 또는 유도체를 포함한다.

[0065] 본원에 사용된 용어 "전구약물"은 모약물에 비해 이환된 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)]을 참조한다. 본 발명의 전구약물은 포스페이트-함유 전구약물, 티오포스페이트-함유 전구약물, 술페이트-함유 전구약물, 펩티드-함유 전구약물, D-아미노산-변형된 전구약물, 글리코실화된 전구약물, β-락탐-함유 전구약물, 임의로 치환된 페녹시아세트아미드-함유 전구약물 또는 임의로 치환된 페닐아세트아미드-함유 전구약물, 5-플루오로시토신, 및 더욱 활성이고 세포독성이 없는 약물로 전환될 수 있는 다른 5-플루오로우리딘 전구약물을 포함하지만 이에 제한되지는 않는다. 본 발명에 사용하기 위한 전구약물 형태로 유도체화될 수 있는 세포독성 약물의 예는 상기 기재된 화학요법제를 포함하지만 이에 제한되지는 않는다.

[0066] 본원에 개시된 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 전형적으로 폴리펩티드의 진단 또는 치료 용도를 방해할 물질이고, 효소, 호르몬, 및 다른 단백질성 또는 비-단백질성 용질을 포함할 수 있다. 실시양태에서, 폴리펩티드는 (1) 스피닝 컵 시퀴네이터(spinning cup sequenator)를 사용하여 N-말단 또는 내부 아미노산 서열의 15개 이상의 잔기를 얻기에 충분한 정도로, 또는 (2) 쿠마시 블루(Coomassie blue) 또는 바람직하게는 은 염색을 이용하여 비-환원 또는 환원 조건하에 SDS-PAGE에 의해 균일한 것으로 나타날 정도로 정제될 것이다. 단리된 폴리펩티드는 폴리펩티드 자연 환경의 적어도 한 성분도 존재하지 않을 것이기 때문에 재조합 세포 내의 계내 폴리펩티드를 포함한다. 그러나, 통상적으로, 단리된 폴리펩티드는 1회 이상의 정제 단계를 통해 제조될 것이다.

[0067] "단리된" 폴리펩티드-코딩 핵산 또는 다른 폴리펩티드-코딩 핵산은 폴리펩티드-코딩 핵산의 천연 공급원에서 그와 통상적으로 회합되는 하나 이상의 오염 핵산 분자로부터 확인되고 분리된 핵산 분자이다. 단리된 폴리펩티드-코딩 핵산 분자는 자연계에서 발견되는 형태 또는 셋팅과 다른 것이다. 따라서, 단리된 폴리펩티드-코딩 핵산 분자는 천연 세포에 존재하는 특정 폴리펩티드-코딩 핵산 분자와 구별된다. 그러나, 단리된 폴리펩티드-코딩 핵산 분자는, 폴리펩티드를 통상적으로 발현하는 세포 내에 함유되고 예를 들어 천연 세포에서와는 상이한 염색체 위치에 존재하는 폴리펩티드-코딩 핵산 분자를 포함한다.

[0068] 용어 "제어 서열"은 특정 숙주 유기체 내에서 작동가능하게 연결된 코딩 서열의 발현에 필요한 DNA 서열을 나타낸다. 원핵생물에 적합한 제어 서열은 예를 들어 프로모터, 임의로는 오퍼레이터 서열 및 리보솜 결합 부위를 포함한다. 진핵 세포는 프로모터, 폴리아데닐화 신호 및 인핸서를 이용하는 것으로 공지되어 있다.

[0069] 핵산은 또 다른 핵산 서열과 기능적 관계로 배치될 때 "작동가능하게 연결"된다. 예를 들어, 전서열 또는 분비 리더의 DNA는 폴리펩티드에 대한 DNA가 상기 폴리펩티드의 분비에 수반되는 전단백질로서 발현되는 경우에 상기 폴리펩티드에 대한 DNA에 작동가능하게 연결된 것이고; 프로모터 또는 인핸서는 코딩 서열의 전사에 영향을 미칠 경우에 상기 코딩 서열에 작동가능하게 연결된 것이며; 또는 리보솜 결합 부위는 코딩 서열의 번역을 용이하게 하도록 배치될 경우에 상기 코딩 서열에 작동가능하게 연결된 것이다. 일반적으로, "작동가능하게 연결된"은 연결될 DNA 서열들이 인접하여 위치함을 의미하며, 분비 리더의 경우에는 인접하여 위치하고 리딩 페이스(reading phase) 내에 존재하는 것을 의미한다. 그러나, 인핸서는 인접하여 위치할 필요가 없다. 연결은 편리한 제한 부위에서의 라이게이션을 통해 달성된다. 이러한 부위가 존재하지 않는 경우에는 합성 올리고뉴클레오티드 어댑터 또는 링커를 통상적인 관행에 따라 사용한다.

[0070] 본원에 정의된 바와 같이, "엄격 조건" 또는 "고엄격도 조건"은 (1) 세척시 낮은 이온 강도 및 높은 온도, 예를 들어 50℃에서 0.015 M 염화나트륨/0.0015 M 시트르산나트륨/0.1% 나트륨 도데실 술페이트를 사용하거나, (2) 혼성화 동안에 예를 들어 42℃에서 포름아미드, 예를 들어 0.1% 소 혈청 알부민/0.1% 피콜(Ficoll)/0.1% 폴리비닐피롤리돈/750 mM 염화나트륨, 75 mM 시트르산나트륨을 함유하는 50 mM 인산나트륨 완충액 (pH 6.5)을 함유하는 50% (v/v) 포름아미드와 같은 변성제를 사용하거나, 또는 (3) 42℃에서 50% 포름아미드, 5xSSC (0.75 M NaCl, 0.075 M 시트르산나트륨), 50 mM 인산나트륨 (pH 6.8), 0.1% 피로인산나트륨, 5x덴하르트(Denhardt) 용액, 초음파처리된 연어 정자 DNA (50 ㎍/ml), 0.1% SDS 및 10% 덱스트란 술페이트를 사용하고 42℃에서 0.2xSSC (염화나트륨/시트르산나트륨)에 10분 세척한 후에, 55℃에서 EDTA가 함유된 0.1xSSC로 이루어진 고엄격도 세척을 10분 수행한다.

[0071] 본원에 기재된 아미노산 서열은 달리 명시되지 않는 한 인접한 아미노산 서열이다.

[0072] 본원에서 사용된 용어 "이뮤노어드헤신"은 이종성 단백질 ("어드헤신")의 결합 특이성이 이뮤노글로불린 불변 도메인의 이펙터 기능과 조합된 항체-유사 분자를 의미한다. 구조적으로, 이뮤노어드헤신은 항체의 항원 인식 및 결합 부위 이외의, 목적하는 결합 특이성을 갖는 아미노산 서열 (즉, "이종성")과 이뮤노글로불린 불변 도메인 서열의 융합체를 포함한다. 이뮤노어드헤신 분자의 어드헤신 부분은 일반적으로 수용체 또는 리간드, 예를

들어 VEGFR 또는 피브로넥틴 리간드의 결합 부위를 적어도 포함하는 인접 아미노산 서열이다. 이뮤노어드헤신 내의 이뮤노글로불린 불변 도메인 서열은 임의의 이뮤노글로불린, 예를 들어 IgG-1, IgG-2, IgG-3, 또는 IgG-4 하위유형, IgA (IgA-1 및 IgA-2 포함), IgE, IgD 또는 IgM으로부터 얻을 수 있다. 펩티바디 (이뮤노글로불린의 Fc 영역에 융합된 표적에 특이적으로 결합하는 서열의 파지 디스플레이 선택으로부터 유래된 서열을 포함하기도 함)가 본원에서 이뮤노어드헤신으로 고려될 수 있다.

[0073] 용어 "항체"는 광범위한 의미로 사용되고, 천연 폴리펩티드에 특이적으로 결합하고/거나 본 발명의 생물학적 활성 또는 면역학적 활성을 나타내는 한, 구체적으로 예를 들어, 단일 모노클로날 항체 (효능제, 길항제 및 중화 항체 포함), 폴리에피토프 특이성을 갖는 항체 조성물, 폴리클로날 항체, 단일-쇄 항-항체 및 항체의 단편 (하기 참조)을 포함한다. 한 실시양태에 따라, 항체는 표적 단백질의 올리고머 형태, 예를 들어 삼량체 형태에 결합한다. 또 다른 실시양태에 따라, 항체는 단백질에 특이적으로 결합하며, 여기서 결합은 본 발명의 모노클로날 항체에 의해 억제될 수 있다 (예를 들어, 본 발명의 기탁된 항체 등). 항체의 "기능적 단편 또는 유사체"라는 어구는 언급되는 항체와 마찬가지로 정성적인 생물학적 활성을 갖는 화합물이다. 예를 들어, 본 발명의 항체의 기능성 단편 또는 유사체는 VEGF 또는 α5β1에 특이적으로 결합할 수 있는 것일 수 있다. 한 실시양태에서, 항체는 세포 증식을 유도하는 VEGF의 능력을 방지하거나 실질적으로 감소시킬 수 있다.

[0074] "단리된 항체"는 천연 환경의 성분으로부터 확인 및 분리 및/또는 회수된 항체이다. 그의 천연 환경의 오염 성분은 항체에 대한 진단 또는 치료 용도를 방해하는 물질이고, 효소, 호르몬 및 다른 단백질성 또는 비-단백질성 용질을 포함할 수 있다. 실시양태에서, 항체는 (1) 로우리(Lowry) 방법으로 측정시에 항체의 95 중량%를 초과하는 정도, 가장 바람직하게는 99 중량%를 초과하는 정도로, (2) 스피닝 컵 시퀘네이터를 사용하여 N-말단 또는 내부 아미노산 서열의 15개 이상의 잔기를 얻기에 충분한 정도로, 또는 (3) 쿠마시 블루 또는 바람직하게는 은 염색을 이용하여 환원 또는 비환원 조건하에 SDS-PAGE에 의해 균질한 것으로 나타날 정도로 정제될 것이다. 단리된 항체는 재조합 세포 내의 계내 항체를 포함하는데, 이는 항체 천연 환경의 하나 이상의 성분이 존재하지 않을 것이기 때문이다. 그러나, 통상적으로, 단리된 항체는 1회 이상의 정제 단계를 통해 제조될 것이다.

[0075] 기본적인 4-쇄 항체 단위는 2개의 동일한 경쇄 (L) 및 2개의 동일한 중쇄 (H)로 이루어진 이종사량체 당단백질이다 (IgM 항체는 J 쇄라 불리는 추가의 폴리펩티드와 함께 5개의 기본적인 이종사량체 단위로 이루어져 있어서 10개의 항원 결합 부위를 함유하고, 분비형 IgA 항체는 중합되어 J 쇄와 함께 기본적인 4-쇄 단위를 2개 내지 5개 포함하는 다가 조립체를 형성할 수 있음). IgG의 경우, 4-쇄 단위는 일반적으로 약 150,000 달톤이다. 각각의 L 쇄는 1개의 공유결합 디술피드 결합에 의해 H 쇄에 연결되지만, 2개의 H 쇄는 H 쇄 이소형에 따라 하나 이상의 디술피드 결합에 의해 서로 연결된다. 또한, 각 H 쇄 및 L 쇄에는 일정한 간격을 두고 이격된 쇄내 디술피드 브릿지가 존재한다. 각각의 H 쇄는 N-말단에 가변 도메인 (V_H)을 갖고, 그 뒤에 α 및 γ 쇄 각각의 경우에는 3개의 불변 도메인 (C_H), μ 및 ε 이소형의 경우에는 4개의 C_H 도메인을 갖는다. 각 L 쇄에는 N-말단의 가변 도메인 (V_L) 및 그 뒤에 다른쪽 말단의 불변 도메인 (C_L)이 있다. V_L은 V_H와 정렬되고, C_L은 중쇄의 제1 불변 도메인 (C_H1)과 정렬된다. 특정 아미노산 잔기는 경쇄 및 중쇄 가변 도메인 사이의 계면을 형성한다고 여겨진다. V_H 및 V_L의 쌍형성은 함께 단일 항원-결합 부위를 형성한다. 상이한 부류의 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] (페이지 71 및 챕터 6)을 참조한다.

[0076] 임의의 척추동물 종의 L 쇄는 이들의 불변 도메인의 아미노산 서열을 기초로 하여 카파 및 람다라고 불리는 명백히 상이한 2가지 유형 중 하나에 배정될 수 있다. 이뮤노글로불린은 중쇄의 불변 도메인 (C_H)의 아미노산 서열에 따라 상이한 부류 또는 이소형으로 배정될 수 있다. 5가지 부류의 이뮤노글로불린 IgA, IgD, IgE, IgG 및 IgM이 존재하고, 각각은 α, δ, γ, ε 및 μ라고 지칭되는 중쇄를 갖는다. γ 및 α 부류는 C_H 서열 및 기능에 있어서의 상대적으로 작은 차이점을 기초로 하여 하위부류로 더 분류되는데, 예를 들어 인간은 하위부류 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 및 IgA2를 발현한다.

[0077] 용어 "가변"은 가변 도메인의 특정 분절의 서열이 항체마다 크게 상이하다는 사실을 나타낸다. V 도메인은 항원 결합을 매개하고, 특정 항체의 그의 특정 항원에 대한 특이성을 한정한다. 그러나, 가변성이 가변 도메인의 110개 아미노산 범위에 걸쳐 고르게 분포되어 있는 것은 아니다. 대신, V 영역은 길이가 각각 9개 내지 12개 아미노산이며 가변성이 극도로 높아 "초가변 영역"이라 불리는 보다 짧은 영역에 의해 분리되어 있는, 15개 내지 30개 아미노산으로 이루어진 프레임워크 영역 (FR)이라 불리는 상대적으로 불변성인 스트레치로 이루어진다. 천연 중쇄 및 경쇄의 가변 도메인은 각각, β-시트 형태를 주로 채택하는 4개의 FR을 포함하고, 이들은 상기 β

-시트 구조를 연결하며 일부 경우에는 β-시트 구조의 일부를 형성하는 루프를 형성하는 3개의 초가변 영역에 의해 연결된다. 각 쇄의 초가변 영역은 FR에 의해 서로 근접하게 위치하고, 다른 쇄의 초가변 영역과 함께 항체의 항원 결합 부위의 형성에 기여한다 (문헌 [Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)] 참조). 불변 도메인은 항원에 대한 항체 결합에 직접 관여하지는 않지만, 다양한 이펙터 기능, 예컨대 항체 의존적 세포 세포독성 (ADCC)에 있어서의 항체의 참여를 나타낸다.

[0078] 용어 "초가변 영역"이 본원에서 사용되는 경우, 이것은 항원-결합을 담당하는 항체의 아미노산 잔기를 나타낸다. 초가변 영역은 일반적으로 "상보성 결정 영역" 또는 "CDR"로부터의 아미노산 잔기 (예를 들어, V_L의 대략 잔기 24-34 (L1), 50-56 (L2) 및 89-97 (L3), 및 V_H의 대략 31-35B (H1), 50-65 (H2) 및 95-102 (H3) (한 실시양태에서, H1은 대략 31-35임) [Kabat et al., 상기 문헌] 및/또는 "초가변 루프"로부터의 잔기 (예를 들어, V_L의 잔기 26-32 (L1), 50-52 (L2) 및 91-96 (L3), 및 V_H의 26-32 (H1), 53-55 (H2) 및 96-101 (H3); 문헌 [Chothia and Lesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)])를 포함한다.

[0079] 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, [Kabat et al., 상기 문헌 (1991)] 참조). "EU 넘버링 시스템" 또는 "EU 색인 (index)"은 일반적으로 이뮤노글로불린 중쇄 불변 영역 내의 잔기를 언급하기 위해 사용된다 (예를 들어, 명백하게 본원에 참고로 도입된 [Kabat et al., 상기 문헌 (1991)]에 보고된 EU 색인 참조). 본원에서 달리 언급하지 않는다면, 항체의 가변 도메인 내의 잔기 번호에 대한 언급은 카바트 넘버링 시스템에 의해 넘버링된 잔기를 의미한다. 본원에서 달리 언급하지 않으면, 항체의 불변 도메인 내의 잔기 번호에 대한 언급은 EU 넘버링 시스템에 의한 잔기 넘버링을 의미한다.

[0080] 본원에서 사용되는 용어 "모노클로날 항체"는 실질적으로 균질한 항체들의 집단으로부터 수득된 항체를 지칭하고, 즉 집단을 구성하는 개별 항체들은 미량으로 존재할 수 있는 가능한 천연 돌연변이를 제외하고는 동일하다. 모노클로날 항체는 단일 항원 부위에 대해 지시되며 고도로 특이적이다. 추가로, 상이한 결정자 (에피토프)에 대해 지시된 상이한 항체를 포함하는 폴리클로날 항체 제제와는 반대로, 각각의 모노클로날 항체는 항원상의 단결정자에 대해 지시된다. 그의 특이성 이외에, 모노클로날 항체는 다른 항체에 의해 오염되지 않지 않고 합성될 수 있다는 점에서 유리하다. 수식어구 "모노클로날"은 임의의 특정한 방법을 통한 항체 생성이 필요하다는 것으로 해석되어서는 안된다. 예를 들어, 본 발명에서 유용한 모노클로날 항체는 문헌 [Kohler et al., Nature, 256:495 (1975)]에 의해 처음 기재된 하이브리도마 방법에 의해 제조될 수 있거나, 또는 박테리아, 진핵생물 동물 또는 식물 세포에서 재조합 DNA 방법을 이용하여 제조될 수 있다 (예를 들어, 미국 특허 제4,816,567호 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 열거된 방법을 사용하여 파지 항체 라이브러리로부터 단리될 수 있다.

[0081] 본원에서 모노클로날 항체는 본 발명의 생물학적 활성을 보이는 한, 중쇄 및/또는 경쇄의 일부가 특정 종에서 유래하거나 특정 항체 부류 또는 하위부류에 속하는 항체의 대응하는 서열과 동일하거나 상동성이고 쇄(들)의 나머지는 다른 종에서 유래하거나 다른 항체 종류 또는 하위부류에 속하는 항체의 대응하는 서열과 동일하거나 상동성인 "키메라" 항체 및 상기 항체의 단편을 포함한다 (미국 특허 제4,816,567호; 및 문헌 [Morrison et al., PNAS USA, 81:6851-6855 (1984)] 참조). 본원에서 관심있는 키메라 항체는 비-인간 영장류 (예를 들어, 구세계(Old World) 원숭이, 유인원 등)로부터 유래된 가변 도메인 항원-결합 서열 및 인간 불변 영역 서열을 포함하는 "영장류화" 항체를 포함한다.

[0082] "친화도 성숙" 항체는 변경(들)을 갖지 않는 모 항체에 비해 항원에 대한 항체의 친화도를 개선시키는, 하나 이상의 CDR에 하나 이상의 변경을 갖는 항체이다. 바람직한 친화도 성숙 항체는 표적 항원에 대해 나노몰 또는 심지어는 피코몰의 친화도를 가질 것이다. 친화도 성숙 항체는 당업계에 공지된 절차에 의해 제조된다. 문헌 [Marks et al., Bio/Technology 10:779-783 (1992)]에는 VH 및 VL 도메인 셔플링 (shuffling)에 의한 친화도 성숙이 기재되어 있다. CDR 및/또는 프레임워크 잔기의 무작위 돌연변이유발이 문헌 [Barbas et al., PNAS USA 91:3809-3813 (1994)]; [Schier et al., Gene 169:147-155 (1995)]; [Yelton et al., J. Immunol. 155:1994-2004 (1995)]; [Jackson et al., J. Immunol. 154(7):3310-9 (1995)]; 및 [Hawkins et al., J. Mol. Biol. 226:889-896 (1992)]에 기재되어 있다.

[0083] "차단" 항체 또는 "길항제" 항체는 이것이 결합하는 항원의 생물학적 활성을 억제하거나 감소시키는 항체이다.

예를 들어 차단 또는 길항제 항-α5β1 항체는 α5β1에 결합함으로써 부분적으로 또는 완전히 혈관신생을 억제한다.

[0084] "효능제" 항체는 그가 결합하는 항원의 생물학적 활성을 향상 또는 증가시키는 것이다. 예를 들어, 효능제 항체 항-α5β1 항체는 α5β1에 결합함으로써 혈관신생을 향상시킨다.

[0085] "무손상" 항체는 항원 결합 부위 및 C_L 및 적어도 중쇄 불변 도메인, C_H1, C_H2 및 C_H3을 포함하는 항체이다. 불변 도메인은 천연 서열 불변 도메인 (예를 들어, 인간 천연 서열 불변 도메인) 또는 그의 아미노산 서열 변이체일 수 있다. 무손상 항체는 하나 이상의 이펙터 기능을 갖는 것이 바람직하다.

[0086] "항체 단편"은 무손상 항체의 일부, 바람직하게는 무손상 항체의 항원 결합 또는 가변 영역을 포함한다. 항체 단편의 예는 Fab, Fab', $F(ab')_2$ 및 Fv 단편, 디아바디, 선형 항체 (미국 특허 제5,641,870호의 실시예 2; 문헌 [Zapata et al., Protein Eng. 8(10): 1057-1062 [1995]] 참조), 단일-쇄 항체 분자, 및 항체 단편들로부터 형성된 다중특이적 항체를 포함한다.

[0087] "선형 항체"란 표현은 일반적으로, 문헌 [Zapata et al., Protein Eng., 8(10):1057-1062 (1995)]에 기재된 항체를 나타낸다. 간략하게 설명하면, 이들 항체는 상보적 경쇄 폴리펩티드와 함께 한 쌍의 항원 결합 영역을 형성하는 한 쌍의 병렬식 Fd 절편 (VH-CH1-VH-CH1)을 포함한다. 선형 항체는 이중특이적 또는 단일특이적일 수 있다.

[0088] 항체를 파파인으로 분해시키면 "Fab" 단편이라고 불리는 2개의 동일한 항원-결합 단편 및 나머지 "Fc" 단편이 생성되는데, Fc라는 명칭은 쉽게 결정화되는 능력을 반영한 것이다. Fab 단편은 H 쇄의 가변 영역 도메인 (V_H) 및 1개 중쇄의 제1 불변 도메인 (C_H1) 및 L 쇄 전체로 이루어진다. 각 Fab 단편은 항원 결합에 대해 1가이고, 즉, 단일 항원-결합 부위를 갖는다. 항체의 펩신 처리는 2가 항원-결합 활성을 갖고 2개의 디술피드 연결된 Fab 단편에 대충 상응하며 항원을 여전히 가교할 수 있는 커다란 단일 $F(ab')_2$ 단편을 생성한다. Fab' 단편은 항체 힌지 영역으로부터의 하나 이상의 시스테인을 포함하는 C_H1 도메인의 카르복시 말단에서 몇 개의 추가 잔기를 갖는다는 점에서 Fab 단편과 상이하다. Fab'-SH는 본원에서 불변 도메인의 시스테인 잔기(들)이 유리 티올기를 보유하는 Fab'를 나타낸다. $F(ab')_2$ 항체 단편은 본래 가운데에 힌지 시스테인을 갖는 Fab' 단편의 쌍으로 생성된다. 항체 단편의 다른 화학적 커플링이 또한 공지되어 있다.

[0089] Fc 단편은 디술피드에 의해 함께 결합되어 있는 H 쇄 둘 모두의 카르복시-말단 부분을 포함한다. 항체의 이펙터 기능은 Fc 영역의 서열에 의해 결정되는데,이 영역은 또한 특정 유형의 세포에서 발견되는 Fc 수용체 (FcR)에 의해 인식되는 부분이기도 하다.

[0090] "변이체 Fc 영역"은 본원에서 규정되는 바와 같은 하나 이상의 "아미노산 변형"에 의해 천연 서열 Fc 영역의 것과 상이한 아미노산 서열을 포함한다. 바람직하게는, 변이체 Fc 영역은 천연 서열 Fc 영역 또는 모 폴리펩티드의 Fc 영역과 비교하여 하나 이상의 아미노산 치환을 갖고, 예를 들어 천연 서열 Fc 영역 또는 모 폴리펩티드의 Fc 영역에서 약 1 내지 약 10개의 아미노산 치환, 바람직하게는 약 1 내지 약 5개 아미노산 치환을 갖는다. 한 실시양태에서, 변이체 Fc 영역은 본원에서 천연 서열 Fc 영역과 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. 또 다른 실시양태에 따라, 변이체 Fc 영역은 본원에서 모 폴리펩티드의 Fc 영역과 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.

[0091] 용어 "Fc 영역-포함 폴리펩티드"는 Fc 영역을 포함하는 폴리펩티드, 예를 들어 항체 또는 이뮤노어드헤신 (하기 정의 참고)을 나타낸다. Fc 영역의 C-말단 리신 (EU 넘버링 시스템에 따르는 잔기 447)은, 예를 들어 폴리펩티의 정제 동안 또는 이러한 폴리펩티드를 코딩하는 핵산을 재조합적으로 공학 처리함으로써 제거할 수 있다. 따라서, 본 발명에 따르는 Fc 영역을 갖는 폴리펩티드 (항체 포함)를 포함하는 조성물은 모든 K447 잔기가 제거된 폴리펩티드 집단, K447 잔기가 전혀 제거되지 않은 폴리펩티드 집단, 또는 K447 잔기를 수반한 폴리펩티드와 K447 잔기를 수반하지 않는 폴리펩티드의 혼합물을 갖는 폴리펩티드 집단을 포함할 수 있다.

[0092] "Fv"는 완전한 항원-인식 및 항원-결합 부위를 함유하는 최소 항체 단편이다. 이 단편은 1개의 중쇄 가변 영역 도메인 및 1개의 경쇄 가변 영역 도메인이 단단하게 비-공유적으로 회합된 이량체로 이루어진다. 이들 2개 도메인이 폴딩되어 6개의 초가변 루프 (H 쇄 및 L 쇄로부터 각각 3개의 루프)가 형성되는데, 상기 루프는 항원 결

합을 위한 아미노산 잔기를 제공하고 항체에 항원 결합 특이성을 부여한다. 그러나, 단일 가변 도메인 (또는 항원에 특이적인 3개의 CDR만을 포함하는 Fv의 절반)일지라도 전체 결합 부위보다 친화도가 낮긴 하지만 항원을 인식하고 결합하는 능력을 갖는다.

[0093] "단일-쇄 Fv" (또한 약어로 "sFv" 또는 "scFv"라고 함)는 단일 폴리펩티드 쇄로 연결된 V_H 및 V_L 항체 도메인을 포함하는 항체 단편이다. 바람직하게는, sFv 폴리펩티드는 sFv가 항원 결합을 위한 목적하는 구조를 형성할 수 있도록 하는, V_H 및 V_L 도메인 사이의 폴리펩티드 링커를 더 포함한다. sFv를 검토하기 위해서는 문헌 [Pluckthun in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenburg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994)]; [Borrebaeck 1995, (하기 문헌)]을 참조한다.

[0094] 용어 "디아바디"는 V_H 도메인 및 V_L 도메인 사이의 짧은 링커 (약 5개 내지 10개 잔기)로 sFv 단편 (이전 단락 참조)을 구축함으로써 V 도메인의 쇄내 쌍형성이 아닌 쇄간 쌍형성을 달성하여 2가 단편, 즉, 2개의 항원-결합 부위를 갖는 단편을 생성하여 제조된 작은 항체 단편을 나타낸다. 이중특이적 디아바디는 2개 항체의 V_H 도메인 및 V_L 도메인이 상이한 폴리펩티드 쇄에 존재하는 2개의 "교차" sFv 단편의 이종이량체이다. 디아바디는 예를 들어 EP 404,097; WO 93/11161; 및 문헌 [Hollinger et al., PNAS USA, 90:6444-6448 (1993)]에 보다 상세히 기재되어 있다.

[0095] "인간화" 항체는 비-인간 항체로부터 유래된 최소 서열을 함유하는 키메라 항체인 비-인간 (예를 들어, 설치류) 항체의 형태이다. 대부분의 경우, 인간화 항체는 수용자의 초가변 영역의 잔기가 원하는 항체 특이성, 친화성 및 능력을 보유하는 마우스, 래트, 토끼 또는 비-인간 영장류와 같은 비-인간 종 (공여자 항체)의 초가변 영역의 잔기로 대체된 인간 이뮤노글로불린 (수용자 항체)이다. 일부 예에서, 인간 이뮤노글로불린의 프레임워크 영역 (FR) 잔기를 상응하는 비-인간 잔기로 대체한다. 또한, 인간화 항체는 수용자 항체 또는 공여자 항체에 없는 잔기를 포함할 수 있다. 이러한 변형은 항체 성능이 추가로 개선되게 한다. 일반적으로, 인간화 항체는 적어도 1개, 전형적으로는 2개의 가변 도메인을 실질적으로 모두 포함할 것이고, 여기서 모든 또는 실질적으로 모든 초가변 루프는 비-인간 이뮤노글로불린의 초가변 루프에 상응하고 모든 또는 실질적으로 모든 FR은 인간 이뮤노글로불린 서열의 FR이다. 또한, 인간화 항체는 임의로 이뮤노글로불린 불변 영역 (Fc)의 적어도 일부, 전형적으로 인간 이뮤노글로불린의 불변 영역의 적어도 일부를 포함할 것이다. 추가의 세부사항에 대하여는 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.

[0096] "종-의존성 항체"는 제2 포유동물 종으로부터의 항원의 상동체에 대한 결합 친화성보다 제1 포유동물 종으로부터의 항원에 대한 더 강한 결합 친화성을 갖는 항체이다. 통상적으로, 종-의존성 항체는 인간 항원 (즉, 결합 친화도 (Kd) 값이 약 1×10^{-7} M 이하, 약 1×10^{-8} M 이하, 또는 약 1×10^{-9} M 이하)에 "특이적으로 결합"하지만, 제2 비-인간 포유동물 종의 항원의 상동체에 대한 결합 친화도는 인간 항원에 대한 그의 결합 친화도보다 적어도 약 50배, 또는 적어도 약 500배, 또는 적어도 약 1000배 더 약하다. 종-의존적 항체는 상기 정의된 바와 같은 임의의 다양한 유형의 항체일 수 있으나, 바람직하게는 인간화 또는 인간 항체이다.

[0097] 이러한 실시양태에서, "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 분자의 결합을 일반적으로 결합 활성을 보유하지 않는 유사한 구조의 분자인 대조군 분자의 결합과 비교하여 결정함으로써 측정할 수 있다. 예를 들어, 특이적 결합은 표적과 유사한 대조군 분자, 예를 들어 과량의 비표지 표적과의 경쟁에 의해 측정할 수 있다. 이 경우, 프로브에 대한 표지된 표적의 결합이 과량의 비표지 표적에 의해 경쟁적으로 억제된다면 특이적 결합이다. 본원에서 사용되는 특정 폴리펩티드 또는 특정 폴리펩티드 표적 상의 에피토프에 대한 용어 "특이적 결합" 또는 "특이적으로 결합하는" 또는 "특이적인"은 예를 들어 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 이상인 분자로 설명될 수 있다. 한 실시양태에서, 용어 "특이적 결합"은 분자가 임의의 다른 폴리펩티드 또는 폴리펩티드 에피토프에 대해 실질적으로 결합하지 않으면서 특정 폴리펩티드 또는 특정 폴리펩티드에서의 에피

토프에 결합하는 결합을 의미한다.

[0098] 항체 "이펙터 기능"은 항체의 Fc 영역 (천연 서열 Fc 영역 또는 아미노산 서열 변이체 Fc 영역)에 기인하는 생물학적 활성을 지칭하고, 항체 이소형에 따라 달라진다. 항체 이펙터 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 영역"은 자연계에서 발견된 Fc 영역의 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 포함한다. Fc 서열의 예는 예를 들어 문헌 [Kabat et al., 상기 문헌 (1991)] (이에 제한되지는 않음)에 기재되어 있다.

[0099] 본원에서 확인된 폴리펩티드 및 항체 서열과 관련한 "아미노산 서열 동일성 (%)" 또는 "상동성"은 서열 동일성의 일부로서의 모든 보존적 치환을 고려하여 서열을 정렬시킨 후, 비교되는 폴리펩티드 내의 아미노산 잔기와 동일한 후보 서열 중의 아미노산 잔기의 비율 (%)로서 정의된다. 아미노산 서열 동일성 퍼센트를 결정하기 위한 정렬은 당업계 기술 범위 내의 다양한 방법, 예를 들어 공개적으로 이용가능한 컴퓨터 소프트웨어, 예컨대 BLAST, BLAST-2, ALIGN 또는 메갈린(Megalign) (디엔에이스타(DNASTAR)) 소프트웨어를 이용하여 달성할 수 있다. 당업자는 비교될 전장 서열에 대한 최대 정렬을 달성하는데 필요한 임의의 알고리즘을 비롯하여 정렬 결정에 적절한 파라미터를 정할 수 있다. 그러나, 본원의 목적상, 아미노산 서열 동일성 % 값은 서열 비교 컴퓨터 프로그램 ALIGN-2를 이용하여 생성된다. ALIGN-2 서열 비교 컴퓨터 프로그램은 제넨테크, 인크.(Genentech, Inc.) 소유로서, 소스 코드는 미국 저작권청(Copyright Office) (미국 20559 워싱턴 디.씨.)에 사용자 문서로 제출되어 있고, 미국 저작권 등록 번호 TXU510087로 등록되어 있다. ALIGN-2 프로그램은 제넨테크, 인크. (미국 캘리포니아주 사우스 샌 프란시스코)로부터 공개적으로 입수가능하다. ALIGN-2 프로그램은 UNIX 작업 시스템, 바람직하게는 디지탈 UNIX V4.0D에서 사용되도록 컴파일되어야 한다. 모든 서열 비교 파라미터는 ALIGN-2 프로그램에 의해 설정되어 있으며 변하지 않는다.

[0100] 용어 "Fc 수용체" 또는 "FcR"은 항체의 Fc 영역에 결합하는 수용체를 설명하기 위해 사용된다. 한 실시양태에서, 본 발명의 FcR은 IgG 항체 (감마 수용체)에 결합하고 상기 수용체의 대립 유전자 변이체 및 선택적으로 스플라이싱된 형태를 포함하여 FcγRI, FcγRII 및 FcγRIII 하위부류의 수용체를 포함하는 것이다. FcγRII 수용체는 FcγRIIA ("활성화 수용체") 및 FcγRIIB ("억제 수용체")를 포함하고, 이들은 주로 세포질 도메인에서 상이한 유사한 아미노산 서열을 갖는다. 활성화 수용체 FcγRIIA는 그의 세포질 도메인에 면역수용체 티로신-기재의 활성화 모티프 (ITAM)를 함유한다. 억제 수용체 FcγRIIB는 그의 세포질 도메인 내에 면역수용체 티로신-기재의 억제 모티프 (ITIM)를 함유한다. (문헌 [M. in Daeron, Annu. Rev. Immunol. 15:203-234 (1997)]의 개관을 참조한다). 상기 용어는 동종이인자형, 예를 들어 FcγRIIIA 동종이인자형, 즉 FcγRIIIA-Phe158, FcγRIIIA-Val158, FcγRIIA-R131 및/또는 FcγRIIA-H131을 포함한다. FcR은 문헌 [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)]에서 검토된다. 추후로 확인될 것을 포함하는 다른 FcR이 본원의 용어 "FcR"에 포함된다. 이 용어는 모체 IgG를 태아에게 전달하는 것을 담당하는 신생아 수용체 FcRn을 또한 포함한다 (문헌 [Guyer et al., J. Immunol. 117:587 (1976)] 및 [Kim et al., J. Immunol. 24:249 (1994)]).

[0101] 용어 "FcRn"은 신생아의 Fc 수용체 (FcRn)를 의미한다. FcRn은 주조직 적합 복합체 (MHC)와 구조적으로 유사하고, β2-마이크로글로불린에 비공유 결합된 α-쇄로 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 이뮤노글로불린 IgG의 수동 전달 및 혈청 IgG 수준의 조절에서 소정의 역할을 수행한다. FcRn은 세포 내에서 및 세포를 가로질러 세포흡수된 (pinocytosed) 무손상 형태의 IgG에 결합하여 수송하고 이를 불완전 분해 경로로부터 구제하는 샐비지 (salvage) 수용체로서 작용할 수 있다.

[0102] WO 00/42072 (프레스타) 및 문헌 [Shields et al. J. Biol. Chem. 9(2): 6591-6604 (2001)]은 FcR에 대한 결합이 개선되거나 감소된 항체 변이체를 기재하고 있다. 상기 문헌의 내용은 본원에 참고로 구체적으로 도입된다.

[0103] 인간 IgG Fc 영역의 "CH1 도메인" ("H1" 도메인의 "C1"로도 언급됨)은 일반적으로 대략 아미노산 118 내지 대략 아미노산 215 (EU 넘버링 시스템)에 해당한다.

[0104] "힌지 영역"은 일반적으로 인간 IgG1의 Glu216으로부터 Pro230으로 확장된 것으로서 규정된다 (문헌 [Burton, Molec. Immunol.22:161-206 (1985)]). 다른 IgG 이소형의 힌지 영역은 중쇄간 S-S 결합을 형성하는 첫번째 및 마지막 시스테인 잔기를 IgG1 서열과 동일한 위치에 배치하여 정렬될 수 있다.

[0105] Fc 영역의 "보다 낮은 힌지 영역"은 통상 힌지 영역에 바로 C-말단인 잔기의 스트레치, 즉 Fc 영역의 잔기 233

내지 239로서 정의된다. 선행 보고에서, FcR 결합은 일반적으로 IgG Fc 영역의 보다 낮은 힌지 영역 내의 아미노산 잔기에 따른 것이었다.

[0106] 인간 IgG Fc 영역의 "CH2 도메인" ("H2" 도메인의 "C2"로도 언급됨)은 일반적으로 대략 아미노산 231 내지 대략 아미노산 340에 해당한다. CH2 도메인은 또 다른 도메인과 근접하게 쌍을 이루지 않는다는 점에서 독특하다. 오히려, 2개의 N-연결된 분지형 탄수화물 쇄가 무손상 천연 IgG 분자의 2개의 CH2 도메인 사이에 배치된다. 탄수화물이 도메인-도메인 페어링에 대한 대체물을 제공할 수 있고 CH2 도메인의 안정화를 도울 수 있다고 추정되었다. 문헌 [Burton, Molec. Immunol.22:161-206 (1985)].

[0107] "CH3 도메인" ("C2" 또는 "H3" 도메인으로도 불림)은 Fc 영역 내의 CH2 도메인에 C-말단인 잔기의 스트레치 (즉, 대략 아미노산 잔기 341 내지 항체 서열의 C-말단, 통상적으로 IgG의 아미노산 잔기 446 또는 447)를 포함한다.

[0108] "기능적 Fc 영역"은 천연 서열 Fc 영역의 "이펙터 기능"을 보유한다. 예시적인 "이펙터 기능"에는 C1q 결합; 보체 의존성 세포독성; Fc 수용체 결합; 항체-의존적 세포-매개 세포독성 (ADCC); 포식작용; 세포 표면 수용체 (예를 들어, B 세포 수용체; BCR)의 하향 조절 등이 포함된다. 이러한 이펙터 기능은 Fc 영역이 결합 도메인 (예를 들어, 항체 가변 도메인)과 조합되는 것을 일반적으로 필요로 하고, 예를 들어 본원에 개시된 바와 같은 다양한 분석법을 사용하여 평가할 수 있다.

[0109] "C1q"는 이뮤노글로불린의 Fc 영역에 대한 결합 부위를 포함하는 폴리펩티드이다. C1q는 2종의 세린 프로테아제, C1r 및 C1s와 함께 보체 의존적 세포독성 (CDC) 경로의 제1 성분인 복합체 C1을 형성한다. 인간 C1q는, 예를 들어 퀴델(Quidel) (미국 캘리포니아주 샌디에고)로부터 상업적으로 구입할 수 있다.

[0110] 용어 "결합 도메인"은 또 다른 분자에 결합하는 폴리펩티드의 영역을 나타낸다. FcR의 경우에, 결합 도메인은 Fc 영역에 대한 결합을 담당하는 그의 폴리펩티드 쇄의 일부 (예를 들어, 그의 알파 쇄)를 포함할 수 있다. 유용한 한 결합 도메인은 FcR 알파 쇄의 세포외 도메인이다.

[0111] FcR 결합 친화도 또는 ADCC 활성이 "변경된" 변이체 IgG Fc를 갖는 항체 또는 펩티바디는 모 폴리펩티드 또는 천연 서열 Fc 영역을 포함하는 폴리펩티드에 비해 향상되거나 감소된 FcR 결합 활성 (예를 들어, FcγR 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 겉보기 Kd 또는 IC50 값)로 하나 이상의 FcR에 결합한다. 일부 실시양태에 따라, 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 1000%의 결합 향상이다. FcR에 대한 "감소된 결합을 보이는" 폴리펩티드 변이체는 모 폴리펩티드보다 더 낮은 친화도 (예를 들어, 더 높은 겉보기 Kd 또는 더 높은 IC50 값)로 하나 이상의 FcR에 결합한다. 모 폴리펩티드에 비해 결합의 감소는 약 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60% 이상의 결합의 감소일 수 있다.

[0112] "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 이펙터 세포가 항원 보유 표적 세포에 특이적으로 결합한 후, 표적 세포를 세포독소로 사멸시키도록 만드는 세포독성의 한 형태를 의미한다. 항체는 세포독성 세포의 "암(arm)"이고 이러한 사멸에 반드시 필요하다. ADCC를 매개하는 주요 세포인 NK 세포는 FcγRIII만을 발현하는 반면, 단핵구는 FcγRI, FcγRII 및 FcγRIII를 발현한다. 조혈 세포상에서의 FcR 발현은 문헌 [Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol 9:457-92 (1991)]의 페이지 464, 표 3에 요약되어 있다. 관심있는 분자의 ADCC 활성을 평가하기 위해서, 미국 특허 제5,500,362호 또는 제5,821,337호 또는 하기 실시예에 기재된 바와 같은 시험관내 ADCC 분석을 수행할 수 있다. 이러한 분석에 유용한 이펙터 세포는 말초혈 단핵 세포 (PBMC) 및 천연 킬러 (NK) 세포를 포함한다. 대안적으로 또는 추가로, 관심 분자의 ADCC 활성은 예를 들어 문헌 [Clynes et al. PNAS (USA) 95:652-656 (1998)]에 개시된 바와 같은 동물 모델에서 생체내 평가할 수 있다.

[0113] 인간 이펙터 세포의 존재하에 야생형 IgG Fc를 갖는 폴리펩티드 또는 모 폴리펩티드보다 더 효과적으로 항체-의존성 세포-매개 세포 독성 (ADCC)을 매개하거나 "증가된 ADCC를 보이는" 변이체 Fc 영역을 포함하는 폴리펩티드는 분석에서 변이체 Fc 영역을 갖는 폴리펩티드 및 야생형 Fc 영역을 갖는 폴리펩티드 (또는 모 폴리펩티드)의 양이 본질적으로 동일할 때 시험관내에서 또는 생체내에서 ADCC를 실질적으로 보다 효과적으로 매개하는 것이다. 일반적으로, 이러한 변이체는 본원에 개시된 바와 같은 시험관내 ADCC 분석을 사용하여 확인될 것이지만, 예를 들어 동물 모델 등에서 ADCC 활성을 결정하기 위한 다른 분석 또는 방법도 고려된다. 한 실시양태에

서, 바람직한 변이체는 야생형 Fc (또는 모 폴리펩티드)보다 약 5배 내지 약 100배, 예를 들어 약 25 내지 약 50배 더 효과적으로 ADCC를 매개한다.

[0114] "보체 의존적 세포독성" 또는 "CDC"는 보체 존재하에 표적 세포의 용해를 나타낸다. 고전적 보체 경로의 활성화는 동족 항원에 결합된 항체 (적절한 하위부류의 항체)에 대한 보체 시스템 제1 성분 (C1q)의 결합으로 개시된다. 보체 활성화를 평가하기 위해, 예를 들어 문헌 [Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods 202:163 (1996)]에 기재된 바와 같은 CDC 분석을 수행할 수 있다.

[0115] 변경된 Fc 영역 아미노산 서열을 갖고 C1q 결합 능력이 증가 또는 감소된 폴리펩티드 변이체는 미국 특허 제 6,194,551호 및 WO 99/51642에 기재되어 있다. 이러한 특허 공개공보의 내용은 본원에 참고로 명확하게 도입된다. 문헌 [Idusogie et al. J. Immunol. 164: 4178-4184 (2000)]을 또한 참조한다.

[0116] "인간 이펙터 세포"는 하나 이상의 FcR을 발현하고 이펙터 기능을 수행하는 백혈구이다. 한 실시양태에 따라, 세포는 적어도 FcγRIII을 발현하고 ADCC 이펙터 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. 이펙터 세포는 천연 공급원으로부터, 예를 들어 본원에 기재된 바와 같이 PBMC 또는 혈액으로부터 단리될 수 있다.

[0117] FcRn에 대한 결합을 측정하는 방법은 공지되어 있다 (예를 들어, [Ghetie 1997], [Hinton 2004] 참조). 생체 내 인간 FcRn에 대한 결합 및 인간 FcRn 고친화도 결합 폴리펩티드의 혈청 반감기는 예를 들어 인간 FcRn을 발현하는 트랜스제닉 (transgenic) 마우스 또는 형질감염된 인간 세포주에서, 또는 Fc 변이체 폴리펩티드가 투여된 영장류에서 분석될 수 있다. 한 실시양태에서, 구체적으로 변이체 IgG Fc를 갖는 본 발명의 항-α5β1 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 실시양태에서, 인간 FcRn에 대한 결합 친화도는 약 170배 증가한다.

[0118] FcRn에 대한 결합 친화도에 대해, 한 실시양태에서, 폴리펩티드의 EC50 또는 겉보기 Kd (pH 6.0에서)는 1 μM 미만, 보다 바람직하게는 100 nM 이하, 보다 바람직하게는 10 nM 이하이다. 한 실시양태에서, FcγRIII (F158; 즉, 저-친화도 이소형)에 대한 증가된 결합 친화도에 대해, EC50 또는 겉보기 Kd는 10 nM 이하이고, FcγRIII (V158; 고-친화도 이소형)에 대해, EC50 또는 겉보기 Kd는 3 nM 이하이다. 또 다른 실시양태에 따라, 대조군 항체 (예를 들어, 헤르셉틴(Herceptin)® 항체)에 비교할 때 항체의 Fc 수용체에 대한 결합의 감소는, 시험 항체 및 대조군 항체 결합 곡선의 중간 지점에서의 흡광도 값의 비 (예를 들어, $A_{450\ nm(항체)}/A_{450\ nm(대조군\ Ab)}$)가 40% 이하일 경우에 대조군 항체에 비해 유의한 것으로 간주될 수 있다. 또 다른 실시양태에 따라, 대조군 항체 (예를 들어, 헤르셉틴® 항체)에 비교할 때 항체의 Fc 수용체에 대한 결합의 증가는, 시험 항체 및 대조군 항체 결합 곡선의 중간 지점에서의 흡광도 값의 비 (예를 들어, $A_{450\ nm(항체)}/A_{450\ nm(대조군\ Ab)}$)가 125% 이상일 경우에 대조군 항체에 비해 유의한 것으로 간주될 수 있다.

[0119] "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. 통상적으로, 모 폴리펩티드 또는 모 항체는 본원에 개시된 하나 이상의 Fc 영역 변형이 결여되어 있고, 본원에 개시된 폴리펩티드 변이체에 비해 이펙터 기능이 상이하다. 모 폴리펩티드는 천연 서열 Fc 영역 또는 기존의 아미노산 서열 변형 (예를 들어, 부가, 결실 및/또는 치환)을 갖는 Fc 영역을 포함할 수 있다.

[0120] 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.

[0121] "파지 디스플레이"는 변이체 폴리펩티드를 파지, 예를 들어 섬유상 파지 입자의 표면 상에 외피 단백질의 적어도 일부와의 융합 단백질로서 디스플레이하는 기술이다. 파지 디스플레이의 유용성은 무작위화 단백질 변이체의 대형 라이브러리를 표적 항원과 고 친화도로 결합하는 서열에 대해 신속하고 효율적으로 분류할 수 있다는 점에 있다. 펩티드 및 단백질 라이브러리를 파지 상에 디스플레이하는 것은 특이적 결합 특성을 갖는 폴리펩티드를 찾기 위해서 수백만개의 폴리펩티드를 스크리닝하는데 이용되어 왔다. 다가 파지 디스플레이 방법은 필라멘트형 파지의 유전자 III 또는 유전자 VIII과의 융합을 통하여 소형 무작위 펩티드 및 소형 단백질을 디스플레이하기 위해 사용되어 왔다. 문헌 [Wells and Lowman, Curr. Opin. Struct. Biol., 3:355-362 (1992)] 및 본

원에서 인용된 문헌. 1가 파지 디스플레이에서는, 단백질 또는 펩티드 라이브러리를 유전자 III 또는 그의 일부와 융합시키고, 야생형 유전자 III 단백질의 존재하에 저수준으로 발현시켜 파지 입자가 상기 융합 단백질의 1개 카피를 디스플레이하거나 전혀 디스플레이하지 않도록 한다. 화합력 효과는 다가 파지에 비해 감소되기 때문에 분류는 내재적 리간드 친화도를 기준으로 하고 DNA 조작을 단순화시키는 파지미드 벡터를 사용한다. 문헌 [Lowman and Wells, Methods: A companion to Methods in Enzymology, 3:205-0216 (1991)].

[0122] "파지미드"는 박테리아 복제 기점, 예를 들어 ColE1, 및 박테리오파지의 유전자간 영역의 카피를 갖는 플라스미드 벡터이다. 파지미드는 필라멘트형 박테리오파지 및 람다형 박테리오파지를 비롯한 임의의 공지된 박테리오파지에서 사용될 수 있다. 이러한 플라스미드는 또한 일반적으로 항생제 내성에 대한 선별가능한 마커를 함유할 것이다. 이들 벡터 내로 클로닝된 DNA 절편은 플라스미드로서 증식될 수 있다. 이들 벡터를 보유하는 세포에 파지 입자의 생성에 필요한 모든 유전자가 제공되는 경우, 플라스미드의 복제 방식이 롤링 서클(rolling circle) 복제로 변화되어 플라스미드 DNA 및 패키지 파지 입자의 1개 가닥 카피를 생성시킨다. 파지미드는 감염성 또는 비-감염성 파지 입자를 형성할 수 있다. 상기 용어는 유전자 융합체로서 이종 폴리펩티드 유전자에 연결된 파지 외피 단백질 유전자 또는 그의 단편을 함유하여 상기 이종 폴리펩티드가 파지 입자의 표면상에 디스플레이 되도록 하는 파지미드를 포함한다.

[0123] 용어 "파지 벡터"는 이종 유전자를 함유하고 복제할 수 있는 이중 가닥 복제 형태의 박테리오파지를 의미한다. 파지 벡터는 파지 복제와 파지 입자 형성을 허용하는 파지 복제 기점을 갖는다. 파지는 바람직하게는 필라멘트형 박테리오파지, 예컨대 M13, f1, fd, Pf3 파지 또는 그의 유도체, 또는 람다형 파지, 예를 들어 람다, 21, phi80, phi81, 82, 424, 434 등 또는 그의 유도체이다.

[0124] 폴리펩티드, 예를 들어 펩티바디, 이뮤노어드헤신, 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. 통상적으로 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 작용제를 포함한다.

[0125] 다른 변형은 글루타미닐 및 아스파라기닐 잔기의 각각 상응하는 글루타밀 및 아스파르틸 잔기로의 탈아미드화, 프롤린 및 리신의 히드록실화, 세릴 또는 트레오닐 잔기의 히드록실기의 인산화, 리신, 아르기닌 및 히스티딘 측쇄의 α-아미노기의 메틸화 (문헌 [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.

[0126] 다른 변형은 독소의 길항제, 예를 들어 메이탄신 및 메이탄시노이드, 칼리케아미신 및 다른 세포독성제에 대한 접합을 포함한다.

[0127] 폴리펩티드의 공유 변형에 대한 다른 종류는 미국 특허 제4,640,835호; 제4,496,689호; 제4,301,144호; 제4,670,417호; 제4,791,192호 또는 제4,179,337호에 열거된 방식으로 다양한 비단백질성 중합체, 예를 들어 폴리에틸렌 글리콜 (PEG), 폴리프로필렌 글리콜, 또는 폴리옥시알킬렌 중의 하나에 폴리펩티드를 연결시키는 것을 포함한다.

[0128] 또한, 본 발명의 폴리펩티드는 유리할 경우, 다른 이종성 폴리펩티드 또는 아미노산 서열 (예를 들어, 이뮤노어드헤신 또는 펩티바디)에 융합된 폴리펩티드를 포함하는 키메라 분자를 형성하는 방식으로 변형될 수도 있다.

[0129] 한 실시양태에서, 이러한 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 (문헌 [Schwarze et al., 1999, Science 285: 1569-72]).

[0130] 또 다른 실시양태에서, 이러한 키메라 분자는 항-태그 항체가 그에 대해 선택적으로 결합할 수 있는 에피토프를 제공하는 태그 폴리펩티드와 폴리펩티드의 융합체를 포함한다. 에피토프 태그는 일반적으로 상기 폴리펩티드의 아미노- 또는 카르복실-말단에 위치한다. 이러한 에피토프-태그가 부착된 형태의 폴리펩티드의 존재는 태그 폴

리펩티드에 대한 항체를 사용하여 검출할 수 있다. 또한, 에피토프 태그를 제공함으로써 항-태그 항체 또는 에피토프 태그에 결합하는 또 다른 유형의 친화도 매트릭스를 사용한 친화도 정제에 의해 폴리펩티드를 쉽게 정제할 수 있다. 다양한 태그 폴리펩티드와 그의 각각의 항체는 당업계에 공지되어 있다. 그 예는 폴리-히스티딘 (폴리-his) 또는 폴리-히스티딘-글리신 (폴리-his-gly) 태그; flu HA 태그 폴리펩티드 및 그의 항체 12CA5 (문헌 [Field et al., Mol. Cell. Biol., 8:2159-2165 (1988)]); c-myc 태그 및 그에 대한 8F9, 3C7, 6E10, G4, B7 및 9E10 항체 (문헌 [Evan et al., Molecular and Cellular Biology, 5:3610-3616 (1985)]); 및 단순 포진 바이러스 당단백질 D (gD) 태그 및 그의 항체 (문헌 [Paborsky et al., Protein Engineering, 3(6):547-553 (1990)])를 포함한다. 다른 태그 폴리펩티드는 Flag-펩티드 (문헌 [Hopp et al., BioTechnology, 6:1204-1210 (1988)]); KT3 에피토프 펩티드 (문헌 [Martin et al., Science, 255:192-194 (1992)]); α-튜불린 에피토프 펩티드 (문헌 [Skinner et al., J. Biol. Chem., 266:15163-15166 (1991)]); 및 T7 유전자 10 단백질 펩티드 태그 (문헌 [Lutz-Freyermuth et al., PNAS USA, 87:6393-6397 (1990)])를 포함한다.

[0131] 다른 실시양태에서, 키메라 분자는 이뮤노글로불린 또는 이뮤노글로불린의 특정 영역과 폴리펩티드의 융합체를 포함할 수 있다. 2가 형태의 키메라 분자 (예를 들어, "이뮤노어드헤신")에 대해, 이러한 융합체는 IgG 분자의 Fc 영역에 대한 것일 수 있다. 본 발명의 Ig 융합체는 Ig 분자 내의 하나 이상의 가변 영역 대신에 대략 인간의 잔기 94-243, 잔기 33-53 또는 잔기 33-52를 포함하거나 상기 잔기만을 포함하는 폴리펩티드를 포함한다. 특히 실시양태에서, 이뮤노글로불린 융합체는 힌지, CH2 및 CH3, 또는 IgG1 분자의 힌지, CH1, CH2 및 CH3 영역을 포함한다. 이뮤노글로불린 융합체의 생산에 대해서는 미국 특허 제5,428,130호를 또한 참조한다.

[0132] 본 발명은 재발 종양 성장 또는 재발 암 세포 성장을 억제하거나 예방하기 위한 방법 및 조성물을 제공한다. 다양한 실시양태에서, 암은 암 세포의 수가 유의하게 감소되지 않았거나 증가되었거나, 또는 종양 크기가 유의하게 감소되지 않았거나 증가되었거나, 또는 암 세포의 수 또는 크기에서 임의의 추가의 감소가 일어나지 못한 경우에 재발성 종양 성장 또는 재발성 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 생체내에서 또는 시험관내에서 결정될 수 있다. 항-VEGF 치료에 내성인 종양은 재발성 종양 성장의 예이다.

[0133] 본원에 개시된 폴리펩티드, 항체, 길항제 또는 조성물의 "유효량"은 구체적으로 언급된 목적을 달성하기에 충분한 양이다. "유효량"은 언급한 목적과 관련하여 공지된 방법으로 실험적으로 결정될 수 있다.

[0134] 용어 "치료 유효량"은 특정 포유동물 (환자)에게서 질환 또는 장애를 "치료"하는 데에 유효한 본 발명의 항체, 폴리펩티드 또는 길항제의 양을 나타낸다. 암의 경우, 약물의 치료 유효량은 암 세포 수를 감소시키고/시키거나; 종양 크기 또는 중량을 감소시키고/시키거나; 암 세포가 말초 기관 내로 침윤되는 것을 억제 (즉, 어느 정도 느리게 하고, 바람직하게는 중지시킨다)시키고/시키거나; 종양 전이를 억제 (즉, 어느 정도 느리게 하고, 바람직하게는 중지시킨다)시키고/시키거나; 종양 성장을 어느 정도 억제하고/하거나; 암과 연관된 한 가지 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 실시양태에서, 치료 유효량은 성장 억제량이다. 또 다른 실시양태에서, 치료 유효량은 환자의 생존율을 연장시키는 양이다. 또 다른 실시양태에서, 치료 유효량은 환자의 질환 진행이 없는 생존율을 개선시켜 주는 양이다.

[0135] 상처 치유의 경우에, 용어 "유효량" 또는 "치료 유효량"은 대상체에서 상처 치유를 촉진 또는 개선하기에 효과적인 약물의 양을 나타낸다. 치료 용량은 환자에 대해 치료 효과를 보이는 용량이고, 치료 용량 아래의 용량은 치료되는 환자에 대해 치료 효과를 보이지 않는 용량이다.

[0136] "만성 상처"는 치유되지 않는 상처를 나타낸다. 예를 들어, 문헌 [Lazarus et al., Definitions and guidelines for assessment of wounds and evaluation of healing, Arch. Dermatol. 130:489-93 (1994)]을 참조한다. 만성 상처는 예를 들어, 동맥 궤양, 당뇨성 궤양, 압력 궤양, 정맥 궤양 등을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 급성 상처는 만성 상처로 발달할 수 있다. 급성 상처는 예를 들어, 열 손상, 외상, 수술, 광범한 피부암의 절제, 심부 진균 및 박테리아 감염, 혈관염, 공피증, 천포창, 독성 표피 괴사 등에 의해 유발된 상처를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 예를 들어, 문헌 [Buford, Wound Healing and Pressure Sores, HealingWell.com, published on: October 24, 2001]을 참조한다. "정상 상처"는 정상 상처 치유 복구를 겪는 상처를 나타낸다.

[0137] 본 발명의 폴리펩티드, 항체, 길항제 또는 조성물의 "성장 억제량"은 세포, 특히 종양, 예를 들어 암 세포의 성장을 시험관내에서 또는 생체내에서 억제할 수 있는 양이다. 신생물성 세포 성장을 억제하기 위한 본 발명의 폴리펩티드, 항체, 길항제 또는 조성물의 "성장 억제량"은 공지된 방법으로 또는 본원에 열거된 예에 의해 실험

적으로 결정할 수 있다.

[0138] 본 발명의 폴리펩티드, 항체, 길항제 또는 조성물의 "세포독성량"은 세포, 특히 종양, 예를 들어 암 세포를 시험관내에서 또는 생체내에서 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.

[0139] 본원에서의 "자가면역 질환"은 개체 자신의 조직 또는 동시 분리계(co-segregate)로부터 그에 대해 발생하는 질환 또는 장애, 또는 그의 증상 또는 그로 인한 상태이다. 자가면역 질환 또는 장애의 예는 다음을 포함하나, 이에 제한되지는 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 특발성 두드러기, 예를 들어 만성 자가면역 두드러기, 다발근육염/피부근염, 연소성 피부근염, 독성 표피괴사, 공피증 (전신성 공피증 포함), 경화증, 예를 들어 전신성 경화증, 다발성 경화증 (MS), 예를 들어 척수-눈 MS, 원발성 진행성 MS, 및 재발 완화형 MS, 진행성 전신성 경화증, 죽상동맥경화증, 아테롬성 동맥경화증, 범발성 경화증, 및 실조성 경화증, 염증성 장 질환 (IBD) (예를 들어, 크론병, 대장염, 예를 들어 궤양성 대장염, 궤양 대장염, 현미경적 대장염, 교원질성 대장염, 용종 대장염, 괴사 소장대장염, 및 경벽성 대장염, 및 자가면역 염증성 장 질환), 괴저농피증, 결절홍반, 원발성 경화 쓸개관염, 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 라스무센 (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 유형 I 및 유형 II, 및 급속 진행성 GN, 알레르기 상태, 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 상태, 만성 폐 염증성 질환, 자가면역 심근염, 백혈구 부착 결핍, 전신 홍반성 루푸스 (SLE) 또는 전신 홍반성 에리테마토데스 (erythematodes), 예를 들어 피부 SLE, 아급성 피부 홍반 루푸스, 신생아 루푸스 증후군 (NLE), 파종상 홍반성 루푸스, 루푸스 (예를 들어, 신장염, 뇌염, 소아, 비-신장, 신장외, 원반상 탈모증), 연소성 발병 (유형 I) 진성 당뇨병, 예를 들어 소아 인슐린-의존형 진성 당뇨병 (IDDM), 성인 발병 진성 당뇨병 (유형 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 육아종 증, 베게너 육아종증, 무과립구증, 혈관염, 예를 들어 맥관염 (예를 들어, 대혈관 맥관염 (예를 들어, 류마티스성 다발성 근육통 및 거대세포 (타카야수; Takayasu) 동맥염), 중형 혈관 맥관염 (예를 들어, 가와사키병 및 다발성 결절 동맥염), 현미경적 다발 동맥염, CNS 맥관염, 괴사, 피부, 또는 과민성 맥관염, 전신성 괴사 맥관염, 및 ANCA-관련 맥관염, 예를 들어 처크-스트라우스 (Churg-Strauss) 맥관염 또는 증후군 (CSS)), 일시적 동맥염, 재생불량 빈혈, 자가면역 재생불량 빈혈, 쿰즈 (Coombs) 양성 빈혈, 다이아몬드 블랙팬 (Diamond Blackfan) 빈혈, 용혈 빈혈 또는 면역 용혈 빈혈, 예를 들어 자가면역 용혈 빈혈 (AIHA), 악성 빈혈, 애디슨 (Addison) 병, 진정 적혈구계 빈혈 또는 무형성 (PRCA), 인자 VIII 결핍증, A형 혈우병, 자가면역 호중구 감소증, 범혈구감소증, 백혈구 감소증, 백혈구 혈구 누출을 수반하는 질환, CNS 염증성 장애, 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 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 질환, 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 갑상

선 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 안진전근경련 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 분해장애증, 복강 질환, 비열대 스프루 (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 장애, 난청, 실명, 주기적 마비, 및 CNS의 채널병증, 자폐증, 염증성 근염, 국소 분절 사구체 경화증 (FSGS), 내분비 눈병증, 포도망막염, 맥락망막염, 자가면역 간질환, 섬유근육통, 다발성 내분비 부전, 슈미트 (Schmidt) 증후군, 부신염, 위 위축, 초로 치매, 탈수초성 질환, 예를 들어 자가면역 탈수초성 질환, 당뇨성 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 융기성 홍반, 태아적모구증, 호산구성 근막염, 슐만 (Shulman) 증후군, 펠티 (Felty) 증후군, 사상충증, 섬모체염, 예를 들어 만성 섬모체염, 이시성 섬모체염, 홍채섬모체염, 또는 푸크 (Fuch) 섬모체염, 헤노호-쉔라인 (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 부전, 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 장애, 아스퍼미오게네스 (aspermiogenese), 자가면역 용혈, 뵈크 (Boeck) 병, 한랭글로불린혈증, 뒤피트렌 (Dupuytren) 구축, 수정체 과민 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 고환염, 췌장염, 급성 다발 신경근염, 괴저농피증, 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 상태, 백혈구 혈구 누출을 수반하는 질환, 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 부전, 말초 신경병증, 자가면역 다분비선 증후군 유형 I, 성인 발병 특발성 부갑상선 기능 저하증 (AOIH), 전체탈모증, 확장 심근병증, 후천적 수포성 표피박리증 (EBA), 혈색소침착증, 심근염, 신 증후군, 원발성 경화쓸개관염, 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, 아스페르길루스종, 또는 호산구를 포함하는 육아종, 과민증, 음성혈청 척추관절염, 다발성 내분비 자가면역 질환, 경화쓸개관염, 공막, 상공막, 만성 점막 피부 칸디다증, 브루톤 (Bruton) 증후군, 유아의 일과성 감마글로불린저혈증, 위스코트-올드리히 (Wiskott-Aldrich) 증후군, 운동실조 모세혈관확장증, 교원병과 연관된 자가면역 질환, 류마티스, 신경학적 질환, 허혈 재관류 장애, 혈압 반응의 감소, 혈관 기능이상, 혈관확장증, 조직 손상,

심혈관 허혈, 통각과민, 뇌 허혈 및 혈관신생을 수반하는 질환, 알레르기 과민성 장애, 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, 당뇨성 대동맥 질환, 말단동맥 과다증식, 분해 궤양, 판막염 및 자궁내막증.

[0140] 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. 일반적으로, 검출을 위해 사용되는 특정 기술은 본 발명의 실시에 중요하지 않다.

[0141] 예를 들어, 본 발명에 따른 "검출하는"은 α5 유전자 생성물, β1 유전자 생성물 (예를 들어, mRNA 분자), 또는 α5 또는 α5β1 폴리펩티드의 존재 또는 부재; α5 또는 α5β1 폴리펩티드의 수준 또는 표적에 결합된 양의 변화; α5 또는 α5β1 폴리펩티드의 생물학적 기능/활성의 변화를 관찰하는 것을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, "검출하는"은 야생형 α5 또는 α5β1 수준 (예를 들어, mRNA 또는 폴리펩티드 수준)을 검출하는 것을 포함할 수 있다. 검출은 대조군과 비교할 때 적어도 약 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100% 이상 중 임의의 값의 변화 (예를 들어, 증가 또는 감소)를 정량하는 것을 포함할 수 있다. 검출은 적어도 약 2-배, 3-배, 4-배, 5-배, 6-배, 7-배, 8-배, 9-배, 10-배 이상, 예를 들어 20-배, 30-배, 40-배, 50-배, 60-배, 70-배, 80-배, 90-배, 100-배 이상 중 임의의 값의 변화를 정량하는 것을 포함할 수 있다.

[0142] 본원에서 사용되는 "표지"는 항체에 직접 또는 간접적으로 접합되는 검출가능 화합물 또는 조성물을 나타낸다. 표지 자체는 단독으로 검출가능성일 수 있거나 (예를 들어, 방사성 동위원소 표지 또는 형광 표지), 효소적 표지의 경우에,검출가능한 기질 화합물 또는 조성물의 화학적 변경을 촉매할 수 있다.

[0143] III. 항-α5β1 항체

[0144] 인간 α5β1에 결합하고, 인간 α5β1에 대한 항-α5β1 18C12 항체의 결합을 경쟁적으로 억제할 수 있는 항체가 본원에 제공된다. 따라서, 본 발명의 한 실시양태는 서열 2, 3, 4, 5, 6, 7, 또는 8 중 어느 하나 열거된 가변 경쇄 (VL) 서열 및 서열 9, 10, 11, 12, 13, 또는 14 중 어느 하나에 열거된 가변 중쇄 (VH) 서열을 포함하는 항체를 제공한다. 본원에 기재된 항-α5β1 항체의 항체의 인간 또는 키메라 (예를 들어, 인간화 포함) 형태가 또한 고려된다.

[0145] 한 실시양태에 따라, 항체는 인간 α5β1에 500 nM 내지 1 pM의 Kd로 결합한다. 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항체는 ≤ 1 μM, ≤ 100 nM, ≤ 10 nM, ≤ 1 nM, ≤ 0.1 nM, ≤ 0.01 nM, 또는 ≤ 0.001 nM (예를 들어, 10^{-8} M 이하, 예를 들어 10^{-8} M 내지 10^{-13} M, 예를 들어 10^{-9} M 내지 10^{-13} M)의 해리 상수 (Kd)를 갖는다. 또 다른 실시양태에 따라, 항체는 αVβ3 또는 αVβ5 또는 αVβ1에 결합하지 않는다. 또 다른 실시양태에 따라, 항체는 인간 IgG, 예를 들어 인간 IgG1 또는 인간 IgG4의 Fc 서열을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, Fc 서열은 종종 이들의 Fc 수용체 (FcR)에 대한 결합과 관련된 항체-의존성 세포 세포독성 (ADCC) 이펙터 기능이 결여되도록 변경되거나 또는 다르게는 변화된다. 이펙터 기능을 변경할 수 있는 Fc 서열에 대한 변화 또는 돌연변이의 다수의 예가 존재한다. 예를 들어, WO 00/42072 및 문헌 [Shields et al. J. Biol. Chem. 9(2): 6591-6604 (2001)]은 FcR에 대한 개선된 또는 감소된 결합을 갖는 항체 변이체를 기재한다. 이들 문헌의 내용은 명백하게 본원에 참고로 도입된다. 항체는 Fab, Fab', $F(ab)'_2$, 단일-쇄 Fv (scFv), Fv 단편; 디아바디 및 선형 항체의 형태일 수 있다. 또한, 항체는 α5β1에 결합하는 다중-특이적 항체일 수 있고, α5β1 길항제이나, 또한 하나 이상의 다른 표적에 결합하고, 이들의 기능을 억제하거나 (예를 들어, VEGF) 또는 α5β1 상의 2개 이상의 상이한 부위에 결합하는 다중-특이적 항체이다. 항체는 치료제 (예를 들어, 세포독성제, 방사성동위원소 및 화학요법제) 또는 영상화에 의해 환자 샘플 또는 생체내에서 α5β1을 검출하기 위한 표지 (예를 들어, 방사성동위원소, 형광 염료 및 효소)에 접합될 수 있다.

[0146] 항-α5β1 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 사용) 또는 환자에서 α5β1 단백질을 검출하기 위해 사용될 수 있다.

[0147] A. 모노클로날 항체

[0148] 모노클로날 항체는 예를 들어, 하이브리도마 방법, 예를 들어 문헌 [Kohler and Milstein, Nature, 256:495

(1975)]에 기재된 방법을 이용하여 제조할 수 있거나, 재조합 DNA 방법 (미국 특허 4,816,567)에 의해 제조할 수 있거나, 하기 실시예에서 본원에 기재된 방법에 의해 생성할 수 있다. 하이브리도마 방법에서, 햄스터, 마우스, 또는 다른 적절한 숙주 동물을 통상적으로 면역화제 (예를 들어, α5, β1, 또는 α5β1 폴리펩티드 단독 또는 적합한 담체와의 조합)로 면역화시켜, 면역화제에 특이적으로 결합할 항체를 생산하거나 생산할 수 있는 림프구를 유도시킨다. 대안적으로, 림프구는 시험관내에서 면역화될 수 있다.

[0149] 면역화제는 일반적으로 관심있는 단백질의 폴리펩티드 또는 융합 단백질, 또는 단백질을 포함하는 조성물을 포함할 것이다. 일반적으로, 인간 기원의 세포가 요망될 경우 말초 혈액 림프구 ("PBL")가 사용되거나, 또는 비-인간 포유동물원이 요망될 경우 비장 세포 또는 림프절 세포가 사용된다. 이어서, 림프구를 적합한 융합제, 예컨대 폴리에틸렌 글리콜을 사용하여 불멸화 세포주와 융합시켜, 하이브리도마 세포를 형성한다. 문헌 [Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice (New York: Academic Press, 1986), pp. 59-103]. 불멸화 세포주는 통상적으로 형질전환된 포유동물 세포, 특히 설치류, 소, 및 인간 기원의 골수종 세포이다. 통상적으로, 래트 또는 마우스 골수종 세포주가 사용된다. 하이브리도마 세포는 바람직하게는 비융합된 불멸화 세포의 성장 또는 생존을 억제하는 하나 이상의 물질을 함유하는 적합한 배양 배지에서 배양될 수 있다. 예를 들어, 모 세포에 하이포잔틴 구아닌 포스포리보실 트랜스퍼라제 (HGPRT 또는 HPRT)가 결여되어 있을 경우, 하이브리도마용 배양 배지는 전형적으로 하이포잔틴, 아미노프테린 및 티미딘을 함유할 것이며 ("HAT 배지"), 상기 물질들은 HGPRT-결핍 세포의 성장을 방지한다.

[0150] 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, 예를 들어 미국 캘리포니아주 샌 디에고 소재의 솔크 인스티튜트 셀 디스트리뷰션 센터(Salk Institute Cell Distribution Center) 및 미국 버지니아주 매나사스 소재의 아메리칸 타입 컬처 컬렉션(American Type Culture Collection)으로부터 수득할 수 있는 뮤린 골수종 세포주이다. 인간 골수종 및 마우스-인간 이종골수종 세포주가 또한 인간 모노클로날 항체의 생산을 위해 설명되었다. 문헌 [Kozbor, J. Immunol., 133:3001 (1984)]; [Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications (Marcel Dekker, Inc.: New York, 1987) pp. 51-63].

[0151] 이어서, 하이브리도마 세포를 배양하는 배양 배지를 폴리펩티드에 대해 작용하는 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. 이러한 기술 및 분석법은 당업계에 공지되어 있다. 모노클로날 항체의 결합 친화도는 예를 들어 문헌 [Munson and Pollard, Anal. Biochem., 107:220 (1980)]의 스캐챠드(Scatchard) 분석에 의해 결정될 수 있다.

[0152] 목적하는 하이브리도마 세포를 확인한 후, 클론을 제한 희석 절차에 의해 서브클로닝하고 표준 방법에 의해 성장시킬 수 있다. [Goding, 상기 문헌]. 상기 목적을 위한 적합한 배양 배지는 예를 들어 둘베코 (Dulbecco) 변형 이글 (Eagle) 배지 및 RPMI-1640 배지를 포함한다. 대안적으로, 하이브리도마 세포는 포유동물 내에서 복수로서 생체내에서 성장할 수 있다.

[0153] 서브클론에 의해 분비된 모노클로날 항체는 통상적인 이뮤노글로불린 정제 절차, 예를 들어 단백질 A-세파로스, 히드록실아파타이트 크로마토그래피, 겔 전기영동, 투석, 또는 친화도 크로마토그래피에 의해 배양 배지 또는 복수액으로부터 단리 또는 정제될 수 있다.

[0154] 모노클로날 항체는 또한 재조합 DNA 방법, 예를 들어 미국 특허 제4,816,567호에 설명된 방법에 의해 제조할 수 있다. 본 발명의 모노클로날 항체를 코딩하는 DNA는 통상적인 절차를 사용하여 (예를 들어, 뮤린 항체의 중쇄 및 경쇄를 코딩하는 유전자에 특이적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오티드 프로브를 사용하여) 쉽게 단리하고 서열분석할 수 있다. 본 발명의 하이브리도마 세포는 상기 DNA의 바람직한 공급원으로 기능한다. 일단 단리되면, DNA는 발현 벡터 내로 도입될 수 있고, 이것은 재조합 숙주 세포에서 모노클로날 항체를 합성하기 위해서, 그렇지 않으면 이뮤노글로불린 단백질을 생산하지 않는 숙주 세포, 예를 들어 유인원 COS 세포, 차이니즈 햄스터 난소 (CHO) 세포, 또는 골수종 세포 내로 형질감염된다. DNA는 또한 예를 들어, 상동성 뮤린 서열 대신에 인간 중쇄 및 경쇄 불변 도메인에 대한 코딩 서열을 치환함으로써 (미국 특허 제4,816,567호; [Morrison et al., 상기 문헌]) 또는 이뮤노글로불린 코딩 서열에 비-이뮤노글로불린 폴리펩티드에 대한 코딩 서열 전부 또는 일부를 공유 연결함으로써 변형시킬 수 있다. 상기 비-이뮤노글로불린 폴리펩티드는 본 발명의 항체의 불변 도메인을 대체할 수 있거나, 또는 본 발명의 항체의 한 항원-결합 부위의 가변 도메인을 대체하여 키메라 2가 항체를 생성할 수 있다.

[0155] 항체는 1가 항체일 수 있다. 1가 항체를 제조하는 방법은 당업계에 공지되어 있다. 예를 들어, 한 방법은 이뮤노글로불린 경쇄 및 변형된 중쇄의 재조합 발현을 포함한다. 중쇄는 일반적으로 중쇄 가교결합을 방지하도록 Fc 영역 내의 임의의 위치에서 말단 절단된다. 대안적으로, 관련 시스테인 잔기는 가교를 방지하도록 또 다른 아미노산 잔기로 치환되거나 결실된다.

[0156] 1가 항체를 제조하기 위해 시험관내 방법도 적합하다. 그의 단편, 특히 Fab 단편을 생산하기 위한 항체의 분해는 당업계에 공지된 기술을 이용하여 달성할 수 있지만 이에 제한되지는 않는다.

[0157] B. 인간 항체

[0158] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항체는 인간 항체이다. 인간 항체는 다양한 당업계의 공지된 기술을 이용하여 생성될 수 있다. 인간 항체는 일반적으로 문헌 [van Dijk and van de Winkel, Curr. Opin. Pharmacol. 5: 368-74 (2001)] 및 [Lonberg, Curr. Opin. Immunol. 20:450-459 (2008)]에 기재되어 있다.

[0159] 인간 항체는 항원 챌린지(challenge)에 반응하여 인간 가변 영역을 갖는 무손상 인간 항체 또는 무손상 항체를 생성하도록 변형된 트랜스제닉 동물에게 면역원을 투여하여 제조할 수 있다. 이러한 동물은 전형적으로 내인성 이뮤노글로불린 로커스를 대체하거나 또는 염색체외에 존재하거나 동물의 염색체로 무작위적으로 통합된 인간 이뮤노글로불린 로커스의 전부 또는 일부를 함유한다. 이러한 트랜스제닉 마우스에서, 내인성 이뮤노글로불린 로커스는 일반적으로 불활성화된다. 트랜스제닉 동물로부터 인간 항체를 수득하는 방법의 검토를 위해, 문헌 [Lonberg, Nat. Biotech. 23:1117-1125 (2005)]을 참조한다. 또한, 예를 들어 미국 특허 제6,075,181호 및 제6,150,584호 (제노마우스(XENOMOUSE)™ 기술을 기재함); 미국 특허 제5,770,429호 (HuMab® 기술을 기재함); 미국 특허 제7,041,870호 (K-M 마우스(K-M MOUSE)® 기술을 기재함), 및 미국 특허 출원 공개공보 제US 2007/0061900호 (벨로시마우스(VelociMouse)® 기술을 기재함)를 참조한다. 이러한 동물에 의해 생성된 무손상 항체로부터의 인간 가변 영역은 예를 들어 상이한 인간 불변 영역과 조합시켜 추가로 변형될 수 있다.

[0160] 인간 항체는 또한 하이브리도마-기재의 방법에 의해 제조될 수 있다. 인간 모노클로날 항체의 생성을 위한 인간 골수종 및 마우스-인간 이종골수종 세포주가 기재되어 있다. (예를 들어, 문헌 [Kozbor J. Immunol., 133: 3001 (1984)]; [Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)]; 및 [Boerner et al., J. Immunol., 147: 86 (1991)] 참조). 인간 B-세포 하이브리도마 기술을 통해 생성된 인간 항체는 또한 문헌 [Li et al., PNAS. USA, 103:3557-3562 (2006)]에 기재되어 있다. 추가의 방법은, 예를 들어 미국 특허 제7,189,826호 (하이브리도마 세포주로부터의 모노클로날 인간 IgM 항체의 생성을 기재함) 및 문헌 [Ni, Xiandai Mianyixue, 26(4):265-268 (2006)] (인간-인간 하이브리도마를 기재함)에 기재된 것을 포함한다. 인간 하이브리도마 기술 (트리오마(Trioma) 기술)은 또한 문헌 [Vollmers and Brandlein, Histology and Histopathology, 20(3):927-937 (2005)] 및 [Vollmers and Brandlein, Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology, 27(3):185-91 (2005)]에 기재되어 있다.

[0161] 인간 항체는 또한 인간-유래 파지 디스플레이 라이브러리로부터 선택된 Fv 클론 가변 도메인 서열을 단리하여 생성될 수 있다. 이어서, 이러한 가변 도메인 서열은 바람직한 인간 불변 도메인과 조합될 수 있다. 항체 라이브러리로부터 인간 항체를 선별하기 위한 기술은 아래 기재된다.

[0162] C. 라이브러리-유래 항체

[0163] 본 발명의 항체는 바람직한 활성(들)을 갖는 항체에 대해 조합 라이브러리를 스크리닝하여 단리될 수 있다. 예를 들어, 파지 디스플레이 라이브러리를 생성하고, 이러한 라이브러리를 바람직한 결합 특정을 보유하는 항체에 대해 스크리닝하는 다양한 방법이 당업계에 공지되어 있다. 이러한 방법은 예를 들어 문헌 [Hoogenboom et al. in Methods in Molecular Biology 178:1-37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ, 2001)]에 검토되어 있고, 예를 들어 문헌 [McCafferty et al., Nature 348:552-554]; [Clackson et al., Nature 352: 624-628 (1991)]; [Marks et al., J. Mol. Biol. 222: 581-597 (1992)]; [Marks and Bradbury, in Methods in Molecular Biology 248:161-175 (Lo, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2003)]; [Sidhu et al., J. Mol. Biol. 338(2): 299-310 (2004)]; [Lee et al., J. Mol. Biol. 340(5): 1073-1093 (2004)]; [Fellouse, PNAS USA 101(34): 12467-12472 (2004)]; 및 [Lee et al., J. Immunol. Methods 284(1-2): 119-132(2004)]에 추가로 기재되어 있다.

[0164] 특정 파지 디스플레이 방법에서, VH 및 VL 유전자의 레퍼토리는 독립적으로 폴리머라제 연쇄 반응 (PCR)에 의해

클로닝되고, 파지 라이브러리에 무작위적으로 재조합되며, 이는 이어서 문헌 [Winter et al., Ann. Rev. Immunol., 12: 433-455 (1994)]에 기재된 바와 같이 항원-결합 파지에 대해 스크리닝될 수 있다. 파지는 전형적으로 항체 단편을 단일-쇄 Fv (scFv) 단편 또는 Fab 단편으로 디스플레이한다. 면역화된 공급원으로부터의 라이브러리는 하이브리도마를 구축할 필요없이 면역원에 대해 높은-친화도 항체를 제공한다. 다르게는, 나이브 레퍼토리를 클로닝 (예를 들어, 인간으로부터)하여, 문헌 [Griffiths et al., EMBO J, 12: 725-734 (1993)]에 기재된 바와 같이 어떠한 면역화도 없이 광범위한 비-자가 및 자가 항원에 대한 항체의 단일 공급원을 제공할 수 있다. 마지막으로, 나이브 라이브러리는 또한 문헌 [Hoogenboom and Winter, J. Mol. Biol., 227: 381-388 (1992)]에 기재된 바와 같이, 줄기 세포로부터의 정렬되지 않은 V-유전자 절편을 클로닝하고, 고도의 가변 CDR3 영역을 클로닝하고, 시험관내에서 재정렬을 달성하는 무작위적인 서열을 함유하는 PCR 프라이머를 사용하여 합성에 의해 만들 수 있다. 인간 항체 파지 라이브러리를 기재하고 있는 특허 공개공보는 예를 들어 미국 특허 제5,750,373호, 및 미국 특허 공개공보 제2005/0079574호, 제2005/0119455호, 제2005/0266000호, 제2007/0117126호, 제2007/0160598호, 제2007/0237764호, 제2007/0292936호, 및 제2009/0002360호를 포함한다.

[0165] 인간 항체 라이브러리로부터 단리된 항체 또는 항체 단편은 본원에서 인간 항체 또는 인간 항체 단편으로 여겨진다.

[0166] D. 키메라 및 인간화 항체

[0167] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항체는 키메라 항체이다. 특정 키메라 항체는 예를 들어 미국 특허 제4,816,567호, 및 문헌 [Morrison et al., PNAS USA, 81:6851-6855 (1984)]에 기재되어 있다. 한 예에서, 키메라 항체는 비-인간 가변 영역 (예를 들어, 마우스, 래트, 햄스터, 토끼 또는 비-인간 영장류, 예컨대 원숭이로부터 유래된 가변 영역) 및 인간 불변 영역을 포함한다. 추가의 예에서, 키메라 항체는 부류 또는 하위부류가 모 항체의 것으로부터 변화된 "부류 스위칭(switched)" 항체이다. 키메라 항체는 항원-결합 그의 단편을 포함한다.

[0168] 특정 실시양태에서, 키메라 항체는 인간화 항체이다. 전형적으로, 비-인간 항체는 모 비-인간 항체의 특이성 및 친화도를 유지하면서 인간에 대한 면역원성이 감소하도록 인간화된다. 일반적으로, 인간화 항체는 HVR, 예를 들어 CDR (또는 그의 부분)이 비-인간 항체로부터 유래되고, FR (또는 그의 부분)이 인간 항체 서열로부터 유래된 하나 이상의 가변 도메인을 포함한다. 인간화 항체는 또한 임의로 인간 불변 영역의 적어도 일부를 포함할 것이다. 일부 실시양태에서, 인간화 항체의 일부 FR 잔기는, 예를 들어 항체 특이성 또는 친화도를 복원하거나 또는 향상시키기 위해, 비-인간 항체 (예를 들어, HVR 잔기가 유래된 항체)로부터의 상응하는 잔기로 치환된다.

[0169] 인간화 항체 및 이들의 제조 방법은 예를 들어 문헌 [Almagro and Fransson, Front. Biosci. 13:1619-1633 (2008)]에 검토되어 있고, 예를 들어 문헌 [Riechmann et al., Nature 332:323-329 (1988)]; [Queen et al., PNAS USA 86:10029-10033 (1989)]; 미국 특허 제5,821,337호, 제7,527,791호, 제6,982,321호 및 제7,087,409호; [Kashmiri et al., Methods 36:25-34 (2005)] (SDR (a-CDR) 이식을 기재함); [Padlan, Mol. Immunol. 28:489-498 (1991)] ("리서페이싱"을 기재함); [Dall'Acqua et al., Methods 36:43-60 (2005)] ("FR 셔플링"을 기재함); 및 [Osbourn et al., Methods 36:61-68 (2005)] 및 [Klimka et al., Br. J. Cancer, 83:252-260 (2000)] (FR 셔플링에 대한 "안내 선별" 접근법을 기재함)에 추가로 기재되어 있다.

[0170] 인간화에 사용될 수 있는 인간 프레임워크 영역은 "베스트-핏(best-fit)" 방법을 사용하여 선택된 프레임워크 영역 (예를 들어, 문헌 [Sims et al. J. Immunol. 151:2296 (1993)] 참조); 경쇄 또는 중쇄 가변 영역의 특정 하위군의 인간 항체의 컨센서스 서열로부터 유래된 프레임워크 영역 (예를 들어, 문헌 [Carter et al. PNAS USA, 89:4285 (1992)]; 및 [Presta et al. J. Immunol., 151:2623 (1993)] 참조); 인간 성숙 (체세포 성숙) 프레임워크 영역 또는 인간 배선 프레임워크 영역 (예를 들어, 문헌 [Almagro and Fransson, Front. Biosci. 13:1619-1633 (2008)] 참조); FR 라이브러리 스크리닝으로부터 유래된 프레임워크 영역 (예를 들어, 문헌 [Baca et al., J. Biol. Chem. 272:10678-10684 (1997)] 및 [Rosok et al., J. Biol. Chem. 271:22611-22618 (1996)] 참조)을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

[0171] E. 다중-특이적 항체

[0172] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항체는 다중특이적 항체, 예를 들어 이중특이적 항체이다. 다중특이적 항체는 2개 이상의 상이한 부위에 대해 결합 특이성을 갖는 모노클로날 항체이다. 특정 실시양태에서, 결합 특이성 중 하나는 α5β1에 대한 것이고 다른 것은 임의의 다른 항원 (예를 들어, VEGF)에 대한 것이다. 특정 실시양

태에서, 이중특이적 항체는 α5β1의 2개의 상이한 에피토프에 결합할 수 있다. 이중특이적 항체는 또한 α5β1을 발현시키는 세포에 세포독성제를 위치시키는데 사용될 수 있다. 이중특이적 항체는 전장 항체 또는 항체 단편으로서 제조될 수 있다.

[0173] 다중특이적 항체를 제조하기 위한 기술은 상이한 특이성을 갖는 2개의 이뮤노글로불린 중쇄-경쇄 쌍의 재조합 동시-발현 (문헌 [Milstein and Cuello, Nature 305: 537 (1983)], WO 93/08829, 및 [Traunecker et al., EMBO J. 10: 3655 (1991)] 참조), 및 "놉-인-홀(Knob-in-hole)" 조작 (예를 들어, 미국 특허 제5,731,168호 참조)을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 다중특이적 항체는 또한 항체 Fc-이종이량체 분자를 제조하기 위한 정전기 스티어링(steering) 효과의 조작 (WO 2009/089004A1); 2개 이상의 항체 또는 단편의 가교 (예를 들어, 미국 특허 제4,676,980호, 및 문헌 [Brennan et al., Science, 229: 81 (1985)] 참조); 이중특이적 항체를 생성하기 위한 류신 지퍼(leucine zipper)의 사용 (예를 들어, 문헌 [Kostelny et al., J. Immunol., 148(5):1547-1553 (1992)] 참조); 이중특이적 항체 단편의 제조를 위한 "디아바디" 기술의 사용 (예를 들어, 문헌 [Hollinger et al., PNAS USA, 90:6444-6448 (1993)] 참조); 및 단일-쇄 Fv (sFv) 이량체의 사용 (예를 들어, 문헌 [Gruber et al., J. Immunol., 152:5368 (1994)] 참조); 및 예를 들어 문헌 [Tutt et al. J. Immunol. 147: 60 (1991)]에 기재된 바와 같은 3중특이적 항체의 제조에 의해 제조될 수 있다.

[0174] "옥토퍼스(Octopus) 항체"를 비롯하여, 3개 이상의 기능적 항원 결합 부위를 갖는 조작된 항체가 또한 본원에 포함된다 (예를 들어, US 2006/0025576A1 참조). 본원의 항체 또는 단편은 또한 α5β1 및 다른 상이한 항원에 결합하는 항원 결합 부위를 포함하는 "이중 작용 FAb" 또는 "DAF"를 포함한다 (예를 들어, US 2008/0069820 참조).

[0175] F. 항체 변이체

[0176] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항체의 아미노산 서열 변이체가 고려된다. 예를 들어, 항체의 결합 친화성 및/또는 다른 생물학적 특성을 개선시키는 것이 바람직할 수 있다. 항체의 아미노산 서열 변이체는 항체를 코딩하는 뉴클레오티드 서열에 적절한 변경을 도입하거나 펩티드 합성에 의해 제조할 수 있다. 이러한 변형은 예를 들어 항체의 아미노산 서열 내 잔기의 결실 및/또는 삽입 및/또는 치환을 포함한다. 최종 구축물이 원하는 특성, 예를 들어 항원-결합을 보유하도록, 최종 구축물에 도달하기 위해 결실, 삽입 및 치환의 임의의 조합이 이루어질 수 있다.

[0177] 1. 치환, 삽입 및 결실 변이체

[0178] 특정 실시양태에서, 하나 이상의 아미노산 치환을 갖는 항체 변이체가 제공된다. 치환 돌연변이유발을 위한 관심 부위는 HVR 및 FR을 포함한다. 보존적 치환은 "보존적 치환"의 표제하의 표 1에 나타낸다. 보다 더 실질적인 변화는 "예시적인 치환"의 표제하의 표 1에 아미노산 측쇄 부류에 관하여 아래 추가로 기재된 바와 같이 제공된다. 아미노산 치환은 관심 항체에 도입되고, 생성물은 바람직한 활성, 예를 들어 유지/개선된 항원 결합, 감소된 면역원성 또는 개선된 ADCC 또는 CDC에 대해 스크리닝될 수 있다.

표 1

본래 잔기	예시적 치환	바람직한 치환
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; 노르류신	Leu
Leu (L)	노르류신; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; 노르류신	Leu

[0179]

[0180] 아미노산은 공통적인 측쇄 특성에 따라 분류될 수 있다:

[0181] (1) 소수성: 노르류신, Met, Ala, Val, Leu, Ile;

[0182] (2) 중성 친수성: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;

[0183] (3) 산성: Asp, Glu;

[0184] (4) 염기성: His, Lys, Arg;

[0185] (5) 쇄 배향에 영향을 미치는 잔기: Gly, Pro;

[0186] (6) 방향족: Trp, Tyr, Phe.

[0187] 비-보존적 치환은 이들 부류 중의 하나의 구성원을 또 다른 부류로 교환하는 것을 수반할 것이다.

[0188] 치환 변이체의 한 가지 유형은 모 항체 (예를 들어, 인간화 또는 인간 항체)의 하나 이상의 초가변 영역 잔기를 치환하는 것을 포함한다. 일반적으로, 추가 연구를 위해 선별된 생성된 변이체(들)은 모 항체에 비해 특정 생물학적 특성 (예를 들어, 상승된 친화도, 감소된 면역원성)의 변형 (예를 들어, 개선)을 가질 것이고/거나 모 항체의 특정 생물학적 특성을 실질적으로 유지할 것이다. 예시적 치환 변이체는 예를 들어 본원에 기재된 것과 같은 파지 디스플레이-기재의 친화도 성숙 기술을 이용하여 편리하게 생성될 수 있는 친화도 성숙 항체이다. 간략하게 설명하면, 하나 이상의 HVR 잔기가 돌연변이화되고, 변이체 항체가 파지 상에 디스플레이되고, 특정 생물학적 활성 (예를 들어, 결합 친화도)에 대해 스크리닝된다.

[0189] 변경 (예를 들어, 치환)은 예를 들어 항체 친화도를 개선시키기 위해 HVR에서 이루어질 수 있다. 이러한 변경은 HVR "핫스팟(hotspot)", 즉 체세포 성숙 과정 (예를 들어, 문헌 [Chowdhury, Methods Mol. Biol. 207:179-196 (2008)] 참조), 및/또는 SDR (a-CDR) 동안 결합 친화도에 대해 시험된 생성된 변이체 VH 또는 VL로 높은 빈도에서 돌연변이화를 수행하는 코돈에 의해 코딩되는 잔기에서 이루어질 수 있다. 2차 라이브러리로부터의 구축 및 재선별에 의한 친화도 성숙은 예를 들어 문헌 [Hoogenboom et al. in Methods in Molecular Biology

178:1-37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ, (2001)]에 기재되어 있다. 친화도 성숙의 일부 실시양태에서에서, 다양성은 임의의 다양한 방법 (예를 들어, 에러-프론(error-prone) PCR, 쇄 셔플링, 또는 올리고뉴클레오티드-유도된 돌연변이유발)에 의한 성숙을 위해 선택된 가변 유전자로 도입된다. 이어서, 2차 항체를 생성한다. 이어서, 바람직한 친화도를 갖는 임의의 항체 변이체를 확인하게 위해 라이브러리를 스크리닝한다. 다양성을 도입하는 다른 방법은 HVR-유도된 접근법과 연관되며, 여기서 여러 HVR 잔기 (예를 들어, 한 번에 4 내지 6개 잔기)가 무작위화된다. 항원 결합과 연관된 HVR 잔기는 예를 들어 알라닌 스캐닝 돌연변이유발 또는 모델링을 이용하여 구체적으로 확인될 수 있다. 특히, CDR-H3 및 CDR-L3이 종종 표적화된다.

[0190] 특정 실시양태에서, 치환, 삽입 또는 결실은 이러한 변경이 항원에 결합하는 항체의 능력을 실질적으로 감소시키지 않는 한, 하나 이상의 HVR 내에서 일어날 수 있다. 예를 들어, 결합 친화도를 실질적으로 감소시키지 않는 보존적 변경 (예를 들어, 본원에 제공된 바와 같은 보존적 치환)이 HVR에서 이루어질 수 있다. 이러한 변경은 HVR "핫스팟" 또는 SDR의 외부일 수 있다. 상기에서 제공된 변이체 VH 및 VL 서열의 특정 실시양태에서, 각각의 HVR은 변경되지 않거나, 또는 1, 2 또는 3개 이하의 아미노산 치환을 함유한다.

[0191] 문헌 [Cunningham and Wells (1989) Science, 244:1081-1085]에 기재된 바와 같이, 돌연변이유발을 위해 표적화될 수 있는 항체의 잔기 또는 영역의 확인에 유용한 방법은 "알라닌 스캐닝 돌연변이유발"이라고 지칭된다. 이 방법에서, 잔기 또는 표적 잔기들의 군이 확인되고 (예를 들어, 하전된 잔기, 예컨대 arg, asp, his, lys 및 glu), 중성 또는 음으로 하전된 아미노산 (예를 들어, 알라닌 또는 폴리알라닌)으로 대체되어 항체와 항원과의 상호작용에 영향을 미치는지 여부를 결정한다. 추가의 치환은 초기 치환에 대한 기능적 감수성을 입증하는 아미노산 위치에 도입될 수 있다. 다르게는 또는 부가적으로, 항체와 항원 사이의 접촉 지점을 확인하기 위해 항원-항체 복합체의 결정 구조를 분석하는 것이 유익할 수 있다. 이러한 접촉 잔기 및 이웃하는 잔기는 치환을 위한 후보로 표적화되거나 또는 제거될 수 있다. 변이체는 그들이 바람직한 특성을 함유하는지 여부를 결정하기 위해 스크리닝될 수 있다.

[0192] 아미노산 서열 삽입에는 길이 범위가 하나의 잔기 내지 100개 이상의 잔기를 함유하는 폴리펩티드에 이르는 아미노- 및/또는 카르복실-말단 융합 및 단일 또는 다수 아미노산 잔기의 서열내 삽입이 포함된다. 말단 삽입의 예에는 N-말단 메티오닐 잔기를 갖는 항체를 포함한다. 항체 분자의 다른 삽입 변이체는 효소 (예를 들어, ADEPT의 경우) 또는 항체의 혈청 반감기를 증가시키는 폴리펩티드가 상기 항체의 N- 또는 C-말단에 융합된 것을 포함한다.

[0193] 2. 글리코실화 변이체

[0194] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항체는 항체가 글리코실화되는 정도를 증가시키거나 감소시키도록 변경된다. 항체에 대한 글리코실화 부위의 부가 또는 결실은 하나 이상의 글리코실화 부위가 생성되거나 제거되도록 아미노산 서열을 변경함으로써 편리하게 달성될 수 있다.

[0195] 항체가 Fc 영역을 포함하는 경우, 이에 부착된 탄수화물이 변경될 수 있다. 포유동물 세포에 의해 생성된 천연 항체는 전형적으로 Fc 영역의 CH2 도메인의 Asn297에 대한 N-연결에 의해 일반적으로 부착되는 분지된 2분지의 올리고사카라이드를 포함한다. 예를 들어, 문헌 [Wright et al. TIBTECH 15:26-32 (1997)]을 참조한다. 상기 올리고사카라이드는 각종 탄수화물, 예를 들어 만노스, N-아세틸 글루코사민 (GlcNAc), 갈락토스 및 시알산, 및 2분지형 올리고사카라이드 구조의 "줄기" 내의 GlcNAc에 부착된 푸코스를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 항체 내의 올리고사카라이드의 변형은 특정의 개선된 특성을 지닌 항체 변이체를 제조하기 위해 이루어질 수 있다.

[0196] 한 실시양태에서, Fc 영역에 (직접 또는 간접적으로) 부착된 푸코스가 결여된 탄수화물 구조를 갖는 항체 변이체가 제공된다. 예를 들어, 이러한 항체에서 푸코스의 양은 1% 내지 80%, 1% 내지 65%, 5% 내지 65% 또는 20% 내지 40%일 수 있다. 푸코스의 양은 예를 들어 WO 2008/077546에 기재된 바와 같이 MALDI-TOF 질량 분광분석법에 의해 측정된 Asn 297에 부착된 모든 당구조물 (예를 들어, 복합체, 하이브리드 및 높은 만노스 구조물)의 합에 비해 Asn297에서 당쇄 내의 푸코스의 평균적인 양을 계산하여 결정된다. Asn297은 Fc 영역의 약 위치 297 (Fc 영역 잔기의 EU 넘버링)에 위치한 아스파라긴 잔기를 나타내지만; Asn297은 또한 항체의 부가적 서열 변형에 의해 위치 297의 약 ±3 아미노산 상류 또는 하류, 즉 위치 294와 300 사이에 위치할 수 있다. 이러한 푸코실화 변이체는 개선된 ADCC 기능을 가질 수 있다. 예를 들어, 미국 특허 공개공보 제US 2003/0157108호 (프레스타, 엘.(Presta, L.)); 제US 2004/0093621호 (쿄와 하꼬 코교(Kyowa Hakko Kogyo) Co., Ltd)를 참조한다. "탈푸코실화" 또는 "푸코스-결핍" 항체 변이체에 대한 문헌의 예는 US 2003/0157108; WO 2000/61739; WO 2001/29246; US 2003/0115614; US 2002/0164328; US 2004/0093621; US 2004/0132140; US 2004/0110704; US

2004/0110282; US 2004/0109865; WO 2003/085119; WO 2003/084570; WO 2005/035586; WO 2005/035778; WO2005/053742; WO2002/031140; [Okazaki et al. J. Mol. Biol. 336:1239-1249 (2004)]; [Yamane-Ohnuki et al. Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004)]을 포함한다. 탈푸코실화 항체를 생성할 수 있는 세포주의 예는 단백질 푸코실화가 결핍된 Lec13 CHO 세포 (문헌 [Ripka et al. Arch. Biochem. Biophys. 249:533-545 (1986)]; 미국 특허 출원 제US 2003/0157108 A1호 (프레스타, 엘); 및 WO 2004/056312 A1 (아담스(Adams) 등) (특허 실시예 11)), 및 녹아웃 세포주, 예컨대 알파-1,6-푸코실트랜스퍼라제 유전자, FUT8, 녹아웃 CHO 세포 (예를 들어, 문헌 [Yamane-Ohnuki et al. Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004)]; [Kanda, Y. et al., Biotechnol. Bioeng., 94(4):680-688 (2006)]; 및 WO2003/085107 참조)를 포함한다.

[0197] 이등분된 올리고사카라이드를 수반한 항체 변이체가 추가로 제공되는데, 예를 들어 항체의 Fc 영역에 부착된 이분지의 올리고사카라이드가 GlcNAc에 의해 이등분된다. 이러한 항체 변형체에서는 푸코실화가 감소되고/되거나 ADCC 기능이 개선될 수 있다. 상기 항체 변이체의 예가, 예를 들어 WO 2003/011878 (장-마이레트(Jean-Mairet) 등); US 특허 제6,602,684호 (우마나(Umana) 등); 및 US 2005/0123546 (우마나 등)에 기재되어 있다. Fc 영역에 부착된 올리고사카라이드 내에 하나 이상의 갈락토스 잔기를 갖는 항체 변이체가 또한 제공된다. 이러한 항체 변이체는 개선된 CDC 기능을 가질 수 있다. 상기 항체 변이체는, 예를 들어 WO 1997/30087 (파텔(Patel) 등); WO 1998/58964 (라주, 에스.(Raju, S.)); 및 WO 1999/22764 (라주, 에스.)에 기재되어 있다.

[0198] 3. Fc 영역 변이체

[0199] 특정 실시양태에서, 하나 이상의 아미노산 변형은, 예를 들어 비정상적인 혈관신생 및/또는 혈관 투과성 또는 누출과 연관된 질환 또는 장애를 치료하는데 있어 항체의 유효성을 향상시키도록, 본원에 제공된 항체의 Fc 영역에 도입되어, Fc 영역 변이체를 생성할 수 있다. Fc 영역 변이체는 하나 이상의 아미노산 위치에서 아미노산 변형 (예를 들어, 치환)을 포함하는 인간 Fc 영역 서열 (예를 들어, 인간 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 Fc 영역)을 포함할 수 있다.

[0200] 특정 실시양태에서, 본 발명은 모든 이펙터 기능은 아니지만, 몇몇 이펙터 기능을 보유하고 있으므로, 생체내에서의 항체의 반감기가 중요하긴 하지만 특정의 이펙터 기능 (예컨대 보체 및 ADCC)이 불필요하거나 해로운 많은 적용 분야에 대한 바람직한 후보가 되는 항체 변이체를 고려한다. CDC 및/또는 ADCC 활성의 감소/고갈을 확인하기 위해 시험관내 및/또는 생체내 세포독성 분석을 수행할 수 있다. 예를 들어, 항체에 FcγR 결합은 없지만 (따라서, 아마도 ADCC 활성이 없을 것임), FcRn 결합 능력은 보유하고 있는 것을 확인하기 위해서 Fc 수용체 (FcR) 결합 분석을 수행할 수 있다. ADCC를 매개하는 주요 세포인 NK 세포는 FcγRIII 만을 발현하는 반면에, 단핵구는 FcγRI, FcγRII 및 FcγRIII을 발현한다. 조혈 세포상에서의 FcR 발현은 문헌 [Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9:457-492 (1991)]의 페이지 464, 표 3에 요약되어 있다. 관심있는 분자의 ADCC 활성을 평가하기 위한 시험관내 분석의 비-제한적 예가 미국 특허 제5,500,362호 (예를 들어, 문헌 [Hellstrom, I. et al. PNAS USA 83:7059-7063 (1986)] 및 [Hellstrom, I et al., PNAS USA 82:1499-1502 (1985)] 참조); 제5,821,337호 (문헌 [Bruggemann, M. et al., J. Exp. Med. 166:1351-1361 (1987)] 참조)에 기재되어 있다. 다르게는, 비-방사성 분석 방법을 이용할 수 있다 (예를 들어, 유동 세포계수를 위한 악티(ACTI)™ 비-방사성 세포독성 분석 (셀테크놀로지, 인크.(CellTechnology, Inc.), 미국 캘리포니아주 마운틴 뷰); 및 사이토톡스(CytoTox) 96® 비-방사성 세포독성 분석 (프로메가(Promega), 미국 위스콘신주 매디슨) 참조). 이러한 분석에 유용한 이펙터 세포는 말초혈 단핵 세포 (PBMC) 및 천연 킬러 (NK) 세포를 포함한다. 다르게는 또는 부가적으로, 관심있는 분자의 ADCC 활성은 생체내에서, 예를 들어 문헌 [Clynes et al. PNAS USA 95:652-656 (1998)]에 기재된 바와 같은 동물 모델에서 평가할 수 있다. 항체가 C1q에 결합할 수 없고, 따라서 CDC 활성이 없다는 것을 확인하기 위해 C1q 결합 분석을 수행할 수도 있다. 예를 들어, WO 2006/029879 및 WO 2005/100402의 C1q 및 C3c 결합 ELISA를 참조한다. 보체 활성화를 평가하기 위해 CDC 분석을 수행할 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods 202:163 (1996)]; [Cragg, M.S. et al., Blood 101:1045-1052 (2003)]; 및 [Cragg, M.S. and M.J. Glennie, Blood 103:2738-2743 (2004)] 참조). FcRn 결합 및 생체내 제거율/반감기 결정은 또한 당업계에 공지된 방법을 이용하여 수행할 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Petkova, S.B. et al., Int'l. Immunol. 18(12):1759-1769 (2006)] 참조).

[0201] 감소된 이펙터 기능을 갖는 항체는 Fc 영역 잔기 238, 265, 269, 270, 297, 327 및 329 중 하나 이상의 치환을 갖는 것을 포함한다 (미국 특허 제6,737,056호). 이러한 Fc 돌연변이체는 아미노산 위치 265, 269, 270, 297 및 327 중 2개 이상에 치환을 갖는 Fc 돌연변이체 (잔기 265 및 297의 알라닌으로의 치환을 갖는, 소위 "다나(DANA)" Fc 돌연변이체 포함)를 포함한다 (미국 특허 제7,332,581호).

[0202] FcR에 대해 개선되거나 또는 감소된 결합을 갖는 특정 항체 변이체가 기재된다. (예를 들어, 미국 특허 제 6,737,056호; WO 2004/056312 및 문헌 [Shields et al., J. Biol. Chem. 9(2): 6591-6604 (2001)] 참조).

[0203] 특정 실시양태에서, 항체 변이체는 ADCC를 개선시키는 하나 이상의 아미노산 치환, 예를 들어 Fc 영역의 위치 298, 333 및/또는 334 (잔기의 EU 넘버링)에서의 치환을 갖는 Fc 영역을 포함한다.

[0204] 일부 실시양태에서, 예를 들어 미국 특허 제6,194,551호, WO 99/51642 및 문헌 [Idusogie et al. J. Immunol. 164: 4178-4184 (2000)]에 기재된 바와 같이, 변경된 (즉, 개선된 또는 감소된) C1q 결합 및/또는 보체 의존성 세포독성 (CDC)을 나타내는 변경들이 Fc 영역에서 만들어진다.

[0205] Fc 영역 서열 내의 돌연변이 또는 변경은 FcR 결합을 개선시키기 위해서 실시될 수 있다 (예를 들어, FcγR, FcRn). 한 실시양태에 따라, 본 발명의 항체는 천연 IgG 또는 모 항체에 비해, ADCC, CDC, 및 개선된 FcRn 결합으로 이루어진 군 중으로부터 선택되는 하나 이상의 변경된 이펙터 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. 모체 IgG를 태아에게 전달하는 것을 담당하는 신생아 Fc 수용체 (FcRn) (문헌 [Guyer et al., J. Immunol. 117:587 (1976)] 및 [Kim et al., J. Immunol. 24:249 (1994)])에 대한 결합이 개선되고 반감기가 증가된 항체가 US2005/0014934A1 (힌톤(Hinton) 등)에 기재되어 있다. 이들 항체는 FcRn에 대한 Fc 영역의 결합성을 개선시키는 하나 이상의 치환을 갖는 Fc 영역을 포함한다. 이러한 Fc 변이체는 Fc 영역 잔기: 238, 256, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424 또는 434 중 하나 이상에서의 치환, 예를 들어 Fc 영역 잔기 434의 치환 (미국 특허 제7,371,826호)을 갖는 것을 포함한다.

[0206] Fc 영역 변이체의 다른 예에 관해서는 또한 문헌 [Duncan & Winter, Nature 322:738-40 (1988)]; 미국 특허 제 5,648,260호; 제5,624,821호; 및 WO 94/29351을 참조한다.

[0207] 4. 시스테인 조작된 항체 변이체

[0208] 특정 실시양태에서, 항체의 하나 이상의 잔기를 시스테인 잔기로 치환시킨 시스테인 조작된 항체, 예를 들어 "티오MAb"를 제조하는 것이 바람직할 수 있다. 특정 실시양태에서, 이와 같이 치환된 잔기는 항체의 접근가능한 부위에서 일어난다. 이들 잔기를 시스테인으로 치환함으로써 반응성 티올기가 항체의 접근가능한 부위에 배치되게 되고, 이것을 이용하여 항체를 본원에 추가로 기재한 바와 같이 다른 잔기, 예컨대 약물 잔기 또는 링커-약물 잔기에 접합시켜 면역접합체를 생성할 수 있다. 특정 실시양태에서, 임의의 하나 이상의 하기 잔기가 시스테인으로 치환될 수 있다: 경쇄의 V205 (카바트 넘버링); 중쇄의 A118 (EU 넘버링); 및 중쇄 Fc 영역의 S400 (EU 넘버링). 시스테인 조작된 항체는, 예를 들어 미국 특허 제7,521,541호에 기재된 바와 같이 생성될 수 있다.

[0209] 일부 실시양태에서, 시스테인 잔기(들)이 Fc 영역에 도입되어, 상기 영역 내에 쇄내 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. 문헌 [Caron et al., J. Exp. Med., 176: 1191-1195 (1992)] 및 [Shopes, J. Immunol., 148: 2918-2922 (1992)]을 참조한다. 향상된 항종양 활성을 갖는 동종이량체 항체도 문헌 [Wolff et al., Cancer Research, 53: 2560-2565 (1993)]에 기재된 바와 같은 이종2관능성 가교-링커를 사용하여 제조할 수 있다. 대안적으로, 이중 Fc 영역을 갖는 항체가 조작되어 향상된 보체 용해 및 ADCC 능력을 가질 수 있다. 문헌 [Stevenson et al., Anti-Cancer Drug Design, 3: 219-230 (1989)]을 참조한다.

[0210] 5. 항체 유도체

[0211] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항체는 당업계에 공지되고 쉽게 입수가능한 추가의 비단백질성 잔기를 함유하도록 추가로 변형될 수 있다. 항체의 유도체화에 적합한 잔기는 수용성 중합체를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 수용성 중합체의 비제한적 예는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG), 에틸렌 글리콜/프로필렌 글리콜의 공중합체, 카르복시메틸셀룰로스, 덱스트란, 폴리비닐 알콜, 폴리비닐 피롤리돈, 폴리-1,3-디옥솔란, 폴리-1,3,6-트리옥산, 에틸렌/말레산 무수물 공중합체, 폴리아미노산 (단독중합체 또는 무작위 공중합체), 및 덱스트란 또는 폴리(n-비닐 피롤리돈)폴리에틸렌 글리콜, 프로프로필렌 글리콜 단독중합체, 폴리프로필렌 옥시드/에틸렌 옥시드 공중합체, 폴리옥시에틸화 폴리올 (예를 들어, 글리세롤), 폴리비닐 알콜, 및 이들의 혼합물을 포함하지만 이에 제한되지는 않는다. 폴리에틸렌 글리콜 프로피온알데히드는 물에서의 안정성으로 인해 제조에 유리할 수 있다. 중합체는 임의의 분자량을 가질 수 있고, 분지형 또는 비분지형일 수 있다. 항체에 부착되는 중합체의 수는 다양할 수 있으며, 1개 초과의 중합체가 부착될 경우에 이들은 동일하거나 상이한 분자일 수 있

다. 일반적으로, 유도체화에 사용되는 중합체의 수 및/또는 유형은 개선될 항체의 특정 특성 또는 기능, 항체 유도체가 규정된 조건하에 요법에서 사용될 것인지의 여부 등을 포함하지만 이에 제한되지는 않은 고려사항을 기초로 결정될 수 있다.

[0212] 또 다른 실시양태에서, 항체, 및 방사선 노출에 의해 선택적으로 가열될 수 있는 비단백질성 잔기의 접합체가 제공된다. 한 실시양태에서, 비단백질성 잔기는 탄소 나노튜브이다 (문헌 [Kam et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102: 11600-11605 (2005)]). 방사선은 임의의 파장일 수 있고, 통상적인 세포에는 해를 끼치지 않지만 항체-비단백질성 잔기에 근접한 세포는 사멸시키는 온도로 비단백질성 잔기를 가열하는 파장을 포함하지만 이에 제한되지는 않는다.

[0213] G. 면역접합체

[0214] 본 발명은 또한 하나 이상의 세포독성제, 예컨대 화학요법제 또는 약물, 성장 억제제, 독소 (예를 들어, 단백질 독소, 박테리아, 진균, 식물 또는 동물 기원의 효소 활성 독소 또는 그의 단편) 또는 방사성 동위원소에 접합된 본원의 항-α5β1 항체를 포함하는 면역접합체를 제공한다.

[0215] 한 실시양태에서, 면역접합체는 항체가 하나 이상의 약물 (메이탄시노이드 (미국 특허 제 5,208,020호, 제 5,416,064호 및 유럽 특허 EP 0 425 235 B1 참조); 아우리스타틴, 예컨대 모노메틸아우리스타틴 약물 잔기 DE 및 DF (MMAE 및 MMAF) (미국 특허 제5,635,483호 및 제5,780,588호 및 제7,498,298호 참조); 돌라스타틴; 칼리케아미신 또는 그의 유도체 (미국 특허 제5,712,374호, 제5,714,586호, 제5,739,116호, 제5,767,285호, 제5,770,701호, 제5,770,710호, 제5,773,001호 및 제5,877,296호; 문헌 [Hinman et al., Cancer Res. 53:3336-3342 (1993)]; 및 [Lode et al., Cancer Res. 58:2925-2928 (1998)]); 안트라시클린, 예컨대 다우노마이신 또는 독소루비신 (문헌 [Kratz et al., Current Med. Chem. 13:477-523 (2006)]; [Jeffrey et al., Bioorganic & Med. Chem. Letters 16:358-362 (2006)]; [Torgov et al., Bioconj. Chem. 16:717-721 (2005)]; [Nagy et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:829-834 (2000)]; [Dubowchik et al., Bioorg. & Med. Chem. Letters 12:1529-1532 (2002)]; [King et al., J. Med. Chem. 45:4336-4343 (2002)]; 및 미국 특허 제6,630,579호 참조); 메토트렉세이트; 빈데신; 탁산 예컨대 도세탁셀, 파클리탁셀, 라로탁셀, 테세탁셀 및 오르타탁셀; 트리코테센; 및 CC1065를 포함하나 이에 제한되지는 않음)에 접합된 항체-약물 접합체 (ADC)이다.

[0216] 또 다른 실시양태에서, 면역접합체는 효소 활성 독소 또는 그의 단편 (디프테리아 A 쇄, 디프테리아 독소의 비-결합 활성 단편, 외독소 A 쇄 (슈도모나스 아에루기노사(Pseudomonas aeruginosa)로부터 유래됨), 리신 A 쇄, 아브린 A 쇄, 모데신 A 쇄, 알파-사르신, 알레우리테스 포르디이(Aleurites fordii) 단백질, 디안틴 단백질, 피토라카 아메리카나(Phytolaca americana) 단백질 (PAPI, PAPII 및 PAP-S), 모모르디카 카란티아(momordica charantia) 억제제, 쿠르신, 크로틴, 사파오나리아 오피시날리스(sapaonaria officinalis) 억제제, 겔로닌, 미토겔린, 레스트릭토신, 페노마이신, 에노마이신 및 트리코테센을 포함하나 이에 제한되지는 않음)에 접합된 본원에 기재된 항체를 포함한다.

[0217] 또 다른 실시양태에서, 면역접합체는 방사성접합체를 형성하기 위해 방사성 원자에 접합된 본원에 기재된 바와 같은 항체를 포함한다. 다양한 방사성 동위원소가 방사성접합체의 생산을 위해 이용가능하다. 그 예는 At^{211}, I^{131}, I^{125}, Y^{90}, Re^{186}, Re^{188}, Sm^{153}, Bi^{212}, P^{32}, Pb^{212}, 및 Lu의 방사성 동위원소를 포함한다. 방사성접합체는 검출용으로 사용되는 경우에 섬광조영 연구를 위한 방사성 원자, 예를 들어 tc99m 또는 I123을 포함하거나, 핵자기 공명 (NMR) 영상화 (자기 공명 영상화, mri로도 공지됨)용 스핀 (spin) 표지, 예를 들어 다시 요오드-123, 요오드-131, 인듐-111, 불소-19, 탄소-13, 질소-15, 산소-17, 가돌리늄, 망간 또는 철을 포함할 수 있다.

[0218] 항체 및 세포독성제의 접합체는 다양한 2관능성 단백질 커플링제, 예를 들어 N-숙신이미딜-3-(2-피리딜디티오)프로피오네이트 (SPDP), 숙신이미딜-4-(N-말레이미도메틸) 시클로헥산-1-카르복실레이트 (SMCC), 이미노티올란 (IT), 이미도에스테르의 2관능성 유도체 (예를 들어, 디메틸 아디피미데이트 HCl), 활성 에스테르 (예를 들어, 디숙신이미딜 수베레이트), 알데히드 (예를 들어, 글루타르알데히드), 비스-아지도 화합물 (예를 들어, 비스(p-아지도벤조일) 헥산디아민), 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 제조할 수 있다. 예를 들어, 리신 면역독소는 문헌 [Vitetta et al., Science 238:1098 (1987)]에 기재된 바와 같이 제조할 수 있다. 탄소-14-표지된 1-이소티오시아네이토벤질-3-메틸디에틸렌 트리아민펜타아세트산 (MX-DTPA)은 방사선뉴클레오티드를 항체에 접합시키기 위한 예시적인 킬레이트화제이다. WO 94/11026을 참조한다. 링커는 세포 내에서 세포독성 약물의 방출을 용이하게 하는 "절단

가능한 링커"일 수 있다. 예를 들어, 산-불안정성 링커, 펩티다제-감수성 링커, 광 불안정성 링커, 디메틸 링커 또는 디술피드-함유 링커 (문헌 [Chari et al., Cancer Res. 52:127-131 (1992)]; 미국 특허 제5,208,020호)가 사용될 수 있다.

[0219] 본원의 면역접합체 또는 ADC는 시판되는 (예를 들어, 피어스 바이오테크놀로지, 인크.(Pierce Biotechnology, Inc.; 미국 일리노이주 록포드)로부터 시판됨) 가교-링커 시약 (BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, 술포-EMCS, 술포-GMBS, 술포-KMUS, 술포-MBS, 술포-SIAB, 술포-SMCC, 및 술포-SMPB, 및 SVSB (숙신이미딜-(4-비닐술폰)벤조에이트를 포함하나 이에 제한되지는 않음)으로 제조된 상기 접합체를 명백하게 고려하나 이에 제한되지는 않는다.

[0220] H. 이뮤노리포좀

[0221] 또한, 본원에 개시된 항체는 이뮤노리포좀으로서 제제화될 수 있다. 항체를 함유하는 리포좀은 문헌 [Epstein et al., PNAS USA, 82: 3688 (1985)]; [Hwang et al., PNAS USA, 77: 4030 (1980)]; 및 미국 특허 제4,485,045호 및 제4,544,545호에 기재된 것과 같은 당업계에 공지된 방법에 의해 제조된다. 순환 시간이 향상된 리포좀은 미국 특허 제5,013,556호에 개시되어 있다.

[0222] 특히 유용한 리포좀은 포스파티딜콜린, 콜레스테롤, 및 PEG-유도체화된 포스파티딜에탄올아민 (PEG-PE)을 포함하는 지질 조성물을 사용하여 역상 증발 방법에 의해 생성될 수 있다. 규정된 공동 크기의 필터를 통해 리포좀을 압출하여 원하는 직경의 리포좀이 산출된다. 본 발명의 항체의 Fab' 단편은 문헌 [Martin et al., J. Biol. Chem., 257: 286-288 (1982)]에 기재된 바와 같이 디술피드-상호교환 반응을 통해 리포좀에 접합될 수 있다. 항신생물제, 성장 억제제, 또는 화학요법제 (예를 들어, 독소루비신)도 임의로 리포좀 내에 함유된다. 문헌 [Gabizon et al., J. National Cancer Inst., 81(19): 1484 (1989)]을 참조한다.

[0223] IV. 항-α5β1 항체를 사용하는 치료 방법

[0224] 본원에 제공된 임의의 항-α5β1 항체는 치료 방법에 사용될 수 있다. 본원에 기재된 임의의 제제 또는 치료 방법은 항-α5β1 항체를 대신하여 또는 항-α5β1 항체에 더하여 본 발명의 면역접합체를 사용할 수 있는 것으로 이해된다.

[0225] 한 측면에서, 의약으로 사용하기 위한 항-α5β1 항체가 제공된다. 추가의 측면에서, 비정상적인 혈관신생 및/또는 혈관 투과성 또는 누출과 연관된 질환 및 장애 (예를 들어, 암, 안구 질환 및 면역 장애 (예를 들어, 자가면역 장애) 포함)를 치료하는데 사용하기 위한 항-α5β1 항체가 제공된다. 특정 실시양태에서, 치료 방법에 사용하기 위한 항-α5β1 항체가 제공된다. 특정 실시양태에서, 본 발명은 비정상적인 혈관신생 및/또는 혈관 투과성 또는 누출과 연관된 질환 또는 장애를 갖는 개체에게 유효량의 항-α5β1 항체를 투여하는 것을 포함하는 상기 개체의 치료 방법에 사용하기 위한 항-α5β1 항체가 제공된다. 이러한 한 실시양태에서, 상기 방법은 예를 들어 본원에 기재된 항혈관신생제, 항신생물제, 성장 억제제 또는 화학요법제를 비롯하여, 적어도 1, 2, 3, 4가지 이상의 추가의 치료제(들)을 유효량으로 개체에게 투여하는 것을 더 포함한다. 추가의 실시양태에서, 본 발명은 비정상적인 혈관신생 및/또는 혈관 투과성 또는 누출을 억제하는데 사용하기 위한 항-α5β1 항체를 제공한다. 특정 실시양태에서, 본 발명은 비정상적인 혈관신생 및/또는 혈관 투과성 또는 누출을 억제하기 위해 유효량의 항-α5β1 항체를 개체에게 투여하는 것을 포함하는, 개체에서 비정상적인 혈관신생 및/또는 혈관 투과성 또는 누출을 억제하는 방법에 사용하기 위한 항-α5β1 항체를 제공한다. 임의의 상기 실시양태에 따른 "개체"는 바람직하게는 인간이다.

[0226] 추가의 측면에서, 본 발명은 의약의 제조 또는 제제화에 있어 항-α5β1 항체의 용도를 제공한다. 한 실시양태에서, 의약은 비정상적인 혈관신생 및/또는 혈관 또는 누출과 연관된 질환 또는 장애의 치료용이다. 추가의 실시양태에서, 의약은 비정상적인 혈관신생 및/또는 혈관 투과성 또는 누출과 연관된 질환 또는 장애를 갖는 개체에게 유효량의 의약을 투여하는 것을 포함하는, 비정상적인 혈관신생 및/또는 혈관 투과성 또는 누출과 연관된 질환 또는 장애를 치료하는 방법에 사용하기 위한 것이다. 이러한 한 실시양태에서, 상기 방법은 예를 들어 본원에 기재된 바와 같은 항혈관신생제, 항신생물제, 성장 억제제 또는 화학요법제를 비롯하여, 적어도 1, 2, 3, 4가지 이상의 추가의 치료제(들)을 유효량으로 개체에게 투여하는 것을 더 포함한다. 추가의 실시양태에서, 의약은 비정상적인 혈관신생 및/또는 혈관 투과성 또는 누출을 억제하기 위한 것이다. 추가의 실시양태에서, 의약은 비정상적인 혈관신생 및/또는 혈관 투과성 또는 누출을 억제하기 위해 유효량의 의약을 개체에게 투여하는 것을 포함하는, 개체에서 비정상적인 혈관신생 및/또는 혈관 투과성 또는 누출을 억제하는 방법에 사용하기 위한 것이다. 임의의 상기 실시양태에 따른 "개체"는 인간일 수 있다.

[0227] 추가의 측면에서, 본 발명은 비정상적인 혈관신생 및/또는 혈관 투과성 또는 누출과 연관된 질환 또는 장애를 치료하기 위한 방법을 제공한다. 한 실시양태에서, 상기 방법은 이러한 비정상적인 혈관신생 및/또는 혈관 투과성 또는 누출과 연관된 질환 또는 장애를 갖는 개체에게 유효량의 항-α5β1 항체를 투여하는 것을 포함한다. 이러한 한 실시양태에서, 방법은 아래 기재된 바와 같은 유효량의 하나 이상의 추가의 치료제를 개체에게 투여하는 것을 더 포함한다. 임의의 상기 실시양태에 따른 "개체"는 인간일 수 있다.

[0228] 추가의 측면에서, 본 발명은 개체에서 비정상적인 혈관신생 및/또는 혈관 투과성 또는 누출을 억제하기 위한 방법을 제공한다. 한 실시양태에서, 상기 방법은 비정상적인 혈관신생 및/또는 혈관 투과성 또는 누출을 억제하기 위해 유효량의 항-α5β1 항체를 개체에게 투여하는 것을 포함한다. 한 실시양태에서, "개체"는 인간이다.

[0229] 추가 측면에서, 본 발명은 예를 들어 임의의 상기 치료 방법에 사용하기 위한, 본원에 제공된 임의의 항-α5β1 항체를 포함하는 제약 제제를 제공한다. 한 실시양태에서, 제약 제제는 본원에 제공된 임의의 항-α5β1 항체 및 제약상 허용되는 담체를 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 제약 제제는 본원에 제공된 임의의 항-α5β1 항체 및 하나 이상의 추가의 치료제, 예를 들어 본원에 기재된 것을 포함한다.

[0230] 본원에 기재된 조합 요법은 조합 투여 (여기서 2, 3, 4가지 이상의 치료제가 동일한 또는 별개의 제제에 포함된다), 및 개별 투여를 포함하고, 개별 투여시에, 본 발명의 항체의 투여는 추가의 치료제 및/또는 아주반트의 투여 전에, 투여와 동시에 및/또는 투여 후에 수행될 수 있다. 또한, 본 발명의 항체는 방사선 요법과 조합되어 사용될 수도 있다.

[0231] 특정 실시양태에서, 추가의 치료제는 VEGF 길항제 (예를 들어, 항-VEGF 항체, 예컨대 베바시주맙)이다. 일부 실시양태에서, 항-α5β1 항체는 VEGF 길항제와 조합되어 투여된다. 항-α5β1 항체 및 추가의 작용제 (예를 들어, VEGF 길항제)는 동시에 또는 순차적으로 투여할 수 있다. 대안적으로, 대상체를 VEGF 길항제로 치료한 후에 α5β1 길항제를 투여할 수 있고, 예를 들어 대상체가 VEGF 길항제 치료에 반응하지 않을 때까지 대상체를 VEGF 길항제로 치료한 후에 대상체를 α5β1 길항제로 치료한다. 한 실시양태에 따라, 암이 비-침습성일 때 대상체를 VEGF 길항제로 치료한 후에, 암이 침습성일 때에 α5β1 길항제로 치료한다. 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, 항신생물제, 화학요법제, 성장 억제제 및 세포독성제)를 더 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. 대안적으로, 화학요법 및 VEGF 길항제로 치료된 바 있는 환자는 α5β1 길항제 요법으로부터 도움을 받을 수 있다. 한 실시양태에서, 항-VEGF 항체는 베바시주맙이다. 또 다른 실시양태에서, 항-α5β1 항체는 본원에 기재된 항-α5β1 항체이다.

[0232] 본 발명의 항체 (및 임의의 추가 치료제)는 비경구, 폐내 및 비내를 비롯한 임의의 적합한 수단에 의해 투여될 수 있고, 국소 치료를 위해 바람직하다면, 병변내 투여될 수 있다. 비경구 주입은 근육내, 정맥내, 동맥내, 복강내 또는 피하 투여를 포함한다. 투여는 임의의 적합한 경로, 예를 들어 부분적으로는 투여가 단기인지 장기인지에 따라 정맥내 또는 피하 주사와 같은 주사에 의해 수행될 수 있다. 다양한 시점에 걸쳐 단일 또는 다중 투여 등을 비롯한 다양한 투여 계획으로는 본원에서 볼루스 투여 및 펄스 주입이 고려된다.

[0233] 본 발명의 항체는 우수 의료 실무와 일치하는 방식으로 제제화되고 투약되고 투여될 것이다. 이와 관련하여 고려할 인자에는 치료할 특정 장애, 치료받을 특정 포유동물, 개별 환자의 임상적 상태, 장애의 원인, 작용제의 전달 부위, 투여 방법, 투여 스케줄, 및 의료 전문인에게 공지된 다른 인자가 포함된다. 반드시 그럴 필요는 없지만, 임의로, 항체는 문제의 장애를 예방 또는 치료하는데 현재 사용되는 하나 이상의 작용제와 함께 제제화된다. 이러한 다른 작용제의 유효량은 제제 내에 존재하는 항체의 양, 장애 또는 치료의 유형, 및 상기 논의된 다른 요인들에 의해 좌우된다. 이는 일반적으로 상기 기재된 바와 동일한 투여량 및 투여 경로로, 또는 본원에 기재된 투여량의 약 1 내지 99%로, 또는 실험적으로/임상적으로 적절한 것으로 결정된 임의의 투여량 및 경로에 의해 사용된다.

[0234] 질환의 예방 또는 치료를 위해, 본 발명의 항체의 적절한 투여량 (단독으로 또는 하나 이상의 다른 추가의 치료제와 조합으로 사용될 때)은 치료될 질환의 유형, 항체의 유형, 질환의 중증도 및 경과, 항체가 예방 또는 치료 목적으로 투여되는지의 여부, 선행 요법, 환자의 임상 병력 및 항체에 대한 반응, 및 담당 의사의 결정에 따라 결정될 것이다. 항체는 한번에 또는 일련의 치료에 걸쳐 환자에게 적합하게 투여된다. 질환의 유형 및 중증도에 따라서, 예를 들어 1회 이상의 별개 투여에 의해서든 아니면 연속식 주입에 의해서든지 상관없이, 약 1 ㎍/kg 내지 15 mg/kg (예를 들어, 0.1 mg/kg 내지 10 mg/kg)의 항체가 환자에게 투여하기 위한 초기 투여량 후보

이다. 전형적인 1일 투여량 중 하나는 상기 언급된 인자에 따라 약 1 ㎍/kg 내지 100 mg/kg 이상의 범위일 수 있다. 수일 이상에 걸친 반복 투여의 경우, 치료는 일반적으로 상태에 따라 질환 증상이 원하는 수준으로 저해될 때까지 지속된다. 항체의 한 가지 예시적인 투여량은 약 0.05 mg/kg 내지 약 10 mg/kg 범위일 것이다. 따라서, 약 0.5 mg/kg, 2.0 mg/kg, 4.0 mg/kg 또는 10 mg/kg (또는 이들의 임의의 조합) 중 하나 이상의 용량이 환자에게 투여될 수 있다. 이러한 용량은 간헐적으로, 예를 들어 매주 또는 매 3 주마다 투여될 수 있다 (예를 들어, 약 2회 내지 약 20회, 또는 예를 들어 약 6회 용량의 항체가 환자에게 제공되도록). 보다 높은 초기 로딩 용량을 투여한 후, 1회 이상의 보다 낮은 용량을 투여할 수 있다. 그러나, 다른 투여 방식이 유용할 수 있다. 이러한 요법의 진행은 통상적인 기술 및 분석에 의해 쉽게 모니터링된다.

[0235] 치료할 적응증 및 당업계의 의사에게 통상적인 투약 관련 인자에 따라, 본 발명의 항체는 독성 및 부작용을 최소화하면서 상기 적응증의 치료에 효능이 있는 투여량으로 투여될 것이다.

[0236] 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 (이에 제한되지는 않음)에 의해 평가될 수 있다. 본원에 기재된 항혈관신생제는 종양 혈관계를 표적화하고, 반드시 신생물 세포 자체를 표적화하는 것은 아니기 때문에 독특한 부류의 항암 약물을 나타내고, 따라서 약물에 대한 임상 반응의 독특한 측정법 및 정의를 필요로 할 수 있다. 예를 들어, 2차원 분석에서 50% 초과의 종양 수축이 반응을 선언하는 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 영상화를 통한 반응의 측정을 포함하는, 요법의 효능을 결정하는 접근법을 이용할 수 있다.

[0237] 연령-관련 황반 변성 (AMD)의 치료에 대한 평가는 추가의 시력 상실 속도의 감소 또는 추가의 시력 상실의 예방을 포함하고, 이에 제한되지는 않는다. AMD 치료를 위해, 생체내 효능은 예를 들어 다음 중 하나 이상에 의해 측정될 수 있다: 기준선으로부터 요구되는 시간까지 최대 교정 시력 (BCVA)의 평균 변화의 평가, 기준선에 비해 요구되는 시간에서 15 글자 시력표 미만의 시력을 잃는 대상체의 비율의 평가, 기준선에 비해 요구되는 시간에서 15 글자 시력표 이상의 시력을 얻는 대상체의 비율의 평가, 요구되는 시간에서 20/2000의 스넬렌 근시가 (Snellen equivalent) 또는 이보다 낮은 시력을 갖는 대상체의 비율 평가, NEI 시력 기능의 설문 (Visual Functioning Questionnaire)의 평가, 플루오레세인 혈관조영술에 의해 평가되는 요구되는 시간에서의 CNV 크기 및 CNV 누출량의 평가 등.

[0238] V. 제약 제제

[0239] 항-α5β1 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 (문헌 [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, 완충액, 예를 들어 포스페이트, 시트레이트 및 다른 유기산; 항산화제, 예를 들어 아스코르브산 및 메티오닌; 방부제 (예를 들어, 옥타데실디메틸벤질 암모늄 클로라이드; 헥사메토늄 클로라이드; 벤즈알코늄 클로라이드; 페놀, 부틸 또는 벤질 알콜; 알킬 파라벤, 예를 들어 메틸 또는 프로필 파라벤; 카테콜; 레소르시놀; 시클로헥사놀; 3-펜타놀; 및 m-크레졸); 저분자량 (약 10개 미만의 잔기) 폴리펩티드; 단백질, 예를 들어 혈청 알부민, 젤라틴, 또는 이뮤노글로불린; 친수성 중합체, 예를 들어 폴리비닐피롤리돈; 아미노산, 예를 들어 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 히스티딘, 아르기닌, 또는 리신; 단당류, 이당류, 및 다른 탄수화물, 예를 들어 글루코스, 만노스, 또는 덱스트린; 킬레이팅제, 예를 들어 EDTA; 당, 예를 들어 수크로스, 만니톨, 트레할로스 또는 소르비톨; 염 형성 반대이온, 예를 들어 나트륨; 금속 착체 (예를 들어, Zn-단백질 착체); 및/또는 비이온계 계면활성제, 예를 들어 트윈(TWEEN)™, 플루로닉스(PLURONICS)™ 또는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)을 포함한다. 예시적인 항체 제제는 그 거명을 통해 본원에 참고로 도입된 WO98/56418에 기재되어 있다. 본원에서 예시적 제약상 허용되는 담체는 또한 간질성 약물 확산제, 예컨대 가용성 중성-활성 히알루로니다제 당단백질 (sHASEGP), 예를 들어 인간 가용성 PH-20 히알루로니다제 당단백질, 예컨대 rHuPH20 (힐레넥스(HYLENEX)®, 박스터 인터내셔널, 인크.(Baxter International, Inc.))을 포함한다. 특정 예시적 sHASEGP 및 사용 방법 (rHuPH20 포함)은 미국 특허 공개공보 제2005/0260186호 및 제2006/0104968호에 기재되어 있다. 한 측면에서, sHASEGP는 콘드로이티나제와 같은 하나 이상의 추가의 글리코사미노글리카나제와 조합된다. 피하 투여에 적합한 동결건조된 제제는 WO97/04801에 기재되어 있다. 이러한 동결건조 제제는 적합한 희석제를 사용하여 높은 단백질 농도로 재구성될

수 있고, 재구성된 제제가 본원에서 치료될 포유동물에게 피하 투여될 수 있다.

[0240] 본원에서의 제제는 치료될 특정 적응증에 필요하다면 1가지를 초과하는 활성 화합물, 바람직하게는 서로에게 역효과를 일으키지 않는 보완적인 활성이 있는 것들을 또한 함유할 수 있다. 예를 들어, 추가로 항신생물제, 성장 억제제, 세포독성제 및/또는 화학요법제를 제공하는 것이 바람직할 수 있다. 이러한 분자는 의도된 목적에 유효한 양으로 조합되어 적합하게 존재한다. 이러한 다른 작용제의 유효량은 제제 중에 존재하는 항체의 양, 질환 또는 장애 또는 치료법의 유형, 및 상기 논의된 다른 인자에 따라 달라진다. 이들은 일반적으로 본원에 기재된 바와 동일한 투여량 및 투여 경로 또는 이전에 사용되던 투여량의 약 1% 내지 99%로 사용된다.

[0241] 활성 성분은 또한 예를 들어 코아세르베이션 기술 또는 계면 중합에 의해 제조된 마이크로캡슐, 예를 들어 각각 히드록시메틸셀룰로스 또는 젤라틴-마이크로캡슐 및 폴리-(메틸메타크릴레이트) 마이크로캡슐에, 콜로이드성 약물 전달 시스템 (예를 들어, 리포좀, 알부민 미소구, 마이크로에멀젼, 나노입자 및 나노캡슐)에, 또는 매크로에멀젼에 포획될 수 있다. 이러한 기술은 문헌 [Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)]에 개시되어 있다.

[0242] 지속 방출형 제제를 제조할 수 있다. 지속 방출형 제제의 적합한 예는 길항제를 함유하는 고체 소수성 중합체의 반투과성 매트릭스를 포함하고, 이러한 매트릭스는 성형 용품, 예를 들어 필름 또는 마이크로캡슐의 형태이다. 지속 방출형 매트릭스의 예는 폴리에스테르, 히드로겔 (예를 들어, 폴리(2-히드록시에틸-메타크릴레이트) 또는 폴리(비닐알콜)), 폴리락티드 (미국 특허 제3,773,919호), L-글루탐산 및 에틸-L-글루타메이트의 공중합체, 비-분해성 에틸렌-비닐 아세테이트, 분해성 락트산-글리콜산 공중합체, 예컨대 루프론 데포(LUPRON DEPOT)™ (락트산-글리콜산 공중합체 및 류프롤리드 아세테이트로 이루어진 주사가능한 미소구), 및 폴리-D-(-)-3-히드록시부티르산을 포함한다.

[0243] 본 발명의 폴리펩티드 및 항체 또는 조성물을 세포 내로 전달하기 위해 리포펙틴 또는 리포좀이 사용될 수 있다. 항체 단편이 사용되는 경우, 표적 단백질의 결합 도메인에 특이적으로 결합하는 최소 크기의 억제 단편이 바람직하다. 예를 들어 항체의 가변-영역 서열을 기초로 하여, 표적 단백질 서열에 결합하는 능력을 보유하는 펩티드 분자를 디자인할 수 있다. 이러한 펩티드는 화학적으로 합성하고/하거나 재조합 DNA 기술에 의해 생산할 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Marasco et al., PNAS USA, 90: 7889-7893 (1993)]을 참조한다.

[0244] 활성 성분은 또한 예를 들어 코아세르베이션 기술 또는 계면 중합에 의해 제조된 마이크로캡슐, 예를 들어 각각 히드록시메틸셀룰로스 또는 젤라틴-마이크로캡슐 및 폴리-(메틸메타크릴레이트) 마이크로캡슐에, 콜로이드성 약물 전달 시스템 (예를 들어, 리포좀, 알부민 미소구, 마이크로에멀젼, 나노입자 및 나노캡슐)에, 또는 매크로에멀젼에 포획될 수 있다. 이러한 기술은 [Remington's Pharmaceutical Sciences, 상기 문헌]에 개시되어 있다.

[0245] 지속-방출 제제를 제조할 수 있다. 지속 방출형 제제의 적합한 예는 항체를 함유하는 고체 소수성 중합체의 반투과성 매트릭스를 포함하고, 이러한 매트릭스는 성형 용품, 예를 들어 필름 또는 마이크로캡슐의 형태이다. 지속 방출형 매트릭스의 예는 폴리에스테르, 히드로겔 (예를 들어, 폴리(2-히드록시에틸-메타크릴레이트) 또는 폴리(비닐알콜)), 폴리락티드 (미국 특허 제3,773,919호), L-글루탐산 및 γ 에틸-L-글루타메이트의 공중합체, 비-분해성 에틸렌-비닐 아세테이트, 분해성 락트산-글리콜산 공중합체, 예컨대 루프론 데포™ (락트산-글리콜산 공중합체 및 류프롤리드 아세테이트로 이루어진 주사가능한 미소구), 및 폴리-D-(-)-3-히드록시부티르산을 포함한다. 예컨대 에틸렌-비닐 아세테이트 및 락트산-글리콜산과 같은 중합체는 100일을 초과하여 분자를 방출할 수 있는 반면, 특정 히드로겔은 단백질을 더 짧은 기간 동안 방출한다. 캡슐화된 항체가 장기간 동안 신체 내에 유지될 때, 항체는 37℃에서 습기에 노출되어 변성 또는 응집하여 생물학적 활성을 상실하고, 가능하게는 면역원성이 변경될 수 있다. 수반된 메카니즘에 따라 안정화를 위한 합리적인 전략이 고안된다. 예를 들어, 티오-디술피드 상호 교환을 통해 분자간 S-S 결합 형성이 되도록 하는 응집 메카니즘이 밝혀질 경우, 안정화는 술프히드릴 잔기의 변형, 산성 용액으로부터의 동결건조, 습기 함량의 조절, 적절한 첨가제의 사용 및 특이적 중합체 매트릭스 조성물의 개발에 의해 달성할 수 있다.

[0246] 생체내 투여에 사용될 제제는 멸균되어야 한다. 이는 멸균 여과 막을 통한 여과에 의해 쉽게 달성된다.

[0247] VI. 항-α5β1 항체를 사용한 진단 및 영상화 방법

[0248] α5β1 폴리펩티드에 특이적으로 결합하는 표지된 항-α5β1 항체, 및 그의 유도체 및 유사체는 α5β1의 발현, 이상 발현 및/또는 활성과 연관된 질환 및/또는 장애의 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.

[0249] 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.

[0250] 본 발명의 추가의 실시양태는 동물 (예를 들어, 포유동물, 예를 들어 인간)에서 α5β1의 발현 또는 이상 발현과 연관된 질환 또는 장애를 진단하는 방법을 포함한다. 이 방법은 포유동물에서 α5β1 분자의 검출을 포함한다. 한 실시양태에서, VEGF 길항제의 투여 후에, 진단은 (a) 유효량의 표지된 항-α5β1 항체를 포유동물에게 투여하고, (b) 투여 후에, 표지된 α5β1 항체가 α5β1 분자가 발현되는 대상체의 부위에 우선적으로 집중될 수 있도록 (그리고, 비결합된 표지된 분자가 배경 수준으로 소실되도록) 일정 시간 간격 동안 기다리고; (c) 배경 수준을 결정하고; (d) 대상체에서 표지된 분자를 검출하는 것을 포함하고, 여기서 표지된 분자가 배경 수준보다 높게 검출되면, 이것은 대상체가 α5β1의 발현 또는 이상 발현과 연관된 특정 질환 또는 장애를 갖는다는 것을 나타낸다. 배경 수준은 검출된 표지된 분자의 양을 특정 시스템에 대해 이전에 결정된 기준값에 비교하는 것을 포함하는 다양한 방법에 의해 결정될 수 있다.

[0251] 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 발현을 검출하는데 유용한, 또 다른 항체-기반 방법에는 면역분석법, 예컨대 효소 결합 면역흡착 분석법 (ELISA) 및 방사성 면역분석법 (RIA)이 포함된다. 적합한 항체 분석 표지는 당업계에 공지되어 있고, 효소 표지, 예를 들어 글루코스 옥시다제; 방사성동위원소, 예를 들어 요오드 (^{131}I, ^{125}I, ^{123}I, ^{121}I), 탄소 (^{14}C), 황 (^{35}S), 트리튬 (^{3}H), 인듐 (^{115m}In, ^{113m}In, ^{112}In, ^{111}In), 및 테크네튬 (^{99}Tc, ^{99m}Tc), 탈륨 (^{201}Ti), 갈륨 (^{68}Ga, ^{67}Ga), 팔라듐 (^{103}Pd), 몰리브덴 (^{99}Mo), 제논 (^{133}Xe), 불소 (^{18}F), ^{153}Sm, ^{177}Lu, ^{159}Gd, ^{149}Pm, ^{140}La, ^{175}Yb, ^{166}Ho, ^{90}Y, ^{47}Sc, ^{186}Re, ^{188}Re, ^{142}Pr, ^{105}Rh, ^{97}Ru; 루미놀; 및 형광 표지, 예를 들어 플루오레세인 및 로다민, 및 비오틴을 포함한다.

[0252] 당업계에 공지된 기술을 본 발명의 표지된 항체에 적용할 수 있다. 상기 기술은 2관능성 접합제의 사용을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다 (예를 들어, 미국 특허 제5,756,065호; 제5,714,631호; 제5,696,239호; 제5,652,361호; 제5,505,931호; 제5,489,425호; 제5,435,990호; 제5,428,139호; 제5,342,604호; 제5,274,119호; 제4,994,560호; 및 제5,808,003호 참조).

[0253] 하나의 특정 실시양태에 따라, α5β1 폴리펩티드 발현 또는 과다발현은 세포의 표면 상에 존재하는 α5β1의 수준을 평가함으로써 (예를 들어, 항-α5β1 항체를 사용하는 면역조직화학 분석을 통해) VEGF 길항제 치료제의 투여 후에 진단 또는 예후 분석에서 결정된다. 대안적으로, 또는 추가로, 예를 들어 α5β1-코딩 핵산 또는 그의 상보체에 대응하는 핵산 기반 프로브를 사용하는 형광 계내 혼성화 (FISH; 1998년 10월 공개된 WO98/45479 참조), 서던 블롯팅, 노던 블롯팅, 또는 중합효소 연쇄 반응 (PCR) 기술, 예를 들어 실시간 정량적 PCR (RT-PCR)을 통해 세포 내의 α5β1 폴리펩티드-코딩 핵산 또는 mRNA의 수준을 측정할 수 있다. 또한, α5β1 과다발현은 예를 들어 항체 기반 분석 (또한, 예를 들어 1990년 6월 12일 허여된 미국 특허 제4,933,294호; 1991년 4월 18일 공개된 WO91/05264; 1995년 3월 28일 허여된 미국 특허 제5,401,638호; 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 생체외 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.

[0254] VII. 제품 및 키트

[0255] 본 발명의 다른 실시양태는 암 (예를 들어, 종양), 안구 질환 (예를 들어, 습성 AMD) 또는 자가면역 질환 및 관련 상태의 치료에 유용한 물질을 함유하는 제품이다. 제품은 용기, 및 용기 위에 있거나 용기와 연합된 라벨 또는 포장 삽입물을 포함한다. 적합한 용기는 예를 들어 병, 바이알, 시린지 등을 포함한다. 다양한 물질, 예컨대 유리 또는 플라스틱으로부터 용기가 형성될 수 있다. 일반적으로, 용기는 상태 치료에 효과적인 조성물을 보유하고 있고, 멸균 유입 포트를 가질 수 있다 (예를 들어, 용기는 피하 주사 바늘에 의해 뚫을 수 있는 마개

를 갖는 정맥내 용액 백 또는 바이알일 수 있다). 조성물 내의 하나 이상의 활성제는 본 발명의 VEGF 길항제 또는 α5β1 길항제 또는 VEGF 효능제 또는 α5β1 효능제이다. 라벨 또는 포장 삽입물은 해당 조성물이 특정 상태를 치료하는데 사용됨을 표시한다. 라벨 또는 포장 삽입물은 항체 조성물을 환자에게 투여하는 것에 관한 지침서를 더 포함할 것이다. 본원에 기재된 조합 요법제를 포함하는 제품 및 키트도 고려된다.

[0256] 포장 삽입물은 치료 제품의 시판되는 포장물 내에 통상적으로 포함되어 있으며 이러한 치료 제품의 사용에 관한 적응증, 사용법, 투여량, 투여, 금기사항 및/또는 경고에 대한 정보를 함유하는 지침서를 나타낸다.

[0257] 추가로, 제품은 제약상 허용되는 완충액, 예컨대 주사용 정균수 (BWFI), 인산염 완충 염수, 링거액 및 덱스트로스 용액을 포함하는 제2 용기를 더 포함할 수 있다. 이것은 상업적 및 사용자 관점에서 바람직한 다른 물질, 예를 들어 다른 완충액, 희석제, 필터, 바늘 및 시린지를 더 포함할 수 있다.

[0258] 임의로 제품과 함께 다양한 목적을 위해, 예를 들어 환자에서 α5β1 및/또는 VEGF의 단리 또는 검출을 위해 유용한 키트를 또한 제공한다. α5β1의 단리 및 정제를 위해, 키트는 비드 (예를 들어, 세파로스 비드)에 커플링된 항-α5β1 항체를 함유할 수 있다. 시험관내에서, 예를 들어 ELISA 또는 웨스턴 블롯에서 α5β1 및/또는 VEGF의 검출 및 정량을 위한 항체를 함유하는 키트를 제공할 수 있다. 제품과 마찬가지로, 키트는 용기, 및 용기 상의 또는 용기와 결합된 라벨 또는 포장 삽입물을 포함한다. 예를 들어, 용기는 본 발명의 하나 이상의 항-α5β1 항체를 포함하는 조성물을 보유한다. 예를 들어 희석제 및 완충액, 대조군 항체를 함유하는 추가의 용기가 포함될 수 있다. 라벨 또는 포장 삽입물은 조성물에 대한 설명 및 의도된 시험관내 또는 진단 용도에 대한 지침을 제공할 수 있다.

[0259] 달리 나타내지 않는다면, 본 실시예에서 언급되는 시판 시약은 제조업체의 지침에 따라 사용하였다. 하기 실시예 및 명세서 전반에 걸쳐 ATCC 기탁 번호로 확인된 세포의 공급원은 아메리칸 타입 컬쳐 컬렉션 (미국 버지니아주 매나사스)이다. 달리 언급되지 않는다면, 본 발명은 본원에서 상기 및 하기 문헌에 기재된 것과 같은 재조합 DNA 기술의 표준 절차를 이용하였다 (문헌 [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]).

[0260] 실시예

[0261] 다음 실시예는 예시하기 위해 제공되며, 본원에 청구된 본 발명을 제한하지 않는다. 당업자라면 실질적으로 동일한 결과를 산출하도록 변화 또는 변형시킬 수 있는 다양한 비임계적 파라미터들을 쉽게 인지할 것이다.

[0262] 실시예 1: 재료 및 방법

[0263] A. 비아코어 분석:

[0264] 본원에 기재된 항체의 결합 동역학 및 친화도를 결정하기 위해, 비아코어™-3000 기기를 사용하는 표면 플라스몬 공명 (SRP) 측정을 이용하였다. 우선 항체를 대략 150 RU (반응 단위)를 달성하도록 상이한 유동 세포 상에 미리-고정된 토끼 항-인간 Fc CM5 바이오센서 칩에 의해 포획하였다. 동역학 측정을 위해, 인간 인테그린 α5β1의 2-배 연속 희석액 (300 nM 내지 1.2 nM)을 PBT 완충액 (PBS + 0.05% 트윈 20) 중에서 30 ㎕/분의 유속으로 25℃에서 주입하였다. 결합 속도 (k_{on}) 및 해리 속도 (k_{off})를 단순 일-대-일 랭뮤어 결합 모델 (비아코어 평가 소프트웨어 버전 3.2)을 사용하여 계산하였다. 평형 해리 상수 (K_D)는 k_{off}/k_{on} 비로 계산하였다.

[0265] B. U937 세포를 사용하는 피브로넥틴 결합 분석

[0266] PBS pH 7.4에 희석된 10 ㎍/ml 피브로넥틴 (알 앤드 디 시스템즈(R & D Systems)) 100 ㎕를 96-웰 플레이트 (넌크 맥시소르프(Nunc MaxiSorp))의 웰에 첨가하고, 2 내지 8℃에서 밤새 인큐베이션하였다. 플레이트를 PBS pH 7.4 200 ㎕로 3회 세척하였다. PBS pH 7.4/1% BSA 200 ㎕를 모든 웰에 첨가하고, 플레이트를 부드럽게 교반하면서 실온에서 60분 이상 동안 인큐베이션하였다. 플레이트를 PBS pH 7.4 200 ㎕로 3회 세척하였다.

[0267] 희석된 항-α5β1 항체 50 ㎕를 각각의 웰에 첨가하고 (10 ㎍/mL 연속 희석 1:3 10회), 직후에 분석 배지 (RPMI 1640 (메디아 프렙(Media Prep) A0806), 5 mg/mL BSA, 1 mM L-글루타민, 1 mM $MgCl_2$) 중 $1x10^6$개 세포/mL의 농

도의 U937 세포 (ATCC, Cat#CRL-1593.2) 50 ㎕를 첨가하였다.

[0268] 플레이트를 30분 동안 37℃에서 인큐베이션하고, 결합하지 않은 세포를 버리고, 플레이트를 분석 배지 150 ㎕로 2회 세척하였다. 분석 배지 100 ㎕ 및 셀-타이터 글로(Cell-Titer Glow) (프로메가(Promega) Cat#G7573) 100 ㎕를 각각의 웰에 첨가하였다. 플레이트를 실온에서 10 내지 15분 동안 인큐베이션하고, 뚜껑을 덮었다. 발광을 빅토르(VICTOR) ^{2}V (퍼킨-엘머(Perkin-Elmer)) 플레이트 판독기 상에서 검출하고, 4-파라미터 비선형 최소제곱법 핏팅을 이용하여 분석에 사용된 항체의 농도와 관련하여 발광 단위를 분석하여 IC_{50} 값을 수득하였다.

[0269] C. α5β1을 사용하는 피브로넥틴 결합 분석

[0270] PBS에 희석된 1 ㎍/ml 피브로넥틴 (알 앤드 디 시스템즈) 25 ㎕를 384-웰 플레이트 (넌크 맥시소르프)의 웰에 첨가하고, 2 내지 8℃에서 밤새 인큐베이션하였다. 플레이트를 PBT 완충액 80 ㎕로 3회 세척하였다. PBS/1% BSA 50 ㎕를 모든 웰에 첨가하고, 플레이트를 부드럽게 교반하면서 실온에서 60분 이상 동안 인큐베이션한 후에 PBT 완충액 80 ㎕로 3회 세척하였다.

[0271] 항-α5β1 항체 (30 ㎍/mL)를 1:3 11회 연속 희석하였다. 연속 희석된 항-α5β1 항체 50 ㎕를 0.65 mL 마이크로 튜브에 첨가하고, ELISA 완충액 (150 mM NaCl, 10 mM 트리스, pH 7.5, 5 mg/mL BSA, 1 mM $MnCl_2$) 중 200 ng/mL α5β1 (알 앤드 디 시스템즈) 50 ㎕와 부드럽게 교반하면서 60분 동안 실온에서 사전혼합 (1:1)하였다. 사전혼합된 α5β1 및 항-α5β1 항체 25 ㎕를 피브로넥틴 코팅된 웰에 첨가하고, 플레이트를 부드럽게 교반하면서 실온에서 60분 동안 인큐베이션하였다. 플레이트를 PBT 완충액으로 6회 세척하고, ELISA 완충액 중 100 ng/mL 항-β1-비오틴을 각각의 웰에 첨가하고, 플레이트를 부드럽게 교반하면서 실온에서 60분 동안 인큐베이션하였다. 플레이트를 PBT 완충액 80 ㎕로 6회 세척하고, 스트렙타비딘-HRP (ELISA 완충액 중 1:50,000, GE 헬스케어(GE Healthcare)) 25 ㎕를 각각의 웰에 첨가한 후에, 플레이트를 부드럽게 교반하면서 실온에서 60분 동안 인큐베이션하였다. 플레이트를 PBT 완충액 80 ㎕로 6회 세척하고, TMB 기질 (키르크가드 앤드 페리 레보러토리즈(Kirkgaard and Perry Laboratories)) 25 ㎕를 각각의 웰에 첨가하고, 플레이트를 실온에서 약 6분 동안 인큐베이션하고, 반응을 1 M 인산 25 ㎕로 중단시켰다. 흡광도를 450 nm에서 판독하고, IC_{50} 값을 상기 섹션 B에 기재된 바와 같이 분석하였다.

[0272] D. HUVEC 이동 분석

[0273] HUVEC 세포를 표준 배지에서 80% 전면성장률까지 성장시켰다. 세포를 트립신화하고, 계수하고, 0.1% BSA를 포함한 EBM-2 배지에 5 x 10^{5}개 세포/ml의 농도로 재현탁시켰다. 분석을 위해, 웰 하나 당 세포 (5 x 10^{4}개 세포/웰) 100 ㎕를 BD 팔콘(Falcon) HTS 다중웰 시스템 24 웰 (BD Ref: 351185, 공경 크기 8 ㎛)에 플레이팅하였다. HTS 플레이트를 피브로넥틴 (1 내지 2 ㎍/ml)으로 밤새 사전-코팅하였다. 플레이트를 PBS로 세척하고, 500 ㎕ (EBM + 0.1% BSA) 용액을 바닥 챔버에 첨가하였다. 각각의 샘플에 대해, 3 내지 6개 웰을 사용하였다. 음성 대조군 웰에는 이동 자극물질 (예를 들어, VEGF)을 첨가하지 않았다.

[0274] 분석을 시작하기 위해, 세포 (5 x 10^{4}개 세포/웰) 100 ㎕를 상부 챔버에 첨가하였다. 하부 챔버는 배지 (EBM + 0.1% BSA) 500 ㎕를 함유하였다. 항-인테그린 α5β1 항체 및 이소형 대조군을 일반적으로 0 ㎍/ml, 1 ㎍/ml 또는 5 ㎍/ml의 최종 농도에서 세포와 함께 상부 챔버에 첨가하고, 15분 동안 인큐베이션한 후에 이동 자극물질 (VEGF)을 하부 챔버에 첨가하였다.

[0275] 자극물질 (10 ng/ml VEGF-A)을 하부 챔버에 첨가하고, 플레이트를 4 내지 6시간 동안 또는 밤새 인큐베이션하였다. 세포를 스폰지 면봉을 사용하여 하부 챔버로부터 긁어내고, PBS를 첨가한 후에 상부 챔버로부터 세포를 다시 긁어냈다. 하부 챔버로부터 배지를 따라 버리고, 세포를 100% 메탄올 500 ㎕로 5분 동안 고정시켰다.

[0276] 이어서, 세포를 사이톡스(SYTOX)® 그린 핵산 염료 (PBS 중 1:5000 또는 1:10000 희석) (몰레큘라 프로브스(Molecular Probes) S7020) 500 ㎕로 10분 이상 동안 (암실에서) 염색하였다. 이어서, 현미경을 사용하여 각각의 웰의 개별 사진을 찍었다. 악시오비전(AxioVision) AC 프로그램 및 5x 대물렌즈를 사용하여 사진을 찍었다.

[0277] 이미지J(ImageJ)를 사용하여 결과를 분석하였다 (최소 5 픽셀, 빈 5). 웰 하나 당 세포의 수를 기록하고, 마이크로소프트 엑셀(Microsoft Excel)을 사용하여 분석하였다.

[0278] 실시예 2: 항-α5β1 항체의 생성

[0279] 재조합 인간 α5β1 세포외 도메인 폴리펩티드로 햄스터를 면역화시켜 항 α5β1 항체를 생성하였다. 도 1 및 2에 열거된 VH 및 VL 서열을 포함하는 햄스터 모노클로날 항체 클론 18C12를 선별하였다.

[0280] 단지 CDR-H3 접촉 영역이 상이한 2개의 컨센서스 $VL_{\kappa1}/VH_{III}$ 프레임워크: h18C12.v1.1 및 h18C12.v2.1로 햄스터 18C12로부터의 경쇄를 클로닝하여 키메라 햄스터 18C12의 2가지 버전, h18C12.v1.1 및 h18C12.v2.1을 생성하였다. 구체적으로, h18C12.v1.1의 CDR-H3 접촉 영역은 하기 잔기를 포함하고: $C^{92}A^{93}R^{94}$, h18C12.v2.1의 CDR-H3 접촉 영역은 하기 잔기를 포함한다: $C^{92}T^{93}S^{94}$. h18C12.v1.1 및 h18C12.v2.1은 둘 모두 파지 상에 Fab 포맷으로 성공적으로 디스플레이되고, 파지 경쟁 ELISA에 의해 결합이 관찰되었다. h18C12.v1.1과 h18C12.v2.1 사이에서는 결합에서 유의한 차이가 관찰되지 않았다. 추가의 인간화를 위한 h18C12.v1.1을 선별하였다. h18C12.v1.1의 대부분의 경쇄 프레임워크를 경쇄의 Y36, A43 및 Y49 잔기를 제외하고 인간 컨센서스 람다 IV 프레임워크로 변화시켜 인간화 18C12.v3을 생성하였다. 또한, 인간 VH_{III} 프레임워크에 G49 및 D73 잔기가 유지되었다.

[0281] h18C12.v3을 친화도 성숙시키고, 하기 클론을 생성하였다: h18C12.v6; h18C12.v7; h18C12.v9; h18C12.v15; h18C12.v16; h18C12.v28; h18C12.v30; h18C12.v51; h18C12.v54; h18C12.v70; h18C12.v78. 각각의 클론에 대한 CDR 서열을 도 3에 열거하였다. h18C12.v6 클론에 대한 CDR 서열을 다음과 같이 변형시켰다: CDR-L2: D50cS 및 D56S; CDR-H1: N31A; 및 CDR-H2: N53A. 이어서, 변형된 CDR 서열을 변형된 인간 λIII//VHIII 프레임워크에 삽입하여 h18C12.v6.1Lam3 (h18C12.v6.1) 및 h18C12.v6.2Lam3 (h18C12.v6.2)을 생성하였다. h18C12.v6.1에 대한 변형된 인간 λIII 프레임워크는 하기 변형을 함유하였다: L46Y; V47L; I48M; N69A; A71R; 및 G77N. h18C12.v6.2에 대한 변형된 인간 λIII 프레임워크는 하기 변형을 함유하였다; N69A; A71R; 및 G77N. 변형된 VHIII 프레임워크는 하기 변형을 함유하였다: S49G 및 N73D.

[0282] 클론 h18C12.v6.1을 CDR-L2 ($N^{50a}S^{50b}S^{50c}G^{50d}$)에서 아스파라긴 (N)이 제거되도록 추가로 변형시켰다. 하기 클론이 생성되었다: h18C12.v6.1.1; h18C12.v6.1.2; h18C12.v6.1.3; h18C12.v6.1.4; 및 h18C12.v6.1.5. 각각의 h18C12.v6.1 클론에 대한 위치 50a, 50b, 50c 및 50d에서의 CDR-L2 서열을 도 7에 열거하였다.

[0283] 실시예 3: 파지 경쟁 ELISA

[0284] 맥시소르프™ 마이크로타이터 플레이트를 PBS 중 5 ㎍/ml의 재조합 인간 인테그린 α5β1 (알 앤드 디)로 코팅한 후에, PBST 완충액 (PBS 중 0.5% BSA 및 0.05% 트윈 20)으로 실온에서 1시간 동안 차단하였다. 배양 상청액으로부터의 파지를 조직-배양 마이크로타이터 플레이트에서 1시간 동안 PBST 완충액 중 연속 희석된 인간 인테그린 α5β1과 인큐베이션하고, 이후에 혼합물 80 ㎕를 15분 동안 표적-코팅된 웰로 옮겨 결합하지 않은 파지를 포획하였다. 플레이트를 PBT 완충액 (PBS 중 0.05% 트윈 20)으로 세척하고, HRP-접합된 항-M13 (아머샴 파마시아 바이오텍(Amersham Pharmacia Biotech))을 40분 동안 첨가하였다 (PBST 완충액 중 1:5000). 플레이트를 PBT 완충액으로 세척하고, 테트라메틸벤지딘 기질 (키르크가드 앤드 페리 레보러토리즈, 미국 매릴랜드주 게이더스버그)을 첨가하여 발색시켰다. 450 nm에서의 흡광도를 용액 중 표적 농도의 함수로 플롯팅하여 파지 IC_{50}을 결정하였다. 이를 파지의 표면 상에 디스플레이된 Fab 클론에 대한 친화도 추정치로 사용하였다. 도 4는 인간 α5β1 인테그린에 대한 친화도 성숙 18C12 변이체 h18C12.v3; h18C12.v6; h18C12.v7; h18C12.v9; h18C12.v15; h18C12.v16; h18C12.v28; h18C12.v30; h18C12.v51; h18C12.v54; h18C12.v70; 및 h18C12.v78의 결합을 입증하는 파지 경쟁 분석으로부터의 결과를 도시한다.

[0285] 실시예 4: 비아코어에 의한 항체 친화도 결정

[0286] 키메라 18C12, h18C12.v6.1, h18C12.v6.1.1, h18C12.v6.1.2, h18C12.v6.1.3, h18C12.v6.1.4, h18C12.v6.1.5 IgG의 결합 동역학 및 친화도를 결정하기 위해, 실시예 1에 기재된 바와 같이 비아코어™-3000 기기를 사용하는 표면 플라스몬 공명 (SRP) 측정을 사용하였다.

[0287] 도 5는 인간 α5β1 인테그린에 대한 친화도 성숙 18C12 변이체의 결합의 비아코어 분석으로부터의 결과를 도시한다. 도 6은 인간 α5β1 인테그린에 대한 키메라 18C12 (도 1에 열거된 햄스터 VL 및 VH 서열 및 IgG1의 Fc 부분을 포함하는 18C12) 및 h18C12.v6.1의 결합의 비아코어 분석으로부터의 결과를 도시한다. 데이터는 h18C12.v6.1이 인간 α5β1 인테그린에 대한 햄스터 18C12의 결합 친화도보다 대략 2배 더 높은 인간 α5β1 인테그린에 대한 결합 친화도를 갖는다는 것을 입증한다. 도 7은 각각의 h18C12.v6.1 클론에 대한 비아코어 분석으로부터의 결과를 도시한다.

[0288] 실시예 5: 18C12 항체는 피브로넥틴에 대한 결합을 억제한다

[0289] 피브로넥틴에 대한 결합에 대한 키메라 18C12 및 h18C12.v6.1 또는 h18C12.v6.1.5 IgG의 효과를 비교하기 위해, 상기 실시예 1에 기재된 피브로넥틴 결합 분석을 사용하였다.

[0290] 도 8은 키메라 18C12 및 h18C12.v6.1이 피브로넥틴에 대한 U937 세포의 결합을 방해하는 능력을 비교하는 피브로넥틴 결합 분석의 결과를 도시한다. 도 9는 햄스터 18C12 및 h18C12.v6.1.5가 피브로넥틴에 대한 U937 세포의 결합을 방해하는 능력을 비교하는 피브로넥틴 결합 분석의 결과를 도시한다. 도 10은 햄스터 18C12 및 h18C12.v6.1.5가 피브로넥틴에 대한 재조합 $\alpha_5\beta_1$ 세포외 도메인의 결합을 방해하는 능력을 비교하는 피브로넥틴 결합 분석의 결과를 도시한다. 데이터는 햄스터 18C12, 키메라 18C12, h18C12.v6.1, 및 h18C12.v6.1.5가 피브로넥틴에 대한 U937 세포 또는 재조합 $\alpha_5\beta_1$ 세포외 도메인의 결합을 억제한다는 것을 입증한다.

[0291] 실시예 6: 18C12 항체는 HUVEC 이동을 억제한다

[0292] 키메라 18C12 및 h18C12.v6.1 IgG의 HUVEC 세포의 이동에 대한 효과를 비교하기 위해, 상기 실시예 1에 기재된 HUVEC 이동 분석을 사용하였다.

[0293] 도 11은 키메라 18C12 및 h18C12.v6.1이 피브로넥틴 상에서 HUVEC 세포의 이동을 방해하는 능력을 비교하는 HUVEC 이동 분석의 결과를 도시한다. 데이터는 키메라 18C12 및 h18C12.v6.1이 피브로넥틴 상에서 HUVEC 세포의 이동을 억제한다는 것을 입증한다.

[0294] 실시예 7: 배아 발생 분석

[0295] 키메라 α5β1 인테그린 (인간 α5 및 뮤린 β1)을 발현하는 α5 트랜스제닉 마우스를 배아 발생 분석에 사용하여 본원에 기재된 18C12 항체의 효능을 입증하였다. 인간 α5를 발현하고, 뮤린 α5는 발현하지 않는 수컷 트랜스제닉 마우스를 인간 α5 및 뮤린 α5에 대한 이종접합체를 발현하지 않는 암컷 마우스와 교배하였다. 교미 9.5일 후부터 시작하여 수태 중인 마우스에게 10 mg/kg 항-α5β1 항체 (h18C12.v6.1.5) 또는 음성 대조군 항체를 2x/주 복강내 주사하였다. 교미 14.5일 후에, 배아를 수집하고, 유전자형을 결정하고, 배아 혈관계를 평가하였다. 결과는 하기 표에 요약하였다.

[0296]

처치	인테그린 α5 발현	혈관 발생
h18C12.v6.1.5	인간 α5 단독	출혈, 발육방해 및 광범위한 전신 부종
h18C12.v6.1.5	뮤린 α5 단독	정상
음성 대조군 항체	인간 α5 단독	정상
음성 대조군 항체	뮤린 α5 단독	정상

[0297] 이들 결과는 h18C12.v6.1.5가 혈관 발생 동안 생체내에서 α5β1 인테그린 기능을 파괴한다는 것을 입증한다.

[0298] 실시예 8: 종양 동종이식 분석

[0299] C57/B16 동종이식 종양 모델을 본원에 기재된 18C12 항체의 효능을 입증하기 위한 연구에 사용하였다. C57/B16 종양 세포를 뮤린 α5 녁아웃::인간 α5 트랜스제닉 마우스에 이식하고, 이 마우스를 항-α5β1 항체로 처치하였다.

[0300] 확립된 종양을 보유하는 마우스를 모든 그룹이 유사한 출발 종양 부피를 갖도록 4개의 그룹으로 무작위적으로 추출하였다. 투여 처방은 다음과 같다:

[0301] (1) 음성 대조군 항체 (13.5 mg/kg, 2x/주)

[0302] (2) 항-VEGF 항체 (3.5 mg/kg, 2x/주) + 음성 대조군 항체 (10 mg/kg, 2x/주)

[0303] (3) 음성 대조군 항체 (3.5 mg/kg, 2x/주) + 항-α5β1 항체 (18C12) (10 mg/kg, 2x/주)

[0304] (4) 항-VEGF 항체 (3.5 mg/kg, 2x/주) + 항-α5β1 항체 (18C12) (10 mg/kg, 2x/주)

[0305] 종양의 길이 및 폭을 캘리퍼를 사용하여 1주에 2회 측정하고, 종양 부피를 하기 식을 사용하여 계산하였다: 종양 부피 (mm^3) = (w^2 x l)/2 (여기서, w = 폭 및 l = 길이 (mm)). 성장 속도를 반영시키기 위해 종양 부피를 시간에 대해 플롯팅하였다.

[0306] 실시예 9: 종양 이종이식 분석

[0307] 종양 이종이식 분석을 본원에 기재된 18C12 항체의 효능을 입증하기 위한 연구에 사용하였다. 루시페라제 리포터 유전자가 있는 인간 U87 신경교종 세포를 누드 마우스의 뇌에 이식하고, 마우스를 항-α5β1 항체로 처치하였다.

[0308] 확립된 종양을 보유하는 마우스를 생물발광 영상화를 이용하여 영상화하고, 모든 그룹이 유사한 출발 종양 부담을 갖도록 3개의 그룹으로 무작위적으로 추출하였다. 투여 처방은 다음과 같다:

[0309] (1) 음성 대조군 항체 (두드러기쑥) (5 mg/kg, 2x/주) + 항-gD (10 mg/kg, 2x/주)

[0310] (2) 항-VEGF 항체 (B20-4.1) (5 mg/kg, 2x/주) + 음성 대조군 항체 항-gD (10 mg/kg, 2X/주)

[0311] (3) 항-VEGF 항체 (B20-4.1) (5 mg/kg, 2x/주) + 항-α5β1 항체 (h18C12.v6.1.5) (10 mg/kg, 2x/주)

[0312] 종양 세포의 수술 이식 후에 이들 마우스의 생존을 매일 모니터링하였다. 항-VEGF와 조합된 항-α5β1 항체 h18C12.v6.1.5로의 처치는 항-VEGF 단독에 비해 마우스의 생존을 유의하게 향상시켰다. 결과를 도 12에 나타내었다. 또한, 생물발광 영상화를 이용하여 이식 1, 3, 4 및 5주 후에 종양 부담을 측정하였다. 항-VEGF와 조합된 항-α5β1 항체 h18C12.v6.1.5로 처치된 마우스는 항-VEGF 단독으로 처치된 마우스에 비해 종양 부담이 감소하였다. 결과를 도 13에 나타내었다.

[0313] 본원에 인용된 모든 문헌 (예를 들어, 특허, 공개된 특허 출원 및 진뱅크 기탁 번호 포함)은 이들 참고문헌이 각각 구체적으로 및 개별적으로 참고로 도입되는 것과 같이 그 전문이 모든 목적을 위해 본원에 참고로 도입된다.

도면

도면1a

카바트 - CDR L1: 24–34
코티아 - CDR L1: 24–34
접촉 - CDR L1: 30–36

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	A	B	C	D	28	29	30	31	32	33	34	35	36
hum 람다 III	-	S	E	L	T	Q	D	-	P	A	V	S	V	A	L	G	Q	T	V	R	I	T	C	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	W	Y
햄스터 18C12	Q	P	V	L	T	Q	S	-	P	S	A	S	A	S	L	G	N	S	V	K	I	T	C	T	L	S	S	Q				H	S	T	Y	T	I	G	W	Y
h18C12.v1.1	D	I	V	L	T	Q	S	-	P	S	A	S	A	S	L	G	N	S	V	K	I	T	C	T	L	S	S	Q				H	S	T	Y	T	I	G	W	Y
h18C12.v3	E	P	V	L	T	Q	S	-	P	S	A	S	A	S	L	G	A	S	V	K	L	T	C	T	L	S	S	Q				H	S	T	Y	T	I	G	W	Y
h18C12.v6	E	P	V	L	T	Q	S	-	P	S	A	S	A	S	L	G	A	S	V	K	L	T	C	T	L	S	S	Q				H	S	T	Y	T	I	G	W	Y
h18C12.v6.1.Lam3	S	S	E	L	T	Q	D	-	P	A	V	S	V	A	L	G	Q	T	V	R	I	T	C	T	L	S	S	Q				H	S	T	Y	T	I	G	W	Y
h18C12.v6.2.Lam3	S	S	E	L	T	Q	D	-	P	A	V	S	V	A	L	G	Q	T	V	R	I	T	C	T	L	S	S	Q				H	S	T	Y	T	I	G	W	Y
h18C12.v6.1.5	S	S	E	L	T	Q	D	-	P	A	V	S	V	A	L	G	Q	T	V	R	I	T	C	T	L	S	S	Q				H	S	T	Y	T	I	G	W	Y

도면1b

카바트 - CDR L2 (50–56)
코티아 - CDR L2 (50–56)
접촉 - CDR L2 (46–55)

카바트#	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	A	B	C	D	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72
hum 람다 III	Q	Q	K	P	G	Q	A	P	V	L	V	I	Y	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	G	I	P	D	R	F	S	G	S	S	S	G	N	T	A	S
햄스터 18C12	Q	Q	H	P	D	K	A	P	K	Y	V	M	Y	L	N	S	D	G	S	H	N	K	G	D	G	I	P	D	R	F	S	G	S	S	S	G	A	H	R	Y
h18C12.v1.1	Q	Q	H	P	D	K	A	P	K	Y	V	M	Y	L	N	S	D	G	S	H	N	K	G	D	G	I	P	D	R	F	S	G	S	S	S	G	A	H	R	Y
h18C12.v3	Q	Q	Q	P	G	K	A	P	R	Y	L	M	Y	L	N	S	D	G	S	H	N	K	G	D	G	I	P	D	R	F	S	G	S	S	S	G	A	D	R	Y
h18C12.v6	Q	Q	Q	P	G	K	A	P	R	Y	L	M	Y	L	N	S	D	G	S	H	N	K	G	D	G	I	P	D	R	F	S	G	S	S	S	G	A	D	R	Y
h18C12.v6.1.Lam3	Q	Q	K	P	G	Q	A	P	V	Y	L	M	Y	L	N	S	S	G	S	H	N	K	G	S	G	I	P	D	R	F	S	G	S	S	S	G	A	T	R	S
h18C12.v6.2.Lam3	Q	Q	K	P	G	Q	A	P	V	L	V	I	Y	L	N	S	S	G	S	H	N	K	G	S	G	I	P	D	R	F	S	G	S	S	S	G	A	T	R	S
h18C12.v6.1.5	Q	Q	K	P	G	Q	A	P	V	Y	L	M	Y	L	N	S	D	S	S	H	N	K	G	S	G	I	P	D	R	F	S	G	S	S	S	G	A	T	R	S

카바트 - CDR L3 (89–97)
코티아 - CDR L3 (89–97)
접촉 - CDR L3 (89–96)

카바트#	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	A	B	96	97	98	99	100	101	102	서열
hum 람다 III	L	T	I	T	G	A	Q	A	E	D	E	A	D	Y	Y	C	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	F	G	G	G	T	1
햄스터 18C12	L	S	I	S	N	I	Q	P	E	D	E	A	D	Y	F	C	G	S	S	Y	S	S	G	-	-	Y	V	F	G	S	G	T	2
h18C12.v1.1	L	S	I	S	N	I	Q	P	E	D	E	A	D	Y	F	C	G	S	S	Y	S	S	G	-	-	Y	V	F	G	S	G	T	3
h18C12.v3	L	T	I	S	N	L	Q	S	E	D	E	A	D	Y	Y	C	G	S	S	Y	S	S	G	-	-	Y	V	F	G	G	G	T	4
h18C12.v6	L	T	I	S	N	L	Q	S	E	D	E	A	D	Y	Y	C	A	A	Y	Y	A	Y	G	-	-	Y	V	F	G	G	G	T	5
h18C12.v6.1.Lam3	L	T	I	T	N	A	Q	A	E	D	E	A	D	Y	Y	C	A	A	Y	Y	A	Y	G	-	-	Y	V	F	G	G	G	T	6
h18C12.v6.2.Lam3	L	T	I	T	N	A	Q	A	E	D	E	A	D	Y	Y	C	A	A	Y	Y	A	Y	G	-	-	Y	V	F	G	G	G	T	7
h18C12.v6.1.5	L	T	I	T	N	A	Q	A	E	D	E	A	D	Y	Y	C	A	A	Y	Y	A	Y	G	-	-	Y	V	F	G	G	G	T	8

도면2a

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	A	B	36	37	38	39	40
																															카바트- CDR H1											
																										코티아 - CDR H1																
																														접촉 - CDR H1												
햄스터18C12	E	V	H	L	V	E	S	G	G	D	L	V	Q	P	G	S	S	L	K	L	S	C	A	A	S	G	F	T	F	S	N	R	W	I	Y			W	V	R	Q	A
hum VH III	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	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	W	N	W	V	R	Q	A
h18C12.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	F	T	F	S	N	R	W	I	Y			W	V	R	Q	A
h18C12.v6	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	F	T	F	S	N	R	W	I	Y			W	V	R	Q	A
h18C12.v6.1.Lam3	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	F	T	F	S	A	R	W	I	Y			W	V	R	Q	A
h18C12.v6.2.Lam3	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	F	T	F	S	A	R	W	I	Y			W	V	R	Q	A
h18C12.v6.1.5	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	F	T	F	S	A	R	W	I	Y	-	-	W	V	R	Q	A

도면2b

카바트 - CDR H2

코티아 - CDR H2

접촉 - CDR H2

카바트#	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	A	B	C	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
햄스터 18C12	P	G	K	G	L	E	W	V	G	G	I	K	T	K	P	N	I	Y	A	T	E	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	R	D	D	S	K	N	S	L	Y
hum VH III	P	G	K	G	L	E	W	V	S	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	R	F	T	I	S	R	D	N	S	K	N	T	L	Y
h18C12.v3	P	G	K	G	L	E	W	V	G	G	I	K	T	K	P	N	I	Y	A	T	E	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	R	D	D	S	K	N	T	L	Y
h18C12.v6	P	G	K	G	L	E	W	V	G	G	I	K	T	K	P	N	I	Y	A	T	E	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	R	D	D	S	K	N	T	L	Y
h18C12.v6.1.Lam3	P	G	K	G	L	E	W	V	G	G	I	K	T	K	P	A	I	Y	A	T	E	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	R	D	D	S	K	N	T	L	Y
h18C12.v6.2.Lam3	P	G	K	G	L	E	W	V	G	G	I	K	T	K	P	A	I	Y	A	T	E	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	R	D	D	S	K	N	T	L	Y
h18C12.v6.1.5	P	G	K	G	L	E	W	V	G	G	I	K	T	K	P	A	I	Y	A	T	E	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	R	D	D	S	K	N	T	L	Y

카바트 - CDR H3

코티아 - CDR H3

접촉 - CDR H3

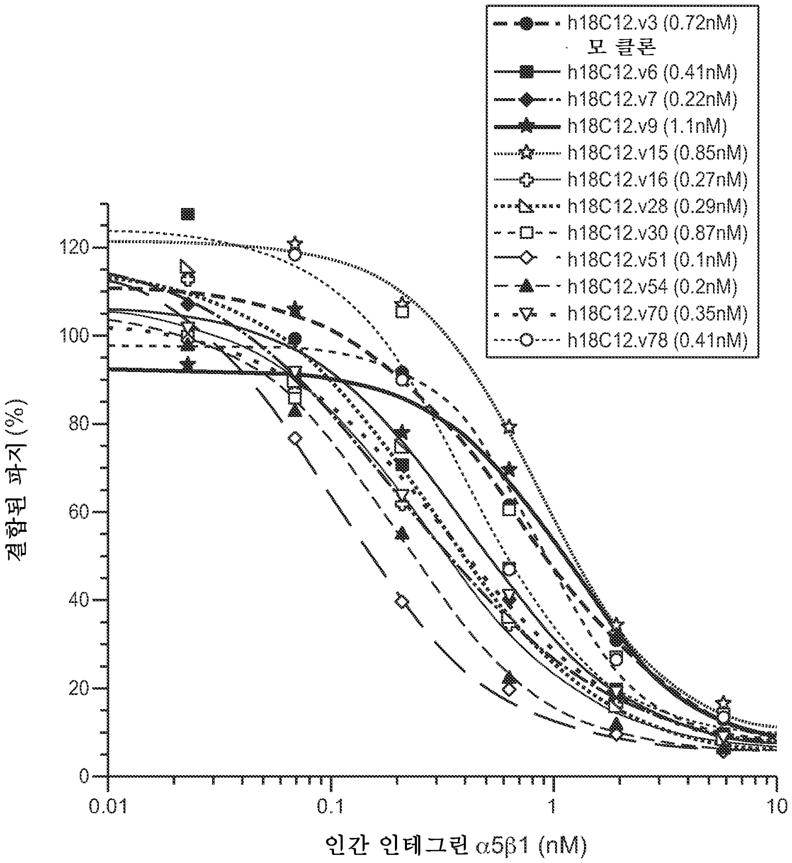
카바트#	80	81	82	A	B	C	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	A	101	102	103	104	105	106	107	서열
햄스터18C12	L	Q	M	N	T	L	R	V	D	D	T	A	I	Y	Y	C	T	S	L	T	G	M	R	Y	F	D	Y	W	G	Q	G	T	9
hum VH III	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	X	X	X	X	X	X	X	X	X	W	G	Q	G	T	10
h18C12.v3	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	L	T	G	M	R	Y	F	D	Y	W	G	Q	G	T	11
h18C12.v6	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	L	T	G	M	K	Y	F	D	Y	W	G	Q	G	T	12
h18C12.v6.1.Lam3	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	L	T	G	M	K	Y	F	D	Y	W	G	Q	G	T	13
h18C12.v6.2.Lam3	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	L	T	G	M	K	Y	F	D	Y	W	G	Q	G	T	13
h18C12.v6.1.5	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	L	T	G	M	K	Y	F	D	Y	W	G	Q	G	T	14

도면3

클론	CDR-L1													CDR-L2												CDR-L3									
	24	25	26	27	A	28	29	30	31	32	33	34		50	A	B	C	D	51	52	53	54	55	56		89	90	91	92	93	94	95	96	97	
h18C12.v3	T	L	S	S	Q	H	S	T	Y	T	I	G	21	L	N	S	D	G	S	H	N	K	G	D	25	G	S	S	Y	S	S	G	Y	V	29
h18C12.v6	T	L	S	S	Q	H	S	T	Y	T	I	G	21	L	N	S	D	G	S	H	N	K	G	D	25	A	A	Y	Y	A	Y	G	Y	V	30
h18C12.v7	T	L	S	S	Q	H	S	T	Y	T	I	G	21	L	N	S	D	G	S	H	N	K	G	D	25	G	Y	S	Y	Y	S	G	Y	V	31
h18C12.v9	T	L	S	S	Q	H	S	T	Y	T	I	G	21	L	N	S	D	G	S	H	N	K	G	D	25	G	S	S	Y	S	T	G	Y	V	32
h18C12.v15	T	L	S	P	Q	H	F	T	Y	K	I	D	22	L	N	S	D	G	S	H	N	K	G	D	25	G	S	S	Y	S	S	G	Y	V	29
h18C12.v16	T	L	S	S	N	H	S	I	Y	T	I	S	23	L	N	S	D	G	S	H	N	K	G	D	25	G	S	S	Y	S	S	G	Y	V	29
h18C12.v28	T	L	S	S	Q	H	S	T	Y	T	I	G	21	L	N	S	D	G	S	H	N	K	G	D	25	G	A	S	Y	S	S	G	Y	I	33
h18C12.v30	T	L	T	T	Q	H	S	T	Y	T	I	G	24	L	N	S	D	G	S	H	N	K	G	D	25	G	S	S	Y	S	S	G	Y	V	29
h18C12.v51	T	L	S	S	Q	H	S	T	Y	T	I	G	21	L	N	S	D	G	S	H	N	K	G	D	25	G	S	S	Y	S	S	G	Y	V	29
h18C12.v54	T	L	S	S	Q	H	S	T	Y	T	I	G	21	I	N	S	D	G	S	H	K	K	G	V	26	G	S	S	Y	S	S	G	Y	V	29
h18C12.v70	T	L	S	S	Q	H	S	T	Y	T	I	G	21	L	T	S	H	G	L	H	Q	K	G	V	27	G	S	S	Y	S	S	G	Y	V	29
h18C12.v78	T	L	S	S	Q	H	S	T	Y	T	I	G	21	L	N	S	D	S	T	Y	I	T	A	V	28	G	S	S	Y	S	S	G	Y	V	29

클론	CDR-H1											CDR-H2																				CDR-H3									
	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35		50	51	52	A	B	C	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65		95	96	97	98	99	100	A	101	102	
h18C12.v3	G	F	T	F	S	N	R	W	I	Y	34	G	I	K	T	K	P	N	I	Y	A	T	E	Y	A	D	S	V	K	G	36	L	T	G	M	R	Y	F	D	Y	38
h18C12.v6	G	F	T	F	S	N	R	W	I	Y	34	G	I	K	T	K	P	N	I	Y	A	T	E	Y	A	D	S	V	K	G	36	L	T	G	M	K	Y	F	D	Y	39
h18C12.v7	G	F	T	F	S	N	R	W	I	Y	34	G	I	K	T	K	P	N	I	Y	A	T	E	Y	A	D	S	V	K	G	36	L	T	G	M	R	Y	F	D	Y	38
h18C12.v9	G	F	T	F	S	N	R	W	I	Y	34	G	I	K	T	K	P	N	I	Y	A	T	E	Y	A	D	S	V	K	G	36	L	T	G	M	R	Y	F	D	Y	38
h18C12.v15	G	F	T	F	S	N	R	W	I	Y	34	G	I	K	T	K	P	N	I	Y	A	T	E	Y	A	D	S	V	K	G	36	L	T	G	M	R	Y	F	D	Y	38
h18C12.v16	G	F	T	F	S	N	R	W	I	Y	34	G	I	K	T	K	P	N	I	Y	A	T	E	Y	A	D	S	V	K	G	36	L	T	G	M	R	Y	F	D	Y	38
h18C12.v28	G	F	T	F	S	N	R	W	I	Y	34	G	I	K	T	K	P	N	I	Y	A	T	E	Y	A	D	S	V	K	G	36	V	T	G	M	R	Y	F	D	Y	40
h18C12.v30	G	F	T	F	S	N	R	W	I	Y	34	G	I	K	T	K	P	N	I	Y	A	T	E	Y	A	D	S	V	K	G	36	L	T	G	M	R	Y	F	D	Y	38
h18C12.v51	G	F	T	F	S	N	R	W	V	Y	35	G	I	K	T	K	P	T	R	Y	A	T	Q	Y	A	D	S	V	K	G	37	L	T	G	M	R	Y	F	D	Y	38
h18C12.v54	G	F	T	F	S	N	R	W	I	Y	34	G	I	K	T	K	P	N	I	Y	A	T	E	Y	A	D	S	V	K	G	36	L	T	G	M	R	Y	F	D	Y	38
h18C12.v70	G	F	T	F	S	N	R	W	I	Y	34	G	I	K	T	K	P	N	I	Y	A	T	E	Y	A	D	S	V	K	G	36	L	T	G	M	R	Y	F	D	Y	38
h18C12.v78	G	F	T	F	S	N	R	W	I	Y	34	G	I	K	T	K	P	N	I	Y	A	T	E	Y	A	D	S	V	K	G	36	L	T	G	M	R	Y	F	D	Y	38

도면4



도면5

항-α5β1 hIgG 비아코어 분석 (리간드 : hIgG; 분석물 : α5β1)			
항-α5β1	인간 인테그린 α5β1 (R&D)		
	kon(10^5 $M^{-1}S^{-1}$)	koff(10^{-4} S^{-1})	Kd(nM)
h18C12.v3	0.71 ± 0.08	8.07 ± 0.37	11.5 ± 1.1
h18C12.v6	1.74 ± 0.51	7.50 ± 1.64	4.8 ± 2.1
h18C12.v15	2.23 ± 0.09	15.2 ± 0.5	6.9 ± 0.3
h18C12.v54	0.63 ± 0.11	7.34 ± 0.32	11.9 ± 2.4
h18C12.v70	0.66 ± 0.19	12.8 ± 0.8	20.3 ± 3.8

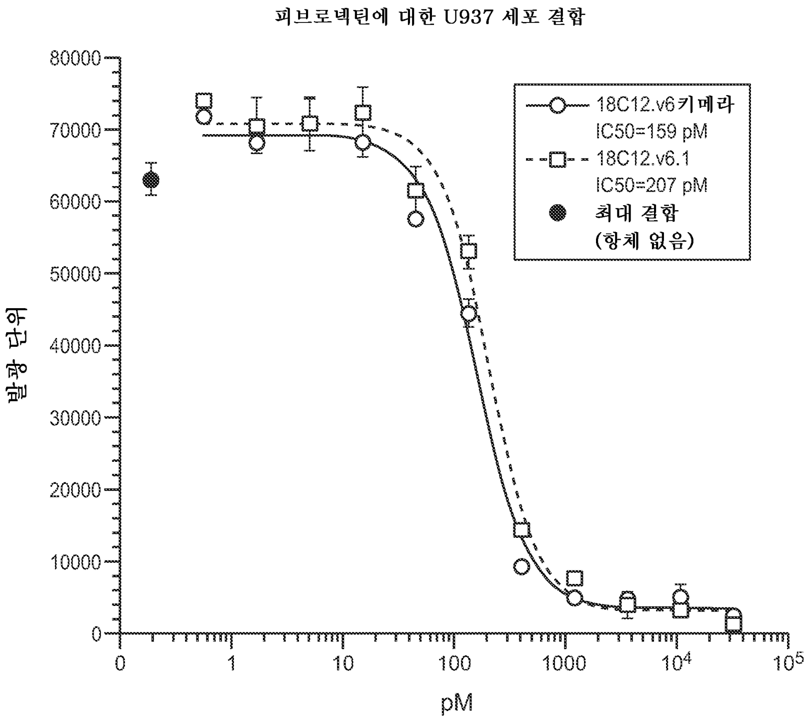
도면6

항-α5β1 hIgG 비아코어 요약 (리간드: hIgG; 분석물: α5β1)			
항체	인간 인테그린 α5β1 (R&D)		
	kon(10^5 $M^{-1}S^{-1}$)	koff(10^{-4} S^{-1})	Kd(nM)
h18C12.v6.1.Lam3	0.97 ± 0.03	3.86 ± 0.24	4.00 ± 0.32
키메라 18C12	1.2 ± 0.1	9.22 ± 0.19	7.68 ± 0.53

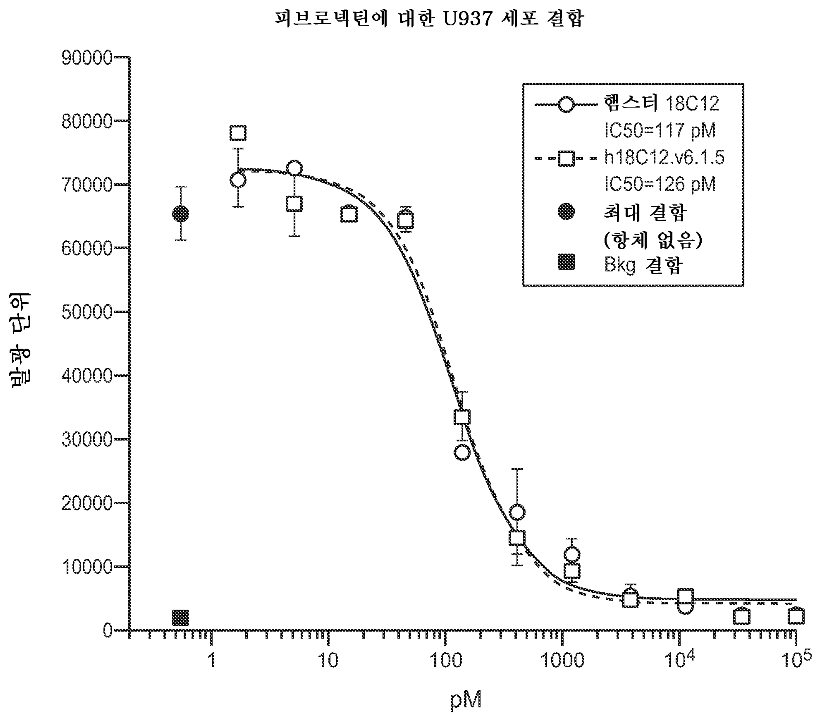
도면7

항-α5β1 h18C12.v6.1 변이체	CDR-L2				인간 인테그린 α5β1 (R&D)		
	50a	50b	50c	50d	kon(10^5 $M^{-1}S^{-1}$)	koff(10^{-4} S^{-1})	Kd(nM)
h18C12.v6.1.1	S	S	S	G	1.2	32	26.7
h18C12.v6.1.2	N	S	D	G	0.48	6.43	13.5
h18C12.v6.1.3	N	S	A	G	1.1	40	36.4
h18C12.v6.1.4	N	S	D	A	0.46	14.4	31.6
h18C12.v6.1.5	N	S	D	S	0.43	6.59	15.5

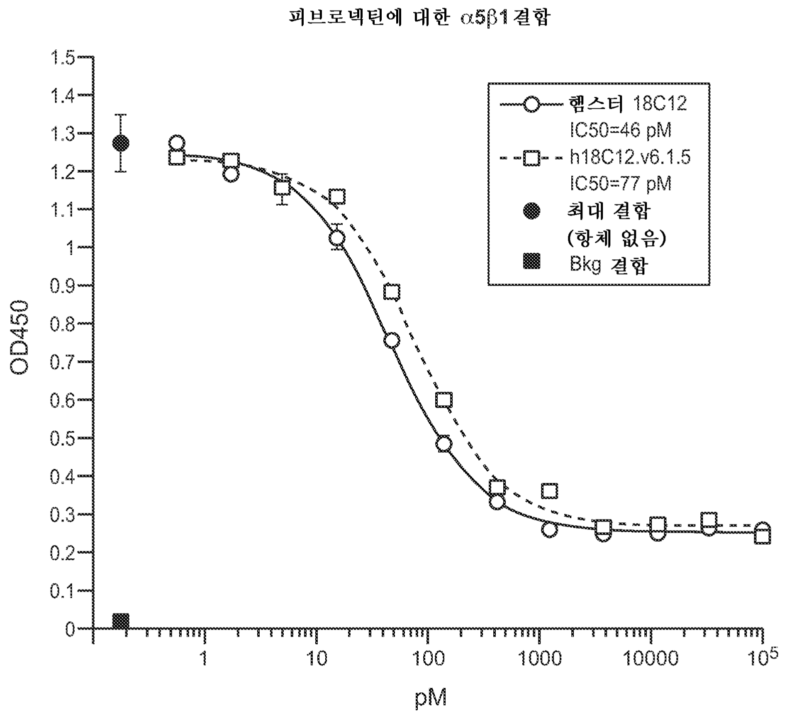
도면8



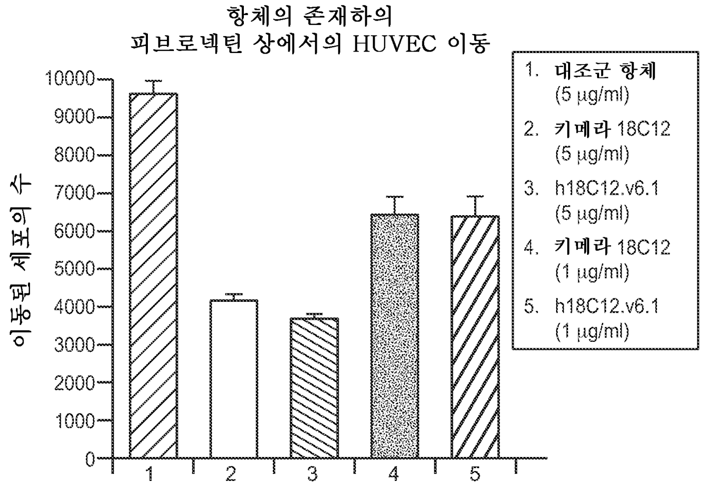
도면9


피브로넥틴에 대한 U937 세포 결합
발광 단위
pM
햄스터 18C12
IC50=117 pM
h18C12.v6.1.5
IC50=126 pM
최대 결합
(항체 없음)
Bkg 결합

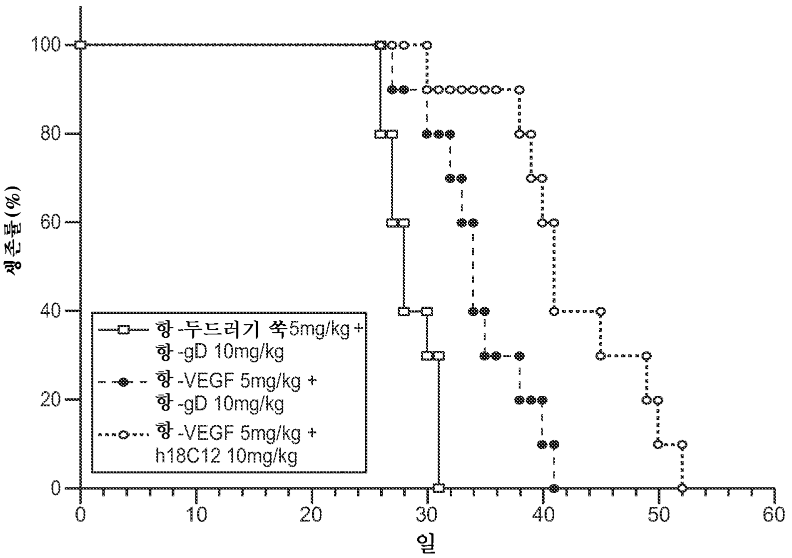
도면10


피브로넥틴에 대한 α5β1결합
OD450
pM
햄스터 18C12
IC50=46 pM
h18C12.v6.1.5
IC50=77 pM
최대 결합
(항체 없음)
Bkg 결합

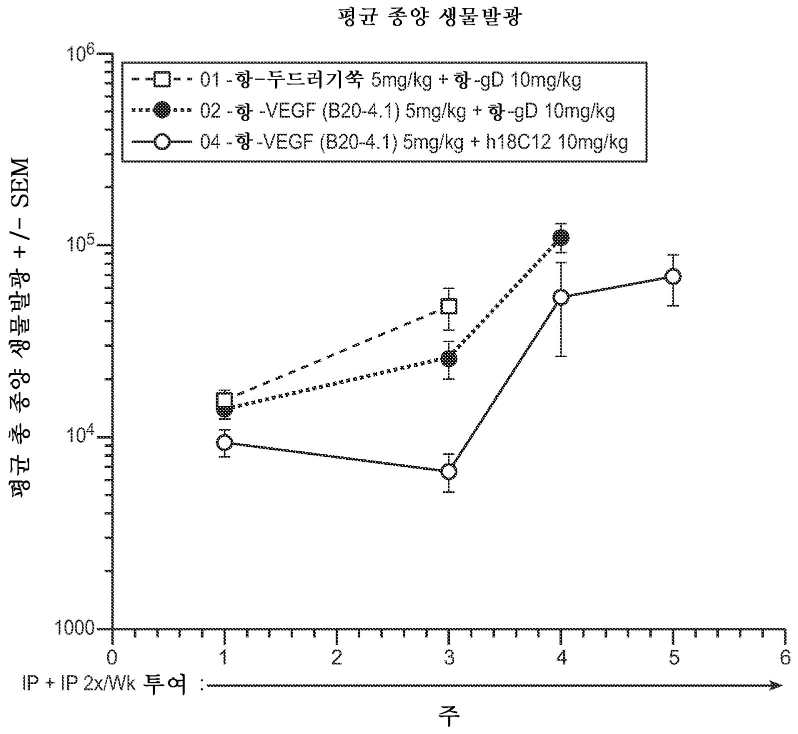
도면11


항체의 존재하의
피브로넥틴 상에서의 HUVEC 이동
이동된 세포의 수
10000
9000
8000
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
1
2
3
4
5
1. 대조군 항체
(5 µg/ml)
2. 키메라 18C12
(5 µg/ml)
3. h18C12.v6.1
(5 µg/ml)
4. 키메라 18C12
(1 µg/ml)
5. h18C12.v6.1
(1 µg/ml)

도면12


생존률(%)
100
80
60
40
20
0
0
10
20
30
40
50
60
일
항-두드러기 쑥5mg/kg +
항-gD 10mg/kg
항-VEGF 5mg/kg +
항-gD 10mg/kg
항-VEGF 5mg/kg +
h18C12 10mg/kg

도면13



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> GENENTECH, INC.

Liang, Wei-Ching

Plowman, Gregory D.

Wu, Yan

Ye, Weilan

<120> NOVEL ANTI- Alpha 5 Beta 1 ANTIBODIES AND USES THEREOF

<130> P4170R1

<150> US 61/163,241

<151> 2009-03-25

<160> 40

<210> 1

<211> 110

<212> PRT

<213> Humanized

<220><221> Variant

<222> 22-36

<223> X is any amino acid

<220><221> Unsure

<222> 22-36,52-62,95-105

<223> Unknown amino acid

<220><221> Variant

<222> 52-62

<223> X is any amino acid

<220><221> Variant

<222> 95-105

<223> X is any amino acid

<400> 1

Ser Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala Leu Gly Gln

1 5 10 15

Thr Val Arg Ile Thr Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa

20 25 30

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala

35 40 45

Pro Val Leu Val Ile Tyr Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa

50 55 60

Xaa Xaa Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Asn

65 70 75

Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Ala Glu Asp Glu Ala

80 85 90

Asp Tyr Tyr Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa

95 100 105

Phe Gly Gly Gly Thr

110

<210> 2

<211> 106

<212

> PRT

<213> Cricetulus griseus

<400> 2

Gln Pro Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser Ala Ser Leu Gly
1 5 10 15

Asn Ser Val Lys Ile Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gln His Ser Thr
20 25 30

Tyr Thr Ile Gly Trp Tyr Gln Gln His Pro Asp Lys Ala Pro Lys
35 40 45

Tyr Val Met Tyr Leu Asn Ser Asp Gly Ser His Asn Lys Gly Asp
50 55 60

Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ala His Arg
65 70 75

Tyr Leu Ser Ile Ser Asn Ile Gln Pro Glu Asp Glu Ala Asp Tyr
80 85 90

Phe Cys Gly Ser Ser Tyr Ser Ser Gly Tyr Val Phe Gly Ser Gly
95 100 105

Thr

<210> 3

<211> 106

<212> PRT

<213> Humanized

<400> 3

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

1 5 10 15

Asn Ser Val Lys Ile Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gln His Ser Thr
20 25 30

Tyr Thr Ile Gly Trp Tyr Gln Gln His Pro Asp Lys Ala Pro Lys
35 40 45

Tyr Val Met Tyr Leu Asn Ser Asp Gly Ser His Asn Lys Gly Asp
50 55 60

Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ala His Arg
65 70 75

Tyr Leu Ser Ile Ser Asn Ile Gln Pro Glu Asp Glu Ala Asp Tyr
80 85 90
Phe Cys Gly Ser Ser Tyr Ser Ser Gly Tyr Val Phe Gly Ser Gly
95 100 105
Thr

<210> 4
<211> 106
<212> PRT
<213> Humanized
<400> 4
Glu Pro Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser Ala Ser Leu Gly
1 5 10 15
Ala Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gln His Ser Thr
20 25 30
Tyr Thr Ile Gly Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Gly Lys Ala Pro Arg
35 40 45
Tyr Leu Met Tyr Leu Asn Ser Asp Gly Ser His Asn Lys Gly Asp
50 55 60
Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ala Asp Arg
65 70 75
Tyr Leu Thr Ile Ser Asn Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr
80 85 90
Tyr Cys Gly Ser Ser Tyr Ser Ser Gly Tyr Val Phe Gly Gly Gly
95 100 105
Thr

<210> 5
<211> 106
<212> PRT
<213> Humanized
<400> 5
Glu Pro Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser Ala Ser Leu Gly

1 5 10 15

Ala Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gln His Ser Thr

20 25 30

Tyr Thr Ile Gly Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Gly Lys Ala Pro Arg

35 40 45

Tyr Leu Met Tyr Leu Asn Ser Asp Gly Ser His Asn Lys Gly Asp

50 55 60

Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ala Asp Arg

65 70 75

Tyr Leu Thr Ile Ser Asn Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr

80 85 90

Tyr Cys Ala Ala Tyr Tyr Ala Tyr Gly Tyr Val Phe Gly Gly Gly

95 100 105

Thr

<210> 6

<211> 106

<212> PRT

<213> Humanized

<400> 6

Ser Ser Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala Leu Gly

1 5 10 15

Gln Thr Val Arg Ile Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gln His Ser Thr

20 25 30

Tyr Thr Ile Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val

35 40 45

Tyr Leu Met Tyr Leu Asn Ser Ser Gly Ser His Asn Lys Gly Ser

50 55 60

Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ala Thr Arg

65 70 75

Ser Leu Thr Ile Thr Asn Ala Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr

80 85 90

Tyr Cys Ala Ala Tyr Tyr Ala Tyr Gly Tyr Val Phe Gly Gly Gly
95 100 105
Thr

<210> 7
<211> 106
<212> PRT
<213> Humanized
<400> 7

Ser Ser Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala Leu Gly
1 5 10 15
Gln Thr Val Arg Ile Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gln His Ser Thr
20 25 30
Tyr Thr Ile Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val
35 40 45
Leu Val Ile Tyr Leu Asn Ser Ser Gly Ser His Asn Lys Gly Ser
50 55 60
Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ala Thr Arg

65 70 75
Ser Leu Thr Ile Thr Asn Ala Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr
80 85 90
Tyr Cys Ala Ala Tyr Tyr Ala Tyr Gly Tyr Val Phe Gly Gly Gly
95 100 105
Thr

<210> 8
<211> 106
<212> PRT
<213> Humanized
<400> 8
Ser Ser Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala Leu Gly
1 5 10 15

Gln Thr Val Arg Ile Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gln His Ser Thr

20 25 30

Tyr Thr Ile Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val

35 40 45

Tyr Leu Met Tyr Leu Asn Ser Asp Ser Ser His Asn Lys Gly Ser

50 55 60

Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ala Thr Arg

65 70 75

Ser Leu Thr Ile Thr Asn Ala Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr

80 85 90

Tyr Cys Ala Ala Tyr Tyr Ala Tyr Gly Tyr Val Phe Gly Gly Gly

95 100 105

Thr

<210> 9

<211> 114

<212> PRT

<213> Cricetulus griseus

<400> 9

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

1 5 10 15

Ser Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser

20 25 30

Asn Arg Trp Ile Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu

35 40 45

Glu Trp Val Gly Gly Ile Lys Thr Lys Pro Asn Ile Tyr Ala Thr

50 55 60

Glu Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp

65 70 75

Asp Ser Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Thr Leu Arg Val

80 85 90

Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Thr Ser Leu Thr Gly Met Arg

95 100 105

Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

110

<210> 10

<211> 116

<212> PRT

<213> Humanized

<220><221> Variant

<222> 26-35

<223> X is any amino acid

<220><221> Unsure

<222> 26-35,52-70,103-111

<223> Unknown amino acid

<220><221> Variant

<222> 52-70

<223> X is any amino acid

<220><221> Variant

<222> 103-111

<223> X is any amino acid

<400> 10

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 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa

20 25 30

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys

35 40 45

Gly Leu Glu Trp Val Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa

50 55 60

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Arg Phe Thr Ile Ser

65 70 75

Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu

80 85 90

Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Xaa Xaa Xaa

95 100 105

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Gly Gln Gly Thr

110 115

<210> 11

<211> 114

<212> PRT

<213> Humanized

<400> 11

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 Phe Thr Phe Ser

20 25 30

Asn Arg Trp Ile Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu

35 40 45

Glu Trp Val Gly Gly Ile Lys Thr Lys Pro Asn Ile Tyr Ala Thr

50 55 60

Glu Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp

65 70 75

Asp Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala

80 85 90

Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Leu Thr Gly Met Arg

95 100 105

Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

110

<210> 12

<211> 114

<212> PRT

<213> Humanized

<400> 12

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 Phe Thr Phe Ser

20 25 30

Asn Arg Trp Ile Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu

35 40 45

Glu Trp Val Gly Gly Ile Lys Thr Lys Pro Asn Ile Tyr Ala Thr

50 55 60

Glu Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp

65 70 75

Asp Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala

80 85 90

Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Leu Thr Gly Met Lys

95 100 105

Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

110

<210> 13

<211> 114

<212> PRT

<213> Humanized

<400> 13

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 Phe Thr Phe Ser

20 25 30

Ala Arg Trp Ile Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu

35 40 45

Glu Trp Val Gly Gly Ile Lys Thr Lys Pro Ala Ile Tyr Ala Thr

50 55 60

Glu Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp

65 70 75

Asp Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala

80 85 90

Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Leu Thr Gly Met Lys

95 100 105

Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

110

<210> 14

<211> 114

<212> PRT

<213> Humanized

<400> 14

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 Phe Thr Phe Ser

20 25 30

Ala Arg Trp Ile Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu

35 40 45

Glu Trp Val Gly Gly Ile Lys Thr Lys Pro Ala Ile Tyr Ala Thr

50 55 60

Glu Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp

65 70 75

Asp Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala

80 85 90

Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Leu Thr Gly Met Lys

95 100 105

Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

110

<210> 15

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<220><221> Variant

<222> 3

<223> X is S or T

<220><221> Variant

<222> 4

<223> X is S, P, or T

<220><221> Variant

<222> 5

<223> X is Q or N

<220><221> Variant

<222> 7

<223> X is F or S

<220><221> Variant

<222> 8

<223> X is T or I

<220><221> Variant

<222> 10

<223> X is K or T

<220><221> Variant

<222

> 12

<223> X is G, D, or S

<400> 15

Thr Leu Xaa Xaa Xaa His Xaa Xaa Tyr Xaa Ile Xaa

5 10

<210> 16

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<220><221> Variant

<222> 1

<223> X is L or I

<220><221> Variant

<222> 2

<223> X is N or T

<220><221> Variant

<222> 4

<223> X is D, H, or S

<220><221> Variant

<222> 5

<223> X is G or S

<220><221> Variant

<222> 6

<223> X is S, L, or T

<220><221

> Variant

<222> 7

<223> X is H or Y

<220><221> Variant

<222> 8

<223> X is N, K, Q or I

<220><221> Variant

<222> 9

<223> X is K or T

<220><221> Variant

<222> 10

<223> X is G or A

<220><221> Variant

<222> 11

<223> X is D, S, or V

<400> 16

Xaa Xaa Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa

5 10

<210> 17

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<220><221> Variant

<222> 1

<223> X is G or A

<

220><221> Variant

<222> 2

<223> X is S, A, or Y

<220><221> Variant

<222> 3

<223> X is S or Y

<220><221> Variant

<222> 5

<223> X is S, A, or Y

<220><221> Variant

<222> 6

<223> X is S, Y, or T

<220><221> Variant

<222> 9

<223> X is V or I

<400> 17

Xaa Xaa Xaa Tyr Xaa Xaa Gly Tyr Xaa

5

<210> 18

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<220><221> Variant

<222> 6

<223> X is N or A

<220><221

> Variant

<222> 9

<223> X is I or V

<400> 18

Gly Phe Thr Phe Ser Xaa Arg Trp Xaa Tyr

5 10

<210> 19

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<220><221> Variant

<222> 7

<223> X is N, A, or T

<220><221> Variant

<222> 8

<223> X is I or R

<220><221> Variant

<222> 12

<223> X is E or Q

<400> 19

Gly Ile Lys Thr Lys Pro Xaa Xaa Tyr Ala Thr Xaa Tyr Ala Asp

1 5 10 15

Ser Val Lys Gly

<210> 20

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<220><221> Variant

<222> 1

<223> X is L or V

<220><221> Variant

<222> 4

<223> X is M or K

<220><221> Variant

<222> 5

<223> X is R or K

<400> 20

Xaa Thr Gly Xaa Xaa Tyr Phe Asp Tyr

5

<210> 21

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 21

Thr Leu Ser Ser Gln His Ser Thr Tyr Thr Ile Gly

5 10

<210> 22

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 22

Thr Leu Ser Pro Gln His Phe Thr Tyr Lys Ile Asp

5 10

<210> 23

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 23

Thr Leu Ser Ser Asn His Ser Ile Tyr Thr Ile Ser

5 10

<210> 24

<211> 12

<212> PRT

<213

> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 24

Thr Leu Thr Thr Gln His Ser Thr Tyr Thr Ile Gly

5 10

<210> 25

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 25

Leu Asn Ser Asp Gly Ser His Asn Lys Gly Asp

5 10

<210> 26

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 26

Ile Asn Ser Asp Gly Ser His Lys Lys Gly Val

5 10

<210> 27

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 27

Leu Thr Ser His Gly Leu His Gln Lys Gly Val

5 10

<210> 28

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 28

Leu Asn Ser Asp Ser Thr Tyr Ile Thr Ala Val

5 10

<210> 29

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 29

Gly Ser Ser Tyr Ser Ser Gly Tyr Val

5

<210> 30

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 30

Ala Ala Tyr Tyr Ala Tyr Gly Tyr Val

5

<210> 31

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 31

Gly Tyr Ser Tyr Tyr Ser Gly Tyr Val

5

<210> 32

<211

> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 32

Gly Ser Ser Tyr Ser Thr Gly Tyr Val

5

<210> 33

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 33

Gly Ala Ser Tyr Ser Ser Gly Tyr Ile

5

<210> 34

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 34

Gly Phe Thr Phe Ser Asn Arg Trp Ile Tyr

5 10

<210> 35

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 35

Gly Phe Thr Phe Ser Asn Arg Trp Val Tyr

5 10

<210> 36

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 36

Gly Ile Lys Thr Lys Pro Asn Ile Tyr Ala Thr Glu Tyr Ala Asp

1 5 10 15

Ser Val Lys Gly

<210> 37

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 37

Gly Ile Lys Thr Lys Pro Thr Arg Tyr Ala Thr Gln Tyr Ala Asp

1 5 10 15

Ser Val Lys Gly

<210> 38

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 38

Leu Thr Gly Met Arg Tyr Phe Asp Tyr

5

<210> 39

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 39

Leu Thr Gly Met Lys Tyr Phe Asp Tyr

5

<210> 40

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 40

Val Thr Gly Met Arg Tyr Phe Asp Tyr

5