



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2013년10월29일
 (11) 등록번호 10-1323455
 (24) 등록일자 2013년10월23일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/18 (2006.01) *C07K 16/00* (2006.01)
 (21) 출원번호 10-2007-7021247
 (22) 출원일자(국제) 2006년02월17일
 심사청구일자 2011년02월11일
 (85) 번역문제출일자 2007년09월14일
 (65) 공개번호 10-2007-0107770
 (43) 공개일자 2007년11월07일
 (86) 국제출원번호 PCT/US2006/005854
 (87) 국제공개번호 WO 2006/089232
 국제공개일자 2006년08월24일
 (30) 우선권주장
 60/654,197 2005년02월18일 미국(US)
 (56) 선행기술조사문헌
 W02003059282 A2*
 W02003085107 A1*
 *는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
메다텍스, 엘.엘.시.
 미국, 08540 뉴저지, 프린스턴, 루트 206 앤드 프
 로빈스 라인 로드
 (72) 발명자
카다렐리 조세핀 엠
 미국 94070 캘리포니아주 산 카를로스 레슬리 드
 라이브 126
블랙 아멜리아 낸시
 미국 95035 캘리포니아주 로스 게토스 카퍼스트라
 노 플레이스 124
 (74) 대리인
김성기, 김진희

전체 청구항 수 : 총 17 항

심사관 : 이미욱

(54) 발명의 명칭 푸코실 잔기가 결합된 CD30에 대한 단클론 항체

(57) 요약

본 발명은 푸코실 잔기가 결합된 항-CD30 항체에 관한 것이다. 본 발명의 항체는 푸코실화된 형태의 항체에 의해 용해되지 않는 CD30 발현 세포주를 용해시키는 능력을 포함한, 증가된 항체 의존성 세포독성(ADCC) 활성을 나타낸다. 본 발명은 또한 푸코실 잔기가 결합된 항-CD30 항체를 발현하는 숙주 세포로서, 푸코실트랜스퍼라제가 결합된 숙주 세포를 제공한다. 종양 세포와 같은 CD30⁺ 세포의 성장을 억제하기 위해 항체를 사용하는 방법도 또한 제공된다.

특허청구의 범위

청구항 1

서열 번호 7을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1, 서열 번호 10을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2, 서열 번호 13을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3, 서열 번호 16을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR1, 서열 번호 19를 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR2 및 서열 번호 22를 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR3을 포함하는, 푸코스 잔기가 결여된 단리된 항-CD30 항체.

청구항 2

(a) 서열 번호 1을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및
(b) 서열 번호 4를 포함하는 경쇄 가변 영역
을 포함하는, 푸코스 잔기가 결여된 단리된 항-CD30 항체.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, CD30을 발현하는 종양 세포의 증식을 억제하는 것인 항체.

청구항 4

제1항 또는 제2항에 있어서, 항체 의존성 세포독성(ADCC)을 증강시키는 것인 항체.

청구항 5

제1항 또는 제2항에 있어서, 단클론 항체인 항체.

청구항 6

제1항 또는 제2항에 있어서, 인간 항체, 인간화 항체 또는 키메라 항체인 항체.

청구항 7

제1항 또는 제2항에 있어서, 세포독소에 접합된 항체.

청구항 8

제1항 또는 제2항의 항-CD30 항체를 코딩하는 면역글로불린 중쇄 및 경쇄 유전자를 포함하는 숙주 세포로서, 이 숙주 세포에 의해 발현되는 항-CD30 항체에 푸코스 잔기가 결여되도록 푸코실트랜스퍼라제가 결여되어 있는 숙주 세포.

청구항 9

제8항에 있어서, 면역글로불린 중쇄 및 경쇄 유전자가 인간 면역글로불린 중쇄 및 경쇄 유전자인 숙주 세포.

청구항 10

제8항에 있어서, 상기 푸코실트랜스퍼라제가 FUT8인 숙주 세포.

청구항 11

제8항에 있어서, CHO 세포인 숙주 세포.

청구항 12

CD30⁺ 세포의 항체 의존성 세포독성(ADCC)을 유도하기에 충분한 조건 하에 상기 세포를 제1항 또는 제2항에 정의된 탈푸코실화된 항-CD30 항체와 접촉시키는 것을 포함하는, CD30⁺ 세포의 성장을 억제하는 시험관 내 방법.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 항-CD30 항체가 인간 항체인 방법.

청구항 14

제1항 또는 제2항의 항-CD30 항체를 포함하는, CD30을 발현하는 종양 세포의 성장을 억제하기 위한 약학 조성물로서, 상기 종양 세포가 호지킨병(HD) 종양 세포인 약학 조성물.

청구항 15

제14항에 있어서, 상기 항-CD30 항체가 인간 항체인 약학 조성물.

청구항 16

제1항 또는 제2항의 항-CD30 항체를 포함하는, CD30을 발현하는 종양 세포의 성장을 억제하기 위한 약학 조성물로서, 상기 종양 세포가 역형성 대세포 림프종(ALCL) 종양 세포인 약학 조성물.

청구항 17

제16항에 있어서, 상기 항-CD30 항체가 인간 항체인 약학 조성물.

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

명세서

배경기술

- [0001] CD30 세포 표면 분자는 종양 괴사 인자 수용체(TNF-R) 거대족의 구성원이다. 이 족에 속하는 분자들은 그 구성원들 사이의 상동성이 다양하며, 신경 성장 인자 수용체(NGFR), CD120(a), CD120(b), CD27, CD40 및 CD95를 포함한다. 전형적으로, 이들 분자는 세포질의 영역에 다수의 시스테인-풍부 반복부가 존재함을 특징으로 한다[de Bruin, P.C., *et al. Leukemia* 9:1620-1627 (1995)]. 이 족의 구성원은 림프구의 증식 및 분화 조절에 중요하다고 간주된다.
- [0002] CD30은 종양 힌지 서열을 가지고 6개(인간) 또는 3개(쥐 및 래트)의 시스테인-풍부 반복부가 있는 I형 막형단당단백질이다. CD30은 세포내 90 kDa 전구체 단백질로부터 발달하는 120 kDa 막 분자로서 존재한다. 이는 세포 표면에서 대략 90 kDa의 가용성 단백질(sCD30)로서 쉼(shedding)된다. sCD30의 쉼은 살아있는 CD30 세포의 능동적인 과정이며, 단지 사멸되고 있거나 이미 사멸한 세포에서 방출되는 것에 의한 것은 아니다. CD30 단백질을 코딩하는 cDNA는 단클론 항체 Ki-1 및 Ber-H2를 이용한 면역스크리닝에 의해 HLTV-1 인간 T-세포주 HUT-102의 발현 라이브러리로부터 클로닝된 바 있다[Schwab, U., *et al. Nature* 299:65 (1982)]. 마우스 및 래트의 CD30 cDNA는 각각 498개 아미노산과 493개 아미노산을 코딩하는 것으로 밝혀졌다. 인간 CD30 cDNA는 시스테인 풍부 도메인 중 하나가 부분적으로 중복된 추가의 90개 아미노산을 코딩한다. CD30 유전자는 인간에서는 1p36에, 래트에서는 5q36.2에 매핑되었다.
- [0003] CD30은 활성화된 림프양 세포에 의해 우선적으로 발현된다. 구체적으로, 림프양 세포에서의 CD30 자극은 세포 유형, 분화 단계 및 다른 자극의 존재 여부에 따라, 증식, 활성화, 분화 및 세포 사멸 등을 포함한 다면성의 생물학적 효과를 유도하는 것으로 나타났다[Gruss, H.J. *et al., Blood* 83:2045-2056 (1994)]. CD30은 호지킨병의 호지킨 및 리드-스틴버그(Reed-Sternberg) 세포에서 발현되는 항원에 반응성인 단클론 항체 Ki-1에 의해 최초로 확인되었다[Schwab *et al., Nature* 299:65 (1982)]. 따라서, CD30은 호지킨 림프종 및 관련된 혈액계 악성종양에 대한 임상적 마커로서 널리 사용된다[Froese *et al., J. Immunol.* 139:2081 (1987); Carde *et al., Eur. J. Cancer* 26:474 (1990)].
- [0004] 이후, CD30은 버키트 림프종, 역형성 대세포 림프종(ALCL), 피부 T-세포 림프종, 결절성 소분할 세포 림프종, 림프구성 림프종, 말초 T-세포 림프종, 레너트 림프종, 면역야세포성 림프종, T-세포 백혈병/림프종(ATLL), 성인 T-세포 백혈병(T-ALL) 및 중심모세포/중심세포(cb/cc) 여포성 림프종([Stein *et al., Blood* 66:848 (1985); Miettinen, *Arch. Pathol. Lab. Med.* 116:1197 (1992); Piris *et al., Histopathology* 17:211 (1990); Burns *et al., Am. J. Clin. Pathol.* 93:327(1990); 및 Eckert *et al., Am. J. Dermatopathol.* 11:345 (1989)]) 등을 포함한 비호지킨 림프종 (NHL)의 서브세트뿐만 아니라 몇 가지 바이러스들로 형질전환된 세포주, 예를 들어 인간 T-세포 림프영양성 바이러스 I 또는 II로 형질전환된 T-세포 및 엡스테인-바르 바이러스로 형질전환된 B-세포([Stein *et al., Blood* 66:848 (1985); Andreesen *et al., Blood* 63:1299 (1984)])에서도 발현되는 것으로 나타났다. 또한, CD30 발현은 태생암, 비태생암, 악성 흑색종, 간엽 종양 및 골수 세포주 및 후기 분화 단계의 대식세포에서도 보고되었다([Schwartz *et al., Blood* 74:1678 (1989); Pallesen *et al., Am J. Pathol.* 133:446 (1988); Mechttersheimer *et al., Cancer* 66:1732(1990); Andreesen *et al., Am. J. Pathol.* 134:187 (1989)]).
- [0005] 정상적인 개체에서는 CD30-양성 세포의 비율(%)이 매우 적기 때문에, 종양 세포에서의 CD30 발현은, 항체 매개 요법이 CD30-양성 신생물 세포에 특이적으로 표적화하기 위한 좋은 표적이 되도록 한다[Chaiarle, R., *et al. Clin. Immunol.* 90(2):157-164 (1999)]. 항체 매개 요법은 보체 활성화 및 항체 의존성 세포독성(ADCC) 모두에

의해 CD30-양성 세포의 세포독성을 증가시키는 것으로 나타났다(Pohl C., *et al.* Int J Cancer 54:418 (1993)). 그러나, 현재까지 얻은 결과는 CD30이 면역요법에 유용한 표적임을 명백하게 확립하긴 했지만, 현재 이용가능한 쥐 항체는 이상적인 치료를 구성하지 못하고 있는 것임을 나타내고 있다. 수동 항체 요법은 난치성 호지킨병을 앓는 환자에 대해 시험관 내 또는 생체 내에서 효과적이지 않았다. 항-CD30 항체 Ber-H2의 임상적 시험은 반응이 아닌, 항체의 국소화를 나타냈다(Falini B. *et al.*(1992) *Brit J Haematol.* 82:38-45; Koon, H.B. *et al.* (2000) *Curr Opin in Oncol.* 12:588-593). 탈글리코실화 리신(Ricin) 독소-A 사슬 독소에 대한 항-CD30 항체의 결합을 통해, SCID 마우스 모델에서 인간 호지킨병의 치료에 있어 세포독성이 확인되었으나, 대상에서 3등급 독성도 확인되었다(Schell, R. *et al.* (2002) *Annals of Oncology* 13:57-66).

[0006] 따라서, CD30에 의해 매개되는 질병의 치료 및/또는 예방에 더욱 효과적인, CD30에 대한 개선된 치료 항체가 요구된다.

[0007] **발명의 개요**

[0008] 본 발명은 인간 CD30에 결합하고, 탈푸코실화되지 않은 형태의 항체(즉, 푸코스 잔기를 갖는 항체)에 비해, CD30 발현 세포의 증진된 항체 지정 세포독성(ADCC) 사멸을 나타내는 단리된 탈푸코실화된 항체(즉, 푸코스 잔기가 결여된 항체)를 제공한다. 또한, 본 발명의 항체 및 조성물을 이용한, CD30 발현과 관련된 각종 질병들의 치료 방법들도 제공한다.

[0009] 한 측면에서, 본 발명은 10×10^{-8} M 이하, 더욱 바람직하게는 1×10^{-8} M 이하, 더욱 더 바람직하게 5×10^{-9} M 이하, 더욱 더 바람직하게는 1×10^{-9} M 이하의 K_D 로 인간 CD30에 결합하는 단리된 탈푸코실화된 단클론 항체 또는 그것의 항원 결합 부분에 관한 것이다.

[0010] 본 발명의 탈푸코실화된 항체는 CD30에 결합하고, 푸코실화된 형태의 항체에 비해, 인간 이펙터 세포(예컨대, 단핵구 또는 다핵구)의 존재 하에 항체 의존성 세포독성(ADCC)을 증진시킴으로써 CD30 발현 세포의 성장을 억제한다. 한 실시양태에서, 탈푸코실화된 항체는 마우스 이펙터 세포의 존재 하가 아닌 인간 이펙터 세포의 존재 하에 CD30 발현 세포의 증가된 ADCC를 매개한다.

[0011] 한 바람직한 실시양태에서, 본 발명의 탈푸코실화된 항체는 시험관 내에서 L1236 세포의 ADCC를 유도하며, 여기에서 푸코실화된 형태의 항체는 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 항체 농도 및 1:50의 표적 세포 대 이펙터 세포 비의 조건 하에서는 ADCC를 유도하지 않는다. 또 다른 바람직한 실시양태에서, 본 발명의 탈푸코실화된 항체는 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 항체 농도 및 1:50의 표적 세포 대 이펙터 세포 비의 조건 하에서, 푸코실화된 형태의 항체에 비해, 시험관 내에서 L540, L428 및 카르파스(Karpas) 세포의 ADCC를 증진시킨다. 따라서, 본 발명의 항체는 CD30 발현을 특징으로 하는 장애를 치료하기 위한 개선된 수단을 제공한다.

[0012] 바람직하게, 본 발명의 탈푸코실화된 항체는 단클론 항체이다. 한 측면에서, 본 발명은 인간화 또는 키메라 단클론 항체에 관한 것이다. 바람직하게, 인간화 또는 키메라 항체는 AC10, HeFi-1, Ber-H2, Ki-1, Ki-4, HRS-3, Irac, HRS-4, M44, M67, Ber-H8로 이루어진 군으로부터 선택되는 마우스 항-CD30 항체로부터 제조된다. 또 다른 측면에서, 본 발명은 인간 단클론 항체에 관한 것이다.

[0013] 본 발명의 한 실시양태에서, 인간 단클론 항체는

[0014] (a) 서열 번호 1, 2 및 3으로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및

[0015] (b) 서열 번호 4, 5 및 6으로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역

[0016] 을 포함하는 항체로서, CD30에 결합하며, 푸코스 잔기가 결여되어 있다.

[0017] 한 바람직한 조합은

[0018] (a) 서열 번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및

[0019] (b) 서열 번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역

[0020] 을 포함한다.

[0021] 또 다른 바람직한 조합은

[0022] (a) 서열 번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및

- [0023] (b) 서열 번호 5의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역
- [0024] 을 포함한다.
- [0025] 또 다른 바람직한 조합은
- [0026] (a) 서열 번호 3의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및
- [0027] (b) 서열 번호 6의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역
- [0028] 을 포함한다.
- [0029] 또 다른 측면에서, 본 발명은
- [0030] CDR1, CDR2 및 CDR3 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역 (여기에서,
- [0031] (a) 서열 번호 7, 8 및 9의 아미노산 서열들로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1 서열;
- [0032] (b) 서열 번호 10, 11 및 12의 아미노산 서열들로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2 서열;
- [0033] (c) 서열 번호 13, 14 및 15의 아미노산 서열들로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3 서열;
- [0034] (a) 서열 번호 16, 17 및 18의 아미노산 서열들로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR1 서열;
- [0035] (a) 서열 번호 19, 20 및 21의 아미노산 서열들로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR2 서열; 및
- [0036] (a) 서열 번호 22, 23 및 24의 아미노산 서열들로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR3 서열
- [0037] 을 포함하고, CD30에 결합하는, 푸코스 잔기가 결여된 탈푸코실화된 항-CD30 항체를 제공한다.
- [0038] 한 바람직한 조합은
- [0039] (a) 서열 번호 7을 포함하는 인간 중쇄 가변 영역 CDR1;
- [0040] (b) 서열 번호 10을 포함하는 인간 중쇄 가변 영역 CDR2;
- [0041] (c) 서열 번호 13을 포함하는 인간 중쇄 가변 영역 CDR3;
- [0042] (d) 서열 번호 16을 포함하는 인간 경쇄 가변 영역 CDR1;
- [0043] (e) 서열 번호 19를 포함하는 인간 경쇄 가변 영역 CDR2; 및
- [0044] (f) 서열 번호 22을 포함하는 인간 경쇄 가변 영역 CDR3
- [0045] 을 포함한다
- [0046] 또 다른 바람직한 조합은
- [0047] (a) 서열 번호 8을 포함하는 인간 중쇄 가변 영역 CDR1;
- [0048] (b) 서열 번호 11을 포함하는 인간 중쇄 가변 영역 CDR2;
- [0049] (c) 서열 번호 14을 포함하는 인간 중쇄 가변 영역 CDR3;
- [0050] (d) 서열 번호 17을 포함하는 인간 경쇄 가변 영역 CDR1;
- [0051] (e) 서열 번호 20을 포함하는 인간 경쇄 가변 영역 CDR2; 및
- [0052] (f) 서열 번호 23을 포함하는 인간 경쇄 가변 영역 CDR3
- [0053] 을 포함한다.

- [0054] 또 다른 바람직한 조합은
- [0055] (a) 서열 번호 9를 포함하는 인간 중쇄 가변 영역 CDR1;
- [0056] (b) 서열 번호 12를 포함하는 인간 중쇄 가변 영역 CDR2;
- [0057] (c) 서열 번호 15를 포함하는 인간 중쇄 가변 영역 CDR3;
- [0058] (d) 서열 번호 18을 포함하는 인간 경쇄 가변 영역 CDR1;
- [0059] (e) 서열 번호 21을 포함하는 인간 경쇄 가변 영역 CDR2; 및
- [0060] (f) 서열 번호 24를 포함하는 인간 경쇄 가변 영역 CDR3
- [0061] 을 포함한다.
- [0062] 또 다른 측면에서, 본 발명은 인간 V_H 4-34 또는 V_H 3-07 유전자의 산물이거나 그것으로부터 유래된 중쇄 가변 영역을 포함하는 탈푸코실화된 인간 항-CD30 항체를 제공한다. 본 발명은 또한 인간 V_k L15, A27 또는 L6 유전자의 산물이거나 그것으로부터 유래된 경쇄 가변 영역을 포함하는 탈푸코실화된 인간 항-CD30 항체를 제공한다. 본 발명은 또한 발명은 인간 V_H 4-34 또는 V_H 3-07 유전자의 산물이거나 그것으로부터 유래된 중쇄 가변 영역, 및 인간 V_k L15, A27 또는 L6 유전자의 산물이거나 그것으로부터 유래된 경쇄 가변 영역을 포함하는 탈푸코실화된 인간 항-CD30 항체를 제공한다.
- [0063] 또 다른 측면에서, 본 발명은 항-CD30 항체를 코딩하는 면역글로불린 중쇄 및 경쇄 유전자를 포함하는 숙주 세포로서, 푸코실트랜스퍼라제가 결여되어 있어, 그 숙주 세포에 의해 발현된 항-CD30 항체에 푸코스 잔기가 결여되어 있는 숙주 세포에 관한 것이다. 바람직하게, 면역글로불린 중쇄 및 경쇄 유전자는 인간 면역글로불린 중쇄 및 경쇄 유전자이다. 바람직하게, 푸코실트랜스퍼라제는 FUT8이다. 바람직하게, 숙주 세포는 CHO 세포이다.
- [0064] 또 다른 측면에서, 본 발명은 $CD30^+$ 세포의 성장을 억제하는 방법을 제공한다. 이 방법은 세포를 탈푸코실화된 항-CD30 항체와 상기 세포의 항체 의존성 세포독성(ADCC)을 유도하기에 충분한 조건 하에 접촉시키는 것을 포함한다. 세포는 예를 들어, 종양 세포일 수 있다. 바람직하게, 항-CD30 항체는 인간 항체이다.
- [0065] 본 발명은 또한 대상에 있어 CD30 발현 종양 세포의 성장을 억제하는 방법을 제공한다. 이 방법은 대상에 있어 CD30 발현 종양 세포의 성장을 억제하기에 충분한 양의 탈푸코실화된 항-CD30 항체를 대상에게 투여하는 단계를 포함한다. 바람직하게, 항-CD30 항체는 인간 항체이다. 바람직한 실시양태에서, 종양 세포는 호지킨병(HD) 종양 세포 또는 역형성 대세포 림프종(ALCL) 종양 세포이다.
- [0066] 본 발명의 다른 특징 및 장점은 하기 발명의 상세한 설명 및 실시예로부터 명백해질 것이나, 이들은 본 발명을 제한하는 것으로 간주되어서는 안된다. 본원 전반에 걸쳐 인용된 모든 참고문헌, 유전자은행 등록데이터, 특허 및 공개 특허 출원의 내용은 전체적으로 본원에 명백히 참고 인용된다.

발명의 상세한 설명

- [0081] 본 발명은 CD30 및/또는 CD30 발현 세포와 관련된, 개선된 항체 조성물을 제공한다. 본 발명의 항체는 항체 탄수화물 사슬 상에 푸코실 잔기가 결여되어 있다. 또한, 항체는 CD30+ 세포의 증진된 항체 지정 세포독성(ADCC) 사멸을 나타낸다. 한 특별한 실시양태에서, 본 발명의 항체는 푸코실화된 형태의 항체가 CD30+ 세포를 효과적으로 사멸시키지 않을 조건 하에서 CD30+ 세포를 사멸시킬 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 항체는 푸코실화된 형태의 항체에 비해, CD30+ 세포의 사멸을 증진시킨다. 한 실시양태에서, 본 발명의 항체는 완전 인간 항체이고, CD30 발현 세포와 관련된 장애를 갖는 인간의 치료적 처치에 특히 유용하다. 치료적 처치(예컨대, CD30의 발현과 관련된 질병의 치료 및/또는 예방)를 위한 푸코실 잔기가 결여된 항-CD30 항체를 이용하는 방법도 또한 본 발명에 포함된다.
- [0082] 본 발명을 더욱 쉽게 이해할 수 있도록 하기 위해, 하기와 같이 일부 용어들을 정의할 것이다. 추가의 정의는 발명의 상세한 설명 전반에 걸쳐 나와 있다.
- [0083] 용어 "CD30" 및 "CD30 항원"은 본원에서 상호 혼용되며, 세포에 의해 자연적으로 발현되는 인간 CD30의 임의의 변형체, 이소타입 및 중 동족체를 포함한다. 인간 CD30 단백질의 완전 아미노산 서열은 유전자은행 수탁 번호 NP_001234를 가진다. 인간 CD30 단백질을 코딩하는 완전 cDNA 서열은 유전자은행 수탁 번호 NM_001243을

가진다.

- [0084] 본원에 사용되는 용어 "푸코스 잔기가 결여된 항체" 및 "탈푸코실화된 항체"는 상호 혼용되며, 항체의 탄수화물 부분이 푸코스 잔기를 가지지 않거나, 그것으로부터 푸코스 잔기가 제거된 항체를 칭하기 위한 것이다. 푸코스 잔기가 결여된 항체는 예를 들어, 푸코스 잔기를 항체 탄수화물 사슬에 부착하지 않거나 이를 최소화하는 세포 또는 발현 시스템 내 항체의 발현에 의해, 또는 탄수화물 사슬로부터 푸코스 잔기를 제거하기 위한 항체의 화학적 변형(예컨대, 푸코시다제를 이용한 항체의 처리)에 의해 발생될 수 있다. 이에 따라, 용어 "푸코스 잔기가 결여된" 및 "탈푸코실화된"이란 변경된 탄수화물 구조가 제조되도록 하는 기전에 의해 제한되지 않도록 한다.
- [0085] 본원에 사용되는 용어 "푸코스 잔기를 발현하는 항체" 및 "푸코실화된 항체"는 상호 혼용되며, 항체의 탄수화물 부분이 푸코스를 함유하는 항체를 지칭하기 위한 것이다.
- [0086] 용어 "면역 반응"은 예를 들어, 자동 면역 또는 병원성 감염, 정상 인간 세포 또는 조직의 경우, 또는 침습 병원체에 감염된 세포 또는 조직, 암세포를 인간 신체로부터 제거하거나, 그것을 선택적으로 손상시키거나 파괴하도록 하는, 림프구, 항원 제시 세포, 식세포, 과립구, 및 상피 세포 또는 간에 의해 생산된 가용성 거대분자(항체, 사이토카인 및 보체 포함)의 작용을 가리킨다.
- [0087] 본원에 사용되는 용어 "이펙터 세포"는, 면역 반응의 인식 및 활성화 단계와 대립되는, 면역 반응의 이펙터 단계에 관여하는 면역 세포를 지칭한다. 예시적인 면역 세포에는 골수 또는 림프 기원의 세포, 예를 들어 림프구(예컨대, 세포 용해성 T 세포(CTL)를 포함한 B 세포 및 T 세포), 킬러(killer)세포, 자연 킬러 세포, 대식세포, 단핵구, 호산구, 호중구, 다형구, 과립세포, 비만 세포 및 호염구가 포함된다. 일부 이펙터 세포는 특이적 Fc 수용체를 발현하며, 특이적 면역 기능을 수행한다. 바람직한 실시양태에서, 이펙터 세포는 항체 의존성 세포 매개성 세포독성(ADCC)을 유도할 수 있고, 예를 들어 호중구는 ADCC를 유도할 수 있다. 예를 들어, FcR을 발현하는 단핵구 및 대식세포는 표적 세포를 특이적으로 사멸시켜, 항원을 면역계의 다른 성분에 제시하거나, 항원을 제시하는 세포에 결합하는 것에 관여한다. 다른 실시양태에서, 이펙터 세포는 표적 항원 또는 표적 세포를 식작용할 수 있다. 이펙터 세포 상에서의 특정 FcR의 발현은 사이토카인과 같은 체액성 인자에 의해 제어될 수 있다. 예를 들어, Fc α RI의 발현은 G-CSF 또는 GM-CSF에 의해 상향제어되는 것으로 밝혀졌다. 이러한 발현 증가는 표적에 대한 Fc α RI-보유 세포의 이펙터 기능을 증가시킨다. 이펙터 세포는 표적 항원 또는 표적 세포를 식작용하거나 용해시킬 수 있다.
- [0088] "표적 세포"는 그 자체의 제거가 대상(예컨대, 인간 또는 동물)에서 유익하며, 본 발명의 조성물(예컨대, 항체)에 의해 표적화될 수 있는 임의의 세포 또는 병원체를 지칭한다. 예를 들어, 표적 세포는 CD30을 발현 또는 과발현하는 세포일 수 있다.
- [0089] 용어 "항체 의존성 세포독성" 또는 "ADCC"는, 항-CD30 항체가 결합된 CD30+ 표적 세포가 Fc 수용체 보유 이펙터 세포에 의해 인식되고, 그 후 보체의 관여를 요하지 않으면서 용해되게 되는 세포 매개성 세포독성 반응을 의미한다.
- [0090] 본원에 사용되는 용어 (예컨대, 세포와 관련한) "ADCC를 증진시키다"는 이펙터 세포의 존재 하(예컨대, 표적 세포:이펙터 세포의 비 = 1:50)에, 푸코실화된 항-CD30 항체와 접촉되는 동일 세포의 세포 사멸에 비해, 푸코스 잔기가 결여된 항-CD30 항체와 접촉할 때의 세포 용해의 임의의 측정가능한 증가, 예컨대 적어도 약 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 150%, 200%, 250%, 300% 또는 325% 만큼의 세포 용해 증가를 포함하기 위한 것이다.
- [0091] 본원에 언급되는 용어 "항체"는 전체 항체 및 임의의 항원 결합 단편(즉, "항원 결합 부분") 또는 그 단일쇄를 포함한다. "항체"는 디설피드 결합에 의해 서로 연결된 적어도 2개의 중쇄(H) 및 2개의 경쇄(L)를 포함하는 당단백질, 또는 그것의 항원 결합 부분을 지칭한다. 각각의 중쇄는 중쇄 가변 영역(본원에서 V_H 로 약칭됨) 및 중쇄 불변 영역으로 이루어진다. 중쇄 불변 영역은 3개의 도메인인 C_{H1} , C_{H2} 및 C_{H3} 으로 이루어진다. 각각의 경쇄는 경쇄 가변 영역(본원에서 V_L 로 약칭됨) 및 경쇄 불변 영역으로 이루어진다. 경쇄 불변 영역은 하나의 도메인 C_L 로 이루어진다. V_H 및 V_L 영역은 골격 영역(framework region, FR)으로 칭해지는, 보다 보존된 영역이 내부에 산재된, 상보성 결정 영역(complementarity determining region, CDR)으로 칭해지는 과변이(hypervariability) 영역으로 추가로 다시 나뉘어질 수 있다. 각각의 V_H 및 V_L 은 아미노 말단에서 카르복시 말단으로 하기의 순서로 배열된 3개의 CDR 및 4개의 FR로 이루어진다: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. 중쇄 및 경쇄의 가변 영역은 항원과 상호 작용하는 결합 도메인을 포함한다. 항체의 불변 영역은 면역계의 각종 세포(예컨대, 이펙터 세

포) 및 전형적인 보체계(classical complement system)의 제1 성분(C1q)을 포함하여, 면역글로불린의 숙주 조직 또는 인자에의 결합을 매개할 수 있다.

[0092] 본원에서 사용되는 용어, 항체의 "항원 결합 부분" (또는 단순히 "항체 부분")은 항원(예컨대, CD30)에 특이적으로 결합하는 능력을 보유하는 하나 이상의 항체 단편을 말한다. 항체의 항원 결합 기능은 전장 항체의 단편에 의해 수행될 수 있음이 밝혀졌다. 항체의 "항원 결합 부분"이라는 용어 내에 포함되는 결합 단편의 예는 (i) V_L , V_H , C_L 및 C_{H1} 도메인으로 이루어진 일가 단편인 Fab 단편; (ii) 현지 영역에서 디설피드 가교에 의해 결합된 2개의 Fab 단편을 포함하는 이가 단편인 $F(ab')_2$ 단편; (iii) V_H 및 C_{H1} 도메인으로 이루어진 Fd 단편; (iv) 항체의 단일 암(arm)으로 이루어진 V_L 및 V_H 도메인으로 이루어진 Fv 단편; (v) V_H 도메인으로 이루어진 dAb 단편 ([Ward *et al.*, (1989) *Nature* 341:544-546]); 및 (vi) 단리된 상보성 결정 영역(CDR)을 포함한다. 또한, Fv 단편의 2개의 도메인, V_L 및 V_H 가 개별적인 유전자에 의해 코딩된다 해도, 이들은 재조합 방법을 이용하여 V_L 및 V_H 영역이 쌍을 이루어 일가 분자(단일쇄 Fv(scFv)로 공지됨)를 형성하는 단일 단백질 사슬로 만들어지게 할 수 있는 합성 링커에 의해 접합될 수 있다(예컨대, [Bird *et al.* (1988) *Science* 242:423-426; 및 Huston *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883] 참고). 그러한 단일쇄 항체도 항체의 "항원 결합 부분"이라는 용어 내에 포함시키고자 한다. 이러한 항체 단편은 당업자에게 공지된 통상적인 기술을 이용하여 수득되며, 이 단편들은 비변형 항체에서와 동일한 방식으로 유용성에 대하여 스크리닝된다.

[0093] 본원에 사용되는 용어 "재조합 인간 항체"는 재조합 수단에 의해 제조, 발현, 생성 또는 단리된 모든 인간 항체, 예를 들어 (a) 인간 면역글로불린 유전자에 대하여 유전자도입이거나 염색체도입인 동물(예컨대, 마우스) 또는 그것으로부터 제조한 하이브리도마로부터 단리된 항체(하기에 또한 기술되어 있음), (b) 인간 항체를 발현하도록 형질전환된 숙주 세포, 예를 들어 트랜스펙토마(transfectoma)로부터 단리된 항체, (c) 재조합, 조합 인간 항체 라이브러리로부터 단리된 항체, 및 (d) 인간 면역글로불린 유전자 서열의 다른 DNA 서열로의 스플라이싱을 포함하는 임의의 다른 수단으로 제조, 발현, 생성 또는 단리된 모든 인간 항체를 포함한다. 그러한 재조합 인간 항체는 골격 및 CDR 영역이 인간 배선 면역글로불린 서열로부터 유래되는 가변 영역을 가진다. 그러나 특정 실시 형태에 있어서 그러한 재조합 인간 항체는 시험관 내에서 돌연변이가 유발될 수 있으며 (또는, 인간 Ig 서열에 있어서 유전자도입인 동물이 사용되는 경우, 생체 내 체세포 돌연변이 유발), 이에 따라 재조합 항체의 V_H 및 V_L 영역의 아미노산 서열은, 인간 배선 V_H 및 V_L 서열로부터 유래되어 그와 연관되지만 생체 내에서 인간 항체 배선 레퍼토리 내에는 자연적으로 존재하지 않을 수도 있는 서열이다.

[0094] 본원에 사용되는 용어 "단클론 항체" 또는 "단클론 항체 조성물"은 단일 분자 조성물의 항체 분자의 제제를 지칭한다. 단클론 항체 조성물은 특정 에피토프에 대한 단일 결합 특이성 및 친화도를 나타낸다.

[0095] 본원에 사용되는 용어 "인간 항체"는 골격 및 CDR 영역 둘 모두가 인간 배선 면역글로불린 서열로부터 유래되는 가변 영역을 갖는 항체를 포함하기 위한 것이다. 또한, 항체가 불변 영역을 포함하는 경우, 이 불변 영역도 인간 배선 면역글로불린 서열로부터 유래된다. 본 발명의 인간 항체는 인간 배선 면역글로불린 서열에 의해 코딩되지 않는 아미노산 잔기를 포함할 수도 있다(예컨대, 시험관 내 랜덤 돌연변이 또는 부위 특이적 돌연변이에 의해, 또는 생체 내 체세포 돌연변이에 의해 도입되는 돌연변이).

[0096] 용어 "인간 단클론 항체"는 골격 및 CDR 영역 둘 모두가 인간 배선 면역글로불린 서열로부터 유래되는 가변 영역을 가지는, 단일 결합 특이성을 나타내는 항체를 지칭한다. 한 실시양태에서, 인간 단클론 항체는 불멸화 세포에 융합된 인간 증쇄 도입유전자 및 경쇄 도입유전자를 포함하는 계놈을 갖는 인간의 유전자도입 동물, 예를 들어 유전자도입 마우스로부터 수득되는 B 세포를 포함하는 하이브리도마에 의해 생산된다. 본원에 사용되는 용어 "인간 단클론 항체"는 재조합 수단에 의해 제조, 발현, 생성 또는 단리되는 모든 인간 항체, 예를 들어 (a) 인간 면역글로불린 유전자에 대하여 유전자도입이거나 염색체도입인 동물(예컨대, 마우스) 또는 그것으로부터 제조한 하이브리도마로부터 단리된 항체(하기에 또한 기술되어 있음), (b) 인간 항체를 발현하도록 형질전환된 숙주 세포, 예를 들어 트랜스펙토마로부터 단리된 항체, (c) 재조합, 조합 인간 항체 라이브러리로부터 단리된 항체, 및 (d) 인간 면역글로불린 유전자 서열의 다른 DNA 서열로의 스플라이싱을 포함하는 임의의 다른 수단으로 제조, 발현, 생성 또는 단리된 모든 인간 항체를 포함한다. 그러한 재조합 인간 항체는 골격 및 CDR 영역이 인간 배선 면역글로불린 서열로부터 유래되는 가변 영역을 가진다. 그러나 특정 실시 형태에 있어서 그러한 재조합 인간 항체는 시험관 내에서 돌연변이가 유발될 수 있으며 (또는, 인간 Ig 서열에 있어서 유전자도입인 동물이 사용되는 경우, 생체 내 체세포 돌연변이 유발), 이에 따라 재조합 항체의 V_H 및 V_L 영역의 아미노산 서열은, 인간 배선 V_H 및 V_L 서열로부터 유래되어 그와 연관되지만 생체 내에서 인간 항체 배선 레퍼토리 내에는 자

연적으로 존재하지 않을 수도 있는 서열이다.

- [0097] 본원에 사용되는 "단리된 항체"는 항원 특이성이 상이한 다른 항체가 실질적으로 없는 항체를 지칭하기 위한 것이다(예컨대, CD30에 특이적으로 결합하는 단리된 항체에 CD30 이외의 항원에 특이적으로 결합하는 항체가 실질적으로 없음). 그러나, 인간 CD30의 에피토프, 아형태 또는 변이체에 특이적으로 결합하는 단리된 항체는 다른 관련 항원, 예를 들어 다른 종(예컨대, CD30 종 동종체) 유래의 항원에 대하여 교차 반응성을 가진다. 또한, 단리된 항체에는 다른 세포 물질 및/또는 화학 물질이 실질적으로 없을 수도 있다. 본 발명의 한 실시양태에서, 상이한 특이성을 갖는 "단리된" 단클론 항체의 조합물이 잘 정의된 조성을 조합된다.
- [0098] 용어 "인간화 항체"는 마우스와 같은 또 다른 포유동물 종의 배선으로부터 유도된 CDR 서열이 인간 골격 서열에 그래프팅된 항체를 지칭하기 위한 것이다. 부가적 골격 영역 변형이 인간 골격 서열 내에서 이루어질 수 있다.
- [0099] 용어 "키메라 항체"는 가변 영역 서열이 한 종으로부터 유래되고 불변 영역 서열이 또 다른 종으로부터 유래된 항체, 예컨대 가변 영역 서열이 마우스 항체로부터 유래되고 불변 영역 서열이 인간 항체로부터 유래된 항체를 지칭하기 위한 것이다.
- [0100] 용어 "에피토프"는 항체에 대해 또는 항체에 의해 특이적으로 결합할 수 있는 단백질 결정자를 의미한다. 에피토프는 통상적으로 아미노산 또는 당 측쇄와 같이 분자의 화학적 활성 표면기로 구성되고, 통상적으로는 특이적인 3차원 구조 특성뿐만 아니라 특이적인 전하 특성을 가진다. 입체형태 에피토프와 입체형태 에피토프는, 비-입체형태 에피토프와의 결합은 변성 용매의 존재 하에 소실되지만, 비-입체형태 에피토프와의 결합은 그렇지 않다는 점에서 구별된다.
- [0101] 본원에 사용되는 용어 "특이적 결합"은 소정의 항원에 대한 항체 결합을 지칭한다. 전형적으로, 항체는 10^{-7} M 이하의 해리상수(K_D)로 결합하고, 소정의 항원에 대한 결합 K_D 가 소정의 항원 또는 밀접하게 관련된 항원이 아닌 비-특이적 항원(예컨대, BSA, 카제인)에 대한 결합의 K_D 보다 2배 이상 더 낮은 K_D 로 소정의 항원에 결합한다. 문구 "항원을 인식하는 항체" 및 "항원에 대해 특이적인 항체"는 본원에서 "항원에 특이적으로 결합하는 항체"라는 용어와 상호 혼용된다.
- [0102] 본원에 사용되는 "이소타입"은 중쇄 불변 영역 유전자에 의해 코딩되는 항체 클래스(예컨대, IgM 또는 IgG1)를 지칭한다.
- [0103] 본원에 사용되는 용어 "백터"는 연결된 또 다른 핵산을 전달할 수 있는 핵산 분자를 지칭하기 위한 것이다. 백터의 유형 중 하나는 추가 DNA 절편이 결합될 수 있는 원형 이중가닥 DNA 루프를 지칭하는 "플라스미드"이다. 또 다른 백터 유형은 바이러스 백터인데, 이 백터에서는 추가 DNA 절편이 바이러스 게놈 내로 결합될 수 있다. 특정 백터는 이들이 도입된 숙주 세포에서 자가 복제될 수 있다(예컨대, 박테리아 복제 기원을 보유하는 박테리아 백터 및 에피솜형 포유동물 백터). 다른 백터(예컨대, 비-에피솜형 포유동물 백터)도 숙주 세포로의 도입 시에 숙주 세포의 게놈에 통합되어 숙주 게놈과 함께 복제될 수 있다. 또한, 일부 백터는 이들과 작동가능하게 연결된 유전자의 발현을 지정할 수 있다. 본원에서는 이러한 백터를 "재조합 발현 백터" (또는 간단하게 "발현 백터")라고 지칭한다. 일반적으로, 재조합 DNA 기술에 유용한 발현 백터는 종종 플라스미드 형태이다. 플라스미드가 가장 흔히 사용되는 백터 형태이므로, 본 명세서에서 "플라스미드" 및 "백터"는 혼용될 수 있다. 그러나, 본 발명은 동등한 기능을 수행하는, 바이러스 백터(예컨대, 복제 결핍 레트로바이러스, 아데노바이러스 및 아데노-관련 바이러스)와 같은 다른 형태의 발현 백터도 포함한다.
- [0104] 본원에 사용되는 용어 "재조합 숙주 세포" (또는 간단하게 "숙주 세포")는 재조합 발현 백터가 도입된 세포를 지칭한다. 이러한 용어는 특정 대상 세포뿐만 아니라 이러한 세포의 자손까지 지칭하는 것으로 이해해야 한다. 돌연변이 또는 환경적인 영향으로 인해 이후 세대에서 특정 변형이 일어날 수 있기 때문에, 사실상 이러한 자손은 모(parent) 세포와 동일하지 않을 수 있지만, 본원에 사용되는 용어 "숙주 세포"의 범위에 여전히 포함된다. 재조합 숙주 세포는 예를 들어 CHO 세포, 트랜스팩토마 및 림프구 세포를 포함한다.
- [0105] 본원에 사용되는 용어 "대상"은 임의의 인간 또는 인간의 동물을 포함한다. 용어 "인간의 동물"은 모든 척추동물, 예를 들어 포유동물 및 비-포유동물, 예를 들어 인간의 영장류, 양, 개, 소, 닭, 양서류, 파충류 등을 포함한다.
- [0106] 용어 "유전자도입 인간의 동물"은 하나 이상의 인간 중쇄 및/또는 경쇄 도입유전자 또는 도입염색체(동물의 천연 게놈 DNA에 통합되거나 통합되지 않음)를 포함하며, 완전 인간 항체를 발현할 수 있는 게놈을 가지는 인간의 동물을 지칭한다. 예를 들어, 유전자도입 마우스는 인간 경쇄 도입유전자 및 인간 중쇄 도입유전자나 인간 중쇄

도입염색체를 보유할 수 있어서, 상기 마우스는 CD30 항원 및/또는 CD30 발현 세포로 면역화되는 경우에 인간 항-CD30 항체를 생성한다. 인간 중쇄 도입유전자는 유전자도입, 예를 들어 HuMAb 마우스의 경우에서와 같이 마우스의 염색체 DNA로 통합될 수도 있고, 인간 중쇄 도입유전자는 WO 02/43478에 기재된 바와 같이 도입염색체 (예컨대, KM) 마우스의 경우에서와 같이 염색체외에서 유지될 수도 있다. 이러한 유전자도입 및 도입염색체 마우스는 V-D-J 재조합 및 이소타입 전환을 수행함으로써 CD30에 대한 인간 단클론 항체의 각종 이소타입(예컨대, IgG, IgA 및/또는 IgE)을 생성할 수 있다.

[0107] 본 발명의 다양한 측면이 하기 단락에 더욱 상세하게 기재되어 있다.

[0108] 푸코스 잔기가 결합되고 증진된 ADCC 활성을 갖는 항-CD30 항체

[0109] 본 발명은 푸코스실화된 형태의 항체에 비해, CD30 발현 세포에 대해 증진된 항체 지정 세포독성(ADCC)을 갖는 탈푸코스실화된 항-CD30 항체에 관한 것이다. 한 바람직한 실시양태에서, 본 발명의 탈푸코스실화된 항체는 시험관 내에서 L1236 세포의 ADCC를 유도하고, 여기에서 푸코스실화된 형태의 항체는 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 항체 농도 및 1:50의 표적 세포 대 이펙터 세포 비의 조건 하에서 ADCC를 유도하지 않는다. 또 다른 바람직한 실시양태에서, 본 발명의 탈푸코스실화된 항체는 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 항체 농도 및 1:50의 표적 세포 대 이펙터 세포 비의 조건 하에서, 푸코스실화된 형태의 항체에 비해, 시험관 내 L540, L428 및 카르파스 세포의 ADCC를 증진시킨다.

[0110] 본 발명의 탈푸코스실화된 항체의 증가된 ADCC 활성이, 예를 들어 ADCC 활성을 탈푸코스실화 및 푸코스실화된 형태에 대한 동일한 조건(예컨대, 동일한 항체 농도 및 동일한 표적 대 이펙터 세포 비) 하에서 측정할 때, 푸코스실화된 형태의 항체 대비, 세포 용해율 %의 증가분으로서 정량화될 수 있다. 바람직하게, 본 발명의 탈푸코스실화된 항-CD30 항체는 CD30+ 세포의 용해율 %를, 푸코스실화된 형태의 항체 대비, 1.25배 이상(즉, 탈푸코스실화된 형태 대 푸코스실화된 형태의 용해율 %의 비는 1.25 이상임), 더 바람직하게는 2배 이상, 더욱 더 바람직하게는 2.5배 이상, 더욱 더 바람직하게는 3배 이상 증가시킨다. 각종 실시양태들에서, 탈푸코스실화된 형태의 항체는, 바람직하게 항체가 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 있고, 표적 세포 대 이펙터 세포 비가 1:50인 조건 하에서, 푸코스실화된 형태의 항체 대비, CD30+ 세포의 용해율 %를 1.25배 내지 3.25배, 바람직하게는 1.5배 내지 3.25배, 더욱 더 바람직하게는 1.61배 내지 3.25배, 더욱 더 바람직하게는 2.15배 내지 3.25배, 더욱 더 바람직하게는 2.63배 내지 3.25배 증가시킨다.

[0111] 부가적으로 또한 대안적으로, 본 발명의 탈푸코스실화된 항체의 증가된 ADCC 활성은, 예를 들어 푸코스실화된 형태 대비, 탈푸코스실화된 형태에 대한 EC_{50} 값의 감소분에 의해 측정되는 증가된 효능(potency)으로서 정량화될 수 있다. 이는 푸코스실화된 형태 대 탈푸코스실화된 형태의 EC_{50} 비에 의해 정량화될 수 있다. 바람직하게, CD30+ 세포의 ADCC에 대한 푸코스실화된 형태 대 탈푸코스실화된 형태의 EC_{50} 비는 3(즉, 탈푸코스실화된 형태의 EC_{50} 는 푸코스실화된 형태의 EC_{50} 보다 3배 더 낮음) 이상, 더 바람직하게는 4 이상, 더욱 더 바람직하게는 5 이상, 7 이상, 10 이상, 15 이상 또는 20 이상이다. 각종 실시양태들에서, CD30+ 세포의 ADCC에 대한 푸코스실화된 형태 대 탈푸코스실화된 형태의 EC_{50} 비는 2 내지 27.1, 더 바람직하게는 4 내지 27.1, 더욱 더 바람직하게는 4.7 내지 27.1, 더욱 더 바람직하게는 7.8 내지 27.1, 더욱 더 바람직하게는 11.1 내지 27.1이다. 바람직하게는, EC_{50} 값은 1:50의 표적 세포 대 이펙터 세포 비, 및 0.0001 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 내지 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 또는 그 이상의 항체 농도를 이용하는 ADCC 검정으로 결정된다.

[0112] 본 발명의 ADCC 검정에 사용될 수 있고 본 발명의 탈푸코스실화된 항체가 푸코스실화된 형태의 항체에 비해 증진된 ADCC 활성을 나타내게 하는 CD30+ 세포주의 예에는 L540 세포(인간 호지킨 림프종; DSMZ 기탁 번호 ACC 72), L428 세포(인간 호지킨 림프종; DSMZ 기탁 번호 ACC 197), L1236 세포(인간 호지킨 림프종; DSMZ 기탁 번호 ACC 530), 및 카르파스 세포(인간 T 세포 림프종; DSMZ 기탁 번호 ACC 31)가 포함된다. 탈푸코스실화된 항-CD30 항체에 의한 증진된 ADCC 효과는 ADCC가 푸코스실화된 형태의 항체로는 관찰되지 않게 되는 항체 농도에서 CD30+ 세포 상에서의 ADCC 활성을 초래할 수 있다. 예를 들어, 표적 세포:이펙터 세포 비가 1:50인 시험관 내 ADCC 검정에서, 탈푸코스실화된 항-CD30 항체로 인한 ADCC가 0.005 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 정도로 낮은 농도에서 CD30+ 세포주 L1236에서 관찰되며, 반면 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 정도로 높은 농도에서 푸코스실화된 항-CD30 항체에서 ADCC 활성이 검출되지 않는다.

[0113] 항-CD30 항체의 탈푸코스실화

[0114] 항-CD30 항체(예컨대, 쥐, 키메라, 인간화 및 인간 항체)가 당업계에서 공지되어 있고, 본 발명에 이용될 수 있다. 본 발명의 항-CD30 항체는, 항체에 푸코스실 잔기가 결합되도록 변형된다. 각종 방법들 중 하나에 의해, 푸코스실 잔기가 결합된 항체가 제조될 수 있다. 예를 들어, 항체는 탄수화물 사슬에 대한 푸코스실 잔기의 부가가 역

제되도록 하는 변경된 글리코실화 기작으로, 세포에서 재조합 DNA 기술을 이용하여 발현될 수 있다. 부가적으로 또는 대안적으로, 항체는 푸코실 잔기의 화학적 제거를 통해 탈푸코실화될 수 있다.

[0115] 한 실시양태에서, 항체는 세포주가 그것의 탄수화물 내 푸코스가 결합된 단백질을 생성하도록 푸코실트랜스퍼라제 효소가 결합된 세포에서 발현된다. 예를 들어, 세포주 Ms704, Ms705 및 Ms709에는 푸코실트랜스퍼라제 유전자, FUT8(알파(1,6) 푸코실트랜스퍼라제)가 결합되어 있어, Ms704, Ms705 및 Ms709 세포주에서 발현되는 항체에는 그것의 탄수화물에 푸코스가 결합되어 있다. Ms704, Ms705, 및 Ms709 FUT8^{-/-} 세포주는 2개 교체 벡터를 이용하여 CHO/DG44 세포 내의 FUT8 유전자의 표적화 붕괴에 의해 발생되었다(미국 특허 공보 제20040110704호 (Yamane *et al.* and Yamane-Ohnuki *et al.*) (2004) *Biotechnol Bioeng* 87:614-22 참고). 또 다른 예로서, 유럽 특허 제1,176,195호(Hanai 등)에는 푸코실트랜스퍼라제를 코딩하는 FUT8 유전자가 기능적으로 파괴되어서, 그러한 세포주에서 발현되는 항체는 알파 1,6 결합-관련 효소를 감소 또는 제거함으로써 하이포푸코실화를 나타내는 세포주가 기재되어 있다. [Hanai 등]은 또한 항체의 Fc 영역에 결합하거나 효소 활성을 가지지 않는 N-아세틸글루코사민에 푸코스를 첨가함에 대한 효소 활성이 본래 낮은 세포주, 예를 들어 래트 골수종 세포주 YB2/0(ATCC CRL 1662)에 대해 기재하고 있다. PCT 공보 WO 03/035835(Presta)에는 변이체 CHO 세포주인 Lec13 세포가 개시되어 있는데, 이 세포는 푸코스가 Asn(297)-결합 탄수화물에 부착되는 능력이 감소되었으며, 또한 이에 따라 그 숙주 세포에서 발현되는 항체가 하이포푸코실화된다는(또한 [Shields, R.L. *et al.* (2002) *J. Biol. Chem.* 277:26733-26740] 참고). PCT 공보 WO 99/54342(Umana 등)에는 당단백질-변형 글리코실 트랜스퍼라제(예컨대, 베타(1,4)-N-아세틸글루코사미닐트랜스퍼라제 III(GnTIII))를 발현하도록 공학처리된 세포주에서 발현되는 항체가 항체의 ADCC 활성을 증가시키게 되는 GlcNAc 구조체의 양분 증가를 나타내는 세포주가 개시되어 있다 (또한 [Umana *et al.* (1999) *Nat. Biotech.* 17:176-180] 참고).

[0116] 또 다른 실시양태에서, 항-CD30 항체는 발현되고, 푸코실 잔기(들)는 푸코시다제 효소를 이용하여 절단된다. 예를 들어, 푸코시다제 알파-L-푸코시다제는 항체로부터 푸코실 잔기를 제거한다(Tarentino, A.L. *et al.* (1975) *Biochem.* 14:5516-23).

[0117] 부가적으로, 다른 실시양태에서, 항체의 다른 형태의 글리코실화가 또한 변형된다. 예를 들어 비글리코실화(aglycosylated) 항체가 만들어질 수 있다(즉, 항체에는 글리코실화가 결합됨). 그러한 탄수화물 변형은 예를 들어 항체 서열 내의 하나 이상의 글리코실화 부위의 변경에 의해 성취될 수 있다. 예를 들어, 하나 이상의 아미노산 치환이 이루어져, 하나 이상의 가변 영역 골격의 글리코실화 부위를 제거함으로써 상기 부위에서 글리코실화를 제거할 수 있다. 그러한 비글리코실화는 항원에 대한 항체의 친화도를 증가시킬 수도 있다. 그러한 접근법은 미국 특허 제5,714,350호 및 동 제6,350,861호(Co 등)에 더욱 상세하게 기재되어 있다.

[0118] 항-CD30 항체 상에서의 푸코실 잔기의 부재의 특징화

[0119] 본 발명의 항체에는 푸코실 잔기가, 예를 들어 Fc 부분 탄수화물 사슬에서 결합되어 있다. 항체는 당업계에 공지된 표준 기법, 예컨대 APTS 모세관 전기영동 레이저 유도 형광을 이용하여 푸코실 잔기의 부재에 대해 시험할 수 있다. 간략히, 펩티드 N-글리카나제(프로자임(Prozyme))를 첨가하여 하룻밤 동안 인큐베이션함으로써, 정제된 항-CD30 항체의 N-연결 올리고당을 방출할 수 있다. 탄수화물을 재현탁시키고, 푸코실 잔기의 탈시알릴화 및 손실이 최소화되는 온화한 환원 아민화 조건 하에서 8-아미노피렌-1,3,6-트리술포네이트(APTS)로 유도화한다. 반응 부가물을 레이저 유도 형광 검출기(베크만 쿨터(Beckman Coulter))를 이용한 모세관 전기영동에 의해 분석한다. 푸코스의 부재는 푸코스를 함유하는 동일한 항체와 비교하여, 이동 전기영동에 의해 관찰될 수 있다. 항-CD30 항체 상에서의 푸코스의 부재를 시험하는 또 다른 기법은 HPLC를 이용한 단당류 분석이다. CD30 결합을 결정하기 위한 적당한 검정법은 실시예에서 추가 기재되어 있다.

[0120] CD30+ 세포의 항체 의존성 세포 사멸의 특징화

[0121] 탈푸코실화된 항-CD30 항체를 CD30 발현 세포의 식작용 및 사멸을 매개하는 능력에 대해 시험할 수도 있다. 한 실시양태에서, 탈푸코실화된 항-CD30 항체는 동일 농도에서 비교 시, 푸코스-함유 동일 항체에 비해 CD30 발현 세포의 사멸을 증진시킨다. 또 다른 실시양태에서, 탈푸코실화된 항-CD30 항체는, 푸코스-함유의 동일 항체가 동일 농도에서 세포 사멸을 유도하지 않는 경우, CD30 발현 세포의 사멸을 유도한다.

[0122] 단클론 항체의 ADCC 활성은 확립된 시험관 내 검정으로 시험될 수 있다. 한 예로서, 크롬 방출 ADCC 검정을 이용할 수 있다. 간략히, 건강한 공여자로부터의 말초혈 단핵 세포(PBMC) 또는 다른 이펙터 세포를 피콜 하이파크(Ficoll Hypaque) 밀도 원심분리한 후에 오염 적혈구를 용해시켜 정제할 수 있다. 세정된 PBMC는 10% 열-불활성화 우태 혈청이 보충된 RPMI에 현탁시키고 이펙터 세포 대 종양 세포(이펙터 세포:종양 세포)의 다양한 비로

^{51}Cr 표지된 CD30 발현 세포와 혼합할 수 있다. 이어서, 항-CD30 항체를 다양한 농도로 첨가할 수 있다. 이소타입 매칭 항체를 음성 대조군으로서 사용할 수 있다. 분석은 37°C에서 4 내지 18시간 동안 수행할 수 있다. 배양 상등액으로의 ^{51}Cr 방출량을 측정함으로써 샘플을 세포용해에 관해 검정할 수 있다. 또한, 항-CD30 단클론을 서로 조합하여 시험함으로써, 다중 단클론 항체의 사용으로 세포용해가 향상되는지 여부를 결정할 수도 있다.

[0123] 식작용 매개 능력 및 CD30 발현 세포의 사멸에 대해 시험하기 위해 사용될 수 있는 한 대안적 검정법은 시간 분해 형광분석 검정법(time resolved fluorometry assay)이다. 간략히, CD30 발현 세포에, 세포막을 투과하는 형광 증진 리간드(BATDA)의 아세톡시메틸 에스테르를 로딩한다. 세포 내에서 에스테르 결합이 가수분해되고, 그 화합물은 더 이상 세포막을 통과할 수 없다. 이어서, 항-CD30 항체를 각종 농도로 첨가할 수 있다. 세포분해 후, यू로퓴 용액(europium solution)(피어킨 엘머(Perkin Elmer))을 첨가하고, 임의의 유리 리간드는 यू로퓴에 결합하여, 마이크로플레이트 리더(피어킨 엘머)에서 판독될 수 있는 고흡광성 및 안정성 킬레이트(EuTDA)를 형성한다. 측정된 신호는 분해된 세포의 양과 상관관계가 있다.

[0124] 또한, CD30에 결합하는 인간 단클론 항체를 생체 내 모델(예컨대, 마우스)에서 시험하여, CD30 발현 세포, 예를 들어 종양 세포의 식작용 및 사멸을 매개하는 데 있어서의 그것의 효능을 결정할 수도 있다. 이들 항체는 예를 들어 하기 비제한적 기준을 기초로 하여 선택할 수 있다:

[0125] 1) CD30 발현 생세포에의 결합;

[0126] 2) CD30에의 높은 결합 친화도;

[0127] 3) CD30상의 독특한 에피토프에의 결합(조합하여 사용될 경우, 상보적 활성을 보유하는 단클론 항체가 동일한 에피토프에의 결합에 대하여 경쟁할 가능성을 없앴);

[0128] 4) CD30 발현 세포의 흡소닌화;

[0129] 5) 인간 이펙터 세포의 존재 하에 CD30 발현 세포의 성장 억제, 식작용 및/또는 사멸의 매개.

[0130] 본 발명의 바람직한 인간 단클론 항체는 상기 기준들 중 하나 이상, 바람직하게는 모두를 충족시킨다. 한 특정 실시양태에서, 인간 단클론 항체는 예를 들어 2종 이상의 항-CD30 단클론 항체 또는 그것의 단편을 포함하는 약제학적 조성물로서 조합하여 사용된다. 예를 들면, 단일 요법에서 상이하지만 상보적인 활성을 보유하는 인간 항-CD30 단클론 항체를 배합하여, 원하는 치료 또는 진단 효과를 달성할 수 있다. 그 일례로 이펙터 세포의 존재 하에 표적 세포의 고도로 효과적인 사멸을 매개하는 항-CD30 인간 단클론 항체를 함유하고 CD30 발현 세포의 성장을 억제하는 또 다른 인간 항-CD30 단클론 항체와 조합된 조성물이 있다.

[0131] CD30에 대한 결합의 특정화

[0132] 본 발명의 항체를 CD30에 대한 결합에 대해, 예를 들어 당업계에서 공지된 표준 검정법, 예컨대 ELISA, FACS 분석 및/또는 비아코어(Biacore) 분석에 의해 시험할 수 있다. 한 전형적인 ELISA 검정에서, 간략히 마이크로타이트 플레이트를 PBS 중의 0.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 정제된 CD30으로 코팅한 후, PBS 중의 5% 소혈청 알부민(BSA)으로 차단한다. 항체 희석액을 각 웰에 첨가하고 37°C에서 1-2시간 동안 인큐베이션한다. 플레이트를 PBS/Tween으로 세정한 후, 알카리성 포스파타제에 접합된 2차 제제(예컨대, 인간 항체 또는 염소-항-인간 IgG Fc-특이적 다클론 시약)와 함께 37°C에서 1시간 동안 인큐베이션한다. 세정 후, 플레이트를 pNPP 기질(1 mg/ml)를 사용하여 현상하고, 405-650의 OD에서 분석한다.

[0133] CD30을 발현하는 생세포에 대한 단클론 항체의 결합을 입증하기 위해서는 유세포분류법을 이용할 수 있다. 유세포분류 프로토콜의 전형적인 예에서(단, 이에 제한되지는 않음), (표준 성장 조건 하에 성장한) CD30 발현 세포주를 0.1% BSA 및 20% 마우스 혈청을 함유하는 PBS 중 다양한 농도의 단클론 항체와 혼합하고, 37°C에서 1시간 동안 인큐베이션한다. 세정 후, 세포를 1차 항체 염색 시와 동일한 조건 하에 플루오레신-표지된 2차 항체(예컨대, 항-인간 IgG 항체)와 반응시킨다. 샘플을 단일 세포에 대한 광산란 및 측산란 성질을 이용하는 FACSscan 기기로 분석할 수 있다. 형광 현미경을 사용하는 한 대안적 방법의 분석법을 유세포분류법과 병행하여(또는 그 유세포분류법 대신에) 이용할 수 있다. 상기한 바 그대로의 동일한 방식으로 세포를 염색하여 형광 현미경으로 조사할 수 있다. 이 방법은 개개의 세포를 가시화할 수 있지만, 항원의 밀도에 따라 민감성이 감소될 수 있다.

[0134] 웨스턴 블로팅을 이용하여, 항-CD30 인간 IgG를 CD30 항원과의 반응성에 대해 추가로 시험할 수 있다. 예를 들어, CD30 발현 세포로부터의 세포 추출물을 제조하여 나트륨 도데실 술페이트(SDS) 폴리아크릴아미드 겔 전기영

동시킬 수 있다. 전기영동 후, 분리된 항원을 니트로셀룰로스 막으로 옮기고 20% 마우스 혈청으로 차단하고, 시험할 단클론 항체로 프로빙(probing)한다. 인간 항체 결합을 알칼리성 포스파타제에 연결된 항-종 특이적 2차 항체를 사용하여 검출하고, BCIP/NBT 기질 정제(시그마 케미칼 컴파니(Sigma Chem. Co.)(미국 미주리주 세인트 루이스 소재))로 발색시킬 수 있다. RIA 및 비아코어 분석을 포함한, CD30에 대한 항체의 결합 능력을 평가하는 다른 기법이 당업계에서 공지되어 있다. CD30 결합을 결정하기 위한 적당한 검정법이 실시예에 상세히 기재되어 있다.

[0135] 키메라 또는 인간화 항-CD30 항체

[0136] 특정 실시양태에서, 본 발명의 탈푸코실화된 항-CD30 항체는 키메라 또는 인간화 항체이다. 그러한 항체는 당업계에서 이용가능한 마우스 항-CD30 항체, 및 마우스 항체를 키메라 또는 인간화 항체로 전환하기 위한 확립된 절차를 이용하여 제조될 수 있다. 그러한 마우스 항-CD30 항체의 비제한적 예에는 AC10, HeFi-1, Ber-H2, Ki-1, Ki-4, HRS-3, Irac, HRS-4, M44, M67 및 Ber-H8 단클론 항체가 포함된다. 또한, 인간화 항-CD30 항체는 PCT 공보 WO 02/4661에 기재되어 있다.

[0137] 인간 단클론 항-CD30 항체

[0138] 본 발명의 바람직한 항체는 인간 항-CD30 단클론 항체를 포함한다. 인간 항-CD30 단클론 항체의 예는 PCT 공개 WO 03/059282에 원래 기재되어 있는 바대로 단리되고 구조적으로 특징화된 5F11, 17G1 및 2H9 항체를 포함한다. 5F11, 17G1 및 2H9의 V_H 아미노산 서열이 서열 번호 1, 2, 및 3에 각기 나와 있다. 5F11, 17G1 및 2H9의 V_L 아미노산 서열이 서열 번호 4, 5 및 6에 각기 나와 있다.

[0139] 이 항체들 각각이 CD30에 결합할 수 있다면, V_H 및 V_L 서열은 "혼합 및 매치되어", 본 발명의 다른 항-CD30 결합 분자를 생성할 수 있다. 그러한 "혼합 및 매치된" 항체의 CD30 결합은 당업계에 공지된 결합 검정, 예컨대 FACS 분석 및 ELISA 검정을 이용하여 시험할 수 있다. 바람직하게는, V_H 및 V_L 사슬이 혼합 및 매칭될 경우, 특정 V_H/V_L 쌍 유래의 V_H 서열은 구조적으로 유사한 V_H 서열로 대체된다. 마찬가지로, 바람직하게는 특정 V_H/V_L 쌍 형성 유래의 V_L 서열은 구조적으로 유사한 V_L 서열로 대체된다. 예를 들어 5F11 및 2H9의 V_H 서열은 혼합 및 매치가 특히 쉬운데, 이는 이 항체들에서 동일한 배선 서열로부터 유래되는 V_H 서열이 사용되며(V_H 4-34), 따라서 이들이 구조적 유사성을 나타내기 때문이다.

[0140] 특별한 실시양태에서, 본 발명은

[0141] (a) 서열 번호 1, 2 및 3의 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및

[0142] (b) 서열 번호 4, 5 및 6의 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역

[0143] 을 포함하고, 인간 CD30에 특이적으로 결합하는, 탈푸코실화된 단클론 항체 또는 그것의 항원 결합 부분을 제공한다.

[0144] 바람직한 중쇄 및 경쇄 조합은

[0145] (a) 서열 번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 (b) 서열 번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역; 또는

(a) 서열 번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 (b) 서열 번호 5의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역; 또는

[0146] (a) 서열 번호 3의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 (b) 서열 번호 6의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역

[0147] 을 포함한다.

[0148] 또 다른 측면에서, 본 발명은 5F11, 17G1 및 2H9의 중쇄 및 경쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3, 또는 그 조합을 포함하는 탈푸코실화된 항체를 제공한다. 5F11, 17G1 및 2H9의 V_H CDR1의 아미노산 서열이 서열 번호 7, 8 및 9에 각기 나와 있다. 5F11, 17G1 및 2H9의 V_H CDR2의 아미노산 서열이 서열 번호 10, 11 및 12에 각기 나와 있다. 5F11, 17G1 및 2H9의 V_H CDR3의 아미노산 서열이 서열 번호 13, 14 및 15에 각기 나와 있다. 5F11, 17G1 및 2H9

의 V_k CDR1의 아미노산 서열이 서열 번호 16, 17 및 18에 각기 나와 있다. 5F11, 17G1 및 2H9의 V_k CDR2의 아미노산 서열이 서열 번호 19, 20 및 21에 각기 나와 있다. 5F11, 17G1 및 2H9의 V_k CDR3의 아미노산 서열이 서열 번호 22, 23 및 24에 각기 나와 있다. CDR 영역은 카바트(Kabat) 시스템을 이용하여 나와 있다[Kabat, E. A., *et al.* (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242]

[0149] 상기 항체들 중 각각이 CD30에 결합할 수 있고, 항원 결합 특이성이 주로 CDR1, 2 및 3 영역에 의해 제공된다면, V_H CDR1, 2 및 3 서열과 V_k CDR1, 2 및 3 서열은 "혼합 및 매치"되어(즉, 상이한 항체 유래의 CDR은, 각각의 항체가 V_H CDR1, 2 및 3과 V_k CDR1, 2 및 3을 반드시 포함하여야 함에도 불구하고, 혼합 및 매치될 수 있음) 본 발명의 다른 항-CD30 결합 분자를 생성할 수 있다. 그러한 "혼합 및 매치된" 항체의 CD30 결합은 당업계에 공지된 결합 검정, 예컨대 FACS 분석 및 ELISA 검정을 이용하여 시험할 수 있다. 바람직하게는 V_H CDR 서열이 혼합 및 매치될 경우, 특정 V_H 서열 유래의 CDR1, CDR2 및/또는 CDR3 서열은 구조적으로 유사한 CDR 서열(들)로 대체된다. 마찬가지로, V_k CDR 서열이 혼합 및 매치될 경우, 특정 V_k 서열 유래의 CDR1, CDR2 및/또는 CDR3 서열은 바람직하게는 구조적으로 유사한 CDR 서열(들)로 대체된다. 신규한 V_H 및 V_L 서열은, 하나 이상의 V_H 및/또는 V_L CDR 영역의 서열을 단클론 항체인 항체 5F11, 17G1 및 2H9에 있어서 본원에 개시된 CDR 서열 유래의 구조적으로 유사한 서열을 사용함으로써 생성할 수 있다는 것이 당업자에게는 자명할 것이다.

[0150] 따라서, 또 다른 측면에서, 본 발명은

[0151] (a) 서열 번호 7, 8 및 9의 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1;

[0152] (b) 서열 번호 10, 11 및 12의 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2;

[0153] (c) 서열 번호 13, 14 및 15의 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3;

[0154] (d) 서열 번호 16, 17 및 18의 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR1;

[0155] (e) 서열 번호 19, 20 및 21의 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR2; 및

[0156] (f) 서열 번호 22, 23 및 24의 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR3

[0157] 을 포함하며, CD30에 특이적으로 결합하는, 탈푸코실화된 단클론 항체 또는 그것의 항원 결합 부분을 제공한다.

[0158] 한 바람직한 실시양태에서, 항체는

[0159] (a) 서열 번호 7을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1;

[0160] (b) 서열 번호 10을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2;

[0161] (c) 서열 번호 13을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3;

[0162] (d) 서열 번호 16을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR1;

[0163] (e) 서열 번호 19를 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR2; 및

[0164] (f) 서열 번호 22을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR3

[0165] 을 포함한다.

[0166] 또 다른 바람직한 실시양태에서, 항체는

[0167] (a) 서열 번호 8을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1;

[0168] (b) 서열 번호 11을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2;

- [0169] (c) 서열 번호 14을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3;
- [0170] (d) 서열 번호 17을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR1;
- [0171] (e) 서열 번호 20을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR2; 및
- [0172] (f) 서열 번호 24를 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR3
- [0173] 을 포함한다.
- [0174] 또 다른 바람직한 실시양태에서, 항체는
- [0175] (a) 서열 번호 9를 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1;
- [0176] (b) 서열 번호 12를 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2;
- [0177] (c) 서열 번호 15를 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3;
- [0178] (d) 서열 번호 18을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR1;
- [0179] (e) 서열 번호 21을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR2; 및
- [0180] (f) 서열 번호 24를 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR3
- [0181] 을 포함한다.
- [0182] 특별한 배선 서열을 갖는 항체
- [0183] 특정 실시양태에서 본 발명의 탈푸코실화된 항체는 특별한 배선의 중쇄 면역글로불린 유전자 유래의 중쇄 가변 영역 및/또는 특별한 배선의 경쇄 면역글로불린 유전자 유래의 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0184] 예를 들어, 한 바람직한 실시양태에서, 본 발명은 인간 V_H 4-34 유전자의 산물이거나 그것으로부터 유래된 중쇄 가변 영역을 포함하며 CD30에 특이적으로 결합하는, 탈푸코실화된 단클론 항체 또는 그것의 항원 결합 부분을 제공한다. 또 다른 바람직한 실시양태에서, 본 발명은 인간 V_H 3-07 유전자의 산물이거나 그것으로부터 유래된 중쇄 가변 영역을 포함하며 CD30에 특이적으로 결합하는, 탈푸코실화된 단클론 항체 또는 그것의 항원 결합 부분을 제공한다. 또 다른 바람직한 실시양태에서, 본 발명은 인간 V_K L15 유전자의 산물이거나 그것으로부터 유래된 경쇄 가변 영역을 포함하며 CD30에 특이적으로 결합하는, 탈푸코실화된 단클론 항체 또는 그것의 항원 결합 부분을 제공한다. 또 다른 바람직한 실시양태에서, 본 발명은 인간 V_K A27 유전자의 산물이거나 그것으로부터 유래된 경쇄 가변 영역을 포함하며 CD30에 특이적으로 결합하는, 탈푸코실화된 단클론 항체 또는 그것의 항원 결합 부분을 제공한다. 또 다른 바람직한 실시양태에서, 본 발명은 인간 V_K L6 유전자의 산물이거나 그것으로부터 유래된 경쇄 가변 영역을 포함하며 CD30에 특이적으로 결합하는, 탈푸코실화된 단클론 항체 또는 그것의 항원 결합 부분을 제공한다.
- [0185] 또 다른 바람직한 실시양태에서, 본 발명은
- [0186] (a) (서열 번호 25 및 26에 각기 나와 있는 아미노산 서열을 코딩하는) 인간 V_H 4-34 또는 3-07의 산물이거나 그것으로부터 유래된 중쇄 가변 영역을 포함하고;
- [0187] (b) (서열 번호 27, 28 및 29에 각기 나와 있는 아미노산 서열을 코딩하는) 인간 V_K L15, A27 또는 L6 의 산물이거나 그것으로부터 유래된 경쇄 가변 영역을 포함하며;
- [0188] (c) 인간 CD30에 특이적으로 결합하는,
- [0189] 탈푸코실화된 단클론 항체 또는 그것의 항원 결합 부분을 제공한다.
- [0190] 한 바람직한 V_H 및 V_K 배선 조합은 V_H 4-34 및 V_K L15이다. V_H 4-34 및 V_K L15의 V_H 및 V_K 를 각기 갖는 항체의 한 예는 5F11 항체이다. 또 다른 바람직한 V_H 및 V_K 배선 조합은 V_H 3-07 및 V_K A27이다. V_H 3-07 및 V_K A27의 V_H 및 V_K 를 각기 갖는 항체의 한 예는 17G1 항체이다. 또 다른 바람직한 V_H 및 V_K 배선 조합은 V_H 4-34 및 V_K L6이다. V_H 4-34 및 V_K L6의 V_H 및 V_K 를 각기 갖는 항체의 한 예는 2H9 항체이다.

- [0191] 본원에 사용되는 인간 항체는, 항체의 가변 영역이 인간 배선 면역글로불린 유전자를 사용하는 시스템으로부터 수득되는 경우, 특별한 배선 서열의 "산물" 또는 그것으로부터 "유래"된 중쇄 또는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 그러한 시스템은 관심 항원으로 인간 면역글로불린 유전자를 갖는 유전자도입 마우스를 면역화하는 것, 또는 관심 항원을 갖는 파지 상에 표시된 인간 면역글로불린 유전자 라이브러리를 스크리닝하는 것을 포함한다. 인간 배선 면역글로불린 서열의 "산물" 또는 그것으로부터 "유래"된 인간 항체는 인간 항체의 아미노산 서열을 인간 배선 면역글로불린의 아미노산 서열과 (예컨대, V베이스 데이터베이스를 이용하여) 비교하고, 인간 항체의 서열과 서열에 있어 가장 근접한(즉, 최대 동일성 %을 갖는) 인간 배선 면역글로불린 서열을 선택하는 것과 같은 방법에 의해 동정될 수 있다. 특별한 인간 배선 면역글로불린 서열의 "산물" 또는 그것으로부터 "유래"된 인간 항체는, 예를 들어 자연 발생 체세포 돌연변이 또는 부위-지정 돌연변이의 의도적 도입으로 인하여 배선의 서열 대비, 아미노산 차이를 가질 수도 있다. 그러나 선택된 인간 항체는 전형적으로 아미노산 서열에 있어서 인간 배선 면역글로불린 유전자에 의해 코딩되는 아미노산 서열과의 동일성이 90% 이상이며, 다른 종의 배선 면역글로불린 아미노산 서열(예컨대, 쥐 배선 서열)과 비교할 경우, 인간 항체를 인간이라고 확인하는 아미노산 잔기를 포함한다. 특정의 경우에 있어서 인간 항체는 아미노산 서열에 있어서 배선 면역글로불린 유전자에 의해 코딩되는 아미노산 서열과의 동일성이 95% 이상, 또는 심지어 적어도 96%, 97%, 98%, 또는 99%일 수도 있다. 전형적으로는 특정 인간 배선 서열로부터 유래되는 인간 항체는 인간 배선 면역글로불린 유전자에 의해 코딩되는 아미노산 서열 대비, 10개 이하의 아미노산 차이를 나타낸다. 특정의 경우에 있어서, 인간 항체는 배선 면역글로불린 유전자에 의해 코딩되는 아미노산 서열 대비, 5개 이하, 또는 심지어 4개, 3개, 2개 또는 1개 이하의 아미노산 차이를 나타낼 수도 있다.
- [0192] 상동성 항체
- [0193] 또 다른 바람직한 실시양태에서, 본 발명의 탈푸코실화된 항체는 본원에 기재된 바람직한 항체의 아미노산 서열에 대해 상동성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체로서, 본 발명의 항-CD30 항체의 요망되는 기능적 성질을 보유한다.
- [0194] 예를 들어, 본 발명은 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하는 탈푸코실화된 단클론 항체 또는 그것의 항원 결합 부분으로서,
- [0195] (a) 중쇄 가변 영역이 서열 번호 1, 2 및 3의 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열에 대한 상동성이 80% 이상인 아미노산 서열을 포함하고;
- [0196] (b) (경쇄 가변 영역이 서열 번호 4, 5 및 6의 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열에 대한 상동성이 80% 이상인 아미노산 서열을 포함하며;
- [0197] (c) 항체가 인간 CD30에 특이적으로 결합하는,
- [0198] 탈푸코실화된 단클론 항체 또는 그것의 항원 결합 부분을 제공한다.
- [0199] 다른 실시양태에서, V_H 및/또는 V_L 아미노산 서열은 상기 서열들에 대해 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 상동성을 가질 수 있다. 상기 서열들의 V_H 및 V_L 영역에 대해 큰 상동성(즉, 80% 이상)을 갖는 V_H 및 V_L 영역을 갖는 항체는, 서열 번호 1-6을 코딩하는 하나 이상의 핵산 분자의 돌연변이유발(예컨대, 부위-지정 또는 PCR-매개 돌연변이유발)에 의해, 또한 그에 이어서 본원에 기재된 결합 검정을 이용하여 보유된 기능(즉, CD30에 대한 결합)에 대해 코딩된 변경 항체를 시험함으로써 수득될 수 있다. 서열 번호 1-6을 코딩하는 핵산 분자가 서열 번호 30-35에 나와 있다.
- [0200] 2개 아미노산 서열 간의 상동성 %은 두 서열 간의 동일성 %와 동등하다. 2개 서열 사이의 동일성(%)은 갭(gap)의 수 및 각 갭의 길이를 고려하면서 2개 서열을 최적으로 정렬할 때 도입할 필요가 있는 서열이 공유하는 동일 위치의 수에 대한 함수이다(즉, 상동성(%) = 동일한 위치의 수/위치의 총 수 × 100). 서열의 비교 및 2개 서열 사이의 동일성(%) 측정은 하기 비제한적 실시예에 기재된 바와 같이 수학적인 알고리즘을 이용하여 달성할 수 있다.
- [0201] 2개 뉴클레오티드 서열 사이의 동일성(%)은 GCG 소프트웨어 팩키지(<http://www.gcg.com>에서 이용가능함) 중의 GAP 프로그램으로, NWSgapdna.CMP 매트릭스, 40, 50, 60, 70 또는 80의 갭 중량 및 1, 2, 3, 4, 5 또는 6의 길이 중량을 사용하여 결정할 수 있다. 2개 뉴클레오티드 또는 아미노산 서열 사이의 동일성(%)은 ALIGN 프로그램(버전 2.0)에 도입된 이. 메이어스(E. Meyers) 및 더블유. 밀러(W. Miller)의 알고리즘 [*Comput. Appl. Biosci.*, 4:11-17 (1988)]으로 PAM120 가중 잔기 표, 12의 갭 길이 패널티 및 4의 갭 패널티를 사용하여 측정

할 수도 있다. 또한, 2개 아미노산 서열 사이의 동일성(%)은 GCG 소프트웨어 팩키지(<http://www.gcg.com>에서 이용가능함) 중의 GAP 프로그램에 도입된 니들만(Needleman) 및 웬치(Wunsch)의 알고리즘 [*J. Mol. Biol.* 48:444-453(1970)]으로 Blossum 62 매트릭스 또는 PAM250 매트릭스, 16, 14, 12, 10, 8, 6 또는 4의 갭 중량 및 1, 2, 3, 4, 5 또는 6의 길이 중량을 사용하여 측정할 수 있다.

[0202] 2개 아미노산 서열 사이의 동일성(%)은 ALIGN 프로그램(버전 2.0)에 도입된 이. 메이어스(E. Meyers) 및 더블 유. 밀러(W. Miller)의 알고리즘 [*Comput. Appl. Biosci.*, 4:11-17 (1988)]으로 PAM120 중량 잔기 표, 12의 갭 길이 패널티 및 4의 갭 패널티를 사용하여 측정할 수 있다. 또한, 2개 아미노산 서열 사이의 동일성(%)은 GCG 소프트웨어 팩키지(<http://www.gcg.com>에서 이용가능함) 중의 GAP 프로그램에 도입된 니들만(Needleman) 및 웬치(Wunsch)의 알고리즘 [*J. Mol. Biol.* 48:444-453(1970)]으로 Blossum 62 매트릭스 또는 PAM250 매트릭스, 16, 14, 12, 10, 8, 6 또는 4의 갭 중량 및 1, 2, 3, 4, 5 또는 6의 길이 중량을 사용하여 측정할 수 있다.

[0203] 부가적으로 또는 대안적으로, 본 발명의 단백질 서열을 "질의 서열"로서 추가로 사용하여 공공 데이터베이스를 검색함으로써 예를 들어 관련 서열을 동정할 수 있다. 그러한 검색은 문헌 [Altschul, *et al.* (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-10]의 XBLAST 프로그램(버전 2.0)을 이용하여 수행할 수 있다. BLAST 프로그램(점수 = 50, 단어 길이 = 3)으로 BLAST 단백질 검색을 수행하여, 본 발명의 항체 분자와 상동성인 아미노산 서열을 얻을 수 있다. 비교 목적의 갭 정렬을 얻기 위해, 갭 BLAST를 문헌 [Altschul *et al.*, (1997) *Nucleic Acids Res.* 25 (17):3389-3402]에 기재된 바와 같이 이용할 수 있다. BLAST 및 갭 BLAST 프로그램을 이용할 경우, 각 프로그램 (예컨대, XBLAST 및 NBLAST)의 디폴트 파라미터를 사용할 수 있다. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>를 참고한다.

[0204] 보존적 변형을 갖는 항체

[0205] 특정 실시양태에서, 본 발명의 탈푸코실화된 항체는 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하고, 여기에서 이들 CDR 서열 중 하나 이상은 본원에 기재된 바람직한 항체(예컨대, 5F11, 17G1 및 2H9)에 기초한 특정화된 아미노산 서열, 또는 이들의 보존적 변형체를 포함하고, 항체는 본 발명의 항-CD30 항체의 요망되는 기능적 성질을 보유한다. 따라서, 본 발명은

[0206] CDR1, CDR2, 및 CDR3 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및 CDR1, CDR2, 및 CDR3 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 탈푸코실화된 단클론 항체 또는 그것의 항원 결합 부분으로서,

[0207] (a) 중쇄 가변 영역 CDR3 서열은 서열 번호 9, 12 또는 15의 아미노산 서열, 및 그것의 보존적 변형체를 포함하고;

[0208] (b) 경쇄 가변 영역 CDR3 서열은 서열 번호 18, 21 또는 24의 아미노산 서열, 및 그것의 보존적 변형체를 포함하며;

[0209] (c) 인간 CD30에 특이적으로 결합하는,

[0210] 탈푸코실화된 단클론 항체 또는 그것의 항원 결합 부분을 제공한다.

[0211] 한 바람직한 실시양태에서, 중쇄 가변 영역 CDR2 서열은 서열 번호 8, 11 또는 14의 아미노산 서열, 및 그것의 보존적 변형체를 포함하고; 경쇄 가변 영역 CDR2 서열은 서열 번호 17, 20 또는 23의 아미노산 서열, 및 그것의 보존적 변형체를 포함한다. 또 다른 바람직한 실시양태에서, 중쇄 가변 영역 CDR1 서열은 서열 번호 7, 10 또는 13의 아미노산 서열, 및 그것의 보존적 변형체를 포함하고; 경쇄 가변 영역 CDR1 서열은 서열 번호 16, 19 또는 22의 아미노산 서열, 및 그것의 보존적 변형체를 포함한다.

[0212] 본원에 사용되는 용어 "보존성 서열 변형체"는, 아미노산 서열을 포함하는 항체의 결합 특성에 유의하게 영향을 주거나 상기 결합 특성을 유의하게 변경시키지 않는 아미노산 변형을 지칭하기 위한 것이다. 그러한 보존성 변형은 아미노산 치환, 부가 및 결실을 포함한다. 변형은 당업계에서 공지된 표준 기술, 예를 들어 부위-지정 돌연변이 유발 및 PCR-매개 돌연변이유발에 의해 본 발명의 항체 내로 도입될 수 있다. 보존성 아미노산 치환은 아미노산 잔기가 유사한 측쇄를 갖는 아미노산 잔기로 대체되는 것이다. 유사한 측쇄를 갖는 아미노산 잔기 패밀리는 당업계에서 정의되었다. 이 패밀리는 염기성 측쇄(예컨대, 리신, 아르기닌, 히스티딘), 산성 측쇄(예컨대, 아스파르트산, 글루탐산), 비하전된 극성 측쇄(예컨대, 글리신, 아스파라긴, 글루타민, 세린, 트레오닌, 티로신, 시스테인, 트립토판), 비극성 측쇄(예컨대, 알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 프롤린, 페닐알라닌, 메티오닌), 베타-분지화된 측쇄(예컨대, 트레오닌, 발린, 이소류신) 및 방향족 측쇄(예컨대, 티로신, 페닐알라닌, 트립토판, 히스티딘)를 포함하는 아미노산을 포함한다. 따라서, 본 발명의 항체의 CDR 영역 내의 하나 이상의 아미노산 잔기는 동일한 측쇄 패밀리 유래의 다른 아미노산 잔기로 대체될 수 있으며 변경된 항체는 본원에 기

술되어 있는 기능적 검정을 이용하여 보유된 기능(즉, 상기 (i) 내지 (iv)에 나타내어져 있는 기능)에 대하여 시험할 수 있다.

[0213] 대안적으로, 또 다른 실시양태에서는, 예를 들어 포화 돌연변이유발법에 의해 항-CD30 항체 코딩 서열의 전체 또는 일부에 돌연변이가 무작위로 도입될 수 있고, 이로써 생성되는 변형된 항-CD 항체를 결합 활성에 대해 스크리닝할 수 있다.

[0214] 본 발명의 항-CD30 항체와 동일한 에피토프에 결합하는 항체

[0215] 또 다른 실시양태에서 본 발명은 본원에서 제공된 본 발명의 각종 항-CD30 항체가 결합하는 것과 동일한 에피토프에 결합하는, 탈푸코실화된 항체, 예컨대 본원에 개시된 5F11, 17G1 또는 2H9 항체와 동일한 에피토프에 결합하는 다른 인간 항체를 제공한다. 그러한 부가적 항체는 표준 CD30 결합 분석에서 5F11, 17G1 또는 2H9와 같은, 본 발명의 다른 항체와 교차 경쟁하는(예컨대, 통계학적으로 유의한 방식으로 그것의 결합을 경쟁적으로 억제하는) 능력을 기초로 하여 확인될 수 있다. 예를 들어 5F11, 17G1 또는 2H9의 인간 CD30에의 결합을 억제하는 시험 항체의 능력은 시험 항체가 인간 CD30에의 결합에 있어서 이 항체와 경쟁할 수 있음을 입증하는 것이며, 그러한 항체는 비제한적 이론에 따르면 그가 경쟁하는 항체와 동일하거나 연관된(예컨대, 구조적으로 유사하거나 공간적으로 근접한) 인간 CD30 상의 에피토프에 결합할 수 있다. 한 바람직한 실시양태에서, 인간 5F11, 17G1 또는 2H9와 동일한 에피토프에 결합하는 탈푸코실화된 항체는 인간 단일 클론 항체이다. 그러한 인간 단일 클론 항체는 PCT 공보 WO 03/059282에 기술되어 있는 바와 같이 제조 및 단리될 수 있다.

[0216] 공학처리되고(engineered) 및 변형된 항체

[0217] 본 발명의 탈푸코실화된 항체는 또한 변형된 항체를 공학처리(조작)하기 위한 출발 물질로서 본원에 개시된 V_H 및/또는 V_L 서열 중 하나 이상을 갖는 항체를 사용하여 제조될 수 있는데, 상기 변형된 항체는 출발 항체 유래의 변경된 특성을 가질 수 있다. 항체는 하나의 가변 영역 또는 양자 모두의 가변 영역(즉, V_H 및/또는 V_L) 내의, 예를 들어 하나 이상의 CDR 영역 내 및/또는 하나 이상의 골격 영역 내의 하나 이상의 잔기의 변형에 의해 공학처리할 수 있다. 부가적으로 또는 대안적으로, 항체는, 예를 들어 항체의 이펙터 기능(들)을 변경하기 위하여 불변 영역(들) 내의 잔기를 변형함으로써 공학처리할 수 있다.

[0218] 수행될 수 있는 가변 영역 공학처리의 한 유형은 CDR 그래프팅이다. 항체는 주로 6개의 중쇄 및 경쇄 상보성 결정 영역(CDR)에 위치하는 아미노산 잔기를 통하여 표적 항원과 상호 작용한다. 이런 이유 때문에 CDR 내의 아미노산 서열은 CDR 외측 서열보다 개개의 항체들 사이에서 더욱 다양하다. CDR 서열은 대부분의 항체-항원 상호 작용의 원인이 될 수 있기 때문에, 상이한 성질을 갖는 상이한 항체 유래의 골격 서열 상으로 그래프팅된 특성의 자연 발생 항체 유래의 CDR 서열을 포함하는 발현 벡터의 구축에 의해 특성의 자연 발생 항체의 특성을 모방하는 재조합 항체를 발현시키는 것이 가능하다(예컨대, [Riechmann, L. *et al.* (1998) *Nature* 332:323-327; Jones, P. *et al.* (1986) *Nature* 321:522-525; Queen, C. *et al.* (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86:10029-10033]; 미국 특허 제5,225,539호(Winter), 및 미국 특허 제5,530,101호, 동 제5,585,089호; 동 제5,693,762호 및 동 제6,180,370호(Queen 등) 참고).

[0219] 따라서, 본 발명의 또 다른 실시양태는 서열 번호 7, 8 및 9, 서열 번호 10, 11 및 12, 및 서열 번호 13, 14 및 15로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 각기 포함하는 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및 서열 번호 16, 17 및 18, 서열 번호 19, 20 및 21, 및 서열 번호 22, 23 및 24로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 각기 포함하는 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 탈푸코실화된 단일 클론 항체 또는 그것의 항원 결합 부분에 관한 것이다. 이와 같이, 그러한 항체는 단일 클론 항체 5F11, 17G1 또는 2H9의 V_H 및 V_L CDR 서열을 포함하나, 이 항체들 유래의 상이한 골격 서열을 포함할 수도 있다.

[0220] 그러한 골격 서열은 배선 항체 유전자 서열을 포함하는 공용 DNA 데이터베이스 또는 공개된 참고 문헌으로부터 얻을 수 있다. 예를 들어 인간 중쇄 및 경쇄 가변 영역 유전자를 위한 배선 DNA 서열은 "VBase" 인간 배선 서열 데이터베이스(www.mrc-cpe.cam.ac.uk/vbase에서 인터넷 상에서 이용가능함), 및 [Kabat, E. A., *et al.* (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242; Tomlinson, I. M., *et al.* (1992) "The Repertoire of Human Germ-line V_H Sequences Reveals about Fifty Groups of V_H Segments with Different Hypervariable Loops" *J. Mol. Biol.* 227:776-798; 및 Cox, J. P. L. *et al.* (1994) "A Directory of Human Germ-line V_H Segments Reveals

a Strong Bias in their Usage" *Eur. J. Immunol.* 24:827-836]에서 찾아볼 수 있는데, 상기 문헌 각각의 내용은 본원에 참고로 명백하게 포함된다.

[0221] 본 발명의 항체에서 사용하기 위한 바람직한 골격 서열은 본 발명의 선택된 항체에 의해 사용되는 골격 서열과 구조적으로 유사한, 예를 들어 본 발명의 바람직한 단클론 항체에 의해 사용되는 V_H 4-34 또는 3-07 서열(서열 번호 25 또는 26) 및/또는 V_K L15, A27 또는 L6 골격 서열(서열 번호 27, 28 또는 29)과 구조적으로 유사한 것이다. V_H CDR1, 2 및 3 서열과 V_K CDR1, 2 및 3 서열은 골격 서열이 유래되는 배선 면역글로불린 유전자에서 발견되는 것과 동일한 서열을 갖는 골격 영역 상으로 그래프팅될 수 있거나, 이 CDR 서열들은 배선 서열에 비하여 하나 이상의 돌연변이를 포함하는 골격 영역 상으로 그래프팅될 수 있다. 예를 들어, 특정의 경우에 있어서 골격 영역 내의 잔기를 돌연변이시켜 항체의 항원 결합 능력을 유지 또는 증강시키는 것이 유익하다는 것이 밝혀졌다(예컨대, 미국 특허 제5,530,101호; 동 제5,585,089호; 동 제5,693,762호 및 동 제6,180,370호(Queen 등) 참고).

[0222] 가변 영역 변형의 다른 유형은 V_H 및/또는 V_K CDR1, CDR2 및/또는 CDR3 영역 내의 아미노산 잔기를 돌연변이시키고, 이로써 목적 항체의 하나 이상의 결합 특성(예컨대, 친화도)을 개선하는 것이다. 특정 부위 돌연변이유발 또는 PCR-매개 돌연변이유발을 수행하여 돌연변이(들)를 도입할 수 있으며, 항체 결합에 대한 영향, 또는 목적으로 하는 기타 기능적 성질은 본원에 기술되어 있으며 실시예에 제공되어 있는 바와 같이 시험관 내 또는 생체 내 검정으로 평가할 수 있다. 바람직하게, (상기에 논의되어 있는 바와 같은) 보존성 변형이 도입된다. 돌연변이는 아미노산 치환, 부가 또는 결실일 수도 있지만 바람직하게는 치환이다. 또한, 전형적으로 CDR 영역 내의 1개, 2개, 3개, 4개 또는 5개 이하의 잔기가 변경된다.

[0223] 따라서, 또 다른 실시양태에서 본 발명은 (a) 서열 번호 7, 8 및 9로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열, 또는 서열 번호 7, 8 및 9로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열에 비하여 1개, 2개, 3개, 4개 또는 5개의 아미노산이 치환, 결실 또는 부가된 아미노산 서열을 포함하는 V_H CDR1 영역; (b) 서열 번호 10, 11 및 12로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열, 또는 서열 번호 10, 11 및 12로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열에 비하여 1개, 2개, 3개, 4개 또는 5개의 아미노산이 치환, 결실 또는 부가된 아미노산 서열을 포함하는 V_H CDR2 영역; (c) 서열 번호 13, 14 및 15로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열, 또는 서열 번호 13, 14 및 15로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열에 비하여 1개, 2개, 3개, 4개 또는 5개의 아미노산이 치환, 결실 또는 부가된 아미노산 서열을 포함하는 V_H CDR3 영역; (d) 서열 번호 16, 17 및 18의 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열, 또는 서열 번호 16, 17 및 18로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열에 비하여 1개, 2개, 3개, 4개 또는 5개의 아미노산이 치환, 결실 또는 부가된 아미노산 서열을 포함하는 V_K CDR1 영역; (e) 서열 번호 19, 20 및 21의 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열, 또는 서열 번호 19, 20 및 21로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열에 비하여 1개, 2개, 3개, 4개 또는 5개의 아미노산이 치환, 결실 또는 부가된 아미노산 서열을 포함하는 V_K CDR2 영역; 및 (f) 서열 번호 22, 23 및 24의 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열, 또는 서열 번호 22, 23 및 24로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열에 비하여 1개, 2개, 3개, 4개 또는 5개의 아미노산이 치환, 결실 또는 부가된 아미노산 서열을 포함하는 V_K CDR3 영역을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하는 탈푸코실화된 항-CD30 단클론 항체 또는 그것의 항원 결합 부분을 제공한다.

[0224] 본 발명의 공학처리된 항체는 항체의 성질의 개선을 위하여 V_H 및/또는 V_K 내의 골격 잔기를 변형시킨 것을 포함한다. 전형적으로는 그러한 골격 변형은 항체의 면역원성의 감소를 위하여 행해진다. 예를 들어 한가지 접근법은 하나이상의 골격 잔기를 상응하는 배선 서열로 "복귀 돌연변이시키는(backmutated)" 것이다. 더욱 구체적으로, 체세포 돌연변이가 일어난 항체는 이 항체가 유래되는 배선 서열과는 다른 골격 잔기들을 포함할 수도 있다. 그러한 잔기는 항체 골격의 서열을 항체가 유래되는 배선 서열과 비교함으로써 확인할 수 있다. 예를 들어 5F11의 경우, V_H 의 아미노산 잔기 #83(FR3 내)는 아스파라긴이며, 반면 상응하는 V_H 4-34 배선 서열에서의 이 잔기는 세린이다. 골격 영역의 서열을 그것의 배선 배열(configuration)로 되돌리기 위하여, 체세포 돌연변이는 예를 들어 부위-지정 돌연변이유발 또는 PCR-매개 돌연변이유발에 의해 배선 서열로 "복귀 돌연변이시킬" 수 있다(예컨대, 5F11의 V_H 의 FR3의 잔기 83는 아스파라긴에서 세린으로 "복귀 돌연변이시킬" 수 있음). 그러한 "복귀 돌연변이된" 항체도 본 발명에 포함하고자 한다.

- [0225] 또 다른 유형의 골격 변형은 골격 영역 내에서, 또는 심지어 하나 이상의 CDR 영역 내에서 하나 이상의 잔기를 돌연변이시켜 T 세포 에피토프를 제거하고 이로써 항체의 잠재적인 면역원성을 감소시키는 것을 포함한다. 이러한 접근법은 "면역제거(deimmunization)"로도 칭해지며, 미국 특허 공보 제20030153043호(Carr 등)에 더욱 상세하게 개시되어 있다.
- [0226] 골격 또는 CDR 영역 내에서 만들어진 변형에 부가하여, 또는 그에 대해 대안적으로, 본 발명의 항체를 공학처리하여, Fc 영역 내에 변형을 포함시킬 수도 있으며, 전형적으로는 항체의 하나 이상의 기능적 성질, 예를 들어 혈청중 반감기(serum half-life), 보체 고정, Fc 수용체 결합 및/또는 항원 의존성 세포 독성을 변경시킬 수도 있다. 또한 본 발명의 항체는 화학적으로 변형시키거나(예컨대, 하나 이상의 화학적 부분을 항체에 부착시킬 수 있음) 그것의 글리코실화가 변경되도록, 또한 항체의 하나 이상의 기능적 성질이 변경되도록 변형시킬 수도 있다. 이러한 실시양태 각각은 하기에 더욱 상세하게 기술되어 있다. Fc 영역 중의 잔기의 넘버링은 Kabat의 EU 인덱스에 따른 것이다.
- [0227] 한 실시양태에서, CH1의 힌지 영역은 힌지 영역 중의 시스테인 잔기의 갯수가 변경되도록, 예를 들어 증가 또는 감소되도록 변형된다. 이러한 접근법은 미국 특허 제5,677,425호(Bodmer 등)에 또한 개시되어 있다. CH1의 힌지 영역 중의 시스테인의 갯수는 예를 들어 경쇄 및 중쇄의 어셈블리(assembly)를 용이하게 하거나, 항체의 안정성을 증가 또는 감소시키기 위하여 변경된다.
- [0228] 또 다른 실시양태에서 항체의 Fc 힌지 영역은 항체의 생물학적 반감기의 감소를 위하여 돌연변이된다. 더욱 구체적으로는 하나 이상의 아미노산 돌연변이가 Fc-힌지부 단편의 CH2-CH3 도메인 경계 영역 내로 도입되어서, 항체는 천연 Fc-힌지 도메인의 스태필로코실(*Staphylococcy1*) 단백질 A(SpA) 결합에 비하여 약화된 SpA 결합력을 가진다. 이러한 접근법은 미국 특허 제6,165,745호(Ward 등)에 더욱 상세하게 개시되어 있다.
- [0229] 또 다른 실시양태에서, 항체는 그것의 생물학적 반감기의 증가를 위하여 변형된다. 각종 접근법들이 가능하다. 예를 들어 미국 특허 제6,277,375호(Ward 등)에 개시되어 있는 바와 같이, 하기 돌연변이 중 하나 이상이 도입될 수 있다: T252L, T254S, T256F. 대안적으로는, 미국 특허 제5,869,046호 및 동 제6,121,022호(Presta 등)에 기재되어 있는 바와 같이, 생물학적 반감기의 증가를 위하여, 항체는 IgG의 Fc 영역의 CH2 도메인의 2개의 루프로부터 취해지는 재생 수용체(salvage receptor) 결합 에피토프를 포함하도록 CH1 또는 CL 영역 내에서 변경될 수 있다.
- [0230] 또 다른 실시양태에서, Fc 영역은 하나 이상의 아미노산 잔기를 상이한 아미노산 잔기로 대체하여 항체의 이펙터 기능(들)을 변경함으로써 변경시킨다. 예를 들어, 아미노산 잔기 234, 235, 236, 237, 297, 318, 320 및 322로부터 선택되는 하나 이상의 아미노산을 상이한 아미노산 잔기로 대체하여 항체가 이펙터 리간드에 대하여 변경된 친화도를 가지지만 부모 항체의 항원 결합 능력은 보유하도록 할 수 있다. 친화도가 변경된 이펙터 리간드는 예를 들어 Fc 수용체 또는 보체의 C1 성분일 수 있다. 이러한 접근법은 둘 모두 미국 특허 제5,624,821호 및 동 제5,648,260호(양 특허 모두 Winter 등)에 더욱 상세하게 기재되어 있다.
- [0231] 또 다른 예에 있어서, 아미노산 잔기 329, 331 및 322로부터 선택되는 하나 이상의 아미노산은, 항체가 변경된 C1q 결합 및/또는 감소되거나 무효화된 보체 의존성 세포 독성(complement dependent cytotoxicity, CDC)을 가지도록 상이한 아미노산 잔기로 대체될 수 있다. 이러한 접근법은 미국 특허 제6,194,551호(Idsugie 등)에 더욱 상세하게 기재되어 있다.
- [0232] 또 다른 예에 있어서, 아미노산 위치 231 및 239 내의 하나 이상의 아미노산 잔기를 변경시킴으로써 항체가 보체를 고정시키는 능력을 변경시킨다. 이러한 접근법은 PCT 공보 제WO 94/29351호(Bodmer 등)에 또한 기재되어 있다.
- [0233] 또 다른 예에 있어서, Fc 영역을 변형시켜, 항체가 항체 의존성 세포 독성(antibody dependent cellular cytotoxicity, ADCC)을 매개하는 능력을 증가시키고/시키거나 하기 위치의 하나 이상의 아미노산을 변형시킴으로써, Fc γ 수용체에 대한 항체의 친화도를 증가시킨다: 238, 239, 248, 249, 252, 254, 255, 256, 258, 265, 267, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 301, 303, 305, 307, 309, 312, 315, 320, 322, 324, 326, 327, 329, 330, 331, 333, 334, 335, 337, 338, 340, 360, 373, 376, 378, 382, 388, 389, 398, 414, 416, 419, 430, 434, 435, 437, 438 또는 439. 이러한 접근법은 PCT 공보 제WO 00/42072호(Presta)에 또한 기재되어 있다. 또한, Fc γ R1, Fc γ RII, Fc γ RIII 및 FcRn에 대한 인간 IgG1 상의 결합 부위가 매핑되었으며, 결합력이 개선된 변이체가 기재되었다([Shields, R.L. *et al.* (2001) *J. Biol. Chem.* 276:6591-6604] 참고). 위치 256, 290, 298, 333, 334 및 339에서의 특정 돌연변이는

Fc γ RIII에의 결합을 개선시키는 것으로 밝혀졌다. 부가적으로, 하기의 조합의 돌연변이체는 Fc γ RIII 결합을 개선시키는 것으로 밝혀졌다: T256A/S298A, S298A/E333A, S298A/K224A 및 S298A/E333A/K334A.

[0234] 본 발명에 의해 고려되는 본원의 항체의 다른 변형은 peg화(pegylation)이다. 항체는 예를 들어 항체의 생물학적(예컨대, 혈청중) 반감기의 증가를 위하여 peg화될 수 있다. 항체의 peg화를 위해서는, 전형적으로 항체 또는 그것의 단편을, 하나 이상의 PEG 기가 항체 또는 항체 단편에 부착하게 되는 조건 하에서, 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 예컨대 PEG의 반응성 에스테르 또는 알데히드 유도체와 반응시킨다. 바람직하게는 peg화는 반응성 PEG 분자 (또는 유사한 반응성의 수용성 중합체)와의 아실화 반응 또는 알킬화 반응을 통하여 실시된다. 본원에 사용되는 용어 "폴리에틸렌 글리콜"은 다른 단백질의 유도체화를 위하여 사용된 임의의 형태의 PEG, 예를 들어 모노(C1-C10) 알콕시- 또는 아릴옥시-폴리에틸렌 글리콜 또는 폴리에틸렌 글리콜-말레이미드를 포함하기 위한 것이다. 특정 실시양태에서, peg화될 항체는 비글리코실화 항체이다. 단백질의 peg화 방법은 당업계에서 공지되어 있으며, 본 발명의 항체에 적용될 수 있다. 예를 들어 유럽 특허 제0 154 316호(Nishimura 등) 및 유럽 특허 제 0 401 384호(Ishikawa 등)를 참고한다.

[0235] 항체의 공학처리 방법

[0236] 상기에 논의된 바와 같이, 본원에 개시되어 있는 V_H 및 V_K 서열을 갖는 탈푸코실화된 항-CD30 항체는 V_H 및/또는 V_K 서열, 또는 그에 부착된 불변 영역(들)을 변형시킴으로써 새로운 항-CD30 항체를 생성하기 위하여 사용될 수 있다. 따라서, 본 발명의 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 항-CD30 항체, 예를 들어 5F11, 17G1 또는 2H9의 구조적 특징을 사용하여 본 발명의 항체의 하나 이상의 기능적 성질, 예를 들어 인간 CD30에 결합하는 것을 보유하는, 구조적으로 연관된 탈푸코실화된 항-CD30 항체를 생성한다. 상기에 논의되어 있는 바와 같이, 예를 들어 5F11, 17G1 또는 2H9, 또는 그것의 돌연변이의 하나 이상의 CDR 영역을 공지된 골격 영역 및/또는 다른 CDR과 재조합적으로 조합하여 재조합적으로 공학처리된 추가의 본 발명의 항-CD30 항체를 생성할 수 있다. 다른 유형의 변형은 이전의 절에서 기술된 것을 포함한다. 공학처리 방법에 있어서의 출발 재료는 본원에 제공되어 있는 하나 이상의 V_H 및/또는 V_K 서열, 또는 그것의 하나 이상의 CDR 영역이다. 공학처리된 항체의 생성을 위해서는, 본원에 제공된 하나 이상의 V_H 및/또는 V_K 서열, 또는 그것의 하나 이상의 CDR 영역을 갖는 항체를 실제로 제조(즉, 단백질로서 발현시킴)할 필요는 없다. 오히려, 서열(들)에 포함된 정보를 출발 재료로 이용하여 원래 서열(들)로부터 유래되는 "2세대" 서열(들)을 생성하고 이어서 "2세대" 서열(들)은 단백질로서 제조 및 발현된다.

[0237] 따라서, 또 다른 실시양태에서, 본 발명은

[0238] (a) (i) 서열 번호 7, 8 및 9로 이루어진 군으로부터 선택되는 CDR1 서열, 서열 번호 10, 11 및 12로 이루어진 군으로부터 선택되는 CDR2 및/또는 서열 번호 13, 14 및 15로 이루어진 군으로부터 선택되는 CDR3 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 항체 서열; 및 (ii) 서열 번호 16, 17 및 18의 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 CDR1 서열, 서열 번호 19, 20 및 21의 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 CDR2 서열 및/또는 서열 번호 22, 23 및 24의 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 CDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역 항체 서열을 제공하는 단계;

[0239] (b) 중쇄 가변 영역 항체 서열 및/또는 경쇄 가변 영역 항체 서열 내의 하나 이상의 아미노산 잔기를 변경시켜 하나 이상의 변경된 항체 서열을 생성하는 단계; 및

[0240] (c) 변경된 항체 서열을 단백질로서 발현하는 단계

[0241] 를 포함하는 항-CD30 항체의 제조 방법을 제공한다.

[0242] 표준 분자 생물학 기술을 이용하여 변경된 항체 서열을 제조 및 발현시킬 수 있다. 이어서, 이와 같이 제조된 변경된 항체 서열을 본원에 기재된 방법을 이용하여 탈푸코실화된 형태로 제조할 수 있고, 이에 따라 탈푸코실화된 변경된 항-CD30 항체를 수득한다.

[0243] 변경된 항체의 기능적 성질은 당업계에서 이용가능하고/하거나 본원에 기재된 표준 검정, 예컨대 실시예에 나와 있는 방법들(예컨대, 유세포분류법, 결합 검정, ADCC 검정)을 이용하여 평가할 수 있다.

[0244] 변경된 항체 서열(들)에 의해 코딩되는 항체는 본원에 기술된 항-CD30 항체의 기능적 성질들 중 하나, 일부 또는 전부를 유지하는 것인데, 기능적 성질은 하기를 포함하지만 이로 한정되는 것은 아니다:

[0245] 본 발명의 항체의 공학처리 방법의 특정 실시양태에서, 돌연변이는 항-CD30 항체의 코딩 서열의 전부 또는 일부를 따라 무작위로 또는 선택적으로 도입될 수 있으며, 생성된 변형 항-CD30 항체는 본원에 기술되어 있는 바와 같이 결합 활성 및/또는 기타 기능적 성질에 대하여 스크리닝될 수 있다. 돌연변이 방법은 당업계에서 기재되었

다. 예를 들어 PCT 공보 제WO 02/092780호(Short)에는 포화 돌연변이 생성법, 합성 결찰 어셈블리법 또는 그것의 조합을 이용하여 항체 돌연변이를 생성 및 스크리닝하는 방법이 기재되어 있다. 대안적으로는, PCT 공보 제WO 03/074679호(Lazar 등)에는 항체의 물리화학적 특성의 최적화를 위한 컴퓨터에 의한(computational) 스크리닝 방법의 사용 방법이 개시되어 있다.

[0246] 본 발명의 항체를 코딩하는 핵산 분자

[0247] 본 발명의 또 다른 측면은 본 발명의 항체를 코딩하는 핵산 분자에 관한 것이다. 본 발명에 사용되는 용어 "핵산 분자"는 DNA 분자 및 RNA 분자를 포함하기 위한 것이다. 핵산 분자는 단일 나선 또는 이중 나선일 수 있으나, 바람직하게는 이중 나선 DNA이다. 핵산은 전세포(whole cell), 세포 용해물(lysate) 중에 존재하거나, 또는 부분적으로 정제된 형태 또는 실질적으로 순수한 형태로 존재할 수도 있다. 핵산은, 알칼리/SDS 처리, CsCl 밴드화(banding), 컬럼 크로마토그래피, 아가로스 겔 전기영동 및 당업계에 잘 알려진 기타의 것을 포함하는 표준 기술에 의해 다른 세포 성분 또는 기타 오염 물질, 예를 들어 다른 세포의 핵산 또는 단백질로부터 정제되어 나올 경우, "단리"되거나 "실질적으로 순수하게 되는" 것이다. [F. Ausubel, *et al.*, ed. (1987) Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York]을 참고한다. 본 발명의 핵산은 예를 들어 DNA 또는 RNA일 수 있으며, 인트론 서열을 포함하거나 포함하지 않을 수 있다. 바람직한 실시양태에 있어서 핵산은 cDNA 분자이다.

[0248] 본 발명의 핵산은 표준 분자 생물학 기술을 이용하여 획득될 수 있다. 하이브리도마(예컨대, 하기에 추가로 기술되는 바와 같이 인간 면역글로불린 유전자를 지니는 유전자도입 마우스로부터 제조되는 하이브리도마)에 의해 발현되는 항체에 있어서, 하이브리도마에 의해 만들어지는 항체의 경쇄 및 중쇄를 코딩하는 cDNA는 표준 PCR 증폭 또는 cDNA 클로닝 기술로 획득할 수 있다. 면역글로불린 유전자 라이브러리(예컨대, 파지 디스플레이 기술을 이용함)로부터 획득되는 항체에 있어서는 항체를 코딩하는 핵산이 라이브러리로부터 회수될 수 있다.

[0249] 본 발명의 바람직한 핵산 분자는 5F11, 17G1 및 2H9 단클론 항체의 VH 및 VL 서열을 코딩하는 것들이다. 5F11의 VH 서열을 코딩하는 DNA 서열이 서열 번호 30에 나와 있다. 5F11의 VL 서열을 코딩하는 DNA 서열이 서열 번호 33에 나와 있다. 17G1의 VH 서열을 코딩하는 DNA 서열이 서열 번호 31에 나와 있다. 17G1의 VL 서열을 코딩하는 DNA 서열이 서열 번호 34에 나와 있다. 2H9의 VH 서열을 코딩하는 DNA 서열이 서열 번호 32에 나와 있다. 2H9의 VL 서열을 코딩하는 DNA 서열이 서열 번호 35에 나와 있다.

[0250] 일단 VH 및 VL 절편을 코딩하는 DNA 단편이 획득되면, 상기 DNA 단편은 예를 들어 가변 영역 유전자를 전장 항체 사슬의 유전자로, Fab 단편의 유전자로, 또는 scFv 유전자로 변환시키기 위하여 표준 재조합 DNA 기술로 추가로 조작할 수 있다. 이러한 조작에 있어서, VL- 또는 VH-코딩 DNA 단편은 다른 단백질을 코딩하는 다른 DNA 단편, 예를 들어 항체 불변 영역 또는 가요성 링커에 작용가능하게 연결된다(operatively linked). 본 문맥에서 사용되는 용어 "작용가능하게 연결된"은 2개의 DNA 단편에 의해 코딩되는 아미노산 사열이 프레임에 맞게(in-frame) 남아있도록 2개의 DNA 단편이 결합되는 것을 의미하려는 것이다.

[0251] VH 영역을 코딩하는 단리된 DNA는 VH-코딩 DNA를 중쇄 불변 영역(CH1, CH2 및 CH3)을 코딩하는 또 다른 DNA 분자에 작용가능하게 연결시킴으로써 전장 중쇄 유전자로 변환시킬 수 있다. 인간 중쇄 불변 영역 유전자의 서열은 당업계에 공지되어 있으며(예컨대, [Kabat, E. A., *et al.* (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242] 참고), 상기 영역을 포함하는 DNA 단편은 표준 PCR 증폭으로 획득할 수 있다. 중쇄 불변 영역은 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM 또는 IgD 불변 영역일 수 있지만, 가장 바람직하게는 IgG1 또는 IgG4 불변 영역이다. Fab 단편의 중쇄의 유전자에 있어서, VH-코딩 DNA는 단지 중쇄 CH1 불변 영역만을 코딩하는 다른 DNA 분자에 작용가능하게 연결될 수 있다.

[0252] VL 영역을 코딩하는 단리된 DNA는 VL-코딩 DNA를 경쇄 불변 영역을 코딩하는 다른 DNA 분자에 작용가능하게 연결시킴으로써 (Fab 경쇄 유전자뿐만 아니라) 전장 경쇄 유전자로 변환시킬 수 있다. 인간 경쇄 불변 영역 유전자의 서열은 당업계에 공지되어 있으며(예컨대, [Kabat, E. A., *et al.* (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242] 참고), 상기 영역을 포함하는 DNA 단편은 표준 PCR 증폭으로 획득할 수 있다. 경쇄 불변 영역은 카파 또는 람다 불변 영역일 수 있지만, 가장 바람직하게는 카파 불변 영역이다.

[0253] scFv 유전자의 생성을 위해서는, VH- 및 VL-코딩 DNA 단편을, 가요성 링커를 코딩하는, 예를 들어 아미노산 서열(Gly₄-Ser)₃을 코딩하는 다른 단편에 작용가능하게 연결시켜서, 이 때 VH 및 VL 서열이 인접(contiguous) 단

일쇄 단백질로 발현될 수 있도록 하는데, VL 및 VH 영역은 가요성 링커에 의해 결합된다(예컨대, [Bird *et al.* (1988) *Science* 242:423-426; Huston *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883; McCafferty *et al.*, (1990) *Nature* 348:552-554] 참고).

- [0254] cDNA, 게놈 또는 그것의 혼합물로부터의 본 발명의 핵산 조성물은 종종 천연 서열로 존재하지만(변형된 제한 부위 등은 제외함), 표준 기술에 따라 이를 돌연변이시킨 유전자 서열을 제공할 수 있다. 코딩 서열의 경우, 이러한 돌연변이는 아미노산 서열에 원하는 바에 따라 영향을 미칠 수 있다. 특히, 천연 V, D, J 서열, 불변 서열 및 전환 서열 및 본원에 기재된 이러한 기타 서열과 실질적으로 상동성이 있거나 이들로부터 유래된 DNA 서열도 고려된다(여기에서, "유래된"은 한 서열이 또 다른 서열과 동일하거나 그로부터 변형된 것임을 의미함).
- [0255] 본 발명의 단클론 항체의 생산
- [0256] 본 발명의 단클론 항체(mAb)는 통상적인 단클론 항체에 대한 방법을 포함한 다양한 기술, 예를 들어 [Kohler and Milstein (1975) *Nature* 256: 495]의 표준 체세포 혼성화 기술로 제조할 수 있다. 원칙적으로는 체세포 혼성화 절차가 바람직하기는 하지만, 단클론 항체의 다른 제조 기술, 예를 들어 B 림프구의 바이러스성 또는 발암성 형질전환법이 이용될 수 있다.
- [0257] 하이브리도마의 제조를 위한 바람직한 동물 시스템은 쥐 시스템이다. 마우스에서의 하이브리도마 생성은 매우 잘 확립된 절차이다. 면역화 프로토콜 및 융합용의 면역화 비장 세포(splenocyte)의 단리 기술은 당업계에 공지되어 있다. 융합 상대(예컨대, 쥐 골수종 세포) 및 융합 절차도 공지되어 있다.
- [0258] 각종 실시양태들에서, 항체는 예를 들어, 인간 항체, 인간화 항체 또는 키메라 항체일 수 있다.
- [0259] 본 발명의 키메라 또는 인간화 항체는 상기한 바와 같이 제조되는 쥐 단클론 항체의 서열을 기초로 하여 제조할 수 있다. 중쇄 및 경쇄 면역글로불린을 코딩하는 DNA는 목적하는 쥐 하이브리도마로부터 획득되며 표준의 분자 생물학 기술을 이용하여 쥐 외의 동물(예컨대, 인간)의 면역글로불린 서열을 포함하도록 공학처리할 수 있다. 예를 들어 키메라 항체의 생성을 위해서는, 당업계에 공지된 방법을 이용하여 쥐 가변 영역을 인간 불변 영역에 결합시킬 수 있다(예컨대, 미국 특허 제4,816,567호(Cabilly 등) 참고). 인간화 항체의 생성을 위해서는, 당업계에 공지된 방법을 이용하여 쥐 CDR 영역을 인간 골격 내로 삽입할 수 있다(예컨대, 미국 특허 제5,225,539호(Winter 등)와, 미국 특허 제5,530,101호; 동 제5,585,089호; 동 제5,693,762호 및 동 제6,180,370호(Queen 등) 참고). 키메라 또는 인간화 항-CD30 항체, 예를 들어 AC10, HeFi-1, Ber-H2, Ki-1, HRS-3, Irac, HRS-4, M44, M67 및 Ber-H8을 생성시키는데 사용될 수 있는 각종 마우스 항-CD30 항체들이 당업계에 공지되어 있다.
- [0260] 한 바람직한 실시양태에서, 본 발명의 항체는 인간 단클론 항체이다. CD30에 대해 지정된 그러한 인간 단클론 항체는 마우스 시스템이 아니라 인간 면역계의 일부를 지니는 유전자도입 마우스를 이용하여 생성시킬 수 있다. 이들 유전자도입 및 염색체도입 마우스는 본원에서 HuMAb 마우스 및 KM 마우스로 각기 칭해지는 마우스들을 포함하고, 본원에서 "인간 Ig 마우스"로 총칭된다.
- [0261] HuMAb 마우스[®] (메다렉스 인코포레이티드(Medarex, Inc.))는 내인성 μ 쇄 및 κ 쇄 좌위를 불활성화시키는 표적 돌연변이와 함께, 재배열되지 않은 인간 중쇄(μ 및 γ) 및 κ 경쇄 면역글로불린 서열을 코딩하는 인간 면역글로불린 유전자 미니좌위(miniloci)를 포함한다[Lonberg, N. et al. (1994) *Nature* 368 (6474):856-859]. 따라서, 마우스는 마우스 IgM 또는 κ 의 발현이 감소된 것으로 나타나고, 면역화에 반응하여 도입된 인간 중쇄 및 경쇄 도입유전자에서 클래스 전환 및 체세포 돌연변이가 일어나 고친화도의 인간 IgG κ 단클론 항체가 생산된다 ([Lonberg, N. et al. (1994), 이하 동문; (Lonberg, N. (1994) *Handbook of Experimental Pharmacology* 113:49-101)에서 검토됨; Lonberg, N. and Huszar, D. (1995) *Intern. Rev. Immunol.* 13: 65-93, 및 Harding, F. and Lonberg, N. (1995) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 764:536-546]). HuMAb 마우스, 및 그러한 마우스가 지니는 게놈 변형체의 제조 및 용도가 [Taylor, L. et al. (1992) *Nucleic Acids Research* 20:6287-6295; Chen, J. et al. (1993) *International Immunology* 5: 647-656; Tuailon et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:3720-3724; Choi et al. (1993) *Nature Genetics* 4:117-123; Chen, J. et al. (1993) *EMBO J.* 12: 821-830; Tuailon et al. (1994) *J. Immunol.* 152:2912-2920; Taylor, L. et al. (1994) *International Immunology* 6: 579-591; 및 Fishwild, D. et al. (1996) *Nature Biotechnology* 14: 845-851]에 더욱 기재되어 있고, 상기 모든 문헌의 내용은 전체적으로 본원에 참고 인용된다. 또한, 미국 특허 제5,545,806호, 동 제5,569,825호, 동 제5,625,126호, 동 제5,633,425호, 동 제5,789,650호, 동 제5,877,397호, 동 제5,661,016호, 동 제5,814,318호, 동 제5,874,299호 및 동 제5,770,429호(이들 모두 Lonberg 및 Kay); 미국 특허 제5,545,807호(Surani 등); PCT 공보 No. WO 92/03918, WO 93/12227, WO 94/25585, WO 97/13852, WO 98/24884 및 WO

99/45962(이들 모두 Lonberg 및 Kay); 및 PCT 공보 No. WO 01/14424(Korman)도 참고한다.

- [0262] 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 인간 항체는 도입유전자 및 도입염색체 상에 인간 면역글로불린 서열을 지니는 마우스, 예를 들어 인간 중쇄 도입유전자 및 인간 경쇄 도입염색체를 지니는 마우스를 사용하여 생기게 할 수 있다. 본원에서 "KM 마우스"로 칭해지는 그러한 마우스는 PCT 공보 제WO 02/43478호(Ishida 등)에 상세하게 개시되어 있다.
- [0263] 또한 인간 면역글로불린 유전자를 발현하는 대안적인 유전자도입 동물 시스템이 당업계에서 이용가능하며 본 발명의 항-CD30 항체를 생기게 하기 위하여 이를 사용할 수 있다. 예를 들어 제노마우스(Xenomouse)(아비제닉스 인코포레이티드(Abgenix, Inc.))로 칭해지는 대안적인 유전자도입 시스템이 사용될 수 있으며, 그러한 마우스는, 예를 들어 미국 특허 제5,939,598호; 동 제6,075,181호; 동 제6,114,598호; 동 제6,150,584호 및 동 제6,162,963호(Kucherlapati 등)에 개시되어 있다.
- [0264] 또한, 인간 면역글로불린 유전자를 발현하는 대안적인 염색체도입 동물 시스템이 당업계에서 이용가능하며 본 발명의 항-CD30 항체를 생기게 하기 위하여 이를 사용할 수 있다. 예를 들어 인간 중쇄 도입염색체 및 인간 경쇄 도입염색체 모두를 지니며 "TC 마우스"로 칭해지는 마우스가 사용될 수 있으며, 그러한 마우스는 [Tomizuka et al. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:722-727]에 개시되어 있다. 또한 인간 중쇄 및 경쇄 도입염색체를 지니는 소가 당업계에 개시되었으며([Kuroiwa et al. (2002) *Nature Biotechnology* 20:889-894]), 본 발명의 항-CD30 항체를 생기게 하기 위하여 이를 사용할 수 있다.
- [0265] 본 발명의 인간 단클론 항체는 인간 면역글로불린 유전자의 라이브러리를 스크리닝하기 위한 파지 디스플레이 방법을 이용하여서도 제조할 수 있다. 인간 항체를 단리하기 위한 그러한 파지 디스플레이 방법이 당업계에 확립되어 있다. 예를 들어 미국 특허 제5,223,409호; 동 제5,403,484호; 및 동 제5,571,698호(Ladner 등); 미국 특허 제5,427,908호 및 동 제5,580,717호(Dower 등); 미국 특허 제5,969,108호 및 동 제6,172,197호(McCafferty 등); 및 미국 특허 제5,885,793호; 동 제6,521,404호; 동 제6,544,731호; 동 제6,555,313호; 동 제6,582,915호 및 동 제6,593,081호(Griffiths 등)를 참고한다.
- [0266] 본 발명의 인간 단클론 항체는 인간 면역 세포가 재구성되어서 인간 항체 반응이 면역화 시에 생성될 수 있는 SCID 마우스를 사용하여서도 제조할 수 있다. 그러한 마우스는 예를 들어 미국 특허 제5,476,996호 및 동 제5,698,767호(Wilson 등)에 기재되어 있다.
- [0267] 인간 Ig 마우스의 면역화
- [0268] [Lonberg, N. et al. (1994) *Nature* 368(6474): 856-859; Fishwild, D. et al. (1996) *Nature Biotechnology* 14: 845-851; 및 PCT 공보 WO 98/24884 및 WO 01/14424]에 기재되어 있는 바와 같이, 인간 Ig 마우스를 사용하여 본 발명의 인간 항체를 생성되게 할 경우, 그러한 마우스는 CD30 항원 및/또는 재조합 CD30 또는 CD30 융합 단백질의 정제 제제 또는 풍부화(enriched) 제제로 면역화할 수 있다. 바람직하게는 마우스는 제1 주입시 6 내지 16주령일 것이다. 예를 들어 정제 또는 재조합 CD30 항원 제제(5 내지 50 μ g)를 사용하여 인간 Ig 마우스를 복강내 면역화로 면역화할 수 있다.
- [0269] CD30에 대한 완전 인간 단클론 항체를 생성하기 위한 상세한 절차 PCT 공보 WO 03/059282에 기술되어 있다. 각종 항원들을 이용한 누적 경험에 의하면, 완전 프로인트 보조제(complete Freund's adjuvant) 중의 항원을 이용한 처음의 복강내 (IP) 면역화, 이어서 불완전 프로인트 보조제 중 항원을 이용한 격주 IP 면역화 (최대 총 6주)할 때 유전자도입 마우스가 반응한다는 것이 밝혀졌다. 그러나 프로인트 이외의 보조제도 효과적인 것으로 밝혀졌다. 또한 보조제의 부재 하에서의 전 세포는 고도로 면역원성인 것으로 밝혀졌다. 면역 반응은 면역화 프로토콜 코스에 걸쳐 모니터링할 수 있는데, 혈장 샘플은 레트로오비탈(retroorbital) 채혈로 수득한다. 혈장은 ELISA(하기에 기술되어 있음)로 스크리닝할 수 있으며, 항-CD30 인간 면역글로불린의 역치가 충분한 마우스를 융합에 사용할 수 있다. 마우스는 희생 및 비장 제거 3일 전에 항원으로 정맥 내로 면역 강화(boost)할 수 있다. 각각의 면역화에 있어서 2-3회의 융합이 수행될 필요가 있을 수 있다고 기대된다. 전형적으로 6 내지 24 마리 사이의 마우스가 각각의 항원에 대하여 면역화된다. 일반적으로 HCo7 및 HCo12 주(strain) 둘 모두가 사용된다. 또한 HCo7 및 HCo12 도입유전자 둘 모두는 2개의 상이한 인간 중쇄 도입유전자(HCo7/HCo12)을 갖는 단일 마우스 내로 함께 번식될(bred) 수 있다.
- [0270] 본 발명의 인간 단클론 항체를 생산하는 하이브리도마의 생성
- [0271] 본 발명의 인간 단클론 항체를 생산하는 하이브리도마의 생성을 위하여, 면역화된 마우스 유래의 비장 세포 및/또는 림프절 세포를 단리하고 적절한 불멸화 세포주, 예를 들어 마우스 골수종 세포주에 융합시킬 수 있다. 생

성된 하이브리도마는 항원 특이성 항체의 생산에 대하여 스크리닝될 수 있다. 예를 들어 면역화 마우스 유래의 비장 림프구의 단일 세포 현탁물은 50% PEG를 이용하여 1/6의 갯수의 P3X63-Ag8.653 비분비 마우스 골수종 세포(ATCC, CRL 1580)에 융합시킬 수 있다. 세포를 평평한 바닥의 마이크로타이터 플레이트에 대략 2×10^5 개로 도말하고, 이어서 20%의 태아 클론(Clone) 혈청, 18%의 "653" 조절 배지, 5%의 오리젠(IGEN), 4 mM의 L-글루타민, 1 mM의 피루브산나트륨, 5 mM의 HEPES, 0.055 mM의 2-메르캅토에탄올, 50 단위/ml의 페니실린, 50 mg/ml의 스트렙토마이신, 50 mg/ml의 겐타마이신 및 1X HAT(시그마; HAT은 융합한지 24시간 후에 첨가함)을 포함하는 선택적 배지에서 2주간 배양한다. 대략 2주 후 HAT를 HT로 대체한 배지에서 세포를 배양할 수 있다. 이어서 개개의 웰을 인간 단클론 IgM 및 IgG 항체에 대하여 ELISA로 스크리닝할 수 있다. 일단 많은 하이브리도마 성장이 일어나면, 일반적으로 10 내지 14일 후에 배지를 관찰할 수 있다. 항체 분비 하이브리도마를 재도말하고, 다시 스크리닝하고, 인간 IgG에 대하여 여전히 양성일 경우, 단클론 항체를 한정 희석에 의해 2회 이상 서브클로닝할 수 있다. 이어서 안정한 서브클론은 시험관 내에서 배양하여, 적은 양의 항체를 조직 배양용 배지에서 특성화를 위하여 생성할 수 있다.

[0272] 인간 단클론 항체의 정제를 위해서는, 선발된 하이브리도마를 단클론 항체 정제를 위하여 2리터 스피너(spinner) 플라스크에서 배양할 수 있다. 상등액을 여과하고 농축시킨 후 단백질 A-세파로스를 포함하는 친화성 크로마토그래피(파마시아(Pharmacia), 미국 뉴저지주 피스카타웨이 소재)를 행한다. 용출된 IgG는 겔 전기영동 및 고성능 액체 크로마토그래피로 체크하여 순도를 보장할 수 있다. 완충제 용액은 PBS로 교환할 수 있으며 농도는 1.43의 소광 계수를 사용하여 OD280에 의해 측정할 수 있다. 단클론 항체는 분취하여 -80°C에서 보관할 수 있다.

[0273] 본 발명의 단클론 항체를 생산하는 트랜스펙토마의 생성

[0274] 또한 본 발명의 항체는 예를 들어 당업계에서 잘 알려져 있는 재조합 DNA 기술 및 유전자 트랜스펙션 방법의 조합을 이용하여 숙주 세포 트랜스펙토마에서 생산할 수 있다(예컨대, [Morrison, S. (1985) *Science* 229: 1202]).

[0275] 예를 들어, 항체 또는 그것의 항체 단편의 발현을 위하여, 부분적이거나 전장인 경쇄 및 중쇄를 코딩하는 DNA를 표준 분자 생물학 기술(예컨대, PCR 증폭 또는 목적 항체를 발현하는 하이브리도마를 사용한 cDNA 클로닝)로 수득할 수 있으며, DNA는 유전자가 전사 및 번역 제어 서열에 작용가능하게 연결되도록 발현 벡터 내로 삽입될 수 있다. 이와 관련하여, 용어 "작용가능하게 연결된"은 벡터 내의 전사 및 번역 제어 서열이 항체 유전자의 전사 및 번역을 조절하는 의도된 기능을 하도록 항체 유전자가 벡터 내로 결합된다는 것을 의미하려는 것이다. 발현 벡터 및 발현 제어 서열은 사용되는 발현용 숙주 세포와 상용성이도록 선택된다. 항체의 경쇄 유전자 및 항체의 중쇄 유전자는 별개의 벡터 내로 삽입되거나, 더 전형적으로는 두 유전자 모두 동일한 발현 벡터 내로 삽입된다. 항체는 표준 방법(예컨대, 항체 유전자 단편 및 벡터 상의 상보성 제한 효소 부위의 결합, 또는 제한 효소 부위가 전혀 존재하지 않을 경우, 블린트(blunt) 말단 결합)으로 발현 벡터 내로 삽입된다. 본원에 기술되어 있는 항체의 경쇄 및 중쇄 가변 영역은, 요망되는 이소타입의 중쇄 불변 영역 및 경쇄 불변 영역을 이미 코딩하고 있는 발현 벡터 내로 이들을 삽입함으로써 V_H 절편이 벡터 내의 C_H 절편(들)에 작용가능하게 연결되고 V_K 절편이 벡터 내의 C_L 절편에 작용가능하게 연결되도록 하여 임의의 항체 이소타입의 전장 항체 유전자를 생성하는 데에 사용될 수 있다. 부가적으로 또는 대안적으로, 재조합 발현 벡터는 숙주 세포로부터의 항체 사슬의 분비를 용이하게 하는 신호 펩티드를 코딩할 수 있다. 항체 사슬 유전자는 신호 펩티드가 프레임에 맞게 항체 사슬 유전자의 아미노 말단에 결합되도록 벡터 내로 클로닝될 수 있다. 신호 펩티드는 면역글로불린 신호 펩티드 또는 이중성 신호 펩티드(즉, 면역글로불린 외 단백질 유래의 신호 펩티드)일 수 있다.

[0276] 항체 사슬 유전자 외에도, 본 발명의 재조합 발현 벡터는 숙주 세포에서 항체 사슬 유전자의 발현을 제어하는 조절 서열을 지닌다. 용어 "조절 서열"은 항체 사슬 유전자의 전사 또는 번역을 제어하는 프로모터, 인핸서 및 기타 발현 제어 요소(예컨대, 폴리아데닐화 신호)를 포함하려는 것이다. 그러한 조절 서열은 예를 들어 [Goeddel, *Gene Expression Technology. Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, CA (1990)]에 기재되어 있다. 당업자라면 조절 서열의 선택을 포함하는 발현 벡터의 디자인이 형질전환시킬 숙주 세포의 선택, 요망되는 단백질의 발현 수준 등과 같은 인자에 따라 달라질 수 있음을 인식할 것이다. 포유류 숙주 세포 발현에 있어서 바람직한 조절 서열은 포유류 세포에서 단백질이 높은 수준으로 발현되게 하는 바이러스 요소, 예를 들어 사이토메갈로바이러스(cytomegalovirus, CMV), 시미언 바이러스 40(Simian Virus 40, SV40), 아데노바이러스(예컨대, 아데노바이러스 주요 후기 프로모터(AdMLP)) 및 폴리오마(polyoma)로부터 유래되는 프로모터 및/또는 인핸서를 포함한다. 대안적으로는 비바이러스 조절 서열, 예를 들어 유비퀴틴 프로모터 또는 β -글로빈 프로모터가 사용될 수 있다. 또한, 상이한 공급원 유래의 서열로 구성된 조절 요소, 예를 들어 SR α 프

로모터 시스템은 SV40 초기 프로모터 유래의 서열 및 인간 T 세포 백혈병 바이러스 제1형의 긴 말단 반복체(long terminal repeat)를 포함한다([Takebe, Y. *et al.* (1988) *Mol. Cell. Biol.* 8:466-472]).

[0277] 항체 사슬 유전자 및 조절 서열 외에도, 본 발명의 재조합 발현 벡터는 추가의 서열, 예를 들어 숙주 세포에서 벡터의 복제를 조절하는 서열(예컨대, 복제 원점) 및 선발가능한 마커 유전자를 지닐 수도 있다. 선발가능한 마커 유전자는 벡터가 도입된 숙주 세포의 선발을 용이하게 한다(예컨대, 미국 특허 제4,399,216호, 동 제 4,634,665호 및 동 제5,179,017호(이들 모두 Axel 등) 참고). 예를 들어 전형적으로 선발가능한 마커 유전자는 약물, 예를 들어 G418, 하이그로마이신 또는 메토틱렉세이트에 대한 내성을 벡터가 도입된 숙주 세포에 부여한다. 바람직하며 선발가능한 마커 유전자는 디히드로폴레이트 리덕타제(DHFR) 유전자(dhfr-숙주 세포에서 메토틱렉세이트 선발/증폭으로 사용하기 위함) 및 네오(neo) 유전자(G418 선발용)를 포함한다.

[0278] 경쇄 및 중쇄의 발현에 있어서, 중쇄 및 경쇄를 코딩하는 발현 벡터(들)는 표준 기술로 숙주 세포 내로 트랜스펙션시킨다. 각종 유형의 "트랜스펙션"이라는 용어는 원핵 또는 진핵 숙주 세포 내로 외인성 DNA를 도입하는 데에 통상 사용되는 매우 다양한 기술, 예를 들어 전기영동법, 인산칼슘 침전법, DEAE-덱스트란 트랜스펙션 등을 포함하려는 것이다. 원핵 또는 진핵 숙주 세포에서 본 발명의 항체를 발현시키는 것이 이론적으로 가능하지만, 진핵 세포, 가장 바람직하게는 포유류 숙주 세포에서의 항체의 발현이 가장 바람직한데, 이는 그러한 진핵 세포, 특히 포유류 세포가 적당하게 폴딩되고 면역학적으로 활성인 항체를 원핵 생물보다 더 어셈블링 및 분비할 것 같기 때문이다. 항체 유전자의 원핵 생물 발현은 활성 항체의 고수율의 생성에는 효과가 없는 것으로 보고되었다[Boss, M. A. and Wood, C. R. (1985) *Immunology Today* 6:12-13].

[0279] 본 발명의 재조합 항체를 발현하기 위한 바람직한 숙주 세포에는 발현된 항체의 푸코실화를 변형시키는 세포가 포함된다. 예를 들어, 숙주 세포는 푸코실트랜스퍼라제 효소가 결여되어 그 숙주 세포가 자체의 탄수화물 내 푸코스가 결여된 단백질을 생산하도록 하는 세포, 또는 당단백질-변형 글리코실 트랜스퍼라제를 발현하여, 숙주 세포 내 발현된 항체가 푸코실화를 방지하는 증가된 이등분 GlcNac 구조를 가지도록 하는 숙주 세포일 수 있다. 재조합 항체를 발현하는 다른 포유류 숙주 세포는 중국 햄스터 난소(Chinese Hamster Ovary, CHO) 세포(예컨대, [R. J. Kaufman and P. A. Sharp (1982) *Mol. Biol.* 159:601-621]에 기술되어 있는 바와 같이, DHFR 선발가능한 마커와 함께 사용되는, [Urlaub and Chasin, (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216-4220]에 기술되어 있는 dhfr- CHO 세포를 포함함), NSO 골수종 세포, COS 세포 및 SP2 세포를 포함한다. 특히, NSO 골수종 세포에서 사용함에 있어서, 다른 바람직한 발현 시스템은 WO 87/04462, WO 89/01036 및 유럽 특허 제EP 338,841호에 개시되어 있는 GS 유전자 발현 시스템이다. 항체 유전자를 코딩하는 재조합 발현 벡터가 포유류 숙주 세포 내로 도입될 경우, 항체는 숙주 세포에서 항체가 발현되게 하기에 충분한 기간 동안, 또는 더 바람직하게는 숙주 세포가 배양되는 배양 배지 내로 항체가 분비되게 하기에 충분한 기간 동안 숙주 세포를 배양함으로써 제조된다. 항체는 표준 단백질 정제 방법을 사용하여 배양 배지로부터 회수될 수 있다.

[0280] 면역접합체

[0281] 또 다른 측면에서, 본 발명은 치료 부분, 예를 들어 세포독소, 약물(예컨대, 면역억제제) 또는 방사성독소에 접합된 탈푸코실화된 항-CD30 단클론 항체 또는 그것의 단편을 특징으로 한다. 그러한 접합체는 본원에서 "면역접합체"로 칭해진다. 하나 이상의 세포독소를 포함하는 면역접합체는 "면역 독소"로 칭해진다. 세포독소 또는 세포 독성제는 세포에 유해한(예컨대, 세포를 사멸시키는) 임의의 제제를 포함한다. 그 예에는 탁솔, 시토칼라신 B, 그라미시딘 D, 에티뎀 브로마이드, 에메틴, 미토마이신, 에토포시드, 테노포시드, 빈크리스틴, 빈블라스틴, 콜히친, 독소루비신, 다우노루비신, 디히드록시 안트라신 디온, 미톡산트론, 미트라마이신, 악티노마이신 D, 1-데히드로테스토스테론, 글루코코르티코이드, 프로카인, 테트라카인, 리도카인, 프로프라놀롤, 및 류로마이신과 그것의 유사체 또는 동족체가 포함된다. 치료제는 또한 예를 들어 대사길항제(예컨대, 메토틱렉세이트, 6-메르캅토피린, 6-티오구아닌, 사이타라빈, 5-플루오로우라실 데카르바진), 알킬화제(예컨대, 메클로레타민, 티오에파 클로람부실, 멜팔란, 카르무스틴(BSNU) 및 로무스틴(CCNU), 시클로토스파미드, 부솔판, 디브로모만니톨, 스트렙토조토신, 미토마이신 C, 및 시스-디클로로디아민 백금(II)(DDP) 시스플라틴), 안트라사이클린(예컨대, 다우노루비신(이전에는 다우노마이신이라 함) 및 독소루비신), 항생제(예를 들어 닥티노마이신(이전에는 악티노마이신이라 함), 블레오마이신, 미트라마이신 및 안트라마이신(AMC))와, 항세포 분열제(anti-mitotic agent)(예컨대, 빈크리스틴 및 빈블라스틴)를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0282] 본 발명의 항체에 접합될 수 있는 치료용 세포독소의 다른 바람직한 예에는 듀오카르마이신, 칼리케아미신, 마이탄신 및 아우리스타틴과 그것의 유도체가 포함된다. 칼리케아미신 항체 접합체의 예는 구매가능하다(마이로타르그(Mylotarg)TM 웨이쓰-아이어스트(Wyeth-Ayerst)).

- [0283] 세포독소는 당업계에서 이용가능한 링커 기술을 사용하여 본 발명의 항체에 접합될 수 있다. 세포독소를 항체에 접합시키기 위하여 사용되어 온 링커 유형의 예에는 히드라존, 티오에테르, 에스테르, 디술폰드 및 펩티드-함유 링커가 포함되지만 이로 한정되는 것은 아니다. 예를 들어 리소좀형 구획 내에서 낮은 pH에 의해 절단되기 쉽거나 프로테아제, 예를 들어 종양 조직에서 우선적으로 발현되는 프로테아제, 예를 들어 카텡신(예컨대, 카텡신 B, C, D)에 의해 절단되기 쉬운 링커가 선택될 수 있다.
- [0284] 세포독소의 유형, 링커 및 치료제를 항체에 접합시키는 방법에 대한 추가의 논의에 대해서는 [Saito, G. *et al.* (2003) *Adv. Drug Deliv. Rev.* 55:199-215; Trail, P.A. *et al.* (2003) *Cancer Immunol. Immunother.* 52:328-337; Payne, G. (2003) *Cancer Cell* 3:207-212; Allen, T.M. (2002) *Nat. Rev. Cancer* 2:750-763; Pastan, I. and Kreitman, R. J. (2002) *Curr. Opin. Investig. Drugs* 3:1089-1091; Senter, P.D. and Springer, C.J. (2001) *Adv. Drug Deliv. Rev.* 53:247-264]을 또한 참고한다.
- [0285] 본 발명의 항체는 방사성 면역접합체로도 칭해지는 세포 독성 방사성 약의 생성을 위하여 방사성 동위 원소에 또한 접합시킬 수 있다. 진단용 또는 치료용으로 사용하기 위하여 항체에 접합될 수 있는 방사성 동위 원소의 예에는 요오드¹³¹, 인듐¹¹¹, 이트륨⁹⁰ 및 루테튬¹⁷⁷이 포함되지만 이로 한정되는 것은 아니다. 방사성 면역접합체의 제조 방법은 당업계에 확립되어 있다. 제발린(Zevalin)TM IDEC 파마슈티칼즈(IDEC Pharmaceuticals) 및 박사르(Bexxar)TM 코릭사 파마슈티칼즈(Corixa Pharmaceuticals)를 포함한 방사성 면역접합체의 예가 시중 입수 가능하며, 유사한 방법을 사용하여, 본 발명의 항체를 사용한 방사성 면역접합체를 제조할 수 있다
- [0286] 본 발명의 항체 접합체를 사용하여, 주어진 생물학적 반응을 변형시킬 수 있으며, 약물 부분은 전통적인 화학 치료제로 한정되는 것으로 간주되어서는 안된다. 예를 들어 약물 부분은 요망되는 생물학적 활성을 보유하는 단백질 또는 폴리펩티드일 수 있다. 그러한 단백질은 예를 들어 효소적 활성 독소 또는 그것의 활성 단편, 예를 들어 아브린(abrin), 리신(ricin) A, 슈도모나스(pseudomonas) 내독소 또는 디프테리아 독소; 단백질, 예를 들어 종양 괴사 인자 또는 인터페론- γ ; 또는 생물학적 반응 변형제, 예를 들어 림포카인, 인터루킨-1("IL-1"), 인터루킨-2("IL-2"), 인터루킨-6("IL-6"), 과립구 대식 세포 콜로니 자극 인자(granulocyte macrophage colony stimulating factor, "GM-CSF"), 과립구 콜로니 자극 인자("G-CSF"), 또는 기타 성장 인자를 포함할 수 있다.
- [0287] 그러한 치료 부분을 항체에 접합시키는 기술은 잘 알려져 있으며, 예를 들어 [Arnon *et al.*, " Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", in Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeld *et al.* (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom *et al.*, " Antibodies For Drug Delivery", in Controlled Drug Delivery (2nd Ed.), Robinson *et al.* (eds.), pp. 623-53(Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, " Antibodies Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", in Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, Pinchera *et al.* (eds.), pp. 475-506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", in Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy, Baldwin *et al.* (eds.), pp. 303-16(Academic Press 1985), and Thorpe *et al.*, "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", *Immunol. Rev.*, 62:119-58 (1982)]을 참고한다.
- [0288] 약제학적 조성물
- [0289] 또 다른 측면에서, 본 발명은 약제학적으로 허용가능한 담체와 함께 제형되는, 본 발명의 인간 단클론 항체 또는 그것의 항원-결합 부분(들) 중 하나 또는 이들의 조합물을 함유하는 조성물, 예를 들어 약제학적 조성물을 제공한다. 그러한 조성물은 본 발명의 (예컨대, 2 종 이상의 상이한) 항체, 또는 면역접합체의 조합물을 포함할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 약제학적 조성물은 표적 항원에 대해 상이한 에피토프에 결합하거나 상보 활성을 가지는 항체(또는 면역접합체)의 조합물을 포함할 수 있다.
- [0290] 본 발명의 약제학적 조성물은 또한 병행 요법으로 될 수 있는 바, 즉 다른 치료제와 병용될 수 있다. 예를 들어, 상기 병행 요법은 1종 이상의 항신생물제, 소염제 또는 1종 이상의 면역억제제와 조합하여 본 발명의 탈푸코실화된 항-CD30 항체를 포함할 수 있다. 이러한 치료제에는 무엇보다도 스테로이드성 및 비스테로이드성 소염 약물(NSAIDS), 예를 들어 아스피린 및 다른 살리실레이트, 예컨대 이부프로펜(모트린(Motrin), 아드빌(Advil)), 나프록센(나프로신(Naprosyn)), 술린닥(클리노릴(Clinoril)), 디클로페낙(볼타렌(Voltaren)), 피록시캄(펠덴(Feldene)), 케토프로펜(오루디스(Orudis)), 디플루니살(돌로비드(Dolobid)), 나부메톤(렐라펜(Relafen)), 에토돌락(로딘(Lodine)), 옥사프로진(다이프로(Daypro)), 인도메타신(인도신(Indocin)) 및 아스피린이 고투여량으로 포함된다. 병용 요법에 사용될 수 있는 치료제의 다른 예가 본 발명의 항체의 단락에서 이하

에 더욱 상세하게 기재되어 있다.

- [0291] 본원에서 사용되는 "약제학적으로 허용가능한 담체"로는 생리적으로 상용가능한 임의의 모든 용매, 분산 매질, 코팅물, 항세균제, 항진균제, 등장화제 및 흡수지연제 등이 포함된다. 바람직하게는, 담체는 정맥 내, 근육내, 피하, 비경구, 척수 또는 표피 투여(예컨대, 주사 또는 주입에 의한 투여)에 적합하다. 투여 경로에 따라, 활성 화합물, 즉 항체 또는 면역접합체를 산의 작용 및 화합물을 불활성화시킬 수 있는 다른 천연 조건으로부터 보호하는 물질로 코팅할 수 있다.
- [0292] 본 발명의 약제학적 화합물은 하나 이상의 약제학적으로 허용가능한 염을 함유할 수 있다. "약제학적으로 허용가능한 염"은 모 화합물의 바람직한 생물학적 활성을 보유하며 임의의 바람직하지 않은 독성학적 효과를 부여하지 않는 염을 의미한다(예컨대, 문헌 [Berge, S.M., *et al.* (1977) *J. Pharm. Sci.* 66:1-19] 참고). 이러한 염의 예로는 산부가염 및 염기 부가염이 포함된다. 산 부가염으로는 무독성 무기산, 예를 들어 염산, 질산, 인산, 황산, 브롬화수소산, 요오드화수소산 및 인산 등으로부터 유래된 것들뿐만 아니라, 무독성 유기산, 예를 들어 지방족 모노- 및 디카르복실산, 페닐-치환된 알칸산, 히드록시 알칸산, 방향족산, 지방족 및 방향족 술폰산 등으로부터 유래된 것들이 포함된다. 염기 부가염으로는 알칼리 토금속, 예를 들어 나트륨, 칼륨, 마그네슘 및 칼슘 등으로부터 유래된 것들뿐만 아니라, 무독성 유기 아민, 예를 들어 N,N'-디벤질에틸렌디아민, N-메틸글루카민, 클로로프로카인, 콜린, 디에탄올아민, 에틸렌디아민 및 프로카인 등으로부터 유래된 것들이 포함된다.
- [0293] 본 발명의 약제학적 조성물은 또한 약제학적으로 허용가능한 항산화제를 함유할 수 있다. 약제학적으로 허용가능한 항산화제의 예로는 (1) 수용성 항산화제, 예를 들어 아스코르브산, 시스테인 히드로클로라이드, 중황산나트륨, 메타중아황산나트륨 및 아황산나트륨 등; (2) 지용성 항산화제, 예를 들어 아스코르빌 팔미테이트, 부틸화 히드록시아니솔(BHA), 부틸화 히드록시톨루엔(BHT), 레시틴, 프로필 갈레이트 및 알파-토코페롤 등 및 (3) 금속 킬레이트화제, 예를 들어 시트르산, 에틸렌디아민 테트라아세트산 (EDTA), 소르비톨, 타르타르산 및 인산 등이 포함된다.
- [0294] 본 발명의 약제학적 조성물 중에 사용될 수 있는 적합한 수성 및 비수성 담체의 예로는 물, 에탄올, 폴리올(예컨대, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜 등) 및 이들의 적절한 혼합물, 식물성유, 예를 들어 올리브유 및 주사가능한 유기 에스테르, 예를 들어 에틸 올레이트가 포함된다. 예를 들어 레시틴과 같은 코팅 물질을 사용함으로써 분산액의 경우, 필요한 입도를 유지함에 따라, 계면활성제를 사용함으로써 적절한 유동성을 유지할 수 있다.
- [0295] 이 조성물은 또한 보조제, 예를 들어 보존제, 습윤제, 유화제 및 분산제를 함유할 수도 있다. 상기 무균화 절차 및 다양한 항세균제 및 항진균제, 예를 들어 파라벤, 클로로부탄올 및 페놀 소르브산 등을 포함시키는 방법 모두에 의해 미생물 존재의 방지를 보장할 수 있다. 등장성제, 예를 들어 당, 염화나트륨 등을 조성물에 포함시키는 것이 바람직할 수도 있다. 또한, 흡수를 지연시키는 제제, 예를 들어 알루미늄 모노스테아레이트 및 젤라틴을 포함시켜 주사가 가능한 약제 제형의 흡수를 지연시킬 수 있다.
- [0296] 약제학적으로 허용가능한 담체로는 무균 주사용 용액제 또는 분산액의 즉석 제조를 위한 무균 수용액 또는 분산액 및 무균 분말이 포함된다. 약제학적으로 활성인 물질을 위한 이러한 매질 및 제제의 용도는 당업계에 공지되어 있다. 임의의 통상적인 매질 또는 제제가 활성 화합물과 비상용성인 경우를 제외하고는, 상기 매질 또는 제제를 본 발명의 약제학적 조성물에 사용하는 것이 고려된다. 보충 활성 화합물이 또한 조성물에 혼입될 수 있다.
- [0297] 치료 조성물은 전형적으로 무균성이어야 하며, 제조 및 저장 조건 하에 안정해야 한다. 이 조성물은 용액, 마이크로에멀션, 리포솜 또는 높은 약물 농도에 대해 적합한 다른 정돈된 구조물로서 제형될 수 있다. 담체는 예를 들어 물, 에탄올, 폴리올(예컨대, 글리세롤, 프로필렌 글리콜 및 액상 폴리에틸렌 글리콜 등) 및 이들의 적합한 혼합물을 함유하는 용매 또는 분산 매질일 수 있다. 예를 들어 레시틴과 같은 코팅물을 이용함으로써, 분산액의 경우, 필요한 입도를 유지함으로써, 계면활성제를 사용함으로써 적절한 유동성을 유지할 수 있다. 많은 경우에서, 조성물 중에 등장성제, 예를 들어 당(sugar), 폴리알콜, 예를 들어 만니톨, 소르비톨 또는 염화나트륨을 포함시키는 것이 바람직할 것이다. 흡수를 지연시키는 제제, 예를 들어 모노스테아레이트 염 및 젤라틴을 조성물 중에 포함시켜 주사가 가능한 조성물의 흡수를 지연시킬 수 있다.
- [0298] 필요에 따라, 필요량의 활성 화합물을 상기 언급한 성분들 중 하나 또는 이들의 조합물과 함께 적절한 용매 중에 혼입한 다음, 무균 미세여과하여 무균 주사용 용액을 제조할 수 있다. 일반적으로, 염기성 분산 매질 및 상기 언급한 것들 중 필요한 다른 성분을 포함하는 무균 비히클 중에 활성 화합물을 혼입시켜 분산액을 제조한다.

무균 주사용 용액의 제조를 위한 무균 분말의 경우, 바람직한 제조 방법은 미리 무균 여과한 용액으로부터의 활성 성분과 임의의 추가의 바람직한 성분의 분말을 생성하는 진공 건조법 및 동결 건조법(동결건조)이다.

[0299] 단일 투약 형태를 생성시키기 위해 담체 물질과 조합할 수 있는 활성 성분의 양은 치료될 대상 및 특정 투여 방식에 따라 달라질 것이다. 단일 투약 형태를 제조하기 위해 담체 물질과 조합될 수 있는 활성 성분의 양은 일반적으로 치료 효과를 나타내는 조성물의 양일 것이다. 일반적으로, 이 양은 100% 중 활성 성분 약 0.01% 내지 약 99%, 바람직하게는 약 0.1% 내지 약 70%, 가장 바람직하게는 약 1% 내지 약 30%의 범위이다.

[0300] 투약요법을 조절하여 최적의 바람직한 반응(예컨대, 치료 반응)을 제공한다. 예를 들어, 치료 상태의 요건에 따라 지시되는 바대로, 단일 볼루스를 투여하거나 여러 번으로 나누어 시간에 따라 투여하거나, 투여량을 비례적으로 감소 또는 증가시킬 수 있다. 투여를 용이하게 하고 투약량을 일정하게 하기 위해 비경구 조성물을 단위 투약 형태로 제형하는 것이 특히 유리하다. 본원에서 사용된 단위 투약 형태는 치료될 대상에 대하여 단위 투여량으로 적합하도록 물리적으로 분리된 단위를 의미하며, 각 단위는 필요한 약제학적 담체와 함께 목적하는 치료 효과를 나타내도록 계산된 소정의 양의 활성 화합물을 포함한다. 본 발명의 단위 투약 형태에 대한 세부사항은 (a) 활성 화합물의 독특한 특성 및 달성하고자 하는 특정 치료 효과 및 (b) 개체에서 감응성 치료를 위해 이러한 활성 조합물을 배합하는 기술에 있어서의 고유한 제한 사항에 의해 지정되고, 이들에 의해 직접적으로 의존한다.

[0301] 항체의 투여에 있어서, 투약량은 숙주의 체중 1 kg 당 0.0001 내지 100 mg, 더 일반적으로는 0.01 내지 5 mg이다. 예를 들어 투약량은 체중 1 kg 당 0.3 mg, 1 mg, 3 mg, 5 mg 또는 10 mg일 수 있거나, 1 내지 10 mg 범위일 수 있다. 한 예시적인 요법은 주 1회, 매 2주에 1회, 매 3주에 1회, 매 4주에 1회, 월 1회, 매 3개월에 1회 또는 매 3개월 내지 6개월에 1회 투여를 수반한다. 본 발명의 탈푸코실화된 항-CD30 항체의 바람직한 투약 요법은 정맥 내 투여를 통한 체중 1 kg 당 1 mg 또는 3 mg을 포함하며, 항체는 하기의 투여 일정 중 하나를 사용하여 주어진다: (i) 매 4주 6회 투여, 이어서 매 3개월 투여; (ii) 매 3주에 투여; (iii) 매 3주에 체중 1 kg 당 3 mg을 1회 투여, 이어서 체중 1 kg 당 1 mg 투여.

[0302] 일부 방법에 있어서, 결합 특이성이 상이한 2종 이상의 단클론 항체를 동시에 투여하는데, 이 경우에 투여되는 각각의 항체의 투약량은 지시된 범위 이내이다. 항체는 일반적으로 다회의 시기에 투여된다. 단일 투약 사이의 간격은 예를 들어 1주, 1개월, 매 3개월 또는 1년일 수 있다. 간격은 또한 환자에 있어서 표적 항원에 대한 항체의 혈중 수준의 측정에 의해 지시되는 바와 같이 불규칙적일 수 있다. 일부 방법에 있어서 투약량은 약 1 내지 1000 $\mu\text{g/ml}$, 그리고 일부 방법에서는 약 25 내지 300 $\mu\text{g/ml}$ 의 혈장 항체 농도를 성취하도록 조정된다.

[0303] 대안적으로는, 항체는 지속 방출형 제형으로 투여될 수 있는데, 이 경우에 덜 빈번한 투여가 요구된다. 투약량 및 빈도는 환자에서의 항체의 반감기에 따라 달라진다. 일반적으로 인간 항체가 가장 긴 반감기를 나타내며, 그 다음이 인간화 항체, 키메라 항체, 그리고 인간의 항체이다. 투여량 및 투여 빈도는 치료가 예방적인지 또는 치료적인지에 따라 달라질 수 있다. 예방적 용도에 있어서, 비교적 낮은 투여량이 장기간에 걸쳐 비교적 드문 간격으로 투여된다. 일부 환자는 남은 여성 동안 치료를 계속하여 받는다. 치료적 용도에 있어서, 질병의 진행이 감소 또는 종료될 때까지, 바람직하게는 환자가 질병의 증상의 부분적 또는 전적인 개선을 나타낼 때까지 비교적 짧은 간격으로 비교적 높은 투여량이 때로 요구된다. 그 후, 환자에게 예방적 요법이 시행될 수 있다.

[0304] 본 발명의 약제학적 조성물 중 활성 성분의 실제 투약량 수준은, 환자에게 유독하게 됨이 없이, 특정 환자에 있어서의 요망되는 치료적 반응, 조성물, 및 투여 방식을 성취하기에 유효한 활성 성분의 양이 얻어지도록 달라질 수 있다. 선택된 투약량 수준은 이용되는 본 발명의 특정 조성물, 또는 그것의 에스테르, 염 또는 아미드의 활성, 투여 경로, 투여 시간, 이용되는 특정 화합물의 배출 속도, 치료 지속 기간, 이용되는 특정 조성물과 조합되어 사용되는 기타 약물, 화합물 및/또는 물질, 치료할 환자의 연령, 성별, 체중, 상태, 종합적인 건강 및 이전의 병력을 포함한 다양한 약물 동력학적 인자와, 의료 분야에서 잘 알려져 있는 유사 인자에 따라 달라진다.

[0305] 본 발명의 항-CD30 항체의 "치료적 유효 투약량"은 바람직하게는 질병 증상의 중증도를 감소시키거나, 질병의 무증상 기간의 빈도 및 지속 기간을 증가시키거나, 질병의 고통으로 인한 손상 또는 장애를 예방한다. 예를 들어, 암 종양 치료에 있어, "치료적 유효 투약량"은 바람직하게는 세포 성장 또는 종양 성장을 비처리된 대상에 비해 약 20% 이상, 더욱 바람직하게는 약 40% 이상, 더욱 더 바람직하게는 약 60% 이상, 가장 바람직하게는 약 80% 이상까지 억제한다. 암을 억제하는 화합물의 능력은 인간 종양에서의 효능을 예상할 수 있는 동물 모델 시스템에서 평가할 수 있다. 대안적으로, 조성물의 이러한 성질은 예를 들어 당업자에게 공지되어 있는 시험관 내 분석에 의해 화합물의 억제 능력을 조사함으로써 평가할 수 있다. 치료적 유효량의 치료 화합물은 대상에서 종양 크기를 감소시킬 수 있거나, 그와 달리 증상을 경감시킬 수 있다. 당업자라면 대상의 크기, 대상의 증상

중증도 및 선택된 특별한 조성물 또는 투여 경로와 같은 인자를 기준으로 하여 치료적 유효량을 결정할 수 있을 것이다.

[0306] 본 발명의 조성물은 당업계에 공지된 하나 이상의 다양한 방법을 사용하여 하나 이상의 투여 경로를 통하여 투여할 수 있다. 당업자에 의해 인식되는 바와 같이, 투여 경로 및/또는 방식은 요망되는 결과에 따라 달라진다. 본 발명의 항체에 있어서 바람직한 투여 경로에는 정맥 내, 근육내, 피내, 복강내, 피하, 척수 또는 기타 비경구 경로의 투여, 예를 들어 주사 또는 주입에 의한 투여가 포함된다. 본원에 사용되는 용어 "비경구 투여"는 일반적으로 주사에 의한, 장 및 국소 투여 이외의 투여 방식을 의미하며, 비제한적으로 정맥 내, 근육내, 동맥내, 척수강내, 관절낭내, 안와내, 심장내, 피내, 복강내, 경기관, 피하, 표피하, 관절강내, 피막하, 지주막하, 척수강내, 경막외강 및 흉골내 주사 및 주입을 포함한다.

[0307] 대안적으로, 본 발명의 탈푸코실화된 항체는 비경구가 아닌 경로, 예를 들어 국소, 표피 또는 점막 투여 경로, 예를 들어 비강내 투여 경로, 경구 투여 경로, 질 투여 경로, 직장 투여 경로, 설하 투여 경로 또는 국소 투여 경로를 통하여 투여될 수 있다.

[0308] 활성 화합물은 임플란트, 경피 패치, 및 미세캡슐화 전달 시스템을 포함한, 방출 제어형 제형과 같이, 이 화합물이 급속 방출되는 것을 방지하는 담체와 함께 제조될 수 있다. 생분해성의 생체적합성 중합체, 예를 들어 에틸렌 비닐 아세테이트, 폴리무수물(polyanhydride), 폴리글리콜산, 콜라겐, 폴리오르토에스테르 및 폴리아세트산이 사용될 수 있다. 그러한 제형의 다수의 제조 방법은 특허되거나 일반적으로 당업자에게 공지되어 있다. 예를 들어 [Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978]를 참고한다.

[0309] 치료 조성물은 당업계에 공지된 의료 장치로 투여될 수 있다. 예를 들어 바람직한 실시양태에서 본 발명의 치료 조성물은 무침(needleless) 피하 주사 장치, 예를 들어 미국 특허 제5,399,163호; 동 제5,383,851호; 동 제5,312,335호; 동 제5,064,413호; 동 제4,941,880호; 동 제4,790,824호; 또는 동 제4,596,556호에 개시된 장치로 투여할 수 있다. 본 발명에 유용한 잘 알려진 임플란트 및 모듈의 예는, 제어된 속도로 의약을 분배하기 위한 이식가능한 마이크로-주입 펌프가 개시되어 있는 미국 특허 제4,487,603호; 피부를 통하여 의약을 투여하기 위한 치료 장치가 개시되어 있는 미국 특허 제4,486,194호; 정확한 주입 속도로 의약을 전달하기 위한 의약 주입 펌프가 개시되어 있는 미국 특허 제4,447,233호; 연속적인 약물 전달을 위한 가변 유동식의 이식가능한 주입 기구가 개시되어 있는 미국 특허 제4,447,224호; 다중 챔버 구획이 있는 삼투성 약물 전달 시스템이 개시되어 있는 미국 특허 제4,439,196호; 및 삼투성 약물 전달 시스템이 개시되어 있는 미국 특허 제4,475,196호를 포함한다. 상기 특허는 본원에 참고로 포함되어 있다. 그와 같은 다수의 임플란트, 전달 시스템 및 모듈이 당업자에게 알려져 있다.

[0310] 특정 실시양태에서 본 발명의 탈푸코실화된 항체는 생체 내에서의 적당한 분배를 확실히 하도록 제형될 수 있다. 예를 들어 혈액-뇌 장벽(blood-brain barrier, BBB)은 다수의 고도로 친수성인 화합물을 배제한다. 본 발명의 치료 화합물이 BBB를 가로지르는 것을 확실히 하기 위하여 (요망될 경우), 이들은 예를 들어 리포솜 중에 제형될 수 있다. 리포솜의 제조 방법에 대해서는, 예를 들어 미국 특허 제4,522,811호; 동 제5,374,548호; 및 동 제5,399,331호를 참고한다. 리포솜은 특정 세포 또는 기관 내로 선택적으로 운송되며, 이에 따라서 표적화된 약물의 전달을 증강시키는 하나 이상의 부분을 포함할 수도 있다(예컨대, [V.V. Ranade (1989) *J. Clin. Pharmacol.* 29:685] 참고). 예시적인 표적화 부분은 폴레이트 또는 비오틴(예컨대, 미국 특허 제5,416,016호 (Low 등) 참고); 만노시드([Umezawa *et al.*, (1988) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 153:1038]); 항체([P.G. Bloeman *et al.* (1995) *FEBS Lett.* 357:140; M. Owais *et al.* (1995) *Antimicrob. Agents Chemother.* 39:180] 참고); 계면활성 단백질 A 수용체([Briscoe *et al.* (1995) *Am. J. Physiol.* 1233:134]); p120([Schreier *et al.* (1994) *J. Biol. Chem.* 269:9090])을 포함하며; [K. Keinänen; M.L. Laukkanen (1994) *FEBS Lett.* 346:123; J.J. Killian; I.J. Fidler (1994) *Immunomethods* 4:273]도 참고한다.

[0311] 본 발명의 용도 및 방법

[0312] 본 발명의 탈푸코실화된 항체, 항체 조성물 및 방법은 CD30 발현과 관련된 장애의 진단 및 치료에 있어 시험관 내 및 생체 내 진단 및 치료 용도를 가진다. 예를 들어, 이 분자들은 예컨대 시험관 내 또는 체외 배양물 중 세포에, 또는 생체 내에 대상의 세포에 투여되어, 다양한 질병을 치료, 예방 또는 진단할 수 있다. 본원에서 사용되는 용어 "대상"은 인간 및 인간의 동물을 포함하기 위한 것이다. 인간의 동물에는 모든 척추 동물, 예를 들어 포유류 및 포유류 외 동물, 예를 들어 인간의 영장류, 양, 개, 고양이, 소, 말, 닭, 양서류 및 파충류가 포함된다. 본 바람직한 대상에는 CD30 발현을 특징으로 하는 장애를 갖는 인간 환자가 포함된다. CD30에 대한 항체가

다른 제제와 함께 투여될 경우, 이 둘은 순서대로 또는 동시에 투여될 수 있다.

- [0313] 본 발명의 항체 조성물(예컨대, 항체 또는 면역접합체)의 생체 내 및 시험관 내 투여에 적합한 경로는 당업계에 공지되어 있으며, 당업자에 의해 선택될 수 있다. 예를 들어, 항체 조성물은 (예컨대, 정맥 내 또는 피하) 주사에 의해 투여될 수 있다. 사용되는 분자의 적합한 투약량은 대상의 연령 및 체중, 및 항체 조성물의 농도 및/또는 제형에 따라 좌우될 수 있다.
- [0314] 한 실시양태에서, 본 발명의 항체를 먼저 치료 또는 진단의 용도와 관련된 결합 활성화에 대해 시험관 내에서 시험할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 조성물은 ELISA 및 유세포분석 검정을 이용하여 시험할 수 있다. 또한, CD30 발현 세포의 성장 및/또는 사멸을 억제하는 것을 비롯하여, 하나 이상의 이펙터 매개성 이펙터 세포 활성을 유발하는 데 있어서 이들 분자의 활성을 검정할 수 있다. 이펙터 세포 매개성 ADCC를 검정하기 위한 프로토콜이 하기 실시예에 기재되어 있다.
- [0315] A. 검출 방법
- [0316] 한 실시양태에서, 본 발명의 항체를 사용하여, CD30의 수준, 또는 막 표면 상에 CD30을 함유하는 세포의 수준을 검출할 수 있으며, 이어서 상기 수준을 특정 질병 증상과 연관지을 수 있다.
- [0317] 한 특별한 실시양태에서, 본 발명은 항체 또는 그것의 부분과 CD30 사이의 복합체 형성을 가능하게 하는 조건 하에, CD30에 특이적으로 결합하는 탈푸코실화 항체 또는 그것의 항원 결합 부분을 샘플 및 대조 샘플과 접촉시키는 단계를 포함하는, 샘플 중 CD30 항원의 존재를 검출하거나, CD30 항원의 양을 측정하는 방법을 제공한다. 그 후, 복합체의 형성에 대해 검출하며, 이 때 샘플과 대조 샘플 사이의 상이한 복합체 형성이 샘플 중 CD30 항원의 존재에 대한 지표이다. 예를 들어, 당업계에 공지되어 있는 표준 검출 방법, 예컨대 ELISA 및 유세포분석 검정을 본 발명의 조성물을 이용하여 수행할 수 있다.
- [0318] 따라서, 한 측면에서, 본 발명은 항체 또는 그것의 부분과 CD30 사이의 복합체 형성을 가능하게 하는 조건 하에, CD30에 특이적으로 결합하는 본 발명의 항체 또는 그것의 항원 결합 부분을 샘플 및 대조 샘플과 접촉시키는 단계를 포함하는, 샘플 중 CD30(예컨대, 인간 CD30 항원)의 존재를 검출하거나, CD30의 양을 측정하는 방법을 추가로 제공한다. 그 후, 복합체의 형성에 대해 검출하며, 이 때 샘플과 대조 샘플 사이의 상이한 복합체 형성이 샘플 중 CD30 항원의 존재에 대한 지표이다.
- [0319] 본 발명의 조성물은 또한 예를 들어 CD30 발현 세포를 표적화, 예를 들어 표지하기 위해 사용될 수 있다. 그러한 용도의 경우, 결합제를 검출될 수 있는 분자에 결합시킬 수 있다. 따라서, 본 발명은 CD30 발현 세포를 체외 또는 시험관 내 국소화하는 방법을 제공한다. 검출가능한 표지는 예컨대 방사성 동위원소, 형광 화합물, 효소 또는 효소 보조인자일 수 있다.
- [0320] B. CD30+ 세포의 성장 억제
- [0321] 항체를 사용하여 CD30 기능을 억제 또는 차단할 수 있고, 이로써 특정 질병 증상을 예방 또는 경감시킬 수 있으며, 이는 CD30이 질병에 관련된 것임을 의미한다). 비질병 상태 대비의 질병 상태 중 CD30 발현의 차이는 그러한 질병을 앓는 대상으로부터의 시험 샘플을, 항체와 CD30 사이의 복합체를 형성하도록 하는 조건 하에서 항-CD30 항체를 갖는 대조군 샘플과 접촉시킴으로써 결정될 수 있다. 항체와 CD30 사이에 형성된 임의의 복합체를 검출하여, 샘플 및 대조군에서 비교한다.
- [0322] 예를 들어, 항체를 사용하여, 예를 들어 CD30 발현 세포의 성장 및/또는 사멸을 억제하는 것; 인간 이펙터 세포의 존재 하에 CD30 발현 세포의 식작용 또는 ADCC를 매개하는 것; 가용성 CD30의 웨딩을 억제하는 것; CD30 리간드와 CD30의 결합을 차단하는 것; IL-4 발현을 억제하는 것; 또는 Th2 표현형의 발현을 예를 들어 낮은 투약량에서 매개하는 것과 같은 생물학적 활성 중 하나 이상을 생체 내 또는 시험관 내에서 도출할 수 있다. 본원에 논의된 바와 같이, 본 발명의 탈푸코실화된 항체는 푸코실화된 형태의 항체에 비해 증진된 ADCC 활성을 나타낸다.
- [0323] 따라서, 또 다른 측면에서, 본 발명은 CD30⁺ 세포를 상기 세포의 항체 의존성 세포독성(ADCC)을 유도하기에 충분한 조건 하에, 탈푸코실화된 항-CD30 항체와 접촉시키는 단계를 포함하는, CD30⁺ 세포의 성장을 억제하는 방법을 제공한다. 세포는 예를 들어, 종양 세포일 수 있다. 한 바람직한 실시양태에서, 항-CD30 항체는 인간 항체이다.
- [0324] 한 실시양태에서, 본 발명의 항체 또는 그것의 결합 부분을 사용하여, 세포 표면 상의 수용체를 캡핑하거나 제

거하는 것 등의 방식으로 표적 세포 상의 CD30 수준을 조절할 수 있다. 항-Fc 수용체 항체의 혼합물도 또한 이 목적을 위해 사용될 수 있다.

[0325] 표적 특이적 이펙터 세포, 예를 들어 본 발명의 조성물에 결합된 이펙터 세포도 또한 치료제로 사용될 수 있다. 표적화를 위한 이펙터 세포는 인간 백혈구, 예를 들어 대식세포, 호중구 또는 단핵구일 수 있다. 다른 세포로는 호산구, 자연 킬러 세포 및 다른 IgG- 또는 IgA-수용체 보유 세포가 포함된다. 원한다면, 이펙터 세포를 치료하고자 하는 대상으로부터 얻을 수 있다. 표적 특이적 이펙터 세포는 생리적으로 허용되는 용액 중 세포 현탁액으로서 투여할 수 있다. 투여되는 세포의 수는 약 10^8 내지 10^9 개일 수 있지만, 치료 목적에 따라 달라질 것이다. 일반적으로, 상기 양은 표적 세포, 예를 들어 CD30 발현 종양 세포로의 국소화를 달성하고, 예를 들어 식작용에 의해 세포 사멸을 이루기 위한 충분한 양일 것이다. 투여 경로 또한 달라질 수 있다.

[0326] 표적 특이적 이펙터 세포를 사용한 요법은 표적화된 세포의 제거를 위한 다른 기술과 함께 수행할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 조성물 및/또는 이들 조성물과 결합된 이펙터 세포를 사용하는 항종양 요법을 화학요법과 병용할 수 있다. 부가적으로, 병행 면역요법을 이용하여, 종양 세포 거부에 대한 2가지 별개의 세포독성 이펙터 집단을 유도할 수 있다.

[0327] C. 면역접합체 및 병용 요법의 용도

[0328] 한 실시양태에서, 본 발명의 면역접합체를 사용하여, 화합물(예컨대, 치료제, 표지, 세포독소, 방사성독서, 면역억제제 등)을 항체에 연결함으로써, CD30 세포 표면을 갖는 세포에 상기 화합물을 표적화할 수 있다. 따라서, 본 발명은 또한 CD30 발현 세포를 (예를 들어, 검출가능한 표지, 예컨대 방사성 동위원소, 형광 화합물, 효소 또는 효소 보조인자를 이용하여), 체외 또는 시험관 내에서 국소화하는 방법을 제공한다. 대안적으로, 면역접합체를 사용하여, 세포독소 또는 방사성독소를, CD30에, 예컨대 CD30 발현 종양 세포에 표적화함으로써 종양 세포를 제거하게 되거나, CD30 발현 항원-제시 세포에 표적화함으로써, (예컨대, 자가면역 장애에서) 면역 반응을 억제하는 수단으로서 APC를 제거하게 됨으로써, CD30 세포 표면 수용체를 갖는 세포를 사멸시킬 수 있다.

[0329] 다른 실시양태에서, 대상은 예를 들어 사이토카인으로 대상을 처리함으로써, Fc γ 또는 Fc γ 수용체의 발현 또는 활성을 조정, 예컨대 증진 또는 억제하는 제제로 추가로 처리될 수 있다. 처리 동안 투여하기에 바람직한 사이토카인에는 과립구 콜로니-자극 인자(G-CSF), 과립구-대식세포 콜로니-자극 인자(GM-CSF), 인터페론- γ (IFN- γ) 및 종양 괴사 인자(TNF)가 포함된다.

[0330] 또 다른 실시양태에서, 대상을 림포카인 제제로 부가적으로 치료할 수 있다. CD30을 고도로 발현하지 않는 암 세포를 림포카인 제제를 사용하여 CD30을 고도로 발현하도록 유도할 수 있다. 림포카인 제제는 종양 세포 중에서 CD30의 더욱 균일한 발현을 일으켜, 더욱 효과적인 요법을 유도할 수 있다. 투여하기에 적합한 림포카인 제제로는 인터페론-감마, 종양 괴사 인자 및 이들의 조합물이 포함된다. 이들은 정맥 내로 투여될 수 있다. 림포카인의 적합한 투약량은 환자 1인 당 10,000 내지 1,000,000 단위이다.

[0331] 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 항체 조성물로 처리된 환자에, 인간 항체의 치료 효과를 증진시키거나 강화시키는 다른 치료제, 예컨대 세포독성제 또는 방사성독성제를 추가로 (상기 다른 치료제를 투여하기 전, 후 또는 그와 동시에) 투여할 수 있다. 항체는 (면역복합체로서) 제제에 결합될 수 있거나, 제제와 별도로 투여될 수 있다. 후자의 경우(별도 투여), 항체는 제제의 투여 전, 후 또는 동시에 투여될 수 있거나, 다른 공지 요법, 예컨대 항암 요법, 예컨대 방사선치료와 공동 투여될 수 있다. 그러한 치료제에는 무엇보다도 항-신생물제, 예컨대 독소루비신(아드리아마이신), 시스플라틴 블레오마이신 술페이트, 카르무스틴, 클로르암부실 및 시클로포스프미드 히드록시우레아가 포함되며, 이들은 그 자체로 환자에게 독성이거나 덜 독성인 수준에서만 효과적이다. 시스플라틴은 매4주 1회 100 mg/ml 용량으로 정맥 내 투여하고, 아드리아마이신은 매21일 1회 60 내지 75 mg/ml 용량으로 정맥 내 투여한다. 본 발명의 항-CD30 항체 또는 그것의 항원 결합 단편과 화학요법제의 공동 투여는 인간 종양 세포에 대해 세포독성 효과를 산출하는 상이한 기작을 통해 작용하는 두가지 항암제를 제공한다. 이러한 공동 투여는 약물에 대한 내성의 발달 또는 종양 세포의 항원성의 변화로 인해 종양 세포가 항체와 반응하지 않게 되는 문제를 해결할 수 있다.

[0332] D. 자가면역 질병의 치료

[0333] 조성물을 시험관 내 또는 생체 내 사용하여, CD30과 관련되거나 그에 의해 매개되는 질병, 예를 들어 CD30의 발현, 전형적으로는 과발현을 특징으로 하는 질병, 예컨대 대식세포, 활성화된 호중구, 수상 세포 또는 NK 세포에 의해 매개되는 자가면역 질병, 예컨대 이식거부 또는 이식편대숙주병(GVHD)을 치료할 수 있다. 가용성 CD30은 CD30 발현 세포의 표면으로부터 규칙적으로 shedding되고, 상승된 sCD30 수준이 다양한 종양원성 및 자가면역 장애

들을 갖는 환자들의 혈청에서 보고되었다. 따라서, 본 발명의 항체의 또 다른 용도에는 sCD30의 웨딩을 차단 또는 억제하는 것을 포함하는 질병의 예방 또는 치료를 포함한다.

[0334] (예컨대, 항체를 대상에게 투여함에 의해) 항체를 CD30와 접촉시킴으로써, 그러한 활성을 유도하는 CD30의 능력이 억제되고, 이에 따라 관련 장애가 치료된다. 항체 조성물은 단독으로, 또는 또 다른 치료제, 예컨대 항체 조성물과 병용하여 또는 그에 상승효과적으로 작용하는 면역억제제와 함께 투여되어, CD30 매개 질병을 치료 또는 예방할 수 있다. 바람직한 항체는 CD30에 대해 특이적인 에피토프에 결합하고, 이에 따라 유리하게도 CD30 유도 활성을 억제하나, 구조적으로 관련된 항원의 활성을 간섭하지는 않는다. 조성물을 사용하여, 자가면역 용혈성 빈혈(AIHA), 류마티스성 관절염(RA), 전신성 홍반성 낭창(SLE), 전신성 경화증, 아토피성 피부염, 그레이브병, 하시모토 갑상선염, 베게너 육아종증, 오펜 증후군, 만성 신부전, 특발성 혈소판 감소성 자반증(ITP), 염증성 대장 질환(IBD; 크론씨병, 궤양성 대장염 및 쉐리악 병 포함), 인슐린 의존성 당뇨병(IDDM), 급성 감염성 단핵구증, HIV, 헤르페스 바이러스 관련 질병, 다발성 경화증(MS), 용혈성 빈혈, 갑상선염, 강직인간 증후군, 신생아 천포창 및 중증근육무력증(MG)을 비제한적으로 포함하는, CD30 발현 세포에 의해 매개되는 임의의 질병을 치료할 수 있다.

[0335] E. 암의 치료

[0336] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은, 대상에게 있어 CD30+ 종양 세포(즉, CD30 발현 종양 세포)의 성장을 억제하는 방법으로서, 본 발명의 탈푸코실화된 항-CD30 항체를 대상에게 투여하여, CD30+ 종양 세포의 성장을 억제하는 방법을 제공한다. 인간 대상에 있어, 항체는 바람직하게 인간화 또는 인간 항체이다. 한 바람직한 실시양태에서, 종양 세포는 호지킨병 종양 세포이다. 또 다른 바람직한 실시양태에서, 종양 세포는 역형성 대세포 림프종(ALCL) 종양 세포이다. 다른 실시양태에서, 종양 세포는 비호지킨 림프종, 버키트 림프종, 피부 T-세포 림프종, 결절성 소분할 세포 림프종, 림프구성 림프종, 말초 T-세포 림프종, 레너트 림프종, 면역아세포성 림프종, T-세포 백혈병/림프종(ATLL), 성인 T-세포 백혈병(T-ALL) 및 중심모세포/중심세포(cb/cc) 여포성 림프종 암, 미만성 B형 대세포 림프종, 혈관면역아세포성 림프절증(AILD) 유사 T-세포 림프종, 성인 T-세포 림프종(ATL), HIV 관련 체강계 림프종, 태생암, 비인강(鼻咽腔)의 미분화 암종(예컨대, 슈민케 종양), 캐슬랜병, 카포시 육종 및 기타 CD30+ T-세포 또는 CD30+ B-세포 림프종으로 이루어진 군으로부터 선택되는 질병으로부터 비롯될 수 있다.

[0337] 본 방법은 대상에게 본 발명의 항체 조성물을 장애를 치료 또는 예방하기에 유효한 양으로 투여하는 단계를 포함한다. 항체 조성물은 단독으로, 또는 또 다른 치료제, 예컨대 항체 조성물과 병용하여 또는 그에 상승효과적으로 작용하는 세포독성제 또는 방사성독성제와 같은 또 다른 치료제와 함께 투여되어, CD30 발현과 관련된 질병을 치료 또는 예방할 수 있다.

[0338] 키트

[0339] 본 발명의 항체 및 사용설명서를 포함하는 키트도 또한 본 발명의 범주 내에 포함된다. 키트는 하나 이상의 추가의 시약, 예컨대 면역억제제, 세포독성제 또는 방사성독성제, 또는 본 발명의 1종 이상의 부가적 인간 항체(예컨대, 제1 항체와는 별개인 CD30 항원 내의 에피토프에 결합하는 보체 활성을 갖는 항체)를 추가로 포함할 수 있다. 키트는 전형적으로 키트의 내용물의 의도된 용도를 나타내는 표지를 포함한다. 용어 표지는 키트 상에 또는 키트와 함께 공급되거나, 그렇지 않을 경우, 키트에 동반되는 임의의 기입 물질 또는 기록 물질을 포함한다.

[0340] 본 발명은 하기 실시예에 의해 추가로 설명되나, 그 실시예는 본 발명을 더욱 한정하는 것으로 간주되어서는 안 된다. 본 출원의 전반에 걸쳐 인용된 모든 도면 및 모든 참고문헌, 특허 및 특허 공개 공보의 내용은 본원에 참고로 명백하게 인용된다.

실시예

[0341] **실시예 1: 탈푸코실화된 항-CD30 단클론 항체의 제조 및 특징화**

[0342] 이 실시예에서, 완전 인간 항-CD30 단클론 항체는, 세포주가 그 탄수화물에서 푸코스가 결합된 단백질을 생성시키도록, 푸코실트랜스퍼라제 효소가 결합된 세포주에서 발현되었다. (푸코실트랜스퍼라제 효소를 함유하는 상이한 세포주에서 발현된) 탈푸코실화된 항체를 푸코실화된 항-CD30 항체에 대해 시험하여, 모세관 전기영동, 아미노산 서열 비교, 질량 분광법에 의한 질량 차이, 및 모세관 등전 초점에 의한 하전 변화를 포함한 다양한 화학 분석 기법을 이용하여 항체 간의 구조적 및 특징적 차이를 결정하였다.

[0343] 항-CD30 완전 인간 단클론 항체 5F11는 본래 PCT 공보 WO 03/059282에 기재되었다. 5F11 중쇄의 아미노산 및 뉴

클레오티드 서열이 도 1A에 나와 있고, 5F11 경쇄의 아미노산 및 뉴클레오티드 서열이 도 1B에 나와 있다. 5F11 중쇄 및 경쇄 가변 서열을 발현 벡터에 서브클로닝하였다. 자체의 신호 서열 및 최적의 코작(Kozak) 서열을 포함한 5F11 카파 가변 영역 cDNA를, 인간 카파 불변 영역을 갖는 골격에 서브클로닝하였다. 자체의 신호 서열 및 최적의 코작 서열을 포함한 5F11 중쇄 가변 영역 cDNA를, 인간 $\gamma 1$ 중쇄 불변 영역을 갖는 골격에 서브클로닝하였다. 경쇄 및 중쇄 발현 모두를 인간 유비퀴틴 C 프로모터에 의해 유도하였다(Nenoi, M. et al. *Gene* 175:179, 1996). 이 발현 벡터는 미국 특허 출원 일련번호 제60/500,803호에 더욱 상세히 기재되어 있고, 그 공보의 내용이 본원에 참고로 명백히 인용된다.

[0344] 발현 벡터를 DNA 전기천공에 의해 FUT8^{-/-} 숙주 세포주 Ms704에 트랜스펙션시켰다. 2개의 교체 벡터를 이용하여 CHO/DG44 세포 내의 FUT8 유전자의 표적화 붕괴에 의해 Ms704 FUT8^{-/-} 세포주를 생성시켰고, 이는 미국 특허 공보 제20040110704호(Yamane 등) 및 [Yamane-Ohnuki et al. (2004) *Biotechnol Bioeng* 87:614-22]에 더욱 상세히 기재되어 있다. Ms704 세포를, 16 μ M 티미딘(인비트로젠(Invitrogen) #11067-030) 및 6 mM L-글루타민(인비트로젠 #25030-081)과 함께 100 μ M 하이포잔틴으로 보충된 성장 배지인 엑스-셀(EX-CELL)TM 325 PF CHO 배지(JRH #14335)에서 현탁 배양으로 성장하도록 적합화시켰다

[0345] 전기천공을 위해 사용되는 벡터 DNA를 에탄올 석출시키고, 10 mM Tris 7.6, 1 mM EDTA에 재현탁시켰다. 1, 5, 10, 15 또는 20 μ g DNA를 DNA 농도 당 4회 전기천공으로 하여, 20회 전기천공하기 위해 이용하였다. Ms704 세포를, 수크로스-완충 용액(SBS)으로 세포를 세정하고, 세포를 1×10^7 세포/ml SBS 용액으로 재현탁시킴으로써 트랜스펙션을 위해 제조하였다. 400 μ l 세포를 구축물 DNA와 혼합하였고, 230 볼트, 400 마이크로패러데이 용량, 및 13 옴 저항(BTX 분자 전달 시스템(BTX Molecular Delivery Systems) #600 전기세포조작기)의 설정을 이용하여 전기천공하였다. 전기천공 큐벳으로부터 세포를 제거하였고, 20 ml의 성장 배지를 첨가하였다. 세포를 웰 당 200 μ l 세포, 대략 4×10^4 세포/웰로 이용하여 96 웰에 도말하였다. 전기천공 후 2일째, 각 웰에서 150 μ l의 배지를 제거하였고, 150 μ l 선택 배지, 400 μ g/ml G418(인비트로젠 #10131-035)을 갖는 성장 배지로 교체하였다. 매 3 내지 7일, 웰 당 150 μ l의 선택 배지를 새 선택 배지를 교체하였다. CHO DG44 숙주 세포(FUT 8 +/+)를 유사한 절차를 이용하여 동일한 5F11 구축물로 전기천공하였고, 푸코실화된 탄수화물을 함유하는 제조합 5F11 항체를 발현하는 CHO DG44 형질감염체를 구축하였다.

[0346] 최고 생산 Ms704 및 CHO DG44 클론을 확장시켰고, 제조합 5F11 항체를 단백질 A 친화도 크로마토그래피에 의해 세포 배양 상등액으로부터 정제하였다.

[0347] Ms704로부터 유래된 N-연결 올리고당 및 CHO DG44 유래 항-CD30 단클론 항체 샘플의 비교 분석을 모세관 전기영동 레이저 유도 형광법(cLIF)에 의해 행하였다(Chen and Evangelista (1998) *Electrophoresis* 15:1892). 펩티드 N-글리카나제(프로자임)를 첨가하고 하룻밤 동안 인큐베이션함으로써, 정제된 항체의 N-연결 올리고당을 해리시켰다. 단백질을 에탄올 석출하고, 탄수화물 함유 상등액을 새 관에 옮겨, 스피드백(Speedvac)을 이용하여 건조시켰다. 탄수화물을 재현탁시키고, 푸코실 잔기의 손실 및 탈시알릴화가 최소화되는 온화한 환원 아민화 조건 하에서 8-아미노피렌-1,3,6-트리술포네이트(APTS)로 유도화하였다. 반응 부가물을 레이저 유도 검출기(베크만 코울터)를 이용한 모세관 전기영동에 의해 분석하였다(Ma and Nashabeh (1999) *Anal. Chem.* 71:5185). 올리고당 프로파일의 차이를, Ms704 유래 항-CD30 항체 내 푸코스 잔기가 없는 일관성을 갖는, CHO DG44 세포주 대비, Ms704 세포주로부터 수득한 항체 사이에서 관찰하였다.

[0348] Ms704 세포 내 발현된 항체에 대한 푸코스 잔기의 부재를 확인하기 위해, 단당류 조성 분석을 수행하였다. 결과가 하기 표 1에 나와 있다.

표 1

[0349] 단당류 분석

| 항체 | 단당류 양(μg) | 단당류 | 실측량(pmol) | mol 당/ mol 단백질 |
|-----------------|-----------|-------|-----------|-------------------|
| 항-CD30 + 푸코스 | 29 μg | 푸코스 | 206.0 | 1.0 |
| | | 갈락토사민 | 0.0 | 0.0 |
| | | 글루코사민 | 847.6 | 4.4 |
| | | 갈락토스 | 85.8 | 0.5 |
| | | 만노스 | 547.0 | 2.9 |
| 항-CD30 - 푸코스 | 23 μg | 푸코스 | 0.0 | 0.0 |
| | | 갈락토사민 | 0.0 | 0.0 |
| | | 글루코사민 | 655.2 | 4.3 |
| | | 갈락토스 | 89.7 | 0.6 |
| | | 만노스 | 488.8 | 3.2 |

[0350] 단당류 분석의 결과로부터, Ms704 세포에서 발현된 항체에 푸코실 잔기가 결합되어 있음이 확인된다.

[0351] 모세관 전기영동 및 단당류 분석에 의해 나타난 올리고당에서의 차이와 별도로, Ms704 및 CHO DG44 유래 항-CD30 항체 단백질 샘플은 본질적으로 동일하였다. N-말단 단백질 서열의 분석은 동일한 N-말단 아미노산 서열을 나타냈다. Ms704 및 CHO DG44 유래 항-CD30 항체의 경쇄의 질량 분광법으로 23,740 및 23,742의 질량이 각기 측정되었고, 이는 기기의 오차 범위 내에 속하였다. 표준 모세관 등전 초점 키트 검정(베크만 코울터)을 이용하여 2개 항체를 또한 시험하였고, 이에 2개 항체 샘플이 8.6에서 동일한 등전점을 가지는 것으로 나타났다. 이 연구는 Ms704 및 CHO DG44 세포로부터 유래된 항체 샘플의 단백질 성분이 Ms704 유래 항체의 탄수화물 성분의 탈푸코실화를 제외하고는 본질적으로 동일함을 나타낸다.

[0352] 실시예 2: 탈푸코실화된 항-CD30 항체의 ADCC 활성의 평가

[0353] 항-CD30 단클론 항체 5F11은 항체 의존성 세포독성(ADCC)을 통해 이펙터 세포 모집단의 모집을 통해 CD30+ 세포를 사멸시킬 수 있다. 이 실시예에서, 탈푸코실화된 5F11(defuc-5F11) 단클론 항체를 세포독성 크롬 방출 검정에서 이펙터 세포의 존재 하에 CD30+ 세포주의 사멸 능력에 대해 시험하였다

[0354] 이하에서와 같이 전혈로부터 인간 이펙터 세포를 조제하였다. 인간 말초혈 단핵 세포를 표준 Ficoll-파크 분리기에 의해 헤파린 처리 전혈로부터 정제하였다. 세포를 10% FBS 및 200 U/ml의 인간 IL-2를 함유하는 RPMI1640 배지에 현탁시켰고, 37°C에서 하룻밤 동안 인큐베이션하였다. 그 다음 날, 세포를 수집하여, 배양 배지로 1회 세정하였고, 1×10^7 세포/ml로 재현탁시켰다. 2백만개 표적 CD30+ 세포를 37°C에서 1시간 동안 총 부피 1 ml로 $200 \mu\text{Ci}^{51}\text{Cr}$ 과 함께 인큐베이션하였다. 표적 세포를 1회 세정하고, 1 ml의 배지 중에 재현탁시켰고, 30분 동안 더 37°C에서 인큐베이션하였다. 최종 인큐베이션 후, 표적 세포를 1회 세정하였고, 최종 체적이 1×10^5 세포/ml가 되도록 하였다.

[0355] CD30+ 세포주 L540(인간 호지킨 림프종; DSMZ 기탁 번호 ACC 72), L428(인간 호지킨 림프종; DSMZ 기탁 번호 ACC 197), L1236(인간 호지킨 림프종; DSMZ 기탁 번호 ACC 530) 및 카르파스(인간 T 세포 림프종; DSMZ 기탁 번호 ACC 31) 세포주를, 먼저 표준 FACS 분석을 이용하여 푸코실화된 5F11(fuc-5F11) 및 defuc-5F11 모두에의 결합에 대해 시험하였다. 각 표적 세포는 fuc-5F11 및 defuc-5F11 모두에 대한 항체 농도 범위에서 유사한 결합 프로파일을 나타냈다. 평균 형광 강도에 의해 결정되는 CD30 발현 수준은 L540에서 최고였고, 그 다음은 카르파스, L428였으며, 최저 CD30 발현은 L1236 세포에서 나타났다.

[0356] L540, L428, L1236 및 카르파스 세포를 하기와 같이 변형된 ^{51}Cr 항체 의존성 세포독성(ADCC) 검정으로 시험하였다. 각 표적 세포주(100 μl의 표지화 CD30+ 세포)를 50 μl의 이펙터 세포 및 50 μl의 항체와 함께 인큐베이션하였다. 표적:이펙터 비 1:50를 실험 전반에 걸쳐 사용하였다. 모든 연구들에서, 하기 음성 대조군을 또한 시험하였다: a) 항체가 없는 표적 및 이펙터 세포, b) 이펙터 세포가 없는 표적 세포, c) 1% 트리톤(Triton) X-100의 존재 하에 표적 및 이펙터 세포를 함유하는 웰, 및 d) 인간 IgG1 이소타입 대조군. 37°C에서 4시간 동안 인큐베이션한 후, 상등액을 수집하였고, 240 내지 400 keV의 관독 윈도우를 이용하여 감마 카운터(코브라

(Cobra) II 오토-감마(auto-gamma)(패커드 인스트루먼트(Packard Instruments) 제조)로 계수하였다. 분당 계수를 항체 농도의 함수로 플로팅하였고, 데이터를 프리즘(Prism) 소프트웨어(미국 캘리포니아주 샌디에고 소재)를 이용하여 비선형 회귀법, 단일 모드형 용량 반응(가변 기울기)을 이용하여 계수하였다. fuc-5F11 및 defuc-5F11의 다양한 농도를 이용하여 L540, L428, L1236 및 카르파스 세포주에 대한 세포독성 곡선이 도 4 내지 7에 각각 도시된다.

[0357] 용해율 %을 하기 방정식에 의해 결정하였다:

[0358] 용해율 % = (샘플 CPM - 항체 배제 CPM)/(트리톤 X CPM - 항체 배제 CPM)×100

[0359] 용해율 %를 25 µg/ml의 항체 농도 및 1:50의 표적:이펙터 세포 비로 시험하였다. EC₅₀ 값을 또한 각 표적 세포에 대해 계산하였다. 결과가 하기 표 2에 요약되어 있다.

표 2

[0360] **탈푸코실화된 항-CD30 단클론 항체의 세포 독성 능력**

| 표적 세포 | 용해율 % | 용해율 % | 용해율 % 비 푸코스 -: 푸코스 + | EC ₅₀ (µg/ml) | EC ₅₀ (µg/ml) | EC ₅₀ 비 푸코스+: 푸코스- |
|-------|-------|-------|----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|----------------------------------|
| | 푸코스 + | 푸코스 - | | 푸코스 + | 푸코스 - | |
| L540 | 42 | 68 | 1.61 | 0.042 | 0.009 | 4.7 |
| 카르파스 | 19 | 50 | 2.63 | 0.250 | 0.032 | 7.8 |
| L428 | 20 | 43 | 2.15 | 0.100 | 0.009 | 11.1 |
| L1236 | 4 | 13 | 3.25 | 1.218 | 0.045 | 27.1 |

[0361] Defuc-5F11은, fuc-5F11 항체 대비, 1.61배(L540 세포) 내지 3.25배(L1236 세포) 더 큰 세포 용해율 %을 나타냈다. 이 증가된 defuc-5F11 효능은 fuc-5F11가 측정가능한 효과를 가지지 않는 항체 농도에서 측정가능한 세포 용해를 초래한다. 예를 들어, CD30의 낮은 발현 수준을 갖는 L1236 세포 상에서, 0.1 µg/ml의 defuc-5F11은 10% 비(specific) 용해율을 초래하고, 반면 동일 농도의 fuc-5F11은 측정가능한 효과를 가지지 않는다(도 6 참고). Defuc-5F11은 EC₅₀ 값의 비에 의해 측정 시, fuc-5F11 항체보다 ADCC 활성이 4.7배(L540 세포) 내지 27.1배(L1236 세포) 더 강하였다.

[0362] **실시예 3: 항-CD30 항체의 ADCC 활성의 평가**

[0363] 이 실시예에서, 항-CD30 단클론 항체를 형광 세포독성 검정으로 항체 의존성 세포독성(ADCC)을 통한 이펙터 세포의 존재 하에 CD30+ 세포주를 사멸시키는 능력에 대해 시험하였다. 상기한 같이 인간 이펙터 세포를 제조하였고, 상기 나타낸 바와 같이 ADCC 검정을 수행하였다. 도 9에서 볼 수 있는 바와 같이, 탈푸코실화된 항-CD30 항체를 이용할 때, 모 항-CD30 항체에 비해, ADCC 활성이 증가하였다. 또한, 탈푸코실화된 항-CD30 항체는 모 항-CD30 항체와 비교 시에, 감소된 EC₅₀으로 입증되는 바, 모 항체에 대해 더 강력하였다. 항체는 또한 최대 용해율 %이 탈푸코실화된 항-CD30 항체보다 더 높은 사실에 의해 입증되는 바와 같이, 더 효능적이었다. 어느 항체를 이용하여서도, 항-CD16(3G8) 항체는 ADCC를 효율적으로 억제하였고, 이는 이 용해가 CD16에 의해 매개된다는 것을 제시한다.

[0364] **실시예 4: 인간 이펙터 세포에 있어 증가된 ADCC**

[0365] ADCC 검정을 상기 기재된 바와 같이 수행하였다. 그러나, 이 실험에서, 마우스 이펙터 세포를 인간 이펙터 세포와 비교하였다. 도 10에서 보는 바와 같이, 마우스 이펙터 세포를 사용할 때, 탈푸코실화된 항체와 모 항-CD30 항체를 비교 시 증가된 ADCC가 없었고, 한편 인간 이펙터 세포를 조사할 때, 모 항-CD30 항체와 비교 시에 탈푸코실화된 항체에 있어 ADCC의 현저한 증가가 있었다.

[0366] **실시예 5: 사이노물거스 원숭이로부터의 이펙터 세포를 이용한, 모 항체 및 탈푸코실화된 항체를 비교하는 ADCC 검정**

[0367] 전혈을 사이노물거스 원숭이로부터 입수하였다. 적혈구 용해 사이노물거스 말초혈 세포를 50 U/ml rIL-2로 자극

하였고, 37°C에서 하룻밤 동안 10% FBS 함유의 RPMI1640 배지에서 배양하였다. 연구 당일, 사이노몰거스 세포를 1×10^7 세포/mL로 검정 완충액(RPMI1640, 10% FBS, 2.5 mM 프로베네시드)에 재현탁시켰고, CD30 양성 표적 세포, 카르파스 299를 표지하였고, 세정 완충액(PBS, 2.5 mM 프로베네시드, 20 mM HEPES)로 3회 세정하였으며, 1:50 표적:이펙터 세포 비가 되도록 1×10^5 세포/mL로 조정하였다. ADCC 검정을 상기한 바와 같이 수행하였다. 본인들은 사이노몰거스 혈액으로부터 정제된 이펙터 세포를 이용하여, 탈푸코실화된 항체와 모 항-CD30 항체의 활성을 비교하였다. 적당한 ADCC 활성이 모 항체(10 µg/mL에서 약 7 내지 10% 세포 용해율)에서 나타났다. 대조적으로, 탈푸코실화된 항체는 상당히 더 높은 용해율(10 µg/mL에서 약 10 내지 30% 세포 용해), 및 감소된 EC50를 유도하였다(도 11 참고).

[0368] **실시예 6: L540 세포, 활성화된 인간 및 사이노몰거스 말초혈 세포에 대한 항-CD30 단클론 항체의 결합 친화도의 스캐차드 분석**

[0369] 모 항체 및 탈푸코실화된 항-CD30 항체의 결합 친화도를 결정하였다. 본인들은 CD30 양성 L540 세포 및 PHA/Con A-활성화 인간 또는 사이노몰거스 말초혈 단핵 세포에 대한 두 항체의 결합 친화도를 비교하였다.

[0370] 인간 또는 사이노몰거스 말초혈 세포를 2 µg/ml PHA, 10 µg/ml Con A, 및 50 U/ml rIL-2로 자극하였고, 3일 동안 1×10^6 세포/ml 밀도로 10% 우태 혈청(FBS)을 함유하는 RPMI1640 배지에서 배양하였다. 연구 당일, 세포를 세정하였고, 결합 완충액(RPMI1640 +10% FBS)에서 2×10^7 세포/ml로 조정하였다. 대조군으로서, ($4-8 \times 10^6$ 세포/ml로 조정된) CD30 양성 L540 세포는 높은 항원 수준을 나타내기 때문에, 이를 이 연구들에 사용하였다. 실험 개시 시까지 세포를 빙상에 두었다. 밀리포어(Millipore) 유리 섬유 필터 플레이트(MAFBNOB50)를 물 중 1% 무지방 건조 밀크로 코팅하여, 하룻밤 동안 4°C에서 저장하였다. 플레이트를 0.2 ml의 결합 완충액으로 3회 세정하였다. 50 마이크로리터의 완충액만을 최대 결합 웰(총 결합)에 첨가하였다. 25 마이크로리터의 완충액만을 대조군 웰에 첨가하였다. 다양한 농도들의 ¹²⁵I-항-CD30 항체를 25 µl의 체적으로 모든 웰에 첨가하였다. 300 내지 400 배 과량의 다양한 농도들의 비표지 항체를 25 µl의 체적으로 대조군 웰(비특이적 결합)에 첨가하였고, 결합 완충액 내 25 µl의 CD30 양성 L540 세포 또는 자극된 인간 또는 사이노몰거스 말초혈 세포를 모든 웰에 첨가하였다. 플레이트를 4°C에서 웨이커에서 200 RPM으로 2시간 동안 인큐베이션하였다. 인큐베이션 완료 시, 밀리포어 플레이트를 0.2 ml의 냉 세정 완충액(RPMI1640, 10% FBS, 500 mM NaCl)으로 2회 세정하였다. 필터를 제거하였고, 감마 카운터로 계수하였다. 프리즘 소프트웨어(미국 캘리포니아주 샌디에고 소재)로 단일 부위 결합 파라미터를 이용하여, 평형 결합의 평가를 수행하였다.

[0371] 상기 스캐차드 결합 검정법을 이용하여, L540 세포에 대한 모 CD30 항체의 K_D는 대략 1.4 nM이었고, 탈푸코실화된 항체의 K_D는 1.9 nM이었다(표 3). 이는 푸코스 제거로 친화도 변화가 적었음을 가리킨다. 이 연구를 세포주가 아닌 일차 세포를 이용하여 반복하였다. 또한, 세포 당 상당히 더 적은 수용체를 발현하는 세포에 대한 친화도를 시험하였다. 활성화된 인간 말초혈 세포를 상기 나타낸 바와 같이 제조하였고, K_D는 모 항체 및 탈푸코실화된 항-CD30 항체에 대해 각기 1.1 nM 및 2.7 nM인 것으로 나타났다.

[0372] 마지막으로, PHA, Con A, 및 rIL-2 활성화 사이노몰거스 말초혈 단핵 세포에 대한 모 항체 및 탈푸코실화된 항체의 결합 친화도를 비교하였다. K_D는 모 항체 및 탈푸코실화된 항체에 대해 각기 0.47 nM 및 0.83 nM인 것으로 나타났다.

표 3

[0373] **스캐차드 분석**

| 샘플 | | L540 | 인간 | 사이노몰거스 |
|------------|--------------|---------|-------|--------|
| 모 CD30 | KD(nM 평균) | 1.37 | 1.08 | 0.47 |
| | 세포 당 수용체(평균) | 2496082 | 45654 | 72781 |
| 탈푸코실화 CD30 | KD(nM 평균) | 1.93 | 2.66 | 0.83 |
| | 세포 당 수용체(평균) | 3024600 | 74258 | 108824 |

[0374] **균등 범위**

[0375] 당업자라면, 통상적인 수준 이하의 실험을 이용하여 본원에 기술된 본 발명의 특정 실시양태의 많은 균등 범위의 실시 형태를 인식하거나 확인할 수 있을 것이다. 그러한 균등 범위를 하기의 청구의 범위에 포함시키고자 한다.

[0376]

| 서열 목록의 요약 | | | |
|-----------|-------------------|-------|-------------------|
| 서열 번호 | 서열 | 서열 번호 | 서열 |
| 1 | VH a.a. 5F11 | 19 | VK CDR2 a.a. 5F11 |
| 2 | VH a.a. 17G1 | 20 | VK CDR2 a.a. 17G1 |
| 3 | VH a.a. 2H9 | 21 | VK CDR2 a.a. 2H9 |
| 4 | VK a.a. 5F11 | 22 | VK CDR3 a.a. 5F11 |
| 5 | VK a.a. 17G1 | 23 | VK CDR3 a.a. 17G1 |
| 6 | VK a.a. 2H9 | 24 | VK CDR3 a.a. 2H9 |
| 7 | VH CDR1 a.a. 5F11 | | |
| 8 | VH CDR1 a.a. 17G1 | 25 | VH 4-34 배선 aa |
| 9 | VH CDR1 a.a. 2H9 | 26 | VH 3-07 배선 aa |
| 10 | VH CDR2 a.a. 5F11 | 27 | VK L15 배선 aa |
| 11 | VH CDR2 a.a. 17G1 | 28 | VK A27 배선 aa |
| 12 | VH CDR2 a.a. 2H9 | 29 | VK L6 배선 aa |
| 13 | VH CDR3 a.a. 5F11 | 30 | VH n.t. 5F11 |
| 14 | VH CDR3 a.a. 17G1 | 31 | VH n.t. 17G1 |
| 15 | VH CDR3 a.a. 2H9 | 32 | VH n.t. 2H9 |
| 16 | VK CDR1 a.a. 5F11 | 33 | VK n.t. 5F11 |
| 17 | VK CDR1 a.a. 17G1 | 34 | VK n.t. 17G1 |
| 18 | VK CDR1 a.a. 2H9 | 35 | VK n.t. 2H9 |

도면의 간단한 설명

- [0067] 도 1A는 5F11 인간 단클론 항체의 중쇄 가변 영역의 뉴클레오티드 서열(서열 번호 30) 및 아미노산 서열(서열 번호 1)을 나타낸다. CDR1(서열 번호 7), CDR2(서열 번호 10) 및 CDR3(서열 번호 13) 영역이 기술되어 있고, V, D 및 J 배선 유도화가 나와 있다.
- [0068] 도 1B는 5F11 인간 단클론 항체의 경쇄 가변 영역의 뉴클레오티드 서열(서열 번호 33) 및 아미노산 서열(서열 번호 4)을 나타낸다. CDR1(서열 번호 16), CDR2(서열 번호 19) 및 CDR3(서열 번호 22) 영역이 기술되어 있고, V 및 J 배선 유도화가 나와 있다.
- [0069] 도 2A는 17G1 인간 단클론 항체의 중쇄 가변 영역의 뉴클레오티드 서열(서열 번호 31) 및 아미노산 서열(서열 번호 2)을 나타낸다. CDR1(서열 번호 8), CDR2(서열 번호 11) 및 CDR3(서열 번호 14) 영역이 기술되어 있고, V 및 J 배선 유도화가 나와 있다.
- [0070] 도 2B는 17G1 인간 단클론 항체의 경쇄 가변 영역의 뉴클레오티드 서열(서열 번호 34) 및 아미노산 서열(서열 번호 5)을 나타낸다. CDR1(서열 번호 17), CDR2(서열 번호 20) 및 CDR3(서열 번호 23) 영역이 기술되어 있고, V 및 J 배선 유도화가 나와 있다.
- [0071] 도 3A는 2H9 인간 단클론 항체 중쇄 가변 영역의 뉴클레오티드 서열(서열 번호 32) 및 아미노산 서열(서열 번호 3)을 나타낸다. CDR1(서열 번호 9), CDR2(서열 번호 12) 및 CDR3(서열 번호 15) 영역이 기술되어 있고, V, D 및 J 배선 유도화가 나와 있다.
- [0072] 도 3B는 2H9 인간 단클론 항체의 경쇄 가변 영역의 뉴클레오티드 서열(서열 번호 35) 및 아미노산 서열(서열 번호 6)을 나타낸다. CDR1(서열 번호 18), CDR2(서열 번호 21) 및 CDR3(서열 번호 24) 영역이 기술되어 있고, V 및 J 배선 유도화가 나와 있다.
- [0073] 도 4는 이소타입-매칭 대조 항체(1D4) 대비의, L540 인간 호지킨 림프종 세포주에 대한 푸코실화 및 탈푸코실화

된 형태의 5F11의 세포독성 세포 사멸 활성을 나타내는 그래프이다.

[0074] 도 5는 이소타입-매칭 대조 항체(1D4) 대비의, L428 인간 호지킨 림프종 세포주에 대한 푸코실화 및 탈푸코실화된 형태의 5F11의 세포독성 세포 사멸 활성을 나타내는 그래프이다.

[0075] 도 6은 이소타입-매칭 대조 항체(1D4) 대비의, L1236 인간 호지킨 림프종 세포주에 대한 푸코실화 및 탈푸코실화된 형태의 5F11의 세포독성 세포 사멸 활성을 나타내는 그래프이다.

[0076] 도 7은 이소타입-매칭 대조 항체(1D4) 대비의, 카르파스 인간 T 세포 림프종 세포주에 대한 푸코실화 및 탈푸코실화된 형태의 5F11의 세포독성 세포 사멸 활성을 나타내는 그래프이다.

[0077] 도 8A 및 8B는 인간 배선 V_H 3-11, V_K L15, V_K A27, 및 V_K L6(각기, 서열 번호25-29)의 아미노산 서열을 나타내고, CDR이 기술되어 있다.

[0078] 도 9는 항-CD16 항체를 이용한 ADCC 활성의 차단을 나타내는 그래프이다.

[0079] 도 10은 마우스(좌측 패널) 또는 인간(우측 패널) 이펙터 세포의 존재 하에서의 푸코실화 및 탈푸코실화된 형태의 5F11의 세포독성 세포 사멸 활성을 나타내는 그래프이다.

[0080] 도 11은 사이노몰거스 혈액을 이용한 ADCC 검정을 나타내는 그래프이다.

도면

도면1A

```

항-CD30 5F11 VH
V-세그먼트 : 좌위: 4-34
D 세그먼트 : 좌위- 7-27
J 세그먼트 : JH4b
1   Q V Q L Q Q W G A G L L K P S E T L
    CAG GTG CAG CTA CAG CAG TGG GGC GCA GGA CTG TTG AAG CCT TCG GAG ACC CTG

                                CDR1
55   S L T C A V Y G G S F S A Y Y W S W
    TCC CTC ACC TGC GCT GTC TAT GGT GGG TCC TTC AGT GCT TAC TAC TGG AGC TGG

                                CDR2
109  I R Q P P G K G L E W I G D I N H G
    ATC CGC CAG CCC CCA GGG AAG GGG CTG GAG TGG ATT GGG GAC ATC AAT CAT GGT

                                CDR2
163  G G T N Y N P S L K S R V T I S V D
    GGA GGC ACC AAC TAC AAC CCG TCC CTC AAG AGT CGA GTC ACC ATA TCA GTA GAC

217  T S K N Q F S L K L N S V T A A D T
    ACG TCC AAG AAC CAG TTC TCC CTG AAG CTG AAC TCT GTA ACC GCC GCG GAC ACG

                                CDR3
271  A V Y Y C A S L T A Y W G Q G S L V
    GCT GTG TAT TAC TGT GCG AGC CTA ACT GCC TAC TGG GGC CAG GGA AGC CTG GTC
        D7-27/DHQ52  ↳ JH4b

325  T V S S
    ACC GTC TCC TCA
    
```


도면1B

항-CD30 5F11 VL
 V-세그먼트 : 좌위: L15
 J 세그먼트 : JK5

D I Q M T Q S P T S L S A S V G D R
 1 GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA ACC TCA CTG TCT GCA TCT GTA GGA GAC AGA

CDR1
 V T I T C R A S Q G I S S W L T W Y
 55 GTC ACC ATC ACT TGT CGG GCG AGT CAG GGT ATT AGC AGC TGG TTA ACC TGG TAT

CDR2
 Q Q K P E K A P K S L I Y A A S S L
 109 CAG CAG AAA CCA GAG AAA GCC CCT AAG TCC CTG ATC TAT GCT GCA TCC AGT TTG

CDR2
 Q S G V P S R F S G S G S G T D F T
 163 CAA AGT GGG GTC CCA TCA AGG TTC AGC GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT

CDR3
 L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q
 217 CTC ACC ATC AGC AGC CTG CAG CCT GAA GAT TTT GCA ACT TAT TAC TGC CAA CAG

CDR3
 Y D S Y P I T F G Q G T R L E I K
 271 TAT GAT AGT TAC CCT ATC ACC TTC GGC CAA GGG ACA CGA CTG GAG ATT AAA

↳ JK5

도면2A

항-CD30 17G1 VH
 V-세그먼트 : 좌위: 3-07
 D 세그먼트 : 발견되지 않음
 J 세그먼트 : JH2

E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L
 1 GAG GTG CAG TTG GTG GAG TCT GGG GGA GGC TTG GTC CAG CCT GGG GGG TCC CTG

CDR1
 R L S C V A S G F T F S N S W M S W
 55 AGA CTC TCC TGT GTA GCC TCT GGA TTC ACC TTT AGT AAC TCT TGG ATG AGC TGG

CDR2
 V R Q A P G K G L E W V A N I N E D
 109 GTC CGC CAG GCT CCA GGG AAA GGG CTG GAG TGG GTG GCC AAC ATA AAC GAA GAT

CDR2
 G S E K F Y V D S V K G R F T F S R
 163 GGA AGT GAG AAA TTC TAT GTG GAC TCT GTG AAG GGC CGA TTC ACC TTC TCC AGA

CDR3
 D N A E N S L Y L Q M N S L R A E D
 217 GAC AAC GCC GAG AAC TCA CTG TAT CTG CAA ATG AAC AGC CTG AGA GCC GAG GAC

CDR3
 T A V Y Y C A R V H W Y F H L W G R
 271 ACG GCT GTG TAT TAC TGT GCG AGG GTT CAT TGG TAC TTC CAT CTC TGG GGC CGT

↳ JH2

G T L V T V S S
 325 GGC ACC CTG GTC ACT GTC TCC TCA

도면2B

항-CD30 17G1 VL
V-세그먼트: 좌위: A27
J 세그먼트: JK1

```

1   E I V L T Q S P G T L S L S P G E R
    GAA ATT GTG TTG ACG CAG TCT CCA GGC ACC CTG TCT TTG TCT CCA GGG GAA AGA

                                CDR1
    A T L S C R A S Q S V S S S Y L A W
55  GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG AGT GTT AGC AGC AGC TAC TTA GCC TGG

                                CDR2
    Y Q Q K P G Q A P R L L I Y G A S S
109 TAC CAG CAG AAA CCT GGC CAG GCT CCC AGG CTC CTC ATC TAT GGT GCA TCC AGC

    CDR2
    R A T G I P D R F S G S G S G T D F
163 AGG GCC ACT GGC ATC CCA GAC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC

                                CDR3
    T L T I S S L E P E D F A V Y Y C Q
217 ACT CTC ACC ATC AGC AGC CTG GAG CCT GAA GAT TTT GCA GTG TAT TAC TGT CAG

    CDR3
    Q Y G S S P W T F G Q G T K V E I K
271 CAG TAT GGT AGC TCA CCG TGG ACG TTC GGC CAA GGG ACC AAG GTG GAA ATC AAA
        ↓
        JK1
    
```

도면3A

항-2H9 CD30 VH
V-세그먼트: 좌위: 4-34
D 세그먼트: 좌위- 5-12
J 세그먼트: JH2

```

1   Q V Q L Q Q W G A G L L K P S E T L
    CAG GTG CAG CTA CAG CAG TGG GGC GCA GGA CTG TTG AAG CCT TCG GAG ACC CTG

                                CDR1
    S L T C A V Y G G S F S G Y Y W S W
55  TCC CTC ACC TGC GCT GTC TAT GGT GGG TCC TTC AGT GGT TAC TAC TGG AGC TGG

                                CDR2
    I R Q P P G K G L E W I G E I N H S
109 ATC CGC CAG CCC CCA GGG AAG GGG CTG GAG TGG ATT GGG GAA ATC AAT CAT AGT

    CDR2
    G S T K Y T P S L K S R V T I S V D
163 GGA AGC ACC AAG TAC ACC CCG TCC CTC AAG AGC CGA GTC ACC ATA TCA GTA GAC

    T S K H Q F S L K L S S V T A A D T
217 ACG TCC AAG CAC CAA TTC TCC CTG AAG CTG AGC TCT GTG ACC GCC GCG GAC ACG

                                CDR3
    A V Y Y C A R E T V Y Y F D L W G R
271 GCT GTG TAT TAC TGT GCG AGA GAG ACT GTC TAC TAC TTC GAT CTC TGG GGC CGT
        ↓
        JH2

    G T L V T V S S
325 GGC ACC CTG GTC ACT GTC TCC TCA
    
```

도면3B

항-2H9 CD30 VL

V-세그먼트 : 좌위: L6

J 세그먼트 : JK1

```

1  E I V L T Q S P A T L S L S P G E R
   GAA ATT GTG TTG ACA CAG TCT CCA GCC ACC CTG TCT TTG TCT CCA GGG GAA AGA

                                CDR1
   A T L S C R A S Q S V S S N L A W Y
55  GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG AGT GTA AGC AGC AAC TTA GCC TGG TAC

                                CDR2
   Q Q K P G Q A P R L L I Y D A S N R
109 CAA CAG AAA CCT GGC CAG GCT CCC AGG CTC CTC ATC TAT GAT GCA TCC AAC AGG

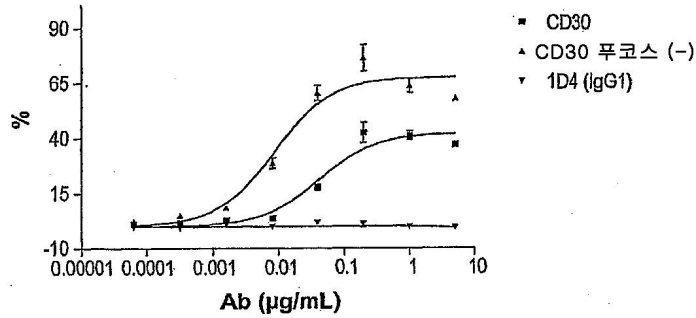
   CDR2
   A T G I P A R L S G S G S G T D F T
163  GCC ACT GGC ATC CCA GCC AGG CTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC ACT

                                CDR3
   L T I S S L E P E D F A V Y Y C Q Q
217  CTC ACC ATC AGC AGC CTA GAG CCT GAA GAT TTT GCA GTT TAT TAC TGT CAA CAG

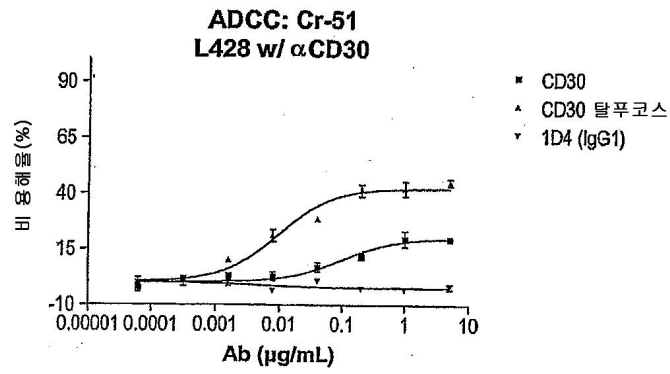
   CDR3
   R S N W P W T F G Q G T K V E I K
271  CGT AGC AAC TGG CCG TGG ACG TTC GGC CAA GGG ACC AAG GTG GAA ATC AAA
       |
       ↓ JK1
    
```

도면4

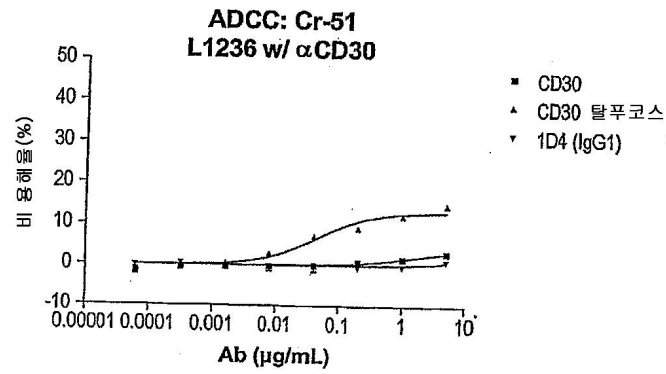
ADCC: Cr
L540 w/ CD30



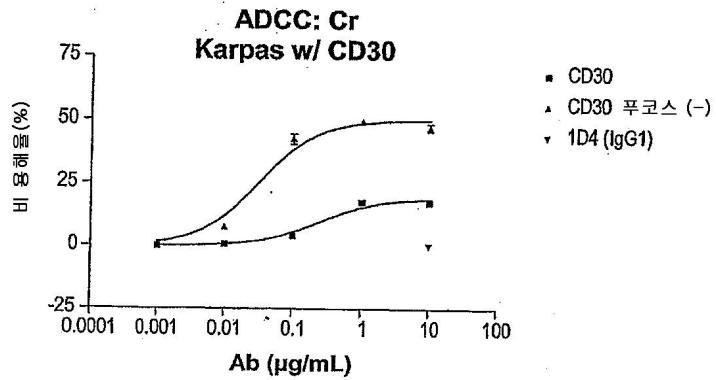
도면5



도면6



도면7



중쇄 배선 서열

4-34 배선 : QVQLQ^{CDR1}QWGA^{CDR2}GLK^{CDR3}PSE^{CDR1}TL^{CDR2}SL^{CDR3}TC^{CDR1}AVYGG^{CDR2}S^{CDR3}F^{CDR1}S^{CDR2}GY^{CDR3}Y^{CDR1}W^{CDR2}S

WIRQPPGKGL^{CDR2}EWIGE^{CDR3}IN^{CDR1}H^{CDR2}SG^{CDR3}ST^{CDR1}NY^{CDR2}NP^{CDR3}SL^{CDR1}K^{CDR2}SR^{CDR3}V^{CDR1}TT^{CDR2}S

VDTSKNQ^{CDR3}FL^{CDR1}KL^{CDR2}SS^{CDR3}V^{CDR1}TA^{CDR2}AVY^{CDR3}Y^{CDR1}CA^{CDR2}R

3-07 배선 : EVQLV^{CDR1}ESGG^{CDR2}GLV^{CDR3}QPG^{CDR1}SSL^{CDR2}RL^{CDR3}SCA^{CDR1}ASG^{CDR2}FT^{CDR3}SS^{CDR1}Y^{CDR2}W^{CDR3}MS^{CDR1}W

VRQAPGKGL^{CDR2}EWVANI^{CDR3}KQD^{CDR1}GSE^{CDR2}K^{CDR3}Y^{CDR1}VD^{CDR2}SV^{CDR3}KGR^{CDR1}FT^{CDR2}ISR

DNAKNSLYLQ^{CDR1}MNS^{CDR2}LR^{CDR3}AED^{CDR1}TA^{CDR2}VY^{CDR3}Y^{CDR1}CA^{CDR2}R

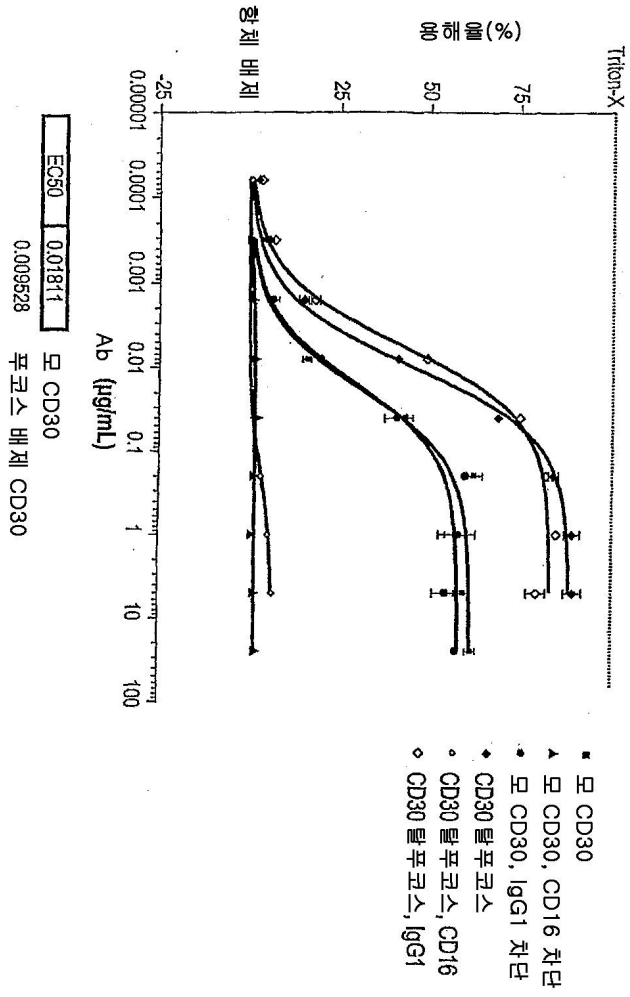
경쇄 배선 서열

I6 배선: E I V I T Q S P A T L S L S P G E R A T L S C R A S Q S V S S Y L A ^{CDR1}
 W Y Q Q K P G Q A P R L L I Y D A S N R A T G I P A R F S G S G S G ^{CDR2}
 T D F T L T I S S L E P E D F A V Y Y C Q Q R S N W ^{CDR3}

A27 배선: E I V I T Q S P G T I S L S P G E R A T L S C ^{CDR1}
 R A S Q S Y S S S Y L A W Y Q Q K P G Q A P R L L I Y ^{CDR2}
 G I P D R F S G S G S G T D F T L L I S R L E P E D F A V Y Y C Q Q Y G S S ^{CDR3}

I15 배선: D I Q M T Q S P S S I S A S V G D R V T T I C ^{CDR1}
 R A S Q G I S S W L A W Y Q Q K P K A P R S L I Y ^{CDR2}
 G V P S R F S G S G S G T D F T L L I S S L Q P E D F A V Y Y C Q Q I N S Y ^{CDR3}

항-CD16 항체 3G8 을 이용한 ADCC 활성의 차단

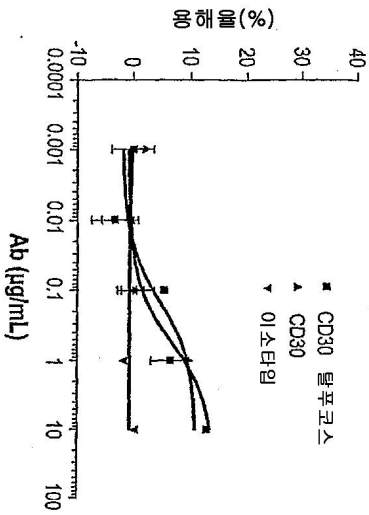


도면9

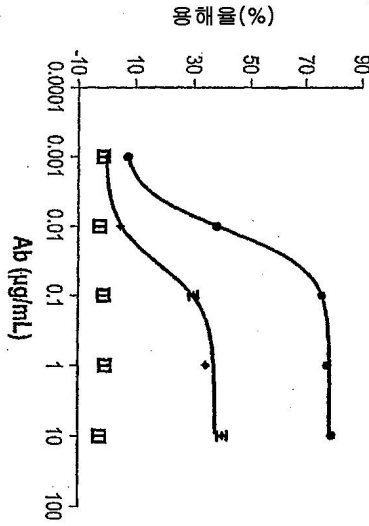
도면10

마우스 및 인간 작용자 세포를 이용한 ADCC 검정의 비교

마우스 작용자 세포
1001-BP 081704



인간 작용자 세포
1001-BP 081704



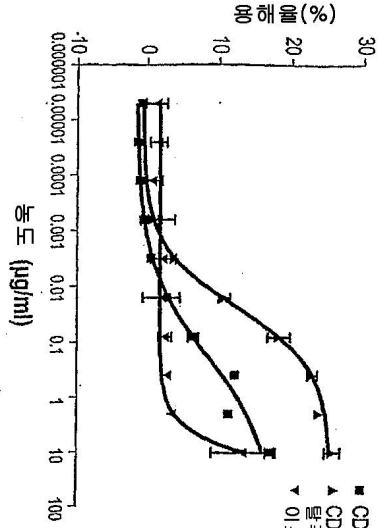
비용해율(%) = (샘플 - 항체 배제) / (트리튼-x - 항체 배제) × 100%

도면11

사이노물거스 혈액을 이용한 ADCC 검정

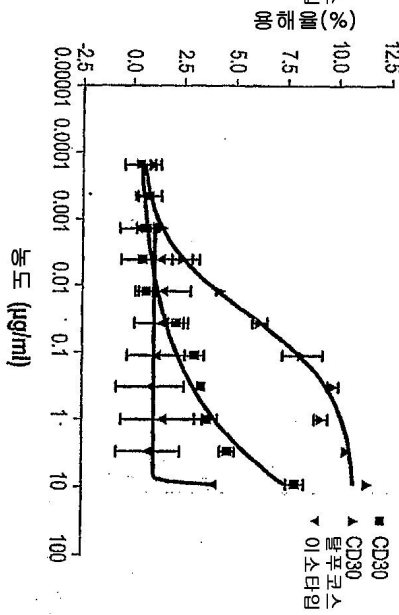
실험 #1

카르파스 299 및 사이노물거스 세포를 이용한 ADCC CD30
1:50 T/E 비
50 U/ml IL2 하룻밤동안 처리



실험 #2

카르파스 299 및 사이노물거스 세포를 이용한 ADCC CD30
1:50 T/E 비
50 U/ml IL2 하룻밤동안 처리



SEQUENCE LISTING

서열목록

<110> MEDAREX, INC.

<120> MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST CD30 LACKING IN FUCOSYL RESIDUES

<130> MXI-333PC

<140>

<141>

<150> 60/654,197

<151> 2005-02-18

<160> 35

<170> Patent In Ver. 3.3

<210> 1

<211> 112

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Ala Tyr
 20 25 30

Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Asp Ile Asn His Gly Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
 50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
 65 70 75 80

Lys Leu Asn Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95

Ser Leu Thr Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Ser Leu Val Thr Val Ser Ser
 100 105 110

<210> 2

<211> 116

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ser
 20 25 30

Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Asn Ile Asn Glu Asp Gly Ser Glu Lys Phe Tyr Val Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Phe Ser Arg Asp Asn Ala Glu Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Val His Trp Tyr Phe His Leu Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val
 100 105 110

Thr Val Ser Ser
 115

<210> 3

<211> 116

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Gly Tyr
 20 25 30

Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Glu Ile Asn His Ser Gly Ser Thr Lys Tyr Thr Pro Ser Leu Lys

50

55

60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys His Gln Phe Ser Leu
65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Glu Thr Val Tyr Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 4

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
20 25 30

Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asp Ser Tyr Pro Ile
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 5
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 5
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
 20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu
 65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
 85 90 95

Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 6
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 6
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Asn
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Leu Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Trp
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 7
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 7
 Ala Tyr Tyr Trp Ser
 1 5

<210> 8
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 8
 Asn Ser Trp Met Ser
 1 5

<210> 9
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 9
 Gly Tyr Tyr Trp Ser
 1 5

<210> 10
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 10
 Asp Ile Asn His Gly Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
 1 5 10 15

<210> 11
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 11
 Asn Ile Asn Glu Asp Gly Ser Glu Lys Phe Tyr Val Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 12
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 12
 Glu Ile Asn His Ser Gly Ser Thr Lys Tyr Thr Pro Ser Leu Lys Ser
 1 5 10 15

<210> 13
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 13
 Leu Thr Ala Tyr
 1

<210> 14

<211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 14
 Val His Trp Tyr Phe His Leu
 1 5

<210> 15
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 15
 Glu Thr Val Tyr Tyr Phe Asp Leu
 1 5

<210> 16
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 16
 Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Thr
 1 5 10

<210> 17
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 17
 Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala
 1 5 10

<210> 18
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 18
 Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Asn Leu Ala

1 5 10

<210> 19
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 19
 Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser
 1 5

<210> 20
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 20
 Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr
 1 5

<210> 21
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 21
 Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
 1 5

<210> 22
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 22
 Gln Gln Tyr Asp Ser Tyr Pro Ile Thr
 1 5

<210> 23
 <211> 9
 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 23

Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Trp Thr
 1 5

<210> 24

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 24

Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Trp Thr
 1 5

<210> 25

<211> 97

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 25

Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Gly Tyr
 20 25 30

Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Glu Ile Asn His Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
 50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
 65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95

Arg

<210> 26
 <211> 98
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 26
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Asn Ile Lys Gln Asp Gly Ser Glu Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg

<210> 27
 <211> 94
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 27
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp
 85 90

<210> 28

<211> 95

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 28

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
 20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser
 85 90 95

<210> 29

<211> 94

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 29

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
 35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr
 85 90

<210> 30

<211> 336

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(336)

<400> 30

cag gtg cag cta cag cag tgg ggc gca gga ctg ttg aag cct tcg gag 48
 Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15

acc ctg tcc ctc acc tgc gct gtc tat ggt ggg tcc ttc agt gct tac 96
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Ala Tyr
 20 25 30

tac tgg agc tgg atc cgc cag ccc cca ggg aag ggg ctg gag tgg att 144
 Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

ggg gac atc aat cat ggt gga ggc acc aac tac aac ccg tcc ctc aag 192
 Gly Asp Ile Asn His Gly Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys

50

55

60

agt cga gtc acc ata tca gta gac acg tcc aag aac cag ttc tcc ctg 240
 Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
 65 70 75 80

aag ctg aac tct gta acc gcc gcg gac acg gct gtg tat tac tgt gcg 288
 Lys Leu Asn Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95

agc cta act gcc tac tgg ggc cag gga agc ctg gtc acc gtc tcc tca 336
 Ser Leu Thr Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Ser Leu Val Thr Val Ser Ser
 100 105 110

<210> 31
 <211> 348
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(348)

<400> 31
 gag gtg cag ttg gtg gag tct ggg gga ggc ttg gtc cag cct ggg ggg 48
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

tcc ctg aga ctc tcc tgt gta gcc tct gga ttc acc ttt agt aac tct 96
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ser
 20 25 30

tgg atg agc tgg gtc cgc cag gct cca ggg aaa ggg ctg gag tgg gtg 144
 Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

gcc aac ata aac gaa gat gga agt gag aaa ttc tat gtg gac tct gtg 192
 Ala Asn Ile Asn Glu Asp Gly Ser Glu Lys Phe Tyr Val Asp Ser Val
 50 55 60

aag ggc cga ttc acc ttc tcc aga gac aac gcc gag aac tca ctg tat 240

Lys Gly Arg Phe Thr Phe Ser Arg Asp Asn Ala Glu Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80

ctg caa atg aac agc ctg aga gcc gag gac acg gct gtg tat tac tgt 288
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

gcg agg gtt cat tgg tac ttc cat ctc tgg ggc cgt ggc acc ctg gtc 336
 Ala Arg Val His Trp Tyr Phe His Leu Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val
 100 105 110

act gtc tcc tca 348
 Thr Val Ser Ser
 115

<210> 32
 <211> 348
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(348)

<400> 32
 cag gtg cag cta cag cag tgg ggc gca gga ctg ttg aag cct tcg gag 48
 Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15

acc ctg tcc ctc acc tgc gct gtc tat ggt ggg tcc ttc agt ggt tac 96
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Gly Tyr
 20 25 30

tac tgg agc tgg atc cgc cag ccc cca ggg aag ggg ctg gag tgg att 144
 Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

ggg gaa atc aat cat agt gga agc acc aag tac acc ccg tcc ctc aag 192
 Gly Glu Ile Asn His Ser Gly Ser Thr Lys Tyr Thr Pro Ser Leu Lys
 50 55 60

agc cga gtc acc ata tca gta gac acg tcc aag cac caa ttc tcc ctg 240
 Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys His Gln Phe Ser Leu

| | | | | |
|---|-----|-----|-----|-----|
| 65 | 70 | 75 | 80 | |
| aag ctg agc tct gtg acc gcc gcg gac acg gct gtg tat tac tgt gcg | | | | 288 |
| Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala | | | | |
| | 85 | 90 | 95 | |
| aga gag act gtc tac tac ttc gat ctc tgg ggc cgt ggc acc ctg gtc | | | | 336 |
| Arg Glu Thr Val Tyr Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val | | | | |
| | 100 | 105 | 110 | |
| act gtc tcc tca | | | | 348 |
| Thr Val Ser Ser | | | | |
| | 115 | | | |
| | | | | |
| <210> 33 | | | | |
| <211> 321 | | | | |
| <212> DNA | | | | |
| <213> Homo sapiens | | | | |
| | | | | |
| <220> | | | | |
| <221> CDS | | | | |
| <222> (1)..(321) | | | | |
| | | | | |
| <400> 33 | | | | |
| gac atc cag atg acc cag tct cca acc tca ctg tct gca tct gta gga | | | | 48 |
| Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Thr Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly | | | | |
| 1 | 5 | 10 | 15 | |
| gac aga gtc acc atc act tgt cgg gcg agt cag ggt att agc agc tgg | | | | 96 |
| Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp | | | | |
| | 20 | 25 | 30 | |
| tta acc tgg tat cag cag aaa cca gag aaa gcc cct aag tcc ctg atc | | | | 144 |
| Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile | | | | |
| | 35 | 40 | 45 | |
| tat gct gca tcc agt ttg caa agt ggg gtc cca tca agg ttc agc ggc | | | | 192 |
| Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly | | | | |
| | 50 | 55 | 60 | |
| agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc atc agc agc ctg cag cct | | | | 240 |
| Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro | | | | |

| | | | | |
|---|-----|-----|----|-----|
| 65 | 70 | 75 | 80 | |
| gaa gat ttt gca act tat tac tgc caa cag tat gat agt tac cct atc | | | | 288 |
| Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asp Ser Tyr Pro Ile | | | | |
| | 85 | 90 | 95 | |
| acc ttc ggc caa ggg aca cga ctg gag att aaa | | | | 321 |
| Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys | | | | |
| | 100 | 105 | | |
| <210> 34 | | | | |
| <211> 324 | | | | |
| <212> DNA | | | | |
| <213> Homo sapiens | | | | |
| <220> | | | | |
| <221> CDS | | | | |
| <222> (1)..(324) | | | | |
| <400> 34 | | | | |
| gaa att gtg ttg acg cag tct cca ggc acc ctg tct ttg tct cca ggg | | | | 48 |
| Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly | | | | |
| 1 | 5 | 10 | 15 | |
| gaa aga gcc acc ctc tcc tgc agg gcc agt cag agt gtt agc agc agc | | | | 96 |
| Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser | | | | |
| | 20 | 25 | 30 | |
| tac tta gcc tgg tac cag cag aaa cct ggc cag gct ccc agg ctc ctc | | | | 144 |
| Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu | | | | |
| | 35 | 40 | 45 | |
| atc tat ggt gca tcc agc agg gcc act ggc atc cca gac agg ttc agt | | | | 192 |
| Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser | | | | |
| | 50 | 55 | 60 | |
| ggc agt ggg tct ggg aca gac ttc act ctc acc atc agc agc ctg gag | | | | 240 |
| Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu | | | | |
| 65 | 70 | 75 | 80 | |
| cct gaa gat ttt gca gtg tat tac tgt cag cag tat ggt agc tca ccg | | | | 288 |
| Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro | | | | |
| | 85 | 90 | 95 | |

tgg acg ttc ggc caa ggg acc aag gtg gaa atc aaa 324
 Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 35
 <211> 321
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(321)

<400> 35
 gaa att gtg ttg aca cag tct cca gcc acc ctg tct ttg tct cca ggg 48
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15

gaa aga gcc acc ctc tcc tgc agg gcc agt cag agt gta agc agc aac 96
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Asn
 20 25 30

tta gcc tgg tac caa cag aaa cct ggc cag gct ccc agg ctc ctc atc 144
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45

tat gat gca tcc aac agg gcc act ggc atc cca gcc agg ctc agt ggc 192
 Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Leu Ser Gly
 50 55 60

agt ggg tct ggg aca gac ttc act ctc acc atc agc agc cta gag cct 240
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
 65 70 75 80

gaa gat ttt gca gtt tat tac tgt caa cag cgt agc aac tgg ccg tgg 288
 Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Trp
 85 90 95

acg ttc ggc caa ggg acc aag gtg gaa atc aaa 321
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105