



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0025859
(43) 공개일자 2011년03월11일

(51) Int. Cl.

C07K 16/30 (2006.01) C12N 15/13 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2011-7002248

(22) 출원일자(국제출원일자) 2009년06월30일

심사청구일자 없음

(85) 번역문제출일자 2011년01월28일

(86) 국제출원번호 PCT/US2009/049139

(87) 국제공개번호 WO 2010/002822

국제공개일자 2010년01월07일

(30) 우선권주장

61/077,041 2008년06월30일 미국(US)

61/097,034 2008년09월15일 미국(US)

(71) 출원인

모르포테크, 인크.

미국 19341 펜실베이니아주 엑스톤 웰시 폴 로드 210

(72) 발명자

니콜라이드스, 니콜라스, 씨.

미국 19342 펜실베이니아주 글렌 밀즈 마운트 에 이르 팜 로드 66

사스, 필립, 엠.

미국 19403 펜실베이니아주 오듀본 블랙 호크 서클 1903

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

양영준, 양영환

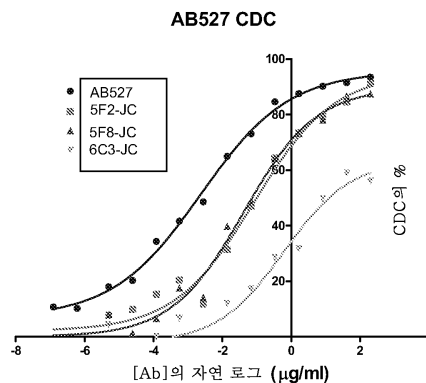
전체 청구항 수 : 총 43 항

(54) 항-GD2 항체 및 이와 관련된 방법 및 용도

(57) 요약

강글리오시드 GD2에 특이적으로 결합하는 항체를 본원에서 설명한다. 상기 항체를 코딩하는 뉴클레오타이드, 상기 항체를 발현하는 세포, 상기 항체를 위한 사용 방법, 및 강글리오시드 GD2와 연관된 질병을 치료하기 위해 항체를 사용하는 방법을 또한 설명한다. 또한, 조직 배양 배지 보충물을 설명하고, 보충물에 대한 사용 방법을 또한 설명한다. 알부민-강글리오시드 접합체, 및 그러한 접합체를 생산하기 위한 상응하는 방법을 본원에서 설명한다. 항체를 정제 또는 분리하는 방법을 또한 설명한다

대표도 - 도18



(72) 발명자

그라소, 루이지

미국 19010 펜실베이니아주 브린 마우어 바바라 레인 403

에벨, 볼프강

미국 19462 펜실베이니아주 폴리머스 미팅 킬리베그스 레인 302

루시에, 에릭

미국 19342 펜실베이니아주 글렌 밀즈 콩코드 로드 547

야오, 준

미국 19425 펜실베이니아주 체스터 스프링즈 프랭클린 코트 4403

조우, 유흥

미국 19460 펜실베이니아주 피닉스빌 셀번 레인 285

주요, 순

미국 19355 펜실베이니아주 맬버튼 샌디 레인 27

특허청구의 범위

청구항 1

중쇄 CDR3이 서열 12의 아미노산 서열을 포함하는 것인, 인간 GD2에 특이적으로 결합하는, 단리된 항체 또는 그의 항원-결합 단편.

청구항 2

제1항에 있어서, 중쇄 CDR1이 서열 10의 아미노산 서열을 포함하고, 중쇄 CDR2가 서열 11의 아미노산 서열을 포함하고, 경쇄 CDR1이 서열 26의 아미노산 서열을 포함하고, 경쇄 CDR2가 서열 27의 아미노산 서열을 포함하고, 경쇄 CDR3이 서열 28의 아미노산 서열을 포함하는 것인 항체 또는 그의 항원-결합 단편.

청구항 3

제1항에 있어서, 항체가 인간 항체인 항체 또는 그의 항원-결합 단편.

청구항 4

제1항에 있어서, 중쇄 가변 도메인이 서열 16의 아미노산 서열을 포함하는 것인 항체 또는 그의 항원-결합 단편.

청구항 5

제1항에 있어서, 경쇄 가변 도메인이 서열 32의 아미노산 서열을 포함하는 것인 항체 또는 그의 항원-결합 단편.

청구항 6

제1항에 있어서, 중쇄가 서열 40의 아미노산 서열을 포함하는 것인 항체 또는 그의 항원-결합 단편.

청구항 7

제1항에 있어서, 경쇄가 서열 42의 아미노산 서열을 포함하는 것인 항체 또는 그의 항원-결합 단편.

청구항 8

제1항에 있어서, IgM 이소형의 것인 항체 또는 그의 항원-결합 단편.

청구항 9

제8항에 있어서, 중합체인 항체 또는 그의 항원-결합 단편.

청구항 10

제9항에 있어서, 항체 또는 그의 항원-결합 단편의 중합체 상태가 오량체인 항체 또는 그의 항원-결합 단편.

청구항 11

제10항에 있어서, 오량체 항체 또는 그의 항원-결합 단편이 J-사슬을 포함하지 않는 것인 항체 또는 그의 항원-결합 단편.

청구항 12

제1항에 있어서, 보체 의존성 세포독성을 매개하는 항체 또는 그의 항원-결합 단편.

청구항 13

제1항의 항체 또는 항원 결합 단편을 코딩하는 폴리뉴클레오티드.

청구항 14

제13항에 있어서, 서열 4를 포함하는 폴리뉴클레오티드.

청구항 15

제14항에 있어서, 서열 2, 서열 3, 서열 18, 서열 19, 및 서열 20의 핵산 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드.

청구항 16

제14항에 있어서, 서열 8의 핵산 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드.

청구항 17

제14항에 있어서, 서열 24의 핵산 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드.

청구항 18

제14항에 있어서, 서열 39의 핵산 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드.

청구항 19

제14항에 있어서, 서열 41의 핵산 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드.

청구항 20

제1항의 항체 또는 그의 항원-결합 단편 및 제약상 허용되는 담체를 포함하는 조성물.

청구항 21

제14항의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 벡터.

청구항 22

제21항의 벡터를 포함하는 세포.

청구항 23

제22항에 있어서, 박테리아 세포인 세포.

청구항 24

제22항에 있어서, 진핵 세포인 세포.

청구항 25

제24항에 있어서, 진핵 세포가 차이니스 햄스터 난소 (CHO) 세포인 세포.

청구항 26

제1항의 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 발현하는 세포.

청구항 27

제11항의 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 발현하는 세포.

청구항 28

제26항에 있어서, 하이브리도마인 세포.

청구항 29

제27항에 있어서, 트랜스펙토마 (transfectoma)인 세포.

청구항 30

대상체에게 GD2에 특이적으로 결합하는 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 GD2-연관 질병의 치료 또는 예방에 효과적인 양으로 투여하는 것을 포함하는, 대상체에서 GD2-연관 질병을 치료 또는 예방하는 방법.

청구항 31

제30항에 있어서, GD2-연관 질병이 암인 방법.

청구항 32

제31항에 있어서, GD2-연관 질병이 흑색종인 방법.

청구항 33

제30항에 있어서, 대상체가 포유동물인 방법.

청구항 34

제30항에 있어서, 포유동물이 인간인 방법.

청구항 35

제26항에 따른 숙주 세포를 항체 또는 그의 항원-결합 단편의 생산에 적합한 조건 하에 배양하고, 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 세포 배양액으로부터 회수하는 것을 포함하는, 항체 또는 그의 항원-결합 단편의 제조 방법.

청구항 36

제27항에 따른 숙주 세포를 항체 또는 그의 항원-결합 단편의 생산에 적합한 조건 하에 배양하고, 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 세포 배양액으로부터 회수하는 것을 포함하는, 항체 또는 그의 항원-결합 단편의 제조 방법.

청구항 37

AB527-HYB-3B2-3C9 세포에 의해 생산되고, J-사슬을 포함하지 않는 항체 또는 그의 항원-결합 단편.

청구항 38

대상체에게 제1항에 따른 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 투여하고, GD2를 발현하는 세포를 검출하는 것을 포함하는, 대상체에서 GD2-발현 세포를 검출하는 방법.

청구항 39

제38항에 있어서, 항체 또는 그의 항원-결합 단편이 검출가능하게 표지되는 것인 방법.

청구항 40

제39항에 있어서, 검출가능한 표지가 요오드-131인 방법.

청구항 41

제2항에 있어서, GD2에 대한 항정 상태 해리 상수 (K_D)가 4.5×10^{-9} M인 항체 또는 그의 항원-결합 단편.

청구항 42

ATCC 기탁 번호 PTA-9376의 세포에 의해 생산되는 항체의 중쇄 및 경쇄 CDR을 포함하는 항체 또는 그의 항원-결합 단편.

청구항 43

ATCC 기탁 번호 PTA-9376의 세포에 의해 생산되는 항체의 중쇄 및 경쇄 가변 도메인을 포함하는 항체 또는 그의

항원-결합 단편.

명세서

기술 분야

[0001] 관련 출원에 대한 교차 참조

[0002] 본원은 둘 모두 본원에 참조로 포함되는 미국 특허 가출원 61/077,041 (2008년 6월 30일자 출원) 및 미국 특허 가출원 61/097,034 (2008년 9월 15일자 출원)를 우선권 주장한다.

[0003] 기술 분야

[0004] 본 발명은 일반적으로 면역치료제의 분야에 관한 것이다. 보다 구체적으로, 본 발명은 강글리오시드에 결합하는 모노클로날 항체, 및 치료를 필요로 하는 대상체에서 상기 항체를 사용하는 방법에 관한 것이다. 진단 및 치료 목적을 위해 상기한 항체를 사용하는 방법을 또한 제공한다. 또한, 상기한 항체를 발현하는 세포를 배양하는 것에 관한 조직 배양 배지 조성물 및 방법, 및 상기한 항체를 정제 또는 분리하기 위한 방법을 또한 제공한다.

배경 기술

[0005] 암은 미국에서 두 번째 주요 사인이다. 미국 국립 보건원 (NIH)의 국립 암 연구소 (NCI)에서는 2008년에 500,000명 초과와 개체가 암으로 죽을 것이고 140만명 초과와 개체가 암으로 진단될 것으로 추정한다. 영국, 미국과 같은 국가 및 암-관련 연구를 최우선 과제로 하는 다른 국가에서 암의 치료 방법을 개발하고, 암의 예방 방법에 관한 일반적인 이해를 향상시키기 위해 세계적으로 연구하고 노력하여 왔다. 예를 들어, NIH에서는 2008년 회계 연도에 암-관련 연구를 위한 기금에 50억 달러 이상을 배정하였고, 이것은 다른 중증 질병, 예를 들어 HIV 및 심장병에 대해 제공된 기금의 양의 거의 2배이다.

[0006] 100종 초과와 상이한 암이 존재한다. 매우 다양한 암에도 불구하고, 대부분의 암-관련 사망은 몇몇 일반적인 암, 예를 들어 폐암, 결장직장암, 및 유방암에 의해 유발된다. NCI에서는 이들 3가지 형태의 암이 2008년에 250,000명 초과와 사망을 유발할 것으로 추정한다. 앞에서 언급된 암과 같이 치명적이지는 않지만, 피부암이 미국에서 모든 새로 진단된 암의 대략 절반을 나타내고, 따라서 가장 일반적인 형태의 암이 되었다. 다양한 종류의 피부암 중에서, 흑색종이 가장 드물고 가장 치명적이다. 미국 암 학회 (American Cancer Society)에서는 흑색종이 미국에서 진단된 모든 피부암의 단지 4%만을 차지하지만, 모든 피부암-관련 사망의 79%를 유발하는 것으로 추정한다.

[0007] 성공적인 암 치료는 종종 조기 진단 및 치료의 결과이다. 암을 진단하는 강력한 방법은 암과 연관된 것으로 공지된 종양 마커 (marker)를 검출하는 것이다. 종양 마커는 암에 반응하여 종양 세포 또는 체 내의 다른 세포에 의해 생산되는 물질, 종종 단백질이다. 종양 마커는 혈액, 소변, 종양 세포의 표면, 또는 다른 비-암성 세포 및 조직 상에서 (또는 내에서) 발견될 수 있다. 강글리오시드가 많은 종양과 연관된 마커의 하나의 종류로서 확인되었다 (Hakomori, 99 Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 10718 (2002)).

[0008] 강글리오시드는 적어도 하나의 당-연결된 시알산을 갖는 스핑고당지질 (glycosphingolipid)이다. 이들 화합물은 세포 형질막의 성분이고, 세포 성장, 세포 분화, 세포 신호 전달, 및 미생물 독소에 대한 수용체 역할과 같은 다양한 생물학적 기능에서 중심 역할을 하는 것으로 생각된다 (Jacques, et al. 4 Org. Biomol. Chem. 142 (2006)). 40개 초과와 상이한 강글리오시드가 확인되었지만; 이들의 특정 하위세트, GM3, GM2, GD3 및 GD2가 종양 세포에서 일반적으로 과다 발현된다 (상기 문헌). 또한, 강글리오시드는 인간에서 고도로 면역원성인 것으로 보고되었다. 높은 면역원성 및 종양 세포에 의한 과다-발현의 조합으로 인해 강글리오시드는 암 치료제에 대한 잠재적인 표적이 된다.

[0009] 강글리오시드-특이적 모노클로날 항체가 개발되었고, 일부 경우에 인간에서 효능이 검사되었다 (일반적으로 문헌 [Azuma et al., 13 Clin. Cancer Res. 2745 (2007)]; [Irie, et al., 53 Cancer Immunol. Immunother. 110 (2004)]; [Irie and Morton, 83 Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 8694 (1986)] 참조). 인간, GD2-특이적 항체에 관한 가장 초기 연구 보고 중 하나는 문헌 [Cahan, et al., 79 Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 7629 (1982)]이다. 면역치료 연구에서는 흑색종 백신을 예방접종한 환자에 대해 보다 높은 생존률이 IgG보다는 강글

리오시드-특이적 IgM과 상호관련함을 보여주었다 (Jones et al., 66 J. Natl. Cancer Inst. 249 (1981)). 상기 발견과 일치하게, 강글리오시드 GD2 및 GD3에 대한 IgM 항체를 포함한 인간 연구에서는 흑색종에 대한 가능한 치료로서 상기 항체의 사용에 관한 유망한 결과를 제공하였다 ([Irie, et al., 53 Cancer Immunol. Immunother. 110]; [Irie and Morton, 83 Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 8694 (1986)]).

[0010] IgM은 5개의 인간 항체 이소형 중 하나이고; 다른 것은 IgG, IgA, IgE 및 IgD이다. IgM은 대개 체액성 면역 반응에서 생산되는 제1 항체이고, 이는 IgM 중쇄 불변 유전자의 위치로 인해 이소형 스위칭 (switching) 없이 생산될 수 있기 때문이다 (Charles A. Janeway, et al. Immunobiology 9-12 (5th ed. 2001)). IgM은 종종 유전자 성숙이 일어나기 전에 생산되기 때문에, 상기 클래스의 항체 이소형은 대개 다른 이소형보다 제시된 항원에 대해 더 낮은 친화도를 갖는다 (상기 문헌). IgM은 항체 분자의 결합력 (avidity)을 증가시키는 중합체를 형성함으로써 낮은 친화도를 보상한다 (상기 문헌). 중합체성 IgM은 대체로 J-사슬 (항체 중합반응을 촉진하는 ~15 kD 분자)과 회합된 오량체를 형성하지만; 이는 또한 J-사슬의 부재 하에 오량체 또는 육량체로 중합반응할 수 있다 (상기 문헌, 4-19에서). 일부 경우에, 중합성 상태의 IgM은 병원체의 존재 하에 보체 경로의 고도로 효과적인 활성화를 매개할 수 있다. 예를 들어, J-사슬-함유 오량체성 IgM은 항원에 결합될 때 구조적 변화를 거치지 않으면 보체를 활성화시키는데 대체로 효과적이지 않다 (상기 문헌, 9-17에서). 이와 반대로, J-사슬이 없는 또는 육량체성 IgM은 오량체성 IgM보다 보체를 100배까지 더 활성화시키는 것으로 나타났다 (Weirisma et al., 160 J. Immunol. 5979 (1998)).

[0011] 암은 세계적인 보건 문제이다. 다양한 형태의 상기 질병을 치료하는데 진전이 이루어지고 있지만, 개선된 치료제가 필요하다. 면역치료제는 암 치료에 큰 가능성을 갖는 것으로 생각된다. 암 세포에 의해 발현되는 항원에 특이적인 IgM 항체는 효과적인 암 치료제인 것으로 입증되었다.

발명의 내용

[0012] 개요

[0013] 강글리오시드 GD2에 특이적으로 결합하는 단리된 항체 및 항원-결합 단편을 본원에서 설명한다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 항원-결합 단편은 IgM이다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 항원-결합 단편은 오량체성 또는 육량체성이다. 항체 또는 항원-결합 단편은 인간, 인간화 또는 키메라의 것일 수 있지만, 항체 또는 항원-결합 단편은 바람직하게는 인간의 것이다. 항체 또는 항원-결합 단편은 서열 40과 실질적으로 동일한 또는 동일한 아미노산 서열을 갖는 중쇄 및 서열 42와 실질적으로 동일한 또는 동일한 아미노산 서열을 갖는 경쇄를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 항원-결합 단편은 서열 10과 실질적으로 동일한 또는 동일한 중쇄 CDR1 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 항원-결합 단편은 서열 11과 실질적으로 동일한 또는 동일한 중쇄 CDR2 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 항원-결합 단편은 서열 12와 실질적으로 동일한 또는 동일한 중쇄 CDR3 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 항원-결합 단편은 서열 26과 실질적으로 동일한 또는 동일한 경쇄 CDR1 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 항원-결합 단편은 서열 27과 실질적으로 동일한 또는 동일한 경쇄 CDR2 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 항원-결합 단편은 서열 28과 실질적으로 동일한 또는 동일한 경쇄 CDR3 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 항체 또는 항원-결합 단편은 서열 10과 실질적으로 동일한 또는 동일한 CDR1 아미노산 서열; 서열 11과 실질적으로 동일한 또는 동일한 CDR2 아미노산 서열; 및 서열 12와 실질적으로 동일한 또는 동일한 CDR3 아미노산 서열을 갖는 중쇄를 포함할 수 있다. 항체 또는 항원-결합 단편은 서열 26과 실질적으로 동일한 또는 동일한 CDR1 아미노산 서열; 서열 27과 실질적으로 동일한 또는 동일한 CDR2 아미노산 서열; 및 서열 28과 실질적으로 동일한 또는 동일한 CDR3 아미노산 서열을 갖는 경쇄를 포함할 수 있다. 항체 또는 항원-결합 단편은 서열 10과 실질적으로 동일한 또는 동일한 CDR1 아미노산 서열; 서열 11과 실질적으로 동일한 또는 동일한 CDR2 아미노산 서열; 및 서열 12와 실질적으로 동일한 또는 동일한 CDR3 아미노산 서열을 갖는 중쇄를 포함하고, 또한 서열 26과 실질적으로 동일한 또는 동일한 CDR1 아미노산 서열; 서열 27과 실질적으로 동일한 또는 동일한 CDR2 아미노산 서열; 및 서열 28과 실질적으로 동일한 또는 동일한 CDR3 아미노산 서열을 갖는 경쇄를 가질 수 있다.

[0014] 항체 또는 항원-결합 단편은 서열 13과 실질적으로 동일한 또는 동일한 중쇄 FWR1 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 항원-결합 단편은 서열 14와 실질적으로 동일한 또는 동일한 중쇄 FWR2 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 항원-결합 단편은 서열 15와 실질적으로 동일한 또는 동일한 중쇄 FWR3 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 항원-결합 단편은 서열 29와 실질적으로 동일한 또는 동일한 경쇄 FWR1 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 항원-결

합 단편은 서열 30과 실질적으로 동일한 또는 동일한 경쇄 FWR2 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 항원-결합 단편은 서열 31과 실질적으로 동일한 또는 동일한 경쇄 FWR3 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 항원-결합 단편은 서열 13과 실질적으로 동일한 또는 동일한 FWR1 아미노산 서열; 서열 14와 실질적으로 동일한 또는 동일한 FWR2 아미노산 서열; 및 서열 15와 실질적으로 동일한 또는 동일한 FWR3 아미노산 서열을 갖는 중쇄를 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 항원-결합 단편은 서열 29와 실질적으로 동일한 또는 동일한 FWR1 아미노산 서열; 서열 30과 실질적으로 동일한 또는 동일한 FWR2 아미노산 서열; 및 서열 31과 실질적으로 동일한 또는 동일한 FWR3 아미노산 서열을 갖는 경쇄를 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 항원-결합 단편은 중쇄 및 경쇄를 포함할 수 있고, 여기서 중쇄는 서열 13과 실질적으로 동일한 또는 동일한 FWR1 아미노산 서열; 서열 14와 실질적으로 동일한 또는 동일한 FWR2 아미노산 서열; 및 서열 15와 실질적으로 동일한 또는 동일한 FWR3 아미노산 서열을 포함하고; 경쇄는 서열 29와 실질적으로 동일한 또는 동일한 FWR1 아미노산 서열; 서열 30과 실질적으로 동일한 또는 동일한 FWR2 아미노산 서열; 및 서열 31과 실질적으로 동일한 또는 동일한 FWR3 아미노산 서열을 포함한다.

[0015] 일부 실시양태에서, 항체 또는 항원-결합 단편은 서열 10과 실질적으로 동일한 또는 동일한 CDR1 아미노산 서열; 서열 11과 실질적으로 동일한 또는 동일한 CDR2 아미노산 서열; 및 서열 12와 실질적으로 동일한 또는 동일한 CDR3 아미노산 서열; 서열 13과 실질적으로 동일한 또는 동일한 FWR1 아미노산 서열; 서열 14와 실질적으로 동일한 또는 동일한 FWR2 아미노산 서열; 및 서열 15와 실질적으로 동일한 또는 동일한 FWR3 아미노산 서열을 갖는 중쇄를 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 항원-결합 단편은 서열 26과 실질적으로 동일한 또는 동일한 CDR1 아미노산 서열; 서열 27과 실질적으로 동일한 또는 동일한 CDR2 아미노산 서열; 및 서열 28과 실질적으로 동일한 또는 동일한 CDR3 아미노산 서열; 서열 29와 실질적으로 동일한 또는 동일한 FWR1 아미노산 서열; 서열 30과 실질적으로 동일한 또는 동일한 FWR2 아미노산 서열; 및 서열 31과 실질적으로 동일한 또는 동일한 FWR3 아미노산 서열을 갖는 경쇄를 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 항원-결합 단편은 중쇄 및 경쇄를 포함하고, 여기서 중쇄는 서열 10과 실질적으로 동일한 또는 동일한 CDR1 아미노산 서열; 서열 11과 실질적으로 동일한 또는 동일한 CDR2 아미노산 서열; 및 서열 12와 실질적으로 동일한 또는 동일한 CDR3 아미노산 서열; 서열 13과 실질적으로 동일한 또는 동일한 FWR1 아미노산 서열; 서열 14와 실질적으로 동일한 또는 동일한 FWR2 아미노산 서열; 및 서열 15와 실질적으로 동일한 또는 동일한 FWR3 아미노산 서열을 갖고; 경쇄는 서열 26과 실질적으로 동일한 또는 동일한 CDR1 아미노산 서열; 서열 27과 실질적으로 동일한 또는 동일한 CDR2 아미노산 서열; 및 서열 28과 실질적으로 동일한 또는 동일한 CDR3 아미노산 서열; 서열 29와 실질적으로 동일한 또는 동일한 FWR1 아미노산 서열; 서열 30과 실질적으로 동일한 또는 동일한 FWR2 아미노산 서열; 및 서열 31과 실질적으로 동일한 또는 동일한 FWR3 아미노산 서열을 갖는다. CDR 및 FWR의 항원-결합 배열은 또한 CDR 스캐폴딩 (scaffolding)으로서 항체-유사 단백질을 사용하여 공학처리될 수 있다. 그러한 공학처리된 항원-결합 단백질은 본 명세서의 범위 내에 있다.

[0016] 상기한 항체 또는 항원-결합 단편은 서열 40과 실질적으로 동일한 또는 동일한 아미노산 서열을 갖는 중쇄를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 서열 39와 실질적으로 동일한 또는 동일한 폴리뉴클레오티드는 상기 중쇄 아미노산 서열을 코딩할 수 있다. 상기한 항체 또는 항원-결합 단편은 서열 42와 실질적으로 동일한 또는 동일한 아미노산 서열을 갖는 경쇄를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 서열 41과 실질적으로 동일한 또는 동일한 폴리뉴클레오티드는 상기 경쇄 아미노산 서열을 코딩할 수 있다. 상기한 항체 또는 항원-결합 단편은 중쇄 및 경쇄를 포함할 수 있고, 여기서 중쇄는 서열 40과 실질적으로 동일한 또는 동일한 아미노산 서열을 갖고, 경쇄는 서열 42와 실질적으로 동일한 또는 동일한 아미노산 서열을 갖는다.

[0017] 일부 실시양태에서, 항체는 2008년 7월 16일자로 아메리칸 타입 컬처 컬렉션 (Amer. Type Cult. Coll.; 미국 버지니아주 20110-2209 매나싸스 유니버시티 볼리바드 10801)에 기탁된 항체-생산 세포에 의해 생산되고, 기탁 번호 PTA-9376을 배정받았다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 기탁된 항체-생산 세포에 의해 생산된 항체의 GD2에 대한 결합 친화도를 갖는다. 일부 실시양태에서, 개시된 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 기탁된 항체-생산 세포에 의해 생산된 항체의 중쇄 및 경쇄 CDR을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 기탁된 항체-생산 세포에 의해 생산된 항체의 중쇄 및 경쇄 가변 구역을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 기탁된 항체-생산 세포에 의해 생산된 항체와 실질적으로 동일하거나 더 큰 수준의 보체-의존 세포독성 활성을 보여준다. 또한, GD2에 대한 결합을 위해 기탁된 세포에 의해 생산된 항체와 경쟁하는 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 본원에 기재된 항체의 범위 내에 있는 것으로 고려된다. 예를 들어, 항체는 다른 항체가 경쟁 항체의 부재 하에 항체가 달리 결합할 항원성 부위에 결합하는 것을 방지하거나 방해하면 다른 항체 또는 항원-결합 단편과 경쟁할 수 있다.

[0018] GD2에 특이적으로 결합하는 항체 또는 항원-결합 단편을 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 또한 개시된다. 일부 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드는 서열 10, 예를 들어 서열 2와 실질적으로 동일한 또는 동일한 중쇄 CDR1 서열을 갖는 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 코딩한다. 일부 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드는 서열 11, 예를 들어 서열 3과 실질적으로 동일한 또는 동일한 중쇄 CDR2를 갖는 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 코딩한다. 일부 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드는 서열 12, 예를 들어 서열 4와 실질적으로 동일한 또는 동일한 중쇄 CDR3을 갖는 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 코딩한다. 일부 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드는 서열 26, 예를 들어 서열 18과 실질적으로 동일한 또는 동일한 경쇄 CDR1을 갖는 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 코딩한다. 일부 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드는 서열 27, 예를 들어 서열 19와 실질적으로 동일한 또는 동일한 경쇄 CDR2를 갖는 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 코딩한다. 일부 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드는 서열 28, 예를 들어 서열 20과 실질적으로 동일한 또는 동일한 경쇄 CDR3을 갖는 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 코딩한다. 폴리뉴클레오티드는 서열 10, 예를 들어 서열 2와 실질적으로 동일한 또는 동일한 CDR1; 서열 11, 예를 들어 서열 3과 실질적으로 동일한 또는 동일한 CDR2; 및 서열 12, 예를 들어 서열 4와 실질적으로 동일한 또는 동일한 CDR3을 갖는 중쇄를 갖는 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 코딩할 수 있다. 폴리뉴클레오티드는 서열 26, 예를 들어 서열 18과 실질적으로 동일한 또는 동일한 경쇄 CDR1; 서열 27, 예를 들어 서열 19와 실질적으로 동일한 또는 동일한 CDR2; 및 서열 28, 예를 들어 서열 20과 실질적으로 동일한 또는 동일한 CDR3을 갖는 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 코딩할 수 있다. 폴리뉴클레오티드는 서열 10, 예를 들어 서열 2와 실질적으로 동일한 또는 동일한 중쇄 CDR1; 서열 11, 예를 들어 서열 3과 실질적으로 동일한 또는 동일한 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩되는 CDR2; 및 서열 12, 예를 들어 서열 4와 실질적으로 동일한 또는 동일한 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩되는 CDR3; 및 서열 26, 예를 들어 서열 18과 실질적으로 동일한 또는 동일한 경쇄 CDR1; 서열 27, 예를 들어 서열 19와 실질적으로 동일한 또는 동일한 CDR2; 및 서열 28, 예를 들어 서열 20과 실질적으로 동일한 또는 동일한 CDR3을 갖는 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 코딩할 수 있다. CDR의 항원-결합 배열은 또한 CDR 스캐폴딩으로서 항체-유사 단백질을 사용하여 공학처리될 수 있다. 그러한 공학처리된 항원-결합 단백질은 본 명세서의 범위 내에 있다.

[0019] 일부 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드는 서열 13, 예를 들어 서열 5와 실질적으로 동일한 또는 동일한 중쇄 FWR1을 갖는 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 코딩한다. 일부 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드는 서열 14, 예를 들어 서열 6과 실질적으로 동일한 또는 동일한 중쇄 FWR2를 갖는 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 코딩한다. 일부 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드는 서열 15, 예를 들어 서열 7과 실질적으로 동일한 또는 동일한 중쇄 FWR3을 갖는 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 코딩한다. 일부 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드는 서열 29, 예를 들어 서열 21과 실질적으로 동일한 또는 동일한 경쇄 FWR1을 갖는 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 코딩한다. 일부 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드는 서열 30, 예를 들어 서열 22와 실질적으로 동일한 또는 동일한 경쇄 FWR2를 갖는 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 코딩한다. 일부 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드는 서열 31, 예를 들어 서열 23과 실질적으로 동일한 또는 동일한 경쇄 FWR3을 갖는 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 코딩한다. 일부 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드는 서열 13, 예를 들어 서열 5와 실질적으로 동일한 또는 동일한 중쇄 FWR1; 서열 14, 예를 들어 서열 6과 실질적으로 동일한 또는 동일한 FWR2; 및 서열 15, 예를 들어 서열 7과 실질적으로 동일한 또는 동일한 FWR3을 갖는 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 코딩한다. 일부 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드는 서열 29, 예를 들어 서열 21과 실질적으로 동일한 또는 동일한 경쇄 FWR1; 서열 30, 예를 들어 서열 22와 실질적으로 동일한 또는 동일한 FWR2; 및 서열 31, 예를 들어 서열 23과 실질적으로 동일한 또는 동일한 FWR3을 갖는 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 코딩한다. 일부 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드는 중쇄 및 경쇄를 갖는 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 코딩하고, 여기서 중쇄 FWR1은 서열 13, 예를 들어 서열 5와 실질적으로 동일하거나 동일하고; 중쇄 FWR2는 서열 14, 예를 들어 서열 6과 실질적으로 동일하거나 동일하고; 중쇄 FWR3은 서열 15, 예를 들어 서열 7과 실질적으로 동일하거나 동일하고; 경쇄 FWR1은 서열 29, 예를 들어 서열 21과 실질적으로 동일하거나 동일하고; 경쇄 FWR2는 서열 30, 예를 들어 서열 22와 실질적으로 동일하거나 동일하고; 경쇄 FWR3은 서열 31, 예를 들어 서열 23과 실질적으로 동일하거나 동일하다.

[0020] 일부 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드는 서열 10, 예를 들어 서열 2와 실질적으로 동일한 또는 동일한 중쇄 CDR1; 서열 11, 예를 들어 서열 3과 실질적으로 동일한 또는 동일한 중쇄 CDR2; 및 서열 12, 예를 들어 서열 4와 실질적으로 동일한 또는 동일한 중쇄 CDR3; 서열 13, 예를 들어 서열 5와 실질적으로 동일한 또는 동일한 중쇄 FWR1; 서열 14, 예를 들어 서열 6과 실질적으로 동일한 또는 동일한 중쇄 FWR2; 및 서열 15, 예를 들어 서열 7과 실질적으로 동일한 또는 동일한 중쇄 FWR3을 갖는 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 코딩한다. 일부 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드는 서열 26, 예를 들어 서열 18과 실질적으로 동일한 또는 동일한 경쇄 CDR1; 서열 27, 예를 들어 서열 19와 실질적으로 동일한 또는 동일한 경쇄 CDR2; 및 서열 28, 예를 들어 서열 20과 실질적

으로 동일한 또는 동일한 경쇄 CDR3; 서열 29, 예를 들어 서열 21과 실질적으로 동일한 또는 동일한 경쇄 FWR1; 서열 30, 예를 들어 서열 22와 실질적으로 동일한 또는 동일한 경쇄 FWR2; 및 서열 31, 예를 들어 서열 23과 실질적으로 동일한 또는 동일한 경쇄 FWR3을 갖는 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 코딩한다.

[0021] 일부 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드는 중쇄 및 경쇄를 갖는 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 코딩하고, 여기서 폴리뉴클레오티드는 서열 10, 예를 들어 서열 2와 실질적으로 동일한 또는 동일한 중쇄 CDR1; 서열 11, 예를 들어 서열 3과 실질적으로 동일한 또는 동일한 중쇄 CDR2; 서열 12, 예를 들어 서열 4와 실질적으로 동일한 또는 동일한 중쇄 CDR3; 서열 13, 예를 들어 서열 5와 실질적으로 동일한 또는 동일한 중쇄 FWR1; 서열 14, 예를 들어 서열 6과 실질적으로 동일한 또는 동일한 중쇄 FWR2; 및 서열 15, 예를 들어 서열 7과 실질적으로 동일한 또는 동일한 중쇄 FWR3; 및 서열 26, 예를 들어 서열 18과 실질적으로 동일한 또는 동일한 경쇄 CDR1; 서열 27, 예를 들어 서열 19와 실질적으로 동일한 또는 동일한 경쇄 CDR2; 서열 28, 예를 들어 서열 20과 실질적으로 동일한 또는 동일한 경쇄 CDR3; 서열 29, 예를 들어 서열 21과 실질적으로 동일한 또는 동일한 경쇄 FWR1; 서열 30, 예를 들어 서열 22와 실질적으로 동일한 또는 동일한 경쇄 FWR2; 및 서열 31, 예를 들어 서열 23과 실질적으로 동일한 또는 동일한 경쇄 FWR3을 코딩한다. 공학처리된 항원-결합 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 또한 본 발명의 범위 내에 있다.

[0022] 항체- 및 항원-결합 단편-코딩 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 제공하고, GD2에 특이적으로 결합하는 항체 또는 항원-결합 단편을 발현하는 세포를 또한 제공한다.

[0023] 치료를 필요로 하는 대상체에서 GD2-연관 질병을 치료 또는 예방하는 방법을 본원에서 설명한다. 일부 실시양태에서, GD2-연관 질병은 암이다. 일부 실시양태에서, GD2-연관 질병은 흑색종이다. 방법은 대상체에게 GD2에 특이적으로 결합하는 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 GD2-연관 질병을 치료 또는 예방하기 위해 효과적인 양으로 투여하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 방법은 항체 또는 그의 항원-결합 단편 및 제약상 허용되는 담체를 포함하는 제약 조성물을 투여하는 것을 포함한다. 일부 측면에서, 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 IgM 항체 또는 항원-결합 단편이다. 일부 실시양태에서, 대상체에서 GD2-연관 질병을 치료 또는 예방하는 상기한 방법은 본원에 기재된 GD2-특이적 항체와 결합에 대해 경쟁하는 항체 또는 항원-결합 단편을 사용하여 수행할 수 있다.

[0024] 생체 내에서 또는 시험관 내에서 GD2-발현 세포를 검출하는 방법을 본원에서 설명한다. 방법은 대상체에서 검출 또는 위치결정 (localization)을 허용하기 위해 대상체에게 GD2에 특이적으로 결합하는 본원에 기재된 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 투여하는 것을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 상기한 항체 또는 항원-결합 단편은 검출가능하게 표지될 수 있다. 그러한 검출가능한 표지는 형광 표지, 방사성 표지, 비오틴 등을 포함할 수 있다. 별법으로, 일부 실시양태에서, GD2-특이적 항체 또는 항원-결합 단편은 표지되지 않고, 대신 검출가능하게 표지된 2차 항체에 의해 검출된다. 일부 실시양태에서, 상기한 검출 방법은 본원에 기재된 GD2-특이적 항체 및 항원-결합 단편과 결합에 대해 경쟁하는 항체 또는 항원-결합 단편을 사용하여 수행할 수 있다.

[0025] IgM 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 제조하고 정제 또는 분리하는 방법을 본원에서 설명한다. 방법은 숙주 세포를 항체 또는 항원-결합 단편을 생산하기 위해 적합한 조건 하에 배양하고, 항체 또는 항원-결합 단편을 세포 배양액으로부터 회수하고, 회수된 항체 또는 항원-결합 단편을 정제 또는 분리하는 것을 포함한다. 임의로 항체 또는 항원-결합 단편을 세제로 세척하고, 항체 또는 항원-결합 단편을 포함하는 용액을 친화도 크로마토그래피 컬럼에 적용하고, 친화도 크로마토그래피 컬럼으로부터의 용출액을 양이온 교환 크로마토그래피 컬럼에 적용하고, 양이온 교환 크로마토그래피 컬럼으로부터의 용출액을 히드록시아파타이트 크로마토그래피 컬럼에 적용하고, 히드록시아파타이트 크로마토그래피 컬럼으로부터 용출액을 회수하는 것을 포함하는, IgM 항체 또는 항원-결합 단편을 정제 또는 분리하는 방법을 또한 특징으로 한다.

[0026] 추가의 방법은 세포 배양 배지에 아미노산, 당 및 비타민을 포함하는 조성물을 보충함으로써 배양된 진핵 세포의 생활력을 향상시키는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 조성물은 글루코스, 글루타메이트, 아스파르테이트, 세린, 히스티딘, 트레오닌, 아르기닌, 티로신, 시스테인, 발린, 메티오닌, 트립토판, 페닐알라닌, 이소류신, 류신, 라이신, 프롤린, 니코틴산 아마이드, 피리독신 HCl, 엽산, 비타민 B-12, 리보플라빈, 및 티아민 HCl을 포함할 수 있다. 단백질을 생산하도록 변형된 세포에 의한 단백질 생산을 향상시키는 방법을 또한 본원에서 설명한다. 한 측면에서, 이들 방법은 세포의 성장 배지에 발레르산을 보충하는 것을 포함한다.

[0027] 알부민, 예를 들어 소 혈청 알부민 (BSA) 및 강글리오시드의 단백질 접합체, 및 그러한 단백질 접합체를 생산하기 위한 방법을 본원에서 설명한다. 한 실시양태에서, 접합된 강글리오시드는 GD2일 수 있다. 한 실시양태에서, 접합된 강글리오시드는 GM2일 수 있다. 한 실시양태에서, 접합된 강글리오시드는 GM3일 수 있다. 한 실시

양태에서, 알부민은 환원적 아민화에 의해 강글리오시드의 탄수화물 모이어티 (moiety)의 환원 단부에 접합된다. 한 실시양태에서, 환원적 아민화는 나트륨 시아노보로하이드라이드에 의해 촉매된다.

도면의 간단한 설명

[0028]

도 1은 ELISA에 의해 결정할 때 엡스타인-바아 (Epstein-Barr) 바이러스-형질전환된 인간 림프모세포 풀 (pool) (HLP)의 상등액 내에 존재하는 항체의 가변적인 항원 특이성을 보여준다. 도 1A는 HLP로부터 농축된 세포 배양 상등액이 세포 계대배양 (passage) 2 (8.1X 농축) 또는 4 (14.2X 농축)에서 GD2에 특이적인 IgM 항체를 함유함을 입증한다. 도 1B는 HLP로부터 세포 배양 상등액이 강글리오시드 GD1a, GD2, GM2 및 GM3에 결합하는 IgM 항체를 함유함을 입증한다.

도 2는 형광 활성화된 세포 분류 (FACS)에 의해 분석할 때 GD2-발현 1205LU 흑색종 세포 상에서 HLP 세포 배양액에 의해 생산된 IgM 항체의 결합 수준을 보여준다. 도 2A는 음성 대조군으로서 역할을 하고, GD2-특이적 1차 항체의 부재 하에 결합을 보여준다. 도 2B 및 도 2C는 각각 8.1X 또는 14.2X 농축된 세포 배양 상등액으로부터 얻은 HLP-유래된 IgM의 결합을 보여준다. 도 2D는 쥐 하이브리도마 HB-8568TM (ATCC #HB 8568TM)에 의해 생산된 쥐 GD2-특이적 IgM 항체의 결합을 보여주고, 양성 대조군으로서 역할을 한다.

도 3은 HLP-유래된 하이브리도마에 의해 생성된 하이브리도마 클론으로부터 폐 배지 (spent medium)를 사용하는 항원-특이적 ELISA를 보여준다. 도 3A는 강글리오시드 GD2, GD1a, GM2 및 GM3에 대한 하이브리도마 3B2, 5D7 및 10B4의 배지 내에 함유된 IgM 항체의 결합 특징을 보여준다. 도 3B는 강글리오시드 GD2, GD1a, GM2 및 GM3에 대한 1470 하이브리도마 서브클론의 배지 내에 함유된 IgM 항체의 결합 특징을 보여준다.

도 4는 FACS에 의해 분석할 때 GD2-발현 1205LU 흑색종 세포 상에서 하이브리도마 3B2 및 1470 세포 배양액에 의해 생산된 IgM 항체의 결합 수준을 보여준다. 도 4A는 음성 대조군으로서 역할을 하고, GD2-특이적 1차 항체의 부재 하에 결합의 결핍을 보여준다. 도 4B는 양성 대조군으로서 역할을 하고, HB-8568TM 세포에 의해 생산된 쥐 GD2-특이적 IgM 항체의 결합을 보여준다. 도 4C 및 D는 각각 3B2 및 1470 하이브리도마 세포에 의해 생산된 IgM의 결합을 보여준다.

도 5는 하이브리도마 3B2 조직 배양 상등액으로부터 얻은 IgM 또는 비-GD2-특이적 인간 IgM (nhIgM)에 의해 매개된 보체-의존 세포독성 (CDC)에 의한 세포 사멸을 보여준다.

도 6은 AB527 항체 중쇄 및 경쇄 세그먼트의 클로닝의 개략도를 제공한다.

도 7은 AB527 발현 벡터의 개략도를 제공한다.

도 8은 표면 플라스몬 공명 (plasmon resonance)에 의해 측정할 때, 강글리오시드 GD2, GM2 및 GD3에 대한 AB527의 결합 활성을 보여준다.

도 9는 GD2에 결합된 항체의 변하는 농도에 대한 표면 플라스몬 공명에 의해 측정할 때 AB527 결합 평형의 그래프를 제공한다.

도 10은 박층 크로마토그래피에 의해 분리된 다양한 강글리오시드의 염색 패턴을 보여준다. 오르시놀 염색은 비-특이적 강글리오시드 염색을 보여주고, 이것은 AB527 염색과 비교하기 위한 기초를 제공한다.

도 11은 세포 표면에서 GD2를 발현하는 (세포주: M14, M0023, M101, M18, M10-Vac, PM0496) 또는 GD2 발현이 결핍되는 (GD2-음성주: M21, M238, IMCD0023, MG1055) 인간 흑색종 세포주에 결합하는 AB527의 유동 세포측정 (컬럼 I 및 II) 및 비교 광학 현미경 및 면역형광 현미경 영상 (컬럼 II 및 IV)을 보여준다.

도 12는 EL4 세포에 대한 AB527의 결합 특성을 결정하는 포화 결합 곡선 및 상응하는 스캐차드 (Scatchard) 플롯의 그래프를 제공한다.

도 13은 GD2 양성 (M14) 및 음성 (MG1055, RPMI7951 및 JS0592) 흑색종 세포주의 AB527 염색을 보여준다. 면역조직화학 분석은 비오틴화 AB527 (도 13A) 또는 비오틴화, 비-GD2-특이적, 대조 IgM (도 13B)를 사용하여 수행하였다.

도 14는 M14 종양 절편이 비오틴화 hIgM (14a)와 면역반응성이 아니지만, 비오틴화 AB527 (14b)과 면역반응성을 보임을 보여준다.

도 15는 하이브리도마 AB527-HYB-3B2-3C9 또는 AB527 IgM으로부터 얻어진 IgM에 의해 매개되는 GD2 양성 또는

GD2 음성 세포의 보체-의존 세포독성 (CDC)의 비교를 보여준다.

도 16은 GD2를 발현하는 (M14) 또는 GD2를 발현하지 않는 (1205LU) 인간 종양 세포에 대한 보체의 존재 또는 부재 하의 AB527-매개된 CDC의 그래프이다.

도 17은 비-특이적 인간 IgM, AB527, 비-특이적 hIgG, 및 IgG1 불변 구역을 갖는 이소형-스위칭된 AB527에 대한 CDC 활성의 상대적인 정도를 도시한다.

도 18은 J-사슬 (JC)을 갖거나 갖지 않는 AB527 항체에 대한 CDC 활성의 상대적인 정도를 도시한다.

도 19는 단백질 A 친화도 크로마토그래피 컬럼에 적용된 세제-처리된 조건화된 배양 상등액 (CCS) (Load) 및 3 M MgCl₂에 의한 용출 후에 모아진 분획으로부터 수집된 물질 (Elute)의 환원 SDS-PAGE 겔을 보여준다. 화살표는 IgM 중쇄 (~70kD) 및 경쇄 (~25kD)를 가리킨다.

도 20은 변하는 양의 마크로캡(MacroCap)TM SP 양이온 교환 수지에 의해 포획된 AB527의 환원 SDS-PAGE 겔을 보여준다. 화살표는 IgM 중쇄 (~70kD) 및 경쇄 (~25kD)를 가리킨다.

도 21은 변하는 부피의 AB527 중간체를 마크로캡TM SP 양이온 교환 수지에 적용한 후 수집된 관통액 (flowthrough) (도 21A) 또는 용출액 (도 21B) 내의 다양한 형태의 AB527 IgM의 상대적인 양을 보여준다.

도 22는 크기 배제-HPLC로부터의 크로마토그램을 도시한 것이고, 이것은 마크로캡TM SP 컬럼으로부터 관통액 (도 22A) 및 용출액 (도 22B) 내에 존재하는 물질의 크기 분포를 입증한다.

도 23은 GD2-BSA 접합체에 대한 AB527 결합의 그래프를 제공한다.

도 24는 GD2-BSA, GM2-BSA, 및 GM3-BSA 접합체에 대한 AB527 결합을 비교하는 그래프를 제공한다.

도 25는 CMS의 실시양태를 첨가한 (배양 배지 보충물 (CMS)) 및 첨가하지 않은 (CD CHO 대조군) 배지 내에서 배양된 AB527-발현 세포에 대한 시간 경과에 따른 생존가능한 세포 밀도의 비교를 보여준다.

도 26은 CMS의 실시양태를 첨가한 (CMS) 및 첨가하지 않은 (CD CHO 대조군) 배지 내에서 배양된 AB527-발현 세포에 대한 시간 경과에 따른 생존가능한 세포의 상대적인 백분율을 보여준다.

도 27은 CMS의 실시양태를 첨가한 (CMS) 및 첨가하지 않은 (CD CHO 대조군) 배지 내에서 배양된 AB527-발현 세포에 대한 시간 경과에 따른 통합 생존가능한 세포 밀도 (IVC)를 보여준다.

도 28은 CMS의 실시양태를 첨가한 (CMS) 및 첨가하지 않은 (CD CHO 대조군) 배지 내에서 배양된 AB527-발현 세포의 배양액 내에서 14일 후의 총 항체 생산을 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0029] 설명과 관련한 다양한 용어가 명세서와 특허청구범위 전체에 걸쳐 사용된다. 이들 용어는 달리 나타내지 않으면 당업계에서 그의 통상적인 의미를 갖는 것으로 이해된다. 다른 구체적으로 정의되는 용어는 본원에서 제시된 정의와 일치하는 방식으로 이해되어야 한다.

[0030] 본 명세서 및 첨부된 특허청구범위에서 사용될 때, 단수형 (부정관사 "a", "an" 및 정관사 "the")은 내용상 분명하게 다른 의미를 나타내지 않으면 복수형의 지시 대상을 포함한다. 따라서, 예를 들어 "세포"라는 언급은 2개 이상의 세포의 조합 등을 포함한다.

[0031] 측정가능한 값, 예를 들어 양, 시간 지속시간 등을 언급할 때 본원에서 사용되는 용어 "약"은 명시된 값으로부터 ±20%까지의 변동을 포함하는 것을 의미하고, 이는 그러한 변동이 개시된 방법을 수행하기 위해 적절하기 때문이다. 달리 나타내지 않으면, 명세서와 특허청구범위에서 사용되는 성분의 양, 특성, 예를 들어 분자량, 반응 조건 등을 표현하는 모든 수치는 모든 경우에 용어 "약"에 의해 수식되는 것으로 이해되어야 한다. 따라서, 반대로 나타내지 않으면, 다음 명세서 및 첨부된 청구의 범위에 제시된 수치 파라미터는 본 발명이 달성하고자 하는 목적하는 특성에 따라 상이할 수 있는 근사치이다. 적어도, 및 균등론이 적용되는 본원을 특허청구항의 범위로 제한하기 위한 시도가 아니라, 각각의 수치 파라미터는 적어도 보고된 유의한 수치에 비추어 통상적인 반올림 기술을 적용함으로써 고려되어야 한다.

[0032] 본 발명의 넓은 범위를 제시하는 수치 범위 및 파라미터가 근사치임에도 불구하고, 특정 예에서 제시되는 수치 값은 가능한 한 정확하게 보고된다. 그러나, 임의의 수치값은 그들의 각각의 시험 측정에서 발견되는 표준 편

차로부터 반드시 발생하는 고유한 특정 오차를 포함한다.

[0033] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "세포독성제" 또는 "세포증식 억제제"는 세포의 생물학적 과정을 억제하거나, 또는 세포의 생활력 또는 증식능을 감소시키는 물질을 의미한다. 세포독성 또는 세포증식 억제제는 다양한 방식으로, 예를 들어 DNA 손상의 유도, 세포 주기 정지의 유도, DNA 합성의 억제, 전사의 억제, 번역 또는 단백질 합성의 억제, 세포 분열의 억제, 또는 세포자멸(apoptosis)의 유도(이에 제한되지 않음)에 의해 기능할 수 있다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "화학요법제"는 신생물 세포를 우선적으로 사멸시키거나, 성장을 억제하거나 전이를 억제하거나 또는 빠르게 증식하는 세포의 세포 주기를 붕괴시키는 세포독성, 세포증식 억제, 및 항신생물제를 의미한다. 화학요법제는 합성 화합물, 천연 및 재조합 박테리아 독소, 천연 및 재조합 진균 독소, 천연 및 재조합 식물 독소, 분열성 핵종, 및 방사성 핵종을 포함하고, 이에 제한되지 않는다. 화학요법제의 특정한 예는 억새풀(pokeweed) 항바이러스 단백질, 아브린, 리신 및 각각의 그들의 A 사슬, 모모르딘, 사포린, 브리오딘 1, 보우가닌, 겔로닌, 디프테리아 독소, 슈도모나스(Pseudomonas) 외독소, 시가 독소, 칼리케아미신, 메이탄시노이드, 납-212, 비스무트-212, 아스타틴-211, 요오드-131, 스칸듐-47, 레늄-186, 레늄-188, 이트륨-90, 요오드-123, 요오드-124, 요오드-125, 브롬-77, 인듐-111, 붕소-10, 악티나이드, 알트레타민, 악티노마이신 D, 플리카마이신, 퓨로마이신, 그라미시딘 D, 독소루비신, 콜히친, 시토칼라신 B, 시클로포스파미드, 에메틴, 메이탄신, 암사크린, 시스플라스틴, 에토포시드, 에토포시드 오르토크논, 테니포시드, 다우노루비신, 겐시타빈, 독소루비신, 미톡산트론, 비산트렌, 블레오마이신, 메토포렉세이트, 빈데신, 아드리아마이신, 빈크리스틴, 빈블라스틴, BCNU, 탁솔, 타르세바, 아바스틴, 미토마이신, 5-플루오로우라실, 시클로포스파미드 및 특정 시토킨, 예를 들어 TNF-알파 및 TNF-베타를 포함하고, 이에 제한되지 않는다.

[0034] "단리된"은 천연 상태에서부터 "사람에 의해" 변경됨을 의미한다. 분자 또는 조성물이 자연에서 발생할 경우, 이들은 그의 원래의 환경으로부터 변경 또는 제거되거나, 또는 변경 및 제거될 때 "단리된" 것이다. 예를 들어, 천연적으로 살아있는 식물 또는 동물에 존재하는 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드는 "단리된" 것이 아니지만, 그의 천연 상태의 공존하는 물질로부터 분리된 동일한 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드는 본원에서 사용되는 바와 같이 "단리된" 것이다.

[0035] "핵산 분자" 또는 "핵산"과 동의어로서 언급되는 "폴리뉴클레오티드"는 비변형 RNA 또는 DNA 또는 변형 RNA 또는 DNA일 수 있는 임의의 폴리리보뉴클레오티드 또는 폴리데옥시리보뉴클레오티드를 의미한다. "폴리뉴클레오티드"는 단일- 및 이중가닥 DNA, 단일- 및 이중가닥 구역의 혼합물인 DNA, 단일- 및 이중가닥 RNA, 및 단일- 및 이중가닥 구역의 혼합물인 RNA, 단일가닥 또는 보다 일반적으로는 이중가닥일 수 있는 DNA 및 RNA를 포함하는 하이브리드 분자 또는 단일구역과 이중가닥 구역의 혼합물을 포함하고 이에 제한되지 않는다. 또한, "폴리뉴클레오티드"는 RNA 또는 DNA 또는 RNA와 DNA 둘 모두를 포함하는 삼중가닥 구역을 의미한다. 또한, 용어 폴리뉴클레오티드는 하나 이상의 변형된 염기를 갖는 DNA 또는 RNA 및 안정성 또는 다른 이유로 변형된 백본(backbone)을 갖는 DNA 또는 RNA를 포함한다. "변형된" 염기는 예를 들어 트리틸화(tritylated) 염기 및 특이한 염기, 예를 들어 이노신을 포함한다. 다양한 변형이 DNA 및 RNA에 대해 이루어질 수 있고; 따라서, "폴리뉴클레오티드"는 일반적으로 자연에서 발견되는 폴리뉴클레오티드의 화학적으로, 효소에 의해 또는 대사에 의해 변형된 형태, 및 바이러스 및 세포에 특유한 DNA 및 RNA의 화학적 형태를 포함한다. 또한, "폴리뉴클레오티드"는 올리고뉴클레오티드로 종종 언급되는 비교적 짧은 핵산 사슬을 포함한다.

[0036] 핵산 또는 아미노산 서열에 대한 "실질적으로 동일한"은 2 이상의 서열 사이의 적어도 65%의 동일성을 의미한다. 바람직하게는, 이 용어는 2 이상의 서열 사이의 적어도 70%의 동일성, 보다 바람직하게는 적어도 75%의 동일성, 보다 바람직하게는 적어도 80%의 동일성, 보다 바람직하게는 적어도 85%의 동일성, 보다 바람직하게는 적어도 90%의 동일성, 보다 바람직하게는 적어도 91%의 동일성, 보다 바람직하게는 적어도 92%의 동일성, 보다 바람직하게는 적어도 93%의 동일성, 보다 바람직하게는 적어도 94%의 동일성, 보다 바람직하게는 적어도 95%의 동일성, 보다 바람직하게는 적어도 96%의 동일성, 보다 바람직하게는 적어도 97%의 동일성, 보다 바람직하게는 적어도 98%의 동일성, 보다 바람직하게는 적어도 99% 또는 이보다 큰 동일성을 의미한다. 상기 동일성은 mBLAST 알고리즘을 사용하여 결정할 수 있다 ([Altschul et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-8]; [Karlin and Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-7]).

[0037] "벡터"는 세그먼트의 복제 또는 발현을 유발하기 위해 또 다른 핵산 세그먼트가 작동가능하게 삽입될 수 있는 레플리콘, 예를 들어 플라스미드, 파지, 코스미드, 또는 바이러스이다.

[0038] 용어 "작동가능하게 연결된" 또는 "작동가능하게 삽입된"은 코딩 서열의 발현에 필요한 조절 서열이 코딩 서열의 발현을 가능하게 하기 위해서 핵산 분자를 코딩 서열에 대해 적절한 위치에 배치되는 것을 의미한다. 예를

들어, 프로모터는 프로모터가 코딩 서열의 전사 또는 발현을 제어할 수 있을 때 코딩 서열에 작동가능하게 연결된 것이다. 코딩 서열은 센스 또는 안티센스 배향으로 프로모터 또는 조절 서열에 작동가능하게 연결될 수 있다. 용어 "작동가능하게 연결된"은 때때로 발현 벡터 내의 다른 전사 제어 요소 (예를 들어, 인핸서)의 배열에 적용된다.

[0039] 세포는 외인성 또는 이종성 핵산, 예를 들어 DNA가 세포 내로 도입될 때 "형질전환된" 것이다. 형질전환 DNA는 세포의 게놈 내로 통합될 (공유 연결될) 수 있거나 되지 않을 수 있다. 예를 들어, 원핵생물, 효모, 및 포유동물 세포에서, 형질전환 DNA는 에피솜 요소, 예를 들어 플라스미드 상에서 유지될 수 있다. 진핵 세포에 있어서, 안정하게 형질전환된 세포, 또는 "안정한 세포"는 형질전환 DNA를 함유하는 딸 세포 집단으로 이루어진 세포주 또는 클론을 확립하는 진핵 세포의 능력에 의해 입증된다. "클론"은 유사분열에 의해 단일 세포 또는 공통 조상으로부터 유도된 세포의 집단이다. "세포주"는 많은 세대 동안 시험관 내에서 안정하게 성장할 수 있는 1차 세포의 클론이다. 본원에서 제시되는 일부 예에서, 세포는 세포를 DNA로 형질감염시킴으로써 형질전환된다.

[0040] "폴리펩티드"는 펩티드 결합 또는 변형된 펩티드 결합에 의해 서로 연결된 2 이상의 아미노산을 포함하는 임의의 펩티드 또는 단백질, 즉, 펩티드 동배체 (isostere)를 의미한다. "폴리펩티드"는 통상 펩티드, 올리고펩티드 또는 올리고머로 언급되는 짧은 사슬, 및 일반적으로 단백질로서 언급되는 더 긴 사슬을 모두 의미한다. 폴리펩티드는 20개의 유전자에 의해 코딩되는 아미노산 이외의 다른 아미노산을 포함할 수 있다. "폴리펩티드"는 천연 과정, 예를 들어 번역 후 처리에 의해, 또는 당업계에 공지된 화학적 변형 기술에 의해 변형된 아미노산 서열을 포함한다. 그러한 변형은 기본 교체, 전공 논문, 및 연구 문헌에 잘 설명되어 있다. 변형은 펩티드 백본, 아미노산 측쇄 및 아미노 또는 카르복실 말단을 비롯하여 폴리펩티드의 임의의 위치에서 발생할 수 있다. 동일한 종류의 변형이, 제시된 폴리펩티드 내의 여러 부위에서 동일하거나 상이한 정도로 존재할 수 있다. 또한, 제시된 폴리펩티드는 많은 종류의 변형을 포함할 수 있다. 폴리펩티드는 유비퀴틴화의 결과로 분지될 수 있고, 분지쇄가 존재하거나 존재하지 않는 시클릭 사슬일 수 있다. 시클릭, 분지된 및 분지된 시클릭 폴리펩티드는 천연 번역 후 과정에 의해 생성될 수 있거나 또는 합성 방법에 의해 제조될 수 있다. 변형은 아세틸화, 아실화, ADP-리보실화, 아미드화, 플라빈의 공유 부착, 헴 모이어티의 공유 부착, 뉴클레오타이드 또는 뉴클레오타이드 유도체의 공유 부착, 지질 또는 지질 유도체의 공유 부착, 포스포티딜이노시톨의 공유 부착, 가교결합, 고리화, 디설피드 결합의 형성, 탈메틸화, 공유 가교결합의 형성, 시스틴의 형성, 피로글루타메이트의 형성, 포르밀화, 감마-카르복실화, 글리코실화, GPI 앵커 (anchor) 형성, 히드록실화, 요오드화, 메틸화, 미리스토일화, 산화, 단백질 분해에 의한 처리, 인산화, 프레닐화, 라세미화, 셀레노일화, 황산화, 단백질에 대한 아미노산의 운반-RNA 매개 부가, 예를 들어 아르기닐화, 및 유비퀴틴화를 포함한다 (예를 들어, 문헌 [Proteins - Structure and Molecular Properties, 2nd Ed., T. E. Creighton, W. H. Freeman and Company, New York, 1993] 및 [Wold, F., Posttranslational Protein Modifications: Perspectives and Prospects, pgs. 1-12 in Posttranslational Covalent Modification of Proteins, B. C. Johnson, Ed., Academic Press, New York, 1983]; [Seifter et al., Analysis for Protein Modifications and Nonprotein Cofactors, Meth Enzymol (1990) 182:626-646] 및 [Rattan et al., Protein Synthesis: Posttranslational Modifications and Aging, Ann NY Acad Sci (1992) 663:48-62] 참조).

[0041] "생체분자"는 단백질, 폴리펩티드, 핵산, 지질, 당당류, 다당류, 및 그의 모든 단편, 유사체, 상동체, 접합체, 및 유도체를 포함한다.

[0042] 용어 "발현하다" 및 "생산하다"는 본원에서 동의어로 사용되고, 유전자 생성물의 생합성을 의미한다. 이들 용어는 유전자의 RNA로의 전사를 포함한다. 이들 용어는 또한 RNA의 하나 이상의 폴리펩티드로의 번역을 포함하고, 모든 천연 생성되는 전사 후 및 번역 후 변형을 추가로 포함한다. 항체 또는 그의 항원-결합 단편의 발현 또는 생산은 세포의 세포질 내에서, 또는 세포외 환경, 예를 들어 세포 배양의 성장 배지 내에서 이루어질 수 있다.

[0043] 용어 "치료하는" 또는 "치료"는 임의의 객관적 또는 주관적 파라미터, 예를 들어 증상을 감퇴, 완화, 감소시키거나, 또는 손상, 병상, 또는 병태를 환자가 보다 참을 수 있도록 만들거나, 퇴화 또는 쇠약 속도를 느리게 하거나, 최종 퇴화 상태를 보다 덜 쇠약하도록 만들거나, 대상체의 신체 또는 정신 건강 상태를 개선하거나, 생존 기간을 연장하는 것을 비롯하여 손상, 병상 또는 병태의 약화 또는 개선의 임의의 성공 또는 성공의 표시를 의미한다. 치료는 신체 검사, 신경학적 검사, 또는 심리 평가의 결과를 포함하는 객관적 또는 주관적 파라미터에 의해 평가할 수 있다.

- [0044] "유효량" 및 "치료 유효량"은 본원에서 상호교환가능하게 사용되고, 특정 생물학적 또는 치료 결과, 예를 들어 본원에 개시되거나 설명되거나 예시된 생물학적 또는 치료 결과 (이에 제한되지 않음)의 달성에 효과적인, 본원에서 설명되는 항체, 항원-결합 단편, 또는 항체 조성물의 양을 의미한다. 항체 또는 그의 항원-결합 단편의 치료 유효량은 개체의 질병 상태, 연령, 성별 및 체중, 및 개체에서 목적하는 반응을 유도하는 항체 또는 그의 항원-결합 단편의 능력과 같은 인자에 따라 상이할 수 있다. 상기 결과는 당업계에서 적합한 임의의 수단에 의해 결정되는 암의 치료를 포함할 수 있고, 이에 제한되지 않는다.
- [0045] "제약상 허용되는"은 약물학/독성학 관점으로부터 환자에게 및 조성, 제형화, 안정성, 환자 허용성, 및 생체이용률에 대한 물리/화학적 관점으로부터 제약화학자에게 허용되는 특성 및 물질을 의미한다.
- [0046] "제약상 허용되는 담체"는 활성 성분(들)의 생물학적 활성의 유효성을 손상하지 않고 그가 투여되는 숙주에 비독성인 매질을 의미한다.
- [0047] "항체"는 달리 명시하지 않으면 각각의 이소형의 다양한 단량체 및 중합체 형태를 포함하는 면역글로불린의 모든 이소형 (IgG, IgA, IgE, IgM, IgD, 및 IgY)을 의미한다.
- [0048] 항원-결합 단편은 특정 항원에 대한 결합 친화도를 보일 수 있는 임의의 단백질질 구조체이다. 일부 항원-결합 단편은 모 항체 분자의 항원-결합 특이성을 보유하는 무손상 항체의 일부로 이루어진다. 예를 들어, 항원-결합 단편은 특정 항원에 결합하는 것으로 공지된 항체의 적어도 하나의 가변 구역 (중쇄 또는 경쇄 가변 구역) 또는 하나 이상의 CDR을 포함할 수 있다. 적합한 항원-결합 단편의 예는 디아바디 (diabody) 및 단일-사슬 분자 및 Fab, F(ab')₂, Fc, Fabc, 및 Fv 분자, 단일 사슬 (Sc) 항체, 개별 항체 경쇄, 개별 항체 중쇄, 항체 사슬 또는 CDR과 다른 단백질 사이의 키메라 융합체, 단백질 스캐폴드 (scaffold), 또는 분자, 중쇄 단량체 또는 이량체, 경쇄 단량체 또는 이량체, 하나의 중쇄 및 하나의 경쇄로 이루어진 이량체 등을 포함하고 이에 제한되지 않는다. 모든 항체 이소형은 항원-결합 단편의 생산을 위해 사용될 수 있다. 추가로, 항원-결합 단편은 관심 있는 제시된 항원에 대한 친화도를 부여하는 배향으로 폴리펩티드 세그먼트, 예를 들어 단백질 스캐폴드를 성공적으로 포함할 수 있는 비-항체 단백질성 프레임워크를 포함할 수 있다. 항원-결합 단편은 재조합 방식으로 생산되거나 또는 무손상 항체의 효소에 의한 또는 화학적 절단에 의해 생산될 수 있다. 문구 "항체 또는 그의 항원-결합 단편"은 문구에서 언급되는 항체의 하나 이상의 아미노산 세그먼트를 포함함을 나타내기 위해 사용될 수 있다.
- [0049] "항체 조성물"은 적어도 하나의 제약상 허용되는 담체, 화학요법제, 또는 진단 모이어티, 예를 들어 ¹¹¹In-1,4,7,10-테트라아자시클로도데칸-N,N',N'',N'''-테트라아세트산 (¹¹¹In-DOTA)과 커플링된 항체 또는 그의 결합 단편을 의미한다.
- [0050] "특이적 결합"은 다른 생체분자에 결합할 수 있는 것보다 더 큰 친화도로 특정 생체분자에 결합하는 항체 또는 항원-결합 단편의 능력을 나타낸다.
- [0051] 본원에서 설명되는 실시양태는 물론 변할 수 있는 특정 방법, 시약, 화합물, 조성물 또는 생물학적 시스템으로 제한되지 않는다. 또한, 본원에서 사용되는 용어는 단지 특정 항체 또는 항원-결합 단편을 설명하기 위한 것으로서, 본 발명을 제한하는 것으로 의도되지 않는다.
- [0052] GD2-특이적 항체
- [0053] ganglioside GD2에 특이적으로 결합하는 단량체 또는 항원-결합 단편을 본원에서 설명한다. 한 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 모노클로날 항체 또는 항원-결합 단편이지만; 다른 실시양태는 GD2-특이적 폴리클로날 항체 및 GD2에 대한 특이성을 보유하는 항체의 유도체 또는 단편을 포함한다. 항체 분자의 일반적인 구조는 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항원 결합 도메인, 및 보체 고정을 비롯하여 다양한 기능을 수행하는 Fc 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 항원-결합 단편은 보체-의존 세포독성을 매개한다.
- [0054] Fc 구역 내의 중쇄의 1차 구조가 면역글로불린 클래스를 결정하는 5개의 면역글로불린 클래스가 존재한다. 구체적으로, 알파, 델타, 엡실론, 감마, 및 뮤 사슬은 각각 IgA, IgD, IgE, IgG 및 IgM 이소형에 대응한다. 상기한 항체 또는 항원-결합 단편은 4개 사슬의 면역글로불린 구조의 모든 이소형 및 합성 다량체를 포함한다. 또한, 상기한 항체 또는 항원-결합 단편은 일반적으로 닭 또는 칠면조 혈청 및 닭 또는 칠면조 난황에서 발견되는 IgY 이소형을 포함한다. 항체 또는 항원-결합 단편은 비-공유결합에 의해, 특이적으로, 및 가역적으로 항원에 결합한다.
- [0055] 개시된 항체 또는 항원-결합 단편은 임의의 종으로부터 유도될 수 있다. 예를 들어, 항체 또는 항원-결합 단편

은 마우스, 래트, 염소, 말, 돼지, 소, 닭, 토끼, 당나귀, 인간 등으로부터 유도될 수 있다. 인간의 치료에 사용하기 위해, 비-인간 유도 항체 또는 항원-결합 단편은 인간 환자에 투여시에 항원성이 더 작도록 유전적으로 또는 구조적으로 변경될 수 있다.

[0056] 일부 실시양태에서, 항체 또는 항원-결합 단편은 키메라이다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "키메라" 항체 또는 항원-결합 단편은 비-인간 포유동물, 설치류, 또는 파충류의 항체 아미노산 서열로부터 유도된 적어도 하나의 가변 도메인의 적어도 일부 부분을 갖고 항체 또는 그의 항원-결합 단편의 나머지 부분은 인간으로부터 유도된 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 의미한다. 예를 들어, 키메라 항체는 인간 Fc 또는 다른 그러한 구조적 도메인과 함께 마우스 항원 결합 도메인을 포함할 수 있다.

[0057] 일부 실시양태에서, 항체는 인간화 항체이다. 인간화 항체는 비-인간 면역글로불린으로부터 유도된 최소 서열을 함유하는 키메라 면역글로불린, 면역글로불린 사슬 또는 그의 단편 (예를 들어, 항체의 Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ 또는 다른 항원-결합 하위서열)일 수 있다. 대부분, 인간화 항체는 수여자 항체의 상보성-결정 구역 (CDR) 으로부터의 잔기가 목적하는 특이성, 친화도, 및 능력을 갖는 비-인간 중 (공여자 항체), 예를 들어 마우스, 래트 또는 토끼의 CDR로부터의 잔기로 교체된 인간 면역글로불린 (수여자 항체)이다. 일부 경우에, 인간 면역글로불린의 Fv 프레임워크 구역 (FWR) 잔기는 대응하는 비-인간 잔기로 교체된다. 또한, 인간화 항체는 수여자 항체 또는 도입된 CDR 또는 프레임워크 서열에서 발견되지 않는 잔기를 포함할 수 있다. 이들 변형은 항체 성능을 추가로 정밀화하고 최적화하기 위해 이루어진다. 일반적으로, 인간화 항체는 모든 또는 실질적으로 모든 CDR 구역이 비-인간 면역글로불린의 것에 대응하고 모든 또는 실질적으로 모든 FWR 구역이 인간 면역글로불린 서열의 것인 적어도 하나, 일반적으로 2개의 가변 도메인을 실질적으로 모두 포함할 것이다. 또한, 인간화 항체는 면역글로불린 불변 구역 (Fc)의 적어도 일부, 일반적으로 인간 면역글로불린의 일부를 최적으로 포함할 것이다. 보다 상세한 내용에 대해서는, 문헌 [Jones et al., 321 Nature 522-5 (1986)]; [Reichmann et al., 332 Nature 323-9 (1988)]; 및 [Presta, 2 Curr. Op. Struct. Biol. 593-6 (1992)]을 참조한다.

[0058] 몇몇 경우에, 상기한 항체는 인간 항체 또는 그의 항원 결합 단편이다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "인간 항체"는 완전히 인간 기원의 항체 또는 가변 및 불변 도메인 서열이 인간 서열인 항체를 의미한다. 이 용어는 인간 유전자로부터 유도되지만 (즉, 이용하지만), 예를 들어 가능한 면역원성을 감소시키고, 친화도를 증가시키고, 바람직하지 않은 폴딩 (folding) 등을 야기할 수 있는 시스템을 제거하기 위해 변경된 서열을 갖는 항체를 포함한다. 이 용어는 인간 세포에 전형적이지 않은 글리코실화를 부여할 수 있는 비-인간 세포에서 재조합 방식으로 생산된 상기 항체를 포함한다.

[0059] 본원에서 설명되는 항체 또는 항원-결합 단편은 예를 들어 치료 또는 진단 용도를 위해 다양한 화학적 또는 생물분자 모이어티로 표지되거나 접합될 수 있다. 모이어티는 세포독성, 예를 들어, 박테리아 독소, 바이러스 독소, 방사성 동위원소 등일 수 있다. 모이어티는 검출가능한 표지, 예를 들어, 형광 표지, 방사성 표지, 비오틴 등, 예를 들어 ¹¹¹In-DOTA, ¹¹¹In-디에틸렌트리아민펜타아세트산 (DTPA), 또는 방사성 핵종, 예를 들어 납-212, 비스무트-212, 아스타틴-211, 요오드-131, 스칸듐-47, 레늄-186, 레늄-188, 이트륨-90, 요오드-123, 요오드-124, 요오드-125, 브롬-77, 인듐-111, 및 분열성 핵종, 예를 들어 붕소-10 또는 악티나이드 (이에 제한되지 않음)일 수 있다.

[0060] 일부 실시양태에서, 항체 또는 항원-결합 단편은 하나 이상의 화학요법제, 예를 들어 방사성 핵종, 독소, 및 세포독성 및 세포증식 억제제 (이에 제한되지 않음)에 접합된다. 다른 실시양태에서, 항체 또는 항원-결합 단편은 하나 이상의 화학요법제와 조합되어 사용된다. 본원에서 설명되는 항체 또는 항원-결합 단편은 단독으로 생체분자 또는 화학요법제, 예를 들어 세포독성제 또는 세포증식 억제제와 함께 (예를 들어, 공동투여되거나 또는 접합되어) 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 화학요법제는 납-212, 비스무트-212, 아스타틴-211, 요오드-131, 스칸듐-47, 레늄-186, 레늄-188, 이트륨-90, 요오드-123, 요오드-124, 요오드-125, 브롬-77, 인듐-111, 및 분열성 핵종, 예를 들어 붕소-10 또는 악티나이드를 포함하고 이에 제한되지 않는 방사성 핵종이다. 다른 실시양태에서, 화학요법제는 독소 또는 세포독성 약물, 억제제 항바이러스 단백질, 아브린, 리신 및 각각의 그들의 A 사슬, 모모르딘, 사포린, 브리오팀 1, 보우가닌, 겔로닌, 디프테리아 독소, 슈도모나스 외독소, 시가 독소, 칼리케아미신, 메이탄시노이드, 알트레타민, 악티노마이신 D, 폴리카마이신, 푸로마이신, 그라미시딘 D, 독소루비신, 콜히친, 시토크라신 B, 시클로포스파미드, 에메틴, 메이탄신, 암사크린, 시스플라틴, 에토포시드, 에토포시드 오르토크논, 테니포시드, 다우노루비신, 겐시타빈, 독소루비신, 미톡산트론, 비산트렌, 블레오마이신, 메토타렉세이트, 페메트렉세드, 시스플라틴, 빈데신, 아드리아마이신, 빈크리스틴, 빈블라스틴, BCNU, 탁산 (예를 들어, 탁솔™), 타르세바, 아바스틴, 미토마이신, 5-플루오로우라실, 시클로포스파미드, 특정 시토크,

예를 들어 TNF-알파 및 TNF-베타 등이다. 상기 물질에 대한 항체 또는 항원-결합 단편의 접합 방법은 문헌에 제시되어 있다.

[0061] 항체 특이성은 6개의 CDR 구역, 특히 H쇄 CDR3에 의해 주로 결정된다 ([Kala et al., 132 J. Biochem. 535-41 (2002)]; [Morea et al., 275 J. Mol. Biol. 269-94 (1998)]; 및 [Chothia et al., 196 J. Mol. Biol. 901-17 (1987)]). 그러나, 항체 프레임워크 구역은 특히 CDR 루프의 입체형태에 영향을 줄 때 (Foote et al., 224 J. Mol. Biol. 487-99 (1992)) 항원-항체 상호작용에서 일정 역할을 할 수 있다 (Panka et al., 85 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 3080-4 (1988)). 따라서, 상기한 항체 또는 항원-결합 단편은 GD2에 특이성을 부여하는 H 또는 L쇄 CDR 또는 FWR 구역의 임의의 조합을 포함할 수 있다. 당업계에서 통상적으로 수행되는 도메인 셔플링 (shuffling) 실험 ([Jirholt et al., 215 Gene 471-6 (1998)]; [Soederlind et al., 18 Nature Biotechnology 852-6 (2000)])은 본원에서 설명되고 예시되는 바에 따라 GD2에 특이적으로 결합하는 항체를 생성시키기 위해 사용될 수 있다. 상기 도메인 셔플링 실험에 의해 생성된 항체 또는 항원-결합 단편은 본원에 기재된 항체 또는 항원-결합 단편의 범위 내에 포함된다. 또한, CDR은 CDR 스캐폴딩으로서 기능하기 위해서 항체-유사 단백질을 공학처리함으로써 제시된 항원에 결합하도록 배열될 수 있다 (Nicaise et al., 13 Protein Sci. 1882 (2004)). 상기 항원-결합 단백질은 본원에 기재된 항체의 범위 내에 있다.

[0062] 본원에서 설명되는 항체 또는 항원-결합 단편은 다양한 형태로 발생할 수 있지만, 표 1에 제시된 하나 이상의 항체 세그먼트를 포함할 것이다.

표 1

상기한 항체의 항체 세그먼트 및 그의 항원-결합 단편 ("Lc"는 경쇄를 나타내고, "Hc"는 중쇄를 나타낸다).

AB527 항체 세그먼트	아미노산 서열	DNA 서열
Lc CDR1	26	18
Lc CDR2	27	19
Lc CDR3	28	20
Lc FWR1	29	21
Lc FWR2	30	22
Lc FWR3	31	23
Lc 가변 도메인	32	24
경쇄	42	41
Hc CDR1	10	2
Hc CDR2	11	3
Hc CDR3	12	4
Hc FWR1	13	5
Hc FWR2	14	6
Hc FWR3	15	7
Hc 가변 도메인	16	8
중쇄	40	39

[0063]

[0064] 일부 실시양태에서, 항체 또는 항원-결합 단편은 서열 10과 실질적으로 동일한 또는 동일한 중쇄 CDR1 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 항원-결합 단편은 서열 11과 실질적으로 동일한 또는 동일한 중쇄 CDR2 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 항원-결합 단편은 서열 12와 실질적으로 동일한 또는 동일한 중쇄 CDR3 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 항원-결합 단편은 서열 26과 실질적으로 동일한 또는 동일한 경쇄 CDR1 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 항원-결합 단편은 서열 27과 실질적으로 동일한 또는 동일한 경쇄 CDR2 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 항원-결합 단편은 서열 28과 실질적으로 동일한 또는 동일한 경쇄 CDR3 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 항원-결합 단편은 서열 10과 실질적으로 동일한 또는 동일한 중쇄 CDR1 아미노산 서열; 서열 11과 실질적으로 동일한 또는 동일한 CDR2 아미노

산 서열; 및 서열 12와 실질적으로 동일한 또는 동일한 CDR3 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 항원-결합 단편은 서열 26과 실질적으로 동일한 또는 동일한 경쇄 CDR1 아미노산 서열; 서열 27과 실질적으로 동일한 또는 동일한 CDR2 아미노산 서열; 및 서열 28과 실질적으로 동일한 또는 동일한 CDR3 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 항원-결합 단편은 중쇄 및 경쇄를 포함할 수 있고, 여기서 중쇄는 서열 10과 실질적으로 동일한 또는 동일한 CDR1 아미노산 서열; 서열 11과 실질적으로 동일한 또는 동일한 CDR2 아미노산 서열; 및 서열 12와 실질적으로 동일한 또는 동일한 CDR3 아미노산 서열을 갖고; 경쇄는 서열 26과 실질적으로 동일한 또는 동일한 CDR1 아미노산 서열; 서열 27과 실질적으로 동일한 또는 동일한 CDR2 아미노산 서열; 및 서열 28과 실질적으로 동일한 또는 동일한 CDR3 아미노산 서열을 갖는다. CDR의 항원-결합 배열은 또한 CDR 스캐폴딩으로서 항체-유사 단백질을 사용하여 공학처리될 수 있다. 그러한 공학처리된 항원-결합 단백질은 본 명세서의 범위 내에 있다.

[0065] 일부 실시양태에서, 항체 또는 항원-결합 단편은 서열 13과 실질적으로 동일한 또는 동일한 중쇄 FWR1 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 항원-결합 단편은 서열 14와 실질적으로 동일한 또는 동일한 중쇄 FWR2 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 항원-결합 단편은 서열 15와 실질적으로 동일한 또는 동일한 중쇄 FWR3 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 항원-결합 단편은 서열 29와 실질적으로 동일한 또는 동일한 경쇄 FWR1 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 항원-결합 단편은 서열 30과 실질적으로 동일한 또는 동일한 경쇄 FWR2 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 항원-결합 단편은 서열 31과 실질적으로 동일한 또는 동일한 경쇄 FWR3 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 항원-결합 단편은 서열 13과 실질적으로 동일한 또는 동일한 FWR1 아미노산 서열; 서열 14와 실질적으로 동일한 또는 동일한 FWR2 아미노산 서열; 및 서열 15와 실질적으로 동일한 또는 동일한 FWR3 아미노산 서열을 갖는 중쇄를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 항원-결합 단편은 서열 29와 실질적으로 동일한 또는 동일한 FWR1 아미노산 서열; 서열 30과 실질적으로 동일한 또는 동일한 FWR2 아미노산 서열; 및 서열 31과 실질적으로 동일한 또는 동일한 FWR3 아미노산 서열을 갖는 경쇄를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 항원-결합 단편은 중쇄 및 경쇄를 포함할 수 있고, 여기서 중쇄는 서열 13과 실질적으로 동일한 또는 동일한 FWR1 아미노산 서열; 서열 14와 실질적으로 동일한 또는 동일한 FWR2 아미노산 서열; 및 서열 15와 실질적으로 동일한 또는 동일한 FWR3 아미노산 서열을 포함하고; 경쇄는 서열 29와 실질적으로 동일한 또는 동일한 FWR1 아미노산 서열; 서열 30과 실질적으로 동일한 또는 동일한 FWR2 아미노산 서열; 및 서열 31과 실질적으로 동일한 또는 동일한 FWR3 아미노산 서열을 포함한다.

[0066] 일부 실시양태에서, 항체 또는 항원-결합 단편은 서열 10과 실질적으로 동일한 또는 동일한 CDR1 아미노산 서열; 서열 11과 실질적으로 동일한 또는 동일한 CDR2 아미노산 서열; 및 서열 12와 실질적으로 동일한 또는 동일한 CDR3 아미노산 서열; 서열 13과 실질적으로 동일한 또는 동일한 FWR1 아미노산 서열; 서열 14와 실질적으로 동일한 또는 동일한 FWR2 아미노산 서열; 및 서열 15와 실질적으로 동일한 또는 동일한 FWR3 아미노산 서열을 갖는 중쇄를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 항원-결합 단편은 서열 26과 실질적으로 동일한 또는 동일한 CDR1 아미노산 서열; 서열 27과 실질적으로 동일한 또는 동일한 CDR2 아미노산 서열; 및 서열 28과 실질적으로 동일한 또는 동일한 CDR3 아미노산 서열; 서열 29와 실질적으로 동일한 또는 동일한 FWR1 아미노산 서열; 서열 30과 실질적으로 동일한 또는 동일한 FWR2 아미노산 서열; 및 서열 31과 실질적으로 동일한 또는 동일한 FWR3 아미노산 서열을 갖는 경쇄를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 항원-결합 단편은 중쇄 및 경쇄를 포함하고, 여기서 중쇄는 서열 10과 실질적으로 동일한 또는 동일한 CDR1 아미노산 서열; 서열 11과 실질적으로 동일한 또는 동일한 CDR2 아미노산 서열; 및 서열 12와 실질적으로 동일한 또는 동일한 CDR3 아미노산 서열; 서열 13과 실질적으로 동일한 또는 동일한 FWR1 아미노산 서열; 서열 14와 실질적으로 동일한 또는 동일한 FWR2 아미노산 서열; 및 서열 15와 실질적으로 동일한 또는 동일한 FWR3 아미노산 서열을 포함하고; 경쇄는 서열 26과 실질적으로 동일한 또는 동일한 CDR1 아미노산 서열; 서열 27과 실질적으로 동일한 또는 동일한 CDR2 아미노산 서열; 및 서열 28과 실질적으로 동일한 또는 동일한 CDR3 아미노산 서열; 서열 29와 실질적으로 동일한 또는 동일한 FWR1 아미노산 서열; 서열 30과 실질적으로 동일한 또는 동일한 FWR2 아미노산 서열; 및 서열 31과 실질적으로 동일한 또는 동일한 FWR3 아미노산 서열을 갖는다. CDR 및 FWR의 항원-결합 배열은 또한 CDR 스캐폴딩으로서 항체-유사 단백질을 사용하여 공학처리될 수 있다. 그러한 공학처리된 항원-결합 단백질은 본 명세서의 범위 내에 있다.

[0067] 일부 실시양태에서, 본원에서 설명되는 항체 또는 항원-결합 단편은 서열 40과 실질적으로 동일한 또는 동일한 아미노산 서열을 포함하는 중쇄를 갖는다. 일부 실시양태에서, 본원에서 설명되는 항체 또는 항원-결합 단편은 서열 42와 실질적으로 동일한 또는 동일한 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 갖는다. 상기한 항체 또는 항원-

결합 단편은 중쇄 및 경쇄를 가질 수 있고, 여기서 중쇄는 서열 40과 실질적으로 동일한 또는 동일한 아미노산 서열을 포함하고, 경쇄는 서열 42와 실질적으로 동일한 또는 동일한 아미노산 서열을 포함한다.

[0068] 또한, GD2에 특이적으로 결합하는 항체 또는 항원-결합 단편을 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 설명된다. 일부 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드는 서열 10, 예를 들어 서열 2와 실질적으로 동일한 또는 동일한 중쇄 CDR1 서열을 갖는 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 코딩한다. 일부 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드는 서열 11, 예를 들어 서열 3과 실질적으로 동일한 또는 동일한 중쇄 CDR2를 갖는 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 코딩한다. 일부 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드는 서열 12, 예를 들어 서열 4와 실질적으로 동일한 또는 동일한 중쇄 CDR3을 갖는 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 코딩한다. 일부 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드는 서열 26, 예를 들어 서열 18과 실질적으로 동일한 또는 동일한 경쇄 CDR1을 갖는 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 코딩한다. 일부 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드는 서열 27, 예를 들어 서열 19와 실질적으로 동일한 또는 동일한 경쇄 CDR2를 갖는 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 코딩한다. 일부 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드는 서열 28, 예를 들어 서열 20과 실질적으로 동일한 또는 동일한 경쇄 CDR3을 갖는 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 코딩한다. 폴리뉴클레오티드는 서열 10, 예를 들어 서열 2와 실질적으로 동일한 또는 동일한 CDR1; 서열 11, 예를 들어 서열 3과 실질적으로 동일한 또는 동일한 CDR2; 및 서열 12, 예를 들어 서열 4와 실질적으로 동일한 또는 동일한 CDR3을 갖는 중쇄를 갖는 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 코딩할 수 있다. 폴리뉴클레오티드는 서열 26, 예를 들어 서열 18과 실질적으로 동일한 또는 동일한 경쇄 CDR1; 서열 27, 예를 들어 서열 19와 실질적으로 동일한 또는 동일한 CDR2; 및 서열 28, 예를 들어 서열 20과 실질적으로 동일한 또는 동일한 CDR3을 갖는 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 코딩할 수 있다. 폴리뉴클레오티드는 서열 10, 예를 들어 서열 2와 실질적으로 동일한 또는 동일한 중쇄 CDR1; 서열 11, 예를 들어 서열 3과 실질적으로 동일한 또는 동일한 CDR2; 및 서열 12, 예를 들어 서열 4와 실질적으로 동일한 또는 동일한 CDR3; 및 서열 26, 예를 들어 서열 18과 실질적으로 동일한 또는 동일한 경쇄 CDR1; 서열 27, 예를 들어 서열 19와 실질적으로 동일한 또는 동일한 CDR2; 및 서열 28, 예를 들어 서열 20과 실질적으로 동일한 또는 동일한 CDR3을 갖는 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 코딩할 수 있다.

[0069] 일부 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드는 서열 13, 예를 들어 서열 5와 실질적으로 동일한 또는 동일한 중쇄 FWR1을 갖는 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 코딩한다. 일부 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드는 서열 14, 예를 들어 서열 6과 실질적으로 동일한 또는 동일한 중쇄 FWR2를 갖는 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 코딩한다. 일부 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드는 서열 15, 예를 들어 서열 7과 실질적으로 동일한 또는 동일한 중쇄 FWR3을 갖는 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 코딩한다. 일부 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드는 서열 29, 예를 들어 서열 21과 실질적으로 동일한 또는 동일한 경쇄 FWR1을 갖는 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 코딩한다. 일부 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드는 서열 30, 예를 들어 서열 22와 실질적으로 동일한 또는 동일한 경쇄 FWR2를 갖는 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 코딩한다. 일부 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드는 서열 31, 예를 들어 서열 23과 실질적으로 동일한 또는 동일한 경쇄 FWR3을 갖는 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 코딩한다. 일부 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드는 서열 13, 예를 들어 서열 5와 실질적으로 동일한 또는 동일한 중쇄 FWR1; 서열 14, 예를 들어 서열 6과 실질적으로 동일한 또는 동일한 FWR2; 및 서열 15, 예를 들어 서열 7과 실질적으로 동일한 또는 동일한 FWR3을 갖는 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 코딩한다. 일부 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드는 서열 29, 예를 들어 서열 21과 실질적으로 동일한 또는 동일한 경쇄 FWR1; 서열 30, 예를 들어 서열 22와 실질적으로 동일한 또는 동일한 FWR2; 및 서열 31, 예를 들어 서열 23과 실질적으로 동일한 또는 동일한 FWR3을 갖는 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 코딩한다. 일부 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드는 중쇄 및 경쇄를 갖는 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 코딩하고, 여기서 중쇄 FWR1은 서열 13, 예를 들어 서열 5와 실질적으로 동일하거나 동일하고; 중쇄 FWR2는 서열 14, 예를 들어 서열 6과 실질적으로 동일하거나 동일하고; 중쇄 FWR3은 서열 15, 예를 들어 서열 7과 실질적으로 동일하거나 동일하고; 경쇄 FWR1은 서열 29, 예를 들어 서열 21과 실질적으로 동일하거나 동일하고; 경쇄 FWR2는 서열 30, 예를 들어 서열 22와 실질적으로 동일하거나 동일하고; 경쇄 FWR3은 서열 31, 예를 들어 서열 23과 실질적으로 동일하거나 동일하다.

[0070] 일부 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드는 서열 10, 예를 들어 서열 2와 실질적으로 동일한 또는 동일한 중쇄 CDR1; 서열 11, 예를 들어 서열 3과 실질적으로 동일한 또는 동일한 중쇄 CDR2; 및 서열 12, 예를 들어 서열 4와 실질적으로 동일한 또는 동일한 중쇄 CDR3; 서열 13, 예를 들어 서열 5와 실질적으로 동일한 또는 동일한 중쇄 FWR1; 서열 14, 예를 들어 서열 6과 실질적으로 동일한 또는 동일한 중쇄 FWR2; 및 서열 15, 예를 들어 서열 7과 실질적으로 동일한 또는 동일한 중쇄 FWR3을 갖는 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 코딩한다. 일부 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드는 서열 26, 예를 들어 서열 18과 실질적으로 동일한 또는 동일한 경쇄 CDR1; 서열 27, 예를 들어 서열 19와 실질적으로 동일한 또는 동일한 경쇄 CDR2; 및 서열 28, 예를 들어 서열 20과 실질적으로 동일한 또는 동일한 경쇄 CDR3; 서열 29, 예를 들어 서열 21과 실질적으로 동일한 또는 동일한 경쇄 FWR1;

서열 30, 예를 들어 서열 22와 실질적으로 동일한 또는 동일한 경쇄 FWR2; 및 서열 31, 예를 들어 서열 23과 실질적으로 동일한 또는 동일한 경쇄 FWR3을 갖는 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 코딩한다.

[0071] 일부 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드는 중쇄 및 경쇄를 갖는 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 코딩하고, 여기서 폴리뉴클레오티드는 서열 10, 예를 들어 서열 2와 실질적으로 동일한 또는 동일한 중쇄 CDR1; 서열 11, 예를 들어 서열 3과 실질적으로 동일한 또는 동일한 중쇄 CDR2; 서열 12, 예를 들어 서열 4와 실질적으로 동일한 또는 동일한 중쇄 CDR3; 서열 13, 예를 들어 서열 5와 실질적으로 동일한 또는 동일한 중쇄 FWR1; 서열 14, 예를 들어 서열 6과 실질적으로 동일한 또는 동일한 중쇄 FWR2; 및 서열 15, 예를 들어 서열 7과 실질적으로 동일한 또는 동일한 중쇄 FWR3; 및 서열 26, 예를 들어 서열 18과 실질적으로 동일한 또는 동일한 경쇄 CDR1; 서열 27, 예를 들어 서열 19와 실질적으로 동일한 또는 동일한 경쇄 CDR2; 서열 28, 예를 들어 서열 20과 실질적으로 동일한 또는 동일한 경쇄 CDR3; 서열 29, 예를 들어 서열 21과 실질적으로 동일한 또는 동일한 경쇄 FWR1; 서열 30, 예를 들어 서열 22와 실질적으로 동일한 또는 동일한 경쇄 FWR2; 및 서열 31, 예를 들어 서열 23과 실질적으로 동일한 또는 동일한 경쇄 FWR3을 코딩한다.

[0072] 공학처리된 항원-결합 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 또한 본 명세서의 범위 내에 있다.

[0073] 일부 실시양태에서, 상기한 폴리뉴클레오티드 (및 이들이 코딩하는 펩티드)는 리더 서열을 포함한다. 당업계에 공지된 임의의 리더 서열이 사용될 수 있다. 리더 서열은 제한 부위 또는 번역 출발 부위를 포함할 수 있지만 이에 제한되지 않는다. 일부 실시양태에서, 리더 서열은 핵산 서열

[0074] ATGGGATGGAGCTGTATCATCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACAGGTGTACACAGC (서열 43)을 갖는다. 일부 실시양태에서, 리더 서열은 아미노산 서열 MGWSCHLFLVATATGVHS (서열 44)를 코딩한다.

[0075] 중쇄 및 경쇄 및 이들을 코딩하는 유전자 중에 존재할 수 있는 천연 서열 변이 때문에, 아미노산 서열 또는 본원에 기재된 항체 또는 항원-결합 단편을 코딩하는 유전자 내에서 그들의 특유한 결합 특성 (예를 들어, 특이성 및 친화도)에 거의 또는 전혀 영향을 주지 않는 일정 수준의 변이를 발견할 것으로 예상할 수 있다. 상기 예상은 부분적으로는 유전자 코드의 다의성 (degeneracy), 및 코딩된 단백질의 특성을 평가가능할 정도로 변경하지 않는 보존적 아미노산 서열 변이의 진화상 성공에 의한 것이다. 따라서, 일부 실시양태는 본 발명의 항체 또는 항원-결합 단편에 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 상동성을 갖는 항체 또는 항원-결합 단편을 포함한다. 다른 실시양태는 본원에 기재된 항체 및 항원-결합 단편과 유의한 상동성을 공유하지 않는 프레임워크, 스캐폴드, 또는 다른 비-결합 구역을 갖지만, 결합능 부여에 필요한, 본원에서 설명되는 상기 서열에 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 상동성인 하나 이상의 CDR 또는 다른 서열을 포함하는 GD-2 특이적 항체 또는 항원-결합 단편을 포함한다.

[0076] 본원에 기재된 항체 또는 항원-결합 단편은 상기한 항체 또는 항원-결합 단편의 생물학적 특성 (예를 들어, 결합 친화도 또는 면역 효과기 활성)을 보유하는 단일 또는 다수의 아미노산 치환, 결실, 또는 부가를 갖는 변이체를 포함한다. 당업자는 단일 또는 다수의 아미노산 치환, 결실, 또는 부가를 갖는 변이체를 생산할 수 있다. 이들 변이체는 (a) 하나 이상의 아미노산 잔기가 보존적 또는 비보존적 아미노산으로 치환되는 변이체, (b) 하나 이상의 아미노산이 폴리펩티드에 부가되거나 폴리펩티드로부터 결실되는 변이체, (c) 하나 이상의 아미노산이 치환체 기를 포함하는 변이체, 및 (d) 폴리펩티드가 폴리펩티드에 유용한 특성을 부여할 수 있는 또 다른 펩티드 또는 폴리펩티드, 예를 들어 융합 파트너, 단백질 태그 또는 다른 화학 모이어티, 예를 들어 항체에 대한 에피토프, 폴리히스티딘 서열, 비오틴 모이어티 등과 융합되는 변이체를 포함할 수 있다. 본원에 기재된 항체 또는 항원-결합 단편은 하나의 종으로부터의 아미노산 잔기가 보존된 또는 비보존된 위치에서 또 다른 종의 상응하는 잔기를 치환하는 변이체를 포함할 수 있다. 다른 실시양태에서, 비보존된 위치에서 아미노산 잔기는 보존적 또는 비보존적 잔기로 치환된다. 유전적 (억제, 결실, 돌연변이 등), 화학적 및 효소에 의한 기술을 포함하여 이들 변이체를 얻는 기술은 당업자에게 공지되어 있다.

[0077] 본원에 기재된 항체 또는 항원-결합 단편은 몇몇 여러 항체 이소형, 예를 들어 IgM, IgD, IgG, IgA 및 IgE를 구현할 수 있다. 항체 또는 그의 항원-결합 단편 특이성은 주로 아미노산 서열, 및 CDR의 배열에 의해 결정된다. 따라서, 한 이소형의 CDR은 항원 특이성을 변경하지 않으면서 또 다른 이소형으로 전달될 수 있다. 별법으로, 하이브리도마를 항원 특이성을 변경하지 않으면서 한 항체 이소형의 생산으로부터 또 다른 이소형의 생산으로 스위칭하는 기술 (이소형 스위칭)이 확립되었다. 따라서, 그러한 항체 이소형은 상기한 항체 또는 항원-결합 단편의 범위 내에 포함된다.

[0078] 항체의 이소형을 변경하는 것은 항체 불변 구역에 의해 부여되는 상이한 효과기 기능을 항원 특이성과 조합하기

위해 유용할 수 있다. 예를 들어, IgG는 단량체 형태로 생산되고, 보체 활성화에 효과적이고, 신체의 혈장 및 세포내 컴파트먼트에서 일반적으로 발견된다. IgA는 단량체 및 J-사슬-회합 이량체로서 생산된다. 이량체 형태는 상피 세포 장벽을 가로질러 수송될 수 있기 때문에, IgA는 신체의 관강 (luminal) 공간 및 모유에서 가장 일반적으로 발견된다. IgA와 같이, IgM도 중합체를 형성할 수 있지만, J-사슬과 회합될 때 오량체를, J-사슬과 회합되지 않을 때는 오량체 및 육량체를 형성하는 경향이 있다. 이들 고 중합성 항체는 친화도를 감소시키지 않으면서 결합력을 증가시킴으로써 전체 항원-결합 능력을 증가시키는 역할을 한다. IgM의 두 중합체 형태는 보체를 효율적으로 활성화시킬 수 있고, 이에 의해 보체-의존 세포독성 (CDC)을 야기할 수 있다.

[0079] 본원에 기재된 항체 또는 항원-결합 단편은 일부 실시양태에서 중합체 IgM 항체 또는 항원-결합 단편이다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 항원-결합 단편은 J-사슬과 회합되는 오량체 IgM 항체 또는 항원-결합 단편이다. 다른 실시양태에서, 항체 또는 항원-결합 단편은 J-사슬과 회합되지 않는 육량체 IgM 항체 또는 항원-결합 단편이다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 항원-결합 단편은 J-사슬과 회합되지 않는 오량체 IgM 항체 또는 항원-결합 단편이다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 항원-결합 단편은 J-사슬과 회합되는 육량체 IgM 항체 또는 항원-결합 단편이다.

[0080] 본원에 기재된 항체 또는 항원-결합 단편은 1×10^{-2} 미만의 해리 상수 (K_D)를 포함하는, GD2에 대한 결합 친화도 (M 단위)를 갖는다. 일부 실시양태에서, K_D 는 1×10^{-3} 미만이다. 다른 실시양태에서, K_D 는 1×10^{-4} 미만이다. 일부 실시양태에서, K_D 는 1×10^{-5} 미만이다. 또 다른 실시양태에서, K_D 는 1×10^{-6} , 2×10^{-6} , 3×10^{-6} , 4×10^{-6} , 5×10^{-6} , 6×10^{-6} , 7×10^{-6} , 8×10^{-6} , 또는 9×10^{-6} 미만이다. 다른 실시양태에서, K_D 는 1×10^{-7} , 2×10^{-7} , 또는 3×10^{-7} , 2×10^{-7} , 3×10^{-7} , 4×10^{-7} , 5×10^{-7} , 6×10^{-7} , 7×10^{-7} , 8×10^{-7} , 또는 9×10^{-7} 미만이다. 다른 실시양태에서, K_D 는 1×10^{-8} , 2×10^{-8} , 3×10^{-8} , 4×10^{-8} , 5×10^{-8} , 6×10^{-8} , 7×10^{-8} , 8×10^{-8} , 또는 9×10^{-8} 미만이다. 다른 실시양태에서, K_D 는 1×10^{-9} , 2×10^{-9} , 3×10^{-9} , 4×10^{-9} , 5×10^{-9} , 6×10^{-9} , 7×10^{-9} , 8×10^{-9} , 또는 9×10^{-9} 미만이다. 다른 실시양태에서, K_D 는 1×10^{-10} , 2×10^{-10} , 3×10^{-10} , 2×10^{-10} , 3×10^{-10} , 4×10^{-10} , 5×10^{-10} , 6×10^{-10} , 7×10^{-10} , 8×10^{-10} , 또는 9×10^{-10} 미만이다. 또 다른 실시양태에서, K_D 는 1×10^{-11} , 2×10^{-11} , 3×10^{-11} , 4×10^{-11} , 5×10^{-11} , 6×10^{-11} , 7×10^{-11} , 8×10^{-11} , 또는 9×10^{-11} 미만이다. 일부 실시양태에서, K_D 는 1×10^{-12} 미만이다. 다른 실시양태에서, K_D 는 1×10^{-13} 미만이다. 다른 실시양태에서, K_D 는 1×10^{-14} 미만이다. 또 다른 실시양태에서, K_D 는 1×10^{-15} 미만이다. 바람직한 실시양태에서, K_D 는 4.5×10^{-9} 이하이다.

[0081] 본원에서 설명되는 항체 또는 항원-결합 단편은 일부 실시양태에서 각각의 GD1a, GM2 또는 GM3과는 대조적으로 GD2에 대한 특이적인 결합 친화도를 갖는다. 일부 실시양태에서, GD2에 대한 K_D 는 각각의 GD1a, GM2 또는 GM3에 대한 K_D 와 적어도 3배, 바람직하게는 10배 상이하다.

[0082] 본원에 기재된 항체 또는 항원-결합 단편은, 예를 들어 항체 또는 그의 항원-결합 단편이 그의 에피토프에 결합하는 것을 공유 부착이 방지하지 않도록 항체 또는 그의 항원-결합 단편에 대한 임의의 종류의 분자의 공유 부착에 의해 변형될 수 있다. 적합한 변형의 예는 글리코실화, 아세틸화, peg화, 인산화, 아마이드화 등을 포함하고, 이에 제한되지 않는다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 항원-결합 단편 자체는 공지의 보호/차단기, 단백질 분해에 의한 절단, 세포성 리간드 또는 다른 단백질 등에 대한 연결에 의해 유도체화될 수 있다. 항체 또는 항원-결합 단편은 항체 또는 그의 항원-결합 단편 상에 활성 또는 안정성을 개선시키는 변역 후 모이어티를 가질 수 있다. 이들 모이어티는 황, 메틸, 탄수화물, 인 및 면역글로불린 분자 상에서 일반적으로 발견되는 다른 화학기를 포함한다. 또한, 항체 또는 항원-결합 단편은 하나 이상의 비-전통적인 아미노산을 함유할 수 있다.

[0083] 본원에 기재된 항체 또는 항원-결합 단편은 독성 또는 비-독성 모이어티로 표지되거나 그에 접합될 수 있다. 독성 모이어티는 예를 들어 박테리아 독소, 바이러스 독소, 식물 독소, 진균 독소, 방사성 동위원소 등을 포함한다. 항체 또는 항원-결합 단편은 항체 또는 항원-결합 단편의 검출을 돕도록 생물학적 분석 (예를 들어, 방

사성 동위원소 표지, 형광 표지)에서 사용하기 위해 표지될 수 있다. 또한, 항체 또는 항원-결합 단편은 진단 또는 치료 목적을 위해, 예를 들어, 방사선 면역치료 (Garmestani et al., 28 Nucl. Med. Biol. 409 (2001)), 영상화 기술 및 방사성 면역유도 수술과 같은 용도를 위해 목적하는 부위에 방사선을 직접 전달하는 방사성 동위원소 또는 특이적 항체/항원 복합체의 생체내 영상화 또는 검출을 허용하는 표지로 표지되거나 접합될 수 있다. 항체 또는 항원-결합 단편은 또한 면역독소를 제공하도록 독소와 접합될 수 있다 ([Kreitman, R.J., 31 Adv. Drug Del. Rev. 53 (1998)] 참조).

[0084] 적어도 하나의 상기한 항체 또는 그의 항원-결합 단편 및 제약상 허용되는 담체를 포함하는 조성물을 본원에서 설명한다. 그러한 조성물은 예를 들어 암, 예를 들어 본원에서 설명되고 예시된 암을 치료하기 위해 환자에게 투여하기 위해 유용하다. 조성물은 본원에서 설명되고 예시된 것을 포함하여 당업계에 공지되고 적합한 임의의 다양한 제제로서 제형화될 수 있다. 일부 실시양태에서, 조성물은 수성 제형이다. 수성 용액은 물 또는 적합한 생리학적 버퍼 내에서 항체 또는 항원-결합 단편을 혼합하고, 임의로 요구되는 적합한 착색제, 향미제, 보존제, 안정화제 및 비후제 등을 첨가함으로써 제조할 수 있다. 또한, 수성 현탁액은 항체 또는 항원-결합 단편을 물 또는 생리학적 버퍼 내에서 점성 물질, 예를 들어 천연 또는 합성 검, 수지, 메틸셀룰로스, 나트륨 카르복시 메틸셀룰로스, 및 다른 공지의 현탁제와 함께 분산시킴으로써 제조될 수 있다.

[0085] 또한, 액체 제형, 및 사용 직전에 액체 제제로의 전환이 의도되는 고체 형태 제제가 포함된다. 상기 액체는 용액, 현탁액, 시럽, 슬러리, 및 에멀전을 포함한다. 액체 제제는 제약상 허용되는 첨가제, 예를 들어 현탁제 (예를 들어, 소르비톨 시럽, 셀룰로스 유도체 또는 수소화 식물 지방 또는 오일); 유화제 (예를 들어, 레시틴 또는 아카시아); 비-수성 비히클 (예를 들어, 아몬드유, 오일성 에스테르, 또는 분별 (fractionated) 식물유); 및 보존제 (예를 들어, 메틸 또는 프로필-p-히드록시벤조에이트 또는 소르브산)를 사용하여 통상적인 수단에 의해 제조될 수 있다. 상기 제제는 활성 물질에 추가로, 착색제, 향미제, 안정화제, 버퍼, 인공 및 천연 감미료, 분산제, 증점제, 가용화제 등을 함유할 수 있다. 조성물은 사용 전에 적합한 비히클, 예를 들어 멸균수, 생리학적 버퍼, 염수 용액 또는 알콜로 구성하기 위한 분말 또는 동결건조된 형태로 존재할 수 있다.

[0086] 조성물은 대상체에게 주사하기 위해 제형화될 수 있다. 주사를 위해, 설명되는 조성물은 수성 용액, 예를 들어 물 또는 알콜 내에, 또는 생리학상 적합한 버퍼, 예를 들어 행크 (Hanks) 용액, 링거액, 또는 생리학적 염수 버퍼 내에 제형화될 수 있다. 용액은 하나 이상의 제형 물질, 예를 들어 현탁제, 안정화제 또는 분산제를 함유할 수 있다. 주사 제형은 또한 사용 직전에, 예를 들어, 사용 전에 적합한 비히클, 예를 들어 멸균수, 염수 용액 또는 알콜로 구성함으로써 주사에 적합한 액체 형태 제제로의 전환이 의도되는 고체 형태 제제로서 제조될 수 있다.

[0087] 조성물은 지속 방출 비히클 또는 데포 (depot) 제제 내에 제형화될 수 있다. 상기 지속 작용 제형은 이식 (예를 들어 피하 또는 근내) 또는 근내 주사에 의해 투여될 수 있다. 따라서, 예를 들어, 조성물은 적합한 중합체 또는 소수성 물질 (예를 들어, 허용가능한 오일 내의 에멀전) 또는 이온 교환 수지와 함께, 또는 난용성 유도체, 예를 들어, 난용성 염으로서 제형화될 수 있다. 리포솜 및 에멀전은 소수성 약물에 대한 담체로서 사용하기 적합한 전달 비히클의 공지의 예이다.

[0088] 생체 내 또는 시험관 내에서 상기한 항체, 또는 항원-결합 단편을 사용하여 GD-2-발현 세포를 검출하기 위한 방법이 본원에 개시된다. 일부 실시양태는 검출가능한 표지, 예를 들어 형광 표지, 방사성 표지, 비오틴, 효소 등, 예를 들어 ^{111}In -DOTA, ^{111}In -DTPA, 또는 납-212, 비스무트-212, 아스타틴-211, 요오드-131, 스칸듐-47, 레늄-186, 레늄-188, 이트륨-90, 요오드-123, 요오드-124, 요오드-125, 브롬-77, 인듐-111, 및 분열성 핵종, 예를 들어 붕소-10 또는 악티나이드를 포함하고 이에 제한되지 않는 방사성 핵종에 접합된 개시된 항체, 또는 항원-결합 단편을 이용한다. 예를 들어, 검출가능하게 표지된 항체 또는 항원-결합 단편은 GD2를 발현하는 대상체에서 세포를 검출하고 위치 결정을 위해 대상체에게 투여될 수 있다. 상기 방법은 또한 GD2가 대상체에서 다른 세포 또는 조직에 비해 고도로 발현되는 세포 또는 조직을 검출하기 위해 사용될 수 있다. 별법으로, GD-2-발현 세포를 검출하기 위한 개시된 방법의 한 실시양태는 대상체로부터 얻은 세포, 예를 들어 혈액 샘플 또는 조직 생검으로부터 얻은 세포에 의한 GD2를 검출하거나 그의 발현을 정량하기 위해 본원에 기재된 검출가능하게 표지된 항체 또는 항원-결합 단편을 사용하는 것을 포함할 수 있다.

[0089] 별법으로, 상기한 항체, 또는 항원-결합 단편을 사용하여 GD-2-발현 세포를 검출하기 위한 설명된 방법은 표지되지 않은 GD2-특이적 항체를 사용하여 수행될 수 있다. 예를 들어, 한 실시양태에서, GD2-발현 세포는 먼저 대상체에게 본원에 기재된 GD2-특이적 항체 또는 항원-결합 단편을 투여한 후, 초기에 투여된 GD2-특이적 항체 또는 항원-결합 단편에 결합할 수 있는 검출가능하게 표지된 2차 항체를 투여함으로써 대상체에서 검출될 수 있다.

다. 유사한 방법은 시험관 내에서 GD2-발현 세포를 검출하기 위해 사용될 수 있다.

[0090] 치료 또는 예방을 필요로 하는 대상체에서 질병을 치료 또는 예방하기 위한 방법을 또한 본원에서 설명한다. 일부 측면에서, 이 방법은 GD2-연관 질병, 예를 들어 암, 예를 들어, 흑색종의 치료 또는 예방을 필요로 하는 대상체를 확인하는 것을 포함할 수 있다. 다른 실시양태는 진단 목적을 위해, 예를 들어 영상화 기술 또는 특이적 항체/항원 복합체의 검출을 위해, 예를 들어 방사선을 목적하는 부위에 직접 전달하는 방사성 동위원소로 표시되거나 접합된 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 포함한다. 한 실시양태에서, 방법은 대상체에게 GD2-특이적 항체 또는 항원-결합 단편, 예를 들어 재조합, 인간, GD2-특이적 IgM 항체를 질병의 치료 또는 예방에 효과적인 양으로 투여하는 것을 포함한다. 한 측면에서, 방법은 대상체에게 제약상 허용되는 담체 및 GD2에 특이적으로 결합하는 적어도 하나의 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 포함하는 조성물, 예를 들어 본원에서 설명되고 예시된 조성물을 질병의 치료 또는 예방에 효과적인 양으로 투여하는 것을 포함한다. 한 실시양태에서, 방법은 대상체에게 GD2에 특이적으로 결합하는 적어도 하나의 항체 또는 항원-결합 단편, 예를 들어 본원에 기재되거나 예시된 항체 또는 항원-결합 단편을 질병의 치료 또는 예방에 효과적인 양으로 투여하는 것을 포함한다. 한 실시양태에서, 방법은 본원에 예시된 독성 또는 비-독성 모이어티에 표시 또는 접합된 적어도 하나의 GD2-특이적 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 대상체에게 투여하는 것을 포함한다.

[0091] 본원에 기재된 항체 또는 항원-결합 단편은 임의의 허용되는 투여 형태, 예를 들어 캡슐, 정제, 수성 현탁액, 용액 등으로 경구 투여될 수 있다. 항체 또는 항원-결합 단편은 또한 피하, 정맥내, 근내, 관절내, 윤활막내, 흉골내, 비내, 국소, 경막내, 간내, 병변내, 및 두개내 주사 또는 주입 기술을 포함하고, 이에 제한되지 않는 방식으로 비경구로 투여될 수 있다. 별법으로, 항체 또는 항원-결합 단편은 예를 들어 주사에 의해 정맥 내 또는 복강 내로 투여될 것이다.

[0092] 대상은 임의의 동물일 수 있고, 바람직하게는 포유동물, 예를 들어 마우스, 래트, 햄스터, 기니 피그, 토끼, 고양이, 개, 원숭이, 당나귀, 소, 말, 돼지 등이다. 가장 바람직하게는, 포유동물은 인간이다. 일부 실시양태에서, 대상체에게 적어도 하나의 항-GD2 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 대상체의 체중 1 kg 당 0.01 μ g 내지 500 mg의 항체 또는 그의 항원-결합 단편의 1일 용량 범위로 투여될 수 있다. 또한, 대상체에게 투여되는 용량은 또한 매일 투여되는 적어도 하나의 항-GD2 항체 또는 그의 항원-결합 단편의 총량의 면에서 측정될 수 있다. 일부 실시양태에서, 대상체에게 매일 5 내지 5000 mg의 적어도 하나의 항-GD2 항체 또는 그의 항원-결합 단편이 투여된다. 일부 실시양태에서, 대상체에게 매일 10 mg의 적어도 하나의 항-GD2 항체 또는 그의 항원-결합 단편이 투여된다. 일부 실시양태에서, 대상체에게 매일 100 mg 이하의 적어도 하나의 항-GD2 항체 또는 그의 항원-결합 단편이 투여된다. 일부 실시양태에서, 대상체에게 매일 250 mg 이하의 적어도 하나의 항-GD2 항체 또는 그의 항원-결합 단편이 투여된다. 일부 실시양태에서, 대상체에게 매일 500 mg 이하의 적어도 하나의 항-GD2 항체 또는 그의 항원-결합 단편이 투여된다. 일부 실시양태에서, 대상체에게 매일 750 mg 이하의 적어도 하나의 항-GD2 항체 또는 그의 항원-결합 단편이 투여된다. 일부 실시양태에서, 대상체에게 매일 1000 mg 이하의 적어도 하나의 항-GD2 항체 또는 그의 항원-결합 단편이 투여된다. 일부 실시양태에서, 대상체에게 매일 1500 mg 이하의 적어도 하나의 항-GD2 항체 또는 그의 항원-결합 단편이 투여된다. 일부 실시양태에서, 대상체에게 매일 2000 mg 이하의 적어도 하나의 항-GD2 항체 또는 그의 항원-결합 단편이 투여된다. 일부 실시양태에서, 대상체에게 매일 2500 mg 이하의 적어도 하나의 항-GD2 항체 또는 그의 항원-결합 단편이 투여된다. 일부 실시양태에서, 대상체에게 매일 3000 mg 이하의 적어도 하나의 항-GD2 항체 또는 그의 항원-결합 단편이 투여된다. 일부 실시양태에서, 대상체에게 매일 3500 mg 이하의 적어도 하나의 항-GD2 항체 또는 그의 항원-결합 단편이 투여된다. 일부 실시양태에서, 대상체에게 매일 4000 mg 이하의 적어도 하나의 항-GD2 항체 또는 그의 항원-결합 단편이 투여된다. 일부 실시양태에서, 대상체에게 매일 4500 mg 이하의 적어도 하나의 항-GD2 항체 또는 그의 항원-결합 단편이 투여된다. 일부 실시양태에서, 대상체에게 매일 5000 mg 이하의 적어도 하나의 항-GD2 항체 또는 그의 항원-결합 단편이 투여된다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 대상체에게 매주 또는 격주로 투여된다.

[0093] 처리는 적어도 하나의 항-GD2 항체 또는 항원-결합 단편의 최적 용량 미만의 보다 적은 용량으로 개시될 수 있고, 이어서 상황에 따라 최적 효과가 도달될 때까지 치료 과정에 걸쳐 용량을 증가시킨다. 지시되는 경우에, 총 일일 용량은 분할되어 하루에 걸쳐 일부씩 투여될 수 있다.

[0094] GD2-연관 질병의 효과적인 치료를 위해, 당업자는 치료되는 대상체에게 적당한 투여 계획 및 용량을 권고할 수 있다. 투약은 필요한 만큼 오랫동안 매일 1 내지 4회 또는 그 초과로 실시할 수 있다. 투약은 조성물이 지속 전달 비히클 내에 제형화되면 덜 빈번하게 실시될 수 있다. 투여 계획은 또한 활성 약물 농도에 따라 변할 수

있고, 이것은 대상체의 필요에 따라 결정될 수 있다.

- [0095] 본원에 기재된 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 또한 제공한다. 벡터는 발현 벡터일 수 있다. 따라서, 관심있는 폴리펩티드를 코딩하는 서열을 함유하는 재조합 발현 벡터를 제공한다. 발현 벡터는 하나 이상의 추가의 서열, 예를 들어 조절 서열 (예를 들어, 프로모터, 인핸서), 선택 마커, 및 폴리아데닐화 신호 (이에 제한되지 않음)를 포함할 수 있다. 매우 다양한 숙주 세포를 형질전환하기 위한 벡터는 공지되어 있고, 플라스미드, 파지미드, 코스미드, 바큘로바이러스, 박미드 (bacmid), 박테리아 인공 염색체 (BAC), 효모 인공 염색체 (YAC), 및 다른 박테리아, 효모 및 바이러스 벡터를 포함하고, 이에 제한되지 않는다.
- [0096] 명세서의 범위 내의 재조합 발현 벡터는 적합한 조절 요소에 작동가능하게 연결될 수 있는 적어도 하나의 재조합 단백질을 코딩하는 합성, 게놈, 또는 cDNA-유래 핵산 단편을 포함한다. 그러한 조절 요소는 전사 프로모터, 적합한 mRNA 리보솜 결합 부위를 코딩하는 서열, 및 전사 및 번역의 종결을 제어하는 서열을 포함할 수 있다. 발현 벡터, 특히 포유동물 발현 벡터는 하나 이상의 비전사된 요소, 예를 들어 복제 기점, 적합한 프로모터 및 발현되는 유전자에 연결되는 인핸서, 다른 5' 또는 3'의 측면에 인접하는 비전사된 서열, 5' 또는 3' 비번역된 서열 (예를 들어 필요한 리보솜 결합 부위), 폴리아데닐화 부위, 스플라이스 공여자 및 수용자 부위, 또는 전사 종결 서열을 포함할 수 있다. 또한, 숙주에서 복제하는 능력을 부여하는 복제 기점이 포함될 수 있다.
- [0097] 척추동물 세포를 형질전환시키는데 사용할 발현 벡터 내의 전사 및 번역 제어 서열은 바이러스 공급원에 의해 제공될 수 있다. 예시적인 벡터는 문헌 [Okayama and Berg, 3 Mol. Cell. Biol. 280 (1983)]에 기재된 바와 같이 제조할 수 있다.
- [0098] 일부 실시양태에서, 항체 또는 항원-결합 단편-코딩 서열은 강력한 구성적 프로모터, 예를 들어 히포잔틴 포스포리보실 트랜스퍼라제 (HPRT), 아데노신 데아미나제, 피루베이트 키나제, 베타-악틴, 인간 미오신, 인간 헤모글로빈, 인간 근육 크레아틴 등의 유전자에 대한 프로모터의 제어 하에 놓인다. 또한, 많은 바이러스 프로모터는 진핵 세포에서 구성적으로 기능하고, 설명된 실시양태에서 사용하기 위해 적합하다. 상기 바이러스 프로모터는 비제한적으로, 사이토메갈로바이러스 (CMV) 초기 프로모터, SV40의 초기 및 후기 프로모터, 마우스 유방종양 바이러스 (MMTV) 프로모터, 말로니 (Maloney) 백혈병 바이러스의 긴 말단 반복 (LTR), 인간 면역결핍 바이러스 (HIV), 엡스타인 바아 (Epstein Barr) 바이러스 (EBV), 라우스 육종 바이러스 (RSV), 및 다른 레트로바이러스, 및 단순 포진 (Herpes Simplex) 바이러스의 티미딘 키나제 프로모터를 포함한다. 한 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원-결합 단편 코딩 서열은 유도가능 프로모터, 예를 들어 메탈로티오네인 프로모터, 테트라사이클린-유도가능 프로모터, 독시사이클린-유도가능 프로모터, 하나 이상의 인터페론-자극된 반응 요소 (ISRE), 예를 들어 단백질 키나제 R 2',5'-올리고아데닐레이트 신타제, Mx 유전자, ADAR1을 함유하는 프로모터 등의 제어 하에 놓인다.
- [0099] 본원에 기재된 벡터는 하나 이상의 내부 리보솜 도입 부위(들) (IRES)을 함유할 수 있다. IRES 서열을 융합 벡터 내로 포함시키면 일부 단백질의 발현을 향상시키기 위해 유익할 수 있다. 일부 실시양태에서, 벡터 시스템은 임의의 상기 언급된 핵산 서열의 상류 또는 하류일 수 있는 하나 이상의 폴리아데닐화 부위 (예를 들어, SV40)를 포함할 것이다. 벡터 성분은 인접하게 연결되거나, 유전자 생성물을 발현하기 위한 최적 간격을 제공하는 방식으로 배열되거나 (즉, ORF 사이에 "스페이스 (spacer)" 뉴클레오티드를 도입함으로써), 또 다른 방식으로 배치될 수 있다. 조절 요소, 예를 들어 IRES 모티프가 또한 발현을 위한 최적 간격을 제공하도록 배열될 수 있다.
- [0100] 벡터는 당업계에 잘 공지되어 있는 선택 마커를 포함할 수 있다. 선택 마커는 양성 및 음성 선택 마커, 예를 들어, 항생제 내성 유전자 (예를 들어, 네오마이신 내성 유전자, 히드로마이신 내성 유전자, 카나마이신 내성 유전자, 테트라사이클린 내성 유전자, 페니실린 내성 유전자), 글루타메이트 신타제 유전자, HSV-TK, 간시클로버 선택을 위한 HSV-TK 유도체, 또는 6-메틸퓨린 선택을 위한 박테리아 퓨린 뉴클레오시드 포스포릴라제 유전자 (Gadi et al., 7 Gene Ther. 1738-1743 (2000))를 포함한다. 선택 마커를 코딩하는 핵산 서열 또는 클로닝 부위는 관심있는 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 서열 또는 클로닝 부위의 상류 또는 하류에 있을 수 있다.
- [0101] 본원에 기재된 벡터는 다양한 세포를 상기한 항체 또는 항원-결합 단편을 코딩하는 유전자로 형질전환시키기 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, 벡터는 항체 또는 항원-결합 단편-생산 세포를 생성하기 위해 사용될 수 있다. 따라서, 다른 측면은 GD2에 특이적으로 결합하는 항체 또는 그의 항원-결합 단편, 예를 들어 본원에 기재되거나 예시된 항체 또는 항원-결합 단편을 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 벡터를 사용하여 형질전환된 숙주 세포를 특징으로 한다.

- [0102] 외래 유전자를 세포 내로 도입하기 위한 수많은 기술이 당업계에 공지되어 있고, 본원에서 설명되고 예시된 다양한 실시양태에 따라 설명된 방법을 수행하기 위한 재조합 세포의 제조를 위해 사용될 수 있다. 사용되는 기술은 이중성 유전자 서열이 유전되고 세포 자손체에 의해 발현될 수 있고, 수여자 세포의 필요한 발달 및 생리학적 기능이 파괴되지 않도록 이중성 유전자 서열을 숙주 세포로 안정하게 전달하여야 한다. 사용될 수 있는 기술은 염색체 전달 (예를 들어, 세포 융합, 염색체 매개 유전자 전달, 미세 세포 매개 유전자 전달), 물리적 방법 (예를 들어, 형질감염, 스페로플라스트 (spheroplast) 융합, 미세주사, 전기천공, 리포솜 담체), 바이러스 벡터 전달 (예를 들어, 재조합 DNA 바이러스, 재조합 RNA 바이러스) 등 ([Cline, 29 Pharmac. Ther. 69-92 (1985)]에 기재됨)을 포함하고, 이에 제한되지 않는다. 또한, 박테리아 원형질체의 인산칼슘 침전 및 포유동물 세포와의 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)-유도 융합도 세포의 형질전환을 위해 사용될 수 있다.
- [0103] 본원에 기재된 항체 또는 항원-결합 단편의 발현에 사용하기 위해 적합한 세포는 바람직하게는 진핵 세포, 보다 바람직하게는 식물, 설치류, 또는 인간 기원의 세포, 예를 들어 NS0, CHO, perC.6, Tk-ts13, BHK, HEK293 세포, COS-7, T98G, CV-1/EBNA, L 세포, C127, 3T3, HeLa, NS1, Sp2/0 골수종 세포, 및 BHK 세포주 (이에 제한되지 않음)이다. 또한, 항체의 발현은 하이브리도마 세포를 사용하여 수행될 수 있다. 하이브리도마의 생산 방법은 당업계에 잘 확립되어 있다.
- [0104] 본원에 기재된 발현 벡터로 형질전환된 세포는 본원에 기재된 항체 또는 항원-결합 단편의 재조합 발현에 대해 선택되거나 스크리닝될 수 있다. 재조합-양성 세포는 팽창되고, 예를 들어 단백질 변형 또는 변경된 번역 후 변형에 의해 목적하는 표현형, 예를 들어 고수준 발현, 향상된 성장 특성, 또는 목적하는 생화학적 특징을 갖는 단백질을 생산하는 능력을 보이는 서브클론에 대해 스크리닝된다. 이들 표현형은 제시된 서브클론의 고유한 특성 또는 돌연변이에 의한 것일 수 있다. 돌연변이는 화학물질, UV-과장 광, 방사선, 바이러스, 삽입 돌연변이 원, DNA 미스매치 복구 (mismatch repair)의 억제, 또는 상기 방법의 조합의 사용에 의해 유발될 수 있다.
- [0105] 일단 목적하는 단백질을 발현하는 세포가 확인되면, 세포는 팽창되고 선택될 수 있다. 형질전환된 세포는 많은 방식으로 선택될 수 있다. 예를 들어, 세포는 관심있는 폴리펩티드의 발현에 대해 선택될 수 있다. 선택가능한 마커를 포함하는, 예를 들어 형광 단백질을 생산하는 벡터로 형질전환된 세포는 마커의 발현에 대해 양성 선택될 수 있다. 다른 실시양태에서, 약물 내성 유전자를 갖는 벡터를 포함하는 세포는 선택 조건 하에서 성장하는 능력에 대해 양성 선택될 수 있다.
- [0106] 키트
- [0107] 환자에서 암 세포의 성장을 억제하거나 감소시키기 위한 키트가 제공된다. 또한, 시험관 내 또는 생체 내에서 이형성 (dysplastic) 세포의 존재를 확인하기 위한 키트를 제공한다.
- [0108] 본원에 설명되는 키트는 본원에 기재된 항체, 그의 항원-결합 단편 또는 항체 조성물, 및 환자에서 종양 세포의 성장을 억제하거나 감소시키는 방법 또는 예를 들어 생물학적 샘플에서 이형성 세포의 존재를 확인하기 위한 방법에서 키트를 사용하기 위한 사용 지시서를 포함할 수 있다. 키트는 적어도 하나의 화학치료 또는 세포독성 시약을 포함할 수 있다. 키트는 항염산제 화합물을 포함할 수 있다. 키트는 적어도 하나의 진단 시약을 포함할 수 있다. 진단 시약의 예는 검출가능한 표지, 비제한적인 예를 들어 방사성, 형광, 또는 발색 물질 (예를 들어, ¹¹¹In-DOTA)이다. 검출가능한 표지는 효소를 포함할 수 있다. 키트는 사용 지시서 및 항체 또는 항체 조성물의 투여, 예를 들어 주사를 위한 수단을 포함할 수 있다.
- [0109] BSA-강글리오시드 접합체의 사용 및 제조 방법
- [0110] 알부민-강글리오시드 접합체 및 상기 접합체의 제조 방법이 본원에서 설명된다. 관심있는 항체 또는 항원-결합 단편이 제시된 항원에 대한 결합을 매개하는데 효과적인지를 결정하기 위해, 항체 결합의 특성을 결정하여야 한다. 항체 결합의 특성을 결정하기 위한 많은 방법, 예를 들어 도트-블롯 (dot-blot), 웨스턴 블롯, 면역침전 분석, ELISA, FACS 분석/유동 세포측정, 및 결합된 항체의 면역형광 검출이 존재한다. 다양한 분석이 항체 결합의 시험을 위해 이용가능하지만, 사용되는 특정 분석은 항체의 목적을 이해하면서 선택되어야 한다. 예를 들어, 항체 또는 그의 항원-결합 단편이 임상 환경에서 사용되어야 할 경우, 관심있는 항원을 생체 내에서 발견될 가능성이 가장 큰 형태로 제시하는 분석에 의해 그 특성이 결정되어야 한다. 이 경우, 및 세포-표면 단백질의 경우에, 유동 세포측정은 천연 항원의 배경에서 평가되는 항체 또는 그의 항원-결합 단편의 상호작용을 허용하기 때문에 유용한 분석일 수 있다.
- [0111] 항원-특이적 결합 단백질을 코딩하는 벡터를 포함하는 세포를 확인하는 한 가지 방법은 관심있는 항원을 이용하는 효소 연결 면역 흡착 분석 (ELISA)을 사용한다. ELISA 수행에 사용되는 2가지의 주요 방법, 즉 간접적

ELISA 및 샌드위치 ELISA가 존재한다. 간접적 ELISA를 수행하기 위해서, 관심있는 항원은 미세역가 플레이트의 표면에 흡착되거나 고정된 후, 관심있는 항체 또는 그의 항원-결합 단편이 항원을 검출하기 위해 미세역가 플레이트에 첨가된다. 이와 반대로, 샌드위치 ELISA는 특성이 결정되는 항체에 추가하여, 관심있는 항원에 특이적인 것으로 알려진 항체를 사용한다. 상기 알려진 항체는 미세역가 플레이트에 첨가될 때 관심있는 항원에 결합하거나 항원을 포획하도록 미세역가 플레이트를 코팅하기 위해 사용된다. 관심있는 항원이 포획되면, 관심있는 항체 또는 그의 항원-결합 단편이 항원에 대한 그의 결합 특징을 평가하기 위해서 미세역가 플레이트에 첨가된다. 어느 경우든, 결합된 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 일반적으로 관심있는 항체 또는 그의 항원-결합 단편에 특이적인 효소-접합된 2차 항체에 의해 검출된다.

[0112] 강글리오시드-특이적 항체 또는 항원-결합 단편의 특성 결정에 유용한 ELISA는 상기 항체 또는 항원-결합 단편의 잠재적인 용도 결정에 유용할 것이다. 그러나, ELISA 항원으로서 강글리오시드의 사용은 유리 강글리오시드의 면역원성이 매우 작다는 사실 때문에 복잡하다 (Jacques et al., 4 Org. Biomol. Chem. 142-154 (2006)).

[0113] 강글리오시드 접합체

[0114] 접합된 강글리오시드의 항원 특성을 보유할 뿐만 아니라 강글리오시드의 안정성을 증가시키고 ELISA 미세역가 플레이트에 대한 양호한 부착을 허용하는 강글리오시드-알부민 접합체가 본원에서 개시된다. 강글리오시드는 나트륨 시아노보로히드라이드의 존재 하에 알부민 내의 1차 아민에 의한 강글리오시드의 환원적 아민화를 통해 알부민에 접합된다. 접합은 강글리오시드 상의 탄수화물 모이어티의 환원 단부(들)에 대한 슈프 (Schiff) 염기 형성, 이어서 나트륨 시아노보로히드라이드를 사용한 환원에 의해 진행된다. 따라서, 본원에 기재된 일부 실시양태는 강글리오시드 상의 탄수화물 모이어티의 환원 단부(들)를 통해 담체 단백질에 접합된 강글리오시드를 포함한다. 일부 실시양태는 담체 단백질에 접합된 강글리오시드를 포함하고, 담체는 BSA이다. 일부 실시양태에서, 강글리오시드는 GD2이다. 일부 실시양태에서, 강글리오시드는 GM3이다. 일부 실시양태에서, 강글리오시드는 GM2이다. 다른 실시양태에서, GD2는 BSA에 접합된다. 일부 실시양태에서, 강글리오시드의 환원적 아민화는 나트륨 시아노보로히드라이드에 의해 촉매된다.

[0115] 일부 실시양태에서, 강글리오시드-알부민 접합체는 강글리오시드-특이적 모노클로날 항체 또는 그의 항원-결합 단편이 접합체에 결합할 수 있도록 강글리오시드 항원성을 보유한다. 일부 실시양태에서, GD2-BSA 접합체는 GD2-특이적 모노클로날 항체 또는 그의 항원-결합 단편이 접합체에 결합할 수 있도록 GD2 항원성을 보유한다. 일부 실시양태에서, GM2-BSA 접합체는 GM2-특이적 모노클로날 항체 또는 그의 항원-결합 단편이 접합체에 결합할 수 있도록 GM2 항원성을 보유한다. 일부 실시양태에서, GM3-BSA 접합체는 GM3-특이적 모노클로날 항체 또는 그의 항원-결합 단편이 접합체에 결합할 수 있도록 GM3 항원성을 보유한다.

[0116] 본원에 기재된 알부민-강글리오시드 접합체는 특정 강글리오시드에 대한 항체 또는 그의 항원-결합 단편의 특이성의 특성을 결정하기 위해 ELISA에서 사용할 수 있다. 한 측면에서, 설명되는 알부민-강글리오시드 접합체는 비접합된 강글리오시드에 비해 접합된 강글리오시드를 ELISA 플레이트에 흡착시키는 향상된 능력을 제공한다. 일단 흡착된 후에, 접합체는 강글리오시드 특이적 항체 또는 항원-결합 단편의 결합 측면의 특성을 결정하기 위해 직접적 ELISA에서 강글리오시드 항원으로서 사용될 수 있다. 한 실시양태에서, 알부민-강글리오시드 접합체는 BSA-GD2 접합체일 수 있다. 한 실시양태에서, BSA-강글리오시드 접합체는 BSA-GM2 접합체일 수 있다. 한 실시양태에서, BSA-강글리오시드 접합체는 BSA-GM3 접합체일 수 있다. 다른 상기 강글리오시드는 설명된 방법을 사용하여 BSA에 접합된 후, 본원에 기재된 목적을 위해 사용될 수 있다. 그러한 접합체 및 그의 용도는 본 명세서의 범위 내에 있다.

[0117] 단백질 접합체의 실시양태는 다음을 포함한다.

[0118] 실시양태 A1은 알부민 및 강글리오시드를 포함하는 단백질 접합체를 제공한다.

[0119] 실시양태 A2는 알부민이 소 혈청 알부민인 실시양태 A1의 접합체를 제공한다.

[0120] 실시양태 A3은 강글리오시드가 강글리오시드 상의 탄수화물 모이어티의 환원 단부를 통해 알부민에 접합된 실시양태 A1의 접합체를 제공한다.

[0121] 실시양태 A4는 알부민이 소 혈청 알부민인 실시양태 A3의 접합체를 제공한다.

[0122] 실시양태 A5는 강글리오시드가 GD2인 실시양태 A3의 접합체를 제공한다.

[0123] 실시양태 A6은 접합체가 GD2-특이적 항체와 면역반응성인 실시양태 A1의 접합체를 제공한다.

- [0124] 실시양태 A7은 강글리오시드가 GM2인 실시양태 A1의 접합체를 제공한다.
- [0125] 실시양태 A8은 접합체가 GM2-특이적 항체와 면역반응성인 실시양태 A7의 접합체를 제공한다.
- [0126] 실시양태 A9는 강글리오시드가 GM3인 실시양태 A1의 접합체를 제공한다.
- [0127] 실시양태 A10은 접합체가 GM3-특이적 항체와 면역반응성인 실시양태 A9의 접합체를 제공한다.
- [0128] 실시양태 A11은 강글리오시드 상의 탄수화물 모이어티의 환원 단부를 환원에 의해 아민화시키는 것을 포함하는, 강글리오시드를 알부민에 접합하는 방법을 제공한다.
- [0129] 실시양태 A12는 알부민이 소 혈청 알부민인 실시양태 A11의 방법을 제공한다.
- [0130] 실시양태 A13은 환원적 아민화가 나트륨 시아노보로히드라이드에 의해 촉매되는 실시양태 A11의 방법을 제공한다.
- [0131] 실시양태 A14는 강글리오시드가 GD2인 실시양태 A13의 방법을 제공한다.
- [0132] 실시양태 A15는 강글리오시드가 GM2인 실시양태 A13의 방법을 제공한다.
- [0133] 실시양태 A16은 강글리오시드가 GM3인 실시양태 A13의 방법을 제공한다.
- [0134] 세포 배양 조성물 및 방법
- [0135] 진핵 세포를 배양하기 위한 조성물 및 방법을 본원에서 설명한다. 세포는 임의의 종류의 진핵 세포일 수 있지만, 한 실시양태에서 바람직하게는 포유동물 기원의 세포이다. 일부 실시양태에서, 세포는 차이니즈 햄스터 난소 (CHO) 세포이다. 일부 실시양태에서, 진핵 세포는 IgM 항체 또는 항원-결합 단편을 생산하도록 유전적으로 변형된다. 진핵 세포는 임상 단리물이거나, 외래 DNA 또는 RNA로 형질전환되거나, 불멸화되거나, 바이러스-감염되거나, 또는 다른 일반적으로 공지된 생물학적 또는 화학적 수단에 의해 변형될 수 있다. 진핵 세포는 단일 층 또는 현탁 배양액에서 성장할 수 있고, 이는 세포 배양 인큐베이터, 생물반응기, 진탕-플라스크, 또는 다른 유사한 조직 배양 장치에서 이루어질 수 있다. 또한, 진핵 세포는 32℃ 초과 및 50℃ 미만의 온도에서 2% 내지 8% CO₂에서 진탕하거나 진탕하지 않으면서 배양될 수 있다. 한 실시양태에서, 세포는 37℃의 온도에서 5% CO₂에서, 120 rpm으로 진탕하면서 배양될 수 있다. 진핵 세포는 본원에서 개시되는 조성물 및 방법과 조합되어 조직 배양 배지, 예를 들어 GIBCO-CD-CHO 완전 배지 (1 L GIBCO-CD-CHO 배지 + 25 μM MSX) 또는 유사한 완전 배지 내에서 배양될 수 있다. 배양된 진핵 세포는 외래 단백질을 생산하도록 공학처리될 수 있고, 이는 반드시 그럴 필요는 없지만 본원에 기재된 조성물 및 방법에 의해 향상될 수 있다.
- [0136] 진핵 세포 배양 배지에 사용하기 적합한 조성물을 본원에서 개시한다. 조성물은 배양된 진핵 세포의 성장 특징에 영향을 줄 수 있는 다양한 필수 및 비필수 아미노산, 예를 들어, 알라닌, 아르기닌, 아스파라긴, 아스파르트산, 시스테인, 글루타민, 글루탐산, 글라이신, 히스티딘, 이소류신, 류신, 라이신, 메티오닌, 페닐알라닌, 프롤린, 세린, 트레오닌, 트립토판, 티로신, 및 발린; 당, 예를 들어, 글루코스, 프럭토스, 만노스, 및 갈락토스; 및 비타민, 예를 들어 엽산, 비타민 B-12, 비타민 D, 및 리보플라빈을 포함하고 이에 제한되지 않는다. 실시양태 B1에서, 조성물은 글루코스, 글루타메이트, 아스파르테이트, 세린, 히스티딘, 트레오닌, 아르기닌, 티로신, 시스테인, 발린, 메티오닌, 트립토판, 페닐알라닌, 이소류신, 류신, 라이신, 프롤린, 니코틴산 아미드, 피리독신 HCl, 엽산, 비타민 B-12, 리보플라빈, 및 티아민 HCl을 포함한다.
- [0137] 실시양태 B2에서, 조성물은 실시양태 B1의 세포 배양액을 포함하고, 여기서 글루코스의 농도는 50 g/L이고, 글루타메이트의 농도는 2.5 내지 3.75 g/L이고, 아스파르테이트의 농도는 1.5 내지 2.0 g/L이고, 세린의 농도는 0.3 내지 0.5 g/L이고, 히스티딘의 농도는 1.1 내지 1.5 g/L이고, 트레오닌의 농도는 2.0 내지 3.0 g/L이고, 아르기닌의 농도는 1.0 내지 1.5 g/L이고, 티로신의 농도는 1.8 내지 2.2 g/L이고, 시스테인의 농도는 0.9 내지 1.1 g/L이고, 발린의 농도는 1.0 내지 3.0이고, 메티오닌의 농도는 0.8 내지 1.2 g/L이고, 트립토판의 농도는 0.5 내지 0.8 g/L이고, 페닐알라닌의 농도는 1.3 내지 1.7 g/L이고, 이소류신의 농도는 0.8 내지 2.4 g/L이고, 류신의 농도는 1.5 내지 4.5 g/L이고, 라이신의 농도는 3.5 내지 5.0 g/L이고, 프롤린의 농도는 0.5 내지 0.7 g/L이고, 니코틴산 아미드의 농도는 30 내지 40 mg/L이고, 피리독신 HCl의 농도는 200 내지 250 mg/L이고, 엽산의 농도는 100 내지 130 mg/L이고, 비타민 B-12의 농도는 20 내지 40 mg/L이고, 리보플라빈의 농도는 20 내지 40 mg/L이고, 티아민 HCl의 농도는 100 내지 150 mg/L이다.
- [0138] 또한, 선행 문단에서 설명된 조성물을 사용하여 진핵 세포의 생활력을 향상시킬 수 있는, 진핵 세포를 배양하는

방법을 본원에서 개시한다. 예를 들어, 조성물은 배양된 CHO 세포 및 배양된 IgM-생산 진핵 (예를 들어, CHO) 세포에 첨가될 수 있다. 조성물은 성장 배지가 진핵 세포에 적용되기 전 또는 후에 조성물을 성장 배지에 배지 보충물로서 첨가함으로써 진핵 조직 배양 세포의 생활력을 향상시키기 위해 사용될 수 있다. 별법으로, 성장 배지 성분은 조성물을 포함하는 성장 배지를 생성하기 위해 조성물에 첨가될 수 있다.

- [0139] 실시양태 B3은 세포를 1차 조직 배양 배지에 첨가한 후, 1차 조직 배양 배지에 글루코스, 글루타메이트, 아스파르테이트, 세린, 히스티딘, 트레오닌, 아르기닌, 티로신, 시스테인, 발린, 메티오닌, 트립토판, 페닐알라닌, 이소류신, 류신, 라이신, 프롤린, 니코틴산 아마이드, 피리독신 HCl, 엽산, 비타민 B-12, 리보플라빈, 및 티아민 HCl을 포함하는 세포 배양 조성물을 보충하는 것을 포함하는, 진핵 세포의 배양 방법을 제공한다.
- [0140] 실시양태 B4는 1차 조직 배양 배지에 첨가되는 세포 배양 조성물의 부피가 1차 조직 배양 배지의 부피의 1.0% 내지 20%인 실시양태 B3의 방법을 제공한다.
- [0141] 실시양태 B5는 세포 배양 조성물이 1차 조직 배양 배지의 첨가 후 제3일 전에 1차 조직 배양 배지에 첨가되지 않는 것인 실시양태 B3의 방법을 제공한다.
- [0142] 실시양태 B6은 진핵 세포가 하나 이상의 단백질을 생산하도록 형질전환된 것인 실시양태 B3의 방법을 제공한다.
- [0143] 실시양태 B7은 하나 이상의 단백질이 항체 또는 그의 항원-결합 단편인 실시양태 B6의 방법을 제공한다.
- [0144] 실시양태 B8은 항체가 IgM인 실시양태 B7의 방법을 제공한다.
- [0145] 실시양태 B9는 세포 배양 조성물이 매일 1차 조직 배양 배지에 첨가되는 것인 실시양태 B3의 방법을 제공한다.
- [0146] 다른 실시양태에서, 조성물은 재조합 단백질을 생산하도록 유전적으로 변형된 진핵 세포에 의해 생산되는 단백질의 양을 증가시키기 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, 조성물은 재조합 인간 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 발현하도록 공학처리된 배양된 세포 (예를 들어, IgM을 발현하도록 변형된 세포, 보다 구체적으로 IgM을 발현하도록 변형된 CHO 세포)에 첨가될 수 있다. 조성물은 성장 배지가 진핵 세포에 적용되기 전에 또는 후에 배지 보충물로서 조성물을 성장 배지에 첨가함으로써 재조합 단백질 발현을 증가시키기 위해 사용될 수 있다. 별법으로, 조성물을 함유하는 성장 배지를 생성하기 위해 성장 배지 성분이 조성물에 첨가될 수 있다.
- [0147] 조성물은 성장 배지로서 또는 성장 배지를 위한 보충물로서 사용될 수 있다. 보충물로서, 조성물은 배양 배지가 조직 배양 용기에 첨가되기 전에 또는 후에 세포 배양 배지에 첨가될 수 있다. 본원에 기재된 조성물은 진핵 세포 배양 배지를 1.5% 내지 2.5%의 총 농도로 보충하기 위해 사용될 수 있다. 이와 동일한 농도는 이미 조성물을 함유하는 세포 배양 배지를 생산하기 위해 사용될 수 있다.
- [0148] 또한, 발레르산을 세포 배양 배지에 첨가함으로써 재조합 단백질을 생산하도록 유전적으로 변형된 진핵 세포에 의해 생산되는 단백질의 양을 증가시키는 방법이 제시된다. 예를 들어, 발레르산은 재조합 인간 항체 또는 항원-결합 단편을 발현하도록 공학처리된 배양된 CHO, 하이브리도마, 및 NSO 세포를 위한 배지에 첨가될 수 있다. 한 실시양태에서, 발레르산은 세포 배양 배지에 0.1 mM 내지 10 mM의 최종 농도로 첨가될 수 있다. 한 실시양태에서, 발레르산은 세포 성장 기간 내의 특정 시점에 첨가될 수 있고, 예를 들어, 발레르산은 세포 원액의 회복 후 특정 일에 또는 세포 배양액을 나누는 후에 배양 배지에 첨가될 수 있다.
- [0149] 실시양태 B10은 세포의 성장 배지에 발레르산을 보충하는 것을 포함하는, 세포에 의한 단백질 생산을 향상시키는 방법을 제공한다.
- [0150] 실시양태 B11은 세포가 항체-생산 세포인 실시양태 B10의 방법을 제공한다.
- [0151] 실시양태 B12는 성장 배지가 0.1 mM 내지 10 mM의 발레르산 농도를 갖도록 보충되는 것인 실시양태 B10의 방법을 제공한다.
- [0152] 항체 단리 또는 정제
- [0153] 본원에 기재된 항체 또는 항원-결합 단편은 이들이 보다 정제된 또는 단리된 형태의 항체 또는 항원-결합 단편을 허용하기 위해 그로부터 회수되는 세포 성장 배지의 실질적인 부분으로부터 분리될 수 있다. 항체 또는 항원-결합 단편, 예를 들어 인간 IgM 항체 또는 항원-결합 단편을 용액, 예를 들어, 조건화된 배양 상등액 (CCS) 으로부터 정제 또는 단리하는 방법을 본원에서 설명한다. 항체 또는 항원-결합 단편을 함유하는 용액의 순도를 증가시키는 것은 투석, 크기 배제 크로마토그래피, 원심분리, 이온-교환 크로마토그래피, 구배 원심분리, 크기-배제 필터를 사용한 여과, 친화도 크로마토그래피, 면역친화도 크로마토그래피, 및 고성능 액체 크로마토그래피

를 포함하고 이에 제한되지 않는 많은 방식으로 수행할 수 있다. 또한, 상기한 항체 또는 항원-결합 단편은 친화도 정제 기술을 통해 항체 또는 그의 항원-결합 단편 순도를 증가시키기 위해 사용될 수 있는 친화도 태그, 예를 들어 폴리히스티딘을 포함하도록 유전적으로 또는 화학적으로 변형될 수 있다.

[0154] 따라서, 일부 실시양태는 친화도 크로마토그래피에 의해 용액으로부터 분리되는 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 포함한다. 일부 실시양태는 친화도 크로마토그래피에 의해 용액으로부터 실질적으로 분리되는 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 포함하고, 여기서 항체 또는 그의 항원-결합 단편에 대한 친화도는 단백질 A에 의해 매개된다. 일부 실시양태는 이온-교환 크로마토그래피에 의해 용액으로부터 실질적으로 분리되는 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 포함한다. 일부 실시양태는 양이온-교환 크로마토그래피에 의해 용액으로부터 실질적으로 분리되는 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 포함하고, 여기서 양이온-교환 크로마토그래피 컬럼은 아크릴아미드-텍스트란 공중합체 수지를 포함한다. 일부 실시양태는 히드록시아파타이트 크로마토그래피에 의해 용액으로부터 실질적으로 분리되는 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 포함한다. 일부 실시양태는 히드록시아파타이트 크로마토그래피에 의해 용액으로부터 실질적으로 분리되는 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 포함하고, 여기서 히드록시아파타이트 크로마토그래피 컬럼은 세라믹 인산칼슘 수지를 포함한다.

[0155] 상기한 항체 또는 항원-결합 단편이 그에 의해 정제 또는 분리될 수 있는 방법은, 생성되는 항체 또는 그의 항원-결합 단편에 대한 요건이 항체 또는 그의 항원-결합 단편이 사용되는 용도에 따라 상이할 수 있기 때문에 상이할 수 있다. 예를 들어, 제약조성물에 사용하기 위한 항체 또는 항원-결합 단편은 엄격한 정제를 필요로 할 것이고, 시험관내 진단 분석에 사용하기 위한 항체 또는 항원-결합 단편은 보다 낮은 정도로 정제될 수 있다. 따라서, 일부 실시양태는 항체 또는 항원-결합 단편-함유 샘플을 단백질 A 매트릭스와 접촉시키는 것을 포함한다. 일부 실시양태는 항체 또는 항원-결합 단편-함유 샘플을 이온-교환 매트릭스와 접촉시키는 것을 포함한다. 한 실시양태에서, 이온-교환 매트릭스는 양이온-교환 크로마토그래피 매트릭스일 수 있다. 보다 바람직한 실시양태에서, 양이온-교환 크로마토그래피 매트릭스는 아크릴아미드-텍스트란 공중합체 수지를 포함할 수 있다. 일부 실시양태는 항체 또는 항원-결합 단편-함유 샘플을 히드록시아파타이트 매트릭스와 접촉시키는 것을 포함한다. 한 실시양태에서, 히드록시아파타이트 매트릭스는 인산칼슘 수지를 포함할 수 있다.

[0156] 연속적인 친화도 크로마토그래피는 분리된 또는 정제된 단백질을 생성시키는 과정이다. 이 과정은 관심있는 정제된 또는 분리된 단백질을 생산하기 위해 2 라운드 이상의 상이한 친화도 크로마토그래피 기술을 사용할 수 있다 (Friedrichs and Grose, 49 J. Virol. 992 (1984)). 따라서, 일부 실시양태에서, 항체 또는 항원-결합 단편-함유 샘플은 항체 또는 항원-결합 단편의 매트릭스에 대한 결합을 촉진하는 조건 하에서 단백질 A 매트릭스와 접촉될 수 있고; 비결합된 단백질을 제거하기 위해 매트릭스를 세척할 수 있고; 단백질 A 매트릭스에 결합된 물질은 용출될 수 있고; 용출된 물질은 항체 또는 항원-결합 단편의 매트릭스에 대한 결합을 촉진하는 조건 하에서 양이온-교환 크로마토그래피 매트릭스에 접촉시킬 수 있고; 비결합된 단백질을 제거하기 위해 매트릭스를 세척할 수 있고; 양이온-교환 크로마토그래피 매트릭스에 결합된 물질은 용출될 수 있고; 용출된 물질은 항체 또는 항원-결합 단편의 매트릭스에 대한 결합을 촉진하는 조건 하에서 히드록시아파타이트 수지에 접촉시킬 수 있고; 비결합된 단백질을 제거하기 위해 매트릭스를 세척할 수 있고; 결합된 물질은 용출될 수 있다. 또한, 항체 또는 그의 항원-결합 단편의 보다 엄격한 정제를 위해 상기 과정의 다양한 지점에 선택적인 단계가 추가될 수 있다. 예를 들어, 미생물, 예를 들어 박테리아, 바이러스, 및 기생충을 불활성화시키기 위해 항체 또는 항원-결합 단편-함유 용액에는 세제, 예를 들어 트리톤(Triton)[®]

-X 100 또는 트윈(Tween)[®]

80이 보충될 수 있다.

[0157] 단백질의 친화도-기반 크로마토그래피는 일반적으로 크로마토그래피 컬럼을 평형화시키고, 샘플 용액을 컬럼의 매트릭스와 접촉시키고, 컬럼 내의 비결합된 물질을 세척하고, 목적하는 물질을 용출시키는 것을 포함하는 다단계 과정이다. 상기 전체적인 과정을 샘플의 순도를 증가시키기 위해 상이한 조건 하에서 필요에 따라 1회 이상 반복할 수 있다. 일부 실시양태에서, 단백질 A 매트릭스는 정제되는 샘플을 접촉시키기 위해 사용될 수 있다. 한 실시양태에서, 단백질 A 매트릭스는 직경이 1000 내지 5000 Å인 세공이 존재하는 다공성일 수 있다. 다른 실시양태에서, 단백질 A 매트릭스는 평균 직경이 3000 Å인 세공을 갖는다.

[0158] 일부 실시양태에서, 친화도 매트릭스는 사용 전에 세척하고 평형화된다. 예를 들어, 임의의 오염물을 제거하기 위해 친화도 매트릭스를 정제수로 세척할 수 있다. 일부 실시양태에서, 친화도 매트릭스를 3 내지 10 컬럼 부피의 정제수로 세척할 수 있다. 다른 실시양태에서, 친화도 매트릭스를 5 컬럼 부피의 정제수로 세척할 수 있

다. 일부 실시양태에서, 친화도 매트릭스를 적어도 하나의 산성 버퍼로 세척할 수 있다. 예를 들어, 친화도 매트릭스를 1 내지 5 컬럼 부피의 20 mM HCl (pH 1.5)로 세척할 수 있다. 다른 실시양태에서, 친화도 매트릭스를 3 컬럼 부피의 20 mM HCl (pH 1.5)로 세척한다.

[0159] 또한, 친화도 매트릭스를 적어도 하나의 추가의 버퍼, 예를 들어 6 M 구아니딘·HCl로 세척할 수 있다. 친화도 매트릭스를 샘플과 접촉시키기 전에, 매트릭스를 약염기성 또는 중성 pH 버퍼로 평형화시킬 수 있다. 한 실시양태에서, 친화도 매트릭스는 pH 7.5의 2 내지 8 컬럼 부피의 버퍼로 평형화시킬 수 있다. 다른 실시양태에서, 친화도 매트릭스는 200 mM NaCl 및 0.01% 트윈®

-80을 함유하는 5 컬럼 부피의 10 mM 인산나트륨 버퍼 (pH 7.5)로 평형화시킬 수 있다. 본원에 기재된 인산나트륨 버퍼는 일염기성 및 이염기성 인산나트륨의 혼합물로부터 제조될 수 있다. 적정 비율로 혼합될 때, 상기 용액은 pH 4 내지 pH 10의 포스페이트 버퍼를 생성시킬 수 있다.

[0160] 친화도 매트릭스에 대한 접촉을 통해 정제 또는 분리되는 샘플에는 큰 입자형 물질이 실질적으로 없어야 한다. 그러한 입자형 물질은 다양한 방식, 예를 들어 원심분리 또는 여과에 의해 제거될 수 있다. 다른 실시양태에서, 본원에 기재된 조건화된 배양 상등액 (CCS)은 친화도 매트릭스와 접촉하기 전에 실질적으로 큰 입자형 물질이 없도록 만들어진다. 또 다른 실시양태에서, CCS는 입자형 물질을 제거하기 위해 여과된다. 적절한 공극 크기를 갖는 필터, 예를 들어 평균 직경이 1 μm 인 공극을 갖는 필터 또는 평균 직경이 0.75 μm 인 공극을 갖는 필터 또는 평균 직경이 0.5 μm 인 공극을 갖는 필터 또는 평균 직경이 0.22 μm 인 공극을 갖는 필터, 또는 평균 직경이 0.1 μm 인 공극을 갖는 필터를 사용할 수 있다.

[0161] 친화도 매트릭스를 정제 또는 분리시킬 샘플을 함유하는 용액과 접촉시키기 전에, 적어도 하나의 미생물 오염물, 예를 들어 박테리아, 바이러스, 및 기생충을 불활성화시키기 위해 용액을 세제로 처리할 수 있다. 한 실시양태에서, CCS에는 적어도 하나의 미생물 오염물을 불활성화시키기 위해 세제가 보충된다. 한 실시양태에서, 세제는 트리톤®

X-100이다. 정제 또는 분리시킬 샘플을 함유하는 용액에 첨가된 세제의 농도는 특정 정제 방식의 필요성을 충족시키도록 상이할 수 있다. 한 실시양태에서, 정제 또는 분리시킬 샘플을 함유하는 용액은 10% 세제를 포함할 수 있다. 다른 실시양태에서, 정제 또는 분리시킬 샘플을 함유하는 용액은 7% 세제를 포함할 수 있다. 한 실시양태에서, 정제 또는 분리시킬 샘플을 함유하는 용액은 5% 세제를 포함할 수 있다. 한 실시양태에서, 정제 또는 분리시킬 샘플을 함유하는 용액은 3% 세제를 포함할 수 있다. 한 실시양태에서, 정제 또는 분리시킬 샘플을 함유하는 용액은 2% 세제를 가질 수 있다. 한 실시양태에서, 정제 또는 분리시킬 샘플을 함유하는 용액은 1% 세제를 포함할 수 있다. 한 실시양태에서, 정제 또는 분리시킬 샘플을 함유하는 용액은 0.5% 세제를 포함할 수 있다. 한 실시양태에서, 정제 또는 분리시킬 샘플을 함유하는 용액은 0.1% 세제를 포함할 수 있다.

[0162] 친화도 매트릭스에 적용된 후에, 샘플은 예를 들어 샘플의 처리 또는 결합을 용이하게 하기 위해 목적하는 유속에서 처리될 수 있다. 임의의 유속이 이용될 수 있지만, 통상적인 유속은 1 내지 200 cm/h이다. 일부 실시양태에서, 샘플의 유속은 1 cm/h일 수 있다. 다른 실시양태에서, 샘플의 유속은 10 cm/h일 수 있다. 한 실시양태에서, 샘플의 유속은 25 cm/h일 수 있다. 한 실시양태에서, 샘플의 유속은 50 cm/h일 수 있다. 다른 실시양태에서, 샘플의 유속은 76 cm/h일 수 있다. 다른 실시양태에서, 샘플의 유속은 100 cm/h일 수 있다. 일부 실시양태에서, 샘플의 유속은 125 cm/h일 수 있다. 다른 실시양태에서, 샘플의 유속은 150 cm/h일 수 있다. 한 실시양태에서, 샘플의 유속은 175 cm/h일 수 있다. 한 실시양태에서, 샘플의 유속은 200 cm/h일 수 있다.

[0163] 친화도 매트릭스가 샘플 물질과 접촉한 후에, 비결합된 샘플 물질은 버퍼로 세척하여 제거될 수 있다. 한 실시양태에서, 친화도 매트릭스는 산성 pH의 버퍼로 세척하여 제거될 수 있다. 한 실시양태에서, 친화도 매트릭스는 중성 pH의 버퍼로 세척하여 제거될 수 있다. 한 실시양태에서, 친화도 매트릭스는 염기성 pH의 버퍼로 세척하여 제거될 수 있다. 다른 실시양태에서, 친화도 매트릭스는 200 mM NaCl 및 0.01% 트윈®

-80을 함유하는 5 내지 15 컬럼 부피의 10 mM 인산나트륨 버퍼 (pH 7.5)로 세척할 수 있다.

[0164] 비결합된 단백질을 세척에 의해 친화도 매트릭스로부터 제거한 후에, 친화도 매트릭스에 결합된 단백질은 친화도 매트릭스를 용출 버퍼로 세척함으로써 용출될 수 있다. 용출 버퍼는 관심있는 단백질, 예를 들어, 인간 IgM 항체와 매트릭스 사이의 상호작용은 파괴하지만, 관심있는 단백질을 변성시키거나 그 상태를 나쁘게 하지 않도록 조심스럽게 선택하여야 한다. 한 실시양태에서, 친화도 매트릭스는 관심있는 단백질을 용출시키기 위해 산성 pH의 버퍼로 세척될 수 있다. 한 실시양태에서, 친화도 매트릭스는 관심있는 단백질을 용출시키기 위해 중

성 pH의 버퍼로 세척될 수 있다. 한 실시양태에서, 친화도 매트릭스는 관심있는 단백질을 용출시키기 위해 염기성 pH의 버퍼로 세척될 수 있다. 일부 실시양태는 크로마토그래피 컬럼에 결합된 물질을 용출시키기 위해 인산나트륨 및 염화마그네슘을 갖는 버퍼를 포함하고, 여기서 컬럼으로부터 결합된 물질을 용출시키기 위해 10 컬럼 부피 이하의 상기 버퍼가 사용된다. 일부 실시양태에서, 친화도 매트릭스에 결합된 물질을 용출시키기 위해 5 내지 10 mM 인산나트륨 및 1 내지 5 M 염화마그네슘을 갖는 버퍼를 사용할 수 있다. 또 다른 실시양태는 친화도 매트릭스에 결합된 물질을 용출시키기 위해 5 mM 인산나트륨 및 3 M 염화마그네슘을 포함하는 3 컬럼 부피의 버퍼를 포함한다. 일부 실시양태에서, IgM은 3 M $MgCl_2$ 가 보충된 5 mM 인산나트륨 버퍼 (pH 6.8)를 사용하여 단백질 A 매트릭스로부터 용출될 수 있다.

[0165] 단백질, 예를 들어, IgM 항체 또는 항원-결합 단백을 이온-교환 크로마토그래피를 사용하여 정제 또는 분리하기 위한 방법을 본원에 개시한다. 단백질의 이온-교환 크로마토그래피는 일반적으로 크로마토그래피 컬럼을 평형화시키고, 샘플 용액을 컬럼의 매트릭스와 접촉시키고, 컬럼 내의 비결합된 물질을 세척하고, 목적하는 물질을 용출시키는 것을 포함하는 다단계 과정이다. 상기 전체적인 과정을 샘플의 순도를 증가시키기 위해 상이한 조건 하에서 필요에 따라 1회 이상 반복할 수 있다. 일부 실시양태에서, 양이온 교환 크로마토그래피 매트릭스는 아크릴아미드-덱스트란 공중합체 수지일 수 있다. 한 실시양태에서, 양이온 교환 크로마토그래피 매트릭스는 마크로캡™ SP 수지일 수 있다.

[0166] 일부 실시양태에서, 이온-교환 매트릭스는 사용 전에 세척하고 평형화된다. 예를 들어, 임의의 오염물을 제거하기 위해 이온-교환 매트릭스를 정제수로 세척할 수 있다. 일부 실시양태에서, 이온-교환 매트릭스를 1 내지 10 컬럼 부피의 정제수로 세척할 수 있다. 다른 실시양태에서, 이온-교환 매트릭스를 2 컬럼 부피의 정제수로 세척할 수 있다. 일부 실시양태에서, 이온-교환 매트릭스를 적어도 하나의 버퍼로 세척할 수 있다. 예를 들어, 이온-교환 매트릭스를 0.5 M NaOH를 갖는 1 내지 5 컬럼 부피의 버퍼로 세척할 수 있다. 다른 실시양태에서, 이온-교환 매트릭스를 0.5 M NaOH를 갖는 3 컬럼 부피의 버퍼로 세척할 수 있다. 일부 실시양태에서, 이온-교환 매트릭스를 2 M NaCl을 갖는 3 컬럼 부피의 버퍼로 세척할 수 있다. 이온-교환 매트릭스를 샘플과 접촉시키기 전에, 매트릭스를 산성, 염기성 또는 중성 pH 버퍼로 평형화시킬 수 있다. 한 실시양태에서, 이온-교환 매트릭스는 pH 6.8의 2 내지 8 컬럼 부피의 버퍼로 평형화시킬 수 있다. 한 실시양태에서, 이온-교환 매트릭스는 75 mM NaCl 및 0.01% 트윈®

-80을 함유하는 5 컬럼 부피의 10 mM 인산나트륨 버퍼 (pH 6.8)로 평형화시킬 수 있다.

[0167] 이온-교환 매트릭스에 대한 접촉을 통해 정제 또는 분리되는 샘플에는 큰 입자형 물질이 실질적으로 없어야 한다. 그러한 입자형 물질은 다양한 방식, 예를 들어 원심분리 또는 여과에 의해 제거될 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 조건화된 배양 상등액 (CCS)은 이온-교환 매트릭스와 접촉하기 전에 실질적으로 큰 입자형 물질이 없도록 만들어진다. 다른 실시양태에서, CCS는 입자형 물질을 제거하기 위해 여과된다. 임의의 공극 크기를 갖는 필터, 예를 들어 평균 직경이 1 μm 인 공극을 갖는 필터 또는 평균 직경이 0.75 μm 인 공극을 갖는 필터 또는 평균 직경이 0.5 μm 인 공극을 갖는 필터 또는 평균 직경이 0.22 μm 인 공극을 갖는 필터, 또는 평균 직경이 0.1 μm 인 공극을 갖는 필터를 사용할 수 있다.

[0168] 이온-교환 매트릭스를 정제할 샘플을 함유하는 용액과 접촉시키기 전에, 용액은 적어도 하나의 미생물 오염물, 예를 들어 박테리아, 바이러스, 및 기생충을 불활성화시키기 위해, 또는 표적 단백질을 가용형 상태로 유지하는 것을 돕기 위해 세제로 처리될 수 있다. 일부 실시양태에서, 샘플에는 적어도 하나의 미생물 오염물을 불활성화시키기 위해 또는 표적 단백질을 가용형 상태로 유지하는 것을 돕기 위해 세제가 보충될 수 있다. 한 실시양태에서, 세제는 트리톤®

X-100이다. 한 실시양태에서, 세제는 트윈®

-80이다. 정제 또는 분리시킬 샘플을 함유하는 용액에 첨가된 세제의 농도는 특정 정제 방식의 필요성을 충족시키도록 상이할 수 있다. 한 실시양태에서, 정제 또는 분리시킬 샘플을 함유하는 용액은 10% 세제를 포함할 수 있다. 한 실시양태에서, 정제 또는 분리시킬 샘플을 함유하는 용액은 7% 세제를 포함할 수 있다. 한 실시양태에서, 정제 또는 분리시킬 샘플을 함유하는 용액은 5% 세제를 포함할 수 있다. 한 실시양태에서, 정제 또는 분리시킬 샘플을 함유하는 용액은 3% 세제를 포함할 수 있다. 한 실시양태에서, 정제 또는 분리시킬 샘플을 함유하는 용액은 2% 세제를 가질 수 있다. 한 실시양태에서, 정제 또는 분리시킬 샘플을 함유하는 용액은 1% 세제를 포함할 수 있다. 한 실시양태에서, 정제 또는 분리시킬 샘플을 함유하는 용액은 0.5% 세제를 포함할 수

있다. 한 실시양태에서, 정제 또는 단리시킬 샘플을 함유하는 용액은 0.1% 세제를 포함할 수 있다.

[0169] 이온-교환 매트릭스에 적용된 후에, 샘플은 예를 들어 샘플의 처리 또는 결합을 용이하게 하기 위해 목적하는 유속에서 처리될 수 있다. 임의의 유속이 이용될 수 있지만, 통상적인 유속은 1 내지 200 cm/h이다. 한 실시양태에서, 샘플의 유속은 1 cm/h일 수 있다. 한 실시양태에서, 샘플의 유속은 10 cm/h일 수 있다. 한 실시양태에서, 샘플의 유속은 25 cm/h일 수 있다. 한 실시양태에서, 샘플의 유속은 50 cm/h일 수 있다. 한 실시양태에서, 샘플의 유속은 76 cm/h일 수 있다. 다른 실시양태에서, 샘플의 유속은 100 cm/h일 수 있다. 한 실시양태에서, 샘플의 유속은 125 cm/h일 수 있다. 한 실시양태에서, 샘플의 유속은 150 cm/h일 수 있다. 한 실시양태에서, 샘플의 유속은 175 cm/h일 수 있다. 한 실시양태에서, 샘플의 유속은 200 cm/h일 수 있다.

[0170] 이온-교환 매트릭스가 샘플 물질과 접촉한 후에, 비결합된 샘플 물질은 버퍼로 세척하여 제거될 수 있다. 한 실시양태에서, 이온-교환 매트릭스는 산성 pH의 버퍼로 세척하여 제거될 수 있다. 한 실시양태에서, 이온-교환 매트릭스는 중성 pH의 버퍼로 세척하여 제거될 수 있다. 한 실시양태에서, 이온-교환 매트릭스는 염기성 pH의 버퍼로 세척하여 제거될 수 있다. 한 실시양태에서, 이온-교환 매트릭스는 10 mM 인산나트륨, 75 mM NaCl 및 0.01% 트윈®

-80을 함유하는 5 내지 15 컬럼 부피의 버퍼 (pH 6.8)로 세척할 수 있다.

[0171] 비결합된 단백질을 세척에 의해 이온-교환 매트릭스로부터 제거한 후에, 이온-교환 매트릭스에 결합된 단백질은 이온-교환 매트릭스를 용출 버퍼로 세척함으로써 용출될 수 있다. 용출 버퍼는 관심있는 단백질, 예를 들어, 인간 IgM 항체와 매트릭스 사이의 상호작용은 파괴하지만, 관심있는 단백질을 변성시키거나 그 상태를 나쁘게 하지 않도록 조심스럽게 선택하여야 한다. 한 실시양태에서, 이온-교환 매트릭스는 관심있는 단백질을 용출시키기 위해 산성 pH의 버퍼로 세척될 수 있다. 한 실시양태에서, 이온-교환 매트릭스는 관심있는 단백질을 용출시키기 위해 중성 pH의 버퍼로 세척될 수 있다. 한 실시양태에서, 이온-교환 매트릭스는 관심있는 단백질을 용출시키기 위해 염기성 pH의 버퍼로 세척될 수 있다. 일부 실시양태는 크로마토그래피 컬럼에 결합된 물질을 용출시키기 위해 인산나트륨 및 염화마그네슘을 갖는 버퍼를 포함하고, 여기서 컬럼으로부터 결합된 물질을 용출시키기 위해 10 컬럼 부피 이하의 상기 버퍼가 사용된다. 일부 실시양태에서, 이온-교환 매트릭스에 결합된 물질을 용출시키기 위해 5 내지 50 mM 인산나트륨 및 150 내지 500 M 염화나트륨을 갖는 버퍼를 사용할 수 있다. 또 다른 실시양태는 이온-교환 매트릭스에 결합된 물질을 용출시키기 위해 200 mM NaCl을 함유하는 10 mM 인산나트륨 버퍼를 포함하는 4 컬럼 부피의 버퍼를 포함한다. 일부 실시양태에서, IgM은 200 mM NaCl 및 0.01% 트윈®

-80을 함유하는 10 mM 인산나트륨 버퍼 (pH 6.8)를 사용하여 마크로캡™ SP 매트릭스로부터 용출될 수 있다.

[0172] 단백질, 예를 들어, IgM 항체 또는 항원-결합 단편을 히드록시아파타이트 크로마토그래피를 사용하여 정제 또는 단리하기 위한 방법을 본원에 개시한다. 단백질의 히드록시아파타이트 크로마토그래피는 일반적으로 크로마토그래피 컬럼을 평형화시키고, 샘플 용액을 컬럼의 매트릭스와 접촉시키고, 컬럼 내의 비결합된 물질을 세척하고, 목적하는 물질을 용출시키는 것을 포함하는 다단계 과정이다. 상기 전체적인 과정을 샘플의 순도를 증가시키기 위해 상이한 조건 하에서 필요에 따라 1회 이상 반복할 수 있다. 일부 실시양태에서, 히드록시아파타이트 크로마토그래피 매트릭스는 인산칼슘 매트릭스일 수 있다. 한 실시양태에서, 히드록시아파타이트 크로마토그래피 매트릭스는 CHI®

II 세라믹 히드록시아파타이트 (80 μm 비드 크기)일 수 있다.

[0173] 일부 실시양태에서, 히드록시아파타이트 매트릭스는 사용 전에 수화된다. 한 실시양태에서, 히드록시아파타이트 매트릭스는 각 1 mL의 목적하는 컬럼-층 부피에 대해 0.54 g의 건조 매트릭스를 사용하여 200 mM 인산칼슘을 포함하는 용액 (pH 9.0)으로 수화된다. 히드록시아파타이트 매트릭스를 샘플 매트릭스와 접촉시키기 전에 산성, 염기성, 또는 중성 pH 버퍼로 평형화시킬 수 있다. 한 실시양태에서, 히드록시아파타이트 매트릭스를 2 내지 8 컬럼 부피의 버퍼 (pH 6.8)로 평형화시킬 수 있다. 다른 실시양태에서, 히드록시아파타이트 매트릭스를 10 mM 인산나트륨, 100 mM NaCl 및 0.01% 트윈®

-80을 함유하는 5 컬럼 부피의 버퍼 (pH 6.8)로 평형화시킬 수 있다.

[0174] 히드록시아파타이트 매트릭스에 대한 접촉을 통해 정제 또는 단리되는 샘플에는 큰 입자형 물질이 실질적으로 없어야 한다. 그러한 입자형 물질은 다양한 방식, 예를 들어 원심분리 또는 여과에 의해 제거될 수 있다. 한

실시양태에서, 본원에 기재된 조건화된 배양 상등액 (CCS)은 히드록시아파타이트 매트릭스와 접촉하기 전에 실질적으로 큰 입자형 물질이 없도록 만들어진다. 한 실시양태에서, CCS는 입자형 물질을 제거하기 위해 여과된다. 임의의 공극 크기를 갖는 필터, 예를 들어 평균 직경이 1 μm 인 공극을 갖는 필터 또는 평균 직경이 0.75 μm 인 공극을 갖는 필터 또는 평균 직경이 0.5 μm 인 공극을 갖는 필터 또는 평균 직경이 0.22 μm 인 공극을 갖는 필터, 또는 평균 직경이 0.1 μm 인 공극을 갖는 필터를 사용할 수 있다.

[0175] 히드록시아파타이트 매트릭스를 정제할 샘플을 함유하는 용액과 접촉시키기 전에, 용액은 적어도 하나의 미생물 오염물, 예를 들어 박테리아, 바이러스, 및 기생충을 불활성화시키기 위해, 또는 표적 단백질을 가용형 상태로 유지하는 것을 돕기 위해 세제로 처리될 수 있다. 일부 실시양태에서, 샘플에는 적어도 하나의 미생물 오염물을 불활성화시키기 위해 또는 표적 단백질을 가용형 상태로 유지하는 것을 돕기 위해 세제가 보충될 수 있다. 한 실시양태에서, 세제는 트리톤®

X-100이다. 한 실시양태에서, 세제는 트윈®

-80이다. 정제 또는 단리시킬 샘플을 함유하는 용액에 첨가된 세제의 농도는 특정 정제 방식의 필요성을 충족시키도록 상이할 수 있다. 한 실시양태에서, 정제 또는 단리시킬 샘플을 함유하는 용액은 10% 세제를 포함할 수 있다. 한 실시양태에서, 정제 또는 단리시킬 샘플을 함유하는 용액은 7% 세제를 포함할 수 있다. 한 실시양태에서, 정제 또는 단리시킬 샘플을 함유하는 용액은 5% 세제를 포함할 수 있다. 한 실시양태에서, 정제 또는 단리시킬 샘플을 함유하는 용액은 3% 세제를 포함할 수 있다. 한 실시양태에서, 정제 또는 단리시킬 샘플을 함유하는 용액은 2% 세제를 가질 수 있다. 한 실시양태에서, 정제 또는 단리시킬 샘플을 함유하는 용액은 1% 세제를 포함할 수 있다. 한 실시양태에서, 정제 또는 단리시킬 샘플을 함유하는 용액은 0.5% 세제를 포함할 수 있다. 한 실시양태에서, 정제 또는 단리시킬 샘플을 함유하는 용액은 0.1% 세제를 포함할 수 있다.

[0176] 히드록시아파타이트 매트릭스에 적용된 후에, 샘플은 예를 들어 샘플의 처리 또는 결합을 용이하게 하기 위해 목적하는 유속에서 처리될 수 있다. 임의의 유속이 이용될 수 있지만, 통상적인 유속은 1 내지 200 cm/h이다. 한 실시양태에서, 샘플의 유속은 1 cm/h일 수 있다. 한 실시양태에서, 샘플의 유속은 10 cm/h일 수 있다. 한 실시양태에서, 샘플의 유속은 25 cm/h일 수 있다. 한 실시양태에서, 샘플의 유속은 50 cm/h일 수 있다. 한 실시양태에서, 샘플의 유속은 76 cm/h일 수 있다. 다른 실시양태에서, 샘플의 유속은 100 cm/h일 수 있다. 한 실시양태에서, 샘플의 유속은 125 cm/h일 수 있다. 한 실시양태에서, 샘플의 유속은 150 cm/h일 수 있다. 한 실시양태에서, 샘플의 유속은 175 cm/h일 수 있다. 한 실시양태에서, 샘플의 유속은 200 cm/h일 수 있다.

[0177] 히드록시아파타이트 매트릭스가 샘플 물질과 접촉한 후에, 비결합된 샘플 물질은 버퍼로 세척하여 제거될 수 있다. 한 실시양태에서, 히드록시아파타이트 매트릭스는 산성 pH의 버퍼로 세척하여 제거될 수 있다. 한 실시양태에서, 히드록시아파타이트 매트릭스는 중성 pH의 버퍼로 세척하여 제거될 수 있다. 한 실시양태에서, 히드록시아파타이트 매트릭스는 염기성 pH의 버퍼로 세척하여 제거될 수 있다. 한 실시양태에서, 히드록시아파타이트 매트릭스는 10 mM 인산나트륨, 100 mM NaCl 및 0.01% 트윈®

-80을 함유하는 5 내지 15 컬럼 부피의 버퍼 (pH 6.8)로 세척할 수 있다.

[0178] 비결합된 단백질을 세척에 의해 히드록시아파타이트 매트릭스로부터 제거한 후에, 히드록시아파타이트 매트릭스에 결합된 단백질은 히드록시아파타이트 매트릭스를 용출 버퍼로 세척함으로써 용출될 수 있다. 용출 버퍼는 관심있는 단백질, 예를 들어, 인간 IgM 항체와 매트릭스 사이의 상호작용은 파괴하지만, 관심있는 단백질을 변성시키거나 그 상태를 나쁘게 하지 않도록 조심스럽게 선택하여야 한다. 한 실시양태에서, 히드록시아파타이트 매트릭스는 관심있는 단백질을 용출시키기 위해 산성 pH의 버퍼로 세척될 수 있다. 한 실시양태에서, 히드록시아파타이트 매트릭스는 관심있는 단백질을 용출시키기 위해 중성 pH의 버퍼로 세척될 수 있다. 한 실시양태에서, 히드록시아파타이트 매트릭스는 관심있는 단백질을 용출시키기 위해 염기성 pH의 버퍼로 세척될 수 있다. 일부 실시양태는 히드록시아파타이트 컬럼에 결합된 물질을 용출시키기 위해 인산나트륨 및 염화나트륨을 갖는 버퍼를 포함하고, 여기서 컬럼으로부터 결합된 물질을 용출시키기 위해 10 컬럼 부피 이하의 상기 버퍼가 사용된다. 일부 실시양태에서, 히드록시아파타이트 매트릭스에 결합된 물질을 용출시키기 위해 150 내지 500 mM 인산나트륨 및 50 내지 200 M 염화나트륨을 갖는 버퍼를 사용할 수 있다. 한 실시양태에서, 히드록시아파타이트 매트릭스에 결합된 물질을 용출시키기 위해 100 mM NaCl을 함유하는 175 mM 인산나트륨 버퍼를 포함하는 4 컬럼 부피의 버퍼가 사용될 수 있다. 다른 실시양태에서, IgM은 CHT®

II 세라믹 히드록시아파타이트 매트릭스로부터 175 mM 인산나트륨, 100 mM NaCl 및 0.01% 트윈®

-80을 함유하는 버퍼 (pH 6.8)를 사용하여 용출될 수 있다.

- [0179] 사용되는 염, 염 농도, 사용되는 세제, 세제 농도, pH 등에 대해 상이한 조성의 버퍼가 본원에 기재된 방법을 실질적으로 수행하기 위해 사용될 수 있다. 따라서, 상기 변경은 제시된 개시내용의 범위 내에 있는 것으로 고려되고, 이는 독점적이거나 제한적인 것으로 의도되지 않는다.
- [0180] 실시양태 C1은 단백질을 포함하는 용액을 친화도 크로마토그래피 컬럼에 적용하고, 친화도 크로마토그래피 컬럼으로부터의 용출액을 양이온 교환 크로마토그래피 컬럼에 적용하고, 양이온 교환 크로마토그래피 컬럼으로부터의 용출액을 히드록시아파타이트 크로마토그래피 컬럼에 적용하고, 히드록시아파타이트 크로마토그래피 컬럼으로부터 용출액을 수득하는 것을 포함하는, 단백질을 정제 또는 분리하는 방법을 제공한다.
- [0181] 실시양태 C2는 친화도 크로마토그래피 컬럼이 단백질 A로 코팅된 적어도 하나의 기질을 포함하는 것인 실시양태 C1의 방법을 제공한다.
- [0182] 실시양태 C3은 단백질 A로 코팅된 적어도 하나의 기질이 다공성인 실시양태 C2의 방법을 제공한다.
- [0183] 실시양태 C4는 다공성 기질이 3000 Å의 세공을 포함하는 것인 실시양태 C3의 방법을 제공한다.
- [0184] 실시양태 C5는 단백질 A로 코팅된 적어도 하나의 물질이 단백질에 결합하는 것인 실시양태 C1의 방법을 제공한다.
- [0185] 실시양태 C6은 단백질 A로 코팅된 적어도 하나의 물질에 결합된 단백질이 염화마그네슘을 포함하는 용액으로 용출되는 것인 실시양태 C5의 방법을 제공한다.
- [0186] 실시양태 C7은 염화마그네슘을 포함하는 용액이 1 M 내지 5 M 염화마그네슘의 용액인 실시양태 C6의 방법을 제공한다.
- [0187] 실시양태 C8은 염화마그네슘을 포함하는 용액이 3 M 염화마그네슘의 용액인 실시양태 C6의 방법을 제공한다.
- [0188] 실시양태 C9는 단백질 A로 코팅된 적어도 하나의 물질에 결합되는 단백질이 항체인 실시양태 C5의 방법을 제공한다.
- [0189] 실시양태 C10은 항체가 IgM인 실시양태 C9의 방법을 제공한다.
- [0190] 실시양태 C11은 양이온 교환 크로마토그래피 컬럼이 아크릴아미드-텍스트란 공중합체 수지를 포함하는 것인, 실시양태 C1의 방법을 제공한다.
- [0191] 실시양태 C12는 아크릴아미드-텍스트란 공중합체 수지가 단백질에 결합하는 것인 실시양태 C11의 방법을 제공한다.
- [0192] 실시양태 C13은 아크릴아미드-텍스트란 공중합체 수지에 결합된 단백질이 10 mM 인산나트륨, 200 mM 염화나트륨 및 0.01% 폴리소르베이트 80을 포함하는 용액으로 용출되는 것인 실시양태 C12의 방법을 제공한다.
- [0193] 실시양태 C14는 아크릴아미드-텍스트란 공중합체 수지에 결합된 단백질이 항체인 실시양태 C13의 방법을 제공한다.
- [0194] 실시양태 C15는 항체가 IgM인 실시양태 C14의 방법을 제공한다.
- [0195] 실시양태 C16은 히드록시아파타이트 크로마토그래피 컬럼이 인산칼슘 수지를 포함하는 것인 실시양태 C1의 방법을 제공한다.
- [0196] 실시양태 C17은 인산칼슘 수지가 단백질에 결합하는 것인 실시양태 C16의 방법을 제공한다.
- [0197] 실시양태 C18은 인산칼슘 수지에 결합된 단백질이 175 mM 인산나트륨, 100 mM 염화나트륨, 및 0.01% 폴리소르베이트 80을 포함하는 용액으로 용출되는 것인 실시양태 C17의 방법을 제공한다.
- [0198] 실시양태 C19는 인산칼슘 수지에 결합된 단백질이 항체인 실시양태 C18의 방법을 제공한다.
- [0199] 실시양태 C20은 항체가 IgM인 실시양태 C19의 방법을 제공한다.
- [0200] 실시양태 C21은

- [0201] a. 단백질을 함유하는 용액을 단백질 A로 코팅된 적어도 하나의 기질을 포함하는 친화도 크로마토그래피 컬럼에 적용하고, 단백질 A로 코팅된 적어도 하나의 물질에 의해 결합된 임의의 단백질을 3M 염화마그네슘을 포함하는 용액으로 용출시키고;
- [0202] b. 친화도 크로마토그래피 컬럼으로부터의 용출액을 아크릴아미드-텍스트란 공중합체 수지를 포함하는 양이온 교환 크로마토그래피 컬럼에 적용하고, 아크릴아미드-텍스트란 공중합체 수지에 의해 결합된 임의의 단백질을 10 mM 인산나트륨, 200 mM 염화나트륨 및 0.01% 폴리소르베이트 80을 포함하는 용액으로 용출시키고;
- [0203] c. 양이온 교환 크로마토그래피 컬럼으로부터의 용출액을 인산칼슘 수지를 포함하는 히드록시아파타이트에 적용하고, 인산칼슘 수지에 의해 결합된 임의의 단백질을 175 mM 인산나트륨, 100 mM 염화나트륨 및 0.01% 폴리소르베이트 80을 포함하는 용액으로 용출시키는 것
- [0204] 을 포함하는, 단백질의 정제 또는 분리 방법을 제공한다.
- [0205] 다음 실시예는 본원에 기재된 실시양태를 보다 상세하게 설명하기 위해 제공된다. 실시예는 실시양태를 제한하는 것이 아니라 예시하도록 의도된다.
- [0206] 실시예 1
- [0207] CV-3-유래된 IgM의 GD-2 특이성
- [0208] 엡스타인-바아 바이러스 (HLP)로 형질전환된 인간 림프모세포의 풀 (Cahan, et al.)을 GD2-특이적 IgM 항체를 생산하는 능력에 대해 시험하였다. 세포를 RPMI 완전 배지 (10% 열-불활성화된 FBS, 1% L-Glu, 1% 항생제 (시그마 (Sigma)) 내에서 배양하였다. 폐 성장 배지를 계대배양 2 내지 4에서 수집하고, IgM 농도 및 GD2와의 반응성에 대해 분석하였다. HLP는 $2-5 \times 10^5$ 세포/mL의 배양액을 3일 동안 성장시킨 후 6-8 $\mu\text{g/mL}$ IgM (ELISA에 의해 정량된)을 생산하였다.
- [0209] HLP에 의해 생산된 IgM이 GD2에 특이적인지 결정하기 위해, 각각의 배양액으로부터의 폐 배지를 ELISA에 의해 분석하였다. 간단히 설명하면, 25 ng의 GD2, GD1a, GM2 또는 GM3을 함유하는 200 μl 의 에탄올을 증발시킴으로써, 강글리오시드를 ELISA 플레이트에 코팅하였다. 이어서, 플레이트를 차단하고, IgM-함유 세포 배양 배지 또는 인간 IgM의 결합을 통상적인 ELISA 절차에 따라 평가하였다. HLP로부터의 폐 배지 (8.1배 또는 14.2배 농축된)는 GD2-반응성 IgM을 함유하지만 (도 1A); 항체는 또한 강글리오시드 GD1a, GM2 및 GM3을 인식하였다 (도 1B). 이들 데이터는 HLP에 의해 생산된 IgM이 다가반응성을 나타낸다.
- [0210] HLP에 의해 생산된 IgM이 흑색종 세포의 표면에 발현된 GD2에 결합할 수 있는지 결정하기 위해, FACS 분석을 수행하였다. 간단히 설명하면, 1205LU 세포 (그의 표면에 GD2를 발현하는 인간 흑색종 세포주)를 HLP 배양액으로부터의 폐 배지와 함께 인큐베이팅하고, 세척한 후, 2차 항체 FITC-염소-항-인간 Ig (잭슨 래보라토리스 (Jackson Laboratories))로 표지하였다. 도 2에 도시된 바와 같이, HLP의 매우 초기 계대배양 (계대배양 2)로부터의 배양 배지만이 세포 표면 GD2를 인식할 수 있는 IgM을 생산하였다 (도 2B). 그러나, 상기 활성화는 HLP를 수주 동안 계대배양한 후 빠르게 상실되었다 (도 2C). 이들 결과는 특이적 GD2-반응성 IgM을 생산하는 세포가 HLP에서 저성장 세포 (slow grower)이고, 비-생산자 또는 비특이적 항체 생산자에 의해 빠르게 과피화되거나, 또는 상기 IgM의 생산이 안정적이지 않음을 제한한다. 귀 항-GD2 IgM 항체 MA8-126 (ATCC# HB-8568™)을 양성 대조군으로서 사용하였고, 이는 강건한 GD2-특이적 결합을 나타냈다 (도 2D).
- [0211] 실시예 2
- [0212] HLP로부터 유래된 하이브리도마는 GD2-양성 세포 상에 CDC 활성을 매개하는
- [0213] GD-2 특이적 IgM을 생산한다.
- [0214] 항-GD2 특이적 IgM을 생산하는 EBV-무효(nu11) 하이브리도마 세포주를 생성하기 위해, HLP의 초기 계대배양으로부터 세포를 융합 파트너 A6 (ATCC CRL-8192) 또는 K6H6/B5 (ATCC CRL-1823)와 융합시켜 하이브리도마를 형성하였다. HLP에서 GD2-특이적 서브클론의 명백하게 낮은 풍부도로 인해, 80,000개의 클론을 GD2-특이적 ELISA에 의해 스크리닝하였다. 이들 하이브리도마 세포주로부터의 항체 제제의 대략 5-10%가 양성 GD2 반응성을 보였다. 그러나, 90% 초과인 GD2 양성 클론은 강글리오시드의 패널 (GD1, GM2 및 GM3)을 사용하여 특이성에 대해 스크리닝할 때 다수 강글리오시드에 반응성을 보였다 (도 3A - 클론 5D7 및 10B4). 또한, 대다수의 다가반응성 항체는 비-관련 대조 단백질의 패널에 교차 반응성이었다 (데이터를 제시하지 않음). 이들 결과는 GD2-특이적 IgM을 생산하는 림프모세포가 HLP에서 희귀함을 제한한다.

- [0215] 서브클로닝 및 스크리닝을 통해 GD2-특이적 IgM-생산 하이브리도마 세포주를 단리하였다. 2종의 GD2 특이적 하이브리도마 세포주, 3B2 및 1470이 단리되었다. 두 세포주의 배양액을 0.3-0.4e⁶/mL의 세포의 접종 밀도로 접종하고, 3 내지 4일마다 나누어, 페 배지 내에 3-8 µg/mL의 IgM을 얻었다. 강글리오시드-특이적 ELISA로 GD2와 만 양성 반응성이고 3종의 대조군 강글리오시드 (GD1a, GM2 및 GM3)에는 반응성이 없음을 밝혔고 (도 3A 및 B), 이는 이들 세포가 GD2-특이적 항체를 생산함을 제안한다. 또한, FACS 분석은 3B2 및 1470 항체를 사용하여 1205LU 인간 흑색종 세포의 양성 염색을 보여주었고, 이는 상기 항체가 세포 표면 상에서 GD2를 인식할 수 있음을 제안한다 (도 4). 클론 기원을 결정하기 위해 클론 3B2 및 1470의 분자 분석을 수행하였다. 경쇄 특이적 ELISA는 두 클론이 카파 경쇄를 함유하는 IgM을 분비하였음을 보여주었다 (데이터를 제시하지 않음). 이들 세포로부터 cDNA의 서열 분석으로 동일한 중쇄 및 경쇄 서열을 밝혔고, 이는 2가지 클론이 동일한 HLP 림프모세포 클론으로부터 유래하였음을 제안한다 (데이터를 제시하지 않음).
- [0216] 3B2 배양액으로부터 부분적으로 정제된 항체를 사용하여 GD2 발현 흑색종 세포주 상에서 보체-의존 세포독성 (CDC)을 매개하는 상기 항체의 능력을 평가하였고, 이는 상기 활성이 그의 항원에 결합할 때 항체가 취하는 입체형태에 크게 의존하기 때문이다 (Janeway et al., Immunobiology, 9-12 (5th ed. 2001)). 흑색종 표적 세포주 (GD2-양성 세포주 LF0023 및 M14, 및 GD2-음성 세포주 PM0496 및 JS0592)를 10% FBS, 2 mM L-글루타민, 비필수 아미노산, 및 6 µM HEPES를 보충한 RPMI1640 내에서 배양하고, 사용 전에 트립신을 사용하여 수거하였다. 표적 세포를 3B2 IgM-함유 상등액과 함께 20% 인간 혈청의 존재 하에 인큐베이팅하였다. 1시간 동안 37°C에서 인큐베이션 후에, 살아있는 세포를 셀 타이터 글로(Cell Titer Glo)[®]
- 시약 (프로메가 코프. (Promega Corp.; 미국 위스콘신주 매디슨))을 사용하여 확인하였다. 치사율 %를 처리된 세포 대 비처리된 세포로부터의 신호의 비로서 결정하였다. 도 5의 데이터는 3B2 클론에 의해 생산된 IgM이 특정 GD2 양성 흑색종 세포주 상에 강력한 CDC 반응을 유발할 수 있음을 제안한다.
- [0217] 클론 3B2 및 1470이 EBV로 감염되었는지 결정하기 위해, 분자 분석을 수행하였다. 6개의 PCR 프라이머 쌍 ((EBNA2-1141f (서열 45) 및 EBNA2-1440r (서열 46); EBV2001f (서열 47) 및 EBV2622r (서열 48); EBV1901F (서열 49) 및 EBV2822R (서열 50); EBV169461f (서열 51) 및 EBV170100r (서열 52); EBV169480f (서열 53) 및 EBV170080r (서열 54); EBV8491F (서열 55) 및 EBV9020r (서열 56))를 EBV 게놈의 존재 및 무손상성을 입증하기 위해 설계하였다. 프라이머 쌍 중 하나는 EBNA-2의 개방 해독 프레임을 증폭시키고; 2개의 중복 세트는 각각 EBV 게놈의 5' 및 3' 말단을 증폭시키고; 하나의 쌍은 복제 기점을 증폭시켰다. 초기에, 3B2 및 1470 클론은 모두 게놈 PCR에 의해 입증할 때 EBV 양성이었다 (데이터를 제시하지 않음). 그러나, 웰당 하나의 세포 미만으로 플레이팅하는 제한 희석에 의한 추가의 서브클로닝은 EBV-특이적 PCR 분석에 의해 결정할 때 EBV 게놈을 함유하지 않은 3B2 및 1470 세포주의 서브클론을 생성하였다 (데이터를 제시하지 않음).
- [0218] EBV-음성 3B2 서브클론 (AB527-HYB-3B2-EBVnu11)을 2008년 7월 16일자로 아메리칸 타입 컬처 컬렉션 (미국 버지니아주 20110-2209 매나사스 유니버시티 불리바드 10801)에 기탁하고, 기탁 번호 PTA-9376을 배정받았다. 원래의 하이브리도마는 인간 또는 마우스 J-사슬을 생산할 수 있으므로, 단일 형태의 면역글로불린 J-사슬을 생산한 클론을 확인하기 위해 AB527-HYB-3B2-EBVnu11 서브클론을 서브클로닝의 제2 라운드에 적용하였다. 단일 형태의 J-사슬을 갖는 클론, 또는 J-사슬-무효 클론을 확인하기 위해, 인간 J-사슬 (hu-285F (서열 57) 및 hu-418R (서열 58)), 또는 마우스 J-사슬 (m-230F (서열 59) 및 m-370R (서열 60))에 특이적인 프라이머를 사용하여 RT-PCR을 수행하였다. 결과는 3B2 서브클론인 AB527-HYB-3B2-3C9가 EBV 무효, 인간 J-사슬 무효, 쥐 J-사슬 양성이고, 대략 30 mg/L의 모노클로날 GD2-특이적 IgM을 정적 배양액 내에 분비함을 나타냈다.
- [0219] 실시예 3
- [0220] GD2-특이적 IgM을 발현하는 트랜스펙토마 (transfectoma) 세포주의 생산
- [0221] AB527-HYB-3B2-3C9 (EBV 무효, 인간 J-사슬 무효, 쥐 J-사슬 양성 하이브리도마)로부터 단리된 총 RNA를 cDNA로 역전사하고, 서열 33 및 35에 상응하는 프라이머를 사용하는 IgM 중쇄, 및 서열 36 및 38에 상응하는 프라이머를 사용하는 경쇄의 PCR 증폭을 위한 주형으로서 사용하였다. AB527-HYB-3B2-3C9로부터 증폭된 중쇄 뉴클레오타이드 서열은 서열 40의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드를 코딩하고, AB527-HYB-3B2-3C9로부터 증폭된 경쇄 뉴클레오타이드 서열은 서열 42의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드를 코딩한다. pEE6.4 (중쇄) 및 pEE14.4 (경쇄) (상기 두 벡터는 론자 바이올로지스 (Lonza Biologics) 글루타민 신타제 발현 시스템 (지에스 시스템 (GS System))의 일부로서 공급된다) 내로 앰플리콘의 클로닝을 용이하게 하기 위해 5' 및 3' 제한 엔도뉴클레아제 인식 부위를 도입하면서, 인간 리더 서열을 추가하기 위해 제2 라운드의 PCR 증폭을 수행하였다. IgM 중쇄의

제2 라운드 PCR 증폭은 서열 34 및 35에 상응하는 프라이머를 사용하여 수행한 한편, 경쇄 증폭에서는 서열 37 및 38에 상응하는 프라이머를 사용하였다.

[0222] PCR 증폭된 경쇄 cDNA는 HindIII 및 EcoRI로 소화시키고, 유사하게 절단된 pEE14.4 내로 라이게이팅하는 한편, 중쇄 cDNA는 HindIII 및 MfeI로 소화시키고, HindIII 및 EcoRI로 소화시킨 pEE6.4 내로 라이게이팅하였다 (MfeI 및 EcoRI는 적합한 "점착성 (sticky)" 단부를 생성시킨다). 중쇄 및 경쇄의 뉴클레오티드 서열의 확인 후에, 중쇄 발현 카세트를 NotI/PvuI 단편으로서 pEE14.4-AB527-LC 내로 도입하여 최종 발현 벡터 pEE14.4-AB527-LC-HC (p0311)를 제작하였다 (도 6). pEE14.4는 글루타민 신타제 미니 유전자를 함유하는 10 Kb 벡터이고, GS 억제제 L-메티오닌 술폭시민 (MSX)의 존재 하에 안정한 형질감염체의 선택을 허용한다. 상기 벡터 내의 cDNA 삽입물의 전사는 인간 CMV 최조기 프로모터에 의해 전사되고, cDNA 삽입물의 상류에는 인트론 1을 함유하는 hCMV-MIE 5' 비번역된 구역이 있고, cDNA 삽입물의 하류에는 전사체의 효율적인 폴리아데닐화를 허용하는 SV40 폴리아데닐화 신호가 있다 (도 7).

[0223] CHO 세포를 선형화된 이중-유전자 벡터 p0311로 전기천공에 의해 형질감염시켜, 제조함 GD2-특이적 IgM의 발현을 허용한다. 형질감염 후에, 세포를 투석된 태소 혈청 (dFBS) 및 글루타민 신타제 보충물을 함유하는 비-선택 배지를 사용하여 96-웰 플레이트 내에 플레이트하였다. 다음날, dFBS, 글루타민 신타제 보충물 및 MSX (10 μ M 최종 농도)를 함유하는 선택 배지를 각각의 웰에 첨가하여, 발현 벡터를 함유하는 세포의 선택을 가능하게 하였다. 단일 형질감염된 세포로부터 온 것으로 인지되는 콜로니만을 계속 사용하였다.

[0224] 형질감염체를 인간 IgM의 존재에 대해 ELISA에 의해 스크리닝하였다. 콜로니를 혈청-함유 선택 배지 내에서 팽창시키고, 생존하는 콜로니를 정량적 2차 분석에 의해 검사하여, 최고-생산 콜로니를 확인하였다. 최고-생산 형질감염체를 화학적으로 규정된 IS-CHO-CD™ 배지 (어빈 사이언티픽 (Irvine Scientific, 미국 캘리포니아주 산타아나)에 적응시키고, 2,500 세포/웰로 평저 96 웰 플레이트 (80 플레이트)에서 10 μ M MSX를 함유하는 배지 내에 접종하였다. 약물-내성 콜로니를 ELISA에 의해 IgM 생산에 대해 분석하였다. IgM 생산에 대해 양성인 콜로니를 증가시키고, 후속적인 2차 (6 웰) 및 3차 (20 mL 진탕 플라스크) 분석으로 항체 생산성에 대해 분석하였다. 이에 의해 IgM-생산 CHO-K1SV 트랜스펙토마 클론인 127C8을 확인하였다. 127C8 클론은 J-사슬을 발현하지 않고, 따라서, 상기 세포주에 의해 생산된 제조함 AB527 IgM은 J-사슬-결핍성이다. AB527의 중쇄 및 경쇄의 아미노산 서열을 각각 서열 40 및 42에 나타낸다.

[0225] 실시예 4

[0226] AB527은 시험관 내에서 GD2에 특이적으로 결합한다.

[0227] 제조함 AB527이 시험관 내에서 정제된 GD2에 결합할 수 있는지 결정하기 위해 몇 가지 실험을 수행하였다. 처음에, 제조함 AB527이 GD2에 결합할지 결정하기 위해서뿐만 아니라 GM2 또는 GD3에 대한 친화도를 보였는지 결정하기 위해, 표면 플라스몬 공명 실험을 수행하였다 (도 8). 실험은 다음과 같이 수행하였다: 30% 에탄올을 함유하는 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA (HBS-E) 내의 GD2 (바이오디자인 (BioDesign)), GD3 (하이테스트 (HyTest)), 및 GM2 (유에스바이올로지칼 (USBiological))의 0.3 mg/mL 용액 40 μ l을 BIAcore 3000 기구를 사용하여 각각 CM5 칩의 유동 셀 2, 3 및 4 위로 5 μ l/분의 유속으로 주입하였다. 안정한 기준선이 달성될 때까지, 각각의 강글리오시드의 고정 후에 20 μ l 10 mM NaOH의 5회 반복 주사를 수행하였다. 이어서, HBS-E 버퍼 내의 200 nM 제조함 AB527 80 μ l을 4개의 모든 유동 셀 위로 (유동 셀 1은 참조 유동 셀로서 사용됨) 20 μ l/분의 유속 주입하였다. 제조함 AB527의 해리는 6분 동안 이어졌다. 칩 표면은 50 μ l의 10 mM NaOH를 사용하여 재생하였다.

[0228] AB527의 결합 운동학의 특성을 보다 잘 결정하기 위해, BIAcore CM5 칩 상에 고정된 AB527 및 GD2의 연속 희석액을 사용하여 추가의 표면 플라스몬 공명 실험을 수행하였다. 간단히 설명하면, 800 nM에서 출발하여 AB527의 2배 연속 희석액을 상기한 GD2-함유 CM5 칩 위로 20 μ l/분의 유속으로 HBS-E 버퍼 내에서 주입하였다. 칩 표면은 각각의 사이클 사이에 50 μ l의 10 mM NaOH를 사용하여 재생하였다. 각각의 농도에서 평형 결합 (R_{eq})을 BIAevaluation 소프트웨어에서 시험된 각각의 농도에 대해 결정한 후, R_{eq} 대 농도의 플롯을 작성하였다. 생성되는 데이터를 그래프패드 프리즘(GraphPad Prism)®

소프트웨어를 사용하여 비-선형 항정 상태 (steady-state) 결합 모델에 피팅하였다. R_{eq} 가 AB527 농도의 함수로서 플로팅될 때, 항정 상태 K_D 또는 최대 결합의 1/2이 달성될 때 AB527의 농도를 결정할 수 있다 (도 9).

GD2에 결합하는 AB527에 대해 항정 상태 K_D 값은 4.5×10^{-9} M이다.

[0229] 제조합 AB527의 특이성을 박층 크로마토그래피 (TLC)에 의해 분리된 다양한 강글리오시드를 면역염색함으로써 또한 시험하였다. 다음 강글리오시드를 면역 TLC 분석에서 사용하였다: GM 믹스 (매트레야 (Matreya), 에탄올 중 0.5 mg/mL은 GM1, GM2, 및 GM3을 함유한다), GD 믹스 (매트레야, 에탄올 중 0.5 mg/mL은 GD1a, GD1b 및 GD3을 함유한다), GM4 (매트레야, 에탄올 중 1 mg/mL), GD2 (바이오디자인, 에탄올 중 1 mg/mL), 및 GM3 (유에스 바이올로지칼, 에탄올 중 1 mg/mL). 총 2 μ L의 각각의 강글리오시드를 5x10 cm 실리카 TLC 플레이트 (이엠디 케미칼스, 인크. (EMD Chemicals, Inc.)) 상에 스폿팅하고, 58:37:8 비의 CHCl_3 , MeOH, 및 0.1 M CaCl_2 를 갖는 용액 내에서 발색시켰다. 1.36N H_2SO_4 중의 0.1% 오르시놀을 분무하고 100°C에서 가열함으로써, TLC 플레이트를 총 강글리오시드에 대해 염색하였다. 면역TLC 분석을 위해, 발색된 플레이트를 먼저 H_2O 중 0.1% 폴리이소부틸 메타크릴레이트로 처리한 후 건조시켰다. 이어서, 플레이트를 1시간 동안 1x 포스페이트-완충 염수 (PBS) 중 1% BSA로 차단시켰다. 이어서, 차단시킨 플레이트를 1% BSA를 함유하는 1x PBS 중의 2 μ g/mL AB527 내에서 4°C에서 철야 인큐베이팅하였다. 플레이트를 후속적으로 1x PBS로 세척한 후, 1% BSA를 함유하는 PBS 중의 1:4000으로 희석시킨 염소 항-인간 IgG/IgM-호스래디시 퍼옥시다제 (horseradish peroxidase) 접합체와 함께 인큐베이팅하였다. 플레이트를 세척하고, 결합된 항체는 플레이트를 0.3 mg/mL 4-클로로 1-나프톨 및 0.03% H_2O_2 내에서 인큐베이팅함으로써 검출하였다. 비교 염색 결과를 도 10에 제시한다.

[0230] 실시예 5

[0231] AB527은 GD2-발현 세포를 표지한다.

[0232] GD2-발현 흑색종 세포주를 특이적으로 표지하는 AB527의 능력을 평가하였다. GD2-양성 세포주: M14, M0023, M101, M18, M10-Vac, 및 PM0496, 및 GD2-음성 세포주: M21, M238, IMCD0023, MG1055를 10% FBS, 2 mM L-글루타민, 비-필수 아미노산, 및 6 μ M HEPES를 보충한 RPMI 1640 내에서 따로 배양하고, 트립신을 사용하여 수거하였다. 트립신 처리된 세포를 10 μ g/mL의 대조 IgM (인간 IgM, 피어스 (Pierce) cat# 31146) (컬럼 I) 또는 10 μ g/mL의 AB527 (컬럼 II)와 함께 1시간 동안 얼음 상에서 인큐베이팅하였다. 1x PBS로 3회 세척한 후, 세포를 10 μ g/mL FITC-표지된 염소 항 인간 Ig (H+L) 항체 (서던 바이오테크 (Southern Biotech, 미국 알라바마주 버밍햄))와 함께 1시간 동안 얼음 상에서 인큐베이팅한 후, 유동 세포측정 (각각 컬럼 I 및 II) 또는 광학 현미경 및 면역형광 현미경 분석 (각각 컬럼 III 및 IV)으로 처리하였다. 도 11에 도시된 바와 같이, AB527 표지된 세포는 그들의 표면 상에 GD2를 발현한다 (컬럼 II). 반대로, 검사된 세포주는 어느 것도 비-GD2-특이적 인간 IgM을 사용할 때 염색을 보이지 않았다 (컬럼 I). 면역형광 연구에서는 유동 세포측정 데이터와의 직접적인 상호관련성을 보여주었고 (컬럼 IV), 광학 현미경 영상을 또한 비교 목적을 위해 제시한다 (컬럼 III).

[0233] GD2-발현 세포주 M14, LLC-MK2, EL4 세포, 및 CHO-K1 세포 (음성 대조군)에 대한 AB527 결합을 평가하기 위해 세포-기반 ELISA를 수행하였고, 이것은 상응하는 스캐차드 분석을 수행하기 위해 데이터를 제공하였다. 도 12는 EL4 세포에 대한 스캐차드 데이터의 대표적인 세트를 제공한다. M14 및 LLC-MK2 세포에 대한 AB527 결합은 거의 동일한 것으로 결정되었다 (각각 0.13 ± 0.02 nM 및 0.15 ± 0.04 nM). EL4 세포에 대한 결합은 다소 더 낮았다 (0.93 ± 0.16 nM). 상기 차이는 M14 및 LLC-MK2에 비해 EL4 세포에서 관찰된 GD2의 현저하게 더 낮은 발현 때문일 수 있다 (데이터를 제시하지 않음). 이들 실험을 위해 M14, LLC-MK2, EL4, 및 CHO-K1 세포를 아메리칸 티슈 타입 컬렉션 (American Tissue Type Collection: ATCC, 미국 버지니아주 매나싸스)으로부터 입수하였다. M14, EL4, 및 CHO-K1 세포를 10% 태소 혈청을 보충한 RPMI 내에서 배양하였다. LLC-MK2 세포는 1% 말 혈청을 보충한 배배지 199 내에서 배양하였다. 세포를 1x PBS 내에 현탁시키고, 흑색의 U자형 미세역가 플레이트 (그레니어 (Grenier) cat. #665209)에 2.5×10^6 세포/웰로 첨가한 후, 1500 rpm에서 5분 동안 실온에서 펠렛화하였다. 상등액을 폐기하고, 세포를 20 μ g/mL에서 출발하여 2% BSA를 함유하는 PBS 내에 1:2로 연속 희석시킨 AB527을 함유하는 용액 내에 재현탁시켰다. 세포를 항체와 함께 1 hr 동안 실온에서 인큐베이팅하였다. 세포를 2% BSA 및 0.05% 트윈®

-20을 함유하는 PBS 200 μ L로 3회 세척하고, 1500 rpm에서 5분 동안 원심분리하여 세척 단계 사이에 세포를 수집하였다. 이어서, 세포를 1 μ g/mL 호스래디시 퍼옥시다제 접합된 염소 항-인간 IgG/IgM (잭슨 이뮤노리서치 (Jackson ImmunoResearch)) 및 2% BSA를 함유하는 PBS 용액 내에서 1 hr 동안 실온에서 인큐베이팅하였다. 세포를 위에서와 같이 세척하였다. 결합된 AB527은 스펙트라마क्स(SpectraMax)®

M5 멀티모델 플레이트 판독기 (몰레큘라 디바이시스(Molecular Devices)) 내에서 325 nm/420 nm의 여기/방출 파장으로 퀀타블루(QuantaBlu)TM 형광 기질 (피어스)을 사용하여 검출하였다. 비처리 데이터를 소프트맥스 프로(SoftMax Pro)[®]

(ver. 5.2)에서 플로팅하고, 4-파라미터 모델에 피팅하였다. 데이터 분석을 GraphPad Prism[®]

소프트웨어 (ver. 4.03)에서 수행하였다. 비-특이적 배경을 먼저 통제하고 (CHO-K1 세포에 대한 결합), 이어서 데이터를 스캐차드 분석에 의해 분석하였다.

[0234] AB527이 GD2를 발현하지 않는 흑색종 세포에 교차-반응성을 보이는지 결정하기 위해, 면역조직화학 (IHC) 실험을 수행하였다. 정제시킨 AB527, 및 비-특이적 인간 IgM (피어스 cat# 31146)을 제공된 지시에 따라 포스페이트-완충 염수 중 50:1 몰비의 비오틴화 시약 (EZ-LinkTM 술폰-NHS-LC-비오틴, 피어스 cat# 21335)에서 NHS 에스테르 결합 화학을 이용하여 비오틴화하고, 다양한 GD2-양성 (M14) 또는 GD2-음성 (MG1055, RPMI7951 및 JS0592) 세포주를 염색하기 위해 사용하였다. 간단히 설명하면, 각각의 흑색종 세포주를 챔버 슬라이드 상에 접종하고, 10% FBS, 2 mM L-글루타민, 비-필수 아미노산 및 6 μ M HEPES를 보충한 RPMI1640 내에서 철야 배양하였다. 세포를 1x PBS로 1회 세척하고, 포르말린-고정시켰다. 고정시킨 세포를 1 μ g/mL 비오틴화 AB527 또는 비오틴화 비특이적 인간 IgM (음성 대조군)과 함께 철야 인큐베이팅하고, 표지된 세포를 바이오제넥스 슈퍼 센시티브(BioGenex Super Sensitive)TM 링크-라벨(Link-Label) IHC 검출 시스템을 이용하여 검출하였다. 도 13A에 도시된 바와 같이, AB527은 GD2 양성 세포에 특이적으로 결합하고, GD2 음성 세포와 최소 교차반응성을 갖는 반면, 비-특이적 동위원소 대조 항체는 두 세포 종류를 염색시키지 않는다 (도 13B).

[0235] 종양 및 정상 조직 샘플을 사용하여 AB527의 결합 특징을 또한 평가하였다. AB527 및 비특이적 정상 인간 IgM (hIgM)을 코반스 리서치 프러덕츠 (Covance Research Products)에서 비오틴화하고, 찰스 리버 래보라토리스 (Charles River Laboratories)에서 IHC 연구를 위해 사용하였다. 인간 흑색종 암 세포, M14을 누드 (nude) 래트에 이식하여 이종이식 종양을 확립한 후, IHC 방법 개발을 위한 GD2 양성 대조군 조직으로서 사용하였다. 직접적인 아비딘-비오틴-페옥시다제 복합체 (ABC) 절차를 이용하는 예비 연구에서는 비오틴화 AB527 (도 14(b))을 사용할 때 M14 종양 절편의 양성 염색을 얻었지만, 비오틴화 hIgM (도 14(a))에서는 그렇지 않았다. 예상되는 바와 같이, 정상 인간 비장의 냉동절편 내의 림프구는 두 항체를 사용할 때 염색되지 않았다. 항체의 적정 후에, GLP 인간 조직 교차-반응성 연구를 위해 선택된 비오틴화 AB527 및 비오틴화 hIgM의 염색 농도를 3 및 15 μ g/mL로 설정하였다. 상기 방법을 이용하여, 35개의 정상 인간 조직 (조직당 3개 샘플/공여자)에서 AB527 결합을 결정하기 위해 연구를 수행하였다. 예상되는 바와 같이, 고친화도 막성 염색 (AB527의 보다 낮은 농도 - 3 μ g/mL에서 양성 세포 막 염색)이 M14 종양 절편에서 검출될 수 있었다. 표 2에 제시된 바와 같이, 고친화도 막성 염색은 식도 (3개 샘플 중 2개), 난관 (3개 샘플 중 1개), 및 요관 (3개 샘플 중 1개)의 상피 세포에서 및 및 태반 (3개 샘플 중 3개)의 탈락막 세포, 흉선 (3개 샘플 중 2개)의 망상 세포에서만 발견되었다. 다른 모든 조직은 고친화도 막성 염색을 보이지 않았다 (표 2).

표 2

정상 인간 조직에서 AB527 면역조직화학

조직	양성/총 (세포 종류)	조직	양성/총 (세포 종류)	조직	양성/총 (세포 종류)
부신	음성	간	음성	피부	음성
혈액 세포	음성	폐	음성	척수	음성
혈관	음성	림프절	음성	비장	음성
골수	음성	난소	음성	횡문근	음성
뇌 (피질)	음성	난관	1/3 (상피)	고환	음성
뇌 (소뇌)	음성	체장	음성	흉선	2/3 (망상 세포)
유방	음성	부갑상선	음성	갑상선	음성
눈	음성	말초 신경	음성	편도선	음성
식도	2/3 상피	뇌하수체	음성	요관	1/3 (상피)
GI 관	음성	태반	3/3 (탈락막 세포)	방광	음성
심장	음성	전립선	음성	자궁 (체부)	음성
신장	음성	타액선	음성	자궁 (경부)	음성

[0236]

[0237]

실시예 6

[0238]

AB527은 GD2를 발현하는 세포의 보체 의존성 세포독성을 용이하게 한다.

[0239]

AB527이 CDC를 매개하는지 결정하기 위해, 도 11에 대해 상기 설명된 흑색종 세포주를 AB527-HYB-3B2-3C9 클론 또는 AB527로부터 부분적으로 정제된 항체와 함께 인큐베이팅하였다. 표적 세포를 10% FBS, 2 mM L-글루타민, 비-필수 아미노산, 및 6 μ M HEPES를 보충한 RPMI1640 내에서 배양하고, 사용 전에 트립신을 사용하여 수거하였다. 표적 세포를 10 μ g/mL의 AB527 또는 AB527-HYB-3B2-3C9 클론 IgM과 함께 20% 인간 혈청의 존재 하에 인큐베이팅하였다. 1시간 동안 37°C에서 인큐베이션 후에, 살아있는 세포를 셀 타이터 글로®

시약 (프로메가 코프. (미국 위스콘신주 매디슨))을 사용하여 확인하였다. 치사율 %는 처리된 세포 대 비처리된 세포로부터의 신호의 비로서 결정하였다. 도 15의 데이터는 두 항체 모두 특정 흑색종 세포주 상에 강력한 CDC 반응을 유발할 수 있음을 보여주고, 여기서 AB527은 보다 큰 정도의 CDC를 지속적으로 유발한다. 본 실시예에 설명된 AB527을 사용한 실험 결과를 표 3에 요약한다.

표 3

AB527로 처리한 인간 흑색종 세포주의 FACS, 면역형광 현미경 및 CDC 분석의 비교.

세포주	AB527 FACS 염색	AB527 IHC	AB527-매개된 CDC 치사
M14	+	+	+
LF0023	+	+	+
M101	+	+	+
M18	+	+	+
M10VAC	+	+	+
M21	+/-	-	-
M238	-	-	-
PM0496	+	+	-
IMCD0023	+/-	-	-
MG1055	-	-	-

[0240]

[0241]

AB527이 보체의 존재 하에 GD2를 발현하는 세포의 CDC만을 용이하게 함을 보여주기 위해 추가의 작업을 수행하였다. 도 16에 도시된 바와 같이, AB527-매개된 CDC 활성은 GD2를 발현하지 않는 인간 종양 세포인 1205LU 세포와 반대로, 단지 보체 및 GD2-발현 세포, 예를 들어 M14 세포의 존재 하에 감지가능한 수준으로 발생한다.

[0242]

CDC를 유도하는 IgG1 이소형-스위칭된 AB527의 시험관내 능력을 평가하기 위해, AB527의 HindIII/BamHI 가변 구역 DNA 단편을 IgG1 불변 구역을 함유하는 HindIII/BamHI 소화된 pEE6.4 벡터 내로 인-프레임 (in-frame)으로 클로닝하였다. AB527 경쇄와의 공발현은 IgG1 버전의 AB527을 생산시켰다. M14 세포의 CDC를 매개하는 상기 항체의 능력을 도 17에 도시된 바와 같이 1-100 $\mu\text{g/mL}$ 에서 IgM 버전의 AB527에 비교하였다.

[0243]

J-사슬이 AB527-매개된 CDC에서 할 수 있는 역할을 평가하기 위해 연구를 또한 수행하였다. J-사슬을 갖는 AB527 IgM 분자를 생산하기 위해, J-사슬을 코딩하는 플라스미드 p0362를 CHOK1-SV 세포 내로 형질감염시키고, 안정한 J-사슬-발현 클로날 세포주를 생성하였다. 이어서, AB527 발현 플라스미드를 상기 세포주 내로 도입하여, AB527 및 J-사슬을 발현하는 클론을 생성하였다. 5.F2-JC, 5.F8-JC, 및 6.C3-JC로 명명한 3개의 클론을 단리하였다. 비-J-사슬 함유 버전의 AB527에 대한 그들의 상대적인 CDC 활성을 비교하기 위해, 항체를 동시에 정제하였다. 용량 반응 곡선을 도 18에 도시한다. AB527, 5.F2-JC, 5.F8-JC, 및 6.C3-JC에 대한 계산된 90% 유효 용량 (ED90)은 각각 1.21, 4.35, 2.52, 및 6.81 $\mu\text{g/mL}$ 이었다. J-사슬을 함유하는 IgM (5.F2-JC, 5.F8-JC, 및 6.C3-JC)는 J-사슬이 없는 AB527에 비해 CDC를 매개하는데 덜 효과적인 것으로 나타났다.

[0244]

실시예 7

[0245]

단백질 A 친화도 크로마토그래피에 의한 조건화된 배양 상등액으로부터 IgM의 포획

[0246]

컬럼을 CPG3000A-단백질 A 수지 (밀리포어 (Millipore))로 충전하였다. 1 mL의 수지가 76 cm/h의 유속에서 대략 8 mg의 IgM에 결합하는 것을 이해하여, IgM을 포획하기 위해 사용된 수지의 부피를 추정하였다 (표 4). 일단 컬럼을 목적하는 양의 수지로 로딩한 후, FPLC 장치에 연결시키고 5 컬럼 부피의 정제수; 3 컬럼 부피의 20 mM HCl (pH 1.5) (버퍼 A2); 및 3 컬럼 부피의 6 M 구아니딘·HCl (버퍼 A3)으로 세척하였다. 샘플을 로딩하기 전에, 컬럼을 200 mM NaCl 및 0.01% 트윈®

-80을 함유하는 10 mM 인산나트륨 버퍼 (pH 7.5) (버퍼 A1) 5 컬럼 부피로 평형화시켰다.

[0247]

조건화된 배양 상등액 (CCS)을 0.22 μm 멤브레인 필터를 통한 여과에 의해 청정화하였다. 여과된 CCS에 세제를 첨가하여, 1% 트리톤®

X-100 및 0.1% TNBP를 함유하는 용액을 생성시키고, 4°C에서 2시간 초과 동안 인큐베이션하였다. 세제-처리된 CCS를 평형화시킨 CPG3000A 단백질 A 컬럼에 적용하고, 76 cm/h의 유속으로 처리하였다. 비결합된 단백질을 10

컬럼 부피의 버퍼 A1으로 세척 제거한 후, IgM을 3 M MgCl₂를 보충한 5 mM 인산나트륨 버퍼 (pH 6.8) (버퍼 B)를 사용하여 컬럼으로부터 용출시켰다. 남아있는 결합된 단백질은 3 컬럼 부피의 버퍼 A2 및 3 컬럼 부피의 버퍼 A3을 적용함으로써 컬럼으로부터 제거하였다. 순도를 평가하기 위해, 단백질 A 컬럼에 적용된 세척-처리된 CCS (Load) 및 용출 후에 모아진 분획으로부터 수집된 AB527 (Elute)을 비교하는 환원 SDS-PAGE 겔을 수행하였다 (도 19 - 화살표는 IgM μ 사슬 (~70kD) 및 경쇄 (~25kD)를 가리킨다). 단백질 A 친화도 크로마토그래피는 도입 IgM의 $\geq 90\%$ 의 회수를 허용하였고, 이는 오염물이 실질적으로 없었다.

표 4

CPG3000A 단백질 A 수지에 의한 IgM의 동적 결합 능력. 변하는 부피의 AB527 함유 CCS를 10X25 mm CPG3000A 컬럼을 통해 상이한 선형 유속으로 통과시켰다. 컬럼 내로 로딩된 및 관통액 내에 존재하는 AB527의 농도는 HPLC 시스템 상에 피팅된 단백질 A 컬럼 (POROS A, 어플라이드 바이오시스템즈 (Applied Biosystems)) 상에서 결정된 공지의 IgM 표준물질에 대한 표준 곡선에 비교할 때 그들의 상대 농도를 결정함으로써 측정하였다. 각각의 관통액 내의 AB527 대 로딩된 항체의 양의 비를 각각의 주사에 대해 계산하여, 컬럼의 동적 결합 능력을 5% 및 10% IgM 돌파 (breakthrough)에서 결정하였다.

선형 유동 속도 (cm·hr ⁻¹)	동적 결합 능력(DBC) ¹ (mg AB527/L CPG3000A)		관통액 (FT) 중 AB527 (mg)	
	5% 돌파	10% 돌파	5% 돌파	10% 돌파
23	5780	6420	11559	12840
38	6869	7630	13737	15260
76	4395	5437	8789	10873
152	3126	3910	6252	7819

¹ DBC는 1.0 cm x 2.5 cm 층 (2 ml 층 부피) 상에서 결정하였다

[0248]

[0249]

실시예 8

[0250]

양이온 교환 크로마토그래피에 의한 조건화된 배양 상등액 오염물로부터 IgM의 분리

[0251]

오염물을 제거하기 위해, 버퍼 B 내에 현탁된 IgM을 프레프/스케일-TFF 1 카트리지 (밀리포어), 및 10배 부피의 10 mM 인산나트륨, 75 mM NaCl 함유 버퍼를 사용한 정용여과 (diafiltration)에 의해 농축시켰다. 정용여과는 약 200 mL/분의 유속으로 수행하였고, 여기서 도입구 압력을 20 PSI 미만으로 및 투과 유동을 약 60 mL/분으로 유지시켰다. 10% 트리톤®

X-100의 용액을 정용여과시킨 샘플에 첨가하여, 트리톤®

X-100의 1% 최종 농도를 생성하고, 샘플을 실온에서 1시간 동안 인큐베이팅하고, 0.2 μ m 멤브레인을 통해 여과하였다.

[0252]

양이온 교환 컬럼을 마크로캡™ SP 수지 (지이 헬스케어 (GE Healthcare))로 충전하였다. 1 mL의 수지가 76 cm/h의 유속에서 대략 9 mg의 IgM에 결합하는 것을 이해하여, IgM을 포획하기 위해 사용된 수지의 부피를 추정하였다 (도 20). 일단 컬럼을 목적하는 양의 수지로 로딩한 후, FPLC 장치에 연결하고, 2 컬럼 부피의 정제수; 3 컬럼 부피의 0.5 M NaOH (버퍼 A6), 및 3 컬럼 부피의 2 M NaCl로 세척하였다. 샘플을 로딩하기 전에, 컬럼을 10 mM 인산나트륨, 75 mM NaCl, 0.01% 트윈®

-80을 함유하는 버퍼 (pH 6.8) (버퍼 A4) 5 컬럼 부피로 평형화시켰다.

[0253]

정용여과시킨 샘플을 컬럼에 적용하고, 76 cm/h의 유속으로 처리하였다. 비결합된 단백질을 5 컬럼 부피의 버퍼 A4로 세척 제거한 후, 200 mM NaCl 및 0.01% 트윈®

-80을 함유하는 10 mM 인산나트륨 버퍼 (pH 6.8) (버퍼 C) 4 컬럼 부피를 사용하여 IgM을 컬럼으로부터 용출시켰다. 남아있는 결합된 단백질은 3 컬럼 부피의 버퍼 A6 및 3 컬럼 부피의 2 M NaCl을 적용함으로써 컬럼으로부터 제거하였다. 도 13A 및 B에 도시된 바와 같이, 관통액 물질은 주로 IgM 삼량체 및 이량체의 혼합물을 함유하였지만 (도 21A); 용출된 물질은 거의 독점적으로 오량체 IgM이었다 (도 21B). 양이온 교환 크로마토그래피에 의해, 오염물 및 불완전하게 조립된 IgM이 실질적으로 없는 오량체 IgM의 $\geq 95\%$ 수율을 제공하였다 (도 22).

[0254] 실시예 9

[0255] 히드록시아파타이트 크로마토그래피에 의한 조건화된

[0256] 배양 상등액 오염물로부터 IgM의 분리

[0257] CHT[®]

II 세라믹 히드록시아파타이트, 80 μ m 비드 크기 (바이오-라드 래보라토리스 (Bio-Rad Laboratories), #157-8100)를 사용하여 히드록시아파타이트 컬럼을 준비하였다. 1 mL의 수지가 76 cm/h의 유속에서 대략 20 mg의 IgM에 결합하고 상기 유속에서 컬럼 관통액에서 IgM의 5% 미만의 손실이 존재하는 것을 이해하여, IgM을 포획하기 위해 사용된 수지의 부피를 추정하였다. 목적하는 컬럼-층 부피 각 1 mL 당 0.54 g의 건조 매트릭스를 사용하여 매트릭스를 200 mM 인산칼륨 (pH 9.0)으로 수화시킴으로써 컬럼을 충전하였다. 수화된 매트릭스를 컬럼에 첨가하여, 이를 침전시킨 후, 수지를 10 mM 인산나트륨, 100 mM NaCl, 0.01% 트윈[®]

-80을 함유하는 버퍼 (pH 6.8) (버퍼 A8) 5 컬럼 부피로 평형화시켰다.

[0258] 오염물을 감소시키기 위해, 10 mM 인산나트륨, 200 mM NaCl, 0.01% 트윈[®]

-80 (pH 6.8) 내에 현탁시킨 IgM을 동등 부피의 0.01% 트윈[®]

-80으로 희석하고, 평형화시킨 컬럼에 첨가하였다. IgM 현탁액을 컬럼을 통해 76 cm/h의 유속으로 처리하였다. 컬럼을 10 컬럼 부피의 버퍼 A8로 세척하여 비결합된 물질을 제거하였다. 결합된 IgM을 100 mM NaCl 및 0.01% 트윈[®]

-80을 함유하는 175 mM 인산나트륨 버퍼 (pH 6.8) 4 컬럼 부피로 용출시켰다 (데이터를 제시하지 않음). 용출 후에, 남아있는 결합된 단백질은 100 mM NaCl을 함유하는 500 mM 인산나트륨 버퍼 (pH 6.8)를 사용하여 컬럼으로부터 제거하였다. 생성되는 IgM 용액은 오염물이 실질적으로 없었다. 히드록시아파타이트 매트릭스로부터 용출된 용액은 본원에 설명된 단백질 A 친화도 크로마토그래피 및 양이온 교환 크로마토그래피를 앞서 수행할 때 청정화된 세포 배양 상등액에 비해 99% 초과로 순수하였다.

[0259] 실시예 10

[0260] 강글리오시드-BSA 접합체의 생산

[0261] 면역분석에 의해 GD2 특이적 항체의 특이성을 검사하기 위해 효과적인 GD2 항원을 제공하도록 GD2-BSA 접합체를 제조하였다. 또한, GD2-BSA 결합 특이성에 대한 대조군으로서 역할을 하도록 GM2-BSA 및 GM3-BSA 접합체를 생산하였다. 공유 접합체는 순한 환원제로서 나트륨 시아노보로히드라이드를 사용하여 BSA 상에 존재하는 아민에 의한 강글리오시드의 부위 특이적 환원적 아민화에 의해 제조하였다. 결합을 BSA 내에 존재하는 라이신 잔기의 측쇄 상의 말단 ϵ -아미노기에 주로 일어나는 것으로 생각된다.

[0262] 접합체를 제조하기 위해, 0.05 M 카르보네이트-비카르보네이트 버퍼 (pH 9.6) 내에 용해시킨 BSA의 2 mg/ml 용액 400 μ l을 무수 에탄올에 용해시킨 GD2 (바이오디자인 인터내셔널 (Bioscience International), #A86168H), GM2 (엑소라 (Axxora), #ALX-302-005-M001), 또는 GM3 (엑소라, #ALX-302-003-M002)의 1 mg/ml 용액 500 μ l; 2070 μ l의 0.05 M 카르보네이트-비카르보네이트 버퍼 (pH 9.6); 및 10 mM 수산화나트륨의 5 M 나트륨 시아노보로히드라이드 용액 30 μ l과 합하였다. 반응 혼합물을 25°C에서 2시간 동안 인큐베이팅한 후, 1200 μ l의 1 M 에탄올아민 (pH 8.0)을 첨가하고, 25°C에서 추가로 15분 동안 인큐베이팅하였다. 반응 용액을 투석 튜브 (피어스 바이오테크놀로지 (Pierce Biotechnology), #68100)에 넣고, 1 L의 50 mM 탄산나트륨-중탄산나트륨 용액 (pH 9.6) 내에서 2-8°C에서 6-18시간 동안 2회 투석하였다.

[0263] 실시예 11

[0264] AB527은 BSA-접합된 GD2에 결합한다.

[0265] GD2-BSA 접합체의 항원성을 ELISA에 의해 평가하였다. 하나의 카르보네이트/비카르보네이트 캡슐 (시그마)을 100 mL 초순수에 용해시켜 ELISA 코팅 버퍼를 제조하였다. GD2-BSA 접합체를 ELISA 코팅 버퍼 내에 2 μ g/ml의 농도로 희석시키고, 96-웰 ELISA 플레이트 (그라이너 바이오원 (Greiner Bio-One) cat #655081)의 웰에 첨가하였다. 플레이트를 밀봉하고, 2-8°C에서 16-24시간 동안 인큐베이팅하였다. 인큐베이션 후에, 코팅 버퍼를

웰로부터 제거하고, 0.3 mL/웰의 ELISA 차단 용액 (2.5% BSA (w/v) 및 0.05% 트윈®

-20을 보충한 PBS)을 첨가하였다. 플레이트를 마이크로플레이트 진탕기 상에서 진탕하면서 2시간 동안 21-25℃에서 인큐베이팅한 후, AB527 항체를 첨가하였다. AB527의 2배 연속 희석액 (2 µg/ml의 초기 작업 농도)을 차단시킨 ELISA 플레이트에 첨가하고, 마이크로플레이트 진탕기 상에서 진탕하면서 21-25℃에서 1시간 동안 인큐베이팅하였다. 플레이트를 다이넥스 울트라워시(Dynex Ultrawash)™ 플레이트 세척기 상에서 0.3 mL/웰 ELISA 세척 버퍼를 사용하여 3회 세척하였다. 결합된 AB527은 ELISA 차단 버퍼 내에 1:10,000로 희석시킨 HRP-접합된 염소 항-인간 IgG + IgM (H+L)를 사용하여 검출하였다. HRP-접합체를 제거하고, 웰을 0.3 mL/웰 ELISA 세척 버퍼로 3회 세척하고, SureBlue™ TMB 기질 (50 µl/웰)을 세척한 웰에 첨가하고, 플레이트를 21-25℃에서 15분 동안 인큐베이팅한 후, AB527 결합을 광 흡수 (450 nm)에 의해 평가하였다 (도 23). 450 nm에서 비특이적 흡수는 AB527의 부재 하에 0.065인 것으로 결정되었다.

[0266] GD2-BSA 접합체와 반대로, AB527은 다른 강글리오시드-BSA 접합체를 인식하지 않았다. 강글리오시드 GM2 및 GM3을 GD2에 대해 설명된 방법에 의해 BSA에 접합시키고, 둘 모두 ELISA에 의해 AB527 결합을 유도하는 능력에 대해 평가하였다. 도 24에 도시된 바와 같이, AB527은 GD2-BSA 접합체만을 인식하였다. GM2-특이적 항체는 GM2-BSA 접합체를 검출할 수 있었지만; GM3-BSA 접합체의 항원 특성을 평가하기 위해 적절한 GM3-특이적 항체는 이용가능하지 않았음을 (데이터를 제시하지 않음) 알아야 한다.

[0267] 실시예 12

[0268] GIBCO-CD CHO 완전 배지에서 성장시킨 AB527-발현 세포에 대한 CMS의 효과

[0269] 세포 성장 및 항체 생산에 대한 배양 배지 보충물 (CMS)의 효과를 결정하기 위해, 세포를 부활시키고 진탕 플라스크 내에서 20 mL GIBCO-CD-CHO 완전 배지 내에서 배양하였다. 모든 배양액을 125 mL 진탕 플라스크 내에서 37℃, 5% CO₂, 120 rpm에서 인큐베이팅하였다. 접종 밀도는 >95% 생활력에서 3.5×10^5 세포/mL이었다. 세포를 CD-CHO 배지 내에서 또는 제3-7일에 2% (vol/vol) CMS를 보충한 CD-CHO 배지 내에서 14일 동안 배양하였다. 제7일에 CMS를 첨가한 후, 초기 배양액 부피의 총 10%를 CMS로 보충하였다. 생존가능한 세포 밀도 (도 25), 생활력 % (도 26), 및 통합 생존가능한 세포 밀도 (IVC) (도 27)를 CEDEX 자동화 세포 계수기를 사용하여 제0, 3, 5, 7, 10, 13, 및 14일에 결정하였다. 항체 생산은 각각의 군의 배양된 세포에 대해 제14일에 단백질 A HPLC에 의해 결정하였다 (도 28).

[0270] 도 25에 도시된 바와 같이, 제3 내지 7일에 2% CMS를 제공한 배양된 세포는 제7일에 12.8×10^6 세포/mL의 최대 생존가능한 세포 밀도를 달성하였다. CMS가 없는 대조 세포 배양액은 제7일에 10.7×10^6 세포/mL의 최대 세포 밀도에 도달하였다. CMS의 사용은 제한하는 배지 성분, 예를 들어 글루코스, 아미노산 및 비타민을 보충하고, 배양액이 보다 높은 세포 밀도에 도달하도록 돕는다. 두 세포 배양 조건 모두에서, 세포는 제7일까지 우수한 생활력 (>90%)을 유지하였지만 (도 26); 제3 내지 7일에 CMS를 제공한 배양된 세포는 제7일 후에 대조 배양액보다 더 우수한 생활력을 보였다. 일부 핵심 영양분이 제7일 후에 대조 배양액 내에서 결핍된 반면, CMS는 핵심 영양분을 다시 첨가하였고 세포가 더 우수한 생활력을 유지하도록 도운 것이 가능하다.

[0271] 제14일에, 총 항체 생산을 각각의 배양액에 대해 평가하였다. CMS를 사용하여 배양한 세포는 7240 mg/L의 최대 항체 역가에 도달하였고, 이것은 대조 배양액에 대해 관찰된 것 (3036 mg/L)보다 훨씬 더 높다 (도 28). 보다 높은 항체 역가는 영양분의 첨가 후에 보다 높은 특이적 항체 생산 속도의 결과일 수 있다. 각각의 성장 조건에 대한 세포 성장 및 항체 생산 프로필을 조사하면 CMS를 제공한 배양액이 항체 생산에서 140% 증가를 달성하였음을 입증하였다 (표 5). 배가 시간 (doubling time)은 두 배양액에 대해 동일하였지만, CMS는 배양액이 IVC에서 50% 개선 및 특이적 항체 생산 속도에서 또 다른 50% 증가를 달성하는 것을 도왔다. IVC에서 50% 개선은 CMS를 갖는 배양액 내에서 달성된 더 높은 최대 세포 밀도 때문이었다. 최종 항체 역가는 IVC x 특이적 생산 속도와 동일하므로, IVC 및 특이적 항체 생산 속도는 모두 CMS를 갖는 세포 배양액에서 항체 생산의 140% 증가에 기여한 것으로 제안되었다. 표 5는 AB527-발현 세포에 대한 CMS의 효과를 요약한다.

표 5

AB527-발현 세포의 세포 성장 및 항체 생산에 대한 CMS의 효과의 요약.

배양 조건	최대 생존가능한 세포 밀도 ($10^5/\text{mL}$)	최종 항체 역가 (mg/L)	배가 시간 (DT)	생존가능한 세포 밀도의 통합 (IVC) (세포·일/ mL)	특이적 항체 생산 속도 (Q_p) ($\text{mg}/10^9 \text{ 세포/일}$)
CD-CHO 대조군	107.00	3036	24.17	$6.85\text{E}+7$	44.08
CMS	128.40	7239.9	24.17	$1.04\text{E}+8$	66.95

[0272]

[0273] 실시예 13

[0274] GIBCO-CD CHO 완전 배지에서 성장된 AB527-발현 세포에 대한 발레르산의 효과

[0275] 세포 성장에 대한 발레르산의 효과를 결정하기 위해, AB527-발현 세포를 발레르산을 0 mM, 1 mM, 2 mM, 4 mM 또는 8 mM의 농도로 보충한 GIBCO-CD-CHO 완전 배지 내에서 배양하였다. 세포를 14일 동안 배양하고, 생존가능한 세포 밀도, % 생활력, 및 통합 생존가능한 세포 밀도를 CEDEX 자동화 세포 계수기를 사용하여 제0, 3, 5, 7, 10, 13, 및 14일에 결정하였다. 항체 생산은 각각의 군의 배양된 세포에 대해 제14일에 단백질 A HPLC에 의해 결정하였다.

[0276] 발레르산 없이 배양된 세포는 제7일에 10.8×10^6 세포/mL의 최대 세포 밀도를 달성하였지만; 발레르산과 함께 배양된 세포는 발레르산의 농도가 증가함에 따라 훨씬 더 느리게 성장하였다. 예를 들어, 8 mM 발레르산에서 배양된 세포는 제7일에 5.4×10^6 세포/mL의 최대 세포 밀도에 도달하였고, 이것은 모든 배양액 중 가장 낮은 최대 세포 밀도이다. 세포 생활력 연구에서는 발레르산과 함께 배양된 세포가 제7일 전에 더 낮은 생활력을 가졌고, 여기서 제7일의 최저 생활력 (67.4%)은 8 mM 발레르산에서 배양된 세포에 대해 관찰되었음을 입증하였다. 이들 결과는 보다 높은 농도의 발레르산이 세포 증식을 억제하였음을 나타낸다. 제7일 후에, 대조 배양액의 생활력은 훨씬 더 빨리 떨어졌지만; 상기 세포 배양액이 발레르산에서 배양된 것보다 훨씬 더 큰 세포 밀도를 가지므로, 이것은 아마도 핵심 영양분의 소비 때문이다 (표 6).

[0277] 그러나, 예상치 못하게, 발레르산은 항체 생산에 대한 양성 효과를 가졌다. 8 mM의 최고 농도를 제외하고는, 발레르산의 존재 하에 배양된 모든 세포는 제14일에 대조 배양액보다 더 높은 항체 역가를 가졌다. 1 mM 발레르산에서 배양된 세포는 제14일에 최고 항체 역가 (4137 mg/L)를 생산하였고, 이것은 대조 배양액의 것 (3036 mg/L)보다 36% 더 높다 (표 6).

[0278] 발레르산은 세포 성장을 억제하였지만, 8 mM의 최고 농도를 제외하고는 생존가능한 세포 밀도의 통합에 대해 유의한 음성 효과를 나타내지 않았다. 제14일에 IVC 값은 다른 4가지 배양 조건에 매우 유사하였다. 이것은 아마도 세포 증식에 대한 발레르산의 억제가 영양분의 소비를 보다 느리게 하고, 따라서, 대조 배양액에서는 접하게 되는 후기 영양분-결핍 배지를 피하기 때문이다.

[0279] 요약하면, 세포 배양액은 발레르산의 존재 하에 보다 우수한 항체 생산을 달성할 수 있다. 발레르산을 갖는 배양액에서 52 내지 $58 \text{ mg}/10^9$ 세포/일의 특이적 항체 생산 속도가 관찰되었고 (표 6), 이것은 대조 배양액에 대해 관찰된 $44 \text{ mg}/10^9$ 세포/일의 값보다 훨씬 더 높다. 따라서, 1 mM 발레르산에서 배양된 세포에 의해 달성된 최고 항체 생산은 주로 특이적 항체 생산의 증가 때문이었다 (표 6).

표 6

AB527-발현 세포의 세포 성장 및 항체 생산에 대한 발레르산의 효과의 요약.

배양 조건	최대 생존가능한 세포 밀도 (10 ⁵ /mL)	최종 항체 역가 (mg/L)	배가 시간 (DT)	생존가능한 세포 밀도의 통합 (IVC) (세포·일/mL)	특이적 항체 생산 속도 (Qp) (mg/10 ⁹ 세포/일)
CD-CHO 대조군	107.00	3036	24.17	6.85E+7	44.08
발레르산 (1 mM)	94.60	4137.1	24.17	6.74 E+7	58.44
발레르산 (2 mM)	81.00	3706.7	24.17	6.55 E+7	54.45
발레르산 (4 mM)	77.40	3600.1	24.17	6.72 E+7	52.24
발레르산 (8 mM)	54.40	2760.4	24.17	4.76 E+7	56.16

[0280]

수탁번호

[0281]

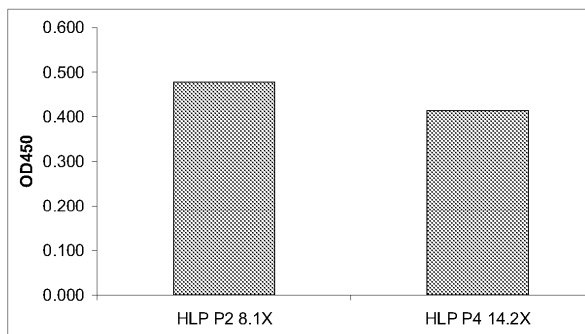
기탁기관명 : ATCC

수탁번호 : PTA-9376

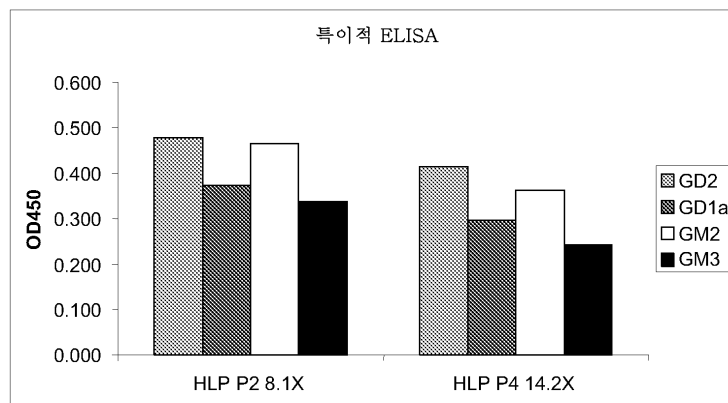
수탁일자 : 20080716

도면

도면1

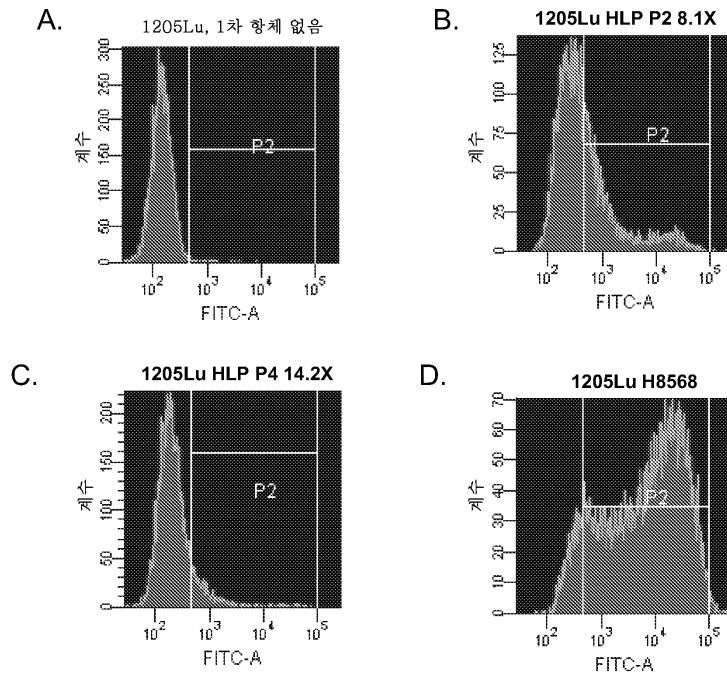


1A

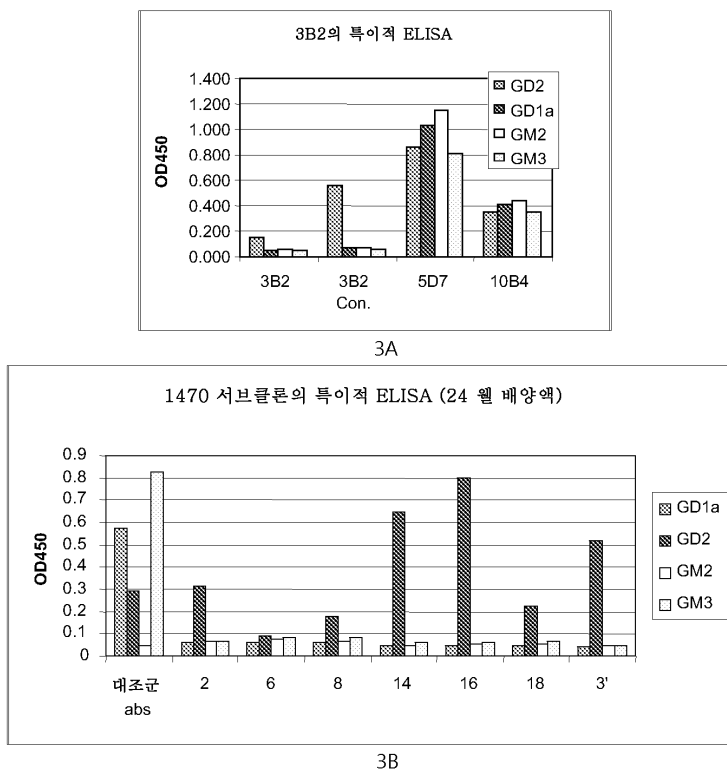


1B

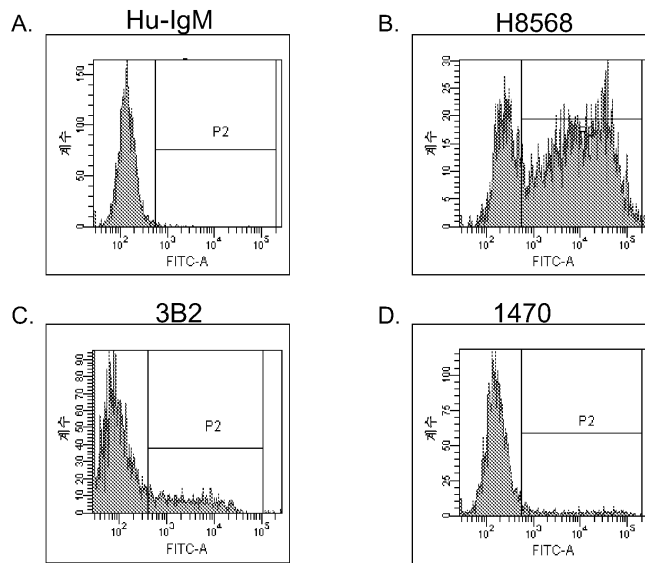
도면2



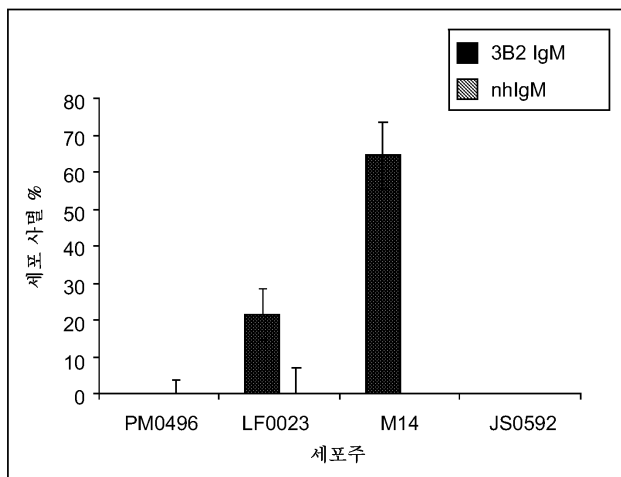
도면3



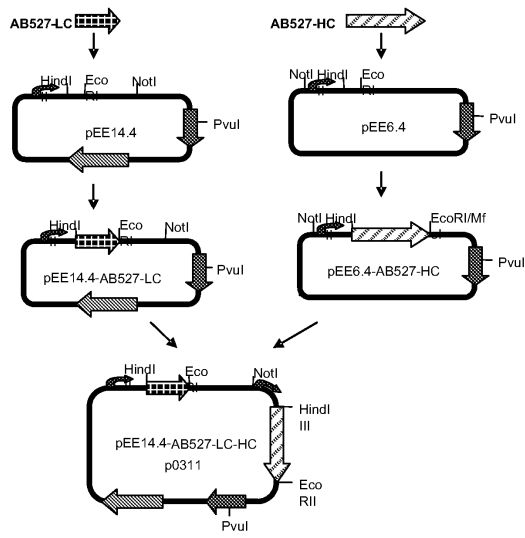
도면4



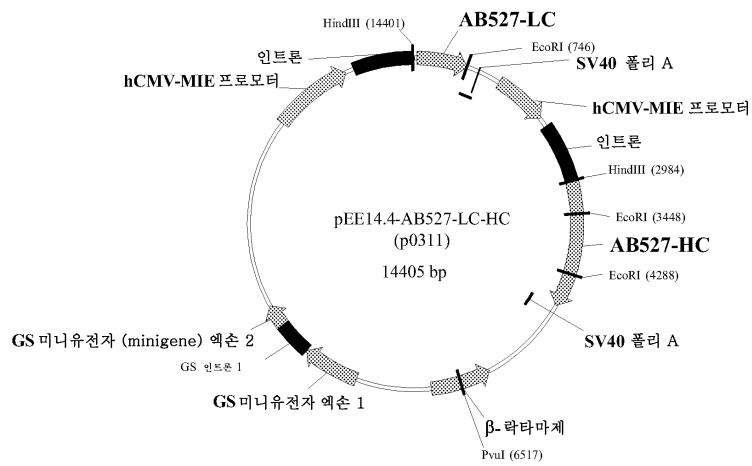
도면5



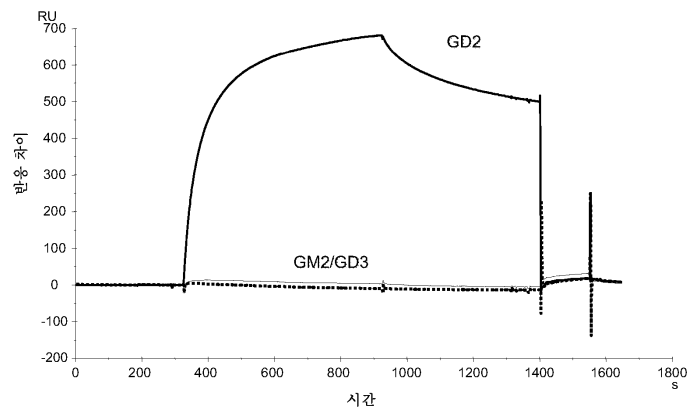
도면6



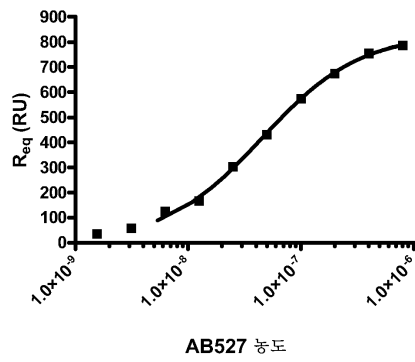
도면7



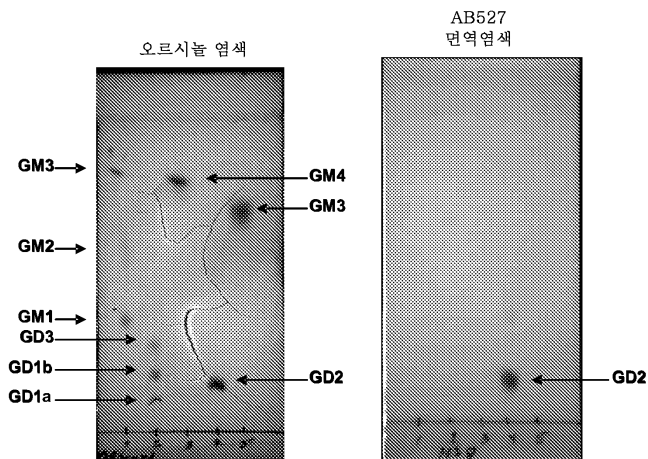
도면8



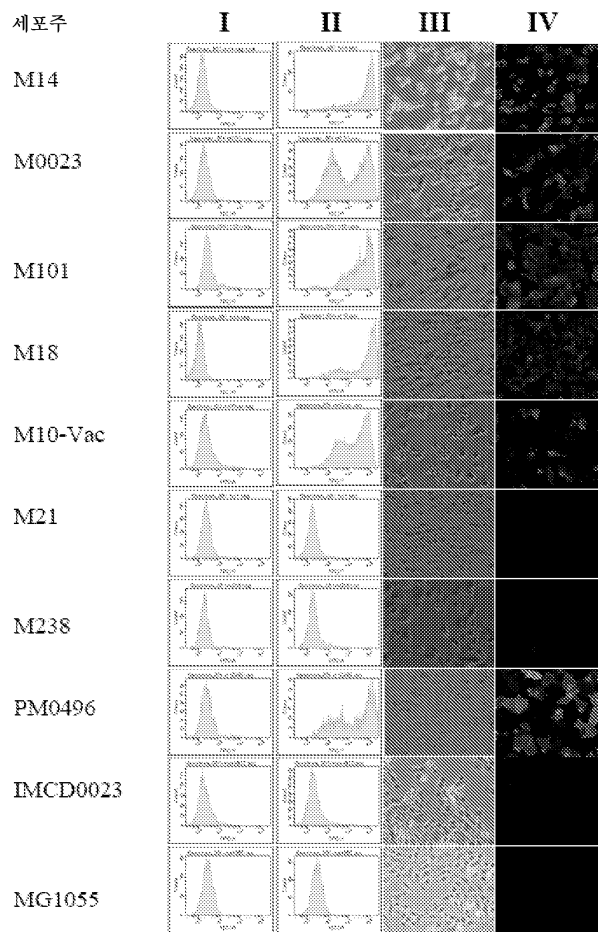
도면9



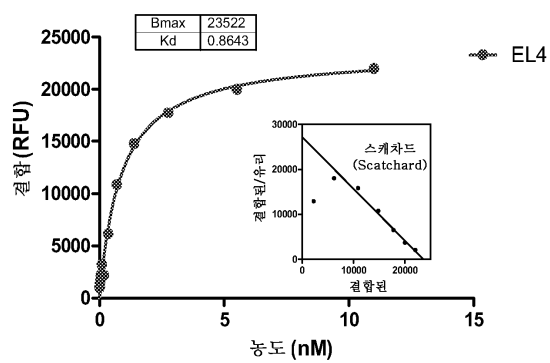
도면10



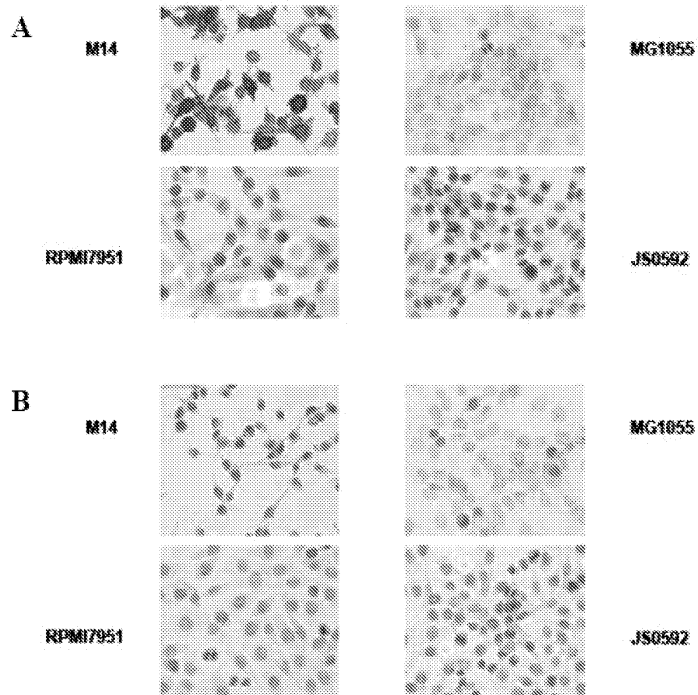
도면11



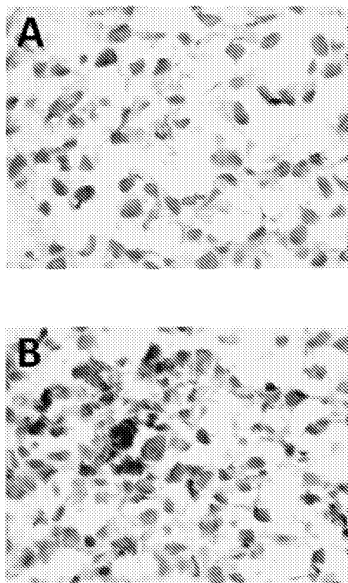
도면12



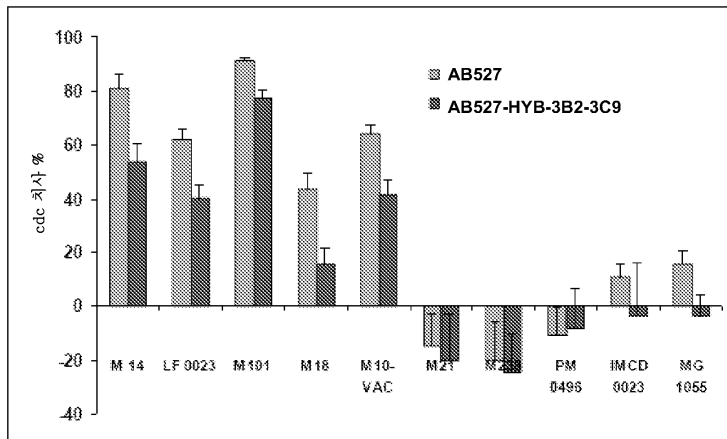
도면13



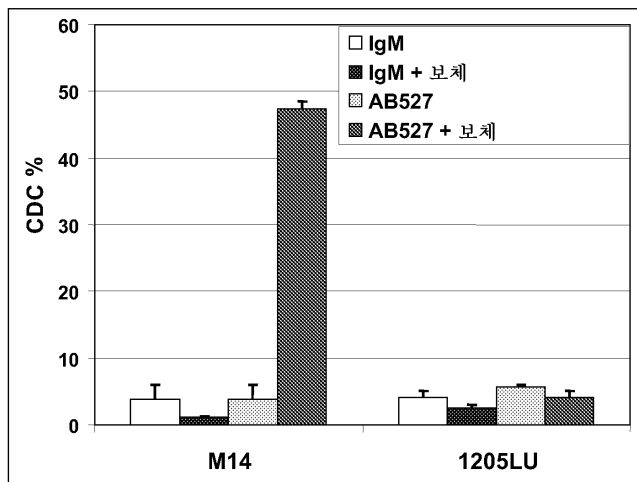
도면14



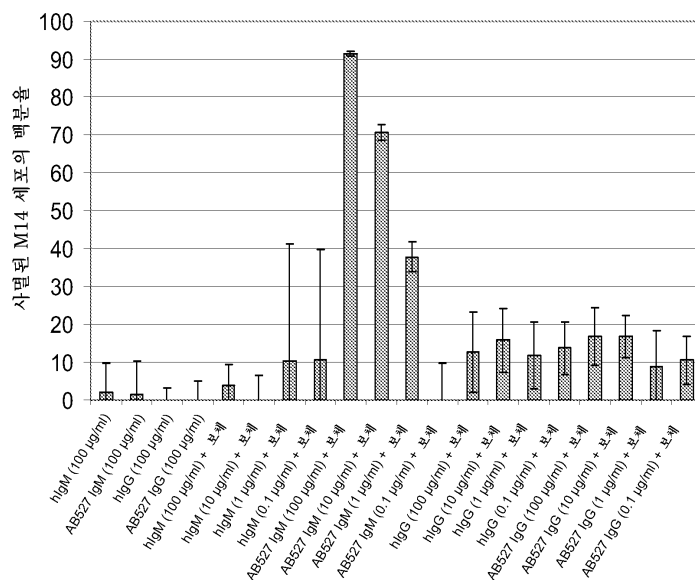
도면15



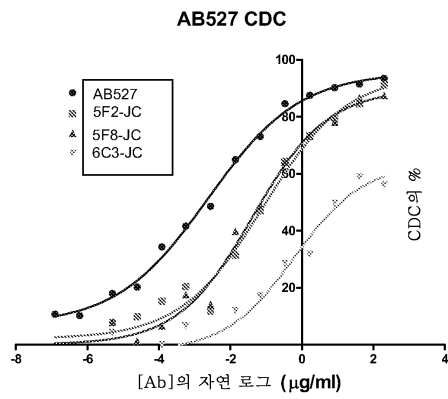
도면16



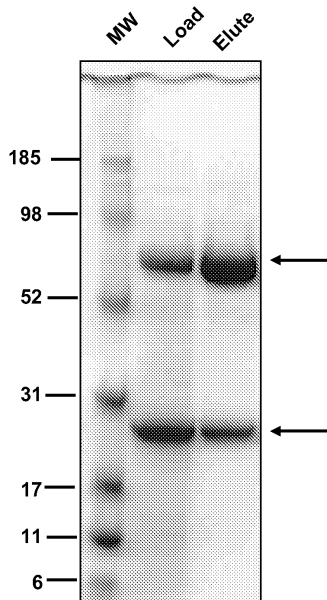
도면17



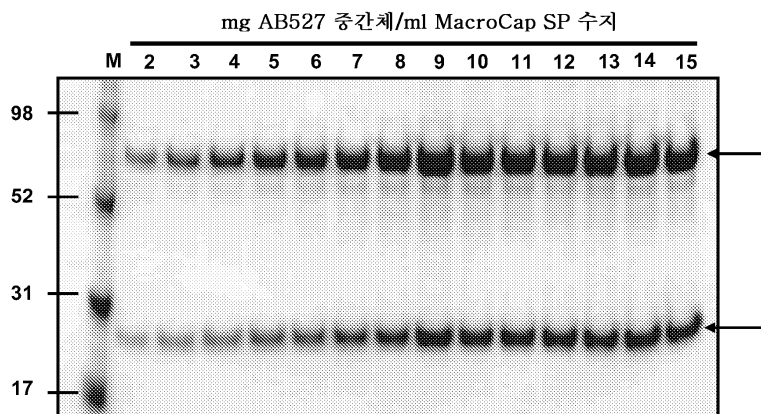
도면18



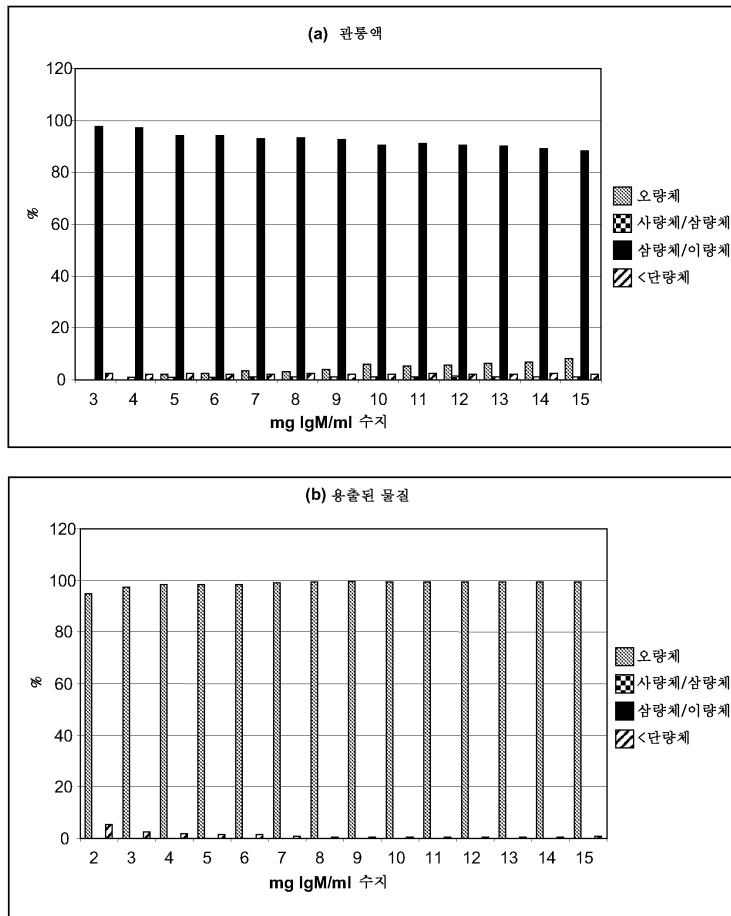
도면19



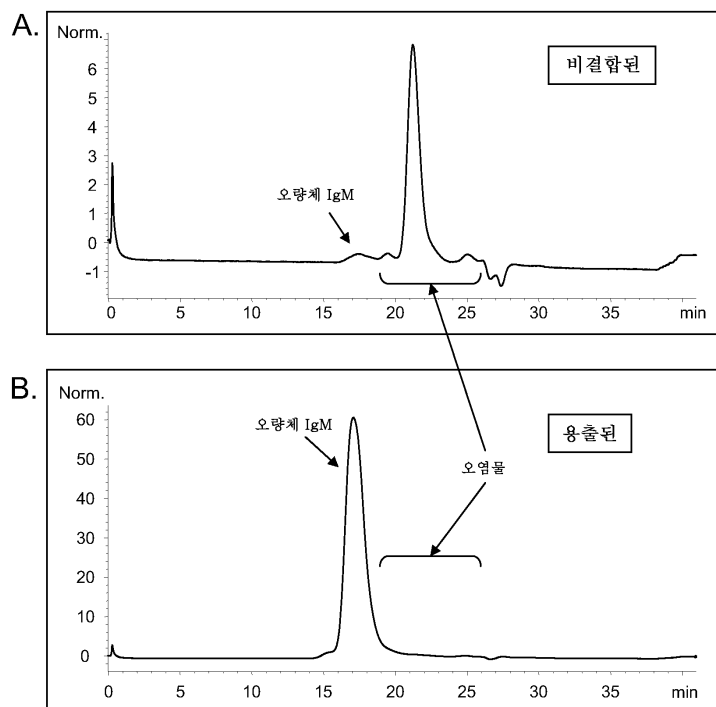
도면20



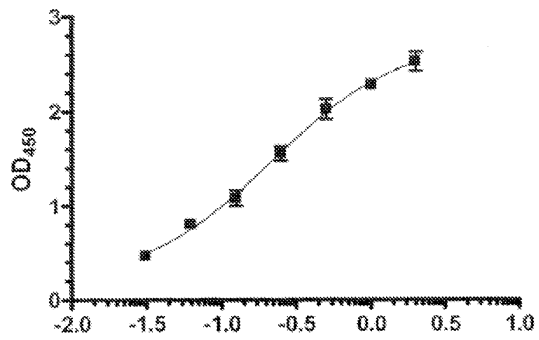
도면21



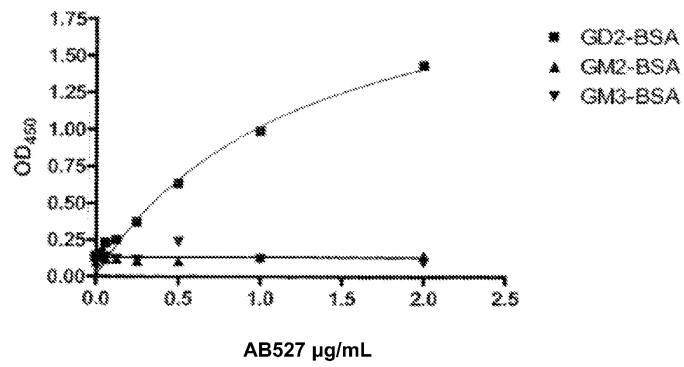
도면22



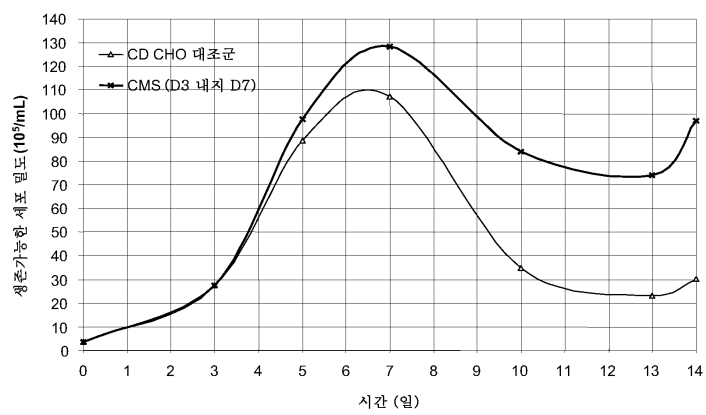
도면23



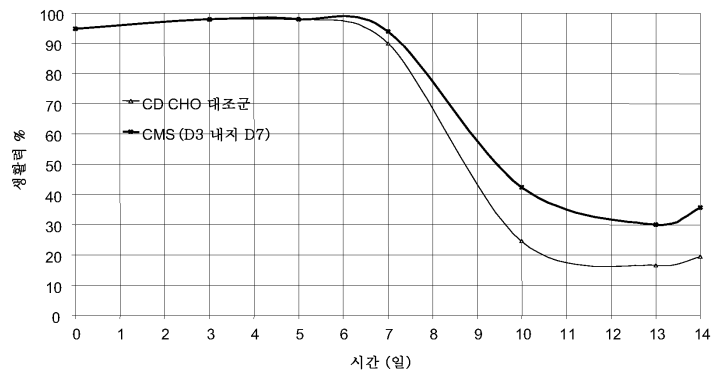
도면24



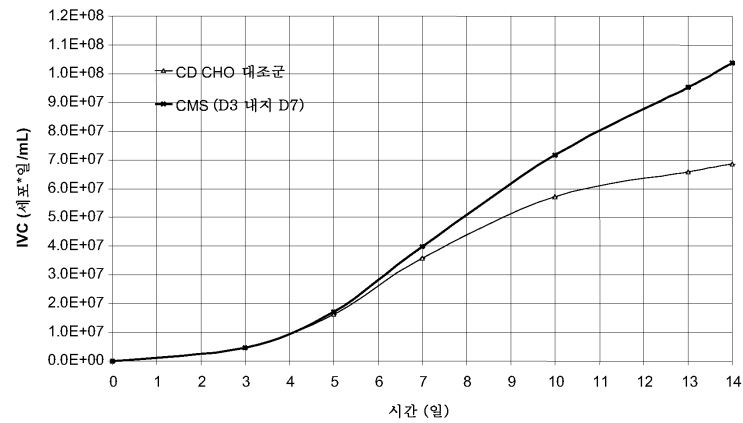
도면25



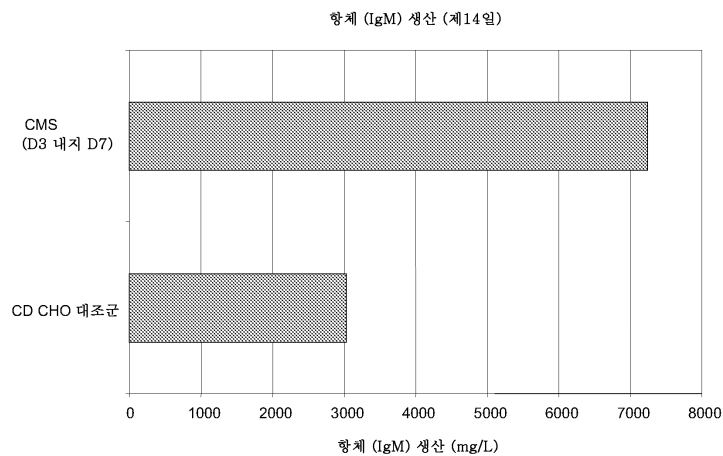
도면26



도면27



도면28



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> Morphotek, Inc.

Nicolaides, Nicholas C.

Sass, Philip M.
Grasso, Luigi
Ebel, Wolfgang
Routhier, Eric
Yao, Jun
Zhou, Yuhong
Zuo, Xun

<120> ANTI-GD2 ANTIBODIES AND METHODS AND USES RELATED THERETO

<130> MOR-0759

<150> US 61/077,041

<151> 2008-06-30

<150> US 61/097,034

<151> 2008-09-15

<160> 60

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 1767

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 1

atgggatgga gcgtatcat cctcttcttg gtagcaacag ctacaggtgt acacagcgag	60
gtgcagctgg tggagtctgg gggaggcttg gtccagcctg gggggtcct gagactctcc	120
tgtgcagcct ctgggttcac cgctcagtggc agctacatga gctgggtccg ccaggtccca	180
gggaagggac tggagtgggt ctcagtcatt tatagcggtg gtagcacata ctacgcagac	240
tccgtgaagg gcagattcac catctccaga gacaattcga agaacaccct gtatcttcaa	300
atgaacagcc tgagagccga ggacacggct gtgtattact gtgcgagaga cctccgcggt	360
tcctatgact actggggcca gggaaccctg gtcacgtctt cctcaggag tgcacccgcc	420
ccaacccttt tccccctcgt ctectgtgag aattccccgt cggatacgag cagcgtggcc	480
gttggctgcc tcgcacagga ctctcttccc gactccatca ctttctcctg gaaatacaag	540
aacaactctg acatcagcag caccgggggc ttcccatcag tcctgagagg gggcaagtac	600
gcagccacct cacaggtgct gctgccttcc aaggacgtca tgcagggcac agacgaacac	660

gtggtgtgca aagtcacgca ccccaacggc aacaaagaaa agaacgtgcc tcttcagtg 720
attgctgagc tgcctcccaa agtgagcgtc ttcgtccac cccgcgacgg cttcttcggc 780

aacccccgca agtccaagct catctgccag gccacgggtt tcagtccccg gcagattcag 840
gtgtcctggc tgcgcgaggg gaagcagggtg gggctctggcg tcaccacgga ccagggtcag 900
gctgaggcca aagagtctgg gccacgacc tacaaggatga ccagcacact gaccatcaaa 960
gagagcgact ggctcagcca gagcatgttc acctgccgcg tggatcacag gggcctgacc 1020
ttccagcaga atgcgtcctc catgtgtgtc cccgatcaag acacagccat ccgggtcttc 1080
gccatcccc catcctttgc cagcatcttc ctaccaagt ccaccaagt gacctgctg 1140
gtcacagacc tgaccaccta tgacagcgtg accatctcct ggacccgcca gaatggcgaa 1200

gctgtgaaaa cccacaccaa catctccgag agccacccca atgccacttt cagcgccgtg 1260
ggtagaggcca gcatctgcga ggatgactgg aattccgggg agagggttcac gtgcaccgtg 1320
accacacag acctgccctc gccactgaag cagaccatct cccggcccaa gggggtggcc 1380
ctgcacaggc ccgatgtcta cttgtgtcca ccagcccggg agcagctgaa cctgcgggag 1440
tcggccacca tcacgtgcct ggtgacgggc ttctctcccg cggacgtctt cgtgcagtgg 1500
atgcagaggg ggcagccctt gtccccggag aagtatgtga ccagcgcccc aatgcctgag 1560
ccccaggccc caggccggtg cttcggccac agcatcctga ccgtgtccga agaggaatgg 1620

aacacggggg agacctacac ctgcgtgggtg gccatgagg ccctgcccga cagggtcacc 1680
gagaggaccg tggacaagtc caccggtaaa cccacctgt acaacgtgtc cctgggtcatg 1740
tccgacacag ctggcacctg ctactga 1767

<210> 2
<211> 30
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 2
gggttcaccg tcagtggcag ctacatgagc 30

<210> 3
<211> 48
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 3
gtcatttata gcggtggtag cacatactac gcagactccg tgaagggc 48

<210> 4

<211> 24

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 4

gacctccgcg gttcctatga ctac 24

<210> 5

<211> 75

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 5

gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtccagc ctggggggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cctct 75

<210> 6

<211> 42

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 6

tgggtccgcc aggtccagg gaagggactg gagtgggtct ca 42

<210> 7

<211> 96

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 7

agattcacca tctccagaga caattcgaag aacaccctgt atcttcaaat gaacagcctg 60

agagccgagg acacggctgt gtattactgt gcgaga 96

<210> 8

<211> 315

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 8

gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtccagc ctggggggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cctctgggtt caccgtcagt ggcagctaca tgagctgggt ccgccaggct 120

ccagggaagg gactggagtg ggtctcagtc atttatagcg gtggtagcac atactacgca 180

gactccgtga agggcagatt caccatctcc agagacaatt cgaagaacac cctgtatctt 240

caaatgaaca gcctgagagc cgaggacacg gctgtgtatt actgtgcgag agacctccgc 300

ggttcctatg actac 315

<210> 9

<211> 588

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 9

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly

1 5 10 15

Val His Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln

20 25 30

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Val

35 40 45

Ser Gly Ser Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu

50 55 60

Glu Trp Val Ser Val Ile Tyr Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp

65 70 75 80

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr

85 90 95

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr

100 105 110

Tyr Cys Ala Arg Asp Leu Arg Gly Ser Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

115 120 125

Thr Leu Val Ile Val Ser Ser Gly Ser Ala Ser Ala Pro Thr Leu Phe

130 135 140

Pro Leu Val Ser Cys Glu Asn Ser Pro Ser Asp Thr Ser Ser Val Ala

145 150 155 160

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

165 170 175
 Trp Lys Tyr Lys Asn Asn Ser Asp Ile Ser Ser Thr Arg Gly Phe Pro
 180 185 190
 Ser Val Leu Arg Gly Gly Lys Tyr Ala Ala Thr Ser Gln Val Leu Leu
 195 200 205
 Pro Ser Lys Asp Val Met Gln Gly Thr Asp Glu His Val Val Cys Lys

 210 215 220
 Val Gln His Pro Asn Gly Asn Lys Glu Lys Asn Val Pro Leu Pro Val
 225 230 235 240
 Ile Ala Glu Leu Pro Pro Lys Val Ser Val Phe Val Pro Pro Arg Asp
 245 250 255
 Gly Phe Phe Gly Asn Pro Arg Lys Ser Lys Leu Ile Cys Gln Ala Thr
 260 265 270
 Gly Phe Ser Pro Arg Gln Ile Gln Val Ser Trp Leu Arg Glu Gly Lys

 275 280 285
 Gln Val Gly Ser Gly Val Thr Thr Asp Gln Val Gln Ala Glu Ala Lys
 290 295 300
 Glu Ser Gly Pro Thr Thr Tyr Lys Val Thr Ser Thr Leu Thr Ile Lys
 305 310 315 320
 Glu Ser Asp Trp Leu Ser Gln Ser Met Phe Thr Cys Arg Val Asp His
 325 330 335
 Arg Gly Leu Thr Phe Gln Gln Asn Ala Ser Ser Met Cys Val Pro Asp

 340 345 350
 Gln Asp Thr Ala Ile Arg Val Phe Ala Ile Pro Pro Ser Phe Ala Ser
 355 360 365
 Ile Phe Leu Thr Lys Ser Thr Lys Leu Thr Cys Leu Val Thr Asp Leu
 370 375 380
 Thr Thr Tyr Asp Ser Val Thr Ile Ser Trp Thr Arg Gln Asn Gly Glu
 385 390 395 400
 Ala Val Lys Thr His Thr Asn Ile Ser Glu Ser His Pro Asn Ala Thr

 405 410 415

Phe Ser Ala Val Gly Glu Ala Ser Ile Cys Glu Asp Asp Trp Asn Ser
420 425 430
Gly Glu Arg Phe Thr Cys Thr Val Thr His Thr Asp Leu Pro Ser Pro
435 440 445
Leu Lys Gln Thr Ile Ser Arg Pro Lys Gly Val Ala Leu His Arg Pro
450 455 460
Asp Val Tyr Leu Leu Pro Pro Ala Arg Glu Gln Leu Asn Leu Arg Glu

465 470 475 480
Ser Ala Thr Ile Thr Cys Leu Val Thr Gly Phe Ser Pro Ala Asp Val
485 490 495
Phe Val Gln Trp Met Gln Arg Gly Gln Pro Leu Ser Pro Glu Lys Tyr
500 505 510
Val Thr Ser Ala Pro Met Pro Glu Pro Gln Ala Pro Gly Arg Tyr Phe
515 520 525
Ala His Ser Ile Leu Thr Val Ser Glu Glu Glu Trp Asn Thr Gly Glu

530 535 540
Thr Tyr Thr Cys Val Val Ala His Glu Ala Leu Pro Asn Arg Val Thr
545 550 555 560
Glu Arg Thr Val Asp Lys Ser Thr Gly Lys Pro Thr Leu Tyr Asn Val
565 570 575
Ser Leu Val Met Ser Asp Thr Ala Gly Thr Cys Tyr
580 585

<210> 10

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

Gly Phe Thr Val Ser Gly Ser Tyr Met Ser

1 5 10

<210> 11

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens
<400> 11

Val Ile Tyr Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly

1 5 10 15

<210> 12

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 12

Asp Leu Arg Gly Ser Tyr Asp Tyr

1 5

<210> 13

<211> 25

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 13

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

20 25

<210> 14

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 14

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser

1 5 10

<210> 15

<211> 32

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 15

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln

1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg

20 25 30

<210> 16

<211> 105

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 16

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 Val Ser Gly Ser

20 25 30

Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ser Val Ile Tyr Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys

50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu

65 70 75 80

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

85 90 95

Arg Asp Leu Arg Gly Ser Tyr Asp Tyr

100 105

<210> 17

<211> 717

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 17

atgggatgga gctgtatcat cctcttcttg gtagcaacag ctacaggtgt acacagcgaa 60

attgtgctga ctacgtctcc actctccctg cccgtcaccc ttggacagcc ggcctccatc 120

tcctgcaggt ctagtcaaag cctcgatac agtgatggaa acacctactt gaattggttt 180

cagcagaggc caggccaatc tccaaggcgc ctaatttata aggtttctaa ccgggactct 240

ggggtcccag acagattcag cggcagtggtg tcaggcactg atttcacact gaaaatcagc	300
agggtggagg ctgaggatgt tggggtttat tactgcatgc aaggtacaca ctggccgcgg	360
acgttcggcc aagggaccaa ggtggaaatc aaacgaactg tggtgcacc atctgtcttc	420
atcttcccgc catctgatga gcagttgaaa tctggaactg cctctgttgt gtgcctgctg	480
aataacttct atcccagaga ggccaaagta cagtgggaagg tggataacgc cctccaatcg	540
ggtaactccc aggagagtgt cacagagcag gacagcaagg acagcaccta cagcctcagc	600
agcaccctga cgctgagcaa agcagactac gagaaacaca aagtctacgc ctgcgaagtc	660
acctatcagg gcctgagctc gcccgtcaca aagagcttca acaggggaga gtgttaa	717
<210> 18	
<211> 48	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 18	
aggtctagtc aaagcctcgt atacagtgat ggaacacct acttgaat	48
<210> 19	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 19	
aaggttttcta accgggactc t	21
<210> 20	
<211> 27	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 20	
atgcaaggta cacactggcc gcggacg	27
<210> 21	
<211> 69	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 21	
gaaattgtgc tgactcagtc tccactctcc ctgccgtca cccttgaca gccggcctcc	60

atctcctgc 69

<210> 22

<211> 45

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 22

tggtttcagc agaggccagg ccaatctcca aggcgcctaa tttat 45

<210> 23

<211> 96

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 23

ggggtccag acagattcag cggcagtggtg tcaggcactg attcacact gaaaatcagc 60

agggtggagg ctgaggatgt tggggtttat tactgc 96

<210> 24

<211> 306

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400>

> 24

gaaattgtgc tgactcagtc tccactctcc ctgccgtca cccttggaca gccggcctec 60

atctcctgca ggctctagtc aagcctcgta tacagtgatg gaaacaccta ctgaattgg 120

tttcagcaga ggccaggcca atctccaagg cgcttaattt ataaggtttc taaccgggac 180

tctgggggtcc cagacagatt cagcggcagt gggtcaggca ctgatttcac actgaaaatc 240

agcagggtgg aggctgagga tgttgggggtt tattactgca tgcaaggtac aactggccg 300

cggacg 306

<210> 25

<211> 238

<212> PRT

<213>

Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 25

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly

1 5 10 15

Val His Ser Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val
20 25 30
Thr Leu Gly Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu
35 40 45
Val Tyr Ser Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Asn Trp Phe Gln Gln Arg Pro
50 55 60
Gly Gln Ser Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Asp Ser
65 70 75 80
Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
85 90 95
Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys
100 105 110
Met Gln Gly Thr His Trp Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val
115 120 125
Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
130 135 140
Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu
145 150 155 160
Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn
165 170 175
Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser
180 185 190
Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala
195 200 205
Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly
210 215 220
Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230 235
<210> 26
<211> 16
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400

> 26

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val Tyr Ser Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Asn

1 5 10 15

<210> 27

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 27

Lys Val Ser Asn Arg Asp Ser

1 5

<210> 28

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 28

Met Gln Gly Thr His Trp Pro Arg Thr

1 5

<210> 29

<211> 23

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 29

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly

1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys

20

<210> 30

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 30

Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser Pro Arg Arg Leu Ile Tyr

1 5 10 15

<210> 31

<211> 32

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 31

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15

Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 32

<211> 102

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 32

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val Tyr Ser
20 25 30

Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Asn Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser

35 40 45

Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Asp Ser Gly Val Pro

50 55 60

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

65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Gly

85 90 95

Thr His Trp Pro Arg Thr

100

<210> 33

<211> 103

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Oligonucleotide primer
 <400> 33
 gatcggatcc aagcttgccg ccacatggg atggagctgt atcatcctct tcttggtagc 60
 aacagctaca ggtgtacaca gcgagggtgca gctggtggag tct 103
 <210> 34
 <211> 60
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Oligonucleotide primer
 <400> 34
 gggaagctta ccatgaagag gcccaggagt cccccccggg gtcagggtga tggaggcagg 60
 <210> 35
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Oligonucleotide primer
 <400> 35
 gatcaattgt cagtagcagg tgccagctgt gtcggacatg accag 45
 <210> 36
 <211> 80
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Oligonucleotide primer
 <400> 36
 gatcggatcc gccgccacca tgggatggag ctgtatcatc ctcttcttgg tagcaacagc 60
 tacaggtgta cacagcgaaa 80
 <210> 37
 <211> 60
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Oligonucleotide primer
 <400> 37
 gggaagctta ccatgaagag gcccaggagt cccccccggg gtcagggtga tggaggcagg 60

<210> 38
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Oligonucleotide primer
 <400> 38
 gatcgaattc ttaacactct cccctgttga ag 32
 <210> 39
 <211> 1710
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 39
 gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtccagc ctggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctgggtt caccgtcagt ggcagctaca tgagctgggt ccgccaggct 120
 ccagggaagg gactggagtg ggtctcagtc atttatagcg gtggtagcac atactacgca 180
 gactccgtga agggcagatt caccatctcc agagacaatt cgaagaacac cctgtatctt 240

 caaatgaaca gcctgagagc cgaggacacg gctgtgtatt actgtgcgag agacctccgc 300
 ggttcctatg actactgggg ccagggaacc ctggatcatc tctcctcagg gagtgcattc 360
 gccccaaacc ttttcccct cgtctcctgt gagaattccc cgtcggatac gagcagcgtg 420
 gccgttggtt gcctgcaca ggacttctt cccgactcca tcaatttctc ctggaaatac 480
 aagaacaact ctgacatcag cagcacccgg ggcttccat cagtctgag agggggcaag 540
 tacgcagcca cctcacaggt gctgtgcct tccaaggacg tcatgcaggg cacagacgaa 600
 cacgtggtgt gcaaagtcca gcacccaac ggcaacaaag aaaagaacgt gcctcttcca 660

 gtgattgctg agctgcctcc caaagtgagc gtcttcgtcc caccgccga cggtctcttc 720
 ggcaaccccc gcaagtccaa gctcatctgc caggccacgg gtttcagtcc ccggcagatt 780
 caggtgtcct ggctgcgca ggggaagcag gtggggtctg gcgtcaccac ggaccagggtg 840
 caggctgagg ccaaagagtc tgggcccacg acctacaagg tgaccagcac actgaccatc 900
 aaagagagcg actggctcag ccagagcatg ttcacctgcc gcgtggatca caggggcctg 960
 accttcagc agaatgcgtc ctccatgtgt gtccccgac aagacacagc catccgggtc 1020
 ttcgccatcc ccccatcctt tgccagcatc ttctcacca agtcaccaa gttgacctgc 1080

 ctggtcacag acctgaccac ctatgacagc gtgacctct cctggaccg ccagaatggc 1140
 gaagctgtga aaaccacac caacatctcc gagagccacc ccaatgccac tttcagcgcc 1200

gtgggtgagg ccagcatctg cgaggatgac tggaattccg gggagagggtt cacgtgcacc 1260
 gtgaccacaca cagacctgcc ctgccactg aagcagacca tctcccggcc caaggggggtg 1320
 gccctgcaca ggcccgatgt ctacttgctg ccaccagccc gggagcagct gaacctgcgg 1380
 gagtccggcca ccatcacgtg cctgggtgacg ggctttctctc ccgcggacgt cttcgtgcag 1440
 tggatgcaga gggggcagcc cttgtccccg gagaagtatg tgaccagcgc cccaatgcct 1500

gagccccagg cccaggccg gtacttcgcc cacagcatcc tgaccgtgtc cgaagaggaa 1560
 tggaacacgg gggagacctt caccctgcgtg gtggcccatg aggcctgcc caacagggtc 1620
 accgagagga ccgtggacaa gtccaccggt aaaccacccc tgtacaacgt gtccttggtc 1680
 atgtccgaca cagctggcac ctgctactga 1710

<210> 40

<211> 569

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 40

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 Val Ser Gly Ser

20 25 30

Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ser Val Ile Tyr Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys

50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu

65 70 75 80

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

85 90 95

Arg Asp Leu Arg Gly Ser Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val

100 105 110

Ile Val Ser Ser Gly Ser Ala Ser Ala Pro Thr Leu Phe Pro Leu Val

115 120 125

Ser Cys Glu Asn Ser Pro Ser Asp Thr Ser Ser Val Ala Val Gly Cys

130 135 140
 Leu Ala Gln Asp Phe Leu Pro Asp Ser Ile Thr Phe Ser Trp Lys Tyr
 145 150 155 160
 Lys Asn Asn Ser Asp Ile Ser Ser Thr Arg Gly Phe Pro Ser Val Leu
 165 170 175
 Arg Gly Gly Lys Tyr Ala Ala Thr Ser Gln Val Leu Leu Pro Ser Lys
 180 185 190
 Asp Val Met Gln Gly Thr Asp Glu His Val Val Cys Lys Val Gln His
 195 200 205

 Pro Asn Gly Asn Lys Glu Lys Asn Val Pro Leu Pro Val Ile Ala Glu
 210 215 220
 Leu Pro Pro Lys Val Ser Val Phe Val Pro Pro Arg Asp Gly Phe Phe
 225 230 235 240
 Gly Asn Pro Arg Lys Ser Lys Leu Ile Cys Gln Ala Thr Gly Phe Ser
 245 250 255
 Pro Arg Gln Ile Gln Val Ser Trp Leu Arg Glu Gly Lys Gln Val Gly
 260 265 270

 Ser Gly Val Thr Thr Asp Gln Val Gln Ala Glu Ala Lys Glu Ser Gly
 275 280 285
 Pro Thr Thr Tyr Lys Val Thr Ser Thr Leu Thr Ile Lys Glu Ser Asp
 290 295 300
 Trp Leu Ser Gln Ser Met Phe Thr Cys Arg Val Asp His Arg Gly Leu
 305 310 315 320
 Thr Phe Gln Gln Asn Ala Ser Ser Met Cys Val Pro Asp Gln Asp Thr
 325 330 335

 Ala Ile Arg Val Phe Ala Ile Pro Pro Ser Phe Ala Ser Ile Phe Leu
 340 345 350
 Thr Lys Ser Thr Lys Leu Thr Cys Leu Val Thr Asp Leu Thr Thr Tyr
 355 360 365
 Asp Ser Val Thr Ile Ser Trp Thr Arg Gln Asn Gly Glu Ala Val Lys
 370 375 380

Thr His Thr Asn Ile Ser Glu Ser His Pro Asn Ala Thr Phe Ser Ala
385 390 395 400

Val Gly Glu Ala Ser Ile Cys Glu Asp Asp Trp Asn Ser Gly Glu Arg
405 410 415

Phe Thr Cys Thr Val Thr His Thr Asp Leu Pro Ser Pro Leu Lys Gln
420 425 430

Thr Ile Ser Arg Pro Lys Gly Val Ala Leu His Arg Pro Asp Val Tyr
435 440 445

Leu Leu Pro Pro Ala Arg Glu Gln Leu Asn Leu Arg Glu Ser Ala Thr
450 455 460

Ile Thr Cys Leu Val Thr Gly Phe Ser Pro Ala Asp Val Phe Val Gln
465 470 475 480

Trp Met Gln Arg Gly Gln Pro Leu Ser Pro Glu Lys Tyr Val Thr Ser
485 490 495

Ala Pro Met Pro Glu Pro Gln Ala Pro Gly Arg Tyr Phe Ala His Ser
500 505 510

Ile Leu Thr Val Ser Glu Glu Glu Trp Asn Thr Gly Glu Thr Tyr Thr
515 520 525

Cys Val Val Ala His Glu Ala Leu Pro Asn Arg Val Thr Glu Arg Thr
530 535 540

Val Asp Lys Ser Thr Gly Lys Pro Thr Leu Tyr Asn Val Ser Leu Val
545 550 555 560

Met Ser Asp Thr Ala Gly Thr Cys Tyr
565

<210> 41

<211> 660

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 41

gaaattgtgc tgactcagtc tccactctcc ctgcccgtea cccttggaca gccggcctcc 60

atctcctgca ggictagtca aagcctcgta tacagtgatg gaaacaccta cttgaattgg 120

tttcagcaga ggccaggcca atctccaagg cgcctaattt ataaggtttc taaccgggac 180
 tctgggttc cagacagatt cagcggcagt gggtcaggca ctgatttcac actgaaaatc 240
 agcagggtgg aggtctagga tgttgggtt tattactgca tgcaaggtac aactggccg 300
 cggacgttcg gccaaaggac caaggtggaa atcaaacgaa ctgtggctgc accatctgtc 360
 ttcattctcc cgccatctga tgagcagttg aaatctggaa ctgcctctgt tgtgtgcctg 420
 ctgaataact tctatccag agaggccaaa gtacagtga aggtggataa cgccctccaa 480
 tcgggtaact ccaggagag tgtcacagag caggacagca aggacagcac ctacagcctc 540

agcagcacc tgacgtgag caaagcagac tacgagaaac acaaagtcta cgcctgcgaa 600
 gtcaccatc agggcctgag ctgccccgtc acaaagagct tcaacagggg agagtgttaa 660

<210> 42

<211> 219

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 42

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly

1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val Tyr Ser

20 25 30

Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Asn Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser

35 40 45

Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Asp Ser Gly Val Pro

50 55 60

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

65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Gly

85 90 95

Thr His Trp Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105 110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu

115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe

130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 145 150 155 160
 Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser

165 170 175
 Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 180 185 190
 Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 195 200 205
 Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

<210> 43

<211> 57

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 43

atgggatgga gctgtatcat cctcttcttg gtagcaacag ctacaggtgt acacagc 57

<210> 44

<211> 19

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 44

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15
 Val His Ser

<210> 45

<211> 24

<212> DNA

<213> Epstein-Barr Virus

<400> 45

agcatgcctg aactaagtcc agtc 24

<210> 46

<211> 24

<212> DNA
 <213> Epstein-Barr Virus
 <400> 46
 ttctactgggt ccctccacat aatc 24

 <210> 47
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Epstein-Barr Virus
 <400> 47
 ttctactagg aaacggcgag cagg 24

 <210> 48
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Epstein-Barr Virus
 <400> 48
 ccgggggtgct ggcgtctcat aa 22

 <210> 49
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Epstein-Barr Virus
 <400> 49
 ctgattgctg agaacctgct g 21

 <210> 50
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Epstein-Barr Virus

 <400> 50
 ctccttgag cgtggcgttg at 22

 <210> 51
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Epstein-Barr Virus
 <400> 51

aggtcgtgtt ccatacctcag g 21

<210> 52

<211> 22

<212> DNA

<213> Epstein-Barr Virus

<400> 52

tgccccagca agccgcagcg ac 22

<210> 53

<211> 21

<212> DNA

<213> Epstein-Barr Virus

<400> 53

gggcagtgtg tcaggagcaa g 21

<210> 54

<211> 22

<212> DNA

<213> Epstein-Barr Virus

<400> 54

actttccgcg cctgcctcat ga 22

<210> 55

<211> 20

<212> DNA

<213> Epstein-Barr Virus

<400> 55

ttcacctgtc ttggtcctg 20

<210> 56

<211> 20

<212> DNA

<213> Epstein-Barr Virus

<400> 56

gtaaaagggt cctaaggaac 20

<210> 57

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 57

cctcaccatt gagaaccaga 20

<210> 58

<211> 21

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 58

tgtagcactg tcttcacac a 21

<210> 59

<211> 20

<212> DNA

<213> Murine

<400> 59

cctccccact gagaaggaac 20

<210> 60

<211> 20

<212> DNA

<213> Murine

<400> 60

tctcaggaac accatcgtct 20