



(19)대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) 。 Int. Cl.

C07K 16/18 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

(11) 공개번호

10-2006-0126659

(43) 공개일자

2006년12월08일

(21) 출원번호 10-2006-7011975

(22) 출원일자 2006년06월16일

심사청구일자 없음

번역문 제출일자 2006년06월16일

(86) 국제출원번호 PCT/EP2004/014157

(87) 국제공개번호

WO 2005/049082

국제출원일자 2004년11월19일

국제공개일자

2005년06월02일

(30) 우선권주장

03292873.1

2003년11월19일

유럽특허청(EPO)(EP)

(71) 출원인

인스티튜트 내셔널 드 라 쏜테 에 드 라 리세르세메디칼르(인셈)

프랑스. 에프-75654 파리 세텍스 13, 뤼 드 톨비아크 101

유니버시티 헬스 네트워크

캐나다 온타리오 엠5취 2엠9 토론토610 유니버시티 애비뉴

(72) 발명자

스마드자, 플로렌스

프랑스 에프-92260 퐁테나이-오-로제 루 장 조레 1

딕, 존, 이.

캐나다 온타리오 엠4이 2지8 토론토 67 맥클린 애비뉴

카두세, 장

프랑스 에프-75013 파리 불러바드 아라고 62

(74) 대리인

강승옥

김진희

전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 키메라 항 C D44 항체 및 그 급성 골수성 백혈병 치료용용도

(57) 요약

본 발명은 A3D8 및 H90 유래의 특정 아미노산 서열을 포함하는 두 개의 키메라 항-CD44 항체 및 암 요법 그리고 보다 구체적으로는 급성 골수성 백혈병 요법에서 병리학적 줄기 세포를 근절하는 의약의 제조에 있어서의 이들의 용도를 제공한다.

특허청구의 범위

청구항 1.

서열 1, 서열 3으로 구성되는 군으로부터 선택되는 뉴클레오티드 서열.

청구항 2.

서열 2, 서열 4로 구성되는 군으로부터 선택되는 아미노산 서열.

청구항 3.

적어도 제1항의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 전달 구성체.

청구항 4.

서열 1, 3 및 5로 코딩된 아미노산 서열을 포함하는 키메라 항-CD44 항체, 및 그 F(ab')₂, Fab, Fab', scFv, Fv 또는 CDR 단편.

청구항 5.

서열 2, 4 및 6을 포함하는 키메라 항-CD44 항체, 및 그 F(ab')₂, Fab, Fab', scFv, Fv 또는 CDR 단편.

청구항 6.

서열 1, 3 및 7로 코딩된 아미노산 서열을 포함하는 키메라 항-CD44 항체, 및 그 F(ab')₂, Fab, Fab', scFv, Fv 또는 CDR 단편.

청구항 7.

서열 2, 4 및 8을 포함하는 키메라 항-CD44 항체, 및 그 F(ab')₂, Fab, Fab', scFv, Fv 또는 CDR 단편.

청구항 8.

제3항 내지 제7항에 있어서, 상기 항-CD44 항체는 단클론 항체인 것인 키메라 항체.

청구항 9.

제3항 내지 제8항 가운데 어느 한 항에 있어서, 상기 키메라 항-CD44 항체는 갈레닉(galenic) 벡터와 커플된 것인 키메라 항체.

청구항 10.

암 요법에서 병리학적 줄기 세포를 근절하는 의약의 제조에 있어서의 제3항 내지 제9항의 키메라 항-CD44 항체의 용도.

청구항 11.

제10항에 있어서, 암 요법에서 병리학적 줄기 세포를 특이적으로 근절하고 정상적인 줄기 세포를 생체 밖에서 보존하는 의약의 제조에 있어서의 용도.

청구항 12.

제10항 내지 제11항 가운데 어느 한 항에 있어서, 상기 줄기 세포는 백혈병 줄기 세포인 것인 용도.

청구항 13.

백혈병 세포를 분화시키고 백혈병 줄기 세포를 근절하는 의약의 제조에 있어서의 제3항 내지 제9항의 키메라 항-CD44 항체의 용도.

청구항 14.

제10항 내지 제11항에 있어서, 상기 줄기 세포는 유방 또는 대장암 줄기 세포인 것인 용도.

청구항 15.

제10항 내지 제14항 가운데 어느 한 항에 있어서, 상기 키메라 항-CD44 항체는 치료당 10mg 내지 1000mg 투여량으로 저속 주입에 의해 투여되는 것인 용도.

명세서

기술분야

본 발명은 키메라 항체 항암 요법, 보다 자세하게는 백혈병에 대한 요법에 관한 것이다.

배경기술

서로 다른 종류의 백혈병을 확인할 수 있다: 급성 림프모구 백혈병 (ALL) 또는 림프종을 특히 포함하는 림프모구 백혈병 그리고 급성 골수모구 백혈병 (AML) 을 특히 포함하는 골수모구 백혈병. AML은 백혈병 사례의 대략 절반을 차지하여, 매년 프랑스에서 1000, 미국에서 6000의 새로운 사례가 발생하여 40년간 기하급수적인 증가추세에 있다. AML은 미성숙 단계에서 골수 세포의 분화가 억제되는 것에 해당하며, 모세포에 의한 골수 및 순환 혈액의 침입으로 전달되며, 그 세포학적 특성이 M1 내지 M7 (프랑스-미국-영국(FAB) 분류) 로 분류되는 서로 다른 AML 아형을 정의하며, 가장 흔한 유형은 M1 내지 M5이다.

급성 골수성 백혈병 (AML) 에서, 백혈병 클론은 광범위한 재생력을 갖는 희귀 백혈병 줄기 세포 (LSC) 유래의 계층도로서 조직되며, 이는 골수 분화의 다양한 단계에 정지한 백혈병 모세포를 생성하여, 구별되는 AML 아형을 정의한다.

1978년에, 레오 삭스는 *Nature* (1978, Aug. 10; 274(5671):535-9) 에 마우스 백혈병 세포가 생리적 성장 및 분화 인자의 존재하에 분화 유도될 수 있음을 발표하였다. 이 결과는 인간 백혈병 세포에서 확인되었으며 골수 혈구 형성의 두 가지 분화 유도제인 레티노산 및 G-CSF로 성공적으로 생체 내 전환되었다. 불행하게도 광범위한 연구에도 불구하고, 완전한 완화는 2개의 AML 아형 (t(8;21) 전이를 갖는 AML3 및 AML2) 에서만 얻어졌다. 본 발명자들은 CD44의 절단이 서로 다른 수준의 골수 분화 봉쇄 (AML1 내지 AML5) 를 역전시킨다고 이미 밝힌 바 있다 (Nat Med. 1999 Jun; 5(6):669-76). AML 모세포의 분화는 다음 사실들에 의해 입증되었다.

- 산화적 파열과 같은 산화환원 기능을 생성하는 능력,

- 직계성 항원의 발현 증가 및
- 분화된 골수 세포에 특이적인 세포학적 변형.

또한, 특이적인 단클론 항체 (mAb) 에 의한 CD44 절단도 각각 AML5 (단핵 모세포 아형), AML3 (전골수구 아형) 및 AML2 (골수 모세포 아형) 의 흥미로운 모델인 THP-1, NB4 및 HL60 세포주의 말단 분화를 유도한다. 그러면, 대량의 세포자멸사가 NB4 세포에 유도될 수 있고, 매우 온건한 세포자멸사가 THP-1 및 HL60 세포에 유도될 수 있다.

백혈병 줄기 세포 (LSC) 는 재생력, 즉 모세포와 유사한 딸세포를 생성하는 능력에 의해 모든 다른 AML 세포와 구분된다. 광범위한 재생력은 LSC의 내재적 성질이며, 백혈병의 발달에 필수적인 것으로 알려져 왔다.

실험적으로, 인간 LSC는 NOD/SCID 면역 결핍 마우스에 이식시 공여자의 AML 유형을 일관성 있게 재현하는 질병을 생성하는 것으로 확인된다. 이는 이식시에 백혈병 클론을 개시하는 능력을 보유하므로, SCID-백혈병 개시 세포 (Leukaemia Initiating Cells) 를 뜻하는 SL-IC로 지칭되어 왔다. 이들 SLC는 다른 백혈병 세포들과 구별되는데, 그 이유는 이들은 AML 세포 모집단의 0.1% 내지 1%를 차지하는 CD34+ cd38- 세포 분획 내에만 존재하며, 이는 모든 AML 아형에서 그러하기 때문이다.

요약하면, 새로운 AML 치료법을 위해서는 LSC를 효과적으로 표적화하여 근절하여야만 한다.

AML의 전통적인 치료는 화학요법이다. 이는 60-85%의 환자에서 최초의 완전한 완화를 유도하는 데 성공함에도 불구하고, 아직 대부분의 AML 환자를 치유할 수 없으며 (5년 생존률 : 37%), 특히 55-60세를 넘는 성인 AML 환자의 장기 생존은 발전이 거의 없었다 (5년 생존률 : 15%). 이 환경은 세포자멸사 억제제 (삼산화 비소), 안티센스 전략 (항 BCL2) 및 항 전사유도제 (DNA 메틸라제, 히스톤 아세틸화제) 를 이용한 새로운 표적 요법 접근의 개발 노력을 유도하였다. 그러나, 현재 이용되는 대부분의 치료 전략은 순환성 (cycling) 세포를 표적으로 하고, SL-IC는 가시적이지 못하여, 새로운 접근이 개발되어야만 함을 시사한다.

본 발명자들의 기존 연구들은 백혈병 세포의 분화를 유도하기 위해 백혈병 세포를 특이적 표적으로 하는, 항-CD44 항체 (Charrad 등 Nature Medicine 1999) 를 포함하는 새로운 치료법을 소개하였다. <<분화 요법>>이라 불리는 이러한 요법은 AML3 아형의 환자 치료에 이용되어 왔으며, 이는 분화 유도 분자로 레티노산을 이용하며, 전통적인 치료인 화학요법과 함께 이용한다.

추가 실험 결과, 본 발명자들은 백혈병 세포 분화뿐 아니라 백혈병 줄기 세포 근절도 가능한 특이적 항-CD44 항체, H90 (P245라고도 명명) 을 선택하게 되었다. 실제로, 이 항-CD44 항체는 인간 백혈병 NOD/SCID 마우스를 완전히 치유하였다 (Jin L. 등, 2003). 화학 요법은 고통스러운 치료이기 때문에, 이 항체는 단일 요법에서 독자적으로 이용됨으로써 화학요법을 대체할 것이다.

그러나, 이 항체는 마우스의 항-CD44 항체이기 때문에 인간에서의 이용은 제한될 것이다. 사실, 마우스 항체의 주입은 HAMA (인간 항-마우스 항체) 로 알려진 이 외래 단백질에 대한 환자의 반응을 일으킬 수 있다. HAMA의 이 진행은 하나의 항체에서 다른 항체에 이르기까지 가변적일 수 있으나, 일단 HAMA가 발생하면, 마우스 항체의 투여는 모든 효력을 상실한다.

발명의 상세한 설명

이에, 본 발명자들은 개선된 활성, 특히 개선된 분화 활성을 갖는 키메라 항-CD44 항체를 개발하였다.

따라서, 본 발명은 항암 단일 요법, 보다 자세하게는 백혈병에 대한 단일 요법에 유용한 2개의 키메라 항-CD44 항체를 제공한다.

본 발명에 따른 2개의 키메라 항-CD44 항체는 각각 뉴클레오티드 서열 1, 3 및 5, 또는 1, 3 및 7로 코딩된 아미노산 서열을 포함하며, 대응 아미노산 서열은 각각 2, 4 및 6, 그리고 2, 4 및 8이다. 본 발명은 또한 이들의 F(ab')₂, Fab, Fab', scFv, Fv 또는 CDR (상보성 결정 부위) 단편 그리고 뉴클레오티드 서열 1, 3, 5, 아미노산 서열 2, 4, 6 그리고 상기 뉴클레오티드 서열들 가운데 하나 이상을 포함하는 전달 구성체 (transfer construct) 도 커버한다.

제1키메라 항-CD44 항체 또는 그 단편은 감마 1로 키메라화된 항-CD44 항체를 지칭한다.

이 감마 1 구성체는 최초 활성화에 더해 강력한 ADCC (항체 의존 세포-매개 세포독성) 및 CDC (보체-의존 세포독성) 성분을 제공할 수 있다.

반대로, 제2키메라 항-CD44 항체 또는 그 단편은 ADCC와 CDC가 거의 없거나 없는 감마 4 구성체에 해당한다. 더욱이, 이 후자 구성체는 약한 탄수화물 성분을 갖는 잇점을 또한 갖는데, 이는 특정 반응, 특히 이중 면역 반응 또는 비특이적 결합을 피하게 해 준다. 더 나아가, 그 자체의 분화 치료 활성화에 덧붙여 면역 독성과 관련한 이러한 특별한 중성에 기인해, 이 감마 4 구성체는 임의의 보완 치료 약품 또는 입자 (방사성 동위원소, 세포독성 화합물, ...) 가 연결될 수 있는 표적화 분자로서 잇점을 가지고 이용될 수 있다.

또한, 이 감마 4 키메라 항체의 반감기는 20 내지 25일 수준으로 대단히 만족스럽다.

유리하게는 재조합 바쿨로바이러스를 이용한 이러한 항체의 발현은 당 조성과 관련하여 완전하게 조절된다.

바람직하게는 전체 키메라 항체가 이용된다. 사실, 치료적 항체는 전체 항체로서 이용될 때가 F(ab')₂, Fab 또는 Fab' 단편화 항체 또는 소형 구성체 (scFv 등) 형태보다 통상적으로 효과적이다.

또 하나의 바람직한 구체예에서, 키메라 항체는 단클론 항체이다.

본 발명은 또한 암 요법에서 병리학적 줄기 세포를 근절하는 의약의 제조에 있어서의 본 발명에 따른 키메라 항-CD44 항체의 용도에 관한 것이다.

본 발명은 또한 암 요법에서 병리학적 줄기 세포를 특이적으로 근절하고 정상적인 줄기 세포를 생체 밖에서 보존하는 의약의 제조에 있어서의 본 발명에 따른 키메라 항-CD44 항체의 용도에 관한 것이다.

본 발명의 또 하나의 양태는 환자로부터 병리학적 줄기 세포를 근절하는 방법으로서, 항원-항체 반응이 일어나는 조건하에서 본 발명에 따른 키메라 항-CD44 항체를 상기 환자에 투여하는 단계를 포함하되, 병리학적 줄기 세포만 근절하는 방법에 관한 것이다.

더 나아가, 본 발명은 또한 백혈병 또는 암 환자의 조직 시료로부터 병리학적 줄기 세포를 특이적으로 근절하고 정상적인 줄기 세포를 생체 밖에서 보존하는 방법으로서, 항원-항체 반응이 일어나는 조건하에서 본 발명에 따른 하나 이상의 키메라 항-CD44 항체를 상기 조직 시료와 접촉시키는 단계를 포함하는 방법에 관한 것이다. 이러한 방법은 골수 세포 모집단의 정제에 적합하다.

상기 의약/방법은 병리학적 줄기 세포, 특히 백혈병 세포 및 암 세포로부터 배출되는 병리학적 세포의 생성을 회피한다.

상기 언급한 바와 같이, 분화 요법은 백혈병 줄기 세포의 근절을 위해 화학 요법의 이용을 필요로 한다. 본 발명에 따른 키메라 항-CD44 항체의 이용은 어떠한 화학 요법도 필요로 하지 않으면서 백혈병 세포의 분화를 개선된 효율로 유도할 뿐 아니라, 백혈병 줄기 세포의 근절도 유도한다.

본 발명에 따른 의약은 치료당 대략 10mg 내지 1000mg, 바람직하게는 100 내지 400mg 수준의 투여량으로 투여될 수 있다. 투여 횟수는 의약의 효능 향상을 위해 (시간에 따라) 증가 또는 감소 및/또는 반복될 수 있다.

키메라 감마 4 항체는 비독성이기 때문에, 그 투여량은 쉽게 증가시킬 수 있고 환자에 적합화시킬 수 있다.

의약의 제조는 임의의 적합한 약학적 제형으로, 그리고 특히 알약, 과립, 캡슐, 분말 형태, 현탁액, 경구액, 주사액의 형태로 될 수 있다. 투여는 바람직하게는 저속 주입에 의해 수행할 수 있다.

본 발명에 따라 이용되는 의약은 원하는 제형에 적합화된 임의의 적합한 화합물 또는 부형제, 특히 임의의 약학적 비활성 운반체(vehicle)를 더 포함할 수도 있다.

유리하게는, 적합한 제형은 주사, 바람직하게는 정맥 주사용 식염수이다.

본 발명에 따른 의약으로 치료할 수 있는 병리학적 세포는 백혈병 세포, 병리학적 줄기 세포, 그리고 보다 구체적으로는 백혈병 줄기 세포 및 유방 또는 대장암 줄기 세포이다.

사실, AML에서와 같이, 다른 암에서 종양 클론은 희귀 종양 줄기 세포의 광범위한 증식 및 재생에 의해서도 유지된다는 증거들이 증가하고 있다. CD44 또한 대부분의 암 세포에 존재하므로, CD44 절단 또한 그러한 종양 줄기 세포의 근절에 효과적일 수 있으며, 따라서 이는 AML 이외의 몇몇 암에서도 치료 효과를 나타낼 수 있다.

본 발명은 본 출원의 개시 (개시, 실시예, 청구항 및 도면) 및 종래 기술에 따른 수단으로부터 본 기술분야의 숙련된 자가 과도한 실험 없이 만들어 낼 수 있는 모든 대안적인 구체에도 포함한다.

실시예

실시예 1: 항-CD44 단클론 항체가 백혈병 (종양) 줄기 세포를 근절

NOD/SCID 마우스 백혈병 모델 및 이식된 PML-RAR 마우스를 이용한다. NOD/SCID 마우스 백혈병 모델은 독특한 모델로서, 인간 AML의 모든 아형 (AML3 제외) 의 병리를 일관성 있게 재현하며, 가장 중요하게는 광범위한 증식 및 재생 능력을 갖고 백혈병 클론의 유지에 관계하는 인간 백혈병 줄기 세포의 초소형 아모집단의 운명을 추적할 수 있게 해 준다.

재료 및 방법

AML 세포

신선한 또는 냉동된 AML 말초 혈액 세포를 피콜-밀도 구배 원심으로 농축하고, 5% 우태아 혈청을 함유하는 이스코브의 변형 둘베코 배지 (IMDM) 에서 세척하였다.

AML 세포의 NOD/SCID 마우스에의 이식

8 내지 12주령 NOD/SCID 마우스를 ^{137}Cs 원으로부터의 375 또는 400cGy로 치사량 미만으로 조사한 즉시 AML 세포를 꼬리 정맥 주사하였다. 마우스는 인간 줄기 세포 인자 (SCF) 와 융합 단백질 huIL3/hu GM-CSF (PIXY321) 을 각각 마우스당 10 μg 및 7 μg 의 농도로 복강내 주사로서 격일로 받는다.

백혈병 줄기 세포 (LSC) 의 분석

AML의 NOD/SCID 마우스에의 이식은 백혈병 클론 내에 존재하며 이를 유지하며, CD34+ + CD38neg 면역 표현형을 나타내는 백혈병 줄기 세포 (LSC) 의 희귀 모집단의 증식 및 제한적 분화로부터 발생한다는 사실이 입증되었다 (Bonnet 및 Dick, Nature Medicine 3:730-737, 1997). 그러므로, AML 이식의 성공은 LSC의 존재를 증명하는 것이다. 표시된 시점 (4-8주) 에서, 이식된 NOD/SCID 마우스의 골수 내 백혈병 침투 백분율을 서로 다른 시점에서의 무릎 관절 흡인 (흡인물 당 평균 10 ^{6}) 으로 측정한다. 백혈병 모집단은 조혈 특이적 항원 (CD45) 및 분화 항원 (CD33, CD14, CD15, CD11b) 에 대한 mAb 패널을 이용하여 표지한다. CD19의 부재는 분화된 세포가 이식된 AML 시료에 포함된 정상적인 조혈 줄기 세포로부터 기원하지 않는다는 지표로 간주된다.

결과

[표 1]

P245는 NOD/SCID 마우스에서 AML 줄기 세포의 발달을 억제한다. 마우스에 15.106 인간 AML 세포를 정맥 주사하고 (0 일), 20일 내지 50일에 P245로 처리하였다 (750 μg /주사, 주당 3번). 골수 내 인간 AML 세포의 %를 인간 범골수형 (pan-myeloid) 항원 huCD45 발현을 기준으로 측정하였다 (무릎 관절 흡인, 흡인물당 평균 106 개의 세포). 데이터는 3회의 독립적인 실험으로부터의 평균 $\pm$ 표준 편차이며 5마우스/군이다. 이 표는 P245가 AML의 발달을 억제함을 보여 준다. *2 차 수령자들은 P245 주사를 받지 않았다.

	% huCD45+ 세포

환자	AML 아형	1차 수령자		2차 수령자*	
		미처리	P245 처리	미처리 1차 수령자로 부터	P245 처리한 1차 수령자로부터
4971	M5	23+/-19	0	23.4+/-16	0.0+/-0.1
5131	M5	67+/-20	7+/-10	1.7+/-1.5	0.0+/-0.1
5173	M4	14+/-12	2+/-2	7.3+/-3	0+/-0

지금까지 수행한 4회의 독립적인 실험은 P245가 1차 수령자의 대부분의 AML 세포를 근절하는 데 매우 효율적이라는 것을 대단히 재현성 있게 분명히 보여 준다 (표 1). 이는 표 2에 나타난 바와 같이 부분적으로는 말단 분화의 유도 때문일 수 있다. 그러나, 2차 이식 측정에 나타난 바와 같이 (표 1), 대부분의 백혈병 줄기 세포의 근절 때문이기도 하며, 이것이 아마 주된 이유이다. 이 결과는 AML 줄기 세포를 생체 내에서 근절할 수 있음을 보여 주며, 독성이나 기타 바람직하지 못한 부작용이 관찰되지 않았음을 주목하여야 한다. 장기 생존에 대한 P245의 효과도 조사하였다. 또한, 정상적인 줄기 세포에 대한 P245의 효과 역시 연구하였다. 가장 흥미롭게는, 예비 실험에서 정상적인 CD34+ 제대혈구의 이식에 대한 P245의 억제 효과가 관찰되지 않아서 P245는 AML 줄기 세포를 생체 내에서 선택적으로 근절함을 보여 주었다.

[표 2]

P245 처리한 1차 수령자에서의 AML 모세포의 생체 내 분화 : 분화는 AML 세포 (CD45+) 상에서의 과립구 특이적 분화 항원 CD15의 발현 증가로 입증된다. 이 발현은 4회의 독립적인 실험 가운데 하나의 대표예이다.

환자	처리	huCD45+ 세포의 %	CD45+ 모집단 내 CD15+의 %
4971	없음	43	22
	P245	6.2	56

이식된 PML-RAR 마우스는 본 발명자들로 하여금 NOD/SCID 마우스에 이식할 수 없는 유일한 아형인 AML3 아형 모델 상에서의 CD44-표적화 분자의 생체 내 효과를 조사할 수 있게 해 주었다. 마우스 CD44에 대한 mAb를 이용할 수 없었기 때문에, HA의 치료 효과를 조사하였고, AML 모세포의 완전한 말단 분화 및 이식된 PML-RAR 마우스의 완전한 완화를 유도하는 레티노산과 비교하였다. 얻은 결과 (표 3에 요약) 는 투여 4일 후, HA는 질병의 비장비대 특성을 저지하는 데 레티노산만큼 효율적이며, 백혈구 모세포의 골수 침투 감소에도 성공적임을 명백히 보여 준다. 이 효과는 HA 투여량에 좌우된다. 분화된 과립구 전구체의 환형 (apparition) 은 HA가 시험관 내에서 그렇듯이 그리고 레티노산과 유사하게 AML 모세포의 말단 분화를 유도한다는 것을 강하게 시사한다. 종합하면 이들 결과는 CD44 절단이 AML 세포를 생체 내 근절하는 효율적인 수단이라는 것을 최초로 보여 주며, AML에서의 CD44 표적화 요법 개발의 새로운 기초를 제공한다.

[표 3]

HA는 PML-RAR 세포 (AML3) 의 생체 내 성장을 억제하며 말단 분화를 유도한다. HA(6.105kAa) 를 105개의 백혈병 PML-RAR 모세포를 12일 전에 이식받은 백혈병 마우스에 1 μ l/시간의 속도로 4일간 삼투 펌프를 통해 투여하였다. 비장비대의 강한 억제와 함께, 골수 내 모세포 침투 감소 (현미경 관찰로 계수) 와 분화 과립구 전구체 세포의 증가가 관찰된다. 데이터는 3회의 독립적인 실험으로부터의 평균 +/- 표준 편차이며 5마우스/군이다. RA: 레티노산

처리	평균 비장 중량 (mg)	골수 내 모세포 %	골수 내 골수세포 및 림프구 세포 %
없음	480+/-45	85+/-7	12+/-3
HA	120+/-57	28+/-15	48+/-23
RA	135+/-68	18+/-7	67+/-17

실시예 2: 바쿨로바이러스-Sf9 세포계에서의 마우스 항체 H90의 키메라화 및 발현 - IgG1의 발현

출발물질

5×10^6 개의 H90 하이브리도마 세포 (드라이아이스상) 의 2개의 펠릿을 이용하였다. H90 단클론 항체는 IgG1 카파이다.

WO 95 20672 및 Lieby 등의 Blood, 15 June 2001, vol.97, no 12, p.3820-3828에 기술된 바와 같은 <<Baculomab>> 테크닉을 이용하였다.

1 - 중 (heavy) 및 경 (light) 가변 부위의 분리

- 전체 RNA의 분리: Qiagen 추출 키트 (Ref. 74 104) 를 공급자가 설명한 프로토콜에 따라 이용하였다.

- 상보 DNA 합성

상기 추출한 전체 RNA에 역전사를 행하였다. 이용한 전사 효소는 Qiagen의 Omniscript (Ref. 205 111) 이다.

- VH 및 VL의 증폭

이용한 기술은 "Chardes, T., Villard, S., Ferrieres, G., Piechaczyk, M., Cerutti, M., Devauchelle, G., and B. Pau. 1999. Efficient and direct sequencing of mouse variable regions from any immunoglobulin gene family. *FEBS Lett.* **452**, 386-394"에 기술된 내용으로부터 이끌어 냈다.

중 또는 경 가변 부위의 동정 및 클로닝을 위해, 18회의 PCR을 병렬로 행하였다. 다음으로, 대략 400bp의 단편을 플라스미드 pGEMTeasy에 클로닝한 뒤 서열분석하였다. 이 서열분석은 MWGBiotech사가 수행하였다.

a - VL 부위의 증폭

결과

1차 시도 : 2개의 클론을 연구하였다.

- H90 32LS Cl 15

- H90 32LS Cl 18

이 서열의 분석은 클론 15 및 18이 면역글로불린 가변 부위를 암호화하지 않는다는 것을 보여 준다. 따라서 상보 DNA의 추가 제조를 수행하였고 (변경 프로토콜), PCR 생성물을 클로닝 및 분석하였다.

2차 시도 : 4개의 클론을 얻었다.

- H90 3LS Cl 5

- H90 3LS Cl 7

- H90 22LS Cl 12

- H90 22LS Cl 16

클론 12 및 16은 카파 유사 유전자 (pseudogene) 에 해당한다 (생쥐 (*Mus musculus*) 면역글로불린이 카파 사슬 mRNA를 비정상적으로 재배열하였다).

클론 H80 3LS Cl 7은 실제로 기능적 VL-카파 가변 부위 (서열 1 및 2) 에 해당한다. 따라서, 이 클론을 바쿨로바이러스 전달 벡터 pBHUCk47에 삽입한다.

b - VH 부위의 증폭

동일한 기술을 이용하여 중 가변 부위를 분리하였다. 18회의 PCR을 수행한다.

결과

1차 시도: 1개의 클론을 분석하였다.

- H90 19HS Cl 9

이 클론의 서열 분석 결과, 이것이 마우스 유사 유전자에 대응된다는 것이 나타났다 (해독틀 이행, reading frame shift).

2차 시도: 새로운 상보 DNA를 합성하여 PCR 분석에 이용하였다.

2개의 클론을 분석하였다 :

- H90 17LS Cl 23

- H90 17LS Cl 28

이 2개의 클론은 실제로 마우스 감마 1 가변 부위에 해당한다; 불행하게도, N-말단 서열의 대략 1/3이 없었다. 그러나, IMGT상에서의 이 서열의 분석은 가장 가능성 높은 기원 배 라인 (germinal line of origin) 의 동정 및 따라서 다른 PCR 프라이머의 설계를 가능케 하였다.

후자의 접근에 의해, 본 발명자들은 새로운 클론을 분리하였다: H90 3HS 클론 15.

이 서열의 분석은 올바른 마우스 VH 부위를 보여 준다 (서열 3 및 4). 이것이 바쿨로바이러스 전달 벡터에 도입된 클론이다.

2 - 중 및 경 가변 부위의 전달 벡터로의 삽입

이들 VH 및 VL을 증폭하고, 상부 (upstream) 에 위치한 신호 서열 그리고 하부 (downstream) 에 위치한 카파 또는 감마 1 불변 부위와의 동상 (in phase) 삽입을 가능케 하도록 PCR 프라이머를 설계하였다.

얻은 구성체를 서열 분석으로 다시 확인하였다.

3 - IgG1 형태로 H90 항체를 발현하는 재조합 바이러스의 구성

H90 항체의 중 부위를 플라스미드 구성체 H90 3HS 클론 15로부터 분리한 뒤, 인간 $\gamma 1$ 중쇄의 발현을 가능케 하는 전달 벡터 p119Cg1에 삽입하였다. 감마 1 불변 부위의 서열을 제시한다 (서열 5 및 6).

4 - 재조합 바이러스의 획득

Sf9 세포를 (i) 정제된 바이러스 DNA 및 (ii) 상기 설명한 VH 및 VL 부위 (서열 1 및 3) 를 함유하는 두 전달 벡터의 DNA 로 공감염 (transfection) 시켰다.

28°C에서 5일간의 배양 후에 생성된 바이러스를 용해반 (lysis plaque) 기술로 클로닝하였다. 9개의 분리된 클론을 증폭 하였으며, 항체 발현을 ELISA로 확인하였다. 모든 클론은 양성으로 확인되었다. 상보성 분석에는 클론 B2954, B2955, B2957 및 B2958을 선택하였다.

5 - 생성된 항체의 특이성 확인

항체를 발현하는 4개의 바이러스 클론을 재증폭하고, 인간 CD44에 대한 재조합 항체의 특이성을 확인하기 위해 대략 5ml의 배양 상청액을 분석하였다.

6 - 재조합 바이러스의 계능 확인

4개의 바이러스 클론의 DNA를 추출하고 HindIII 제한 엔도뉴클레아제로 소화시킨 뒤, 서던 블롯팅으로 분석하였다. 중 및 경쇄에 특이적인 두 개의 프로브를 연속적으로 이용하였다: Cy1 프로브 및 카파 프로브 (도 1).

실시예 3: 바쿨로바이러스-Sf9 세포계에서의 마우스 항체 H90의 키메라화 및 발현 - IgG4의 발현

마우스 항-CD44 항체의 VH 및 VL 가변 부위를 실시예 2에서 설명한 바와 같이 H90 하이브리도마로부터 분리하였다.

1 - IgG4의 형태로 H90 항체를 발현하는 재조합 바이러스의 구성

H90 항체의 중 부위를 플라스미드 구성체 H90 3HS 클론 15로부터 분리한 뒤, 인간 γ 4 중쇄의 발현을 가능케 하는 전달 벡터 pII9Cg4에 삽입하였다. 감마 4 불변 부위의 서열을 제시한다 (서열 7 및 8).

2 - 재조합 바이러스의 획득

Sf9 세포를 각각 상기 설명한 VH (pII9Cg4) 및 VL (pBHUCK47) 가변 부위 및 바이러스 DNA를 함유하는 2개의 전달 벡터 (재조합 바쿨로바이러스) 로 공감염시켰다.

28°C에서 5일간의 배양 후에, 생성된 바이러스를 용해반 기술로 클로닝하였다. 10개의 분리된 바이러스 클론을 증폭하였다. 항체 생성을 ELISA로 확인하였다 (포획 항체: 항-Fd γ 1, 더 바인딩 사이트, Sigma의 과산화효소 표지된 인간 항-카파 항체로 가시화).

ELISA 결과: 분리된 바이러스 클론 모두가 항체를 생산한다.

IgG4 H90			
PBS	16 개의 클론 : B3651 내지 B3666		+ 대조군
0.08	B3651	1.245	3.314
0.071	B3652	0.737	3.065
0.083	B3653	0.723	2.484
0.067	B3654	0.909	1.759
0.057	B3655	0.874	1.127
0.056	B3656	0.778	0.707
0.058	B3657	0.837	0.413
0.071	B3658	0.809	0.257
0.116	B3659	0.99	
0.07	B3660	0.743	
0.058	B3661	0.869	
0.055	B3662	0.729	
0.064	B3663	1.021	
0.053	B3664	0.784	
0.077	B3665	1.45	
0.078	B3666	0.733	

굵은 글씨: 선택한 4개의 클론

3 - 재조합 바이러스의 계능 확인

항체를 발현하는 4개의 바이러스 클론의 계능을 확인하였다 (클론 B3667, B3668, B3669 및 B3670). 증폭한 다음, 배양 상청액에 함유된 바이러스를 35,000rpm에서 30분간 침전시켰다 (TLA 100, Beckmann). 다음으로, 이들 바이러스의 DNA를 추출 및 정제한 뒤, HindIII 제한 엔도뉴클레아제로 소화시켰다. 소화 생성물을 아가로스 겔상에서 분리하였고, 인간 중 및 경쇄에 특이적인 두 프로브로 하이브리드화하였다 (도 2).

이들 클론 가운데 두 개, B3668 및 B3669는 예상되는 계능 조직화에 해당하는 하이브리드화 프로파일을 보인다. 단일 재조합 B3669를 증폭하고, 재조합 H90y4 항체의 생산 및 정제를 위해 적정하였다.

CD44에 대한 항체의 특이성이 입증되었다.

4 - 항체 생산 및 정제

Sf9 세포를 무혈청 배지상에서 배양되도록 하였다 (SB5/6 배지, Dr Gerard Devauchelle (프랑스 Saint Christol Les Ales)로부터 공급받음).

생산을 위해, Sf9 세포를 롤링 병에 대략 500,000 세포/ml의 농도로 파종하고 최종 부피가 400ml가 되게 한다. 세포를 B3669 바이러스로 2PFU/세포의 감염 중복도로 즉시 감염시킨 뒤, 28°C에서 배양한다.

감염 4일 뒤, 배양물을 3000rpm에서 원심분리한다. 상청액을 제거한 뒤 사용할 때까지 -80°C에서 저장한다.

배양 상청액에 함유된 항체를 단백질 A에 대한 종래의 분리 기술에 따라 정제한다. 간단하게는, 배지의 pH를 8.5로 조정하고, 이 배지를 0.5µm Millipore 카트리지를 통해 여과시켜 단백질 A 컬럼 (High Trap ProtA FF, Amersham) 상에 적재되도록 한다. 컬럼을 100mM 트리스 완충액 pH 8.5 로 세척한 뒤, 항체를 100mM 시트르산 나트륨 pH 3.0 내에 용출시킨다. 수집한 분획을 2M 트리스 pH 8.8 로 중화한다 (용출액 3부피당 트리스 1부피).

항체를 Macrosep 30K (Pall) 상에서 농축시킨다. 제조물을 ELISA로 측정한 뒤, 10% 폴리아크릴아미드 겔상에서의 이동 및 은 염색으로 분석한다.

실시예 4: 키메라 항-CD44 항체의 분화 활성

인간 감마 1/감마 4로 키메라화된 H90

인간 감마 1로 키메라화된 H 90의 분화 활성 연구를 골수성 백혈병 세포주 THP-1 및 NB4에 대해 수행하였다. 이 연구는 Florence Smadja-Joffe의 문헌 (Blood January 2002, vol 99, number 1 - Blood August 2000, vol 96, number 3) 에 이미 설명된 분화 기준을 이용하여 행하였다. 이 기존 연구는 보다 신뢰성 있는 분화 변수가 CD11b (과립구 및 대식 세포 분화 모두의 동안에 증가), CD14 (단핵 세포-분화 특이적) 및/또는 CD15 (과립구 분화 과정에서 가장 증가하지만, 단핵 세포 분화 과정에서도 약간 증가) 와 같은 골수-분화 특이적 항원 수준의 증가라는 것을 보였다.

결과

THP-1 및 NB4 세포는 각각 AML5 및 AML3 아형에 대한 모델인 확립 세포주이다 (Charrad 등 Blood 2002). 이들 세포주를 서로 다른 형태의 분화-유도 항-CD44 항체 H90으로 3일간 처리하였다 : 마우스의 것, 인간 감마 1 사슬로 키메라화된 것, 또는 인간 감마 4 사슬로 키메라화된 것 (각각 ch-인간 감마 1 사슬 및 ch-인간 감마 1 사슬 H90으로 지칭). 이들 형태 각각을 50µg/mL의 최종 농도로 이용하였다. 분화 항원 CD11b, CD15 및 CD14의 수준을 FITC(플루오레세인 이소티오시아네이트)-접합 특이적 단클론 항체 및 유세포 분류기 (flow-cytometry) 분석을 이용하여 평가하였다. 이는 FITC-접합 동형-일치 IgG로 표지된 세포들의 것과 대비한 양성 세포의 백분율 및 평균 형광 강도로 표현된다. 개별 형태의 H90은 양성 세포의 백분율 또는 평균 형광 강도의, 적어도 1 또는 2개의 분화 항원의 증가된 발현을 유발하는 경우, 분화를 유도할 수 있는 것으로 판단하였다.

표 4에 나타난 결과는 인간 감마 1 및 인간 감마 1 키메라화 H90 분자 모두가 THP-1 및 NB 세포 모두의 분화 유도에 있어서 마우스의 것보다 효율적임을 알려 준다. 실제로, THP-1 세포에서 이들은 CD15 양성 세포의 백분율 및 CD15 형광

강도의 보다 큰 증가, 그리고 CD14 양성 세포 백분율의 보다 큰 증가를 유발한다. 유사하게, NB4 세포에서 이들은 CD15의 발현을 마우스 H90 형태보다 증가시켰고, CD11b의 수준을 증가시키는 데 마우스 H90만큼 효율적이었다. 이 관점에서 인간 감마 4 키메라화 H90은 인간 감마 1 키메라화 H90보다 효율적이었다.

[표 4]

			대조군*	H90		
				마우스	ch-인간 감마 1 사슬**	ch-인간 감마 4 사슬**
THP-1 세포 (단핵모세포 AML 세포)	CD15	양성 세포 %	87	72	99	83
		평균 형광 강도	36	45	94	65
	CD14	양성 세포 %	0	3	11	14
		평균 형광 강도	0	28	22	25
NB4 세포 (전골수구 AML 세포)	CD15	양성 세포 %	87	72	99	83
		평균 형광 강도	36	45	94	65
	CD11b	양성 세포 %	19	33	35	34
		평균 형광 강도	32	47	27	48

대조군*: 마우스 IgG1, 인간 감마1 또는 인간 감마4로 처리한 세포. 유사한 값을 얻었다. 이 표에 나타난 값들은 세포를 마우스 IgG1으로 처리하여 얻은 것이다.

여기에 감마 1 구성체의 Fc 부분이 유도하는 CDC 세포 독성 활성 그리고 특히 ADCC 세포 독성 활성이 추가된다.

키메라 P245 (H90)의 세포 독성 활성을 앞서 설명한 2개의 AML 주 상에서 "시험관 내" 연구하였으며, P245, A3D8 및 Hermes 3을 포함한 다른 항-CD44 항체와 비교하였다.

THP1 및 NB4에서, 키메라화 감마 1 항체의 강력한 세포 독성 능력이 관찰되었다. 4일째에, 세포 독성은 80%를 넘는다. 이 활성은 키메라화 항체에 대해서만 나타난다. 어떠한 마우스 항체도 이 성질을 보유하지 않는다. 이는 AML5를 앓고 있는 환자의 세포에서도 관찰된다.

단일 모세포-유형 AML5 세포는 CD44 수용체를 발현하므로 표적 세포이면서, 단핵구로서 감마-글로불린, 특히 감마 1에 대한 Fc 수용체를 보유하여 표적 세포이기만 한 전골수구 AML3 세포의 경우는 그러하지 아니한 ADCC 현상을 낳으므로 작동자 세포이기도 하다.

이 ADCC 활성 역시 세포 독성을 위한 NK 세포를 이용하여 "시험관 내" 연구하였다 (종래의 측정).

감마-4 구성체의 경우에는 세포 독성이 없이 분화 활성만이 관찰되었다.

실시예 5: 갈레닉(galenic) 벡터 - 에멀전의 제형

LIPOID E-80, Vit E 및 스테아릴아민을 유상에 직접 용해한다. 한편, 폴록사머와 글리세롤을 수상에 직접 용해한다. 이 유상과 수상은 마그네틱 교반기를 이용하여 따로 제조하고, 여과한 뒤 70°C의 온도로 가열한다. 두 상을 마그네틱 교반기를 이용하여 섞는다. 온도를 85°C로 올린다. 혼합물을 Polytron 또는 Ultraturrax로 3 내지 5분간 균일화한다. 온도를 20°C로 급속히 낮춘다. 이 에멀전을 고압 균일화기 (마이크로유화기)를 통해 5분간 통과시킨다. 온도를 20°C로 급속히 조절한다. pH를 0.1M 염산으로 원하는 값으로 조정한다. 에멀전을 0.45µm 필터를 통해 통과시키고, 실리코화 유리병에 질소 분위기하에 저장한 뒤, 오토클레이브에서 소독한다.

최대 40개의 IgG 분자가 하나의 양이온성 유적에 접합할 수 있음이 밝혀졌다.

결론적으로, 이 갈레릭 벡터는 AML 세포상의 항체 사이트의 갯수를 증가시키고 항 CD44 항체의 반감기를 개선하는 것으로 밝혀졌다.

실시예 6: 본 발명에 따른 처리

의약의 제형 (20mL 플라스크, 냉동 건조):

- 활성소 : 냉동 건조 P245 100mg
- 부형제 : 사카로스, 폴리소르베이트, 제1인산나트륨, 제2인산나트륨.

이 제형은 그 포장 내에서 +2 및 +8℃ 사이에 18개월간 놓아 둘 수 있다. 냉동하지 않는다.

일단 제조된 후에는 의약은 3시간만 유지될 수 있다.

처리: 5mg/kg을 저속 주입 (예컨대 2시간 동안).

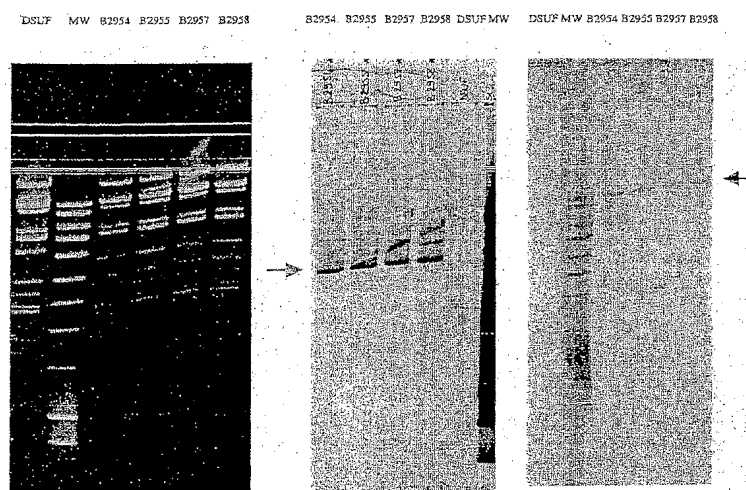
도면의 간단한 설명

도 1은 4개의 바이러스 클론 B2954, B2955, B2957, B2958의 DNA의 서던 블롯 (Southern Blot) 을 가리킨다. 첫째, 둘째 및 셋째 슬라이드는 각각 BET 착색, C γ 1 프로브 및 카파 프로브에 의한 하이브리드화에 대응된다.

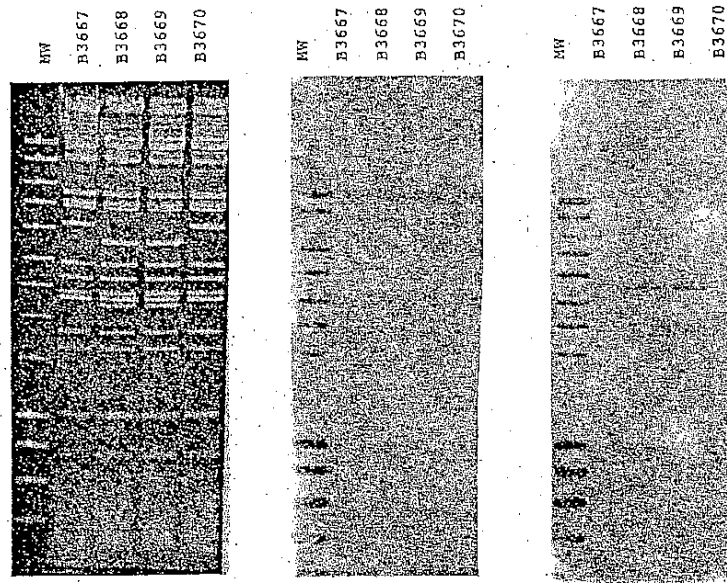
도 2는 또다른 4개의 바이러스 클론 B3667, B3668, B3669, B3670의 DNA의 서던 블롯을 가리킨다. 첫째, 둘째 및 셋째 슬라이드는 각각 BET 착색, 카파 프로브 및 감마 프로브에 의한 하이브리드화에 대응된다.

도면

도면1



도면2



도면3

서열 1 : 클론 «H90 3LS cl 7»로부터의 VL 뉴클레오타이드 서열
및

서열 2 : 클론 «H90 3LS cl 7»로부터의 VL 아미노산 서열

70/1	100/11
GAT GTT GTG ATG ACT CAG ACC CCA CTC ACT	TTG TCG GTT ACC ATT GGA CAA CCA GCC TCC
D V V M T Q T P L T	L S V T I G Q P A S
130/21	160/31
ATC TCT TGC AAA TCA AGT CAG AGC CTC TTA	CAT AGT AAT GGA AAG ACA TAT TTG AAT TGG
I S C K S S Q S L L	H S N G K T Y L N W
190/41	220/51
TTG TTA CAG AGG CCA GGC CAG TCT CCA AAG	CTC CTA ATC TAT CTG GTG TCT AAA CTG GAA
L L Q R P G Q S P X	L L I Y L V S K L E
250/61	280/71
TCT GGA GTC CCT GAC AGG TTC AGT GGC AGT	GGA TCA GGG ACA GAA TTC ACA CTG AAA ATC
S G V P D R F S G S	G S G T E F T L K I
310/81	340/91
AGC AGA GTG GAG GCT GAG GAT TCG GGA GTT	TAT TAC TGC TTG CAA GCT ACA CAT TTT CCT
S R V E A E D S G V	Y Y C L Q A T H F P
370/101	400/111
CTC ACG TTC GGT GCT GGG ACC AAA CTG GAG	CTG AAA CGG GCT GAT GCT GCA CCA ACT GTA
L T F G A G T K L E	L K R A D A A P T V
430/121	
TCC ATC TTC CCA CCA GTC GAC	
S I F P P V D	

Début de la région constante
souris

도면4

서열 3 : 클론 « H90 3HS cl 15 »로부터의 VH 뉴클레오타이드 서열
및

서열 4 : 클론 « H90 3HS cl 15 »로부터의 VH 아미노산 서열

```

37/51          67/11
CAG GTT CAG CTG CAG CAG TCT GGG GAT GAG CTG GTG AGG CCT GGG TCC TCA GTG AAG ATT
Q V Q L Q Q S G D E L V R P G S S V K I
97/21          127/31
TCC TGC AAG GCT TCT GGC TAT GCA TTC AGT AGG TAC TGG ATG AAC TGG GTG AAG CAG AGG
S C K A S G Y A F S R Y W M N W V K Q R
157/41          187/51
CCT GGA CAG GGT CTT CAG TGG ATT GGA CAG ATT TAT CCT GGA GAT GGT GAT ACT AAC TAC
P G Q G L E W I G Q I Y F G D G D T N Y
217/61          247/71
AAT GGA AAG TTC AAG GGT AAA GCC ACA CTG ACT GCA GAC AAA TCC TCC AGC ACA GCC TAC
N G K F K G K A T L T A D K S S S T A Y
277/81          307/91
ATG CAG CTC AAC AGC CTA ACA TCT GAG GAC TCT GCG GTC TAT TTC TGT GCA AGA CGG CGA
M Q L N S L T S E D S A V Y F C A R R R
337/101          367/111
TGG TCC GAT TAC TTT GGT ATG GAC TAC TGG GGT CAA GGA ACC TCA GTC ACC GTC TCC TCA
W S D Y F G M D Y W G Q G T S V T V S S
397/121          427/131
GCC AAA ACG ACA CCC CCA TCT GTC TAT CCA CTG GCC CCT GGA TCT ACT GCC CAA ACT AAC
A K T T P P S V Y P L A P G S T A Q T N

```

Début de la région constante gamma 1 de souris

```

457/141
TCC ATG GTG ACC CTG GGA TGC CTG GGT C
S M V T L G C L G

```

도면5

서열 5 : 뉴클레오타이드 감마 1 불변 부위 서열

서열 6 : 아미노산 감마 1 불변 부위 서열

1/1 31/11
GCT AGC ACC AAG GGC CCA TCG GTC TTC CCC CTG GCA CCC TCC TCC AAG AGC ACC TCT GGG
A S T K G P S V F P L A P S S K S T S G
61/21 91/31
GGC ACA GCG GCC CTG GGC TGC CTG GTC AAG GAC TAC TTC CCC GAA CCG GTG ACG GTG TCG
G T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S
121/41 151/51
TGG AAC TCA GGC GCC CTG ACC AGC GGC GTG CAC ACC TTC CCG GCT GTC CTA CAG TCC TCA
W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S
181/61 211/71
GGA CTC TAC TCC CTC AGC AGC GTG GTG ACC GTG CCC TCC AGC AGC TTG GGC ACC CAG ACC
G L Y S L S S V V T V P S S S L G T Q T
241/81 271/91
TAC ATC TGC AAC GTG AAT CAC AAG CCC AGC AAC ACC AAG GTG GAC AAG AAA Gtt GAG CCC
Y I C N V N H K P S N T K V D K K V E P
301/101 331/111
AAA TCT TGT GAC AAA ACT CAC ACA TGC CCA CCG TGC CCA GCA CCT GAA CTC CTG GGG GGA
K S C D K T H T C P P C P A P E L L G G
361/121 391/131
CCG TCA GTC TTC CTC TTC CCC GCA AAA CCC AAG GAC ACC CTC ATG ATC TCC CGG ACC CCT
P S V F L F P P K F K D T L M I S R T P
421/141 451/151
GAG GTC ACA TGC GTG GTG GTG GAC GTG AGC CAC GAA GAC CCT GAG GTC AAG TTC AAC TGG
E V T C V V V D V S H E D P E V K F N W
481/161 511/171
TAC GTG GAC GGC GTG GAG GTG CAT AAT GCC AAG ACA AAG CCG CGG GAG GAG CAG TAC AAC
Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y N
541/181 571/191
AGC ACG TAC CGC GTG GTC AGC GTC CTC ACC GTC CTG CAC CAG GAC TGG CTG AAT GGC AAG
S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K
601/201 631/211
GAG TAC AAG TGC AAG GTC TCC AAC AAA GCC CTC CCA GCC CCC ATC GAG AAA ACC ATC TCC
E Y K C K V S N K A L P A P I E K T I S
661/221 691/231
AAA GCC AAA GGG CAG CCC CGA GAA CCA CAG GTG TAC ACC CTG CCC CCA TCC CGG GAT GAG
K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R D E
721/241 751/251
CTG acc AAG AAC CAG GTC AGC CTG ACC TGC CTG GTC AAA GGC TTC TAT CCC AGC GAC ATC
L T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I
781/261 811/271
GCC GTG GAG TGG GAG AGC AAT GGG CAG CCG GAG AAC AAC TAC AAG ACC ACG CCT CCC GTG
A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V
841/281 871/291
CTG GAC TCC GAC GGC TCC TTC TTC CTC TAC AGC AAG CTC ACC GTG GAC AAG AGC AGG TGG
L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W
901/301 931/311
CAG CAG GGG AAC GTC TTC TCA TGC TCC GTG ATG CAT GAG GCT CTG CAC AAC CAC TAC ACG
Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T
961/321
CAG AAG AGC CTC TCC CTG TCT CCG GGT AAA
Q K S L S L S P G K

도면6

서열 7 : 뉴클레오타이드 감마 4 불변 부위 서열

서열 8 : 아미노산 감마 4 불변 부위 서열

```

1/1      31/11
GCT TCC ACC AAG GGC CCA TCC GTC TTC CCC CTG GCG CCC TGC TCC AGG AGC ACC TCC GAG
A S T K G P S V F P L A P C S R S T S E
61/21    91/31
AGC ACA GCG GCC CTG GGC TGC CTG GTC AAG GAC TAC TTC CCC GAA CCG GTG ACG GTG TCG
S T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S
121/41   151/51
TGG AAC TCA GGC GCC CTG ACC AGC GGC GTG CAC ACC TTC CCG GCT GTC CTA CAG TCC TCA
W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S
181/61   211/71
GSA CTC TAC TCC CTC AGC AGC GTG GTG ACC GTG CCC TCC AGC AGC TTG GGC ACG AAG ACC
G L Y S L S S V V T V P S S S L G T K T
241/81   271/91
TAC ACC TGC AAT GTA GAT CAC AAG CCC AGC AAC ACC AAG GTG GAC AAG AGA GTT GAG TCC
Y T C N V D H K P S N T K V D K R V E S
301/101  331/111
AAA TAT GGT CCC CCA TGC CCA TCA TGC CCA GCA CCT GAG TTC CTG GGG GGA CCA TCA GTC
K Y G P P C P S C P A P E F L G G P S V
361/121  391/131
TTC CTG TTC CCC CCA AAA CCC AAG GAC ACT CTC ATG ATC TCC CGG ACC CCT GAG GTC ACG
F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T
421/141  451/151
TGC GTG GTG GTG GAC GTG AGC CAG GAA GAC CCC GAG GTC CAG TTC AAC TGG TAC GTG GAT
C V V V D V S Q E D P E V Q F N W Y V D
481/161  511/171
GGC GTG GAG GTG CAT AAT GCC AAG ACA AAG CCG CGG GAG GAG CAG TTC AAC AGC ACG TAC
G V E V H N A K T K P R E E Q F N S T Y
541/181  571/191
CGT GTG GTC AGC GTC CTC ACC GTC CTG CAC CAG GAC TGG CTG AAC GGC AAG GAG TAC AAG
R V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K
601/201  631/211
TGC AAG GTC TCC AAC AAA GGC CTC CCG TCC TCC ATC GAG AAA ACC ATC TCC AAA GCC AAA
C K V S N X G L P S S I E K T I S K A K
661/221  691/231
GGG CAG CCC CGA GAG CCA CAG GTG TAC ACC CTG CCC CCA TCC CAG GAG GAG ATG ACC AAG
G Q P R E P Q V Y T L P P S Q E E M T K
721/241  751/251
AAC CAG GTC AGC CTG ACC TGC CTG GTC AAA GGC TTC TAC CCC AGC GAC ATC GCC GTG GAG
N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E
781/261  811/271
TGG GAG AGC AAT GGG CAG CCG GAG AAC AAC TAC AAG ACC ACG CCT CCC GTG CTG GAC TCC
W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S
841/281  871/291
GAC GGC TCC TTC CTC TAC AGC AGG CTA ACC GTG GAC AAG AGC AGG TGG CAG GAG GGG
D G S F F L Y S R L T V D K S R W Q E G
901/301  931/311
AAT GTC TTC TCA TGC TCC GTG ATG CAT GAG GCT CTG CAC AAC CAC TAC ACA CAG AAG AGC
N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S
961/321
CTC TCC CTG TCT CTG GGT AAA
L S L S L G K

```

En vert : 2 mutations silencieuses

서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE

UNIVERSITY HEALTH NETWORK

<120> CHIMERIC ANTI CD44 ANTIBODIES AND THEIR APPLICATIONS

<130> CP/BT/BB 61172Bis

<140> PCT/EP04/014157

<141> 2004-11-19

<150> EP 03 292 873.1

<151> 2003-11-19

<160> 8

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 381

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> VL nucleotide sequence

<400> 1

gatgttgtga tgactcagac cccactcact ttgtcgggta ccattggaca accagcctcc	60
atctcttgca aatcaagtca gagcctctta catagtaatg gaaagacata tttgaattgg	120
ttgttacaga ggccaggcca gtctccaaag ctctaatact atctgggtgtc taaactggaa	180
tctggagtcc ctgacagggt cagtggcagt ggatcaggga cagaattcac actgaaaatc	240
agcagagtgg aggctgagga ttcgggaggt tattactgct tgcaagctac acattttcct	300
ctcacgttcg gtgctgggac caaactggag ctgaaacggg ctgatgctgc accaactgta	360
tccatcttcc caccagtcga c	381

<210> 2

<211> 127

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> VL amino acid sequence

<400> 2

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

Gln	Pro	Ala	Ser	Ile	Ser	Cys	Lys	Ser	Ser	Gln	Ser	Leu	Leu	His	Ser
			20				25					30			

Asn	Gly	Lys	Thr	Tyr	Leu	Asn	Trp	Leu	Leu	Gln	Arg	Pro	Gly	Gln	Ser
		35					40				45				

Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Leu	Val	Ser	Lys	Leu	Glu	Ser	Gly	Val	Pro
	50					55				60					

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

Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Ser	Gly	Val	Tyr	Tyr	Cys	Leu	Gln	Ala
			85					90						95	

Thr	His	Phe	Pro	Leu	Thr	Phe	Gly	Ala	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Leu	Lys
			100				105					110			

Arg	Ala	Asp	Ala	Ala	Pro	Thr	Val	Ser	Ile	Phe	Pro	Pro	Val	Asp
		115					120					125		

<210> 3

<211> 448

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> VH nucleotide sequence

<400> 3

```

caggttcagc tgcagcagtc tggggatgag ctggtgaggc ctgggtcctc agtgaagatt      60
tcctgcaagg cttctggcta tgcattcagt aggtactgga tgaactgggt gaagcagagg      120
cctggacagg gtcttgagtg gattggacag atttatcctg gagatgggtga tactaactac      180
aatggaaagt tcaagggtaa agccacactg actgcagaca aatcctccag cacagcctac      240
atgcagctca acagcctaac atctgaggac tctgcggtct atttctgtgc aagacggcga      300
tggtccgatt actttggtat ggactactgg ggtcaaggaa cctcagtcac cgtctcctca      360
gccaaaacga ccccccatc tgtctatcca ctggcccctg gatctactgc ccaaactaac      420
tccatggtga ccctgggatg cctggggtc                                     448

```

<210> 4

<211> 149

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> VH amino acid sequence

<400> 4

```

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

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Arg Tyr
          20           25           30

```

Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Gln Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Gly Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Arg Arg Trp Ser Asp Tyr Phe Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val
115 120 125

Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Ser Thr Ala Gln Thr Asn Ser Met Val Thr
130 135 140

Leu Gly Cys Leu Gly
145

<210> 5

<211> 990

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Nucleotide gamma 1 constant region sequence

<400> 5

gctagcacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcaccct cctccaagag cacctctggg 60

ggcacagcgg ccctgggctg cctggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacggtgtcg 120

tggaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtcctca 180
 ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg caccagacc 240
 tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagaa agttgagccc 300
 aaatcttgtg acaaaaactca cacatgcccc ccggtgccag cacctgaact cctgggggga 360
 ccgtcagtct tcctcttccc cccaaaaccc aaggacaccc tcatgatctc ccggaccct 420
 gaggtcacat gcgtggtggt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg 480
 tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac 540
 agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtctgcacc aggactggct gaatggcaag 600
 gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc 660
 aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacaccc tgccccatc ccgggatgag 720
 ctgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc 780
 gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg 840
 ctggactccg acggctcctt ctctctctac agcaagctca ccgtggacaa gagcagggtg 900
 cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg 960
 cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa 990

<210> 6

<211> 330

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid gamma 1 constant region sequence

<400> 6

Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys
1				5				10						15	

Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr
			20					25					30		

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

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

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
225 230 235 240

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330

<210> 7

<211> 981

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Nucleotide gamma 4 constant region sequence

<400> 7

gcttccacca agggcccatc cgtcttcccc ctggcgccct gctccaggag cacctccgag	60
agcacagcgg ccctgggctg cctggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacggtgtcg	120
tggaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtccctca	180
ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg cacgaagacc	240
tacacctgca atgtagatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag agttgagtcc	300
aaatatggtc ccccatgccc atcatgccca gcacctgagt tcctgggggg accatcagtc	360

ttcctgttcc ccccaaaacc caaggacact ctcatgatct cccggacccc tgaggtcacg 420
 tgcgtggtgg tggacgtgag ccaggaagac cccgaggtcc agttcaactg gtacgtggat 480
 ggctgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagttcaa cagcacgtac 540
 cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaacggcaa ggagtacaag 600
 tgcaaggtct ccaacaaaagg cctcccgctcc tccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa 660
 gggcagcccc gagagccaca ggtgtacacc ctgcccccat cccaggagga gatgaccaag 720
 aaccaggtca gcctgacctg cctggtcaaa ggcttctacc ccagcgacat cgccgtggag 780
 tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccggt gctggactcc 840
 gacggctcct tcttcctcta cagcaggcta accgtggaca agagcaggtg gcaggagggg 900
 aatgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac acagaagagc 960
 ctcttcctgt ctctgggtaa a 981

<210> 8

<211> 327

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid gamma 4 constant region sequence

<400> 8

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
 1 5 10 15

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

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

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

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro
100 105 110

Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
115 120 125

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
130 135 140

Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
145 150 155 160

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
165 170 175

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
180 185 190

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
195 200 205

Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
210 215 220

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
225 230 235 240

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
245 250 255

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
260 265 270

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 275 280 285

Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
 290 295 300

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 305 310 315 320

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 325