



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년03월21일
(11) 등록번호 10-1932697
(24) 등록일자 2018년12월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01) A61K 39/395 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2014-7031292
(22) 출원일자(국제) 2013년04월25일
심사청구일자 2018년04월25일
(85) 번역문제출일자 2014년11월06일
(65) 공개번호 10-2015-0008092
(43) 공개일자 2015년01월21일
(86) 국제출원번호 PCT/US2013/038135
(87) 국제공개번호 WO 2013/163377
국제공개일자 2013년10월31일
(30) 우선권주장
61/639,637 2012년04월27일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
Journal of Immunology 2004, 173(5):2933-2941.
Clinical & Experimental Immunology, 2003,
133(3):318-325.
WO2002011767 A2

(73) 특허권자
노보 노르디스크 에이/에스
덴마크 디케이-2880 박스바에르트 노보 알레
암젠 인코포레이티드
미국 캘리포니아 91320-1799 싸우전드 오크스 원
암젠센터 드라이브
(72) 발명자
안델센 메트 다알
덴마크 디케이-2880 박스바에르트 노보 알레 노보
노르디스크 에이/에스 내
덴출러 제프
미국 워싱턴 98133 시애틀 웨인 플레이스 노스
14012
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인와이에스장

전체 청구항 수 : 총 17 항

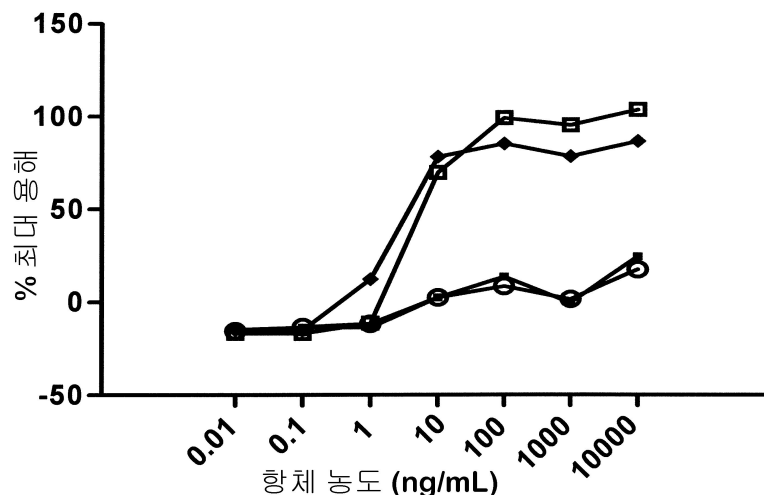
심사관 : 이현지

(54) 발명의 명칭 사람 CD30 리간드 항원 결합 단백질

(57) 요약

본 발명에는 사람 CD30L 항원 결합 단백질과 관련된 조성물 및 방법이 제공된다. 본원에 기술된 조성물은 사람 CD30L 항원 결합 단백질, 사람 CD30L 항원 결합 단백질을 코드화하는 폴리뉴클레오티드, 이들 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터, 숙주 세포 및 제약학적 조성물을 포함한다. 이들 각각의 조성물을 제조하고 사용하는 방법이 또한 제공된다.

대표도



(72) 발명자

아미테이즈 리차드 제이.

미국 워싱턴 98110 베인브릿지 아일랜드 패카드 레
인 5840

클라크 루틸리오

미국 워싱턴 98110 베인브릿지 아일랜드 올드 밀
로드 노스이스트 5335

명세서

청구범위

청구항 1

CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 및 CDRL3을 포함하는, 사람 CD30L에 결합하는 분리된 항체로서,

- a) CDRH1, CDRH2 및 CDRH3은 각각 SEQ ID NO: 14, 19, 25로 표시되는 아미노산 서열로 한정되고, CDRL1, CDRL2 및 CDRL3은 각각 SEQ ID NO: 1, 7 및 11로 표시되는 아미노산 서열로 한정되거나, 또는
- b) CDRH1, CDRH2 및 CDRH3은 각각 SEQ ID NO: 15, 21, 26으로 표시되는 아미노산 서열로 한정되고, CDRL1, CDRL2 및 CDRL3은 각각 SEQ ID NO: 2, 8 및 12로 표시되는 아미노산 서열로 한정되거나, 또는
- c) CDRH1, CDRH2 및 CDRH3은 각각 SEQ ID NO: 15, 21, 26으로 표시되는 아미노산 서열로 한정되고, CDRL1, CDRL2 및 CDRL3은 각각 SEQ ID NO: 3, 8 및 12로 표시되는 아미노산 서열로 한정되거나, 또는
- d) CDRH1, CDRH2 및 CDRH3은 각각 SEQ ID NO: 16, 22, 27로 표시되는 아미노산 서열로 한정되고, CDRL1, CDRL2 및 CDRL3은 각각 SEQ ID NO: 4, 9 및 12로 표시되는 아미노산 서열로 한정되거나, 또는
- e) CDRH1, CDRH2 및 CDRH3은 각각 SEQ ID NO: 17, 23, 28로 표시되는 아미노산 서열로 한정되고, CDRL1, CDRL2 및 CDRL3은 각각 SEQ ID NO: 5, 8 및 13으로 표시되는 아미노산 서열로 한정되거나, 또는
- f) CDRH1, CDRH2 및 CDRH3은 각각 SEQ ID NO: 18, 24, 29로 표시되는 아미노산 서열로 한정되고, CDRL1, CDRL2 및 CDRL3은 각각 SEQ ID NO: 6, 10 및 12로 표시되는 아미노산 서열로 한정되는, 분리된 항체.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 항체는 사람 CD30L의 AA 위치 201-234로 한정된 사람 CD30L의 C-말단 영역에 결합하는 것을 특징으로 하는 분리된 항체.

청구항 3

제 2 항에 있어서, 항체는 사람 CD30L의 AA 위치 75-95로 한정된 사람 CD30L의 추가의 영역에 결합하는 것을 특징으로 하는 분리된 항체.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 항체는 다음으로 구성되는 군으로부터 선택된 적어도 하나의 특성을 가지는 것을 특징으로 하는 분리된 항체:

- a) hCD30/hCD30L 상호작용 억제;
- b) hCD30L-유도된 IL-8 유도 억제;
- c) 사람 CD30L에의 결합에 대해 제 1 항의 a) 내지 f) 하에 한정된 항체 중 하나와 교차-결합; 및
- d) 사람 CD30L에 대한 해리 상수가 최대 70pM.

청구항 5

제 1 항에 있어서, 상기 항체는 다음의 항체 중 하나와 동일하거나 더 낮은 Kd로 사람 CD30L과 결합하는 것을 특징으로 하는 분리된 항체:

- A) SEQ ID NO: 36로 한정된 경쇄 가변 영역과 SEQ ID NO: 50로 한정된 중쇄 가변 영역을 포함하는 항체;
- B) SEQ ID NO: 38로 한정된 경쇄 가변 영역과 SEQ ID NO: 64로 한정된 중쇄 가변 영역을 포함하는 항체;
- C) SEQ ID NO: 40로 한정된 경쇄 가변 영역과 SEQ ID NO: 66로 한정된 중쇄 가변 영역을 포함하는 항체;
- D) SEQ ID NO: 42로 한정된 경쇄 가변 영역과 SEQ ID NO: 68로 한정된 중쇄 가변 영역을 포함하는 항체;

- E) SEQ ID NO: 44로 한정된 경쇄 가변 영역과 SEQ ID NO: 70로 한정된 중쇄 가변 영역을 포함하는 항체; 또는
F) SEQ ID NO: 46로 한정된 경쇄 가변 영역과 SEQ ID NO: 72로 한정된 중쇄 가변 영역을 포함하는 항체.

청구항 6

제 1 항에 있어서, 항체는 사람 CD30L에의 결합에 대해 다음의 항체 중 하나 이상의 Fab와 경합하는 것을 특징으로 하는 분리된 항체:

- A) SEQ ID NO: 36로 한정된 경쇄 가변 영역과 SEQ ID NO: 50로 한정된 중쇄 가변 영역을 포함하는 항체;
B) SEQ ID NO: 38로 한정된 경쇄 가변 영역과 SEQ ID NO: 64로 한정된 중쇄 가변 영역을 포함하는 항체;
C) SEQ ID NO: 40로 한정된 경쇄 가변 영역과 SEQ ID NO: 66로 한정된 중쇄 가변 영역을 포함하는 항체;
D) SEQ ID NO: 42로 한정된 경쇄 가변 영역과 SEQ ID NO: 68로 한정된 중쇄 가변 영역을 포함하는 항체;
E) SEQ ID NO: 44로 한정된 경쇄 가변 영역과 SEQ ID NO: 70로 한정된 중쇄 가변 영역을 포함하는 항체; 및
F) SEQ ID NO: 46로 한정된 경쇄 가변 영역과 SEQ ID NO: 72로 한정된 중쇄 가변 영역을 포함하는 항체.

청구항 7

제 1 항에 있어서, 상기 항체는 IgG1-, IgG2-, IgG3- 또는 IgG4-타입인 것을 특징으로 하는 분리된 항체.

청구항 8

제 1 항에 있어서, CDRH1, CDRH2 및 CDRH3은 각각 SEQ ID NO: 14, 19, 25로 표시되는 아미노산 서열로 한정되고, CDRL1, CDRL2 및 CDRL3은 각각 SEQ ID NO: 1, 7 및 11로 표시되는 아미노산 서열로 한정되는 것을 특징으로 하는 분리된 항체.

청구항 9

제 1 항에 있어서, SEQ ID NO: 48의 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO: 36의 경쇄 가변 영역을 포함하는 것을 특징으로 하는 분리된 항체.

청구항 10

제 1 항 내지 제 9 항 중 어느 한 항의 적어도 하나의 항체 및 제약학적으로 허용되는 부형제를 포함하는, 자가면역 질병, 만성 염증성 질병 또는 암 치료용 제약학적 조성물.

청구항 11

제 1 항 내지 제 9 항 중 어느 한 항의 항체를 코드화하는 분리된 핵산 분자.

청구항 12

제 11 항의 핵산 분자를 포함하는 숙주 세포.

청구항 13

환자에서 CD30L 활성을 감소시키는데 사용하기 위한, SEQ ID NO: 48의 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO: 36의 경쇄 가변 영역을 포함하는 분리된 항체.

청구항 14

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 환자에서 CD30L 활성을 감소시키는데 사용하기 위한 것임을 특징으로 하는 분리된 항체.

청구항 15

제 9 항에 있어서, CD30L 활성과 관련된 상태를 치료 또는 예방하는데 사용하기 위한 것임을 특징으로 하는 분리된 항체.

청구항 16

제 10 항에 있어서, 환자에서 자가면역 질병, 만성 염증성 질병 또는 암과 관련된 CD30L 활성을 감소시키는데 사용하기 위한 것임을 특징으로 하는 제약학적 조성물.

청구항 17

제 10 항에 있어서, CD30L 활성과 관련된 상태를 치료 또는 예방하는데 사용하기 위한 것이고, 상기 CD30L 활성과 관련된 상태는 자가면역 질병, 만성 염증성 질병 또는 암을 포함하는 것을 특징으로 하는 제약학적 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 CD30L에 결합하는 항원 결합 단백질에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] CD30에 대한 자연 발생적인 리간드인 CD30 리간드(CD30L, CD153)는 CD30에 특이적으로 결합하는 유형 II 막 당 단백질로, 그것의 세포질 도메인을 경유하여 신호를 전파하도록 CD30을 촉발시킨다. CD30과 CD30L은 각각 TNFR과 TNF 슈퍼패밀리의 구성원인 상호작용하는 세포 표면 당단백질이다(Durkop et al, *Cell*, 68:421, 1992; Smith et al, *Cell*, 73:1349, 1993; 미국 특허 번호 5,480,981; 5,677,430; 6,143,869 및 6,652,854). CD30과 CD30L의 발현은 면역계의 세포에 제한되고 엄격하게 조절된다. CD30은 주로 활성화된 B 세포 및 T 세포의 하위 세트에서 활성화된/기억 표현형으로 발현된다(Ellis et al., *J. Immunol.*, 151:2380, 1993; Falini et al., *Blood*, 85:1, 1995). CD30L은 활성화된 마우스 및 사람 T 세포 상에서 고수준으로 발현된다(Shimozato et al, *Biochem. & Biophys. Res. Comm.*, 256:519, 1999; Armitage, *J. Biological Regulators & Homeostatic Agents*, 14:142, 2000). CD30L의 상대적인 유전자 발현의 극적인 변화는 B 세포가 배종심(germinal center)을 통해 수송됨에 따라 발생한다(Klein et al, *Proc. Nat. Acad. Sci., USA*, 100:2639, 2003). 그로써 B 세포 상에서의 CD30L의 발현은 단계 및 맥락 특이적일 수 있다. CD30L은 또한 T 세포가 B 세포와 상호작용하는 장소인 비장 여포(splenic follicle)에 존재하는 마우스 수지상세포-유사 부속 세포의 독특한 집단의 마커일 것으로 여겨진다(Kim et al., *Immunity*, 18:643, 2003).

[0003] CD30/CD30L을 발현하는 세포들 사이의 상호작용은 강력한 T-세포 의존성 이차 또는 부류간 스위칭된 항체 반응의 생성에 중요한 것으로 여겨진다. 그런 역할에 대한 증거는 마우스 시스템에서 이루어진 시험관 내 연구(Shanebeck et al., *Eur. J. Immunol.*, 25:2147-53, 1995) 및 생체 내 연구(Gaspal et al., *J. Immunol.*, 174:3891-6, 2005)로부터의 데이터를 포함한다. 또한, 마우스 CD30L에 대한, 차단성이지만 비-고갈성인 쥐 mAb로 마우스를 생체 내 처리하면 T 및/또는 B 세포-의존성 자가면역 질병의 많은 모델에서 질병의 발생 또는 진전을 억제하는 것으로 밝혀졌다(미국 특허 번호 6,667,039). 강력한 체액 면역 성분을 포함한 모델에서, 질병의 억제는 질병-관련 항체 반응의 억제와 상관관계가 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0004] 그러므로 치료 및 진단 용도에 사용하기 위하여 CD30L에 결합하는 사람 항체 및/또는 항원 결합 영역을 포함하는 조성물을 제공하는 것이 유용할 것이다.

과제의 해결 수단

[0005] CD30L, 특히 사람 CD30L에 결합하는 항원 결합 단백질이 제공된다. 사람 CD30L 항원 결합 단백질은 CD30L/CD30 상호작용에 관련된 적어도 하나의 생물학적 반응을 감소, 억제, 간섭 및/또는 조절할 수 있고, 그로써 CD30L-관련 질병 또는 장애의 효과를 개선시키는 데 유용하다. CD30L 항원 결합 단백질은 예를 들면 CD30L/CD30 상호작용을 감소, 억제, 간섭 및/또는 조절하기 위해 사용될 수 있다.

[0006] 한 구체예에서, 분리된 항원 결합 단백질은 AA 201 내지 234를 포함하는 CD30L의 C-말단 영역에 결합한다. 추가의 구체예에서는 AA 201 내지 234를 포함하는 CD30L의 C-말단 영역 및 AA 75 내지 95에 의해 규정되는, 세포의 재성 영역의 N-말단 부분에 위치한 CD30L의 추가 영역에 결합하는 항원 결합 단백질이 제공된다. 본 발명의 추

가의 구체예에서, 항원 결합 단백질은 a) CD30/CD30L 상호작용의 억제; b) CD30L-유도된 IL-8 유도의 억제; c) 사람 CD30L에의 결합에 대한 항체 A 내지 F 중 하나와의 교차-결합; d) 최대 70pM의 사람 CD30L에 대한 해리 상수 및 e) 항체 A 내지 F 중 하나와 실질적으로 동일하거나 더 높은 친화성(더 낮은 K_D)으로 사람 CD30L에 대한 결합으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 한 가지의 특성을 가진다. 친화성(또는 K_D)은, 예를 들면 본원의 실시예 4에서 기술되는 것과 같은 SPR 또는 FACS에 의해 기술분야의 숙련된 사람들에게 공지되어 있는 것과 같이 측정될 수 있다.

[0007] 추가의 구체예에서, 항원 결합 단백질은 CD30L에 결합하고, CD30L에의 결합에 대해 항체 A, B, C, D, E 및 F의 하나 또는 그 이상의 Fab와 결합한다. 또는 다르게는 상기 항원 결합 단백질은 hCD30L에의 결합이 하나 또는 그 이상의 항체 A, B, C, D, E 및 F의 Fab의 결합에 의해 억제되는 항원 결합 단백질로서 특징지어진다. 추가의 특정 구체예에서, Fab는 A1, A2, A3, A4, A5 및 A6의 각각을 포함하여 항체 A의 Fab이다.

[0008] 한 구체예에서, a) 표 3에 제시된 것과 같은 CDRH1과 4, 3, 2 또는 하나의 아미노산 치환, 삽입 또는 결실이 다른 CDRH1; b) 표 3에 제시된 것과 같은 CDRH2와 7, 6, 5, 4, 3, 2 또는 하나의 아미노산 치환, 삽입 및/또는 결실이 다른 CDRH2; c) 표 3에 제시된 것과 같은 CDRH3와 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 또는 하나의 아미노산 치환, 삽입 및/또는 결실이 다른 CDRH3로 이루어진 군으로부터 선택된 CDRH1, CDRH2 및 CDRH3를 포함하는 적어도 하나의 중쇄 가변 영역을 포함하고; d) 표 3에 제시된 것과 같은 CDRL1과 4, 3, 2 또는 하나의 아미노산 치환, 삽입 및/또는 결실이 다른 CDRL1; e) 표 3에 제시된 것과 같은 CDRL2와 2 또는 하나의 아미노산 치환, 삽입 또는 결실이 다른 CDRL2; f) 표 3에 제시된 것과 같은 CDRL3와 2 또는 하나의 아미노산 치환, 삽입 또는 결실이 다른 CDRL3로 이루어진 군으로부터 선택된 CDRL1, CDRL2 및 CDRL3를 포함하는 적어도 하나의 경쇄 가변 영역을 포함하는, CD30L에 결합하는 분리된 항원 결합 단백질이 제공된다. 관련된 구체예에서는, SEQ ID NO:14, 15, 16, 17, 18 및 33으로 이루어진 군으로부터 선택된 CDRH1; SEQ ID NO:19, 20, 21, 22, 23, 24 및 34로 이루어진 군으로부터 선택된 CDRH2; SEQ ID NO:25, 26, 27, 28, 29 및 35로 이루어진 군으로부터 선택된 CDRH3; SEQ ID NO:1, 2, 3, 4, 5, 6 및 30으로 이루어진 군으로부터 선택된 CDRL1; SEQ ID NO:7, 8, 9, 10 및 31로 이루어진 군으로부터 선택된 CDRL2; 및 SEQ ID NO:11, 12, 13 및 32로 이루어진 군으로부터 선택된 CDRL3가 제공된다.

[0009] 다른 구체예는 SEQ ID NO:36, 28, 40, 42 또는 44의 아미노산 잔기 23 내지 36을 포함하는 CDR1, 아미노산 잔기 52 내지 58을 포함하는 CDR2 및 아미노산 잔기 91 내지 100을 포함하는 CDR3를 포함하는 적어도 하나의 경쇄 가변 영역; 또는 b) SEQ ID NO:46의 아미노산 잔기 25 내지 36을 포함하는 CDR1, 아미노산 잔기 52 내지 58을 포함하는 CDR2 및 아미노산 잔기 91 내지 100을 포함하는 CDR3를 포함하는 경쇄 가변 영역; 및 SEQ ID NO:48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70 또는 72의 아미노산 잔기 31 내지 35를 포함하는 CDR1, 아미노산 잔기 50 내지 65를 포함하는 CDR2 및 아미노산 잔기 98 내지 113을 포함하는 CDR3를 포함하는 적어도 하나의 중쇄 가변 영역을 포함하는, 사람 CD30L에 결합하는 분리된 항원 결합 단백질을 제공한다. 관련된 구체예에서, 적어도 하나의 중쇄 가변 영역과 적어도 하나의 경쇄 가변 영역을 포함하는 항원 결합 단백질이 제공된다. 또 다른 구체예에서, 적어도 2개의 중쇄 가변 영역과 적어도 2개의 경쇄 가변 영역을 포함하는 항원 결합 단백질이 제공된다.

[0010] 또 다른 구체예에서, 중쇄 가변 영역과 경쇄 가변 영역을 포함하는, CD30L에 결합하는 분리된 항원 결합 단백질이 제공되는데, 이때 중쇄 가변 영역 서열은 표 2에 제시된 것과 같은 중쇄 가변 영역 서열과 31, 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 또는 하나의 아미노산 치환, 첨가 및/또는 결실이 다르고; 경쇄 가변 영역 서열은 표 1에 제시된 것과 같은 경쇄 가변 영역 서열과 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 또는 하나의 아미노산 치환, 첨가 및/또는 결실이 다르다.

[0011] 또 다른 구체예는 SEQ ID NO:48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70 및 72에 대해 적어도 80%의 서열 동일성을 가지는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역과 SEQ ID NO:36, 38, 40, 42, 44 및 46에 대해 적어도 88%의 서열 동일성을 가지는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는, CD30L에 결합하는 분리된 항원 결합 단백질을 제공한다.

[0012] 한 구체예에서는, a) SEQ ID NO:48, 50, 52, 54, 56, 58, 60 및 62로 이루어진 군으로부터 선택된 중쇄 가변 영역과 SEQ ID NO:36의 경쇄 가변 영역; b) SEQ ID NO:64의 중쇄 가변 영역과 SEQ ID NO:38의 경쇄 가변 영역; c) SEQ ID NO:66의 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO:40의 경쇄 가변 영역; d) SEQ ID NO:68의 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO:42의 경쇄 가변 영역; e) SEQ ID NO:70의 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO:44의 경쇄 가변 영역; 및 f)

SEQ ID NO:72의 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO:46의 경쇄 가변 영역으로 이루어진 군으로부터 선택된, CD30L에 결합하는 분리된 항원 결합 단백질이 제공된다. 관련된 구체예에서, 분리된 항원 결합 단백질은 항체이다. 또 다른 관련 구체예에서, 항체는 단클론성 항체, 재조합 항체, 사람 항체, 인간화된 항체, 키메라 항체, 다중특이성 항체 또는 그것들의 항체 단편이다. 추가의 구체예에서, 항체 단편은 Fab 단편, Fab' 단편, F(ab')₂ 단편, Fv 단편, 이중체 또는 단일 사슬 항체 분자이다. 관련된 구체예에서, 항원 결합 단백질은 사람 항체이다. 또 다른 관련 구체예에서, 항원 결합 단백질은 단클론성 항체이다. 추가의 관련 구체예에서, 항원 결합 단백질은 IgG1-, IgG2-, IgG3- 또는 IgG4-유형의 것이다. 관련된 구체예에서, 항원 결합 단백질은 IgG1- 또는 IgG2-유형의 것이다.

[0013] 또 다른 구체예는 상기에서 기술된 것과 같은 항원 결합 단백질을 코드화하는 분리된 핵산 분자를 제공한다. 관련된 구체예에서, 적어도 하나의 중쇄 가변 영역은 SEQ ID NO:49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71 및 73으로 이루어진 군으로부터 선택된 분리된 핵산 분자에 의해 코드화되고, 적어도 하나의 경쇄 가변 영역은 SEQ ID NO:37, 39, 41, 43, 45 및 47로 이루어진 군으로부터 선택된 분리된 핵산 분자에 의해 코드화된다. 또 다른 관련 구체예에서, 핵산 분자는 제어 서열에 작동가능하게 연결된다. 추가의 관련 구체예에서는, 상기에서 기술된 핵산을 포함하는 벡터와 그런 벡터를 포함하는 숙주 세포가 제공된다. 또 다른 추가의 구체예에서는, 상기에서 기술된 것과 같은 핵산 분자의 단편 또는 그것의 상보물인 혼성화 프로브, PCR 프라이머 또는 서열화 프라이머로서 사용하기에 충분한 분리된 폴리뉴클레오티드가 제공된다.

[0014] 또 다른 구체예는 항원 결합 단백질을 분비하는 숙주 세포로부터 항원 결합 단백질을 제조하는 단계를 포함하는, 상기에서 기술된 것과 같은 항원 결합 단백질의 제조 방법을 제공한다.

[0015] 또 다른 구체예는 a) CD30/CD30L 상호작용을 억제하고; b) CD30L-유도된 IL-8 유도를 억제하며; c) 사람 CD30L에의 결합에 대해 항체 A 내지 F 중 하나와 교차-경합하고; d) 해리 상수가 $\leq 70\text{pM}$ 이며 e) 항체 A 내지 F 중 하나와 실질적으로 동일한 Kd로 사람 CD30L에 결합하는 것으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 한 가지의 특성을 가지는, 상기에서 기술된 것과 같은 분리된 항원 결합 단백질을 제공한다.

[0016] 또 다른 구체예에서는, 상기에서 기술된 것과 같은 적어도 하나의 항원 결합 단백질과 제약학적으로 허용되는 부형제를 포함하는 제약학적 조성물이 제공된다. 관련된 구체예는 추가로 표지화 그룹 또는 이펙터 그룹을 포함하는 그런 제약학적 조성물을 추가로 제공한다. 또 다른 관련 구체예에서, 표지화 그룹은 동위원소 표지, 자성 표지, 산화환원 활성 부분, 광학 염료, 비오틀화된 기 및 이차 리포터에 의해 인지되는 예정된 폴리펩티드 에피토프로 이루어진 군으로부터 선택된다. 추가의 관련 구체예에서, 이펙터 기는 방사성 동위원소, 방사성 핵종, 독소, 치료 기 및 화학요법 기로 이루어진 군으로부터 선택된다. 또 다른 관련 구체예에서, 항원 결합 단백질은 표지화 그룹에 결합된다.

[0017] 또 다른 구체예는 환자에서 CD30L과 관련된 질환을 치료 또는 예방하는 방법을 제공하는데, 그 방법은 치료나 예방의 필요가 있는 환자에게 상기에서 기술된 것과 같은 적어도 하나의 분리된 항원 결합 단백질의 효과적인 양을 투여하는 것으로 이루어진다. 또 다른 관련 구체예에서, 분리된 항원-결합 단백질은 단독으로 또는 조합 치료법으로서 투여된다.

[0018] 또 다른 구체예는 상기에서 기술된 것과 같은 적어도 하나의 항원 결합 단백질의 효과적인 양을 투여하는 것으로 이루어지는, 환자에서 CD30L 활성을 감소시키는 방법을 제공한다.

[0019] 또 다른 구체예에서, 상기에서 기술된 것과 같은 적어도 하나의 항원 결합 단백질과 경합하는 항원 결합 단백질이 제공된다.

[0020] 또 다른 구체예에서는, 전체적으로 또는 부분적으로 아퓨코실레이트화된(afucosylated) 상기에서 기술된 것과 같은 항원 결합 단백질이 제공된다.

도면의 간단한 설명

[0021] 도 1a는 Ramos 세포와 NK 이펙터를 도시한다. 하얀색 사각형: 리툭산(IgG1), 검은색 다이아몬드형: 항체 A1 IgG1f, 검은색 사각형: 항체 A1 IgG1, 하얀색 원: 항체 A1 IgG2.

도 1b는 JD38 세포와 NK 이펙터를 도시한다. 하얀색 사각형: 리툭산(IgG1), 검은색 다이아몬드형: 항체 A1 IgG1f, 검은색 사각형: 항체 A1 IgG1, 하얀색 원: 항체 A1 IgG2.

도 1c는 DS179 세포와 NK 이펙터를 도시한다. 하얀색 사각형: 리툭산(IgG1), 검은색 다이아몬드형: 항체 A1

IgG1f, 검은색 사각형: 항체 A1 IgG1, 하얀색 원: 항체 A1 IgG2.

도 1d는 EW36 세포와 NK 이펙터를 도시한다. 하얀색 사각형: 리툭산(IgG1), 검은색 다이아몬드형: 항체 A1 IgG1f, 검은색 사각형: 항체 A1 IgG1, 하얀색 원: 항체 A1 IgG2.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0022] 본 발명은 CD30L과 CD30사이의 상호작용을 차단하는 항원 결합 단백질, 예를 들면 항-CD30L 항체, 항체 단편 및 항체 유도체, 예컨대 중화 항-CD30L 항체, 항체 단편 또는 항체 유도체를 포함하는, CD30L 항원 결합 단백질에 관련된 조성물, 키트 및 방법을 제공한다. 또한 CD30L에 결합하는 폴리펩티드의 전부 또는 부분을 코드화하는 핵산 서열을 포함하는 폴리뉴클레오타이드, 그것의 유도체 및 단편, 예를 들면 항-CD30L 항체의 전부 또는 부분, 항체 단편, 또는 항체 유도체를 코드화하는 폴리뉴클레오타이드, 그런 핵산을 포함하는 플라스미드 및 벡터, 및 그런 폴리뉴클레오타이드 및/또는 벡터 및 플라스미드를 포함하는 세포 또는 셀라인이 제공된다. 또한 생체 내 또는 시험관 내의 방법들, 예를 들면 CD30L 항원 결합 단백질, 예컨대 항-CD30L 항체를 제조하거나, 확인하거나, 또는 분리하는 방법, 분자가 CD30L과 CD30 사이의 상호작용을 차단하는 지의 여부를 측정하는 방법, 분자가 CD30L을 길항하는 지의 여부를 측정하는 방법, 조성물, 예컨대 CD30L 항원 결합 단백질을 포함하는 제약학적 조성물의 제조 방법 및 CD30L 항원 결합 단백질을 대상에게 투여하기 위한 방법, 예를 들면 CD30L에 의해 중재된 질환을 치료하기 위한, 그리고 CD30L과 CD30 사이의 상호작용을 차단하기 위한 방법이 제공된다.
- [0023] 본원에서 다르게 규정되지 않는 한, 본 발명과 관련하여 사용된 과학적 및 기술적 용어들은 해당 기술분야에 통상적인 지식을 가진 사람들에게 의해 보편적으로 이해되는 의미를 가져야 할 것이다. 나아가, 맥락에 의해 다르게 요구되지 않는 한, 단일 형태의 용어들은 복수의 것을 포함하고, 복수의 용어들은 단일한 것을 포함할 것이다. 일반적으로, 본원에 기술된 세포 및 조직 배양물, 분자 생물학, 면역학, 미생물학, 유전학 및 핵산 화학 및 혼성화와 관련하여 사용된 명명법, 및 기법들은 해당 기술분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용된다. 본 발명의 방법 및 기법은 일반적으로 다른 표시가 없는 한 해당 기술분야에 잘 공지되어 있고, 본 명세서를 통털어 인용되고 논의된 다양한 일반적인고 더 구체적인 참조에서 기술되어 있는 것과 같은 종래 방법에 따라 수행된다 (예컨대 Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2001) and Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates (1992), and Harlow and Lane *Antibodies: A Laboratory Manual* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1990) 참조). 효소 반응과 정제 기법은 제조업체의 지시에 따라, 해당 기술분야에서 통상적으로 수립된 것과 같이 또는 본원에 기술되는 것과 같이 수행된다. 본원에 기술된 분석 화학, 합성 유기 화학 및 의학 및 약제학 화학과 관련하여 사용된 용어 및 그것들의 실험실 과정 및 기법들은 해당 기술분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것들이다. 화학적 합성, 화학적 분석, 제약학적 제제, 제형 및 전달, 및 환자의 치료에 표준 기법들이 사용될 수 있다.
- [0024] 본 출원에서 인용된 모든 문서 또는 문서의 부분들, 이를테면 그것에 한정되는 것은 아니지만 특허, 특허 출원, 기사, 책, 및 논문들은 예를 들면 본원에 기술된 정보와 관련하여 사용될 수 있을 그런 공보물에 기술된 방법론들을 기술하고 개시할 목적에 대해 전체적으로 참조로 본원에 포함된다.
- [0025] 용어 "CD30-리간드"(CD30L)는 문헌(Smith et al., *Cell* 73:1349-1360, 1993) 및 미국 특허 번호 5,480,981에 개시된 것과 같이 CD30에 결합할 수 있는 폴리펩티드 속을 말하며, 그것의 CD30-결합 뮤테인을 포함하고; 그런 폴리펩티드는 막-결합 단백질(세포질 도메인, 경막 영역 및 세포외재성 도메인을 포함한다)뿐 아니라 CD30-결합 특성을 보유한 절단된 단백질을 포함한다. 그런 절단된 단백질은, 예를 들면 세포외재성(수용체 결합) 도메인만을 포함하는 가용성 CD30L을 포함한다. 또한 CD30에 결합하는 능력을 보유하거나 CD30 폴리펩티드 또는 NF- κ B의 활성화와 같은 생물학적 신호를 전달할 수 있는 전-길이 CD30의 부분과 특이적으로 결합하는 항체를 유도할 수 있는 전-길이 CD30L 폴리펩티드의 부분을 포함하여 CD30L 단편이 절단된 단백질에 포함된다.
- [0026] 용어 "CD30"은 TNF/NGF 수용체 슈퍼패밀리의 구성원인 수용체를 말하며, 그것의 클로닝에 대해서는 Durkop et al. (*Cell* 68:421, 1992)에 기술되어 있다. 구절 "가용성 CD30"(sCD30)은 CD30 단백질의 세포 외재성 도메인의 전부 또는 부분을 포함하고, CD30L과 특이적으로 결합할 수 있는 가용성 분자를 말한다. 가용성 CD30 폴리펩티드는 재조합 sCD30과 고도로 정제된 형태의 자연 발생적인 sCD30 단백질을 포함한다.
- [0027] 본원에서 사용되는 것과 같은 구절 "CD30의 단편"은 CD30L에 결합하는 능력을 보유하거나 CD30 폴리펩티드 또는 NF- κ B의 활성화와 같은 생물학적 신호를 전달할 수 있는 전-길이 CD30의 부분과 특이적으로 결합하는 항체를 유도할 수 있는 전-길이 CD30L 폴리펩티드의 부분을 말한다.

- [0028] 본원에서 사용되는 것과 같은 구절 "CD30/CD30L 상호작용"은 CD30L에 대한 CD30의 특이한 결합을 나타내는 것으로, 그것은 CD30에 의한 신호 변환을 초래한다. 이것은 적어도 하나의 결합 파트너가 CD30 또는 CD30L 중 어느 하나인 경우를 포함하는 것으로, 이 용어는 CD30L에 대한 CD30 단편의 결합 상호작용, CD30L 단편에 대한 CD30의 결합 상호작용 또는 CD30L 단편에 대한 CD30 단편의 결합 상호작용을 포함할 수 있다. 또한 CD30/CD30L 상호작용은 CD30L에 특이적으로 결합할 수 있는 CD30의 유사체(예컨대 대립유전자 변이체 또는 뮤테인)를 포함할 수 있거나, 또는 CD30과 특이적으로 결합할 수 있는 CD30L의 유사체(예컨대 대립유전자 변이체 또는 뮤테인)를 포함할 수 있다. 더욱이, CD30/CD30L 상호작용은 내인성 CD30 또는 CD30L 단백질을 포함할 수 있거나 또는 재조합 단백질을 코드화하는 핵산으로 형질전환된 세포에 의해 발현된 재조합 CD30 또는 CD30L을 포함할 수 있다.
- [0029] 용어 "폴리뉴클레오티드"는 단일-가닥 및 이중-가닥 핵산을 둘 다 포함하고, 게놈의 DNA, RNA, mRNA, cDNA 또는 정상적으로 자연에서 발견되는 서열과 관련이 없는 합성 기원 또는 그것들의 일부의 조합을 포함한다. 명시된 서열을 포함하는 분리된 폴리뉴클레오티드는 명시된 서열 외에, 10개 또는 심지어 12개까지의 다른 단백질 또는 그것의 부분들에 대한 코딩 서열을 포함할 수 있고, 또는 인공된 핵산 서열의 코딩 서열의 발현을 제어하는 작동가능하게 연결된 조절 서열을 포함할 수 있으며, 및/또는 벡터 서열을 포함할 수 있다. 폴리뉴클레오티드를 포함하는 뉴클레오티드는 리보뉴클레오티드 또는 데옥시리보뉴클레오티드 또는 어느 한 유형의 뉴클레오티드의 변형된 형태일 수 있다. 변형은 브로모유리딘 및 이노신 유도체와 같은 염기 변형, 2',3'-다이데옥시리보스와 같은 리보스 변형 및 포스포로싸이오에이트, 포스포로다이싸이오에이트, 포스포셀레노에이트, 포스포로다이셀레노에이트, 포스포로아닐로싸이오에이트, 포스포로아닐라테이트 및 포스포로아미테이트와 같은 뉴클레오티드내 연쇄 변형을 포함한다.
- [0030] 용어 "올리고뉴클레오티드"는 100 또는 그것보다 적은 수의 뉴클레오티드를 포함하는 폴리뉴클레오티드를 의미한다. 어떤 구체예에서, 올리고뉴클레오티드는 길이가 10 내지 60 염기이다. 다른 구체예에서, 올리고뉴클레오티드는 길이가 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20 내지 40 뉴클레오티드이다. 올리고뉴클레오티드는 예를 들어 돌연변이 유전자의 구성에 사용하기 위하여 단일 가닥 또는 이중 가닥일 수 있다. 올리고뉴클레오티드는 센스 또는 안티센스 올리고뉴클레오티드일 수 있다. 올리고뉴클레오티드는 검출 분석을 위해 검출가능한 표지, 예를 들면 방사성 표지, 형광 표지, 합텐 또는 항원성 표지를 포함할 수 있다. 올리고뉴클레오티드는 예를 들면 PCR 프라이머, 클로닝 프라이머 또는 혼성화 프로브로서 사용될 수 있다.
- [0031] 용어 "폴리펩티드" 또는 "단백질"은 천연 단백질의 아미노산 서열을 가지는 마크로분자, 즉 자연-발생적인 및 비-재조합 세포에 의해 생성된; 또는 유전자-공학처리된 또는 재조합 세포에 의해 생성된 단백질을 의미하고, 천연 단백질의 아미노산 서열을 가지는 분자 또는 천연 서열의 아미노산 잔기로부터 하나 또는 그 이상의 결실, 그것에 대한 삽입 및/또는 그것의 치환을 가지는 분자를 포함한다. 이 용어는 또한 하나 또는 그 이상의 아미노산이 해당하는 자연-발생 아미노산 및 중합체의 화학적 유사체인 아미노산 중합체를 포함한다. 용어 "폴리펩티드" 및 "단백질"은 CD30L 항원 결합 단백질(예컨대 항체) 및 그 항원 결합 단백질 서열의 아미노산 잔기로부터의 하나 또는 그 이상의 결실, 그것에 대한 첨가 및/또는 그것의 치환을 가지는 서열을 포함한다. 용어 "폴리펩티드 단편"은 전-길이 천연 단백질과 비교하여 아미노-말단 결실, 카복실-말단 결실 및/또는 내부 결실을 가지는 폴리펩티드를 나타낸다. 그런 단편은 또한 천연 단백질과 비교하여 변형된 아미노산을 함유할 수 있다. 특정 구체예에서, 단편은 약 5 내지 500개의 아미노산 길이이다. 예를 들면 단편은 적어도 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 50, 70, 100, 110, 150, 200, 250, 300, 350, 400 또는 450개의 아미노산 길이일 수 있다. 유용한 폴리펩티드 단편은 결합 도메인을 포함하여, 항체의 면역학적으로 기능적인 단편을 포함한다. CD30L 항원 결합 단백질의 경우에, 그런 항체, 유용한 단편은 그것들에 한정되는 것은 아니지만 하나 또는 그 이상의 CDR 영역, 중쇄 또는 경쇄의 가변 도메인, 항체 사슬의 부분, 세 개 미만의 CDR을 포함하는 가변 영역의 부분 등을 포함한다.
- [0032] "아미노산"은 기술분야에서의 그것의 정상적인 의미를 포함한다. 20개의 자연 발생적인 아미노산과 그것의 유도체는 종래의 용법을 따른다(Immunology-A Synthesis, 2nd Edition, (E. S. Golub and D. R. Gren, eds.), Sinauer Associates: Sunderland, Mass. (1991) 참조). 20개의 종래의 아미노산의 입체 이성질체(예컨대 D-아미노산), 비천연 아미노산, 예컨대 [알파]-, [알파]-이중치환된 아미노산, N-알킬 아미노산 및 다른 비종래 아미노산들이 또한 폴리펩티드에 대한 적당한 성분일 수 있다. 비종래 아미노산의 실례로는 다음을 포함한다: 4-하이드록시프롤린, [감마]-카복시글루타메이트, [엡실론]-N,N,N-트라이메틸라이신, [엡실론]-N-아세틸라이신, O-포스포세린, N-아세틸세린, N-포도멜티오닌, 3-메틸히스티딘, 5-하이드록시라이신, [시그마]-N-메틸아르기닌 및 다른 유사한 아미노산 및 이미노산(예컨대 4-하이드록시프롤린). 본원에서 사용된 폴리펩티드에 대한 언급에서, 표준 용법 및 관례에 따라 좌측-손 방향은 아미노 말단 방향이고, 우측-손 방향은 카복실-말단 방향이다.

- [0033] 용어 "분리된 단백질"은 예를 들면 그것의 치료적, 진단적, 예방적, 연구 또는 다른 용도를 간섭할 수 있을 단백질 또는 폴리펩티드 또는 다른 오염물로부터 정제된 항원 결합 단백질(그것의 한 예는 항체일 수 있다)과 같은 단백질을 말한다. 본원에서 사용되는 것과 같이, "실질적으로 순수한"은 기술된 분자 종이 존재하는 우세한 종인 것, 즉 분자를 기초로 동일한 혼합물에 있는 어떠한 다른 개별적인 종보다 풍부한 것을 의미한다. 특정 구체예에서, 실질적으로 순수한 분자는 그 종의 대상 종이 존재하는 모든 마크로분자 종의 적어도 50%(분자를 기초로)를 포함하는 조성물이다. 다른 구체예에서, 실질적으로 순수한 조성물은 조성물에 존재하는 모든 마크로분자 종의 적어도 80%, 85%, 90%, 95% 또는 99%를 포함할 것이다. 특정 구체예에서, 본질적으로 균질한 물질은 오염시키는 종이 종래의 검출 방법에 의해 조성물 중에서 검출될 수 없고 그로써 조성물이 단일한 검출가능한 마크로분자 종으로 구성되는 정도로까지 정제되었다.
- [0034] 폴리펩티드의 "변이체"(예컨대 항체와 같은 항원 결합 단백질)는 하나 또는 그 이상의 아미노산 잔기가 다른 폴리펩티드 서열에 관련하여 그 아미노산 서열 안으로 삽입되거나, 그것으로부터 결실되거나 및/또는 치환되는 경우의 아미노산 서열을 포함한다. 변이체는 융합 단백질을 포함한다. 폴리펩티드의 "유도체"는 삽입, 결실 또는 치환 변이체와는 구별되는 어떤 방식으로, 예컨대 다른 화학적 부분과의 포함을 통해 화학적으로 변형된 폴리펩티드이다.
- [0035] 본 명세서를 통틀어 폴리펩티드, 핵산, 숙주 세포 등과 같은 생물학적 물질과 관련하여 사용되는 용어 "자연 발생적인" 또는 "천연"은 자연에서 발견되는 물질을 말한다. 이런 맥락에서 "재조합 단백질"은 재조합 기법을 사용하여, 즉 본원에 기술된 것과 같은 재조합 핵산을 통해 만들어진 단백질이다. 재조합 단백질의 제조 방법 및 기법들은 해당 기술분야에 잘 알려져 있다.
- [0036] 용어 "항체"는 표적 항원에 대한 특이한 결합에 대해 무상 항체와 결합할 수 있는 어떠한 아이소타입의 무상 면역글로불린 또는 그것의 단편을 말하고, 예를 들면 키메라, 인간화된, 전체 사람 및 이중특이성 항체를 포함한다. 항체는 그 자체로서 항원 결합 단백질의 종이다. 다르게 표시되지 않는 한, 용어 "항체"는 두 개의 전-길이 중쇄 및 두 개의 전-길이 경쇄를 포함하는 항체 외에, 그것의 유도체, 변이체, 단편 및 뮤테인을 포함하며, 그것들의 실례는 아래에서 기술된다. 무상 항체는 일반적으로 적어도 두 개의 전-길이 중쇄 및 두 개의 전-길이 경쇄를 포함하겠지만, 어떤 경우에는 하나의 중쇄만을 포함할 수 있는 낙타과에서 자연 발생적인 항체와 같이 더 적은 수의 사슬을 포함하기도 한다. 항체는 단독으로 단일 공급원으로부터 유도될 수 있거나, 또는 "키메라", 즉 항체의 상이한 부분들이 아래에서 추가로 기술되는 것과 같이 두 개의 상이한 항체로부터 유도될 수 있다. 항원 결합 단백질, 항체 또는 결합 단편은 하이브리도마에서, 재조합 DNA 기법에 의해, 또는 무상 항체의 효소적 또는 화학적 절단에 의해 생성될 수 있다.
- [0037] 항체 또는 면역글로불린 사슬(중쇄 또는 경쇄)의 "기능적 단편"(또는 간단히 "단편")이란 용어는 본원에서 사용되는 것과 같이, 전-길이 사슬에 존재하는 아미노산의 적어도 일부가 부족하지만 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 항체의 부분(그 부분이 얻어지고 합성되는 방법과는 무관하다)을 포함하는 항원 결합 단백질이다. 그런 단편은 그것이 표적 항원에 특이적으로 결합하고, 주어진 에피토포에 대한 특이적 결합에 대해 무상 항체를 포함하여 다른 항원 결합 단백질과 결합할 수 있다는 점에서 생물학적으로 활성이다. 한 측면으로, 그런 단편은 전-길이 경쇄 또는 중쇄에 존재하는 적어도 하나의 CDR을 보유할 것이고, 어떤 구체예에서는 단일한 중쇄 및/또는 경쇄 또는 그것의 부분을 포함할 것이다. 이들 생물학적으로 활성인 단편은 재조합 DNA 기법에 의해 생성될 수 있거나, 또는 무상 항체를 포함하여 항원 결합 단백질의 효소적 또는 화학적 절단에 의해 생성될 수 있다. 단편으로는, 그것들에 한정되는 것은 아니지만 면역학적으로 기능적인 단편, 예컨대 Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, 도메인 항체 및 단일 사슬 항체를 포함하고, 어떠한 포유류 공급원, 이를테면 그것들에 한정되는 것은 아니지만 사람, 마우스, 쥐, 낙타 또는 토끼로부터 유도될 수 있다. 또한 본원에 기술된 항원 결합 단백질의 기능적 부분, 예컨대 하나 또는 그 이상의 CDR은 두 번째 단백질 또는 작은 분자에 공유 결합될 수 있어서, 이중기능성 치료적 특성을 가지거나 연장된 혈청 반감기를 가지는, 신체의 특별한 표적에 대해 지시되는 치료적 체제를 생성할 수 있는 것으로 여겨진다.
- [0038] 용어 "경합하다"는 항원 결합 단백질(예컨대 중화 항원 결합 단백질 또는 중화 항체)의 맥락에서 사용될 때, 시험되는 항원 결합 단백질(예컨대 항체 또는 그것의 면역학적으로 기능적인 단편)이 공통 항원(예컨대 CD30L 단백질 또는 그것의 단편)에 대한 참조 항원 결합 단백질(예컨대 리간드 또는 참조 항체)의 특이한 결합을 방지하거나 억제하는 분석에 의해 측정되는 바와 같이, 항원 결합 단백질들 사이의 경합을 의미한다. 경합 결합 분석의 많은 유형이 사용될 수 있는데, 예를 들면 고체상 직접 또는 간접 방사성 면역 분석(RIA), 고체상 직접 또는 간접 효소 면역분석(EIA), 샌드위치 경합 분석(Stahli et al., 1983, Methods in Enzymology 92:242-253); 고체상 직접 비오틴-아비딘 EIA(Kirkland et al., 1986, J. Immunol. 137:3614-3619), 고체상 직접 표지된 분석,

고체상 직접 표지된 샌드위치 분석(Harlow and Lane, 1988, Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press); I-125 표지를 사용하는 고체상 직접 표지 RIA(Morel et al., 1988, Molec. Immunol. 25:7-15); 고체상 직접 비오틴-아비딘 EIA(Cheung, et al., 1990, Virology 176:546-552); 및 직접 표지된 RIA(Moldenhauer et al., 1990, Scand. J. Immunol. 32:77-82)가 있다. 전형적으로, 그런 분석은 고체 표면, 또는 미표지된 시험 항원 결합 단백질과 표지된 참조 항원 결합 단백질 중 어느 하나를 포함하고 있는 세포에 결합된 정제된 항원의 사용을 포함한다. 숙련된 사람들에 의해 상이한 접근법이 사용될 수 있다. 대체 선택은 임의로 가요성 매트릭스를 경유하여 플레이트에 결합된 참조 항원 결합 단백질을 사용하는 것을 포함한다. 추가의 변형은 첨가 순서를 기초로, 즉 항원이 먼저 플레이트 결합된 참조 항원 결합 단백질과 혼합되거나 시험 항원 결합 단백질과 혼합된다면 첨가 순서를 기초로 한 것일 수 있다. 모든 시나리오에서 항원 결합 단백질에 의한 항원의 포화는 잘못된 비-결합 결과를 피하기 위해 필요하다.

[0039] 결합성 억제제는 시험 항원 결합 단백질의 존재 하에 고체 표면 또는 세포에 결합된 표지의 양을 측정함으로써 측정된다. 결합 분석에 의해 확인된 항원 결합 단백질(결합하는 항원 결합 단백질)은 참조 항원 결합 단백질과 동일한 에피토프에 결합하는 항원 결합 단백질 및 입체 장애의 발생에 대해 참조 항원 결합 단백질에 의해 결합된 에피토프에 충분히 가까이 있는 인접한 에피토프에 결합하는 항원 결합 단백질을 포함한다. 통상적으로, 결합하는 항원 결합 단백질이 과잉으로 존재할 때, 그것은 공통 항원에 대한 참조 항원 결합 단백질의 특이적 결합을 적어도 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70% 또는 75% 억제할 것이다. 어떤 경우에 결합은 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상 억제된다.

[0040] 결합 실험은 상이한 민감성을 가질 수 있는 상이한 유형의 분자를 사용하여 이루어질 수 있다. 만약 항원 결합 단백질이 항체라면, 분자는 2가일 것이다. 만약 항원 결합 단백질이 Fab라면, 그것은 일가 및 실질적으로 전-길이 항체보다 더 작은 분자여서 더 적은 입체 장애를 유발할 것이다. 결합 실험에서, 이것은 특정 항원 결합 단백질의 경우, hCD30L에 대한 결합이 본원에 기술된 것과 같이 항체 항원 결합 단백질, 예컨대 항체 A, B, C, D, E 및 F 중 어느 하나의 Fab의 결합에 의해 억제된다.

[0041] 용어 "에피토프" 또는 "항원 결정기"는 항원 결합 단백질이 결합하는 항원 상의 한 부위를 말한다. 에피토프는 연속적인 아미노산으로부터 또는 단백질의 삼차원 접힘에 의해 나란히 놓여 있는 비연속적인 아미노산으로부터 모두 형성될 수 있다. 연속적인 아미노산으로부터 형성된 에피토프는 전형적으로 변성 용매에 노출될 때에도 보유되는 한편, 삼차원 접힘에 의해 형성된 에피토프는 변성 용매로 처리될 때 전형적으로 상실된다. 에피토프 결정기는 아미노산, 당 측사슬, 포스포릴 또는 설포닐기와 같은 분자들의 화학적으로 활성인 부위를 포함할 수 있고, 특이한 삼차원 구조적 특성 및/또는 특이한 전하 특성을 가질 수 있다. 에피토프는 전형적으로 적어도 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35개의 아미노산을 독특한 공간 형태로 포함한다. 에피토프는 해당 기술분야에 공지되어 있는 방법을 사용하여 측정될 수 있다.

[0042] 항원 결합 단백질의 결합은 또한 항원 결합 단백질과 상호작용하는 항원의 영역 또는 영역들에 의해 설명될 수 있다. 그런 상호작용의 영역(들)은 해당 기술분야에 공지되어 있는 다양한 방법에 의해, 예를 들면 다양한 항원 분자를 사용하는 결합 분석을 수행함으로써 또는 본원에서 예시하는 것과 같이(실시예 6 참조) HX-MS에 의해 측정될 수 있고, 그로써 항원 결합 단백질과 항원의 상호작용의 영역(들)이 측정된다.

[0043] HX-MS 기술은 단백질의 수소 교환(HX)과 쉽게 이어질 수 있는 질량 분석(MS)을 활용한다. 수소를 함유하고 있는 수성 용매를 중수소를 함유하고 있는 수성 용매로 교체함으로써, 단백질의 주어진 자리에서 중수소 원자의 통합이 1Da의 질량의 증가를 유발한다. 이 질량의 증가는 교환 반응의 퀀팅된 샘플에서 질량 분석에 의해 시간의 함수로서 모니터링될 수 있다. 중수소 표지화 정보는 퀀팅 조건 하에서 펩신 소화 및 그에 뒤따르는 그 결과의 펩티드의 질량 증가에 의해 단백질의 영역에 한층 더 국한될 수 있다. HX-MS는 항체-항원 상호작용을 포함하는 단백질-단백질 복합체 형성 시에 감소된 수소 교환의 영역들을 확인함으로써 분자의 상호작용에 포함된 부위들에 대해 프로브하기 위해 사용될 수 있다. 통상적으로, 결합 계면은 용매의 입체적인 축출로 인한 수소 교환의 현저한 감소에 의해 드러날 것이다. 단백질-단백질 복합체 형성은 시간의 함수로서 각각의 결합 파트너의 존재 및 부재 시의 어느 하나의 단백질 구성원에 통합된 중수소의 총량을 측정함으로써 간단하게 HX-MS에 의해 검출될 수 있다. HX-MS 기법은 천연 성분들, 즉 단백질 및 항체 또는 Fab 단편을 사용하고, 용액 중에서 수행된다. 그로써 HX-MS는 생체 내 조건을 모방하는 가능성을 제공한다(HX-MS 기술에 대한 참조, 예컨대 Wales and Engen, Mass Spectrom. Rev. 25, 158 (2006)).

[0044] 본원에 기술된 것과 같은 특정 항원 결합 단백질은 CD30L과 AA201 내지 234에 의해 규정된 사람 CD30L의 C-말단 영역을 통해 상호작용하거나 결합한다. 항원 결합 단백질은 AA 201 내지 234에 의해 규정된 사람 CD30L의 C-말

단 영역 또는 AA 205 내지 230 또는 AA 211 내지 226과 같은 더 작은 영역에 결합한다. 상기에서 기술된 것과 같이 에피토프는 비-연속적일 수 있고 따라서 상호작용의 영역일 수 있다. 한 구체예에서, 본 발명에 따르는 항원 결합 단백질은 CD30L의 적어도 두 개의 영역에 결합한다. 본 발명에 따르는 그런 추가의 항원 결합 단백질은 상기에서 규정된 것과 같이 C-말단 영역 및 세포외재성 도메인의 N-말단 부분에 위치한 사람 CD30L의 추가의 영역, 예컨대 전 길이 hCD30L의 AA70 내지 100에 의해 규정된 영역과 상호작용할 수 있다. 그런 항원 결합 단백질은 AA201 내지 234, AA 205 내지 230 또는 AA 211 내지 226에 의해 규정된 C-말단 영역 외에 AA 75 내지 95 또는 그것보다 짧은 영역, 예컨대 AA 80 내지 90 또는 AA 82 내지 88에 결합할 수 있다.

[0045] CD30L 항원 결합 단백질

[0046] 본원에서 사용된 것과 같이 "항원 결합 단백질"은 명시된 표적 항원에 특이적으로 결합하는 단백질을 의미하고; 본원에서 제공되는 것과 같은 항원은 CD30L 특히 사람 CD30L이다. 항원 결합 단백질은, 예를 들면 CD30L과 CD30의 상호작용을 차단하거나 억제하는 것들을 포함한다. 그런 "차단하는" 항원 결합 단백질은 CD30L, 또는 그것의 단편, 변이체 또는 유도체를 향해 개발되고, CD30L 및 CD30의 상호작용을 간섭하는 능력에 대해 종래의 분석법으로 선별될 수 있다. CD30L과 CD30의 상호작용을 억제하는 능력에 대해 항원 결합 단백질을 시험하는 적당한 분석의 실패는 본원에 기술된다. 항원 결합 단백질은 또한 CD30L을 억제하거나 CD30L을 활성화하는 것들을 포함한다. 그런 억제 또는 증가는 항원 결합 단백질의 부재시 반응에 비교하여 항원 결합 단백질의 존재시의 생물학적 반응을 파괴하고, 해당 기술분야에 공지되어 있고 본원에 기술된 분석들을 사용하여 측정될 수 있다. 본원에 제공된 항원 결합 단백질은 예를 들면 CD30⁺ 세포로부터 IL-8 생성을 유도한다. 본원에 개시된 것과 같은 항원 결합 단백질은 또한 다른 TNF 슈퍼패밀리 구성원들, 특히 4-1BBL, OX-40L, TNF α , TNF β , RANKL, Trail, CD40L 또는 CD27L에 결합하지 않는다.

[0047] 상이한 CD30L 항원 결합 단백질은 CD30L의 상이한 도메인 또는 에피토프에 결합하거나 상이한 작용 메커니즘에 의해 작용할 수 있다. CD30L 항원 결합 단백질은 본원에 기술된 것과 같이 사용되기 위하여 CD30L 유도된 활성을 완전하게 억제할 필요는 없고; 오히려 CD30L의 특별한 활성을 감소시키는 항원 결합 단백질이 사용하기에 적당할 것으로 여겨진다. 항원 결합 단백질은 또한 본원에 기술된 참조 항원 결합 단백질을 중 어느 것과도 같이 사람 CD30L과 결합하기 위해 교차-결합하고; 사람 CD30L의 동일한 에피토프에 결합하며; 사람 CD30L에 실질적으로 동일한 Kd로 결합하고; CD30L에 실질적으로 동일한 제거 속도(off rate)로 결합하는 것들을 포함한다. 그런 특징들을 측정하는 다양한 방법이 해당 기술분야에 공지되어 있고 본원에서 기술된다.

[0048] 또한 본원에는 CD30L⁺ 세포를 고갈시키는 CD30L 항원 결합 단백질이 제공된다. 그런 고갈시키는 CD30L 항원 결합 단백질과 함께, 그것의 항원 표적을 포함하는 세포에 대한 항원 결합 단백질의 결합은 항원 또는 세포 기능의 억제를 유발하거나 세포의 사멸을 유발한다. 한 구체예에서, 본 발명의 고갈시키는 항체는 CD30L에 결합하고 CD30에 대한 CD30L의 결합을 차단하거나 차단하지 않을 수 있다. 그로써 고갈시키는 항원 결합 단백질은 특이적으로 차단 및 비-차단 항원 결합 단백질을 포함한다. 한 측면으로, CD30L⁺ 세포를 고갈시키는 CD30L 항원 결합 단백질은 해당 기술분야에 공지되어 있는 아포토시스 분석에 의해 측정되는 바와 같이, 아포토시스 또는 계획된 세포 사멸을 유도할 수 있다. 그런 CD30L 항원 결합 단백질은 1) CD30L⁺ 세포와 상호작용하여 면역 반응을 유도하는 세포를 제거함으로써 및/또는 2) CD30L이 특정 면역 반응에 참여하는 세포 유형의 세포 표면 마커이지만 그렇게 하기 위해 반드시 CD30⁺ 세포와 상호작용할 필요가 없는 세포를 제거함으로써 면역 조절 효과를 나타낼 수 있다. 이 경우, CD30L은 특정 질병과 관련된 세포 유형의 마커일 것이고, CD30/CD30L 상호작용은 질병 자체의 발병에는 포함되지 않을 수 있다. 다른 구체예는 포함된 독소 또는 세포독성제를 포함하는 고갈시키는 항원 결합 단백질을 포함하며, 이때 독소 또는 세포독성제는 항원 결합 단백질 포함체에 결합하는 세포의 고갈을 유도한다.

[0049] 항원 결합 단백질은 항원에 결합하는 부분, 및 임의로 항원 결합 부분이 항원에 결합하는 항원의 결합을 촉진하는 형태를 채택하는 것을 허용하는 스캐폴드 또는 프레임워크 부분을 포함할 수 있다. 항원 결합 단백질의 실패는 항체, 항체 단편(예컨대 항체의 항원 결합 부분), 항체 유도체 및 항체 유사체를 포함한다. 항원 결합 단백질은 이식된 CDR 또는 CDR 유도체를 가지는 대체 단백질 스캐폴드 또는 인공 스캐폴드를 포함할 수 있다. 그런 스캐폴드의 예를 들면, 그것들에 한정되는 것은 아니지만, 예를 들어 항원 결합 단백질의 삼차원 구조를 안정화시키기 위해 도입된 돌연변이를 포함하는 항체-유도된 스캐폴드뿐 아니라 예를 들어 생체 내 적합성 중합체를 포함하는 전체 합성 스캐폴드를 포함한다(Korndorfer et al., Proteins: Structure, Function and Bioinformatics, (2003) Volume 53, Issue 1:121-129; Roque et al., Biotechnol. Prog., 2004, 20:639-654).

또한 펩티드 항체 모방물("PAM"), 파이브로넥틴 성분을 활용하여 모방하는 항체를 기초로 한 스캐폴드가 또한 스캐폴드로서 사용될 수 있다.

- [0050] 본원에 기술된 특정 항원 결합 단백질은 항체이거나 항체로부터 유도된다. 그런 항원 결합 단백질은, 그것들에 한정된 것은 아니지만 단클론성 항체, 이중특이성 항체, 미니바디, 도메인 항체, 합성 항체, 항체 모방물, 키메릭 항체, 인간화된 항체, 사람 항체, 항체 융합물, 항체 포합체, 단일 사슬 항체 및 그것들의 단편을 각각 포함한다. 어떤 경우에 항원 결합 단백질은 항체의 면역학적 단편(예컨대 Fab, Fab', F(ab')₂ 또는 scFv)이다. 다양한 구조는 본원에서 추가로 설명되고 규정된다.
- [0051] 제공되는 특정 항원 결합 단백질은 본원에 기술되는 것과 같이 하나 또는 그 이상의 CDR(예컨대 1, 2, 3, 4, 5, 6 또는 그 이상의 CDR)을 포함할 수 있다. 어떤 경우에, 항원 결합 단백질은 (a) 폴리펩티드 구조 및 (b) 폴리펩티드 구조 안에 삽입되거나 및/또는 연결되는 하나 또는 그 이상의 CDR을 포함한다. 폴리펩티드 구조는 다양하고 상이한 형태를 취할 수 있다. 예를 들어 폴리펩티드 구조는 자연 발생적인 항체의 프레임워크, 또는 그것의 단편이거나 그것들을 포함할 수 있고, 또는 본질적으로 완전히 합성된 것일 수 있다. 다양한 폴리펩티드 구조의 실례는 추가로 아래에 기술된다.
- [0052] 본원에 제공되는 것과 같은 항원 결합 단백질중 어떤 것들은 사람 CD30L에 특이하게 결합한다. 본원에서 사용되는 것과 같은 "특이적으로 결합한다"는 평형 해리 상수(K_D)가 $<10^{-8}$ 내지 $<10^{-10}$ M, 또는 다르게는 $<10^{-9}$ 내지 $<10^{-10}$ M, 보다 구체적으로 $<10^{-11}$ M 내지 $<10^{-12}$ M인 것을 의미한다. 한 구체예에서, 항원 결합 단백질은 10^{-8} , 또는 예컨대 5.0×10^{-9} 또는 예컨대 10^{-9} 또는 심지어 5.0×10^{-10} 인 평형 해리 상수(K_D)로 표시되는 고친화성으로 결합한다. 평형 해리 상수는 해당 기술분야에 공지되어 있는 것과 같이 측정될 수 있다. 그런 구체예에서, K_D 는 전형적으로 저밀도로 종을 고정시키고(이 종은 다가일 수 있다) 다가 종의 적정 시리즈를 주입한(결합 단계) 후, 복합체가 떨어져 나가는 해리 단계를 허용함으로써 측정된다. 다가 복합체의 결합과 해리에 해당하는 속도 상수는 각각 결합 속도 상수 k_a 및 해리 속도 상수 k_d 로 언급된다. 그 결과의 데이터는 다음 단계로 3개의 매개변수를 적용하는 1:1 결합 모델에 적용된다: 결합 속도 상수 k_a , 해리 속도 상수 k_d 및 표면 밀도와 화학양론에 관련된 R_{max} . k_d/k_a 의 비율은 평형 해리 상수 K_D 와 동일하다.
- [0053] K_D 는 또한 본원의 실시예 4에서 기술되는 것과 같이 FACS 분석을 사용하여 측정될 수 있는데, 이때 항체는 Ramos 세포 상에 발현되는 CD30L에 결합된다.
- [0054] 한 구체예는 본원에 기술된 것과 같이 분리된 항원 결합 단백질에 관련되는데, 이때 상기 항원 결합 단백질은 적어도 75pM, 예컨대 50pM, 예컨대 40pM의 사람 CD30L에 대한 친화성(K_D)을 가진다. 추가의 구체예에서, 항원 결합 단백질의 사람 CD30L에 대한 해리 상수(K_D)는 최대 35pM, 예컨대 최대 25pM, 예컨대 20pM, 예컨대 최대 15pM이다. 그런 구체예에서 친화성(또는 K_D)은 본원의 실시예 4에 기술된 것과 같이 FACS에 의해 측정될 수 있다.
- [0055] 또 다른 측면은 시험관 내 또는 생체 내에서(예컨대 사람 대상에게 투여될 때) 적어도 하루의 반감기를 가지는 항원 결합 단백질을 제공한다. 한 구체예에서, 항원 결합 단백질은 적어도 3일의 반감기를 가진다. 다른 구체예에서, 항체 또는 그것의 부분은 4일 또는 그것보다 긴 반감기를 가진다. 또 다른 구체예에서, 항체 또는 그것의 부분은 8일 또는 그것보다 긴 반감기를 가진다. 또 다른 구체예에서, 항체 또는 그것의 항원 결합 부분은 유도체화되지 않거나 변형되지 않은 항체에 비교하여 더 긴 반감기를 가지도록 유도체화되거나 변형된다. 또 다른 구체예에서, 항원 결합 단백질은 예컨대 WIPO 공보 번호 WO 00/09560에 기술되어 있는 것과 같이, 혈청 반감기를 증가시키기 위하여 점 돌연변이를 포함한다.
- [0056] 항원 결합 단백질이 치료적 용도로 사용되는 구체예에서, 항원 결합 단백질은 CD30L의 하나 또는 그 이상의 생물학적 활성을, CD30⁺ 세포로부터의 IL-8 생성의 유도와 같이 감소, 억제, 간섭하거나 조절할 수 있다.
- [0057] 제공되는 항원 결합 단백질의 일부는 전형적으로 자연 발생적인 항체와 관련된 구조를 가진다. 이들 항체의 구조 단위는 전형적으로 하나 또는 그 이상의 4량체를 포함하고, 각각의 4량체는 폴리펩티드 사슬의 2개의 동일한 2행 사슬로 구성되지만, 어떤 포유류 종들은 또한 단지 하나의 중쇄만을 가지는 항체를 생성한다. 전형적인 항체에서, 각각의 쌍 또는 2행 사슬은 하나의 전-길이 "경쇄"(어떤 구체예에서 약 25kDa) 및 하나의 전-길이 "중

쇄"(어떤 구체예에서 약 50 내지 70kDa)를 포함한다. 각각의 개별적인 면역글로불린 사슬은 여러 개의 "면역글로불린 도메인"으로 구성되고, 각각은 대략 90 내지 110개의 아미노산으로 구성되며 특징적인 접합 패턴을 나타낸다. 이들 도메인은 항체 폴리펩티드를 구성하는 기본적인 단위들이다. 각 사슬의 아미노-말단 부분은 전형적으로 항원 인지에 기여하는 가변 영역을 포함한다. 카복시-말단 부분은 사슬의 다른 쪽 단부보다 진화적으로 더 보존된 부분이고 따라서 "불변 영역" 또는 "C 영역"으로서 언급된다. 사람 경쇄는 일반적으로 카파 및 람다 경쇄로 분류되고, 이것들은 각각 하나의 가변 영역과 하나의 불변 도메인을 가지고 있다. 중쇄는 전형적으로 뮤, 델타, 감마, 알파 또는 엡실론 사슬로서 분류되며, 이것들은 각각 항체의 아이소타입을 IgM, IgD, IgG, IgA 및 IgE로서 규정한다. IgG는 여러 개의 하위유형, 이를테면 그것들에 한정되는 것은 아니지만 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4를 가지고 있다. IgM 하위유형은 IgM과 IgM2를 포함한다. IgA 하위유형은 IgA1과 IgA2를 포함한다. 사람에서 IgA와 IgD 아이소타입은 4개의 중쇄 및 4개의 경쇄를 함유하고; IgG 및 IgE 아이소타입은 두 개의 중쇄 및 두 개의 경쇄를 함유하며; IgM 아이소타입은 5개의 중쇄 및 5개의 경쇄를 함유한다. 중쇄 불변 영역(CH)은 전형적으로 이펙터 기능에 기여할 수 있는 하나 또는 그 이상의 도메인을 포함한다. 중쇄 불변 영역 도메인의 수는 아이소타입에 따라 다를 것이다. 예를 들어 IgG 중쇄의 경우, 각각은 CH1, CH2 및 CH3로 알려져 있는 세 개의 CH 영역 도메인을 함유한다. 제공되는 항원 결합 단백질은 이들 아이소타입 및 하위유형 중 어느 것이든 지 가질 수 있는데, 예를 들면 CD30L 항원 결합 단백질은 IgG1, IgG2 또는 IgG4 하위유형의 것이다. 만약 IgG4가 바람직하다면, 그것은 또한 문헌에 기술되어 있는 것과 같이(Bloom et al., 1997, Protein Science 6:407) 힌지 영역에 점 돌연변이(CPSCP->CPPCP)가 도입되어 IgG4 항체에서 이중성을 유도할 수 있는 H-사슬간 이황화 결합으로의 경향성이 경감되는 것이 바람직할 것이다. 한 유형의 것인 본원에 제공된 항체는 하위부류 스위칭 방법을 사용하여 상이한 유형으로 교환될 수 있다(예컨대 Lantto et al., 2002, Methods Mol. Biol. 178:303-316 참조).

[0058] 전-길이 경쇄 및 중쇄에서, 가변 및 불변 영역은 약 12 또는 그 이상의 아미노산의 "J" 영역에 의해 연결되고, 이때 중쇄는 또한 약 10 또는 그 이상의 아미노산의 "D" 영역을 포함한다(Fundamental Immunology, 2nd ed., Ch. 7 (Paul, W., ed.) 1989, New York: Raven Press). 각 경쇄/중쇄 쌍의 가변 영역은 전형적으로 항원 결합 부위를 형성한다.

[0059] 가변 영역

[0060] 본원에 제공된 다양한 중쇄 및 경쇄 가변 영역(또는 도메인)은 아래의 표 1 및 표 2에 제시된다. 이들 각각의 가변 영역은 예를 들면 상기에서 기술된 중쇄 및 경쇄 불변 영역에 부착될 수 있다. 나아가, 그렇게 생성된 중쇄 및 경쇄 서열은 각각 완전한 항원 결합 단백질 구조를 형성하기 위해 조합될 수 있다.

표 1

표 1 예시적인 가변 경쇄 영역 서열

VL1 SEQ ID NO: 36	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGVDYVSWYQQHPGKAPKLMYEVSNRPS GVSNRFGSGSKSGNTASLTISGLQTEADYYCSSYTSRSTWVFEGGGTKLTVL
VL2 SEQ ID NO:38	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGLYNYVSWYQQHPDKAPKLMIFEVNNRPSG VSNRFGSGNSGNTASLTISGLQAEADYYCSSYTSSSTWVFEGGGTKLTVL
VL3 SEQ ID NO:40	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDIGLYDYVSWYQQHPDRAPKLIIFEVNNRPSGV SYRFGSGNSGNTASLTISGLQAEADYYCSSYTSSSTWVFEGGGTKLTVL
VL4 SEQ ID NO:42	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDIGLYNYVSWYQQHPGKAPKLIYEVINRPSGV SNRFGSGESGNTASLTISGLQAEDEANYCSSYTSSSTWVFEGGGTKLTVL
VL5 SEQ ID NO:44	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSSDIGTYNYVSWYQQYPGKAPKLMYEVNNRPSG VSDRFGSGTSGNTASLTISGLQANDEADYYCSSYSSSTWVFEGGGTKLTVL
VL6 SEQ ID NO: 46	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGLYNYVSWYQQPGKAPKLMYEVSKRPS GVSNRFGSGTSGNTASLTISGLQADDEADYSCSYTSSTWVFEGGGTKLTVL

[0061]

[0062] 상보성 결정 영역(CDR)은 진한 이탤릭체로 표시되고, 프레임워크 영역(FR)은 보통의 활자로 표시된다. 요소들의 순서는 다음과 같다: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 및 FR4.

표 2

표 2 예시적인 가변 중쇄 영역 서열

VH1 SEQ ID NO:48	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSYIWSWIRQPAGKGLEWIGRIYASGNTNY NPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSMTAADTAVYYCARDYRVAGTYYYYYGLDWWGQG TTVTVSS
VH2 SEQ ID NO: 50	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSYIWSWIRQPAGKGLEWIGRIYASGNTNY NPSLKSRVTMSVDTSKNQFSLKLSSMTAADTAVYYCARDYRVAGTYYYYYGLDWWGQG GTTVTVSS
VH3 SEQ ID NO:52	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSYIWSWIRQPAGKGLEWIGRIYASGNTNY NPSLKSRVTMSVDTSKNQFSLKLSSVTAAADTAVYYCARDYRVAGTYYYYYGLDWWGQG GTTVTVSS
VH4 SEQ ID NO: 54	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSYIWSWIRQPAGKGLEWIGRIYASGNTNY NPSLKSRVTMSVDTSKNQFSLKLSSMTAADTAVYYCARDYRVAGTYYYYYGLDWWGQG GTTVTVSS
VH5 SEQ ID NO:56	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSYIWSWIRQPAGKGLEWIGRIYASGNTNY NPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAAADTAVYYCARDYRVAGTYYYYYGLDWWGQG TTVTVSS
VH6 SEQ ID NO:58	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSYIWSWIRQPAGKGLEWIGRIYASGNTNY NPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAAADTAVYYCARDYRVAGTYYYYYGLDWWGQG TTVTVSS
VH7 SEQ ID NO:60	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSYIWSWIRQPAGKGLEWIGRIYASGNTNY NPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSMTAADTAVYYCARDYRVAGTYYYYYGLDWWGQG TTVTVSS
VH8 SEQ ID NO:62	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSYIWSWIRQPAGKGLEWIGRIYASGNTNY NPSLKSRVTMSVDTSKNQFSLKLSSVTAAADTAVYYCARDYRVAGTYYYYYGLDWWGQG GTTVTVSS
VH9 SEQ ID NO:64	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSYIWSWIRQPAGKGLEWIGRIYASGNTNY PSLKSRVTMSVDTSKNQFSLKLSSVTAAADTAVYYCARERVVGASRYYYYGVDDWWGQG TTVTVSS
VH10 SEQ ID NO:66	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSYIWSWIRQPAGKGLEWIGRIYASGNTNY PSLKSRVTMSVDTSKNQFSLKLSSVTAAADTAVYYCARERVVGASRYYYYGVDDWWGQG TTVTVSS
VH11 SEQ ID NO:68	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSYIWSWIRQPAGKGLEWIGRTSTSGRNN YNPSLKSRVTMSVDTSKNQFSLKLNSVTAAADTAVYYCARDFTIAARRYYYGMDDWWGQG GTTVTVSS
VH12 SEQ ID NO:70	QVQLQESGPGRLVKPSSETLSLTCTVSGGSITNNYWSWIRQPAGKGLEWIGRVYSSGLTN YKPSLKSRVTMSVDTSKNQFSLRLNSVTAAADTAVYYCARERATVTTRYHYDGMDDWWG QGTSVTVSS
VH13 SEQ ID NO:72	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSYIWSWIRQPAGKGLEWIGRIFASGNTNY NPSLRSRVMSRDTSKNQFSLKLSSVTAAADTAVYYCAKERVGVQDYHYHSGMDWWGQG GTTVTVSS

[0063]

[0064]

상보성 결정 영역(CDR)은 진한 이탤릭체로 표시되고, 프레임워크 영역(FR)은 보통의 활자로 표시된다. 요소들의 순서는 다음과 같다: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 및 FR4.

[0065]

표 1 및 표 2에 제시된 것과 같은 VH1, VH2, VH3, VH4, VH5, VH6, VH7, VH8, VH9, VH10, VH11, VH12 및 VH13으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 중쇄 가변 영역(VH) 및/또는 VL1, VL2, VL3, VL4, VL5, VL6로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 경쇄 가변 영역(VL)을 함유하는 항원이 제공된다.

[0066]

표 2에 열거된 중쇄 가변 영역은 각각 표 1에 제시된 경쇄 가변 영역 중 어느 것과 조합되어 항원 결합 단백질을 형성할 수 있다. 어떤 경우에, 항원 결합 단백질은 표 1 및 표 2에 열거된 것들로부터 적어도 하나의 중쇄 가변 영역 및/또는 하나의 경쇄 가변 영역을 포함한다. 어떤 경우에, 항원 결합 단백질은 표 1 및 표 2에 열거된 것들로부터 적어도 두 개의 중쇄 가변 영역 및/또는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 중쇄 가변 영역의 다양한

조합이 경쇄 가변 영역의 다양한 조합의 어느 것이라도 조합될 수 있다.

[0067] 다른 경우에, 항원 결합 단백질은 두 개의 동일한 경쇄 가변 영역 및/또는 두 개의 동일한 중쇄 가변 영역을 함유한다. 실례로서, 항원 결합 단백질은 두 개의 경쇄 가변 영역과 두 개의 중쇄 가변 영역을 표 1과 표 2에 열거된 것과 같이 경쇄 가변 영역의 쌍과 중쇄 가변 영역의 쌍의 조합으로 포함하는 항체 또는 면역학적으로 기능하는 단편일 수 있다. 두 개의 동일한 중쇄 및 경쇄 가변 영역을 포함하는 그런 항원 결합 단백질의 실례로는 다음을 포함한다: 항체 A VH2/VL1; 항체 A1 VH1/VL1; 항체 A2 VH3/VL1; 항체 A3 VH4/VL1; 항체 A4 VH5/VL1; 항체 A5 VH6/VL1; 항체 A6 VH7/VL1; 항체 A7 VH8/VL1; 항체 B VH9/VL2; 항체 C VH10/VL3; 항체 D VH11/VL4; 항체 E VH12/VL5 및 항체 F VH13/VL6.

[0068] 제공된 어떤 항원 결합 단백질은 표 1 및 표 2로부터 선택된 중쇄 가변 영역 및/또는 경쇄 가변 영역의 서열과 단지 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25, 30, 31 또는 그 이상의 아미노산 잔기가 상이한 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및/또는 경쇄 가변 영역을 포함하는데, 이때 각각의 그런 서열의 차이는 독립적으로 한 아미노산의 결실, 삽입 또는 치환이다. 어떤 항원 결합 단백질에서, 경쇄 및 중쇄 가변 영역은 표 1 및 표 2에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 서열 동일성을 가지는 아미노산을 포함한다. 다른 항원 결합 단백질, 예컨대 항체 또는 면역학적으로 기능적인 단편은 또한 본원에 기술된 것과 같이 다양한 중쇄 영역 형태 및/또는 다양한 경쇄 영역 형태를 포함한다.

[0069] 용어 "동일성"은 배열 및 서열 비교에 의하여 측정되는 바와 같이, 둘 또는 그 이상의 폴리펩티드 분자 또는 둘 또는 그 이상의 폴리뉴클레오티드의 서열 사이의 관계를 나타낸다. "% 동일성"은 비교된 분자의 아미노산 또는 뉴클레오티드 사이의 동일한 잔기의 %를 의미하고, 비교되는 분자들의 가장 작은 크기를 기초로 계산된다. 이 계산을 위해서는 (있다면) 배열의 갭은 특별한 수학적 모델 또는 컴퓨터 프로그램(즉 "알고리즘")에 의해 해결되어야 한다. 배열된 핵산 또는 폴리펩티드의 동일성을 계산하기 위해 사용될 수 있는 방법은 다음의 문헌들에 기술되어 있는 방법들을 포함한다: *Computational Molecular Biology*, (Lesk, A. M., ed.), 1988, New York: Oxford University Press; *Biocomputing Informatics and Genome Projects*, (Smith, D. W., ed.), 1993, New York: Academic Press; *Computer Analysis of Sequence Data, Part I*, (Griffin, A. M., and Griffin, H. G., eds.), 1994, New Jersey: Humana Press; von Heinje, G., 1987, *Sequence Analysis in Molecular Biology*, New York: Academic Press; *Sequence Analysis Primer*, (Gribskov, M. and Devereux, J., eds.), 1991, New York: M. Stockton Press; 및 Carillo *et al.*, 1988, *SIAM J. Applied Math.* 48:1073.

[0070] % 동일성을 계산할 때, 비교되는 서열은 서열 사이의 가장 큰 매치를 제공하는 방식으로 배열된다. % 동일성을 측정하기 위해 사용된 컴퓨터 프로그램은 GCG 프로그램 패키지로, 그것은 GAP을 포함한다(Devereux *et al.*, 1984, *Nucl. Acid Res.* 12:387; Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, WI). 컴퓨터 알고리즘 GAP는 그것들에 대한 % 서열 동일성을 측정하고자 하는 두 개의 폴리펩티드 또는 폴리뉴클레오티드를 배열하기 위해 사용된다. 서열들은 그것들의 각각의 아미노산 또는 뉴클레오티드의 최적의 매칭(matching)을 위해 배열된다(알고리즘에 의해 측정되는 것과 같이, "매치된 스캔"). 갭 오프닝 페널티(3×평균 대각선으로서 계산되는데, 이때 "평균 대각선"은 사용되는 비교 매트릭스의 대각선의 평균이고, "대각선"은 특별한 비교 매트릭스에 의해 각각의 완벽한 아미노산 매치에 배정된 점수 또는 수이다) 및 갭 연장 페널티(보통 갭 오프닝 페널티의 1/10배이다)뿐 아니라 PAM 250 또는 BLOSUM 62와 같은 비교 매트릭스가 알고리즘과 함께 사용된다. 특정 구체예에서, 표준 비교 매트릭스(PAM 250 비교 매트릭스에 대해 Dayhoff *et al.*, 1978, *Atlas of Protein Sequence and Structure* 5:345-352; BLOSUM 62 비교 매트릭스에 대해서 Henikoff *et al.*, 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89:10915-10919)가 또한 알고리즘에 의해 사용된다.

[0071] GAP 프로그램을 사용하여 폴리펩티드 또는 뉴클레오티드 서열에 대한 % 동일성을 측정하기 위해 권장된 변수들은 다음과 같다: 알고리즘: Needleman *et al.*, 1970, *J. Mol. Biol.* 48:443-453; 비교 매트릭스: Henikoff *et al.*, 1992, 상기 동일한 BLOSUM 62; 갭 페널티: 12(단부 갭에 대해서는 페널티가 없다), 갭 길이 페널티: 4, 유사성의 한계점: 0. 두 개의 아미노산 서열을 배열하기 위한 특정 배열 계획은 두 서열의 단지 짧은 영역만의 매칭을 초래할 수 있고, 이 작게 배열된 영역은 두 개의 전-길이 서열 사이에 유의미한 관계가 없을지라도 매우 높은 서열 동일성을 가질 수 있다. 따라서, 선택된 배열 방법(GAP 프로그램)은 만약 표적 폴리펩티드의 적어도 50개의 연속적인 아미노산에 걸쳐있는 배열을 유발하는 것이 바람직하다면 조정될 수 있다.

[0072] **상보성 결정 영역**

[0073] 상보성 결정 영역 또는 "CDR"은 중쇄 및 경쇄 가변 영역의 프레임워크 내에 삽입되며, 그곳에서 CDR은 항원 결

합 및 인지에 기여하는 영역을 구성한다. 예를 들어 동일한 종의 면역글로불린 사슬의 가변 도메인은 일반적으로 유사한 전체 구조를 나타낸다; 즉 초가변 CDR 영역에 의해 연결된 상대적으로 보존된 프레임워크 영역(FR)을 포함한다. 항원 결합 단백질은 1, 2, 3, 4, 5, 6 또는 그 이상의 CDR을 가질 수 있다. 예를 들어 상기에서 논의된 가변 영역은 전형적으로 3개의 CDR을 포함한다. 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역으로부터의 CDR은 전형적으로 표적 항원(예컨대 CD30L) 상에서 특이적으로 결합하는 구조를 형성하기 위해 프레임워크 영역에 의해 배열된다. 자연-발생적인 경쇄 및 중쇄 가변 영역은 둘 다 N-말단으로부터 C-말단 쪽으로 이들 요소의 다음의 순서를 따른다: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 및 FR4. 예시적인 경쇄 가변 도메인 및 중쇄 가변 도메인의 CDR 및 FR 영역은 표 1 및 표 2에서 강조된다. CDR 및 FR 영역의 경계는 강조된 그것들로부터 달라질 수 있다. 넘버링 시스템은 이들 도메인의 각각에 위치한 아미노산의 번호를 매기기 위해 고안되었다. 주어진 항원 결합 단백질의 상보성 결정 영역 및 프레임워크 영역은 이들 시스템을 사용하여 확인될 수 있다. 넘버링 시스템은 문헌에서 규정된다: Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed., US Dept. of Health and Human Services, PHS, NIH, NIH Publication No. 91-3242, 1991, or Chothia & Lesk, 1987, *J. Mol. Biol.* 196:901-917; Chothia et al., 1989, *Nature* 342:878-883. 면역글로불린 사슬의 아미노산에 대한 다른 넘버링 시스템은 IMGT®(the international ImmunoGeneTics information system; Lefranc et al, *Dev. Comp. Immunol.* 2005, 29:185-203) 및 AHO(Honegger and Pluckthun, *J. Mol. Biol.* 2001, 309(3):657-670)를 포함한다. 본원에 제공된 CDR은 관례적인 항체 구조의 항원 결합 도메인을 규정하기 위해서일뿐 아니라, 본원에 기술된 것과 같이, 다양한 다른 폴리펩티드 구조에 내장될 수 있다.

[0074]

본원에 개시된 항원 결합 단백질은 하나 또는 그 이상의 CDR이 그 안으로 접목, 삽입, 내장 및/또는 연결되는 폴리펩티드이다. 예를 들어 항원 결합 단백질은 하나의 중쇄 CDR1("CDRH1"), 및/또는 하나의 중쇄 CDR2("CDRH2"), 및/또는 하나의 중쇄 CDR3("CDRH3"), 및/또는 하나의 경쇄 CDR1("CDRL1"), 및/또는 하나의 경쇄 CDR2("CDRL2") 및/또는 하나의 경쇄 CDR3("CDRL3")를 가질 수 있다. 어떤 항원 결합 단백질들은 CDRH3와 CDRL3를 둘 다 포함한다. 특정 구체에는 일반적으로 반복적이지 않은 CDR의 조합을 활용하는데, 예를 들면 항원 결합 단백질들은 일반적으로 하나의 가변 중쇄 영역에 두 개의 CDRH2 영역을 포함하는 등의 방식으로 만들어지는 않는다. 항원 결합 단백질은 표 3에 제시된 CDR의 하나 또는 그 이상의 아미노산 서열과 단지 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 또는 그 이상의 아미노산 잔기에서 동일하거나 상이한 하나 또는 그 이상의 아미노산 서열을 포함할 수 있고, 이때 각각의 그런 서열 차이는 독립적으로 한 아미노산의 결실, 삽입 또는 치환이다. 어떤 항원 결합 단백질에서 CDR은 표 3에 제시된 CDR 서열에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 서열 동일성을 가지는 아미노산의 서열을 포함한다. 어떤 항원 결합 단백질에서, CDR은 "프레임워크" 영역 안에 내장되고, 그 프레임워크는 CDR(들)을 CDR(들)의 적절한 항원 결합 특성이 이루어지도록 적응시키는 역할을 한다.

표 3

[0075]

예시적인 가변 중쇄 영역 서열

SEQ ID NO:1	TGTSSDVGVDYVS
SEQ ID NO:2	TGTSSDVGLNYVS
SEQ ID NO:3	TGTSSDIGLYDYVS
SEQ ID NO:4	TGTSSDIGLYNYVS
SEQ ID NO:5	TGSSSDIGTYNYVS
SEQ ID NO:6	TGTSSDVGLNYVS
SEQ ID NO:7	EVSNRPS
SEQ ID NO:8	EVNNRPS
SEQ ID NO:9	EVINRPS
SEQ ID NO:10	EVSKRPS
SEQ ID NO:11	SSYTSRSTWV
SEQ ID NO:12	SSYTSSSTWV
SEQ ID NO:13	SSYSSSTWV
SEQ ID NO:14	SYIWS
SEQ ID NO:15	SYYWT
SEQ ID NO:16	SYSWS
SEQ ID NO:17	NNYWS
SEQ ID NO:18	SYYWS
SEQ ID NO:19	RIYASGNTNYPNPSLKS

SEQ ID NO:20	RIYASGQTNYNPSLKS
SEQ ID NO:21	RIYTSGITNYNPSLKS
SEQ ID NO:22	RTSTSGRNNYNPSLKS
SEQ ID NO:23	RVYSSGLTNYKPSLKS
SEQ ID NO:24	RIFASGSTNYNPSLRS
SEQ ID NO:25	DYRVAGTYYYYYGLDV
SEQ ID NO:26	ERVVGASRYYYGVDV
SEQ ID NO:27	DFTIAARRYYYGMDV
SEQ ID NO:28	ERATVTTRYHYDGMDV
SEQ ID NO:29	ERVGVQDYHYHSGMDV

- [0076] 본원에는 SEQ ID NO:36, 38, 40, 42 및 44의 아미노산 잔기 23 내지 36; SEQ ID NO:46의 아미노산 잔기 25 내지 36 및 SEQ ID NO:48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70 및 72의 아미노산 잔기 31 내지 35를 포함하는 CDR1 영역이 제공된다. SEQ ID NO:36, 38, 40, 42, 44 및 46의 아미노산 잔기 52 내지 58 및 SEQ ID NO:48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70 및 72의 아미노산 잔기 50 내지 65를 포함하는 CDR2 영역이 제공된다. SEQ ID NO:36, 38, 40, 42, 44 및 46의 아미노산 잔기 91 내지 100 및 SEQ ID NO:48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70 및 72의 아미노산 잔기 98 내지 113을 포함하는 CDR2 영역이 제공된다.
- [0077] 본원에서 개시된 CDR은 관련된 서열 군으로부터 유도된 공통 서열을 포함한다. CDRL1 공통 서열은 TGX1SSDX2GX3YX4YVS(SEQ ID NO:30)로 이루어지는데, 이때 X1은 쓰레오닌 또는 세린이고, X2는 발린 또는 아이소로이신이며, X3은 발린, 쓰레오닌 또는 로이신이고, X4는 아스파르트산 또는 아스파라긴이다.
- [0078] CDRL2 공통 서열은 EVX1X2RPS(SEQ ID NO:31)로 구성되고, 이때 X1은 세린, 아스파라긴 또는 아이소로이신이며 X2는 아스파라긴 또는 라이신이다.
- [0079] CDRL3 공통 서열은 SSYX1SX2STWV(SEQ ID NO:32)를 포함하고, 이때 X1은 쓰레오닌 또는 세린이며 X2는 아르기닌 또는 세린이다.
- [0080] CDRH1 공통 서열은 X1X2X3WX4(SEQ ID NO:33)로 구성되며, 이때 X1은 세린 또는 아스파라긴이고, X2는 타이로신 또는 아스파라긴이며, X3은 아이소로이신, 타이로신 또는 세린이고, X4는 쓰레오닌 또는 세린이다. 상이한 구체예에서, CDRH1 공통 서열은 SYX3WX5(SEQ ID NO:75)로 구성되고, 이때 X3은 I, S 또는 Y이며, X5는 T 또는 S이다.
- [0081] CDRH2 공통 서열은 RX1X2X3SGX4X5NYX6PSLX7S(SEQ ID NO:34)로 구성되며, 이때 X1은 아이소로이신, 발린 또는 쓰레오닌이고, X2는 타이로신, 페닐알라닌 또는 세린이며, X3은 쓰레오닌, 세린 또는 알라닌이고, X4는 아이소로이신, 로이신, 아스파라긴, 세린, 아르기닌 또는 글루타민이며, X5는 쓰레오닌 또는 아스파라긴이고, X6는 아스파라긴 또는 라이신이며, X7은 라이신 또는 아르기닌이다.
- [0082] CDRH3 공통 서열은 X1X2X3X4X5X6X7X8YX9YX10GX11DV(SEQ ID NO:35)로 구성되고, 이때 X1은 글루탐산 또는 아스파르트산이고, X2는 아르기닌, 타이로신 또는 페닐알라닌이며, X3는 발린, 알라닌, 아르기닌 또는 쓰레오닌이고, X4는 발린, 쓰레오닌, 글리신 또는 아이소로이신이며, X5는 발린, 알라닌 또는 글리신이며, X6는 알라닌, 쓰레오닌, 글리신 또는 글루타민이고, X7은 쓰레오닌, 아스파르트산, 아르기닌 또는 세린이며, X8은 아르기닌 또는 타이로신이고, X9는 타이로신 또는 히스티딘이며, X10은 타이로신, 아스파르트산 또는 세린이고, X11은 메티오닌, 로이신 또는 발린이다.
- [0083] **단클론성 항체**
- [0084] 본원에 제공된 항원 결합 단백질은 CD30L에 결합하는 단클론성 항체를 포함한다. 단클론성 항체는 해당 기술분야에 공지되어 있는 어떠한 기법을 사용하여, 예를 들면 면역화 스케줄이 완료된 후에 유전자 도입 동물로부터 수득된 비장 세포를 불멸화시킴으로써 제조될 수 있다. 비장 세포는 해당 기술분야에 공지되어 있는 어떠한 기법을 사용하여, 예컨대 비장 세포를 골수종 세포와 융합시켜 하이브리도마를 생성함으로써 불멸화될 수 있다. 하이브리도마-생성 융합 과정에 사용하기 위한 골수종 세포는 바람직하게는 비-항체 생산성이고, 고융합 효율을 가지며, 원하는 융합된 세포(하이브리도마)만의 성장을 지지하는 특정 선택 배지에서 성장할 수 없도록 만드는 효소 결핍을 가지고 있다. 마우스 융합에 사용하기에 적당한 셀라인의 실례로는 Sp-20, P3-X63/Ag8, P3-X63-Ag8.653, NS1/1.Ag 4 1, Sp210-Ag14, FO, NSO/U, MPC-11, MPC11-X45-GTG 1.7 및 S194/5XXO Bu1이 있고; 쥐 융합에 사용된 셀라인의 실례로는 R210.RCY3, Y3-Ag 1.2.3, IR983F 및 4B210이 있다. 세포 융합에 유용한 다른

셀라인들은 U-266, GM1500-GRG2, LICR-LON-HMy2 및 UC729-6이다.

[0085] 어떤 경우에, 하이브리도마 셀라인은 동물(예컨대 사람 면역글로불린 서열을 가지는 유전자 도입 동물)을 CD30L 면역원으로 면역화하고; 면역된 동물로부터 비장 세포를 수득하며; 그 수득된 비장 세포를 골수종 셀라인에 융합시킴으로써 하이브리도마 세포를 생성하고; 하이브리도마 세포로부터 하이브리도마 셀라인을 수립하며, CD30L 폴리펩티드에 결합하는 항체를 생성하는 하이브리도마 셀라인을 확인함으로써 생성된다. 그런 하이브리도마 셀라인, 및 그것에 의해 생성된 항-CD30L 단클론성 항체는 본 출원의 측면들이다.

[0086] 하이브리도마 셀라인에 의해 분비된 단클론성 항체는 해당 기술분야에 공지되어 있는 어떠한 기법이든지 사용하여 정제될 수 있다. 하이브리도마 또는 mAb는 추가로 특별한 특성, 예컨대 CD30과의 CD30L 상호작용을 감소, 억제, 간섭 또는 조절하는 능력을 가지는 mAb를 확인하기 위해 선별될 수 있다.

[0087] 키메라 및 인간화된 항체

[0088] 전술한 서열을 기초로 한 키메라 및 인간화된 항체가 또한 제공된다. 치료제로서 사용하기 위한 단클론성 항체는 사용 전에 다양한 방법으로 변형될 수 있다. 한 실례는 키메라 항체로, 그것은 기능적 면역글로불린 경쇄 또는 중쇄 또는 그것의 면역학적으로 기능적인 부분들을 생성하기 위해 공유 연결되는, 상이한 항체로부터의 단백질 절편들로 구성된 항체이다. 일반적으로 중쇄 및/또는 경쇄의 부분은 특별한 중으로부터 유도된 또는 특별한 항체 부류 또는 하위부류에 속하는 항체의 해당하는 서열과 동일하거나 상동성인 한편, 사슬(들)의 나머지는 다른 중으로부터 유도되거나 다른 항체 부류 또는 하위부류에 속하는 항체의 해당하는 서열과 동일하거나 상동성이다. 키메라 항체와 관련된 방법들은 예를 들면 미국 특허 번호 4,816,567; 및 Morrison *et al.*, 1985, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6851-6855를 참조한다. CDR 그래프팅은 예를 들면 미국 특허 번호 6,180,370, 5,693,762, 5,693,761, 5,585,089 및 5,530,101에서 기술된다.

[0089] 키메라 항체의 한 가지 유용한 유형은 "인간화된" 항체이다. 일반적으로, 인간화된 항체는 비-사람 동물에서 초기에 발생된 단클론성 항체로부터 생성된다. 전형적으로 항체의 비-항원 인지 부분으로부터 유래한 이 단클론성 항체의 특정 아미노산 잔기는 해당하는 아이소타입의 사람 항체의 해당하는 잔기에 대해 상동하도록 변형된다. 인간화는 예를 들면 설치류 가변 영역의 적어도 일부분을 사람 항체의 해당하는 영역에 대해 치환하는 것에 의한 다양한 방법을 사용하여 수행될 수 있다(예컨대 미국 특허 번호 5,585,089 및 5,693,762; Jones *et al.*, 1986, *Nature* 321:522-525; Riechmann *et al.*, 1988, *Nature* 332:323-27; Verhoeyen *et al.*, 1988, *Science* 239:1534-1536 참조).

[0090] 특정 구체예에서, 사람 이외의 중으로부터 유래한 불변 영역은 하이브리드 항체를 생성하기 위해 사람 가변 영역(들)과 함께 사용될 수 있다.

[0091] 전체 사람 항체

[0092] 전체 사람 항체가 또한 제공된다. 주어진 항원에 대해 특이적인 전체 사람 항체를, 사람을 그 항원에 노출시키지 않으면서 제조하기 위하여 많은 방법들이 활용될 수 있다("전체 사람 항체"). 전체 사람 항체의 제조를 시행하기 위해 제공된 한 가지 구체적인 수단은 마우스 체액 면역 시스템의 "인간화"이다. 사람 면역글로불린(Ig)을 내인성 Ig 유전자들이 비활성화되어 있는 마우스에 도입하는 것은 마우스에서 전체 사람 단클론성 항체(mAb)를 생성하는 한 가지 수단이고, 이때 그 동물은 어떠한 원하는 항원으로 면역될 수 있다. 전체 사람 항체를 사용하는 것으로 인해 때로 마우스 또는 마우스-유도체화된 mAb를 치료제로서 사람에게 투여함으로써 유발될 수 있는 면역원성 및 알레르기 반응을 최소화할 수 있다.

[0093] 전체 사람 항체는 내인성 면역글로불린 생성이 없을 때 사람 항체의 레퍼토리를 생성할 수 있는 유전자 도입 동물(통상적으로 마우스)을 면역시킴으로써 제조될 수 있다. 이 목적을 위한 항원은 전형적으로 6 또는 그 이상의 연속적인 아미노산을 가지고, 임의로 담체, 예컨대 합텐에 포함된다(Jakobovits *et al.*, 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:2551-2555; Jakobovits *et al.*, 1993, *Nature* 362:255-258; and Bruggermann *et al.*, 1993, *Year in Immunol.* 7:33). 그런 방법의 한 실례에서, 유전자 도입 동물은 마우스 중쇄 및 경쇄 면역글로불린을 코드화하는 내인성 마우스 면역글로불린 유전자좌를 그 안에서 무능화시키고, 사람 중쇄 및 경쇄 단백질을 코드화하는 유전자좌를 함유하는 사람 게놈 DNA의 마우스 게놈 큰 단편 안에 삽입시킴으로써 생성된다. 그런 다음 사람 면역글로불린 유전자좌의 전체보다 적은 상보물을 가지게 된 부분적으로 변형된 동물이 교차-교배되어 원하는 면역 시스템 변형을 모두 가지는 동물이 얻어진다. 면역원이 투여될 때, 이들 유전자도입 동물은 면역원에 대해서는 면역학적으로 특이하지만 쥐과 아미노산 서열 이외의 사람 아미노산 서열, 이를테면 가변 영역을 가지는 항체를 생성한다. 그런 방법의 추가의 설명은 예를 들면 WIPO 특허 공보 W096/33735 및 W094/02602를 참

조한다. 사람 항체를 만들기 위한 유전자 도입 마우스와 관련된 추가의 방법은 미국 특허 번호 5,545,807; 6,713,610; 6,673,986; 6,162,963; 5,545,807; 6,300,129; 6,255,458; 5,877,397; 5,874,299 및 5,545,806; WIPO 특허 공보 W091/10741, W090/04036 및 EP 546073B1 및 EP 546073A1에 기술된다.

[0094] 상기에서 기술된 유전자도입 마우스는 재배열되지 않은 사람 중쇄([뮤] 및 [감마]) 및 [카파] 경쇄 면역글로불린 서열을 코드화하는 사람 면역글로불린 유전자 미니유전자좌를, 내인성 [뮤] 및 [카파] 사슬 유전자좌를 비활성화시키는 표적화된 돌연변이와 함께 함유한다(Lonberg *et al.*, 1994, *Nature* 368:856-859). 따라서 마우스는 면역화에 대한 반응으로 마우스 IgM 또는 [카파]의 감소된 발현을 나타내고, 도입된 사람 중쇄 및 경쇄 이식유전자는 부류간 스위칭 및 체세포성 돌연변이를 진행시켜서 고친화성 사람 IgG [카파] 단클론성 항체를 생성한다(Lonberg *et al.*, 상기 동일; Lonberg and Huszar, 1995, *Intern. Rev. Immunol.* 13: 65-93; Harding and Lonberg, 1995, *Ann. N.Y Acad. Sci.* 764:536-546). 그런 마우스의 제조는 문헌에 상세하게 기술되어 있다(Taylor *et al.*, 1992, *Nucleic Acids Research* 20:6287-6295; Chen *et al.*, 1993, *International Immunology* 5:647-656; Tuailon *et al.*, 1994, *J. Immunol.* 152:2912-2920; Lonberg *et al.*, 1994, *Nature* 368:856-859; Lonberg, 1994, *Handbook of Exp. Pharmacology* 113:49-101; Taylor *et al.*, 1994, *International Immunology* 6:579-591; Lonberg and Huszar, 1995, *Intern. Rev. Immunol.* 13:65-93; Harding and Lonberg, 1995, *Ann. N.Y Acad. Sci.* 764:536-546; Fishwild *et al.*, 1996, *Nature Biotechnology* 14:845-85). 추가로 미국 특허 번호 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; 5,789,650; 5,877,397; 5,661,016; 5,814,318; 5,874,299; 및 5,770,429; 뿐만 아니라 미국 특허 번호 5,545,807; WIPO 공보 WO 93/1227; WO 92/22646; 및 WO 92/03918을 참조한다. 이들 유전자도입 마우스에서 사람 항체를 생성하기 위해 활용된 기법들은 WIPO 공보 W098/24893 및 Mendez *et al.*, 1997, *Nature Genetics* 15:146-156에서 개시된다. 예를 들어 HCo7과 HCo12 유전자도입 마우스 계통은 항-CD30L 항체를 생성하기 위해 사용될 수 있다.

[0095] 하이브리도마 기술을 사용하여, 원하는 특이성을 가지는 항원-특이적 사람 mAb가 제조될 수 있고 상기에서 기술된 것과 같은 유전자도입 마우스들로부터 선택될 수 있다. 그런 항체는 적당한 벡터 또는 숙주 세포를 사용하여 클론되고 발현될 수 있고, 또는 항체는 배양된 하이브리도마 세포로부터 수득될 수 있다.

[0096] 전체 사람 항체는 또한 파지-디스플레이 라이브러리로부터 유도될 수 있다(Hoogenboom *et al.*, 1991, *J. Mol. Biol.* 227:381; Marks *et al.*, 1991, *J. Mol. Biol.* 222:581; WIPO 공보 WO 99/10494). 파지 디스플레이 기법은 필라멘트형 박테리오파지의 표면에 항체 레퍼토리의 디스플레이와, 이어서 선택된 항원에 대한 결합에 의한 파지의 선택을 통해 면역 선택을 모방한다.

[0097] **이중특이성 또는 이중기능성 항원 결합 단백질**

[0098] "이중특이성", "이중적-특이성" 또는 "이중기능성" 항원 결합 단백질 또는 항체는 각각 두 개의 상이한 항원 결합 부위, 예컨대 상기 기술된 것과 같이 하나 또는 그 이상의 CDR 또는 하나 또는 그 이상의 가변 영역을 가지는 하이브리드 항원 결합 단백질 또는 항체이다. 어떤 경우에, 그것은 두 개의 상이한 중쇄/경쇄 쌍과 두 개의 상이한 결합 부위를 가지는 인공 하이브리드 항체이다. 다중특이성 항원 결합 단백질 또는 "다중특이성 항체"는 하나 이상의 항원 또는 에피토프를 표적으로 하는 것이다. 이중특이성 항원 결합 단백질 및 항체는 다중특이성 항원 결합 단백질 항체의 종이고, 다양한 방법, 이를테면 그것들에 한정되는 것은 아니지만 하이브리도마의 융합 또는 Fab' 단편의 연결에 의해 제조될 수 있다. 예컨대 Songsivilai and Lachmann, 1990, *Clin. Exp. Immunol.* 79:315-321; Kostelny *et al.*, 1992, *J. Immunol.* 148:1547-1553 참조.

[0099] **면역학적 단편**

[0100] 항원 결합 단백질은 또한 항체의 면역학적 단편들(예컨대 Fab, Fab', F(ab')₂ 또는 scFv)을 포함한다. "Fab 단편"은 하나의 경쇄(경쇄 가변 영역(V_L) 및 그것의 해당하는 불변 도메인(C_L))와 하나의 중쇄(중쇄 가변 영역(V_H)과 첫 번째 불변 영역(C_{H1}))로 구성된다. Fab 분자의 중쇄는 다른 중쇄 분자와 이황화 결합을 형성할 수 없다. "Fab' 단편"은 하나의 경쇄 및 C_{H1}과 C_{H2} 도메인 사이의 영역을 또한 함유하는 하나의 중쇄 부분을 함유하고 있어서, 사슬간 이황화 결합이 두 개의 Fab' 단편의 두 개의 중쇄 사이에 형성되어 F(ab')₂ 분자를 형성할 수 있다. 그러므로 "F(ab')₂ 단편"은 두 개의 중쇄 사이에서 이황화 결합에 의해 함께 유지되는 두 개의 Fab' 단편으로 구성된다. "Fv 단편"은 항체의 단일 아암의 가변 경쇄 영역과 가변 중쇄 영역으로 구성된다. 단일-사슬 항체 "scFv"는 중쇄 및 경쇄 가변 영역들이 가요성 링커에 의해 연결되어 있는 Fv 분자이고, 그것은 항원 결합 영역을 형성한다. 단일 사슬 항체는 WIPO 공보 WO 88/1649, 미국 특허 번호 4,946,778 및 5,260,203; Bird, 1988,

Science 242:423; Huston *et al.*, 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85:5879; Ward *et al.*, 1989, *Nature* 334:544, de Graaf *et al.*, 2002, *Methods Mol Biol.* 178:379-387; Kortt *et al.*, 1997, *Prot. Eng.* 10:423; Kortt *et al.*, 2001, *Biomol. Eng.* 18:95-108 및 Kriangkum *et al.*, 2001, *Biomol. Eng.* 18:31-40에서 상세하게 논의된다. "Fc" 영역은 항체의 C_H2 및 C_H3 도메인을 포함하는 두 개의 중쇄 단편을 함유한다. 두 개의 중쇄 단편은 둘 또는 그 이상의 이황화 결합 C_H3 도메인의 소수성 상호작용에 의해 함께 유지된다.

[0101] 또한 도메인 항체, 중쇄의 가변 영역 또는 경쇄의 가변 영역만을 함유하는 면역학적으로 기능적인 면역글로불린 단편이 포함된다. 어떤 경우에, 둘 또는 그 이상의 V_H 영역은 펩티드 링커와 공유적으로 연결되어서 이가의 도메인 항체를 생성한다. 이가 도메인 항체의 두 개의 V_H 영역은 동일하거나 상이한 항원을 표적으로 할 수 있다. 이 중체는 두 개의 폴리펩티드 사슬을 포함하는 이가 항체이고, 이때 각각의 폴리펩티드 사슬은 동일한 사슬 상의 두 개의 도메인 사이에서 쌍을 이루는 것을 허용하기에는 너무 짧은 링커에 의해 연결된 V_H 및 V_L 도메인을 포함함으로써 각각의 도메인이 또 다른 폴리펩티드 사슬 상의 상보성 도메인과 쌍을 이루는 것을 허용하게 된다 (Holliger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-48, 1993 and Poljak *et al.*, *Structure* 2:1121-23, 1994). 유사하게, 삼중체 및 사중체는 각각 3개 및 4개의 폴리펩티드 사슬을 포함하는 항체로, 각각 동일하거나 상이할 수 있는 3 또는 4개의 항원 결합 부위를 형성한다. 맥시바디(maxibodies)는 IgG1의 Fc 영역에 공유적으로 부착된 이가의 scFv를 포함한다(Fredericks *et al.*, 2004, *Protein Engineering, Design & Selection*, 17:95-106; Powers *et al.*, 2001, *Journal of Immunological Methods*, 251:123-135; Shu *et al.*, 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:7995-7999; Hayden *et al.*, 1994, *Therapeutic Immunology* 1:3-15).

[0102] 다양한 다른 형태

[0103] 또한 상기에서 기술된 항원 결합 단백질의 변종 형태가 제공되는데, 예를 들어 하나 또는 그 이상의 중쇄 또는 경쇄 가변 영역 또는 CDR에 하나 또는 그 이상의 보존성 아미노산 치환을 가지고 있는 항원 결합 단백질의 일부가 표 1 및 표 2에 열거된다.

[0104] 자연-발생적인 아미노산은 공통적인 측쇄 특성을 기초로 다음과 같은 부류들로 나누어질 수 있다: 소수성(노르로이신, Met, Ala, Val, Leu, Ile); 중성 친수성(Cys, Ser, Thr, Asn, Gln); 산성(Asp, Glu); 염기성(His, Lys, Arg); 사슬 방향에 영향을 미치는 잔기(Gly, Pro); 및 방향족(Trp, Tyr, Phe).

[0105] 보존성 아미노산 치환은 이들 부류 중 하나의 구성원의 동일한 부류의 다른 구성원으로서의 교환을 포함할 수 있다. 보존성 아미노산 치환은 비-자연 발생적인 아미노산 잔기를 포함할 수 있는데, 그것은 전형적으로 생물학적 시스템에서 합성 이외의 화학적 펩티드 합성에 의해 통합된다. 이것들은 펩티드 유사 모방물(peptidomimetics)과 아미노산 부분의 다른 반전된 또는 반대 형태를 포함한다. 본원에 기술된 항원 결합 단백질의 기능적 및/또는 생화학적 특징의 그런 실질적인 변형은 (a) 치환되는 지역의 분자 골격의 구조를, 예컨대 쉬트 또는 나선 형태로서 유지하고, (b) 표적 부위에서 분자의 전하 또는 소수성을 유지하며, 또는 (c) 측쇄의 풍만성(bulkiness)을 유지하는 것에 미치는 효과에서 상당히 다른 중쇄 및 경쇄의 아미노산 서열에 치환을 생성함으로써 이루어질 수 있다.

[0106] 비-보존성 치환은 다른 부류로부터의 구성원에 대해 상기 부류들 중 하나의 구성원의 교환을 포함할 수 있다. 그렇게 치환된 잔기는 사람 항체의 상동하는 항체의 영역 안으로, 또는 분자의 비-상동성 영역 안으로 도입될 수 있다.

[0107] 특정 구체예에 따르면, 그런 변화를 만드는 데 있어서, 아미노산의 수치요법 지수를 고려할 수 있다. 단백질의 수치요법 프로파일은 각각의 아미노산에 수치("수치 지수")를 배정한 후 반복적으로 이들 값을 펩티드 사슬을 따라 평균을 넘으로써 계산된다. 각각의 아미노산은 그것의 소수성 및 전하 특성을 토대로 수치 지수가 배정되었다. 그것들은 다음과 같다: 이소로이신(+4.5); 발린(+4.2); 로이신(+3.8); 페닐알라닌(+2.8); 시스테인/시스틴(+2.5); 메티오닌(+1.9); 알라닌(+1.8); 글리신(-0.4); 쓰레오닌(-0.7); 세린(-0.8); 트립토판(-0.9); 타이로신(-1.3); 프롤린(-1.6); 히스티딘(-3.2); 글루타메이트(-3.5); 글루타민(-3.5); 아스파테이트(-3.5); 아스파라긴(-3.5); 라이신(-3.9); 및 아르기닌(-4.5).

[0108] 단백질에 상호적인 생물학적 기능을 부여하는 데 있어 수치요법 프로파일의 중요성은 해당 기술분야에서 인지된다(예컨대 Kyte *et al.*, 1982, *J. Mol. Biol.* 157:105-131). 특정 아미노산은 유사한 수치요법 지수 또는 점수를 가지는 다른 아미노산에 대해 치환될 수 있고, 여전히 유사한 생물학적 활성을 보유하는 것으로 알려져 있다. 수치요법 지수를 토대로 변화를 만들 때에, 특정 구체예에서, 그것의 수치요법 지수가 ±2 내에 있는 아미노산

의 치환이 포함된다. 어떤 측면으로는 ± 1 내에 있는 것들이 포함되며, 다른 측면으로는 ± 0.5 내에 있는 것들이 포함된다.

[0109] 또한 해당 기술분야에서 유사한 아미노산의 치환은 친수성을 토대로, 특히 그렇게 생성된 생물학적으로 기능적인 단백질 또는 펩티드가 본 발명에서와 같이 면역학적 구체예에서 사용되도록 의도되는 경우에 효과적으로 이루어질 수 있다는 것이 인지되어야 한다. 특정 구체예에서, 단백질의 가장 큰 국소적 평균 친수성은 그것의 인접한 아미노산의 친수성에 의해 지배되는 것과 같이, 그것의 면역원성 및 항원 결합 또는 면역원성과, 즉 단백질의 생물학적 특성과 상관된다.

[0110] 다음의 친수성 값이 이들 아미노산 잔기에 배정되었다: 아르기닌(+3.0); 라이신(+3.0); 아스파테이트(+3.0 $\pm$ 1); 글루타메이트(+3.0 $\pm$ 1); 세린(+0.3); 아스파라긴(+0.2); 글루타민(+0.2); 글리신(0); 쓰레오닌(-0.4); 프롤린(-0.5 $\pm$ 1); 알라닌(-0.5); 히스티딘(-0.5); 시스테인(-1.0); 메티오닌(-1.3); 발린(-1.5); 로이신(-1.8); 아이소로이신(-1.8); 타이로신(-2.3); 페닐알라닌(-2.5) 및 트립토판(-3.4). 유사한 친수성 값을 토대로 하여 변화를 만들 때, 특정 구체예에서는, 그것의 친수성 값이 ± 2 내에 있는 아미노산의 치환이 포함되며, 다른 구체예에서는 ± 1 내에 있는 것들이 포함되고, 또 다른 구체예에서는 ± 0.5 내에 있는 것들이 포함된다. 어떤 경우에 친수성을 토대로 하여 일차 아미노산 서열로부터 에피토프를 확인할 수도 있다. 이들 영역은 또한 "에피토프 코어 영역"으로서 언급된다.

[0111] 예시적인 보존성 아미노산 치환을 아래의 표 4에 나타낸다.

표 4

보존성 아미노산 치환

[0112]

잔기	치환	잔기	치환	잔기	치환	잔기	치환
Ala	Ser	Gln	Asn	Leu	Ile, Val	Thr	Ser
Arg	Lys	Glu	Asp	Lys	Arg, Gln, Glu	Trp	Tyr
Asn	Gln, His	Gly	Pro	Met	Leu, Ile	Tyr	Trp, Phe
Asp	Glu	His	Asn, Gln	Phe	Met, Leu, Tyr	Val	Ile, Leu
Cys	Ser	Ile	Leu, Val	Ser	Thr	Thr	Ser

[0113] 잔기 = 원래의 잔기; 치환 = 예시적인 치환

[0114] 숙련된 전문가들은 본원에서 표시한 것과 같은 폴리펩티드의 적당한 변이체를 잘 알려져 있는 기법들을 사용하여 측정할 수 있을 것이다. 해당 기술분야의 숙련자는 활성에 중요할 것으로 여겨지지 않는 영역을 표적화함으로써 활성을 파괴하지 않으면서 변화될 수 있는 분자의 적당한 지역을 확인할 수 있다. 숙련된 전문가는 또한 유사한 폴리펩티드들 중에서도 보존된 분자들의 잔기 및 부분을 확인할 수 있을 것이다. 추가의 구체예에서는, 생물학적 활성 또는 구조에 중요할 수 있는 지역조차도 생물학적 활성을 파괴하지 않으면서 또는 폴리펩티드 구조에 불리하게 영향을 미치지 않으면서 보존적인 아미노산 치환이 수행될 수 있다.

[0115] 또한, 해당 기술분야의 숙련자는 활성 또는 구조에 중요한 유사한 폴리펩티드의 잔기를 확인하는 구조-기능 연구를 리뷰할 수 있다. 그런 비교의 관점에서, 누구든지 유사한 단백질의 활성 또는 구조에 중요한 아미노산 잔기에 해당하는 단백질의 아미노산 잔기의 중요성을 예상할 수 있다. 해당 기술분야의 숙련자는 그렇게 예상된 중요한 아미노산 잔기에 대한 화학적으로 유사한 아미노산 치환을 선택할 수 있다.

[0116] 해당 기술분야의 숙련자는 또한 유사한 폴리펩티드의 구조와 관련하여 3-차원 구조 및 아미노산 서열을 분석할 수 있다. 그런 정보의 관점에서, 해당 기술분야의 숙련자는 그것의 삼차원 구조와 관련하여 항체의 아미노산 잔기의 배열을 예측할 수 있다. 해당 기술분야의 숙련자는 단백질의 표면에 있을 것으로 예측된 아미노산 잔기에 대한 라디칼 변화를 만들지 않는 것을 선택할 수 있는데, 왜냐하면 그런 잔기는 다른 분자와의 중요한 상호작용에 포함될 수 있기 때문이다. 더욱이, 해당 기술분야의 숙련자는 각각의 원하는 아미노산 잔기에서 단일한 아미노산 치환을 함유하는 시험 변이체를 생성할 수 있다. 이들 변이체는 그런 다음에 CD30L 활성에 대한 분석을 사용하여 선별될 수 있고(예컨대 아래의 실시예 단원 참조), 그로써 어떤 아미노산이 교체될 수 있고 어떤 것이 교체되지 않아야 하는지에 관한 정보를 얻을 수 있다. 다르게 표현하면, 그런 기본적인 실험으로부터 모아진 정보를 토대로, 해당 기술분야의 숙련자는 추가의 치환이 단독으로 또는 다른 돌연변이와 조합하여 피해야 하는

아미노산 위치를 쉽게 결정할 수 있다.

- [0117] 많은 과학적 출판물이 이차 구조의 예측에 할애되었다. 예컨대 Moulton, 1996, *Curr. Op. in Biotech.* 7:422-427; Chou *et al.*, 1974, *Biochem.* 13:222-245; Chou *et al.*, 1974, *Biochemistry* 113:211-222; Chou *et al.*, 1978, *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 47:45-148; Chou *et al.*, 1979, *Ann. Rev. Biochem.* 47:251-276; and Chou *et al.*, 1979, *Biophys. J.* 26:367-384 참조. 더욱이, 이차 구조를 예측하는 것을 보조하는 컴퓨터 프로그램이 현재 활용가능하다. 이차 구조를 예측하는 한 가지 방법은 상동성 모델링을 토대로 한다. 예를 들어 30%보다 큰 서열 동일성, 또는 40%보다 큰 유사성을 가지는 두 개의 폴리펩티드 또는 단백질은 자주 유사한 구조적 위상기하학을 가진다. 단백질 구조 데이터베이스(PDB)의 최근의 성장은 폴리펩티드 또는 단백질의 구조 내에서 잠재적인 접힘의 수를 포함하여, 이차 구조에 대한 증대된 예측가능성을 증명하고 있다(예컨대 Holm *et al.*, 1999, *Nucl. Acid. Res.* 27:244-247 참조). 주어진 폴리펩티드 또는 단백질에서 접힘의 수는 제한되어 있고, 일단 결정적인 수의 구조가 풀리면, 구조적 예측은 극적으로 보다 정확해질 것이라는 것이 제안되었다(Brenner *et al.*, 1997, *Curr. Op. Struct. Biol.* 7:369-376).
- [0118] 이차 구조를 예측하는 추가의 방법으로는 "쓰레딩(threading)"(Jones, 1997, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 7:377-387; Sippl *et al.*, 1996, *Structure* 4:15-19), "프로필 분석"(Bowie *et al.*, 1991, *Science* 253:164-170; Gribskov *et al.*, 1990, *Meth. Enzym.* 183:146-159; Gribskov *et al.*, 1987, *Proc. Nat. Acad. Sci.* 84:4355-4358) 및 "진화적 관련성"(Holm, 1999, *supra*; and Brenner, 1997, 상기 동일)이 있다.
- [0119] 어떤 구체예에서, (1) 단백질 가수분해에 대한 민감성을 감소시키고, (2) 산화에 대한 민감성을 감소시키며, (3) 단백질 복합체를 형성하기 위한 결합 친화성을 변경시키고, (4) 리간드 또는 항원 결합 친화성을 변경시키며, 및/또는 (5) 다른 물리화학적 또는 기능적 특성을 그런 폴리펩티드에 부여하거나 변형시키는, 예컨대 치환 지역의 분자 골격의 구조를, 예를 들면 쉬트 또는 나선 형태로서 유지하는; 표적 부위에서 분자의 전하 또는 소수성을 유지하거나 변경시키는, 또는 측쇄의 풍만성을 유지하거나 변경시키는 아미노산 치환이 만들어진다.
- [0120] 예를 들면 단일 또는 다중 아미노산 치환(특정 구체예에서, 보존성 아미노산 치환)이 자연-발생적인 서열에 만들어질 수 있다. 치환은 분자간 접촉을 형성하는 도메인(들)의 밖에 있는 항체 부분에서 만들어질 수 있다. 그런 구체예에서, 원래의 서열의 구조적 특징을 실질적으로 변화시키지 않는 보존성 아미노산 치환이 사용될 수 있다(예컨대 원래의 또는 천연 항원 결합 단백질을 특징짓는 이차 구조를 파괴하지 않는 하나 또는 그 이상의 대체 아미노산). 해당 기술분야에서 인지된 폴리펩티드 이차 및 삼차 구조의 실례는 *Proteins, Structures and Molecular Principles* (Creighton, Ed.), 1984, W. H. New York: Freeman and Company; *Introduction to Protein Structure* (Branden and Tooze, eds.), 1991, New York: Garland Publishing; 및 Thornton *et al.*, 1991, *Nature* 354:105에 기술되어 있다.
- [0121] 추가의 변이체는 원래의 또는 천연 아미노산 서열의 하나 또는 그 이상의 시스테인 잔기가 결실되어 있거나 다른 아미노산(예컨대 세린)으로 치환되어 있는 시스테인 변이체를 포함한다. 시스테인 변이체는 무엇보다도, 항체(예를 들어)가 생물학적으로 활성인 형태로 접혀져야 할 때 유용하다. 시스테인 변이체는 천연 단백질보다 더 적은 수의 시스테인 잔기를 가질 수 있고, 전형적으로 쌍을 이루지 않은 시스테인으로부터 유발되는 상호작용을 최소화하기 위해 짝수를 가진다.
- [0122] 본원에 개시된 중쇄 및 경쇄 가변 영역 및 CDR은 CD30L 폴리펩티드에 특이적으로 결합할 수 있는 항원 결합 영역을 함유하는 항원 결합 단백질을 제조하기 위해 사용될 수 있다. "항원 결합 영역"은 명시된 항원에 특이적으로 결합하는 단백질 또는 단백질의 영역, 예컨대 항원과 상호작용하고 항원 결합 단백질에 표적 항원에 대한 그것의 특이성 및 친화성을 부여하는 아미노산 잔기를 함유하는 영역을 의미한다. 항원 결합 영역은 하나 또는 그 이상의 CDR을 포함할 수 있고, 특정 항원 결합 영역은 또한 하나 또는 그 이상의 "프레임워크" 영역을 포함한다. 예를 들어 표 3에 열거된 하나 또는 그 이상의 CDR은 공유적으로 또는 비공유적으로 분자(예컨대 폴리펩티드) 안에 통합되어 면역접착성을 만들 수 있다. 면역접착성은 CDR(들)을 더 큰 폴리펩티드 사슬의 부분으로서 통합할 수 있고, CDR(들)을 다른 폴리펩티드 사슬에 공유적으로 연결시키거나, 또는 CDR(들)을 비공유적으로 통합시킬 수 있다. CDR(들)은 면역접착성이 관심의 특별한 항원(예컨대 CD30L 폴리펩티드)에 특이적으로 결합하는 것을 가능하게 한다.
- [0123] 다른 항원 결합 단백질은 본원에 기술된 가변 영역 및 CDR을 토대로 한 모방물(예컨대 "펩티드 모방물" 또는 "펩티드 유사 모방물")을 포함한다. 이들 유사체는 펩티드, 비-펩티드 또는 펩티드와 비-펩티드 영역의 조합물일 수 있다(Fauchere, 1986, *Adv. Drug Res.* 15:29; Veber and Freidinger, 1985, *TINS* p. 392; and Evans *et al.*, 1987, *J. Med. Chem.* 30:1229). 치료적으로 유용한 펩티드에 구조적으로 유사한 펩티드 모방물은 유사한

치료적 또는 예방적 효과를 생성하기 위해 사용될 수 있다. 그런 화합물들은 자주 컴퓨터화된 분자 모델링의 도움을 받아 개발된다. 일반적으로 펩티드 유사 모방물은 원하는 생물학적 활성, 예컨대 CD30과 CD30L의 상호작용을 억제하거나 차단하는 능력을 나타내는 항원 결합 단백질에 구조적으로 유사한 단백질이지만, 펩티드 유사 모방물은 예를 들면 $-CH_2NH-$, $-CH_2S-$, $-CH_2-CH_2-$, $-CH-CH-$ (시스 및 트랜스), $-COCH_2-$, $-CH(OH)CH_2-$ 및 $-CH_2SO-$ 로부터 해당 기술분야에 잘 알려져 있는 방법에 의해 선택된 연쇄로 임의로 교체된 하나 또는 그 이상의 펩티드 연쇄를 가진다. 공통 서열의 하나 또는 그 이상의 아미노산의 동일한 유형의 D-아미노산으로의 체계적 치환(예컨대 L-라이신 대신 D-라이신)은 더 안정한 단백질을 생성하기 위해 특정 구체예에서 사용될 수 있다. 또한 공통 서열 또는 실질적으로 동일한 공통 서열 변화를 포함하는 제약된 펩티드는 해당 기술분야에 공지되어 있는 방법들(Rizo and Gierasch, 1992, *Ann. Rev. Biochem.* 61:387)에 의해, 예를 들면 펩티드를 고리화하는 분자내 이황화 가교를 형성할 수 있는 내부 시스테인 잔기를 첨가함으로써 생성될 수 있다.

[0124] 본원에 기술된 항원 결합 단백질의 유도체가 또한 제공된다. 유도체화된 항원 결합 단백질은 그 항원 결합 단백질 또는 단편에 원하는 특성, 예컨대 특별한 용도에서 증가된 반감기를 부여하는 어떠한 분자 또는 물질을 포함할 수 있다. 유도체화된 항원 결합 단백질은 예를 들면 검출가능한(또는 표지화) 부분(예컨대 방사성, 비색성, 항원성 또는 효소적 분자, 검출가능한 비드(예컨대 자성 또는 전기적으로 조밀한(예컨대 금) 비드), 또는 다른 분자에 결합하는 분자(예컨대 비오틴 또는 스트렙타비딘)), 치료적 또는 진단용 부분(예컨대 방사성, 세포독성, 또는 제약학적으로 활성인 부분), 또는 특별한 용도(예컨대 대상, 예를 들면 사람 대상에의 투여, 또는 다른 생체 내 또는 시험관 내 용도)에 대해 항원 결합 단백질의 적합성을 증가시키는 분자를 포함할 수 있다. 항원 결합 단백질을 유도체화하기 위해 사용될 수 있는 분자들의 실례로는 알부민(예컨대 사람 혈청 알부민) 및 폴리에틸렌 글리콜(PEG)을 포함한다. 항원 결합 단백질의 알부민-연결된 및 폐쇄화된 유도체는 해당 기술분야에 잘 알려져 있는 기법들을 사용하여 제조될 수 있다. 한 구체예에서, 항원 결합 단백질은 트랜스싸이레틴(TTR) 또는 TTR 변이체에 포함되거나 그렇지 않으면 연결된다. TTR 또는 TTR 변이체는 화학적으로, 예를 들면 텍스트란, 폴리(n-비닐 피롤리돈), 폴리에틸렌 글리콜, 프로프로필렌 글리콜 단일중합체, 폴리프로필렌 옥사이드/에틸렌 옥사이드 공중합체, 폴리옥시에틸화된 폴리올 및 폴리비닐 알코올로 이루어진 군으로부터 선택된 화합물질로 변형될 수 있다.

[0125] 다른 유도체는 다른 단백질 또는 폴리펩티드와 CD30L 항원 결합 단백질의 공유 또는 응집성 포함체를, 예컨대 CD30L 항원 결합 단백질의 N-말단 또는 C-말단에 융합된 이중성 폴리펩티드를 포함하는 재조합 융합 단백질의 발현에 의해서 포함한다. 예를 들어 포함된 펩티드는 이중성 신호(또는 리더) 폴리펩티드, 예를 들면 이스트 알파-인자 리더, 또는 펩티드, 예컨대 에피토프 태그일 수 있다. CD30L 항원 결합 단백질-함유 융합 단백질은 CD30L 항원 결합 단백질의 정제 또는 확인을 용이하게 하기 위해 첨가된 펩티드(예컨대 폴리-His)를 포함할 수 있다. CD30L 항원 결합 단백질은 또한 문헌에 기술되어 있는 것과 같이 FLAG 펩티드에 연결될 수 있다(Hopp *et al.*, 1988, *Bio/Technology* 6:1204; 및 미국 특허 번호 5,011,912). FLAG 펩티드는 고도로 항원성이며 특이적 단클론성 항체(mAb)에 의해 역으로 결합된 에피토프를 제공함으로써 발현된 재조합 단백질의 신속한 분석 및 용이한 정제를 가능하게 한다. FLAG 펩티드가 주어진 폴리펩티드에 융합되는 융합 단백질을 제조하기에 유용한 시약은 상업적으로 활용가능하다(Sigma, St. Louis, MO).

[0126] 하나 또는 그 이상의 CD30L 항원 결합 단백질을 함유하는 올리고머는 CD30L 길항체로서 사용될 수 있다. 올리고머는 공유적으로 연결되거나 비-공유적으로 연결된 이량체, 삼량체 또는 그것보다 큰 올리고머의 형태일 수 있다. 둘 또는 그 이상의 CD30L 항원 결합 단백질을 포함하는 올리고머가 사용될 것으로 고려되는데, 한 실례는 동종이량체이다. 다른 올리고머로는 이종이량체, 동종삼량체, 이종삼량체, 동종사량체, 이종사량체 등이 있다. CD30L 항원 결합 단백질에 융합된 펩티드 부분들 사이의 공유적 또는 비-공유적 상호작용을 통해 연결된 다수의 CD30L 결합 단백질을 포함하는 올리고머도 포함된다. 그런 펩티드는 펩티드 링커(스페이서), 또는 올리고머화를 촉진하는 특성을 가지는 펩티드일 수 있다. 적당한 펩티드 링커 중에는 미국 특허 번호 4,751,180 및 4,935,233에 기술되어 있는 것들이 있다. 그것에 부착된 CD30L 항원 결합 단백질의 올리고머화를 촉진할 수 있는 펩티드들 중에는 로이신 지퍼 및 항체로부터 유도된 특정 폴리펩티드가 있다. 가용성 올리고머 단백질을 생성하기에 적당한 로이신 지퍼 도메인의 실례는 WIPO 공보 번호 WO 94/10308; Hoppe *et al.*, 1994, *FEBS Letters* 344:191; 및 Fanslow *et al.*, 1994, *Semin. Immunol.* 6:267-278에 기술되어 있다. 한 접근법에서, CD30L 항원 결합 단백질 단편 또는 로이신 지퍼 펩티드에 융합된 유도체를 포함하는 재조합 융합 단백질이 적당한 숙주 세포에서 발현되고, 형성된 가용성 올리고머 CD30L 항원 결합 단백질 단편 또는 유도체는 배양 상층액으로부터 회수된다.

[0127] 그런 올리고머는 2 내지 4개의 CD30L 항원 결합 단백질을 포함할 수 있다. 올리고머의 CD30L 항원 결합 단백질

부분은 상기에서 기술된 형태 중 어느 것, 예컨대 변이체 또는 단편일 수 있다. 바람직하게는, 올리고머는 CD30L 결합 활성을 가지는 CD30L 항원 결합 단백질을 포함한다. 올리고머는 면역글로불린으로부터 유도된 폴리펩티드를 사용하여 제조될 수 있다. 항체-유도된 폴리펩티드의 다양한 부분(Fc 도메인을 포함함)에 융합된 특정 이중성 폴리펩티드를 포함하는 융합 단백질의 제조는 예컨대 문헌들에 기술되어 있다: Ashkenazi *et al.*, 1991, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:10535; Byrn *et al.*, 1990, *Nature* 344:677; 및 Hollenbaugh *et al.*, 1992 "Construction of Immunoglobulin Fusion Proteins", in *Current Protocols in Immunology*, Suppl. 4, pages 10.19.1-10.19.11.

[0128] 또한 항체의 Fc 영역에 CD30L 항원 결합 단백질을 융합시킴으로써 생성된 두 개의 융합 단백질을 포함하는 이량체가 포함된다. 이량체는 예를 들면 융합 단백질을 코드화하는 유전자 융합을 적절한 발현 벡터에 삽입하고, 재조합 발현 벡터로 형질전환된 숙주 세포에서 유전자 융합을 발현시키며, 발현된 융합 단백질이 훨씬 더 많이 항체 분자로 조립되도록 허용함으로써 만들어질 수 있고, 이때 사슬간 이황화 결합이 Fc 부분 사이에 형성되어 이량체가 만들어진다. Fc 폴리펩티드는 항체의 Fc 영역으로부터 유도된 폴리펩티드의 천연 및 뮤테인 형태를 포함한다. 이량체화를 촉진하는 힌지 영역을 함유하는 그런 폴리펩티드의 절단된 형태도 또한 포함된다. Fc 부분(및 그것으로부터 형성된 올리고머)을 포함하는 융합 단백질은 단백질 A 또는 단백질 G 칼럼 상에서의 친화성 크로마토그래피에 의한 용이한 정제라는 장점을 제공한다. WIPO 공보 WO 93/10151 및 미국 특허 번호 5,426,048 및 5,262,522에 기술되어 있는 한 가지 적당한 Fc 폴리펩티드는 사람 IgG1 항체의 Fc 영역의 N-말단 힌지 영역으로부터 천연 C-말단까지 뻗어있는 단일 사슬 폴리펩티드이다. 다른 유용한 Fc 폴리펩티드는 미국 특허 번호 5,457,035 및 Baum *et al.*, 1994, *EMBO J.* 13:3992-4001에 기술되어 있는 Fc 뮤테인이다. 이 뮤테인의 아미노산 서열은 WIPO 공보 WO 93/10151에 표시된 천연 Fc 서열과 동일한데, 단 아미노산 19는 Leu에서 Ala로 바뀌었고, 아미노산 20은 Leu에서 Glu로 바뀌었으며, 아미노산 22는 Gly에서 Ala로 바뀌었다. 뮤테인은 Fc 수용체에 대해 감소된 친화성을 나타낸다.

[0129] 글리코실화

[0130] 항원 결합 단백질은 천연 종에서 발견되는 것과 상이하거나 변경된 글리코실화 패턴을 나타낸다. 해당 기술분야에서 알 수 있는 것과 같이, 글리코실화 패턴은 단백질의 서열(예컨대 아래에서 논의되는 것과 같이 특별한 글리코실화 아미노산 잔기의 존재 또는 부재), 또는 그 단백질이 생성되는 숙주 세포 또는 유기체 둘 다에 좌우될 수 있다. 특별한 발현 시스템은 아래에서 논의된다.

[0131] 폴리펩티드의 글리코실화는 전형적으로 N-연결되거나 O-연결된다. N-연결된이란 아스파라긴 잔기의 측쇄에 탄수화물 부분이 부착되는 것을 말한다. 3-펩티드 서열, 아스파라긴-X-세린 및 아스파라긴-X-쓰레오닌(X는 프롤린을 제외한 어떠한 아미노산)은 아스파라긴 측쇄에 탄수화물 부분을 효소적으로 부착하기 위한 인지 서열이다. 그러므로, 폴리펩티드 중의 이들 3-펩티드 서열 중 어느 하나의 존재는 잠재적인 글리코실화 부위를 생성한다. O-연결된 글리코실화는 당 N-아세틸갈락토사민, 갈락토스 또는 자일로스 중 하나가 하이드록시아미노산, 대부분 통상적으로 세린 또는 쓰레오닌에 부착되는 것을 말하며, 5-하이드록시프롤린 또는 5-하이드록시라이신이 사용될 수도 있다.

[0132] 글리코실화 부위의 항원 결합 단백질에의 첨가는 아미노산 서열을, 그것이 하나 또는 그 이상의 상기에서 기술된 3-펩티드 서열(N-연결된 글리코실화 부위에 대해)을 포함하도록 변경시킴으로써 관례적으로 이루어진다. 변경은 또한 출발 서열에 하나 또는 그 이상의 세린 또는 쓰레오닌 잔기를 첨가하거나 치환함으로써 이루어질 수도 있다(O-연결된 글리코실화 부위에 대해). 용이하게 하기 위해서는 항원 결합 단백질 아미노산 서열은 DNA 수준에서, 특히 표적 폴리펩티드를 코드화하는 DNA를 미리 선택한 염기에서 돌연변이시킴으로써 원하는 아미노산으로 번역하게 될 코돈을 생성하는 방식의 변화를 통해 변경될 수 있다.

[0133] 항원 결합 단백질 상의 탄수화물 부분의 수를 증가시키는 다른 수단은 단백질에 글리코시드를 화학적으로 또는 효소적으로 결합시키는 것이다. 이들 과정은 그것이 N- 및 O-연결된 글리코실화에 대한 글리코실화 능력을 가지는 숙주에서 단백질을 생성할 필요가 없다는 장점이 있다. 사용된 결합 방식에 따라, 당(들)은 (a) 아르기닌 및 히스티딘, (b) 유리 카복실기, (c) 유리 설프하이드릴기, 예컨대 시스테인의 유리 설프하이드릴기, (d) 유리 하이드록실기, 예컨대 세린, 쓰레오닌 또는 하이드록시프롤린의 유리 하이드록실기, (e) 방향족 잔기, 예컨대 페닐알라닌, 타이로신 또는 트립토판의 방향족 잔기 또는 (f) 글루타민의 아마이드 기에 부착될 수 있다. 방법들은 PCT 공보 번호 WO 87/05330, 및 Aplin and Wriston, 1981, *CRC Crit. Rev. Biochem.*, pp. 259-306에 기술되어 있다.

[0134] 출발 항원 결합 단백질 상에 존재하는 탄수화물 부분의 제거는 화학적으로 또는 효소적으로 이루어질 수 있다.

화학적 탈글리코실화는 단백질의 화합물 트라이플루오로메탄설폰산, 또는 동등한 화합물에의 노출을 필요로 한다. 이 처리는 연결 당(N-아세틸글루코사민 또는 N-아세틸갈락토사민)을 제외한 대부분 또는 모든 당의 절단을 초래하지만, 한편으로 폴리펩티드는 무상으로 남겨둔다. 화학적 탈글리코실화는 문헌에 설명되어 있다 (Hakimuddin *et al.*, 1987, *Arch. Biochem. Biophys.* 259:52 및 Edge *et al.*, 1981, *Anal. Biochem.* 118:131). 폴리펩티드 상의 탄수화물 부분의 효소적 절단은 문헌에 설명되어 있는 것과 같이 다양한 엔도- 및 엑소-글리코시다제를 사용함으로써 이루어질 수 있다(Thotakura *et al.*, 1987, *Meth. Enzymol.* 138:350). 잠재적인 글리코실화 부위에서의 글리코실화는 문헌에 설명되어 있는 것과 같이 튜니카마이신 화합물을 사용함으로써 방지될 수 있다(Duskin *et al.*, 1982, *J. Biol. Chem.* 257:3105). 튜니카마이신은 단백질-N-글리코시드 연쇄의 형성을 차단한다.

[0135] 그러므로, 본 발명의 어떤 측면은 글리코실화 부위(들)의 수 및/또는 유형이 원래의 폴리펩티드의 아미노산 서열에 비교하여 변경되어 있는 항원 결합 단백질의 글리코실화 변이체를 포함한다. 특정 구체예에서, 항원 결합 단백질 변이체는 원래의 폴리펩티드보다 많거나 적은 N-연결된 글리코실화 부위를 포함한다. 이 서열을 제거하거나 변경하는 치환은 원래의 폴리펩티드에 존재하는 N-연결된 탄수화물 사슬의 첨가를 방지할 것이다. 예를 들면 글리코실화는 Asn을 결실시키거나 또는 상이한 아미노산을 사용하여 Asn을 치환함으로써 감소될 수 있다. 항체는 전형적으로 Fc 영역에 N-연결된 글리코실화 부위를 가진다.

[0136] 표지 및 이펙터 그룹

[0137] 항원 결합 단백질은 하나 또는 그 이상의 표지를 포함할 수 있다. 용어 "표지" 또는 "표지화 그룹"은 어떠한 검출가능한 표지를 말한다. 일반적으로 표지는 그것이 검출되어야 하는 분석에 따라 다음과 같이 다양한 부류로 나누어진다: a) 방사성 또는 중동위원소일 수 있는 동위원소 표지; b) 자성 표지(예컨대 자성 입자); c) 산화환원 활성 부분; d) 광학 염료; 효소 기(예컨대 서양고추냉이 산화환원효소, β -갈락토시다제, 루시페라제, 알칼리 포스파타제); e) 비오틴화된 기; 및 f) 이차 리포터(예컨대 로이신 지퍼 쌍 서열, 이차 항체에 대한 결합 부위, 금속 결합 도메인, 에피토프 태그 등)에 의해 인지된 예정된 폴리펩티드 에피토프. 어떤 구체예에서, 표지화 그룹은 다양한 길이의 스페이서 아암을 통해 항원 결합 단백질에 결합되어 잠재적인 입체 장애가 감소된다. 단백질을 표지화하는 다양한 방법이 해당 기술분야에 공지되어 있다. 적당한 표지화 그룹의 실례로는, 그것들에 한정되는 것은 아니지만 다음과 같은 것들을 포함한다: 방사성 동위원소 또는 방사성 핵종(예컨대 ^3H , ^{14}C , ^{15}N , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I), 형광 기(예컨대, FITC, 로다민, 란타네 인광체), 효소 기(예컨대 서양고추냉이 과산화효소, β -갈락토시다제, 루시페라제, 알칼리 포스파타제), 화학발광기, 비오틴화 기 또는 이차 리포터(예컨대 로이신 지퍼 쌍 서열, 이차 항체에 대한 결합 부위, 금속 결합 도메인, 에피토프 태그)에 의해 인지된 예정된 폴리펩티드 에피토프. 어떤 구체예에서, 표지화 그룹은 다양한 길이의 스페이서 아암을 통해 항원 결합 단백질에 결합되어 잠재적인 입체 장애가 감소된다. 단백질을 표지화하는 다양한 방법이 해당 기술분야에 공지되어 있고 잘 맞는 것처럼 사용될 수 있다.

[0138] 용어 "이펙터 그룹"은 세포독성제로서 작용하는 항원 결합 단백질에 결합될 수 있는 어떠한 기를 의미한다. 적당한 이펙터 그룹의 실례로는 방사성 동위원소 또는 방사성 핵종(예컨대 ^3H , ^{14}C , ^{15}N , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I)이 있다. 다른 적당한 기로는 독소, 치료기 또는 화학요법 기가 있다. 적당한 그룹의 실례로는 칼리케아마 이신, 아우리스타틴, 겔라나마이신 및 마이탄신이 있다. 어떤 구체예에서, 이펙터 그룹은 다양한 길이의 스페이서 아암을 통해 항원 결합 단백질에 결합되어 잠재적인 입체 장애가 감소된다.

[0139] CD30L 항원 결합 단백질을 코드화하는 폴리뉴클레오티드

[0140] 본원에 기술된 항원 결합 단백질 또는 그것의 부분들을 코드화하는 폴리뉴클레오티드가 또한 제공되는데, 이를테면 항체의 하나 또는 두 개의 사슬, 또는 그것의 단편, 유도체, 유데인 또는 변이체를 코드화하는 폴리뉴클레오티드, 중쇄 가변 영역 또는 CDR만을 코드화하는 폴리뉴클레오티드, 폴리펩티드를 코드화하는 폴리뉴클레오티드의 확인, 분석, 돌연변이 또는 증폭시키기 위한 혼성화 프로브, PCR 프라이머 또는 서열화 프라이머로서 사용하기에 충분한 폴리뉴클레오티드, 폴리뉴클레오티드의 발현을 억제하기 위한 안타-센스 핵산 및 전술한 것들의 상보성 서열이 제공된다. 폴리뉴클레오티드는 어떠한 길이든지 될 수 있다. 예를 들면 폴리뉴클레오티드는 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 75, 85, 95, 100, 125, 150, 175, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 750, 1,000, 1,500, 3,000, 5,000 또는 그 이상의 길이, 및 그 사이의 어떤 값의 핵산일 수 있고, 및/또는 하나 또는 그 이상의 추가 서열, 예를 들면 조절 서열을 포함할 수 있고, 및/또는 더 큰 폴리뉴클레오티드, 예를 들면 벡터의 부분일 수 있다. 폴리뉴클레오티드는 단일-가닥 또는 이중-가닥일 수 있으며 RNA 및/또는 DNA 핵산

및 그것의 인공 변이체(예컨대 펩티드 핵산)를 포함할 수 있다.

[0141] 특정 항원 결합 단백질, 또는 그것의 일부(예컨대 전체 길이 항체, 중쇄 또는 경쇄, 가변 도메인, 또는 CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 또는 CDRL3)를 코드화하는 폴리뉴클레오티드는 CD30L 또는 그것의 면역원성 단편으로 면역된 마우스의 B-세포로부터 분리될 수 있다. 폴리뉴클레오티드는 중합효소 연쇄 반응(PCR)과 같은 종래 과정에 의해 분리될 수 있다. 파지 디스플레이는 그것에 의해 항체 및 다른 항원 결합 단백질의 유도체들이 제조될 수 있는 공지된 기법의 또 다른 실례이다. 한 접근법에서, 관심의 항원 결합 단백질의 성분인 폴리펩티드는 어떠한 적당한 재조합 발현 시스템에서 발현되고, 발현된 폴리펩티드는 조립되도록 허용되어 항원 결합 단백질 분자가 형성된다. 파지 디스플레이는 또한 상이한 특성(예컨대 그것이 결합하는 항원에 대해 달라지는 친화성)을 가지는 항원 결합 단백질을 사슬 서플링(Marks *et al.*, 1992, *BioTechnology* 10:779)을 통해 유도하기 위해 사용된다.

[0142] 유전자 코드의 축퇴성으로 인해, 본원에서 묘사된 각각의 폴리펩티드 서열은 또한 제공된 것 외에도 대다수의 다른 폴리뉴클레오티드 서열에 의해 코드화된다. 예를 들어 본원에 제공된 중쇄 가변 도메인은 폴리뉴클레오티드 서열 SEQ ID NO:49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71 및 73에 의해 코드화될 수 있다. 경쇄 가변 도메인은 폴리뉴클레오티드 서열 SEQ ID NO:37, 39, 41, 43, 45 및 47에 의해 코드화될 수 있다. 해당 기술 분야의 숙련자는 따라서 본 발명이 각각의 항원 결합 단백질을 코드화하는 각각의 축퇴성 뉴클레오티드 서열에 대한 적당한 서면상의 설명 및 구현을 제공한다는 것을 인정할 것이다.

[0143] 발명의 한 측면은 추가로 특별한 혼성화 조건 하에서 다른 폴리뉴클레오티드 분자에 혼성화하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다. 핵산을 혼성화하기 위한 방법, 혼성화 조건의 선택에 영향을 미치는 기본적인 변수들 및 적당한 조건을 고안하기 위한 지침들은 해당 기술분야에 잘 알려져 있다. 예컨대 Sambrook, Fritsch, and Maniatis (2001, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. 및 *Current Protocols in Molecular Biology*, 1995, Ausubel *et al.*, eds., John Wiley & Sons, Inc. 참조. 본원에서 규정된 바와 같이, 적당하게 엄격한 혼성화 조건은 5×염화나트륨/시트르산 나트륨(SSC), 0.5%의 SDS, 1.0mM이 EDTA(pH 8.0), 약 50% 폼아마이드의 혼성화 완충액, 6×SSC 및 55℃의 혼성화 온도(또는 다른 유사한 혼성화 용액, 예컨대 약 50%의 폼아마이드를 함유하는 용액과 42℃의 혼성화 온도)를 함유하는 사전 세척 용액, 및 0.5×SSC, 0.1% SDS 중에서의 60℃의 세척 조건을 사용한다. 엄격한 혼성화 조건은 45℃에서 6×SSC에서 혼성화하고, 이어서 68℃에서 0.1×SSC, 0.2% SDS중에서 1회 또는 그 이상 세척한다. 나아가 해당 기술분야의 숙련자는 혼성화의 엄격성을 증가 또는 줄이기 위하여 혼성화 및/또는 세척 조건을 조작할 수 있어서, 상호간에 적어도 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한(그 사이의 모든 값을 포함함) 핵산 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드가 전형적으로 상호간에 혼성화된 상태를 유지할 수 있다.

[0144] 변화는 폴리뉴클레오티드 안으로의 돌연변이에 의해 도입될 수 있어서, 그것이 코드화하는 폴리펩티드(예컨대 항원 결합 단백질 또는 항원 결합 단백질 유도체)의 아미노산 서열의 변화를 초래한다. 돌연변이는 해당 기술분야에 공지되어 있는 어떠한 기법, 예를 들면 부위-특정 돌연변이생성 및 무작위 돌연변이생성을 사용하여 도입될 수 있다. 돌연변이 폴리펩티드는 발현되고 원하는 특성에 대해 선택될 수 있다. 돌연변이는 그것이 코드화하는 폴리펩티드의 생물학적 활성을 유의미하게 변경시키지 않으면서 폴리뉴클레오티드 안에 도입될 수 있다. 예를 들면 비-필수 아미노산 잔기에서의 치환을 들 수 있다. 또는 달리 하나 또는 그 이상의 돌연변이가 그것이 코드화하는 폴리펩티드의 생물학적 활성을 선택적으로 바꾸는 폴리뉴클레오티드 안에 도입될 수 있다. 예를 들면 돌연변이는 생물학적 활성을 정량적으로 또는 정성적으로 바꿀 수 있는데, 예를 들면 항원 결합 단백질의 활성을 증가, 감소 또는 제거하고 항원 특이성을 변화시킬 수 있다.

[0145] 또 다른 측면은 핵산 서열의 검출을 위한 프라이머 또는 혼성화 프로브로서 사용하기에 적당한 폴리뉴클레오티드를 제공한다. 폴리뉴클레오티드는 전체-길이 폴리펩티드를 코드화하는 핵산 서열의 단지 일부, 예를 들면 프로브 또는 프라이머로서 사용될 수 있는 단편 또는 폴리펩티드의 활성 부분(예컨대 CD30L 결합 부분)을 코드화하는 단편을 포함할 수 있다. 핵산의 서열을 기초로 한 프로브는 핵산 또는 유사한 핵산, 예를 들면 폴리펩티드를 코드화하는 전사물을 검출하기 위해 사용될 수 있다. 프로브는 표지 그룹, 예컨대 방사성 동위원소, 형광 화합물, 효소 또는 효소 보조-인자를 포함할 수 있다. 그런 프로브는 폴리펩티드를 발현하는 세포를 확인하기 위해 사용될 수 있다.

[0146] **항원 결합 단백질의 발현 방법**

[0147] 본원에 제공된 항원 결합 단백질은 많은 종래의 기법들 중 어느 것에 의해 제조될 수 있다. 예를 들면 CD30L 항

원 결합 단백질은 재조합 발현 시스템에 의해, 해당 기술분야에 공지되어 있는 어떠한 기법이든지 사용하여 제조될 수 있다. 예컨대 Monoclonal Antibodies, Hybridomas: A New Dimension in Biological Analyses, Kennet et al.(eds.) Plenum Press, New York (1980); 및 Antibodies: A Laboratory Manual, Harlow and Lane (eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1988) 참조.

[0148] 상기에서 기술된 것과 같은 적어도 하나의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 시스템 및 플라스미드, 발현 벡터, 전사 또는 발현 카세트 형태의 구성물뿐 아니라 그런 발현 시스템 또는 구성물을 포함하는 숙주 세포가 또한 본원에 제공된다. 본원에서 사용된 것과 같이, "벡터"는 숙주 세포 안에 단백질 코딩 정보를 전달하기 위해 사용하기에 적당한 어떠한 분자 또는 실체(예컨대 핵산, 플라스미드, 박테리오파지 또는 바이러스)를 의미한다. 벡터의 실례로는, 그것들에 한정되는 것은 아니지만, 플라스미드, 바이러스 벡터, 비-에피솜성 포유류 벡터 및 발현 벡터, 예를 들면 재조합 발현 벡터를 포함한다. 발현 벡터, 예컨대 재조합 발현 벡터는 숙주 세포의 형질전환에 유용하고 그것에 작동가능하게 연결된 하나 또는 그 이상의 이중성 코딩 영역의 발현을 지시 및/또는 제어하는(숙주 세포와 함께) 핵산 서열을 함유한다. 발현 구성물은 예를 들면 그것에 한정되는 것은 아니지만, 전사, 번역 및 존재하는 경우 인트론에 영향을 미치거나 제어하는, 그것에 작동가능하게 연결된 코딩 영역의 RNA 스플라이싱에 영향을 미치는 서열들을 포함한다. "작동가능하게 연결된"은 이 용어가 적용되는 성분들이 그것들의 고유한 기능을 수행할 수 있는 관계에 있는 것을 의미한다. 예를 들면 단백질 코딩 서열에 "작동가능하게 연결되어 있는" 제어 서열, 예컨대 프로모터는 제어 서열의 정상적인 활성이 단백질 코딩 서열의 전사를 유도하여 코드화된 단백질의 재조합 발현을 초래하도록 배열된다.

[0149] 또 다른 측면은 발현 벡터, 예컨대 재조합 발현 벡터가 도입되는 숙주 세포를 제공한다. 숙주 세포는 어떠한 원핵 세포(예컨대 대장균) 또는 진핵 세포(예컨대 효모, 곤충 또는 포유류 세포(예를 들면 CHO 세포))일 수 있다. 벡터 DNA는 원핵 또는 진핵 세포에 종래의 형질전환 기법들을 통해 도입될 수 있다. 포유류 세포의 안정적인 형질전환을 위해, 사용된 발현 벡터 및 형질전환 기법에 따라 단지 세포의 작은 분획이 외래 DNA를 그것의 게놈 안으로 통합시킬 수 있다. 이들 통합물을 확인하고 선택하기 위하여, 선택가능한 마커(예컨대 항생물질에 대한 내성에 대한 마커)를 코드화하는 유전자가 일반적으로 관심의 유전자와 함께 숙주 세포 안으로 도입된다. 바람직한 선택가능한 마커는 G418, 하이그로마이신 및 메토타렉세이트와 같은 약물에 대한 내성을 부여하는 것들을 포함한다. 도입된 폴리뉴클레오티드로 안정적으로 형질전환된 세포는 다른 방법들 중에서도 약물 선택(예컨대 선택가능한 마커를 통합한 세포들은 생존하는 한편, 다른 세포들은 죽음)에 의해 확인될 수 있다.

[0150] 항원 결합 단백질은 하이브리도마 셀라인에서(예컨대 특별한 항체는 하이브리도마에서 발현될 수 있다) 또는 하이브리도마 외의 셀라인에서 발현될 수 있다. 항원 결합 단백질을 코드화하는 발현 구성물이 포유류, 곤충 또는 미생물 숙주 세포를 형질전환하기 위해 사용될 수 있다. 형질전환은 숙주 세포 안으로 폴리뉴클레오티드를 도입하기 위한 어떠한 공지된 방법, 이를테면 예컨대 미국 특허 번호 4,399,216; 4,912,040; 4,740,461; 4,959,455 에 의해 예시되어 있는 것과 같이, 바이러스 또는 박테리오파지에 폴리뉴클레오티드를 패키징하고 숙주 세포를 해당 기술분야에 공지되어 있는 형질전환 과정에 의해 구성물로 형질도입함으로써 수행될 수 있다. 사용된 최적의 형질전환 과정은 형질전환시키고자 하는 숙주 세포의 유형에 따라 좌우될 것이다. 포유류 세포 안에 이중성 폴리뉴클레오티드를 도입하기 위한 방법은 해당 기술분야에 잘 알려져 있고, 예를 들면 그것들에 한정되는 것은 아니지만, 텍스트란-중재된 형질전환, 칼슘 포스페이트 침전, 폴리브렌 중재된 형질전환, 원형질체 융합, 일렉트로포레이션, 폴리뉴클레오티드(들)의 리포솜에의 캡슐화, 핵산과 포지티브-전하 지질과의 혼합 및 DNA의 핵 안으로의 직접 마이크로주사가 있다.

[0151] 재조합 발현 구성물은 전형적으로 폴리펩티드를 코드화하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 폴리펩티드는 하나 또는 그 이상의 다음의 것들을 포함할 수 있다: 하나 또는 그 이상의 본원에서 제공된 것과 같은 CDR; 경쇄 가변 영역; 중쇄 가변 영역; 경쇄 불변 영역; 중쇄 불변 영역(예컨대 C_H1, C_H2 및/또는 C_H3); 및/또는 CD30L 항원 결합 단백질의 또 다른 스캐폴드 부분. 이들 핵산 서열은 표준 결찰 기법을 사용하여 적절한 발현 벡터 안으로 삽입된다. 한 구체예에서, 중쇄 또는 경쇄 불변 영역은 본원에 제공된 중쇄 또는 경쇄 가변 영역의 C-말단에 첨부되고 발현 벡터 안으로 결찰된다. 벡터는 전형적으로 사용된 특별한 숙주 세포에서 기능적이 되도록 선택된다(즉 벡터는 숙주 세포 기계와 부합할 수 있어서 유전자의 증폭 및/또는 발현이 일어나는 것을 허용한다). 어떤 구체예에서, 단백질 리포터, 예컨대 다이하이드로폴레이트 환원효소를 사용하여 단백질-단편 상보 분석을 사용하는 벡터가 사용된다(예컨대 미국 특허 번호 6,270,964 참조). 적당한 발현 벡터는 예를 들면 Invitrogen Life Technologies(Carlsbad, CA) 또는 BD Biosciences(San Jose, CA)로부터 구매할 수 있다. 항체 및 단편의 클로닝 및 발현을 위한 다른 유용한 벡터로는 Bianchi and McGrew, 2003, *Biotech. Biotechnol. Bioeng.* 84:439-44 에 기술된 것들을 포함한다. 추가의 적당한 발현 벡터는 예를 들면 *Methods Enzymol.*, vol. 185 (D. V.

Goeddel, ed.), 1990, New York: Academic Press에서 논의된다.

- [0152] 전형적으로, 숙주 세포 중 어느 것에서든지 사용된 발현 벡터는 플라스미드 유지 및 외인성 뉴클레오타이드 서열의 클로닝 및 발현을 위한 서열을 함유할 것이다. 그런 서열은 어떤 구체예에서는 포괄적으로, 전형적으로 하나 또는 그 이상의 다음의 뉴클레오타이드 서열을 포함할 "플래깅 서열"을 언급한다: 프로모터, 하나 또는 그 이상의 인핸서 서열, 복제 기원, 전사 종결 서열, 공여체 및 수용체 스플라이스 부위를 함유하는 완전한 인트론 서열, 폴리펩티드 분비를 위한 리더 서열을 코드화하는 서열, 리보솜 결합 부위, 폴리아데닐화 서열, 발현될 폴리펩티드를 코드화하는 폴리뉴클레오타이드를 삽입하기 위한 폴리링커 영역 및 선택가능한 마커 요소. 제공되는 발현 벡터는 상업적으로 활용할 수 있는 벡터와 같은 출발 벡터로부터 구성될 수 있다. 하나 또는 그 이상의 본원에 기술된 플래깅 서열이 이미 벡터에 존재하지 않는 경우, 플래깅 서열은 개별적으로 얻어질 수 있고 벡터 안에 결합될 수 있다. 각각의 플래깅 서열을 얻기 위해 사용된 방법은 해당 기술분야의 숙련자에게 잘 알려져 있다.
- [0153] 임의로, 벡터는 "태그"-코드화 서열, 즉 CD30L 항원 결합 단백질 코딩 서열의 5' 또는 3' 단부에 위치한 올리고뉴클레오타이드 분자; 폴리His(예컨대 헥사His)를 코드화하는 올리고뉴클레오타이드 서열, 또는 또 다른 "태그", 예컨대 그것들에 대한 항체가 상업적으로 활용가능한 FLAG[®], HA(헤마글루티닌 인플루엔자 바이러스), 또는 myc를 함유할 수 있다. 이 태그는 전형적으로 폴리펩티드의 발현 시에 폴리펩티드에 융합되고, 숙주 세포로부터 CD30L 항원 결합 단백질의 친화성 정제 또는 검출을 위한 수단으로서 활용될 수 있다. 친화성 정제는 예를 들면 태그에 대한 항체를 친화성 매트릭스로서 사용하는 칼럼 크로마토그래피에 의해 이루어질 수 있다. 임의로, 태그는 계속해서 정제된 CD30L 항원 결합 단백질로부터 다양한 수단, 예를 들면 절단용 특정 펩티다제를 사용하여 제거될 수 있다.
- [0154] 플래깅 서열은 상동성이거나(즉 숙주 세포와 동일한 종 및/또는 균주로부터), 이종성이거나(즉 숙주 세포 종 또는 균주 이외의 종으로부터), 하이브리드이거나(즉 하나 이상의 공급원으로부터의 플래깅 서열의 조합), 합성 또는 천연의 것일 수 있다. 플래깅 서열의 공급원은 그 자체로 플래깅 서열이 그 안에서 기능적이기만 하다면 원핵 또는 진핵 유기체, 어떠한 척추동물 또는 무척추동물 유기체, 또는 어떠한 식물일 수 있고, 숙주 세포 기체에 의해 활성화될 수 있다.
- [0155] 벡터에 유용한 플래깅 서열은 해당 기술분야에 잘 알려져 있는 여러 방법 중 어느 것에 의해서든지 얻어질 수 있다. 전형적으로, 본원에서 유용한 플래깅 서열은 지도화에 의해 및/또는 제한 엔도뉴클레아제 소화에 의해 이미 확인되어 있을 것이고, 따라서 적절한 제한 엔도뉴클레아제를 사용하여 적절한 조직 공급원으로부터 분리될 수 있다. 어떤 경우에, 플래깅 서열의 완전한 뉴클레오타이드 서열이 알려질 수 있다. 본원에서 플래깅 서열은 핵산 합성 또는 클로닝을 위해 본원에 기술된 방법들을 사용하여 합성될 수 있다.
- [0156] 플래깅 서열의 전체 또는 부분만이 알려져 있더라도, 플래깅 서열은 중합효소 연쇄 반응(PCR)을 사용하여 및/또는 적당한 프로브, 예컨대 동일한 또는 다른 종으로부터의 올리고뉴클레오타이드 및/또는 플래깅 서열 단편을 사용하여 게놈 라이브러리를 선별함으로써 얻어질 수 있다. 플래깅 서열이 공지되어 있지 않은 경우, 플래깅 서열을 함유하는 DNA의 단편은 예를 들면 코딩 서열 또는 심지어 또 다른 유전자 또는 유전자들을 함유할 수 있는 DNA의 더 큰 조각으로부터 분리될 수 있다. 분리는 적절한 DNA 단편을 생성하기 위한 제한 엔도뉴클레아제 소화와 이어서 아가로스 겔 정제, Qiagen[®] 칼럼 크로마토그래피(QiagenM Chatsworth, CA) 또는 숙련된 전문가에게 공지되어 있는 다른 방법들을 사용한 분리에 의해 이루어질 수 있다. 이 목적을 달성하기 위한 적당한 효소의 선택은 해당 기술분야의 숙련자에게 쉽게 드러날 것이다.
- [0157] 복제 기원은 전형적으로 상업적으로 구매할 수 있는 원핵 발현 벡터의 부분이고, 그것은 숙주 세포에서 벡터의 증폭을 보조한다. 만약 선택된 벡터가 복제 기원 부위를 함유하고 있지 않다면, 누구든지 공지된 서열을 토대로 화학적으로 합성하고, 벡터에 결합시킬 수 있다. 예를 들어 플라스미드 pBR322(New England Biolabs, Beverly, MA)로부터의 복제 기원은 대부분의 그람-네거티브 박테리아에 적합하고, 다양한 바이러스 기원(예컨대 SV40, 폴리오마, 아데노바이러스, 수포성 구내염 바이러스(VSV) 또는 유두종 바이러스, 예컨대 HPV 또는 BPV)은 포유류 세포에 벡터를 클로닝하는 데 유용하다. 일반적으로 복제 기원 성분은 포유류 발현 벡터에는 필요하지 않다(예를 들어 SV40 기원은 단지 그것이 바이러스 초기 프로모터를 함유하기 때문에 자주 사용된다).
- [0158] 전사 종결 서열은 전형적으로 폴리펩티드 코딩 영역의 단부의 3'에 위치하고 전사를 종결시키는 작용을 한다. 통상적으로, 원핵 세포의 전사 종결 서열은 G-C가 풍부한 단편이고, 그 뒤에 폴리-T 서열이 이어진다. 서열은 쉽게 라이브러리로부터 클론되거나 벡터의 부분으로서 상업적으로 구매할 수 있지만, 또한 본원에 기술된 것과 같은 핵산 합성을 위한 방법들을 사용하여 쉽게 합성될 수 있다.

- [0159] 선택가능한 마커 유전자는 선택적 배양 배지에서 성장된 숙주 세포의 생존 및 성장에 필요한 단백질을 코드화한다. 전형적인 선택 마커 유전자는 (a) 원핵 숙주 세포에 대해 항생물질 또는 다른 독소, 예컨대 암피실린, 테트라사이클린 또는 카나마이신에 대한 내성을 부여하고; (b) 세포의 보충물 영양요구성이 결핍되며; 또는 (c) 복합체 또는 규정된 배지로부터 활용할 수 없는 결정적 영양분을 공급하는 단백질을 코드화한다. 특이적인 선택가능한 마커는 카나마이신 내성 유전자, 암피실린 내성 유전자 및 테트라사이클린 내성 유전자이다. 유익하게도, 네오마이신 내성 유전자가 또한 원핵 및 진핵 숙주 세포 둘 다에서의 선택을 위해 사용될 수 있다.
- [0160] 다른 선택가능한 유전자는 발현될 유전자를 증폭시키기 위해 사용될 수 있다. 증폭은 성장 또는 세포 성장에 결정적인 단백질의 생성에 필요한 유전자가 재조합 세포의 연속적인 생성의 염색체 내에서 한줄로 반복되는 과정이다. 포유류 세포에 대한 적당한 선택가능한 마커의 실례는 다이하이드로폴레이트 환원효소(DHFR) 및 프로모터가 없는 싸이미딘 키나제 유전자를 포함한다. 포유류 세포 형질전환체는 선택 압력 하에 놓이는데, 그 환경에서 단지 형질전환체만이 백터에 존재하는 선택가능한 유전자에 의해 생존하도록 유일하게 채택된다. 선택 압력은 배지 중의 선택제 농도가 연속적으로 증가되는 조건 하에서 형질전환된 세포를 배양함으로써 부과되는데, 그로써 선택가능한 유전자와 다른 유전자, 예컨대 CD30L에 결합하는 항원 결합 단백질을 코드화하는 DNA가 둘 다 증폭되는 것이 유도된다. 그 결과로서, 증가된 양의 폴리펩티드, 예컨대 항원 결합 단백질이 증폭된 DNA로부터 합성된다.
- [0161] 리보솜-결합 부위는 통상적으로 mRNA의 번역 개시에 필요하고, 샤인-달가노 서열(원핵 세포) 또는 Kozak 서열(진핵 세포)을 특징으로 한다. 이 요소는 전형적으로 프로모터에 대해 3'에, 발현될 폴리펩티드의 코딩 서열에 대해 5'에 위치한다.
- [0162] 어떤 경우에, 예컨대 진핵 숙주 세포 발현 시스템에서 글리코실화가 바람직한 경우에, 글리코실화 또는 수율을 향상시키기 위하여 다양한 프레- 또는 프로-서열을 조작할 수 있다. 예를 들어 특별한 신호 펩티드의 펩티다제 절단 부위를 변경하거나, 글리코실화에 또한 영향을 미칠 수 있는 프로서열을 첨가할 수 있다. 최종 단백질 생성물은 -1 위치(성숙한 단백질의 첫 번째 아미노산과 관련하여)에 하나 또는 그 이상의 추가의 아미노산 사건을 포함할 수 있고, 그것은 전체적으로 제거되지 않을 수 있다. 예를 들어 최종 단백질 생성물은 펩티다제 절단 부위에서 발견되고 아미노-말단에 부착된 하나 또는 두 개의 아미노산 잔기를 가질 수 있다. 또는 다르게는, 어떤 효소 절단 부위의 사용은, 그 효소가 성숙한 폴리펩티드 내에서 그런 지역을 절단한다면 원하는 폴리펩티드의 약간 절단된 형태를 유발할 수 있다.
- [0163] 발현 및 클로닝은 전형적으로 숙주 유기체에 의해 인지되고 CD30L 항원 결합 단백질을 코드화하는 분자에 작동가능하게 연결된 프로모터를 함유할 것이다. 프로모터는 구조적 유전자의 전사를 제어하는 구조적 유전자(대체로 약 100 내지 1000bp 내에 있다)의 출발 코돈에 대해 상류(즉 5')에 위치한 미전사 서열이다. 프로모터는 관례적으로 두 가지 부류 중 하나로 그룹화된다: 유도성 프로모터와 본질성 프로모터. 유도성 프로모터는 배양 조건의 어떤 변화, 예컨대 영양분의 존재 또는 부재 또는 온도 변화에 대한 반응으로 제어하여 DNA로부터 증가된 수준의 전사를 개시한다. 다른 한편으로, 본질성 프로모터는 그것들이 작동가능하게 연결되는 유전자를 균질하게 전사한다, 즉 유전자 발현에 대해 약간 제어되거나 전혀 제어되지 않는다. 다양한 잠재적인 숙주 세포에 의해 인지되는 대다수의 프로모터가 잘 알려져 있다. 적당한 프로모터는 제한 효소 소화에 의해 공급원 DNA로부터 프로모터를 제거하고, 원하는 프로모터 서열을 백터 안에 삽입함으로써, CD30L 항원 결합 단백질의 중쇄 가변 영역 또는 경쇄 가변 영역을 코드화하는 DNA에 작동가능하게 연결된다.
- [0164] 효모 숙주와 함께 사용하기에 적당한 프로모터는 해당 기술분야에 잘 알려져 있다. 효모 인헨서는 유익하게도 효모 프로모터와 함께 사용된다. 포유류 숙주 세포와 함께 사용하기에 적당한 프로모터는 잘 알려져 있으며, 예를 들면 그것들에 한정되는 것은 아니지만, 바이러스, 예컨대 폴리오마 바이러스, 계두 바이러스, 아데노바이러스(예컨대 아데노바이러스 2), 소 유두종 바이러스, 조류 육종 바이러스, 사이토메갈로바이러스, 레트로바이러스, B형 간염 바이러스 및 유인원 바이러스 40(SV40)의 게놈으로부터 얻어진 것들을 포함한다. 다른 적당한 포유류 프로모터로는 이중성 포유류 프로모터, 예를 들면 열충격 프로모터 및 액틴 프로모터를 포함한다.
- [0165] 관심의 대상인 추가의 프로모터로는, 그것들에 한정되는 것은 아니지만 다음과 같은 것들을 포함한다: SV40 초기 프로모터(Benoist and Chambon, 1981, *Nature* 290:304-310); CMV 프로모터(Thornsen *et al.*, 1984, *Proc. Natl. Acad. U.S.A.* 81:659-663); 라우스 육종 바이러스의 3' 긴 말단 반복부에 함유된 프로모터(Yamamoto *et al.*, 1980, *Cell* 22:787-797); 헤르페스 싸이미딘 키나제 프로모터(Wagner *et al.*, 1981, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78:1444-1445); 메탈로티오닌 유전자로부터의 프로모터 및 조절 서열(Prinster *et al.*, 1982, *Nature* 296:39-42); 및 베타-락타마제 프로모터(Villa-Kamaroff *et al.*, 1978, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*

75:3727-3731) 또는 tac 프로모터(DeBoer *et al.*, 1983, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 80:21-25)와 같은 원핵 프로모터. 또한 관심의 대상은 조직 특이성을 나타내고 유전자도입 동물에서 활용되는 다음의 동물 전사 제어 영역이다: 췌장 선포세포에서 활성인 엘라스타제 I 유전자 제어 영역(Swift *et al.*, 1984, *Cell* 38:639-646; Ornitz *et al.*, 1986, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 50:399-409; MacDonald, 1987, *Hepatology* 7:425-515); 췌장 베타 세포에서 활성인 인슐린 유전자 제어 영역(Hanahan, 1985, *Nature* 315:115-122); 림프종 세포에서 활성인 면역글로불린 유전자 제어 영역(Grosschedl *et al.*, 1984, *Cell* 38:647-658; Adames *et al.*, 1985, *Nature* 318:533-538; Alexander *et al.*, 1987, *Mol. Cell. Biol.* 7:1436-1444); 고환, 유방, 림프종 및 비만 세포에서 활성인 마우스 유방암종 바이러스 제어 영역(Leder *et al.*, 1986, *Cell* 45:485-495); 간에서 활성인 알부민 유전자 제어 영역(Pinkert *et al.*, 1987, *Genes and Devel.* 1:268-276); 간에서 활성인 알파-태아-단백질 유전자 제어 영역(Krumlauf *et al.*, 1985, *Mol. Cell. Biol.* 5:1639-1648; Hammer *et al.*, 1987, *Science* 253:53-58); 간에서 활성인 알파 1-항트립신 유전자 제어 영역(Kelsey *et al.*, 1987, *Genes and Devel.* 1:161-171); 골수종 세포에서 활성인 베타-글로빈 유전자 제어 영역(Mogam *et al.*, 1985, *Nature* 315:338-340; Kollias *et al.*, 1986, *Cell* 46:89-94); 뇌의 회소 돌기 아교 세포에서 활성인 미엘린 염기성 단백질 유전자 제어 영역(Readhead *et al.*, 1987, *Cell* 48:703-712); 골격근에서 활성인 미오신 경쇄-2 유전자 제어 영역(Sani, 1985, *Nature* 314:283-286); 및 시상하부에서 활성인 고나도트로핀 방출 호르몬 유전자 제어 영역(Mason *et al.*, 1986, *Science* 234:1372-1378).

[0166] 인헨서 서열은 고등 진핵생물에 의해 전사를 증가시키기 위해 벡터 안에 삽입될 수 있다. 인헨서는 DNA의 시스-작용 요소이며, 통상적으로 약 10 내지 300bp 길이이고, 전사를 증가시키기 위해 프로모터에 대해 작용한다. 인헨서는 상대적으로 방향 및 위치와 무관하며, 전사 유닛의 5' 및 3' 양 위치에서 발견된다. 포유류 유전자로부터 활용할 수 있는 여러 인헨서 서열이 알려져 있다(예컨대 글로빈, 엘라스타제, 알부민, 알파-태아-단백질 및 인슐린). 그러나 전형적으로, 바이러스로부터 유래된 인헨서가 사용된다. 해당 기술분야에 공지되어 있는 SV40 인헨서, 사이토메갈로바이러스 초기 프로모터 인헨서, 폴리오마 인헨서 및 아데노바이러스 인헨서가 진핵생물 프로모터의 활성화에 대한 예시적인 증강 요소이다. 인헨서는 코딩 서열의 5' 및 3'의 어느 쪽이든 벡터에 위치할 수 있지만, 전형적으로는 프로모터로부터 5'쪽 부위에 위치한다. 적절한 천연 또는 이중성 신호 서열(리더 서열 또는 신호 펩티드)을 코드화하는 서열이 항체의 세포외채성 분비를 촉진하기 위하여 발현 벡터 안에 통합될 수 있다. 신호 펩티드 또는 리더의 선택은 항체가 생성되고, 이중성 신호 서열이 천연 신호 서열을 대신할 수 있는 숙주 세포의 유형에 따라 좌우된다. 포유류 숙주 세포에서 기능적인 신호 펩티드의 실례는 다음의 것들을 포함한다: 미국 특허 번호 4,965,195에 기술된 인터류킨-7에 대한 신호 서열; Cosman *et al.*, 1984, *Nature* 312:768에 기재되어 있는 인터류킨-2 수용체에 대한 신호 서열; 유럽 특허 번호 0 367 566에 기술되어 있는 인터류킨-4 수용체 신호 펩티드; 미국 특허 번호 4,968,607에 기술된 제 I 유형 인터류킨-1 수용체 신호 펩티드; 유럽 특허 번호 0 460 846에 기술된 제 II 유형 인터류킨-1 수용체 신호 펩티드.

[0167] 벡터가 구성된 후에, 완성된 벡터는 증폭 및/또는 폴리펩티드 발현을 위해 적당한 숙주 세포 안에 삽입될 수 있다. 항원 결합 단백질에 대한 발현 벡터의 선택된 숙주 세포 안으로의 형질전환은 형질전환, 감염, 칼슘 포스페이트 공동-침전, 일렉트로포레이션, 마이크로주입, 리포펙션, DEAE-텍스트란 중재된 형질전환 또는 다른 공지된 기법들을 포함한 잘 알려져 있는 방법들에 의해 이루어질 수 있다. 선택된 방법은 부분적으로는, 사용되는 숙주 세포 유형의 기능일 것이다. 이들 방법 및 다른 적당한 방법은 숙련된 전문가에게 잘 알려져 있으며, 예를 들면 문헌에 설명되어 있다(Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2001)).

[0168] 숙주 세포는 적절한 조건 하에서 배양될 때, 배양 배지로부터(만약 숙주 세포가 단백질을 배지 안으로 분비한다면) 또는 그것을 생성하는 숙주 세포로부터 직접(만약 단백질이 분비되지 않는다면) 계속해서 수집될 수 있는 단백질을 합성한다. 적절한 숙주 세포의 선택은 다양한 요인, 예컨대 원하는 발현 수준, 활성화에 대해 바람직한 또는 필요한 폴리펩티드 변형(예컨대 글리코실화 또는 인산화) 및 생물학적으로 활성인 분자로의 용이한 접합에 따라 좌우될 것이다.

[0169] 발현을 위한 숙주로서 활용할 수 있는 포유류 셀라인은 해당 기술분야에 공지이고 예를 들면 그것들에 한정되는 것은 아니지만, 아메리칸 타입 컬처 콜렉션(ATCC)으로부터 활용할 수 있는 불멸화된 셀라인, 이를테면 차이니스 햄스터 난소(CHO) 세포, HeLa 세포, 어린 햄스터 신장(BHK) 세포, 원숭이 신장 세포(COS), 사람 간세포 암종 세포(예컨대 Hep G2) 및 많은 다른 셀라인이 있다. 특정 구체예에서, 셀라인은 어떤 셀라인이 높은 발현 수준을 나타내고 CD30L 결합 특성을 가지는 항원 결합 단백질을 본질적으로 생성하는 지에 대한 측정을 통해 선택될 수 있다. 다른 구체예에서, 자체의 항체를 만들지는 못하지만 이중성 항체를 만들고 분비할 수 있는 능력을 가지고

있는 B 세포 계통으로부터의 셀라인도 또한 선택될 수 있다. 다른 구체예에서, 퓨코실트란스페라제는 전체 또는 부분적인 아퓨코실화된 항체를 생성하는 셀라인을 녹-아웃시킨다(미국 특허 6,946,292, US 7,425,446, US 7,846,725, US 8,067,232, Potelligent[®] 세포, BioWa, Princeton, NJ).

[0170] **CD30L 시험관 내 생체분석**

[0171] 또한 본 발명에는 CD30/CD3L 상호작용을 억제하는 길항체를 확인하기 위한 방법이 제공된다. 이들 방법은 CD30L에 대한 반응으로 CD30+ 세포로부터 생성된 마커 사이토킨의 유도를 사용한다. 방법은 CD30L의 공급원과 관심의 시험 화합물을 조합시키는 단계; 시험 화합물/CD30L 조합을 CD30과 CD30L의 상호작용에 대한 반응으로 마커 사이토킨을 발현할 수 있는 CD30+ 세포에 첨가하는 단계; 세포 상층액을 수득하는 단계; 그리고 세포 상층액에서 생성된 및/또는 상층액으로 방출된 마커 사이토킨의 양을 측정함으로써 시험화합물이 CD30/CD30L 상호작용을 억제하는지의 여부를 측정하는 단계를 포함한다. 예를 들어 그런 CD30L-의존성 시험관내 생체분석은 사람 악성 큰세포 림프종(ALCL) 셀라인, 내인성 CD30의 Karpas-299(K299) 발현 및 CD30과 CD30L의 상호작용에 대한 반응으로 이들 세포로부터의 IL-8의 방출을 활용할 수 있다. 이들 방법은 나아가 본원에 제공된 실시예에서 예시된다.

[0172] 시험 화합물은 CD30L 항원 결합 단백질, 이를테면, 그것들에 한정되는 것은 아니지만 항체, 그것의 항원 결합 단편 및 그것들의 유도체를 포함한다. 시험 화합물은 또한 재조합 가용성 CD30 화합물(예컨대 Fc 태그, 폴리-HIS 태그, FLAG[®]-태그 등과 융합된 CD30 세포외재성 도메인)뿐 아니라 작은 분자를 포함할 수 있다. 적당한 CD30+ 셀라인은 CD30과 CD30L의 상호작용에 대한 반응으로 마커 사이토킨을 발현하고; 그런 셀라인은 사람 CD30⁺ 악성 큰세포 림프종 셀라인 K299(Karpas-299, DSMZ, Germany)를 포함한다.

[0173] CD30L에 대한 공급원은 가용성 CD30L 구성물 및 막 결합된 CD30L을 포함한다. 가용성 CD30L은 CD30L 단편, 바람직하게는 CD30L의 세포외재성 영역의 단편을 포함하는 키메릭 조성물을 포함한다. 그런 가용성 구성물은 다량체로이신 또는 아이소로이신 지퍼 구성물을 포함한다. 그런 구성물은 사람 또는 게먹이 원숭이 CD30L의 세포외재성 도메인의 N-말단에 부착된 33개의 아미노산 로이신 지퍼 모티프를 포함한다. 가용성 재조합 CD30L 구성물은 또한 상업적으로 활용가능하다(R&D Systems, Minneapolis, MN). 다른 가용성 CD30L은 또한 FLAG[®]-태그(Axxora LLC, San Diego, CA)에 융합된 CD30L 세포외재성 도메인을 포함한다. 막 결합된 CD30L은 천연 및 형질전환된 CD30L 발현 세포 및 셀라인을 포함한다. 그런 셀라인은, 그것에 한정되는 것은 아니지만 예컨대 CD30L⁺ 사람 B 셀라인 Ramos(ATCC, Manassas, VA)을 포함한다. 또한 게먹이 원숭이 혈액 T 세포와 마우스 수지상 돌기 셀라인이 포함된다.

[0174] 본원에는 CD30L이 CD30+ 세포로부터 IL-8 생성을 유도하는 것을 측정하기 위한 방법이 제공되는데, 그 방법은 시험 화합물을 CD30L의 공급원과 조합하는 단계; 그 시험 화합물-CD30L 조합을 조사된(irradiated) CD30⁺ 세포에 첨가하는 단계; 세포 상층액을 수득하는 단계; 그리고 세포 상층액으로 방출된 IL-8의 양을 측정하는 단계를 포함한다. 이 CD30L-의존성 시험관 내 생체분석은 사람 악성 큰세포 림프종(ALCL) 셀라인, 내인성 CD30의 Karpas-299(K-299) 발현 및 CD30과 CD30L의 상호작용에 대한 반응으로 이들 세포로부터의 IL-8의 방출을 활용할 수 있다. 방출된 IL-8은 예를 들면 IL-8 ELISA에 의해 정량될 수 있다. CD30L 길항체, 예컨대 본원에 기술된 항원 결합 단백질은 가용성 CD30L(단일 세포 분석) 또는 막 결합된 CD30L(이중 세포 분석)과 함께 인큐베이션된 후 K299 세포와 함께 배양된다. 그런 다음 세포 상층액이 수득되고 CD30L 길항체, 예컨대 본원에 기술된 것과 같은 항원 결합 단백질에 의한 차단에 대한 반응으로 K299 세포로부터의 IL8 방출의 억제에 IL-8 샌드위치 ELISA를 사용하여 측정된다.

[0175] 단일 세포 분석에 대해서, CD30L 길항체가 96-웰 미소역가 플레이트, 예컨대 Costar[®] 96 웰 플레이트(Corning; Acton, MA)에 원하는 범위의 최종 농도, 예를 들면 1 μ g/ml 내지 10pg/ml로 적정된다. CD30L 항원 결합 단백질, 예컨대 본원에 기술된 것과 같은 것들이 포지티브 대조표준으로서 사용될 수 있다. 플레이트는 약 45분 동안 실온에서 인큐베이션되었다. 그런 다음 각 웰에 CD30+ 세포 공급원이 첨가되었다. 플레이트는 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂에서 24시간 동안 인큐베이션되었다.

[0176] 이중 세포 분석에 대해서, CD30L 공급원은 막 결합되고 조사된다. CD30L 발현 세포로는, 그것들에 한정되는 것은 아니지만, 사람 CD30L⁺ 사람 B 셀라인 Ramos(ATCC, Manassas, VA), 활성화된 게먹이 원숭이 혈액 T 세포 또는 마우스 쥐과 DC 셀라인과 같은 세포들이 있다. CD30L 발현 세포는 가장 높은 세포 표면 CD30L 발현 수준을

나타내는 그런 세포를 선택하기 위해 사용 전에 FACS 분류가 시행될 수 있다. CD30L 발현 세포는 CD30L 길항체와 조합되고, 45분 동안 인큐베이션된 후 CD30⁺ 세포 공급원에 첨가된다. 다시 한 번, 플레이트는 24시간 동안 37°C, 5% CO₂에서 인큐베이션된다.

[0177] 두 가지 분석에 대해 방출된 IL8은 IL-8을 검출하기 위한 어떠한 방법, 예를 들면 IL-8 샌드위치 ELISA에 의해 측정되고 정량될 수 있다. 그런 분석은 상업적으로 활용가능하며, 예를 들면 R&D Systems(Minneapolis, MN)에 의해 제공되는 것들이다. IL-8 수준은 ELISA 표준 곡선 및 상업적으로 활용가능한 소프트웨어, 예를 들면 DeltaSoft(DeltaSoft, Inc., Hillsborough, NJ) 및 GraphPad PRISM (GraphPad Software Inc., San Diego, CA)을 사용하여 측정된 IC₅₀ 값으로부터 설명될 수 있다.

[0178] **진단 및 치료 목적을 위한 사람 CD30L 항원 결합 단백질의 용도**

[0179] 본원에 제공된 항원 결합 단백질은 생물학적 샘플 중의 CD30L을 검출하고, CD30L을 생성하는 세포 또는 조직을 확인하는 데 유용하다. CD30L에 특이적으로 결합하는 항원 결합 단백질은 진단 및/또는 치료의 필요가 있는 환자에서 CD30L과 관련된 질병의 진단 및/또는 치료에 사용될 수 있는데, 예를 들면 CD30L 항원 결합 단백질은 진단 분석에, 예컨대 CD30⁺ 세포로부터 IL-8을 유도하기 위해 사용될 수 있다. CD30L에 결합하는 항원 결합 단백질은 CD30L과 관련된 질병의 개선에 치료적으로 사용될 수 있다.

[0180] **지표**

[0181] 본 발명은 또한 본원에 개시된 것과 같은 질병의 예방 또는 치료적 치료에 사용하기 위한 CD30L 항원 결합 단백질의 용도에도 관련된다. CD30L 항원 결합 단백질은 CD30L이 근원적인 질병 또는 장애에 기여하는 또는 그렇지 않으면 네거티브 증상에 기여하는 데 관련이 되어 있거나 그런 역할을 하는 다양한 상태를 치료하는 데 유용하다.

[0182] 본원에는 다양한 질병, 예컨대 자가면역 및 만성 염증성 질병 및 암을, 본원에 기술된 하나 또는 그 이상의 CD30L 항원 결합 단백질을 포함하는 조성물의 효과적인 양을 치료의 필요가 있는 환자에게 투여함으로써 치료하는 방법이 제공된다. 그런 조성물은 CD30⁺와 CD30L⁺ 세포 사이의 상호작용을 차단하고; CD30L⁺ 세포를 고갈시키거나; 또는 CD30L⁺ 세포상의 활성을 길항함으로써 생체 내에서 면역 반응을 조절하는 데 유용하다. CD30L은 "역신호화"를 나타낼 수 있고, 호중구 및 말초혈 T 세포 상에서 발현된 CD30L은 그런 세포에서 대사적 활성을 자극하기 위해 교차-결합됨으로써 활성화될 수 있다(Wiley et al., *J Immunol* 157: 3235-39, 1996; Cerutti et al., *J. Immunol.* 165: 786, 2000; Cerutti et al., *Nat. Immunol.* 2: 150, 2001). CD30L에 결합하는 본원에 기술된 항원 결합 단백질은 그 자체로서 역 CD30L 신호화를 차단하거나 CD30L⁺ 세포를 자극하기 위해 사용될 수 있었다.

[0183] CD30⁺ 세포는 호지킨병과 강력하게 관련되고, CD30은 많은 혈액학상의 악성종양에 대해 광범위하게 사용되는 임상적 마커이다(개관을 위해서는 Horie and Watanabe, *Immuno.* 10:457-470, 1998 참조). 본원에 기술된 하나 또는 그 이상의 CD30L 항원 결합 단백질을 단독으로 또는 다른 치료제와 함께 포함하는 조성물은 그런 상태를 치료하는 데 유용할 수 있다.

[0184] CD30L은 활성화된 T 세포 및 특정 B 세포 및 수지상 세포 집단에서 발현된다. CD30은 활성화된 T 및 B 세포의 부분에서 발현된다. 이 발현 패턴은 CD30L을 표적화하는 것이 T 세포, B 세포 및 수지상 세포 사이의 상호작용을 조절하는 데 유용할 것임을 시사한다. CD30L은 체액성 면역성에 영향을 미치는 것으로 밝혀졌다. 본원에 기술된 항원 결합 단백질은 염증성 질병, 특히 T-세포 의존성 B 세포 반응에 의해 유발된 질병에 관련된 치료적 처방에 사용될 수 있다.

[0185] 관절염은 본원에 개시된 방법 및 조성물에 의해 치료될 수 있다. 본원에서 사용되는 것과 같이, 용어 "관절염"은 다양한 신체 기관 또한 영향을 받을 수 있긴 하지만 주로 관절 또는 관절을 둘러싸고 있는 연결조직에 영향을 미치는 만성 염증성 질환을 말한다. 관절염은 기원적으로 자가면역 또는 외상에 의한 것일 수 있으며, 또는 외래 항원에 노출됨으로써 촉발된 후, 더 이상은 촉발시키는 항원의 지속적인 존재에 의존하지 않는 만성 상태로 이어질 수 있다. 용어 "관절염"은 본원에서 사용되는 것과 같이, 변형성 관절염; 골관절염; 류머티스성 관절염(성인 및 청소년); 라임병 관절염; 반응성 관절염, 이를테면 라이터병; 건선성 관절염; 결절성 관절염; 혈청음성 척추관절염, 이를테면 그것에 한정되는 것은 아니지만 강직성 척추염을 포함한다.

- [0186] 본원에 기술된 항원 결합 단백질은, 본원에서 고통스럽고 흔히 관절, 근육, 신경, 힘줄, 피부, 눈, 연결 조직 또는 다양한 다른 기관 시스템의 다수의 곳에 위치한 염증을 포함한 어떠한 만성 장애로서 규정된 다양한 류머티스성 장애를 치료하는 데 유용하다. 그러한 것으로는, 이것들에 한정되는 것은 아니지만 관절염; 경피증; 통풍; 전신성 홍반성 루푸스; 류머티스성 다발성 근육통; 스틸병; 만성 포도막염; 수의근의 염증을 초래하는 장애, 이를테면 피부근염 및 다발성 근염, 이를테면 산발성 봉입체 근염을 포함한다. 전신성 홍반성 루푸스는 관절, 피부, 신장, 심장, 폐, 혈관 및 뇌의 염증을 유발할 수 있다. 전신성 홍반성 루푸스는 그것의 진전된 형태로 신장 질환을 초래할 수 있다.
- [0187] 또한 본원에 기술된 항원 결합 단백질을 내분비계의 다양한 장애를 치료하기 위한 치료제에 사용하는 방법이 제공되는데, 그러한 장애로는 그것들에 한정되는 것은 아니지만, 청소년기 또는 성인기 개시 당뇨병(이를테면 자가면역성 인슐린-의존성 유형의 당뇨병; 비-인슐린 의존성 유형 및 비만-중재된 당뇨병); 특발성 신장 부근 위축; 애디슨병; 갑상성 기능 저하증; 그레이브병; 자가면역 갑상선염, 예컨대 하시모토 갑상선염; 및 다선성 자가면역 증후군(제 I 유형 및 II 유형)을 포함한다.
- [0188] 본원에 기술된 항원 결합 단백질은 또한 위장계의 질환, 이를테면 그것들에 한정되는 것은 아니지만 자가면역 경화성 담관염; 만성 소화 장애증; 염증성 장 질환, 이를테면 크론병 및 궤양성 대장염; 자가면역 췌장염, 이를테면 만성 췌장염; 특발성 위마비; 및 특발성 궤양, 이를테면 위 및 십이지장 궤양을 치료하기 위한 치료제에 유용하다.
- [0189] 또한 본원에는 본원에 기술된 항원 결합 단백질을 비뇨생식계의 장애, 예를 들면 자가면역 및 특발성 신사구체염; 및 만성 특발성 전립선염(비-박테리아성), 이를테면 양성 전립선 비대증을 치료하기 위한 치료법에 사용하는 방법이 포함된다.
- [0190] 또한 본원에는 본원에 기술된 항원 결합 단백질을 다양한 혈액학상의 질환, 이를테면 그것들에 한정되는 것은 아니지만, 빈혈 및 혈액학상의 장애, 이를테면 악성 빈혈 및 재생불량성 빈혈, 및 판코니 재생불량성 빈혈; 자가면역 용혈성 빈혈; 특발성 혈소판 감소성 자반증(ITP); 골수 이형성 증후군(난치성 빈혈, 관상 철아구가 포함되는 난치성 빈혈, 과잉 배(blast)를 포함한 난치성 빈혈, 형질전환시 과잉 배를 포함한 난치성 빈혈); 및 자가면역 림프증식 증후군(ALPS)을 치료하기 위한 치료법에 사용하는 방법이 포함된다.
- [0191] 나아가 개시된 항원 결합 단백질은 간에 영향을 미치는 질환, 예컨대 자가면역 또는 만성 염증성 간염을 치료하는 데 유용하다.
- [0192] 또한, 개시된 항원 결합 단백질 및 조합은 청력 상실을 포함하는 다양한 자가면역 또는 만성 염증성 장애를 치료하기 위해 사용된다. 그런 장애중 하나는 자가면역 과정으로부터 유발되는 것으로 여겨지는 내이 또는 달팽이관 신경-관련 청력 상실, 즉 자가면역 청력 상실이다. 이 질환은 현재 스테로이드, 메토트렉세이트 및/또는 사이클로포스파미드로 치료되며, 그것들은 CD30/CD30L 상호작용의 억제제 또는 차단제와 함께 투여될 수 있다.
- [0193] 많은 염증성 폐 장애가 또한 개시된 항원 결합 단백질로 치료될 수 있는데, 이를테면 특발성 림프관평활근증증; 만성 비-감염성 기관지염 또는 기종과 관련된 만성 폐쇄성 폐질환(COPD); 및 섬유상 폐질환, 예컨대 낭포성 섬유증 및 특발성 폐 섬유증이 치료될 수 있다.
- [0194] 또한 이식과 관련된 장애들, 이를테면 이식편-대-숙주 질병이 개시된 항원 결합 단백질로 치료될 수 있다. 이식편-대-숙주 질병을 예방 또는 개선하기 위하여, 하나 또는 그 이상의 개시된 항원 결합 단백질을 포함하는 조성물이 심장, 간, 폐, 피부, 신장 또는 다른 기관의 이식을 포함하여 골수 또는 고형 기관 이식 전에, 동시에 또는 후에 투여될 수 있다.
- [0195] 개시된 항원 결합 단백질은 또한 만성 염증성 눈 질병, 이를테면 자가면역 포도막염을 치료하는 데 유용하다.
- [0196] 그러한 조성물은 기도 염증과 관련된 질병, 예컨대 천식을 치료하기 위해 유용할 수 있다.
- [0197] 본원에 기술된 항원 결합 단백질은 또한 여성 생식계에 영향을 미치는 염증성 장애, 이를테면 다발성 이식 장애/불임; 유산 증후군 또는 제 IV배 상실(자연 유산); 및 자궁내막증을 치료하는 데 유용하다.
- [0198] 본원에 기술된 항원 결합 단백질을 사용하여 치료될 수 있는 다른 질병으로는 만성 염증 및/또는 중추신경계의 퇴행성 질병을 포함한다. 이것은 예를 들면 탈수초화와 관련된 질병, 예컨대 다발성 경화증, 전신성 경화증 및 길랑-바레 증후군(급성 염증성 탈수초화 다발성 신경장애, 급성 운동 축삭돌기 신경병증 및 피서 증후군을 포함함)을 포함한다. 다발성 경화증은 대표적인 중추신경계의 만성 퇴행성 질병으로, CD30과 CD30L의 상호작용을 억

제하거나 차단할 수 있는 제제로 치료될 수 있다. 예컨대 미국 특허 번호 6,652,854 참조.

- [0199] 개시된 항원 결합 단백질로 치료될 수 있는 다른 만성 염증성 질환으로는 한랭응집소병; 베크트 증후군; 쇼그렌 증후군; 및 특발성 건초염뿐 아니라, 유전적 결핍과 관련된 다양한 만성 염증성 장애가 있다. 본 발명의 억제제, 조성물 및 조합 치료법은 나아가 안면 신경마비(특발성 안면 마비); 만성 피로 증후군(진행중인 감염과 관련되지 않은); 만성 퇴행성 척추 디스크 질환; 겔프진 증후군; 및 중증 근무력증을 포함하며, 이것들은 코르티코스테로이드를 함께 사용하여 치료될 수 있다.
- [0200] 피부 또는 점막을 포함한 장애 또한 본원에 기술된 항원 결합 단백질을 사용하여 치료될 수 있다. 그러한 장애로는 다음을 포함한다: 극세포분리증, 이틀테면 원관성 루푸스, 아급성 피부 홍반성 루푸스, 피부 맥관염, 다리 에병, 모낭 각화증, 심상성 천포창 및 종양수반성 천포창; 여드름 딸기코; 원형 탈모증; 수포성 류천포창; 습진; 홍반, 이틀테면 다형홍반 및 수포성 다형홍반(스티븐스-존슨 증후군); 염증성 피부 질병; 편평태선; 선형 IgA 수포성 질병(만성 아동 수포성 피부병); 피부 탄성의 상실; 호중구 피부염(스위트 증후군); 모공성 홍색비강진; 건선; 괴저성 농피증; 피부 탄성의 상실; 및 중독성 표피 박리.
- [0201] 개시된 항원 결합 단백질로 치료될 수 있는 다른 질병으로는 자가면역-관련 만성 피부점막 칸디다증; 알레르기; 유육종증; 다중심 망내조직구증; 베그너 육아종증; 동맥염, 이틀테면 거대세포 동맥염; 맥관염 및 만성 자가면역 심근염이 있다.
- [0202] 본원에 개시된 항원 결합 단백질을 사용하여 질병을 치료하기 위해서는, 치료적으로 효과적인 양의 치료제가 그럴 필요가 있는 포유류에 투여된다. 제제는 장애의 심각성을 반영하는 적어도 하나의 지표의 지속적인 개선을 유도하기에 적당한 투여 용량 및 빈도의 처방을 따른다. 개선은 환자가 적어도 하루의 간격을 두고, 바람직하게는 1주, 2주, 3주 또는 4 또는 그 이상의 주 간격으로 적어도 2회의 기회에 개선을 나타낸다면 "지속된" 것으로 간주된다. 장애의 심각성은 신호 또는 증상을 토대로 측정되며, 또는 환자에게 주어지는 설문지에 의해, 예컨대 만성 질병 질환의 상태를 평가하기 위해 의사들이 자주 사용하는 생활의 질 설문지에 의해 측정될 수 있다.
- [0203] 환자의 질환의 심각성을 반영하는 하나 또는 그 이상의 지표는 약물 투여의 빈도 및 기간이 충분한지를 측정하기 위해 평가될 수 있다. 선택된 지표에 대한 기준선 값은 치료제의 첫 번째 용량의 투여 전에 환자의 조사에 의해 수립된다. 바람직하게는 기준선 조사는 첫 번째 용량을 투여하고 약 60일 이내에 이루어진다.
- [0204] 만약 치료되는 상태가 전신성 홍반성 루푸스인 경우, 치료의 충분한 정도를 측정하는 지표는 다음의 것들 중 하나에서 관찰되는 개선으로 구성될 수 있다: 피로; 열; 입과 코의 궤양; 안면 발진("접형발진"); 감광성(SLE는 자주 햇빛에 노출된 후에 확 올라온다); 흉막염; 심막염; 레이노 현상(저온에 노출됨으로써 손가락과 발가락에 혈액순환이 줄어듦); 신장 기능; 및 백혈구 수(SLE 환자는 자주 백혈구 수가 감소된다).
- [0205] 제약학적으로 허용되는 담체와 함께 제형된, 본원에 개시된 항원 결합 단백질을 포함하는 제약학적 조성물이 제공된다. 어떤 구체예에서, 제약학적으로 허용되는 담체는 사람 대상에 투여하기에 적합하다.
- [0206] **진단 방법**
- [0207] 기술된 항원 결합 단백질은 CD30/CD30L 상호작용과 관련된 질병 및/또는 질환을 검출, 진단 또는 모니터링하기 위한 진단 목적에 사용될 수 있다. CD30L의 존재의 검출에 유용한 방법들의 실례로는 면역분석, 예컨대 효소 결합 면역흡착 분석(ELISA) 및 방사성 면역분석(RIA)이 있다.
- [0208] 진단 용도에 대해서는, 항원 결합 단백질은 전형적으로 검출가능한 표지화 그룹으로 표지될 수 있다. 적당한 표지화 그룹으로는, 그것들에 한정되는 것은 아니지만, 다음과 같은 것들이 있다: 방사성 동위원소 또는 방사성 핵종(예컨대 ^3H , ^{14}C , ^{15}N , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I), 형광 기(예컨대, FITC, 로다민, 란탄계 인광체), 효소 기(예컨대 서양고추냉이 과산화효소, β -갈락토시다제, 루시페라제, 알칼리 포스파타제), 화학발광기, 비오틴기 또는 이차 리포터(예컨대 로이신 지퍼 쌍 서열, 이차 항체에 대한 결합 부위, 금속 결합 도메인, 에피토프 태그)에 의해 인지된 예정된 폴리펩티드 에피토프. 어떤 구체예에서, 표지화 그룹은 다양한 길이의 스페이서 아암을 통해 항원 결합 단백질에 결합되어 잠재적인 입체 장애가 감소된다. 단백질을 표지화하는 다양한 방법이 해당 기술분야에 공지되어 있고 사용될 수 있다.
- [0209] 다른 진단 방법들이 CD30L을 발현하는 세포 또는 세포들을 확인하기 위해 제공된다. 특정 구체예에서, 항원 결합 단백질은 표지화 그룹으로 표지되고, CD30L에의 표지된 항원 결합 단백질의 결합이 검출된다. 추가의 특정 구체예에서, 항원 결합 단백질의 CD30L에의 결합은 생체 내에서 검출된다. 추가의 특정 구체예에서, CD30L 항원 결합 단백질이 분리되고 해당 기술분야에 공지되어 있는 기법들을 사용하여 측정된다. 예를 들어 *Harlow and*

Lane, 1988, *Antibodies: A Laboratory Manual*, New York: Cold Spring Harbor (ed. 1991 and periodic supplements); John E. Coligan, ed., 1993, *Current Protocols In Immunology* New York: John Wiley & Sons 참조.

[0210] 다른 방법들은 제공된 항원 결합 단백질과 CD30L에의 결합에 대해 경합하는 시험 분자의 존재의 검출을 제공한다. 그런 분석의 한 실례는 시험 분자의 존재 또는 부재하에 CD30L의 일정량을 함유하는 용액 중의 유리 항원 결합 단백질의 양을 검출하는 것을 포함할 것이다. 유리 항원 결합 단백질(즉 CD30L에 결합하지 않는 항원 결합 단백질)의 양의 증가는 항원 결합 단백질과 CD30L 결합에 대해 경합할 수 있는 시험 분자를 가리킬 것이다. 한 구체예에서, 항원 결합 단백질은 표지화 그룹으로 표지된다. 또는 다르게는, 시험 분자가 표지되고, 유리 시험 분자의 양이 항원 결합 단백질의 존재 및 부재 하에 모니터된다.

[0211] **치료 방법: 제약학적 제형, 투여 경로**

[0212] 하나의 또는 다수의 항원 결합 단백질의 치료적으로 효과적인 양과 제약학적으로 허용되는 부형제, 희석제, 담체, 가용화제, 유화제, 보존제 및/또는 보조제를 포함하는 제약학적 조성물이 제공된다. 또한 그런 제약학적 조성물을 투여함으로써 환자를 치료하는 방법이 포함된다. 용어 "환자"는 사람 환자를 포함한다. 용어 "치료하다"와 "치료"는 적어도 하나의 증상 또는 장애의 다른 측면의 완화 또는 예방, 또는 질병 심각성의 감소 등을 포함한다. 용어 "치료적으로 효과적인 양" 또는 "효과적인 양"은 포유류에서 어떠한 치료적 반응을 생성하는 것으로 측정된 CD30L 항원 결합 단백질의 양을 말한다. 그러한 치료적으로 효과적인 양은 해당 기술분야에 숙련된 사람에게 의해 쉽게 확인된다. 이 개시내용의 목적에 대해 용어 "병", "질병", "질환", "비정상 상태", "고질병", "의학적 장애", "장애" 등은 상호교환적으로 사용된다.

[0213] 항원 결합 단백질은 성공적인 치료제를 구성하기 위하여 질병의 모든 증상 또는 징후의 완전한 치유, 또는 퇴치에 영향을 미칠 필요는 없다. 적절한 분야에서 인지되는 것과 같이, 치료제로서 사용된 약물은 주어진 질병 상태의 심각성을 감소시킬 수는 있지만, 유용한 치료제로서 간주되기 위해 질병의 모든 징후를 다 없애야 하는 것은 아니다. 유사하게, 예방학적으로 투여된 치료제는 성공적인 예방제를 구성하기 위하여 질환의 개시를 예방하는 데 완전히 효과적일 필요는 없다. 단순히 질병의 충격을 감소시킴으로써(예를 들면 질병의 증상의 수 또는 심각성을 감소시킴으로써, 또는 다른 치료의 유효성을 증가시킴으로써 또는 다른 유익한 효과를 발생시킴으로써) 또는 질병이 대상에서 일어날 또는 악화될 가능성을 감소시키는 것으로 충분하다. 본원에 제공된 특정 방법은 환자에게 CD30L 길항제(예컨대 본원에 개시된 항원 결합 단백질)를 특별한 장애의 심각성을 반영하는 지표의 기준선 이상으로 지속적인 개선을 유도하기에 충분한 양으로 및 시간 동안 투여하는 것을 포함한다.

[0214] 적절한 분야에서 인지되는 것과 같이, 본 발명의 분자를 포함하는 제약학적 조성물은 징후에 적절한 방식으로 환자에게 투여된다. 제약학적 조성물은 어떠한 적당한 기법에 의해, 이를테면 그것에 한정되는 것은 아니지만, 비경구로, 국소적으로 또는 흡입에 의해 투여될 수 있다. 주입되는 경우에는, 제약학적 조성물은 예를 들면 동맥 내로, 정맥 내로, 근육 내로, 병변 내로, 복강 내로 또는 피하 경로를 통해, 거한 주사에 의해, 또는 연속적인 주입에 의해 투여될 수 있다. 예를 들어 질병 또는 상해 부위에 국소적인 투여가 고려된다면, 경피 전달 및 이식편으로부터의 지속적인 방출이 고려된다. 흡입에 의한 전달은 예를 들면 코 또는 구강 흡입, 분무기의 사용, 에어로졸 형태의 길항제의 흡입 등을 포함한다. 다른 대체물은 점안액; 환, 시럽, 당의정 또는 씹는 껌을 포함하는 경구용 제제; 및 로션, 젤, 분무제 및 연고와 같은 국소용 제제를 포함한다.

[0215] 항원 결합 단백질을 생체 외 과정에 사용하는 것이 또한 본 발명에 포함된다. 예를 들어 환자의 혈액 또는 다른 체액이 CD30L에 결합하는 항원 결합 단백질과 체액에서 접촉될 수 있다. 항원 결합 단백질은 적당한 불용성 매트릭스 또는 고체 지지체 물질에 결합될 수 있다.

[0216] 유익하게도, 항원 결합 단백질은 하나 또는 그 이상의 추가의 성분들, 예컨대 생리적으로 허용되는 담체, 부형제 또는 희석제를 포함하는 조성물의 형태로 투여된다. 임의로, 조성물은 추가로 조합 치료법을 위해 하나 또는 그 이상의 생리적 활성 제제를 포함한다. 제약학적 조성물은 완충제, 항산화제, 예컨대 아스코르브산, 저분자량 폴리펩티드(예컨대 10개 이하의 아미노산을 가지는 것들), 단백질, 아미노산, 탄수화물, 예컨대 글루코스, 슈크로스 또는 텍스트란, 킬레이트화제, 예컨대 EDTA, 글루타민, 안정화제 및 부형제로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 또는 그 이상의 물질과 함께 CD30L 항원 결합 단백질을 포함할 수 있다. 중성 완충된 식염수 또는 동종의 혈청 알부민과 혼합된 식염수는 적절한 희석제의 실례이다. 적절한 산업 표준에 따르면, 벤질 알코올과 같은 보존제가 또한 첨가될 수 있다. 조성물은 희석제로서 적절한 부형제 용액(예컨대 슈크로스)을 사용한 리오필리제이트로서 제형될 수 있다. 적당한 성분들은 사용된 단위용량 및 농도에서 부형제에 비독성이다. 제약학적 제

형에 사용될 수 있는 성분들의 추가의 실례는 21판(2005)을 포함하여 어떠한 레밍턴 조제학[Remington's Pharmaceutical Sciences]에서 제시된다(Mack Publishing Company, Easton, PA).

- [0217] 의료 종사자에 의해 사용되는 키트는 본원에서 논의된 질환 중 어느 것이든지 치료하는 데 사용하기 위한 CD30L 항원 결합 단백질 및 표지 또는 다른 지시사항을 포함한다. 한 구체예에서, 키트는 상기에서 개시된 것과 같은 조성물의 형태로 존재하고, 하나 또는 그 이상의 바이알에 있을 수 있는, 하나 또는 그 이상의 CD30L 결합 항원 결합 단백질의 멸균 제제를 포함한다.
- [0218] 투여의 단위용량 및 빈도는 질환이 급성 또는 만성인지 투여 경로, 사용된 특별한 항원 결합 단백질, 치료하고자 하는 질병의 성질 및 심각성, 및 대상의 크기 및 일반적 상태와 같은 인자들에 따라 달라질 수 있다. 적절한 단위용량은 적절한 기술분야, 예컨대 단계적 연구에 포함될 수 있는 임상 실험에서 공지되어 있는 과정에 의해 측정될 수 있다.
- [0219] 전형적인 단위용량은 상기에서 언급된 인자들에 따라 약 0.1 μ g/kg 내지 약 30mg/kg 또는 그 이상의 범위일 수 있다. 특정 구체예에서, 단위용량은 0.1 μ g/kg부터 약 30mg/kg까지, 임의로 1 μ g/kg부터 약 30mg/kg까지, 임의로 10 μ g/kg부터 약 10mg/kg까지, 임의로 약 0.1mg/kg 내지 5mg/kg 또는 임의로 약 0.3mg/kg 내지 3mg/kg의 범위일 수 있다.
- [0220] 투약 빈도는 사용된 제형 중의 특별한 CD30L 항원 결합 단백질의 약물학적 변수들에 좌우될 것이다. 전형적으로, 임상되는 단위용량이 원하는 효과를 이루는 단위용량에 이를 때까지 조성물을 관리한다. 그러므로 조성물은 시간에 걸쳐서 단일 용량으로서, 또는 2 또는 그 이상의 용량으로서(원하는 분자의 동일한 양을 함유하거나 함유하지 않을 수 있다) 또는 이식 장치 또는 카테테르를 통한 연속 주입으로서 투여될 수 있다. 적절한 단위용량은 적절한 용량-반응 데이터의 사용을 통해 확인될 수 있다. 본 발명의 CD30L 항원 결합 단백질은 예를 들면 1회 또는 1회 이상, 예컨대 일정 기간에 걸쳐 규칙적인 간격으로 투여될 수 있다. 특별한 구체예에서, CD30L 항원 결합 단백질은 적어도 1달 또는 그 이상, 예컨대 1달, 2달 또는 3달 또는 심지어 무한한 기간에 걸쳐서 투여된다. 만성 질환을 치료하기 위해서는 일반적으로 장기간 치료가 가장 효과적이다. 그러나 급성 질환을 치료하기 위해서는 더 짧은 기간 동안, 예컨대 1주 내지 6주 동안 투여가 충분할 것이다. 일반적으로 항원 결합 단백질은 환자가 선택된 지표 또는 지표들에 대한 기준선 이상으로 의학적으로 관련된 개선 정도를 나타낼 때까지 투여된다.
- [0221] CD30L 항원 결합 단백질은 치료하고자 하는 장애의 심각성을 반영하는 적어도 하나의 지표에서 개선, 바람직하게는 지속적인 개선을 유도하기에 충분한 양으로 및 시간 동안 환자에게 투여되는 것으로 여겨진다. 환자의 병, 질병 또는 질환의 정도를 반영하는 다양한 지표들은 치료의 양과 시간이 충분한지 어떤지를 측정하기 위하여 평가될 수 있다. 그런 지표로는 예를 들면 의문의 질병의 심각성, 증상 또는 징후의 임상적으로 인지된 지표를 포함한다. 한 구체예에서, 만약 대상이 2 내지 4주 간격으로 적어도 2회의 기회에 개선을 나타낸다면 개선이 지속적인 것으로 간주된다. 개선의 정도는 일반적으로 의사에 의해 측정되는데, 의사는 이 측정을 신호, 증상, 생검 또는 다른 시험 결과를 토대로 시행하며, 또한 대상에게 지시되는 설문지, 예컨대 주어진 질병에 대해 개발된 생활의 질 설문지를 사용할 수 있다. 본 발명의 방법 및 조성물의 특별한 구체예는 CD30L 항원 결합 단백질 및 하나 또는 그 이상의 추가의 CD30L 길항체, 예를 들면 본 발명의 물 또는 그 이상의 항원 결합 단백질, 또는 본 발명의 항원 결합 단백질 및 하나 또는 그 이상의 다른 CD30L 길항체의 사용을 포함한다. 또한 본원에는 단독으로 또는 환자가 영향을 받는 질환을 치료하는 데 유용한 다른 제제들과 조합하여 투여되는 CD30L 항원 결합 단백질이 제공된다. 그런 제제의 실례로는 단백질성 및 비-단백질성 약물 둘 다를 포함한다. 그런 제제로는 예를 들면 TNF α , IL-1, IL-2, RANK 또는 다른 사이토킨의 길항체들을 포함한다. 사이토킨 길항체는 사이토킨 및/또는 그것의 수용체를 표적으로 하는 것들을 포함한다. 사이토킨을 표적으로 하는 길항체는 사이토킨에 대한 가용성 수용체를 포함할 수 있고, 통상적으로 사이토킨에 대한 수용체의 세포외재성 도메인의 부분 또는 전부를 포함한다. 가용성 사이토킨 수용체는 단량체로서, 또는 이량체 또는 고급 다량체로서(예컨대 가용성 수용체가 사람 면역글로불린의 이량체-촉진하는 Fc 부분에 부착되는 융합 분자로서) 사용될 수 있다. 다른 구체예에서, 가용성 사이토킨 수용체는 그것의 혈청 반감기를 증가시키기 위해 폐결화된다. 어떤 구체예에서, 가용성 사이토킨 길항체는 가용성 TNF 수용체(타입 I 또는 II)를 포함한다. 염증성 사이토킨을 억제하는 작은 유기 분자들이 또한 본 발명의 치료제와 함께 사용될 수 있다. 하나 이상의 CD30 리간드 항원 결합 단백질 및/또는 그것의 항원 결합 영역은 자가면역 또는 만성 염증성 질병을 치료하기 위해 부수적으로 투여될 수 있고, 단독으로 또는 동일한 자가면역 또는 만성 염증성 질환에 대해 효과적이거나 또는 동일한 환자에서 상이한 질환을 치료하기 위해 투여되는 다른 약물과 함께 투여될 수 있다.

- [0222] 다수의 치료제가 공동 투여되는 경우에, 적절한 기술분야에서 인지되거나 공지되어 있는 것과 같이, 단위용량도 따라서 조정될 수 있다. 그러한 제제는 동시에, 연속적으로, 교대로 또는 효과적일 치료법의 전체 과정을 허용하는 어떠한 다른 처방에 따라 투여될 수 있다.
- [0223] 사람 환자에 더불어, CD30L 항원 결합 단백질은 비-사람 동물, 예컨대 가축용 애완동물(개, 고양이, 새, 영장류 등), 가축용 농장 동물(말, 소, 양, 돼지, 새 등)의 치료에 유용하다. 그런 경우에 적절한 용량은 동물의 체중에 따라 측정될 수 있다. 예를 들어 0.2 내지 1mg/kg의 용량이 사용될 수 있다. 또는 다르게는, 용량은 동물의 표면적에 따라 결정되고, 예시적인 용량 범위는 0.1 내지 20mg/m², 보다 바람직하게는 5 내지 12mg/m²이다. 작은 동물, 예컨대 개 또는 고양이의 경우, 적당한 용량은 0.4mg/kg이다. CD30L 항원 결합 단백질(바람직하게는 수용체 종으로부터 유도된 유전자로부터 구성됨)은 동물의 상태가 개선될 때까지 주당 1회 또는 그 이상 주사 또는 다른 적당한 경로에 의해 투여되거나, 또는 무기한으로 투여될 수 있다.
- [0224] 다음의 구체예 및 실시예는, 수행된 실험 및 이루어진 결과를 포함하여, 단지 예시적인 목적으로만 제공되는 것으로, 첨부되는 청구범위의 범주를 제한하는 것으로 해석되어서는 안된다.
- [0225] **구체예**
- [0226] 1. a) 표 3에 제시된 것과 같은 CDRH1과 4개까지의 아미노산 치환, 삽입 또는 결실만큼 상이한 CDRH1;
- [0227] b) 표 3에 제시된 것과 같은 CDRH2와 7개까지의 아미노산 치환, 삽입 및/또는 결실만큼 상이한 CDRH2;
- [0228] c) 표 3에 제시된 것과 같은 CDRH3와 11개까지의 아미노산 치환, 삽입 및/또는 결실만큼 상이한 CDRH3로 이루어진 군으로부터 선택된 CDRH1, CDRH2 및 CDRH3를 포함하는 적어도 하나의 중쇄 가변 영역; 및
- [0229] d) 표 3에 제시된 것과 같은 CDRL1과 4개까지의 아미노산 치환, 삽입 및/또는 결실만큼 상이한 CDRL1;
- [0230] b) 표 3에 제시된 것과 같은 CDRL2와 2개까지의 아미노산 치환, 삽입 또는 결실만큼 상이한 CDRL2;
- [0231] c) 표 3에 제시된 것과 같은 CDRL3와 2개까지의 아미노산 치환, 삽입 또는 결실만큼 상이한 CDRL3로 이루어진 군으로부터 선택된 CDRL1, CDRL2 및 CDRL3를 포함하는 적어도 하나의 경쇄 가변 영역을 포함하는, CD30L에 결합하는 분리된 항원 결합 단백질.
- [0232] 2. 다음의 것들을 포함하는 구체예 1의 분리된 항원 결합 단백질:
- [0233] SEQ ID NO:14, 15, 16, 17, 18 및 33으로 이루어진 군으로부터 선택된 CDRH1;
- [0234] SEQ ID NO:19, 20, 21, 22, 23, 24 및 34로 이루어진 군으로부터 선택된 CDRH2;
- [0235] SEQ ID NO:25, 26, 27, 28, 29 및 35로 이루어진 군으로부터 선택된 CDRH3;
- [0236] SEQ ID NO:1, 2, 3, 4, 5, 6 및 30으로 이루어진 군으로부터 선택된 CDRL1;
- [0237] SEQ ID NO:7, 8, 9, 10 및 31로 이루어진 군으로부터 선택된 CDRL2;
- [0238] SEQ ID NO:11, 12, 13 및 32로 이루어진 군으로부터 선택된 CDRL3.
- [0239] 3. a) SEQ ID NO:36, 28, 40, 42 또는 44의 아미노산 잔기 23 내지 36을 포함하는 CDR1, 아미노산 잔기 52 내지 58을 포함하는 CDR2 및 아미노산 잔기 91 내지 100을 포함하는 CDR3를 포함하는 경쇄 가변 영역; 또는
- [0240] b) SEQ ID NO:46의 아미노산 잔기 25 내지 36을 포함하는 CDR1, 아미노산 잔기 52 내지 58을 포함하는 CDR2 및 아미노산 잔기 91 내지 100을 포함하는 CDR3를 포함하는 경쇄 가변 영역으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 경쇄 가변 영역과,
- [0241] SEQ ID NO:48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70 또는 72의 아미노산 잔기 31 내지 35를 포함하는 CDR1, 아미노산 잔기 50 내지 65를 포함하는 CDR2 및 아미노산 잔기 98 내지 113을 포함하는 CDR3를 포함하는 적어도 하나의 중쇄 가변 영역을 포함하는, 사람 CD30L에 결합하는 분리된 항원 결합 단백질.
- [0242] 4. 적어도 하나의 중쇄 가변 영역과 적어도 하나의 경쇄 가변 영역을 포함하는 구체예 1의 분리된 항원-결합 단백질.
- [0243] 5. 적어도 두 개의 중쇄 가변 영역과 적어도 두 개의 경쇄 가변 영역을 포함하는 구체예 1의 분리된 항원-결합 단백질.

- [0244] 6. 중쇄 가변 영역과 경쇄 가변 영역을 포함하는, CD30L에 결합하는 분리된 항원 결합 단백질로서, 이때 중쇄 가변 영역 서열은 표 2에 제시된 것과 같은 중쇄 가변 영역 서열과 31개까지의 아미노산 치환, 첨가 및/또는 결실만큼 상이하고, 경쇄 가변 영역 서열은 표 1에 제시된 것과 같은 경쇄 가변 영역 서열과 30개까지의 아미노산 치환, 첨가 및/또는 결실만큼 상이하다.
- [0245] 7. SEQ ID NO:48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70 및 72에 대해 적어도 80%의 서열 동일성을 가지는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및
- [0246] SEQ ID NO:36, 38, 40, 42, 44 및 46에 대해 적어도 88%의 서열 동일성을 가지는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는, CD30L에 결합하는 분리된 항원 결합 단백질.
- [0247] 8. 다음으로 이루어진 군으로부터 선택된, CD30L에 결합하는 분리된 항원 결합 단백질:
- [0248] a) SEQ ID NO:48, 50, 52, 54, 56, 58, 60 및 62로 이루어진 군으로부터 선택된 중쇄 가변 영역과 SEQ ID NO:36의 경쇄 가변 영역을 포함하는 분리된 항원 결합 단백질;
- [0249] b) SEQ ID NO:64의 중쇄 가변 영역과 SEQ ID NO:38의 경쇄 가변 영역을 포함하는 분리된 항원 결합 단백질;
- [0250] c) SEQ ID NO:66의 중쇄 가변 영역과 SEQ ID NO:40의 경쇄 가변 영역을 포함하는 분리된 항원 결합 단백질;
- [0251] d) SEQ ID NO:68의 중쇄 가변 영역과 SEQ ID NO:42의 경쇄 가변 영역을 포함하는 분리된 항원 결합 단백질;
- [0252] e) SEQ ID NO:70의 중쇄 가변 영역과 SEQ ID NO:44의 경쇄 가변 영역을 포함하는 분리된 항원 결합 단백질; 및
- [0253] f) SEQ ID NO:72의 중쇄 가변 영역과 SEQ ID NO:46의 경쇄 가변 영역을 포함하는 분리된 항원 결합 단백질.
- [0254] 9. 상기 항원 결합 단백질이 항체인, 구체에 1 내지 8 중 어느 것의 분리된 항원 결합 단백질.
- [0255] 10. 상기 항체는 단클론성 항체, 재조합 항체, 사람 항체, 인간화된 항체, 키메라 항체, 다중특이성 항체 또는 그것들의 항체 단편인, 구체에 9의 분리된 항원 결합 단백질.
- [0256] 11. 구체에 10의 분리된 항원 결합 단백질로서, 상기 항체 단편은 Fab 단편, Fab' 단편, F(ab')₂ 단편, Fv 단편, 이중체 또는 단일 사슬 항체 분자이다.
- [0257] 12. 구체에 10의 분리된 항원 결합 단백질로서, 상기 항원 결합 단백질은 사람 항체이다.
- [0258] 13. 구체에 10의 분리된 항원 결합 단백질로서, 상기 항원 결합 단백질은 단클론성 항체이다.
- [0259] 14. 구체에 9의 분리된 항원 결합 단백질로서, 상기 항원 결합 단백질은 IgG1-, IgG2-, IgG3- 또는 IgG4-유형의 것이다.
- [0260] 15. 구체에 14의 분리된 항원 결합 단백질로서, 상기 항원 결합 단백질은 IgG1- 또는 IgG2-유형의 것이다.
- [0261] 16. 전술한 구체에 중 어느 것의 분리된 항원 결합 단백질로서, 상기 항원 결합 단백질은 다음의 것들로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 특성을 가지는 분리된 항원 결합 단백질:
- [0262] a) CD30/CD30L 상호작용을 억제하고;
- [0263] b) CD30L-유도된 IL-8 유도를 억제하며;
- [0264] c) 사람 CD30L에의 결합에 대해 항체 A 내지 F 중 하나와 교차-경합하고;
- [0265] d) 해리 상수가 $\leq 70\text{pM}$ 이며;
- [0266] e) 항체 A 내지 F 중 하나와 실질적으로 동일한 K_D 로 사람 CD30L에 결합한다.
- [0267] 17. CD30L에 결합하는 분리된 항원 결합 단백질로서, 그 항원 결합 단백질은 AA 201 내지 234, 또는 예컨대 AA 205 내지 230 또는 AA 211 내지 226에 의해 규정된 CD30L의 C-말단 영역에 결합한다.
- [0268] 18. 구체에 17의 분리된 항원 결합 단백질로서, 그 항원 결합 단백질은 AA 75 내지 95, 예컨대 AA 80 내지 90 또는 AA 82 내지 88에 의해 규정된 CD30L의 추가의 영역에 결합한다.
- [0269] 19. 구체에 17 또는 18의 분리된 항원 결합 단백질로서, 상기 항원 결합 단백질은 다음으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 특성을 가지는 분리된 항원 결합 단백질:

- [0270] a) CD30/CD30L 상호작용을 억제하고;
- [0271] b) CD30L-유도된 IL-8 유도를 억제하며;
- [0272] c) 사람 CD30L에의 결합에 대해 항체 A 내지 F 중 하나와 교차-경합하고;
- [0273] d) 사람 CD30L에 대한 해리 상수가 최대한 70pM이며;
- [0274] e) 항체 A 내지 F 중 하나와 실질적으로 동일하거나 더 낮은 K_D 로 사람 CD30L에 결합한다.
- [0275] 20. 전술한 구체예 17 내지 19 중 어느 것의 분리된 항원 결합 단백질로서, 항원 결합 단백질의 hCD30L에 대한 결합은 항체 A, B, C, D, E 및 F 중 하나 또는 그 이상의 Fab의 결합에 의해 억제된다.
- [0276] 21. 전술한 구체예 17 내지 19 중 어느 것의 분리된 항원 결합 단백질로서, 항원 결합 단백질은 항체 A, B, C, D, E 및 F 중 하나 또는 그 이상의 Fab와 CD30L에의 결합에 대해 경합한다.
- [0277] 22. 구체예 20 또는 21의 분리된 항원 결합 단백질로서, Fab는 항체 A1의 Fab이다.
- [0278] 23. 전술한 구체예 17 내지 22 중 어느 것의 분리된 항원 결합 단백질로서, 상기 항원 결합 단백질은 최대 75pM, 예를 들면 최대 50pM, 예컨대 40pM의 사람 CD30L에 대한 해리 상수(K_D)를 가진다.
- [0279] 24. CDRH1, CDRH2 및 CDRH3와 CDRL1, CDRL2 및 CDRL3를 포함하는, 전술한 구체예 17 내지 23 중 어느 것의 분리된 항원 결합 단백질로서,
- [0280] CDRL1은 SEQ ID NO:30의 CDRL1 공통 서열이고,
- [0281] CDRL2는 SEQ ID NO:31의 CDRL2 공통 서열이며,
- [0282] CDRL3는 SEQ ID NO:32의 CDRL3 공통 서열이고,
- [0283] CDRH1은 SEQ ID NO:33의 CDRH1 공통 서열이며,
- [0284] CDRH2는 SEQ ID NO:34의 CDRH2 공통 서열이고,
- [0285] CDRH3는 SEQ ID NO:35의 CDRH3 공통 서열이다.
- [0286] 25. CDRH1, CDRH2 및 CDRH3와 CDRL1, CDRL2 및 CDRL3를 포함하는, 전술한 구체예 17 내지 23 중 어느 것의 분리된 항원 결합 단백질로서,
- [0287] CDRL1은 SEQ ID NO:30의 CDRL1 공통 서열이고,
- [0288] CDRL2는 SEQ ID NO:31의 CDRL2 공통 서열이며,
- [0289] CDRL3는 SEQ ID NO:32의 CDRL3 공통 서열이고,
- [0290] CDRH1은 SEQ ID NO:17의 서열 또는 SEQ ID NO:75의 CDRH1 공통 서열이며,
- [0291] CDRH2는 SEQ ID NO:34의 CDRH2 공통 서열이고,
- [0292] CDRH3는 SEQ ID NO:35의 CDRH3 공통 서열이다.
- [0293] 26. CDRH1, CDRH2 및 CDRH3와 CDRL1, CDRL2 및 CDRL3를 포함하는, 전술한 구체예 17 내지 23 중 어느 것의 분리된 항원 결합 단백질로서,
- [0294] CDRL1은 SEQ ID NO:30의 CDRL1 공통 서열이고,
- [0295] CDRL2는 SEQ ID NO:31의 CDRL2 공통 서열이며,
- [0296] CDRL3는 SEQ ID NO:32의 CDRL3 공통 서열이고,
- [0297] CDRH1은 SEQ ID NO:17의 서열 또는 SEQ ID NO:75의 CDRH1 공통 서열이며,
- [0298] CDRH2는 서열 ID NO:19, 20, 21, 22, 23 및 24로부터 선택되고,
- [0299] CDRH3는 SEQ ID NO:35의 CDRH3 공통 서열이다.
- [0300] 27. CDRH1, CDRH2 및 CDRH3와 CDRL1, CDRL2 및 CDRL3를 포함하는, 전술한 구체예 17 내지 23 중 어느 것의 분

리된 항원 결합 단백질로서,

- [0301] CDRL1은 SEQ ID NO:30의 CDRL1 공통 서열이고,
- [0302] CDRL2는 SEQ ID NO:31의 CDRL2 공통 서열이며,
- [0303] CDRL3는 SEQ ID NO:32의 CDRL3 공통 서열이고,
- [0304] CDRH1은 SEQ ID NO:17의 서열 또는 SEQ ID NO:75의 CDRH1 공통 서열이며,
- [0305] CDRH2는 서열 ID NO:19, 20, 21, 22, 23 및 24로부터 선택되고,
- [0306] CDRH3는 SEQ ID NO:25, 26, 27, 28 및 29로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0307] 28. 다음을 포함하는 전술한 구체예 17 내지 23 중 어느 것의 분리된 항원 결합 단백질:
- [0308] SEQ ID NO:14, 15, 16, 17 및 18로 이루어진 군으로부터 선택된 CDRH1;
- [0309] SEQ ID NO:19, 20, 21, 22, 23 및 24로 이루어진 군으로부터 선택된 CDRH2;
- [0310] SEQ ID NO:25, 26, 27, 28 및 29로 이루어진 군으로부터 선택된 CDRH3;
- [0311] SEQ ID NO:1, 2, 3, 4, 5 및 6으로 이루어진 군으로부터 선택된 CDRL1;
- [0312] SEQ ID NO:7, 8, 9 및 10으로 이루어진 군으로부터 선택된 CDRL2; 및
- [0313] SEQ ID NO:11, 12 및 13으로 이루어진 군으로부터 선택된 CDRL3.
- [0314] 29. 다음을 포함하는 전술한 구체예 17 내지 23 중 어느 것의 분리된 항원 결합 단백질:
- [0315] a) SEQ ID NO:14, 19 및 25에 의해 확인된 CDRH1, CDRH2 및 CDRH3와 SEQ ID NO:1, 7 및 11에 의해 확인된 CDRL1, CDRL2 및 CDRL3,
- [0316] b) SEQ ID NO:15, 21 및 26에 의해 확인된 CDRH1, CDRH2 및 CDRH3와 SEQ ID NO:2, 8 및 12에 의해 확인된 CDRL1, CDRL2 및 CDRL3,
- [0317] c) SEQ ID NO:15, 21 및 26에 의해 확인된 CDRH1, CDRH2 및 CDRH3와 SEQ ID NO:3, 8 및 12에 의해 확인된 CDRL1, CDRL2 및 CDRL3,
- [0318] d) SEQ ID NO:16, 22 및 27에 의해 확인된 CDRH1, CDRH2 및 CDRH3와 SEQ ID NO:4, 9 및 12에 의해 확인된 CDRL1, CDRL2 및 CDRL3,
- [0319] e) SEQ ID NO:17, 23 및 28에 의해 확인된 CDRH1, CDRH2 및 CDRH3와 SEQ ID NO:5, 8 및 13에 의해 확인된 CDRL1, CDRL2 및 CDRL3 또는
- [0320] f) SEQ ID NO:18, 24 및 29에 의해 확인된 CDRH1, CDRH2 및 CDRH3와 SEQ ID NO:6, 10 및 12에 의해 확인된 CDRL1, CDRL2 및 CDRL3.
- [0321] 30. 구체예 1 내지 29 중 어느 것의 적어도 하나의 항원 결합 단백질과 경합하는 항원 결합 단백질.
- [0322] 31. 전부 또는 부분적으로 아퓨코실화된 구체예 1 내지 29 중 어느 것의 항원 결합 단백질.
- [0323] 32. 전술한 구체예들 중 어느 것의 항원 결합 단백질을 코드화하는 분리된 핵산 분자.
- [0324] 33. 구체예 32의 분리된 핵산 분자로서, 적어도 하나의 중쇄 가변 영역은 SEQ ID NO:49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71 및 73으로 이루어진 군으로부터 선택된 분리된 핵산 분자에 의해 코드화되고, 적어도 하나의 경쇄 가변 영역은 SEQ ID NO:37, 39, 41, 43, 45 및 47로 이루어진 군으로부터 선택된 분리된 핵산 분자에 의해 코드화된다.
- [0325] 34. 구체예 33에 따르는 핵산 분자로서, 상기 핵산 분자는 제어 서열에 작동가능하게 연결된다.
- [0326] 35. 구체예 32에 따르는 핵산 분자를 포함하는 벡터.
- [0327] 36. 구체예 32에 따르는 핵산 분자를 포함하는 숙주 세포.
- [0328] 37. 구체예 35에 따르는 벡터를 포함하는 숙주 세포.
- [0329] 38. 구체예 33 또는 34의 핵산 분자의 단편 또는 그것의 상보물인 혼성화 프로브, PCR 프라이머 또는 서열화 프

라이머로서 사용하기에 충분한 분리된 폴리뉴클레오티드.

- [0330] 39. 구체에 1 내지 31 중 어느 것의 항원 결합 단백질을 제조하는 방법으로서, 그 방법은 상기 항원 결합 단백질을 상기 항원 결합 단백질을 분리하는 숙주 세포로부터 제조하는 단계를 포함한다.
- [0331] 40. 구체에 1 내지 31 중 어느 것의 적어도 하나의 항원 결합 단백질과 제약학적으로 허용되는 부형제를 포함하는 제약학적 조성물.
- [0332] 41. 추가로 표지화 그룹 또는 이펙터 그룹을 포함하는 구체에 40의 제약학적 조성물.
- [0333] 42. 구체에 41의 제약학적 조성물로서, 상기 표지화 그룹은 동위원소 표지, 자성 표지, 산화환원 활성 부분, 광학 염료, 비오틴화된 기 및 이차 리포터에 의해 인지된 예정된 폴리펩티드 에피토프로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0334] 43. 구체에 42의 제약학적 조성물로서, 상기 이펙터 그룹은 방사성 동위원소, 방사성 핵종, 독소, 치료기 및 화학요법 기로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0335] 44. 구체에 1 내지 31 중 어느 것의 적어도 하나의 분리된 항원 결합 단백질의 효과적인 양을 질환의 치료 또는 예방이 필요한 환자에게 투여하는 것으로 이루어지는, 환자에서 CD30L과 관련된 질환을 치료 또는 예방하는 방법.
- [0336] 45. 분리된 항원-결합 단백질은 단독으로 또는 조합 치료법으로서 투여되는 구체에 44의 방법.
- [0337] 46. 구체에 1 내지 31 중 어느 것의 적어도 하나의 항원 결합 단백질의 효과적인 양을 투여하는 것으로 이루어지는, 환자에서 CD30L 활성을 감소시키는 방법.
- [0338] 47. 치료 방법에 사용하기 위한 전술한 구체에 1 내지 31 중 어느 것에 따르는 항원 결합 단백질.
- [0339] 48. 염증성 질병의 치료를 위한 전술한 구체에 1 내지 31 중 어느 것에 따르는 항원 결합 단백질.
- [0340] 49. 자가면역 질병, 예컨대 관절염(류머티스 관절염(RA)을 포함함), 전신성 홍반성 루푸스(SLE), 염증성 장 질환(IBD), 이틀테면 크론병 및 궤양성 대장염의 치료를 위한, 전술한 구체에 1 내지 31 중 어느 것에 따르는 항원 결합 단백질.
- [0341] **실시예**
- [0342] **실시예 1**
- [0343] **사람 CD30L 항체의 생성**
- [0344] XenoMouseTM 기술(Amgen, Thousand Oaks, CA)을 사용하여 재조합 CD30L 활성을 인지하고 억제하는 사람 단클론성 항체를 개발하였다. 선택된 항체는 사람과 게막이 원숭이 CD30L과 교차반응하지만, 마우스 CD30L과는 반응하지 않는다.
- [0345] 하이브리도마 상층액을 293T 세포상에서 발현된 재조합 사람 CD30L에의 결합에 대해 형광 마이크로부피 분석 기술(FMAT)에 의해 선별할뿐 아니라 Ramos 세포 상에서의 천연 사람 CD30L에의 결합에 대해 형광-활성화된 세포 분류(FACS) 분석에 의해 선별하였다. FMAT 분석에서, CD30L을 발현하는 293T 세포로 플레이트를 코팅하고, 거기에 하이브리도마 상층액을 첨가한 후, 표준 ELISA 기법을 통해 검출하기 위해 이차 항-사람 Ig 항체를 첨가하였다. 네거티브 대조표준은 CD30L을 발현하지 않는 해당하는 비-형질전환 293T 세포였다.
- [0346] 상층액을 정제하고, 재조합 항체를 IgG1 및 IgG2 구성물로서 표시하였다. 항체를 천연 사람 및 게막이 원숭이 CD30L에의 결합에 대해 다시 선별하였다. 간단히 설명하자면, 사람 버킷 림프종 Ramos 세포(3×10^5 /웰)를 둥근 바닥 96-웰 미소적정 플레이트(Costar® 96 웰 플레이트(Corning; Acton, MA))에서 인큐베이션하면서 차단 완충액(0.02%의 아지드화 나트륨, 2%의 정상 염소 혈청 및 1%의 정상 토끼 혈청을 함유하고 있는 PBS)중의 항-CD30L IgG 항체로 적정하였다($10 \mu\text{g/mL}$ 내지 3.2 ng/mL 의 최종 농도). 사람 CD30.Fc 융합 단백질을 결합에 대한 포지티브 대조표준으로서 포함시켰다. 세포를 30분 동안 4°C에서 인큐베이션한 후 PBS로 2회 세척하고, 추가로 30분 동안 4°C에서 $30 \mu\text{L}$ /웰의 항-hu IgG-비오틴(차단 완충액 중의 1:50; Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA)과 함께 인큐베이션하였다. 그것을 PBS로 2회 세척하고, 세포를 30분 동안 4°C에서 $30 \mu\text{L}$ /웰(PBS로 1:50 희석)의 스트렙타비딘-파이코에리트린(PE; Molecular Probes, Eugene, OR)과 함께 인큐베이션하였다. 세포를 PBS로 2회 세척하고, FACS 분석에 대해 준비하였다. 그 결과를 표 5에 나타낸다.

[0347] 게먹이 원숭이 활성화된 T 세포를 아이소림프(Isolymph)상에서 밀도 원심분리(2000rpm, 20분 동안)에 의해 해파린 처리된 게먹이 원숭이 혈액으로부터 말초혈 단핵 세포(PBMC)를 분리함으로써 제조하였다. PBMC를 25mL의 PBS에 재현탁하고, 300 μ L의 2-아미노에틸아이소싸이오유로늄 브로마이드(AET)-처리된 양 적혈구의 50% 용액에 첨가한 후 약 700 rpm으로 4℃에서 10분 동안 원심분리하였다. 펠릿화된 세포를 4℃에서 추가로 10분 동안 인큐베이션하고, 부드럽게 재현탁한 후 아이소림프상에서 원심분리하였다. 상층액을 T 세포/적혈구 펠릿으로부터 제거하였다. 그런 다음 펠릿을 25mL의 용해 완충액(물 중의 0.85% 염화 암모늄)에 재현탁하고, 37℃에서 10분 동안 인큐베이션하였다. 그 결과의 T 세포를 펠릿화하고 배양 배지(RPMI-1640 배지 + 10% 열-비활성화된 소태아 혈청)로 2회 세척한 후, 37℃에서 18시간 동안 10ng/mL의 포볼 미리스테이트 아세테이트(PMA; Sigma Chemicals, St Louis, MO) 및 500ng/mL의 로노마이신(Calbiochem, San Francisco, CA)의 존재하에 배양하였다. 배양 기간이 끝날 때에 게먹이 원숭이 T 세포를 계수하고, PBS로 1회 세척한 후 PBS 중의 2%의 염소 혈청, 1%의 토끼 혈청 및 0.1%의 사람 혈청과 함께 30분 동안 4℃에서 인큐베이션하였다. 그런 다음 세포를 상기에서 사람 Ramos 세포에 대해 기술한 것과 같이 항-huCD30L 항체로 염색하였다. 그 결과를 표 5에 나타낸다.

[0348] 항체를 또한 가용성 사람 CD30.Fc 분자에의 사람 CD30L의 결합을 차단하는 능력에 대해 선별하였다. 간단히 설명하자면, 사람 Ramos 세포 또는 활성화된 게먹이 원숭이 T 세포를 차단 완충액 중의 50 μ g/mL의 항-CD30L IgG와 함께 30분 동안 4℃에서 인큐베이션하였다. 그런 다음 가용성 huCD30.Fc-His를 최종 농도 2.5 μ g/mL(30 μ L/웰)로 첨가하고, 30분 동안 4℃에서 인큐베이션하였다. 세포를 PBS로 2회 세척하고, 5 μ g/mL의 마우스 항-His 단클론성 항체(차단 완충액 중의 30 μ L/웰)와 함께 30분 동안 4℃에서 인큐베이션하였다. 그것을 PBS로 2회 세척하고, 세포를 항-마우스 IgG-PE(PBS중의 1:50; BD Pharmingen, San Diego, CA)와 함께 추가로 30분 동안 4℃에서 인큐베이션하였다. 그런 다음 세포를 PBS로 2회 세척하고, FACS 분석에 대해 준비하였다. 그 결과를 표 5에 나타낸다.

[0349] 실시예 2

[0350] CD30L 항체 기능적 선별

[0351] 항체를 두 개의 IL-8 방출 분석을 사용하여 그것들의 CD30L/CD30 상호작용을 차단하는 능력에 대해 특성화하였다. 이들 분석은 사람 악성 큰 세포 림프종(ALCL) 셀라인 Karpas-299(K299)를 활용하는데, 그것은 CD30L에 대한 반응으로 내인성 CD30을 발현하고 IL-8을 방출한다. 간단히 설명하면, 정제된 항-사람 CD30L IgG 항체를 재조합 CD30L(단일 세포 분석) 또는 천연 CD30L을 발현하는 Ramos 세포(이중 세포 분석) 중 어느 하나와 함께 인큐베이션하고 K299 세포와 함께 배양하였다. 규정된 인큐베이션 시간이 지난 후, 세포 상층액을 수득하고 샌드위치 ELISA를 사용하여 IL-8 함량에 대해 분석하여, CD30L에 대한 반응으로 항체 후보들에 의한 K299 세포로부터의 IL-8 방출의 억제를 측정하였다.

[0352] 단일 세포 분석

[0353] 항-CD30L IgG 항체를 배양 희석액(RPMI-1640 배지 + 10% 열-비활성화된 소태아 혈청)으로 적정하고, 둥근 바닥 96-웰 미소적정 플레이트(Costar[®] 96 웰 플레이트(Corning; Acton, MA))에 넣어 최종 농도 범위를 1 μ g/mL 내지 10pg/mL로 만들었다. 포지티브 대조표준으로서, 마우스 항-사람 CD30L 단클론성 항체를 미국 특허 번호 5,480,981에 기술되어 있는 것과 같이 제조하였다. 희석제 및 CD30L IgG의 최종 부피는 100 μ L/웰이었다. 각 웰에 50 μ L의 재조합 사람 CD30L 아이소로이신 지퍼(huCD30L LZ)를 첨가하였다. huCD30L LZ 구성물은 로이신 잔기를 아이소로이신 잔기로 대체함으로써 변형된 아이소로이신 지퍼 모티프에 그것의 N-말단에서 연결된 사람 CD30L의 세포외재성 도메인을 포함한다(미국 특허 번호 5,480,981 참조). 단일 세포 분석을 또한 huCD30L LZ 대신 cyno CD30L LZ를 사용하여 cyno 교차-반응성을 측정하기 위해 사용하였다. CynoCD30L LZ는 사람 LZ 분자에 대해 기술된 것과 같이 제조하였다.

[0354] 플레이트를 45분 동안 실온에서 인큐베이션하였다. 각 웰에 50 μ L의 K299 세포(4×10^5 세포/mL)를 첨가하였다. 그런 다음 플레이트를 24시간 동안 37℃ 5% CO₂에서 인큐베이션하였다.

[0355] 세포 상층액 중의 IL-8의 양을 샌드위치 ELISA에 의해, 제조업체(R&D Systems, Minneapolis, MN)의 지시를 따라 CDCL8/IL-8 ELISA DuoSet 키트를 사용하여 측정하였다. IL-8 수준을 ELISA 표준 곡선으로부터 DeltaSoft 3 버전 2.2 소프트웨어(DeltaSoft, Inc. Hillsborough, NJ)를 사용하여 내삽하였다. 모든 결과를 GraphPad PRISM 소프트웨어 v. 4.01 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA)에 의해 계산하고 IC₅₀ 값과 같이 3개의 중복 배양물에 대한 평균±평균의 표준 오차(SEM)로서 표시한다. cynoCD30L LZ를 사용한 결과를 표 5에 나타낸다.

[0356] 이중 세포 분석

[0357] 상기에서 기술된 것과 같이, 항-CD30L IgG 항체를 배양 희석액 안으로 적정하고, 둥근 바닥 96-웰 미소적정 플레이트에 넣어 최종 농도 범위를 1 μ g/ml 내지 10pg/ml로 만들었다. 희석제 및 CD30L IgG의 최종 부피는 100 μ l/웰이었다. 각 웰에 50 μ l의 조사된(5000 RADS) CD30L⁺ Ramos 세포(4 $\times$ 10⁶/ml, ATCC)를 첨가하였다. Ramos 세포에 대해 FACS 분류를 시행하여 가장 높은 수준의 세포 표면 CD30L 발현을 보이는 세포들을 선택하였다.

[0358] 플레이트를 45분 동안 실온에서 인큐베이션하였다. 각 웰에 50 μ l의 K299 세포(4 $\times$ 10⁵ 세포/ml)를 첨가하였다. 그 플레이트를 24시간 동안 37 $^{\circ}$ C 5% CO₂에서 인큐베이션하였다.

[0359] 배양 상층액 중의 IL-8의 양을 샌드위치 ELISA에 의해, 제조업체(R&D Systems, Minneapolis, MN)의 지시를 따라 CDCL8/IL-8 ELISA DuoSet 키트를 사용하여 측정하였다. IL-8의 양 및 IC₅₀ 값을 상기에서 기술한 것과 같이 계산하였다. 표 5 참조.

[0360] 항체 유도를 마우스 항-사람 CD30L 단클론성 항체 대조표준과 비교하여 CD30L-유도된 IL-8 유도를 억제하는 능력을 토대로 선택하였다.

표 5

[0361] 다양한 기능적 분석에서 CD30L 항체에 대한 평균 IC₅₀(pM) 및 % 억제

분석	항체							
	A	E	F	C	D	B	A1	A1 IgG1
천연 huCD30L (K299/Ramos 이중 세포, IC ₅₀)	28pM	45pM	60pM	36pM	62pM	72pM	33pM	32pM
천연 결합 (FACS, EC ₅₀) Hu Cyno								
	1.7nM 2.2nM	3.3nM 2.7nM	2.3nM 2.9nM	1.7nM 1.0nM	3.3nM 2.7nM	3.1nM 4.0nM		
CD30L LZ 차단 (K299에의 결합, IC ₅₀) Hu Cyno								
	1.5nM 1.4nM	2.1nM 1.3nM	2.0nM 0.45nM	1.9nM			2.5nM	1.4nM
천연 차단 (CD30Fc 결합, % 억제) Hu Cyno								
	68% 77%	80% 87%	ND 97%	88% 83%	55% 84%	70% 88%		
Cyno CD30L LZ (K299/단일 세포, IC ₅₀)								
	2.0nM	5.4nM	5.5nM	3.9nM	5.4nM	5.6nM	2.4nM	1.5nM
이론적인 등전점	8.89	8.86	8.96	8.74	9.01	8.84		

[0362] 실시예 3

[0363] 결합 경합에 의한 CD30L 항체의 비닝

[0364] 하나의 표지된 CD30L 항체가 rhCD30L에의 결합에 대해 다른 미표지 CD30L 항체의 과잉량과 경합하는 결합 경합 분석을 사용하여 비닝(binning)을 수행하였다. 상호간에 경합하는 항체를 동일한 빈(bin)으로 배정하였다. 항체 A 내지 F는 rhCD30L에의 결합에 대해 상호간에 경합하였다.

[0365] 실시예 4

[0366] CD30L 항체에 대한 세포 상의 평형 해리 상수(Kd)의 측정

[0367] Ramos 세포상에서 발현된 CD30L에 대한 CD30L 항체의 결합 친화성을 FACS Kd 방법에 의해 측정하였다. Ramos 세포를 RPMI1640 배지 + 10% FBS + L-glut + 0.05% 아자이드 중에서 배양하였다. 2개의 평형 반응을 설정하였고, 항체를 60nM부터 338fM까지 세포 배양 배지를 사용하여 적정하고, 두 개의 상이한 일정한 세포 농도(25000 및 250000 세포)로 인큐베이션하였다. 플레이트를 과파필름으로 밀봉하고 37℃에서 20시간 동안 흔들어주면서 인큐베이션하였다. 평형 플레이트를 원심분리하고 세포 펠릿을 빙냉 FACS 완충액(1X D-PBS+2% FBS)으로 2회 세척하였다. 그런 다음 세포를 이차 항체 염소 항-사람 Fc Cy5(Jackson Immuno Research, West Grove, PA) 및 7AAD(BD-Biosciences, Rockville, MD)와 함께 1시간 동안 얼음 위에서 어두운 곳에서 인큐베이션하였다. 인큐베이션 후에, 세포를 빙냉 FACS 완충액으로 세척하고, 유동 세포분석법으로 분석하였다. 살아있는 세포 집단에 모인 FL4 시프트의 GeoMean 값은 결합된 [Ab]를 측정한다. 그런 다음 평형 용액 중의 이론적인 유리 [Ag]를 반영하는 GeoMean 값의 반전값을 계산하였다. GeoMean 관독의 반전값을 분석에 대한 KinExA 소프트웨어 및 각 항체에 대한 Kd 계산에 사용하였다. 유리 [Ag] 척도를 적정 성분의 출발 농도에 대하여 도표화하고, 이들 도표로부터 두 개의 상이한 세포 농도에서 Kd를 곡선 맞춤으로부터 KinExATM Pro 소프트웨어로 n-곡선 분석을 사용하여 얻었다. 95% 신뢰 간격을 낮은 Kd 및 높은 Kd로서 제공한다.

[0368] 아래의 표 6에서 알 수 있는 것과 같이, 항체는 Ramos 세포 상에서 발현된 CD30L에 대해 높은 친화성을 나타낸다. 모두 낮은 pM 범위의 Kd 값을 나타냈다.

표 6

[0369] K_D(pM) 등급표

항체	K _D (pM)	낮은 K _D (pM)	높은 K _D (pM)
B	7.43	4.58	11.70
A	25.46	18.15	33.10
D	11.90	8.44	16.14
E	52.08	38.29	69.56
F	35.75	26.92	46.64
C	43.99	34.15	56.02

[0370] 실시예 5

[0371] ADCC 분석

[0372] A1으로부터의 가변 도메인을 사람 IgG1 불변 도메인(A1 IgG1)에 부착시켰다. 이 항체를 Fut-8 녹-아웃 CHO 셀라인에서 발현시켜서 아퓨코실화된 항체, A1 IgG1f를 얻었다.

[0373] CD30L 항체 중재된 표적 세포의 사멸을 항체 의존성 세포독성(ADCC) 분석으로 평가하였다. 표적 세포 Ramos(CD30L 발현 수준 높음), JD38(CD30L 발현 수준 중간), DS179(CD30L 발현 수준 낮음) 및 EW36(CD30L 발현 없음)을 수득하고, 2X10⁶ 세포/ml로 cRPMI-10 배지(RPMI(Life Technologies, Carlsberg, CA)+ 10% 소태아 혈청)에 재현탁하였다. 거기에 무수 DMSO 중의 Calcein-AM, 4MM(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)을 10 μM의 최종 농도(1:400 희석)로 첨가하였다. 세포를 30분 동안 37℃에서 인큐베이션한 다음, PBS로 2회 세척하였다(각각 1500rpm, 4℃에서 5분). 펠릿을 cRPMI-10에 재현탁하고, 얼음 위에 0.2×10⁶ 세포/ml의 농도로 조정하여 놓고 다음 단계에서 사용하였다.

[0374] 항체 A1 IgG1 및 항체 A1 IgG1f를 먼저 U-자형 바닥 96-웰 플레이트(BD, Franklin Lakes, NJ)에 10 μg/ml로부터 시작하여 10배 연속 적정으로 첨가하였다. 리톡시맵(Genentech, South San Francisco, CA)을 포지티브 항체 대조표준으로서 사용하였다. 항체 A1(IgG2)를 네거티브 대조표준으로서 첨가하였다. 그런 다음 상기에서 설명된 것과 같은 Calcein-AM-표지된 표적 세포를 각 웰에 첨가하고(10,000세포/웰), 항체와 함께 20분 동안 37℃에서 인큐베이션하였다. 인큐베이션 후에, 각 웰에 50 μl의 NK 세포를 4×10⁶ 세포/ml의 농도로 첨가하고, 4시간 동안 37℃에서 인큐베이션하였다. NK 세포를 펠릿화하고(1500rpm, 4℃에서 5분) cRPMI-10에 재현탁하고, 세포 농도를 4×10⁶ 세포/mL로 조정하였다.

[0375] 인큐베이션 후에 대조 웰을 100% 용해를 자극하기 위해 20 μl/웰의 9% NP-40(IGEPAL CA 630, Sigma-Aldrich)을 첨가함으로써 제조하였다. 다른 웰에는 모두 20 μl/웰의 cRPMI-10 배지만을 넣었다. 플레이트를 800RPM에서 4분

동안 4℃에서 회전시켰다. 상층액(150 μ l)을 제거하고, 깨끗한 바닥의 검은색 96 웰 플레이트(Molecular Devices, Spectra max GEMINI)에 옮기고 플레이트 판독기 상에서 형광값을 판독하였다. 여기 485, 방출 535.

[0376] % 최대 용해를 (샘플 값-자발적 용해)/(100% 용해-자발적 용해)*100으로서 계산하였다.

[0377] 4개의 표적 세포의 CD30L 항체 중재된 사멸의 결과를 도 1에 나타낸다(1a 내지 1d). 항체 A1 IgG1은 CD30L 발현 세포 중 어느 것에 대해서도 세포 사멸을 중재하지 못하였다(도 1a 내지 1d). 항체 A1 IgG1f는 높은 CD30L 발현을 보이는 표적 세포(도 1a) 및 중간 CD30L 발현을 보이는 표적 세포(도 1b) 둘 다에 대해 세포 사멸을 유도하였다. 항체 A1 IgG1f는 중간 수준의 CD30L 발현을 보이는 표적 세포에 대한 것보다 더 높은 CD30L 발현을 보이는 표적 세포에 대해 더 큰 수준의 고갈을 중재하였다(도 1a 및 1b 참조). 항체 A1 IgG1f는 낮은 CD30L 발현을 보이는(도 1c) 또는 발현을 보이지 않는(도 1d) 표적 세포를 죽이지 못하였다.

[0378] 실시예 6

[0379] 항-CD30L mAb의 HX-MS에 의한 에피토프 지도화

[0380] 항-CD30L 항체의 CD30L 결합 영역을 HX-MS에 의해 평가하여 본원에서 기술된 항체 A 내지 F와의 분자상 상호작용에 포함된 사람 CD30L의 영역 또는 영역들을 확인하였다.

[0381] 재료

[0382] hCD30L: hCD30L의 세포외재성 도메인의 두 개의 상이한 버전을 사용하였는데, SEQ ID NO:74에 의해 확인된 것과 같이 His-hCD30L-EC는 hCD30L의 잔기 63 내지 234를 함유하고, 이름이 나타내는 것과 같이 단백질은 N-말단 His-태그(RnD Systems)를 사용하여 제조된다. FLAG-hCD30L-EC는 SEQ ID NO:74의 잔기 66 내지 234를 함유하고, N-말단 FLAG-His-태그를 사용하여 포유류 세포로부터 얻었다.

[0383] 사람 CD30L의 세포외재성 도메인의 cDNA를 Origene으로부터 구매하였다. FLAG-His6 태그 및 TEV 프로테아제 절단 부위를 아미노산 66 내지 234에 대한 코딩 서열의 N-말단에 2-단계 연장 PCR에 의하여 융합시키고, pJSV001 플라스미드의 EcoRI과 BamHI 부위 사이에 CD33 신호 펩티드와 한 프레임으로 클론하였다.

[0384] 아래에서 사용되는 FLAG-hCD30L-EC는 N-글리코실화를 없애는 N153Q 점 돌연변이를 포함한다. N153Q 돌연변이를 Qiagen 빠른-변화 점 돌연변이생성 키트(QIAGEN)를 사용하여 생성하였다.

[0385] HEK293 6E 세포를 단백질 제조를 위해 사용하였다. 세포를 25 μ g/ml의 Geneticin 418(Gibco) 및 0.1%의 F-68(Gibco)이 첨가된 FreeStyleTM 배지(Gibco)와 함께 배양하였다. 형질전환 첫 날에 세포를 1 $\times$ 10⁶ 세포/ml의 밀도로 유지하고, 제조업체의 지시를 따라 293 Fectin(Invotrogen)으로 형질전환시켰다. 형질전환 후 24시간이 지난 후에, 펩톤(Promega)을 배양물에 0.5%의 최종 농도로 첨가하였다. 세포를 계속 5일 동안 성장시킨 후 상층액을 수집하였다.

[0386] 배양 상층액을 원심분리(15,000rpm $\times$ 20분, 4℃)에 의해 수득한 후 0.22 μ m의 셀룰로스 니트레이트 막을 사용하여 여과함으로써 정화시켰다. 정화된 상층액을 Ni-킬레이트화된 세파로스 XK60 칼럼(20ml)(GE healthcare)에 적용한 후, 5 칼럼 부피의 20mM NaH₂PO₄ pH 7.4, 0.5M NaCl, 0.5M 이미다졸로 용출하였다. 용출된 단백질을 모아 Amicon 울트라 15 원심분리 튜브(10,000Da MWCO, Millipore)에 의해 약 5ml로 농축하고, Hiload 26/60 Superdex200 318ml 칼럼(GE healthcare)에 로딩하여 응집체를 제거하고, 완충액을 PBS로 교체하였다. 농축한 후에 최종 단백질 농도를 NANODROP UV 분광계를 사용하여 280nm에서의 흡광도를 측정함으로써 측정하였다. 단백질 순도를 SDS-PAGE에 의해 평가하였다.

[0387] 탈글리코실화를 대략 16시간 동안 37℃에서 5 μ g의 hCD30L당 1U의 PNGaseF(Roche)를 사용하여 수행하였다. 탈글리코실화된 단백질을 4℃에서 보관하고, 일주일 이내의 실험에 대해 사용하였다. 모든 단백질의 완충액을 PBS pH 7.4로 교체한 후 HX-MS 실험을 수행하였다.

[0388] HX-MS 실험

[0389] 기기 및 데이터 기록

[0390] HX 실험을 Synapt G2 질량 분석기(Waters Inc.)에 결합된 HDX 기술을 사용하는 나노ACQUITY UPLC 시스템 상에서 수행하였다. Waters HDX 시스템은 LeapShell 소프트웨어(Leap Technologies Inc/Waters Inc.)에 의해 작동되는 Leap 로봇(H/D-x PAL; Waters Inc.)을 포함하는데, 그것은 중수소 교환 반응의 개시, 반응 시간 제어, 퀀칭 반응, UPLC 시스템 안으로의 주입 및 소화 시간 제어를 수행하였다. Leap 로봇에는 각각 완충액 보관 및 HX

반응을 위해 20℃에서 유지되고, 단백질의 보관 및 쿨링 용액을 위해 2℃에서 유지되는 두 개의 온도 제어된 스택이 장착되어 있다. 나아가 Waters HDX 시스템에는 예비- 및 분석용 칼럼을 보유하는 온도 제어된 챔버, 및 1℃에서의 LC 튜빙과 스위칭 밸브가 구비되어 있다. 별도로 온도 제어된 챔버는 25℃에서의 펌프 칼럼을 포함한다. 인라인 펌프 소화를 위해, 300pmol의 hCD30L을 함유하고 있는 100 μL의 쿨링된 샘플을 로딩하고, 25℃에서 놓여있는 Poroszyme® 고정된 펌프 카트리지를(2.1×30mm(Applied Biosystems)) 위를 100 μL/Q분의 등용매 유속을 사용하여(0.1% 폼산:CH₃CN 95:5) 통과시킨다. 그 결과의 펩티드를 포획하고, VanGuard 예비-칼럼 BEH C18 1.7 μm(2.1×5mm (Waters Inc.)) 상에서 탈염시켰다. 계속해서, 밸브를 스위칭하여 예비-칼럼 인라인을 분석 칼럼, UPLC-BEH C18 1.7 μm(1×100mm (Waters Inc.))으로 위치시키고, 펩티드를 나노AQUITY UPLC 시스템(Waters Inc.)으로부터 40 μL/분에서 전달된 10 내지 50%의 B의 9분 구배를 사용하여 분리하였다. 이동상은 A: 0.1%의 폼산과 B: CH₃CN 중의 0.1%의 폼산으로 구성되었다. ESI MS 데이터, 및 별도의 상승된 에너지(MS^E) 실험을 Synapt G2 질량 분석기(Waters Inc.)를 사용하여 양이온 방식으로 얻었다. 로이신-엔케팔린을 질량 잠금(m/z 556.2771에서 [M+H]⁺ 이온)으로서 사용하였고, 데이터를 연속 방식으로 수집하였다(추가 설명에 대해서는 Andersen and Faber, Int. J. Mass Spec., 302, 139-148(2011) 참조).

[0391] 데이터 분석

[0392] 펌프 펩티드를 별도의 실험으로, 펩티드와 단편이 Synapt G2(Waters Inc.)의 이온 이동 특성을 활용하여 추가로 배열되는 표준 MS^E 방법을 사용하여 확인하였다. MS^E 데이터를 ProteinLynx Global Server 버전 2.5(Waters Inc.)를 사용하여 처리하였다. HX-MS 원데이터 파일을 DynamX 2.0 소프트웨어(Waters Inc.)로 처리하였다. DynamX는 질량 잠금-수정 및 중수소 통합 측정, 즉 중수소처리된 펩티드의 중심 측정을 자동으로 수행한다. 나아가 모든 펩티드를 소프트웨어에 의해 정확한 피크 및 중수소화 과업을 보장하기 위해 점검하였다.

[0393] 에피토프 지도화 실험

[0394] 아마이드 수소/중수소 교환(HX)을 mAb A, B, C, D, E 또는 F의 존재 또는 부재하에 해당하는 중수소화된 완충액(즉 D₂O중에 제조된 PBS, 96% D₂O 최종, pH 7.4(수정되지 않은 값))으로 hCD30L의 6배 희석에 의해 개시하였다. 모든 HX 반응을 20℃에서 수행하였고, 6.6 μM의 mAb의 존재 또는 부재하에 6 μM의 hCD30L(사용된 단량체 Mw)을 함유하였으며, 따라서 2.2배 과잉 몰의 mAb를 얻었다. 0.25, 0.5, 1, 3 및 10분의 시간 간격으로, HX 반응액의 50 μL의 일정액을 50 μL의 빙냉 쿨링 완충액(1.35M TCEP)에 의해 쿨링하여 2.5의 최종 pH를 얻었다(수정되지 않은 값).

[0395] **결과**

[0396] hCD30L 단백질

[0397] hCD30L 중의 글리코실화의 존재는 HXMS 분석을 방해할 것이다. 단백질 글리코실화의 미지의 질량 및 혼하게는 이중성 성질 때문에, 그 결과의 펌프 펩티드는 MS로 확인 및 분석될 수 없다. 그러나 hCD30L로부터 글리코실화를 제거함으로써 HXMS에 적당한 잘-규정된 아미노산 서열을 생성할 수 있었고, 그것은 MS로 확인 및 분석될 수 있다.

[0398] hCD30L 세포외재성 도메인은 아래의 표 7의 첫 번째 칼럼에서 열거된 것과 같이 5개의 잠재적인 N-글리코실화 부위를 함유한다. 글리코실화를 PNGaseF를 사용한 처리 및 점 돌연변이 둘 다에 의해 제거하여 HXMS 분석에 더 적합한 단백질을 얻으려고 시도하였다.

[0399] His-hCD30L-EC의 MS 및 SEC-MALS 분석은 5개의 잠재적인 N-글리코실화 부위 중에서 4개가 실제로 글리코실화되었음을 나타냈다(표 7; 데이터는 제시하지 않음). 이 단백질을 천연 조건 하에서 PNGaseF로 처리할 때, 단지 2개의 글리코실화만이 PNGaseF에 의해 효소적으로 제거될 수 있었고, 따라서 두 개의 N-글리코실화는 단백질 상에 남아 있었다.

[0400] 천연 조건 하에서 PNGaseF로 FLAG-hCD30L-EC를 처리할 때, MS와 SEC-MALS는 둘 다 이 단백질이 완전히 탈글리코실화될 수 있었음을 증명하였다. 결론적으로, N153Q 돌연변이는 His-hCD30L-EC로부터 효소적으로는 제거될 수 없었던 N-글리코실화 부위를 제거하였고, 이 단백질은 HXMS에 최적인 것으로 여겨졌다. 글리코실화 부위(들) 평가의 개관은 표 7에 포함된다.

표 7

[0401]

hCD30L 단백질의 상이한 버전에서 글리코실화의 상태

CD30L의 잠재적인 N-글리코실화 부위	His-hCD30L-EC	His-hCD30L-EC + PNGaseF	FLAG-hCD30L-EC (N153Q)	FLAG-hCD30L-EC + PNGaseF
N81	Glyc	D	Glyc	D
N109	Glyc	D	Glyc	D
N153	Glyc	Glyc	Q	Q
N189	N	N	N	N
N201	Glyc	Glyc	Glyc	D

[0402]

D, N, Q는 서열 위치에서 변형되지 않은 아미노산의 존재를 나타낸다.

[0403]

Glyc는 N-글리코실화의 존재를 나타낸다.

[0404]

HX-MS 분석

[0405]

중수소 교환 반응 후에, hCD30L-EC를 펩신으로 소화시켜서 표 8에 표시된 펩신 펩티드 영역을 얻는다. hCD30L 잔기의 넘버링은 SEQ ID NO:74를 따르지만, N-말단 FLAG-His 태그 DYKDDDDKHHHHHHENLYFQG는 hCD30L 서열의 부분이 아니다. FLAG-hCD30L-EC의 일차 구조의 83%를 차지하는 40 펩신 펩티드의 HX 시간-경과를 mAb A, B, C, D, E 또는 F의 존재 또는 부재시에 모니터하였고, 데이터를 표 8에 나타낸다.

[0406]

본 연구에서 분석하지 않은 나머지 서열은 펩신 펩티드로 덮여있다; 그러나 신호 세기가 데이터 분석에는 불충분하였다. mAb A1, B, C, D, E 또는 F의 존재 또는 부재시에 초기 시간 지점(<10분)에서 관찰된 교환 패턴은 두 개의 상이한 군으로 나누어질 수 있다: 한 군은 hCD30L-EC 펩신 펩티드가 mAb의 결합에 의해 영향을 받지 않은 교환 패턴을 나타낸다. 대조적으로, 다른 군은 hCD30L의 펩티드가 mAb 결합시에 교환으로부터 보호되는 것으로 나타난다(표 8). 중복하는 펩신 펩티드의 경우, 교환 보호 정보는 펩티드 N-말단과 첫 번째 펩티드 결합의 완전한 백-교환을 가정하는 펩티드 내에서 특이한 잔기 또는 스트레치로 하위-국한시키는 것을 시도한다. 펩티드에서 교환 보호는 이런 영역이 mAb 결합에 포함되어 있음을 가리킨다. 그로써 에피토프는 부분적으로 또는 완전하게 특이한 펩티드에 의해 규정된 영역 내에 위치한다. 그러나, HX-MS의 해상도는 변성된 단백질의 펩신 소화를 토대로 하기 때문에, 주어진 영역 내에서의 교환 보호는 그 영역 내에 있는 모든 잔기가 본질적으로 mAb 결합에 포함되는 펩신 펩티드에 의해 규정된다는 것을 암시하는 것은 아니다.

[0407]

mAb A1의 에피토프 지도화

[0408]

mAb A1의 에피토프를 4가지의 상이한 실험으로, 3회는 FLAG-hCD30L-EC를 사용하고 1회는 His-hCD30L-EC를 사용하여 지도화하였다. 두 가지 단백질을 모두 HX-MS 실험 전에 PNGaseF로 처리하였다. 이들 연구의 결과는 사용된 hCD30L 단백질과 무관하게 매우 유사하였고, 모두 동일한 에피토프 정보를 산출하였다. 그러나, 서열 범위는 His-hCD30L-EC 실험에서 글리코실화된 영역의 검출가능한 펩티드의 결핍으로 인해 명백하게 더 적었다.

[0409]

mAb A1에 대한 에피토프 신호는 hCD30L의 N-말단에서 잔기 Cys88까지에서 관찰되었다(표 8). 교환 보호는 출발 지점(잔기 45, 62 또는 66)으로부터 연장된 펩티드가 더 길어질수록 더 강력해졌고, 그로써 펩티드의 더 많은 C-말단 영역 및 또한 잔기 88에서 교환 보호가 있음을 가리킨다. 대조적으로 펩티드 45 내지 65, 45 내지 81 및 66 내지 81은 교환 보호를 나타내지 않았다. 나아가, 잔기 D81은 글리코실화된 N이 PNGaseF의 작용을 받을 때 D로 되는 글리코실화 부위이다. 따라서 N/D81은 아마도 mAb 결합에 포함되지 않는다. 그러므로 에피토프 신호는 영역 82 내지 88 CSEDLLC 내에 있는 잔기로부터 발생하는 것으로 보인다.

[0410]

mAb A1에 대한 에피토프 신호를 또한 F211 내지 S226 영역에 걸쳐있는 6개의 상이한 펩티드에서 hCD30L의 C-말단 영역(표 8)에서 관찰하였다. 관찰된 교환 보호 수준을 토대로, 모든 부분이 결합에 포함되거나 다소의 정도 차이는 있어도 mAb의 결합에 의해 영향을 받는 것으로 보인다. 항체에 의해 결합된 영역들은 표 8에서 진하게 표시된다.

[0411]

결론적으로, mAb A 결합에 포함된 hCD30L의 영역은 82 내지 88 영역 CSEDLLC와 211 내지 226 영역 FQYIDTSTFPLENVL로서 검출된다.

[0412]

mAb B, C, D, E 및 F의 에피토프 지도화

[0413]

mAb B, C, D, E 및 F의 에피토프를 HX-MS 실험 전에 PNGaseF로 처리된 FLAG-hCD30L-EC를 사용하여 지도화하였다. 이들 연구의 에피토프 결과는 mAb A와 매우 유사하였고(표 8), 또한 교환 보호의 정도와 관련되었다. mAb E

에 대한 에피토프 지도화를 2회 수행한 반면, A, B, C 및 D는 각각 1회 지도화하였다.

표 8

hCD30L 펩티드			항체					
출발	관	서열	A1	B	C	D	E	F
45	65	DYKDDDDKHHHHHHENLYFQG	N	N	N	N	N	N
45	81	DYKDDDDKHHHHHHHHENLYFQGDSPNSPDNVPLKGGD	N	na	na	na	N	na
45	84	DYKDDDDKHHHHHHHHENLYFQGDSPNSPDNVPLKGGDCSE	EX	EX	na	EX	EX	EX
45	86	DYKDDDDKHHHHHHHHENLYFQGDSPNSPDNVPLKGGDCSEDL	EX	EX	na	EX	EX	EX
45	87	DYKDDDDKHHHHHHHHENLYFQGDSPNSPDNVPLKGGDCSEDLL	EX	EX	na	EX	EX	EX
62	81	YFQGDSPNSPDNVPLKGGD	N	W	W	N	N	W
62	84	YFQGDSPNSPDNVPLKGGDCSE	W	W	W	W	W	W
62	85	YFQGDSPNSPDNVPLKGGDCSED	na	W	na	na	na	W
62	86	YFQGDSPNSPDNVPLKGGDCSEDL	EX	EX	EX	EX	EX	EX
62	87	YFQGDSPNSPDNVPLKGGDCSEDLL	EX	EX	EX	EX	EX	EX
62	88	YFQGDSPNSPDNVPLKGGDCSEDL C	EX	EX	EX	EX	EX	EX
66	81	DSIPNSPDNVPLKGGD	N	na	na	N	N	na
66	86	DSIPNSPDNVPLKGGDCSEDL	W	W	W	W	W	W
66	87	DSIPNSPDNVPLKGGDCSEDLL	EX	EX	EX	EX	EX	EX
87	102	LCILKRAPFKKSWAYL	N	N	N	N	N	N
88	102	CILKRAPFKKSWAYL	N	N	N	N	N	N
89	102	ILKRAPFKKSWAYL	N	N	N	N	N	N
91	102	KRAPFKKSWAYL	N	N	N	N	N	N
103	131	QVAKHLDKTKLSWNKDGILHGVRYODGNL	N	N	N	N	N	N

표 8: 항체 분자 A-F 에 대한 에피토프 정보를 산출하는 사람 hCD30L 의 HXMS 분석

105	131	AKHLDKTKLSWKNKGILHGVRYQDGNL	N	na	na	N	N	na
114	121	SWNKDGIL	N	na	na	N	N	na
114	129	SWNKDGILHGVRYQDGG	na	N	N	na	na	N
114	131	SWNKDGILHGVRYQDGNL	N	N	N	N	N	N
132	138	VIQFPGL	N	N	N	N	N	N
132	139	VIQFPGLY	N	N	N	N	N	N
132	140	VIQFPGLYF	N	N	N	N	N	N
148	157	LVQCPQNSVD	N	N	N	N	N	N
158	162	LKLEL	N	N	N	N	N	N
163	173	LINKHIKKQAL	N	N	N	N	N	N
163	175	LINKHIKKQALVT	N	N	N	N	N	N
174	190	VTVCESGMQTKHYVQNL	N	N	N	N	N	N
174	192	VTVCESGMQTKHYVQNL	N	N	N	N	N	N
174	193	VTVCESGMQTKHYVQNL	N	N	N	N	N	N
176	190	VCESGMQTKHYVQNL	N	na	na	N	N	na
211	222	FQYIDTSTFPLE	EX	EX	EX	EX	EX	EX
211	225	FQYIDTSTFPLENVL	EX	na	na	na	EX	na
213	222	YIDTSTFPLE	EX	EX	EX	EX	EX	EX
213	225	YIDTSTFPLENVL	EX	EX	EX	EX	EX	EX
213	226	YIDTSTFPLENVLS	EX	EX	na	na	EX	EX
217	225	STFPLENVL	W	W	W	W	W	W

Ex: 에피토프 영역을 가리키는 항체 결합시 교환 보호(적어도 3개의 시간-지점에서 >0.4Da)

W: 항체 결합시 약한 교환 보호(적어도 3개의 시간-지점에서 0.2 내지 0.4Da)

N: 항체 결합시 교환 보호 없음(<0.2Da)

na: 각각의 실험에서 분석되지 않음.

결론적으로, 결합하는 mAb B, C, D, E 및 F에 포함된 hCD30L의 영역은 mAb A1의 결합에 포함된 영역과 유사하고, 82 내지 88 영역 CSEDLIC 및 211 내지 226 영역 FQYIDTSTFPLENVLS로서 검출된다.

실시예 7

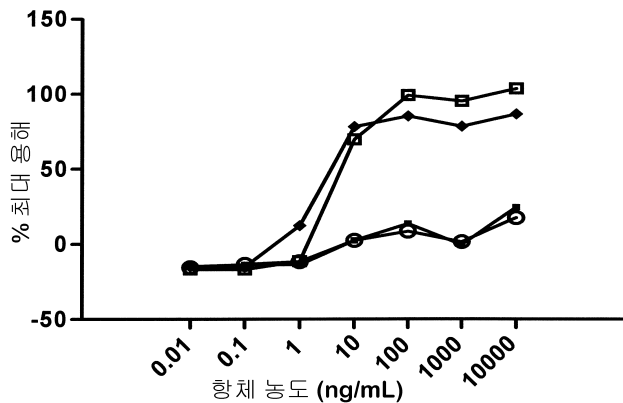
고정된 항-CD30L A-F_{AB}를 사용한 CD30L 항체의 비닝

항-사람 CD30L 단클론성 항체를 고정적인 샌드위치 접근법을 사용하여 Biacore T200(GE Healthcare 28-9750-01) 상에서 에피토프 비닝하였다.

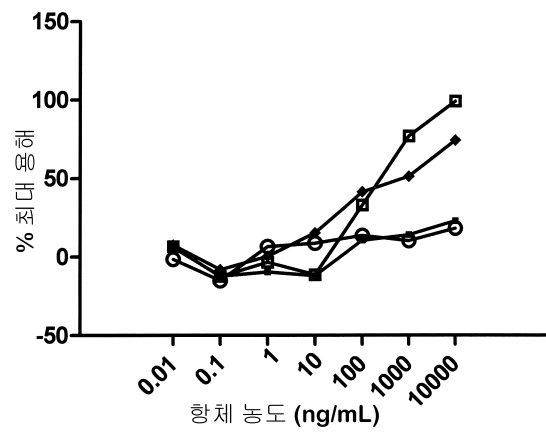
- [0424] 입체 장애를 줄이기 위하여 고정된 항체를 일가 형식으로 사용하였다. 항-hCD30L 항체의 항원 결합 영역이 중복되는 에피토프에 결합하는지를 측정하기 위하여, 이미 항체 A1의 Fab에 의해 결합된 CD30L에 항체 A 내지 F가 결합하는 능력을 시험하였다.
- [0425] 전체 항체를 힌지 영역의 시스테인의 상류쪽을 절단하는 파파인으로 소화시키거나 중쇄 및 경쇄 가변 영역의 제조합 발현에 의해 Fab 단편을 얻었다. 항-hCD30L A1의 Fab 단편(A1-F_{AB})을, 시스테인의 존재 하에 힌지 영역의 오른 쪽 위에서 전체 IgG를 효소적으로 절단하여 항체 분자당 두 개의 Fab 단편과 하나의 Fc 단편을 생성하는 고정된 파파인을 사용하여 제조하였다. Fab를 Fc로부터 단백질 A 친화성 크로마토그래피를 사용하여 분리한 후 완충액을 PBS로 교환하였다. 그 과정을 제조업체(Pierce Fab Preparation Kit #44985, US)의 지시를 따라 수행하였다.
- [0426] 항-사람 CD30L F_{AB}(항체 A1의 Fab)를 고정시키고 이어서 사람 CD30L-His₁₀ 삼량체(R&D Systems 1028-CL)를 포획했다. 계속해서 가용성 항-hCD30L A-F를 주입하였다. 이차 항체의 결합은 두 개의 항체가 상이한 에피토프 빈에 있음을 시사한다.
- [0427] 항-hCD30L A1-F_{AB}를 10mM의 아세트이트 완충액, pH 5.0으로 40 μ g/mL로 희석하고, 표준 과정을 사용하여 CM5 칩(GE healthcare BR-1000-12, BR-1000-50)에 3566 RU의 수준으로 아민 결합시켰다. 사람 CD30L-His₁₀ 삼량체(R&D Systems 1028-CL)를 HBS-P+(GE healthcare BR-1006-71)로 10nM로 희석하고, A-F_{AB} 표면 위로 주입하여 대략 175RU의 CD30L을 포획하였다. 이차 항체를 포획된 hCD30L 위로 75nM에서 주입하였다. 대조표준은 가치없는 포획(완충액만 있음)을 포함하였고, 가용성 항체 대신 완충액을 주입하였다. 모든 실험을 25 $^{\circ}$ C에서 수행하였다.
- [0428] A-FAB로 hCD30L을 코팅하는 것은 항체 A-F의 하위 그룹의 결합을 차단하였다. A-Fab와 A를 사용한 대조표준은 예상했던 것과 같이 둘 다 차단하였다. 또한 항체 F와 B는 포획된 hCD30L에의 결합이 방지된 반면, 항체 E, C 및 D는 hCD30L에 결합할 수 있었는데, 이것은 A, B 및 F의 결합 에피토프와 구별될 수 있는 결합 에피토프가 있다는 것을 증명한다. 결론적으로, 항체 A, F 및 B는 hCD30L에의 결합에 대해 항체 A1의 Fab와 경쟁한다.

도면

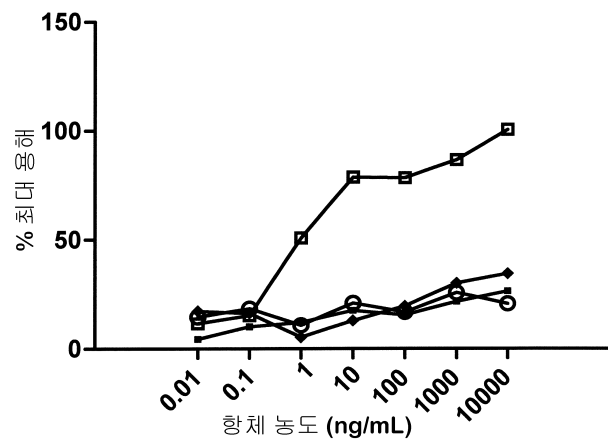
도면1a



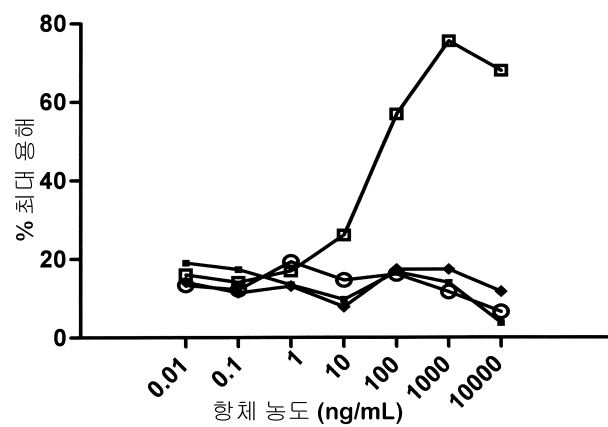
도면1b



도면1c



도면1d



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> AMGEN Inc.

Novo Nordis A/S

<120> CD30 LIGAND ANTIGEN BINDING PROTEINS

<130> 8679.204-WO

<160> 75

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Val Tyr Asp Tyr Val Ser

1 5 10

<210> 2

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

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

1 5 10

<210> 3

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Thr Gly Thr Ser Ser Asp Ile Gly Leu Tyr Asp Tyr Val Ser

1 5 10

<210> 4

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Thr Gly Thr Ser Ser Asp Ile Gly Leu Tyr Asn Tyr Val Ser

1 5 10

<210> 5

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Thr Gly Ser Ser Ser Asp Ile Gly Thr Tyr Asn Tyr Val Ser

1 5 10

<210> 6

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

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

1 5 10

<210> 7

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

Glu Val Ser Asn Arg Pro Ser

1 5

<210> 8

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

Glu Val Asn Asn Arg Pro Ser

1 5

<210> 9

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

Glu Val Ile Asn Arg Pro Ser

1 5

<210> 10

<211> 7

<212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 10
 Glu Val Ser Lys Arg Pro Ser
 1 5
 <210> 11
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 11
 Ser Ser Tyr Thr Ser Arg Ser Thr Trp Val
 1 5 10
 <210> 12
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 12
 Ser Ser Tyr Thr Ser Ser Ser Thr Trp Val
 1 5 10
 <210> 13
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 13
 Ser Ser Tyr Ser Ser Ser Ser Thr Trp Val
 1 5 10
 <210> 14
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 14
 Ser Tyr Ile Trp Ser
 1 5
 <210> 15

<211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 15
 Ser Tyr Tyr Trp Thr
 1 5
 <210> 16
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 16
 Ser Tyr Ser Trp Ser

 1 5
 <210> 17
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 17
 Asn Asn Tyr Trp Ser
 1 5
 <210> 18
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 18
 Ser Tyr Tyr Trp Ser
 1 5
 <210> 19
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 19
 Arg Ile Tyr Ala Ser Gly Asn Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
 1 5 10 15

<210> 20

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 20

Arg Ile Tyr Ala Ser Gly Gln Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser

1 5 10 15

<210> 21

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 21

Arg Ile Tyr Thr Ser Gly Ile Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser

1 5 10 15

<210> 22

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 22

Arg Thr Ser Thr Ser Gly Arg Asn Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser

1 5 10 15

<210> 23

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 23

Arg Val Tyr Ser Ser Gly Leu Thr Asn Tyr Lys Pro Ser Leu Lys Ser

1 5 10 15

<210> 24

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 24

Arg Ile Phe Ala Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Arg Ser

1 5 10 15

<210> 25

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 25

Asp Tyr Arg Val Ala Gly Thr Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Leu Asp Val

1 5 10 15

<210> 26

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 26

Glu Arg Val Val Gly Ala Ser Arg Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Val Asp Val

1 5 10 15

<210> 27

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 27

Asp Phe Thr Ile Ala Ala Arg Arg Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val

1 5 10 15

<210> 28

<211> 16

<212> PRT

<

213> Homo sapiens

<400> 28

Glu Arg Ala Thr Val Thr Thr Arg Tyr His Tyr Asp Gly Met Asp Val

1 5 10 15

<210> 29

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens
 <400> 29
 Glu Arg Val Gly Val Gln Asp Tyr Tyr His Tyr Ser Gly Met Asp Val
 1 5 10 15

<210> 30

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CONSENSUS SEQUENCE

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (3)..(3)

<223> XAA CAN BE THR OR SER

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (7)..(7)

<223> XAA CAN BE VAL OR ILE

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (9)..(9)

<223> XAA CAN BE VAL, THR OR LEU

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (11)..(11)

<223> XAA CAN BE ASP OR ASN

<400> 30

Thr Gly Xaa Ser Ser Asp Xaa Gly Xaa Tyr Xaa Tyr Val Ser

1 5 10

<210> 31

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CONSENSUS SEQUENCE

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (3)..(3)

<223> XAA CAN BE SER, ASN OR ILE

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (4)..(4)

<223> XAA CAN BE ASN OR LYS

<400> 31

Glu Val Xaa Xaa Arg Pro Ser

1 5

<210> 32

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CONSENSUS SEQUENCE

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (4)..(4)

<223> XAA CAN BE THR OR SER

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (6)..(6)

<223> XAA CAN BE ARG OR SER

<400> 32

Ser Ser Tyr Xaa Ser Xaa Ser Thr Trp Val

1 5 10

<210> 33

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CONSENSUS SEQUENCE

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> XAA CAN BE SER OR ASN

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> XAA CAN BE TYR OR ASN

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (3)..(3)

<223> XAA CAN BE ILE, TYR OR SER

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (5)..(5)

<223> XAA CAN BETHR OR SER

<400> 33

Xaa Xaa Xaa Trp Xaa

1 5

<210> 34

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CONSENSUS SEQUENCE

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> XAA CAN BE ILE, VAL OR THR

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (3)..(3)

<223> XAA CAN BE TYR, PHE OR SER

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (4)..(4)

<223> XAA CAN BE THR, SER OR ALA

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (7)..(7)

<223> XAA CAN BE ILE, LEU, ASN, SER, ARG OR GLN

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (8)..(8)

<223> XAA CAN BE THR OR ASN

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (11)..(11)

<223> XAA CAN BE ASN OR LYS

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (15)..(15)

<223> XAA CAN BE LYS OR ARG

<400> 34

Arg Xaa Xaa Xaa Ser Gly Xaa Xaa Asn Tyr Xaa Pro Ser Leu Xaa Ser

1	5	10	15
---	---	----	----

<210> 35
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> CONSENSUS SEQUENCE
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(1)
 <223> XAA CAN BE GLU OR ASP
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (2)..(2)
 <223> XAA CAN BE ARG, THR OR PHE
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (3)..(3)

 <223> XAA CAN BE VAL, ALA, ARG OR THR
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (4)..(4)
 <223> XAA CAN BE VAL, THR, GLY OR ILE
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (5)..(5)
 <223> XAA CAN BE VAL, ALA OR GLY
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (6)..(6)
 <223> XAA CAN BE ALA, THR, GLY OR GLN
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (7)..(7)
 <223> XAA CAN BE THR, ASP, ARG OR SER
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (8)..(8)
 <223> XAA CAN BE ARG OR TYR
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (10)..(10)
 <223> XAA CAN BE THR OR HIS

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (12)..(12)

<223> XAA CAN BE THR ASP OR SER

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (14)..(14)

<223> XAA CAN BE MET, LEU OR VAL

<400> 35

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Tyr Xaa Tyr Xaa Gly Xaa Asp Val

1 5 10 15

<210> 36

<211> 110

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 36

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

1 5 10 15

Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Val Tyr

20 25 30

Asp Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu

35 40 45

Met Ile Tyr Glu Val Ser Asn Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe

50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu

65 70 75 80

Gln Thr Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Tyr Thr Ser Arg

85 90 95

Ser Thr Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu

100 105 110

<210> 37

<211> 326

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 37

cagtctgccc tgactcagcc tgcctccgtg tctgggtctc ctggacagtc gatcaccatc 60
 tcctgcactg gaaccagcag tgacgttggg gtttatgact atgtctcctg gtatcaacag 120
 caccaggca aagccccaa actcatgatt tatgaggtca gtaatcggcc ctcaggggtt 180

tctaategct tccttggtc caagctggc aacacgcct cctgacat ccttggtc 240
 caaactgagg acgaggtga ttattactgc agtcatata caagcaggag cacttggtg 300
 ttcggcggag ggaccaagct gaccgt 326

<210> 38

<211> 110

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 38

Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln
 1 5 10 15
 Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Leu Tyr
 20 25 30

Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Asp Lys Ala Pro Lys Leu
 35 40 45
 Met Ile Phe Glu Val Asn Asn Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe
 50 55 60
 Ser Gly Ser Asn Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
 65 70 75 80
 Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Tyr Thr Ser Ser
 85 90 95

Ser Thr Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105 110

<210> 39

<211> 330

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 39

cagtctgccc tgactcagcc tgcctccgtg tctgggtctc ctggacagtc gatcaccatc 60
 tcctgcactg gaaccagcag tgacgttggg ctttataact atgtctcctg gtaccaacag 120

caccagaca aagccccaa actcatgatt tttaggtca ataatcgcc ctcaggggtt 180
tctaategt tctctggctc caactctggc aacacggcct ccctgaccat ctcctgggctc 240
caggctgagg acgaggctga ttattactgc agctcatata caagcagcag cacttgggtg 300

ttcggcggag ggaccaagtt gaccgtccta 330

<210> 40

<211> 110

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 40

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

1 5 10 15

Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Ile Gly Leu Tyr

20 25 30

Asp Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Asp Arg Ala Pro Lys Leu

35 40 45

Ile Ile Phe Glu Val Asn Asn Arg Pro Ser Gly Val Ser Tyr Arg Phe

50 55 60

Ser Gly Ser Asn Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu

65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Tyr Thr Ser Ser

85 90 95

Ser Thr Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu

100 105 110

<210> 41

<211> 326

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 41

cagtctgcc tgactcagcc tgccctccgtg tctgggtctc ctggacagtc gatcaccatc 60

tcttgactg gaaccagcag tgacatttgt ctttatgact atgtctctg gtaccaacag 120

caccagaca gagccccaa actcataatt tttaggtca ataatcgcc ctcaggggtt 180

tcttatcgt tctctggctc caactctggc aacacggcct ccctgaccat ctcctgggctc 240

caggctgagg acgaggctga ttattactgc agtcatata caagcagcag cacttgggtg 300
ttcggcggag ggaccaagtt gaccgt 326

<210> 42

<211> 110

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 42

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

1 5 10 15

Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Ile Gly Leu Tyr

20 25 30

Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu

35 40 45

Ile Ile Tyr Glu Val Ile Asn Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe

50 55 60

Ser Gly Ser Glu Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu

65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asn Tyr Tyr Cys Ser Ser Tyr Thr Ser Ser

85 90 95

Ser Thr Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu

100 105 110

<210> 43

<211> 330

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400>

> 43

cagtctgccc tgactcagcc tgcctccgtg tctgggtctc ctggacagtc gatcaccatc 60

tcttgactg gaaccagcag tgacattggt ctttataact atgtctctg gtaccaacag 120

caccaggca aagccccaa actcataatt tatgaggtca ttaatcggcc ctgaggggtt 180

tctaactgct tctctggctc cgagtctggc aacacggcct cctgaccat ctctggactc 240

caggctgagg acgaggctaa ttattactgc agtcatata caagcagcag cacttgggtg 300

ttcggcggag ggaccaagct gaccgtcctg 330

<210> 44

<211> 110

<212> PRT

<213>

Homo sapiens

<400> 44

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

1 5 10 15

Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Ser Ser Asp Ile Gly Thr Tyr

20 25 30

Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Tyr Pro Gly Lys Ala Pro Glu Leu

35 40 45

Met Ile Tyr Glu Val Asn Asn Arg Pro Ser Gly Val Ser Asp Arg Phe

50 55 60

Ser Gly Ser Thr Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu

65 70 75 80

Gln Ala Asn Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Tyr Ser Ser Ser

85 90 95

Ser Thr Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu

100 105 110

<210> 45

<211> 326

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 45

cagtctgccc tgactcagcc tgectccgtg tctgggtctc ctggacagtc gatcaccatc 60

tcttgactg gaagcagcag tgacattggt acttataact atgtctcctg gtaccaacag 120

taccaggca aagccccga actcatgatt tatgaggtca ataatcggcc ctcaggggtt 180

tctgatcgt tctctggctc cactctggc aatacggcct ccctgacat cctctgggctc 240

caggctaacg acgaggctga ttattactgc agtcatatt caagcagcag cacttgggtg 300

ttcgcgaggag ggactaagct gaccgt 326

<210> 46

<211> 110

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 46

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

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

65	70	75	80
Gln	Ala	Asp	Asp
Glu	Ala	Asp	Tyr
Ser	Cys	Ser	Ser
Tyr	Thr	Ser	Ser
85	90	95	
Ser	Thr	Trp	Val
Phe	Gly	Gly	Gly
Thr	Lys	Leu	Thr
Val	Leu		
100	105	110	

<210> 47

<211> 322

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 47

cagctctgcc	tgactcagcc	tgcctccgtg	tctgggtctc	ctggacagtc	gacaccatc	60
tcctgcactg	gaactagcag	tgacgttggt	ctttataact	atgtctctg	gtaccaacag	120
cagccaggca	aagcccccaa	actcatgatt	tatgaggtca	gtaagcggcc	ctcaggagtt	180
tctaatecgt	tctctggctc	cacgtctggc	aacacggcct	ccctgaccat	ctctgggctc	240
caggctgacg	acgaggtcga	ttattcctgc	agctcatata	caagcagcag	cacttgggtc	300
ttcggcggag	ggaccaagct	ga				322

<210> 48

<211> 124

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 48

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Tyr
20 25 30

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

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

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

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

Arg Asp Tyr Arg Val Ala Gly Thr Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Leu Asp
100 105 110

Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 49

<211> 372

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 49

caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcgagac cctgtccctc 60

acctgcactg tctctggtgg ctccatcagt agttacatct ggagctggat ccggcagccc 120

gccggaaagg gactggagtg gattgggcgt atctatgcca gtgggaacac caactacaac 180

ccctccctca agagtcgagt caccatatca gtagacacgt ccaagaacca gttctccctg 240

aagctgagct ctatgaccgc cgcgacacg gccgtatatt actgtgcgag agattatagg 300

gtggctggca cttactacta ctactacggt ttggacgtct ggggccaagg gaccacggtc 360

accgtctcct ca 372

<210> 50

<211> 124

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 50

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

Ser Arg Val Thr Met Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
 65 70 75 80
 Lys Leu Ser Ser Met Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Arg Asp Tyr Arg Val Ala Gly Thr Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Leu Asp
 100 105 110
 Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 51

<

211> 372

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 51

caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcggagac cctgtccctc 60
 acctgcactg tctctggtgg ctccatcagt agttacatct ggagctggat ccggcagccc 120
 gccggaaagg gactggagtg gattgggcgt atctatgcca gtgggaacac caactacaac 180
 ccctccctca agagtcgagt caccatgtca gtagacacgt ccaagaacca gttctccctg 240
 aagctgagct ctatgaccgc cgcggacacg gccgtatatt actgtgcgag agattatagg 300
 gtggctggca cttactacta ctactacggt ttggacgtct ggggccaagg gaccacggtc 360

accgtctcct ca 372

<210> 52

<211> 124

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 52

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Gly Arg Ile Tyr Ala Ser Gly Asn Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys

50 55 60

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

65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala

85 90 95

Arg Asp Tyr Arg Val Ala Gly Thr Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Leu Asp

100 105 110

Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 53

<211> 372

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 53

caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcggagac cctgtccctc 60

acctgcactg tctctgggtg ctccatcagt agttacatct ggagctggat ccggcagccc 120

gccggaaagg gactggagtg gattgggcgt atctatgcca gtgggaacac caactacaac 180

ccctccctca agagtcgagt caccatgtca gtagacacgt ccaagaacca gttctccctg 240

aagctgagct ctgtaaccgc gcgggacacg gccgtatatt actgtgcgag agattatagg 300

gtggctggca cttactacta ctactacggt ttggacgtct ggggccaagg gaccacggtc 360

accgtctcct ca 372

<210> 54

<211> 124

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 54

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Gly Arg Ile Tyr Ala Ser Gly Gln Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys

50 55 60

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

65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Met Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala

85 90 95

Arg Asp Tyr Arg Val Ala Gly Thr Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Leu Asp

100 105 110

Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 55

<211> 366

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 55

cagctgcagg agtcgggccc aggactggtg aagccttcgg agaccctgtc cctcacctgc 60

actgtctctg gtggctccat cagtagttac atctggagct ggatccggca gcccgccgga 120

aagggactgg agtggattgg gcgtatctat gccagtgggc aaaccaacta caaccctcc 180

ctcaagatc gattccat gtcagtagac acgtccaaga accagttctc cctgaagctg 240

agctctatga ccgccgcca caccgccga tattactgtg cgagagatta taggggtggt 300

ggcacttact actactacta cggtttggac gtctggggcc aaggaccac ggtcacctgc 360

tcctca 366

<210> 56

<211> 124

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 56

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Gly Arg Ile Tyr Ala Ser Gly Gln Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys

50 55 60

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

65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala

85 90 95

Arg Asp Tyr Arg Val Ala Gly Thr Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Leu Asp

100 105 110

Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 57

<211> 366

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 57

cagctgcagg agtcgggccc aggactgggtg aagccttcgg agaccctgtc cctcacctgc 60

actgtctctg gtggctccat cagtagttac atctggagct ggatccggca gcccgcgga 120

aagggaactgg agtggattgg gcgtatctat gccagtgggc aaaccaacta caaccctcc 180

ctcaagagtc gagtcccat atcagtagac acgtccaaga accagttctc cctgaagctg 240

agctctgtaa ccgccgcgga caggccgta tattactgtg cgagagatta taggggtggct 300

ggcacttact actactacta cgttttggac gtctggggcc aaggaccac ggtcacgcgc 360
tcctca 366

<210> 58
<211> 124
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 58

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Tyr
20 25 30

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

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

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

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

Arg Asp Tyr Arg Val Ala Gly Thr Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Leu Asp
100 105 110

Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 59
<211> 372
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 59

caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcgagac cctgtccctc 60

acctgcactg tctctggtgg ctccatcagt agttacatct ggagctggat ccggcagccc 120
gccggaagg gactggagtg gattgggcgt atctatgcca gtgggaacac caactacaac 180
ccctccctca agagtcgagt caccatatca gtagacacgt ccaagaacca gttctccctg 240

aagctgagct ctgtaaccgc cgcggacacg gccgtatatt actgtgagag agattatagg 300
gtggctggca ctactacta ctactacggt ttggacgtct ggggccaagg gaccacggtc 360
accgtctcct ca 372

<210> 60

<211> 124

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 60

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Gly Arg Ile Tyr Ala Ser Gly Gln Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys

50 55 60

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

65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Met Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala

85 90 95

Arg Asp Tyr Arg Val Ala Gly Thr Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Leu Asp

100 105 110

Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 61

<

211> 379

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 61

cagatgtcag gtgcagctgc aggagtcggg cccaggactg gtgaagcctt cggagaccct 60

gtccctcacc tgcactgtct ctggctggctc catcagtagt tacatctgga gctggatccg 120

gcagcccgcc ggaaaggac tggagtggat tggcgtatc tatgccagtg ggcaaaccaa 180

ctacaacccc tccctcaaga gtcgagtcac catatcagta gacacgtcca agaaccagtt 240
ctccctgaag ctgagctcta tgaccgccgc ggacacggcc gtatattact gtgcgagaga 300
ttatagggtg gctggcactt actactacta ctacggtttg gacgtctggg gccaagggac 360

cacggtcacc gtctcctca 379

<210> 62

<211> 124

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 62

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Gly Arg Ile Tyr Ala Ser Gly Gln Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys

50 55 60

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

65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala

85 90 95

Arg Asp Tyr Arg Val Ala Gly Thr Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Leu Asp

100 105 110

Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 63

<211> 379

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 63

cagatgtcag gtgcagctgc aggagtcggg cccaggactg gtgaagcctt cggagaccct 60

gtccctcacc tgcactgtct ctggtggctc catcagtagt tacatctgga gctggatccg 120

gcagcccgcc ggaaaggac tggagtggat tgggcgtatc tatgccagt ggcaaaccac 180
ctacaacccc tccctcaaga gtcgagtcac catgtcagta gacacgtcca agaaccagtt 240
ctccctgaag ctgagctctg taaccgccgc ggacacggcc gtatattact gtgcgagaga 300

ttatagggtg gctggcactt actactacta ctacggtttg gacgtctggg gccaaaggac 360
cacggtcacc gtctctca 379

<210> 64

<211> 124

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 64

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Gly Arg Ile Tyr Thr Ser Gly Ile Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys

50 55 60

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

65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala

85 90 95

Arg Glu Arg Val Val Gly Ala Ser Arg Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Val Asp

100 105 110

Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 65

<211> 372

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 65

caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcgagac cctgtcctc 60

acctgcactg tcctctgggtg ctccatcagt agttactact ggacctggat cgggcagccc 120
gcccgggaagg gactggagtg gattgggcgt atctatacca gtggaatcac caactacaat 180
ccctccctca agagtcgcgt caccatgtca gtagacacgt ccaagaacca gttctccctg 240

aagctgagct ctgtgaccgc cgcggacacg gccgtgtatt actgtgcgag agagcgggta 300
gtgggagcta gtaggtacta ctactacggt gtggacgtct ggggccaagg gaccacggtc 360
accgtctcct cc 372

<210> 66

<211> 124

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 66

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Gly Arg Ile Tyr Thr Ser Gly Ile Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys

50 55 60

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

65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala

85 90 95

Arg Glu Arg Val Val Gly Ala Ser Arg Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Val Asp

100 105 110

Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 67

<211> 372

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 67

caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcggagac cctgtccctc 60
acctgcactg tctctgggtg ctccatcagt agttactact ggacctggat ccggcagccc 120
gccgggaagg gactggagtg gattgggctg atctatacca gtggaatcac caactacaat 180

ccctccctca agagtcgctg caccatgtca gtagacacgt ccaagaacca gttctccctg 240
aagctgagct ctgtgaccgc cgcgacacg gccgtgtatt actgtgcgag agagcgggta 300
gtgggagcta gtaggtacta ctactacggt gtggacgtct ggggccaagg gaccacggtc 360
accgtctcct cc 372

<210> 68

<211> 124

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 68

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Gly Arg Thr Ser Thr Ser Gly Arg Asn Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys

50 55 60

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

65 70 75 80

Lys Leu Asn Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala

85 90 95

Arg Asp Phe Thr Ile Ala Ala Arg Arg Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp

100 105 110

Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 69

<211> 372

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 69

caggtgcagt tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcggagac cctgtccctc 60

acctgcactg tctctggtgg ctccatcagt agttactcct ggagctggat ccggcagccc 120

gccgggaagg gactggagtg gattgggcgt accagtagca gtgggagaaa caactacaac 180

ccctccctca agagtcgagt caccatgtca gttgacacgt ccaagaacca gttctccctg 240

aagctgaact ctgtgaccgc cgcgacacg gccgtgtatt actgtgcgag agatttcact 300

atagcagctc gtcgctacta ctactacggt atggacgtct ggggccaagg gaccacggtc 360

accgtctcct ca 372

<210> 70

<211> 124

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 70

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

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Thr Asn Asn

20 25 30

Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Ala Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Arg Val Tyr Ser Ser Gly Leu Thr Asn Tyr Lys Pro Ser Leu Lys

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Arg Glu Arg Ala Thr Val Thr Thr Arg Tyr His Tyr Asp Gly Met Asp

100 105 110

Val Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 71

<

211> 372

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 71

```

caggtgcagc tgcaggagtc gggcccaaga ctggtgaagc cttcggagac cctgtccctc      60
acctgcactg tctctgggtg ctccatcact aataactact ggagctggat cggcgagccc      120
gccgggaagg ggctggagtg gattgggcgt gtctatagta gtggactcac caactacaag      180
ccctccctca agagtcgagt caccatgtca gtagacacgt ccaagaacca attctccctg      240
aggttgaact ctgtgaccgc cgcggacacg gccgtgtatt actgtgcgag agagagggca      300
acagtaacta cgaggtacca ctacgacggt atggacgtct ggggccaagg gacctcggtc      360

```

```

accgtctcct ca      372

```

<210> 72

<211> 124

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 72

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Tyr

20 25 30

Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Ala Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Arg Ile Phe Ala Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Arg

50 55 60

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

65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala

85 90 95

Lys Glu Arg Val Gly Val Gln Asp Tyr Tyr His Tyr Ser Gly Met Asp

100 105 110

Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 73

<211> 372

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 73

caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcgagac cctgtccctc 60
acttgactg tctctggtgg ctccatcagt agttactact ggagctggat ccggcagccc 120
gccgggaagg gactggagtg gattgggcgc atctttgcca gtgggagcac caactacaac 180
ccctccctca ggagtcgagt caccatgtca agagacacgt ccaagaacca gttctccctg 240
aagctgagtt ctgtgaccgc cgcgacacg gccgtttatt actgtgcgaa agaaagggtg 300

ggagtacagg attactacca ctattccggt atggacgtct ggggccaagg gaccacggtc 360
accgtctcct ca 372

<210> 74

<211> 234

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(37)

<223> Cytoplasmic

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (38)..(62)

<223> Transmembrane

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (63)..(234)

<223> Extracellular

<400> 74

Met Asp Pro Gly Leu Gln Gln Ala Leu Asn Gly Met Ala Pro Pro Gly

1 5 10 15

Asp Thr Ala Met His Val Pro Ala Gly Ser Val Ala Ser His Leu Gly

20 25 30

Thr Thr Ser Arg Ser Tyr Phe Tyr Leu Thr Thr Ala Thr Leu Ala Leu

35 40 45

Cys Leu Val Phe Thr Val Ala Thr Ile Met Val Leu Val Val Gln Arg

50 55 60

Thr Asp Ser Ile Pro Asn Ser Pro Asp Asn Val Pro Leu Lys Gly Gly
65 70 75 80

Asn Cys Ser Glu Asp Leu Leu Cys Ile Leu Lys Arg Ala Pro Phe Lys
85 90 95

Lys Ser Trp Ala Tyr Leu Gln Val Ala Lys His Leu Asn Lys Thr Lys
100 105 110

Leu Ser Trp Asn Lys Asp Gly Ile Leu His Gly Val Arg Tyr Gln Asp
115 120 125

Gly Asn Leu Val Ile Gln Phe Pro Gly Leu Tyr Phe Ile Ile Cys Gln
130 135 140

Leu Gln Phe Leu Val Gln Cys Pro Asn Asn Ser Val Asp Leu Lys Leu
145 150 155 160

Glu Leu Leu Ile Asn Lys His Ile Lys Lys Gln Ala Leu Val Thr Val
165 170 175

Cys Glu Ser Gly Met Gln Thr Lys His Val Tyr Gln Asn Leu Ser Gln
180 185 190

Phe Leu Leu Asp Tyr Leu Gln Val Asn Thr Thr Ile Ser Val Asn Val
195 200 205

Asp Thr Phe Gln Tyr Ile Asp Thr Ser Thr Phe Pro Leu Glu Asn Val
210 215 220

Leu Ser Ile Phe Leu Tyr Ser Asn Ser Asp
225 230

<210> 75

<211> 5

<212> PRT

<213> synthetic sequence

<220><221> misc_feature

<222> (3)..(3)

<223> wherein X is I, S or Y.

<220><221> misc_feature

<222> (5)..(5)

<223> wherein X is T or S.

<400> 75

Ser Tyr Xaa Trp Xaa

1 5

【심사관 직권보정사항】

【직권보정 1】

【보정항목】 청구범위

【보정세부항목】 청구항 1-3, 5, 6, 8

【변경전】

에 의해

【변경후】

로