(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년06월25일
(11) 등록번호 10-2126964
(24) 등록일자 2020년06월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
*C07K 16/28* (2006.01) *A61K 38/17* (2006.01)
*A61K 38/18* (2006.01) *A61K 39/395* (2006.01)
*A61K 47/42* (2017.01) *A61K 48/00* (2006.01)
*A61K 49/16* (2006.01) *C07K 14/435* (2006.01)
*C07K 14/475* (2006.01) *C07K 16/18* (2006.01)
*C07K 16/22* (2006.01)
(52) CPC특허분류
*C07K 16/28* (2013.01)
*A61K 38/17* (2013.01)
(21) 출원번호 10-2019-7007436(분할)
(22) 출원일자(국제) 2010년11월11일
심사청구일자 2019년04월12일
(85) 번역문제출일자 2019년03월14일
(65) 공개번호 10-2019-0031335
(43) 공개일자 2019년03월25일
(62) 원출원 특허 10-2012-7012326
원출원일자(국제) 2010년11월11일
심사청구일자 2015년11월10일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2010/006888
(87) 국제공개번호 WO 2011/057788
국제공개일자 2011년05월19일
(30) 우선권주장
09014136.7 2009년11월11일
유럽특허청(EPO)(EP)
*(뒷면에 계속)*
(56) 선행기술조사문헌
KR1020020027490 A
WO2009087978 A1
KR1020090101886 A
KR1020080090403 A

(73) 특허권자
**가니메드 파마슈티칼스 게엠베하**
독일 55131 마인츠 안 데르 골드그루베 12
**요하네스 구텐베르크-유니버시타트 마인츠**
독일 데-55128 마인츠 자르스트라쎄 21
(72) 발명자
**사힌, 우구르**
독일 55116 마인즈 필리프-폰-자베른-플라츠 1
**튀레시, 외즐렘**
독일 55116 마인즈 필리프-폰-자베른-플라츠 1
*(뒷면에 계속)*
(74) 대리인
**박장원**

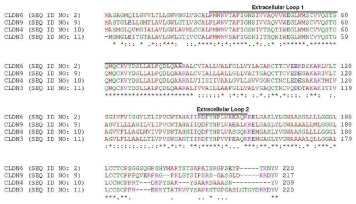
전체 청구항 수 : 총 45 항 심사관 : 노은주

(54) 발명의 명칭 **클라우딘 6 특이적 항체**

## (57) 요 약

본 발명은 난소암, 폐암, 위암, 유방암, 간암, 췌장암, 피부암, 악성 흑색종, 두경부암, 육종, 담관암, 방광암, 신장암, 결장암, 태반 융모상피암, 자궁경부암, 고환암 및 자궁암과 같은 종양 관련 질병을 포함하는, CLDN6를 발현하는 세포와 관련된 질병을 치료 및/또는 예방하기 위한 약제로서 유용한 항체를 제공한다.

## 대 표 도



(52) CPC특허분류
*A61K 38/18* (2013.01)
*A61K 39/395* (2013.01)
*A61K 47/42* (2013.01)
*A61K 48/00* (2013.01)
*A61K 49/16* (2013.01)
*C07K 14/435* (2013.01)
*C07K 14/475* (2013.01)
*C07K 16/18* (2013.01)
*C07K 16/22* (2013.01)

(72) 발명자
**코슬로브스키, 미카엘**
독일 65933 프랑크푸르트 아우토겐스트라세 50
**발테르, 코르덴**
독일 65203 비에스바덴 휘글레르스트라세 3
**뵐르, 스테판**
독일 55299 나크켄하임 폼마르트스트라세 22아
**크레우즈베르크, 마리아**
독일 55131 마인즈 프라이헤르-폼-스타인 스트라세 1
**후브네르, 베른트**
독일 80933 뮌헨 텔로트스트라세 14
**에르델얀, 미카엘**
독일 65239 호크하임 암 마인 힌테르가세 60

(30) 우선권주장
61/260,202 2009년11월11일 미국(US)
10006956.6 2010년07월06일
유럽특허청(EPO)(EP)
61/361,618 2010년07월06일 미국(US)

# 명 세 서

## 청구범위

### 청구항 1

CLDN6에 결합하는, 항-CLDN6 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 생산하는 방법으로서, 상기 방법은:

a. 숙주 세포가 상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 발현하는 조건하에서, 항체 중쇄 가변 영역을 인코딩하는 핵산 서열을 포함하는 발현 컨스트럭트 및 항체 경쇄 가변 영역을 인코딩하는 핵산 서열을 포함하는 발현 컨스트럭트로 형질전환된 상기 숙주 세포를 배양하는 단계로서, 상기 발현 컨스트럭트는 하나 이상의 발현 벡터에 존재하는 것인 단계; 및

b. 상기 세포에 의하여 발현된 상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편의 제조물을 수확하는 단계를 포함하고,

여기서,

(i) 항체 중쇄 가변 영역을 인코딩하는 상기 핵산 서열은 SEQ ID NO: 34의 중쇄 HCDR1, HCDR2, 및 HCDR3 영역을 인코딩하는 핵산 서열을 포함하고,

항체 경쇄 가변 영역을 인코딩하는 상기 핵산 서열은 SEQ ID NO: 35의 경쇄 LCDR1, LCDR2, 및 LCDR3 영역을 인코딩하는 핵산 서열을 포함하며,

HCDR1은 SEQ ID NO: 34 내에서 확인되는 아미노산 서열 GYSFTGYT (SEQ ID NO: 47)로 이루어지고,

HCDR2는 SEQ ID NO: 34 내에서 확인되는 아미노산 서열 INPYNGGT (SEQ ID NO: 54)로 이루어지고,

HCDR3는 SEQ ID NO: 34 내에서 확인되는 아미노산 서열 ARDYGYVLDY (SEQ ID NO: 55)로 이루어지고,

LCDR1은 SEQ ID NO: 35 내에서 확인되는 아미노산 서열 SSVSY (SEQ ID NO: 56)으로 이루어지고,

LCDR2는 SEQ ID NO: 35 내에서 확인되는 아미노산 서열 STS (SEQ ID NO: 53)으로 이루어지고,

LCDR3는 SEQ ID NO: 35 내에서 확인되는 아미노산 서열 QQRSIYPPWT (SEQ ID NO: 57)로 이루어지거나, 또는

(ii) 항체 중쇄 가변 영역을 인코딩하는 상기 핵산 서열은 SEQ ID NO: 36의 중쇄 HCDR1, HCDR2, 및 HCDR3 영역을 인코딩하는 핵산 서열을 포함하고,

항체 경쇄 가변 영역을 인코딩하는 상기 핵산 서열은 SEQ ID NO: 37의 경쇄 LCDR1, LCDR2, 및 LCDR3 영역을 인코딩하는 핵산 서열을 포함하며,

HCDR1은 SEQ ID NO: 36 내에서 확인되는 아미노산 서열 GYSFTGYT (SEQ ID NO: 47)로 이루어지고,

HCDR2는 SEQ ID NO: 36 내에서 확인되는 아미노산 서열 INPYNGGT (SEQ ID NO: 54)로 이루어지고,

HCDR3는 SEQ ID NO: 36 내에서 확인되는 아미노산 서열 ARDYGFVLDY (SEQ ID NO: 58)로 이루어지고,

LCDR1은 SEQ ID NO: 37 내에서 확인되는 아미노산 서열 SSVSY (SEQ ID NO: 56)으로 이루어지고,

LCDR2는 SEQ ID NO: 37 내에서 확인되는 아미노산 서열 STS (SEQ ID NO: 53)으로 이루어지고,

LCDR3는 SEQ ID NO: 37 내에서 확인되는 아미노산 서열 QQRSNYPPWT (SEQ ID NO: 59)로 이루어지거나, 또는

(iii) 항체 중쇄 가변 영역을 인코딩하는 상기 핵산 서열은 SEQ ID NO: 38의 중쇄 HCDR1, HCDR2, 및 HCDR3 영역을 인코딩하는 핵산 서열을 포함하고,

항체 경쇄 가변 영역을 인코딩하는 상기 핵산 서열은 SEQ ID NO: 39의 경쇄 LCDR1, LCDR2, 및 LCDR3 영역을 인코딩하는 핵산 서열을 포함하며,

HCDR1은 SEQ ID NO: 38 내에서 확인되는 아미노산 서열 GYSFTGYT (SEQ ID NO: 47)로 이루어지고,

HCDR2는 SEQ ID NO: 38 내에서 확인되는 아미노산 서열 INPYNGGI (SEQ ID NO: 60)으로 이루어지고,

HCDR3는 SEQ ID NO: 38 내에서 확인되는 아미노산 서열 ARDFGYVLDY (SEQ ID NO: 61)로 이루어지고,

LCDR1은 SEQ ID NO: 39 내에서 확인되는 아미노산 서열 SSVSY (SEQ ID NO: 56)으로 이루어지고,

LCDR2는 SEQ ID NO: 39 내에서 확인되는 아미노산 서열 STS (SEQ ID NO: 53)으로 이루어지고,

LCDR3는 SEQ ID NO: 39 내에서 확인되는 아미노산 서열 QQRSTYPPWT (SEQ ID NO: 62)로 이루어지거나, 또는

(iv) 항체 중쇄 가변 영역을 인코딩하는 상기 핵산 서열은 SEQ ID NO: 40의 중쇄 HCDR1, HCDR2, 및 HCDR3 영역을 인코딩하는 핵산 서열을 포함하고,

항체 경쇄 가변 영역을 인코딩하는 상기 핵산 서열은 SEQ ID NO: 41의 경쇄 LCDR1, LCDR2, 및 LCDR3 영역을 인코딩하는 핵산 서열을 포함하며,

HCDR1은 SEQ ID NO: 40 내에서 확인되는 아미노산 서열 GYSFTGYT (SEQ ID NO: 47)로 이루어지고,

HCDR2는 SEQ ID NO: 40 내에서 확인되는 아미노산 서열 INPYNGGS (SEQ ID NO: 63)으로 이루어지고,

HCDR3는 SEQ ID NO: 40 내에서 확인되는 아미노산 서열 ARDYGYVFDY (SEQ ID NO: 64)로 이루어지고,

LCDR1은 SEQ ID NO: 41 내에서 확인되는 아미노산 서열 SSVNY (SEQ ID NO: 65)로 이루어지고,

LCDR2는 SEQ ID NO: 41 내에서 확인되는 아미노산 서열 STS (SEQ ID NO: 53)으로 이루어지고,

LCDR3는 SEQ ID NO: 41 내에서 확인되는 아미노산 서열 QQRNNYPPWT (SEQ ID NO: 66)으로 이루어진다.

**청구항 2**

제1항에 있어서, 상기 숙주 세포는 림프구 세포, 진핵 숙주 세포, CHO 세포, NS/0 세포, HEK293 세포, HEK293T 세포, 식물 세포, 곰팡이 세포, 수지상 세포, B 세포, COS 세포, K562 세포, HELA 세포, 이스트 세포 또는 곤충 세포인 것인 방법.

**청구항 3**

제2항에 있어서, 상기 숙주 세포는 CHO 세포인 것인 방법.

**청구항 4**

제1항 내지 제3항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 발현 벡터는 프로모터 서열, 리더 서열, 번역 개시 서열, 경쇄 불변 영역, 중쇄 불변 영역, 3' 비번역 서열, 폴리아데닐레이션 서열, 또는 전사 종결 서열을 포함하는 것인 방법.

**청구항 5**

아래의 핵산 서열을 포함하는 재조합 핵산:

(i) SEQ ID NO: 34의 중쇄 HCDR1, HCDR2, 및 HCDR3 영역을 포함하는 항체의 중쇄를 인코딩하는 핵산 서열로서,

HCDR1은 SEQ ID NO: 34 내에서 확인되는 아미노산 서열 GYSFTGYT (SEQ ID NO: 47)로 이루어지고,

HCDR2는 SEQ ID NO: 34 내에서 확인되는 아미노산 서열 INPYNGGT (SEQ ID NO: 54)로 이루어지고,

HCDR3는 SEQ ID NO: 34 내에서 확인되는 아미노산 서열 ARDYGYVLDY (SEQ ID NO: 55)로 이루어진 핵산 서열, 또는

(ii) SEQ ID NO: 36의 중쇄 HCDR1, HCDR2, 및 HCDR3 영역을 포함하는 항체의 중쇄를 인코딩하는 핵산 서열로서,

HCDR1은 SEQ ID NO: 36 내에서 확인되는 아미노산 서열 GYSFTGYT (SEQ ID NO: 47)로 이루어지고,

HCDR2는 SEQ ID NO: 36 내에서 확인되는 아미노산 서열 INPYNGGT (SEQ ID NO: 54)로 이루어지고,

HCDR3는 SEQ ID NO: 36 내에서 확인되는 아미노산 서열 ARDYGFVLDY (SEQ ID NO: 58)로 이루어진 핵산 서열, 또는

(iii) SEQ ID NO: 38의 중쇄 HCDR1, HCDR2, 및 HCDR3 영역을 포함하는 항체의 중쇄를 인코딩하는 핵산 서열로서,

HCDR1은 SEQ ID NO: 38 내에서 확인되는 아미노산 서열 GYSFTGYT (SEQ ID NO: 47)로 이루어지고,

HCDR2는 SEQ ID NO: 38 내에서 확인되는 아미노산 서열 INPYNGGI (SEQ ID NO: 60)으로 이루어지고,

HCDR3는 SEQ ID NO: 38 내에서 확인되는 아미노산 서열 ARDFGYVLDY (SEQ ID NO: 61)로 이루어진 핵산 서열, 또는

(iv) SEQ ID NO: 40의 중쇄 HCDR1, HCDR2, 및 HCDR3 영역을 포함하는 항체의 중쇄를 인코딩하는 핵산 서열로서,

HCDR1은 SEQ ID NO: 40 내에서 확인되는 아미노산 서열 GYSFTGYT (SEQ ID NO: 47)로 이루어지고,

HCDR2는 SEQ ID NO: 40 내에서 확인되는 아미노산 서열 INPYNGGS (SEQ ID NO: 63)으로 이루어지고,

HCDR3는 SEQ ID NO: 40 내에서 확인되는 아미노산 서열 ARDYGYVFDY (SEQ ID NO: 64)로 이루어진 핵산 서열.

**청구항 6**

제5항에 있어서, 상기 핵산 서열은 SEQ ID NO: 34, 36, 38 또는 40의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역을 인코딩하는 것인 재조합 핵산.

**청구항 7**

제5항에 있어서, 상기 재조합 핵산은 인간의 또는 쥐과(murine)의 중쇄 불변 영역을 포함하는 것인 재조합 핵산.

**청구항 8**

제7항에 있어서, 상기 인간의 중쇄 불변 영역을 인코딩하는 상기 핵산은 SEQ ID NO: 24의 핵산 서열을 포함하거나, SEQ ID NO: 25의 아미노산 서열을 인코딩하는 것인 재조합 핵산.

**청구항 9**

아래의 핵산 서열을 포함하는 재조합 핵산:

(i) SEQ ID NO: 35의 경쇄 LCDR1, LCDR2, 및 LCDR3 영역을 포함하는 항체의 경쇄를 인코딩하는 핵산 서열로서,

LCDR1은 SEQ ID NO: 35 내에서 확인되는 아미노산 서열 SSVSY (SEQ ID NO: 56)으로 이루어지고,

LCDR2는 SEQ ID NO: 35 내에서 확인되는 아미노산 서열 STS (SEQ ID NO: 53)으로 이루어지고,

LCDR3는 SEQ ID NO: 35 내에서 확인되는 아미노산 서열 QQRSIYPPWT (SEQ ID NO: 57)로 이루어진 핵산 서열, 또는

(ii) SEQ ID NO: 37의 경쇄 LCDR1, LCDR2, 및 LCDR3 영역을 포함하는 항체의 경쇄를 인코딩하는 핵산 서열로서,

LCDR1은 SEQ ID NO: 37 내에서 확인되는 아미노산 서열 SSVSY (SEQ ID NO: 56)으로 이루어지고,

LCDR2는 SEQ ID NO: 37 내에서 확인되는 아미노산 서열 STS (SEQ ID NO: 53)으로 이루어지고,

LCDR3는 SEQ ID NO: 37 내에서 확인되는 아미노산 서열 QQRSNYPPWT (SEQ ID NO: 59)로 이루어진 핵산 서열, 또는

(iii) SEQ ID NO: 39의 경쇄 LCDR1, LCDR2, 및 LCDR3 영역을 포함하는 항체의 경쇄를 인코딩하는 핵산 서열로서,

LCDR1은 SEQ ID NO: 39 내에서 확인되는 아미노산 서열 SSVSY (SEQ ID NO: 56)으로 이루어지고,

LCDR2는 SEQ ID NO: 39 내에서 확인되는 아미노산 서열 STS (SEQ ID NO: 53)으로 이루어지고,

LCDR3는 SEQ ID NO: 39 내에서 확인되는 아미노산 서열 QQRSTYPPWT (SEQ ID NO: 62)로 이루어진 핵산 서열, 또는

(iv) SEQ ID NO: 41의 경쇄 LCDR1, LCDR2, 및 LCDR3 영역을 포함하는 항체의 경쇄를 인코딩하는 핵산

서열로서,

LCDR1은 SEQ ID NO: 41 내에서 확인되는 아미노산 서열 SSVNY (SEQ ID NO: 65)로 이루어지고,

LCDR2는 SEQ ID NO: 41 내에서 확인되는 아미노산 서열 STS (SEQ ID NO: 53)으로 이루어지고,

LCDR3는 SEQ ID NO: 41 내에서 확인되는 아미노산 서열 QQRNNYPPWT (SEQ ID NO: 66)으로 이루어진 핵산 서열.

**청구항 10**

제9항에 있어서, 상기 핵산 서열은 SEQ ID NO: 35, 37, 39 또는 41의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 인코딩하는 것인 재조합 핵산.

**청구항 11**

제9항에 있어서, 상기 재조합 핵산은 인간의 또는 쥐과의 경쇄 불변 영역을 포함하는 것인 재조합 핵산.

**청구항 12**

제11항에 있어서, 상기 인간의 경쇄 불변 영역을 인코딩하는 상기 핵산은 SEQ ID NO: 26의 핵산 서열을 포함하거나, SEQ ID NO: 27의 아미노산 서열을 인코딩하는 것인 재조합 핵산.

**청구항 13**

제5항 내지 제12항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 핵산 서열은 발현 조절 서열에 작동적으로 결합된 것인 재조합 핵산.

**청구항 14**

제13항에 있어서, 상기 발현 조절 서열은 원핵 또는 진핵 숙주 세포에서 발현을 가능하게 하는 것인 재조합 핵산.

**청구항 15**

(i) 제5항 내지 제8항 중 어느 하나의 항에 기재된 재조합 핵산, 및

(ii) 제9항 내지 제12항 중 어느 하나의 항에 기재된 재조합 핵산

을 포함하고, 상기 핵산은 CLDN6에 결합하는 항-CLDN6 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 인코딩하는 것인 재조합 세포.

**청구항 16**

제15항에 있어서, 상기 세포는 림프구 세포, 진핵 숙주 세포, CHO 세포, NS/0 세포, HEK293 세포, HEK293T 세포, 식물 세포, 곰팡이 세포, 수지상 세포, B 세포, COS 세포, K562 세포, HELA 세포, 이스트 세포 또는 곤충 세포인 것인 재조합 세포.

**청구항 17**

제16항에 있어서, 상기 세포는 CHO 세포인 것인 재조합 세포.

**청구항 18**

제15항에 기재된 재조합 세포로부터 얻어지는, CLDN6에 결합하는, 항-CLDN6 항체 또는 그의 항원 결합 단편.

**청구항 19**

아래의 단계를 포함하는 항체 생산 세포를 제조하는 방법:

a. (i) 제5항 내지 제8항 중 어느 하나의 항에 기재된 핵산, 및

(ii) 제9항 내지 제12항 중 어느 하나의 항에 기재된 핵산

을 포함하는 발현 벡터로 세포를 형질전환시키는 단계로서,

상기 핵산은, CLDN6에 결합하는, 항-CLDN6 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 인코딩하는 것인 단계; 및

b. 상기 형질전환된 세포를 수득하는 단계로서, 상기 형질전환된 세포는 항체의 중쇄를 인코딩하는 핵산 서열 및 항체의 경쇄를 인코딩하는 핵산 서열을 포함하는 것인 단계.

**청구항 20**

CLDN6에 결합하는, 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 생산하는 방법으로서, 상기 방법은:

a. 숙주 세포가 상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 발현하는 조건하에서, 하나 이상의 발현 벡터로 형질전환된 인간 숙주 세포를 배양하는 단계; 및

b. 상기 인간 숙주 세포에 의하여 발현된 상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편의 제조물을 수확하는 단계를 포함하고,

여기서, 상기 하나 이상의 발현 벡터는:

(i) 각각, SEQ ID NO: 34의 위치 26-33, 위치 51-58, 및 위치 97-106의 아미노산 서열을 갖는 상기 항체 중쇄 CDR1, CDR2, 및 CDR3 영역을 포함하는 폴리펩타이드를 인코딩하는 핵산 서열; 및

각각, SEQ ID NO: 35의 위치 27-31, 위치 49-51, 및 위치 88-97의 아미노산 서열을 갖는 상기 항체 경쇄 CDR1, CDR2, 및 CDR3 영역을 포함하는 폴리펩타이드를 인코딩하는 핵산 서열; 또는

(ii) 각각, SEQ ID NO: 36의 위치 26-33, 위치 51-58, 및 위치 97-106의 아미노산 서열을 갖는 상기 항체 중쇄 CDR1, CDR2, 및 CDR3 영역을 포함하는 폴리펩타이드를 인코딩하는 핵산 서열; 및

각각, SEQ ID NO: 37의 위치 27-31, 위치 49-51, 및 위치 88-97의 아미노산 서열을 갖는 상기 항체 경쇄 CDR1, CDR2, 및 CDR3 영역을 포함하는 폴리펩타이드를 인코딩하는 핵산 서열; 또는

(iii) 각각, SEQ ID NO: 38의 위치 26-33, 위치 51-58, 및 위치 97-106의 아미노산 서열을 갖는 상기 항체 중쇄 CDR1, CDR2, 및 CDR3 영역을 포함하는 폴리펩타이드를 인코딩하는 핵산 서열; 및

각각, SEQ ID NO: 39의 위치 27-31, 위치 49-51, 및 위치 88-97의 아미노산 서열을 갖는 상기 항체 경쇄 CDR1, CDR2, 및 CDR3 영역을 포함하는 폴리펩타이드를 인코딩하는 핵산 서열; 또는

(iv) 각각, SEQ ID NO: 40의 위치 26-33, 위치 51-58, 및 위치 97-106의 아미노산 서열을 갖는 상기 항체 중쇄 CDR1, CDR2, 및 CDR3 영역을 포함하는 폴리펩타이드를 인코딩하는 핵산 서열; 및

각각, SEQ ID NO: 41의 위치 27-31, 위치 49-51, 및 위치 88-97의 아미노산 서열을 갖는 상기 항체 경쇄 CDR1, CDR2, 및 CDR3 영역을 포함하는 폴리펩타이드를 인코딩하는 핵산 서열

을 포함하는 것인 방법.

**청구항 21**

제20항에 있어서, 상기 인간 숙주 세포는 HEK293 세포, HEK293T 세포, 수지상 세포, B 세포, K562 세포, HELA 세포, 또는 림프구 세포인 것인 방법.

**청구항 22**

제21항에 있어서, 상기 인간 숙주 세포는 B 세포인 것인 방법.

**청구항 23**

제20항에 있어서, 상기 발현 벡터는 프로모터 서열, 리더 서열, 번역 개시 서열, 경쇄 불변 영역, 중쇄 불변 영역, 3' 비번역 서열, 폴리아데닐레이션 서열, 또는 전사 종결 서열을 포함하는 것인 방법.

**청구항 24**

제20항 내지 제23항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 항원 결합 단편은 Fab, F(ab')2, Fv, 또는 단일 사슬 Fv인 것인 방법.

**청구항 25**

아래의 핵산 서열을 포함하는 재조합 핵산:

(i) 각각, SEQ ID NO: 34의 위치 26-33, 위치 51-58, 및 위치 97-106의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 CDR1, CDR2, 및 CDR3 영역을 포함하는 폴리펩타이드를 인코딩하는 핵산 서열; 또는

(ii) 각각, SEQ ID NO: 36의 위치 26-33, 위치 51-58, 및 위치 97-106의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 CDR1, CDR2, 및 CDR3 영역을 포함하는 폴리펩타이드를 인코딩하는 핵산 서열; 또는

(iii) 각각, SEQ ID NO: 38의 위치 26-33, 위치 51-58, 및 위치 97-106의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 CDR1, CDR2, 및 CDR3 영역을 포함하는 폴리펩타이드를 인코딩하는 핵산 서열; 또는

(iv) 각각, SEQ ID NO: 40의 위치 26-33, 위치 51-58, 및 위치 97-106의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 CDR1, CDR2, 및 CDR3 영역을 포함하는 폴리펩타이드를 인코딩하는 핵산 서열; 또는

(v) 각각, SEQ ID NO: 35의 위치 27-31, 위치 49-51, 및 위치 88-97의 아미노산 서열을 갖는 경쇄 CDR1, CDR2, 및 CDR3 영역을 포함하는 폴리펩타이드를 인코딩하는 핵산 서열; 또는

(vi) 각각, SEQ ID NO: 37의 위치 27-31, 위치 49-51, 및 위치 88-97의 아미노산 서열을 갖는 경쇄 CDR1, CDR2, 및 CDR3 영역을 포함하는 폴리펩타이드를 인코딩하는 핵산 서열; 또는

(vii) 각각, SEQ ID NO: 39의 위치 27-31, 위치 49-51, 및 위치 88-97의 아미노산 서열을 갖는 경쇄 CDR1, CDR2, 및 CDR3 영역을 포함하는 폴리펩타이드를 인코딩하는 핵산 서열; 또는

(viii) 각각, SEQ ID NO: 41의 위치 27-31, 위치 49-51, 및 위치 88-97의 아미노산 서열을 갖는 경쇄 CDR1, CDR2, 및 CDR3 영역을 포함하는 폴리펩타이드를 인코딩하는 핵산 서열.

**청구항 26**

제25항에 있어서, 상기 핵산 서열은 SEQ ID NO: 34, 36, 38 또는 40의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역을 인코딩하는 것인 재조합 핵산.

**청구항 27**

제25항에 있어서, 상기 핵산 서열은 SEQ ID NO: 35, 37, 39 또는 41의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 인코딩하는 것인 재조합 핵산.

**청구항 28**

제25항에 있어서, 상기 핵산 서열은 발현 조절 서열에 작동적으로 결합된 것인 재조합 핵산.

**청구항 29**

제25항 내지 제28항 중 어느 하나의 항에 기재된 재조합 핵산을 포함하는 재조합 인간 세포.

**청구항 30**

제29항에 있어서, 상기 세포는 HEK293 세포, HEK293T 세포, 수지상 세포, B 세포, K562 세포, HELA 세포, 또는 림프구 세포인 것인 재조합 인간 세포.

**청구항 31**

제25항 내지 제28항 중 어느 하나의 항에 기재된 재조합 핵산에 의하여 인코딩되는 폴리펩타이드.

**청구항 32**

제31항에 있어서, 면역글로불린 경첩 영역을 더 포함하는 것인 폴리펩타이드.

**청구항 33**

아래의 핵산 서열을 포함하는 재조합 핵산:

(i) SEQ ID NO: 34의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO: 35의 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 영역을 포함하는 폴리펩타이드를 인코딩하는 핵산; 또는

(ii) SEQ ID NO: 36의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO: 37의 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 영역을 포함하는 폴리펩타이드를 인코딩하는 핵산; 또는

(iii) SEQ ID NO: 38의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO: 39의 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 영역을 포함하는 폴리펩타이드를 인코딩하는 핵산; 또는

(iv) SEQ ID NO: 40의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO: 41의 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 영역을 포함하는 폴리펩타이드를 인코딩하는 핵산.

**청구항 34**

제33항에 있어서, 상기 핵산 서열은 발현 조절 서열에 작동적으로 결합된 것인 재조합 핵산.

**청구항 35**

아래의 핵산 서열을 포함하고, 상기 핵산 서열은 발현 조절 서열에 작동적으로 결합된 것인 재조합 인간 세포:

(i) SEQ ID NO: 34의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 영역을 포함하는 폴리펩타이드를 인코딩하는 핵산 서열 및 SEQ ID NO: 35의 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 영역을 포함하는 폴리펩타이드를 인코딩하는 핵산 서열; 또는

(ii) SEQ ID NO: 36의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 영역을 포함하는 폴리펩타이드를 인코딩하는 핵산 서열 및 SEQ ID NO: 37의 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 영역을 포함하는 폴리펩타이드를 인코딩하는 핵산 서열; 또는

(iii) SEQ ID NO: 38의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 영역을 포함하는 폴리펩타이드를 인코딩하는 핵산 서열 및 SEQ ID NO: 39의 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 영역을 포함하는 폴리펩타이드를 인코딩하는 핵산 서열; 또는

(iv) SEQ ID NO: 40의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 영역을 포함하는 폴리펩타이드를 인코딩하는 핵산 서열 및 SEQ ID NO: 41의 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 영역을 포함하는 폴리펩타이드를 인코딩하는 핵산 서열.

**청구항 36**

제35항에 있어서, 상기 세포는 HEK293 세포, HEK293T 세포, 수지상 세포, B 세포, K562 세포, HELA 세포, 또는 림프구 세포인 것인 재조합 인간 세포.

**청구항 37**

제33항 또는 제34항에 기재된 재조합 핵산에 의하여 인코딩되는 폴리펩타이드.

**청구항 38**

제37항에 있어서, 면역글로불린 경첩 영역을 더 포함하는 것인 폴리펩타이드.

**청구항 39**

제35항 또는 제36항에 기재된 재조합 인간 세포에 의하여 발현되는 항-CLDN6 항체로서, 상기 항체는 CLDN6에 결합하는 것인 항-CLDN6 항체.

**청구항 40**

제35항 또는 제36항에 기재된 재조합 인간 세포에 의하여 발현되는 항원 결합 단편으로서, 상기 항원 결합 단편은 CLDN6에 결합하는 것인 항원 결합 단편.

**청구항 41**

제40항에 있어서, 상기 항원 결합 단편은 Fab, F(ab')2, Fv, 또는 단일 사슬 Fv인 것인 항원 결합 단편.

**청구항 42**

제40항에 있어서, 상기 항원 결합 단편은 면역글로불린 경첩 영역에 융합된 것인 항원 결합 단편.

**청구항 43**

아래의 단계를 포함하는 재조합 진핵 숙주 세포를 제조하는 방법:

a. 제25항 내지 제28항, 제33항 및 제34항 중 어느 하나의 항에 기재된 재조합 핵산을 포함하는 발현 벡터로 진핵 세포를 형질전환시키는 단계; 및

b. 상기 형질전환된 세포를 수득하는 단계로서, 상기 형질전환된 세포는 상기 재조합 핵산을 포함하는 것인 단계.

**청구항 44**

제43항에 있어서, 상기 재조합 진핵 숙주 세포는 인간 세포인 것인 방법.

**청구항 45**

제44항에 있어서, 상기 인간 세포는 HEK293 세포, HEK293T 세포, 수지상 세포, B 세포, K562 세포, HELA 세포, 또는 림프구 세포인 것인 방법.

## *발명의 설명*

### *기 술 분 야*

[0001] 본 발명은 클라우딘 6 특이적 항체에 관한 것이다.

### *배 경 기 술*

[0002] 항체는 암 치료에의 사용을 위하여 임상에 성공적으로 도입되었으며, 지난 10년에 걸쳐 종양학에 있어 가장 전도 유망한 치료법으로 등장하였다.

[0003] 암에 대한 항체에 기초한 치료요법은 종래의 약물과 비교하여 높은 특이성 및 낮은 부작용 프로파일의 잠재성을 가진다. 그 이유는 항체에 의한 정상 및 종양성신생세포들 사이에 정밀한 구분과, 작용 모드가 세포독성의 면역세포들의 모집(recruitement) 및 보체 활성을 비롯한 적은 독성 면역 항종양 메커니즘에 의존한다는 사실이다.

[0004] 클라우딘(Claudin)은 상피조직 및 내피의 타이트 정션 내에 위치하는 내재성 막 단백질(integral membrane protein)이다. 클라우딘은 두 개의 세포외 루프를 가지는 4개의 막관통 단편과 세포질 내에 위치하는 N 및 C 말단을 포함하는 것으로 예상된다. 막관통 단백질의 클라우딘(CLDN) 패밀리는 상피조직 및 내피의 타이트 정션에 중요한 역할을 수행하고, 또한 세포 골격의 유지 및 세포 신호 전달에 중요한 역할을 할 수도 있다. 종양과 정상 세포 사이의 이러한 단백질 발현의 차이는, 그들의 멤브레인 위치에 더하여 그들을 암 면역치료에 있어 매력적인 표적으로 만들며, 암 치료법에 있어서 CLDN을 표적으로 하는 항체-기반 치료제를 사용하는 것은 높은 수준의 치료 특이성을 약속한다.

[0005] 그러나, CLDN-표적화 치료법의 임상적 적용은 수개의 장애물에 직면하고 있다. CLDN의 체내 도처에서의 발현 및 타이트 정션의 유지에 대한 CLDN의 중요한 역할은 전신 독성을 최소화하고 치료 특이성을 최대로 하기 위하여 CLDN-표적 치료법에 표적 특이성을 요구한다.

[0006] WO 2009/087978은 항-CLDN6 항체 및 항암제로서 그들의 사용에 관한 것이다. 특히 AB3-1, AE1-16, AE49-11, 및 AE3-20으로 명명된 단일클로날 항체가 기술되어 있다. 그러나, 이들 항체 중 그 어느 것도, 실시예 5에서 FACS 분석에 의해 보여지는 것과 같이 CLDN6에 특이적이지 못하다. 항체 AE3-20는 CLDN9와 반응하는 반면, 항체 AE1-16 및 AE49-11는 CLDN9와 상당한 반응성을 나타내었고 또한 CLDN4와도 반응하였다. 항체 AB3-1의 CLDN6에 대한 결합은 CLDN9에 대한 그것의 결합만큼이나 강력하였다. 이는 항체 AE49-11가 마우스 종양 모델에 투여되었을 때 종양 성장을 억제하고, 수명 연장 효과를 가지는 경향을 보였다고 실시예 7에 기술되어 있다. 그러나, 사용된 항체의 비특이성을 고려하면, 기술된 효과가 항체의 CLDN6에 대한 결합으로 인한 것인지는 분명하지 않다.

[0007] 따라서, 지금까지 CLDN6을 발현하는 세포의 표면에 선택적으로 결합하는 그 어떠한 CLDN6-특이적 항체도 기술된 바가 없다. 그러나, 그러한 특이적 항체는 CLDN6을 표적으로 사용하는 항체-기반 치료적 접근을 위하여 요구될 것이다.

[0008] 도 1에 나타난 CLDN3, CLDN4, CLDN6 및 CLDN9의 서열의 배열은 다른 클라우딘 단백질에 대한 CLDN6의 고도의 보

존성을 나타낸다. 이러한 CLDN6의 다른 클라우딘 단백질, 특히 CLDN9 및 CLDN4에 대한 높은 상동성과 WO 2009/087978가 CLDN6-특이적 항체를 제공하는데 실패하였다는 사실은 CLDN6에 특이적으로 결합하는 항체를 생산하는 것이 가능하지 않을 수도 있다는 것을 제시한다.

## *발명의 내용*

### *해결하려는 과제*

[0009] 본 명세서에 기술된 실험 결과들은 CLDN6가 정상 세포에서의 발현은 태반에 제한되는 반면에, 여러 인간 암 세포 내에서 발현된다는 것을 확인시켜 준다.

[0010] 게다가 본 발명은 CLDN6을 발현하는 온전한 세포의 표면에 결합할 수 있는 CLDN6-특이적 항체의 성공적인 생산을 최초로 기술한다. CLDN6을 발현하는 온전한 세포의 FACS 분석은 항-CLDN6 항체의 특이적 결합을 나타낸 반면에, 다른 클라우딘 단백질을 발현하는 세포, 특히 CLDN3, CLDN4 및 CLDN9, 또는 그 어떠한 이런 CLDN 단백질을 발현하지 않는 세포에의 결합은 관찰되지 않았다. 따라서, 본 발명은 예상치 않게도, CLDN6을 발현하는 세포의 표면 상에서 CLDN6와의 항체-항원 반응을 특이적으로 수행하지만, 고도로 상동성인 다른 클라우딘과는 항원-항체 반응을 실질적으로 수행하지 않는 항체를 생산할 수 있음을 보여준다.

[0011] 본 발명은 CLDN6를 발현하고, CLDN6와 세포 표면의 결합을 특징으로 하는 세포와 관련된 질병을 치료 및/또는 예방하는 치료법에 유용한 항체를 일반적으로 제공하는데, 상기 질병은 암-관련 질병, 특히 난소암, 특히 난소 선암 및 난소 기형암, 소세포 폐암(SCLC) 및 비소세포 폐암(NSCLC)을 포함하는 폐암, 특히 편평상피세포 암종 및 선암, 위암, 유방암, 간암, 췌장암, 피부암, 특히 기저 세포암 및 편평 세포암, 악성 흑색종, 두경부암, 특히 악성 다형성 선종, 육종, 특히 활막 육종 및 암육종, 담도암, 방광암, 특히 이행 세포 암종 및 유두상암, 신장암, 특히 투명세포 신세포암 및 유두상 신세포암을 포함하는 신세포 암, 결장암, 회장암을 포함하는 소장암, 특히 소장 선암 및 회장 선암, 고환 배아성 암종, 태반 융모 상피암, 자궁경부암, 고환암, 특히 고환 정상피종, 고환 기형종 및 배아성 고환암, 자궁암, 기형암 또는 배아암종과 같은 생식세포암, 특히 고환의 생식세포암, 및 이들의 전이 형태와 같은 암을 포함한다.

[0012] 하나의 관점에서, 본 발명은 CLDN6을 발현하는 세포의 표면에 결합된 CLDN6에 결합할 수 있는 항체와 관련된다. 좋기로는 상기 항체는 CLDN9를 발현하는 세포의 표면에 결합된 CLDN9와 실질적으로 결합할 수 없는 것이다. 좋기로는 상기 항체는 CLDN4를 발현하는 세포의 표면과 결합된 CLDN4에 실질적으로 결합할 수 없는 것이거나 및/또는 CLDN3을 발현하는 세포의 표면에 결합된 CLDN3에 실질적으로 결합할 수 없는 것이다. 가장 좋기로는 상기 항체는 CLDN 단백질을 발현하는 세포의 표면에 결합된 CLDN6를 제외한 CLDN 단백질에는 실질적으로 결합할 능력이 없는 것이고, CLDN6에 대하여 특이적인 것이다. 좋기로는 상기 CLDN 단백질을 발현하는 상기 세포는 온전한 것이고, 특히 비투과화(non-permeabilized)된 세포이고, 세포의 표면과 결합된 상기 CLDN 단백질은 천연의, 즉 변성되지 않은 형태를 가지는 것이다. 좋기로는 상기 항체는 그 자연 형태에서 CLDN6의 1 이상의 에피토프에 결합할 수 있다.

[0013] 일 구현예에서, 항체는 CLDN6의 세포외 부분 내에 위치한 에피토프에 결합할 수 있는 것인데, 여기서 상기 CLDN6의 세포외 부분은 좋기로는 SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 14 및 SEQ ID NO: 15 중 어느 하나로 이루어진 아미노산 서열을 포함하고, 좋기로는 SEQ ID NO: 6 또는 SEQ ID NO: 7로 이루어진 아미노산 서열, 더 좋기로는 SEQ ID NO: 6로 이루어진 아미노산 서열을 포함하는 것이다. 좋기로는 항체는 SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 14 및 SEQ ID NO: 15 중 어느 하나로 이루어진 아미노산 서열, 좋기로는 SEQ ID NO: 6 또는 SEQ ID NO: 7로 이루어진 아미노산 서열 이내에 위치한 에피토프와 결합할 수 있는 것이다.

[0014] 일 구현예에서, 항체는 Thr33, Phe35, Gly37, Ser39, Ile40 및 Leu151로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나, 좋기로는 2, 3, 4 또는 5와 같은 1 이상, 좋기로는 모든 아미노산과의 결합에 의하여, 좋기로는 Thr33, Phe35, Gly37, Ser39 및 Ile40로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나, 좋기로는 1이상, 좋기로는 모든 아마노산과의 결합에 의하여, 더 좋기로는 Phe35, Gly37, Ser39 및 Ile40으로 이루어지는 또는 Thr33, Phe35, Gly37 및 Ser39으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 적어도 하나, 좋기로는 1 이상, 좋기로는 모든 아미노산과의 결합에 의하여, 그리고 특히 Phe35, Gly37 및 Ser39으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 적어도 하나, 좋기로는 1이상, 더 좋기로는 모든 아미노산과의 결합에 의하여 CLDN6에 결합할 수 있는 것이다. 좋기로는 상기 항체는 Glu154, Ala155, Arg158 및 Gly161으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1 이상, 좋기로는 모든 아미노산과 결합하지 않으며, 좋기로는 Arg158 및 Gly161으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1 이상, 좋기로는 모든 아

미노산과 결합하지 않는 것이다.

[0015] 항체 및 CLDN6 사이의 결합, 특히 그 자연 형태에서의 결합을 아미노산의 알라닌 스캐닝 돌연변이 생성법에 의하여 분석할 수 있다. CLDN6 변이체에 특이적 단일클론 항체가 결합될 수 있는 능력을 평가할 수 있다. CLDN6 변이체에 특이적 단일클론 항체가 결합하지 못함은 변이된 아미노산이 중요한 접촉 잔기라는 것을 제안한다. 결합은 예를 들어 유세포 분석법으로 분석될 수 있다.

[0016] 일 구현예에서, 항체는 SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 14 및 SEQ ID NO: 15 중의 어느 하나의 아미노산 서열, 좋기로는 SEQ ID NO: 6 또는 SEQ ID NO: 7의 아미노산 서열을 가지는 펩타이드 또는 면역학적으로 동등한 펩타이드, 또는 상기 펩타이드를 발현하는 핵산 또는 숙주 세포를 사용하여 동물을 면역화하는 단계를 포함하는 방법에 의하여 얻을 수 있다.

[0017] 다른 구현예에서, 항체가 결합할 수 있는 능력이 있는 CLDN6는 SEQ ID NO: 2의 아미노산 서열 또는 SEQ ID NO: 8의 아미노산 서열을 가진다. 항체는 SEQ ID NO: 2의 아미노산 서열을 가지는 CLDN6에 결합할 수 있고, SEQ ID NO: 8의 아미노산 서열을 가지는 CLDN6에 결합할 수 있는 능력이 있는 것이 특히 바람직하다.

[0018] 일 구현예에서, 본 발명의 항체는 SEQ ID NOs: 34, 36, 38 및 40으로부터 선택되는 항체 중쇄 서열 또는 그 변이체의 CDR 서열들 중의 적어도 하나, 좋기로는 2개, 보다 좋기로는 3개 모두를 포함하는 항체 중쇄를 포함한다. CDR 서열은 도 25에 나타난 바와 같이 앞서 언급한 항체 중쇄 서열 내 박스에 의하여 표시된다.

[0019] 일 구현예에서, 본 발명의 항체는 CDR3 서열 Xaa1 Gly Xaa2 Val Xaa3을 포함하는 항체 중쇄를 포함하는데, 여기서 Xaa1는 임의의 아미노산, 좋기로는 방향족 아미노산, 보다 좋기로는 Phe 또는 Tyr, 가장 좋기로는 Tyr이고, Xaa2는 임의의 아미노산, 좋기로는 방향족 아미노산, 보다 좋기로는 Phe 또는 Tyr, 가장 좋기로는 Tyr이고, Xaa3은 임의의 아미노산, 좋기로는 Leu 또는 Phe, 보다 좋기로는 Leu이다. 일 구현예에서, 본 발명의 항체는 CDR3 서열 Asp Xaa1 Gly Xaa2 Val Xaa3 또는 Xaa1 Gly Xaa2 Val Xaa3 Asp을 포함하는 항체 중쇄를 포함하는데, 여기서 Xaa1, Xaa2 및 Xaa3는 상기 정의된 바와 같다. 일 구현예에서, 본 발명의 항체는 CDR3 서열 Asp Xaa1 Gly Xaa2 Val Xaa3 Asp을 포함하는 항체 중쇄를 포함하는데, 여기서 Xaa1, Xaa2 및 Xaa3는 상기 정의된 바와 같다. 일 구현예에서, 본 발명의 항체는 CDR3 서열 Ala Arg Asp Xaa1 Gly Xaa2 Val Xaa3 Asp Tyr을 포함하는 항체 중쇄를 포함하는데, 여기서 Xaa1, Xaa2 및 Xaa3는 상기 정의된 바와 같다. 일 구현예에서, 앞선 구현예들에 따른 항체는 SEQ ID NO: 47에 따른 CDR1 서열 또는 그 변이체 및/또는 SEQ ID NO: 48에 따른 CDR2 서열 또는 그 변이체를 포함하는 항체 중쇄를 포함한다.

[0020] 일 구현예에서, 본 발명의 항체는 SEQ ID NOs: 34, 36, 38 및 40로부터 선택되는 항체 중쇄 서열 또는 그 변이체를 포함하는 항체 중쇄를 포함한다.

[0021] 일 구현예에서, 본 발명의 항체는 SEQ ID NOs: 35, 37, 39 및 41로부터 선택되는 항체 경쇄 서열 또는 그 변이체의 CDR 서열들 중의 적어도 하나, 좋기로는 2개, 보다 좋기로는 3개 모두를 포함하는 항체 경쇄를 포함한다. CDR 서열은 도 26에 나타난 바와 같이 앞서 언급한 항체 경쇄 서열 내에 박스로 표시되어 있다.

[0022] 일 구현예에서, 본 발명의 항체는 CDR3 서열 Arg Xaa1 Xaa2 Xaa3 Pro을 포함하는 항체 경쇄를 포함하는데, 여기서 Xaa1는 임의의 아미노산, 좋기로는 Ser 또는 Asn, 가장 좋기로는 Ser이고, Xaa2는 임의의 아미노산, 좋기로는 Tyr, Ser, Ile, Asn 또는 Thr, 보다 좋기로는 Tyr, Ser, 또는 Asn, 가장 좋기로는 Asn이고, Xaa3는 임의의 아미노산, 좋기로는 Ser 또는 Tyr, 보다 좋기로는 Tyr이다. 일 구현예에서, 본 발명의 항체는 CDR3 서열 Gln Arg Xaa1 Xaa2 Xaa3 Pro Pro를 포함하는 항체 경쇄를 포함하는데, 여기서 Xaa1, Xaa2 및 Xaa3는 상기 정의된 바와 같다. 일 구현예에서, 본 발명의 항체는 CDR3 서열 Gln Gln Arg Xaa1 Xaa2 Xaa3 Pro Pro Trp Thr을 포함하는 항체 경쇄를 포함하는데, 여기서 Xaa1, Xaa2 및 Xaa3는 상기 정의된 바와 같다. 일 구현예에서, 상기 구현예들에 따른 항체는 SEQ ID NO: 52에 따른 CDR1 서열 또는 그의 변이체 및/또는 SEQ ID NO: 53에 따른 CDR2 서열 또는 그의 변이체를 포함한다.

[0023] 일 구현예에서, 본 발명의 항체는 SEQ ID NOs: 35, 37, 39 및 41로부터 선택되는 항체 경쇄 서열 또는 그 변이체를 포함하는 항체 경쇄를 포함한다.

[0024] 다양한 구현예에서, 본 발명에 따른 항체는 앞서 논의한 바와 같은 항체 중쇄 및 앞서 논의한 바와 같은 항체 경쇄를 포함한다.

[0025] 일 구현예에서, 본 발명의 항체는 다음을 포함한다:

[0026] (i) SEQ ID NO: x의 항체 중쇄 서열 또는 그 변이체의 CDR 서열들 중의 적어도 하나, 좋기로는 2개, 보다 좋기

로는 3개 모두를 포함하는 항체 중쇄, 및

[0027] (ii) SEQ ID NO: x+1의 항체 경쇄 서열 또는 그 변이체의 CDR 서열들 중의 적어도 하나, 좋기로는 2개, 보다 좋기로는 3개 모두를 포함하는 항체 경쇄;

[0028] 여기서 x는 34, 36, 38 및 40으로부터 선택된다.

[0029] CDR 서열들은 도 25 및 26에 각각 나타난 바와 같이 각각 앞서 언급한 항체 중쇄 서열 및 항체 경쇄 서열 내에 박스로 표시되어 있다.

[0030] 일 구현예에서, 본 발명의 항체는 다음을 포함한다:

[0031] (i) Xaa1 Gly Xaa2 Val Xaa3, Asp Xaa1 Gly Xaa2 Val Xaa3, Xaa1 Gly Xaa2 Val Xaa3 Asp, Asp Xaa1 Gly Xaa2 Val Xaa3 Asp, 및 Ala Arg Asp Xaa1 Gly Xaa2 Val Xaa3 Asp Tyr으로 구성된 군으부터 선택되는 CDR3 서열을 포함하는 항체 중쇄,

[0032] 여기서 Xaa1은 임의의 아미노산, 좋기로는 방향족 아미노산, 보다 좋기로는 Phe 또는 Tyr, 가장 좋기로는 Tyr이고, Xaa2는 임의의 아미노산, 좋기로는 방향족 아미노산, 보다 좋기로는 Phe 또는 Tyr, 가장 좋기로는 Tyr이고, Xaa3는 임의의 아미노산, 좋기로는 Leu 또는 Phe, 보다 좋기로는 Leu이고, 그리고

[0033] (ii) Arg Xaa1 Xaa2 Xaa3 Pro, Gln Arg Xaa1 Xaa2 Xaa3 Pro Pro, Gln Gln Arg Xaa1 Xaa2 Xaa3 Pro Pro Trp Thr으로 구성된 군으로부터 선택되는 CDR3 서열을 포함하는 항체 경쇄,

[0034] 여기서 Xaa1는 임의의 아미노산, 좋기로는 Ser 또는 Asn, 가장 좋기로는 Ser이고, Xaa2는 임의의 아미노산, 좋기로는 Tyr, Ser, Ile, Asn 또는 Thr, 보다 좋기로는 Tyr, Ser, 또는 Asn, 가장 좋기로는 Asn이고, Xaa3은 임의의 아미노산, 좋기로는 Ser 또는 Tyr, 가장 좋기로는 Tyr이다.

[0035] 일 구현예에서, 상기 구현예들에 따른 항체는 (i) SEQ ID NO: 47에 따르는 CDR1 서열 또는 그 변이체 및/또는 SEQ ID NO: 48에 따르는 CDR2 서열 또는 그 변이체를 포함하는 포함하는 항체 중쇄 및/또는 (ii) SEQ ID NO: 52에 따른 CDR1 서열 또는 그 변이체 및/또는 SEQ ID NO: 53에 따른 CDR2 서열 또는 그 변이체를 포함하는 항체 경쇄를 포함한다.

[0036] 일 구현예에서, 본 발명의 항체는 다음을 포함한다:

[0037] (i) SEQ ID NO: x의 항체 중쇄 서열 또는 그 변이체를 포함하는 항체 중쇄, 및

[0038] (ii) SEQ ID NO: x+1의 항체 경쇄 서열 또는 그 변이체를 포함하는 항체 경쇄,

[0039] 여기서 x는 34, 36, 38 및 40으로부터 선택된다.

[0040] 바람직한 구현예에서, 항체는 (i) CLDN6를 발현하는 세포 살해 활성, (ii) CLDN6를 발현하는 세포의 증식 억제 활성, (iii) CLDN6를 발현하는 세포의 콜로니 형성 억제 활성, (iv) 정착한 종양의 관해, 즉 크기의 감소, 좋기로는 완전한 감퇴, 즉 완전한 소멸을 매개하는 활성, (v) 종양의 형성 또는 재형성 억제 활성, 및 (vi) CLDN6을 발현하는 세포의 전이 억제 활성 중에서 선택되는 1종 이상의 활성을 갖는다. 따라서, 항체는 특히 환자에게 투여되는 경우 상술한 것의 1종 이상을 위하여 사용될 수 있다. 이와 같은 세포 살해 및/또는 세포의 1종 이상의 활동을 억제하는 활성은 본 명세서에 기술된 바와 같이 약학적으로 이용될 수 있다. 특히 세포의 살해, 세포 증식의 억제 및/또는 세포 콜로니 형성의 억제는 암의 전이를 포함하는 암을 치료 또는 예방하는데에 사용될 수 있다. 세포의 증식, 콜로니 형성 및/또는 전이의 억제는 특히 암 세포의 암 전이 및 전이성 전파를 치료하거나 예방하기 위하여 사용될 수 있다. 좋게는 본 발명의 항체는 보체 의존성 세포독성(CDC) 매개된 용해, 항체 의존성 세포 독성(ADCC) 매개된 용해, 아폽토시스, 동형 부착 및/또는 식균작용, 좋게는 CDC 매개된 용해 및/또는 ADCC 매개된 용해의 유도에 의해 세포들의 살해를 매개한다. 그러나, 본 발명은 항체가 보체 의존성 세포독성(CDC) 매개된 용해, 항체 의존성 세포 독성(ADCC) 매개된 용해, 아폽토시스, 동형 부착 및/또는 식균작용을 유도하지 않고도, 세포 살해 및/또는 1 이상의 세포 활성, 예컨대 세포 증식 및/또는 콜로니 형성의 억제와 같이, 본 명세서에 기술된 활성을 행사하는 구현예들도 포함한다. 예를 들어, 본 발명의 항체는 세포 표면 상의 CLDN6에 결합하고, 그리하여 즉 세포의 증식을 차단하는 것에 의한 단순한 효과를 또한 행사할 수 있다. 일 구현예에서, 본 발명의 항체는 세포의 CDC 매개 용해를 유도하지 않는다.

[0041] 좋게는 세포의 ADCC 매개 용해는 효과기 세포(effector cell)의 존재에서 일어나고, 특히 이것은 모노사이트, 단핵 세포, NK 세포 및 PMN들로 구성된 군에서 선택되고, 식세포작용은 대식세포에 의한다.

[0042] CLDN6를 발현하는 세포, 좋기로는 암 세포의 증식을 억제 또는 감소시키는 활성은 브로모디옥시유리딘(5-bromo-2-deoxyuridine, BrdU)를 사용하는 분석 중에서 CLDN6-발현 암 세포의 증식을 측정하여 인 비트로에서 측정될 수 있다. BrdU는 티미딘의 유사체인 합성의 뉴클레오타이드이고, DNA 복제 중에 티민을 대체하면서 복제 중인 (세포 사이클의 S 위상에 있는) 세포의 새롭게 합성된 DNA 속으로 혼입될 수 있다. 예컨대 BrdU에 특이적인 항체를 사용하여 혼입된 화합물이 탐지되는 것은 활발하게 DNA를 복제하고 있는 세포를 나타낸다.

[0043] CLDN6를 발현하는 세포, 좋기로는 암 세포의 콜로니 형성을 억제 또는 감소시키는 활성은 세포집락 측정법(clonogenic assay)에서 인 비트로 측정될 수 있다. 세포집락 측정법은 세포의 생존 및 증식에 대하여 특이적인 제제의 효능을 시험하기 위한 미생물학적 기법이다. 이는 종양 세포 증식에 대한 약물 또는 방사능의 효능을 시험하기 위하여 암 연구 실험실에서 빈번하게 사용된다. 실험은 다음의 3가지 주요 단계와 관련된다: (i) 세포, 특히 암 세포의 시료에 치료법을 적용하는 단계, (ii) 세포를 조직 배양 용기에 두는 단계 및 (iii) 세포를 성장하게 두는 단계. 생성된 콜로니를 고정시키고, 염색하고, 계수한다. 콜로니 형성은 개개의 종양 세포가 기관을 잠입하는 경우에 전이의 형성과 관련하여 중요하다. 항체의 억제 활성은 전이 형성을 억제하는 그들의 잠재력을 나타낸다. 세포집락 측정법에서 콜로니 형성을 억제하거나 감소시키는 활성을 가지는 항체는 암 세포, 특히 본 명세서에 기재된 종류의 암의 전이 및 전이성 전파를 치료하거나 예방하는데 특히 유용하다.

[0044] 바람직한 구현예에서, 항체는 그 자연적 형태에서 CLDN6을 전달하는 세포에 대하여 1 이상의 면역 효과기 기능을 나타내는데, 여기서 상기 1 이상의 면역 효과기 기능이란 좋기로는 보체 의존성 세포독성(CDC), 항체 의존성 세포 매개 독성(ADCC), 아폽토시스의 유도 및 증식의 억제로 구성된 군으로부터 선택되고, 좋기로는 상기 효과기 기능이란 ADCC 및/또는 CDC이다.

[0045] 좋기로는, 상기 1 이상의 활성 또는 상기 1 이상의 면역 효과기 기능은 상기 항체에 의하여 나타나는 것이고, 상기 항체의 CLDN6에, 좋기로는 CLDN6의 세포외 부분 내에 위치한 에피토프에 대한 결합에 의하여 유도되고, 여기서 상기 CLDN6의 세포외 부분은 좋기로는 SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 14 및 SEQ ID NO: 15 중 어느 하나의 아미노산 서열, 좋기로는 SEQ ID NO: 6 또는 SEQ ID NO: 7의 아미노산 서열, 더 좋기로는 SEQ ID NO: 6의 아미노산 서열을 포함한다.

[0046] 본 발명에 따를 때, CLDN6를 발현하는 세포는 좋기로는 그 세포 표면과 CLDN6의 결합을 그 특징으로 한다. 자연 형태에 있는 CLDN6을 발현하는 세포 또는 CLDN6를 전달하는 세포는 좋기로는 암 세포와 같은 종양세포이고, 좋기로는 난소암, 특히 난소 선암 및 난소 기형암, 소세포 폐암(SCLC) 및 비소세포 폐암(NSCLC)을 포함하는 폐암, 특히 편평상피세포 암종 및  선암, 위암, 유방암, 간암, 췌장암, 피부암, 특히 기저 세포암 및 편평 세포암, 악성 흑색종, 두경부암, 특히 악성 다형성 선종, 육종, 특히 활막 육종 및 암육종, 담도암, 방광암, 특히 이행 세포 암종 및 유두상암, 신장암, 특히 투명세포 신세포암 및 유두상 신세포암을 포함하는 신세포 암, 결장암, 회장암을 포함하는 소장암, 특히 소장 선암 및 회장 선암, 고환 배아성 암종, 태반 융모 상피암, 자궁경부암, 고환암, 특히 고환 정상피종, 고환 기형종 및 배아성 고환암, 자궁암, 기형암 또는 배아암종과 같은 생식세포암, 특히 고환의 생식세포암, 및 이들의 전이 형태로 이루어진 군으로부터 선택되는 암으로부터 유래한 암세포이다.

[0047] 본 발명의 항체는, 표적하는 세포 독성, 즉 종양 세포의 살해를 제공하기 위하여, 1 이상의 약학적 효과기 모이어티, 예컨대 방사능 표지, 사이토톡신, 약학적 효소, 아폽토시스를 유도하는 제제 등과 연결될 수 있다.

[0048] 일 구현예에서, 본 발명의 항체는 (i) CLDN6을 발현하고, CLDN6가 세포 표면에 부착된 것을 특징으로 하는 세포와 결합하고, (ii) CLDN6를 발현하지 않고, CLDN6가 세포 표면에 부착된 것을 특징으로 하지 않는 세포에는 결합하지 않는다. 본 발명의 항체는 좋기로는 CLDN6를 발현하고, CLDN6가 세포 표면에 부착된 것을 특징으로 하는 세포의 살해를 매개하거나 및/또는 증식을 억제하고, (ii) CLDN6를 발현하지 않고, CLDN6가 세포 표면에 부착된 것을 특징으로 하지 않는 세포를 살해하지 않으며 및/또는 그 증식을 억제하지 않는다.

[0049] 바람직한 구현예에서, 본 발명의 항체는 SEQ ID NOs: 6 또는 7의 것과 같이 살아있는 세포의 표면 상에 나타나는 CLDN6의 자연적인 에피토프에 결합한다. 다른 바람직한 구현예에서, 본 발명의 항체는 CLDN6-발현 암 세포에 대하여 특이적이며, CLDN6를 발현하지 않는 암 세포에는 결합하지 않는다.

[0050] 본 발명의 항체는 이것에 제한되는 것은 아니지만, 마우스, 래트, 래빗, 귀니아 피그 및 인간을 함유하는 상이한 종들로부터 유래될 수 있다. 본 발명의 항체는 하나의 종, 좋게는 인간으로부터 유래된 항체 불변 영역이 다른 종들로부터 유래된 항원 결합 사이트와 조합된 키메라 분자를 함유한다. 또한, 본 발명의 항체는 비인간 종들로부터 유래된 항체의 항원 결합 사이트가 인간 기원의 불변 및 뼈대(framework) 영역과 조합된 인간화된 분자를 함유한다.

[0051] 본 발명의 항체는 폴리클로날 및 모노클로날 항체를 함유하고, IgG2a(예컨대, IgG2a, κ, λ), IgG2b(예컨대, IgG2b, κ, λ), IgG3(예컨대, IgG3, κ, λ) 및 IgM 항체를 함유한다. 그러나, 다른 항체 이소타입(isotype)은 본 발명에 포함되고, IgG1, IgA1, IgA2, 분비 IgA, IgD, 및 IgE 항체를 함유한다. 항체는 전체 항체 또는 예컨대, Fab, $F(ab')_2$, Fv, 단일 사슬 Fv 단편들 또는 이중특이적(bispecific) 항체를 함유하는 그 항원 결합 단편일 수 있다. 또한, 항원 결합 단편은 (i) 면역글로불린 경첩(hinge) 부위 폴리펩타이드와 융합되는 (중쇄 가변 영역 또는 경쇄 가변 영역을 비롯한) 결합 도메인 폴리펩타이드, (ii) 경첩 부위에 융합된 면역 글로불린 중쇄 CH2 불변 영역, 및 (iii) CH2 불변 영역에 융합된 면역 글로불린 중쇄 CH3 불변 영역을 포함하는 결합-도메인 면역글로불린 융합 단백질을 함유한다. 그러한 결합-도메인 면역글로불린 융합 단백질은 US2003/0118592 및 US 2003/0133939에 추가적으로 개시된다.

[0052] 본 발명의 항체는 좋기로는 단일클론, 키메라, 인간 또는 인간화 항체 또는 항체의 단편이다. 본 발명의 항체는 완전한 인간 항체를 포함한다. 이와 같은 항체는 V-D-J 재조합 및 동형전환(isotype switching)을 받아 CLDN6에 대한 인간 단일 클론 항체의 다수의 이소타입을 생산할 수 있는 비-인간 형질전환 동물, 예컨대 형질전환 마우스에서 생산될 수 있다. 이와 같은 형질전환 동물은 US 2003/0017534에 개시된 것과 같은 폴리클론 항체를 생산하기 위한 형질전환 래빗일 수 있다.

[0053] 본 발명의 항체는 좋기로는 대략 1-100 nM 또는 그 미만의 해라 상수(KD)를 가지고, CLDN6로부터 해리된다. 좋기로는 본 발명의 항체는 관련된 세포-표면 항원과 교차 반응하지 않으며 따라서 그들의 기능을 억제하지 않는다.

[0054] 바람직한 구현예에서, 본 발명의 항체는 다음에 기술된 성질 중 1 이상을 그 특징으로 할 수 있다:

[0055] a) CLDN6에 대한 특이성;

[0056] b) CLDN6에 대한 결합친화성이 약 100 nM 또는 그 미만, 좋기로는 약 5-10 nM 또는 그 미만, 더 좋기로는 약 1-3 nM 또는 그 미만;

[0057] c) CLDN6를 발현하고 세포 표면에 CLDN6가 부착되어 있는 것을 특징으로 하는 세포의 CDC를 유도하는 능력;

[0058] d) CLDN6를 발현하고 세포 표면에 CLDN6가 부착되어 있는 것을 특징으로 하는 세포의 성장을 억제하는 능력;

[0059] e) CLDN6를 발현하고 세포 표면에 CLDN6가 부착되어 있는 것을 특징으로 하는 세포의 아폽토시스를 유도하는 능력;

[0060] f) CLDN6를 발현하고 세포 표면에 CLDN6가 부착되어 있는 것을 특징으로 하는 세포의 동형 접합(homotypic adhesion)을 유도하는 능력:

[0061] g) 효과기 세포의 존재 하에, CLDN6를 발현하고 세포 표면에 CLDN6가 부착되어 있는 것을 특징으로 하는 세포의 ADCC를 유도하는 능력;

[0062] h) CLDN6를 발현하고 세포 표면에 CLDN6가 부착되어 있는 것을 특징으로 하는 종양 세포를 가지는 대상체의 생존을 연장시키는 능력;

[0063] i) CLDN6를 발현하고 세포 표면에 CLDN6가 부착되어 있는 것을 특징으로 하는 종양 세포를 감소시키는 능력;

[0064] j) 살아있는 세포 표면 상의 CLDN6을 응집시키는 능력.

[0065] 본 명세서에 기술된 바람직한 항체는 DSMZ(Inhoffenstr. 7B, 38124 Braunschweig, Germany)에 기탁된 하이브리도마 세포에 의해 생산되거나 얻어질 수 있는 것이고, 아래 명칭 및 수탁 번호 중 하나를 가지는 항체이다:

[0066] 1. 2010년 6월 21일에 기탁된, GT512muMAB 59A, 수탁 번호 DSM ACC3067;

[0067] 2. 2010년 6월 21일에 기탁된, GT512muMAB 60A, 수탁 번호 DSM ACC3068;

[0068] 3. 2010년 6월 21일에 기탁된, GT512muMAB 61D, 수탁 번호 DSM ACC3069;

[0069] 4. 2010년 6월 21일에 기탁된, GT512muMAB 64A, 수탁 번호 DSM ACC3070;

[0070] 5. 2010년 6월 21일에 기탁된, GT512muMAB 65A, 수탁 번호 DSM ACC3071;

[0071] 6. 2010년 6월 21일에 기탁된, GT512muMAB 66B, 수탁 번호 DSM ACC3072;

[0072] 7. 2010년 6월 21일에 기탁된, GT512muMAB 67A, 수탁 번호 DSM ACC3073;

[0073] 8. 2010년 8월 31일에 기탁된, GT512muMAB 55A, 수탁 번호 DSM ACC3089; 또는

[0074] 9. 2010년 8월 31일에 기탁된, GT512muMAB 89A, 수탁 번호 DSM ACC3090.

[0075] 본 발명의 항체는 항체의 명칭을 언급하는 것에 의하여 및/또는 항체를 생산하는 클론(예컨대, muMAB 59A)을 언급하는 것에 의하여 본 명세서에 명명된다.

[0076] 다른 바람직한 항체는, 상기에서 기술한 하이브리도마로부터 생산되고 얻을 수 있는 항체, 특히 항원 결합 부분 또는 항원 결합 부위, 특히 앞서 기술한 하이브리도마로부터 생산되고 얻을 수 있는 항체의 그것과 동일하거나 고도의 상동성을 가지는 가변 영역을 포함하는 항체의 특이성을 갖는 것들이다.

[0077] 바람직한 항체란 앞서 기술된 하이브리도마로부터 생산되고 얻을 수 있는 항체의 영역과 동일하거나 고도의 상동성을 가지는 CDR 영역을 가지는 것들로 해석된다. "고도의 상동성"이란 1 내지 5개, 좋기로는 1 내지 3개 또는 1개 또는 2개와 같은 1 내지 4 개의 치환이 각각의 CDR 영역에 있을 수 있는 것으로 해석된다. 특히 바람직한 항체는 앞서 기술된 하이브리도마로부터 생산되고 얻을 수 있는 항체의 키메라 및 인간화 형태이다.

[0078] 따라서, 본 발명의 항체는 다음으로 구성된 군으로부터 선택되는 것일 수 있다: (i) 수탁 번호 DSM ACC3067(GT512muMAB 59A), DSM ACC3068(GT512muMAB 60A), DSM ACC3069(GT512muMAB 61D), DSM ACC3070(GT512muMAB 64A), DSM ACC3071(GT512muMAB 65A), DSM ACC3072(GT512muMAB 66B), DSM ACC3073(GT512muMAB 67A), DSM ACC3089(GT512muMAB 55A), 또는 DSM ACC3090(GT512muMAB 89A) 하에 기탁된 클론으로부터 생산되거나 얻을 수 있는 항체, (ii) (i)의 항체의 키메라 또는 인간화 형태인 것인 항체,

[0079] (iii) (i)의 항체의 특이성을 가지는 것인 항체, 및

[0080] (iv) (i)의 항체의 항원 결합 부분 또는 항원 결합 부위를 포함하는 것인 항체. (i)의 항체의 항원 결합 부분 또는 항원 결합 부위는 (i)의 항체의 가변 영역을 포함할 수 있다.

[0081] 본 발명은 또한 상기 기술된 항체를 생산하는 하이브리도마 세포와 같은 세포와 관련된다.

[0082] 바람직한 하이브리도마 세포는 DSMZ(Inhoffenstr. 7B, 38124 Braunschweig, Germany)에 기탁된 것들이며, 다음의 명칭 및 수탁 번호를 갖는다:

[0083] 1. 2010년 6월 21에 기탁된, GT512muMAB 59A, 수탁 번호 DSM ACC3067;

[0084] 2. 2010년 6월 21에 기탁된, GT512muMAB 60A, 수탁 번호 DSM ACC3068;

[0085] 3. 2010년 6월 21에 기탁된, GT512muMAB 61D, 수탁 번호 DSM ACC3069;

[0086] 4. 2010년 6월 21에 기탁된, GT512muMAB 64A, 수탁 번호 DSM ACC3070;

[0087] 5. 2010년 6월 21에 기탁된, GT512muMAB 65A, 수탁 번호 DSM ACC3071;

[0088] 6. 2010년 6월 21에 기탁된, GT512muMAB 66B, 수탁 번호 DSM ACC3072;

[0089] 7. 2010년 6월 21에 기탁된, GT512muMAB 67A, 수탁 번호 DSM ACC3073;

[0090] 8. 2010년 8월 31일에 기탁된, GT512muMAB 55A, 수탁 번호 DSM ACC3089; 또는

[0091] 9. 2010년 8월 31일에 기탁된, GT512muMAB 89A, 수탁 번호 DSM ACC3090.

[0092] 본 발명의 항-CLDN6 항체는 유도체화(derivatize)되고, 다른 결합 특이성(specificities)과 공동발현되거나 결합될 수 있다. 특정 구현예에서, 본 발명은 적어도 하나의 CLDN6를 위한 제1 결합 특이성(예컨대, 항-CLDN6 항체 또는 그 모방물(mimetic)) 및 Fc 수용체(예컨대, Fc-감마 RI를 비롯한 Fc-감마 수용체, 또는 다른 Fc 수용체) 또는 T세포 수용체, 예컨대, CD3를 위한 결합 특이성을 비롯한 효과기 세포에 대한 제2결합 특이성을 포함하는 이중특이성, 다중 특이성 분자를 제공한다.

[0093] 따라서, 본 발명은 CLDN6 및 Fc 수용체 또는 T 세포 수용체, 예컨대, CD3에 모두 결합하는 이중특이성 및 다중특이성 분자를 함유한다. Fc 수용체의 예들은 IgG 수용체, FcγRI(CD64), FcγRII(CD32), 및 FcγRIII(CD16)을 비롯한 Fc-감마 수용체(FcγR)이다. IgA 수용체(예컨대, FcαRI)를 비롯한 다른 Fc 수용체들 또한 표적될 수 있다. Fc 수용체는 좋게는 효과기 세포, 예컨대, 모노사이트, 대식세포 또는 활성화된 단핵 세포의 표면에 위치된다. 선호된 구현예에서, 이중특이성 및 다중 특이성 분자는 수용체의 면역글로불린 Fc(예컨대, IgG 또는 IgA)

결합 사이트로부터 구별되는 사이트에서 Fc 수용체와 결합한다. 그러므로, 이중특이성 및 다중특이성 분자는 면역글로불린의 생리학적 수준에 의해 차단되지 않는다.

[0094] 다른 면에서, 본 발명의 항-CLDN6 항체는 유도체화되고, 다른 기능적 분자, 예컨대, 다른 펩타이드 또는 단백질(예컨대, Fab' 단편)에 결합되거나 공동 발현된다. 예를들어, 본 발명의 항체는 다른 항체(예컨대, 이중특이성 또는 다중특이성 항체를 생산하기 위한), 세포독소(cytotoxin), 세포 리간드 또는 항원(면역독소를 비롯한 면역콘쥬게이트를 생산하기 위한)를 비롯한 하나 이상의 다른 분자적 실체(entities)에 기능적으로 결합(예컨대, 화학적 커플링, 유전자적 융합, 비공유적 조합 또는 다른)될 수 있다. 본 발명의 항체는 다른 치료적 모이어티(moieties) 예컨대, 방사성동위원소, 저분자 항암 약물, 재조합 사이토카인 또는 케모카인과 결합할 수 있다. 따라서, 본 발명은 다양한 항체 콘쥬게이트, 이중특이성 및 다중특이성 분자 및 융합 단백질을 포함하고, 이들 모두는 CLDN6 발현 세포 및/또는 CLDN6가 세포 표면에 부착되는 것을 특징으로 하는 세포에 결합하고, 그러한 세포들에 대해 다른 분자들을 표적화하는데 사용될 수 있다.

[0095] 일반적으로, 본 발명의 목적을 위한 본 명세서에 기술된 항체 컨주게이트, 이중특이성 및 다중특이성 분자, 융합 단백질과 같은 항체의 모든 유도체들은 용어 "항체"에 포함된다.

[0096] 다른 관점에서, 본 발명은 또한 비-면역글로불린 도메인으로부터 유래한 CLDN6-결합 단백질, 특히 단일쇄 단백질을 상정한다. 이와 같은 결합 단백질 및 그의 생산을 위한 방법이 예를 들어 브린쯔 등(Binz et al. (2005) Nature Biotechnology 23 (10): 1257-1268)에 기술되어 있는데, 이 내용은 참조로서 본 명세서에 혼입된다. 면역 글로불린 또는 결합 분자로부터 유래한 면역 글로불린과 관련하여 본 명세서에 기재된 가르침은 또한 상응하는 비-면역 글로불린 도메인으로부터 유래한 결합 분자에도 적용되는 것으로 이해될 것이다. 특히 이와 같은 비-면역 글로불린 도메인으로부터 유래한 결합분자를 이용하여, 상기 표적을 발현하고 세포 표면에 상기 표적이 부착된 것을 특징으로 하는 세포의 CLDN6를 차단하여, 그 결과 본 발명의 항체에 대하여 본 명세서에서 기술된 바와 같은 약학적 효과, 특히 증식과 같은 본 명세서에 기술된 종양 세포의 활성의 1 이상을 억제하는 것을 가능하게 한다. 비록 강제적인 것은 아니지만, 예컨대 항체의 Fc 영역에의 융합에 의하여 그와 같은 비-면역 글로불린 결합 분자에 항체의 효과기 기능을 부여하는 것이 가능하다.

[0097] 본 발명은 일반적으로 세포에 의해 발현되고 세포 표면에 부착되는 CLDN6를 표적화하는 것에 의하여, 질병 특히 종양 질병을 치료 및/또는 진단하는 것을 포괄한다. 이러한 방법은 그와 같은 세포의 선택적인 탐지 및/또는 근절을 제공하고, 이에 따라 CLDN6을 발현하지 않고 세포 표면에 CLDN6가 부착된 것을 특징으로 하지 않는 정상 세포에 대한 부작용을 최소화 한다. 치료 또는 진단을 위한 바람직한 질병은 종양 질병, 특히 본 명세서에 기술된 것들과 같은 암 질병과 같이, CLDN6를 발현하고 세포 표면에 CLDN6가 부착된 것을 특징으로 하는 세포와 관련된 것들이다.

[0098] 하나의 관점에서, 본 발명은 본 발명의 항체 또는 항체들의 조합을 포함하는 조성물, 예컨대 약학적 및 진단적 조성물/키트를 제공한다. 본 발명의 약학적 조성물은 약학적으로 허용가능한 담체를 포함할 수 있고, 1 이상의 보조제, 안정제 등을 임의로 포함할 수 있다. 특정 구현예에서, 조성물은 독특한 에피토프에 부착하거나, CDC 및/또는 ADCC를 유도 및 아폽토시스 유도와 같은 독특한 기능적 특성을 보유하는 항체들의 조합을 포함한다. 본 발명의 이러한 구현예에서, 항체들은 예컨대 2 이상의 항-CLDN6 단일클론 항체를 포함하는 약학적 조성물로서 조합되어 사용될 수 있다. 예를 들어, 원하는 약학적 효과를 달성하기 위하여, 다르지만 보완적인 활성을 가지는 항-CLDN6 항체들이 단일의 치료법 내에 조합될 수 있다. 바람직한 구현예에서, 조성물은 아폽토시스를 유도하는 다른 항-CLDN6 항체와 조합된, CDC를 매개하는 항-CLDN6 항체를 포함한다. 다른 구현예에서, 조성물은 CLDN6을 발현하고 세포 표면에 CLDN6가 부착된 것을 특징으로 하는 세포의 성장을 억제할 수 있는 다른 항-CLDN6 항체와 조합된, 효과기 세포의 존재하에서 표적 세포의 매우 효과적인 살해를 유도하는 항-CLDN6 항체를 포함한다.

[0099] 본 발명은 또한 본 발명의 항-CLDN6 항체 2 이상의 동시 또는 연속 투여를 포함하는데, 여기서 좋기로는 상기 항체 중 적어도 하나는 키메라 항-CLDN6 항체이고, 적어도 하나의 다른 항체는 인간 항-CLDN6항체이고, 상기 항체들은 CLDN6의 동일하거나 또는 상이한 에피토프에 결합하는 것이다. 좋기로는 본 발명의 키메라 CLDN6 항체가 우선 투여되고, 그 다음으로 본 발명의 인간 항-CLDN6 항체가 투여되는데, 여기서 인간 항-CLDN6 항체는 좋기로는 연장된 기간 동안, 즉 유지 치료법으로서 투여된다.

[0100] 본 발명의 항체, 컨주게이트, 이중 특이성/다중 특이성 분자 및 조성물은, 세포를 상기 항체, 컨주게이트, 이중특이성/다중 특이성 분자 및 조성물의 유효량과 접촉시켜, 세포의 성장이 억제되거나 및/또는 세포를 사멸시키게 하는 것에 의하여, CLDN6를 발현하고 세포 표면에 CLDN6가 부착된 것을 특징으로 하는 세포의 성장을 억제하

거나 및/또는 CLDN6를 발현하고 세포 표면에 CLDN6가 부착된 것을 특징으로 하는 세포를 선택적으로 살해하는 다양한 방법에 사용될 수 있다. 일 구현예에서, 상기 방법은, 임의로 효과기 세포의 존재 하에서, 예컨대 CDC, 아폽토시스, ADCC, 식균작용 또는 이들 기전의 2 이상의 조합에 의하여 CLDN6를 발현하고 세포 표면에 CLDN6가 부착된 것을 특징으로 하는 세포를 살해하는 것을 포함한다. 본 발명의 항체를 사용하여 억제되거나 살해될 수 있는 CLDN6를 발현하고 세포 표면에 CLDN6가 부착된 것을 특징으로 하는 세포는 암 세포를 포함한다.

[0101] 본 발명의 항체, 컨주게이트 및 이중 특이성/다중 특이성 분자 및 조성물은, 질병으로 고통받는 환자에 항체를 투여하는 것에 의하여, CLDN6를 발현하고 세포 표면에 CLDN6가 부착된 것을 특징으로 하는 세포와 관련된 다양한 질병을 치료 및/또는 예방하는데에 사용될 수 있다. 치료되거나(예컨대, 완화되거나) 또는 예방될 수 있는 예시적인 질병은 이에 제한되는 것은 아니지만, 종양 형성 질병을 포함한다. 치료 및/또는 예방될 수 있는 종양 형성 질병의 예는 난소암, 특히 난소 선암 및 난소 기형암, 소세포 폐암(SCLC) 및 비소세포 폐암(NSCLC)을 포함하는 폐암, 특히 편평상피세포 암종 및  선암, 위암, 유방암, 간암, 췌장암, 피부암, 특히 기저 세포암 및 편평 세포암, 악성 흑색종, 두경부암, 특히 악성 다형성 선종, 육종, 특히 활막 육종 및 암육종, 담도암, 방광암, 특히 이행 세포 암종 및 유두상암, 신장암, 특히 투명세포 신세포암 및 유두상 신세포암을 포함하는 신세포 암, 결장암, 회장암을 포함하는 소장암, 특히 소장 선암 및 회장 선암, 고환 배아성 암종, 태반 융모 상피암, 자궁경부암, 고환암, 특히 고환 정상피종, 고환 기형종 및 배아성 고환암, 자궁암, 기형암 또는 배아암종과 같은 생식세포암, 특히 고환의 생식세포암, 및 이들의 전이 형태와 같은 암 질병을 포함한다.

[0102] 본 발명의 또 다른 관점은, 본 발명의 항체, 컨주게이트, 이중 특이성/다중 특이성 분자 및 조성물을 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, CLDN6를 발현하고 세포 표면에 CLDN6가 부착된 것을 특징으로 하는 세포와 관련된 질병 또는 질환을 치료 또는 예방하는 방법에 관한 것이다. 상기 질병 또는 질환은 좋기로는 종양-관련 질병이고, 특정 구현예에서는 난소암, 특히 난소 선암 및 난소 기형암, 소세포 폐암(SCLC) 및 비소세포 폐암(NSCLC)을 포함하는 폐암, 특히 편평상피세포 암종 및  선암, 위암, 유방암, 간암, 췌장암, 피부암, 특히 기저 세포암 및 편평 세포암, 악성 흑색종, 두경부암, 특히 악성 다형성 선종, 육종, 특히 활막 육종 및 암육종, 담도암, 방광암, 특히 이행 세포 암종 및 유두상암, 신장암, 특히 투명세포 신세포암 및 유두상 신세포암을 포함하는 신세포암, 결장암, 회장암을 포함하는 소장암, 특히 소장 선암 및 회장 선암, 고환 배아성 암종, 태반 융모 상피암, 자궁경부암, 고환암, 특히 고환 정상피종, 고환 기형종 및 배아성 고환암, 자궁암, 기형암 또는 배아암종과 같은 생식세포암, 특히 고환의 생식세포암, 및 이들의 전이 형태로 구성된 군으로부터 선택된다. CLDN6는 좋기로는 상기 세포의 표면에서 발현된다.

[0103] 본 발명은 종양 질병의 예방 및/또는 약학적 치료를 위한, 즉 종양 질병을 갖거나 종양 질병이 발전될 위험이 있는 환자를 치료하기 위한, 본 명세서에 기술된 약제 및 조성물의 사용과 관련될 수 있다. 하나의 관점에서, 본 발명은 본 명세서에서 기술된 약제 및 조성물의 1 이상을 투여하는 것을 포함하는, 종양 성장을 억제하는 방법을 제공한다.

[0104] 좋기로는 본 명세서에서 기술된 약제 및 조성물은, 태반 조직 또는 태반과 같이, 조직 또는 기관이 CLDN6를 발현하고 세포 표면에 CLDN6가 부착된 것을 특징으로 하는 종양으로부터 자유로운 경우에, 약제학적으로 활성인 물질이 조직 또는 기관에 전달되지 않거나 또는 실질적으로 전달되지 않는 방식으로 투여된다. 이를 위하여, 본 명세서에서 기술된 약제 또는 조성물은 국소적으로 투여될 수 있다.

[0105] 하나의 관점에서, 본 발명은 본 명세서에서 기술된 치료법에 사용될 수 있는, 본 명세서에서 기술된 것과 같은 항체를 제공한다. 일 구현예에서, 본 발명은 본 명세서에서 기술된 치료법에 사용될 수 있는, 본 명세서에서 기술된 것과 같은 약학적 조성물을 제공한다.

[0106] 본 발명의 특별한 구현예에서, 항체가 투여될 대상은 화학치료제, 방사선, 또는 사이토카인을 비롯한 Fc 수용체, 예컨대, Fc-감마 수용체의 활성 또는 발현을 조절, 예컨대 증가하거나 억제하는 작용제로 추가적으로 처리될 수 있다. 치료중에 투여를 위한 전형적인 사이토카인은 G-CSF(granulocyte colony-stimulating factor), GM-CSF(granulocyte-macrophage colony-stimulating factor), IFN-γ(interferon- γ), 및 TNF(tumor necrosis factor)를 함유한다. 전형적인 치료제는 다른 것들, 독소루비신, 시스플라틴, 택소티어, 5-플루오르우라실, 메토트렉사트(methotrexat), 겜지타빈(gemzitabin), 및 시클로포스파미드(cyclophosphamide)를 비롯한 항종양제를 함유한다.

[0107] 또 다른 관점에서, 본 발명은 항체를 얻기 위하여 인간 CLDN6 또는 그의 펩타이드 단편으로 마우스와 같은 비-인간 동물을 면역화시키는 면역화 전략에 관한 것이다. 면역화를 위한 바람직한 펩타이드는 SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 14 및 SEQ ID NO: 15로 구성된 군으로부터 선택되는 것 및 면역학적으로 동등한 펩타이

드이다.

[0108] 와일드타입 뿐만 아니라 유전자이식 비인간 동물은 CLDN6 항원 또는 그 펩타이드 단편 및/또는 핵산 및/또는 CLDN6 또는 그 펩타이드 단편을 발현하는 세포들의 정제된 또는 부화 제제로 면역화될 수 있다. 좋게는, 유전자 재조합 비인간 동물은 V-D-J 재조합 및 아이소타입 스위칭(switching)을 거침에 의해 CLDN6에 대한 인간 모노클로날 항체들의 다중 아이소타입(예컨대, IgG, IgA 및/또는 IgM)을 생산할 수 있다. 아이소타입 스위칭은 예컨대, 전통적인 또는 비전통적인 아이소타입 스위칭에 의해 일어날 수 있다.

[0109] 따라서, 다른 면에서, 본 발명은 상기된 비인간 동물로부터의 분리된 B 세포들을 제공한다. 분리된 B 세포들은 그리고나서 본 발명의 항체의 소스 (예컨대, 하이브리도마)를 제공하기 위한 불사화된 세포들에 융합에 의해 불사화될 수 있다. 그러한 하이브리도마 (즉, 이것은 본 발명의 항체를 생산한다)는 또한 본 발명의 범위 내에 포함된다.

[0110] 또 다른 관점에서, 본 발명은 본 발명의 항체를 사용하여, 환자로부터 분리된 생물학적 시료 중의 CLDN6 또는 CLDN6를 발현하고 세포의 표면에 CLDN6이 부착된 것을 특징으로 하는 세포의 양을 탐지 및/또는 측정하는 것을 포함하는, 종양 질병을 진단, 탐지 또는 모니터링하는 방법에 관한 것이다. 상기 생물학적 시료는 종양 질병을 가지거나, 종양 질병에 걸리거나 가질 것으로 의심되거나 또는 종양 질병의 잠재력을 가진 환자로부터 분리될 수 있다.

[0111] 본 발명에 따른 종양 질병의 진단, 탐지 또는 모니터링하는 방법의 일 구현예에서, 생물학적 시료 및/또는 대조군/참조 시료는 종양 질병에 의한 영향에 관하여 진단, 탐지 또는 모니터링 할 조직 또는 기관에 대응하는 조직 또는 기관으로부터 유래된 것인데, 예컨대 진단, 탐지 또는 모니터링 할 종양 질병은 난소암이고, 생물학적 시료 및/또는 대조군/참조 시료는 난소 조직이다. 이와 같은 조직 및 기관은, 예를 들어 상이한 종양 질병 및 암과 관련되어 본 명세서에 기술된다.

[0112] 종양 질병을 진단, 탐지 또는 모니터링하는 방법의 일 구현예에서, 생물학적 시료는 CLDN6를 실질적으로 발현하지 않거나 세포 표면에 CLDN6가 실질적으로 부착된 것을 특징으로 하지 않는 종양이 없는 조직 또는 기관인 경우에, 조직 또는 기관으로부터 유래한 것이다. 좋기로는 상기 조직은 태반 조직이 아닌 조직이다.

[0113] 전형적으로, 생물학적 시료 중의 표적 분자의 레벨은 참조 레벨과 비교되는데, 여기서 상기 참조 레벨로부터 벗어나는 것은, 대상체 중에 종양 질병의 존재 및/또는 국면을 나타낸다. 참조 레벨은 대조군 시료(예컨대, 건강한 조직 또는 대상체로부터 유래한 것)에서 결정된 레벨 또는 건강한 대상체로부터의 중앙값일 수 있다. 상기 참조 레벨로부터 "벗어남"이란 적어도 10%, 20%, 또는 30%, 좋기로는 적어도 40% 또는 50%, 또는 그 이상으로 증가 또는 감소되는 것과 같은 현저한 변화를 나타낸다. 좋기로는, 상기 생물학적 시료 중의 CLDN6 또는 CLDN6을 발현하고 세포 표면에 CLDN6이 부착된 것을 특징으로 하는 세포의 존재, 및 CLDN6 또는 CLDN6을 발현하고 세포 표면에 CLDN6이 부착된 것을 특징으로 하는 세포의 참조 레벨과 비교하여 증가된 양은 종양 질병의 존재를 나타낸다.

[0114] 전형적으로, 본 발명이 방법에서 탐지 및/또는 양의 결정은, 표적 분자에 특이적으로 결합하는 표지된 항체의 사용과 관련된다.

[0115] 특정 관점에서, 본 발명은 탐지가능한 표지와 결합된 본 발명의 항체를 환자에게 투여하는 것을 포함하는, 탐지, 즉 종양 질병의 위치 또는 부위, 예컨대 특정 조직 또는 기관을 결정하는 방법에 관한 것이다. 상기 환자 중의 조직 또는 기관이 표지된 것은 상기 조직 또는 기관 중에 종양 질병의 존재 또는 위험을 나타낼 수 있다.

[0116] 본 명세서에 예시된 바와 같이, 본 발명의 항체는 항체를 발현하는 하이브리도마로부터 직접적으로 얻을 수 있으며, 또는 숙주 세포(예컨대 CHO 세포 또는 림프구 세포) 중에 클로닝되어 재조합적으로 발현될 수 있다. 숙주 세포의 추가 예시로는 대장균과 같은 균류, 이스트 등의 미생물이 있다. 아니면, 이들은 재조합된 비-인간 동물 또는 식물 중에서 재조합적으로 생산될 수 있다. 그러나, 본 발명은 또한 본 명세서에 기술된 면역화 전략을 사용하여, 항체가 면역화 또는 백신화하는 것에 의하여 항체가 환자 중에서 인 시투 방식으로 생산되는 구현예를 상정한다.

[0117] 본 발명은 여기에 개시된 항체 또는 그 일부, 예컨대, 항체 사슬을 코딩하는 핵산 서열 또는 유전자를 포함하는 핵산에 관한 것이다. 핵산은 벡터, 예컨대, 플라스미드, 코스미드, 바이러스, 박테리오파지 또는 예컨대, 유전공학에서 통상적으로 사용된 다른 벡터에 포함될 수 있다. 벡터는 적절한 숙주세포 및 적절한 조건하에 벡터의 선택을 허용하는 마커 유전자로써 추가적인 유전자를 포함할 수 있다. 또한, 벡터는 적절한 숙주에서 코딩 영역의 적절한 발현을 허용하는 발현 조절 요소를 포함할 수 있다. 그러한 조절 요소는 당업자에게 알려져있고, 프

로모터, 스플라이스 카세트 및 번역 개시 코돈을 함유할 수 있다.

[0118] 좋게는, 본 발명의 핵산은 진핵 또는 원핵 세포들에서 발현하게 하는 상기 발현 조절 서열에 작동적으로 결합된다. 진핵 세포 또는 원핵 세포에서 발현을 보증하는 조절 요소는 기술분야에 잘 알려져 있다.

[0119] 발현을 일으키거나 이루기 위해, 선택된 숙주 세포에 적절히 도입되기 위한 상기 핵산 분자를 포함하는 벡터구축을 위한 본 발명에 따른 핵산 분자를 구축하기 위한 방법은 기술분야에 잘 알려져있다.

[0120] 본 발명의 추가적인 면은 여기에 개시된 핵산 또는 벡터를 포함하는 숙주세포에 관한 것이다.

[0121] 본 발명의 다른 특징 및 잇점은 후술하는 상세한 설명 및 청구항들로부터 명백해질 것이다.

## *과제의 해결 수단*

[0122] **용어의 정의**

[0123] 본 발명이 보다 용이하게 이해될 수 있게 하기 위하여, 우선 특정 용어를 정의한다. 추가적인 정의는 발명의 상세한 설명의 전반에 걸쳐 기재되어 있다.

[0124] 이 명세서 및 뒤이은 청구항 전반에 걸쳐서, 문맥이 다르게 요구하지 않는 한, 단어 "포함" 및 "포함한다" 및 "포함하는"과 같은 변형은 언급된 멤버, 멤버의 정수 또는 단계 또는 그룹, 정수들, 단계들 또는 그룹들을 포함하는 것을 함축하는 것으로 이해될 것이고, 다른 멤버, 멤버의 다른 정수 또는 단계 또는 그룹들, 정수들 또는 단계들을 배제하는 것으로 이해되서는 안 된다. 발명을 기술하는 문맥(특히 청구항의 문맥)에서 사용되는 용어 "일" 및 "하나" 및 "그" 및 유사한 언급은, 본 명세서에 다르게 지시되거나 문맥에 의해 명백히 모순되는 것이 아닌 한, 단수 및 복수 모두를 커버하는 것을 해석될 것이다. 본 명세서에서 값의 범위의 인용은, 그 범위 이내에 속하는 각각의 분리된 값을 개별적으로 언급하는 것을 단지 속기의 방법으로 제공하기 위해 의도된 것이다. 본 명세서에서 다르게 지시하지 않는 한, 각각의 개별 값은 그들이 마치 본 명세서에 개별적으로 언급된 것과 같이 본 명세서에 혼입된다. 본 명세서에 기술된 모든 방법은, 본 명세서에 다르게 지시되거나, 문맥에 의해 명백히 모순되는 것이 아닌 한, 적절한 임의의 순서로 수행될 수 있다. 본 명세서에 제공된 임의의 및 모든 예시 또는 예시적인 언어(예컨대, "와 같은")의 사용은 단지 발명을 더 잘 기술하려는 의도일 뿐이고, 다르게 청구되는 발명의 범위에 제한을 가하고자 하는 의도가 아니다. 명세서에 사용된 그 어떠한 언어도, 발명의 실행에 필수적인 임의의 비-청구된 요소를 지시하는 것으로 해석되어서는 아니 된다.

[0125] 클라우딘은 타이트 정션의 가장 중요한 성분인 단백질의 일 족인데, 여기서 그들은 상피의 세포들 간의 세포 내 공간 중에서 분자의 흐름을 조절하는 세포간(paracellular) 장벽을 이룬다. 클라우딘은 그 N-말단 및 C-말단이 모두 세포질 내에 존재하면서 멤브레인을 4회 가로지르는 막통과 단백질이다. 제1의 세포외 루프는 평균 53개 아미노산으로 이루어지고, 제2의 것은 약 24개의 아미노산으로 이루어진다. CLDN6 및 CLDN9는 CLDN 패밀리의 가장 유사한 멤버이다.

[0126] 본 명세서에서 사용되는 용어 "CLDN"는 클라우딘을 의미하고, CLDN6, CLDN9, CLDN4 및 CLDN3을 포함한다. 좋기로는 CLDN은 인간 CLDN이다.

[0127] 용어 "CLDN6"는 좋기로는 인간 CLDN6와 관련되고, 특히 (i) SEQ ID NO: 1의 핵산 서열을 포함하는 핵산과 같이, SEQ ID NO: 2의 아미노산 서열을 인코딩하거나 SEQ ID NO: 8의 아미노산 서열을 인코딩하는 핵산 서열을 포함하는 핵산, 또는 (ii) SEQ ID NO: 2의 아미노산 서열을 포함하거나 또는 SEQ ID NO: 8의 아미노산 서열을 포함하는 단백질과 관련된다. CLDN6의 제1의 세포외 루프는, SEQ ID NO: 7에 나타난 아미노산 서열과 같이, SEQ ID NO: 2에 나타난 아미노산 서열 또는 SEQ ID NO: 8에 나타난 아미노산 서열의 좋기로는 28 내지 80번째 아미노산, 보다 좋기로는 28 내지 76번째 아미노산을 포함한다. CLDN6의 제2의 세포외 루프는 SEQ ID NO: 6에 나타난 아미노산 서열과 같이, SEQ ID NO: 2에 나타난 아미노산 서열 또는 SEQ ID NO: 8에 나타난 아미노산 서열의 138 내지 160번째 아미노산, 좋기로는 141 내지 159 아미노산, 보다 좋기로는 145 내지 157번째 아미노산을 바람직하게 포함한다. 상기 제1 및 제2의 세포외 루프는 좋기로는 CLDN6의 세포외 부분을 형성한다.

[0128] 용어 "CLDN9"는 좋기로는 인간 CLDN9과 관련되고, 특히 (i) SEQ ID NO: 9의 아미노산 서열을 인코딩하는 핵산 서열을 포함하는 핵산 또는 (ii) SEQ ID NO: 9의 아미노산 서열을 포함하는 단백질에 관한 것이다. CLDN9의 제1의 세포외 루프는 SEQ ID NO: 9에 나타난 아미노산 서열의 28 내지 76번째 아미노산을 바람직하게 포함한다. CLDN9의 제2의 세포외 루프는 SEQ ID NO: 9에서 나타난 아미노산 서열의 141 내지 159번째 아미노산을 바람직하게 포함한다. 상기 제1 및 제2의 세포외 루프는 CLDN9의 세포외 부분을 바람직하게 형성한다.

[0129] 용어 "CLDN4"는 좋기로는 인간 CLDN4와 관련되고, 특히 (i) SEQ ID NO: 10의 아미노산 서열을 인코딩하는 핵산 서열을 포함하는 핵산 또는 (ii) SEQ ID NO: 10의 아미노산 서열을 포함하는 단백질에 관한 것이다. CLDN4의 제1의 세포외 루프는 SEQ ID NO: 10에 나타난 아미노산 서열의 28 내지 76번째 아미노산을 바람직하게 포함한다. CLDN4의 제2의 세포외 루프는 SEQ ID NO: 10에 나타난 아미노산 서열의 141 내지 159번째 아미노산 서열을 바람직하게 포함한다. 상기 제1 및 제2의 세포외 루프는 CLDN4의 세포외 부위를 바람직하게 형성한다.

[0130] 용어 "CLDN3"는 좋기로는 인간 CLDN3에 관련된 것이고, 특히 (i) SEQ ID NO: 11의 아미노산 서열에 의해 인코딩하는 핵산 서열을 포함하는 핵산 또는 (ii) SEQ ID NO: 11의 아미노산 서열을 포함하는 단백질에 관한 것이다. CLDN3의 제1의 세포외 루프는 SEQ ID NO: 11으로 나타난 아미노산 서열의 27 내지 75번째 아미노산을 바람직하게 포함한다. CLDN3의 제2의 세포외 루프는 SEQ ID NO: 11으로 나타난 아미노산 서열의 140 내지 158번째 아미노산을 바람직하게 포함한다. 상기 제1 및 제2의 세포외 루프는 CLDN3의 세포외 부위를 바람직하게 형성한다.

[0131] 앞서 기술한 CLDN 서열들은 상기 서열의 임의의 변이체를 포함하는데, 특히, 돌연변이, 스플라이스 변이체, 입체 이성질체, 이소형태, 대립성 변이체, 종 변이체 및 종 상동체(species homolog), 특히 자연적으로 존재하는 것들을 포함한다. 대립성 변이체는 유전자의 정상 서열 중의 변경과 관련되는데, 그 중요성은 종종 불분명하다. 완전한 유전자 시퀀싱은 종종 주어진 유전자의 수많은 대립성 변이체를 동정한다. 종 상동체는 주어진 핵산 또는 아미노산 서열의 것과 상이한 종 출처를 가지는 핵산 또는 아미노산 서열이다. 용어 "CLDN"는 (i) CLDN 스플라이스 변이체, (ii) 특히 N-글리코실화 상태와 같은 상이한 글리코실화를 가지는 변이체를 포함하는 CLDN-번역 후 변형 변이체, (iii) CLDN 입체 형태 변이체, (iv) CLDN 암 관련 및 CLDN 비-암 관련 변이체를 포괄하는 것이어야 한다. CLDN는 좋기로는 자연 형태로 존재한다.

[0132] CLDN6는 예를 들어, 난소암, 폐암, 위암, 유방암, 간암, 췌장암, 피부암, 멜라노마, 두경부암, 육종, 담관암, 신세포암 및 방광암 중에서 발현되는 것으로 발견되었다. CLDN6는 특히 난소암, 특히 난소 선암 및 난소 기형암, 소세포 폐암(SCLC) 및 비소세포 폐암(NSCLC)을 포함하는 폐암, 특히 편평상피세포 암종 및 선암, 위암, 유방암, 간암, 췌장암, 피부암, 특히 기저 세포암 및 편평 세포암, 악성 흑색종, 두경부암, 특히 악성 다형성 선종, 육종, 특히 활막 육종 및 암육종, 담도암, 방광암, 특히 이행 세포 암종 및 유두상암, 신장암, 특히 투명세포 신세포암 및 유두상 신세포암을 포함하는 신세포 암, 결장암, 회장암을 포함하는 소장암, 특히 소장 선암 및 회장 선암, 고환 배아성 암종, 태반 융모 상피암, 자궁경부암, 고환암, 특히 고환 정상피종, 고환 기형종 및 배아성 고환암, 자궁암, 기형암 또는 배아암종과 같은 생식세포암, 특히 고환의 생식세포암, 및 이들의 전이 형태를 예방 및/또는 치료하기 위한 특히 바람직한 표적이다. 일 구현예에서 CLDN6의 발현과 관련된 암 질병은 난소암, 폐암, 전이성 난소암 및 전이성 폐암으로 구성된 군으로부터 선택된다. 난소암은 좋기로는 암종 또는 선암종이다. 폐암은 좋기로는 암종 또는 선암종이고, 좋기로는 기관지 암종 또는 기관지 선암종과 같은 기관지암이다. 일 구현예에서, CLDN6의 발현과 관련된 종양 세포는 암과 같은 세포이다.

[0133] 용어 "부분"은 단편을 의미한다. 아미노산 서열 또는 단백질과 같은 특정 구조와 관련하여, 상기 용어 그것의 "부분"은 상기 구조의 연속된 또는 불연속된 단편을 의미할 수 있다. 좋기로는 아미노산의 부분이란 상기 아미노산 서열의 아미노산의 적어도 1%, 적어도 5%, 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 30%, 좋기로는 적어도 40%, 좋기로는 적어도 50%, 보다 좋기로는 적어도 60%, 보다 좋기로는 적어도 70%, 더욱 보다 좋기로는 적어도 80%, 그리고 가장 좋기로는 적어도 90%을 포함한다. 바람직하게는 만일 부분이 불연속된 단편이라면, 상기 불연속된 단편은 구조의 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 또는 더 많은 일부분으로 구성되며, 각각의 일부분은 상기 구조의 연속된 요소이다. 예를 들어, 아미노산 서열의 불연속된 단편은 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 또는 그 이상, 좋기로는 상기 아미노산 서열의 4 일부분보다 많지 않은 것으로 구성될 수 있는데, 여기서 각각의 일부분은 상기 아미노산 서열의 적어도 5개의 연속된 아미노산, 적어도 10개의 연속된 아미노산, 좋기로는 적어도 20개의 연속된 아미노산, 좋기로는 적어도 30개의 연속된 아미노산을 바람직하게 포함한다.

[0134] 용어 "일부분" 및 "단편"은 본 명세서에서 교환적으로 사용될 수 있고, 연속된 요소를 의미한다. 예를 들어, 아미노산 서열 또는 단백질과 같은 구조의 부분은 상기 구조의 연속된 요소를 의미한다. 구조의 부분, 일부분 또는 단편은 상기 구조의 1 이상의 기능적 성질을 바람직하게 포함한다. 예를 들어, 에피토프 또는 펩타이드의 부분, 일부분, 단편은 좋기로는 그것이 유래된 에피토프 또는 펩타이드와 면역학적으로 동등하다.

[0135] 본 발명의 문맥 중에서 용어 "CLDN의 세포외 부분"는 세포의 세포외 공간을 마주하는 CLDN의 부분, 바람직하게는 상기 세포의 외부로부터의 접근, 즉 세포의 외부에 위치한 항체에 의한 접근이 가능한 부분을 언급한다. 좋기로는 상기 용어는 CLDN에 바람직하게 특이적인 CLDN의 1 이상의 세포외 루프 또는 그 일부 또는 다른 임의의 세포외 부위를 언급한다. 좋기로는, 상기 일부분은 적어도 5, 적어도 8, 적어도 10, 적어도 15, 적어도 20, 적

어도 30, 또는 적어도 50개 아미노산 또는 그 이상을 포함한다.

[0136] 용어 "세포의 표면에 부착된 CLDN"란 상대적으로 자연의 CLDN, 즉 변성되지 않은 상태의 CLDN, 좋기로는 자연적으로 접혀진 상태의 CLDN와 관련된 것으로 이해되어야 할 것이다. 좋기로는, 용어 "세포의 표면에 부착된 CLDN"란 CLDN가 상기 세포와 결합되어 있고 상기 세포의 세포막에 위치하고 있음을 의미하는데, 여기서 적어도 CLDN의 일부분, 좋기로는 세포외 부분은 상기 세포의 세포외 공간을 향하고 상기 세포의 외부로부터, 예컨대 세포의 외각에 외치한 항체에 의한 접근이 가능하다. 상기 부착은 직접적 또는 간접적일 수 있다. 예를 들어, 부착은 1 이상의 막통과 도메인, 1 이상의 지방 앵커에 의하여, 및/또는 다른 임의의 단백질, 지방, 당류, 또는 세포의 세포막의 외부 잎상에서 발견될 수 있는 다른 구조와의 상호 작용에 의하여 이루어질 수 있다. 예를 들어 세포의 표면에 부착된 CLDN는 세포외 부분을 가지는 막투과 단백질, 즉 막관통 단백질(integral membrane protein)이거나, 또는 막투과 단백질인 다른 단백질과의 상호 작용에 의하여 세포의 표면에 부착된 단백질일 수 있다.

[0137] CLDN6은 그것이 세포 표면에 위치하는 경우 표면과 결합되어 있고, 세포에 첨가된 CLDN6-특이적 항체 결합에 접근성이 있다. 바람직한 구현예에서 세포 표면에 CLDN6가 부착된 것을 특징으로 하는 세포는 CLDN6를 발현하는 세포이다. CLDN6가 세포에 의하여 발현되는 경우, 상기 세포의 표면에 결합된 CLDN6는 발현된 CLDN6의 오직 부분일 수도 있는 것으로 이해될 것이다.

[0138] 용어 "CLDN를 전달하는 세포"는 바람직하게는 상기 세포가 그 표면 상에서 CLDN를 전달하는 것, 즉 CLDN가 상기 세포의 표면에 결합된 것을 의미한다.

[0139] "세포 표면" 또는 "세포의 표면"은 당업계의 일반적 의미에 따라 사용되고, 단백질 또는 다른 분자의 결합에 접근 가능한 세포의 외부를 포함한다.

[0140] 표현 "세포의 표면에서 발현되는 CLDN"는 세포에 의하여 발현되는 CLDN가 상기 세포의 표면과 결합되어 발견되는 것을 의미한다.

[0141] 본 발명에 따를 때, 그 발현 및 결합의 레벨이 태반 세포 또는 태반 조직의 발현 및 결합과 비교하여 더 낮은 경우, CLDN6는 세포 중에서 실질적으로 발현되지 않으며, 세포의 표면과 실질적으로 결합되지 않는다. 바람직하게는, 상기 발현 및 결합의 레벨은 태반 세포 또는 태반 조직에서의 발현 및 결합의 10% 미만, 좋기로는 5%, 3%, 2%, 1%, 0.5%, 0.1% 또는 0.05% 미만 또는 심지어 더 낮은 값이다. 좋기로는 그 발현 및 결합의 레벨이 태반 조직이 아닌 비종양성, 비암성 조직에서의 발현 및 결합을 2배 이하, 좋기로는 1.5배 이하로 초과하는 경우, 좋기로는 상기 비종양성, 비암성 조직에서의 발현 및 결합의 레벨을 초과하지 않는 경우, CLDN6는 세포 내에서 실질적으로 발현되지 않으며, 세포 표면과 실질적으로 결합되지 않는다. 좋기로는 발현 또는 결합의 레벨이 탐지 한계 아래이거나 및/또는 발현 또는 결합의 레벨이 세포에 첨가된 CLDN6-특이적 항체에 의한 결합을 허여하기에 지나치게 낮은 경우, CLDN6는 세포 내에서 실질적으로 발현되지 않으며, 세포 표면과 실질적으로 결합되지 않는다.

[0142] 본 발명에 따를 때, CLDN6의 발현 및 결합의 레벨이 태반 조직이 아닌 비종양성, 비암성 세포 내의 발현 및 결합의 레벨을 초과하는 경우, 좋기로는 2배보다 많이, 좋기로는 10-배, 100-배, 1000-배, 또는 10000-배 보다 많이 초과하는 경우, CLDN6는 세포 내에서 발현되며, 세포 표면에 부착된다. 좋기로는 CLDN6의 발현 및 결합의 레벨이 탐지 한계보다 높거나 및/또는 그 발현 및 결합이 세포에 첨가된 CLDN6-특이적 항체의 결합을 허여할 정도로 충분히 높은 경우에, CLDN6는 세포 내에서 발현되고 세포의 표면에 부착된다. 좋기로는 세포 내 발현되는 CLDN6는 상기 세포의 세포 표면 상에서 발현 및 노출된다.

[0143] 용어 "라프트(raft)"는 세포의 세포막의 외부 잎 영역 중에 위치하는 스핑고리피드- 및 콜레스테롤이 풍부한 막 마이크로도메인을 의미한다. 특정 단백질이 이와 같은 도메인에 결합하는 능력 및 "응집체" 또는 "병소 응집체"를 형성하는 그 능력은 단백질의 기능에 영향을 줄 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 항체가 결합된 후에, CLDN6 분자를 그와 같은 구조 속으로 이동시키는 것은 세포막 중에서  고밀도의 CLDN6 항원-항체 복합체를 형성한다. 이와 같은 고밀도의 항원-항체 복합체는 CDC 중에 보체 시스템의 효과적인 활성화를 가능하게 할 수 있다.

[0144] 본 발명에 따를 때, 용어 "질병"은 암, 특히 본 명세서에 기술된 형태의 암을 포함하는 임의의 병리학적 상태를 의미한다.

[0145] "CLDN6를 발현하고 세포 표면에 CLDN6가 부착된 것을 특징으로 하는 세포와 관련된 질병"이란 본 발명에 따를 때, 병든 조직 또는 기관의 세포 중에서 발현 및 결합이 건강한 조직 또는 기관에서의 상태와 비교하여 좋기로

는 증가되는 것을 의미한다. 증가란 적어도 10% 증가, 특히 적어도 20%, 적어도 50%, 적어도 100%, 적어도 200%, 적어도 500%, 적어도 1000%, 적어도 10000% 또는 심지어 더 증가하는 것을 의미한다. 일 구현예에서 발현 및 세포 표면과의 결합은 병든 조직에서만 오직 발견되는 반면, 건강한 조직 내 발현은 억제된다. 본 발명에 따를 때, CLDN6를 발현하고 세포 표면에 CLDN6가 부착된 것을 특징으로 하는 세포와 관련된 질병은 암 질병과 같은 종양 질병을 포함한다. 또한, 본 발명에 따를 때, 암 질병과 같은 종양 질병은 좋기로는 종양 세포 또는 암 세포가 CLDN6을 발현하고 세포 표면에 CLDN6가 부착된 것을 특징으로 하는 것들이다.

[0146] 본 명세서에 사용되는 "종양 질병", "종양 관련 질병" 또는 "종양성 질병"은 종양 및/또는 종양의 전이를 발생 또는 그 발생을 일으키는 경향을 일으킬 수 있는, 비정상적으로 조절되는 세포 성장, 증식, 분화, 부착 및/또는 이동에 의해 특징 지워지는 질병을 포함한다. "종양 세포"는 빠르고 통제되지 않은 세포 증식에 의하여 성장하고, 새로운 성장을 개시하는 신호 중단 후에도 성장을 계속하는 비정상적인 세포를 의미한다.

[0147] "종양"이란 빠르고 통제되지 않은 세포 증식에 의하여 성장하고, 새로운 성장을 개시하는 신호 중단 후에도 성장을 계속하는 비정상적인 세포 또는 조직의 군을 의미한다. 종양은 정상 조직과의 구조적 조직화 및 기능적 대등관계의 부분적으로 또는 완전한 결여를 나타내며, 일반적으로 구별되는 조직의 덩어리를 형성하는데, 이는 양성, 전-악성 또는 악성일 수 있다.

[0148] 좋기로는 본 발명에 따른 "종양 질병", "종양 관련 질병" 또는 "종양성 질병"은 암 질병, 즉 악성 질병이고, 종양 세포는 암 세포이다. 좋기로는 "종양 질병", "종양 관련 질병" 또는 "종양성 질병"은 CLDN6를 발현하고 세포 표면에 CLDN6 이 부착된 것을 특징으로 하는 세포를 그 특징으로 하며, 종양 세포는 CLDN6를 발현하고 그 세포 표면에 CLDN6가 부착된 것을 특징으로 한다.

[0149] CLDN6를 발현하고 세포 표면에 CLDN6이 부착된 것을 특징으로 하는 세포는 좋기로는 종양 세포 또는 암세포이고, 좋기로는 본 명세서에 기술된 종양 또는 암이다. 좋기로는 이와 같은 세포는 태반 세포 이외의 세포이다.

[0150] 본 발명에 따른 바람직한 암 질병 또는 암은 난소암, 특히 난소 선암 및 난소 기형암, 소세포 폐암(SCLC) 및 비소세포 폐암(NSCLC)을 포함하는 폐암, 특히 편평상피세포 암종 및  선암, 위암, 유방암, 간암, 췌장암, 피부암, 특히 기저 세포암 및 편평 세포암, 악성 흑색종, 두경부암, 특히 악성 다형성 선종, 육종, 특히 활막 육종 및 암육종, 담도암, 방광암, 특히 이행 세포 암종 및 유두상암, 신장암, 특히 투명세포 신세포암 및 유두상 신세포암을 포함하는 신세포 암, 결장암, 회장암을 포함하는 소장암, 특히 소장 선암 및 회장 선암, 고환 배아성 암종, 태반 융모 상피암, 자궁경부암, 고환암, 특히 고환 정상피종, 고환 기형종 및 배아성 고환암, 자궁암, 기형암 또는 배아암종과 같은 생식세포암, 특히 고환의 생식세포암, 및 이들의 전이 형태로 구성된 군으로부터 선택된다.

[0151] 폐암의 주요 형태는 소세포 폐암(SCLC) 및 비소세포 폐암(NSCLC)이다. 비소세포 폐암에는 3개지 주요 서브 타입이 있다: 편평 상피세포 폐암, 선암 및 대세포 폐암. 선암은 폐암의 약 10%를 차지한다. 이 암은, 보다 중심에 위치하는 경향이 있는 소세포암 및 편평 상피세포 폐암과는 반대로, 일반적으로 폐에서 말초적으로 나타난다.

[0152] 피부암은 피부 상의 악성 성장이다. 가장 흔한 피부암은 기저세포암, 편평세포암 및 흑색종이다. 악성 흑색종은 피부암의 심각한 형태이다. 이는 멜라노사이트라 불리우는 색소 세포의 통제되지 않은 성장에서 기인한다.

[0153] 본 발명에 따를 때, 악성 종양은 기관의 내면층(상피 세포) 중에서 시작하는 암이다.

[0154] "세기관지성 암"은 말단 세기관지의 상피층으로부터 유래하는 것으로 여겨지는 폐의 악성 종양인데, 신생 조직은 폐포 벽을 따라 신장하고, 폐포 내 작은 덩어리로 성장한다. 점액소는 세포의 몇몇 중에서, 그리고 벗겨진 세포를 또한 포함하는 폐포 중의 물질 중에서 나타날 수 있다.

[0155] "선암"은 샘 조직에서 발생하는 암이다. 이 조직은 또한 상피 조직으로 알려진 더 큰 조직 카테고리의 일 부분이다. 상피 세포는 피부, 샘 및 몸의 체강 및 기관에 정렬하는 다양한 다른 조직을 포함한다. 상피층은 발생학상으로 외배엽, 내배엽 및 중배엽으로부터 유래한다. 선암으로서 분류되기 위해서 세포가 분비 성질을 가지는한, 샘의 일부일 필요는 없다. 이러한 악성 종양의 형태는 인간을 포함하는 몇몇 고등 동물에서 발생할 수 있다. 잘 분화된 선암은 그들이 유래한 샘 조직을 닮는 경향이 있는 반면에, 잘 분화되지 못한 것은 그러하지 아니하다. 생검으로부터 세포를 염색하는 것에 의하여, 병리학자들은 종양이 선암인지 또는 다른 형태의 암인지 결정할 것이다. 선암은 몸체의 도처에 위치하는 샘의 특성상 신체의 많은 조직에서 발생할 수 있다. 각각의 샘은 동일한 물질을 분비하지 않을 수도 있는 반면, 세포에 외분비 기능이 있는 한 그것은 샘으로 여겨지며, 따라서 그것의 악성 형태를 선암으로 명명한다. 악성 선암은 다른 조직을 침범하고, 그렇게 하기에 충분한 시간

이 주어지는 경우 종종 전이된다. 난소 선암은 가장 흔한 난소 악성 종양의 형태이다. 그것은 장액 및 점액소의 선암, 투명세포 선암 및 자궁내막양 선암을 포함한다.

[0156] "낭선암"은 난소암의 한 형태인 표피 상피-스트로마 종양의 악성 형태이다. 표피 상피-스트로마 종양은 난소 표면 상피층(변형된 복막) 또는 전위 자궁내막 또는 팔로피오관(관의) 조직으로부터 유래한 것으로 여겨지는 난소 신생물 군이다. 이 종양 군은 모든 난소 종양의 대다수를 차지한다.

[0157] 기형암종이란 기형증이 배아암 또는 융모막암종 또는 둘 모두와 혼합된 것인 발아 세포 종양을 의미한다. 융모막암종은 일반적으로 태반의, 영양 아층의 침습적이고, 악성인 암이다. 그것은 폐로의 조기 조혈성 전파를 특징으로 한다.

[0158] 육종은 중배엽 증식으로부터 유래한, 연결 조직(뼈, 연골, 지방)의 암이다. 이는 상피적 기원을 가지는 선암과 달리, 일반적으로 팔 또는 다리의 관절 근처에서 발생한다. 이것은 연 조직 육종의 하나이다.

[0159] 신세포 암 또는 신세포 암종으로도 알려져 있는 콩팥 세포 암종은 혈액을 거르고 노폐물을 제거하는 신장 내 매우 작은 튜브인 근위세뇨관의 내층으로부터 유래되는 신장암이다. 신세포 암종은 지금까지 성인에게 발행하는 신장암의 가장 흔한 형태이고, 모든 비뇨 생식기 종양 중에서 가장 치명적이다. 신세포 암종의 뚜렷한 서브타입으로는 투명세포 신세포암 및 유두상 신세포암이 있다. 투명세포 신세포암은 신세포 암종에서 가장 흔한 형태이다. 현미경으로 관찰하는 경우 투명세포 신세포암을 이루는 세포들은 매우 창백하고 투명하게 보인다. 유두상 신세포암은 두 번째로 흔한 서브타입이다. 이들 암은 종양의 대부분이 아니라면, 몇몇 종양에서 작은 손가락 유사의 돌출(유두라고 불리움)를 형성한다.

[0160] 배아 세포 종양은 배아 세포로부터 유래한 신생물이다. 배아 세포 종양은 암성 또는 비암성 종양일 수 있다. 배아 세포는 일반적으로 생식선(난소 및 정소) 내부에서 발생한다. 생식선의 외부(예컨대, 머리, 입안, 목, 골반내; 몸 중심선, 특히 꼬리뼈의 첨단에서 가장 빈번하게 발견되는 태아, 아기 및 어린아이 내)에서 유래하는 배아 세포 종양은 배아의 발달 중의 잘못에서 야기되는 출생적 결함일 수 있다.

[0161] 배아 세포 종양의 두개의 주된 부류는 정상피종 및 비정상피종인데, 여기서 비정상피종은 기형암종, 배아암, 난황 낭종, 융모막 암종 및 분화된 기형증을 포함한다. 비정상피종으로부터 유래한 대부분의 세포주는 배아암종과 동등한데, 다시 말해 몇몇은 레티노산과 같은 분화 유도제에 반응하더라도, 그들은 기저 조건에서 분화하지 않는 줄기 세포의 거의 전체를 구성한다.

[0162] "전이(metastasis)"는 원래 위치로부터 신체의 다른 일부에 암 세포들의 전이를 의미한다. 전이의 형성은 매우 복잡한 과정이고, 초기 종양으로부터 악성 세포들의 분리, 세포외 기질의 침입, 체강 및 혈관에 들어가기 위한 내피 기저막의 통과, 그리고나서, 혈액에 의해 운반된 후, 표적 기관으로의 침투에 의존한다. 최종적으로, 표적 사이트에서 새로운 종양의 성장은 혈관신생에 의한다. 종양 전이는 초기 종양의 제거 후에도 자주 일어날 수 있는데, 왜냐하면 종양 세포들 또는 성분들이 남아있을 수 있고, 전이 잠재력을 발달시킬 수 있기 때문이다. 일구현예에서, 본 발명에 따른 "전이"라는 용어는 초기 종양 및 국부적 림프 절계로부터 떨어진 전이에 관한 것인 "원격 전이(distant metastasis)"에 관한 것이다.

[0163] 이차 또는 전이 종양의 세포는 기원 종양의 그것과 유사하다. 이는, 예를 들면, 난소암이 간으로 전이된 경우, 2차 종양은 비정상적인 간세포가 아닌 비정상적인 난소 세포로 이루어짐을 의미한다. 그리하여 간에 있는 종양은 간암이 아니라 전이성 난소암이라고 불리운다.

[0164] "치료"란 질병을 예방하거나 제거하기 위하여 대상체에 본 명세서에 기술된 화합물 또는 조성물을 투여하는 것을 의미하는데, 이는 대상체 중의 종양의 크기를 줄이거나 종양 수를 줄이는 것; 대상체 중의 질병을 억류 또는 늦추는 것; 대상체 중의 새로운 질병의 발생을 억제 또는 늦추는 것; 현재 질병을 가지고 있거나 이전에 질병을 가지고 있었던 대상체에서 증상의 빈도 또는 심각성 및/또는 재발을 감소시키는 것; 및/또는 연장, 즉 대상체의 수명기간을 증가시키는 것을 포함한다.

[0165] "질병의 치료"라는 용어는 질병 또는 그 증상의 치료, 기간의 단축, 완화, 예방, 진행 또는 악화를 늦추거나 억제, 또는 발병의 예방 또는 지연을 포함한다.

[0166] "위험이 있는"이란 일반적 군집과 비교하여 질병, 특히 암을 발전시킬 통상적인 기회가 더 높은 것으로 밝혀진 대상체, 즉 환자를 의미한다. 또한, 질병 특히 암을 가지고 있었거나 현재 가지고 있는 대상체는 질병을 발전시킬 증가된 위험을 가지는 대상체이며, 그리하여 대상체는 질병을 발전시키는 것을 계속할 수 있다. 암을 현재 가지고 있거나 가지고 있었던 대상체는 또한 암 전이의 증가된 위험을 가진다.

[0167] 용어 "면역요법"이란 특이적인 면역 반응과 관련되는 치료법을 의미한다. 본 발명의 문맥에서, "보호", "방지", "예방", "예방적인" 또는 "보호적인"과 같은 용어들은 개인에 있어서 종양의 발생 및/또는 전파 모두의 예방 또는 치료와 관련된다. 본 발명의 문맥 중에서 용어 "면역치료"란 좋기로는 효능 있는 종양 면역화 또는 종양 백신화를 언급한다. 면역 치료의 예방적 투여, 예컨대 본 발명의 조성물의 예방적 투여는 바람직하게는 종양 성장의 발전으로부터 수용자를 보호한다. 면역 치료의 치료적 투여, 예컨대 본 발명의 조성물의 치료적 투여는 종양 진행/성장의 억제를 이끌 수 있다. 이는 종양 진행/성장의 감속화, 특히 종양 진행의 중단을 포함하는데, 이는 좋기로는 종양의 제거를 이끌 수 있다. 면역 치료의 치료적 투여는 예를 들어 존재하는 종양의 확산 또는 전이로부터 개인을 보호할 수 있다.

[0168] 용어 "면역화" 또는 "백신화"란 치료적 또는 예방적 이유로 면역 반응을 유도할 목적으로 대상체에 항원을 투여하는 과정을 기술한다.

[0169] 용어 "대상체", "개인", "유기체" 또는 "환자"는 교환적으로 사용되며, 척추 동물, 좋기로는 포유류를 의미한다. 예를 들어 본 발명의 문맥에서 포유류란 인간, 비인간 영장류, 개, 고양이, 양, 소, 염소, 돼지, 말 등의 가축, 마우스, 래트, 래빗, 귀니아 피그 등의 실험 동물뿐만 아니라, 동물원의 동물들과 같은 포획된 동물을 의미한다. 본 명세서에서 사용되는 용어 "동물"이란 사람을 포함한다. 용어 "대상체" 또한 환자, 즉 동물, 좋기로는 질병, 좋기로는 CLDN6의 발현과 관련된 질병, 좋기로는 암과 같은 종양성 질병을 가진 인간을 포함한다.

[0170] 용어 "보조제"는 면역 반응을 연장 또는 증진 또는 가속화하는 화합물과 관련된다. 본 발명의 조성물은 좋기로는 보조제의 추가 없이 그 효능을 행사한다. 그러나, 본 출원의 조성물은 알려진 임의의 보조제를 포함할 수 있다. 보조제는 오일 유화물(예컨대 프로이드 어주번트), 미네랄 화합물(명반 등), 박테리아 생성물(*Bordetella pertussis* 톡신 등), 리포좀 및 면역-자극성 복합체와 같은 화합물의 이종 군을 포함한다. 보조제의 예로는 모노포스필-리피드-A(MPL SmithKline Beecham). QS21와 같은 사포닌(SmithKline Beecham), DQS21(SmithKline Beecham; WO 96/33739), QS7, QS17, QS18, 및 QS-L1(So et al., 1997, Mol. Cells 7: 178-186), 불완전한 프로이드 어주번트, 완전한 프로이드 어주번트, 비타민 E, 몬타니드(montanid), 백반, CpG 올리고뉴클레오타이드(Krieg et al., 1995, Nature 374: 546-549) 및 스쿠알렌 및/또는 토코페롤과 같이 생물학적으로 분해가능한 오일로부터 제조한 다양한 오일 내 물 유화물 등이 있다.

[0171] 본 발명에 따라, 시료는 본 발명에 따라 유용한 어떠한 시료, 체액들을 포함한 특히 조직 시료와 같은 생물학적 시료 및/또는 세포적 시료일 수도 있고, 펀치(punch) 생검을 포함한 조직 생검 및 혈액, 기관지 흡인물 bronchial aspirate), 가래, 소변, 대변 또는 다른 체액들에 의한 것과 같은 통상적인 방법에 의해 얻을 수 있다. 본 발명에 따라, "생물학적 시료"라는 용어는 생물학적 시료들의 분획들을 또한 포함한다.

[0172] "항체"라는 용어는 이황화결합에 의해 상호-연결된 적어도 두개의 중쇄(H) 및 적어도 두개의 경쇄(L)를 포함하는 당단백질을 의미하며, 그 항원 결합 부위를 포함하는 임의의 분자를 포함한다. 용어 "항체"는 인간 단일클론 항체, 인간화 단일클론 항체, 키메라 단일클론 항체, 단일쇄 항체, 예컨대 Fab 및 Fab' 단편과 같은 scFv's 및 항원-결합 항체 단편을 포함하지만 이에 제한되지 않는 단일 클론 항체 및 그 단편 또는 유도체를 포함하고, 또한 항체들, 예컨대 원핵세포들에서 발현된 항체들, 비글리코실화된 항체들, 및 어떠한 항원-결합 항체 단편들 및 본 명세서에 기술된 바와 같은 유도체들의 모든 재조합 형태들을 포함한다. 각각의 중쇄는 중쇄 가변 영역(줄여서, 여기에서 VH) 및 중쇄 불변 영역으로 구성된다. 각각의 경쇄는 경쇄 가변 영역 (줄여서, 여기에서 VL) 및 경쇄 불변 영역으로 구성된다. VH 및 VL 영역들은 프래임 영역들(FR)로 불리는 더 보존된 영역들로 산재된(interspersed), 상보성 결정 영역들(CDR)로 불리는 과변이의 영역들로 추가적으로 다시나누어질 수 있다. 각각의 VH 및 VL은 다음과 같은 순서: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4로 아미노 말단부터 카복시 말단까지 3개의 CDR들과 4개의 FR들로 구성된다. 중쇄들 및 경쇄들의 가변 영역은 항원과 상호작용하는 결합 도메인을 포함한다. 항체들의 불변 영역들은 전통적인 보체 시스템의 제1 성분 (Clq) 및 면역 시스템 (예컨대, 효과기 세포들)의 다양한 세포들을 포함하는 숙주 조직들 또는 인자들에 면역 글로불린의 결합을 매개할 수 있다.

[0173] 본 발명에 따를 때, 용어 "적어도 1개의 CDR 서열"이란 좋기로는 적어도 CDR3 서열을 의미한다. 용어 "항체 사슬의 CDR 서열"이란 좋기로는 항체의 중쇄 또는 경쇄의 CDR1, CDR2 및 CDR3와 관련된다.

[0174] 본 발명에 따를 때, 특정 CDR3 서열과 같은 특정 CDR 서열을 포함하는 항체 사슬에 대한 언급은, 상기 특정 CDR3 서열이 상기 항체 사슬의 CDR3 영역과 같은 CDR 영역, 즉 상기 특정 CDR 서열로 이루어진 CDR 영역을 형성하거나, 또는 상기 항체 사슬의 CDR3 영역과 같은 CDR 영역, 즉 상기 특정 CDR 서열을 포함하는 CDR3 영역의 일

부분을 형성하는 것을 의미한다.

[0175] 본 발명에 따라, 특정 CDR 서열을 포함하는 사슬과 같은 특정 항체 중쇄 및/또는 특정 항체 경쇄를 포함하는 항체에 대한 언급이 이루어진다면, 항체의 중쇄 및/또는 경쇄 모두가 각각 특정 항체 중쇄 및/또는 특정 항체 경쇄로 이루어지는 것이 바람직하다.

[0176] "인간화된 항체"라는 용어는 비인간 종들로부터의 면역글로불린으로부터 실질적으로 유래된 항원 결합 사이트를 가지는 분자를 말하는 것으로, 분자의 남아있는 면역글로불린 구조는 인간 면역글로불린의 구조 및/또는 서열에 근거한다. 항원 결합 사이트는 불변 도메인들 상에 융합된 완전 가변 영역들 또는 가변 도메인들에서 적절한 프래임워크 영역들 상에 이식된 오직 상보성 결정 영역들(CDR)를 포함할 수 있다. 항원 결합 사이트는 야생(wild-type)이거나 하나 이상의 아미노산 치환, 예컨대, 인간 면역글로불린과 좀 더 닮기위한 변형에 의해 변형될 수 있다. 인간화된 항체들의 몇몇 형태들은 모든 CDR 서열들(예컨대 마우스 항체로부터 모든 6개의 CDR들을 포함하는 면역화된 마우스 항체)을 보존한다. 다른 형태들은 원래의 항체에 관하여 변경된 하나 이상의 CDR들을 가진다.

[0177] "키메라 항체"라는 용어는 중쇄 및 경쇄의 각각의 아미노산 서열의 일 부분이 특별한 클래스에 속하거나 특별한 종들로부터 유래된 항체들에서 상응하는 서열들과 상동성이고, 반면 사슬의 남아있는 부분(segment)은 다른 항체 내의 상응하는 서열들에 상동성이다. 전형적으로 경쇄 및 중쇄들의 가변 영역은 포유류의 한 종들로부터 유래된 항체들의 가변 영역들과 닮은 반면, 불변 부분들은 달리 유래된 항체들의 서열들과 상동성이다. 그러한 키메라 형태들의 한가지 분명한 잇점은 가변 영역이 예컨대, 인간 세포 제조로부터 유래된 불변 영역들과 조합하여 비인간 숙주 유기체로부터 쉽게 이용가능한 B-세포들 또는 하이브리도마를 이용하여 현재 알려진 소스로부터 편리하게 유래될 수 있다는 것이다. 가변 영역은 각각의 제조물의 잇점을 가지고, 특이성은 소스에 영향을 받지 않는 반면, 인간인 불변 영역은 항체들이 비인간 소스로부터의 불변 영역인 것 보다 항체들이 주입될 때 인간 대상으로부터의 면역 반응을 잘 이끌어내지 않는다. 그러나 정의는 이러한 특별한 예시에 제한되지 않는다.

[0178] 여기에서 사용되는 항체의 "항원-결합 부분"이라는 용어 (또는 간단히, "결합 부분")은 항원에 특이적으로 결합하는 능력을 보유하는 항체의 하나 이상의 단편을 말한다. 항체의 항원-결합 기능은 전장(full-length) 항체의 단편들에 의해 수행될 수 있다는 것으로 나타났다. 항체의 "항원-결합 부분"이라는 용어 내에 포함된 결합 단편들의 예들은 (i) Fab 단편들, VL, VH, CL 및 CH 도메인들로 구성된 1가의 단편들; (ii) $F(ab')_2$ 단편들, 힌지 영역에서 이황화 결합에 의해 연결된 2개의 Fab 단편들을 포함하는 2가의 단편들; (iii) VH 및 CH 도메인들로 구성된 Fd 단편들; (iv) 항체의 단일 팔(arm)의 VL 및 VH 도메인들로 구성된 Fv 단편들, (v) dAb 단편들 (Ward et al., (1989) Nature 341: 544-546), VH 도메인으로 구성됨; (vi) 분리된 상보성 결정 영역들(CDR), 및 (vii) 합성 링커에 의해 임의적으로 결합될 수 있는 두개 이상의 CDR들의 조합들을 포함한다. 또한, VL 및 VH의 2개의 도메인들이 분리된 유전자들에 의해 코딩됨에도 불구하고, VL과 VH영역들이 1가의 분자들을 형성하기 위해 짝을 이루는 단일 단백질 사슬로써 그것들이 만들어지도록 하는 합성 링커에 의해 재조합 방법들을 이용하여 결합될 수 있다 (단일 사슬 Fv (scFv)로 알려진; Bird et al. (1988) Science 242: 423-426; 및 Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-5883 참고). 그러한 단일 사슬 항체들은 항체의 "항원-결합 부분"이라는 용어 내에서 포함될 수 있는 것으로 생각된다. 추가적인 예는 (i) 면역글로불린 힌지 영역 폴리펩타이드에 융합되는 결합 도메인 폴리펩타이드, (ii) 힌지 영역에 융합되는 면역글로불린 중쇄 CH2 불변 영역, (iii) CH2 불변 영역에 융합되는 면역글로불린 중쇄 CH3 불변 영역을 포함하는 결합-도메인 면역글로불린 융합 단백질들이다. 결합 도메인 폴리펩타이드는 중쇄 가변 영역 또는 경쇄 가변 영역일 수 있다. 결합-도메인 면역글로불린 융합 단백질들은 추가적으로 US 2003/0118592 및 US 2003/0133939에 개시된다. 이러한 항체 단편들은 기술분야에 당업자에게 알려져있는 통상의 기술을 이용하여 얻고, 그 단편들은 인택트(intact) 항체들처럼 동일한 방식으로 사용을 위해 스크리닝된다.

[0179] 용어 "에피토프"는 분자에 있어서 항원성 결정부위, 즉 면역 시스템, 예를 들어 항체에 의하여 인식되는 분자의 부위를 의미한다. 예를 들어, 에피토프는 항원 상의 분리된 3차원적 부위인데, 이는 면역 시스템에 의하여 인식된다. 본 발명의 문맥에서, 에피토프는 좋기로는 CLDN 단백질로부터 유래한다. 에피토프들은 당 곁사슬 또는 아미노산들을 비롯한 분자들의 화학적 활성 표면 그룹핑들로 구성되고, 일반적으로 특이적 전하 특징들 뿐만 아니라 특이적 3차원 구조적 특징을 가진다. 구조적인(Conformational) 에피토프 및 비구조적인 에피토프들은 후자가 아닌 전자에 대한 결합이 변성 용매들의 존재에서 잃는다는 점에서 구별된다. CLDN와 같은 단백질의 에피토프는 좋기로는 상기 단백질의 연속 또는 불연속적인 부분을 포함하고, 좋기로는 5 내지 100, 좋기로는 5 내지 50, 더 좋기로는 8 내지 30, 가장 좋기로는 10 내지 25개의 아미노산 길이인데, 예컨대 에피토프는 좋기로는 8,

9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 또는 25개 아미노산 길이일 수 있다.

[0180] 여기에서 사용되는 "불연속적인 에피토프"는 단백질의 초기 서열에서 적어도 2개의 분리된 영역들로부터 형성되는 단백질 항원 상에 구조적 에피토프를 말한다.

[0181] "이중특이성 분자"는 예컨대, 단백질, 펩타이드 또는 단백질 또는 펩타이드 복합체와 같은 어떠한 작용제를 포함하는 것으로 생각되고, 이것은 두개의 서로 다른 결합 특이성을 가진다. 예컨대, 분자는 (a) 세포 표면 항원, 및 (b) 효과기 세포의 표면 상에 Fc 수용체와 결합하거나 상호작용할 수 있다. "다중특이성 분자" 또는 "이종특이성 분자"라는 용어는 예컨대, 단백질, 펩타이드 또는 단백질 또는 펩타이드 복합체와 같은 어떠한 작용제를 포함하는 것으로 생각되고, 이것은 두개 이상의 서로다른 결합 특이성을 가진다. 예컨대, 분자는 (a) 세포 표면 항원, (b) 효과기 세포의 표면상에 Fc 수용체, 및 (c) 적어도 하나의 다른 성분과 결합하거나 상호작용 할 수 있다. 따라서, 본 발명은, 이것에 제한되는 것은 아니지만, CLDN6및 효과기 세포들 상에 Fc 수용체를 비롯한 다른 표적들에 지시된 이중특이성, 삼중특이성, 사중특이성, 및 다른 다중특이성 분자들을 포함한다. "이중특이성 항체들"이라는 용어는 이체(diabodies)들을 또한 포함한다. 이체들은 2가이고, VH 및 VL 도메인들이 단일 폴리펩타이드 사슬에 발현되지만, 같은 사슬상에 두개의 도메인들 사이에 짝을 이루도록 하기에는 너무 짧은 링커를 사용하고 그것에 의해 도메인들이 다른 사슬들의 상보적 도메인들과 짝을 이루고, 두개의 항원 결합 사이트들을 생성할 수 있는 이중특이성 항체들이다 (Holliger, P., et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448; Poljak, R. J., et al. (1994) Structure 2: 1121-1123 참고).

[0182] 여기에서 사용된 바와 같이, "헤테로항체(heteroantibody)"라는 용어는 둘 이상의 항체들, 그 유도체들, 또는 함께 결합되는 항원 결합 영역들, 적어도 2개의 상이한 특이성을 가지는 것에 관한 것이다. 이러한 상이한 특이성들은 효과기 세포 상에 Fc 수용체를 위한 결합 특이성, 및 표적 세포, 예컨대 종양 세포 상에 항원 또는 에피토프를 위한 결합 특이성을 포함한다.

[0183] 여기에 기재된 항체들은 인간 항체들일 수 있다. 여기에서 사용된 "인간 항체"라는 용어는 인간 점라인 면역글로불린 서열들로부터 가변 영역들 및 불변영역들을 가지는 항체들을 포함하는 것으로 생각된다. 본 발명의 인간 항체들은 인간 점라인 면역글로불린 서열들에 의해 코딩되지 않는 아미노산 잔기들을 포함할 수 있다 (예컨대, 무작위적으로 또는 시험관 내 사이트-특이적 돌연변이유발에 의해 또는 생체 내에서 체세포 변이에 의해 도입된 돌연변이).

[0184] 여기에서 사용된 "모노클로날 항체"라는 용어는 단일 분자 조성물의 항체 분자들의 제조물을 말한다. 모노클로날 항체는 단일 결합 특이성 및 특별한 에피토프를 위한 친화도를 나타낸다. 일 구현예에서, 모노클로날 항체들은 불사화된 세포에 융합되는 비인간 동물, 예컨대, 마우스로부터 얻어지는 B 세포를 포함하는 하이브리도마에 의해 생산된다.

[0185] 여기에서 사용된 바와 같이, "재조합 항체"라는 용어는 (a) 면역글로불린 유전자들 또는 그들로부터 제조되는 하이브리도마에 관하여 유전자 이식 또는 트랜스염색체적인 동물 (예컨대, 마우스)로부터 분리된 항체들 , (b) 항체를 발현하기 위해 형질전환된 숙주 세포, 예컨대, 트랜스팩토마로부터 분리된 항체들, (c) 재조합, 조합 항체 라이브러리로부터 분리된 항체들, 및 (d) 다른 DNA 서열들에 면역글로불린 유전자 서열들의 스플라이싱과 관련된 다른 수단들에 의해 분리되거나, 생성되거나, 발현되거나 제조된 항체들을 비롯한, 재조합적 수단에 의해 분리되거나, 생성되거나, 발현되거나, 제조된 모든 항체들을 포함한다.

[0186] 여기에 사용된, "트랜스펙토마(transfectome)"라는 용어는 CHO 세포들, NS/0 세포들, HEK293 세포들, HEK293T 세포들, 식물 세포들, 또는 효모를 포함하는 곰팡이를 비롯한 항체를 발현하는 재조합 진핵 숙주세포들을 포함한다.

[0187] 여기에 사용된, "이종 항체(heterologous antibody)"는 그러한 항체를 생산하는 형질전환 유기체와 관련하여 규정된다. 이러한 용어는 아미노산 서열을 가지거나, 형질전환 유기체를 구성하지 않는 유기체에서 나타나는 것에 상응하는 핵산 서열을 코딩하고, 형질전환 유기체 외에 종들로부터 일반적으로 유래되는 항체를 지시한다.

[0188] 여기에서 사용된, "헤테로하이브리드 항체"는 상이한 유기체들 기원의 경쇄 및 중쇄를 가지는 항체를 말한다. 예컨대, 뮤린 경쇄와 연관된 인간 중쇄를 가지는 항체는 헤테로하이브리드 항체이다.

[0189] 본 발명은 본 명세서에 기술된 바와 같은 모든 항체 및 항체의 유도체를 포함하는데, 본 발명의 목적은 용어 "항체"에 의하여 포괄된다. 용어 "항체 유도체"란 항체의 임의의 변형된 형태, 예컨대 항체와 다른 약제 또는 항체, 또는 항체 단편과의 컨주게이트를 의미한다.

[0190] 여기에 기재된 항체들은 좋게는 분리된다. 여기에서 사용된 "분리된 항체"는 상이한 항원성 특이성을 가지는 다른 항체들이 없는(free)한 항체들을 나타내는 것으로 생각된다 (예컨대, CLDN6에 특이적으로 결합하는 분리된 항체는 실질적으로 CLDN6이 아닌 항체들에 특이적으로 결합하는 항체들이 없는(free)한 것이다). 인간 CLDN6의 에피토프, 아이소형태 또는 변이체에 특이적으로 결합하는 분리된 항체는 그러나, 다른 관련된 항원들, 예컨대, 다른 종들(예컨대, CLDN6 종들 동족체)로부터, 크로스-반응성을 가질 수 있다. 또한, 분리된 항체는 실질적으로 다른 세포성 물질 및/또는 화학물질이 없을(free)할 수 있다. 본 발명의 일 구현예에서, "분리된" 모노클로날 항체들의 조합은 상이한 특이성을 가지고 잘 규정된 조성물에서 혼합되는 항체들에 관한 것이다.

[0191] 본 발명에 따를 때, 항체가 미리 결정된 표적에 현저한 친화도를 가지는 것이고, 본 명세서에 기술된 분석법과 같은 표준 분석 중에 미리 결정된 상기 표적에 결합하는 것이라면, 항체는 상기 미리 결정된 표적에 결합할 능력이 있는 것이다. 좋기로는, 온전한 세포의 표면에 발현되는 표적에 대한 항체의 결합을 측정하는 유세포 분석(FACS 분석) 중에 항체가 상기 표적에 탐지 가능하게 결합하는 것이라면, 항체는 상기 표적에 결합할 능력이 있는 것이다. 바람직하게는 항체가 10 ㎍/ml 또는 그 미만, 5 ㎍/ml 또는 그 미만, 또는 2 ㎍/ml 또는 그 미만의 농도로 존재하는 경우에, 항체가 상기 표적에 탐지 가능하게 결합한다. 바람직하게는 항체가 50 nM 또는 그 미만, 30 nM 또는 그 미만, 또는 15 nM 또는 그 미만의 농도로 존재하는 경우에, 항체가 상기 표적에 탐지 가능하게 결합한다. "친화도" 또는 "결합 친화도"는 해리 상수($K_D$)에 의하여 종종 측정된다. 바람직하게는, 용어 "현저한 친화도"란 $10^{-5}$ M 또는 그 미만, $10^{-6}$ M 또는 그 미만, $10^{-7}$ M 또는 그 미만, $10^{-8}$ M 또는 그 미만, $10^{-9}$ M 또는 그 미만, $10^{-10}$ M 또는 그 미만, $10^{-11}$ M 또는 그 미만, 또는 $10^{-12}$ M 또는 그 미만의 해리 상수($K_D$) 값을 가지고, 미리 정해진 표적에 결합하는 것을 의미한다. 본 발명의 항체는 바람직하게는 CLDN6에 대한 결합에 대하여, 6500 ng/ml 또는 그 미만, 3000 ng/ml 또는 그 미만, 2500 ng/ml 또는 그 미만, 2000 ng/ml 또는 그 미만, 1500 ng/ml 또는 그 미만, 1000 ng/ml 또는 그 미만, 500 ng/ml 또는 그 미만, 400 ng/ml 또는 그 미만, 300 ng/ml 또는 그 미만, 200 ng/ml 또는 그 미만, 또는 100 ng/ml 또는 그 미만의 EC50 값을 가진다.

[0192] 항체는 그것이 상기 표적에 대해 현저한 친화도를 가지지 않고, 표준 분석에서 상기 표적에 현저하게 결합하지 않는다면, 항체는 상기 표적에 결합할 능력이 (실질적으로) 없는 것이다. 좋기로는, 온전한 세포의 표면에 발현되는 표적에 대한 항체의 결합을 측정하는 유세포 분석(FACS 분석) 중에 항체가 상기 표적에 탐지 가능하게 결합하지 않는다면, 상기 항체는 상기 표적에 결합할 능력이 (실질적으로) 없는 것이다. 좋기로는, 상기 항체가 2 ㎍/ml까지, 좋기로는 5 ㎍/ml까지, 좋기로는 10 ㎍/ml까지, 좋기로는 20 ㎍/ml까지, 더 좋기로는 50 ㎍/ml까지, 특히 100 ㎍/ml까지, 또는 150 ㎍/ml까지, 200 ㎍/ml까지 또는 그 이상의 농도로 존재하는 경우에도 상기 표적에 탐지가능하게 결합하지 않는다. 좋기로는 상기 항체가 15 nM까지, 좋기로는 30 nM까지, 좋기로는 50 nM까지, 좋기로는 100 nM까지, 좋기로는 150 nM까지, 170 nM까지, 300 mM까지, 600 nM까지, 1000 nM까지, 1300 nM까지 또는 그 이상의 농도로 존재하는 경우에도 상기 표적에 탐지가능하게 결합하지 않는다. 좋기로는 상기 항체는 그것이 항체가 결합하는 표적, 즉 CLDN6에 대한 결합을 포화시키는 농도로 존재하는 경우에도 상기 표적에 탐지가능하게 결합하지 않는다. 좋기로는, 항체가 결합할 수 있는 미리 정해진 표적에의 결합을 위한 $K_D$ 보다도 적어도 10-배, 100-배, $10^3$-배, $10^4$-배, $10^5$-배, 또는 $10^6$-배 더 높은 $K_D$ 값을 가지고 상기 항체가 상기 표적에 결합하는 경우에도, 상기 항체는 현저한 친화도를 가지지 않는다. 예를 들어 항체가 결합할 수 있는 표적에의 항체의 결합에 대한 $K_D$ 값이 $10^{-7}$ M인 경우, 항체가 현저한 친화도를 갖지 않는 상기 표적에의 결합을 위한 $K_D$ 값은 적어도 $10^{-6}$ M, $10^{-5}$ M, $10^{-4}$ M, $10^{-3}$ M, $10^{-2}$ M, 또는 $10^{-1}$ M일 것이다.

[0193] 어느 항체가 다른 표적에는 결합할 수 없는 것, 즉 다른 표적에는 현저한 친화도를 가지지 않고, 표준 분석에서 다른 표적에는 현저하게 결합하지 않는 것인 반면에, 미리 정해진 표적에는 결합할 수 있는 것이라면, 그 항체는 상기 미리 정해진 표적에 특이적인 것이다. 본 발명에 따를 때, 어느 항체가 CLDN6에 대해서는 결합할 수 있지만, 다른 표적, 특히 CLDN9, CLDN4, CLDN3 및 CLDN1와 같이 CLDN6가 아닌 다른 클라우딘 단백질에는 결합할 수 없는 것이라면, 그 항체는 CLDN6에 특이적인 것이다. 좋기로는, CLDN9, CLDN4, CLDN3 및 CLDN1와 같은 CLDN6가 아닌 클라우딘 단백질에 대한 친화도 및 결합이, 소 혈청 알부민(BSA), 카세인, 인간 혈청 알부민(HSA)과 같은 클라우딘과 관계없는 단백질에 대한 친화도 또는 결합, 또는 MHC 분자 또는 트랜스페린 수용체와 같은 비클라우딘 막투과 단백질, 또는 다른 특정 폴리펩타이드에 대한 친화도 또는 결합을 현저하게 능가하는 것이 아니라면, 상기 항체는 CLDN6에 대하여 특이적인 것이다. 좋기로는 어느 항체가 특이적이지 않은 표적에의

결합을 위한 $K_D$ 값보다 적어도 10-배, 100-배, $10^3$-배, $10^4$-배, $10^5$-배, 또는 $10^6$-배 더 낮은 $K_D$ 값을 가지고 미리 정해진 표적에 결합한다면, 그 항체는 상기 표적에 대하여 특이적인 것이다. 예를 들어 어느 항체가 그것이 특이적인 표적에 결합하기 위한 $K_D$ 값이 $10^{-7}$ M인 경우, 그것이 특이적이지 않은 표적에 결합하기 위한 $K_D$ 값은 적어도 $10^{-6}$ M, $10^{-5}$ M, $10^{-4}$ M, $10^{-3}$ M, $10^{-2}$ M, 또는 $10^{-1}$ M일 것이다.

[0194] 항체의 표적에 대한 결합은 임의의 적절한 방법을 사용하여 실험적으로 결정될 수 있는데, 예를 들어 논문(Berzofsky et al., "Antibody-Antigen Interactions" In Fundamental Immunology, Paul, W. E., Ed., Raven Press New York, N Y (1984), Kuby, Janis Immunology, W. H. Freeman 및 Company New York, N Y (1992)) 및 본 명세서에 기술된 방법을 참조하라. 평형투석의 사용; 제조사에 의해 개괄된 일반적 절차를 사용하는 BIAcore 2000 기구의 사용; 방사능 표지된 표적 항원을 사용하는 방사능 면역 분석법에 의하여; 또는 숙련된 기술자에게 알려진 또 다른 방법에 의하는 것과 같은 통상적인 기법을 사용하여 친화도를 손쉽게 결정할 수 있다. 친화도 데이터는 예를 들어 논문(Scatchard et al., Ann N.Y. Acad. ScL, 51:660 (1949))의 방법에 의하여 분석될 수 있다. 만일 다른 조건(예컨대 염 농도, pH)에서 측정된다면, 특정 항체-항원 결합의 측정된 친화도는 변할 수 있다. 따라서, 친화도 및 $K_D$, $IC_{50}$와 같은 다른 항원-결합 파라미터의 측정은 표준화된 항체 및 항원 용액 및 표준화된 완충액을 사용하여 이루어지는 것이 바람직하다.

[0195] 본 발명의 항체의 독특한 특징은 세포 표면 클라우딘 6에 결합하는 능력이다. 이는 클라우딘 6를 발현하는 세포의 유세포 분석에 의해 결정된다.

[0196] 클라우딘을 발현하는 살아있는 세포에 대한 단일클론 항체의 결합을 시험하기 위하여 유세포 분석이 사용될 수 있다. 간략히 말해 막-결합 클라우딘을 발현하는 세포주(표준 성장 조건 하에서 배양한 것)를 2% 열 불활성 FCS 및 0.1% $NaN_3$를 포함하는 PBS 중에서 다양한 농도의 항체와 4°C에서 30분 동안 혼합한다. 세척 후에 세포를 일차 항체 염색에서와 동일한 조건 하에서 형광 표지된 2차 항체와 반응시킨다. 빛과 단일 세포에 신호하는 SS(side scatter) 성질을 이용하여, 시료를 FACS로 분석하고, 표지된 항체의 결합을 측정할 수 있다.

[0197] 본 발명에 따를 때, 용어 "결합"은 본 명세서에 정의된 특이적 결합과 관련된다.

[0198] 여기에서 사용된 바와 같이, "아이소타입(isotype)"은 중쇄 불변 영역 유전자들에 의해 코딩되는 항체 클래스(예컨대, IgM 또는 IgG1)를 나타낸다.

[0199] 여기에서 사용된 바와 같이, "아이소타입 스위칭(switching)"은 항체들의 클래스 또는 아이소타입이 하나의 Ig 클래스로부터 다른 Ig 클래스들 중 하나까지로 변화하는 것에 의한 현상을 나타낸다.

[0200] 물체와 관련하여, 여기에서 사용된 바와 같은, "자연적으로 일어나는"이라는 용어는 목적을 자연에서 찾을 수 있는 사실을 나타낸다. 예컨대, 자연에서 소스로부터 분리될 수 있고, 실험실에서 사람에 의해 의도적으로 변형되지 않은 유기체 (바이러스들을 포함)에 존재하는 폴리펩타이드 또는 폴리뉴클레오티드 서열이 자연적으로 일어난다.

[0201] 여기에서 사용된 바와 같이, "재배열된(rearranged)"라는 용어는 중쇄 또는 경쇄 면역글로불린 로커스(locus)의 배열을 나타내는 것으로, V 부분은 필수적으로 완전한 VH 또는 VL 도메인을 코딩하는 구조에서 D-J 또는 J 부분에 즉시 인접하여 위치된다. 재배열된 면역글로불린 (항체) 유전자 로커스는 점라인(germline) DNA와 비교에 의해 확인될 수 있다; 재배열된 로커스는 적어도 하나의 재조합된 헵타머/나노머 상동성 요소를 가질 것이다.

[0202] V 부분을 참고하여 여기에서 사용된 "비재배열된(rearranged)" 또는 "점라인(germline) 배열"라는 용어는 배열을 나타내는 것이고, 여기서 V 부분은 D 또는 J 부분에 즉시 인접하기 위해 재조합되지 않는다.

[0203] 여기에서 사용된 바와 같은 "핵산 분자"라는 용어는 DNA 분자들 및 RNA 분자들을 함유하는 것으로 생각된다. 핵산 분자는 단일-가닥 또는 이중-가닥일 수 있지만, 종게는 이중 가닥 DNA이다. 핵산 분자는, 예를 들어 DNA 주형으로부터 인 비트로 전사에 의하여 제조될 수 있는 RNA의 형태로 세포 속으로 도입, 즉 감염을 위해 채택될 수 있다. RNA는 안정화 서열, 캡핑 및 폴리아데닐화에 의하여 적용 전에 추가로 변형될 수 있다.

[0204] 본 발명에 따라 기재된 핵산들은 종게는 분리된다. "분리된 핵산"이라는 용어는 본 발명에 따라 핵산이 (i) 시험관 내, 예컨대 PCR에 의해 증폭되거나, (ii) 클로닝에 의해 재조합적으로 생산되거나, (iii) 예컨대 절단 및 젤 전기영동 분획에 의해 정제되거나, 또는 (iv) 예컨대 화학 합성에 의해 합성되었다는 것을 의미한다. 분리된

핵산은 재조합 DNA 기술에 의한 조작을 위해 이용될 수 있는 핵산이다.

[0205] 본 발명에 따른 핵산들은 단독 또는 다른 핵산들과 조합하여 존재할 수 있고, 이것은 동종이거나 이종일 수 있다. 선호된 구현예에서, 핵산은 상기 핵산에 관하여 동종 또는 이종일 수 있는 발현 조절 서열들에 기능적으로 연결되는데, 여기서 "동종(homologous)"이라는 용어는 핵산이 자연적으로 발현 조절 서열에 또한 기능적으로 연결된 것을 의미하고, "이종(heterologous)"은 핵산이 자연적으로 발현 조절 서열에 기능적으로 연결되지 않았다는 것을 의미한다.

[0206] 만약, 핵산 및 발현조절 서열이 상기 핵산의 발현 또는 전사가 조절되거나 상기 발현 조절 서열의 영향 하에 있는 방식으로 서로 공유적으로 연결되어 있다면, RNA 및/또는 단백질 또는 펩타이드를 발현하는 핵산을 비롯한 핵산 및 발현 조절 서열은 서로 "기능적으로" 연결된다. 핵산이 기능적 단백질로 번역되고, 그리고나서 코딩 서열에 기능적으로 결합된 발현 조절 서열과 함께라면, 코딩 서열 또는 소망하는 단백질 또는 펩타이드로 번역될 수 없는 상기 코딩 서열에서 프래임 쉬프트(frame shift)를 일으키는 것 없이, 상기 발현 조절 서열의 유도는 핵산의 전사를 일으킨다.

[0207] "발현 조절 서열"이라는 용어는 본 발명에 따라 프로모터, 리보솜 결합 사이트, 인핸서(enhancer), 및 유전자의 전사 또는 mRNA의 번역을 조절하는 다른 조절 요소들을 포함한다. 본 발명의 특별한 구현예에서, 발현 조절 서열은 조절될 수 있다. 발현 조절 서열의 정확한 구조는 세포 유형 또는 종들의 기능에 따라 변화될수 있지만, TATA 박스, 캡핑 서열, CAAT 서열, 및 유사종을 비롯한 전사 및 번역 개시에 관련된 5'-비전사된 및 5'- 및 3'-비번역된 서열들 각각을 일반적으로 포함한다. 더 구체적으로, 5'-비전사화된 발현 조절 서열은 기능적으로 연결된 핵산의 전사 조절을 위한 프로모터 서열을 포함하는 프로모터 영역을 포함한다. 발현 조절 서열은 또한 인핸서 서열들 또는 업스트림 활성자 서열들을 포함할 수 있다.

[0208] 본 발명에 따라 "프로모터" 또는 "프로모터 영역"이라는 용어는 발현되는 핵산 서열에 대해 업스트림 (5') 위치되는 핵산 서열에 관한 것이고, RNA-폴리머라제를 위한 인식 및 결합 사이트를 제공하는 것에 의해 서열의 발현을 조절한다. "프로모터 영역"은 유전자의 전사 조절에 관련된 추가적인 인자들을 위한 인식 및 결합 사이트를 추가적으로 포함한다. 프로모터는 원핵 또는 진핵 유전자들의 전사를 조절할 수 있다. 또한, 프로모터는 "유도가능할" 수 있고, 유도제에 반응하는 전사를 개시할 수 있거나, 전사가 유도제에 의해 조절되지 않는다면 "구조적" 일 수 있다. 만약 유도제가 없다면, 유도가능한 프로모터의 조절 하에 유전자는 발현되지 않거나, 작은 범위로 오직 발현된다. 유도제의 존재에서, 유전자는 스위치-온(switch on)되거나 전사의 수준이 증가된다. 이것은 일반적으로, 특이적 전사 인자의 결합에 의해 매개된다.

[0209] 본 발명에 따라 선호된 프로모터들은 SP6, T3 및 T7 폴리머라제를 위한 프로모터들, 인간 U6 RNA 프로모터, CMV 프로모터, 및 일부분(part) 또는 부분들이 예컨대, 인간 GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)를 비롯한 다른 세포 단백질들의 유전자들의 프로모터들의 일부분 또는 부분들과 융합된 그것의 인공적인 하이브리드 프로모터들 (예컨대, CMV) 및 추가적인 인트론(들)을 포함하거나 포함하지 않는 프로모터들을 포함한다.

[0210] 본 발명에 따라, "발현"이라는 용어는 가장 일반적인 의미에서 사용되고, RNA 또는 RNA 및 단백질/펩타이드의 생산을 포함한다. 그것은 또한 핵산들의 부분적인 발현을 포함한다. 또한, 발현은 일시적으로 또는 안정적으로 수행될 수 있다. 본 발명에 따를 때, 용어 발현은 또한 "변종 발현" 또는 "비정상적 발현"을 포함한다.

[0211] "변종 발현" 또는 "비정상적 발현"은 본 발명에 따를 때 참조와 비교하여, 좋기로는 비종양성 정상 세포 또는 건강한 개인에서의 상태와 비교하여, 그 발현이 변경, 좋기로는 증가된 것을 의미한다. 발현의 증가는 적어도 10%, 특히 적어도 20%, 적어도 50% 또는 적어도 100% 증가된 것을 의미한다. 일 구현예에서, 건강한 조직에서는 발현이 억제되는 반면에, 병든 조직에서만 오직 발현이 발견된다.

[0212] 선호되는 구현예에서, 본 발명에 따른 핵산은 벡터 내에 존재하고, 적절하게 프로모터와 함께, 이것은 핵산의 발현을 조절한다. "벡터"라는 용어는 가장 넓은 의미에서 사용되고, 상기 핵산을 예컨대, 원핵세포 및/또는 진핵세포에 도입시키고, 적절하게, 게놈에 삽입하는 핵산을 위한 어떠한 중개 비히클(intermediary vehicle)을 포함한다. 이러한 종류의 벡터들은 좋게는 복제되고/거나 세포 내에서 발현된다. 벡터들은 플라스미드, 파지미드, 박테리오파지 또는 바이러스 게놈들을 포함한다. "플라스미드"라는 용어는 여기에서 사용된 바와 같이, 일반적으로 염색체외적인 유전적 물질의 구조, 보통 원형 DNA 듀플렉스의 구조물에 관한 것이고, 이것은 염색체 DNA의 독립적으로 복제할 수 있다.

[0213] 항체의 발현을 위한 벡터로서, 항체 중쇄 및 경쇄가 서로다른 벡터들에서 존재하는 벡터 유형이거나 중쇄 및 경쇄가 동일한 벡터 내에 존재하는 벡터 유형도 사용될 수 있다.

[0214] 특이적 핵산 및 아미노산 서열에 관하여 여기에 주어진 개시, 예컨대, 서열 리스팅에서 나타난 그것들과 같은 것은 상기 특이적 서열들에 기능적으로 등가인 서열들을 나타내는 상기 특이적 서열들의 변형(즉, 변이체), 예컨대, 특이적 핵산 서열에 의해 코딩되는 아미노산 서열의 그것들과 비슷하거나 동일한 특징들을 나타내는 아미노산 서열들을 코딩하는 핵산 서열들 및 특이적 아미노산 서열들의 그것과 동일하거나 유사한 특징을 나타내는 아미노산 서열에 관한 것이기 위해, 해석되어야만 한다. 하나의 중요한 특징은 CDC 및/또는 ADCC와 같은 항체의 효과기 기능을 유지하거나 그 표적에 대한 항체의 결합을 보유하기 위한 것이다. 좋게는, 특이적 서열에 관하여 변형된 서열은, 그것이 항체 내 특이적 서열을 리플래이스(replace)할 때, 좋게는 여기에 개시된 바와 같은 상기 항체들의 기능들, 그리고 표적에 대한 상기 항체의 결합을 유지한다.

[0215] 유사하게, 특이적 항체 또는 특이적 항체를 생산하는 하이브리도마와 관련하여 본 명세서에 주어진 가르침은 특이적 항체의 아미노산 서열 및/또는 핵산 서열과 비교하여 변형된 아미노산 서열 및/또는 핵산 서열을 특징으로 하지만, 기능적으로 동등한 항체와도 또한 관련되는 것으로 해석될 것이다. 하나의 중요한 성질은 그 표적에 대한 항체의 결합을 보유하거나 항체의 효과기 기능을 지속하는 것이다. 좋기로는 특정 서열에 관하여 변형된 서열은, 그것이 항체 내의 특정 서열을 치환한 경우에도, 표적에 대한 상기 항체의 결합 및 좋기로는 본 명세서에 기술된 바와 같은 상기 항체의 기능, 즉 CDC 매개 용해 또는 ADCC 매개 용해를 유지한다.

[0216] 특별히 CDR의 서열들, 과변이성 및 변이 영역들은 표적에 결합하는 능력을 잃어버리지 않고 변형될 수 있다는 것은 당업자에게 인식될 수 있을 것이다. 예컨대, CDR 영역들은 여기에 특정된 항체들의 영역들과 동일하거나 매우 상동적일 것이다. "매우 상동적(highly homologous)"에 의해, 1 내지 3 또는 1 또는 2 치환을 비롯한 1 내지 5, 좋게는 1 내지 4의 치환들이 CDR들에서 만들어진다는 것은 고려된다. 추가적으로, 과변이 및 가변 영역들은 그것들이 여기에 특이적으로 개시된 항체들의 영역들과 실질적인 상동성을 나타내기 위해 변형될 수 있다.

[0217] 여기에 개시된 특이적 핵산들은 또한 특별한 숙주 세포 또는 유기체들에서 코돈 사용을 최적화 하기 위하여 변형된 핵산들을 함유하는 것으로 이해된다. 유기체들 중 코돈 사용에서 차이들은 이종기원의(heterologous) 유전자 발현에 관한 다양한 문제를 가져온다. 원래의 서열의 하나이상의 뉴클레오티드를 변화시키는 것에 의한 코돈 최적화는 핵산이 발현되는 동종 또는 이종기원의 숙주에서 핵산의 발현의 최적화, 특히 번역 효율의 최적화로 나타날 수 있다.

[0218] 본 발명에 따를 때, 핵산 서열, 아미노산 서열 또는 펩타이드의 변이체, 유도체, 변형 형태 또는 단편은 좋기로는 각각 그것들이 유래한 핵산 서열, 아미노산 서열, 또는 펩타이드의 기능적 성질을 가진다. 그와 같은 기능적 성질은 다른 분자와의 상호작용 또는 결합을 포함한다. 일 구현예에서, 핵산 서열, 아미노산 서열 또는 펩타이드의 변이체, 유도체, 변형 형태 도는 단편은 그것들이 각각 유래한 핵산 서열, 아미노산 서열 또는 펩타이드와 면역학적으로 동등하다.

[0219] 특정 핵산 서열과, 상기 특정 핵산 서열에 대하여 변형되거나 또는 그것의 변이체인 핵산 서열 사이의 동일성의 정도는 좋기로는 적어도 70%, 좋기로는 적어도 75%, 보다 좋기로는 적어도 80%, 보다 더 좋기로는 적어도 90% 또는 가장 좋기로는 적어도 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%일 것이다. 좋기로는 CLDN6 핵산 변이체에 관한 동일성의 정도는 적어도 약 300, 적어도 약 400, 적어도 약 450, 적어도 약 500, 적어도 약 550, 적어도 약 600 또는 적어도 약 630개 뉴클레오타이드의 영역에 대하여 주어진다. 바람직한 구현예에서, 동일성의 정도는 서열 목록에서 주어진 핵산 서열과 같은 참조 핵산 서열의 전체 길이에 대하여 주어진다. 좋게는, 두개의 서열들은 혼성화 및 좋게는 폴리뉴클레오티드들 (엄격한 조건들) 사이에 특이적 혼성화를 허용하는 조건하에 수행되는 혼성화와 함께 서로 안정적인 듀플렉스(duplex)를 형성할 수 있다. 엄격한 조건들은 예컨대, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, J. Sambrook et al., Editors, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory press, Cold Spring Harbor, New York, 1989 or Current Protocols in Molecular Biology, F.M. Ausubel et al., Editors, John Wiley & Sons, Inc., New York에 기재되고, 예컨대, 혼성화 완충액 (3.5 x SSC, 0.02% 피콜, 0.02% 폴리비닐피롤리돈, 0.02% 소혈청알부민, 2.5 mM $NaH_2PO_4$ (pH 7), 0.5% SDS, 2 mM EDTA)에서 65℃에서 혼성화를 나타내는 것이다. SSC는 0.15 M 염화나트륨/0.15 M 구연산나트륨, pH 7이다. 혼성화 후, DNA가 전이된 막은 예컨대, 실온에서 2 X SSC로 세척하고 난 다음, 68℃까지의 온도를 올려서 0.1-0.5 ×SSC/0.1 ×SDS로 세척한다.

[0220] 본 발명에 따를 때, 용어 "변이체"는 돌연변이체, 스플라이스 변이체, 컨포메이션, 이소형태, 대립성 변이체, 종 변이체 및 종 상동체를 또한 포함하는데, 이들은 특히 자연적으로 존재한다. 대립성 변이체는 유전자의 정상 서열 중의 변경과 관련되는데, 그 중요성은 종종 불분명하다. 완전한 유전자 시퀀싱은 종종 주어진 유전자에 대한 수많은 대립성 변이체를 동정한다. 종 상동체는 주어진 핵산 또는 아미노산 서열의 것과 상이한 종 출처를

가지는 핵산 또는 아미노산 서열이다.

[0221] 본 발명의 목적을 위하여, 아미노산 서열의 "변이체"는 아미노산 삽입 변이체, 아미노산 첨가 변이체, 아미노산 결실 변이체 및/또는 아미노산 치환 변이체를 포함한다. 단백질의 N-말단 및/또는 C-말단의 결여를 포함하는 아미노산 결실 변이체는 또한 N-말단 및/또는 C-말단 절단 변이체로도 불리운다.

[0222] 아미노산 삽입 변이체는 특정 아미노산 서열 중에 1 또는 2 이상의 아미노산의 삽입을 포함한다. 삽입을 가지는 아미노산 서열 변이체의 경우, 생성물의 적절한 스크리닝을 구비한 랜덤한 삽입 또한 가능하지만, 1 이상 아미노산 잔기는 아미노산 서열의 특정 부위 속으로 삽입된다.

[0223] 아미노산 첨가 변이체는 1, 2, 3, 5, 10, 20, 30, 50개 또는 그 이상의 아미노산과 같은 1 이상의 아미노산의 아미노- 및/또는 카복시-말단 융합을 포함한다.

[0224] 아미노산 결실 변이체는 1, 2, 3, 5, 10, 20, 30, 50개 또는 그 이상의 아미노산을 제거하는 것에 의하는 것과 같이 서열로부터 1 이상의 아미노산을 제거하는 것을 특징으로 한다. 결여는 단백질의 임의의 부위에 있을 수 있다.

[0225] 아미노산 치환 변이체는 서열 내 적어도 하나의 잔기를 제거하고 그 위치에 다른 잔기를 삽입하는 것을 그 특징으로 한다. 상동체 단백질 또는 펩타이드 사이에 보존되지 않은 아미노산 서열 부위에서의 변형 및/또는 아미노산을 유사한 성질을 가지는 다른 것으로 치환하는 것이 선호된다. 바람직하게는 단백질 변이체에서의 아미노산의 변화는 보존적 아미노산 변화, 즉 유사하게 전하성 또는 비전하성 아미노산의 치환이다. 보존적 아미노산 변화는 그것의 측쇄와 관련된 아미노산 족의 하나의 치환과 관련된다. 자연적으로 발생하는 아미노산은 일반적으로 다음의 4개 족으로 나뉜다: 산성 아미노산(아스파르트, 글루타메이트), 염기성 아미노산(라이신, 아르기닌, 히스티딘), 비극성 아미노산(알라닌, 발린, 루이신, 이소루이신, 프롤린, 페닐알라닌, 메티오닌, 트립토판), 및 비전하성 극성 아미노산(글라이신, 아스파라긴, 글루타민, 시스테인, 세린, 트레오닌, 타이로신). 페닐알라닌, 트립토판 및 타이로신은 때때로 방향족 아미노산으로 함께 분류된다.

[0226] 좋게는, 실질적인 상동성을 나타내는 아미노산 서열들 사이와 같이, 특이적 아미노산 서열 및 상기 특이적 아미노산 서열에 관하여 변형된 또는 그에 관한 변이체인 아미노산 서열 사이에 유사성, 좋게는 동일성(identity)의 정도는 적어도 70%, 더 좋게는 적어도 80%, 더욱 더 좋게는 적어도 90% 또는 가장 좋게는 적어도 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%일 것이다. 좋기로는, 아미노산 영역에 대한 유사성 또는 동일성의 정도는 참조 아미노산 서열의 길이의 적어도 약 10%, 적어도 약 20%, 적어도 약 30%, 적어도 약 40%, 적어도 약 50%, 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 적어도 약 80%, 적어도 약 90% 또는 약 100%인 아미노산 영역에 대하여 주어진다. 예를 들어 참조 아미노산 서열이 200개 아미노산으로 구성된 경우, 유사성 또는 동일성의 정도는 좋기로는 적어도 약 20, 적어도 약 40, 적어도 약 60, 적어도 약 80, 적어도 약 100, 적어도 약 120, 적어도 약 140, 적어도 약 160, 적어도 약 180, 또는 약 200개 아미노산에 대하여, 좋기로는 연속되는 아미노산에 대하여 주어진다.

[0227] CLDN6 폴리펩타이드 변이체에 관하여, 유사성 또는 동일성의 정도는 좋기로는 적어도 약 100, 적어도 약 120, 적어도 약 140, 적어도 약 160, 적어도 약 180, 적어도 약 200, 또는 적어도 약 210개 아미노산의 영역에 대하여 주어진다. 바람직한 구현예에서, 유사성 또는 동일성의 정도는 서열 목록에 나타난 아미노산 서열과 같은 참조 아미노산 서열의 전체 길이에 대하여 주어진다. 서열 유사성 결정을 위한 배열, 좋기로는 서열 동정은 당업계에 알려진 도구를 이용하여, 좋기로는 최상의 서열 배열을 사용하여, 예를 들어 얼라인(Align)을 사용하여, 표준 세팅, 좋기로는 EMBOSS::니들, 매트릭스(Matrix): Blosum62, 갭 오픈(Gap Open) 10.0, 갭 익스텐드(Gap Extend) 0.5를 사용하여 수행될 수 있다.

[0228] "서열 유사성"은 동일하거나 또는 보존적 아미노산 치환을 나타내는 아미노산들의 백분율을 나타낸 것이다. 두 폴리펩타이드 또는 핵산 서열들 사이에 "서열 동일성"은 서열들 사이에 동일하다는 아미노산들 또는 뉴클레오티드들의 백분율을 나타낸 것이다.

[0229] "백분율(percentage) 동일성"은 최상의 정렬 후에 얻어지고, 이러한 백분율은 순수히 통계적이고, 두 서열들 사이에 차이들은 무작위적으로 전체 길이에 따라 분배된다. 두 뉴클레오티드들 또는 아미노산 서열들 사이에 서열 비교들은 전통적으로 그것들을 최적으로 정렬시킨 후에 이러한 서열들을 비교함으로써 수행되고, 상기 비교는 서열 유사성의 국부 영역을 비교하고 확인하기 위해 "비교의 윈도우(window)"에 의해 또는 부분(segment)에 의해 수행될 수 있다. 비교를 위한 서열의 최적 정렬은 손으로 뿐만 아니라, Smith 및 Waterman, 1981, Ads App. Math. 2, 482의 로컬 상동성 알고리즘에 의해, 또는 Neddleman 및 Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48, 443 의 로컬 상동성 알고리즘에 의해, 또는 Pearson 및 Lipman, 1988, Proc. Natl Acad. Sci. USA 85, 2444의 유사성 조

사 방법에 의해, 또는 이러한 알고리즘들을 이용하는 컴퓨터 프로그램들(GAP, BESTFIT, FASTA, BLAST P, BLAST N 및 TFASTA in Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wis.)에 의해, 생산될 수 있다.

[0230] 백분율 동일성은 비교되는 두개의 서열들 사이에 동일한 위치들의 수를 측정하고, 이러한 수를 비교되는 위치들의 수로 나누고, 두 서열들 사이의 백분율 동일성을 얻기 위해 100을 곱하여 결과값을 얻음으로써 계산된다.

[0231] "보존적 치환"은 예컨대, 관련된 잔기들의 극성, 전하, 용해도, 소수성, 친수성, 및/또는 양쪽성 성질에서 유사성에 근거하여 만들어진다. 예컨대, (a) 비극성 (소수성) 아미노산들은 알라닌, 루신, 이소루신, 발린, 프롤린, 페닐알라닌, 트립토판 및 메티오닌을 함유한다; (b) 극성 중성 아미노산들은 글리신, 세린, 트레오닌, 시스테인, 티로신, 아스파라긴, 및 글루타민을 함유한다; (c) 양성적으로 전하를 띠는 (염기) 아미노산들은 아르기닌, 리신, 및 히스티딘을 함유한다; (d) 음성적으로 전하를 띠는 (산성) 아미노산들은 아스팔틱산 및 글루탐산을 함유한다. 치환은 전형적으로 (a)-(d) 그룹들 내에서 만들어질 수 있다. 추가적으로, 글리신 및 프롤린은 [알파]-헬리스를 붕괴시키기 위한 능력에 근거하여 서로 치환될 수 있다. 몇몇 선호되는 치환들은 다음의 그룹들: (i) S 및 T; (ii) P 및 G; 및 (iii) A, V, L 및 I 중에서 만들어질 수 있다. 알려진 유전적 코드, 재조합 및 합성 DNA 기술을 가지고, 숙련된 과학자는 쉽게 보존적 아미노산 변이체를 코딩하는 DNA들을 구성할 수 있다.

[0232] 본 발명은 항체들의 기능적 또는 약력학적 성질들을 변화시키기 위해 Fc 영역에서 변경이 만들어지는 항체들을 포함한다. 그러한 변경은 C1q 결합 및 CDC 또는 FcɣR 결합 및 ADCC의 감소 또는 증가를 가져올 수 있다. 치환들은 예컨대, 하나 이상의 중쇄 불변 영역의 아미노산 잔기들에서 만들어질 수 있고, 그것에 의해 변형된 항체들과 비교하여 항원에 결합하는 능력은 보존되면서 효과기 기능에서 변경을 일으킬 수 있다 (US 5,624,821 및 US 5,648,260 참고).

[0233] 항체의 생체 내 반감기는, 분자가 인택트(intact) CH2 도메인 또는 인택트 Ig Fc 영역을 포함하지 않는 것과 같이, Ig 유사 불변 영역 또는 Ig 불변 영역의 샐비지(salvage) 수용체 에피토프를 변형함으로써 증진될 수 있다 (US 6,121,022 및 US 6,194,551 참고). 생체 내 반감기는 또한 예컨대, 252 위치에서 루신을 트레오닌으로, 254 위치에서 세린을 트레오닌으로, 256 위치에서 페닐알라닌을 트레오닌으로 치환함으로써, Fc 영역에서 돌연변이를 만듬으로써 더 증가될 수 있다(US 6,277,375 참고).

[0234] 또한, 항체들의 효과기 기능을 변화시키기 위해 항체들의 글리코실화 패턴을 변형시킬 수 있다. 예컨대, Fc-수용체에 대한 Fc 영역의 친화도를 증가시키기 위해, 보통 Fc 영역의 297 위치에서 Asn에 결합된 푸코오스(fucose) 유닛을 추가하지 않는 트랜스팩토마에서 항체를 발현시킬 수 있으며, 이에 따라, NK 세포 존재 하에 항체의 ADCC가 증가될 것이다 (Shield et al. (2002) JBC, 277: 26733 참고). 또한, 갈락토실화의 변형은 CDC를 변형하기 위해 만들어질 수 있다.

[0235] 또 다르게, 다른 구현예에서, 돌연변이들은 포화 돌연변이유발(saturation mutagenesis)에 의해서와 같이, 서열을 코딩하는 항-CLDN6 항체의 전부 또는 일부를 따라 무작위적으로 도입될 수 있다.

[0236] 본 발명에 따를 때, 용어 "세포" 또는 "숙주 세포"는 좋기로는 온전한 세포, 효소, 기관 또는 유전 물질과 같은 통상의 세포내 성분을 방출하지 않은 온전한 멤브레인을 가지는 세포와 관련된다. 온전한 세포는 좋기로는 살아있는 세포, 즉 그것의 통상의 대사 기능을 수행할 수 있는 살아있는 세포이다. 좋기로는 본 발명에 따른 상기 용어는 외인성 핵산으로 형질전환 또는 감염시킬 수 있는 임의의 세포와 관련된다. 용어 "세포"는 본 발명에 따라 원핵 세포(예컨대 대장균) 또는 진핵 세포(예컨대, 수지상 세포, B 세포, CHO 세포, COS 세포, K562 세포, HEK293 세포, HELA 세포, 이스트 세포 및 곤충 세포)를 포함한다. 외인성 핵산은 (i) 그 자체로 자유롭게 분산된, (ii) 재조합 벡터 내에 혼입된, 또는 (iii) 숙주 세포 게놈 또는 미토콘드리아 DNA 속으로 통합된 세포 내부에서 발견될 수 있다. 인간, 마우스, 햄스터, 돼지, 염소 및 영장류와 같은 포유동물 세포가 특히 선호된다. 상기 세포는 다수의 조직 형태로부터 유래될 수 있으며, 일차 세포 및 세포주를 포함할 수 있다. 특정 예로는 케라티노사이트, 말초 혈액 백혈구, 골수 줄기 세포 및 배아 줄기세포를 포함한다. 추가 구현예에서, 세포는 항원 제시 세포, 특히 수지상 세포, 단핵구 또는 대식세포이다. 본 명세서에 사용되는 용어 "숙주 세포"는 재조합 발현 벡터가 속으로 도입되어진 세포를 일컫는다.

[0237] 핵산 분자를 포함하는 세포는 바람직하게는 상기 핵산에 의하여 인코딩되는 펩타이드 또는 단백질을 발현한다.

[0238] 용어 "형질전환(transgenic) 동물"은 하나 이상의 이식 유전자(transgene), 좋게는 중쇄 및/또는 경쇄 이식 유전자 또는 트랜스염색체 (동물의 자연 게노믹(genomic) DNA에 삽입된 또는 비삽입된)를 포함하는 게놈을

가지고, 좋게는 이식 유전자들을 발현할 수 있는 동물을 나타낸다. 예컨대, 형질전환 마우스는 인간 경쇄 이식 유전자 및 인간 중쇄 이식 유전자 또는 인간 중쇄 트랜스염색체를 가질 수 있고, 마우스는 CLDN6 및/또는 CLDN6 발현 세포들로 면역화될 때 인간 항-CLDN6 항체들을 생산한다. 중쇄 이식 유전자는 형질전환 마우스들, 예컨대, HCo7 또는 HCo12 마우스들을 비롯한 HuMAb 마우스들의 경우와 같이, 마우스의 염색체 DNA로 삽입될 수 있거나, 인간 중쇄 이식 유전자는 WO 02/43478에 기재된 바와 같이, 트랜스염색체(예컨대, KM) 마우스의 경우처럼, 염색체외적으로 유지될 수 있다. 그러한 형질전환 및 트랜스염색체 마우스들은 V-D-J 재조합 및 아이소타입 스위칭을 거침에 의해 CLDN6에 대한 인간 모노클로날 항체들의 다양한 아이소타입들(예컨대, IgG, IgA 및/또는IgE)을 생산할 수 있다.

[0239] 본 명세서에 사용되는 "감소" 또는 "억제"는 레벨에 있어서, 즉 세포의 증식 레벨에 있어서, 전체적인 감소, 좋기로는 5% 이상, 10% 이상, 20% 이상, 보다 바람직하게는 50% 이상, 및 가장 바람직하게는 75% 이상의 감소를 야기할 수 있는 능력을 의미한다. 용어 "억제" 또는 유사한 어구는 완전한 또는 필수적으로 완전한 억제, 즉 0 또는 필수적으로 0으로의 감소를 포함한다.

[0240] "증가" 또는 "촉진"과 같은 용어는 적어도 약 10%, 좋기로는 적어도 약 20%, 좋기로는 적어도 약 30%, 보다 좋기로는 적어도 약 40%, 보다 좋기로는 적어도 약 50%, 보다 더 좋기로는 적어도 약 80%, 그리고 가장 바람직하게는 적어도 100%의 증가 또는 촉진과 바람직하게 관계된다. 이러한 용어는 또한 시간이 0인 때 특정 화합물 또는 조건에 대한 탐지가능한 신호가 없고, 시간이 0보다 나중의 시점에서는 특정 화합물 또는 조건에 대한 탐지가능한 신호가 있는 환경과 관련될 수도 있다.

[0241] 용어 "면역학적으로 동등한"이란 면역학적으로 동등한 아미노산 서열과 같이 면역학적으로 동등한 분자가, 예를 들어 체액성 및/또는 세포성 면역 반응, 유도된 면역 반응의 강도 및/또는 지속시간, 또는 유도된 면역 반응의 특이성과 같은 면역학적 효과의 형태에 관하여, 동일 또는 필수적으로 동일한 면역학적 성질을 나타내고 및/또는 동일 또는 필수적으로 동일한 면역학적 효과를 행사하는 것을 의미한다. 본 발명의 문맥에서, 용어 "면역학적으로 동등한"이란 면역을 위해 사용되는 펩타이드 또는 펩타이드 변이체의 면역학적 효과 또는 성질과 관련하여 바람직하게 사용된다. 특정의 면역학적 성질은 항체에 결합하고, 적절한 곳에서, 좋기로는 항체 생성을 자극하는 것에 의한 면역 반응을 생성시키는 능력이다. 예를 들어, 어떤 아미노산 서열이 대상체의 면역 시스템에 노출된 때에 면역 반응, 좋기로는 CLDN6의 일부분을 형성하는 참조 아미노산과 같은 참조 아미노산 서열과 반응의 특이성을 가지는 항체를 유도하는 경우, 상기 아미노산 서열은 상기 참조 아미노산 서열에 면역학적으로 동등한 것이다.

[0242] 본 발명의 문맥에 있어서, 용어 "면역 효과기 기능"은, 종양 확산 및 전이의 억제를 포함하는, 종양 성장의 억제 및/또는 종양 발전의 억제를 야기하는 면역 시스템의 성분에 의하여 매개되는 임의의 기능을 포함한다. 좋기로는 면역 효과기 기능은 종양 세포의 살해를 일으킨다. 좋기로는 본 발명의 문맥에서 면역 효과기 기능은 항체-매개 효과기 기능이다. 이와 같은 기능은, 예를 들어 표면 항원에의 항체의 결합, 및/또는 종양-관련 항원을 나르는 세포의 증식 억제, 좋기로는 ADCC 및/또는 CDC에 의한, 보체 의존성 세포독성(CDC), 항체-의존성 세포-매개 세포독성(ADCC), 종양-관련 항원을 전달하는 세포의 아폽토시스의 유도를 포함한다. 따라서, 1 이상의 면역 효과기 기능을 매개하는 능력이 있는 항체는 좋기로는 CDC-매개된 용해, ADCC-매개된 용해, 아폽토시스, 동형 부착 및/또는 식균작용, 좋게는 CDC 매개된 용해 및/또는 ADCC 매개된 용해를 유도하는 것에 의한 세포 살해를 매개할 수 있다. 또한, 항체는 종양 세포의 표면 상의 종양-관련 항원에 단순히 결합하는 것에 의하여 효과를 행사할 수도 있다. 예를 들어, 항체는 종양 세포의 표면 상의 종양-관련 항원에 단지 결합하는 것에 의하여 종양-관련 항원 기능을 차단하거나 또는 아폽토시스를 유도할 수 있다.

[0243] **mAb작용의 메커니즘**

[0244] 후술하는 것이 본 발명의 항체의 치료적 효능에 근거한 메커니즘에 관한 고려를 제공하더라도, 어떠한 방법으로도 본 발명을 제한하는 것으로 고려되지 않는다.

[0245] 여기에 개시된 항체는 면역 시스템, 좋게는 ADCC 또는 CDC를 통한 면역 시스템의 인자와 상호반응할 수 있다. 본 발명의 항체는 직접 종양 세포를 살해하는 표적 페이로드(payload) (예를 들면, 방사성 동위체, 약물 또는 독소)에 또한 이용될 수 있거나, T 림포사이트에서 화학치료적 세포독성 부작용 때문에 면역반응이 제대로 발휘되지 못할 수 있는 항종양 면역 반응을 함유할 수 있는 작용의 상보적인 기전을 통해 종양을 공격하는 전통적인 화학치료제를 상승적으로 사용할 수 있다. 그러나, 본 발명의 항체는 세포 표면 상의 CLDN6에 단순히 결합하는 것에 의하여, 그리하여 세포의 증식을 차단하는 것에 의하여 효능을 또한 행사할 수도 있다.

[0246] **항체 의존성 세포-매개된 세포독성**

[0247] ADCC는 여기에 개시된 것처럼 효과기 세포들, 특히 림포사이트들의 세포 살해 능력을 설명하고, 이것은 좋게는 항체에 의해 마킹(mark)되는 표적 세포를 필요로한다.

[0248] ADCC는 좋게는 항체들이 종양 세포상에 항원과 결합하고, 항체 Fc 도메인들이 면역 효과기 세포들의 표면에서 Fc 수용체와 결합할 때 일어난다. Fc 수용체들의 몇몇 패밀리는 확인되어왔고, 특이적 세포 집단은 특징적으로 규명된 Fc 수용체들을 발현한다. ADCC는 항원 표시 및 종양 관련된 T 세포 반응의 유도를 가져오는 즉각적인 종양 파괴의 다양한 정도를 직접 유도하기 위한 메커니즘으로서 간주될 수 있다. 좋게는, ADCC의 생체 내 유도는 종양 관련 T 세포 반응들 및 숙주 유래 항체 반응을 가져온다.

[0249] **보체 의존성 세포독성**

[0250] CDC는 항체에 의해 지시될 수 있는 다른 세포 살해 방법이다. IgM은 보체 활성을 위한 가장 효과적인 아이소타입이다. IgG1 및 IgG3는 전형적인 보체활성 경로를 통해 CDC를 지시하는 것에서 매우 효과적이다. 좋게는, 이러한 캐스캐이드(cascade)에서, 항원-항체 복합체들의 형성은 IgG 분자 (C1q는 보체 C1의 3개의 하위인자 중 하나이다)를 비롯한 항체 분자를 참여하는 CH2 도메인상에 가깝게 근접하여 다중 C1q 결합 사이트의 노출을 일으킨다. 좋게는, 이러한 노출된 C1q 결합 사이트는 이전의 낮은 친화도의 C1q-IgG 상호반응을 높은 애비더티(avidity)로 전환하고, 이것은 다른 일련의 보체 단백질이 관련된 하나의 캐스캐이드 작용을 일으키고, 효과기 세포 화학주성의/활성제 C3a 및 C5a의 단백질 분해적 방출을 가져온다. 좋게는, 보체 캐스케이드는 세포 내외로의 용질과 물의 자유(free) 통과를 용이하게 해주는 세포 막 내 포어를 생성하는 막 손상성 복합체의 형성으로 종료하는 것이 바람직하다.

[0251] **항체의 생산**

[0252] 본 발명의 항체는 통상적인 모노클로날 항체 방법론, 예컨대, Kohler 및 Milstein, Nature 256: 495 (1975),을 함유하는 다양한 기술에 의해 생산가능하다. 체세포 혼성화 절차가 선호될 지라도, 주로, 모노클로날 항체를 생산하기 위한 다른 기술들이 전개될 수 있다, 예컨대, B-림포사이트 또는 파지의 바이러스 또는 종양 형질변환은 항체 유전자의 라이브러리를 이용한 기술을 나타낸다.

[0253] 모노클로날 항체를 분비하는 하이브리도마를 생산하기 위한 선호되는 동물 시스템은 쥐과(murine) 계열이다. 마우스에서 하이브리도마 생산은 매우 잘 구축된 절차이다. 융합을 위한 면역화된 비장세포의 분리를 위한 면역화 프로토콜 및 기술은 기술분야에서 잘 알려져있다. 융합 파트너 (예컨대, 쥐과 골수 세포)와 융합 절차는 또한 알려져있다.

[0254] 모노클로날 항체를 분비하는 하이브리도마를 제조하기 위한 다른 선호되는 동물 시스템은 래트 및 래빗 시스템이다 (예컨대, Spieker-Polet et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 92:9348 (1995), Rossi et al., Am. J. Clin. Pathol. 124: 295 (2005)에 개시된).

[0255] 다른 구현예에서, CLDN6에 관한 인간 모노클로날 항체들은 마우스 시스템 보다 인간 면역 시스템의 부분들을 수행하는 유전자이식(transgenic) 또는 트랜스염색체적(transchromosomal) 마우스를 이용하여 생성가능하다. 이러한 유전자이식 및 트랜스염색체적 마우스는 각각 HuMab 마우스 및 KM 마우스로 알려져 있고, "유전자 이식 마우스"로 여기에 집합적으로 언급된다. 그러한 유전자 이식 쥐 내에 인간 항체의 생산은 WO2004 035607에서 CD20을 위한 자세히 기재된 내용으로써 수행될 수 있다.

[0256] 모노클로날 항체들을 생성하기 위한 또 다른 전략은 예컨대, Babcock et al., 1996; 규정된 전략의 항체를 생산하는 단일의 분리된 림포사이트들로부터 모노클로날 항체를 생산하기 위한 신규한 전략을 참고한, 규정된 전략의 항체를 생산하는 림포사이트로부터 항체를 코딩하는 유전자를 직접 분리하는 것이다. 재조합 항체 공학의 자세한 내용은 또한 문헌(Welschof 및 Kraus, Recombinant antibodes for cancer therapy ISBN-0-89603-918-8 및 Benny K.C. Lo Antibody Engineering ISBN 1-58829-092-1)을 참고하라.

[0258] **면역화**

[0259] CLDN6에 대한 항체를 생성하기 위해, 전술한 바와 같이, 마우스를 재조합적으로 발현된 부화 제제 또는 그 단편인, CLDN6 서열로부터 유래된 담체-콘쥬게이트된 펩타이드 및/또는 CLDN6 또는 그의 단편을 발현하는 세포들로 면역화시킬 수 있다. 별법으로, 마우스는 전장 인간 CLDN6 또는 그 단편을 코딩하는 DNA로 면역화될 수 있다. CLDN6 항원의 정제된 또는 부화 제제을 이용한 면역화가 항체를 생성하지 않는 경우에, 마우스는 면역 반응을

촉진하기 위해, CLDN6을 발현하는 세포들, 예컨대 세포주로 또한 면역화될 수 있다.

[0260] 면역 반응은 꼬리 정맥 또는 안와후(retroorbital) 블리즈(bleeds)에 의해 수득되는 혈장 및 혈청 시료로 면역화 프로토콜의 코스로 모니터될 수 있다. 충분한 역가의 항-CLDN6 면역글로불린을 가진 마우스는 융합에 이용될 수 있다. 마우스를 희생시키기 3-5일 전에 CLDN6 발현 세포로 복강내 또는 정맥내 부스트시킨 다음 비장을 제거하여 항체분비 하이브리도마의 비율을 증가시킬 수 있다.

[0261] **모노클로날 항체를 생산하는 하이브리도마의 생성**

[0262] CLDN6에 대한 모노클로날 항체를 생산하는 하이브리도마를 생성하기 위해, 면역화된 마우스들로부터의 림프절 세포들 및 비장세포는 분리되고, 마우스 골수 세포주를 비롯한 적절한 불사화된 세포주에 융합될 수 있다. 결과적으로 나오는 하이브리도마들은 그리고나서 항원 특이적 항체의 생산을 위해 스크린될 수 있다. 그리고나서, 각각의 웰들은 항체를 분비하는 하이브리도마에 대해 ELISA에 의해 스크린될 수 있다. CLDN6 발현 세포들을 이용한 면역형광 및 FACS에 의해, CLDN6에 특이적인 항체들이 확인될 수 있다. 항체를 분비하는 하이브리도마는 리플레이트(replate)될 수 있고, 다시 스크린될 수 있으며, 만약 항-CLDN6 모노클로날 항체들을 위해 여전히 양성이라면 한계 희석에 의해 서브클론될 수 있다. 안정적인 서브클론은 그리고나서 특성화를 위한 조직 배양 배지에서 항체를 생성하기 위해 시험관내(in vitro)에서 배양될 수 있다.

[0263] **모노클로날 항체를 생산하는 트랜스펙토마(transfectoma)의 생성**

[0264] 본 발명의 항체들은 예컨대, 기술분야에 잘 알려져 있는 재조합 DNA 기술 및 유전자 감염 방법들의 조합을 이용하여 숙주 세포 트랜스펙토마에서 생산될 수 있다 (Morrison, S. (1985) Science 229: 1202).

[0265] 예컨대, 일 구현예에서, 흥미로운 유전자(들), 예컨대, 항체 유전자들은 WO 87/04462, WO 89/01036 및 EP 338 841에 개시된 GS 유전자 발현 시스템 또는 기술분야에 잘 알려진 다른 발현 시스템에 의해 사용된 것을 비롯한 진핵 발현 플라스미드를 비롯한 발현 벡터내로 라이게이션 될 수 있다. 클론된 항체 유전자들을 가진 정제된 플라스미드는 CHO 세포들, NS/0 세포들, HEK293T 세포들 또는HEK293 세포들 등의 진핵생물 숙주 세포 또는 대안적으로 식물 유래 세포들, 곰팡이 또는 효모 세포들과 같은 다른 진핵 세포들내로 도입될 수 있다. 이러한 유전자들을 도입하기 위해 사용되는 방법은 일렉트로포레이션, 리포펙틴, 리포펙타민 또는 다른 것들을 비롯한 기술분야에 기재된 방법들일 수 있다. 숙주 세포 내에서 이러한 항체 유전자들의 도입 후에, 항체를 발현하는 세포들은 확인되고 선택된다. 이러한 세포들은 그리고나서 그 발현 수준을 위해 증폭되고, 항체를 생산하기 위해 업스케일(upscale)될 수 있는 트랜스펙토마를 나타낸다. 재조합 항체들은 이러한 배양 상청액 및/또는 세포들로부터 분리되고 정제될 수 있다.

[0266] 다르게, 클론된 항체 유전자들은 E.coli를 비롯한 미생물을 비롯한 원핵 세포들을 함유하는 다른 발현 시스템에서 발현될 수 있다. 또한, 항체들은 양(sheep) 또는 래빗으로부터의 우유에서 또는 암탉의 달걀에서와 같은 형질전환 비인간 동물들 또는 형질전환 식물들에서 생산될 수 있다(Verma, R., et al. (1998) J. Immunol. Meth. 216: 165-181; Pollock, et al. (1999) J. Immunol. Meth. 231: 147-157; 및 Fischer, R., et al. (1999) Biol. Chem. 380: 825-839 참고).

[0267] **인택트(intact) 항체를 발현하기 위한 부분적인 항체 서열의 용도 (즉, 인간화 및 키메라화)**

[0268] a) 키메라화

[0269] 뮤린(murine) 모노클로날 항체들은 독소 또는 방사성 동위원소로 표지될 때 인간 내에서 치료적 항체로써 사용될 수 있다. 비표지된 뮤린 항체들은 반복적으로 치료적 효과의 감소를 가져올 때 인간 내에서 높은 면역성이다. 뮤린 항체의 면역원성은 중쇄 불변 영역에 의해 매개된다. 인간에서 뮤린 항체들의 면역원성은 만약 각각의 항체들이 키메라화되거나 인간화되면 감소되거나 완전히 막을 수 있다. 키메라 항체들은 항체들이고, 뮤린 항체로부터 유래된 가변 영역 및 인간 면역글로불린 불변 영역을 가지는 것을 비롯한 상이한 동물 종들로부터 유래된 상이한 부분들이다. 항체들의 키메라화는 인간 중쇄 및 경쇄의 불변영역과 뮤린 항체 중쇄 및 경쇄의 불변 영역을 결합함에 의해 성취된다 (예컨대, Kraus et al., in Methods in Molecular Biology series, Recombinant antibodies for cancer therapy ISBN-0-89603-918-8에 의해 개시된). 선호되는 방식으로는, 키메라화된 항체는 인간 카파 경쇄의 불변 영역을 뮤린 경쇄의 가변 영역에 결합시킴으로써 생성할 수 있다. 또 다른 선호되는 항체의 키메라화 방식으로는 인간 람다(lambda) 경쇄의 불변 영역을 뮤린 경쇄의 가변 영역에 결합시키는 방법이 있다. 키메라화된 항체 생성을 위한 선호되는 중쇄 불변 영역은 IgG1, IgG3 및 IgG4가 있다. 그 밖에 키메라 항체의 생성을 위해 선호되는 중쇄 불변 영역으로는 IgG2, IgA, IgD 및 IgM이 있다.

[0270] b) 인간화

[0271] 항체는 주로 6개의 중쇄 및 경쇄 CDR안에 존재하는 아미노산 잔기를 통해 우세하게 표적 항원과 반응한다. 이 때문에 CDR 내부의 아미노산 서열들은 CDR 외부의 서열보다 각각의 항체들 사이에서 다양하게 나타난다. CDR 서열이 대부분의 항체-항원간 반응에 있어 결정적 역할을 하기 때문에, 서로 다른 성질들을 가진 서로 다른 항체로부터의 프래임워크(framework) 서열들 상에 이식되는 특이적으로 일어나는 항체로부터 CDR 서열을 포함하는 발현 벡터를 구축함으로써, 특이적 자연적으로 발생하는 항체들의 성질을 모방하는 재조합 항체를 발현하는 것이 가능하다(e.g., Riechmann, L. et al. (1998) Nature 332: 323-327; Jones, P. et al. (1986) Nature 321: 522-525; 및 Queen, C. et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 86: 10029-10033). 그러한 프래임워크 서열은 점라인(germline) 항체 유전자 서열을 포함하는 공공 DNA 데이터베이스에서 얻을 수 있다. 이러한 점라인 서열은 성숙한 항체 유전자 서열과 다를 것인데, 이들은 B 세포의 성숙 분열기 동안 V (D) J가 결합됨으로써 생성되는 완전히 결합된 가변 유전자를 포함하지 않을 것이기 때문이다. 점라인 유전자 서열은 또한 가변 영역 전체에 고르게 분포된 각각의 고친화도 이차적 레퍼토리 항체와도 다를 것이다. 예를 들어, 체세포 돌연변이는 프래임워크 영역 1의 아미노 말단 부분과 프래임워크 영역 4의 카르복시기 말단 부분에서는 상대적으로 빈번하지 않다. 또한 많은 체세포 돌연변이는 항체의 결합 성질을 크게 변화시키지 못한다. 따라서, 원래의 항체의 결합 성질과 유사한 성질을 갖는 온전한 재조합 항체를 재현하고자 특정 항체의 DNA 서열 전체를 얻을 필요는 없다(WO 99/45962). 이 같은 목적을 위해서는 해당 CDR 영역에 걸쳐있는(spanning) 중쇄 및 경쇄 서열의 일부만으로 충분하다. 이 부분적 서열은 재조합된 항체 가변 영역들에 기여되는 점라인 가변 및 결합 유전자 단편을 결정하는 데 사용된다. 그 후 이 점라인 서열은 가변 영역의 빠진 부분을 채우게 된다. 중쇄 및 경쇄 리딩(leading) 서열은 단백질 성숙기 동안 분열되어 최종 항체의 성질에는 아무런 영향을 끼치지 못한다. 빠진 서열을 더하기 위해, 클론된 cDNA 서열들은 라이게이션 또는 PCR 증폭을 통해 합성 올리고뉴클레오티드와 결합될 수 있다. 또는 그 대신, 전체적으로 합성 가변 영역 클론을 생성하기 위해 가변 영역 전체가 하나의 짧고 겹쳐진 올리고뉴클레오티드 세트로 합성되어 PCR 증폭을 통해 합성될 수도 있다. 이 과정은 특정 제한 사이트의 제거나 함유, 또는 특정 코돈의 최적화 등의 장점이 있다.

[0272] 하이브리도마로부터의 중쇄 및 경쇄 전사물의 뉴클레오티드 서열은 자연적 서열과 같은 동일한 아미노산 코딩 능력을 갖는 합성 V 서열을 생성하기 위한 합성뉴클레오티드의 중복 세트를 고안하는데 사용된다. 이러한 합성 중쇄 및 카파 사슬 서열은 세가지 측면에서 자연적 서열과 다를 수 있다: 첫째, 반복되는 뉴클레오티드 염기의 스트링(strings)들은 올리고뉴클레오티드 합성과 PCR 증폭을 촉진하기 위해 방해받는다; 둘째, Kozak의 룰(Kozak, 1991, J. Biol. Chem. 266: 19867-19870)에 따라 최적 번역 개시 사이트들이 병합된다; 셋째, HindIII 사이트들이 번역 개시 사이트들의 상류에 위치하도록 조작된다.

[0273] 중쇄 가변 영역과 경쇄 가변 영역을 모두에 있어서, 최적화된 코딩 및 그에 따르는 비코딩, 스트랜드(strand) 서열들은 대응하는 비코딩 올리고뉴클레오타이드의 대략 중간 지점에서 30-50개의 뉴클레오티드로 쪼개진다. 이에 따라 각각의 사슬에서, 올리고뉴클레오티드들은 150-400개의 뉴클레오티드 단편을 걸치는 중복 더블 스트랜디드 세트로 조합될 수 있다. 이 풀은 다시 150-400개 뉴클레오티드의 PCR 증폭 생산물을 생성하는 데 주형으로 쓰인다. 전형적으로, 단일 가변 영역 올리고뉴클리오티드 세트는 2개의 풀로 나뉘어 따로 증폭되어 두 개의 겹치는 PCR 생산물을 생성하게 된다. 이렇게 생성된 겹치는 생산물은 다시 PCR 증폭에 의해 결합되어 완전한 가변 영역을 형성한다. 발현 벡터 구축물로 쉽게 클론될 수 있는 단편을 생성하기 위해, PCR 증폭 내에 중쇄 또는 경쇄 불변 영역의 겹치는 단편을 PCR 증폭에 포함시키는 것이 바람직할 수 있다.

[0274] 재구축된 키메라화 또는 인간화된 중쇄 및 경쇄 가변 영역들은 클론된 프로모터, 리더, 번역 개시, 불변 영역, 3' 비번역된, 폴리아데닐레이션, 전사 종결 서열과 결합되어 발현 벡터 구축물을 형성한다. 중쇄 및 경쇄 발현 구축물은 단일 벡터로 결합되거나, 숙주 세포로 공동-감염되거나, 연속적으로 감염되거나, 혹은 개별적으로 감염될 수 있다. 이들은 이후 합쳐져 두 사슬을 모두 발현하는 숙주 세포를 구성하게 된다. 인간 IgGκ를 위한 발현 벡터의 구축에 사용되는 플라스미드에 대해서 설명한다. 이 플라스미드는, PCR 증폭된 V 중쇄 및 V 카파 경쇄 cDNA 서열이 완전한 중쇄 및 경쇄 미니유전자들(minigenes)을 재구축하는 데 쓰일 수 있도록 구축될 수 있다. 이러한 플라스미드는 완전히 인간 또는 키메라화된 IgG1, 카파 또는 IgG4, 카파 항체들을 발현하는 데 쓰일 수 있다. 유사한 플라스미드가 다른 중쇄 아이소타입 발현이나 람다 경쇄를 포함하는 항체 발현을 위해 구축될 수 있다.

[0275] 따라서, 본 발명의 또 다른 면으로, 본 발명의 항-CLDN6 항체들의 구조적 특질은 CLDN6에 결합하는 것을 비롯한, 본 발명의 항체들의 적어도 하나의 기능적 특징을 보유하는 구조적으로 관련된 인간화된 항-CLDN6 항체들을 생성하기 위해 사용된다. 좀 더 구체적으로, 마우스 모노클로날 항체들의 하나 이상의 CDR 영역들은 본 발

명의 추가적인, 재조합적으로-공학된(engineered), 인간화된 항-CLDN6 항체들을 생성하기 위해 알려진 인간 프래임워크 영역들 및 CDR들에 재조합적으로 결합될 수 있다.

[0277] **항원 발현 세포들에 대한 결합**

[0278] CLD18에 결합하는 항체의 능력은 예들에서 개시된 것들을 비롯한 표준 결합 어세이들을 이용하여 측정될 수 있다(예컨대, ELISA, 웨스턴 블롯, 면역형광 및 플로우 사이토미트리 분석)._

[0280] **항체의 분리 및 특성화**

[0281] 항-CLDN6 항체들을 정제하기 위해, 선택된 하이브리도마들은 모노클로날 항체 정제를 위한 2-리터 스피너-플라스크에서 자랄 수 있다. 또 다르게, 항-CLDN6 항체들은 투석 바이오리액터에서 생산될 수 있다. 상청액은 필터될 수 있고, 만약 필요하다면, 단백질 G-세파로스 또는 단백질 A-세파로스로 친화도 크로마토그래피 전에 농축될 수 있다. 녹여서 분리된(eluted) IgG는 순도 보장을 위해 젤 전기영동 및 고성능 액체 크로마토그래피에 의해 체크될 수 있다. 완충 용액은 PBS로 교체될 수 있고, 농도는 1.43 소강 계수(extinction coefficient)를 이용하여 OD280에 의해 측정된다. 모노클로날 항체들을 분취하여, -80℃에서 보관할 수 있다.

[0282] 만약 선택된 항-CLDN6 모노클로날 항체들이 유일한 에피토프와 결합하는지를 알아보기 위해, 사이트-지시된(site-directed) 또는 멀티사이트 지시된(multi-site directed) 돌연변이유발(mutagenesis)이 이용될 수 있다.

[0283]

[0284] **아이소타입 결정(determination)**

[0285] 정제된 항체들의 아이소타입을 알아보기 위해, 다양한 키트의 아이소타입 ELISA(예컨대, Zymed, Roche Diagnostics)가 수행되었다. 마이크로타이터 플레이트의 웰들은 항-마우스 Ig로 코팅될 수 있다. 블록킹 후에, 플레이트는 2시간동안 주변 온도에서 모노클로날 항체들 또는 정제된 아이소타입 대조군들로 반응시켰다. 그리고나서 웰들은 마우스 IgG1, IgG2a, IgG2b 또는 IgG3, IgA 또는 마우스 IgM-특이적 페록시다제-콘쥬게이트된 프로브들과 반응시킬 수 있다. 세척 후, 플레이트들은 ABTS 기질 (1mg/ml)로 현상시키고, 405-650 OD로 분석할 수 있다. 또 다르게는, 아이소스트립 마우스 모노클로날 항체 아이소타이핑 키트 (Roche, Cat. No. 1493027)가 제조자에 의해 기재된 바와 같이 사용될 수 있다.

[0286] **플로우 사이토미트리 분석(Flow cytometric analysis)**

[0287] CLDN6를 발현하는 살아있는 세포들에 대한 모노클로날 항체들의 결합 또는 면역화된 마우스들의 혈청에서 항-CLDN6 항체들의 존재를 증명하기 위해, 플로우 사이토미트리가 사용되었다. 천연 또는 감염후 CLDN6 발현하는 세포주들 및 CLDN6 발현을 결여한 음성 대조군들 (표준 성장 조건에서 자란)은 하이브리도마 상청액들 또는 1% FBS 함유 PBS 내 다양한 농도의 모노클로날 항체들과 혼합될수 있고, 30분 동안 4℃에서 인큐베이션 할 수 있다. 세척 후, APC- 또는 Alexa647-표지된 항 IgG 항체는 초기 항체 염색과 같은 조건하에 CLDN6-결합된 모노클로날 항체와 결합할 수 있다. 시료들은 단일, 살아있는 세포들을 게이트(gate)하기 위한 빛 및 사이드 산란 특징(light 및 side scatter properties)들을 이용한 FACS 기구로 플로우 사이토미트리에 의해 분석될 수 있다. 단일 측정에서 비특정 바인더(binder)들로부터 CLDN6-특이적 모노클로날 항체들을 구별하기 위해, 공동-감염 방법이 구현될 수 있다. CLDN6 및 형광 마커를 코딩하는 플라스미드로 일시적으로 감염된 세포들은 상기에 기재된 바와 같이 염색될 수 있다. 감염된 세포들은 항체-염색된 세포들과 서로 다른 형광 채널에서 검출될 수 있다. 감염된 세포들의 다수가 이식유전자(transgene) 모두를 발현하는 것처럼, CLDN6-특이적 모노클로날 항체들은 형광 마커 발현 세포들에 선호되게 결합하는 반면, 비특이적 항체들은 비감염된 세포들에 비교할만한 비율로 결합한다. 형광 현미경을 이용하는 대안적인 어세이는 플로우 사이토미트리 어세이에 더하여 또는 대신으로 사용될 수 있다. 세포들은 상기한 바와 같이 정확히 염색되고, 형광 현미경에 의해 조사될 수 있다.

[0288]

[0289] **면역 형광 현미경**

[0290] 면역화된 마우스의 혈청에 항 CLDN6 항체의 존재 또는 CLDN6을 발현하는 살아있는 세포와 모노클로날 항체와의 결합을 증명하기 위해 면역 형광 현미경이 사용될 수 있다. 예를 들어 자발적으로, 혹은 감염 후에 CLDN6을 발현하는 세포주나 CLDN6 발현을 결여하는 음성대조군은 10% FCS, 2 mM L-글루타민, 100IU/ml 페니실린, 100㎍/ml 스트렙토마이신이 보충된 DMEM/F12 배지에서 표준 성장 조건하의 챔버 슬라이드에서 배양된다. 세포들은 그

후 메탄올이나 파라포름알데히드로 고정되거나 미처리한 채로 둔다. 그리고나서 30분간 25℃에서 CLDN6에 대해 모노클로날 항체와 반응하게 된다. 세척 후, 이 세포들은 동일 조건에서 Alexa555 표지된 항-마우스 IgG 2차 항체(Molecular Probes)와 반응하게 된다. 그리고 나서 형광 현미경으로 조사할 수 있다.

[0291] 세포안의 총 CLDN6 수준은 세포가 메탄올 또는 파라포름알데히드로 고정되거나 트리톤 X-100으로 투과될 때 관찰할 수 있다. 살아있는 세포와 투과되지 않고 파라포름알데히드 고정된 세포에서 CLDN6의 표면 국소화(localization)가 관찰될 수 있다. 또한 치밀 이음새(tight junction)에 대한 CLDN6의 표적화는 ZO-1과 같은 치밀 이음새 마커와의 공동-염색에 의해 분석될 수 있다. 또한, 세포막내의 항체 결합 및 CLDN6 국소화의 효과를 조사할 수 있다.

[0293] **웨스턴 블럿(Western Blot)**

[0294] CLDN6 항원과의 반응성에 대해, 항-CLDN6 IgG를 웨스턴 블럿팅에 의해 추가로 실험할 수 있다. 간단히 말해, CLDN6을 발현하는 세포나 적절한 음성대조군으로부터의 세포추출물을 준비해 SDS 폴리아크릴아마이드 젤 전기영동시킬 수 있다. 전기영동 후, 분리된 항원은 니트로셀룰로오스 막으로 이동되어 차단되고, 실험할 모노클로날 항체와 함께 조사된다. IgG 결합은 항-마우스 IgG 페록시다아제를 사용해 검출되고 ECL 기질로 현상(develop)된다.

[0295] **면역조직화학(Immunohistochemistry)**

[0296] 항-CLDN6 마우스 IgGs는 당업자에게는 잘 알려진 방식으로 면역조직화학에 의해, 예컨대, 수술 과정에서 환자로부터, 혹은 자발적으로 또는 형질 감염후, CLDN6을 발현하는 세포주가 접종된 이종 이식된 종양을 갖고 있는 마우스로부터 얻은 암 없는 조직이나 암 조직 시료들로부터 파라포름알데히드나 아세톤 고정된 크라이오섹션, 또는 파라핀을 함유하고 파라포름알데히드로 고정된 조직 섹션을 사용하는 방식에 의해, CLDN6 항원에 대한 반응성을 추가적으로 측정할 수 있다. 면역염색을 위해, CLDN6에 대해 반응성있는 항체들은 인큐베이션될 수 있고, 그 다음으로 파는 사람의 지시에 따라 고트 항-마우스 또는 고트(goat) 항-래빗 항체들(DAKO)과 홀스라디시-페록시다제 콘쥬게이트된다.

[0298] **시험관 내 항체의 식균(phagocytic) 및 세포 살해 작용**

[0299] CLDN6에 대한 특이적인 결합에 더해, CLDN6를 발현하고 CLDN6이 세포 표면에 부착되어 있는 것을 특징으로 하는 세포의 식균(phagocytosis) 및 살해를 매개하는 능력을 측정하기 위해 항-CLDN6 항체들을 시험할 수 있다. 시험관 내 모노클로날 항체 활성의 측정은 생체 내 모델 시험에 앞서 초기 스크리닝을 제공할 것이다.

[0300] *항체 의존적 세포-매개된 세포독성(ADCC):*

[0301] 간단히 말해, 건강한 공여자로부터 나온 PMNs(polymorphonuclear cells), NK 세포, 모노사이트, 단핵 세포, 또는 다른 효과기 세포는 오염된 적혈구의 용해 후에 피콜 하이파크 밀도 원심분리에 의해 정제될 수 있다. 세척된 효과기 세포는 다양한 효과기 세포 대 표적 세포의 비율로 10% 열-비활성화된 FCS 또는 대신 5% 열-비활성화된 인간 혈청이 보충된 RPMI에서 현탁되고 CLDN6를 발현하고 CLDN6가 세포 표면에 부착되는 것을 특징으로 하는 $^{51}Cr$ 로 표지된 표적 세포와 섞인다. 이와 다르게, 표적 세포가 리간드를 향상시키는 형광(BATDA)으로 표지될 수도 있다. 죽은 세포에서 나오는 강화하는 리간드를 가진 유로피움의 고형광 킬레이트는 형광계에 의해 측정될 수 있다. 또다른 대안 기술은 루시퍼레이즈를 가진 표적 세포의 감염을 활용하는 것이다. 첨가된 루시퍼 옐로우는 이후 생존가능한 세포에 의해서만 산화될 수도 있다. 정제된 항-CLDN6 IgGs는 이후 다양한 농도로 더해질 수 있다. 무관한 인간 IgG는 음성대조군으로 쓰일 수 있다. 어세이는 사용된 효과기 세포 유형에 따라 적게는 4시간에서 많게는 20시간 동안 37℃에서 실시된다. 시료들은 배양 상청액의 $^{51}Cr$ 배출 또는 EuTDA 킬레이트 화합물의 존재를 측정함으로써 세포용해를 위해 어세이된다. 다르게, 루시퍼옐로우의 산화에 의한 발광은 생존가능한 세포의 척도이다.

[0302] 항-CLDN6 모노클로날 항체는 또한 세포용해가 다수의 모노클로날 항체와 함께 증가하는 지를 측정하기 위해 다양한 조합으로 테스트될 수 있다.

[0303] *보체 의존적 세포독성(CDC)*

[0304] 모노클로날 항-CLDN6 항체의 CDC 매개 능력을 다양한 알려진 테크닉을 통해 테스트할 수 있다. 예를 들어, 보체를 위한 혈청은 당업자에게 알려진 방식에 따라 혈액으로부터 얻을 수 있다. mAbs의 CDC 활성을 측정하기 위해서는 다른 방법이 사용된다. 예를 들어 $^{51}Cr$ 배출을 측정할 수도 있고 상승한 세포막 삼투성을 PI 제외 어세이를

사용해 측정할 수도 있다. 간단하게, 표적 세포를 세척해 5 x $10^5$/ml를 다양한 농도의 mAb로 10-30분간 37℃ 또는 실온에서 인큐베이팅할 수 있다. 그리고나서 혈청이나 혈장을 최종 농도가 20%(v/v)가 될 때까지 더해 세포를 37℃에서 20-30분간 둔다. 각각의 시료에서 나온 모든 세포를 FACS 튜브의 PI 용액에 더한다. 이 혼합물은 FACS 어레이를 사용하여 플로우 사이토미트릭 분석을 통해 즉시 분석할 수 있다.

[0305] 다른 어세이에서, CDC 유도는 부착 세포(adherent cell)에 따라 결정된다. 이러한 어세이의 일 구현예에서, 세포들이 조직배양 편평한 바닥 마이크로티터 플레이트에서 3 x $10^4$/웰의 밀도로 어세이 24시간 전에 씨드(seed)된다. 그 다음날 생장 배지는 제거되고 이 세포들은 항체들과 함께 세벌(triplicate)로 인큐베이트된다. 대조군 세포들은 각각 배경(background) 용해나 최대 용해의 측정을 위해 생장 배지나 0.2%의 사포닌을 함유하는 생장 배지와 함께 인큐베이트된다. 20분간 상온에서 인큐베이트한 후에 상청액은 제거되고 DMEM(37℃ 에서 예열된) 안의 20%(v/v) 인간 혈장이나 혈청을 세포에 더해 37℃에서 다시 20분간 인큐베이트한다. 각 시료에서 나온 모든 세포들을 프로피디움 요오드화물 용액(10㎍/ml)에 더한다. 그리고나서, 상청액은 2.5㎍/ml 에티디움 브로마이드를 포함하는 PBS로 대체되고 520 nm에서 여기(excitation)에 의한 형광 방출은 Tecan Safire를 사용해 600nm에서 측정된다. 그 백분율(percentage) 특이적 용해는 다음과 같이 계산된다.: % 특이적 용해 = (형광 시료-형광 배경)/ (형광 최대 용해-형광 배경) x 100

[0306] *모노클로날 항체에 의한 세포 확산의 억제:*

[0307] 아폽토시스(apoptosis) 개시 능력을 시험하기 위해, 예를 들어 모노클로날 항 CLDN6를 CLDN6 양성 종양 세포, 또는 CLDN6로 감염된 종양 세포와 37℃에서 약 20시간 동안 인큐베이트할 수 있다. 이 세포들은 채취된 후 Annexin-V 결합되는 버퍼(BD Bioscience)에서 세척되어 FITC나 APC(BD Bioscience)와 접합된 Annexin V와 15분간 어둠속에서 인큐베이트 된다. 각 시료에서 나온 모든 세포들은 FACS 튜브 안의 PI 용액 (PBS 중10 ㎍/ml)에 더해지고 즉시 플로우 사이토메트리(위에서 언급한대로)에 의해 평가된다. 대신 모노클로날 항체에 의한 세포 증식의 일반적 억제는 상용 키트로 검출할 수 있다. DELFIA Cell Proliferation Kit (Perkin-Elmer, Cat. No. AD0200)는 마이크로플레이트 안의 증식하는 세포의 DNA 합성 동안의 5-브로모-2'-디옥시우리딘 (BrdU) 혼합 측정에 기초한 비동위원소 면역 어세이이다. 혼합된 BrdU는 유로피움 표지된 모노클로날 항체를 사용해 검출된다. 항체 검출을 허락하기 위해, 세포들은 Fix 용액을 사용해 고정되고 DNA 변성된다. 결합되어 있지 않은 항체는 세척되어 떨어져 나가고, 표지된 항체로부터 유로피움 이온을 분리시키기 위해 용액에 DELFIA 유도인자가 첨가된다. 이 용액에서 이들은 DELFIA 유도인자의 구성성분을 가진 고 형광 킬레이트 화합물을 형성한다. 측정된 형광 -검출에서 시간-분해된(time-resolved) 플루오로메트리를 활용-은 각 웰의 세포에서 DNA 합성에 비례한다.

[0308] **전임상 연구**

[0309] CLDN6 발현 종양 세포의 성장 조절에 있어, 그 효능을 측정하기 위해, CLDN6에 결합하는 모노클로날 항체는 또한 생체 내 모델(예를 들어 CLDN6을 발현할 가능성이 있는 세포주가 주입된, 또는 감염 후 세포주로 접종된 이종 이식 종양을 가진 면역 결핍 마우스에서)에서 실험할 수 있다.

[0310] CLDN6 발현 종양 세포를 면역부족 마우스나 다른 동물에 이종이식한 후의 체내 연구를 본 발명의 항체를 사용해 수행할 수 있다. 종양의 형성이나 종양 관련 증상을 예방하기 위한 항체의 효과를 측정하기 위해, 종양 없는 마우스에게 항체들을 투여하고 이어서 종양 세포의 투여할 수 있다. 항체들을 종양이 있는 마우스에 투여하여 종양의 성장, 전이 또는 종양 관련 증상을 줄이기 위한 각각의 항체의 치료 효능을 측정할 수 있다. 항체 적용(application)은 세포 증식 억제제(cystostatic drugs), 성장 인자 억제제, 세포주기 차단제, 혈관신생 억제제 같은 다른 물질과 다른 항체들의 적용을 조합들의 시너지 효과나 잠재적 독성을 측정할 수 있다. 본 발명의 항체들에 의해 나타나는 독성 부작용을 분석하기 위해 동물에 항체나 대조 시약을 주입하고 CLDN6 항체 치료와 연관이 있을 수 있는 증상에 대해 면밀히 조사할 수 있다. CLDN6 항체의 생체 내 적용의 가능한 부작용으로는 태반을 포함하는 CLDN6 발현 조직에서의 독성이 있다. 인간이나 그 밖에 쥐와 같은 다른 종에서의 CLDN6을 인식하는 항체는 특히 인간에서의 모노클로날 CLDN6 항체의 적용에 의해 나타나는 잠재적 부작용을 예방하는 데 유용하다.

[0311] **에피토프 맵핑(mapping)**

[0312] 본 발명의 항체에 의해 인지되는 에피토프 맵핑을 "Epitope Mapping Protocols (Methods in Molecular Biology) by Glenn E. Morris ISBN-089603-375-9 및 'Epitope Mapping: A Practical Approach" Practical Approach Series, 248 by Olwyn M. R. Westwood, Frank C. Hay 에 자세히 설명된 대로 수행할 수 있다.

[0313] **I. CLDN6에 결합되는 이중특이적(bispecific)/다중특이적(multispecific) 분자**

[0314] 본 발명의 또 다른 구현예 있어서, CLDN6에 대한 항체는 또 다른 기능적 분자, 예를 들면 또 다른 펩타이드나 단백질(예를 들어 Fab' 단편)에 파생되거나 연결되어 다수의 결합 사이트나 표적 에피토프에 결합하는 이중특이적 혹은 다중특이적 분자를 생성할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 항체가 또다른 항체, 펩타이드, 또는 결합 의태물(mimetic) 등의 다른 하나의 혹은 여러개의 결합 분자에 기능적으로 연결될 수 있다(화학적 결합, 유전적 융합, 비공유 결합 또는 다른 방법에 의해).

[0315] 따라서, 본 발명은 CLDN6에 대한 적어도 하나의 일차 결합 특이성과 이차 표적 에피토프에 대한 이차 결합 특이성을 가진 이중특이적이며 다중특이적인 분자들을 포함한다. 본 발명의 특정 구현예에 있어서, 이차 표적 에피토프는 예컨대, 인간 Fc-감마 RI(CD64)나 인간 Fc-알파 수용체(CD89) 같은 Fc 수용체나, CD3같은 T 세포 수용체이다. 그러므로, 본 발명은 효과기 세포들(예컨대, 모노사이트, 소식세포(macrophagesors), 또는 다형핵세포(PMNs) 등)을 발현하는 Fc-감마R, Fc-알파R이나 FC-엡실론R에 결합할 수 있으면서 CLDN6를 발현하고 세포 표면에 CLDN6가 부착된 것을 특징으로 하는 표적 세포에도 결합 가능한 이중특이적, 다중특이적 분자들을 포함한다. 이러한 이중특이적, 다중특이적 분자들은 CLDN6를 발현하고 세포 표면에 CLDN6가 부착된 것을 특징으로 하는 세포들을 수용체 세포에 표적으로 하거나 CLDN6를 발현하고 세포 표면에 CLDN6가 부착된 것을 특징으로 하는 세포의 식균 작용, 항체 의존적 세포 독성(ADCC), 사이토카인 배출, 또는 슈퍼옥사이드 음이온의 생성과 같은 Fc 수용체에 의해 매개되는 효과기 세포 작용을 유발할 수도 있다.

[0316] 본 발명의 이중특이적, 다중특이적 분자들은 또한 항-Fc 결합 특이성과 항(anti)-CLDN6 결합 특이성에 더하여 삼차 결합 특이성을 포함할 수 있다. 일 구현예에서, 삼차 결합 특이성은 항(anti)-향상 인자(EF,enhancement factor) 부분, 예를 들면 세포독성 작용에 관여하는 표면 단백질에 결합함으로써 표적 세포에 대한 면역 반응을 증가시키는 분자이다. "항-향상 인자 부분"은 수용체 같은 특정 분자에 결합함으로써 Fc 수용체나 표적 세포 항원에 대해 결합 결정자(determinant)의 효과를 향상시키는 결과를 가져오는 항체나 기능적 항체 단편, 또는 항원이나 리간드일 수 있다. "항-향상 인자 부분"은 Fc 수용체나 표적 세포 항원을 결합할 수 있다. 대신, 항-향상 인자 부분은 일차, 이차 결합 특이성이 결합하는 엔터티(entity)와는 다른 엔터티(entity)에 결합할 수 있다. 예를 들어, 항-향상 인자 부분은 세포독성의 T 세포(예를 들면, CD2, CD3, CD8, CD28, CD4, CD40, ICAM-1 등 표적 세포에 대한 면역 반응을 증가시키는 면역 세포)를 결합할 수 있다.

[0317] 일 구현예에서, 본 발명의 이중특이적, 다중특이적 분자들은 결합 특이성으로서 적어도 하나의 항체, 예를 들어, Fab, Fab', $F(ab')_2$, Fv, 또는 단일 사슬 Fv 등을 포함한다. 이 항체는 또한 경쇄나 중쇄 다이머(dimer), 또는 그것의 소수(minimal) 단편, 예를 들어 Fv나 Ladner et al., US 4,946,778에 묘사된 바와 같은 단일 사슬 구축물일 수도 있다. 항체는 또한 US2003/0118592 및 US 2003/0133939에서 설명된 바와 같이 결합 도메인 면역 글로불린 항체 융합 단백질일 수도 있다.

[0318] 일 구현예예서, 본 발명의 이중특이적, 다중특이적 분자들은 효과기 세포의 표면에 존재하는 Fc-감마R이나 Fc-알파R에 대한 결합 특이성과, CLDN6과 같은 표적 세포 항원에 대한 결합 특이성을 포함한다.

[0319] 일 구현예에서, Fc 수용체에 대한 결합 특이성은 모노클로날 항체에 의해 생산되며, 모노클로날 항체의 결합은 인간 면역 글로불린 항체 G(IgG)에 의해 억제되지 않는다. 여기서 사용된 바와 같이, "IgG 수용체"는 염색체 1에 위치하는 8개의 감마-사슬 유전자 중 하나를 가리킨다. 이러한 유전자는 Fc-감마RI (CD64), Fc-감마RII (CD32), 및 Fc-감마RIII (CD16)라는 세개의 Fc-감마 수용체 클래스로 구분되는 총 12개의 트랜스멤브레인 또는 가용성 수용체 아이소형태(isoform)를 코딩한다. 일 선호된 구현예에서, Fc-감마 수용체는 인간 고친화도 Fc-감마RI이다.

[0320] 다른 선호된 구현예에서, Fc 수용체에 대한 결합 특이성은 Fc-알파 수용체(Fc-알파RI (CD89))와 같이 인간 IgA 수용체에 결합하는 항체에 의해 제공된다. 이 인간 IgA 수용체의 결합은 오히려 인간 면역글로불린 항체 A(IgA)에 의해 차단되지 않는다. "IgA 수용체"라는 용어는 염색체 19에 위치한 알파-유전자(Fc-알파RI)의 유전 물질을 포함하는 것으로 한다. 이 유전자는 55에서 110 kDa의 스플라이스된 몇몇 트랜스멤브레인 아이소형태들을 대안적으로 코딩하는 것으로 알려져 있다. Fc-알파RI(CD89)는 모노사이트/마크로파지(대식세포), 호산성 및 호중성 과립구에 구조적으로 발현되나, 비-효과기 세포군에는 발현되지 않는다. Fc-알파RI는 IgA1과 IgA2 모두에 중간정도의 친화력을 갖는데, 이는 G-CSF나 GM-CSF(Morton, H. C. et al. (1996) Critical Reviews in Immunology 16: 423-440) 같은 사이토킨에 노출될 경우 증가한다. 네 개의 Fc-알파RI 특이적 모노클로날 항체, 즉 A3, A59, A62, 그리고 A77는 IgA리간드 결합 도메인 밖에서 Fc-알파RI를 결합하는 것이, 설명되어 있다

(Monteiro, R. C. et al. (1992) J.Immunol. 148: 1764).

[0321] 또다른 구현예에서, 이중특이적 분자는 상보적인 기능적 활성을 포함하는 본 발명에 따르면 두 가지 모노클로날 항체, 즉 CDC 유도에 의해 주로 작용하는 항체와 아폽토시스를 유도해 주로 작용하는 항체로 구성된다.

[0322] 여기서 사용된 "효과기 세포 특이적 항체"라 함은 효과기 세포의 Fc 수용체에 결합하는 항체 혹은 기능적 항체 단편을 가리킨다. 본 발명에서 사용하는데 선호되는 항체는 효과기 세포의 Fc 수용체를 내인적 면역글로불린에 의해 결합되지 않은 자리에서 결합시킨다.

[0323] 여기에서 사용된 "효과기 세포"는 면역 반응의 인지적 및 활성화 단계에 반대되는 면역 반응의 효과기 단계에 관련된 면역 세포를 가리킨다. 대표적 면역 세포는 골수 또는 림프구 기원 세포, 예를 들어 림프구 세포(예를 들어 B 세포) 및 세포용해성 T 세포(CTLs)를 포함하는 T세포, 살해 세포, NK 세포, 대식 세포, 모노사이트, 호산성 세포(eosinophils), 호중성 세포(neutrophils), 다형핵 세포, 과립성 세포, 비만 세포, 호염기성 세포(basophils))를 포함한다. 일부 효과기 세포는 특이적 Fc 수용체를 발현하고 특이적 면역 기능을 수행한다. 선호된 구현예에서, 예를 들어 ADCC를 유도할 수 있는 호중성 세포와 같이 효과기 세포는 ADCC를 유도할 수 있다. 예를 들어, FcR을 발현하는 모노사이트, 대식 세포는 표적세포의 특이적 치사에 관여하고, 면역체계의 다른 구성성분에 항원을 표시하거나 항원을 표시하는 세포에 결합하는 데 관여한다. 다른 구현예에서, 효과기 세포는 표적 항원, 표적 세포, 또는 미생물을 식균할 수 있다. 효과기 세포상에 특정 FcR의 발현은 사이토카인과 같은 체액(humoral) 인자에 의해 통제된다. 예를 들어, Fc-감마RI의 발현은 인터페론 감마(IFN-γ)에 의해 상승 통제되는 것으로 밝혀졌다. 이러한 향상된 발현은 Fc-감마RI를 포함하는 세포의 표적에 대한 식균 작용을 증가시킨다. 효과기 세포는 표적 항원이나 표적 세포를 식균하거나 용해시킬 수 있다.

[0324] "표적 세포"는 본 발명의 항체의 표적이 될 수 있는 대상(예를 들어 인간 혹은 동물)의 바람직하지 않은 어떠한 세포도 의미한다. 선호된 구현예에서, 표적 세포는 CLDN6을 발현 또는 과발현하고 CLDN6가 세포 표면에 부착된 것을 특징으로 하는 세포이다. CLDN6를 발현하고 CLDN6가 세포 표면에 부착된 것을 특징으로 하는 세포는 전형적으로 종양 세포를 포함한다.

[0325] **II. 면역콘쥬게이트**

[0326] 또 다른 면에서, 본 발명은 세포독소, 약물(예를 들어 면역 억제약), 또는 방사성 동위원소와 같은 치료적 모이어티나 작용제에 콘쥬게이트된 항-CLDN6 항체를 특징으로 한다. 그러한 결합은 여기서 "면역콘쥬게이트"을 지칭한다. 하나 이상의 세포독소를 포함하는 면역콘쥬게이트는 "면역독소"를 가리킨다. 세포독소 또는 세포독성 작용제는 세포에 해롭거나 특히 세포를 살해시키는 모든 작용제를 포함한다. 그 예로는 택솔, 사이토칼라신 B(cytochalasin B), 그라미디신 D, 이티디움 브로마이드, 에메틴(emetine), 마이토마이신, 에토포시드(etoposide), 테노포시드(tenoposide), 빈크리스틴, 빈블라스틴, 콜히친, 독소루비신, 다우노루비신(daunorubicin), 디히드록시 안트라신 디온(dihydroxy anthracin dione), 미토크산트론, 미트라마이신, 악티노마이신 D, 1-디히드록테스토스테론, 글루코코르티코이드, 프로카인, 테트라카인, 리도카인, 프로프라놀롤, 그리고 퓨로마이신과 이것들의 유사물 또는 동족물질을 포함한다.

[0327] 본 발명의 면역콘쥬게이트를 형성하기 위한 적절한 치료적 작용제는, 이것에 제한되는 것은 아니지만, 항대사산물 (예컨대, 메토트레사트(methodtrexate), 6-머캅토퓨린, 6-티오구아닌, 시타라빈, 플루다라빈, 5-플루오로우라실 데카르바진), 알킬레이팅 작용제(예컨대, 메크로레타민, 티오테파, 클로람부실, 멜파란, 카르무스틴(BSNU), 및 로무스틴(CCNU), 시클로포스파미드, 부설판, 디브로모만니톨, 스트렙토조토신, 미토마이신 C 및 시스-디클로로디아민 플라티넘 (II) (DDP) 시스플라틴), 안트라시클린 (예컨대, 다우노루비신 (이전에 다우노마이신)) 및 독소루비신), 항생제 (예컨대, 닥티노마이신 (이전에 악티노마이신), 블레오마이신, 미트라마이신 및 안트라마이신 (AMC), 및 항-미토틱 작용제 (예컨대, 빈크리스틴 및 빈블라스틴)를 포함한다. 일 선호된 구현예에서, 치료제는 세포 독성 작용제나 방사성 독성 작용제이다. 다른 구현예예서, 치료제는 면역억제제이다. 또 다른 구현예에서, 치료제는 GM-CSF이다. 선호된 구현예에서, 치료제는 독소루비신, 시스플라틴, 블레오마이신, 황산염, 카르무스틴, 클로람부실, 시클로포스파미드 또는 리신 A이다.

[0328] 본 발명의 항체는 또한 암과 같은 CLDN6와 관련된 질병을 치료하기 위해 요오드-131, 이트륨-90, 인듐-111과 같은 방사성 동위원소에 결합해 세포 독성 방사성 의약품을 생산할 수 있다. 본 발명의 항체 결합물은 해당 생물학적 반응을 변형시키는 데 사용될 수 있으며, 이 약물 모이어티는 전통적 화학 치료 작용제에 국한되는 뜻으로 해석되지 않는다. 예를 들어, 이 약물 모이어티는 생물학적 작용을 갖는 단백질이나 바람직한 폴리펩타이드일 수 있다. 그러한 단백질에는 예를 들어 효소적 활성 독성, 또는 그것의 활성 단편인 아브린, 리신 A, 수도모나

스 외독소, 디프테리아 독성; 괴사 인자나 인터페론-γ와 같은 단백질; 또는 예를 들어 림포킨, 인터루킨-1("IL-1"), 인터루킨-2("IL-2"), 인터루킨-6("IL-6"), 과립성 대식세포 군집 자극 인자(GM-CSF), 과립성 군집 자극 인자(G-CSF) 또는 다른 성장 인자들을 비롯한 생물학적 반응 변형자들을 포함할 수 있다.

[0329] 항체에 대한 그러한 치료적 물질을 결합하는 테크닉은 잘 알려져 있으며, 예를 들어 문헌들(Arnon et al., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", in Monoclonal Antibodies 및 Cancer Therapy, Reisfeld et al(eds. ), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom et al., "Antibodies For Drug Delivery", in Controlled Drug Delivery (2nd Ed.), Robinson et al. (eds.), pp. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", in Monoclonal Antibodies '84: Biological 및 Clinical Applications, Pincheraet al. (eds. ), pp. 475-506 (1985); "Analysis, Results, 및 Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", in Monoclonal Antibodies For Cancer Detection 및 Therapy, Baldwin et al. (eds.), pp. 303-16 (Academic Press 1985), 및 Thorpe et al., "The Preparation 및 Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", Immunol. Rev., 62: 119-58 (1982))을 보라.

[0330] 추가적 구현예에서, 본 발명에 따르면 항체들은 링커-킬레이트 물질, 예를 들어 티우젝탄(tiuxetan)과 같이 항체가 방사성 동위원소에 결합할 수 있게 하는 물질에 결합된다.

[0331] **III. 약학적 조성물**

[0332] 또다른 면에서, 본 발명은 예를 들면 약학적 조성물과 같이 본 발명의 항체나 혹은 항체들의 조합을 포함하는 조성물을 제공한다. 이러한 약학적 조성물은 약학적으로 수용가능한 매개체나 희석액, 그리고 다른 알려진 아쥬반트 및 부형제를 사용해 Remington: The Science 및 Practice of Pharmacy, 19th Edition, Gennaro, Ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1995에 개시된 통상적인 테크닉에 따라 제조할 수 있다. 일 구현예에서, 조성물은 본 발명의 다수의(예를 들면 두개나 그 이상의) 독립된 항체의 조합을 포함하는데, 이는 다른 매커니즘에 따라 작용하는 항체, 예를 들어 CDC 유도에 의해 주로 작용하는 하나의 항체를 아폽토시스 유도에 의해 주로 작용하는 다른 항체와 결합시키는 것이다.

[0333] 본 발명의 약학적 조성물은 또한 예를 들어 다른 작용제와 조합 투여되는 것과 같은 조합 치료에서 투여될 수 있다. 예를 들어, 조합 치료는 적어도 하나의 항염 작용제나 면역억제 작용제와 본 발명의 조성물을 포함할 수 있다. 일 구현예에서, 그러한 치료적 작용제는 하나 이상의 항염 작용제, 예를 들면 스테로이드 약이나 NSAID를 포함한다. 선호되는 작용제는 예를 들면 아스피린 및 다른 살리실산염, 로펙콕시브(Vioxx)와 셀레콕시브(Celebrex) 등의 Cox-2 억제제, 이부프로펜(Motrin, Advil)과 같은 NSAIDs, 페노프로펜(Nalfon), 나프록센(Naprosyn), 술린닥(Clinoril), 디클로페낙(Voltaren), 피록시캄(Feldene), 케토프로펜(Orudis), 디플루니살(Dolobid), 나부메톤(Relafen), 에토돌락(Lodine), 옥사프로진(Daypro), 그리고 인도메사신(Indocin)을 비롯한 Cox-2 억제제를 포함한다.

[0334] 또 다른 구현예에서, 그러한 치료적 작용제는 낮은 투여량의 시클로포스파미드, 항-CTLA4 항체, 항-IL2, 또는 항-IL2-수용체 항체 등과 같은 조절 T 세포의 고갈(depletion) 또는 기능적 비활성화로 이어지는 작용제를 포함한다.

[0335] 그러나 또다른 구현예에서, 그러한 치료적 작용제는 탁솔 유도체, 탁소테르, 젬시타빈, 5-플루오로루라실, 독소루비신(Adriamycin), 시스플라틴(Platinol), 시클로포스파미드(Cytoxan, Procytox, Neosar)와 같은 하나 이상의 화학치료요법을 포함한다. 또 다른 구체에서, 본 발명의 항체는 좋게는 본 명세서에 기술된 종류의 암환자들에서 많은 치료 효험을 보이는 화학요법 작용제와 함께 투여할 수 있다.

[0336] 또 다른 구현예에서, 본 발명의 항체는 방사성 치료 및/또는 자가조직 말초 줄기 세포나 골수 이식과 병행하여 투여될 수 있다.

[0337] 여기서 사용된 "약학적으로 허용가능한 담체"에는 모든 용매, 분산 미디어(media), 코팅, 항박테리아 및 항균 작용제, 등장 및 흡수지연 작용제, 그리고 생리적으로 융화가능한 유사물이 포함된다. 좋게는, 미디어는 정맥, 근육, 피하, 비경구, 척수, 상피 투여(예를 들어 주사나 주입에 의한)에 적합하다. 투여의 방법에 따라, 항체, 이중특이적 또는 다중특이적 분자와 같은 활성 화합물은 산이나 그 밖에 그 화합물의 작용을 저하시킬 수도 있는 다른 자연적 조건들로부터 화합물을 보호하기 위해 코팅될 수도 있다.

[0338] "약학적으로 허용가능한 염"은 부모(parent) 화합물의 바람직한 생물학적 활성을 유지하면서 어떠한 바람직하지 않은 독소 효과(예를 들어 Berge, S. M., et al. (1977) J. Pharm. Sci. 66: 1-19 참고)를 미치지 않는 염을

가리킨다.

[0339] 그러한 염의 예에는 산 부가 염과 염기 부가 염이 포함된다. 산 부가 염에는 염화수소산, 질산, 인산, 황산, 브롬화수소산, 요드화수소산, 아인산, 그리고 다른 유사물과 같은 무독성 무기물 뿐 아니라 지방성 모노카르복시 및 디카르복시산, 페닐치환된 알카노익산, 수산기 알카노익산, 방향족산, 지방성 및 방향족 술폰산 및 그 유사물로부터 유래된 염들이 포함된다. 염기 부가 염에는 나트륨, 칼륨, 마그네슘, 칼슘, 그 밖의 유사물과 같은 알칼리토류 금속으로부터 유래된 그것들 뿐만 아니라 N,N'-디벤질에틸렌디아민, N-메틸글루카민, 클로로프로케인, 콜린, 디에탄올아민, 에틸렌디아민, 프로케인과 그 유사물을 비롯한 비독성 유기 아민으로부터 유래된 그것들도 포함된다.

[0340] 본 발명의 조성물은 기술분야에서 알려진 다양한 방법에 의해 투여될 수 있다. 당업자에 의해 인정되듯이, 투여의 방법 및 방식은 바람직한 결과에 따라 다양할 것이다. 활성 화합물은 주입, 경피성 패치, 마이크로캡슐 전달 체계 등을 포함하는 억제된 방출 조제와 같은 빠른 방출로부터 합성물을 보호할 담체와 함께 제조될 수 있다. 생분해가능한, 생체적합성 폴리머, 에틸렌 비닐 아세테이트, 폴리언하이드라이드, 폴리글리콜릭산, 콜라겐, 폴리오소에스테르, 폴리락틱산이 사용될 수 있다. 그러한 제형들의 조제를 위한 방법들은 기술분야에 일반적으로 알려져있다. 예컨대, Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R.Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc.,New York, 1978 참고.

[0341] 본 발명의 화합물을 특정 투여 방식에 의해 투여하기 위해서는 비활성화를 예방하기 위해 그 화합물을 다른 물질로 코팅하거나 다른 물질과 함께 투여할 필요가 있다. 예를 들어, 그 화합물을 예를 들면 리포솜이나 희석제와 같은 적절한 담체에 내에서 투여해야 한다. 약학적으로 허용가능한 희석제에는 식염수나 수성 완충 용액이 있다. 리포솜에는 수중유중수적(water-in-oil-in-water) CGF 에멀젼과 전통적인 리포솜이 있다(Strejan et al. (1984) J. Neuroimmunol. 7: 27).

[0342] 약학적으로 허용가능한 담체들은 살균 수성 용매 또는 분산과 살균 투여가능 용매나 분산의 임시적 조제약을 위한 살균 파우더를 포함한다. 약학적으로 활성의 물질로 그러한 매개물이나 작용제를 사용하는 것은 기술분야에서는 알려져 있다. 다만 모든 전통적인 미디어(media)나 작용제가 그 활성 화합물과 부적합성인 경우를 제외하고는 (incompatible), 본 발명에서 약학적 화합물에 그러한 사용이 의도된다. 보충하는 활성 화합물도 또한 그러한 조성물들에 혼합될 수 있다.

[0343] 치료적 조성물은 전형적으로 반드시 제조나 보관 조건에서 있어 살균이고 안정적이어야 한다. 이 조성물은 용액, 마이크로에멀전, 리포솜, 또는 다른 고 약물 농도에 적합한 주문된 구조로 제조될 수 있다. 담체는 예를 들어 물, 에탄올, 폴리올(예를 들어 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 액상 폴리에틸렌 글리콜, 및 유사물) 등을 포함하는 용매나 분산 매개물일 수 있으며 그러한 것들의 적합한 혼합물일 수 있다. 적절한 유동성은 예를 들어 레시틴 등의 코팅 사용이나 분산의 경우에는 필요한 입자 크기 유지에 의해, 또는 계면 활성제의 사용에 의해 유지될 수 있다. 많은 경우, 조성물 내, 예를 들어 당류, 만니톨, 소르비톨 등의 폴리알코올, 또는 염화나트륨과 같은 등장 작용제를 포함하는 것이 선호될 것이다. 주입가능한 조성물의 흡수 지연은 조성물에 예를 들어 모노스테아레이트 염이나 젤라틴과 같은 흡수를 지연시키는 작용제를 포함시킴으로써 가능하다.

[0344] 살균 투입가능 용액은 필요한 양 내의 활성 화합물을 위에서 열거한 성분 중 하나나 혹은 조합으로 이루어진 적절한 용매에 혼합하여 만든 다음, 살균 마이크로필트레이션 하여 제조될 수 있다.

[0345] 일반적으로, 분산물은 활성 화합물을 기본 분산 매개물을 포함하는 살균 비히클과 위에서 열거한 다른 필요한 성분에 혼합함으로써 만들 수 있다. 살균 투입가능 용매의 준비를 위한 살균 파우더의 경우, 선호되는 방식은 이전에 살균 필터된 용매로부터 어떠한 추가적 바람직한 구성성분에 더해 활성 성분의 파우더를 만들어내는 진공 건조나 동결 건조이다.

[0346] 투약요법은 최적의 바람직한 반응(예를 들면 치료적 반응)을 제공하기 위해 조절된다. 예를 들어, 하나의 큰 환약을 투여할 수도 있으며 시간을 두고 여러번 나누어 투약할 수도 있고 치료 상황의 급박성에 따라 1회 투여량을 비율적으로 줄이거나 늘릴 수 있다. 투약의 용이성과 투약량의 균일성을 위해 투약 제형 단위를 비경구성 약제로 조제하는 것이 특히 유리하다. 여기서 투약 제형 단위는 대상의 치료를 위한 단일 투약에 적합하게 물리적으로 분리된 단위를 가리키며, 각각의 단위는 필요한 약학적 담체와 관련되어 바람직한 치료적 효과를 생산할 수 있도록 계산된 활성 약품의 선결정된 양을 포함한다.

[0347] 약학적으로 허용가능한 산화방지제의 예들은 다음을 포함한다: (1)아스코르브산, 시스테인 히드로클로라이드, 소듐 중황산염, 소듐 메타중황산염, 소듐 아황산염 및 유사물을 비롯한 수용성 산화방지제; (2)아스코빌 팔미테

이트, 부틸 히드록시아니솔(BHA), 부틸 히드록시톨루엔(BHT), 레시틴, 프로필 갈라트, 알파-토코페롤, 및 유사물을 비롯한 유성 산화방지제; (3)구연산, EDTA(ethylendiamine tetraacetic acid), 소르비톨, 타르타르산, 인산, 및 유사물을 비롯한 금속 킬레이트제.

[0348] 치료적 조성물을 위해, 본 발명의 제형들은 구강, 비강, 국소(topical) (볼 또는 설하를 포함하는), 직장, 질, 및/또는 비경구(parenteral) 투여에 적합한 것을 포함한다. 제형은 유닛 투약 형태로 편리하게 존재할 수 있고, 약학 분야에 알려진 방법에 의해 제조될 수 있다. 단일 투약 형태를 생산하기 위한 담체 물질과 결합될 수 있는 활성 성분의 양은 치료되는 대상과 투여의 특별한 모드에 따라 변화할 것이다. 단일 투약 형태를 생산하기 위한 담체 물질과 결합될 수 있는 상당한 양의 활성 성분은 일반적으로 치료적 효과를 생산하는 조성물의 양일 것이다.

[0349] 질 투여에 적절한 본 발명의 제형들은 기술분야에서 적절하다고 알려진 담체들을 포함하는 페서리(pessaries), 탐폰, 크림, 젤, 페이스트들, 폼(foam), 또는 스프레이 제형들을 또한 포함한다. 본 발명의 국소 또는 경피성 투여를 위한 투약 형태들은 분말, 스프레이, 연고, 페이스트, 크림, 로션, 젤, 용액, 패치 및 흡입제들을 포함한다. 활성 화합물은 약학적으로 허용가능한 담체, 그리고 필요로하는 임의의 보존제, 완충액, 또는 추진제(propellant)와 살균 조건하에서 혼합될 수 있다.

[0350] 여기에 사용된 바와 같은 "비경구(parenteral) 투여" 및 "비경구적으로 투여되는"이라는 어구는 일반적으로 주사에 의해 장 및 국소적 투여가 아닌 투여 모드를 의미하고, 제한없이, 정맥내, 근육내, 동맥내, 척수내(intrathecal), 낭내(intracapsular), 안와내(intraorbital), 심장내, 피내(intradermal), 복막내, 경기관(transtracheal), 피하(subcutaneous), 서브큐티큘라(subcuticular), 관절내, 서브캡슐라(subcapsular), 서브아라크노이드(subarachnoid), 척수강내(intraspinal), 경막밖의(epidural) 및 흉골내(intrasternal) 주사 및 주입을 포함한다.

[0351] 본 발명의 약학적 조성물에 구현될 수 있는 적절한 수성 및 비수성 담체들의 예들은 물, 에탄올, 폴리올(글리세롤, 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 및 그 유사종과 같이), 그리고 그것의 적절한 혼합물, 올리브 오일을 비롯한 야채 오일들, 그리고 에틸 올레이트를 비롯한 주사가능한 유기 에스터들을 포함한다. 적절한 유동성은 예컨대, 레시틴을 비롯한 코팅 물질의 사용에 의해, 분산의 경우에 필요로하는 입자 크기의 유지에 의해, 그리고 계면활성제의 이용에 의해 유지될 수 있다.

[0352] 이러한 조성물들은 보존제, 습윤제, 에멀젼화제, 및 분산제를 비롯한 아쥬반트들을 또한 포함할 수 있다. 미생물들의 존재 예방은 살균 과정에 의해서 그리고, 예컨데, 파라벤, 클로로부탄올, 페놀 소르빅산, 및 그 유사종 같은 다양한 항박테리아 및 항곰팡이제의 포함에 의해 보장될 수 있다. 추가적으로, 주입가능한 약학적 형태의 연장된 흡수는 알루미늄 모노스테아레이트 및 젤라틴을 비롯한 흡수를 지연하는 작용제의 혼합에 의해 일어날 수 있다.

[0353] 선택된 투여 경로 고려함 없이, 본 발명의 화합물은 적절히 수화된 형태에서 사용가능하고/거나 본 발명의 약학적 조성물에서 사용가능하고, 이것은 기술분야 당업자에게 알려진 통상의 방법에 의한 약학적으로 혀용가능한 투약 형태로 조제될 수 있다.

[0354] 본 발명의 약학적 조성물 내에 활성 성분의 실제 투약 수준은 환자에게 독성없이, 투여 모드, 조성물, 특별한 환자의 소망되는 치료적 반응을 성취하는데 유효한 활성성분 상당한 양을 얻기 위해 변화가능하다. 선택된 투약 수준은/ 구현되는 본 발명의 특별한 조성물의 활성, 투여 경로, 투여시간, 구현되는 특별한 화합물의 배설률, 치료의 지속, 특별한 조성물과 조합하여 사용되는 물질들, 다른 약물들, 화합물들, 및/또는 치료되는 환자의 나이, 성별, 체중, 상태, 일반적인 건강 및 이전 의학적 히스토리, 그리고 의학 기술분야에 알려진 유사 인자들을 비롯한 다양한 약물동력학적 요소에 의해 좌우될 것이다.

[0355] 기술분야에서 일반적인 지식을 가진 의사 또는 수의사는 필요로 하는 약학적 조성물의 유효량을 쉽게 결정하고 처방할 수 있다. 예컨대, 의사 또는 수의사는 소망하는 치료적 효과를 달성하기 위해 필요로하는 수준보다 낮은 수준에서 약학적 조성물에 구현되는 본 발명의 화합물의 투여량으로 시작할 수 있고, 소망하는 효과가 달성될 때까지 투약을 점차적으로 증가시킬 수 있다. 일반적으로, 본 발명의 조성물의 적절한 일일 투여량은 치료적 효과를 생산하기 위해 유효한 가장 낮은 투여량인 화합물의 양일 것이다. 그러한 유효 투여량은 상기 기재된 인자들상에서 일반적으로 좌우될 것이다. 투여는 정맥내, 근육내, 복막내, 또는 피하, 좋게는 표적의 사이트에 근접하여 투여될 수 있는 것이 바람직하다. 소망한다면, 치료적 조성물의 유효한 일일 투여량은 하루에 걸쳐 적절한 간격으로 분리하여 2, 3, 4, 5, 6 이상의 서브-투여량으로, 임의적으로 유닛 투여 형태로 투여될 수 있다. 본

발명의 화합물이 단독으로 투여되는 것이 바람직할 때, 약학적 제형(조성물)로써 화합물을 투여하는 것이 바람직하다.

[0356] 일 구현예에서, 본 발명의 항체들은 독성 부작용을 막기 위해, 주입, 좋게는 24시간 이상과 같은 긴 기간 이상 느리고 연속적인 주입에 의해 투여될 수 있다. 이러한 투여는 2 내지 12시간을 비롯한 2 내지 24시간들의 기간 이상 연속적인 주입에 의해 또한 수행될 수 있다. 그러한 요법은 예컨대, 6개월 또는 12개월 후에 필요애 따라 하나 또는 그 이상의 횟수들로 반복될 수 있다. 그 요법은 항-CLDN6 항체들을 표적하는 항-유전자형(anti-idiotypic) 항체들을 사용함에 의한 생물학적 시료내 투여상에 있어서 순환하는 모노클로날 항-CLDN6 항체들의 양을 측정함에 의해 결정되거나 조절될 수 있다.

[0357] 또 다른 구현예에서, 항체들은 예컨대, 6개월 또는 그 이상의 기간에 걸쳐서 1주일에 한번과 같은 유지 치료에 의해 투여된다.

[0358] 또 다른 구현예에서, 본 발명에 따른 항체들은 CLDN6에 대한 항체의 1회 주입, 그 다음으로 방사성동위원소와 콘쥬게이트된 CLDN6에 대한 항체의 주입을 포함하는 요법에 의해 투여될 수 있다. 요법은 예컨대, 7 내지 9일 후에 반복될 수 있다.

[0359] 본 발명의 일 구현예에서, 본 발명의 치료적 화합물은 리포솜(liposome)에서 조제될 수 있다. 일 선호된 구현예에서, 리포솜은 표적 모이어티(moiety)를 포함한다. 일 가장 선호된 구현예에서, 그 리포솜 내에 치료적 화합물들은 소망하는 지역, 예컨대 종양의 사이트에 근접한 사이트에 볼러스(bolus) 주사에 의해 전달될 수 있다. 그 조성물은 쉽게 주사될 수 있는 유동성있는 상태로 존재해야만 한다. 그것은 제조 및 저장 조건 하에서 안정해야만 하고, 박테리아 및 곰팡이를 비롯한 미생물들의 오염 작용으로부터 보호되어야만 한다.

[0360] 일 추가적인 구현예에서, 본 발명의 항체들은 태반을 가로지르는 운송을 예방하거나 줄이기 위해 제조될 수 있다. 이것은 기술분야에 알려진 방법들, 예컨대, 항체들의 페그화에 의해 또는 F(ab)2' 단편들의 사용에 의해 행해질 수 있다.

[0361] 추가적인 참고는 "Cunningham-Rundles C, Zhuo Z, Griffith B, Keenan J. (1992) Biological activities of polyethylene-glycol immunoglobulin conjugates. Resistance to enzymatic degradation. J. Immunol. Methods, 152: 177-190; 및 내지 "Landor M. (1995) Maternal-fetal transfer of immunoglobulins, Ann. Allergy Asthma Immunol. 74: 279-283"로부터 만들어질 수 있다.

[0362] 종양 치료를 위한 "치료적으로 유효한 투약(dosage)"은 완전 또는 부분적인 목적 종양 반응들에 의해 측정될 수 있다. 완전 반응 (CR)은 질병의 아무런 임상적, 방사선적 또는 다른 증거들이 없는 것으로 규정된다. 부분적 반응 (PR)은 50% 이상의 총 종양 크기의 감소를 가져온다. 진행에 대한 중간 시간(median time)은 목적 종양 반응의 지속성(durability)을 특징화하는 측정값이다.

[0363] 종양 치료를 위한 "치료적으로 유효한 투약(dosage)"는 질병의 진행을 안정화하기 위한 능력에 의해 또한 측정될 수 있다. 암을 억제하기 위한 화합물의 능력은 인간 종양들에서의 효능을 예측하는 동물 모델 시스템에서 평가될 수 있다. 다르게는, 조성물의 이러한 특징은 당업자에게 알려진 시험관 내 어세이에 의해 세포 성장 또는 아폽토시스를 억제하기 위한 화합물의 능력의 조사에 의해 평가될 수 있다. 치료적으로 유효한 양의 치료 화합물은 종양 크기를 감소시킬 수 있거나 그렇지 않으면 대상 내에 증상을 개선시킬 수 있다. 기술분야의 당업자는 대상의 크기, 대상 증상의 심한정도, 및 특별한 조성물 또는 선택되는 투여 경로를 비롯한 인자들에 기초한 양들을 결정할 수 있다.

[0364] 조성물은 살균되어야 하고, 조성물이 주사기에 의해 전달될 수 있는 범위의 유동성이어야 한다. 물에 더하여, 담체는 등장성 완충 식염수, 에탄올, 폴리올 (예컨대, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 및 액체 폴리에틸렌 글리콜, 및 그 유사종), 그리고 적절한 그 혼합물일 수 있다. 적절한 유동성은 예컨대, 레시틴을 비롯한 코팅을 이용하여, 분산의 경우에 필요로하는 입자 크기의 유지에 의해, 그리고 계면활성제에 의해 유지될 수 있다. 많은 경우에, 등장성 작용제, 예컨대, 조성물 내에 당, 만니톨 또는 솔비톨을 비롯한 폴리알콜, 그리고 염화 나트륨을 포함하는 것이 바람직하다. 주입가능한 조성물들의 긴 기간의 흡수는 조성물 내에 흡수를 지연하는 작용제, 예컨대, 알루미늄 모노스테아레이트, 또는 젤라틴을 포함시킴에 의해 일어날 수 있다.

[0365] 상기 개시된 바와 같이, 활성 화합물이 적절히 보호될 때, 화합물은 경구 투여, 예컨대, 비활성 희석제 또는 동화할 수 있는 식용가능한 담체로 경구투여 될 수 있다.

[0367] **IV. 본 발명의 용도 및 방법**

[0368] 본 발명의 항체들 (면역콘쥬게이트, 이중특이성/다중특이성, 조성물 및 여기에 기재된 다른 유사체들을 포함하는)은 CLDN6을 발현하고 CLDN6가 세포 표면에 부착된 것을 특징으로하는 세포들과 관련된 질환들을 치료하는데 관련된 많은 수의 치료적 유틸리티(utility)를 가진다. 예컨대, 항체들은 예컨대, 시험관 내 또는 생체 외에서의 배양에서 세포들에게 또는 여기에 기재된 것들을 비롯한 다양한 질환들을 치료 또는 예방하기 위해 예컨대 생체 내, 인간 대상에게 투여될 수 있다.선호된 대상들은 질병걸린 세포들, 특히 정상 세포들과 비교되는 CLDN6의 변경된 발현 패턴 및/또는 세포 표면에 CLDN6가 부착된 변경된 패턴에 의해 특징되는 세포들을 살해시킴으로써 고쳐지거나 개선될 수 있는 질환들을 가진 인간 환자들을 포함한다.

[0369] 본 발명의 항체들은 치료되고/거나 예방될 수 있는 종양성 질병의 예들은, 예컨대, 위암을 포함하는 CLDN6를 발현하고 세포 표면에 CLDN6가 부착된 것을 특징으로 하는 종양 세포들의 존재에 의해 특징되는 질환들인 종양성 질환들 이 있는 대상을 치료하는데 사용될 수 있다. 본 명세서에 기술된 종양들 및 모든 CLDN6 발현 암들을 포함한다. 이러한 암들은 초기, 중기 또는 예컨대 전이와 같은 진행된 단계(advanced stage)일 수 있다.

[0370] 본 발명에 따라 기재된 치료 방법 및 약학적 조성물은 여기에 개시된 질병을 예방하기 위한 면역화 또는 백신접종(vaccination)을 위해 또한 사용될 수 있다.

[0371] 다른 구현예에서, 본 발명의 항체들은 CLDN6 수준(level) 또는 CLDN6의 특별한 형태들 또는 그 막 표면상에 CLDN6을 포함하는 세포들의 수준을 검출하는데 사용될 수 있고, 그 수준은 그래서 상기 기재된 바와 같은 임의의 질병 또는 질병 징후와 연결될 수 있다. 다르게는, 항체들은 CLDN6를 발현하고 세포 표면에 CLDN6가 부착된 것을 특징으로 하는 세포들의 기능과 상호작용 또는 고갈시키는데 사용될 수 있고, 그것에 의해 질병의 중요한 매개자로써 이러한 세포들이 연관된다. 이것은 항체와 CLDN6 사이에 복합체의 형성을 허용하는 조건하에서 항-CLDN6 항체와 시료 및 대조군 시료를 접촉하는 것에 의해 이뤄질 수 있다. 항체와 CLDN6 사이에 형성된 임의의 복합체들은 검출되고 시료 및 대조군 시료, 즉 참조 시료 내에서 비교된다.

[0372] 본 발명의 항체들은 시험관 내 치료적 또는 진단적 용도들과 관련된 그 결합 활성을 위해 우선 시험될 수 있다. 예컨대, 항체들은 여기에 기재된 바와 같이 플로우 사이토미트리 어세이를 이용하여 시험될 수 있다.

[0373] 본 발명의 항체들은 생체 내 또는 시험관 내 하나 이상의 다음의 생물학적 활성들을 이끌어내는데 사용될 수 있다: CLDN6을 발현하고 세포 표면에 CLDN6가 부착된 것을 특징으로 하는 세포의 성장 및/또는 분화를 억제하는 활성; CLDN6을 발현하고 세포 표면에 CLDN6가 부착된 것을 특징으로 하는 세포들을 살해하는 활성; 효과기 세포들의 존재하에서 CLD18을 발현하는 세포의 ADCC 또는 식세포작용을 매개하는 활성; 보체 존재하에서 CLDN6을 발현하고 세포 표면에 CLDN6가 부착된 것을 특징으로 하는 세포의 CDC를 매개하는 활성; CLDN6을 발현하고 세포 표면에 CLDN6가 부착된 것을 특징으로 하는 세포들의 아폽토시스를 매개하는 활성; 동형(homotypic) 부착을 유도하는 활성; 및/또는 CLDN6에 결합하는 지질 래프트(raft)로의 전좌를 유도하는 활성.

[0374] 일 특별한 구현예에서, 항체들은 다양한 CLDN6-관련된 질병들을 치료, 예방 또는 진단하기 위해 생체 내 또는 시험과 내에서 사용될 수 있다. CLDN6-관련된 질병들의 예로는 다른 것들 중에서, 본 명세서에 기술된 바와 같은 암들을 포함한다.

[0375] 상기 기재한 바와 같이, 본 발명의 항-CLDN6 항체들은 하나 이상의 치료제, 예컨대, 세포독성제, 방사성독성제, 항신생혈관제 또는 본 발명의 항체들에 대한 면역 반응 유도를 줄이는 면역억제제로 공동-투여될 수 있다. 항체는 작용제와 연결될 수 있거나 (면역복합체로써), 작용제와 분리하여 투여될 수 있다. 후자의 경우 (분리 투여), 항체는 전, 후 또는 동시에 작용제와 투여될 수 있고, 다른 알려진 치료법들 예컨대, 항암 치료법 예컨대, 방사능과 함께 공동-투여될 수 있다. 그러한 치료제들은 상기 리스트된 바와 같은 항-종양제(anti-neoplastic agents), 다른 것들 중에서 포함될 수 있다. 본 발명의 항-CLDN6 항체들과 화학치료제들과의 공동-투여는 종양 세포들에게 세포독성 효과를 생산하는 상이한 메커니즘들을 통해 작동하는 두개의 항암제를 제공한다. 그러한 공동-투여는 약물에 내성의 발달 또는 종양 세포들이 항체에 반응하지 않도록하는 종양 세포들의 항원성(antigenicity)에있어서 변화로 인한 문제들을 해결할 수 있다.

[0376] 보체와 결합하는 IgG1, -2, 또는 -3 또는 IgM으로부터의 부분을 비롯한 보체 결합 사이트들을 가지는 본 발명의 조성물 (예컨대, 항체들, 다중특이성 및 이중특이성 분자들 및 면역콘쥬게이트들)은 또한 보체의 존재하에서 사용될 수 있다. 일 구현예에서, 표적세포를 포함하는 세포 집단의 본 발명의 결합제와 적절한 효과기 세포들로의 생체 외 처리는 보체 또는 보체를 함유한 혈청의 추가에 의해 보충될 수 있다. 본 발명의 결합제로 코딩된 표적 세포들의 식세포 작용은 보체 단백질의 결합에 의해 개선될 수 있다. 다른 구현예에서, 본 발명의 조성물로 코팅된 표적 세포들은 보체에 의해 용해될 수 있다. 또 다른 구현예에서, 본 발명의 조성물들은 보체를 활성화하

지 않는다.

[0377] 본 발명의 조성물들은 또한 보체와 함께 투여된다. 따라서, 본 발명의 범위내에서는 항체들, 다중특이성 또는 이중특이성 분자들 및 혈청 또는 보체가 그 범위내이다. 이러한 조성물들은 항체들, 다중특이성 또는 이중특이성 분자들과 가까이 근접한 곳에 위치된다는 점에서 잇점이 있다.

[0378] 다르게는, 본 발명의 항체들, 다중 특이성 또는 이중특이성 분자들과 보체들 또는 혈청은 분리하여 투여될 수 있다. 본 발명의 조성물과 표적 세포들과의 결합은 세포막의 지질 래프트 내로 CLDN6 항원-항체 복합체의 전좌를 일으킬 수 있다. 그러한 전좌는 효율적으로 CDC를 활성화하고/거나 증강시킬 수 있는 높은 밀도의 항원-항체 복합체들을 생성한다.

[0379] 또한, 본 발명의 범위내에서는 본 발명의 항체 조성물을 포함하는 키트(예컨대, 항체들 및 면역콘쥬게이트들) 및 사용을 위한 지시가 있다. 키트는 세포독성제 또는 방사성독성제, 면역억제제를 비롯한 하나 이상의 추가적인 시약들, 또는 하나 이상의 추가적인 본 발명의 항체들 (예컨대, 상보적 활성을 가지는 항체)을 추가적으로 포함할 수 있다.

[0380] 따라서, 본 발명의 항체 조성물로 치료된 환자들에게 본 발명의 항체들의 치료적 효과를 증강시키거나 증대시키는 세포독성제 또는 방사성독성제를 비롯한 다른 치료적 작용제가 추가적으로 투여(본 발명의 항체 투여 전, 동시에, 또는 후에)될 수 있다.

[0381] 다른 구현예에서, 대상은 추가적으로 예컨대, Fc-감마 또는 Fc-알파 수용체의 활성 또는 발현을 예컨대, 사이토카인을 대상에 처리함으로써 조절하는, 예컨대, 증가시키거나 억제하는 작용제로 추가적으로 처리될 수 있다. 선호되는 사이토카인은 과립구 콜로니 자극인자 (G-CSF), 과립구-마크로파지 콜로니 자극 인자 (GM-CSF), 인터페론-γ(IFN-γ), 및 종양 괴사 인자(TNF)를 포함한다. 여기에 개시된 항체들 및 약학적 조성물들의 치료적 효능을 증가시키기 위한 다른 중요한 작용제는 가지있는 글루코스 잔기의 호모폴리사카라이드이고 다양한 식물 및 미생물, 예컨대, 박테리아, 조류, 곰팡이, 효모 및 곡물에 의해 생산되는 β-글루칸이다. 유기체에 의해 생산된 β-글루칸의 단편들 또한 사용될 수 있다. 좋게는, β-글루칸은 β(1,3) 글루코스의 폴리머로, 적어도 몇몇의 뼈대(backbone) 글루코스 유닛, 예컨대, 뼈대 글루코스 유닛의 3-6%는 β(1,6) 가지들을 비롯한 가지들을 가지고 있다.

[0382] 특별한 구현예에서, 본 발명은 시료 내에 CLDN6 항원의 존재를 검출하거나, CLDN6항원의 양을 측정하기 위한 방법을 제공하는 것으로, 항체 또는 그 부분 및 CLDN6사이에 복합체의 형성을 허용하는 조건하에서, CLDN6과 특이적으로 결합하는 항체를 시료 및 대조군 시료와 접촉하는 단계를 포함한다. 복합체의 형성은 그리고나서 검출되고, 대조군 시료와 비교하여 시료 사이에 복합체 형성 차이는 시료 내에 CLDN6의 존재를 나타낸다.

[0383] 또 다른 구현예에서, 본 발명은 생체 내 또는 시험관 내 CLDN6을 발현하고 세포 표면에 CLDN6가 부착된 것을 특징으로 하는 세포의 양을 정량하거나 존재를 검출하기 위한 방법을 제공한다. 상기 방법은 (i) 검출가능한 마커와 콘쥬게이트된 본 발명의 조성물을 대상에 투여하는 단계, 및 (ii) CLDN6을 발현하고 세포 표면에 CLDN6가 부착된 것을 특징으로 하는 세포를 포함하는 영역을 확인하기 위한 상기 검출가능한 마커를 검출하기 위한 수단에 대상을 노출시키는 단계를 포함한다.

[0384] 상기 기술된 방법은 특히, 암 질병을 비롯한 CLDN6-관련된 질병들의 국소화(localization) 및/또는 CLDN6-관련된 질병들을 진단하는데 유용하다. 좋기로는, 대조군 시료에서 상당한 양의 CLDN6 보다 높은, 시료 내에 상당한 양의 CLDN6은 시료가 유래된 대상, 특히 인간에서 CLDN6-관련된 질병의 존재를 나타낸다.

[0385] 앞서 기술된 방법을 사용하는 경우, 본 명세서에 기술된 항체는 다음의 기능을 하는 표지를 제공받을 수 있다: (i) 탐지가능한 신호를 제공하는 기능; (ii) 제1의 또는 제2의 표지, 예컨대 FRET(Fluorescence Resonance Energy Transfer)에 의하여 제공되는 탐지가능한 신호를 수정하기 위한 제2의 표지와 반응하는 기능; (iii) 전하, 소수성, 모양, 또는 다른 물리적 파라미터에 의한 운동성, 예컨대 전기영동적 운동성에 영향을 주는 기능, 또는 (iv) 친화도, 항체/항원 또는 이온 복합체와 같은 캡쳐 모이어티를 제공하는 기능. 표지로서 적합한 것으로는 형광 표지, 발광 표지, 발색단 표지, 방사능 표지, 동위원소 표지, 좋기로는 안정한 동위원소 표지, 동중핵 표지, 효소 표지, 입자 표지, 특히 금속 입자 표지, 자기입자 표지, 고분자 입자 표지, 바이오틴과 같은 유기 소분자, 수용체 리간드 또는 세포 부착 단백질 또는 렉틴과 같은 결합 분자, 결합제의 사용에 의하여 탐지가능한 핵산 및/또는 아미노산 잔기를 포함하는 표지-서열 등이 있다. 표지는, 비 제한적인 방식으로, 황산 바륨(barium sulfate), 이오세탐산(iocetamic acid), 이오파오산(iopanoic acid), 칼슘 이포데이트(calcium ipodate), 소듐 디아트리조에이트(sodium diatrizoate), 메글루민 디아트리조에이트(meglumine diatrizoate),

메트리자미드(metrizamide), 소듐 티로파노에이트 및 불소-18 및 탄소-11과 같은 양전자 방출제, 요오드-123, 테크네티움(technetium)-99m, 요오드-131 및 인듐-111과 같은 감마 방출제, 불소 및 가도리늄과 같은 핵자기 공명을 위한 핵종을 포함하는 방사능 진단제를 포함한다.

[0386] 또 다른 구현예에서, 본 발명의 면역 컨주게이트는 그와 같은 물질을 항체와 결합시키는 것에 의하여, 그 표면에 결합된 CLDN6를 가지고 있는 세포에 화합물(예컨대, 약학적 약제, 표지, 사이토톡신, 라디오톡신, 면역역제제 등)을 표적화하기 위하여 사용될 수 있다.

[0387] 그리하여, 본 발명은 종양 세포를 순환하는 것을 비롯한 CLDN6를 발현하고 세포 표면에 CLDN6가 부착된 것을 특징으로 하는 세포들을 생체 외 또는 시험관 내 국소화(localize)하기 위한 방법을 또한 제공한다.

[0388] 본 발명은 본 발명의 범위를 제한하는 것으로 해석되지 않는 하기 실시예로부터 추가적으로 설명된다.

## *도면의 간단한 설명*

[0389] **도 1. CLDN3, CLDN4, CLDN6 및 CLDN9의 서열 배열**

**도 2. CLDN6-특이적 항체를 생산하도록 면역화한 마우스로부터 얻은 혈청의 면역형광 분석결과**

(A) 인간 CLDN6 및 GFP를 각각 인코딩하는 핵산으로 공동 감염시킨, 고정되지 않은 CHO-K1 세포를, 항-CLDN6 단일클론 마우스 항체(R&D Systems, MAB3656)를 사용하여 탐지하였다. CLDN6는 감염된 세포의 세포막에 위치하고, 특이적 항체에 의하여 살아있는 세포 상에서 표적화될 수 있다.

(B) 하이브리도마 F3-6C3-H8를 생산하는 기초가 된 마우스로부터 유래한 혈청은, 인간 CLDN6 및 GFP를 각각 인코딩하는 핵산으로 공동 감염시킨 고정되지 않은 CHO-K1 세포의 표면 위에 있는 CLDN6에 결합하는 항체를 포함하였다.

**도 3. HEK293T 세포 내 클라우딘 단백질의 내인적 발현의 분석을 위한 웨스턴 블롯 분석**

CLDN3, CLDN4, CLDN6, 및 CLDN9 각각을 인코딩하는 핵산으로 감염시키거나 의사 감염시킨 HEK293T 세포의 단백질 용해물을 상업적으로 이용가능한 항-CLDN3(A) (Invitrogen, Cat No. 34-1700), 항-CLDN4(A)(Zymed, 32-9400), 항-CLDN6(A)(ARP, 01-8865) 및 항-CLDN9(A)(Santa Cruz, sc-17672) 항체를 사용하여, 웨스튼블롯법으로 시험하였다. 상기 항체들은 오직 각각의 HEK293T 형질변환체 중에서만 그들의 상응하는 표적의 발현을 탐지하였다. 감염되지 않은 HEK293T 세포 중에서는 그 어떠한 클라우딘의 내인적 발현도 관찰되지 않았다.

**도. 4. 상업적으로 이용가능한 항-CLDN 항체의 특이성을 분석하기 위한 유세포 분석**

CLDN3, CLDN4, CLDN6, 및 CLDN9 각각을 인코딩하는 핵산으로 감염시키거나 또는 감염시키지 않은 HEK293T 세포에 대한 상업적으로 이용가능한 항-CLDN 항체의 결합을 유세포 분석으로 측정하였다. 오직 상업적으로 이용가능한 항-CLDN3 항체만이 그 표적에 특이적이다.

**도 5. 본 발명에 따라 제조된 항-CLDN 항체의 특이성 분석을 위한 유세포 분석**

CLDN6, CLDN3, CLDN4 또는 CLDN9를 인코딩하는 벡터와 형광 마커를 인코딩하는 벡터로 공동 감염시킨 HEK293T 세포에 대한, 단일클론 하이브리도마 서브클론으로부터 유래한 상등액 중의 항체의 결합을, 유세포 분석으로 측정하였다.

(A) 단일클론 하이브리도마 서브클론 F3-6C3-H8로부터 유래한 상등액 중의 항체는 CLDN6 감염된 세포에 특이적으로 결합하나, CLDN3, CLDN4 및 CLDN9 각각으로 감염시킨 세포에는 결합하지 않는다. 반면에, 단일클론 하이브리도마 서브클론 F4-4F7-F2로부터 유래한 상등액 중의 항체는 CLDN6 또는 CLDN9으로 감염시킨 세포에 결합한다. 단일클론 하이브리도마 서브클론 F3-6C3-H8로부터 유래한 상등액 중의 항체 또한 CLDN6의 (I143V)-SNP 변이체로 감염시킨 세포에 결합한다.??

(B) 단일클론 하이브리도마 서브클론 F3-7B3-B4로부터 유래한 상등액 중의 항체는 CLDN6, CLDN3 또는 CLDN9으로 감염시킨 세포에 결합한다. 단일클론 하이브리도마 서브클론 F3-3F7-A5로부터 유래한 상등액 중의 항체는 CLDN6, CLDN4 또는 CLDN9으로 감염시킨 세포에 결합한다.

**도 6. 항-CLDN6 뮤린 단일클론 항체 muMAB 59A, 60A, 61D, 64A, 65A, 66B 및 67A의 결합 특이성**

항-CLDN6 항체의 인간 CLDN6, 3, 4, 9 및 CLDN6 SNP(single nucleotide polymorphism) 변이체 I143V에 대한 결합을, 상응하는 인간 클라우딘을 일시적으로 발현하는 HEK293T 세포를 사용하여 유세포 분석법으로 분석하였다.

비감염된 세포(Q1 및 Q3 군집) 및 감염된 세포(Q2 및 Q4 군집) 간 구별을 위하여 형광 마커로 HEK293T를 공동감염시켰다. 사용된 항체 농도는 CLDN6에 대한 결합을 포화시키는 농도였다(25 ㎍/ml). 인간 클라우딘-6(R&D Systems, MAB3656), 인간 클라우딘-3(R&D Systems, MAB4620) 및 인간 클라우딘-4(R&D Systems, MAB 4219)에 대하여 상업적으로 이용가능한 단일클론 항체를 사용하여 인간 CLDN6, 3, 4, 9 및 CLDN6-SNP(I143V)의 발현을 확인하였다.

**도 7. 항-CLDN6 뮤린 단일클론 항체 muMAB 59A, 60A, 61D, 64A, 65A, 66B 및 67A의 상대적인 친화도**

상대적인 친화도를 결정하기 위하여, HEK293 세포의 표면에서 안정되게 발현되는 인간 CLDN6에 대한 항-CLDN6 항체의 결합을 유세포 분석으로 분석하였다. 포화 결합 실험에서, 항체의 농도를 FACS 신호(형광 강도의 중앙값)에 대하여 표시하였다. 비선형 회귀에 의하여 EC50(평형에서 결합 부위의 절반에 결합하는 항체의 농도)을 계산하였다. CLDN6-특이적 항체 muMAB 59A, 60A, 61D, 64A, 65A, 66B 및 67A는 매우 낮은 EC50 값(EC50 200-500 ng/ml)을 나타내었고, 낮은 농도에서 포화 결합이 달성되었다.

**도 8. 항-CLDN6 뮤린 단일클론 항체 muMAB 59A, 60A, 61D, 64A, 65A, 66B 및 67A의 보체 의존성 세포 독성(CDC) 활성**

비용출 세포 내의 내인적 ATP를 탐지하는 루시퍼라제 의존 분석법을 사용하여 항-CLDN6 항체의 CDC 활성을 분석하였다. 그러므로, 인간 CLDN6를 안정되게 발현하는 CHO-K1 세포를 다른 농도의 muMAB 59A, 60A, 61D, 64A, 65A, 66B 및 67A로 처리하였다. MuMAB 59A, 60A, 61D, 64A, 65A, 66B 및 67A는 양 의존적 CDC 활성을 나타내었고, 낮은 농도에서 CDC를 유도하였다.

**도 9. 내인적으로 CLDN6를 발현하는 NEC8 세포 및 NEC8 LVTS2 54(CLDN6 녹다운) 세포 상에서의, 항-CLDN6 뮤린 단일클론 항체 muMAB 65A 및 66B의 보체 의존적 세포독성(CDC)**

항-CLDN6 항체 muMAB 65A 및 66B는 NEC8 세포 상에서 양 의존적 방식으로 CDC를 유도하였다. muMAB 65A 및 66B의 표적 특이성은 NEC8 LVTS2 54 세포(CLDN6 녹다운)의 사용에 의하여 입증되었다.

**도 10. 종양 세포주 NEC8를 이식한 마우스를 사용한 초기 치료 이종이식 모델 중에서의 muMAB 59A, 60A, 61D, 64A, 65A, 66B 및 67A의 약학적 효과**

아티믹 누드-*Foxn1*$^{nu}$ 마우스 중에 내인적으로 CLDN6를 발현하는 NEC8 이종 이식을 모델로 사용하였다. 식염수 대조군과 비교하여, muMAB 59A, 60A, 61D, 64A, 65A, 66B 및 67A는 NEC8 세포를 이식한 마우스 내에서 종양 성장 억제를 나타내었다.

**도 11. 항-CLDN6 키메라 단일클론 항체 chimAB 61D, 64A, 67A 및 89A의 결합 특이성**

상응하는 인간 클라우딘을 안정적으로 발현하는 HEK293 세포를 사용한 유세포 분석에 의하여, 인간 CLDN6, 3, 4 및 9 각각에 대한 항-CLDN6 항체의 결합을 분석하였다. 사용된 항체 농도는 결합을 포화시키는 농도였다(25 ㎍/ml). 인간 클라우딘-3(R&D Systems, MAB4620) 및 인간 클라우딘-4(R&D Systems, MAB 4219)에 대한 상업적으로 이용가능한 단일클론 항체 및 CLDN6/9-반응성 뮤린 단일클론 항체 muMAB 5F2D2 각각을 사용하여 인간 CLDN3, 4, 6 및 9의 발현을 확인하였다. 음성적 대조군은 일차 항체 없이 동일한 조건하에서 수행하였다.

**도 12. HEK293-CLDN6 세포에 대한 항-CLDN6 키메라 단일클론 항체 chimAB 61D, 64A, 67A 및 89A의 상대적인 친화도**

상대적인 친화도를 결정하기 위하여, 유세포 분석법으로 HEK293 세포의 표면에서 안정적으로 발현되는 인간 CLDN6에 대한 항-CLDN6 항체 결합을 분석하였다. 포화 결합 실험에서, 항체의 농도를 FACS 신호(형광 강도의 중앙값)에 대하여 표시하였다. 비선형 회귀를 사용하여 EC50(평형에서 결합 부위의 절반에 결합하는 항체의 농도)을 계산하였다. CLDN6-특이적 항체 chimAB 64A 및 89A는 매우 낮은 EC50 값(EC50 450-600 ng/ml)을 나타내었고, 결합의 포화는 낮은 농도에서 달성되었다. ChimAB 67A 및 61D은 각각 낮은 EC50값(EC50 1000 ng/ml) 및 중간 EC50값(EC50 2300 ng/ml)을 나타내었다.

**도 13. NEC8 세포에 대한 항-CLDN6 키메라 단일클론 항체 chimAB 61D, 64A, 67A 및 89A의 상대적인 친화도**

항-CLDN6 항체의 인간 CLDN6를 내인적으로 발현하는 종양세포에 대한 상대적 친화도를 측정하기 위하여, 고환암 세포주 NEC8에 대한 결합을 유세포 분석법을 사용하여 분석하였다. CLDN6-특이적 항체 chimAB 64A 및 89A는 매우 낮은 EC50 값(EC50 600-650 ng/ml)을 나타내었고, 낮은 농도에서 포화 결합이 달성되었는데, 여기서 chimAB

61D 및 67A 각각은 중간 EC50 값(EC50 1700 ng/ml) 및 높은 EC50 값(EC50 6100 ng/ml)을 나타내었다.

**도 14. 항-CLDN6 키메라 단일클론 항체 chimAB 61D, 64A, 67A 및 89A의 OV90 세포에 대한 상대적인 친화도**

인간 CLDN6를 내인적으로 발현하는 종양 세포에 대한 항-CLDN6 항체의 결합 친화도를 결정하기 위하여, 난소암 세포주 OV90에 대한 결합을 유세포 분석법으로 분석하였다. CLDN6-특이적 항체 chimAB 64A 및 89A는 매우 낮은 EC50 값(EC50 550-600 ng/ml)을 나타내었고, 낮은 농도에서 포화 결합이 달성되었다. ChimAB 61D 및 67A은 중간 EC50 값(각각 EC50 1500 ng/ml 및 EC50 2300 ng/ml)을 나타내었다.

**도 15. NEC8 야생형 및 NEC8 녹다운 세포에 대한 항-CLDN6 키메라 단일클론 항체 chimAB 61D, 64A, 67A 및 89A의 보체 의존성 세포 독성(CDC) 활성**

항-CLDN6 항체의 CDC 활성을 비용해된 세포 내의 내인적 ATP를 탐지하는 루시퍼라제 의존적 분석을 사용하여 분석하였다. 그러므로, 전위적으로 루시퍼라제를 발현하는 NEC8 야생형 세포(NEC8 LVTS2 77)를 다른 농도의 chimAB 61D, 64A, 67A 및 89A로 처리하였다. NEC-8 세포에 대하여 chimAB 61D, 64A, 67A 및 89A는 양 의존적 방식으로 CDC 활성을 나타낸 반면에, NEC-8 CLDN6 녹다운 세포(NEC8 LVTS2 54)에 대해서는 이 항체들 중 그 어느 것도 비특이적 세포 용해를 유도하지 않았다. 이 결과는 chimAB 61D, 64A, 67A 및 89A의 표적 특이적 효과기 기능을 나타내었다.

**도 16. NEC8 wildtype 및 NEC8 녹다운 세포에 대한 항-CLDN6 키메라 단일클론 항체 chimAB 61D, 64A, 67A 및 89A의 항체-의존적 세포 독성(ADCC) 활성**

비용해된 세포 내 내인적 ATP를 측정하는 루시퍼라제 의존적 분석법을 사용하여 항-CLDN6 항체의 ADCC 활성을 분석하였다. 그러므로, NEC-8 야생형 세포(NEC8 LVTS2 77)를 다른 농도의 chimAB 61D, 64A, 67A 및 89A으로 처리하였다. ChimAB 61D, 64A, 67A 및 89A는 양 의존적 방식으로 ADCC 활성을 나타내었고, 심지어 낮은 항체 농도에서도 유도된 ADCC를 나타내었다. 표적 특이성을 설명하기 위하여, CLDN6을 안정적으로 녹다운시킨 NEC8 세포(NEC8 LVTS2 54)를 사용하였다.

**도 17. 종양 세포주 NEC8을 이식한 마우스를 사용한 초기 치료 이종이식 모델에서, 항-CLDN6 뮤린 단일클론 항체 muMAB 61D, 64A 및 67A의 장기간의 약제학적 효과**

아티믹 누드-*Foxn1*$^{nu}$ 마우스 중 내인적으로 CLDN6를 발현하는 NEC8 이종이식체를 모델로 사용하였다. CLDN6 특이적 항체로 46일간 마우스를 처리하였다. 처리 후에, 종양 성장을 60일 동안 관찰하였다. 심지어 면역 치료를 중단한 후에도, 뮤린 단일클론 항체 muMAB 61D, 64A 및 67A로 처리한 마우스는 그 어떠한 종양 성장도 나타내지 않았다.

**도 18. 종양 세포주 NEC8를 이식한 마우스를 사용한 초기 치료 이종 이식 모델에서, 항-CLDN6 뮤린 단일클론 항체 muMAB 89A의 약학적 효과**

아티믹 누드-*Foxn1*$^{nu}$ 마우스 내에서 내인적으로 CLDN6를 발현하는 NEC8 이종이식체를 모델로 사용하였다. 흩어진 점들(Scatter blots)은 아티믹 누드- *Foxn1*$^{nu}$ 마우스 중 NEC8 이종이식체 초기 치료 중의 상이한 시점에서의 이식된 종양의 부피를 나타낸다. 식염수 대조군과 비교하여, muMAB 89A는 NEC8 세포를 이식한 마우스 내에서 종양 성장의 억제를 나타내었다(A). 대조군으로서 PBS 및 CLDN6 특이적 항체 각각으로 47일 동안 마우스를 처리하였다. 종양 성장은 추가적인 51일 동안에 모니터하였다. PBS 대조군과 대조적으로, muMAB89A으로 처리한 마우스 중에서는 연구의 종결 시점에서 종양이 탐지되지 않았다(B).

**도 19. 종양 세포주 NEC8를 이식한 마우스를 사용한 진행 치료 이종이식 모델에서 항-CLDN6 뮤린 단일클론 항체 muMAB 64A의 약학적 효과**

흩어진 점들은 아티믹 누드-*Foxn1*$^{nu}$ 마우스 내 진행된 NEC8 이종 이식체의 치료 중 다른 시점에서의 이식된 종양의 부피를 나타낸다. 뮤린 단일클론 항-CLDN6 항체 muMAB 64A를 사용한 면역치료는 항체 및 식염수 대조군 모두와 비교하여, 고체 NEC8 이종이식체의 종양 성장의 억제를 나타내었다.

**도 20. 종양 세포주 NEC8를 이식한 마우스를 사용한 진행 치료 이종이식 모델에서 항-CLDN6 뮤린 단일클론 항체 muMAB 64A의 장기간 약제학적 효과**

이식 15일 후에, CLDN6 특이적 항체 muMAB 64A를 이용하여 45일 동안 마우스를 처리하였다. 종양의 성장은 추가

적인 49일 동안 관찰하였다(A). 생존 플롯은 CLDN6 특이적 항체 muMAB 64A로 처리한 마우스의 연장된 생존을 나타낸다(B).

**도 21. 종양 세포주 NEC8를 이식한 마우스를 사용한 진행 치료 이종이식 모델에서 항-CLDN6 뮤린 단일클론 항체 muMAB 61D, 67A 및 89A의 약학적 효과**

흩어진 점들은 진행된 NEC8 이종 이식체의 치료 중 다른 시점에서의 이식된 NEC8 종양의 부피를 나타낸다. 염수 및 항체 대조군과 대조적으로 뮤린 단일클론 항-CLDN6 항체 muMAB 61D, 67A 및 89A를 사용하여 종양 성장의 억제가 달성되었다.

**도 22. 종양 세포주 NEC8를 이식한 마우스를 사용한 진행 치료 이종이식 모델에서 항-CLDN6 뮤린 단일클론 항체 muMAB 61D, 67A 및 89A의 장기간 약학적 효과**

이식 17일 후에, CLDN6 특이적 항체 muMAB 61D, 67A 및 89A로 마우스를 42일 동안 처리하였다(A). 종양 증식을 49일간 관찰하였다. 생존 플롯은 CLDN6 특이적 항체 muMAB 61D 및 67A로 처리한 마우스의 연장된 생존을 나타낸다(B).

**도 23. NEC8 야생형과 안정되게 CLDN6를 녹다운시킨 NEC8 세포를 이식한 마우스를 사용한 진행 치료 이종이식 모델에서 항-CLDN6 뮤린 단일클론 항체 muMAB 64A 및 89A의 약학적 효과**

MuMAB 64A 및 89A는 NEC8 야생형으로 이식한 마우스 내에서만 오직 약학적 효과를 나타내고, CLDN6 녹다운 NEC8 세포를 이식한 마우스에서는 그러하지 않는데, 이는 인 비보에서의 항체의 표적 특이성을 나타낸다.

**도 24. chimMAB 61D, 64A, 67A 및 89A의 고해상도 에피토프 매핑**

야생형-알라닌의 경우, 알라닌 변이체를 "야생형 잔기 번호 알라닌" 또는 "야생형 잔기 번호 글라이신"으로 명명하는데, 여기서 아미노산은 1글자 코드로 주어진다. CLDN6의 제1의 세포외 도메인의 아미노산 F35, G37, S39와 가능하게는 T33은 CLDN6 특이적 키메라 항체 chimAB 61D, 64A, 67A 및 89A과의 상호작용을 위하여 중요하다. 잔기 I40은 chimAB 89A의 결합에 필수적이고, chimAB 61D 및 67A의 결합에 기여한다. 또한 CLDN6의 제2의 세포외 도메인의 L151는 chimAB 67A와의 상호작용에 기여한다. 면역형광 실험이 CLDN6 돌연변이주 P28A, W30A, G49A, L50A, W51A, C54A 및 C64A의 발현을 확인시킨다고 하더라도, 그들은 막 염색을 나타내지 않았다. 이러한 이유로 우리는 이 아미노산들과 우리 항체와의 결합을 배재할 수 없다. 그와 함께, 여기서 밝혀진 에피토프는 CLDN6의 EC1 도메인의 DNA 및 펩타이드를 사용한 우리의 면역 전략과도 일치한다.

**도 25. 본 발명의 CLDN6 특이적 항체의 중쇄 가변 영역 아미노산 서열의 배열**

CDR 서열(HCDR1, HCDR2, 및 HCDR3)은 박스로 표시되어 있다.

**도 26. 본 발명의 CLDN6 특이적 항체의 경쇄 가변 영역 아미노산 서열의 배열**

CDR 서열(LCDR1, LCDR2, 및 LCDR3)은 박스로 표시되어 있다.

## *발명을 실시하기 위한 구체적인 내용*

[0390] **실시예**

[0391] 본 명세서의 사용된 기법 및 방법은 여기에 기술되며, 기술된 것과 같은 방법 또는 그 자체로 알려진 방법, 예컨대 논문(Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Edition (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y)에서의 방법으로 수행된다. 키트 및 시약의 사용을 포함하는 모든 방법은 특별한 지시가 없는 한 제조사 정보에 따라 수행된다.

[0393] **실시예 1: 실시간 RT-PCR을 이용한 정상 조직, 암 조직 및 암 세포주에서의 CLDN6 발현의 정량화**

[0394] 제조사 지시에 따라 알엔이지 미니 키트(RNeasy Mini Kit (Qiagen))를 사용하여 동결 조직 표본 및 암 세포주로부터 세포의 총 RNA를 추출하고, $dT_{18}$ 올리고뉴클레오타이드를 사용하여 프라임한 다음, 수퍼스크립트 II(GIBCO/Lifetech)을 사용하여 역전사하였다. p53 전사물을 30 사이클 PCR에서 증폭하여, 획득한 cDNA의 완결성을 시험하였다. HPRT에 대하여 표준화한 후에, ΔΔCT 계산을 사용하여 CLDN6의 발현을 정량화하였다.

[0395] 3명의 개인으로부터 유래한 조직을 각각 정상 조직형으로서 시험하였다. 40 사이클의 RT-PCR 이후에 오직 미량의 CLDN6 전사물만이 정상 조직에서 탐지될 수 있었다. 컷 오프 발현을 약간 초과한 정상 조직은 오직 태반뿐이

었다.

[0396] 정상 조직과 달리, 본 발명자들은 난소암(adenocarcinomas), 폐암(NSCLC, 선암에서 높은 빈도 및 발현 수준을 가짐), 위암, 유방암, 간암, 췌장암, 피부암(기저세포암 및 편평세포암종), 악성 흑색종, 두경부암(malignant pleomorphic adenoma), 육종(synovial sarcoma 및 carcinosarcoma), 담관암, 신장암(clear cell carcinoma 및 papillary carcinoma), 자궁암 및 세포주 A2780(난소암), NIH-OVCAR3(난소암), HCT-116(결장암), EFO-27(난소암), CPC-N(SCLC), NCI-H552(NSCLC), SNU-1(위암), KATOIII(위암), YAPC(췌장암), AGS(위암), FU97(위암), MKN7(위암)로 부터 유래한 시료 중에서 CLDN6가 고도로 발현됨을 발견하였다.

[0397] **실시예 2: 웨스턴 블롯 분석법을 사용한 정상 조직, 암 조직 및 암 세포주에서 CLDN6 발현의 정량화**

[0398] 웨스턴 블로 분석을 위하여 라엠리-라이시스(Laemmli-lysis) 완충액으로 용해한 세포로부터 추출한 총 단백질 20 ㎍을 사용하였다. 추출물을 환원 시료 완충액(Roth)에 희석시키고, SDS-PAGE를 수행하고, 뒤이어 PVDF 멤브레인(Pall)위로 전기적으로 전달하였다. CLDN6 (ARP) 및 beta-Actin (Abcam)에 반응성인 폴리클로날 항체를 사용하여 면역 염색을 수행하고, 그 이후에 고트 항-마우스 및 고트 항-래빗 이차 항체와 접합시킨 호오스래디쉬-페록시다제(Dako)를 사용하여 일차 항체를 탐지하였다.

[0399] 5명까지의 개인으로부터 유래한 조직 용해물을 각각 정상 조직형으로 시험하였다. 분석된 정상 조직의 그 어느 것에서도 CLDN6 단백질 발현이 탐지되지 않았다. 정상 조직과는 대조적으로 난소암 및 폐암으로부터 유래한 시료에서는 CLDN6 단백질의 높은 발현이 탐지되었다. CLDN6 발현은 NIH-OVCAR3(난소암), MKN7(위암), AGS(위암), CPC-N(SCLC), HCT-116(결장암), FU97(위암), NEC8(고환암종), JAR(태반 융모상피암), JEG3(태반 융모상피암), BEWO (태반 융모상피암), 및 PA-1(난소 기형암종)에서 탐지되었다.

[0401] **실시예 3: 정상 조직 및 암 조직에서의 CLDN6의 발현의 면역조직화학적염색(IHC) 분석**

[0402] 파라핀-임베드된 조직 단편(4 ㎛)를 가열판(HI 1220, Leica) 위에서 58℃에서 1시간 동안 배양하였다. 로티클레어(Roticlear (Roth)) 중에서 슬라이드를 RT에서 2 x 10분 동안 배양하여 단편으로부터 파라핀을 제거하였다. 그 후 단편을 등급화된 알코올(99%, 2 x 96%, 80% 및 70%, 5 min each) 중에서 재수화하였다. 10 mM 시트레이트 완충액(pH 6.0) + 0,05% 트윈-20 중에서 120℃(15 psi)에서 15분간 슬라이드를 끓여서 항원 회복을 수행하였다. 그 직후에 끓인 슬라이드를 5분간 PBS에서 배양하였다. RT에서 15분 동안 MeOH 내 0.3% 과산화수소를 사용하여 내인적 페록시다제 활성을 차단하였다. 비특이적 결합을 회피하기 위하여, RT에서 30분 동안 PBS 내 10% 염소 혈청을 사용하여 슬라이드를 차단하였다. 그 다음 슬라이드를 CLDN6-특이적 폴리클로날 항체(1 ㎍/ml)(ARP)와 함께 4℃에서 밤새 배양하였다. 그 다음날, PBS를 사용하여 RT (3 x 5 분)에서 슬라이드를 세척하고, RT에서 1시간 동안 이차항체(사용이 준비된 PowerVision poly HRP-Anti-Rabbit IgG(ImmunoLogic)) 100 ㎕와 배양시켰다. 그 다음 슬라이드를 RT (3 x 5 min)에서 PBS로 세척하였다.벡터 실험실(Burlingame)로부터 구입한 벡터 노바레드 기질 키트 SK-4800을 사용하여 최종 염색을 수행하였다. RT에서 90초 동안 헤마톡실린으로 단편을 대조 염색하였다. 등급화된 알코올(70%, 80%, 2x 96% 및 99%, 각각 5 분)을 사용한 탈수 및 자일롤에서 10분간 배양 후에, 슬라이드를 엑스트라 키트(X-tra Kit, Medite Histotechnic)에 탑재하였다.

[0403] 폐, 난소, 위, 결장, 췌장, 간, 십이지장 또는 신장으로부터 유래한 정상 조직에서는 CLDN6 발현이 탐지되지 않았다. 정상 조직과 대조적으로 난소암, 폐암, 피부암, 췌장암, 위암, 유방암, 신장암(transitional cell carcinoma), 경부암, 고환암(seminoma) 및 자궁암으로부터 온 조직 단편 상에서는 강하고 적어도 중요한 염색이 관찰되었다. 악성 상피 세포군의 세포막에 염색이 명백히 강조된 반면에, 인접한 스트로마 및 비-악성 상피 세포에서는 그러하지 않았다. 이러한 결과는 CLDN6 단백질이 악성 세포의 세포막에 국소화됨을 나타낸다.

[0404]

[0405] **실시예 4: CLDN6에 대한 뮤린 항체의 제조**

[0406] **a. 전장 CLDN6 및 CLDN6 단편을 인코딩하는 발현 벡터의 제조**

[0407] 전장 CLDN6(NCBI 접근번호 NP_067018.2, SEQ ID NO: 2)를 인코딩하는 코돈 최적화한 인공 DNA 서열(SEQ ID NO: 3)을 화학 합성법(GENEART AG, Germany)으로 준비하고, pcDNA3.1/*myc*-His 벡터(Invitrogen, USA) 속으로 클로닝하여 벡터 p3953을 제조하였다. 정지 코돈의 삽입은 *myc*-His 태그를 코딩하는 벡터에 융합시킴없이 CLDN6 단백질의 발현을 허여하였다. CLDN6의 발현은 상업적으로 이용가능한 항-CLDN6 항체(ARP, 01-8865; R&D Systems, MAB3656)를 사용하여 웨스턴 블롯, 유세포 분석 및 면역형광분석법으로 시험하였다.

[0408] 또한, 올바른 신호 펩타이드 절단 부위(SEQ ID NO: 5)를 확실히 하기 위하여, 4개의 추가적인 아미노산이 뒤따

르는 N-말단 Ig 카파 리더 유래 신호 펩타이드와의 융합형태로서, CLDN6 (SEQ ID NO: 6)의 잠정적인 세포외 도메인 2(EC2) 단편을 인코딩하는 코돈-최적화 DNA 서열(SEQ ID NO: 4)을 제조하고, pcDNA3.1/*myc*-His 벡터 속으로 클로닝하여 벡터 p3974를 제조하였다. 면역화에 앞서, 일시적으로 감염시킨 파라포름알데히드(PFA)-고정된 CHO-K1 세포를 상업적으로 이용가능한 항-*myc* 항체(Cell Signaling, MAB 2276)를 사용하여 면역형광 현미경으로 관찰하여 EC2 단편의 발현을 확인하였다.

[0409] **b. CLDN6를 안정적으로 발현하는 세포주의 제조**

[0410] CLDN6를 안정적으로 발현하는 HEK293 및 P3X63Ag8U.1 세포주를 벡터 p3953을 사용한 표준 기술을 사용하여 제조하였다.

[0411] **c. 면역화**

[0412] 0, 16 및 36번째 날에 PEI-만노스(PEI-Man; 폴리플러스 트랜스펙션에서 유래한 인 비트로-jetPEI™Man) (5% 글루코스 수용액 중의 PEI-Man 150 mM) 4 ㎕와 함께 p3974 플라스미드 DNA 25 ㎍를 사용하여, 복강내 주사로 Balb/c 마우스를 면역화하였다. 48 및 62번째 날에 CLDN6을 안정적으로 발현하도록 p3953 벡터로 감염시킨 P3X63Ag8U.1 마이엘로마 셀을 복강내 주사하여 마우스를 면역화하였다. 62번째 날에 투여된 세포는 주입전에 3000 rad로 조사된 것이었다. CLDN6 및 GFP를 인코딩하는 핵산으로 공동-감염시킨 CHO-K1 세포를 사용하여 20 내지 70일째 날에 마우스 혈청 중 CLDN6에 대한 항체의 존재를 면역형광 현미경으로 관찰하였다. 이를 위하여, 감염 후 24시간에 PFA-고정 또는 비고정된 세포를 면역화된 마우스로부터 유래한 혈청의 1:100 희석액과 상온(RT)에서 45분간 배양하였다. 세포를 세척하고 Alexa555-표지된 항-마우스 Ig 항체(Molecular Probes)와 배양하고, 형광 현미경으로 관찰하였다.

[0413] 하이브리도마 F3-6C3-H8를 제조한 기초가 되었던 마우스로부터 얻은 혈청 샘플 중에서 항-CLDN6 특이적 항체가 탐지되었다(도 2 참조).

[0414] 단일클론 항체 생산을 위하여, 비장적출 4일 전에 p3953 벡터로 안정적으로 감염된 2 x $10^7$개 HEK293 세포를 복강내 주사하여 탐지가능한 항-CLDN6 면역 반응을 가지는 마우스를 추가면역(boost)하였다.

[0415] **d. CLDN6에 대한 뮤린 단일클론 항체를 생산하는 하이브리도마의 제조**

[0416] 면역화된 마우스로부터 분리한 비장세포 6 x $10^7$개를 PEG 1500(Roche, CRL 10783641001)를 사용하여 마우스 마이엘로마 세포주 P3X63Ag8.653(ATCC, CRL 1580)의 세포 3 x $10^7$개와 융합시켰다. 평평한 저면 마이크로티터 플레이트의 각 웰당 대략 5 x $10^4$개의 세포를 넣고, 열로 불활성화한 우태아 혈청 10%, 하이브리도마 융합 및 클로닝 보충제(HFCS, Roche, CRL 11363735) 1%, HEPES 10 mM, 소듐 피루베이트 1 mM, 글루코스 4.5%, 2-메르캅토에탄올 0.1 mM , 1 x 페니실린/스트렙토마이신 및 1 x HAT 보충제(Invitrogen, CRL 21060)를 포함하는 RPMI 선택적 배지 중에서 약 2주간 배양하였다. 10 내지 14일 후에, 유세포 분석기를 사용하여 항-CLDN6 단일클론 항체에 대하여 개별 웰을 스크리닝하였다. 항체 분비 하이브리도마를 한계 희석으로 서브 클로닝하고, 항-CLDN6 단일클론 항체에 대하여 다시 시험하였다. 특성화를 위하여, 안정된 서브 클론을 배양하여 조직 배양 배지로 적은 양의 항체를 발생시켰다. 모 세포의 반응성을 보유하고 있는 각각의 하이브리도마(유세포 분석기로 시험함)의 적어도 1종의 클론을 선별하였다. 각각의 나인-바이얼-셀 뱅크를 발생시키고 액상 질소 중에 보관하였다.

[0417] **실시예 5: 단일클론 항체 및 하이브리도마 상등액의 결합 특성**

[0418] **a. (i) 웨스턴 블롯 및 (ii) 유세포 분석을 이용한, 일시적으로 감염된 HEK293T 세포의 품질 조절**

[0419] (i) HEK293T 세포를 각각 CLDN3, CLDN4, CLDN6 및 CLDN9를 인코딩하는 핵산으로 감염, 또는 의사 감염시켰다. HEK293T 세포 중에서의 CLDN3, CLDN4, CLDN6 및 CLDN9의 발현을 웨스턴 블롯으로 측정하였다. 이를 위하여 감염 24시간 후에 세포를 수확하고 용해하였다. 용해물에 대해 SDS-PAGE를 수행하고, 니트로스셀룰로오스 멤브레인에 묻히고, 변성 조건 하에서 상응하는 클라우딘의 C-말단에 특이적으로 결합하는 항-CLDN3(A)(Invitrogen, 34-1700), 항-CLDN4(A)(Zymed, 32-9400), 항-CDLN6(A)(ARP, 01-8865) 또는 항-CLDN9(A)(Santa Cruz, sc-17672) 항체를 사용하여 염색하였다. 페록시다제-표지된 이차 항체로 배양하고 ECL 시약으로 발전시킨 후에, 시각화를 위하여 LAS-3000 영상계(Fuji)를 사용하였다. CLDN3, CLDN4, CLDN6 및 CLDN9의 예상되는 분자량 밴드는 감염된 세포 중에서만 관찰되었고, 대조군 세포(도 3) 중에서는 관찰되지 않았는데, 이는 HEK293T 세포가 연구 대상 클라우딘 중 임의의 것을 내인적으로 발현하지 않으며, 따라서 CLDN6의 교차 반응성을 결정하는데 적합한 도구가

됨을 나타내는 것이었다.

[0420] (ii) 자연적인 에피토프를 인식하는 항-CLDN 항체(마우스 항-CLDN3 IgG2a (R&D, MAB4620), 마우스 항-CLDN4 IgG2a (R&D, MAB4219), 마우스 항-CLDN6 IgG2b (R&D, MAB3656))을 사용한 유세포 분석법으로 (i)의 HEK293T세포를 더 분석하였다. 상품 번호 M9144 및 M8894으로 시그마 사로부터 구입할 수 있는 항체를 이소타입 대조군으로 사용하였다. CLDN3, CLDN4, CLDN6 및 CLDN9 각각을 인코딩하는 핵산으로 일시적으로 감염시킨 HEK293T 세포를 사용하여, 이러한 항-CLDN 항체의 특이성을 분석하였다. 항-CLDN6 항체는 CLDN3, CLDN4 및 CLDN9와 교차-반응성을 나타내었다. 항-CLDN4 항체는 CLDN3, CLDN6 및 CLDN9와 교차-반응성을 나타내었다. 항-CLDN3은 CLDN3에 특이적으로 결합하였다(도 4).

[0421] **b. 유세포 분석기를 사용한, 본 발명에 따라 생산된 단일클론 항체의 특이성 결정**

[0422] 상이한 CLDN 단백질을 인코딩하는 벡터와 형광 마커를 인코딩하는 벡터로 HEK293T 세포를 공동 감염시켰다. 감염 24시간 후에 0.05% 트립신/EDTA 용액을 사용하여 세포를 수확하고, FACS 완충액(2% FCS 및 0.1% 소듐 아자이드를 포함하는 PBS)으로 세척하였다. 웰 당 $2 \times 10^5$개 세포로 U-저면 마이크로티터 플레이트로 세포를 이전시키고, 하이브리도마 상등액과 함께 4℃에서 60분 동안 배양하였다. FACS 완충액으로 3회 세척하고, 세포를 알로피코시아닌(APC)-접합된 항-마우스 IgG 1+2a+2b+3 특이적 이차 항체(Dianova, 115-135-164)와 함께 배양하였다. 그 다음, 세포를 2회 세척하고, BD FACSArray를 사용한 유세포 분석으로 결합을 분석하였다(도 5). 수직축 상의 항체 결합에 대한 형광 마커의 발현을 수평축 상에 도시하였다. 상업적으로 이용가능한 마우스 항-CLDN6 IgG2b 항체(R&D, MAB3656)를 양성적 대조군으로서 사용하였고, 상품 번호 M8894하에서 시그마 사로부터 구입가능한 항체를 이소타입 대조군으로 사용하였다.

[0423] 모두 하이브리도마 F3-6C3로부터 유래한 단일클론 하이브리도마 서브클론 F3-6C3-H2, F3-6C3-H8, F3-6C3-H9, F3-6C3-D8 및 F3-6C3-G4으로부터 유래한 상등액 중의 항체는 CLDN6에 대하여 특이적이었으며, CLDN9, CLDN3 및 CLDN4에 결합하지 않았다. 도 5A는 단일클론 하이브리도마 서브클론 F3-6C3-H8에 대한 결과를 예시적으로 보여준다. 단일클론 하이브리도마 서브클론 F3-6C3-H8으로부터 유래한 상등액 중의 항체는 또한 CLDN6의 (I143V)-SNP 변이체로 감염된 세포에도 결합하였다. 단일클론 하이브리도마 서브클론 F4-4F7-F2로부터 유래한 상등액 중의 항체는 CLDN6 및CLDN9 모두에 결합한다(도 5A). 단일클론 하이브리도마 서브클론 F3-7B3-B4로부터 유래한 상등액 중의 항체는 CLDN6, CLDN3 및 CLDN9에 결합한다(도 5B). 단일클론 하이브리도마 서브클론 F3-3F7-A5로부터 유래한 상등액 중의 항체는 CLDN6, CLDN4 및 CLDN9에 결합한다(도 5B).

[0425] **실시예 6: CLDN6에 대한 단일클론 항체의 발생 및 시험**

[0426] **a. CLDN6의 세포외 도메인 1을 인코딩하는 발현 벡터의 제조**

[0427] 올바른 신호 펩티다제 절단 부위(SEQ ID NO: 13)를 확실히 하기 위한 4개의 추가적인 아미노산이 뒤따르는 신호 펩타이드로부터 유래한 N-말단 Ig 카파 리더와의 융합으로서, 잠정적인 CLDN6(SEQ ID NO: 7)의 세포외 도메인 1(EC1) 단편을 인코딩하는 코돈-최적화 DNA 서열(SEQ ID NO: 12)을 준비하고, pcDNA3.1/myc-His 벡터 속으로 클로닝하여 벡터 p3973을 제조하였다. 면역화에 앞서, 상업적으로 이용가능한 항-myc 항체(Cell Signaling, MAB 2276)를 사용하여, 일시적으로 감염시킨 파라포름알데히드(PFA)-고정된 CHO-K1 세포를 면역형광 현미경으로 관찰하여 EC1 단편의 발현을 확인하였다.

[0428] **b. 면역화**

[0429] 0 및 14번째 날에 PEI-만노스(PEI-Man; 폴리플러스 트랜스펙션에서 유래한 인 비보-jetPEI™Man) (5% 글루코스 수용액 중의 PEI-Man 150 mM) 4 ㎕와 함께 p3973 플라스미드 DNA 25 ㎍를 사용하여, 복강내 주사로 Balb/c 마우스를 면역화하였다. 28 및 44번째 날에 HPLC-정제된 PTO-CpG-ODN(PBS 중에 25 ㎍; 5'-TCCATGACGTTCCTGACGTT; 유로핀 MWG 오페론, 독일)과 함께 KLH-접합 펩타이드 SEQ ID NO: 14 및 SEQ ID NO: 15 (각각 PBS 중에 100 ㎍, JPT 펩타이드 테크놀로지, 독일)를 사용하여 마우스를 피하로 면역화하였다. 64, 77 및 97번째 날에, 안정적으로 CLDN6를 발현하도록 p3953 벡터로 감염시킨 P3X63Ag8U.1 마이엘로마 세포 $2 \times 10^7$개를 복강 주입하여 마우스를 면역화하였다. 투여에 앞서 세포를 미토마이신-C (2.5 ㎍/ml, Sigma-Aldrich, M4287)로 처리하였다. 64 및 97일에는 HPLC-정제된 PTO-CpG-ODN(PBS 중 50 ㎍)를 함께 세포를 투여하였고, 77일에는 불완전한 프로이드 어주번트와 함께 투여하였다.

[0430] 단일클론 항체 생산을 위하여, 비장 절제 4일 전에 p3953 벡터로 안정적으로 감염된 HEK293 세포 $2 \times 10^7$개를

복강 투여하여 탐지 가능한 항-CLDN6 면역 반응을 가지는 마우스를 추가면역하였다.

[0431] **c. CLDN6에 대한 단일클론 항체의 시험**

[0432] 유세포 분석

[0433] CLDN6 및 그 상동체에 대한 단일클론 항체의 결합을 시험하기 위하여, HEK293T 세포를 상응하는 클라우딘-코딩 플라스미드로 일시적으로 감염시키고, 유세포 분석기를 사용하여 발현을 분석하였다. 감염된 세포와 비감염된 세포를 차별화하기 위하여, 리포터로서 형광 마커를 사용하여 HEK293T 세포를 공동 감염시켰다. 감염 24시간 후에 0.05% 트립신/EDTA를 사용하여 세포를 수확하고, FACS 완충액(2% FCS 및 0.1% 소듐 아자이드를 포함하는 PBS)을 사용하여 세척하고, 농도가 2 x $10^6$ 세포/ml인 FACS 완충액 중에 재현탁시켰다. 4℃에서 30분 동안, 세포 현탁액 100 ㎕를 지시된 농도의 적당한 항체와 배양하였다. CLDN6 및 CLDN9 발현을 탐지하기 위하여 교차-반응성 항체를 사용하였다. 상업적으로 이용가능한 마우스 항-클라우딘 항체들인 항-CLDN3(R&D, MAB4620) 및 항-CLDN4(R&D, MAB4219)을 양성적 대조군으로서 사용하고, 마우스 IgG2a(Sigma, M9144) 및 IgG2b(Sigma, M8894)를 이소타입 대조군으로 사용하였다. FACS 완충액을 사용하여 세포를 3회 세척하고, APC-접합된 항-마우스 IgG 1+2a+2b+3a 특이적 2차 항체(Dianova, 115-135-164)와 4℃에서 30분 동안 배양하였다. 세포를 2회 세척하고 FACS 완충액에 재현탁시켰다. BD FACSArray를 용한 유세포 분석법으로 결합을 분석하였다. 수직축 상의 항체 결합에 대한 형광 마커의 발현을 수평축 상에 도시하였다.

[0434]

[0435] CDC

[0436] 항-CLDN6 항체와 배양시킨 표적 세포에 인간 보체를 첨가한 후에, 용해되지 않은 세포 중의 세포 내 ATP의 함량을 측정하는 것에 의하여, 보체 의존적 세포독성(complement dependent cytotoxicity (CDC))을 측정하였다. ATP 측정을 위해 매우 민감한 분석 기법으로서, 루시퍼라제의 발광 반응을 사용하였다.

[0437] CLDN6(CHO-K1-CLDN6)으로 안정적으로 감염된 CHO-K1 세포를 0.05% 트립신/EDTA로 수확하고, X-Vivo 15 배지(Lonza, BE04-418Q)로 2회 세척하고, X-Vivo 15 배지 중에 1 x $10^7$ 세포/ml의 농도로 재현탁시켰다.

[0438] 세포 현탁액 250 ㎕을 0.4 cm의 전기 영동 큐벳으로 이전시키고, 루시퍼라제를 인코딩하는 인 비트로 전사된 RNA(luciferase IVT RNA) 7 ㎍과 혼합하였다. 진 펄서 엑스셀(Gene Pulser Xcell, Bio Rad)을 사용하여 200 V 및 300 μF에서 세포를 전기 영동 시켰다. 전기 영동 후에 10% (v/v) FCS, 1% (v/v) 페니실린/스트렙토마이신 및 1.5 mg/ml G418를 포함하는 GlutaMax-I 배지(Invitrogen, 31331-093)와 함께 미리 데워둔 D-MEM/F12 (1:1)에 세포를 현탁시켰다. 셀 당 세포 현택액 50 ㎕를 FF 화이트 96-웰 PP-플레이트에 넣고, 7.5% $CO_2$ 및 37℃에서 배양하였다. 전기 영동 24시간 후에 60% RPMI(20 mM HEPES을 포함하는 것) 및 40% 인간 혈청(6명의 건강한 기증자로부터 얻은 혈청 풀) 중의 단일클론 뮤린 항-CLDN6 50 ㎕을 지시된 농도로 세포에 첨가하였다. PBS 내 8% (v/v) 트리톤 X-100을 웰당 10 ㎕로 총 용해(*total lysis*) 대조군에 첨가한 반면에, 최대 생존 세포(*max viable cells*) 대조군 및 실제 시료에는 PBS를 웰당 10 ㎕으로 첨가하였다. 7.5% $CO_2$ 및 37℃에서 80분의 배양 후에 루시페린 믹스($ddH_2O$ 중160 mM HEPES, 3.84 mg/ml D-루시페린, 및 0.64 U/ml ATPase)를 웰당 50 ㎕으로 첨가하였다. 플레이트를 RT에서 45분 동안 암실에서 배양하였다. 루미노메터(Infinite M200, TECAN)를 사용하여 발광을 측정하였다. 결과는 통합된 디지털 RLU(relative light units) 값으로 나타낸다.

[0439] NEC8 세포를 200 V 및 400 μF에서 전기 영동하고, 10%(v/v) FCS를 포함하는 GlutaMAX-I 배지(Invitrogen, 61870)와 함께 RPMI 1640 중에서 배양하였다.

[0440] 특이적 용해(specific lysis)는 다음에 의하여 계산된다.

[0442] $$\text{specific lysis [\%]} = 100 - \left[\frac{(\text{sample} - \text{total lysis})}{(\text{max viable cells} - \text{total lysis})} \times 100\right]$$

[0443]

[0444] 최대 생존 세포(*max viable cells*): 항체 없이 PBS 10 ㎕

[0445] 총 용해(*total lysis*):항체 없이 PBS 중의 8% (v/v) 트리톤 X-100 10 ㎕

[0447] 초기 처리

[0448] 초기 항체 처리를 위하여, PBS 200 ㎕ 중에 있는 NEC8 세포 2 x $10^7$개를 아티믹 누드-*Foxn1*$^{nu}$ 마우스의 옆구리에 피하 주입하였다. 각각의 실험그룹은 6-8주령의 자성 마우스 열마리로 구성되었다. 접종 3일 후에, 1주에 두 번 정맥 및 복강 투여를 반복하는 것에 의하여, 정제된 뮤린 단일클론 항체 muMAB 59A, 60A, 61D, 64A, 65A, 66B 및 67A 200 ㎍을 46일 동안 적용하였다. PBS로 처리한 그룹을 음성적 대조군으로 사용하였다. 종양 부피(TV = (length x width$^2$)/2)를 주2회 한번 관찰하였다. TV는 $mm^3$로 표시되는데, 이는 시간에 따른 종양 성장의 커브 구조를 허용한다. 종양이 1500 $mm^3$ 보다 더 큰 부피에 도달한 때에 마우스를 희생시켰다.

[0449] **d. 실험결과**

[0450] 뮤린 단일클론 항체 muMAB 59A, 60A, 61D, 64A, 65A, 66B 및 67A는 인간 CLDN6 및 CLDN6 SNP (single nucleotide polymorphism) 변이체 I143V에 대한 강한 결합을 나타낸 반면에, CLDN3, 4, 및 9에 대한 결합은 관찰되지 않았다(도 6).

[0451] MuMAB 59A, 60A, 61D, 64A, 65A, 66B 및 67A는 매우 낮은 EC50 값(EC50 200-500 ng/ml)을 나타내었고, 낮은 농도에서 결합포화를 달성하였다(도 7).

[0452] MuMAB 59A, 60A, 61D, 64A, 65A, 66B 및 67A은 양-의존적 CDC 활성을 나타내었고 낮은 온도에서 CDC을 유도하였다(도 8). 항-CLDN6 항체 65A 및 66B는 양 의존적 방식으로 NEC8 세포 상에서 CDC를 유도하였다(도 9). muMAB 65A 및 66B의 표적 특이성은 NEC8 LVTS2 54 세포(CLDN6 녹 다운)을 사용하여 입증하였다.

[0453] 또한, muMAB 59A, 60A, 61D, 64A, 65A, 66B 및 67A는 NEC8 세포를 이식한 마우스에서 종양 성장 억제를 나타내었다(도 10).

[0455] **실시예 7: CLDN6에 대한 키메라 단일클론 항체의 생성 및 시험**

[0456] **a. 마우스/인간 키메라 단일클론 항체의 생성**

[0457] 키메라화를 위하여, 뮤린 중쇄 및 리더 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 아래 표에 나열된 프라이머를 사용하여 PCR로 증폭하였다. 뮤린 중쇄는 ApaI 제한부위(5'-GGGCCC-3')를 사용하여 발현 벡터가 인코딩하는 인간 Fcgamma1 사슬의 N-말단 부위에 융합시켰다. 리더 서열을 포함하는 뮤린 카파 체인의 가변 도메인을 BsiWI 제한부위를 사용하여 불변 영역의 앞에 클로닝하였다. 벡터 중 불변 영역의 올바른 방향, 즉 벡터의 선행하는 프로모터에 대해 적합한 방향은 시퀀싱에 의하여 확인하였다. ApaI 제한 부위 위치 때문에, 상기 목적을 위한 리더 서열을 포함하는 가변 영역의 임의의 증폭은, ApaI 부위 서열에 더하여 인간 감마-1 불변 영역 서열의 첫번째 11개 뉴클레오타이드를 포함해야 한다. 인간 감마-1 중쇄 불변 영역의 뉴클레오타이드 서열은 SEQ ID NO: 24로서 열거되고, 그렇게 발현된 인간 감마-1 불변 영역의 아미노산 서열은 SEQ ID NO: 25로서 열거된다. 카파 경쇄의 불변 영역을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 SEQ ID NO: 26로서 열거되고, 개개의 아미노산 서열은 SEQ ID NO: 27로서 열거된다.

[0459] 표 1: 항체 클로닝에 사용된 마우스 하이브리도마 세포주

*표 1*

[0460]

| | muMAB | 이소타입 | 프라이머 SEQ ID NOs: |
|---|---|---|---|
| 중쇄 | 64A | IgG2a | 17, 18 |
| | 89A | IgG2a | 17, 19 |
| | 61D | IgG2a | 17, 20 |
| | 67A | IgG2a | 17, 20 |
| 경쇄 | 64A | IgK | 21, 22 |
| | 89A | IgK | 21, 23 |
| | 61D | IgK | 21, 22 |
| | 67A | IgK | 21, 22 |

[0461] 그들의 뮤린 대응부위에 상응하는 키메라 단일클론 항체는 접두어 "chim"을 사용하여, 예컨대 chimAB 64A와 같이 명명하였다.리더 서열을 포함하는 경쇄 및 중쇄의 뮤린 가변 영역의 증폭은 마쯔 등(Matz et al., Nucleic Acids Research, 1999, Vol. 27, No. 6)에 기술된 "스텝-아웃 PCR" 방법에 따라 수행하였다. 이를 위하여 당업

계에서 숙련된 자들에게 알려진 표준 방법, 예컨대 RNeasy 미니 키트(Qiagen)를 사용하는 방법에 의하여, 단일 클론 하이브리도마 세포주로부터 총 RNA를 준비하였다(표 1 참조). 또한, 마쯔 등(Matz et al., Nucleic Acids Research, 1999, Vol. 27, No. 6, 1558)에 기술된 "템플레이트-스위치" 기법에 따라 단일 가닥 cDNA를 준비하였다. (dT)30 올리고머(SEQ ID NO: 28)에 더하여, 그것은 cDNA 가닥의 중합 중에 템플레이트 스위칭을 위한 5' 아답터로서 기능하기 위한 DNA/RNA 하이브리드 올리고머(SEQ ID NO: 29)을 포함하였다. 이러한 아답터 올리고머에서 마지막 3개의 뉴클레오타이드는 디옥시리보뉴클레오타이드 대신에 리보뉴클레오타이드였다. 뒤이은 "스텝-아웃 PCR"은 마우스 카파 체인의 불변 영역 또는 감마 체인의 서브클래스 2a의 불변 영역(각각 SEQ ID NO: 30 및 31)을 표적화하는 안티센스 올리고머를 사용하였다. 하이브리도마 세포주에 의하여 생산되는 뮤린 단일클론 항체의 IgG 서브클래스는 IsoStrip(Roche)로 면역학적으로 앞서 분석하였고, 그에 따라 적당한 안티센스 올리고머를 선택하였다(도 1 참조). SEQ ID NO: 32 및 33 중에 열거되는 두 개의 올리고머를 포함하는 프라이머 혼합물을 "스텝-아웃 PCR"에서 센스 올리고머로 사용하였다.

[0462] 그 다음, 5' UTR 및 3' 마우스 불변 영역을 제외하고, 인간 불변 영역을 포함하는 준비된 발현벡터 속으로의 서브 클로닝을 가능하게 하는 제한 부위를 말단에 첨가하는 PCR에 의하여 리더 서열을 포함하는 동정된 뮤린 가변 영역을 증폭하였다. 그 다음 센스 올리고머는, 일치된 코작(Kozak) 서열(5'-GCCGCCACC-3') 및 ApaI 제한 부위에 더하여 인간 감마-1 불변 영역의 첫번째 11개 뉴클레오타이드를 포함하는 중쇄 가변 영역을 위한 안티센스 올리고머를 제공하였다(표 1, SEQ ID NOs: 17 내지 23 참조). 리더 서열을 포함하는 카파 경쇄 가변 영역을 HindIII 및 BsiWI 제한효소, 감마 중쇄 가변 영역 요구 HindIII 및 ApaI 제한효소를 사용하여 클로닝하였다.

[0463] 리더 서열을 포함하는 추가적인 경쇄 및 중쇄의 뮤린 가변 영역을 증폭하였고, CLDN6에 대한 키메라 단일 클론 항체를 상기 기술한 프로토콜에 따라 추가로 생성시켰다.

[0464] **b. 키메라 단일클론 항-CLDN6 항체의 생산**

[0465] 키메라 단일클론 항체를, 상응하는 항체의 경쇄 및 중쇄를 인코딩하는 플라스미드 DNA로 감염시킨 HEK293T 세포(ATCC CRL-11268)에서 일시적으로 발현시켰다. 감염 24시간 후에 8 x $10^7$개의 세포를 145 mm 셀 배양 플레이트에 넣고 25 ml HEK293T-배지(DMEM/F12 + GlutaMAX-I, 10% FCS, 1% 페니실린/스트렙토마이신) 중에서 배양하였다. 세포 배양 플레이트 당, 보충제가 없는 HEK293T-배지 5 ml 중에 플라스미드 DNA 20 ㎍를 용해하였다. 선형 폴리에틸렌이민(PEI)(1 mg/ml)(Polyscience, 23966) 75 ㎕를 첨가한 후에, (DNA:PEI)-혼합물을 RT에서 15분 동안 배양하였다. 그 다음 감염-혼합물을 떨어뜨리는 방식으로 세포에 첨가하였다. 감염 24시간 후에, HEK293T-배지를 1% 페니실린/스트렙토마이신을 포함하는 Pro293a-배지(Lonza, BE12-764Q)로 대체하였다. 최적의 발현을 위하여, 96 내지 120 시간의 추가적인 시간 동안 감염된 세포를 37 ℃ 및 7.5% $CO_2$에서 배양하였다. 상등액을 수확하고, 단백질-A 컬럼을 사용한 FPLC에 의하여 키메라 항체를 정제하였다. SDS-PAGE로 항체의 농도를 측정하고, 품질을 측정하였다.

[0466] **c. CLDN6에 대한 키메라 단일클론 항체의 시험**

[0467] 유세포 분석

[0468] 각각 CLDN3, 4, 6 또는 9로 안정되게 감염시킨 HEK293 세포 및 내인적으로 CLDN6을 발현하는 종양 세포주에 결합하는 CLDN6-특이적 키메라 단일클론 항체의 특이성 및 친화도를 시험하기 위하여, 유세포 분석을 수행하였다. 따라서, 0.05% 트립신/EDTA로 세포를 수확하고, FACS 완충액(PBS 포함 2% FCS 및 0.1% 소듐 아자이드)으로 세척하고, 2 x $10^6$ 세포/ml의 농도로 FACS 완충액에 재현탁시켰다. 세포 현탁액 100 ㎕을 4℃에서 60분 동안 지시된 농도의 적절한 항체와 함께 배양시켰다. CLDN6 및 CLDN9 발현을 탐지하기 위하여, 키메라 교차 반응성 항체(chimAB 5F2D2)를 사용하였다. 상업적으로 이용가능한 마우스 항-클라우딘 항체인 항-CLDN3 (R&D, MAB4620) 및 항-CLDN4 (R&D, MAB4219)을 양성적 대조군으로 사용한 반면, 인간 IgG1-kappa (Sigma, I5154)을 음성적 대조군으로 사용하였다. 세포를 FACS 완충액으로 3회 세척하고, APC-접합 고트 항-인간 IgG Fc-감마(Dianova, 109-136-170) 또는 APC-접합 항-마우스 IgG 1+2a+2b+3a(Dianova, 115-135-164) 특이적인 이차 항체 각각과 함께 4℃에서 30분 동안 배양하였다. 세포를 2회 세척하고, FACS 완충액에 재현탁시켰다. BD FACSArray를 사용하여 유세포 분석법으로 결합을 분석하였다.

[0469] CDC

[0470] 항-CLDN6 항체와 배양시킨 표적 세포에 인간 보체를 첨가한 후에 용해되지 않은 세포 중의 세포 내 ATP의 함량을 측정하는 것에 의하여 보체 의존적 세포독성(complement dependent cytotoxicity (CDC))을 측정하였다. ATP

의 측정을 위하여 매우 민감한 분석기법으로서 루세퍼라제의 생 발광 반응을 사용한다.

[0471] 이 분석에서, 둘 모두 루시퍼라제 발현 컨스트럭트를 안정적으로 도입한 것인 NEC8 야생형 세포(CLDN6 양성) 및 NEC8 CLDN6 녹다운 세포(CLDN6 음성)를 사용하였다. 0.05% Trypsin/EDTA를 사용하여 세포를 수확하고, 10% (v/v) FCS를 포함하는 GlutaMax-I 배지(Invitrogen, 61870-010)를 사용하여 RPMI 중에 2 x $10^5$ 세포/ml의 농도로 조절하였다. 1 x $10^4$개의 세포를 화이트 96-웰 PP-플레이트에 넣고, 37 ℃ 및 5% $CO_2$에서 24시간 동안 배양하였다. 배양 후에 60% RPMI(20 mM HEPES를 포함하는 것) 및 40% 인간 혈청(6명의 건강한 기증자로부터 얻은 혈청 풀) 중에 있는 단일클론 키메라 항-CLDN6 항체 50 ㎕ 을 지시된 농도로 세포에 첨가하였다. 웰 당 PBS 중의 8% (v/v) 트리톤 X-100 10 ㎕를 총 용해(*total lysis*) 대조군에 첨가한 반면, 웰 당 PBS 10 ㎕를 최대 생존 세포(*max viable cells*) 대조군 및 실제 샘플에 첨가하였다. 37 ℃ 및 5% $CO_2$에서 80분간 추가로 배양한 후에, 웰 당 루시페린 혼합물($ddH_2O$ 중에 3.84 mg/ml D-루시페린, 0.64 U/ml ATPase 및 160 mM HEPES) 50 ㎕을 첨가하였다. 어둠속 RT에서 45분 동안 플레이트를 배양하였다. 루미노미터(Infinite M200, TECAN)를 사용하여 생발광을 측정하였다. 결과는 통합된 디지털 RLU(relative light units) 값으로 나타낸다.

[0472]

[0473] 특이적 용해(specific lysis)는 다음과 같이 계산된다:

[0474] $$\text{specific lysis [\%]} = 100 - \left[\frac{(\text{sample} - \text{total lysis})}{(\text{max viable cells} - \text{total lysis})} \times 100\right]$$

[0475] 최대 생존 세포(*max viable cells*): 항체 없이 PBS 10 ㎕

[0476] 총 용해(*total lysis*): 항체 없이 PBS 중의 8% (v/v) 트리톤 10 ㎕

[0478] ADCC

[0479] 항-CLDN6 항체와 배양한 표적 세포에 인간 PBMC을 첨가한 후에 비용해된 세포 중의 세포내 ATP 함량을 측정하는 것에 의하여 항체 의존적 세포 독성(ADCC)을 측정하였다. ATP의 측정을 위하여 매우 민감한 분석 기법으로서 루시페라제의 생발광 반응을 사용하였다.

[0480] 본 분석을 위하여, 둘 모두에 루시퍼라제 발현 컨스트럭트를 안정되게 도입시킨 NEC-8 야생형 세포(CLDN6 양성) 및 NEC-8 CLDN6 녹다운 세포(CLDN6 음성)를 사용하였다. 세포를 0.05% 트립신/EDTA으로 수확하고, 10% (v/v) FCS 및 20 mM Hepes를 포함하는 GlutaMax-I 배지(Invitrogen, 61870-010)를 사용하여 RPMI 중에 2 x $10^5$ 세포/ml의 농도로 조절하였다. 1 x $10^4$개 세포를 화이트 96-웰 PP-플레이트에 넣고, 37 ℃ 및 5% $CO_2$에서 4시간 동안 배양하였다.

[0481] 피콜 하이파크(GE Healthcare, 17144003)를 사용하여 밀도 구배 원심분리에 의하여 인간 기증자 혈액 샘플로부터 PBMC를 분리하였다. PBMC 포함 중간상을 분리하고, PBS/EDTA(2 mM)을 사용하여 세포를 2회 세척하였다. 1 x $10^8$개 PBMC를 5% 열-불활성화된 인간 혈청(Lonza, US14-402E)을 포함하는 X-비보 15 배지(Lonza, BE04-418Q) 50 ml 중에 접종하고, 37 ℃ 및 5% $CO_2$에서 2시간 동안 배양하였다. 표적 세포의 접종 4시간 후에, PBS 중의 단일클론 키메라 항-CLDN6 항체 25 ㎕를 지시된 농도로 세포에 첨가하였다. 2시간 배양 이내에 점착성 단핵 세포로부터 분리한 비점착성 PBMC를 수확하고, X-vivo 15 배지 중에 8 x $10^6$ 세포/ml의 농도로 조절하였다. 이러한 세포 현탁액 25 ㎕를 표적 세포 및 단일클론 키메라 항-CLDN6 항체에 첨가하였다. 플레이트를 37 ℃ 및 5% $CO_2$에서 24시간 동안 배양하였다.

[0482] 배양 24시간 후에, 웰 당 PBS 중의 8% (v/v) 트리톤 X-100 10 ㎕를 총 용해(*total lysis*) 대조군에 첨가한 반면, 웰 당 PBS 10 ㎕를 최대 생존 세포(*max viable cells*) 대조군 및 실제 샘플에 첨가하였다. 웰 당 루시페린 혼합물($ddH_2O$ 중에 3.84 mg/ml D-루시페린, 0.64 U/ml ATPase 및 160 mM HEPES) 50 ㎕를 첨가하였다. 플레이트를 암실 RT에서 30분 동안 배양하였다. 루미노메터(Infinite M200, TECAN)를 사용하여 생발광을 측정하였다. 결과는 통합된 디지털 RLU(relative light units) 값으로 나타낸다.

[0484] 특이적 용해(specific lysis)는 다음과 같이 계산된다:

[0485] $$\text{specific lysis [\%]} = 100 - \left[\frac{(\text{sample} - \text{total lysis})}{(\text{max viable cells} - \text{total lysis})} \times 100\right]$$

[0487] 최대 생존 세포(*max viable cells*): 항체 없이 PBS 10 ㎕

[0488] 총 용해(*total lysis*): 항체 없이 PBS 중 8% (v/v) 트리톤 X-100 10 ㎕

[0490] **d. 실험결과**

[0491] 항-CLDN6 키메라 단일클론 항체인 chimAB 61D, 64A, 67A 및 89A은 인간 CLDN6에 대한 강한 결합을 보여준 반면에, CLDN3, 4, 및 9에 대한 결합은 관찰되지 않았다(도 11).

[0492] HEK293 세포의 표면에 안정적으로 발현되는 인간 CLDN6에 대한 결합에 관하여, 항-CLDN6 키메라 단일클론 항체인 chimAB 64A 및 89A은 매우 낮은 EC50 값(EC50 450-600 ng/ml)을 나타내었고, 결합 포화는 매우 낮은 농도에서 성취되었다. ChimAB 67A 및 61D은 낮은 EC50 값(EC50 1000 ng/ml) 및 중간 EC50 값(EC50 2300 ng/ml)을 각각 나타내었다(도 12).

[0493] NEC8 세포 중에서 내인적으로 발현되는 CLDN6에 대한 결합에 관하여, 항-CLDN6 키메라 단일클론 항체인 chimAB 64A 및 89A는 매우 낮은 EC50 값(EC50 600-650 ng/ml)을 나타내었고, 결합의 포화는 매우 낮은 농도에서 달성된 반면에, chimAB 61D 및 67A 는 중간 EC50 값(EC50 1700 ng/ml) 및 높은 EC50 값(EC50 6100 ng/ml)을 각각 나타내었다(도 13).

[0494] OV90 세포 중에서 내인적으로 발현되는 CLDN6에 대한 결합에 관하여, 항-CLDN6 키메라 단일클론 항체 chimAB 64A 및 89A는 매우 낮은 EC50 값(EC50 550-600 ng/ml)을 나타내었고, 결합의 포화는 낮은 농도에서 달성되었다. ChimAB 61D 및 67A는 중간 EC50 값(각각 EC50 1500 ng/ml 및 EC50 2300 ng/ml)을 나타내었다(도 14).

[0495] 항-CLDN6 키메라 단일클론 항체인 chimAB 61D, 64A, 67A 및 89A는 양-의존적 방식으로 NEC-8 세포에 대한 CDC 활성을 나타내었다(도 15).

[0496] 항-CLDN6 키메라 단일클론 항체인 chimAB 61D, 64A, 67A 및 89A는 NEC-8 세포에 대하여 양-의존적 ADCC 활성을 나타내었고, 심지어 낮은 항체 농도에서도 ADCC를 유도하였다(도 16).

[0497] 이러한 결과는 CLDN6에 대한 이러한 키메라 단일클론 항체의 특이성을 명백하게 보여준다.

[0499] **실시예 8: CLDN6에 대한 단일클론 항체를 사용한 치료**

[0500] 초기 치료

[0501] 초기 항체 치료를 위하여, RPMI 배지(Gibco) 200 ㎕ 중에 있는 2 x $10^7$개 NEC8 세포를 아티믹(athymic) 누드-*Foxn1*$^{nu}$ 마우스의 옆구리에 피하 접종하였다. 각각의 실험군은 6 내지 8주령의 자성 마우스 10마리로 구성되었다. 종양 세포 접종 3일 후에, 정제된 뮤린 단일클론 항체 muMAB 89A 200 ㎍를 1주에 2번 정맥 및 복강 투여를 번갈아 하는 방식으로 7주간 적용하였다. PBS로 처리한 실험군을 음성적 대조군으로 사용하였다. 종양 부피(TV = (길이 x 너비$^2$)/2)를 2주에 한번 모니터 하였다. TV를 $mm^3$으로 표시하였는데, 이는 시간에 따른 종양 성장의 커브 구조를 허용한다. 종양이 1500 $mm^3$ 보다 더 큰 부피에 도달한 때에 마우스를 희생시켰다.

[0502]

[0503] 진행 치료(advanced treatment)

[0504] 진행된 제노그라프트 종양의 항체 치료를 위하여, RPMI 배지(Gibco) 200 ㎕ 중에 있는 2 x $10^7$개의 NEC8 세포를 6 내지 8주령의 자성 아티믹 누드--*Foxn1*$^{nu}$ 마우스의 옆구리에 피하 접종하였다. 종양 부피(TV = (길이 x 너비$^2$)/2)를 2주에 한번 모니터 하였다. TV를 $mm^3$으로 표시하였는데, 이는 시간에 따른 종양 성장의 커브 구조를 허용한다. 종양 세포 접종 15 내지 17일 후에, 마우스를 80 $mm^3$ 초과의 균일한 종양 크기를 가지는 코호트 당 8마리 동물로 구성된 치료 그룹으로 분류하였다. 정제된 뮤린 단일클론 항체 muMAB 61D, 64A, 67A 및 89A 200 ㎍를 2주에 한번 정맥 및 복강 투여를 번갈아하는 방식으로 5주 동안 적용하였다. PBS로 처리한 실험군 및 비특

이적 항체를 음성적 대조군으로 사용하였다. 종양이 1500 $mm^3$ 보다 더 큰 부피에 도달한 때에 마우스를 희생시켰다.

[0505] 종양 세포주 NEC8을 이종이식한 마우스를 사용한 초기 치료 제노그라프트 모델에서, 뮤린 단일클론 항체 muMAB 61D, 64A 및 67A로 처리한 마우스는 심지어 면역치료요법을 중단한 후에도 종양 성장을 나타내지 않았다(도 17).

[0506] 종양 세포주 NEC8를 이종이식한 마우스를 사용한 초기 치료 제노그라프트 모델에서, muMAB 89A는 암 성장 억제를 나타내었고, 본 연구의 마지막에 muMAB89A으로 치료한 마우스에서 그 어떠한 종양도 탐지되지 않았다(도 18).

[0507] 종양 세포주 NEC8를 이종이식한 마우스를 사용한 진행 치료 제노그라프트 모델에서, muMAB 64A는 종양 성장의 억제를 나타내었다(도 19).

[0508] 종양 세포주 NEC8를 이종이식한 마우스를 사용한 진행 치료 제노그라프트 모델에서, muMAB 64A로 치료한 마우스는 연장된 생존을 나타내었다(도 20).

[0509] 종양 세포주 NEC8를 이종이식한 마우스를 사용한 진행 치료 제노그라프트 모델에서, 뮤린 단일클론 항-CLDN6 항체 muMAB 61D, 67A 및 89A을 사용한 종양 성장의 억제가 달성되었다(도 21).

[0510] 종양 세포주 NEC8를 이종이식한 마우스를 사용한 진행 치료 제노그라프트 모델에서, CLDN6 특이적 항체 muMAB 61D 또는 67A로 치료한 마우스는 연장된 생존을 나타내었다(도 22).

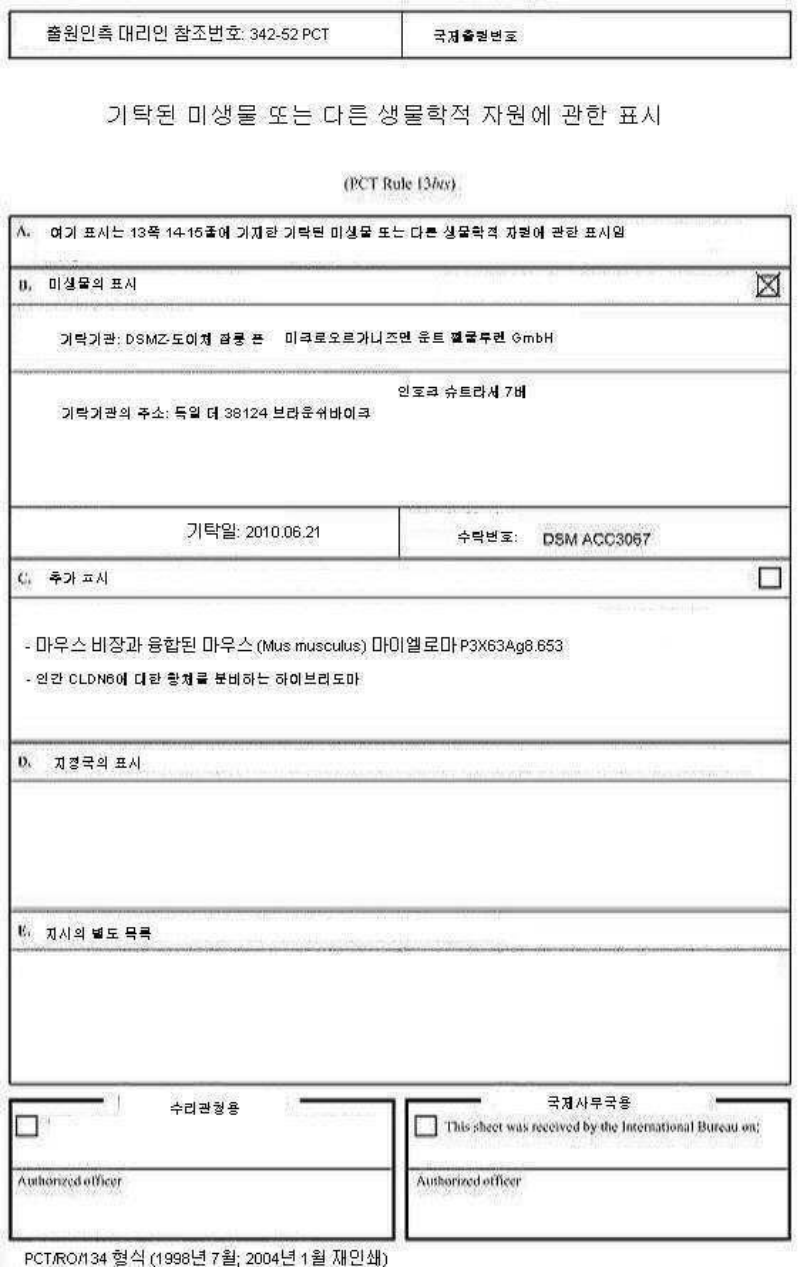
[0511] NEC8 야생형 및 안정되게 CLDN6이 녹다운된 NEC8 세포를 이식한 마우스를 사용한  진행 치료 제노그라프트 모델에서, muMAB 64A 및 89A는 NEC8 야생형을 이종이식한 마우스에서만 치료적 효과를 나타내고, CLDN6 녹다운된 NEC8 세포를 이종이식한 마우스에서는 그러하지 아니하였는데, 이는 인 비보에서 항체의 CLDN6-특이성을 나타낸다(도 23).

[0512] **실시예 9: CLDN6에 대한 단일클론 항체의 고-해상 에피토프 매핑**

[0513] CLDN6 특이적 단일클론 항체는 ELISA 에피토프-매핑 연구에서, 선형 펩타이드에 대하여 오직 매우 약한 결합(만일 존재한다면)만을 나타내었는데, 이는 그들의 에피토프가 입체배좌적(conformational)임을 함축한다. 본 명세서에 기술된 항체와 자연적인 입체형태를 띠는 CLDN6 사이의 상호작용을 분석하기 위하여, 포유류 세포 배양 중 특정위치 돌연변이를 에피토프-매핑 기술로서 사용하였다. 첫 번째 및 두 번째 세포와 도메인 내의 아미노산 27-81 및 137-161의 알라닌 스캐닝 돌연변이 발생을 각각 수행하였다. HEK293T 세포 내 일시적인 발현 이후에, 특이적 단일클론 항체가 결합할 수 있는 CLDN6 변이체의 능력을 분석하였다. 특이적 단일클론 항체의 CLDN6 변이체에 대한 결합의 손상은 변이된 아미노산이 접촉 및/또는 입체배위적으로 중요한 잔기임을 제시하는 것이다. 결합은 유세포 분석법으로 분석하였다. 감염된것과 감염되지 않은 세포군의 구별을 위하여, 세포를 형광 마커로 공동 감염시켰다.

[0514] CLDN6 특이적 키메라 항체와의 결합에 중요한 CLDN6 아미노산 잔기는 알라닌-스캐닝에 의하여 전체적으로 동정되었다. 알라닌 및 글라이신 변이는 특정위치 돌연변이 발생법(GENEART AG, Germany)으로 발생시켰다. 야생형 CLDN6 및 그 변이체에 대한 단일클론 키메라 항체의 결합을 시험하기 위하여, 상응하는 클라우딘을 코딩하는 플라스미드로 HEK293T 세포를 일시적으로 감염시키고, 유세포 분석법으로 그 발현을 분석하였다. 감염된 것과 비감염된 세포 사이의 구별을 위하여, HEK293T 세포는 리포터로서의 형광 마커로 공동 감염시켰다. 감염 24시간 후에, 세포를  0.05 % 트립신/EDTA으로 수확하고, FACS 완충액(2 % FCS 및 0.1 % 소듐 아자이드 포함 PBS)으로 세척하고,  2 x $10^6$ 세포/ml의 농도로 FACS 완충액 중에 재현탁시켰다. 세포 현탁액 100 ㎕을 4 ℃에서 45분간 항체 10 ㎍/ml와 배양하였다. CLDN6 변이체의 세포-표면 발현을 탐지하기 위하여 대조군으로서 상업적으로 이용가능한 마우스 항-CLDN6(R&D, MAB3656)을 사용하였다. FACS 완충액을 사용하여 세포를 3회 세척하고, 4℃에서 30분 동안 APC-접합된 고트 항-인간 IgG Fc-감마(Dianova, 109-136-170) 또는 APC-접합된 항-마우스 IgG 1+2a+2b+3a 특이적 2차 항체(Dianova, 115-135-164)와 함께 배양하였다. 세포를 2회 세척하고 FACS 완충액에 재현탁시켰다. BD FACSArray를 사용한 유세포 분석기법으로 감염된 세포군 내의 결합을 분석하였다. 따라서, 형광 마커의 발현을 수직축 상의 항체 결합에 대하여 수평축 상에 도시하였다. 변이 CLDN6에 결합한 단일클론 키메라 CLDN6 특이적 항체의 평균 신호 강도를 야생형 결합의 퍼센트로 표시하였다. 결합에 필수적인 아미노산은 변이된 후에 결합을 전혀 나타내지 못한 반면에, 결합을 보조하는 아미노산은 야생형과 비교하여 감소된 결합을 나타내었다.

[0515] 고 해상 에피토프-매핑은 CLDN6의 첫 번째 세포외 도메인의 아미노산 F35, G37, S39과 가능성 있게는 T33가 CLDN6 특이적 키메라 항체인 chimAB 61D, 64A, 67A 및 89A와의 결합에 중요함을 보여주었다. 잔기 I40는 chimAB 89A의 결합에 필수적이고, chimAB 61D 및 67A의 결합에 기여한다. 또한 CLDN6의 두 번째 세포외 도메인의 L151은 chimAB 67A와의 상호작용에 중요하다(도 24).



출원인측 대리인 참조번호: 342-52 PCT | 국제출원번호

기탁된 미생물 또는 다른 생물학적 자원에 관한 표시

(PCT Rule 13bis)

A. 여기 표시는 13쪽 14-15줄에 기재한 기탁된 미생물 또는 다른 생물학적 자원에 관한 표시임

B. 미생물의 표시 ☒

기탁기관: DSMZ-도이체 잠룽 폰 미크로오르가니즈멘 운트 젤쿨투렌 GmbH

기탁기관의 주소: 독일 더 38124 브라운쉬바이크 인호프 슈트라세 7비

기탁일: 2010.06.21 | 수탁번호: DSM ACC3067

C. 추가 표시 ☐

- 마우스 비장과 융합된 마우스 (Mus musculus) 마이엘로마 P3X63Ag8.653
- 인간 CLDN6에 대한 항체를 분비하는 하이브리도마

D. 지정국의 표시

E. 지시의 별도 목록

수리관청용 ☐ Authorized officer

국제사무국용 ☐ This sheet was received by the International Bureau on: Authorized officer

PCT/RO/134 형식 (1998년 7월; 2004년 1월 재인쇄)

[0517]

[0518]

[0519] **생물학적 물질을 위한 추가 시트**

[0520] **추가 기탁의 증명:**

[0521] 1) 기탁을 위한 기탁기관의 명칭 및 주소:

[0522] 데에스엠제트-도이체 잠룽 폰 미크로오르가니즈멘 운트 젤쿨투렌 게엠베하(DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH)

[0523] 독일

[0524] 38124 브라운쉐이그

[0525] 인호프펜슈트라세 7 B

*표 2*

[0526]

| 기탁일 | 수탁 번호 | 아래 표시는 PCT 국제공보상의 해당하는 페이지에 기술된 기탁된 미생물과 관련된다. |
|---|---|---|
| 2010년 6월 21일 | DSM ACC3068 | page 13, lines 16-17 |
| 2010년 6월 21일 | DSM ACC3069 | page 13, lines 18-19 |
| 2010년 6월 21일 | DSM ACC3070 | page 13, lines 20-21 |
| 2010년 6월 21일 | DSM ACC3071 | page 13, lines 22-23 |
| 2010년 6월 21일 | DSM ACC3072 | page 13, lines 24-25 |
| 2010년 6월 21일 | DSM ACC3073 | page 13, lines 26-27 |
| 2010년 8월 31일 | DSM ACC3089 | page 13, lines 28-29 |
| 2010년 8월 31일 | DSM ACC3090 | page 13, lines 30-31 |

[0527] **상기 언급한 기탁에 대한 추가 정보:**- 마우스(Mus musculus) 비장세포와 융합된 마우스(Mus musculus) 마이엘로마 P3X63Ag8.653

[0528] - 인간 CLDN6에 대한 항체를 분비하는 하이브리도마

[0530] **2) 기탁자:**

[0531] 상기 언급된 모든 기탁은 다음 기탁자에 의해 이루어짐:

[0532] 가니메드 파마슈티칼스 아게

[0533] 독일

[0534] 55131 마인츠

[0535] 프라일리히라트슈트라세 12

*수탁번호*

[0537]

기탁기관명 : Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH

수탁번호 : DSMACC3067

수탁일자 : 20100621

기탁기관명 : Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH

수탁번호 : DSMACC3068

수탁일자 : 20100621

기탁기관명 : Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH

수탁번호 : DSMACC3069

수탁일자 : 20100621

기탁기관명 : Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH

수탁번호 : DSMACC3070

수탁일자 : 20100621

기탁기관명 : Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH

수탁번호 : DSMACC3071

수탁일자 : 20100621

기탁기관명 : Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH

수탁번호 : DSMACC3072

수탁일자 : 20100621

기탁기관명 : Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH

수탁번호 : DSMACC3073

수탁일자 : 20100621

기탁기관명 : Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH

수탁번호 : DSMACC3089

수탁일자 : 20100831

기탁기관명 : Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH

수탁번호 : DSMACC3090

수탁일자 : 20100831

도면

도면1

Extracellular Loop 1

```
CLDN6 (SEQ ID NO: 2)    MASAGMQILGVVLTLLGWVNGLVSCALPMWKVTAFIGNSIVVAQVVWEGLWMSCVVQSTG 60
CLDN9 (SEQ ID NO: 9)    MASTGLELLGMTLAVLGWLGTLVSCALPLWKVTAFIGNSIVVAQVVWEGLWMSCVVQSTG 60
CLDN4 (SEQ ID NO: 10)   MASMGLQVMGIALAVLGWLAVMLCCALPMWRVTAFIGSNIVTSQTIWEGLWMNCVVQSTG 60
CLDN3 (SEQ ID NO: 11)   -MSMGLEITGTALAVLGWLGTIVCCALPMWKVSAFIGSNIITSQNIWEGLWMNCVVQSTG 59
                          * *::: * .*::***:  ::.****:*:*:****..*:.:* :*******.*******

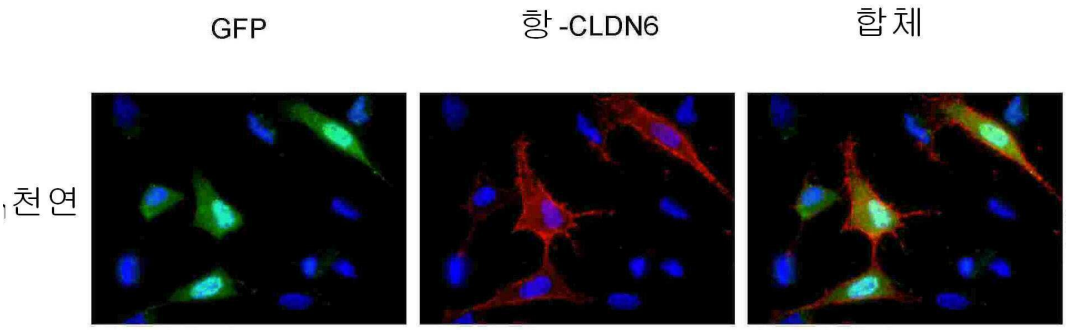
CLDN6 (SEQ ID NO: 2)    QMQCKVYDSLLALPQDLQAARALCVIALLVALFGLLVYLAGAKCTTCVEEKDSKARLVLT 120
CLDN9 (SEQ ID NO: 9)    QMQCKVYDSLLALPQDLQAARALCVIALLLALLGLLVAITGAQCTICVDEGAKARIVLT 120
CLDN4 (SEQ ID NO: 10)   QMQCKVYDSLLALPQDLQAARALVTISIIVAALGVLLSVVGGKCTNCLEDESAKAKTMIV 120
CLDN3 (SEQ ID NO: 11)   QMQCKVYDSLLALPQDLQAARALIVVAILLAAFGLLVALVGAQCTNCVQDDTAKAKITIV 119
                        ********************** :::::::* :*:*: :.*.:***.*:::. :***:  :.

                                                Extracellular Loop 2
CLDN6 (SEQ ID NO: 2)    SGIVFVISGVLTLIPVCWTAHAIIRDFYNPLVAEAQKRELGASLYLGWAASGLLLLGGGL 180
CLDN9 (SEQ ID NO: 9)    AGVILLLAGILVLIPVCWTAHAIIQDFYNPLVAEALKRELGASLYLGWAAAALLMLGGGL 180
CLDN4 (SEQ ID NO: 10)   AGVVFLLAGLMVIVPVSWTAHNIIQDFYNPLVASGQKREMGASLYVGWAASGLLLLGGGL 180
CLDN3 (SEQ ID NO: 11)   AGVLFLLAALLTIVPVSWSANTIIRDFYNPVVPEAQKREMGAGLYVGWAAAALQLLGGAL 179
                        :*::::::::.::**.*:*: **:******:*... ***:**.**:****:.* :****.*

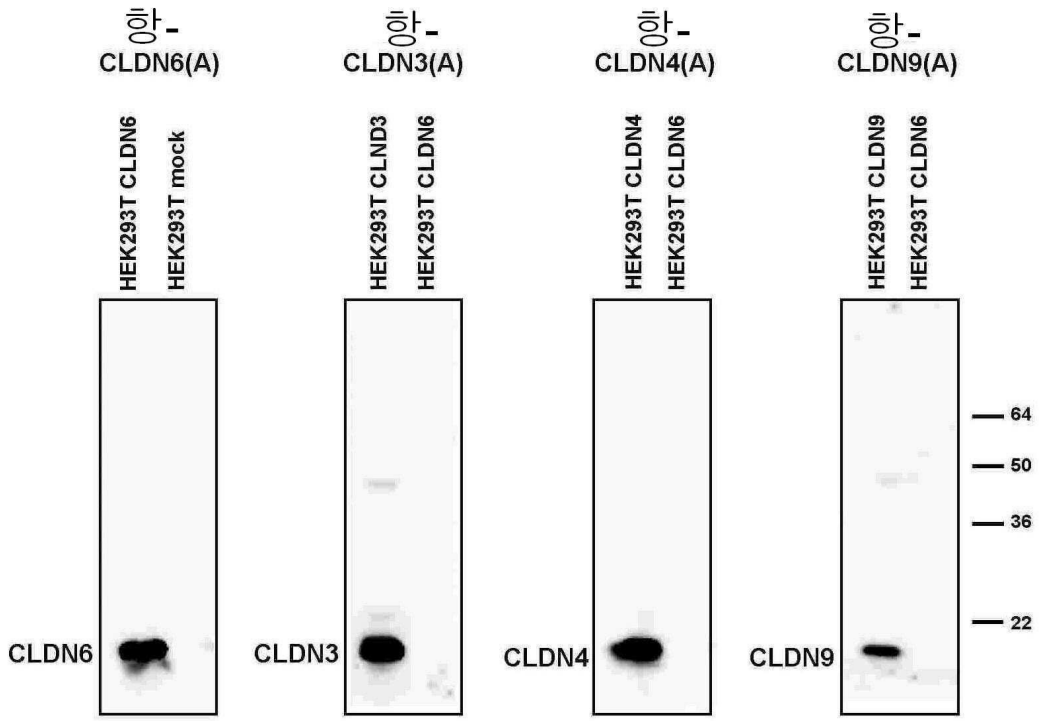
CLDN6 (SEQ ID NO: 2)    LCCTCPSGSQGPSHYMARYSTSAPAISRGPSEYP-----TKNYV 220
CLDN9 (SEQ ID NO: 9)    LCCTCPPPQVERPRG--PRLGYSIPSRS-GASGLD-----KRDYV 217
CLDN4 (SEQ ID NO: 10)   LCCNCPPRT---DKPYSAK---YSAARSAAASN---------YV 209
CLDN3 (SEQ ID NO: 11)   LCCSCPPR----EKKYTATKVVYSAPRSTGPGASLGTGYDRKDYV 220
                        ***.**.      .  .. * ...              **
```

도면2a

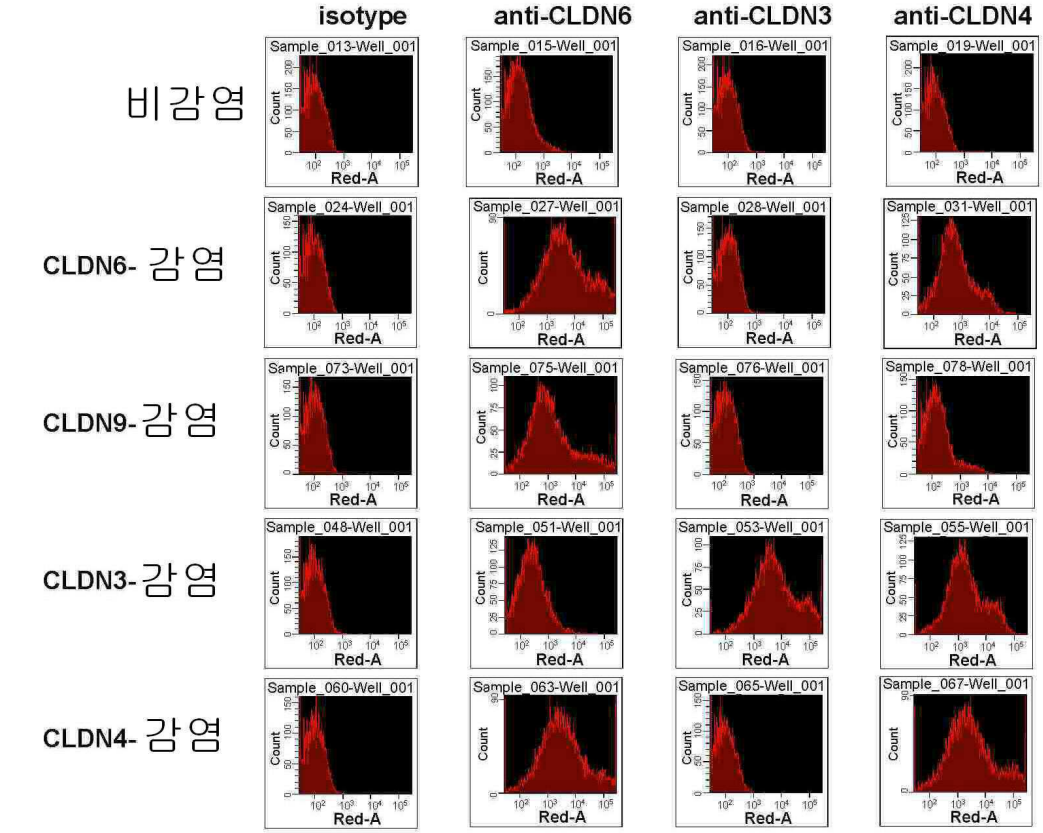
도면2b


GFP
항-CLDN6
합체
천연

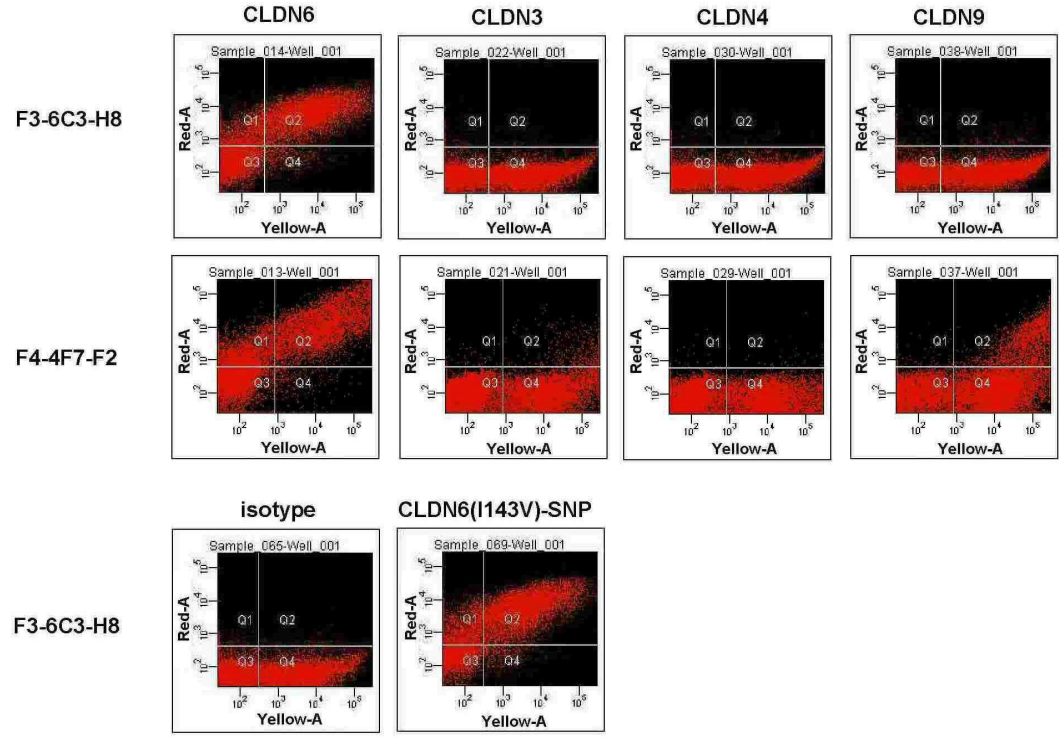
도면3


항-
CLDN6(A)
항-
CLDN3(A)
항-
CLDN4(A)
항-
CLDN9(A)
HEK293T CLDN6
HEK293T mock
HEK293T CLND3
HEK293T CLDN6
HEK293T CLDN4
HEK293T CLDN6
HEK293T CLDN9
HEK293T CLDN6
64
50
36
22
CLDN6
CLDN3
CLDN4
CLDN9

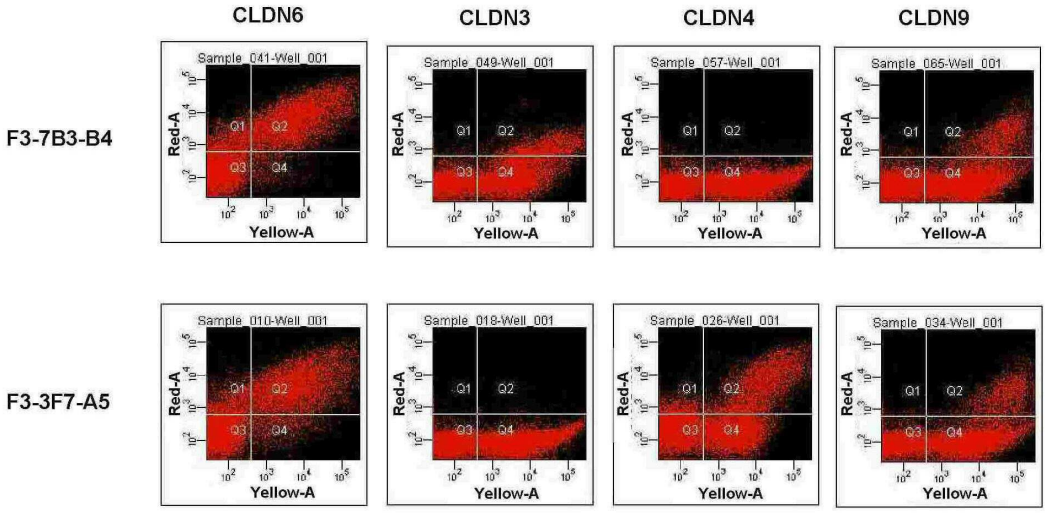
도면4


isotype
anti-CLDN6
anti-CLDN3
anti-CLDN4
비감염
CLDN6- 감염
CLDN9- 감염
CLDN3- 감염
CLDN4- 감염
Count
Red-A

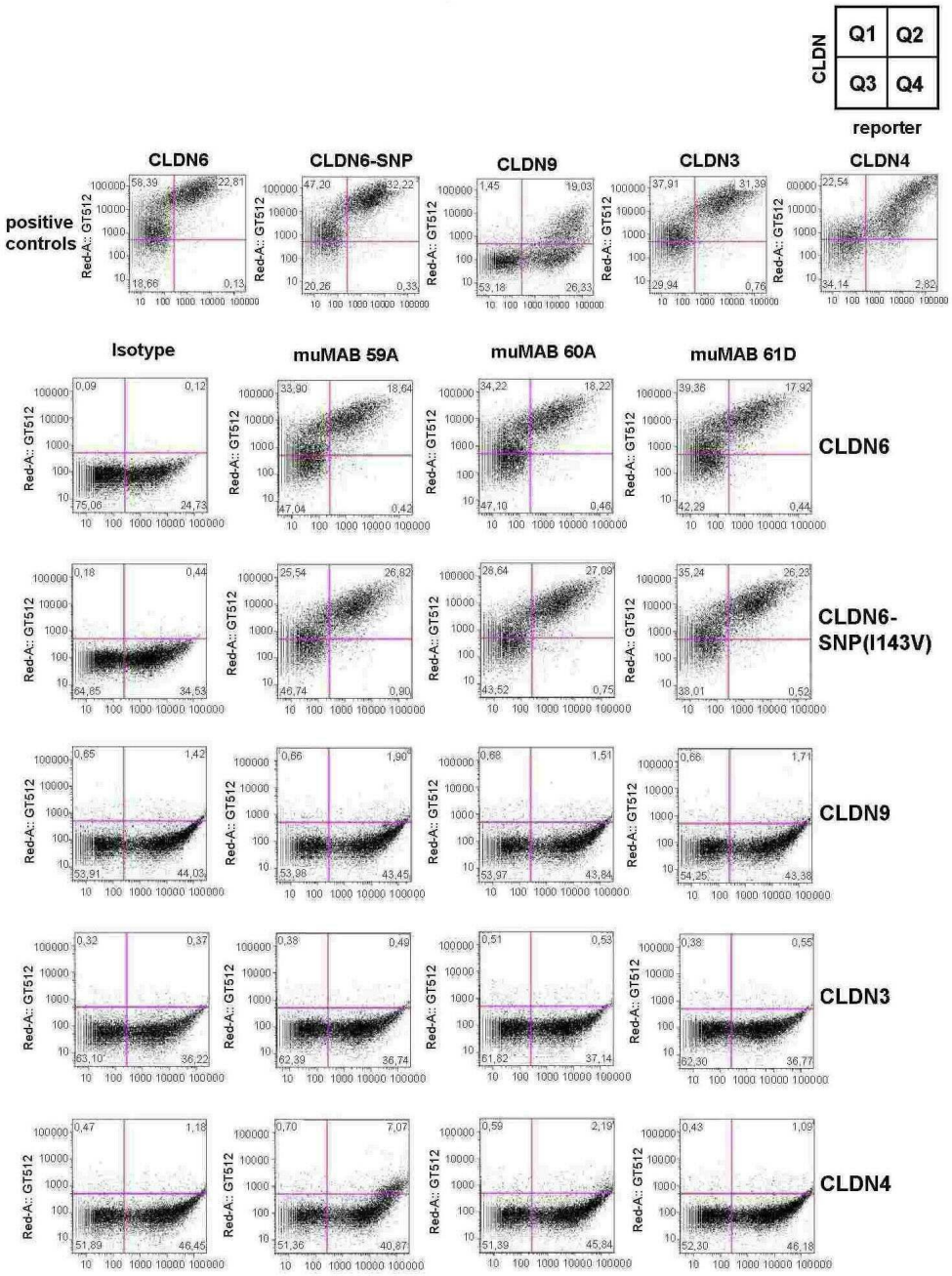
도면5a


CLDN6
CLDN3
CLDN4
CLDN9
F3-6C3-H8
F4-4F7-F2
isotype
CLDN6(I143V)-SNP
F3-6C3-H8
Red-A
Yellow-A
Q1
Q2
Q3
Q4

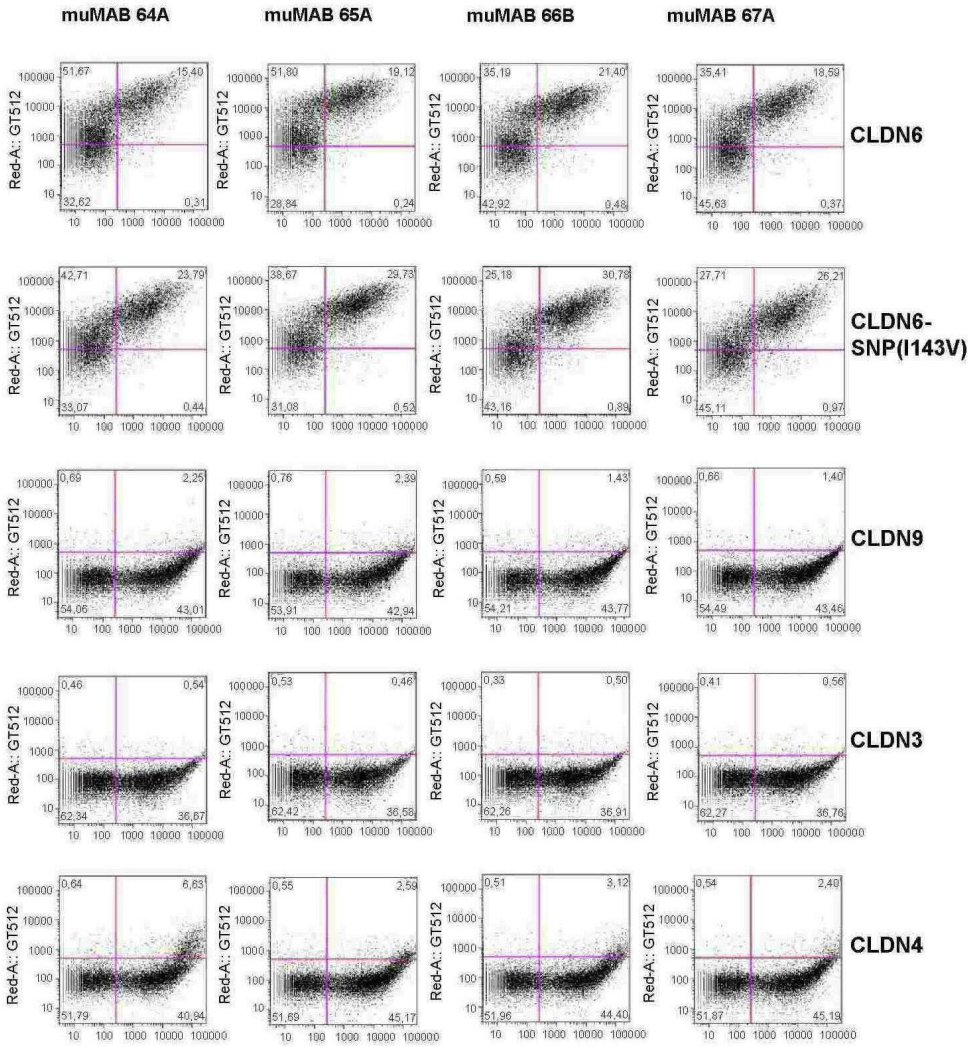
도면5b


CLDN6
CLDN3
CLDN4
CLDN9
F3-7B3-B4
F3-3F7-A5
Sample_041-Well_001
Sample_049-Well_001
Sample_057-Well_001
Sample_065-Well_001
Sample_010-Well_001
Sample_018-Well_001
Sample_026-Well_001
Sample_034-Well_001
Red-A
Yellow-A
Q1
Q2
Q3
Q4

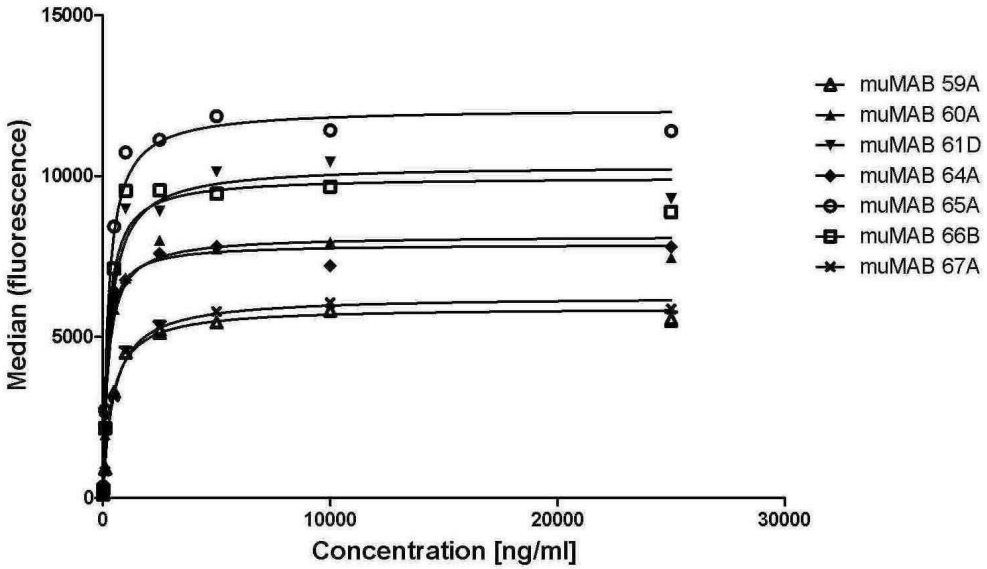
도면6a


CLDN
Q1
Q2
Q3
Q4
reporter
CLDN6
CLDN6-SNP
CLDN9
CLDN3
CLDN4
positive controls
Isotype
muMAB 59A
muMAB 60A
muMAB 61D
CLDN6
CLDN6-SNP(I143V)
CLDN9
CLDN3
CLDN4
Red-A:: GT512

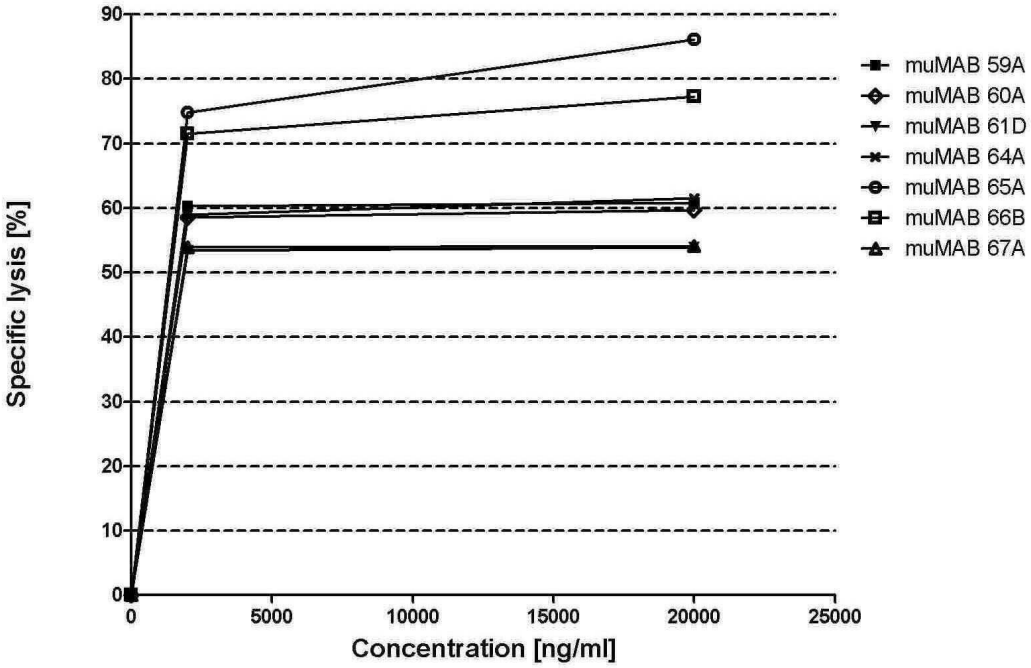
도면6b


muMAB 64A
muMAB 65A
muMAB 66B
muMAB 67A
Red-A:: GT512
CLDN6
CLDN6-SNP(I143V)
CLDN9
CLDN3
CLDN4

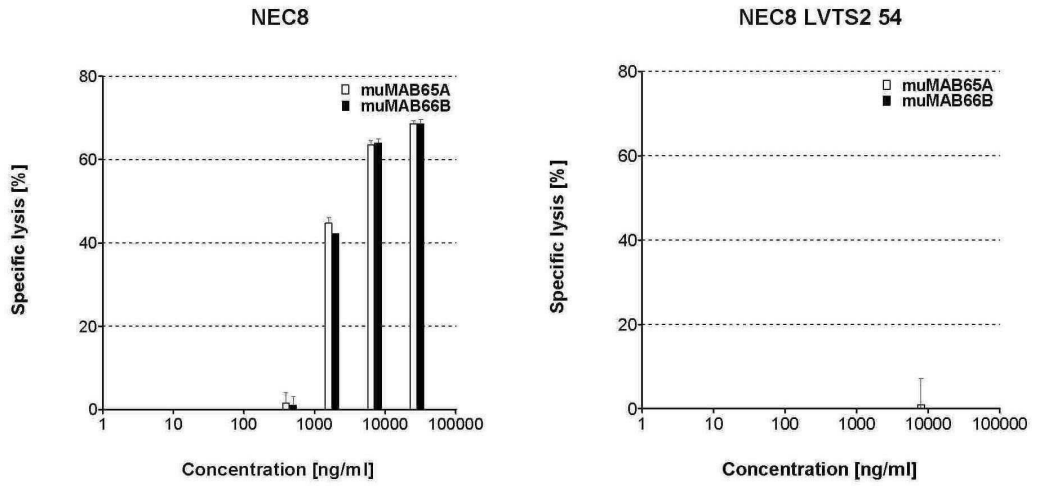
도면7


Median (fluorescence)
Concentration [ng/ml]
0
5000
10000
15000
20000
30000
muMAB 59A
muMAB 60A
muMAB 61D
muMAB 64A
muMAB 65A
muMAB 66B
muMAB 67A

도면8

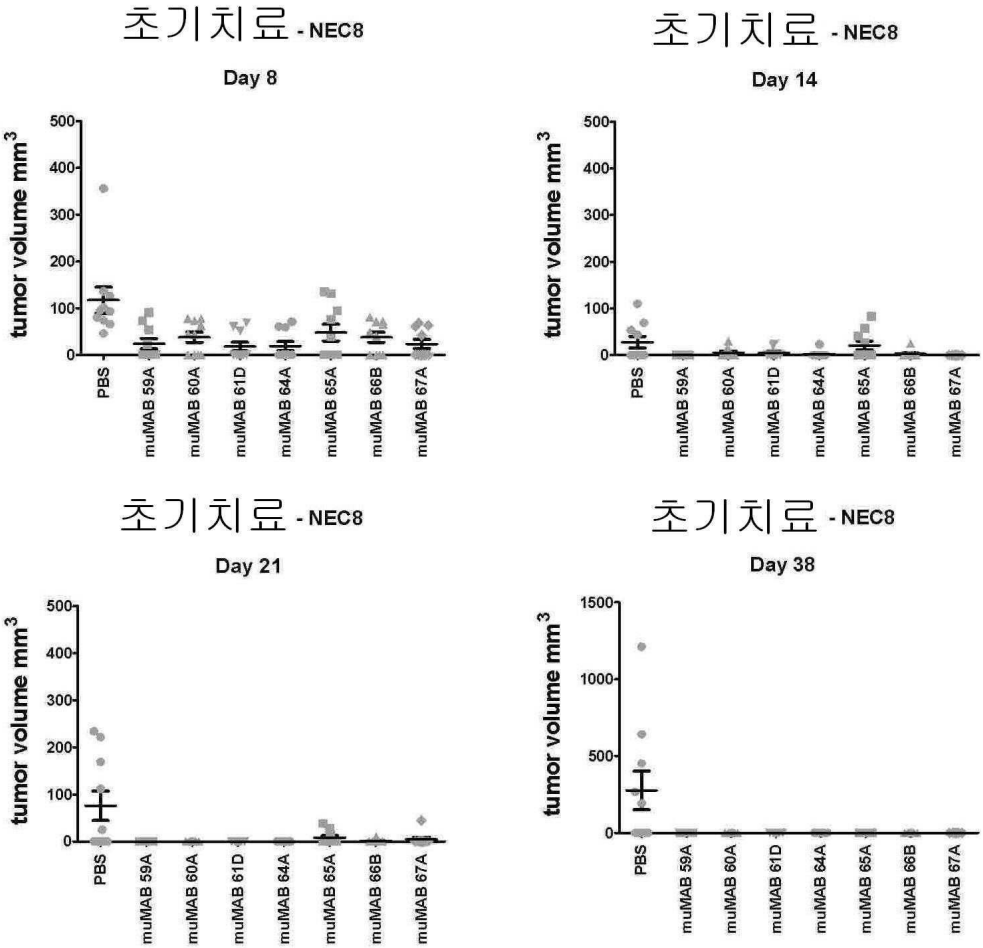



도면9

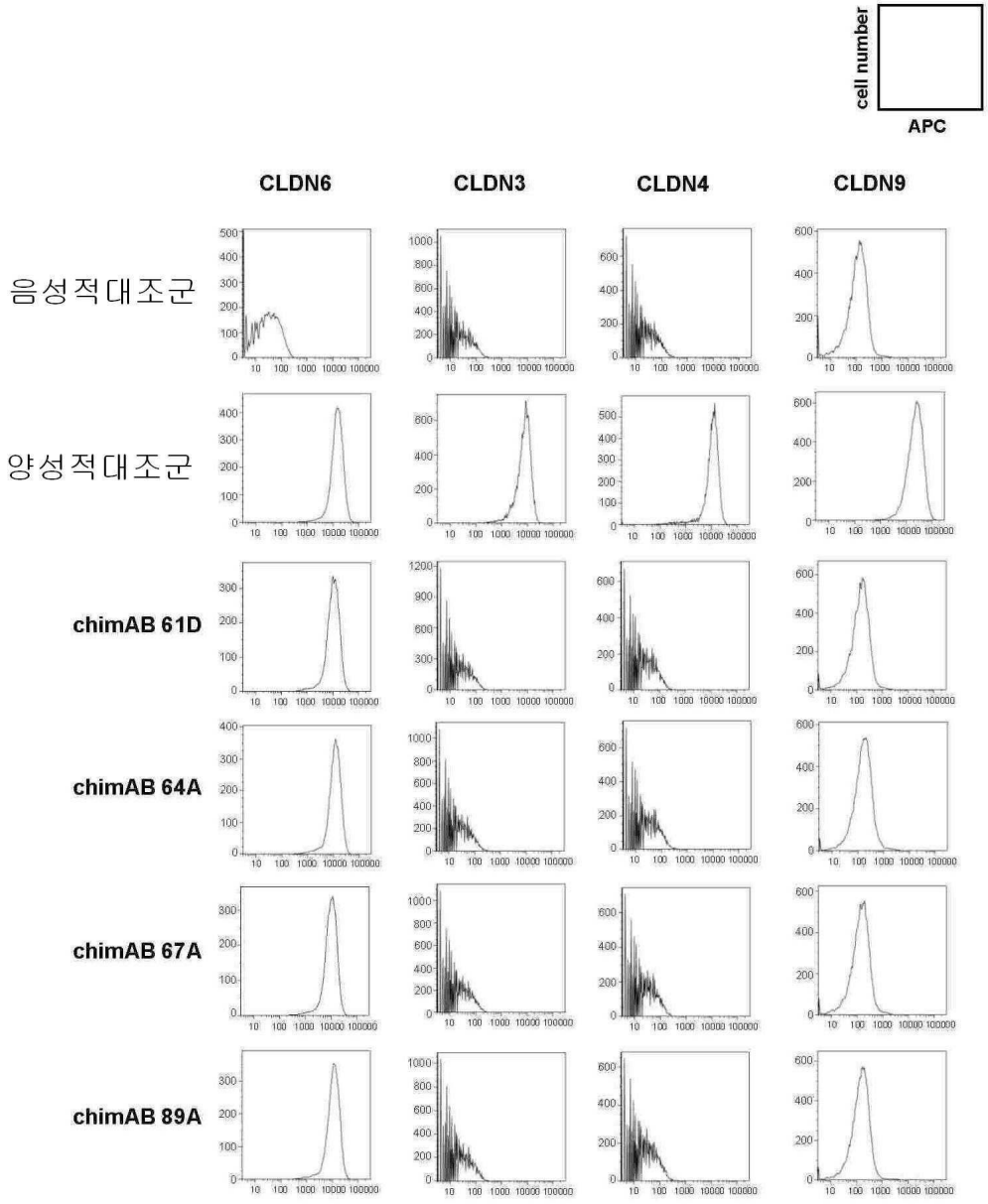



error bars: SEM

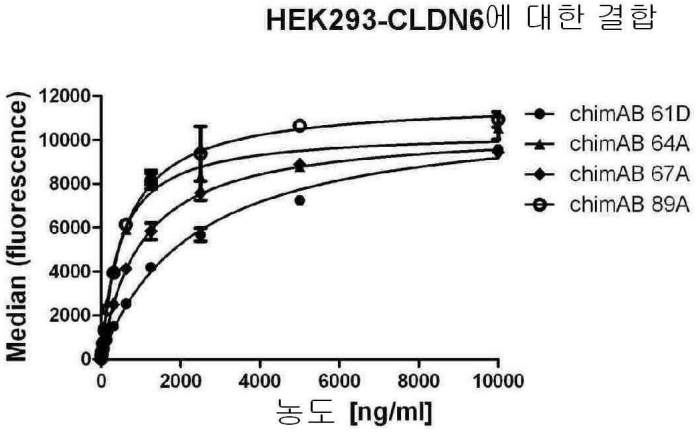
도면10


초기치료 - NEC8
Day 8
tumor volume mm3
500
400
300
200
100
0
PBS
muMAB 59A
muMAB 60A
muMAB 61D
muMAB 64A
muMAB 65A
muMAB 66B
muMAB 67A
초기치료 - NEC8
Day 14
tumor volume mm3
500
400
300
200
100
0
PBS
muMAB 59A
muMAB 60A
muMAB 61D
muMAB 64A
muMAB 65A
muMAB 66B
muMAB 67A
초기치료 - NEC8
Day 21
tumor volume mm3
500
400
300
200
100
0
PBS
muMAB 59A
muMAB 60A
muMAB 61D
muMAB 64A
muMAB 65A
muMAB 66B
muMAB 67A
초기치료 - NEC8
Day 38
tumor volume mm3
1500
1000
500
0
PBS
muMAB 59A
muMAB 60A
muMAB 61D
muMAB 64A
muMAB 65A
muMAB 66B
muMAB 67A

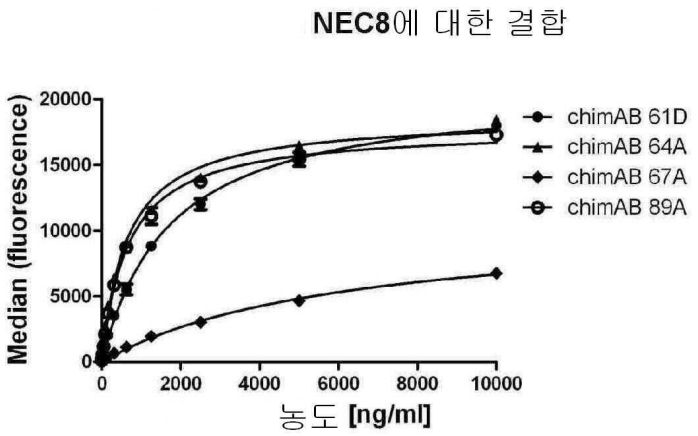
도면11


cell number
APC
CLDN6
CLDN3
CLDN4
CLDN9
음성적대조군
양성적대조군
chimAB 61D
chimAB 64A
chimAB 67A
chimAB 89A

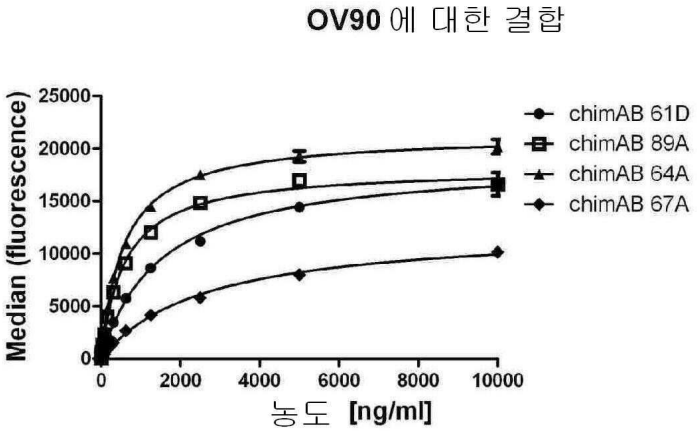
도면12


HEK293-CLDN6에 대한 결합
Median (fluorescence)
농도 [ng/ml]
chimAB 61D
chimAB 64A
chimAB 67A
chimAB 89A

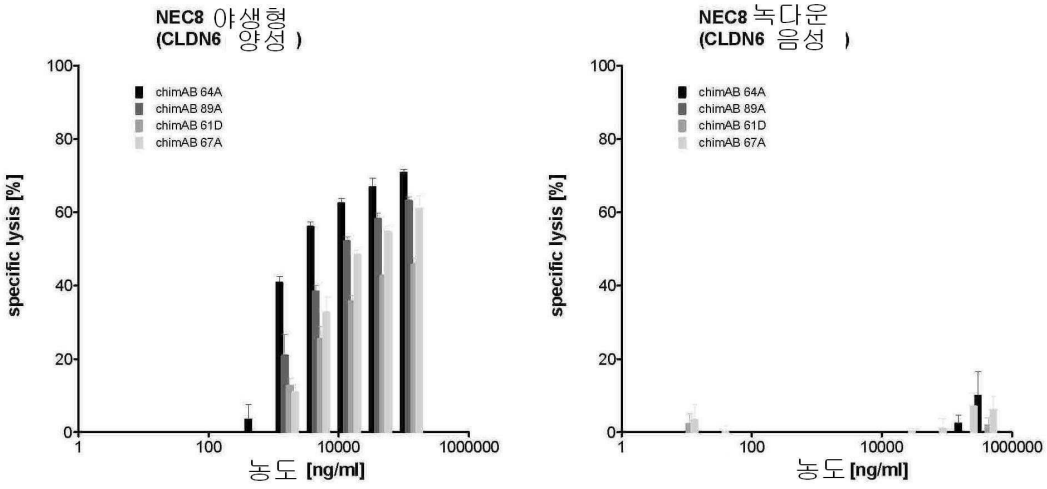
도면13



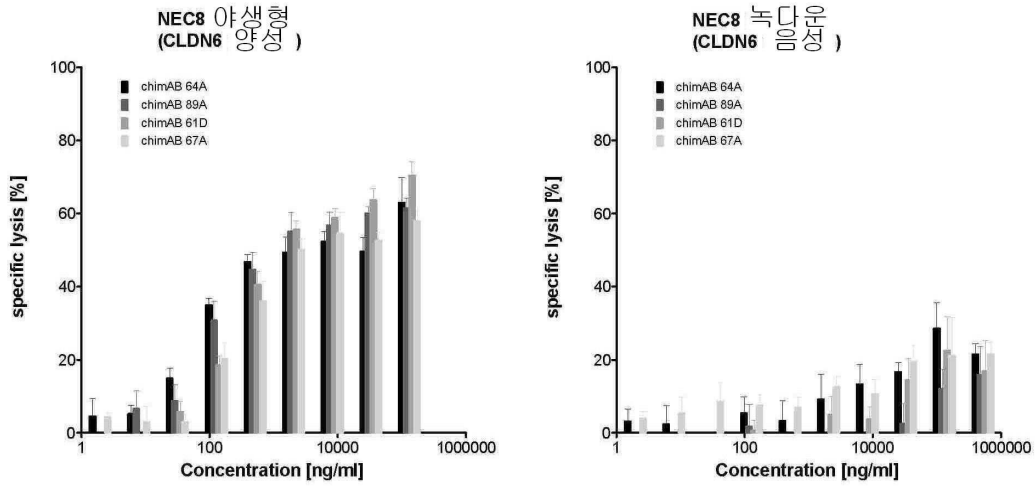

도면14



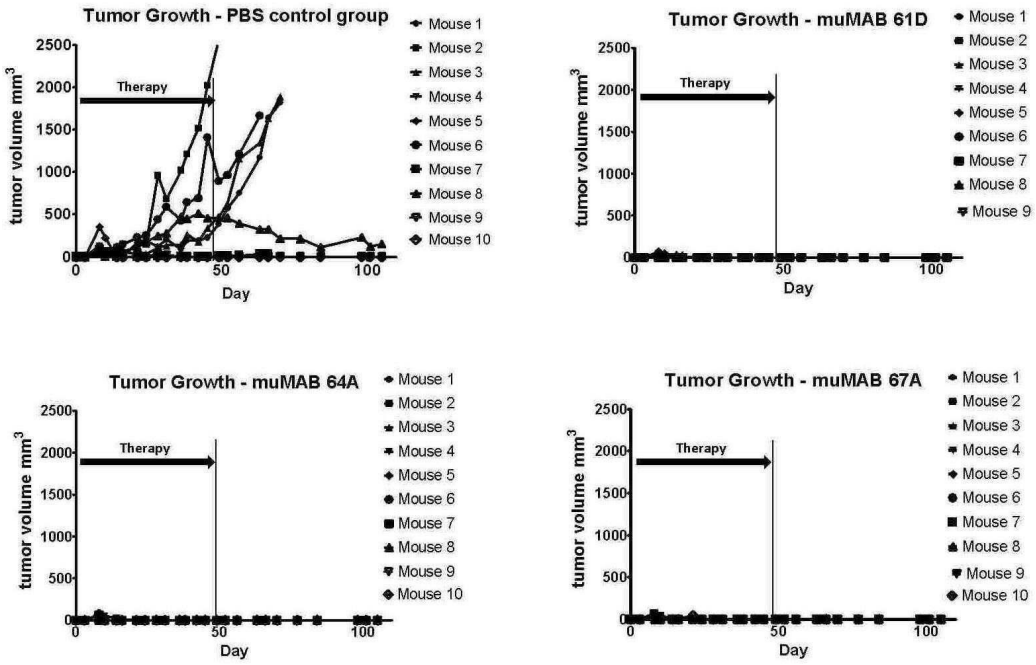

도면15



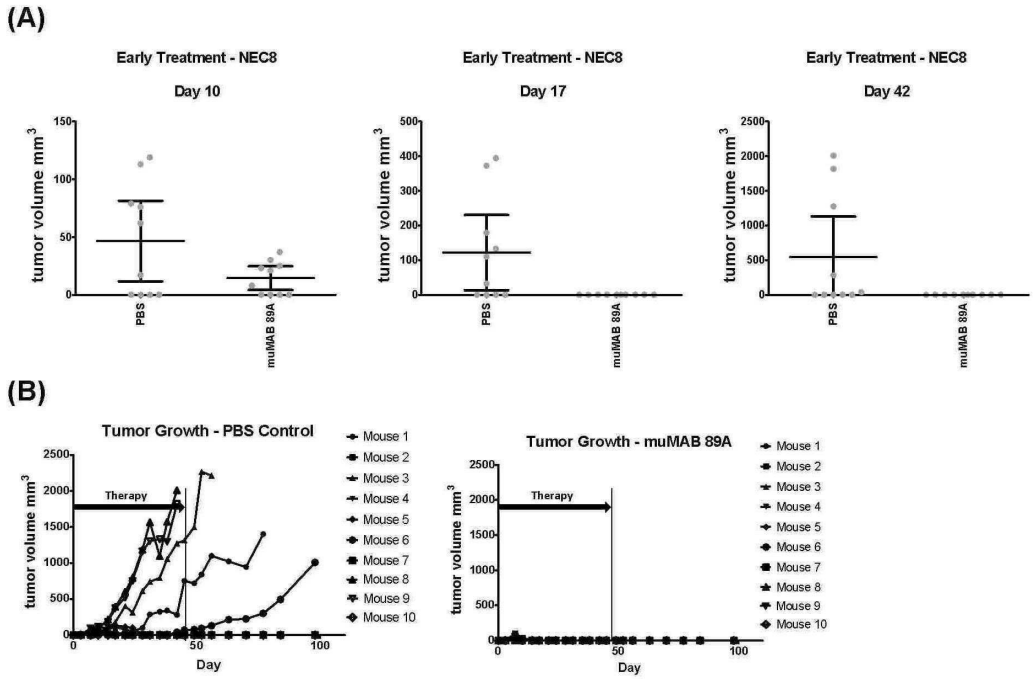
도면16


NEC8 야생형
(CLDN6 양성)
chimAB 64A
chimAB 89A
chimAB 61D
chimAB 67A
specific lysis [%]
Concentration [ng/ml]
NEC8 녹다운
(CLDN6 음성)
chimAB 64A
chimAB 89A
chimAB 61D
chimAB 67A
specific lysis [%]
Concentration [ng/ml]

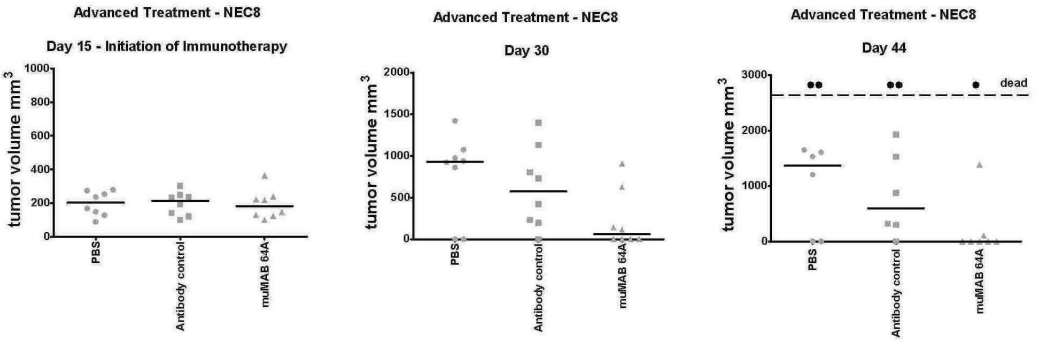
도면17


Tumor Growth - PBS control group
Therapy
tumor volume mm3
Day
Mouse 1
Mouse 2
Mouse 3
Mouse 4
Mouse 5
Mouse 6
Mouse 7
Mouse 8
Mouse 9
Mouse 10
Tumor Growth - muMAB 61D
Therapy
tumor volume mm3
Day
Mouse 1
Mouse 2
Mouse 3
Mouse 4
Mouse 5
Mouse 6
Mouse 7
Mouse 8
Mouse 9
Tumor Growth - muMAB 64A
Therapy
tumor volume mm3
Day
Mouse 1
Mouse 2
Mouse 3
Mouse 4
Mouse 5
Mouse 6
Mouse 7
Mouse 8
Mouse 9
Mouse 10
Tumor Growth - muMAB 67A
Therapy
tumor volume mm3
Day
Mouse 1
Mouse 2
Mouse 3
Mouse 4
Mouse 5
Mouse 6
Mouse 7
Mouse 8
Mouse 9
Mouse 10

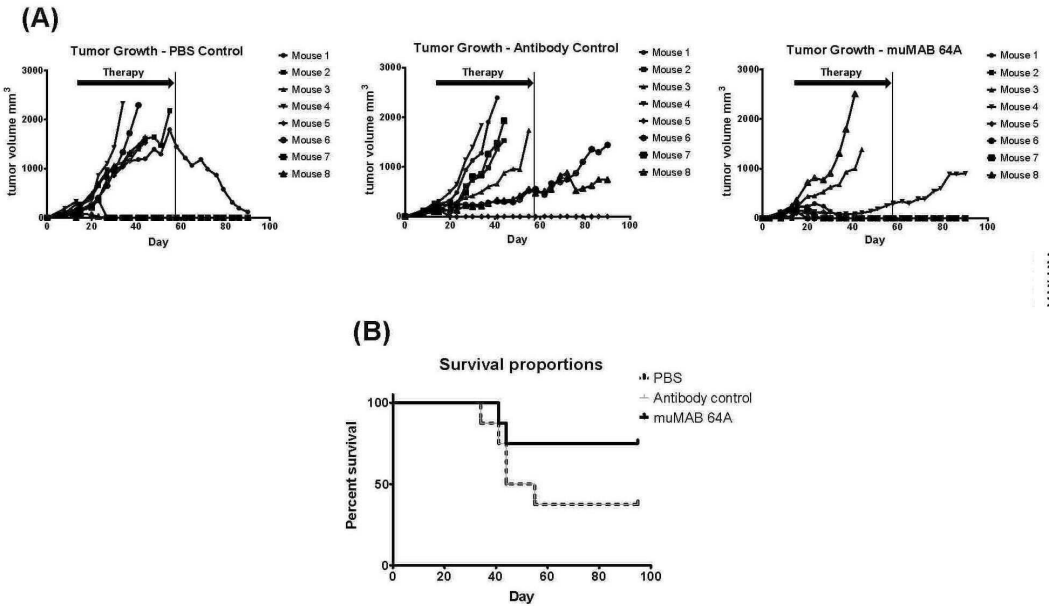
도면18


(A)
Early Treatment - NEC8
Day 10
Early Treatment - NEC8
Day 17
Early Treatment - NEC8
Day 42
tumor volume mm3
PBS
muMAB 89A
(B)
Tumor Growth - PBS Control
Tumor Growth - muMAB 89A
Therapy
Day
Mouse 1
Mouse 2
Mouse 3
Mouse 4
Mouse 5
Mouse 6
Mouse 7
Mouse 8
Mouse 9
Mouse 10

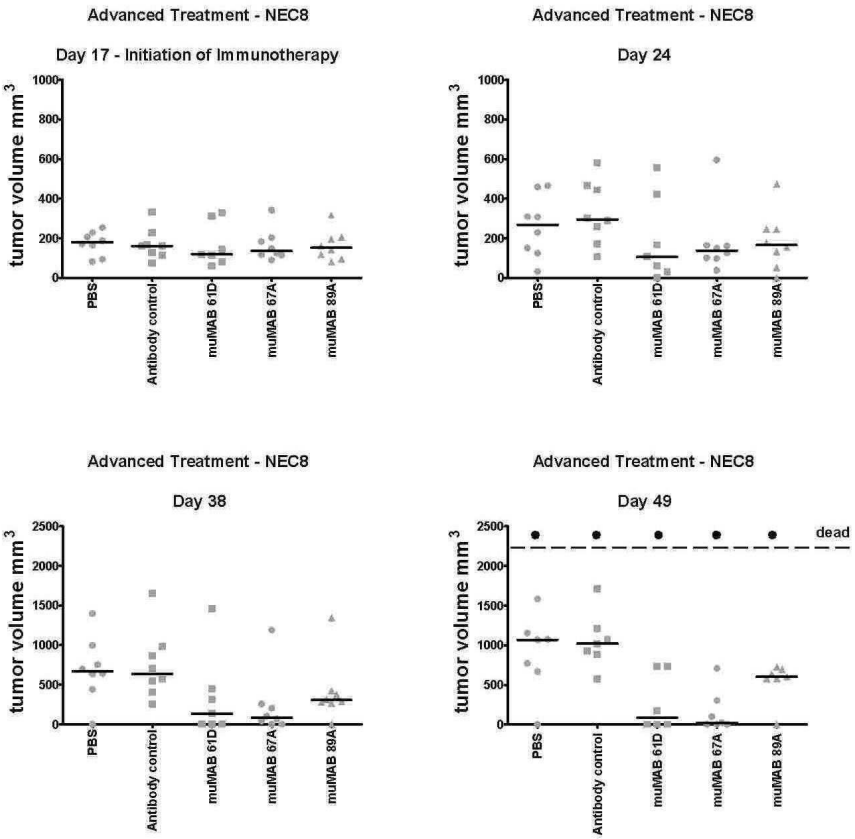
도면19


Advanced Treatment - NEC8
Day 15 - Initiation of Immunotherapy
Advanced Treatment - NEC8
Day 30
Advanced Treatment - NEC8
Day 44
dead
tumor volume mm3
PBS
Antibody control
muMAB 64A

도면20

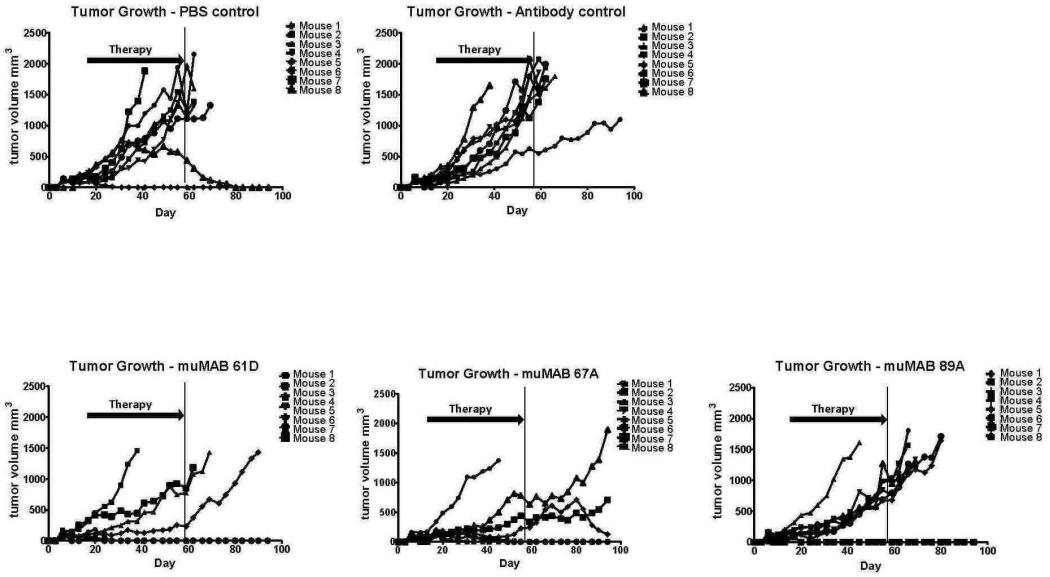

(A)
Tumor Growth - PBS Control
Tumor Growth - Antibody Control
Tumor Growth - muMAB 64A
Therapy
tumor volume mm3
Day
Mouse 1
Mouse 2
Mouse 3
Mouse 4
Mouse 5
Mouse 6
Mouse 7
Mouse 8
(B)
Survival proportions
Percent survival
PBS
Antibody control
muMAB 64A

도면21


Advanced Treatment - NEC8
Day 17 - Initiation of Immunotherapy
Day 24
Day 38
Day 49
tumor volume mm3
PBS
Antibody control
muMAB 61D
muMAB 67A
muMAB 89A
dead

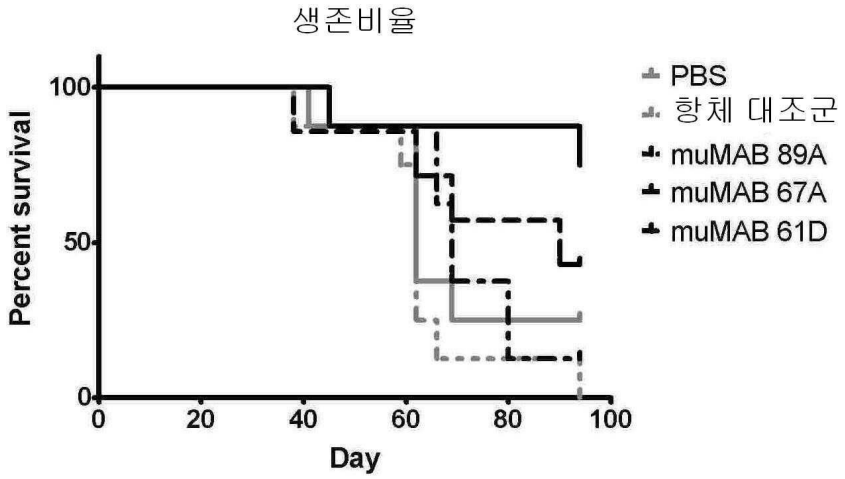
도면22a

(A)

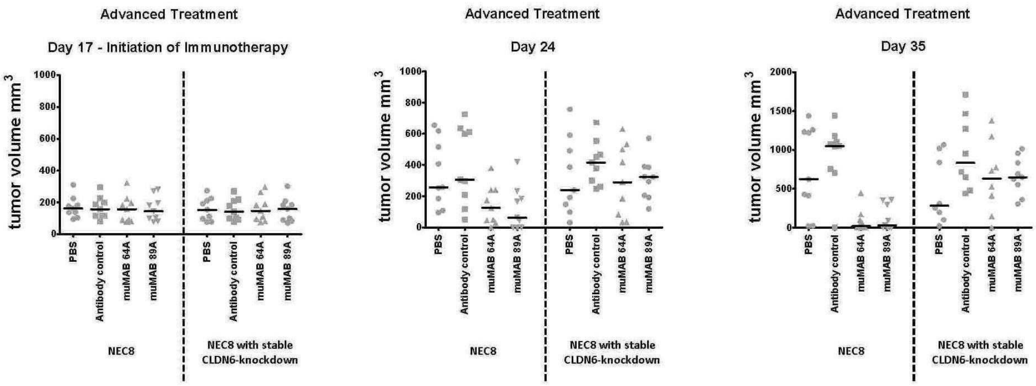



도면22b

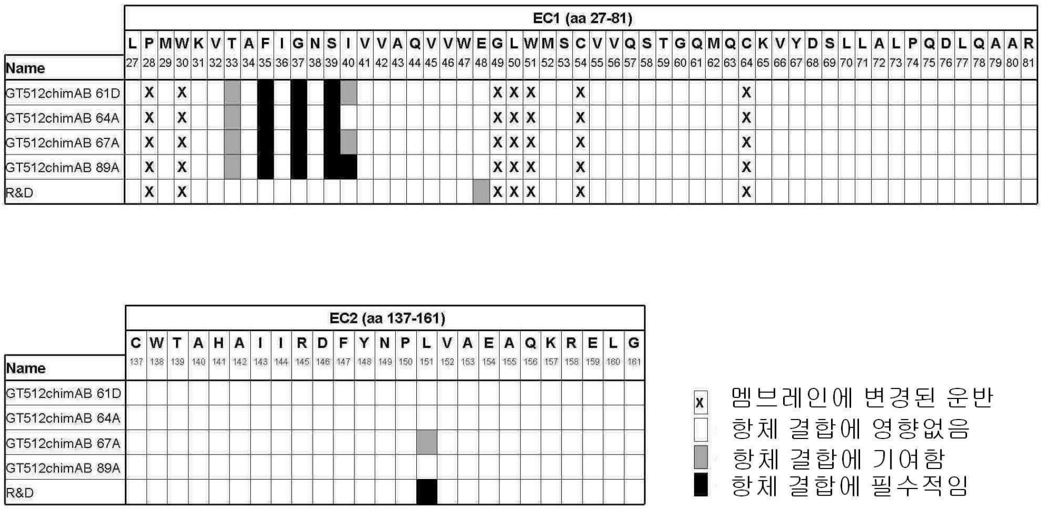
(B)



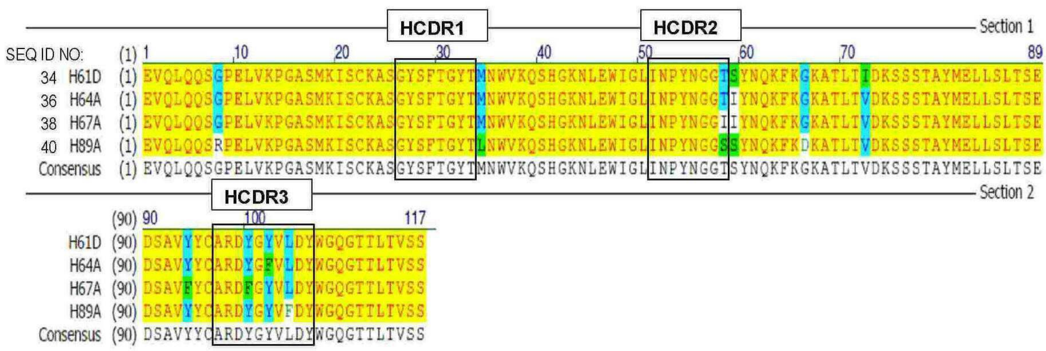
도면23



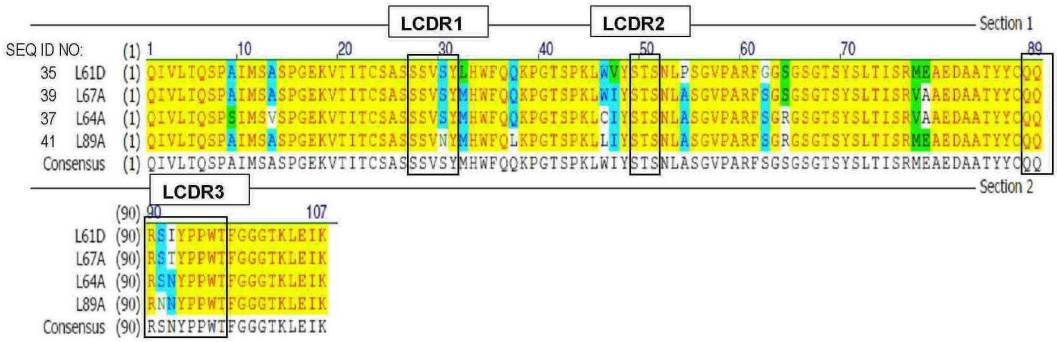

도면24




도면25



도면26




서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> Ganymed Pharmaceuticals AG et al.

<120> Antibodies for treatment of cancer

<130> 342-52 PCT

<150> EP 09 014 136.7

<151> 2009-11-11

<150> EP 10 006 956.6

<151> 2010-07-06

<150> US 61/361,618

<151> 2010-07-06

<150> US 61/260,202

<151> 2009-11-11

<160> 53

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 1369

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

cgacactcgg cctaggaatt tcccttatct ccttcgcagt gcagctcctt caacctcgcc 60

atggcctctg ccggaatgca gatcctggga gtcgtcctga cactgctggg ctgggtgaat 120

ggcctggtct cctgtgccct gcccatgtgg aaggtgaccg ctttcatcgg caacagcatc 180

gtggtggccc aggtggtgtg ggagggcctg tggatgtcct gcgtggtgca gagcaccggc 240

cagatgcagt gcaaggtgta cgactcactg ctggcgctgc cacaggacct gcaggctgca 300

cgtgccctct gtgtcatcgc cctccttgtg gccctgttcg gcttgctggt ctaccttgct 360

ggggccaagt gtaccacctg tgtggaggag aaggattcca aggcccgcct ggtgctcacc 420

tctgggattg tctttgtcat ctcaggggtc ctgacgctaa tccccgtgtg ctggacggcg 480

catgccatca tccgggactt ctataacccc ctggtggctg aggcccaaaa gcgggagctg 540

ggggcctccc tctacttggg ctgggcggcc tcaggccttt tgttgctggg tgggggggttg 600

ctgtgctgca cttgcccctc gggggggtcc cagggcccca gccattacat ggcccgctac 660

tcaacatctg cccctgccat ctctcggggg ccctctgagt accctaccaa gaattacgtc 720

tgacgtggag gggaatgggg gctccgctgg cgctagagcc atccagaagt ggcagtgccc 780

aacagctttg ggatgggttc gtacctttg tttctgcctc ctgctatttt tcttttgact 840

gaggatattt aaaattcatt tgaaaactga gccaaggtgt tgactcagac tctcacttag 900

gctctgctgt ttctcaccct tggatgatgg agccaaagag gggatgcttt gagattctgg 960

atcttgacat gcccatctta gaagccagtc aagctatgga actaatgcgg aggctgcttg 1020

ctgtgctggc tttgcaacaa gacagactgt ccccaagagt tcctgctgct gctgggggct 1080

gggcttccct agatgtcact ggacagctgc cccccatcct actcaggtct ctggagctcc 1140

tctcttcacc cctggaaaaa caaatgatct gttaacaaag gactgcccac ctccggaact 1200

tctgacctct gtttcctccg tcctgataag acgtccaccc cccagggcca ggtcccagct 1260

atgtagaccc ccgcccccac ctccaacact gcacccttct gccctgcccc cctcgtctca 1320

ccccctttac actcacattt ttatcaaata aagcatgttt tgttagtgc 1369

<210> 2

<211> 220

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Ala Ser Ala Gly Met Gln Ile Leu Gly Val Val Leu Thr Leu Leu

1 5 10 15

Gly Trp Val Asn Gly Leu Val Ser Cys Ala Leu Pro Met Trp Lys Val

20 25 30

Thr Ala Phe Ile Gly Asn Ser Ile Val Val Ala Gln Val Val Trp Glu

35 40 45

Gly Leu Trp Met Ser Cys Val Val Gln Ser Thr Gly Gln Met Gln Cys

50 55 60

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

Ser Lys Ala Arg Leu Val Leu Thr Ser Gly Ile Val Phe Val Ile Ser
115 120 125
Gly Val Leu Thr Leu Ile Pro Val Cys Trp Thr Ala His Ala Ile Ile
130 135 140
Arg Asp Phe Tyr Asn Pro Leu Val Ala Glu Ala Gln Lys Arg Glu Leu
145 150 155 160
Gly Ala Ser Leu Tyr Leu Gly Trp Ala Ala Ser Gly Leu Leu Leu Leu
165 170 175

Gly Gly Gly Leu Leu Cys Cys Thr Cys Pro Ser Gly Gly Ser Gln Gly
180 185 190
Pro Ser His Tyr Met Ala Arg Tyr Ser Thr Ser Ala Pro Ala Ile Ser
195 200 205
Arg Gly Pro Ser Glu Tyr Pro Thr Lys Asn Tyr Val
210 215 220

<210> 3
<211> 805
<212> DNA
<213> Artificial
<220><223> codon-optimized nucleic acid sequence encoding human claudin 6
<400> 3
caagcgcgtc aattaaccct cactaaaggg aacaaaagct gttaattaac taaggtacca 60

agcttgccac catggccagc gccggcatgc agatcctggg agtggtgctg accctgctgg 120
gctgggtgaa cggcctggtg tcctgcgccc tgcccatgtg gaaagtgacc gccttcatcg 180
gcaacagcat cgtggtggcc caggtcgtgt gggagggcct gtggatgagc tgtgtggtgc 240
agagcaccgg ccagatgcag tgcaaggtgt acgacagcct gctggccctg cctcaggatc 300
tgcaggccgc cagagccctg tgtgtgatcg ccctgctggt cgccctgttc ggcctgctgg 360

tgtacctcgc tggcgccaag tgcaccacct gtgtggagga aaaggacagc aaggcccggc 420

tggtcctgac aagcggcatc gtgttcgtga tcagcggcgt gctgacactg atccccgtgt 480

gctggaccgc ccacgccatc atccgggact tctacaaccc tctggtggcc gaggcccaga 540

agagagagct gggcgccagc ctgtatctgg gatgggccgc ctcaggactg ctgctgctgg 600

gcggaggcct gctgtgctgt acatgtccta gcggcggctc ccagggccct agccactaca 660

tggcccggta cagcaccagc gcccctgcca tcagcagagg ccccagcgag taccccacca 720

agaactacgt gtgataggaa ttcgagctct tatggcgcgc ccaattcgcc ctatagtgag 780

tcgtattacg tcgcgctcac tggcc 805

<210> 4

<211> 165

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> codon-optimized nucleic acid sequence encoding the predicted extracellular loop 2 (EC2) of human claudin 6

<400> 4

ggcgcgccaa ggtaccaagc ttgccaccat ggaaaccgac accctgctgc tgtgggtgct 60

gctcctgtgg gtcccaggct ctacaggcga cgccgcccag cccagagact tctacaaccc 120

cctggtggcc gaggcccaga agctcgagtc tagagggtta attaa 165

<210> 5

<211> 38

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> predicted 2nd extracellular loop of human claudin 6 containing an Ig kappa leader sequence

<220><221> SIGNAL

<222> (1)..(21)

<223> Ig kappa leader sequence

<220><221> DOMAIN

<222> (26)..(38)

<223> predicted 2nd extracellular loop (EC2) of human claudin 6

<400> 5

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro

1 5 10 15

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

20 25 30

Val Ala Glu Ala Gln Lys

35

<

210> 6

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Arg Asp Phe Tyr Asn Pro Leu Val Ala Glu Ala Gln Lys

1 5 10

<210> 7

<211> 53

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

Pro Met Trp Lys Val Thr Ala Phe Ile Gly Asn Ser Ile Val Val Ala

1 5 10 15

Gln Val Val Trp Glu Gly Leu Trp Met Ser Cys Val Val Gln Ser Thr

20 25 30

Gly Gln Met Gln Cys Lys Val Tyr Asp Ser Leu Leu Ala Leu Pro Gln

35 40 45

Asp Leu Gln Ala Ala

50

<210> 8

<211> 220

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> VARIANT

<222> (143)..(143)

<223> human claudin 6 I143V polymorphism

<400> 8

Met Ala Ser Ala Gly Met Gln Ile Leu Gly Val Val Leu Thr Leu Leu
1 5 10 15
Gly Trp Val Asn Gly Leu Val Ser Cys Ala Leu Pro Met Trp Lys Val
20 25 30

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

Val Tyr Leu Ala Gly Ala Lys Cys Thr Thr Cys Val Glu Glu Lys Asp
100 105 110
Ser Lys Ala Arg Leu Val Leu Thr Ser Gly Ile Val Phe Val Ile Ser
115 120 125
Gly Val Leu Thr Leu Ile Pro Val Cys Trp Thr Ala His Ala Val Ile
130 135 140
Arg Asp Phe Tyr Asn Pro Leu Val Ala Glu Ala Gln Lys Arg Glu Leu
145 150 155 160

Gly Ala Ser Leu Tyr Leu Gly Trp Ala Ala Ser Gly Leu Leu Leu Leu
165 170 175
Gly Gly Gly Leu Leu Cys Cys Thr Cys Pro Ser Gly Gly Ser Gln Gly
180 185 190
Pro Ser His Tyr Met Ala Arg Tyr Ser Thr Ser Ala Pro Ala Ile Ser
195 200 205
Arg Gly Pro Ser Glu Tyr Pro Thr Lys Asn Tyr Val
210 215 220

<210> 9

<211

> 217

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

Met Ala Ser Thr Gly Leu Glu Leu Leu Gly Met Thr Leu Ala Val Leu
1 5 10 15

Gly Trp Leu Gly Thr Leu Val Ser Cys Ala Leu Pro Leu Trp Lys Val
20 25 30

Thr Ala Phe Ile Gly Asn Ser Ile Val Val Ala Gln Val Val Trp Glu
35 40 45

Gly Leu Trp Met Ser Cys Val Val Gln Ser Thr Gly Gln Met Gln Cys
50 55 60

Lys Val Tyr Asp Ser Leu Leu Ala Leu Pro Gln Asp Leu Gln Ala Ala
65 70 75 80

Arg Ala Leu Cys Val Ile Ala Leu Leu Leu Ala Leu Leu Gly Leu Leu
85 90 95

Val Ala Ile Thr Gly Ala Gln Cys Thr Thr Cys Val Glu Asp Glu Gly
100 105 110

Ala Lys Ala Arg Ile Val Leu Thr Ala Gly Val Ile Leu Leu Leu Ala
115 120 125

Gly Ile Leu Val Leu Ile Pro Val Cys Trp Thr Ala His Ala Ile Ile
130 135 140

Gln Asp Phe Tyr Asn Pro Leu Val Ala Glu Ala Leu Lys Arg Glu Leu
145 150 155 160

Gly Ala Ser Leu Tyr Leu Gly Trp Ala Ala Ala Ala Leu Leu Met Leu
165 170 175

Gly Gly Gly Leu Leu Cys Cys Thr Cys Pro Pro Pro Gln Val Glu Arg
180 185 190

Pro Arg Gly Pro Arg Leu Gly Tyr Ser Ile Pro Ser Arg Ser Gly Ala
195 200 205

Ser Gly Leu Asp Lys Arg Asp Tyr Val
210 215

<210> 10

<211> 209

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

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

Gly Trp Leu Ala Val Met Leu Cys Cys Ala Leu Pro Met Trp Arg Val
20 25 30

Thr Ala Phe Ile Gly Ser Asn Ile Val Thr Ser Gln Thr Ile Trp Glu
35 40 45

Gly Leu Trp Met Asn Cys Val Val Gln Ser Thr Gly Gln Met Gln Cys
50 55 60

Lys Val Tyr Asp Ser Leu Leu Ala Leu Pro Gln Asp Leu Gln Ala Ala
65 70 75 80

Arg Ala Leu Val Ile Ile Ser Ile Ile Val Ala Ala Leu Gly Val Leu
85 90 95

Leu Ser Val Val Gly Gly Lys Cys Thr Asn Cys Leu Glu Asp Glu Ser
100 105 110

Ala Lys Ala Lys Thr Met Ile Val Ala Gly Val Val Phe Leu Leu Ala
115 120 125

Gly Leu Met Val Ile Val Pro Val Ser Trp Thr Ala His Asn Ile Ile
130 135 140

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

Gly Ala Ser Leu Tyr Val Gly Trp Ala Ala Ser Gly Leu Leu Leu Leu
165 170 175

Gly Gly Gly Leu Leu Cys Cys Asn Cys Pro Pro Arg Thr Asp Lys Pro
180 185 190

Tyr Ser Ala Lys Tyr Ser Ala Ala Arg Ser Ala Ala Ala Ser Asn Tyr
195 200 205

Val

<210> 11

<211> 220

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 11

Met Ser Met Gly Leu Glu Ile Thr Gly Thr Ala Leu Ala Val Leu Gly
1 5 10 15

Trp Leu Gly Thr Ile Val Cys Cys Ala Leu Pro Met Trp Arg Val Ser
20 25 30

Ala Phe Ile Gly Ser Asn Ile Ile Thr Ser Gln Asn Ile Trp Glu Gly
35 40 45

Leu Trp Met Asn Cys Val Val Gln Ser Thr Gly Gln Met Gln Cys Lys
50 55 60

Val Tyr Asp Ser Leu Leu Ala Leu Pro Gln Asp Leu Gln Ala Ala Arg
65 70 75 80

Ala Leu Ile Val Val Ala Ile Leu Leu Ala Ala Phe Gly Leu Leu Val
85 90 95

Ala Leu Val Gly Ala Gln Cys Thr Asn Cys Val Gln Asp Asp Thr Ala
100 105 110

Lys Ala Lys Ile Thr Ile Val Ala Gly Val Leu Phe Leu Leu Ala Ala
115 120 125

Leu Leu Thr Leu Val Pro Val Ser Trp Ser Ala Asn Thr Ile Ile Arg
130 135 140

Asp Phe Tyr Asn Pro Val Val Pro Glu Ala Gln Lys Arg Glu Met Gly
145 150 155 160

Ala Gly Leu Tyr Val Gly Trp Ala Ala Ala Ala Leu Gln Leu Leu Gly
165 170 175

Gly Ala Leu Leu Cys Cys Ser Cys Pro Pro Arg Glu Lys Lys Tyr Thr
180 185 190

Ala Thr Lys Val Val Tyr Ser Ala Pro Arg Ser Thr Gly Pro Gly Ala
195 200 205

Ser Leu Gly Thr Gly Tyr Asp Arg Lys Asp Tyr Val

210 215 220

<210> 12

<211> 159

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> codon-optimized nucleic acid sequence encoding the predicted extracellular loop 1 (EC1) of human claudin 6

<400> 12

cccatgtgga aagtgaccgc cttcatcggc aacagcatcg tggtggccca ggtggtctgg 60

gagggcctgt ggatgagctg cgtggtgcag agcaccggcc agatgcagtg caaggtgtac 120

gacagcctgc tggccctgcc tcaggatctg caggctgct 159

<210> 13

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> predicted 1st extracellular loop of human claudin 6 containing an Ig kappa leader sequence

<220><221> Signal

<222> (1)..(21)

<223> Ig kappa leader sequence

<220><221> Domain

<222> (26)..(78)

<223> predicted 1st extracellular loop (EC1) of human claudin 6

<400> 13

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly Asp Ala Ala Gln Pro Pro Met Trp Lys Val Thr Ala
20 25 30

Phe Ile Gly Asn Ser Ile Val Val Ala Gln Val Val Trp Glu Gly Leu
35 40 45

Trp Met Ser Cys Val Val Gln Ser Thr Gly Gln Met Gln Cys Lys Val
50 55 60

Tyr Asp Ser Leu Leu Ala Leu Pro Gln Asp Leu Gln Ala Ala Leu Glu

65 70 75 80

Ser Arg Gly Pro Phe Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn

85 90 95

Met His Thr Gly His His His His His His

100 105

<210> 14

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 14

Pro Met Trp Lys Val Thr Ala Phe Ile Gly Asn Ser Ile

1 5 10

<210> 15

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 15

Met Trp Lys Val Thr Ala Phe Ile Gly Asn Ser Ile Val Val Ala

1 5 10 15

<210> 16

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Oligonucleotide

<400> 16

tccatgacgt tcctgacgtt 20

<210> 17

<211> 43

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Oligonucleotide

<400> 17

gagaaagctt gccgccacca tgggatggag ctggatcttt ctc 43

<210> 18

<211> 43

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Oligonucleotide

<400> 18

gagagggccc ttggtggagg ctgaagagac tgtgagagtg gtg 43

<210> 19

<211> 43

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Oligonucleotide

<400> 19

gagagggccc ttggtggagg ctgaggagac tgtgagagtg gtg 43

<210> 20

<211> 43

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Oligonucleotide

<400> 20

gagagggccc ttggtggagg ctgaggagac tgtgagagtg gtg 43

<210> 21

<211> 46

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Oligonucleotide

<400> 21

gagaaagctt gccgccacca tgcattttca agtgcagatt ttcagc 46

<210> 22

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Oligonucleotide

<400> 22

cacacgtacg tttgatttcc agcttggtgc ctc 33

<210> 23

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Oligonucleotide

<400> 23

cacacgtacg tttgatttcc agcttggtgc ctc 33

<210> 24

<211> 993

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 24

gcctccacca agggcccaag cgtgttcccc ctggccccca gcagcaagag caccagcggc 60

ggcacagccg ccctgggctg cctggtgaag gactacttcc ccgagcccgt gaccgtgagc 120

tggaacagcg gagccctgac ctccggcgtg cacaccttcc ccgccgtgct gcagagcagc 180

ggcctgtaca gcctgagcag cgtggtgacc gtgcccagca gcagcctggg cacccagacc 240

tacatctgca acgtgaacca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag agtggagccc 300

aagagctgcg acaagaccca cacctgcccc ccctgcccag ccccagagct gctgggcgga 360

cccagcgtgt tcctgttccc ccccaagccc aaggacaccc tgatgatcag caggaccccc 420

gaggtgacct gcgtggtggt ggacgtgagc cacgaggacc cagaggtgaa gttcaactgg 480

tacgtggacg gcgtggaggt gcacaacgcc aagaccaagc ccagagagga gcagtacaac 540

agcacctaca gggtggtgtc cgtgctgacc gtgctgcacc aggactggct gaacggcaag 600

gaatacaagt gcaaggtctc caacaaggcc ctgccagccc ccatcgaaaa gaccatcagc 660

aaggccaagg gccagccacg ggagccccag gtgtacaccc tgcccccag ccgggaggag 720

atgaccaaga accaggtgtc cctgacctgt ctggtgaagg gcttctaccc cagcgacatc 780

gccgtggagt gggagagcaa cggccagccc gagaacaact acaagaccac cccccagtg 840

ctggacagcg acggcagctt cttcctgtac agcaagctga ccgtggacaa gtccaggtgg 900

cagcagggca acgtgttcag ctgcagcgtg atgcacgagg ccctgcacaa ccactacacc 960

cagaagtccc tgagcctgag ccccggcaag tag 993

<210> 25

<211> 330

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 25

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly

210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
225 230 235 240
Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

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

<210> 26
<211> 324
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 26
cgtacggtgg ccgctcccag cgtgttcatc ttcccccca gcgacgagca gctgaagtcc 60
ggcaccgcca gcgtggtgtg cctgctgaac aacttctacc cccgggaggc caaggtgcag 120

tggaaggtgg acaacgccct gcagagcggc aacagccagg agagcgtcac cgagcaggac 180
agcaaggact ccacctacag cctgagcagc accctgaccc tgagcaaggc cgactacgag 240
aagcacaagg tgtacgcctg cgaggtgacc caccagggcc tgtccagccc cgtgaccaag 300
agcttcaaca ggggcgagtg ctag 324

<210> 27
<211> 107
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 27
Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu

1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
20 25 30
Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
35 40 45
Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
50 55 60
Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
65 70 75 80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
85 90 95
Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

<210> 28
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Oligonucleotide
<220><221> misc_feature
<222> (31)..(32)
<223> any nucleotide
<400> 28
ttttttttt ttttttttt ttttttttt nn 32

<210> 29
<211> 30
<212> DNA

<213> Artificial Sequence
<220><223> Oligonucleotide
<400> 29
aagcagtggt atcaacgcag agtacgcggg 30

<210> 30
<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Oligonucleotide

<400> 30

ctgctcactg gatggtggga agatgg 26

<210> 31

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Oligonucleotide

<400> 31

acaggggcca gtggatagac cgatg 25

<210> 32

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Oligonucleotide

<400> 32

gtaatacgac tcactatagg gcaagcagtg gtatcaacgc agagt 45

<210> 33

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Oligonucleotide

<400> 33

gtaatacgac tcactatagg gc 22

<210> 34

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antibody VH sequence

<400> 34

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

1 5 10 15

Ser Met Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr

20 25 30

Thr Met Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Asn Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Leu Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Leu Thr Val Ser Ser

115

<210> 35

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antibody VL sequence

<400> 35

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

1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Leu

20 25 30

His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Thr Ser Pro Lys Leu Trp Val Tyr

35 40 45

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

50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Met Glu Ala Glu

65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Ile Tyr Pro Pro Trp

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 36

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antibody VH sequence

<400> 36

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

1 5 10 15

Ser Met Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr

20 25 30

Thr Met Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Asn Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Leu Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Ile Tyr Asn Gln Lys Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Asp Tyr Gly Phe Val Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr

100 105 110

Leu Thr Val Ser Ser

115

<210> 37

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antibody VL sequence

<400> 37

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

1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30
His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Thr Ser Pro Lys Leu Cys Ile Tyr
35 40 45
Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Arg
50 55 60
Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Val Ala Ala Glu
65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Tyr Pro Pro Trp
85 90 95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 38

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antibody VH sequence

<400> 38

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Met Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr

20 25 30
Thr Met Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Asn Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Leu Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Gly Ile Ile Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60
Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Leu Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Phe Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Asp Phe Gly Tyr Val Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr

100 105 110

Leu Thr Val Ser Ser

115

<210> 39

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antibody VL sequence

<400> 39

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

1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met

20 25 30

His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Thr Ser Pro Lys Leu Trp Ile Tyr

35 40 45

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

50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Val Ala Ala Glu

65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Thr Tyr Pro Pro Trp

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 40

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antibody VH sequence

<400> 40

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

1 5 10 15

Ser Met Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr

20 25 30

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

Ala Arg Asp Tyr Gly Tyr Val Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr
100 105 110
Leu Thr Val Ser Ser
115

<210> 41
<211> 107
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antibody VL sequence
<400> 41

Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Asn Tyr Met
20 25 30

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

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 42

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antibody VH CDR3 sequence

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> Any amino acid, preferably an aromatic amino acid, more preferably Phe or Tyr, most preferably Tyr

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (3)..(3)

<223> Any amino acid, preferably an aromatic amino acid, more preferably Phe or Tyr, most preferably Tyr

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (5)..(5)

<223> Any amino acid, preferably Leu or Phe, more preferably Leu

<400> 42

Xaa Gly Xaa Val Xaa

1 5

<210> 43

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antibody VH CDR3 sequence

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> Any amino acid, preferably an aromatic amino acid, more preferably Phe or Tyr, most preferably Tyr

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (4)..(4)

<223> Any amino acid, preferably an aromatic amino acid, more

preferably Phe or Tyr, most preferably Tyr

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (6)..(6)

<223> Any amino acid, preferably Leu or Phe, more preferably Leu

<400> 43

Asp Xaa Gly Xaa Val Xaa

1 5

<210> 44

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antibody VH CDR3 sequence

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> Any amino acid, preferably an aromatic amino acid, more

preferably Phe or Tyr, most preferably Tyr

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (3)..(3)

<223> Any amino acid, preferably an aromatic amino acid, more

preferably Phe or Tyr, most preferably Tyr

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (5)..(5)

<223> Any amino acid, preferably Leu or Phe, more preferably Leu

<400> 44

Xaa Gly Xaa Val Xaa Asp

1 5

<210> 45

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antibody VH CDR3 sequence

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> Any amino acid, preferably an aromatic amino acid, more

preferably Phe or Tyr, most preferably Tyr

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (4)..(4)

<223> Any amino acid, preferably an aromatic amino acid, more

preferably Phe or Tyr, most preferably Tyr

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (6)..(6)

<223> Any amino acid, preferably Leu or Phe, more preferably Leu

<400> 45

Asp Xaa Gly Xaa Val Xaa Asp

1 5

<210> 46

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antibody VH CDR3 sequence

<220><221

> MISC_FEATURE

<222> (4)..(4)

<223> Any amino acid, preferably an aromatic amino acid, more

preferably Phe or Tyr, most preferably Tyr

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (6)..(6)

<223> Any amino acid, preferably an aromatic amino acid, more

preferably Phe or Tyr, most preferably Tyr

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (8)..(8)

<223> Any amino acid, preferably Leu or Phe, more preferably Leu

<400> 46

Ala Arg Asp Xaa Gly Xaa Val Xaa Asp Tyr

1 5 10

<210> 47

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antibody VH CDR1 sequence

<400> 47

Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr Thr

1 5

<210> 48

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antibody VH CDR2 sequence

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (8)..(8)

<223> Any amino acid, preferably Thr, Ser or Ile, most preferably Thr

<400> 48

Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Gly Xaa

1 5

<210> 49

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antibody VL CDR3 sequence

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> Any amino acid, preferably Ser or Asn, most preferably Ser

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (3)..(3)

<223> Any amino acid, preferably Tyr, Ser, Ile, Asn or Thr, more
preferably Tyr, Ser, or Asn, most preferably Asn

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (4)..(4)

<223> Any amino acid, preferably Ser or Tyr, more preferably Tyr

<400> 49

Arg Xaa Xaa Xaa Pro

1 5

<210> 50

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antibody VL CDR3 sequence

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (3)..(3)

<223> Any amino acid, preferably Ser or Asn, most preferably Ser

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (4)..(4)

<223> Any amino acid, preferably Tyr, Ser, Ile, Asn or Thr, more preferably Tyr, Ser, or Asn, most preferably Asn

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (5)..(5)

<223> Any amino acid, preferably Ser or Tyr, more preferably Tyr

<400> 50

Gln Arg Xaa Xaa Xaa Pro Pro

1 5

<210> 51

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antibody VL CDR3 sequence

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (4)..(4)

<223> Any amino acid, preferably Ser or Asn, most preferably Ser

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (5)..(5)

<223> Any amino acid, preferably Tyr, Ser, Ile, Asn or Thr, more preferably Tyr, Ser, or Asn, most preferably Asn

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (6)..(6)

<223>

Any amino acid, preferably Ser or Tyr, more preferably Tyr

<400> 51

Gln Gln Arg Xaa Xaa Xaa Pro Pro Trp Thr

1 5 10

<210> 52

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antibody VL CDR1 sequence

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (4)..(4)

<223> Any amino acid, preferably Ser or Asn, most preferably Ser

<400> 52

Ser Ser Val Xaa Tyr

1 5

<210> 53

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antibody VL CDR2 sequence

<400> 53

Ser Thr Ser

1