



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2009-0088929  
(43) 공개일자 2009년08월20일

(51) Int. Cl.

C07K 16/18 (2006.01) C12N 15/13 (2006.01)  
C12N 15/63 (2006.01) A61K 39/395 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2009-7013741(분할)

(22) 출원일자 2000년06월08일

심사청구일자 2009년06월30일

(62) 원출원 특허 10-2001-7015848

원출원일자 2001년12월08일

심사청구일자 2005년05월27일

(85) 번역문제출일자 2009년06월30일

(86) 국제출원번호 PCT/US2000/015749

(87) 국제공개번호 WO 2000/75348

국제공개일자 2000년12월14일

(30) 우선권주장

09/328,296 1999년06월08일 미국(US)

(71) 출원인

씨애틀 지네틱스, 인코포레이션

미국, 워싱턴 98021, 보텔, 26 애버뉴  
에스.이.22215

(72) 발명자

시갈 클레이 비.

미국, 워싱턴, 98020, 에드몬즈, 8 애버뉴 에스,  
639

왈 앨런 에프.

미국, 워싱턴 98040, 머서 아일랜드, 이스트 머서  
웨이 6150

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

백남훈

전체 청구항 수 : 총 14 항

(54) 재조합 항-C D40 항체 및 그의 용도

(57) 요약

본 발명은 암, 염증성 질환 및 면역 계의 장애 또는 결핍의 예방 및 치료를 위한 방법 및 조성물에 관한 것이다.  
본 발명의 방법은 CD40 리간드에 대한 CD40의 결합을 강화시키는 CD40 결합 단백질의 투여를 포함한다.

대표도 - 도1

```

GATGTTGTGGTGACCCAACTCCACTCTCCCTGCTGTGAGTCTTGGAGCTCAAACCTCCATCTCTTGCAGATCT 75
CTACAAACCACTGGGTTTGAGGTGAGAGGGACGGACAGTCAGAACCTCGAGTTCGGAGGTAGAGAACCTCTAGA
O V V V T Q T P L S L P V S L G A Q A S I S C R S
AGTCAGAGGCTTGTACACAGTAATGGAAACACCTTTTACATTGGTACCTGCAGAGCCAGGCCAGTCTCCAAAA 150
TCAGTCTCGGAACATGTGTCACTTCTTGTGGAATAATGTAACTTGGAGCTCTTCCGTCCGTCCAGAGGTTTT
S Q S L Y H S K G H T F L H W Y L Q K P G Q S P K
CTCCTGATCTACACAGTTTCCAAACGATTTCTGGGGTCCAGACAGGTTCACTGGCAGTGGATCAGGGACAGAT 225
GAGGACTAGATGTGTCAAAGGTTGGCTAAAGACCCAGGGTCTGTCCAAAGTCAACCTCACTAGTCCCTTCTTA
L L I Y T V S K R F S G Y P D R F S G S G S G T O
TTCACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATCTGGGAGTTATTTCTGCTCTCAAACTACACATGTCCG 300
AAGTGTGAGTTCTAGTCTGTCTCACTCCGACTCTAGACCTCAATAAAGACGAGAGTTTGATGTGTACAAAGC
F T L K I S R V E A E O L G V Y F C S Q T T H V P
TGGACGTTGGTGGAGGACCAAGCTGGAATCCAA 336
ACCTGCAAGCACCTCCGTGGTTCGACCTTAGGTT
W T F G G G T K L E I Q

```

(72) 발명자

**프란시스코 조셉 에이.**

미국, 워싱턴 98020, 에드몬즈, 92 애버뉴 더블류.  
21705

**펠 헨리 피. 주니어.**

미국, 워싱턴 98053 레드몬드, 218 플레이스 엔.  
이. 741

---

## 특허청구의 범위

### 청구항 1

상보성-결정 영역 및 하부구조 영역으로 이루어진 항체를 코딩하는 핵산에 있어서,

(a) 가변 영역의 아미노산 서열에서 선택적인 치환이 존재하고,

(b) CD40과 면역 특이적으로 결합하며,

(c) ATCC에 기탁되고 양도된 수탁번호 PTA-110의 하이브리도마에 의해 분비되는 고유 단일클론 항체 S2C6과 CD40에 결합하기 위해서 경쟁하고,

(d) 서열번호 8로 표시되는 CDR1, 서열번호 9로 표시되는 CDR2 및 서열번호 10으로 표시되는 CDR3을 가지는 중쇄 가변 영역, 서열번호 3으로 표시되는 CDR1, 서열번호 4로 표시되는 CDR2 및 서열번호 5로 표시되는 CDR3을 가지는 경쇄 가변 영역 및 인간 항체의 하부구조 영역으로 이루어진 것을 특징으로 하는,

암 치료용 약학조성물 제조에 사용되며 항-CD40 항체를 코딩하는 분리된 핵산.

### 청구항 2

제1항에 있어서,

상기 항체는 인간 항체의 불변 영역을 추가로 포함하여 이루어진 것을 특징으로 하는 항-CD40 항체를 코딩하는 분리된 핵산.

### 청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 분리된 핵산은 IgG 항체를 코딩하는 것을 특징으로 하는 항-CD40 항체를 코딩하는 분리된 핵산.

### 청구항 4

제3항에 있어서,

상기 IgG 항체는 IgG1 항체인 것을 특징으로 하는 항-CD40 항체를 코딩하는 분리된 핵산.

### 청구항 5

(a) 가변 영역의 아미노산 서열에서 선택적인 치환이 존재하고,

(b) CD40과 면역 특이적으로 결합하며,

(c) ATCC에 기탁되고 양도된 수탁번호 PTA-110의 하이브리도마에 의해 분비되는 고유 단일클론 항체 S2C6과 CD40에 결합하기 위해서 경쟁하고,

(d) 서열번호 8로 표시되는 CDR1, 서열번호 9로 표시되는 CDR2 및 서열번호 10으로 표시되는 CDR3을 가지는 중쇄 가변 영역, 서열번호 3으로 표시되는 CDR1, 서열번호 4로 표시되는 CDR2 및 서열번호 5로 표시되는 CDR3을 가지는 경쇄 가변 영역 및 인간 항체의 하부구조 영역으로 이루어진 것을 특징으로 하며,

암 치료용 약학조성물 제조에 사용되는 분리된 항-CD40 인간화된 단일클론 항체.

### 청구항 6

(a) 가변 영역의 아미노산 서열에서 선택적인 치환이 존재하고,

(b) CD40과 면역 특이적으로 결합하며,

(c) ATCC에 기탁되고 양도된 수탁번호 PTA-110의 하이브리도마에 의해 분비되는 고유 단일클론 항체 S2C6과 CD40에 결합하기 위해서 경쟁하고,

(d) 서열번호 8로 표시되는 CDR1, 서열번호 9로 표시되는 CDR2 및 서열번호 10으로 표시되는 CDR3을 가지는 중쇄 가변 영역, 서열번호 3으로 표시되는 CDR1, 서열번호 4로 표시되는 CDR2 및 서열번호 5로 표시되는 CDR3을

가지는 경쇄 가변 영역, 인간 항체의 하부구조 영역 및 인간 항체의 불변영역으로 이루어진 것을 특징으로 하며,

암 치료용 약학조성물 제조에 사용되는 분리된 항-CD40 인간화된 단일클론 항체.

#### 청구항 7

제6항에 있어서,

상기 항체는 IgG 항체인 것을 특징으로 하는 분리된 항-CD40 인간화된 단일클론 항체.

#### 청구항 8

제7항에 있어서,

상기 IgG 항체는 IgG1 항체인 것을 특징으로 하는 분리된 항-CD40 인간화된 단일클론 항체.

#### 청구항 9

상보성-결정 영역 및 하부구조 영역으로 이루어진 항체를 코딩하는 핵산을 포함하는 발현 벡터에 있어서,

(a) 가변 영역의 아미노산 서열에서 선택적인 치환이 존재하고,

(b) CD40과 면역 특이적으로 결합하며,

(c) ATCC에 기탁되고 양도된 수탁번호 PTA-110의 하이브리도마에 의해 분비되는 고유 단일클론 항체 S2C6과 CD40에 결합하기 위해서 경쟁하고,

(d) 서열번호 8로 표시되는 CDR1, 서열번호 9로 표시되는 CDR2 및 서열번호 10으로 표시되는 CDR3을 가지는 중쇄 가변 영역, 서열번호 3으로 표시되는 CDR1, 서열번호 4로 표시되는 CDR2 및 서열번호 5로 표시되는 CDR3을 가지는 경쇄 가변 영역 및 인간 항체의 하부구조 영역으로 이루어진 것을 특징으로 하는,

항-CD40 항체를 코딩하는 분리된 핵산을 포함하는 것을 특징으로 하며, 암 치료용 약학조성물 제조에 사용되는 발현 벡터.

#### 청구항 10

상보성-결정 영역 및 하부구조 영역으로 이루어진 항체를 코딩하는 핵산을 포함하는 발현 벡터에 있어서,

(a) 가변 영역의 아미노산 서열에서 선택적인 치환이 존재하고,

(b) CD40과 면역 특이적으로 결합하며,

(c) ATCC에 기탁되고 양도된 수탁번호 PTA-110의 하이브리도마에 의해 분비되는 고유 단일클론 항체 S2C6과 CD40에 결합하기 위해서 경쟁하고,

(d) 서열번호 8로 표시되는 CDR1, 서열번호 9로 표시되는 CDR2 및 서열번호 10으로 표시되는 CDR3을 가지는 중쇄 가변 영역 및 인간 항체의 하부구조 영역으로 이루어진 것을 특징으로 하는,

항-CD40 항체를 코딩하는 분리된 핵산을 포함하는 것을 특징으로 하며, 암 치료용 약학조성물 제조에 사용되는 발현 벡터.

#### 청구항 11

상보성-결정 영역 및 하부구조 영역으로 이루어진 항체를 코딩하는 핵산을 포함하는 발현 벡터에 있어서,

(a) 가변 영역의 아미노산 서열에서 선택적인 치환이 존재하고,

(b) CD40과 면역 특이적으로 결합하며,

(c) ATCC에 기탁되고 양도된 수탁번호 PTA-110의 하이브리도마에 의해 분비되는 고유 단일클론 항체 S2C6과 CD40에 결합하기 위해서 경쟁하고,

(d) 서열번호 3으로 표시되는 CDR1, 서열번호 4로 표시되는 CDR2 및 서열번호 5로 표시되는 CDR3을 가지는 경쇄 가변 영역 및 인간 항체의 하부구조 영역으로 이루어진 것을 특징으로 하는,

항-CD40 항체를 코딩하는 분리된 핵산을 포함하는 것을 특징으로 하며, 암 치료용 약학조성물 제조에 사용되는 발현 벡터.

## 청구항 12

제9항의 발현 벡터에 의해 형질전환된 세포.

## 청구항 13

서열번호 8로 표시되는 CDR1, 서열번호 9로 표시되는 CDR2 및 서열번호 10으로 표시되는 CDR3을 가지는 중쇄 가변 영역 및 인간 항체의 하부구조 영역으로 이루어진 것을 특징으로 하는 항체를 코딩하는 분리된 핵산.

## 청구항 14

서열번호 3으로 표시되는 CDR1, 서열번호 4로 표시되는 CDR2 및 서열번호 5로 표시되는 CDR3을 가지는 경쇄 가변 영역 및 인간 항체의 하부구조 영역으로 이루어진 것을 특징으로 하는 항체를 코딩하는 분리된 핵산.

## 명세서

### 발명의 상세한 설명

#### 기술 분야

- <1> 본 발명은 CD40에 대한 CD40 리간드의 결합을 증진시키는 CD40 결합 단백질을 투여함을 포함하는, 암, 염증성 질환 또는 장애 및 면역계 질환 또는 장애를 포함한 질병과 장애의 치료 방법 및 치료 조성물에 관한 것이다. CD40 결합 단백질은 재조합/이형의 단일클론 항체 S2C6 및 그의 유도체를 포함한다.

#### 배경 기술

- <2> CD40은 다양한 세포 유형, 예를 들어 B 세포, B 세포 악성종양, 모낭 수지상 세포, 기저 상피 세포 및 암종 상에서 발현되는 세포 표면 인 함유 당단백질이다. CD40은 CD40 리간드(“CD40L”)에 결합한다. CD40L은 염증 및 암 시기 동안 활성화된 T 세포 상에서 발현된다[Younes et al., 1998, Br. J. Haematol. 100:135-141; 고찰을 위해 문헌(Grewal and Flavell, 1998, Annu. Rev. Immunol. 16:111-135)을 참조]. CD40과 CD40L과의 상호작용으로 B 세포가 활성화되고 정상적인 B 세포가 증식되나; B-세포 유래 종양주에서 CD40 매개된 신호는 활성화 유발된 세포사(cell death)를 발생시킬 수 있다. 활성화 신호의 강도는 활성화 유발된 종양 세포 사에 중요하다[Grafton et al., 1997, Cell. Immunol. 182:45-56]. 따라서, CD40과 CD40L간의 수용체-리간드 상호작용 및 상기간의 활성화 신호의 강도를 증가시키는 방법 및 조성물은 질병의 치료에 대단히 가치가 있을 것이다.
- <3> CD40 및 CD40 리간드
- <4> CD40은 TNF 수용체 상과의 일원이다. 이과에는 TNFrII, CD40, CD30, LMP-1, LTBr, ATAR, OX-40 및 4-1BB 수용체가 포함된다. CD40은 B-림프구, 대식세포 및 수지 상 세포 상에서 구성적으로 발현되며 섬유아세포, 내피세포 및 상피세포 상의 사이토킨(cytokine) 활성화에 의해 유도된다[Van Kooten and Banchereau, 1997, Curr. Opin. Immunol. 9:330-337]. 또한, CD40은 폐, 방광, 위, 유방 및 난소 암을 포함한 많은 인간 암종 상에서 고도로 발현되는 것으로 나타났다[Stamenkovic et al., 1989, EMBO J. 8:1403-1410].
- <5> CD40의 리간드는 활성화된 T 세포 상에서 발현되는 막 단백질이다. CD40L의 수용체 결합으로 CD40 다량체화(multimerization), 활성화 신호(수지 상 세포, 대식세포 및 B 세포와 같은 세포를 제공하는 항원에 대한 것)의 발생, 및 성장 및 분화 신호(사이토킨-활성화된 섬유아세포 및 상피세포에 대한 것)의 발생이 일어난다. CD40 신호들은 일련의 TNF 수용체-결합 인자(“TRAF”)의 보충을 통해 상기 다량체화된 수용체로부터 변환된다[Kehry, 1996, J. Immunol. 156:2345-2348]. TRAF의 서브세트들은 CD40을 포함한 TNF 과 일원들과 상이하게 상호작용하여 광범위하게 다양한 하단부 경로들에 자극을 제공한다. TRAF1 및 TRAF2는 세포사멸(apoptosis)의 조절과 관련된다[Speiser et al., 1997, J. Exp. Med. 185:1777-1783; Yeh et al., 1997, Immunity 7:715-725]. TRAF 2, 5 및 6은 NF-kB 및 c-Jun N-말단 키나제 활성화를 포함한 증식 및 활성화 사건들에 관여한다. 정상적인 B 세포에서, CD40의 결합은 TRAF2 및 TRAF3를 수용체 복합체에 보충시키고 다른 TRAF의 하향 조절을 유도한다[Kuhune et al., 1997, J. Exp. Med. 186:337-342]. 또한, CD40 결합 효과는 막 밀도

에 의존한다[De Paoli et al., 1997, Cytometry 30:33-38].      중요하게는, 정상적인 1차 B 세포에서 관찰되는 증식 반응과 달리, 종양 B 세포에 대한 CD40의 결합은 성장 억제 및 활성화-유발된 세포사를 일으킬 수 있다[Funakoshi et al., 1994, Blood 83:2787-2794].      따라서, 상이한 세포 유형, 형질전환, 정주 TRAF 및 공동-자극과 관련하여 CD40 활성화는 활성화 및 증식에서 성장 억제 및 세포사멸 범위의 반응들을 유발시킬 수 있다.

<6>      항-CD40 항체

<7>      적어도 하나를 제외하고는, 지금까지 개시된 항-CD40 단일클론 항체(“mAb”)는 일반적으로 3 개의 군, 즉 (1) CD40/CD40L 상호작용을 적어도 90%까지 차단하고 항-종양 성질을 갖는 것들[Armitage et al., 미국 특허 제 5,674,492 호; Fanslow et al., 1995, Leukocyte Typing V, Schlossman et al., eds., 1:555-556]; (2) CD40을 통해 신호화를 길항하는 것들[deBoer et al., 미국 특허 제 5,677,165 호]; 및 (3) CD40을 통해 자극 신호를 전달하지만 CD40과 CD40L간의 상호작용은 증가시키지 않는 것들, 예를 들어 G28-5[Ledbetter et al., 미국 특허 제 5,182,368 호; PCT 공보 제 WO 96/18413 호]를 갖는다.

<8>      하나의 mAb로서, CD40.4(5C3)[PharMingen, San Diego, California]는 CD40과 CD40L간의 상호작용을 대략 30 내지 40%까지 증가시키는 것으로 나타났다[Schlossman et al., eds., 1995, Leukocyte Typing V: White Cell Differentiation Antigens 1:547-556].

<9>      아미테이지(Armitage) 등의 미국 특허 제 5,674,492 호에는 CD40을 발현하는 종양 세포를 특징으로 하는 질환의 예방 또는 치료를 위해, CD40과 결합할 수 있고 CD40의 CD40L에 대한 결합을 억제시킬 수 있는 CD40 결합 단백질, 예를 들어 mAb HuCD40-M2를 사용하는 방법이 개시되어 있다.

<10>      디보어(DeBoer) 등의 미국 특허 제 5,677,165 호에는 현저한 작용 활성 없이 B-세포 표면상의 CD40에 결합하여 B-세포 활성화를 차단하는 항-CD40 mAb가 개시되어 있다.      미국 특허 제 5,677,165 호의 필수적인 특징은 항-CD40 mAb가 정상적인 인간 B 세포 표면상의 인간 CD40에 결합할 때 정상적인 인간 B 세포의 성장 또는 분화가 억제된다는 것이다.

<11>      레드베터(Ledbetter) 등의 미국 특허 제 5,182,368 호에는 B 세포 표면 항원 Bp50(현재는 CD40이라 칭함)에 결합하고 B 세포 증식이 증대되도록 활성화된 B 세포를 자극하여 상기 세포 주기를 방해하는 리간드인 G28-5가 개시되어 있다.      그러나, G28-5는 CD40L의 존재 하에서는 B 세포의 활성화를 향상시키지 못하며 CD40/CD40L 상호작용을 강화시키지 않는다.

<12>      S2C6은 인간 방광암에 대해서 제조된 항 CD40 mAb이다[Paulie et al., 1984, Cancer Immunol. Immunother. 17:165-179].      S2C6은 B-림프구, 내피세포 및 상피세포를 포함한 다양한 세포 유형의 세포 상에서 발현되는 CD40 수용체에 결합한다.      S2C6은 종양성 요로 상피 및 B 세포 유래된 악성 림프구에 대해 특이성을 갖는 것으로 나타났다.      전립선 암 세포주인 HS와의 반응성 및 흑색종과의 약한 반응성도 또한 나타났다[Paulie et al., 1984, Cancer Immunol. Immunother. 17:165-179].      연구들은 S2C6의 B 악성종양에 대한 진단 마커로서의 유용성을 제시하였다[Paulie et al., 1984, Cancer Immunol. Immunother. 17:165-179; Paulie et al., 1985, Eur. J. Cancer. Clin. Oncol. 21:701-710].      S2C6은 B 세포 악성 종양을 검출하는 것 외에, 강한 성장-촉진 신호를 B 림프구에 전달하는 것으로 나타났다[Paulie et al., 1989, J. Immunol. 142:590-595].

<13>      S2C6은 용량 의존 방식으로 1차 B 세포 증식을 자극하는 능력으로 입증되는 바와 같이 인간 말초 B 세포에 대해 작용 활성을 갖는다[Paulie et al., 1989, J. Immunol. 142:590-595].

<14>      경쟁 연구들이 G28-5 및 S2C6이 동일하거나 또는 인접한 에피토프에 결합함을 입증하였지만, 상기 항체들은 주로 이전에 자극되었던 편도선 B 세포 상의 어느 한 mAb에 의해 이루어진 자극의 크기를 기준으로 기능적으로 상이한 것으로 결정되었다[Clark and Ledbetter, 1986, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:4494-4498; Ledbetter et al., 미국 특허 제 5,182,368 호].      시험된 특정 조건 하에서 편도선 B 세포 활성화를 이루는데는 G28-5에 비해 100 배 이상의 S2C6이 요구되었다[Ledbetter et al., 미국 특허 제 5,182,368 호].

<15>      당해 분야에서는 암을 치료 또는 예방하거나, 면역계를 활성화 또는 증대시키거나, 면역 결핍 또는 장애를 치료 또는 예방하기 위해서 증가된 효능을 갖는 치료법이 필요하며, 이는 본 발명에 의해 제공된다.

<16>      본 원의 임의의 참고문헌의 인용 및 확인은 상기 참고문헌을 본 발명에 대한 선행 기술로서 이용할 수 있는 허가로서 해석되어서는 안 된다.

## 발명의 내용

### 해결 하고자하는 과제

- <17> 본 출원인들은 뜻밖에도, 새로운 부류의 항-CD40 항체가 자극 신호를 전달하는 것 이외에 CD40과 CD40L간의 상호작용을 증진시키고, CD40L-매개된 자극을 증진시키며, 생체 내 항-종양 활성을 가짐을 발견하였다. 이러한 항체 및 관련 분자의 생산 및 용도는 mAb S2C6의 가변 영역에 대한 본 발명자들의 클로닝 및 서열화, 및 CDR 및 그 안의 하부구조 영역들의 확인에 의해 촉진된다.

### 과제 해결수단

- <18> 본 발명은 신규 서열(서열번호: 3, 4, 8, 9 또는 10)을 갖는 mAb S2C6 또는 하나 이상의 그의 상보성-결정 영역들(CDRs)의 가변적인 도메인을 포함하는 분자에 관한 것으로, 상기 분자는 (a) CD40과 면역 특이적으로 결합하며 (b) ATCC에 기탁되고 양도된 수탁 번호 PTA-110의 하이브리도마에 의해 분비되는 고유 단일클론 항체 C2C6에 비해 하나 이상의 치환 또는 결실을 1 차 아미노산 서열에 포함하거나, 또는 ATCC에 기탁되고 양도된 수탁번호 PTA-110의 하이브리도마에 의해 분비되는 단일클론 항체 S2C6가 아니고 파파인(papain) 또는 펩신에 의한 S2C6의 절단으로부터 생성되지 않는다. 특정한 구현예에서, 상기 분자는 고유 단일클론 항체 S2C6가 아니고 상기 단일클론 항체 S2C6 고유의 중(heavy)쇄 또는 경(light)쇄를 포함하지 않는다. 또 다른 특정한 구현예에서, 상기 분자는 항체이다. 또 다른 구현예에서, 상기 항체는 이소타입인 IgG1이 아니다. 또 다른 특정한 구현예에서, 상기 분자는 경쇄의 가변 도메인인 서열번호:2의 아미노산 서열, 또는 중쇄의 가변 도메인인 서열번호:7의 아미노산 서열을 포함한다.
- <19> 본 발명은 또한 제 2 단백질의 아미노산 서열에 융합된 mAb S2C6의 단편을 포함하는 키메라(chimeric)/융합 단백질뿐만 아니라, mAb S2C6의 단편이 또 다른 화학 구조에 공유 결합(예를 들어 가교결합제를 사용하여)된 분자에 관한 것이다. 특정한 구현예에서, 브리오딘 1(BD1)의 아미노산 서열을 포함하는 제 2 단백질에 융합된 mAb S2C6의 중쇄 및/또는 경쇄의 가변 도메인을 포함하는, CD40에 면역 특이적으로 결합하는 분자를 제공한다.
- <20> 본 발명은 또한 서열번호: 2, 서열번호: 3, 서열번호: 4, 서열번호: 7, 서열번호: 8, 서열번호: 9 또는 서열번호: 10에 95% 이상 일치하는 아미노산 서열을 포함하는 단백질들에 관한 것으로, 이들 단백질은 (a) CD40과 면역 특이적으로 결합하며 (b) ATCC에 기탁되고 양도된 수탁번호 PTA-110의 하이브리도마에 의해 분비되는 고유 단일클론 항체 C2C6에 비해 하나 이상의 치환 또는 결실을 1 차 아미노산 서열에 포함한다. 특정한 구현예에서, 상기 단백질은 고유 단일클론 항체 S2C6가 아니고 상기 단일클론 항체 S2C6 고유의 중쇄 또는 경쇄를 포함하지 않는다.
- <21> 본 발명은 또한 정제된 단백질에 관한 것으로, 상기 단백질은 (a) ATCC에 기탁되고 양도된 수탁번호 PTA-110의 하이브리도마에 의해 분비되는 고유 단일클론 항체 S2C6과 CD40에 결합하기 위해서 경쟁하고 (b) CD40에 대한 CD40 리간드의 결합을 45% 이상 증가시키고, (c) ATCC에 기탁되고 양도된 수탁번호 PTA-110의 하이브리도마에 의해 분비되는 고유 단일클론 항체 C2C6에 비해 하나 이상의 치환 또는 결실을 1 차 아미노산 서열에 포함하거나, 또는 ATCC에 기탁되고 양도된 수탁번호 PTA-110의 하이브리도마에 의해 분비되는 단일클론 항체 S2C6가 아니고 파파인 또는 펩신에 의한 S2C6의 절단으로부터 생성되지 않는다. 특정한 구현예에서, 상기 단백질은 고유 단일클론 항체 S2C6가 아니고 상기 단일클론 항체 S2C6 고유의 중쇄 또는 경쇄를 포함하지 않는다.
- <22> 본 발명은 또한 상기와 같은 분자 및 단백질을 암호화하거나, 상기와 같은 단백질을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 DNA에 하이브리드를 형성하는 핵산; 상기와 같은 분자를 포함하는 재조합 세포; 및 상기와 같은 단백질의 제조 방법에 관한 것이다.
- <23> 하나의 구현예에서, 상기 분리된 핵산은 (a) ATCC에 기탁되고 양도된 수탁 번호 PTA-110의 하이브리도마에 의해 분비되는 단일클론 항체 S2C6의 중쇄 가변 도메인, 및 (b) 인간 항체의 불변 영역을 포함하는 단백질을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함한다.
- <24> 하나의 구현예에서, 상기 분리된 핵산은 (a) ATCC에 기탁되고 양도된 수탁 번호 PTA-110의 하이브리도마에 의해 분비되는 단일클론 항체 S2C6의 경쇄 가변 도메인, 및 (b) 인간 항체의 불변 영역을 포함하는 단백질을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함한다.
- <25> 본 발명은 또한 단백질을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 재조합 핵산 벡터를 함유하는 재조합 세포



에 관한 것으로, 이때 상기 단백질은 ATCC에 기탁되고 양도된 수탁번호 PTA-110의 하이브리도마에 의해 분비되는 단일클론 항체 S2C6과 CD40에 결합하기 위해서 경쟁하고 CD40 리간드의 CD40에 대한 결합을 45% 이상 증가시킨다. 본 발명은 또한 상기 단백질이 상기 세포에 의해 발현되도록 상기와 같은 세포를 증식시키고, 상기 발현된 단백질을 회수함을 포함하는 상기와 같은 단백질의 제조 방법을 제공한다.

<26> 본 발명은 또한 서열번호: 1, 서열번호: 6, 서열번호: 11, 서열번호: 12, 서열번호: 13, 서열번호: 14 또는 서열번호: 15를 포함하는 재조합 핵산 벡터를 함유하는 재조합 세포, 및 상기 뉴클레오티드 서열에 의해 암호화되는 단백질이 상기 세포에 의해 발현되도록 상기와 같은 세포를 증식시키고 상기 발현된 단백질을 회수함을 포함하는 단백질의 제조방법에 관한 것이다.

<27> 본 발명의 분자 및 항체를, 바람직하게는 정제된 형태로 함유하는 약제 조성물을 또한 제공한다. 특정 구현예에서, 본 발명은 서열번호: 2, 서열번호: 3, 서열번호: 4, 서열번호: 7, 서열번호: 8, 서열번호: 9 또는 서열번호: 10을 포함하는 분자, 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 약제 조성물에 관한 것으로, 이때 상기 분자는 (i) CD40에 면역 특이적으로 결합하고, (ii) CD40 리간드의 CD40에 대한 결합을 증가시키고, (iii) ATCC에 기탁되고 양도된 수탁번호 PTA-110의 하이브리도마에 의해 분비되는 고유 단일클론 항체 C2C6에 비해 하나 이상의 치환 또는 결실을 1 차 아미노산 서열에 포함한다. 특정한 구현예에서, 상기 분자는 고유 단일클론 항체 S2C6가 아니며 상기 단일클론 항체 S2C6 고유의 중쇄 또는 경쇄를 포함하지 않는다.

<28> 본 발명은 또한 정제된 단백질 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 약제 조성물에 관한 것으로, 이때 상기 단백질은 (i) ATCC에 기탁되고 양도된 수탁번호 PTA-110의 하이브리도마에 의해 분비되는 mAb S2C6와 CD40에 결합하기 위해서 경쟁하고 (ii) CD40에 대한 CD40 리간드의 결합을 45% 이상 증가시키고, (iii) ATCC에 기탁되고 양도된 수탁번호 PTA-110의 고유 단일클론 항체 C2C6에 비해 하나 이상의 치환 또는 결실을 1 차 아미노산 서열에 포함하거나, 또는 ATCC에 기탁되고 양도된 수탁번호 PTA-110의 하이브리도마에 의해 분비되는 단일클론 항체 S2C6가 아니고 파파인 또는 펩신에 의한 S2C6의 절단으로부터 생성되지 않는다. 특정한 구현예에서, 상기 단백질은 고유 단일클론 항체 S2C6가 아니고 상기 단일클론 항체 S2C6 고유의 중쇄 또는 경쇄를 포함하지 않는다.

<29> 특정한 구현예들에서, 본 발명의 약제 조성물은 본 발명의 분자 또는 항체를 암의 치료 또는 예방에 유효한 양으로, 또는 면역 반응의 활성화 또는 증대에 유효한 양으로, 또는 환자의 면역 반응이 활성화되거나 증대되도록 하는 양으로 함유한다.

<30> 특정한 구현예들에서, 본 발명의 약제 조성물은 CD40 리간드를 추가로 포함한다. 특정한 구현예에서, 상기 약제 조성물은 암 또는 면역 장애의 치료 또는 예방, 또는 면역 반응의 활성화 또는 증대에 유효한 양으로, (a) CD40에 면역 특이적으로 결합하고, CD40 리간드의 CD40에 대한 결합을 증가시키는 분자; (b) CD40 리간드; 및 (c) 약학적으로 허용가능한 담체를 포함한다. 상기 구현예에서, 예를 들어 상기 분자는 본원에 개시된 바와 같은 고유 mAb S2C6 또는 고유 mAb 5C3 또는 S2C6 유도체일 수 있다.

<31> 본 발명은 또한 환자에게 치료 유효량의 본 발명의 분자 또는 항체, 예를 들어 서열번호: 2, 서열번호: 3, 서열번호: 4, 서열번호: 7, 서열번호: 8, 서열번호: 9 또는 서열번호: 10을 포함하는 분자를 투여함을 포함하는, 상기 환자의 암 치료 또는 예방, 상기 환자의 면역 반응의 활성화 또는 증대, 또는 상기 환자의 면역 결핍 또는 장애의 치료 또는 예방 방법에 관한 것으로, 이때 상기 분자는 (i) CD40에 면역 특이적으로 결합하고, (ii) CD40 리간드의 CD40에 대한 결합을 45% 이상 증가시키고, ATCC에 기탁되고 양도된 수탁번호 PTA-110의 하이브리도마에 의해 분비되는 고유 단일클론 항체 C2C6에 비해 하나 이상의 치환 또는 결실을 1 차 아미노산 서열에 포함한다. 특정한 구현예에서, 상기 분자는 고유 단일클론 항체 S2C6가 아니며 상기 단일클론 항체 S2C6 고유의 중쇄 또는 경쇄를 포함하지 않는다.

<32> 본 발명은 또한 정제된 단백질을 환자에게 투여함을 포함하는, 상기 환자의 암 치료 또는 예방, 상기 환자의 면역 반응의 활성화 또는 증대, 또는 상기 환자의 면역 결핍 또는 장애의 치료 또는 예방 방법에 관한 것으로, 이때 상기 단백질은 (i) ATCC에 기탁되고 양도된 수탁번호 PTA-110의 하이브리도마에 의해 분비되는 단일클론 항체 S2C6와 CD40에 결합하기 위해서 경쟁하고 (ii) CD40에 대한 CD40 리간드의 결합을 45% 이상 증가시키고, (iii) ATCC에 기탁되고 양도된 수탁번호 PTA-110의 고유 단일클론 항체 C2C6에 비해 하나 이상의 치환 또는 결실을 1차 아미노산 서열에 포함하거나, 또는 ATCC에 기탁되고 양도된 수탁번호 PTA-110의 하이브리도마에 의해 분비되는 단일클론 항체 S2C6가 아니고 파파인 또는 펩신에 의한 S2C6의 절단으로부터 생성되지 않는다. 특정한 구현예에서, 상기 단백질은 고유 단일클론 항체 S2C6가 아니고 상기 단일클론 항체 S2C6 고유의 중쇄 또는 경쇄를 포함하지 않는다.



- <33> 구체적인 구현예들에서, 본 발명의 방법은 CD40 리간드를 환자에게 투여함을 추가로 포함한다.
- <34> 본 발명은 또한 환자에게 상기 환자의 암 또는 면역 장애의 치료 또는 예방에 유효한 양으로 (a) CD40에 면역 특이적으로 결합하고, CD40 리간드의 CD40에 대한 결합을 증가시키는 분자; 및 (b) CD40 리간드를 투여함을 포함하는 상기 치료 또는 예방 방법에 관한 것으로, 이때 상기 분자는 본원에 개시된 고유 mAb S2C6 또는 고유 mAb 5C3 또는 S2C6 유도체를 중 임의의 것일 수 있다.
- <35> 바람직한 구현예에서, 상기 환자는 인간이다.
- <36> 본 발명은 또한 ATCC에 기탁되고 양도된 수탁번호 PTA-110의 하이브리도마에 의해 분비되는 단일클론 항체 S2C6와 CD40에 결합하기 위해서 경쟁하고 CD40에 대한 CD40 리간드의 결합을 45% 이상 증가시키는 단백질을 암호화하는 하나 이상의 트랜스젠(transgene)을 함유하는 트랜스제닉 비-인간 동물, 식물 또는 분리된 세포에 관한 것이다.

### 발명의 실시를 위한 구체적인 내용

- <37> 본 발명은 S2C6 유전자에 의해 암호화되는 단백질 및 상기 유전자의 뉴클레오타이드 서열에 관한 것이다. 본 발명은 또한 상기와 같은 S2C6 단백질 및 핵산의 단편 및 다른 유도체 및 동족체에 관한 것이다. 다양한 특성의 구현예들에서, 본 발명의 분자들(예: 항체들)은 mAb S2C6의 전부 또는 일부(경쇄 및/또는 중쇄, 또는 경쇄 CDR 1(서열번호: 3) 및/또는 2(서열번호: 4), 및/또는 중쇄 CDR 1(서열번호: 8), 2(서열번호: 9) 및/또는 3(서열번호: 10), 또는 경쇄 CDR 3(서열번호: 5))를 임의의 다른 CDR들 및/또는 4 개의 중쇄 및 경쇄 하부구조 영역들 중 하나 이상과 함께 포함하나, 단 상기와 같은 분자들은 ATCC에 기탁되고 양도된 수탁번호 PTA-110의 고유 mAb S2C6 또는 그의 중쇄 또는 경쇄가 아니다. 상기와 같은 분자들은 S2C6과 서열 및/또는 번역 후 변형(글리코실화, 아미드화, 비-S2C6 서열에의 펩티드 결합 또는 가교결합, 등)이 상이할 수 있다. 다양한 특성의 구현예들에서, 본 발명의 분자는 CD40에 면역 특이적으로 결합하고(또는 다량체화될 때 CD40에 면역 특이적으로 결합한다), CD40에 결합하기 위해서 고유 S2C6과 경쟁하고/하거나 CD40에 대한 CD40 리간드의 결합을 적어도 45%, 50%, 60% 또는 65%까지 증가시킨다. 상기와 같은 분자, 예를 들어 S2C6 단편 또는 유도체를 암호화하는 핵산뿐만 아니라 고유 mAb S2C6를 암호화하는 핵산도 또한 본 발명의 범위 내에 있다. 상기 단백질들의, 예를 들어 재조합 방법에 의한 생산을 제공한다.
- <38> 본 발명은 또한 S2C6 단백질 및 유도체, 예를 들어 비 제한적으로 작용 활성인, 즉 완전한 길이의 S2C6 mAb와 결합된 하나 이상의 공지된 작용 활성을 나타낼 수 있는 융합/키메라 단백질에 관한 것이다. 이러한 작용 활성에는 비 제한적으로 CD40에 결합하고, 상기 CD40 신호화 경로에 자극 신호를 전달하고(예를 들어 B 세포 증식을 일으키기 위해서), CD40L과 CD40과의 상호작용을 강화시키는 능력; 종양 증식을 억제시키는 능력; 및 면역 반응을 유도하는 능력이 포함된다.
- <39> S2C6, 그의 유도체 및 동족체를 포함하는 CD40에 대한 항체로 예를 들어 비 제한적으로 인간화된 항체; 단쇄 항체; 이중특이성 항체; 및 화학요법제 또는 생물 반응 개질제에 결합된 항체를 추가로 제공한다.
- <40> 본 발명은 또한 본 발명의 조성물을 단독으로 또는 CD40L과 함께 투여함을 포함하는, 암, 염증 질환 및 면역계의 장애를 치료 또는 예방하는 방법에 관한 것이다.
- <41> 본 발명을 다음에 섹션 6 내지 9의 실시예들에 의해서 예시하며, 상기 섹션은 특히 S2C6 유전자의 클로닝 및 특성화; CD40/CD40L 상호작용의 강화; 종양 증식의 억제; 및 CD40-Ig에 대한 단쇄 항-CD40 면역독소의 결합을 개시한다.
- <42> 내용을 명확하게 나타내기 위해서 비 제한적으로 본 발명의 상세한 설명을 다음의 서브 섹션들로 나눈다.
- <43> 5.1 S2C6 유전자 분리
- <44> 본 발명은 S2C6 핵산의 뉴클레오타이드 서열에 관한 것이다. 특정한 구현예에서, S2C6 핵산은 서열번호: 1 및 6의 cDNA 서열, 또는 S2C6 단백질(예를 들어, 서열번호: 2 및 7의 서열을 갖는 단백질)을 암호화하는 핵산을 포함한다. 본 발명은 S2C6 유전자 서열의 8 개 이상의 뉴클레오타이드들(즉, 하이브리드화 가능한 부분)로 이루어진 정제된 핵산을 제공하며; 다른 구현예들에서, 상기 핵산은 S2C6 서열 또는 완전한 길이의 S2C6 가변 영역 암호화 서열의 25 개 이상, 50 개 이상, 100 개 이상 또는 200 개 이상의 (인접하는) 뉴클레오타이드들로 이루어진다. 동일하거나 다른 구현예들에서, 상기 핵산은 길이가 50, 75, 100, 200 또는 5000 개의 뉴클레오타이드보다 짧다. 핵산은 단일가닥 또는 이중가닥일 수 있다. 본 발명은 또한 상기 서열들 또는 이들의 역보

충물에 하이브리드를 형성하거나 상기에 대해 상보적인 핵산, 및 특히 CD40에 결합하고, CD40에 결합하기 위해서 S2C6와 경쟁하고/하거나 CD40에 대한 CD40 리간드의 결합을 적어도 45%, 50%, 60% 또는 65%까지 증가시키는 핵산에 관한 것이다. 특정한 구현예에서, S2C6 가변 영역 유전자의 전체 암호화 영역 또는 적어도 10, 25, 50, 100 또는 200 개의 뉴클레오티드에 상보적인 서열을 포함하는 핵산을 제공한다.

<45> S2C6 단백질의 유도체 또는 동족체를 암호화하는 핵산을 추가로 제공한다. 쉽게 명백해지는 바와 같이, 본원에 사용된 “S2C6 단백질의 단편 또는 일부를 암호화하는 핵산”은 단지 S2C6 단백질의 인용된 단편 또는 부분을 암호화하는 핵산을 지칭하는 것이지 연속적인 서열로서 상기 S2C6 단백질의 다른 연속적인 부분들을 암호화하는 핵산을 지칭하는 것은 아닌 것으로 해석해야 한다.

## <46> 5.2 클로닝 과정

<47> S2C6 유전자의 클로닝에 대한 특정한 구현예들은 다음과 같다. 특정한 구현예에서, 전체 RNA를 mAb S2C6-생산 하이브리도마로부터 분리시키고 본원에 개시된 서열들을 기본으로 하는 프라이머를 사용하는 폴리머라제 체 반응을 사용하여 목적하는 가변 영역 서열들을 증폭시킨다. 예시적인 예에 대해서 다음 섹션 6을 참조하시오. 또 다른 예로서, mRNA를 mAb S2C6 생산 하이브리도마로부터 분리시키고, cDNA를 제조하여 숙주 세포에 의해 발현되고 이어서 상기 세포 내로 도입될 수 있도록 발현 벡터(예: 박테리오파지 유도체)내로 연결시킨다. 이어서 다양한 스크리닝 분석을 사용하여 발현된 생성물을 선별할 수 있다. 하나의 구현예에서, 선별은 S2C6 유전자 또는 그의 RNA의 일부 또는 그의 단편을 나타내는 표지된 탐침에 대한 하이브리드화를 기준으로 한다[Benton and Davis, 1977, Science 196:180; Grunstein and Hogness, 1975, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 72:3961]. 상기 탐침과 상당히 유사한 DNA 단편들이 하이브리드화될 것이다. 제한 효소 절단(들) 및 공지된 제한 지도(입수가 가능한 경우)에 따라 예상되는 크기를 갖는 단편 크기들의 비교에 의해 적합한 단편을 확인하는 것도 또한 가능하다. 추가의 선별을 상기 유전자의 성질을 기준으로 수행할 수 있다.

<48> 한편으로, 목적하는 유전자의 존재를 그의 발현 생성물의 물리적, 화학적 또는 면역학적 성질을 기준으로 하는 분석에 의해 탐지할 수 있다. 예를 들어, 적합한 mRNA들을 하이브리드-선택하는 cDNA 클론 또는 DNA 클론을 선별하고 발현시켜, 예를 들어 S2C6에 대해 공지된 바와 유사하거나 동일한 전기영동 이동, 등전점 초점 양상, 단백질분해 절단 지도 또는 작용 활성을 갖는 단백질을 생산할 수 있다. 예를 들어, CD40에 결합하는 능력을 ELISA(효소-결합된 면역흡착 분석)-유형의 과정으로 탐지할 수 있다.

<49> S2C6 유전자를 또한 핵산 하이브리드화를 이용하는 mRNA 선별에 이어 생체 외에서 번역함으로써 동정할 수 있다. 이 과정에서, 단편들을 사용하여 하이브리드화에 의한 상보적 mRNA를 분리시킨다. 상기 분리된 mRNA의 분리 생성물의 생체 외 번역 산물에 대한 기능 분석(예를 들어, CD40에 대한 결합 등)으로 mRNA, 및 따라서 목적하는 서열을 함유하는 상보적 DNA 단편을 동정한다.

<50> 또 다른 구현예에서, S2C6 cDNA를 본원에 개시된 서열로부터 화학적으로 합성할 수 있다. 당해 분야의 숙련자들에게 공지된 S2C6 유전자의 다른 분리 방법들을 사용할 수 있다.

<51> 이어서 동정되고 분리된 S2C6 유전자/cDNA를 적합한 클로닝 벡터내로 삽입시킬 수 있다. 당해 분야에 공지된 다수의 벡터-숙주 시스템을 사용할 수도 있다. 가능한 벡터로는 비 제한적으로 플라스미드 또는 변형된 바이러스가 있으나, 벡터 시스템은 사용되는 숙주 세포에 적합해야 한다. 이러한 벡터로는 비 제한적으로 람다 유도체와 같은 박테리오파지, 또는 플라스미드, 예를 들어 PBR322 또는 pUC 플라스미드 유도체 또는 블루스크립트 벡터(Stratagene)가 있다. 클로닝 벡터 내로의 삽입은 예를 들어 DNA 단편을 상보적인 결합 말단을 갖는 클로닝 벡터내로 연결시킴으로써 수행될 수 있다. 그러나, 상보적 제한 부위가 DNA가 클로닝 벡터 중에 존재하지 않는 단편에 사용되는 경우, 상기 DNA 분자의 단부(end)들을 효소적으로 변형시킬 수 있다.

한편으로, 임의의 목적하는 부위를 뉴클레오티드 서열(링커)을 DNA 말단에 연결시킴으로써 생성시킬 수 있으며; 이러한 연결된 링커는 제한 엔도뉴클레아제 인식 서열을 암호화하는 특정한 화학 합성된 올리고뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 또 다른 방법에서, 절단된 벡터 및 S2C6 유전자를 단독중합체성 테일링(tailing)에 의해서, 또는 적합한 서열을 함유하는 프라이머를 사용하여 PCR에 의해서 변형시킬 수 있다. 재조합 분자를 상기 유전자 서열의 다수의 복제가 일어나도록 형질전환, 형질감염, 감염, 일렉트로포레이션(electroporation) 등을 통해 숙주 세포 내로 도입시킬 수 있다.

<52> 또 다른 방법에서, 목적하는 유전자를 적합한 클로닝 벡터 내로 “무차별” 접근으로 삽입시킨 후에 동정 및 분리시킬 수 있다. 예를 들어 크기 분별화에 의한 목적하는 유전자의 농축을 클로닝 벡터 내로의 삽입 전에

수행할 수 있다.

<53> 특정한 구현예들에서, 분리된 S2C6 유전자, cDNA 또는 합성 DNA 서열이 통합된 재조합 DNA 분자로 숙주 세포를 형질전환시키면 상기 유전자의 다수의 복제를 일으킬 수 있다. 따라서, 상기 유전자를 형질전환체를 증식시키고, 상기 형질전환체로부터 재조합 DNA 분자를 분리시키고, 경우에 따라 상기 분리된 재조합 DNA로부터 삽입된 유전자를 회수함으로써 다량으로 얻을 수 있다.

<54> 본 발명에 의해 제공되는 S2C6 서열은 고유 S2C6 가변 영역들에서 발견되는 것과 실질적으로 동일한 아미노산 서열을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열 및 기능상 동등한 아미노산을 갖는 암호화된 아미노산 서열뿐만 아니라 S2C6 유도체 및 동족체에 대해 다음 개시하는 바와 같은 다른 S2C6 유도체 또는 동족체를 암호화하는 서열을 포함한다.

### <55> 5.3 S2C6 유전자의 발현

<56> S2C6 단백질 또는 그의 작용 활성인 동족체 또는 단편 또는 다른 유도체들(섹션 5.6 참조)을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 적합한 발현 벡터, 즉 삽입된 단백질-암호화 서열의 전사 및 번역에 필요한 요소들을 함유하는 벡터내로 삽입시킬 수 있다. 필요한 전사 및 번역 신호들은 또한 고유 S2C6 유전자 및/또는 그의 측부 영역에 의해 공급될 수 있다. 다양한 숙주-벡터 시스템들을 사용하여 단백질 암호화 서열을 발현시킬 수 있다.

이들 시스템에는 비 제한적으로 바이러스(예: 우두 바이러스, 아데노바이러스 등)에 의해 감염된 포유동물 세포 시스템; 바이러스(예: 바콜로바이러스)에 의해 감염된 곤충 세포 시스템; 효모 벡터를 함유하는 효모, 또는 박테리오파지, DNA, 플라스미드 DNA 또는 코스미드 DNA로 형질전환된 세균과 같은 미생물; 트랜스제닉 식물 또는 트랜스제닉 비-인간 동물이 포함된다. 벡터의 발현 요소들은 구조 및 특이성에 있어서 다양하다. 사용되는 숙주-벡터 시스템에 따라, 다수의 적합한 전사 및 번역 요소들 중 임의의 하나를 사용할 수 있다.

<57> DNA 단편의 벡터 내로의 삽입에 대해 이전에 개시된 방법들 중 임의의 방법을 사용하여 적합한 전사/번역 조절 신호 및 단백질 암호화 서열로 이루어진 키메라 유전자를 함유하는 발현 벡터를 제작할 수 있다. 이들 방법은 생체 외 재조합 DNA와 합성 기법, 및 생체 내 재조합체(유전적 재조합)을 포함할 수 있다. S2C6 단백질 또는 펩티드 단편을 암호화하는 핵산 서열의 발현은 상기 S2C6 단백질 또는 펩티드가 재조합 DNA 분자로 형질전환된 숙주에서 발현되도록 제 2 핵산 서열에 의해 조절될 수 있다. 예를 들어, S2C6 단백질의 발현을 당해 분야에 공지된 임의의 프로모터/활성제(enhancer) 요소에 의해 조절할 수 있다. S2C6 유전자 발현을 조절하는데 사용될 수 있는 고유 S2C6 유전자 프로모터가 아닌 프로모터들에는 비 제한적으로 SV40 초기 프로모터 영역[Benoist and Chambon, 1981, Nature 290:304-310], 라우스 육종 바이러스의 3' 장 말단 반복부에 함유된 프로모터[Yamamoto et al., 1980, Cell 22:787-797], 헤르페스 티미딘 키나제 프로모터[Wagner et al., 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78:1441-1445], 메탈로티오네인 유전자의 조절 서열[Brinster et al., 1982, Nature 296:39-42]; 원핵 생물 발현 벡터, 예를 들어  $\beta$ -락타마제 프로모터(Villa-Kamaroff et al., 1978, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 75:3727-3731), 또는 *lac* 프로모터[DeBoer et al., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80:21-25]; 또한 문헌[“재조합 세균으로부터의 유용 단백질”, Scientific American, 1980, 242:74-94] 참조; 노팔린 합성효소 프로모터 영역[Herrera-Estrella et al., Nature 303:209-213] 또는 꽃양배추 모자이크 바이러스 35S RNA 프로모터[Gardner et al., 1981, Nucl. Acids Res. 9:2871], 및 광합성 효소 리불로즈 비스포페이트 카복실라제의 프로모터[Herrera-Estrella et al., Nature 310:115-120]를 포함하는 식물 발현 벡터; 효모 또는 다른 진균으로부터의 프로모터 요소, 예를 들어 Gal 4 프로모터, ADC(알콜 데하이드로게나제) 프로모터, PGK(포스포글리세롤 키나제) 프로모터, 알칼리성 포스파타제 프로모터, 및 조직 특이성을 나타내고 트랜스제닉 동물에서 이용되었던 하기의 동물 전사 조절 프로모터: 이자외분비세포에서 활성인 엘라스타제 I 유전자 조절 영역[Swift et al., 1984, Cell 38:639-646; Ornitz et al., 1986, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 50:399-409; MacDonald, 1987, Hepatology 7:425-515]; 췌장 베타 세포에서 활성인 유전자 조절 영역[Hanaban, 1985, Nature 315:115-122], 림프양 세포에서 활성인 면역글로불린 유전자 조절 영역[Grosschedl et al., 1984, Cell 38:647-658; Adames et al., 1985, Nature 318:533-538; Alexander et al., 1987, Mol. Cell. Biol. 7:1436-1444], 고환, 유방, 림프 및 비만 세포에서 활성인 마우스 유방 바이러스 조절 영역[Leder et al., 1986, Cell 45:485-495], 간에서 활성인 알부민 유전자 조절 영역[Pinkert et al., 1987, Genes and Devel. 1:268-276], 간에서 활성인 알파-태아 단백질 유전자 조절 영역[Krumlauf et al., 1985, Mol. Cell. Biol. 5:1639-1648; Hammer et al., 1987, Science 235:53-58]; 간에서 활성인 알파 1-항트립신 유전자 조절 영역[Kelsey et al., 1987, Genes and Devel. 1: 161-171], 골수 세포에서 활성인 베타-글로빈 유전자 조절 영역[Mogam et al., 1985, Nature 315:338-340; Kollias et al., 1986, Cell 46:89-94]; 뇌의 펩티드 교세포에서 활성인 마이엘린 염기성 단백질 유전자 조절 영역[Readhead et al., 1987, Cell 48:703-712]; 골격

근에서 활성인 마이오신 경쇄-2 유전자 조절 영역[Sani, 1985, Nature 314:283-286], 및 시상하부에서 활성인 고나도트로핀 방출 호르몬 유전자 조절 영역[Mason et al., 1986, Science 234:1372-1378]이 포함된다.

<58> 특정한 구현예에서, S2C6 유전자 핵산에 작동적으로 연결된 프로모터, 하나 이상의 복제 기원, 및 임의로 하나 이상의 선별성 마커(예: 항생제 내성 유전자)를 포함하는 벡터를 사용한다.

<59> S2C6 유전자 삽입물을 함유하는 발현 벡터를 3 가지 일반적인 접근법으로 동정할 수 있다: (a) 핵산 하이브리드화; (b) “마커” 유전자 기능의 존재 또는 부재; 및 (c) 삽입된 서열의 발현. 첫 번째 접근법에서, 발현 벡터에 삽입된 S2C6 유전자의 존재를 삽입된 S2C6 유전자와 일치하는 서열을 포함하는 탐침을 사용하는 핵산 하이브리드화에 의해 탐지할 수 있다. 두 번째 접근법에서, 재조합 벡터/숙주 시스템을 상기 벡터에의 S2C6 유전자의 삽입에 의해 야기된 특정 “마커” 유전자 기능(예를 들어, 티미딘 키나제 활성, 항생제 내성, 형질전환 표현형, 바콜로바이러스에서의 폐색체 형성 등)의 존재 또는 부재를 기준으로 동정 및 선별할 수 있다. 예를 들어, S2C6 유전자가 벡터의 마커 유전자 서열 내에 삽입되는 경우, 상기 S2C6 삽입물을 함유하는 재조합체를 상기 마커 유전자 기능의 부재에 의해 동정할 수 있다. 세 번째 접근법에서, 재조합 발현 벡터를 재조합체에 의해 발현된 S2C6 산물을 분석함으로써 동정할 수 있다. 이러한 분석은 예를 들어 생체 외 분석 시스템에서의 S2C6 단백질의 물리적 또는 기능적 성질, 예를 들어 CD40과 결합하는 CD40L의 강화; 정상 B 세포 증식의 자극; 종양 증식의 억제 등을 기준으로 할 수 있다.

<60> 일단 특정한 재조합 DNA 분자가 동정 및 분리되면, 당해 분야에 공지된 다수의 방법들을 사용하여 이를 증식시킬 수 있다. 일단 적합한 숙주 시스템과 증식 조건이 정해지면, 재조합 발현 벡터를 증식시키고 다량 제조할 수 있다. 앞서 설명한 바와 같이, 사용될 수 있는 발현 벡터에는, 몇 가지만 언급하자면, 비 제한적으로 하기의 벡터 또는 그의 유도체; 인간 또는 동물 바이러스, 예를 들어 우두 바이러스 또는 아데노바이러스; 바콜로바이러스와 같은 곤충 바이러스; 효모 벡터; 박테리오파지 벡터(예: 람다 파아지), 및 플라스미드 및 코스미드 DNA 벡터가 있다.

<61> 또한, 삽입된 서열의 발현을 조절하거나, 또는 목적하는 특정한 방식으로 유전자 산물을 변형 및 가공하는 숙주 세포주를 선택할 수 있다. 몇몇 프로모터로부터의 발현을 몇몇 유도인자의 존재 하에서 상승시킬 수 있으며; 따라서 유전자 조작된 S2C6 단백질의 발현을 통제할 수 있다. 더욱 또한, 상이한 숙주 세포들은 번역 및 번역 후 프로세싱 및 변형(예를 들어, 단백질의 글리코실화, 인산화)에 특징적이고 특이적인 기전을 갖는다. 발현된 외래 단백질의 목적하는 변형 및 프로세싱을 보장하기 위해서 적합한 세포주 또는 숙주 시스템을 선택할 수 있다. 예를 들어 세균 시스템에서의 발현을 사용하여 비-글리코실화된 코어 단백질 산물을 제조할 수 있다. 효모에서의 발현은 글리코실화된 산물을 생성시킬 것이다. 포유동물 세포에서의 발현을 이용하여 이중 단백질의 “고유”의 글리코실화를 보장할 수 있다. 더욱 또한, 상이한 벡터/숙주 발현 시스템은 상이한 정도로 가공 반응들을 수행할 수 있다.

<62> 특정한 구현예들에서, 발현되는 S2C6 관련 단백질은 항체 또는 그의 단편 또는 유도체이다. 상기 재조합 항체는 재조합 경쇄 가변 도메인, 재조합 중쇄 가변 도메인, 또는 이들 모두를 함유할 수 있다. 특정한 구현예에서, 상기 두 경쇄 및 중쇄 모두 또는 이들의 유도체들을 세포에 의해 재조합적으로 발현시킨다(예를 들어 보스(Boss) 등의 1989년 3월 28일자 미국 특허 제 4,816,397 호를 참조하시오). 다양한 숙주-벡터 시스템을 사용하여 단백질 암호화 서열을 발현시킬 수 있다. 이러한 시스템에는 비 제한적으로 바이러스(예: 우두 바이러스, 아데노바이러스 등)에 의해 감염된 포유동물 세포 시스템; 바이러스(예: 바콜로바이러스)에 의해 감염된 곤충 세포 시스템; 효모 벡터를 함유하는 효모, 또는 박테리오파지, DNA, 플라스미드 DNA 또는 코스미드 DNA로 형질전환된 세균과 같은 미생물; 트랜스제닉 식물 또는 트랜스제닉 비-인간 동물이 포함된다.

#### <63> 5.4 유전자 산물의 동정 및 정제

<64> 특정한 구현예에서, 본 발명은 상보성-결정 영역(CDR)을 포함하거나 또는 달리 작용적으로 활성인 S2C6 단백질 및 그의 단편 및 유도체들의 아미노산 서열뿐만 아니라 상기를 암호화하는 핵산 서열을 제공한다. 본 원에 사용된 “작용적으로 활성인” S2C6 물질이란 완전한 길이(고유)의 S2C6 단백질과 관련된 하나 이상의 작용 활성, 예를 들어 CD40에의 결합; 정상 B 세포 증식의 자극; 종양 증식의 억제를 나타내고 CD40에 대한 CD40 리간드의 결합을 45% 이상 증가시키는 물질을 지칭한다.

<65> 특정한 구현예들에서, 본 발명은 6 개, 10 개, 20 개, 50 개, 75 개 또는 100 개 이상의 아미노산으로 이루어진 S2C6 단백질의 단편 및 이를 암호화하는 핵산을 제공한다.

<66> 일단 S2C6 유전자 서열을 발현하는 재조합체가 동정되면, 상기 유전자 산물을 분석할 수 있다. 이는 상기



산물의 방사능 표지화에 이은 겔 전기영동, 면역분석에 의한 분석; 정상 B 세포 증식의 자극; CD40 결합 분석, CD40에 대한 CD40 리간드의 결합 촉진, 중앙 증식의 억제 등 상기 산물의 물리적 또는 작용적 성질을 기준으로 하는 분석에 의해 이루어진다.

<67> 일단 상기 S2C6 단백질이 동정되면, 상기를 크로마토그래피(예: 이온 교환, 친화성 및 크기배열 컬럼 크로마토그래피), 원심분리, 차등 용해도, 또는 단백질 정제를 위한 임의의 다른 표준 기법을 포함한 표준 방법에 의해 분리 및 정제시킨다. 작용적 성질을 임의의 적합한 분석을 사용하여 평가할 수 있다(섹션 5.7 참조).

<68> 한편으로, S2C6 단백질 또는 그의 유도체를 본 원에 개시된 서열을 기본으로 하는 당해 분야에 공지된 표준 화학 방법에 의해 합성할 수 있다(예를 들어 문헌[Hunkapiller et al., 1984, Nature 310:105-111]을 참조하시오).

<69> 본 발명의 특정한 구현예에서, 상기와 같은 S2C6 단백질은, 재조합 DNA 기법에 의해 생산되든지, 혹은 화학 합성 방법 또는 고유 단백질의 정제에 의해 생산되든지 간에, 비 제한적으로 1 차 아미노산 서열, 도 3A-3B에 실질적으로 도시된 아미노산 서열의 전부 또는 일부(서열번호: 2 및 7)뿐만 아니라 상기와 일치하는 단백질을 포함한 그의 단편 및 다른 유도체 및 동족체를 포함한다.

#### <70> 5.5 S2C6 유전자 및 단백질의 구조

<71> 본 발명의 S2C6 유전자 및 단백질의 구조를 당해 분야에 공지된 다양한 방법들에 의해 분석할 수 있다. 이러한 방법들의 일부 예가 다음에 개시된다.

##### <72> 5.5.1 유전자 분석

<73> S2C6 유전자에 상응하는 클로닝된 DNA 또는 cDNA를, 비 제한적으로 써던 하이브리드화[Southern, 1975, J. Mol. Biol. 98:503-517], 노던 하이브리드화(예를 들어, 문헌[Freeman et al., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80:4094-4098] 참조), 제한 엔도뉴클레아제 지도작성[Maniatis, 1982, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York], 및 DNA 서열 분석을 포함한 방법들에 의해 분석할 수 있다. 따라서, 본 발명은 폴리머라제 쉘 반응(PCR; 미국 특허 제 4,683,202, 4,683,195 및 4,889,818 호; Gyllenstein et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85:7652-7656; Ochman et al., 1988, Genetics 120:621-623; Loh et al., 1989, Science 243:217-220)에 이어서 S2C6 유전자-특이적인 탐침을 사용하는 써던 하이브리드화에 의해 세포(예: 하이브리도마)로부터의 DNA 또는 cDNA에서 S2C6 유전자를 검출할 수 있다. PCR 이외의 다른 증폭 방법들도 통상적으로 공지되어 있으며 또한 사용할 수 있다. 써던 및 노던 하이브리드화 모두에 대한 하이브리드화 조건의 엄격성을, 사용되는 특정한 S2C6 유전자 탐침에 목적하는 정도로 관련되게 핵산이 검출되도록 조작할 수 있다. 당해 분야에 통상적으로 공지된 상기 방법 및 다른 방법에 대한 변형 방법들을 사용할 수 있다.

<74> 제한 엔도뉴클레아제 지도작성을 사용하여 S2C6 유전자의 유전자 구조를 대략적으로 결정할 수 있다. 제한 엔도뉴클레아제 절단에 의해 유래된 제한 지도를 DNA 서열 분석에 의해 확인할 수 있다.

<75> DNA 서열 분석을 당해 분야에 공지된 임의의 기법들, 예를 들어 비 제한적으로 막삼과 길버트의 방법[Maxam and Gilbert, 1980, Meth. Enzymol. 65:499-560], 상거 디데옥시 방법[Sanger et al., 1977, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 74:5463], T7 DNA 폴리머라제의 사용[Tabor and Richardson, 미국 특허 제 4,795,699 호], 또는 자동화된 DNA 서열화기의 사용[예를 들어, Applied Biosystems, Foster City, California]에 의해 수행할 수 있다.

##### <76> 5.5.2 단백질 분석

<77> S2C6 단백질의 아미노산 서열을 DNA 서열로부터 추론하여, 또는 한편으로 예를 들어 자동화된 아미노산 서열화기에 의한 단백질의 직접적인 서열화에 의해 이끌어낼 수 있다.

<78> S2C6 단백질 서열을 친수성 분석[Hopp and Woods, 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78:3824]에 의해 추가로 특성화할 수 있다. 친수성 프로파일을 사용하여 S2C6 단백질의 소수성 및 친수성(잠재적으로 면역원성) 영역 및 상기 영역을 암호화하는 유전자 서열의 상응하는 영역을 동정할 수 있다.

<79> 두 번째로, 구조 분석[Chou and Fasman, 1974, Biochemistry 13:222]을 또한 수행하여 특이적인 2 차 구조를 띠는 S2C6 단백질의 영역을 동정할 수 있다.

<80> 조작, 번역 및 2 차 구조 예견, 개방 관독 프레임 예견과 작성뿐만 아니라 서열 일치성의 결정을 또한 당해 분

야에서 입수할 수 있는 컴퓨터 소프트웨어 프로그램을 사용하여 수행할 수 있다.

<81> 5.6 mAb S2C6 항체 유도체

<82> CD40에 면역 특이적으로 결합할 수 있는 S2C6 항체 유도체의 제조 방법이 본 원에 개시되어 있다.

<83> 이러한 항체에는 비 제한적으로 단일클론 항체, 인간화된 항체, 키메라 항체, 단쇄 항체, 이중특이성 항체, Fab 단편, F(ab') 단편, Fab 발현 라이브러리에 의해 생산된 단편, 항-유전자형(항-Id) 항체 및 상기 항체들 중 임의의 항체의 에피토프-결합 단편들이 포함된다. 하나의 구현예에서, S2C6 유도체는 S2C6의 1차 아미노산 서열에 비해 1차 아미노산 서열에 하나 이상의 결실, 첨가 및/또는 치환을 포함한다. 또 다른 구현예에서, S2C6 유도체는 S2C6를 파파인 또는 펩신으로 절단시켜 생성되지 않는다. 더욱 또한 구현예에서, 상기 S2C6 유도체는 S2C6의 1차 아미노산 서열에 비해 1차 아미노산 서열에 하나 이상의 결실, 첨가 및/또는 치환을 포함하며 파파인 또는 펩신에 의한 S2C6의 절단으로부터 생성되지 않는다. 적합한 결실, 첨가 및/또는 치환의 선택을 위한 안내가 본 섹션 및 다음 섹션 5.7에 제공된다.

<84> CD40에 대한 추가의 단클론 항체를 제조하기 위해서, 배양액 중의 연속적인 세포 주에 의해 항체 분자를 생성시키는 임의의 기법들을 사용할 수 있다. 이러한 기법들로는 비 제한적으로 콜러와 밀스타인[Kohler and Milstein, 1975, Nature 256, 495-497; 및 미국 특허 제 4,376,110]의 하이브리도마 기법, 인간 B-세포 하이브리도마 기법[Kozbor et al., 1983, Immunology Today 4, 72; Cole et al., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 2026-2030] 및 인간 단일클론 항체의 제조를 위한 EBV-하이브리도마 기법[Cole et al., 1985, Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96]이 있다. 당해 분야에서 입수할 수 있는 상기과 같은 항체 또는 다른 항-CD40 항체들을 예를 들어 클로닝하고, 따라서 S2C6 중쇄를 재조합적으로 발현시키는 경우 상보적인 경쇄(상기 두쇄를 동일한 세포에서 재조합적으로 발현시키거나 또는 별도의 발현 및 정제 후에 생체 외에서 결합시킬 수 있다)를 공급하기 위한 주성분으로서 사용할 수 있으며; 한편으로 임의의 특이성을 갖는 항체로부터의 경쇄를 사용할 수도 있다. S2C6 중쇄를 암호화하거나 또는 S2C6 중쇄 가변도메인을 포함하는 분자를 암호화하는 핵산(예: 플라스미드)을 다량체성 단백질의 발현을 위해서 항체 경쇄 또는 항체 경쇄를 포함하는 분자를 발현하는 세포 내로 형질감염시킬 수 있으며; 상기 항체 경쇄는 재조합체 또는 비-재조합체일 수 있고, 항-CD40 특이성을 가질 수도, 또는 갖지 않을 수도 있다. 한편으로, S2C6 중쇄, 또는 그의 가변 영역 또는 CDR을 포함하는 분자를 임의로 발현시킬 수 있으며 상보적인 경쇄 또는 경쇄 가변 영역의 존재 없이 사용할 수 있다. 다양한 구현예들에서, 본 발명은 CD40 결합 친화성을 갖는 S2C6 중쇄, 또는 (한편으로) 중쇄 CDR 8, 9 및/또는 10의 하나 이상의 복제물로 이루어지거나 상기를 포함하는 분자, 또는 CDR 8, 9 또는 10의 하나 이상의 복제물로 이루어지거나 상기를 포함하는 단백질(펩티드 또는 폴리펩티드) 서열을 제공한다. 특정한 구현예에서, 상기과 같은 단백질은 예를 들어 C-말단 아미드화 또는 N-말단 아세틸화에 의해 N 또는 C-말단 변형시킬 수 있다.

<85> 또한, 적합한 항원 특이성을 갖는 마우스 항체 분자의 유전자를 적합한 생물 활성을 갖는 인간 항체 분자의 유전자와 함께 이음으로써 “키메라 항체”의 제조를 위해 개발된 기법[Morrison, et al., 1984, Proc. Natl. Acad. Sci., 81, 6851-6855; Neuberger, et al., 1984, Nature 312, 604-608; Takeda, et al., 1985, Nature 314, 452-454]을 사용할 수 있다. 키메라 항체는 상이한 부분들이 상이한 동물 종들로부터 유래된 분자, 예를 들어 마우스 mAb로부터 유래된 가변 영역 및 인간 면역 글로불린 일정 영역을 갖는 것이다(예를 들어 Cabilly et al., 미국 특허 제 4,816,567 호; 및 Boss et al., 미국 특허 제 5,816,397 호를 참조하십시오). 특정한 구현예에서, 상기 키메라 항체는 ATCC에 기탁되고 양도된 수탁번호 PTA-110의 하이브리도마에 의해 분비된 단일클론 항체 S2C6의 가변 도메인 및 인간 항체의 불변 영역을 포함한다. 특정한 구현예들에서, 키메라 항체의 가변 도메인은 도 3A에 도시된 S2C6 V(서열번호: 2) 및/또는 도 3B에 도시된 S2C6 V(서열번호: 7)를 포함한다.

<86> 또한, 인간화된 항체의 제조를 위한 기법들이 개발되었다(예를 들어, Queen, 미국 특허 제 5,585,089 호 및 Winter, 미국 특허 제 5,225,539 호를 참조하십시오). 면역글로불린 경쇄 또는 중쇄 가변 영역은 상보성-결정 영역(CDR)이라 지칭되는 3 개의 고도로 가변성인 영역에 의해 중단되는 “하부구조” 영역으로 이루어진다. 상기 하부구조 영역 및 CDR의 범위는 정확하게 한정되었다(“면역학적으로 흥미가 있는 단백질의 서열”, Kabat, E. et al., 미국 보건사회 보장성(1983)). 간단히, 인간화된 항체는 비-인간 종들로부터의 하나 이상의 CDR 및 인간 면역 글로불린 분자로부터의 하부구조 영역을 갖는 비-인간 종들로부터의 항체 분자이다.

<87> 본 발명은 중쇄 또는 경쇄 가변 도메인을 포함하는 항체 또는 그의 유도체를 포함하며, 이때 상기 가변 도메인은 (a) 3 개의 상보성-결정 영역(CDR) 셋트(이때 상기 CDR 셋트는 단클론 항체 S2C6의 것이다) 및 (b) 4 개의



하부구조 영역 세트(이때 상기 하부구조 영역 세트는 단일클론 항체 S2C6의 하부구조 영역 세트와 상이하며, 상기 항체 또는 그의 유도체는 CD40에 면역 특이적으로 결합한다)를 포함한다. 바람직하게는, 상기 하부구조 영역 세트는 인간 단일클론 항체, 예를 들어 CD40에 결합하지 않는 인간 단클론 항체이다.

<88> 특정한 구현예에서, 본 발명은 경쇄 가변 도메인을 포함하는 항체 또는 그의 유도체를 포함하며, 이때 상기 가변 도메인은 (a) 3 개의 상보성-결정 영역(CDR) 세트(이때 상기 CDR 세트는 서열번호: 3 또는 서열번호: 4를 포함한다) 및 (b) 4 개의 하부구조 영역 세트(이때 상기 하부구조 영역 세트는 단일클론 항체 S2C6의 경쇄의 하부구조 영역 세트와 상이하며, 상기 항체 또는 그의 유도체는 CD40에 면역 특이적으로 결합한다)를 포함한다.

<89> 특정한 구현예에서, 본 발명은 중쇄 가변 도메인을 포함하는 항체 또는 그의 유도체를 포함하며, 이때 상기 가변 도메인은 (a) 3 개의 상보성-결정 영역(CDR) 세트(이때 상기 CDR 세트는 서열번호: 8, 서열번호: 9 또는 서열번호: 10을 포함한다) 및 (b) 4 개의 하부구조 영역 세트(이때 상기 하부구조 영역 세트는 단일클론 항체 S2C6의 중쇄의 하부구조 영역 세트와 상이하며, 상기 항체 또는 그의 유도체는 CD40에 면역 특이적으로 결합한다)를 포함한다.

<90> 한편으로, 단쇄 항체의 제조를 위해 개시된 기법들[미국 특허 제 4,946,778 호; Bird, 1988, Science 242, 423-426; Huston, et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 5879-5883; 및 Ward, et al., 1989, Nature 334, 544-546]은 S2C6 서열을 사용하는 단쇄 항체의 제조에 적합할 수 있다. 단쇄 항체들은 아미노산 가교를 통해 Fv 영역의 중쇄 및 경쇄 단편을 결합시켜 단쇄 폴리펩티드를 생성시킴으로써 형성된다. 특정한 구현예에서, 상기 단쇄 항체는 도 3A 및 3B에 도시된 아미노산 서열들(각각 서열번호: 2 및 7)을 포함한다.

<91> 특정한 구현예에서, 서열번호: 1 또는 서열번호: 6의 전부 또는 일부를 포함하는 CD40 폴리펩티드, 펩티드 또는 다른 유도체, 또는 그의 동족체에 대한 항체는 이중특이성 항체이다(일반적으로, 예를 들어 문헌[Fanger and Drakeman, 1995, Drug News and Perspectives 8: 133-137]을 참조하시오). 상기과 같은 이중특이성 항체는 (1) 에피토프 및 (2) 다양한 “유발인자” 분자들, 예를 들어 골수 세포 상의 Fc 수용체, 및 T 세포 상의 CD3 및 CD2(이들은 세포독성 T-세포가 특정한 표적을 파괴할 수 있게 만드는 것으로서 동정되었다)들 중 하나를 모두 인식하도록 유전자 조작된다. 상기과 같은 이중특이성 항체들은 당해 분야의 숙련가들에 공지된 화학적 결합인 하이브리도마 또는 재조합 분자 생물 기법에 의해서 제조될 수 있다. 특정한 구현예에서, 상기 이중특이성 항체는 S2C6 중쇄 또는 경쇄 가변 도메인 또는 그의 CDR 서열을 포함하는 분자를 함유하며, 상기 분자는 항체 중쇄 또는 경쇄의 구조를 가지나 고유 S2C6의 중쇄 또는 경쇄와는 다르다(예를 들어, 하부구조 영역 또는 인간 항체의 불변 영역에 아미노산 치환(들)을 가짐으로써).

<92> CD40을 인식하는 능력을 보유하는 항체 단편을 공지된 기법들에 의해 제조할 수 있다. 예를 들어, 이러한 단편들에는 비제한적으로 F(ab') 단편(항체 분자의 펩신 절단에 의해 생성될 수 있다) 및 F(ab') 단편(상기 F(ab') 단편의 디설파이드 가교를 환원시킴으로써 생성될 수 있다)이 포함된다. 한편으로, Fab 발현 라이브러리를 제작하여(Huse, et al., 1989, Science 246, 1275-1282) 목적하는 특이성을 갖는 단일클론 Fab 단편들을 신속하고 용이하게 동정할 수 있다.

## <93> 5.7 S2C6 단백질, 유도체 및 동족체

<94> 상기 섹션 5.6에 개시된 항체 분자/변형체 이외에, 본 발명은 또한 S2C6 단백질, 그의 유도체(비제한적으로 단편들을 포함한다), 동족체 및 분자들에 관한 것이다. S2C6 단백질 유도체 및 단백질 동족체를 암호화하는 핵산을 또한 제공한다. 하나의 구현예에서, 상기 S2C6 단백질은 상기 섹션 5.1에 개시된 핵산에 의해 암호화된다. 특정한 구현예에서, 상기 단백질, 유도체 또는 동족체는 서열번호: 1 또는 서열번호: 6의 서열에 의해 암호화된다.

<95> S2C6 단백질과 관련된 유도체 및 동족체의 생산 및 용도는 본 발명의 범위 내에 있다. 특정한 구현예에서, 상기 유도체 또는 동족체는 작용적으로 활성이다, 즉 완전한 길이의 S2C6 단백질과 관련된 하나 이상의 작용 활성을 나타낼 수 있다. 일례로, 목적하는 결합 특이성을 갖는 상기과 같은 유도체 또는 동족체를 면역 분석, 또는 종양 증식의 억제 등에 치료학적으로 사용할 수 있다. 특정한 구현예는 CD40과 결합하고 CD40에 대한 CD40L의 결합을 강화하는 S2C6 단백질 단편에 관한 것이다. S2C6 단백질의 유도체 또는 동족체를 당해 분야에 공지된 다양한 면역분석들, 예를 들어 비제한적으로 방사능면역분석, 효소 결합된 면역흡착 분석(ELISA), “샌드위치” 면역분석, 웨스턴 블롯, 면역형광 분석, 단백질 A 분석, 면역전기영동 분석 등과 같은 기법을 사용하는 경쟁 및 비-경쟁 분석 시스템에 의해 목적하는 활성에 대해서 시험할 수 있다.

<96> 또한, 당해 분야에 공지된 분석들을 사용하여 생체 내 또는 생체 외에서 세포 증식을 억제(예를 들어 종양 세포

증식의 억제)하는 능력 또는 세포 증식(예를 들어 B 세포의 증식)을 자극하는 능력을 탐지 또는 측정할 수 있다.

<97> 특히, S2C6 서열을 작용적으로 동등한 분자를 제공하는 치환, 첨가(예: 삽입) 또는 결실에 의해 변경시킴으로써 S2C6 유도체를 제조할 수 있다. 뉴클레오티드 암호화 서열의 변성으로 인해, S2C6 유전자와 실질적으로 동일한 아미노산 서열을 암호화하는 다른 DNA 서열들을 본 발명의 실시예에 사용할 수 있다. 여기에는 비 제한적으로 서열 내에서 작용적으로 동일한 아미노산 잔가를 암호화하는 상이한 코돈들의 치환에 의해 변경되어, 무반응(silent) 변화를 생성시키는 S2C6 유전자의 전부 또는 일부를 포함하는 뉴클레오티드 서열이 포함된다. 마찬가지로, 본 발명의 S2C6 유도체에는 비 제한적으로 1차 아미노산 서열로서, 작용적으로 동일한 아미노산 잔기가 변경된 서열 내의 잔기와 치환되어 무반응 변화를 생성시키는 상기 변경된 서열을 포함하는 S2C6 단백질의 아미노산의 전부 또는 일부를 함유하는 것들이 포함된다. 예를 들어, 상기 서열 내의 하나 이상의 아미노산 잔기들은 작용상 등가물로서 작용하여 무반응 변화를 생성시킬 수 있는 유사 극성의 또 다른 아미노산으로 치환될 수 있다. 상기 서열 내의 아미노산 치환은 상기 아미노산이 속하는 군의 다른 구성원들 중에서 선택될 수 있다. 예를 들어, 비극성(소수성) 아미노산에는 알라닌, 류신, 이소류신, 발린, 프롤린, 페닐알라닌, 트립토판 및 메티오닌이 포함된다. 극성의 중성 아미노산에는 글리신, 세린, 스레오닌, 시스테인, 티로신, 아스파라긴 및 글루타민이 포함된다. 양으로 하전된(염기성) 아미노산으로는 아르기닌, 리신 및 히스티딘이 있다. 음으로 하전된(산성) 아미노산으로는 아스파르트산 및 글루탐산이 있다. 이러한 치환은 일반적으로 보존적인 치환인 것으로 이해된다.

<98> 본 발명의 특정한 구현예에서, S2C6 단백질의 10 개 이상의 (연속적인) 아미노산들로 이루어진 상기 S2C6 단백질의 단편으로 이루어지거나 또는 상기를 포함하는 단백질을 제공한다. 다른 구현예에서, 상기 단편은 상기 S2C6 단백질의 20 개 이상 또는 50 개 이상의 아미노산으로 이루어진다. 특정한 구현예에서, 상기과 같은 단편은 50, 75, 100 또는 200 개 이하의 아미노산으로 이루어진다. S2C6 단백질의 유도체 또는 동족체에는 비 제한적으로 S2C6 단백질 또는 그의 단편과 실질적으로 일치(예를 들어, 다양한 구현예에서 삽입 또는 결실이 없는 동일한 크기의 아미노산 서열에 대해서 또는 당해 분야에 공지된 컴퓨터 상동성 프로그램에 의해 정렬되는 정렬 서열에 비해 60%, 70%, 80%, 90% 또는 95% 이상 일치)하거나 또는 그의 암호화 핵산이 고도의 엄격성, 중간 엄격성 또는 낮은 엄격성 조건 하에서 암호화 S2C6 유전자 서열에 하이브리드를 형성할 수 있는 영역을 포함하는 분자가 포함된다.

<99> 구체적으로, 상동성 측정을 위한 컴퓨터 프로그램의 예로서, 비 제한적으로 TBLASTN, BLASTP, FASTA, TEASTA 및 CLUSTALW가 있을 수 있다[Pearson and Lipman, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85(8):2444-8; Altschul et al., 1990, J. Mol. Biol. 215(3):403-10; Thompson, et al., 1994, Nucleic Acids Res. 22(22):4673-80; Higgins, et al., 1996, Methods Enzymol 266:383-402; Altschul, et al., 1990, J. Mol. Biol. 215(3):403-10]. 이러한 컴퓨터 프로그램들 각각에 대한 디폴트 변수들은 잘 공지되어 있으며 이용될 수 있다.

<100> 구체적으로, 베이직 로컬 얼라인먼트 씨치 툴(BLAST)(www.ncbi.nlm.nih.gov)[Altschul et al., 1990, J. of Molec. Biol., 215:403-410, "The BLAST Algorithm; Altschul et al., 1997, Nuc. Acids Res. 25:3389-3420]은 문헌[Karlin and Altschul 1990, Proc. Natl Acad. Sci. USA, 87:2264-68; 1993, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 90:5873-77]의 통계적 방법을 사용하는 유의수준에 기여하는 서열 유사성을 찾는 데 맞춰진 발견적인 탐색 연산이다. 5 개의 특정한 BLAST 프로그램들은 하기의 업무를 수행한다, 즉 1) BLASTP 프로그램은 의문의 아미노산 서열을 단백질 서열 데이터 베이스에 대해 비교하고; 2) BLASTN 프로그램은 의문의 뉴클레오티드 서열을 뉴클레오티드 서열 데이터 베이스에 비교하고; 3) BLASTX 프로그램은 의문의 뉴클레오티드 서열(두 스트랜드 모두)에 대한 6-프레임의 개념상 번역 산물을 단백질 서열 데이터 베이스에 비교하고; 4) TBLASTN 프로그램은 의문의 단백질 서열을 6 개의 판독 프레임(두 스트랜드 모두) 모두에서 번역된 뉴클레오티드 서열 데이터 베이스에 비교하고; 5) TBLASTX 프로그램은 의문의 뉴클레오티드 서열의 6-프레임 번역을 뉴클레오티드 서열 데이터 베이스의 6-프레임 번역에 대해 비교한다.

<101> 스미스-워터맨(Smith-Waterman)(데이터 베이스: 유럽 생물 과학 정보 연구소 www.ebi.ac.uk/bic\_sw/)[Smith-Waterman, 1981, J. of Molec. Biol., 147: 195-197]은 서열 정렬에 대해 수학적으로 정확한 연산이다.

<102> FASTA(문헌[Pearson et al., 1988, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA, 85:2444-2448]을 참조하시오)는 상기 스미스-워터맨 연산에 대한 발견적인 근사치이다. 상기 BLAST, 스미스-워터맨 및 FASTA 연산의 과정 및 이점에 대한 일반적인 논의에 대해서 문헌[Nicholas et al., 1998, "A Tutorial on Searching Sequence Databases and Sequence Scoring Methods"(www.psc.edu)] 및 상기 문헌에서 인용된 참고문헌들을 참조하시오.

- <103> 본 발명의 S2C6 유도체 및 동족체를 당해 분야에 공지된 다양한 방법들에 의해 제조할 수 있다. 상기를 생성시키는 조작은 유전자 또는 단백질 수준에서 수행될 수 있다. 예를 들어, 클로닝된 S2C6 유전자 서열을 당해 분야에 공지된 임의의 다수의 전략들에 의해 변형시킬 수 있다[Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York]. 상기 서열을 제한 엔도뉴클레아제(들)을 사용하여 적합한 부위에서 절단한 다음, 경우에 따라 추가로 효소에 의해 변형시키고, 분리시키고, 생체 외에서 연결시킬 수 있다. 상기 S2C6 단백질의 유도체 또는 동족체를 암호화하는 변형된 유전자의 제조에서, 상기 변형된 유전자가 고유 단백질과 동일한 번역 판독 프레임 내에서 유지되고 목적하는 S2C6 단백질 활성을 암호화하는 유전자 영역에서 번역 정지 신호들에 의해 중단되지 않도록 주의해야 한다.
- <104> 추가로, S2C6 핵산 서열을 생체 외 변형을 더욱 용이하게 하기 위해서 번역, 개시 및/또는 종결 서열의 생성 및/또는 파괴, 또는 암호화 영역의 변화 생성 및/또는 새로운 제한 엔도뉴클레아제 부위의 형성 또는 기존 부위의 파괴를 위해 생체 외 또는 생체 내에서 변이시킬 수 있다. 당해 분야에 공지된 임의의 돌연변이유발 기법들, 예를 들어 비 제한적으로 화학적 돌연변이, 생체 외 부위-지향된 돌연변이[Hutchinson et al., 1978, J. Biol. Chem. 253:6551], 변이를 함유하는 프라이머를 사용하는 PCR 등을 사용할 수 있다.
- <105> S2C6 단백질 서열의 조작을 또한 단백질 수준에서도 수행할 수 있다. 본 발명에 포함되는 것은 예를 들어 글리코실화, 아세틸화, 인산화, 아마이드화, 공지된 보호/차단 그룹에 의한 유도체화, 단백질 분해적 절단, 항체 분자 또는 다른 세포 리간드와의 결합 등에 의해 번역 중 또는 번역 후에 차등적으로 변형되는 S2C6 단백질 단편 또는 다른 유도체 또는 동족체이다. 다수의 화학적 변형들 중 임의의 변형을 공지된 기법, 예를 들어 비 제한적으로 시아노겐 브로마이드, 트립신, 키모트립신, 파파인, V8 프로테아제, NaBH, 아세틸화, 포르밀화, 산화, 환원, 투니카마이신 존재 하의 대사적 합성 등에 의해 수행할 수 있다.
- <106> 또한, S2C6 단백질의 동족체 또는 유도체를 화학적으로 합성할 수 있다. 예를 들어, 목적하는 도메인을 포함하거나, 또는 생체 외에서 목적하는 활성을 매개하는 S2C6 단백질의 일부에 상응하는 펩티드를 펩티드 합성기를 사용하여 합성할 수 있다. 더욱 또한, 경우에 따라, 비 전형적인 아미노산 또는 화학적 아미노산 동족체를 치환 또는 첨가로서 S2C6 서열에 도입시킬 수 있다. 비 전형적인 아미노산에는 비 제한적으로 통상적인 아미노산의 D-이성체들,  $\alpha$ -아미노 이소부티르산, 4-아미노부티르산, Abu, 2-아미노 부티르산,  $\gamma$ -Abu,  $\epsilon$ -Ahx, 6-아미노 핵사노산, Aib, 2-아미노 이소부티르산, 3-아미노 프로피온산, 오르니틴, 노르류신, 노르발린, 하이드록시프롤린, 사르코신, 시트룰린, 시스테인산, t-부틸글리신, t-부틸알라닌, 페닐글리신, 사이클로헥실알라닌,  $\beta$ -알라닌, 플루오로-아미노산, 모사 아미노산, 예를 들어  $\beta$ -메틸 아미노산, C $\alpha$ -메틸 아미노산, N $\alpha$ -메틸 아미노산, 및 일반적인 아미노산 동족체가 포함된다. 더욱 또한, 상기 아미노산은 D(우선성) 또는 L(좌선성)일 수 있다.
- <107> 다른 특정한 구현예들에서, S2C6 단백질, 단편, 동족체 또는 유도체를 융합 또는 키메라 단백질 생성물(상이한 단백질의 이중 단백질 서열에 대한 펩티드 결합을 통해 결합된 단백질, 단편, 동족체 또는 유도체 포함)로서 발현시킬 수 있다. 상기 이중 단백질 서열은 생물 반응 조절제, 예를 들어 비 제한적으로 인터페론- $\alpha$ , 인터페론  $\gamma$ , 인터류킨-2, 인터류킨-4, 인터류킨-6, 및 중앙 피사 인자 또는 그의 작용적으로 활성인 부분을 포함할 수 있다. 한편으로, 상기 이중 단백질 서열은 효소, 예를 들어  $\beta$ -락타마제 또는 카복실에스테라제 또는 독소, 예를 들어 브리오딘 1, 슈도모나스 엑소톡신 A, 또는 겔로닌, 또는 그의 작용 활성 부분을 포함할 수 있다. 또한, 상기 S2C6 단백질은 화학요법제, 예를 들어 비 제한적으로 알킬화제(예: 질소 머스타드, 니트로소우레아, 트리아젠); 항대사산물(예: 폴산 동족체, 피리미딘 동족체, 퓨린 동족체); 천연 생성물(예: 항생제, 효소, 생물 반응 조절제); 갖가지 작용제(예: 치환된 우레아, 백금 배위 착체); 및 호르몬 및 길항물질(예: 에스트로겐, 안드로겐, 항안드로겐, 고나도트로핀 방출 호르몬 동족체); 또는 그의 작용 활성 부분에 화학적으로 결합될 수 있다.(예를 들어 문헌[Goodman and Gilman, The Pharmacological Basis of Therapeutics, Ninth Edition, McGraw-Hill, pp. 1225-1287, 1996]). 이러한 키메라 생성물을 목적하는 아미노산 서열을 암호화하는 적합한 핵산 서열을 서로 당해 분야에 공지된 방법에 의해 적합한 암호화 프레임에서 연결시키고, 상기 키메라 생성물을 당해 분야에 통상적으로 공지된 방법들에 의해 발현시킴으로써 제조할 수 있다. 한편으로, 상기와 같은 키메라 생성물을 단백질 합성 기법, 예를 들어 펩티드 합성기의 사용에 의해 제조할 수 있다. 다른 구현예들에서, 상기 이중 단백질 서열을 펩티드 결합 이외의 방법, 예를 들어 당해 분야에 널리 공지된 화학적 가교결합제를 사용하여 S2C6-관련 서열에 공유 결합시킬 수 있다.
- <108> 특정한 구현예에서, S2C6 단백질 유도체는 펩티드 결합을 통해 그의 아미노- 또는 카복시 말단에서 상이한 단백질의 아미노산 서열에 결합된 S2C6 단백질 또는 그의 단편(바람직하게는 S2C6 단백질의 하나 이상의 도메인 또



는 동기, 또는 S2C6 단백질의 10, 50 또는 100 개 이상의 아미노산으로 이루어진다)을 포함하는 키메릭 또는 융합 단백질이다. 특정한 구현예에서, 상이한 단백질은 독소, 효소 또는 생물 반응 조절제이다.

<109> 특정한 구현예들에서, 상기 상이한 단백질의 아미노산 서열은 작용 활성인 상기 상이한 단백질 또는 그의 일부의 6, 10, 20 또는 30 개 이상의 연속적인 아미노산이다. 하나의 구현예에서, 상기과 같은 키메릭 단백질은 상기 단백질을 암호화하는 핵산(상이한 단백질에 대한 암호화 서열에 프레임 내 결합된 S2C6 암호화 서열을 포함한다)의 재조합 발현에 의해 생산된다. 상기과 같은 키메릭 생성물을 목적하는 아미노산 서열을 암호화하는 적합한 핵산 서열들을 서로 당해 분야에 공지된 방법에 의해 적합한 암호화 프레임에서 연결시키고, 상기 키메릭 생성물을 당해 분야에 통상적으로 공지된 방법들에 의해 발현시킴으로써 제조할 수 있다. 한편으로, 상기과 같은 키메릭 생성물을 단백질 합성 기법, 예를 들어 펩티드 합성기의 사용에 의해 제조할 수 있다. 임의의 이중 단백질 암호화 서열에 융합된 S2C6 유전자의 일부를 포함하는 키메릭 유전자를 제작할 수도 있다.

특정한 구현예는 6, 15 또는 50 개 이상의 아미노산을 갖는 S2C6 단백질의 단편, 또는 상기 S2C6 단백질의 하나 이상의 작용 활성을 나타내는(예를 들어 하나 이상의 CDR 복제물을 포함하는) 단편을 포함하는 키메릭 단백질에 관한 것이다.

<110> 특정한 구현예에서, S2C6 단백질 또는 그의 유도체를, 비 제한적으로 독소루비신, 패클리탁셀 또는 도세탁셀을 포함한 화학요법 약물에 화학적으로 결합시킨다. 상기과 같은 S2C6-약물 접합물은 상기 약물을 CD40을 발현하는 세포로 전달할 수 있다. 하나 이상의 약물 분자들을 S2C6 단백질 또는 유도체에 결합시킬 수 있다. 결합에는 비 제한적으로 히드라존, 펩티드 또는 탄수화물 결합이 포함된다.

<111> 또 다른 특정한 구현예에서, 상기 유도체는 S2C6와의 상동 영역을 포함하는 분자이다. 예로서, 다양한 구현예들에서, 제 1 단백질 영역을 상기 제 1 영역의 아미노산 서열이 상기 제 1 영역(어떠한 삽입이나 결실이 없는)에 함유된 수와 동일한 수의 아미노산을 갖는 제 2 아미노산 영역의 임의의 서열과 비교할 때 또는 당해 분야에 공지된 컴퓨터 상동성 프로그램에 의해 정렬된 제 2 영역의 정렬된 서열과 비교할 때 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90% 또는 95% 이상 일치하는 경우 상기 제 2 단백질에 대해 “상동성”인 것으로 간주할 수 있다.

## <112> 5.8 하이브리드화 조건

<113> 특정한 구현예에서, 낮은 엄격성 조건 하에서 S2C6 핵산(예를 들어, 서열번호: 1 또는 6에 나타난 서열을 가짐) 또는 그의 역 보완물, 또는 S2C6 유도체를 암호화하는 핵산 또는 그의 역 보완물에 하이브리드를 형성시킬 수 있는 핵산을 제공한다. 예로서, 비 제한적으로 상기과 같은 낮은 엄격성 조건을 사용하는 과정은 다음과 같다(또한 문헌[Shilo and Weinberg, 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78, 6789-6792]을 참조하십시오). DNA 함유 필터를 40 °C에서 35% 포름아미드, 5X SSC, 50 mM 트리스-HCl(pH 7.5), 5 mM EDTA, 0.1% PVP, 0.1% 피콜, 1% BSA 및 500 µg/ml의 변성된 연어 정액 DNA를 함유하는 용액에서 6 시간 동안 예비 처리한다. 상기 용액에서 하기와 같이 변형시켜 하이브리드화를 수행한다: 0.02% PVP, 0.02% 피콜, 0.2% BSA, 100 µg/ml의 연어 정액 DNA, 10%(중량/부피) 텍스트란 설페이트, 및 5-20 ×10 cpm의 P-표지된 탐침을 사용한다. 필터를 40 °C에서 18 내지 20 시간 동안 하이브리드화 혼합물 중에서 배양하고, 이어서 55 °C에서 2X SSC, 25 mM 트리스-HCl(pH 7.4), 5 mM EDTA 및 0.1% SDS를 함유하는 용액으로 1.5 시간 동안 세척한다. 상기 세척액을 새로운 용액으로 갈고 60 °C에서 추가로 1.5 시간 동안 배양한다. 필터를 흡수 건조시키고 방사능 사진 촬영을 위해 노출시킨다. 경우에 따라, 필터를 65 ~ 68 °C에서 세 번째로 세척하고 필터에 재 노출시킨다. 사용될 수 있는 다른 저 엄격성 조건은 당해 분야에 널리 공지되어 있다(예를 들어, 교차-종 하이브리드화 사용).

<114> 특정한 구현예에서, 고도의 엄격성 조건 하에서 S2C6 핵산(예를 들어, 서열번호: 1 또는 6에 나타난 서열을 가짐) 또는 그의 역 보완물, 또는 S2C6 유도체를 암호화하는 핵산 또는 그의 역 보완물에 하이브리드를 형성시킬 수 있는 핵산을 제공한다. 예로서, 비 제한적으로 상기과 같은 고도의 엄격성 조건을 사용하는 과정은 다음과 같다. DNA 함유 필터의 예비 하이브리드화를 65 °C에서 6X SSC, 50 mM 트리스-HCl(pH 7.5), 1 mM EDTA, 0.02% PVP, 0.02% 피콜, 0.02% BSA 및 500 µg/ml의 변성된 연어 정액 DNA로 구성된 완충액에서 8 시간 동안 밤새 수행한다. 필터를 65 °C에서 100 µg/ml의 변성된 연어 정액 DNA 및 5 ~ 20 ×10 cpm의 P-표지된 탐침을 함유하는 예비 하이브리드화 혼합물에서 48시간 동안 하이브리드화시킨다. 필터를 37 °C에서 1 시간 동안 2X SSC, 0.01% PVP, 0.01% 피콜 및 0.01% BSA를 함유하는 용액으로 세척한다. 이어서 50 °C에서 45 분 동안 0.1X SSC에서 세척한 후에 방사능 사진 촬영한다. 사용될 수 있는 다른 고도의 엄격성 조건은 당해 분야에 널리 공지되어 있다.

<115> 특정한 구현예에서, 중간의 엄격성 조건 하에서 S2C6 핵산(예를 들어, 서열번호: 1 또는 6에 나타난 서열을 가

짐) 또는 그의 역 보완물, 또는 S2C6 유도체를 암호화하는 핵산 또는 그의 역 보완물에 하이브리드를 형성시킬 수 있는 핵산을 제공한다. 상기와 같은 엄격성에 적합한 조건을 선택하는 것은 당해 분야에 널리 공지되어 있다(예를 들어 문헌[Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2d Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York; Ausubel et al., eds., in the Current Protocols in Molecular Biology series of laboratory technique manuals, 1987-1997 Current Protocols, 1994-1997 John Wiley and Sons, Inc.]을 참조하시오).

<116> 5.9 치료 용도

<117> 본 발명은 치료 화합물(본 원에서는 “치료제”라 칭한다)의 투여에 의한 다양한 질병 또는 장애의 치료 또는 예방을 제공한다. 이러한 치료제에는 비 제한적으로 S2C6 항체 및 그의 유도체(예: 상술한 바와 같음); 및 상기와 같은 S2C6 항체 및 유도체를 암호화하는 핵산(예: 상술한 바와 같음)이 포함된다. 본 발명에 사용된 “치료”는 질병 또는 장애에 대해 임의의 임상적으로 바람직하거나 유리한 효과, 예를 들어 비 제한적으로 하나 이상의 증상의 완화, 역행, 진행의 지체 또는 저지 등을 포함하는 것으로 간주될 것이다.

<118> 본 발명의 특정할 구현예들에서, 상기 치료제를 악성 종양(비 제한적으로 암종 및 혈액암을 포함함), 염증성 질환, 및 면역계 장애의 치료 또는 예방을 위해 단독으로 또는 CD40L과 함께 투여한다. 상기 치료제 및 CD40L은, 필요한 것은 아니지만, 동일한 제형 내에 함유될 수 있다, 즉 상기 치료제와 CD40을 별도로 그러나 동시에, 또는 동일한 치료 과정 동안 투여할 수 있다. 특정한 구현예에서, 상기 악성 세포는 CD40을 발현한다. 한편으로, 상기 악성 세포는 CD40을 발현할 필요가 없는데, 그 이유는 악성 종양과 관련된 맥관 구조의 내피 세포가 CD40을 발현할 것이며 따라서 본 발명의 치료제는 CD40을 발현하지 않는 종양에 대해서조차도 치료 효능을 제공할 것이다. 바람직한 구현예에서, 상기 치료제는 CD40에 대한 CD40L의 결합을 45%, 50%, 60% 또는 65% 이상 강화시킨다.

<119> 특정한 구현예들에서, 상기 치료제를 면역 억제된 개인, 예를 들어 후천성 면역결핍증, 악성 종양을 앓고 있는 사람, 또는 유아 또는 노인의 면역 반응을 증가시키는데 사용한다.

<120> 본 발명의 다른 구현예들에서, 상기 치료제를 상기가 결합하는 세포가 사멸되도록 화학적으로 변형시킬 수도 있다. 이러한 세포에는 비 제한적으로 다발성 골수종 세포, 림프종 세포 또는 암종이 포함된다. 모든 B-세포가 CD40을 발현하므로, 이러한 접근법으로 면역 반응을 억제시킬 수 있다. 예를 들어, S2C6 서열에 결합된 세포독성 약물(예: 융합 단백질)을 이식 환자에서 조직 적합성 차단제를 뛰어 넘도록 면역 억제를 유발시키기 위해서 생체 내에서 사용할 수 있으며; 한편으로, 이들 변형된 리간드들을 자가면역 질환의 억제에 사용할 수도 있다.

<121> 다른 구현예들에서, 상기 치료제를 직접적인 악성 종양 치료 수단으로서 또는 화학요법에 대한 보조물로서, B 세포가 아닌 CD40-함유 세포, 예를 들어 폐암 세포의 증식 및/또는 분화를 촉진시키는데 사용할 수 있다.

<122> 본 발명의 치료제를 사용하여 치료 또는 예방될 수 있는 악성종양들에는 다음 표 1의 것들이 포함되나, 이들로 제한되지 않는다:

표 1

악성종양 및 그와 관련된 장애

백혈병

급성 백혈병

급성 림프구성 백혈병

급성 골수구성 백혈병

골수아구성

전골수구성

골수단구성

단구성

적백혈병

만성 백혈병

만성 골수구성(과립구성) 백혈병

만성 림프구성 백혈병

진성다혈구증

림프종

호지킨질환

비호지킨질환

다발성골수종

왈덴스트롬 마크로글로불린혈증

중쇄 질환

고형종양

육종과 암종

섬유육종

점액육종

지방육종

연골육종

골원성육종

골육종

척삭종

혈관육종

내피육종

림프관육종

림프관내피육종

활막성종양

증피종

유잉 종양

평활근육종

횡문근육종

결장암

대장암

췌장암

유방암



<124> (계속)

난소암  
전립선암  
편평세포암  
기저세포암  
선암  
한선암  
피지선암  
유두상암  
유두상선암  
낭종암  
수양암  
기관지암  
신세포암  
간세포암  
담관암  
융모암  
정상피종  
태생기암  
월름 종양  
경부암  
자궁암  
고환 종양  
폐암  
소세포폐암  
비소세포폐암  
방광암  
상피암  
신경교종  
성상세포종  
수아세포종  
두개인두종  
상의세포종  
송과체종  
혈관모세포종  
청신경종  
회돌기신경교종  
메난지오(menangioma)  
악성 흑색종  
신경아종  
망막아세포종  
비인두암  
식도암

<125>

<126> 본 발명의 치료제를 사용하여 치료 또는 예방될 수 있는 염증성 질환 및 면역계의 결핍증 또는 장애에는 다음 표 2의 것들이 포함되나, 이들로 제한되지 않는다:

표 2

염증성 질환 및 면역계 질환
전신성홍반성루푸스(SLE)
강피증(예, CRST 증후군)
염증성 근육염
스피르겐 증후군(SS)
혼합결합조직병(예, MCTD, 샤프 증후군)
만성관절 류마티즘
다발성경화증
염증성장질환(예, 궤양성대장염, 크론 증후군)
급성호흡부진곤란증후군
폐의 염증
골다공증
지연형과민증
천식
원발성담즙성간경변증(PBC)
특발성혈소판감소성자반병(ITP)

<127>

<128>

#### 5.9.1 유효용량

<129>

상기와 같은 치료제의 독성 및 치료 효능을 예를 들어 LD(집단의 50%가 치사하는 용량) 및 ED(집단의 50%에서 치료 효과적인 용량)를 측정하기 위한, 세포 배양액 또는 실험 동물에서의 표준 약학 절차에 의해 측정할 수 있다. 독성 효과와 치료 효과간의 용량 비가 치료 지수이며 이를 LD/ED의 비로서 나타낼 수 있다. 큰 치료 지수를 나타내는 치료제가 바람직하다. 독성 부작용을 나타내는 치료제를 사용하는 동안에는, 감염되지 않은 세포에 대한 잠재적인 손상을 최소화하고 이에 의해 부작용을 감소시키기 위해서 상기와 같은 화합물을 침범된 조직으로 표적화하는 전달 시스템의 고안에 주의를 기울여야 한다.

<130>

세포 배양액 분석 및 동물 연구로부터 얻어진 데이터를 인간에 사용하기 위한 용량 범위를 명확히 나타내는데 사용할 수 있다. 전형적인 용량에는 1 ng/kg 내지 100 mg/kg이 있으나, 이것으로 제한되지 않는다. 상기와 같은 치료제의 용량은 바람직하게는 독성이 거의 없거나 전혀 없는 ED를 포함하는 순환 농도 범위 내에 있다. 상기 용량을 사용하는 투여형 및 사용되는 투여 경로에 따라 상기 범위 내에서 변화시킬 수 있다. 치료제에 대해서, 치료 유효량은 바람직하게는 세포 배양액 분석으로부터 초기에 추정될 수 있다. 세포 배양액에서 측정되는 IC(증상의 최대 억제제의 1/2를 달성하는 시험 화합물의 농도)을 포함하는 순환 혈장 농도 범위를 이루기 위한 용량을 동물 모델에서 명확히 나타낼 수 있다. 이러한 정보를 이용하여 인간에서 유용한 용량을 보다 정확하게 측정할 수 있다. 혈장 중 수준을 예를 들어 고성능 액체 크로마토그래피에 의해 측정할 수 있다.

<131>

#### 5.9.2 제형화

<132>

본 발명에 따라 사용하기 위한 약제 조성물을 하나 이상의 생리학적으로 허용가능한 담체 또는 부형제를 사용하여 통상적인 방식으로 제형화할 수 있다.

<133>

따라서, 상기 치료제 및 그의 생리학적으로 허용가능한 염 및 용매화물을 흡입 또는 취입(입 또는 코를 통해서), 또는 경구, 구강, 비 경구 또는 직장 투여에 의해 투여하기 위해서 제형화할 수 있다.

<134>

경구 투여를 위해서, 상기 약제 조성물은 예를 들어 약학적으로 허용가능한 부형제, 예를 들어 결합제(예: 예비 젤라틴화된 옥수수 전분, 폴리비닐피롤리돈 또는 하이드록시프로필 메틸셀룰로즈); 충전제(예: 락토오즈, 미정질 셀룰로즈 또는 인산 수소 칼슘); 윤활제(예: 스테아르산 마그네슘, 활석 또는 실리카); 봉해제(예: 감자 전분 또는 나트륨 전분 글리콜레이트); 또는 습윤제(예: 나트륨 라우릴 설페이트)와 함께 통상적인 수단에 의해

제조된 정제 또는 캡슐의 형태를 취할 수 있다. 상기 정제를 당해 분야에 널리 공지된 방법으로 코팅시킬 수도 있다. 경구 투여용 액체 제제는 예를 들어 용액, 시럽 또는 현탁액의 형태를 취하거나, 또는 상기를 사용 전에 물이나 다른 적합한 비히클로 제조성하기 위한 건조 생성물로서 제공할 수도 있다. 이러한 액체 제제는 약학적으로 허용가능한 첨가제, 예를 들어 현탁제(예: 솔비톨 시럽, 셀룰로즈 유도체 또는 수소화된 식용 지방); 유화제(예: 레시틴 또는 아라비아 고무); 비-수성 비히클(예: 아몬드 오일, 유질 에스테르, 에틸 알콜 또는 분류된 식물성 오일); 및 보존제(예: 메틸 또는 프로필-p-하이드록시벤조에이트 또는 소르브산)를 사용하여 통상적인 수단에 의해 제조될 수 있다. 상기 제제는 또한 완충 염, 풍미제, 착색제 및 감미제를 적당하게 함유할 수도 있다.

<135> 경구 투여용 제제를 유효 화합물의 조절된 방출을 제공하기 위해서 적합하게 제형화할 수 있다.

<136> 구강 투여용의 상기 조성물은 통상적인 방식으로 제형화된 정제 또는 로젠지의 형태를 취할 수 있다.

<137> 흡입에 의한 투여를 위해서, 본 발명에 따라 사용하기 위한 치료제를 편의상 적합한 분사제, 예를 들어 디클로로디플루오로메탄, 트리클로로플루오로메탄, 디클로로테트라플루오로에탄, 이산화 탄소 또는 다른 적합한 기체를 사용하여, 가압된 팩 또는 연무기로부터의 에어로졸 스프레이 형태로 전달한다. 가압된 에어로졸의 경우에, 투여 단위는 계량된 양을 전달하는 밸브를 제공함으로써 측정될 수 있다. 흡입기 또는 취입기에 사용하기 위해서 상기 화합물 및 락토오스 또는 전분과 같은 적합한 분말 베이스의 분말 혼합물을 함유하는, 예를 들어 젤라틴의 캡슐 또는 카트리지를 제형화할 수 있다. 주사용 제형을 단위 투여형, 예를 들어 앰풀 또는 수회 용량 용기로 보존제와 함께 또는 상기 없이 제공할 수 있다. 상기 조성물은 유성 또는 수성 비히클 중의 현탁액, 용액 또는 유화액과 같은 형태를 취할 수 있으며, 현탁제, 안정화제 및/또는 분산제와 같은 제형화제를 함유할 수도 있다. 한편으로, 유효 성분은 사용 전에 적합한 비히클, 예를 들어 멸균 발열물질-비 함유 수로 재 조성되는 분말 형태일 수 있다.

<138> 상기 치료제를 또한 예를 들어 코코아 버터 또는 다른 글리세라이드와 같은 통상적인 좌제 베이스를 함유하는 좌제 또는 정제 관장제와 같은 직장 조성물로 제형화할 수 있다.

<139> 상술한 제형들 이외에, 상기 치료제를 또한 데포 제제로서 제형화할 수도 있다. 상기과 같은 장기간 작용성 제형들은 피하 주입(예를 들어, 피하 또는 근육 내로) 또는 근육 내 주입에 의해 투여될 수 있다. 따라서, 예를 들어 상기 치료제를 적합한 중합체 또는 소수성 물질(예를 들어 허용가능한 오일 중의 유화액으로서) 또는 이온 교환 수지와 함께, 또는 드물게 가용성인 유도체로서, 예를 들어 드물게 가용성인 염으로서 제형화할 수 있다.

<140> 상기 조성물을 경우에 따라 유효 성분을 함유하는 하나 이상의 단위 투여형을 함유할 수 있는 팩 또는 분배 장치로 제공할 수도 있다. 상기 팩은 예를 들어 금속 또는 플라스틱 호일, 예를 들어 발포 팩을 포함할 수 있다. 상기 팩 또는 분배 장치에는 인간에게 바람직하게 투여하기 위한 투여 설명서가 첨부될 수도 있다.

<141> 특정한 구현예들에서, 본 발명은 치료 유효량의 치료제를 CD40 리간드와 함께 포함하는 약제 조성물을 제공한다.

<142> 본 발명을 다음 실시예에서 추가로 개시하며, 이들 실시예는 본 발명의 범위를 제한하지 않는다.

## 실시예

<143> 6. 실시예: S2C6 가변영역(variable region)의 클로닝

<144> 6.1 재료 및 방법

<145> S2C6 경쇄(light chain)와 중쇄(heavy chain)의 가변영역(variable region)을 길리랜드(Gilliland) 등[1996, Tissue Antigens 47: -20]에 기재된 방법에 따라 클로닝하였다. 총 RNA를 S2C6 하이브리도마(hybridoma)로부터 추출한 후, 역전사효소 및 JC 접합부(junction)의 약 100 bp 하단부(downstream)에 부착(anneal)되는 안티센스 프라이머(anti-sense primer)를 사용하여 마우스의 카파(kappa) 경쇄 및 중쇄의 가변영역에 대한 제1상보 DNA 가닥(first complementary DNA; cDNA)을 제조하였다.

<146> 말단기전이효소(terminal transferase)를 사용하여 폴리-G 꼬리를 상기 cDNA에 부착시킨 후 PCR을 사용하여 이중가닥(double stranded) DNA를 제조하였다. 폴리-G 꼬리 또는 경쇄 나 중쇄의 cDNA 안쪽의 약 50 bp에 대해 특이성을 갖는 PCR 프라이머들은 단일 제한효소자리들을 갖도록 제작되었다. PCR 증폭 후 PCR생산물물을 EcoRI 및 HindIII로 자른 후 역시 동일한 제한효소로 자른 pUC19 플라스미드에 삽입 및 연결시켜 대장균

DH5 α에 형질전환시킨 후 상기의 결과로 얻어지는 클론을 제한분석(restriction analysis)을 통하여 검침(screen)하였다. 제한효소분석결과 양성을 보인 클론은 LiCor 형광 시퀀서(fluorescence sequencer)를 사용하여 DNA염기서열을 판독하였다. 경쇄 가변영역(VL)의 염기서열(서열번호 1) 및 아미노산 서열(서열번호 2)은 도 1에 표시되어 있고, 중쇄 가변영역(VH)의 염기서열(서열번호 6) 및 아미노산 서열(서열번호 7)은 도 2에 표시되어 있다. 도 3A-3B는 각각 S2C6 VL 및 S2C6 VH를 나타내고 있으며 CDRs는 밑줄을 그어 놓았다.

VL CDRs 1-3의 아미노산 서열은 각각 서열번호 3-5에 해당하며 VH CDRs 1-3의 아미노산 서열은 각각 서열번호 8-10에 해당한다.

<147> 상기로부터 얻어진 DNA염기서열은 동기준표본(isotype)을 갖는 다른 설치류의 항체의 경쇄 및 중쇄의 가변영역과 비교하여 S2C6로부터 추출된 유전자에 대한 리딩프레임(reading frame) 및 그 해당 아미노산 서열을 결정하였다. 이 아미노산 서열을 확인하기 위하여 S2C6 mAb의 경쇄 및 중쇄의 가변영역을 N-말단 아미노산 분석으로 검증하였다.

<148> S2C6 VL, S2C6 VH 및 VL과 VH의 CDRs의 아미노산 서열은 NR 데이터베이스(모든 비중복적인 GenBank CDS translations + PDS + SwissProt + PIR + PRF) 및 Kabat 데이터베이스(면역학적 관계가 있는 서열에 대한 Kabat의 데이터베이스)를 사용하여 1999년 4월 21일 BLASTP 조사를 위해 제출하였다. NR 데이터베이스로 찾은 서열은 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>에서 접근번호(Accession No.)를 사용하여 활용할 수 있으며 Kabat 데이터베이스로 찾은 서열은 [http://immuno.bme.nwu.edu/database\\_.html](http://immuno.bme.nwu.edu/database_.html)에서 및 SEQHUNT II를 통해 접근번호를 사용하여 활용할 수 있다.

<149> NR 데이터베이스를 통한 BLASTP검색

<150> **S2C6 VL**(서열번호 2): NR 데이터베이스의 BLASTP조사를 통해 S2C6 VL을 검색해 본 결과 100% 동일한 것은 1개도 없었으며 94%(106/112) 동일한 것은 6개가 있었는데 이들 6개는 다음과 같다.

<151> pir || PT0359 IgG 카파쇄 V 영역 (R4A.12) -마우스 (단편)

<152> gi | 196660 (M59949) 면역글로불린 카파-쇄 VJ영역 [Mus musculus]

<153> gi | 196954 (M12183) 카파-쇄 V-영역[Mus musculus]>gi | 2247 [Mus musculus]

<154> pir || B34904 Ig 카파쇄 전구체 V 영역 (12-40 및 5-14)...

<155> emb | CAA80076 | (Z22102) 면역글로불린 가변영역[Mus musculus]

<156> dbj | BAA22172 | (AB006833) 안티-슈도유리딘 단일클론 항체...

<157> **VL CDR1**(서열번호 3): BLASTP조사를 통해 VL CDR1을 검색해 본 결과 100% 동일한 것은 1개도 없었으며 93%(15/16) 동일한 것은 상당히 많았는데 이들 중 처음 5개는 다음과 같다.

<158> dbj | BAA03480 | (D14627) 면역글로불린 감마-3 카파쇄 [Mus musculus]

<159> dbj | BAA22172 | (AB006833) 항-슈도유리딘 단일클론 항체...

<160> gi | 4101647 (AF005352) 면역글로불린 V 영역 경쇄 [Mus musculus]

<161> gi | 3377681 (AF078800) 단일쇄 항-HIV-1 Rev 가변 단편...

<162> gi | 1870366 (U55625) 항-DNA 면역글로불린 경쇄 IgM [Mus musculus]

<163> **VL CDR2**(서열번호 4): NR 데이터베이스의 BLASTP조사를 통해 VL CDR2를 검색해 본 결과 유사한 것이 1개도 없었다.

<164> **VL CDR3**(서열번호 5): NR 데이터베이스의 BLASTP조사를 통해 VL CDR3를 검색해 본 결과 유사한 것이 1개도 없었다.

<165> **S2C6 VH**(서열번호 7): NR 데이터베이스의 BLASTP조사를 통해 S2C6 VH를 검색해 본 결과 100% 동일한 것은 1개도 없었으며 88% 동일한 것은 상당히 많았는데 이들 중 처음 5개는 다음과 같다.

<166> gi | 3561044 (AF083186) 항-HIV-1 p24 항체 D2 중쇄 [Mus musculus]

<167> pdb | 1A6T | B쇄 B, Mab-Ia 단일클론 항체의 Fab 단편

- <168> gi | 2895955 (AF045895) IgG1 중쇄 mAB1-IA [Mus musculus]
- <169> emb | CAA80023 | (Z22049) 면역글로불린 가변영역[Mus musculus]
- <170> gi | 194510 (M91695) 면역글로불린 감마-1쇄 [Mus musculus]
- <171> **VH CDR1**(서열번호 8): NR 데이터베이스의 BLASTP조사를 통해 VH CDR1을 검색해 본 결과 유사한 것이 1개도 없었다.
- <172> **VH CDR2**(서열번호 9): BLASTP조사를 통해 VH CDR2를 검색해 본 결과 100% 동일한 것은 1개도 없었으며 94%(16/17) 동일한 것이 1개 있었고 94% 미만이 동일한 것은 상당히 많았는데 이들 중 94%가 동일한 것은 다음과 같다.
- <173> gi | 3561044 (AF083186) 항-HIV-1 p24 항체 D2 중쇄 [Mus musculus]
- <174> **VH CDR3**(서열번호 10): NR 데이터베이스의 BLASTP조사를 통해 VH CDR3를 검색해 본 결과 유사한 것이 1개도 없었다.
- <175> KABAT 데이터베이스를 통한 BLASTP검색
- <176> **S2C6 VL**(서열번호 2): Kabat 데이터베이스의 BLASTP조사를 통해 S2C6 VL을 검색해 본 결과 100% 동일한 것은 1개도 없었으며 89-91% 동일한 것은 상당히 많았는데 이들 중 처음 5개는 다음과 같다.
- <177> KADBID 005591, 마우스 IG 카파 경쇄 가변영역(5-14...),
- <178> KADBID 005594, 마우스 IG 카파 경쇄 가변영역(10VA...),
- <179> KADBID 005593, 마우스 IG 카파 경쇄 가변영역(12-4...),
- <180> KADBID 005603, 마우스 IG 카파 경쇄 가변영역(17s...),
- <181> KADBID 005588, 마우스 IG 카파 경쇄 가변영역(TEPC...),
- <182> **VL CDR1**(서열번호 3): Kabat 데이터베이스의 BLASTP조사를 통해 VL CDR1을 검색해 본 결과 100% 동일한 것은 1개도 없었으며 93%(15/16) 동일한 것은 상당히 많았는데 이들 중 처음 5개는 다음과 같다.
- <183> KADBID 005720, 마우스 IG 카파 경쇄 가변영역(BW24...),
- <184> KADBID 005614, 마우스 IG 카파 경쇄 가변영역(PME7...),
- <185> KADBID 005624, 마우스 IG 카파 경쇄 가변영역(C5-7...),
- <186> KADBID 005621, 마우스 IG 카파 경쇄 가변영역(40-6...),
- <187> KADBID 005640, 마우스 IG 카파 경쇄 가변영역(40-9...),
- <188> **VL CDR2**(서열번호 4): BLASTP조사를 통해 VL CDR2를 검색해 본 결과 유사한 것이 1개도 없었다.
- <189> **VL CDR3**(서열번호 5): Kabat 데이터베이스의 BLASTP조사를 통해 VL CDR3를 검색해 본 결과 100% 동일한 것이 1개 있었으며 이는 다음과 같다.
- <190> KADBID 005681, 마우스 IG 카파 경쇄 가변영역(NC10...).
- <191> **S2C6 VH**(서열번호 7): Kabat 데이터베이스의 BLASTP조사를 통해 S2C6 VH를 검색해 본 결과 100% 동일한 것은 1개도 없었으며 79-85% 동일한 것은 상당히 많았는데 이들 중 처음 5개는 다음과 같다.
- <192> \* KADBID 001498, 마우스 IG 중쇄 가변영역(HDEX24),
- <193> KADBID 001494, 마우스 IG 중쇄 가변영역(HDEX5),
- <194> KADBID 001529, 마우스 IG 중쇄 가변영역(163.72'CL),
- <195> KADBID 001500, 마우스 IG 중쇄 가변영역(HDEX37),
- <196> KADBID 001597, 마우스 IG 중쇄 가변영역(BB128'CL),
- <197> **VH CDR1**(서열번호 8): BLASTP조사를 통해 VH CDR1을 검색해 본 결과 유사한 것이 1개도 없었다.

**VH CDR2**(서열번호 9): Kabat 데이터베이스의 BLASTP조사를 통해 VH CDR2를 검색해 본 결과 100% 동일한 것은 1개도 없었으며 87-88% 동일한 것은 10개가 있었는데 이들 중 처음 5개는 다음과 같다.

KADBID 001535, 마우스 IG 중쇄 가변영역(H10'CL),

KADBID 001534, 마우스 IG 중쇄 가변영역(H81'CL),

KADBID 001533, 마우스 IG 중쇄 가변영역(H50'CL),

KADBID 019741, 마우스 IG 중쇄 가변영역(Clone F'CL),

KADBID 001529, 마우스 IG 중쇄 가변영역(163.72'CL),

**VH CDR3**(서열번호 10): Kabat 데이터베이스의 BLASTP조사를 통해 VH CDR3를 검색해 본 결과 유사한 것이 1개도 없었다.

## 7. 실시예: S2C6의 생물학적 활성

### 7.1 재료 및 방법

#### 7.1.1 항-CD40 항체의 제조

S2C6 하이브리도마를 10% 소태아혈청(FBS), 100 units/ml 페니실린 및 100 mg/ml의 스트렙토마이신을 함유하고 있는 완전 IMDM[Gibc BRL, Grand Island, NY]배지에서 37℃의 온도로 배양하였다. 상기 배양액을 원심분리한 후 상등액을 0.2 마이크론의 여과지를 사용하여 여과하였다. 상기 여과액을 감마빈드(GammaBind™) 세파로스 칼럼(Pierce)을 통과시키고, 인산완충용액(PBS)으로 세척한 후, 0.1 M 글리신(pH 2.5)으로 용출하였다. 용출 즉시 항체를 1M Tris(pH 8.0)로 중화시킨 후 PBS로 투석(dialyze)하고 여과를 하여 살균하였다. MAb의 제조는 크기 배제 크로마토그래피(size exclusion chromatography)를 통해 분석하였으며, 99% 단량체 단백질 시아의 샘플들만 다음의 연구에 사용하였다.

#### 7.1.2 인체종양 이종간이식 모델

생후 6 내지 8주된 C.B.-17 SCID 마우스 암컷 98마리를 Taconic 실험실(Germantown, NY)에서 얻은 후 2주간 격리시켰다. 대조군의 마우스는 사람의 B세포 종양주(tumor line)를 정맥주사(intravenous injection: i.v.)하였다: Ramos(비-호지킨씨 악성림프종), HS Sultan(다발성 골수종), 또는 IM-9(다발성 골수종)세포 ( $1 \times 10^6 \sim 2 \times 10^6$ ). 잔류 마우스를 두 그룹으로 나누어 한 그룹은 종양세포를 주사하기 하루 전에 숙주 자연살세포[natural killer cells: 머피등., 1992, 면역학 저널. 22: 241)]를 제거하기 위하여 항-아사이알로-지엠1[anti-asialo-GM1: Waco 화학, 리치몬드, 버지니아]의 1 : 10 희석액 200  $\mu$ l를 투여하였다. 상기 두 그룹의 마우스들은 라모스, HS Sultan 또는 IM-9세포( $1 \times 10^6 \sim 2 \times 10^6$ )를 정맥주사하였다. 시험군에 속하는 마우스들은 첫 날 또는 종양이식 후 5일째 날부터 아래에 기재된 스케줄에 따라 섹션 7.1.2에 따라 제조된 S2C6 1 mg/kg을 복강내주사(intraperitoneal injection: i.p.)하였으며 부분적 마비나 기타 질병의 징후가 있는지 관찰하였다.



이종이식 종양모델 스케줄

그룹	종양 세포주	항체 (1mg/kg, i. p.)	항-아사이알 로 지엠1	mAb로 치료한 일수
1 대조군	Ramos	-	-	-
2	Ramos	S2C6	-	1, 5, 9, 13, 17
3	Ramos	S2C6	-	5, 9, 13, 17, 21
4	Ramos	S2C6	+	1, 5, 9, 13, 17
5	Ramos	S2C6	+	5, 9, 13, 17, 21
6 대조군	HS Sultan	-	-	-
7	HS Sultan	S2C6	-	1, 5, 9, 13, 17
8	HS Sultan	S2C6	-	5, 9, 13, 17, 21
9	HS Sultan	S2C6	+	1, 5, 9, 13, 17
10	HS Sultan	S2C6	+	5, 9, 13, 17, 21
11 대조군	-	-	-	-
12	IM-9	S2C6	-	1, 5, 9, 13, 17
13	IM-9	S2C6	-	5, 9, 13, 17, 21
14	IM-9	S2C6	+	1, 5, 9, 13, 17
15	IM-9	S2C6	+	5, 9, 13, 17, 21

<211>

<212>

### 7.1.3 말초혈액 B세포 분리

<213>

CD19 및 CD20에 대한 비유동성 항체를 사용하여 양성 선별(positive selection)에 의해 말초혈액 B세포를 분리하였다. 최종적으로 분리된 세포집단은 유량세포측정법(flow cytometry)에 의해 분석한 결과 85% 이상의 B세포를 함유함이 밝혀졌다. 상기 세포들은 10% DMSO(디메틸설폭사이드)를 함유하는 소태아혈청액(FBS)에  $4 \times 10^7$  세포가 되게 희석한 후 액체질소냉동기에 보관하였다.

<214>

### 7.1.4 B세포 증식 시험

<215>

5 ng/ml의 재조합 인간 IL-4 (Biosource) 및 여러 농도로 희석된 항-cd40 mAb; S2C6, G28-5[Bristol-Myers Squibb] 또는 M3[Genzyme #80-3702-04]가 들어 있는 10% FBS를 함유하는 IMDM액이 담겨진 총 96개의 웰(well)로 이루어진 조직배양플레이트에 상기 냉동보관된 인체의 말초혈액 B세포를 해동시킨 후 각 웰마다  $1 \times 10^5$  세포수가 되도록 적하한 후 배양하였다. 대조군의 세포들은 IL-4 및 관련이 없는 대조 mAb, EXA2-1H8(항-슈도모나스 외독소)하에서 배양하였다. 상기 배양 플레이트들은 37 °C에서 3일간 배양한 후 각 웰마다 0.5 mCi  $^3\text{H}$ -티미딘으로 16시간동안 펄스(pulse)를 가하였다. 그 후 상기 배양세포들은 Filtermate 196 Harvester™ [Packard Instruments]를 사용하여 96개 웰로 된 유리섬유필터에 옮긴 후 Topcount LSCTM[Packard Instruments]을 사용하여 액체섬광계측(liquid scintillation counting)을 수행하였다.

<216>

연속적으로 높은 수준의 CD40L(Jurkat/CD40L)를 발현하기 위해 선택된 Jurkat 세포주는 CD40L의 자극세포로서 사용되었다[말릭 등, 1996, 면역학 저널. 156:3952-60]. 상기 자극세포의 증식을 막기 위해 미토마이신 C(mitomycin C; 50 mg/ml)를 함유한 PBS에 넣어 37 °C에서 20분간 배양한 후 PBS로 3회 세척 후 B세포와 혼합하였다. B세포( $1 \times 10^5$ /웰)는 Jurkat CD40L와 혼합 후 상기와 같이 분석하였다. B세포와 IL-4는 초기에 자극세포들( $2.5 \times 10^4$ /웰)과 혼합한 후 직접 항-CD40 mAbs를 첨가하였다. 단일클론 항체를 자극세포의 고정

농도로 적정하거나 또는 자극세포를 mAb의 고정농도로 적정하였다.

#### <217> 7.1.5 CD40/CD40L 결합 분석시험

<218> Jurkat/CD40L 세포주를 이 시험에서 표적 세포주로 사용하였다. 샘플당 50  $\mu\text{l}$ 에서 세포를 밀도  $2 \times 10^7/\text{ml}$ 로 조정하였다. 결합은 RPMI 1640 배지(Gibco)+10% FBS를 수행하였다. 수용체 포화를 결정하기 위하여 Jurkat/CD40L 세포주를 CD40-Ig(CD40의 가용성 융합단백질과 인간 면역글로불린)의 농도를 증가시키면서 배양하였고[Noelle et al., 1992, Proc. Natl.Acad. Sci. USA 89:6550-6554], 세척하고, FITC-항 인간 Ig(항인간 면역글로불린과 결합된 형광 이소티오시아네이트)로 배양하였다. FacScan™ 유량세포측정기[Becton Dickinson]를 사용하여 결합 결과를 평가하였다. 제조합 가용성 CD40-Ig(25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )을 얼음에서 1시간 동안 mAb S2C6의 농도를 증가시키면서 전배양하였다. 항CD40 mAb G28-5; M3; 및 항슈도모나스 외독소인 이소타입의 대조구를 비교하기 위해 사용하였다. 마우스 CD8 융합단백질로 생산되고 FITC로 표지된 제조합 인간 가용성 CD40 리간드(CD154- $\mu\text{CD8}$ )를 리서치 다이아그노스틱 사[Flanders, NJ]로부터 얻었다. 가용성 CD40-Ig의 희석과 항CD40 mAbs는 4배의 최종 농도로 만들었고, 얼음상에서 1시간 동안 전배양한 후, 얼음상에서 1시간 동안 Jurkat 세포주를 결합시켰다. 세포를 세척하고 FITC-Goat 항 인간 F(ab')<sub>2</sub>로 표지하였다[Jackson Labs, Fc-specific #109-096-098]. CD40 결합 범위는 유량세포측정법에 의해 결정하였다.

#### <219> 7.2 결과

##### <220> 7.2.1 IN VITRO 연구: mAb S2C6 CD40/CD40L 상호작용

<221> 활성화된 T 세포의 표면에 발현된 가용성 CD40과 CD40L의 결합상의 항CD40 mAbs의 효과를 평가하기 위하여, 여러 가지 CD40 mAbs의 농도를 증가시키면서 가용성 CD40-Ig 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 을 전배양하고 Jurkat/CD40L 세포를 가진 콤플렉스의 배양하였다. 선별된 CD40L+ Jurkat T 세포 상에서 CD40L발현은 초기에 FITC로 표지된 항CD40L(데이터 나타나지 않음)을 사용하여 유량 세포측정법에 의해 검증되었다. 그런 다음, 결합 CD40-Ig를 검출하기 위하여 이 표적 세포상에서 CD40이 CD40L로 결합하는 것을 FITC-goat 항인간 Ig를 사용하여 Jurkat/CD40L 세포의 유량 세포측정법에 의해 결정하였다. CD40-Ig로의 적정이 대략 CD40-Ig 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 수용체 포화를 나타냈다. 가용성 CD40의 포화 농도를 사용하면서 0.25 내지 2 : 1(질량 : 질량)의 범위로 한정된 비율에서 CD40으로 S2C6은 CD40이 CD40L로 결합하는데 용량에 의존하는 증가로 결과가 나타났다[대략 6  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 13  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  및 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  각각의 농도에서 약 50%, 100%, 146% 및 220%][도 4]. 항체 M3 저해활성과 유사한 적정은 용량 의존 방식으로 CD40/CD40L 결합을 막았다. mAb G28-5는 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 까지 농도에서 단지 약간 CD40/CD40L 결합 효과가 나타나지 않았으며, 대조구 EXA2-1H8 Ig에 관련하여 가장 높은 농도인 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 단지 약간 나타났다.

<222> 상기 데이터는 mAb S2C6이 CD40/CD40L 상호작용을 증진시킴을 명백히 나타낸다. 게다가, S2C6은 CD40/CD40L 상호작용을 증가시키는 능력에서 G28-5와 M3과 다르다.

<223> 반비례 분석에서 B 세포의 표면에 나타내어지는 막 결합 CD40에 가용성 CD40L의 결합상에서 항CD40 mAbs의 효과를 평가하였다. 가용성 CD40L의 적정은 대략 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 라모스(Ramos) B 세포 표면 CD40 포화를 보여주었다. 여러 가지 항CD40 mAbs의 농도를 증가시키면서 FITC로 표지된 가용성 CD40L 세포의 배양에 의해 수행된 CD40 발현 B 세포를 전배양하였다. 그런 다음, 이 표적 B 세포상에서 표지된 CD40L이 CD40로 결합하는 것을 라모스 세포의 유량 세포측정법에 의해 결정하였다. CD40 발현 세포와 콤플렉스된 mAb S2C6은 가용성 CD40L의 포화 농도를 사용하면서 0.04 내지 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 한정된 농도에서 대략 51% 내지 68%의 CD40L 결합을 최대 증가로 결과가 나타났다[도 5].

<224> mAb G28-5는 CD40/CD40L의 상호작용의 효과가 거의 없는 가용성 CD40의 상기 결과와 반대로, G28-5는 모든 농도에서 CD40에 가용성 리간드 결합의 저해가 나타났다. 또한, mAb M3 저해활성과 유사한 적정은 용량 의존 방식으로 CD40/CD40L 결합을 막았다.

<225> 상기 데이터는 S2C6은 CD40/CD40L 상호작용을 증가시키는 능력에서 G28-5와 M3과 다르다. 게다가, 이들 조건 하에서 mAb G28-5와 mAb M3는 40 ng/ml 만큼 낮은 농도에서 가용성 CD40L과 CD40의 상호작용을 저해한다.

##### <226> 7.2.2 생체 외 연구: mAb S2C6는 CD40/CD40L에 반응하여 B 세포를 증가시킴.

<227> CD40L 발현 세포에 대한 1차 말초 B 세포의 성장 반응을 항CD40 mAb(S2C6, G28-5 또는 M3)의 존재로 측정하였다. 첫째, 여러 가지 mAbs의 고정된 수준(30 ng/ml)의 존재 또는 부재에서 증식되지 않는

Jurkat/CD40L 세포수가 증가되면서 B 세포를 배합하였다. 그런 다음, 처리에 대하여 B 세포 활성화는 자극 후 72 시간  $^3\text{H}$ -티미딘 결합에 의해 측정되었다. mAb M3의 존재에서 T 세포 적정은 대조구 Ig와 유사한 B 세포 증식으로 결과가 나타났다[도 6].

<228> mAb G28-5는 리간드의 부재[도 7]에서 몇몇 B 세포 활성을 막음에도 불구하고 G28-5의 존재에서  $\text{CD40L}^+$  T 세포 적정은 G28-5만을 나타낸 레벨에 걸쳐 단지 명목상으로 B 세포 증식(1.3 배)을 증가시켰다. 반대로, B 세포 증식은 4 : 1의 비율의 T 세포 자극기에 대한 B 세포로 단지 mAb만의 자극 보다 3배 높게 T 세포 자극기의 수를 증가시키는 용량 의존 방식으로 S2C6의 존재를 증가시켰다.

<229> 상기 데이터는 M3와 G28-5와는 달리 S2C6이 CD40에 의하여 B 세포 증식을 증진시키기 위한 CD40L의 놀라운 상승효과가 있음을 보여준다.

<230> 이 타입의 두 번째 분석에서, B 세포는 항 CD40 mAb로 적정하거나 증식하지 않는 4 : 1(B : T)의 고정 비율에서  $\text{CD40L}^+$  T 자극 세포와 결합되고 항CD40 mAb로 적정하였다[도 7].

<231> 상기 결과들은 상기 조건하에서 1차 인간 말초혈액 B 세포의 활성이 G28-5 홀로 비교할 때 mAb G28-5와 리간드의  $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 2배 증가하였음을 보여준다.

<232> 놀라운 정도로, S2C6은 현저하게 더욱 활성을 가지며, 리간드의 존재로 S2C6 홀로 비교할 때  $10 \mu\text{g}/\text{ml}$  (가장 높은 레벨 시험)에서 용량 의존 방식으로 B 세포 증식이 16.2배로 증가되었다.

<233> 상기 데이터는 CD40과 콤플렉스된 S3C6은 CD40L 결합이 증가됨을 보여준다. S2C6 저절로 G28-5와 유사한 방법으로 B 세포 증식을 자극할 것에도 불구하고, S2C6은 CD40L결합과 CD40L-매개된 활성 신호의 다음 크기를 증가시키는 능력에 의해 G28-5와 구별된다.

<234> 8. 실시예: 단일클론 항체 S2C6은 종양 성장을 억제함.

<235> 고유 mAb S2C6의 항종양 활성을 평가하기 위하여 암컷 C.B.-17 SCID 마우스들을 2그룹으로 분리하였다 (20마리/그룹). 각 그룹의 반은 숙주 고유의 킬러 세포 활성을 약하게 하기 위하여 항-아사이알로-GM1로 처리하였다[Murphy et al., 1992, Eur. J. Immunol. 22:241]. 다음 날, 마우스들에게 Ramos, HS Sultan 또는 IM-9세포( $1 \times 10^6$  세포)로 정맥 주입하였다. 그후, *supra* 섹션 7의 물질과 방법에 상술된 바와 같이, 마우스들에게 S2C6 IgG  $1 \text{ mg}/\text{kg}$ 으로 복강내 주입하였고, 부분적인 중풍 또는 질병 또 다른 증세를 모니터하였다.

<236> 라모스 인간 B 세포 림프종(도 8A), HS Sultan 다발성 골수종(도 8B) 또는 IM-9 다발성 골수종(도 8C)을 포함하는 동물의 단일클론 항체 S2C6 처리는 종양 질량과 다음 종양에 관련된 사망률이 현저히 감소하는 결과를 나타내었다. mAb S2C6의 존재로 증가된 생존율이 비특이적 NK 활성이 아니므로 같은 방향의 연구에서 유효성은 항-아사이알로-GM1의 존재를 유지하였다. IM-9의 처리는 다발성 골수종과 같이 질병의 대행 마커로서 인간 Ig를 분비하는 공격적인 종양 모델이다.

<237> mAb S2C6을 가진 질병에 걸린 마우스들에게 IM-9의 처리는 동물 생존율을 현저히 증가시켰다. 상기 연구들은 명백히 S2C6이 마우스에 주입된 인간 종양에 대하여 강력한 항종양 활성가짐을 보여준다.

<238> 9. 실시예: 단쇄 항 CD40 면역독소 융합 단백질이 CD40-Ig와 결합함.

<239> BD1-S2C6 sFv(단일클론 항체 S2C6의 가변 영역에 융합된 브리오딘 1(BD1)의 아미노산 서열을 구성하는 융합단백질[Francisco et al., 1997, J. Biol. Chem. 272(39):24165-24169]로 이루어진 단쇄 항-CD40 면역독소)는 봉입체로서 대장균에서 발현되며, 변성되고 재접합되었다.

<240> 요약하면, 전체 RNA는 제조사의 권유로 TRIZOL 시약[Life Technologies]을 사용하여 S2C6 하이브리도마 세포로부터 분리되었다. 경쇄와 중쇄 가변영역의 첫 번째 가닥 cDNA 합성은 길리랜드(Gilliland) 등[Tissue Antigens, 47:1-20(1996)]에 설명된 대로 J-C 접합부(junction)의 약 100 bp 하단부 서열에 상보적인 프라이머를 사용하여 수행하였다. 그런 다음, 첫 번째 가닥을 폴리-G 꼬리화하고 폴리-G 꼬리와 상보적인 폴리-C 앵커 프라이머 및 첫 번째 가닥 합성에 사용된 것 내 약 50 bp 내포된 프라이머를 사용하여 PCR 증폭시켰다. PCR 프라이머는 PCR 생산물의 5', 3'-단부(end)에 유일한 제한효소 부위가 생성되도록 제작하였다. 경쇄와 중쇄 가변 영역으로 코딩한 서열을 포함하는 두 PCR 생성물을 *EcoRI*과 *HindIII*로 자르고 같은 효소로 잘려진 pUC19에 연결하였다. 생성된 플라스미드인 pSG5와 pSG10은 각각 S2C6 VL과 S2C6 VH를 코딩하는 DNA를 포함한다. 두 플라스미드의 DNA를 모체의 단일클론 항체의 아미노-터미널 에시드(acid) 서열을 매치(match)시키

기 위하여 시퀀스하고 확인하였다.

<241> S2C6의 VH와 VL 단편은 길리랜드 등에 의해 설명된 대로 VH-VL 방향으로 함께 "봉합"되었고, 클로닝 벡터에 연결되었다. 이어서 BD1-G28-5 sFv의 sFv 단편[Francisco et al., 1997, J. Biol. Chem. 272:24165-24169]을 제한효소에 의해 pSE151로부터 제거하였고, S2C6 sFv를 그 곳에 연결하였다. 결과 플라스미드인 pSG40은 유도 T7 프로모터의 조절 하에 BD1-S2C6 sFv를 코딩하는 유전자를 포함한다.

<242> 발현하도록, pSG40을 수용성 대장균 BL21(DE3)pLysS 세포에 도입하여 그 세포를 37 °C T-육즙 배양하였다. 배양이 OD<sub>600</sub>=1.0에 도달하면 세포를 IPTG(isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside) 1 mM로 3시간 동안 유도하였다. 그런 다음, 세포를 원심분리하여 회수하고 초음파분쇄하고 BD1-S2C6 sFv 용합을 원심분리로 다음과 같이 변성되고 재접합된 불용성 봉입체를 분리하였다: 봉입체는 5 mg/ml에서 7 M 구아니딘으로 용해하고 0.3 M L-아르기닌과 2 mM DTT를 포함하는 PBS로 빠르게 희석(1 : 100)함으로써 재접합하고, 다음 정제를 위해 20 mM 소듐 포스페이트 버퍼(pH 7.4)로 투석하였다.

<243> 상기 재접합된 단백질을 블루 세파로스를 사용하여 분리시킨 다음 고정화된 CD40-Ig 상에서 친화성 크로마토그래피를 수행하였다.

<244> 그런 다음 정제된 단백질은 ELISA법으로 고정화된 CD40-Ig와 결합하기 위한 시험하였다. 미세적정 플레이트를 CD40-Ig에 의해 0.5 μg/ml로 코팅시킨 다음 25 μg/ml의 S2C6 mAb(▲), 25 μg/ml의 대조용 항체 BR96(●) 또는 과도하지 않은 항체(■)의 존재 하에서 0.05% 트윈20과 1% 소태아 혈청 알부민과 함께 PBS(pH 7.4)로 정제된 BD1-S2C6 sFv의 희석액을 첨가하였다. 상기 고정화된 수용체에 대한 BD1-S2C6 sFv의 결합을 BD1-특이적인 토끼 항혈청[Seattle Genetics, Inc., Bothell, Washington]의 첨가에 이어서 양고추냉이 퍼옥시다제 결합된 염소 항-토끼 Ig의 첨가에 의해 탐지하였다.

<245> CD40-Ig에 대한 BD1-S2C6 sFv의 결합은 과잉의 S2C6의 첨가에 의해서 완전히 억제되었으나, 대조용 mAb에 의해서 억제되지 않았다.[도 9].

<246> 10. 실시예: CD40-양성 악성종양의 치료로 재조합 S2C6 투여

<247> 비-호지킨씨 악성림프종, 다발성 골수종 결장과 같은 CD40-양성 악성종양 또는 다른 암종을 가진 환자를 재조합 인간화된 S2C6-항-CD40 단일클론 항체[마우스 CDRs와 인간 골격부위와 함께] 또는 S2C6의 가변영역과 인간 항체의 불변영역을 포함하는 재조합 키메라 항체를 주입하였다. 재조합 항체를 생체 외에서 제조하였다. 부수적인 화학요법의 존재 또는 부재에 질병의 진행 동안 어느 때나 치료를 시작할 수 있다.

<248> 치료법이 식염수 희석액 또는 다른 생리학적으로 화합할 수 있는 용액을 주마다 주입하는 것을 포함한다.

<249> 재조합 S2C6 사용 복용량은 (환자의 신체 표면적에 대하여) 0.1 내지 10000 mg/m<sup>2</sup>, 바람직하게는 100 내지 500 mg/m<sup>2</sup>이다.

<250> 말초 IV 접근선(access line) 또는 중심 IV 접근선 중에서 하나를 통해 정맥 내 주사한다. 이 시약을 IV 푸시(push)가 아닌 주입법으로 투여한다.

<251> 재조합 S2C6으로 치료하는 효과는 다음과 같은 측정으로 모니터된다: a) 말초 혈액 내의 전체 림프구, T 및 B 림프구 수,; b) 생체 외 T 림프구 활성(헬퍼 T4 림프구와 세포용해 T8 림프구); 및 /또는 c) CT(computed tomographic) 촬영, MRI(magnetic resonance imaging) 촬영, X-방사선 촬영, 골 촬영 및 BMA(bone marrow aspiration)를 포함하는 종양 생검 샘플링과 같은 기술들을 사용하여 종양의 형태 변화.

<252> 상기에서 얻은 결과에 의존하여 치료법이 개발되어 종양 세포의 완전한 근절과 종양 억제를 달성하는 최종 목표를 가지고 면역계 증인으로 최소 충격으로 CD40-양성 악성종양을 최선으로 치료한다.

<253> 11. 미생물 기탁

<254> 고유 단일클론 항체 S2C6을 분비하는 하이브리도마 S2C6을 1999년 5월 25일에 부다페스트 조약에 의해 미생물 국제기탁기관인 미국 버지니아주 20110-2209, 매나썬스 볼레버드 대학교 10801의 미국유전자은행(ATCC)에 특허절차 목적으로 미생물을 기탁하였으며 수탁번호 PTA-110을 부여받았다.

<255> 12. 특정한 구현예 및 참고문헌 인용

<256> 본 발명은 상술한 특정 구현예에 의해 범위를 한정하지 않는다. 실제로, 상기 구현예에 덧붙여 본 발명의 여러 가지 보정은 상기 명세서와 첨부도면으로부터 당해 분야에서 숙련된 구현예들로 명백하게 될 것이다. 이러한 보정은 첨부한 청구범위 내에 들어갈 것이다.

<257> 특허 출원, 특허 및 학술 공개를 포함하는 여러 가지 참고문헌을 참고문헌에 의해 여기 덧붙여진 설명으로 여기에 인용한다.

<258>	<div> <div>미생물</div> <div>본 서류는 76 페이지 6 내지 10 번째줄의 설명과 같다.</div> <div>A. 기탁 확인</div> <div>첨부서류에 기탁 확인</div> <div>기탁기관 : 미국 유전자은행</div> <div>기탁기관 주소 : 미국 버지니아주 20110-2209, 매나싸스 볼레버드 대학교 10801</div> <div>기탁일: 1999.5.25      수탁번호: PTA-110</div> <div>B. 추가적인 표시</div> <div>C. 지적된 진술</div> <div>D. 별개의 표시</div> <div>E. 본장은 국제출원시 받음</div> </div>
-------	--

## 도면의 간단한 설명

<259> 도 1은 S2C6의 경쇄 가변 영역의 구조이다. 상기 경쇄 가변 영역(“V<sub>L</sub>”)의 뉴클레오티드(서열번호: 1) 및 아미노산(서열번호: 2) 서열을 나타낸다.

<260> 도 2는 S2C6의 중쇄 가변 영역의 구조이다. 상기 중쇄 가변 영역(“V<sub>H</sub>”)의 뉴클레오티드(서열번호: 6) 및 아미노산(서열번호: 7) 서열을 나타낸다.

<261> 도 3A-3B는 S2C6의 가변 영역의 구조이다. (A) S2C6 V<sub>L</sub>의 아미노산 서열(서열번호: 2)을 나타낸다. (B) S2C6 V<sub>H</sub>의 아미노산 서열(서열번호: 7)을 나타낸다. 상보성-결정 영역(“CDR”)은 밑줄을 그었다. 상기 CDR에 인접한 4 개의 하부구조 영역들의 서열을 나타낸다. V<sub>L</sub> CDR 1-3의 아미노산 서열은 각각 서열번호: 3-5에 상응한다. V<sub>H</sub> CDR 1-3의 아미노산 서열은 각각 서열번호: 8-10에 상응한다.

<262> 도 4는 S2C6 mAb가 CD40L-발현 주르캣(Jurkat) T 세포에 대한 CD40-Ig의 결합을 증대시킴을 나타낸다. 표면 CD40L에 대한 CD40-Ig(CD40 및 인간 면역글로불린의 가용성 융합 단백질)의 결합은 증가하는 농도의 항-CD40 단일클론 항체(“mAb”)의 존재 하에서 수행되었다. mAb를 CD40-Ig와 함께 1 시간 동안 전배양시킨 다음 CD40L-발현 표적 세포와 함께 1 시간 동안 배양시켰다. 표적 세포에 대한 CD40-Ig 결합을 형광물질 이소티오시아네이트(“FITC”)-표지된 항-인간 Ig를 사용하여 유량세포측정기에 의해 탐지하였다. 이어서 CD40/CD40L 결합 정도를 로그 평균 형광 강도(“MFI”)로부터 측정하였다. MFI - 각 집단의 백그라운드를 나타낸다.

<263> 도 5는 S2C6 mAb가 B 세포 표면 CD40에 대한 가용성 CD40L의 결합을 증대시킴을 나타낸다. 가지모양의 B 세포인 인간 B 세포 림프종을 증가하는 농도의 항-CD40 mAb: S2C6, G28-5 또는 M3, 또는 무관한 대조용 mAb인 EXA2-1H8의 존재 하에서 배양시켰다. 상기 mAb들을 CD40-발현 표적 세포와 함께 1 시간 동안 전배양시켰다. 이어서, B 세포에 대한 상기 FITC-표지된 CD40L의 결합을 유량세포측정기에 의해 직접 탐지하였다. 이어서 CD40/CD40L 결합 정도를 로그 평균 형광 강도로부터 측정하였다. MFI - 각 집단의 백그라운드를 나타낸다.

<264> 도 6은 S2C6가 CD40L<sup>+</sup> 자극 세포 및 항-CD40 mAb의 존재 하에서 1차 인간 말초 B 세포의 증식 반응을 증진시킴을 나타낸다. 말초 B 세포( $1 \times 10^5$ /웰)를 증가하는 수의 비-증식성 CD40L<sup>+</sup> 주르캣 T 자극 세포와 30 ng/ml



의 항-CD40 mAb: S2C6, G28-5 또는 M3, 또는 무관한 대조용 mAb인 EXA2-1H8과 혼합하였다. B 세포 증식을 자극을 가한 다음 72 시간째에  $^3\text{H}$ -TdR 결합에 의해 측정하였다.

<265> 도 7은 CD40L의 존재 또는 부재 하의 항-CD40 mAb에 대한 1차 인간 말초 B 세포의 상대적인 증식 반응을 나타낸다. 말초 B 세포를 비-증식성 CD40L<sup>+</sup> 자극 세포와 4 : 1의 고정비로 혼합시키고 증가하는 농도의 항-CD40 mAb: S2C6, G28-5 또는 M3, 또는 무관한 대조용 mAb인 EXA2-1H8과 혼합시켰다. B 세포 증식을 자극을 가한 다음 72 시간째에  $^3\text{H}$ -TdR 결합에 의해 측정하였다.

<266> 도 8A-8C는 생체 내에서의 mAb S2C6의 항 종양 활성을 나타낸다. (A) 라모스(ramos) 인간 B 세포 비-호지킨 림프종, (B) HS 술탄(sultan) 다발성 골수종, 또는 (C) IM-9 다발성 골수종에 대한 S2C6의 항 종양 활성을 평가하였다. SCID 마우스(5/그룹)를 고유의 킬러("NK") 활성을 억제하기 위해서 항-아사이알로-GM1으로 전처리하거나 전처리하지 않고  $1 \times 10^6$  내지  $2 \times 10^6$  개의 종양 세포를 주입한지 1 일 또는 5 일 후에 mAb로 처리하였다.

<267> 도 9는 BD1-S2C6 sFv가 ELISA에서 고정화된 CD40-Ig에 특이적으로 결합함을 나타낸다. BD1-S2C6 sFv(단일 클론 항체 S2C6의 가변 영역에 융합된 브리오딘 1(BD1)으로 이루어진 단쇄 항-CD40 면역독소)는 봉입체로서 대장균에서 발현되며, 변성되고 재접힘되었다. 이어서 상기 재접힘된 단백질을 블루 세파로스를 사용하여 분리시킨 다음 고정화된 CD40-Ig 상에서 친화성 크로마토그래피를 수행하였다. 이어서 상기 정제된 단백질을 ELISA로 고정화된 CD40-Ig에의 결합에 대해서 시험하였다. 미세적정 플레이트를 CD40-Ig에 의해  $0.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ 로 코팅시킨 다음  $25 \mu\text{g}/\text{ml}$ 의 S2C6 mAb(▲),  $25 \mu\text{g}/\text{ml}$ 의 대조용 항체 BR96(●) 또는 과도하지 않은 항체(■)의 존재 하에서 정제된 BD1-S2C6 sFv의 희석액을 첨가하였다. 상기 고정화된 수용체에 대한 BD1-S2C6 sFv의 결합을 BD1-특이적인 토끼 항혈청의 첨가에 이어서 양고추냉이 퍼옥시다제 결합된 염소 항-토끼 Ig의 첨가에 의해 탐지하였다. CD40-Ig에 대한 BD1-S2C6 sFv의 결합은 과잉의 S2C6의 첨가에 의해서 완전히 억제되었으나, 대조용 mAb에 의해서는 억제되지 않았다.

## 도면

### 도면1

```

GATGTTCTGGTGACCCAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCACTCTTGGAGCTCAAGCCTCCATCTCTTGCAGATCT 75
CTACAACACCACTGGGTTTGAGGTGAGAGGGGACGGACAGTCAGAACCTCGAGTTCGGAGGTAGAGAACCTCTAGA
O V V V T Q T P L S L P V S L G A Q A S I S C R S

AGTCAGAGCCTTGTACACAGTAATGGAACACCTTTTACATTGGTACCTGCAGAGCCAGGCCAGTCTCCAAAA 150
TCAGTCTCGGAACATGTGTCTTACCTTTGTGGAATAATGTAACTGACGCTCTTCGGTCCGGTCAGAGGTTTT
S Q S L V H S K G H T F L H W Y L Q K P G Q S P K

CTCCTGATCTACACAGTTTCCAACCGATTTTCTGGGGTCCAGACAGGTTCACTGGCAGTGGATCAGGGACAGAT 225
GAGGACTAGATGTGTCAAGGTTGGCTAAAGACCCAGGGTCTGTCCAAGTCACCGTCACCTAGTCCCTTCTA
L L I Y T V S K R F S G V P D R F S G S G S G T D

TTCACACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATCTGGGAGTTTATTTCTGCTCTCAAACTACACATGTCCG 300
AAGTGTGAGTTCTAGTCTCTCACTCCGACTCCTAGACCTCAAAATAAGACGAGAGTTTGATGTGTACAAAGC
F T L K I S R V E A E O L G V Y F C S Q T T H V P

TGGACGTTCCGTGGAGGCACCAAGCTGGAATCCAA 336
ACCTGCAAGCCACCTCCGTGGTTCGACCTTTAGGT
W T F G G G T K L E I Q
    
```



도면2

```

GAGGTCCAGCTGCAGCAGTCTGGACCTGACCTGGTGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGATCTCTGCAAGGCTTCT 75
CTCCAGGTGAGCTGCTCAGACCTGGACTGGACCACTTCGGACCCGAACTCAGTTCTAGAGGACGTTCCGAAGA
E V Q L Q Q S G P O L V K P G A S V K I S C K A S
GGTTACTCATTCACTGGCTACTACATACACTGGGTGAAGCAGAGCCATGGAAGAGCCTTGAGTGGATTGGACCT 150
CCAATGAGTAAGTGACCGATGATGATGACCCACTTCGTCTGGTACCTTCTCGGAACCTCAGCTAACCTGCA
G Y S F T G Y Y I H W V K Q S H G K S L E W I G R
GTTATTCCTAACAAATGGAGGCACTAGTTACAACCAAGTTCAAGGGCAAGGCCATATTAAGTGTAGACAAGTCA 225
CAATAAGGATTGTTACCTCCGTGATCAATGTTGGTCTTCAAGTTCCGTTCCGGTATAATTGACATCTGTTCACT
V I P K K G G T S Y H Q K F K G K A I L T V O E S
TCCAGCACAGCCTACATGGAACCTCCGACGCTGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTGCAAGAGAAGGG 300
AGGTGCTGTGGATGTACCTTGAGGCGTCGGACTGTAGACTCCTGAGACGCCAGATAATGACACGTTCTCTTCCC
S S T A Y M E L R S L T S E D S A V Y Y C A R E G
ATCTACTGGTGGGGCCACGGCACCACTCTCAGTCTCCTCA 342
TAGATGACCAACCCCGTGGCTGGTGAAGTGTGAGAGGAGT
I Y W V G H G T T L T V S S

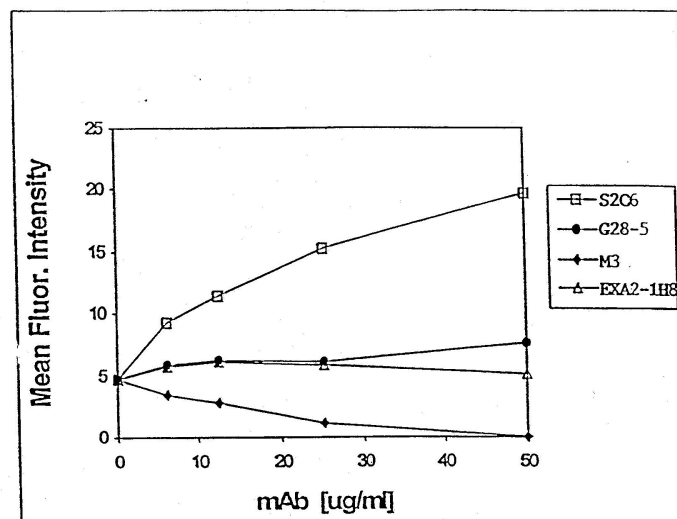
```

도면3

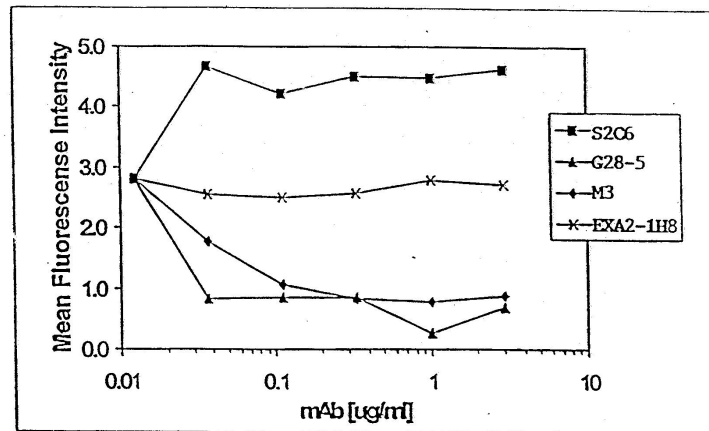
S2C6 VL  
DVVVTQTPLSLPVSLGAQASISCRSSQSLVHSNGNTFLHWYLQKPGQSPKL  
CDR1  
LIYTVSNRFGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFCSQTHVPWT  
CDR2 CDR3  
FGGGTKLEIQ

S2C6 VH  
EVQLQQSGPDLVKPGASVKISCKASGYSFTGYIHWVKQSHGKSLIEWIGRV  
CDR1  
IPNNGGTSYNQKFKGKAILTVDKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCAREGIY  
CDR2 CDR3  
WWGHGTTTLTVSS

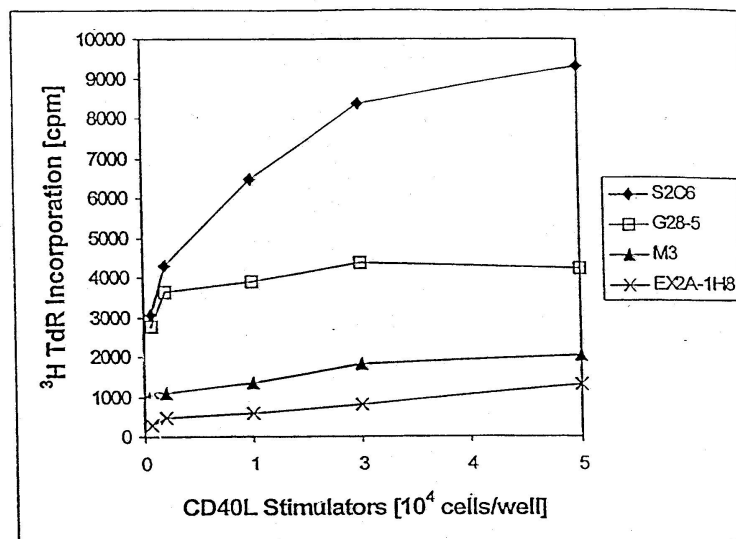
도면4



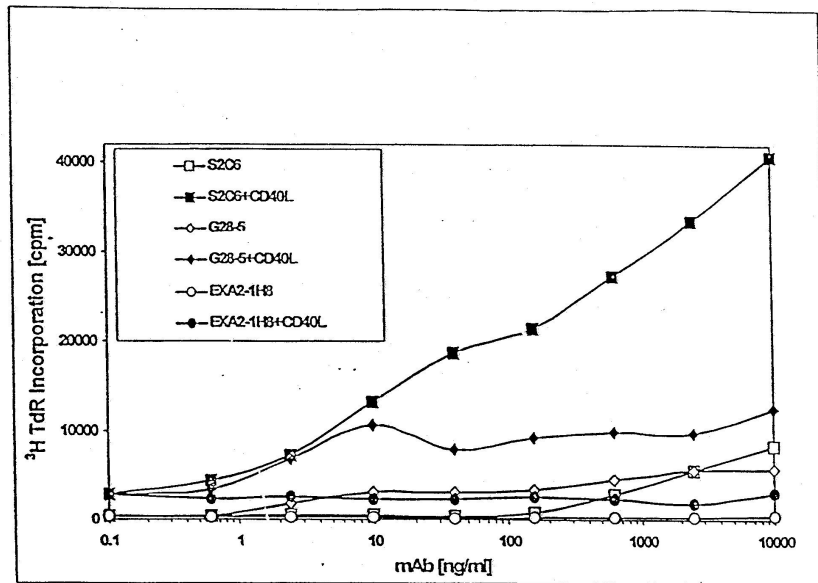
도면5



도면6

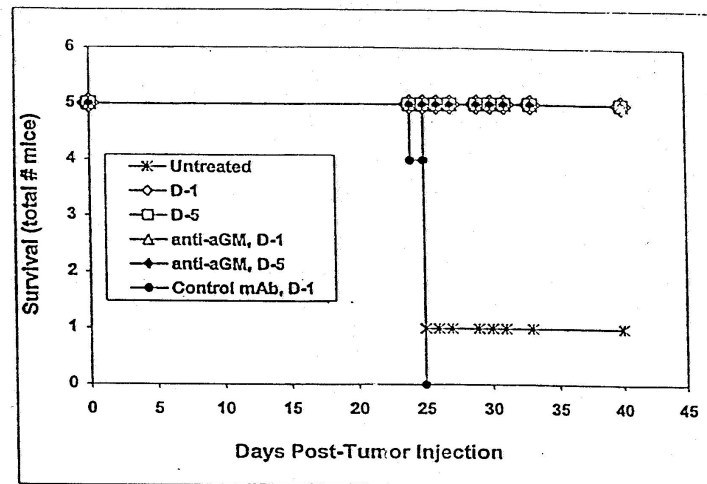


도면7

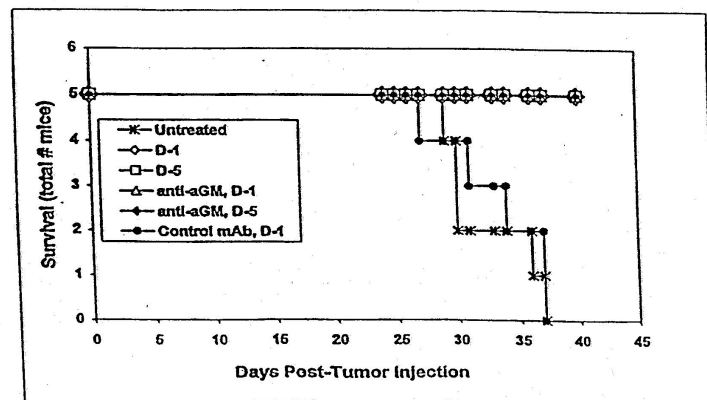


도면8

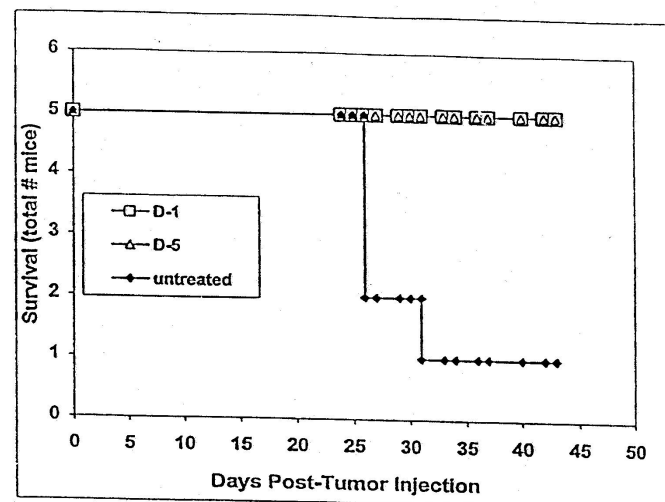
A.



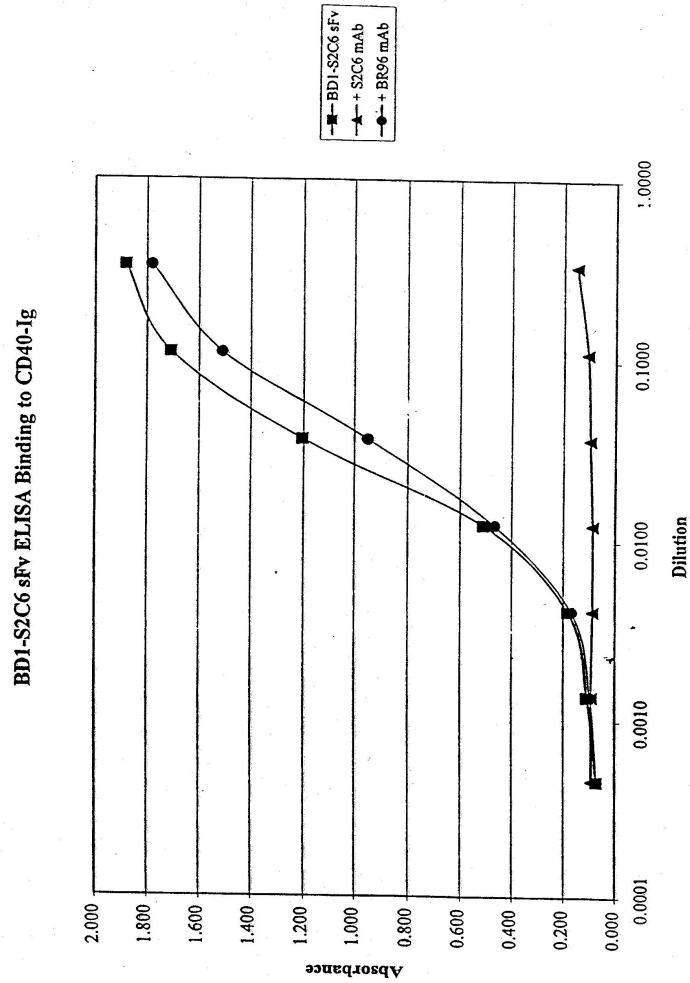
B.



도면8c



도면9



## 서열 목록

SEQUENCE LISTING  
 <110> SEATTLE GENETICS, INC.  
 <120> RECOMBINANT ANTI-CD40 ANTIBODY AND USES THEREOF  
 <130> 9632-009-228  
 <140> PCT/US00/15749  
 <141> 2000-06-08  
 <150> 09/328,296  
 <151> 1999-06-08  
 <160> 15  
 <170> Patent In Ver. 2.0  
 <210> 1  
 <211> 336  
 <212> DNA  
 <213> Mus musculus  
 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(336)  
 <400> 1



gat gtt gtg gtg acc caa act cca ctc tcc ctg cct gtc agt ctt gga 48  
 Asp Val Val Val Thr Gln Thr Pro Leu  
 Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly  
 1 5 10 15  
 gct caa gcc tcc atc tct tgc aga tct agt cag agc ctt gta cac agt 96  
 Ala Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser  
 20 25 30  
 aat gga aac acc ttt tta cat tgg tac ctg cag aag cca ggc cag tct 144  
 Asn Gly Asn Thr Phe Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
 35 40 45  
 cca aaa ctc ctg atc tac aca  
 gtt tcc aac cga ttt tct ggg gtc cca 192  
 Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Thr Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro  
 50 55 60  
 gac agg ttc agt ggc agt gga tca ggg aca gat ttc aca ctc aag atc 240  
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
 65 70 75 80  
 agc aga gtg gag gct gag gat ctg gga gtt tat ttc tgc tct caa act 288  
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln  
 Thr  
 85 90 95  
 aca cat gtt ccg tgg acg ttc ggt gga ggc acc aag ctg gaa atc caa 336  
 Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Gln  
 100 105 110  
 <210> 2  
 <211> 112  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus  
 <400> 2  
 Asp Val Val Val Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly  
 1 5 10 15  
 Ala Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser  
 20 25 30  
 Asn Gly Asn Thr Phe Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
 35 40 45  
 Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Thr Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro  
 50 55 60  
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
 65 70 75 80  
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Thr  
 85 90 95  
 Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Gln  
 100 105 110  
 <210> 3  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus  
 <400> 3  
 Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly Asn Thr Phe Leu His  
 1 5 10 15  
 <210> 4  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus  
 <400> 4  
 Thr Val Ser Asn Arg Phe Ser

1 5

<210> 5  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus  
 <400> 5  
 Ser Gln Thr Thr His Val Pro Trp Thr  
 1 5  
 <210> 6  
 <211> 342  
 <212> DNA  
 <213> Mus musculus  
 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(342)  
 <400> 6  
 gag gtc cag ctg cag cag tct gga cct gac ctg gtg aag cct ggg gct 48  
 Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Asp Leu Val Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15  
 tca gtg aag atc tcc tgc aag  
 gct tct ggt tac tca ttc act ggc tac 96  
 Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr  
 20 25 30  
 tac ata cac tgg gtg aag cag agc cat gga aag agc ctt gag tgg att 144  
 Tyr Ile His Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45  
 gga cgt gtt att cct aac aat gga ggc act agt tac aac cag aag ttc 192  
 Gly Arg Val Ile Pro Asn Asn Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe  
 50 55  
 60  
 aag ggc aag gcc ata tta act gta gac aag tca tcc agc aca gcc tac 240  
 Lys Gly Lys Ala Ile Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 atg gaa ctc cgc agc ctg aca tct gag gac tct gcg gtc tat tac tgt 288  
 Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 gca aga gaa ggg atc tac tgg tgg ggc cac ggc acc act ctc aca gtc 336  
 Ala  
 Arg Glu Gly Ile Tyr Trp Trp Gly His Gly Thr Thr Leu Thr Val  
 100 105 110  
 tcc tca 342  
 Ser Ser  
 <210> 7  
 <211> 114  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus  
 <400> 7  
 Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Asp Leu Val Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15  
 Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr  
 20 25 30  
 Tyr Ile His Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45  
 Gly Arg Val Ile Pro Asn Asn Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe  
 50 55 60

Lys Gly Lys Ala Ile Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80  
Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95  
Ala  
Arg Glu Gly Ile Tyr Trp Trp Gly His Gly Thr Thr Leu Thr Val  
100 105 110  
Ser Ser  
<210> 8  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Mus musculus  
<400> 8  
Thr Gly Tyr Tyr Ile His  
1 5  
<210> 9  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> Mus musculus  
<400> 9  
Arg Val Ile Pro Asn Asn Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Lys  
1 5 10  
15  
Gly  
<210> 10  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> Mus musculus  
<400> 10  
Glu Gly Ile Tyr  
1  
<210> 11  
<211> 48  
<212> DNA  
<213> Mus musculus  
<400> 11  
agatctagtc agagccttgt acacagtaat ggaaacacct tttacat 48  
<210> 12  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Mus musculus  
<400> 12  
acagtttcca accgattttc t 21  
<210> 13  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Mus musculus  
<400> 13  
actggctact acatacac 18  
<210> 14  
<211> 51  
<212> DNA  
<213> Mus musculus  
<400> 14  
cgtgttattc ctaacaatgg aggcactagt tacaaccaga agttcaaggg c 51  
<210> 15  
<211> 12

<212> DNA  
<213> Mus musculus  
<400> 15  
gaagggatct ac

12