(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0077600
(43) 공개일자 2025년05월30일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 39/395 (2006.01) *A61K 31/337* (2006.01)
A61K 31/4745 (2006.01) *A61K 31/513* (2006.01)
A61K 31/519 (2006.01) *A61K 31/555* (2006.01)
A61K 31/7068 (2006.01) *A61K 33/243* (2019.01)
A61K 45/06 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 39/39558 (2013.01)
A61K 31/337 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2025-7016132(분할)
(22) 출원일자(국제) 2013년05월21일
심사청구일자 없음
(62) 원출원 특허 10-2023-7009833
원출원일자(국제) 2013년05월21일
심사청구일자 2023년04월21일
(85) 번역문제출일자 2025년05월16일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2013/001503
(87) 국제공개번호 WO 2013/174509
국제공개일자 2013년11월28일
(30) 우선권주장
PCT/EP2012/002211 2012년05월23일
유럽특허청(EPO)(EP)

(71) 출원인
아스테라스 세이야쿠 가부시키가이샤
일본국 도쿄토 츄오쿠 니혼바시 혼쵸 2쵸메 5방 1고
트론-트란슬라셔날레 온콜로기 안 데어 유니버시태츠메디진 데어 요하네스 구텐베르크-유니버시태트 마인츠 게마인뉘치게 게엠베하
독일 55131 마인츠 프라일리그라트슈트라쎄 12
(72) 발명자
사힌, 우구르
독일 55116 마인츠 필립-폰-자베른-플라츠 1
튀레시, 외즐렘
독일 55116 마인츠 필립-폰-자베른-플라츠 1
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
박장원

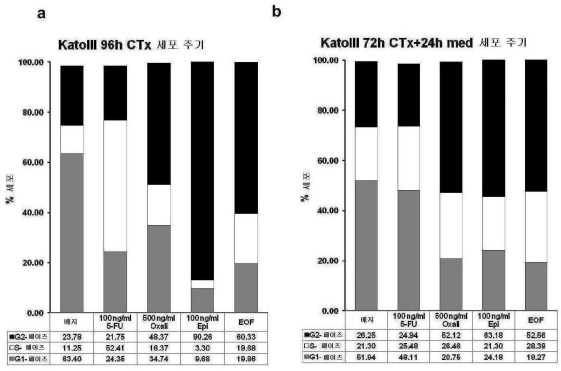
전체 청구항 수 : 총 16 항

(54) 발명의 명칭 **암의 치료에 클라우딘 18.2에 대한 항체를 이용하는 조합 요법**

(57) 요 약

본 발명은 위암, 식도암, 췌장암, 폐암, 난소암, 결장암, 간암, 두경부암 및 담낭암 및 그의 전이암과 같은 암 질환을 비롯하여 CLDN18.2를 발현하는 세포와 관련된 질환을 효과적으로 치료 및/또는 예방하기 위한 조합 요법을 제공한다.

대 표 도



(52) CPC특허분류
A61K 31/4745 (2013.01)
A61K 31/513 (2013.01)
A61K 31/519 (2013.01)
A61K 31/555 (2013.01)
A61K 31/7068 (2013.01)
A61K 33/243 (2022.01)
A61K 45/06 (2013.01)
A61P 35/00 (2018.01)
C07K 16/28 (2013.01)
(72) 발명자
미트나흐트-크라우스, 리타
독일 61169 프리드베르크 타우누슈트라쎄 45
야콥스, 슈테판 데니스
독일 55252 마인츠-카스텔 프리덴슈트라쎄 7
웃쉬, 막달레나 야트비가
독일 55262 하이데샤임 암 라인 핑거크라우트베크 30베
하인츠, 코르넬리아 아드리아나 마리아
독일 55278 달하임 아우프 덴 엘프모르겐 22
슈타들러, 크리스티아네 레지나
독일 64625 벤스하임 다름슈태드터 슈트라쎄 76

명 세 서

청구범위

청구항 1

CLDN18.2 양성인 암 질환을 치료 또는 예방하는 방법에 사용하기 위한, CLDN18.2에 결합하는 항체를 포함하는 의약 조성물로서,

상기 방법은 환자에게 상기 의약 조성물 및 제제를 투여하는 것을 포함하며,

여기서, 상기 항체는 하기 상보성 결정 영역 (CDR)을 포함하고:

(i) SEQ ID NO: 17의 위치 45-52 (HCDR1);

(ii) SEQ ID NO: 17의 위치 70-77 (HCDR2);

(iii) SEQ ID NO: 17의 위치 116-126 (HCDR3);

(iv) SEQ ID NO: 24의 위치 47-58 (LCDR1);

(v) SEQ ID NO: 24의 위치 76-78 (LCDR2); 및

(vi) SEQ ID NO: 24의 위치 115-123 (LCDR1), 및

상기 제제는 (i) 5-플루오로우라실, 류코보린 및 이리노테칸, (ii) 시스플라틴 및 5-플루오로우라실이나 또는 카페시타빈; (iii) 도세탁셀, 옥살리플라틴, 5-플루오로우라실 및 폴린산, 및 (iv) 5-플루오로우라실, 류코보린, 이리노테칸 및 옥살리플라틴으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 의약 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 항체는, SEQ ID NO: 32로 나타내는 아미노산 서열을 포함하는 항체 중쇄 및 SEQ ID NO: 39로 나타내는 아미노산 서열을 포함하는 항체 경쇄를 포함하는 것인, 의약 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 방법은 γδ T 세포를 자극하는 제제를 투여하는 것을 더 포함하고,

상기 제제는 비스포스포네이트 또는 졸레드론산, 클로드론산, 이반드론산, 파미드론산, 리세드론산, 미노드론산, 올파드론산, 알렌드론산, 인카드론산 및 그의 염으로 이루어진 군으로부터 선택되는 제제인 것인, 의약 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 CLDN18.2에 결합하는 항체는 카파, 쥐의 경쇄 가변부, 인간 카파 경쇄 불변부 동종이형 (allotype) Km(3), 쥐의 중쇄 가변부, 인간 IgG1 불변부, 동종이형 G1m(3)을 포함하는 키메라 마우스/인간 IgG1 모노클로날 항체인 것인, 의약 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 항체는 SEQ ID NO: 13으로 나타내는 아미노산 서열 및/또는 SEQ ID NO: 12로 나타내는 아미노산 서열을 포함하는 것인, 의약 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 항체는, SEQ ID NO: 17로 나타내는 아미노산 서열을 포함하는 항체 중쇄 또는 그의 단편 및 SEQ ID NO: 24로 나타내는 아미노산 서열을 포함하는 항체 경쇄 또는 그의 단편을 포함하고, 상기 항체 중쇄의 단편은 SEQ ID NO: 17로 나타내는 아미노산 서열의 N-말단 절단 변이체로서, 상기 아미노산 서열의 N-말단에서 19개의 아미노산이 제거되고, 상기 항체 경쇄의 단편은 SEQ ID NO: 24로 나타내는 아미노산 서열의 N-말단 절단 변이체로서, 상기 아미노산 서열의 N-말단에서 20개의 아미노산이 제거되는 것인, 의약 조성물.

청구항 7

제3항에 있어서, 상기 γδ T 세포를 자극하는 제제는 인터류킨-2와 조합하여 투여되는 것인, 의약 조성물.

청구항 8

제1항에 있어서, CLDN18.2에 결합하는 상기 항체는 하나 이상의 보체 의존성 세포독성(CDC) 매개된 용해, 항체 의존성 세포독성(ADCC) 매개된 용해, 세포자멸사의 유도 및 증식 억제에 의해 세포 사멸을 매개하는 것인, 의약 조성물.

청구항 9

제1항에 있어서, 상기 방법은 상기 항체를 최대 1000 mg/m^2의 투여량으로 투여하는 것을 포함하는 것인, 의약 조성물.

청구항 10

제1항 있어서, 상기 방법은 상기 항체를 300 내지 600 mg/m^2의 투여량으로 반복적으로 투여하는 것을 포함하는 것인, 의약 조성물.

청구항 11

제1항에 있어서, 상기 암은 선암종인 것인, 의약 조성물.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 암은 진행성 선암종인 것인, 의약 조성물.

청구항 13

제1항에 있어서, 상기 암은 위의 암, 식도의 암, 위식도 접합부의 암 및 위식도암으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 의약 조성물.

청구항 14

제13항에 있어서, 상기 식도의 암은 하부 식도의 암인 것인, 의약 조성물.

청구항 15

제1항에 있어서, 상기 환자는 HER2/neu 음성 환자 또는 HER2/neu 양성 상태이지만 트라스투주맙 요법으로는 치료되지 않는 환자인 것인, 의약 조성물.

청구항 16

제1항에 있어서, CLDN18.2는 SEQ ID NO: 1에 따른 아미노산 서열을 갖는 것인, 의약 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 위 및 식도(위식도; GE)의 암은 의료적 필요성이 가장 충족되지 못한 질병의 일종이다. 위암은 전세계적으로 암으로 인한 사망 중 2 번째 사망 요인이다. 식도암의 발생은 최근 수십년간 증가일로에 있으며 이는 조직학적 유형과 원발성 종양 위치의 이동과 일치하는 것이다. 식도의 선암종은 미국과 서구에서 이제 편평 세포 암종보다 더 흔하며, 대부분의 종양이 식도 원위에 위치한다. 실질적인 부작용이 수반되는 확립된 표준 치료 방법이 공격적인데도 불구하고 위식도암의 전체적인 5년 생존율은 20-25%에 불과하다.

[0002] 환자들의 대다수는 국소적으로 진행되거나 전이된 질환에 걸려 있으며 제1선의 화학요법을 받아야 한다. 치료법은 대체로 제3 화합물 (예컨대 탁산 또는 안트라사이클린)과 결합된 백금 및 플루오로피리미딘 유도체의 백본에 기초한다. 여전히, 고작해야 메디안 무진행 생존기간은 5 내지 7개월, 그리고 메디안 전체 생존기간은 9 내지

11개월 정도로 기대할 수 있을 뿐이다.

배 경 기 술

[0003] 이들 암들에 대한 다양한 새로운 세대의 조합 화학요법으로부터 얻어지는 중요한 장점의 결여로 인해 표적화 물질을 사용하는 연구가 활기를 띠어왔다. 최근, Her2/뉴로-양성 위식도암에 대해 트라스투주맙(Trastuzumab)이 인가되었다. 그러나, 환자들의 단지 ~20% 만이 표적을 발현하며 이 치료법을 적용하는데 적절하기 때문에, 의료에 대한 필요성은 여전히 높다.

[0004] 밀착연접(tight junction) 분자인 클라우딘 18 스플라이스 변이체 2 (클라우딘 18.2 (CLDN18.2))는 밀착연접 단백질들의 클라우딘 패밀리의 일원이다. CLDN18.2는 2개의 작은 세포외 루프와 함께, 4개의 막 스패닝 도메인으로 이루어져 있다.

[0005] 정상 조직에서는 위장을 제외하고 RT-PCR에 의해 CLDN18.2의 발현이 검출되지 않는다. CLDN18.2 특이 항체를 이용한 면역조직화학에 의하면 위장은 유일한 양성 조직이다.

[0006] CLDN18.2는 단명한(short-lived) 분화된 위상피세포 상에서만 발현되는 고도로 선택적인 위 직계 항원이다. CLDN18.2는 악성 세포전환의 경과 중에 유지되며 그에 따라 인간 위암 세포 표면에 종종 나타난다. 뿐만 아니라, 이 범종양 항원은 식도, 췌장 및 폐 선암종에서 유의적인 수준으로 이소적으로(ectopically) 활성화된다. CLDN18.2 단백질은 위암 선암종의 림프절 전이 및 특히 난소 내로의 원위성 전이(소위 크루켄버그 종양)에서도 국소화된다.

[0007] CLDN18.2에 지향된 키메라 IgG1 항체 IMAB362가 가니메드 파마슈티칼스 아게에 의해 개발되었다. IMAB362는 CLDN18.2의 첫번째 세포외 도메인(ECD1)을 고도의 친화성과 특이성으로 인식한다. IMAB362는 클라우딘 18의 밀접하게 관련된 스플라이스 변이체 1(CLDN18.1)을 비롯한 다른 어떠한 클라우딘 패밀리 멤버와도 결합하지 않는다. IMAB362는 정확한 종양 세포 특이성과 4개의 독립적이고 고도로 강력한 작용 메카니즘을 나타낸다. IMAB362는 표적과 결합하면 ADCC, CDC 및 종양 세포 표면에서의 표적의 가교에 의해 유도된 세포자멸사의 유발 그리고 직접적인 증식 저해에 의해 세포 사멸을 매개한다. 따라서, IMAB362는 시험관내 및 생체내에서 인간 위암 세포주를 비롯한 CLDN18.2-양성 세포를 효과적으로 용해시킨다. CLDN18.2-양성 암세포주들을 산생하는 마우스들은 생존에 유리하며 IMAB362로 처리시 최대 40%의 마우스들에서 종양의 관해를 나타낸다.

[0008] 시노몰구스 원숭이에 있어서 투여량 범위 탐색 연구, 28일 반복형 투여량 독성 연구와 마우스에 있어서 3개월 반복형 투여량 독성 연구를 비롯하여 IMAB362의 독성 및 PK/TK 프로파일이 마우스와 시노몰구스 원숭이에 대해 철저히 수행되었다. 마우스(최장 치료기간 3개월간 매주 투여, 최고 투여량 수준 400 mg/kg) 및 시노몰구스 원숭이(최대 5주일간 매주 최대 100 mg/kg 투여) 양자 모두에서 IMAB362 i.v.의 반복 투여가 잘 관용되었다. 전신 독성 또는 국소 독성의 징후는 관찰되지 않았다. 특히, 어떠한 독성 연구에서도 위장 독성은 관찰된 바 없다. IMAB362는 면역 활성화 및 시토카인 방출을 유도하지 않는다. 남성이나 여성의 생식기관에 대한 어떠한 약영향도 기록되지 않았다. IMAB362는 표적이 없는 조직에는 결합하지 않는다. 마우스에서의 바이오분포 연구 결과 위장 독성이 없는 이유는 아마도 건강한 위장 상피의 내강 위치(luminal site)에서의 밀착연접의 구획화(compartimentalization)에 기인하는 것으로 여겨지며, 이것이 IMAB362 에피토프의 접근성을 심하게 방해하는 것으로 보인다. 이러한 구획화는 악성 세포전환시 소실되어 당해 에피토프를 IMAB362에 의해 약물화가능하게(drugable) 만든다.

[0009] IMAB362는 초기 임상단계 시험중이다. I상 임상 연구가 사람을 대상으로 수행되었다. 3명의 각 환자들의 5 투여량 코호트 (33 mg/m^2, 100 mg/m^2, 300 mg/m^2, 600 mg/m^2, 1000 mg/m^2)에게 IMAB362를 일회 정맥투여하고 28일간 관찰하였다. IMAB362는 환자들에서 유관성 있는 안전성 관찰 없이 매우 잘 관용되었다. 한 명의 환자에 있어서 측정된 모든 종양 마커들이 치료 4주 이내에 유의적으로 감소되었다. 진행 중인 IIa상 임상 시험에서는 IMAB362가 반복 투여된다.

[0010] 본 발명에서 제시되는 데이터는 졸레드론산(ZA)와 같은 비스포스포네이트가, 특히 재조합 인터류킨-2(IL-2)와 함께 연계적으로 투여될 경우, IMAB362와 같은 항CLDN18.2 항체의 활성을 증가시킴을 나타낸다. 기저 메카니즘은 고도로 세포독성적인 면역세포 집단(γ9δ2 T 세포)의 활성화 및 확장이다.

[0011] 또한, 본 발명자들은 화학요법 약물이 암세포 표면에서 CLDN18.2를 안정화시키거나 그의 발현을 증가시킴으로 해서, IMAB362와 같은 항CLDN18.2 항체에 의한 CLDN18.2의 약물가능성(drugability)을 개선시킴을 입증하는 데이터를 제시한다. IMAB362와 같은 항CLDN18.2 항체와 특정 화학요법, 특히 위암 치료 또는 인간 고형암 치료에

사용되는 화학요법과의 상승 효과가 관찰되었다. 화학요법에 의해 전처리된 인간 암세포들은 항체-유도된 표적-특이적 사멸에 대해 보다 감수성이 높았다. 마우스 종양 모델에서, 항CLDN18.2 항체 플러스 화학요법을 이용한 종양 제어는 단일 약물로서 항CLDN18.2 항체를 이용한 경우보다 더 우수하다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0012] **발명의 개요**

[0013] 본 발명은 일반적으로 위암, 식도암, 췌장암, 폐암 예컨대 비소세포 폐암 (NSCLC), 난소암, 결장암, 간암, 두경부암, 및 담낭암 및 이들의 전이암, 특히 크루켄버그 종양과 같은 위암 전이 종양, 복강 전이 및 림프절 전이와 같은 암 질환을 비롯하여, CLDN18.2를 발현하는 세포와 연관된 질병을 효과적으로 치료 및/또는 예방하기 위한 조합 치료법을 제공한다. 특히 바람직한 암 질환은 위장, 식도, 췌장관, 담즙관, 폐 및 난소의 선암종이다.

과제의 해결 수단

[0014] 일 측면에서, 본 발명은 CLDN18.2에 결합하는 능력이 있는 항체를 γδ T 세포를 자극하는 물질과 조합적으로 환자에게 투여하는 것을 포함하는, 암 질환을 치료 또는 예방하기 위한 방법을 제공한다. γδ T 세포를 자극하는 물질은 CLDN18.2에 결합하는 능력이 있는 항체 또는 그의 조합의 투여 전, 투여와 동시 또는 투여 후에 첨가할 수 있다.

[0015] 일 구체예에서, γδ T 세포는 Vγ9Vδ2 T 세포이다. 일 구체예에서, γδ T 세포를 자극하는 물질은 질소-함유 비스포스포네이트 (아미노비스포스포네이트)와 같은 비스포네이트이다. 일 구체예에서, γδ T 세포를 자극하는 물질은 졸레드론산, 클로드론산, 이반드론산, 파미드론산, 리센드론산, 미노드론산, 올파드론산, 알렌드론산, 인카드론산 및 그의 염으로 이루어지는 군으로부터 선택된다. 일 구체예에서, γδ T 세포를 자극하는 물질은 인터류킨-2와 조합 투여된다.

[0016] 일 구체예에서, 본 발명의 방법은 CLDN18.2의 발현을 안정화 또는 증가시키는 물질을 투여하는 것을 더 포함한다. CLDN18.2의 발현은 암 세포의 세포 표면에서 일어나는 것이 바람직하다.

[0017] CLDN18.2의 발현을 안정화 또는 증가시키는 물질은 세포독성 및/또는 세포증식억제제일 수 있다. 일 구체예에서, CLDN18.2의 발현을 안정화 또는 증가시키는 물질은 세포 주기의 1 이상의 페이즈, 좋기로는 G1-페이즈가 아닌 세포 주기의 1 이상의 페이즈에 세포 주기의 정지(arrest)를 유도하거나 세포를 축적시키는 것을 유도하는 물질을 포함한다. CLDN18.2의 발현을 안정화 또는 증가시키는 물질은 안트라사이클린, 백금 화합물, 뉴클레오사이드 유사체, 탁산, 및 캄토테신 유사체, 또는 그의 전구약물, 및 그의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 물질을 포함할 수 있다. CLDN18.2의 발현을 안정화 또는 증가시키는 물질은 에피루비신, 옥살리플라틴, 시스플라틴, 5-플루오로우라실 또는 그의 전구약물 예컨대 카페시타빈, 도세탁셀, 이리노테칸, 및 그의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 물질을 포함할 수 있다. CLDN18.2의 발현을 안정화 또는 증가시키는 물질은 옥살리플라틴과 5-플루오로우라실 또는 그의 전구약물과의 조합, 시스플라틴과 5-플루오로우라실 또는 그의 전구약물과의 조합, 1 이상의 안트라사이클린과 옥살리플라틴과의 조합, 1 이상의 안트라사이클린과 시스플라틴과의 조합, 1 이상의 안트라사이클린과 5-플루오로우라실 또는 그의 전구약물과의 조합, 1 이상의 탁산과 옥살리플라틴과의 조합, 1 이상의 탁산과 시스플라틴과의 조합, 1 이상의 탁산과 5-플루오로우라실 또는 그의 전구약물과의 조합, 또는 1 이상의 캄토테신 유사체와 5-플루오로우라실 또는 그의 전구약물과의 조합을 포함할 수 있다. CLDN18.2의 발현을 안정화 또는 증가시키는 물질은 면역원성 세포 사멸을 유도하는 물질일 수 있다. 면역원성 세포 사멸을 유도하는 물질은 안트라사이클린, 옥살리플라틴 및 그의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 물질을 포함할 수 있다. CLDN18.2의 발현을 안정화 또는 증가시키는 물질은 에피루비신 및 옥살리플라틴의 조합을 포함할 수 있다. 일 구체예에서, 본 발명의 방법은 적어도 1종의 안트라사이클린, 적어도 1종의 백금 화합물 및 적어도 1종의 5-플루오로우라실 및 그의 전구약물들을 투여하는 것을 포함한다. 안트라사이클린은 에피루비신, 독소루비신, 다우노루비신, 이다루비신 및 발루비신으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 좋기로는, 안트라사이클린은 에피루비신이다. 백금 화합물은 옥살리플라틴 및 시스플라틴으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 뉴클레오사이드 유사체는 5-플루오로우라실 및 그의 전구약물들로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 탁산은 도세탁셀 및 파클리탁셀로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 캄토테신 유사체는 이리노테칸 및 토포테칸으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 일 구체예에서, 본 발명의 방법은 (i) 에피루비신, 옥살리플라틴 및 5-플루오로우라실, (ii) 에피루비신, 옥살리플라틴 및 카페시타빈, (iii) 에피루비신, 시스플

라틴 및 5-플루오로우라실, (iv) 에피루비신, 시스플라틴 및 카페시타빈, 또는 (v) 폴린산, 옥살리플라틴 및 5-플루오로우라실을 투여하는 것을 포함한다.

[0018] 본 발명의 방법은 세포독성 물질일 수 있는 적어도 1종의 추가 화학요법 약제를 투여하는 것을 더 포함할 수 있다.

[0019] CLDN18.2에 결합하는 능력이 있는 항체는 살아있는 세포 표면에 존재하는 CLDN18.2의 천연 에피토프에 결합할 수 있다. 일 구체예에서, CLDN18.2에 결합하는 능력이 있는 항체는 CLDN18.2의 제1 세포외 루프에 결합한다. 일 구체예에서, CLDN18.2에 결합하는 능력이 있는 항체는 하나 이상의 보체의존성 세포독성(CDC) 매개된 용해, 항체 의존성 세포독성(ADCC) 매개된 용해, 세포자멸사의 유도 및 증식 억제에 의해 세포 사멸을 매개한다. 일 구체예에서, CLDN18.2에 결합하는 능력이 있는 항체는 모노클로날, 키메라 또는 인간화 항체, 또는 항체 단편이다. 일 구체예에서, CLDN18.2에 결합하는 능력이 있는 항체는 (i) 수탁번호 DSM ACC2737, DSM ACC2738, DSM ACC2739, DSM ACC2740, DSM ACC2741, DSM ACC2742, DSM ACC2743, DSM ACC2745, DSM ACC2746, DSM ACC2747, DSM ACC2748, DSM ACC2808, DSM ACC2809, 또는 DSM ACC2810으로 기탁된 클론으로부터 생산 및/또는 수득가능한 항체, (ii) 상기 (i)의 항체의 키메라 형태 또는 인간화 형태인 항체, (iii) 상기 (i)의 항체의 특이성을 갖는 항체 및 (iv) 좋기로는 상기 (i)의 항체의 특이성을 갖고 (i)의 항체의 항원 결합부 또는 항원 결합자리 특히 가변부를 포함하는 항체로 이루어진 군으로부터 선택되는 항체이다. 일 구체예에서, 이 항체는 독소, 방사능동위원소, 약물 또는 세포독성 물질과 같은 치료제에 커플링된다.

[0020] 일 구체예에서, 본 발명의 방법은 CLDN18.2에 결합하는 능력이 있는 항체를 최대 1000 mg/m^2의 투여량으로 투여하는 것을 포함한다. 일 구체예에서, 본 발명의 방법은 CLDN18.2에 결합하는 능력이 있는 항체를 300 내지 600 mg/m^2의 투여량으로 반복 투여하는 것을 포함한다.

[0021] 일 구체예에서, 암은 CLDN18.2 양성이다. 일 구체예에서, 암 질환은 위암, 식도암, 췌장암, 폐암, 난소암, 결장암, 간암, 두경부암, 담낭암 및 이의 전이암으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 암 질환은 크루켄버그 종양, 복강 전이 및/또는 림프절 전이일 수 있다. 일 구체예에서, 암은 선암종, 특히 진행성(advanced) 선암종이다. 일 구체예에서, 암은 위의 암, 식도의 암, 특히 하부 식도의 암, 위식도 접합부의 암 및 위식도암으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 환자는 HER2/neu 음성 환자이거나 또는 HER2/neu 양성 상태이지만 트라스투주맙 요법으로는 치료되지 않는 환자일 수 있다.

[0022] 본 발명에 따라, CLDN18.2은 SEQ ID NO: 1에 따른 아미노산 서열을 갖는 것이 바람직하다.

[0023] 또 다른 측면에서, 본 발명은 CLDN18.2에 결합하는 능력이 있는 항체와 γδ T 세포를 자극하는 물질을 포함하는 의약 조제품(medical preparation)을 제공한다. 본 발명의 의약 조제품은 CLDN18.2의 발현을 안정화 또는 증가시키는 물질을 더 포함할 수 있다. CLDN18.2에 결합하는 능력이 있는 항체 및 γδ T 세포를 자극하는 물질, 및 임의로 CLDN18.2의 발현을 안정화 또는 증가시키는 물질은 의약 조제품 내에 혼합물로서 또는 서로 분리된 상태로 존재할 수 있다. 의약 조제품은 CLDN18.2에 결합하는 능력이 있는 항체를 포함하는 제1 용기 및 γδ T 세포를 자극하는 물질을 포함하는 용기, 그리고 임의로 CLDN18.2의 발현을 안정화 또는 증가시키는 물질을 포함하는 용기를 포함하는 키트일 수 있다. 의약 조제품은 또한 암 치료용 제제, 특히 본 발명의 방법에 사용되는 제제의 사용에 관한 인쇄된 지침서를 더 포함할 수 있다. 의약 조제품의 여러가지 상이한 구체예들, 특히 γδ T 세포를 자극하는 물질과 CLDN18.2의 발현을 안정화 또는 증가시키는 물질의 상이한 구체예들은 본 발명의 방법과 관련하여 전술한 바와 같다.

[0024] 본 발명은 또한 예컨대 γδ T 세포를 자극하는 물질, 및 임의로 CLDN18.2의 발현을 안정화 또는 증가시키는 물질과 조합 투여되기 위한, 본 발명에 설명된 방법에 사용되기 위한 CLDN18.2에 결합하는 능력이 있는 항체와 같은 물질 역시도 제공한다.

[0025] 본 발명의 기타 특징 및 장점은 이하의 상세한 설명과 청구범위로부터 명확히 이해될 것이다.

도면의 간단한 설명

[0026] 도 1. 위암 세포에 대한 화학요법의 효과. KatoIII 세포를 96 시간 배양하여 세포 주기를 G0/G1-페이즈에 멈추게 하고 CLDN18.2의 하향조절을 유도한다. 세포증식억제 다양한 세포 주기 페이즈(S-페이즈 (5-FU) 또는 G2-페이즈 (에피루비신))로 세포 주기를 정지시키는 결과를 야기하는 세포증식 억제 화합물들은 CLDN18.2-발현을 안정화시킨다.

도 2. 위암 세포에 대한 화학요법의 효과. a/b: 위암 세포에서 CLDN18.2의 전사체 및 단백질 수준에 미치는 화학요법의 효과. c: 화학요법물질로 처리된 위암 세포에 대한 세포외 IMAB362 결합의 유세포분석.

도 3. 위암 세포에 대한 화학요법의 효과. 세포 주기의 다양한 페이즈(S/G2-페이즈 (이리노테칸) 또는 G2-페이즈 (도세탁셀))에서 세포 주기를 정지시키는 세포증식억제 화합물들.

도 4. 화학요법 약제 전처리 후의 위암 세포의 IMAB362-유도된 ADCC 매개된 사멸

도 5. 위암 세포에 대한 화학요법의 효과. a: 이리노테칸,_도세탁셀 또는 시스플라틴으로 처리된 세포들은 배지 배양된 표적 세포에 비해 살아있는 세포 수준이 더 낮은 것으로 나타났다. b: 이리노테칸, 도세탁셀 또는 시스플라틴으로 처리된 세포에서의 CLDN18.2 발현은 배지 배양된 세포에 비해 증가됨. c/d: 이리노테칸, 도세탁셀 또는 시스플라틴에 의한 세포 처리는 ADCC를 유도하는 IMAB362의 능력을 증강시킨다.

도 6. IMAB362-유도된 CDC에 대한 화학요법의 효과

도 7. 이펙터 세포에 대한 화학요법의 효과

도 8. ZA/IL-2 보강된 배양체 중의 PBMCs의 확장(expansion)

도 9. ZA/IL-2 보강된 PBMC 배양체 중의 Vγ9Vδ2 T 세포의 농축(enrichment)

도 10. ZA가 보강된 배지에서의 Vγ9Vδ2 T 세포의 농축 및 IL-2 투여량 증가

도 11. ZA-펄스된 단핵구 및 인간 암 세포와 함께 인큐베이션된 후 Vγ9Vδ2 T 세포의 확장 및 세포독성 활성

도 12. PBMC 배양체 중 여러가지 세포 종류의 ZA-의존성 발달

도 13. ZA/IL-2 처리 후 Vγ9Vδ2 T-세포 상의 표면 마커의 디스플레이

도 14. CLDN18.2-양성 NUGC-4 위암 세포에 대한 IMAB362에 의한 Vγ9Vδ2 T 세포의 ADCC 활성

도 15. 이펙터 세포로서 Vγ9Vδ2 T 세포를 이용한 IMAB362의 ADCC

도 16. 표적 세포 상의 CLDN18.2의 표면 국소화에 미치는 ZA의 효과

도 17. 이펙터 세포에 대한 ZA/IL-2 처리 및 화학요법의 효과

도 18. 마우스에 있어서 컨쥬게이트된 항체를 이용한 생물분포 연구

도 19. HEK293~CLDN18.2 종양 이종이식편(종양 xenografts)의 조기 치료

도 20. 진행된 HEK293~CLDN18.2 종양 이종이식편의 치료

도 21. 위암 이종이식편의 피하 종양 성장에 대한 IMAB362의 효과

도 22. NCI-N87~CLDN18.2 위암종 이종이식편에 미치는 IMAB362를 이용한 면역요법의 효과

도 23. NCI-N87~CLDN18.2 이종이식편에 대한 IMAB362 및 EOF의 조합 치료 효과

도 24. NUGC-4~CLDN18.2 이종이식편에 대한 IMAB362 및 EOF 조합 치료 효과

도 25. NSG 마우스에 있어서 IMAB362에 의한 육안으로 보이는 종양의 제어에 미치는 ZA/IL-2 유도된 Vγ9Vδ2 T 세포의 효과

도 26. CLS-103~cldn18.2 동종이식편 종양에 대한 IMAB362 및 EOF의 조합 치료 효과

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0027] 이하에 본 발명을 보다 상세히 설명하지만, 본 발명이 본 명세서에 기재된 특정 방법론, 프로토콜 및 시약들로 한정되는 것이 아님을 이해하여야 한다. 또한 본 명세서에 사용된 용어들은 어디까지나 특정 구체예를 설명하기 위한 것일 뿐, 본 발명의 범위를 한정하려는 의도로 해석되어서는 아니되며 본 발명의 범위는 청구범위에 의해서만 한정되는 것으로 이해되어야 한다. 달리 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 통상의 기술자에게 흔히 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다.

[0028] 이하에서, 본 발명의 요소들을 설명한다. 이 구성 요소들은 특정 구체예와 함께 리스트되지만, 이들은 여하한 방식 및 여하한 횟수로든 조합되어 부가적인 구체예를 생성할 수 있는 것으로 이해되어야 한다. 다양한 실시예

와 바람직한 구체예들은 다양하게 설명된 실시예와 바람직한 구체예들은 본 발명을 단지 명시적으로 설명된 구체예들만으로 한정짓는 것으로 해석되어서는 아니된다. 이 설명은 명시적으로 설명된 구체예들과 여하한 수의 개시된 및/또는 바람직한 구성 요소들을 조합하는 구체예들을 뒷받침하고 포괄하는 것으로 이해되어야 한다. 뿐만 아니라, 이 출원의 모든 설명된 구성요소들의 여하한 순열 및 조합들 역시 문맥상 달리 지시되지 않는 한, 본 출원의 설명에 의해 개시된 것으로 간주되어야 한다.

[0029] 좋기로는, 본 명세서에 사용된 용어들은 "A multilingual glossary of biotechnological terms: (IUPAC Recommendations)", H.G.W. Leuenberger, B. Nagel, 및 H. Koebl, Eds., Helvetica Chimica Acta, CH-4010 Basel, Switzerland, (1995)에 설명된 바와 같이 정의된다.

[0030] 본 발명을 실시하는데 있어서는 달리 설명되지 않는 한, 이 기술분야의 문헌 (cf., 예컨대, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Edition, J. Sambrook 외 eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor 1989)에서 설명되는 화학, 생화학, 세포생물학, 면역학 및 재조합 DNA 기술의 상법이 이용될 것이다.

[0031] 이하의 상세한 설명과 청구범위에 걸쳐, 문맥상 달리 요구되지 않는 한 "포함하다(comprise)" 및 그의 변형어들 예컨대 "comprises" 및 "comprising"은 명시된 멤버, 정수 또는 단계 또는 멤버, 정수 또는 단계들의 그룹을 포괄하되, 비록 몇몇 구체예에서는 다른 멤버, 정수 또는 단계 또는 멤버, 정수 또는 단계들의 그룹이 배제될 수도 있지만, 다른 멤버, 정수 또는 단계 또는 멤버, 정수 또는 단계들의 그룹이 배제되는 것은 아니다, 즉, 본 발명의 청구대상은 명시된 멤버, 정수 또는 단계 또는 멤버, 정수 또는 단계들의 그룹들을 포함한다. 본 발명을 설명함에 있어 문맥상 사용된 관사 "a" 및 "an" 및 "the" 그리고 이와 유사한 참조 용어들(특히 청구범위 문맥상)은 달리 언급되거나, 반대 의미를 갖는 것이 명백하지 않은 한, 단복수를 아우르는 것이다.

[0032] 본 발명의 값들을 범위로 인용하는 것은 단지 해당 범위에 속하는 각각의 개별 값들을 개별적으로 손쉽게 칭하기 위한 것이다. 달리 언급하지 않는 한, 각각의 개별적인 값은 본 명세서에서 개별적으로 언급된 것처럼 명세서에 인용된 것으로 간주된다. 본 발명에 설명된 모든 방법들은 달리 언급하거나 문맥상 모순되지 않는 한, 적절한 순서로 실시될 수 있다. 본 명세서에 제공된 여하한 그리고 모든 예시 또는 예시적 언어 (예컨대 "와 같은")는 본 발명을 좀 더 잘 설명하기 위해 의도된 것으로, 본 발명의 범위를 달리 한정지으려는 것이 아니다. 명세서 내의 어떠한 언어도 청구되지 않은 구성요소를 본 발명을 실시하는데 필수적인 것으로 가리키는 것으로 해석되어서는 아니된다.

[0033] 본 발명의 명세서 전반에 걸쳐 몇가지 문헌들이 인용된다. 인용된 이들 각각의 상기 또는 하기 문헌들 (모든 특허, 특허출원, 과학간행물, 제조업체의 설명서, 지침서 등)은 모두 그 내용 전체가 본 발명에 참조 병합된다. 이들 언급된 문헌들 중 어느 것도 선행발명임을 이유로, 본 발명이 그러한 개시내용에 선행한다고 하지 못함을 인정하는 것으로 해석되어서는 아니된다.

[0034] 용어 "CLDN18"은 클라우딘 18에 관한 것으로, 클라우딘 18 스플라이스 변이체 1 (클라우딘 18.1 (CLDN18.1)) 및 클라우딘 18 스플라이스 변이체 2 (클라우딘 18.2 (CLDN18.2))를 비롯한 여하한 변이체들을 포괄한다.

[0035] 용어 "CLDN18.2"는 좋기로는 인간 CLDN18.2에 관한 것으로, 좋기로는, 서열목록의 SEQ ID NO: 1에 따른 아미노산 서열 또는 상기 아미노산 서열의 변이체를 포함하는, 좋기로는 이러한 서열로 구성된 단백질에 관한다.

[0036] 용어 "CLDN18.1"은 좋기로는 인간 CLDN18.1에 관한 것으로, 특히 서열목록의 SEQ ID NO: 2에 따른 아미노산 서열 또는 상기 아미노산 서열의 변이체를 포함하는, 좋기로는 이러한 서열로 구성된 단백질에 관한다.

[0037] 본 발명에 있어서 용어 "변이체(variant)"는 특히 돌연변이체, 스플라이스 변이체, 컨포메이션(conformations), 이소형(isoforms), 대립형 변이체(allelic variants), 종 변이체(species variants) 및 종 동족체(species homologs), 특히 자연적으로 존재하는 것들을 칭한다. 대립형 변이체는 어떤 유전자의 정상적 서열에 있어서의 변경과 관련된 것으로, 그 유의성은 종종 불확실하다. 주어진 유전자에 대한 완전한 유전자 시퀀싱에 의해 종종 수많은 대립형 변이체들이 동정된다. 종 동족체는 주어진 핵산이나 아미노산 서열의 그것과 기원을 달리하는 다른 종의 핵산 또는 아미노산 서열이다. "변이체"라는 용어는 후번역적으로 변형된 변이체 및 컨포메이션 변이체들을 모두 포괄한다.

[0038] 본 발명에 따라, 용어 "CLDN18.2 양성 암"은 CLDN18.2를 발현하는 암세포, 좋기로는 상기 암세포 표면에 CLDN18.2를 발현하는 암세포를 포함하는 암을 의미한다.

[0039] "세포 표면"이라 함은 기술분야에서 흔히 갖는 그대로의 의미로 사용되며, 따라서 단백질 및 기타 분자들이 결합할 수 있도록 접근가능한 세포의 외부를 포함한다.

[0040] CLDN18.2는 만일 그것이 상기 세포의 표면에 위치하면 세포 표면 상에서 발현되며 그 세포에 첨가된 CLDN18.2-특이적 항체에 의한 결합에 대해 접근을 허용한다.

[0041] 본 발명에 있어서, CLDN18.2는 만일 발현 수준이 위장 세포 또는 위장 조직에서의 발현 수준보다 낮을 경우 세포에서 실제로 발현되지 않는다. 좋기로는, 발현 수준은 위장 세포 또는 위장 조직에서의 발현 수준의 10% 미만, 좋기로는 5% 미만, 3% 미만, 2% 미만, 1% 미만, 0.5% 미만, 0.1% 미만 또는 0.05% 미만 또는 심지어 이보다 더 낮은 것이 바람직하다. 좋기로는, CLDN18.2는 만일 발현 수준이 위장이 아닌 다른 비암(non-cancerous) 조직에서의 발현 수준을 2배 이하, 좋기로는 1.5배 이하로 초과할 경우 실제로 세포에서 발현되지 않으며, 바람직하게는, 상기 비암 조직에서의 발현 수준을 초과하지 않는 것이 좋다. 좋기로는, CLDN18.2는 만일 발현 수준이 검출한계 미만이고/미만이거나 세포에 첨가된 CLDN18.2-특이적 항체에 의한 결합을 허용하기에 발현 수준이 너무 낮을 경우 세포에서 실제로 발현되지 않는다.

[0042] 본 발명에 따라, CLDN18.2는 발현 수준이 위장이 아닌 비암 조직에서의 발현 수준을 좋기로는 2배 초과, 좋기로는 10배 초과, 100배 초과, 1000배 초과, 또는 10000배 초과할 경우 세포에서 발현된다. 좋기로는, CLDN18.2는 발현 수준이 검출한계를 상회하고/상회하거나 세포에 첨가된 CLDN18.2-특이적 항체에 의한 결합을 허용하기에 충분할 정도로 발현 수준이 높을 경우 세포에서 발현된다. 좋기로는, 세포에서 발현된 CLDN18.2는 상기 세포의 표면에서 발현되거나 노출된다.

[0043] 본 발명에 따라, "질병/질환"이라는 용어는 암, 특히 본 명세서에 설명된 유형의 암을 비롯하여 모든 병리적 상태를 일컫는다. 암 또는 암의 특정 형태에 대한 모든 칭호는 그의 암 전이도 포괄한다. 바람직한 구체예에서, 본 출원발명에 따라 치료될 질병은 CLDN18.2를 발현하는 세포와 연관되어 있다.

[0044] "CLDN18.2를 발현하는 세포와 연관된 질병" 또는 이와 비슷한 표현은 본 발명에 따라, CLDN18.2가 병에 걸린 조직 또는 장기의 세포에서 발현됨을 의미한다. 일 구체예에서, 병에 걸린 조직이나 장기의 세포에서 CLDN18.2의 발현은 건강한 조직 또는 장기에서의 상태에 비해 증가된다. 증가라 함은 적어도 10%, 특히 적어도 20%, 적어도 50%, 적어도 100%, 적어도 200%, 적어도 500%, 적어도 1000%, 적어도 10000% 또는 그 이상의 증가를 의미한다. 일 구체예에서, 발현은 오직 병에 걸린 조직에서만 발견되는 반면, 건강한 조직에서는 발현이 억제된다. 본 발명에 따라, CLDN18.2를 발현하는 세포와 연관된 질환에는 암 질환이 포함된다. 또한, 본 발명에 따라, 암 질환은 좋기로는 암세포가 CLDN18.2를 발현하는 질환이다.

[0045] 본 발명에서, "암 질환" 또는 "암"은 세포 성장, 증식, 분화, 유착 및/또는 이동이 비정상적으로 조절됨을 특징으로 하는 질환을 포괄한다. "암 세포"라 함은 급속하게 제어되지 않는 세포 증식에 의해 성장하고 그 새로운 성장을 개시시킨 자극이 멈춘 후에도 지속적으로 성장하는 비정상적인 세포를 의미한다. 좋기로는, "암 질환"은 CLDN18.2를 발현하는 세포에 의해 특징지어지며 암 세포는 CLDN18.2를 발현한다. CLDN18.2를 발현하는 세포는 좋기로는 암 세포이며, 본 발명에서 설명된 암의 암 세포인 것이 바람직하다.

[0046] "선암종(Adenocarcinoma)"은 샘조직에 기원을 둔 암이다. 이 조직은 또한 상피 조직이라 알려진 보다 큰 조직 카테고리의 일부이기도 하다. 상피 조직에는 피부, 샘 및 신체의 캐비티와 장기들을 라이닝하는 다양한 기타 조직이 포함된다. 상피는 발생학적으로 외배엽, 내배엽 및 중배엽으로부터 유래한다. 해당 세포가 분비 특성을 갖는 한, 선암종으로 분류되기 위해, 이들이 반드시 샘의 일부일 필요는 없다. 암종의 이러한 형태는 인간을 비롯한 어느 정도 고등 포유동물에서 일어날 수 있다. 잘 분화된 선암종은 이들이 유래한 샘 조직과 유사한 경향이 있는 반면, 덜 분화된 선암종은 그렇지 않을 수 있다. 생검에 의해 세포를 염색함으로써, 병리학자는 종양이 선암종인지 또는 다른 유형의 암인지 결정할 수 있다. 선암종은 샘들이 체내 도처에 존재하는 특성 상 신체의 많은 조직에서 일어날 수 있다. 각각의 샘이 동일한 물질을 분비하는 것이 아닐 수 있으나, 세포에 대해 외분비 기능이 있는 한, 샘이라 간주되며 그의 악성 형태는 따라서 선암종이라 명명된다. 악성 선암종은 다른 조직을 침습하며 시간이 충분할 경우 종종 전이되기도 한다. 난소 선암종은 난소 암종의 가장 흔한 유형이다. 이것은 장액성(serous) 및 점액성(mucinous) 선암종, 투명한 세포 선암종 및 자궁내막모양 선암종을 포함한다.

[0047] "전이(metastasis)"라 함은 암 세포가 그의 원래 자리로부터 체내의 다른 부분으로 확산되는 것을 의미한다. 전이의 형성은 매우 복잡한 과정으로서 종양으로부터 악성 세포의 탈리, 세포외 매트릭스의 침습, 상피기저막의 침입에 의한 체강 및 혈관으로의 유입 및 이어서 혈액에 의한 운반 후 표적 장기내로의 침윤에 의존한다. 마지막으로, 표적 부위에서의 새로운 종양의 성장은 혈관신생에 의존한다. 종양 전이는 원발성 종양의 제거 후에도 종양 세포 또는 성분들이 남아있을 수 있거나 전이 잠재능을 발달시키기 때문에 종종 발생한다. 일 구체예에서, 본 발명에 따라 "전이"라는 용어는 원발성 종양 및 국소 림프절 시스템으로부터 멀리 떨어진 전이에 관한 것인 "원격전이(distant metastasis)"에 관한 것이다. 일 구체예에서, 본 발명에 따른 "전이"라는 용어는 림프절 전

이에 관한 것이다. 본 발명의 치료법으로 치료가능한 전이의 한 가지 특별한 형태는 원발 부위로서 위암으로부터 기원하는 전이이다. 바람직한 구체예에서 이러한 위암 전이는 크루켄버그(Krukenberg) 종양, 복강 전이 및/또는 림프절 전이이다.

[0048] 크루켄버그 종양은 모든 난소 종양의 1% 내지 2%를 차지하는, 난소의 흔치 않은 전이 종양이다. 크루켄버그 종양의 예후는 여전히 나쁘며 크루켄버그 종양의 확립된 치료법도 없는 실정이다. 크루켄버그 종양은 난소의 전이성 반지세포 선암종이다. 위장은 대부분의 크루켄버그 종양 케이스의 원발 부위이다(70%). 결장, 충수 및 유방의 암종(주로 침윤성 소엽 암종)이 두 번째로 흔한 원발 부위이다. 담낭, 담도관, 췌장, 소장, 바터 팽대부, 자궁경부 및 방광/요막관의 암종으로부터 기원하는 흔치 않은 경우의 크루켄버그 종양 역시 보고된 바 있다. 원발성 암종의 진단과 그에 이은 난소 관련 발견 사이의 간격은 대개 6개월 이하이지만, 이보다 더 긴 기간도 보고된 바 있다. 많은 경우, 원발성 종양은 매우 크기가 작아 종종 검사시 놓칠 수 있다. 위장이나 다른 장기의 이전의 암종 이력은 오직 20% 내지 30%에 불과하다.

[0049] 크루켄버그 종양은 위장-난소 축에서 가장 흔한, 암의 선택적 확산례이다.이 종양 확산 축(axis of tumor spread)은 역사적으로 많은 병리학자들의 관심을 끌었는데, 특히 위 신생물이 다른 조직의 관여 없이 난소에 선택적으로 전이된 것으로 밝혀진 경우 특히 그러했다. 난소로의 위 암종의 전이 경로는 오랫동안 미스터리였지만, 현재는 역행 림프성 확산이 이 전이의 가장 가능성 높은 경로라는 것이 분명해졌다.

[0050] 크루켄버그 종양을 앓는 여성들은 전형적으로 50대인 전이성 암종이 있는 환자들에 비해, 평균 연령이 45세라는 점에서 이례적으로 젊은 경향이 있다. 이와 같은 젊은 연령 분포는 부분적으로는 젊은 여성의 위장 반지세포 암종의 증가된 빈도와 연관이 있을 수 있다. 흔히 나타나는 증상들은 대개 난소와 연관이 있고, 가장 흔한 증상은 복부 통증과 팽만감(주로 양측의 커다란 난소 덩어리에 기인한다)이다. 나머지 환자들은 비특이적인 위장 증상을 나타내거나 증상이 없다. 또한, 크루켄버그 종양은 난소 간질에 의한 호르몬 생산에 기인하는 남성화와 관련이 있는 것으로 보고되고 있다. 이 질병의 50%에서 복수(ascites)가 존재하며 대개는 악성 세포로 드러난다.

[0051] 크루켄버그 종양은 보고된 케이스의 80% 초과에서 양측성이다. 난소는 대개 비대칭적으로 커지며, 융기가 난 윤곽(bosselated contour)을 갖는다. 구획화된 표면은 황색 또는 백색이며; 종종 낭종성(cystic)이기는 하지만 이들은 대개 고형이다. 크루켄버그 종양이 있는 난소의 캡슐형 표면이 대개 매끄럽고 유착물 또는 복강 침적물이 없다는 것은 중요한 점이다. 난소에 대한 다른 전이성 종양이 표면 이식물과 연관이 있는 점을 고려할 때 이는 흥미로운 것이다. 이것은 크루켄버그 종양의 육안 관찰(gross) 형태학이 어째서 원발성 난소 종양처럼 속기 쉽게 보이는지를 설명해주는 것일 수 있다. 그러나, 크루켄버그 종양의 양측성은 그의 전이 특성에서도 일관되게 유지된다.

[0052] 크루켄버그 종양이 있는 환자들은 전체적으로 사망률이 유의적으로 높다. 대부분의 환자들은 2년 이내에 사망한다 (메디안 생존율, 14 개월). 몇가지 연구 결과 난소로의 전이가 발견된 후에 원발성 종양이 동정된 경우 예후가 나쁘고 원발성 종양이 숨겨진 채 남아있는 경우에는 예후가 더 나빠진다.

[0053] 문헌상 크루켄버그 종양에 대한 최적의 치료 전략은 이제까지 명확하게 확립된 바 없다. 외과적 절제가 실시되어야 하는지에 대해서도 적절히 지침된 바 없다. 크루켄버그 종양이 있는 환자들의 예후에 화학요법이나 방사능요법은 유의적인 효과를 미치지 못한다.

[0054] "치료하다(treat)"라 함은 대상자에서 종양의 크기 또는 종양의 수를 감소시키는 것; 대상자의 질환 진행을 멈추거나 둔화시키는 것; 대상자에서 새로운 질병의 발달을 억제하거나 둔화시키는 것; 현재 질병에 걸려 있거나 이전에 질병에 걸렸었던 대상자에서 증상 및/또는 재발의 빈도나 위중도를 감소시키는 것; 및/또는 대상자의 수명을 연장, 즉 증가시키는 것을 비롯하여, 질병을 예방 또는 제거하기 위해, 대상자에게 화합물이나 조성물 또는 화합물이나 조성물의 조합을 투여하는 것을 의미한다.

[0055] 특히, "질병의 치료"라는 용어에는, 질병이나 그의 증상을 치유, 기간 단축, 완화, 예방, 둔화시키거나 진행이나 악화를 억제하거나 또는 개시를 예방 또는 둔화시키는 것이 포함된다.

[0056] 본 발명에서 "환자"라는 용어는 치료의 대상자, 특히 질병에 걸린 대상자를 의미하며 여기에는 인간, 비인간 영장류 또는 기타 동물, 특히 소, 말, 돼지, 양, 염소, 개, 고양이와 같은 포유동물 또는 마우스나 래트와 같은 설치류가 포함된다. 특히 바람직한 구체예에서, 환자는 인간이다.

[0057] γδ T 세포 (감마 델타 T 세포)는 그 표면에 독특한 T 세포 수용체(TCR: T cell receptor)를 지니는 T 세포의 작은 서브세트이다. 대다수의 T 세포들은 α- 및 β-TCR 사슬로 칭해지는 2개의 당단백질 사슬로 구성된 TCR을 갖는다. 이와 대조적으로, γδ T 세포에서는, TCR이 하나의 γ-사슬과 하나의 δ-사슬로 이루어져 있다. 이 T

세포 그룹은 대개 αβT 세포에 비해 매우 드물다. 인간의 γδ T 세포는 감염성 질환 및 자가면역과 같은 스트레스-감시(stress-surveillance) 반응에 있어서 중요한 역할을 한다. 종양에 있어서 형질전환-유도된 변화 역시 γδ T 세포에 의해 매개되는 스트레스-감시 반응을 일으켜 항종양 면역성을 증강시키는 것으로 유추된다. 항원 인게이지먼트 후, 병변에서 활성화된 γδ T 세포가 다른 이펙터 세포의 소환을 매개하는 케모카인 및/또는 시토카인(예컨대 INFγ, TNFα)을 제공하고 세포독성(죽은 수용체와 세포용해성 과립구 경로를 통해) 및 ADCC와 같은 즉각적인 이펙터 기능을 나타낸다는 것은 매우 중요하다.

[0058] 말초혈액에서 대부분의 γδ T 세포들은 Vγ9Vδ2 T 세포 수용체 (TCRγδ)를 발현한다. Vγ9Vδ2 T 세포는 인간과 영장류만 가지며 이들은 많은 급성 염증에서 급속히 확장함에 따라 침입 병원균에 의한 "위험"을 감지하는데 있어서 초기에 중요한 역할을 하는 것으로 추정되며 예컨대 결핵, 살모넬라증, 에를리히증, 브루셀라증, 야토증, 리스테리아증, 톡소플라즈마증 및 말라리아 있어서 수일 내에 다른 모든 림프구들을 능가할 수 있다.

[0059] γδ T 세포들은 메발로네이트 경로를 통해 포유동물 세포에서 생산된 이소펜테닐 파이로포스페이트(IPP) 및 세균에서 합성된 파이로포스페이트와 같은 작은 비펩타이드성 포스포릴화 항원(포스포항원)에 대해 반응한다. 정상 세포에서의 IPP 생산이 γδ T 세포의 활성화에 충분치 않은 반면, 종양 세포에서의 메발로네이트 경로의 조절곤란은 IPP의 축적과 γδ T 세포의 활성화를 유도한다. IPPs는 메발로네이트 경로 효소인 파네실 파이로포스페이트 합성효소 (FPPS)를 억제하는 아미노비스포스포네이트에 의해 치료적으로 증가될 수도 있다. 그 중에서도, 졸레드론산(ZA, 졸레드로네이트, Zometa™, Novartis)는 이러한 아미노비스포스포네이트를 대표하는 것으로, 이것은 이미 골다공증 및 전이성 골질환의 치료를 위해 환자에게 임상적으로 투여되고 있다. 시험관내에서 PBMCs 치료시, ZA는 특히 단핵구에 의해 흡수된다. IPP는 단핵구에 축적되어 γδ T 세포의 발달을 자극하는 항원-제시 세포로 분화된다. 이 세팅에서는, 활성화된 γδ T 세포에 대한 성장 및 생존 인자로서 인터류킨-2 (IL-2)의 첨가가 바람직하다. 마지막으로, 어떤 알킬화 아민이 시험관내에서 Vγ9Vδ2 T 세포를 활성화시키는 것으로, 그러나 단지 밀리몰 농도의 수준으로 활성화시키는 것으로 설명된 바 있다.

[0060] 본 발명에 따라, "γδ T 세포를 자극하는 물질"이라는 용어는 시험관내 및/또는 생체내에서, 특히 γδ T 세포의 활성화 및 확장을 유도함으로써, γδ T 세포, 특히 Vγ9Vδ2 T 세포의 발달을 자극하는 화합물에 관한다. 이 용어는 좋기로는 메발로네이트 경로 효소인 파네실 파이로포스페이트 합성효소 (FPPS)를 억제함으로써, 포유동물 세포에서 생산된 이소펜테닐 파이로포스페이트 (IPP)를 시험관내 및/또는 생체내에서 증가시키는 화합물에 관한다.

[0061] γδ T 세포를 자극하는 특정한 일군의 화합물들은 비스포스포네이트, 특히 질소-함유 비스포스포네이트 (N-비스포스포네이트; 아미노비스포스포네이트)이다.

[0062] 예컨대, 본 발명에 사용되기에 적절한 비스포스포네이트에는 다음 화합물들 중 하나 이상, 그의 유사체 및 유도체, 약학적 염, 수화물, 에스테르, 컨쥬게이트 및 전구약물들이 포함될 수 있다:

[0063] [1-히드록시-2-(1H-이미다졸-1-일)에탄-1,1-디일]비스(포스폰산), 졸레드론산, 예컨대 졸레드로네이트;

[0064] (디클로로-포스포노-메틸)포스폰산, 예컨대 클로드로네이트

[0065] {1-히드록시-3-[메틸(펜틸)아미노]프로판-1,1-디일}비스(포스폰산), 이반드론산, 예컨대 이반드로네이트

[0066] (3-아미노-1-히드록시프로판-1,1-디일)비스 (포스폰산), 파미드론산, 예컨대 파미드로네이트

[0067] (1-히드록시-1-포스포노-2-피리딘-3-일-에틸)포스폰산, 리세드론산, 예컨대 리세드로네이트;

[0068] (1-히드록시-2-이미다조[1,2-a]피리딘-3-일-1-포스포노에틸)포스폰산, 미노드론산;

[0069] [3-(디메틸아미노)-1-히드록시프로판-1,1-디일]비스(포스폰산), 올파드론산.

[0070] [4-아미노-1-히드록시-1-(히드록시-옥시도-포스포릴)-부틸]포스폰산, 알레드론산, 예컨대 알레드로네이트;

[0071] [(시클로헵틸아미노)메틸렌]비스(포스폰산), 인카드론산;

[0072] (1-히드록시에탄-1,1-디일)비스(포스폰산), 에티드론산, 예컨대 에티드로네이트; 및

[0073] {[(4-클로로페닐)티오]메틸렌}비스(포스폰산), 틸루드론산.

[0075] 본 발명에 따라, 졸레드론산 (INN) 또는 졸레드로네이트 (Novartis가 상표명 Zometa, Zomera, Aclasta 및

Reclast로 시판중임)는 특히 바람직한 비스포스포네이트이다. Zometa는 다발성 골수종 및 전립선암과 같은 암 환자의 골격 골절의 예방과 골다공증을 치료하는데 이용된다. 이것은 또한 악성 고칼슘혈증의 치료에도 이용될 수 있고 골전이로 인한 통증을 치료하는데도 도움이 될 수 있다.

[0076] 한 가지 바람직한 구체예에서, 본 발명에 따른 γδ T 세포를 자극하는 물질은 IL-2와 조합 투여된다. 이러한 조합은 γ9δ2 T 세포의 확장을 매개하고 활성화시키는데 특히 효과적인 것으로 나타났다.

[0077] 인터류킨-2(IL-2)는 면역계에서 시토카인 시그널링 분자의 한 종류인 인터류킨이다. 이것은 림프구를 유인하는 단백질이며 미생물 감염에 대한 우리 몸의 자연적인 반응의 일부를 구성하여, 우리 몸(self)과 외래 물질(non-self)을 구별한다. IL-2는 림프구에 의해 발현되는 IL-2 수용체에 대한 결합에 의해 그의 효력을 매개한다.

[0078] 본 발명에 사용되는 IL-2는 γδ T 세포의 자극을 지지하거나 자극을 가능케하는 IL-2이면 어느 것이든 무방하고, 모든 종, 좋기로는 인간으로부터 유래될 수 있다. I1-2는 분리되거나 재조합적으로 생산되거나 합성적인 IL-2일 수 있고, 자연발생적이거나 변형된 IL-2일 수 있다.

[0079] "CLDN18.2의 발현을 안정화 또는 증가시키는 물질"이라는 용어는, 세포에 그 물질이나 물질들의 조합물이 제공될 경우, 이러한 물질이나 물질들의 조합물이 제공되지 않은 세포의 상황에 비해, CLDN18.2의 RNA 및/또는 단백질 수준 증가를 초래하는, 좋기로는 그 세포 표면 상에 CLDN18.2 단백질의 수준을 증가시키는 결과를 초래하는 물질 또는 물질들의 조합물을 일컫는다. 좋기로는, 상기 세포는 암세포, 특히 CLDN18.2를 발현하는 세포, 예컨대 본 발명에 설명된 유형의 암의 세포들인 것이 좋다. "CLDN18.2의 발현을 안정화 또는 증가시키는 물질"이라는 용어는 특히, 세포에 그 물질이나 물질들의 조합물이 제공될 경우, 이러한 물질이나 물질들의 조합물이 제공되지 않은 세포의 상황에 비해, 상기 세포의 표면 상에 더 높은 CLDN18.2 밀도를 결과시키는 물질 또는 물질들의 조합물을 일컫는다. "CLDN18.2의 발현을 안정화시키다"라는 표현은 특히 그 물질 또는 물질들의 혼합물이 CLDN18.2의 발현 저하를 예방하거나 발현 저하를 감소시키는 상황을 포함하며, 예컨대, 그 물질 또는 물질들의 조합물이 제공되지 않을 경우 CLDN18.2의 발현이 저하되거나 또는 그 물질 또는 물질들의 조합물이 제공됨으로 해서 CLDN18.2 발현의 상기 저하가 예방되거나 발현 저하가 감소되는 것이 이에 해당한다. "CLDN18.2의 발현을 증가시키다"라는 표현은 특히, 그 물질 또는 물질들의 조합물이 CLDN18.2의 발현을 증가시키는 상황을 포함하며, 예컨대, 그 물질 또는 물질들의 조합물이 제공되지 않을 경우 CLDN18.2의 발현이 기본적으로 저하되거나, 일정하게 유지되거나 증가하는 상황 및 그 물질 또는 물질들의 조합물이 제공될 경우, 이러한 물질이나 물질들의 조합물이 제공되지 않은 세포의 상황에 비해, CLDN18.2의 발현을 증가시킴으로 해서, 이러한 물질이나 물질들의 조합물이 제공되지 않아 CLDN18.2의 발현이 기본적으로 저하되거나, 일정하게 유지되거나 증가하는 상황에 비해 CLDN18.2이 더 높게 발현되는 결과를 초래하는 상황이 이에 포함된다.

[0080] 본 발명에 따라, "CLDN18.2의 발현을 안정화 또는 증가시키는 물질"이라는 용어에는 세포증식억제제와 같은 화학요법제 또는 화학요법제의 조합물이 포함된다. 화학요법제는 다음 중 어느 한 방식, 즉: (1) 세포의 DNA에 손상을 주어 세포가 더 이상 번식하지 못하도록 하거나, (2) 새로운 DNA 스트랜드의 합성을 저해하여 세포 복제를 불가능하게 만들거나, (3) 세포의 유사분열 프로세스를 중단시켜 세포가 2개의 세포로 분할되지 못하도록 하는 방식으로 세포에 영향을 줄 수 있다.

[0081] 본 발명에 따라, "CLDN18.2의 발현을 안정화 또는 증가시키는 물질"이라는 용어는 좋기로는 세포 특히 암 세포에 제공될 경우, 세포 주기의 정지(arrest)를 유도하거나 또는 세포 주기의 하나 이상의 페이즈, 좋기로는 G1- 및 G0-페이즈가 아닌 세포 주기, 좋기로는 G1-페이즈가 아닌 세포 주기, 좋기로는 세포 주기의 G2- 또는 S-페이즈 중 하나 이상의 세포 주기, 예컨대 세포 주기의 G1/G2-, S/G2-, G2- 또는 S-페이즈에 세포를 정지시키거나 세포를 축적시키는 결과를 일으키는, 세포증식 억제 화합물 또는 세포증식억제 화합물들의 조합물과 같은 물질 또는 물질들의 조합물에 관한다. "세포 주기의 하나 이상의 페이즈에 세포가 정지되거나 축적된다"라는 표현은 세포 주기의 상기 하나 이상의 페이즈에 있는 세포의 백분율이 증가함을 의미하는 것이다. 각 세포는 그 자신을 복제하기 위해 4개의 페이즈로 이루어진 세포 주기를 통과하여야 한다. G1이라 칭해지는 첫 번째 페이즈는 세포가 그 자신의 염색체를 복제할 준비가 된 때이다. 두 번째 단계는 S라 칭해지는데 이 페이즈에서는 DNA 합성이 일어나서 DNA가 복제된다. 이어지는 페이즈는 G2 페이즈로서, RNA와 단백질이 복제되는 시기이다. 마지막 페이즈는 M 단계로서, 실제로 세포가 분할되는 단계이다. 이 마지막 단계에서는 복제된 DNA 및 RNA가 나뉘어 세포의 이격된 말단부로 이동하여, 세포가 실제로 2개의 동일하고도 기능적인 세포들로 나뉜다. DNA에 손상을 가하는 물질인 화학요법제는 대체로 G1 및/또는 G2 페이즈에 세포를 축적시키는 결과를 초래한다. 항대사산물과 같이 DNA 합성을 간섭함으로써 세포 성장을 차단하는 화학요법제는 대개 S-페이즈에 세포를 축적시키는 결과를 초래한다. 이러한 약물의 예로는 6-머캅토퓨린과 5-플루오로우라실을 들 수 있다.

[0082] 본 발명에 따라, "CLDN18.2의 발현을 안정화 또는 증가시키는 물질"이라는 용어에는 에피루비신과 같은 안트라사이클린, 옥살리플라틴 및 시스플라틴과 같은 백금 화합물, 5-플루오로우라실 또는 그의 전구약물과 같은 뉴클레오사이드 유사체, 도세탁셀과 같은 탁산, 및 이리노테칸 및 토포테칸과 같은 캄토테신 유사체, 및 약물들의 조합, 예컨대 에피루비신과 같은 안트라사이클린, 옥살리플라틴 및 5-플루오로우라실 1종 이상을 포함하는 약물들의 조합, 예컨대 옥살리플라틴 및 5-플루오로우라실을 포함하는 약물들의 조합물 또는 본 명세서에 설명된 다른 약물 조합물들이 포함된다.

[0083] 바람직한 일 구체예에서, "CLDN18.2의 발현을 안정화 또는 증가시키는 물질"은 "면역원성 세포 사멸을 유도하는 물질"이다.

[0084] 특정 상황에서, 암 세포는 면역계에 의해 암호해독되는 시공간적으로 규정되는 시그널들의 조합의 방출과 연결된 치명적인 스트레스 경로에 들어가, 종양-특이적인 면역 반응을 활성화시킬 수 있다(Zitvogel L. 외 (2010) 세포 140: 798-804). 이러한 시나리오 하에서는 암 세포들이 수지상 세포와 같은 선천적인 면역 이펙터에 의해 감지되는 시그널을 방출하도록 촉발되어 CD8+ T 세포 및 IFN-γ 시그널링이 관여된 동종(cognate) 면역반응을 촉발함으로 해서, 종양 세포 사멸이 생산적인 항암 면역 반응을 이끌어낼 수 있다. 이 시그널들은 세포 표면에의 세포질세망(ER) 샤프론 칼레티쿨린 (CRT)의 예비-세포자멸사 노출, ATP의 예비-세포자멸사 분비 및 핵 단백질 HMGB1의 후-세포자멸사 방출을 포함한다. 이와 함께, 이들 프로세스들은 면역원성 세포사멸(ICD)의 분자 결정인자를 구성한다. 안트라사이클린, 옥살리플라틴, 및 γ 조사는 ICD를 정의하는 모든 시그널을 유도할 수 있는 반면, 죽어가는 세포 표면에 ER로부터의 CRT 전좌(translocation)의 유도 - ER 스트레스를 필요로 하는 프로세스-를 결여하는 시스플라틴과 같은 물질은 ER 스트레스 인듀서인 탑시가르긴(thapsigargin)에 의한 상보성을 필요로 한다.

[0085] 본 발명에 따라, 용어 "면역원성 세포 사멸을 유도하는 물질"은 세포, 특히 암 세포에 제공될 경우, 그 세포로 하여금 궁극적으로 종양-특이적 면역 반응을 초래하는 치명적인 스트레스 경로로 들어가게 할 수 있는 물질 또는 물질들의 조합물을 칭한다. 특히, 면역원성 세포 사멸을 유도하는 물질은 세포에 제공될 경우 세포로 하여금, 세포 표면에의 세포질세망(ER) 샤프론 칼레티쿨린 (CRT)의 예비-세포자멸사 노출, ATP의 예비-세포자멸사 분비 및 핵 단백질 HMGB1의 후-세포자멸사 방출을 비롯한 시공간적으로 규정되는 시그널들의 조합을 방출하도록 유도한다.

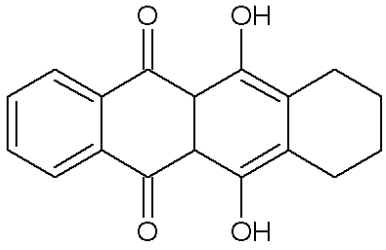
[0086] 본 발명에서, "면역원성 세포 사멸을 유도하는 물질"이라는 용어에는 안트라사이클린 및 옥살리플라틴이 포함된다.

[0087] 안트라사이클린은 항생물질이기도 하며 암 화학요법에 흔히 사용되는 약물 부류이다. 구조적으로 모든 안트라사이클린은 공통적으로 4환식 7,8,9,10-테트라히드로테트라센-5,12-퀴논 구조를 공유하며 대체로 특정 자리에서 글리코실화를 필요로 한다.

[0088] 안트라사이클린은 좋기로는 다음 중 한 가지 이상의 작용을 한다: 1. DNA/RNA 스트랜드의 염기쌍들 간의 인터컬레이팅에 의한 DNA 및 RNA 합성 저해에 의해, 급속히 성장하는 암 세포의 복제를 방지함. 2. 토포이소머라제 II 효소를 억제하여, 수퍼코일된 DNA의 릴랙싱을 방지함으로써 DNA 전사 및 복제를 차단함. 3. DNA 및 세포막을 손상시키는 철-매개된 유리 산소 래디칼을 생성함.

[0089] 본 발명에 따라, "안트라사이클린"은 좋기로는 토포이소머라제 II에서 DNA의 재결합을 억제함으로써, 세포자멸사를 유도하는 물질, 좋기로는 항암제를 가리킨다.

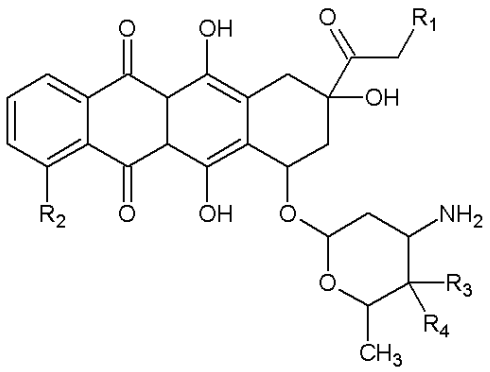
[0090] 좋기로는, 본 발명에서 "안트라사이클린"은 일반적으로 다음의 고리 구조를 갖는 화합물, 그의 유사체 및 유도체, 약학적 염, 수화물, 에스테르, 컨쥬게이트 및 전구약물들을 가리킨다.

[0091] 

[0092] 안트라사이클린 및 안트라사이클린 유사체의 예로는 다우노루비신 (다우노마이신), 독소루비신

(아드리아마이신), 에피루비신, 이다루비신, 로다마이신, 피라루비신, 발루비신, N-트리플루오로-아세틸 독소루비신-14-발레레이트, 아클라시노마이신, 모르폴리노독소루비신 (모르폴리노-DOX), 시아노모르폴리노-독소루비신 (시아노모르폴리노-DOX), 2-피롤리노-독소루비신 (2-PDOX), 5-이미노다우노마이신, 미토잔트론 및 아클라시노마이신 A (아클라루비신)을 들 수 있으나 이에 한정되지 않는다. 미토잔트론은 안트라사이클린의 당 부분은 결여하지만 DNA 내로 인터컬레이션할 수 있게 해주는 평면(planar) 폴리시클릭 방향족 고리 구조는 유지하는 안트라사이클린 유사체인 안트라센디온 부류 화합물의 일종이다.

[0093] 본 발명에 따라 안트라사이클린으로서 특히 바람직한 것은 다음 구조를 갖는 화합물이다:



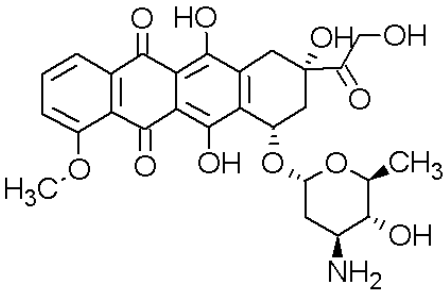
[0094]

[0095] 식 중

[0096] R_1은 H 및 OH로 이루어진 군으로부터 선택되고, R_2는 H 및 OMe로 이루어진 군으로부터 선택되며, R_3는 H 및 OH로 이루어진 군으로부터 선택되고, R_4는 H 및 OH로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0097] 일 구체예에서, R_1은 H, R_2는 OMe, R_3는 H이고 R_4는 OH이다. 또 다른 구체예에서, R_1은 OH, R_2는 OMe, R_3는 H이고 R_4는 OH이다. 또 다른 구체예에서, R_1은 OH, R_2 는 OMe, R_3는 OH이고 R_4는 H이다. 또 다른 구체예에서, R_1은 H, R_2는 H, R_3는 H이고, R_4는 OH이다.

[0098] 본 발명의 문맥 상 안트라사이클린으로서 특히 바람직한 것으로 간주되는 것은 에피루비신이다. 에피루비신은 다음 구조를 갖는 안트라사이클린 약물이며:

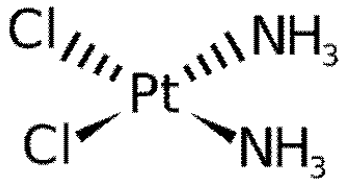


[0099]

[0100] 미국에서는 상표명 Ellence로 시판되고 있고 그 밖의 국가에서는 Pharmorubicin 또는 Epirubicin Ebewe라는 상표명으로 판매되고 있다. 특히, "에피루비신"이라는 용어는 화합물 (8R,10S)-10-[(2S,4S,5R,6S)-4-아미노-5-히드록시-6-메틸-옥산-2-일]옥시-6,11-디히드록시-8-(2-히드록시아세틸)-1-메톡시-8-메틸-9,10-디히드로-7H-테트라센-5,12-디온을 가리킨다. 에피루비신은 몇몇 화학요법에서는 가장 널리 사용되는 안트라사이클린인 독소루비신보다 더 선호되는데, 이는 에피루비신이 부작용이 더 적은 것으로 나타났기 때문이다.

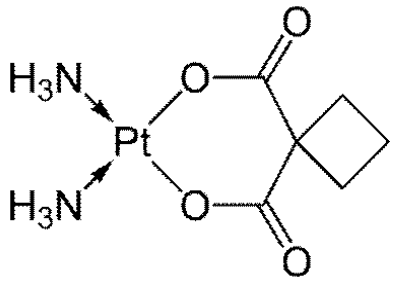
[0101] 본 발명에 따라, 용어 "백금 화합물"은 백금 착물과 같이 그 구조 내에 백금을 함유하는 화합물을 칭하는 것으로 시스플라틴, 카르보플라틴 및 옥살리플라틴과 같은 화합물이 이에 포함된다.

[0102] "시스플라틴" 또는 "시스플라티늄"이라는 용어는 다음 구조를 갖는 *cis*-디아민디클로로백금(II) (CDDP)를 가리킨다:



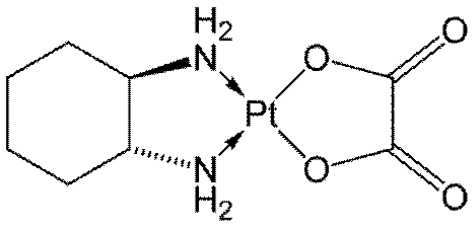
[0103]

[0104] "카르보플라틴"이라 함은 다음 구조를 갖는 cis-디아민(1,1-시클로부탄디카르복실레이토)백금(II) 화합물을 가리킨다:



[0105]

[0106] "옥살리플라틴"이라는 용어는 다음 구조식을 갖는 디아미노시클로헥산 캐리어 리간드에 착화된 백금 화합물인 화합물을 가리킨다:

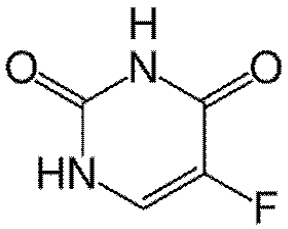


[0107]

[0108] 특히, "옥살리플라틴"이라는 용어는 [(1R,2R)-시클로헥산-1,2-디아민](에탄디오에이토-0,0')백금(II) 화합물을 가리킨다. 주사용 옥살리플라틴 역시도 Eloxatine이라는 상표명으로 판매되고 있다.

[0109] "뉴클레오사이드 유사체"는 뉴클레오사이드의 구조적 유사체를 가리키는 것으로, 이 카테고리는 퓨린 유사체와 피리미딘 유사체 양자를 포함한다. 특히, "뉴클레오사이드 유사체"는 플루오로우라실 및 그의 전구약물들을 포함하는 플루오로피리미딘 유도체를 가리킨다.

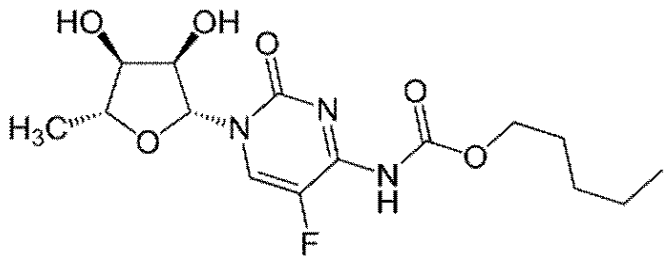
[0110] "플루오로우라실" 또는 "5-플루오로우라실" (5-FU 또는 f5U) (브랜드명 Adrucil, Carac, Efudix, Efudex 및 Fluoroplex로 판매됨)은 다음 구조를 갖는 피리미딘 유사체인 화합물이다:



[0111]

[0112] 특히, 이 용어는 화합물 5-플루오로-1H-피리미딘-2,4-디온을 가리킨다.

[0113] "카페시타빈" (Xeloda, Roche)은 조직 내에서 5-FU로 전환되는 전구약물인 화학요법제를 가리킨다. 경구 투여가능한 카페시타빈은 다음 구조식을 갖는다:

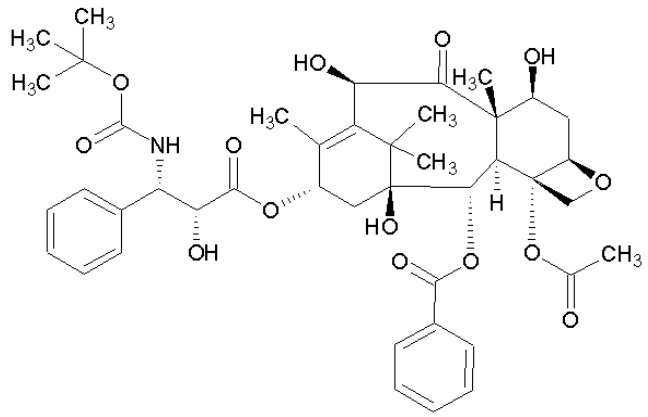


[0114]

[0115] 특히, 이 용어는 화합물 펜틸 [1-(3,4-디히드록시-5-메틸테트라히드로퓨란-2-일)-5-플루오로-2-옥소-1H-피리미딘-4-일]카바메이트를 가리킨다.

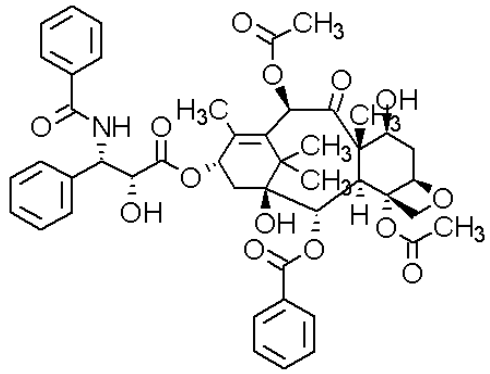
[0116] 탁산은 처음에는 Taxus속 식물과 같은 천연 공급원으로부터 유도되었던 디테르펜 화합물의 한 부류지만, 몇몇 종류는 인공적으로 합성되었다. 탁산 부류의 화합물의 주된 작용 메카니즘은 미세관(microtubule) 기능의 파괴에 의한 것으로, 이에 따라, 세포 분열 과정을 저해한다. 탁산에는 도세탁셀 (Taxotere) 및 파클리탁셀 (Taxol)이 포함된다.

[0117] 본 발명에서, "도세탁셀"은 다음 구조의 화합물을 가리킨다:



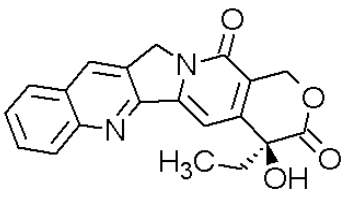
[0118]

[0119] 본 발명에서, "파클리탁셀"은 다음 구조의 화합물을 가리킨다:



[0120]

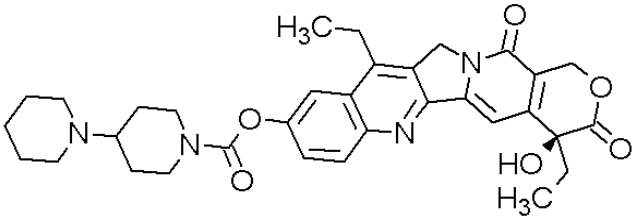
[0121] 본 발명에서, "캄토테신 유사체"라는 용어는 캄토테신 (CPT; (S)-4-에틸-4-히드록시-1H-피라노[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-b] 퀴놀린-3,14-(4H,12H)-디온) 화합물의 유도체를 가리킨다. 좋기로는, "캄토테신 유사체"는 다음 구조를 갖는 화합물이다:



[0122]

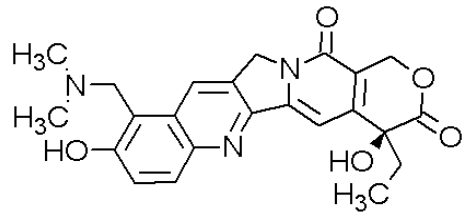
[0123] 본 발명에서, 바람직한 캄토테신 유사체는 DNA 효소인 토포이소머라제 I (topo I)의 저해제이다. 본 발명에 따른 바람직한 캄토테신 유사체는 이리노테칸 및 토포테칸이다.

[0124] 이리노테칸은 토포이소머라제 I의 저해에 의해 DNA가 풀리지 않도록 하는 약물이다. 화학적 용어로 말하면, 이것은 다음 구조를 갖는 천연 알콜로이드 캄토테신의 반합성 유사체이다:

[0125] 

[0126] 특히, 용어 "이리노테칸"은 화합물 (S)-4,11-디에틸-3,4,12,14-테트라히드로-4-히드록시-3,14-디옥소1H-피라노[3',4':6,7]-인돌리지노[1,2-b]퀴놀린-9-일-[1,4'바이피페리딘]-1'-카르복실레이트를 가리킨다.

[0127] 토포테칸은 다음 구조를 갖는 토포이소머라제 억제제이다:

[0128] 

[0129] 특히, 용어 "토포테칸"은 화합물 (S)-10-[(디메틸아미노)메틸]-4-에틸-4,9-디히드록시-1H-피라노[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-b]퀴놀린-3,14(4H,12H)-디온 모노히드로클로라이드를 가리킨다.

[0130] 본 발명에 따라, CLDN18.2의 발현을 안정화 또는 증가시키는 물질은 화학요법제, 특히, 암 치료에 사용되도록 확립된 화학요법제일 수 있고 암 치료에 사용되도록 확립된 약물들의 조합물과 같은 약물들의 조합물의 일부일 수 있다. 이러한 약물들의 조합물은 화학요법에 사용되는 약물 조합물일 수 있고, **EOX** 화학요법, **ECF** 화학요법, **ECX** 화학요법, **EOF** 화학요법, **FLO** 화학요법, **FOLFOX** 화학요법, **FOLFIRI** 화학요법, **DCF** 화학요법 및 **FLOT** 화학요법으로 구성된 군으로터 선택된 화학요법에서 사용되는 것과 같은 약물 조합물일 수 있다.

[0131] **EOX** 화학요법에 사용되는 약물 조합은 에피루비신, 옥살리플라틴 및 카페시타빈으로 이루어진다. **ECF** 화학요법에 사용되는 약물 조합은 에피루비신, 시스플라틴 및 5-플루오로우라실로 이루어진다. **ECX** 화학요법에 사용되는 약물 조합은 에피루비신, 시스플라틴 및 카페시타빈으로 이루어진다. **EOF** 화학요법에 사용되는 약물 조합은 에피루비신, 옥살리플라틴 및 5-플루오로우라실로 이루어진다.

[0132] 에피루비신은 대체로 50 mg/m2의 투여량, 시스플라틴은 60 mg/m2의 투여량, 옥살리플라틴은 130 mg/m2의 투여량으로 주어지며, 200 mg/m2/일의 투여량으로 5-플루오로우라실, 1일 2회 625 mg/m2의 투여량으로 경구용 카페시타빈을 3주일의 사이클로 총 8회 장기간 정맥 주입한다(protracted venous infusion).

[0133] **FLO** 화학요법에 사용되는 약물 조합은 5- 플루오로우라실, 폴린산 및 옥살리플라틴 (보통 5-플루오로우라실 2,600 mg/m^2 24-h 주입, 폴린산 200 mg/m^2 및 옥살리플라틴 85 mg/m^2, 2주일마다)으로 이루어진다.

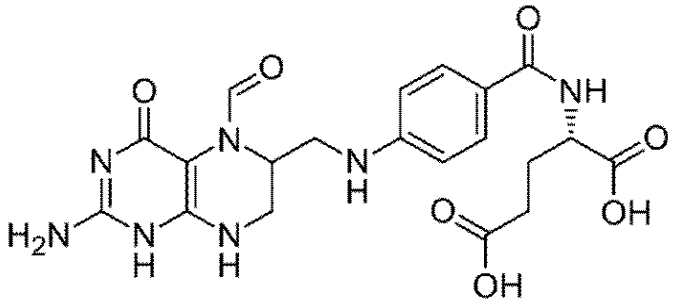
[0134] **FOLFOX**는 폴린산(류코보린), 5-플루오로우라실 및 옥살리플라틴으로 구성된 화학요법이다. 2주일마다 주어지는 권장 투여 스케쥴은 다음과 같다: 제1일: 옥살리플라틴 85 mg/m^2IV 주입 및 류코보린 200 mg/m^2 IV 주입, 이어서 5-FU 400 mg/m^2 IV 볼루스, 이어서 22시간 연속하여 5-FU 600 mg/m^2 IV 주입; 제2일: 120분에 걸쳐 류코보린 200 mg/m^2 IV 주입, 이어서 2-4분에 걸쳐 5-FU 400 mg/m^2 IV 볼루스 주입, 이어서 22 시간 연속하여 5-FU 600 mg/m^2IV 주입.

[0135] **FOLFIRI** 화학요법에 사용되는 약물 조합은 5-플루오로우라실, 류코보린, 및 이리노테칸으로 이루어진다.

[0136] **DCF** 화학요법은 도세탁셀, 시스플라틴 및 5-플루오로우라실으로 구성된다.

[0137] FLOT 화학요법에 사용되는 약물 조합은 도세탁셀, 옥살리플라틴, 5-플루오로우라실 및 폴린산으로 구성된다.

[0138] "폴린산" 또는 "류코보린"은 화학요법제 5-플루오로우라실과 상승적으로 조합되는데 유용한 화합물을 가리킨다. 폴린산은 다음 구조식을 갖는다:

[0139] 

[0140] 특히, 이 용어는 화합물 (2S)-2-{[4-[(2-아미노-5-포르밀-4-옥소-5,6,7,8-테트라히드로-1H-프테리딘-6-일)메틸아미노]벤조일]아미노}펜타디오인산을 가리킨다.

[0141] CLDN18.2의 발현을 안정화 또는 증가시키는 물질의 투여를 위해, 일 구체예에서, EOX 요법에 따른 표준 화학요법을 CLDN18.2에 결합하는 능력이 있는 항체, 특히 IMAB362와 조합하여 최대 8 사이클에 걸쳐 투여한다. 투여량 및 투여 스케쥴은 다음과 같이 실시할 수 있다:

[0142] ● EOX 페이즈 동안 각 사이클의 제1일에 50 mg/m2 에피루비신을 15분 주입으로서 i.v. 투여한다.

[0143] ● EOX 페이즈 동안 각 사이클의 제1일에 130 mg/m2 옥살리플라틴을 2h 주입으로서 i.v. 투여한다.

[0144] ● EOX 페이즈 동안 각 사이클의 제1일의 저녁부터 시작하여 625 mg/m2 카페시타빈을 21일 동안 아침 저녁으로 하루 2회 p.o. 투여한다.

[0145] ● 사이클 1의 제1일에 1000 mg/m2의 항체를 2h 주입으로서 i.v. 투여한다. 그 후, 옥살리플라틴 주입 완료 후, 상호 각 사이클의 제1일에 600 mg/m2 항체를 2h 주입으로서 i.v. 투여한다.

[0146] ● 화학요법 종결 후에도, 환자에게 계속해서 3주일 또는 4주일마다 600 mg/m2 항체를 2h 주입으로서 투여한다.

[0147] 본 발명의 일 구체예에서, ZA/IL-2 및 CLDN18.2에 결합하는 능력이 있는 항체, 특히 IMAB362와 조합하여 EOX 요법에 따른 표준 화학요법을 최대 8 사이클 (24주일) 동안 실시한다.

[0148] 용어 "항원"은 면역 반응이 지향되거나 지향될 에피토프를 포함하는 단백질 또는 펩타이드와 같은 물질에 관한다. 바람직한 구체예에서, 항원은 예컨대 CLDN18.2와 같은 종양-관련 항원, 즉 세포질, 세포 표면 및 세포핵으로부터 유래할 수 있는 암 세포의 구성원이며, 특히, 암 세포 상에서 표면 항원으로서 또는 세포내에서 대량 생산되는 항원인 것들이 바람직하다.

[0149] 본 발명의 문맥 상, "종양-관련 항원"은 좋기로는 정상 조건 하에서 제한된 수의 조직 및/또는 장기에서 특이적으로 또는 특이적 발달 단계에서 발현되고 하나 이상의 종양 또는 암 조직에서 발현되거나 또는 비정상적으로 발현되는 단백질에 관한 것이다. 본 발명의 문맥 상, 종양-관련 항원은 암 세포의 세포 표면과 연관이 있고, 정상 조직에서는 발현되지 않거나 발현되더라도 드물게만 발현되는 것이 바람직하다.

[0150] "에피토프"라는 용어는 분자 내의 항원 결정인자를 가리키는데, 즉, 면역계에 의해 인식되는, 예컨대, 항체에 의해 인식되는 분자의 일부를 가리킨다. 예컨대, 에피토프는 항원 상의 불연속적인, 3차원적 부분이며, 면역계에 의해 인식된다. 에피토프는 대개 아미노산 또는 당 측쇄와 같은 분자의 화학 활성적인 표면 그루핑을 구성하며, 대체로 특이적인 3차원 구조 특징과 특이적인 전하 특징을 갖는다.

[0151] 입체형태적(Conformational) 에피토프와 비입체형태적(non-conformational) 에피토프는 변성 용매의 존재 하에서는 전자에 대한 결합이 소실되는 반면 후자에 대한 결합은 그렇지 않다는 점에서 구별된다. CLDN18.2와 같은 단백질의 에피토프는 좋기로는 상기 단백질의 연속적 또는 불연속적 부분을 포함하며 좋기로는 길이가 예컨대 5 내지 100, 좋기로는 5 내지 50, 더욱 좋기로는 8 내지 30, 가장 좋기로는 10 내지 25 아미노산인 것이 바람직하고, 예컨대, 에피토프의 길이가 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 또는 25 아미노산인 것이 좋다.

[0152] "항체"라 함은 디설파이드 결합에 의해 상호연결된 적어도 2개의 중쇄(H)와 2개의 경쇄(L)를 포함하는 당단백질을 칭하는 것으로, 그의 항원 결합부를 포함하는 분자이면 어느 것이든 이에 포함된다. "항체"라는 용어에는 모노클로날 항체 및 항체 단편 또는 항체 유도체가 포함되고 여기에는, 인간 항체, 인간화 항체, 키메라 항체, 단쇄 항체, 예컨대 scFv's 및 항원-결합 항체 단편 예컨대 Fab 및 Fab' 단편이 포함되나 이에 한정되지 않으며, 항체의 모든 재조합 형태, 예컨대, 원핵생물에서 발현되는 항체, 비글리코실화 항체 및 본 명세서에 설명된 모든 항원-결합 항체 단편 및 유도체도 이에 포함된다. 각각의 중쇄는 중쇄 가변부(VH로 약칭됨) 및 중쇄 불변부로 이루어진다. 각각의 경쇄는 경쇄 가변부(VL로 약칭됨)와 경쇄 불변부로 이루어진다. VH 및 VL 부분은 상보성 결정부(CDR)라 명명되는 하이퍼변이성 부분들로 더 세분화될 수 있고, 프레임워크부(FR)로 명명되는, 보다 보존적인 부분들이 사이사이에 배치될 수 있다. 각각의 VH 및 VL은 3개의 CDRs과 4개의 FRs로 구성되며, 이들은 아미노 말단으로부터 카르복시 말단까지 다음 순서로 배치된다: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. 중쇄와 경쇄의 가변부는 항원과 상호작용하는 결합 도메인을 함유한다. 항체의 불변부는 면역계의 다양한 세포들(예컨대 이펙터 세포) 및 클래시컬 보체계의 제1 성분(C1q)을 비롯하여, 숙주의 조직 또는 인자들에 대한 면역글로불린의 결합을 매개할 수 있다.

[0153] 본 발명에 설명된 항체들은 인간 항체일 수 있다. 본 발명에서 "인간 항체"라는 용어는 인간 생식세포 면역글로불린 서열로부터 유래된 가변부와 불변부를 갖는 항체를 포괄하는 것으로 의도된다. 본 발명에 설명된 인간 항체는 인간 생식세포 면역글로불린 서열에 의해 코딩되지 않은 아미노산 잔기들을 포함할 수 있다(예컨대, 무작위적인 또는 위치-특이적 돌연변이 유발에 의해 시험관내 유도된 돌연변이 또는 생체내 체세포 돌연변이).

[0154] "인간화 항체"라 함은 분자의 항원 결합부는 실질적으로 비인간 종으로부터의 면역글로불린으로부터 유래한 반면, 분자의 나머지 면역글로불린 구조는 인간 면역글로불린의 구조 및/또는 서열에 기초하는 것인 분자를 가리킨다. 항원-결합 부분은 불변 도메인 상에 융합된 완전한 가변 도메인을 포함할 수도 있고 또는 가변 도메인 내의 적절한 프레임워크 부분에 그래프트된 상보성 결정부(CDR) 만을 포함할 수도 있다. 항원-결합 부분는 야생형이거나 또는 1 이상의 아미노산 치환에 의해 변형될 수 있는데, 예컨대, 인간 면역글로불린에 보다 더 밀접히 닮도록 변형될 수 있다. 인간화 항체들 중 몇몇 유형은 모든 CDR 서열을 보존한다 (예컨대 마우스 항체로부터의 모든 6개의 CDRx를 함유하는 인간화된 마우스 항체). 다른 유형들은 하나 이상의 CDR이 오리지널 항체와 다를 수 있다.

[0155] "키메라 항체"라는 용어는 중쇄 및 경쇄의 각각의 아미노산 서열의 일 부분이 특별한 종에 속하거나 특별한 종들로부터 유래된 항체들에서 상응하는 서열들과 상동성이고, 반면 사슬의 남아있는 세그먼트(segment)는 상응하는 서열들에 달리 상동성이다. 전형적으로 경쇄 및 중쇄들의 가변부는 포유류의 한 종들로부터 유래된 항체들의 가변부들과 닮은 반면, 불변 부분들은 달리 유래된 항체들의 서열들과 상동성이다. 그러한 키메라 형태들의 한 가지 분명한 잇점은 가변부가 예컨대, 인간 세포 제조로부터 유래된 불변부들과 조합하여 비인간 숙주 유기체로부터 쉽게 이용가능한 B-세포들 또는 하이브리도마를 이용하여 현재 알려진 소스로부터 편리하게 유래될 수 있다는 것이다. 가변부는 각각의 제조물의 잇점을 가지고, 특이성은 소스에 영향을 받지 않는 반면, 인간인 불변부는 항체들이 비인간 소스로부터의 불변부인 것 보다 항체들이 주입될 때 인간 대상으로부터의 면역 반응을 잘 이끌어내지 않는다. 그러나 정의는 이러한 특별한 예시에 제한되지 않는다.

[0156] 항체의 "항원-결합 부분"이라는 용어 (또는 간단히, "결합 부분") 또는 항체의 "항원-결합 단편(또는 간단히 "결합 단편")은 항체에 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 외, (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 외 (1988) Science 242: 423-426; 및 Huston 외 (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-5883 참고). 그러한 단일 사슬 항체들은 항체의 "항원-결합 단편"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 불변부, (iii) CH2 불변부에 융합되는 면역글로불린 중쇄 CH3 불변부를 포함하는 결합-도메인 면역글로불린

융합 단백질들이다. 결합 도메인 폴리펩타이드는 중쇄 가변부 또는 경쇄 가변부일 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.

[0157] "이중특이성 분자"는 예컨대, 단백질, 펩타이드 또는 단백질 또는 펩타이드 복합체와 같은 어떠한 물질을 포함하는 것으로 생각되고, 이것은 두개의 서로다른 결합 특이성을 가진다. 예컨대, 분자는 (a) 세포 표면 항원, 및 (b) 이펙터 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 물질을 포함하는 것으로 생각되고, 이것은 두개 이상의 서로다른 결합 특이성을 가진다. 예컨대, 분자는 (a) 세포 표면 항원, (b) 이펙터 세포의 표면상에 Fc 수용체, 및 (c) 적어도 하나의 다른 성분과 결합하거나 상호작용 할 수 있다. 따라서, 본 발명은, 이것에 제한되는 것은 아니지만, CLD18.2 및 이펙터 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., 외 (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448; Poljak, R. J., 외 (1994) Structure 2: 1121-1123 참고).

[0158] 항체는 세포독소, 약물(예를 들어 면역 억제약), 또는 방사성 동위원소와 같은 치료적 모이어티나 물질에 컨쥬게이트될 수도 있다. 세포독소 또는 세포독성 물질은 세포에 해롭거나 특히 세포를 살해시키는 모든 물질을 포함한다. 그 예로는 탁솔, 사이토칼라신 B(cytochalasin B), 그라미시딘 D, 이티디움 브로마이드, 에메틴, 마이토마이신, 에토포시드, 테노포시드, 빈크리스틴, 빈블라스틴, 콜히친, 독소루비신, 다우노루비신, 디히드록시 안트라신 디온, 미토잔트론, 미트라마이신, 악티노마이신 D, 1-디히드록테스토스테론, 글루코코르티코이드, 프로카인, 테트라카인, 리도카인, 프로프라놀롤, 그리고 퓨로마이신과 이것들의 유사체 또는 동족체 물질을 포함한다. 항체 컨쥬게이트를 형성하기 위한 적절한 치료적 물질은, 이것에 제한되는 것은 아니지만, 항대사산물(예컨대, 메토트렉세이트(methodtrexate), 6-머캅토퓨린, 6-티오구아닌, 시타라빈, 플루다라빈, 5-플루오로우라실 데카르바진), 알킬레이팅 물질(예컨대, 메크로레타민, 티오에파, 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 물질 (예컨대, 빈크리스틴 및 빈블라스틴)를 포함한다. 일 선호된 구체예에서, 치료제는 세포 독성 물질나 방사성 독성 물질이다. 다른 구체예예서, 치료제는 면역억제제이다. 또 다른 구체예에서, 치료제는 GM-CSF이다. 선호된 구체예에서, 치료제는 독소루비신, 시스플라틴, 블레오마이신, 황산염, 카르무스틴, 클로람부실, 시클로포스파미드 또는 리신 A이다.

[0159] 항체는 또한 요오드-131, 이트륨-90, 인듐-111과 같은 방사성 동위원소에 결합해 세포 독성 방사성 의약품을 생산할 수 있다.

[0160] 본 발명의 항체 컨쥬게이트는 해당 생물학적 반응을 변형시키는 데 사용될 수 있으며, 이 약물 모이어티는 전통적 화학 치료 물질에 국한되는 뜻으로 해석되지 않는다. 예를 들어, 이 약물 모이어티는 바람직한 생물학적 작용을 갖는 단백질이나 폴리펩타이드일 수 있다. 그러한 단백질에는 예를 들어 효소적 활성 독성, 또는 그것의 활성 단편인 아브린, 리신 A, 슈도모나스 외독소, 디프테리아 독성; 괴사 인자나 인터페론-γ와 같은 단백질; 또는 예를 들어 림포킨, 인터류킨-1("IL-1"), 인터류킨-2("IL-2"), 인터류킨-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.

[0161] 이러한 치료적 모이어티를 항체에 컨쥬게이트시키는 기술은 잘 알려져 있다. 예를 들어 문헌들(Arnon 외, "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", in Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Reisfeld 외(eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom 외, "Antibodies For Drug Delivery", in Controlled Drug Delivery (2nd Ed.), Robinson 외 (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, Pinchera외 (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 외 (eds.), pp. 303-16 (Academic Press 1985), 및 Thorpe 외, "The Preparation 및 Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", Immunol. Rev., 62: 119-58 (1982))을 참조할 것.

[0162] 본 발명에서, 동물을 면역시키거나 면역글로불린 유전자 라이브러리를 스크리닝함으로써 계로부터 항체가 얻어지는 경우 그 항체는 특정 생식세포 서열로부터 "유래된(derived from)" 것이며, 선택된 항체는 그 생식세포 면역글로불린 유전자가 코딩하는 아미노산 서열에 대해 적어도 90%, 더욱 좋기로는 적어도 95%, 더더욱 좋기로는 적어도 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일한 것이다. 일반적으로, 특정 생식세포 서열로부터 유래된 항체는 그 생식세포 면역글로불린이 코딩하는 아미노산 서열과 아미노산 차이가 10개 이하, 더욱 좋기로는, 5개 이하, 더더욱 좋기로는 4개, 3개, 2개, 또는 1개 이하인 것이 바람직하다.

[0163] 본 발명에서, "헤테로항체(heteroantibody)"라는 용어는 함께 결합된 둘 이상의 항체들, 그 유도체들, 또는 항원 결합부 중 적어도 2개가 상이한 특이성을 가짐을 의미한다. 이러한 상이한 특이성들은 이펙터 세포 상에 Fc 수용체를 위한 결합 특이성, 및 표적 세포, 예컨대 종양 세포 상에 항원 또는 에피토프를 위한 결합 특이성을 포함한다.

[0164] 본 발명에 기재된 항체들은 모노클로날 항체들일 수 있다. 본 발명에서 "모노클로날 항체"라는 용어는 단일 분자 조성물의 항체 분자들의 제조물을 말한다. 모노클로날 항체는 단일 결합 특이성과 친화도를 나타낸다. 일 구체예에서, 모노클로날 항체들은 불사화된 세포에 융합되는 비인간 동물, 예컨대, 마우스로부터 얻어지는 B 세포를 포함하는 하이브리도마에 의해 생산된다.

[0165] 본 발명에 설명된 항체들은 재조합 항체들일 수 있다. 본 발명에서 "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.

[0166] 본 발명에 설명된 항체들은 비제한적인 예로서 마우스, 래트, 토끼, 기니픽 및 인간을 비롯한 서로 다른 종으로부터 유래할 수 있다.

[0167] 본 발명에 설명된 항체들에는 폴리클로날 및 모노클로날 항체들이 포함되며 IgA 예컨대 IgA1 또는 IgA2, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgE, IgM, 및 IgD 항체가 포함된다. 다양한 구체예에서, 항체는 IgG1 항체, 더욱 특히는 IgG1, 카파 또는 IgG1, 람다 이소형 (즉 IgG1, κ,λ), IgG2a 항체 (예컨대 IgG2a, κ,λ), IgG2b 항체 (예컨대 IgG2b, κ,λ), IgG3 항체 (예컨대 IgG3, κ,λ) 또는 IgG4 항체 (예컨대 IgG4, κ,λ)이다.

[0168] 본 발명에서, "트랜스펙토마(transfectoma)"라는 용어는 CHO 세포들, NS/0 세포들, HEK293 세포들, HEK293T 세포들, 식물 세포들, 또는 효모를 포함하는 곰팡이를 비롯한, 항체를 발현하는 재조합 진핵 숙주세포들을 포함한다.

[0169] 본 발명에서, "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.

[0170] 여기에서 사용된, "헤테로하이브리드 항체"는 상이한 유기체들 기원의 경쇄 및 중쇄를 가지는 항체를 말한다. 예컨대, 쥐의 경쇄와 연관된 인간 중쇄를 가지는 항체는 헤테로하이브리드 항체이다.

[0171] 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 컨쥬게이트를 의미한다.

[0172] 본 발명에 기재된 항체들은 좋기로는 분리된 것이다. 본 발명에서 사용된 "분리된 항체"라는 용어는 상이한 항원성 특이성을 가지는 다른 항체들이 실질적으로 없는 항체를 가리키는 것으로 의도된 것이다 (예컨대, CLDN18.2에 특이적으로 결합하는 분리된 항체에는 실질적으로 CLDN18.2가 아닌 항원들과 특이적으로 결합하는 항체들이 없다). 인간 CLDN18.2의 에피토프, 이소형 또는 변이체에 특이적으로 결합하는 분리된 항체는 그러나, 다른 관련된 항원들, 예컨대, 다른 종들로부터 유래된 다른 관련된 항원들과 교차반응성을 갖는다 (예컨대, CLDN18.2 종 동족체). 또한, 분리된 항체에는 실질적으로 다른 세포성 물질 및/또는 화학물질이 없을 수 있다.

본 발명의 일 구체예에서, "분리된" 모노클로날 항체들의 조합은 상이한 특이성들을 가지며 잘 규정된 조성물 또는 혼합물로서 조합된 항체들에 관한 것이다.

[0173] 본 발명에서 "결합(binding)"이라는 용어는 좋기로는 특이적 결합에 관한 것이다.

[0174] 본 발명에서, 만일 항체가 표준 분석법에 의할 때 소정의 표적에 대해 유의적인 친화도를 가지고 상기 소정의 표적과 결합한다면 상기 항체는 상기 소정의 표적에 결합할 능력이 있는 것이다. "친화도" 또는 "결합 친화도"는 평형 해리 상수(K_D)에 의하여 종종 측정된다. 바람직하게는, 용어 "유의적인 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) 값으로 소정의 표적에 결합하는 것을 의미한다.

[0175] 만일 항체가 상기 표적에 대해 유의적인 친화도를 가지지 않고, 표준 분석에서 상기 표적에 유의적으로 결합하지 않는다면, 특히 검출가능할 정도로 결합하지 않는다면, 그 항체는 상기 표적에 결합할 능력이 (실질적으로) 없는 것이다. 좋기로는, 항체가 최대 2, 좋기로는 최대 10, 더욱 좋기로는 최대 20, 특히 최대 50 또는 100 ㎍/ml 또는 그 이상의 농도로 존재하면, 그 항체는 상기 표적과 검출가능할 정도로 결합하는 것이 아니다. 좋기로는, 만일 항체가 결합할 능력이 있는 소정의 표적에 대한 결합 K_D에 비해 K_D값이 적어도 10배, 100배, 10^3배, 10^4배, 10^5배, 또는 10^6배 더 높게 상기 표적과 결합한다면 그 항체는 상기 표적에 대해 유의적인 친화도를 갖는 것이 아니다. 예컨대, 만일 항체가 결합 가능한 표적에 대한 항체의 결합 K_D값이 10^{-7} M이면, 그 항체가 유의적인 친화도를 갖지 않는 표적에 대한 결합 K_D는 적어도 10^{-6} M, 10^{-5} M, 10^{-4} M, 10^{-3} M, 10^{-2} M, 또는 10^{-1} M이 될 것이다.

[0176] 어느 항체가 다른 표적에는 결합할 수 없는 것, 즉 다른 표적에는 유의적인 친화도를 가지지 않고, 표준 분석에서 다른 표적에는 유의적으로 결합하지 않는 것인 반면에, 소정의 표적에는 결합할 수 있는 것이라면, 그 항체는 상기 소정의 표적에 특이적인 것이다. 본 발명에서, 어느 항체가 CLDN18.2에 대해서는 결합할 수 있지만, 다른 표적에는 (실질적으로) 결합할 수 없는 것이라면, 그 항체는 CLDN18.2에 특이적인 것이다. 좋기로는, 다른 표적에 대한 친화도 및 결합이, 소 혈청 알부민(BSA), 카세인, 인간 혈청 알부민(HSA)과 같은 CLDN18.2와 관계없는 단백질에 대한 친화도 또는 결합, 또는 MHC 분자 또는 트랜스페린 수용체와 같은 비클라우딘 막투과 단백질, 또는 다른 특정 폴리펩타이드에 대한 친화도 또는 결합을 유의적으로 능가하는 것이 아니라면, 상기 항체는 CLDN18.2에 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 소정의 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.

[0177] 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 참조할 것. 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.

[0178] 본 발명에서, "이소형(isotype)"이라 함은 중쇄 불변부 유전자들에 의해 코딩되는 항체 클래스(예컨대, IgM 또는 IgG1)를 나타낸다.

[0179] 본 발명에서 사용된 바와 같이, "이소형 스위칭(switching)"은 항체들의 클래스 또는 이소형이 하나의 Ig 클래

스로부터 다른 Ig 클래스들 중 하나까지로 변화하는 것에 의한 현상을 나타낸다.

[0180] 목적에서 적용된 바와 같이, 본 발명에서 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.

[0181] 본 발명에서 사용된 바와 같이, "재배열된(rearranged)"라는 용어는 중쇄 또는 경쇄 면역글로불린 로커스(locus)의 배열을 나타내는 것으로, V 세그먼트는 필수적으로 완전한 VH 또는 VL 도메인을 코딩하는 구조에서 D-J 또는 J 세그먼트에 즉시 인접하여 위치된다. 재배열된 면역글로불린 (항체) 유전자 로커스는 생식세포(germline) DNA와 비교에 의해 확인될 수 있다; 재배열된 로커스는 적어도 하나의 재조합된 헵타머/나노머 상동성 요소를 가질 것이다.

[0182] V 세그먼트와 관련하여 본 명세서에서 사용된 "비재배열된(unrearranged)" 또는 "생식세포(germline) 배열"이라는 용어는 V 세그먼트가 재조합되지 않아 D 또는 J 세그먼트에 직접적으로 인접되어 있는 배열을 가리킨다.

[0183] 본 발명에서 CLDN18.2에 결합하는 능력이 있는 항체는 CLDN18.2에 존재하는 에피토프, 좋기로는 CLDN18.2의 세포외 도메인들, 특히 제1 세포외 도메인 내에 위치하는 에피토프, 특히, CLDN18.2의 아미노산 위치 29 내지 78 내에 존재하는 에피토프에 결합할 수 있는 항체이다. 특정 구체예에서, CLDN18.2에 결합하는 능력이 있는 항체는 (i) CLDN18.1 상에 존재하는 것이 아닌, CLDN18.2, 좋기로는 SEQ ID NO: 3, 4, 및 5 상의 에피토프, (ii) CLDN18.2-루프1, 좋기로는 SEQ ID NO: 8 상에 위치하는 에피토프, (iii) CLDN18.2-루프2, 좋기로는 SEQ ID NO: 10 상에 위치하는 에피토프, (iv) CLDN18.2-루프D3, 좋기로는 SEQ ID NO: 11 상에 위치하는 에피토프, (v) CLDN18.2-루프1 및 CLDN18.2-루프D3을 포괄하는 에피토프, 또는 (vi) CLDN18.2-루프D3, 좋기로는 SEQ ID NO: 9 상에 위치하는 비글리코실화 에피토프에 결합할 수 있는 항체이다.

[0184] 본 발명에 따라 CLDN18.2에 결합하는 능력이 있는 항체는 CLDN18.1에는 결합하지 않지만 CLDN18.2에는 결합하는 능력이 있는 항체이다. 좋기로는, CLDN18.2에 결합하는 능력이 있는 항체는 CLDN18.2에 대해 특이적이다. 좋기로는, CLDN18.2에 결합하는 능력이 있는 항체는 좋기로를 그 세포 표면에서 발현되는 CLDN18.2에 결합하는 능력이 있는 항체이다. 특히 바람직한 구체예에서, CLDN18.2에 결합하는 능력이 있는 항체는 살아있는 세포 표면에 존재하는 CLDN18.2의 천연 에피토프에 결합한다. 좋기로는, CLDN18.2에 결합하는 능력이 있는 항체는 SEQ ID NOs: 1, 3-11, 44, 46, 및 48-50으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1 이상의 펩타이드에 결합한다. 좋기로는, CLDN18.2에 결합하는 능력이 있는 항체는 전술한 단백질, 펩타이드 또는 면역원성 단편 또는 그의 유도체에 특이적이다. CLDN18.2에 결합하는 능력이 있는 항체는 SEQ ID NOs: 1, 3-11, 44, 46, 및 48-50로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 단백질이나 펩타이드 또는 상기 단백질이나 펩타이드를 발현하는 핵산 또는 숙주 세포로 동물을 면역화시키는 단계를 포함하는 방법에 의해 수득가능하다. 좋기로는, 상기 항체는 암 세포, 특히 전술한 유형의 암 세포에 결합하고, 비암(non-cancerous) 세포에는 실질적으로 결합하지 않는 것이 좋다.

[0185] 바람직하게도, CLDN18.2를 발현하는 세포에 대한 CLDN18.2에 결합하는 능력이 있는 항체의 결합은 CLDN18.2를 발현하는 세포의 사멸을 유도하거나 매개한다. CLDN18.2를 발현하는 세포는 좋기로는 암 세포이며 특히 종양원성(tumorigenic)인 위, 식도, 췌장, 폐, 난소, 결장, 간, 두경부 및 담낭의 암 세포인 것이 바람직하다. 좋기로는 이 항체는 보체의존성 세포독성(CDC) 매개형 용해, 항체의존성 세포독성(ADCC) 매개형 용해, 세포자멸사 및 CLDN18.2를 발현하는 세포의 증식 억제 중 한 가지 이상의 유도에 의해 세포의 사멸을 유도하거나 매개한다. 좋기로는, 세포의 ADCC 매개형 용해는, 특정 구체예에서 단핵구, 단핵구 세포, NK 세포 및 PMNs로 이루어지는 군으로부터 선택되는 이펙터 세포의 존재 하에 일어나는 것이 바람직하다. 세포의 증식 억제는 브로모데옥시우리딘(5-브로모-2-데옥시우리딘, BrdU)을 이용하는 분석에서 세포의 증식을 탐지함으로써 시험관내 측정가능하다. BrdU는 티미딘의 유사체인 합성 뉴클레오사이드로서 복제중인 세포(세포 주기의 S 페이즈 동안)의 새롭게 합성된 DNA내로 병합되어, DNA 복제가 일어나는 동안 티미딘을 대체할 수 있다. 예컨대 BrdU에 특이적인 항체들을 이용하여, 병합된 화학물질을 탐지함으로써, 그들의 DNA를 활발하게 복제하는 세포들을 찾아낼 수 있다.

[0186] 바람직한 구체예에서, 본 발명에 설명된 항체들은 다음 특성들 중 한 가지 이상에 의해 특징지어질 수 있다:

[0187] a) CLDN18.2에 대한 특이성;

[0188] b) 약 100 nM 이하, 좋기로는, 약 5-10 nM 이하 및, 더욱 좋기로는, 약 1-3 nM 이하의 CLDN18.2에 대한 결합 특이성,

[0189] c) CLDN18.2 양성 세포에 대한 CDC를 유도하거나 매개하는 능력;

[0190] d) CLDN18.2 양성 세포에 대한 ADCC를 유도하거나 매개하는 능력;

[0191] e) CLDN18.2 양성 세포의 성장을 억제하는 능력;

[0192] f) CLDN18.2 양성 세포의 세포자멸사를 유도하는 능력.

[0193] 특히 바람직한 구체예에서, CLDN18.2에 결합하는 능력이 있는 항체는 DSMZ(Mascheroder Weg 1b, 31824 Braunschweig, Germany; 신주소: Inhoffenstr. 7B, 31824 Braunschweig, Germany)에 기탁되어 다음의 명칭과 수탁번호를 부여받은 하이브리도마에 의해 생산된다:

[0194] a. 182-D1106-055, 수탁번호 DSM ACC2737, 2005년 10월 19일에 기탁됨

[0195] b. 182-D1106-056, 수탁번호 DSM ACC2738, 2005년 10월 19일에 기탁됨

[0196] c. 182-D1106-057, 수탁번호 DSM ACC2739, 2005년 10월 19일에 기탁됨

[0197] d. 182-D1106-058, 수탁번호 DSM ACC2740, 2005년 10월 19일에 기탁됨

[0198] e. 182-D1106-059, 수탁번호 DSM ACC2741, 2005년 10월 19일에 기탁됨

[0199] f. 182-D1106-062, 수탁번호 DSM ACC2742, 2005년 10월 19일에 기탁됨,

[0200] g. 182-D1106-067, 수탁번호 DSM ACC2743, 2005년 10월 19일에 기탁됨

[0201] h. 182-D758-035, 수탁번호 DSM ACC2745, 2005년 11월 17일에 기탁됨

[0202] i. 182-D758-036, 수탁번호 DSM ACC2746, 2005년 11월 17일에 기탁됨

[0203] j. 182-D758-040, 수탁번호 DSM ACC2747, 2005년 11월 17일에 기탁됨

[0204] k. 182-D1106-061, 수탁번호 DSM ACC2748, 2005년 11월 17일에 기탁됨

[0205] l. 182-D1106-279, 수탁번호 DSM ACC2808, 2006년 10월 26일에 기탁됨

[0206] m. 182-D1106-294, 수탁번호 DSM ACC2809, 2006년 10월 26일에 기탁됨,

[0207] n. 182-D1106-362, 수탁번호 DSM ACC2810, 2006년 10월 26일에 기탁됨.

[0208] 본 발명에 따른 바람직한 항체들은 전술한 하이브리도마가 생산하거나 이로부터 수득가능한 것들이다; 즉, 182-D1106-055의 경우 37G11, 182-D1106-056의 경우 37H8, 182-D1106-057의 경우 38G5, 182-D1106-058의 경우 38H3, 182-D1106-059의 경우 39F11, 182-D1106-062의 경우 43A11, 182-D1106-067의 경우 61C2, 182-D758-035의 경우 26B5, 182-D758-036의 경우 26D12, 182-D758-040의 경우 28D10, 182-D1106-061의 경우 42E12, 182-D1106-279의 경우 125E1, 182-D1106-294의 경우 163E12, 및 182-D1106-362의 경우 175D10; 및 이들의 키메라 형태 및 인간화 형태.

[0209] 바람직한 키메라 항체 및 이들의 서열은 다음 표에 나타낸 바와 같다.

	클론	mAb	이소형	가변부	키메라 항체
중쇄	43A11	182-D1106-062	IgG2a	SEQ ID NO:29	SEQ ID NO:14
	163E12	182-D1106-294	IgG3	SEQ ID NO:30	SEQ ID NO:15
	125E1	182-D1106-279	IgG2a	SEQ ID NO:31	SEQ ID NO:16
	166E2	182-D1106-308	IgG3	SEQ ID NO:33	SEQ ID NO:18
	175D10	182-D1106-362	IgG1	SEQ ID NO:32	SEQ ID NO:17
	45C1	182-D758-187	IgG2a	SEQ ID NO:34	SEQ ID NO:19
경쇄	43A11	182-D1106-062	IgK	SEQ ID NO:36	SEQ ID NO:21
	163E12	182-D1106-294	IgK	SEQ ID NO:35	SEQ ID NO:20
	125E1	182-D1106-279	IgK	SEQ ID NO:37	SEQ ID NO:22
	166E2	182-D1106-308	IgK	SEQ ID NO:40	SEQ ID NO:25
	175D10	182-D1106-362	IgK	SEQ ID NO:39	SEQ ID NO:24
	45C1	182-D758-187	IgK	SEQ ID NO:38	SEQ ID NO:23
	45C1	182-D758-187	IgK	SEQ ID NO:41	SEQ ID NO:26
	45C1	182-D758-187	IgK	SEQ ID NO:42	SEQ ID NO:27
	45C1	182-D758-187	IgK	SEQ ID NO:43	SEQ ID NO:28

[0210]

[0211] 바람직한 구체예에서, 항체, 특히 본 발명에 따른 항체의 키메라 형태는 SEQ ID NO: 13으로 나타내지는 아미노산 서열 또는 그의 단편과 같은 인간 중쇄 불변부로부터 유래하는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 불변부(CH)를 포함하는 항체를 포함하는 것이 좋다. 또 다른 바람직한 구체예에서, 항체, 특히 본 발명에 따른 항체의 키메라 형태는 SEQ ID NO: 12로 나타내지는 아미노산 서열 또는 그의 단편과 같은 인간 경쇄 불변부로부터 유래하는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 불변부(CL)를 포함하는 항체를 포함하는 것이 좋다. 특히 바람직한 구체예에서, 항체, 특히 본 발명에 따른 항체의 키메라 형태는 SEQ ID NO: 13으로 나타내지는 아미노산 서열 또는 그의 단편과 같은 인간 CH로부터 유래하는 아미노산 서열을 포함하는 CH 또는 SEQ ID NO: 12로 나타내지는 아미노산 서열 또는 그의 단편과 같은 인간 CL로부터 유래하는 아미노산 서열을 포함하는 CL을 포함한다.

[0212] 일 구체예에서, CLDN18.2에 결합하는 능력이 있는 항체는 카파, 쥐의 경쇄 가변부, 인간 카파 경쇄 불변부 동종이형(allotype) Km(3), 쥐의 중쇄 가변부, 인간 IgG1 불변부, 동종이형 G1m(3)을 포함하는 키메라 마우스/인간 IgG1 모노클로날 항체이다.

[0213] 바람직한 특정 구체예에서, 항체들의 키메라 형태에는 SEQ ID NOs: 14, 15, 16, 17, 18, 19, 및 그의 단편으로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄를 포함하고/포함하거나 SEQ ID NOs: 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 및 그의 단편으로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함하는 항체들이 포함된다.

[0214] 바람직한 특정 구체예에서, 항체들의 키메라 형태에는 다음의 (i) 내지 (ix)의 가능성으로부터 선택되는 중쇄와 경쇄와의 조합을 포함하는 항체들이 포함된다:

[0215] (i) 중쇄는 SEQ ID NO: 14로 나타내지는 아미노산 서열 또는 그의 단편을 포함하고 경쇄는 SEQ ID NO: 21로 나타내지는 아미노산 서열 또는 그의 단편을 포함함,

[0216] (ii) 중쇄는 SEQ ID NO: 15로 나타내지는 아미노산 서열 또는 그의 단편을 포함하고 경쇄는 SEQ ID NO: 20으로 나타내지는 아미노산 서열 또는 그의 단편을 포함함,

[0217] (iii) 중쇄는 SEQ ID NO: 16으로 나타내지는 아미노산 서열 또는 그의 단편을 포함하고 경쇄는 SEQ ID NO: 22로 나타내지는 아미노산 서열 또는 그의 단편을 포함함,

[0218] (iv) 중쇄는 SEQ ID NO: 18로 나타내지는 아미노산 서열 또는 그의 단편을 포함하고 경쇄는 SEQ ID NO: 25로 나타내지는 아미노산 서열 또는 그의 단편을 포함함,

[0219] (v) 중쇄는 SEQ ID NO: 17로 나타내지는 아미노산 서열 또는 그의 단편을 포함하고 경쇄는 SEQ ID NO: 24로 나타내지는 아미노산 서열 또는 그의 단편을 포함함,

[0220] (vi) 중쇄는 SEQ ID NO: 19로 나타내지는 아미노산 서열 또는 그의 단편을 포함하고 경쇄는 SEQ ID NO: 23으로 나타내지는 아미노산 서열 또는 그의 단편을 포함함,

[0221] (vii) 중쇄는 SEQ ID NO: 19로 나타내지는 아미노산 서열 또는 그의 단편을 포함하고 경쇄는 SEQ ID NO: 26으로 나타내지는 아미노산 서열 또는 그의 단편을 포함함,

[0222] (viii) 중쇄는 SEQ ID NO: 19로 나타내지는 아미노산 서열 또는 그의 단편을 포함하고 경쇄는 SEQ ID NO: 27로 나타내지는 아미노산 서열 또는 그의 단편을 포함함, 및

[0223] (ix) 중쇄는 SEQ ID NO: 19로 나타내지는 아미노산 서열 또는 그의 단편을 포함하고 경쇄는 SEQ ID NO: 28로 나타내지는 아미노산 서열 또는 그의 단편을 포함함.

[0224] 전술한 바와 같이 본 발명에서 "단편" 또는 "아미노산 서열의 단편"이라 함은 항체 서열의 일부를 가리키는 것으로서, 즉, N- 및/또는 C-말단에서 단축된 항체 서열을 나타내며, 이것이 항체에서 상기 항체 서열을 대체할 경우, CLDN18.2에 대한 상기 항체의 결합을 유지하고, 좋기로는 전술한 바와 같은 상기 항체의 기능 예컨대, CDC 매개형 용해 또는 ADCC 매개형 용해능을 유지하는 서열을 의미한다. 좋기로는, 아미노산의 단편은 상기 아미노산 서열의 아미노산 잔기의 적어도 80%, 좋기로는 적어도 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%를 포함하는 것이 바람직하다. SEQ ID NOs: 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 및 28로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열의 단편은 좋기로는 N-말단에서 17, 18, 19, 20, 21, 22 또는 23개의 아미노산이 제거된 상기 서열에 관한 것이다.

[0225] 바람직한 일 구체예에서, CLDN18.2에 결합하는 능력이 있는 항체는 SEQ ID NOs: 29, 30, 31, 32, 33, 34, 및 그의 단편으로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변부 (VH)를 포함한다.

[0226] 바람직한 일 구체예에서, CLDN18.2에 결합하는 능력이 있는 항체는SEQ ID NO: 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 및 그의 단편으로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변부 (VL)를 포함한다.

[0227] 바람직한 특정 구체예에서, CLDN18.2에 결합하는 능력이 있는 항체는 다음의 가능한 경우 (i) 내지 (ix)로부터 선택되는 중쇄 가변부 (VH)와 경쇄 가변부 (VL)와의 조합을 포함한다:

[0228] (i) VH는 SEQ ID NO: 29로 나타내지는 아미노산 서열 또는 그의 단편을 포함하고 및 VL은 SEQ ID NO: 36로 나타내지는 아미노산 서열 또는 그의 단편을 포함함,

[0229] (ii) VH는 SEQ ID NO: 30으로 나타내지는 아미노산 서열 또는 그의 단편을 포함하고 및 VL은 SEQ ID NO: 35로 나타내지는 아미노산 서열 또는 그의 단편을 포함함,

[0230] (iii) VH는 SEQ ID NO: 31로 나타내지는 아미노산 서열 또는 그의 단편을 포함하고 및 VL은 SEQ ID NO: 37로 나타내지는 아미노산 서열 또는 그의 단편을 포함함,

[0231] (iv) VH는 SEQ ID NO: 33으로 나타내지는 아미노산 서열 또는 그의 단편을 포함하고 및 VL은 SEQ ID NO: 40으로 나타내지는 아미노산 서열 또는 그의 단편을 포함함,

[0232] (v) VH는 SEQ ID NO: 32로 나타내지는 아미노산 서열 또는 그의 단편을 포함하고 및 VL은 SEQ ID NO: 39로 나타내지는 아미노산 서열 또는 그의 단편을 포함함,

[0233] (vi) VH는 SEQ ID NO: 34로 나타내지는 아미노산 서열 또는 그의 단편을 포함하고 및 VL은 SEQ ID NO: 38로 나타내지는 아미노산 서열 또는 그의 단편을 포함함,

[0234] (vii) VH는 SEQ ID NO: 34로 나타내지는 아미노산 서열 또는 그의 단편을 포함하고 및 VL은 SEQ ID NO: 41로 나타내지는 아미노산 서열 또는 그의 단편을 포함함,

[0235] (viii) VH는 SEQ ID NO: 34로 나타내지는 아미노산 서열 또는 그의 단편을 포함하고 및 VL은 SEQ ID NO: 42로 나타내지는 아미노산 서열 또는 그의 단편을 포함함,

[0236] (ix) VH는 SEQ ID NO: 34로 나타내지는 아미노산 서열 또는 그의 단편을 포함하고 및 VL은 SEQ ID NO: 43으로 나타내지는 아미노산 서열 또는 그의 단편을 포함함.

[0237] 바람직한 일 구체예에서, CLDN18.2에 결합하는 능력이 있는 항체는 다음 구체예 (i) 내지 (vi)로부터 선택되는 상보성-결정부 CDR1, CDR2 및 CDR3 세트를 포함하는 VH를 포함한다:

[0238] (i) CDR1: SEQ ID NO: 14의 위치 45-52, CDR2: SEQ ID NO: 14의 위치 70-77, CDR3: SEQ ID NO: 14의 위치 116-125,

[0239] (ii) CDR1: SEQ ID NO: 15의 위치 45-52, CDR2: SEQ ID NO: 15의 위치 70-77, CDR3: SEQ ID NO: 15의 위치 116-126,

[0240] (iii) CDR1: SEQ ID NO: 16의 위치 45-52, CDR2: SEQ ID NO: 16의 위치 70-77, CDR3: SEQ ID NO: 16의 위치 116-124,

[0241] (iv) CDR1: SEQ ID NO: 17의 위치 45-52, CDR2: SEQ ID NO: 17의 위치 70-77, CDR3: SEQ ID NO: 17의 위치 116-126,

[0242] (v) CDR1: SEQ ID NO: 18의 위치 44-51, CDR2: SEQ ID NO: 18의 위치 69-76, CDR3: SEQ ID NO: 18의 위치 115-125, 및

[0243] (vi) CDR1: SEQ ID NO: 19의 위치 45-53, CDR2: SEQ ID NO: 19의 위치 71-78, CDR3: SEQ ID NO: 19의 위치 117-128.

[0244] 바람직한 일 구체예에서, CLDN18.2에 결합하는 능력이 있는 항체는 다음 구체예 (i) 내지 (ix)로부터 선택되는 상보성-결정부 CDR1, CDR2 및 CDR3의 세트를 포함하는 VL을 포함한다:

[0245] (i) CDR1: SEQ ID NO: 20의 위치 47-58, CDR2: SEQ ID NO: 20의 위치 76-78, CDR3: SEQ ID NO: 20의 위치 115-123,

[0246] (ii) CDR1: SEQ ID NO: 21의 위치 49-53, CDR2: SEQ ID NO: 21의 위치 71-73, CDR3: SEQ ID NO: 21의 위치 110-118,

[0247] (iii) CDR1: SEQ ID NO: 22의 위치 47-52, CDR2: SEQ ID NO: 22의 위치 70-72, CDR3: SEQ ID NO: 22의 위치 109-117,

[0248] (iv) CDR1: SEQ ID NO: 23의 위치 47-58, CDR2: SEQ ID NO: 23의 위치 76-78, CDR3: SEQ ID NO: 23의 위치 115-123,

[0249] (v) CDR1: SEQ ID NO: 24의 위치 47-58, CDR2: SEQ ID NO: 24의 위치 76-78, CDR3: SEQ ID NO: 24의 위치 115-123,

[0250] (vi) CDR1: SEQ ID NO: 25의 위치 47-58, CDR2: SEQ ID NO: 25의 위치 76-78, CDR3: SEQ ID NO: 25의 위치 115-122,

[0251] (vii) CDR1: SEQ ID NO: 26의 위치 47-58, CDR2: SEQ ID NO: 26의 위치 76-78, CDR3: SEQ ID NO: 26의 위치 115-123,

[0252] (viii) CDR1: SEQ ID NO: 27의 위치 47-58, CDR2: SEQ ID NO: 27의 위치 76-78, CDR3: SEQ ID NO: 27의 위치 115-123, 및

[0253] (ix) CDR1: SEQ ID NO: 28의 위치 47-52, CDR2: SEQ ID NO: 28의 위치 70-72, CDR3: SEQ ID NO: 28의 위치 109-117.

[0254] 바람직한 일 구체예에서, CLDN18.2에 결합하는 능력이 있는 항체는 다음 구체예 (i) 내지 (ix)로부터 선택되는 상보성-결정부 CDR1, CDR2 및 CDR3의 세트를 각각 포함하는 VH와 VL의 조합을 포함한다:

[0255] (i) VH: CDR1: SEQ ID NO: 14의 위치 45-52, CDR2: SEQ ID NO: 14의 위치 70-77, CDR3: SEQ ID NO: 14의 위치 116-125, VL: CDR1: SEQ ID NO: 21의 위치 49-53, CDR2: SEQ ID NO: 21의 위치 71-73, CDR3: SEQ ID NO: 21의 위치 110-118,

[0256] (ii) VH: CDR1: SEQ ID NO: 15의 위치 45-52, CDR2: SEQ ID NO: 15의 위치 70-77, CDR3: SEQ ID NO: 15의 위치 116-126, VL: CDR1: SEQ ID NO: 20의 위치 47-58, CDR2: SEQ ID NO: 20의 위치 76-78, CDR3: SEQ ID NO: 20의 위치 115-123,

[0257] (iii) VH: CDR1: SEQ ID NO: 16의 위치 45-52, CDR2: SEQ ID NO: 16의 위치 70-77, CDR3: SEQ ID NO: 16의 위치 116-124, VL: CDR1: SEQ ID NO: 22의 위치 47-52, CDR2: SEQ ID NO: 22의 위치 70-72, CDR3: SEQ ID NO: 22의 위치 109-117,

[0258] (iv) VH: CDR1: SEQ ID NO: 18의 위치 44-51, CDR2: SEQ ID NO: 18의 위치 69-76, CDR3: SEQ ID NO: 18의 위치 115-125, VL: CDR1: SEQ ID NO: 25의 위치 47-58, CDR2: SEQ ID NO: 25의 위치 76-78, CDR3: SEQ ID NO: 25의 위치 115-122,

[0259] (v) VH: CDR1: SEQ ID NO: 17의 위치 45-52, CDR2: SEQ ID NO: 17의 위치 70-77, CDR3: SEQ ID NO: 17의 위치 116-126, VL: CDR1: SEQ ID NO: 24의 위치 47-58, CDR2: SEQ ID NO: 24의 위치 76-78, CDR3: SEQ ID NO: 24의 위치 115-123,

[0260] (vi) VH: CDR1: SEQ ID NO: 19의 위치 45-53, CDR2: SEQ ID NO: 19의 위치 71-78, CDR3: SEQ ID NO: 19의 위치 117-128, VL: CDR1: SEQ ID NO: 23의 위치 47-58, CDR2: SEQ ID NO: 23의 위치 76-78, CDR3: SEQ ID NO: 23의 위치 115-123,

[0261] (vii) VH: CDR1: SEQ ID NO: 19의 위치 45-53 , CDR2: SEQ ID NO: 19의 위치 71-78, CDR3: SEQ ID NO: 19의 위치 117-128, VL: CDR1: SEQ ID NO: 26의 위치 47-58, CDR2: SEQ ID NO: 26의 위치 76-78, CDR3: SEQ ID NO: 26의 위치 115-123,

[0262] (viii) VH: CDR1: SEQ ID NO: 19의 위치 45-53, CDR2: SEQ ID NO: 19의 위치 71-78, CDR3: SEQ ID NO: 19의 위치 117-128, VL: CDR1: SEQ ID NO: 27의 위치 47-58, CDR2: SEQ ID NO: 27의 위치 76-78, CDR3: SEQ ID NO: 27의 위치 115-123, 및

[0263] (ix) VH: CDR1: SEQ ID NO: 19의 위치 45-53, CDR2: SEQ ID NO: 19의 위치 71-78, CDR3: SEQ ID NO: 19의 위치 117-128, VL: CDR1: SEQ ID NO: 28의 위치 47-52, CDR2: SEQ ID NO: 28의 위치 70-72, CDR3: SEQ ID NO: 28의 위치 109-117.

[0264] 또 다른 바람직한 구체예에서, CLDN18.2에 결합하는 능력이 있는 항체는 좋기로는 하나 이상의 상보성 결정부 (CDRs), 적어도 좋기로는, CLDN18.2에 대한 모노클로날 항체, 좋기로는 본 발명에 설명된 CLDN18.2에 대한 모노클로날 항체의 중쇄 가변부 (VH) 및/또는 경쇄 가변부 (VL)의 CDR3 가변부를 포함하는 것이 바람직하고, 좋기로는 하나 이상의 상보성 결정부 (CDRs), 적어도 좋기로는, CLDN18.2에 대한 모노클로날 항체, 좋기로는 본 발명에 설명된 CLDN18.2에 대한 모노클로날 항체의 중쇄 가변부 (VH) 및/또는 경쇄 가변부 (VL)의 CDR3 가변부를 포함하는 것이 바람직하다. 일 구체예에서 상기 하나 이상의 상보성 결정부 (CDRs)는 본 발명에 설명된 상보성 결정부 CDR1, CDR2 및 CDR3 세트로부터 선택된다. 특히 바람직한 구체예에서, CLDN18.2에 결합하는 능력이 있는 항체는 좋기로는 CLDN18.2에 대한 모노클로날 항체, 좋기로는 본 발명에 설명된 CLDN18.2에 대한 모노클로날 항체의 중쇄 가변부 (VH) 및/또는 경쇄 가변부 (VL)의 상보성 결정부 CDR1, CDR2 및 CDR3를 포함하는 것이 바람직하며, 좋기로는 본 발명에 설명된 중쇄 가변부들 (VH) 및/또는 경쇄 가변부들 (VL)의 상보성 결정부 CDR1, CDR2 및 CDR3를 포함하는 것이 바람직하다.

[0265] 일 구체예에서 본 발명에 설명된 바와 같은 하나 이상의 CDRs, CDRs 세트 또는 CDRs 세트의 조합을 포함하는 항체는 상기 CDRs 및 그들의 개재(intervening) 프레임워크 부분을 함께 포함한다. 좋기로는 상기 부분은 또한 제1 및 제4 프레임워크 부분 중 어느 일방 또는 양방을 적어도 약 50% 포함하며, 이 50%는 제1 프레임워크 부분의 C-말단 50%와 제4 프레임워크 부분의 N-말단 50%이다. 재조합 DNA 기술에 의해 만들어진 항체의 구조는, 면역글로불린 중쇄, 기타 가변부(예컨대 다이아바디 제조시) 또는 단백질 표지를 비롯한 추가 단백질 서열에 본 발명의 가변부를 결합시키기 위해 링커를 도입하는 것을 비롯하여, 클로닝 또는 기타 조작 단계를 용이하게 수행하도록 도입되는 링커에 의해 코딩된 가변부의 N-말단 또는 C-말단 잔기가 도입되도록 할 수 있다.

[0266] 일 구체예에서 본 발명에 설명된 하나 이상의 CDRs, CDRs 세트 또는 CDR 세트들의 조합은 인간 항체 프레임워크 내의 상기 CDRs을 포함한다.

[0267] 본 발명에서 항체가 중쇄와 관련하여 특정 사슬 또는 특정 부분 또는 서열을 포함하는 경우 좋기로는 상기 항체의 모든 중쇄들이 상기 사슬, 부분 또는 서열을 포함하는 것이 바람직하다. 이것은 항체의 경쇄에도 마찬가지로 적용된다.

[0268] 본 발명에서 "핵산"이라는 용어는 DNA 및 RNA를 포괄하도록 의도된다. 핵산은 단일 가닥 또는 이중 가닥일 수 있지만, 좋기로는 이중-가닥 DNA가 바람직하다.

[0269] 본 발명에서, "발현"이라는 용어는 대부분 그의 일반적인 의미로 사용되며 RNA 또는 RNA와 단백질/펩타이드의 생산을 포함한다.

[0270] 이것은 핵산의 부분적 발현도 포함한다. 또한, 발현은 일시적으로 또는 안정적으로 수행될 수도 있다.

[0271] 특이적인 아미노산 서열, 예컨대 서열목록에 나타나 있는 서열들에 대한 본원발명의 교시 내용은 상기 특이적인 서열과 기능적으로 동등한 서열, 예컨대 특이적인 아미노산 서열과 동등한 특성을 나타내는 아미노산 서열을 결과시키는 상기 특이적인 서열의 변이체에 대해서도 적용되는 것으로 이해된다. 한 가지 중요한 특성은 표적에 대한 항체의 결합을 유지하거나 항체의 이펙터 기능을 유지하는 것이다. 좋기로는, 어떤 특이적인 서열과 관련한 변이체인 서열은 항체에서 그 특이적인 서열을 대체할 경우, CLDN18.2에 대한 상기 항체의 결합을 지속하는 것이 바람직하고, 본 발명에 설명된 상기 항체의 기능, 예컨대 CDC 매개형 용해 또는 ADCC 매개형 용해와 같은 기능을 유지하는 것이 바람직하다.

[0272] 통상의 기술자는 특히 CDR, 하이퍼가변부 및 가변부의 서열들이 CLDN18.2에 대한 결합능을 잃지 않고도 변형될 수 있음을 이해할 것이다. 예컨대, CDR 부분은 본 발명에 명시된 항체의 부분들과 동일하거나 고도로 상동적일 것이다. "고도로 상동적인(highly homologous)"이라는 의미는 CDRs 내에 1 내지 5, 좋기로는 1 내지 4, 예컨대 1 내지 3 또는 1 또는 2개의 치환이 있을 수 있는 것으로 의도된다. 또한, 하이퍼가변부 및 가변부는 이들이 본 발명에 특별히 설명된 항체들의 부분과 실제로 상동성을 갖도록 변형될 수도 있다.

[0273] 본 발명의 목적상, 아미노산 서열의 "변이체"는 아미노산 삽입 변이체, 아미노산 첨가 변이체, 아미노산 결여 변이체 및/또는 아미노산 치환 변이체를 포함한다. 단백질의 N-말단 및/또는 C-말단의 결여를 포함하는 아미노산 결여 변이체는 또한 N-말단 및/또는 C-말단 절단 변이체로도 불리운다.

[0274] 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.

[0275] 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.

[0276] 아미노산 결여 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.

[0277] 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.

[0278] 좋게는, 유사성 정도, 좋기로는 주어진 아미노산 서열과 상기 주어진 아미노산 서열의 변이체인 아미노산 서열 간의 동일성이 적어도 약 60%, 65%, 70%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%인 것이 바람직하다. 유사성 또는 동일성의 정도는 좋기로는 참조 아미노산 서열의 전장의 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. 바람직한 구체예에서, 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 사

용하여 수행될 수 있다.

[0279] "서열 유사성"은 동일하거나 또는 보존적 아미노산 치환을 나타내는 아미노산들의 백분율을 나타낸 것이다. 두 개의 아미노산 서열들 간의 "서열 동일성"은 서열 간 동일한 아미노산들의 백분율을 가리킨다.

[0280] 용어 "퍼센트 동일성(percentage identity)"은 가장 적합한 정렬 후 얻어지는 비교될 두 개의 서열들 간에 동일한 아미노산 잔기들의 퍼센트를 나타내고자 하는 것으로, 이러한 퍼센트는 오로지 통계적인 퍼센트이고 임의적으로 분포된 두 개의 서열 간의 차이 및 전장 서열에 걸친 두 개의 서열 간의 차이이다. 두 개의 아미노산 서열들 간의 서열 비교는 통상적으로 상술한 서열들을 최적으로 정렬시킨 후 비교함으로써 실시되고, 상기 비교는 절편 또는 "비교 윈도우(window of comparison)"에 의해 실시되어 서열 유사성의 국소적 부위들을 동정하고 비교하는 것이다. 비교를 위한 서열들 간의 최적 정렬은 수작업 외에도 Smith and Waterman, 1981, Ads App. Math. 2, 482의 국소 상동성 알고리즘, Neddleman and Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48, 443의 국소 상동성 알고리즘, Pearson and Lipman, 1988, Proc. Natl Acad. Sci. USA 85, 2444의 유사성 탐구 방법, 또는 상술한 알고리즘들을 이용하는 컴퓨터 프로그램들(GAP, BESTFIT, FASTA, BLAST P, BLAST N and TFASTA in Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wis.)에 의해 얻어질 수 있다.

[0281] 퍼센트 동일성은 비교되는 두 개의 서열들 간의 동일한 위치들의 수를 결정하는 단계, 비교된 위치들의 수로 상기 동일한 위치들의 수를 나누는 단계 및 얻어진 결과들에 100을 곱하는 단계에 의해 계산되어 상술한 두 개의 서열들 간의 퍼센트 동일성을 얻는다.

[0282] 용어 "트랜스제닉 동물(transgenic animal)"은 하나 이상의 트랜스유전자들, 바람직하게는 항체 중쇄 및/또는 경쇄 트랜스유전자들, 또는 트랜스염색체들(동물의 천연 게놈 DNA 내로 통합되거나 또는 통합되지 않음)을 포함하는 게놈을 가지는 동물을 의미하고 좋게는 상기 트랜스유전자들을 발현할 수 있는 동물이다. 예를 들어, 트랜스제닉 마우스는 인간 경쇄 트랜스유전자 및 인간 중쇄 트랜스유전자 또는 인간 중쇄 트랜스염색체 중 어느 하나를 가질 수 있으며, 그로 인해 상기 마우스가 CLDN18.2 항원 및/또는 CLDN18.2를 발현하는 세포들로 면역화되는 경우 상기 마우스는 인간 항-CLDN18.2 항체들을 생산한다. 인간 중쇄 트랜스유전자는 트랜스제닉 마우스, 예컨대 HCo7 또는 HCo12 마우스 같은 HuMAb 마우스 또는 인간 중쇄 트랜스유전자의 경우에서처럼 마우스의 염색체 DNA 내로 통합될 수 있거나, 또는 상기 인간 중쇄 트랜스유전자는 WO 02/43478에 기재된 대로 트랜스염색체성 마우스(예컨대, KM)의 경우 같이 염색체 외적으로 유지될 수 있다. 그러한 트랜스제닉 및 트랜스염색체성 마우스는 V-D-J 재조합 및 이소형 스위칭을 통해 CLDN18.2에 대한 인간 단일클론 항체들의 복수 이소형들(예컨대, IgG, IgA 및/또는 IgE)을 생산할 수 있을 것이다.

[0283] 본 발명에서 "감소시키다", "저감시키다", "억제하다"의 의미는 어떤 수준, 예컨대 세포의 증식 수준 또는 발현 수준을, 좋게는 5% 이상, 10% 이상, 20% 이상, 보다 좋게는 50% 이상, 및 가장 좋게는 75% 이상 전반적으로 감소시키거나 전반적인 감소를 유발하는 능력을 의미한다.

[0284] "증가시키다" 또는 "증대시키다"라는 용어는 좋기로는 약 적어도 10%, 좋기로는 적어도 20%, 좋기로는 적어도 30%, 더욱 좋기로는 적어도 40%, 더욱 좋기로는 적어도 50%, 더더욱 좋기로는 적어도 80%, 및 가장 좋기로는 적어도 100%, 적어도 200%, 적어도 500%, 적어도 1000%, 적어도 10000% 또는 그 이상 증가 또는 증대시키는 것에 관한다.

[0285] **mAb작용의 메카니즘**

[0286] 후술하는 것이 본 발명의 항체의 치료적 효능에 근거한 메카니즘에 관한 고려를 제공하더라도, 어떠한 방법으로도 본 발명을 제한하는 것으로 고려되지 않는다.

[0287] 본 발명에 개시된 항체는 바람직하게는 면역 시스템, 좋게는 ADCC 또는 CDC를 통한 면역 시스템의 인자와 상호반응한다. 본 발명의 항체는 직접 종양 세포를 살해하는 표적 페이로드(payload)(예컨대, 방사성 동위체, 약물 또는 독소)에 또한 이용될 수 있거나, T 임파구에서 화학치료적 세포독성 부작용 때문에 타협될 수 있는 항종양 면역 반응을 함유할 수 있는 작용의 상보적인 기전을 통해 종양을 공격하는 전통적인 화학치료제와 상승적으로 사용할 수 있다. 그러나, 본 발명의 항체는 세포 표면 상의 CLDN18.2에 단순히 결합하는 것에 의하여, 그리하여 세포의 증식을 차단하는 것에 의하여 효능을 또한 행사할 수도 있다.

[0288] **항체 의존성 세포-매개된 세포독성**

[0289] ADCC는 본 발명에 개시된 것처럼 이펙터 세포들, 특히 임파구들의 세포 살해 능력을 설명하고, 이것은 좋게는

항체에 의해 마킹(mark)되는 표적 세포를 필요로 한다.

[0290] ADCC는 좋게는 항체들이 종양 세포상에 항원과 결합하고, 항체 Fc 도메인들이 면역 이펙터 세포들의 표면에 Fc 수용체와 관여할 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 메카니즘으로서 간주될 수 있다. 좋게는, ADCC의 생체 내 유도는 종양 관련 T 세포 반응들 및 숙주 유래 항체 반응을 가져온다.

[0291] **보체 의존성 세포독성**

[0292] CDC는 항체에 의해 지시될 수 있는 다른 세포 살해 방법이다. IgM은 보체 활성을 위한 가장 효과적인 이소형이다. IgG1 및 IgG3는 전형적인 보체활성 경로를 통해 CDC를 지시하는 것에서 매우 효과적이다. 좋게는, 이러한 캐스캐이드(cascade)에서, 항원-항체 복합체들의 형성은 IgG 분자를 비롯한 항체 분자를 참여하는 CH2 도메인상에 가깝게 근접하여 다중 C1q 결합 사이트의 노출(uncloaking)을 일으킨다(C1q는 보체 C1의 3개의 하위인자 중 하나이다). 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, 이펙터 세포 화학주성의/활성제 C3a 및 C5a의 단백질 분해적 방출을 가져온다. 좋게는, 막의 형성에서 보체 캐스캐이드 말단은 복합체를 공격하고, 이것은 세포 내외의 용질 및 물의 자유(free) 통로를 촉진하는 세포 막에서 구멍을 형성한다.

[0293] 본 발명의 항체는 통상적인 모노클로날 항체 방법론, 예컨대, Kohler 및 Milstein, Nature 256: 495 (1975)의 표준 체세포 하이브리다이제이션 기술을 비롯한 다양한 기술에 의해 생산가능하다. 체세포 혼성화 절차가 선호될 지라도, 주로, 모노클로날 항체를 생산하기 위한 다른 기술들이 전개될 수 있다, 예컨대, B-임파구 또는 파지의 바이러스 또는 종양 형질변환은 항체 유전자의 라이브러리를 이용한 기술을 나타낸다.

[0294] 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, 쥐의 골수종 세포)와 융합 절차는 또한 알려져있다.

[0295] 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 개시됨).

[0296] 또 다른 바람직한 구체예에서, 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 알려진 것을 포함하고, "유전자이식 마우스"로 본 발명에 집합적으로 언급된다. 그러한 유전자 이식 쥐 내에 인간 항체의 생산은 WO2004035607에서 CD20을 위한 자세히 기재된 내용으로써 수행될 수 있다.

[0297] 모노클로날 항체들을 생성하기 위한 또 다른 전략은 예컨대, Babcock et al., 1996; 규정된 특이성의 항체를 생산하는 단일의 분리된 임파구들로부터 모노클로날 항체를 생산하기 위한 신규한 전략을 참고한, 규정된 특이성의 항체를 생산하는 임파구로부터 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 참고할 것.

[0298] 항체를 생성하기 위해, 항원 서열, 즉 그 항체을 지향시키고자 하는 서열로부터 유래된 담체-컨쥬게이트된 펩타이드, 기재된 CLDN18.2을 재조합적으로 발현된 풍부한 제조물 또는 그 단편 및/또는 CLDN18.2 또는 그의 단편을 발현하는 세포들로 마우스를 면역화시킬 수 있다. 별법으로, 마우스는 항원 또는 그 단편을 코딩하는 DNA로 면역화될 수 있다. 항원의 정제된 또는 풍부한 제조물을 이용한 면역화가 항체를 생성하지 않는 경우에, 마우스는 면역 반응을 촉진하기 위해, 항원을 발현하는 세포들, 예컨대 세포주로 또한 면역화될 수 있다.

[0299] 면역 반응은 꼬리 정맥 또는 안와후(retroorbital) 블리즈(bleeds)에 의해 수득되는 혈장 및 혈청 시료로 면역화 프로토콜의 코스로 모니터될 수 있다. 충분한 역가의 면역글로불린을 가진 마우스는 융합에 이용될 수 있다. 마우스는 희생되어, 특이적 항체 분비 하이브리도마의 비율을 증가시키기 위한 비장(spleen) 제거 3일 전에 항원 발현 세포들로 복강내 또는 정맥내로 부스트(boost)될 수 있다.

[0300] 모노클로날 항체를 생산하는 하이브리도마를 생성하기 위해, 면역화된 마우스들로부터의 림프절 세포들 및 비장 세포를 분리하여, 마우스 골수종 세포주를 비롯한 적절한 불사화된 세포주에 융합시킬 수 있다. 이어서, 결과적으로 나오는 하이브리도마들을 항원 특이적 항체의 생산을 위해 스크리닝할 수 있다. 그리고나서, 각각의 웰들은 항체 분비 하이브리도마를 위한 ELISA에 의해 스크린될 수 있다. 항원 발현 세포들을 이용한 면역형광 및 FACS에 의해, 항원에 특이적인 항체들이 확인될 수 있다. 항체 분비 하이브리도마는 리플레이트(replate)될 수 있고, 다시 스크린될 수 있으며, 만약 모노클로날 항체들을 위해 여전히 양성이라면 제한하는 희석에 의해 서브클론될 수 있다. 안정적인 서브클론은 그리고 나서 특성화를 위한 조직 배양 배지에서 항체를 생성하기 위해 시험관내(in vitro)에서 배양될 수 있다.

[0301] 항체들은 또한 예컨대, 기술분야에 잘 알려져 있는 재조합 DNA 기술 및 유전자 형질감염 방법들의 조합을 이용하여 숙주 세포 트랜스펙토마에서 생산될 수 있다 (Morrison, S. (1985) Science 229: 1202).

[0302] 예컨대, 일 구체예에서, 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 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.

[0303] 다르게, 클론된 항체 유전자들은 E.coli를 비롯한 미생물을 비롯한 원핵 세포들을 함유하는 다른 발현 시스템에서 발현될 수 있다. 또한, 항체들은 쉽(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).

[0304] 키메라화(Chimerization)

[0305] 뮤린(murine) 모노클로날 항체들은 독소 또는 방사성 동위원소로 표지될 때 인간 내에서 치료적 항체로써 사용될 수 있다. 비표지된 뮤린 항체들은 반복적으로 적용되어 치료적 효과의 감소를 가져올 때 인간 내에서 높은 면역성이다. 뮤린 항체의 면역원성은 중쇄 불변부에 의해 매개된다. 인간에서 뮤린 항체들의 면역원성은 만약 각각의 항체들이 키메라화되거나 인간화되면 감소되거나 완전히 막을 수 있다. 키메라 항체들은 항체들이고, 뮤린 항체로부터 유래된 가변부 및 인간 면역글로불린 불변부를 가지는 것을 비롯한 상이한 동물 종들로부터 유래된 상이한 부분들이다. 항체들의 키메라화는 인간 중쇄 및 경쇄의 불변부와 뮤린 항체 중쇄 및 경쇄의 가변부를 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 불변부를 뮤린 경쇄의 가변부에 결합시킴으로써 생성할 수 있다. 또 다른 선호되는 항체의 키메라화 방식으로는 인간 람다(lambda) 경쇄의 불변부를 뮤린 경쇄의 가변부에 결합시키는 방법이 있다. 키메라화된 항체 생성을 위한 선호되는 중쇄 불변부는 IgG1, IgG3 및 IgG4가 있다. 그 밖에 키메라 항체의 생성을 위해 선호되는 중쇄 불변부으로는 IgG2, IgA, IgD 및 IgM이 있다.

[0306] 인간화(Humanization)

[0308] 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 프래임워

크 서열은 생식세포(germline) 항체 유전자 서열을 포함하는 공공 DNA 데이터베이스에서 얻을 수 있다. 이러한 생식세포 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. 생식세포 유전자 서열은 또한 가변부 전체에 고르게 분포된 각각의 고친화도 이차적 레퍼토리 항체와도 다를 것이다.

[0309] 항원에 결합하는 항체의 능력은 표준 결합분석법(예컨대, ELISA, 웨스턴 블롯, 면역형광법 및 유세포분석법)을 이용하여 탐지될 수 있다

[0310] 항체들을 정제하기 위해, 선택된 하이브리도마들은 모노클로날 항체 정제를 위한 2-리터 스피너-플라스크에서 자랄 수 있다. 별법으로, 항체들은 투석 기반 생물반응기에서 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 젤 전기영동 및 순도를 보장하기 위해 고성능 액체 크로마토그래피에 의해 체크될 수 있다. 완충 용액은 PBS로 교체될 수 있고, 농도는 1.43 흡광 계수(extinction coefficient)를 이용하여 OD280에 의해 측정된다. 모노클로날 항체들은 나누어떨어지고(aliquote), -80℃에서 보관될 수 있다.

[0311] 만약 선택된 모노클로날 항체들이 유일한 에피토프와 결합하는지를 알아보기 위해, 부위-특이적(site-directed) 또는 다부위 특이적(multi-site directed) 돌연변이유발(mutagenesis)이 이용될 수 있다.

[0312] 항체들의 이소형을 알아보기 위해, 다양한 시판 키트의 이소형 ELISA(예컨대, Zymed, Roche Diagnostics)가 수행되었다. 마이크로 타이터 플레이트의 웰들은 항-마우스 Ig로 코팅될 수 있다. 블록킹 후에, 플레이트는 2시간 동안 주변 온도에서 모노클로날 항체들 또는 정제된 이소형 대조군들로 반응시켰다. 그리고나서 웰들은 마우스 IgG1, IgG2a, IgG2b 또는 IgG3, IgA 또는 마우스 IgM-특이적 페록시다제-컨쥬게이트된 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.

[0313] 항원을 발현하는 살아있는 세포들에 대한 모노클로날 항체들의 결합 또는 면역화된 마우스들의 혈청에서 항체들의 존재를 증명하기 위해, 유세포 분석법이 사용되었다. 천연 또는 형질감염후 항원을 발현하는 세포주들 및 항원 발현을 결여한 음성 대조군들 (표준 성장 조건에서 자란)은 하이브리도마 상청액들 또는 1% FBS 함유 PBS 내 모노클로날 항체들의 다양한 농도로 혼합될 수 있고, 30분동안 4℃에서 인큐베이션 할 수 있다. 세척 후, APC- 또는 Alexa647-표지된 항 IgG 항체는 초기 항체 염색과 같은 조건하에 항원-결합된 모노클로날 항체와 결합할 수 있다. 시료들은 단일, 살아있는 세포들을 게이트(gate)하기 위한 빛 및 사이드 산란 특징(light and side scatter properties)들을 이용한 FACS 기구로 유세포 분석법에 의해 분석될 수 있다. 단일 측정에서 비특정 바인더(binder)들로부터 항원-특이적 모노클로날 항체들을 구별하기 위해, 공동-형질감염 방법이 구현될 수 있다. 항원을 코딩하는 플라스미드로 일시적으로 형질감염된 세포들 및 형광 마커는 상기에 기재된 바와 같이 염색될 수 있다. 형질감염된 세포들은 항체-염색된 세포들보다 서로 다른 형광 채널에서 검출될 수 있다. 형질감염된 세포들의 다수가 이식유전자(transgene) 모두를 발현하는 것처럼, 항원-특이적 모노클로날 항체들은 형광 마커 발현 세포들에 선호되게 결합하는 반면, 비특이적 항체들은 비형질감염된 세포들에 비교할만한 비율로 결합한다. 형광 현미경을 이용하는 대안적인 어세이는 유세포 분석법 어세이에 더하여 또는 대신으로 사용될 수 있다. 세포들은 상기한 바와 같이 정확히 염색되고, 형광 현미경에 의해 조사될 수 있다.

[0314] 면역화된 마우스의 혈청에 항체의 존재 또는 항원을 발현하는 살아있는 세포와 모노클로날 항체와의 결합을 증명하기 위해 면역 형광 현미경이 사용될 수 있다. 예를 들어 자발적으로, 혹은 형질감염 후에 항원을 발현하는 세포주나 항원 발현을 결여하는 음성대조군은 10% FCS, 2 mM L-glutamine, 100IU/ml 페니실린, 100㎍/ml 스트렙토마이신이 보충된 DMEM/F12 배지에서 표준 성장 조건하의 챔버 슬라이드에서 배양된다. 세포들은 그 후 메탄올이나 파라포름알데히드로 고정되거나 미처리된다. 그리고나서 30분간 25℃에서 항원에 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.

[0315] 항원을 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.

[0316] 항체는 당업자에게는 잘 알려진 방식으로 면역조직화학에 의해, 예컨대, 수술 과정에서 환자로부터, 혹은 자발

적으로 또는 형질 감염후, 항원을 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, 항원에 대한 반응성을 추가적으로 측정할 수 있다. 면역염색을 위해, 항원에 대해 반응성이 있는 항체들을 인큐베이션한 다음 배포업체 지시에 따라 고트 항-마우스 또는 고트(goat) 항-래빗 항체들(DAKO)과 호스래디쉬-퍼옥시다제 컨쥬게이트시킨다.

[0317] 항체를 대식작용을 매개하는 능력 및 CLDN18.2를 발현하는 세포를 사멸하는 능력에 대해 테스트할 수 있다. 시험관내에서의 모노클로날 항체 활성의 테스트 의해 생체내 모델에서의 테스트에 앞서, 초기 스크리닝이 이루어질 수 있다.

[0318] *항체 의존성 세포-매개된 세포독성(ADCC):*

[0319] 간단히 설명하면, 건강한 도너로부터 나온 PMNs(polymorphonuclear cells), NK 세포, 모노사이트, 단핵 세포, 또는 다른 이펙터 세포를 피콜 하이파크 밀도 원심분리에 의해 정제한 후 오염된 적혈구를 용해시킬 수 있다. 세척된 이펙터 세포를 10% 열-비활성화된 FCS가 보강되거나 또는 별법으로, 5% 열-비활성화된 인간 혈청이 보강된 RPMI에 현탁하고, CLDN18.2를 발현하는, ^{51}Cr로 표지된 표적 세포와 다양한 이펙터 세포 대 표적 세포의 비율로 혼합한다. 별법으로, 표적 세포를 형광강화 리간드(BATDA)로 표지할 수도 있다. 죽은 세포에서 나오는 상기 강화 리간드를 갖는 유로피움의 고형광 킬레이트를 형광계로 측정할 수 있다. 이렇게 첨가된 루시퍼 옐로우는 살아있는 세포에 의해서만 산화될 수 있다. 이어서 정제된 항-CLDN18.2 IgGs를 다양한 농도로 첨가할 수 있다. 무관한 인간 IgG를 음성대조군으로 사용할 수 있다. 사용된 이펙터 세포 유형에 따라 적게는 4시간에서 많게는 20시간동안 37℃에서 분석을 실시할 수 있다. 시료들을 배양 상청액의^{51}Cr 배출 또는 EuTDA 킬레이트 화합물의 존재를 측정함으로써 세포용해를 위해 분석된다. 별법으로, 루시퍼옐로우의 산화에 의한 발광이 살아있는 세포들의 척도가 될 수 있다.

[0320] 또한 세포용해가 다수의 모노클로날 항체와 함께 증가하는지를 알아보기 위해, 항-CLDN18.2 모노클로날 항체를 다양한 조합으로 테스트할 수 있다.

[0321] *보체 의존성 세포독성(CDC)*

[0322] 모노클로날 항-CLDN18.2 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 작용을 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 첨가하여 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.

[0323] 또 다른 분석법에서, CDC 유도는 부착 세포(adherent cell)에 따라 결정된다. 이러한 분석법의 일 구체예에서, 세포들을 조직배양 편평한 바닥 마이크로티터 플레이트에서 3 x 10^4/웰의 밀도로 분석 24시간 전에 접종한다. 그 다음날 생장 배지를 제거하고 이 세포들을 항체들과 함께 세벌(triplicate)로 인큐베이션시킨다. 대조군 세포들을 각각 배경(background) 용해나 최대 용해의 측정을 위해 생장 배지나 0.2%의 사포닌을 함유하는 생장 배지와 함께 인큐베이션한다. 20분간 상온에서 인큐베이션한 후에 상청액을 제거하고 DMEM(37℃에서 예열됨) 안의 20%(v/v) 인간 혈장이나 혈청을 세포에 더해 37℃에서 다시 20분간 인큐베이션한다. 각 시료에서 나온 모든 세포들을 프로피디움 요오드화물 용액(10㎍/ml)에 더한다. 그리고나서, 상청액을 2.5㎍/ml 에티디움 브로마이드를 포함하는 PBS로 대체하고 520 nm에서 여기(excitation)에 의한 형광 방출을 Tecan Safire를 사용해 600nm에서 측정한다. 특이적 용해 백분율은 다음과 같이 계산된다.: % 특이적 용해 = (형광 시료-형광 배경)/ (형광 최대 용해-형광 배경) x 100

[0324] *모노클로날 항체에 의한 세포자멸사의 유도 및 세포 증식의 억제:*

[0325] 세포자멸사(apoptosis) 개시 능력을 시험하기 위해, 예를 들어 모노클로날 항 CLDN18.2 항체를 CLDN18.2 양성 종양 세포, 예컨대, SNU-16, DAN-G, KATO-III 또는 CLDN18.2로 형질감염된 종양 세포와 37℃에서 약 20시간 동안 인큐베이션할 수 있다. 이 세포들을 채취된 후 Annexin-V 결합되는 버퍼(BD 생명과학)에서 세척하여 FITC나 APC(BD 생명과학)와 접합된 Annexin V와 15분간 암실에서 인큐베이션한다. 각 시료에서 나온 모든 세포들을

FACS 튜브 안의 PI 용액(10 μg/ml in PBS)에 첨가하고 즉시 유세포분석법(상기한 바와 같음)으로 평가한다. 별법으로 상용 키트에 의해 모노클로날 항체에 의한 세포 증식의 일반적 억제를 검출할 수도 있다. DELFIA Cell Proliferation Kit (Perkin-Elmer, Cat. No. AD0200)는 마이크로플레이트 안의 증식하는 세포의 DNA 합성 동안의 5-브로모-2'-데옥시우리딘 (BrdU) 혼합 측정에 기초한 비동위원소 면역분석법이다. 혼합된 BrdU는 유로피움 표지된 모노클로날 항체를 사용해 검출된다. 항체가 검출될 수 있도록, 세포들을 고정하고 Fix 용액을 사용해 DNA를 변성시킨다. 결합되어 있지 않은 항체를 씻어내고, 표지된 항체로부터 유로피움 이온을 분리시키기 위해 DELFIA 유도인자를 용액에 첨가하면, 여기서. 이들은 DELFIA 유도인자의 구성성분을 가진 고 형광 킬레이트 화합물을 형성한다. 측정된 형광 -검출에서 시간-분해된(time-resolved) 형광분석형광법을 이용함-은 각 웰의 세포에서 DNA 합성에 비례한다.

[0326] **전임상 연구**

[0327] CLDN18.2를 발현하는 종양 세포의 성장을 제어하는데 있어서의 효능을 알아보기 위해, CLDN18.2에 결합하는 모노클로날 항체들을 생체내 모델(예컨대 SNU-16, DAN-G, KATO-III, 또는 형질감염 후 예컨대 HEK293와 같은 CLDN18.2을 발현하는 세포주가 접종된, 이종이식된 종양을 지니는 면역결핍 마우스에서)에서 실험할 수 있다.

[0328] CLDN18.2 발현 양성 세포를 면역손상 마우스나 다른 동물에 주입한 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 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. 항체에 의한 독성 부작용을 분석하기 위해 동물에 항체나 대조 시약을 주입하고 CLDN18.2 항체 치료와 연관이 있을 수 있는 증상에 대해 면밀히 조사할 수 있다. CLDN18.2 항체의 생체 내 적용의 가능한 부작용으로는 위장을 비롯한 CLDN18.2 발현 조직에서의 독성이 있다. 인간이나 그 밖에 쥐와 같은 다른 종에서의 CLDN18.2을 인식하는 항체는 특히 인간에서의 모노클로날 CLDN18.2 항체의 적용에 의해 나타나는 잠재적 부작용을 예측하는 데 유용하다.

[0329] 항체에 의해 인지되는 에피토프 맵핑을 "Epitope Mapping Protocols (Methods in Molecular Biology) by Glenn E. Morris ISBN-089603-375-9 및 in 'Epitope Mapping: A Practical Approach" Practical Approach Series, 248 by Olwyn M. R. Westwood, Frank C. Hay 에 자세히 설명된 대로 수행할 수 있다.

[0330] 본 발명에 설명된 화합물들과 약제는 적절한 의약 조성물의 형태로 투여될 수 있다.

[0331] 의약 조성물은 단위 투여제형으로 대개 제공되며 공지 방식으로 제조될 수 있다. 의약 조성물은 예컨대 용액 또는 현탁액 형태일 수 있다.

[0332] 의약 조성물은 염, 완충물질, 보존제, 담체, 희석제 및/또는 부형제를 포함할 수 있으며, 이들 모두는 약학적으로 허용가능한 것이 좋다. "약학적으로 허용가능한"이라 함은 그 의약 조성물의 활성 성분의 작용과 상호반응하지 않는, 물질의 비독성을 가리킨다.

[0333] 약학적으로 허용가능하지 않은 염들을 이용하여 약학적으로 허용가능한 염을 만들 수 있으며 이들 역시 본 발명에 속한다. 이러한 종류의 약학적으로 허용가능한 염에는 다음의 산으로부터 제조되는 것이 포함되나 이에 한정되지 않는다: 염산, 히드로브롬산, 황산, 질산, 인산, 말레산, 아세트산, 살리실산, 시트르산, 포름산, 말론산, 숙신산 등. 약학적으로 허용가능한 염은 또한 알칼리금속 염이나 알칼리토금속염, 예컨대 나트륨염, 칼륨염 또는 칼슘염으로서 제조될 수도 있다.

[0334] 의약 조성물에 사용되기에 적합한 완충물질에는 아세트산염, 시트르산염, 붕산염 및 인산염이 포함된다.

[0335] 의약 조성물에 사용되기에 적합한 보존제로는 염화벤잘코늄, 클로로부탄올, 파라벤 및 티메로살을 들 수 있다.

[0336] 주사가능한 포뮬레이션은 Ringer Lactate와 같은 약학적으로 허용가능한 부형제를 포함할 수 있다.

[0337] "담체"라는 용어는 활성성분의 적용을 용이화, 증강 또는 가능하게 하기 위해, 활성성분과 조합되는, 천연 또는 합성된 유기 또는 무기 성분을 가리키다. 본 발명에 따라, "담체"는 또한 환자에게 투여하는데 적합한 1 이상의 혼용가능한 고체 또는 액체 충전제, 희석제 또는 캡슐화 물질을 포함하기도 한다.

[0338] 비경구 투여를 위한 가능한 담체 물질은 예컨대 멸균수, Ringer, Ringer 락테이트, 멸균 염화나트륨 용액, 폴리알킬렌 글리콜, 수소첨가된 나프탈렌 미치 특히, 생물적합성 락타이드 폴리머, 락타이드/글리콜라이드 코폴리머

또는 폴리옥시에틸렌/폴리옥시프로필렌 코폴리머이다.

[0339] 본 발명에서 "부형제"라는 용어는 의약 조성물 내에 존재할 수 있으나, 예컨대 담체, 바인더, 윤활제, 농후제, 표면활성제, 보존제, 유화제, 완충제, 풍미제 또는 착색제와 같이, 활성성분은 아닌 모든 물질을 가리키는 것으로 의도된다.

[0340] 본 발명에 설명된 물질과 조성물은 주사 또는 주입을 비롯한 비경구 투여와 같은 여하한 통상적인 경로를 통해 투여될 수 있다. 투여는 좋기로는 예컨대 정맥내, 동맥내, 피하(subcutaneously), 피내(intradermally), 또는 근육내를 비롯한 비경구 투여에 의해 투여될 수 있다.

[0341] 비경구 투여에 적합한 조성물은 대체로 활성 화합물의 멸균된 수성 또는 비수성 제제를 포함하며, 이것은 수용자의 혈액과 등장성인 것이 좋다. 적합한 담체 및 용매는 Ringer 용액 및 등장성 염화나트륨 용액이다. 이에 더해, 대개 멸균된 고정 오일(fixed oils)이 용액 또는 현탁액 매질로서 이용된다.

[0342] 본 발명에 설명된 물질 및 조성물은 유효량으로 투여된다. "유효량"이라 함은 그 단독으로 또는 추가 투여량(doses)과 함께 소망되는 반응 또는 소망되는 효과를 낼 수 있는 양이다. 특정 질환 또는 특정 상태를 치료하는 경우, 소망되는 반응은 좋기로는 그 질환의 경과를 억제하는 것에 관한다. 이것은 질병의 진행을 둔화시키는 것, 특히, 질병의 진행을 방해하거나 역전시키는 것을 포함한다. 질병 또는 상태의 치료시 소망되는 반응은 또한 상기 질병이나 상기 상태의 개시를 둔화시키거나 개시를 방지하는 것일 수도 있다.

[0343] 본 발명에 설명된 물질 또는 조성물의 유효량은 치료하고자 하는 상태, 질병의 위중도, 환자의 개별적인 변수, 예컨대 연령, 생리적 상태, 크기 및 체중, 치료 기간, 부수되는 치료법의 종류(있을 경우), 특정 투여 경로 및 유사 인자들에 따라 달라진다. 따라서, 본 발명에 설명된 물질의 투여량은 이러한 다양한 변수에 따라 달라진다. 만일 환자의 반응이 초기 투여량으로 불충분할 경우, 더 많은 투여량(또는 보다 국소적인, 다른 투여 경로에 의해 달성되는 효과적으로 더 높은 투여량)이 사용될 수 있다.

[0344] 본 발명에 설명된 물질과 조성물은 본 발명에 설명된 것과 같은 다양한 질환을 치료 또는 예방하기 위해 환자에게 예컨대, 생체내로 투여될 수 있다. 바람직한 환자로는 본 발명에 설명된 물질과 조성물의 투여에 의해 교정 또는 완화될 수 있는 질병에 걸린 인간 환자가 포함된다. 여기에는 CLDN18.2의 변경된 발현 패턴에 의해 특징지어지는 세포가 관련된 질병이 포함된다.

[0345] 예컨대, 일 구체예에서, 본 발명에 설명된 항체들을 이용하여 암 질환, 예컨대, CLDN18.2를 발현하는 암세포의 존재에 의해 특징지어지는 본 발명에 설명된 것과 같은 암질환에 걸린 환자를 치료할 수 있다.

[0346] 본 발명에 따른 의약 조성물과 치료 방법은 또한 본 발명에 설명된 질병의 예방을 위한 면역화 또는 백신접종을 위해 사용될 수도 있다.

[0347] 다음에 실시예를 들어 본 발명을 더욱 구체적으로 설명하나, 본 발명의 범위가 이들로 한정되는 것은 아니다.

[0349] **실시예**

[0350] 실시예 1: 인간 위암 세포주들의 CLDN18.2 발현을 화학요법제를 이용한 시험관내 처리에 의해 안정화시킨다

[0351] 세포증식억제 화합물 존재 또는 부재하에 인간 위종양 세포주인 KatoIII 세포를 37℃ 및 5% CO_2에서, 20% FCS (Perbio) 및 2 mM Glutamax (Invitrogen)를 함유하는 RPMI 1640 배지 (Invitrogen)에서 배양하였다. 에피루비신 (Pfizer)을 10 또는 100 ng/ml의 농도로, 5-FU (NeoCorp AG사의 Neofluor)를 10 또는 100 ng/ml의 농도로, 그리고 옥살리플라틴 (Hospira)을 50 또는 500 ng/ml의 농도로 시험하였다. 또한 이들 3종의 화합물 (EOF; 에피루비신 10 ng/ml, 옥살리플라틴 500 ng/ml, 5-FU 10 ng/ml)의 혼합물도 시험하였다. 37℃ 및 5% CO_2 6웰 조직배양 플레이트에서 $8x10^5$ KatoIII 세포를 배지 변경없이 96 시간 동안 배양하거나 또는 72 시간 배양한 후 표준 배지에서 24 시간 배양하여 세포 주기 정지로부터 세포를 방출시켰다. 세포들을 EDTA/트립신을 이용하여 수확, 세척 및 분석하였다.

[0352] CLDN18.2의 세포외 검출을 위해 세포들을 모노클로날 항CLDN18.2 항체 IMAB362(Ganymed) 또는 이소형-맷치된 대조군 항체(Ganymed)로 염색하였다. 제2 시약으로서 Dianova사의 염소-항huIgG-APC를 이용하였다.

[0353] 세포성 DNA 함량의 측정에 기초하여 세포 주기 단계들을 알아보았다. 이 과정에 의해 세포 주기의 G1-, S- 또는 G2-페이즈의 세포들을 서로 구별할 수 있다. S-페이즈에서는 DNA 복제가 일어나는 반면 G2-페이즈에서는 세포가

성장하고 유사분열을 준비한다. 제조업체의 프로토콜에 따라 BD Biosciences사의 CycleTEST PLUS DNA Reagent Kit을 이용하여 세포 주기 분석을 실시하였다. BD FACS CantoII (BD Biosciences) 및 FlowJo (Tree Star) 소프트웨어를 이용하여 유세포분석 자료수집 및 분석을 수행하였다.

[0354] 도 1a 및 b의 컬럼은 세포 주기의 G1-, S- 또는 G2-페이즈의 세포 백분율을 나타낸다. 배지로 배양된 KatoIII 세포는 주로 G1-페이즈로 세포 주기가 정지된 것으로 나타났다. 5-FU로 처리된 세포들은 주로 S-페이즈에 머물렀다. 에피루비신- 또는 EOF-처리된 KatoIII 세포들은 주로 G2-페이즈의 세포 주기에 정지되었다. 옥살리플라틴으로 처리된 KatoIII 세포들은 주로 G1- 및 G2-페이즈에 많이 나타났다. 도 1c에 나타난 바와 같이, S-페이즈 또는 G2-페이즈에서의 세포 주기 정지는 CLDN18.2의 안정화 또는 상향조절(upregulation)을 야기한다. 세포 주기의 여하한 페이즈에서건 일단 세포가 벗어나면 (도 1b) KatoIII 세포의 세포 표면 상에서의 CLDN18.2 발현이 상향조절된다(도 1d).

[0355] NUGC-4 및 KATO III 세포를 5-FU + OX (10 ng/ml 5-FU 및 500 ng/ml 옥살리플라틴), EOF (10 ng/ml 에피루비신, 500 ng/ml 옥살리플라틴 및 10 ng/ml 5-FU) 또는 FLO (10 ng/ml 5-FU, 50 ng/ml 폴린산 및 500 ng/ml 옥살리플라틴)로 96 시간 처리하였다. 화학요법 전처리된 NUGC-4 및 KATO III 세포의 RNA를 분리하여 cDNA로 전환시켰다. 정량적 실시간 PCR에 의해 CLDN18.2 전사 수준을 분석하였다. 결과를 하우스키핑 유전자 HPRT의 전자 수준과 비교한 상대적 발현값으로서 도 2a에 나타내었다. 도 2b는 미처리 및 처리된 NUGC-4 세포의 액틴 로딩 대조군 및 CLDN18.2의 웨스턴 블롯을 나타낸 도면이다. 발광 시그널 강도를 액틴에 대해 상대적인 백분율로 나타내었다.

[0356] NUGC-4 및 KATO III 세포를 EOF, FLO 및 5-FU + OX 조합 화학요법으로 전처리하자 정량적 실시간 PCR (도 2a) 및 웨스턴 블롯 (도 2b)에 나타난 바와 같이, CLDN18.2의 RNA 및 단백질 수준이 증가하였다.

[0357] 유세포분석에 의해 96 시간 동안 EOF (10 ng/ml 에피루비신, 500 ng/ml 옥살리플라틴 및 10 ng/ml 5-FU) 또는 FLO (10 ng/ml 5-FU, 50 ng/ml 폴린산 및 500 ng/ml 옥살리플라틴)으로 처리된 NUGC-4 및 KATO III 위암 세포에 대한 IMAB362의 결합을 분석하였다. 위암 세포주들 표면의 IMAB362에 의해 표적화가능한 CLDN18.2 단백질의 양이 도 2c에 도시된 바와 같이 증가하였다. 이 효과는 EOF 또는 FLO로 전처리된 세포에서 가장 두드러졌다.

[0358] KatoIII 세포를 4일간 이리노테칸 또는 도세탁셀로 전처리한 다음 CLDN18.2 발현 및 세포 주기 정지에 대해 분석하였다. 이리노테칸에 의한 세포 처리는 세포 성장의 억제 및 S/G2-페이즈로의 세포 주기 정지를 투여량 의존적으로 결과시켰다(도 3). 도세탁셀에 의한 세포 처리는 세포 성장의 억제 및 G2-페이즈로의 세포 주기 정지를 투여량 의존적으로 결과시켰다(도 3).

[0359] 실시예 2: 화학요법에 의한 인간 위암 세포의 전처리는 보다 높은 효율로 IMAB362-매개된 ADCC를 결과시킨다

[0360] 10 ng/ml 5-FU 및 500 ng/ml 옥살리플라틴 (5-FU + OX), 10 ng/ml 에피루비신, 500 ng/ml 옥살리플라틴 및 10 ng/ml 5-FU (EOF) 또는 10 ng/ml 5-FU, 50 ng/ml 폴린산 및 500 ng/ml 옥살리플라틴 (FLO)으로 96 시간 동안 전처리되거나 (이펙터:표적 비율 40:1) 또는 처리되지 않은 NUGC-4 위암 세포를 표적으로서 이용하여 IMAB362-매개된 ADCC를 조사하였다. 미처리 세포 및 EOF, FLO 또는 5-FU + OX로 전처리된 NUGC-4 세포에 대해 7명의 건강한 도너(donor)로부터 EC_{50} 값을 수집하였다.

[0361] 도 4a에 도시된 바와 같이, 전처리된 세포에 대한 투여량/반응 곡선은 미처리 표적 세포에 비해 상향 및 좌측으로 이동하였다. 이것은 미처리 세포에 비해 더 높은 최대 용해(maximal lysis) 및 EC_{50} 값을 1/3로 낮추는 결과를 초래하였다(도 4b).

[0362] 건강한 인간 도너로부터 얻은 NK 세포, 단핵구, 단핵 세포 또는 기타 이펙터 세포를 비롯한 말초 혈액 단핵 세포(PBMCs)를 Ficoll Hypaque 밀도 원심분리에 의해 정제하였다. 세척된 이펙터 세포를 X-Vivo 배지에 접종하였다. CLDN18.2를 내재적으로 발현하고 위에 기원하는 KatoIII 세포들을 이 세팅에서 표적 세포로 사용하였다. 표적 세포는 살아있는 세포에 의해서만 산화되는 루시퍼 옐로우, 루시페라제를 안정적으로 발현하였다. 정제된 항 CLDN18.2 항체 IMAB362를 다양한 농도로 첨가하고 이소형 대조군 항체로는 무관한(irrelevant) 키메라(chim) huIgG1 항체를 이용하였다. IMAB362 유도된 세포독성 후 남아있는 살아있는 세포의 수를 나타내는 값인 루시퍼 옐로우의 산화로부터 결과되는 발광량을 측정함으로써 샘플을 세포용해에 대해 분석하였다. 이리노테칸 (1000 ng/ml), 도세탁셀 (5 ng/ml) 또는 시스플라틴 (2000 ng/ml)에 의해 3일간 전처리된 KatoIII를 미처리된 배지 배양 표적 세포와 비교하고 IMAB362 유도된 ADCC를 정량하였다.

[0363] 이리노테칸, 도세탁셀 또는 시스플라틴으로 3일간 전처리된 KatoIII 세포는 배지 배양된 표적 세포에 비해 살아

있는 세포 수준이 더 낮게 나타났고(도 5a), 이리노테칸, 도세탁셀 또는 시스플라틴으로 전처리된 세포에서의 클라우딘18.2 발현은 배지 배양된 세포에 비해 증가하였다(도 5b).

[0364] 또한, 이리노테칸, 도세탁셀 또는 시스플라틴에 의한 KatoIII 세포의 전처리는 ADCC를 유도하는 IMAB362의 능력을 증강시켰다 (도 5c, d).

[0365] 실시예 3: 화학요법은 IMAB362-유도된 CDC의 효율을 더 높인다

[0366] KATO III 위암 세포를 10 ng/ml 5-FU 및 500 ng/ml 옥살리플라틴 (5-FU + OX)으로 48 시간 전처리함으로써 IMAB362-유도된 CDC에 미치는 화학요법제의 효과를 분석하였다. 화학요법제로 전처리된 KATO III 세포를 이용한 IMAB362-유도된 CDC의 대표적인 투여량 반응 곡선을 도 6에 나타내었다. 48 시간 동안의 종양 세포 전처리에 의해 CDC를 유도하는 IMAB362의 강도가 증가되었고, 미처리 세포에 비해 전처리된 종양세포의 최대 세포 용해가 더 높아지는 결과가 초래되었다.

[0367] 실시예 4: IMAB362-매개된 ADCC를 수행하는 면역 이펙터 세포의 능력은 화학요법 치료에 의해 약화되지 않는다

[0368] EOF 또는 FLO 요법에 사용되는 화학요법제는 표적 세포 증식을 억제하는데 있어서 매우 강력하다. 이펙터 세포에 미치는 화학요법의 부작용을 조사하기 위해, ADCC 분석에 앞서 72시간 동안, 건강한 도너로부터의 PBMCs를 10 ng/ml 에피루비신, 500 ng/ml 옥살리플라틴 및 10 ng/ml 5-FU (EOF) 또는 10 ng/ml 5-FU, 50 ng/ml 폴린산 및 500 ng/ml 옥살리플라틴 (FLO)으로 처리하였다. 도 7a는 4명의 건강한 도너의 EC_{50} 값을 나타내고 도 7b는 EOF 또는 FLO 전처리된 이펙터 세포를 이용하여 IMAB362 유도된 ADCC의 대표적인 투여량/반응 곡선을 나타낸다. NUGC-4 위암종 세포의 IMAB362-유도된 ADCC는 EOF 또는 FLO 화학요법으로 인하여 약화(compromised) 되지 않는다.

[0369] 실시예 5: ZA/IL-2 처리는 말초 혈액 단핵 세포(PBMC) 배양체의 최적으로 확정시킨다

[0370] PBMC 배양체의 증식에 미치는 ZA/IL-2의 효과를 *시험관내* 평가하였다. PBMCs를 건강한 인간 도너로부터 수확하고 배양체를 ZA를 단회 투여하여 처리하였다. IL-2를 매 3-4일마다 첨가하였다. 특히, 3명의 서로 다른 건강한 인간 도너(#1, #2, #3)로부터 유래하는 PBMC를 1 μM ZA 플러스 높거나((300 U/ml) 낮은 (25 U/ml) 투여량의 IL-2과 함께 14일 동안 RPMI 배지 ($1x10^6$ 세포/ml)에서 배양하였다; cf. 도 8a. 동일한 도너의 PBMCs를 14일 동안 300 U/ml IL-2 플러스 ZA 또는 ZA 없이 RPMI 배지에서 부가적으로 배양하였다; cf. 도 8b. 제6, 8, 11 및 14일에 살아있는 세포를 계수함으로써 세포 수의 증가를 탐지하였다.

[0371] 고 투여량의 IL-2가 공급된 배지에서는 저 투여량의 IL-2가 공급된 배양체에 비해 약 2-5배 더 세포가 증식하였다 (도 8a). ZA가 함유되지 않은 배지에서의 세포 증식은 ZA가 들어있는 배지에서 성장된 세포에 비해 대략 2배 더 낮았다(도 8b). 이 데이터들은 세포의 적절한 증식을 보장하기 위해 ZA와 IL-2 화합물 양자를 조합하여 적용할 필요가 있음을 보여준다.

[0372] 실시예 6: ZA/IL-2 처리는 PBMC 배양체 중 Vγ9Vδ2 T-세포의 대량 증식을 결과시킨다

[0373] PBMCs를 300 U/ml IL-2가 보강되고 1 μM ZA를 함유하거나 함유하지 않는 RPMI 배지에서 14일간 배양하였다. CD3+ 림프구 집단 중의 Vγ9+Vδ2+ T 세포의 백분율 (도 9a)과 CD3+Vγ9+Vδ2+ T 세포 집단에서의 CD16+ 세포의 백분율(도 9b)을 제0일과 제14일에 다색 FACS로 측정하였다. 결과를 각 도너에 대해 스캐터 플롯으로 점수화시켰다. 도 9c는 림프구 집단에서 CD3+ Vγ9+Vδ2+ 및 CD3+CD16+ Vγ9+Vδ2+ T 세포의 수의 경시적인 증가(농축: enrichment)를 나타내는 스캐터 플롯이다. 제0일에 접종된 세포의 양과 제14일에 수확된 세포의 양을 고려하였다.

[0374] 림프구의 생존과 성장을 위해 PBMC 배양체 중의 IL-2 첨가가 요구된다. 이들은 300 U/ml IL-2가 보강된 배양체에서 효과적으로 증식한다. Vγ9 및 Vδ2 특이적인 항체를 이용하여 FACS 분석한 결과 ZA/IL-2는 Vγ9Vδ2 T 세포의 축적을 특이적으로 유도하는 것으로 나타났다 (도 9a). 14일 후, CD3+ 림프구 집단은 최대 80%의 Vγ9Vδ2 T 세포를 포함하였다. Vγ9Vδ2 T 세포의 일부는 CD16을 발현하는 반면, CD3+ 림프구 집단 중의 이들 세포의 농축 정도는 도너에 따라 다르지만 10-700배 였다 (도 9b 및 9c). 배양체 중의 CD16+Vγ9+Vδ2+ T 세포는 ZA 없이 성장한 배양체에 비해 10-600배 더 높다 (도 9c). 본 발명자들은 시험관내 PBMCs의 ZA/IL-2 처리가 γδ T 세포의 유의적인 비율로 ADCC-매개 FcγIII 수용체 CD16의 상향 조절을 결과시키는 것으로 결론지었다.

[0375] 실시예 7: IL-2는 투여량-의존 방식으로 Vγ9Vδ2 T 세포의 증식에 영향을 미친다

[0376] 배양체에 대한 ZA의 첨가는 Vγ9Vδ2 T 세포의 발달을 유도하는데 있어서 가장 중요한 인자이다. T 세포의 성장

과 생존에 IL-2가 필요하다는 것은 잘 알려져 있다.

[0377] PBMCs를 1 μM ZA가 보강된 RPMI 배지에서 14일 동안 IL-2 농도를 증가시키면서 배양하였다. IL-2를 제0일과 제4일에 첨가하였다. CD3+ 림프구 집단에서의 CD16+Vγ9+Vδ2+ T 세포의 농축을 제0일과 제14일에 다색 FACS 염색에 의해 탐지하였다. 상이한 도너들을 서로 비교하기 위해, 600 U/ml IL-2와 함께 배양 후 수확된 CD16+Vγ9+Vδ2+ T 세포의 양을 100%로 하였다; cf. 도 10, 좌측. 또한, IL-2의 농도를 증가시키면서 14일간 성장된 분리된 배양체의 ADCC 활성을 검사하였다; cf. 도 10, 우측.

[0378] 본 발명자들은 투여량 반응 곡선에 의해 IL-2가 Vγ9Vδ2 T 세포 서브세트의 성장과 생존 역시도 촉진함을 확인하였다. 배지에 IL-2를 저농도로 첨가함으로써, IL-2 투여량과 CD3+ 림프구 집단에서의 CD16+Vγ9Vδ2 T 세포의 백분율과 IL-2 투여량 간의 상관관계가 발견되었다 (도 10, 좌측). IL-2가 더 높은 농도(150-600U/ml)에서 성장된 세포의 ADCC 활성은 저농도 IL-2에서 성장한 세포에 비해 더 향상되었다 (도 10, 우측).

[0379] 실시예 8: ZA는 단핵구와 암세포에서 IPP 생성을 유도하고 두 가지 모두 Vγ9Vδ2 T 세포의 증식을 촉진한다

[0380] 신선한 PBMCs (Exp. #1) 또는 14일 ZA/IL-2 자극된 Vγ9Vδ2 T 세포 배양체(Exp. #2-5)를 단핵구 없이(이펙터, 단핵구 비율 1:0), 또는 0.2배(4:1) 또는 5배 (비율 1:4) 양의 단핵구 ± 1 μM ZA와 함께 인큐베이션하였다. 14일 후 공-배양체 중의 Vγ9Vδ2 T 세포의 농축을 다색 FACS에 의해 탐지하고 배양체의 증식을 계산하였다. 단핵구와 1:4의 비율로 배양된 Vγ9Vδ2 T 세포의 농축 팩터를 각 실험에 있어서 100%로 설정하였다. 배양체 중 단핵구의 증가는 Vγ9Vδ2 T 세포의 농축을 10배 더 넘게 농축시키는 결과를 가져왔다. 이 효과는 명백히 ZA-의존적인 것이었다; cf. 도 11a.

[0381] 또한, 인간 위암 세포 (NUGC-4-루시페라제) 및 쥐의 위암 세포 (CLS103 - 칼세인 염색됨)를 5 μM ZA 존재 또는 부재 하에 2일간 전처리하였다. 인간 Vγ9Vδ2 T 세포들을 MACS 정제하고 (제14일) 암 세포와 함께 24시간 동안 공-배양하였다. 비처리된 표적 세포와 ZA-처리된 표적 세포에 대한 Vγ9Vδ2 T 세포의 세포독성을, 남아있는 루시페라제 활성 또는 칼세인 형광을 측정함으로써 알아보았다; cf. 도 11b.

[0382] 표적 세포 (NUGC-4 및 CLS103)를 5 μM ZA 존재 또는 부재 하에 2일간 전처리한 다음 이어서 미토마이신 c (50 MI)와 함께 4 시간 인큐베이션시켜 증식을 중단시켰다. MACS 정제된 인간 14일된 휴지기 Vγ9Vδ2 T 세포 및 ^{3}H-티미딘을 표적 세포에 첨가하고 공-배양체들을 37℃에서 48 시간 동안 인큐베이션하였다. MicroBeta 섬광계수기를 이용하여 DNA에서의 ^{3}H 티미딘 병합을 측정함으로써 증식을 탐지하였다. ZA로 처리되지 않은 표적 세포 w/o Vγ9Vδ2 T 세포의 증식을 100%로 설정하였다; cf. 도 11c.

[0383] 도 11b 및 11c에 도시된 바와 같이, ZA-펄스된 인간 암세포들은 세포독성(5-10배)과 증식(1.4-1.8배) 측면에서 Vγ9Vδ2 T 세포를 활성화시킨 반면, 쥐의 암 세포주 CLS103는 Vγ9Vδ2 T 세포에 대해 이러한 효과를 이끌어내지 못하였다.

[0384] 실시예 9: ZA/IL-2 처리는 PBMC 배양체의 조성에 영향을 미친다

[0385] PBMC 배양체 중의 특이적인 세포 종류의 성장과 분화는 시토카인의 존재에 의존한다. 이 성분들은 배지에 첨가되거나 (예컨대 혈청에 존재하는 성장 인자, IL-2) 또는 면역 세포 자체에 의해 분비된다. 어떤 종류의 세포가 발달하는지는 또한 PBMC의 초기 조성과 유전적 소인에 따라 달라진다. 이펙터 세포(NK 세포 및 Vγ9Vδ2 T 세포)에서의 전체적인 증가를 분석하기 위해 10명의 상이한 도너들의 PBMCs를 300 U/ml IL-2의 존재하 그리고 1 μM ZA의 존재 또는 부재 하에 14일간 성장시켰다. 림프구 집단 중의 이펙터 세포의 양을 CD3, CD16, CD56, Vγ9 및 Vδ2 항체를 이용하여 다색 FACS 염색에 의해 동정하였다. CD3-CD56+CD16+ 세포는 NK 세포를 나타내고 CD3+Vγ9+Vδ2+는 Vγ9Vδ2 T 세포를 나타낸다.

[0386] 다색 FACS 분석 결과 IL-2 처리시 주로 NK 세포가 발달하는 반면, ZA/IL-2 처리된 배양체에서는 주로 Vγ9Vδ2 T 세포가 증식하는 것으로 밝혀졌다(도 12).

[0387] 실시예 10: ZA/IL-2 처리는 Vγ9Vδ2+ 이펙터 메모리 T 세포를 생성한다

[0388] T 림프구의 부분모집단(subpopulation)을 2가지 표면 마커, 케모카인 수용체 CCR7 흔한 림프구 항원 CD45RA의 고분자량 이소형을 이용하여 윤곽을 잡을 수 있다. CCR7+ 나이브 및 센트럴-메모리(CM: centra-memory) T 세포는 림프절 내로 반복적으로 순환하여 항원과 조우하는 능력을 갖는 것으로 특징지어진다. 이와 대조적으로 이펙터-메모리(EM: effector-memory) 및 이펙터 T 림프구 RA+ (TEMRA)는 CCR7을 하향조절하고 말초의 비림프 조직(peripheral nonlymphoid tissues) 예컨대 감염 부위나 종양 부위로 이동하는 특징이 있는 것으로 보인다. EM

세포는 또한 분화적인 CD27 및 CD28 발현에 기초하여 더욱 세분될 수도 있다. CD28 및 CD27 표면 발현의 점진적인 상실은 세포의 세포용해능의 상향 조절에 부수적으로 일어난다. 이에 더해, CD57의 수준은 그랜자임(granzymes)과 퍼포린의 발현과 상관성이 있으며 따라서 세포독성/세포 성숙을 나타내는 제3 마커를 대표하는 것이다.

[0389] PBMCs를 300 U/ml IL-2 및 1 μM ZA 존재 또는 부재하에 14일간 배양하였다. 여러가지 상이한 표면 마커들의 발현을 제0일과 제14일에 다색 FACS 분석법으로 탐지하였다. 나이브 세포들은 CD45RA+ CCR7+, 센트럴 메모리 세포(CM)는 CD45RA- CCR7+, TEMRA는 CD45RA+ CCR7-, 그리고 이펙터 메모리 세포 (EM)는 두 가지 마커 모두에 대해 네거티브였다; cf. 도 13a. 또한, Vγ9Vδ2 T-세포의 세포용해 활성을 CD27 및 CD57 마커에 대해 염색함으로써 탐지하였다; cf. 도 13b,c. 이에 더해, ADCC 활성에 중요한 NK 세포-유사 특징들의 발달을, CD3+ 세포를 CD16 (항체 결합) 및 CD56 (부착)으로 염색함으로써 분석하였다; cf. 도 13d.

[0390] Vγ9Vδ2 T 세포의 다색 FACS 분석 결과 ZA/IL-2 처리는 CD27- 및 CD57+인 EM형의 Vγ9Vδ2 T 세포의 발달을 명백히 촉진한 것으로 나타났다 (도 13b-c). 증강된 세포용해 활성에 더해, NK 세포 (CD3-CD16+CD56+)로부터 ADCC에 관여하는 것으로 알려진, CD16 및 CD56의 수준 증가가 CD3+ 집단에서 관찰되었다 (도 13d).

[0391] 이를 함께 취합하면, 이들 데이터는 PBMCs의 ZA 처리가 말초 비림프 조직으로 이동할 수 있고 높은 세포용해 활성의 마커를 나타내는, CD16+Vγ9+Vδ2+ 이펙터 메모리 T 세포의 발달을 야기하는 것으로 추정된다. IMAB362 종양 표적화 항체와의 조합에서 이들 세포들은 종양 세포를 표적화 및 사멸시키도록 이동하는데 극히 유용하게 이용될 수 있다.

[0392] 실시예 11: ZA/IL-2 확장된 Vγ9Vδ2 T 세포는 IMAB362-매개된 CLDN18.2 의존성 ADCC에 대한 강력한 이펙터이다

[0393] NK 세포와 마찬가지로, ZA/IL-2 확장된 Vγ9Vδ2 T 세포는 FcγRIII 수용체인 CD16에 대해 양성이며 (도 9 및 13 참조), 세포-결합된 항체는 이를 경유하여 ADCC를 촉발한다. Vγ9Vδ2 T 세포가 IMAB362와 연계하여 강력한 ADCC를 유도할 수 있는지 평가하기 위하여 일련의 실험을 실시하였다.

[0394] 2명의 서로 다른 도너(#1 및 #2)로부터 유래된 PBMCs를 1 μM ZA의 존재 또는 부재 하에, 300 U/ml IL-2이 보강된 배지에서 배양하였다. 14일 후 세포들을 수확하고 CLDN18.2를 발현하는 NUGC-4 세포에 IMAB362의 농도를 증가시키면서(0.26 ng/ml - 200 μg/ml) 첨가하였다. 루시페라제 분석에서 특이적인 사멸을 탐지하였다; cf. 도 14a. 도 14b,c는 ZA의 존재 또는 부재 하, 300 U/ml IL-2에서 성장한 27명의 도너에 대해 수행된 ADCC 분석을 개괄하는 도면이다. NUGC-4는 표적 세포로서 기능하였다. 각각의 도너에 대해, 투여량-반응 곡선으로부터 계산되는 EC_{50} 값 (b) 및 200 μg/ml IMAB362에서의 최대 특이적 사멸률 (c)을 스캐터 플롯으로 점수화하였다.

[0395] ZA/IL-2와 함께 14일간 배양된 PBMCs를 이용한 CLDN18.2-양성 NUGC-4 세포에 대해 강력한 IMAB362-의존성 ADCC 활성이 관찰되었다 (도 14a). ZA/IL-2-처리된 PBMC 배양체를 이용하면, ADCC는 Vγ9Vδ2 T 세포의 존재에 의존한다 (도 12 및 15). ZA 부재하에 세포들이 배양된 경우, ADCC 활성은 대부분의 도너에서 감소한다. 이들 배양체에서, 잔여 ADCC 활성은 NK-세포 의존적이다 (도 11 및 14). 20명이 넘는 도너들을 테스트한 결과, ADCC 분석에 의해 PBMCs의 ZA/IL-2 처리는 IL-2 단독의 존재 하에 배양된 PBMCs의 경우에 비해 EC_{50} 및 최대 특이적 사멸률을 향상시킨 것으로 나타났다.

[0396] 또한, 2명의 상이한 도너들 (#1 + #2)의 PBMCs를 1 μM ZA 및 300 U/ml IL-2와 함께 배양하였다. 이 이펙터 세포 배양체를, CLDN18.2-양성 (NUGC-4, KATO III) 및 네거티브 (SK-BR-3) 인간 표적 세포주들 (E:T 비율 40:1)과 함께 ADCC 분석에 사용하였다. IMAB362 항체의 양을 증가시키면서(0.26 ng/ml - 200 μg/ml) 첨가하였다. ADCC를 루시페라제 분석으로 측정하였다; cf. 도 15a. (a)에 설명된 것과 동일한 실험을 상이한 시점에서 ZA/IL-2로 처리된 배양체로부터 수확한 이펙터 세포와 NUGC-4 표적 세포에 대해 실시하였다; cf. 도 15b. (a)에 설명된 것과 동일한 실험을 표적 세포로서 NUGC-4를 이용하여 수행하였다; cf. 도 15c. ZA/IL-2 확장된 세포들을 직접 사용하거나, 또는 Vγ9Vδ2 T 세포를, TCRγδ MACS 소팅 (Miltenyi Biotech)을 이용하여 배양체로부터 정제하였다. 림프구 중 97.0%를 초과하는 순도로 Vγ9Vδ2 T 세포가 수득되었다.

[0397] CLDN18.2-양성 대해서는 강력한 ADCC 활성이 나타나지만, CLDN18.2-네거티브 인간 종양 세포주들에 대해서는 그렇지 않은 것으로 관찰되었다 (도 15a). 또한, 이소형 대조군 항체로는 ADCC 활성이 수득되지 않는다 (도시하지 않음). ZA/IL-2 처리 과정 중, ADCC 용해 활성이 도너의 일부에서 경시적으로 증가한다 (도 15b). IMAB362의 투여량/효과 곡선은 상향 그리고 좌측으로 이동하는데 이는 경시적으로 증가된 EC_{50} 값과 최대 용해율을 나타내는

것이다. 컨디셔닝되지 않은 PBMC에 비해, ZA/IL-2 처리에 의해 농축된 Vγ9Vδ2 이펙터 T 세포는 CLDN18.2-양성 표적 세포의 보다 높은 최대 사멸율에 도달할 수 있고 이에 더해 이들은 동일한 사멸률에 대해 보다 낮은 IMAB362를 필요로 한다

[0398] Vγ9Vδ2 T 세포가 용해(lytic) 활성에 대한 레저브와인지 확인하기 위해, 이 세포들을 제14일에 ZA/IL-2-배양된 PBMC 집단으로부터 자성을 이용한 세포 소팅에 의해 > 97% 순도로 분리하였다. IMAB362와 연계적으로 ADCC 활성이 유지되었고 보다 높은 순도로 인해 부분적으로는 향상되었다. 이 데이터는 Vγ9Vδ2 T 세포들이 14일된 PBMC 배지에서 관찰된 ADCC 활성에 주로 책임이 있는 것임을 확인해주는 것이다 (도 15c).

[0399] 실시예 12: ZA/IL-2에 의한 표적 세포주들의 처리는 CLDN18.2의 표면 활성에 영향을 미치지 않는다.

[0400] IMAB362 촉발된 작용 모드는 전적으로 세포외 검출가능한 CLDN18.2의 존재 및 그 양에 의존한다. 따라서 CLDN18.2 표면 밀도에 대한 ZA/IL-2 처리 영향을, 내인성 CLDN18.2를 발현하는 NUGC-4 및 KATO III 세포주들을 이용하여 유세포분석에 의해 분석하였다. 구체적으로, 72시간 동안 ZA/IL-2 또는 ZA/IL-2+EOF 또는 ZA/IL-2+5-FU/OX에 의해 전처리된 불투과성 NUGC-4 위암 세포에 대한 IMAB362 결합의 유세포분석을 수행하였다.

[0401] *시험관내* ZA/IL-2 처리 결과 CLDN18.2 표면 국소화 양에는 아무런 변화가 없는 것으로 나타났다; cf. 도 16.

[0402] 실시예 13: PBMCs의 ZA/IL-2 처리에 의한 IMAB362-매개된 ADCC의 증가는 EOF 전처리에 의해 약화되지 않는다

[0403] 화학요법제는 세포 증식을 약화시킨다. 이와 대조적으로 ZA/IL-2 처리는 Vγ9Vδ2 T 세포의 확장을 촉발한다. 이펙터 세포에 대하나 이들 상반된 상호반응의 영향을 분석하기 위해, 6명의 건강한 도너로부터의 PBMCs를 ADCC 분석에 적용하기에 앞서, 8일 동안 ZA/IL-2 또는 ZA/IL-2+EOF와 함께 배양하였다 (E:T 비율 15:1).미처리 NUGC-4 표적 세포의 50% ADCC 매개형 용해를 결과시키는 IMAB362 농도 (EC_{50})를 구하였다.

[0404] ZA/IL-2에 의한 처리에 기인하는 PBMC의 NUGC-4 세포의 IMAB362 유도된 ADCC의 증가는 EOF에 의한 PBMCs의 조합 처리에 의해 유의적으로 변경되지 않는다 (도 17).

[0405] 실시예 14: 누드 마우스에 있어서 인간 종양 세포 이종이식편에 대한 IMAB362의 항종양 효과 및 CLDN18.2-양성 종양에 대한 IMAB362의 시험관내 표적화

[0406] IMAB362의 *생체내* 종양 세포 표적화를 조사하기 위해 80㎍ Dyelight® 80-표지된 항체를 인간 위암 세포주 NUGC-4가 피하로 이종이식된 누드 마우스에게 정맥내 투여하였다. NUGC-4 세포는 CLDN18.2 과 HER2/neu (트라스투주맙의 표적)의 표면 발현을 나타내었지만, CD20에 대해서는 음성적이었다. NUGC-4 이식된 마우스 그룹에 Dyelight® 680-표지된 트라스투주맙 (양성 대조군) 또는 Dyelight® 680-표지된 리툭시맙 (음성 대조군) 중 어느 하나를 주사함으로써 대조군 연구를 실시하였다. 항체를 정맥 주사한지 24 시간 후 Xenogen® 형광 조영 시스템을 이용하여 마우스를 실시간 조영함으로써 입증된 바와 같이, IMAB362는 마우스 이종이식편에마 집중적이고도 배타적으로 축적된다 (도 18). IMAB362는 심지어 120 시간 후에도 표적-양성 종양에서 효과적으로 유지되고 필적할만한 강도로 검출가능하다 (도 18). 트라스투주맙 또한 주사 24시간 후 이종이식편에서만 독점배타적으로 검출된다. 트라스투주맙 시그널은 주사 후 120 시간 이내에 급속히 사라진다. 리툭시맙 시그널은 탐지되지 않는다.

[0407] 뿐만 아니라, IMAB362를 이용하여 CLDN18.2-양성 이종이식편 종양을 산생하는 누드 마우스를 처리하였다. 초기 치료 모델 연구(종양 세포 접종 3일 경과 후 IMAB362 투여)를 실시하였다. 또한, 종양이 약 60-120 mm^3의 크기에 도달했을 때, 종양 접종 후 9일까지, 진행된 종양 처리 실험을 개시하였다.

[0408] 누드 마우스에 $1x10^7$ HEK293~CLDN18.2 트랜스펙턴트를 피하 접종하였다. 종양 접종 3일 후부터 한 그룹 당 10마리의 마우스에 대해 치료를 시작하였다. 마우스를 200 ㎍ IMAB362, 이소형 대조군으로서 인플릭시맙 및 PBS로 6주일간 주 2회 처리하되 정맥 투여와 복강내 투여 경로를 교대로 하였다. PBS 또는 이소형 대조군으로 처리된 그룹 내 모든 마우스들이 70-80일 이내에 죽은 반면, IMAB362로 처리된 동물들은 생존에 유리하였다 (도 19). 죽음에 이르는 시간이 연장되었을 뿐 아니라, 10마리 중 4마리의 마우스는 210일간의 관찰 전체 기간 동안 생존하였다.

[0409] 평균 종양 크기가 88 mm^3 (62 - 126 mm^3)에 도달하였을 때 그룹 당 9 내지 10 마리의 마우스의 치료를 개시하였다. 모든 그룹에서 종양 크기를 비교가능하게 하기 위해 치료에 앞서 마우스들을 몇몇 테스트 그룹으로 계측화

하였다. 마우스들을 200 ㎍ IMAB362, 이소형 대조군 또는 PBS로 6주일 동안 1주에 2회 정맥내 및 복강내 투여 경로로 교대로 처리하였다. PBS 또는 이소형 대조군으로 처리된 그룹 내의 모든 마우스들은 50-100일 이내에 죽었다. IMAB362로 처리된 동물들은 평균 생존 기간의 거의 2배 길게 생존하였다 (47일 대 25일). 이들 마우스들 중 3마리는 관찰 기간 내내 생존하였다 (도 20). 생체내 항종양 효과가 종양 세포 상의 표적의 존재에 의존한다는 것은 중요한 사항이다. CLDN18.2-음성 HEK293 종양 세포가 이식된 마우스에서는 IMAB362 처리의 어떠한 항종양 효과도 관찰되지 않았다.

[0410] CLDN18.2가 내재적으로 발현되는 암 세포에 대한 IMAB362의 효능을 조사하기 위해 NUGC-4 위 종양 모델을 이용하였다. NUGC-4 세포는 누드 마우스에서 공격적으로 성장한다.

[0411] $1x10^7$ NUGC-4 위암 세포를 무흉선 누드 마우스의 좌측 옆구리에 피하 주사하였다 (IMAB362 그룹의 경우 n = 9; 대조군의 경우 n = 8). 종양을 정맥내 주사한지 6일부터 시작하여 IMAB362 (주사 당 200 ㎍) 및 대조군을 정맥내 및 복강내로 1주일에 2회 교대로 투여하였다. 종양 크기를 1주일에 2회 모니터링하였다. 도 21a에 도시된 데이터는 SEM 평균이다. IMAB362로 처리된 마우스의 종양 성장은 대조군으로 처리된 마우스에 비해 유의적으로 저해되었다 (* $p<0.05$). 도 21b는 종양 접종 후 제21일의 종양 크기를 나타낸다. IMAB362 처리된 마우스의 종양 크기는 대조군 마우스의 종양보다 유의적으로 현저히 더 작았다 (* $p<0.05$).

[0412] $1x10^7$ 종양 세포가 마우스에 접종된 경우, 미처리 마우스의 메디안 생존 기간은 25일 이하이다. 종양의 평균 크기가 약 109 mm^3 (63 - 135 mm^3)에 도달하였을 때 IMAB362, 세툭시맙, 트라스투주맙 또는 이소형 및 완충액 대조군에 의한 처리를 개시하였다. 크기-의존적으로 마우스들을 처리군으로 계층화하였다 (도 21). IMAB362는 종양 성장률을 유의적으로 감소시킨 것으로 나타났다. 이 공격적으로 성장하는 종양 모델에서는 식염수 또는 항체 대조군에 비교되는 바와 같이 종양 크기의 유의적인 감소가 관찰되지 않았다. 종양 성장의 지연은 IMAB362 처리된 마우스의 비유의적으로 증가된 메디안 생존 시간과 연관이 있었다 (31일 대 25일).

[0413] IMAB362의 항종양 활성을 IMAB362 표적 CLDN18.2 에 의해 렌티바이러스 형질유도된 NCI-N87 또는 NUGC-4 세포 (NCI-N87~CLDN18.2 및 NUGC-4~CLDN18.2)를 이용하여 2명의 인간 위암종 이종이식편 모델에 대해 시험하였다.

[0414] NCI-N87~CLDN18.2 이종이식편 종양을 처리군 당 8마리의 누드 마우스(암컷, 6주령)의 옆구리에 $1x10^7$ NCI-N87~CLDN18.2 세포를 피하 주사함으로써 접종하였다. 800 ㎍ IMAB362 또는 식염수 대조군의 경우 200 ㎕ 0.9% NaCl을 정맥 주사함으로써 종양 접종 5일부터 처리를 개시하였다. 정맥 투여를 전체 관찰기간 동안 매주 계속하였다. 종양의 크기와 동물의 건강을 일주일에 두번(semi-weekly) 실시하였다. 도 22a는 종양 성장에 미치는 IMAB362 처리 효과를 나타낸다. 피하 종양의 크기를 일주일에 2회 측정하였다(평균 + SEM, ***$p<0.001$). 도 22b는 카플란-마이어(Kaplan-Meier) 생존 플롯을 나타낸 것이다. 종양 크기가 1400 mm^3에 도달하였을 때 마우스들을 희생시켰다.

[0415] 따라서, 지속적인 IMAB362 처리는 NCI-N87~CLDN18.2 위암종 이종이식편의 고도로 유의적인 ($p<0.001$) 종양 성장을 억제하였다 (도 22a). 종양 성장의 지연은 IMAB362 처리된 마우스의 유의적으로 ($p<0.05$) 더 긴 생존 시간과 연관이 있었다 (도 22b).

[0417] 급속히 성장하는 NUGC-4~CLDN18.2 이종이식편의 IMAB362 면역요법에 의해 처리 14일째 종양의 크기는 유의적으로 ($p<0.05$) 더 작아졌다. 최초 2주일간의 IMAB362 처리 후 NUGC-4~CLDN18.2 의 종양진행은 매우 공격적이었다. 그러나, 처리 14일에 이르러서는 NUGC-4~CLDN18.2 종양 성장 억제가 일어나 IMAB362 처리된 마우스의 생존 기간을 유의적으로 ($p < 0.05$) 더 연장시켰다.

[0418] 정리하면, IMAB362는 위암종 이종이식편을 치료하는데 있어서 매우 효과적이었으며 내인성 CLDN18.2-양성 종양 모델에 있어서 종양의 진행을 둔화시키고 생존기간을 연장시키는데 유의적인 것으로 나타났다. 매우 공격적인 종양 모델계에 있어서 IMAB362의 이러한 항종양 효과는 대단히 두드러진 것이라 할 수는 없지만 그럼에도 불구하고 유의적인 것이며 IMAB362의 강력한 항종양 효능을 나타내는 것이다.

[0420] 실시예 15: 마우스 종양 모델에 있어서 화학요법과 조합된 IMAB362의 항종양 효과

[0421] *시험관내*에서, IMAB362-매개된 ADCC는 EOF 및 5-FU + OX를 비롯한 화학요법제와의 조합으로 전처리된 인간 위암

세포에서 보다 효과적이다. 따라서, IMAB362와 이들 화합물과의 조합에 의한 항종양 효과를 마우스 종양 모델에서 생체내 연구하였다.

[0422] 각 처리군 당 9마리씩의 마우스의 옆구리에 $1x10^7$ NCI-N87~CLDN18.2 세포들을 피하주사함으로써 NCI-N87~CLDN18.2 이종이식편 종양을 접종하였다. 종양 산생 마우스들을 종양 접종 후 제 4, 11, 18 및 25일에 EOF 요법과 조합적으로 1.25 mg/kg 에피루비신, 3.25 mg/kg 옥살리플라틴 및 56.25 mg/kg 5-플루오로우라실을 복강 투여함으로써 처리한 다음, 화학요법 투여 24시간 후에 800 μg IMAB362를 정맥 주사하였다. IMAB362 처리를 매주 계속하였다. 종양 크기와 동물의 건강을 일주일에 두번 모니터링하였다. 도 23a는 종양 성장에 미치는 조합 치료의 효과를 나타낸다. 피하투여된 종양의 크기를 일주일에 2회 측정하였다 (mean + SEM; * $p<0.05$). 도 23b는 카플란-마이어 생존 플롯을 나타낸다. 종양 크기가 1400 mm^3에 도달했을 때 마우스들을 희생시켰다.

[0423] IMAB362 또는 EOF 요법으로 처리된 NCI-N87~CLDN18.2 종양 산생 누드 마우스들은 대조군 마우스들에 비해 고도로 유의적으로 종양 성장이 억제된 것으로 나타났다. EOF 화학요법과 조합된 부가적인 IMAB362 처리는 EOF 요법 단독에 의한 처리에 비해 유의적으로 ($p<0.05$) 더 높은 종양 성장 억제를 결과시켰다 (도 23a). 식염수 대조군의 마우스의 메디안 생존 기간은 59일이었다. IMAB362를 매주 투여받은 마우스들은 메디안 생존 기간이 76일까지 유의적으로 연장되었는데 이것은, EOF 군에서도 메디안 생존 기간이 76일이었던 것과 유사한 결과이다. 그러나, IMAB362와 EOF를 조합 처리한 경우에는 메디안 생존 기간이 81일로 증가하였다 (도 23b).

[0424] 처리군 당 10마리의 누드 마우스(암컷, 6주령)의 옆구리에 $1x10^7$ NUGC-4~CLDN18.2 세포를 피하주사함으로써 이종이식편 종양을 접종하였다. 마우스들을 화학요법제로 제 3, 10, 17 및 24일에 처리하였다. IMAB362 처리를 매주 계속하였다. 도 24a는 피하 투여된 NUGC-4~CLDN18.2 이종이식편의 종양 성장 곡선을 나타낸다 (평균 + SEM). 도 24b는 카플란-마이어 생존 플롯을 나타낸다 (Log-rank (Mantel-Cox) Test, **$p<0.01$).

[0425] 피하 투여된 NUGC-4~CLDN18.2 이종이식편 종양들은 매우 공격적으로 성장한다. 그럼에도 불구하고, 종양 산생 누드 마우스의 IMAB362 처리는 식염수 대조군에 비해 종양 성장을 유의적으로 억제시켰다. EOF와의 조합치료에서, NUGC-4~CLDN18.2 종양 성장에 미치는 IMAB362 효과는 EOF 처리에 기인하는 종양 억제에 의해 가려져서 EOF 단독 처리에 비해 이렇다할 종양 성장 억제 증가는 나타내지 않았다 (도 24a). 그러나, IMAB362 및 EOF 요법으로 처리된 마우스들의 평균 생존 기간은 EOF 단독으로 처리된 마우스의 생존 기간과 비교할 때 유의적으로 ($p<0.01$) 연장되었다 (도 24b).

[0426] 실시예 16: ZA/IL-2 확장된 Vγ9Vδ2 T 세포는 생체내에서 진행성 종양의 IMAB362-매개된 조절을 향상시킨다

[0427] 마우스 시스템에서 IMAB362 및 ZA/IL-2 생성 γδ T 세포의 조합 활성을 조사하기 위해, 본 발명자들은 NSG 마우스들을 이용하였다. NSG 마우스는 성숙한 T 세포, B 세포, 천연 킬러 (NK) 세포, 다중 시토카인 시그널링 경로를 결여하므로, 이들은 선천성 면역에 있어 많은 결손을 안고 있는 반면, 일차 및 이차 면역학적 조직에서의 니치(niches)로 인해 인간 면역 세포에 의한 집락화를 허용한다.

[0428] NSG 마우스들에게 1 $x10^7$ CLDN18.2-형질감염된 HEK293 세포를 피하 접종하였다. 같은 날, ZA-보강된 배지에서 14일간 배양된, Vγ9Vδ2 T 세포가 농축된 $8x10^6$ 인간 PBMCs를 이들 마우스에게 투여하였다. 또한, 마우스들에게 50μg/kg ZA 및 5000 U IL-2 (Proleukin)도 주사하였다. 인간 T 세포의 기능을 유지하기 위해, IL-2를 일주일에 두번, 그리고 ZA를 매주 투여하였다. HEK293~CLDN18.2 종양이 육안으로 보일 정도로 커지면, 200 μg IMAB362의 일주 이회 처리를 개시하였다. 설명된 바와 같이 처리된 9 마리 마우스에 더해, 2그룹의 마우스 대조군을 수립하였다. 한 그룹에게는 인간 γδ T 세포를 투여하지 않았고, 다른 한 그룹은 IMAB362 대신 이소형 대조군 항체로 처리하였다. 인간 γδ T 세포 및 ZA의 존재 하에 IMAB362로 처리된 마우스에 있어서의 CLDN18.2-양성 종양의 과성장은 유의적으로 억제되어 거의 사라진 반면, 이소형 대조군 항체로 처리되거나 인간 T 세포 이펙터를 결여한 마우스들의 경우에는, 종양이 공격적으로 성장하여 마우스들을 조기에 희생시켜야만 하였다 (도 25).

[0429] 실시예 17: 마우스 종양모델에 있어서 화학요법과 조합된 IMAB362의 항종양 효과

[0430] 쥐의 cldn18.2의 렌티바이러스 형질도입과 함께 CLS-103 세포를 이용하여 면역경쟁적 이계교배된 NMRI 마우스(CLS-103~cldn18.2)들에 있어서 피하 위암종 동종이식편에서, 화학요법과 조합된 IMAB362의 항종양 활성을 시험하였다.

[0431] 각 처리군 당 10마리의 NMRI 마우스의 옆구리에 $1x10^6$ CLS-103~cldn18.2 세포를 피하 주사함으로써 CLS-103~cldn18.2 동종이식편 종양을 접종하였다. 종양 산생 마우스들을 종양 접종 후 제3, 10, 17 및 24일에 1.25 mg/kg 에피루비신, 3.25 mg/kg 옥살리플라틴 및 56.25 mg/kg 5-플루오로우라실 (EOF)로 처리한 후, 각 화학요법제를 투여한지 24시간 후에 800 μg IMAB362를 정맥 주사하였다. 3000 IE 를 일주일에 두번 피하 주사함으로써 IL-2를 투여하였다. 화학요법 종료 후에도, 관찰 기간 전체에 걸쳐 IMAB362 및 IL-2 처리를 계속하였다. 종양 크기 및 동물의 건강을 일주일에 두번 모니터링하였다. 종양 크기가 1400 mm^3 에 도달하거나 종양이 궤양성 (ulcerous)이 되면 마우스들을 희생시켰다.

[0432] 도 26에 도시된 바와 같이, IMAB362 또는 EOF 단독으로 처리된 CLS-103~cldn18.2 종양 산생 NMRI 마우스들은 식염수 대조군에 비해 유의적인 종양 성장 억제를 보이지 않았다. 이와 대조적으로, EOF 화학요법과 IMAB362 처리의 조합은 종양 성장을 유의적으로 더 크게 억제하였고 종양 산생 마우스의 생존 기간도 유의적으로 연장시켰다. 이러한 관찰 결과는 EOF 화학요법과 IMAB362 면역요법의 조합에 의해 부가적이거나 또는 심지어 상승적인 치료 효과가 나타남을 가리키는 것이다. IL-2 처리는 종양 성장에 아무 효과도 나타내지 않았다.

Applicant's or agent's file reference 342-75 | International application No.

INDICATIONS RELATING TO DEPOSITED MICROORGANISM OR OTHER BIOLOGICAL MATERIAL

(PCT Rule 13*bis*)

A. The indications made below relate to the deposited microorganism or other biological material referred to in the description on page 40, line 1.

B. IDENTIFICATION OF DEPOSIT — Further deposits are identified on an additional sheet [X]

Name of depositary institution
DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH

Address of depositary institution (*including postal code and country*)
Mascheroder Weg 1b
38124 Braunschweig
DE

Date of deposit	Accession Number
October 19, 2005	DSM ACC2737

C. ADDITIONAL INDICATIONS (*leave blank if not applicable*) — This information is continued on an additional sheet [ ]

- Mouse (Mus musculus) myeloma P3X63Ag8U.1 fused with mouse (Mus musculus) splenocytes
- Hybridoma secreting antibody against human claudin-18A2

D. DESIGNATED STATES FOR WHICH INDICATIONS ARE MADE (*if the indications are not for all designated States*)

E. SEPARATE FURNISHING OF INDICATIONS (*leave blank if not applicable*)

The indications listed below will be submitted to the International Bureau later (*specify the general nature of the indications e.g., "Accession Number of Deposit"*)

For receiving Office use only	For International Bureau use only
[ ] This sheet was received with the international application	[ ] This sheet was received by the International Bureau on:
Authorized officer	Authorized officer

Form PCT/RO/134 (July1998; reprint January 2004)

[0434]

[0435] 신규 국제특허출원

[0436] 가니메드 파마슈티컬스 아게, 외

[0437] "암 치료를 위한 클라우딘 18.2에 대한 항체와 연관된 조합 치료"

[0438] 당소 정리번호: 342-75 PCT

[0440] **생물학적 물질에 대한 부가 시트**

[0441] **추가 기탁 표시:**

[0443] 1) 기탁물질 (DSM ACC2738, DSM ACC2739, DSM ACC2740, DSM ACC2741, DSM ACC2742, DSM ACC2743, DSM ACC-2745, DSM ACC2746, DSM ACC2747, DSM ACC2748)의 기탁기관의 명칭 및 주소는 다음과 같다:

[0444] 데에스엠제트-도이체 잠룽 폰 미크로오르가니즈멘 운트 젤쿨투렌 게엠베하(DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH)

[0445] 독일 38124 브라운쉬바이그 마쉐로더 베그 1베

[0446] 2) 기탁물질 (DSM ACC2808, DSM ACC2809, DSM ACC2810)에 대한 기탁기관의 명칭 및 주소는 다음과 같다:

[0447] 데에스엠제트-도이체 잠룽 폰 미크로오르가니즈멘 운트 젤쿨투렌 게엠베하(DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH)

[0448] 독일 38124 브라운쉬바이그 인호펜슈트라쎄 7베

[0449]

기탁일	수탁번호	해당 미생물에 관한 설명이 나타나 있는 페이지를 다음에 나타내었다
2005 년 10 월 19 일	DSM ACC2738	40 페이지, 2 행
2005 년 10 월 19 일	DSM ACC2739	40 페이지, 3 행
2005 년 10 월 19 일	DSM ACC2740	40 페이지, 4 행
2005 년 10 월 19 일	DSM ACC2741	40 페이지, 5 행
2005 년 10 월 19 일	DSM ACC2742	40 페이지, 6 행
2005 년 10 월 19 일	DSM ACC2743	40 페이지, 7 행
2005 년 11 월 17 일	DSM ACC2745	40 페이지, 8 행
2005 년 11 월 17 일	DSM ACC2746	40 페이지, 9 행
2005 년 11 월 17 일	DSM ACC2747	40 페이지, 10 행
2005 년 11 월 17 일	DSM ACC2748	40 페이지, 11 행
2006 년 10 월 26 일	DSM ACC2808	40 페이지, 12 행
2006 년 10 월 26 일	DSM ACC2809	40 페이지, 13 행
2006 년 10 월 26 일	DSM ACC2810	40 페이지, 14 행

[0450] **상기 기탁 미생물 전체에 해당하는 추가 설명:**

[0452] - 마우스(Mus musculus) 비장세포와 융합된 마우스 (Mus musculus) 골수종 P3X63Ag8U.1

[0453] - 인간 클라우딘-18A2에 항체를 분비하는 하이브리도마

[0454] 3) **기탁자:**

[0455] 전술한 모든 기탁은 다음 기탁자에 의해 이루어졌다:

[0456] 가니메드 파마슈티컬스 아게

[0457] 독일 55131 마인츠 프라일리그라트슈트라쎄 12

[0458] DE

수탁번호

[0459]

기탁기관명 : Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH

수탁번호 : DSMACC2737

수탁일자 : 20051019

기탁기관명 : Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH

수탁번호 : DSMACC2738

수탁일자 : 20051019

기탁기관명 : Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH

수탁번호 : DSMACC2739

수탁일자 : 20051019

기탁기관명 : Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH

수탁번호 : DSMACC2740

수탁일자 : 20051019

기탁기관명 : Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH

수탁번호 : DSMACC2741

수탁일자 : 20051019

기탁기관명 : Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH

수탁번호 : DSMACC2742

수탁일자 : 20051019

기탁기관명 : Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH

수탁번호 : DSMACC2743

수탁일자 : 20051019

기탁기관명 : Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH

수탁번호 : DSMACC2745

수탁일자 : 20051117

기탁기관명 : Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH

수탁번호 : DSMACC2746

수탁일자 : 20051117

기탁기관명 : Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH

수탁번호 : DSMACC2747

수탁일자 : 20051117

기탁기관명 : Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH

수탁번호 : DSMACC2748

수탁일자 : 20051117

기탁기관명 : Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH

수탁번호 : DSMACC2808

수탁일자 : 20061026

기탁기관명 : Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH

수탁번호 : DSMACC2809

수탁일자 : 20061026

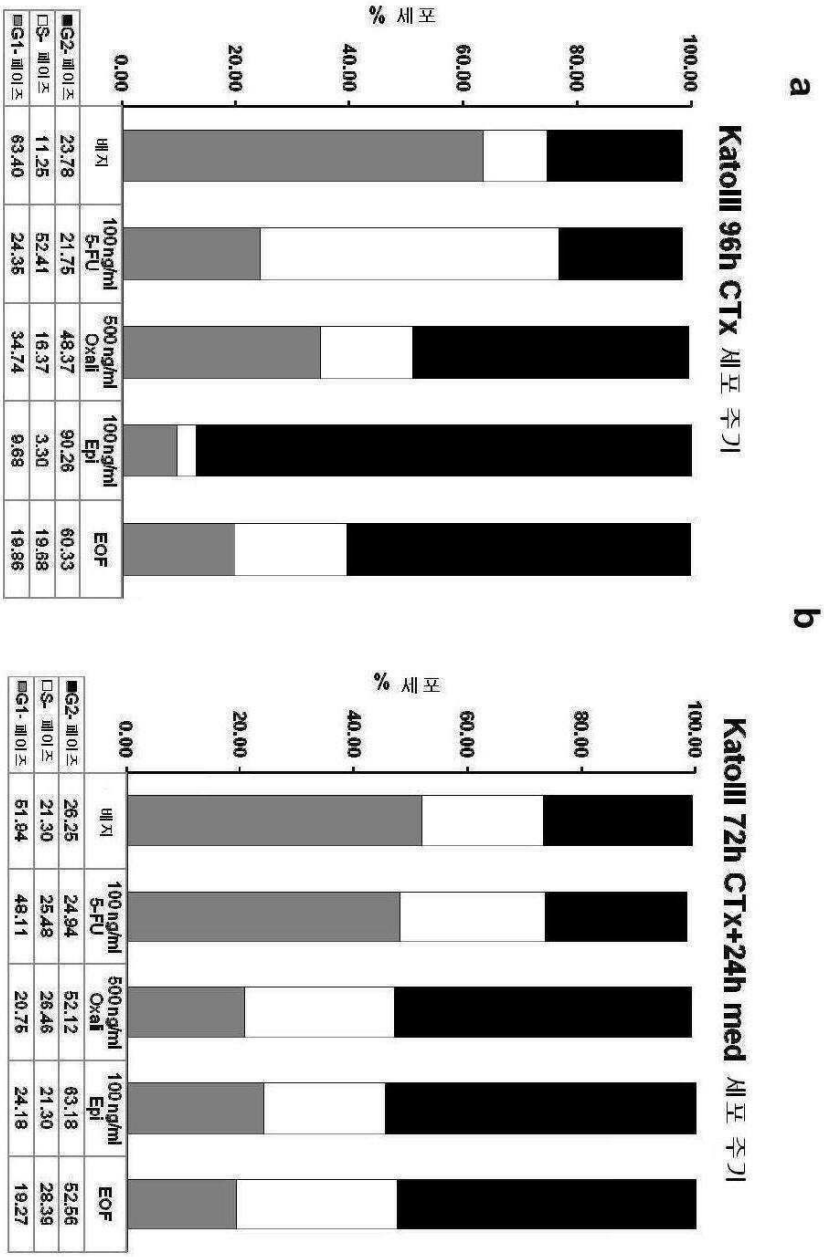
기탁기관명 : Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH

수탁번호 : DSMACC2810

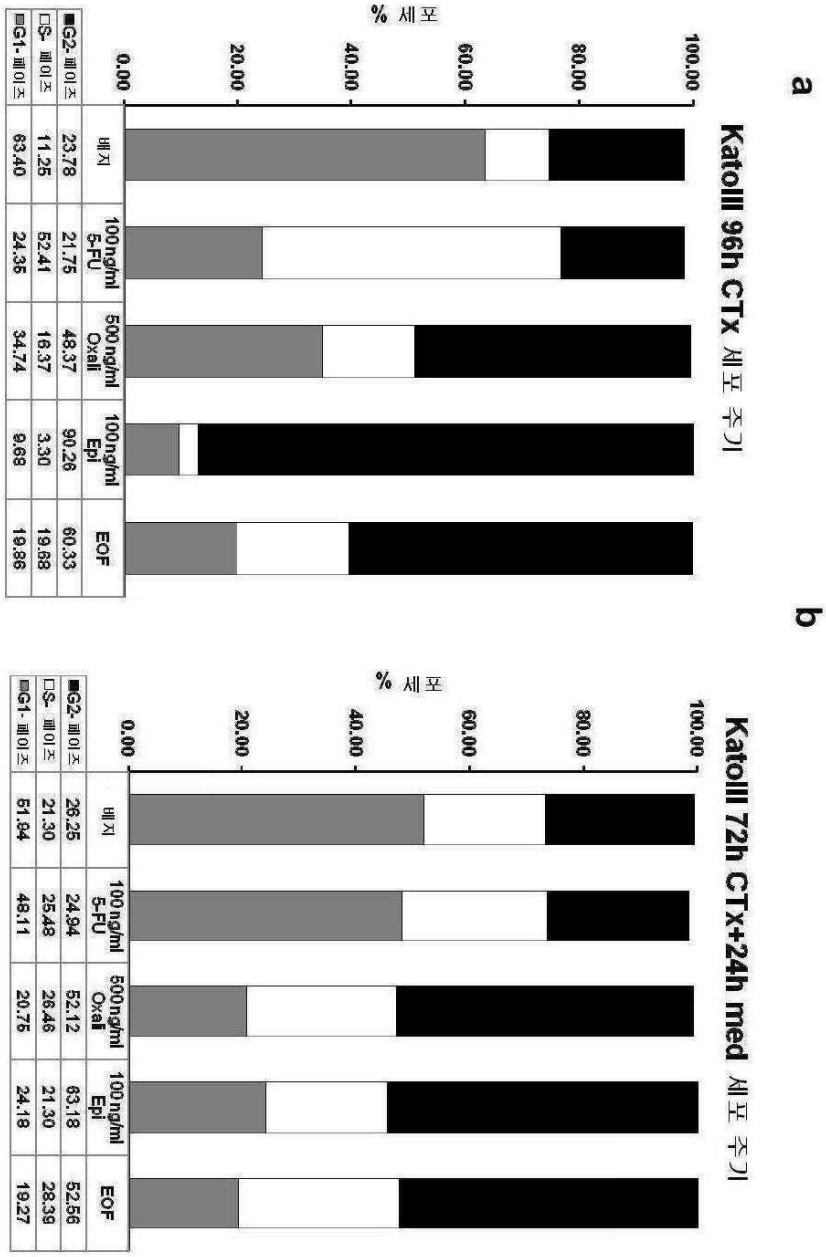
수탁일자 : 20061026

도면

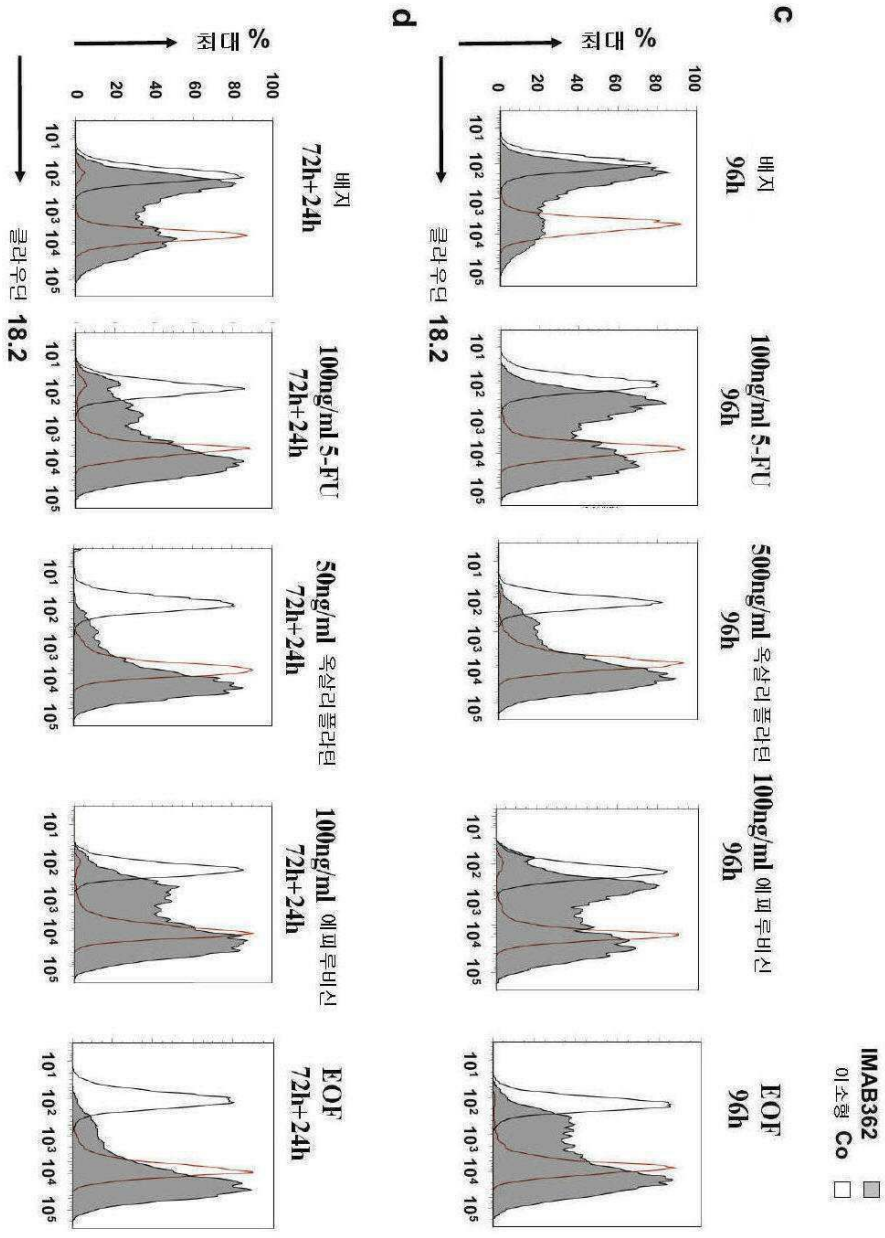
도면1a


a
KatoIII 96h CTx 세포 주기
% 세포
0.00
20.00
40.00
60.00
80.00
100.00
배지
100ng/ml 5-FU
500ng/ml Oxali
100ng/ml Epi
EOF
G2-페이즈 23.78 21.75 48.37 90.26 60.33
S-페이즈 11.25 52.41 16.37 3.30 19.68
G1-페이즈 63.40 24.35 34.74 9.68 19.86
b
KatoIII 72h CTx+24h med 세포 주기
% 세포
0.00
20.00
40.00
60.00
80.00
100.00
배지
100ng/ml 5-FU
500ng/ml Oxali
100ng/ml Epi
EOF
G2-페이즈 26.25 24.94 52.12 63.18 52.56
S-페이즈 21.30 25.48 26.46 21.30 28.39
G1-페이즈 51.94 48.11 20.75 24.18 19.27

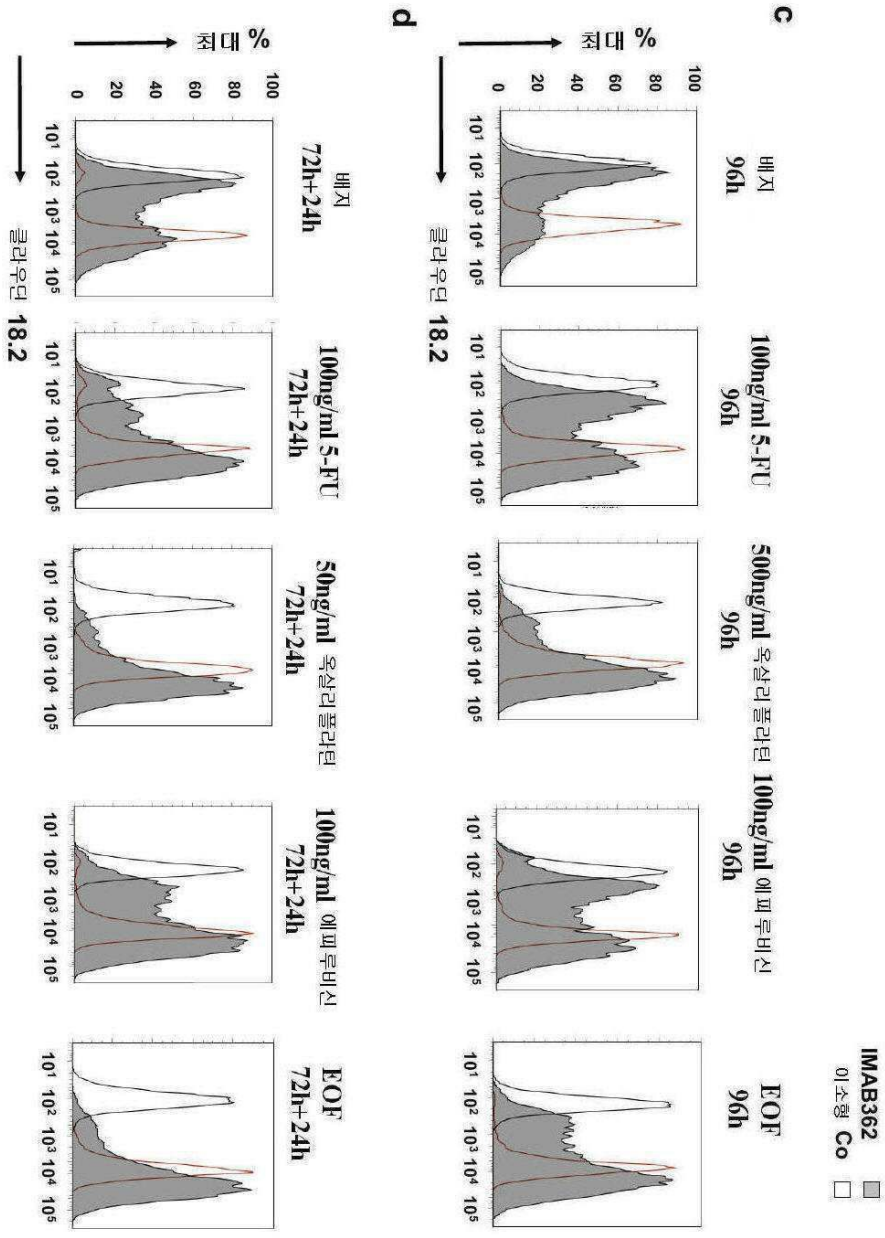
도면1b


a
KatoIII 96h CTx 세포 주기
% 세포
0.00
20.00
40.00
60.00
80.00
100.00
베지
100 ng/ml 5-FU
500 ng/ml Oxali
100 ng/ml Epi
EOF
■G2- 페이즈
□S- 페이즈
■G1- 페이즈
23.78
11.25
63.40
21.75
52.41
24.35
48.37
16.37
34.74
90.26
3.30
9.68
60.33
19.68
19.86
b
KatoIII 72h CTx+24h med 세포 주기
% 세포
0.00
20.00
40.00
60.00
80.00
100.00
베지
100 ng/ml 5-FU
500 ng/ml Oxali
100 ng/ml Epi
EOF
■G2- 페이즈
□S- 페이즈
■G1- 페이즈
26.25
21.30
51.94
24.94
25.48
48.11
52.12
26.46
20.76
63.18
21.30
24.18
52.56
28.39
19.27

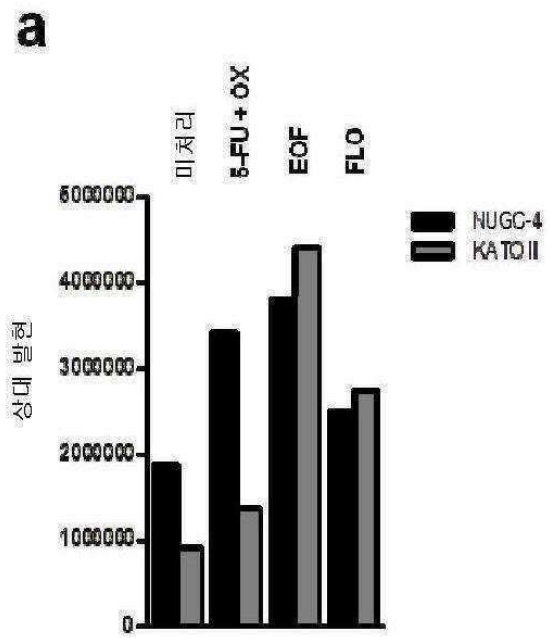
도면1c


c
d
IMAB362
이소형 Co
EOF
96h
100ng/ml 옥살리플라틴
96h
500ng/ml 옥살리플라틴
96h
100ng/ml 에피루비신
96h
EOF
72h+24h
100ng/ml 에피루비신
72h+24h
50ng/ml 옥살리플라틴
72h+24h
100ng/ml 5-FU
72h+24h
베지
72h+24h
베지
96h
100ng/ml 5-FU
96h
최대 %
클라우딘
18.2

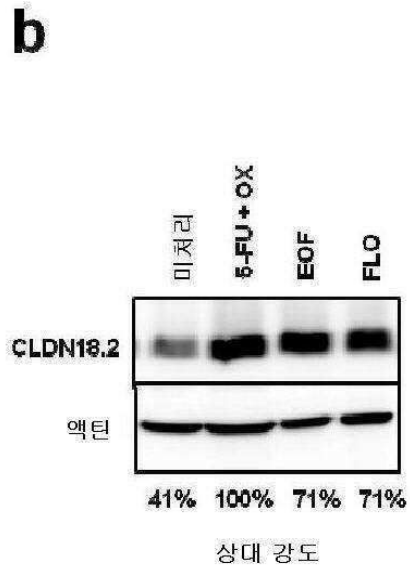
도면1d


c
d
IMAB362
이소형 Co
EOF
96h
500ng/ml 옥살리플라틴
100ng/ml 에피루비신
100ng/ml 5-FU
베지
72h+24h
50ng/ml
% 최대
클라우딘
18.2

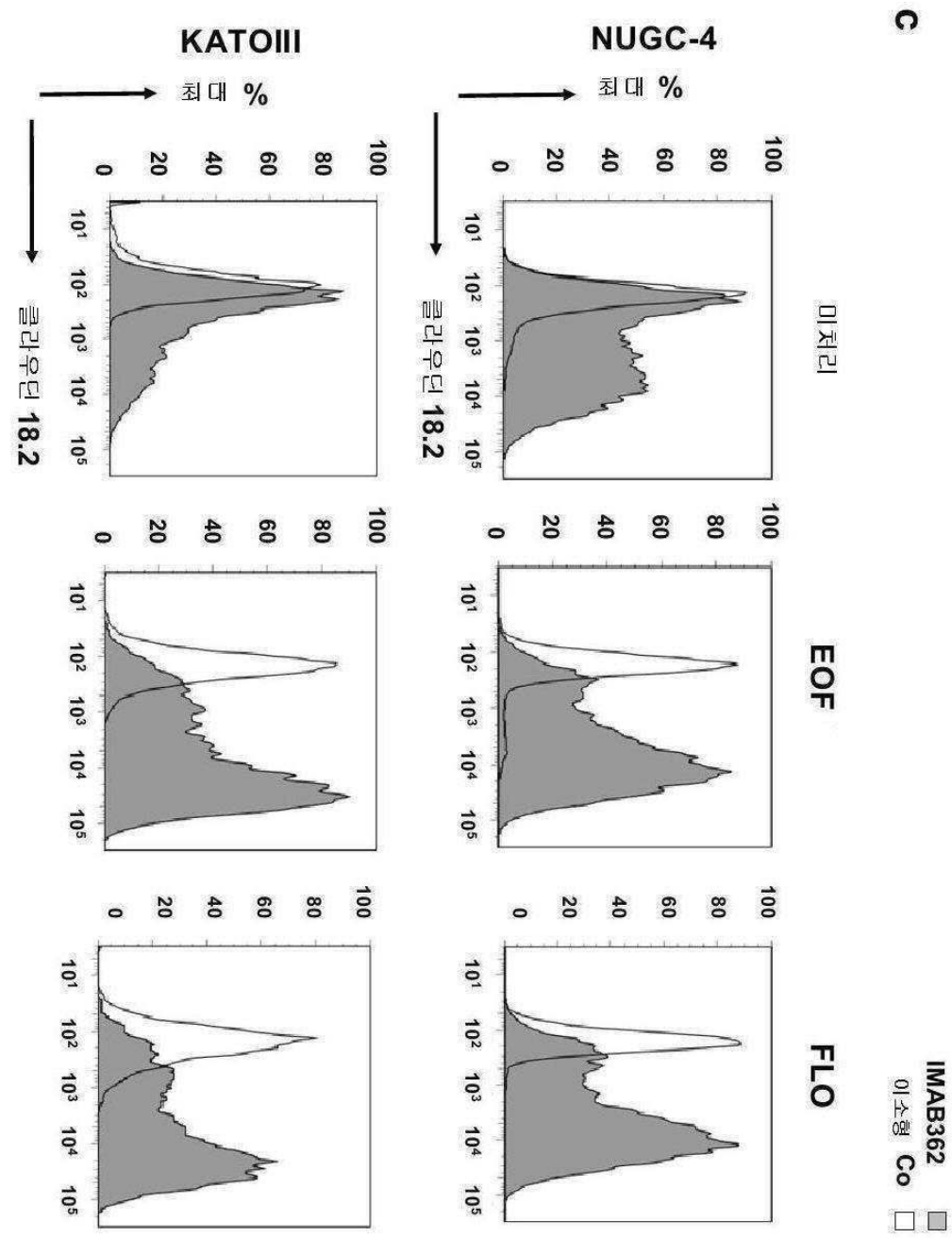
도면2a


a
미처리
5-FU + OX
EOF
FLO
NUGC-4
KATO II
상대 발현
6000000
4000000
3000000
2000000
1000000
0

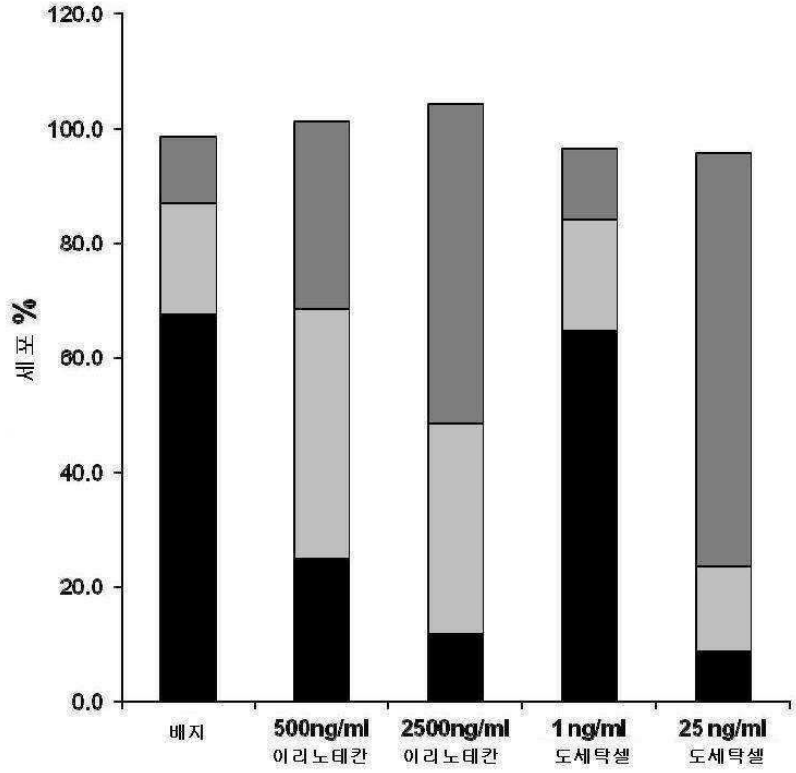
도면2b


b
미처리
5-FU + OX
EOF
FLO
CLDN18.2
액틴
41%
100%
71%
71%
상대 강도

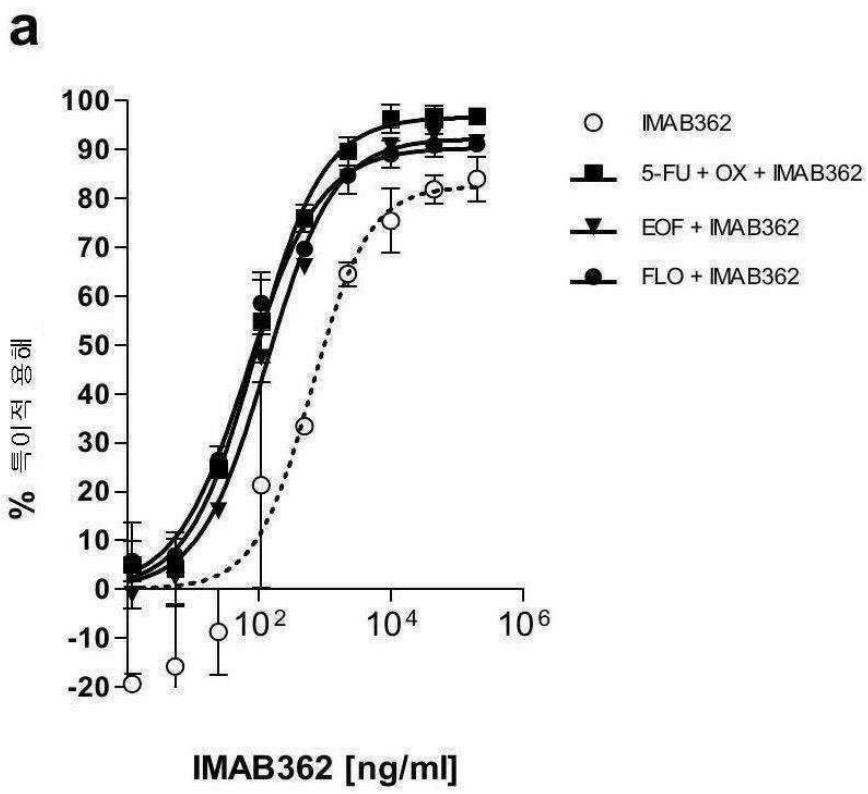
도면2c



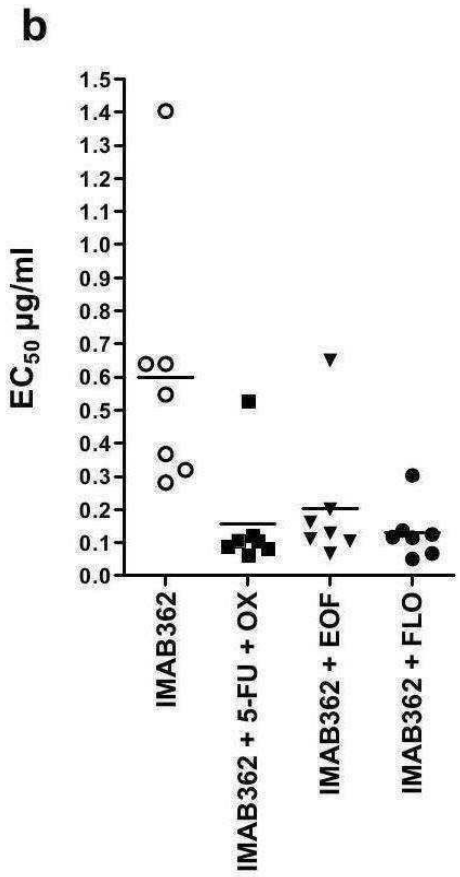
도면3


120.0
100.0
80.0
60.0
40.0
20.0
0.0
세포 %
베지
500ng/ml
이리노테칸
2500ng/ml
이리노테칸
1 ng/ml
도세탁셀
25 ng/ml
도세탁셀

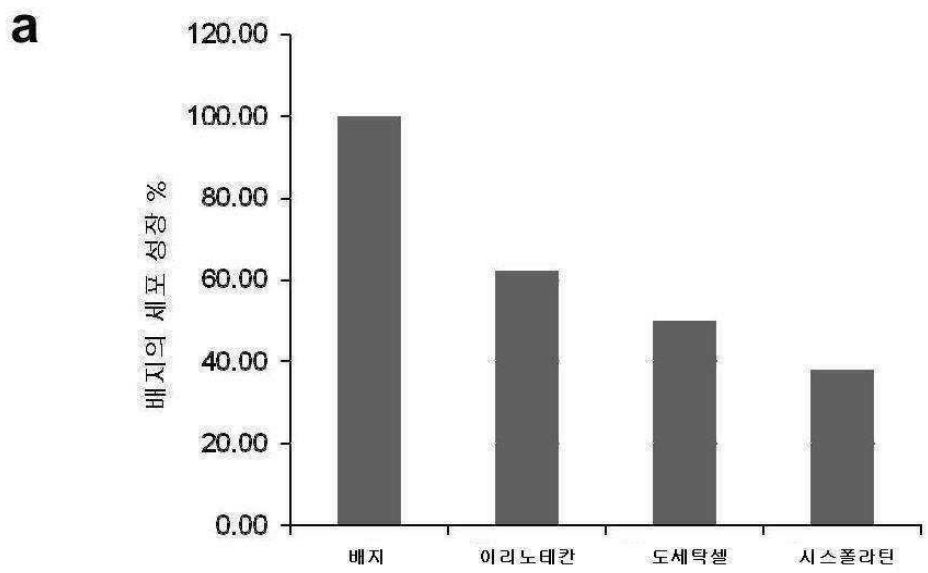
도면4a


a
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
-10
-20
% 특이적 용해
10^2
10^4
10^6
IMAB362 [ng/ml]
IMAB362
5-FU + OX + IMAB362
EOF + IMAB362
FLO + IMAB362

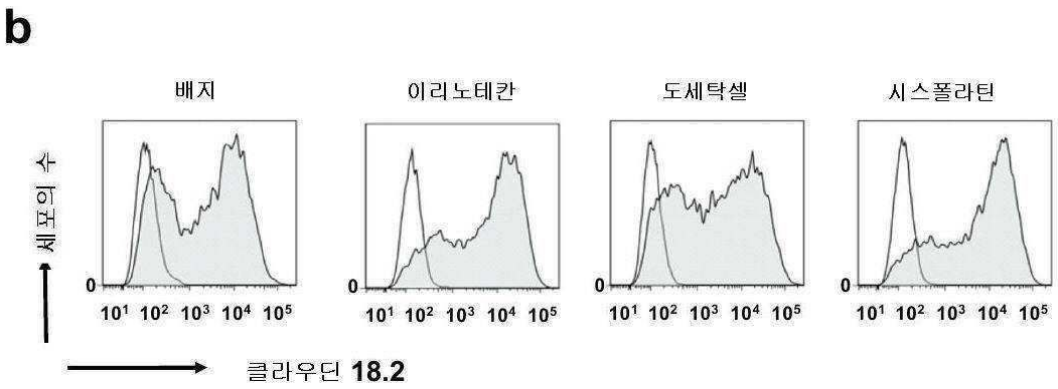
도면4b


b
EC50 µg/ml
1.5
1.4
1.3
1.2
1.1
1.0
0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
IMAB362
IMAB362 + 5-FU + OX
IMAB362 + EOF
IMAB362 + FLO

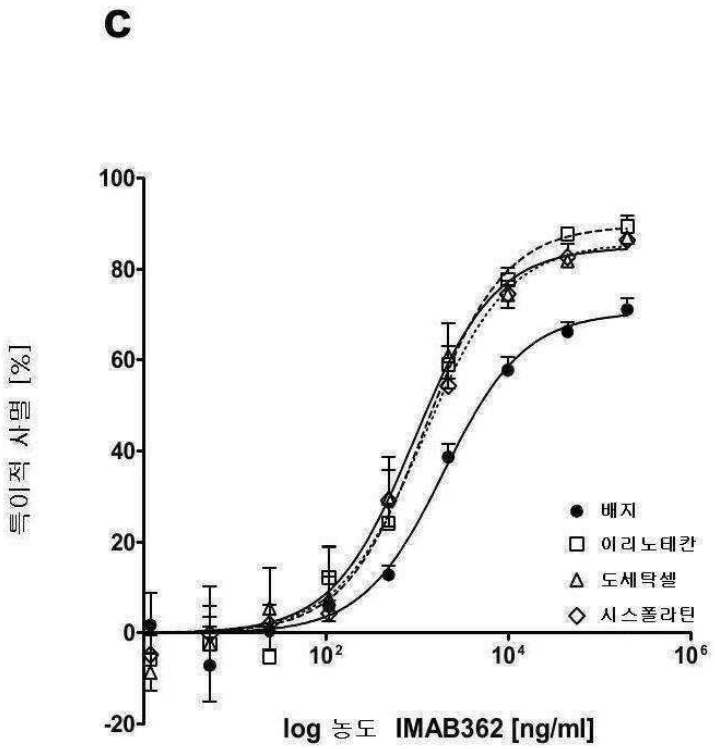
도면5a


a
배지의 세포 성장 %
120.00
100.00
80.00
60.00
40.00
20.00
0.00
배지
이리노테칸
도세탁셀
시스폴라틴

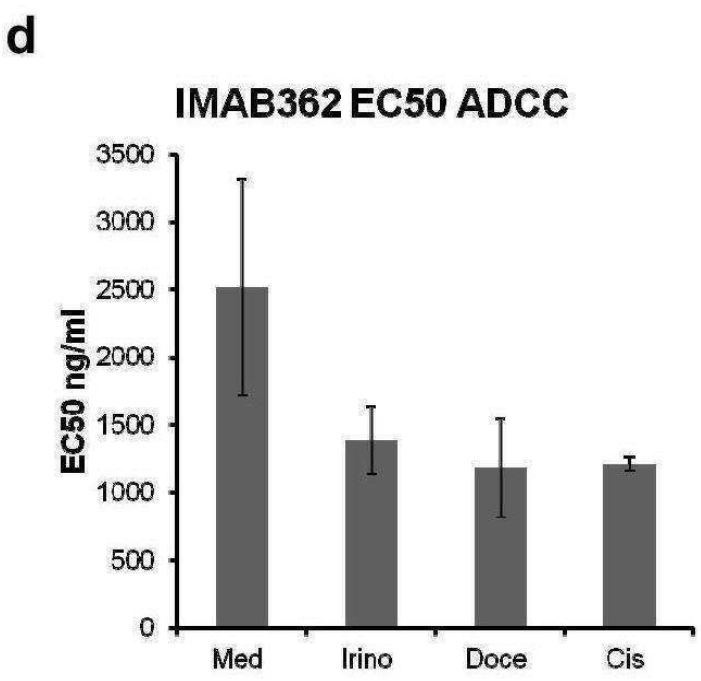
도면5b


b
배지
이리노테칸
도세탁셀
시스폴라틴
세포의 수
0
10^1 10^2 10^3 10^4 10^5
클라우딘 18.2

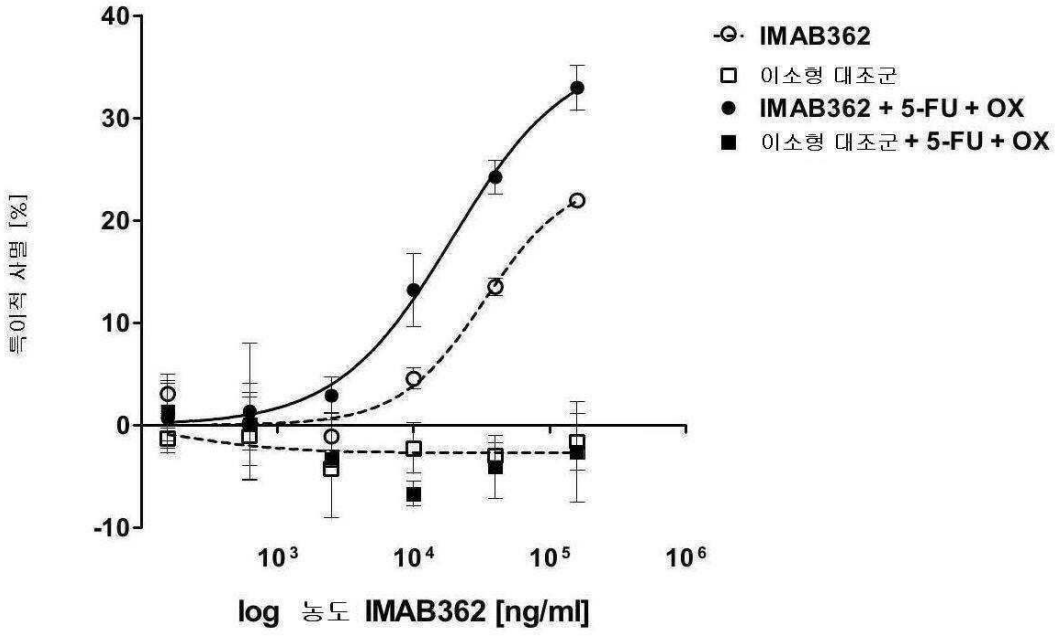
도면5c


c
특이적 사멸 [%]
100
80
60
40
20
0
-20
10^2
10^4
10^6
배지
이리노테칸
도세탁셀
시스폴라틴
log 농도 IMAB362 [ng/ml]

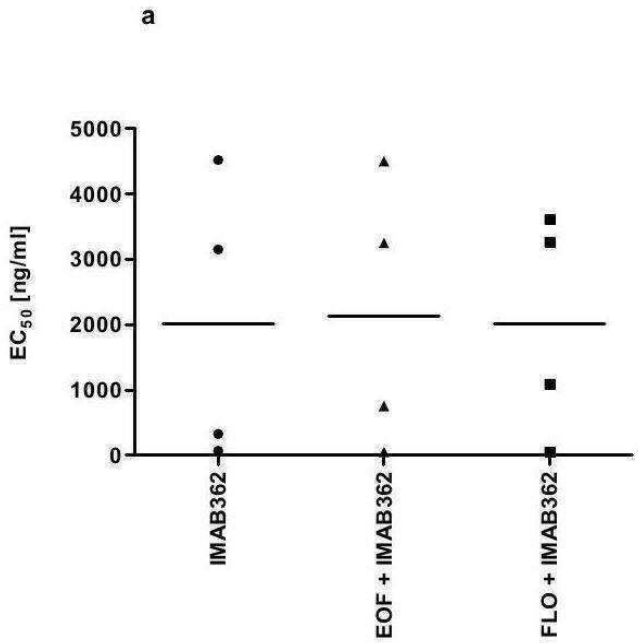
도면5d


d
IMAB362 EC50 ADCC
EC50 ng/ml
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
Med
Irino
Doce
Cis

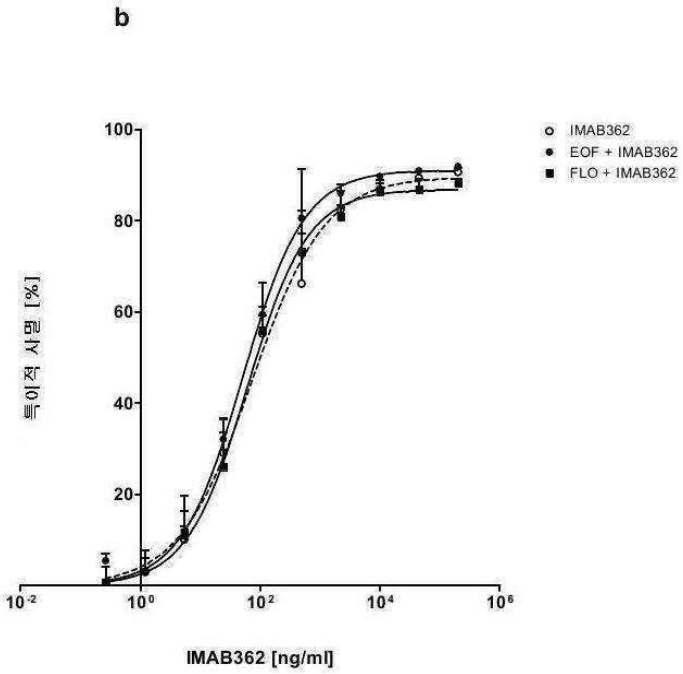
도면6


특이적 사멸 [%]
40
30
20
10
0
-10
10³
10⁴
10⁵
10⁶
log 농도 IMAB362 [ng/ml]
IMAB362
이소형 대조군
IMAB362 + 5-FU + OX
이소형 대조군 + 5-FU + OX

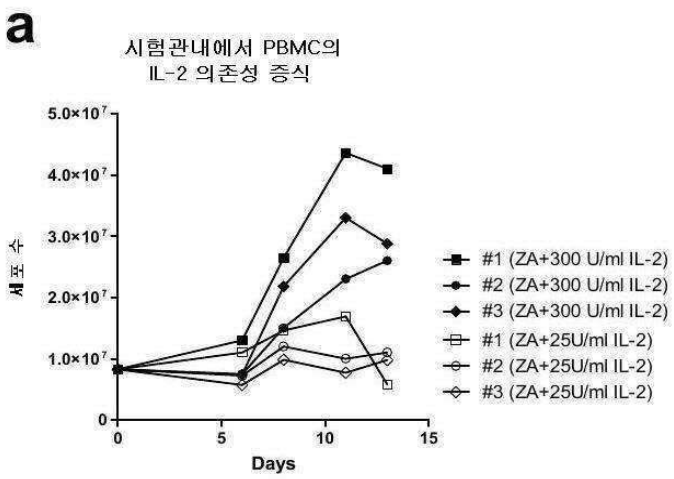
도면7a


a
5000
4000
3000
2000
1000
0
EC50 [ng/ml]
IMAB362
EOF + IMAB362
FLO + IMAB362

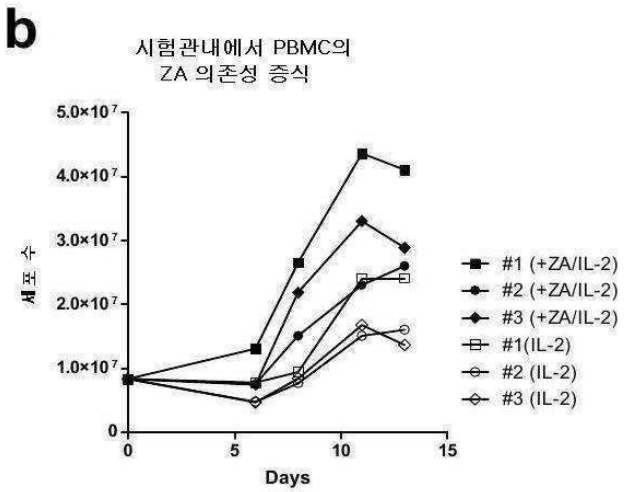
도면7b


b
100
80
60
40
20
특이적 사멸 [%]
10-2
100
102
104
106
IMAB362 [ng/ml]
IMAB362
EOF + IMAB362
FLO + IMAB362

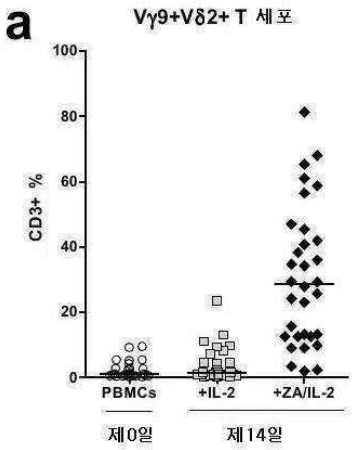
도면8a



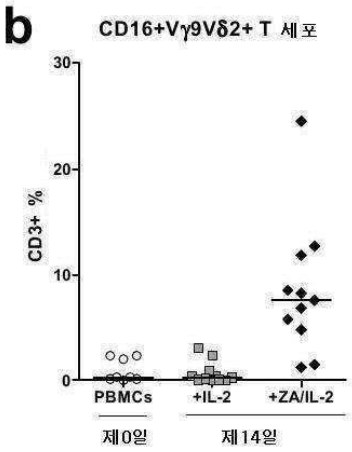
도면8b



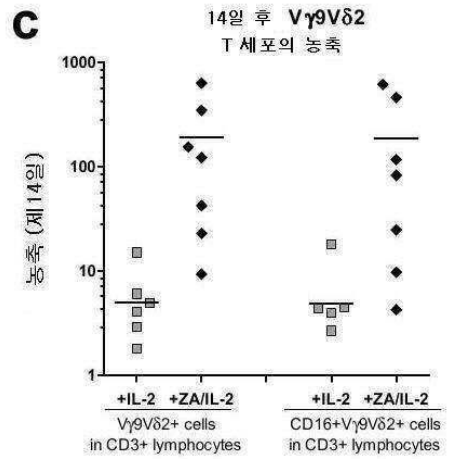
도면9a



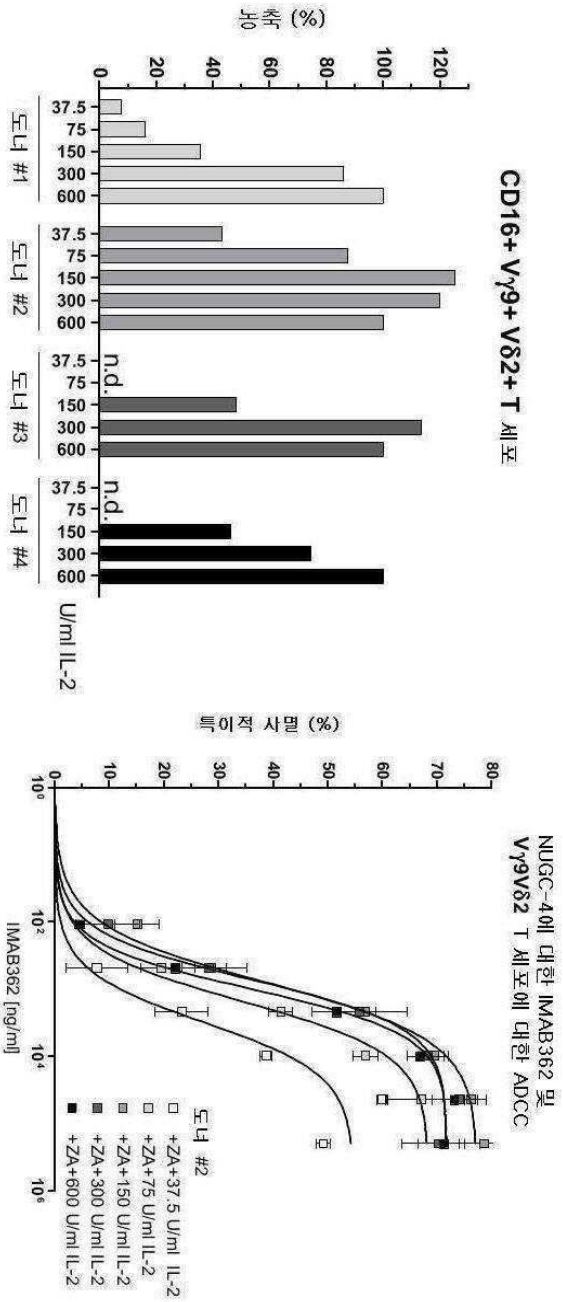
도면9b


b
CD16+Vγ9Vδ2+ T 세포
CD3+ %
30
20
10
0
PBMCs
+IL-2
+ZA/IL-2
제0일
제14일

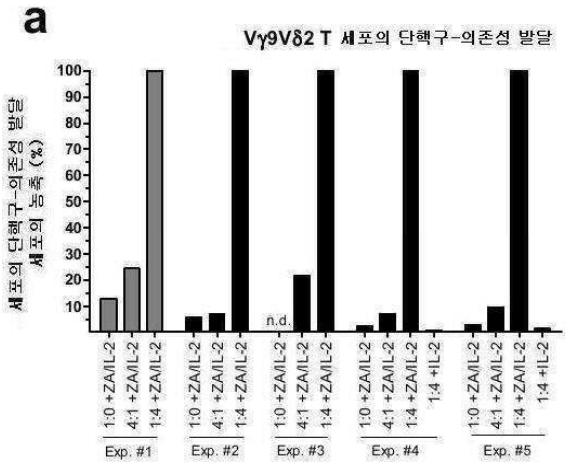
도면9c


c
14일 후 Vγ9Vδ2
T 세포의 농축
농축 (제14일)
1000
100
10
1
+IL-2
+ZA/IL-2
Vγ9Vδ2+ cells
in CD3+ lymphocytes
+IL-2
+ZA/IL-2
CD16+Vγ9Vδ2+ cells
in CD3+ lymphocytes

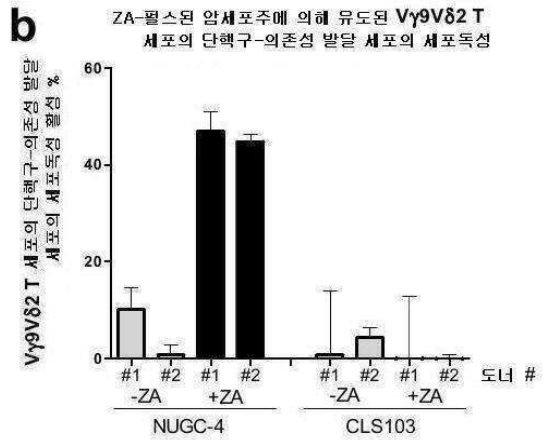
도면10


CD16+ Vγ9+ Vδ2+ T 세포
녹아 (%)
0
20
40
60
80
100
120
도너 #1
37.5
75
150
300
600
도너 #2
37.5
75
150
300
600
도너 #3
37.5
n.d.
75
150
300
600
도너 #4
37.5
n.d.
75
150
300
600
U/ml IL-2
NUGC-4에 대한 IMAB362 및
Vγ9Vδ2 T 세포에 대한 ADCC
특이적 사멸 (%)
0
10
20
30
40
50
60
70
80
IMAB362 [ng/ml]
10⁰
10²
10⁴
10⁶
도너 #2
+ZA+37.5 U/ml IL-2
+ZA+75 U/ml IL-2
+ZA+150 U/ml IL-2
+ZA+300 U/ml IL-2
+ZA+600 U/ml IL-2

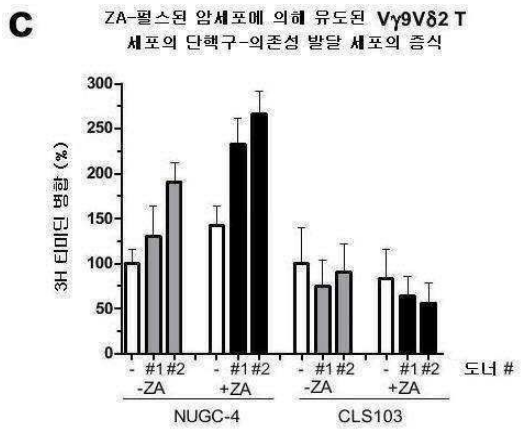
도면11a



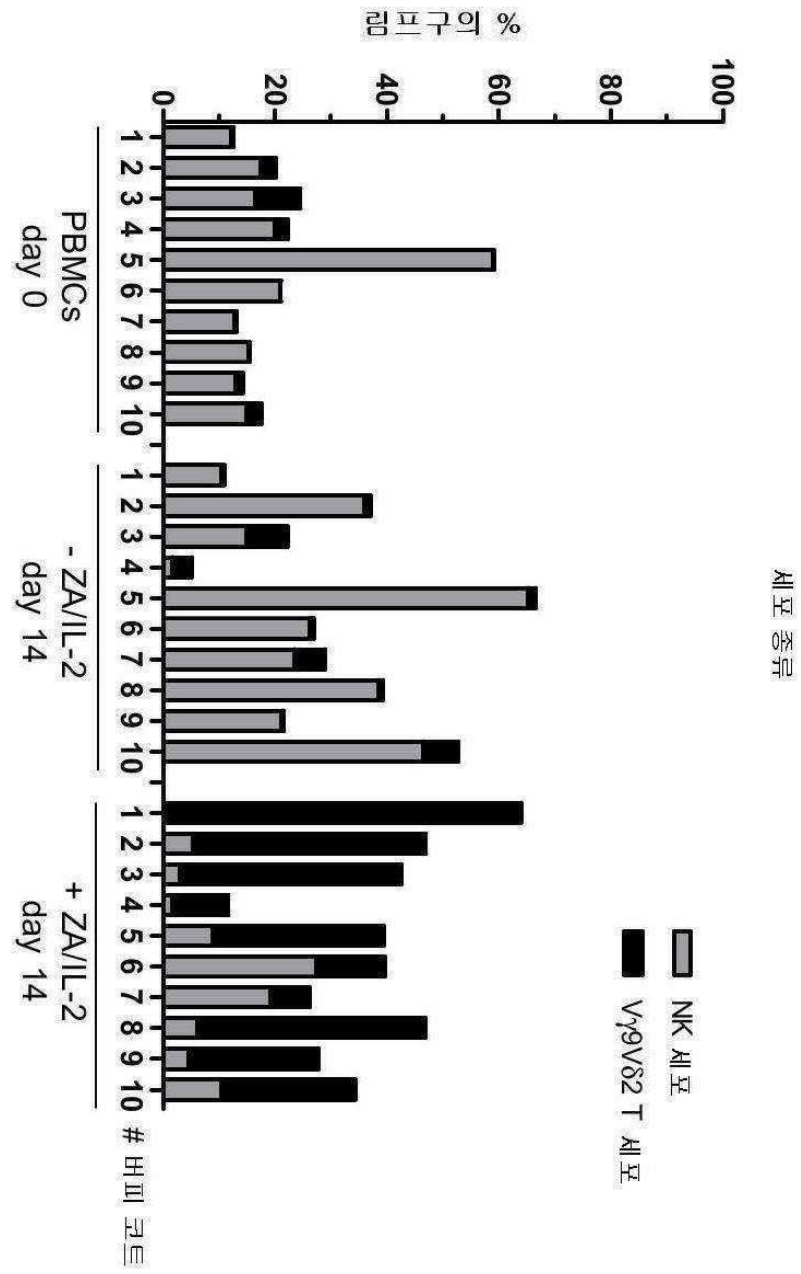
도면11b



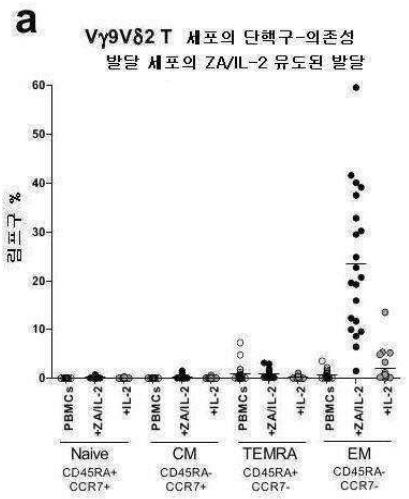
도면11c



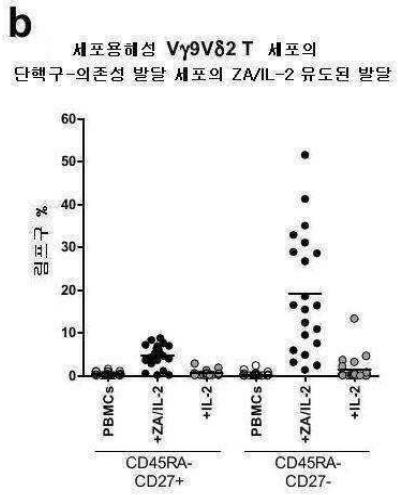
도면12


림프구의 %
0
20
40
60
80
100
PBMCs
day 0
- ZA/IL-2
day 14
+ ZA/IL-2
day 14
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
버피 코트
세포 종류
NK 세포
Vγ9Vδ2 T 세포

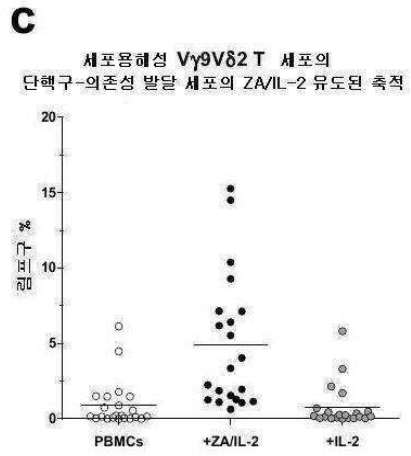
도면13a



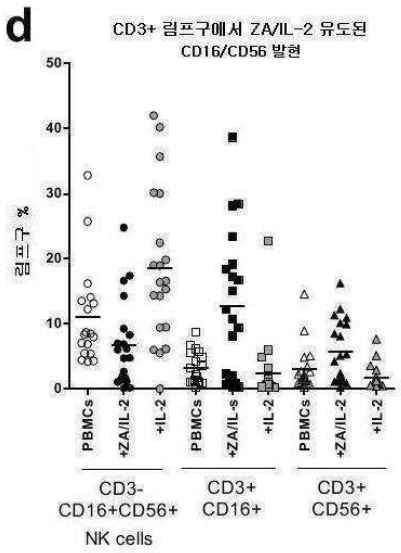
도면13b



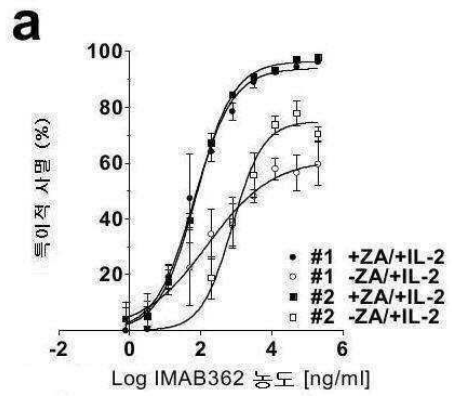
도면13c



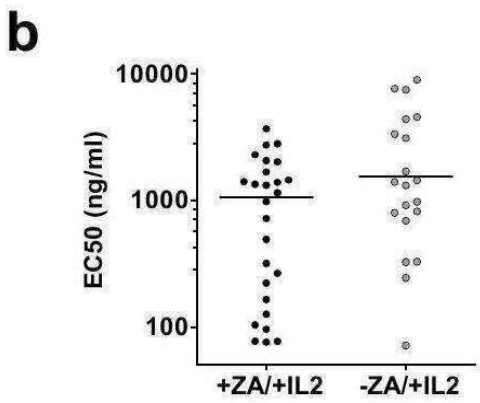
도면13d



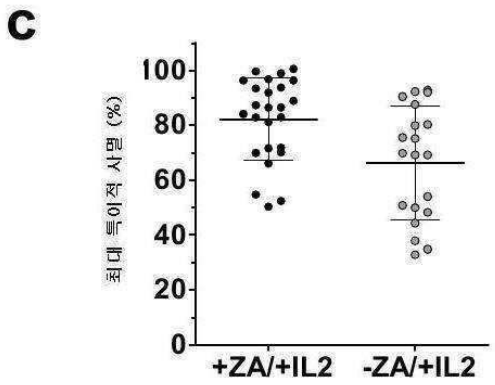
도면14a



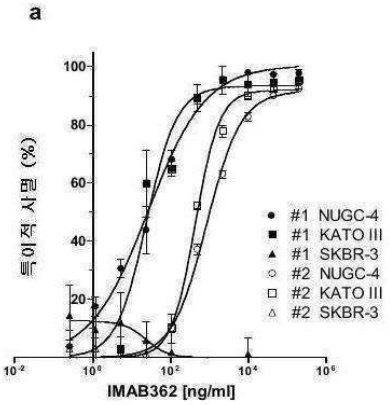
도면14b



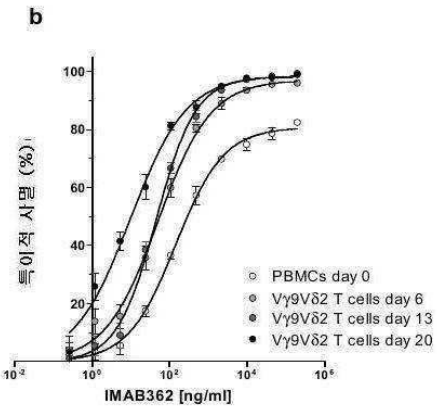
도면14c



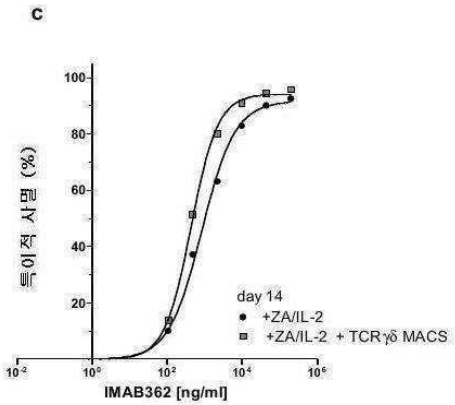
도면15a



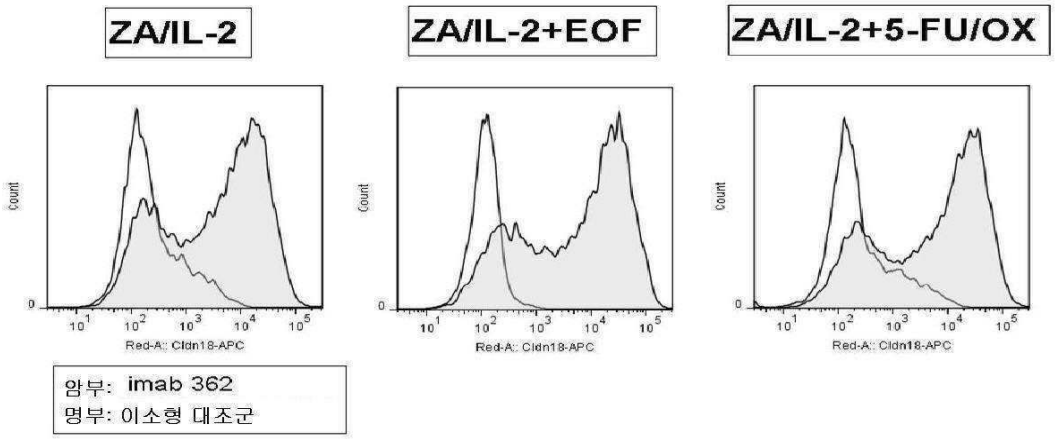
도면15b



도면15c


c
특이적 사멸 (%)
day 14
+ZA/IL-2
+ZA/IL-2 + TCRγδ MACS
IMAB362 [ng/ml]

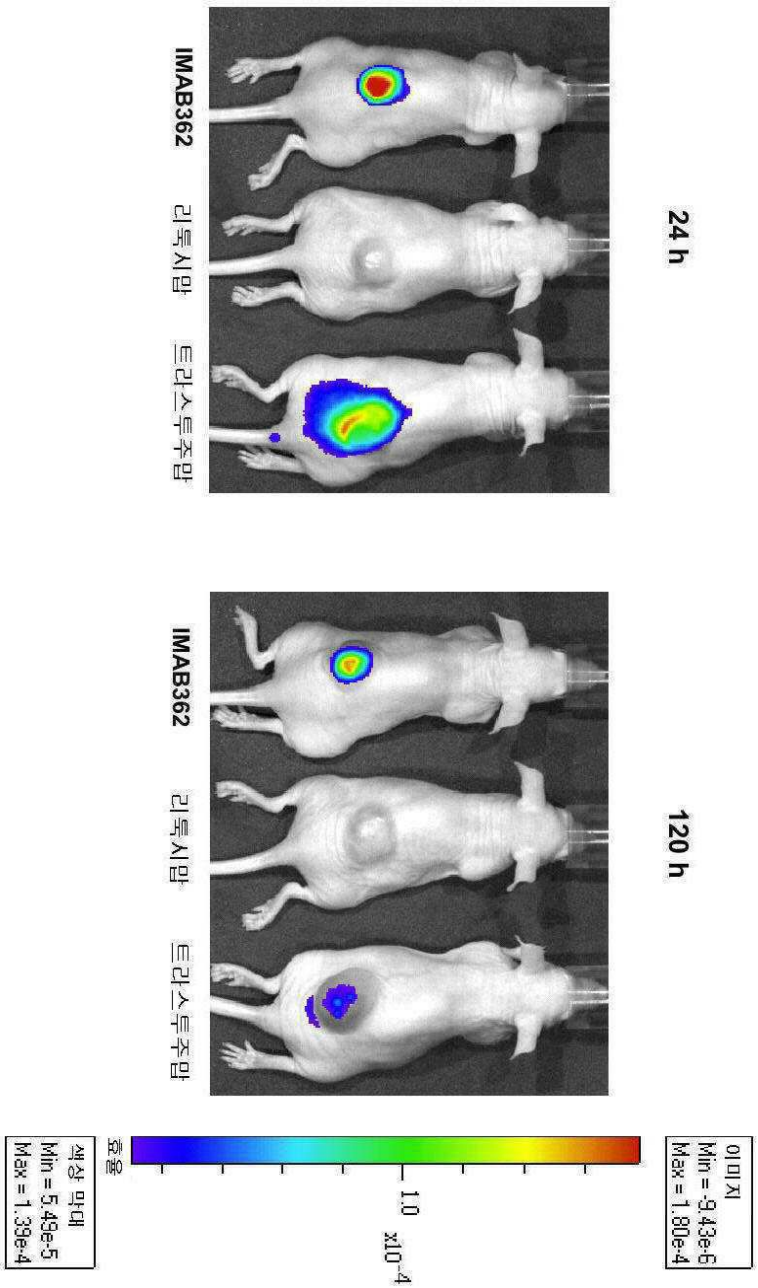
도면16


ZA/IL-2
ZA/IL-2+EOF
ZA/IL-2+5-FU/OX
Count
Red-A:: Cldn18-APC
암부: imab 362
명부: 이소형 대조군

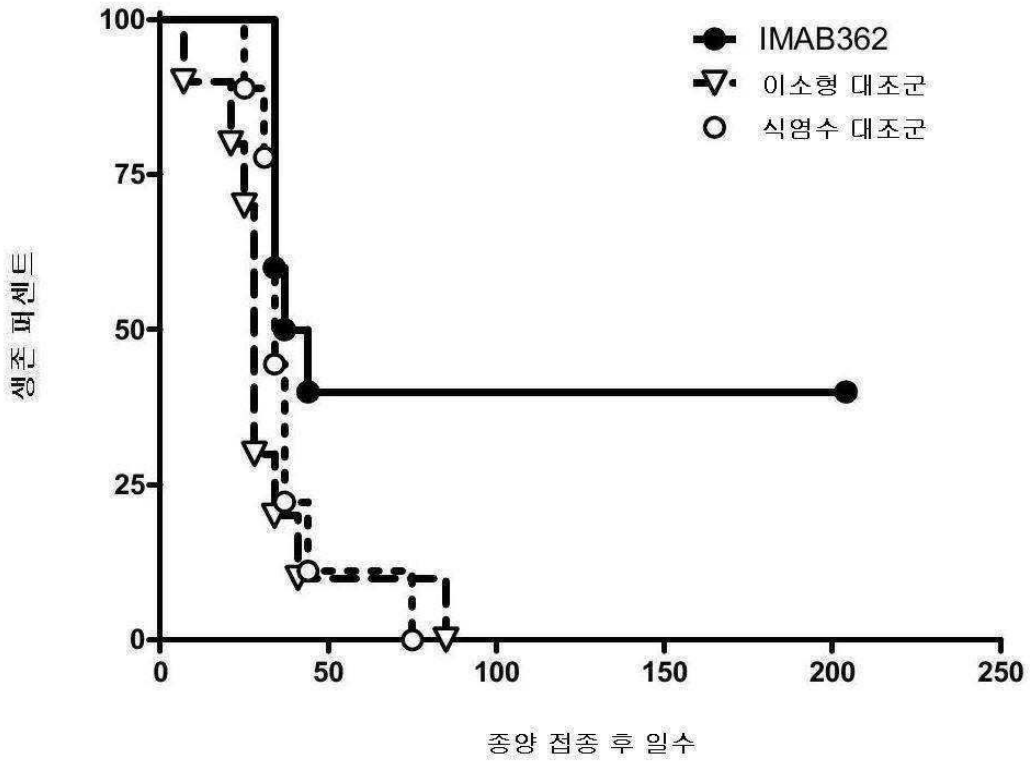
도면17



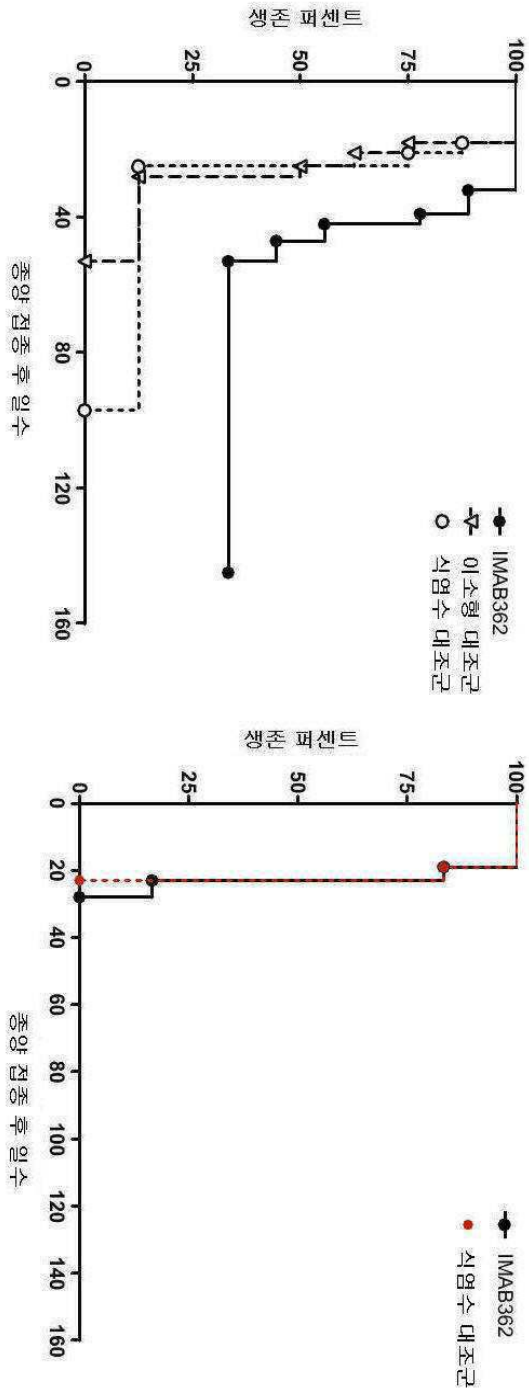
도면18


24 h
120 h
IMAB362
리독시맙
트라스투주맙
이미지
Min = -9.43e-6
Max = 1.80e-4
1.0
x10^-4
플룸
색상 막대
Min = 5.49e-5
Max = 1.39e-4

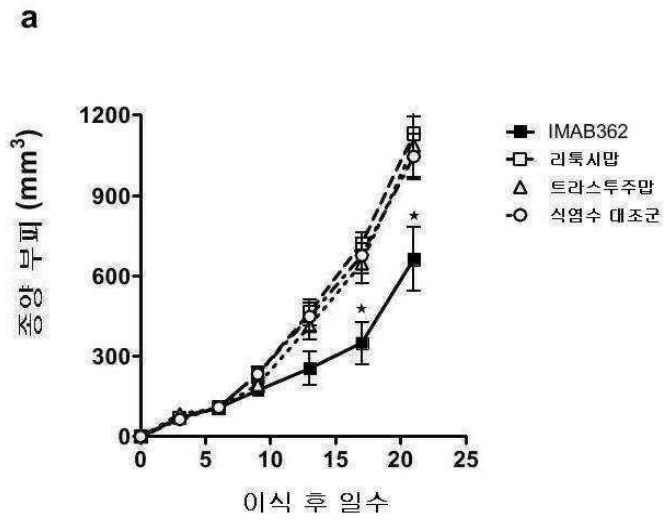
도면19


IMAB362
이소형 대조군
식염수 대조군
생존 퍼센트
100
75
50
25
0
0
50
100
150
200
250
종양 접종 후 일수

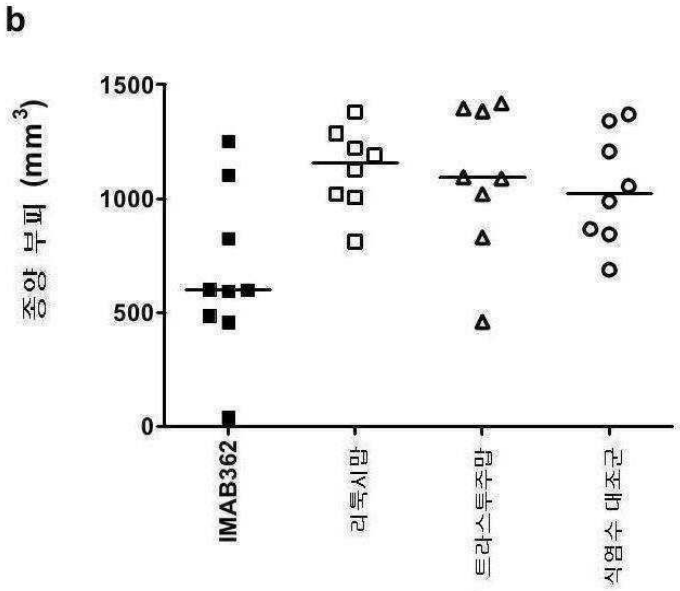
도면20


생존 퍼센트
0
25
50
75
100
0
40
80
120
160
종양 접종 후 일수
IMAB362
이소형 대조군
식염수 대조군
생존 퍼센트
0
25
50
75
100
0
20
40
60
80
100
120
140
160
종양 접종 후 일수
IMAB362
식염수 대조군

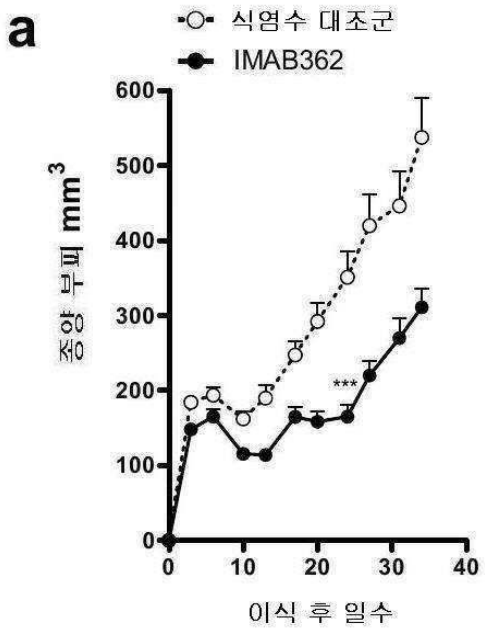
도면21a


a
종양 부피 (mm3)
1200
900
600
300
0
0
5
10
15
20
25
이식 후 일수
IMAB362
리툭시맙
트라스투주맙
식염수 대조군

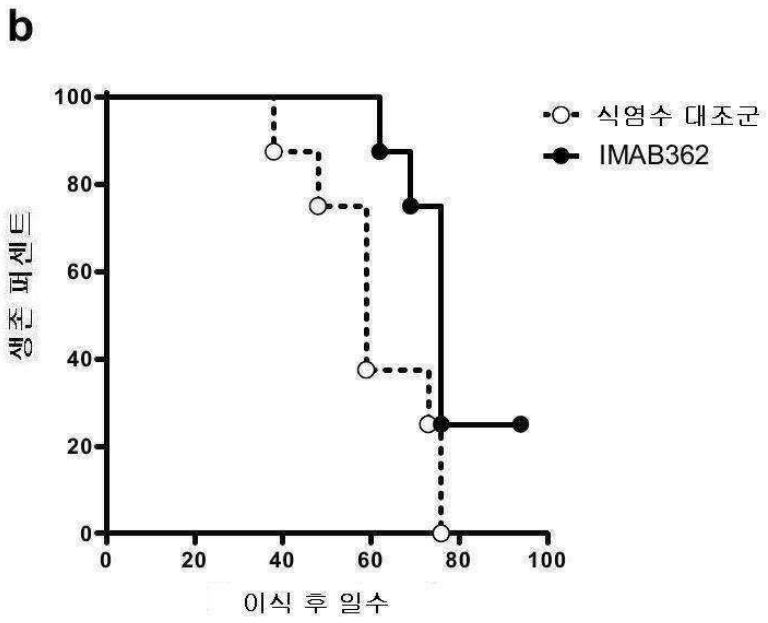
도면21b


b
종양 부피 (mm3)
1500
1000
500
0
IMAB362
리툭시맙
트라스투주맙
식염수 대조군

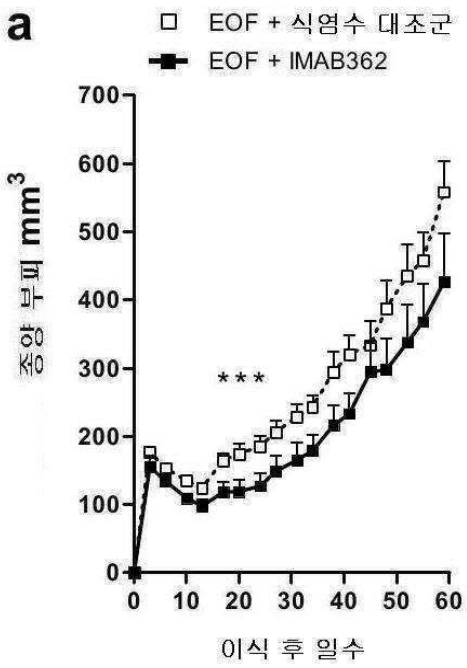
도면22a


a
식염수 대조군
IMAB362
종양 부피 mm3
600
500
400
300
200
100
0
***
0
10
20
30
40
이식 후 일수

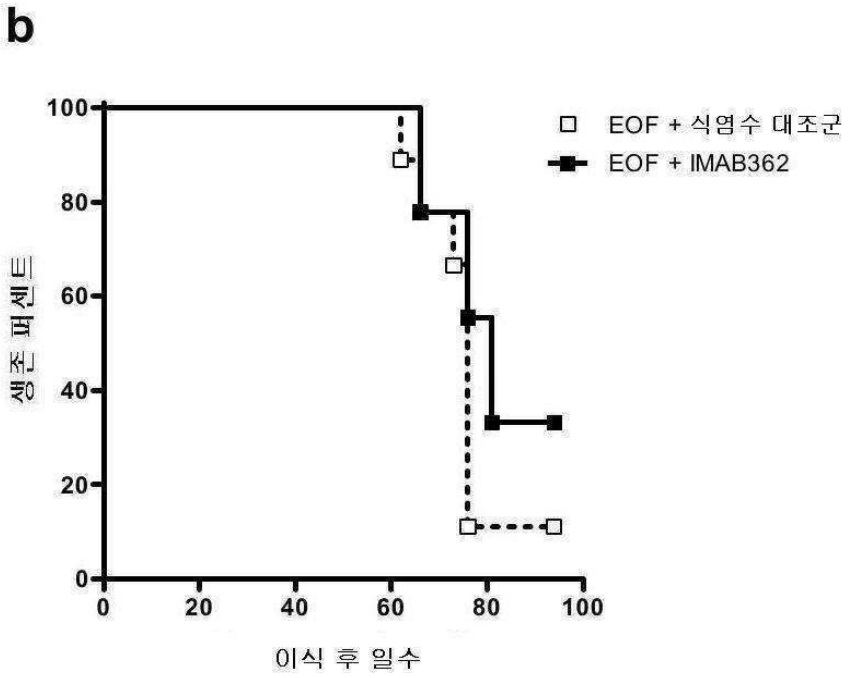
도면22b


b
식염수 대조군
IMAB362
생존 퍼센트
100
80
60
40
20
0
0
20
40
60
80
100
이식 후 일수

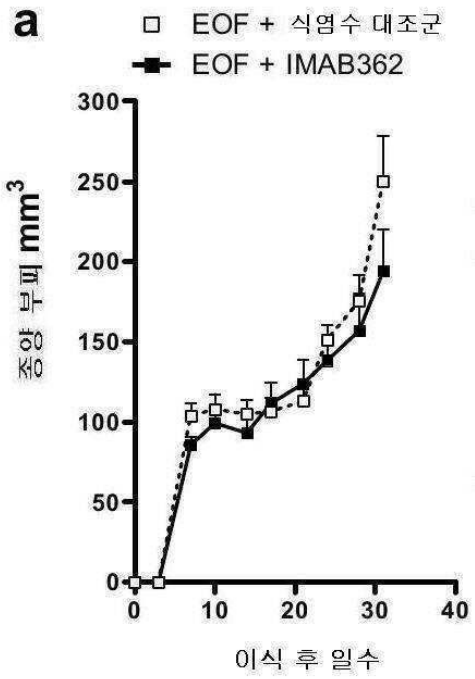
도면23a


a
EOF + 식염수 대조군
EOF + IMAB362
종양 부피 mm3
700
600
500
400
300
200
100
0
***
0
10
20
30
40
50
60
이식 후 일수

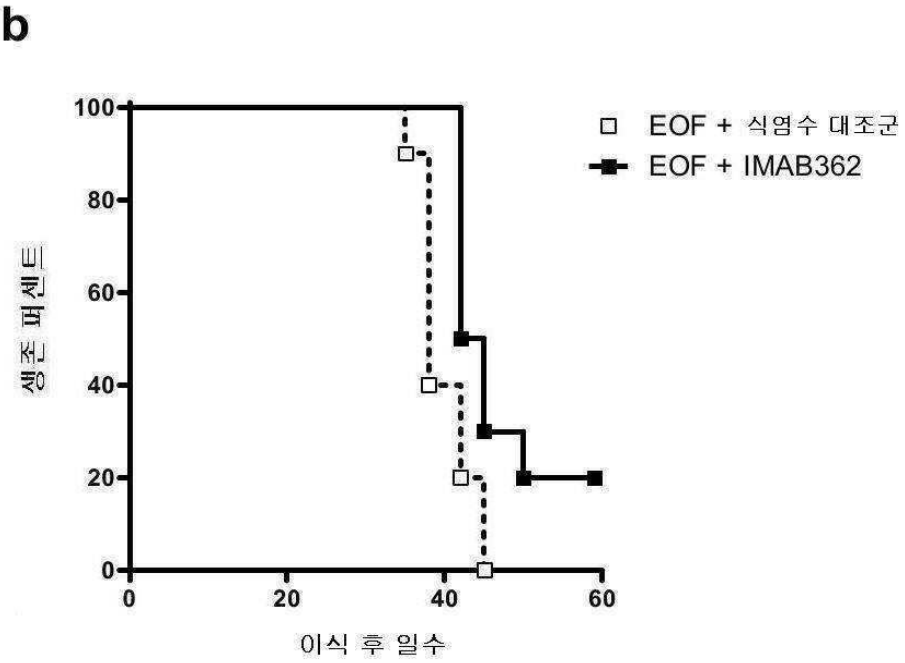
도면23b


b
EOF + 식염수 대조군
EOF + IMAB362
생존 퍼센트
100
80
60
40
20
0
0
20
40
60
80
100
이식 후 일수

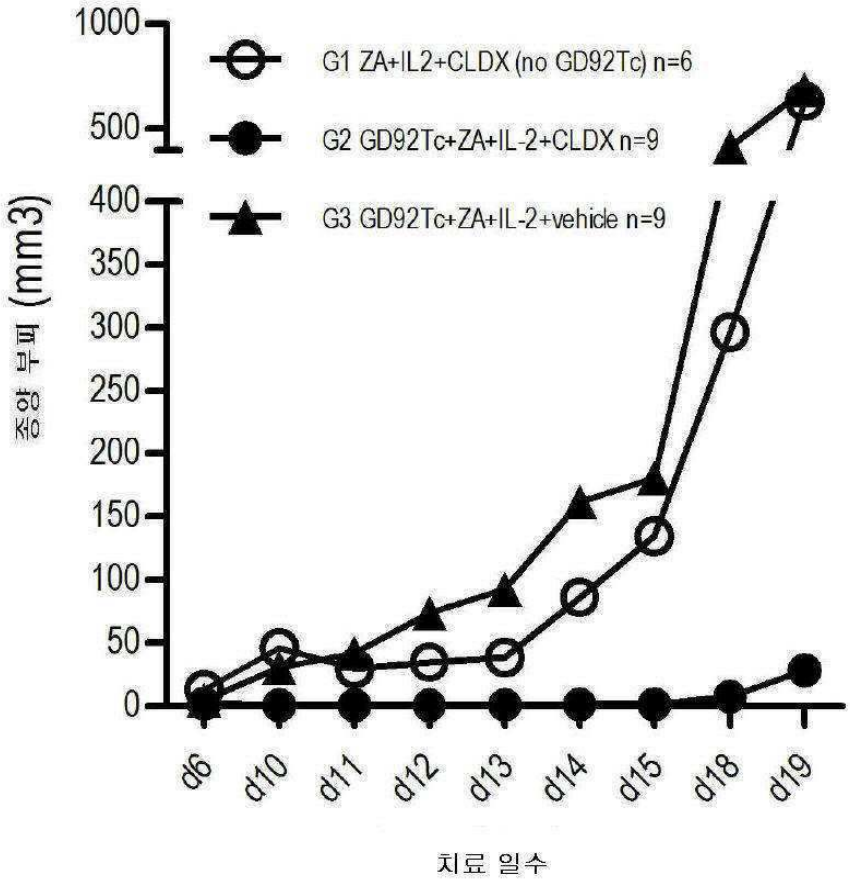
도면24a


a
EOF + 식염수 대조군
EOF + IMAB362
종양 부피 mm3
300
250
200
150
100
50
0
0
10
20
30
40
이식 후 일수

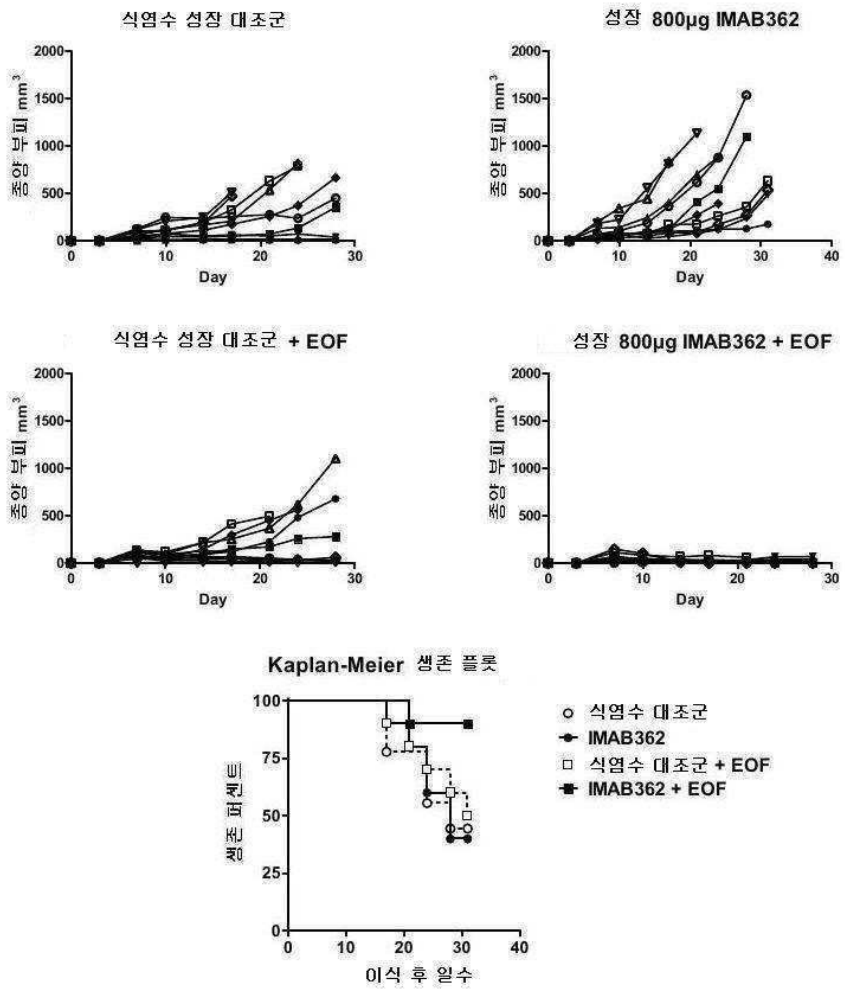
도면24b


b
EOF + 식염수 대조군
EOF + IMAB362
생존 퍼센트
100
80
60
40
20
0
0
20
40
60
이식 후 일수

도면25


1000
500
400
350
300
250
200
150
100
50
0
종양 부피 (mm3)
G1 ZA+IL2+CLDX (no GD92Tc) n=6
G2 GD92Tc+ZA+IL-2+CLDX n=9
G3 GD92Tc+ZA+IL-2+vehicle n=9
d6
d10
d11
d12
d13
d14
d15
d18
d19
치료 일수

도면26



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> Ganymed Pharmaceuticals AG

<120> COMBINATION THERAPY INVOLVING ANTIBODIES AGAINST CLAUDIN 18.2 FOR TREATMENT OF CANCER

<130> 342-75 PCT

<150> PCT/EP2012/002211

<151> 2012-05-23

<160> 50

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 261

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

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

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

85 90 95
Ser Ile Phe Ala Leu Lys Cys Ile Arg Ile Gly Ser Met Glu Asp Ser
100 105 110
Ala Lys Ala Asn Met Thr Leu Thr Ser Gly Ile Met Phe Ile Val Ser
115 120 125
Gly Leu Cys Ala Ile Ala Gly Val Ser Val Phe Ala Asn Met Leu Val
130 135 140
Thr Asn Phe Trp Met Ser Thr Ala Asn Met Tyr Thr Gly Met Gly Gly

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

210 215 220
Phe Lys Ala Ser Thr Gly Phe Gly Ser Asn Thr Lys Asn Lys Lys Ile
225 230 235 240
Tyr Asp Gly Gly Ala Arg Thr Glu Asp Glu Val Gln Ser Tyr Pro Ser

245 250 255

Lys His Asp Tyr Val

260

<210> 2

<211> 261

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

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

1 5 10 15

Gly Leu Ala Gly Cys Ile Ala Ala Thr Gly Met Asp Met Trp Ser Thr

20 25 30

Gln Asp Leu Tyr Asp Asn Pro Val Thr Ser Val Phe Gln Tyr Glu Gly

35 40 45

Leu Trp Arg Ser Cys Val Arg Gln Ser Ser Gly Phe Thr Glu Cys Arg

50 55 60

Pro Tyr Phe Thr Ile Leu Gly Leu Pro Ala Met Leu Gln Ala Val Arg

65 70 75 80

Ala Leu Met Ile Val Gly Ile Val Leu Gly Ala Ile Gly Leu Leu Val

85 90 95

Ser Ile Phe Ala Leu Lys Cys Ile Arg Ile Gly Ser Met Glu Asp Ser

100 105 110

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

115 120 125

Gly Leu Cys Ala Ile Ala Gly Val Ser Val Phe Ala Asn Met Leu Val

130 135 140

Thr Asn Phe Trp Met Ser Thr Ala Asn Met Tyr Thr Gly Met Gly Gly

145 150 155 160

Met Val Gln Thr Val Gln Thr Arg Tyr Thr Phe Gly Ala Ala Leu Phe

165 170 175

Val Gly Trp Val Ala Gly Gly Leu Thr Leu Ile Gly Gly Val Met Met

180 185 190

Cys Ile Ala Cys Arg Gly Leu Ala Pro Glu Glu Thr Asn Tyr Lys Ala

195 200 205

Val Ser Tyr His Ala Ser Gly His Ser Val Ala Tyr Lys Pro Gly Gly

210 215 220

Phe Lys Ala Ser Thr Gly Phe Gly Ser Asn Thr Lys Asn Lys Lys Ile

225 230 235 240

Tyr Asp Gly Gly Ala Arg Thr Glu Asp Glu Val Gln Ser Tyr Pro Ser

245 250 255

Lys His Asp Tyr Val

260

<210

> 3

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Asp Gln Trp Ser Thr Gln Asp Leu Tyr Asn

1 5 10

<210> 4

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Asn Asn Pro Val Thr Ala Val Phe Asn Tyr Gln

1 5 10

<210> 5

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Ser Thr Gln Asp Leu Tyr Asn Asn Pro Val Thr Ala Val Phe

1 5 10

<210> 6

<211

> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Thr Asn Phe Trp Met Ser Thr Ala Asn Met Tyr Thr Gly

1 5 10

<210> 7

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

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

1 5 10

<210> 8

<211> 55

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

Met Asp Gln Trp Ser Thr Gln Asp Leu Tyr Asn Asn Pro Val Thr Ala

1 5 10 15

Val Phe Asn Tyr Gln Gly Leu Trp Arg Ser Cys Val Arg Glu Ser Ser

20 25 30

Gly Phe Thr Glu Cys Arg Gly Tyr Phe Thr Leu Leu Gly Leu Pro Ala

35 40 45

Met Leu Gln Ala Val Arg Ala

50 55

<210> 9

<211> 24

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

Phe Ala Leu Lys Cys Ile Arg Ile Gly Ser Met Glu Asp Ser Ala Lys

1 5 10 15

Ala Asn Met Thr Leu Thr Ser Gly

20

<210> 10

<211> 40

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

Ala Asn Met Leu Val Thr Asn Phe Trp Met Ser Thr Ala Asn Met Tyr

1 5 10 15

Thr Gly Met Gly Gly Met Val Gln Thr Val Gln Thr Arg Tyr Thr Phe

20 25 30

Gly Ala Ala Leu Phe Val Gly Trp

35 40

<210> 11

<211> 153

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 11

Met Asp Gln Trp Ser Thr Gln Asp Leu Tyr Asn Asn Pro Val Thr Ala

1 5 10 15

Val Phe Asn Tyr Gln Gly Leu Trp Arg Ser Cys Val Arg Glu Ser Ser

20 25 30

Gly Phe Thr Glu Cys Arg Gly Tyr Phe Thr Leu Leu Gly Leu Pro Ala

35 40 45

Met Leu Gln Ala Val Arg Ala Leu Met Ile Val Gly Ile Val Leu Gly

50 55 60

Ala Ile Gly Leu Leu Val Ser Ile Phe Ala Leu Lys Cys Ile Arg Ile

65 70 75 80

Gly Ser Met Glu Asp Ser Ala Lys Ala Asn Met Thr Leu Thr Ser Gly

85 90 95

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

100 105 110

Phe Ala Asn Met Leu Val Thr Asn Phe Trp Met Ser Thr Ala Asn Met

115 120 125

Tyr Thr Gly Met Gly Gly Met Val Gln Thr Val Gln Thr Arg Tyr Thr
130 135 140
Phe Gly Ala Ala Leu Phe Val Gly Trp
145 150

<210> 12
<211> 107
<212> PRT
<213> Artificial
<220><223> Description of artificial sequence: Translation of PCR product
<400> 12

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> 13
<211> 326
<212> PRT
<213> Artificial
<220><223> Description of artificial sequence: Translation of PCR product
<400> 13

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

1 5 10 15

Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro

20 25 30

Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr

35 40 45

Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val

50 55 60

Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn

65 70 75 80

Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro

85 90 95

Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu

100 105 110

Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp

115 120 125

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp

130 135 140

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly

145 150 155 160

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn

165 170 175

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

180 185 190

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro

195 200 205

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu

210 215 220

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn

225 230 235 240

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile

245 250 255

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
260 265 270
Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
275 280 285

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

<210> 14
<211> 466
<212> PRT
<213> Artificial
<220><223> Description of artificial sequence: chimeric monoclonal antibody
<400> 14
Met Glu Trp Thr Trp Val Phe Leu Phe Leu Leu Ser Val Thr Ala Gly

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

65 70 75 80
Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn
85 90 95
Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
100 105 110
Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Asp Tyr Pro Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
115 120 125

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val

130 135 140

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala

145 150 155 160

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser

165 170 175

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val

180 185 190

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro

195 200 205

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys

210 215 220

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp

225 230 235 240

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly

245 250 255

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile

260 265 270

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu

275 280 285

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His

290 295 300

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg

305 310 315 320

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys

325 330 335

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu

340 345 350

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr

355 360 365

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu

370 375 380

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp

385 390 395 400

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val

405 410 415

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

420 425 430

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His

435 440 445

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro

450 455 460

Gly Lys

465

<210> 15

<211> 467

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Description of artificial sequence: chimeric monoclonal antibody

<400> 15

Met Asp Trp Leu Trp Asn Leu Leu Phe Leu Met Ala Ala Ala Gln Ser

1 5 10 15

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

20 25 30

Pro Gly Glu Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe

35 40 45

Thr Asn Tyr Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu

50 55 60

Lys Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Asn Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala

65 70 75 80

Glu Glu Phe Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser

85 90 95

Thr Ala Tyr Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr

100 105 110

Tyr Phe Cys Ala Arg Leu Gly Phe Gly Asn Ala Met Asp Tyr Trp Gly

115 120 125

Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser

130 135 140

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

145 150 155 160

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val

165 170 175

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala

180 185 190

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val

195 200 205

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His

210 215 220

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys

225 230 235 240

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly

245 250 255

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met

260 265 270

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His

275 280 285

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val

290 295 300

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr

305 310 315 320

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly

325 330 335

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile

340 345 350

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val

355 360 365

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser

370 375 380

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu

385 390 395 400

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro

405 410 415

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

420 425 430

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met

435 440 445

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser

450 455 460

Pro Gly Lys

465

<210> 16

<211> 465

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Description of artificial sequence: chimeric monoclonal antibody

<400> 16

Met Glu Trp Ile Trp Ile Phe Leu Phe Ile Leu Ser Gly Thr Ala Gly

1 5 10 15

Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg

20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe

35 40 45

Thr Asp Tyr Tyr Ile Asn Trp Val Lys Gln Arg Thr Gly Gln Gly Leu

50 55 60

Glu Trp Ile Gly Glu Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr Asn

65 70 75 80

Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu

145 150 155 160

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp

165 170 175

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

180 185 190

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser

195 200 205

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro

210 215 220

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys

225 230 235 240

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro

245 250 255

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser

260 265 270

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp

275 280 285

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn

290 295 300

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val

305 310 315 320

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu

325 330 335

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys

340 345 350

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr

355 360 365

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr

370 375 380

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu

385 390 395 400

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu

405 410 415

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

420 425 430

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu

435 440 445

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly

450 455 460

Lys

465

<210> 17

<211> 467

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Description of artificial sequence: chimeric monoclonal antibody

<400> 17

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

1 5 10 15

Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg

20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe

35 40 45

Thr Ser Tyr Trp Ile Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu

50 55 60

Glu Trp Ile Gly Asn Ile Tyr Pro Ser Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Asn

65 70 75 80

Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser

85 90 95

Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Pro Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val

100 105 110

Tyr Tyr Cys Thr Arg Ser Trp Arg Gly Asn Ser Phe Asp Tyr Trp Gly

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val

165 170 175

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala

180 185 190

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val

195 200 205

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His

210 215 220

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys

225 230 235 240

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly

245 250 255

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met

260 265 270

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His

275 280 285

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val

290 295 300

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr

305 310 315 320

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly

325 330 335

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile

340 345 350

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val

355 360 365

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser

370 375 380

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu

385 390 395 400

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro

405 410 415

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

420 425 430

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met

435 440 445

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser

450 455 460

Pro Gly Lys

465

<210> 18

<211> 466

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Description of artificial sequence: chimeric monoclonal antibody

<400> 18

Met Glu Trp Arg Ile Phe Leu Phe Ile Leu Ser Gly Thr Ala Gly Val

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Asp Tyr Val Ile Ser Trp Val Lys Gln Arg Thr Gly Gln Gly Leu Glu

50 55 60

Trp Ile Gly Glu Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Glu

65 70 75 80

Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Asn Thr

85 90 95

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

100 105 110

Phe Cys Ala Arg Gly Val Leu Leu Arg Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

115 120 125

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val

130 135 140

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala

145 150 155 160

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser

165 170 175

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val

180 185 190

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro

195 200 205

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys

210 215 220

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp

225 230 235 240

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly

245 250 255

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile

260 265 270

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu

275 280 285

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His

290 295 300

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg

305 310 315 320

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys

325 330 335

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu

340 345 350

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr

355 360 365

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu

370 375 380

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp

385 390 395 400

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val

405 410 415

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

420 425 430

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His

435 440 445

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro

450 455 460

Gly Lys

465

<210> 19

<211> 469

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Description of artificial sequence: chimeric monoclonal antibody

<400> 19

Met Asp Trp Ile Trp Ile Met Leu His Leu Leu Ala Ala Ala Thr Gly
1 5 10 15
Ile Gln Ser Gln Val His Leu Gln Gln Ser Gly Ser Glu Leu Arg Ser
20 25 30
Pro Gly Ser Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Asp Phe Asp Ser Glu Val

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

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

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

Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys

225 230 235 240

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu

245 250 255

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr

260 265 270

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val

275 280 285

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val

290 295 300

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser

305 310 315 320

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

325 330 335

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala

340 345 350

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro

355 360 365

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln

370 375 380

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala

385 390 395 400

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr

405 410 415

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu

420 425 430

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser

435 440 445

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser

450 455 460

Leu Ser Pro Gly Lys

465

<210> 20

<211> 240

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Description of artificial sequence: chimeric monoclonal antibody

<400> 20

Met Glu Ser Gln Thr Gln Val Leu Met Ser Leu Leu Phe Trp Val Ser
1 5 10 15

Gly Thr Cys Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Thr
20 25 30

Val Thr Ala Gly Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser
35 40 45

Leu Leu Asn Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln
50 55 60

Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg
65 70 75 80

Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
85 90 95

Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr
100 105 110

Tyr Cys Gln Asn Asp Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr
115 120 125

Lys Leu Glu Leu Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe
130 135 140

Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys
145 150 155 160

Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val
165 170 175

Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln
180 185 190

Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser
195 200 205

Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His
210 215 220

Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230 235 240

<210> 21

<211> 235

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Description of artificial sequence: chimeric monoclonal antibody

<400> 21

Met His Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser
1 5 10 15

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

Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser
35 40 45

Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Thr Ser
50 55 60

Pro Lys Leu Trp Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
65 70 75 80

Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile
85 90 95

Ser Arg Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg
100 105 110

Ser Ser Tyr Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
115 120 125

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
130 135 140

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
145 150 155 160

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
165 170 175
Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
180 185 190

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
195 200 205
Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
210 215 220
Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230 235

<210> 22
<211> 234
<212> PRT
<213> Artificial
<220><223> Description of artificial sequence: chimeric monoclonal antibody
<400> 22

Met Glu Phe Gln Thr Gln Val Phe Val Phe Val Leu Leu Trp Leu Ser

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

65 70 75 80
Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
85 90 95
Asn Val Gln Ser Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Cys Leu Gln His Trp
100 105 110
Asn Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
115 120 125

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

130 135 140

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
145 150 155 160
Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
165 170 175
Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
180 185 190
Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys

195 200 205

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
210 215 220
Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230

<210> 23
<211> 240
<212> PRT
<213> Artificial
<220><223> Description of artificial sequence: chimeric monoclonal antibody
<400> 23
Met Asp Ser Gln Ala Gln Val Leu Met Leu Leu Leu Leu Trp Val Ser
1 5 10 15

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

Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp

85 90 95

Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Lys Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr

100 105 110

Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr

115 120 125

Lys Leu Glu Leu Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe

130 135 140

Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys

145 150 155 160

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

165 170 175

Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln

180 185 190

Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser

195 200 205

Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His

210 215 220

Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

225 230 235 240

<210> 24

<211> 240

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Description of artificial sequence: chimeric monoclonal antibody

<400> 24

Met Glu Ser Gln Thr Gln Val Leu Met Ser Leu Leu Phe Trp Val Ser

1 5 10 15

Gly Thr Cys Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Thr

20 25 30

Val Thr Ala Gly Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser

35 40 45

Leu Leu Asn Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln

50 55 60

Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg
65 70 75 80

Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
85 90 95

Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr
100 105 110

Tyr Cys Gln Asn Asp Tyr Ser Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr
115 120 125

Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe
130 135 140

Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys
145 150 155 160

Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val
165 170 175

Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln
180 185 190

Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser
195 200 205

Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His
210 215 220

Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230 235 240

<210> 25

<211> 239

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Description of artificial sequence: chimeric monoclonal antibody

<400> 25

Met Asp Ser Gln Ala Gln Val Leu Ile Leu Leu Leu Leu Trp Val Ser
1 5 10 15

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

Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
85 90 95
Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr
100 105 110
Tyr Cys Lys Gln Ser Tyr Asn Leu Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys
115 120 125
Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro
130 135 140

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

Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln
210 215 220
Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230 235

<210> 26
<211> 240
<212> PRT
<213> Artificial

<220><223> Description of artificial sequence: chimeric monoclonal antibody

<400> 26

Met Asp Ser Gln Ala Gln Val Leu Met Leu Leu Leu Trp Val Ser
1 5 10 15

Gly Thr Cys Gly Asp Ile Val Met Ser Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala
20 25 30

Val Ser Val Gly Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser
35 40 45

Leu Leu Tyr Ser Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln
50 55 60

Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg
65 70 75 80

Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Ala Thr Asp
85 90 95

Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Asp Tyr
100 105 110

His Cys Gly Gln Gly Tyr Ser Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr
115 120 125

Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe
130 135 140

Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys
145 150 155 160

Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val
165 170 175

Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln
180 185 190

Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser
195 200 205

Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His
210 215 220

Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

225 230 235 240

<210> 27

<211> 240

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Description of artificial sequence: chimeric monoclonal antibody

<400> 27

Met Asp Ser Gln Ala Gln Val Leu Met Leu Leu Leu Leu Trp Val Ser
1 5 10 15

Gly Thr Cys Gly Asp Ile Val Met Ser Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala
20 25 30

Val Ser Val Gly Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser
35 40 45

Leu Leu Tyr Ser Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln
50 55 60

Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg
65 70 75 80

Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
85 90 95

Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Lys Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr
100 105 110

Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr
115 120 125

Lys Leu Glu Leu Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe
130 135 140

Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys
145 150 155 160

Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val
165 170 175

Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln
180 185 190

Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser

195 200 205

Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His
210 215 220
Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230 235 240

<210> 28
<211> 234
<212> PRT
<213> Artificial
<220><223> Description of artificial sequence: chimeric monoclonal antibody
<400> 28

Met Glu Ser Gln Thr Leu Val Phe Ile Ser Ile Leu Leu Trp Leu Tyr
1 5 10 15

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

Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Ala Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
85 90 95
Ser Val Lys Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr
100 105 110
Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg
115 120 125
Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
130 135 140

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
145 150 155 160

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

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
210 215 220
Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230

<210> 29
<211> 117
<212> PRT
<213> Artificial
<220><223> Description of artificial sequence: Translation of PCR product
<400> 29

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Met Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Thr Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Trp Ile Glu Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Glu Ile Leu Pro Gly Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60
Lys Gly Lys Ala Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Tyr Asp Tyr Pro Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110
Val Thr Val Ser Ala
115

<210> 30

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Description of artificial sequence: Translation of PCR product

<400> 30

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

1 5 10 15

Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr

20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met

35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Asn Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Glu Glu Phe

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys

85 90 95

Ala Arg Leu Gly Phe Gly Asn Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110

Ser Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 31

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Description of artificial sequence: Translation of PCR product

<400> 31

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Tyr Ile Asn Trp Val Lys Gln Arg Thr Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Glu Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr Asn Glu Lys Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Ser Tyr Gly Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu

100 105 110

Thr Val Ser Ser

115

<210> 32

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Description of artificial sequence: Translation of PCR product

<400> 32

Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr

20 25 30

Trp Ile Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Asn Ile Tyr Pro Ser Asp Ser Tyr Thr Asn 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 Gln Leu Ser Ser Pro Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

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

100 105 110

Thr Leu Thr Val Ser Ser

115

<210> 33

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial

<220

><223> Description of artificial sequence: Translation of PCR product

<400> 33

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

1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr

20 25 30

Val Ile Ser Trp Val Lys Gln Arg Thr Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Glu Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Glu Lys Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Ser Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 34

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Description of artificial sequence: Translation of PCR product

<400> 34

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

1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Asp Phe Asp Ser Glu Val Phe Pro Phe
20 25 30
Ala Tyr Met Ser Trp Ile Arg Gln Lys Pro Gly His Gly Phe Glu Trp
35 40 45

Ile Gly Asp Ile Leu Pro Ser Ile Gly Arg Thr Ile Tyr Gly Glu Lys
50 55 60
Phe Glu Asp Lys Ala Thr Leu Asp Ala Asp Thr Val Ser Asn Thr Ala
65 70 75 80
Tyr Leu Glu Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Ile Tyr Tyr
85 90 95
Cys Ala Arg Gly Glu Gly Tyr Gly Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
115 120

<210> 35
<211> 113
<212> PRT
<213> Artificial
<220><223> Description of artificial sequence: Translation of PCR product
<400> 35
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Thr Val Thr Ala Gly
1 5 10 15
Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
20 25 30
Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln

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

Asp Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu

100 105 110

Lys

<210> 36

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Description of artificial sequence: Translation of PCR product

<400> 36

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 Met Glu Ala Glu

65 70 75 80

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

85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 37

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Description of artificial sequence: Translation of PCR product

<400> 37

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Arg Thr Ala
20 25 30
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Ala Leu Ile
35 40 45

Tyr Leu Ala Ser Asn Arg His Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Ser
65 70 75 80
Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Cys Leu Gln His Trp Asn Tyr Pro Leu
85 90 95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 38
<211> 113

<212> PRT
<213> Artificial
<220><223> Description of artificial sequence: Translation of PCR product
<400> 38
Asp Ile Val Met Ser Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala Val Ser Val Gly
1 5 10 15
Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser
20 25 30
Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45

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

100 105 110

Lys

<210> 39
<211> 113
<212> PRT
<213> Artificial
<220><223> Description of artificial sequence: Translation of PCR product
<400> 39
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Thr Val Thr Ala Gly
1 5 10 15
Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
20 25 30
Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60
Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80
Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn
85 90 95
Asp Tyr Ser Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile
100 105 110

Lys

<210> 40
<211> 112
<212> PRT
<213> Artificial
<220><223> Description of artificial sequence: Translation of PCR product
<400> 40
Asp Ile Val Met Ser Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala Val Ser Ala Gly

1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser

20 25 30

Arg Thr Arg Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln

35 40 45

Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val

50 55 60

Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr

65 70 75 80

Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Lys Gln

85 90 95

Ser Tyr Asn Leu Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105 110

<210> 41

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Description of artificial sequence: Translation of PCR product

<400> 41

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

1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser

20 25 30

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

35 40 45

Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val

50 55 60

Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Ala Thr Asp Phe Thr Leu Thr

65 70 75 80

Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Asp Tyr His Cys Gly Gln

85 90 95

Gly Tyr Ser Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile

100 105 110

Lys

<210> 42
<211> 113
<212> PRT
<213> Artificial
<220><223> Description of artificial sequence: Translation of PCR product
<400> 42
Asp Ile Val Met Ser Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala Val Ser Val Gly
1 5 10 15
Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser
20 25 30
Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45

Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60
Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80
Ile Ser Ser Val Lys Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
85 90 95
Tyr Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu
100 105 110

Lys

<210> 43
<211> 107
<212> PRT
<213> Artificial
<220><223> Description of artificial sequence: Translation of PCR product
<400> 43
Asn Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Lys Ser Met Ser Met Ser Val Gly

1 5 10 15

Glu Arg Val Thr Leu Thr Cys Lys Ala Ser Glu Asn Val Val Thr Tyr

20 25 30

Val Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Gly Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Ala Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Lys Ala

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys

100 105

<210> 44

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Epitope

<400> 44

Met Asp Gln Trp Ser Thr Gln Asp Leu Tyr Asn Asn Pro Val Thr

1 5 10 15

<210> 45

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Epitope

<400> 45

Ser Thr Gln Asp Leu Tyr Asn Asn Pro Val Thr Ala Val Phe Asn

1 5 10 15

<210> 46

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Epitope

<400> 46

Leu Tyr Asn Asn Pro Val Thr Ala Val Phe Asn Tyr Gln Gly Leu

1 5 10 15

<210> 47

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Epitope

<400> 47

Pro Val Thr Ala Val Phe Asn Tyr Gln Gly Leu Trp Arg Ser Cys

1 5 10 15

<210> 48

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Epitope

<400> 48

Val Phe Asn Tyr Gln Gly Leu Trp Arg Ser Cys Val Arg Glu Ser

1 5 10 15

<210> 49

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Epitope

<400> 49

Gln Gly Leu Trp Arg Ser Cys Val Arg Glu Ser Ser Gly Phe Thr

1 5 10 15

<210> 50

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Epitope

<400> 50

Arg Ser Cys Val Arg Glu Ser Ser Gly Phe Thr Glu Cys Arg Gly

1 5 10 15