



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0101331
 (43) 공개일자 2014년08월19일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 39/395 (2006.01) *C07K 16/04* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
- (21) 출원번호 10-2014-7005724
- (22) 출원일자(국제) 2012년08월10일
 심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2014년03월03일
- (86) 국제출원번호 PCT/IB2012/001795
- (87) 국제공개번호 WO 2013/021279
 국제공개일자 2013년02월14일
- (30) 우선권주장
 61/521,996 2011년08월10일 미국(US)
 61/567,364 2011년12월06일 미국(US)

- (71) 출원인
라보라토이레 프란카이즈 듀 프락티온네먼트 에트 데스 바이오테크놀로지스
 프랑스, 레스 율리스 에프-91940, 자 데 퀴타보에 프, 에비뉴 데스 트로피퀘스 3
- (72) 발명자
페이드 발레그
 프랑스 에프-91940 레 줄리 아파테먼트 112 바티 먼트 에이 아비뉴 데 캠프 나즈니어 7
체브룩스 굴리아우메
 프랑스 에프-75009 파리 튀 데 마티르 66
- (74) 대리인
김진희, 김성기

전체 청구항 수 : 총 74 항

(54) 발명의 명칭 **고도로 갈락토실화된 항체**

(57) 요약

일 측면에서, 본 발명은 고도로 갈락토실화된 항체, 이들 항체의 제조 방법 및 이들 항체의 사용 방법에 관한 것이다.

특허청구의 범위

청구항 1

고도로 갈락토실화된 항체 집단을 포함하는 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 집단 형태의 항체는 유선 상피 세포에서 트랜스제닉으로(transgenically) 생성되는 것인 조성물.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 집단 형태의 항체는 동일한 항원 에피토프에 대하여 유도되는 것인 조성물.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 집단 형태의 항체는 동일한 핵산 서열에 의해 코딩되는 것인 조성물.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 집단 형태의 항체의 갈락토실화 수준은 70% 이상인 조성물.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 항체 집단은 1갈락토실화된(mono-galactoxylated) N-글리칸을 포함하는 항체를 포함하는 것인 조성물.

청구항 7

항체 집단을 포함하는 조성물로서,
집단 형태의 항체의 갈락토실화 수준이 70% 이상이며,
항체 집단이 1갈락토실화된 N-글리칸을 포함하는 항체를 포함하고,
집단 형태의 항체가 동일한 핵산 서열에 의해 코딩되는 것인 조성물.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 집단 형태의 항체의 갈락토실화 수준은 80% 이상인 조성물.

청구항 9

제8항에 있어서, 집단 형태의 항체의 갈락토실화 수준은 90% 이상인 조성물.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 집단 형태의 항체의 푸코실화 수준은 80% 이상인 조성물.

청구항 11

제10항에 있어서, 집단 형태의 항체의 푸코실화 수준은 90% 이상인 조성물.

청구항 12

항체 집단을 포함하는 조성물로서,
집단 형태의 항체의 푸코실화 수준에 대한 집단 형태의 항체의 갈락토실화 수준의 비가 0.8 내지 1.2이며,
항체 집단은 1갈락토실화된 N-글리칸을 포함하는 항체를 포함하고,
집단 형태의 항체는 동일한 핵산 서열에 의해 코딩되는 것인 조성물.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 항체 집단은 2갈락토실화된(bi-galactoxylated) N-글리칸을 포함하는 항체를 포함하는 것인 조성물.

청구항 14

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 항체 집단은 1갈락토실화된 N-글리칸 및 2갈락토실화된 N-글리칸 둘 모두를 포함하는 항체를 포함하는 것인 조성물.

청구항 15

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 집단 형태의 항체의 35% 이상은 2갈락토실화된 N-글리칸을 포함하며, 집단 형태의 항체의 5% 이상은 1갈락토실화된 N-글리칸을 포함하는 것인 조성물.

청구항 16

제7항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 집단 형태의 항체는 유선 상피 세포에서 트랜스제닉으로 생성되는 것인 조성물.

청구항 17

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 항체 집단은 항체를 발현하도록 조작된 인간의 포유류의 유선 상피 세포에서 트랜스제닉으로 생성되는 것인 조성물.

청구항 18

제17항에 있어서, 인간의 포유류는 염소, 양, 들소, 낙타, 소, 돼지, 토끼, 물소, 말, 래트(rat), 마우스 또는 라마인 조성물.

청구항 19

제17항에 있어서, 인간의 포유류는 염소인 조성물.

청구항 20

제1항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 밀크(milk)를 추가로 포함하는 것인 조성물.

청구항 21

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 항체 집단의 항체는 유선 상피 세포에서 생성되지 않은 항체 집단과 비교할 때 증가된 수준의 보체 의존성 세포독성(CDC) 활성을 갖는 것인 조성물.

청구항 22

제21항에 있어서, 유선 상피 세포에서 생성되지 않은 항체 집단의 항체는 세포 배양으로 생성되는 것인 조성물.

청구항 23

제21항 또는 제22항에 있어서, 유선 상피 세포에서 생성되지 않은 항체 집단의 항체는 저 갈락토스 항체인 조성물.

청구항 24

제23항에 있어서, 저 갈락토스 항체는 리투산(Rituxan)인 조성물.

청구항 25

제1항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, 항체 집단의 항체는 유선 상피 세포에서 생성되지 않은 항체 집단과 비교할 때 증가된 수준의 항체 의존성 세포독성(ADCC) 활성을 갖는 것인 조성물.

청구항 26

제25항에 있어서, 유선 상피 세포에서 생성되지 않은 항체 집단의 항체는 세포 배양으로 생성되는 것인 조성물.

청구항 27

제25항 또는 제26항에 있어서, 유선 상피 세포에서 생성되지 않은 항체 집단의 항체는 저 갈락토스 항체인 조성물.

청구항 28

제27항에 있어서, 저 갈락토스 항체는 리튬산인 조성물.

청구항 29

제1항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서, 집단 형태의 항체는 키메라 항체, 인간화 항체 또는 완전 인간 항체인 조성물.

청구항 30

제1항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서, 집단 형태의 항체는 전장 항체인 조성물.

청구항 31

제1항 내지 제30항 중 어느 한 항에 있어서, 집단 형태의 항체는 중쇄 및 경쇄를 포함하는 것인 조성물.

청구항 32

제1항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, 집단 형태의 항체는 항-CD20 항체인 조성물.

청구항 33

제32항에 있어서, 집단 형태의 항체의 경쇄 및 중쇄는 서열 번호 1 및 서열 번호 2에 개시된 핵산 서열에 의해 코딩되는 것인 조성물.

청구항 34

제1항 내지 제33항 중 어느 한 항에 있어서, 약학적으로 허용되는 담체를 추가로 포함하는 조성물.

청구항 35

제1항 내지 제34항 중 어느 한 항의 조성물을 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 36

제35항에 있어서, 대상체는 암을 갖는 것인 방법.

청구항 37

제36항에 있어서, 암은 B-세포 림프종인 방법.

청구항 38

제35항에 있어서, 대상체는 면역 장애를 갖는 것인 방법.

청구항 39

고도로 갈락토실화된 항체 집단을 제조하는 방법으로서, 고도로 갈락토실화된 항체 집단이 생성되도록 유선 상피 세포에서 항체 집단을 생성하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 40

제39항에 있어서, 생성된 항체 집단을 수집하는 단계를 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 41

고도로 갈락토실화된 항체 집단을 제조하는 방법으로서, 항체를 발현하도록 조작된 유선 상피 세포에서 생성된 고도로 갈락토실화된 항체 집단을 수집하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 42

제39항 내지 제41항 중 어느 한 항에 있어서, 항체 집단의 CDC 활성을 측정하는 단계를 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 43

제39항 내지 제42항 중 어느 한 항에 있어서, 항체 집단의 CDC 활성을 유선 상피 세포에서 생성되지 않은 항체 집단과 비교하는 단계를 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 44

제43항에 있어서, 유선 상피 세포에서 생성되지 않은 항체 집단의 항체는 세포 배양으로 생성되는 것인 방법.

청구항 45

제39항 내지 제44항 중 어느 한 항에 있어서, 항체 집단의 갈락토실화 수준을 측정하는 단계를 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 46

제39항 내지 제45항 중 어느 한 항에 있어서, 유선 상피 세포는 배양내(in culture) 있으며 항체를 코딩하는 서열을 포함하는 핵산으로 형질감염되는 것인 방법.

청구항 47

제39항 내지 제46항 중 어느 한 항에 있어서, 유선 상피 세포는 그 유선에서 항체를 코딩하는 서열을 포함하는 핵산을 발현하도록 조작된 인간의 포유류 내에 있는 것인 방법.

청구항 48

제39항 내지 제47항 중 어느 한 항에 있어서, 유선 상피 세포는 염소, 양, 들소, 낙타, 소, 돼지, 토끼, 물소, 말, 래트, 마우스 또는 라마 유선 상피 세포인 방법.

청구항 49

제48항에 있어서, 유선 상피 세포는 염소 유선 상피 세포인 방법.

청구항 50

제39항 내지 제49항 중 어느 한 항에 있어서, 집단 형태의 항체의 갈락토실화 수준은 70% 이상인 방법.

청구항 51

제50항에 있어서, 집단 형태의 항체의 갈락토실화 수준은 80% 이상인 방법.

청구항 52

제51항에 있어서, 집단 형태의 항체의 갈락토실화 수준은 90% 이상인 방법.

청구항 53

제39항 내지 제52항 중 어느 한 항에 있어서, 집단 형태의 항체의 푸코실화 수준은 80% 이상인 방법.

청구항 54

제53항에 있어서, 집단 형태의 항체의 푸코실화 수준은 90% 이상인 방법.

청구항 55

제39항 내지 제54항 중 어느 한 항에 있어서, 집단 형태의 항체의 푸코실화 수준에 대한 집단 형태의 항체의 갈락토실화 수준의 비는 0.8 내지 1.2인 방법.

청구항 56

제39항 내지 제55항 중 어느 한 항에 있어서, 항체 집단은 1갈락토실화된 N-글리칸을 포함하는 항체를 포함하는 것인 방법.

청구항 57

제39항 내지 제56항 중 어느 한 항에 있어서, 항체 집단은 2갈락토실화된 N-글리칸을 포함하는 항체를 포함하는 것인 방법.

청구항 58

제39항 내지 제57항 중 어느 한 항에 있어서, 항체 집단은 1갈락토실화된 N-글리칸 및 2갈락토실화된 N-글리칸 둘 모두를 포함하는 항체를 포함하는 것인 방법.

청구항 59

제39항 내지 제58항 중 어느 한 항에 있어서, 집단 형태의 항체의 35% 이상은 2갈락토실화된 N-글리칸을 포함하며, 집단 형태의 항체의 5% 이상은 1갈락토실화된 N-글리칸을 포함하는 것인 방법.

청구항 60

제39항 내지 제49항 중 어느 한 항에 있어서, 집단 형태의 항체의 갈락토실화 수준이 70% 이상이 되도록 항체 집단을 정제하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 61

제60항에 있어서, 집단 형태의 항체의 갈락토실화 수준이 80% 이상이 되도록 항체 집단을 정제하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 62

제61항에 있어서, 집단 형태의 항체의 갈락토실화 수준이 90% 이상이 되도록 항체 집단을 정제하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 63

제39항 내지 제49항 및 제60항 내지 제62항 중 어느 한 항에 있어서, 집단 형태의 항체의 푸코실화 수준이 80% 이상이 되도록 항체 집단을 정제하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 64

제63항에 있어서, 집단 형태의 항체의 푸코실화 수준이 90% 이상이 되도록 항체 집단을 정제하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 65

제39항 내지 제49항 중 어느 한 항에 있어서, 집단 형태의 항체의 푸코실화 수준에 대한 집단 형태의 항체의 갈락토실화 수준의 비가 0.8 내지 1.2가 되도록 항체 집단을 정제하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 66

제60항 내지 제65항 중 어느 한 항에 있어서, 항체 집단은 1갈락토실화된 N-글리칸을 포함하는 항체를 포함하는 것인 방법.

청구항 67

제60항 내지 제66항 중 어느 한 항에 있어서, 항체 집단은 2갈락토실화된 N-글리칸을 포함하는 항체를 포함하는 것인 방법.

청구항 68

제60항 내지 제67항 중 어느 한 항에 있어서, 항체 집단은 1갈락토실화된 N-글리칸 및 2갈락토실화된 N-글리칸 둘 모두를 포함하는 항체를 포함하는 것인 방법.

청구항 69

제60항 내지 제68항 중 어느 한 항에 있어서, 집단 형태의 항체의 35% 이상은 2갈락토실화된 N-글리칸을 포함하며, 집단 형태의 항체의 5% 이상은 1갈락토실화된 N-글리칸을 포함하는 것인 방법.

청구항 70

제39항 내지 제69항 중 어느 한 항에 있어서, 집단 형태의 항체는 동일한 항원 에피토프에 대하여 유도되는 것인 방법.

청구항 71

제39항 내지 제70항 중 어느 한 항에 있어서, 집단 형태의 항체는 항-CD20 항체인 방법.

청구항 72

제71항에 있어서, 집단 형태의 항체의 경쇄 및 중쇄는 서열 번호 1 및 서열 번호 2에 개시된 핵산 서열에 의해 코딩되는 것인 방법.

청구항 73

제1항 내지 제33항 중 어느 한 항의 항체 집단을 발현하는 유선 상피 세포.

청구항 74

제73항의 유선 상피 세포를 포함하는 인간외 트랜스제닉 포유류.

명세서

기술분야

[0001] 관련 출원

[0002] 본 출원은 2011년 8월 10일에 출원된 미국 가출원 제61/521,996호 및 2011년 12월 6일에 출원된 미국 가출원 제 61/567,364호의, 35 U.S.C. § 119 하에서의 이득을 청구하며, 상기 가출원 각각의 전체 내용은 본원에 참고로 포함된다.

[0003] 본 발명의 분야

[0004] 본 발명은 고도로 갈락토실화된 항체, 그 제조 방법에 관한 것이며, 이외에도 그 사용 방법에 관한 것이다.

배경기술

[0005] 치료 항체가 암을 비롯한 다수의 장애의 치료에 사용되고 있다. 그러나, 특성이 개선된 치료 항체가 필요하다.

발명의 내용

[0006] 일 측면에서, 본 발명은 고도로 갈락토실화된 항체 집단을 포함하는 조성물을 제공한다. 일부 실시양태에서, 항체는 트랜스제닉으로(transgenically) 생성되었다. 일부 실시양태에서, 고도로 갈락토실화된 항체는 또한 고도로 푸코실화된다. 일부 실시양태에서, 고도로 갈락토실화된 항체는 높은 보체 의존성 세포독성(complement dependent cytotoxicity; CDC) 활성 및 높은 항체 의존성 세포독성 (antibody-dependent cellular cytotoxicity; ADCC) 활성 둘 모두를 나타낸다. 일 측면에서, 본 발명은 고도로 갈락토실화된 항체 집단의 제조 방법을 제공한다.

- [0007] 일 측면에서, 본 발명은 고도로 갈락토실화된 항체 집단을 포함하는 조성물을 제공한다. 일부 실시양태에서, 집단 형태의 항체는 유선 상피 세포에서 트랜스제닉으로 생성된다. 일부 실시양태에서, 집단 형태의 항체는 동일한 항체 에피토프(epitope)에 대하여 유도된다.
- [0008] 일부 실시양태에서, 집단 형태의 항체는 동일한 핵산 서열에 의해 코딩된다. 일부 실시양태에서, 집단 형태의 항체의 갈락토실화 수준은 70% 이상이다. 일부 실시양태에서, 항체 집단은 1갈락토실화 N-글리칸을 포함하는 항체를 포함한다.
- [0009] 일 측면에서, 본 발명은 집단 형태의 항체의 갈락토실화 수준이 70% 이상이며, 항체 집단이 1갈락토실화 N-글리칸을 포함하는 항체를 포함하며, 집단 형태의 항체가 동일한 핵산 서열에 의해 코딩되는, 항체 집단을 포함하는 조성물을 제공한다.
- [0010] 본원에 제공된 조성물들 중 임의의 것의 일부 실시양태에서, 집단 형태의 항체의 갈락토실화 수준은 80% 이상이다. 본원에 제공된 조성물들 중 임의의 것의 일부 실시양태에서, 집단 형태의 항체의 갈락토실화 수준은 90% 이상이다. 본원에 제공된 조성물들 중 임의의 것의 일부 실시양태에서, 집단 형태의 항체의 푸코실화 수준은 80% 이상이다. 본원에 제공된 조성물들 중 임의의 것의 일부 실시양태에서, 집단 형태의 항체의 푸코실화 수준은 90% 이상이다.
- [0011] 일 측면에서, 본 발명은 집단 형태의 항체의 푸코실화 수준에 대한 집단 형태의 항체의 갈락토실화 수준의 비가 0.8 내지 1.2이며, 항체 집단은 1갈락토실화 N-글리칸을 포함하는 항체를 포함하며, 집단 형태의 항체는 동일한 핵산 서열에 의해 코딩되는, 항체 집단을 포함하는 조성물을 제공한다.
- [0012] 본원에 제공된 조성물들 중 임의의 것의 일부 실시양태에서, 항체 집단은 2갈락토실화 N-글리칸을 포함하는 항체를 포함한다. 본원에 제공된 조성물들 중 임의의 것의 일부 실시양태에서, 항체 집단은 1갈락토실화 N-글리칸 및 2갈락토실화 N-글리칸 둘 모두를 포함하는 항체를 포함한다. 본원에 제공된 조성물들 중 임의의 것의 일부 실시양태에서, 집단 형태의 항체 중 35% 이상은 2갈락토실화 N-글리칸을 포함하며, 집단 형태의 항체 중 5% 이상은 1갈락토실화 N-글리칸을 포함한다.
- [0013] 본원에 제공된 조성물들 중 임의의 것의 일부 실시양태에서, 집단 형태의 항체는 유선 상피 세포에서 트랜스제닉으로 생성된다. 본원에 제공된 조성물들 중 임의의 것의 일부 실시양태에서, 항체 집단은 항체를 발현하도록 조작된(engineered) 인간의 포유류의 유선 상피 세포에서 트랜스제닉으로 생성된다. 일부 실시양태에서, 인간의 포유류는 염소, 양, 들소, 낙타, 소, 돼지, 토끼, 물소, 말, 래트(rat), 마우스(mouse) 또는 라마이다. 일부 실시양태에서, 인간의 포유류는 염소이다.
- [0014] 본원에 제공된 조성물들 중 임의의 것의 일부 실시양태에서, 조성물은 밀크(milk)를 추가로 포함한다.
- [0015] 본원에 제공된 조성물들 중 임의의 것의 일부 실시양태에서, 항체 집단의 항체는 유선 상피 세포에서 생성되지 않은 항체 집단과 비교할 때 증가된 수준의 보체 의존성 세포독성(CDC) 활성을 갖는다. 일부 실시양태에서, 유선 상피 세포에서 생성되지 않은 항체 집단의 항체가 세포 배양으로 생성된다. 일부 실시양태에서, 유선 상피 세포에서 생성되지 않은 항체 집단의 항체는 저갈락토스 항체이다. 일부 실시양태에서, 저갈락토스 항체는 리투산(Rituxan)이다.
- [0016] 본원에 제공된 조성물들 중 임의의 것의 일부 실시양태에서, 항체 집단의 항체는 유선 상피 세포에서 생성되지 않은 항체 집단과 비교할 때 증가된 수준의 항체 의존성 세포독성(ADCC) 활성을 갖는다. 일부 실시양태에서, 유선 상피 세포에서 생성되지 않은 항체 집단의 항체가 세포 배양으로 생성된다. 일부 실시양태에서, 유선 상피 세포에서 생성되지 않은 항체 집단의 항체는 저갈락토스 항체이다. 일부 실시양태에서, 저갈락토스 항체는 리투산이다.
- [0017] 본원에 제공된 조성물들 중 임의의 것의 일부 실시양태에서, 집단 형태의 항체는 키메라 항체, 인간화 항체 또는 완전 인간 항체이다. 일부 실시양태에서, 집단 형태의 항체는 전장 항체이다. 일부 실시양태에서, 집단 형태의 항체는 중쇄 및 경쇄를 포함한다. 일부 실시양태에서, 집단 형태의 항체는 항-CD20 항체이다. 일부 실시양태에서, 집단 형태의 항체의 경쇄 및 중쇄는 서열 번호 1 및 서열 번호 2에 개시된 핵산 서열에 의해 코딩된다.
- [0018] 본원에 제공된 조성물들 중 임의의 것의 일부 실시양태에서, 조성물은 약학적으로 허용되는 담체를 추가로 포함한다.
- [0019] 일 측면에서, 본 발명은 본원에 제공된 조성물들 중 임의의 것을 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 대상체는 암을 갖는다. 일부 실시양태에서, 암은 B 세포 림프종

이다. 일부 실시양태에서, 대상체는 면역 장애를 갖는다.

- [0020] 일 측면에서, 본 발명은 고도로 갈락토실화된 항체 집단이 생성되도록 유선 상피 세포에서 항체 집단을 생성하는 단계를 포함하는, 고도로 갈락토실화된 항체 집단을 생성하는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 본 방법은 생성된 항체 집단을 수집하는 단계를 추가로 포함한다.
- [0021] 일 측면에서, 본 발명은 항체를 발현하도록 조작된 유선 상피 세포에서 생성된 고도로 갈락토실화된 항체 집단을 수집하는 단계를 포함하는, 고도로 갈락토실화된 항체 집단을 생성하는 방법을 제공한다.
- [0022] 본원에 제공된 방법들 중 임의의 것의 일부 실시양태에서, 본 방법은 항체 집단의 CDC 활성을 결정하는 단계를 추가로 포함한다.
- [0023] 본원에 제공된 방법들 중 임의의 것의 일부 실시양태에서, 본 방법은 항체 집단의 CDC 활성을 유선 상피 세포에서 생성되지 않은 항체 집단과 비교하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 유선 상피 세포에서 생성되지 않은 항체 집단의 항체는 세포 배양으로 생성된다.
- [0024] 본원에 제공된 방법들 중 임의의 것의 일부 실시양태에서, 본 방법은 항체 집단의 ADCC 활성을 측정하는 단계를 추가로 포함한다.
- [0025] 본원에 제공된 방법들 중 임의의 것의 일부 실시양태에서, 본 방법은 본 항체 집단의 ADCC 활성을 유선 상피 세포에서 생성되지 않은 항체 집단과 비교하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 유선 상피 세포에서 생성되지 않은 항체 집단의 항체는 세포 배양으로 생성된다.
- [0026] 본원에 제공된 방법들 중 임의의 것의 일부 실시양태에서, 본 방법은 항체 집단의 갈락토실화 수준을 측정하는 단계를 추가로 포함한다.
- [0027] 본원에 제공된 방법들 중 임의의 것의 일부 실시양태에서, 유선 상피 세포는 배양내(in culture) 있으며, 본 항체를 코딩하는 서열을 포함하는 핵산으로 형질감염된다.
- [0028] 본원에 제공된 방법들 중 임의의 것의 일부 실시양태에서, 유선 상피 세포는 유선에서 항체를 코딩하는 서열을 포함하는 핵산을 발현하도록 조작된 인간외 포유류 세포이다.
- [0029] 본원에 제공된 방법들 중 임의의 것의 일부 실시양태에서, 유선 상피 세포는 염소, 양, 들소, 낙타, 소, 돼지, 토끼, 물소, 말, 래트, 마우스 또는 라마 유선 상피 세포이다. 일부 실시양태에서, 유선 상피 세포는 염소 유선 상피 세포이다.
- [0030] 본원에 제공된 방법들 중 임의의 것의 일부 실시양태에서, 집단 형태의 항체의 갈락토실화 수준은 70% 이상이다. 일부 실시양태에서, 집단 형태의 항체의 갈락토실화 수준은 80% 이상이다. 일부 실시양태에서, 집단 형태의 항체의 갈락토실화 수준은 90% 이상이다.
- [0031] 본원에 제공된 방법들 중 임의의 것의 일부 실시양태에서, 집단 형태의 항체의 푸코실화 수준은 80% 이상이다. 일부 실시양태에서, 집단 형태의 항체의 푸코실화 수준은 90% 이상이다.
- [0032] 본원에 제공된 방법들 중 임의의 것의 일부 실시양태에서, 집단 형태의 항체의 푸코실화 수준에 대한 집단 형태의 항체의 갈락토실화 수준의 비는 0.8 내지 1.2이다.
- [0033] 본원에 제공된 방법들 중 임의의 것의 일부 실시양태에서, 항체 집단은 1갈락토실화 N-글리칸을 포함하는 항체를 포함한다.
- [0034] 본원에 제공된 방법들 중 임의의 것의 일부 실시양태에서, 항체 집단은 2갈락토실화 N-글리칸을 포함하는 항체를 포함한다.
- [0035] 본원에 제공된 방법들 중 임의의 것의 일부 실시양태에서, 항체 집단은 1갈락토실화 N-글리칸 및 2갈락토실화 N-글리칸 둘 모두를 포함하는 항체를 포함한다.
- [0036] 본원에 제공된 방법들 중 임의의 것의 일부 실시양태에서, 집단 형태의 항체 중 35% 이상은 2갈락토실화 N-글리칸을 포함하며, 집단 형태의 항체 중 5% 이상은 1갈락토실화 N-글리칸을 포함한다.
- [0037] 본원에 제공된 방법들 중 임의의 것의 일부 실시양태에서, 본 방법은 집단 형태의 항체의 갈락토실화 수준이 70% 이상이도록 항체 집단을 정제하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 본 방법은 집단 형태의 항체의 갈락토실화 수준이 80% 이상이도록 항체 집단을 정제하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 본

방법은 집단 형태의 항체의 갈락토실화 수준이 90% 이상이도록 항체 집단을 정제하는 단계를 추가로 포함한다.

- [0038] 본원에 제공된 방법들 중 임의의 것의 일부 실시양태에서, 본 방법은 집단 형태의 항체의 푸코실화 수준이 80% 이상이도록 항체 집단을 정제하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 본 방법은 집단 형태의 항체의 푸코실화 수준이 90% 이상이도록 항체 집단을 정제하는 단계를 추가로 포함한다.
- [0039] 본원에 제공된 방법들 중 임의의 것의 일부 실시양태에서, 본 방법은 집단 형태의 항체의 푸코실화 수준에 대한 집단 형태의 항체의 갈락토실화 수준의 비가 0.8 내지 1.2가 되도록 항체 집단을 정제하는 단계를 추가로 포함한다.
- [0040] 본원에 제공된 방법들 중 임의의 것의 일부 실시양태에서, 항체 집단은 1갈락토실화 N-글리칸을 포함하는 항체를 포함한다.
- [0041] 본원에 제공된 방법들 중 임의의 것의 일부 실시양태에서, 항체 집단은 2갈락토실화 N-글리칸을 포함하는 항체를 포함한다.
- [0042] 본원에 제공된 방법들 중 임의의 것의 일부 실시양태에서, 항체 집단은 1갈락토실화 N-글리칸 및 2갈락토실화 N-글리칸 둘 모두를 포함하는 항체를 포함한다.
- [0043] 본원에 제공된 방법들 중 임의의 것의 일부 실시양태에서, 집단 형태의 항체 중 35% 이상은 2갈락토실화 N-글리칸을 포함하며, 집단 형태의 항체 중 5% 이상은 1갈락토실화 N-글리칸을 포함한다.
- [0044] 본원에 제공된 방법들 중 임의의 것의 일부 실시양태에서, 집단 형태의 항체는 동일한 항원 에피토프에 대하여 유도된다.
- [0045] 본원에 제공된 방법들 중 임의의 것의 일부 실시양태에서, 집단 형태의 항체는 항-CD20 항체이다. 일부 실시양태에서, 집단 형태의 항체의 경쇄 및 중쇄는 서열 번호 1 및 서열 번호 2에 개시된 핵산 서열에 의해 코딩된다.
- [0046] 일 측면에서, 본 발명은 본원에 제공된 임의의 항체 집단을 발현하는 유선 상피 세포를 제공한다.
- [0047] 일 측면에서, 본 발명은 본원에 제공된 임의의 유선 상피 세포를 포함하는 인간의 트랜스제닉 포유류를 제공한다.
- [0048] 본 발명의 제한들 각각은 본 발명의 다양한 실시양태를 포함할 수 있다. 따라서, 요소들 중 임의의 하나의 요소 또는 요소들의 조합을 포함하는 본 발명의 제한들 각각은 본 발명의 각각의 측면에 포함될 수 있음이 예상된다. 본 발명은 그 응용에 있어서 하기 [발명을 실시하기 위한 구체적인 내용]에 개시되거나 도면에 도시된 구성 요소의 배열 및 구성의 상세 사항으로 한정되지 않는다. 본 발명은 다른 실시양태가 가능하며 다양한 방식으로 실시되거나 수행될 수 있다. 또한, 본원에서 사용되는 자구 및 용어는 설명의 목적을 위한 것이며, 한정하는 것으로 간주되지 않아야 한다.

도면의 간단한 설명

- [0049] 도 1은 Tg20의 경쇄(서열 번호 1; 도 1a) 및 중쇄(서열 번호 2; 도 2b)의 서열을 나타낸다.
- 도 2는 트랜스제닉 항-CD20 항체(TG20)의 생성을 위한 분자적 방법을 나타낸다.
- 도 3은 비환원 및 환원 조건 하에서, Tg20, 저 푸코스 기준 항체, 및 MW 표준물(Std)의 SDS-PAGE를 나타낸 것으로서, 이는 쿠마시 블루(Coomassie blue) 염색된 것(좌측 패널) 및 은 염색된 것(우측 패널)이고 겔보기 분자량은 kDa 단위이다.
- 도 4는 Tg20으로부터의 2-AB 표지 PNGase F-방출 N-글리칸의 NP-HPLC 프로파일을 나타낸다.
- 도 5는 Tg20의 크기 배제 프로파일을 나타낸다.
- 도 6은 전혈 분석의 실험 조건을 나타낸다.
- 도 7은 TG20 발현 염소의 생성 방법을 나타낸다.
- 도 8은 Tg20 및 리툭산(Rituxan)의 기능성의 비교를 나타낸다.
- 도 9는 Tg20 및 리툭산(RTX)의 ADCC/CD16 분석의 결과를 나타낸다.
- 도 10은 Tg20 및 rtx의 시노몰구스(cynomolgus) 원숭이에서의 약동학적 프로파일을 나타낸다.

도 11은 Tg20 및 RTX의 시노물구스 원숭이에서의 약리학적 활성을 나타낸다.

도 12a 및 도 12b는 혈액 중 잔류 B 림프구(CD45+/CD3-/CD40+)의 백분율의 개개의 동력학적 특성을 나타낸다.

도 13은 모든 연구 동물에 있어서 혈액 중 잔류 B 림프구(CD45+/CD3-/CD40+)의 평균 백분율의 동력학적 특성을 나타낸다.

도 14는 단지 회복 동물에 있어서 혈액 중 잔류 B 림프구(CD45+/CD3-/CD40+)의 평균 백분율의 동력학적 특성을 나타낸다.

도 15는 림프절 중 B 림프구(CD45+/CD3-/CD40+)의 상대적인 백분율의 개개의 동력학적 특성을 나타낸다.

도 16은 모든 연구 동물에 있어서 림프절 중 B 림프구(CD45+/CD3-/CD40+)의 평균적인 상대적인 백분율의 동력학적 특성을 나타낸다.

도 17은 대조군 평균과 비교할 때 림프절 중 B 림프구(CD45+/CD3-/CD40+)의 잔류 백분율의 개개의 동력학적 특성을 나타낸다.

도 18은 대조군 평균과 비교할 때 모든 연구 동물에 있어서 림프절 중 B 림프구(CD45+/CD3-/CD40+)의 평균 잔류 백분율의 동력학적 특성을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0050] 일 측면에서, 본 발명은 고도로 갈락토실화된 항체 집단의 조성물을 제공한다. 일부 실시양태에서, 항체는 트랜스제닉으로 생성되었다. 일부 실시양태에서, 고도로 갈락토실화된 항체는 또한 고도로 푸코실화된다. 일부 실시양태에서, 고도로 갈락토실화된 항체는 높은 보체 의존성 세포독성(CDC) 활성 및 높은 항체 의존성 세포독성(ADCC) 활성 둘 모두를 나타낸다. 일 측면에서, 본 발명은 고도로 갈락토실화된 항체 집단의 생성 방법을 제공한다.

[0051] 글리코실화

[0052] 일 측면에서, 본 발명은 고도로 갈락토실화된 항체 집단의 조성물을 제공한다. 일부 실시양태에서, 고도로 갈락토실화된 항체 집단은 유선 상피 세포에서 트랜스제닉으로 생성된다. 일부 실시양태에서, 항체 집단 형태의 항체는 동일한 항원 에피토프에 대하여 유도된다. 일부 실시양태에서, 항체 집단 형태의 항체는 동일한 핵산 서열에 의해 코딩된다.

[0053] 일 측면에서, 본 발명은 고도로 갈락토실화된 항체 집단을 포함하는 조성물을 제공하며, 여기서, 항체 집단은 1 갈락토실화 N-글리칸을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체 집단은 트랜스제닉으로 생성된다. 일부 실시양태에서, 항체 집단 형태의 항체는 동일한 핵산 서열에 의해 코딩된다.

[0054] 항체는 Fc-감마 글리코실화 부위(Fc 영역의 Asn 297)에서 글리코실화될 수 있다. 다양한 글리코실화 패턴이 Fc 감마 글리코실화 부위에서 관찰되었으며, 이 부위에서 발견된 올리고당류는 갈락토스, N-아세틸글루코사민(GlcNAc), 만노스, 시알산 또는 N-아세틸뉴라민산(NeuAc) 및 푸코스를 포함한다. 이들 부위에서 발견되는 올리고당류(N-글리칸) 모두는 공통 코어 구조를 갖는데, 상기 구조는 N-아세틸글루코사민(GlcNAc)이 아스파라긴에 부착된 것으로 이루어지고, 이것에 제2 GlcNAc 및 3개의 만노스가 부착되어 있다. 이 코어는 다수의 상이한 글리칸 모티프를 지닐 수 있다. 혈장 단백질의 N-글리칸의 가장 일반적인 유형은 복합 유형이다. 이러한 N-글리칸 유형에 대한 생합성 경로에서, 몇몇 GlcNAc 트랜스퍼라아제는 GlcNAc 잔기를 글리칸 코어의 만노스에 부착시키는데, 이는 갈락토스, 시알산 및 푸코스 잔기에 의해 추가로 연장될 수 있다. N-글리칸의 또 다른 군으로는 고만노스 당단백질이 있으며, 이는 많은 수(5개 이상)의 만노스가 제2 GlcNAc에 부착된 것을 특징으로 한다. 비안테나리 아암(biantennary arm)들 중 하나가 만노스 치환되는 반면 다른 하나의 아암은 복합적인 하이브리드(hybrid) 구조도 발견되었다. 푸코스 잔기는 일반적으로 비안테나리 구조의 "아암"에서 발견되지 않지만 N-결합된 GlcNAc에 부착된다.

[0055] N-글리칸의 생합성은 단백질의 경우에서와 같이 주형에 의해 조절되는 것은 아니지만, 주로 세포 내의 특정 글리코실트랜스퍼라아제의 발현 및 활성에 의존적이다. 따라서, 당단백질, 예컨대 항체 Fc 도메인은 보통은 동일한 단백질 골격 상에 상이한 글리칸들을 지니는 글리코형의 불균질한 집단으로 존재한다.

[0056] 글리코실화 패턴은 당업계의 공지된 많은 방법에 의해 결정될 수 있다. 예를 들어, 단백질 상의 탄수화물의 분석 방법은 미국 특허 출원 제2006/0057638호 및 미국 특허 출원 제2006/0127950호에 기술되었다. 단백질 상의

탄수화물의 분석 방법은 본원에 참고로 포함된다.

[0057] 고도로 갈락토실화된 항체 집단은 집단 형태의 항체의 갈락토실화 수준이 50% 이상, 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 90% 이상, 100% 이하의 갈락토실화이다. 고도로 갈락토실화된 항체 집단의 일부 실시양태에서, 집단 형태의 항체의 갈락토실화 수준은 70% 이상이다.

[0058] 본원에서 사용되는 갈락토실화 수준은 하기 식에 의해 결정된다:

$$\frac{\sum_{i=1}^n (\text{Gal의 수}) * (\text{상대적인 면적}(\%))}{\sum_{i=1}^n (\text{A의 수}) * (\text{상대적인 면적}(\%))} * 100$$

[0059]

[0060] 상기 식에서,

[0061] - n은 정상상 고성능 액체 크로마토그래피(Normal-Phase High Performance Liquid Chromatography; NP HPLC) 스펙트럼과 같은 크로마토그램의 분석된 N-글리칸 피크의 수를 나타내며,

[0062] - "Gal의 수"는 피크에 상응하는 글리칸의 안테나 상의 갈락토스 모티프의 수를 나타내며,

[0063] - "A의 수"는 피크에 상응하는 글리칸 형태의 N-아세틸글루코사민 안테나의 수에 상응하며,

[0064] - "상대적인 면적(%)"는 상응하는 피크 하의 면적의 %에 상응한다.

[0065] 따라서, 집단 형태의 항체의 갈락토실화의 수준의 수준은 항체로부터의 N-글리칸의 방출, 크로마토그램 상에서의 N-글리칸의 해상, 특정 피크에 상응하는 N-글리칸의 식별, 피크 강도의 결정 및 상기에 제공된 식에 데이터의 적용에 의해 결정될 수 있다(본원에 제공된 실험 섹션을 또한 참조).

[0066] 갈락토실화된 항체는 하나 이상의 갈락토스 단당을 갖는 임의의 항체를 포함한다. 그러한 항체는 "안테나"의 둘 모두의 아암들 상에 복합 글리칸 모티프를 갖는 항체 및 복합 글리칸 모티프를 갖는 단지 하나의 아암을 갖는 항체 둘 모두를 포함한다. 하나 이상의 갈락토스 단당을 포함하는 항체는 N-글리칸을 갖는 항체, 예컨대 G1(하나의 갈락토스), G1F(하나의 갈락토스, 하나의 푸코스), G2(2개의 갈락토스) 및 G2F(2개의 갈락토스, 하나의 푸코스)를 포함한다. 게다가, 하나 이상의 갈락토스 단당을 포함하는 N-글리칸은 시알릴화될 수 있거나 시알릴화되지 않을 수 있다.

[0067] 고도로 갈락토실화된 항체 집단의 일부 실시양태에서, 상기 집단은 시알릴화될 수 있거나 시알릴화되지 않을 수 있는 1갈락토실화 N-글리칸을 포함하는, 그리고 전적으로 또는 부분적으로 A2G1F 형태에 상응하는 항체를 포함한다. 고도로 갈락토실화된 항체 집단의 일부 실시양태에서, 항체 N-글리칸의 1% 이상, 5% 이상, 10% 이상, 15% 이상, 20% 이상, 25% 이상, 30% 이상, 40% 이상, 50% 이상, 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 90% 이상, 100% 이하가 1갈락토실화 N-글리칸을 포함한다. 고도로 갈락토실화된 항체 집단의 일부 실시양태에서, 항체의 5% 이상이 1갈락토실화 N-글리칸을 포함한다.

[0068] 고도로 갈락토실화된 항체 집단의 일부 실시양태에서, 상기 집단은 시알릴화될 수 있거나 시알릴화되지 않을 수 있는 1갈락토실화 N-글리칸을 포함하는 그리고 전적으로 또는 부분적으로 A2G1F 형태에 상응하는 항체, 및 시알릴화될 수 있거나 시알릴화되지 않을 수 있는 2갈락토실화 N-글리칸을 포함하는 그리고 전적으로 또는 부분적으로 A2G2F 형태에 상응하는 항체를 포함한다. 고도로 갈락토실화된 항체 집단의 일부 실시양태에서, 항체 N-글리칸의 1% 이상, 5% 이상, 10% 이상, 15% 이상, 20% 이상, 25% 이상, 30% 이상, 40% 이상, 50% 이상, 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 90% 이상, 99% 이하가 1갈락토실화 N-글리칸을 포함하며, 항체 N-글리칸의 1% 이상, 5% 이상, 10% 이상, 15% 이상, 20% 이상, 25% 이상, 30% 이상, 40% 이상, 50% 이상, 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 90% 이상, 99% 이하가 2갈락토실화 N-글리칸을 포함한다. 고도로 갈락토실화된 항체 N-글리칸의 집단의 일부 실시양태에서, 항체 N-글리칸의 5% 이상이 1갈락토실화 N-글리칸을 포함하며, 항체의 35% 이상이 2갈락토실화 N-글리칸을 포함한다.

[0069] 고도로 갈락토실화된 항체 집단의 일부 실시양태에서, 상기 집단은 고도로 푸코실화된 항체를 포함한다. 고도로 푸코실화된 항체 집단은 상기 집단 형태의 항체의 N-글리칸의 푸코실화 수준이 50% 이상, 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 90% 이상, 100% 이하의 푸코실화된 항체 집단이다. 일부 실시양태에서, 고도로 갈락토실화된 항체 집단에서, 항체 N-글리칸의 푸코실화 수준은 80% 이상이다.

[0070] 본원에 사용되는 푸코실화 수준은 하기 식으로 결정된다:

$$[0071] \sum_{n=1}^m (\text{푸코스의 수}) * (\text{상대적인 면적}(\%))$$

[0072] 상기 식에서,

[0073] - n은 정상상 고성능 액체 크로마토그래피(NP HPLC) 스펙트럼과 같은 크로마토그램의 분석된 N-글리칸 피크의 수를 나타내며,

[0074] - "푸코스의 수"는 피크에 상응하는 글리칸 상의 푸코스 모티프의 수를 나타내며,

[0075] - "상대적인 면적(%)"는 푸코스 모티프를 포함하는 상응하는 피크 하의 면적의 %에 상응한다.

[0076] 푸코실화된 항체는 그의 N-글리칸 상에 하나 이상의 푸코스 단당을 갖는 임의의 항체를 포함한다.

[0077] 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 항체 집단은 집단 형태의 항체의 N-글리칸의 갈락토실화 수준이 50% 이상이며 집단 형태의 항체의 푸코실화 수준이 50% 이상인 집단에 관한 것이다. 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 항체 집단은 집단 형태의 항체의 N-글리칸의 갈락토실화 수준이 50% 이상이며 집단 형태의 항체의 N-글리칸의 푸코실화 수준이 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 90% 이상, 100% 이하인 집단에 관한 것이다. 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 항체 집단은 집단 형태의 항체의 N-글리칸의 갈락토실화 수준이 60% 이상이며 집단 형태의 항체의 N-글리칸의 푸코실화 수준이 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 90% 이상, 100% 이하인 집단에 관한 것이다. 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 항체 집단은 집단 형태의 항체의 N-글리칸의 갈락토실화 수준이 70% 이상이며 집단 형태의 항체의 N-글리칸의 푸코실화 수준이 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 90% 이상, 100% 이하인 집단에 관한 것이다. 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 항체 집단은 집단 형태의 항체의 N-글리칸의 갈락토실화 수준이 80% 이상이며 집단 형태의 항체의 N-글리칸의 푸코실화 수준이 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 90% 이상, 100% 이하인 집단에 관한 것이다. 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 항체 집단은 집단 형태의 항체의 N-글리칸의 갈락토실화 수준이 90% 이상이며 집단 형태의 항체의 N-글리칸의 푸코실화 수준이 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 90% 이상, 100% 이하인 집단에 관한 것이다. 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 항체 집단은 집단 형태의 항체의 N-글리칸의 갈락토실화 수준이 100% 이하이며 집단 형태의 항체의 N-글리칸의 푸코실화 수준이 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 90% 이상, 100% 이하인 집단에 관한 것이다.

[0078] 일 측면에서, 본 발명은 Fc-감마 글리코실화 부위에서 푸코실화된 집단 형태의 항체의 N-글리칸의 백분율에 대한 Fc-감마 글리코실화 부위에서 갈락토실화된 집단 형태의 항체의 N-글리칸의 백분율의 특정한 비를 갖는 항체 집단을 포함하는 조성물에 관한 것이다. 일부 실시양태에서, 본 발명은 집단 형태의 항체의 N-글리칸의 푸코실화 수준에 대한 집단 형태의 항체의 N-글리칸의 갈락토실화 수준의 비가 특정한 비를 갖는 항체 집단을 포함하는 조성물에 관한 것이다. 일부 실시양태에서, 항체 집단은 시알릴화될 수 있거나 시알릴화되지 않을 수 있는 1 갈락토실화 N-글리칸을 포함하는 그리고 전적으로 또는 부분적으로 A2G1F 형태에 상응하는 항체의 N-글리칸을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체 집단 형태의 항체는 동일한 항원 에피토프에 대하여 유도된다. 일부 실시양태에서, 항체 집단 형태의 항체는 동일한 핵산 서열에 의해 코딩된다. 일부 실시양태에서, 본 발명은 집단 형태의 항체의 N-글리칸의 푸코실화 수준에 대한 집단 형태의 항체의 N-글리칸의 갈락토실화 수준의 비가 0.5 내지 2, 0.6 내지 1.8, 0.7 내지 1.5, 0.8 내지 1.2, 또는 0.9 내지 1.1인 항체 집단을 포함하는 조성물에 관한 것이다. 일부 실시양태에서, 본 발명은 집단 형태의 항체의 N-글리칸의 푸코실화 수준에 대한 집단 형태의 항체의 N-글리칸의 갈락토실화 수준의 비가 0.8 내지 1.2, 예를 들어 1인 항체 집단을 포함하는 조성물에 관한 것이다.

[0079] *고도로 갈락토실화된 항체의 생성*

[0080] 일 측면에서, 본 발명은 고도로 갈락토실화된 항체 집단을 포함하는 조성물을 제공한다. 일부 실시양태에서, 고도로 갈락토실화된 항체 집단은 트랜스제닉으로 생성된다. 일부 실시양태에서, 항체 집단은 세포 배양으로 생성된다. 일부 실시양태에서, 세포 배양물은 예를 들어 갈락토실트랜스퍼라아제를 세포 배양물에 첨가하거나 유전 물질에 의해 세포에 첨가함으로써 항체 갈락토실화의 양을 증가시키도록 변형되었는데, 이는 갈락토실트랜스퍼라아제의 생성을 증가시킨다. 일부 실시양태에서, 항체 집단은 세포 배양으로 생성되며, 후속적으로 테스트관내에서의 생화학 반응에 의해 변형되어 (추가) 갈락토스를 부착시킨다.

[0081] 일부 실시양태에서, 고도로 갈락토실화된 항체 집단은 트랜스제닉으로 생성된다. 일부 실시양태에서, 항체 집단은 유선 상피 세포에서 생성된다. 일부 실시양태에서, 항체 집단은 항체를 발현하도록 조작된 인간의 포유류의 유선 상피 세포에서 생성된다. 일부 실시양태에서, 인간의 포유류는 염소, 양, 들소, 낙타, 소, 돼지, 토끼, 물

소, 말, 래트, 마우스 또는 라마이다. 일부 실시양태에서, 인간의 포유류는 염소이다. 일부 실시양태에서, 고도로 갈락토실화된 항체 집단을 포함하는 조성물은 밀크를 추가로 포함한다.

- [0082] 본원에 개시된 방법에 따라 트랜스제닉으로 생성된 항체 집단은 고도로 갈락토실화되며 고도로 푸코실화된다. 본 기술분야는 고 만노스 항체 / 저 푸코스 항체가 트랜스제닉으로 생성되었다는 것을 제공한다 (예를 들어, 국제 특허 공개 제WO 2007/048077호 참조).
- [0083] CDC 활성
- [0084] 일 측면에서, 고도로 갈락토실화된 항체 집단을 포함하는 조성물은 높은 보체 의존성 세포독성(CDC) 활성을 갖는다. 일 측면에서, 고도로 갈락토실화된 항체 집단을 포함하는 조성물은 높은 항체 의존성 세포독성(ADCC) 활성을 갖는다. 일부 실시양태에서, 고도로 갈락토실화된 항체 집단을 포함하는 조성물은 높은 보체 의존성 세포독성(CDC) 활성을 가지며 높은 항체 의존성 세포독성(ADCC) 활성을 갖는다.
- [0085] 일부 실시양태에서, 고도로 갈락토실화된 항체 집단은 저 갈락토스인 항체 집단과 비교할 때 증가된 수준의 보체 의존성 세포독성(CDC) 활성을 갖는다. 일부 실시양태에서, 고도로 갈락토실화된 항체 집단 및 저 갈락토스인 항체 집단은 동일한 항원 에피토프에 대하여 유도된다. 일부 실시양태에서, 고도로 갈락토실화된 항체 집단 및 저 갈락토스인 항체 집단은 동일한 핵산에 의해 코딩된다.
- [0086] 본원에서 사용될 때, 저 갈락토스인 항체 집단은 집단 형태의 항체의 갈락토실화 수준이 50% 미만, 40% 미만, 30% 미만, 20% 미만, 10% 미만에서 0%까지인 항체 집단을 나타낸다.
- [0087] 일부 실시양태에서, 고도로 갈락토실화된 항체 집단의 CDC 활성은 저 갈락토스인 항체 집단과 비교할 때 1.1배 이상 더 높으며, 1.2배 이상 더 높으며, 1.3배 이상 더 높으며, 1.4배 이상 더 높으며, 1.5배 이상 더 높으며, 1.6배 이상 더 높으며, 1.7배 이상 더 높으며, 1.8배 이상 더 높으며, 1.9배 이상 더 높으며, 2배 이상 더 높으며, 3배 이상 더 높으며, 5배 이상 더 높으며, 10배 이상 더 높으며, 100배 이하로 더 높거나 또는 그보다 더 많이 더 높다. 일부 실시양태에서, 고도로 갈락토실화된 항체 집단의 CDC 활성은 저 갈락토스인 항체 집단과 비교할 때 1.5배 이상 더 높다. 일부 실시양태에서, 고도로 갈락토실화된 항체 집단의 CDC 활성은 저 갈락토스인 항체 집단과 비교할 때 3배 이상 더 높다.
- [0088] 일부 실시양태에서, 고도로 갈락토실화된 항체 집단은 고도로 푸코실화된다. 일부 실시양태에서, 고도로 갈락토실화되고 고도로 푸코실화된 항체 집단은 저 갈락토스 및 저 푸코스인 항체 집단과 비교할 때 증가된 수준의 보체 의존성 세포독성(CDC) 활성을 갖는다. 일부 실시양태에서, 고도로 갈락토실화되고 고도로 푸코실화된 항체 집단 및 저 갈락토스이면서 저 푸코스인 항체 집단은 동일한 항원 에피토프에 대하여 유도된다. 일부 실시양태에서, 고도로 갈락토실화되고 고도로 푸코실화된 항체 집단 및 저 갈락토스이면서 저 푸코스인 항체 집단은 동일한 핵산에 의해 코딩된다.
- [0089] 본원에서 사용될 때, 저 푸코스인 항체 집단은 집단 형태의 항체의 푸코실화 수준이 50% 미만, 40% 미만, 30% 미만, 20% 미만, 10% 미만에서 0%까지인 항체 집단을 나타낸다.
- [0090] 일부 실시양태에서, 고도로 갈락토실화되고 고도로 푸코실화된 항체 집단의 CDC 활성은 저 갈락토스이면서 저 푸코스인 항체 집단과 비교할 때 1.1배 이상 더 높으며, 1.2배 이상 더 높으며, 1.3배 이상 더 높으며, 1.4배 이상 더 높으며, 1.5배 이상 더 높으며, 1.6배 이상 더 높으며, 1.7배 이상 더 높으며, 1.8배 이상 더 높으며, 1.9배 이상 더 높으며, 2배 이상 더 높으며, 3배 이상 더 높으며, 5배 이상 더 높으며, 10배 이상 더 높으며, 100배 이하로 더 높거나 또는 그보다 더 많이 더 높다. 일부 실시양태에서, 고도로 갈락토실화되고 고도로 푸코실화된 항체 집단의 CDC 활성은 저 갈락토스이면서 저 푸코스인 항체 집단과 비교할 때 1.5배 이상 더 높다. 일부 실시양태에서, 고도로 갈락토실화되고 고도로 푸코실화된 항체 집단의 CDC 활성은 저 갈락토스이면서 저 푸코스인 항체 집단과 비교할 때 3배 이상 더 높다.
- [0091] 일부 실시양태에서, 고도로 갈락토실화되고 유선 상피 세포에서 생성된 항체 집단은 유선 상피 세포에서 생성되지 않은 항체 집단과 비교할 때 증가된 수준의 보체 의존성 세포독성(CDC) 활성을 갖는다. 일부 실시양태에서, 유선 상피 세포에서 생성되지 않은 항체 집단은 세포 배양으로 생성된다. 일부 실시양태에서, 세포 배양으로 생성된 항체 집단은 리톡산이다. 일부 실시양태에서, 유선 상피 세포에서 생성된, 고도로 갈락토실화된 항체 집단, 및 유선 상피 세포에서 생성되지 않은 항체 집단은 동일한 핵산에 의해 코딩될 수 있다.
- [0092] 일부 실시양태에서, 고도로 갈락토실화되고 유선 상피 세포에서 생성된 항체 집단의 CDC 활성은 유선 상피 세포에서 생성되지 않은 항체 집단과 비교할 때 1.1배 이상 더 높으며, 1.2배 이상 더 높으며, 1.3배 이상 더 높으며,

며, 1.4배 이상 더 높으며, 1.5배 이상 더 높으며, 1.6배 이상 더 높으며, 1.7배 이상 더 높으며, 1.8배 이상 더 높으며, 1.9배 이상 더 높으며, 2배 이상 더 높으며, 3배 이상 더 높으며, 5배 이상 더 높으며, 10배 이상 더 높으며, 100배 이하로 더 높거나 또는 그보다 더 많이 더 높다. 일부 실시양태에서, 고도로 갈락토실화되고 유선 상피 세포에서 생성된 항체 집단의 CDC 활성은 유선 상피 세포에서 생성되지 않은 항체 집단과 비교할 때 1.5배 이상 더 높다. 일부 실시양태에서, 고도로 갈락토실화되고 유선 상피 세포에서 생성된 항체 집단의 CDC 활성은 유선 상피 세포에서 생성되지 않은 항체 집단과 비교할 때 3배 이상 더 높다.

[0093] 일 측면에서, 본원에 개시된 항체 집단의 조성물은 높은 (보체 의존성 세포독성) CDC 활성을 갖는다. 항체는 다양한 기작들을 통하여 치료제로서 작용할 수 있으며, 상기 기작들 중 하나는 CDC 활성을 통한 것이다. 표적 세포 수용체(예컨대 CD20)에 결합하는 일부 치료 항체는 보체 경로의 단백질에 또한 결합할 수 있다. 보체 단백질의 결합은 치료 항체가 결합하는 세포의 사멸 및 세포 용해를 야기하는 "막 공격 복합체"를 마침내 생성하는 보체 캐스케이드(cascade)(C1-복합체 활성화를 통하여)를 생성한다 (예를 들어, 문헌[Reff M. E. *Blood* 1994, 83: 435] 참조). 적어도 부분적으로, CDC 활성의 유도를 통하여 치료 효과를 발휘하는 것으로 생각되는 치료 항체의 하나의 예로는 리툭시맙(Rituximab)(리툭산)이 있으며, 이는 CD20(이는 특정 림프종 세포 상에서 과다발현됨)에 결합할 수 있다.

[0094] 일부 실시양태에서, 증가된 수준의 보체 의존성 세포독성(CDC) 활성을 갖는 항체 집단은 증가된 수준의 보체 의존성 세포독성(CDC) 활성을 갖지 않는 항체 집단과 비교할 때 더 많은 양의 세포 용해를 유도하는 항체 집단이다. CDC의 수준을 측정하는 방법은 당업계에 공지되어 있으며, 흔히 세포 용해의 양의 측정을 기반으로 한다. CDC 활성을 측정하기 위한 상업적 키트는 예를 들어 겐스크립트(Genscript)(미국 뉴저지주 피스카타웨이 소재)로부터 구매될 수 있다.

[0095] *ADCC 활성*

[0096] 일 측면에서, 고도로 갈락토실화된 항체 집단을 포함하는 조성물은 높은 보체 의존성 세포독성(CDC) 활성을 갖는다. 일 측면에서, 고도로 갈락토실화된 항체 집단을 포함하는 조성물은 높은 항체 의존성 세포독성(ADCC) 활성을 갖는다. 일부 실시양태에서, 고도로 갈락토실화된 항체 집단을 포함하는 조성물은 높은 보체 의존성 세포독성(CDC) 활성을 가지며 높은 항체 의존성 세포독성(ADCC) 활성을 갖는다.

[0097] 일부 실시양태에서, 고도로 갈락토실화된 항체 집단은 저 갈락토스인 항체 집단과 비교할 때 증가된 수준의 항체 의존성 세포독성(ADCC)을 갖는다. 일부 실시양태에서, 고도로 갈락토실화된 항체 집단의 ADCC 활성은 저 갈락토스인 항체 집단과 비교할 때 1.1배 이상 더 높으며, 1.2배 이상 더 높으며, 1.3배 이상 더 높으며, 1.4배 이상 더 높으며, 1.5배 이상 더 높으며, 1.6배 이상 더 높으며, 1.7배 이상 더 높으며, 1.8배 이상 더 높으며, 1.9배 이상 더 높으며, 2배 이상 더 높으며, 3배 이상 더 높으며, 5배 이상 더 높으며, 10배 이상 더 높으며, 100배 이하로 더 높거나 또는 그보다 더 많이 더 높다. 일부 실시양태에서, 고도로 갈락토실화된 항체 집단의 ADCC 활성은 저 갈락토스인 항체 집단과 비교할 때 2배 이상 더 높다. 일부 실시양태에서, 고도로 갈락토실화된 항체 집단의 ADCC 활성은 저 갈락토스인 항체 집단과 비교할 때 5배 이상 더 높다.

[0098] 일부 실시양태에서, 고도로 갈락토실화되고 유선 상피 세포에서 생성된 항체 집단은 유선 상피 세포에서 생성되지 않은 항체 집단과 비교할 때 증가된 수준의 항체 의존성 세포독성(ADCC)을 갖는다. 일부 실시양태에서, 고도로 갈락토실화되고 유선 상피 세포에서 생성된 항체 집단의 ADCC 활성은 유선 상피 세포에서 생성되지 않은 항체 집단과 비교할 때 1.1배 이상 더 높으며, 1.2배 이상 더 높으며, 1.3배 이상 더 높으며, 1.4배 이상 더 높으며, 1.5배 이상 더 높으며, 1.6배 이상 더 높으며, 1.7배 이상 더 높으며, 1.8배 이상 더 높으며, 1.9배 이상 더 높으며, 2배 이상 더 높으며, 3배 이상 더 높으며, 5배 이상 더 높으며, 10배 이상 더 높으며, 100배 이하로 더 높거나 또는 그보다 더 많이 더 높다. 일부 실시양태에서, 고도로 갈락토실화되고 유선 상피 세포에서 생성된 항체 집단의 ADCC 활성은 유선 상피 세포에서 생성되지 않은 항체 집단과 비교할 때 2배 이상 더 높다. 일부 실시양태에서, 고도로 갈락토실화되고 유선 상피 세포에서 생성된 항체 집단의 ADCC 활성은 유선 상피 세포에서 생성되지 않은 항체 집단과 비교할 때 5배 이상 더 높다.

[0099] 일부 실시양태에서, 고도로 갈락토실화되고 유선 상피 세포에서 생성된 항체 집단은 유선 상피 세포에서 생성되지 않은 항체 집단과 비교할 때 증가된 수준의 항체 의존성 세포독성(ADCC)을 갖는다. 일부 실시양태에서, 유선 상피 세포에서 생성되지 않는 항체 집단은 세포 배양으로 생성된다. 일부 실시양태에서, 세포 배양으로 생성된 항체 집단은 리툭산이다.

[0100] 일부 실시양태에서, 고도로 갈락토실화된 항체 집단은 고도로 푸코실화된다. 일부 실시양태에서, 고도로 갈락토

실화되고 고도로 푸코실화된 항체 집단은 저 갈락토스이면서 저 푸코스인 항체 집단의, 유의한 백분율의 항체 의존성 세포독성(ADCC) 활성을 갖는다. 일부 실시양태에서, 고도로 갈락토실화되고 고도로 푸코실화된 항체 집단의 ADCC 활성은 저 갈락토스이면서 저 푸코스인 항체 집단과 비교할 때 10% 이상, 20% 이상, 30% 이상, 40% 이상, 50% 이상, 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 90% 이상, 최대 100% 또는 그보다 더 크다. 일부 실시양태에서, 고도로 갈락토실화되고 고도로 푸코실화된 항체 집단의 ADCC 활성은 저 갈락토스이면서 저 푸코스인 항체 집단과 비교할 때 40% 이상이다.

[0101] 일부 실시양태에서, 갈락토실화되고 유선 상피 세포에서 생성된 항체 집단은 유선 상피 세포에서 생성되지 않은 항체 집단의 유의한 백분율의 항체 의존성 세포독성(ADCC) 활성을 갖는다. 일부 실시양태에서, 유선 상피 세포에서 생성된, 고도로 갈락토실화된 항체 집단 및 유선 상피 세포에서 생성되지 않은 항체 집단은 동일한 핵산에 의해 코딩될 수 있다. 일부 실시양태에서, 유선 상피 세포에서 생성되지 않은 항체 집단은 세포 배양으로 생성된다. 일부 실시양태에서, 고도로 갈락토실화되고 유선 상피 세포에서 생성된 항체 집단의 ADCC 활성은 유선 상피 세포에서 생성되지 않은 항체 집단과 비교할 때, 10% 이상, 20% 이상, 30% 이상, 40% 이상, 50% 이상, 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 90% 이상, 최대 100% 또는 그보다 더 크다. 일부 실시양태에서, 고도로 갈락토실화되고 유선 상피 세포에서 생성된 항체 집단의 ADCC 활성은 유선 상피 세포에서 생성되지 않은 항체 집단과 비교할 때 40% 이상이다.

[0102] 일 측면에서, 본원에 개시된 항체 집단의 조성물은 높은 ADCC 활성을 갖는다. 항체는 다양한 기작들을 통하여 치료제로서 작용할 수 있으며, 상기 기작들 중 하나는 ADCC 활성을 통한 것이다. 표적 세포 상의 세포 수용체(예컨대 CD20)에 결합하고, Fc 글리코실화 부위를 포함하는 치료 항체는 또한 Fc 수용체(예컨대 CD16)에 결합할 수 있으며, 이는 Fc 수용체를 발현하는 세포가 표적 세포에 고착되게 한다. 일반적으로 항체의 Fc 영역의 결합 친화성은 Fc 글리코실화 부위의 글리코실화 성질에 의존적이다. Fc 수용체는 자연 살해 세포, 대식 세포, 호중구 및 비만 세포를 비롯한 다수의 면역 세포 상에서 발견된다. Fc 수용체에의 결합은 표적 세포를 살해하기 위한 식작용 및 사이토카인(예컨대 IL-2)을 유도하는 면역 세포를 생성한다. 일부 실시양태에서, 증가된 수준의 항체 의존성 세포독성(ADCC) 활성을 갖는 항체 집단은 증가된 수준의 항체 의존성 세포독성(ADCC) 활성을 갖지 않는 항체 집단과 비교할 때 CD16을 발현하는 세포에 대하여 증가된 결합성을 나타내는 항체 집단이다. 일부 실시양태에서, 증가된 수준의 항체 의존성 세포독성(ADCC) 활성을 갖는 항체 집단은 증가된 수준의 항체 의존성 세포독성(ADCC) 활성을 갖지 않는 세포의 집단과 비교할 때 (예를 들어 자연 살해 세포에서) IL-2 생성의 유도 증가를 나타내는 항체 집단이다. ADCC 활성을 측정하기 위한 상업적 키트는 예를 들어 쟈스크림프(미국 뉴저지 주 피스카타웨이 소재) 및 프로메가(Promega)(미국 위스콘신주 매디슨 소재)로부터 구매될 수 있다.

[0103] *B-세포 제거*

[0104] 일 측면에서, 고도로 갈락토실화된 항체 집단을 포함하는 조성물은 높은 보체 의존성 세포독성(CDC) 활성을 갖는다. 일 측면에서, 고도로 갈락토실화된 항체 집단을 포함하는 조성물은 높은 항체 의존성 세포독성(ADCC) 활성을 갖는다. 일부 실시양태에서, 고도로 갈락토실화된 항체 집단을 포함하는 조성물은 높은 보체 의존성 세포독성(CDC) 활성을 가지며 높은 항체 의존성 세포독성(ADCC) 활성을 갖는다. 일부 실시양태에서, 고도로 갈락토실화된 항체 집단을 포함하는 조성물은 (예를 들어, 혈액 샘플에서 또는 대상체에서) B 세포 제거를 유도하는 능력이 강하다. 일부 실시양태에서, 고도로 갈락토실화되고 B 세포 제거를 유도하는 능력이 강한 항체 집단의 항체는 항-CD20 항체이다.

[0105] *항체*

[0106] 일 측면에서, 본 발명은 고도로 갈락토실화된 항체 집단을 제공한다. 일부 실시양태에서, 고도로 갈락토실화된 항체 집단은 트랜스제닉으로 생성된다. 일부 실시양태에서, 집단 형태의 항체는 키메라 항체, 인간화 항체 또는 완전 인간 항체이다. 일부 실시양태에서, 집단 형태의 항체는 전장 항체이다. 일부 실시양태에서, 집단 형태의 항체는 중쇄 및 경쇄를 포함한다.

[0107] 일부 실시양태에서, 항체 집단의 항체는 항-CD20 항체이다. 항-CD20 항체는 당업계에 기술되어 있으며, 예를 들어 리투스맵(제넨테크(Genentech)), 오파투무맵(ofatumumab)(지에스케이(GSK)) 및 오크렐리주맵(ocrelizumab)(제넨테크)을 포함한다(예를 들어, 문헌[Robak et al., Biodrugs 2011, 25: 13-25] 참조). 일부 실시양태에서, 항체 집단은 항-CD20 항체들의 혼합물이다.

[0108] 일부 실시양태에서, 항체 집단의 항체는 집단 형태의 항체의 경쇄 및 중쇄가 서열 번호 1 및 서열 번호 2에 개시된 핵산 서열에 의해 코딩되는 항체이다.

- [0109] 본원에서 사용될 때, "항체 집단"은 동일한 항원에 대하여 유도된 항체의 배치(batch)(예를 들어, 항-CD20 항체)를 나타낸다. 일부 실시양태에서, 항체 집단의 항체는 동일한 항원 에피토프에 대하여 유도된다(예를 들어, CD20의 특정한 아미노산 서열에 결합하는 항-CD20 항체). 동일한 에피토프에 대하여 유도된 항체 집단은 동일한 CDR을 갖지만 상이한 CDR외(non-CDR) 영역들을 갖는 항체 집단을 포함하며, 일부의 항체가 항원 에피토프(이에 대하여 항체가 유도됨)에의 결합 성질을 변화시키지 않는 하나 이상의 돌연변이를 갖는 항체 집단을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체 집단의 항체는 동일한 핵산에 의해 코딩된다. 그러나, 심지어 항체 집단 형태의 항체가 동일한 핵산에 의해 코딩되더라도, 상기 항체는 동일할 필요가 없음을 알아야 한다. 예를 들어, 항체들은 상이한 글리코실화 패턴을 가질 수 있다.
- [0110] 일부 실시양태에서, 항체 집단의 항체는 유사한 방식으로 생성된다. 예를 들어, 항체 집단은 트랜스제닉으로 생성될 수 있다. 본 집단은 트랜스제닉으로 생성된 항체의 하나의 수확물 또는 다수의 수확물에서 유래할 수 있다. 상기 다수의 수확물은 동일한 소스(source), 예를 들어 동일한 트랜스제닉 동물로부터의 것일 수 있거나 상이한 소스들, 예를 들어 상이한 트랜스제닉 동물로부터 조합될 수도 있다.
- [0111] 일부 실시양태에서, 항체는 트랜스제닉으로 생성된 항체이다. 본원에서 사용될 때, "트랜스제닉으로 생성된 항체"라는 용어는 트랜스제닉 동물, 즉 게놈 내에 생성될 항체를 코딩하는 핵산 서열을 갖는 동물에서 생성된 항체를 나타낸다. 일부 실시양태에서, 트랜스제닉 항체는 트랜스제닉 동물의 기관들 중 하나 이상에서 발현된다. 일부 실시양태에서, 트랜스제닉 항체는 간에서 발현된다. 일부 실시양태에서, 트랜스제닉 항체는 유선 상피 세포에서 발현된다.
- [0112] 본원에서 사용될 때, "단리된 항체"는 상이한 항원 특이성을 갖는 다른 항체가 실질적으로 없는 항체를 나타낸다. 그러나, 항원의 에피토프, 이소형(isoform) 또는 변이체에 특이적으로 결합하는 단리된 항체는 예를 들어 다른 종 유래의 다른 관련 항원에 대하여 교차 반응성을 가질 수 있다. 게다가, 단리된 항체에는 다른 세포 물질 및/또는 화학물질이 실질적으로 없을 수 있다. 본원에서 사용될 때, "특이적 결합"은 항체가 소정의 항원에 결합하는 것을 나타낸다. 전형적으로, 항체는 소정의 항원 또는 밀접하게 관련된 항원 이외의 비특이적 항원에의 결합 친화성보다 2배 이상 더 큰 친화성으로 결합한다. 따라서, 일부 실시양태에서 본원에 제공된 항체는 표적 항원에 특이적으로 결합한다.
- [0113] 본원에서 사용될 때, "항체"라는 용어는 디슬피드 결합으로 상호 연결된 적어도 2개의 중쇄(H chain) 및 2개의 경쇄(L chain)를 포함하는 당단백질, 즉, 상이한 유전자에 의해 코딩되는 2개의 동일한 Ig H쇄 및 2개의 동일한 L쇄로 이루어진 공유적 이종사량체(heterotetramer)를 나타낸다. 각각의 중쇄는 중쇄 가변 영역(본원에서 HCVR 또는 V_H 로 줄여 씀) 및 중쇄 불변 영역으로 이루어진다. 중쇄 불변 영역은 3개의 도메인, C_{H1} , C_{H2} and C_{H3} 으로 이루어진다. 각각의 경쇄는 경쇄 가변 영역(본원에서 LCVR 또는 V_L 로 줄여 씀) 및 경쇄 불변 영역으로 이루어진다. 경쇄 불변 영역은 하나의 도메인, C_L 로 이루어진다. V_H 및 V_L 영역은 프레임워크 영역(framework region; FR)으로 칭해지는, 더욱 보존된 영역이 산재된, 상보성 결정 영역(complementarity determining region; CDR)으로 칭해지는 추가변 영역으로 추가로 세분될 수 있다. 각각의 V_H 및 V_L 은 3개의 CDR 및 4개의 FR로 구성되며, 이는 아미노 말단으로부터 카르복시 말단까지 하기 순서로 배열된다: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역은 항원과 상호작용하는 결합 도메인을 함유한다. 항체의 불변 영역은 면역계의 다양한 세포(예를 들어, 이펙터(effector) 세포) 및 고전적인 보체계의 제1 성분(C1q)을 비롯하여, 숙주 조직 또는 인자에 대한 면역글로불린의 결합을 매개할 수 있다. 성숙한 기능성 항체 분자의 형성은 두 단백질이 화학량론적 양으로 발현되고 적당한 구성으로 자가 조립될 때 성취될 수 있다.
- [0114] "항체"라는 용어는 또한 이의 항원 결합 단편을 포함한다. 본원에서 사용될 때, 항체의 "항원 결합 단편"은 항원에 특이적으로 결합하는 능력을 유지하는 항체의 하나 이상의 부분을 나타내며, 이는 Fc 글리코실화 부위를 포함한다.
- [0115] 일부 실시양태에서, 항체는 이소타입(isotype) IgG, IgA 또는 IgD의 것이다. 추가의 실시양태에서, 항체는 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgAsec, IgD, IgE로 이루어진 군으로부터 선택되거나 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgAsec, IgD 또는 IgE의 면역글로불린 불변 및/또는 가변 도메인을 갖는다. 바람직한 실시양태에서, 항체는 타입 IgG1의 것이다. 다른 실시양태에서, 항체는 2특이성(bispecific) 또는 다중 특이성(multispecific) 항체이다. 또 다른 실시양태에서, 항체는 재조합 항체, 다클론 항체, 단클론 항체, 인간화 항체 또는 키메라 항체, 또는 이들의 혼합물이다. 일부 실시양태에서, 키메라 항체는 인간외(예를 들어, 마우스, 래트 또는 토끼) 항체의 일부와 인간 항체의 일부의 유전자 조각된 융합물이다. 일부 실시양태에서, 키메

라 항체는 대략 33%의 비인간 단백질 및 67%의 인간 단백질을 함유할 수 있다. 마우스 키메라와 특징적으로 관련하여, 키메라는 쥐과 항체에 의해 유발되는 HAMA 응답을 감소시키도록 개발될 수 있으며, 그 이유는 키메라가 쥐과 항체의 특이성을 인간 항체의 효율적인 인간 면역계 상호작용과 조합시킬 수 있기 때문이다.

[0116] 일부 실시양태에서, 항체는 키메라 항체 또는 인간화 항체이다. 본원에서 사용될 때, "키메라 항체"라는 용어는 쥐과 가변 또는 초가변 영역이 인간 불변 영역 또는 불변 프레임워크 영역 및 가변 프레임워크 영역과 조합된 항체를 나타낸다. 본원에서 사용될 때, "인간화 항체"라는 용어는 인간 프레임워크 영역과 회합된, 모(parent) 항체로부터의 항원 결합 CDR만을 보유하는 항체를 나타낸다(예를 들어, 문헌[Waldmann, 1991, *Science* 252:1657] 참조). 쥐과 항체의 결합 특이성을 유지하는 이러한 키메라 또는 인간화 항체는 본 발명에 따라 진단, 예방 또는 치료 응용용으로 생체내 투여될 때 감소된 면역원성을 가질 것으로 예상된다. 인간화(재형상화(reshaping) 또는 CDR 그래프팅(grafting)으로도 지칭됨)는 마우스와 같은 이종(xenogeneic) 소스 유래의 단클론 항체의 면역원성을 감소시키는 확립된 기술이다. 인간화 항체는 표준 분자 생물학 기술을 통하여 생성될 수 있다. 일부 실시양태에서, 이는 설치류 상보성 결정 영역(CDR)을 인간 프레임워크 내에 그래프팅하는 것을 포함한다. 그러나, 이 기술은 대개 반복 과정이며, 인간화 항체를 설계할 때 하기의 다수의 요소가 작용한다: CDR의 길이, 인간 프레임워크 및 설치류 mAb 유래의 잔사의 인간 프레임워크 영역으로의 치환(역돌연변이)

[0117] 치료용 마우스 mAb는 때때로 인간 사용에 이상적이지 않으며, 그 이유는 HAMA(인간 항-마우스 항체(human anti-mouse antibody) 응답이 상기 항체를 중화시키며, 이를 순환계로부터 빠르게 제거하고, 최악의 경우에는 심각한 알러지성 과민증을 유도한다. 몇몇 전략은 쥐과 Ig 서열의 대부분을 인간 서열로 대체하여 효능은 유지하면서 부작용은 더 적어지도록 개발되었다. 인간 치료 mAb의 하나의 개발 전략은 쥐과 중쇄(H) 및 경쇄(L) 불변 영역(각각 C_H 및 C_L), 또는 일반적으로 비인간 쇄들을 인간 영역으로 대체하여서 생성된 키메라 항체가 비인간 도메인으로 남아 있는 항원 결합 도메인을 제외하고는 대개 인간 IgG 단백질 서열로 이루어지게 하는 것이다. 이러한 전략은 비호지킨(non-Hodgkin) 림프종의 치료에 사용되는, 미국에서 승인된 첫 번째 단클론 항체인 리투산[®](리투시맵 항-인간 CD20, 제넨테크)의 개발에 사용되었다. 어렵잡아서, 인간 C_H 및 C_L 서열을 포함하는 치료 mAb를 제공하면 쥐과 항체 단백질의 면역원성의 대략 90%가 없어져야 한다.

[0118] 특정 실시양태에서, 항체는 인간 항체이다. 본원에서 사용될 때, "인간 항체"라는 용어는 인간 생식계열 면역글로불린 서열로부터 유래된 가변 영역 및 불변 영역을 갖는 항체를 포함하고자 한다. 본 발명의 인간 항체는 인간 생식계열 면역글로불린 서열에 의해 코딩되지 않는 아미노산 잔기(예를 들어, 테스트관내에서의 랜덤 돌연변이 유발 또는 부위 특이적 돌연변이 유발에 의해 또는 생체내에서의 체세포 돌연변이에 의해 도입된 돌연변이)를 포함할 수 있다. 그러나, 본원에서 사용될 때, "인간 항체"라는 용어는 마우스와 같은 또 다른 포유류 종의 생식계열로부터 유래된 CDR 서열이 인간 프레임워크 서열 상에 그래프팅된 항체(본원에서, "인간화 항체"로 칭해짐)를 포함하고자 하는 것은 아니다. 인간 항체는 마우스 면역계라기보다는 오히려 인간 면역계의 일부를 지닌 트랜스제닉 마우스를 사용하여 생성된다.

[0119] 완전 인간 단클론 항체는 또한 인간 면역글로불린 중쇄 및 경쇄 유전자좌의 대부분에 대하여 마우스 트랜스제닉을 면역화함으로써 제조될 수 있다. 예를 들어, 미국 특허 제5,591,669호, 미국 특허 제5,598,369호, 미국 특허 제5,545,806호, 미국 특허 제5,545,807호, 미국 특허 제6,150,584호 및 그 안에 인용된 참고 문헌을 참조하는데, 이들의 내용은 본원에 참고로 포함된다. 이들 동물은 내인성(예를 들어, 쥐과) 항체의 생성에 있어서 기능적 결실이 있도록 유전자 변형되었다. 상기 동물은 이들 동물의 면역화에 의해 관심있는 항원에 대한 완전 인간 항체가 생성되도록 인간 생식계열 면역글로불린 유전자좌의 전부 또는 일부분을 함유하도록 추가로 변형된다. 이들 마우스(예를 들어, 제노마우스(XenoMouse)(아브게닉스(Abgenix)), HuMAb 마우스(메다텍스(Medarex)/젠팜(GenPharm))의 면역화 후, 단클론 항체는 표준 하이브리도마(hybridoma) 기술에 따라 제조된다. 이들 단클론 항체는 인간 면역글로불린 아미노산 서열을 가지며, 따라서 인간에게 투여될 때 인간 항-마우스 항체(HAMA) 응답을 일으키지 않는다. 인간 항체는 본원에 제공된 항체들 중 임의의 항체와 같이, 단클론 항체, 다클론 항체 또는 단클론 항체와 다클론 항체의 혼합물일 수 있다.

[0120] 고도로 갈락토실화된 항체의 소스

[0121] 일 측면에서, 본 발명은 고도로 갈락토실화된 항체 집단을 제공한다. 일부 실시양태에서, 고도로 갈락토실화된 항체 집단은 트랜스제닉으로 생성된다.

[0122] 일부 실시양태에서, 포유류 유선 상피 세포는 마우스 또는 염소와 같은 트랜스제닉 동물의 밀크에서 항체를 발현하도록 엔지니어링되었다. 이 유전자의 발현은 예를 들어 염소 β-카제인 조절 요소의 제어 하에 있다. 트랜

스제닉 동물은 H쇄 및 L쇄를 함유하는 별도의 구성물들 또는 둘 모두의 쇄를 함유하는 하나의 구성물을 동시 형질감염시킴으로써 생성될 수 있다. 특정 실시양태에서, 둘 모두의 트랜스진은 동일한 염색체 부위 내에 통합되어서, 상기 유전자들은 함께 자손에게 전해지게 되고 단백질 발현은 공동으로 조절된다. 일부 실시양태에서, 상기 발현은 유단백질을 생성하는 개개의 유전 도관 상피 세포에 최적화된다.

[0123] 트랜스제닉 동물의 생성을 위한 구성물

[0124] 일부 실시양태에서, 핵이식에 의해 트랜스제닉 염소를 생성하는 데 사용하기 위한 구성물(예를 들어, 항-CD20 항체를 코딩함)을 함유하는 일차 세포주를 생성하기 위하여, 중쇄 및 경쇄 구성물을 일차 염소 피부 상피 세포 내에 형질감염시킬 수 있는데, 상기 세포는 클론 확장되고, 트랜스진의 카피수, 트랜스진의 구조적 완전성 (structural integrity) 및 염색체 통합 부위의 평가를 위하여 완전히 특성화된다. 본원에서 사용될 때, "핵이식"은 공여체 세포 유래의 핵을 핵제거된 난모 세포 내에 이식하는 클로닝 방법을 나타낸다.

[0125] 관심있는 단백질(예를 들어, 항체)의 코딩 서열은, 서열 데이터베이스, 예컨대 NCBI, 젠뱅크(Genbank)로부터 취득되는, 선택된 동물(예컨대 소 또는 마우스)로부터 유래된 역번역 메신저(messenger) RNA 또는 게놈 물질의 라이브러리의 스크리닝에 의해, 또는 항체 등의 서열의 수득에 의해 수득될 수 있다. 상기 서열들은 적절한 플라즈미드 벡터 내에 클로닝되고, 적합한 숙주 유기체, 예컨대 이. 콜라이(*E. coli*)에서 증폭될 수 있다. 벡터의 증폭 후, DNA 구성물을 잘라 내고, 벡터의 나머지로부터 정제하고, 트랜스제닉 동물의 생성에 사용될 수 있는 발현 벡터 내로 도입할 수 있다. 트랜스제닉 동물은 요망되는 트랜스제닉 단백질이 그 게놈 내로 통합된 것을 갖는다.

[0126] 벡터의 증폭 후, 적절한 5' 및 3' 제어 서열을 갖는 DNA 구성물을 잘라 내고, 벡터의 나머지로부터 정제하고, 게놈 내에 요망되는 비글리코실화된 관련 트랜스제닉 단백질이 통합된 트랜스제닉 동물의 생성에 사용할 수 있다. 역으로, 효모 인공 염색체(yeast artificial chromosome; YAC)와 같은 일부 벡터에서, 벡터로부터의 조립된 구성물을 제거하는 것이 필요하지 않으며, 그러한 경우, 증폭된 벡터는 트랜스제닉 동물의 제조에 직접적으로 사용될 수 있다. 코딩 서열은 제어 서열에 작동적으로 연결될 수 있으며, 이는 코딩 서열이 비인간 트랜스제닉 포유류의 밀크에서 발현되는 것을 가능하게 한다.

[0127] 트랜스제닉 동물의 밀크가 생성되게 하는 데 적합한 DNA 서열은 천연적으로 유래된 유단백질로부터 유래된 5'-프로모터 영역을 지닐 수 있다. 그 결과, 이 프로모터는 호르몬 및 조직 특이적 인자의 제어 하에 있으며, 젖분비 유전 조직에서 가장 큰 활성을 갖는다. 일부 실시양태에서, 상기 프로모터는 염소 베타 카제인 프로모터이다. 프로모터는 단백질 리더(leader) 서열의 생성을 유도하는 DNA 서열에 작동가능하게 연결될 수 있는데, 상기 단백질 리더 서열은 트랜스제닉 단백질이 유전 상피 를 가로질러 밀크 내로 분비되게 한다. 일부 실시양태에서, 자연적으로 분비되는 유단백질로부터 유래될 수 있는 3'-서열이 mRNA의 안정성의 향상을 위하여 부가될 수 있다.

[0128] 본원에서 사용될 때, "리더 서열" 또는 "신호 서열"은 단백질 분비 신호를 코딩하며 트랜스제닉 단백질을 코딩하는 하류 핵산 분자에 작동가능하게 연결될 때 분비를 유도하는 핵산 서열이다. 리더 서열은 인공적으로 유도된 리더, 천연 인간 리더 서열일 수 있거나, 트랜스진 코딩 서열의 전사의 지시에 사용되는 프로모터와 동일한 유전자로부터 또는 포유류 유전 상피 세포와 같은 세포로부터 정상적으로 분비되는 또 다른 단백질로부터 수득될 수 있다.

[0129] 일부 실시양태에서, 프로모터는 밀크 특이적 프로모터이다. 본원에서 사용될 때, "밀크 특이적 프로모터"는 단백질을 밀크 내로 분비하는 세포(예를 들어, 유전 상피 세포)에서 유전자의 발현을 자연적으로 지시하는 프로모터이며, 예를 들어 카제인 프로모터, 예를 들어, α-카제인 프로모터(예를 들어, 알파 S-1 카제인 프로모터 및 알파 S2-카제인 프로모터), β-카제인 프로모터(예를 들어, 염소 베타 카제인 유전자 프로모터(문헌[DiTullio, BioTechnology 10:74-77, 1992]), γ-카제인 프로모터, κ-카제인 프로모터, 유장 산성 단백질(whey acidic protein; WAP) 프로모터(문헌[Gordon et al., BioTechnology 5: 1183-1187, 1987]), β-락토글로불린 프로모터(문헌[Clark et al., BioTechnology 7: 487-492, 1989]) 및 α-락트알부민 프로모터(문헌[Soulier et al., FEBS Letts. 297:13, 1992])를 포함한다. 이 정의에 또한 포함되는 것은 예를 들어 마우스 유선 종양 바이러스(mouse mammary tumor virus; MMTV)의 긴 말단 반복체(long terminal repeat; LTR) 프로모터와 같은, 유전 조직에서 특이적으로 활성화되는 프로모터이다.

[0130] 본원에서 사용될 때, 코딩 서열 및 조절 서열은, 이들이 조절 서열의 영향 또는 제어 하에서 코딩 서열의 발현 또는 전사를 하도록 하는 그러한 방식으로 공유 결합될 때 "작동가능하게 연결된"이라고 한다. 코딩 서열이 기

능성 단백질로 번역되게 하기 위하여, 코딩 서열은 조절 서열에 작동가능하게 연결된다. 2개의 DNA 서열은, 5' 조절 서열 내의 프로모터의 유도가 코딩 서열을 전사하는 경우, 및 상기 2개의 DNA 서열 사이의 결합의 성질이 (1) 프레임 이동 돌연변이를 도입시키지 않거나, (2) 프로모터 영역이 코딩 서열의 전사를 지시하는 능력을 간섭하지 않거나, (3) 상응하는 RNA 전사체가 단백질로 번역되게 하는 능력을 간섭하지 않을 경우, 작동가능하게 연결되어 있다고 한다. 따라서, 프로모터 영역은, 생성된 전사체가 요망되는 단백질 또는 폴리펩티드로 전사될 수 있도록 프로모터 영역이 그 DNA 서열의 전사를 초래할 수 있을 경우, 코딩 서열에 작동가능하게 연결되는 것이다.

[0131] 본원에서 사용될 때, "벡터"는 상이한 유전 환경들 사이의 수송을 위하여 또는 숙주 세포에서의 발현을 위하여 제한 및 라이게이션(ligation)에 의해 요망되는 서열이 삽입될 수 있는 다수의 핵산들 중 임의의 핵산일 수 있다. 벡터는 전형적으로 DNA로 구성되지만, RNA 벡터도 이용가능하다. 벡터는 플라스미드 및 파지미드를 포함하지만, 이로 한정되는 것은 아니다. 클로닝 벡터는 숙주 세포에서 복제가 가능하고, 추가로, 벡터가 확인가능한 방식으로 절단될 수 있는 그리고 새로운 재조합 벡터가 숙주 세포에서 복제되는 그의 능력을 유지하도록 요망되는 DNA 서열이 라이게이션될 수 있는 하나 이상의 엔도뉴클레아제 제한 부위를 특징으로 하는 것이다. 플라스미드의 경우, 요망되는 서열의 복제는 숙주 박테리아 내에서 플라스미드의 카피수가 증가할 때 다회 일어나거나, 숙주가 유사 분열에 의해 복제될 때 숙주당 단지 1회 일어날 수 있다. 파지의 경우, 복제는 용해기 동안 능동적으로 일어날 수 있거나 용원기 동안 수동적으로 일어날 수 있다. 발현 벡터는 요망되는 DNA 서열이 제한 및 라이게이션에 의해 삽입될 수 있어서 이것이 조절 서열에 작동가능하게 연결되게 되고 RNA 전사체로서 발현될 수 있는 것이다. 벡터는 벡터로 형질전환 또는 형질감염되었거나 그렇게 되지 않은 세포의 동정에서 사용하기에 적합한 하나 이상의 마커 서열을 추가로 포함할 수 있다. 마커는 예를 들어 항생제 또는 다른 화합물에 대한 내성 또는 민감성을 증가 또는 감소시키는 단백질을 코딩하는 유전자, 활성이 당업계에 공지된 표준 분석법에 의해 검출가능한 효소(예를 들어, β -갈락토시다아제 또는 알칼리 포스파타아제)를 코딩하는 유전자, 및 형질전환 또는 형질감염된 세포, 숙주, 콜로니 또는 플라크의 표현형에 가지적으로 영향을 주는 유전자를 포함한다. 바람직한 벡터는 자율 복제가 가능한 그리고 그가 작동가능하게 연결된 DNA 절편에 존재하는 구조 유전자 생성물의 발현이 가능한 것이다.

[0132] 트랜스제닉 동물

[0133] 일 측면에서, 본 발명은 본원에 제공된 항체 집단 중 임의의 집단을 발현하는 유전 상피 세포를 제공한다. 일부 실시양태에서, 본 발명은 본원에 제공된 항체 집단 중 임의의 집단을 발현하는 유전 상피 세포를 포함하는 비인간 트랜스제닉 포유류를 제공한다.

[0134] 일 측면에서, 본 발명은 트랜스제닉 항체, 및 이의 변이체 및 단편의 제조 방법을 제공하며, 본 방법은 비인간 트랜스제닉 포유류의 밀크에서 핵산 구성물에 의해 코딩되는 트랜스제닉 항체를 발현시키는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 항체의 제조 방법은

[0135] (a) 요망되는 트랜스제닉 항체를 코딩하는 트랜스진 DNA 구성물로 비인간 포유류 세포를 형질감염시키는 단계;

[0136] (b) 상기 트랜스진 DNA 구성물이 세포의 계놈 내에 삽입된 세포를 선발하는 단계; 및

[0137] (c) 요망되는 트랜스제닉 항체에 대하여 이형접합성인 비인간 트랜스제닉 포유류가 생성되도록 제1 핵이식 절차를 수행하는 단계를 포함한다.

[0138] 일 측면에서, 본 발명은

[0139] (a) 항체를 발현하도록 조작된 비인간 트랜스제닉 포유류를 제공하고,

[0140] (b) 비인간 트랜스제닉 포유류의 밀크에서 항체를 발현시키고,

[0141] (c) 밀크에서 발현된 항체를 단리하는 방법을 제공한다.

[0142] 그러한 방법은 수득된 항체의 CDC 활성 및/또는 ADCC 활성을 측정하는 단계 뿐만 아니라 젖분비를 유도하는 단계도 추가로 포함할 수 있다. 그러한 방법은 수득된 항체의 갈락토실화 및/또는 푸코실화의 양 또는 수준을 측정하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 또한 본 방법은 추가의 단리 및/또는 정제 단계를 추가로 포함할 수 있다. 또한 본 방법은 유전 상피 세포에서 생성되지 않은 (예를 들어, 세포 배양으로 생성된) 항체에 의해 수득되는 항체의 CDC 활성 및/또는 ADCC 활성을 비교하는 단계를 포함할 수 있다.

[0143] 재조합 항체 발현이 가능한 트랜스제닉 동물은 또한 당업계에 공지된 방법에 따라 생성될 수 있다(예를 들어,

미국 특허 제5,945,577호 참조). 트랜스제닉 발현에 적합한 동물은 염소, 양, 들소, 낙타, 소, 돼지, 토끼, 물소, 말, 래트, 마우스 또는 라마를 포함하지만, 이로 한정되는 것은 아니다. 적합한 동물은 또한 각각 소, 염소, 양 및 돼지(또는 멧돼지)의 다양한 종에 관련된, 소과, 염소과, 양과 및 돼지과를 포함한다. 또한 적합한 동물은 유제류를 포함한다. 본원에서 사용될 때, "유제류"는 발굽이 있는, 전형적으로 초식성의 네발 포유류의 것이거나 이에 관련되며, 이는 제한 없이, 양, 돼지, 염소, 소 및 말을 포함한다. 일 실시양태에서, 동물은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 별도의 구성물들로 일차 세포를 동시 형질감염시킴으로써 생성된다. 그 후 이들 세포는 핵이식에 사용된다. 대안적으로, 미세주입법을 이용하여 트랜스제닉 동물을 생성할 경우, 구성물은 주입될 수 있다.

[0144] 클로닝은 다수의 트랜스제닉 동물 - 각각이 관심있는 항체 또는 다른 유전자 구성물을 생성할 수 있음 - 을 생성한다. 제조 방법은 클로닝된 동물 및 이 동물의 자식의 사용을 포함한다. 일부 실시양태에서, 클로닝된 동물은 염소과, 소과 또는 마우스이다. 또한 클로닝은 태아의 핵이식, 핵이식, 조직 및 기관 이식 및 키메라 자식의 생성을 포함한다.

[0145] 클로닝 과정의 하나의 단계는 항체를 코딩하는 트랜스진을 함유하는 세포의 게놈을 핵 제거된 난모 세포 내로 이식하는 것을 포함한다. 본원에서 사용될 때, "트랜스진"은 술책에 의해 세포 내로 또는 이의 조상 내로 삽입되고, 이 세포로부터 발달하는 동물의 게놈의 일부가 되는 핵산 분자의 임의의 조각을 나타낸다. 그러한 트랜스진은 트랜스제닉 동물에 대하여 부분적으로 또는 전적으로 외인성인(즉, 외래인) 유전자를 포함할 수 있거나, 이 동물의 내인성 유전자에 대하여 아이덴티티(identity)를 갖는 유전자를 나타낼 수 있다.

[0146] 난모 세포에 적합한 포유류 소스는 염소, 양, 소, 돼지, 토끼, 기니아 피그, 마우스, 햄스터, 래트, 비인간 영장류 등을 포함한다. 바람직하게는 난모 세포는 유제류, 가장 바람직하게는 염소 또는 소로부터 수득된다. 난모 세포의 단리 방법은 당업계에 공지되어 있다. 본질적으로, 본 공정은 난모 세포를 포유류, 예를 들어 염소의 난소 또는 생식관으로부터 단리하는 것을 포함한다. 유제류 난모 세포의 쉽게 입수가 가능한 소스는 호르몬 유도된 암컷 동물로부터의 것이다. 유전자 조작, 핵이식 및 클로닝과 같은 기술의 성공적인 사용에 있어서, 바람직하게는 난모 세포는 이들 세포가 핵이식용 수령 세포로서 사용될 수 있기 전에, 그리고 상기 세포가 정자에 의해 수정되어 배아로 발달하기 전에, 생체내에서 성숙될 수 있다. 생체내에서 성숙된 제II 중기 시기의 난모 세포가 핵이식 기술에서 성공적으로 사용되었다. 본질적으로, 성숙한 제II 중기 난모 세포는 발정기를 시작하지 수시간 후 또는 인간 융모성 고나드트로핀(hCG) 또는 유사 호르몬을 주입하지 수시간 후 과배란되지 않은 또는 과배란된 동물로부터 외과적으로 수집된다.

[0147] 유선에서 발현되는 제조합 단백질의 양 및 품질을 예측하는 데 사용되는 도구들 중 하나로는 젖분비의 유도를 통한 것이 있다(문헌[Ebert KM, 1994]). 유도된 젖분비는 적어도 1년 이후인, 임신에서 생기는 첫 번째의 자연 젖분비로부터라기보다는 오히려 초기 단계의 트랜스제닉 생성으로부터의 단백질의 발현 및 분석을 허용한다. 젖분비 유도는 호르몬에 의해 또는 수동으로 행해질 수 있다.

[0148] 일부 실시양태에서, 본원에서 제공된 고도로 갈라토실화된 항체의 조성물은 밀크를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 본원에서 제공된 방법은 트랜스제닉 동물의 밀크로부터 항체 집단을 단리하는 단계를 포함한다. 트랜스제닉 동물의 밀크로부터 항체를 단리하는 방법은 당업계에 공지되어 있으며, 예를 들어 문헌[Pollock et al., Journal of Immunological Methods, Volume 231, Issues 1-2, 10 December 1999, Pages 147-157]에 기술되어 있다.

[0149] *질환의 치료*

[0150] 일 측면에서, 본 발명은 본원에 기술된 조성물들 중 임의의 것을 이를 필요로 하는 대상체, 예컨대 질환에 의해, 외상에 의해 또는 괴독에 의해 영향을 받은 대상체에게 투여하는 방법을 제공한다.

[0151] 일부 실시양태에서, 대상체는 암을 갖는다. 일부 실시양태에서, 암은 B-세포 림프종이다.

[0152] 본원에서 사용될 때, "암"은 신체 기관 및 체계의 정상 기능을 간섭하는 비제어된 세포 성장을 나타낸다. 원래 위치로부터 이동하여 중요 기관에 시딩된(seed) 암은 영향을 받은 기관의 기능적 열화를 통하여 대상체를 점진적으로 사멸시킬 수 있다.

[0153] 본원에서 사용될 때, 암은 하기 유형의 암들, B-세포 림프종, 호지킨 림프종, 비호지킨 림프종, 균상식육종/시자리 증후군(Szary syndrome), 히스티오사이토시스 X, 만성 림프구성 백혈병, 유모 세포 백혈병, 다발성 골수종, 왈덴스트롬 마크로글로불린혈(Waldenstrom's macroglobulinaemia), 한랭글로불린혈증, 중쇄 질환, 유방암, 담도암; 방광암; 교모세포종 및 수모세포종을 포함하는 뇌암; 자궁경부암; 융모암종; 결장암; 자궁내막암; 식도

암; 위암; 백혈병; 급성 림프구성 및 골수성 백혈병을 포함하는 혈액 종양(hematological neoplasm); T-세포 급성 림프모구성 백혈병/림프증; 유모 세포 백혈병; 만성 골수성 백혈병, 다발성 골수증; 에이즈(AIDS)-관련 백혈병 및 성인 T-세포 백혈병 림프증; 보웬병(Bowen's disease) 및 파제트병(Paget's disease)을 포함하는 상피내 종양(intraepithelial neoplasm); 간암; 폐암; 호지킨병 및 림프구성 림프증을 포함하는 림프증; 신경모세포증; 편평 세포 암종을 포함하는 구강암; 상피 세포, 간질 세포, 생식 세포 및 간엽 세포에서 생긴 것을 포함하는 난소암; 췌장암; 전립선암; 직장암; 평활근육종, 횡문근육종, 지방육종, 섬유육종, 및 골육종을 포함하는 육종; 흑색종, 카포시 육종(Kaposi's sarcoma), 기저세포암(basocellular cancer), 및 편평 세포암을 포함하는 피부암; 본원 종양(germinal tumor), 예컨대 정상피종, 비정상피종 (기형종, 용모암종), 간질 종양, 및 생식 세포 종양을 포함하는 고환암; 갑상선 선암 및 수질암종을 포함하는 갑상선암; 및 선암 및 빌름스 종양(Wilms tumor)을 포함하는 신장암을 포함한다. 다른 암이 당업계의 숙련자에게 공지되어 있으며, 이는 비만세포증, 흉선종, 형질세포종 및 신경교종을 포함한다.

[0154] 치료 방법은 또한 조혈계 암, 예컨대 백혈병에 대한 것인데, 이는 대상체에서 정상 조혈계 구획을 증가함으로써 조혈계 실패에 이르게 되어(빈혈, 혈소판 감소증 및 호중구 감소증의 형태) 궁극적으로 사망을 야기할 수 있다.

[0155] 치료 방법은 또한 전이의 억제에 대한 것이다. 전이는 원발성 종양으로부터 신체의 다른 부분으로 암세포가 전파되어 생기는, 원발성 종양 위치와는 별개인 암세포의 영역이다. 원발성 종양 매스(mass)의 진단 시점에서, 대상체는 전이의 존재에 대하여 모니터링될 수 있다. 전이는 특정 증상의 모니터링에 더하여, 가장 흔히는 유일한 또는 조합된 자기 공명 영상(magnetic resonance imaging; MRI) 스캔, 컴퓨터 단층 촬영(computed tomography; CT) 스캔, 혈구 및 혈소판 계수, 간기능 연구, 가슴 X선 및 뼈 스캔의 사용을 통하여 탐지된다.

[0156] 면역 장애의 치료

[0157] 일 측면에서, 본 발명은 본원에 개시된 조성물들 중 임의의 것을 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 대상체는 면역 장애를 갖는다.

[0158] 또한 본 발명의 조성물은 면역 장애의 치료에 유용하며, 상기 면역 장애는 성인 호흡 장애 증후군, 동맥 경화증, 천식, 아테롬성 동맥 경화증, 담낭염, 간경변, 크론병(Crohn's disease), 진성 당뇨병, 기종, 과호산구 증가증, 염증, 파킨슨 장 증후군, 다발성 경화증, 중증 근무력증, 심근 또는 심막 염증, 골관절염, 골다공증, 췌장염, 류마티스 관절염, 경피증, 결장염, 전신성 홍반성 루푸스, 루푸스 신염, 진성 당뇨병, 염증성 장질환, 셀리악병(celiac disease), 자가면역성 갑상선 질환, 애디슨병(Addison's disease), 쇼그렌 증후군(Sjogren's syndrome), 시데남 무도병(Sydenham's chorea), 타카야수 동맥염(Takayasu's arteritis), 베게너 육아종증(Wegener's granulomatosis), 자가면역성 위염, 자가면역성 간염, 피부 자가면역 질환, 자가면역성 확장성 심근증, 다발성 경화증, 심근염, 중증 근무력증, 악성 빈혈, 다발성 근육통, 건선, 급속 진행 사구체신염, 류마티스 관절염, 궤양성 대장염, 맥관염, 근육의 자가면역 질환, 고환의 자가면역 질환, 난소의 자가면역 질환 및 눈의 자가면역 질환을 포함하지만, 이로 한정되는 것은 아니다.

[0159] 다른 치료제

[0160] 일 측면에서, 본원에 제공된 항체 조성물은 다른 치료제와 함께 투여된다. 항체 조성물 및 다른 치료제는 동시에 또는 순차적으로 투여될 수 있다. 다른 치료제들이 동시에 투여될 때, 이들은 동일한 제형 또는 별도의 제형으로 투여될 수 있지만, 동시에 투여된다. 상기 다른 치료제들은 상기 다른 치료제 및 항체의 투여가 일시적으로 분리될 때, 서로와 순차적으로 그리고 항체와 순차적으로 투여된다. 이들 화합물의 투여 사이의 시간의 분리는 분의 문제일 수 있거나 이것은 더 길 수 있다.

[0161] 다른 치료제는 예를 들어 항암 요법을 포함하지만, 이로 한정되는 것은 아니다. 항암 요법은 암용 의약, 방사선 및 수술 절차를 포함한다. 본원에서 사용될 때, "암용 의약"은 암 치료 목적을 위하여 대상체에게 투여되는 에이전트(agent)를 나타낸다.

[0162] 본원에서 사용될 때, "암을 치료하는"은 암의 발달을 예방하는 것, 암의 증상을 감소시키는 것 및/또는 확립된 암의 성장을 저해하는 것을 포함한다. 다른 측면에서, 암용 의약은 암 발달 위험을 감소시킬 목적을 위하여 암 발달 위험이 있는 대상체에게 투여된다. 암 치료용의 다양한 유형의 의약이 본원에 기술되어 있다. 본 명세서의 목적상, 암용 의약은 화학요법제, 면역치료제, 암용 백신, 호르몬 요법 및 생물학적 응답 변형제로서 분류된다.

[0163] 화학요법제는 메토틱렉세이트, 빈크리스틴, 아드리아마이신, 시스플라틴, 당 비함유 클로로에틸니트로소우레아, 5-플루오로우라실, 미토마이신 C, 블레오마이신, 독소루비신, 다카르바진, 탁솔, 프라길린, 메글라민(Meglamine) GLA, 발루비신, 카르무스타인 및 폴리페르포산, MMI270, BAY 12-9566, RAS 파메실 트랜스퍼라아제

저해제, 파메실 트랜스퍼라아제 저해제, MMP, MTA/LY231514, LY264618/로메텍솔(Lometexol), 글라몰렉(Glamolec), CI-994, TNP-470, 하이캄틴(Hycamtin)/토폠테칸(Topotecan), PKC412, 발스포다르(Valspodar)/PSC833, 노반트론(Novantrone)/미트록산트론(Mitroxantrone), 메타렛(Metaret)/수라민(Suramin), 바티마스탯(Batimastat), E7070, BCH-4556, CS-682, 9-AC, AG3340, AG3433, 인셀(Incel)/VX-710, VX-853, ZD0101, ISI641, ODN 698, TA 2516/마르미스탯(Marmistat), BB2516/마르미스탯, CDP 845, D2163, PD183805, DX8951f, 레모날(Lemonal) DP 2202, FK 317, 피시바닐(Picibanil)/OK-432, AD 32/발루비신(Valrubicin), 메타스트론(Metastron)/스트론툼 유도체, 테모달(Temodal)/테모졸로마이드(Temozolomide), 에바셋(Evacet)/리포좀 독소루비신, 유타산(Yewtaxan)/파클리탁셀(Paclitaxel), 탁솔(Taxol)/파클리탁셀, 셀로드(Xeload)/카페시타빈(Capecitabine), 푸르톨론(Furtulon)/독시플루리딘(Doxifluridine), 사이클로팍스(Cyclopax)/경구 파클리탁셀, 오랄 탁소이드(Oral Taxoid), SPU-077/시스플라틴, HMR 1275/플라보피리돌(Flavopiridol), CP-358 (774)/EGFR, CP-609 (754)/RAS 발암유전자 저해제, BMS-182751/경구 백금, UFT(테가푸르(Tegafur)/우라실), 에르가미솔(Ergamisol)/레바미솔(Levamisole), 에닐우라실(Eniluracil)/776C85/5FU 인핸서(enhancer), 캄프토(Campto)/레바미솔, 캄프토사르(Camptosar)/이리노테칸(Irinotecan), 투모덱스(Tumodex)/랄리트렉세드(Ralitrexed), 류스타틴(Leustatin)/클라드리빈(Cladribine), 팍섹스(Paxex)/파클리탁셀(Paclitaxel), 독실(Doxil)/리포좀 독소루비신, 카엘릭스(Caelyx)/리포좀 독소루비신, 플루다라(Fludara)/플루다라빈(Fludarabine), 파마루비신(Pharmarubicin)/에피루비신(Epirubicin), 데포사이트(DepoCyt), ZD1839, LU 79553/비스-나프탈이미드(Bis-Naphtalimide), LU 103793/돌라스타인(Dolastain), 카에티스(Caetyx)/리포좀 독소루비신, 겐자르(Gemzar)/겐시타빈(Gemcitabine), ZD 0473/아노르메드(Anormed), YM 116, 로딘 시드(Iodine seed), CDK4 및 CDK2 저해제, PARP 저해제, D4809/덱시포사미드(Dexifosamide), 이페스(Ifes)/메스넥스(Mesnex)/이포사미드(Ifosamide), 부몬(Vumon)/테니포시드(Teniposide), 파라플라틴(Paraplatin)/카르보플라틴(Carboplatin), 플란티놀(Platinol)/시스플라틴, 베페시드(Vepeside)/에토포시드(Etoposide), ZD 9331, 탁소테레(Taxotere)/도세탁셀(Docetaxel), 구아닌 아라비노시드의 전구약, 탁산(Taxane) 유사체, 니트로소우레아, 알킬화제, 예컨대 멜렐란 및 사이클로포스파미드, 아미노글루테티미드(Aminoglutethimide), 아스파라기나아제, 부숴판(Busulfan), 카르보플라틴, 클로롬부실(Chlorombucil), 사이타라빈(Cytarabine) HCl, 닥티노마이신(Dactinomycin), 다우노루비신(Daunorubicin) HCl, 에스트라무스틴 포스페이트 소듐(Estramustine phosphate sodium), 에토포시드(Etoposide)(VP16-213), 플록수리딘(Floxuridine), 플루오로우라실(5-FU), 플루타미드(Flutamide), 히드록시우레아(히드록시카르바미드), 이포스파미드(Ifosfamide), 인터페론 알파-2a, 알파-2b, 류프롤리드(Leuprolide) 아세테이트(LHRH-방출 인자 유사체), 로무스틴(Lomustine)(CCNU), 메클로레타민(Mechlorethamine) HCl(질소 머스타드), 메르캅토피린(Mercaptopurine), 메스나(Mesna), 미토탄(Mitotane) (o.p'-DDD), 미토잔트론(Mitoxantrone) HCl, 옥트레오티드(Octreotide), 플리카마이신(Plicamycin), 프로카르바진(Procarbazine) HCl, 스트렙토조신(Streptozocin), 타목시펜(Tamoxifen) 시트레이트, 티오구아닌(Thioguanine), 티오테파(Thiotepa), 빈블라스틴(Vinblastine) 술페이트, 암사크린(Amsacrine)(m-AMSA), 아자시티딘(Azacitidine), 에르트로포이에틴(Erthropoietin), 헥사메틸멜라민(HMM), 인터류킨 2, 미토구아존(Mitoguanzone)(메틸-GAG; 메틸글리옥살 비스-구아닐히드라존; MGBG), 펜토스타틴(Pentostatin)(2' 데옥시코포르마이신), 세무스틴(Semustine)(메틸-CCNU), 테니포시드(Teniposide)(VM-26) 및 빈데신(Vindesine) 술페이트로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있지만, 이것은 그렇게 한정되는 것은 아니다.

[0164] 암용 백신은 EGF, 항-이디오타입 암용 백신, Gp75 항원, GMK 흑색종용 백신, MGv 강글리오시드 공액 백신, Her2/neu, 오바렉스(Ovarex), M-백스(Vax), O-백스, L-백스, STn-KHL 테라토프(theratope), BLP25 (MUC-1), 리포좀 이디오타입 백신, 멜라신(Melacine), 펩티드 항원 백신, 독소/항원 백신, MVA 기반의 백신, PACIS, BCG 백신, TA-HPV, TA-CIN, DISC-바이러스 및 이뮤시스트(ImmuCyst)/테라시스(TheraCys)로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있지만, 이것은 그렇게 한정되는 것은 아니다.

[0165] 일부 실시양태에서, 상기 다른 치료제는 면역치료제이다. 면역치료제는 리부탁신(Ributaxin), 헤르셉틴(Herceptin), 쿼드라메트(Quadramet), 파노렉스(Panorex), IDEC-Y2B8, BEC2, C225, 온코림(Oncolym), 스마트(SMART) M195, 아트라젠(ATRAGEN), 오바렉스(Ovarex), 벅사르(Bexxar), LDP-03, ior t6, MDX-210, MDX-11, MDX-22, OV103, 3622W94, 항-VEGF, 제나팍스(Zenapax), MDX-220, MDX-447, 멜리툼(MELIMMUNE)-2, 멜리툼-1, 세아시드(CEACIDE), 프리타겟(Pretarget), 노보맵(NovoMab)-G2, TNT, 글리오맵(Gliomab)-H, GNI-250, EMD-72000, 림포시드(LymphoCide), CMA 676, 모노팜(Monopharm)-C, 4B5, ior egf.r3, ior c5, BABS, 항-FLK-2, MDX-260, ANA Ab, 스마트 1D10 Ab, 스마트 ABL 364 Ab 및 ImmuRAIT-CEA를 포함하지만, 이로 한정되는 것은 아니다.

[0166] 약학 조성물 및 치료 방법

- [0167] 일 측면에서, 본 발명은 본원에 개시된 고도로 갈락토실화된 항체들 중 임의의 것 및 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 조성물을 제공한다.
- [0168] 일 측면에서, 본 발명은 본원에 개시된 조성물들 중 임의의 것을 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 대상체는 암을 갖는다. 일부 실시양태에서, 암은 B-세포 림프종이다. 일부 실시양태에서, 대상체는 면역 장애를 갖는다.
- [0169] "대상체"는 개, 고양이, 말, 소, 돼지, 양, 염소, 또는 영장류, 예를 들어 원숭이를 포함하지만 이로 한정되는 것은 아닌 척추동물 포유류 또는 인간을 의미한다.
- [0170] 유효량의 본원에 제공된 조성물이 유용하다. 유효량이라는 용어는 요망되는 생물학적 효과를 실현하는 데 필요하거나 상기 실현에 충분한 양을 나타낸다. 본원에 제공된 교시와 조합하여, 다양한 활성 화합물 및 가중 인자, 예컨대 효력, 상대적인 생체 이용률, 환자 체중, 불리한 부작용의 중증도 및 바람직한 투여 양식 중에서 선택함으로써 유효한 예방적 또는 치료적 치료 요법이 계획될 수 있는데, 이는 상당한 독성을 야기하지 않고 특정 대상체를 치료하는 데 효과적이다. 임의의 특정 응용에 있어서의 유효량은 치료되는 질환 또는 질병, 투여되는 특정 조성물, 대상체의 크기, 또는 질환 또는 질병의 중증도와 같은 그러한 인자에 따라 달라질 수 있다. 당업계의 숙련자라면 과도한 실험 없이 특정 조성물의 유효량을 경험적으로 결정할 수 있다. 일반적으로, 최대 용량, 즉, 건전한 의학적 판단에 따른 최고의 안전한 용량이 사용되는 것이 바람직하다. 일일 다회 용량이 화합물의 적절한 전신 수준의 달성을 위하여 고려될 수 있다. 적절한 전신 수준은 예를 들어 환자의, 약물의 피크 또는 지속적 혈장중 수준의 측정에 의해 결정될 수 있다. "용량" 및 "투여량"은 본원에서 상호교환가능하게 사용된다.
- [0171] 본원에서 사용될 때, "치료하는", "치료하다" 또는 "치료"라는 용어는 방지적(예를 들어, 예방적) 및 완화적 치료를 포함한다.
- [0172] 치료적 유효량의 결정은 특정적으로 의약의 독성 및 효능과 같은 그러한 인자에 의존한다. 독성은 당업계에 공지된 방법을 이용하여 결정될 수 있다. 효능은 동일한 지침을 이용하여 결정될 수 있다. 따라서 약학적 유효량은 임상시에 의해 독물학적으로 견딜수 있지만 유효한 것으로 생각되는 양이다. 예를 들어, 효능은 표적화된 조직에서 T-림프구 세포독성의 유도 또는 상당한 유도에 의해 또는 표적화된 조직의 매스의 감소에 의해 측정될 수 있다. 바람직한 실시양태에 따르면, 적합한 투여량은 약 1 mg/kg 내지 10 mg/kg인 것으로 예상된다.
- [0173] 본원에 제공된, 치료적 유효량의 항체 조성물을 치료를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함하는 실시양태에 따르면, "치료적으로 유효한"은 질환 상태를 저해하거나 역전시키는(예를 들어, 암 성장을 감소시키거나 저해하는) 데 필요한 조성물의 양을 나타낸다. 일부 방법은 공지된 암용 의약 또는 치료법, 예를 들어 화학요법(바람직하게는 본원에 열거된 종류의 화합물을 사용함) 또는 방사선과의 병용 치료법을 고려한다. 환자는 인간 또는 인간외 동물일 수 있다. 전형적으로 환자는 암의 유지 또는 증식을 촉진하는 수용체의 수준 증가를 특징으로 하는 암을 앓고 있을 때 치료를 필요로 한다.
- [0174] 일반적으로, 활성 화합물의 일일 경구 용량은 일일 약 0.01 mg/kg 내지 일일 1000 mg/kg이다. 일일 1회 또는 수회 투여에 있어서 0.5 내지 50 mg/kg의 범위의 경구 용량이 요망되는 결과를 생성할 것으로 예상된다. 투여량은 투여 양식에 따라, 요망되는 국소적 또는 전신적 약물 수준의 달성을 위하여 적절하게 조정될 수 있다. 예를 들어, 정맥내 투여는 1의 차수 내지 몇 차수의 크기로 일일 용량이 더 낮을 것으로 예상된다. 대상체에서의 응답이 그러한 용량에서 불충분할 경우, 환자 용인이 허용한다면 훨씬 더 많은 용량(또는 상이한, 더욱 국소화된 전달 경로에 의한 효과적인 더욱 많은 용량)이 이용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 항체의 적절한 전신 수준을 달성하기 위하여 다회 일일 용량이 고려된다.
- [0175] 일부 실시양태에서, 제공된 조성물은 생체내 응용용으로 이용된다. 생체내에서 의도된 투여 양식에 따라 사용되는 조성물은 예를 들어 정제, 알약, 분말, 캡슐, 겔, 연고, 액체, 현탁액 등과 같은 고체, 반고체 또는 액체의 투여 형태로 존재할 수 있다. 바람직하게는, 본 조성물은 정확한 투여량의 단회 투여에 적합한 단위 투여 형태로 투여된다. 또한 본 조성물은 요망되는 제형에 따라 약학적으로 허용되는 담체 또는 희석제를 포함할 수 있는데, 상기 담체 또는 희석제는 동물 또는 인간 투여용의 약학 조성물의 제형화에 보통 사용되는 수성계 비히클로서 정의된다. 희석제는 관심있는 인간 재조합 단백질의 생물학적 활성에 영향을 주지 않도록 선택된다. 그러한 희석제의 예로는 증류수, 생리식염수, 링거액(Ringer's solution), 텍스트로스 용액 및 헝크액(Hank's solution)이 있다. 상기 희석제들이 관심있는 동결건조된 인간 재조합 단백질의 재구성에 사용될 수 있다. 게다가, 약학 조성물은 다른 약용 에이전트, 약품, 담체, 아주반트(adjutant), 비독성, 비치료적, 비면역원성 안정

제 등을 또한 포함할 수 있다. 그러한 희석제 또는 담체의 유효량은 성분의 용해도, 생물학적 활성 등의 면에서 약학적으로 허용되는 제형을 수득하는 데 효과적인 양이다. 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 조성물은 살균 조성물이다.

- [0176] 본원의 조성물은 항흑색종, 항립프종, 항백혈병 및 항유방암 치료를 위하여 경구, 비경구 또는 국소 투여 및 다르게는 전신형을 통하여 인간 환자에게 투여될 수 있다. 본 발명의 조성물은 또한 류마티스 관절염, 전신성 루푸스, 다발성 경화증 등과 같은 일련의 자가면역 장애에 대하여 치료적으로 이용될 수 있다.
- [0177] 생체내 치료 동안의 투여는 다수의 경로에 의한 것일 수 있으며, 상기 경로는 비경구 및 경구, 그러나 바람직하게는 비경구 경로를 포함한다. 관절내, 정맥내, 척추강내 및 복강내 투여 경로가 이용될 수 있으며, 일반적으로 정맥내 투여 경로가 바람직하다. 당업자라면 투여 경로가 치료되는 장애에 따라 달라짐을 인식한다.
- [0178] 치료법에서 사용하기 위하여, 유효량의 조성물이 요망되는 표면에 조성물을 전달하는 임의의 양식에 의해 대상 체에게 투여될 수 있다. 본 발명의 약학 조성물의 투여는 당업자에게 공지된 임의의 수단에 의해 성취될 수 있다. 바람직한 투여 경로는 경구, 비경구, 근육내, 비강내, 설하, 기관내, 흡입, 눈, 질 및 직장 투여 경로를 포함하지만, 이로 한정되는 것은 아니다.
- [0179] 본 조성물은, 본 조성물을 전신적으로 전달하는 것이 바람직할 때, 주사에 의한, 예를 들어 볼루스 주사 또는 연속 주입에 의한 비경구 투여용으로 제형화될 수 있다. 주사용 제형은 단위 투여 형태로, 예를 들어 앰플 형태로 또는 다회 용량 용기 형태로 제시될 수 있으며, 이때 방부제가 첨가된다. 본 조성물은 유성 또는 수성 비히클 중 현탁액, 용액 또는 에멀전과 같은 그러한 형태를 취할 수 있으며, 현탁제, 안정제 및/또는 분산제와 같은 제형 에이전트를 함유할 수 있다.
- [0180] 비경구 투여용 약학 제형은 수용성 형태의 활성 화합물의 수용액을 포함한다. 부가적으로, 활성 화합물의 현탁액은 적절한 유성 주사용 현탁액으로서 제조될 수 있다. 적합한 친지성 용매 또는 비히클은 지방 오일, 예컨대 참깨유, 또는 합성 지방산 에스테르, 예컨대 에틸 올레에이트 또는 트리글리세라이드, 또는 리포솜을 포함한다. 수성 주사용 현탁액은 현탁액의 점도를 증가시키는 물질, 예컨대 소듐 카르복시메틸 셀룰로오스, 소르비톨 또는 텍스트란을 함유할 수 있다. 임의로, 현탁액은 또한 고도로 농축된 용액이 제조되게 하기 위하여 화합물의 용해도를 증가시키는 적합한 안정제 또는 에이전트를 함유할 수 있다.
- [0181] 대안적으로, 본 조성물은 사용 전에, 적합한 비히클, 예를 들어 발열원 무함유 살균수를 이용한 구성을 위한 분말 형태로 존재할 수 있다.
- [0182] 경구 투여에 있어서, 약학 조성물은 예를 들어 약학적으로 허용되는 부형제, 예컨대 결합제(예를 들어, 예비젤라틴화 옥수수 전분, 폴리비닐피롤리돈 또는 히드록시프로파일 메틸셀룰로오스); 충전제(예를 들어, 락토스, 미정질 셀룰로오스 또는 인산수소칼슘); 윤활제(예를 들어, 스테아르산마그네슘, 활석 또는 실리카); 붕해제(예를 들어, 감자 전분 또는 소듐 스타치 글리콜레이트); 또는 습윤제(예를 들어, 소듐 라우릴 술페이트)를 이용하여 통상적인 수단에 의해 제조된 정제 또는 캡슐의 형태를 취할 수 있다. 정제는 당업계에 공지된 방법에 의해 코팅될 수 있다. 경구 투여용 액체 제제는 예를 들어 용액, 시럽 또는 현탁액의 형태를 취할 수 있거나, 상기 액체 제제는 사용 전에 물 또는 다른 적합한 비히클을 이용한 구성용의 건조 제품으로서 제시될 수 있다. 그러한 액체 제제는 약학적으로 허용되는 첨가제, 예컨대 현탁제(예를 들어, 소르비톨 시럽, 셀룰로오스 유도체 또는 수소화 식용 지방); 유화제(예를 들어, 레시틴 또는 아카시아); 비수성 비히클(예를 들어, 아몬드유, 유성 에스테르, 에틸 알코올 또는 분별된 식물유); 및 방부제(예를 들어, 메틸 또는 프로파일-p-히드록시벤조에이트 또는 소르브산)을 이용하여 통상적인 수단에 의해 제조될 수 있다. 상기 제제는 또한 적절할 경우 완충염, 착향제, 착색제 및 감미제를 함유할 수 있다.
- [0183] 경구 투여용 제제는 적합하게는 활성 화합물의 제어된 방출을 제공하도록 제형화될 수 있다. 협착 투여에 있어서, 조성물은 통상적인 방식으로 제형화된 정제 또는 로젠지제의 형태를 취할 수 있다.
- [0184] 경구 투여에 있어서, 예를 들어, 본 조성물은 활성 항체를 당업계에 공지된 약학적으로 허용되는 담체와 조합함으로써 쉽게 제형화될 수 있다. 그러한 담체는, 치료되는 대상체에 의한 경구 섭취를 위하여, 본 발명의 화합물이 정제, 알약, 드라제(dragee), 캡슐, 액체, 젤, 시럽, 슬러리, 현탁액 등으로 제형화될 수 있게 한다. 경구 사용용 약학 제제는 임의로, 생성된 혼합물을 분쇄하고, 요망될 경우 적합한 보조제를 첨가한 후 과립의 혼합물을 가공하여 정제 또는 드라제 코어를 수득하여 고체 부형제로서 수득될 수 있다. 적합한 부형제는 특히 충전제, 예컨대 락토스, 수크로스, 만니톨 또는 소르비톨을 포함하는 당류; 셀룰로오스 제제, 예를 들어 옥수수 전분, 밀 전분, 쌀 전분, 감자 전분, 젤라틴, 트래거캔스 검, 메틸 셀룰로오스, 히드록시프로파일메틸-셀룰로오스

스, 소듐 카르복시메틸셀룰로오스 및/또는 폴리비닐 피롤리돈(PVP)이다. 요망될 경우, 붕해제, 예컨대 가교된 폴리비닐 피롤리돈, 한천, 또는 알긴산 또는 이의 염, 예컨대 알긴산나트륨이 첨가될 수 있다. 임의로, 경구 제형은 또한 내부 산 조건을 중화시키기 위하여 염수 또는 완충제, 예를 들어, EDTA 중에 제형화될 수 있거나, 어떠한 담체도 없이 투여될 수 있다.

[0185] 또한 특정적으로 고려되는 것은 조성물의 경구 투여 형태이다. 본 조성물의 성분(들)은 항체 조성물의 경구 전달이 효능이 있도록 화학적으로 변형될 수 있다. 일반적으로, 고려되는 화학적 변형은 하나 이상의 모이어티(moiety)의 항체에의 부착이며, 여기서, 상기 모이어티는 (a) 단백질 분해의 저해; 및 (b) 위 또는 장으로부터의 혈류 내로의 흡수를 가능케 한다. 또한 요망되는 것은 항체의 전체 안정성의 증가 및 체내에서의 순환 시간의 증가이다. 그러한 모이어티의 예는 폴리에틸렌 글리콜, 에틸렌 글리콜과 프로파일렌 글리콜의 공중합체, 카르복시메틸 셀룰로오스, 텍스트란, 폴리비닐 알코올, 폴리비닐 피롤리돈 및 폴리프롤린을 포함한다. 문헌 [Abuchowski and Davis, 1981, "Soluble Polymer-Enzyme Adducts", Enzymes as Drugs, Hochenberg and Roberts, eds., Wiley-Interscience, New York, NY, pp. 367-383; Newmark, et al., 1982, J. Appl. Biochem. 4:185-189]. 사용될 수 있는 다른 중합체로는 폴리-1,3-디옥솔란 및 폴리-1,3,6-티옥소안이 있다. 상기에 나타낸 바와 같이, 약학 용도에 바람직한 것은 폴리에틸렌 글리콜 모이어티이다.

[0186] 조성물에 있어서, 방출 위치는 위, 소장(십이지장, 공장 또는 회장), 또는 대장일 수 있다. 당업계의 숙련자에게는 위에서 용해되지 않지만 십이지장 또는 장 내의 다른 곳에서 그 물질을 방출하는 이용가능한 제형이 있다. 바람직하게는, 방출은 항체의 보호에 의해 또는 장에서와 같이 위 환경을 넘어선 생물학적 활성 물질의 방출에 의해 위 환경의 해로운 영향을 회피한다.

[0187] 완전한 위 내성을 보장하기 위하여, pH 5.0 이상에 대하여 불투과성인 코팅이 필수적이다. 장용 코팅으로서 사용되는 더욱 일반적인 불활성 성분의 예로는 셀룰로오스 아세테이트 트리멜리테이트(CAT), 히드록시프로파일메틸셀룰로오스 프탈레이트(HPMCP), HPMCP 50, HPMCP 55, 폴리비닐 아세테이트 프탈레이트(PVAP), 유드라기트(Eudragit) L30D, 아쿠아테릭(Aquateric), 셀룰로오스 아세테이트 프탈레이트(CAP), 유드라기트 L, 유드라기트 S, 및 셸락(Shellac)이 있다. 이들 코팅은 혼합된 필름으로서 사용될 수 있다.

[0188] 코팅 또는 코팅 혼합물이 정제 상에 또한 사용될 수 있는데, 이는 위에 대한 보호용으로 의도되지 않는다. 이는 당 코팅, 또는 정제가 더욱 쉽게 삼켜지게 하는 코팅을 포함할 수 있다. 캡슐은 건조 치료제, 즉, 분말의 전달을 위한 경질 셸(예컨대 젤라틴)으로 이루어질 수 있으며; 액체 형태의 경우, 연질 젤라틴 셸이 사용될 수 있다. 카시에(cachet)의 셸 물질은 진한(thick) 전분 또는 다른 식용 종이일 수 있다. 알약, 로젠지, 성형 정제 또는 습제 정제에 있어서, 수분 매싱(massing) 기술이 이용될 수 있다.

[0189] 본 조성물은 약 1 mm의 입자 크기의 펠렛 또는 과립의 형태의 미세 다중미립자로서 제형 중에 포함될 수 있다. 캡슐 투여용 물질의 제형은 또한 분말, 가볍게 압축된 플러그(plug) 또는 심지어 정제로서 존재할 수 있다. 치료제는 압축에 의해 제조될 수 있다.

[0190] 착색제 및 착향제 모두가 포함될 수 있다. 예를 들어, 조성물은 (리포솜 또는 미소구체 봉입에 의한 것과 같이) 제형화되고, 그 후 추가로 식용 제품, 예컨대 착색제 및 착향제를 함유하는 냉장 음료수 내에 추가로 함유될 수 있다.

[0191] 불활성 물질을 이용하여 치료제의 부피를 증가시키거나 희석시킬 수 있다. 이들 희석제는 탄수화물, 특히 만니톨, α-락토스, 무수 락토스, 셀룰로오스, 수크로스, 변형 텍스트란 및 전분을 포함할 수 있다. 특정 무기염이 또한 충전제로서 사용될 수 있으며, 이는 삼인산칼슘, 탄산마그네슘 및 염화나트륨을 포함한다. 일부 구매가능한 희석제로는 패스트-플로(Fast-Flo), 엠덱스(Emdex), STA-Rx 1500, 엠콤프레스(Emcompress) 및 아비셀(Avicell)이 있다.

[0192] 붕해제가 고체 투여 형태 내에 들어가는 조성물의 제형 중에 포함될 수 있다. 붕해제로서 사용되는 물질은 전분을 기반으로 하는 상업적 붕해제, 엑스포타브(Explotab)을 비롯한 전분을 포함하지만, 이로 한정되는 것은 아니다. 소듐 스타치 글리콜레이트, 앰버라이트(Amberlite), 소듐 카르복시메틸셀룰로오스, 울트라밀로펙틴, 알긴산나트륨, 젤라틴, 오렌지 필(orange peel), 산성 카르복시메틸 셀룰로오스, 천연 스펀지 및 벤토나이트 모두가 사용될 수 있다. 또 다른 형태의 붕해제로는 불용성 양이온 교환 수지가 있다. 분말형 검이 붕해제로서 그리고 결합제로서 사용될 수 있으며, 이는 분말형 검, 예컨대 한천, 카라야(Karaya) 또는 트래거캔스를 포함할 수 있다. 알긴산 및 그 나트륨염도 붕해제로서 유용하다.

[0193] 결합제는 조성물을 함께 유지하여 경질 정제를 형성하는 데 사용될 수 있으며, 아카시아, 트래거캔스, 전분 및

젤라틴과 같은 천연 생성물로부터의 물질을 포함할 수 있다. 다른 것은 메틸 셀룰로오스(MC), 에틸 셀룰로오스(EC) 및 카르복시메틸 셀룰로오스(CMC)를 포함한다. 폴리비닐 피롤리돈(PVP) 및 히드록시프로파일메틸 셀룰로오스(HPMC) 둘 모두가 치료제의 과립화를 위하여 알코올성 용액에서 사용될 수 있다.

- [0194] 마찰 방지제를 조성물의 제형에 첨가하여 제형화 공정 동안의 점착을 방지할 수 있다. 윤활제는 치료제와 다이렉트 사이의 층으로서 사용될 수 있으며, 이는 마그네슘염 및 칼슘염을 포함하는 스테아르산, 폴리테트라플루오로에틸렌(PTFE), 액체 파라핀, 식물유 및 왁스를 포함할 수 있지만, 이로 한정되는 것은 아니다. 가용성 윤활제, 예컨대 소듐 라우릴 술페이트, 마그네슘 라우릴 술페이트, 다양한 분자량의 폴리에틸렌 글리콜, 카르보왁스(Carbowax) 4000 및 6000이 또한 사용될 수 있다.
- [0195] 제형화 동안 약물의 유동 특성을 향상시킬 수 있는 그리고 압축 동안 재배열을 돕기 위한 글리다นต์(glidant)가 첨가될 수 있다. 글리다นต์는 진분, 활석, 발열원성 실리카 및 수화 실리코알루미네이트를 포함할 수 있다.
- [0196] 수성 환경 내로의 조성물의 용해를 돕기 위하여, 계면활성제가 습윤제로서 첨가될 수 있다. 계면활성제는 음이온성 세제, 예컨대 소듐 라우릴 술페이트, 디옥틸 소듐 술포석시네이트 및 디옥틸 소듐 술포네이트를 포함할 수 있다. 양이온성 세제가 사용될 수 있으며, 이는 벤잘코늄 클로라이드 또는 벤제토늄 클로라이드를 포함할 수 있다. 계면활성제로서 제형 중에 포함될 수 있는 잠재적인 비이온성 세제의 목록으로는 라우로마크로콜 400, 폴리옥실 40 스테아레이트, 폴리옥시에틸렌 수소화 피마자유 10, 50 및 60, 글리세롤 모노스테아레이트, 폴리소르베이트 40, 60, 65 및 80, 수크로스 지방산 에스테르, 메틸 셀룰로오스 및 카르복시메틸 셀룰로오스가 있다. 이들 계면활성제는 단독으로 또는 상이한 비의 혼합물로서 제형에 존재할 수 있다.
- [0197] 경구적으로 사용될 수 있는 약학 제제는 글리세롤 또는 소르비톨과 같은 가소제 및 젤라틴으로 만들어진 연질 밀봉 캡슐 뿐만 아니라 젤라틴으로 만들어진 푸시핏(push-fit) 캡슐도 포함한다. 푸시핏 캡슐은 충전제, 예컨대 락토스, 결합제, 예컨대 진분, 및/또는 윤활제, 예컨대 활석 또는 스테아르산마그네슘, 및 임의로, 안정제와의 혼합물 형태의 활성 성분을 함유할 수 있다. 연질 캡슐에서, 조성물은 적합한 액체, 예컨대 지방 오일, 액체 파라핀, 또는 액체 폴리에틸렌 글리콜에 용해되거나 현탁될 수 있다. 게다가, 안정제가 첨가될 수 있다. 경구 투여용으로 제형화된 미소구체가 또한 사용될 수 있다. 그러한 미소구체는 당업계에서 잘 규정되었었다. 경구 투여용의 모든 제형은 그러한 투여에 적합한 투여형으로 존재하여야 한다.
- [0198] 협측 투여에 있어서, 조성물은 통상적인 방식으로 제형화된 정제 또는 로젠지의 형태를 취할 수 있다.
- [0199] 흡입에 의한 투여에 있어서, 조성물은 편리하게는 적합한 분사제, 예를 들어 디클로로디플루오로메탄, 트리클로로플루오로메탄, 디클로로테트라플루오로메탄, 이산화탄소 또는 다른 적합한 가스의 사용에 의해, 가압 팩 또는 분무기로부터의 에어로졸 스프레이 제시의 형태로 전달될 수 있다. 가압 에어로졸의 경우, 투여 단위는 계량된 양을 전달하기 위한 밸브를 제공함으로써 결정될 수 있다. 예를 들어 본 화합물과, 적합한 분말 베이스, 예컨대 락토스 또는 진분의 분말 믹스를 함유하는, 흡입기 또는 취입기에서 사용하기 위한 젤라틴의 캡슐 및 카트리지가 제형화될 수 있다.
- [0200] 본원에서 또한 고려되는 것은 폐 전달이다. 본 조성물은 흡입되면서 포유류의 폐로 전달될 수 있으며, 폐 상피 라이닝을 가로질러 혈류로 횡단한다. 흡입 분자에 대한 다른 보고는 문헌[Adjei et al., 1990, Pharmaceutical Research, 7:565-569]; 문헌[Adjei et al., 1990, International Journal of Pharmaceutics, 63:135-144](류프롤리드 아세테이트); 문헌[Braquet et al., 1989, Journal of Cardiovascular Pharmacology, 13(suppl. 5):143-146](엔도텔린-1); 문헌[Hubbard et al., 1989, Annals of Internal Medicine, Vol. III, pp. 206-212] (a1-항트립신); 문헌[Smith et al., 1989, J. Clin. Invest. 84:1145-1146] (a-1-프로테이나아제); 문헌[Oswein et al., 1990, "Aerosolization of Proteins", Proceedings of Symposium on Respiratory Drug Delivery II, Keystone, Colorado, March](재조합 인간 성장 호르몬); 문헌[Debs et al., 1988, J. Immunol. 140:3482-3488](인터페론-g 및 종양 괴사 인자 알파) 및 플라츠(Platz) 등의 미국 특허 제5,284,656호(과립구 콜로니 자극 인자)를 포함한다. 진신 효과를 위한 약물의 폐 전달을 위한 방법 및 조성물은 1995년 9월 19일에 왕(Wong) 등에게 허여된 미국 특허 제5,451,569호에 기술되어 있다.
- [0201] 본 발명의 실시에서의 사용용으로 고려되는 것은 치료 제품의 폐 전달용으로 설계된 넓은 범위의 기계적 기구인데, 이는 분무기, 용량 계량식 흡입기, 및 분말 흡입기를 포함하지만 이로 한정되는 것은 아니며, 이들 모두는 당업계의 숙련자에게 친숙하다.
- [0202] 조성물의 전달에 적합한 구매가능한 기구의 일부 특정한 예로는 미국 미주리주 세인트 루이스 소재의 말린크로트, 인크.(Mallinckrodt, Inc.)에 의해 제조된 울트라벤트(Ultravent) 분무기; 미국 콜로라도주 엔글우드 소재

의 마르퀘스트 메디칼 프로덕츠(Marquest Medical Products)에 의해 제조된 아콘(Acorn) II 분무기; 미국 노스캐롤라이나주 리서치 트라이앵글 파크 소재의 글락소 인크.(Glaxo Inc.)에 의해 제조된 벤톨린(Ventolin) 용량 계량식 흡입기; 및 미국 매사추세츠주 베드포드 소재의 피슨즈 코퍼레이션(Fisons Corp.)에 의해 제조된 스피너(Spinahaler) 분말 흡입기가 있다.

- [0203] 모든 그러한 기구는 분배에 적합한 제형의 사용을 필요로 한다. 전형적으로, 각각의 제형은 이용되는 기구의 유형에 대하여 특이적이며, 치료법에서 유용한 일반적인 희석제, 아주반트 및/또는 담체에 더하여, 적절한 분사제 물질의 사용을 포함할 수 있다. 또한, 리포솜, 미세캡슐 또는 미소구체의 사용, 복합체의 포함, 또는 다른 유형의 담체가 고려된다. 화학적으로 변형된 항체는 또한 이용되는 기구의 유형 또는 화학적 변형의 유형에 따라 상이한 제형의 형태로 제조될 수 있다.
- [0204] 제트식 또는 초음파식 중 어느 하나의 분무기에서 사용하기에 적합한 제형은 전형적으로 용액 1 mL당 약 0.1 내지 25 mg의 생물학적 활성 치료제의 농도로 물에 용해된 치료제를 포함한다. 또한 제형은 완충제 및 단당(예를 들어, 항체 안정화 및 삼투압의 조절)을 포함할 수 있다. 분무기 제형은 또한 에어로졸 형성에 있어서 용액의 분무에 의해 야기되는 치료제의 표면 유도된 응집을 감소시키거나 또는 방지하기 위하여, 계면활성제를 함유할 수 있다.
- [0205] 용량 계량식 흡입기 기구에서 사용하기 위한 제형은 일반적으로 계면활성제의 도움으로 분사제 중에 현탁된 치료제를 함유하는 미분화 분말을 포함한다. 분사제는 이 목적에 이용되는 임의의 통상적인 물질, 예컨대 클로로플루오로카본, 히드로클로로플루오로카본, 히드رو플루오로카본 또는 탄화수소일 수 있는데, 이는 트리클로로플루오로메탄, 디클로로디플루오로메탄, 디클로로테트라플루오로에탄올 및 1,1,1,2-테트라플루오로에탄, 또는 이들의 조합을 포함한다. 적합한 계면활성제는 소르비탄 트리올레이트 및 대두 레시틴을 포함한다. 올레산은 또한 계면활성제로서 유용할 수 있다.
- [0206] 분말 흡입기 기구로부터의 분배를 위한 제형은 치료제를 함유하는 미분화된 건조 분말을 포함하며, 또한 벌킹제, 예컨대 락토스, 소르비톨, 수크로스 또는 만니톨을 상기 기구로부터의 분말의 분배를 돕는 양, 예를 들어 제형의 50 내지 90 중량%의 양으로 포함할 수 있다. 치료제는 원위 폐로의 가장 효과적인 전달을 위하여 10 mm(또는 마이크로미터) 미만, 가장 바람직하게는 0.5 내지 5 mm의 평균 입자 크기를 갖는 미립자 형태로 제조될 수 있다.
- [0207] 본 발명의 약학 조성물의 비강 전달이 또한 고려된다. 코 전달은 폐에서의 치료 제품의 침적에 대한 필요성 없이 상기 제품을 코에 투여한 직후 본 발명의 약학 조성물이 혈류로 통과되게 한다. 코 전달용 제형은 텍스트란 또는 사이클로텍스트란을 포함하는 것을 포함한다.
- [0208] 코 투여에 있어서, 유용한 기구는 소형의 경질 병이며, 상기 병에는 용량 계량식 스프레이어가 부착된다. 일 실시양태에서, 계량된 용량은 본 발명의 용액의 약학 조성물을 규정된 부피의 챔버 내로 당김으로써 전달되는데, 상기 챔버는 에어로졸화되도록 치수화된 천공을 가지며, 에어로졸 제형은 챔버 내의 액체가 압축될 때 스프레이를 형성함으로써 전달된다. 챔버는 본 발명의 약학 조성물이 투여되도록 압축된다. 특정한 실시양태에서, 챔버는 피스톤 어레인지먼트(arrangement)이다. 그러한 기구는 구매가능하다.
- [0209] 대안적으로, 스퀴즈(squeeze) 때 스프레이를 형성함으로써 에어로졸 제형이 에어로졸화되도록 치수화된 천공 또는 개구를 갖는 플라스틱 스퀴즈 병이 사용된다. 일반적으로 개구는 상기 병의 상부에서 발견되며, 상기 상부는 일반적으로 에어로졸 제형의 효율적인 투여를 위하여 비강 내에 부분적으로 맞도록 점점 늘어진다. 바람직하게는 코 흡입기는 측정된 용량의 약물의 투여를 위하여 에어로졸 제형의 계량된 양을 제공한다.
- [0210] 또한 본 조성물은 예를 들어 통상적인 좌약 베이스, 예컨대 코코아 버터 또는 다른 글리세라이드를 함유하는, 좌약 또는 보류 관장제와 같은 직장 또는 질 조성물의 형태로 제형화될 수 있다.
- [0211] 이전에 기술된 제형에 더하여, 조성물은 또는 데포(depot) 제제로서 제형화될 수 있다. 이러한 장시간 작용 제형은 적합한 중합체 물질 또는 소수성 물질(예를 들어, 허용되는 오일 중 에멀전으로서) 또는 이온 교환 수지를 이용하여, 또는 난용성 유도체로서, 예를 들어 난용성 염으로서 제형화될 수 있다.
- [0212] 약학 조성물은 또한 적합한 고체 또는 겔상 담체 또는 부형제를 포함할 수 있다. 이러한 담체 또는 부형제의 예는 탄산칼슘, 인산칼슘, 다양한 당류, 전분, 셀룰로오스 유도체, 젤라틴, 및 중합체, 예컨대 폴리에틸렌 글리콜을 포함하지만, 이로 한정되는 것은 아니다.
- [0213] 적합한 액체 또는 고체 약학 제제 형태는 예를 들어 흡입용 수성 또는 염수 용액, 미세캡슐화된, 엔코클리에이

팅된(encochleated), 미시적 금 입자 상에 코팅된, 리포솜 내에 함유된, 분무된 에어로졸, 피부 내로의 임플란트를 위한 펠렛, 또는 침예한 물체 상에 건조시켜 피부를 스크래칭하여 피부 내로 들어가게 하는 펠렛이다. 또한 약학 조성물은 활성 화합물을 장기간 방출하는 과립, 분말, 정제, 코팅 정제, (미세)캡슐, 좌약, 시럽, 에멀전, 현탁액, 크림, 드롭 또는 제제를 포함하며, 여기서 이들의 제조 부형제 및 첨가제 및/또는 보조제, 예컨대 붕해제, 결합제, 코팅제, 팽윤제, 윤활제, 착향제, 감미제 또는 가용화제가 상기에 기술된 바와 같이 통상적으로 사용된다. 본 약학 조성물은 다양한 약물 전달 시스템에서 사용하기에 적합하다. 약물 전달 방법에 대한 간략한 개요에 대해, 본원에 참고로 포함된 문헌[Langer, Science 249:1527-1533, 1990]을 참조한다.

- [0214] 다른 치료제는 그 자체로(순수) 투여되거나 약학적으로 허용되는 염의 형태로 투여될 수 있다. 의약에서 사용될 때, 상기 염은 약학적으로 허용되어야 하지만, 약학적으로 허용되지 않는 염이 이의 약학적으로 허용되는 염의 제조에 편리하게 사용될 수 있다. 그러한 염은 하기 산으로부터 제조되는 것을 포함하지만, 이로 한정되는 것은 아니다: 염화수소산, 브롬화수소산, 황산, 질산, 인산, 말레산, 아세트산, 살리실산, p-톨루엔 술폰산, 타르타르산, 시트르산, 메탄 술폰산, 포름산, 말론산, 숙신산, 나프탈렌-2-술폰산 및 벤젠 술폰산. 또한, 그러한 염은 카르복실산 기의 나트륨, 칼륨 또는 칼슘 염과 같은 알칼리 금속 또는 알칼리 토류 염으로서 제조될 수 있다.
- [0215] 적합한 완충제는 하기를 포함한다: 아세트산 및 염(1-2% w/v); 시트르산 및 염(1-3% w/v); 붕산 및 염(0.5-2.5% w/v); 및 인산 및 염(0.8-2% w/v). 적합한 방부제는 벤잘코늄 클로라이드(0.003-0.03% w/v); 클로로부탄올(0.3-0.9% w/v); 파라벤(0.01-0.25% w/v) 및 티메로살(0.004-0.02% w/v).
- [0216] 본 발명의 약학 조성물은 약학적으로 허용되는 담체에 포함된 유효량의 항체 및 임의로 치료제를 함유한다. 약학적으로 허용되는 담체라는 용어는 하나 이상의 양립가능한 고체 또는 액체 충전제, 희석제 또는 봉입 물질을 의미하는데, 이는 인간 또는 다른 척추 동물에게의 투여용으로 적합하다. 담체라는 용어는 유기 또는 무기 성분으로서 천연 또는 합성인 것을 나타내는데, 활성 성분은 이것과 조합되어 적용을 돕는다. 약학 조성물의 성분은 또한 요망되는 약학 효율을 실질적으로 손상시키는 어떠한 상호작용도 없게 하는 방식으로, 본 발명의 화합물과 그리고 서로와 혼합될 수 있다.
- [0217] 특정적으로 항체를 포함하지만 이로 한정되는 것은 아닌 조성물은 입자 형태로 제공될 수 있다. 본원에서 사용될 때, 입자는 전적으로 또는 부분적으로 항체로 이루어질 수 있는 나노입자 또는 미세입자(또는 일부의 경우 더욱 큰 입자)를 의미한다. 입자는 장용 코팅을 포함하지만, 이로 한정되는 것은 아닌 코팅으로 둘러싸인 코어 내에 치료제(들)를 함유할 수 있다. 또한 치료제(들)는 입자 전체에 걸쳐 분산될 수 있다. 또한 치료제(들)는 입자 내에 흡착될 수 있다. 입자는 0차 방출, 1차 방출, 2차 방출, 지연 방출, 지속 방출, 즉각적인 방출 및 이들의 임의의 조합 등을 포함하는 임의의 차수의 방출 동력학의 것일 수 있다. 입자는 치료제(들)에 더하여, 약학 및 의약 분야에서 통상적으로 사용되는 임의의 물질을 포함할 수 있으며, 이는 침식성, 비침식성, 생분해성, 또는 비생분해성 물질 또는 이들의 조합을 포함하지만, 이로 한정되는 것은 아니다. 입자는 용액 중에 또는 반고체 상태의 항체를 함유하는 미세캡슐일 수 있다. 입자는 사실상 임의의 형상의 것일 수 있다.
- [0218] 비생분해성 및 생분해성 중합체 물질 둘 모두가 치료제(들)의 전달을 위한 입자의 제조에서 사용될 수 있다. 그러한 중합체는 천연 또는 합성 중합체일 수 있다. 중합체는 방출이 요망되는 시간의 기간을 기반으로 하여 선택된다. 특히 관심있는 생체침착성 중합체는 문헌[H.S. Sawhney, C.P. Pathak and J.A. Hubell, *Macromolecules*, (1993) 26:581-587]에 기술된 생체침착성 히드로겔을 포함하며, 상기 문헌의 교시는 본원에 참고로 포함된다. 이들은 폴리히알루론산, 카제인, 젤라틴, 글루틴, 폴리엔하이드리드, 폴리아크릴산, 알기네이트, 키토산, 폴리(메틸 메타크릴레이트), 폴리(에틸 메타크릴레이트), 폴리(부틸메타크릴레이트), 폴리(이소부틸 메타크릴레이트), 폴리(헥실메타크릴레이트), 폴리(이소데실 메타크릴레이트), 폴리(라우릴 메타크릴레이트), 폴리(페닐 메타크릴레이트), 폴리(메틸 아크릴레이트), 폴리(이소프로파일 아크릴레이트), 폴리(이소부틸 아크릴레이트), 및 폴리(옥타데실 아크릴레이트)를 포함한다.
- [0219] 조성물은 제어된 방출계에 함유될 수 있다. "제어된 방출"이라는 용어는 제형으로부터의 약물 방출의 방식 및 프로파일이 제어되는 임의의 약물 함유 제형을 나타내고자 한다. 이는 즉각적이지 않은 방출형의 제형 뿐만 아니라 즉각적인 방출형의 제형도 나타내며, 이때 즉각적이지 않은 방출형의 제형은 지속 방출형 및 지연 방출형 제형을 포함하지만, 이로 한정되는 것은 아니다. "지속 방출"("장기간 방출"로도 칭해짐)이라는 용어는 장기간에 걸쳐 점진적인 약물 방출을 제공하는, 그리고 바람직하게는 반드시 그러한 것은 아니지만 장기간에 걸쳐 약물 혈중 수준이 실질적으로 일정한 약물 제형을 나타내기 위하여 그의 통상적인 의미로 사용된다. "지연 방출"이라는 용어는 제형의 투여와 이로부터의 약물의 방출 사이에 시간 지연이 있는 약물 제형을 나타내기 위하여 그의 통상적인 의미로 사용된다. "지연 방출"은 장기간에 걸친 점진적인 약물 방출을 포함할 수 있거나 그렇지

않을 수 있으며, 따라서 "지속 방출"일 수 있거나 그렇지 않을 수 있다.

- [0220] 장기간 지속 방출형 임플란트의 사용이 만성 질병의 치료에 특히 적합할 수 있다. 본원에서 사용될 때, "장기간" 방출은 임플란트가 7일 이상, 바람직하게는 30-60일 동안 활성 성분의 치료적 수준을 전달하도록 구성 및 배열됨을 의미한다. 장기간 지속 방출형 임플란트는 당업계의 숙련자에게 공지되어 있으며, 상기에 기술된 방출계들 중 일부를 포함한다.
- [0221] 본원에서 또한 제공되는 것은 항체 조성물을 함유하는 키트이다. 본 키트는 항체 조성물을 포함하며, 또한 하나 이상의 바이알 또는 용기를 포함할 수 있다. 본 키트는 또한 본원에 기술된 질환, 예컨대 암을 갖는 또는 그러한 질환의 증상을 갖는 대상체에게 상기 성분(들)을 투여하는 것에 대한 설명서를 포함할 수 있다.
- [0222] 일부 실시양태에서, 본 키트는 약학 제제용 바이알, 약학 제제 희석제용 바이알 및 항체를 포함한다. 약학 제제용 희석제를 포함하는 바이알은 임의적이다. 희석제용 바이알은 항체의 농축된 용액 또는 동결건조된 분말일 수 있는 것을 희석시키기 위한 생리식염수와 같은 희석제를 포함한다. 설명서는 특정한 양의 희석제를 특정한 양의 농축된 약학 제제와 혼합함으로써 주사 또는 주입용 최종 제형을 제조하는 데 대한 설명서를 포함할 수 있다. 설명서는 시린지 또는 다른 투여 기구에서 사용하는 데 대한 설명서를 포함할 수 있다. 설명서(20)는 환자를 유효량의 항체로 치료하는 것에 대한 설명서를 포함할 수 있다. 용기가 병이든지, 격벽을 갖는 바이알이든지, 격벽을 갖는 앰플이든지, 주입 백 등이든지 간에, 제제를 포함하는 용기는 제제가 오토클레이브되거나 다르게는 살균되었을 때 변색되는 통상적인 마킹과 같은 인덱스를 포함할 수 있음이 또한 이해된다.
- [0223] 본 발명을 하기 실시예로 추가로 예시하는데, 실시예는 어떠한 방식으로든지 추가의 제한으로서 해석되어서는 안된다. 본 출원 전체에 걸쳐 인용된 모든 참고 문헌(참고 문헌, 허여된 특허, 공개된 특허 출원, 및 공개류 중인 특허 출원을 포함함)의 전체 내용은 특히 상기에 언급된 교시를 위하여 본원에 명백하게 참고로 포함된다. 그러나, 어떠한 참고 문헌의 인용도 상기 참고 문헌이 종래 기술임을 인정하는 것으로 의도되는 것은 아니다.
- [0224] 실시예
- [0225] 1. 고도로 갈락토실화된 항체를 발현하는 트랜스제닉 염소의 생성
- [0226] *CD20 항체 구성물의 생성*
- [0227] 트랜스제닉 CD20 항체(Tg20)의 아미노산 서열을 도 1에 제공하는데, 경쇄는 서열 번호 1이며, 중쇄는 서열 번호 2이다. 트랜스제닉 CD20 항체의 아미노산 서열을 코딩하는 핵산 서열을 사용하여 트랜스제닉 CD20 항체(TG20)을 발현하는 트랜스제닉 염소를 생성하였다. 카제인 프로모터를 트랜스제닉 CD20 항체의 아미노산 서열을 코딩하는 핵산 서열에 작동가능하게 연결하여 염소의 유선에서의 핵산 서열의 발현을 도왔다.
- [0228] 항-CD20 항체의 경쇄 및 중쇄를 코딩하는 핵산 서열을 하기 부가/변화를 이용하여 합성하였다:
- [0229] 1) 측면 XhoI 부위를 부가하여 발현 벡터 Bc800 내로의 서브클로닝을 도왔다.
- [0230] 2) 코작 콘센서스 서열(Kozak consensus sequence)(GCCACC)을 상기 둘 모두의 구성물 상의 ATG 개시자의 바로 상류에 부가하였다.
- [0231] 3) 사일런트(silent) 돌연변이를 잠재적인 스플라이스 부위의 파괴를 위하여 중쇄의 종료 코돈 근처에 도입하였다: **G GGT AAA TGA** (서열 번호 3)의 **G GGA AAA TGA** (서열 번호 4)로의 돌연변이.
- [0232] 경쇄 및 중쇄 서열 둘 모두를 발현 벡터 Bc800의 XhoI 클로닝 부위 내로 서브클로닝하였는데, 상기 벡터는 닭 베타 글로빈 인슐레이터(insulator) 서열, 6.2 kb의 5' 베타카제인 프로모터 서열, XhoI 클로닝 부위, 7.1 kb의 3' 베타 카제인 하류 서열, 도 다른 인슐레이터 서열, G418 내성 마커, 및 최종 인슐레이터 서열을 슈퍼코스(SuperCos) 골격 내에 포함한다(도 2 참조). 플라스미드 DNA를 염화세슘 원심분리에 의해 제조하였다. 슈퍼코스 골격을 측면 NotI 부위를 이용하여 방출시키고, 아가로스 겔을 통한 전기영동에 의해 트랜스진 단편으로부터 분리하였다. 그 후, 생성된 정제된 핵산 단편을 체세포 핵이식에 사용하였다. TG20의 중쇄 및 경쇄를 코딩하는 cDNA 단편을 유선 특이적 발현 벡터 내로 삽입하여 2개의 트랜스진을 획득하였으며, 이를 암컷 염소 태아 세포(리포펙트아민(LipofectAMINE), 깁코(Gibco)) 내로 동시 형질감염시켰다. 핵이식을 이전에 기술된 바와 같이 수행하였다(문헌[Melican et al. 2005]; 문헌[Therigenology 63:1549]).
- [0233] *피부 섬유모세포주의 생성*
- [0234] 신선한 염소 피부 생검 샘플로부터의 섬유모세포를 테스트관내에서 일차 배양에서 유지하였다. 간략하게는, 피

부 샘플을 Ca^{++} 무함유 및 Mg^{++} 무함유 인산염 완충 염수(PBS)에서 미분화하고, EDTA 중 회석 트립신으로 수확하여 단일 세포 현탁액을 회수하고, 37°C에서 배양하였다. 융합성 세포를 트립신 처리하고, 계대배양하였다. 세포의 분취물을 미래의 사용을 위하여 액체 질소에서 저온 보존하였다.

[0235] *형질감염된 세포주의 분석*

[0236] 형질감염된 세포를 트랜스진에 대하여 특이적인 프로브를 이용하여 서던(Southern) 블롯 분석에 의해 특성화하여 트랜스진 카피수를 확립하고 잠재적인 재배열을 확인하였다. 각각의 세포주를 FISH로 또한 분석하여 단일 통합을 확인하고 염색체 위치를 결정하였다. 세포유전학적 분석을 수행하여 세포주의 핵형을 확인하였다. PCR, 서던 블롯 및 FISH 분석에 의해 Ig 중쇄 및 경쇄 트랜스진 둘 모두의 존재를 확인하였다.

[0237] *FISH*

[0238] 간기 FISH를 위하여, 각각의 확장된 콜로니로부터의 수백개의 세포를 필터 상에 고정시키고, 증폭된 트랜스진에 특이적인 디그옥시제닌으로 표지된 프로브에 혼성화하였다. 중기 FISH를 위하여, 세포를 랩 텍 챔버(Lab Tek Chamber) 슬라이드(미국 뉴욕주 로체스터 소재의 닝크(Nunc)) 상에서 배양하고, 5-브로모-2'-데옥시우리딘(Brd U)으로 펄싱하여 복제 밴딩(banding)을 허용하였다. 프로브 결합을 FITC 공액 항-디그옥시제닌으로 검출하고, 염색체를 4',6-디아미디노-2-페닐인돌(DAPI)로 대조염색하였다. 이미지를 짜이스 악시오스콥(Zeiss Axioskop) 현미경(미국 뉴욕주 톤우드 소재의 짜이스 이미징(Zeiss Imaging)), 하마마츠(Hamamatsu) 디지털 카메라(미국 뉴저지주 브리지워터 소재의 하마마츠(Hamamatsu)), 및 이미지 프로-플러스(Image Pro-Plus) 소프트웨어(미국 매릴랜드주 실버 스프링즈 소재의 미디어 사이버네틱스(Media Cybernetics))를 이용하여 포착하였다.

[0239] *세포유전학적 분석*

[0240] 세포유전학적 분석을 공여체의 형질감염된 섬유모세포주에서 수행하였다. 트랜스진 프로브를 디그옥시제닌-dUTP를 이용하여 닉 번역(nick translation)에 의해 표지하였다. 변성된 염색체에 대한 프로브 결합을 FITC 공액 항-디그옥시제닌을 이용하여 또는 서양고추냉이 퍼옥시다아제 공액 항-디그옥시제닌, 이어서 FITC 공액 티라미드를 이용하여 검출하였다. 염색체 밴딩 패턴을 DAPI로 가시화하였다. 염소는 60개의 염색체를 가지며, 이들 모두는 말단 동원체형이다(중간에서라기보다는 또는 중간 근처라기보다는 오히려 하나의 말단에 동원체를 가짐). 중기 스프레드(spread)를 염색체의 손실, 복제 또는 총체적인 재배열과 같은 총체적인 비정상의 증거에 대하여 검사하였다.

[0241] *CD20 항체를 발현하는 트랜스제닉 동물의 생성*

[0242] CD20 항체의 트랜스제닉 구성물을 사용하여 트랜스제닉 염소를 생성하였다. 성숙 항체를 생성하는 트랜스제닉 염소를 중쇄 및 경쇄 구성물의 1:1 혼합물의 도입에 의해 생성하였다.

[0243] 소정의 유전학적 특성을 갖는 트랜스제닉 염소를 당업계에 통상적인 핵이식 기술을 이용하여 생성하였다. 상기에 기술된 트랜스제닉 구성물을 표준 형질감염에 의해 피부 섬유모세포 세포주 내로 도입하였다. 제조할 일차 세포주를 트랜스진의 카피수, 완전성 및 통합 부위에 대하여 테스트관내에서 스크리닝한 후, 상기 세포주를 사용하여 트랜스제닉 동물을 생성하였다.

[0244] 염소를 USDA 등록된, FDA 및 EMA 검사된 시설에서 유지하였다. 자식의 트랜스진 분석(FISH, PCR 및 서던 블롯)을 혈액 및 조직 샘플로부터 단리한 게놈 DNA를 사용하여 행하였다. 자식의 트랜스진 분석(FISH, PCR 및 서던 블롯)을 혈액 및 조직 샘플로부터 단리한 게놈 DNA를 사용하여 행하였다(도 7 참조).

[0245] *항체의 정제*

[0246] 항체를 트랜스제닉 염소의 밀크로부터 수확하였다. 염소 밀크는 트랜스제닉 염소의 호르몬 유도된 젖분비에 의한 것이었다(예를 들어, 문헌[Ebert et al., 1994, Biotech 12: 699-702] 참조). 상기 밀크는 원심분리에 의해 대다수의 카세인 및 지방이 제거되도록 청정시켰다. 그 후, 항체를 단백질 A 크로마토그래피, 이어서 Q 세파로스 패스트 플로우(Sepharose Fast Flow) 상에서의 음이온 교환 크로마토그래피로 정제하였다. 최종 생성물을 시트르산나트륨/염화나트륨 + 폴리소르베이트 80 중에 제형화하였다.

[0247] 2. 트랜스제닉으로 생성된 항체의 분석

[0248] A. 재료 및 방법:

[0249] *클리코실화 프로파일링*

- [0250] 프로자임(Prozyme) *N*-탈글리코실화 키트(샌 리앤드로(San Leandro), 미국 캘리포니아주 소재)를 사용하여 제조업체의 절차에 따라 항체 샘플의 *N*-탈글리코실화를 수행하였다. 간단히 말해서, 300 µg의 건조된 항체 샘플을 135 µL의 10-mM 수성 트리스(Tris)-HCl 완충액(pH 8.0) 중에서 회수하고, 4.5 µL의 10% (v/v) β-메르캅토에탄올 수용액을 첨가하여 항체 디설피드 가교를 감소시켰다. 7.5 mU의 펩티달-*N*-글리코시다제(PNGase) F를 첨가한 후 37°C에서 하룻밤 인큐베이션하여 *N*-탈글리코실화를 수행하였다.
- [0251] 이 단계에서는, 많은 *N*-글리칸을 글리코실아민으로 방출하였으며, 그 후 환원 글리칸으로 서서히 가수분해되었다. PNGase F-분해된 항체 샘플에 5% (v/v)의 최종 농도로 빙초산을 첨가한 후 실온에서 1시간 인큐베이션함으로써 환원 글리칸의 완전한 재생을 수행하였다. 새로 재생된 환원 *N*-글리칸 믹스를 50 mg 하이퍼셉 하이퍼카רב(Hypersep Hypercarb) 다공성 흑연화 카본(porous graphitized carbon, PGC) 컬럼 상으로 고상 추출(SPE)에 의해 정제하였다(써모피셔 사이언티픽(ThermoFischer Scientific), 독일 브레멘 소재) (문헌[Packer et al., 1998]). PGC SPE 컬럼을 1 mL의 메탄올 및 2 x 1 mL의 0.1% (v/v) 수성 트리플루오로아세트산 (TFA)으로 순차적으로 세척하였다. 이 올리고사카라이드를 200 µL의 0.1% (v/v) 수성 TFA 중에 용해시키고, 컬럼에 적용하고, 2 x 1 mL의 0.1% (v/v) 수성 TFA로 세척하였다. 0.1% (v/v) TFA를 함유하는 2 x 400 µL의 25% (v/v) 수성 아세토니트릴을 적용하고 용리액을 진공-건조시킴으로써 글리칸의 용리를 수행하였다.
- [0252] 건조된 글리칸을 0.35 M 2-AB 및 1 M 시아노붕소화나트륨을 함유하는 DMSO 중 33% (v/v) 아세트산 10 µL에 의해 회수함으로써 PGC-정제된 글리칸을 2-아미노벤즈아미드(2-AB)로 환원적으로 아미노화하고, 이 반응을 37°C에서 16시간 동안 유지하였다. 2-AB-표지된 *N*-글리칸을 50 mg 오아시스(Oasis) 중합체 HLB SPE 컬럼(워터스(Waters), 미국 매사추세츠주 밀포드 소재) 상으로 정제하였는데, 이때 이 컬럼은 친수성 상호작용 크로마토그래피(hydrophilic interaction chromatography, HILIC) 모드에서 사용된다. HILIC SPE 컬럼을 1 mL의 20% (v/v) 수성 아세토니트릴로 순차적으로 습윤시키고, 2 x 1 mL의 아세토니트릴로 평형화하고, 이어서 아세토니트릴 중에 용해된 2-AB 유도체를 SPE 컬럼 상에 로딩하였다. 2 x 1 mL의 아세토니트릴로 컬럼을 세척한 후, 그 다음에 2 x 500 µL의 20% (v/v) 수성 아세토니트릴을 적용함으로써 2-AB 유도체의 용리를 수행하였다. 1 mL의 용리액을 50 µL로 진공-농축시켰다.
- [0253] 정제된 2-AB 유도체를 150 x 4.6 mm ID TSK-겔 아미드-80 HILIC HPLC 컬럼(도쇼 바이오사이언스(TOSOH Bioscience), 미국 펜실베이니아주 킹 오브 프리시아 소재)를 사용하여 순상 고성능 액체 크로마토그래피(NP-HPLC)로 최종적으로 프로파일링하였다. 이동상은 pH 4.4로 조정된 50 mM 포름산암모늄 수용액(A) 및 아세토니트릴(B)의 혼합물로 이루어졌다. 작동 유량 및 온도는 각각 1 mL/min 및 30°C였다. 5 µL의 정제된 2-AB 유도체를 80% (v/v) 수성 아세토니트릴을 사용하여 40배 희석시키고, 50 µL의 새로 진탕된 유기 혼합물을 80% (v/v) B로 평형화된 HILIC 컬럼에 주입하였다. 일단 샘플을 주입하면, 다음과 같이 *N*-글리칸의 분리를 수행하였다: 15분 내에 80% 내지 70% (v/v) B; 150분 내에 70% 내지 55% (v/v) B; 5분 내에 55% to 10% (v/v) B; 10분 동안 10% (v/v) B; 1분 내에 10% 내지 80% (v/v); 45분 동안 80% (v/v) B (재평형화). 330 nm의 여기 파장 및 420 nm의 방출 파장으로 형광 검출(FD)에 의해 이 형광 유도체의 검출을 수행하였다.
- [0254] 참고문헌: [Guile GR, Rudd PM, Wing DR, Prime SB, Dwek RA. A rapid high-resolution high-performance liquid chromatographic method for separating glycan mixtures and analyzing oligosaccharide profiles. Anal Biochem. 1996 Sep 5; 240(2):210-26]; [Packer NH, Lawson MA, Jardine DR, Redmond JW. A general approach to desalting oligosaccharides released from glycoproteins. Glycoconj J. 1998 Aug; 15(8):737-47].
- [0255] 인간 CD 16a에 대한 결합
- [0256] 바이아코어(Biacore) 시스템(X100, 지이 헬스케어(GE Healthcare))에서 표면 플라즈몬 공명(Surface Plasmon Resonance, SPR) 기술을 사용하여 인간 CD 16a에 대한 결합을 수행하였다. 이 분석에서는, CD 16a를 2183 RU의 수준으로 아민 화학을 사용하여 SPR 칩 상에 고정화하였다. 테스트하고자 하는 항체를 상이한 농도(50, 100 및 200 nM)로 PBS 완충액 중에 희석시키고, 동일한 완충액과 함께 고정화된 CD 16a 상에 순차적으로 주입하였다. 칩 상에서, 비특이적 상호작용에 의해 야기된 배경을 감하기 위하여 하나의 유동-셀(flow-cell)을 대조구로서 사용하였다. 각각의 주입 사이에는, 3.75 nM NaOH 용액으로 칩의 재생을 수행하였다.
- [0257] CD 16 분석
- [0258] 간단히 말해서, NK 이펙터 세포를 불사화 트랜스제닉 세포성 세포(인간 CD16a를 발현하는 주르카트(Jurkat) 세포)로 치환하여 실험의 높은 재현성을 가능하게 하였다. 주르카트 CD 16a 세포, WIL2-S 세포 및 PMA(Phorbol-

Myristate Acetate, 포르볼-미리스테이트 아세테이트)를 각각 이펙터 세포, 표적 세포 및 비특이적 활성화제로서 사용하고, 테스트하고자 하는 항체의 용량 범위로 인큐베이션하였다. 인큐베이션 후, 주르카트 세포 활성화는 IL-2 사이토카인 방출로 이어졌으며, 이를 특이적 ELISA에 의해 정량화하였다(문헌[Vivier E et al., Int. Immunol. 1992, 4 (11): 1313- 1323]). 상청 세포 배양액 내의 IL-2의 양은 WIL2-S/테스트하고자 하는 항체의 면역 복합체가 CD 16a에 결합하고 이를 활성화하는 능력에 직접 상관된다.

[0259] ADCC 분석

[0260] 테스트하고자 하는 항체의 약리학적 활성을 테스트하는 데 사용된 ADCC (항체-의존성 세포성 세포독성)를 락테이트 테히드로게나아제 방출 분석에 의해 실현하였다. 이펙터 세포로서 사용된 건강한 공여체로부터의 인간 NK 세포를 면역자성 세포를 사용하여 정제하였는데, 이때 이 면역자성 세포는 NK 세포 단리 키트 및 오토맥스 (AutoMacs) 오토매트(automat) (밀테니 바이오텍(Miltenyi biotec))로 분류하였다. 10% FCS를 함유하는 IMDM 중 배양액 중에 유지된 버킷 림프종 라지(Raji) 세포주(ATCC CCL 86)(피에이에이 더 셀 컬처 컴퍼니(PAA The cell culture company), 프랑스 레 뮤호 소재)를 표적 세포로서 사용하였다. 세포를 마이크로플레이트 내에서 상이한 농도의 항체의 존재 하에서 이펙터/표적 비 R=10/1로 공동-인큐베이션하고, 5% CO₂를 함유하는 가습된 분위기 내에서 37°C에서 4시간 동안 인큐베이션하였다. 단지 표적 세포만이 들어 있는 웰 및 단지 이펙터 세포만이 들어 있는 또 다른 웰을 포함하는 음성 대조 웰을 이 테스트에 포함시켜 이펙터 세포-매개 표적 세포사에 대하여 자발적인 이펙터 세포사와의 구별을 가능하게 하였다. 표적 세포 및 항체를 공동-인큐베이션함으로써 제조된 "항체 대조" 웰을 또한 진행하여 이펙터 세포의 부재 하에서의 표적 세포에 대한 항체의 고유 세포독성 특성을 테스트하였다. 마지막으로, 잠재적인 항체 비의존성 세포성 세포독성(antibody-independent cellular cytotoxicity, AICC) 활성을 평가하기 위하여 항체의 부재 하에서 표적 및 이펙터 세포 둘 모두를 공동-인큐베이션함으로써 대조 웰을 제조하였다. 원심분리 후에, 세포독성 검출 키트(로슈 어플라이드 사이언스(Roche Applied Science), 독일 소재)를 사용하여 상청액을 LDH 방출에 대해 테스트하였다.

[0261] 해동 후에, PBMC를 세척하고 10% FCS로 보충된 RPMI 중에 현탁시켰다. MEC-1 또는 SUDHL-8 세포주를 4°C에서 30분 동안 20 µg/ml로 인간 mAb와 함께 인큐베이션하였다. 세척 후에, 세포주를 10분 동안 카복시플루오레세인 디아세테이트 숙신이미딜 에스테르(CFSE)로 표지하였다. 표지된 표적 세포를 RPMI 1640 (+10% FCS) 중에 현탁시키고 다양한 이펙터/표적(E/T) 비로 PBMC와 혼합하였다. 세포를 37°C에서 4시간 인큐베이션하고, 밀테니로부터의 키트를 사용하여 PL 인간 B-CLL 또는 CLL 환자 또는 건강한 지원자로부터의 PBMC로부터 부화된 인간 B 림프구로 염색한 후에 FC에 의해 분석하였다.

[0262] 각각의 항체 농도에 대한 ADCC 활성(%)을 다음 식에 따라 계산하였다: [(항체 + 표적 + NK) - (항체 + 표적)] / [100 - (항체 + 표적)] - [(NK + 표적) - (항체 + 표적)] / [100 - (항체 + 표적)]. 실험 값을 프리즘(Prism) 소프트웨어(그래프패드 소프트웨어 인크.(Graphpad Software Inc.), 미국 캘리포니아주 라 줄라 소재)를 사용하여 이용하고 S자형 용량-반응 곡선에 피팅하고, E_{max} (최대 세포독성) 및 EC₅₀ (E_{max}의 50%를 얻기 위해 필요한 항체 농도)을 결정하였다.

[0263] CDC 분석

[0264] 테스트하고자 하는 항체를 인간 혈청의 존재 하에서 CD20 항원을 발현하는 WIL2-S 세포와 하나의 농도로 혼합하였다. 각각의 테스트에서, 8개의 샘플을 독립적으로 제조하였다. 인간 Clq 결합된 혈청 내의 세포를 10 µg/ml의 인간 mAb 및 다양한 농도의 Clq로 37°C에서 10분 스파이킹하였다. DNA 염료 프로피듐 요오다이드(PI)의 삽입에 의해 형광에 의해 세포사를 결정하였다. 형광 수준은 배양 배지 내의 생존 세포의 개수에 비례한다(문헌 [O'Brien, J. et al (2000) Eur. J. Biochem. 267, 5421-5426]).

[0265] 시노몰구스 약동학 연구

[0266] 시노몰구스 원숭이(마카카 파시쿨라스(*Macaca fascicularis*))는 체중이 3.1 내지 4.4 kg의 범위였다. 투약 개시 전에, 모든 동물의 체중을 측정하고, 전산 무작위화 절차를 사용하여 처리군에 할당하였다. 혈액 샘플을 투약 개시 전에 2회 수집하였으며(여분 동물 포함), 제2 샘플링을 투약 전 1 내지 4일 사이에, 이어서 1일(투약 후 4시간)에, 그리고 2 내지 8일, 15, 22, 29, 36, 43, 50, 57, 64, 71, 78, 85, 및 92일에 수집하였다. 동물을 92일에 안락사하였다. 적격한 분석 방법을 사용하여 혈액 샘플을 분석하였다. 림프구 집단을 세포 표면 마커에 대해 특이적인 항체를 사용하여 유세포 분석에 의해 정량화하였다. 절제 생검에 의해 림프절(LN)을 수집하였으며, 세포 표면 마커에 대해 특이적인 항체를 사용하여 유세포 분석에 의해 CD45+ 림프구의 상대 백분율로서 림프구 집단을 정량화하였다. 윈논린(WinNonLin) 약동학 소프트웨어(파르사이트 코퍼레이션(Pharsight Corp.), 미국 캘

리포니아주 마운틴 뷰 소재)를 사용하여 약동학적 파라미터를 평가하였다. 파라미터 평가에 대해 비-구획적 접근법을 사용하였다(도 10 및 도 11 참조).

[0267] 전혈 실험

[0268] 이 테스트는 도 6에 따라 특히 CDC 및 ADCC에서 모든 자연적인 면역학적 현상에 의해 인간 공여체의 전혈에서 B 림프구의 제거를 유도하는 Tg20의 능력을 평가하기 위하여 수행하였다.

[0269] (말초 혈액에서 그리고 일부 림프양 기관에서) B 세포 제거에 있어서 항체의 활성 및 약동학적 프로파일을 상이한 항-CD20 항체에 대하여 모니터링하였다: 2가지의 상이한 용량으로 정맥내 경로에 의해 투여할 때 시노몰구스 원숭이에서 RTX 및 TG20.

[0270] 이 연구 설계는 다음과 같았다:

[0271] - 용량 수준: 0.03 mg/kg/일(저) 및 0.3 mg/kg/일(고)

[0272] - 항체당 용량당 3마리의 동물

[0273] 혈액 표현형 결정

[0274] 혈액 샘플을 투약 개시 전에 2회 수집하였으며(여분 동물 포함), 제2 샘플링을 투약 전 1 내지 4일 사이에, 이어서 1일(투약 후 4시간)에, 그리고 2 내지 8일, 15, 22, 29, 36, 43, 50, 57, 64, 71, 78, 85, 및 92일에 수집하였다. 혈액 샘플을 2일 내지 92일 동안 대략 동일한 시점에 수집하였다. 1 mL 부피의 혈액을 대퇴부 정맥으로부터 튜브 내로 수집하였는데, 상기 튜브는 림프구 하위세트의 분석을 위하여 항응고제로서 K₂EDTA를 함유하였다. 샘플은 22일 이후의 계획된 종료시에는 동물로부터 수집하지 않았다. 샘플을 온화하게 혼합하고, 프로세싱을 위한 테스트링 시설의 면역학 실험실로 옮기기까지 주위 조건에서 유지하였다.

[0275] 혈액 샘플을 적격 분석 방법을 이용하여 분석하였다. 하기 표에 확인된 림프구 집단을 세포 표면 마커에 대한 특이적 항체를 이용하여 유세포 분석법으로 정량화하였다(상대적인 백분율 및 절대 계수치). 샘플을 하기 항체 패널을 이용하여 22일까지 프로세싱하였다: CD45/CD3/CD8/CD4, CD45/CD3/CD8/CD16, 및 CD45/CD3/CD20/CD40. 그 후, 29일 내지 92일까지만 B 림프구 항체 패널을 평가하였다((CD45/CD3/CD20/CD40). 총 림프구 계수치를 비디트루카운트(BD TruCount) 튜브를 사용하여 각각의 항체 패널 튜브에 대하여 결정하고, 각각의 샘플에 있어서 전혈 1 마이크로리터당 CD45+ 림프구의 평균으로서 보고하였다. 이소타입 대조구를 사용하지 않았으며, DPBS 튜브를 음성 대조구로서 사용하였다.

[0276] 림프절 면역표현형 결정

[0277] 우측 서혜부 림프절(LN)을 8일에 동물로부터의 절제 생검에 의해 수집하고, 좌측 서혜부 림프절을 22일에 절제 생검에 의해 수집하였다. 우측 액와 림프절을 92일에 (해부에서) 클린한 절단에 의해 수집하였다. 동물들에게서 하룻밤 음식을 빼앗은 후 예정된 수술을 하였다. 카르프로펜(Carprofen)(4 mg/kg)을 30분 이상 동안 각각의 동물에게 피하 제공한 후 수술을 하였다. 각각의 동물은 수술 전에 그리고 2일 후에 듀플로실린(Duplocillin)[®](1 mL)의 근육내 주사를 받았다. 각각의 동물을 케타민, 자일라진 및 글리코피롤레이트의 근육내 주사로 예비마취 시켜서 충분한 진정 작용을 달성한 후 예비수술 준비를 하였다. 상기 동물은 기관 삽관을 겪었으며, 그 후 SOP 예비마취 및 마취에 따라 이소플루란 및 산소를 이용하여 마취를 유지하였다. 펄스 옥시미터를 사용하여 심박동수 및 O₂ 포화도를 모니터링하였다. 수술 전에, 블랜드(bland) 운할 안과용 에이전트를 각각의 눈에 투여하였다. 일단 동물이 충분히 마취되면, 우측 또는 좌측 서혜부 영역을 면도하고, 수술 부위 준비에 대한 SOP에 따라 준비하였다. 대략 2-3 cm의 절개를 우측 또는 좌측 영역에서 행하였다. 주위 조직을 조심스럽게 절개하여 우측 또는 좌측 서혜부 림프절을 가시화하였다. 가위 및 겸자를 이용하여, 림프절을 수집하였다. 10 mL의 따뜻한 염수의 염수 플리시를 제공한 후 창상 봉합을 하였다. 수집 후, 피하 조직 및 피부를 흡수성 봉합사로 봉합하였다. 림프절을 주위 실온에서 대략 5 mL의 분석 배지(5%(v/v) FBS를 함유하는 RPMI-1640) 내에서 유지하고, 프로세싱/분석때까지 면역학 실험실로 옮겨 두었다. 상기 텍스트 표에서 확인된 집단을 세포 표면 마커에 대한 특이적 항체를 이용하여 유세포 분석법에 의해 CD45+ 림프구의 상대적인 백분율로 정량화하였다. 샘플을 하기 항체 패널을 이용하여 프로세싱하였다: CD45/CD3/CD8/CD4, CD45/CD3/CD8/CD16 및 CD45/CD3/CD20/CD40. 이소타입 대조구를 사용하지 않았으며, DPBS 튜브를 음성 대조구로 사용하였다.

[0278] B: 결과

[0279] SDS PAGE

[0280] 비환원 조건 하에서 그리고 쿠마시 블루 염색 후 수행한 SDS PAGE 분석(도 3 참조)에 의하면, 온전한 항체에 상응하는 저 푸코스 기준 항체 및 Tg20 둘 모두에 있어서 168 kDa에서 주요 밴드가 나타났다. 고분자량(HMW)의 밴드가 기준 항체에 대하여 검출되었으며, 반면에 이것은 Tg20에 대해서는 관찰되지 않았다. 은 염색 후, 기준 항체에 대하여 일반적으로 검출되는 몇몇 다른 부(minor) 밴드 뿐만 아니라 이 HMW 밴드도 또한 Tg20에 대해서 검출되었다. 이들 부 밴드는 부분적으로 환원된 형태의 하기 항체에 상응할 수 있다: HC-HC-LC의 경우 147 kDa, HC-HC의 경우 110 kDa 및 HC-LC의 경우 71 kDa. 168 kDa에서의 주요 밴드는 전체 단백질 함량의 95%로 추정되는 반면, 생성물 관련 불순물의 다른 밴드는 단지 5%를 나타내며, 이는 Tg20의 분해 수준이 낮음을 시사한다. 환원 조건 하에서 수행한 SDS-PAGE 분석(도 3 참조)에 의하면 54 및 28 kDa에서 2개의 주요 밴드가 나타나며, 이는 각각 항체의 중쇄 및 경쇄에 상응한다. 상기 두 항체는 동일한 겔보기 분자 질량을 나타낸다.

[0281] 글리코실화 프로파일링

[0282] 도 4는 PNGase F 처리에 의해 Tg20으로부터 방출되는 2-AB 유도 N-글리칸의 형광 측정적 검출에 의해 수득된 NP-HPLC 프로파일을 나타낸다. 47.49, 59.35 및 78.38 min에서 검출되는 주요 피크는 각각 A2G1F, A2G2F 및 A2G2FNeuGc1에 상응한다. 다수의 더욱 적게 풍부한 피크도 검출되었다. 검출된 형태들의 상대적인 몰비를 표 1에 나타낸다(하기 참조).

[0283] 이 실험에서, 시알릴화 구조의 수준은 43%로 추정되었다. 고 만노스-하이브리드 구조의 수준은 복합 구조의 경우 85%에 대하여 15%로 추정되었다. 전체 갈락토실화 수준은 91%였으며, 푸코실화 수준은 92%로 추정되었다.

표 1

TG20으로부터 방출되고 NP-HPLC-FD에 의해 분석된 주요 N-글리칸의 상대적인 몰비

명칭	RT	면적	상대적인 면적
_G0F-Gn	32.3	372525	0.3
G0	33.2	126744	0.1
G0B	36.3	41050	0.0
G0F	39.2	4045579	3.0
Man6	40.2	550140	0.4
A2G1	42.2	1046877	0.8
A2G1	43.5	210278	0.2
Man4A1G1	45.0	375461	0.3
A2G1F	47.5	10693605	7.9
A2G1F	49.0	1621545	1.2
Man4A1G1F	51.8	314927	0.2
A2G2	53.6	3235548	2.4
Man5A1G1	55.7	1028319	0.8
A2G2F	59.4	51192671	37.9
Man5A1G1F	62.0	1949522	1.4
Man4A1G1FNeuGc1	71.7	7515884	5.6
A2G2FNeuAc1	73.8	5174288	3.8
Man5A1G1NeuGc1	76.5	4047105	3.0
A2G2FNeuGc1	78.4	36337467	26.9
Man5A1G1FNeuGc1	80.0	1411462	1.0
Man5A1G1FNeuGc1	82.5	3105914	2.3
A2G2NeuAc2	84.3	456704	0.3
A2G2FNeuAc2	88.7	325766	0.2
TOTALS		135177381	100.0

고 만노스/Hyb 수준 (%)	15
푸코실화 수준 (%)	92
양분 G1cNAc 수준 (%)	0
갈락토실화된 구조의 수준	96
갈락토실화 수준 (%)	91
시알릴화된 구조의 수준 (%)	43

[0284]

[0285] 일차 구조

[0286] 단백질 서열을 단백질 및 펩티드 지도화에 의해 조사하였다. 93%의 서열 커버리지(coverage)를 펩티드 지도화에 의해 수득하였으며, 단백질 지도화 실험으로부터 추정된 중쇄 및 경쇄의 분자량은 이론적인 질량에 따른다. 중쇄 및 경쇄 둘 모두는 그의 N-말단 글루타민에서 피로글루타민화된 것으로 확인되었다. 중쇄 및 경쇄 둘 모두의 N- 및 C-말단을 확인하였다.

[0287] 크기 배제 크로마토그래피

[0288] Tg20 크기 배제 크로마토그래피(SEC) 프로파일의 연구는 단량체 형태의 생성물이 검출된 형태의 97.3%를 나타냄을 보여준다(도 5). 단편, 이량체 및 중합체를 낮은 풍부함으로, 각각 0.9%, 1.1% 및 0.7%로 검출하였다.

- [0289] 인간 CD16a에의 결합
- [0290] 이 분석법은 항체가 CD16a에 결합하는 능력을 그의 ADCC 활성과 결부시킨 것에 초점을 맞추도록 개발되었다. Tg20에 대하여 수득된 상호작용 곡선은 TG20이 고정된 CD16a에 결합하는 능력을 가짐을 보여준다. 리톡산은 동일한 실험 조건에서 SPR에 의한 검출불가능한 프로파일을 나타냈다(도 8 및 도 9 참조).
- [0291] 단클론 항체 CD20 분석에 의한 CD16 활성화
- [0292] 본 분석법은 CD20 표적 세포(WIL2-S 세포) 상에 결합된 Tg20이 그의 표면 상에서 Fc γ RIIIa 수용체(CD16a로도 칭해짐)를 발현하는 이펙터(effector) 세포를 활성화하는 능력을 평가하도록 개발되었다. 이러한 결합은 이펙터 세포 활성화 및 IL-2 방출을 트리거링한다(trigger). 이러한 분석법은 항-CD20 항체가 자연 살해(Natural Killer; NK) 세포에 의해 매개되는 ADCC를 유도하는 잠재력을 평가한다.
- [0293] IL-2 사이토카인 방출량으로 표현되는 결과는 Tg20의 유의한 활성을 나타냈다. Tg20의 활성은 리톡산보다 유의하게 더 높았다(도 8 및 도 9 참조).
- [0294] ADCC 실험
- [0295] 이 테스트는 CD20+ 표적 세포(라지(Raji) 세포) 상에 결합된 Tg20이 NK 세포를 활성화하고 표적 세포 용해를 유도하는 능력을 평가한다. 항-CD20 항체(Tg20 및 리톡산)에 의해 매개되는 세포독성 활성을 표적 세포의 용해율(%)로서 표현한다.
- [0296] 이들 분석법의 결과는 Tg20에 의해 유도된 세포독성 활성이 리톡산에 의해 유도된 세포독성 활성보다 유의하게 더 높았음을 보여준다(도 8 및 도 9 참조).
- [0297] CDC 분석
- [0298] 이 분석법은 IgG가 그 표적에 결합될 때 항체가 보체계를 활성화하는 능력을 기반으로 한다. Tg20은 리톡산보다 더 높은 CDC 활성을 보여주었다(도 8 참조).
- [0299] 전혈 실험
- [0300] 전혈 실험에서, Tg20은 리톡산과 비교할 때 더 높은 B 세포 제거를 유도하였다.
- [0301] 하기 파라미터 및 종점을 이 연구에서 평가하였다: 임상 징후, 체중, 체중 변화, 욕망, 면역표현형 결정(혈액 및 림프절), 면역원성, 독성 역학 파라미터 및 총체적 해부 발견.
- [0302] RTX, 또는 TG20의 투여는 연구 동안 어느 하나의 용량 수준에서 임의의 계획되지 않은 사망, 임상 관찰, 체중 및 욕망에 대한 영향, 또는 거시적 변화를 생성하지 않았다.
- [0303] 면역표현형 결정 결과를 기반으로 하면, RTX 및 TG20의 단회 주사에 의해 혈액 중 B 림프구가 용량 의존적으로 제거되었다. 저용량에서 그리고 예비 투약 수준과 비교할 때, B 림프구의 제거는 TG20(60%)을 투약한 군과 비교할 때 RTX(70%)를 투약한 군에서 약간 더 확연하였다. 고용량에서, B 림프구의 제거는 비견되는 것이었다. B 림프구 집단은 TG20(22일; 저용량, 78일; 고용량)에 의한 것보다 더 빠르게 RTX(3일; 저용량, 50일; 고용량)에 의해 회복되었다.
- [0304] 고용량 수준에서의 B 림프구(혈액 1 마이크로리터당 100개 미만의 세포)의 완전한 제거의 발생률은 TG20(3마리 중 1마리의 동물)에 의해서보다 RTX(3마리 중 3마리의 동물)에 의해 더 컸다. B 림프구 제거의 발생률 및 혈액 중 그의 회복은 8일에 림프절에서 관찰된 B 림프구의 제거 및 22일 및 92일에서의 회복의 동력학적 특성과 상관되었다.
- [0305] 혈액에서, NK 림프구의 테스트 물품 관련된 감소가 저용량 및 고용량의 RTX 및 TG20에서 주지되었으며, 이때 22일까지는 회복되었다. T 림프구 계수치의 테스트 물품 관련된 감소는 고용량의 RTX에 의해 1일 또는 2일에 주지되었다. 상기 감소는 크기 면에서 약간인 것이었으며, 대부분의 동물에 있어서 3일에 회복되었다. 감소에 대한 명백한 성향은 TG20을 투약한 동물의 T 림프구 절대 계수치에 있어서 관찰되지 않았다. 전술한, 혈액중 세포 하위세트에 대하여 관찰된 감소의 결과로서, 전체 림프구 계수치의 용량 의존적 감소가 3가지의 화합물에서 주지되었다. 저용량에서, 전체 림프구 계수치의 감소 대 기저선 수준은 RTX(1일: 51%)와 비교할 때 TG20(1일: 57%)을 투약한 동물에서 더 확연하였다. 고용량에서, 전체 림프구 계수치의 감소는 TG-20(1일: 60%)에 의한 것보다 RTX(1일: 70%)에 의해 더 명백하였다. 회복은 3가지의 화합물에서 유사하였다(22일까지는 부분적으로 또는 전적으로 회복됨). 림프절에서, 8일 및 22일에 T 및 NK 림프구 하위세트에서 테스트 물품 관련된 변화는 관찰되지

않았다.

[0306] 결론적으로, 2가지의 상이한 용량, 0.03 및 0.3 mg/kg/일로 단회 정맥내 볼루스 주사에 의해 상이한 항-CD20 항체, RTX 및 TG20을 투여하면 둘 모두의 용량 수준에서 원숭이에서 임상적으로 잘 견뎠다. 혈액 및 림프절 B 림프구의 테스트 물질 관련된 용량 의존성 제거가 둘 모두의 화합물에서 관찰되었다. 회복의 빠르기 및 B 림프구의 제거의 정도 및 발생률의 면에서 상기 화합물들 사이에서 약간의 차이가 주지되었다. 저용량에서, B 림프구 제거의 정도는 TG20보다 더 낮았다. 고용량에서, 완전한 B 림프구 제거의 발생률은 RTX에서 더욱 높았고 TG20에서 더욱 낮았다. 모든 용량에서, 회복은 TG20에 의해서보다 RTX에 의해서 더 빨랐다. 혈액 NK 림프구의 유사한 테스트 물질 관련된 감소가 둘 모두의 화합물에서 관찰되었으며, 이때 22일까지는 회복되었다. 혈액 중 전체 T 림프구의 테스트 물질 관련된 감소가 또한 RTX(단지 고용량)에서 관찰되었지만, TG20에서는 관찰되지 않았다. 상기 감소는 크기 면에서 약간의 것이었으며, 대부분의 동물의 경우, 3일에 빠르게 회복되었다(도 12 내지 도 18 참조).

[0307] 등가물

[0308] 상기의 서면으로 된 명세서는 당업계의 숙련자가 본 발명을 실시할 수 있게 하기에 충분한 것으로 간주된다. 본 발명은 제공된 실시예에 의해 범주가 제한되는 것이 아니며, 그 이유는 실시예가 본 발명의 특정한 측면 및 실시양태의 예시로서 의도되기 때문이다. 다른 기능적으로 등가인 실시양태가 본 발명의 범주 이내이다. 본원에 예시되고 기술된 것에 더하여 본 발명의 다양한 변형이 상기 설명으로부터 당업계의 숙련자에게 명백하게 되며, 이는 첨부된 특허청구범위의 범주 내에 있다. 본 발명의 이점 및 목적은 본 발명의 각각의 실시양태에 반드시 포함되는 것은 아니다.

도면

도면1a

Tg20 경쇄 (서열 번호 1)

Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Ala Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
 20 25 30
 His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr
 35 40 45
 Ala 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 Phe Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu
 65 70 75 80
 Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Thr Phe Asn Pro Pro Thr
 85 90 95
 Phe Gly Gly Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
 100 105 110
 Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
 115 120 125
 Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
 130 135 140
 Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
 145 150 155 160
 Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
 165 170 175
 Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
 180 185 190
 Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
 195 200 205
 Asn Arg Gly Glu Cys
 210

도면1b

Tg20 중쇄 (서열 번호 2)

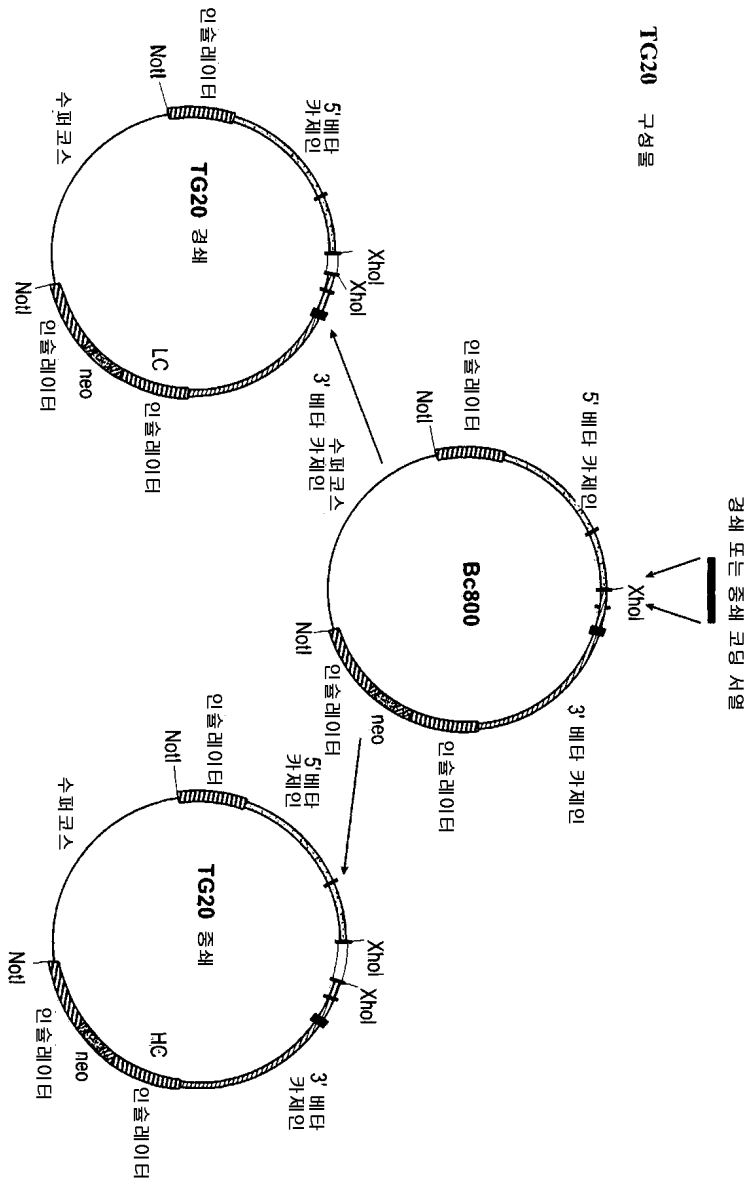
Gln Ala Tyr Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Arg Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Gly Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Gly 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 Tyr Asp Tyr Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
 115 120 125
 Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
 130 135 140
 Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
 145 150 155 160
 Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
 165 170 175
 Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
 180 185 190
 Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
 195 200 205
 Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
 210 215 220
 His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
 225 230 235 240
 Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 245 250 255
 Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
 260 265 270

도면1bb

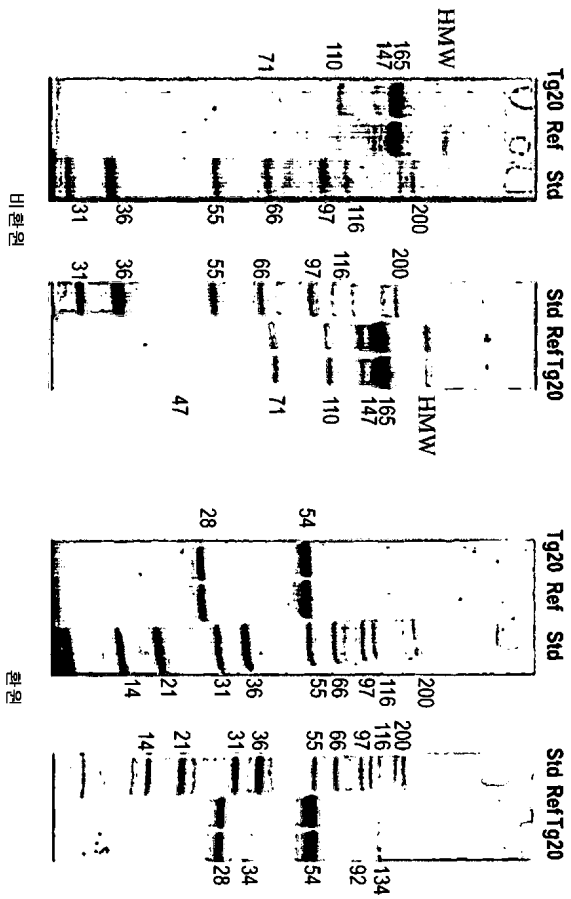
Tg20 중쇄 (서열 번호 2)

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 275 280 285
 Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
 290 295 300
 Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 305 310 315 320
 Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
 325 330 335
 Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
 340 345 350
 Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
 355 360 365
 Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 370 375 380
 Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
 385 390 395 400
 Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
 405 410 415
 Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 420 425 430
 Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440 445

도면2



도면3



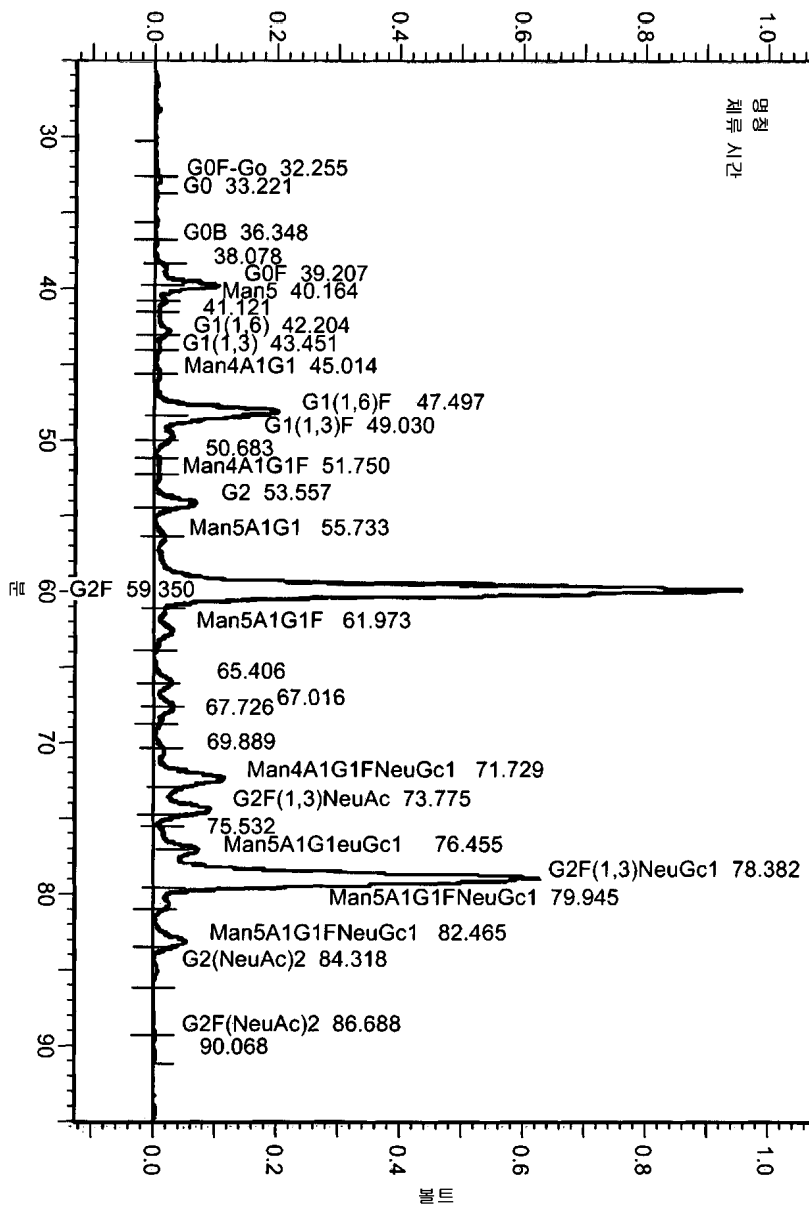
Sid: 문자양 표준물

Tg20

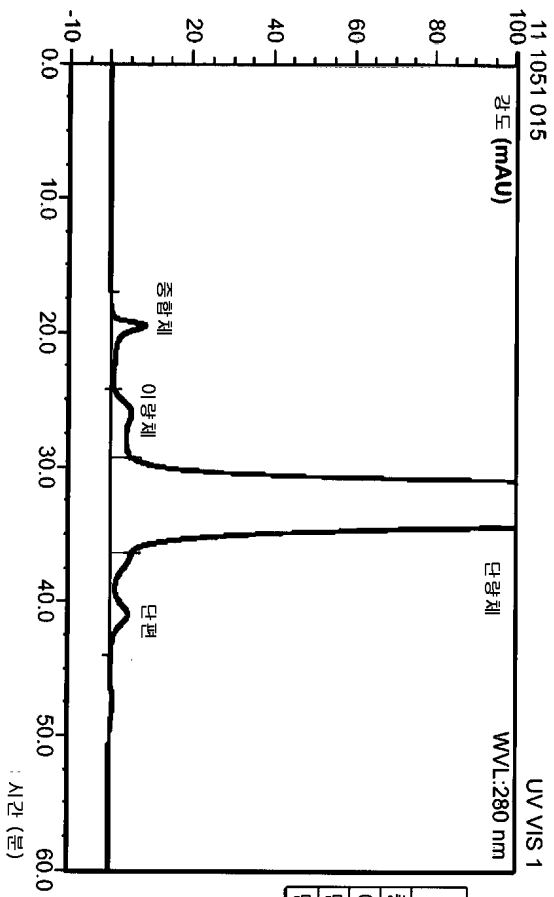
Ref.: 저 푸코스 기준 양체

기준물은 저 푸코스 기준 양체임

도면4

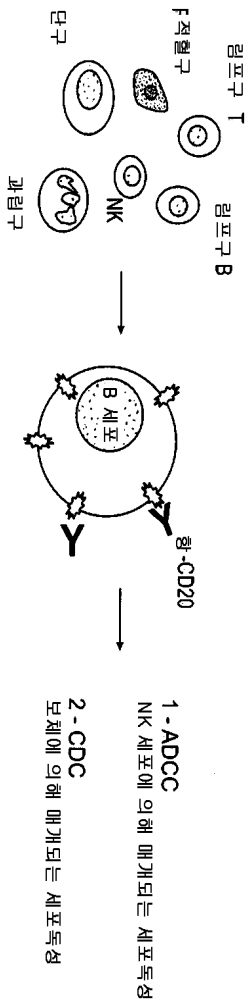


도면5



	상대적인 함량 (%)
중합체	0.7%
이량체	1.1%
단량체	97.3%
단편	0.9%

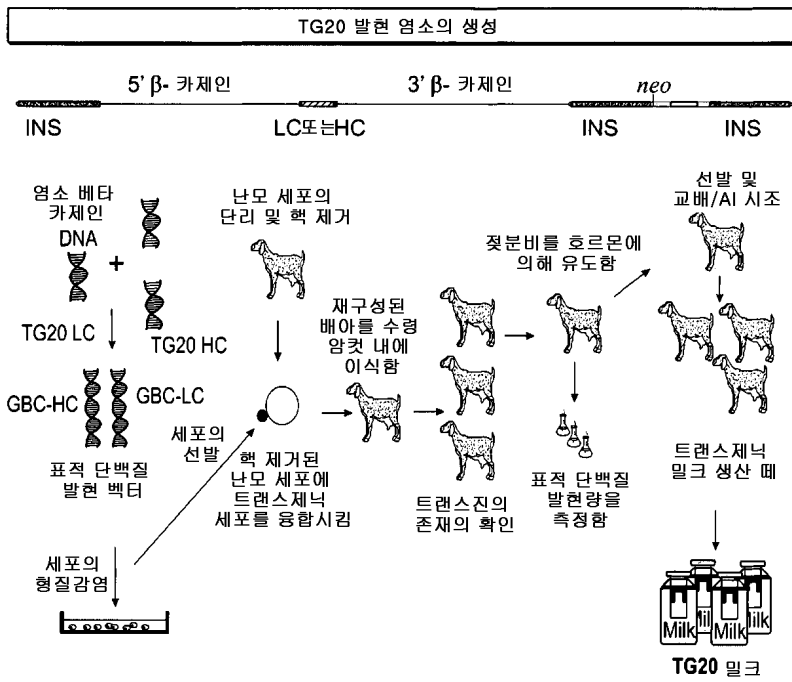
도면6



원리:

전혈	+	항-CD20	18시간 인큐베이션	B 세포 제거의 측정
----	---	--------	------------	-------------

도면7



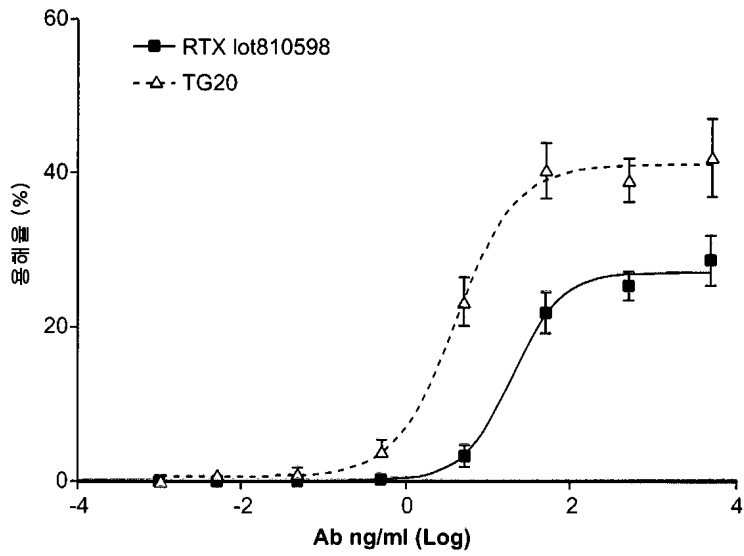
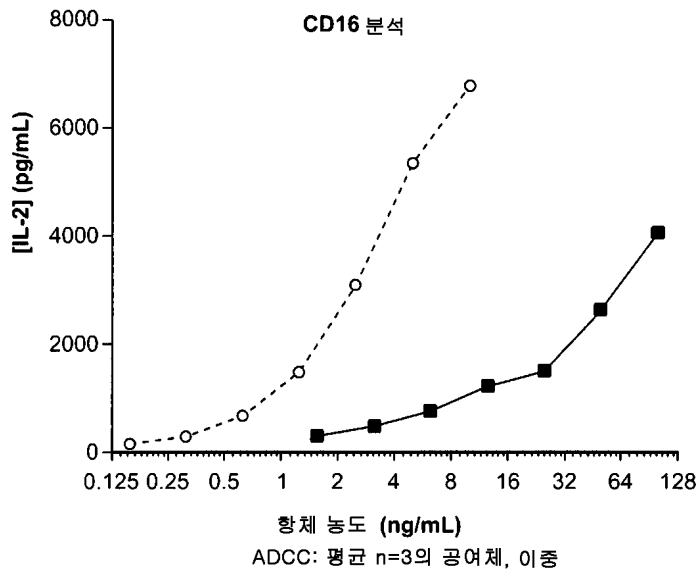
시조 염소	트랜스진 카피수	FISH	유도된 젖분비의 발현 수준	천연 젖분비 발현 수준
L0694	많음 (> 10 카피)	C25 (?)	NA	NA
L0716	4-5 카피	C14	> 10 g/l	10 g/l
L0737	1-2 카피	X	> 2 g/l	2.5 g/l
L0762	4-5 카피	C19	NA	~ 4
L0778	1-2 카피	C26	5 g/l	4-5 g/l
L0824, L0825	3-4 카피	C14q1	2 g/l	2 g/l
L0842	5 카피	C3	NA	11-15 g/l

도면8

TG20의 기능 분석

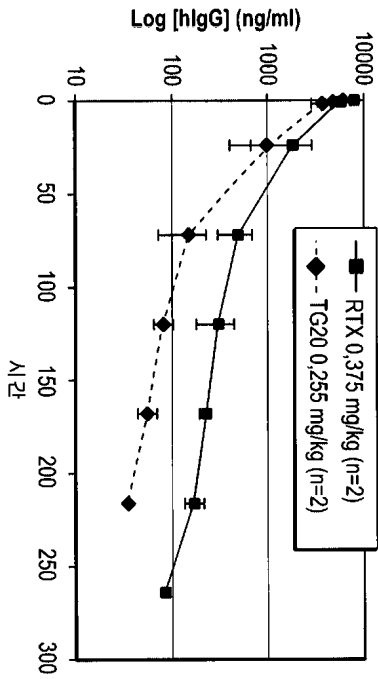
	CD16 활성화	CD16 결합	CDC	ADCC
Tg20	100%	100%	100%	100%
리록산(Rituxan)	< 2%	검출가능하지 않음	59%	6%

도면9



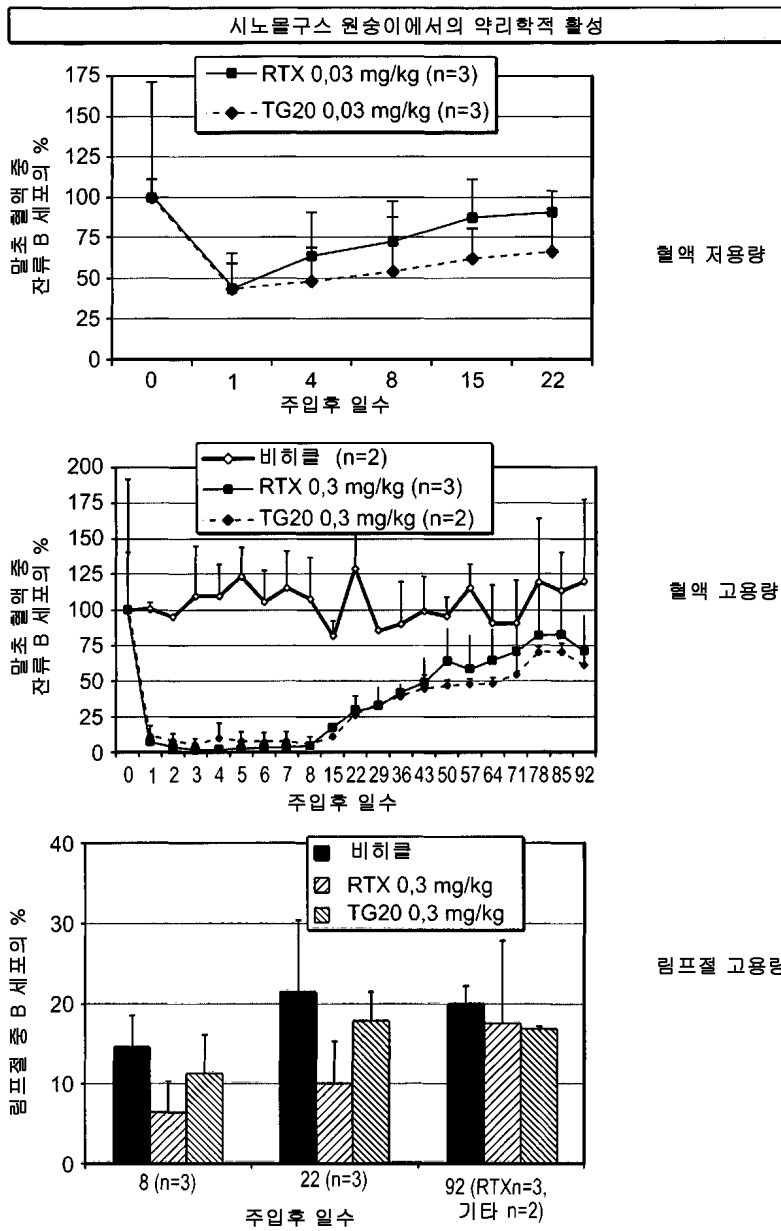
도면10

시노물구스 원숭이에서의 약동학적 프로파일



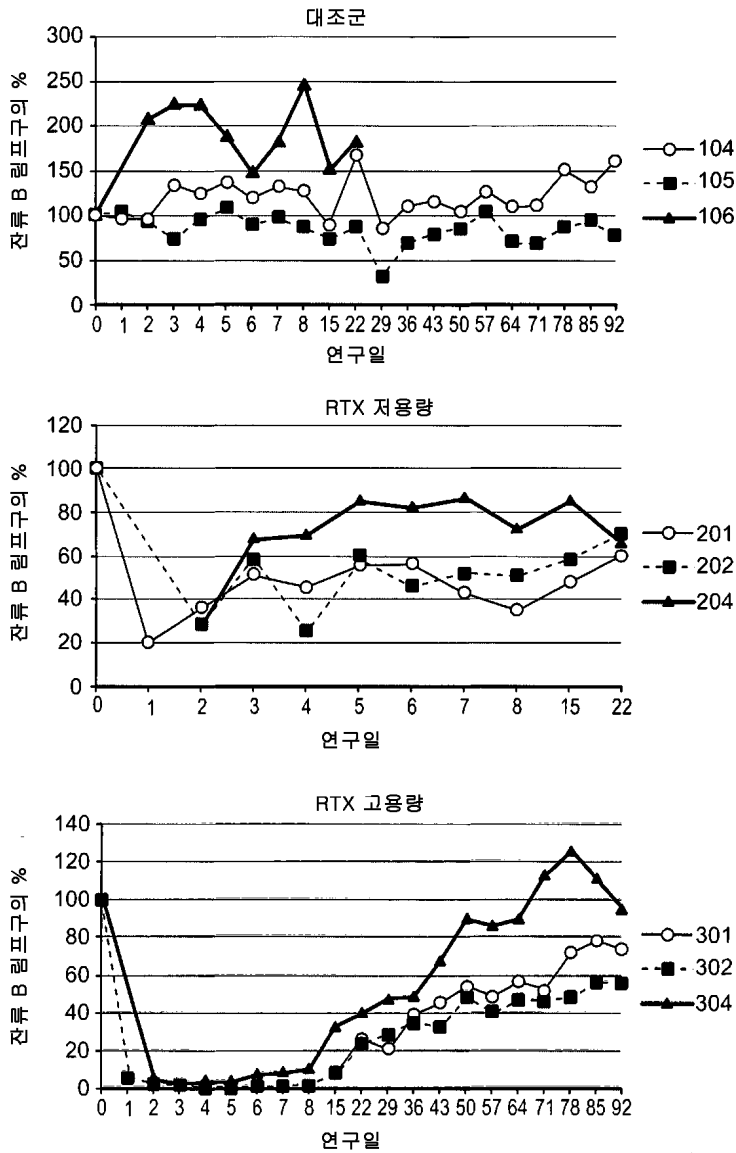
PK 파라미터	단위	RTX 0.375 mg/kg		TG20 0.255 mg/kg	
		#301	#304	#701	#704
t1/2 elim	hr	71	76	58	95
Cmax	ng/ml	8462	7387	6841	5174
AUC (0-168h) 용량	hr*kg*ng/ml/mg	601106	331930	478180	278517
AUC (0-inf) 용량	hr*kg*ng/ml/mg	672871	396415	500679	303662
CI	ml/hr/kg	1.49	2.52	1.99	3.29

도면11



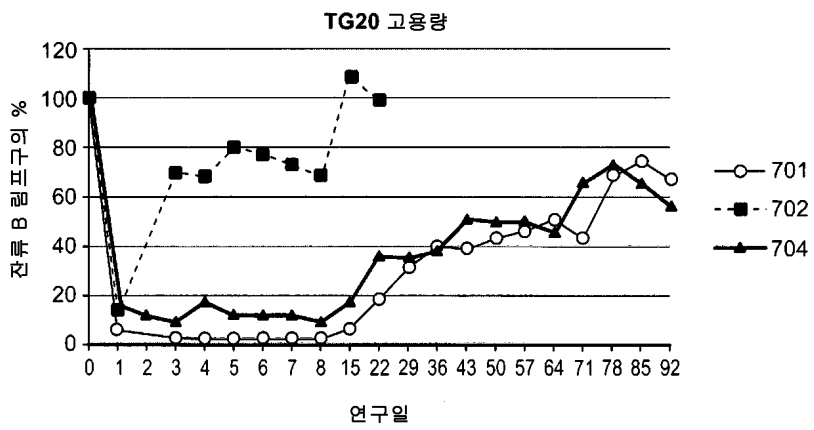
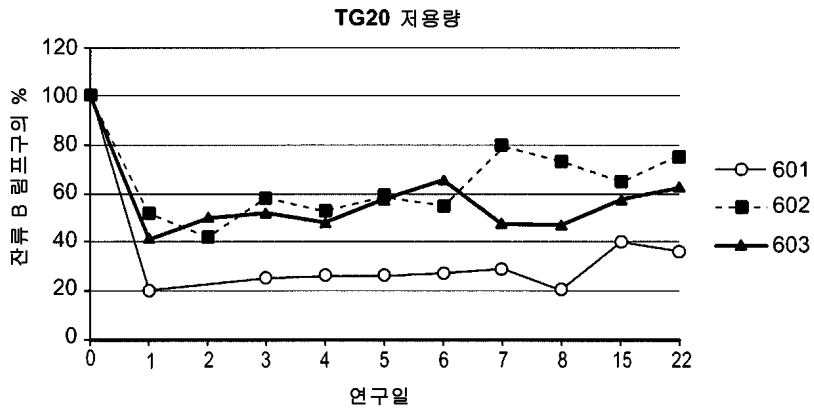
도면12a

혈액 중 잔류 B 림프구(CD45+/CD3-/CD40+)의 %의 개개의 동력학적 특성



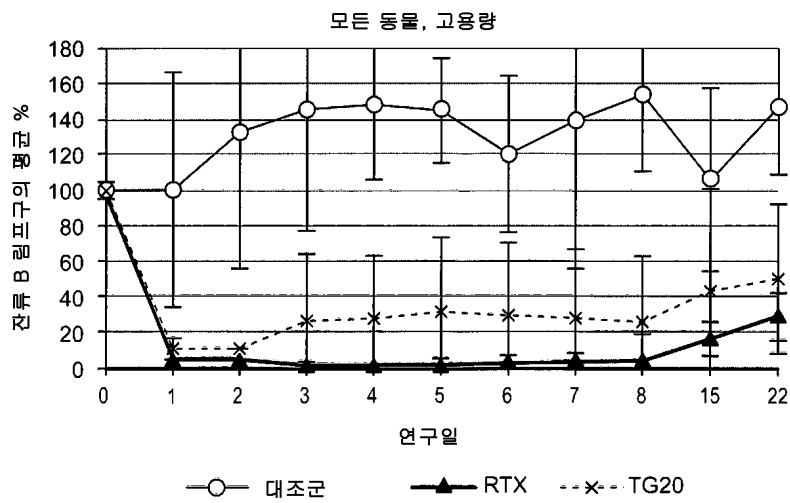
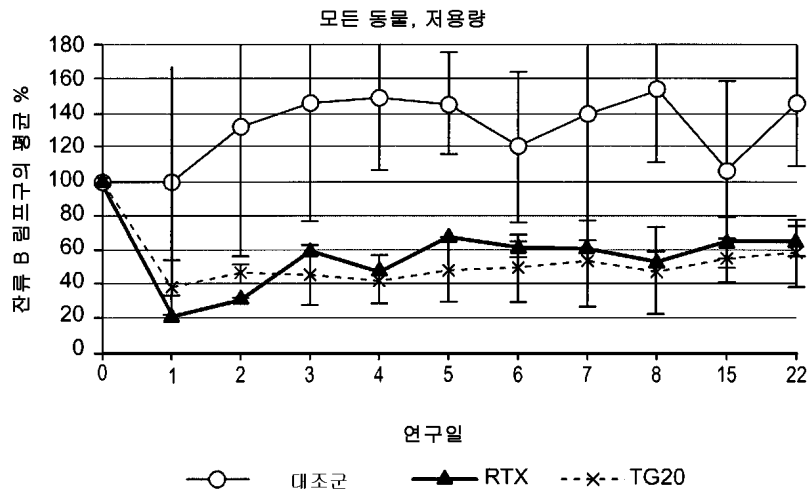
도면12b

혈액 중 잔류 B 림프구(CD45+/CD3-/CD40+)의 %의 개개의 동력학적 특성

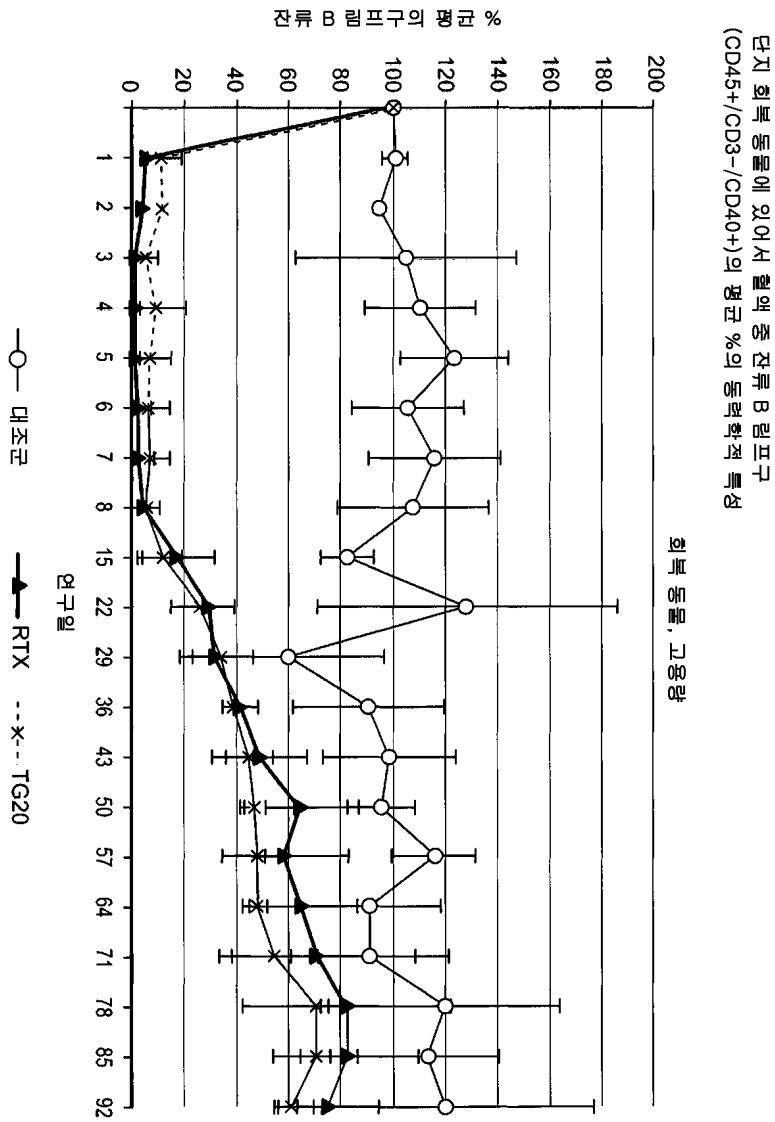


도면13

모든 연구 동물에 있어서 혈액 중 잔류 B 림프구 (CD45+/CD3-/CD40+)의 평균 %의 동력학적 특성

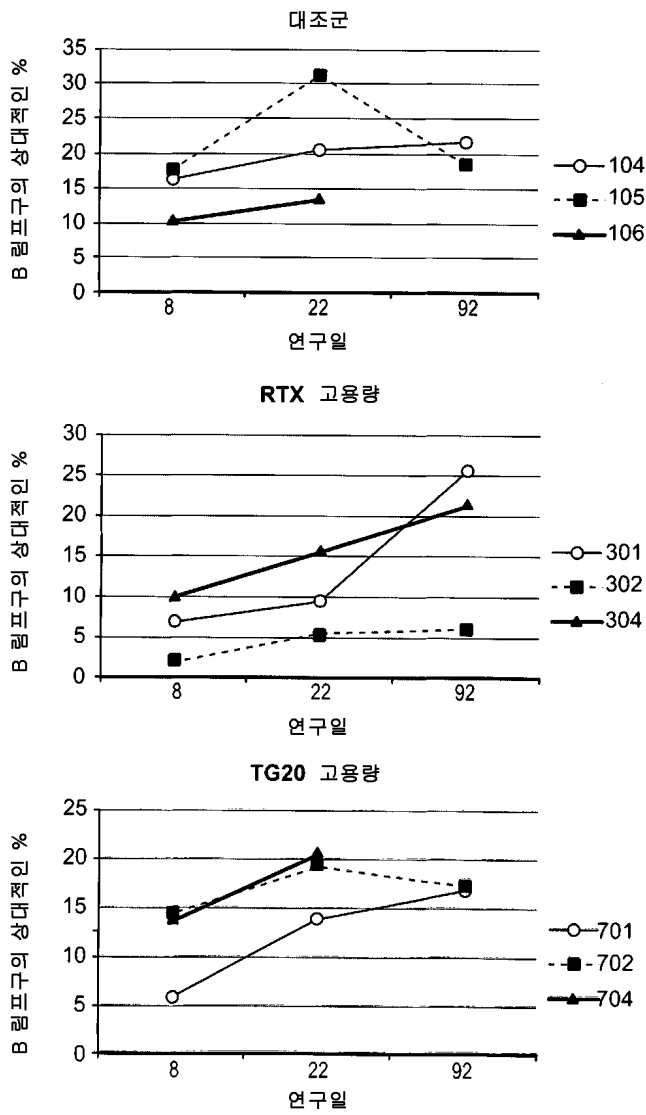


도면14



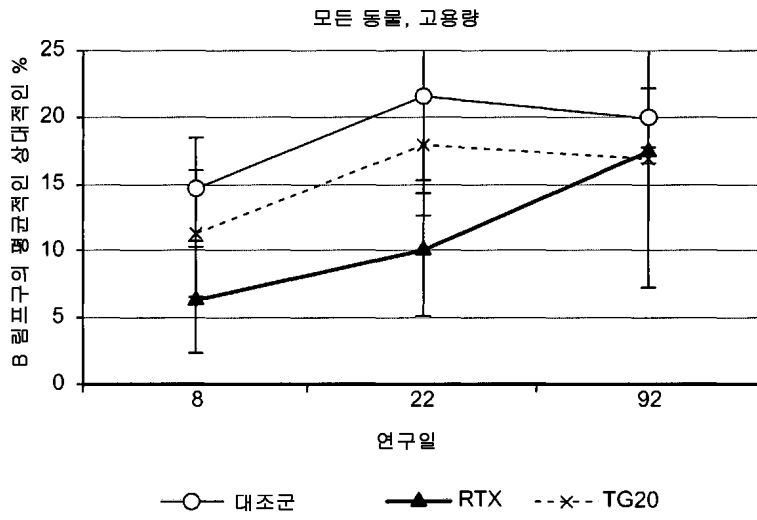
도면15

림프절 중 B 림프구CD45+/CD3-/CD40+)의 상대적인 %의 개개의 동력학적 특성



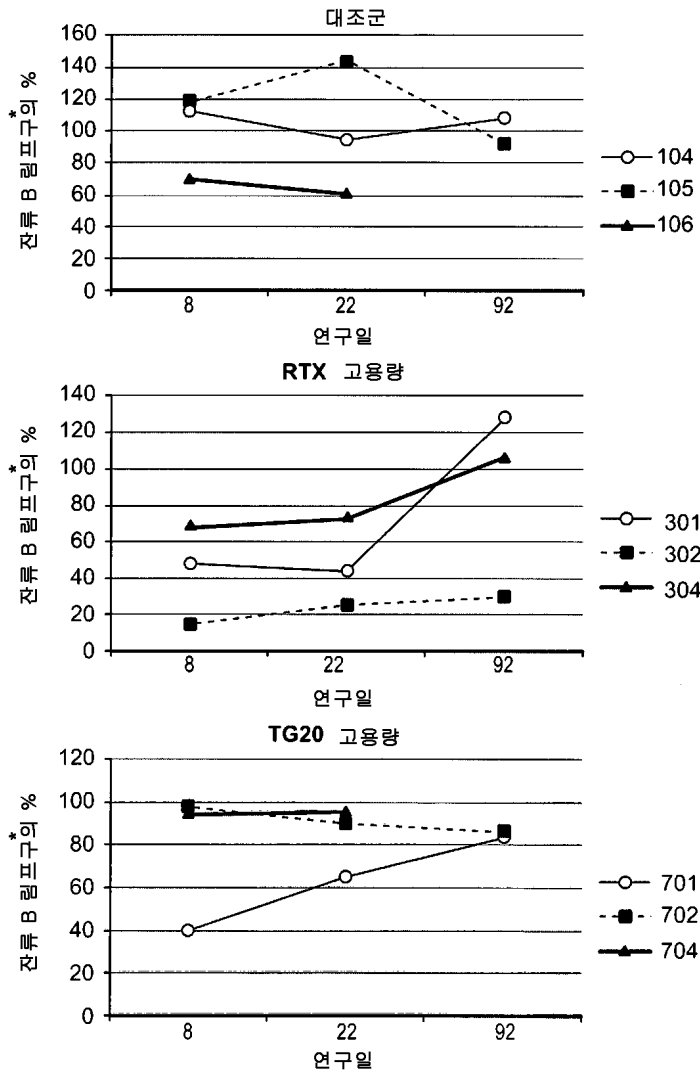
도면16

모든 연구 동물에 있어서 림프절 중 B 림프구(CD45+/CD3-/CD40+)의
 평균적인 상대적인 %의 동력학적 특성



도면17

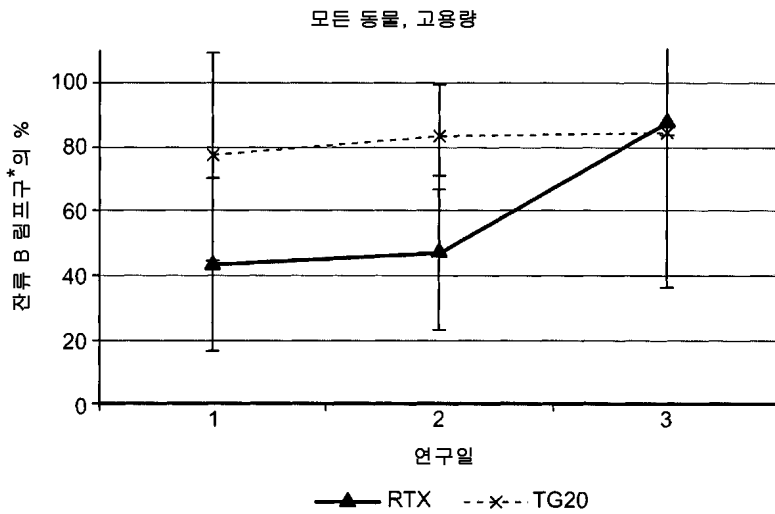
대조군 평균과 비교할 때, 림프절 중 B 림프구(CD45+/CD3-/CD40+)의 잔류 %의 개개의 동력학적 특성



* 대조군 평균을 기저선 수준으로 간주하여 잔류 B 림프구의 %를 계산함

도면18

대조군 평균과 비교할 때, 모든 연구 동물에 있어서 림프절 중 B 림프구 (CD45+/CD3-/CD40+)의 평균 잔류 %의 동력학적 특성



* 대조군 평균을 기저선 수준으로 간주하여 잔류 B 림프구의 %를 계산함

서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> LFB BIOTECHNOLOGIES
 FAID, Valegh
 CHEVREUX, Guillaume

<120> HIGHLY GALACTOSYLATED ANTIBODIES

<130> L0719.70001W000

<140> PCT/US12/50362

<141> 2012-08-10

<150> 61/521,996

<151> 2011-08-10

<150> 61/567,364

<151> 2011-12-06

<160> 4

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 213

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 1

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

1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met

 20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr

 35 40 45

Ala 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 Phe Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu

65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Thr Phe Asn Pro Pro Thr

 85 90 95

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

 100 105 110

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr

 115 120 125

Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys

 130 135 140

Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu

145 150 155 160

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser

 165 170 175

Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala

 180 185 190

Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe

 195 200 205

Asn Arg Gly Glu Cys

 210

<210> 2

<211> 448

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 2

Gln Ala Tyr Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Arg Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Gly Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Gly 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 Tyr Asp Tyr Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
 115 120 125
 Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
 130 135 140
 Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
 145 150 155 160
 Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
 165 170 175
 Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
 180 185 190
 Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
 195 200 205
 Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
 210 215 220

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

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

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

290 295 300

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

305 310 315 320

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

325 330 335

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

340 345 350

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

355 360 365

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

370 375 380

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

385 390 395 400

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

405 410 415

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

420 425 430

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

435 440 445

<210> 3

<211> 10

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<400> 3

gggtaaata

10

<210> 4

<211> 10

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<400> 4

gggaaata

10