



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2008-0068089
(43) 공개일자 2008년07월22일

(51) Int. Cl.

C07K 16/04 (2006.01) C07K 16/00 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2008-7012185

(22) 출원일자 2008년05월21일

심사청구일자 없음

번역문제출일자 2008년05월21일

(86) 국제출원번호 PCT/US2006/041656

국제출원일자 2006년10월23일

(87) 국제공개번호 WO 2007/048077

국제공개일자 2007년04월26일

(30) 우선권주장

60/729,054 2005년10월21일 미국(US)

(71) 출원인

지티씨바이오제라퓨틱스, 인크.

미국 매사추세츠주 01701-9322 프레밍햄 크로싱
볼바드 175

(72) 발명자

챈들러 대니얼

미국 매사추세츠 02464 뉴튼 어퍼 폴스 월리엄스
스트리어 31

미드 헤리 엠

미국 매사추세츠 02158 뉴튼 그래스미어 스트리트
62

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

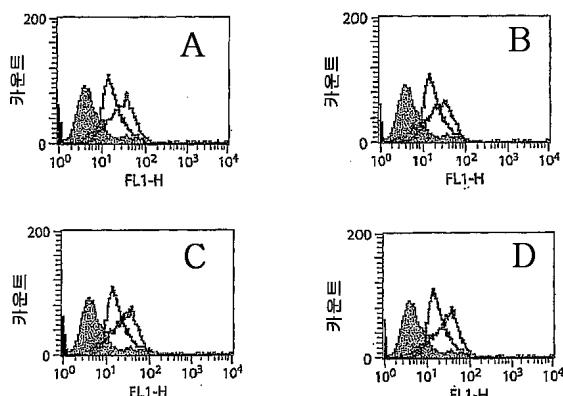
김성기, 김진희

전체 청구항 수 : 총 97 항

(54) 항체 의존성 세포 독성 활성이 증강된 항체, 그 생산 및 사용 방법

(57) 요약

본 발명은 특히 증가된 ADCC 활성을 가지는 항체들에 관한 것이다. 또한 이러한 항체를 생산하는 방법을 제공한다. 본 발명의 항체들은 그것의 젖에서 항체를 발현하고 분비하도록 조작된 비인간 형질전환 동물의 유방 상피세포와 같은 유방 상피세포에서 생산된다. 상기 항체들 또는 항체들을 포함하는 조성물은 ADCC 활성이 제공하는 이득으로 질병을 치료하는 데 사용될 수 있다. 따라서, 한 구현예에서, 항체들 또는 항체들을 포함하는 조성물은 암, 림프증식성 질환 또는 자가면역 질환을 치료하는 데 사용될 수 있다.

대표도

(72) 발명자
에드문즈 티모시
미국 매사추세츠 01740 볼튼 본 힐 로드 38

맥퍼슨 존
미국 01748 매사추세츠 흉킨튼 올드 엘름 웨이 72

특허청구의 범위

청구항 1

항체 의존성 세포 독성(ADCC: enhanced antibody-dependent cellular cytotoxicity) 활성이 증강된 젖 유래 항체를 포함하는 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 젖 유래 항체의 ADCC 활성이 세포 배양 유래 항체의 ADCC 활성보다 적어도 2배, 3배, 4배, 5배, 6배, 7배, 8배, 9배 또는 10배 더 큰 것인 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 젖 유래 항체의 하나 이상의 사슬이 푸코오스를 포함하지 않는 것인 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 젖 유래 항체가 올리고만노오스를 포함하는 것인 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 젖 유래 항체가 올리고만노오스를 포함하는 것인 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 젖 유래 항체의 30% 이상이 하나 이상의 올리고만노오스를 포함하는 것인 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 젖 유래 항체의 탄수화물이 고 만노오스 글리코실화 패턴을 나타내는 것인 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 젖 유래 항체의 하나 이상의 사슬이 올리고만노오스를 포함하고 비푸코실화된 것인 조성물.

청구항 9

제1항에 있어서, 상기 젖 유래 항체의 주요 탄수화물이 비푸코실화된 것인 조성물.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 주요 탄수화물이 비푸코실화된 올리고만노오스인 조성물.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 주요 탄수화물이 비푸코실화된 Man5인 조성물.

청구항 12

제1항에 있어서, 상기 젖 유래 항체의 탄수화물의 40% 미만이 푸코오스를 포함하는 것인 조성물.

청구항 13

제1항에 있어서, 상기 젖 유래 항체가 1,6-푸코오스를 포함하지 않는 것인 조성물.

청구항 14

제1항에 있어서, 상기 항체의 탄수화물의 60% 이상이 비푸코실화된 올리고만노오스이고 상기 항체의 탄수화물의 40% 미만이 푸코오스를 포함하는 것인 조성물.

청구항 15

제1항에 있어서, 상기 항체의 탄수화물의 63%가 비포코실화된 올리고만노오스이고, 상기 항체의 탄수화물의 16%가 코어 푸코오스 함유 G1F이며, 상기 항체의 탄수화물의 21%가 코어 푸코오스 함유 G2F인 조성물.

청구항 16

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 CD3, CD4, CD5, CD8, CD14, CD15, CD16, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD25, CD32B, CD30, CD33, CD37, CD38, CD40, CD40L, CD46, CD52, CD54, CD59, CD74, CD80, CD126, CD138, CD137 또는 GP IIbIIIa에 대해 유도된 단클론 항체인 조성물.

청구항 17

제16항에 있어서, 상기 단클론 항체는 CD137에 대해 유도된 것인 조성물.

청구항 18

제1항에 있어서, 상기 항체는 HM1.24, HLA-DR, MUC1, 테나신, PIGF, VEGF, 암 유전자, 암 유전자 산물, 괴사 항원, 17-A1 항원, IL-2, T101, TAC, IL-6, TRAIL-R1, GD3 강글리오사이드 또는 TRAIL-R2에 대해 유도된 단클론 항체인 조성물.

청구항 19

제1항에 있어서, 상기 젖 유래 항체가 키메라 항체, 인간화 항체 또는 완전한 인간 항체인 조성물.

청구항 20

제1항에 있어서, 상기 젖 유래 항체가 전체 길이 항체인 조성물.

청구항 21

제20항에 있어서, 상기 전체 길이 항체가 전체 길이 단일쇄 항체인 조성물.

청구항 22

제20항에 있어서, 상기 전체 길이 항체가 중쇄 및 경쇄를 포함하는 것인 조성물.

청구항 23

제1항에 있어서, 상기 젖 유래 항체가 항체 단편인 조성물.

청구항 24

제1항에 있어서, 상기 젖 유래 항체가 아이소타입(isotype) IgG, IgA 또는 IgD 항체인 조성물.

청구항 25

제24항에 있어서, 상기 젖 유래 항체가 아이소타입 IgG 항체인 조성물.

청구항 26

제25항에 있어서, 상기 젖 유래 항체가 아이소타입 IgG1 또는 IgG2 항체인 조성물.

청구항 27

제1항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서, 약학적으로 허용 가능한 담체를 더 포함하는 조성물.

청구항 28

제1항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서, 추가의 치료제를 더 포함하는 조성물.

청구항 29

치료를 요하는 피험체에게 ADCC를 증강시키기 위해 유효한 양으로 제27항 또는 제28항의 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 피험체의 치료 방법.

청구항 30

질병에 걸린 피험체에게 질병의 치료에 유효한 양으로 제27항 또는 제28항의 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 피험체의 치료 방법.

청구항 31

제30항에 있어서, 상기 질병은 암, 림프증식성 질환 또는 자가면역 질환인 방법.

청구항 32

제29항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 피험체에게 추가의 치료제를 더 투여하는 방법.

청구항 33

제32항에 있어서, 상기 추가의 치료제가 면역조절제인 방법.

청구항 34

제34항에 있어서, 상기 면역조절제가 IL-1, IL-2, IL-3, IL-6, IL-10, IL-12, IL-18, IL-21, 인터페론, 파클리탁셀, TNF- α 또는 그 조합인 방법.

청구항 35

제29항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 피험체에게 면역조절제 및 트라스투주맙(trastuzumab)을 더 투여하는 방법.

청구항 36

제29항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 피험체에게 IL-21을 더 투여하는 방법.

청구항 37

제29항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 피험체에게 IL-12를 더 투여하는 방법.

청구항 38

제29항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 피험체에게 IL-21 및 트라스투주맙을 더 투여하는 방법.

청구항 39

제29항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 피험체가 인간인 방법.

청구항 40

항체 또는 항체들의 ADCC 활성을 증강시키는 방법으로서, 항체 또는 항체들의 글리코실화를 변형하는 단계를 포함하며, 상기 글리코실화는 포유동물 유방 상피세포에서의 항체 또는 항체들의 생산에 의해 변형되는 것인 방법.

청구항 41

제40항에 있어서, 상기 포유동물 유방 상피세포가 젖에서 항체를 발현하도록 조작된비인간 포유동물의 유방 상피세포인 방법.

청구항 42

제40항 또는 제41항에 있어서, 상기 항체의 하나 이상의 사슬이 푸코오스를 포함하지 않도록 상기 항체를 변형하는 것인 방법.

청구항 43

제42항에 있어서, 상기 항체의 하나의 사슬이 푸코오스를 포함하지 않도록 상기 항체를 변형하는 것인 방법.

청구항 44

제43항에 있어서, 상기 항체가 하나의 올리고만노오스 또는 추가의 올리고만노오스를 포함하도록 상기 항체를 변형하는 것인 방법.

청구항 45

제40항 또는 제41항에 있어서, 상기 항체가 하나의 올리고만노오스 또는 추가의 올리고만노오스를 포함하도록 상기 항체를 변형하는 것인 방법.

청구항 46

제40항 또는 제41항에 있어서, 상기 항체의 탄수화물이 고 만노오스 글리코실화 패턴을 나타내도록 상기 항체를 변형하는 것인 방법.

청구항 47

제46항에 있어서, 상기 항체의 하나 이상의 사슬이 올리고만노오스를 포함하고 비푸코실화되도록 상기 항체를 변형하는 것인 방법.

청구항 48

제47항에 있어서, 상기 항체의 하나의 사슬이 올리고만노오스를 포함하고 비푸코실화되도록 상기 항체를 변형하는 것인 방법.

청구항 49

제40항 또는 제41항에 있어서, 상기 항체의 주요 탄수화물이 비푸코실화되도록 상기 항체를 변형하는 것인 방법.

청구항 50

제49항에 있어서, 상기 주요 탄수화물이 비푸코실화된 올리고만노오스인 방법.

청구항 51

제50항에 있어서, 상기 주요 탄수화물이 비푸코실화된 Man5인 방법.

청구항 52

제40항 또는 제41항에 있어서, 상기 항체의 탄수화물의 40% 미만이 푸코오스를 포함하도록 상기 항체를 변형하는 것인 방법.

청구항 53

제40항 또는 제41항에 있어서, 상기 항체의 30% 이상이 하나 이상의 올리고만노오스를 포함하도록 상기 항체를 변형하는 것인 방법.

청구항 54

(a) 젖에서 항체를 발현하도록 조작된 형질전환 비인간 포유동물의 젖으로부터 항체를 수집하는 단계; 및

(b) 상기 항체의 ADCC 활성을 측정하는 단계

를 포함하는 방법.

청구항 55

제54항에 있어서,

- (c) 수집된 항체의 ADCC 활성과 세포 배양에서 발현된 항체의 ADCC 활성을 비교하는 단계를 더 포함하는 방법.

청구항 56

제54항에 있어서, 상기 형질전환 비인간 포유동물이 염소, 양, 들소, 낙타, 암소, 돼지, 토끼, 물소, 말, 래트, 마우스 또는 라마인 방법.

청구항 57

- (a) 항체를 발현하도록 조작된 유방 상피세포로부터 항체를 수집하는 단계; 및
(b) 상기 항체의 ADCC 활성을 측정하는 단계를 포함하는 항체의 생산 방법.

청구항 58

제57항에 있어서,

- (c) 수집된 항체의 ADCC 활성을 비유방 세포에서 발현된 항체의 ADCC 활성과 비교하는 단계를 더 포함하는 방법.

청구항 59

항체 의존성 세포 독성(ADCC) 활성이 증강된 유방 상피세포 유래 항체를 포함하는 조성물.

청구항 60

제59항에 있어서, 상기 항체의 ADCC 활성이 비유방 상피세포 배양 유래 항체의 ADCC 활성보다 적어도 2배, 3배, 4배, 5배, 6배, 7배, 8배, 9배 또는 10배 더 큰 것인 조성물.

청구항 61

제59항에 있어서, 상기 항체의 하나 이상의 사슬이 푸코오스를 포함하지 않는 것인 조성물.

청구항 62

제61항에 있어서, 상기 항체가 올리고만노오스를 포함하는 것인 조성물.

청구항 63

제59항에 있어서, 상기 항체가 올리고만노오스를 포함하는 것인 조성물.

청구항 64

제59항에 있어서, 상기 항체의 30% 이상이 하나 이상의 올리고만노오스를 포함하는 것인 조성물.

청구항 65

제59항에 있어서, 상기 항체의 탄수화물이 고 만노오스 글리코실화 패턴을 나타내는 것인 조성물.

청구항 66

제65항에 있어서, 상기 항체의 하나 이상의 사슬이 올리고만노오스를 포함하고 비푸코실화된 것인 조성물.

청구항 67

제59항에 있어서, 상기 항체의 주요 탄수화물이 비푸코실화된 것인 조성물.

청구항 68

제67항에 있어서, 상기 주요 탄수화물이 비푸코실화된 올리고만노오스인 조성물.

청구항 69

제68항에 있어서, 상기 주요 탄수화물이 비푸코실화된 Man5인 조성물.

청구항 70

제59항에 있어서, 상기 항체의 탄수화물의 40% 미만이 푸코오스를 포함하는 것인 조성물.

청구항 71

제59항에 있어서, 상기 항체가 1,6-푸코오스를 포함하지 않는 것인 조성물.

청구항 72

제59항에 있어서, 상기 항체의 탄수화물의 60% 이상이 비푸코실화된 올리고만노오스이고 상기 항체의 탄수화물의 40% 미만이 푸코오스를 포함하는 것인 조성물.

청구항 73

제59항에 있어서, 상기 항체의 탄수화물의 63%가 비푸코실화된 올리고만노오스이고, 상기 항체의 탄수화물의 16%가 코어 푸코오스 함유 G1F이며, 상기 항체의 탄수화물의 21%가 코어 푸코오스 함유 G2F인 조성물.

청구항 74

제59항 내지 제73항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 CD3, CD4, CD5, CD8, CD14, CD15, CD16, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD25, CD32B, CD30, CD33, CD37, CD38, CD40, CD40L, CD46, CD52, CD54, CD59, CD74, CD80, CD126, CD138, CD137 또는 GPⅡbⅢa에 대해 유도된 단클론 항체인 조성물.

청구항 75

제74항에 있어서, 상기 단클론 항체는 CD137에 대해 유도된 것인 조성물.

청구항 76

제59항에 있어서, 상기 항체는 HM1.24, HLA-DR, MUC1, 테나신, PIGF, VEGF, 암 유전자, 암 유전자 산물, 괴사 항원, 17-A1 항원, IL-2, T101, TAC, IL-6, TRAIL-R1, GD3 강글리오사이드 또는 TRAIL-R2에 대해 유도된 단클론 항체인 조성물.

청구항 77

제59항에 있어서, 상기 항체가 키메라 항체, 인간화 항체 또는 완전한 인간 항체인 조성물.

청구항 78

제59항에 있어서, 상기 항체가 전체 길이 항체인 조성물.

청구항 79

제78항에 있어서, 상기 전체 길이 항체가 전체 길이 단일쇄 항체인 조성물.

청구항 80

제78항에 있어서, 상기 전체 길이 항체가 중쇄 및 경쇄를 포함하는 것인 조성물.

청구항 81

제59항에 있어서, 상기 항체가 항체 단편인 조성물.

청구항 82

제59항에 있어서, 상기 항체가 아이소타입 IgG, IgA 또는 IgD 항체인 조성물.

청구항 83

제82항에 있어서, 상기 항체가 아이소타입 IgG 항체인 조성물.

청구항 84

제83항에 있어서, 상기 항체가 아이소타입 IgG1 또는 IgG2 항체인 조성물.

청구항 85

제1항 내지 제84항 중 어느 한 항에 있어서, 약학적으로 허용 가능한 담체를 더 포함하는 조성물.

청구항 86

제1항 내지 제84항 중 어느 한 항에 있어서, 추가의 치료제를 더 포함하는 조성물.

청구항 87

치료를 요하는 피험체에게 ADCC를 증강시키기에 유효한 양으로 제85항 또는 제86항의 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 피험체의 치료 방법.

청구항 88

질병에 걸린 피험체에게 질병의 치료에 유효한 양으로 제85항 또는 제86항의 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 피험체의 치료 방법.

청구항 89

제88항에 있어서, 상기 질병은 암, 림프증식성 질환 또는 자가면역 질환인 방법.

청구항 90

제87항 내지 제89항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 피험체에게 추가의 치료제를 더 투여하는 방법.

청구항 91

제90항에 있어서, 상기 추가의 치료제가 면역조절제인 방법.

청구항 92

제91항에 있어서, 상기 면역조절제가 IL-1, IL-2, IL-3, IL-6, IL-10, IL-12, IL-18, IL-21, 인터페론, 파클리탁셀, TNF- α 또는 그 조합인 방법.

청구항 93

제87항 내지 제89항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 피험체에게 면역조절제 및 트拉斯투주맙을 더 투여하는 방법.

청구항 94

제87항 내지 제89항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 피험체에게 IL-21을 더 투여하는 방법.

청구항 95

제87항 내지 제89항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 피험체에게 IL-12를 더 투여하는 방법.

청구항 96

제87항 내지 제89항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 피험체에게 IL-21 및 트拉斯투주맙을 더 투여하는 방법.

청구항 97

제87항 내지 제89항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 피험체가 인간인 방법.

명세서

기술분야

<1> 관련 출원

<2> 본 출원은 2005년 10월 21일자로 출원된 미국 가출원 번호 제60/729,054호에 대하여 미국특허법 제119조에 의거 우선권 효력을 청구한다. 상기 특허를 참조함으로써 그 전체 내용이 본 명세서에 편입된다.

<3> 정부 지원

<4> 본 발명의 구현은 미 국립 암 연구소 SBIR 승인 번호 제5R43CA107608-02호로부터 자금제공을 받아서 이루어졌다. 따라서, 정부는 본 발명에 대한 권리를 가질 수 있다.

<5> 발명의 분야

<6> 본 발명은 항체 의존성 세포 독성(ADCC: antibody-dependent cellular cytotoxicity) 활성이 증강된 항체들, 그 생산 방법뿐만 아니라 사용 방법에 관한 것이다.

배경기술

<7> 단클론 항체들은 질병 치료 수단들 중에서도 중요한 수단이다. 예를 들면, ADCC는 항암 항체들의 유효성에 대한 주요 공헌자이다. ADCC를 중재하는 핵심 수용체는 자연 살해(NK: natural killer) 세포에서 발현된 IgG에 대하여 낮은 친화성 수용체인 Fc γ IIIa (CD16) 수용체이다. 이 수용체 결손 마우스는 리툭시맙(rituximab)에 대하여 유의적으로 적은 항 종양 반응을 나타낸다(Clynes et al., 2000, Nat. Med 6: 443-446). Fc γ IIIa 수용체는 마우스에서 종양 세포독성을 중재하는 역할을 한다(Clynes et al., 1998, PNAS 95: 652-656). 158 위치에서 페닐 알라닌 대신 빌린을 가지는 Fc γ IIIa 수용체를 코딩하는 FCGR3A 유전자의 다형성(polymorphism)은 보다 단단하게 IgG를 결합시키고 NK 세포에 대한 증강된 ADCC 활성을 부여한다(Wu et al., 1997, J Clin Invest 100: 1059-1070). FCGR3A 유전자의 유전형인 FCGR3A-158V/V은 비호지킨 림프종(Cartron et al., 2002, Blood 99: 754-758), 발덴슈트롬(Waldenstrom) 거대글로불린혈증(Treon et al., 2005, J Clin Oncol 23: 474-481), 및 자가면역 질환인 전신홍반성낭창(SLE: systemic lupus erythematosus)(Anolik et al., 2003, Arthritis Rheum 48, 455-459)에서 리툭시맙에 대한 환자 반응에서 긍정적인 효과를 가진다. 또한 동일한 다형성은 크론병에서 다른 항체인 인플릭시맙에 대한 보다 나은 생물 반응과 서로 관련되어 있다(Louis et al., 2004, A Phar Ther 19: 511-519). 이들의 발견은 ADCC가 인간의 단클론 항체들의 치료 활동에서 유의적인 역할을 한다는 것을 예시한다. 따라서, ADCC 활성을 촉진하는 치료 항체들의 활성을 증가시키는 것은 잠재적 치료 가치를 갖는다.

<8> 인간 항체들은 동일한 종쇄에서 각각 하나씩, 두 개의 글리코실화 부위를 갖는다. 글리코실화 및 탄수화물 과정에서 억제제를 사용하는 초기 실험들은 억제된 하이브리도마 클론 내에서 생산된 항체들이 증강된 ADCC 활성을 가지는 것을 발견하였다(Rothman, 1989). 추가적인 작업은 항체의 글리코실화 상태 및 ADCC 활성이 모두 항체가 생산된 세포주에 의해 영향을 받는 것을 보여주었다(Lifely, 1995). 몇몇 연구 그룹들은 종쇄 글리코실화 반응에서 1,6-푸코오스가 결핍되는 항체들이 Fc γ RIII 수용체에 대한 증강된 결합 친화력 및 증가된 ADCC 활성을 가지는 것을 증명하였다(Shields et al., 2002; Shinkawa et al., 2002). 게다가, Fc γ RIII 수용체에 대한 결합 친화력과 ADCC 활성 사이의 상호작용이 확립되었다(Okazaki, 2004; Dall'Ozzo, 2004).

<9> 이 푸코오스의 전달을 촉진시키는 α -1,6-당전위효소(α -1,6-fucosyltransferase)를 인코딩하는 'FUT8'가 결손된 세포주가 생산되었다. 이를 녹아웃(knock-out) 세포들은 더 높은 ADCC 활성을 가지는 항체들을 제조하는데 사용될 수 있다. 이를 테면, FUT8가 결손된 중국 햄스터 난소(CHO: Chinese hamster ovary) 세포가 확립되었다(Yamane-Ohnuki et al., 2004). 또한 소간섭 RNA(siRNA: small interfering RNA)도 FUT8 유전자의 발현을 차단하는데 사용되어 왔다(Mori et al., 2004). 래트 세포주는 증가된 ADCC 활성을 가지는 항체들을 제조하는 사용되어 왔다(Niwa et al., 2004, 2005). 그것의 보다 높은 활성에 더하여, 저함량 푸코오스 IgG1은 Fc γ RIII 다형성에 독립적이고, 야생형 세포에서 트라스투주맙(trastuzumab) 또는 리툭시맙과 함께 보여지는 차이점이 결핍된다(Niwa et al., 2004b, Vol 10 Clin Cane Res).

<10> 이전에도 항체들이 다양한 발현 시스템에서 생산되었지만, 그것의 젖에서 항체를 분비하도록 조작된 형질전환 동물의 포유동물 유방 상피세포와 같이 포유동물의 유방 상피세포에서 생산되는 항체들의 증강된 ADCC 활성은 이전에 인지되지 않았다.

발명의 상세한 설명

<11> 발명의 요약

<12> 그것의 젖에서 항체를 분비하도록 조작된 형질전환 동물의 포유동물 유방 상피세포와 같이 포유동물의 유방 상피세포에서 제조된 항체들이 세포 배양 유래 물질 보다 ADCC 활성이 증강되고 CD16에 대한 결합이 증가되는 것이 발견되었다. 젖 유래 항체들의 글리코실화에 대한 연구들은 젖 유래 항체들에 저함량의 푸코오스가 존재함을 밝혔다. 따라서, 항체 및 그 조성물이 여기에서 제공된다. 제공되는 항체들은 포유동물 유방 상피 세포에서 생산된 것이다. 또한 항체의 생산 방법뿐만 아니라 이를 사용하는 방법도 제공한다.

<13> 증강된 ADCC 활성을 가지는 항체들은 포유동물 유방 상피 세포 내 항체를 발현하여 생산된다. 한 구현예에서 포유동물 유방 상피세포는 그것의 젖에서 항체를 발현하도록 조작된 형질전환 비인간 포유동물의 것이다. 다른 구현예에서, 유방 상피세포는 항체의 서열을 인코딩하는 핵산(예를 들면, DNA) 구조체로 형질전환되고 유방 상피세포에서 항체의 발현을 야기할 수 있는 배양 세포이다.

<14> 따라서, 본 발명의 한 관점에서, 유방 상피세포 유래 항체들(또는 항체)을 포함하는 조성물이 제조되며, 여기에서 상기 항체들은 증강된 항체 의존성 세포 독성(ADCC) 활성을 가진다. 본 발명의 다른 관점에서, 젖 유래 항체들(또는 항체)을 포함하는 조성물이 제공되고, 여기에서 상기 젖 유래 항체들은 증강된 항체 의존성 세포 독성(ADCC) 활성을 가진다. 한 구현예에서, 항체들의 ADCC 활성은 세포 배양 유래 항체들의 ADCC 활성보다 적어도 2배 더 높다. 다른 구현예에서, 상기 항체들의 ADCC 활성은 세포 배양 유래 항체들의 ADCC 활성보다 적어도 3배, 4배, 5배, 7배 또는 10배 더 높다. 한 구현예에서, 젖 유래 항체들이 얻어지는 젖은 항체를 발현하도록 조작된 비인간 형질전환 포유동물이 생산한 것이다.

<15> 본 발명의 관점에 의하면, IgG1 항체들의 Fc 영역의 결합은 항체가 Fc 영역내 Asn297 글리코실화 부위에 부착되는 것으로 발견된 코어 푸코오스(예를 들면, 바이안테너리(biannetenney) 구조의 염기에 결합된 푸코오스)가 결핍되는 경우 증강된다. 어떤 관점에서, 본 발명의 항체들은 이 코어 푸코오스가 결핍된다. 다른 관점에서 젖에서 생산된 단클론 항체들은 현저한 고함량의 만노오스가 있고 하이브리드 구조이다. 일반적으로, 본 발명의 항체들은 FcRIII 수용체에 보다 단단하게 결합할 수 있고 증강된 ADCC를 초래할 수 있다.

<16> 본 발명의 다른 관점에서, 항체들은 여기에서 제공되고 증강된 ADCC 활성을 가지는 성파로서 글리코실화 패턴을 가지도록 변형되었다. 이 변형은 여기에서 제공되는 바와 같이 포유동물 유방 상피세포에서 발현되기 위하여 항체를 생산하는 성파이다.

<17> 제공되는 조성물의 항체들은 그들의 글리코실화에 대하여 동형이거나 또는 이형일 수 있다.

<18> 한 구현예에서, 항체들의 적어도 하나 이상의 사슬은 푸코오스를 포함하지 않도록 변형되었다. 다른 구현예에서, 항체들의 한 사슬은 푸코오스를 포함하지 않도록 변형되었다. 또 다른 구현예에서, 항체들의 적어도 하나 이상의 사슬이 포함하지 않는 푸코오스는 1,6-푸코오스이다. 다른 구현예에서, 항체들의 하나 또는 적어도 하나 이상의 사슬은 푸코오스를 포함하지 않도록 변형되었으나, 이 항체들은 또한 하나의 올리고만노오스 또는 추가의 올리고만노오스를 포함하도록 변형되었다. 올리고만노오스를 포함하는 사슬은 푸코오스를 포함하지 않는 사슬과 동일할 수 있으나, 반드시 그런 것은 아니다. 다른 구현예에서, 항체들의 아미노산 서열은 변형된 후 포유동물 유방 상피세포에서 발현되었다. 한 구현예에서, 항체들의 아미노산 서열이 Asn297의 아미노산 치환을 가진다. 또 다른 구현예에서, 상기 치환은 푸코실화(fucosylated) 되지 않을 아미노산을 가지는 것이다. 다른 구현예에서 Asn297는 Gln으로 치환된다.

<19> 다른 구현예에서 제공되는 항체들은 하나의 올리고만노오스 또는 추가의 올리고만노오스를 포함하도록 변형된다. 다른 구현예에서 항체들의 적어도 30% 이상이 적어도 하나 이상의 올리고만노오스를 포함하도록 상기 항체들이 변형된다. 다른 구현예에서 항체들의 적어도 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 또는 그 이상이 적어도 하나 이상의 올리고만노오스를 포함하도록 상기 항체들이 변형된다. 또 다른 구현예에서 항체들의 50%, 40%, 30%, 20%, 10% 미만, 또는 이보다 적은 것이 하나 또는 적어도 하나 이상의 사슬에서 푸코오스를 포함하지 않도록 상기 항체들이 변형된다. 또 다른 구현예에서 항체들의 적어도 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 또는 그 이상이 적어도 하나 이상의 올리고만노오스를 포함하고, 항체들의 50%, 40%, 30%, 20%, 10% 미만 또는 이보다 적은 것이 하나 또는 적어도 하나 이상의 사슬에서 푸코오스를 포함하도록 항체들이 변형된다.

<20> 다른 구현예에서 항체들의 탄수화물은 고 만노오스 글리코실화 패턴을 나타내도록 변형된다. 또 다른 구현예에

서 항체들의 적어도 하나 이상의 사슬이 올리고만노오스를 포함하고 비푸코실화되도록 항체들이 변형된다. 또 다른 구현예에서 항체들의 주요 탄수화물이 비푸코실화되도록 항체들이 변형된다. 한 구현예에서 주요 탄수화물은 비푸코실화된 올리고만노오스이다. 다른 구현예에서 주요 탄수화물은 비푸코실화된 Man5이다. 또 다른 구현예에서 항체 탄수화물의 40% 미만이 푸코오스를 포함하도록 항체들이 변형된다. 또 다른 구현예에서 항체 탄수화물의 30%, 20%, 10% 미만 또는 이보다 적은 것이 푸코오스를 포함하도록 항체들이 변형된다. 한 구현예에서 푸코오스는 1,6-푸코오스이다. 다른 구현예에서 항체 탄수화물의 적어도 60% 이상이 비푸코실화된 올리고만노오스이고, 항체 탄수화물의 40% 미만이 푸코오스를 포함하도록 항체들이 변형된다. 또 다른 구현예에서 항체 탄수화물의 63%가 비푸코실화된 올리고만노오스이고, 항체 탄수화물의 16%가 코어 푸코오스 함유 G1F이며, 항체 탄수화물의 21%가 코어 푸코오스 함유 G2F가 되도록 항체들이 변형된다.

- <21> 본 발명의 다른 관점에서 증강된 ADCC 활성을 가지는 항체들은 실제로 여기에서 제공되는 방법에 의해 변형되지 않지만, 상기 글리코실화 패턴으로 선별된 항체들이다.
- <22> 한 구현예에서 항체들은 단클론 항체들이다. 다른 구현예에서 항체들은 다클론 항체들이다. 또 다른 구현예에서 항체들은 키메라 항체들, 인간화 항체들 또는 완전한 인간 항체들이다. 다른 구현예에서 항체들은 전체 길이 항체들이다. 또 다른 구현예에서 항체들은 전체 길이 단일쇄 항체들이다. 또 다른 구현예에서 전체 길이 항체들은 중쇄 및 경쇄를 포함한다. 또 다른 구현예에서 항체들은 항체 단편들이다. 또 다른 구현예에서 항체 단편들은 Fc 융합 폴리펩타이드의 일부이다.
- <23> 본 발명의 다른 관점에서 항체들은 N-결합 올리고당을 포함하는 Fc 영역을 포함하는 형질전환 유전자 DNA 구조체에 의해 인코딩된다. 한 구현예에서 항체들은 비인간 형질전환 동물의 젖에서 생산된다. 또 다른 구현예에서 항체들은 여기에 기재된 바와 같이 글리코실화 패턴을 가진다.
- <24> 한 구현예에서 항체들은 아이소타입(isotype) IgG, IgA 또는 IgD를 갖는다. 또 다른 구현예에서 항체들은 아이소타입 IgG를 갖는다. 다른 구현예에서 항체들은 아이소타입 IgG1 또는 IgG2를 갖는다. 또 다른 구현예에서 항체들은 항체 단편들이다. 본 발명의 다른 관점에서 개선된 특성들(예를 들면, ADCC 특성)을 가지는 본 발명의 항체들의 인간화된 버전이 제공된다.
- <25> 상기 항체들은 임의의 항원에 대해 유도된 것일 수 있다. 한 구현예에서 항체들은 CD3, CD4, CD5, CD8, CD14, CD15, CD16, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD25, CD32B, CD30, CD33, CD37, CD38, CD40, CD40L, CD46, CD52, CD54, CD59, CD74, CD80, CD126, CD138, CD137 또는 GP IIbIIIa에 대해 유도될 수 있다. 다른 구현예에서 항체들은 HM1.24, HLA-DR, MUC1, 테나신(tenascin), PIGF, VEGF, 암 유전자, 암 유전자 산물, 괴사 항원, 17-A1 항원, IL-2, T101, TAC, IL-6, TRAIL-R1, GD3 강글리오사이드(ganglioside) 또는 TRAIL-R2에 대해 유도된다. 한 구현예에서 항체들은 항-CD 137 항체들이다.
- <26> 여기에서 제공되는 임의의 조성물 및 방법에서 항체들은 항-CD137 항체들이다.
- <27> 한 구현예에서 제공되는 항체들을 포함하는 조성물은 약학적으로 허용 가능한 담체를 더 포함할 수 있다. 다른 구현예에서 제공되는 조성물은 추가의 치료제를 더 포함할 수 있다. 한 구현예에서 추가의 치료제는 항암제 또는 면역조절제이다.
- <28> 본 발명의 어떤 구현예는 소정의 형질전환 단백질, 그 전구약물, 또는 상기 화합물 또는 그 전구약물의 약학적으로 허용 가능한 염 및 약학적으로 허용 가능한 운반제(vehicle), 희석제 또는 담체를 포함하는 약학 조성물을 포함하는 것에 주목해야 한다.
- <29> 제공되는 조성물은 다수의 치료 방법에서 사용될 수 있다. 본 발명의 한 관점에서, 여기에서 제공되는 조성물을 피험체에서 ADCC를 증강시기 위한 유효량으로 이를 필요로 하는 피험체에게 투여하는 단계를 포함하여 피험체를 치료하는 방법이 제공된다. 본 발명의 다른 관점에서, 피험체가 보유하고 있거나 또는 보유할 위험에 처한 질병을 치료하기에 유효한 양으로 제공되는 조성물을 피험체에게 투여하는 단계를 포함하여 피험체를 치료하는 방법이 제공된다. 한 구현예에서 질병은 암이다. 본 발명의 항체들이 특정 정후들에 대응하여 제공하는 유리한 치료 효과는 어떤 구현예에서, 고형암; 및 흑색종뿐만 아니라 유방, 결장, 난소, 신장, 전립선 및 폐의 암종의 치료를 포함한다. 항체들이 유효한 면역조절 치료를 제공하도록 돋기 때문에 상기 치료는 유효할 것이라고 제한없이 생각된다.
- <30> 따라서, 특이 표적들은 또한 항-CD3 항체들(예를 들면, 비호지킨 림프종; 자가면역 질환-SLE), 항-CD16 항체들(예를 들면, FcRIII), 항-CD19(예를 들면, 비호지킨 림프종), 항-CD20, 항-CD32B 항체들(예를 들면, FcR II B 및 알레르기), 항-CD30 (예를 들면, 비호지킨 질환), 항-GP IIbIIIa(예를 들면, 혈전증), 항-TNF- α (예를 들면, 류마

티스성 관절염 및 크론병), 종양 내피 마커에 대한(예를 들면, 혈관신생-항암 조절에 대한) 항-TEM 항체들 등을 포함할 수 있다.

<31> 다른 구현예에서 상기 질환은 램프증식성 질환이다. 또 다른 구현예에서 상기 질환은 자가면역 질환이다. 본 발명의 다른 구현예에서 본 발명의 ADCC 항체들은 자가면역 유래 뇌척수염, 전신홍반성낭창뿐만 아니라 항-CD137이 어떤 이익을 줄 수 있는 다른 질환 상태의 치료에서 유효하다.

<32> 한 구현예에서 피험체에게 투여되는 항체의 양은 하루에 약 0.01 mg/kg 내지 약 50 mg/kg이다.

<33> 다른 구현예에서 피험체에게 추가의 치료제가 더 투여된다. 한 구현예에서 추가의 치료제는 항암제이다. 다른 구현예에서 추가의 치료제는 면역조절제이다. 한 구현예에서 면역조절제는 IL-1, IL-2, IL-3, IL-6, IL-10, IL-12, IL-18, IL-21, 인터페론, 파클리타셀(paclitaxel), TNF- α 또는 그 조합이다. 다른 구현예에서 피험체에게 IL-2이 더 투여된다. 다른 구현예에서 피험체에게 IL-12이 더 투여된다. 또 다른 구현예에서 피험체에게 항암제 및 면역조절제가 더 투여된다. 한 구현예에서 피험체에게 면역조절제 및 트라스투주맙이 더 투여된다. 또 다른 구현예에서 피험체에게 IL-21 및 트라스투주맙이 더 투여된다. 한 구현예에서 항-CD137 유방 상피세포 유래 항체는 IL-21 및 트라스투주맙의 조합으로 사용된다. 다른 구현예에서 항-CD137 항체는 코어 푸코오스 결핍 고함량 만노오스 항체이다. 따라서, 어떤 구현예에서 항체들은 고형암을 위축하고 그들의 재발을 예방하는데 유효한 면역 조절제와 함께 사용된다. 다른 구현예에서 항체들은 IL-21, IL-12 및/또는 트라스투주맙과 같은 다른 항암 치료제와 함께 사용된다.

<34> 피험체는 ADCC 활성이 바람직한 임의의 피험체가 될 수 있다. 한 구현예에서 피험체는 인간이다. 다른 구현예에서 피험체는 개, 고양이, 말, 암소, 돼지, 양, 염소 또는 영장류이다.

<35> 또한 항체를 변형함으로써 증강된 ADCC 활성을 가지는 항체들을 생산하기 위한 방법이 제공된다. 이를 방법은 포유동물 유방 상피세포에서 항체를 생산하여 항체들의 글리코실화를 변형하는 단계를 포함한다. 한 구현예에서 포유동물 유방 상피세포는 그것의 젖에서 항체를 발현하도록 조작된 비인간 포유동물의 것이다. 또 다른 구현예에서 포유동물 유방 상피세포는 배양한 포유동물 유방 상피세포이다.

<36> 본 발명의 한 관점은 형질전환 항체 및 변이체 및 그 단편을 생산하기 위한 방법을 제공하는데, 이 과정은 형질전환 비인간 포유동물의 젖에서 핵산 구조체에 의해 인코딩되는 형질전환 항체를 발현하는 단계를 포함한다. 한 구현예에서 본 발명의 항체를 생산하는 방법은 하기 단계들을 포함한다:

<37> (a) 원하는 형질전환 항체를 인코딩하는 형질전환 DNA 구조체로 비인간 포유동물 세포를 형질감염시키는 단계;

<38> (b) 상기 형질전환 DNA 구조체가 게놈으로 삽입된 세포를 선별하는 단계; 및

<39> (c) 일차 핵이식 절차를 수행하여 그것의 젖에서 항체를 발현할 수 있는 원하는 형질전환 항체에 대한 비인간 형질전환 포유동물 이형접합체를 생산하는 단계.

<40> 다른 구현예에서 상기 방법은 하기 단계들을 포함한다:

<41> (a) 항체를 발현하도록 조작된 비인간 형질전환 포유동물을 제공하는 단계;

<42> (b) 비인간 형질전환 포유동물의 젖에서 항체를 발현하는 단계; 및

<43> (c) 젖에서 발현된 항체들을 분리하는 단계.

<44> 다른 구현예에서 상기 방법은 젖 분비를 유도하는 단계 및/또는 얻어진 항체들의 ADCC 활성을 측정하는 단계를 더 포함한다. 또 다른 구현예에서 상기 방법은 추가의 분리 및/또는 정제 단계를 더 포함한다. 또 다른 구현예에서 상기 방법은 얻어진 항체들과 세포 배양에서 생산된 항체들의 ADCC 활성을 비교하는 단계를 더 포함한다. 또 다른 구현예에서 상기 방법은 얻어진 항체들과 비-유방 상피세포에 의해 생산된 항체들의 ADCC 활성을 비교하는 단계를 더 포함한다. 이러한 세포들은 세포 배양된 세포가 될 수 있다.

<45> 어떤 구현예에서, 항체들은 여기에서 제공되는 형질전환 동물의 젖으로부터 또는 상기 형질전환 동물의 자손으로부터 항체들을 수집하여 얻어질 수 있다.

<46> 어떤 구현예에서 원하는 항체(또는 항체 융합 폴리펩타이드)를 인코딩하는 구조체는 적어도 하나 이상의 β -카세인 프로모터에 의해 작용된다. 또 다른 구현예에서 비인간 형질전환 포유동물은 유제동물이다. 또 다른 구현예에서 비인간 형질전환 포유동물은 염소이다.

<47> 어떤 구현예에서 형질전환 포유동물에 의해 생산되는 항체들은 생산되는 젖의 리터당 적어도 1g 이상의 수준으

로 생산된다.

- <48> 다른 관점에서 여기에서 제공되는 방법에 의해 항체의 글리코실화를 변형하는 단계를 포함하여 항체의 ADCC 활성을 증강시키는 방법이 제공된다. 한 구현예에서 항체의 적어도 하나 이상의 사슬이 푸코오스를 포함하지 않도록 항체가 변형된다. 다른 구현예에서 항체의 한 사슬이 푸코오스를 포함하지 않도록 항체가 변형된다. 또 다른 구현예에서 하나의 올리고만노오스 또는 추가의 올리고만노오스를 포함하도록 항체가 변형된다. 또 다른 구현예에서 항체는 하나의 올리고만노오스 또는 추가의 올리고만노오스를 포함하도록 변형된다.
- <49> 또 다른 구현예에서 항체들의 탄수화물이 고 만노오스 글리코실화 패턴을 나타내도록 항체들이 변형된다. 한 구현예에서 항체들의 적어도 하나 이상의 사슬이 올리고만노오스를 포함하고 비푸코실화되도록 항체들이 변형된다. 다른 구현예에서 항체들의 한 사슬이 올리고만노오스를 포함하고 비푸코실화되도록 항체들이 변형된다. 또 다른 구현예에서 항체들의 주요 탄수화물이 비푸코실화되도록 항체들이 변형된다. 한 구현예에서 주요 탄수화물은 비푸코실화된 올리고만노오스이다. 다른 구현예에서 주요 탄수화물은 비푸코실화된 Man5이다. 또 다른 구현예에서 항체들은 항체 탄수화물의 40% 미만이 푸코오스를 포함하도록 변형된다. 한 구현예에서 항체들은 항체 탄수화물의 30%, 20%, 10% 미만 또는 그 보다 적은 것이 푸코오스를 포함한다. 또 다른 구현예에서 항체들의 적어도 30% 이상이 적어도 하나 이상의 올리고만노오스를 가지도록 항체들이 변형된다. 한 구현예에서 항체들의 적어도 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 또는 그 이상이 적어도 하나 이상의 올리고만노오스를 가지도록 항체들이 변형된다. 또 다른 구현예에서 항체들의 적어도 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 또는 그 이상이 적어도 하나 이상의 올리고만노오스를 포함하고 항체들의 50%, 40%, 30%, 20%, 10% 미만 또는 이보다 적은 것이 하나 또는 적어도 하나 이상의 사슬에서 푸코오스를 포함한다. 다른 구현예에서 항체들은 항체 탄수화물의 적어도 60% 이상이 비푸코실화된 올리고만노오스이고, 항체 탄수화물의 40% 미만이 푸코오스를 포함하도록 변형된다. 또 다른 구현예에서 항체들은 항체 탄수화물의 63%가 비푸코실화된 올리고만노오스이고, 항체 탄수화물의 16%가 코어 푸코오스 함유 G1F이며, 항체 탄수화물의 21%가 코어 푸코오스 함유 G2F가 되도록 변형된다.
- <50> 또 다른 본 발명의 관점에서, 그것의 젖에서 항체를 발현하도록 조작된 형질전환 비인간 포유동물의 젖에서 항체를 수집하는 단계 및 항체의 ADCC 활성을 측정하는 단계를 포함하여 항체를 제조하는 방법이 제공된다. 한 구현예에서 상기 방법은 수집된 항체의 ADCC 활성과 세포 배양에서 발현된 항체의 ADCC 활성을 비교하는 단계를 더 포함한다. 다른 구현예에서 형질전환 비인간 포유동물은 염소, 양, 들소, 낙타, 암소, 돼지, 토끼, 물소, 말, 래트, 마우스 또는 라마이다.
- <51> 본 발명의 다른 관점에서, 항체를 발현하도록 조작된 유방 상피세포로부터 항체를 수집하는 단계 및 항체의 ADCC 활성을 측정하는 단계를 포함하여 항체를 제조하는 방법이 제공된다. 한 구현예에서 상기 방법은 수집된 항체의 ADCC 활성과 비유방 상피세포에서 발현된 항체의 ADCC 활성을 비교하는 단계를 더 포함한다.
- <52> 본 발명의 또 다른 관점에서, 여기에서 제공되는 방법으로서 항체들을 획득하는 단계 및 항체들의 ADCC 활성을 항체들의 다른 세트와 비교하는 단계를 포함하는 방법이 제공된다. 한 구현예에서 항체들의 다른 세트는 세포 배양에서 얻어진 항체들이다. 다른 구현예에서 항체들의 다른 세트는 배양에서 비유방 상피세포에서 얻어진 항체들이다. 또 다른 구현예에서 항체들의 다른 세트는 배양한 유방 상피세포에서 얻어진 항체들이다. 또 다른 구현예에서 항체들의 다른 세트는 항체들에서 얻어진 항체들이다. 또 다른 구현예에서 항체들의 다른 세트는 포유동물의 젖에서 얻어진 항체들이다. 한 구현예에서 포유동물은 그것의 젖에서 항체들의 다른 세트를 발현하도록 조작된 비인간 형질전환 포유동물이다.
- <53> 본 발명의 각 한정은 본 발명의 다양한 구현예를 포함할 수 있다. 따라서, 임의의 한 요소 또는 요소들의 조합을 포함하는 본 발명의 각 한정은 본 발명의 각 관점에 포함될 수 있다.
- <54> 도면의 간단한 설명
- <55> 도 1은 글리코실화된 항-CD137 항체의 N-결합 올리고당의 MALDI-TOF 스펙트럼들을 제공한다. 글리칸은 PNGase F에 의해 방출된다. 도 1A는 마우스 젖 유래 항체에 대한 스펙트럼을 제공하고; 도 1B는 세포 배양 유래 항체에 대한 스펙트럼을 제공하며; 도 1C는 염소 젖 유래 항체에 대한 스펙트럼을 제공한다.
- <56> 도 2는 글리코실화된 항체들로부터 방출된 올리고당의 형광 검출(2-AA 표지화된) HPLC에 의해 얻어진 올리고당 맵(maps)을 비교한 결과를 제공한다. 도 2A는 마우스 젖 유래 항체와 비교한 것이고; 도 2B는 Endo H로 처리된 마우스 젖 유래 항체와 비교한 것이며; 도 2C는 세포 배양 유래 항체와 비교한 것이고; 도 2D는 Endo H로 처리된 세포 배양 유래 항체와 비교한 것이며; 도 2E는 염소 젖 유래 항체와 비교한 것이고; 도 2F는 Endo H로 처리된 염소 젖 유래 항체와 비교한 것이다.

- <57> 도 3은 마우스 젖 유래 항-CD137 항체에서 방출된 주요 올리고당의 Endo H 민감성을 예시한다. 도 2 유래 시료는 Endo H로 하룻밤 처리하였다. 도 3A는 마우스 젖 유래 항체에 대한 결과를 제공하고; 도 3B는 Endo H로 처리된 마우스 젖 유래 항체에 대한 결과를 제공하며; 도 3C는 세포 배양 유래 항체에 대한 결과를 제공하고; 도 3D는 Endo H로 처리된 세포 배양 유래 항체에 대한 결과를 제공한다.
- <58> 도 4는 항체들의 콘카나발린 A(Con A) 결합을 보여준다. 단백질 A 정제 항체는 Con A 컬럼 상에 장착되었고 알파 메틸만노시다제 함유 완충액으로 용리되었다. 분획들은 흡광도 280 nm에서 모니터되었다. 도 4A는 Con A 컬럼 상의 글리코실화된 항-CD137 항체에 대한 결과를 보여주고; 도 4B Con A 컬럼 상의 비글리코실화된 항-CD137 항체에 대한 결과를 보여준다.
- <59> 도 5는 786-0 세포에 대한 항체들의 결합을 입증한다. 각각의 항체 결합은 FACS 분석으로 측정되었고 음성 대조군 항체(항-2,4-다이니트로페놀(DNP:dinitrophenol)) 및 항-HER2 상에 부착되었다. 도 5A는 마우스 젖 유래 아글리코실화된 항체에 대한 결과를 보여주고; 도 5B는 마우스 젖 유래 글리코실화된 항체에 대한 결과를 보여주며; 도 5C는 세포 배양 유래 글리코실화된 항체에 대한 결과를 보여주고; 도 5D는 염소 젖 유래 글리코실화된 항체를 보여준다.
- <60> 도 6은 ADCC 분석에서 젖 유래 항체에 의해 증강된 789-0 세포 사멸을 예시하다. 사각형: 마우스 젖 유래; 역삼각형: 염소-유래; 마름모: 세포 배양 유래; 원: 아글리코실화된 마우스 젖 유래; 빈 사각형: 트라스투주맙; 삼각형: 항-DNP 항체.
- <61> 도 7은 항체 발현 젖에 대한 형질전환 구조체의 일반적인 개요도를 제공한다. 소정의 유전자는 젖 특이 유전자인 카프린 β -카세인의 코딩 영역을 대신한다. 6.2 kb 프로모터 영역은 H 또는 L IgG 사슬의 어느 것, 뒤이어 비번역된 카프린 β -카세인 3' 서열 및 하류 요소들을 코딩하는 영역에 결합된다. 검은 박스 H 및 L 엑손; 빈 박스: 계놈 인트론; 화살표: 전사 지시.
- <62> 도 8은 형질전환 동물에 의해 제조된 항체들의 존재 또는 부재 탄수화물의 봉괴를 보여준다.
- <63> 도 9는 제조 방법의 일례에 대한 일반적인 순서도를 제공한다.
- <64> 도 10은 코어 푸코오스의 물리적 위치를 보여주는 항체의 공간 채움 모델(space filling model)을 예시한다.
- <65> 도 11은 CD137 발현 CHO 세포에 대한 항체들의 결합을 보여준다. 도 11A는 CD137 없는 CHO 세포(음성대조군)에 대한 결과를 제공하고, 도 11B는 CD137 발현 CHO 세포에 대한 결과를 제공한다. 모든 도면(plot) 내의 절은 곡선은 부적절한 항-DNP 항체로 염색한 것이다.
- <66> 도 12는 ADCC 분석에서 젖 유래 항체에 의해 증강된 CD137 발현 CHO 세포사멸을 예시한다.
- <67> 도 13은 IgG1-sFcgrIIIa 결합의 바이오센서 분석 결과를 제공한다. 도 13A는 염소 젖 유래 항체에 대한 결과를 보여주고; 도 13B는 마우스 젖 유래 항체에 대한 결과를 보여주며; 도 13C는 세포 배양 유래 항체에 대한 결과를 보여주고; 도 13D는 마우스 젖 유래 아글리코실화된 항체에 대한 결과를 보여준다.
- <68> 도 14는 증강된 ADCC 활성을 가지는 항체를 포함하는 키트를 예시한다.
- <69> 발명의 상세한 설명
- <70> 형질전환 동물의 젖에서 생산되는 항체들이 시험관 내 세포 배양을 통해 생산된 재조합 항체들에 상대적인 증강된 ADCC 활성을 가지는 것이 발견되었다. 또한 증강된 ADCC 활성을 가지는 항체들의 글리코실화 패턴이 평가되었다. 유방 상피세포에서 생산된 항체들의 조성물은 그들의 제조 방법 및 용도로 제공한다.
- <71> 본 발명의 한 관점에서 항체들은 증강된 ADCC 활성을 가진다. 여기에서 사용된 "증강된 ADCC 활성"은 그것의 글리코실화 패턴을 변경하는 방법으로 생산될 때가 그것의 글리코실화 패턴을 변경하지 않는 방법으로 생산될 때보다 또는 여기에서 제공되는 그것의 글리코실화 패턴 변경 이전에 가지는 ADCC 활성의 수준 보다 우수한 ADCC 활성을 보이는 항체 또는 그 조성물을 나타내는 것으로 생각된다. 증강된 ADCC 활성을 가지는 항체들은 변형 이전에는 어떠한 ADCC 활성도 보이지 않는 것을 포함한다. 여기에서 사용된 "글리코실화 패턴"은 개별 항체 또는 항체들의 그룹에 존재하는 탄수화물의 세트를 나타낸다. 글리코실화 패턴의 변화는 하나의 항체 또는 항체들의 그룹의 글리코실화를 변경하여 이를 수 있다. 항체 조성물의 글리코실화 패턴 변화는 개별 항체, 조성물 내 항체들의 서브세트 또는 조성물 내 모든 항체들의 글리코실화가 변화하는 경우를 포함하는 것으로 생각된다. 글리코실화 패턴은 당업계에 알려진 많은 방법들에 의해 결정될 수 있다. 예를 들면, 단백질 상의 탄수화물을 분석하는 방법들이 미국특허출원 제11/107,982호 및 제11/244,826호에 기재되어 있다. 단백질 상의 탄수화물을 분석

하는 방법은 참조에 의해 여기에 편입된다.

<72> 글리코실화는 정확한 폴딩(folding), 표적화, 생활성 및 치료 당단백질의 제거에서 중요하다. 예를 들면, 발현 시스템으로서의 형질전환 동물 개발에서 다른 유전적 배경이 생산된 단백질의 다른 발현 및 글리코실화 수준에 기인하는 것이 인식되었다. 염소 젖에서 분리되는 형질전환 유래 단백질의 글리코실화는 세포 배양에서 수확된 단백질의 것과 다르다(Denman et al., 1991). 형질전환으로 생산된 인간 항트롬빈(antithrombin)에서, 글리코실화 유형은 부위 의존적이다. 푸코실화된, 사알릴화된(sialylated) 올리고당들은 Asn96 및 Asn192 위치에서 발견되는 반면에, Asn155는 올리고-만노오스 올리고당을 가진다(Edmunds et al., 1998). 부위 의존 글리코실화는 또한 마우스 젖에서 생산된 감마-인터페론에서 발견된다(James et al., 1995).

<73> 글리코실화는 자연 상태에서 다양한 최종 단백질 형태를 제조할 수 있는 번역후(post-translational) 변형이다. IgG 분자들은 Fc 영역 내 CH₂ 도메인의 Asn₂₉₇ 잔기에서 글리코실화된다. 탄수화물 구조 내 특정 변경은 항체 기능 또는 치료 유효성에 영향을 줄 수 있다. 이를 테면, 류마티스성 관절염과 같은 질병에서 아갈락토실(agalactosyl) 구조(IgG Fc-결합 탄수화물에 대하여 특이적인 것으로 생각된다)의 발생이 정상 보다 높은 것이 문서로 증명되었다(Parekh et al. 1985; Rademacher et al. 1988a). 이 아글리코실화된(aglycosylated) 구조는 이 영역에서 정상적으로 보여지는 구조 보다 더 변하기 쉽고, 따라서 당단백질의 4차 구조에서 변화가 유도될 수 있거나, 항체의 면역원성에 기여하거나 또는 자체로 변종의 항체 기능에 기여할 수 있다(Rademacher et al. 1988b; Axford et al. 1992). 그러나, 질병 상태에서 이 구조는 관찰된 다수의 당형(glycoforms) 중 하나일뿐이다.

<74> 어떤 구현예에서 여기에서 제공되는 항체들은 비유방 상피세포 배양 유래 항체들의 ADCC 활성보다 적어도 2배 더 높은 ADCC 활성을 가진다. 다른 구현예에서 항체들의 글리코실화는 제공되는 방법에 의해 변형되며, 변형된 항체들의 ADCC 활성은 동일한 항체의 비변형된 버전보다 적어도 2배 더 높은 ADCC 활성을 가진다. 어떤 구현예에서 항체들은 적어도 3배, 4배, 5배, 6배, 7배, 8배, 9배, 10배, 15배, 20배, 25배 또는 30배 더 높은 ADCC 활성을 가진다. 제공되는 항체들은 포유동물 유방 상피세포에서의 발현으로 획득된다. 이런 항체들은 또한 여기에서 유방 상피세포 유래 항체들로 나타낸다. 어떤 구현예에서 항체들은 비인간 형질전환 동물의 젖에서의 발현으로 획득된다. 이런 항체들은 또한 여기에서 "젖 유래 항체들"로 나타낸다. 여기에서 사용된 "형질전환"은 기술에 의해 세포 또는 그 시조로 삽입되고 그 세포에서 개발되는 동물 계놈의 일부가 되는 핵산 분자를 포함하는 세포를 나타낸다. 이 용어는 또한 기술에 의해 그 세포 또는 계놈으로 삽입된 핵산 분자를 가지는 동물과 관련하여 사용된다.

<75> 일반적으로, 어떤 구현예에서 글리코실화는 고 만노오스 글리코실화 패턴을 나타낸다. 여기에서 사용된 "고 만노오스 글리코실화 패턴"은 적어도 하나 이상의 올리고만노오스를 포함하는 항체 또는 항체들의 조성물을 나타내는 것으로 생각되고 여기에서 항체들의 적어도 30% 이상이 적어도 하나 이상의 올리고만노오스를 포함한다. 어떤 구현예에서 항체 탄수화물의 적어도 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 또는 그 이상이 올리고만노오스이다. 어떤 구현예에서 항체 탄수화물의 적어도 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 또는 그 이상이 비푸코실화된 올리고만노오스이다. 다른 구현예에서 항체 탄수화물의 50%, 40%, 30%, 20%, 10%, 5% 미만 또는 보다 적은 것이 푸코오스를 포함한다. 또 다른 구현예에서 항체들은 저함량 푸코오스 및 고함량 올리고만노오스이다. 따라서, 또 다른 구현예에서 항체 탄수화물의 적어도 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 또는 그 이상이 올리고만노스이고, 항체 탄수화물의 50%, 40%, 30%, 20%, 10% 또는 5% 미만이 푸코오스를 포함한다. 따라서 또 다른 구현예에서 항체 탄수화물의 적어도 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 또는 그 이상이 비푸코실화된 올리고만노스이고, 항체 탄수화물의 50%, 40%, 30%, 20%, 10% 또는 5% 미만이 푸코오스를 포함한다. 본 발명의 한 구현예는 중쇄에서 1,6-푸코오스 당을 가지지 않는 증가된 ADCC 활성을 가지는 항체들에 관한 것이다. 한 구현예에서 단핵구, 대식세포 및 자연 살해 세포에서 발견되는 Fc γ RIII 수용체에 대한 항체들의 Fc 영역과의 결합은 항체가 Fc 영역에서 Asn297 글리코실화 부위에 부착되는 것이 발견된 코어 푸코오스(예를 들면, 바이안테너리 구조의 염기에 결합된 푸코오스)가 결핍되는 경우에 증강된다.

<76> 특이적 글리코실화 패턴을 가지는 다른 항체들은 실시예를 통해 여기에서 기재된다. 항체들의 조성물이 논의될 때 여기에서 사용된 조성물은 글리코실화에서 동종 또는 이종이 될 수 있다.

<77> 항체들은 질병 진행 및/또는 ADCC에 연루되는 것과 같이, 결합 수용체 또는 다른 단백질에 대한 능력을 통해 선별될 수 있다. 항체들은 그것에 대해 유도된 항체를 제공하고 치료적 이점을 제공하는 ADCC 활성을 가지는 임의의 세포 마커에 결합될 수 있다. 항체들은 종양 세포 마커들과 같은 표적 항원에 결합할 수 있는 것들을 포함한다. 여기에서 포함하는 세포 마커들 및 대표적인 질병들의 예는 CD3, CD4, CD5, CD8, CD14, CD15, CD16, CD19,

CD20, CD21, CD22, CD23, CD25, CD32B, CD30, CD33, CD37, CD38, CD40, CD40L, CD46, CD52, CD54, CD59, CD74, CD80, CD126, CD138, CD137 또는 GPDbIIIa를 포함한다. 어떤 구현예에서 항체들은 HM1.24, HLA-DR, MUC1, 테나신, PIGF, VEGF, 암 유전자, 암 유전자 산물, 괴사 항원, 17-A1 항원, IL-2, T101, TAC, IL-6, TRAIL-R1, GD3 강글리오사이드 또는 TRAIL-R2에 대해 유도된 것일 수 있다. 다른 표적들은 항-CD3 항체들(예를 들면, 비호지킨 림프종; 자가면역 질환-SLE), 항-CD16 항체들(예를 들면, FcR_{III}), 항-CD19(예를 들면, 비호지킨 림프종), 항-CD20, 항-CD32B 항체들(예를 들면, FcR_{II}B 및 알레르기), 항-CD30(예를 들면, 비호지킨 질환), 항-GP II bIII a(예를 들면, 혈전증), 항-TNF-_a(예를 들면, 류마티스성 관절염 및 크론병을 위한), 종양 내피 마커들에 대한 항-TEM 항체들(예를 들면, 혈관신생-항암 제어를 위한)를 포함한다. 종양 세포 마커에 결합하자마자 본 발명의 항체들은 종양 세포를 공격하는 단핵구, 대식세포 및 자연 살해 세포를 보충할 수 있다. 따라서, 증강된 ADCC 활성을 가지는 항체들은 고형암을 위축시키고 그 재발을 예방하는데 효과적일 수 있는 면역 조절제로 간주될 수 있다.

<78>

광범위한 연구들은 그것의 자연 리간드에 의한 또는 작용성(agonistic) 항체들에 의한 CD137의 자극이 다양한 모델들에서 확립된 마우스 종양의 퇴행에 기인한 항종양 반응을 증가시키는 것이 증명되었다. CD137(또한 4-1BB로도 불린다)은 림프구 세포의 여러 가지 유형에서 발현되는 막 당단백질이다. 뮤린 CD137에 대한 작용성 단클론 항체는 생체 내에서 마우스 종양을 위축시키고 그들의 재발을 예방하는 것이 보고되었다. 그것의 자연 리간드 또는 작용성 항체들을 통한 CD137의 자극은 종양 반응 효과가 T 세포의 자극 및 증강된 조절 NK 활성을 통해 생체 내에서 항종양 면역 반응을 증가시킨다. 뮤린 항-CD137 단클론 항체들의 전신 투여는 단독으로 또는 다른 치료 양상들과의 조합으로 저함량 면역성의 AGF104A 육종 및 높은 종양형성(발암성) P815 비만세포종뿐만 아니라 EL4 흉선종, K1735 흑색종, B10.2 및 87 육종, RENCA 신장 암종, J558 형질세포종, MCA205 육종, JC 유방암, MCA26 결장암 및 GL261 신경교종과 같은 마우스에서의 거대 종양의 완전한 퇴행을 유도하였다.

<79>

본 발명의 한 구현예에서 항-CD137 항체는 "미니 유전자" 계娄으로서 형질전환 마우스 및 염소의 여러 가지 계통의 젖에서 클로닝되고 발현될 수 있다. 이 유전자의 발현은 염소 β -카세인 조절 요소들의 제어하에 있다. 마우스와 염소 모두에서 항체 변이체들의 실질적 발현이 확립되었다. 한 구현예에서 본 발명은 증강된 ADCC 활성을 가지는 항-CD137 항체를 제공하고, 이로 인해 치료 특성들을 증가시켰다. 본 발명에 의하고, 본 발명의 대표적인 형질전환 동물에 의해 생산된 항-CD137 항체를 이용하여 비인간:인간 키메라 단클론 항체(즉, 마우스:인간) 작용제 항-CD137이 개발되었다. 항-CD137 항체의 인간화는 면역치료를 경험하는 환자 또는 다른 정후에 대한 그것의 용도를 증강시키는 것으로 예상된다. 관찰된 아미노산 서열 상동성에 기초로 하여 VL 및 VH 영역의 상보성 결정 영역(CDRs: complementary determining regions)이 인간 항-DNA-결합 인자형(idiotype) 면역글로불린 클론에 이식되었다. 본 발명의 재조합 키메라 항체가 뮤린 단클론 항체와 비교할 때 유사한 생활성 프로파일을 보이는 것이 경쟁적 ELISA에 의해 관찰되었다. 항-CD137 항체는 분석될 때 항체 의존성 세포독성 및 보체-매개 세포독성 모두를 중재하는데 효과적이었다. 본 발명의 항체 서열의 인간화는 인간에게 반복된 정맥내 투여를 허용하여 임의의 원하지 않는 인간 항-마우스 항체 반응을 제거하는 것으로 예상된다.

<80>

여기에서 사용된 "항체"라는 용어는 이황화 결합, 예를 들면, 다른 유전자에 의해 인코딩되는 두 개의 동일한 Ig H 사슬 및 두 개의 동일한 L 사슬로 구성되는 공유 이형사량체(heterotetramer)에 의해 서로 결합된 적어도 두 개 이상의 중쇄(H)들 및 적어도 두 개 이상의 경쇄(L)들을 포함하는 당단백질을 나타낸다. 각각의 중쇄는 (여기에서 HCVR 또는 V_H로 약칭된) 중쇄 가변 영역 및 중쇄 불변 영역으로 구성된다. 중쇄 불변 영역은 C_H1, C_H2 및 C_H3의 세 개의 도메인으로 구성된다. 각각의 경쇄는 (여기에서 LCVR 또는 V_L로 약칭된) 경쇄 가변 영역 및 경쇄 불변 영역으로 구성된다. 경쇄 불변 영역은 CL의 하나의 도메인으로 구성된다. V_H 및 V_L 역역은 상보성 결정 영역(CDR)으로 불리는 과변이(hypervariability) 영역으로 더 나뉘어질 수 있고, 구조 영역(FR: framework region)으로 불리는 보다 보존된 영역으로 변화를 줄 수 있다. 각각의 V_H 및 V_L는 아미노 말단부터 카르복시 말단까지 순서대로 FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4로 배열되는 세 개의 CDRs 및 네 개의 FRs로 구성된다. 중쇄 및 경쇄의 가변 영역은 항원과 상호작용하는 결합 도메인을 포함한다. 항체들의 불변 영역은 면역계(예를 들면, 효과기 세포들)의 다양한 세포들 및 전형적인 보체계의 일차 구성성분(C1q)을 포함하는 숙주 조직 또는 인자들에 대한 면역글로불린의 결합을 중재할 수 있다. 성숙한 기능성 항체 분자의 형성은 두 개의 단백질이 화학량론적 양들로 발현되고 적절한 배열로 자가조립할 때 완성될 수 있다.

<81>

항체라는 용어는 그 항원 결합 단편을 포함하는 것을 의미한다. 여기에서 사용된 항체의 "항원 결합 단편"은 항원에 특이적으로 결합하는 능력을 보유하는 항체의 하나 또는 그 이상의 부분들을 말한다. 항체의 항원 결합 기능은 전체 길이 항체의 단편에 의해 수행될 수 있는 것으로 보여진다. 항체의 "항원 결합 단편"이라는 용어 안

에 포함된 결합 단편의 예들은 (i) V_L , V_H , C_L 및 C_H1 도메인으로 구성되는 일원자가 단편인 Fab 단편; (ii) 경첩부에서 이항화 교상결합에 의해 결합되는 두 개의 Fab 단편을 포함하는 이원자가 단편인 $F(ab')_2$ 단편; (iii) V_H 및 C_H1 도메인으로 구성되는 Fd 단편; (iv) 항체의 단일 암(arm)의 V_L 및 V_H 도메인으로 구성된 Fv 단편; (v) V_H 도메인으로 구성된 dAb 단편(Ward et al., (1989) *Nature* 341:544-546); 및 (vi) 분리된 상보성 결정 영역(CDR)을 포함한다. 더욱이, Fv 단편의 두 개의 도메인인 V_L 및 V_H 가 유전자를 분리하여 코딩되더라도, 이들은 단일 단백질 사슬로 제조되는 것을 가능하게 하는 합성 결합기에 의한 재조합 방법을 이용하여 결합되어 V_L 및 V_H 영역이 쌍을 이룸으로써 일원자가 분자(단일쇄 Fv(scFv: single chain Fv)로 알려졌다; 예를 들면, Bird et al. (1988) *Science* 242:423-426; 및 Huston et al. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sd. USA* 85:5879-5883 참조)를 형성할 수 있다. 이러한 단일쇄 항체들은 또한 항체의 "항원 결합 부위"라는 용어 안에 포함되는 것이 의도된다. 이들 항체 단편들은 참조에 의해 뿐만 아니라 당업자에게 알려진 다른 기술들에 의해 여기에 편입되는 문헌[J. Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp 98-118 (N. Y. Academic Press 1983)]에 기재된 바와 같이 가수분해 단편화 절차들과 같이 통상적인 절차들을 사용하여 얻어진다. 단편들은 완전한 항체인 것과 동일한 방법으로 유용성이 스크린된다.

<82> 바람직한 항원 결합 단편은 Fab 단편, $F(ab')_2$ 단편 및 Fv 단편 CDR3를 포함한다. 한 구현예에서 항체 단편은 Fc 융합 폴리펩타이드의 일부이다. 예로서, 항체 단편은 N-결합 올리고당을 포함하는 Fc 영역이다.

<83> 여기에서 사용된 "분리된 항체"는 다른 항원 특이성을 가지는 다른 항체들로부터 실질적으로 자유로운 항체를 나타내는 것으로 생각된다. 그러나, 항원의 에피토프, 동형체(isoform) 및 변이체에 특이적으로 결합하는 분리된 항체는 예를 들면, 다른 종들 유래의 다른 관련 항원들에 대한 교차-반응성을 가질 수 있다. 게다가, 분리된 항체는 다른 세포 물질 및/또는 화학물질로부터 실질적으로 자유로울 수 있다. 여기에서 사용된 "특이 결합"은 주된 항원에 결합하는 항체를 말한다. 일반적으로, 항체는 주된 항원 또는 밀접하게 관련된 항원 이외의 비특이 항원에 대한 그것의 결합 친화력보다 적어도 2배 이상 우수한 친화력으로 결합한다. 따라서, 여기에서 제공되는 항체들은 어떤 구현예에서 표적 항원을 특이적으로 결합한다.

<84> 어떤 구현예에서 항체들은 아이소타입 IgG, IgA 또는 IgD를 갖는다. 또 다른 구현예에서, 항체들은 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgAsec, IgD, IgE로 구성된 군에서 선택되거나 또는 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgAsec, IgD 또는 IgE의 면역글로불린 불변 및/또는 가변 도메인을 갖는다. 다른 구현예에서, 항체들은 양특이성(bispecific) 또는 다특이성(multispecific) 항체이다. 또 다른 구현예에서, 항체들은 재조합 항체들, 단클론 항체들, 인간화 항체들 또는 키메라 항체들 또는 이들의 혼합물이다. 어떤 구현예에서 키메라 항체는 인간 항체의 부분을 가지는 비인간(예를 들면, 마우스, 래트, 토끼) 항체의 일부가 유전적으로 융합 처리된 것이다. 어떤 구현예에서 키메라 항체는 대략 33% 비인간 단백질 및 67% 인간 단백질을 포함할 수 있다. 특정히 마우스 키메라와 관련하여, 이들은 인간 항체의 유효한 인간 면역계의 상호작용과 뮤린 항체의 특이성을 조합시킬 수 있으므로 이들이 뮤린 항체들에 의해 도출되는 HAMA(HAMA: human anti-mouse antibodies) 반응을 감소시키도록 개발될 수 있다.

<85> 다른 구현예에서, 항체들은 재조합 항체들이다. 여기에서 사용된 "재조합 항체"라는 용어는 다른 종들의 면역글로불린 유전자가 형질전환된 동물로부터 분리된 항체들과 같이 재조합 방법으로 제조, 발현, 창조 또는 분리되는 항체들; 숙주 세포로 형질감염된 재조합 발현 벡터를 사용하여 발현되는 항체들; 재조합, 결합 항체 라이브러리로부터 분리되는 항체들; 또는 다른 DNA 서열에 대한 면역글로불린 유전자 서열의 스�挣钱(splicing)을 포함하는 임의의 다른 방법에 의해 제조, 발현, 창조 또는 분리된 항체들을 포함하는 것으로 생각된다.

<86> 또 다른 구현예에서, 항체들은 키메라 또는 인간화 항체들이 될 수 있다. 여기에서 사용된 "키메라 항체"라는 용어는 뮤린 가변 또는 과가변 영역이 인간 불변 영역 또는 불변 및 가변 구조 영역과 결합된 항체들을 말한다. 여기에서 사용된 "인간화 항체"라는 용어는 인간 구조 영역과 결합하여 모체 항체 유래 항원 결합 CDRs만을 보유하는 항체를 나타낸다(Waldmann, 1991, *Science* 252:1657 참조). 뮤린 항체의 결합 특이성을 보유하는 이러한 키메라 또는 인간화 항체들은 본 발명에 의한 진단적, 예방의 또는 치료적 적용을 위하여 생체 내에 투여될 때 감소된 면역성을 가지는 것으로 예상된다. 본 발명의 다른 구현예에서 항체는 증가된 ADCC 활성을 가지는 인간화 항체이다. 한 구현예에서 이 항체는 CD137이다. 인간화(재형성 또는 CDR-이식이라고도 불린다)는 마우스와 같은 이종발생원(xenogeneic sources)으로부터 단클론 항체들의 면역성을 감소시키기 위하여 확립된 기술이다. 인간화 항체들은 표준 분자 생물 기술을 통해 생산될 수 있다. 한 구현예에서 이는 인간 구조체로 설치류 상보성 결정 영역을 이식하는 단계를 포함한다. 그러나, 이 기술은 대부분이 반복적인 공정이고, CDRs, 인간 구조체

및 설치류 mAb에서 인간 구조 영역(역돌연변이(backmutations))으로 치환된 잔기의 길이의 인간화된 항체를 설계할 때 다수의 요소들이 작동하기 시작한다.

<87> 치료 마우스 mAb는 HAMA 반응이 항체를 중화하고 혈액순환으로부터 그것을 빠르게 제거하며, 최악의 경우에는 심각한 알레르기 과민증을 유도하므로 때때로 인체 사용에 이상적이지 않다. 뮤린 Ig 서열의 대부분을 인간 서열로 대체하여 효능을 유지하는 동안 보다 적은 부작용을 초래하는 여러 가지 전략들이 개발되었다. 인간 치료 mAb를 개발하기 위한 하나의 전략은 생산하는 키메라 항체가 비인간이 보유할 수 있는 항원 결합 도메인을 제외한 인간 IgG 단백질 서열의 대부분으로 구성되도록 뮤린 중쇄(H) 및 경쇄(L) 불변 영역(각각 C_H 및 C_L) 또는 일반적인 비인간 사슬을 인간 영역으로 대체한 것이다. 이 전략은 비호지킨 림프종을 치료하는 데 사용되고 미국에서 승인된 첫번째 단클론 항체인 리툭산(Rituxan)(등록상표)(리툭시맙 항-인간 CD20, Genentech)의 개발에 사용되었다. 어떤 평가들에 의하면, 인간 C_H 및 C_L 서열을 가지는 치료 mAb의 제공하기 위해 뮤린 항체 단백질 면역성의 대략 90%를 제거하여야 한다.

<88> 본 발명의 한 관점에 의하여 비인간:인간 키메라 단클론 항체(즉, 마우스:인간) 항-CD137 항체가 제공된다. 마우스 항체의 V_L 및 V_H 영역의 상보성 결정 영역(CDRs)은 인간 항-DNA 결합 인자형 면역글로불린 클론으로 이식되었다. 경쟁적인 ELISA에 의해, 본 발명의 재조합 키메라 항체는 뮤린 단클론 항체와 비교할 때 유사한 생활성 프로파일을 보였다. 항-CD137 항체는 항체 의존성 세포 독성(ADCC) 및 보체 매개 세포독성 모두를 매개하는데 효과적이었다.

<89> 택일적인 구현예에 의하면, 본 발명의 단클론 항체들은 양특이성 항체 또는 다특이성 항체의 형태가 되도록 변형될 수 있다. "양특이성 항체"라는 용어는 임의의 제제, 예를 들면, 단백질, 웨타이드 또는 단백질 또는 웨타이드 복합체를 포함하는 것으로 생각되는데, 이는 (a) 세포 표면 항원 및 (b) 효과기 세포의 표면에 있는 Fc 수용체에 결합거나 또는 상호작용하는 두 개의 다른 결합 특이성들을 가진다. "다특이성 항체"라는 용어는 임의의 제제, 예를 들면, 단백질, 웨타이드 또는 단백질 또는 웨타이드 복합체를 포함하는 것으로 생각되는데, 이는 (a) 세포 표면 항원, (b) 효과기 세포의 표면에 있는 Fc 수용체, 및 (c) 적어도 하나 이상의 다른 성분에 결합하거나 또는 상호작용하는 두 개 보다 많은 다른 결합 특이성들을 가진다. 따라서, 본 발명은 세포 표면 항원 및 효과기 세포에 있는 Fc 수용체에 결합하는 양특이성, 삼특이성, 사특이성 및 다른 다특이성 항체들을 포함하나 이에 한정되지 않는다. "양특이성 항체"라는 용어는 디아바디(diabodies)를 더 포함한다. 디아바디는 V_H 및 V_L 도메인이 단일 폴리웨타이드 사슬에서 발현되지만, 동일 사슬 상에 두 개의 도메인들 사이에서 쌍을 이루기에는 너무 짧은 결합기를 사용하고 그로 인해 다른 사슬의 상보적인 도메인들과 쌍을 이루도록 강행되어 두 개의 항원 결합 부위를 형성하는 이가, 양특이성 항체들이다(예를 들면, Holliger, P., et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sd. USA 90:6444-6448; Pojak, R.J., et al. (1994) Structure 2:1121-1123 참조).

<90> 어떤 구현예에서, 항체들은 인간 항체들이다. 여기에서 사용된 "인간 항체"라는 용어는 인간 생식계 면역글로불린 서열로부터 유래된 가변 및 불변 영역을 가지는 항체를 포함하는 것으로 생각된다. 본 발명의 인간 항체는 인간 생식계 면역글로불린 서열에 의해 인코딩되지 않는 아미노산 잔기를 포함할 수 있다(예를 들면, 돌연변이는 시험관 내에서 무작위 또는 부위 특이적 돌연변이 생성에 의해 또는 생체 내 체세포 돌연변이에 의해 도입되었다). 그러나, 여기에서 사용된 "인간 항체"라는 용어는 인간 구조체 서열로 이식된 마우스와 같이 다른 포유동물 종의 생식계로부터 유래된 CDR 서열이 있는 항체를 포함하는 것으로 생각되지 않는다(여기에서 "인간화 항체"로 나타낸다). 인간 항체들은 마우스 시스템 보다 오히려 인간 면역계의 일부분을 운반하는 형질전환 마우스를 사용하여 생산된다.

<91> 또한 완전한 인간 단클론 항체는 인간 면역글로불린 중쇄 및 경쇄 유전자좌들(loci)의 큰 부위를 형질전환한 마우스를 면역시킴으로써 제조될 수 있다. 예를 들면, 미국등록특허 제5,591,669호, 제5,598,369호, 제5,545,806호, 제5,545,807호, 제6,150,584호, 및 그 내용이 여기에서 참조로 인해 편입된 이 가운데 인용된 참고문헌들 참조. 이들 동물은 일반적으로 내인성(예를 들면, 뮤린) 항체들의 생산에서 기능적 결실이 있도록 변형되었다. 동물들은 이들 동물들의 면역이 소정의 항원에 대한 완전한 인간 항체들의 생산에 기인하는 인간 생식계 면역글로불린 유전자좌의 전부 또는 일부를 포함하도록 더 변형된다. 이들 마우스(예를 들면, 제노마우스(XenoMouse, Abgenix), HuMAb 마우스(Medarex/GenPharm))의 면역화에 이어, 단클론 항체들이 표준 하이브리도마 기술에 의해 제조된다. 이들 단클론 항체들은 인간 면역글로불린 아미노산 서열을 가지고, 따라서 인간에게 투여될 때 인간 항-마우스 항체(HAMA) 반응을 자극할 수 없다. 여기에서 제공되는 임의의 항체들과 같이 인간 항체들은 단클론 항체들, 다클론 항체들, 또는 단클론 및 다클론 항체들의 혼합물이 될 수 있다.

<92> 어떤 구현예에서 항체는 전체 길이 항체이다. 어떤 구현예에서 전체 길이 항체는 중쇄 및 경쇄를 포함한다.

<93> 다클론 항체들을 향상시키는 과정은 잘 알려져 있다. 예를 들면, 항체들은 먼저 방혈되어 예비면역 혈청을 획득하는 뉴질랜드 흰 토끼에서 피하로 항원을 투여하여 향상된다. 항원은 6개의 다른 부위에서 일반적으로 하나 또는 그 이상의 보조제와 함께 부위당 $100 \mu\text{l}$ 의 총 부피로 주사될 수 있다. 그런 다음 토끼는 처음 주사하고 2주 후에 방혈되고 6주마다 3회씩 동일한 항원으로 주기적으로 접종된다. 혈청 시료는 각각 접종 10일 후 수집된다. 다클론 항체들은 바람직하게는 항체를 포획하는 항원을 사용하는 친화성 크로마토그래피에 의해 혈청으로부터 회수된다. 다클론 항체들을 향상시키는 상기 및 다른 절차는 참조에 의해 여기에 편입된 문헌[E. Harlow, et. al., editors, *Antibodies: A Laboratory Manual* (1988)]에 개시되어 있다.

<94> 단클론 항체를 생산하기 위하여, 마우스는 다양한 횟수로 주사되고(상기 참조), 마우스 비장이 제거되고 인산 완충액(PBS: phosphate buffered saline)에 재현탁된다. 비장 세포는 얼마간의 적절한 특이성의 항체를 제공하는 램프구의 원료로 적합하다. 그런 다음 이들은 영속적으로 성장하는 골수종 파트너 세포와 융합된 후 융합 산물이 HAT와 같은 선별제 존재하에 다수의 조직 배양 웰에서 평판배양된다. 그런 다음 웰은 ELISA에 의해 유용한 항체를 제조하는 세포를 포함하는 것들을 동정하여 스크린된다. 그런 다음 이들은 신선한 배지에서 평판배양된다. 성장 기간 이후에 이 웰들은 항체 생산 세포들을 동정하기 위하여 다시 스크린된다. 웰의 90% 이상이 항체 생산에 대하여 양성인 단일 클론을 포함할 때까지 다양한 클로닝 절차가 수행된다. 이 절차로부터 항체를 생산하는 클론의 안정한 계통이 확립된다. 그런 다음 단클론 항체는 단백질 A 세파로오스(Sephadose), 이온교환 크로마토그래피뿐만 아니라 이러한 기술들의 변형 및 조합에 의해 정제될 수 있다(예를 들면, 미국등록특허 제 6,998,467호 참조).

<95> mAb 산물을 개발하기 위한 택일적인 전략은 인간 Ig 유전자로 대체된 전체 네이티브 Ig 레퍼토리(repertoire)를 가지는 형질전환 마우스에서 항체를 생산하는 것이다. 이러한 마우스는 완전한 인간 항체를 생산한다. 이 방법으로 본 발명의 두 개의 구현예에서 키메라, 인간화 또는 완전한 인간 항체가 생산된다. 두 개의 항체들은 효과 기능을 가질 것이고 암 및 암 병변의 치료에서 유용할 것이다. 본 발명의 키메라 항체 구현예는 원래의 뮤린 가변(항원 결합) 서열을 보유하고 이 때문에 그것의 결합 및 기능적 특성을 보유할 것이다.

<96> 항체는 항체의 ADCC 활성을 제공하거나 또는 증강시키는 본 명세서의 어딘가에서 제공되는 글리코실화 패턴을 가질 수 있다. 본 발명은 여기에서 제공되는 증가된 ADCC 활성을 가지는 항체들을 생산하는 모든 방법을 포함한다. 한 구현예에서 상기 방법은 완전한 인간 단클론 항체들을 생산하는 단계를 포함한다. 다른 구현예에서 상기 방법은 인간 유전자에 의해 대체된 그들의 항체 유전자들을 가지고 소정의 항원으로 면역하는 반응에서 '인간화' 항체들을 생산하는 형질전환 마우스 또는 다른 비인간 동물 피험체의 사용을 포함한다. 또 다른 구현 예에서 과지 전시(phage displays)는 박테리오파지를 처리하여 그들의 표면에서 완전한 인간 단클론 항체를 전시하는데 사용될 수 있다. 상기 방법들 중 어느 것에 의해 생성된 항체들은 형질전환 동물을 생산하는데 사용될 수 있다. 한 구현예에서 이는 항체를 인코딩하는 DNA 구조체를 형질전환 동물의 계보으로 통합시킴으로써 수행된다.

<97> 본 발명의 한 관점은 마우스 및 염소를 포함하는 형질전환 동물에서 생산된 젖이며, 이는 고함량의 올리고만노오스 함유 항체를 포함할 수 있다. 이들 올리고만노오스 함유 항체들은 증강된 ADCC 프로파일 및 단핵구, 대식 세포 및 자연 살해 세포의 표적 수용체에 대한 바람직한 표적으로서의 기능을 가진다. 포유동물 유방 상피세포에서 이들을 제조하기 위하여 여기에 기재된 항체들을 재조합적으로 생산하는 방법이 제공된다. 이는 세포 배양에서 수행될 수 있다. 또한 이는 형질전환 동물의 젖에서 항체의 발현을 통해 수행될 수 있다.

<98> 한 구현예에서 포유동물 유방 상피세포는 마우스 또는 염소와 같은 형질전환 동물의 젖에서 항체를 발현하도록 처리되었다. 이 유전자의 발현은 예를 들면, 염소 β -카세인 조절 요소의 제어하에 있다. 마우스와 염소 양쪽에서 항체의 실질적인 발현이 성립되었다. 형질전환 동물은 H 및 L 사슬을 포함하는 개별 구조체 또는 두 사슬을 포함하는 하나의 구조체를 공동-형질감염시켜 생산될 수 있다. 어떤 구현예에서, 양쪽 형질전환 유전자들은 유전자들이 자손에게 함께 유전되고 단백질 발현이 공동으로 조절되도록 하기 위하여 동일한 염색체 부위로 통합된다. 어떤 구현예에서 발현은 젖 단백질을 생산하는 개체의 유선관 상피세포에서 최적화된다. 상기 동물을 예를 들면 염소 및 소와 같은 낙농 동물 또는 마우스가 될 수 있다.

<99> 예를 들면, 핵 이식에 의한 형질전환 염소를 생산하는데 사용하기 위한 (예를 들면, 키메라 항-인간 CD137를 인코딩하는) 구조체를 포함하는 일차 세포주를 생산하기 위하여, 중쇄 및 경쇄 구조체들은 일차 염소 피부 상피세포로 형질감염되어 클론에 의해 연장되고 형질전환 유전자 복제수, 형질전환 유전자 구조 보전 및 염색체 통합 부위를 평가하여 완전히 특성 분석될 수 있다. 여기에서 사용된 "핵 이식"은 클로닝의 방법을 나타내며, 여기에

서 공여 세포 유래 핵은 무핵의 난모세포로 이식된다.

<100> 소정의 단백질을 코딩하는 서열들은 항체 등의 서열을 획득함으로써, 또는 NCBI의 Genbank와 같은 서열 데이터 베이스로부터 획득되거나 (소 또는 마우스와 같은) 선택 동물로부터 유래되는 역-번역(reverse-translated) 전령 RNA 또는 게놈 물질의 라이브러리를 스크리닝하여 얻어질 수 있다. 이 서열은 적당한 플라즈마 벡터로 클로닝되고 대장균(*E. coli*)과 같은 적절한 숙주 유기체에서 증폭될 수 있다. 벡터를 증폭한 후 DNA 구조체가 절단되고, 벡터의 잔류물로부터 정제되며 형질전환 동물을 생산하는데 사용될 수 있는 발현 벡터로 도입될 수 있다. 형질전환 동물은 그들의 게놈으로 통합된 원하는 형질전환 단백질을 가질 수 있다.

<101> 벡터를 증폭한 후 DNA 구조체는 적절한 5' 및 3' 제어 서열로 절단되고, 벡터의 잔류물로부터 정제되며, 원하는 비글루코실화된 관련 형질전환 단백질을 그들의 게놈으로 통합시킨 형질전환 동물을 생산하는데 사용될 수 있다. 반대로, 효모 인조 염색체(YACs:yeast artificial chromosomes)와 같은 어떤 벡터를 사용하면, 벡터로부터 조립된 구조체를 제거할 필요가 없으며; 이 경우에 증폭된 벡터는 형질전환 동물을 제조하는데 바로 사용될 수 있다. 코딩 서열이 형질전환 비인간 포유동물의 젖에서 발현될 수 있도록 하는 제어서열에 코딩 서열이 유효하게 결합될 수 있다.

<102> 형질전환 동물의 젖을 직접 생산하는데 적절한 DNA 서열은 자연적으로 유도된 젖 단백질로부터 유래되는 5'-프로모터 영역을 운반할 수 있다. 이 프로모터는 그 결과로 호르몬 및 조직 특이적 인자들의 제어하에 있고 젖을 분비하는 유방 조직에서 가장 활동적이다. 어떤 구현예에서 상기 프로모터는 염소 β -카세인 프로모터이다. 이 프로모터는 유방 상피를 가로질러 젖으로 형질전환 단백질의 분비를 지시하는 단백질 리더 서열의 생산을 지시하는 DNA 서열에 작동 가능하게 결합될 수 있다. 어떤 구현예에서 자연적으로 분비된 젖 단백질로부터 유래될 수 있는 3'-서열이 mRNA의 안정성을 향상시키기 위하여 첨가될 수 있다.

<103> 여기에서 사용된 "리더 서열" 또는 "신호 서열"은 단백질 분비 신호를 인코딩하는 핵산 서열이고, 형질전환 단백질을 인코딩하는 하류 핵산 분자에 작동 가능하게 결합될 때 분비를 지시한다. 리더 서열은 네이티브 인간 리더 서열, 인위적으로 유도된 리더일 수 있거나 또는 형질전환 유전자 코딩 서열의 전사를 지시하는데 사용된 프로모터와 동일한 유전자로부터 또는 포유동물 유방 상피 세포와 같은 세포로부터 정상적으로 분비되는 다른 단백질로부터 얻어질 수 있다.

<104> 어떤 구현예에서 프로모터는 젖 특이적 프로모터이다. 여기에서 사용된 "젖 특이적 프로모터"는 젖으로 단백질을 분비하는 세포(예를 들면, 유방 상피세포)에서 유전자의 발현을 정상적으로 지시하는 프로모터이며, 예를 들면, 카세인 프로모터, 예를 들면, α -카세인 프로모터(예를 들면, 알파 S-1 카세인 프로모터 및 알파 S2 카세인 프로모터), β -카세인 프로모터(예를 들면, 염소 β -카세인 프로모터(DiTullio, BIOTECHNOLOGY 10:74-77, 1992)), γ -카세인 프로모터, κ -카세인 프로모터, 유청 산 단백질(WAP: whey acidic protein) 프로모터(Gorton et al., BIOTECHNOLOGY 5: 1183-1187, 1987), β -락토글로불린 프로모터(Clark et al., BIOTECHNOLOGY 7: 487-492, 1989) 및 α -락트알부민 프로모터(Soulier et al., FEBS LETTS. 297:13, 1992)를 포함한다. 예를 들면, 마우스 유방 종양 바이러스(MMTV: mouse mammary tumor virus)의 장형 반복 말단(LTR: long terminal repeat) 프로모터와 같이 유방 조직에서 특이적으로 활성화된 프로모터도 이 정의에 포함된다.

<105> 여기에서 사용된 코딩 서열 및 조절 서열은 코딩 서열의 발현 또는 전사를 이들이 조절 서열의 영향 또는 제어 하에 두는 것과 같은 그런 방법으로 공유 결합될 때 "작동 가능하게 결합된"다고 말한다. 코딩 서열이 기능성 단백질로 번역되기 위하여 코딩 서열은 조절 서열과 작동 가능하게 결합된다. 두 개의 DNA 서열들은 5' 조절 서열에서 프로모터의 유도가 코딩 서열 전사를 초래하는 경우 및 두 개의 DNA 서열 사이에 결합 특성이 (1) 구조 이동 돌연변이(frame-shift mutation)의 도입을 초래하지 않거나, (2) 코딩 서열의 전사를 지시하는 프로모터 영역의 능력을 방해하지 않거나, 또는 (3) 단백질로 번역되는 해당 RNA 전사의 능력을 방해하지 않는 경우 작동 가능하게 결합된다고 말한다. 따라서, 프로모터 영역이 전사 결과 원하는 단백질 또는 폴리펩타이드로 번역될 수 있도록 그 DNA 서열을 전사시키는 능력이 있다면 프로모터 영역은 코딩 서열에 작동 가능하게 결합된 것이다.

<106> 여기에서 사용된 "벡터"는 원하는 서열이 다른 유전적 환경들 사이에서 수송을 위하여 또는 숙주 세포에서 발현을 위하여 제한 및 결찰되어 삽입될 수 있는 임의의 다수의 핵산일 수 있다. RNA 벡터도 이용가능하지만 벡터는 일반적으로 DNA로 구성된다. 벡터는 플라스미드 및 파아지미드(phagemid)를 포함하나 이에 한정되지 않는다. 클로닝 벡터는 숙주 세포 내에서 복제가 가능한 것 및 결정가능한 방법으로 벡터를 절단할 수 있고, 새로운 재조합 벡터가 숙주 세포 내에서 복제하는 그것의 능력을 보유하도록 원하는 DNA 서열이 결찰될 수 있는 하나 또는 그 이상의 엔도뉴클레아제 제한 부위에 의해 더 특성화된 것이다. 플라스미드의 경우에서 원하는 서열의 복제는

숙주 세균 내의 복제 수로 증가되는 플라스미드와 같이 여러 번 또는 유사분열에 의한 숙주 번식과 같이 숙주 당 단 한번 발생할 수 있다. 파아지의 경우에서, 복제는 용해성 단계(lytic phase) 동안에는 활발하게 또는 용원성 단계(lysogenic phase) 동안에는 소극적으로 발생될 수 있다. 발현 벡터는 원하는 DNA 서열이 조절 서열에 작동 가능하게 결합되도록 제한효소부위절단 및 결찰에 의해 삽입될 수 있고 RNA 전사와 같이 발현될 수 있는 것이다. 벡터는 벡터로 형질변환 또는 형질감염되거나 또는 그렇지 않은 세포의 동정에 사용하기에 적절한 하나 또는 그 이상의 마커 서열을 더 포함할 수 있다. 마커는 예를 들면, 항생제 또는 다른 화합물에 대한 저항성 또는 민감성 중 어느 한 쪽을 증가시키거나 감소시키는 단백질을 인코딩하는 유전자들, 당업계에 알려진 표준 분석법에 의해 검출가능한 활성을 가지는 효소들(예를 들면, β -갈락토시다아제 또는 알칼리 포스파타아제)을 인코딩하는 유전자들, 및 형질변환 또는 형질전환된 세포, 숙주, 콜로니들 또는 플라크들의 표현형에 뚜렷하게 영향을 주는 유전자들을 포함한다. 바람직한 벡터는 그들이 작동 가능하게 결합된 DNA 분절 내에 존재하는 구조 유전자 산물의 자발적인 복제 및 발현이 가능한 것들이다.

<107> 본 발명의 한 관점은 형질전환 항체, 및 변이체 및 그 단편을 생산하기 위한 방법을 제공하고, 이 과정은 핵산 구조체에 의해 인코딩되는 형질전환 항체를 형질전환 비인간 포유동물의 젖에서 발현시키는 단계를 포함한다. 한 구현예에서 본 발명의 항체를 생산하는 방법은 하기 단계들을 포함한다:

<108> (a) 원하는 형질전환 항체를 인코딩하는 형질전환 유전자 DNA 구조체로 비인간 포유동물 세포를 형질감염시키는 단계;

<109> (b) 상기 형질전환 DNA 구조체가 계놈으로 삽입된 세포를 선별하는 단계; 및

<110> (c) 일차 핵이식 절차를 수행하여 그것의 젖에서 항체를 발현할 수 있는 원하는 형질전환 항체에 대한 비인간 형질전환 포유동물 이형접합체를 생산하는 단계.

<111> 다른 관점에서 상기 방법은 하기 단계들을 포함한다:

<112> (a) 항체를 발현하도록 조작된 비인간 형질전환 포유동물을 제공하는 단계;

<113> (b) 비인간 형질전환 포유동물의 젖에서 항체를 발현하는 단계; 및

<114> (c) 젖에서 발현된 항체들을 분리하는 단계.

<115> 이러한 방법은 젖의 분비를 유도하기 위한 단계들뿐만 아니라 얻어진 항체들의 ADCC 활성을 측정하기 위한 단계들도 더 포함할 수 있다. 이 방법들은 또한 추가의 분리 및/또는 정제 단계들을 더 포함할 수 있다. 이 방법들은 또한 얻어진 항체들의 ADCC 활성을 세포 배양에서 생산된 항체들과 비교하기 위한 단계들을 포함할 수 있다. 어떤 구현예에서, 얻어진 항체들의 ADCC 활성은 비유방 상피세포에 의해 생산된 항체들과 비교될 수 있다. 이러한 세포들은 세포 배양된 세포들일 수 있다. 항체들의 ADCC 활성을 평가하기 위한 실험 기술들은 당해 기술 분야에서 통상적인 기술을 가진 자에게 알려진 임의의 기술 또는 하기 실시예에 기재된 것과 같이 여기에서 제공되는 기술일 수 있다. 어떤 구현예에서, 항체들은 여기에서 제공되는 바와 같이 제조된 형질전환 동물의 젖 유래 또는 상기 형질전환 동물의 자손 유래 항체들을 수집하여 얻어질 수 있다.

<116> 어떤 구현예에서 원하는 항체 (또는 항체 융합 단백질)을 인코딩하는 구조체는 적어도 하나 이상의 β -카세인 프로모터에 의해 작동된다. 다른 구현예에서 비인간 형질전환 포유동물은 유제동물이다. 또 다른 구현예에서 비인간 형질전환 포유동물은 염소이다.

<117> 어떤 구현예에서 형질전환 포유동물에 의해 생산된 항체들은 생산된 젖 리터당 적어도 1g 이상의 수준으로 생산된다.

<118> 재조합 항체 발현이 가능한 형질전환 동물들은 또한 당업계에 알려진 방법에 의해 생산될 수 있다(예를 들면, 미국등록특허 제5,945,577호 참조). 형질전환 발현에 적절한 동물들은 염소, 양, 들소, 낙타, 암소, 돼지, 토끼, 물소, 말, 래트, 마우스 또는 라마를 포함하나 이에 한정되지 않는다. 또한 적절한 동물들은 각각 암소, 염소, 양 및 돼지(또는 맷돼지)의 다양한 종과 관련된 소(bovine), 염소(caprine), 양(ovine) 및 돼지(porcine)를 포함한다. 적절한 동물들은 또한 유제동물을 포함한다. 여기에서 사용된 "유제동물"은 양, 맷돼지, 염소, 소(cattle) 및 말을 포함하나 이에 한정되지 않는 발굽이 있는 전형적인 초식성 네 발 포유동물 또는 이와 관련된 것이다. 한 구현예에서, 동물들은 일차 세포를 중쇄 및 경쇄를 포함하는 개별 구조체와 함께 공동-형질감염하여 생산된다. 이를 세포는 그 후 핵 이식에 사용된다. 택일적으로, 형질전환 동물을 생산하는데 미세주사가 사용된다면 상기 구조체는 공동-주입된다. 구현예에서 글리코실화 수준을 이루는데 교번이 필요하기 때문

에 부위특이적 돌연변이기술이 사용될 수 있다.

<119> 클로닝은 소정의 항체 또는 다른 유전자 구조체를 생산하는 각각의 능력이 있는 형질전환 동물의 다양성에 기인할 것이다. 생산 방법은 클로닝된 동물 및 이들 동물의 자손을 사용하는 것을 포함한다. 어떤 구현예에서 클로닝된 동물들은 염소(caprines), 소(bovines) 또는 마우스이다. 또한 클로닝은 태아의 핵 이식, 핵 이식, 조직 및 유기체 이식 및 키메라 자손의 산물을 포함한다.

<120> 클로닝 과정의 한 단계는 소정의 형질전환 유전자를 포함하는 세포의 계놈을 적출된 난모세포로 전달하는 단계를 포함한다. 여기에서 사용된 "형질전환 유전자"는 기술에 의해 세포 또는 그 시조로 삽입되고 그 세포로부터 개발하는 동물의 계놈의 일부가 되는 핵산 분자의 임의의 조각을 나타낸다. 이러한 형질전환 유전자는 형질전환 동물에 대한 부분적으로 또는 전체가 외인성인 유전자를 포함할 수 있거나 또는 동물의 내인성 유전자와 상동성을 가지는 유전자가 존재할 수 있다.

<121> 난모세포에 적절한 포유동물원은 염소, 양, 소, 돼지, 토끼, 기니아피그, 마우스, 햄스터, 래트, 비인간 영장류 등을 포함한다. 바람직하게는 난모세포는 유제동물로부터 얻어지고, 가장 바람직하게는 염소 또는 소(cattle)로부터 얻어진다. 난모세포를 분리하는 방법들은 당업계에 잘 알려져 있다. 본질적으로, 이 과정은 예를 들면, 염소와 같은 포유동물의 난소 또는 생식기관으로부터 난모세포를 분리하는 단계를 포함한다. 유제동물 난모세포의 즉시 사용 가능한 원료는 호르몬 유도된 암컷 동물에서 유래된다. 유전 공학, 핵 이식 및 클로닝과 같은 기술의 성공적인 사용을 위하여, 이들 세포들이 핵 이식을 위한 수여 세포로서 사용되기 이전에, 및 그들이 배아로 발달되어 정액 세포에 의해 수정되기 이전에 난모세포가 생체 내에서 성숙되는 것이 바람직할 것이다. 생체 내에서 성숙되는 유사분열 중기 II 단계 난모세포는 핵 이식 기술에서 성공적으로 사용된다. 본질적으로, 성숙한 중기 II 단계 난모세포는 발정기에 착수하고 또는 인간 용모성 고나도트로핀(hCG: human chorionic gonadotropin) 또는 유사 호르몬을 주입하고 몇 시간 지나서 비-과배란(non-super ovulated) 또는 과배란된 동물에서 외과적으로 수집된다.

<122> 유선에서 발현된 재조합 단백질의 양과 질을 예측하는데 사용된 도구 중 하나는 젖 분비의 유도를 통한 것이다 (Ebert KM, 1994). 유도된 젖 분비는 임신으로 초래된 초기 선천적인 젖 분비에서 보다 형질전환 생산의 초기 단계에서 단백질의 발현 및 분석을 참작하며, 이는 적어도 일년 이상 이후이다. 젖 분비의 유도는 호르몬적으로 또는 수동 중 어느 쪽으로 행해질 수 있다. 다양한 젖 분비 절차, 특히 호르몬적으로 유도된 젖 분비가 유선에서 글리코실트랜스퍼라아제의 전사 조절에 영향을 줄 수 있다. 클로닝된 동물의 다양한 젖 분비 시료에서 N-결합 올리고당은 NeuGc 함량을 제외하고 동일하다. 다른 젖 분비 유래 시료에서 전체 시알산 함량이 유사하였으나, 선천적인 젖 분비 유래 형질전환 항체 생산에서 탄수화물이 다른 젖 분비 절차 유래된 것 보다 고함량의 NeuGc를 포함하였다. 마찬가지로, 염소의 젖에서 생산된 형질전환 단백질이 또한 개별 단백질 종의 복합 혼합물로 구성되는 것이 나타난다 (Zhou, 2005).

<123> 각 계통으로부터 울혈된 젖 시료들에서 분리된 단백질 A-정제 IgG 분획이 항체 결합 특이성 및 친화성, 및 T-세포 증식의 복용량 의존 향상을 특성화하기 위하여 시험관 내에서 분석되었다. 한 구현예에서, 본래 GW mAb에 대한 젖 유래 글리코실화 및 아글리코실화된 키메라 조제가 수행되었다.

<124> 정상적인 성장 및 생식 특성을 가지는 건강한 형질전환 마우스 및 생활성 항체의 적당한 수준(> 1 mg/ml)으로 생산되었다. 주어진 구조체를 가지는 마우스에서 염소 또는 소와 같은 종에서 대규모 생산 상태로 작업하기 위한 절차로 생산될 수 있다. 키메라 항-CD137의 생산 및 특성 분석은 생체 내에서 항-종양 활성을 증명하기 위한 마우스 모델에서 하나 또는 그 이상의 이들의 조제물을 테스트하여 도달하였다. 그 후에 글리코실화 및 아글리코실화 키메라 항체 구조체를 모두 그들의 젖에서 항-CD137을 발현하는 형질전환 염소를 생산하는데 사용되었다.

<125> 형질전환 기술을 통해 동물 계놈을 변형하는 능력은 변형된 글리코실화 패턴을 가지는 재조합 단백질의 제조를 위한 새로운 대안을 제공한다. 형질전환 사육 동물의 젖에서 인간 재조합 의약품의 생산은 미생물 반응장치(예를 들면, 변역후 변형의 결핍, 부적절한 단백질 접힘, 높은 경제 비용) 또는 동물 세포 생물반응장치(예를 들면, 높은 자본 비용, 값비싼 배양 배지, 낮은 수율)와 관련된 많은 문제들을 해결한다. 본 발명은 어떤 구현 예에서 이들 분자의 글리코실화 패턴을 최적화하는 원하는 유전자에 대한 형질전환 동물 동형접합체의 젖에서 항체들의 형질전환 생산을 위한 사용을 포함한다.

<126> 본 발명의 다른 구현예에 의하면 표적 분자의 글리코실화 패턴은 예를 들면, 비인간 포유동물에 대한 사료 변경을 통해 변형될 수 있다 (Kerr et al., 2003).

- <127> 본 발명은 더 나아가서 그것의 젖에서 항체를 발현하도록 조작된 형질전환 비인간 포유동물의 젖에서 항체를 수집하는 단계 및 항체의 ADCC 활성을 측정하는 단계를 포함하여 항체를 제조하는 방법을 제공한다. 어떤 구현예에서 ADCC 활성은 세포 배양에서 발현된 항체의 ADCC 활성과 비교된다. 다른 구현예에서 항체를 발현하도록 조작된 배양에서 유방 상피세포로부터 항체가 수집되고 항체의 ADCC 활성이 결정된다. 어떤 구현예에서 ADCC 활성은 세포 배양에서 발현된 항체들의 ADCC 활성과 비교된다. 어떤 구현예에서 세포 배양된 세포는 비유방 상피세포이다. ADCC 활성을 평가하기 위한 분석은 하기 실시예들에서 제공되고 또한 당업계에 알려져 있다.
- <128> 여기에서 사용된 "실질적으로 순수한"이라는 용어는 단백질이 그들의 의도된 사용에서 실용적이고 적합한 양에 대하여 다른 기질로부터 본질적으로 자유로운 것을 의미한다. 특히, 단백질은 충분히 순수하고 예를 들면, 단백질 서열화 또는 약학 조제물 생산에 유용하도록 그들의 숙주 세포의 다른 생물학적 구성 성분으로부터 충분히 자유롭다. 따라서, 어떤 구현예에서 항체들은 실질적으로 순수하다.
- <129> 폴리펩타이드와 관련하여 여기서 사용된 "분리된"은 그것의 선천적인 환경으로부터 분리되고 그것의 동정 또는 사용을 허용하는 충분한 양으로 존재하는 것을 의미한다. 단백질 또는 폴리펩타이드에 대하여 언급할 때 "분리된"은 예를 들면, (i) 클로닝을 발현하여 선택적으로 생산된 또는 (ii) 크로마토그래피 또는 전기영동으로 정제된 의미이다. 분리된 단백질 또는 폴리펩타이드는 실질적으로 순수하지만 반드시 그럴 필요는 없다. 분리된 폴리펩타이드가 약학 조제물 내에서 약학적으로 허용 가능한 담체와 혼합될 수 있으므로, 폴리펩타이드는 조제물의 중량에 대하여 작은 비율만 포함할 수 있다. 그럼에도 불구하고 폴리펩타이드는 생존 시스템에서 결합될 수 있는 기질로부터 분리되는, 즉, 다른 단백질로부터 분리된다. 따라서, 어떤 구현예에서 항체들은 분리된 것이다.
- <130> 항체들은 치료에서 단클론 항체들의 성공적인 사용에서 중요한 인자가 되는 증강된 ADCC 활성을 나타낸다. 본 발명의 항체들의 불변 또는 Fc 영역에서의 동시 결합은 생물학적 반응을 유도할 수 있다. 이들 반응 중 하나는 표적 세포 또는 ADCC에서 세포 자가사멸을 유도하는 것이다. ADCC는 단핵구, 대식 세포 및 자연 살해 세포의 표면에 위치하는 Fc 감마 수용체에 대한 Fc 영역에 결합하여 작용한다. 수용체에 결합하여 이들 세포는 활성화되고 표적 세포(항원 표적을 포함하는 세포)를 소멸시킬 수 있는 사이토카인 및 산화 자유 라디칼을 방출한다.
- <131> 따라서, 한 관점에서 본 발명은 증가된 ADCC 활성 및 그 결과로 증강된 치료 특성을 가지는 항체 조제물에 적합하다. 제공되는 조성물은 ADCC 활성이 적어도 어떤 의학적 이익을 제공할 수 있는 피험체를 치료하는 데 사용될 수 있다. 따라서, 제공되는 조성물은 질병을 앓는 피험체를 치료하는 데 사용될 수 있다. 어떤 구현예에서 항체들은 항체 투여를 통해 피험체에서 ADCC 활성을 증강시켜 피험체를 치료하는 데 사용될 수 있다.
- <132> 여기서 사용된 "치료하는", "치료하다" 또는 "치료"라는 용어는 예방적인(예를 들면, 예방) 및 경감하는 치료를 포함한다.
- <133> 제공되는 조성물이 유익한 치료 효과를 제공할 수 있는데, 이에 대응하는 특이적인 징후는 고형암, 흑색종 뿐만 아니라 유방, 결장, 난소, 신장, 전립선 및 폐의 암종의 효과적인 면역조절제 치료와 같은 암을 포함한다.
- <134> 여기에서 사용된 "암"은 신체 기관 및 조직의 정상적인 기능을 방해하는 세포의 억제되지 않는 성장을 나타낸다. 그들의 원래 위치 및 종자 생명유지 기관(seed vital organ)으로부터 이동하는 암은 침범된 기관의 기능 악화를 통해 결국 피험체를 죽음에 이르게 할 수 있다. 암은 호지킨 림프종, 비호지킨 림프종, 균상 식육종/세자리(Sezary) 증후군, 조직구증식증 X, 만성 림프구성 백혈병, 유모 세포 백혈병, 다발성 골수종, 밸텐스 트롭 거대글로불린혈증, 한랭글로불린혈증 및 중쇄 질환을 포함한다. 백혈병과 같은 혈액암(Hemopoietic cancers)은 피험체에서 정상적인 혈액생성 구획이 외부와 경쟁할 수 있고, 이로 인해 (빈혈증, 혈소판감소증 및 호중구감소증의 형태로) 혈액생성을 실패하게 되고, 최후에 죽음에 이른다.
- <135> 전이는 인체의 다른 부분에 대한 초기 종양으로부터 암세포의 보급으로 인해(예 기인하여) 최초 종양 부위와 별개인 암 세포 영역이 되는 것이다. 최초 종양 덩어리의 진단 시점에서 피험체는 전이의 존재를 모니터하게 된다. 전이는 특이 징후를 모니터링하는 것에 부가하여 자기공명영상(MRI: magnetic resonance imaging) 스캔, 전산화 단층촬영(CT: computed tomography) 스캔, 혈액 및 혈소판 계측, 간 기능 연구, 흉부 X-선 및 골 스캔의 단독 또는 결합된 사용으로 흔히 검출된다.
- <136> 여기에서 사용된 암은 하기의 암 유형, 즉, 유방암, 담관암; 방광암; 아교모세포종 및 수모세포종을 포함하는 뇌암; 자궁경부암; 융모암; 결정암; 자궁내막암; 식도암; 위암; 백혈병; 급성 림프구성 및 골수성 백혈병을 포함하는 혈액 종양; T-세포 급성 림프모세포 백혈병/림프종; 유모 세포 백혈병; 크롬 골수성 백혈병, 다발성 골수종; AIDS-결합 백혈병 및 성인 T-세포 백혈병 림프종; 보웬(Bowen)병 및 파제트병을 포함하는 상피내 종양;

간암; 폐암; 비호지킨 질환 및 림프구성 림프종을 포함하는 림프종; 신경아세포종; 편평세포암종을 포함하는 구강암; 상피세포, 기질 세포, 생식 세포 및 중간엽(mesenchymal) 세포에서 발생하는 것들을 포함하는 난소암; 췌장암; 전립선암; 직장암; 평활근육종, 횡문근육종, 지방육종, 섬유육종 및 골육종을 포함하는 육종; 흑색종, 카포시 육종, 기저세포암(basocellular cancer), 및 편평세포암을 포함하는 피부암; 정상피종, 비정상피종(기형증, 용모막암종), 기질 종양, 및 생식 세포 종양과 같은 배세포 종양(germinal tumor)을 포함하는 고환암; 갑상선 선암 및 수질성 암종을 포함하는 갑상선암; 및 선암 및 윌리姆스(Wilms) 종양을 포함하는 신장암을 포함한다. 다른 암은 당업계에서 통상적인 기술 중 하나에 대하여 알려져 있을 것이고 비만세포종, 흉선종, 형질세포종 및 신경교종을 포함한다.

<137> 또한 본 발명의 조성물은 면역 질환을 치료하는데 유용하다. "면역 질환"은 성인 호흡 장애 증후군, 동맥경화증, 천식, 아테롬성동맥경화증, 담낭염, 간경변, 크론병, 당뇨병, 폐기종, 과다호산구증가증(hypereosinophilia), 염증, 과민성 장 증후군, 다발성 경화증, 중증근무력증, 심근 또는 심막 염증, 골관절염, 골다공증, 췌장염, 류마티스성 관절염, 경피증 및 대장염을 포함한다(예를 들면, 미국공개특허공보 제2003/0175754호 참조).

<138> 또한 본 발명의 조성물은 자가면역 질환 치료에 유용하며, 상기 자가면역 질환은 전신홍반성낭창, 낭창성 신염, 당뇨병, 염증성 장 질환, 셀리악병, 자가면역 갑상선 질환, 애디슨병, 쇼그렌증후군, 시덴합 무도병, 다카야스동맥염, 베게너 육아종증, 자가면역 위염, 자가면역 간염, 피부 자가면역 질환, 자가면역 심근증, 다발성 경화증, 심근염, 중증근무력증, 악성 빈혈, 다발성 근육통, 건선, 급속진행성사구체신염, 류마티스성 관절염, 케양성 대장염, 혈관염, 근육의 자가면역 질환, 고환의 자가면역 질환, 난소의 자가면역 질환 및 눈의 자가면역 질환을 포함하나 이에 한정되지 않는다.

<139> 다른 구현예에서 증강된 ADCC 활성을 가지는 항체들은 자가면역 유래 뇌척수염, 전신홍반성낭창뿐만 아니라 다른 질병 상태를 치료하는데 효과적이다.

<140> 여기에서 제공되는 항체들은 다른 치료제와 결합될 수 있다. 항체 및 다른 치료제는 동시에 또는 연속해서 투여될 수 있다. 다른 치료제가 동시에 투여될 때 그들은 동일 또는 분리 제형으로 투여될 수 있으나, 동시에 투여된다. 다른 치료제와 항체들의 투여가 일시적으로 분리될 때 또 다른 치료제는 다른 하나 및 항체들과 함께 연속해서 투여된다. 이를 화합물의 투여 사이에서 때 맞춘 순간의 상황으로 분리될 수 있거나 연장하여 분리될 수 있다.

<141> 다른 치료제는 예를 들면, 항암 치료를 포함하나 이에 한정되지 않는다. 항암 치료는 암 약물, 방사능 및 외과적 처치를 포함한다. 여기에서 사용된, "암 약물"은 암을 치료하는 목적으로 피험체에게 투여되는 제제를 말한다. 여기에서 사용된 "암을 치료하는" 것은 암의 진전을 막는 것, 암의 징후를 감소시키는 것, 및/또는 도입된 암의 성장을 억제하는 것을 포함한다. 다른 관점에서, 암 약물은 암을 진전시키는 위험을 감소하는 목적으로 암을 진전시키는 위험에 상태의 피험체에게 투여된다. 암 치료를 위한 약물의 다양한 유형이 여기에 기재된다. 본 명세서의 목적을 위한 암 약물은 화학치료제, 면역치료제, 암 백신, 호르몬 치료 및 생물 반응 변형제로 분류된다.

<142> 화학치료제는 메토트렉세이트, 빙크리스틴, 아드리아마이신, 시스플라틴, 염화에틸니트로소우레아를 포함하는 비당(non-sugar), 5-플루오로우라실, 미토마이신 C, 블레오마이신, 독소루비신, 다카바진, 탁솔, 프라길린(fragyline), 메글라민 GLA, 발루비신, 카르무스타인(carmustaine) 및 폴리페포산(poliferposan), MMI270, BAY 12-9566, RAS 파네실(farnesyl) 전달효소 억제제, 파네실 전달효소 억제제, MMP, MTA/LY231514, LY264618/로메텍솔(Lometexol), 글라몰렉(Glamolec), CI-994, TNP-470, 하이캄틴(Hycamtin)/토포테칸(Topotecan), PKC412, 발스포다르(Valspodar)/PSC833, 노반트론(Novantrone)/미토산트론(Mitoxantrone), 메타레트(Metaret)/수라민, 바티마스타트(Batimastat), E7070, BCH-4556, CS-682, 9-AC, AG3340, AG3433, 인셀(Incels)/VX-710, VX-853, ZD0101, ISI641, ODN 698, TA 2516/마르미스타트(Marmistat), BB2516/마르미스타트, CDP 845, D2163, PD183805, DX8951f, 레모날(Lemonal) DP 2202, FK 317, 피시바닐/OK-432, AD 32/발루비신(Valrubicin), 메타스트론(Metastron)/스트론튬 유도체, 테모달(Temodal)/테모졸로마이드(Temozolomide), 에바세트(Evacet)/리포좀독소루비신, 유타산(Yewtaxan)/파클리탁셀, 탁솔(Taxol)/파클리탁셀, 젤로다(Xeloda)/카페시타빈(Capecitabine), 푸투론(Furtulon)/독시플루리딘, 시클로파스(Cyclopax)/경구 파클리탁셀, 경구 탁소이드, SPU-077/시스플라틴, HMR 1275/플라보피리돌, CP-358(774)/EGFR, CP-609(754)/RAS 암 유전자 억제제, BMS-182751/경구 플래티넘, UFT(테가푸어(Tegafur)/우라실), 에르가미솔(Ergamisol)/레바미솔, 에닐우라실(Eniluracil)/776C85/5FU 인핸서, 캄프토(Campto)/레바미솔, 캄프토사(Camptosar)/이리노테칸, 토무넥스

(Tumodex)/랄티트렉세드(Ralititrexed), 류스타틴(Leustatin)/클라드리빈, 팍섹스(Paxex)/파클리탁셀, 독실(Doxil)/리포좀 독소루비신, 캘릭스(Caelyx)/리포좀 독소루비신, 플루다라(Fludara)/플루다라빈, 파모루비신(Pharmorubicin)/에피루비신, 데포시트(DepoCyt), ZD1839, LU 79553/비스-나프탈이미드, LU 103793/돌라스타인(Dolastain), 캐티스(Caetyx)/리포좀 독소루비신, 젠자(Gemzar)/젬시타빈, ZD 0473/아노메드(Anormed), YM 116, 로딘 종자(Iodine seeds), CDK4 및 CDK2 억제제, PARP 억제제, D4809/덱시포사미드(Dexifosamide), Ifes/메스넥스(Mesnex)/이포스파미드(Ifosfamide), 부몬(Vumon)/테니포사이드(Teniposide), 파라플라틴(Paraplatin)/카보플라틴(Carboplatin), 플라티놀(Plantinol)/시스플라틴, 베페사이드(Vepeside)/에토포사이드(Etoposide), ZD 9331, 탁소티어(Taxotere)/도세탁셀(Docetaxel), 구아닌 아라비노사이드의 전구약물, 탁산 유사체, 니트로소우레아; 멜팔란 및 사이클로포스파미드와 같은 알킬화 제제; 아미노글루테트이미드, 아스파라기나아제, 부설판, 카보플라틴, 클로람부실(Chlorambucil), 염산 시타라빈(Cytarabine HCl), 닉티노마이신(Dactinomycin), 염산 다우노루비신(Daunorubicin HCl), 에스트라무스틴 인산나트륨, 에토포사이드(VP16-213), 플록스우리딘, 플루오로우라실(5-FU), 플루타미드(Flutamide), 수산화요소(수산화카바마이드), 이포스파미드(Ifosfamide), 인터페론 알파-2a, 알파-2b, 아세트산 루프롤리드(Leuprolide acetate)(LHRH-방출 인자 유사체), 로무스틴(CCNU), 염산 메클로레타민(Mechlorethamine HCl)(질소 겨자), 메르캅토퓨린, 메스나(Mesna), 미토탄(Mitotane)(o,p'-DDD), 염산미톡산트론(Mitoxantrone HCl), 옥트레오타이드, 폴리카마이신, 염산프로카마진(Procarbazine HCl), 스트렙토조토신(Streptozotocin), 시트르산 타목시펜(Tamoxifen), 티오구아닌, 티오테파, 황산 빈블라스틴(Vinblastine sulfate), 암사크린(m-AMSA), 아자시티딘(Azacytidine), 에리스로포이에틴(Erythropoietin), 헥사메틸멜라민(HMM: Hexamethylmelamine), 인터루킨 2, 미토구아존(Mitoguazone)(메틸-GAG; 메틸 글리옥살 비스-구아닐히드라존; MGBG), 웬토스타틴(2'-데옥시코포마이신(2'-deoxycoformycin)), 세무스틴(Semustine)(메틸-CCNU), 테니포사이드(Teniposide)(VM-26) 및 황산빈데신(Vindesine sulfate)으로 구성된 군에서 선택될 수 있으나 이에 한정되지 않는다.

<143> 면역치료제는 리부탁신(Ributaxin), 헤셉틴(Herceptin), 쿼드라메트(Quadramet), 파노렉스(Panorex), IDEC-Y2B8, BEC2, C225, 온코림(Oncolym), 스마트 M195, 아트라젠(ATRAGEN), 오바렉스, 벡사(Bexxar), LDP-03, ior t6, MDX-210, MDX-11, MDX-22, OV103, 3622W94, 항-VEGF, 제나팍스(Zenapax), MDX-220, MDX-447, 멜리뮨(MELIMMUNE)-2, 멜리뮨-1, 씨사이드(CEACIDE), 프리타겟(Pretarget), NovoMAb-G2, TNT, 글리오맙(Gliomab)-H, GNI-250, EMD-72000, 립포사이드(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-CEA로 구성된 군에서 선택될 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

<144> 암 백신은 EGF, 항-인자형 암 백신, Gp75 항원, GMK 흑색종 백신, MGV 장글리오사이드 컨쥬게이트 백신, Her2/neu, 오바렉스(Ovarex), M-Vax, O-Vax, L-Vax, STn-KHL 테라토프, BLP25(MUC-1), 리포좀 인자형 백신, 멜라신(Melaccine), 웬타이드 항원 백신, 독소/항원 백신, MVA-기체 백신, PACIS, BCG 백신, TA-HPV, TA-CIN, DISC-바이러스 및 ImmuCyst/TheraCys로 구성된 군에서 선택될 수 있으나 이에 한정되지 않는다.

<145> 추가의 치료제는 또한 면역조절제가 될 수 있다. 투여될 수 있는 면역조절제의 예는 IL-1, IL-2, IL-3, IL-6, IL-10, IL-12, IL-18, IL-21, 인터페론, 파클리탁셀, TNF- α 또는 그 조합이나, 이에 한정되지 않는다. 또한 본 발명의 항체들은 IL-21, IL-12, 및/또는 트라스투주맙과 같은 면역조절제 및/또는 추가의 항암제의 조합으로 투여될 수 있다.

<146> 제공되는 조성물은 유효량에서 유용하다. 유효량이라는 용어는 원하는 생물학적 효과를 실현하는데 필요하거나 또는 충분한 양을 나타낸다. 여기에서 제공되는 기술과 결합되고, 다양한 활성 화합물과, 잠재성, 상대적인 생물학적 이용가능성, 환자 체중, 불리한 부작용의 격렬한 정도 및 투여의 바람직한 모드와 같은 중요 인자 사이에서 선택함으로써, 유효한 예방 또는 치료학적 치료 처방이 많은 독성을 야기하지 않으면서 여전히 개별 피험체를 치료하는데 유효하게 계획될 수 있다. 임의의 개별적 적용에 대한 유효량은 치료되는 질병 또는 병태, 투여되는 개별 조성물, 피험체의 크기, 또는 질병 또는 병태의 격렬한 정도와 같은 이러한 인자에 의존하여 변화할 수 있다. 당업자는 과도한 실험을 동반하지 않고 개별적 조성물의 유효량을 경험적으로 결정할 수 있다. 사용되는 최대 복용량이 어떤 의학 판단에 따른 가장 안전한 복용량이 되는 것이 일반적으로 바람직하다. 하루에 다중 복용량은 화합물이 적절한 전신 수준에 도달하는 것으로 고려될 수 있다. 적절한 전신 수준은 예를 들면, 환자의 피크 또는 약물의 지속된 혈장 수준을 측정하여 결정될 수 있다. "복용량" 및 "투약량"은 여기에서 서로 교환 가능한 용어로 사용된다.

<147> 치료학적 유효량은 특히 약물의 독성 및 효능과 같은 인자에 의존하여 결정된다. 독성은 당업계에 잘 알려진 방법을 사용하여 결정할 수 있다. 효능은 동일한 견본을 사용하여 결정될 것이다. 따라서, 약학적 유효량은 독력

학적으로 허용할(참을) 수 있고 아직 효능이 있도록 임상의에 의해 간주되는 양이다. 예를 들면, 효능은 표적 조직에서 T-림프구 세포독성을 유도 또는 실질적인 유도에 의해, 또는 표적 조직의 질량 감소에 의해 측정될 수 있다. 바람직한 구현예에 의하면, 적절한 투약량은 약 1 mg/kg 내지 10 mg/kg 이 예상된다.

<148> 여기에서 제공되는 항체의 치료학적 유효량을 치료가 필요한 피험체에게 투여하는 단계를 포함하는 구현예에 따르면, "치료학적으로 유효한"은 질환 병태를 억제 또는 역행시키는데 (예를 들면, 암 성장을 감소 또는 억제시키는) 필요한 항체의 양을 나타낸다. 어떤 방법은 알려진 암 약물 또는 치료용법들, 예를 들면, 화학요법(바람직하게는 여기에서 열거된 종류의 화합물을 사용하는) 또는 방사능과의 조합 요법을 고려한다. 환자는 인간 또는 비인간 동물일 수 있다. 일반적으로 환자는 암 지속 또는 증식을 촉진하는 수용체의 증가된 수준에 의해 특성 분석되는 암으로부터 겪고 있을 때 치료를 필요로 한다.

<149> 일반적으로, 활성 화합물의 일간 경구 복용량은 하루에 약 0.01 mg/kg 내지 1000 mg/kg 일 것이다. 0.5 내지 50 mg/kg 범위에서 1회 또는 여러회 투여하는 경구 복용량은 원하는 성과를 가져올 것으로 기대된다. 투약량은 투여 모드에 의존하는 국부의 또는 전신의 원하는 약물 수준에 도달하기 위하여 적절하게 조절될 것이다. 예를 들면, 정맥내 투여가 하루에 일 내지 수 급수 등급(magnitude) 낮은 복용량이 될 것으로 예상된다. 피험체에서 반응이 이러한 복용량에서 불충분한 경우 더욱 높은 복용량 (또는 다른, 더 많은 국부적 운반 루트에 의해 효과적인 높은 복용량)이 환자 내성을 허용하는 범위로 사용될 수 있다. 하루에 다수의 복용량이 항체들의 적절한 전신 수준에 도달하도록 고려된다.

<150> 어떤 구현예에서 제공되는 조성물은 생체 내 적용을 위하여 사용된다. 생체 내에서 의도되는 투여 모드에 의존하여 사용되는 조성물은 예를 들면, 정제, 환약, 분말, 캡슐, 젤, 연고, 유체 또는 혼탁액 등의 고상, 반고상 또는 액상의 투약 형태일 수 있다. 바람직하게는 상기 조성물은 정확한 투약량의 단독 투여에 적절한 단위 투약 형태로 투여될 수 있다. 또한 상기 조성물은 동물 또는 인간 투여를 위한 약학 조성물을 제형화하는데 일반적으로 사용되는 수성-기체 운반제로 정의되는 약학적으로 허용 가능한 담체 또는 희석제를 원하는 제형에 의존하여 포함할 수 있다. 희석제는 소정의 인간 재조합 단백질의 생물학적 활성에 영향을 주지 않도록 선택된다. 이러한 희석제의 예는 중류수, 생리 식염수, 링거액, 포도당 용액, 및 핸크스(Hank's) 용액이 있다. 동일한 희석제가 소정의 인간 재조합 단백질을 동결건조하여 재구성하는데 사용될 수 있다. 더구나, 약학 조성물은 또한 다른 약물 제제, 약학 제제, 담체, 보조제, 비독성, 비치료상, 비면역성 안정화제 등을 포함할 수 있다. 이러한 희석제 또는 담체의 유효량은 성분의 용해성, 생물학적 활성 등으로 환산하여 약학적으로 허용 가능한 제형을 획득하는데 유효한 양이다. 어떤 구현예에서 여기에서 제공되는 조성물은 멸균한 것이다.

<151> 여기에서 조성물은 경구, 비경구 또는 국부 투여 및 항-흑색종, 항-림프종, 항-백혈병 및 항-유방암 치료를 위한 다른 전신 형태를 통해 인간에게 투여될 것이다. 또한 본 발명의 조성물은 류마티스성 관절염, 전신성낭창, 다발성 경화증 등과 같은 자가면역 질환의 범주에서 치료학적으로 사용될 수 있다.

<152> 생체 내에서 치료하는 동안 비경구 및 경구를 포함하는 많은 루트에 의해, 바람직하게는 비경구 루트에 의해 투여될 수 있다. 관절낭내, 정맥내, 수막강내 및 복강내 루트로 투여될 수 있고, 일반적으로 정맥내 투여가 바람직하다. 숙련된 자는 투여 루트가 치료되는 질환에 의존하여 변화한다는 것을 인지한다.

<153> 치료요법에서의 사용을 위하여, 조성물의 유효량은 원하는 표면으로 조성물을 운반하는 임의의 모드에 의해 피험체에게 투여될 수 있다. 본 발명의 약학 조성을 투여는 숙련된 자에게 알려진 임의의 방법으로 수행될 수 있다. 바람직한 투여 루트는 경구, 비경구, 근육내, 비강내, 설하선(sublingual), 기관내, 흡입, 눈, 젤 및 직장을 포함하나 이에 한정되지 않는다.

<154> 그들을 전신으로 운반하는 것이 바람직할 때 화합물은 주사에 의해, 예를 들면 순간 주사(bolus injection) 또는 연속 주입에 의한 비경구 투여를 위하여 제형화된다. 주사 제형은 단위 투약량 형태, 예를 들면 추가된 방부제와 함께 앰플, 또는 다회 복용(multi-dose) 용기로 존재할 수 있다. 조성물은 유성 또는 수성 부유약 내에 혼탁액, 용액 또는 애밀전과 같은 형태를 유지할 수 있고, 혼탁제, 안정화제 및/또는 분산제와 같은 제형화 제제를 포함할 수 있다.

<155> 비경구 투여를 위한 약학 제형은 수용성 형태 내에 활성 화합물 수용액을 포함한다. 추가적으로, 활성 화합물의 혼탁액은 적절한 유성 주입 혼탁액으로 제조될 수 있다. 적절한 친유성 용매 또는 운반제는 참기름과 같은 지방유; 또는 에틸올레산염 또는 트리글리세라이드와 같은 합성 지방산 에스테르; 또는 리포좀을 포함한다. 수성 주입 혼탁액은 카르복시메틸 나트륨 셀룰로오스, 소르비톨 또는 텍스트란과 같은 혼탁액의 점도를 증가시키는 기질을 포함할 수 있다. 선택적으로, 상기 혼탁액은 또한 진하게 농축된 용액의 제조를 허용하는 화합물의 용해성

을 증가시키는 적절한 안정화제 또는 제제를 포함할 수 있다.

<156> 택일적으로, 활성 화합물은 사용 전에 적절한 운반제, 예를 들면, 멀균 발열물질 제거 물로 구성되는 분말 형태일 수 있다.

<157> 경구 투여를 위하여, 약학 조성물은 예를 들면, 결합제(예를 들면, 예비겔라틴화 옥수수 전분, 폴리비닐피롤리돈 또는 수산화프로필 메틸셀룰로오스); 충전제(예를 들면, 락토오스, 미정질 셀룰로오스 또는 제이인산칼슘); 윤활제(예를 들면, 마그네슘 스테아르산염, 활석 또는 실리카); 봉해제(예를 들면, 감자 전분 또는 전분 글리콜산 나트륨); 또는 습윤제(예를 들면, 라우릴 황산나트륨)와 같은 약학적으로 허용 가능한 부형제와 함께 보편적인 방법으로 제조되는 정제 또는 캡슐의 형태를 취할 수 있다. 정제는 당업계에 잘 알려진 방법에 의해 코팅될 수 있다. 경구 투여를 위한 액상 조제물은 예를 들면, 용액, 시럽 또는 혼탁액의 형태를 취할 수 있거나, 또는 이들은 사용 전에 물 또는 다른 적절한 운반제로 구성하기 위한 건조 산물로 존재하였을 것이다. 이러한 액상 조제물은 혼탁제(예를 들면, 소르비톨 시럽, 셀룰로오스 유도체 또는 경화된 식용 지방); 유화제(예를 들면, 레시틴 또는 아카시아); 비수성 운반제(예를 들면, 편도유, 유성 에스테르, 에틸알콜 또는 분별 식물성 기름); 및 방부제(예를 들면, 파라옥시안식향산 메틸 또는 프로필, 또는 소르빈산)과 같은 약학적으로 허용 가능한 첨가제를 이용하여 보편적인 방법에 의해 제조될 수 있다. 또한 상기 조제물은 적절한 완충염, 착향제, 착색제 및 당미제를 포함할 수 있다.

<158> 경구 투여를 위한 조제물은 활성 화합물의 제어된 방출을 부여하도록 적절하게 제형화될 수 있다. 구강 투여를 위한 조성물은 보편적인 방법으로 제형화된 정제 또는 마름모꼴 정제의 형태를 취할 수 있다.

<159> 경구 투여를 위하여, 예를 들면, 항체들은 당업계에 잘 알려진 약학적으로 허용 가능한 담체들과 활성 항체들을 결합하여 손쉽게 제형화될 수 있다. 이러한 담체들은 치료받는 피험체에 의한 구강 섭취를 위해 정제, 환약, 드라제(dragee), 캡슐, 유체, 젤, 시럽, 슬러리 및 혼탁액 등으로 제형화된 본 발명의 화합물을 허용한다. 구강 사용을 위한 약학 조제물은 고상 부형제로 얻어지며, 원한다면 선택적으로 생성한 혼합물을 분쇄하고, 적절한 보조물들을 첨가한 후 과립의 혼합물을 가공여 정제 또는 드라제 코어를 얻을 수 있다. 적절한 부형제는 특히 락토오스, 수크로오스, 만니톨 또는 솔비톨을 포함하는 당과 같은 충전제; 예를 들면 옥수수 전분, 밀 전분, 쌀 전분, 감자 전분, 젤라틴, 트래거캔스 고무, 메틸셀룰로오스, 수산화프로필메틸셀룰로오스, 카르복시메틸셀룰로오스나트륨 및/또는 폴리비닐피롤리돈(PVP: polyvinylpyrrolidone)과 같은 셀룰로오스 조제물이다. 원한다면, 가교 폴리비닐피롤리돈, 한천 또는 알긴산 또는 알긴산염 나트륨과 같은 그 염과 같은 봉해제가 첨가될 수 있다. 선택적으로 경구 제형은 또한 식염수 또는 완충액, 즉, 내부 산 조건을 중성화하기 위한 EDTA 내에서 제형화될 수 있거나 또는 임의의 담체를 사용하지 않고 투여될 수 있다.

<160> 또한 항체의 경구 복용량 형태가 특히 고려된다. 성분 또는 성분들은 항체들이 경구 운반이 효능이 있도록 화학적으로 변형될 수 있다. 일반적으로, 적어도 하나 이상의 부위에서 항체에 부착되는 화학변영이 고려되며, 여기에서 상기 부위는 (a) 단백질가수분해 억제; 및 (b) 위와 장에서 혈류로의 흡수를 허용한다. 또한 신체에서 항체의 전체 안정성 증가 및 순환 시간 내에서의 증가가 요구된다. 이러한 부위들의 예는 폴리에틸렌글리콜, 에틸렌글리콜과 프로필렌글리콜의 공중합체, 카르복시메틸셀룰로오스, 텍스트란, 폴리비닐알콜, 폴리비닐피롤리돈 및 폴리프롤린을 포함한다. 문헌[Abuchowski and Davis, 1981, "Soluble Polymer-Enzyme Adducts" In: Enzymes as Drugs, Hocenberg and Roberts, eds., Wiley-Interscience, New York, NY, pp. 367-383; Newmark, et al, 1982, J. Appl. Biochem. 4:185-189] 참조. 사용될 수 있는 다른 중합체는 폴리-1,3-다이옥솔란이다. 상기에서 나타난 바와 같이 바람직한 약학 용법은 폴리에틸렌글리콜 부위들이다.

<161> 조성물을 위한 방출 위치는 위, 소장(십이지장, 공장 또는 회장) 또는 대장이 될 수 있다. 당업자는 위에서 용해되지 않고 십이지장 또는 다른 장내에서 물질을 방출하는 제형을 이용할 수 있다. 바람직하게, 항체를 보호함으로써 또는 장에서와 같이 위 주위를 지나서 생물학적 활성물질을 방출함으로써 위 주위의 해로운 효과를 피하도록 방출될 수 있다.

<162> 완전한 위 저항성 평가하기 위하여 적어도 pH 5.0으로 불침투성 코팅하는 것이 필수적이다. 장코팅에 사용되는 보다 공통적인 불활성 성분의 예는 셀룰로오스 아세테이트 트리멜리테이트(CAT: cellulose acetate trimellitate), 수산화프로필메틸셀룰로오스 탈산염(HPMCP: hydroxypropylmethylcellulose phthalate), HPMCP 50, HPMCP 55, 폴리비닐아세테이트 탈산염(PVAP: poly vinyl acetate phthalate), 유드라지트(Eudragit) L30D, 아쿠아테릭(Aquateric), 셀룰로오스 아세테이트 탈산염(CAP: cellulose acetate phthalate), 유드라지트 L, 유드라지트 S, 및 셀락이다. 이들 코팅은 혼합 필름으로 사용될 수 있다.

- <163> 코팅 또는 코팅 혼합물은 또한 위에 대한 보호를 의도하지 않는 정제에도 사용될 수 있다. 이는 당 코팅 또는 삼 키기 위한 정제를 보다 쉽게 제조하는 코팅을 포함할 수 있다. 캡슐은 건조 치료법, 즉, 분말의 운반을 위한 경 질 외관으로 구성될 수 있고; 액상 형태를 위한 연질 젤라틴 외관이 사용될 수 있다. 교갑(cachets)의 외관 물 질은 전분 또는 다른 식용종이를 두껍게 할 수 있다. 환약, 마름모꼴 정제, 성형 정제 또는 정제 가루약을 위하여 수분 응집 기술이 사용될 수 있다.
- <164> 치료제는 약 1 mm 입자 크기의 과립 또는 펠릿의 형태 내 미세한 다수의 미립자들로 제형 내에 포함될 수 있다. 또한 캡슐 투여를 위한 물질 제형은 가루, 약간 압축된 플러그 또는 정제로 될 수 있다. 치료제는 압축에 의해 제조될 수 있다.
- <165> 착색제 및 착향제가 모두 포함될 수 있다. 예를 들면, 조성물은 (리포좀 또는 미소구체 캡슐화에 의한 것과 같아) 제형화된 후 착색제 및 착향제를 포함하는 냉장 음료와 같은 식용 산물 안에 더 포함될 수 있다.
- <166> 한편 불활성 물질로 치료제 용량을 희석하거나 증가시킬 수 있다. 이들 희석제는 탄수화물, 특히 만니톨, α-락토오스, 무수 락토오스, 셀룰로오스, 수크로오스, 변형된 엑스트란 및 전분을 포함할 수 있다. 또한 어떤 무기 염이 3인산칼슘, 탄산마그네슘 및 염화나트륨을 포함하는 충전제로 사용될 수 있다. 어떤 통상적으로 이용 가능한 희석제는 Fast-Flo, 엠텍스(Emdex), STA-Rx 1500, 엠컴프레스(Emcompress) 및 아비셀(Avicell)이다.
- <167> 봉해제는 고상 투약 형태로 치료상의 제형에 포함될 수 있다. 봉해제로 사용되는 물질들은 전분인 익스플로탭(Explotab)을 기초로 하는 통상적인 봉해제를 포함하는 전분을 포함하나 이에 한정되지 않는다. 전분 글리콜산나트륨, 엠버라이트(Amberlite), 카르복시메틸셀룰로오스나트륨, 울트라아밀로펙틴(ultramylopectin), 알긴산나트륨, 젤라틴, 오렌지 겹질, 산 카르복시메틸셀룰로오스, 천연 스펜지 및 벤토나이트가 모두 사용될 수 있다. 봉해제의 다른 형태는 불용성 양이온 교환수지이다. 분말 고무는 봉해제로 및 결합제로 사용될 수 있고 이들은 한천, 카라야(Karaya) 또는 트래거캔스와 같은 분말 고무를 포함할 수 있다. 알긴산 및 그 나트륨염 또한 봉해제로 사용된다.
- <168> 결합제는 치료제를 함께 수용하여 경질 정제를 생성하는데 사용될 수 있고 아카시아, 트래거캔스, 전분 및 젤라틴과 같은 천연 산물 유래 물질을 포함한다. 다른 것으로 메틸셀룰로오스(MC: methyl cellulose), 에틸셀룰로오스(EC: ethyl cellulose) 및 카르복시메틸셀룰로오스(CMC)를 포함한다. 폴리비닐피롤리돈(PVP) 및 수산화프로필메틸셀룰로오스(HPMC) 모두 치료상 과립화하는 알콜 용액 내에서 사용될 수 있다.
- <169> 항-마찰 제제는 제형 가공 동안에 끈적거림(sicking)을 예방하는 치료상 제형에 포함될 것이다. 윤활제는 치료상 및 금형벽 사이의 충으로 사용될 수 있고, 이들은 그것의 마그네슘 및 칼슘염을 포함하는 스테아르산, 폴리테트라플루오로에틸렌(PTFE: polytetrafluoroethylene), 액상 파라핀, 식물성 오일 및 왁스를 포함할 수 있으나 이에 한정되지 않는다. 가용성 윤활제는 또한 예를 들면, 라우릴 황산나트륨, 라우릴 황산 마그네슘, 다양한 분자량의 폴리에틸렌글리콜, 카보왁스(Carbowax) 4000 및 6000이 사용될 수 있다.
- <170> 제형화 동안의 유동 특성들을 향상시킬 수 있고 압축 동안 재배열을 돋는 유동화제가 첨가될 수 있다. 유동화제는 전분, 활석, 발열성 실리카 및 수화 실리코알루미네이트를 포함할 수 있다.
- <171> 수성 환경에서 치료제의 용해를 돋기 위해, 계면활성제가 습윤제로서 첨가될 수 있다. 계면활성제는 라우릴황산나트륨, 디옥틸황화숙신산나트륨, 및 디옥틸술폰산 나트륨과 같은 양이온성 세정제를 포함할 수 있다. 양이온성 세정제가 사용될 수 있고 이는 염화벤즈알코늄 또는 염화벤즈에토뮴을 포함할 수 있다. 계면활성제로 제형 내에 포함될 수 있는 잠재적 비이온성 세정제의 목록은 라우로매크로졸 400(lauromacrogol 400), 폴리옥실 40 스테아르산염, 폴리옥시에틸렌 경화 피마자유 10, 50 및 60, 글리세롤 모노스테아르산염, 폴리소르베이트 40, 60, 65 및 80, 자당(sucrose) 지방산 에스테르, 메틸셀룰로오스 및 카르복시메틸셀룰로오스이다. 이들 계면활성제는 단독 또는 다른 비율에서의 혼합물로 제형 내에 존재할 수 있다.
- <172> 경구로 사용될 수 있는 약학적 조제물은 젤라틴으로 제조된 원터치(push-fit) 캡슐뿐만 아니라 젤라틴 및 글리세롤 또는 소르비톨과 같은 가소제로 제조된 연질 밀봉 캡슐을 포함한다. 원터치 캡슐은 락토오스와 같은 충전제, 전분과 같은 결합제 및/또는 활석 또는 마그네슘스테아르산염과 같은 윤활제, 및 선택적으로 안정화제의 혼합물 내에 활성성분을 포함할 수 있다. 연질 캡슐에서, 활성 화합물은 지방유, 액상 파라핀 또는 액상 폴리에틸렌글리콜과 같이 적절한 유체 내에 용해 또는 혼탁될 수 있다. 그에 더하여, 안정화제가 첨가될 수 있다. 또한 경구 투여를 위해 제형화된 미소구체가 사용될 수 있다. 이러한 미소구체는 당업계에 잘 정의되어 있다. 경구 투여를 위한 모든 제형은 이러한 투여를 위한 적절한 투약량 이내여야 한다.

- <173> 구강 투여를 위하여 조성물은 보편적인 방법으로 제형화된 정제 또는 마름모꼴 정제의 형태를 취할 수 있다.
- <174> 흡입에 의한 투여를 위하여, 본 발명에 의해 사용되는 조성물은 적절한 추진제, 예를 들면, 이염화이불화메탄, 삼염화불화메탄, 이염화사불화에탄, 이산화탄소 또는 다른 적절한 가스의 사용으로 가압 포장 또는 네뷸라이저(nebulizer)에서 에어로졸 분무 제시의 형태로 보편적으로 운반될 수 있다. 가압 에어로졸의 경우에 복용량 단위는 계량된 양을 운반하는 밸브를 제공하여 결정될 수 있다. 흡입기 또는 취입기에서 사용하기 위한, 예를 들면 젤라틴의 캡슐 및 카트리지는 화합물과, 락토오스 또는 전분과 같은 적절한 분말 기체의 분말 혼합물을 포함하여 제형화될 수 있다.
- <175> 또한 여기에서 폐 운반이 고려된다. 조성물은 혈류를 타고 폐 상피를 거쳐 흡입하고 가로질러서 포유동물의 폐로 운반될 수 있다. 흡입된 분자들의 다른 보고들은 문헌들[Adjei et al., 1990, Pharmaceutical Research, 7:565-569; Adjei et al., 1990, International Journal of Pharmaceutics, 63:135-144 (아세트산루프롤리드); Braquet et al., 1989, Journal of Cardiovascular Pharmacology, 13(suppl. 5):143-146 (엔도텔린(endothelin)-1); Hubbard et al., 1989, Annals of Internal Medicine, Vol. III, pp. 206-212 (α -1-안티트립신); Smith et al., 1989, J. Clin. Invest. 84:1145-1146 (α -1-프로테나아제); Oswein et al., 1990, "Aerosolization of Proteins", Proceedings of Symposium on Respiratory Drug Delivery II, Keystone, Colorado, March, (제조합 인간 성장 호르몬); Debs et al., 1988, J. Immunol. 140:3482-3488 (인터페론- γ 및 종양 피사 인자- α) 및 Platz et al., 미국등록특허 제5,284,656호 (파립구 콜로니 자극 인자)]을 포함한다. 전신성 효과에 대한 약물의 폐 운반을 위한 방법 및 조성물은 1995년 9월 19일자로 등록된 미국등록특허 제5,451,569호(Wong et al)에 기재되어 있다.
- <176> 본 발명의 실시에서 용도를 위해 고려된 것은 네뷸라이저, 정량식 흡입기(metered dose inhalers) 및 분말 흡입기를 포함하나 이에 한정되지 않는 당업자에게 잘 알려진 치료 산물의 폐 운반을 위해 설계된 기계 장치의 넓은 범위이다.
- <177> 본 발명의 실시를 위해 적절한 통상적으로 이용가능한 장치의 어떤 특정 실시예는 말린크로드트 인코포레이티드(Mallinckrodt, Inc.; St. Louis, Missouri)에서 제조한 울트라벤트(Ultravent) 네뷸라이저; 마퀘스트 메디컬 프로덕트(Marquest Medical Products; Englewood, Colorado)에서 제조한 아크론(Acorn) II 네뷸라이저; 글락소인코포레이티드(Glaxo Inc.; Research Triangle Park, North Carolina)에서 제조한 벤토린(Ventolin) 정량식 흡입기; 및 피손스 코포레이션(Fisons Corp.; Bedford, Massachusetts)에서 제조한 스핀할러(Spinhaler) 분말 흡입기이다.
- <178> 이러한 모든 장치들은 조제를 위해 적절한 제형의 사용을 요구한다. 일반적으로, 각각의 제형은 사용된 장치의 유형에 특이적이고 치료에 유용한 통상의 회석제, 보조제 및/또는 담체 외에 적절한 추진제 물질의 사용을 더 포함할 수 있다. 또한, 리포좀, 미소캡슐 또는 미소구체, 함유물 복합체, 또는 담체의 다른 유형의 사용이 고려된다. 화학 변형된 항체들은 또한 화학 변형의 유형 또는 사용된 장치의 유형에 의존하여 다른 제형으로 제조될 수 있다.
- <179> 제트 또는 초음파의 네뷸라이저와 함께 사용하기에 적절한 제형은 용액 mL당 생물 활성 치료제의 약 0.1 내지 25 mg의 농도로 물에 용해된 치료제를 일반적으로 포함할 수 있다. 제형은 또한 (예를 들면, 항체 안정화 및 삼투압 조절을 위한) 완충액 및 단순 당을 포함할 수 있다. 네뷸라이저 제형은 또한 에어로졸을 생성하는 용액의 원자화에 의해 발생되는 치료제의 응집이 야기되는 표면을 감소 또는 예방하는 계면활성제를 포함할 수 있다.
- <180> 정량식 흡입기와 함께 사용하기 위한 제형은 일반적으로 계면활성제의 도움으로 추진제 내에 혼탁된 치료제를 함유하는 미세하게 분쇄된 분말을 포함할 수 있다. 추진제는 삼염화불화메탄, 이염화이불화메탄, 이염화사불화에탄 및 1,1,1,2-사불화에탄, 또는 그 조합을 포함하는 염화불화탄소, 수소화염화불화탄소, 수소화불화탄소 또는 탄화수소와 같이 그 목적을 위해 사용되는 임의의 보편적인 물질일 수 있다. 적절한 계면활성제는 소르비탄트리올레산염 및 대두 레시틴을 포함한다. 올레산 또한 계면활성제로서 유용할 수 있다.
- <181> 분말 흡입기 장치로부터 조제하는 제형은 치료제를 포함하는 미세하게 분열된 건조 분말을 포함할 수 있고, 락토오스, 소르비톨, 수크로오스 또는 만니톨과 같은 팽화제를 장치로부터 분말의 분산을 촉진하는 양으로 제형의 중량에 대하여 예를 들면, 50 내지 90% 포함할 수 있다. 치료제는 말단 폐로의 가장 효과적인 운반을 위하여 10 mm(또는 마이크론) 보다 작은, 가장 바람직하게는 0.5 내지 5 mm의 평균 입자 크기를 가지는 미립자 형태로 제조될 수 있다.

- <182> 또한 본 발명의 약학 조성물의 코 운반이 고려된다. 코 운반은 폐에서 산물의 퇴적될 필요없이 코에 치료 산물을 투여한 후 혈류에 직접 본 발명의 약학 조성물이 통과 되도록 한다. 코 운반을 위한 제형은 텍스트란 또는 사이클로렉스트란을 가지는 것을 포함한다.
- <183> 코 투여를 위하여, 유용한 장치는 정량식 분무기(metered dose sprayer)가 부착된 작고 견고한 병이다. 한 구현 예에서, 정량식(metered dose)은 정의된 용량의 챔버로 본 발명의 약학 조성물 용액을 빨아내어 운반하는데, 챔버에서 액상이 압축될 때 챔버는 물발을 생성하여 에어로졸화 및 에어로졸 제형에 대한 치수를 표시하는 구멍을 가진다. 상기 챔버는 본 발명의 약학 조성물을 투여하기 위하여 압축된다. 특정 구현예에서, 챔버는 피스톤 배치이다. 이러한 장치는 통상적으로 이용 가능하다.
- <184> 택일적으로, 압착된 것이 사용될 때 물발을 생성하여 에어로졸화 및 에어로졸 형성에 대한 치수를 표시한 구멍 또는 개구부를 가지는 플라스틱 압착 병이 사용된다. 개구부는 일반적으로 병의 상부에서 발견되고, 상부는 일반적으로 에어로졸 형성의 효과적 투여를 위하여 비도(nasal passage)에서 부분적으로 끼워 맞춰지도록 점차 늘어진다. 바람직하게는, 코 흡입기는 약물의 측정된 복용량의 투여를 위하여 에어로졸 제형의 계량된 양으로 제공된다.
- <185> 또한 화합물은 예를 들면, 코코아 버터 또는 다른 글리세라이드와 같은 보편적인 좌제 기제를 포함하는, 좌제 또는 정체 관장과 같은 직장 또는 질 조성물로 제형화될 수 있다.
- <186> 이전에 기재된 제형에 더하여, 화합물은 또한 저장 조제물로 제형화될 수 있다. 이러한 긴 활성 제형은 (예를 들면, 허용 가능한 오일 내 에멀젼과 같은) 적절한 중합의 또는 소수성 물질, 또는 이온 교환 수지, 또는 예를 들면, 난용성 염과 같은 난용성 유도체를 이용하여 제형화될 수 있다.
- <187> 또한 약학 조성물은 적절한 고상 또는 젤상 담체 또는 부형제를 포함할 수 있다. 이러한 담체 또는 부형제의 예는 탄산칼슘, 인산칼슘, 다양한 당, 전분, 셀룰로오스 유도체, 젤라틴 및 폴리에틸렌글리콜과 같은 중합체를 포함하나 이에 한정되지 않는다.
- <188> 적절한 액상 또는 고상 약학적 조제물 형태는 예를 들면, 흡입용 수용액 또는 식염수 용액, 미소캡슐화된, 코클리에이트화된(encocchleated), 초소형 금 입자에 코팅된, 리포좀 내에 포함된, 분무된(nebulized), 에어로졸, 피부로 피하주입을 위한 펠릿, 피부에 상처내는 뾰족한 물체에서 건조된 형태이다. 또한 약학 조성물은 과립, 분말, 정제, 코팅 정제, (미소)캡슐, 좌제, 시럽, 에멀젼, 혼탁액, 크림, 점적약(drop) 또는 활성 화합물의 연장된 방출을 가지는 조제물을 포함하고, 봉해제, 결합제, 코팅제, 팽윤제, 윤활제, 착향제, 감미료 또는 가용화제와 같은 조제물 부형제 및 첨가제 및/또는 보조물이 상기 기재된 대로 조제물 내에 관례상 사용된다. 약학 조성물은 다양한 약물 운반 시스템 내에 사용하기에 적합하다. 약물 운반 방법의 간략한 리뷰를 위하여, 참조에 의해 여기에 편입된 문헌[Langer, Science 249:1527-1533, 1990]을 참조한다.
- <189> 항체들 및 선택적으로 다른 치료제는 그 자체로 (순수한) 또는 약학적으로 허용 가능한 염의 형태로 투여될 수 있다. 약물 내에 사용될 때 상기 염은 약학적으로 허용 가능한 것이어야 하며, 비약학적으로 허용 가능한 염이 그 약학적으로 허용 가능한 염을 제조하는데 보편적으로 사용될 수 있다. 이러한 염은 하기 산들로부터 제조된 것을 포함하나 이에 한정되지 않는다: 염산, 브롬화수소산, 황산, 질산, 인산, 말레산, 아세트산, 살리실산, p-톨루엔 술폰산, 타르타르산, 시트르산, 메탄술폰산, 포름산, 말론산, 숙신산, 나프탈렌-2-술폰산, 및 벤젠 술폰산. 또한, 이러한 염은 카르복시산기의 나트륨, 칼륨 또는 칼슘 염과 같은 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속으로 제조될 수 있다.
- <190> 적절한 완충제는 아세트산 및 염(1-2% w/v); 시트르산 및 염(1-3% w/v); 봉산 및 염(0.5-2.5% w/v); 및 인산 및 염(0.8-2% w/v)을 포함한다. 적절한 방부제는 염화벤즈알코늄(0.003-0.03% w/v); 염화부탄올(0.3-0.9% w/v); 파라벤(0.01-0.25% w/v) 및 티로메살(0.004-0.02% w/v)을 포함한다.
- <191> 본 발명의 약학 조성물은 약학적으로 허용 가능한 담체에 포함된 항체의 유효량 및 선택적으로 치료제를 포함한다. 약학적으로 허용 가능한 담체라는 용어는 인간 또는 다른 척추 동물에게 투여하는데 적합한 하나 또는 그 이상의 친화성 고체 또는 액상 충전제, 희석제 또는 캡슐화된 기질을 의미한다. 담체라는 용어는 적용을 촉진하기 위하여 활성성분이 결합된 자연 또는 합성의 유기 또는 무기 성분을 나타낸다. 또한 약학 조성물의 구성성분은 원하는 약학적 효능을 실질적으로 손상시키는 상호작용이 없는 방법으로 본 발명의 화합물과 및 서로 간에 혼합될 수 있다.
- <192> 한정되지 않지만 특히 항체를 포함하는 치료제(들)은 미립자로 제공될 수 있다. 여기에서 사용된 미립자는 항체

의 전체 또는 일부에 존재할 수 있는 나노 또는 극미립자(또는 어떤 경우에서 더 큰 것)를 의미한다. 미립자는 한정되지 않지만 장코팅을 포함하는 코팅에 의해 둘러싸인 코어 내에 치료제(들)을 포함할 수 있다. 또한 치료제(들)은 미립자 전체에 분산될 수 있다. 치료제(들)은 또한 미립자에 흡착될 수 있다. 미립자는 영차 방출, 일차 방출, 이차 방출, 지연 방출, 지속 방출, 즉시 방출 및 이들의 임의의 조합 등을 포함하는 임의의 차수 방출 반응역학이 될 수 있다. 미립자는 치료제(들)에 더하여 한정되지 않으나 침식가능한, 비침식가능한, 생물분해성 또는 비생물분해성 물질 또는 그 조합을 포함하는 제약학 및 의학의 기술분야에서 일상적으로 사용되는 임의의 물질들을 포함할 수 있다. 미립자는 용액 또는 반고형 상태로 항체를 포함하는 미소캡슐일 수 있다. 미립자는 실질적으로 임의의 모양일 수 있다.

<193> 비생물분해성 및 생물분해성 중합 물질들 모두 치료제(들)을 운반하는 미립자의 제조에서 사용될 수 있다. 이러한 중합체들은 천연 또는 합성 중합체일 수 있다. 중합체는 방출이 요구되는 기간에 따라서 선택된다. 소정의 미립자의 생접착성(Bioadhesive) 중합체는 여기에 편입된 기술인 문헌[H.S. Sawhney, C.P. Pathak and J.A. Hubell in Macromolecules, (1993) 26:581-587]에 기재된 생물분해성 하이드로겔을 포함한다. 이들은 폴리히알루론산, 카세인, 젤라틴, 글루타민, 폴리무수물, 폴리아크릴산, 알긴산염, 키토산, 폴리(메틸메타크릴레이트), 폴리(에틸메타크릴레이트), 폴리(부틸메타크릴레이트), 폴리(이소부틸메타크릴레이트), 폴리(헥실메타크릴레이트), 폴리(이소데실메타크릴레이트), 폴리(라우릴메타크릴레이트), 폴리(페닐메타크릴레이트), 폴리(메틸아크릴레이트), 폴리(이소프로필아크릴레이트), 폴리(이소부틸아크릴레이트) 및 폴리(옥타데실아크릴레이트)을 포함한다.

<194> 치료제(들)는 제어된 방출 시스템 내에 포함될 수 있다. "제어 방출"이라는 용어는 제형으로부터 약물이 방출되는 방법 및 프로파일이 제어되는 임의의 약물 함유 제형을 나타내는 것으로 생각된다. 이는 한정되지 않으나 지속 방출 및 지연 방출을 포함하는 비-즉시 방출 제형을 가지는 즉시뿐만 아니라 비-즉시 방출 제형을 말한다. (또한 "연장 방출"로도 말하는) "지속 방출"이라는 용어는 시간의 연장된 기간동안 약물의 점진적인 방출을 제공하고, 반드시 그런 것은 아니지만, 바람직하게는 연장된 시간 동안 약물이 실질적으로 혈액 수준에 기인하는 약물 제형을 말하는 보편적인 의미에 사용된다. "지연 방출"이라는 용어는 제형의 투여 및 그것으로부터 약물의 방출 사이에서 시간이 지연되는 약물 제형을 말하는 보편적인 의미에 사용된다. "지연 방출"은 연장된 시간 동안 약물의 점진적인 방출을 포함할 수 있거나 포함하지 않을 수 있고, 따라서 "지속 방출"일 수도 또는 아닐 수도 있다.

<195> 장기 지속 방출 임플란트의 사용은 만성 병태의 치료를 위해 특히 적절할 수 있다. 여기에서 사용된 "장기" 방출은 임플란트가 적어도 7일 이상, 바람직하게는 30-60일간 활성 성분의 치료 수준을 운반하도록 구성된 또는 배열된 것을 의미한다. 장기 지속 방출 임플란트는 당업자에게 잘 알려져 있고, 상기 기재된 방출 시스템 중 어떤 것을 포함한다.

<196> 또한 여기에서 제공되는 항체를 포함하는 키트가 제공된다. 도 14는 이러한 키트의 일실시예를 보여준다. 키트(10)는 항체(12)를 포함한다. 또한 키트(10)는 하나 또는 그 이상의 유리병(vial) 또는 용기(14)를 포함한다. 또한 키트는 암과 같이 여기에 기재된 질병을 앓는 또는 이런 질병의 징후를 보이는 피험체에게 구성성분(들)을 투여하기 위한 사용설명서를 포함한다.

<197> 어떤 구현예에서, 키트(10)는 약학적 조제물 유리병, 약학적 조제물 희석제 유리병 및 항체들을 포함할 수 있다. 약학적 조제물 위한 희석제를 포함하는 유리병은 선택가능하다. 희석제 유리병은 항체의 농축 용액 또는 동결건조 분말이던 것을 희석하기 위한 생리 식염수와 같은 희석제를 포함한다. 사용설명서는 농축된 약학적 조제물의 특정 양을 가지는 희석제의 특정 양을 혼합하기 위한 지시사항을 포함할 수 있고, 그것에 의하여 주사 또는 주입을 위한 최종 제형이 제조된다. 사용설명서는 주사기 또는 다른 투여 장치의 사용을 위한 지시사항을 포함할 수 있다. 사용설명서(20)는 항체들의 유효량으로 환자를 치료하기 위한 지시사항을 포함할 수 있다. 용기가 병, 격막을 가진 유리병, 격막을 가진 앰풀 및 주입 봉지 등이든지 간에, 조제물을 포함하는 용기가 조제물이 압력솥에 멸균되거나 또는 다른 방법으로 멸균될 때 색상을 변화시키는 보편적인 마킹과 같은 표지를 포함할 수 있는 것이 자명할 것이다.

<198> "피험체"는 개, 고양이, 말, 암소, 돼지, 양, 염소 또는 영장류, 예를 들면, 원숭이를 포함하나 이에 한정되지 않는 인간 또는 척추 동물을 의미할 것이다.

<199> 여기에서 달리 정의되지 않았다면, 본 발명과 관련하여 사용된 특정 및 기술적 용어는 당업자에 의해 일반적으로 이해되는 의미를 가질 것이다. 또한, 문맥에 의해 달리 요구되지 않았다면, 단수형 용어는 복수형을 포함하고 복수형 용어는 단수형을 포함한다. 본 발명의 방법 및 기술은 당업계에 잘 알려진 보편적인 방법에 의하여

일반적으로 수행된다. 일반적으로, 명칭은 여기에 기재된 생화학, 효소학, 분자 및 세포 생물학, 미생물학, 유전 및 단백질 및 핵산 화학 및 하이브리드화의 기술 및 그와 관련하여 사용된다. 본 발명의 방법 및 기술은 일반적으로 당업계에 잘 알려진 보편적인 방법에 의하여 그리고 다른 지시가 없다면 본 명세서 전체에 인용되고 기재된 다양한 일반적인 및 보다 특정한 참고문헌에 기재된 바와 같이 수행된다.

<200> 본 발명은 이어지는 실시예에 의해 더 설명되며, 이는 더 한정하는 것으로 분석되어서는 안된다. 본 출원 전체에 인용된 (논문 참고문헌, 등록특허, 공개특허출원 및 공동 계류증인 특히 출원을 포함하는) 모든 참고문헌의 전체 내용은 참조에 의해 명확히 편입된다.

실 시 예

<201> 재료 및 방법

<202> 하이브리도마 유래 mRNA의 서열화

RNA는 큐아젠(Qiagen) RNeasy 미니 키트(Cat # 74104)로 제조하였다. 4일째, 배양액 13 ml를 5분간 원심분리하고 PBS에 재현탁하였다. 이를 5분간 다시 원심분리하였다. 펠릿은 μ -ME 6 μ l를 포함하는 RNeasy RLT 600 μ l에 재현탁하였다. 용균액 22 g 주사침을 5회 통과하였고 70% EtOH 600 μ l을 첨가하여 혼합하였다. 700 μ l 분액을 RNeasy 컬럼에 두번 가하고 30초 원심분리한 후 RW1 700 μ l로 세척하였다. PPE 500 μ l로 2회 세척한 다음 1분간 건조하고 물 50 μ l로 2회 용리하였다.

<204> RNA 2 μ l을 올리고dT 프라이머를 사용하여 프로메가 역전사 반응 시스템(Promega Reverse Transcription System, Cat # A3500)을 이용하여 역전사하였다. 반응물을 42°C에서 1시간 동안 항온배양한 후 95°C에서 5분간 가열하였다. 그런 다음 상기 반응물을 물로 회석하여 100 μ l가 되도록 하였다. cDNA의 분액 1 μ l에 대하여 N-말단 또는 5'-말단용 하나 및 C-말단 또는 3'-말단용 하나에서 선택된 프라이머를 사용하여 PCR을 수행하였다. 양성대조군으로서 불변 영역 유래 프라이머만을 사용하여 PCR을 수행하였다.

<205> PCR 산물은 큐아젠 QiaQuick PCR 정제 키트(Cat #28104)로 정제하였다. 최종 부피가 100 μ l가 되도록 추가 용리하였다. 흡광도 260 nm에서 측정하였다. PCR에 사용된 N-말단 프라이머와 함께 서열화하는데 10~26 ng/ μ l 및 100 ng에서 변화된 농도가 주어졌다.

<206> 사용된 아미노 말단 프라이머가 항체의 아미노 말단을 코딩하는 서열의 일부이므로, 이들은 서열에서 돌연변이를 유도할 수 있었다. 얻어진 서열을 사용하여 생식계 유전자가 마우스 계놈으로부터 동정되었다. 그 다음에 프라이머는 cDNA 유래 전체 코딩 서열의 PCR을 위한 이들 유전자의 말단들을 합성하였다. 이 방법에서 항체의 전체 코딩 영역은 PCR 프라이머에 의해 기부된 임의의 서열에서 자유롭게 얻어졌다. 코딩 서열은 각 경우에서 아미노 말단 서열로 일관되므로 발현된 항체의 서열이 된다. J 영역은 서열내 주석된 바와 같이 알려진 J 영역으로부터 동정하였다.

<207> 항-인간 CD137의 중쇄 및 경쇄 유전자 클로닝 및 서열화

<208> 네 개의 주요 IgG 아군(subclasses)을 위한 인간 불변 영역 서열을 포함하는 형질전환 유전자 발현 벡터를 구성하였다. 이들 벡터는 염소 β -카세인 프로모터 및 유방 특이적 형질전환 유전자 발현을 확실하게 하는 다른 5'- 및 3'-조절 서열을 운반한다. 키메라 항체 변이체는 마우스 항-인간 CD137 항체의 가변 영역 서열을 삽입하여 구성하였다. 뮤린 서열의 항-CD137 H 및 L 사슬은 대응하는 가변 영역을 서열화하여 동정하였다. 뮤린 면역글로불린의 다양한 군들의 5' 코딩 영역 유래 서열을 제시하는 올리고뉴클레오타이드의 수집이 조합되었다. 뮤린 면역글로불린 서열은 개별적으로 하이브리도마 RNA로부터 제조된 cDNA를 증폭하는 5' 프라이머로 사용되었고 생성한 PCR 산물을 클로닝하여 서열화하였다. 3' PCR 프라이머는 불변 영역의 알려진 서열로부터 제조하였다. PCR 프라이머는 생성한 증폭 서열이 발현벡터로 삽입될 수 있도록 엔도뉴클레아제 제한효소절단 부위를 포함하였다. 이들 서열은 구조체로 삽입되어 키메라 단백질을 인코딩하는 유전자를 생산하였다.

<209> 항-CD137 항체 유전자 가변 영역을 클로닝하고 서열화하는데 사용된 방법은 하기 1)~5) 단계들을 포함하였다.
 1) 하이브리도마 RNA로부터 cDNA를 제조하였다. RNA는 기준 방법으로 하이브리도마로부터 제조되었고, cDNA는 반응물의 통상적으로 사용가능한 키트(역전사 시스템, Promega, 위스콘신주 매디슨 소재)로 역전사하여 제조하였다. 2) 특성 분석이 잘된 몇몇 뮤린 단클론 항체 유래 V_H 및 V_L 영역의 아미노 말단에서 유래하는 알려진 서열을 토대로 하는 프라이머로 PCR하여 cDNA를 증폭하였다. 3) PCR에서 생성한 서열을 네오마이신 저항성(neo^R) 선별가능 마커와 함께 클로닝 벡터로 삽입하여 가변 영역 서열을 증폭하였고, neo^R 콜로니들을 분리하였다. 4) 대

략 6개의 콜로니들로부터 제조된 H 및 L 사슬 cDNA를 서열화하여 각각의 가변 영역을 위한 보존 서열을 결정하였다. 어떠한 돌연변이도 PCR 인공산물 유래 서열로 도입되지 않도록 확실하게 하는 것이 중요하였다. 시퀴젠 컴페니(SequeGen, Co., 메사추세츠주 우스터 소재)에 의해 행위별 수가제(fee-for-service) 기준으로 DNA 서열화를 수행하였다. 5) 하이브리도마 상청액으로부터 분리한 H 및 L 단백질을 서열화하였고, 실제 단백질 서열을 유전자 서열로부터 유래된 추정 단백질 서열과 비교하였다. 이 단계에서 클로닝한 유전자가 기능성 항체 사슬을 인코딩하는 것을 확인하였다. 카디널 헬쓰(Cardinal Health, 캘리포니아주 샌디에고 소재)에 의한 행위별 수가제 기준으로 단백질 서열화를 수행하였다.

<210> 키메라 항체들을 위한 분리된 키메라 IgG 중쇄 및 경쇄 구조체의 생산

<211> 상기에서 제공되는 방법에 의해 얻은 가변 영역 서열은 인간 IgG1 항체 내에 존재하는 인간 가변 영역 서열을 대체하는데 사용하였다. 본 발명의 한 구현예에서 IgG1 발현 벡터 내의 인간 가변 영역 서열을 뮤린 가변 영역 서열과 함께 사용하여 키메라 인간화 항체를 생산하였다. 항체 발현 벡터는 그것의 네이티브 글리코실화가 가능한 형태 내 IgG1 H 유전자를 포함하였다. IgG1 글리코실화 부위는 CH2 도메인의 297 위치에 있는 Asn 잔기이다. IgG1 H 사슬의 아글리코실화 형태는 유전자 서열 내 부위 특이적 돌연변이 생성에 의해 Asn₂₉₇을 Gln₂₉₇로 변경하여 생성하였다. 이는 세 개의 구조체를 제공한다: L 사슬, 글리코실화된 H 사슬 및 아글리코실화된 H 사슬. 각 구조체의 두 개의 형태가 테스트에 사용되었다. 각 구조체는 제한효소 지도제작 및 서던 블롯 분석으로 평가되었고, 형질전환 동물의 생산에 사용되었다. 더구나, 상기 구조체는 유전적으로 처리된 키메라 단백질의 생활성을 테스트하는 일시적인 형질감염 연구에 사용되었다.

<212> 형질전환 동물 개발에 사용된 구조체들은 염소 β-카세인 프로모터 및 높은 수준의 유방 특이적 형질전환 유전자 발현을 확실하게 하는데 사용되는 다른 5'- 및 3'-조절 서열을 포함하였다. 프로모터 및 다른 조절 요소들의 교차종(cross-species) 인식 때문에, 동일한 구조체가 형질전환 마우스 및 염소를 생산하는데 사용되었다. 번식되면, 글리코실화 수준 및 증강된 ADCC 특성들에 대하여 염소 및/또는 마우스를 스크린하였다. 제한효소 지도제작에 의하여 구조체의 구조 보전을 확인하였다. 구조체들은 일시적으로 형질감염된 세포 및 형질전환 동물을 제조하는데 사용되었다.

<213> 중쇄 키메라의 구성 및 발현 벡터로의 삽입

<214> 마우스 IgG2a 불변 영역이 인간 IgG1 불변 영역으로 교체되도록 하는 중쇄 키메라를 구성하기 위하여, 마우스 리더 서열을 가지고 인간 항체 서열을 포함하는 BC2083 발현 벡터를 사용하였다(플라스미드 1). 접합 공여 부위(splice donor site)는 C 말단에 근접한 글리신을 코딩을 변화시키지 않는 G에서 A로의 침묵 돌연변이에 의해 제거되었다. 가변 영역을 둘러싸는 BC2083 발현 벡터로 특이 부위를 주입하였다. DraIII 및 PmlI N 말단에 주입되었고, ApaI가 중쇄 불변 영역의 아미노 부분에 존재한다. 프라이머와 함께 CMV-Zeo 유래 zeo 유전자의 PCR을 수행함으로써 이들 부위를 BC2083의 XhoI 부위로 클로닝하였으며, p80 BC2083 zeo(플라스미드 2)를 제공하였다. 플라스미드로 제한효소 절단부위를 삽입하는 빠른 방법은 zeo 유전자에 의해 제공되는 지오신(zeocin) 저항성을 이용하는 것이다. 지오신 저항성은 NZYCM 한천 내에 지오신 25 µg/ml을 사용하여 선별되었다.

<215> 인간 IgG1 불변 부분은 BC2083의 밖으로 그것을 절단하고 p80에 클로닝하여 특이 ApaI 및 XhoI 부위로 다시 주입하여 p83 BC2083 DraIII IgG1(플라스미드 3)을 제공하였다. 이 플라스미드는 임의의 중쇄 가변 영역이 인간 IgG1 불변 영역 코딩 서열에 부착되기 위하여 중쇄 가변 영역의 측면에 위치하는 특이 DraIII/PmlI 및 ApaI 부위를 가진다.

<216> 항-CD137 항체의 중쇄 가변 영역은 PCR에 의해 아미노 말단에 DraIII 및 PmlI 부위를 및 C-말단에 APa 부위를 주입하여 삽입하여 제조하였다. ApaI 부위는 인간 IgG1 불변 영역의 아미노 말단에 근접하여 자연적으로 발생한다. PfuTurbo (Stratagene 카탈로그 번호 제600153-81호) 및 cDNA를 사용하는 MHE 및 MHEC 프라이머를 사용하여 PCR을 수행하였다. PCR 단편은 pCR-Blunt II-TOPO(Invitrogen 카탈로그 번호 제K28602호)로 클로닝하였고 프라이머 pcr2.1f 및 pcr2.1b 프라이머를 사용하여 서열화하였다. 이는 DraIII-PmlI 및 ApaI에 의해 측면이 형성되는 중쇄 가변 영역을 포함하는 p96을 제공하였다(플라스미드 4).

<217> β-카세인 발현 벡터인 p100 BC2083 heavy(BC2197)(플라스미드 5)는 p96 pCR-Blunt II-Mayo-heavy DraIII-ApaI 단편을 분리하고, 그것을 절단 DraIII-ApaI 절단 p83 BC2083 DraIII IgG1(플라스미드 3)에 결찰시켜 구성하였다.

<218> pCR-Zero-Blunt로 서브클로닝되는 프라이머 중쇄 불변 N 및 중쇄 불변 C를 사용하여 BC2083으로부터 PfuTurbo와 함께 PCR하여 중쇄 코딩 서열을 제조하여 표적 아스파라긴을 글루타민으로 변경함으로써 글리코실화를 차단하였다. 이는 p76 및 p77 pCR2.1-Blunt-IgG1-heavy-constant를 제공한다. 이들 플라스미드는 PCR을 수행하는 동안

불변 영역으로 도입되는 어떠한 돌연변이가 발생하지 않도록 확실하게 하기 위하여 서열화되었다. 구현예에 의하면, p77 내 항-CD137 항체의 서브클로닝된 불변 영역은 QuickChange XL 돌연변이생성(Stratagene) 키트 및 돌연변이 유발성 올리고들을 사용하여 돌연변이를 생성하였다. 이 올리고는 아스파라긴 297을 글루타민으로 변경하고, 근처에 BsaAI 부위를 제거하여 트레오닌 코돈의 침묵 돌연변이에 의한 제한효소 분석을 통한 스크리닝을 촉진하였다. 이는 플라스미드 p88, p89 및 p90 pCR2.1-Blunt-IgG1-heavy-mut를 제공한다. 프라이머로 이들 플라스미드 상에서 PCR을 수행하여 서열화를 위한 단편을 제조하였다.

<219> 경쇄 키메라의 구성 및 발현 벡터로의 삽입

<220> 경쇄용으로 사용된 발현 벡터는 BC1060(플라스미드 6)이었다. 두 개의 제한효소 절단부위가 마우스 J 영역 내에 차례로 처리되어 인간 카파 불변 영역에 대한 가변 영역의 융합을 가능하게 하였다. KpnI 부위는 GGG 또는 GGC에서 GGT로 글리신의 코돈을 변경하여 도입되었다. 류신을 코딩하는 서열이 CTG에서 CTT로 변화되어 HindIII 부위를 생성하였다(플라스미드 8).

<221> PfuTurbo(Stratagene)와 함께 PCR을 수행하여, 카파 사슬의 인간 불변 영역을 코딩하는 영역이 개시부 및 프라이머를 사용하는 코딩 영역 말단 근처에서 자연적으로 발생하는 Sad 부위에서 KpnI 및 HindIII 부위를 가지는 BC1060로부터 분리되었다. PCR 산물을 ZERO Blunt TOPO PCR W EC(Invitrogen 카탈로그 번호 제K286020호)로 클로닝하였다. 이들 플라스미드를 서열화하였다. 이는 p85 pcr-blunt-1060 kappa constant rev(플라스미드 7) 및 p86 pcr-blunt-1060 kappa constant(플라스미드 8)을 제조하였다.

<222> 유사하게, 가변 영역은 프라이머를 이용한 PCR에 의해 cDNA로부터 분리되었고 pCR2.1-Blunt-TOPO로 클로닝되어 가변 영역이 뉴클레오타이드 340에서 XhoI 부위에 의해 및 뉴클레오타이드 731 주변의 KpnI 및 HindIII 부위에 의해 측면에 위치하는 p92 pCR2.1-Blunt-kappa variable(플라스미드 9)를 제조하였다. 이들 플라스미드를 서열화하였다.

<223> 경쇄 키메라는 3개의 DNA 조각을 사용하는 pCR-Blunt 내에 일차 구성되었다. XhoI에서 SacI로의 골격은 p86 pcr-blunt-1060 kappa constant에 의해 제공되었다. 카파 불변 영역은 p85 pcr-blunt-1060 kappa constant rev 유래의 HindIII-SacI 조각이었다. XhoI-HindIII 조각을 사용하는 p92 pCR-Blunt-kappa variable rev에 의해 가변 영역을 제공하였다. 콜로니들은 pcr2.1f 및 pcr2.1b 프라이머를 이용한 PCR로 863 bp 단편의 생산을 관찰하여 체크하였다. 이는 p94 pCR-Blunt II-Mayo-kap-chim(플라스미드 10)을 제공하였다. 플라스미드는 XhoI 및 SacI로 절단하여 체크되었고, 684 bp 단편을 제공하였다.

<224> 경쇄 키메라를 마우스 중쇄 리더 서열을 가지는 면역원 인간 경쇄를 포함하는 β-카세인 발현 벡터 BC1060으로 주입하였다. p94를 XhoI-SacI로 절단하였고, 작은 조각을 분리하였다. BC1060을 KpnI-SacI로 절단하였고, 5206 bp 조각을 분리하였다. BC1060은 KpnI, XhoI 및 PacI로 절단하여 큰 골격을 분리하였다. 이들 세 개의 조각을 결찰하였고, 콜로니들은 필요한 프라이머를 사용하여 스크린하였다. 양성 플라스미드는 BglII로 체크하였고, PCR 산물을 서열화하였다. 이 플라스미드는 p104 BC1060 LC chim(BC2198)(플라스미드 11)이다.

<225> 세포 배양 발현 벡터의 구성

<226> 경쇄를 위한 일시적인 발현 벡터를 구성하기 위하여, p104 BC 1060 LC chim (플라스미드 11) 유래 XhoI 단편을 pCEP4의 XhoI 부위로 결찰시켜 p106 및 p107 pCEP4-Mayo-LC(#2203)(플라스미드 12)를 제공하였다. 양성 콜로니들은 올리고 CEPF 및 KVC를 사용하는 PCR에 의해 검출하였다.

<227> 중쇄를 위한 일시적인 발현 벡터를 구성하기 위하여, p100 BC2083 중쇄의 BamHI 단편을 BamHI 절단 pCEP4로 클로닝하였다. 콜로니들은 HVC 09 및 CEPF를 사용하는 PCR로 스크린하였다. 이것은 플라스미드 p110 pCEP4-BamHI-HC (#2202)(플라스미드 13)를 생성하였다.

<228> 항-CD137 항체의 중쇄 가변 영역을 가지는 키메라는 가변 영역을 포함하는 #110 pCEP4-BamHI-HC(#2202)의 짧은 KpnI-AgeI 조각을 KpnI-AgeI 절단 #88 pCR2.1-Blunt-IgG1-heavy-mut로 결찰시켜 제조하였다. 이는 플라스미드 p111 pCR2.1-Mayo-IgG1-heavy-mut(플라스미드 14)를 제공하였다. 이 플라스미드는 BsaAI-PstI로 체크하였다.

<229> 일시적인 발현 벡터를 구성하기 위하여, 키메라 항체 코딩 영역을 포함하는 p111 유래 짧은 XhoI 단편을 pCEP4의 XhoI 부위로 삽입하였다. 콜로니들은 HVC C09 및 CEPF를 사용하는 PCR로 체크하였다. 이는 p112pCEP4-Xho-Mayo-IgG1-aglycos (BC2206)를 제공하였다. EcoRV-HindIII 절단(2479 bp) 및 BamHI 절단(1454 bp)으로 예상 단편을 획득하였다. β-카세인 발현 벡터를 구성하기 위하여, 키메라 항체 코딩 영역을 포함하는 p111 유래 짧은 XhoI 단편을 BC2083의 XhoI 부위로 삽입하였다. 콜로니들은 올리고 HVC 09 및 CA5를 사용하는 PCR로

체크하였다. MluI-Eco47III-NotI으로 절단하여 예상된 2479bp 단편을 제공한 반면, BamHI로 절단하여 예상된 1454 bp 단편을 제공하였다.

<230> IgG1 돌연변이체 클로닝

사용된 항-CD137 항체를 마우스 젖에서 발현하였다. 마우스 발현을 위하여, BC2197(p100 BC2083 heavy) 및 (BC2198) p104 BC1060 경쇄의 구성기술을 사용하였다. 마찬가지로, 모체 플라스미드는 중쇄를 위한 BC2083 또는 경쇄를 위한 BC 1060이었다. 근본적으로, 모체 플라스미드 내에 리더 서열을 포함하는 가변 영역이 항-CD137 항체 cDNA의 중쇄 및 경쇄의 가변 영역에서부터 cDNA 서열로 교체되었다. 발현 벡터의 불변 영역, 중쇄의 IgG1 및 경쇄의 카파는 클로닝된 서열로 대체되었다.

<232> IgG1 서열의 클로닝

이용된 항체의 경쇄는 인비트로젠(Invitrogen)에서 구입된 cDNA로 클로닝되었다. 태반 cDNA 및 하기에서 보여지는 프라이머를 사용하여 PfuTurbo와 함께 PCR을 수행하였다. C 말단 프라이머 61960C11은 접합 공여 부위를 파괴하는 야생형 서열에 대한 기제 변화를 가진다. 993 bp 단편을 ZeroBlunt로 클로닝하였다. 이 서열은 G1m(3)의 한 서열임을 나타내었다. 인간 혈청 유래 감마-글로불린과 결합된 유전되는 차이점이 있다(Grubb 1956; Grubb and Laurell 1956). Km(카파 마커, 예전에 é Inhibitrice Virmi를 의미하는 Inv(또는 Inv)로 나타내었다)에 대해서도 유사한 시스템이 있다. 이는 개시 플라스미드 내에서 발견되는 아프리카인의 알로타입 G1m(z) 또는 G1m(17) 대신에 코카시안종의 알로타입(Caucasian allotype) G1m(f) 또는 G1m(3)이다.

<234> 다른 알로타입을 클로닝하기 위하여, 상기와 같이 뇌 cDNA로부터 PCR을 수행하였고, 플라스미드 p116, p117, p118 및 p119를 제공하였다. 이들 플라스미드 중 어느 것도 정확한 서열을 가지지 않았다. 예를 들면, 대부분의 플라스미드는 서열의 말단에서 PCR 프라이머에 의해 제공되어야 하는 ApaI 및/또는 XhoI 부위가 없었다. 주형 또는 뇌 cDNA로서 p116을 사용하여 다시 PCR을 수행하였다.

<235> p116의 PCR은 121, 122 및 123를 산출하였다. 뇌 cDNA의 PCR은 124를 산출하였다. 플라스미드 121로부터 삽입물은 p133, p134, p135 및 p136을 제조하는데 사용되었는데, 이들은 ApaI 및 XhoI로 100c BC2083 heavy를 절단하고 ApaI 및 XhoI로 p121 ZeroBlunt-IgG1 G1m(17)을 절단하며, 결찰하고, 카나마이신으로 선별하여 BC2083 heavy G1m(17)이었다. p133를 사용하였다.

<236> 마우스 발현을 위하여, 가변 영역만이 마우스 리더 서열을 갖는 인간 항체 서열을 포함하는 발현 벡터인 플라스미드 BC2083 내로 교체하였다. 이는 글리신을 코딩하는 것을 변화시키지 않는 G가 A로 침묵 돌연변이되어 제거된 IgG1 불변 영역의 말단에서 접합 공여 부위를 가진다. 염소 발현을 증강시키는 노력(성파)으로 불변영역은 연속해서 클로닝된 IgG1 불변 영역으로 교체하였다. p114로부터 클로닝된 불변 영역은 p137 및 138을 제작하는데 사용하였다. p100 BC2083 heavy(BC2197)는 ApaI-XhoI로 절단되었고 114 ZeroBlunt-IgG1 G1m(3)는 ApaI 및 XhoI로 절단되었으며 결찰되어 p138(BC2228)을 제공하였다. p121(G1m(17))로부터 클로닝된 불변 영역은 p133, 134, 135 및 136 BC2083 heavy G1m(17)을 제작하는데 사용되었다. 카파 불변 영역은 또한 GTC 생물학적 제제에 의해 클로닝된 하나로 교체되었다.

<237> 서열 번호 1: AGGGTACCAAGCTTGAAATCAAACGAAC-카파 불변 인간 H01;

<238> 서열 번호 2: 5' AAGGGTCCGGATCCTCGAGGATCCTAACACTCTCCCTGTTGAAGCTC-인간 카파 C #7734.

<239> 피부 섬유아세포주의 생산

<240> 신선한 염소 피주 생검 시료 유래 섬유아세포는 시험관 내에서 일차 배양을 지속하였다. 간략하게, 피부 시료는 Ca⁺⁺가 없는 및 Mg⁺⁺가 없는 인산 완충 식염수(PBS: phosphate buffered saline)에 잘게 잘라 섞었으며 EDTA에서 희석한 트립신으로 수화하여, 단일 세포 혼탁액을 회수하고 37°C에서 배양하였다. 융합 세포는 트립신화하였고 계대배양하였다. 세포의 분액은 사후 사용을 위하여 액체 질소 내에서 보존하였다.

<241> 형질감염 세포주의 분석

<242> 형질감염 세포는 β-카세인, 키메라 항-CD137 H 및 L 사슬 cDNAs와 같은 형질전환 유전자의 특이적인 프로브로서던 블롯 분석하여 특성 분석하여 형질전환 유전자 복제물 수를 확립(수립)하고 잠재적 재배열을 동정하였다. 또한 각각의 세포주를 FISH로 분석하여 단일 통합을 확인하고 염색체 위치를 결정하였다. 세포유전학적 분석을 수행하여 세포주의 핵형을 확인하였다.

<243> FISH

간기 FISH를 위하여, 각각의 확장된 콜로니 유래 수백개의 세포들을 필터로 고정시켰으며, 증폭된 형질전환 유전자 특이적 디옥시제닌(digoxigenin) 표지화된 프로브와 하이브리드화하였다. 중기 FISH를 위하여, 세포는 Lab Tek 챔버 슬라이드(Nunc, Rochester, NY)에서 배양하였고, 5-브로모-2'-데옥시우리딘(BrdU)으로 펄스(pulse)를 주어 복제 밴딩을 허용하였다. FITC-컨쥬게이트된 항-디옥시제닌으로 프로브 결합을 검출하였고, 4',6-디아미디노-2-페닐인돌(DAPI:4',6-Diamidino-2-phenylindole)로 염색체를 착색하였다. 이미지는 형광현미경(Leitz Axioskop, Zeiss Imaging, 뉴욕 톤우드(Thornwood) 소재), 하마마쓰 디지털 카메라(Hamamatsu, 뉴저지주 브릿지워터(Bridgewater) 소재), 및 이미지 프로플러스(Pro-Plus) 소프트웨어(Media Cybernetics, 메릴랜드주 실버스프링 소재)를 사용하여 획득하였다. 대부분의 프로브는 상대적으로 크고 검출이 용이하였다. 상대적으로 짧은 cDNA 서열에 의해 인코딩되는 개별 IgG H 및 L 사슬에 대한 프로브는 그들 자체로 좋은 해상도를 제공하기에 너무 작았다. 이들 작은 프로브를 염소 β-카세인을 위한 젖 특이적 프로모터 유래 서열과 혼합하였다.

<245> 세포유전적 분석

공여 형질감염 섬유아세포 세포주의 세포유전적 분석을 수행하였다. 형질전환 유전자 프로브는 새김눈 번역(nick translation)에 의해 디옥시제닌-dUTP로 표지화되었다. 변성 염색체에 결합하는 프로브는 FITC-컨쥬게이트된 티라마이드(tyramide)에 이어 FITC-컨쥬게이트된 항-디옥시제닌 또는 양고추냉이 과산화효소-컨쥬게이트된 항-디옥시제닌으로 검출하였다. 염색체 밴딩 패턴은 DAPI로 시각화하였다. 염소는 모두가 말단동원체형인(중앙부 또는 중앙부 근처에서 보다는 하나의 말단에서 동원체를 가지는) 60개 염색체를 가진다. 중기 확산은 염색체 손실, 복제 또는 전반적인 재배열과 같은 전반적인 기형의 증거를 점검하였다. 1세대 형질전환 염소를 생산하는데 사용되는 세포주는 핵형적으로 정상이었고 β-카세인 프로모터 및 다른 필수 조절 요소들과 함께 구조적으로 온전한 키메라 항-CD137 H 및 L 사슬 유전자를 운반하였다.

<247> 젖에서 키메라 항-인간 CD137을 발현하는 형질전환 동물의 생산

키메라 항-인간 CD137 항체들의 글리코실화 및 비글리코실화 버전을 제조하였다. 생활성을 테스트하기 위하여 젖 유래 항체의 충분한 양을 정제한 후, 동일한 수준에서 본질적으로 생산하더라도, 두 형태의 활성 프로파일에 차이가 있음이 발견되었다.

키메라 항체들을 위한 형질전환 유전자 구조체는 형질전환 마우스 및 염소를 생산하는데 사용되었다. 형질전환 동물은 H 사슬 및 L 사슬 구조체의 1:1 혼합물에 도입되어 성숙한 항체들을 제조한다. L 사슬 구조체는 글리코실화 또는 아글리코실화 H 사슬 구조체에 결합하였다. 특히, 젖에서 생활성 산물의 상대적이고 절대적인(완전한) 수준이 시험관 내에서 항체 결합 측정 및 웨스턴 블랏에 의해 측정되었다.

<250> 형질전환 마우스

형질전환 마우스에서 유도성 시스템의 실행가능성을 테스트하기 위한 실용적인 전략은 1세대(F1) 마우스의 젖에서 형질전환 단백질 발현을 평가하는 것이었다. 어떤 형질전환 동물에서 원래 형질전환 유전자 구조체가 미세주사에 따른 세포 분열 시에 염색체 부위로 통합되는 것이 결정되어 왔다. 따라서, 주조 동물은 형질전환 유전자의 발현 수준에 영향을 줄 수 있는 키메라이다. 이들 염색체 통합 부위는 안정한 동종 형질전환 동물주를 생성하기 위하여 다음 세대에서는 분리될 것이다. 따라서, F1 마우스는 형질전환 유전자 발현의 안정성 및 그들이 생산하는 생물학적 산물을 결정하기에 적당한 모델이다. 더욱이, 마우스가 젖을 분비하도록 하기 위하여, 이들은 성숙하고(약 2개월 정도 걸린다), 교미하고 자손을 생산해야 한다. 분석 후 분비 수준이 안정하였고 사용된 구조체가 효과적임을 결정하였다.

제조된 각각의 구조체 유래 직선형 DNA는 전기용출에 이어 CsCl 구배에 의해 정제하였고 형질전환 마우스는 전핵의 미세주사에 의해 생산하였다. 형질전환 주조 동물은 꼬리 조직 DNA의 PCR 분석에 의해 동정하였고, 상대적인 복제율 수는 서던 블롯 분석을 사용하여 결정하였다. 다수의 형질전환 1세대 형질전환 유전자-출산 "주조"(F0) 암컷은 각각의 (글리코실화된 및 아글리코실화된) 구조체를 생산하였다. 이들 F0 마우스는 성숙기에 교미되어 젖 분비를 개시하였다. 그들의 젖을 염소 항-인간 Fc 항체와 함께 발달시킨 웨스턴 블랏에서 분석하여 인간 C_H 영역을 제공하는 구조적으로 온전한 키메라 항체들을 분비하는 마우스를 동정하였다.

그들의 젖에서 항체의 최대 적당한 발현을 하는 건강한 동물로 정의되는 최상의 주조자는 사용되어 F1 암컷을 생산하였으며, 시험관 내 및 생체 내에서 테스트하는 항체를 위해 수집되는 충분한 젖을 제공하는데 사용되었다.

<254> 형질전환 염소

미리 정의된 유전자를 가지는 형질전환 염소는 당업계에서 일상적인 핵 이식 기술을 사용하여 생산하였다. 형질전환 세포주에서 유래된 모든 동물들이 완전히 형질전환되어야 하기 때문에 핵 이식은 소수의 1세대에서 형질전환 유전자 모자이크 현상에 대한 문제를 없앤다. 형질전환 유전자 구조체는 지질감염법(지질감염법) 또는 전기 영동과 같은 표준 형질감염법으로 일차 세포주로 도입되었다. 재조합 일차 세포주는 그들이 형질전환 동물을 생산하는데 사용되기 전에 형질전환 유전자 복제될 수, 완전(보전) 및 통합 부위와 같은 중요한 특성들에 대한 시험관 내에서 스크린되었다. 암컷 염소 피부 섬유아세포는 핵 이식을 위한 핵 공여체로서 제공되는 형질감염된 형질전환 세포를 제조하는데 사용되었고, 그 결과 모든 암컷 자손에게 전달되었다. 따라서, 재조합 단백질을 포함하는 젖은 F0 염소에서 직접 얻어질 수 있다. 젖에서 생활성 산물의 상대적 및 절대적 수준을 웨스턴 블랏 분석으로 측정하였다.

<256> 결과

<257> 항체의 정제 및 특성 분석

네 개의 다른 키메라 항-CD137 항체들을 생산하였다. 한 변이체는 Asn297을 글루타민으로 돌연변이하여 아글리코실화되었다. 아글리코실화된 IgGs가 Fc 수용체에 결합하지 않거나 또는 ADCC에서 활성적이지 않은 것이 알려져 있으므로(Nose et al., 1983) 이 항체 변이체는 기능성 연구들에서 음성 대조군으로 작용할 수 있다. 두 개의 다른 항체 변이체들은 젖에서 제조되었고, 하나는 마우스 젖에서, 하나는 염소 젖에서 제조하였다. 네번째 항체 변이체는 인간 세포주인 HEK 293 세포에서 발현하였다.

<259> 항체 변이체 중의 하나는 인간 세포에서 발현하였다. 인간 배아 신장 293 세포주(293)는 그것이 유효하게 형질감염될 수 있으므로 일시적인 형질감염 기술에 적절하다. EBV EBNA1 단백질(293E)을 안정하게 발현하는 유전적 변이체를 사용하였고, 이는 EBV의 or iP가 백터 골격에 존재할 때 유의적으로 높은 단백질 발현을 제공한다.

<260> DS가 아닌 FR의 제거는 발현을 강하게 감소시키지만 EBNA1 양성 세포에서 DNA 복제를 개시하는 원인이 되는, or iP의 DS 도메인의 제거는 형질전환 유전자 발현을 감소시키지 않기 때문에, 일시적인 형질감염을 수행할 때, or iP/EBNA1 시스템에서 얻어진 증가된 발현은 에피좀 복제에서 독립적인 것으로 나타난다. 증가된 발현은 or iP의 EBNA1 의존 인핸서 활성의 결합 효과 및 EBNA1(Pham et al., 2003)에서 핵 위치 신호의 존재로 인해 증가된 플라스미드의 핵 유입에 기인하는 것 같다.

<261> CMV 프로모터 유래 높은 수준의 구성 발현을 위해 설계된 백터인 pCEP4(Cat # V04450; Invitrogen, 캘리포니아 주 칼즈배드 소재)는 항체를 발현하는데 사용하였다. 293EBNA/ebv 백터 숙주 시스템은 COS7/SV40ori 기초 시스템에 대하여 유의적인 개선을 나타낸다(Jalanko et al., 1988; Shen et al., 1995). 구성적으로 발현된 아데노바이러스 Ela 단백질에 의해 전사활성화되기 때문에 293 세포에서 특히 효능이 강력한 CMV 프로모터와 같은 숙주 세포주에서 높게 활성되는 프로모터를 갖는 백터를 사용하는 것이 높은 수준의 재조합 단백질 발현을 위한 중요한 쟁점이다(Durocher et al., 2002).

<262> 인간 CD137에 특이적인 단클론 항체를 생산하는 하이브리도마(GW)는 앞서 기재된 바와 같이 표준 방법에 의해 마우스 형질세포종에 대한 마우스 IgG2a Fc 영역 및 인간 CD137 세포의 부분의 융합 단백질로 면역된 마우스 BALB/c 마우스의 비장 B 세포를 융합하여 생산되었다(Wilcox et al., 2002, J Clin Inv 109: 651-659). 항-CD137 항체들은 불변 영역이 각각 인간 IgG1 불변 영역 및 인간 카파 불변 영역에 의한 중쇄 및 경쇄로 대체된 인간 CD137에 대한 마우스 단클론 항체(mAb)의 키메라 버전이다. 이 항체는 일시적인 형질감염에 의해 β-카세인 프로모터를 사용하는 마우스 및 염소 젖에서(Pollock et al., J Immunol Meth 231 : 147-157) 또는 사이토메갈로바이러스(CMV: cytomegalovirus) 프로모터를 사용하는 HEK 293 세포에서 발현되었다. 염소 젖은 형질전환 염소의 호르몬 유래된 젖 분비에 의한 것이었다(Ebert et al., 1994, Biotech 12: 699-702). 항체들은 단백질 A 크로마토그래피로 정제되었다. 염소 젖 항체는 초기 착유 유래 초유를 오염시키는 염소 항체를 막기 위하여 젖 분비 9일 후 정제되었다. 염소 젖 유래 키메라 항-CD137 항체의 유사한 조제품은 크기-배제 크로마토그래피에 의한 90% 단량체 및 10% 응집체이다. 항체 농도는 흡광도 280nm에서 측정되는데, 1.4 mg/ml의 값을 이용하면 전환인자로서 1 OD이다.

<263> 당 분석

<264> 아스파라긴 결합 올리고당은 pH 7.0, 1% β-메르캅토에탄올을 포함하는 pH 7.0 인산나트륨 완충액 50mM 내에서 PNGase F를 사용하여 37°C에서 하룻밤 동안 방출되었다. 이 시료들은 보이저-DE 프로 생체분광측정법 워크스테

이션(Voyager-DE PRO Biospectrometry Workstation, 응용 바이오시스템, 미국 캘리포니아주 포스터시(Foster City) 소재)을 사용하는 매트릭스 지원 레이저 이탈 이온화 비행시간형(MALDI-TOF: matrix-assisted laser desorption-ionization time-of-flight) 질량 분석법(MS: mass spectrometry) 분석에 의해 분석되었다. MALDI-TOF MS 분석은 양이온 반사 모드에서 2,5-디히드록시벤조산/2-히드록시-5-메톡시벤조산(9:1, v/v) 매트릭스로 수행되었다. 마우스 젖 유래 항체 내 주요 탄수화물(63%)은 비-푸코실화된 Man5이다. 도 1은 PNGase F 소화에 의해 항체들로부터 방출된 N-글리칸의 MALDI-TOF MS 분석을 보여준다. 마우스 젖 유래 항체 결과를 세포 배양 유래된 항체의 결과와 비교하면, 마우스 젖 유래 항체 유래 주요 올리고당이 5 만노오스 잔기 및 2 GlcNAc 잔기를 포함하는 Man5 임이 명백하다.

<265> 고압 액상 크로마토그래피(HPLC: High-pressure liquid chromatography) 분석은 37°C에서 하룻밤 동안 소화된 후 PNGase F에 의해 방출된 2-아미노벤조산 표지화된 올리고당에서 수행되었다. 항체의 80 µg이 37°C에서 하룻밤 동안 PNGFase와 함께 처리되었다. 시료는 10 kDa 필터를 통해 여과된 다음 Biodialyzer 내에서 하룻밤 동안 물에 대하여 투석되었다. 시료는 건조되었고, 2-아미노벤조산으로 표지화되었으며, 초과 표지를 제거하기 위하여 없앴다. 건조를 위한 증발 후 시료는 물 500 µl로 재구성되었고, 100 µl가 Anumula et al. (Cammusco et al., 2000, Anim Biotech 11; 1-17)에 의해 기재된 방법에 따라 형광 검출기(자극 230 nm 및 방사 425nm)가 구비된 HP1100 시스템을 사용하는 Asahipak NH2P-50 4D 컬럼(4.6 x 250 mm, Phenomenex)에 주입되었다. Man5 및 Man6 표준(기준)은 Prozyme에서 구입하였다. 정량화(Quantitation)는 HPLC 분석으로 수행하였고, 도 2에서 보여진다. 표준 Man5와 동등하게 이동하는 마우스 젖 유래 항체 유래 종이 만노오스 올리고뉴클레오타이드 임을 확인하는 것은 그것의 Endo H 민감성을 입증하였다(Maley et al., 1981 and Tarentino et al., 1974). Endo H로 처리한 후, Man5 피크가 사라지는데, 이는 항체의 마우스 젖 유래 시료에서 36.5분에서 보여진 피크와 동일함을 확인시켜준다(도 2 및 3). 코어 푸코오스 함유 G1F(16%) 및 G2F(21%)와 같은 적은 종 존재뿐만 아니라 비푸코실화된 G1 및 Man6의 보다 적은 양이 있다. 올리고만노오스 구조를 포함하는 닦고기 IgG는 Man8 및 Glc1Man8에 대응하는 2068 및 1906에서 종을 가진다(Raju et al.). 비록 Man6가 1420에서 검출 가능하지만, 1582, 1744 및 1906에서 보다 고 만노오스 올리고당이 명백하게 보이지 않는다. 그에 반해서, HEK 293 세포 유래 물질 내에 존재하는 주요 종은 적은 종(8%)으로서 G2F를 가지는 푸코실화된 GOF(55%) 및 G1F(37%)이다. HEK 293 세포는 높은 수준에서 제조된 단백질을 효력이 없게 시알화(sialylation)하는 것이 알려져 있다(Chitlara et al., 2002; Chitlara et al., 1998).

<266> 도 1(MS-data) 및 도 2는 모두 젖 유래 항체 및 세포 배양 유래 항체의 탄수화물 조성물이 유의적으로 상이함을 보여준다. 도 2는 형광 검출을 이용한 HPLC에 의해 얻어진 올리고당 지도의 비교이며 마우스 젖 유래 항체 내 주요 탄수화물(63%)이 비-푸코실화된 Man5인 반면에, 세포 배양 유래 항체의 주요 탄수화물이 푸코실화된 것임을 보여준다. 아글리코실화된 항체는 어떤 피크도 제공하지 않았다. HPLC 자료는 젖 유래 항체에서 주요 올리고당이 올리고만노오스인 반면에 세포 배양 유래 항체는 올리고만노오스가 결핍된 것을 나타낸다.

<267> 콘카나발린 A(Con A)는 말단 만노실 잔기에 결합하는 렉틴이다(Goldstein et al., 1965a, Biochim Biophys Acta; Goldstein et al., 1965b Biochem.). 젖 유래 항체가 올리고만노오스를 가지는 우리의 발견과 일관되게, 그것이 콘카나발린 A에 결합하였고 알파-메틸만노사이드로 용리되었다(도 4). 세포 배양 유래 물질에서 주요 종은 말단 GlcNAc 잔기를 가지는 GOF이고, 콘카나발린 A에 결합하지 않을 것으로 예상되었다. 도 4는 형질전환 젖 유래 항체가 올리고만노오스를 포함함을 보여준다. 그에 반해서, 사용된 아글리코실화 항체는 동일한 실험에서 결합하지 않는다.

<268> HEK 293 세포 유래 물질 내에 존재하는 주요 종은 적은 종(8%)으로서 G2F를 가지는 푸코실화된 GOF(55%) 및 G1F(37%)이다. 이는 세포 배양 유래 항체가 완전히 푸코실화됨을 의미한다. HEK 293 세포가 높은 수준에서 제조된 단백질을 비효율적으로 시알화한다고 알려져 있듯이, 상기 세포 배양 유래 항체는 시알산 변형이 결손되어 있다(Chitlara et al., 2002, Biochem J 363, 619-631).

<269> 세포 배양 유래 항체에서 푸코실화되는 글리코실화의 대다수와 대조적으로, 마우스 젖 유래 항체 내 주요 탄수화물(63%)은 비-푸코실화된 Man5이다. 마우스 젖 유래 항체 유래 주요 종은 표준 Man5와 동등하게 이동한다. G1F는 HPLC 분석에서 Man5에 근접하여 이동하지만 이 피크가 만노오스 올리고당임을 확인하는 것은 그것의 Endo H 민감성을 설명해 준다(Maley et al., 1981, J Biol Chem 256:1088-1090). Endo H 처리 후 항체의 마우스 젖 유래 시료에서 36.5분에 보여진 피크는 사라진다(도 2D). 적은 종에 코어 푸코오스 함유 G1F(16%) 및 G2F(21%)뿐만 아니라 보다 적은 양의 비푸코실화된 G1 및 Man6와 같은 것이 존재한다. 염소 젖 유래 물질 내 당의 MALDI-TOF 분석은 마우스 젖 유래 물질에서 발견된 만노오스 함유 당 보다 폭넓은 분포, 그 중에서도 만노시다 아제 공정의 결함을 나타내는 Man7 및 Man8의 존재가 주목할 만하다. 이는 비-푸코실화된 당이보다 넓은 범위에

걸쳐 유포된 것과 같이, HPLC 분석의 정량화를 보다 어렵게 한다. HPLC 분석은 전체 당의 10-20%로 나타나는 많은 EndoH 민감성 피크의 존재를 입증하였다(도 2).

<270> 유세포 분류기 분석

<271> 키메라 항체의 다른 형태의 결합은 FACS 분석에 의해 평가되었다. 2×10^5 세포를 항체와 함께 PBS 5% FBS 내에 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 항온배양하였다. 항체는 1:100 희석된 FITC 표지화 염소 항-인간 Fc(Jackson hnmuno Research Labs)로 검출되었고 FACSCalibur(Becton Dickinson)에 의해 분석되었다. 도 5에 있는 자료는 연구된 모든 항체들이 출처에 개의치 않고 유사하게 항원을 결합하는 것을 입증하였다. 항-DNP 항체의 대조군은 예상대로 결합하지 않았다.

<272> 표면 플라즈몬 공명

<273> CD16a를 가지는 IgG1의 상호작용의 반응역학은 BIACore 2000 기기 및 CM5 센서 칩(BIACORE, 스웨덴 옵살라 소재)을 지닌 표면 플라즈몬 공명에 의해 측정되었다. 항-HPC4 항체들은 NHS/EDC 커플링 제어를 사용하는 칩 상에 고정되었다. 항체는 11,000 RU를 가진 침을 제공하는 pH 5.0에서 20-50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도였다. CD16a-HPC4는 0.15 M NaCl 및 1 mM CaCl₂을 첨가한 0.005% (v/v) P20 계면활성제(HBS-P 완충액, BIACore AB)를 포함하는 pH 7.4의 10 mM 헤피스 완충액 내에서 5 $\mu\text{l}/\text{min}$ 유속으로 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 단백질의 3분 주입으로 이 항체 표면에서 포획되었다. 테스트 항체들은 그 후 상기 결합 완충액으로 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이 되도록 희석하였고, 20 $\mu\text{l}/\text{min}$ 의 유속에서 1분간 포획된 CD16a로 주입되었다. 분리는 3분간 모니터되었다. 그 후 표면은 포획-결합-재생의 다음 사이클 이전에 HBS-P 완충액 내에 제조된 5 mM EDTA의 30분 주입으로 재생시켰다. 도 13은 젖 유래 항체들이 세포 배양 유래 항체들보다 강하게 결합하는 것을 보여준다. 이 증가된 ADCC 활성이 NK 세포 수용체, CD16에 대한 증가된 친화력을 반영하는지가 그 후에 결정되었다. 표면 플라즈몬 공명 측정은 다양항 항체들이 고정된 CD16에 결합하는 것을 측정하는데 사용되었다. 젖 유래 항체들이 세포 배양 항체보다 잘 결합하였다(도 13).

<274> 세포 분석

<275> 인간 신장 암종 세포 786-0 및 인간 배아 신장(HEK:human embryonic kidney) 293 세포는 ATCC로부터 구입하였다. 786-0은 신장 세포 선암 유래 부착 상피세포이다(Williams et al., 1978, In vitro 14: 779-786). 이 세포는 탄화수소나트륨 1.5 g/L, 글루코스 4.5 g/L, HEPES 10 mM 및 피루브산 나트륨 1.0 mM, 90%, 우태아혈청(FBS: fetal bovine serum), 10%를 포함하도록 조정된 2 mM L-글루타민을 포함하는 RPMI 1640 배지에서 성장하였다.

<276> CHO 세포는 CD137 코딩 서열을 발현하는 pCEP4 벡터로 형질감염되었다. 클론은 세포 표면 발현을 위한 FACS에 의해 스크린된 하이드로마이신을 이용하여 선별하여 분리하였고, 클론이 사용되었다.

<277> ADCC 분석

<278> 젖 유래 세포 및 세포 배양 유래 항체들의 상대적인 ADCC 활성을 테스트하기 위하여, 다른 출처 유래 동일한 항체를 제조하였다. 네 개의 다른 형태의 키메라 항-CD137 항체가 제조되었다. 한 형태는 글루타민으로 Asn297의 돌연변이에 의해 아글리코실화되었다. 아글리코실화 IgGs이 Fc 수용체에 결합하지 않거나 또는 ADCC에서 활성화되지 않는 것이 알려져 있으므로(Nose et al., 1983, PNAS 80: 6632:6636) 이는 음성 대조군으로 제공되었다. 두 개의 다른 형태의 항체는 하나는 마우스 젖으로부터 다른 하나는 염소 젖으로부터 제조하였다. 네번째 형태는 인간 세포주인 일시적으로 형질전환된 HEK 293 세포에서 유래하였다.

<279> 786-0 세포는 1:50 Versene(Invitrogen)를 사용하여 수집되었고 성장 배지에 재현탁되었으며, RPMI로 세포를 3회 세척한 후 1.5시간 동안 Na251CrO₄(1 $\mu\text{C}/\mu\text{l}$)로 표지화되었다. 효과기 세포는 앞선 문헌[Van Epps et al., 1999, J Virol 73: 5301-5308]에 기재된 바와 같이 제조된 인간 말초혈액단핵세포(PBMC: peripheral blood mononuclear cells)이었다. 녹은 후 PBMCs 생존력이 단지 40-60%에 불과하므로 200:1의 효과기:표적 비가 사용되었다. 세포는 37°C에서 12시간 동안 공동 항온배양된 후 상청액 25 μl 를 카운팅하기 위하여 옮겼다. 자발적인 방출은 (PBMCs가 아닌) 항체로 배지의 동등한 용량으로 표적 세포를 항온배양하여 결정되었다. 총 방사능은 1% 트리톤-X100 (Sigma)을 포함하는 배지의 동등한 용량으로 표적 세포를 항온배양하여 결정되었다. 용해율(%)은 하기와 같이 산출되었다:

$$[(E-S)/(T-S)] * 100$$

<281> 상기 식에서, T는 총 방사능이고, E는 실험 방출이며, S는 $19 \pm 3\%$ 의 자발적인 방출이다.

- <282> 이들 조제품의 ADCC 활성을 테스트하기 위하여, CD137을 발현하는 종양 세포주를 동정하였다. 786-0은 낮은 양의 CD137 및, 경우에 따라, HER2를 발현하는 신장 세포 암종 세포이다. 키메라 항-CD137 항체의 다른 형태의 결합을 비교하기 위하여 FACS를 사용하였다. 이 기준에 의해 모든 항체들이 동등하게 결합한다(도 5). 그러나, ADCC 분석에서 활성이 측정될 때, 항체들의 효능은 현저히 다르다. 젖 유래 단백질이 활성적인데 반해 세포 배양 물질은 잘 결합되기는 하였으나 어떠한 활성도 가지지 않았다(도 6). 세포가 없는 세포독성의 부재는 (즉, 자발적인 방출은) 항체들 자체가 사멸하지 않음을 입증한다. 도 6에서, 그것은 증강된 ADCC 활성을 가지는 형질 전환 동물의 젖에서 생산된 분자를 보여준다. 이 특성은 종양 세포와 같은 표적 세포를 사멸하는 형질전환 젖 유래 항체의 능력을 향상시킨다. 사용된 대조군은 표적 세포에 결합하지 않아야 하는 항-DNP 항체 및 Fc 수용체에 결합하지 않아야 하는 아글리코실화 항-CD137이었다.
- <283> 또한 CD137을 위한 발현 백터로 형질감염된 CHO 세포 유래 이들 다양한 조제품의 ADCC 활성이 테스트되었다. 또한, 모든 항체 조제물이 형질감염된 세포에 동등하게 결합하였다(도 11). 젖 유래 항체들이 세포 배양 유래 항체보다 2배 이상 높은 활성을 가졌다(도 12).
- <284> 증강된 ADCC 활성은, 어떤 구현예에서는, 중쇄 불변 영역의 글리코실화에서 푸코오스의 결손에 기인한다. 마우스 젖에서 푸코오스 대신에 글리코실화가 거의 모두 전구체, Man5GlcNAc2이다. 그러나, 고함량 만노오스 종이 존재하지 않음으로써 어떤 과정이 발생한다. 젖 유래 항체 Man6는 1420에서 검출가능한 반면(도 1), 1582(Man7), 1744(Man8) 및 1906(Man9)에서 고함량 만노오스 올리고당은 명백하게 결핍되며, 이는 어떤 만노시다아제 I 매개 과정이 발생하는 것을 나타낸다.
- <285> N-아세틸글루코사미닐트랜스퍼라아제 I (GnT-I)은 탄수화물 사슬을 생성(신장)하는 골지 알파-만노시다아제 II 민감성을 유도하는 주요 효소이다. 이 효소는 글리코실화 차단이 Man5GlcNAc2의 축적을 유도하므로 마우스 유선에서 명백히 기능적으로 제한한다(Li et al., 1978, J Biol Chem 253: 6426-6431). 이 축적은 또한 이 효소가 위치하는 중앙의 골지 구획(Golgi compartment) 내에 충분한 시간을 보내지 않은 항체의 결과이다. 이 사슬로 GlcNAc를 전달할 수 없는 것이 N-아세틸글루코사미닐-트랜스퍼라아제 II (GnT-II) 및 갈락토실트랜스퍼라아제에 의해 더 가공될 수 있는 골지-알파-만노시다아제 II에 의한 그것의 절단을 예방한다. 1,6-푸코오스는 올리고만노오스 구조가 글리코실화되지 않는 이유를 설명하는, GnT-II 변형 후 첨가된다(Longmore et al., 1982, Carbohydr Res 100: 365-392). IgG의 이 올리고만노오스 글루코실화 형태는 이전에 N-아세틸글루코사미닐트랜스퍼라아제 I 활성이 부족한 CHO 세포인 Lec1 세포에서 제조되었다(Wright et al., 1994, J Exp Med 180: 1087-1096). 보체 매개 용혈반응 및 FcRI 결합에 불완전한 것이 발견되었다. 다른 항체 보다 보체 활성을 위한 택일적인 경로에서, 실질적으로 많은 C3와 결합하였다(Wright et al., J Immunol 160: 3393-3402).
- <286> 염소 젖 유래 항체는 보다 이형성 글리코실화를 나타낸다. 물질의 부피가 가공되더라도, G1F 및 G2F, 만노오스 함유 올리고당은 Man5 내지 Man8 범위에 이른다(도 1).
- <287> 낮은 수준의 푸코오스 감소는 ADCC 증강에 큰 영향을 유도한다. 항체들의 중쇄는 이합체이다. 모든 중쇄가 글리코실화되거나 또는 어느 것도 글리코실화되지 않는다면, 항체들은 두 개의 중쇄에 모두 올리고만노오스를 가지고거나 또는 두 개의 중쇄에 가공된 만노오스 Man3GlcNAc2를 가질 것이다; 이는 혼합된 이합체가 될 수 없다. 높은 수준의 ADCC는 사슬이 독립적으로 글리코실화되고, 그리고 하나의 사슬이 증강된 활성을 위해 푸코오스에서 결여될 것을 제안한다. 글리코실화는 골지에서 완성되는 반면, 항체 사슬은 소포체에서 다중결합한다. 고함량 만노오스로서 중쇄 및 사슬의 20%의 독립적인 글리코실화로써, 항체 분자의 4%만이 올리고만노오스를 가지는 두 사슬을 가지고, 64%는 두 사슬이 가공된 만노오스를 포함하는 반면, 나머지 32%는 올리고만노오스를 가지는 한 사슬 및 가공된 만노오스를 가지는 다른 사슬로 구성될 수 있다. 이는 적어도 하나 이상의 올리고만노오스 사슬을 가지는, 총 36%의 항체 분자를 제공한다. 따라서, 푸코오스가 결여된 단일 중쇄가 증강된 ADCC를 위해 충분한 것으로 나타낸다. 이는 D1 영역이 한 사슬에 결합하고 D2 영역이 다른 사슬에 결합하는 면역글로불린 분자에 대한 Fc 수용체의 비대칭 결합을 고려하면 대체로 합리적이다(Radaev et al., 2002, Mol Immunol 38: 1073-1083). 따라서, 푸코실화만이 한 도메인에 대한 결합에 영향을 주고, 이는 증가된 친화성을 위한 충분하다. 푸코실화 항체가 91% 푸코오스를 포함하였고 푸코오스 고갈된 항체가 72% 푸코오스를 포함하였던 경우에, 이전의 연구에서 ADCC 내의 유사한 증가가 관찰되었다(Shinkawa et al., 2003, J Biol Chem 278: 3466-3473).
- <288> 실험이 이러한 낮은 항원 밀도를 가지는 세포 상에 잘 작용되는 것이 놀랄만 하다. IgG1에서 푸코오스 제거가 NK 세포의 효과적인 활성화의 결과로서 ADCC 활성을 요구하는 항원 양을 감소시키는 것이 입증되었다. 이 효과는 아마도 CD137을 적게 발현하는 세포주를 이용하여 얻어진 우수한 결과에 대하여 설명한다.
- <289> 마우스 젖에서 생산된 항체는 염소 젖 유래 항체 보다 고농도에서 보다 좋은 활성을 가졌다. 염소 젖 유래 항체

조제물은 표적 세포에 직접 결합하지 않고 PBMCs에 결합할 수 있는 10% 응집물을 포함할 수 있다. 이 비생산적 결합은 PBMCs의 활성을 차단할 수 있다(Kipps et al., 1985, J Exp Med 5 161: 1-17).

<290> 따라서, 형질전환 젖이 ADCC 활성에 대한 증강된 항체의 우수한 원천임이 발견되었다. 곤충 세포에서 생산된 항체는 포유동물 세포에서 생산된 동일 항체 보다 효과적이며 보고되었다(Lang et al., 2004). 다른 시스템들이 시도되었으나 성공적으로 입증되지 못했다. 아마도 아글리코실화 및 글리코실화 항체들의 혼합물이었기 때문에 아스퍼진스 나거에서 생산된 항체는 ADCC 활성을 증가시키지 못했다(Ward et al., 2004). 효모에서 생산된 키메라 항체는 세포 배양에서 유래된 것과 동일한 ADCC 활성을 가지는 것으로 보고되었다(Horwitz et al., 1988). 또한 Fc γ IIIb의 활성화는 사이토카인의 분비를 유도한다.

<291> 어떤 구현예에서 푸코오스 함유 항체는 렉틴 컬럼 상에 항체 혼합물을 통하여 비푸코실화된 항체로부터 분리될 수 있다.

<292> 상기 내용은 본 발명의 모든 양상 또는 실시예를 특정하거나 어떤 방식으로도 본 발명을 제한하도록 의도되지 않았다. 수반하는 도면은, 명세서에 편입되어 그 일부를 구성하는데, 본 발명의 실시예를 묘사하며, 상세한 설명과 더불어, 본 발명의 원리를 설명하는 데에 기여한다.

<293> 본 명세서에 언급된 모든 공개 문헌과 특히 출원들은 참조함으로써, 각각의 독립적인 공개 문헌 또는 특허출원이 참조에 의해 특정적으로 편입되도록 지시되듯이, 동일한 정도로 여기에 편입된다.

<294> 본 발명이 특정 실시예들과 결합되어 설명되고 있음에도 불구하고, 더 변경될 수 있을 것으로 이해되며, 본 출원은 일반적으로 본 발명의 원리에서 수반되는 본 발명의 어떠한 변형, 용도, 또는 적합화를 포함하고, 본 발명이 속하고 여기에 기술된 본질적인 특징이 적용될 수 있는 기술 분야에서의 알려진 또는 통상적인 실현에 기인하는, 본 기재 내용으로부터의, 그와 같은 이격을 포함한다.

<295> 여기에서 참고문헌의 인용은 그 참고문헌을 선행기술 참증으로 인정하고자 의도되지 않았다.

<296>

[참고 문헌]

1. Anolik, J. H., et al., (2003) ARTHRITIS RHEUM 48, 455-459.
2. Anumula, K. R., and Dhume, S. T. (1998) GLYCOBIOLOGY 8, 685-694.
3. Axford, J. S., N. Sumar, et al. (1992), *Changes In Normal Glycosylation Mechanisms In Autoimmune Rheumatic Disease*, J. CLIN INVEST 89(3): 1021-31.
4. Baguisi A, et al. (1999), *Production of Goats by Somatic Cell Nuclear Transfer*, NATURE BIOTECHNOL, 17: 456-461.
5. Cammuso, C., et al., (2000) ANIM BIOTECHNOL 11, 1-17.
6. Canfield, S. M. and S. L. Morrison (1991) *The binding affinity of human IgG for its high affinity Fc receptor is determined by multiple amino acids in the CH2 domain and is modulated by the hinge region*, J. EXP. MED. 173(6): 1483-91.
7. Cartron, G., et al., (2002) BLOOD 99, 754-758.
8. Chen, S.H., et al. (2000), *Rejection of Disseminated Metastases of Colon Carcinoma by Synergism of IL-12 Gene Therapy And 4-IBB Costimulation*, MOL. THER., 2:39-46.
9. Chitlaru, T., et al., (2002) BIOCHEM J 363: 619-31.
10. Chitlaru, T., et al., (1998) BIOCHEM J 336: 647-58.
11. Chiu M.H. et al. (1994), *In Vivo Targeting Function of N-Linked Oligosaccharides with Terminating Galactose and N-Acetylgalactosamine Residues*, J. BIOL. CHEM., 269 (23):16195-202).
12. Clynes, R.A., et al., (2000) NAT MED 6, 443-46.
13. Clynes, R.A., et al., (1998) PROC NATL ACAD SCI U S A 95, 652-56.
14. Dall'Ozzo, S., et al., (2004) CANCER RES 64, 4664-69.
15. Denman, J., et al., (1991) BIOTECHNOLOGY (NY) 9, 839-43.
16. Dorai, H., B. M. Mueller, et al. (1991), *Aglycosylated Chimeric mouse/human IgG1 Antibody Retains Some Effector Function*, HYBRIDOMA 10(2): 211-17.
17. Ebert, K. M., et al., (1994) BIOTECHNOLOGY (NY) 12, 699-702.
18. Edmunds, T., et al., (1998) BLOOD 91, 4561-71.

<297>

19. Foell, J. et al. (2003), *CD137 Co-Stimulatory T cell Receptor Engagement Reverses Acute Disease in Lupus-Prone NZB x NZWF1 mice*, J. CLIN. INVEST. 111(10), 1505-1518.
20. Fuji, S., T. Nishiura, et al. (1990), *Structural Heterogeneity of Sugar Chains in Immunoglobulin G. Conformation of Immunoglobulin G Molecule and Substrate Specificities of Glycosyltransferases*, J. BIOL. CHEM. 265(11): 6009-18.
21. Goldstein, I. J., et al., (1965) BIOCHIM BIOPHYS ACTA 97, 68-76.
22. Goldstein, I. J., et al., (1965) BIOCHEMISTRY 4, 876-83.
23. Gottlieb, C., et al., (1975) J BIOL CHEM 250, 3303-3309.
24. Gruel, Y., et al., (2004) BLOOD 10, 10.
25. Guinn, B.A. et al. (1999), *4-1BB Cooperates With B7-1 And B7-2 In Converting A B Cell Lymphoma Cell Line Into A Long-Lasting Antitumor Vaccine*, J. IMMUNOL. 162:5003-5010.
26. Harpaz, N., and Schachter, H. (1980) J BIOL CHEM 255, 4885-4893.
27. Hong, H. J., J. W. Lee, et al. (2000), *A humanized anti-4-1BB monoclonal antibody suppresses antigen-induced humoral immune response in nonhuman primates*, J. IMMUNOTHER. 23(6): 613-21.
28. Horwitz, A. H., et al., (1988) PROC NATL ACAD SCI USA 85, 8678-82.
29. Jalanko, A., A. Kallio, et al. (1988), *An EBV-based mammalian cell expression vector for efficient expression of cloned coding sequences*, BIOCHIM BIOPHYS ACTA 949(2): 206-12.
30. James, D. C., et al., (1995) BIOTECHNOLOGY (N Y) 13, 592-596.
31. Jefferis, R., J. Lund, et al. (1995), *Recognition sites on human IgG for Fc gamma receptors: the role of glycosylation*, IMMUNOL LETT 44(2-3): 111-17.
32. Kasinathan P. et al. (2001), *Production of Calves from G1 Fibroblasts*, NATURE BIOTECH, 19: 1176-78.
33. Kerr, D.E., and Wellnitz, O., *Mammary Expression of New Genes to Combat Mastitis*, J. ANIM. SCI. 2003. 81:38-47 (2003).
34. Kim et al. (2001), *Divergent Effects of 4-1BB Antibodies on Antitumor Immunity and on TumorReactive T-Cell Generation*, CANCER RESEARCH 61: 2031-2037.
35. Kim, J. K., M. F. Tsien, et al. (1994), *Catabolism of the murine IgG1 molecule: evidence that both CH2-CH3 domain interfaces are required for persistence of IgG1 in the circulation of mice*, SCAND. J. IMMUNOL. 40(4): 457-65.
36. Kipps, T. J., et al., (1985) J EXP MED 161, 1-17.

<298>

37. Knight, D. M., C. Wagner, et al. (1995), *The immunogenicity of the 7E3 murine monoclonal Fab antibody fragment variable region is dramatically reduced in humans by substitution of human for murine constant regions*, MOL. IMMUNOL. 32(16): 1271-81.
38. Koene, H. R., et al., (1997) BLOOD 90, 1109-14.
39. Lang, P., et al., (2004) BLOOD 103, 3982-85.
40. Leatherbarrow, R. J., T. W. Rademacher, et al. (1985) *Effector Functions of a Monoclonal Aglycosylated Mouse Igg2a: Binding and Activation of Complement Component C1 and Interaction with Human Monocyte Fc Receptor*, MOL. IMMUNOL. 22(4): 407-15.
41. Li, Q., et al. (2003), *Polarization Effects of 4-1BB during CD28 Costimulation in Generating Tumor-reactive T Cells for Cancer Immunotherapy*, CANCER RESEARCH 63(10): 2546-52.
42. Li, E., and Kornfeld, S. (1978) J BIOL CHEM 253, 6426-31.
43. Lifely, M.R., Hale, C., Boyce, S., Keen, M.J. and Phillips, J, (1995) GLYCOBIOLOGY 5, 813-822.
44. LoBuglio, A. F., R. H. Wheeler, et al. (1989), *Mouse/human chimeric monoclonal antibody in man: kinetics and immune response*, PROC. NATL. ACAD. SCI. U S A 86(11): 4220-24.
45. Louis, E., et al., (2004) ALIMENT PHARMACOL THER 19, 511-19.
46. Lund, J., N. Takahashi, et al. (1993), *Control of IgG/Fc glycosylation: a comparison of oligosaccharides from chimeric human/mouse and mouse subclass immunoglobulin Gs*, MOL. IMMUNOL. 30(8): 741-8.
47. Lund, J., N. Takahashi, et al. (1996), *Multiple interactions of IgG with its core oligosaccharide can modulate recognition by complement and human Fc gamma receptor I and influence the synthesis of its oligosaccharide chains*, J. IMMUNOL. 157(11): 4963-9.
48. Lund, J., N. Takahashi, et al. (1995), *Oligosaccharide-protein interactions in IgG can modulate recognition by Fc gamma receptors*, FASEB J. 9(1): 115-9.
49. Malaise, M. G., C. Hoyoux, et al. (1990), *Evidence for a role of accessible galactosyl or mannose residues of Fc domain in the in vivo clearance of IgG antibody-coated autologous erythrocytes in the rat*, CLIN. IMMUNOL. IMMUNOPATHOL. 54(3): 469-83.
50. Maley, F., and Trimble, R. B. (1981) J BIOL CHEM 256, 1088-1090.
51. Malhotra, R., M. R. Wormald, et al. (1995), *Glycosylation changes of IgG associated with rheumatoid arthritis can activate complement via the mannose-binding protein*, NAT. MED. 1(3): 237-43.

52. Martinet, O., et al. (2000), *Immunomodulatory gene therapy with interleukin-12 and 4-1BB ligand: long-term remission of liver metastases in a mouse model*, J. NATL. CANCER Inst. 92:931-936.
53. Maynard, J. and G. Georgiou (2000), *Antibody engineering*, ANNUAL REV. BIOMED. Eng 2: 339-76.
54. Melero, I., et al. (1997), *Monoclonal antibodies against the 4-1BB T-cell activation molecule eradicate established tumors*, NAT. MED. 3:682-685. BMS.
55. Melero, I., et al. (1998), *Amplification of tumor immunity by gene transfer of the co-stimulatory 4-1BB ligand: synergy with the CD28 co-stimulatory pathway*, EUR. J. IMMUNOL. 28:1116-1121.
56. Mimura, Y., P. Sondermann, et al. (2001), *Role of oligosaccharide residues of IgG1-Fc in Fc gamma RIIB binding*, J. BIOL. CHEM. 276(49): 45539-47.
57. Miller et al. (2002), *4-1BB-Specific Monoclonal Antibody Promotes the Generation of Tumor-Specific Immune Responses by Direct Activation of CD8 T Cells in a CD40-Dependent Manner*, THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, 169: 1792-1800. Immunex.
58. Mittler, R.S., et al. (1999), *Anti-4-1BB monoclonal antibodies abrogate T cell-dependent humoral immune responses in vivo through the induction of helper T cell energy*, J. EXP. MED. 190:1535.
59. Mizuochi, T., T. Taniguchi, et al. (1982), *Structural and numerical variations of the carbohydrate moiety of immunoglobulin G*, J. IMMUNOL. 129(5): 2016-20.
60. Mori, K., et al., (2004) BIOTECHNOL BIOENG 28, 28.
61. Niwa, R., et al., (2004) CANCER RES 64, 2127-2133.
62. Niwa, R., et al., (2005) CLIN CANCER RES 11, 2327-2336.
63. Niwa, R., et al., (2004) CLIN CANCER RES 10, 6248-6255.
64. Nose, M., and Wigzell H. (1983), *Biological Significance of Carbohydrate Chains on Monoclonal Antibodies*, PROC. NATL. ACAD. SCI. U S A 80(21): 6632-36.
65. Okazaki, A., et al., (2004) J MOL BIOL 336, 1239-1249.
66. Pham, P. L., S. Perret, et al. (2003), *Large-scale transient transfection of serum-free suspension-growing HEK293 EBNA1 cells: Peptone additives improve cell growth and transfection efficiency*, BIOTECHNOL BIOENG 84(3): 332-42.
67. Pollock, D. P., et al., (1999) J IMMUNOL METHODS 231, 147-157.
68. Rademacher, T. W. (1993), *Glycosylation as a Factor Affecting Product Consistency*, BIOLOGICALS 21(2): 103-4.
69. Rademacher, T. W., S. W. Homans, et al. (1986), *Immunoglobulin G as a glycoprotein*, BIOCHEM SOC SYMP 51: 131-48.

70. Rademacher, T. W., R. B. Parekh, et al. (1988), *The role of IgG glycoforms in the pathogenesis of rheumatoid arthritis*, SPRINGER SEMIN IMMUNOPATHOL 10(2-3): 231-49.
71. Raju, T. S., et al., (2000) GLYCOBIOLOGY 10, 477-486.
72. Rothman, R. J., et al., (1989) MOL IMMUNOL. 26, 1113-23.
73. Rudd, P. M., R. J. Leatherbarrow, et al. (1991), *Diversification of the IgG molecule by oligosaccharides*, MOL. IMMUNOL. 28(12): 1369-78.
74. REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES (16th ed., Osol, A., editor, Mack, Easton Press. (1980)).
75. Sacchi, S., M. Federico, et al. (2001), *Treatment of B-cell non-Hodgkin's lymphoma with anti CD 20 monoclonal antibody Rituximab*, CRIT. REV. ONCOL. HEMATOL. 37(1): 13-25.
76. Sambrook et al. (1989), MOLECULAR CLONING--A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Laboratory Press, (2nd Edition).
77. Shen, E. S., G. M. Cooke, et al. (1995), *Improved expression cloning using reporter genes and Epstein-Barr virus ori-containing vectors*, GENE 156(2): 235-9.
78. Shields, R. L., et al., (2002) J BIOL CHEM 277, 26733-26740.
79. Shinkawa, T., et al., (2002) J BIOL CHEM 8, 8.
80. Simmons, L. C., D. Reilly, et al. (2002), *Expression of full-length immunoglobulins in Escherichia coli: rapid and efficient production of aglycosylated antibodies*, J. IMMUNOL. METHODS 263(1-2): 133-47.
81. Stanley, P. (1984), *Glycosylation Mutants of Animal Cells*, ANNUAL REV. GENET. 18: 525-52.
82. Stanley, P., et al., (1975) PROC NATL ACAD SCI U S A 72, 3323-27.
83. Strome S.E. et al. (2002), *Strategies for antigen loading of dendritic cells to enhance the antitumor immune response*, CANCER RESEARCH 62:1884-89.
84. Sumar, N., K. B. Bodman, et al. (1990), *Analysis of glycosylation changes in IgG using lectins*, J. IMMUNOL. METHODS 131(1): 127-36.
85. Sutton, B. J. and D. C. Phillips (1983), *The three-dimensional structure of the carbohydrate within the Fc fragment of immunoglobulin G*, BIOCHEM SOC TRANS 11(Pt 2): 130-2.
86. Sun, Y. et al. (2002), *Costimulatory molecule-targeted antibody therapy of a spontaneous autoimmune disease*, NAT MED. 8(12), 1405-13.

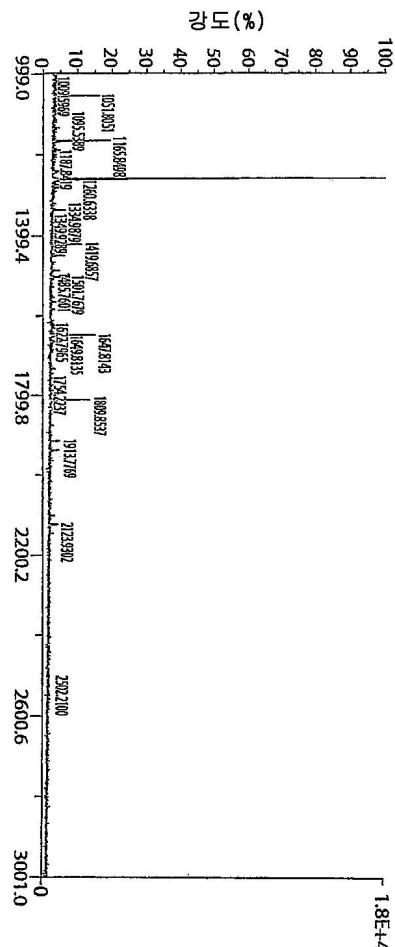
87. Sun, Y. et al. (2002), *Administration of agonistic anti-4-IBB monoclonal antibody leads to the amelioration of experimental autoimmune encephalomyelitis*, J. IMMUNOL. 168(3), 1457-65.
88. Takeuchi, T., et al., (1999) AUTOIMMUNITY 31, 265-271.
89. Tamamori, Y., et al., (2002) INT J ONCOL 21, 649-654.
90. Tandai, M., T. Endo, et al. (1991), *Structural study of the sugar moieties of monoclonal antibodies secreted by human-mouse hybridoma*, ARCH. BIOCHEM. BIOPHYS. 291(2): 339-48.
91. Tao, M. H. and S. L. Morrison (1989), *Studies of aglycosylated chimeric mouse-human IgG. Role of carbohydrate in the structure and effector functions mediated by the human IgG constant region*, J. IMMUNOL. 143(8): 2595-601.
92. Tao, M. H., R. I. Smith, et al. (1993), *Structural features of human immunoglobulin G that determine isotype-specific differences in complement activation*, J. EXP. MED. 178(2): 661-67.
93. Tarentino, A. L., et al., (1974) J BIOL CHEM 249, 818-24.
94. Treon, S. P., et al., (2005) J CLIN ONCOL 23, 474-81.
95. Tsuchiya, N., T. et al. (1989), *Effects of galactose depletion from oligosaccharide chains on immunological activities of human IgG*, J. RHEUMATOL. 16(3): 285-90.
96. Van Epps, H. L., Schmaljohn, C. S., and Ennis, F. A. (1999) J VIROL 73, 5301-5308.
97. Walker, M. R., J. Lund, et al. (1989), *A glycosylation of human IgG1 and IgG3 monoclonal antibodies can eliminate recognition by human cells expressing Fc gamma RI and/or Fc gamma RII receptors*, BIOCHEM J. 259(2): 347-53.
98. Ward, M., et al., (2004) APPL ENVIRON MICROBIOL 70, 2567-76.
99. White, K. D., M. B. Frank, et al. (1996), *Effect of immunoglobulin variable region structure on C3b and C4b deposition*, MOL. IMMUNOL. 33(9): 759-68.
100. Wilcox R.A., et al. (2002), *Provision of antigen and CD137 signaling breaks immunological ignorance, promoting regression of poorly immunogenic tumors*, J. CLIN. INVEST. 109:651-59.
101. Wilcox R.A. et al. (2002), *Signaling through NK cell-associated CD137 promotes both helper function for CD8+ cytolytic T lymphocytes and responsiveness to interleukin-2*, J. IMMUNOL. 169:4230-36.
102. Williams, R. D., et al., (1978) IN VITRO 14, 779-786.
103. Wilmut I, et al. (Oct 10, 2002), *Somatic Cell Nuclear Transfer*, NATURE 419(6907):583-86.

104. Wilmut I, et al. (Feb 27, 1997), *Viable Offspring Derived From Fetal and Adult Mammalian Cells*, NATURE 385(6619):810-3.
105. Wolff, E. A., et al., (1993) CANCER RES 53, 2560-65.
106. Wright, A. and S. L. Morrison (1994), *Effect of altered CH2-associated Carbohydrate Structure On The Functional Properties And In Vivo Fate Of Chimeric Mouse-Human Immunoglobulin G1*, J. EXP. MED. 180(3): 1087-96.
107. Wright, A., and Morrison, S. L. (1998) J IMMUNOL 160, 3393-3402.
108. Wu, J., et al., (1997) J CLIN INVEST 100, 1059-1070.
109. Yamane-Ohmuki, N., et al., (2004) BIOTECHNOL. BIOENG. 87, 614-22.
110. Zhou, Q., et al., (2005) J. BIOTECHNOL. 117, 57-72.
111. Zhu G., et al. (2001), *Progressive depletion of peripheral B lymphocytes in 4-IBB (CD137) ligand/I-E β transgenic mice*, J. IMMUNOL. 167:2671-6.
112. Zou X., et al. (2002), *Generation of Cloned Goats (*Capra Hircus*) from Transfected Foetal Fibroblast Cells, the Effect of Donor Cell Cycle*, MOL REPROD DEV.; 61: 164-172.

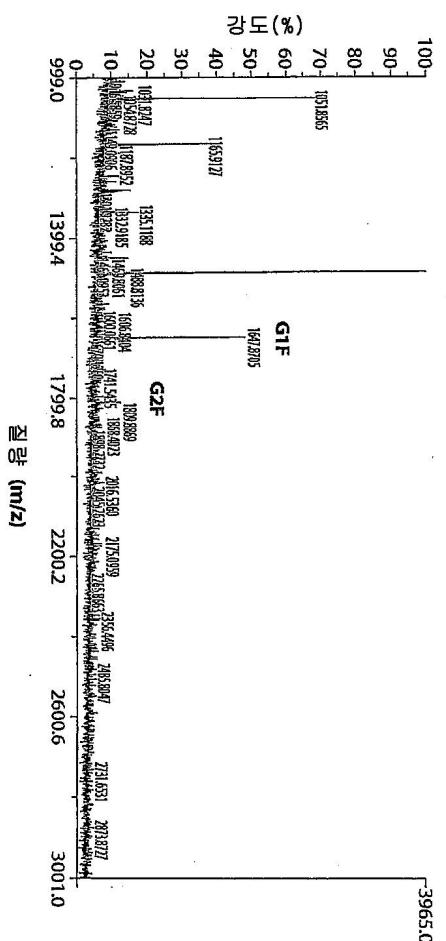
<302> Chen et al., 20050013811

도면

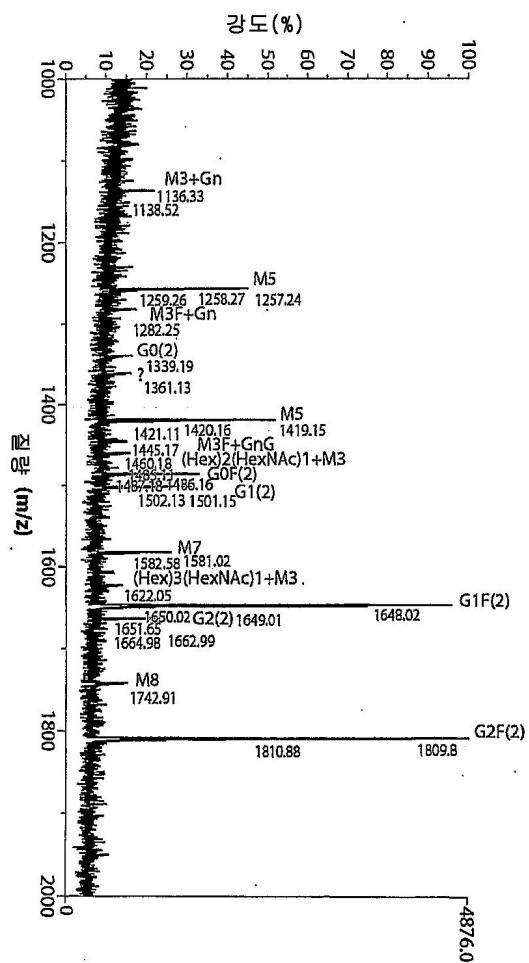
도면1A



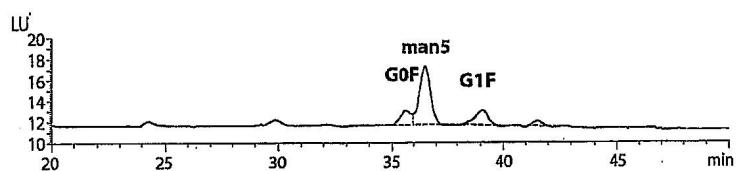
도면 1B



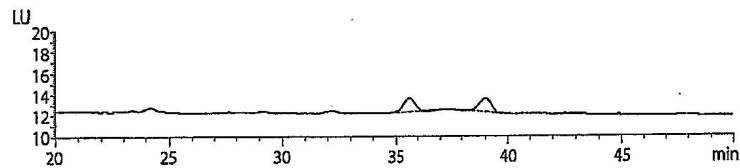
도면1C



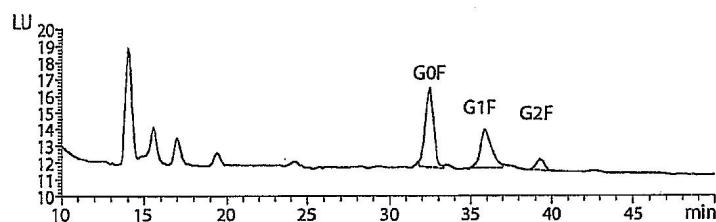
도면2A



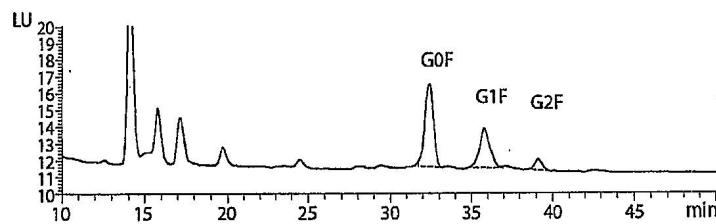
도면2B



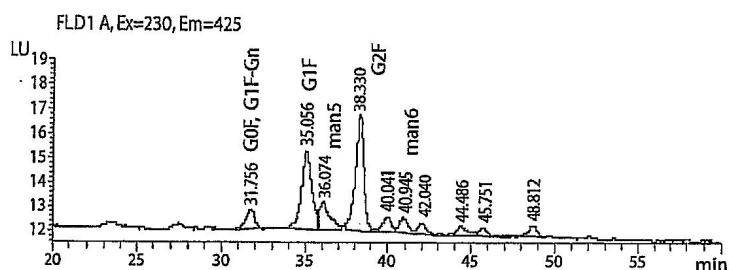
도면2C



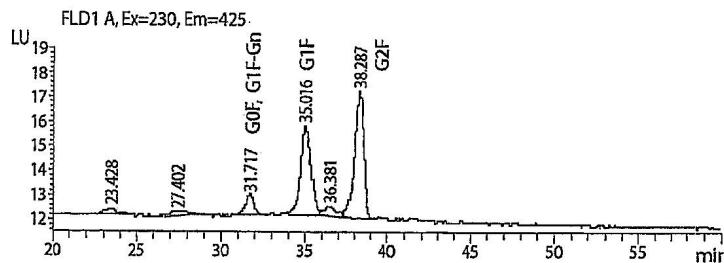
도면2D



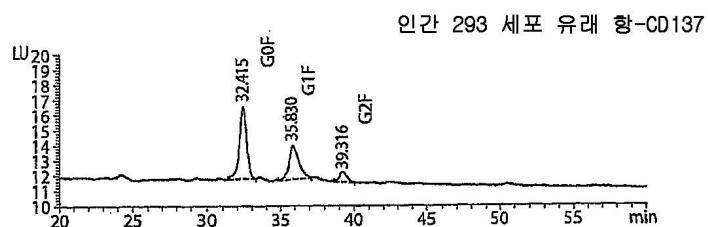
도면2E



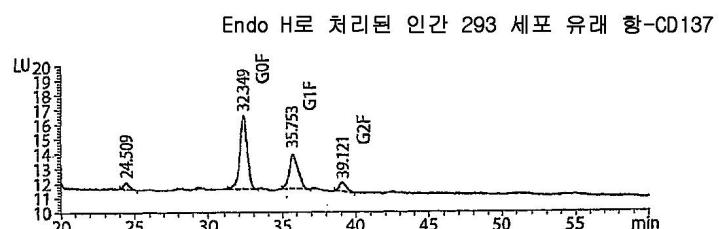
도면2F



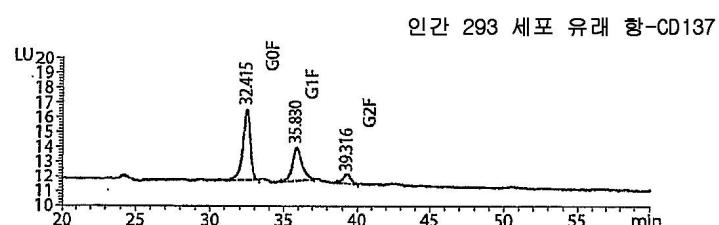
도면3A



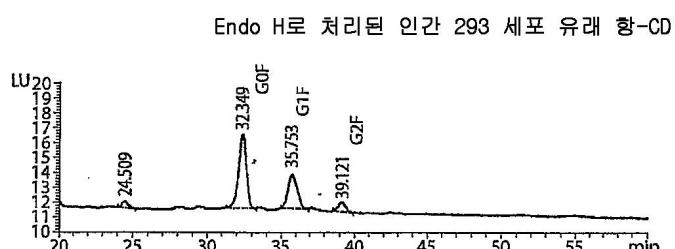
도면3B



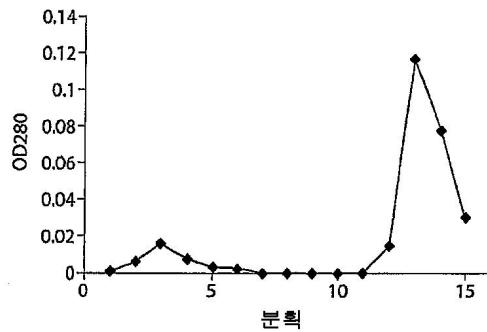
도면3C



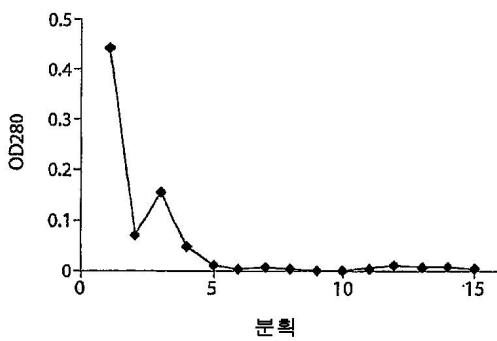
도면3D



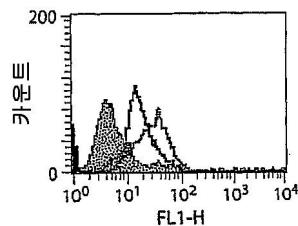
도면4A



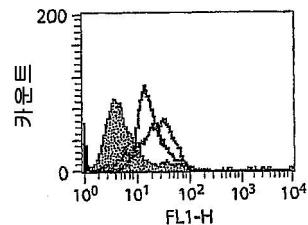
도면4B



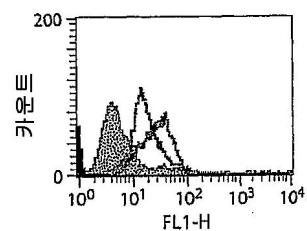
도면5A



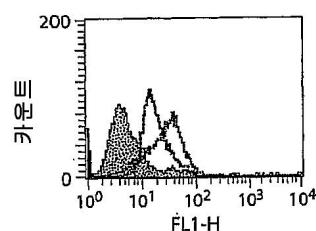
도면5B



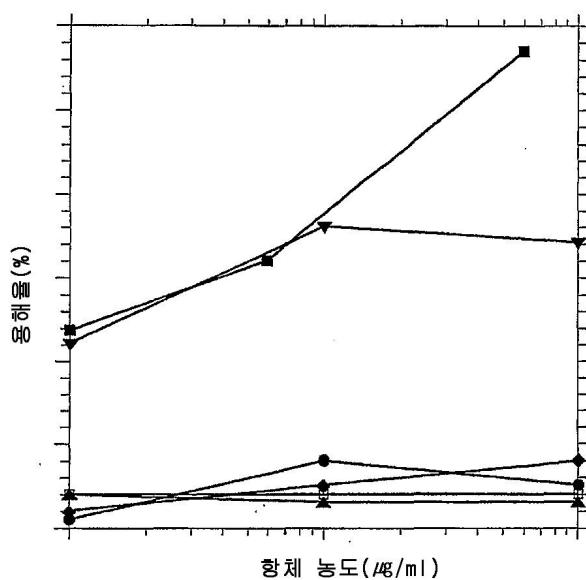
도면5C



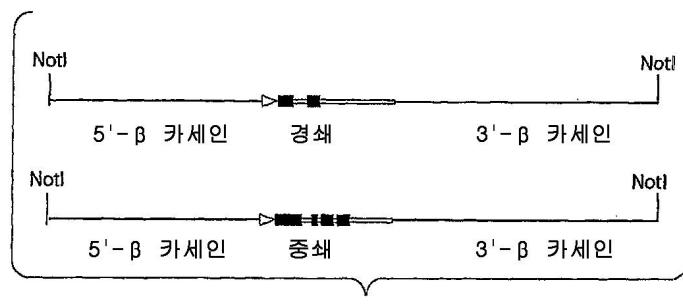
도면5D



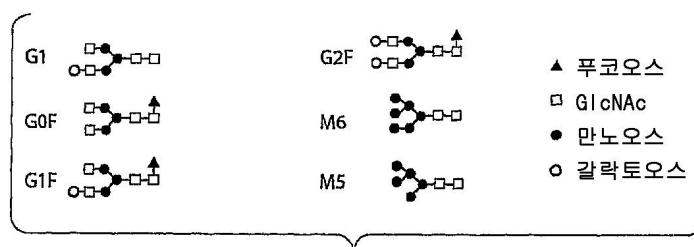
도면6

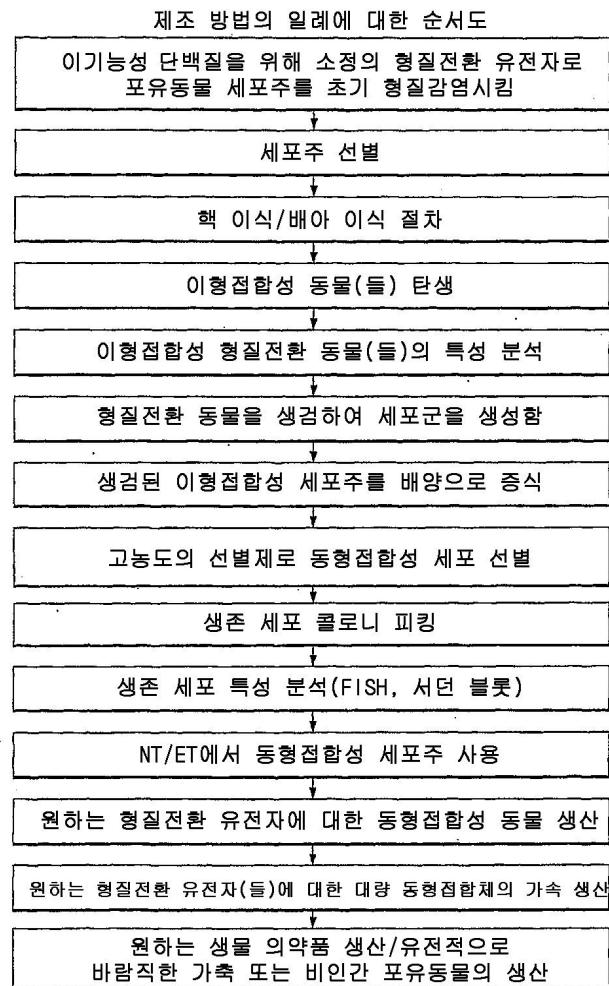
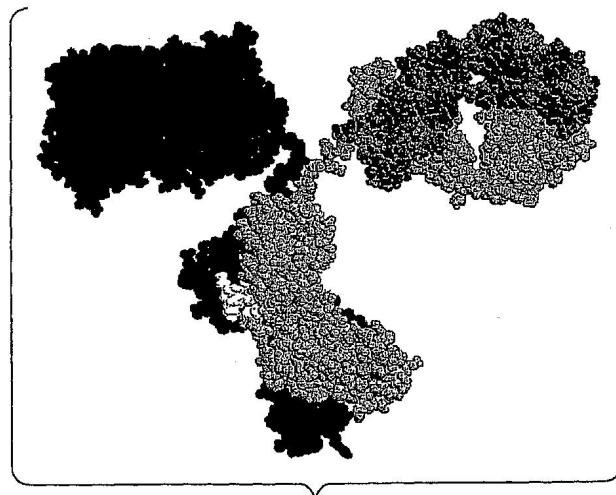


도면7

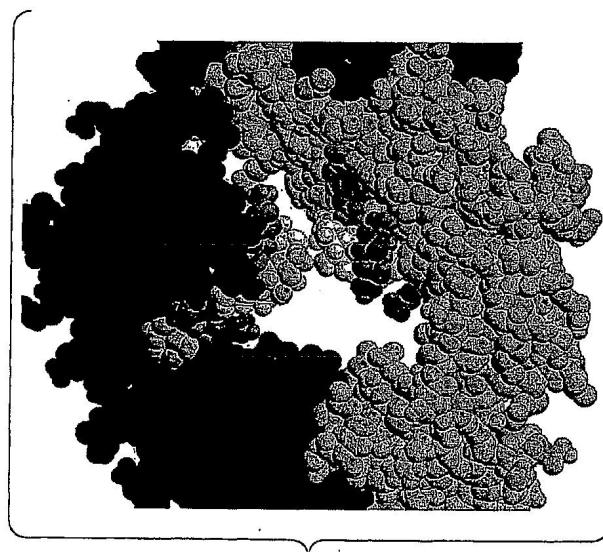


도면8

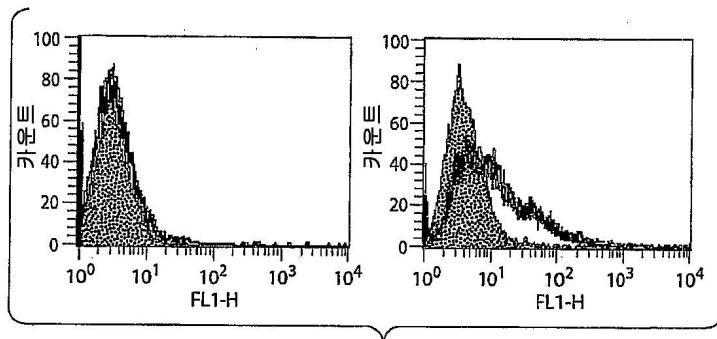


도면9**도면10A**

도면10B

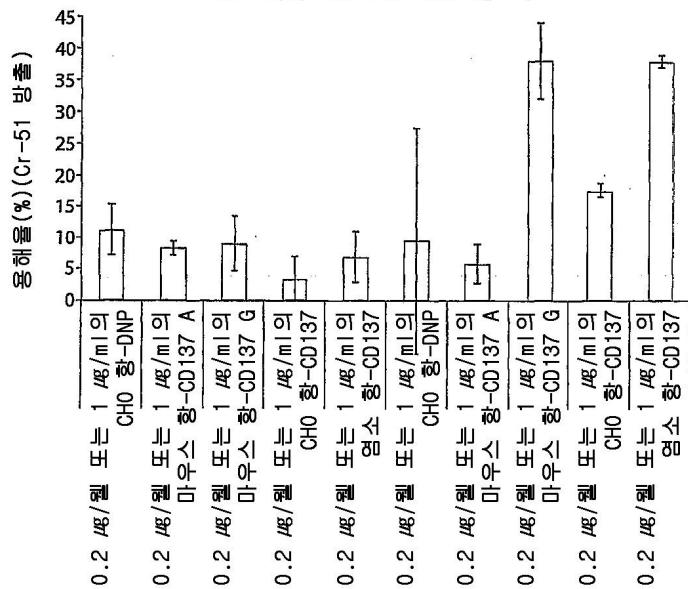


도면11

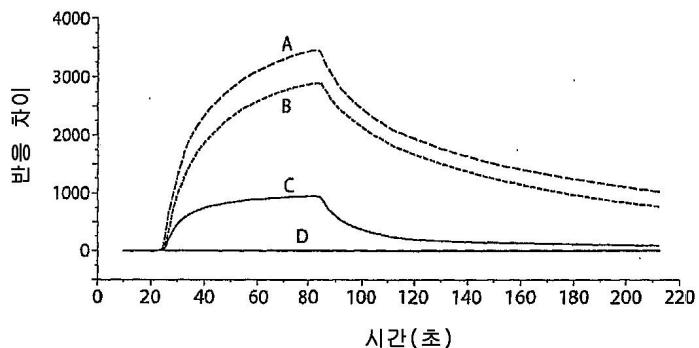


도면12

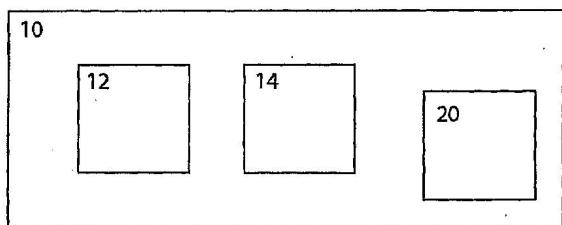
ADCC: 1시간 표지화/15시간 분석
 CHO 또는 CD137 발현 CHO에서 테스트된 CD137 항체
 E:T 비가 100:1인 PBMC 세포주



도면13



도면14



서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> GTC Biotherapeutics Inc.

<120> ANTIBODIES WITH ENHANCED ANTIBODY-DEPENDENT CELLULAR CYTOTOXICITY
ACTIVITY, METHODS OF THEIR PRODUCTION AND USE

<130> G0744.70045W000

<140> unassigned
<141> 2006-10-23

<150> US 60/729,054
<151> 2005-10-21

<160> 2

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1
<211> 28
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> synthetic oligonucleotide

<400> 1
agggtaccaa gcttgaatc aaacgaac 28

<210> 2
<211> 48
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> synthetic oligonucleotide

<400> 2
aagggtccgg atcctcgagg atcctaaacac tctccctgt tgaagctc 48