

(19)대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)(51) Int. Cl.⁷
A61K 39/395
C07K 16/00(11) 공개번호 10-2005-0065587
(43) 공개일자 2005년06월29일(21) 출원번호 10-2005-7006187
(22) 출원일자 2005년04월08일
번역문 제출일자 2005년04월08일
(86) 국제출원번호 PCT/US2003/031801
국제출원일자 2003년10월08일(87) 국제공개번호 WO 2004/032857
국제공개일자 2004년04월22일(30) 우선권주장 60/416,531 2002년10월08일 미국(US)
60/467,161 2003년05월02일 미국(US)
PCT/US02/32307 2002년10월11일 미국(US)(71) 출원인 이뮤노메디스, 인코오포레이티드
미국뉴저지주 07950 모리스플레인즈 어메리칸로오드300(72) 발명자 골든베르그 데이비드 엠.
미국 뉴저지주 07945 멘드함, 캐롤라이스 팜 로드 1
한센 한스 제이.
미국 미시시피주 39466 피카운, 앵글러 드라이브 6014

(74) 대리인 윤동열

심사청구 : 없음

(54) 항체 치료법

명세서

기술분야

관련 출원

본 출원은 2003년 5월 2일에 출원된 미국 가출원번호 제60/467,161호의 일부계속출원(continuation-in-part)이다. 또한 본 출원은 2002년 10월 8일에 출원된 미국 가출원번호 제60/416,531호 및 2002년 10월 11일에 출원된 PCT국제출원 제PCT/US02/32307호의 우선권 효력을 차례로 청구한다.

본 발명의 분야

본 발명은 암태아성 항원(carcinoembryonic antigen, CEA)을 발현하는 암을 치료하는 방법에 관한 것으로서, 특히 또 다른 항체, 화학치료제, 방사성제제, 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 면역조절제, 면역컨쥬게이트 또는 이들의 조합과 같은 적어도 하나 이상의 다른 치료제와 조합된 항체를 포함하는 면역 시약(immunological reagent)을 투여하여 CEA가 발현되는 갑상선 수질종양(medullary thyroid cancer, MTC), 갑상선 비수질종양(non-MTC), 결장직장암(colorectal cancer), 간세포암종(Hepatocellular carcinoma), 위암, 폐암, 유방암 및 다른 암을 치료하는 방법에 관한 것이다. 또한 본 발명은 컨쥬게이트되지 않은 형태의 상기 면역 시약 및 적어도 하나 이상의 치료제를 포함하는 약제학적 조성물에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 바람직하게는 무린(murine) III종 항-CEA MAb에 대응하는 결합 친화적 특성 및 특이성을 가지는 단클론 항체인 III종 항-암태아성 항원 단클론 항체(이하 "MAb"라 한다)를, 보다 바람직하게는 인간 항체의 항원성(antigenic) 및 효과기 특성을 더 가지는 인간화된, 키메라 또는 인간 MABs를 치료제 투여 전에, 함께 또는 투여 후에 투여하여 CEA를 발현하는 암을 치료하는 방법에 관한 것이다. 특히 상기 치료방법에서 유용한 MABs는 항-CEA 무린 MAB의 상보성 결정 영역(complementarity-determining regions, 이하 "CDRs"라 한다)이 인간 항체의 구조 영역/framework regions, FRs)에 이식되어 있는 인간화된 MABs이다.

배경기술

CEA는 대부분 결장뿐만 아니라, 유방, 폐, 췌장, 갑상선(수질형; medullary type) 및 난소에서 발생하는 대다수의 상피 세포 암에서 공통적으로 발현되는 종양태아성 항원(腫瘍胎兒性 抗原; oncofetal antigen)이다(Goldenberg *et al.*, *J. Natl. Cancer Inst.* 57:11-22 (1976), Shively, *et al.*, *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 2:355-399 (1985)). 근본적으로 CEA가 결장직장암(colorectal cancer)의 종양 특이성 항원이 된다고 생각되어졌다(Gold *et al.*, *J. Exper. Med.*, 122:467(1965)). 그러나, 정상적인 인간 결장뿐만 아니라 대다수의 암종들, 양성 종양들 및 질병 조직들에서 다양하게 존재되는 것이 나중에 발견되었다(Shively *et al.*, *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, 2:355(1985); von Kleist *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 69:2492(1972)). CEA는 다양한 종양형성(tumorigenesis)의 관점에서 CEA의 역할이 교대로 관련되는 동형타입(homotypic) 및 이형타입(heterotypic) 상호작용을 통한 세포-세포간 부작을 중재하는 것이 발견되었다.

갑상선(甲状腺; thyroid gland)으로 한정되는 갑상선 수질종양(medullary thyroid cancer, MTC)은 전절제술(total thyroidectomy) 및 중추 림프절 박리(central lymph node dissection)에 의해 잠재적으로 치료될 수 있다. 그러나, 이들 환자의 약 50%가 재발된다. 게다가, 절제 불가능한 질병(unresectable disease) 또는 원위 전이(distant metastases)를 가지는 환자의 예후는 10년 생존이 30% 미만으로 떨어진다(Rossi *et al.*, *Amer. J. Surgery*, 139:554 (1980); Samaan *et al.*, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 67:801 (1988); 및 Schroder *et al.*, *Cancer*, 61:806(1988)). 상기 환자들에게는 적은 치료적 선택만이 놓여 있다(Principles and Practice of Oncology, DeVita, Hellman and Rosenberg(eds.), New York:JB Lippincott Co. 1333-1435(1989); Cance *et al.*, *Current Problems Surgery*, 22:1 (1985)). 평가가 적은 화학 치료법(chemotherapy) 및 방사선 치료학(radiation therapy)은 국부적 질병을 조절하는데만 이용된다(Cance *et al.*, Tubiana *et al.*, *Cancer*, 55:2062(1985)). 따라서, 새로운 치료 양상들이 상기 질병을 조절하는데 필요하다.

암 치료 및 진단에서 유용한 적용은 악성종양의 부위에 직접 치료제 및 진단제를 운반하는 표적 항체들을 이용하는 것을 포함한다. 지난 10년 동안, 여러 가지 종양 특이적 항체들 및 항체 단편들이 약물, 독소, 방사성핵종(radionuclides), 사이토카인과 같은 면역조절제 또는 다른 제제와 같은 치료제에 항체를 컨주게이트하는 방법을 통하여 종양을 표적하는 상기 컨주게이트를 환자에게 투여하는 방법이 폭넓게 개발되었다. 그러나, 무린 단클론 항체들(인간에 대하여 가장 일반적으로 이용되는 표적 항체)과 결합된 약물 또는 방사성핵종을 투여한 환자는 인간 항-쥐 항체(HAMAs)의 혈액순환을 전개하고, 때때로 즉시 컨주게이트의 항체 부분과 반응하는 III종 과민증(type-III hypersensitivity)을 나타내었다. 그러나 이러한 문제들은 인간화된, 키메라 또는 인간 항체를 제조하는 것을 포함하는 대다수의 다른 방법을 통하여 면역원성(immunogenic)이 거의 없는 이들 무린 항체를 제조하여, 표적 항체에 폴리에틸렌 글리콜을 컨주게이트하는 것(PEGylation)과 같이 표적 항체를 화학적으로 변형하여, 또는 항체의 항원성(antigenicity)의 위치(situs)를 특성화한 다음 전체 IgG를 대신해서 사용될 수 있는 Fab', F(ab)₂ 및 다른 항체 단편들을 제거하여 최소화되었다. 부가적으로, 혈액에서 HAMA를 혈장이동형으로(plasmaphoretically) 제거하여 HAMA의 부작용을 감소하도록 제조하고자 시도하였다. 또한 면역억제 기술(immunosuppressive techniques)은 표적 제제를 이용한 다중 치료(multiple treatment)를 수행하여 외부 항체의 부작용을 충분히 개선할 수 있다.

이러한 치료의 진보에 관계없이, CEA를 발현하는 암을 치료하기 위한 보다 효과적인 방법을 공급하기 위한 필요성이 아직 존재한다. 본 발명에서는 미국특허 제5,874,540호 및 Hansen *et al.*, *Cancer*, 71:3478(1993)에 기재된 III종 항-CEA MAb인 무린 MN-14 MAb 및 미국특허 제5,874,540호에 기재된 III종 항-CEA MAb인 키메라 및 인간화된 MN-14 MABs 및 미국특허 제4,818,709호(Primus *et al.*)에 기재된 NP-4와 같은 항-CEA 항체들을 이용하는 효과적인 치료법을 제공하며, 상기 문헌들은 본 명세서에서 참고문헌으로 전체를 통합하여 수록하였다. 바람직하게는, 상기 III종 항-CEA MAb는 인간화된 것이고, 특히 화학요법 제제와 같은 치료제와 조합하여 사용되며, 최소 독성을 가지는 CEA를 발현하는 암을 효과적으로 치료한다. 부가적으로, 다른 항-CEA 항체들, 예를 들면, MN-6(상기의 Hansen *et al.* 참조) 및 NP-3(미국특허 제4,818,709호 참조)와 같은 II종 MABs; 및 MN-3 및 MN-15(상기의 Hansen *et al.* 참조)와 같은 I종 MABs는 CEA를 발현하는 암을 효과적으로 치료하는 방법을 제공한다. 또한 이들 두 개의 구성성분의 분리 투여는 향상된 결과 및 개별적인 치료 방법들에 적응시키기 위한 다양성(versatility) 및 유연성(flexibility)을 제공한다.

발명의 상세한 설명

발명의 요약

갑상선 수질종양 및 갑상선 비수질종양을 치료하기 위한 조성물 및 치료방법은 본 발명의 범주에 속한다.

본 발명의 첫 번째 구현예에서는 적어도 하나 이상의 항-CEA 단클론 항체(MAb) 또는 그 단편을 포함하는 조성물에 관한 것으로서, 바람직하게는 상기 조성물은 III종 항-CEA MAb 또는 그 단편 및 적어도 하나 이상의 치료제를 포함한다. 바람직하게는, 상기 항체 단편은 F(ab')₂, Fab', Fab, Fv 및 scFv로 이루어진 군에서 선택된다. 또한 바람직하게는, 상기 III종 항-CEA MAb 또는 그 단편은 인간화된 것이며, 여기에서 상기 인간화된 MAb는 무린 III종 항-CEA MAB의 III종 항-CEA 결합 특이성을 실질적으로 보유한다. 또한 바람직하게는, 상기 III종 항-CEA MAb 또는 그 단편은 키메라 MAb이며, 여기에서 상기 키메라 MAb는 무린 III종 항-CEA MAB의 III종 항-CEA 결합 특이성을 실질적으로 보유한다. 보다 바람직하게는, 상기 III종 항-CEA MAb 또는 그 단편은 온전한 인간 MAb이며, 여기에서 상기 온전한 인간 MAb는 무린 III종 항-CEA MAB의 III종 항-CEA 결합 특이성을 실질적으로 보유한다. 상기 목적을 위한 다른 바람직한 항-CEA MAb는 본 명세서에서 이하 보다 상세하게 거론되는 CD66a-d와 교차반응하지 않는 II종 MABs 또는 그 단편을 포함한다. 또 다른 구현예는 CD66a, b 및 d와는 반응하고 CD66c와는 반응하지 않는 II종 항-CEA MABs 또는 그 단편, 또는 CD66c뿐만 아니라 CD66a, b 또는 d와 반응하는 I종 MAb 또는 그 단편(CD66c와 결합하는 I종 MAb라고 정의)을 포함한다.

본 발명의 하나의 구현예에서, III종 항-CEA 단클론 항체 또는 그 단편은 MN-14 항체 또는 그 단편이 바람직하다. 보다 바람직하게는, 상기 MN-14 단클론 항체 또는 그 단편은 무린 MN-14 단클론 항체의 상보성 결정 영역(CDRs)를 포함하며, 여기에서 MN-14 항체의 경쇄 가변 영역의 CDRs는 아미노산 서열 KASQDVGTSVA를 포함하는 CDR1; 아미노산 서열 WTSTRHT를 포함하는 CDR2; 및 아미노산 서열 QQYSLYRS를 포함하는 CDR3를 포함하고; III종 항-CEA 항체의 중쇄 가변 영역의 CDRs는 아미노산 서열 TYWMS를 포함하는 CDR1; 아미노산 서열 EIHPDSSTINYAPSLKD를 포함하는 CDR2; 및 LYFGFPWFAY를 포함하는 CDR3를 포함한다. 또한 바람직하게는, 상기 MN-14 단클론 항체는 CEA와 반응하

고, 정상 교차반응 항원(normal cross-reactive antigen, NCA) 및 태변항원(meconium antigen, MA)과는 반응하지 않는다. 가장 바람직하게는, 상기 MN-14 단클론 항체 또는 그 단편은 인간화된, 키메라화된 또는 온전한 인간 MN-14 항체 또는 그 단편이다.

바람직한 구현예에서, 인간화된 MN-14 항체 또는 그 단편의 경쇄 및 중쇄 가변 영역의 구조 영역(FRs)은 뮤린 MN-14 단클론 항체에 대응하는 FRs로부터 치환된 적어도 하나 이상의 아미노산을 포함한다. 특히, 인간화된 MN-14 항체 또는 그 단편은 도 14A-C에 도시된 뮤린 중쇄 가변 영역(KLHuVhAIGA)의 아미노산 잔기 24(A), 28(D), 30(T), 48(I), 49(G), 74(A) 및 94(S)로 이루어진 군에서 선택된 뮤린 MN-14 항체에 대응하는 FR에서 유래하는 적어도 하나 이상의 아미노산을 포함한다. 마찬가지로, 인간화된 MN-14 항체 또는 그 단편은 또한 뮤린 MN-14 경쇄 가변 영역에 상기 대응하는 FR에서 유래하는 적어도 하나 이상의 아미노산을 포함한다. 더욱 바람직하게는, 인간화된 MN-14 항체 또는 그 단편은 도 13A에 도시된 경쇄 가변 영역 및 도 14A-C에 도시되고 KLHuVhAIGA로 제작된 중쇄 가변 영역을 포함한다.

본 발명의 첫 번째 구현예에서, 치료제는 약제학적으로 허용가능한 운반제(vehicle) 내에서 선택적으로 제형화되는 항체 자체, 세포독성 제제, 약물, 방사성핵종, 면역조절제, 광활성 치료제, 면역억제제, 호르몬 또는 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택된다. 또한 본 발명에서 사용하는 치료제는 다카바진(dacarbazine, DTIC)이 아니다.

본 발명의 두 번째 구현예는 약제학적으로 허용가능한 운반제(vehicle) 내에 선택적으로 제형화되는 III종 항-CEA 단클론 항체 또는 그 단편 및 적어도 하나 이상의 치료제를 환자에게 치료학적 유효량으로 동시에 또는 순차적으로 투여하는 단계를 포함하는 갑상선 비수질종양뿐만 아니라 갑상선 수질종양을 치료하는 방법에 관한 것이다. 바람직하게는, 상기 항체 단편은 F(ab')₂, Fab', Fab, Fv 및 scFv으로 이루어진 군에서 선택된다. 또한 바람직하게는, 상기 III종 항-CEA MAb 또는 그 단편은 인간화된 것이며, 여기에서 상기 인간화된 MAb는 뮤린 III종 항-CEA MAb의 III종 항-CEA 결합 특이성을 실질적으로 보유한다. 또한 본 발명의 상기 III종 항-CEA MAb 또는 그 단편은 키메라 MAb이며, 여기에서 상기 키메라 MAb는 뮤린 III종 항-CEA MAb의 III종 항-CEA 결합 특이성을 실질적으로 보유한다.

바람직한 구현예에서, III종 항-CEA 단클론 항체 또는 그 단편은 MN-14 항체 또는 그 단편이 바람직하다. 바람직하게는, 상기 MN-14 단클론 항체 또는 그 단편은 뮤린 MN-14 단클론 항체의 상보성 결정 영역(CDRs)을 포함하며, 여기에서 상기 MN-14 항체의 경쇄 가변 영역의 CDRs는 아미노산 서열 KASQDVGTSA를 포함하는 CDR1; 아미노산 서열 WTSTRHT를 포함하는 CDR2; 및 아미노산 서열 QQYSLYRS를 포함하는 CDR3를 포함하고; III종 항-CEA 항체의 중쇄 가변 영역의 CDRs는 아미노산 서열 TYWMS를 포함하는 CDR1; 아미노산 서열 EIHPDSSTINYAPSLKD를 포함하는 CDR2; 및 LYFGFPWFAY를 포함하는 CDR3를 포함한다. 또한 바람직하게는, 상기 MN-14 단클론 항체는 인간화된, 키메라화된 또는 온전한 인간 항체이며, CEA와 반응하고, 정상 교차반응 항원(normal cross-reactive antigen, NCA) 및 태변항원(meconium antigen, MA)과는 반응하지 않는다. 또한 바람직하게는, 상기 MN-14 단클론 항체 또는 그 단편은 주입시 100-600mg 단백질/dose의 복용량으로 투여된다. 가장 바람직하게는, 상기 MN-14 항체 또는 그 단편은 주입시 300-400mg/dose의 복용량으로 투여된다.

본 발명의 방법에서, 상기 인간화된 MN-14 항체 또는 그 단편의 경쇄 및 중쇄 가변 영역의 구조 영역(FRs)은 뮤린 MN-14 단클론 항체에 대응하는 FRs로부터 치환된 적어도 하나 이상의 아미노산을 포함하는 것이 바람직하다. 보다 바람직하게는, 인간화된 MN-14 항체 또는 그 단편은 상기에서 언급한 도 14A-C의 뮤린 중쇄 가변 영역의 아미노산 잔기 24, 28, 30, 48, 49, 74 및 94로 이루어진 군에서 선택된 상기 뮤린 MN-14 항체에 대응하는 FR에서 유래하는 적어도 하나 이상의 아미노산을 포함한다. 또한 바람직하게는, 상기 인간화된 MN-14 항체 또는 그 단편은 상기 뮤린 MN-14 경쇄 가변 영역에 대응하는 FR에서 유래하는 적어도 하나 이상의 아미노산을 포함한다. 가장 바람직하게는, 상기 인간화된 MN-14 항체 또는 그 단편은 도 13A(중간 서열), 도 22A(hMN-14) 또는 도 23A에 도시된 경쇄 가변 영역 및 KLHuVhAIGA로 제작된 도 14A-C 또는 도 22B(hMn-14) 또는 도 23B에 도시된 중쇄 가변 영역을 포함한다.

또한 본 발명에 의한 치료방법은 EGP-1, EGP-2(17-1A), IL-6, 인슐린양성장인자-1(Insulin like growth factor-1), MUC-1, MUC-2, MUC-3, MUC-4, PAM-4, KC4, TAG-72, EGFR, HER2/neu, BrE3, Le-Y, A3, A33, Ep-CAM, AFP, Tn, 톰슨-프레데레이치(Thomson-Friedenreich) 항원, 종양 괴사 항원(tumor necrosis antigen), VEGF, 태반 성장인자(placenta growth factor, PlGF) 또는 다른 종양성 혈관신생(angiogenesis) 항원, Ga733, 테나신(tenascin), 피브로넥틴(fibronectin) 및 이들의 조합과 반응하는 단클론 항체 또는 그 단편으로 이루어진 군에서 선택된 두 번째 인간화된, 키메라, 인간 또는 뮤린 단클론 항체 또는 그 단편의 치료학적 유효량을 환자에게 동시에 또는 순차적으로 투여하는 단계를 포함한다. 유사하게, 상기 방법은 상기에 기재된 I 종, II 종 또는 III종 항-CEA 단클론 항체 또는 그 단편으로 이루어진 군에서 선택된 두 번째 인간화된, 키메라, 인간 또는 뮤린 단클론 항체 또는 그 단편의 치료학적 유효량을 환자에게 동시에 또는 순차적으로 투여하는 단계를 포함할 수 있다. 바람직하게는, 상기 두 번째 항체 또는 그 단편은 항체 자체 또는 치료제와 컨쥬게이트된 것이다.

본 명세서에 기재된 바람직한 구현예에서, 상기 치료제는 약제학적으로 허용가능한 운반제(vehicle) 내에서 선택적으로 제형화되는 항체 자체, 세포독성 제제, 약물, 방사성핵종, 면역조절제, 광활성 치료제, CEA 또는 비-CEA 항체의 면역억제제, 호르몬 또는 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택된다. 또한 본 발명에서 사용하는 치료제는 다카바진(dacarbazine, DTIC)이 아니다.

바람직하게는, 상기 치료제는 약물 또는 독소로 이루어진 군에서 선택된 세포독성 제제이다. 예를 들면, 유사분열억제제(antimitotic), 알킬레이팅제(alkylating), 항대사물질(antimetabolite) 제제, 혈관신생 억제제, 세포자가사멸제, 알카로이드, COX-2 및 항생제 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택된 약제학적 특성을 가지는 약물이 여기에 속한다. 바람직하게는, 상기 약물은 질소 겨자, 에틸렌이민 유도체들, 알킬 설프네이트, 니트로소우레아(nitrosoureas), 트리아젠(triazenes), 염산 유사체, 안트라사이클린(anthracyclines), 타산(taxanes), COX-2 억제제, 피리미딘 유사체, 플린 유사체, 항대사물질(antimetabolites), 항생제, 효소, 에피포도필로톡신(epipodophyllotoxin), 백금 동등 복합체(platinum coordination complex), 빈카 알칼로이드(vinca alkaloids), 치환된 우레아, 메틸 히드라진 유도체, 부신피질 반응 억제제, 길항제, 엔도스타틴(endostatin), 탁솔(taxol), 캄프토테신(camptothecins), 옥살리프라틴(oxaliplatin), 독소루비신(doxorubicins) 및 이들의 유사체, 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택된 것이다.

치료제가 미생물, 식물 또는 동물 독소인 경우, 상기 제제는 리신(ricin), 아브린(arbin), 알파 독소, 사포린, 리보뉴클레아제(RNase), DNase I, 포도상균의 장독소-A, 미국자리공 항바이러스 단백질, 겔로닌(gelonin), 디프테린 독소, 슈도모나스의 외독소 및 슈도모나스의 내독소로 이루어진 군에서 선택된 것이다.

또한 본 발명에 의한 방법에서 상기 치료제는 사이토카인, 줄기세포 성장인자, 림프독소, 조혈인자, 군체자극인자(colony stimulating factor; CSF), 인터페론(IFN), 에리트로포이에틴(erythropoietin), 트롬보포이에틴(thrombopoietin) 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택된 면역조절제이다. 바람직하게는, 상기 림프독소는 종양괴사인자(TNF)이고, 상기 조혈인자는 인터류킨이며, 상기 군체자극인자는 과립구-군체자극인자(granulocyte-colony stimulating factor, G-CSF) 또는 과립구 대식세포-군체자극인자(granulocyte macrophage-colony stimulating factor, GM-CSF)이고, 상기 인터페론은 인터페론- α , - β 또는 - γ 이며, 상기 줄기세포 성장인자는 "S1 인자"로 제작된 것이다. 또한 바람직하게는, 상기 면역조절제는 IL-1, IL-2, IL-3, IL-6, IL-10, IL-12, IL-18, IL-21, 인터페론- γ , TNF- α 또는 이들의 조합을 포함한다. 미국 특허 제5,120,525호에는 골수성(myeloid) 또는 조혈성(hematopoietic) 독성을 생성하는 세포독성 제제에 노출하기 전, 동시에 또는 이후에 사이토카인을 투여하는 것이 기재되어 있으며, 본 명세서에서 전체를 참고문헌으로 통합하여 수록하였다.

또한 바람직한 치료제는 색원체(chromogen) 또는 염료인 광활성 치료제 또는 다카바진(dacarbazine)인 알킬레이팅 제제이다.

또한 바람직하게는, 상기 치료제는 20-10,000 keV의 에너지를 가지는 방사성핵종이다. 바람직하게는, 상기 방사성핵종은 ^{125}I , ^{131}I , ^{90}Y , ^{88}Y , ^{225}Ac , ^{177}Lu , ^{188}Re , ^{186}Re 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택된다.

또 다른 구현예에서, 본 명세서에 기재된 면역조절제는 항-CEA 단클론 항체 또는 그 단편을 단독으로 치료학적 유효량을 투여하기 전에 투여되거나, 또는 면역조절제는 항-CEA 단클론 항체 및 적어도 하나 이상의 치료제의 치료학적 유효량을 투여하기 전에 투여되며, 여기에서 본 명세서에 기재된 상기 구성성분들 중 하나는 약제학적으로 허용가능한 운반제 내에서 선택적으로 제형화된다.

1. 개관

본 발명에서는 항-CEA 항체 또는 그 단편 자체 및 적어도 하나 이상의 치료제를 치료 기간 동안 순차적으로 또는 동시에 투여하는 치료방법을 제공한다. 특히 상기 방법은 갑상선 수질 종양을 치료하는데 유용하지만, 놀랍게도 갑상선 비수질종양, 결장직장암, 간세포암종, 췌장암, 유방암, 폐암, 두경부(head-and-neck) 암, 방광암(膀胱癌:bladder cancer), 자궁암(uterine cancer) 및 난소암 및 매우 높은 수준으로 CEA를 발현하지 않는 암까지도 치료하는데 유용하다. 예를 들면, 조직에서 최소 100ng/g의 수준으로도 CEA를 발현하지 않는 암을 치료하는 방법도 본 발명의 범주에 속한다. 또한 본 발명에서는 항-CEA 항체를 포함하는 조성물을 제공하며, 항체 및 치료제가 각각의 다른 모든 구성성분과 컨주게이트 또는 결합하지 않는 III종 항-CEA 항체 또는 항체 단편이 바람직하다. 본 명세서에서 사용된 용어 "III종 항-CEA" 항체 또는 항체 단편은 CEA 항원(또는 CD66e)에 결합하고, 정상 교차-반응 항원(NCA), 태변항원(MA), 과립구(granulocytes) 및 CD66a-d와는 반응하지 않는 항체 또는 단편을 의미한다(Primus *et al.*, 미국특허 제4,818,709호 참조, 참고문헌으로 통합하여 수록함). III종 항-CEA 항체 자체 또는 그 단편은 인간화된, 키메라, 인간 또는 무린 항체가 될 수 있다. 바람직한 구현예에서, III종 항-CEA 항체 자체 또는 그 단편은 인간화된 MN-14 항체 또는 그 단편이다.

또한 CD66a-d와 교차-반응하지 않는 II종 MAb도 본 발명의 범주에 속한다. 이들은 태변항원과 반응하고 NCA와는 반응하지 않는 CEA 도메인 N-A1B1, A2B2와 반응하고, 과립구와는 반응하지 않는다. 예를 들면, NP-3 및 MN-6은 본 발명에서 이용하는 II종 항-CEA 항체이다. 부가적으로 CD66a, b 및 d와는 반응하고 CD66c와는 반응하지 않는 II종 항-CEA Mabs 또는 그 단편, 또는 CD66c뿐만 아니라 CD66a, b 또는 d와 반응하는 I종 Mabs 또는 그 단편(CD66c와 결합하는 I종 MAb로 정의) 또한 본 발명의 범주에 속한다.

놀랍게도, 본 발명에 기재된 조성물 및 방법은 또한 결장직장암, 췌장암, 유방암, 폐암, 간세포암종, 비뇨기 방광암, 두경부(head-and-neck) 암 및 난소암을 포함하는 갑상선 비수질종양을 치료하는데 유용하다. 이러한 암 형태는 갑상선 수질 종양보다 CEA의 발현량이 적기 때문에, III종 항-CEA 항체 자체 보다는 치료제와의 조합으로 갑상선 비수질종양을 치료하는데 이용될 수 있다.

III종 항-CEA 항체 자체에 의한 종양 세포 사멸 메커니즘은 확실하게 알려지지 않았으며, 가망이 있는 여러 가지 메커니즘을 포함하고 있다. 항체 자체 단독 또는 치료제와의 조합으로 그들 각각의 항원의 생물학적 활성들을 차단하거나, 또는 항체의존성 세포독성(antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, ADCC) 또는 보체 매개성 용해(complement mediated lysis)와 같은 선천적인 면역적 기능을 자극하여 종양 성장에 영향을 줄 것으로 추측된다. 부가적으로, 항체 자체 단독 또는 치료제와의 조합으로 세포 성장 및 세포 주기 진행(cell cycle progression)을 억제하거나, 세포자가사멸(apoptosis)을 유도하거나, 혈관신생(angiogenesis)을 억제하거나, 전이 활성(metastatic activity)을 억제하거나 및/또는 종양 세포 부착에 영향을 주어 암을 치료 또는 조절할 수 있다. 실제로, 전이암이 종양 세포 부착의 혈관신생에서 보다 영향받기 쉽기 때문에, 본 발명의 항-CEA 항체 또는 그 단편은 원발성암(primary cancer) 보다 전이암을 치료하는데 더 효과적일 수 있다. 본 발명의 치료 방법은 항체 및 효과적인 치료 섭생을 제공하는 하나 또는 그 이상의 다른 치료제의 적정(titration)을 허용함으로써 개인 환자를 위한 최대 항-종양 활성을 제공하기 위하여 가장 효과적인 치료 계획을 제공한다.

본 발명의 한 관점에서, III종 항-CEA 항체 자체 또는 그 단편 및 치료제는 항체 자체 또는 컨주게이트된 인간화된, 무린, 키메라 또는 인간 항체, 융합 단백질 또는 그 단편과 같이 적어도 하나 이상의 부가적 치료제와 함께 보충될 수 있다. 예를 들면, 블로킹되지 않고 과립구 또는 CD66a-d에 결합하지 않는 또 다른 III종 CEA 항체 또는 항체 단편; 블로킹되지 않고 과립구 또는 CD66a-d에 결합하지 않는 II종 항-CEA 항체 또는 항체 단편; CD66a, b 및 d와 반응하고 CD66c와는 반응하지 않는 II종 항-CEA Mabs 또는 그 단편; CD66c뿐만 아니라 CD66a, b 또는 d와 반응하는 I종 Mabs 또는 그 단편

(CD66c와 결합하는 I 종 MAb로 정의); 또는 다른 암종 관련 에피토프 또는 항원에 대항하는 항체는 바람직한 인간화된 MN-14 항체와의 조합 치료를 위한 치료제로 사용될 수 있다. 이러한 부가적 항체, 융합 단백질 또는 그 단편은 아래에서 보다 상세히 기재된 CEA, 또 다른 암 또는 종양 관련 항원과 결합할 수 있다.

2. 용어정의

이어지는 설명에서, 많은 수의 용어들이 사용되었고, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 상기 용어들을 아래와 같이 정의하였다.

본 발명에 기재된 "항체"는 온-길리(자연적으로 발생하거나 또는 정상 면역글로불린 유전자 단편 재조합 과정에 의해 생성된 것이다) 면역글로불린 분자(IgG 항체 등) 또는 면역글로불린 분자의 면역적인 활성(특이적으로 결합) 부분, 이러한 항체의 단편을 말한다.

"항체 단편"은 F(ab')₂, F(ab)₂, Fab', Fab, Fv 및 scFv(단일쇄 Fv)와 같은 항체의 일부이다. 구조에 관계없이, 항체 단편은 온전한 항체에 의해 인지되는 동일 항원과 결합한다.

또한 용어 "항체 단편"은 복합체를 생성하기 위하여 특이 항원과 결합하여 항체와 같은 역할을 하는 어떤 합성적 또는 유전적으로 제조한 단백질을 포함한다. 예를 들면, 항체 단편은 중쇄 및 경쇄의 가변 영역을 구성하는 "Fv" 단편; 경쇄 및 중쇄 가변 영역이 펩티드 링커("scFv 단백질")에 의해 연결되는 재조합 단일쇄 폴리펩티드 분자; 및 과가변 영역(hypervariable region)에 흡사한 아미노산 잔기로 이루어진 최소 인지부와 같이 가변 영역을 구성하는 분리 단편을 포함한다. Fv 단편은 다가 및/또는 멀티특이성 결합 형태를 얻기 위하여 다른 방법으로 구성될 수 있다. 전자인 다가의 경우에는 CEA 에피토프에 대항하는 하나 이상의 결합 부위와 반응하지만, 멀티특이성의 경우에는 하나 이상의 에피토프(CEA의 또는 CEA에 대항하는 것 중 하나 및 다른 항원)에 결합한다.

본 명세서에 기재된 용어 "항체 구성성분"은 전체 항체, 융합 단백질 및 그 단편을 포함한다.

"항체 자체"는 일반적으로 치료제에 컨쥬게이트되지 않는 순수한 항체를 말한다. 항체 분자의 Fc 부분이 보체 고착 및 ADCC(항체 의존성 세포 독성) 등의 작동체 기능을 제공하기 때문에, 항체 자체가 세포를 용해하는 활성으로 대사한다. 그러나, Fc 부분은 치료적 기능을 요구하지 않지만, 세포자가사멸, 항-혈관신생, 항-전이 활성, 이형타입 또는 동형타입의 부작을 억제하는 항-부작 활성 및 신호경로 방해와 같은 다른 대사작용으로 인한 이들의 치료적 효능에 영향을 미친다. 항체 자체는 키메라, 인간화된 또는 인간 항체 및 그 단편과 같은 특정 재조합 항체뿐만 아니라 무인 항체를 포함하는 다클론 및 단클론 항체 및 그 단편을 모두 포함한다. 본 발명에서 정의된 바와 같이, "항체 자체"는 "컨쥬게이트되지 않은"과 동의어이며, 투여될 때 치료제와 결합 또는 컨쥬게이트되지 않는 것을 의미한다.

"키메라 항체"는 하나의 종에서 유래되는 항체, 바람직하게는 설치류 항체의 상보성 결정 영역(complementarity determining regions; CDRs)을 포함하는 중쇄 및 경쇄의 가변 도메인을 포함하는 재조합 단백질이며, 반면에 항체 분자의 특정 도메인은 인간 항체로부터 유래된다. 수의사가 이용할 경우, 상기 키메라 항체의 특정 도메인은 고양이 또는 개와 같은 다른 종으로부터 유래될 수 있다.

"인간화된 항체"는 하나의 종에서 유래된 항체의 CDRs를 가지는 재조합 단백질이고, 설치류 항체를 예로 들면, 설치류 항체의 중쇄 및 경쇄 가변 사슬을 인간의 중쇄 및 경쇄 가변 도메인으로 전달시킨 재조합 단백질이다. 항체 분자의 특정 도메인은 인간 항체로부터 유래된 것이다.

"인간 항체"는 항원 면역성검사에 반응하는 특이 인간 항체를 제조하기 위해 "제작"된 형질전환 쥐로부터 획득한 항체이다. 이러한 기술에서, 인간 중쇄 및 경쇄 유전자좌들(locus)의 성분은 내생적인 중쇄 및 경쇄 유전자좌(loci)의 표적화된 분열을 가지는 배아 줄기 세포주에서 유래된 쥐의 세포주로 도입된다. 상기 형질전환 쥐는 인간 항원에 특이적인 인간 항체를 합성할 수 있으며, 인간 항체를 분비하는 하이브리도마를 제조하는데 사용할 수 있다. 형질전환 쥐로부터 인간 항체를 획득하는 방법은 Green *et al.*, *Nature Genet.* 7: 13 (1994), Lonberg *et al.*, *Nature* 368: 856 (1994), 및 Taylor *et al.*, *Int. Immun.* 6:579 (1994)에 기재되어 있다. 또한 온전한 인간 항체는 파지 전사 기술(phage display technology) 및 유전자 또는 염색체 형질감염 방법 등 당업계에 알려진 방법에 의해 제작된다. 생체 밖에서 비면역화된 도너(donor)에서 유래하는 면역글로불린 가변 도메인 유전자로부터 인간 항체 및 그 단편을 제조하는 방법은 McCafferty *et al.*, *Nature* 348: 552-553 (1990)를 참고한다. 상기 기술에서, 항체 가변 도메인 유전자는 필라멘트 박테리오파지의 주요한 또는 부수적 외피단백질(coat protein) 유전자의 프레임내에서 클론화되고, 파지 입자의 표면에서 기능성 항체 단편으로 전시된다. 필라멘트 입자는 파지 게놈의 단일 가닥 DNA 복사본을 포함하기 때문에, 항체의 기능적 특성에 기초한 선택은 이러한 특성을 보이는 항체를 인코딩하는 유전자의 선택으로 인한 것이다. 이런 방법으로 파지는 B 세포의 일부 특성을 모방한다. 파지 전시는 전체 구성의 다양성으로 수행될 수 있으며, Johnson and Chiswell, *Current Opinion in Structural Biology* 3: 5564-571 (1993)에 개시되어 있다.

또한, 인간항체는 생체 밖에서 활성화된 B 세포에 의해 생성될 수 있다. 미국특허 제5,567,610호 및 제5,229,275호 참조, 본 명세서에서 전체를 참고문헌으로 통합하여 수록하였다.

"치료제"는 항체 또는 항체 단편 또는 하부단편과 같은 항체의 부분과 개별적으로, 동시에 또는 순차적으로 투여되거나 또는 항체의 부분에 컨쥬게이트되는 분자 또는 원자이며, 질병을 치료하는데 이용된다. 치료제의 예로는 항체, 항체 단편, 면역조절제, 약물, 세포독성 제제, 독소, 뉴클라아제, 호르몬, 면역조절제, 길레이터, 봉소 화합물, 광활성 제제 또는 염료 및 방사성동위원소 또는 방사성핵종, 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 면역컨쥬게이트 또는 이들의 조합을 포함한다.

"면역컨쥬게이트"는 치료제와 컨쥬게이트되는 항체 구성성분이다. 적절한 치료제는 상기에 기재된 것이다.

본 명세서에 기재된 용어 "항체 융합 단백질"은 같은 또는 다른 종인 둘 이상의 같은 또는 다른 단일사슬 항체 또는 항체 단편 부분이 연결되도록 재조합하여 제조한 항원 결합 분자를 말한다. III종 항-CEA 융합 단백질은 적어도 하나 이상의 CEA 결합 부위를 포함한다. 바람직하게는, III종 항-CEA 융합 단백질은 MN-14 융합 단백질이다.

융합 단백질의 원자가는 일가, 이가, 삼가 또는 다가와 같이, 융합 단백질이 단일 항원 또는 에피토프에 결합하는 결합 암 (arm) 또는 부위의 수를 나타낸다. 항체 융합 단백질의 다가는 항원에 결합하는 다수의 상호작용의 이점을 가지고, 항원 또는 다른 항원에 결합하려는 욕구를 증가시킨다. 특이성은 일특이성, 양특이성, 삼특이성, 멀티특이성과 같이 항체 융합 단백질이 다른 타입의 항원 또는 에피토프에 얼마나 많이 결합할 수 있는지를 의미한다. 이들 정의에 사용하는 천연 항체, 예로 들면, IgG는 두 개의 결합 팔(arm)을 가지고 있기 때문에 이가이지만, 항원 또는 에피토프의 하나의 타입에만 결합하기 때문에 일특이성이다. 일특이성, 다가 융합 단백질은 동일한 항원 또는 에피토프에 대하여 하나의 이상의 결합 부위를 가진다. 예를 들면, 일특이성 디아바디는 동일한 항원과 반응하는 두 개의 결합 부위를 가지는 융합 단백질이다. 융합 단백질은 다른 항체 구성성분 또는 동일한 항체 구성성분의 멀티플 복제물의 다가 또는 멀티특이성 조합을 포함한다. 예를 들면, 본 발명의 융합 단백질은 멀티특이성이 될 수 있고, 여기에서 융합 단백질(scFv 또는 Fab)의 하나의 팔은 CD66e를 표적하는 III종 항-CEA MAb이고, 융합 단백질의 또 다른 팔은 CD66a-d를 표적하는 또 다른 EA 교차반응 항체에서 유래한다.

본 발명에 의한 바람직한 양특이성 융합 단백질은 III종 CEA 에피토프에 대항하는 하나의 팔 및 과립구에서 발현되는 CD66a-d 에피토프(II종)에 대항하는 두 번째 팔을 가진다. 이들 구현예에서, CD66a-d 결합 부분은 보체를 고정할 수 없거나 또는 ADCC(과립구로부터 사이토카인을 방출하여 생성)를 초래하는 Fc-수용체에 결합할 수 없다. 보체고정 및 ADCC 초래가 본 발명의 항체 자체 치료 구현예들을 위해 바람직한 특성일지라도, 양특이성 융합 단백질과 관련된 본 발명의 구현예의 상황에서는 피해야 한다. 정상 결장 세포 NCA-50/90 및 CEA가 모두 발현되지만, 정상 상피세포의 정점 표면에서 제한되며, 상기 표면은 결장 내강(lumen)에서만 나타나고 주입된 항체에 영향을 받지 않는다. CEA처럼 이들 정상 세포에서 방출되는 또는 사멸된 정상 세포에 결합하는 CEA는 침전물(feces)에서 제거된다. 이러한 극성(polarization)은 결합암 생성시 없어지고, 그런 다음 NCA-50/90 및 CEA 모두 정상 상피세포를 고정시키는 기본적인 정상 하부막을 침입하는 암세포 막에서 발현된다. hMN3/hMN14와 같은 양특이성 항체는 이들 침입 세포에서 CEA 및 NCA-50/90 모두와 반응한다. 더욱이, 과립구에 NCA50/90가 존재할 때, 이 양특이성은 침입 결장 암 세포를 사멸하기 위하여 과립구에 영향을 줄 것으로 예상된다. 이 구현예에 따른 보다 바람직한 구조체는 NCA50/90과 반응하는 하나의 팔 및 CEA와만 반응하는 두 개의 팔을 가지는 양특이성, 삼가 단백질이다. 또 다른 구현예는 NCA50/90에 결합하는 두 개의 팔들을 가지는 양특이성 단백질이 될 수 있다.

또한 과립구와 반응하는 바람직한 융합 단백질은 NCA-50/90(hMN-3)에 대항하는 하나의 팔 및 CEA(hMN14) 표면의 III종 에피토프에 대항하는 하나의 팔을 가지는 디아바디(diabody)가 될 수 있다. 이들 융합 단백질들은 Fc-도메인을 가지지 않아 과립구에서 방출되는 사이토카인을 활성화시킬 수 없다. 보다 더 바람직한 융합 단백질은 하나의 hMN-3 팔 및 두 개의 hMN14 팔들을 가지는 트리야바디(triabody)가 될 수 있다. 이러한 디아바디 및 트리야바디의 구조는 미국특허 제 60/404,919호(2002년 8월 22일 출원), 제 60/345,641호(2002년 1월 8일 출원), 제 60/328,835호(2001년 10월 15일 출원) 및 제 60/341,881호(2001년 12월 21일 출원)에 개시되어 있다.

또한 hMN14/NP-3 특이성 MAb와 함께 제조된 멀티특이성 항체의 어떠한 종류도 바람직하며 보체/활성 ADCC를 고정할 수 있는 Fc-도메인을 가질 수 있다. 예를 들면, hMN14-IgG1[NP-3-scFv]₂ 융합 단백질이 이용될 수 있다; 미국특허 제 09/337,756호에 제조방법이 기재되어 있다.

본 발명에 의한 멀티특이성 항체의 또 다른 바람직한 타입은 보체/효과-ADCC를 고정할 수 있는 능력이 결여된 Fc-도메인을 가지는 hMN-3 MAb이다.

상기 융합 단백질은 부가적으로 치료제를 포함한다. 예를 들면, CD66e 또는 이것의 scFv 또는 Fab를 표적하는 III종 항-CEA MAb와 같은 적어도 하나 이상의 항체 또는 그 단편은 본 명세서에 기재된 모든 인터페론과 같은 사이토카인; 또는 GM-CSF 또는 G-CSF와 같은 균제 자극 인자와 컨주게이트될 수 있다.

"면역조절제"는 인체의 면역 시스템에 존재하거나, 변형하거나, 억제하거나 또는 자극하는 본 발명에서 정의한 치료제이다. 일반적으로 본 발명에서 사용한 면역조절제는 대식세포(macrophage), B-세포 및/또는 T-세포들과 같이 면역 반응 연속단계에서 증식하거나 또는 활성화되는 면역 세포를 자극한다. 본 명세서에 기재된 면역조절제의 예로는 특이적 항원과 접촉하여 하나의 세포 군집(준비된 T-림프구)에 의해 방출되는 약 5-20 kDa의 가용성 작은 단백질이며, 세포들 사이에서 세포간 조절제로 행동하는 사이토카인을 들 수 있다. 당업자라면 알 수 있듯이, 사이토카인은 림프카인(lymphokines), 모노카인(monokines), 인터류킨 및 종양 괴사 인자(TNF) 및 인터페론과 같은 다양한 관련 신호 분자를 포함한다. 케모카인(chemokines)은 사이토카인의 부분집합이다. 특정 인터류킨 및 인터페론은 T-세포 또는 다른 면역 세포 증식을 자극하는 사이토카인의 예이다.

키메라, 인간화된 및 인간 항체를 포함하는 단클론 항체의 제조

단클론 항체(MAb)는 특정 항원에 대한 동질 집단(homogeneous population)이고, 상기 항체는 항원 결합 부위의 하나의 타입만을 포함하며 항원 결정에 의하여 하나의 에피토프에 결합한다. 특이 항원에 대한 설치류의 단클론 항체는 당업계에 잘 알려진 방법으로 획득할 수 있다. Kohler and Milstein, *Nature* 256: 495(1975) 및 Coligan *et al.*(eds.), CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY, VOL. 1, 2.5.1-2.6.7 쪽(John Wiley & Sons 1991)[이하 "Coligan"이라 한다] 참조. 간단하게, 단클론 항체는 항원을 포함하는 조성물을 쥐에 주사하는 단계, 혈청 검체를 제거하여 항체 생산의 유무를 확인하는 단계, B 림프구를 얻기 위하여 비장을 제거하는 단계, 하이브리도마를 제조하기 위해 B 림프구와 골수종 세포를 융합하는 단계, 하이브리도마를 클로닝하는 단계, 항원에 대한 항체를 생산하는 양성 클론을 선별하는 단계, 항원에 대한 항체를 생산하는 클론을 배양하는 단계, 및 배양한 하이브리도마로부터 항체를 분리하는 단계를 거쳐 제조할 수 있다.

MAbs는 다양하게 알려진 기술에 의해 배양한 하이브리도마로부터 분리 및 정제할 수 있다. 이러한 분리 기술은 단백질-A 세파로오스(Sephrose)를 이용한 친화성 크로마토그래피, 크기-배제 크로마토그래피(size-exclusion chromatography) 및 이온교환 크로마토그래피를 포함한다. Coligan의 2.7.1-2.7.12쪽 및 2.9.1-2.9.3 쪽 참조. 또한 Baines *et al.*, "Purification of Immunoglobulin G(IgG)", in METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, VOL. 10, 79-104 쪽(The Humana Press, Inc. 1992) 참조.

펩티드에 대한 항체는 항체 제조를 위한 공지된 방법에 의해 제조한다. 예를 들어, 면역원, 예컨대 (펩티드)_n-KLH(KLH는 키홀 림펫 헤모시아닌(keyhole limpet hemocyanin)이고, n = 1 내지 30 임)를 완전 프로인트 보조제(Freund's adjuvant)에 주사하고, 그 후 불완전 프로인트 보조제 내에 현탁된 동일한 면역원을 면역적격 동물에게 두 번 잇따라 주사한다. 상기 동물에게 항원의 최종 i.v. 부스트를 제공한 후, 3일 이후에 비장 세포를 수집한다. 그 후, 수집한 비장세포를 Sp2/0-Ag14 골수종 세포와 융합시키고, 직접 결합 ELISA(direct-binding ELISA)를 사용하여 생성되는 클론의 배양 상정액을 항-펩티드 반응에 대하여 분석한다. 초기 면역원의 펩티드 단편을 사용하여 생성된 항체에 대한 미세 특이성(fine specificity)을 분석할 수 있다. 이들 단편들은 자동 펩티드 합성기를 사용하여 용이하게 제조할 수 있다. 항체 생성을 위하여, 효소-결합 하이브리도마를 분리하여 융합 세포계의 선별을 가능하게 한다. 또한 상기 기술을 사용하여 항체를 링커, 예를 들어 In(III)-DTPA 킬레이트를 포함하는 하나 이상의 킬레이트에 이입할 수 있다. In(III)-di-DTPA에 대한 단클론적 항체는 공지되어 있다(미국특허 제5,256,395호, Barbet).

본 발명의 항체를 제조하는 또 다른 방법은 형질전환 가축의 우유에서 제조하는 것이다. Colman, A., *Biochem. Soc. Symp.*, 63:141-147, 1998; 미국특허 제5,827,690호 참조, 모두 전체를 참고문헌으로 통합하여 수록하였다. 두 개의 DNA 구조체는 각각 쌍을 이룬 면역글로불린 중쇄 및 경쇄를 인코딩하는 DNA 분절을 포함하도록 제조된다. 상기 DNA 분절은 포유동물 상피세포에서 우선적으로 발현되는 프로모터 서열을 포함하는 발현 벡터로 클론된다. 예를 들면, 토끼, 젖소 및 양 카제인 유전자, 젖소 α -락토글로불린(α -lactoglobulin) 유전자, 양 β -락토글로불린 유전자 및 쥐의 유장산 단백질 유전자에서 유래된 프로모터들을 들 수 있으나, 이에만 한정되는 것은 아니다. 바람직하게는, 삽입된 단편이 유방-특이적 유전자에서 유래한 동일한 기원의 유전자 서열에 의해 그것의 3' 측면에 위치한다. 이것은 폴리아데닐화(polyadenylation) 부위 및 전사 안정화 서열을 제공한다. 발현 카세트는 수정된 포유동물 난자의 전핵(pronuclei)으로 공동주입된 후 수령 암컷의 난자에 이식되고 잉태된다. 생후 자손은 서던(Southern) 분석으로 두 개의 형질전환 유전자의 존재가 스크린된다. 항체가 존재하기 위하여, 중쇄 및 경쇄 유전자 모두 동일한 세포에서 동시에 발현되어야 한다. 형질전환 암컷의 우유에서 당업계에 잘 알려진 표준 면역학적인 방법을 이용하여 항체 또는 항체 단편의 존재 및 기능(functionality)이 분석된다. 상기 항체는 당업계에 잘 알려진 표준 방법을 이용하여 우유에서 정제될 수 있다.

면역원에 대한 항체의 초기 이입 후, 단클론 항체들의 여러 가지 유전자는 하이브리도마 세포로부터 클론되고, 서열화되며, 순차적으로 재조합 기술에 의해 제조될 수 있다. 무린 면역글로불린 가변 도메인을 클로닝하는 일반적인 기술은 Orlandi *et al.*, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 86: 3833 (1989)에 공개되어 있으며, 본 명세서에서 전체를 참고문헌으로 통합하여 수록하였다. 무린 항체 및 항체 단편의 인간화 및 키메라화는 당업계에 잘 알려진 통상적인 기술로 수행하였다. 키메라 항체는 설치류 항체와 같은 동물의 한 종으로부터 유래된 CDRs를 포함하는 가변 도메인을 가지는 재조합 단백질인 반면에, 특정 도메인 등의 항체 분자의 나머지는 인간 항체로부터 유래된다. 인간화된 및 키메라화된 단클론 항체에서 유래되는 항체 구성성분의 이용은 무린 특정 영역의 면역원성과 관련된 잠재적인 문제들을 해결해 준다. 키메라 항체들을 제조하는 기술들은 당업계에 잘 알려져 있다. 예를 들어 보면, Leung *et al.*, *Hybridoma* 13: 469(1994)에는 LL2 단클론 항체인 항-CD22 항체의 V_K 및 V_H 도메인을 인코딩하는 DNA 서열을 각각 인간의 κ 및 IgG₁ 특정 영역 도메인과 조합하여 LL2 키메라를 제조하는 방법이 기재되어 있다.

또한 키메라 단클론 항체(MAb)는 키메라 MAb의 가변 도메인내 무린 FR의 서열을 하나 또는 그 이상의 다른 인간 FR과 교체하여 인간화될 수 있다. 특히, 인간화된 단클론 항체들은 인간 가변 도메인으로 쥐의 면역글로불린의 중쇄 및 경쇄 가변 사슬에서 유래하는 상보성 결정 영역을 전달한 다음, 무린 복제물의 구조 영역에서 인간 잔기를 치환하여 제조된다. 쥐의 CDRs가 인간 FRs로 간단히 전달되어 종종 항체 친화력의 감소 또는 손실이 발생하기 때문에, 무린 항체의 근본 친화력을 회복하기 위하여 부가적 조작이 요구된다. FR 영역내 하나 또는 그 이상의 인간 잔기를 그들의 무린 대조물과 교체되어 그것의 에피토프에 대한 우수한 결합 친화력을 가지는 항체를 획득할 수 있다. Tempest *et al.*, *Biotechnology* 9:266(1991) 및 Verhoeyen *et al.*, *Science* 239:1534 (1988) 참조.

바람직한 구현예에서, 인간화된 항-CEA 항체 또는 그 단편의 구조영역의 일부 인간 잔기들은 그들의 무린 복제물에 의해 교체될 수 있다. 부가적으로, 인간화된 항-CEA MAb의 최초 버전(version)일지라도 키메라 항-CEA가 결합 제작물인 그것의 무린 복제물과 비교할 만한 결합 친화력을 보이는 것을 아는 경우, 키메라 항-CEA의 경쇄 및 중쇄와 혼합하고 조화하여 동정될 수 있다. 바람직하게는, 인간화된 항-CEA 항체는 인간화된 MN-14 항체이며, 그 제조방법 및 서열은 미국특허 제5,874,540호에 개시되어 있고 본 명세서에서 전체를 참고문헌으로 통합하여 수록하였다. 두 개의 인간 항체인 REI 및 NEWMI 인간화된 및 키메라 MN-14 항체들을 제조하기 위한 바람직한 항체들이지만, 둘 또는 그 이상의 다른 인간 항체에서 유래하는 구조영역 서열의 조합이 V_H 및 V_K에 사용될 수 있다. 인간화된 MAbs를 생산하는 기술은 Jones *et al.*, *Nature* 321: 522(1986), Riechmann *et al.*, *Nature* 332: 323 (1988), Verhoeyen *et al.*, *Science* 239: 1534(1988), Carter *et al.*, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 89:4285 (1992), Sandhu, *Crit. Rev. Biotech.* 12: 437 (1992), 및 Singer *et al.*, *J. Immun.* 150:2844 (1993)에 기재되어 있으며, 본 명세서에서 각각을 참고문헌으로 통합하여 수록하였다. 특이적 에피토프에 대한 인간화된, 키메라 및 인간 MAb의 친화력은 CDRs의 돌연변이로 인해 증가될 수 있고, 항체의 낮은 복용량은 돌연변이 이전의 낮은 친화력 MAb의 높은 복용량으로 효과를 나타낼 수 있다. 국제공개특허 제WO0029584 A1호 참조.

또 다른 구현예에서, 본 발명의 항체는 인간 III종 항-CEA 단클론 항체이다. 항-CEA MAb 또는 다른 인간 항체는 형질전환 비-인간 동물에서 획득할 수 있다. Mendez *et al.*, *Nature Genetics*, 15: 146-156 (1997); 및 미국특허 제 5,633,425호를 참조, 본 명세서에서 전체를 참고문헌으로 통합하여 수록하였다. 예를 들면, 인간 항체는 인간 면역글로불린 유전자좌(loci)를 갖고 있는 형질전환 쥐로부터 회복될 수 있다. 바람직하게는 항-CEA 항체는 MN-14 항체이다. 쥐의 체액 면역 시스템은 내생의 면역글로불린 유전자를 불활성화하고, 인간 면역글로불린 유전자좌를 도입함으로써 인간화된다. 인간 면역글로불린 유전자좌는 매우 복잡하고 인간 게놈의 거의 0.2%를 차지하는 다수의 구별되는 단편들로 이루어진다. 형질전환 쥐가 항체의 적절한 레퍼토리를 생산하는지를 확인하기 위하여, 인간 중쇄 및 경쇄 유전자좌의 거대 단백질이 쥐의 게

놈으로 도입되어야 한다. 이는 생식세포주(germline) 배열에서 인간 중쇄 또는 경쇄 면역글로불린 유전자좌를 함유하는 효모 인조 염색체(yeast artificial chromosome, YAC) 형성을 시작으로 단계과정으로 수행한다. 각각의 삽입은 크기적으로 대략 1Mb이기 때문에 YAC 설계는 면역글로불린 유전자좌의 겹침 단편의 동족 재조합을 요구한다. 중쇄 유전자좌를 함유하는 하나와 경쇄 유전자좌를 함유하는 하나인 2개의 YAC는 쥐 배아줄기세포와 YAC-함유 효모 등혈질체(spheroblast)를 융합하여 쥐에 개별적으로 도입한다. 그런 다음 배아 줄기 세포 클론을 쥐의 배반포(blastocyst)로 미세 주입한다. 제조한 키메라 수컷을 그들의 생식세포주를 통해 YAC로 전달되는 능력으로 선별하고 무린 항체생성에 결핍된 쥐와 생식한다. 인간 중쇄 유전자좌를 함유하는 하나와 인간 경쇄 유전자좌를 함유하는 하나인 2종의 형질전환 혈통(strain)을 사육하여 면역화 반응에 대응하는 인간 항체를 생산하는 자손들을 제조한다.

또한, 재배열되지 않은 인간 면역글로불린 유전자는 마이크로셀-조정 염색체 전이기법(microcell-mediated chromosome transfer; MMCT)을 통해 쥐의 배아 줄기 세포(embryonic stem cell)로 도입될 수 있다. Tomizuka *et al.*, *Nature Genetics*, 16: 133(1997) 참조. 상기 방법론에서 인간 염색체를 함유하는 마이크로셀(microcell)은 쥐의 배아 줄기 세포와 융합된다. 형질전환된 염색체가 안정하게 보유되고, 성장한 키메라는 적합한 조직-특이적 발현을 나타낸다.

선택적으로, 본 발명의 항체 또는 항체 단편은 조합적 면역글로불린 라이브러리에서 분리된 인간 항체 단편으로부터 유도될 수 있다. Barbas *et al.*, *METHODS: A Companion to Methods in Enzymology* 2: 119(1991) 및 Winter *et al.*, *Ann. Rev. Immunol.* 12:433(1994) 참조. 전체를 참고문헌으로 통합하여 수록하였다. B-세포 불멸화(immortalization)에 의해 단클론 항체를 생성하는데 관련된 많은 어려움이 파지디스플레이(phage display)를 이용하여 *E. coli*에서 항체단편을 변형하고 발현함으로써 극복될 수 있다. 높은 친화력의 회복을 확실히 하기 위하여, 단클론 항체 조합 면역글로불린 라이브러리는 큰 레퍼토리 크기를 함유하여야 한다. 일반적인 전략은 역전사를 이용하여 cDNA를 합성하기 위해 면역화된 쥐의 림프구 또는 비장세포로부터 얻은 mRNA를 사용하는 것이다. 중쇄 및 경쇄 유전자는 PCR을 통해 개별적으로 증폭되고 파지 클로닝 벡터로 결합된다. 2개의 상이한 라이브러리가 생성되고, 하나는 중쇄 유전자를 함유하며 하나는 경쇄 유전자를 함유한다. 파지 DNA는 각 라이브러리로부터 분리되고, 중쇄 및 경쇄 서열은 함께 결합되며 조합 라이브러리를 형성한다. 각 파지는 중쇄 및 경쇄 cDNA의 임의의 쌍을 포함하고, *E. coli*의 전염은 감염세포에서 항체 사슬의 발현에 영향을 미친다. 대상 항원을 인지하는 항체를 동정하기 위하여, 파지 라이브러리를 도포하고 플라그(plaque)에 존재하는 항체 분자는 여과기로 전달한다. 여과물은 방사성 물질로 라벨된 항원과 함께 배양한 다음 세척하여 과량의 비결합된 리간드를 제거하였다. 자동방사성 그래프에서 방사성 점들은 항원에 결합된 항체를 포함하는 플라그를 나타낸다. 인간 면역글로불린 파지 라이브러리를 생성하는데 유용한 클로닝 및 발현벡터는 예를 들어, STRATAGENE 클로닝 시스템(La Jolla, CA)으로부터 얻을 수 있다.

하나의 구현예에서 본 발명의 항체들은 Hansen 등의 미국특허 제5,874,540호; Hansen *et al.*, *Cancer*, 74:3478(1993); Primus 등의 미국특허 제4,818,709호 및 Shively 등의 미국특허 제5,081,235호에 기재된 방법으로 제조되며, 이들의 전체를 참고문헌으로 통합하여 수록하였다.

항체 단편의 제조

III종 항-CEA 항체, 바람직하게는 MN-14 항체의 단편을 이용하는 것도 본 발명의 범주에 속한다. 본 발명의 III종 항-CEA 항체 또는 그 단편은 과립구 또는 CD66a-d에 결합하지 않는다. 특정 에피토프를 인지하는 항체 단편은 알려진 기술에 의해 제조할 수 있다. 예를 들면, 항체 단편들은 항체를 단백질 가수분해하거나 또는 그 단편을 코딩하는 DNA의 *E. coli*에서 발현하여 제조될 수 있다. 항체 단편은 F(ab')₂, Fab', Fab, Fv 및 scFv와 같이 항원에 결합하는 항체의 일부이며, 통상적인 방법으로 항체 전체를 펩신 또는 파파인 소화하여 획득할 수 있다.

예를 들면, 항체 단편은 F(ab')₂로 표시되는 100Kd 단편을 생성하기 위해 펩신과 항체를 효소분해하여 제조할 수 있다. 이 단편은 티올 환원제를 사용하여 더 분해할 수 있으며, 선택적으로 설피드릴(sulfhydryl)기를 위한 차단기가 다이설파이드 결합을 분해하여 50Kd Fab' 일가 단편을 제조한다. 선택적으로 파파인을 사용하는 효소 분해는 두 개의 일가 Fab 단편 및 하나의 Fc 단편을 직접 제조한다. 이러한 방법은 Goldenberg에 의한 미국특허 제4,036,946호 및 제4,331,647호에 기재되어 있으며, 본 발명에서 전체를 참고문헌으로 통합하여 수록하였다. 또한 Nisonoff *et al.*, *Arch Biochem. Biophys.* 89: 230(1960); Porter, *Biochem. J.* 73:119(1959), Edelman *et al.*, in *METHODS IN ENZYMOLOGY VOL. 1*, 422쪽 (Academic Press 1967), 및 Coligan 2.8.1-2.8.10쪽 및 2.10.-2.10.4쪽 참조.

일가 경쇄-중쇄 단편을 생성하기 위하여 중쇄를 분리하는 것과 같이 항체를 분해하는 다른 방법은 단편을 더 분해하거나, 또는 다른 효소적, 화학적 또는 유전적 기술을 사용할 수 있으며, 상기 단편은 항체 상호작용에 의하여 인지된 항원에 결합하기에 충분한 길이로 사용될 수 있다.

예를 들면, Fv 단편은 V_L 및 V_H 사슬의 결합을 포함한다. 이 결합은 Inbar *et al.*, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. U.S.A.* 69:2659(1972)에 기재된 바와 같이 비공결합이 될 수 있다. 선택적으로, 가변쇄들은 분자간 이황화물(disulfide) 결합 또는 글루타르알데히드(glutaraldehyde)와 같이 화학적으로 교차결합하여 결합될 수 있다. Sandhu, *Crit. Rev. Biotech.* 12:437 (1992) 참조.

바람직하게는, Fv 단편은 펩티드 링커에 의해 결합되는 V_H 및 V_L 사슬을 포함한다. 이들 단일쇄 항원결합 단백질(scFv)은 올리고뉴클레오타이드에 의해 결합되는 V_H 및 V_L 도메인을 인코딩하는 DNA 서열을 포함하는 구조 유전자를 구성하여 제조된다. 상기 구조 유전자는 *E. coli*와 같은 숙주세포에 순차적으로 도입되는 발현벡터에 삽입된다. 재조합 숙주 세포는 두 개의 V 도메인들을 결합하는 링커 펩티드와 단일 펩티드 사슬을 합성한다. scFv의 제조방법은 Whitlow *et al.*, *Methods: A Companion to Methods in Enzymology*, 2:97 (1991) 참조. 또한 Bird *et al.*, *Science* 242:423(1988), Ladner 등의 미국특허 제4,946,778호; 및 Pack *et al.*, *Bio Technology* 11:1271(1993) 및 상기의 Sandhu 참조.

항체 단편의 또 다른 형태는 단일 상보성 결정 영역(CDR)을 코딩하는 펩티드이다. CDR은 항체와 결합하고 가변 영역의 잔여부분 보다 더 많이 가변적인 에피토프에 구조적으로 상보적인 항체 가변 영역의 단편이다. 따라서, CDR을 때때로 고도 가변 영역(hypervariable regions)라고 일컫는다. 가변 영역은 세 개의 CDRs를 포함한다. CDR 펩티드는 대상 항체의

CDR을 인코딩하는 구조 유전자에 의해 제조할 수 있다. 이러한 유전자는 항체 생성 세포의 RNA로부터 가변 영역을 합성하는 중합효소연쇄반응을 이용하여 제조할 수 있다. Larrick *et al.*, *Methods: A Companion to Methods in Enzymology* 2: 106(1991); Courtenay-Luck, "Genetic Manipulation of Monoclonal Antibodies", in MONOCLONAL ANTIBODIES: PRODUCTION, ENGINEERING AND CLINICAL APPLICATION, Ritter *et al.*(eds.), 166-179쪽 (Cambridge University Press 1995); 및 Ward *et al.*, "Genetic Manipulation and Expression of Antibodies", in MONOCLONAL ANTIBODIES: PRINCIPLES AND APPLICATIONS, Birch *et al.*, (eds.), 137-185쪽(Wiley-Liss, Inc. 1995) 참조.

일가 경쇄-중쇄 단편을 생성하기 위하여 중쇄를 분리하는 것과 같이 항체를 분해하는 다른 방법은 단편을 더 분해하거나, 또는 다른 효소적, 화학적 또는 유전적 기술을 사용할 수 있으며, 상기 단편은 항체 상호작용에 의하여 인지된 항원에 결합하기에 충분한 길이로 사용될 수 있다.

치료를 위한 인간화된, 키메라 및 인간 항-CEA 항체

이하 치료를 위한 본 발명의 무린, 키메라, 인간화된 및 인간 III종 항-CEA 항체 및 그 단편을 사용하는 조성물 및 방법을 기재한다. 바람직하게는, III종 항-CEA 항체 또는 그 단편은 MN-14 항체 또는 그 단편이다. 본 발명의 항체들은 비-MTC CEA-발현 암종뿐만 아니라 갑상선 수질종양을 치료하는데 사용될 수 있다. 비-MTC CEA 발현 암종을 예로 들면, 결장직장암, 췌장암, 간세포암종, 위암, 폐암, 두경부(head-and-neck) 암, 비뇨기 방광암(膀胱癌; urinary bladder cancer), 자궁암(uterine cancer), 유방암 및 난소암을 포함한다.

조성물

다른 모든 구성성분과 컨쥬게이트되지 않고, 따라서 각 구성성분의 컨쥬게이트되지 않은 형태로 조성물이 존재하는 적어도 하나 이상의 III종 항-CEA 단클론 항체(MAb) 또는 그 단편 및 적어도 하나 이상의 치료제를 포함하는 조성물도 본 발명의 범주에 속한다. 하나 이상의 항체 또는 항체 단편을 포함하는 조성물에서, 두 번째 III종 항-CEA 항체와 같은 두 번째 항체는 차단되지 않는다(즉, 첫 번째 III종 항-CEA 항체 또는 그 단편의 결합을 차단하지 않는다).

하나의 구현예에서, III종 항-CEA 단클론 항체 또는 그 단편은 인간화된, 키메라 또는 온전한 인간이 되고, 여기에서 인간화된, 키메라 또는 온전한 인간 MAb는 무린 III종 항-CEA MAb의 III종 항-CEA 결합 특이성을 실질적으로 보유한다.

바람직한 구현예에서, III종 항-CEA 단클론 항체 또는 그 단편은 MN-14 항체 또는 그 단편이다. 바람직하게는, 상기 MN-14 단클론 항체 또는 그 단편은 무린 MN-14 단클론 항체의 상보성 결정 영역(CDRs)을 포함하며, 여기에서 MN-14 항체의 경쇄 가변 영역의 CDRs는 아미노산 서열 KASQDVGTSA를 포함하는 CDR1; 아미노산 서열 WTSTRHT를 포함하는 CDR2; 및 아미노산 서열 QQYSLYRS를 포함하는 CDR3를 포함하고; 및 III종 항-CEA 항체의 중쇄 가변 영역의 CDRs는 아미노산 서열 TYWMS를 포함하는 CDR1; 아미노산 서열 EIHPSSTINYAPSLKD를 포함하는 CDR2; 및 LYFGFPWFAY를 포함하는 CDR3를 포함한다. 또한 바람직하게는, 상기 MN-14 단클론 항체는 CEA와 반응하고, 정상 교차반응 항원(normal cross-reactive antigen, NCA) 및 태변항원(meconium antigen, MA)과는 반응하지 않는다. 그러나, 이들 교차반응 결정체에 대항하는 항체들은 MN-14 단클론 항체와의 조합과 같이 CEA-특이적 항체와의 조합 치료에 사용될 수 있다.

본 발명의 또 다른 구현예에서, MN-14 단클론 항체 또는 그 단편은 인간화된 또는 온전한 인간 MN-14 항체 또는 그 단편이다. 인간화된 MN-14 항체 또는 그 단편의 경쇄 및 중쇄 가변 영역의 구조 영역(FRs)은 무린 MN-14 단클론 항체에 대응하는 FRs로부터 치환된 적어도 하나 이상의 아미노산을 포함하는 것이 바람직하다. 더욱 바람직하게는, 인간화된 MN-14 항체 또는 그 단편은 상기에서 언급한 도 14A-C에 도시된 무린 중쇄 가변 영역(KLHuVhAIGA)의 아미노산 잔기 24, 28, 30, 48, 49, 74 및 94로 이루어진 군에서 선택된 무린 MN-14 항체에 대응하는 FR에서 유래하는 적어도 하나 이상의 아미노산을 포함한다. 또한 바람직한 인간화된 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열은 Hansen 등의 미국특허 제 5,874,540호에 기재되어 있으며, 전체를 참고문헌으로 통합하여 수록하였다. 또한 바람직하게는, 인간화된 중쇄 가변 영역은 도 14A-C에 도시된 KLHuVhAIG 및 KLHuVhAIGAY로 제작된 아미노산 서열을 포함한다. 또 다른 구현예에서, 인간화된 MN-14 항체 또는 그 단편은 무린 MN-14 경쇄 가변 영역에 대응하는 구조영역에서 유래하는 적어도 하나 이상의 아미노산을 포함한다. 가장 바람직하게는, 인간화된 MN-14 항체 또는 그 단편은 도 13A, 도 22A 또는 도 23A의 경쇄 가변 영역을 포함한다. 본 발명의 또 다른 구현예는 다른 모든 구성성분과 컨쥬게이트되지 않고, 따라서 각 구성성분이 컨쥬게이트되지 않은 형태로 조성물에 존재하는 키메라 MN-14 단클론 항체 또는 그 단편 및 적어도 하나 이상의 치료제를 포함하는 조성물에 관한 것이다. 바람직하게는, 키메라 항체 또는 그 단편은 도 13A, 도 22A 또는 도 23A에 도시된 무린 MN14 경쇄 가변 영역의 CDRs 및 도 14A-C, 도 22B 또는 도 23B에 도시된 무린 MN14 중쇄 가변 영역의 CDRs를 포함한다.

또한 본 명세서에 기재된 조성물은 약제학적으로 허용가능한 운반제 내에서 제형화되는 무린, 인간화된, 키메라 또는 인간 III종 항-CEA 항체 또는 그 단편 자체 및 치료제, 및 첫 번째 III종 항-CEA 항체 또는 그 단편의 결합을 차단하지 않는 두 번째 항체 자체 또는 컨쥬게이트된 III종 항-CEA 항체 또는 그 항체 단편을 포함한다. 즉, III종 항-CEA 항체 또는 그 단편들은 모두 다른 모든 구성성분들을 차단하지 않고, CEA(CD66e)에 결합하는 항체들 또는 그 단편들을 허용한다. 또한 조합치료에서 이용되는 것들뿐만 아니라 본 발명의 III종 CEA 항체 또는 그 단편은 과립구 또는 CD66a-d와 결합하지 않는다. 항체 자체로서 또는 본 발명에 의한 항체 단편의 III종 항-CEA 항체 자체를 가지는 면역컨쥬게이트의 구성성분으로서 조합 치료를 위해 적절한 다른 III종 항체들은 Kuroki *et al.*, *JP J. Cancer Res.*, 78(4):386(1987) 및 Hammarstrom(*Cancer Res.* 52(8):2329(1992))에 기재되어 있으며, 이들 또한 과립구 또는 CD66a-d와 결합하지 않는다.

부가적으로, 기타 항-CEA 항체, 예컨대 I종 또는 II종 항-CEA 항체가 그 자체이거나 접합된 형태로 본 발명의 III종 항-CEA MAb 항체와 함께 사용될 수 있다. 병용 치료를 위해 사용될 수 있는 상기 II종 항체 또는 항체 단편은 비-차단성이고 과립 백혈구 또는 CD66a-d에 결합하지 않지만 태변 항원(MA) 및 CEA와 반응한다. 예를 들어, 하나 이상의 키메라 또는 인간화된 II종 항-CEA 항체 또는 이의 단편, 예컨대 MN-6 또는 NP-3은 본 발명의 III종 항-CEA 항체 또는 이의 단편과

결합될 수 있다. 상기 두 항체는 CD66a-d 또는 과립 백혈구와 반응하지 않는다(Hansen 등, Cancer 1993 Jun 1; 71(11):3478-85). 다수의 공보는 CEA 및 상이한 성분의 CEA 유전자 패밀리를 인식하는 MAb을 개시하고, 예로서 문헌 [Thompson 등, J. Clin. Lab. Anal. 5:344(1991)]; [Kuroki 등, J. Biol. Chem. 266: 11810(1991)]; [Nagel 등, Eur. J. Biochem. 214:27(1993)]; [Skubits 등, J. Immunol 155:5382(1995)]; [Skubitz 등, J. Leukoc. Biol. 60:106(1996)]; 및 [Chem 등, Proc. Natl. Acad. Sci. 93:14851(1996)]가 있다.

또한, 제 2의 항체 또는 항체 단편은 미접합(그 자체)되거나 하나 이상의 치료제에 접합된다(면역컨쥬게이트). 면역컨쥬게이트는 치료제를 항체 성분에 간접적으로 접합시킴에 의해 제조될 수 있다. 일반적 기술은 문헌 [Shih 등, Int. J. Cancer, 41:832(1998)]; [Shih 등, Inh. J. Cancer, 46:1101(1990)]; 및 [Shih 등, 미국 특허 번호 제 5,057,313]에서 서술되어 있다. 일반적 방법은, 산화된 탄화수소 부분을 가지는 항체를 하나 이상의 유리 아민 관능기를 가지고, 다수의 약제, 독소, 킬레이터, 붕소 애드엔드(addend), 또는 기타 치료제로 로딩된 캐리어 폴리머와 반응시키는 것을 포함한다. 상기 반응은 최초의 Schiff 염기(이민) 결합을 생성하고, 상기 결합은 2차 아민과의 환원에 의해 최종 접합체를 생성함으로써 안정화된다. 바람직하게는, 치료를 위한 조성물 중 항-CEA 또는 이의 단편은 MN-14 항체 또는 이의 단편이다. 더 바람직하게는, MN-14 항체 또는 이의 단편은 인간화된다.

또한, 인간화, 키메라, 쥐과 또는 인간의 III종 항-CEA 항체 또는 이의 단편 자체 및 치료제, 및 접합되거나 미접합된 제 2의 항체 또는 이의 항체 단편이 본 발명에서 고려된다. 하나의 구현예에서, 제 2의 항체 또는 이의 단편은 하나 이상의 치료제에 미접합(자체)되거나 접합된다. 병용 치료를 위해 적합한 I종, II종 또는 III종이 아닌 항-CEA 항체 및 이의 단편은 암종 관련 항체 및 이의 단편을 포함하지만 이에 국한되지는 않는다. 암종 관련 항체 및 이의 단편의 예는 GP-1, EGP-2(예를 들어, 17-1A), MUC-1, MUC-2, MUC-3, MUC-4, PAM-4, KC4, TAG-72, EGFR, HER2/neu, BrE3, Le-Y, A3, A33, Ep-CAM, AFP, Tn, 톨슨-프레덴레이치(Thomson-Friedenreich) 항원, 종양 괴사 항원, VEGF, PIGF, 또는 기타 혈관 형성 항원, Ga 733, IL-6, 인슐린 유사 성장 인자-1, 테나신(tenascin), 피브로넥틴 또는 이의 배합물과 결합한다. 상기에서 기술된 바와 같이, CD66a, b 및 d에 결합하지 않는 비-차단성 II종 및 III종 항-CEA MAb 또는 과립 백혈구 또는 대안적으로 CD66a, b 및 d에 결합하는 II종 항-CEA MAb 및 CD66a, b 및 d 뿐만아니라 CD66c에 결합하는 I종 항-CEA MAb도 또한 III종 CEA 항체와 함께 사용될 수 있다. 또한, 병용 치료에 적절한 기타 항체 및 항체 단편은 종양원 표지자 또는 제품에 대한 항체, 또는 종양 맥관계 표지자, 예컨대 혈관 형성 인자에 대한 항체, 태반 성장 인자(Placental Growth Factor, PIGF), 및 특정 면역 반응 조절제에 대한 항체, 예컨대 CD40을 포함한다.

방법

또한 본 발명에서는 골수 갑상선 암종 및 비-골수 갑상선 암종의 치료 방법이 기술된다. 비-골수 갑상선 암종은 결장직장암 및 임의의 기타 CEA 발현 종양, 예컨대 이자암, 유방암, 간세포 암종, 난소암, 다양한 양의 CEA를 발현하는 특정 종류의 폐, 두경부(head-and-neck), 자궁내막, 간암을 포함한다. 상기 유형의 암 중 CEA 수준은 골수 갑상선 암종 내에 존재하는 것보다 훨씬 낮지만, CEA 수준이 충분히 높아서 III종 항-CEA 치료가 유효한 치료법을 제공하는 경우에 필요하다. 일반적 결장 점막은 약 100-500 ng/g 을 가지지만 조직의 약 5 mcg/gram의 수준에서 CEA를 발현하는 암종은 본 발명에서 기술되는 방법으로 처리하기에 적절하다.

예를 들어, 본 명세서에서는 치료적으로 유효한 양의 III종 항-CEA 단클론 항체 또는 이의 단편 및 하나 이상의 치료제, 및 제약학적으로 허용가능한 담체 중 임의의 제형물을, 동시에 또는 순서대로 환자에게 투여하는 것을 포함하는 골수 갑상선 암종 및 비-골수 갑상선 암종의 치료 방법이 고려된다. 바람직하게는, III종 항-CEA 단클론 항체 또는 이의 단편은 키메라, 쥐과, 인간화 또는 인간 항체이고, 여기서 키메라, 인간화, 쥐과, 또는 인간의 III종 항-CEA MAb는 실질적으로 쥐과 MAb의 III종 항-CEA 결합 특성을 가진다. 더 바람직하게는, III종 항-CEA 항체는 인간화된 항체이고, 가장 바람직하게는, 본 명세서 및 미국 특허 5,874,540에 기술되는 바와 같이 인간화된 MN-14 단클론 항체이다. 바람직한 치료제는 세포 독성제이고, 더 바람직하게는 알킬화제이며, 가장 바람직하게는 다카바진(DTIC)이다. 그러나 또다른 구현예에서, 치료제는 또한 DTIC가 아닐 수도 있다. 기타 종류의 항암 세포증식억제제 및 세포독성제, 예컨대 5-플루오로우라실, CPT-11(이는 또한 이리노테칸(irinotecan) 및 캄프토사(camptosar)로서 공지되어 있음) 및 옥살리플라틴(oxaliplatin)도 특히 결장직장암의 치료에서 항체와 함께 사용될 수 있다. 기타 암 종류에서 유효한 것으로 공지된 암 약제도 또한 본 명세서에서 제시된 항체 치료와 함께 사용하기 위한 좋은 후보이다.

또한 본 명세서에서는 치료적으로 유효한 양의 제 1의 III종 항-CEA 단클론 항체 또는 이의 단편 및 하나 이상의 치료제, 및 그 자체가거나 접합된 제 2의 인간화, 키메라, 인간, 또는 쥐과 단클론 항체 또는 이의 단편, 및 제약학적으로 허용가능한 담체 중 임의의 제형물을, 동시에 또는 순서대로 환자에게 투여하는 것을 포함하는 골수 갑상선 암종 및 비-골수 갑상선 암종의 치료 방법이 고려된다. 바람직하게는, 제 1의 III종 항-CEA MAb는 인간화된 MN-14 항체 또는 이의 단편이다. 하나의 구현예에서, 제 2의 항체 또는 이의 단편은 상기 기술된 바와 같은 TAG-72, EGFR, HER2/neu, MUC1, MUC2, MUC3, MUC4, EGP-1, EGP-2, AFP, Tn, IL-6, 인슐린 성장 인자-1, 또는 또다른 상기 종양 관련 항체와 반응하는 암종 관련 항체 또는 이의 단편이다. 또다른 구현예에서, 제 2의 항체 또는 이의 단편은 비 차단성이고 과립 백혈구 또는 CD66a-d와 결합하지 않는 상이한 III종 항-CEA 항체 또는 이의 단편일 수 있다.

또다른 구현예에서, 제 2의 항-CEA 항체는 Hammarstrom 및 Kuroki에서 기술되는 바와 같은, 과립 백혈구 또는 CD66a-d에 결합하지 않는 II종 항체 또는 이의 단편이다. 또다른 구현예에서, 상기 항체는 CD66a, b, 또는 d 뿐만아니라 CD66c와 반응하는 I종 MAb 또는 이의 단편을 포함한다. 항체 및 이의 단편은 서로 또는 치료제와 동시에 또는 연속적으로 투여될 수 있다. 하나의 구현예에서, 제 2의 항체 또는 이의 단편은 그 자체가거나 다른 치료제에 접합된다.

따라서, 본 발명은 쥐과, 인간화, 키메라 및 인간 항-CEA 항체 및 이의 단편 자체와 하나 이상의 치료제의 동시 또는 연속 투여, 또는 다중모형 치료(multimodal therapy)로서 투여하는 것을 고려한다. 본 명세서에서 기술되는 III종 항-CEA 항체 자체는 암세포의 하나 이상의 치료제에 대한 약제감수성을 증가시킬 수 있다. 예를 들어, 결장암 세포를 치료제, 예컨대 CPT-11, 5'-플루오로우라실(5-FU) 또는 옥살리플라틴의 이전에 또는 이와 동시에 본 명세서에서 기술되는 바와 같은 III종, 항-CEA 항체, MN-14 자체로 치료하는 것은 세포의 치료제, 예컨대 세포독성 약제에 대한 반응을 개선한다. 또한 III종, 항-CEA 항체 자체의 단독 또는 치료제와의 혼합 처치에 의한 상기 치료 방법은 항체 자체의 투여 또는 항체 자체와 하나 이상의 치료제의 투여 이전에 본 명세서에서 기술되는 바와 같은 면역 조절제의 투여에 의해 강화될 수 있다.

본 발명의 다중모형 치료는 미접합 또는 접합 항체, 미접합 또는 접합 융합 단백질, 또는 이의 단편의 투여를 부가하는, III종 항-CEA 항체 또는 이의 단편, 및 치료제에 의한 면역 치료를 포함한다. 예를 들어, 미접합 인간화, 키메라, 쥐과 또는 인간 MN-14 MAb 또는 이의 단편은 또다른 인간화, 쥐과, 키메라 또는 인간 III종 항-CEA 항체(예컨대 CEA 상의 상이한 에피토프에 대한 항체이고 과립 백혈구 또는 CD66a-d에 결합하지 않음), 또는 방사성 동위원소, 화학치료제, 시토킨, 효소, 효소제어제, 호르몬 또는 호르몬 대항제, 금속, 독소, 안티센스 올리고뉴클레오타이드(예를 들어, 항-bcl-2), 또는 이의 배합물과 접합된 인간화, 키메라, 쥐과 또는 인간 III종 항-CEA 항체 면역 접합체와 결합될 수 있다. 그러나, 병용 치료를 위한 III종 항-CEA 항체는 서로 비차단성이고 과립 백혈구 또는 CD66a-d에 결합할 수 없다. 바람직하게는, III종 항-CEA 항체 자체는 제 2의 그 자체이거나 접합된 항체, 융합 단백질, 또는 이의 단편과 연속적으로 또는 동시에 투여될 수 있다. 또한 바람직하게는, 병용 치료에서 사용하기 위한 항체 또는 항체 단편 중 하나는 인간화 MN-14 항체 또는 이의 단편이다. 부가적으로, 그 자체 이거나 접합된 항체, 융합 단백질 또는 이의 단편으로서 사용되는 제 2의 항체는 비차단성이고 과립 백혈구 또는 CD66a-d에 결합하지 않는 인간, 인간화, 키메라 또는 쥐과 II종 CEA 항체 또는 이의 단편일 수 있다. 본 구현예에 따른 항체의 바람직한 배합물은 효과기 기능이 없고, 보체를 활성화시키지 않으며 시토킨 배출을 유도하지 않는 교차 반응 항-CD66a-d 항체 자체를 포함한다. 또한, 교차 반응 항-CD66a-d Fab' 또는 F(ab')₂ 도 과립 백혈구를 손상시키지 않을 것이고, NP-3 유형의 III종 항-CEA MAb 또는 II종 항-CEA MAb와 함께 사용될 수 있다.

본 명세서에서 기술되는 방법에서, 환자는 하나 이상의 III종 항-CEA 항체 또는 이의 단편 자체를 치료제 이전, 이후 또는 이와 함께 투여받는다. 하나의 구현예에서, III종 항-CEA 항체는 전처리 세포로서 사용, 즉 치료제 이전에 투여된다. 바람직하게는, III종 항-CEA 항체는 치료제, 예컨대 5-FU 또는 CPT-11가 투여되기 적어도 한 시간 이전에 투여되는 MN-14 항체, 예컨대 인간화 MN-14(hMN-14)이다.

바람직하게는, 치료제는 표준 암 화학요법에서 사용되는 약물, 예컨대 난소암의 탁센 또는 플리타늄 약물, 플루오로우라실, CPT-11, 및 직장결장암의 옥살리플라틴 약물, 이자암 및 기타 암의 겐사이타빈(gemcitabine), 또는 유방암의 탁센 유도체이다. COX-2 저해제는 암 화학요법의 일반적 세포독성제와 함께 활성을 보여주는 또다른 종류의 체제를 나타내고, 본 발명에서 일부 사용될 수 있으나, CEA 항체 및 기타 암 관련 항체와 함께 결합될 수 있다. 임의로, 상기 약물은 상기 기술된 종류의 방사성 표지된 항체, CEA 항체 접합체 또는 기타 암종 관련 항체와의 방사성 접합체와 함께 사용될 수 있다. 또한 바람직하게는, III종 항-CEA 항체 또는 이의 단편은 MN-14 항체 또는 이의 단편이다. 더 바람직하게는, MN-14 항체 또는 이의 단편은 인간화된다.

바람직한 구현예에서, III종 항-CEA 항체 또는 이의 단편 자체는 다카바진(DTIC), 독소루빈, 시클로포스파미드 또는 빈크리스틴, 또는 이의 임의의 배합물과 동시에 또는 순차적으로(상기 약물의 투여 이전 또는 이후에) 투여된다. 예를 들어, DTIC 및 시클로포스파미드는 III종 항-CEA 항체 또는 이의 단편 자체와 동시에 또는 순차적으로 투여될 수 있다. 바람직하게는, 항-CEA 항체 또는 이의 단편은 인간화 MN-14 항체 또는 이의 단편이다. 유사하게는, 폴린산과 단독으로 배합되거나, 이리노테칸(CPT-11)과 함께, 또는 옥살리플라틴과 함께 배합된 5-플루오로우라실은 직장결장암 치료를 위해 사용되는 요법이다. 기타 적절한 배합 화학요법, 예컨대 옥살리플라틴 단독, 또는 기타 약물과의 배합물이 당업자에게 잘 공지되어 있다. 따라서, 상기 임의의 화학요법제 및 III종 항-CEA 항체 또는 이의 단편 자체가 사용되어, 사용된 요법에 따라서 MTC 또는 비-MTC를 치료할 수 있다. 골수 감소성 암종에서 기타 화학요법제, 예컨대 알킬화제(예를 들어, DTIC), 및 겐사이타빈 및 기타 더 최근 유형의 화학독성제가 바람직하다. 화학요법제 및 III종 항-CEA 항체 또는 이의 단편 자체는 순서대로 또는 함께 투여될 수 있다. 즉, 항체 및 치료제는 동시에 또는 연속적으로 투여될 수 있다. 바람직한 다중모형 치료에서, 화학요법제 및 III종 항-CEA 항체 또는 이의 단편 자체 모두가 본 발명에 따른 접합 또는 미접합 항-CEA 항체, 융합 단백질, 또는 이의 단편 이전, 이후 또는 이와 함께 투여된다. 바람직하게는, III종 항-CEA 항체 또는 이의 단편은 인간화 MN-14 항체 또는 이의 단편이다.

다중모형 치료의 바람직한 치료 일정은 hMN-14 및 DTIC 모두를 3일 동안 투여하고, hMN-14만을 7, 14, 21일 쯤 및 그 후 12달의 치료 기간 동안 매 21일 마다 투여한다. hMN-14의 투여량은 주입 당 0.5-15 mg/kg 체중, 더 바람직하게는 2-8 및, 특히 더 바람직하게는 주입 당 3-5 mg/kg이고, DTIC의 투여량은 의학적으로 바람직한 투여량으로 현재 투여되는 바와 같으나, 또한 최대 바람직하게 사용되는 투여량의 2/3 이하로 제공되어 약물 관련 부작용을 감소시킬 수 있다. 반복되는 약물 주기가 예컨대 매 1-6 달 동안, 환자에 대한 독성이 병용 치료에 의해 강화되지 않도록 각각의 투여량이 조절된다. 항체 자체 치료의 지속, 또는 상이한 일정의 방사성 표지된 항체, 약물 접합 항체, 및 특정 시토킨, 예컨대 G-CSF 및/또는 GM-CSF와 함께 제공된다. 시토킨 성장 인자, 예컨대 G-CSF의 적용은 투여될 골수억제제, 예컨대 방사성 표지된 항체 또는 세포독성제의 더 높은 투여량을 가능하게 할 것이고, 상기 일정 및 투여량은 환자의 질병 상태 및 이전 치료 경험, 모든 영향 골수 상태 및 부가적 세포독성제에 대한 내성에 따라서 환자 개개인에 대해 조절될 것이다. 바람직한 구현예에서, MN-14 항체 또는 이의 단편은 주입 당 투여량 당 100-600 밀리그램 단백질의 사용량으로 투여된다. 더 바람직하게는, MN-14 항체 또는 이의 단편은 주입 당 투여량 당 300-400 밀리그램 단백질의 사용량으로 투여되고, 반복된 투여가 바람직하다. 바람직한 항체 투여 일정은 질병의 정도 및 환자의 혈액 내에서 순환하는 CEA의 양을 포함하는 다수의 인자에 따라서, 매주 1회 주입하거나, 덜 빈번하게, 예컨대 2주 또는 3주에 한번씩 주입한다.

치료제

본 명세서에서 언급되는 치료제는 본 명세서에서 기술되는 바와 같은 항체 자체와는 별도로 투여하기에도 유용한 체제이다. 적절한 치료제는 세포독성제, 독소, 호르몬, 방사성 핵종, 면역조절제, 감광성 치료제(예컨대 크로마젠 또는 염료), 안티센스 뉴클레오타이드, 면역억제제, 또는 항체 자체, 호르몬, 또는 이의 배합물로 이루어지는 군으로부터 선택될 수 있다. 치료제는 예를 들어 화학요법제, 예컨대 빈카 알칼로이드 및 기타 알칼로이드, 안트라시클린, 에피도필로톡신, 탁센, 대사길항제, 알킬화제, 항생제, COX-2 저해제, 항유사분열제, 혈관형성 저해제 및 세포사멸제, 특히 독소루비신, 메토트렉세이트, 탁솔, CPT-11, 캄포테칸, 및 상기 및 다른 항암제로부터의 기타 체제 등을 포함할 수 있다. 면역억제제 및 항체 융합 단백질의 제조를 위한 기타 유용한 암 화학요법제는 질소 겨자, 알킬 설포네이트, 니트로소우레아, 트리아젠, 옥살리플라틴, 엽산 유사체, COX-II 저해제, 피리미딘 유사체, 퓨린 유사체, 백금 동등 복합체, 호르몬, 독소(예를 들어, RNase, 수도모나스 외독소) 등을 포함한다. 바람직한 치료제는 치료되는 악성에 따라서, DTIC, CPT-11, 5-플루오로우라실, 탁솔, 옥살리플라틴, 독소루비신, 시클로포스파미드 및 빈크리스틴 또는 이의 배합물을 포함한다. 적절한 화학요법

제는 문헌 [REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCE, 19th Ed.(Mack Publishing Co. 1995)], 및 [GOODMAN AND GILMAN'S THE PHARMACOLOGICAL BASIS OF THERAPEUTICS, 7th Ed.(MacMillan Publishing Co. 1985)], 및 상기 공보의 교정판에서 기술된다.

독소, 예컨대 수도모나스 외독소도 III종 항-CEA 항체 또는 이의 단편 자체와 함께 투여될 수 있다. 바람직하게는, III종 항-CEA 항체 또는 이의 단편은 인간화 MN-14 항체 또는 이의 단편이다. III종 항-CEA 항체 또는 이의 단편 자체의 이전, 이후, 또는 동시에 투여되는 이에 미접합된 기타 적절한 미생물, 식물 또는 동물 독소는 리신, 아브린, 리보뉴클레아제(RNase), DNase I, 스태필로코칼(*Staphylococcal*) 장독소-A, 미국자리공 항바이러스성 단백질(pokeweed antiviral protein), 젤로닌, 디프테린 독소, 수도모나스 외독소 및 수도모나스 내독소를 포함한다. 예를 들어 문헌 [Pastan 등, Cell 47:641(1986)], 및 [Goldenberg, CA-A Cancer Journal For Clinicians 44:43(1994)]가 참조된다. 본 발명에서 사용하기 위한 부가적인 독소는 당업자에게 공지되어 있고 미국 특허 제 6,077,499호에서 개시되며, 이는 본 명세서에서 참고문헌으로서 도입된다. 이들은, 예를 들어, 동물, 및 미생물원, 또는 화학적 또는 재조합 공정을 거쳐 유도된다. 독소는 식물, 미생물, 또는 동물 독소이거나, 이들의 합성 변형물일 수 있다.

또한, 면역조절제, 예컨대 시토카인이 본 발명의 미접합 키메라, 쥐과, 인간화 또는 인간 II종 항-CEA 항체 또는 이의 단편에 투여될 수 있다. 본 명세서에서 사용되는 경우, 용어 "면역조절제"는 시토카인, 줄기 세포 성장 인자, 림프독소, 예컨대 종양 괴사 인자(TNF), 및 조혈 인자, 예컨대 인터루킨(예를 들어, 인터루킨-1(IL-1), IL-2, IL-3, IL-6, IL-10, IL-12, IL-18 및 IL-21), 세포군 자극 인자(예를 들어, 과립 백혈구-세포군 자극 인자(G-CSF) 또는 과립구 대식세포-세포군 자극 인자(GM-CSF)), 인터페론(인터페론- α , - β 및 - γ)이며, "SI 인자"로 지시되는 줄기 세포 증식 인자, 적혈구 생성 인자, 트롬보포이에틴을 포함한다. 적절한 면역조절제 부분의 예는 IL-2, IL-6, IL-10, IL-12, IL-18, IL-21, 인터페론- γ , TNF- α 등을 포함한다. 따라서, 환자는 III종 항-CEA 항체 또는 이의 단편 자체를 투여받고, III종 항-CEA 항체 또는 이의 단편 자체의 투여 이전, 동시 또는 이후에 투여될 수 있는 시토카인을 별도로 투여받는다. 일부 항원이 또한 면역조절제일 수 있으므로, CD40 항원은, 예를 들어 항체 자체 또는 항체 배합물의 투여와 함께, 그 이전 또는 이후에 III종 항-CEA 항체 또는 이의 단편 자체와 함께 투여될 수 있다. 부가적으로, 질병 조직의 치료에 적절한 방사성 핵종은 ^{32}P , ^{33}P , ^{47}Sc , ^{59}Fe , ^{64}Cu , ^{67}Cu , ^{75}Se , ^{77}As , ^{89}Sr , ^{90}Y , ^{99}Mo , ^{105}Rh , ^{109}Pd , ^{111}Ag , ^{125}I , ^{131}I , ^{142}Pr , ^{143}Pr , ^{149}Pm , ^{153}Sm , ^{161}Tb , ^{166}Ho , ^{169}Er , ^{177}Lu , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{189}Re , ^{194}Ir , ^{198}Au , ^{199}Au , ^{211}Pb , ^{212}Pb 및 ^{213}Bi , ^{58}Co , ^{67}Ga , $^{80\text{m}}\text{Br}$, $^{99\text{m}}\text{Tc}$, $^{103\text{m}}\text{Rh}$, ^{109}Pt , ^{111}In , ^{119}Sb , ^{125}I , ^{161}Ho , $^{189\text{m}}\text{Os}$, ^{192}Ir , ^{152}Dy , ^{211}At , ^{212}Bi , ^{223}Ra , ^{219}Rn , ^{215}Po , ^{211}Bi , ^{225}Ac , ^{221}Fr , ^{217}At , ^{213}Bi , ^{88}Y 및 ^{255}Fm 을 포함하지만 이에 국한되는 것은 아니다. 또한 바람직하게는, 방사성 핵종은 20 내지 10,000 keV의 에너지를 가진다.

제약학적으로 허용가능한 담체

환자에게 주입될 쥐과, 인간화, 키메라 및 인간의 III종 항-CEA MAbs 자체는 하나 이상의 제약학적으로 허용가능한 담체, 하나 이상의 부가적 성분, 또는 이들의 배합물을 포함할 수 있다.

본 발명의 미접합 III종 항-CEA 항체 및 이의 단편은 공지된 방법에 따라 제형화되어 제약학적으로 유용한 조성물을 제조할 수 있다. 바람직하게는, III종 항-CEA 항체 또는 이의 단편은 MN-14 항체 또는 이의 단편이다. 무균 인산-완충된 염수가 제약학적으로 허용가능한 담체의 하나의 예이다. 기타 적절한 담체는 당업자에게 잘 공지되어 있다. 예를 들어 문헌 [Ansel 등, PHARMACEUTICAL DOSAGE FORMS AND DRUG DELIVERY SYSTEMS, 5th Edition(Lea & Febiger 1990)], 및 [Gennaro(ed.), REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 18th Edition(Mack Publishing Company 1990)], 및 이의 교정판이 참조된다.

본 발명의 미접합 III종 항-CEA 항체 또는 이의 단편은 예를 들어 일시 또는 연속 주입을 통한 정맥내 투여를 위해 제형화될 수 있다. 바람직하게는, III종 항-CEA 항체 또는 단편은 MN-14 항체 또는 이의 단편이다. 주입용 제형물은 첨가된 방부제와 함께, 예를 들어 앰플 또는 다중-투여 컨테이너 내에서 단위 투여 형태로 제공될 수 있다. 조성물은 오일 또는 수성 담체 중의 현탁액, 용액 또는 에멀전과 같은 형태일 수 있고, 현탁제, 안정화제 및/또는 분산제와 같은 제형화 제제를 포함할 수 있다. 대안적으로, 활성 성분은 적절한 담체, 예를 들어 무균의 발열원이 없는 물에 의해 사용 전에 분말 형태로 만들어질 수 있다.

부가적인 제약학적 방법이 사용되어 제제 및 항체 자체 또는 이의 단편의 활성의 지속 시간을 제어할 수 있다. 제어 방출 제제가 중합체의 사용을 통해 복합체로 제조되거나 항체 자체를 흡수할 수 있다. 예를 들어, 생물 친화성 중합체는 폴리(에틸렌-코-비닐 아세테이트)의 매질 및 스테아르산 이합체 및 세박산의 폴리엔히드라이드 코폴리머의 매질을 포함한다(문헌 [Sherwood 등, Bio/Technology 10:1446(1992)]). 상기 매질로부터의 항체 또는 이의 단편의 방출 속도는 면역컨쥬게이트 또는 항체의 분자량, 매질 내 항체의 양, 및 분산된 입자의 크기에 의존한다(문헌 [Saltzman 등, Biophys. J. 55:163(1989); Sherwood 등, supra]). 기타 고체 투여 형태가 문헌 [Ansel 등, PHARMACEUTICAL DOSAGE FORMS AND DRUG DELIVERY SYSTEMS, 5th Edition(Lea & Febiger 1990)], 및 [Gennaro(ed.), REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 18th Edition(Mack Publishing Company 1990)], 및 이의 개정판에서 기술된다.

또한, 미접합 III종 항-CEA 항체 또는 이의 단편은 포유류의 피하로 또는 기타 비경구 경로로 투여될 수 있다. 더욱이, 투여는 연속 주입에 의한 것이거나 일회 또는 여러번의 환약 투여일 수 있다. 일반적으로, 투여되는 인간에 대한 항체 자체 또는 이의 단편의 투여량은 환자의 나이, 체중, 키, 성별, 일반적 의료 조건 및 이전의 병력에 따라서 다양할 것이다. 일반적으로, 1회의 정맥내 주입시 약 0.5 mg/kg 내지 20 mg/kg 범위로 항체 자체 또는 이의 단편의 투여량을 환자에게 제공하는 것이 바람직하지만, 더 적거나 더 많은 투여량도 상황에 따라 투여될 수 있다. 상기 투여는, 예를 들어 1 내지 10달 동안 1달에 1회, 바람직하게는 16주 동안 2주에 1회, 및 더 바람직하게는 8주 동안 1주에 1회 필요에 따라 반복될 수 있다. 또한, 이들은 덜 빈번하게, 예컨대 몇 달 동안 2주에 1회 투여되거나, 더 자주 투여될 수 있고/있거나 더 긴 지속 시간 동안 투여될 수 있다. 투여는 투여량 및 일정의 적절한 조절과 함께 각종 비경구 경로를 통해 제공될 수 있다.

치료를 위하여, III종 항-CEA 항체 또는 이의 단편은 치료적으로 유효한 양으로 포유 동물에게 투여되어 치료되지 않은 대조군과 비교시 종양의 크기를 감소시킬 수 있다. 바람직하게는, III종 항-CEA 항체 또는 이의 단편은 인간화 MN-14 항체 또는 이의 단편이다. 본 발명에 대한 적절한 환자는, 비록 인간이 아닌 포유 동물 또는 동물 대상도 고려될 수 있지만 일

반적으로 인간이다. 항체 제제는 투여량이 생리학적으로 상당하다면 "치료적 유효량"으로 투여되는 것으로서 언급된다. 제제는 그의 존재로 인하여 수용자 포유 동물의 생리 기능에 있어서 탐지가능한 변화를 일으킨다면 생리학적으로 상당한 것이다. 특히, 본 발명의 항체 제제는 이의 존재가 항종양 반응을 야기한다면 생리학적으로 상당한 것이다. 생리학적으로 중요한 효과는 또한 수용자 포유 동물에 있어서 인간 및/또는 세포 면역 반응의 유발일 수 있다.

본 발명은 하기의 번호가 매겨진 구현예를 추가로 포함한다:

1. 하나 이상의 항-CEA 단클론 항체(MAb) 또는 이의 단편 및 하나 이상의 치료제를 포함하는 조성물 및 하나 이상의 치료제. 구현예 1의 조성물에 있어서, 상기 항-CEA MAb가 I종, II종 또는 III종 항-CEA mAb이고, 상기 MAb가 I종 또는 II종 MAb이고 과립백혈구와 반응성이 있는 경우, 상기 MAb는 MAb의 단가의 형태인 조성물.

2. 구현예 1에 있어서, 상기 항-CEA MAb 또는 이의 단편이 인간화되고, 상기 인간화된 MAb가 쥐과 항-CEA MAb의 실질적으로 항-CEA인 결합 특이성을 보유하는 조성물.

3. 구현예 1에 있어서, 상기 항-CEA MAb 또는 이의 단편이 키메라 MAb이고, 상기 키메라 MAb가 쥐과 항-CEA MAb의 항-CEA 결합 특이성을 실질적으로 보유하는 조성물.

4. 구현예 1에 있어서, 상기 항-CEA MAb 또는 이의 단편이 완전한 인간 MAb이고, 상기 완전한 인간 MAb가 쥐과 항-CEA MAb의 항-CEA 결합 특이성을 실질적으로 보유하는 조성물.

5. 구현예 1에 있어서, 상기 항-CEA 단클론 항체 또는 이의 단편이 MN-14 항체 또는 이의 단편인 조성물.

6. 구현예 5에 있어서, 상기 MN-14 단클론 항체 또는 이의 단편이 쥐과 MN-14 단클론 항체의 상보성 결정 부위(CDRs)를 포함하고, 상기 MN-14 항체의 경쇄 가변 영역의 CDRs이 아미노산 서열 KASQDVGTSSVA를 포함하는 CDR1; 아미노산 서열 WTSTRHT를 포함하는 CDR2; 및 아미노산 서열 QQYSLYRS를 포함하는 CDR3를 포함하는 조성물. 항-CEA 단클론 항체 또는 이의 단편은, TYWMS를 포함하는 CDR1; EIHPDSSTINYAPSLKD를 포함하는 CDR2; 및 LYFGFPWFAY를 포함하는 CDR3를 포함하는, 상기 항-CEA 항체의 중쇄 가변 영역의 CDRs을 포함한다. 또한, 항 CEA 단클론 항체 또는 이의 단편은 경쇄 및 중쇄 가변 영역 모두의 CDRs을 포함한다.

7. 구현예 1에 있어서, 상기 항-CEA 단클론 항체가 CEA와 반응하고, 정상 교차 반응 항원(NCA) 및 태변 항원(MA)과 반응하지 않는 조성물.

8. 구현예 7에 있어서, 상기 MN-14 단클론 항체 또는 이의 단편이 인간화된 MN-14 항체 또는 이의 단편인 조성물.

9. 구현예 7에 있어서, 상기 MN-14 단클론 항체 또는 이의 단편이 키메라 MN-14 항체 또는 이의 단편인 조성물.

10. 구현예 7에 있어서, 상기 MN-14 단클론 항체 또는 이의 단편이 완전한 인간 MN-14 항체 또는 이의 단편인 조성물.

11. 구현예 8에 있어서, 상기 인간화된 MN-14 항체 또는 이의 단편의 경쇄 및 중쇄 가변 영역의 구조 영역(FRs)가 쥐과 MN-14 단클론 항체의 상응하는 FRs로부터 치환된 하나 이상의 아미노산을 포함하는 조성물.

12. 구현예 11에 있어서, 상기 인간화된 MN-14 항체 또는 이의 단편이 도 14A-C 또는 도 22B(hMn-14) 또는 도 23B의 쥐과 중쇄 가변 영역(KLHuVhAIGA)의 아미노산 잔기 24, 28, 30, 48, 49, 74 및 94로 이루어지는 군으로부터 선택되는, 상기 쥐과 MN-14 항체의 상기 상응하는 FR부터의 하나 이상의 아미노산을 포함하는 조성물.

13. 구현예 11에 있어서, 상기 인간화된 MN-14 항체 또는 이의 단편이 상기 쥐과 MN-14 경쇄 가변 영역의 상기 상응하는 FR로부터의 하나 이상의 아미노산을 포함하는 조성물.

14. 구현예 8에 있어서, 상기 인간화된 MN-14 항체 또는 이의 단편이 도 13A 또는 도 22A 또는 도 23A에서 제시되는 경쇄 가변 영역 및 도 14A-C에서 KLHuVhAIGA로서 지시되거나 도 22B(hMN-14) 또는 도 23B에서 제시되는 중쇄 가변 영역을 포함하는 조성물.

15. 구현예 9에 있어서, 상기 키메라 MN-14 항체 또는 이의 단편은 도 13A에서 쥐과의 MN-14 V_K로서 제시되는 경쇄 가변 영역 및 도 14A-C에서 쥐과의 MN-14 V_H로서 지시되는 중쇄 가변 영역을 포함하는 조성물.

16. 구현예 1 내지 15 중 어느 하나에 있어서, 상기 단편이 F(ab')₂, Fab', Fab, Fv 및 scFv로 이루어지는 군으로부터 선택되는 조성물.

17. 구현예 1 내지 15 중 어느 하나에 있어서, 상기 치료제가 제약학적으로 허용가능한 담체 내에서 임의로 제형화된 항체 자체(naked antibody), 세포독성제, 약물, 방사선헌종, 면역조절제, 감광성 치료제, 면역컨쥬게이트, 호르몬, 독소, 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 또는 이의 배합물로 이루어지는 군으로부터 선택되는 조성물.

18. 구현예 17에 있어서, 상기 배합물이 빈크리스틴, 독소루비신, 옥살리플라틴, CRT-11, 플루오로우라실, DTIC 및 시클로포스파미드를 포함하는 조성물.

19. 구현예 17에 있어서, 상기 치료제가 항체 자체이거나 면역컨쥬게이트인 조성물.

20. 구현예 19에 있어서, 상기 항체 자체 또는 상기 면역컨쥬게이트의 항체 부분이 EGP-1, EGP-2(예를 들어, 17-1A), MUC-1, MUC-2, MUC-3, MUC-4, PAM-4, KC4, TAG-72, EGFR, HER2/neu, BrE3, Le-Y, A3, A33, Ep-CAM, AFP, Tn, 톰슨-프레덴레이치(Thomson-Friedenreich) 항원, 종양 괴사 항원, VEGF, PlGF, 또는 기타 혈관 형성 항원, Ga 733, IL-6, 인슐린 유사 성장 인자-1, 테나신(tenascin), 피브로넥틴 또는 이의 배합물과 반응하는 단클론 항체 또는 이의 단편으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 인간화, 키메라, 인간 또는 쥐과 단클론 항체 또는 이의 단편을 포함하는 조성물.

21. 구현예 20에 있어서, 상기 단편이 F(ab)₂, F(ab')₂, Fab', Fab, Fv 및 scFv로 이루어지는 군으로부터 선택되는 조성물.

22. 구현예 1 내지 15 중 어느 하나에 있어서, 상기 치료제가 DTIC가 아닌 조성물.

23. 치료적으로 유효한 양의 항-CEA 항체 또는 이의 단편 및 하나 이상의 치료제, 및 제약학적으로 허용가능한 담체 중의 임의의 제형물을 동시에 또는 순서대로 환자에게 투여하는 것을 포함하는, 비골수 갑상선 암종의 치료 방법.

24. 구현예 23에 있어서, 상기 항-CEA MAb 또는 이의 단편이 인간화되고, 상기 인간화된 MAb이 쥐과 항-CEA MAb의 항-CEA 결합 특이성을 실질적으로 보유하는 방법.

25. 구현예 23에 있어서, 상기 항-CEA MAb 또는 이의 단편이 키메라 MAb이고, 상기 키메라 MAb이 쥐과의 항-CEA MAb의 항-CEA 결합 특이성을 실질적으로 가지는 방법.

26. 구현예 23에 있어서, 상기 항-CEA MAb 단클론 항체 또는 이의 단편이 MN-14 항체 또는 이의 단편인 방법.

27. 구현예 23에 있어서, 상기 MN-14 단클론 항체 또는 이의 단편이 쥐과 MN-14 항체의 상보성 결정 부위(CDRs)를 포함하고, 여기서 상기 MN-14 항체의 경쇄 가변 부위의 CDRs은, 아미노산 서열 KASQDVGTSA를 포함하는 CDR1; 아미노산 서열 WTSTRHT를 포함하는 CDR2; 아미노산 서열 QQYSLYRS를 포함하는 CDR3를 포함하고, 상기 항-CEA 항체의 중쇄 가변 영역의 CDRs은 TYWMS를 포함하는 CDR1; EIHPDSSTINYAPSLKD를 포함하는 CDR2; 및 LYFGFPWFAY를 포함하는 CDR3를 포함하는 방법.

28. 구현예 27에 있어서, 상기 항-CEA 단클론 항체는 CEA와 반응하고, 정상 교차 반응 항원(NCA) 및 태변 항원(MA)과 반응하지 않는 방법.

29. 구현예 28에 있어서, 상기 MN-14 단클론 항체 또는 이의 단편이 인간화된 MN-14 항체 또는 이의 단편인 방법.

30. 구현예 28에 있어서, 상기 MN-14 단클론 항체 또는 이의 단편이 키메라 MN-14 항체 또는 이의 단편인 방법.

31. 구현예 28에 있어서, 상기 MN-14 단클론 항체 또는 이의 단편이 완전한 인간 MN-14 항체 또는 이의 단편인 방법.

32. 구현예 29에 있어서, 상기 인간화된 MN-14 항체 또는 이의 단편의 경쇄 및 중쇄 가변 영역의 구조 영역(FRs)가 쥐과 MN-14 단클론 항체의 상응하는 FRs로부터 치환된 하나 이상의 아미노산을 포함하는 방법.

33. 구현예 32에 있어서, 상기 쥐과의 MN-14 항체의 상기 상응하는 FR로부터의 하나 이상의 아미노산을 포함하는 상기 인간화된 MN-14 항체 또는 이의 단편은 도 14A-C에서 KLHuVhAIGA로서 지시되거나 도 22B(hMN-14) 또는 도 23 B의 쥐과의 중쇄 가변 영역의 아미노산 잔기 24, 28, 30, 48, 49, 74 및 94로 이루어지는 군으로부터 선택되는 방법.

34. 구현예 32에 있어서, 상기 인간화된 MN-14 항체 또는 이의 단편이 상기 쥐과의 MN-14 경쇄 가변 영역의 상기 상응하는 FR로부터의 하나 이상의 아미노산을 포함하는 방법.

35. 구현예 32에 있어서, 상기 인간화된 MN-14 항체 또는 이의 단편이 도 13A 또는 도 22A(hMN-14) 또는 도 23A에서 제시되는 경쇄 가변 영역 및 도 14A-C에서 KLHuVhAIGA로서 지시되거나 도 22B(hMN-14) 또는 도 23B에서 제시되는 중쇄 가변 영역을 포함하는 방법.

36. 구현예 23 내지 35 중 어느 하나에 있어서, 상기 단편이 F(ab)₂, F(ab')₂, Fab', Fab, Fv 및 scFv로 이루어지는 군으로부터 선택되는 방법.

37. 구현예 23 내지 36 중 어느 하나에 있어서, 상기 치료제가 II종 항-CEA 단클론 항체, III종 항-CEA 단클론 항체, 및 이의 단편으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 인간화, 키메라, 인간 또는 쥐과의 단클론 항체 또는 이의 단편으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 치료제이고, 치료적으로 유효한 양으로 동시에 또는 순서대로 투여되는 방법.

38. 구현예 37에 있어서, 상기 항체 또는 이의 단편이 그 자체이거나 또다른 치료제에 접합된 방법.

39. 구현예 23 내지 36 중 어느 하나에 있어서, 상기 치료제가 제약학적으로 허용가능한 담체 내에서 임의로 제형화된 항체 자체, 세포독성제, 약물, 방사선택중, 면역조절제, 감광성 치료제, 안티센스 올리고뉴클레오타이드, CEA 및 비-CEA 항체의 면역컨쥬게이트, 호르몬, 또는 이의 배합물로 이루어지는 군으로부터 선택되는 방법.

40. 구현예 39에 있어서, 상기 치료제가 EGP-1, EGP-2(예를 들어, 17-1A), MUC-1, MUC-2, MUC-3, MUC-4, PAM-4, KC4, TAG-72, EGFR, HER2/neu, BrE3, Le-Y, A3, A33, Ep-CAM, AFP, Tn, 톰슨-프레덴레이치(Thomson-Friedenreich) 항원, 종양 괴사 항원, VEGF, PIGF, 또는 기타 종양 혈관 형성 항원, Ga 733, IL-6, 인슐린 유사 성장 인자-1, 및 이의 배합물과 반응하는 인간화, 키메라, 인간 또는 쥐과 단클론 항체 또는 이의 단편으로 이루어지는 군으로부터 선택되고, 치료적으로 유효한 양으로 동시에 또는 순서대로 상기 환자에게 투여되는 방법.

41. 구현예 40에 있어서, 상기 항체 또는 이의 단편이 그 자체이거나 또다른 치료제에 접합된 방법.

42. 구현예 23 내지 36 중 어느 하나에 있어서, 상기 치료제가 DTIC가 아닌 방법.

43. 구현예 39에 있어서, 상기 세포독성제가 약물 또는 독소인 방법.

44. 구현예 43에 있어서, 상기 약물이 항유사분열제, 알킬화제, 대사길항제, 혈관형성 저해제, 세포사멸제, 알칼로이드제, COX-2, 및 항생제 및 이의 배합물을 가지는 방법.

45. 구현예 43에 있어서, 상기 약물이 질소 겨자, 에틸렌이민 유도체, 알킬 설포네이트, 니트로소우레아, 트리아젠, 엽산 유사체, 안트라시클린, 택센(taxane), COX-II 저해제, 피리미딘 유사체, 퓨린 유사체, 대사길항제, 항생제, 효소, 에피포도필로톡신(epipodophyllotoxin), 백금 동등 복합체, 빈카 알칼로이드, 치환된 우레아, 메틸 히드라진 유도체, 부신피질 억제제, 대항제, 엔도스타틴, 탁솔, 캄프토테신(camptothecin), 독소루비신 및 이의 유사체, 및 이의 배합물로 이루어지는 군으로부터 선택되는 방법.

46. 구현예 43에 있어서, 상기 독소가 리신, 아브린, 알파 독소, 사포린, 리보뉴클라제(RNase), DNase I, 스태필로코칼 엔터톡신-A(Staphylococcal enterotoxin-A), 포크위드(pokeweed) 항바이러스 단백질, 켈로닌, 디프테린 독소, 수도모나스 외독소, 및 수도모나스 내독소로 이루어지는 군으로부터 선택되는 미생물, 식물 또는 동물 독소인 방법.

47. 구현예 39에 있어서, 상기 면역조절제가 시토카인, 줄기 세포 성장 인자, 림포독소, 조혈 인자, 세포군 자극 인자(CSF), 인터페론(IFN), 줄기 세포 성장 인자, 적혈구 생성 인자, 트롬보포이에틴(thrombopoietin) 및 이의 배합물로 이루어지는 군으로부터 선택되는 방법.

48. 구현예 47에 있어서, 상기 림포독소가 종양 괴사 인자(TNF)이고, 상기 조혈 인자가 인터루킨(IL)이고, 상기 세포군 자극 인자가 과립구-세포군 자극 인자(G-CSF) 또는 과립구 대식세포-세포군 자극 인자(GM-CSF)이고, 상기 인터페론이 인터페론- α , - β 또는 - γ 이며, 상기 줄기 세포 성장 인자가 "SI 인자"로 지시되는 방법.

49. 구현예 47에 있어서, 상기 면역조절제가 IL-1, IL-2, IL-3, IL-6, IL-10, IL-12, IL-18, IL-21, 인터페론- γ , TNF- α 또는 이의 배합물을 포함하는 방법.

50. 구현예 39에 있어서, 상기 방사성핵종이 20 내지 10,000 keV의 에너지를 가지는 방법.

51. 구현예 50에 있어서, 상기 방사성핵종이 ^{125}I , ^{131}I , ^{90}Y , ^{88}Y , ^{225}Ac , ^{177}Lu , ^{188}Re , ^{186}Re , 및 이의 배합물로 이루어지는 군으로부터 선택되는 방법.

52. 구현예 39에 있어서, 상기 감광성 치료제가 색소원 또는 염료인 방법.

53. 구현예 44에 있어서, 상기 알킬화제가 다카바진(dacarbazine)인 방법.

54. 구현예 53에 있어서, 상기 MN-14 항체 또는 이의 단편이 주사 당 투여량 당 100 내지 600 밀리그램 단백질의 용량으로 투여되는 방법.

55. 구현예 54에 있어서, 상기 MN-14 항체 또는 이의 단편이 주사 당 투여량 당 300 내지 400 밀리그램 단백질의 용량으로 투여되는 방법.

56. 치료적으로 유효한 양의 항-CEA 단클론 항체 또는 이의 단편 및 하나 이상의 치료제, 및 제약학적으로 허용가능한 담체 중의 임의의 제형물을, 동시에 또는 순서대로 환자에게 투여하는 것을 포함하는, 비골수 갑상선 암종의 치료 방법.

57. 구현예 56에 있어서, 상기 항-CEA MAb 또는 이의 단편이 인간화되고, 여기서 상기 인간화된 MAb이 쥐과 항-CEA MAb의 항-CEA 결합 특이성을 실질적으로 보유하는 방법.

58. 구현예 56에 있어서, 상기 항-CEA MAb 또는 이의 단편이 키메라 MAb이고, 상기 키메라 MAb가 쥐과 항-CEA MAb의 항-CEA 결합 특이성을 실질적으로 보유하는 방법.

59. 구현예 56에 있어서, 상기 항-CEA 단클론 항체 또는 이의 단편이 MN-14 항체 또는 이의 단편인 방법.

60. 구현예 59에 있어서, 상기 MN-14 단클론 항체 또는 이의 단편은 쥐과 MN-14 단클론 항체의 상보성 결정 부위(CDRs)를 포함하고, 여기서 상기 MN-14 항체의 경쇄 가변 영역의 CDRs은 아미노산 서열 KASQDVGTSA를 포함하는

CDR1; 아미노산 서열 WTSTRHT를 포함하는 CDR2; 및 아미노산 서열 QQYSLYRS를 포함하는 CDR3를 포함하고; 상기 III중 항-CEA 항체의 중쇄 가변 영역의 CDRs은 TYWMS를 포함하는 CDR1; EIHPDSSTINYAPSLKD를 포함하는 CDR2; 및 LYFGFPWFAY를 포함하는 CDR3를 포함하는 방법.

61. 구현예 61에 있어서, 상기 항-CEA 단클론 항체가 CEA와 반응하고, 정상 교차 반응 항원(NCA) 및 태변 항원(MA)과 반응하지 않는 방법.

62. 구현예 61에 있어서, 상기 MN-14 단클론 항체 또는 이의 단편이 인간화된 MN-14 항체 또는 이의 단편인 방법.

63. 구현예 61에 있어서, 상기 MN-14 단클론 항체 또는 이의 단편이 키메라 MN-14 항체 또는 이의 단편인 방법.

64. 구현예 61에 있어서, 상기 MN-14 단클론 항체 또는 이의 단편이 완전한 인간 MN-14 항체 또는 이의 단편인 방법.

65. 구현예 62에 있어서, 상기 인간화된 MN-14 항체 또는 이의 단편의 경쇄 및 중쇄 가변 영역의 구조 영역(FRs)가 쥐 과 MN-14 단클론 항체의 상응하는 FRs로부터 치환된 하나 이상의 아미노산을 포함하는 방법.

66. 구현예 65에 있어서, 상기 쥐 과 MN-14 항체의 상기 상응하는 FR로부터의 하나 이상의 아미노산을 포함하는 상기 인간화 MN-14 항체 또는 이의 단편이 도 14A-C 또는 도 22B의 쥐 과 중쇄 가변 영역의 아미노산 잔기 24, 28, 30, 48, 49, 74 및 94로 이루어지는 군으로부터 선택되는 방법.

67. 구현예 65에 있어서, 상기 인간화된 MN-14 항체 또는 이의 단편이 상기 쥐 과 MN-14 경쇄 가변 영역의 상기 상응하는 FR로부터의 하나 이상의 아미노산을 포함하는 방법.

68. 구현예 65에 있어서, 상기 인간화된 MN-14 항체 또는 이의 단편이 도 13A 또는 도 22A(hMN-14) 또는 도 23A에서 제시되는 경쇄 가변 영역 및 도 14A-C 또는 도 22B(hMN-14) 또는 도 23B에서 제시되는 중쇄 가변 영역을 포함하는 방법.

69. 구현예 56 내지 68 중 어느 하나에 있어서, 상기 단편이 F(ab')₂, Fab', Fab, Fv 및 scFv로 이루어지는 군으로부터 선택되는 방법.

70. 구현예 56 내지 68 중 어느 하나에 있어서, 상기 치료제가 II중 항-CEA 단클론 항체, III중 항-CEA 단클론 항체, 및 이의 단편으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 인간화, 키메라, 인간 또는 쥐 과의 단클론 항체 또는 이의 단편으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 치료제이고, 치료적으로 유효한 양으로 동시에 또는 순서대로 투여되는 방법.

71. 구현예 70에 있어서, 상기 항체 또는 이의 단편이 그 자체이거나 또다른 치료제에 접합된 방법.

72. 구현예 56 내지 68 중 어느 하나에 있어서, 상기 치료제가 제약학적으로 허용가능한 담체 내에서 임의로 제형화된 항체 자체, 세포독성제, 약물, 독소, 방사선훈중, 면역조절제, 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 감광성 치료제, CEA 또는 비-CEA 항체의 면역컨쥬게이트, 호르몬, 또는 이의 배합물로 이루어지는 군으로부터 선택되는 방법.

73. 구현예 72에 있어서, 상기 치료제가 EGP-1, EGP-2(예를 들어, 17-1A), MUC-1, MUC-2, MUC-3, MUC-4, PAM-4, KC4, TAG-72, EGFR, HER2/neu, BrE3, Le-Y, A3, A33, Ep-CAM, AFP, Tn, 톰슨-프레덴레이치(Thomson-Friedenreich) 항원, 종양 괴사 항원, VEGF, PIGF, 또는 기타 종양 혈관 형성 항원, Ga 733, IL-6, 인슐린 유사 성장 인자-1, 및 이의 배합물과 반응하는 인간화, 키메라, 인간 또는 쥐 과 단클론 항체 또는 이의 단편으로 이루어지는 군으로부터 선택되고, 치료적으로 유효한 양으로 동시에 또는 순서대로 환자에게 투여되는 방법.

74. 구현예 73에 있어서, 상기 항체 또는 이의 단편이 그 자체이거나 또다른 치료제에 접합된 방법.

75. 구현예 56 내지 68 중 어느 하나에 있어서, 상기 치료제가 DTIC가 아닌 방법.

76. 구현예 72에 있어서, 상기 세포독성제가 약물 또는 독소인 방법.

77. 구현예 72에 있어서, 상기 약물이 항유사분열제, 알킬화제, 대사길항제, 혈관형성 저해제, 세포사멸제, 알칼로이드제, COX-2, 및 항생제 및 이의 배합물을 가지는 방법.

78. 구현예 76에 있어서, 상기 약물이 질소 겨자, 에틸렌이민 유도체, 알킬 설포네이트, 니트로소우레아, 트리아젠, 염산 유사체, 안트라시클린, 택센(taxane), COX-II 저해제, 피리미딘 유사체, 푸린 유사체, 대사길항제, 항생제, 효소, 에피포도필로톡신(epipodophyllotoxin), 백금 동등 복합체, 빈카 알칼로이드, 치환된 우레아, 메틸 히드라진 유도체, 부신피질 억제제, 대항제, 엔도스타틴, 탁솔, 캄프토테신(camptothecin), 독소 루비신 및 이의 유사체, 및 이의 배합물로 이루어지는 군으로부터 선택되는 방법.

79. 구현예 76에 있어서, 상기 독소가 리신, 아브린, 알과 독소, 사포린, 리보뉴클라제(RNase), DNase I, 스탕필로코칼 엔터톡신-A(Staphylococcal enterotoxin-A), 포크위드(pokeweed) 항바이러스 단백질, 겔로닌, 디프테린 독소, 수도모나스 외독소, 및 수도모나스 내독소로 이루어지는 군으로부터 선택되는 미생물, 식물 또는 동물 독소인 방법.

80. 구현예 72에 있어서, 상기 면역조절제가 시토카인, 줄기 세포 성장 인자, 림포독소, 조혈 인자, 세포군 자극 인자(CSF), 인터페론(IFN), 줄기 세포 성장 인자, 적혈구 생성 인자, 트롬보포이에틴(thrombopoietin) 및 이의 배합물로 이루어지는 군으로부터 선택되는 방법.

81. 구현예 80에 있어서, 상기 림포독소가 종양 괴사 인자(TNF)이고, 상기 조혈 인자가 인터류킨(IL)이고, 상기 세포군 자극 인자가 과립구-세포군 자극 인자(G-CSF) 또는 과립구 대식세포-세포군 자극 인자(GM-CSF)이고, 상기 인터페론이 인터페론- α , - β 또는 - γ 이며, 상기 줄기 세포 성장 인자가 "SI 인자"로 지시되는 방법.

82. 구현예 72에 있어서, 상기 면역조절제가 IL-1, IL-2, IL-3, IL-6, IL-10, IL-12, IL-18, IL-21, 인터페론- γ , TNF- α 또는 이의 배합물을 포함하는 방법.

83. 구현예 72에 있어서, 상기 방사성핵종이 20 내지 10,000 keV의 에너지를 가지는 방법.

84. 구현예 83에 있어서, 상기 방사성핵종이 ^{125}I , ^{131}I , ^{88}Y , ^{90}Y , ^{225}Ac , ^{177}Lu , ^{188}Re , ^{186}Re , 및 이의 배합물로 이루어지는 군으로부터 선택되는 방법.

85. 구현예 72에 있어서, 상기 감광성 치료제가 색소원 또는 염료인 방법.

86. 구현예 77에 있어서, 상기 알킬화제가 다카바진(dacarbazine)인 방법.

87. 구현예 86에 있어서, 상기 MN-14 항체 또는 이의 단편이 주사 당 투여량 당 100 내지 600 밀리그램 단백질의 용량으로 투여되는 방법.

88. 구현예 87에 있어서, 상기 MN-14 항체 또는 이의 단편이 주사 당 투여량 당 300 내지 400 밀리그램 단백질의 용량으로 투여되는 방법.

89. 치료적으로 유효한 양의 항-CEA 단클론 항체 또는 이의 단편 및 하나 이상의 치료제, 및 제약학적으로 허용가능한 담체 중의 임의의 제형물을, 동시에 또는 순서대로 환자에게 투여하는 것을 포함하는, 암의 치료 방법.

90. 구현예 89에 있어서, 상기 치료제가 CPT-11인 방법.

91. 구현예 90에 있어서, 상기 항-CEA 항체 또는 단편이 CPT-11의 투여 이전에 투여되는 방법.

92. 구현예 91에 있어서, 상기 항-CEA 항체 또는 단편이 CPT-11 투여의 3일 이전에 투여되는 방법.

93. 구현예 89에 있어서, 치료제가 DTIC인 방법.

94. 구현예 89에 있어서, 치료제가 옥살리플라틴인 방법.

95. 구현예 89에 있어서, 치료제가 5-플루오로우라실/루코보린인 방법.

96. 비-항체 치료제로 암을 치료하는 방법에 있어서, 암을 앓는 환자에게 항-CEA 항체 또는 이의 단편을 비-항체 치료제의 투여 이전에 예비-투여하는 것을 포함하는 방법.

97. 구현예 96에 있어서, 항-CEA 항체가 hMN-14인 방법.

98. 구현예 96에 있어서, 치료제가 CPT-11인 방법.

99. 항체로 암을 치료하는 방법에 있어서, 암을 앓는 환자에게 항체를 투여하기 이전에 과립 백혈구 및/또는 NK 세포를 활성화시키는 제제를 투여하여 항체의 효과기 기능을 증가시키는 것을 포함하는 방법.

100. 구현예 99에 있어서, 상기 제제가 GM-CSF인 방법.

101. 구현예 99에 있어서, 상기 항체가 항-CEA 항체인 방법.

102. 구현예 101에 있어서, 항체가 hMN-14인 방법.

103. 항-CEA 항체 또는 단편으로 암을 치료하는 방법에 있어서, 암을 앓는 환자에게 항-CEA 항체 또는 단편을 투여하기 이전에, 종양 세포에서 CEA 발현을 상향 조절하기에 유효한 양의 인터페론을 투여하는 것을 포함하는 방법.

104. 구현예 103에 있어서, 항-CEA 항체가 hMN-14인 방법.

105. 동일하거나 다른 항원에 대한 하나 이상의 CEA 결합 부위 및 하나 이상의 기타 결합 부위를 포함하는 항체 융합 단백질.
106. 구현예 105에 있어서, CEA 결합 부위가 MN-14 항체와 동일한 부위에 결합하는 항체 융합 단백질.
107. 구현예 105에 있어서, 2가 및 3가인 항체 융합 단백질.
108. 구현예 105에 있어서, 융합 단백질의 하나의 팔이 CD66e를 표적으로 하는 III종, 항-CEA MAb이고, 융합 단백질의 또다른 팔이 CD66a-d를 표적으로 하는 또다른 CEA 교차 반응 항체인 항체 융합 단백질.
109. 구현예 105에 있어서, 결합 팔이 scFv 또는 Fab 부위인 항체 융합 단백질.
110. 구현예 105에 있어서, 한 팔이 CD66a-d와 반응하고 두 팔이 오로지 CEA(CD66e)와 반응하는 것을 포함하는 비특이적, 3가의 단백질인 항체 융합 단백질.
111. 구현예 105에 있어서, NCA50/90에 결합 하는 두 팔을 포함하는 비특이적 단백질인 항체 융합 단백질.
112. 구현예 105에 있어서, 한 팔이 NCA50/90에 결합하고 두번째 팔이 CEA의 III종 에피토프에 결합하는 것을 포함하는 디아보디(diabody)인 항체 융합 단백질.
113. 구현예 112에 있어서, NCA-50/90 팔이 hMN-3 항체로부터 얻어지고, CEA의 III종 에피토프에 결합하는 두번째 팔이 hMN-14로부터 얻어지는 항체 융합 단백질.
114. 구현예 113에 있어서, 융합 단백질은 과립 백혈구로부터의 시토킨 방출의 활성을 막기 위한 Fc-영역이 없거나, 변형되어 보체 결합 및 ADCC를 막는 Fc-영역을 가지는 항체 융합 단백질.
115. 구현예 104에 있어서, 하나의 hMN-3 팔 및 두 개의 hMN14 팔을 포함하는 트리야보디(triobody)인 항체 융합 단백질. 구현예 104에 있어서, 하나의 hMN-15 팔 및 두 개의 hMN14 팔을 포함하는 트리야보디인 항체 융합 단백질.
116. 구현예 104에 있어서, 하나 이상의 hMN-14 팔 및 하나 이상의 NP-3 팔을 포함하는 항체 융합 단백질.
117. 구현예 116에 있어서, 보체 결합 및 ADCC의 활성을 가능하게 하기 위한 Fc-영역을 포함하는 항체 융합 단백질.
118. 구현예 104에 있어서, 치료제를 추가로 포함하는 항체 융합 단백질.
119. 구현예 118에 있어서, 치료제가 시토킨인인 항체 융합 단백질.
120. 구현예 119에 있어서, 시토킨이 인터페론, 세포군-자극 인자, 또는 인터루킨인 항체 융합 단백질.
121. 구현예 120에 있어서, 세포군-자극 인자가 GM-CSF 또는 G-CSF인 항체 융합 단백질.

도면의 간단한 설명

도 1은 hMN-14 단독, DTIC 단독 또는 hMN-14 및 DTIC의 조합을 처리한 후 종양의 양을 비교한 그래프이다. 도 1A는 25 및 100 μ g/dose에서 DTIC 단독 또는 250 μ g hMN-14 항체와 함께 투여된 것을 보여주며, 도 1B는 50 및 70 μ g/dose에서 DTIC 단독 또는 100 μ g hMN-14 항체와 함께 투여된 것을 보여준다.

도 2는 ^{131}I 및 ^{90}Y -MN-14로 방사선면역치료(radioimmunotherapy, RAIT)한 후 종양의 양을 비교한 그래프이다.

도 3은 TT를 생산하는 쥐에서 여러 가지 화학치료용 약물의 치료적 효능을 종양의 양에 따라 비교한 그래프이다. TT를 생산하는 쥐는 독소루비신 @ 20mg/m²을 0, 1 및 2일간(70 μ g/dose) 처리한 군(○); DTIC @ 300mg/m²을 0, 1 및 2일간(1.08mg/dose) 처리한 군(□); 상기의 독소루비신 및 DTIC 처리한 군(●); 사이클로포스파미드 @ 600mg/m²을 0일간(2.16mg/dose) 처리한 군(△); 빈크리스틴(vincristine) @ 4.2 μ g/dose; 0일간 처리한 군(×); 4개 약물 모두 처리한 군(상기에 기재된 각각의 복용량으로 독소루비신, DTIC, 사이클로포스파미드 및 빈크리스틴 처리) (■); 또는 왼쪽의 비처리군(◆)으로 나뉜다. TT 종양이 생성되는 6-9 주드 쥐로 이루어진 군이다. 처리 시점에서 평균 종양의 양은 0.51 $\pm$ 0.33cm³이었다. 포인트: 평균 종양 크기. 에러 바(bars): std dev 및 상기 투명한 기호에서만 보여진다.

도 4는 쥐에 종양의 양에 따라 RAIT 후 24시간부터 ^{90}Y 로 라벨된 항-CEA MAb MN-14 및 4-약물 조합을 처리하여 RAIT의 조합 치료법의 치료효능을 비교한 그래프이다. 종양 생성 동물은 왼쪽의 비처리군(◆); 52.5 μ Ci ^{90}Y -MN-14(0일)에서 1, 2 및 3일마다 도 1에 기재된 4-약물 접생 처리군(■); 52.5 μ Ci ^{90}Y -MN-14(0일)에서 1, 2 및 3일마다 도 1에 기재된 4-약물 접생 처리군(▲); 52.5 μ Ci ^{90}Y -MN-14(0일) 처리군(△); 또는 105 μ Ci ^{90}Y -MN-14(0일) 처리군(○)으로 나뉜다. 비처리군의 N=5이고, 처리군에서는 n=9-10이다. 처리 시점에서 평균 종양의 양은 0.28 $\pm$ 0.12cm³이었다. 포인트: 평균 종양 크기. 에러 바(bars): std dev 및 상기 투명한 기호에서만 보여진다.

도 5는 TT를 생산하는 쥐에서 DTIC를 첨가한 RAIT 및 독소루비신을 첨가한 RAIT의 치료적 효능을 비교한 그래프이다. TT를 생산하는 쥐는 왼쪽의 비처리군(◆); 105μCi ⁹⁰Y-MN-14(0일) 처리군(○); 105μCi ⁹⁰Y-MN-14(0일)에서 1, 2 및 3일에 하루 최대 복용량의 50%가 투여된 독소루비신 및 DTIC 섭생 처리군(▲); 105μCi ⁹⁰Y-MN-14(0일)에서 1, 2 및 3일에 하루 최대 복용량의 75% DTIC 처리군(×); 또는 DTIC 최대 복용량인 300mg/m²를 1, 2 및 3일에(1.08mg/dose) 처리한 군(□)으로 나뉜다. 비처리군의 N=5이고, 처리군에서는 n=8-9이다. 처리 시점에서 평균 종양의 양은 0.39±0.20cm³이었다. 포인트: 평균 종양 크기. 에러 바(bars): std dev 및 상기 투명한 기호에서만 보여진다.

도 6은 hMN-14 자체를 가지는 TT 이종 이식편(異種移植片)을 생산하는 쥐에서 hMN-14 자체의 처리 섭생 효과를 비교한 그래프이다. 동물들은 TT 세포를 s.c. 주입하여 주어졌으며, 왼쪽 비처리군(A) 또는 0.5mg hMN-14의 i.v. 주입(1일)(B) 또는 11일 후(C)로 나뉜다. 패널 A, B 및 C의 라인은 각 동물의 종양의 양을 나타낸다. 대표적인 처리군의 평균은 패널 D에서 보여준다. 에러 바는 평균의 표준 에러를 나타내고 투명한 하나의 지점만을 보여준다. ◆, 비처리군; □, 1일 처리군; △, 11일 처리군.

도 7은 갑상선 수질종양에서 인간화된 및 무린 MN-14 항체의 효과를 비교한 그래프이다. 동물들은 TT 세포를 s.c. 주입하여 주어졌으며, 왼쪽 비처리군 또는 1일 후 0.5mg MAb를 i.v. 주입하여 주어졌다. 대표적인 처리군의 평균을 보여준다. 에러 바는 평균의 표준 에러를 나타내고 투명한 하나의 지점만을 보여준다. ◆, 비처리군; □, hMN-14 처리군; △, 무린 MN-14 처리군; ×, hLL2 처리군.

도 8은 갑상선 수질종양을 치료하는데 hMN-14의 다른 복용량에 따른 효능을 비교한 그래프이다. 동물은 TT 세포의 s.c. 주입 1일 후 hMN-14의 증가하는 복용량을 i.v. 주입하여 주어졌다. 대표적인 처리군의 평균을 보여준다. ◆, 비처리군; ●, 0.125mg 처리군; ○, 0.25mg 처리군; ×, 1.0mg 처리군; ▲, 2.0mg 처리군. 에러 바는 평균의 표준 에러를 나타내고 비처리군 및 투명한 0.50mg hMN-14/쥐를 받은 군만을 보여준다.

도 9는 TT를 생산하는 누드 쥐에서 다른 처리 시간에 따른 효능을 비교한 그래프이다. 동물은 TT 세포의 s.c. 주입 후 hMN-14 0.25mg을 1일간(●), 3일간(▲) 또는 7일간(■) i.v. 주입하였고, 또는 왼쪽 비처리군(◆)이었다. 대표적인 처리군의 평균을 보여준다. 에러 바는 평균의 표준 에러를 나타내고 투명한 하나의 지점만을 보여준다.

도 10은 hMN-14에 DTIC를 첨가, DTIC 단독 및 hMN-14 단독 처리한 TT 생산 누드 쥐 및 비처리 쥐의 치료 결과를 비교한 그래프이다. 동물은 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 15 및 22일 동안 100μg/dose에서 hMN-14를 i.p. 주입한 다음 매 7일간 처리한 군(○); DTIC, 75μg/dose를 2, 3 및 4일간 처리한 군(▲); 이들 hMN-14 및 DTIC 섭생을 조합한 군(△); 또는 왼쪽 비처리군(◆)으로 주었다. 대표적인 처리군의 평균을 보여준다. 10 동물들/군.

도 11A 및 도 11B는 무린 MN-14 가변 영역 중쇄(VH)의 일치 DNA 서열 및 DNA 서열에 의해 인코딩되는 아미노산 서열을 보여준다. CDRs는 박스 안에 나타내었다.

도 12A 및 도 12B는 무린 MN-14 가변 영역 경쇄(VK)의 일치 DNA 서열 및 DNA 서열에 의해 인코딩되는 아미노산 서열을 보여준다. CDRs는 박스 안에 나타내었다.

도 13A 및 도 13B는 인간 가변 영역 NEWM VH 및 REI VK(도 13A) 및 인간 KOL VH 영역(도 13B)를 가지는 무린 MN-14 가변 영역의 배열을 보여준다. CDRs는 박스이고, 인간화된 VH에 통합되는 무린 VH FRs는 카벳 등의 번호화 시스템(numbering system; Kabat et al., SEQUENCES OF PROTEINS OF IMMUNOLOGICAL INTEREST, U.S. Government Printing Office, Washington, D.C., 1987)에 따라 그들의 위치가 표시되었다. KLHuVH에 포함되는 CDRs 외부 무린 잔기들은 채워진 원으로 나타내었다.

도 14A-14C는 무린 및 인간화된 MN-14 VH 구조 잔기(FR) 사이의 아미노산 서열을 비교하여 보여준다. 쥐에서 유래된 것과 다른 인간 FR 잔기만을 보여준다. 또한 NEWM 및 KOL을 위한 CDRs는 보이지 않는다. 각각의 FRs에서 아미노산 치환 영역은 굵게 강조되었고, 치환 부위는 카벳 등의 번호화 시스템에 따라 나타내었다. 3 CDRs는 박스로 나타내었다.

도 15는 인간 갑상선 수질종양 모델에 hMN-14 CEA MAb 자체 및 DTIC를 처리한 효과를 보여준다.

도 16은 진행된 인간 결장암 모델에 hMN-14 CEA MAb 자체 및 CPT-11을 처리한 효과를 보여준다.

도 17은 종양이 적게 적재된 인간 결장암 모델에 hMN-14 CEA MAb 자체 및 CPT-11을 처리한 효과를 보여준다.

도 18은 인간 결장암 모델에 CPT-11 처리하기 3일전에 hMN-14 CEA MAb 자체를 예비-처리한 효과를 보여준다.

도 19는 인간 결장암 모델에 hMN-14 CEA MAb 자체 및 CPT-11의 여러 가지 투여 순서로 처리한 효과를 비교한 결과를 보여준다.

도 20은 인간 결장암 모델에 hMN-14 CEA MAb 자체 치료에 따른 GM-CSF 예비-처리의 효과를 보여준다.

도 21은 인간 결장암 모델에 낮은 CEA 발현 및 높은 CEA 발현(인터페론-γ 유도)에 따른 hMN-14 CEA MAb 자체 치료의 효과를 비교한 결과를 보여준다.

도 22A 및 22B는 각각 무린 및 인간화된 MN-14를 가지는 인간 REI 및 KOL 항체의 Vk 및 VH 영역의 인간, 무린 및 인간화된 서열을 비교하여 보여준다. 도 22A에 도시된 REI Vk의 인간 서열은 무린 및 인간화된 MN-14 Vk 서열과 유사하

다. 폐쇄된 원은 인간 REI Vk 서열에서 보유되는 서열을 가리킨다. CDRs는 박스로 나타내었다. 도 22B에 도시된 KOL VH의 인간 서열은 류린 및 인간화된 MN-14 VH 서열과 유사하다. 폐쇄된 원은 인간 KOL VH 서열에서 보유되는 서열을 가리킨다. CDRs는 박스로 나타내었다.

도 23A 및 23B는 hMN-14, 인간화된 III종 항-CEA 항체의 가변 경쇄인 Vk 및 가변 중쇄인 VH의 서열을 보여준다. CDR 영역 서열은 굵게 밑줄쳐서 나타내었다. 아미노산 잔기들 및 뉴클레오타이드들은 순차적으로 번호 매겨진다. 경쇄 가변 영역은 도 23A에서 보여주고 중쇄 가변 영역은 도 23B에서 보여준다.

실시예

본 발명은 하기 실시예에 의해 추가로 예시되고 이는 본 발명을 제한하는 것이 아니다.

실시예 1: 물질 및 방법

단클론 항체 및 세포주

TT, 인간 골수 갑상선 세포주를 Americal Type Culture Collection으로부터 구입하였다. 상기 세포를 10% 소태아 혈청, 페니실린(200 U/ml), 스트렙토마이신(100 µg/ml), 및 L-글루타민(2 mM)로 보충된 DMEM(Life Technologies, Gaithersburg, MD) 중 단층 배양하였다. 세포를 트립신, 0.2% EDTA에 의한 박리 이후 일상적으로 통과시켰다.

MN-14는 CEA와 반응하고, 정상 교차 반응 항원, NCA, 및 태변 항원과 반응하지 않는 III종 항-CEA MAb이다(문헌 [Hansen 등, Cancer, 71:3478(1993)]). 본 발명에서 음성 대조군으로서 사용되는 MN-14 및 LL2, 항-CD22 MAb의 인간화된 형태의 구축 및 특성화는 앞서 기술되었다.(문헌 [Sharkey 등, Cancer Res. 55:5935s(1995)]; [Leung 등, Mol. Immunol., 32:1416(1995)]). P3x63Ag8(MOPC-21)는 American Type Culture collection(Rockville, MD)로부터 구입되는 비연관되는(irrelevant) 쥐 골수종 IgG₁이다. 항체를 단백질 A 크로마토그래피에 의해 정제하였다.

생체 내 연구

조직 배양으로 증식된 2×10^8 세정된 TT 세포의 s.c. 주사에 의해, 6-8주된 암컷 nu/nu 쥐(Taconic Farms, Germantown, NY)에서 종양을 증식시켰다. 항체를 외측 꼬리 정맥을 통해 종양을 가지는 동물에게 정맥내 주입하였다. 주입된 항체의 양 및 투여 시간에 대한 세부사항은 각 연구에 대한 결과 부분에서 지시된다. 결과는 각 동물의 종양 부피 및 평균 $\pm$ SE 로서 제시된다. 종양 크기는 캘리퍼스(caliper)를 사용하여 종양의 길이, 너비, 및 깊이를 매 주 측정함으로써 모니터링하였다. 종양 부피를 3 측정치의 결과로서 계산하였다. Student's T-시험을 사용하여 통계 비교하여 종양 부피와 성장 곡선 하의 영역을 비교하였다.

실시예 2. TT(인간 골수 갑상선) 종양 세포의 주입 2 일 후 전달된 hMN-14 자체 및 DTIC의 병용 치료

상기 연구에서, hMN-14 자체 및 다카바진(DTIC)을, 100 µg 및 25 µg 투여량의 DTIC(2, 3, 및 4일째) 및, 2일 째 제공하고, 그 후 매 주 제공하는 250 µg 투여량의 hMN-14를 사용하여 종양 이식의 2일 후에 TT와 함께 제공하였다. hMN-14과 배합된 100 µg DTIC 투여는 둘을 단독으로 투여하는 것에 비해 더 효과적이었다(도 1A). 그러나, 100 µg DTIC 투여량은 너무 강한 반응을 일으키는 반면, 25 µg 투여량은 효과적이지 않았다. 놀랍게도, MN-14 단독 및 DTIC 단독의 효과는 부가적이지 않았다. 즉, 250 µg hMN-14 단독 및 100 µg DTIC 단독 처리의 결과를 보면, 250 µg hMN-14 및 100 µg DTIC의 배합이 그러한 공언된 결과를 가져올 것이라는 것을 예상하기 힘들다. 도 1A 참조.

본 연구에서, 앞선 연구에서와 마찬가지로 TT 세포 주입의 2일 후에 치료를 시작하였다. hMN-14를 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 15 및 22일째, 그 후 매 7일 째 100 µg/투여로서, 동물이 사망하고, 종양이 2.0 cm³의 부피가 되거나 인정상의 이유로 연구가 중단될 때까지 제공하였다. DTIC의 투여량은 투여 당 50 및 75 µg이었고, 이는 앞선 연구에서 제시된 투여량 사이이다. TT 세포를 60 마리의 털 없는 쥐에게 피하 투여하였다. 투여일은 0 일의 월요일이었다. 도 1B 참조.

결과는 MAb 치료 단독 또는 화학요법 단독에 의해 종양 증식이 상당히 지체되었다는 것을 보여준다(도 1B). 상기 일정의 hMN-14 항체와 결합된 75 µg의 DTIC의 투여는 이 둘을 단독으로 처리하는 것보다 훨씬 더 효과적이었다($p < 0.02$). 예기치 못하게, DTIC 및 MAb 병용 치료의 결과는 부가적이지 않았다. 7주 째, 75 µg DTIC 및 MAb 집단 중 8/10 쥐는, 75 µg DTIC 단독 집단 중 1/10 쥐 및 처리되지 않은 집단 및 MAb 집단 중 0/10 쥐와 비교시 관측가능한 종양이 없었다.

7주 째 평균 종양 부피는 0.018 ± 0.039 cm³(75 µg DTIC 플러스 MN-14), 0.284 ± 0.197 cm³(75 µg DTIC 단독), 0.899 ± 0.545 cm³(hMN-14 단독) 및 1.578 ± 0.959 cm³(미처리)였다. 항-CEA 항체 자체와 DTIC의 병용 치료는 독성을 증가시키지 않고 항체 또는 화학요법 단독의 항-종양 효과를 높인다. 병용 형식의 치료의 우수함은 놀라웠다.

투여 요약: (1) hMN-14을 2 내지 11일 째 100 µg/투여/쥐로 일요일을 제외하고 매일 제공(i.p.)하였다. 항체 처리는 DTIC 처리와 동일한 날에 개시하였다. (2) DTIC를 MTD의 5% 및 7.5%에 상응하는 50 내지 75 µg/투여로 2, 3, 및 4일 째 제공하였다. DTIC의 오로지 한 절차만이 제공된다.

집단: 6 집단의 쥐, 각 집단은 10 마리의 쥐를 포함.

집단 1: 미처리

집단 2: 2, 3, 및 4일 째(수요일, 목요일, 및 금요일) 50 µg/투여의 DTIC.

집단 3: 2, 3, 및 4일 제 75 μg /투여의 DTIC.

집단 4: 2, 3, 및 4일 제 50 μg /투여의 DTIC, 플러스 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 15 및 22일 제 및, 그 후 매 7일 제 동물이 사망하거나 종양이 2.0 cm^3 의 부피가 되거나 연구가 종결될때까지 hMN-14(100 μg /투여).

집단 5: 2, 3, 및 4일 제 25 μg /투여의 DTIC, 플러스 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 15 및 22일 제 및, 그 후 매 7일 제 동물이 사망하거나 종양이 2.0 cm^3 의 부피가 되거나 연구가 종결될때까지 hMN-14(100 μg /투여).

집단 6: 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 15 및 22일 제 및, 그 후 매 7일 제 동물이 사망하거나 종양이 2.0 cm^3 의 부피가 되거나 연구가 종결될때까지 hMN-14(100 μg /투여).

생존하는 동물을 모니터링하였다. 종양 및 체중을 매 주 측정하였다.

프로토콜: 2일 제, 2,200 mg/바이알을 주입 용 19.7 ml의 무균수로 재정비하였다. 생성되는 용액은 3.0 내지 4.0 pH 범위의 10 mg/ml의 다카바진을 포함하였다. 용액을 하기에 기술되는 희석을 위해 필요시 사용하였고, 나머지는 차후의 사용을 위해 1 ml 분액으로 냉동시켰다.

집단 2 및 4: 5 ml의 0.5 mg/ml 용액을 제조하였다. 100 μl 의 0.75 mg/ml/쥐를 i.v. 주사하였다.

집단 3 및 5: 5 ml의 0.75 mg/ml 용액을 제조하였다. 100 μl 의 0.75 mg/ml/쥐를 i.v. 주사하였다.

hMN-14의 양을 측정하였다. 100 μl 의 1 mg/ml hMN-14을 집단 4, 5 및 6의 쥐에게 i.p. 주사하였다.

실시예 3. 인간 MTC 이종 이식 모델에 있어서 방사성 면역 치료 연구.

출원인은 TT로 지시되는 인간 MTC 세포주를 생성하는 CEA 및 칼시토닌의 인간 MTC 이종 이식을 사용하여 방사성 표지된 항-CEA MAb의 실험적 방사성 면역 치료용 모델을 제조하였다([Stein, 1992 #82], Appendix 참조). 2×10^8 세포의 접종에 의하여 털없는 쥐에서 MTC 종양을 발생시켰고 MAb의 주입 이전에 2 내지 5 주 동안 증식시켰다. 그 후, 세포 측정에 의하여 TT 세포와 반응하는 것으로 보여진 MN-14에 의해 생물 분포 및 RAIT 연구를 수행하였다. 상기 연구에서 Ag8 및 Mu-9 모두를 음성 대조군 MAb로서 사용하였다. 0.08 g 이하의 더 작은 종양을 사용하는 예비 조사는 ^{131}I -MM-14의 주입 7일 이후에, 종양의 그램 당 주입된 투여량의 백분율(%ID/g)는 68.9% 였고, 공 주입된 ^{125}I -Ag8 대조군은 이에 비하여 12.6% ID/g였다. 더 큰 종양의 사용시(털없는 쥐에서 5 주 동안 증식됨; 평균 종양 중량 = 0.404 g), ^{125}I -MN-14의 투여 7일 후 관측된 종양의 % ID/g는 12.4%였다. 그러나, 공 주입된 ^{88}Y -MN-14의 %ID/g는 50.5%이거나 ^{125}I -MN-14의 4.1배였다. 또한, 종양-대-혈액, 폐, 간, 비장, 및 신장은 ^{88}Y -MN-14의 경우 ^{125}I -MN-14보다 높은 반면, 종양-대-뼈 비율은 두 제제에 대하여 동일하였다. ^{125}I -MN-14 및 ^{88}Y -MN-14 생물 분포 데이터를 사용하여 ^{131}I -MN-14 및 ^{90}Y -MN-14 각각의 종양 방사선량 측정을 예측하였고, ^{90}Y -MN-14(115 μCi)의 MTD에서 전달된 방사선 흡수량은 ^{131}I -MN-14(275 μCi)의 MTD에서 전달된 것에 비해 1.75배 높았다(4900 cGy 대 2800 cGy).

상기 모델의 치료 연구는 ^{90}Y -MN-14 가 ^{131}I -MN-14보다 더 나은 치료제라는 것을 보여주었다. 5주 된 종양에서, ^{90}Y -MN-14의 MTD에서 5주 만에 종양 증식의 억제에 관측된 반면, ^{131}I -MN-14에서 오로지 종양 증식이 지체되었다. 더욱이, 더 작은 2 주 된 종양을 치료하는 경우, ^{90}Y -MN-14의 MTD에서 평균 60%의 종양 부피가 감소하였고, 종양의 일부 완전한 퇴화가 관측되었다. 상기 항종양 효과는, 미처리된 동물 및 대조군 MAb의 MTD에서 처리된 동물에 있어서의 상대적으로 급격한 종양 증식과 비교시 매우 상당한 것이다. 따라서, 본 예비 연구는 동물 모델이 항-CEA MAb에 의한 실험적 RAIT에 명시적으로 적합하다는 것을 증명하였다.

^{90}Y 가 표적 세포에서 더 긴 시간 동안 보유된다는 사실에 부가하여 ^{131}I 와 비교시 ^{90}Y 의 더 긴 경로 길이 및 더 높은 에너지는 종양에 대한 증가된 방사선 투여 및 따라서 에퀴톡식(equitoxic) 투여에서 더 효과적인 치료로서 결론지어졌다. 잔여화(residualizing) ^{131}I (refs)에 대한 상기 결과가 MTC 중 MN-14으로 일반화될 수 있다면, 잔여화 ^{131}I 는 본 발명에서 연구된 크기의 종양에서 ^{90}Y 에 대하여 적어도 동일하게 효과적이거나, 미세 전이 질병 또는 수술 후 보조 치료에서 가장 우수할 것이다.

실시예 4 : 화학요법

누드 쥐에서 TT MTC 이종이식(xenograft)의 성장효과에 대하여 4개의 약물, 즉 독소루비신(doxorubicin), 다카바진(DTIC;dacarbazine), 시클로포스파미드(cyclophosphamide), 및 빈크리스틴(vincristine)을 단독 및 조합으로 측정하였다. 복용량은 mg/m^2 에 대하여 인간에게 임상적으로 부여된 각 약물의 양을 기초로 선택하였다. 동물들은 생존을 모니터링하고, 종양 부피 및 체중을 주마다 측정하였다. 도 3은 본 연구에서 동물의 종양 성장곡선을 나타낸다. DTIC에 의해 야기되는 성장 연기가 다른 약물에서 보다 더 길게 나타내었지만, 개별적으로 주어진 빈크리스틴을 제외하고 독소루비신, DTIC 및 시클로포스파미드는 현저한 성장억제를 나타내었다. 각 그룹에서 2배되는 대략적인 평균 시간은: 비처리군은 1주; 독소루비신은 2.5주; DTIC는 7.5주; 시클로포스파미드는 3주; 및 빈크리스틴은 1.5주;이었다. 독소루비신 및 DTIC의 조합은 각 약물의 단독과 비교하여 2배되는 평균시간은 10주로 증가하는 것으로 효율성이 향상되었다. 그러나, 독소루비신 및 DTIC 조합의 증가된 효율성은 DTIC 단독과 비교하여 95% 신뢰성 수준에 도달하지는 않았다. AUC 비교에서의 P값은 하기와 같았다: 독소루비신+DTIC 대 독소루비신은 $P < 0.01$, 독소루비신+DTIC 대 DTIC은 $P < 0.1$ 이었다. 4-약물 섭취는 2배되는 평균시간이 독소루비신 및 DTIC($P < 0.01$)와 비교하여 12주로 증가되었다.

각 약물 대 비처리군의 생존 결과의 로그랭크(log rank) 분석은 단지 DTIC 및 시클로포스파미드의 차이를 나타내었다. 비처리된 대조군에서의 평균 생존시간은 DTIC 및 시클로포스파미드 처리군에서 각각 11주 및 8주, 및 약물의 조합에서는 12주 이상과 비교하여 4주였다. 체중 손실에 의해 측정되어지는 독성은 모든 연구 군에서 수용가능한 범위내였다. 최대 체중손실은 모든 4개 약물로 처리된 쥐에서 처리 후, 체중 3~12% 손실범위로 1주에서 관찰되었다.

실시예 5. MTC 처리의 방사선면역법 및 화학요법 조합

RAIT + 4-약물 조합 ⁹⁰Y-항 CEA MAb MN-14와의 RAIT 및 4-약물 조합의 효과는 비처리된 쥐와 상기에서 기재된 4-약물 처방(독소루비신, DTIC, 시클로포스파미드 및 빈크리스틴)으로 RAIT(105 μ Ci)의 최대 내성용량(MTD)의 100%, RAIT의 MTD의 50%, 및 4개의 약물과 조합된 RAIT의 MTD의 50%로 처리된 것에서 TT의 성장을 비교하여 측정하였다. 도 4는 다양한 처리로 부여된 쥐에서 TT 종양의 성장 곡선을 나타낸다. 처리군의 모두 4개는 비처리된 동물과 비교하여 효율성이 현저히 향상되는 것으로 나타내었다. 비처리된 동물에서 2배되는 대략적인 평균시간이 1.5주인데 반하여, 4 약물과 화학요법에서는 평균 이배 시간은 10주로 나타났으며, RAIT 단독은 MTD의 50% 및 100%에서 각각 4주 및 8주 2배 시간을 얻었다. 예상한 바와 같이 100% RAIT 그룹 및 4-약물 치료 처방 모두 50% RAIT 군보다 더 현저하게 나타났다. 더욱 중요하게, 50% RAIT 및 4-약물 처방의 조합은 각각 단독 치료와 비교하여 향상된 결과를 얻었으며, 대략적으로 12.5주로 평균 2배 시간은 증가하였다. 4-약물 처방으로 조합된 처리와 비교하여 $P < 0.02$, 및 100% RAIT와 비교하여 $P < 0.01$ 이었다.

처리후 1주 평균 체중손실(최저점)은 100% RAIT 및 4-약물 처방에서 9%였지만, 조합된 50% RAIT + 4-약물 치료에서는 15%였다. 게다가, 조합된 치료 군에서 한 동물은 처리후 3주에 죽었으며, 두 번째 동물은 20%이상 체중손실을 나타냈다. 따라서, 상기 처리는 최대내성용량이 증가하였다.

RAIT에 더하여 2-약물 처방으로 화학요법

또한, ⁹⁰Y-항 CEA MAb MN-14와의 RAIT 및 독소루비신 및 DTIC로 이루어진 2-약물 조합으로의 화학요법의 조합 효과는 상기 MTC 이종이식 모델에서 평가하였다. 그룹에서 대략적인 2배시간은: 비처리군은 1.5주; 독소루비신 + DTIC 8주; RAIT의 MTD는 10주; 및 2-약물 처방의 25~75%로 조합된 RAIT의 MTD는 12주 이상이었다. 따라서, RAIT단독은 2-약물 처방보다 더 효율적이었으며, 보다 중요하게 RAIT 및 2-약물 처방을 조합한 것은 각각 단독 치료와 비교하여 향상된 결과를 나타내었다. 2-약물 처방으로 조합된 치료와 비교하여 $P < 0.005$, RAIT 단독과 비교하여 $P < 0.02$ 이었다.

처리 후 1~2주 평균 체중손실(최저점)은 100% RAIT + 75% 2-약물 화학요법군을 제외하고는 모든 군에서 2~8%이었으며, 2주에서 13% 손실이 관찰되었다. 게다가, 상기 조합된 군에서, 2마리 동물은 처리 후 3~4주에서 죽었으며, 한 마리는 20% 이상 체중손실을 경험하였다. 따라서, 독소루비신 및 DTIC의 75% 복용량 수준에 100% RAIT 처리를 더하여 MTD를 초과한 반면, 상기 2-약물 조합의 50%는 100% RAIT의 조합에 내성이 있을 수 있다.

RAIT + 독소루비신

전기의 공개는 상기 모델에서 RAIT와 독소루비신의 조합을 기재(Stein *et al.*, *Clin Cancer Res.*, 5:3199s(1999); Behr *et al.*, *Cancer Res.* 57:5309(1997))하였지만, 직접 비교는 RAIT + 독소루비신 처방을 제초하였다. 또한, 직접 비교는 RAIT + 4-약물 처방을 제초하였다. 모든 치료는 비처리된 동물과 비교하여 현저한 효율성을 얻었다. RAIT + 독소루비신에서의 평균 2배 시간은 12주였다. 본 연구에서, 독소루비신 및 DTIC 또는 4-약물 처방의 50%와 RAIT의 전체 MTD 조합은 상기 두 그룹 사이에서 통계적으로 현저한 차이없이 15주 이상의 평균 2배시간을 증가하였다. 목적 반응의 실질적인 수는 상기 연구에서 관찰되었다. RAIT + 독소루비신으로의 하기 처리는 최소한 4주에서 안정한 질병을 갖는 5 동물 중 3 완전반응, 2 부분적 반응이었다. RAIT + 2-약물 프로토콜은 12동물 중 10 완전반응 및 2 부분적 반응으로 목적 반응이 증가하였으며, RAIT + 4-약물 치료 프로토콜은 9마리 쥐 중 7 완전반응 및 2 부분적 반응을 나타내었다.

RAIT 플러스 DTIC

단독으로 처리할 경우 DTIC는 가장 효율적인 화학요법 제제이기 때문에, RAIT + DTIC의 효율성은 RAIT + 독소루비신 및 DTIC의 것과 비교하여 측정하였다. 치료 프로토콜에서 독소루비신을 생략하는 것은 특수적으로 공지된 심장독성과 같은 상기 약물의 독성을 피하기 위해 임상 적용에서 중요할 것이다. 도 5에서 나타낸 바와 같이, RAIT와 조합, 독소루비신 및 DTIC 또는 DTIC 단독으로 화학요법으로 주어진 2개의 연구 그룹은 서로 대략적으로 동등하였으며, 모두 단독 형태 치료보다 더 효율적이다. AUC 비교에서 P값은 하기와 같았다: RAIT+DTIC 대하여 DTIC는 $P < 0.01$, 및 RAIT+DTIC 대하여 RAIT는 $P < 0.05$ 이다. RAIT + DTIC 및 RAIT + 독소루비신 및 DTIC의 평균 2배 시간은 DTIC 및 RAIT 단독 각각에 대하여 7.5주 및 9주에 비하여 각각 15.5주 및 14주였다. 따라서, RAIT 플러스 DTIC의 조합 형태치료는 DTIC 화학요법 100%이상까지 2배 평균시간이 증가하였다. RAIT + DTIC 및 RAIT + 독소루비신 및 DTIC 그룹사이에서 AUC 또는 로그 랭크 분석에 의하여 어떠한 차이도 관찰되지 않았다.

실시예 6: 자체 항-CEA 단독으로 연구

자체 hMN-14으로의 치료

누드 쥐에서 TT 종양의 성장에 대하여 비라벨화된 hMN-14의 효율을 연구하기 위해, hMN-14의 단독주입을 종양세포 주입 후 1일 또는 11일에 정맥내 투여하였다. 도 6은 비처리된 대조군과 비교하여 0.5mg hMN-14/쥐로 처리한 동물의 종양 성장곡선을 나타낸다. 비처리군은 16마리 동물을 함유하였고; 2개의 처리 군은 각각 10마리를 함유하였다. 현저한 성장지연은 비처리군 및 종양 주입 후 1일에 처리된 군 사이에서 관측되었다. 평균 종양크기에서 현저한 차이($P < 0.05$)는 32일부터 93일 까지 관측되었다. 32일 및 60사이에서 비처리된 동물과 비교하여 MN-14 처리군에서 종양크기의

64~70% 억제하였다. 11일 군 및 비처리된 동물에서 평균 종양크기 사이에서 현저한 차이가 없었다. 또한, 종양성장에서 현저한 지연은 성장 곡선하에서 면적의 t-시험 분석으로 관찰되었다. 비처리된 군에서 $P < 0.05$ 은 종양 주입에 이은 1일 치료된 군과 비교하였으며, 종양 주입에 이은 11일 치료된 군은 아니었다.

치료의 특이성

도 7은 항-종양 반응의 특이성에 대하여 연구 결과를 요약한다. 누드 쥐에서 TT 종양의 성장에 대하여 비라벨화된 hMN-14의 효과는 음성 대조군 인간화된 MAb, hLL2(항-CD22), 및 쥐과 MN-14의 것과 비교하였다. MAb(0.5mg/쥐)를 TT 세포 후 1일 정맥내 투여하였으며, 주마다 0.5mg/쥐의 3번 복용을 부가하였다. 15마리의 군으로 연구하였다. 0.5mg hMN-14로 치료한 것부터 첫 연구에서 관측된 성장억제는 본 연구에서 확인하였다. hMN-14 및 비처리된 군 사이에서 평균 종양크기($p < 0.05$)의 현저한 차이는 23일에서 시작이 관측되었다. 37일에서 hMN-14로 처리된 군에서 평균 종양부피는 비처리된 대조 동물의 42.7%이었다. 쥐과 MN-14로의 치료는 hMN-14과 유사한 결과를 얻었다. hLL2으로의 치료는 종양성장이 늦지 않았으며; 대신 성장속도에서 (현저하지 않지만)작은 증가가 있었다. 예를들어, 37일 hMN-14로 치료된 종양의 87%는 비처리된 것의 40% 및 hLL2 치료된 군의 29%과 비교하여 0.5cm^3 미만이었다. 성장곡선하에서 면적의 T-시험 분석은 hLL2로 치료된 군을 제외하고 비처리된 군 및 hMN-14 또는 쥐과 MN-14로 치료된 군 사이에서 현저한 차이($p < 0.05$)를 설명하였다. 게다가, hMN-14군은 쥐과 MN-14로 치료된 동물을 제외하고는 hLL2 군과 현저히 상이하였다.

복용량의 효과

누드 쥐에서 TT 종양의 성장에 대하여 비라벨화된 hMN-14의 복용량의 효과를 연구하기 위해, hMN-14의 복용량 증가를 측정하였다. 항체 복용량은 TT 세포 후 1일 투여하였으며, 연구의 말미까지 주마다 투여하였다. 주간 복용량은 6마리의 군에서 0.125mg에서 2.0mg hMN-14/쥐 범위였다. 비처리된 군 및 모든 치료 군사이에서 성장곡선하 평균 종양크기 및 면적에서 현저한 차이를 관측하였다(도 8). 예를들어, 2 가장 낮은 hMN-14 처리 군에서 21일 및 49일 평균 종양부피는 비처리된 동물에서 종양크기의 27~40%이었다. 낮은 복용량, 0.125mg 및 0.25mg으로의 치료는 차이가 통계적 중요도에 도달하지는 않았지만, 높은 복용량으로 치료한 것 보다 더 효율적으로 나타났다.

타이밍

누드 쥐에서 TT 종양의 성장에 대하여 TT 주입 및 hMN-14의 초기 복용량 사이에서 시간의 효과를 MAb의 투여날을 변화하면서 측정하였다. hMN-14(0.25mg)은 TT 세포 후 1, 3, 또는 7일에 투여하였으며, 연구의 말미까지 주간으로 투여하였다. 7~8마리 동물의 군을 연구하였다. 결과를 도 9에 요약하였다. 비처리된 군 및 모든 세 처리군사이에서의 평균 종양크기에서 현저한 차이($p < 0.05$)를 관측하였다. 그러나, 비처리된 쥐 및 7일 치료 군사이에서 평균 종양크기에서의 차이는 단지 28일 한 시간 포인트에서 현저하였다. 1일 치료된 쥐는 21~77일에서 현저한 차이를 얻었으며, 3일 치료 쥐는 21~70일에서 현저한 차이를 얻었다. 성장 곡선하에서 면적의 T-시험 분석은 비처리 군과 비교하여 TT 세포 투여 후, 1 또는 3일에서 hMN-14로 처리한 군에서 현저한 성장억제가 나타났다. 상기 분석은 비처리 군 및 7일 처리된 군(5주에서 $p=0.057$)사이에서 차이의 95% 신뢰 한계에 도달하지 못하였다.

실시예 7: 자체 항-CEA 플러스 MTC의 DTIC 치료의 조합

자체 hMN-14가 DTIC의 효율성에 부가할 수 있는지를 연구하기 위해 누드 쥐에 갖는 TT에 비라벨화된 MAb의 치료의 과정과 조합하여 DTIC($75\mu\text{g}$ /복용량)을 부여하였다. DTIC를 TT 세포의 s.c. 주입 후 2일 시작하여 한 과정으로 $75\mu\text{g}$ /복용량으로 3 연속적으로 투여하였다. hMN-14 MAb 치료는 첫 2주에서 5일동안 $100\mu\text{g}$ /복용량/일로, DTIC의 첫 복용량과 동일한 날에 시작하였으며, 주마다 2번 하였다. 종양성장에서 현저한 지연은 MAb 치료 또는 화학요법 단독의 상기 스케줄에 의해 야기되었다(도 10). hMN-14의 스케줄의 조합으로 DTIC $75\mu\text{g}$ 복용량은 단독 치료보다 현저하게 더 효과적이다($p < 0.02$). 7주에서 $75\mu\text{g}$ DTIC 단독 군에서 1/10, 및 비처리된 군 및 MAb 단독 군에서 0/10과 비교하여 $75\mu\text{g}$ DTIC+ MAb 군에서 8/10 쥐는 명백한 종양이 없었다. 7주에서 평균 종양부피는 $0.018 \pm 0.039\text{cm}^3$ ($75\mu\text{g}$ DTIC+ hMN-14), $0.284 \pm 0.197\text{cm}^3$ ($75\mu\text{g}$ DTIC), $0.899 \pm 0.545\text{cm}^3$ (hMN-14), 및 $1.578 \pm 0.959\text{cm}^3$ (비처리군)이었다.

항-CEA MAb MN-14는 세포살상제(cytotoxicagent)에 컨쥬게이션 없이 MTC에서 예상치 못한 항-종양 효율이 나타났다. hMN-14 치료 및 비처리군에서 평균 종양크기의 차이는 3주에서 시작하여 적어도 2달까지 관측되었다. 이소타입 매치된 음성 대조군 MAb로 치료는 종양 성장이 느리지 않았다. 이는 "자체" 항-CEA MAb로 종양억제의 첫 증거이다. 그러나, DTIC와 함께 자체 항-CEA MAb의 조합된 치료는 독성의 증가없이 항체 또는 화학요법의 항-종양효과가 증대한다. 조합된 형태 처리의 우월성은 MTC 처리의 화학요법적 처방으로 CEA-MAb 치료의 통합을 논의한다.

실시예 8

도 15는 갑상선 수질종양(medullary thyroid carcinoma) 모델에서 자체 hMN-14 CEA Mab 및 DTIC의 효과를 나타낸다. 치료는 종양 이식 후 2일에 시작되었다. DTIC는 2, 3, 및 4일에 쥐에 MTD의 7.5%에서 $75\mu\text{g}$ 로 투여되었다. hMN-14는 2~5, 7~10, 11, 15, 22일에 $100\mu\text{g}$ /날로 투여되었으며, 다음 주당 한번 투여하였다. 결과는 모든 군에서 곡선하 면적이 통계적으로 현저한 차이($P < 0.05$)를 나타낸다. 자체 hMN-14 CEA Mab 치료는 종양성장 억제에 대한 현저한 효과를 나타내었다. DTIC와 조합될 경우 각 단독처리와 비교하여 종양성장의 억제의 향상된 수준을 나타내었다.

실시예 9: 결장암 세포에서 자체 항-CEA 항체 치료 + CPT-11 또는 5-FU

본 연구는 결장암 성장에서 인간화된, 자체 항-CEA, hMN-14 항체(hMN-14) 단독, 및 화학요법과의 조합의 생체내 및 생체밖 효과를 공개한다.

방법 및 물질

항체 생산. 쥐과 MN-14 및 상이한 CEA 에피토프(NP1, NP3, MN3, MN15; (Sharkey, R.M., et al., Cancer Res, 50:2823-2831, 1990)를 표적화하는 기타 항체에 따라 CDR-이식된(인간화된) MN-14(hMN-14) 항-발암태아성(carcinoembryonic,CEA)(Sharkey, R.M., et al., Cancer Res, 55:5935-5945,1995) 항원을 단백질 A 및 이온크로마토그래피(Q-Sepharose;Pharmacia, Piscataway, NJ)로 정제하였다. 순도는 면역전기이동법(immunoelectrophoresis), 환원 및 비환원 조건을 사용한 폴리아크릴아미드 겔 전기영동법 및 크기배제 고압 액상 크로마토그래피로 시험하였다.

생체내 치료연구. 생존 치료는 CEA-양성 GW 39 폐내부(intrapulmonary) 미소전이(micrometastasis) 모델을 사용하여 수행하였다(Sharkey, R. M., et al., J Natl Cancer Inst., 83:627-632,1991; Blumenthal, R.D., et al., Cancer Res, 52:6036-6044,1992). 축적 피하 GW-39 인간 결장직장암은 10% 또는 5% 세포 부유액을 제조하기 위해 사용되었다. 세포(30 μ l)를 측미정맥(caudal vein)으로 정맥내 주입하였다. hMN-14 IgG는 세포 주입 후 0 또는 3일에 시작하여 날마다 14일 및 주간적으로 2번 투여하였으며, 그 후 100 μ g/일의 복용량에서 연구를 지속하였다. CPT-11을 세포 주입 후 0 또는 3일에 시작하여 5일동안 날마다 160 μ g의 복용량으로 투여하였다. 몇 연구에서, 축적 GW-39 종양은 4일동안 날마다 2번 IFN γ 의 100,000U를 받은 쥐로부터 유래되어 CEA 발현을 과다생성하였으며, 이는 전기에 기재(Blumenthal, R. D., et al., Int. J. Cancer, 51:935-941, 1992)된 것과 같이 면역조직학으로 확인하였다. 체중을 주간적으로 모니터링하였으며, 동물생존을 기록하였다. 결과는 Kaplan-Meier 시험으로 분석하였으며, 중간생존 기간(median survival time)을 결정하였다.

암 세포의 항체-유도된 화학민감(chemosensitization)의 생체내 효과

hMN-14-유도된 화학민감의 효과를 생체밖은 물론 생체내에서 나타났다. 상기에서 기재된 바와 같이, GW-39 폐내부 미소전이를 갖는 쥐에서의 생존 곡선은 비처리된 또는 hMN-14 단독(연구기간 동안 100 μ g/d x 14d 및 주마다 2번), CPT-11(80 μ g/d x 5일) 단독의 10% MTD 또는 모두 함께 처리된 것이다. 처리는 세포주입(10% GW-39 세포 부유액의 30 μ l)의 날로 시작되었다. 각 처리군은 10마리 쥐로 시작하였으며, 연구는 2번 반복되었다. 결과는 GW-39 폐 미소전이를 갖는 누드 쥐에 hMN-14 및 CPT-11의 동시투여는 단독 형태의 효과보다 생존이 증가함을 나타낸다. CPT-11의 10% MTD의 투여는 56일 내지 63일까지 1주 중간 생존에서 증가한 것으로 나타났다. 0일에 hMN-14 및 CPT-11 모두로 복용된 동물들의 중간생존 기간은 77일까지 부가적 2주 증가하였다(비처리된 쥐와 비교하여 p < 0.005). 최대 항체 증가는 주입 후 3일에 나타나기 때문에, hMN-14처리는 높은 항체 섭취 및 생체내 화학증감을 인지함으로써 상기 복용이 조합된 형태 처리의 치료적 효과를 증가시키는지를 결정하기 위해 CPT-11 전에 3일에 시작되었다. 결과는 CPT-11에 이어 hMN-14로 3일 예비처리는 70일의 중간 생존을 갖는 3일 CPT-11단독과 비교하여 105일까지 중간 생존이 증가하였다. 본 연구에서 hMN-14 및 CPT-11의 공동처리는 63일의 중간생존을 갖는 0일에 CPT-11 단독 또는 35일의 중간 생존을 갖는 비처리된 쥐에 대항 70일의 생존에 의해 증명된 바와 같이 우세하였다. 결과는 5% GW-39 세포 부유액을 10% GW39 부유액을 대신하여 사용되었던 실험과 유사하였다.

실시예 10: 종양세포 화학민감성에 대하여 hMN-14 및 CPT-11로 처리에 앞서 면역조절제로의 예비처리의 생체내 효과

실험은 인터페론(IFN γ)와 GW-39 축적종양(10% GW-39 세포 부유액)의 예비치료의 결과로서 더 높은 CEA 수준으로 발현하는 GW-39 종양을 갖는 쥐에서 함께 시작되는 CPT-11과 hMN-14의 조합 치료를 평가하였다. 자체 CEA 항체(hMN-14)의 함양효과를 증가하는 인터페론-감마를 포함하는 실험을 하기와 같이 시행하였다.

먼저, GW-39 인간 결장암을 4일동안 하루에 2번 IFN-감마의 100,000단위를 수여받은 쥐에서 연속적으로 성장되었다. GW-39 종양을 갖는 대조군 쥐는 IFN을 수여받지 않았다. 실험 쥐는 8마리의 2군으로 2마리 쥐(예를들어, IFN 유무)로 GW-39(w/v)의 5% 부유액을 정맥내 주입하였다. 각각의 4마리는 IFN-처리 쥐 및 비처리된 쥐의 4마리에서 종양을 받았다. 다음, 8마리 쥐들의 하나의 군은 hMN-14(1일당 100 μ g x 14일 및 실험이 끝날때까지 주간적으로 2번)을 받았고, 다른 군은 CPT-11 160 μ g/일 x 5일(=최대 내성용량의 20%)을 받았고, 세 번째 군은 항체+조합 약물의 동일한 복용량을 받았고, 4번째 군은 전혀 치료하지 않았다. 동물 체중을 측정하고 생존을 주간으로 결정하였다. 또한, 주입된 쥐에서 IFN으로 치료된 축적 종양의 시료는 면역조직학적으로 수행되어 IFN-감마로 처리된 쥐에서의 종양에서 CEA 발현이 증가하였고, 이는 CEA 염색이 전혀 나타나지 않은 Ag8과 같은 무관한 IgG로 면역조직학적으로 부유액을 처리하여 조절되었다.

실시예 11

비교는 동물모델에서 저 및 고(전기에서 기재된 바와 같이 인터페론-감마에 의해 유도된) CEA-발현 종양세포에 자체 hMN-14 CEA Mab의 효과를 수행하였다. 결과는 종양세포에서 CEA 항원의 증가된 발현은 항-CEA 항체의 향상된 효율성과 상호관련 있음을 설명한다. 비교연구의 결과는 도 21에서 설명한다. 따라서, 인터페론-감마 예비처리는 암의 치료에서 항-CEA 항체 치료의 효율성을 증대시키는 데 유용하다.

실시예 12. CEA 항체 및 GM-CSF로 에스자(sigmoid) 결장암 치료

JR은 그의 에스자 결장암의 발견 및 제거의 시점에서 발견된 간으로의 전이를 감소시키는 5-플루오로우라실 및 류코보린(leukovorin)으로의 화학치료에 굴절적인 62살의 남자이다. 항-발암태아성 항원(CEA;carcinoembryonic antigen)의 플라스마 적정은 34ng/mL이고, 간의 단층촬영장치는 오른쪽 엽에서 직경 2~4cm으로 측정되는 여러 작은 병변이 나타나고; 다른 방사선 연구는 정상적으로 나타난다. 인간화된 항-CEA IgG₁, hMN-14, 단클론 항체와의 면역치료법은 2시간에 걸쳐 300mg/m²의 정맥내 복용량으로 4주동안 주마다 시작하였다. hMN-14 치료에 앞서 1주에 환자는 200mcg/m² GM-CSF(sargamist Leukine[®])의 2 연속주입, 3일 떨어져 hMN-14치료의 4주동안 주마다 2번 연속되었다. 상기 4주 후, hMN-14 및 GM-CSF는 부가적인 3달동안 각 주에 동일한 복용량으로 주어졌지만, GM-CSF의 복용량은 250mcg/m²로 증가되었다. 인간화된 CEA 항체의 투여에 앞서 환자는 경구적으로 50mg 디펜하이드라민(diphenhydramine, Benadryl[®]), 및 경구적으로 500mg 아세트아미노펜(Tylenol)을 부여한다. 상기 시기에서 환자는 간 전이로 CT 측정 및 별개의 체내 방사선 스캔으로 재발한다. 또한, 혈액은 화학적으로 취급하고 그의 혈액 CEA 적정의 결정을 하였다. 간의 밖에서는 질병이 면역이 없는 것으로 나타났지만, 간에서 측정가능한 종양의 직경의 합은 40%까지 감소하는 것으로 나타났으며,

환자의 혈액 CEA 적정은 18ng/mL로 감소하여 치료적 반응이 나타났다. hMN-14의 200mg/m² 및 GM-CSF의 250mcg/m²로 매 주에 한번씩 주어지는 hMN-14 및 GM-CSF의 면역치료법은 2달동안 투여하고, 재발은 간 종양의 직경의 합으로 감소하는 것으로 나타나며, CEA 적정에서 10ng/mL로 떨어졌다. 종양감소는 예비치료 경계를 초과하여 > 65%로서 측정되기 때문에, 치료는 부분적 반응을 제공하는 것으로 고려된다. 상기 후, 복용량은 다음 6달 동안 매달에 한번으로 덜 빈번하게 하였으며, 모든 연구는 질병의 변화가 없음을 나타낸다. 다음, 환자는 10달동안 이어졌으며, 치료에 역반응없이 일반적으로 질병의 증후도 없이 부분적 감퇴를 나타낸다.

실시예 13. 전이 결장암의 면역치료법 및 화학요법의 조합

ST는 원 종양이 절제에 이어 결장암의 간 및 폐 전이를 갖는 52살 여성이다. 그녀는 Gramont 스케줄(A. de Grammont et al., J Clin Oncol. 2000;18:2938-1947)에 기반하여 화학요법 및 면역치료법 프로토콜의 조합을 인간화된 항-CEA 단클론 항체 IgG₁과 함께 두었다. 항체의 주입에 앞서 그녀는 경구적으로 50mg 디페닐하이드라민(Benadryl[®]) 및 경구적으로 500mg 아세트아미노펜(Tylenol[®])을 받는다. 그녀는 1일에 류코코린과 동시에 포도당 5%의 250mL에서 2시간 주입으로 85mg/m² 옥살리프라틴(oxaliplatin)과 함께, 매 2주 연속 2일동안 5-플루오로우라실(400mg/m²/일)의 순간주입 및 5-플루오로우라실(600mg/m²/일) 22시간 연속주입에 이어 류코보린(200mg/m²/일)의 2시간 주입을 받는다(FOLFOX4 스케줄). 또한, 환자는 5-하이드록시트리프타민-3-수용체 길항제와 함께 항-구토성 예방을 받는다. 상기 2주 화학요법에 앞서 1주는 hMN-14 단클론 항-CEA 항체를 200mg/m²의 복용량으로 2시간에 걸쳐 주입하고, 2주 화학요법 순환의 각 주로 반복하고 다른 화학요법 순환으로 다음 달동안 각 주로 반복하였다. 또한, G-CSF(filgrastim, Neupogen[®])의 5mcg/kg/일의 피하 복용을 두 번째 화학요법 순환을 시작하면서 주마다 한번씩 투여받고, 다음 3달에 걸쳐 hMN-14 항체와 면역치료법의 기간동안 상기 복용을 계속받는다. 화학요법의 5 순환 전체는 hMN-14 항체 및 필그라스티움(filgrastim)의 투여로 계속되었다. 따라서, hMN-14 및 필그라스티움 치료는 동일한 복용으로 화학요법없이 다음 3달 동안 매주 주어졌다. 환자는 2달 후에 올려져서, 그녀의 간 및 폐 전이는 단층촬영법에 의해 치료전 단층촬영 측정과 비교하여 그녀의 폐 및 간에서 측정된 질병의 > 80%의 감소를 나타낸다. 또한, 그녀의 혈액 CEA 적정은 63ng/mL의 예비 치료수준에서 9ng/mL로 떨어짐을 나타낸다. 그녀는 이어 6달에 걸쳐 이어졌으며, 그녀의 질병은 폐 및 간에서 잔존하는 어떤 병변 및 질병의 증가없이 안정한 것으로 나타난다. 환자의 우세한 독성은 인후두이감각증(laryngopharyngeal dysesthesias)으로 이루어진 말초감각 신경 장애이다. 또한 환자는 화학요법 순환시 설사, запкь, 구역질 및 구토를 경험하지만, 이것들은 과도하지 않는다. 그녀는 단지 면역요법을 투여할 경우 어떠한 역반응을 경험하지 않으며, 현저한 제한없이 전 시간 활성에 돌아갈 수 있다.

실시예 14

도 16은 진행된 결장암 모델에서 자체 hMN-14 CEA Mab 및 CPT-11 치료의 효과를 나타낸다. hMN-14는 쥐에게 종양 전이 후 0일을 시작하여 14일에 걸쳐 100μg/일의 복용으로 주어졌고, 다음 2번/주로 주어졌다. CPT-11은 5일에 걸쳐 60 μg/일로 주어졌다. 상기 조건하에서 자체적 hMN-14의 효과는 나타나지 않고, 단지 CPT-11의 적당한 효과가 관찰되었다(p < 0.05). 그러나, hMN-14는 63일의 CPT-11 중간 생존 대 77일의 조합 치료 중간생존을 비교한 것에서 보는 바와 같이, CPT-11의 효과를 증가시킨다(p < 0.005). hMN-14 CEA Mab 및 CPT-11의 조합 치료는 진행된 인간 결장종양 전이를 갖는 동물의 생존을 현저히 연장한다.

실시예 15

도 17은 낮은 종양 부하된 암모델에서 hMN-14 CEA Mab 및 CPT-11 치료의 효과를 나타낸다. 5% 종양세포 부유액을 사용하는 감소된 종양 부하 모델에서 CPT-11, hMN-14 단독 및 hMN-14 + CPT-11의 조합치료를 비교하였다. 복용은 상기 실시예 14에 기재된대로 하였다. 상기 조건하에서 hMN-14 단독의 명백한 효과가 나타나지 않았다. CPT-11 단독은 70일의 중간 생존시간을 초래하였다. 반대로, 조합 치료는 91일의 중간생존 시간을 나타내었다(p < 0.025). hMN-14 및 CPT-11의 조합은 인간 결장암의 전이모델에서 낮은 종양부하를 갖는 동물의 생존을 현저히 연장시킨다.

실시예 16

도 18은 암모델에서 CPT-11 치료에 앞서 3일에 주어지는 자체 hMN-14 CEA Mab로의 예비처리 효과를 나타낸다. 5% 종양세포 부유액을 사용한 감소된 종양 부하 모델에서, CPT-11, hMN-14 단독, 및 hMN-14는 CPT-11에 앞서 3일에 투여된 hMN-14 + CPT-11의 조합치료를 비교하였다. 복용량은 상기 실시예 14에 기재된대로 하였다. hMN-14 단독은 상기 조건하에서 21%까지 중간 생존시간이 증가되었다(p < 0.05). CPT 11 단독은 76%까지 생존이 증가되었다(p < 0.001). 반대로, hMN-14는 CPT-11에 앞서 3일에 투여된 조합치료는 CPT 11 단독의 58% 이상이 증가된 중간생존 시간을 나타내었다(CPT-11 단독과 비교하여 p < 0.001). hMN-14로의 예비치료는 인간 결장암의 전이모델에서 낮은 종양부하를 갖는 동물의 생존을 현저히 연장한다.

실시예 17

도 19는 인간 결장암 모델에서 자체 hMN-14 CEA Mab 및 CPT-11의 다양한 투여 스케줄의 비교를 나타낸다. CPT-11 전 3일에 hMN-14를 부여하는 것이 가장 효과적이다. 복용은 상기 실시예 14에 기재된대로 하였다. 순서가 반대로 되거나 (CPT-11이 hMN-14전 3일에 주어짐) 또는 모두 동시에 함께 주어질 경우 70일의 중간 생존시간은 비처리군(35일)을 넘어 증가하였지만, CPT-11 전 hMN-14 예비치료하는 것의 105일의 중간 생존시간보다 여전히 못 미쳤다.

실시예 18

도 20은 인간 결장암 모델에서 hMN-14 CEA Mab 치료에 GM-CSF 예비치료의 효과를 나타낸다. GM-CSF는 -4, -3, -2, 및 -1일에 1μg/쥐/일의 복용량으로 투여되었다. 종양세포는 hMN-14 치료와 함께 0일에 이식되었다. 다른 복용은 상기 실시예 14에 기재된대로 하였다. GM-CSF 예비치료는 GM-CSF 단독 또는 hMN-14 단독보다 중간 생존시간(p < 0.002)에서 통계적으로 현저한 증가를 초래하였다.

상기 내용은 가장 바람직한 실시형태를 언급하였지만, 본 발명이 이에 한정되지 않는다는 것을 이해해야 할 것이다. 당업계의 당업자들은 다양한 변형들이 공개된 실시형태를 만들 수 있고, 그러한 변형들이 본 발명의 범위내에 있는 것임을 알 것이다.

본 명세서에서 인용된 모든 공개 및 특허출원 및 특허는 인용예로 전체적으로 배합된다.

산업상 이용 가능성

이상에서 설명한 바와 같이, 본 발명은 또 다른 항체, 화학치료제, 방사성제제, 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 면역조절제, 면역억제제 또는 이들의 조합과 같은 적어도 하나 이상의 다른 치료제와 조합된 항체를 포함하는 면역시약을 투여함으로써, 암태아성 항원(CEA)가 발현하는 갑상선 수질종양, 갑상선 비수질종양, 결장직장암 등의 암을 치료하는 방법을 제공할 수 있다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

적어도 하나의 항-CEA 단클론 항체(MAb) 또는 이의 단편, 및 적어도 하나의 치료제로 이루어진 조성물.

청구항 2.

제 1항에 있어서, 상기 항-CEA MAb는 I 종, II 종, 또는 II 종 항-CEA MAb임을 특징으로 하는 조성물.

청구항 3.

제 1항에 있어서, 상기 항-CEA MAb는 과립구와 반응하고 MAb의 단가 형태인 I 종 또는 II 종 항-CEA MAb임을 특징으로 하는 조성물.

청구항 4.

제 1항에 있어서, 상기 항-CEA MAb 또는 이의 단편은 인간화된 것이고, 상기 인간화된 MAb는 무린 항-CEA MAb의 항-CEA 결합 특이성을 보유하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 5.

제 1항에 있어서, 상기 항-CEA MAb 또는 이의 단편은 키메라 MAb이고, 상기 키메라 MAb는 무린 항-CEA MAb의 항-CEA 결합 특이성을 보유하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 6.

제 1항에 있어서, 상기 항-CEA MAb 또는 이의 단편은 전체 인간 MAb이고, 상기 전체 인간 MAb는 무린 항-CEA MAb의 항-CEA 결합 특이성을 보유하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 7.

제 1항에 있어서, 상기 항-CEA 단클론 항체 또는 이의 단편은 MN-14 항체 또는 이의 단편임을 특징으로 하는 조성물.

청구항 8.

제 7항에 있어서, 상기 MN-14 단클론 항체 또는 이의 단편은 무린 MN-14 단클론 항체의 상보성 결정 영역(CDRs; complementarity-determining regions)으로 이루어지고,

(1) 상기 MN-14 항체의 경쇄 가변부위의 CDRs는 아미노산 서열 KASQDVGTSVA로 이루어진 CDR1; 아미노산 서열 WTSTRHT로 이루어진 CDR2; 및 아미노산 서열 QQYSLYRS로 이루어진 CDR3;로 이루어지고; (2) III중 항-CEA 항체의 중쇄 가변 영역의 CDRs는 TYWMS로 이루어진 CDR1; EIHPDSSTINYAPSLKD로 이루어진 CDR2; 및 LYFGFPWFAY로 이루어진 CDR3 또는 상기 (1) 및 (2)의 CDRs;임을 특징으로 하는 조성물.

청구항 9.

제 1항에 있어서, 상기 항-CEA 단클론 항체는 CEA와 반응하고, 정상 교차반응 항원(NCA) 및 태변항원(meconium antigen,MA)와 반응하지 않음을 특징으로 하는 조성물.

청구항 10.

제 7항에 있어서, 상기 MN-14 단클론 항체 또는 이의 단편은 인간화된 MN-14 항체 또는 이의 단편임을 특징으로 하는 조성물.

청구항 11.

제 7항에 있어서, 상기 MN-14 단클론 항체 또는 이의 단편은 키메라 MN-14 항체 또는 이의 단편임을 특징으로 하는 조성물.

청구항 12.

제 7항에 있어서, 상기 MN-14 단클론 항체 또는 이의 단편은 전체 인간 MN-14 항체 또는 이의 단편임을 특징으로 하는 조성물.

청구항 13.

제 10항에 있어서, 상기 인간화된 MN-14 항체 또는 이의 단편의 경쇄 및 중쇄 가변부위의 구조 영역(FRs;framework regions)는 뮤린 MN-14 단클론 항체의 대응 FRs로부터 치환된 적어도 하나의 아미노산을 함유하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 14.

제 13항에 있어서, 상기 인간화된 MN-14 항체 또는 이의 단편은 도 14A-C 또는 도 15B(hMn-14) 또는 도 16B의 뮤린 중쇄 가변 영역(KLHuVhAIGA)의 아미노산 잔기 24, 28, 30, 48, 49, 74 및 94로 이루어진 군에서 선택된 뮤린 MN-14 항체의 대응 FR로부터 적어도 하나의 아미노산을 함유하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 15.

제 13항에 있어서, 상기 인간화된 MN-14 항체 또는 이의 단편은 뮤린 MN-14 경쇄 가변부위의 대응 FR로부터 적어도 하나의 아미노산을 함유하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 16.

제 10항에 있어서, 상기 인간화된 MN-14 항체 또는 이의 단편은 도 13A 또는 도 15A 또는 도 16A에서 설명한 경쇄 가변 영역, 및 KLHuVhAIGA로 제작된 도 14A-C 또는 도 15B(hMN-14) 또는 도 16B에서 설명한 중쇄 가변 영역으로 이루어지는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 17.

제 11항에 있어서, 상기 키메라 MN-14 항체 또는 이의 단편은 뮤린 MN-14 Vk로 제작된 도 13A에서 설명한 경쇄 가변 영역 및 뮤린 MN-14 VH로 제작된 도 14A-C에서 설명한 중쇄 가변 영역으로 이루어짐을 특징으로 하는 조성물.

청구항 18.

제 1항에 있어서, 상기 단편은 F(ab')₂, Fab', Fab, Fv 및 scFv로 이루어진 군에서 선택된 것임을 특징으로 하는 조성물.

청구항 19.

제 1항에 있어서, 상기 치료제는 자체 항체, 세포독성(cytotoxic) 제제, 약물, 방사성핵종, 면역조절제(immunomodulator), 광활성 치료성(photoactive therapeutic)제제, 이뮤노켄쥬게이트(immunoconjugate), 호르몬, 또는 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택된 것이고, 선택적으로 약학적으로 수용가능한 매체에 처방된 것임을 특징으로 하는 조성물.

청구항 20.

제 19항에 있어서, 상기 이들의 조합은 빈크리스틴(vincristine), 독소루비신(doxorubicin), DTIC 및 시클로포스파미드(cyclophosphamide)를 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 21.

제 19항에 있어서, 상기 치료제는 자체 항체 또는 면역켄쥬게이트임을 특징으로 하는 조성물.

청구항 22.

제 21항에 있어서, 상기 자체 항체 또는 상기 면역켄쥬게이트의 항체부분은 EGP-1, EGP-2(예를들어, 17-1A), MUC-1, MUC-2, MUC-3, MUC-4, PAM-4, KC4, TAG-72, EGFR, EGP-2, HER2/neu, BrE3, Le-Y, A3, A33, Ep-CAM, AFP, Tn, 톰슨-프레덴레이치(Thomson-Friedenreich) 항원, 종양괴사(tumor necrosis) 항원, VEGF, 테나신(tenasin), 피브로넥틴(fibronectin), 또는 기타 종양 혈관생성 항원, Ga733, 또는 이들이 조합과 반응하는 단클론 항체 또는 이의 단편으로 이루어진 군에서 선택된 인간화된, 키메라, 인간 또는 뮤린 단클론 항체 또는 이의 단편으로 이루어진 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 23.

제 22항에 있어서, 상기 단편은 F(ab')₂, Fab', Fab, Fv 및 scFv로 이루어진 군에서 선택된 것임을 특징으로 하는 조성물.

청구항 24.

제 1항에 있어서, 상기 치료제는 DTIC가 아닌 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 25.

적어도 하나의 CEA 결합부위 및 같거나 다른 항원에 적어도 하나의 다른 결합부위로 이루어진 항체 융합단백질.

청구항 26.

제 25항에 있어서, 상기 CEA 결합부위는 I 종, II 종 또는 III종 항-CEA 항체로 동일한 부위에 결합하는 것임을 특징으로 하는 항체 융합단백질.

청구항 27.

제 25항에 있어서, 상기 CEA 결합부위는 III종 항-CEA 항체로 동일한 부위에 결합하는 것임을 특징으로 하는 항체 융합 단백질.

청구항 28.

제 25항에 있어서, 상기 항체 융합단백질은 이가 및 삼가(trivalent)임을 특징으로 하는 항체 융합단백질.

청구항 29.

제 25항에 있어서, 상기 융합단백질의 하나의 팔(arm)은 CD66e를 표적하는 III종 항-CEA mAb이고, 융합단백질의 다른 팔은 CD66a-d를 표적하는 다른 항-CEA 교차반응성 항체임을 특징으로 하는 항체 융합단백질.

청구항 30.

제 25항에 있어서, 상기 결합부위는 scFv 또는 Fab 부위임을 특징으로 하는 항체 융합단백질.

청구항 31.

제 25항에 있어서, 상기 융합단백질은 NCA50/90과 반응하는 하나의 팔과 단지 CEA와 반응하는 2개의 암으로 이루어진 이특이성, 삼가 단백질임을 특징으로 하는 항체 융합단백질.

청구항 32.

제 25항에 있어서, 상기 융합단백질은 NCA50/90에 결합하는 2개의 팔로 이루어진 이특이성 단백질임을 특징으로 하는 항체 융합단백질.

청구항 33.

제 25항에 있어서, 상기 융합단백질은 NCA50/90에 결합하는 하나의 팔과 CEA의 III종 에피토프에 결합하는 2차 팔로 이루어진 디아바디(diabody)임을 특징으로 하는 항체 융합단백질.

청구항 34.

제 33항에 있어서, 상기 NCA50/90 암은 hMN-14 항체로부터 얻어지고, CEA의 III종 에피토프에 결합하는 2차 팔은 hMN-14로부터 얻어지는 것임을 특징으로 하는 항체 융합단백질.

청구항 35.

제 34항에 있어서, 상기 융합단백질은 과립구로부터 방출하는 사이토카인(cytokine)의 활성을 억제하는 Fc-도메인이 부족하거나 보체결합(complement-fixation) 및 ADCC를 억제하도록 변형된 Fc-도메인을 갖는 것을 특징으로 하는 항체 융합단백질.

청구항 36.

제 35항에 있어서, 상기 융합단백질은 하나의 hMN-3 팔 및 2개의 hMN-14 팔로 이루어진 트리아바디(triobody)임을 특징으로 하는 항체 융합단백질.

청구항 37.

제 25항에 있어서, 상기 융합단백질은 하나의 hMN-15 팔 및 2개의 hMN14 팔로 이루어진 트리어바디(triabody)임을 특징으로 하는 항체 융합단백질.

청구항 38.

제 25항에 있어서, 상기 융합단백질은 적어도 하나의 hMN-14 팔 및 적어도 하나의 MN-6 팔로 이루어진 것을 특징으로 하는 항체 융합단백질.

청구항 39.

제 38항에 있어서, 상기 융합단백질은 보체결합 및 ADCC의 활성을 할 수 있는 Fc-도메인으로 이루어진 것을 특징으로 하는 항체 융합단백질.

청구항 40.

제 35항에 있어서, 치료제를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 항체 융합단백질.

청구항 41.

제 40항에 있어서, 상기 치료제는 사이토카인임을 특징으로 하는 항체 융합단백질.

청구항 42.

제 41항에 있어서, 상기 사이토카인은 인터페론(interferon), 군체(colony)-자극 인자 또는 인터류킨(interleukin)임을 특징으로 하는 항체 융합단백질.

청구항 43.

제 42항에 있어서, 상기 군체-자극 인자는 GM-CSF 또는 G-CSF임을 특징으로 하는 항체 융합단백질.

청구항 44.

동시에 또는 연속적으로 항-CEA 항체 또는 이의 단편 및 적어도 하나의 치료제를 치료적으로 유효량을 대상에 투여하고, 선택적으로 약제학적으로 수용가능한 매체에 처방되어진 단계로 이루어진 갑상선 비수질종양(medullary thyroid carcinoma)을 치료하는 방법.

청구항 45.

제 44항에 있어서, 상기 항-CEA 항체는 I 종, II 종, 또는 III종 항-CEA MAb임을 특징으로 하는 방법.

청구항 46.

제 45항에 있어서, 상기 항-CEA MAb는 과립구와 반응하고 MAb의 단가 형태인 I 종 또는 II 종 항-CEA Mab임을 특징으로 하는 방법.

청구항 47.

제 45항에 있어서, 상기 항-CEA MAb 또는 이의 단편은 인간화된 것이고, 상기 인간화된 MAb는 본질적으로 뮤린 항-CEA MAb의 항-CEA 결합 특이성을 보유하고 있는 것임을 특징으로 하는 방법.

청구항 48.

제 45항에 있어서, 상기 항-CEA MAb 또는 이의 단편은 키메라 MAb이고, 상기 키메라 MAb는 본질적으로 뮤린 항-CEA MAb의 항-CEA 결합특이성을 보유하고 있는 것임을 특징으로 하는 방법.

청구항 49.

제 45항에 있어서, 상기 항-CEA 단클론 항체 또는 이의 단편은 MN-14 항체 또는 이의 단편임을 특징으로 하는 방법.

청구항 50.

제 49항에 있어서, 상기 MN-14 단클론 항체 또는 이의 단편은 뮤린 MN-14 단클론 항체의 상보성 결정 영역(CDRs)로 이루어지고,

상기 MN-14 항체의 경쇄 가변 영역의 CDRs은 아미노산 서열 KASQDVGTSSVA로 이루어진 CDR1; 아미노산 서열 WTSTRHT로 이루어진 CDR2; 및 아미노산 서열 QQYSLYRS로 이루어진 CDR3;로 이루어지고; 상기 항-CEA 항체의 중쇄 가변 영역의 CDRs는 아미노산 서열 TYWMS로 이루어진 CDR1; 아미노산 서열 EIHPDSSTINYAPSLKD로 이루어진 CDR2; 및 아미노산 서열 LYFGFPWFAY로 이루어진 CDR3;로 이루어지는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 51.

제 44항에 있어서, 상기 항-CEA 단클론 항체는 CEA와 반응하고, 정상 교차반응 항원(NCA) 및 태변항원(meconium antigen,MA)와 반응하지 않음을 특징으로 하는 방법.

청구항 52.

제 49항에 있어서, 상기 MN-14 단클론 항체 또는 이의 단편은 인간화된 MN-14 항체 또는 이의 단편임을 특징으로 하는 방법.

청구항 53.

제 49항에 있어서, 상기 MN-14 단클론 항체 또는 이의 단편은 키메라 MN-14 항체 또는 이의 단편임을 특징으로 하는 방법.

청구항 54.

제 49항에 있어서, 상기 MN-14 단클론 항체 또는 이의 단편은 전체적으로 인간 MN-14 항체 또는 이의 단편임을 특징으로 하는 방법.

청구항 55.

제 49항에 있어서, 상기 인간화된 MN-14 항체 또는 이의 단편의 경쇄 및 중쇄 가변 영역의 구조 영역(FRs)는 뮤린 MN-14 단클론 항체의 대응 FRs로부터 치환된 적어도 하나의 아미노산으로 이루어진 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 56.

제 55항에 있어서, 상기 인간화된 MN-14 항체 또는 이의 단편은 KLHuVhAIGA로 제작된 도 14A-C 또는 15B(hMN-14) 또는 16B의 뮤린 중쇄 가변 영역의 아미노산 잔기 24, 28, 30, 48, 49, 74 및 94로 이루어진 군에서 선택된 상기 뮤린 MN-14항체의 대응FR로부터 적어도 하나의 아미노산으로 이루어진 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 57.

제 52항에 있어서, 상기 인간화된 MN-14 항체 또는 이의 단편은 상기 뮤린 MN-14 경쇄 가변부위의 대응 FR로부터 적어도 하나의 아미노산으로 이루어진 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 58.

제 57항에 있어서, 상기 인간화된 MN-14 항체 또는 이의 단편은 도 13A 또는 15A(hMN-14)에서 설명한 경쇄 가변부위 및 KLHuVhGA로 제작된 도 14A-C 또는 15B(hMN-14) 또는 16B에서 설명한 중쇄 가변부위로 이루어진 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 59.

제 44항에 있어서, 상기 단편은 F(ab')₂, Fab', Fab, Fv 및 sFv로 이루어진 군에서 선택된 것임을 특징으로 하는 방법.

청구항 60.

제 44항에 있어서, 상기 치료제는 I 종 항-CEA 단클론 항체, II 종 항-CEA 단클론 항체, III종 항-CEA 단클론 항체 및 이의 단편으로 이루어진 군에서 선택된 인간화된, 키메라, 인간 또는 뮤린 단클론 항체 또는 이의 단편으로 이루어진 군에서 선택되고, 치료적으로 유효량을 동시에 또는 연속적으로 투여되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 61.

제 57항에 있어서, 상기 치료제는 자체 항체 또는 다른 치료제에 컨쥬게이트되는 항체임을 특징으로 하는 방법.

청구항 62.

제 44항에 있어서, 상기 치료제는 자체 항체, 세포독성 제제, 약물, 방사성핵종, 면역조절제, 광활성 치료제, CEA 또는 비-CEA 항체의 면역컨쥬게이트, 호르몬, 또는 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택된 것이고, 선택적으로 약학적으로 수용가능한 매체에 처방된 것임을 특징으로 하는 방법.

청구항 63.

제 62항에 있어서, 상기 치료제는 EGP-1, EGP-2(예를들어, 17-1A), IL-6, MUC-1, MUC-2, MUC-3, MUC-4, PAM-4, KC4, TAG-72, EGFR, EGP-2, HER2/neu, BrE3, Le-Y, A3, A33, Ep-CAM, AFP, Tn, 톰슨-프레덴레이치(Thomson-Friedenreich) 항원, 종양괴사 항원, VEGF, 테나신(tenasin), 피브로넥틴(fibronectin), 또는 기타 종양 혈관 생성 항원, Ga733, 또는 이들이 조합과 반응하는 인간화된, 키메라, 인간 또는 뮤린 단클론 항체 또는 이의 단편으로 이루어진 군에서 선택되고, 치료적으로 유효량을 동시에 또는 연속적으로 대상에 투여하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 64.

제 63항에 있어서, 상기 항체 또는 이의 단편은 자체 또는 다른 치료제에 컨쥬게이트된 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 65.

제 44항에 있어서, 상기 치료제는 DTIC가 아님을 특징으로 하는 방법.

청구항 66.

제 62항에 있어서, 상기 세포독성 제제는 약물 또는 독소임을 특징으로 하는 방법.

청구항 67.

제 66항에 있어서, 상기 약물은 항유사분열(antimitotic)제, 알킬화(alkylating)제, 대사길항(antimetabolite)제, 혈관형성 저해(antiangiogenic)제, 세포사멸제(apoptotic), 알칼로이드제, COX-2 및 항생제 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택된, 약제학적 성질을 갖고 있는 것임을 특징으로 하는 방법.

청구항 68.

제 66항에 있어서, 상기 약물은 질소 겨자, 에틸렌이민 유도체들, 알킬 설포네이트, 니트로소우레아(nitrosoureas), 트리아젠(triazenes), 엽산 유사체, 안트라사이클린(anthracyclines), 타산(taxanes), COX-2 억제제, 피리미딘 유사체, 퓨린 유사체, 항대사물질(antimetabolites), 항생제, 효소, 에피포도필로톡신(epipodophyllotoxin), 백금 동등 복합체(platinum coordination complex), 빈카 알칼로이드(vinca alkaloids), 치환된 우레아, 메틸 히드라진 유도체, 부신피질 반응 억제제, 길항제, 엔도스타틴(endostatin), 탁솔(taxol), 캄프토테신(camptothecins), 옥살리프라틴(oxaliplatin), 독소루비신(doxorubicins) 및 이들의 유사체, 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 69.

제 66항에 있어서, 상기 독소는 리신, 아브린(abrin), 알파 독소, 사포린(saporin), 리보뉴클레아제(Rnase), DNase I, 포도상균 장독소(staphylococcal enterotoxin)-A, 미국자리공 항바이러스 단백질, 겔로닌(gelonin), 디프테린(diphtherin) 독소, 슈도모나스 외독소, 및 슈도모나스 내독소로 이루어진 군으로부터 선택된 미생물, 식물 또는 동물성 독소임을 특징으로 하는 방법.

청구항 70.

제 62항에 있어서, 상기 면역조절제는 사이토카인(cytokine), 줄기세포(stem cell) 성장인자, 림프독소(lymphotoxin), 조혈 인자(hematopoietic factor), 군체 자극인자(colony stimulating factor; CSF), 인터페론(IFN), 줄기세포 성장인자, 에리스로포이에틴(erythropoietin), 트롬보포이에틴(thrombopoietin), 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 것임을 특징으로 하는 방법.

청구항 71.

제 70항에 있어서, 상기 림프독소는 종양괴사인자(tumor necrosis factor; TNF), 상기 조혈 인자는 인터루킨(IL), 상기 군체 자극인자는 과립구-군체 자극인자(G-CSF) 또는 과립구 마크로파지-군체 자극인자(GM-CSF), 상기 인터페론은 인터페론- α , - β 또는 - γ 이며, 상기 줄기세포 성장인자는 "S1 인자"로 제작되는 것임을 특징으로 하는 방법.

청구항 72.

제 70항에 있어서, 상기 면역조절제는 IL-1, IL-2, IL-3, IL-6, IL-10, IL-12, IL-18, IL-21, 인터페론- γ , TNF- α 또는 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택된 것임을 특징으로 하는 방법.

청구항 73.

제 62항에 있어서, 상기 방사성핵종은 20~10,000keV의 에너지를 갖고 있음을 특징으로 하는 방법.

청구항 74.

제 73항에 있어서, 상기 방사성핵종은 ^{125}I , ^{131}I , ^{90}Y , ^{88}Y , ^{225}Ac , ^{177}Lu , ^{188}Re , ^{186}Re 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택된 것임을 특징으로 하는 방법.

청구항 75.

제 62항에 있어서, 상기 광활성 치료제제는 색원체(chromogen) 또는 염료(dye)임을 특징으로 하는 방법.

청구항 76.

제 67항에 있어서, 상기 알킬화제는 다카바진(dacarbazine)임을 특징으로 하는 방법.

청구항 77.

제 49항에 있어서, 상기 MN-14 항체 또는 이의 단편은 주입당 복용당 100~600 mg의 복용량으로 투여되는 것임을 특징으로 하는 방법.

청구항 78.

제 49항에 있어서, 상기 MN-14 항체 또는 이의 단편은 주입당 복용당 300~400 mg의 복용량으로 투여되는 것임을 특징으로 하는 방법.

청구항 79.

동시에 또는 연속적으로 항-CEA 항체 또는 이의 단편, 및 적어도 하나의 치료제를 치료적으로 유효량을 대상에 투여하고, 선택적으로 약제학적으로 수용가능한 매체에 처방되어진 단계로 이루어진 갑상선 수질종양(medullary thyroid carcinoma)을 치료하는 방법.

청구항 80.

제 79항에 있어서, 상기 항-CEA 항체는 I 종, II 종, 또는 III종 항-CEA MAb임을 특징으로 하는 방법.

청구항 81.

제 80항에 있어서, 상기 항-CEA MAb는 과립구와 반응하고 MAb의 단가 형태인 I 종 또는 II 종 항-CEA Mab임을 특징으로 하는 방법.

청구항 82.

제 80항에 있어서, 상기 III종 항-CEA MAb 또는 이의 단편은 인간화된 것이고, 상기 인간화된 MAb는 본질적으로 뮤린 III종 항-CEA MAb의 III종 항-CEA 결합특이성을 보유하고 있는 것임을 특징으로 하는 방법.

청구항 83.

제 80항에 있어서, 상기 III종 항-CEA MAb 또는 이의 단편은 키메라 MAb이고, 상기 키메라 MAb는 본질적으로 뮤린 III종 항-CEA MAb의 III종 항-CEA 결합특이성을 보유하고 있는 것임을 특징으로 하는 방법.

청구항 84.

제 80항에 있어서, 상기 III종 항-CEA 단클론 항체 또는 이의 단편은 MN-14 항체 또는 이의 단편임을 특징으로 하는 방법.

청구항 85.

제 84항에 있어서, 상기 MN-14 단클론 항체 또는 이의 단편은 뮤린 MN-14 단클론 항체의 상보성 결정 부위(CDRs)로 이루어지고,

상기 MN-14 항체의 경쇄 가변부위의 CDRs는 아미노산 서열 KASQDVGTSVA로 이루어진 CDR1; 아미노산 서열 WTSTRHT로 이루어진 CDR2; 및 아미노산 서열 QQYSLYRS로 이루어진 CDR3;로 이루어지고; 상기 Ⅲ종 항-CEA 항체의 중쇄 가변부위의 CDRs는 아미노산 서열 TYWMS로 이루어진 CDR1; 아미노산 서열 EIHPDSSTINYAPSLKD로 이루어진 CDR2; 및 아미노산 서열 LYFGFPWFAY로 이루어진 CDR3;로 이루어지는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 86.

제 79항에 있어서, 상기 항-CEA 단클론 항체는 CEA와 반응하고 정상 교차반응 항원(NCA) 및 태변항원(meconium antigen, MA)와 반응하지 않음을 특징으로 하는 방법.

청구항 87.

제 82항에 있어서, 상기 인간화된 Ⅲ종 항-CEA 항체 또는 이의 단편은 인간화된 MN-14 항체 또는 이의 단편임을 특징으로 하는 방법.

청구항 88.

제 82항에 있어서, 상기 키메라 Ⅲ종 항-CEA 단클론 항체 또는 이의 단편은 키메라 MN-14 항체 또는 이의 단편임을 특징으로 하는 방법.

청구항 89.

제 84항에 있어서, 상기 MN-14 단클론 항체 또는 이의 단편은 전체적으로 인간 MN-14 항체 또는 이의 단편임을 특징으로 하는 방법.

청구항 90.

제 87항에 있어서, 상기 인간화된 MN-14 항체 또는 이의 단편의 경쇄 및 중쇄 가변부위의 구조 영역(FRs)는 뮤린 MN-14 단클론 항체의 대응 FRs로부터 치환된 적어도 하나의 아미노산으로 이루어진 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 91.

제 90항에 있어서, 상기 인간화된 MN-14 단클론 항체 또는 이의 단편은 도 14A-C 또는 15B의 뮤린 중쇄 가변 영역의 아미노산 잔기 24, 28, 30, 48, 49, 74 및 94로 이루어진 군에서 선택된 상기 뮤린 MN-14항체의 대응 FR로부터 적어도 하나의 아미노산을 함유하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 92.

제 87항에 있어서, 상기 인간화된 MN-14 항체 또는 이의 단편은 뮤린 MN-14 경쇄 가변 영역의 대응 FR로부터 적어도 하나의 아미노산으로 이루어진 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 93.

제 87항에 있어서, 상기 인간화된 MN-14 항체 또는 이의 단편은 도 13A 또는 15A(hMN-14) 또는 16A에서 설명되는 경쇄 가변 영역 및 도 14A-C 또는 15B(hMN-14) 또는 16B에서 설명되는 중쇄 가변 영역으로 이루어진 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 94.

제 79항에 있어서, 상기 단편은 F(ab')₂, Fab', Fab, Fv 및 sFv로 이루어진 군에서 선택된 것임을 특징으로 하는 방법.

청구항 95.

제 79항에 있어서, 상기 치료제는 I 종 항-CEA 단클론 항체, II 종 항-CEA 단클론 항체, III 종 항-CEA 단클론 항체 및 이의 단편으로 이루어진 군에서 선택된 인간화된, 키메라, 인간 또는 무인 단클론 항체 또는 이의 단편으로 이루어진 군에서 선택되고, 치료적으로 유효량을 동시에 또는 연속적으로 투여되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 96.

제 95항에 있어서, 상기 치료제는 자체 항체 또는 다른 치료제에 컨쥬게이트된 항체임을 특징으로 하는 방법.

청구항 97.

제 79항에 있어서, 상기 치료제는 자체 항체, 세포독성 제제, 약물, 방사성핵종, 면역조절제, 광활성 치료제, CEA 또는 비-CEA 항체의 이뮤노컨쥬게이트, 호르몬, 또는 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택된 것이고, 선택적으로 약학적으로 수용가능한 매체제에 처방된 것임을 특징으로 하는 방법.

청구항 98.

제 98항에 있어서, 상기 치료제는 EGP-1, EGP-2(예를들어, 17-1A), MUC-1, MUC-2, MUC-3, MUC-4, PAM-4, KC4, TAG-72, EGFR, EGP-2, HER2/neu, BrE3, Le-Y, A3, A33, Ep-CAM, AFP, Tn, 테나신(tenasin), 피브로넥틴(fibronectin), 톰슨-프레덴레이치(Thomson-Friedenreich) 항원, 종양괴사 항원, VEGF, 또는 기타 종양 혈관생성 항원, Ga733, 또는 이들이 조합과 반응하는 인간화된, 키메라, 인간 또는 무인뮤린론 항체 또는 이의 단편으로 이루어진 군에서 선택되고, 치료적으로 유효량을 동시에 또는 연속적으로 대상에 투여하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 99.

제 98항에 있어서, 상기 항체 또는 이의 단편은 자체 또는 다른 치료제에 컨쥬게이트된 것임을 특징으로 하는 방법.

청구항 100.

제 79항에 있어서, 상기 치료제는 DTIC가 아님을 특징으로 하는 방법.

청구항 101.

제 97항에 있어서, 상기 세포독성 제제는 약물 또는 독소임을 특징으로 하는 방법.

청구항 102.

제 101항에 있어서, 상기 약물은 항유사분열(antimitotic)제, 알킬화(alkylating)제, 대사길항(antimetabolite)제, 혈관형성 저해(antiangiogenic)제, 세포사멸제(apoptotic), 알칼로이드제, COX-2 및 항생제 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택된 약제학적 성질을 갖고 있는 것임을 특징으로 하는 방법.

청구항 103.

제 101항에 있어서, 상기 약물은 질소 겨자, 에틸렌이민 유도체들, 알킬 설포네이트, 니트로소우레아(nitrosoureas), 트리아젠(triazenes), 염산 유사체, 안트라사이클린(anthracyclines), 타산(taxanes), COX-2 억제제, 피리미딘 유사체, 퓨린 유사체, 항대사물질(antimetabolites), 항생제, 효소, 에피포도필로톡신(epipodophyllotoxin), 백금 동등 복합체(platinum coordination complex), 빈카 알칼로이드(vinca alkaloids), 치환된 우레아, 메틸 히드라진 유도체, 부신피질 반응 억제제, 길항제, 엔도스타틴(endostatin), 탁솔(taxol), 캄프토테신(camptothecins), 옥살리플라틴(oxaliplatin), 독소루비신(doxorubicins) 및 이들의 유사체, 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 104.

제 101항에 있어서, 상기 독소는 리신, 아브린(abrin), 알파 독소, 사포린(saporin), 리보뉴클레아제(Rnase), DNase I, 포도상균 장독소(staphylococcal enterotoxin)-A, 미국자리공 항바이러스 단백질, 겔로닌(gelonin), 디프테린(diphtherin) 독소, 슈도모나스 외독소, 및 슈도모나스 내독소로 이루어진 군으로부터 선택된 미생물, 식물 또는 동물성 독소임을 특징으로 하는 방법.

청구항 105.

제 97항에 있어서, 상기 면역조절제는 사이토카인(cytokine), 줄기세포(stem cell) 성장인자, 림프독소(lymphotoxin), 조혈 인자(hematopoietic factor), 군체 자극인자(colony stimulating factor; CSF), 인터페론(IFN), 에리스로포이에틴(erythropoietin), 트롬보포이에틴(thrombopoietin), 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 것임을 특징으로 하는 방법.

청구항 106.

제 105항에 있어서, 상기 림프독소는 종양괴사인자(tumor necrosis factor; TNF), 상기 조혈 인자는 인터루킨(IL), 상기 군체 자극인자는 과립구-군체 자극인자(G-CSF) 또는 과립구 마크로파지-군체 자극인자(GM-CSF), 상기 인터페론은 인터페론- α , - β 또는 - γ 이며, 상기 줄기세포 성장인자는 "S1 인자"로 제작되는 것임을 특징으로 하는 방법.

청구항 107.

제 105항에 있어서, 상기 면역조절제는 IL-1, IL-2, IL-3, IL-6, IL-10, IL-12, IL-18, IL-21, 인터페론- γ , TNF- α 또는 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택된 것임을 특징으로 하는 방법.

청구항 108.

제 97항에 있어서, 상기 방사성핵종은 20~10,000keV의 에너지를 갖는 것임을 특징으로 하는 방법.

청구항 109.

제 108항에 있어서, 상기 방사성핵종은 ^{125}I , ^{131}I , ^{90}Y , ^{88}Y , ^{225}Ac , ^{177}Lu , ^{188}Re , ^{186}Re 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택된 것임을 특징으로 하는 방법.

청구항 110.

제 97항에 있어서, 상기 광활성제제는 색원체 또는 염료임을 특징으로 하는 방법.

청구항 111.

제 102항에 있어서, 상기 알킬화제는 다카바진임을 특징으로 하는 방법.

청구항 112.

제 87항에 있어서, 상기 MN-14 항체 또는 이의 단편은 주입당 복용당 100~600 mg의 단백질 복용량으로 투여되는 것임을 특징으로 하는 방법.

청구항 113.

제 87항에 있어서, 상기 MN-14 항체 또는 이의 단편은 주입당 복용당 300~400 mg의 단백질 복용량으로 투여되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 114.

동시에 또는 연속적으로 항-CEA 항체 또는 이의 단편, 및 적어도 하나의 치료제를 치료적으로 유효량을 대상에 투여하고, 선택적으로 약제학적으로 수용가능한 매체에 처방되어진 단계로 이루어진 암을 치료하는 방법.

청구항 115.

제 114항에 있어서, 상기 치료제는 CPT-11임을 특징으로 하는 방법.

청구항 116.

제 114항에 있어서, 상기 항-CEA 항체 또는 이의 단편은 CPT-11의 투여 전에 투여되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 117.

제 114항에 있어서, 상기 항-CEA 항체 또는 이의 단편은 CPT-11의 투여 전 대략 3일쯤 투여되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 118.

제 114항에 있어서, 상기 치료제는 DTIC임을 특징으로 하는 방법.

청구항 119.

제 114항에 있어서, 상기 치료제는 옥살리프라틴(oxaliplatin)임을 특징으로 하는 방법.

청구항 120.

제 114항에 있어서, 상기 치료제는 5-플루오로우라실/류코보린(leucovorin)임을 특징으로 하는 방법.

청구항 121.

비-항체 치료제의 투여에 앞서 항-CEA항체 또는 이의 단편으로 암으로부터 고통받는 대상을 예비치료하는 단계를 포함하여 향상시키는 것을 특징으로 하는 비-항체 치료제로 암을 치료하는 방법.

청구항 122.

제 121항에 있어서, 상기 항-CEA 항체는 hMN-14임을 특징으로 하는 방법.

청구항 123.

제 121항에 있어서, 상기 치료제는 CPT-11임을 특징으로 하는 방법.

청구항 124.

항체의 작동체 기능을 증가시키기 위해 항체, 과립구를 활성화하는 제제 및/또는 NK 세포의 투여 전에 암으로부터 고통받는 대상에 투여하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 항체로 암을 치료하는 방법.

청구항 125.

제 125항에 있어서, 상기 제제는 GM-CSF임을 특징으로 하는 방법.

청구항 126.

제 125항에 있어서, 상기 항체는 항-CEA 항체임을 특징으로 하는 방법.

청구항 127.

제 125항에 있어서, 상기 항체는 hMN-14임을 특징으로 하는 방법.

청구항 128.

항-CEA 항체 또는 이의 단편의 투여에 앞서, 종양세포에서 CEA 발현을 과다생성하는데 효과적인 인터페론의 양을 암으로부터 고통받는 대상에 투여하는 단계로 이루어진 항-CEA 항체 또는 이의 단편으로 암을 치료하는 방법.

청구항 129.

제 128항에 있어서, 상기 항-CEA항체는 hMN-14임을 특징으로 하는 방법.

요약

본 발명에서는 인간화된, 키메라 및 인간 항-CEA 항체들 및 CEA를 발현하는 암 및 다른 질병들의 치료에 이용되는 치료제를 포함하는 조성물 및 이 조성물을 이용하여 치료하는 방법을 제공하고자 한다.

대표도

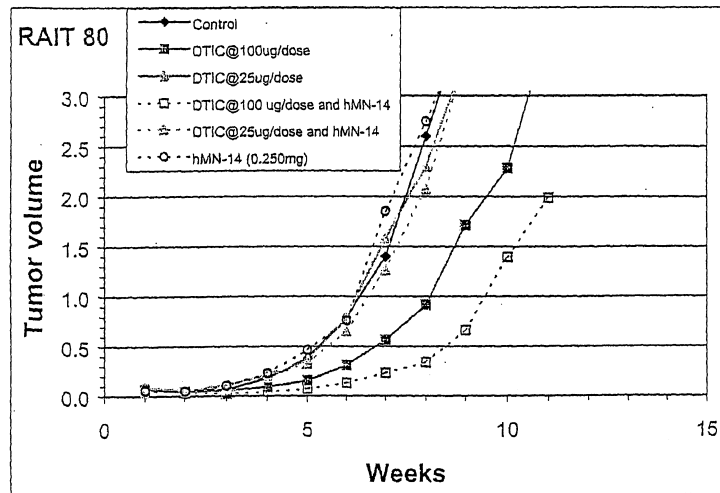
도 1A

색인어

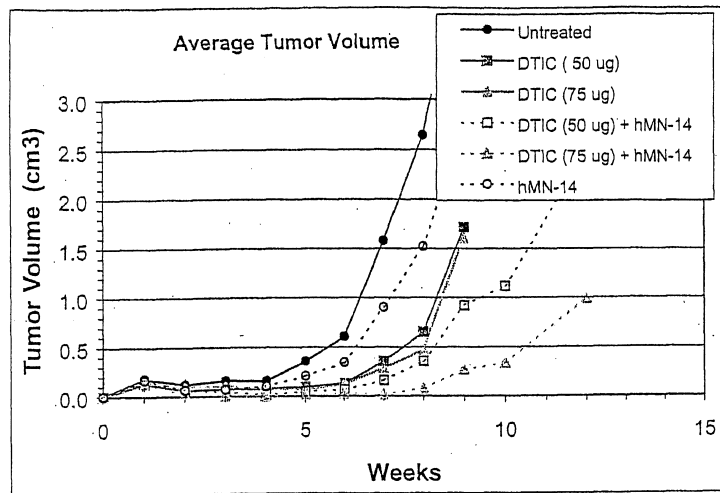
인간 항-CEA 항체, 인간화된 항-CEA 항체, 키메라 항-CEA 항체, 갑상선 수질종양

도면

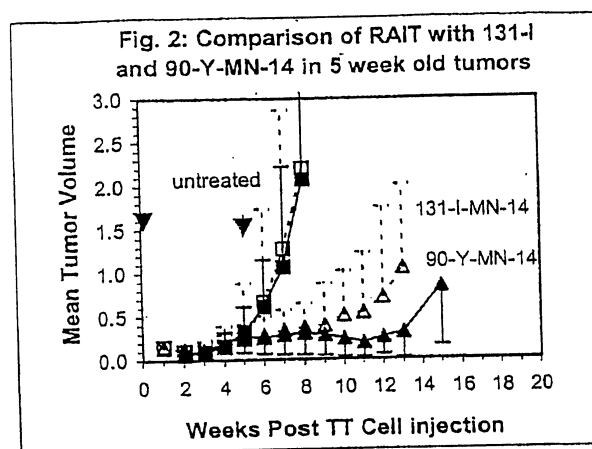
도면1A



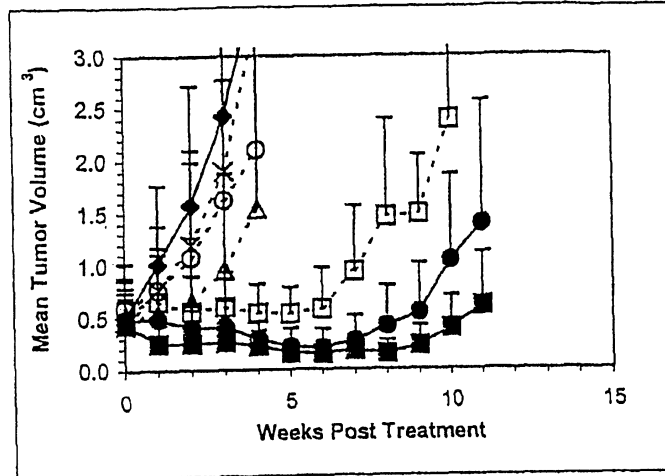
도면1B



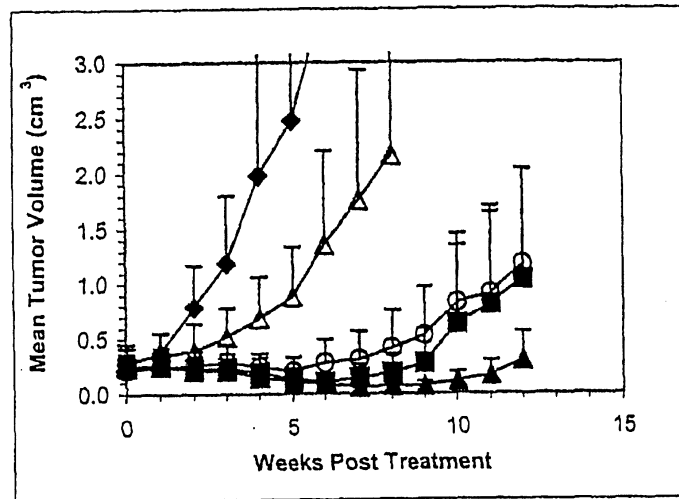
도면2



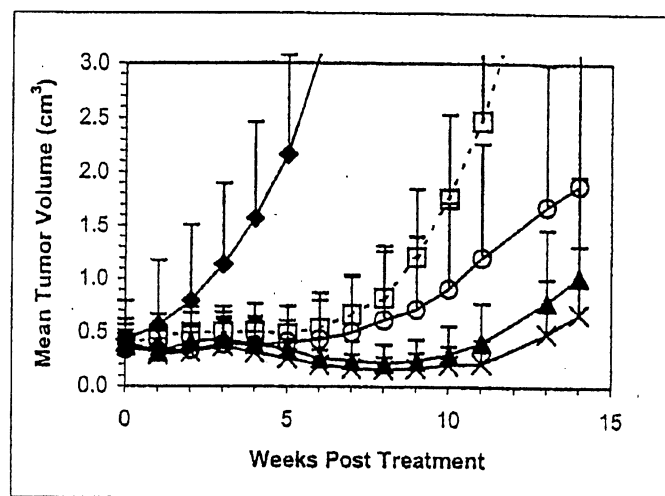
도면3



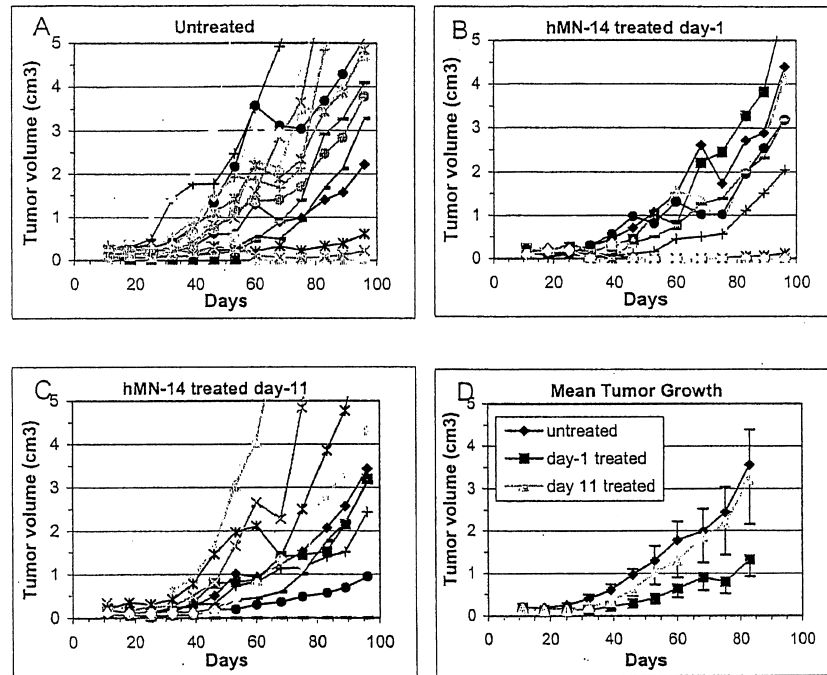
도면4



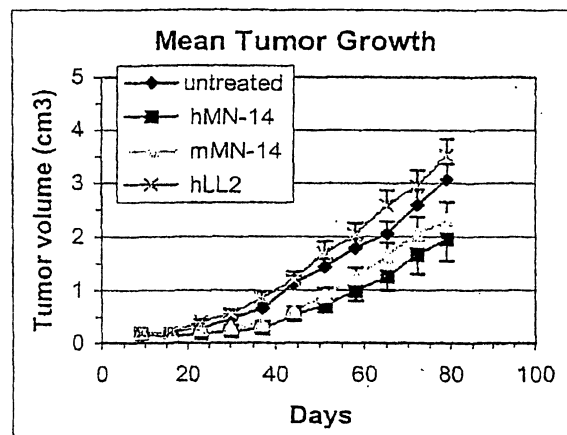
도면5



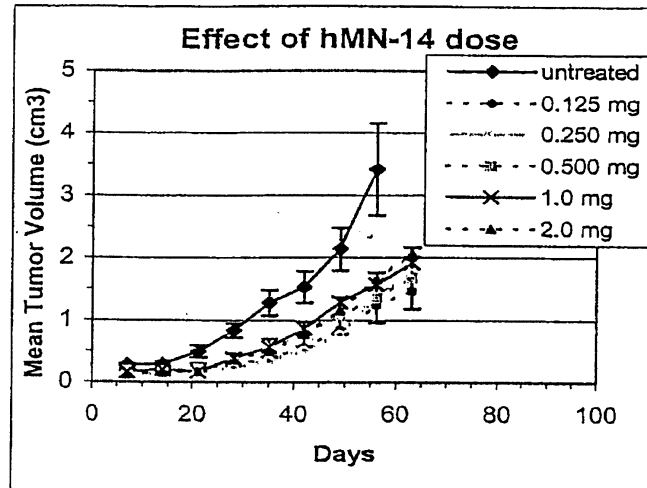
도면6



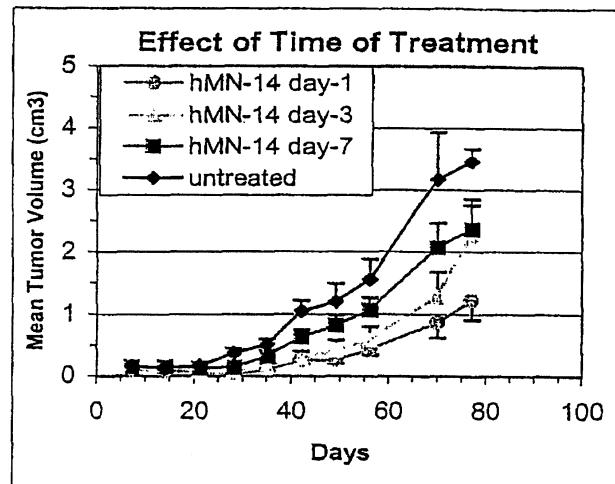
도면7



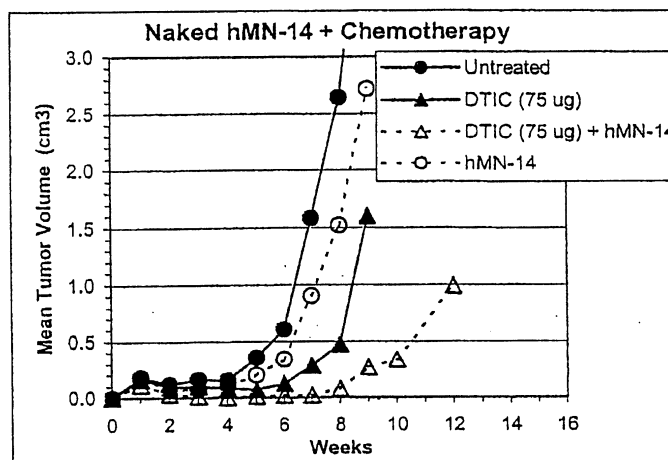
도면8



도면9



도면10



도면11A

H A	XATHM	P	HHEAS	M	BXBNMDD	E
I L	HVPANN	L	AACPC	N	THALBPPI	C
N U	OAHOFL	E	EERYR	L	NOMAONNN	O
3 1	11111	1	13211	1	12141211	K
GAGGTGAAGCTTCTCGAGTCTGGAGTGGCCCTGGTGTGCTGAGTCTGGAGGATCCCTGAAACTC						
CTCCACTTCGAAGAGCTCAGACCTCCACCGGACCACTCAGACCTCCTAGGACTTTGAG						
e v k l l e s g g l v q s g s l k l						
F MD THBTMH						
N SD	FNBANN				ANAFH	NEB
U TE	IFVQLF				VLSOP	LCS
H 21	111113				AAUKA	ARA
TCCTGTGCAGCCTCAGGATTCGATTTTACTACATATTGGATGAGTTGGGTCCGGCAGGCT						
AGGACACGTCCGAGTCCCTAAGCTAAATGATGTATTAACCTACTCAACCCAGGCGGTCCGA						
s c a a s g f d f t t y w m s w v r q a						
SASB	SHRM	F			R	M
EPCS	TAAMA	O			S	S
CYRA	UEEAE	K			A	E
111J	11311	1			1	1
CCAGGGAAGGCCTAGAATGGATGGAGAAATTCATCCAGATAGCAGTACGATTAACTAT						
GGTCCCTTTCCGGATCTTACCTAACCTCTTTAAGTAGGTCTATCGTCATGCTAAATTGATA						
p g k g l e w i g e i h p d s s t i n y						

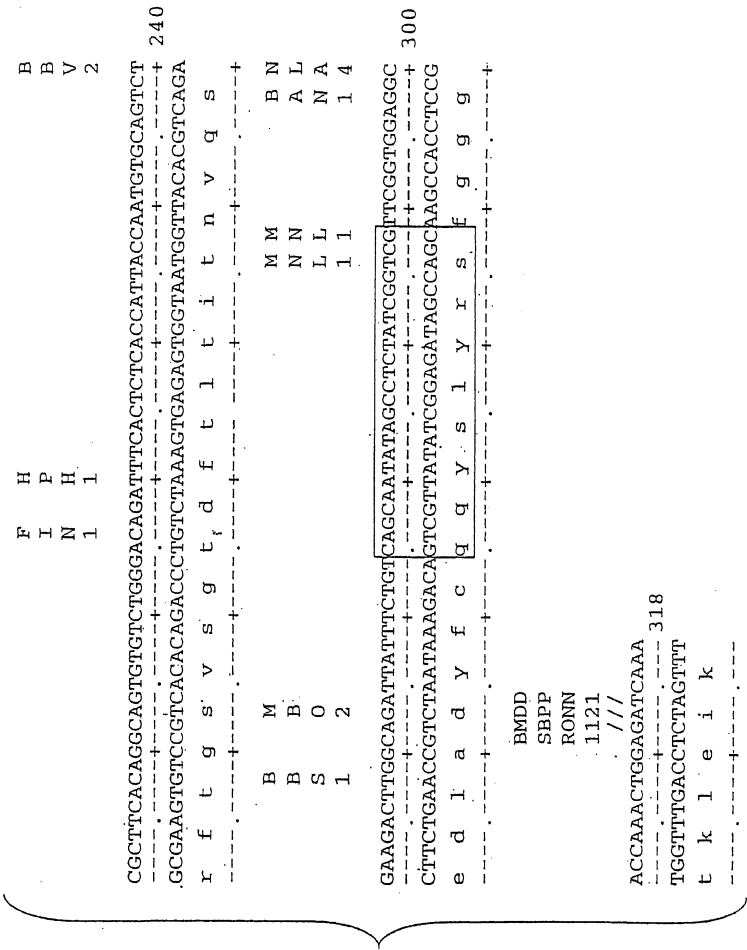
도면11B

H H B A A BB A R
 I H S L L SS L S
 N A M W MM W A
 P 1 2 2 22 2 1
 GGGCGTCTCTAAAGGATTAATTTCATCGTCTCCAGAGACACGCCAAAAATACGCTGTAC 240
 CGGGCAGAGATTTCTCTATTTAAAGTAGCAGAGGCTCTCTGTGCGGTTTATTATGCGACATG
 a p s l k d k f i v s r d n a k n t l y
 B M XBMDDD
 S N HGBPPD
 P L OLNNE
 I 1 221211
 CTGCAATGACGAAGTGAGATCTGAGACACAGCCCCTTTATTACTGTGCAAGCCTTTAC 300
 GAGTTTACTCGTTTCACTTAGACTCCTGTGCGGGAATAATACACAGTTCGGGAATG
 l q m s k v r s e d t a l y y c a s l y
 BSBEAS ANHSSBBP H F H M B
 SESPC SLATESIL N I P A S
 ACARYR UAENCYAE F N A E M
 J1J211 14311J1 1 1 2 3 2
 TTCGGCTTCCCTGTGTTGCTTATTGGGGCCCAAGGGACTCCGGTCACTGCTCTCTGCA 357
 AAGCCGAAGGGGACCAACGAATAACCCCGTTCCCTGAGGCCAGTGACAGAGACGT
 f g f p w f a y w g q g t p v t v s a

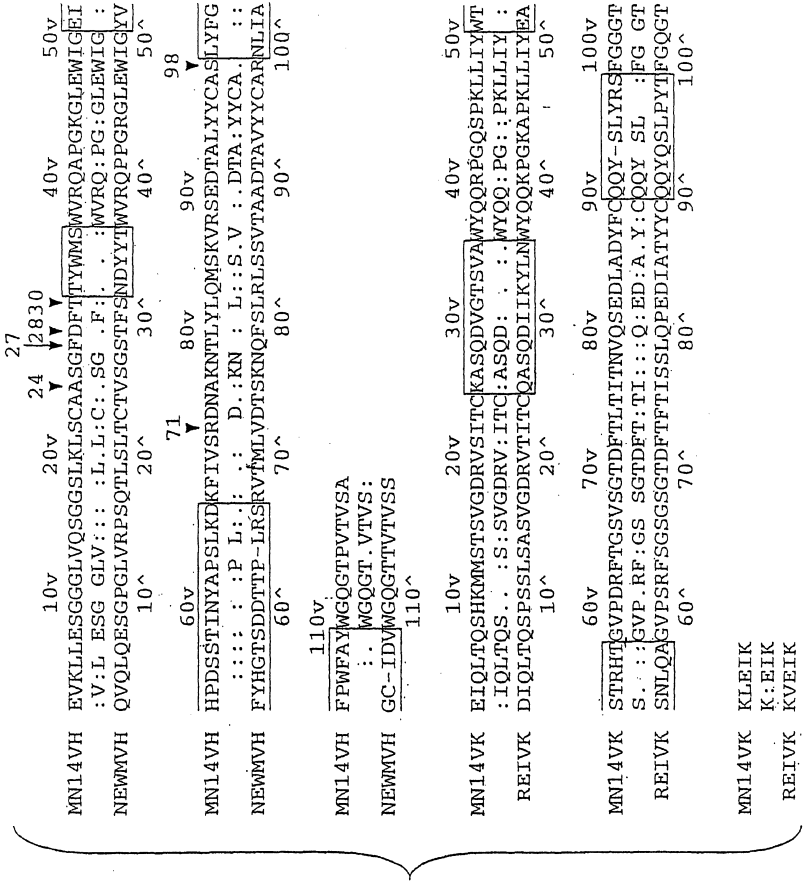
도면12A

PNA N T	B	A	A B B	T H
VSL S T	S	L	L S S	T P
UPU P H	M	W	W T M	H H
2r1 r l	2	2	2 X 2	1 1
GAAATTCAGCTGACCCAGTCTCACAAAATGATGTCACATCAGTGGGAGACAGGGTCAGC				
CTTTAAGTCGACTGGGTACAGTGTGTTTACTACAGGTGTAGTCACCTCTGTGCCAGTCG				
e i q l t	q s h	k m m s t	s v g d r v s	
S	BHH	R F	E A S	A B P B E E A S
F	SAA	S O	C P C	L S P S C C P C
A	PEE	A K	R Y R	W M A A R P Y R
N	113	1 1	2 11 2	211 2 111
ATCACCTGCAAGGCCAGTCAGGATGGGTACTTCTGTAGCCTGGTATCAACAGAGACCA				
TAGTGGACGTTCCGGTCAGTCCTACACCCATGAAGACATCGGACCATAGTTGTCTCTGGT				
i t c k	a s q d v g t s v a	w	y q q r p	
E F	NSH	HF	MPDD	
C O	CCP	NI	BLPP	
O K	IRA	FN	OENN	
D 1	112	11	1121	
GGACAATCTCCTAAACTACTGATTTACTGGACATCCACCCGGCACACTGGAGTCCCTGAT				
CCTGTTAGAGGATTTGATGACTAAATGACCTGACCTGTAGGTGGGCCGTGTCACCTCAGGGACTA				
g q s p k l l i y	w t s t r h t	f	v p d	

도면12B



도면13A



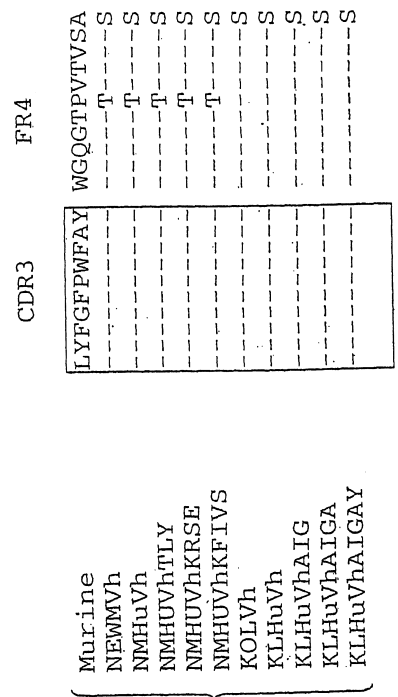
도면13B

	10v	20v	30v	40v	50v
MN14VH	EVKLLESGGLVQSGGLKLSCAASGDFITTYMMSWVRQAPGKGLEWIGET				
	EV:L:ESGGG:VQ:G SL:LSC::SGF F:Y M WVRQAPGKLEW::I				
KOLVH	EVQLVESGGGVVQPGRSRLRLSCSSSGFIFSSYAMYWVRQAPGKLEWVAII				
	10^	20^	30^	40^	50^
	60v	70v	80v	90v	
MN14VH	HPDSSTINYAPSLKDKFIVSRDNKNTLYLQMSKVRSED TALYYCAS				
	D:S. :YA S:K: F.:SRDN:KNTL:LQM.:R:EDT::Y:CA				
KOLVH	WDDGSDQHYADSVKGRFTTISRDNKNTLYLQMSLRPEDTGVYFCARDGGH				
	60^	70^	80^	90^	100^
	V	110v			
MN14VH	-LYFGFPWF--AYMGQGTPVTVSA				
	:.: : F .YMGQGTPVTVS:				
KOLVH	GFCSSASCFGPDYMGQGTPVTVSS				
	110^	120^			

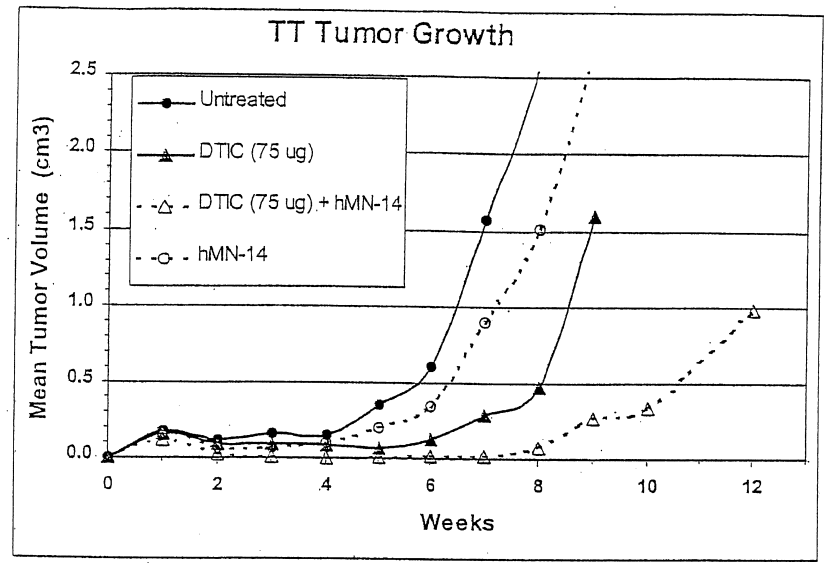
도면14B

Murine NEWWh NMHuVh NMHuVhTLY NMHuVhKRSE NMHuVhKFIVS KOLVh KLHuVh KLHuVhaIG KLHuVhaIGA KLHuVhaIGAY	CDR2		FR3			
	EIH PDSSTIN YAPSLKD		66	71	74	77 79 82 94
	-----		KFIVSRD NAKNTLY LQMSKVRSEDTALYYCAS			
	-----		RVTMLV-TS--QFS-RL-S-TAA---V---R			
	-----		RVTML--TS--QFS-RL-S-TAA---V---R			
	-----		RVTML--TS--RL-S-TAA---V---R			
	-----		RVTML--TS--QFS-RL-----V---R			
	-----		-----TS--QFS-RL-S-TAA---V---R			
	-----		R-TI-----S--F---DSL-P---GV-F--R			
	-----		R-TI-----S--F---DSL-P---GV-F--R			
	-----		R-TI-----S--F---DSL-P---GV-F--R			
	-----		R-TI-----F---DSL-P---GV-F--R			

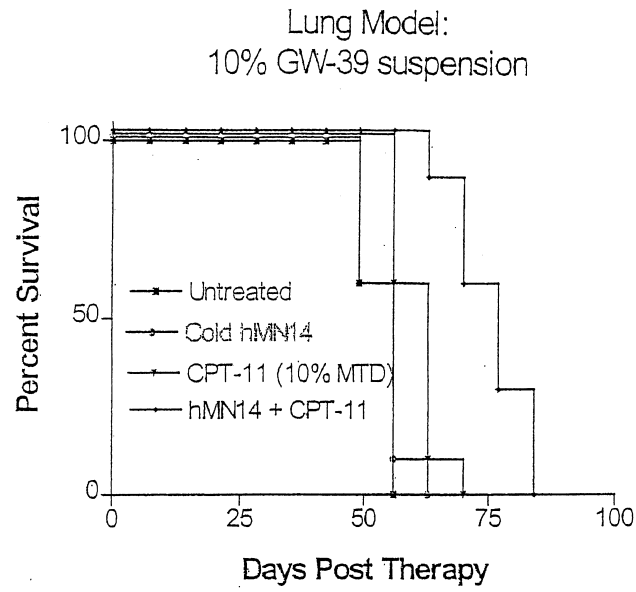
도면14C



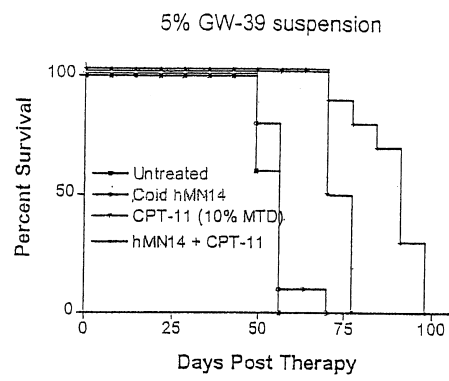
도면15



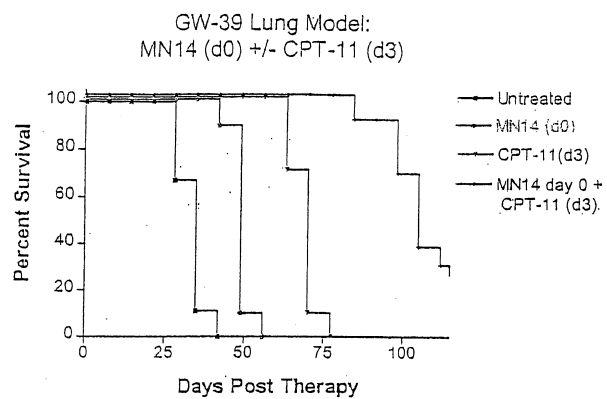
도면16



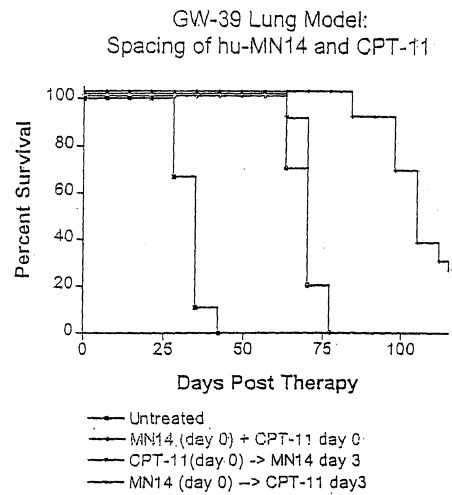
도면17



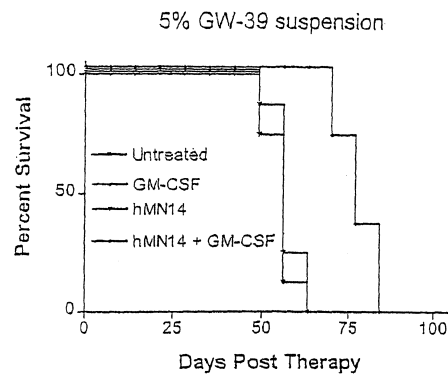
도면18



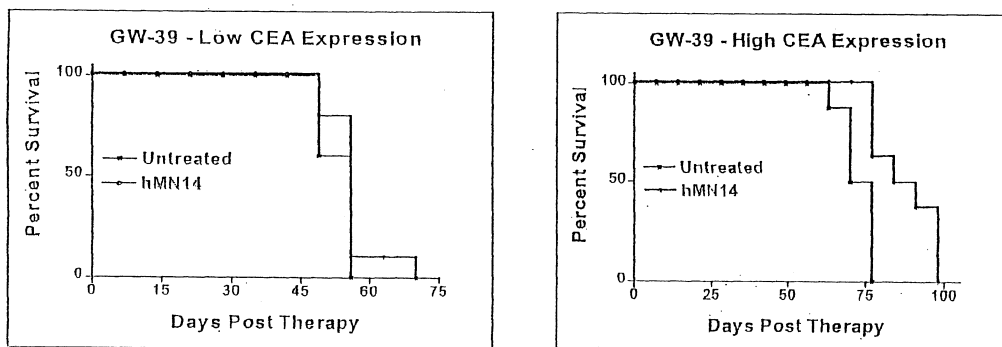
도면19



도면20



도면21



Increased expression of CEA antigen on tumor cells correlates with improved efficacy of anti-CEA (hMN14) antibody in animal models

도면22A

	1	10	20	30	40
REI V_K	DI	QLTQSP	SSLASV	GDRVTITC	QA
MN14 V_K	E	HKMM	T	S	K
hMN14 V_K					K

REI V_K GKAPKLLIYEASNLQA V_K PSRFSGSGTDFFTTISLQP
 MN14 V_K QS WT TRHT T V L TNV S
 hMN14 V_K WT TRHT

REI V_K
 MN14 V_K
 hMN14 V_K

도면22B

KOL V _H	1	10	20	30	40
MN14 V _H	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSSSGFIFSSYAMYWVRQA				
hMN14 V _H	••K•L•••••L••S•G•K••A•A••D•T•W•S•••••				
	••••••••••••••••••••••A•D•T•W•S•••••				
KOL V _H	50	52 A	60	70	
MN14 V _H	PGKGLEWVAITWDDGSDQHYADSVKGRFTISRDN SKNTLF				
hMN14 V _H	•••••IGE•HP•S•TIN•P•L•DK•IV•••••A•••••Y				
	•••••IGE•HP•S•TIN•P•L•D•••••••••••A•••••				
KOL V _H	80	82 A B C	90	100 A B C D E F G H I	
MN14 V _H	LQMDSLRPEDTGVYFCAR			DGGHGFCSSASCFGPDY	
hMN14 V _H	•••SKV•S•••AL•Y••SLYFGFPWF•••••A•••••			•••••SLYFGFPWF•••••A•••••	
KOL V _H	103	110	113		
MN14 V _H	WGQGTPTVTVSS				
hMN14 V _H	••••••••••••••••A•••••				

도면23A

PvuII
GACATCCAGCTGACCCAGAGCCCAAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTGGTGACAGAGTGACCATCACCTGTAGGCCAGTCAGGATGTGGGT 90
1 10 20 30
D I Q L T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C K A S Q D V G
CDR1
ACTTCTGTAGCTGGTACCCAGCAGAGCCAGGTAAGGCTCCAAAGCTGCTGATCTACTGGACATCCACCCGGCACACTGGTGTGCCAAGC 180
40 50 60
T S V A W Y Q Q K P G K A P K L L I Y W T S T R H T G V P S
CDR2
AGATTACGGGTAGCGGTACCGACTTCACCTTCACCATCAGCAGCCTCCAGCCAGGAGACATGCCACCCTACTACTGCCAGCAA 270
70 80 90
R F S G S G S G T D F T F T I S S L Q P E D I A T Y Y C Q Q
TATAGCCTCTATCGGTGTTCCGGCCAAGGACCAAGGTGGAATCAAA 318
94 96 100 107
Y S L Y R S F G Q G T K V E I K
CDR3

도면23B

```

          10      20      30      90
GAGGTCCAACTGGTGGAGAGCGGTGGAGGTGTTGTGCAACCTGGCCGGTCCCTGGCGCTGCTCGCATCTGGCTTCGATTTCACC
1  E V Q L V E S G G V V Q P G R S L R L S C S A S G F D F T
          40      50      52 A
ACATATTGGGATAGCAGTAGCATTAATACTATGCGATGAGTTGGGTGACACAGGCACCTGGAAAAAGTCTTGAGTGGATTGGAGAAATTCAT
          60      70      80      82 A B C
T Y W M S W V R Q A P G K G L E W I G E I H P D S S T I N Y
          90      100      110      103
CCACCGTCTCTAAAGGATAGATTACAATATCGCGAGACAA CGCAAGAACACATTTCTCTGCAATGGACACGCTGAGACCCGAGAC
60 A P S L K D R F T I S R D N A K N T L F L Q M D S L R P E D
          110      120      130      140
ACCGGGTCTATTTTGTGCAAGCCTTTACTTCGGCTTCCCCGGTTTGCTTATTTGGGGCCAGGGACCCCGGTACCCGTCCTCTCA
          150      160      170      180
T G V Y F C A S L Y F G F P W F A Y W G Q G T P V T V S S
          190      200      210      220
          230      240      250      260
          270      280      290      300
          310      320      330      340
          357

```

SEQUENCE LISTING

- <110> IMMUNOMEDICS, INC.
- <120> ANTIBODY THERAPY
- <130> FPC-0504002
- <140>
- <141>
- <150> PCT/US03/031801
- <151> 2003-10-08
- <150> 60/467,161
- <151> 2003-05-02
- <150> PCT/US02/32307
- <151> 2002-10-11
- <150> 60/416,531

<151> 2002-10-08

<160> 27

<170> PatentIn Ver. 3.3

<210> 1

<211> 357

<212> DNA

<213> Mus sp.

<220>

<221> CDS

<222> (1) .. (357)

<400> 1

```

gag gtg aag ctt ctc gag tct gga ggt ggc ctg gtg cag tct gga gga      48
Glu Val Lys Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ser Gly Gly
   1             5             10             15

tcc ctg aaa ctc tcc tgt gca gcc tca gga ttc gat ttt act aca tat      96
Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asp Phe Thr Thr Tyr
           20             25             30

tgg atg agt tgg gtc cgg cag gct cca ggg aaa ggc cta gaa tgg att      144
Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
           35             40             45

gga gaa att cat cca gat agc agt acg att aac tat gcg ccg tct cta      192
Gly Glu Ile His Pro Asp Ser Ser Thr Ile Asn Tyr Ala Pro Ser Leu
           50             55             60

aag gat aaa ttc atc gtc tcc aga gac aac gcc aaa aat acg ctg tac      240
Lys Asp Lys Phe Ile Val Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
           65             70             75             80

ctg caa atg agc aaa gtg aga tct gag gac aca gcc ctt tat tac tgt      288
Leu Gln Met Ser Lys Val Arg Ser Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
           85             90             95

gca agc ctt tac ttc ggc ttc ccc tgg ttt gct tat tgg ggc caa ggg      336
Ala Ser Leu Tyr Phe Gly Phe Pro Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
           100            105            110

act ccg gtc act gtc tct gca                                     357
Thr Pro Val Thr Val Ser Ala
           115

```

<210> 2

<211> 119

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 2

```

Glu Val Lys Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ser Gly Gly
   1             5             10             15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asp Phe Thr Thr Tyr

```

20	25	30
Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile		
35	40	45
Gly Glu Ile His Pro Asp Ser Ser Thr Ile Asn Tyr Ala Pro Ser Leu		
50	55	60
Lys Asp Lys Phe Ile Val Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr		
65	70	75
80		
Leu Gln Met Ser Lys Val Arg Ser Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys		
85	90	95
Ala Ser Leu Tyr Phe Gly Phe Pro Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly		
100	105	110
Thr Pro Val Thr Val Ser Ala		
115		

<210> 3
 <211> 318
 <212> DNA
 <213> Mus sp.

<220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (318)

<400> 3

gaa att cag ctg acc cag tct cac aaa atg atg tcc aca tca gtg gga	48
Glu Ile Gln Leu Thr Gln Ser His Lys Met Met Ser Thr Ser Val Gly	
1 5 10 15	
gac agg gtc agc atc acc tgc aag gcc agt cag gat gtg ggt act tct	96
Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Gly Thr Ser	
20 25 30	
gta gcc tgg tat caa cag aga cca gga caa tct cct aaa cta ctg att	144
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile	
35 40 45	
tac tgg aca tcc acc cgg cac act gga gtc cct gat cgc ttc aca ggc	192
Tyr Trp Thr Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly	
50 55 60	
agt gtg tct ggg aca gat ttc act ctc acc att acc aat gtg cag tct	240
Ser Val Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Thr Asn Val Gln Ser	
65 70 75 80	
gaa gac ttg gca gat tat ttc tgt cag caa tat agc ctc tat cgg tcg	288
Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Ser Leu Tyr Arg Ser	
85 90 95	
ttc ggt gga ggc acc aaa ctg gag atc aaa	318
Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys	
100 105	

<210> 4
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Mus sp.

<400> 4
 Glu Ile Gln Leu Thr Gln Ser His Lys Met Met Ser Thr Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Gly Thr Ser
 20 25 30
 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Trp Thr Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
 50 55 60
 Ser Val Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Thr Asn Val Gln Ser
 65 70 75 80
 Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Ser Leu Tyr Arg Ser
 85 90 95
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 5
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 5
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Arg Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Ser Thr Phe Ser Asn Asp
 20 25 30
 Tyr Tyr Thr Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Tyr Val Phe Tyr His Gly Thr Ser Asp Asp Thr Thr Pro Leu Arg
 50 55 60
 Ser Arg Val Thr Met Leu Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
 65 70 75 80
 Arg Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Arg Asn Leu Ile Ala Gly Cys Ile Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 6
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 6
 Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Ile Lys Tyr
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Glu Ala Ser Asn Leu Gln Ala Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gln Ser Leu Pro Tyr
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 7
 <211> 126
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 7
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Ser Ser Gly Phe Ile Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Ala Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Ile Ile Trp Asp Asp Gly Ser Asp Gln His Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Phe
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Gly Val Tyr Phe Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asp Gly Gly His Gly Phe Cys Ser Ser Ala Ser Cys Phe Gly
 100 105 110
 Pro Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Pro Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 8
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 8
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Arg Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asp Phe Thr Thr Tyr
 20 25 30
 Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Glu Ile His Pro Asp Ser Ser Thr Ile Asn Tyr Ala Pro Ser Leu
 50 55 60
 Lys Asp Arg Val Thr Met Leu Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser
 65 70 75 80
 Leu Arg Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Ser Leu Tyr Phe Gly Phe Pro Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 9
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 9
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Arg Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asp Phe Thr Thr Tyr
 20 25 30
 Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Glu Ile His Pro Asp Ser Ser Thr Ile Asn Tyr Ala Pro Ser Leu
 50 55 60
 Lys Asp Arg Val Thr Met Leu Arg Asp Thr Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Arg Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Ser Leu Tyr Phe Gly Phe Pro Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 10
<211> 119
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 10
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Arg Pro Ser Gln
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asp Phe Thr Thr Tyr
20 25 30

Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Glu Ile His Pro Asp Ser Ser Thr Ile Asn Tyr Ala Pro Ser Leu
50 55 60

Lys Asp Arg Val Thr Met Leu Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser
65 70 75 80

Leu Arg Leu Ser Lys Val Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ser Leu Tyr Phe Gly Phe Pro Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 11
<211> 119
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 11
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Arg Pro Ser Gln
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asp Phe Thr Thr Tyr
20 25 30

Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Glu Ile His Pro Asp Ser Ser Thr Ile Asn Tyr Ala Pro Ser Leu
50 55 60

Lys Asp Lys Phe Ile Val Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser
65 70 75 80

Leu Arg Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Ser Leu Tyr Phe Gly Phe Pro Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 12
<211> 119
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 12
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Ser Ser Gly Phe Asp Phe Thr Thr Tyr
20 25 30

Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Glu Ile His Pro Asp Ser Ser Thr Ile Asn Tyr Ala Pro Ser Leu
50 55 60

Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Phe
65 70 75 80

Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Gly Val Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Ser Leu Tyr Phe Gly Phe Pro Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Pro Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 13
<211> 119
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 13
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Ala Ser Gly Phe Asp Phe Thr Thr Tyr
20 25 30

Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Glu Ile His Pro Asp Ser Ser Thr Ile Asn Tyr Ala Pro Ser Leu
50 55 60

Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Phe

65 70 75 80

Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Gly Val Tyr Phe Cys
 85 90 95

Ala Ser Leu Tyr Phe Gly Phe Pro Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Pro Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 14
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 14

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Ala Ser Gly Phe Asp Phe Thr Thr Tyr
 20 25 30

Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Glu Ile His Pro Asp Ser Ser Thr Ile Asn Tyr Ala Pro Ser Leu
 50 55 60

Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Phe
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Gly Val Tyr Phe Cys
 85 90 95

Ala Ser Leu Tyr Phe Gly Phe Pro Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Pro Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 15
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 15

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Ala Ser Gly Phe Asp Phe Thr Thr Tyr
 20 25 30

Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Glu Ile His Pro Asp Ser Ser Thr Ile Asn Tyr Ala Pro Ser Leu

50	55	60	
Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr			
65	70	75	80
Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Gly Val Tyr Phe Cys			
	85	90	95
Ala Ser Leu Tyr Phe Gly Phe Pro Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly			
	100	105	110
Thr Pro Val Thr Val Ser Ser			
	115		
<210> 16			
<211> 357			
<212> DNA			
<213> Homo sapiens			
<220>			
<221> CDS			
<222> (1) .. (357)			
<400> 16			
gag gtc caa ctg gtg gag agc ggt gga ggt gtt gtg caa cct ggc cgg			48
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg			
1	5	10	15
tcc ctg cgc ctg tcc tgc tcc gca tct ggc ttc gat ttc acc aca tat			96
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Ala Ser Gly Phe Asp Phe Thr Thr Tyr			
	20	25	30
tgg atg agt tgg gtg aga cag gca cct gga aaa ggt ctt gag tgg att			144
Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile			
	35	40	45
gga gaa att cat cca gat agc agt acg att aac tat gcg ccg tct cta			192
Gly Glu Ile His Pro Asp Ser Ser Thr Ile Asn Tyr Ala Pro Ser Leu			
	50	55	60
aag gat aga ttt aca ata tcg cga gac aac gcc aag aac aca ttg ttc			240
Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Phe			
65	70	75	80
ctg caa atg gac agc ctg aga ccc gaa gac acc ggg gtc tat ttt tgt			288
Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Gly Val Tyr Phe Cys			
	85	90	95
gca agc ctt tac ttc ggc ttc ccc tgg ttt gct tat tgg ggc caa ggg			336
Ala Ser Leu Tyr Phe Gly Phe Pro Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly			
	100	105	110
acc ccg gtc acc gtc tcc tca			357
Thr Pro Val Thr Val Ser Ser			
	115		

<210> 17
<211> 119
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 17
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Ala Ser Gly Phe Asp Phe Thr Thr Tyr
20 25 30
Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Glu Ile His Pro Asp Ser Ser Thr Ile Asn Tyr Ala Pro Ser Leu
50 55 60
Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Phe
65 70 75 80
Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Gly Val Tyr Phe Cys
85 90 95
Ala Ser Leu Tyr Phe Gly Phe Pro Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110
Thr Pro Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 18
<211> 318
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (1) .. (318)

<400> 18
gac atc cag ctg acc cag agc cca agc agc ctg agc gcc agc gtg ggt 48
Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
gac aga gtg acc atc acc tgt aag gcc agt cag gat gtg ggt act tct 96
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Gly Thr Ser
20 25 30
gta gct tgg tac cag cag aag cca ggt aag gct cca aag ctg ctg atc 144
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
tac tgg aca tcc acc cgg cac act ggt gtg cca agc aga ttc agc ggt 192
Tyr Trp Trp Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

agc ggt agc ggt acc gac ttc acc ttc acc atc agc agc ctc cag cca 240
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

gag gac atc gcc acc tac tac tgc cag caa tat agc ctc tat cgg tcg 288
 Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Leu Tyr Arg Ser
 85 90 95

ttc ggc caa ggg acc aag gtg gaa atc aaa 318
 Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 19
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 19
 Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Gly Thr Ser
 20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Trp Thr Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Leu Tyr Arg Ser
 85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 20
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Mus sp.

<400> 20
 Lys Ala Ser Gln Asp Val Gly Thr Ser Val Ala
 1 5 10

<210> 21
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Mus sp.

<400> 21
 Trp Thr Ser Thr Arg His Thr
 1 5

<210> 22
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Mus sp.

<400> 22
 Gln Gln Tyr Ser Leu Tyr Arg Ser
 1 5

<210> 23
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Mus sp.

<400> 23
 Thr Tyr Trp Met Ser
 1 5

<210> 24
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Mus sp.

<400> 24
 Glu Ile His Pro Asp Ser Ser Thr Ile Asn Tyr Ala Pro Ser Leu Lys
 1 5 10 15

Asp

<210> 25
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Mus sp.

<400> 25
 Leu Tyr Phe Gly Phe Pro Trp Phe Ala Tyr
 1 5 10

<210> 26
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 26
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Arg Pro Ser Gln
 1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Ser Thr Phe Ser Thr Tyr
 20 25 30

Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Glu Ile His Pro Asp Ser Ser Thr Ile Asn Tyr Ala Pro Ser Leu
50 55 60

Lys Asp Arg Val Thr Met Leu Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser
65 70 75 80

Leu Arg Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Leu Tyr Phe Gly Phe Pro Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 27
<211> 119
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 27

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Ser Ser Gly Phe Ile Phe Ser Thr Tyr
20 25 30

Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Glu Ile His Pro Asp Ser Ser Thr Ile Asn Tyr Ala Pro Ser Leu
50 55 60

Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Phe
65 70 75 80

Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Gly Val Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Arg Leu Tyr Phe Gly Phe Pro Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Pro Val Thr Val Ser Ser
115