



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2013년08월21일
(11) 등록번호 10-1297146
(24) 등록일자 2013년08월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/00 (2006.01) A61K 39/395 (2006.01)
A61K 39/42 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2006-7025895
(22) 출원일자(국제) 2005년05월10일
심사청구일자 2010년04월06일
(85) 번역문제출일자 2006년12월08일
(65) 공개번호 10-2007-0012543
(43) 공개일자 2007년01월25일
(86) 국제출원번호 PCT/US2005/016260
(87) 국제공개번호 WO 2005/110474
국제공개일자 2005년11월24일
(30) 우선권주장
60/569,882 2004년05월10일 미국(US)
60/582,043 2004년06월21일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
W02004016750 A2*
US6737056 B1
Hybridoma, Vol.15, pp.109-116(1996.)
J. Allergy Clin. Immunol., Vol.108,
ppS95-S98(2001.)
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
마크로제닉스, 인크.
미국 메릴랜드주 20850 록빌 메디칼 센터 드라이브 9640
(72) 발명자
존슨, 레슬리, 에스.
미국 20874 메릴랜드주 다르네스타운 포플러 힐 로드 14411
후양, 링
미국 20879 메릴랜드주 가이터스버그 스트라토스 레인 7107
(74) 대리인
송봉식, 정삼영

전체 청구항 수 : 총 39 항

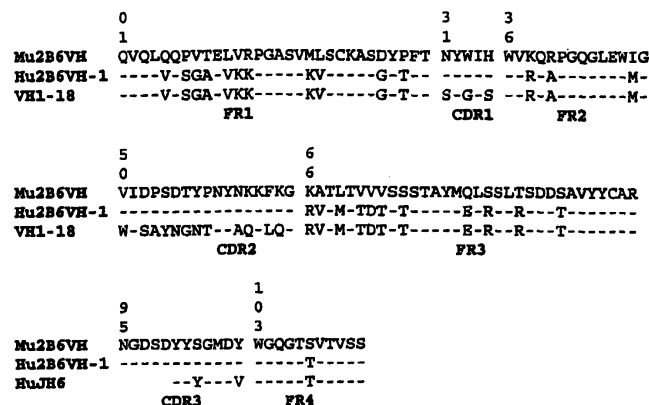
심사관 : 김지연

(54) 발명의 명칭 인간화 Fc γ RIIB 특이적 항체 및 그의 사용 방법

(57) 요약

본 발명은 항체가 Fc γ RIIA에 결합하는 것보다 더 큰 친화도로 인간 Fc γ RIIB에 특이적으로 결합하는 인간화 Fc γ RIIB 항체 또는 그의 단편 및 변이체에 관한 것이다. 본 발명은 Fc 수용체 매개 신호전달의 균형 상실에 관련 된 임의의 질병, 예를 들어 암, 자가면역 질환 및 염증성 질환의 치료를 위한 본 발명의 인간화 항체의 용도를 포함한다. 본 발명은 치료 항체의 이펙터 기능을 향상시키기 위해 본 발명의 인간화 항체를 투여함으로써 치료 항체의 치료 효과를 향상시키는 방법을 제공한다. 본 발명은 또한 본 발명의 인간화 항체를 투여함으로써 백신 조성물의 효능을 향상시키는 방법을 제공한다. 본 발명은 자가면역 질병의 치료 방법 및 Fc γ RIIB를 발현하는 암세포의 제거 방법을 포함한다.

대표도 - 도1A



특허청구의 범위

청구항 1

인간화 항체 또는 그것의 항원 결합 단편으로서,

상기 항체 또는 상기 단편은,

(a) ATCC 기탁 번호 PTA-5958의 클론 1D5에 의해 얻어지는 모노클로날 항체의 여섯 개의 CDR을 포함하여 이루어지거나,

(b) ATCC 기탁 번호 PTA-5961의 클론 2E1에 의해 얻어지는 모노클로날 항체의 여섯 개의 CDR을 포함하여 이루어지거나,

(c) ATCC 기탁 번호 PTA-5962의 클론 2H9에 의해 얻어지는 모노클로날 항체의 여섯 개의 CDR을 포함하여 이루어지거나,

(d) ATCC 기탁 번호 PTA-5960의 클론 2D11에 의해 얻어지는 모노클로날 항체의 여섯 개의 CDR을 포함하여 이루어지거나, 또는

(e) ATCC 기탁 번호 PTA-5959의 클론 1F2에 의해 얻어지는 모노클로날 항체의 여섯 개의 CDR을 포함하여 이루어지고,

또한 상기 항체 또는 단편은 천연 인간 $Fc\gamma RIIA$ 의 세포외 도메인에 결합하는 것보다 더 큰 친화도로 천연 인간 $Fc\gamma RIIB$ 의 세포외 도메인에 특이적으로 결합하며, 상기 단편은 Fab 단편, $F(ab')$ 단편, $F(ab')_2$ 단편 및 scFv 단편으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나인 인간화 항체 또는 그것의 항원 결합 단편.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 항체 또는 단편은 VL CDR2 위치 50에서 아스파라긴을 티로신으로 치환하는 아미노산 변형을 포함하는 것을 특징으로 하는 인간화 항체 또는 단편.

청구항 9

제1항에 있어서, 상기 항체 또는 단편은 VL CDR2 위치 51에서 발린을 알라닌으로 치환하는 아미노산 변형을 포함하는 것을 특징으로 하는 인간화 항체 또는 단편.

청구항 10

제1항에 있어서, 상기 항체 또는 단편은 프레임워크 영역에서 아미노산 변형을 함유하지 않는 것을 특징으로 하는 인간화 항체 또는 단편.

청구항 11

삭제

청구항 12

제1항에 있어서, 상기 항체는 단쇄 항체인 것을 특징으로 하는 인간화 항체.

청구항 13

제1항에 있어서, 상기 항체 또는 단편은 이중 폴리펩티드에 작동가능하게 연결된 것을 특징으로 하는 인간화 항체 또는 단편.

청구항 14

제1항에 있어서, 상기 항체 또는 단편은 치료제에 컨쥬게이팅된 것을 특징으로 하는 인간화 항체 또는 단편.

청구항 15

제14항에 있어서, 상기 치료제가 세포독소인 것을 특징으로 하는 인간화 항체 또는 단편.

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

제1항의 인간화 항체 또는 그것의 단편의 중쇄나 경쇄를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 단리된 핵산.

청구항 19

제18항의 핵산 분자를 포함하는 벡터.

청구항 20

중쇄를 코딩하는 제1 핵산 분자 및 경쇄를 코딩하는 제2 핵산 분자를 포함하며, 상기 중쇄 및 경쇄는 제1항의 인간화 항체 또는 그것의 단편의 중쇄 및 경쇄인 벡터.

청구항 21

제19항에 있어서, 발현 벡터인 것을 특징으로 하는 벡터.

청구항 22

제19항의 벡터를 함유하는 숙주 세포.

청구항 23

이중 프로모터에 작동가능하게 연결된 제1 핵산 및 동일하거나 상이한 이중 프로모터에 작동가능하게 연결된 제2 핵산을 함유하며, 상기 제1 핵산 및 제2 핵산은 제1항의 인간화 항체 또는 그것의 단편의 중쇄 및 경쇄를 각각 코딩하는 것인 숙주 세포.

청구항 24

암 항원에 의해 특징지어지는 암을 앓고 있는 인간을 제외한 대상에 있어서의 암의 치료 방법으로서,

상기 방법은 상기 대상에게 치료 유효량의 제1항, 제8항 또는 제9항 중 어느 한 항에 따른 인간화 항체와 상기 암 항원에 특이적으로 결합하며 세포 독성인 제2 항체를 투여하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 25

제24항에 있어서, 상기 암이 유방암, 난소암, 전립선암, 자궁경부암 또는 췌장암인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 26

제24항에 있어서, 세포독성인 상기 제2 항체는, 트라추주맙, 리톡시맙, IC14, 에드레콜로맙, 세톡시맙, 항- $\alpha V \beta 3$ 인테그린인 비탁신 (VITAXIN)®, 항-CD52 IgG1인 캄파쓰 1H/LDP-03, 에프라투주맙 또는 항-CD20인 제발린 (ZEVALIN)®인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 27

제24항에 있어서, 상기 암 항원이 MAGE-1, MAGE-3, BAGE, GAGE-1, GAGE-2, N-아세틸글루코사미닐트랜스퍼라제, p15, 베타-카테닌, MUM-1, CDK4, HER-2/neu, 인간 파필로마바이러스-E6, 인간 파필로마바이러스-E7 또는 MUC-1 인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 28

제24항에 있어서, 상기 암 항원이 유방암종, 난소암종, 전립선암종, 자궁경부암종 또는 췌장암종 항원인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 29

제24항에 있어서, 하나 이상의 추가 암 치료법의 수행을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 30

제29항에 있어서, 상기 추가 암 치료법이 화학요법, 면역요법, 방사선요법, 호르몬요법 또는 수술로 이루어진 군 중에서 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

인간을 제외한 대상에 있어서의 자가면역 질환의 치료 방법으로서,

상기 방법은 상기 대상에게 치료 유효량의 제1항에 따른 인간화 항체 또는 그것의 단편을 투여하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 34

제33항에 있어서, 상기 자가면역 질환이 류마티스성 관절염, 건선 관절염, 강직성 척추염, 라이터 증후군, 건선 또는 홍반성 루푸스인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 35

제33항에 있어서, 상기 대상에게 치료 유효량의 하나 이상의 항염증제를 투여하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 36

제33항에 있어서, 상기 대상에게 치료 유효량의 하나 이상의 면역조절제를 투여하는 단계를 더 포함하는 것을

특징으로 하는 방법.

청구항 37

제36항에 있어서, 상기 하나 이상의 면역조절제가 유기 소분자인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 38

제37항에 있어서, 상기 유기 소분자가 메토티렉세이트, 레플루노미드, 시클로포스포미드, 시클로스포린 A, FK506, 미코페놀레이트 모페틸, 라파마이신, 미조리빈, 데옥시시페르구알린, 브레퀴나르, 말로니트롤라미드, 스테로이드 또는 코르티코스테로이드인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 39

제35항에 있어서, 상기 항염증제의 하나 이상은 비-스테로이드성 항염증 약물인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 40

제39항에 있어서, 상기 비-스테로이드성 항염증 약물이 아스피린, 이부프로펜, 디클로페낙, 나부메톤, 나프록센 또는 케토프로펜인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 41

인간을 제외한 대상에 있어서의 IgE-매개 알레르기 질환의 치료 또는 예방 방법으로서,

상기 방법은 상기 대상에게 치료 유효량의 제1항에 따른 인간화 항체 또는 그것의 단편을 투여하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 42

제41항에 있어서, 상기 IgE-매개 알레르기 질환이 천식, 알레르기성 비염, 위장관 알레르기, 호산구증가증, 결막염 또는 사구체신염인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 43

세포독성 항체로 치료되는 인간을 제외한 대상에 있어서 항체 매개 세포독성 효과를 향상시키는 방법으로서,

상기 방법은 상기 대상에게 제1항에 따른 인간화 항체 또는 그것의 단편을 세포독성 항체의 세포독성 효과를 향상시키기에 충분한 양으로 투여하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 44

인간을 제외한 대상에 있어서 자가면역 질병의 진단 방법으로서,

상기 방법은,

(a) 상기 대상으로부터의 생물학적 샘플을 유효량의 제1항에 따른 인간화 항체 또는 그것의 단편과 접촉시키는 단계; 및

(b) 검출가능한 마커를 사용하여 상기 항체 또는 그것의 단편의 결합을 검출하는 단계를 포함하며,

상기 검출가능한 마커의 배경 또는 기준 수준을 초과하는 검출은 상기 대상이 자가면역 질병을 앓고 있음을 나타내는 방법.

청구항 45

제44항에 있어서, 상기 검출가능한 마커가 화학발광, 효소, 형광 또는 방사성 표지인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 46

인간을 제외한 대상에 있어서 백신 조성물에 대한 면역 반응을 향상시키는 방법으로서,

상기 방법은 상기 대상에게 제1항에 따른 인간화 항체 또는 그것의 단편과 백신 조성물을 투여하는 단계를 포함

하며,

상기 인간화 항체는 상기 대상에서 상기 백신 조성물에 대한 면역 반응을 향상시키기에 효과적인 양으로 투여되는 방법.

청구항 47

암 항원에 의해 특징지어지는 암을 앓고 있는 인간을 제외한 대상에 있어서 암의 치료 방법으로서,

상기 방법은 상기 대상에게 치료 유효량의 제1항에 따른 인간화 항체 또는 그것의 단편을 투여하는 단계를 포함하며, 여기서 투여되는 항체 또는 그것의 단편은 Fc γ RIIB를 발현하는 암세포의 개체수를 감소시키는 방법.

청구항 48

암 항원에 의해 특징지어지는 암을 앓고 있는 인간을 제외한 대상에 있어서 암의 치료 방법으로서,

상기 방법은 상기 대상에게 치료 유효량의 제1항에 따른 인간화 항체 또는 그것의 단편을 투여하는 단계를 포함하며, 여기서 투여된 항체 또는 그것의 단편은 Fc γ RIIB를 발현하는 암세포를 제거하는 방법.

청구항 49

제1항에 있어서, 인간화 항체 또는 단편은 항체 VH1-18과 VH6의 VH 프레임워크 영역의 아미노산 서열을 갖는 VH 프레임워크 영역을 포함하는 것을 특징으로 하는 인간화 항체 또는 단편.

청구항 50

제1항에 있어서, 인간화 항체 또는 단편은 항체 VK-A26과 JK4의 VH 프레임워크 영역의 아미노산 서열을 갖는 VH 프레임워크 영역을 포함하는 것을 특징으로 하는 인간화 항체 또는 단편.

명세서

[0001] 본원은 각각 그 전부가 본원에 참고로 포함된, 2004년 2004년 6월 21일 출원된 미국 가출원 60/582,043 및 2004년 5월 10일 출원된 미국 가출원 60/569,882를 기초로 한 우선권을 주장한다.

기술분야

[0002] 1. 발명의 분야

[0003] 본 발명은 항체가 Fc γ RIIA에 결합하는 것보다 더 큰 친화도로 인간 Fc γ RIIB에 특이적으로 결합하는 인간화 Fc γ RIIB 항체 및 그의 단편 및 변이체에 관한 것이다. 본 발명은 또한 Fc 수용체 매개 신호전달의 균형 상실에 관련된 임의의 질병, 예를 들어 암 (바람직하게는 B-세포 악성종양, 특히 B-세포 만성 림프구성 백혈병 또는 비호지킨 림프종), 자가면역 질환, 염증성 질환 또는 IgE-매개 알레르기 질환의 치료를 위한 본 발명의 인간화 항체의 용도를 포함한다. 또한, 본 발명은 다른 암 치료제와 조합된 인간화 Fc γ RIIB 항체 또는 그의 항원 결합 단편의 용도를 포함한다. 본 발명은 치료 항체의 이펙터 기능을 향상시키기 위해 본 발명의 인간화 항체를 투여함으로써 치료 항체의 치료 효과를 향상시키는 방법을 제공한다. 본 발명은 또한 본 발명의 인간화 항체를 백신 조성물과 함께 투여함으로써 백신 조성물의 효능을 향상시키는 방법을 제공한다.

배경 기술

[0004] 2. 발명의 배경

[0005] 2.1 Fc 수용체 및 면역 시스템에서 이들의 역할

[0006] 항체-항원 복합체와 면역계 세포의 상호작용은 이펙터 기능, 예를 들어 항체 의존성 세포독성, 비만세포 탈과립, 및 포식작용에서부터 면역조절 신호, 예를 들어 림프구 증식 및 항체 분비를 조절하는 것까지 광범위한 반응을 일으킨다. 이들 모든 상호작용은 항체 또는 면역 복합체의 Fc 도메인의 조혈세포 상의 특수화된 세포 표면 수용체에 대한 결합을 통해 개시된다. 항체 및 면역 복합체에 의해 촉발되는 세포성 반응의 다양성은 Fc 수용체의 구조적 불균일성으로 인한 것이다. Fc 수용체는 아마도 세포내 신호전달을 매개하는 구조적으로 관련

된 리간드 결합 도메인을 공유한다.

[0007] Fc 수용체 (단백질의 면역글로불린 유전자 슈퍼패밀리의 구성원)는 면역글로불린 분자의 Fc 부분에 결합할 수 있는 표면 당단백질이다. 패밀리의 각 구성원은 Fc 수용체의 사슬 상의 인지 도메인을 통해 하나 이상의 이소형의 면역글로불린을 인식한다. Fc 수용체는 면역글로불린 아형에 대한 특이성에 의해 정의된다. IgG에 대한 Fc 수용체는 Fc γ R로, IgE에 대한 수용체는 Fc ϵ R로, IgA에 대한 수용체는 Fc α R로 불린다. 상이한 보조 세포는 상이한 이소형 항체에 대한 Fc 수용체를 보유하고, 항체의 이소형은 보조 세포가 주어진 반응에 관여될지를 결정한다 (Ravetch J.V. et al. 1991, Annu. Rev. Immunol. 9:457-92; Gerber J.S. et al. 2001 Microbes and Infection, 3:131-139; Billadeau D.D. et al. 2002, The Journal of Clinical Investigation, 2(109): 161-1681; Ravetch J.V. et al. 2000, Science, 290: 84-89; Ravetch J.V. et al., 2001 Annu. Rev. Immunol. 19: 275-90; Ravetch J. V. 1994, Cell, 78(4): 553-60). 상이한 Fc 수용체, 이들의 발현하는 세포 및 이들의 이소형 특이성은 표 1에 요약된다 (문헌[Immunobiology: The Immune System in Health and Disease, 4th ed. 1999, Elsevier Science Ltd/Garland Publishing, New York]으로부터 채택함).

[0008] Fc γ 수용체

[0009] 이 패밀리의 각 구성원은 면역글로불린-관련 도메인의 C2-세트에 관련된 세포의 도메인, 단일 막에 걸쳐진 도메인 및 가변 길이의 세포질내 도메인을 갖는 내재성 막 당단백질이다. 3개의 공지의 Fc γ R, 즉 Fc γ RI(CD64), Fc γ RII(CD32), 및 Fc γ RIII(CD16)이 존재한다. 3개의 수용체는 별개의 유전자에 의해 코딩되지만; 3개의 패밀리의 구성원 사이의 광범위한 상동성은 이들이 아마도 유전자 복제에 의해 공통 전구세포로부터 발생함을 제시한다. 본 발명은 Fc γ RII(CD32)에 특히 집중한다.

[0010] Fc γ RII(CD32)

[0011] Fc γ RII 단백질은 단량체성 Ig에 대한 낮은 친화도 (10^6 M^{-1}) 때문에 복합체형성된 IgG에만 결합하는 40KDa 내재성 막 당단백질이다. 상기 수용체는 모든 조혈세포, 예를 들어 단핵구, 대식세포, B세포, NK 세포, 호중구, 비만세포 및 혈소판 상에 나타난 가장 널리 발현된 Fc γ R이다. Fc γ RII은 그의 면역글로불린 결합 사슬 내에 2개의 면역글로불린 유사 영역만을 갖고, 따라서 Fc γ RI보다 IgG에 대한 훨씬 더 낮은 친화도를 갖는다. 3개의 인간 Fc γ RII 유전자 (Fc γ RII-A, Fc γ RII-B, Fc γ RII-C)이 존재하고, 이들은 모두 응집체 또는 면역 복합체로 IgG에 결합한다.

[0012] Fc γ RII-A (CD32A) 및 Fc γ RII-B (CD32B)의 세포질 도메인 내의 뚜렷한 차이는 수용체 연결에 대해 2가지 기능적으로 불균일한 반응을 생성시킨다. 기본적인 차이는 A 이소형은 세포 활성화, 예를 들어 포식작용 및 호흡 터짐 (respiratory burst)을 일으키는 세포내 신호전달을 개시하는 반면, B 이소형은 억제 신호를 개시하는, 예를 들어 B-세포 활성화를 억제한다는 점이다.

[0013] Fc γ R을 통한 신호전달

[0014] 활성화 및 억제 신호는 모두 연결 후 Fc γ R을 통해 변환된다. 이들 정반대되는 기능은 상이한 수용체 이소형 사이의 구조적인 차이로 인한 것이다. 면역수용체 티로신계 활성화 모티프 (ITAM) 또는 면역수용체 티로신계 억제 모티프 (ITIM)로 불리는 수용체의 세포질 신호전달 도메인 내의 2개의 별개의 도메인이 상이한 반응을 설명한다. 이들 구조에 대한 상이한 세포질 효소의 동원이 Fc γ R-매개 세포성 반응의 결과를 지시한다. ITAM-함유 Fc γ R 복합체는 Fc γ RI, Fc γ RIIA, Fc γ RIIA를 포함하는 반면, ITIM-함유 복합체는 Fc γ RIIB만을 포함한다.

[0015] 인간 호중구는 Fc γ RIIA 유전자를 발현한다. 면역 복합체 또는 특이적 항체 가교결합을 통한 Fc γ RIIA 군집형성이 ITAM 인산화를 촉진하는 수용체-결합된 키나제와 함께 ITAM을 응집시키는 역할을 한다. ITAM 인산화는 그의 활성화가 하류 기질 (예를 들어 PI₃K)의 활성화를 일으키는 Syk 키나제에 대한 결합 (docking) 부위로서 역할을 한다. 세포성 활성화는 전염증 매개체의 방출을 일으킨다.

[0016] Fc γ RIIB 유전자는 B 림프구 상에 발현되고; 그의 세포의 도메인은 Fc γ RIIA에 96% 동일하고 구분불가능한 방식으로 IgG 복합체에 결합한다. Fc γ RIIB의 세포질 도메인에 ITIM의 존재는 Fc γ R의 상기 억제 서브클래스를 규정한다. 최근에 상기 억제의 분자적 기초가 확립되었다. 활성화 Fc γ R과 함께 결합될 때, Fc γ RIIB 내의 ITIM은 인산화되고, 이노시톨 폴리포스페이트 5'-포스파타제의 SH2 도메인 (SHIP)을 끌어당기고, 이는 ITAM-함유 Fc γ R-매개된 티로신 키나제 활성화의 결과로서 방출된 포스포이노시톨 메신저를 가수분해시키고, 결과적으로 세

포내 Ca^{++} 의 유입을 방지한다. 따라서, $\text{Fc}\gamma\text{RIIB}$ 의 가교결합은 $\text{Fc}\gamma\text{R}$ 연결에 대한 활성화 반응을 감소시키고 세포성 반응성을 억제한다. 따라서 B세포 활성화, B세포 증식 및 항체 분비가 중단된다.

표 1

면역글로불린 이소형의 Fc 영역에 대한 수용체

수용체	$\text{Fc}\gamma\text{RI}$ (CD64)	$\text{Fc}\gamma\text{RII-A}$ (CD32)	$\text{Fc}\gamma\text{RII-B2}$ (CD32)	$\text{Fc}\gamma\text{RII-BI}$ (CD32)	$\text{Fc}\gamma\text{RIII}$ (CD16)	$\text{Fc}\epsilon\text{RI}$	$\text{Fc}\alpha\text{RI}$ (CD89)
결합	IgG1 10^8 M^{-1}	IgG1 $2 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$	IgG1 $2 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$	IgG1 $2 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$	IgG1 $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$	IgG1 10^{10} M^{-1}	IgG1, IgA2 10^7 M^{-1}
세포 종류	대식세포 호중구 호산구 수지상 세포	대식세포 호중구 호산구 수지상 세포 혈소판 랑게르한 세포	대식세포 호중구 호산구	B세포 비만 세포	NK 세포 호산구 대식세포 호중구 비만 세포	비만 세포 호산구 호염기구	대식세포 호중구 호산구
연결의 효과	흡수 자극 호흡 터짐의 활성화 치사의 유도	흡수 과립 방출	흡수 자극의 억제	흡수 없음 자극의 억제	치사의 유도	과립의 분비	흡수 치사의 유도

2.2 관련 질병

2.2.1 암

신생물 또는 종양은 양성 또는 악성일 수 있는 비정상적인 비제어된 세포 성장으로부터 생성된 신생물 덩어리이다. 양성 종양은 일반적으로 국소화되어 남는다. 악성 종양은 암을 총칭한다. 용어 "악성"은 일반적으로 종양이 이웃 신체 구조에 침범하여 파괴하고 먼 부위로 확산하여 사망시킬 수 있는 것을 의미한다 (검토를 위해 문헌 [Robbins and Angell, 1976, Basic Pathology, 2d Ed., W.B. Saunders Co., Philadelphia, pp.68-122] 참조). 암은 신체의 많은 부위에서 발생하고 그의 기원에 따라 상이하게 거동할 수 있다. 암성 세포는 그들이 기원하는 신체 부분을 파괴한 다음 신체의 다른 부분(들)로 확산하여 여기서 새로 성장하기 시작하여 보다 많은 파괴를 일으킨다.

120만명을 초과하는 미국인에게서 매년 암이 발병한다. 암은 미국에서 제2의 주요 사망 요인이고, 현재 추세로 계속되면 암은 2010년에는 제1의 사망 원인이 될 것으로 예상된다. 폐암 및 전립선암이 미국 남성에게 대한 최고의 암으로 인한 사인이다. 폐암 및 유방암은 미국 여성에게 대한 최고의 암으로 인한 사인이다. 미국 남성의 2명 중 1명이 생애에 언젠가 암으로 진단될 것이다. 미국 여성의 3명 중 1명이 생애에 언젠가 암으로 진단될 것이다. 암 치료법은 아직도 개발될 필요가 있다.

현재의 치료 방법, 예를 들어 수술, 화학요법 및 방사선 처리는 종종 비효율적이거나 심각한 부작용을 초래한다.

2.2.1.1 B-세포 악성종양

비제한적으로 B-세포 림프종 및 백혈병을 포함하는 B세포 악성종양은 미국에서 유의한 발생률을 갖는 신생물 질병이다. 미국에서 매년 약 55,000건의 새로운 림프종이 발생하고 (1998년 데이터), 매년 25,000명이 사망하는 것으로 추정된다. 이는 미국 인구의 암 발생의 4% 및 모든 암-관련 사망의 4%를 나타낸다. 개정된 림프모양 신생물의 유럽-미국 (European-American) 분류 (1994 REAL 분류, 1999년 변경됨)에서는 림프종을 그들의 기원을 기초로 B세포계 림프종, T 세포계 림프종, 또는 호지킨 림프종으로 분류하였다. B세포계의 림프종은 미국에서 진단된 가장 일반적인 종류의 비호지킨 림프종 (NHL)이다 (Williams, Hematology 6th ed. (Beutler et al. Ed.), McGraw Hill 2001).

- [0025] 만성 림프구성 백혈병 (CLL)은 혈액, 골수 및 림프양 조직에서 소형의 성숙한 것으로 보이는 림프구의 축적을 특징으로 하는 신생물 질병이다. CLL은 미국에서 100,000명당 2.7건의 발생률을 갖는다. 위험은 특히 남성에게 있어서 연령에 따라 점진적으로 증가한다. 이는 모든 암의 0.8%의 원인이 되고, 모든 백혈병의 30%에 책임있는 가장 일반적인 성인 백혈병이다. 거의 모든 경우 (>98%)에, 질병에 걸린 세포는 B 림프구계에 속한다. 비-백혈병 변이형인 소림프구성 림프종은 모든 림프종의 5-10%를 구성하고, B-CLL 환자의 관련 림프절로부터 구별할 수 없는 조직학적, 형태학적 및 면역학적 특징을 갖는다 (Williams, 2001).
- [0026] 만성 림프구성 백혈병의 자연 경과와 몇개 상으로 나누어진다. 초기상에서, 만성 림프구성 백혈병은 길어진 수명을 갖는 소형의 성숙한, 기능적으로 무능성의 악성 B-세포의 축적을 특징으로 하는 무활동성 질병이다. 결국, 악성 B-세포의 배가 시간은 감소하고, 환자는 점점 증상을 나타내게 된다. 화학치료를 사용한 치료가 증상 경감을 제공할 수 있지만, 환자의 총 생존율은 단지 최소로 연장된다. 만성 림프구성 백혈병의 후기는 심각한 빈혈 및/또는 저혈소판증을 특징으로 한다. 이 시점에, 중앙 생존율은 2년 미만이다 (Foon et al., 1990, Annals Int. Medicine 113:525). 매우 느린 세포 증식 속도 때문에, 만성 림프구성 백혈병은 화학치료를 사용한 치료에 내성이다.
- [0027] 최근에, 유전자 발현 연구에서 림프증식성 질환에서 상향 조절될 수 있는 몇가지 유전자를 확인하였다. B-세포 만성 림프구성 백혈병 (B-CLL)의 환자에서, 및 비호지킨 림프종 환자의 많은 부분에서 과발현되는 것으로 생각되는 한 분자는 CD32B이다 (Alizadeh et al., 2000, Nature 403:503-511; Rosenwald et al., 2001, J. Exp. Med. 184:1639-1647). 그러나, CD32B가 B-CLL 세포의 낮은 비율 상에서 낮은 밀도로 발현한 것이 보고되었으므로 (Damle et al., 2002, Blood 99:4087-4093) B-CLL에서 CD32B의 역할은 불명확하다. CD32B는 B세포 신생물에서 그의 과발현이 치료 항체에 대한 적합한 표적으로 만드는 B세포계 표면 항원이다. 또한, CD32B는 그의 연결이 음성 신호를 전달하는 억제성 수용체의 범주에 속한다. 따라서, CD32B에 대해 지정된 항체는 보체 의존성 세포독성 (CDC), 항체 의존성 세포성 세포독성 (ADCC)을 포함하지만, 또한 세포자멸 신호를 촉발하는 메카니즘에 의해 중앙 세포를 제거하는 기능을 할 수 있다. 따라서 CD32B와 그의 대응체 CD32A (활성화 Fc γ 수용체)의 높은 상동성은 하나를 선택적으로 인식하지만 다른 형태의 분자는 인식하지 않는 항체의 생산을 크게 방해한다.
- [0028] **2.2.1.2 암 치료법**
- [0029] 현재, 암 치료법은 환자에서 신생물 세포를 근절하기 위해 수술, 화학요법, 호르몬요법 및/또는 방사선 치료를 포함할 수 있다 (예를 들어 Stockdale, 1998, "Principles of Cancer Patient Management", in Scientific American: Medicine, vol. 3, Rubenstein and Federman, eds., Chapter 12, Section IV 참조). 암 치료법은 또한 생물학적 요법 또는 면역요법을 포함할 수 있다. 이들 연구는 모두 환자에 대해 심각한 단점을 지닌다. 예를 들어, 수술은 환자의 건강 때문에 금기될 수 있거나 환자에게 받아들여지지 않을 수 있다. 추가로, 수술은 신생물 조직을 완전히 제거하지 않을 수 있다. 방사선요법은 단지 신생물 조직이 정상 조직보다 방사선에 대해 더 큰 감수성을 나타낼 때에 효과적이고, 방사선요법은 또한 종종 심각한 부작용을 유발할 수 있다. 호르몬요법은 드물게 단일제로서 제공되고 효과적일 수 있지만, 다른 치료가 대부분의 암 세포를 제거한 후 암 재발을 예방하거나 지연시키기 위해 종종 사용된다. 생물학적 요법/면역요법은 횡수에서 제한되고, 발진 또는 종창, 독감 유사 증상, 예를 들어 열, 오한 및 피로, 소화관 문제 또는 알레르기 반응과 같은 부작용을 일으킬 수 있다.
- [0030] 화학요법에 있어서, 암의 치료를 위해 이용가능한 다양한 화학치료제가 존재한다. 상당한 대부분의 암 화학치료제는 DNA 복제 및 수반하는 세포 분열을 방지하기 위해 테옥시리보뉴클레오타이드 트리포스페이트 전구체의 생합성을 억제함으로써 DNA 합성을 직접 또는 간접적으로 억제함으로써 작용한다 (예를 들어 Gilman et al., Goodman and Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics, Eighth Ed. (Pergamom Press, New York, 1990) 참조). 알킬화제, 예를 들어 니트로소우레아, 항대사제, 예를 들어 메토폭세이트 및 히드록시우레아, 및 다른 물질, 예를 들어 에토포시드, 캄프토테신, 블레오마이신, 독소루비신, 다우노루비신 등을 포함하는 이들 약제는 반드시 세포 주기 특이적일 필요는 없지만 DNA 복제에 대한 그들의 효과 때문에 S상 동안 세포를 치사시킨다. 다른 약제, 구체적으로 콜히친 및 빈카 알칼로이드, 예를 들어 빈블라스틴 및 빈크리스틴은 미세관 회합을 저해하여 유사분열 정지를 일으킨다. 화학요법 프로토콜은 일반적으로 치료 효능을 증가시키기 위해 화학치료제의 배합물을 투여하는 것을 포함한다.
- [0031] 다양한 화학치료제의 이용가능성에도 불구하고, 화학요법은 많은 단점을 갖는다 (예를 들어 Stockdale, 1998, "Principles Of Cancer Patient Management" in Scientific American Medicine, vol. 3, Rubenstein and Federman, eds., ch. 12, sect. 10 참조). 거의 모든 화학치료제가 유독성이고, 화학요법은 심각하고 종종 위

험한 부작용, 예를 들어 심한 오심, 골수 억제, 면역억제 등을 일으킨다. 추가로, 화학치료제의 배합물 투여에서도, 많은 종양 세포가 화학치료제에 내성이거나 내성을 발현한다. 실제로, 치료 프로토콜에 사용된 특정 화학치료제에 내성인 세포는 종종 다른 약물, 심지어 특정한 치료에 사용된 약물의 작용 메카니즘과 상이한 메카니즘에 의해 작용하는 약제에 대해서도 내성인 것으로 입증되고, 상기 현상은 다면발현성 약물 또는 다중 약물 내성으로 불린다. 따라서, 약물 내성 때문에, 많은 암이 표준 화학요법 치료 프로토콜에 불응성인 것으로 입증된다.

[0032] B-세포 악성종양은 일반적으로 단일제 화학요법, 조합 화학요법 및/또는 방사선요법으로 치료된다. 이들 치료는 심각한 부작용을 갖기는 하지만 사망률을 감소시키고/시키거나 생존율을 개선시킬 수 있다. 상이한 형태의 치료에 대한 B-세포 악성종양의 반응은 혼합적이다. 예를 들어, 비호지킨 림프종의 적절한 임상 단계가 가능한 경우, 영역 방사선요법이 만족스러운 치료를 제공할 수 있다. 그러나 특정 환자는 반응하지 못하고, 시간이 지남에 따라 특히 질병의 가장 공격적인 변이형을 갖는 치료에 내성을 갖는 질병 재발이 그 후 일어난다. 환자의 약 1/2가 질병으로 죽는다 (Devesa et al., 1987, J. Nat'l Cancer Inst. 79:701).

[0033] 불응성 B세포 신생물의 치료를 위한 연구용 치료법은 자가 및 동종 골수 또는 줄기세포 이식 및 유전자요법을 포함한다. 최근에, B-세포 특이적 항원을 표적으로 하는 모노클로날 항체를 사용하는 면역요법이 B세포 신생물의 치료에 도입되었다. 방사선헤중, 독소, 또는 다른 치료제를 지정하기 위해 모노클로날 항체를 사용하는 것은 상기 약제를 종양 부위로 선택적으로 전달하여, 정상 조직에 대한 독성을 제한할 수 있는 가능성을 제공한다.

[0034] 특히 표준 암 치료, 예를 들어 수술, 방사선요법, 화학요법 및 호르몬요법에 불응하는 것으로 증명된 암의 치료를 위해 대체적인 암 치료가 매우 필요하다. 유망한 대안은 면역요법이고, 여기서 암 세포는 암 항원-특이적 항체에 의해 특이적으로 표적화된다. 면역 반응의 특이성을 이용하는데 대부분의 노력이 기울여졌고, 예를 들어, 하이브리도마 기술은 종양 선택적 모노클로날 항체의 개발을 가능하게 하였고 (Green M.C. et al., 2000 Cancer Treat Rev., 26:269-286; Weiner LM, 1999 Semin Oncol. 26(suppl. 14):43-51 참조), 지난 수년 동안 FDA는 암 치료법을 위한 최초의 MAb를, 즉 리툽신 (항-CD20)을 비호지킨 림프종에 대해, 캄파쓰 (항-CD52)를 B-세포 만성 림프구성 백혈병 (B-CLL)에 대해, 헤르셉틴 [항-(c-erb-2/HER-2)]을 전이 유방암에 대해 승인하였다 (Suzanne A. Eccles, 2001, Breast Cancer Res., 3:86-90). NHL 및 B-CLL은 가장 일반적인 형태의 B세포 신생물 중의 2가지이다. 이들 항체는 임상 효능을 나타냈지만, 그들의 사용에는 부작용이 없지 않았다. 예를 들어, 항체 의존성 세포성 세포독성 ("ADCC")을 매개하는 항체 이펙터 기능의 효력이 상기 치료의 장애물이다. 또한, 리툽산 및 캄파쓰에 있어서, 적어도 1/2의 환자가 반응하지 못하고, 반응자 중 일부는 후속 치료에 불응성일 수 있다.

[0035] 특히 표준 암 치료 및 새로운 면역요법, 예를 들어 리툽산에 불응성인 환자에 대해 암, 특히, B-세포 악성종양에 대한 대체 치료법이 필요하다.

[0036] 2.2.2 염증성 질병 및 자가면역 질병

[0037] 염증은 체내 백혈구 및 화학물질이 외래 물질, 예를 들어 세균 및 바이러스에 의한 감염으로부터 신체를 보호하는 과정이다. 이는 보통 침범된 영역의 통증, 종창, 발열 및 발적을 특징으로 한다. 시토킨 및 프로스타글란딘으로 공지된 화학물질이 이 과정을 제어하고, 질서있고 자기-제한 캐스케이드로 혈액 또는 침범된 조직 내로 방출된다. 상기 화학물질의 방출은 손상 또는 감염 영역으로 혈류를 증가시키고 발적 및 발열을 일으킬 수 있다. 화학물질의 일부는 조직 내로 유체의 누출을 유발시켜, 종창을 일으킨다. 이러한 보호 과정은 신경을 자극하고 통증을 유발할 수 있다. 이들 변화는 관련 영역에서 한정된 기간 동안 발생할 때 신체에 유익하게 작용한다.

[0038] 자가면역 및/또는 염증성 질환에서, 면역 시스템은 퇴치할 외래 물질이 없을 때 염증 반응을 촉발시키고, 신체의 정상적인 보호 면역 시스템은 자신을 잘못 공격함으로써 자신의 조직을 손상시킨다. 신체를 상이한 방식으로 침범하는 많은 상이한 자가면역 질환이 존재한다. 예를 들어, 다발성 경화증의 개인에서 뇌가 침범되고, 크론병의 개인에서 창자가 침범되고, 류마티스성 관절염의 개인에서 각종 관절의 윤활막, 뼈 및 연골이 침범된다. 자가면역 질환이 진행함에 따라, 하나 이상의 종류의 신체 조직의 파괴, 장기의 비정상적 성장, 또는 장기 기능의 변화가 일어날 수 있다. 자가면역 질환은 단지 하나의 장기 또는 조직 종류에 침범할 수 있거나, 다수 장기 및 조직에 침범할 수 있다. 자가면역 질환에 의해 일반적으로 침범되는 장기 및 조직은 적혈구, 혈관, 결합 조직, 내분비선 (예를 들어 갑상선 또는 췌장), 근육, 관절 및 피부를 포함한다. 자가면역 질환의 예는 하시모토 갑상선염, 악성 빈혈, 애디슨병, 1형 당뇨병, 류마티스성 관절염, 전신성 홍반성 루푸스, 피부근육염, 쇼그렌

증후군, 다발성 경화증, 자가면역 내이 질환, 염증성 장 질환, 관절염, 중증 근무력증, 라이터 증후군, 그레이브스병, 자가면역 간염, 가족성 대장 폴립증 및 케양성 대장염을 포함하고, 이로 제한되지 않는다.

[0039] 류마티스성 관절염(RA) 및 유년기 류마티스성 관절염은 염증성 관절염의 종류이다. 관절염은 관절의 염증을 설명하는 일반 용어이다. 모두는 아니지만 몇몇 종류의 관절염은 잘못 지시된 염증의 결과이다. 류마티스성 관절염 외에, 염증과 연관된 다른 종류의 관절염은 건선 관절염, 라이터 증후군, 강직성 척추염 관절염 및 통풍 관절염을 포함한다. 류마티스성 관절염은 신체의 양쪽 측면 상의 관절(예를 들어 양손, 양손목 또는 양무릎)에서 발생하는 만성 관절염의 종류이다. 이러한 대칭성은 류마티스성 관절염을 다른 종류의 관절염과 구분하는 것을 돕는다. 관절에 침범하는 것에 추가로, 류마티스성 관절염은 때때로 피부, 눈, 폐, 심장, 혈액 또는 신경에 침범할 수 있다.

[0040] 류마티스성 관절염은 세계 인구의 약 1%에 영향을 미치고 잠재적으로 신체장애성이다. 미국에서 류마티스성 관절염의 발생율은 약 290만명이다. 남성보다 2 내지 3배 더 많은 여성이 영향을 받는다. 류마티스성 관절염이 발생하는 전형적인 연령은 25 내지 50세이다. 유년기 류마티스성 관절염은 71,000명의 어린 미국인(18세 이하)에 영향을 미치고, 소년보다 소녀에 6배 더 많이 영향을 미친다.

[0041] 류마티스성 관절염은 신체의 면역 시스템이 관절에서 윤활액을 분비하는 윤활막을 외래물질로 잘못 식별하는 자가면역 질환이다. 염증이 일어나고, 관절 내와 둘레의 연골 및 조직이 손상받거나 파괴된다. 중증의 경우, 상기 염증은 다른 관절 조직 및 주변 연골로 확장하여, 여기서 뼈 및 연골을 침식하거나 파괴하여 관절 변형을 일으킬 수 있다. 신체는 손상된 조직을 반흔 조직으로 교체하여, 관절 내 정상 공간을 좁아지게 하고 뼈를 함께 융합시킨다. 류마티스성 관절염은 경직, 종창, 피로, 빈혈, 체중 손실, 열 및 종종 무력화시키는 통증을 일으킨다. 류마티스성 관절염의 몇몇 공통 증상은 1시간 또는 그 이상 지속하는 기상시 관절 경직; 특정한 손가락 또는 손목 관절에서 종창; 관절 둘레 연조직에서 종창; 및 관절의 양쪽 측면에서 종창을 포함한다. 종창은 통증과 함께 또는 통증 없이 일어날 수 있고, 점진적으로 악화하거나, 진행하기 전에 수년 동안 동일하게 유지될 수 있다.

[0042] 류마티스성 관절염의 진단은 통증있는 관절의 특정한 위치 및 대칭성, 아침에 관절 경직의 존재, 피부 아래 혹(bump) 및 결절(류마티스양 결절)의 존재, 류마티스성 관절염을 제시하는 X-선 시험의 결과, 및/또는 류마티스 인자로 불리는 혈액 시험의 양성 결과를 포함하는 인자의 조합에 기초한다. 모두는 아니지만 많은 류마티스성 관절염에 걸린 사람이 혈액 중에 류마티스 인자 항체를 갖는다. 류마티스 인자는 류마티스성 관절염에 걸리지 않은 사람에게 존재할 수 있다. 다른 질병이 또한 류마티스 인자를 혈액 중에 생산시킬 수 있다. 이것이 류마티스성 관절염의 진단을 혈액 내의 류마티스 인자의 존재에만 아니라 몇가지 인자의 조합에 기초하는 이유이다.

[0043] 전형적인 질병 과정은 지속성이지만 변동하는 관절 증상들 중 하나이고, 약 10년 후, 90%의 환자가 뼈 및 연골에 구조적인 손상을 보일 것이다. 작은 비율이 완전히 낫는 단기간 병에 걸릴 것이고, 다른 작은 비율은 많은 관절 변형을 갖는 중증 질병에 걸리고, 때때로 질병의 다른 소견을 가질 것이다. 염증 과정은 관절에서 뼈 및 연골의 침식 또는 파괴를 일으킨다. 류마티스성 관절염에서, 지속적 항원 제시, T-세포 자극, 시토킨 분비, 윤활막 세포 활성화, 및 관절 파괴의 자가면역 주기가 있다. 질병은 개인과 사회 모두에 큰 영향을 끼쳐, 심각한 통증, 기능 손상 및 장애를 일으키고 의료 비용과 손실된 임금에 수백만 달러를 지불시킨다(예를 들어, NIH 웹사이트와 NIAID 웹사이트 참조).

[0044] 현재 이용가능한 관절염 치료법은 소염 또는 면역억제 의약품을 사용하여 관절의 염증을 감소시키는데 집중한다. 임의의 관절염의 제1선 치료제는 보통 항염증제, 예를 들어 아스피린, 이부프로펜 및 Cox-2 억제제, 예를 들어 셀레콕시브 및 로페콕시브이다. "제2선 약물"은 금, 메토타렉세이트 및 스테로이드를 포함한다. 이들이 관절염에 대해 잘 확립된 치료제이기는 하지만, 매우 적은 환자가 이들 치료선 단독으로 경감된다. 류마티스성 관절염의 발병기전에 대한 이해의 최근 진보로 메토타렉세이트를 시토킨 또는 재조합 가용성 수용체에 대한 항체와 조합하여 사용하게 되었다. 예를 들어, 종양 괴사 인자(TNF)- α 에 대한 재조합 가용성 수용체 및 모노클로날 항체가 관절염 치료에서 메토타렉세이트와 조합하여 사용되고 있다. 그러나, 메토타렉세이트 및 항-TNF- α 제, 예를 들어 TNF- α 에 대한 재조합 가용성 수용체의 조합물로 치료한 환자의 단지 약 50%가 임상적으로 유의한 개선을 보인다. 많은 환자는 치료에도 불구하고 불응성으로 남는다. 류마티스성 관절염 환자에 대해 어려운 치료 문제가 여전히 남아있다. 최근의 많은 치료제는 부작용 발생율이 높거나 질병 진행을 완전히 예방할 수 없다. 지금까지, 이상적인 치료제가 없고 치료되지도 않았다. 류마티스성 관절염 및 다른 자가면역 질환을 보다 효과적으로 치료하는 신규한 치료제가 필요하다.

[0045] **2.2.3 알레르기**

- [0046] 면역-매개 알레르기 (과민) 반응은 알레르기 증상의 발현을 일으키는 근원적인 메카니즘에 따라 4가지 종류 (I-IV)로 분류된다. I형 알레르기 반응은 비만세포 및 호염기구로부터 히스타민과 같은 혈관작용 물질의 IgE-매개 방출을 특징으로 한다. 이들 물질의 방출과 후속적인 알레르기 증상의 소견은 알레르겐-결합 IgE의 비만세포 및 호염기구의 표면 상의 그의 수용체에 대한 가교결합에 의해 개시된다. I형 알레르기 반응에 걸린 개인에 있어서, 2번째의 알레르겐에 대한 노출이 IgE 생산에 요구되는 3-세포 상호작용에서 기억 B 및 T 세포 관여의 결과로서 알레르겐에 특이적인 고수준의 IgE 항체 생산을 일으킨다. 생산된 고수준의 IgE 항체는 알레르겐-결합된 IgE에 의한 비만세포 및 호염기구 상의 IgE 수용체의 가교결합을 증가시키고, 이는 다시 이들 세포의 활성화 및 I형 알레르기 질병의 임상 소견에 책임있는 약물학적 매개자의 방출을 일으킨다.
- [0047] IgE에 대한 상이한 친화도를 갖는 2개의 수용체가 확인되고 특성화되었다. 고친화도 수용체 (FcεRI)는 비만세포 및 호염기구의 표면 상에 발현된다. 저친화도 수용체 (FcεRII/CD23)은 B세포, T 세포, 대식세포, 호산구 및 랑게르한 세포를 포함하는 많은 세포 종류에서 발현된다. 고친화도 IgE 수용체는 3개의 서브유닛 (알파, 베타 및 감마 사슬)로 이루어진다. 몇몇 연구는 단지 알파 사슬만이 IgE의 결합에 관여되는 반면, 베타 및 감마 사슬 (트랜스멤브레인 또는 세포질 단백질)은 신호 전달 사건에 요구되는 것을 증명하였다. IgE가 비만세포 및 호염기구 상의 FcεRI에 결합하기 위해 요구되는 IgE 구조의 확인은 IgE-매개 알레르기의 치료 또는 예방을 위한 전략을 고안하는데 있어서 가장 중요하다. 예를 들어, IgE 수용체-결합 부위의 해명은 IgE가 수용체-보유 세포에 결합하는 것을 생체내 차단하는 펩티드 또는 소분자의 확인을 이끌 수 있다.
- [0048] 현재, IgE-매개 알레르기 반응은 비만세포 및 호염기구로부터 방출된 혈관작용 물질의 효과에 반작용함으로써 알레르기 반응과 연관된 증상을 경감하기 위해 시도하는 항히스타민제 및 코르티코스테로이드와 같은 약물로 치료된다. 고용량의 항히스타민제 및 코르티코스테로이드는 유해한 부작용 (예를 들어 중추신경계 교란, 변비 등)을 갖는다. 따라서, I형 알레르기 반응을 치료하기 위한 다른 방법이 필요하다.
- [0049] I형 알레르기 질환의 치료를 위한 하나의 방안은 혈청 내에서 가용성 (유리) IgE와 반응하고, IgE가 비만세포 및 호염기구 상의 그의 수용체에 결합하는 것을 차단시키고, 수용체-결합된 IgE에 결합하지 않는 (즉, 이들은 아나필락시스 발생성이 아니다) 모노클로날 항체를 생산하는 것이다. 상기 항체의 하나인 Xolair이 FDA에 의해 승인되었다.
- [0050] IgE-매개 알레르기 반응에 대한 가장 유망한 치료법의 하나는 내인성 IgE 상의 적절한 비-아나필락시스 발생성 에피토프에 대한 능동 면역화이다. 스탠워스 (Stanworth) 등 (미국 특허 5,601,821)은 이중 캐리어 단백질에 결합된 인간 IgE의 CεH4 도메인로부터 유래된 펩티드를 알레르기 백신으로서 사용하는 것을 포함하는 전략을 설명하였다. 그러나, 상기 펩티드는 천연 가용성 IgE와 반응하는 항체의 생산을 유도하는 것으로 나타나지 않았다. 또한, 헬만 (Hellman) (미국 특허 5,653,980)은 전장 CεH2-CεH3 도메인 (약 220 아미노산 길이)의 외래 캐리어 단백질에 대한 융합에 기초한 항-IgE 백신 조성물을 제안하였다. 그러나, IgE 분자의 CεH2 및 CεH3 도메인의 일부 부분에 대한 항체는 비만세포 및 호염기구의 표면 상의 IgE 수용체에 가교결합하고 과민증의 매개자의 생산을 일으키는 것으로 나타났으므로 (예를 들어 Stadler et al., 1993, Int. Arch. Allergy and Immunology 102:121-126 참조), 헬만이 제안한 항-IgE 백신 조성물에 의해 유도된 항체는 아마도 과민증을 일으킬 것이다. 따라서, 과민성 항체를 유도하지 않는 IgE-매개 알레르기 반응의 치료제가 필요하다.
- [0051] 과민증의 유도에 대한 상당한 관심으로 동물에 투여될 때 항-IgE 폴리클로날 항체 생산을 유도할 수 있는 미모토프 (mimotope)로 이루어지는 I형 알레르기 질환의 치료에 대한 다른 방안이 개발되었다 (예를 들어 Rudolf, et al., 1998, Journal of Immunology 160:3315-3321 참조). 크리체크 (Kricek) 등 (국제 특허 출원 공개 WO 97/31948)는 IgE 수용체 결합의 배위를 모방할 수 있는 펩티드 미모토프를 확인하기 위해 모노클로날 항체 BSWI7을 사용하여 과자-디스플레이된 펩티드 라이브러리를 스크리닝하였다. 이들 미모토프는 아마도 유리 천연 IgE와 반응하지만 수용체-결합된 IgE와 반응하지 않고 IgE가 그의 수용체에 결합하는 것을 차단하는 폴리클로날 항체를 유도하기 위해 사용될 수 있을 것이다. 크리체크 등은 IgE 분자의 임의의 부분에 상동성이 아니고 따라서 본 발명에 개시된 펩티드와 상이한 펩티드 미모토프를 개시하였다.
- [0052] 당업계의 조사에 의해 증명되는 바와 같이, 암, 자가면역 질병, 염증성 질환, 또는 알레르기와 같은 질환을 치료하거나 예방하는 현재 방법의 치료 효능을 향상시키는 것이 필요하다. 특히, 이펙터 기능, 특히, 암의 치료에서 사용된 치료 항체의 세포독성 효과를 향상시키는 것이 필요하다. 당업계의 현재 기술 상태로는 또한 알레르기 질환을 치료하거나 예방하는 방법이 존재하지 않는다 (예를 들어 항체 요법 또는 백신 요법에 의해).

[0053] 3. 발명의 개요

- [0054] 본 발명은 항체 또는 그의 단편이 Fc γ RIIA, 특히 인간 Fc γ RIIA, 보다 특히 천연 인간 Fc γ RIIA에 결합하는 것보다 더 큰 친화도로 Fc γ RIIB, 특히 인간 Fc γ RIIB, 보다 특히 천연 인간 Fc γ RIIB에 특이적으로 결합하는 인간화 Fc γ RIIB 항체, 단리된 항체 또는 그의 단편을 제공한다. 본원에서 사용되는 용어 "천연 Fc γ RIIB 또는 Fc γ RIIA"는 세포에서 내재적으로 발현되고 세포의 표면 상에 존재하거나 포유동물 세포에서 재조합적으로 발현되어 세포 표면에 존재하지만 세균 세포에서 발현된 Fc γ RIIB 또는 Fc γ RIIA 또는 변성된 단리된 Fc γ RIIB 또는 Fc γ RIIA는 아닌 Fc γ RIIB 또는 Fc γ RIIA를 의미한다. 본 발명은 항체 또는 그의 단편이 Fc γ RIIA, 특히 인간 Fc γ RIIA, 보다 특히 천연 인간 Fc γ RIIA에 결합하는 것보다 더 큰 친화도로 Fc γ RIIB, 특히 인간 Fc γ RIIB, 보다 특히 천연 인간 Fc γ RIIB에 특이적으로 결합하는 항체로부터 유도된 인간화 항체 및 그의 항원 결합 단편을 포함한다. 가장 바람직한 실시태양에서, 본 발명은 인간화 2B6 또는 3H7 항체 또는 그의 단편, 바람직하게는 그의 항원 결합 단편에 관한 것이다. 다른 바람직한 실시태양에서, 본 발명은 인간화 1D5, 2E1, 2H9, 2D11 또는 1F2 항체 또는 그의 단편, 바람직하게는 그의 항원 결합 단편에 관한 것이다.
- [0055] 바람직하게는, 본 발명의 인간화 항체는 천연 인간 Fc γ RIIB의 세포외 도메인에 결합한다. 본 발명의 인간화 항-Fc γ RIIB 항체는 CDR1 (서열 1 또는 서열 29) 및/또는 CDR2 (서열 2 또는 서열 30) 및/또는 CDR3 (서열 3 또는 서열 31)의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및/또는 CDR1 (서열 8 또는 서열 38) 및/또는 CDR2 (서열 9, 서열 10, 서열 11 또는 서열 39) 및/또는 CDR3 (서열 12 또는 서열 40)의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 가질 수 있다.
- [0056] 다른 바람직한 실시태양에서, 본 발명의 항체는 서열 18, 서열 20, 서열 22 또는 서열 46의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역 및/또는 서열 24 또는 서열 37의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및/또는 그의 아미노산 서열 변이체를 포함한다.
- [0057] 특히, 본 발명은 천연 인간 Fc γ RIIB의 세포외 도메인에 면역특이적으로 결합하는 인간화 항체를 제공하고, 상기 항체는 VH CDR1 및 VL CDR1; VH CDR1 및 VL CDR2; VH CDR1 및 VL CDR3; VH CDR2 및 VL CDR1; VH CDR2 및 VL CDR2; VH CDR2 및 VL CDR3; VH CDR3 및 VH CDR1; VH CDR3 및 VL CDR2; VH CDR3 및 VL CDR3; VH1 CDR1, VH CDR2 및 VL CDR1; VH CDR1, VH CDR2 및 VL CDR2; VH CDR1, VH CDR2 및 VL CDR3; VH CDR2, VH CDR3 및 VL CDR1, VH CDR2, VH CDR3 및 VL CDR2; VH CDR2, VH CDR2 및 VL CDR3; VH CDR1, VL CDR1 및 VL CDR2; VH CDR1, VL CDR1 및 VL CDR3; VH CDR2, VL CDR1 및 VL CDR2; VH CDR2, VL CDR1 및 VL CDR3; VH CDR3, VL CDR1 및 VL CDR2; VH CDR3, VL CDR1 및 VL CDR3; VH CDR1, VH CDR2, VH CDR3 및 VL CDR1; VH CDR1, VH CDR2, VH CDR3 및 VL CDR2; VH CDR1, VH CDR2, VH CDR3 및 VL CDR3; VH CDR1, VH CDR2, VL CDR1 및 VL CDR2; VH CDR1, VH CDR2, VL CDR1 및 VL CDR3; VH CDR1, VH CDR3, VL CDR1 및 VL CDR2; VH CDR1, VH CDR3, VL CDR1 및 VL CDR3; VH CDR2, VH CDR3, VL CDR1 및 VL CDR2; VH CDR2, VH CDR3, VL CDR1 및 VL CDR3; VH CDR2, VH CDR3, VL CDR2 및 VL CDR3; VH CDR1, VH CDR2, VH CDR3, VL CDR1 및 VL CDR2; VH CDR1, VH CDR2, VH CDR3, VL CDR1 및 VL CDR3; VH CDR1, VH CDR2, VL CDR1, VL CDR2 및 VL CDR3; VH CDR1, VH CDR3, VL CDR1, VL CDR2 및 VL CDR3; VH CDR2, VH CDR3, VL CDR1, VL CDR2 및 VL CDR3; 또는 본원에 개시된 VH CDR 및 VL CDR의 임의의 조합물의 임의의 조합물로써 2B6 또는 3H7의 CDR 서열을 포함한다 (또는 별법으로 이들로 이루어진다).
- [0058] 한 특정 실시태양에서, 본 발명은 인간화 2B6 항체를 제공하고, 여기서 VH 영역은 인간 생식세포주 VH 세그먼트 VH1-18 및 JH6으로부터의 FR 세그먼트, 및 서열 24의 아미노산 서열을 갖는 2B6 VH의 CDR 영역으로 이루어진다. 다른 특정 실시태양에서, 인간화 2B6 항체는 인간 생식세포주 VL 세그먼트 VK-A26 및 JK4로부터의 FR 세그먼트, 및 서열 18, 서열 20 또는 서열 22의 아미노산 서열을 갖는 2B6VL의 CDR 영역으로 이루어지는 VL 영역을 추가로 포함한다.
- [0059] 한 특정 실시태양에서, 본 발명은 인간화 3H7 항체를 제공하고, 여기서 VH 영역은 인간 생식세포주 VH 세그먼트로부터의 FR 세그먼트, 및 서열 37의 아미노산 서열을 갖는 3H7 VH의 CDR 영역으로 이루어진다. 다른 특정 실시태양에서, 인간화 3H7 항체는 인간 생식세포주 VL 세그먼트의 FR 세그먼트, 및 서열 46의 아미노산 서열을 갖는 3H7VL의 CDR 영역으로 이루어지는 VL 영역을 추가로 포함한다.
- [0060] 본 발명은 인간 항체 (수용 항체)의 중쇄 및/또는 경쇄 가변 영역의 하나 이상의 CDR의 하나 이상의 영역이 Fc γ RIIA보다 큰 친화도로 Fc γ RIIB에 특이적으로 결합하는 공여 모노클로날 항체, 예를 들어 각각 ATCC 기탁 번호 PTA-4591 및 PTA-4592의 클론 2B6 또는 3H7에 의해 생산된, Fc γ RIIB에 결합하는 모노클로날 항체 또는 각각 ATCC 기탁 번호 PTA-5958, PTA-5961, PTA-5962, PTA-5960, 및 PTA-5959의 클론 1D5, 2E1, 2H9, 2D11, 및 1F2에 의해 생산된 모노클로날 항체의 하나 이상의 CDR의 유사한 부분으로 치환된, Fc γ RIIB에 특이적인 인간화 항체 분자를 제공한다. 가장 바람직한 실시태양에서, 인간화 항체는 공여 유원 항체와 동일한 에피토프에 특이적

으로 결합할 수 있다. 당업자는 본 발명이 항체의 전체적인 CDR 이식을 포함함을 이해할 것이다. 따라서, 공여 및 수용 항체는 동일한 종의 동물, 심지어 동일한 항체 클래스 또는 서브클래스로부터 유도될 수 있다. 그러나, 보다 일반적으로는, 공여 및 수용 항체는 상이한 종의 동물로부터 유도된다. 전형적으로, 공여 항체는 비-인간 항체, 예를 들어 설치류 MAb이고, 수용 항체는 인간 항체이다.

[0061] 몇몇 실시태양에서, 공여 항체로부터의 적어도 하나의 CDR이 인간 항체에 이식된다. 다른 실시태양에서, 각각의 중쇄 및/또는 경쇄 가변 영역의 적어도 2, 바람직하게는 3개 모두의 CDR이 인간 항체에 이식된다. CDR은 Kabat CDR, 구조 루프 CDR 또는 이들의 조합물을 포함할 수 있다. 몇몇 실시태양에서, 본 발명은 적어도 하나의 CDR 이식된 중쇄 및 적어도 하나의 CDR 이식된 경쇄를 포함하는 인간화 Fc γ RIIB 항체를 포함한다.

[0062] 바람직한 실시태양에서, 인간화 Fc γ RIIB 특이적 항체의 CDR 영역은 Fc γ RIIB에 특이적인 뮤린 항체로부터 유래한다. 몇몇 실시태양에서, 본원에서 설명되는 인간화 항체는 수용 항체, 즉 공여 모노클로날 항체의 결합 특이성 유지에 필요한 인간 중쇄 및/또는 경쇄 가변 도메인 프레임워크 영역의 아미노산 결실, 삽입, 변형을 포함하여 이로 제한되지 않는 변형체를 포함한다. 몇몇 실시태양에서, 본원에서 설명되는 인간화 항체의 프레임워크 영역은 반드시 자연 발생 인간 항체 가변 영역의 프레임워크 영역의 정확한 아미노산 서열로 이루어질 필요는 없지만, 인간화 항체의 특성을 변경시키는, 예를 들어 뮤린 Fc γ RIIB 특이적 항체와 동일한 표적에 특이적인 인간화 항체 영역의 결합 특성을 개선시키는 아미노산 결실, 삽입, 변형을 포함하여 이로 제한되지 않는 다양한 변형체를 포함한다. 가장 바람직한 실시태양에서, 비인간 프레임워크 잔기의 대규모 도입을 방지하고 인간에서 인간화 항체의 최소 면역원성을 보장하기 위해 프레임워크 영역에 최소의 변형이 이루어진다. 몇몇 실시태양에서, 프레임워크 잔기는 인간 생식세포주 VH 세그먼트 VH1-18 및 JH6 및/또는 인간 생식세포주 VL 세그먼트 VK-A26 및 JK4로부터 유래한다. 가장 바람직한 실시태양에서, 프레임워크 영역에 대한 변형이 존재하지 않는다. 본 발명의 공여 모노클로날 항체는 바람직하게는 ATCC 기탁 번호 PTA-4591 및 PTA-4592의 클론 2B6 또는 3H7에 의해 생산된, Fc γ RIIB에 결합하는 모노클로날 항체 또는 각각 ATCC 기탁 번호 PTA-5958, PTA-5961, PTA-5962, PTA-5960, 및 PTA-5959의 클론 1D5, 2E1, 2H9, 2D11, 및 1F2에 의해 생산된 모노클로날 항체이다.

[0063] 본 발명의 항체는 전장 중쇄 및 경쇄를 갖는 완전 항체, Fc γ RIIB에 특이적인 그의 임의의 단편, 예를 들어 Fab 단편, F(ab')₂ 단편, 중쇄 및 경쇄 이량체, 또는 그의 임의의 최소 단편, 예를 들어 Fv, SCA (단쇄 항체) 등을 포함한다.

[0064] 본 발명은 본 발명의 항체 또는 그의 단편의 제조, 특히 Fc γ RIIB 특이적 항체가 Fc γ RIIA에 비해 Fc γ RIIB에 대한 향상된 특이성을 갖도록 인간화 항-Fc γ RIIB 특이적 항체의 제조를 위한 방법을 포함한다. 본 발명은 폴리펩티드 제조에 유용한 당업계에 공지된 임의의 방법, 예를 들어 시험관내 합성, 재조합 DNA 생산 등을 포함한다. 바람직하게는, 인간화 항체는 재조합 DNA 기술에 의해 제조된다. 본 발명의 인간화 Fc γ RIIB 특이적 항체는 재조합 면역글로불린 발현 기술을 사용하여 제조할 수 있다. 본 발명의 재조합 인간화 항체의 제조 방법의 예는 a) CDR 및 공여 항체 결합 특이성을 보유하기 위해 필요한 가변 영역 프레임워크의 최소 부분이 비인간 면역글로불린, 예를 들어 뮤린 Fc γ RIIB 특이적 모노클로날 항체, 예를 들어 각각 ATCC 기탁 번호 PTA-4591 및 PTA-4592의 클론 2B6 또는 3H7에 의해 생산된, Fc γ RIIB에 결합하는 모노클로날 항체 또는 각각 ATCC 기탁 번호 PTA-5958, PTA-5961, PTA-5962, PTA-5960, 및 PTA-5959의 클론 1D5, 2E1, 2H9, 2D11, 및 1F2에 의해 생산된 모노클로날 항체로부터 유래하고 항체의 나머지는 인간 면역글로불린으로부터 유래하여 인간화 항체 중쇄의 발현을 위한 벡터를 생성하는, 항체 중쇄를 코딩하는 오페론을 포함하는 발현 벡터를 통상적인 분자생물학 방법으로 제조하고; b) CDR 및 공여 항체 결합 특이성을 보유하기 위해 필요한 가변 영역 프레임워크의 최소 부분이 비인간 면역글로불린, 예를 들어 뮤린 Fc γ RIIB 모노클로날 항체, 예를 들어 각각 ATCC 기탁 번호 PTA-4591 및 PTA-4592의 클론 2B6 또는 3H7에 의해 생산된, Fc γ RIIB에 결합하는 모노클로날 항체 또는 각각 ATCC 기탁 번호 PTA-5958, PTA-5961, PTA-5962, PTA-5960, 및 PTA-5959의 클론 1D5, 2E1, 2H9, 2D11, 및 1F2에 의해 생산된 모노클로날 항체로부터 유래하고 항체의 나머지는 인간 면역글로불린으로부터 유래하여 인간화 항체 경쇄의 발현을 위한 벡터를 생성하는, 항체 경쇄를 코딩하는 오페론을 포함하는 발현 벡터를 통상적인 분자생물학 방법으로 제조하고; c) 인간화 항-Fc γ RIIB 항체의 발현을 위한 형질감염된 숙주 세포를 생성시키기 위해 발현 벡터를 통상적인 분자생물학 방법으로 숙주 세포에 전달하고; d) 인간화 항-Fc γ RIIB 항체를 제조하기 위해 통상적인 세포 배양 기술에 의해 형질감염된 세포를 배양하는 것을 포함할 수 있다. 숙주 세포는 본 발명의 2개의 발현 벡터, 즉 중쇄 유래 폴리펩티드를 코딩하는 오페론을 포함하는 제1 벡터 및 경쇄 유래 폴리펩티드를 코딩하는 오페론을 포함하는 제2 벡터로 동시형질감염될 수 있다. 2개의 벡터는 상이한 선택가능 마커를 포함할 수 있지만, 중쇄 및 경쇄 코딩 서열을 제외하고 동일한 것이 바람직하다. 상기 과정은 중쇄 및 경쇄 폴리펩티드의 동등한 발현을 제공한다. 별법으로, 중쇄 및 경쇄 폴리펩티드를 모두 코딩하는 단일 벡터를 사용할 수 있다.

중쇄 및 경쇄의 코딩 서열은 cDNA 또는 게놈 DNA 또는 둘 모두를 포함할 수 있다. 본 발명의 재조합 항체의 발현에 사용되는 숙주 세포는 세균 세포, 예를 들어 에서리치아 콜리 (*Escherichia coli*), 또는 바람직하게는 진핵세포일 수 있다. 바람직하게는, 포유동물 세포, 예를 들어 차이나이즈 햄스터 난소 세포 또는 HEK-293을 사용할 수 있다. 발현 벡터의 선택은 숙주 세포에 따라 선택되고, 선택된 숙주 세포에서 요구되는 발현 및 조절 특성을 갖도록 선택할 수 있다. 본 발명의 벡터의 제조, 본 발명의 숙주 세포의 제조를 위한 세포의 형질감염, 본 발명의 항체의 제조를 위한 세포의 배양을 위한 일반적인 방법은 모두 통상적인 분자생물학 방법이다. 유사하게, 본 발명의 재조합 항체는 생성된 후에 형용동 여과, 황산암모늄 침전, 친화도 컬럼 크로마토그래피, 겔 전기영동 등을 포함하여 당업계의 표준 방법에 의해 정제할 수 있다.

[0065] 몇몇 실시태양에서, 그 전부가 본원에 참고로 포함된 미국 특허 5,916,771에 개시된 것과 같이 모노클로날 항체를 제조하기 위한 세포 융합 방법이 본 발명의 방법에 사용될 수 있다. 간단히 설명하면, 상기 방법에 따르면, 요구되는 중쇄 (또는 중쇄의 단편)을 코딩하는 DNA가 제1 포유동물 숙주 세포 내로 도입되고, 요구되는 경쇄 (또는 경쇄의 단편)를 코딩하는 DNA가 제2 포유동물 숙주 세포 내로 도입된다. 제1 형질전환된 숙주 세포 및 제2 형질전환된 숙주 세포는 이어서 세포 융합에 의해 조합되어 제3 세포를 형성한다. 제1 및 제2 세포의 융합 전에, 형질전환된 세포는 특이적으로 요구되는 특성, 예를 들어 높은 수준의 발현을 위해 선택될 수 있다. 융합 후에, 생성되는 하이브리드 세포는 요구되는 중쇄를 코딩하는 DNA와 요구되는 경쇄를 코딩하는 DNA를 모두 포함하여 발현함으로써 다량체성 항체를 생성시킨다.

[0066] 본 발명은 인간 또는 인간화 모노클로날 항체와 같은 다른 항체 또는 그의 단편과 함께 또는 그에 부착된 본 발명의 인간화 항체의 사용을 포함한다. 상기 다른 항체는 본 발명의 항체가 작용하는 질병에 특징적인 다른 마커 (에피토프)와 반응할 수 있거나 예를 들어 질병 세포에 대한 인간 면역계의 분자 또는 세포를 동원하도록 선택된 상이한 특이성을 가질 수 있다. 본 발명의 항체 (또는 그의 일부)는 별개로 투여되는 조성물로서 또는 두 물질이 통상적인 화학적 또는 분자생물학적 방법에 의해 연결된 단일 조성물로서 상기 항체 (또는 그의 일부)와 함께 투여될 수 있다. 추가로, 본 발명의 항체의 진단 및 치료적 가치는 검출가능한 시그널 (시험관 내 또는 생체 내에서)을 생성시키는 표지 또는 치료 특성을 갖는 표지로 인간화 항체를 표지함으로써 증가시킬 수 있다. 몇몇 표지, 예를 들어 방사성 핵종은 검출가능한 시그널을 생성시킬 수 있고, 치료 특성을 갖는다. 방사성 핵종 표지의 예는 ^{125}I , ^{131}I , ^{14}C 를 포함한다. 다른 검출가능한 표지의 예는 형광 현미경에 대한 형광 발색단, 예를 들어 플루오레신, 피코빌리프로테인 또는 테트라에틸 로다민; 형광, 흡광, 가시적인 색상 또는 응집에 의한 검출을 위해 형광 또는 착색 생성물을 생성시키거나 전자현미경에 의한 검출을 위해 전자 밀집 생성물을 생성시키는 효소; 또는 직접 또는 간접 전자현미경 가시화를 위한 페리틴, 퍼옥시다제 또는 금 비드와 같은 전자 밀집 분자를 포함한다. 치료 특성을 갖는 표지는 암치료용 약물, 예를 들어 메토포렉세이트 등을 포함한다.

[0067] 또한, 본 발명의 방법은 본 발명의 인간화 항체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 한 실시태양에서, 본 발명은 항체 또는 그의 단편이 $\text{Fc}\gamma\text{RIIA}$ 에 결합하는 것보다 더 큰 친화도로 $\text{Fc}\gamma\text{RIIB}$ 에 특이적으로 결합하는 항체 또는 그의 단편의 중쇄 또는 경쇄를 코딩하는 단리된 핵산 서열을 제공한다. 또한, 본 발명은 상기 핵산을 포함하는 핵산에 관한 것이다. 본 발명은 중쇄를 코딩하는 제1 핵산 분자 및 경쇄를 코딩하는 제2 핵산 분자를 포함하는 벡터를 추가로 제공하고, 여기서 상기 중쇄 또는 경쇄는 항체 또는 그의 단편이 $\text{Fc}\gamma\text{RIIA}$ 에 결합하는 것보다 더 큰 친화도로 $\text{Fc}\gamma\text{RIIB}$ 에 특이적으로 결합하는 항체 또는 그의 단편에서 유래한 것이다. 한 특정 실시태양에서, 상기 벡터는 발현 벡터이다. 본 발명은 추가로 본 발명의 항체를 코딩하는 벡터 또는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 숙주 세포를 제공한다. 바람직하게는, 본 발명은 각각 ATCC 기탁 번호 PTA-4591 및 PTA-4592, 또는 각각 ATCC 기탁 번호 PTA-5958, PTA-5961, PTA-5962, PTA-5960, 및 PTA-5959의 기탁된 하이브리도마 클론에 의해 생산된 항체의 중쇄 및 경쇄 또는 그의 일부, 예를 들어 CDR 및 그의 인간화 형태를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다.

[0068] 본 발명은 생물학적 샘플에서 $\text{Fc}\gamma\text{RIIB}$ 의 존재를 특이적으로 검출하기 위한 (즉, $\text{Fc}\gamma\text{RIIA}$ 는 검출하지 않고 $\text{Fc}\gamma\text{RIIB}$ 를 검출) 본 발명의 인간화 항체의 용도를 포함한다.

[0069] 활성화 및 억제 Fc 수용체, 예를 들어 $\text{Fc}\gamma\text{RIIA}$ 및 $\text{Fc}\gamma\text{RIIB}$ 는 이들 수용체의 균형잡힌 기능 및 적절한 세포성 면역 반응에 중요하다. 본 발명은 Fc 수용체 신호전달 경로에서 상기 균형 및 조절된 제어의 손실에 관련된 임의의 질병의 치료를 위한 본 발명의 인간화 항체의 용도를 포함한다. 따라서, 본 발명의 인간화 $\text{Fc}\gamma\text{RIIB}$ 항체는 면역 반응을 조절하는데, 예를 들어 자가면역 또는 염증성 질병, 또는 알레르기 반응과 연관된 면역 반응을 억제하는데 용도를 갖는다. 본 발명의 인간화 $\text{Fc}\gamma\text{RIIB}$ 항체는 또한 예를 들어 치료 항체-매개 세포독성을 향상시키도록 특정 이펙터 기능을 변경시키기 위해 사용될 수 있다.

- [0070] 본 발명의 인간화 항체는 예를 들어 한 실시태양에서 단일제 요법으로서 암의 예방 또는 치료를 위해 유용하다. 본 발명의 한 실시태양에서, 본 발명의 인간화 항체는 B-세포 악성종양, 특히 비호지킨 림프종 또는 만성 림프구성 백혈병의 예방 또는 치료에 유용하다. 특정 실시태양에서, 대상체의 암은 하나 이상의 표준 또는 실험적 치료법, 특히 리툭산 치료에 불응성이다. 본 발명의 방법은 B-세포 질병, 예를 들어 B-세포 만성 림프구성 백혈병 (B-CLL), 비호지킨 림프종, 미만성 (diffuse) 큰 B세포 림프종, 미만성 큰 B세포 림프종의 영역을 갖는 여포성 림프종, 소림프구성 림프종, 외투 세포 림프종 및 미만성 소분할 세포 림프종의 치료, 관리, 예방 또는 개선에 사용될 수 있다.
- [0071] 다른 실시태양에서, 본 발명은 치료제 또는 약물에 컨쥬게이팅된 Fc γ RIIB-특이적 항체의 용도를 제공한다. 항-Fc γ RIIB 항체 또는 그의 항원 결합 단편에 컨쥬게이팅될 수 있는 치료제의 예는 시토킨, 독소, 방사성 원소 및 항대사체를 포함하고 이로 제한되지 않는다.
- [0072] 한 실시태양에서, 본 발명은 B-세포 악성종양에 대한 표준 또는 실험적 치료 방법 (예를 들어 화학요법, 방사선 면역요법, 또는 방사선요법)과 조합으로 인간화 Fc γ RIIB-특이적 항체의 용도를 제공한다. 상기 조합 치료법은 표준 또는 실험적 치료의 효능을 향상시킬 수 있다. B-세포 악성종양의 예방, 치료, 관리 또는 개선을 위해 Fc γ RIIB-특이적 항체 또는 그의 항원 결합 단편과 조합으로 특히 유용한 치료제의 예는 리툭산, 인터페론-알파 및 항암제를 포함하고 이로 제한되지 않는다. Fc γ RIIB-특이적 항체 또는 그의 항원 결합 단편과 조합되어 사용될 수 있는 화학치료제는 알킬화제, 항대사제, 천연 생성물 및 호르몬을 포함하고 이로 제한되지 않는다. 본 발명의 조합 치료법은 치료 또는 예방 효과를 달성하기 위해 B-세포 악성종양의 대상체에게 항-Fc γ RIIB 항체 또는 그의 항원 결합 단편의 보다 적은 투여량 및/또는 항-Fc γ RIIB 항체 또는 그의 항원 결합 단편의 덜 빈번한 투여를 가능하게 한다.
- [0073] 다른 실시태양에서, 인간화 Fc γ RIIB 항체 또는 그의 항원 결합 단편의 사용은 B-세포 악성종양으로 진단된 대상체의 생존율을 연장시킨다.
- [0074] 바람직한 실시태양에서, 본 발명의 인간화 항체는 흑색종의 치료 및/또는 예방에 사용된다. 다른 실시태양에서, 인간화 항체는 암의 예방 또는 치료를 위해, 특히 종양 세포 치사를 향상시키고/시키거나 치료 항체의 항체 의존성 세포독성 세포 ("ADCC") 활성, 보체 의존성 세포독성 ("CDC") 활성, 또는 포식작용을 향상시키도록 세포독성 활성을 갖는 암 항원-특이적 치료 항체의 세포독성 활성을 강화시키는데 유용하다.
- [0075] 본 발명은 암 항원을 특징으로 하는 암 환자에서 암을 치료하는 방법을 제공하고, 상기 방법은 상기 환자에게 항체 또는 그의 단편이 Fc γ RIIA에 결합하는 것보다 더 큰 친화도로 Fc γ RIIB에 특이적으로 결합하는 치료 유효량의 제1 인간화 항체 또는 그의 단편, 및 상기 암 항원에 특이적으로 결합하고 세포독성인 제2 항체를 투여하는 것을 포함한다. 본 발명은 또한 암 항원을 특징으로 하는 암 환자에서 암을 치료하는 방법을 제공하고, 상기 방법은 항체 또는 그의 단편이 Fc γ RIIA, 바람직하게는 천연 인간 Fc γ RIIA에 결합하는 것보다 더 큰 친화도로 Fc γ RIIB, 특히 천연 인간 Fc γ RIIB에 특이적으로 결합하고, 그의 불변 도메인이 항체가 단량체성일 때 하나 이상의 Fc 활성화 수용체, 예를 들어 Fc γ RIIIA에 대해 증가된 친화도를 추가로 갖는 치료 유효량의 인간화 항체 또는 그의 단편, 및 상기 암 항원에 특이적으로 결합하고 세포독성인 항체를 상기 환자에게 투여하는 것을 포함한다. 한 특정 실시태양에서, 상기 Fc 활성화 수용체는 Fc γ RIIIA이다.
- [0076] 일부 실시태양에서, 본 발명은 증가된 친화도로 FcRn에 결합하는 변이체 Fc 영역을 포함하여 반감기가 증가된, 예를 들어 반감기가 15일 초과, 바람직하게는 20일 초과, 25일 초과, 30일 초과, 35일 초과, 40일 초과, 45일 초과, 2개월 초과, 3개월 초과, 4개월 초과 또는 5개월 초과인 항체를 포함한다. 특정 작용 메커니즘에 매이기를 의도하지 않지만, 신생 Fc 수용체 (FcRn)는 IgG 항체의 혈청 반감기 조절에서 중요한 역할을 수행한다. 마우스에서 IgG 항체의 FcRn에 대한 pH 의존성 결합 친화도와 그의 혈청 반감기 사이의 상호관계는 확립되었다. 포유동물, 바람직하게는 인간에서 본 발명의 항체 또는 그의 단편의 증가된 반감기는 포유동물에서 상기 항체 또는 항체 단편의 보다 높은 혈청 역가를 생성시키고, 따라서 상기 항체 또는 항체 단편의 투여 빈도를 감소시키고/시키거나 투여될 상기 항체 또는 항체 단편의 농도를 감소시킨다. 예를 들어, 생체내 반감기가 증가된 항체 또는 그의 단편은 Fc 도메인과 FcRn 수용체 사이의 상호작용에 관여하는 것으로 확인된 아미노산 잔기를 변형시킴으로써 (예를 들어, 치환하거나, 결실시키거나 부가함으로써) 생성할 수 있다. 예를 들어, 본 발명은 FcRn에 대한 친화도를 향상시키는 적어도 하나 이상의 변형, 예를 들어 하나 이상의 아미노산 잔기 251-256, 285-290, 308-314, 385-389 및 428-436의 변형 또는 위치 250 및 428에서의 변형을 갖는 변이체 Fc 영역을 포함하는 항체를 포함한다 (예를 들어 그 전부가 본원에 참고로 포함되는 Hinton et al., 2004, J Biol. Chem. 279 (8): PCT 공개 WO 97/34631; 및 WO 02/060919 참조).

- [0077] 다른 실시태양에서, 본 발명은 세포독성 항체를 사용하여 치료하는 대상체에서 항체 매개된 세포독성 효과를 향상시키는 방법을 제공하고, 상기 방법은 상기 환자에게 본 발명의 인간화 항체 또는 그의 단편을 상기 세포독성 항체의 세포독성 효과를 향상시키기에 충분한 양으로 투여하는 것을 포함한다. 또다른 실시태양에서, 본 발명은 세포독성 항체를 사용하여 치료하는 대상체에서 항체-매개 세포독성 효과를 향상시키는 방법을 제공하고, 상기 방법은 상기 환자에게 단량체성일 때 Fc 활성화 수용체에 대한 향상된 친화도를 추가로 갖는 본 발명의 인간화 항체 또는 그의 단편을 상기 세포독성 항체의 세포독성 효과를 향상시키기에 충분한 양으로 투여하는 것을 포함한다. 또다른 실시태양에서, 본 발명은 하나 이상의 추가의 암 치료법의 투여를 추가로 포함하는 방법을 제공한다.
- [0078] 본 발명은 항체의 치료 활성을 강화시키기 위해 세포 치사를 통해 그의 치료 효과를 매개하는 임의의 치료 항체와 조합으로 본 발명의 인간화 항체를 사용하는 것을 포함한다. 한 특정 실시태양에서, 본 발명의 인간화 항체는 항체-매개 이펙터 기능을 향상시킴으로써 항체의 치료 활성을 강화시킨다. 본 발명의 또다른 실시태양에서, 본 발명의 인간화 항체는 표적화된 종양 세포의 포식작용 및 옵소닌작용 (opsonization)을 향상시킴으로써 세포독성 항체의 치료 활성을 강화시킨다. 본 발명의 또다른 실시태양에서, 본 발명의 인간화 항체는 표적화된 종양 세포의 파괴에서 항체-의존성 세포-매개 세포독성 ("ADCC")을 향상시킴으로써 항체의 치료 활성을 강화시킨다. 특정 실시태양에서, 본 발명의 항체는 ADCC를 향상시키기 위해 Fc 융합 단백질과 조합되어 사용된다.
- [0079] 특정 작용 메커니즘에 매이기를 의도하지 않지만, 치료 항체와 조합된 본 발명의 인간화 항체의 조합물은 부분적으로는 억제성 Fc γ RIIB 수용체를 발현하는 대식세포를 제거하는 Fc γ RIIB 특이적 인간화 항체의 세포독성 능력 때문에 향상된 치료 효과를 갖는다. 따라서, 치료 항체의 투여량당 잔류하는 활성화 Fc γ R 수용체 발현 세포의 보다 높은 농도가 존재한다.
- [0080] 일부 실시태양에서, 본 발명은 항체의 치료 활성을 강화시키기 위해 세포 치사를 통해 그의 치료 효과를 매개하지 않는 치료 항체와 조합으로 본 발명의 인간화 항체를 사용하는 것을 포함한다. 특정 실시태양에서, 본 발명은 효현제 활성을 갖는 치료적 세포자멸 유도 항체, 예를 들어 항-Fas 항체와 조합으로 본 발명의 인간화 항체를 사용하는 것을 포함한다. 치료적 세포자멸 유도 항체는 세포자멸 경로의 조절에 대해 당업계에 공지된 임의의 사멸 수용체, 예를 들어 TNFR 수용체 패밀리를 구성원 또는 TRAIL 패밀리를 구성원에 특이적일 수 있다.
- [0081] 본 발명은 대식세포 매개된 종양 세포 진행 및 전이를 차단하기 위해 본 발명의 인간화 항체를 사용하는 것을 포함한다. 본 발명의 항체는 대식세포 침윤이 일어나는 고형 종양의 치료에 특히 유용하다. 본 발명의 길항 항체는 종양 부위에 국재화되는 대식세포의 개체군을 감소시키거나 제거함으로써 종양 세포 전이를 제어하는, 예를 들어 감소시키거나 제거하기 위해 특히 유용하다. 본 발명은 Fc γ RIIB를 발현하는 대식세포 이외의 면역 이펙터 세포, 예를 들어 수지상 세포를 효과적으로 고갈시키거나 제거하는 인간화 항체를 추가로 포함한다. 본 발명의 항체를 사용하는 면역 이펙터 세포의 효과적인 고갈 또는 제거는 이펙터 세포의 집단 형성의 50%, 60%, 70%, 80%, 바람직하게는 90%, 가장 바람직하게는 99% 감소될 수 있다.
- [0082] 몇몇 실시태양에서, 본 발명은 종양 세포 자체 상에서 발현하지 않고 대신 종양 기질을 포함하는 주변의 반응성 및 종양 지지, 비-악성 세포 상에서 발현하는 종양 항원에 면역특이적으로 결합하는 치료 항체와 조합으로 본 발명의 인간화 항체를 사용하는 것을 포함한다. 바람직한 실시태양에서, 본 발명의 인간화 항체는 섬유모세포상의 종양 항원, 예를 들어 섬유모세포 활성화 단백질 (FAP)에 면역특이적으로 결합하는 항체와 조합되어 사용된다.
- [0083] 본 발명은 그를 필요로 하는 환자에서 자가면역 질환을 치료하는 방법을 제공하고, 상기 방법은 상기 환자에게 치료 유효량의 본 발명의 하나 이상의 인간화 항체를 투여하는 것을 포함한다. 본 발명은 또한 그를 필요로 하는 환자에서 자가면역 질환을 치료하는 방법을 제공하고, 상기 방법은 상기 환자에게 치료 유효량의 하나 이상의 항염증제, 및/또는 하나 이상의 면역조절제를 투여하는 것을 추가로 포함한다.
- [0084] 본 발명은 또한 그를 필요로 하는 환자에서 염증성 질환을 치료하는 방법을 제공하고, 상기 방법은 상기 환자에게 치료 유효량의 본 발명의 하나 이상의 인간화 항체를 투여하는 것을 포함한다. 본 발명은 또한 그를 필요로 하는 환자에서 염증성 질환을 치료하는 방법을 제공하고, 상기 방법은 상기 환자에게 치료 유효량의 하나 이상의 항염증제, 및/또는 하나 이상의 면역조절제를 투여하는 것을 추가로 포함한다.
- [0085] 본 발명은 대상체에서 백신 조성물에 대한 면역 반응을 향상시키는 방법을 제공하고, 상기 방법은 상기 대상체에게 항체 또는 그의 단편이 Fc γ RIIA에 결합하는 것보다 더 큰 친화도로 Fc γ RIIA에 특이적으로 결합하는 인간화 항체 또는 그의 항원 결합 단편, 및 백신 조성물을 상기 항체 또는 그의 단편이 상기 대상체에서 상기 백신

조성물에 대한 면역 반응을 향상시키기 위해 효과적인 양으로 투여되도록 투여하는 것을 포함한다. 본 발명의 인간화 항체는 백신 조성물의 항원(들)에 대한 체액성 및/또는 세포 매개 반응을 향상시키기 위해 사용될 수 있다. 본 발명의 항체는 당업계에 공지된 임의의 백신과 조합되어 사용될 수 있다. 본 발명은 특정 항원(들)에 대한 향상된 면역 반응이 질병 또는 질환의 치료 또는 예방에 효과적인 특정 질환을 예방하거나 치료하기 위해 본 발명의 인간화 항체를 사용하는 것을 포함한다.

[0086] 본 발명은 또한 감염체에 대한 면역 요법을 향상시키는 방법을 제공하고, 여기서 본 발명의 인간화 항체는 감염된 세포의 흡수작용 및 포식작용을 향상시키기 위해 병원체, 예를 들어 HIV, HCV 또는 HSV로 이미 감염된 환자에게 투여된다. 또다른 실시태양에서, 본 발명은 본 발명의 인간화 항체를 사용한 패혈증 또는 패혈 쇼크의 치료 방법을 포함한다. 패혈증에서 Fc γ RIIB의 역할은 문헌 [Clatworthy et al., 2004, J Exp Med 199:717-723]에 기재된 바 있다.

[0087] 본 발명은 손상된 세포자멸 매개된 신호전달을 갖는 질병, 예를 들어 암, 자가면역 질병을 치료하는 방법을 제공한다. 특정 실시태양에서, 본 발명은 Fas-매개 세포자멸이 결핍된 질병을 치료하는 방법을 포함하고, 상기 방법은 본 발명의 인간화 항체를 항-Fas 항체와 조합으로 투여하는 것을 포함한다.

[0088] 본 발명은 환자에게 치료 유효량의 본 발명의 인간화 효현 항체를 투여하는 것을 포함하는, 그를 필요로 하는 환자에서 IgE-매개 알레르기 질환을 치료하거나 예방하기 위한 방법을 추가로 제공한다. 본 발명은 또한 환자에게 본 발명의 인간화 항체를 IgE-매개 알레르기 질환의 치료 또는 예방을 위해 사용되는 다른 치료 항체 또는 백신 조성물과 조합으로 투여하는 것을 포함하는, 그를 필요로 하는 환자에서 IgE-매개 알레르기 질환을 치료하거나 예방하기 위한 방법을 제공한다.

[0089] 다른 실시태양에서, 본 발명은 대상체에서 자가면역 질병의 진단 방법을 제공하고, 상기 방법은 (i) 상기 대상체로부터 생물학적 샘플을 유효량의 본 발명의 인간화 항체와 접촉시키고; (ii) 상기 인간화 항체 또는 그의 단편의 결합을 검출하는 것을 포함하고, 여기서 배경 또는 표준 수준을 초과하는 상기 검출가능한 마커의 검출은 상기 대상체가 자가면역 질병에 걸렸음을 나타낸다.

[0090] 본 발명은 (i) 항체 또는 그의 단편이 Fc γ RIIA에 결합하는 것보다 더 큰 친화도로 Fc γ RIIB에 특이적으로 결합하는 치료 유효량의 인간화 항체 또는 그의 단편; 및 (ii) 제약상 허용되는 담체를 포함하는 제약 조성물을 추가로 제공한다. 본 발명은 (i) 항체 또는 그의 단편이 Fc γ RIIA에 결합하는 것보다 더 큰 친화도로 Fc γ RIIB에 특이적으로 결합하는 치료 유효량의 인간화 항체 또는 그의 단편; (ii) 암 항원에 특이적으로 결합하는 세포독성 항체; 및 (iii) 제약상 허용되는 담체를 포함하는 제약 조성물을 추가로 제공한다.

[0091] 본 발명의 특정 실시태양에서, B-세포 악성종양, 또는 그의 하나 이상의 증상을 예방하거나, 치료하거나, 관리하거나 개선시키기 위해 효과적인 양으로 인간화 Fc γ RIIB 항체 또는 그의 항원 결합 단편, 및 제약상 허용되는 담체를 포함하는 제약 조성물이 본 발명의 방법에 따라 사용하기 위해 제공된다. 본 발명은 또한 본 발명의 방법에 따라 사용하기 위한 인간화 Fc γ RIIB 항체 또는 그의 항원 결합 단편, Fc γ RIIB 길항제 이외의 예방제 또는 치료제, 및 제약상 허용되는 담체를 포함하는 제약 조성물을 제공한다.

3.1 정의

[0093] 본원에서 사용되는 용어 "Fc γ RIIB에 특이적으로 결합하는" 및 유사한 용어는 Fc γ RIIB 또는 그의 단편에 특이적으로 결합하고 다른 Fc 수용체, 특히 Fc γ RIIA에 특이적으로 결합하지 않는 항체 또는 그의 단편 (또는 임의의 다른 Fc γ RIIB 결합 분자)를 나타낸다. 또한, Fc γ RIIB에 특이적으로 결합하는 항체는 항체의 가변 도메인 또는 불변 도메인을 통해 결합할 수 있음이 당업계의 숙련인에게 이해된다. Fc γ RIIB에 특이적으로 결합하는 항체가 그의 가변 도메인을 통해 결합하는 경우, 이는 응집되지 않는, 즉 단량체성임이 당업계의 숙련인에게 이해된다. Fc γ RIIB에 특이적으로 결합하는 항체는 예를 들어 면역분석, BIAcore, 또는 당업계에 공지된 다른 분석에 의해 결정할 때 다른 펩티드 또는 폴리펩티드에 더 낮은 친화도로 결합할 수 있다. 바람직하게는, Fc γ RIIB 또는 그의 단편에 특이적으로 결합하는 항체 또는 단편은 다른 항원과 교차반응하지 않는다. Fc γ RIIB에 특이적으로 결합하는 항체 또는 단편은 예를 들어 면역분석, BIAcore, 또는 당업계에 공지된 다른 기술에 의해 확인할 수 있다. Fc γ RIIB에 특이적으로 결합하는 항체 또는 그의 단편은 실험적 기술, 예를 들어 웨스턴 블롯, 방사성 면역분석 (RIA) 및 효소-결합 면역흡착 분석 (ELISA)을 사용하여 결정할 때 임의의 교차반응성 항원에 대한 것보다 더 큰 친화도로 Fc γ RIIB에 결합한다. 항체 특이성에 관한 논의는 예를 들어 문헌 [Paul ed., 1989. Fundamental Immunology Second Edition, Raven Press, New York at pages 332-336]을 참조한다.

[0094] 본원에서 사용되는 용어 "천연 Fc γ RIIB"는 세포 표면 상에 내재적으로 발현되고 제시되는 Fc γ RIIB를

나타낸다. 몇몇 실시태양에서, "천연 Fc γ RIIB"는 포유동물 세포에서 재조합적으로 발현되는 단백질을 포함한다. 바람직하게, 천연 Fc γ RIIB는 세균 세포, 즉, 이. 콜라이 (E. coli)에서 발현되지 않는다. 가장 바람직하게, 천연 Fc γ RIIB는 변성되지 않고, 즉, 그의 생물학적 활성 배열로 존재한다.

[0095] 본원에서 사용되는 용어 "천연 Fc γ RIIA"는 세포 표면 상에 내재적으로 발현되고 제시되는 Fc γ RIIA를 나타낸다. 몇몇 실시태양에서, "천연 Fc γ RIIA"는 포유동물 세포에서 재조합적으로 발현되는 단백질을 포함한다. 바람직하게, 천연 Fc γ RIIA는 세균 세포, 즉, 이. 콜라이에서 발현되지 않는다. 가장 바람직하게, 천연 Fc γ RIIA는 변성되지 않고, 즉, 그의 생물학적 활성 배열로 존재한다.

[0096] 본원에서 사용되는 용어 "항체(들)"은 모노클로날 항체, 다중특이적 항체, 인간 항체, 인간화 항체, 합성 항체, 키메릭 항체, 카멜라이즈드 항체, 단쇄 Fv (scFv), 단쇄 항체, Fab 단편, F(ab') 단편, 디숄피드-연결된 Fv (sdFv), 내부체, 및 항-개별특이형 (항-Id) 항체 (예를 들어, 항-Id 및 본 발명의 항체에 대한 항-항-Id 항체), 및 상기한 임의의 것의 에피토프-결합 단편을 나타낸다. 특히, 항체는 면역글로불린 분자 및 면역글로불린 분자의 면역학적 활성 단편, 즉, 항원 결합 부위를 함유하는 분자를 포함한다. 면역글로불린 분자는 임의의 종류 (예를 들어 IgG, IgE, IgM, IgD, IgA 및 IgY), 클래스 (예를 들어 IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ 및 IgA₂) 또는 서브클래스의 것일 수 있다.

[0097] 본원에서 사용되는 용어 "B-세포 악성종양(들)"은 임의의 B-세포 림프증식성 질환을 나타낸다. B-세포 악성종양은 B-세포 기원의 종양을 포함한다. B-세포 악성종양은 림프종, 만성 림프구성 백혈병, 급성 림프모세포성 백혈병, 다발골수종, 호지킨 및 비호지킨병, 미만성 큰 B세포 림프종, 미만성 큰 B세포 림프종의 영역을 갖는 여포성 림프종, 소림프구성 림프종, 외투 세포 림프종, 및 미만성 소분할 세포 림프종을 포함하고 이로 제한되지 않는다.

[0098] 본원에서 사용되는 용어 "유도체"는 아미노산 잔기 치환, 결실 또는 부가의 도입에 의해 변경된 아미노산 서열을 포함하는 항체를 나타낸다. 본원에서 사용되는 용어 "유도체"는 또한 항체에 대한 임의의 종류의 분자의 공유 부착에 의해 변형된 항체를 나타낸다. 비제한적인 예를 들어 항체는 예를 들어 글리코실화, 아세틸화, PEG화, 인산화, 아미드화, 공지의 보호/차단기에 의한 유도체화, 단백질분해 절단, 세포 리간드 또는 다른 단백질에 대한 연결 등에 의해 변형될 수 있다. 유도체 항체는 당업계의 숙련인에게 공지된 기술, 비제한적인 예를 들어 특이적 화학적 절단, 아세틸화, 포르밀화, 투니카마이신의 대사적 합성 등을 이용하는 화학적 변형에 의해 생산할 수 있다. 또한, 유도체 항체는 그가 유래된 항체와 유사하거나 동일한 기능을 갖는다.

[0099] Fc γ RIIB와 관련하여 본원에서 사용되는 용어 "유도체"는 아미노산 잔기 치환, 결실 또는 부가의 도입 (즉, 돌연변이)에 의해 변경된, Fc γ RIIB 폴리펩티드의 아미노산 서열, Fc γ RIIB 폴리펩티드의 단편, Fc γ RIIB 폴리펩티드에 면역특이적으로 결합하는 항체, 또는 Fc γ RIIB 폴리펩티드에 면역특이적으로 결합하는 항체 단편을 포함하는 폴리펩티드를 나타낸다. 몇몇 실시태양에서, 항체 유도체 또는 그의 단편은 하나 이상의 CDR에서 아미노산 잔기 치환, 결실 또는 부가를 포함한다. 항체 유도체는 비-유도체 항체에 비해 실질적으로 동일한 결합, 더 우수한 결합, 또는 더 불량한 결합을 가질 수 있다. 특정 실시태양에서, CDR의 1, 2, 3, 4, 또는 5개 아미노산 잔기가 치환되거나, 결실되거나 부가된다 (즉, 돌연변이된다). Fc γ RIIB와 관련하여 본원에서 사용되는 용어 "유도체"는 또한 폴리펩티드에 임의의 종류의 분자의 공유 부착에 의해 변형된, Fc γ RIIB 폴리펩티드, Fc γ RIIB 폴리펩티드의 단편, Fc γ RIIB 폴리펩티드에 면역특이적으로 결합하는 항체, 또는 Fc γ RIIB 폴리펩티드에 면역특이적으로 결합하는 항체 단편을 나타낸다. 비제한적인 예를 들어 항체 또는 항체 단편은 예를 들어 글리코실화, 아세틸화, PEG화, 인산화, 아미드화, 공지의 보호/차단기에 의한 유도체화, 단백질분해 절단, 세포 리간드 또는 다른 단백질에 대한 연결 등에 의해 변형될 수 있다. 유도체 항체 또는 항체 단편은 당업계의 숙련인에게 공지된 기술, 비제한적인 예를 들어 특이적 화학적 절단, 아세틸화, 포르밀화, 투니카마이신의 대사적 합성 등을 이용하는 화학적 변형에 의해 변형될 수 있다. 또한, 항체의 유도체 또는 항체 단편은 하나 이상의 비-고전적 아미노산을 함유할 수 있다. 한 실시태양에서, 항체 유도체는 모 항체와 유사하거나 동일한 기능을 갖는다. 다른 실시태양에서, 항체 또는 항체 단편의 유도체는 변경되지 않은 항체에 비해 변경된 활성을 갖는다. 예를 들어, 유도체 항체 또는 그의 단편은 그의 에피토프에 보다 단단하게 결합하거나 단백질분해에 대해 보다 내성일 수 있다.

[0100] 본원에서 사용되는 용어 "질환" 및 "질병"은 대상체의 병을 나타내도록 상호교환가능하게 사용된다. 특히, 용어 "자가면역 질병"은 자신의 세포, 조직 및/또는 장기에 대한 대상체의 면역학적 반응에 의해 유발된 세포, 조직 및/또는 장기 손상을 특징으로 하는 대상체의 병을 나타내도록 용어 "자가면역 질환"과 상호교환가능하게 사용된다. 용어 "염증성 질병"은 염증, 바람직하게는 만성 염증을 특징으로 하는 대상체의 병을 나타내도록 용어

"염증성 질환"과 상호교환가능하게 사용된다. 자가면역 질환은 염증과 연관될 수 있거나 연관되지 않을 수 있다. 더욱이, 염증은 자가면역 질환에 의해 유발될 수 있거나 유발되지 않을 수 있다. 따라서, 특정 질환은 자가면역 및 염증성 질환 모두로서 특성화될 수 있다.

[0101] 본원에서 사용되는 용어 "암"은 비정상적인 비제어된 세포 성장으로부터 생성된 신생물 또는 종양을 나타낸다. 본원에서 사용되는 암은 명백하게 백혈병 및 림프종을 포함한다. 용어 "암"은 말초 위치로 전이할 가능성을 갖고 비-암 세포와 상이한 표현형 형질, 예를 들어, 3차원 기질, 예를 들어 반고형 한천 배지에서 콜로니 형성 또는 3차원 기저막 또는 세포외 매트릭스 체제에서 관모양 그물 또는 망형 매트릭스 형성을 나타내는 세포를 포함하는 질병을 나타낸다. 비-암 세포는 반고형 한천 배지에서 콜로니를 형성하지 않고 3차원 기저막 또는 세포외 매트릭스 체제에서 독특한 구형 구조를 형성한다. 암 세포는 다양한 메카니즘을 통하기는 하지만 발달 동안 특징적인 기능적 능력 세트를 획득한다. 상기 능력은 세포자멸의 회피, 성장 신호에서 자기-충족, 항-성장 신호에 대한 무감응, 조직 침범/전이, 무한한 설명적 잠재성, 및 지속적인 혈관신생을 포함한다. 용어 "암 세포"는 전암성 및 악성 암 세포를 포함하는 것을 의미한다. 몇몇 실시태양에서, 암은 국제화되어 남아있는 양성 종양을 나타낸다. 다른 실시태양에서, 암은 이웃 신체 구조에 침범하고 파괴시키고 먼 부위로 확산하는 악성 종양을 나타낸다. 또다른 실시태양에서, 암은 특이적 암 항원과 관련된다.

[0102] 본원에서 사용되는 용어 "면역조절제" 및 그의 변이형, 비제한적인 예를 들어 면역조절제들은 숙주의 면역 시스템을 조절하는 물질을 나타낸다. 특정 실시태양에서, 면역조절제는 면역억제제이다. 다른 특정 실시태양에서, 면역조절제는 면역자극제이다. 면역조절제는 소분자, 펩티드, 폴리펩티드, 융합 단백질, 항체, 무기 분자, 모방제, 및 유기 분자를 포함하고 이로 제한되지 않는다.

[0103] 본원에서 사용되는 용어 "에피토프"는 항체가 특이적으로 결합하는 항원 분자 상의 영역을 의미한다.

[0104] 본원에서 사용되는 용어 "단편"은 다른 폴리펩티드의 아미노산 서열의 적어도 5개의 인접하는 아미노산 잔기, 적어도 10개의 인접하는 아미노산 잔기, 적어도 15개의 인접하는 아미노산 잔기, 적어도 20개의 인접하는 아미노산 잔기, 적어도 25개의 인접하는 아미노산 잔기, 적어도 40개의 인접하는 아미노산 잔기, 적어도 50개의 인접하는 아미노산 잔기, 적어도 60개의 인접하는 아미노산 잔기, 적어도 70개의 인접하는 아미노산 잔기, 적어도 80개의 인접하는 아미노산 잔기, 적어도 90개의 인접하는 아미노산 잔기, 적어도 100개의 인접하는 아미노산 잔기, 적어도 125개의 인접하는 아미노산 잔기, 적어도 150개의 인접하는 아미노산 잔기, 적어도 175개의 인접하는 아미노산 잔기, 적어도 200개의 인접하는 아미노산 잔기 또는 적어도 250개의 인접하는 아미노산 잔기의 아미노산 서열을 포함하는 펩티드 또는 폴리펩티드를 나타낸다. 특정 실시태양에서, 폴리펩티드의 단편은 폴리펩티드의 적어도 하나의 기능을 보유한다. 바람직하게는, 항체 단편은 에피토프 결합 단편이다.

[0105] 본원에서 사용되는 용어 "인간화 항체"는 인간 프레임워크 영역 및 비인간 (보통 마우스 또는 래트) 면역글로불린으로부터 하나 이상의 CDR을 포함하는 면역글로불린을 나타낸다. CDR을 제공하는 비인간 면역글로불린은 "공여자 (donor)"로 불리고, 프레임워크를 제공하는 인간 면역글로불린은 "수용자 (acceptor)"로 불린다. 불변 영역은 존재할 필요는 없지만, 존재하는 경우 인간 면역글로불린 불변 영역에 실질적으로 동일해야 하고, 즉 적어도 약 85-90%, 바람직하게는 약 95% 또는 그 이상 동일해야 한다. 따라서, 아마도 CDR을 제외하고 인간화 면역글로불린의 모든 부분은 자연 인간 면역글로불린 서열의 대응하는 부분에 실질적으로 동일하다. "인간화 항체"는 인간화 경쇄 및 인간화 중쇄 면역글로불린을 포함하는 항체이다. 예를 들어, 키메라 항체의 전체 가변 영역은 비인간이기 때문에 예를 들어 인간화 항체는 전형적인 키메라 항체를 포함하지 않을 것이다. 생성된 인간화 항체는 CDR을 제공하는 공여 항체와 동일한 항원에 결합하는 것으로 예상되기 때문에, 공여 항체는 "인간화" 과정에 의해 "인간화된" 것으로 말해진다. 대체로, 인간화 항체는 수용자의 초가변영역 잔기가 목적하는 특이성, 친화도, 및 용적을 갖는 비인간 중 (공여 항체), 예를 들어 마우스, 래트, 토끼 또는 비인간 영장류로부터의 초가변영역 잔기로 교체된 인간 면역글로불린 (수용 항체)이다. 몇몇 경우, 인간 면역글로불린의 프레임워크 영역 (FR) 잔기는 대응하는 비인간 잔기에 의해 교체된다. 또한, 인간화 항체는 수용 항체 또는 공여 항체에서 발견되지 않는 잔기를 포함할 수 있다. 이들 변형은 항체 능력을 더욱 정련시키기 위해 이루어진다. 일반적으로, 인간화 항체는 적어도 하나, 전형적으로 2개의 실질적으로 모든 가변 도메인을 포함할 것이고, 여기서 모든 또는 실질적으로 모든 초가변영역은 비인간 면역글로불린의 것에 대응하고 모든 또는 실질적으로 모든 FR은 인간 면역글로불린 서열의 것이다. 임의로 인간화 항체는 또한 전형적으로 아미노산 잔기 치환, 결실 또는 부가의 도입 (즉, 돌연변이)에 의해 변경된 Fc γ RIIB 폴리펩티드에 면역특이적으로 결합하는 인간 면역글로불린의 적어도 일부의 면역글로불린 불변 영역 (Fc)을 포함할 것이다. 몇몇 실시태양에서, 인간화 항체는 유도체이다. 상기 인간화 항체는 하나 이상의 비인간 CDR에서 아미노산 잔기 치환, 결실 또는 부가를 포함한다. 인간화 항체 유도체는 비-유도체 인간화 항체에 비해 실질적으로 동일한 결합, 더 우수한 결합, 또는 더 불량한

결합을 가질 수 있다. 특정 실시태양에서, CDR의 1, 2, 3, 4, 또는 5개 아미노산 잔기가 치환되거나, 결실되거나 부가된다 (즉, 돌연변이된다). 인간화 항체의 상세한 내용은 유럽 특허 EP 239,400, EP 592,106 및 EP 519,596; 국제 특허 출원 공개 WO 91/09967 및 WO 93/17105; 미국 특허 5,225,539, 5,530,101, 5,565,332, 5,585,089, 5,766,886 및 6,407,213; 및 문헌 [Padlan, 1991, Molecular Immunology 28(4/5):489-498; Studnicka et al., 1994, Protein Engineering 7 (6):805-814; Roguska et al., 1994, Proc Natl Acad Sci USA 91:969-973; Tan et al., 2002, J. Immunol. 169:1119-25; Caldas et al., 2000, Protein Eng. 13:353-60; Morea et al., 2000, Methods 20:267-79; Baca et al., 1997, J. Biol. Chem. 272:10678-84; Roguska et al., 1996, Protein Eng. 9:895-904; Couto et al., 1995, Cancer Res. 55 (23 Supp):5973s-5977s; Couto et al., 1995, Cancer Res. 55:1717-22; Sandhu, 1994, Gene 150:409-10; Pedersen et al., 1994, J. Mol. Biol. 235:959-73; Jones et al., 1986, Nature 321:522-525; Reichmann et al., 1988, Nature 332:323-329; 및 Presta, 1992, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596]을 참고한다.

[0106] 본원에서 사용되는 용어 "초가변영역"은 항원 결합을 책임지는 항체의 아미노산 잔기를 나타낸다. 초가변영역은 "상보성 결정 영역" 또는 "CDR"로부터의 아미노산 잔기 (즉, 경쇄 가변 도메인에서 잔기 24-34 (L1), 50-56 (L2) 및 89-97 (L3) 및 중쇄 가변 도메인에서 31-35 (H1), 50-65 (H2) 및 95-102 (H3); Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)) 및/또는 "초가변 루프"로부터의 잔기 (즉, 경쇄 가변 도메인에서 잔기 26-32 (L1), 50-52 (L2) 및 91-96 (L3) 및 중쇄 가변 도메인에서 26-32 (H1), 53-55 (H2) 및 96-101 (H3); Chothia and Lesk, 1987, J. Mol. Biol. 196:901-917)를 포함한다. Eph099B-208.261 및 Eph099B-233.152에 대한 CDR 잔기를 표 1에 나열한다. "프레임워크 영역" 또는 "FR" 잔기는 본원에 정의된 바와 같은 초가변영역 잔기 이외의 가변 도메인 잔기이다.

[0107] 본원에서 사용되는 용어 "단쇄 Fv" 또는 "scFv"는 항체의 VH 및 VL 도메인을 포함하는 항체 단편을 나타내고, 여기서 상기 도메인은 단일 폴리펩티드 사슬 내에 존재한다. 일반적으로, Fv 폴리펩티드는 scFv가 항원 결합을 위해 목적하는 구조를 형성할 수 있도록 하는 VH 및 VL 도메인 사이의 폴리펩티드 링커를 추가로 포함한다. scFv의 검토를 위해 문헌 [Pluckthun in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore eds. Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994)]을 참조한다. 특정 실시태양에서, scFv는 이 중특이적 scFv 및 인간화 scFv를 포함한다.

[0108] 본원에서 사용되는 용어 "핵산" 및 "뉴클레오티드 서열"은 DNA 분자 (예를 들어 cDNA 또는 게놈 DNA), RNA 분자 (예를 들어 mRNA), DNA 및 RNA 분자의 조합물 또는 하이브리드 DNA/RNA 분자, 및 DNA 또는 RNA 분자의 유사체를 포함한다. 상기 유사체는 예를 들어 이노신 또는 트리틸화 염기를 포함하고 이로 제한되지 않는 뉴클레오티드 유사체를 사용하여 생성될 수 있다. 상기 유사체는 또한 분자에 유익한 속성, 예를 들어, 뉴클레아제 내성 또는 세포막을 가로지르는 증가된 능력을 부여하는 변형된 주쇄를 포함하는 DNA 또는 RNA 분자를 포함할 수 있다. 핵산 또는 뉴클레오티드 서열은 단일가닥, 이중가닥일 수 있고, 단일가닥 및 이중가닥 부분을 모두 함유할 수 있고, 삼중가닥 부분을 함유할 수 있지만, 바람직하게는 이중가닥 DNA이다.

[0109] 본원에서 사용되는 용어 "대상체" 및 "환자"는 상호교환가능하게 사용된다. 본원에서 사용되는 대상체는 바람직하게는 포유동물, 예를 들어 비-영장류 (예를 들어 소, 돼지, 말, 고양이, 개, 래트 등) 및 영장류 (예를 들어 원숭이 및 인간), 가장 바람직하게는 인간이다.

[0110] 본원에서 사용되는 용어 "치료하다", "치료하는" 및 "치료"는 Fc 수용체 신호전달 경로에서 조절 손실에 관련된 질병 또는 질환의 증상 근절, 감소 또는 개선, 또는 다른 치료법, 예를 들어 치료 항체, 백신 치료법 또는 예방의 치료 효능을 향상시키는 것을 나타낸다. 몇몇 실시태양에서, 치료는 하나 이상의 치료제 투여로부터 기인하는 일차, 국소 또는 전이성 암 조직의 근절, 제거, 변형, 또는 제어를 나타낸다. 특정 실시태양에서, 상기 용어는 질병에 걸린 대상체에게 하나 이상의 치료제 투여로부터 기인하는 암 확산을 최소화시키거나 지연시키는 것을 나타낸다. 다른 실시태양에서, 상기 용어는 질병 유발 세포의 제거를 나타낸다.

[0111] 본원에서 사용되는 어구 "부작용"은 예방제 또는 치료제의 원치 않는 유해 작용을 포함한다. 유해 작용은 항상 원치 않지만, 원치 않는 작용이 반드시 유해한 것은 아니다. 예방제 또는 치료제로부터 유해 작용은 해롭거나 불편하거나 위험할 수 있다. 화학요법으로부터 부작용은 위장관 독성, 예를 들어 비제한적으로 조기 및 만기 설사 및 위고창, 오심, 구토, 식욕부진, 백혈구 감소, 빈혈, 호중구 감소, 무기력, 복부 경련, 열, 통증, 체중 감소, 탈수, 탈모, 호흡곤란, 불면증, 현기증, 점막염, 구강건조증 및 신부전과 변비, 신경 및 근육 효과, 일시적 또는 영구적 신장 및 방광 손상, 독감 유사 증상, 유체 정체, 및 일시적 또는 영구적 불임을 포함하고 이로

제한되지 않는다. 방사선요법으로부터 부작용은 피로, 입안건조 및 식욕 상실을 포함하고 이로 제한되지 않는다. 생물학적 요법/면역요법으로부터 부작용은 투여 부위에서 발진 또는 종창, 독감 유사 증상, 예를 들어 열, 오한 및 피로, 소화관 장애 및 알레르기 반응을 포함하고 이로 제한되지 않는다. 호르몬요법으로부터 부작용은 오심, 생식 문제, 우울증, 식욕 상실, 눈 문제, 두통, 및 체중 변동을 포함하고 이로 제한되지 않는다. 환자가 대개 경험하는 추가의 바람직하지 않은 작용은 많고 당업계에 공지되어 있다 (예를 들어 그 전부가 본원에 참고로 포함된 Physicians' Desk Reference (56th ed., 2002) 참조).

[0112] 본원에서 사용되는 "치료 유효량"은 Fc γ RIIB와 연관된 질병 또는 질환 및 Fc 수용체 신호전달 경로에서 조절 손실에 관련된 임의의 질병을 치료하거나 관리하기 위해, 또는 다른 치료법, 예를 들어 치료 항체, 백신 치료법 또는 예방 등의 치료 효능을 향상시키기 위해 충분한 치료제의 양을 나타낸다. 치료 유효량은 질병의 발현을 지연시키거나 최소화시키기 위해, 예를 들어 암 확산을 지연시키거나 최소화시키기 위해 충분한 치료제의 양을 나타낼 수 있다. 치료 유효량은 또한 질병의 치료 또는 관리에서 치료상 잇점을 제공하는 치료제의 양을 나타낼 수 있다. 또한, 본 발명의 치료제에 관한 치료 유효량은 단독으로 또는 다른 치료법과 조합으로 질병의 치료 또는 관리에서 치료상 잇점을 제공하는, 예를 들어 질병을 치료하거나 관리하기 위해 충분한 치료 항체의 치료 효능을 향상시키기 위해 충분한 치료제의 양을 의미한다. 본 발명의 Fc γ RIIB 항체의 양과 연관되어 사용될 때, 상기 용어는 전체 치료법을 개선시키거나, 원치 않는 작용을 감소시키거나 피하거나, 또는 다른 치료제의 치료 효능 또는 그와의 상승작용을 향상시키는 양을 포함할 수 있다.

[0113] 본원에서 사용되는 용어 "예방제(들)"은 질환 예방, 또는 질환의 재발 또는 확산 예방에 사용될 수 있는 임의의 물질(들)을 나타낸다. 예방 유효량은 과증식 질환에 소인이 있는 환자, 예를 들어 암에 유전적 소인이 있거나 이전에 발암원에 노출되었던 환자를 포함하고 이로 제한되지 않는 환자에서 과증식 질병, 특히 암의 재발 또는 확산, 또는 그의 발생을 예방하기 위해 충분한 예방제의 양을 나타낼 수 있다. 예방 유효량은 또한 질병의 예방에서 예방 이익을 제공하는 예방제의 양을 나타낼 수 있다. 또한, 본 발명의 예방제에 관련하여 예방 유효량은 질병의 예방에서 예방 이익을 제공하는, 예방제의 단독의 또는 다른 물질과 조합된 양을 의미한다. 본 발명의 Fc γ RIIB 항체의 양과 연관되어 사용될 때, 상기 용어는 전체 예방을 개선시키거나, 다른 예방제, 비제한적인 예를 들어 치료 항체의 예방 효능 또는 그와의 상승작용을 향상시키는 양을 포함할 수 있다. 특정 실시태양에서, 용어 "예방제"는 효원적 Fc γ RIIB-특이적 항체를 나타낸다. 다른 실시태양에서, 용어 "예방제"는 길항적 Fc γ RIIB-특이적 항체를 나타낸다. 다른 특정 실시태양에서, 용어 "예방제"는 암 화학치료제, 방사선요법, 호르몬요법, 생물학적 요법 (예를 들어 면역요법), 및/또는 본 발명의 Fc γ RIIB 항체를 나타낸다. 다른 실시태양에서, 하나 초과와 예방제가 조합으로 투여될 수 있다.

[0114] 본원에서 사용되는 용어 "관리하다", "관리하는" 및 "관리"는 대상체가 예방제 또는 치료제의 투여로부터 얻는 유익한 효과를 나타내고, 이는 질병을 치유하지 않는다. 특정 실시태양에서, 대상체는 질병의 진행 또는 악화를 방지하도록 질병을 "관리하기" 위해 하나 이상의 예방제 또는 치료제로 투여된다.

[0115] 본원에서 사용되는 용어 "예방하다", "예방하는" 및 "예방"은 예방제 또는 치료제의 투여로부터 기인하는 대상체의 질환의 발생 및/또는 재발 또는 하나 이상의 증상의 발현의 방지를 나타낸다.

[0116] 본원에서 사용되는 용어 "조합으로"는 하나 초과와 예방 및/또는 치료제의 사용을 나타낸다. 용어 "조합으로"의 사용은 예방 및/또는 치료제가 질환, 예를 들어 과증식 질환, 특히 암에 걸린 대상체에 투여되는 순서를 한정하지 않는다. 제1 예방제 또는 치료제는 질환에 걸렸거나 걸려 있거나 걸리기 쉬운 대상체에게 제2 예방제 또는 치료제의 투여에 앞서 (예를 들어 1분, 5분, 15분, 30분, 45분, 1시간, 2시간, 4시간, 6시간, 12시간, 24시간, 48시간, 72시간, 96시간, 1주, 2주, 3주, 4주, 5주, 6주, 8주, 또는 12주 전), 그와 동시에 또는 그 후에 (예를 들어 1분, 5분, 15분, 30분, 45분, 1시간, 2시간, 4시간, 6시간, 12시간, 24시간, 48시간, 72시간, 96시간, 1주, 2주, 3주, 4주, 5주, 6주, 8주, 또는 12주 후) 투여될 수 있다. 예방제 또는 치료제는 대상체에게 본 발명의 물질이 달리 투여되는 경우보다 증가된 잇점을 제공하기 위해 다른 물질과 함께 작용할 수 있도록 하는 순서로 및 시간 간격 내에 투여된다. 임의의 추가의 예방제 또는 치료제는 다른 추가의 예방제 또는 치료제와 함께 임의의 순서로 투여될 수 있다.

[0117] 4. 도면의 간단한 설명

[0118] **도 1A 및 B: A. 아미노산 정렬.** 마우스 2B6 VH, 인간화 2B6 VH1-18 및 인간 JH6의 아미노산 서열의 정렬을 도 1A에 제시한다. **B. 아미노산 정렬.** 이 도면은 뮤린 2B6VL, 인간 2B6VL-1, 인간 2B6VL-2; 인간 2B6VL-3, 및 인간 J κ 4의 아미노산 서열의 정렬을 보여준다.

- [0119] 도 2. hu2B6HC/ch2B6LC mAb 및 ch2B6 mAb의 Fc γ RIIB에 대한 결합. 이량체성 가용성 Fc γ RIIB-Fc에 대한 결합을 ELISA로 측정하였다. hu2B6HC/ch2B6LC 모노클로날 항체는 ch2B6 모노클로날 항체에 대한 유사한 친화도로 수용체에 결합하였다.
- [0120] 도 3. hu2B6LC/ch2B6HC mAb, ch2B6LC/hu2B6HC 및 ch2B6 mAb의 Fc γ RIIB에 대한 결합. 이량체성 가용성 Fc γ RIIB-Fc에 대한 결합을 ELISA로 측정하였다. hu2B6HC/ch2B6LC mAb 및 ch2B6HC/hu2B6LC mAb는 ch2B6 mAb에 대한 유사한 친화도로 수용체에 결합하였다.
- [0121] 도 4. hu2B6 변이체의 Fc γ RIIB에 대한 결합. Hu2B6N50Y; Hu2B6N50Y,V51A; Ch2B6, 및 Hu2B6의 이량체성 가용성 Fc γ RIIB-Fc에 대한 결합을 ELISA로 측정하였다. 모든 mAb는 유사한 친화도로 수용체에 결합하였다.
- [0122] 도 5. hu2B6 변이체의 Fc γ RIIA에 대한 결합. Hu2B6N50Y; Hu2B6N50Y,V51A; Ch2B6, 및 Hu2B6의 이량체성 가용성 Fc γ RIIA-Fc에 대한 결합을 ELISA로 측정하였다. 인간화 2B6 mAb는 선택적으로 CD32B에 결합한다. 모든 진한 데이터 점은 서로의 위에 놓이고, 단지 하나의 진한 사각형으로 표시된다.

발명의 상세한 설명

[0123] 5. 바람직한 실시태양의 설명

[0124] 5.1 Fc γ RIIB-특이적 항체

[0125] 본 발명은 항체 또는 그의 단편이 Fc γ RIIA, 바람직하게는 인간 Fc γ RIIA, 보다 바람직하게는 천연 인간 Fc γ RIIA에 결합하는 것보다 더 큰 친화도로 Fc γ RIIB, 바람직하게는 인간 Fc γ RIIB, 보다 바람직하게는 천연 인간 Fc γ RIIB에 특이적으로 결합하는 인간화 항체 (바람직하게는 인간화 모노클로날 항체) 또는 그의 단편을 포함한다. 바람직하게는, 본 발명의 인간화 항체는 천연 인간 Fc γ RIIB의 세포외 도메인에 결합한다. 특정 실시태양에서, 인간화 항체 또는 그의 단편은 상기 항체 또는 그의 단편이 Fc γ RIIA에 결합하는 것보다 2배, 4배, 6배, 10배, 20배, 50배, 100배, 1000배, 10⁴배, 10⁵배, 10⁶배, 10⁷배 또는 10⁸배 더 큰 친화도로 Fc γ RIIB에 결합한다. 한 특정 실시태양에서, 본 발명의 인간화 항체는 각각 ATCC 기탁 번호 PTA-4591 및 PTA-4592의 클론 2B6 또는 3H7에 의해 생산된 마우스 모노클로날 항체로부터 유래한다. 다른 실시태양에서, 본 발명의 인간화 항체는 각각 ATCC 기탁 번호 PTA-5958, PTA-5961, PTA-5962, PTA-5960, 및 PTA-5959의 클론 1D5, 2E1, 2H9, 2D11, 및 1F2에 의해 생산된 마우스 모노클로날 항체로부터 유도된다. 항체 2B6 및 3H7을 생산하는 하이브리도마는 특허 절차상 미생물 기탁에 대한 국제적 승인에 대한 부다페스트 조약의 규정 하에 2002년 8월 13일에 아메리칸 타입 컬처 콜렉션 (미국 20110-2209 버지니아주 마나사스 유니버시티 볼러바드 10801)에 기탁되었고, 각각 기탁 번호 PTA-4591 (2B6 생성 하이브리도마) 및 PTA-4592 (3H7 생성 하이브리도마)를 부여받았고, 이는 그 전부가 본원에 참고로 포함된다. 1D5, 2E1, 2H9, 2D11 및 1F2를 생산하는 하이브리도마는 부다페스트 조약의 규정 하에 2004년 5월 7일에 아메리칸 타입 컬처 콜렉션에 기탁되었고, 각각 기탁 번호 PTA-5958, PTA-5961, PTA-5962, PTA-5960 및 PTA-5959를 부여받았고, 이는 그 전부가 본원에 참고로 포함된다.

[0126] 또다른 실시태양에서, 본 발명은 당업계에 공지되고 본원에 개시된 표준 방법을 사용하여 Fc γ RIIA에 대한 친화도 없이 Fc γ RIIB에 배타적으로 결합하는 인간화 Fc γ RIIB 항체를 포함한다.

[0127] 한 특정 실시태양에서, 본 발명은 인간화 2B6 또는 3H7의 CDR을 포함하는 인간화 항체를 포함한다. 특히, 항체는 서열 24의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 도메인 및 서열 18, 서열 20 또는 서열 22의 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 도메인을 갖는다. 특정 실시태양에서, 본 발명은 서열 37의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 도메인 및 서열 46의 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 도메인을 갖는 인간화 항체를 포함한다. 또다른 바람직한 실시태양에서, 본 발명의 인간화 항체는 추가로 Fc 활성화 수용체, 예를 들어 Fc γ RIIA, Fc γ RIIB 등에 결합하지 않는다. 한 실시태양에서, 본 발명에 따른 Fc γ RIIB-특이적 항체는 문헌 [Pulford et al., 1986 (Immunology, 57: 71-76)]에 개시된 KB61로 지정된 모노클로날 항체, 또는 문헌 [Weinrich et al., 1996, (Hybridoma, 15(2):109-6)]에 개시된 MA618D2로 지정된 모노클로날 항체로부터 유도된 것이 아니다. 특정 실시태양에서, 본 발명의 Fc γ RIIB-특이적 항체는 동일한 에피토프에 결합하지 않고/않거나 모노클로날 항체 KB61 또는 I18D2와 결합에 경쟁하지 않는다. 바람직하게는, 본 발명의 인간화 Fc γ RIIB-특이적 항체는 Fc γ RIIB2 이소형의 위치 135-141에 대응하는 아미노산 서열 SDPNFSI에 결합하지 않는다.

[0128] 본 발명의 인간화 항체의 불변 도메인은 항체의 제안된 기능에 대해, 특히 요구될 수 있는 이펙터 기능에 대해 선택될 수 있다. 일부 실시태양에서, 본 발명의 인간화 항체의 불변 도메인은 인간 IgA, IgE, IgG 또는 IgM 도메인이다. 특정 실시태양에서, 본 발명의 인간화 항체가 치료용으로 의도되고 항체 이펙터 기능이 필요할 때,

인간 IgG 불변 도메인, 특히 IgG1 및 IgG3 이소형의 불변 도메인이 사용된다. 대체 실시태양에서, 본 발명의 인간화 항체가 치료 목적을 위한 것이고 항체 이펙터 기능이 요구되지 않을 때 IgG2 및 IgG4 이소형이 사용된다. 다른 실시태양에서, 본 발명은 그 전부가 본원에 참고로 포함된 미국 특허 출원 공개 2005/0037000 및 2005/0064514 (스타벤하겐 (Stavenhagen) 등); 각각 2003년 1월 9일, 2003년 3월 19일 및 2003년 10월 23일 출원된 미국 특허 가출원 60/439,498; 60/456,041; 및 60/514,549; 및 미국 특허 5,624,821 및 5,648,260 및 유럽 특허 EP 0 307 434에 기재된 것과 같은 Fc 영역 내의 하나 이상의 아미노산 변형을 포함하는 인간화 항체를 포함한다.

[0129] 바람직하게는, 본 발명의 인간화 항체는 천연 인간 Fc γ RIIB의 세포외 도메인에 결합한다. 본 발명의 인간화 항-Fc γ RIIB 항체는 CDR1 (서열 1 또는 서열 29) 및/또는 CDR2 (서열 2 또는 서열 30) 및/또는 CDR3 (서열 3 또는 서열 31)의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및/또는 CDR1 (서열 8 또는 서열 38) 및/또는 CDR2 (서열 9, 서열 10, 서열 11 또는 서열 39) 및/또는 CDR3 (서열 12 또는 서열 40)의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 가질 수 있다.

[0130] 한 특정 실시태양에서, 본 발명은 인간화 2B6 항체를 제공하고, 여기서 VH 영역은 인간 생식세포주 VH 세그먼트 VH1-18 (Matsuda et al., 1998, J. Exp. Med. 188: 2151062) 및 JH6 (Ravetch et al., 1981, Cell 27(3 Pt. 2): 583-91)로부터의 FR 세그먼트, 및 서열 1, 서열 2 또는 서열 3의 아미노산 서열을 갖는 2B6 VH의 하나 이상의 CDR 영역으로 이루어진다. 한 실시태양에서, 2B6 VH는 서열 24의 아미노산 서열을 갖는다. 다른 특정 실시태양에서, 인간화 2B6 항체는 인간 생식세포주 VL 세그먼트 VK-A26 (Lautner-Rieske et al., 1992, Eur. J. Immunol. 22:1023-1029) 및 JK4 (Hieter et al., 1982, J. Biol. Chem. 257:1516-22)로부터의 FR 세그먼트, 및 서열 8, 서열 9, 서열 10, 서열 11 및 서열 12의 아미노산 서열을 갖는 2B6VL의 하나 이상의 CDR 영역으로 이루어지는 VL 영역을 추가로 포함한다. 한 실시태양에서, 2B6 VL은 서열 18, 서열 20 또는 서열 22의 아미노산 서열을 갖는다.

[0131] 다른 특정 실시태양에서, 본 발명은 인간화 3H7 항체를 제공하고, 여기서 VH 영역은 인간 생식세포주 VH 세그먼트 트로부터의 FR 세그먼트 및 서열 37의 아미노산 서열을 갖는 3H7 VH의 CDR 영역으로 이루어진다. 다른 특정 실시태양에서, 인간화 3H7 항체는 인간 생식세포주 VL 세그먼트의 FR 세그먼트 및 서열 46의 아미노산 서열을 갖는 3H7VL의 CDR 영역으로 이루어지는 VL 영역을 추가로 포함한다.

[0132] 특히, 본 발명은 천연 인간 Fc γ RIIB의 세포외 도메인에 면역특이적으로 결합하는 인간화 항체를 제공하고, 상기 항체는 VH CDR1 및 VL CDR1; VH CDR1 및 VL CDR2; VH CDR1 및 VL CDR3; VH CDR2 및 VL CDR1; VH CDR2 및 VL CDR2; VH CDR2 및 VL CDR3; VH CDR3 및 VH CDR1; VH CDR3 및 VL CDR2; VH CDR3 및 VL CDR3; VH1 CDR1, VH CDR2 및 VL CDR1; VH CDR1, VH CDR2 및 VL CDR2; VH CDR1, VH CDR2 및 VL CDR3; VH CDR2, VH CDR3 및 VL CDR1, VH CDR2, VH CDR3 및 VL CDR2; VH CDR2, VH CDR2 및 VL CDR3; VH CDR1, VL CDR1 및 VL CDR2; VH CDR1, VL CDR1 및 VL CDR3; VH CDR2, VL CDR1 및 VL CDR2; VH CDR2, VL CDR1 및 VL CDR3; VH CDR3, VL CDR1 및 VL CDR2; VH CDR3, VL CDR1 및 VL CDR3; VH CDR1, VH CDR2, VH CDR3 및 VL CDR1; VH CDR1, VH CDR2, VH CDR3 및 VL CDR2; VH CDR1, VH CDR2, VH CDR3 및 VL CDR3; VH CDR1, VH CDR2, VL CDR1 및 VL CDR2; VH CDR1, VH CDR2, VL CDR1 및 VL CDR3; VH CDR1, VH CDR3, VL CDR1 및 VL CDR2; VH CDR1, VH CDR3, VL CDR1 및 VL CDR3; VH CDR2, VH CDR3, VL CDR1 및 VL CDR2; VH CDR2, VH CDR3, VL CDR1 및 VL CDR3; VH CDR2, VH CDR3, VL CDR2 및 VL CDR3; VH CDR1, VH CDR2, VH CDR3, VL CDR1 및 VL CDR2; VH CDR1, VH CDR2, VH CDR3, VL CDR1 및 VL CDR3; VH CDR1, VH CDR2, VL CDR1, VL CDR2 및 VL CDR3; VH CDR1, VH CDR3, VL CDR1, VL CDR2 및 VL CDR3; VH CDR2, VH CDR3, VL CDR1, VL CDR2 및 VL CDR3; 또는 본원에 개시된 VH CDR 및 VL CDR의 임의의 조합물의 임의의 조합물로서 2B6 또는 3H7의 CDR 서열을 포함한다 (또는 별법으로 이들로 이루어진다).

[0133] 본 발명은 인간 항체 (수용 항체)의 중쇄 및/또는 경쇄 가변 영역의 하나 이상의 CDR의 하나 이상의 영역이 Fc γ RIIA보다 더 큰 친화도로 Fc γ RIIB에 특이적으로 결합하는 공여 모노클로날 항체, 예를 들어 각각 ATCC 기탁 번호 PTA-4591 및 PTA-4592의 클론 2B6 또는 3H7에 의해 생산된 모노클로날 항체 또는 각각 ATCC 기탁 번호 PTA-5958, PTA-5961, PTA-5962, PTA-5960 및 PTA-5959의 클론 1D5, 2E1, 2H9, 2D11 및 1F2에 의해 생산된 모노클로날 항체의 하나 이상의 CDR의 유사 부분에 의해 치환된, Fc γ RIIB에 특이적인 인간화 항체 분자를 제공한다. 다른 실시태양에서, 인간화 항체는 2B6, 3H7, 1D5, 2E1, 2H9, 2D11 또는 1F2와 동일한 에피토프에 결합한다. 가장 바람직한 실시태양에서, 인간화 항체는 공여자 무린 항체와 동일한 에피토프에 특이적으로 결합한다. 당업계의 숙련인은 본 발명이 항체의 전체적인 CDR 이식을 포함함을 이해할 것이다. 따라서, 공여 및 수용 항체는 동일한 종의 동물, 심지어 동일한 항체 클래스 또는 서브클래스로부터 유도될 수 있다. 그러나, 보다 일반적으로는, 공여 및 수용 항체는 상이한 종의 동물로부터 유도된다. 전형적으로, 공여 항체는 비-인간

항체, 예를 들어 설치류 MAb이고, 수용 항체는 인간 항체이다.

[0134] 몇몇 실시태양에서, 공여 항체로부터의 적어도 하나의 CDR이 인간 항체에 이식된다. 다른 실시태양에서, 각각의 중쇄 및/또는 경쇄 가변 영역의 적어도 2, 바람직하게는 3개 모두의 CDR이 인간 항체에 이식된다. CDR은 Kabat CDR, 구조 루프 CDR 또는 이들의 조합물을 포함할 수 있다. 몇몇 실시태양에서, 본 발명은 적어도 하나의 CDR 이식된 중쇄 및 적어도 하나의 CDR 이식된 경쇄를 포함하는 인간화 Fc γ RIIB 항체를 포함한다.

[0135] 바람직한 실시태양에서, 인간화 Fc γ RIIB 특이적 항체의 CDR 영역은 Fc γ RIIB에 특이적인 뮤린 항체로부터 유래한다. 몇몇 실시태양에서, 본원에서 설명되는 인간화 항체는 수용 항체, 즉 공여 모노클로날 항체의 결합 특이성 유지에 필요한 인간 중쇄 및/또는 경쇄 가변 도메인 프레임워크 영역의 아미노산 결실, 삽입, 변형을 포함하여 이로 제한되지 않는 변형체를 포함한다. 몇몇 실시태양에서, 본원에서 설명되는 인간화 항체의 프레임워크 영역은 반드시 자연 발생 인간 항체 가변 영역의 프레임워크 영역의 정확한 아미노산 서열로 이루어질 필요는 없지만, 인간화 항체의 특성을 변경시키는, 예를 들어 뮤린 Fc γ RIIB 특이적 항체와 동일한 표적에 특이적인 인간화 항체 영역의 결합 특성을 개선시키는 아미노산 결실, 삽입, 변형을 포함하여 이로 제한되지 않는 다양한 변형체를 포함한다. 가장 바람직한 실시태양에서, 비인간 프레임워크 잔기의 대규모 도입을 방지하고 인간에서 인간화 항체의 최소 면역원성을 보장하기 위해 프레임워크 영역에 최소의 변형이 이루어진다. 본 발명의 공여 모노클로날 항체는 바람직하게는 Fc γ RIIB에 결합하는 클론 2B6 및 3H7 (각각 ATCC 기탁 번호 PTA-4591 및 PTA-4592)에 의해 생산된 모노클로날 항체 또는 클론 1D5, 2E1, 2H9, 2D11 또는 1F2 (각각 ATCC 기탁 번호 PTA-5958, PTA-5961, PTA-5962, PTA-5960 및 PTA-5959)에 의해 생산된 모노클로날 항체이다.

[0136] 특정 실시태양에서, 본 발명은 항체가 Fc γ RIIA에 결합하는 것보다 더 큰 친화도로 Fc γ RIIB에 특이적으로 결합하는 CDR 이식된 항체를 포함하고, 여기서 CDR 이식된 항체는 수용 항체의 프레임워크 잔기, 및 항체가 Fc γ RIIA에 결합하는 것보다 더 큰 친화도로 Fc γ RIIB에 특이적으로 결합하는 공여 모노클로날 항체, 예를 들어 클론 2B6, 3H7, 1D5, 2E1, 2H9, 2D11 또는 1F2로부터 생산된 모노클로날 항체로부터의 잔기를 포함하는 중쇄 가변 영역 도메인을 포함한다. 다른 특정 실시태양에서, 본 발명은 항체가 Fc γ RIIA에 결합하는 것보다 더 큰 친화도로 Fc γ RIIB에 특이적으로 결합하는 CDR 이식된 항체를 포함하고, 여기서 CDR 이식된 항체는 수용 항체의 프레임워크 잔기, 및 항체가 Fc γ RIIA에 결합하는 것보다 더 큰 친화도로 Fc γ RIIB에 특이적으로 결합하는 공여 모노클로날 항체, 예를 들어 클론 2B6, 3H7, 1D5, 2E1, 2H9, 2D11 또는 1F2로부터 생산된 모노클로날 항체로부터의 잔기를 포함하는 경쇄 가변 영역 도메인을 포함한다.

[0137] 본 발명의 인간화 Fc γ RIIB 특이적 항체는 모든 또는 실질적으로 모든 CDR 영역이 비인간 면역글로불린 (즉, 공여 항체)의 영역에 대응하고, 모든 또는 실질적으로 모든 프레임워크 영역이 인간 면역글로불린 컨센서스 서열의 영역인 적어도 하나, 전형적으로 2개의 실질적으로 모든 가변 도메인을 포함할 수 있다. 바람직하게는, 본 발명의 인간화 항체는 또한 면역글로불린 불변 영역 (Fc), 전형적으로 인간 면역글로불린의 불변 영역의 적어도 일부를 포함한다. 본 발명의 인간화 항체의 불변 도메인은 항체의 제안된 기능에 대해, 특히 요구될 수 있는 이펙터 기능에 대해 선택할 수 있다. 몇몇 실시태양에서, 항체의 불변 도메인은 인간 IgA, IgE, IgG 또는 IgM 도메인이다. 특정 실시태양에서, 본 발명의 인간화 항체가 치료용으로 의도되고 항체 이펙터 기능이 필요할 때, 인간 IgG 불변 도메인, 특히 IgG1 및 IgG3 이소형의 불변 도메인이 사용된다. 대체 실시태양에서, 본 발명의 인간화 항체가 치료 목적을 위한 것이고 항체 이펙터 기능이 요구되지 않을 때 IgG2 및 IgG4 이소형이 사용된다. 본 발명은 그 전부가 본원에 참고로 포함된 미국 특허 출원 공개 2005/0037000 및 2005/0064514; 각각 2003년 1월 9일, 2003년 3월 19일 및 2003년 10월 23일 출원된 미국 특허 가출원 60/439,498; 60/456,041; 및 60/514,549에 기재된 것과 같은, 항체 이펙터 기능을 변경시키는 하나 이상의 아미노산 변형을 포함하는 Fc 불변 도메인을 포함한다.

[0138] 몇몇 실시태양에서, 본 발명의 인간화 항체는 경쇄 및 적어도 중쇄의 가변 도메인을 포함한다. 다른 실시태양에서, 본 발명의 인간화 항체는 중쇄의 하나 이상의 CH1, 힌지, CH2, CH3 및 CH4 영역을 추가로 포함할 수 있다. 인간화 항체는 IgM, IgG, IgD, IgA 및 IgE를 포함하여 임의의 클래스의 면역글로불린 및 IgG₁, IgG₂, IgG₃ 및 IgG₄를 포함하여 임의의 이소형을 포함할 수 있다. 몇몇 실시태양에서, 불변 도메인은 인간화 항체가 세포독성 활성을 보이는 것이 요구될 경우 보체 고정 불변 도메인이고, 그 클래스는 전형적으로 IgG₁이다. 다른 실시태양에서, 상기 세포독성 활성이 바람직하지 않은 경우, 불변 도메인은 IgG₂ 클래스일 수 있다. 본 발명의 인간화 항체는 하나 초과 클래스 또는 이소형으로부터의 서열을 포함할 수 있고, 요구되는 이펙터 기능을 최적화하기 위해 당업계의 숙련인은 불변 도메인을 용이하게 선택할 수 있다.

- [0139] 인간화 항체의 프레임워크 및 CDR 영역은 모 서열, 예를 들어 공여 CDR에 정확하게 대응할 필요는 없거나, 컨센서스 프레임워크는 그 부위의 CDR 또는 프레임워크 잔기가 컨센서스 또는 공여 항체에 대응하지 않도록 적어도 하나의 잔기의 치환, 삽입 또는 결실에 의해 돌연변이될 수 있다. 그러나, 상기 돌연변이는 바람직하게는 연장되지는 않는다. 대체로, 적어도 75%, 보다 종종 90%, 가장 바람직하게는 95% 초과와 인간화 항체 잔기가 모 프레임워크 영역 (FR) 및 CDR 서열에 대응할 것이다. 인간화 항체는 CDR-이식 (유럽 특허 EP 239,400; 국제 특허 출원 공개 WO 91/09967; 및 미국 특허 5,225,539, 5,530,101 및 5,585,089), 베니어링 (veneering) 또는 재표면처리 (유럽 특허 EP 592,106 및 EP 519,596; Padlan, 1991, *Molecular Immunology* 28(4/5):489-498; Studnicka et al., 1994, *Protein Engineering* 7 (6):805-814; Roguska et al., 1994, *Proc Natl Acad Sci USA* 91:969-973), 사슬 셔플링 (미국 특허 5,565,332), 및 예를 들어 미국 특허 6,407,213, 5,766,886, 5,585,089, 국제 특허 출원 공개 WO 9317105, 문헌 [Tan et al., 2002, *J. Immunol.* 169: 1119-25, Caldas et al., 2000, *Protein Eng.* 13:353-60, Morea et al., 2000, *Methods* 20:267-79, Baca et al., 1997, *J. Biol. Chem.* 272:10678-84, Roguska et al., 1996, *Protein Eng.* 9: 895-904, Couto et al., 1995, *Cancer Res.* 55 (23 Supp):5973s-5977s, Couto et al., 1995, *Cancer Res.* 55:1717-22, Sandhu, 1994, *Gene* 150: 409-10, Pedersen et al., 1994, *J. Mol. Biol.* 235: 959-73, Jones et al., 1986, *Nature* 321:522-525, Riechmann et al., 1988, *Nature* 332: 323, 및 Presta, 1992, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596]에 개시된 기술을 포함하여 이로 제한되지 않는 당업계에 공지된 다양한 기술을 사용하여 제조할 수 있다. 종종, 프레임워크 영역 내의 프레임워크 잔기는 항원 결합을 변경, 바람직하게는 개선시키기 위해 CDR 공여 항체로부터 대응하는 잔기로 치환될 것이다. 상기 프레임워크 치환은 당업계에 공지된 방법, 예를 들어 항원 결합에 중요한 프레임워크 잔기를 확인하기 위한 CDR과 프레임워크 잔기의 상호작용의 모델링 및 특정 위치에서 비통상적인 프레임워크 잔기를 확인하기 위한 서열 비교에 의해 확인된다 (예를 들어 그 전부가 본원에 참고로 포함된 퀸 (Queen) 등의 미국 특허 5,585,089; 미국 특허 출원 공개 2004/0049014 및 2003/0229208; 미국 특허 6,350,861; 6,180,370; 5,693,762; 5,693,761; 5,585,089; 및 5,530,101 및 Riechmann et al., 1988, *Nature* 332: 323 참조).
- [0140] 특정 실시태양에서, 본 발명의 인간화 항체 또는 그의 단편은 Fc γ RIIB의 적어도 하나의 활성을 효현한다. 본 발명의 한 실시태양에서, 상기 활성은 B세포 수용체-매개 신호전달의 억제이다. 다른 실시태양에서, 본 발명의 효현 항체는 B세포의 활성화, B세포 증식, 항체 생산, B세포의 세포내 칼슘 유입, 세포 주기 진행, 또는 Fc γ RIIB 신호 전달 경로에서 하나 이상의 하류 신호전달 분자의 활성을 억제한다. 또다른 실시태양에서, 본 발명의 인간화 효현 항체는 Fc γ RIIB의 인산화 또는 SHIP 동원을 향상시킨다. 본 발명의 추가의 실시태양에서, 인간화 효현 항체는 B세포 수용체-매개 신호전달 경로에서 MAP 키나제 활성 또는 Akt 동원을 억제한다. 다른 실시태양에서, 본 발명의 인간화 효현 항체는 Fc ϵ RI 신호전달의 Fc γ RIIB-매개 억제를 효현한다. 특정 실시태양에서, 상기 인간화 항체는 Fc ϵ RI-유도 비만세포 활성화, 칼슘 이동, 탈과립, 시토킨 생산 또는 세로토닌 방출을 억제한다. 다른 실시태양에서, 본 발명의 인간화 효현 항체는 Fc γ RIIB의 인산화를 자극하고, SHIP의 동원을 자극하고, SHIP 인산화 및 그의 Shc와의 회합을 자극하거나, MAP 키나제 패밀리 멤버 (예를 들어 Erk1, Erk2, JNK, p38 등)의 활성화를 억제한다. 또다른 실시태양에서, 본 발명의 인간화 효현 항체는 p62^{dok}의 티로신 인산화 및 그의 SHIP 및 rasGAP와의 회합을 향상시킨다. 다른 실시태양에서, 본 발명의 인간화 효현 항체는 단핵구 또는 대식세포에서 Fc γ R-매개 포식작용을 억제한다.
- [0141] 다른 실시태양에서, 본 발명의 인간화 항체 또는 그의 단편은 Fc γ RIIB의 적어도 하나의 활성을 길항한다. 한 실시태양에서, 상기 활성은 B세포 수용체-매개 신호전달의 활성화이다. 특정 실시태양에서, 본 발명의 인간화 길항 항체는 B세포 활성화, B세포 증식, 항체 생산, 세포내 칼슘 유입 또는 Fc γ RIIB 신호 전달 경로에서 하나 이상의 하류의 신호전달 분자의 활성을 향상시킨다. 또다른 특정 실시태양에서, 본 발명의 인간화 길항 항체는 Fc γ RIIB의 인산화 또는 SHIP 동원을 감소시킨다. 본 발명의 추가의 실시태양에서, 인간화 길항 항체는 B세포 수용체 매개 신호전달 경로에서 MAP 키나제 활성 또는 Akt 동원을 향상시킨다. 다른 실시태양에서, 본 발명의 인간화 길항 항체는 Fc ϵ RI 신호전달의 Fc γ RIIB-매개 억제를 길항한다. 특정 실시태양에서, 본 발명의 인간화 길항 항체는 Fc ϵ RI-유도 비만세포 활성화, 칼슘 이동, 탈과립, 시토킨 생성 또는 세로토닌 방출을 향상시킨다. 다른 실시태양에서, 본 발명의 인간화 길항 항체는 Fc γ RIIB의 인산화를 억제하고, SHIP의 동원을 억제하고, SHIP 인산화 및 그의 Shc와의 회합을 억제하고, MAP 키나제 패밀리 멤버 (예를 들어 Erk1, Erk2, JNK, p38 등)의 활성화를 향상시킨다. 또다른 실시태양에서, 본 발명의 인간화 길항 항체는 p62^{dok}의 티로신 인산화 및 그의 SHIP 및 rasGAP와의 회합을 억제한다. 다른 실시태양에서, 본 발명의 인간화 길항 항체는 단핵구 또는 대식세포에서 Fc γ R-매개 포식작용을 향상시킨다. 다른 실시태양에서, 본 발명의 인간화 길항 항체는 포식작용, 즉 비장 대식세포에 의한 옴소닌작용된 입자의 소실을 방지한다.

- [0142] 본 발명의 항체는 모노클로날 항체, 합성 항체, 재조합적으로 생산된 항체, 다중특이적 항체, 인간 항체, 인간화 항체, 키메라 항체, 카멜라이즈드 항체, 단쇄 Fv (scFv), 단쇄 항체, Fab 단편, F(ab') 단편, 디설파이드-연결된 Fv (sdFv), 내부체, 및 상기한 임의의 에피토프-결합 단편을 포함하고, 이로 제한되지 않는다. 특히, 본 발명의 방법에 사용되는 항체는 면역글로불린 분자 및 면역글로불린 분자의 면역학적 활성부, 즉 상기 면역글로불린 분자가 Fc γ RIIA에 결합하는 것보다 더 큰 친화도로 Fc γ RIIB에 면역특이적으로 결합하는 항원 결합 부위를 포함하는 분자를 포함한다. 항체 유사체는 또한 Fc γ RIIB-특이적 T-세포 수용체, 예를 들어 키메라 T-세포 수용체 (예를 들어 미국 특허 출원 공개 2004/0043401 참조), 단쇄 항체에 연결된 단쇄 T-세포 수용체 (예를 들어 미국 특허 6,534,633 참조) 및 단백질 스캐폴드 (예를 들어 미국 특허 6,818,418 참조)를 포함할 수 있다. 특정 실시태양에서, 본 발명의 항체 유사체는 모노클로날 항체가 아니다.
- [0143] 본 발명의 방법에 사용되는 인간화 항체는 조류 및 포유동물 (예를 들어 인간, 비인간 영장류, 무린, 당나귀, 양, 토끼, 염소, 기니아 피그, 낙타, 말 또는 닭)을 포함하여 임의의 동물 기원으로부터 유래할 수 있다. 바람직하게는, 항체는 인간 또는 인간화 모노클로날 항체이다. 본원에서 사용되는 "인간" 항체는 인간 면역글로불린의 아미노산 서열을 갖는 항체를 포함하고, 인간 면역글로불린 라이브러리 또는 합성 인간 면역글로불린 코딩 서열의 라이브러리로부터 또는 인간 유전자로부터 항체를 발현하는 마우스로부터 단리된 항체를 포함한다.
- [0144] 본 발명의 방법에 사용되는 인간화 항체는 일특이적, 이중특이적, 삼특이적 또는 다중특이적일 수 있다. 다중특이적 항체는 Fc γ RIIB의 상이한 에피토프에 면역특이적으로 결합하거나, Fc γ RIIB의 에피토프 및 이중 에피토프, 예를 들어 이중 폴리펩티드 또는 고체 지지체 물질 모두에 면역특이적으로 결합할 수 있다 (예를 들어 국제 특허 출원 공개 WO 93/17715, WO 92/08802, WO 91/00360 및 WO 92/05793; Tutt, et al., 1991, J. Immunol. 147: 60-69; 미국 특허 4,474,893, 4,714,681, 4,925,648, 5,573,920 및 5,601,819; 및 Kostelny et al., 1992, J. Immunol. 148: 1547-1553; Todorovska et al., 2001 Journal of Immunological Methods, 248:47-66 참조). 특정 실시태양에서, 본 발명의 인간화 항체는 Fc γ RIIB에 및 특정 질병 또는 질환 치료 또는 억제시에 치사되도록 디자인된 세포 (예를 들어 면역세포, 예를 들어 T-세포 또는 B-세포)에 특이적인 암 항원 또는 임의의 다른 세포 표면 마커에, 또는 다른 Fc 수용체, 예를 들어 Fc γ RIIA, Fc γ RIIB 등에 대한 특이성을 갖는 다중특이적 항체이다.
- [0145] 특정 실시태양에서, 본 발명의 방법에 사용되는 항체는 각각 ATCC 기탁 번호 PTA-4591, PTA-4592, PTA-5958, PTA-5961, PTA-5962, PTA-5960 및 PTA-5959의 클론 2B6, 3H7, 1D5, 2E1, 2H9, 2D11 또는 1F2에 의해 생성된 항체 또는 그의 항원 결합 단편 (예를 들어 하나 이상의 상보성 결정 영역 (CDR), 바람직하게는 6개 CDR 모두를 포함) (예를 들어 중쇄 CDR3)이다. 특정 실시태양에서, 본 발명의 방법에 사용되는 항체는 각각 ATCC 기탁 번호 PTA-4591, PTA-4592, PTA-5958, PTA-5961, PTA-5962, PTA-5960 및 PTA-5959의 클론 2B6, 3H7, 1D5, 2E1, 2H9, 2D11 또는 1F2로부터 생산된 마우스 모노클로날 항체와 동일한 에피토프에 결합하고/하거나 예를 들어 ELISA 분석 또는 다른 적절한 경쟁 면역분석으로 결정시에 각각 ATCC 기탁 번호 PTA-4591, PTA-4592, PTA-5958, PTA-5961, PTA-5962, PTA-5960 및 PTA-5959의 클론 2B6, 3H7, 1D5, 2E1, 2H9, 2D11 또는 1F2로부터 생산된 마우스 모노클로날 항체와 경쟁하고, 또한 상기 항체 또는 그의 단편이 Fc γ RIIA에 결합하는 것보다 더 큰 친화도로 Fc γ RIIB에 결합한다.
- [0146] 본 발명의 방법에 사용되는 인간화 항체는 임의의 종류의 분자의 항체에 대한 공유 부착에 의해 변형된 유도체를 포함한다. 예를 들어, 항체 유도체는 예를 들어 글리코실화, 아세틸화, PEG화, 인산화, 아미드화, 공지의 보호/차단기에 의한 유도체화, 단백질분해 절단, 세포 리간드 또는 다른 단백질에 대한 연결 등에 의해 변형된 항체를 포함하고, 이로 제한되지 않는다. 임의의 많은 화학적 변형은 특이적인 화학적 절단, 아세틸화, 포르밀화, 투니카마이신의 대사 합성 등을 포함하고, 이로 제한되지 않는 공지의 기술에 의해 수행할 수 있다. 추가로, 유도체는 하나 이상의 비전통적인 아미노산을 포함할 수 있다.
- [0147] 인간 및 시험관내 검출 분석에서 인간화 항체의 생체내 용도를 포함하는 일부 용도에 대해, 인간, 키메라 또는 인간화 항체를 사용하는 것이 바람직할 수 있다. 인간 대상체의 치료를 위해 완전 인간 항체가 특히 바람직하다. 인간 항체는 당업계에 공지된 다양한 방법, 예를 들어 인간 면역글로불린 서열로부터 유래된 항체 라이브러리를 사용하는 상기 설명된 파지 디스플레이 방법에 의해 제조될 수 있다 (그 전부가 본원에 참고로 포함된 미국 특허 4,444,887 및 4,716,111; 및 국제 특허 출원 공개 WO 98/46645, WO 98/50433, WO 98/24893, WO 98/16654, WO 96/34096, WO 96/33735 및 WO 91/10741 참조).
- [0148] 또한, 인간 항체는 기능성 내인성 면역글로불린을 발현할 수 없지만 인간 면역글로불린 유전자를 발현할 수 있는 트랜스제닉 마우스를 사용하여 생산할 수 있다. 예를 들어, 인간 중쇄 및 경쇄 면역글로불린 유전자 복합체

는 마우스 배아 줄기세포 내로 랜덤하게 또는 상동 재조합에 의해 도입될 수 있다. 별법으로, 인간 가변 영역, 불변 영역 및 다양성 영역이 인간 중쇄 및 경쇄 유전자에 추가하여 마우스 배아 줄기세포 내로 도입될 수 있다. 마우스 중쇄 및 경쇄 면역글로불린 유전자는 상동 재조합에 의한 인간 면역글로불린 로커스와 별개로 또는 동시에 비기능성이 되도록 만들 수 있다. 특히, J_H 영역의 동종접합 결실은 내인성 항체 생산을 억제한다. 변형된 배아 줄기세포는 팽창되고 배반포에 미세주사되어 키메라 마우스를 생성시킨다. 키메라 마우스는 이어서 인간 항체를 발현하는 동종접합 자손체를 생산하기 위해 교배시킨다. 트랜스제닉 마우스는 통상적인 방법을 사용하여 선택된 항원, 예를 들어 본 발명의 모든 또는 일부의 폴리펩티드로 면역처리된다. 항원에 대한 모노클로날 항체는 통상적인 하이브리도마 기술을 사용하여 면역처리된 트랜스제닉 마우스로부터 얻을 수 있다. 트랜스제닉 마우스가 보유하는 인간 면역글로불린 도입유전자는 B세포 분화 동안 재배열되고, 후속적으로 클래스 스위칭 및 체세포 돌연변이를 겪는다. 따라서, 상기 기술을 사용하여 치료상 유용한 IgG, IgA, IgM 및 IgE 항체를 제조할 수 있다. 상기 인간 항체 생산 기술에 대해서는, 그 전부가 본원에 참고로 포함된 문헌 [Lonberg and Huszar, 1995, Int. Rev. Immunol. 13:65-93]을 참조한다. 상기 인간 항체 및 인간 모노클로날 항체 생산 기술 및 상기 항체 생산 프로토콜에 대한 상세한 내용은 예를 들어 그 전부가 본원에 참고로 포함된 국제 특허 출원 공개 WO 98/24893, WO 96/34096 및 WO 96/33735; 및 미국 특허 5,413,923, 5,625,126, 5,633,425, 5,569,825, 5,661,016, 5,545,806, 5,814,318 및 5,939,598를 참조한다. 또한, 아브게닉스, 인크 (Abgenix, Inc., 미국 캘리포니아주 프리몬트) 및 메다렉스 (Medarex) (미국 뉴저지주 프린스턴)와 같은 회사가 상기한 바와 유사한 기술을 사용하여 선택된 항원에 대해 작용하는 인간 항체를 제공할 수 있다.

- [0149] 키메라 항체는 항체의 상이한 부분이 상이한 면역글로불린 분자로부터 유래한 분자, 예를 들어 비-인간 항체로부터 유래한 가변 영역 및 인간 면역글로불린 불변 영역을 갖는 항체이다. 키메라 항체의 생산 방법은 당업계에 공지되어 있다 (예를 들어 그 전부가 본원에 참고로 포함된 Morrison, 1985, Science 229: 1202; Oi et al., 1986, BioTechniques 4:214; Gillies et al., 1989, J. Immunol. Methods 125:191-202; 및 미국 특허 6,311,415, 5,807,715, 4,816,567 및 4,816,397 참조). 비인간 종으로부터의 하나 이상의 CDR 및 인간 면역글로불린 분자로부터의 프레임워크 영역을 포함하는 키메라 항체는 예를 들어 CDR-이식 (EP 239,400; 국제 특허 출원 공개 WO 91/09967; 및 미국 특허 5,225,539, 5,530,101 및 5,585,089), 베니어링 또는 재표면처리 (EP 592,106; EP 519,596; Padlan, 1991, Molecular Immunology 28 (4/5):489-498; Studnicka et al., 1994, Protein Engineering 7: 805; 및 Roguska et al., 1994, PNAS 91:969) 및 사슬 서플링 (미국 특허 5,565,332)을 포함하여 다양한 당업계에 공지된 기술을 사용하여 제조할 수 있다. 상기 언급한 문헌은 각각 그 전부가 본원에 참고로 포함된다.
- [0150] 또한, 본 발명의 항체는 당업계의 숙련인에게 공지된 기술을 이용하여 항-개별특이형 항체를 생성시키기 위해 사용될 수 있다 (예를 들어, Greenspan & Bona, 1989, FASEB J. 7: 437-444; 및 Nissinoff, 1991, J. Immunol. 147:2429- 2438 참조). 본 발명은 본 발명의 항체 또는 그의 단편을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 사용하는 방법을 포함한다.
- [0151] 본 발명은 카멜라이즈드 단일 도메인 항체를 포함하여 단일 도메인 항체를 포함한다 (예를 들어 그 전부가 본원에 참고로 포함된 Muyldermans et al., 2001, Trends Biochem. Sci. 26:230; Nuttall et al., 2000, Cur. Pharm. Biotech. 1: 253; Reichmann and Muyldermans, 1999, J. Immunol. Meth. 231: 25; 국제 특허 출원 공개 WO 94/04678 및 WO 94/25591; 미국 특허 6,005,079 참조). 한 실시태양에서, 본 발명은 단일 도메인 항체가 형성되도록 변형부를 갖는 2개의 VH 도메인을 포함하는 단일 도메인 항체를 제공한다.
- [0152] 또한, 본 발명의 방법은 포유동물, 바람직하게는 인간에서 반감기 (예를 들어 혈청 반감기)가 15일 초과, 바람직하게는 20일 초과, 25일 초과, 30일 초과, 35일 초과, 40일 초과, 45일 초과, 2개월 초과, 3개월 초과, 4개월 초과, 또는 5개월 초과인 인간화 항체 또는 그의 단편의 사용을 포함한다. 포유동물, 바람직하게는 인간에서 본 발명의 인간화 항체 또는 그의 단편의 증가된 반감기는 포유동물에서 상기 항체 또는 항체 단편의 보다 높은 혈청 역가를 생성시키고, 따라서 상기 항체 또는 항체 단편의 투여 빈도를 감소시키고/시킴거나 투여될 상기 항체 또는 항체 단편의 농도를 감소시킨다. 생체내 반감기가 증가된 항체 또는 그의 단편은 당업계의 숙련인에게 공지된 기술로 생성할 수 있다. 예를 들어, 생체내 반감기가 증가된 항체 또는 그의 단편은 Fc 도메인과 FcRn 수용체 사이의 상호작용에 관여하는 것으로 확인된 아미노산 잔기를 변형시킴으로써 (예를 들어, 치환하거나, 결실시키거나 부가함으로써) 생성할 수 있다. 본 발명의 인간화 항체는 생물학적 반감기를 증가시키기 위해 워드 (Ward) 등에 의해 설명된 방법으로 공학처리될 수 있다 (미국 특허 6,277,375 B1 참조). 예를 들어, 본 발명의 인간화 항체는 증가된 생체내 또는 혈청 반감기를 갖도록 Fc-헹지 도메인에서 공학처리될 수 있다.

- [0153] 생체내 반감기가 증가된 항체 또는 그의 단편은 상기 항체 또는 항체 단편을 중합체 분자, 예를 들어 고분자량 폴리에틸렌글리콜 (PEG)에 부착시켜 생성될 수 있다. PEG는 상기 항체 또는 항체 단편에 다관능성 연결기를 사용하거나 사용하지 않고 상기 항체 또는 항체 단편의 N- 또는 C-말단에 PEG의 부위-특이적 컨쥬게이션을 통해 또는 리신 잔기 상에 존재하는 엡실론-아미노기를 통해 부착될 수 있다. 생물학적 활성의 최소 손실을 일으키는 선형 또는 분지형 중합체 유도화가 이용될 것이다. 항체에 PEG 분자의 적절한 컨쥬게이션을 보장하도록 컨쥬게이션 정도는 SDS-PAGE 및 질량 분광법에 의해 엄밀하게 모니터링될 것이다. 미반응 PEG는 예를 들어, 크기 배제 또는 이온-교환 크로마토그래피에 의해 항체-PEG 컨쥬게이트로부터 분리될 수 있다.
- [0154] 본 발명의 인간화 항체는 또한 면역원성 반응이 실질적으로 없이 포유동물 순환계 내로 주사될 수 있는 조성물을 제공하기 위해 데이비스 (Davis) 등 (미국 특허 4,179,337 참조)에 의해 설명된 방법 및 커플링제에 의해 변형될 수 있다.
- [0155] 본 발명은 또한 프레임워크 또는 CDR 영역에서 돌연변이 (예를 들어, 하나 이상의 아미노산 치환)를 갖는 본 발명의 임의의 항체의 아미노산 서열을 포함하는 인간화 항체 또는 항체 단편의 사용을 포함한다. 바람직하게는, 이들 인간화 항체에서 돌연변이는 면역특이적으로 결합하는 CD32B에 대한 항체의 결합력 및/또는 친화도를 유지하거나 향상시킨다. 특정 항원에 대한 항체의 친화도를 분석하기 위해 당업계의 숙련인에게 공지된 표준 기술 (예를 들어, 면역분석)이 사용될 수 있다.
- [0156] 본 발명은 본 발명의 인간화 항체의 프레임워크 잔기의 변형을 포함한다. 프레임워크 영역의 프레임워크 잔기는 항원 결합을 변경, 바람직하게는 개선시키기 위해 CDR 공여 항체로부터의 대응하는 잔기로 치환될 수 있다. 상기 프레임워크 치환은 당업계에 공지된 방법, 예를 들어 항원 결합에 중요한 프레임워크 잔기를 확인하기 위한 CDR과 프레임워크 잔기의 상호작용의 모델링 및 특정 위치의 비정상적인 프레임워크 잔기를 확인하기 위한 서열 비교에 의해 확인된다 (예를 들어 그 전부가 본원에 참고로 포함된 미국 특허 5,585,089; 및 Riechmann et al., 1988, Nature 332:323 참조).
- [0157] 본 발명은 하나 이상의 Fc γ R에 대한 항체의 결합 친화도를 변경시키는, 바람직하게는 Fc 영역 내의 변형을 포함하는 인간화 항체를 포함한다. 하나 이상의 Fc γ R에 대한 변형된 결합을 갖는 항체의 변형 방법은 당업계에 공지되어 있다 (예를 들어 그 전부가 본원에 참고로 포함된 PCT 출원 공개 WO 04/029207, WO 04/029092, WO 04/028564, WO 99/58572, WO 99/51642, WO 98/23289, WO 89/07142, WO 88/07089, 및 미국 특허 5,843,597 및 5,642,821 참조). 본 발명은 그 전부가 본원에 참고로 포함된, 각각 2003년 1월 9일 및 2003년 3월 19일 출원된 60/439,498 및 60/456,041에 개시된 임의의 돌연변이를 포함한다. 몇몇 실시태양에서, 본 발명은 활성화 Fc γ R, 예를 들어 Fc γ RIIIA에 대한 변형된 친화도를 갖는 항체를 포함한다. 바람직하게는, 상기 변형은 또한 변경된 Fc-매개 이펙터 기능을 갖는다. Fc-매개 이펙터 기능에 영향을 주는 변형은 당업계에 공지되어 있다 (그 전부가 본원에 참고로 포함된 미국 특허 6,194,551 참조). 본 발명의 방법에 따라 변형될 수 있는 아미노산은 프롤린 329, 프롤린 331 및 리신 322를 포함하고 이로 제한되지 않는다. 프롤린 329, 프롤린 331 및 리신 322는 바람직하게는 알라닌으로 치환된다. 그러나, 임의의 다른 아미노산을 사용한 치환도 생각된다 (그 전부가 본원에 참고로 포함된 국제 특허 출원 공개 WO 00/42072 및 미국 특허 6,194,551 참조).
- [0158] 한 특정 실시태양에서, Fc 영역의 변형은 Fc 영역에서 하나 이상의 돌연변이를 포함한다. Fc 영역에서 하나 이상의 돌연변이는 변경된 항체-매개 이펙터 기능, 다른 Fc 수용체 (예를 들어 Fc 활성화 수용체)에 대한 변경된 결합, 변경된 ADCC 활성, 또는 변경된 C1q 결합 활성, 변경된 보체 의존성 세포독성 활성, 대식세포 활성 또는 이들의 임의의 조합을 갖는 항체를 생성시킬 수 있다.
- [0159] 본 발명은 또한 올리고사카라이드 함량이 변경된 인간화 항체를 제공한다. 본원에 사용되는 올리고사카라이드는 2 이상의 간단한 당을 포함하는 탄수화물을 의미하고, 두 용어는 본원에서 상호교환가능하게 사용될 수 있다. 본 발명의 탄수화물 잔기는 당업계에서 통상 사용되는 명명법을 참고로 하여 설명할 것이다. 탄수화물 화학에 대해서는 예를 들어 그 전부가 본원에 참고로 포함된 문헌 [Hubbard et al., 1981 Ann. Rev. Biochem., 50:555-583]을 참조한다. 상기 명명법은 예를 들어 만노스를 나타내는 Man; 2-N-아세틸글루코사민을 나타내는 GlcNAc; 갈락토스를 나타내는 Gal; 푸코스를 나타내는 Fuc 및 글루코스를 나타내는 Glc를 포함한다. 시알산은 5-N-아세틸뉴라민산에 대한 약어 NeuNAc 및 5-글리코뉴라민산에 대한 약어 NeuNGc로 설명된다.
- [0160] 일반적으로, 항체는 중쇄의 불변 영역 내의 보존 위치에 탄수화물 잔기를 포함하고, 30% 이하의 인간 IgG는 글리코실화된 Fab 영역을 갖는다. IgG는 CH2 도메인에 위치하는 Asn 297에 단일 N-연결된 2안테나 (biantennary) 탄수화물 구조를 갖는다 (Jefferis et al., 1998, Immunol. Rev. 163:59-76; Wright et al.,

1997, Trends Biotech 15:26-32). 인간 IgG는 전형적으로 GlcNAc(푸코스)-GlcNAc-Man-(ManGlcNAc)₂ 구조의 탄수화물을 갖는다. 그러나, 탄수화물 함량 내의 IgG 중의 변형이 발생하여 기능을 변경시킨다 (예를 들어 문헌 [Jassal et al., 2001 Biochem. Biophys. Res. Commun. 288: 243-9; Groenink et al., 1996 J. Immunol. 26: 1404-7; Boyd et al., 1995 Mol. Immunol. 32: 1311-8; Kumpel et al., 1994, Human Antibody Hybridomas, 5: 143-51] 참조). 본 발명은 Asn 297에 부착된 탄수화물 잔기의 변형을 포함하는 인간화 항체를 포함한다. 한 실시태양에서, 탄수화물 잔기는 말단 GlcNAc 및/또는 제3 GlcNAc 암 (GlcNAc를 양분하는)의 하나 또는 둘 모두에 갈락토스 및/또는 갈락토스-시알산을 갖는다.

[0161] 몇몇 실시태양에서, 본 발명의 인간화 항체에는 실질적으로 하나 이상의 선택된 당기, 예를 들어 하나 이상의 시알산 잔기, 하나 이상의 갈락토스 잔기, 하나 이상의 푸코스 잔기가 존재하지 않는다. 실질적으로 하나 이상의 선택된 당기가 존재하지 않는 항체는 예를 들어 탄수화물 잔기에 부착된 선택된 당기(들)이 조성물 내의 약 90-100%의 항체에 결여되도록 항체의 탄수화물 잔기에 대한 선택된 당기(들)의 부가에 결함이 있는 숙주 세포에서 본 발명의 항체를 재조합 방식으로 생산하는 것을 포함하여 당업계의 숙련인에게 공지된 통상의 방법을 사용하여 제조할 수 있다. 상기 항체 제조의 다른 방법은 예를 들어 하나 이상의 선택된 당기의 부가를 억제 또는 감소시키는 조건 하에 세포의 배양, 또는 하나 이상의 선택된 당기의 번역후 제거를 포함한다.

[0162] 특정 실시태양에서, 본 발명은 실질적으로 균질한 항체 제제를 생산하는 방법을 포함하고, 여기서 조성물 내의 약 80-100%의 항체에는 그의 탄수화물 잔기 상에 푸코스가 결여된다. 항체는 예를 들어 (a) 그 내부에서 발현되는 단백질을 푸코실화시키는 능력이 감소되도록 푸코스 대사가 결핍된 공학처리된 숙주 세포의 사용; (b) 푸코실화를 억제 또는 감소시키는 조건 하에 세포의 배양; (c) 예를 들어 푸코시다제 효소를 사용한 푸코스의 번역후 제거; 또는 (d) 푸코실화되지 않은 생성물을 선택하기 위한 항체의 정제에 의해 제조할 수 있다. 가장 바람직하게는, 목적하는 항체를 코딩하는 핵산은 그 내부에서 발현되는 항체를 푸코실화하는 능력이 감소된 숙주 세포에서 발현된다. 바람직하게는, 숙주 세포는 Lec 13 CHO 세포 (랜틴 내성 CHO 돌연변이체 세포주; Ribka & Stanley, 1986, Somatic Cell & Molec. Gen. 12(1): 51-62; Ripka et al., 1986 Arch. Biochem. Biophys. 249 (2): 533-45), 항체가 실질적으로 푸코실화되지 않도록 변형된 CHO-K1, DUX-B11, CHO-DP12 또는 CHO-DG44이다. 따라서, 세포는 효소가 세포에서 감소된 활성 및/또는 감소된 발현 수준을 갖도록 푸코스의 N-연결된 올리고사카라이드에 대한 첨가에 관련되는 푸코실트랜스퍼라제 효소, 또는 다른 효소 또는 기질에 대해 변경된 발현 및/또는 활성을 보일 수 있다. 변경된 푸코스 함량을 갖는 항체를 제조하는 방법에 대해서는 예를 들어 그 전부가 본원에 참고로 포함된 WO 03/035835 및 문헌 [Shields et al., 2002, J. Biol. Chem. 277(30): 26733-40]을 참고한다.

[0163] 일부 실시태양에서, 변경된 탄수화물 변형은 항체의 가용화, 항체의 세포 소기관으로의 수송 및 분비의 용이성, 항체 조립의 촉진, 형태 통합성 및 항체 매개 이펙터 기능 중의 하나 이상을 조절한다. 특정 실시태양에서, 변경된 탄수화물 변형은 탄수화물 변형이 결여된 항체에 비해 항체 매개 이펙터 기능을 향상시킨다. 변경된 항체 매개 이펙터 기능을 야기하는 탄수화물 변형은 당업계에 공지되어 있다 (예를 들어 Shields R. L. et al., 2001, J. Biol. Chem. 277(30): 26733-40; Davies J. et al., 2001, Biotechnology & Bioengineering, 74(4): 288-294 참조). 다른 특정 실시태양에서, 변경된 탄수화물 변형은 본 발명의 항체의 Fc γ RIIB 수용체에 대한 결합을 향상시킨다. 본 발명에 따른 탄수화물 변형의 변경은 예를 들어 항체의 탄수화물 함량의 증가 또는 항체의 탄수화물 함량의 감소를 포함한다. 탄수화물 함량의 변경 방법은 당업계의 숙련인에게 공지되어 있다 (예를 들어 그 전부가 본원에 참고로 포함된 Wallick et al., 1988, Journal of Exp. Med. 168(3): 1099-1109; Tao et al., 1989 Journal of Immunology, 143(8): 2595-2601; Routledge et al., 1995 Transplantation, 60(8): 847-53; Elliott et al. 2003; Nature Biotechnology, 21: 414-21; Shields et al. 2002 Journal of Biological Chemistry, 277(30): 26733-40 참조).

[0164] 일부 실시태양에서, 본 발명은 하나 이상의 글리코실화 잔기가 항체에 공유 부착되도록 하나 이상의 글리코실화 부위를 포함하는 인간화 항체를 포함한다. 다른 실시태양에서, 본 발명은 상기 문헌에 개시되고 당업계의 숙련인에게 공지되어 있는 것과 같은 하나 이상의 글리코실화 부위 및 Fc 영역의 하나 이상의 변형을 포함하는 인간화 항체를 포함한다. 바람직한 실시태양에서, Fc 영역의 하나 이상의 변형은 야생형 Fc 영역을 포함하는 항체에 비해 활성화 Fc γ R, 예를 들어 Fc γ RIIA에 대한 항체의 친화도를 개선시킨다. 하나 이상의 글리코실화 부위 및/또는 Fc 영역의 하나 이상의 변형을 갖는 본 발명의 인간화 항체는 향상된 항체 매개 이펙터 기능, 예를 들어 향상된 ADCC 활성을 갖는다. 몇몇 실시태양에서, 본 발명은 위치 241, 243, 244, 245, 245, 249, 256, 258, 260, 262, 264, 265, 296, 299 및 301의 아미노산을 포함하여 이로 제한되지 않는, 항체의 탄수화물 잔기와 직접적으로 또는 간접적으로 상호작용하는 것으로 알려진 아미노산의 하나 이상의 변형을 포함하는 항체를

추가로 포함한다. 항체의 탄수화물 잔기와 직접적으로 또는 간접적으로 상호작용하는 아미노산은 당업계에 공지되어 있다 (예를 들어 Jefferis et al., 1995 Immunology Letters, 44: 111-7 참조).

[0165] 본 발명은 바람직하게는 항체의 기능성, 예를 들어 Fc γ RIIB에 대한 결합 활성을 변경시키지 않으면서 하나 이상의 글리코실화 부위를 항체의 하나 이상의 부위에 도입함으로써 변형시킨 인간화 항체를 포함한다. 글리코실화 부위는 본 발명의 항체의 가변 및/또는 불변 영역 내로 도입될 수 있다. 본원에서 사용되는 "글리코실화 부위"는 올리고사카라이드 (즉 함께 연결되는 2 이상의 간단한 당을 포함하는 탄수화물)가 특이적으로 공유 부착되는 항체 내의 임의의 특정 아미노산 서열을 포함한다. 올리고사카라이드 측쇄는 전형적으로 N- 또는 O-연결을 통해 항체의 주쇄에 연결된다. N-연결된 글리코실화는 올리고사카라이드 잔기의 아스파라긴 잔기의 측쇄에 대한 부착을 의미한다. O-연결된 글리코실화는 올리고사카라이드 잔기의 히드록시아미노산, 예를 들어 세린, 트레오닌에 대한 부착을 의미한다. 본 발명의 항체는 N-연결된 및 O-연결된 글리코실화 부위를 포함하여 하나 이상의 글리코실화 부위를 포함할 수 있다. 당업계에 공지된 N-연결된 또는 O-연결된 글리코실화를 위한 임의의 글리코실화 부위를 본 발명에 따라 사용될 수 있다. 본 발명의 방법에 따라 유용한 예시적인 N-연결된 글리코실화 부위는 아미노산 서열 Asn-X-Thr/Ser (여기서, X는 임의의 아미노산일 수 있고, Thr/Ser은 트레오닌 또는 세린을 나타낸다)이다. 상기 부위 또는 부위들은 본 발명이 속하는 당업계에 공지된 방법을 이용하여 본 발명의 항체 내로 도입될 수 있다 (예를 들어 본원에 참고로 포함된 "In vitro Mutagenesis", Recombinant DNA: A Short Course, J. D. Watson, et al. W. H. Freeman and Company, New York, 1983, chapter 8, pp. 106-116 참조). 글리코실화 부위를 본 발명의 항체 내로 도입하기 위한 예시적인 방법은 목적하는 Asn-X-Thr/Ser 서열을 얻도록 항체의 아미노산 서열을 변형 또는 돌연변이시키는 것을 포함할 수 있다.

[0166] 몇몇 특정 실시태양에서, 본 발명은 위치 50의 글리코실화 부위가 제거되도록 CDR2 영역의 N-글리코실화 컨센스 부위 Asn₅₀-Val-Ser이 변형된 변형 인간화 Fc γ RIIB 항체의 사용을 포함한다. 특정 작용 메커니즘에 매이기를 의도하지 않지만, 글리코실화 부위의 제거는 항체 생산시의 잠재적인 변동 및 제약 용도에서 효능있는 면역원성을 제한할 수 있다. 특정 실시태양에서, 본 발명은 위치 50의 아미노산이 변형, 예를 들어 결실 또는 치환된 인간화 Fc γ RIIB 항체의 사용을 포함한다. 다른 특정 실시태양에서, 본 발명은 위치 51에서 아미노산 변형, 예를 들어 결실 또는 치환을 갖는 항체의 사용을 추가로 포함한다. 한 특정 실시태양에서, 본 발명은 위치 50의 아미노산이 티로신으로 치환된 인간화 Fc γ RIIB 항체의 사용을 포함한다. 다른 보다 특정한 실시태양에서, 본 발명은 위치 50의 아미노산이 티로신으로 치환되고 위치 51의 아미노산이 알라닌으로 치환된 인간화 Fc γ RIIB 항체의 사용을 포함한다.

[0167] 몇몇 실시태양에서, 본 발명은 글리코실화 부위의 추가 또는 삭제에 의해 본 발명의 항체의 탄수화물 함량을 변경시키는 방법을 포함한다. 항체의 탄수화물 함량을 변형시키는 방법은 당업계에 공지되어 있고, 본 발명에 포함된다 (예를 들어 그 전부가 본원에 참고로 포함된 미국 특허 6,218,149; EP 0 359 096 B1; 미국 특허 출원 공개 US 2002/0028486; WO 03/035835; 미국 특허 출원 공개 2003/0115614; 미국 특허 6,218,149, 미국 특허 6,472,511 참조). 다른 실시태양에서, 본 발명은 항체의 하나 이상의 내인성 탄수화물 잔기를 삭제함으로써 본 발명의 항체의 탄수화물 함량을 변형시키는 방법을 포함한다.

[0168] 본 발명은 본원에 개시되거나 당업계에 공지된 방법을 사용하여 항체의 탄수화물 함량을 변형시키는 것을 포함하는, 본 발명의 항체의 이펙터 기능을 변경시키는 방법을 포함한다.

[0169] 항체 또는 그의 단편을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열에 돌연변이를 도입시키기 위해 당업계의 숙련인에게 공지된 표준 기술, 예를 들어 부위-지정 돌연변이생성 및 PCR-매개 돌연변이 생성이 사용될 수 있고, 이는 아미노산 치환을 일으킨다. 바람직하게는, 유도체는 원래 항체 또는 그의 단편에 비해 15개 미만의 아미노산 치환, 10개 미만의 아미노산 치환, 5개 미만의 아미노산 치환, 4개 미만의 아미노산 치환, 3개 미만의 아미노산 치환 또는 2개 미만의 아미노산 치환을 포함한다. 바람직한 실시태양에서, 유도체는 하나 이상의 예측된 비-필수 아미노산 잔기에서 이루어진 보존적 아미노산 치환을 갖는다.

[0170] 또한, 본 발명은 각각 ATCC 기탁 번호 PTA-4591, PTA-4592, PTA-5958, PTA-5961, PTA-5962, PTA-5960 및 PTA-5959의 클론 2B6, 3H7, 1D5, 2E1, 2H9, 2D11 또는 1F2에 의해 생성된 마우스 모노클로날 항체의 가변 중쇄 및/또는 경쇄의 아미노산 서열에 적어도 45%, 적어도 50%, 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 적어도 99% 동일한 가변 중쇄 및/또는 가변 경쇄의 아미노산 서열을 포함하는 인간화 항체 또는 그의 단편을 포함한다. 본 발명은 추가로 항체 또는 그의 단편이 Fc γ RIIA에 결합하는 것보다 더 큰 친화도로 Fc γ RIIB에 특이적으로 결합하는 항체 또는 그의 단편을 포함하고, 상기 항체 또는 항체 단편은 각각 ATCC 기탁 번호 PTA-4591, PTA-4592, PTA-5958, PTA-5961, PTA-5962,

PTA-5960 및 PTA-5959의 클론 2B6, 3H7, 1D5, 2E1, 2H9, 2D11 또는 1F2에 의해 생성된 마우스 모노클로날 항체의 하나 이상의 CDR의 아미노산 서열에 적어도 45%, 적어도 50%, 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 적어도 99% 동일한 하나 이상의 CDR의 아미노산 서열을 포함한다. 두 아미노산 서열의 동일성 비율의 결정은 BLAST 단백질 검색을 포함하여 당업계의 숙련인에게 공지된 임의의 방법에 의해 결정할 수 있다.

[0171] 또한, 본 발명은 항체 또는 그의 단편이 Fc γ RIIA에 결합하는 것보다 더 큰 친화도로 Fc γ RIIB에 특이적으로 결합하는 인간화 항체 또는 항체 단편의 용도를 포함하고, 여기서 상기 항체 또는 항체 단편은 엄격한 조건 하에 각각 ATCC 기탁 번호 PTA-4591, PTA-4592, PTA-5958, PTA-5961, PTA-5962, PTA-5960 및 PTA-5959의 클론 2B6, 3H7, 1D5, 2E1, 2H9, 2D11 또는 1F2에 의해 생성된 마우스 모노클로날 항체의 뉴클레오티드 서열에 혼성화하는 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩된다. 바람직한 실시태양에서, 본 발명은 항체 또는 그의 단편이 Fc γ RIIA에 결합하는 것보다 더 큰 친화도로 Fc γ RIIB에 특이적으로 결합하는 항체 또는 그의 단편을 제공하고, 상기 항체 또는 항체 단편은 엄격한 조건 하에 각각 ATCC 기탁 번호 PTA-4591, PTA-4592, PTA-5958, PTA-5961, PTA-5962, PTA-5960 및 PTA-5959의 클론 2B6, 3H7, 1D5, 2E1, 2H9, 2D11 또는 1F2에 의해 생성된 마우스 모노클로날 항체의 가변 경쇄 및/또는 가변 중쇄의 뉴클레오티드 서열에 혼성화하는 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩되는 가변 경쇄 및/또는 가변 중쇄를 포함한다. 다른 바람직한 실시태양에서, 본 발명은 항체 또는 그의 단편이 Fc γ RIIA에 결합하는 것보다 더 큰 친화도로 Fc γ RIIB에 특이적으로 결합하는 항체 또는 그의 단편을 제공하고, 상기 항체 또는 항체 단편은 각각 ATCC 기탁 번호 PTA-4591, PTA-4592, PTA-5958, PTA-5961, PTA-5962, PTA-5960 및 PTA-5959의 클론 2B6, 3H7, 1D5, 2E1, 2H9, 2D11 또는 1F2에 의해 생성된 마우스 모노클로날 항체의 하나 이상의 CDR의 뉴클레오티드 서열에 엄격한 조건 하에 혼성화하는 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩되는 하나 이상의 CDR을 포함한다. 엄격한 혼성화 조건은 약 45℃에서 6X 염화나트륨/시트르산나트륨 (SSC) 중에서 필터 결합 DNA의 혼성화, 이어서 약 50-65℃에서 0.2X SSC/0.1% SDS 중에서 1회 이상의 세척, 약 45℃에서 6X SSC 중에서 필터 결합 DNA의 혼성화, 이어서 약 60℃에서 0.1X SSC/0.2% SDS 중에서 1회 이상의 세척의 고엄격 조건, 또는 당업계의 숙련인에게 공지된 다른 임의의 엄격한 혼성화 조건 (예를 들어 본원에 참고로 포함된 Ausubel, F.M. et al., eds. 1989 Current Protocols in Molecular Biology, vol. 1, Green Publishing Associates, Inc. and John Wiley and Sons, Inc., NY at pages 6.3.1 to 6.3.6 and 2.10.3, 참조)을 포함하고, 이로 제한되지 않는다.

[0172] 5.1.1. 항체 컨쥬게이트

[0173] 본 발명은 융합 단백질을 생성하기 위해 이중 폴리펩티드 (즉, 비관련 폴리펩티드; 또는 그의 일부, 바람직하게는 폴리펩티드의 적어도 10, 적어도 20, 적어도 30, 적어도 40, 적어도 50, 적어도 60, 적어도 70, 적어도 80, 적어도 90 또는 적어도 100개의 아미노산)에 재조합 방식으로 융합되거나 화학적으로 컨쥬게이팅된 (공유 및 비공유 컨쥬게이션 포함) 인간화 항체를 포함한다. 융합은 반드시 직접적인 필요는 없지만, 링커 서열을 통해 발생할 수 있다. 인간화 항체는 예를 들어 특정 세포 표면 수용체에 특이적인 항체에 항체를 융합 또는 컨쥬게이팅시켜 이중 폴리펩티드를 시험관 내 또는 생체 내에서 특정 세포 종류를 표적화시키기 위해 사용될 수 있다. 이중 폴리펩티드에 융합되거나 컨쥬게이팅된 항체도 당업계에 공지된 방법을 사용하여 시험관내 면역분석 및 정제 방법에 사용될 수 있다 (예를 들어 그 전부가 본원에 참고로 포함된 PCT 공개 WO 93/21232; EP 439,095; Naramura et al., 1994, Immunol. Lett., 39:91-99; 미국 특허 5,474,981; Gillies et al., 1992, Proc Natl Acad Sci, 89: 1428-1432; 및 Fell et al., 1991, J. Immunol., 146: 2446-2452 참조).

[0174] 또한, 인간화 항체는 소정의 생물학적 반응을 변형시키는 치료제 또는 약물 잔기에 컨쥬게이팅될 수 있다. 치료제 또는 약물 잔기는 전통적인 화학 치료제로 제한되는 것으로 생각하지 않아야 한다. 예를 들어, 약물 잔기는 목적하는 생물학적 활성을 갖는 단백질 또는 폴리펩티드일 수 있다. 상기 단백질은 예를 들어 독소, 예를 들어 아브린, 리신 A, 슈도모나스 (pseudomonas) 외독소 (즉 PE-40), 또는 디프테리아 독소, 리신, 겔로닌 및 역새폴 항바이러스 단백질, 단백질, 예를 들어 종양 괴사 인자, 인터페론, 비제한적인 예를 들어 α -인터페론 (IFN- α), β -인터페론 (IFN- β), 신경 성장 인자 (NGF), 혈소관 유래 성장 인자 (PDGF), 조직 플라스미노겐 활성화제 (TPA), 세포자멸제 (예를 들어 PCT 공개 WO 97/33899에 개시된 TNF- α , TNF- β , AIM I), AIM II (예를 들어 PCT 공개 WO 97/34911), Fas 리간드 (Takahashi et al., 1994 J. Immunol., 6: 1567-1574) 및 VEGI (PCT 공개 WO 99/23105), 혈전제 또는 항-혈관신생제 (예를 들어 안지오테라틴 또는 엔도스테라틴) 또는 생물학적 반응 변형제, 예를 들어 림포킨 (예를 들어 인터루킨-1 ("IL-1"), 인터루킨-2 ("IL-2"), 인터루킨-6 ("IL-6"), 과립구 대식세포 콜로니 자극 인자 ("GM-CSF") 및 과립구 콜로니 자극 인자 ("G-CSF"), 대식세포 콜로니 자극 인자 ("M-CSF") 또는 성장 인자 (예를 들어 성장 호르몬 ("GH"); 프로테아제 또는 리보뉴클레아제를 포함할 수 있다.

- [0175] 인간화 항체는 정제를 용이하게 하기 위해 마커 서열, 예를 들어 펩티드에 융합될 수 있다. 바람직한 실시태양에서, 마커 아미노산 서열은 무엇보다도 헥사-히스티딘 펩티드, 예를 들어 pQE 벡터에 제공된 태그 (퀴아겐, 인크. (QIAGEN, Inc.), 미국 91311 캘리포니아주 차쓰워스 이튼 애비뉴 9259)이고, 많은 경우 상업적으로 입수가 가능하다. 문헌 [Gentz et al., 1989 Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86: 821-824]에 기재된 바와 같이, 예를 들어 헥사-히스티딘은 융합 단백질의 편리한 정제를 제공한다. 정제에 유용한 다른 펩티드 태그는 인플루엔자 헤마글루티닌 단백질로부터 유래한 에피토프에 대응하는 헤마글루티닌 "HA" 태그 (Wilson et al., 1984 Cell, 37: 767) 및 "플래그 (flag)" 태그 (Knappik et al., 1994 Biotechniques, 17(4):754-761)를 포함하고 이로 제한되지 않는다.
- [0176] 본 발명은 항체 단편에 융합되거나 컨쥬게이팅된 이중 폴리펩티드를 포함하는 조성물을 추가로 포함한다. 예를 들어, 이중 폴리펩티드는 Fab 단편, Fd 단편, Fv 단편, F(ab)₂ 또는 그의 일부에 융합되거나 컨쥬게이팅될 수 있다. 폴리펩티드를 항체 일부에 융합시키거나 컨쥬게이팅시키는 방법은 당업계에 공지되어 있다 (예를 들어 그 전부가 본원에 참고로 포함된 미국 특허 5,336,603, 5,622,929, 5,359,046, 5,349,053, 5,447,851 및 5,112,946; EP 307,434; EP 367,166; 국제 특허 출원 공개 WO 96/04388 및 WO 91/06570; Ashkenazi et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 10535-10539; Zheng et al., 1995, J. Immunol. 154: 5590-5600; 및 Vil et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:11337-11341 참조).
- [0177] 추가의 융합 단백질은 유전자-서플링, 모티프-서플링, 엑손-서플링 및/또는 코돈-서플링 (집합적으로 "DNA 서플링"으로 부름)의 기술을 통해 생성될 수 있다. DNA 서플링은 본 발명의 항체 또는 그의 단편의 활성을 변경시키기 위해 사용될 수 있다 (예를 들어 보다 높은 친화도 및 보다 낮은 해리 속도를 갖는 항체 또는 그의 단편) (일반적으로 각각 그 전부가 본원에 참고로 포함된 미국 특허 5,605,793; 5,811,238; 5,830,721; 5,834,252 및 5,837,458, 및 Fatten et al., 1997, Curr. Opinion Biotechnol. 8: 724-33; Harayama, 1998, Trends Biotechnol. 16: 76; Hansson, et al., 1999, J. Mol. Biol. 287: 265; 및 Lorenzo and Blasco, 1998, Biotechniques 24: 308 참조). 항체 또는 그의 단편, 또는 코딩되는 항체 또는 그의 단편은 재조합 전에 실수 유발 PCR, 랜덤 뉴클레오티드 삽입 또는 다른 방법에 의해 랜덤 돌연변이 유발에 적용하여 변경시킬 수 있다. 그 일부가 Fc γ RIIB에 특이적으로 결합하는 항체 또는 항체 단편을 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 하나 이상의 부분은 하나 이상의 이중 분자의 하나 이상의 성분, 모티프, 섹션, 부분, 도메인, 단편 등과 재조합될 수 있다.
- [0178] 본 발명은 또한 혈청 반감기 증가가 요구되는 진단 또는 치료제 또는 임의의 다른 분자에 컨쥬게이팅된 인간화 항체를 포함한다. 인간화 항체는 예를 들어 제시된 처리 요법의 효능을 결정하기 위해 예를 들어 임상 시험 과정의 일부로서 질병, 질환 또는 감염의 발생 또는 진행을 모니터링하기 위해 진단적으로 사용될 수 있다. 검출은 항체를 검출가능한 기질에 커플링시켜 용이해질 수 있다. 검출가능한 기질의 예는 다양한 효소, 보조균, 형광 물질, 발광 물질, 생체발광 물질, 방사성 물질, 양전자 방출 금속 및 비방사성 상자성 금속 이온을 포함한다. 검출가능한 기질은 당업계에 공지된 기술을 사용하여 직접적으로 또는 중간체 (예를 들어 당업계에 공지된 링커)를 통해 간접적으로 항체에 커플링되거나 컨쥬게이팅될 수 있다. 예를 들어, 본 발명에 따라 진단제로서 사용하기 위한 항체에 컨쥬게이팅될 수 있는 금속 이온에 대해서는 미국 특허 4,741,900을 참조한다. 상기 진단 및 검출은 항체를 양고추냉이 퍼옥시다제, 알칼린 포스파타제, 베타-갈락토시다제 또는 아세틸콜린스테라제를 포함하고 이로 제한되지 않는 상이한 효소; 스트렙타비딘/비오틴 및 아비딘/비오틴을 포함하고 이로 제한되지 않는 보조균 복합체; 움벨리페론, 플루오레신, 플루오레신 이소티오시아네이트, 로다민, 디클로로트리아지닐아민 플루오레신, 단일 클로라이드 또는 피코에리스린을 포함하고 이로 제한되지 않는 형광 물질; 루미놀을 포함하고 이로 제한되지 않는 발광 물질; 루시페라제, 루시페린 및 아에쿠오린을 포함하고 이로 제한되지 않는 생체발광 물질; 비스무트 (²¹³Bi), 탄소 (¹⁴C), 크롬 (⁵¹Cr), 코발트 (⁵⁷Co), 불소 (¹⁸F), 가돌리늄 (¹⁵³Gd, ¹⁵⁹Gd), 갈륨 (⁶⁸Ga, ⁶⁷Ga), 게르마늄 (⁶⁸Ge), 홀름 (¹⁶⁶Ho), 인듐 (¹¹⁵In, ¹¹³In, ¹¹²In, ¹¹¹In), 요오드 (¹³¹I, ¹²⁵I, ¹²³I, ¹²¹I), 란타넘 (¹⁴⁰La), 루테튬 (¹⁷⁷Lu), 망간 (⁵⁴Mn), 몰리브덴 (⁹⁹Mo), 팔라듐 (¹⁰³Pd), 인 (³²P), 프라세오디뮴 (¹⁴²Pr), 프로메튬 (¹⁴⁹Pm), 레늄 (¹⁸⁶Re, ¹⁸⁸Re), 로듐 (¹⁰⁵Rh), 루테튬 (⁹⁷Ru), 사마륨 (¹⁵³Sm), 스칸듐 (⁴⁷Sc), 셀레늄 (⁷⁵Se), 스트론튬 (⁸⁵Sr), 황 (³⁵S), 테크네튬 (⁹⁹Tc), 티타늄 (²⁰¹Ti), 주석 (¹¹³Sn, ¹¹⁷Sn), 트리튬 (³H), 제논 (¹³³Xe), 이터븀 (¹⁶⁹Yb, ¹⁷⁵Yb), 이트륨 (⁹⁰Y), 아연 (⁶⁵Zn)을 포함하고 이로 제한되지 않는 방사성 물질; 다양한 양전자 방출 단층촬영을 이용하는 양전자 방출 금속 및 비방사성 상자성 금속 이온을 포함하고 이로 제한되지 않는 검출가능한 기질에 커플링시켜 달성할 수 있다.
- [0179] 항체는 치료 잔기, 예를 들어 세포독소 (예를 들어 세포증식억제 또는 세포파괴제), 치료제 또는 방사성 원소

(예를 들어 알파-방사체, 감마-방사체 등)에 컨쥬게이팅될 수 있다. 세포독소 또는 세포독성제는 세포에 유해한 임의의 물질을 포함한다. 그 예는 파클리탁솔, 시토칼라신 B, 그라미시딘 D, 에티뎀 브로마이드, 에메틴, 미토마이신, 에토포시드, 테노포시드, 빈크리스틴, 빈블라스틴, 콜히친, 독소루비신, 다우노루비신, 디히드록시안트라신 디온, 미톡산트론, 미트라마이신, 악티노마이신 D, 1-데히드로테스토스테론, 글루코코르티코이드, 프로카인, 테트라카인, 리도카인, 프로프라놀롤 및 푸로마이신 및 이들의 유사체 및 상동체를 포함한다. 치료제는 항대사제 (예를 들어 메토타렉세이트, 6-머캅토피린, 6-티오구아닌, 시타라빈, 5-플루오로우라실 데카르바진), 알킬화제 (예를 들어 메클로르에타민, 티오에과 클로람부실, 멜팔란, 카르무스틴 (BSNU) 및 로무스틴 (CCNU), 시클로포스파미드, 부술판, 디브로모만니톨, 스트렙토조토신, 미토마이신 C 및 시스디클로로디아민 백금 (II) (DDP) 시스플라틴), 안트라시클린 (예를 들어 다우노루비신 (예전의 다우노마이신) 및 독소루비신), 항생제 (예를 들어 닥티노마이신 (예전의 악티노마이신), 블레오마이신, 미트라마이신 및 안트라마이신 (AMC)), 및 항유사분열제 (예를 들어 빈크리스틴 및 빈블라스틴)을 포함하고 이로 제한되지 않는다.

[0180] 또한, 인간화 항체는 치료 잔기, 예를 들어 방사성 물질 또는 방사성금속 이온 컨쥬게이팅에 유용한 거대고리 킬레이터에 컨쥬게이팅될 수 있다 (방사성 물질의 예에 대해서는 상기 참조). 특정 실시태양에서, 거대고리 킬레이터는 링커 분자를 통해 항체에 부착될 수 있는 1,4,7,10-테트라아자시클로도데칸-N,N',N'',N'''-테트라아세트산 (DOTA)이다. 상기 링커 분자는 통상 당업계에 공지되어 있고, 그 전부가 본원에 참고로 포함된 문헌 [Denardo et al., 1998, Clin Cancer Res. 4: 2483-90; Peterson et al., 1999, Bioconjug. Chem. 10: 553; 및 Zimmerman et al., 1999, Nucl. Med. Biol. 26: 943-50]에 기재되어 있다.

[0181] 치료 잔기를 항체에 컨쥬게이팅시키는 기술은 공지되어 있다 (예를 들어 Arnon et al., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", in Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeld et al. (eds.), 1985, pp. 243-56, Alan R. Liss, Inc.); Hellstrom et al., "Antibodies For Drug Delivery", in Controlled Drug Delivery (2nd Ed.), Robinson et al. (eds.), 1987, pp. 623-53, Marcel Dekker, Inc.); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", in Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, Pinchera et al. (eds.), 1985, pp. 475-506); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", in Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy, Baldwin et al. (eds.), 1985, pp. 303-16, Academic Press; and Thorpe et al., Immunol. Rev., 62:119-58, 1982 참조).

[0182] 단독으로 투여되거나 세포독성 인자(들) 및/또는 시토킨(들)과 조합하여 투여되는, 치료 잔기가 컨쥬게이팅되거나 되지 않은 항체 또는 그의 단편이 치료제로서 사용될 수 있다.

[0183] 별법으로, 항체는 본원에 참고로 포함된 미국 특허 4,676,980에 기재된 바와 같이 제2 항체에 컨쥬게이팅되어 항체 이중컨쥬게이트를 형성할 수 있다.

[0184] 또한, 항체는 표적 항원의 면역분석 또는 정제에 특히 유용한 고체 지지체에 부착될 수 있다. 상기 고체 지지체는 유리, 셀룰로스, 폴리아크릴아미드, 나일론, 폴리스티렌, 폴리비닐 클로라이드 또는 폴리프로필렌을 포함하고 이로 제한되지 않는다.

[0185] 5.2 Fc γ RIIB 인간화 항체의 제조

[0186] 본 발명은 CDR 이식된 중쇄 및 경쇄를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열, 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 클로닝 및 발현 벡터, 뉴클레오타이드 서열로 형질전환된 숙주 세포 및 형질전환된 숙주 세포에서 CDR 이식된 사슬 및 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 항체 분자의 제조 방법을 포함한다. 특정 실시태양에서, 본 발명은 서열 17, 19, 21, 23, 36 또는 45의 뉴클레오타이드 서열 중의 임의의 서열을 포함한다.

[0187] 본 발명은 Fc γ RIIA보다 더 큰 친화도로 Fc γ RIIB에 결합하는 항체, 예를 들어 그 전부가 본원에 참고로 포함된 2002년 8월 14일 출원된 미국 특허 가출원 60/403,366 및 미국 특허 출원 공개 2004/0185045에 기재된 것을 코딩하는 공여 아미노산 서열을 포함한다. 특정 실시태양에서, 공여 아미노산 서열은 각각 ATCC 기탁 번호 PTA-4591, PTA-4592, PTA-5958, PTA-5961, PTA-5962, PTA-5960 및 PTA-5959의 클론 2B6, 3H7, 1D5, 2E1, 2H9, 2D11 또는 1F2로부터 생산되는 모노클로날 항체, 또는 그 전부가 본원에 참고로 포함된 2002년 8월 14일 출원된 미국 특허 가출원 60/403,366 및 미국 특허 출원 공개 2004/0185045에 기재된 발명의 면역화 방법에 의해 생산된 다른 모노클로날 항체를 코딩한다. 또한, 본 발명은 상이한 엄격도, 예를 들어 고엄격, 중간 엄격 또는 저엄격 조건 하에서 각각 ATCC 기탁 번호 PTA-4591, PTA-4592, PTA-5958, PTA-5961, PTA-5962, PTA-5960 및 PTA-5959의 클론 2B6, 3H7, 1D5, 2E1, 2H9, 2D11 또는 1F2로부터 생산된 모노클로날 항체, 또는 그 전부가 본원에

참고로 포함된 2002년 8월 14일 출원된 미국 특허 가출원 60/403,366 및 미국 특허 출원 공개 2004/0185045에 기재된 발명의 면역화 방법에 의해 생산된 다른 모노클로날 항체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드에 혼성화하는 공여 아미노산 서열을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 혼성화는 상이한 엄격성 조건 하에서 수행할 수 있다. 예를 들어, 낮은 엄격성 조건을 사용하는 과정은 다음과 같고, 이로 제한되지 않는다 (Shilo and Weinberg, 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78, 6789-6792 참조). DNA를 포함하는 필터를 35% 포름아미드, 5X SSC, 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 5 mM EDTA, 0.1% PVP, 0.1% Ficoll, 1% BSA 및 500 $\mu\text{g/ml}$ 변성 연어 정자 DNA를 포함하는 용액 중에서 40°C에서 6시간 동안 전처리한다. 혼성화는 다음과 같이 변형된 동일한 용액에서 수행한다: 0.02% PVP, 0.02% Ficoll, 0.2% BSA, 100 $\mu\text{g/ml}$ 연어 정자 DNA, 10% (wt/vol) 텍스트란 술페이트, 및 $5-20 \times 10^6$ cpm ^{32}P -표지된 프로브가 사용된다. 필터는 혼성화 혼합물 중에서 40°C에서 18-20h 동안 인큐베이팅한 후, 2X SSC, 25 mM Tris-HCl (pH 7.4), 5 mM EDTA 및 0.1% SDS를 포함하는 용액에서 55°C에서 1.5h 동안 세척한다. 세척액은 새 용액으로 교체하고, 추가로 1.5h 동안 60°C에서 인큐베이팅한다. 필터를 건조시키고 자가방사기록을 위해 노출시킨다. 필요한 경우, 필터를 65-68°C에서 3차로 세척하고, 필름에 재노출시킨다. 사용될 수 있는 낮은 엄격성의 다른 조건은 당업계에 공지되어 있다 (예를 들어 중간 혼성화에 사용됨). 예를 들어, 고엄격성의 조건을 사용하는 조건은 다음과 같고, 이로 제한되지 않는다. DNA를 포함하는 필터의 예비혼성화는 6X SSC, 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM EDTA, 0.02% PVP, 0.02% Ficoll, 0.02% BSA 및 500 $\mu\text{g/ml}$ 변성 연어 정자 DNA로 구성된 완충액 중에서 65°C에서 8h 동안 수행한다. 필터는 100 $\mu\text{g/ml}$ 변성 연어 정자 DNA 및 $5-20 \times 10^6$ cpm의 ^{32}P -표지된 프로브를 포함하는 예비혼성화 혼합물 중에서 65°C에서 48 h 동안 혼성화된다. 필터 세척은 37°C에서 1h 동안 2X SSC, 0.01% PVP, 0.01% Ficoll 및 0.01% BSA를 포함하는 용액 중에서 수행한다. 이어서, 자가방사기록 전에 0.1X SSC로 50°C에서 45분 동안 세척한다. 사용될 수 있는 고엄격성의 다른 조건은 당업계에 공지되어 있다. 상기 엄격성의 적절한 조건의 선택은 당업계에 공지되어 있다 (예를 들어 Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2d Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York; Ausubel et al., eds., in the Current Protocols in Molecular Biology series of laboratory technique manuals, © 1987-1997, Current Protocols, © 1994-1997 John Wiley and Sons, Inc.; 특허, Dyson, 1991, "Immobilization of nucleic acids and hybridization analysis", In: Essential Molecular Biology: A Practical Approach, Vol. 2, T.A. Brown, ed., pp. 111-156, IRL Press at Oxford University Press, Oxford, UK 참조). 폴리뉴클레오티드는 당업계에 공지된 임의의 방법에 의해 얻을 수 있고, 폴리뉴클레오티드의 뉴클레오티드 서열을 결정할 수 있다.

[0188] 수용 아미노산 서열을 코딩하는 DNA 서열은 당업계의 숙련인에게 공지된 임의의 방법에 의해 얻을 수 있다. 예를 들어, 바람직한 인간 수용 프레임워크를 코딩하는 DNA 서열은 인간 생식세포주 VH 세그먼트 VH1-8 및 JH6 및 인간 생식세포주 VL 세그먼트 VK-A26 및 JK4로부터의 FR 세그먼트를 포함하고, 이로 제한되지 않는다.

[0189] 특정 실시태양에서, 하나 이상의 CDR이 통상적인 재조합 DNA 기술을 사용하여 프레임워크 영역 내에 삽입될 수 있다. 프레임워크 영역은 천연 생성 또는 컨센서스 프레임워크 영역, 바람직하게는 인간 프레임워크 영역일 수 있다 (예를 들어 인간 프레임워크 영역에 대해서는 Chothia et al., 1998, J. Mol. Biol. 278: 457-479 참조). 바람직하게는, 프레임워크 영역 및 CDR의 조합에 의해 생성된 폴리뉴클레오티드는 항체가 Fc γ RIIA에 결합하는 것보다 더 큰 친화도로 Fc γ RIIB에 특이적으로 결합하는 항체를 코딩한다. 바람직하게는, 상기 논의한 바와 같이, 하나 이상의 아미노산 치환은 프레임워크 영역 내에서 이루어질 수 있고, 바람직하게는 아미노산 치환은 본 발명의 항체의 Fc γ RIIB에 대한 결합을 개선시킨다.

[0190] 다른 실시태양에서, 당업계에 이용가능한 인간 라이브러리 또는 임의의 다른 라이브러리는 본 발명의 항체를 코딩하는 핵산을 클로닝하기 위해 당업계에 공지된 표준 기술을 사용하여 스크리닝될 수 있다.

[0191] 본 발명의 인간화 항체는 폴리펩티드 생산에 유용한 당업계에 공지된 임의의 방법, 예를 들어 시험관내 합성, 재조합 DNA 생산 등에 의해 생산될 수 있다. 바람직하게는, 인간화 항체는 재조합 DNA 기술에 의해 생산된다. 본 발명의 인간화 Fc γ RIIB 특이적 항체는 재조합 면역글로불린 발현 기술을 사용하여 생산할 수 있다. 인간화 항체를 포함하여 면역글로불린 분자의 재조합 생산은 그 전부가 본원에 참고로 포함된 미국 특허 4,816,397 (보스 (Boss) 등), 6,331,415 및 4,816,567 (두 특허 모두 카빌리 (Cabilly) 등), 영국 특허 GB 2,188,638 (윈터 (Winter) 등) 및 GB 2,209,757에 기재되어 있다. 인간화 면역글로불린을 포함하여 면역글로불린의 재조합 발현을 위한 기술은 문헌 [Goeddel et al., Gene Expression Technology Methods in Enzymology Vol. 185 Academic Press (1991), 및 Borreback, Antibody Engineering, W. H. Freeman (1992)]에도 기재되어 있다. 재조합 항체의 생산, 디자인 및 발현에 관한 추가의 정보는 문헌 [Mayforth, Designing Antibodies, Academic

Press, San Diego (1993)]에서 볼 수 있다.

[0192] 본 발명의 제조합 인간화 항체의 제조 방법의 예는 a) CDR 및 공여 항체 결합 특이성을 보유하기 위해 필요한 가변 영역 프레임워크의 최소 부분이 비인간 면역글로불린, 예를 들어 뮤린 Fc γ RIIB 모노클로날 항체로부터 유래하고 항체의 나머지는 인간 면역글로불린으로부터 유래하여 인간화 항체 중쇄의 발현을 위한 벡터를 생성시키는, 항체 중쇄를 코딩하는 오페론을 포함하는 발현 벡터를 통상적인 분자생물학 방법에 의해 제조하고, b) CDR 및 공여 항체 결합 특이성을 보유하기 위해 필요한 가변 영역 프레임워크의 최소 부분이 비인간 면역글로불린, 예를 들어 뮤린 Fc γ RIIB 모노클로날 항체로부터 유래하고 항체의 나머지는 인간 면역글로불린으로부터 유래하여 인간화 항체 경쇄의 발현을 위한 벡터를 생성시키는, 항체 경쇄를 코딩하는 오페론을 포함하는 발현 벡터를 통상적인 분자생물학 방법에 의해 제조하고, c) 인간화 항-Fc γ RIIB 항체의 발현을 위한 형질감염된 숙주 세포를 생성시키기 위해 발현 벡터를 통상적인 분자생물학 방법으로 숙주 세포에 전달하고; d) 인간화 항-Fc γ RIIB 항체를 제조하기 위해 통상적인 세포 배양 기술에 의해 형질감염된 세포를 배양하는 것을 포함할 수 있다. 숙주 세포는 본 발명의 2개의 발현 벡터, 즉 중쇄 유래 폴리펩티드를 코딩하는 오페론을 포함하는 제1 벡터 및 경쇄 유래 폴리펩티드를 코딩하는 오페론을 포함하는 제2 벡터로 동시형질감염될 수 있다. 2개의 벡터는 상이한 선택가능 마커를 포함할 수 있지만, 중쇄 및 경쇄 코딩 서열을 제외하고 동일한 것이 바람직하다. 상기 과정은 중쇄 및 경쇄 폴리펩티드의 동등한 발현을 제공한다. 별법으로, 중쇄 및 경쇄 폴리펩티드를 모두 코딩하는 단일 벡터를 사용할 수 있다. 중쇄 및 경쇄의 코딩 서열은 cDNA 또는 게놈 DNA 또는 둘 모두를 포함할 수 있다. 본 발명의 제조합 항체의 발현에 사용되는 숙주 세포는 세균 세포, 예를 들어 에서리치아 콜리 또는 바람직하게는 진핵세포일 수 있다. 바람직하게는, 포유동물 세포, 예를 들어 차이니즈 햄스터 난소 세포 또는 HEK-293을 사용할 수 있다. 발현 벡터의 선택은 숙주 세포에 따라 선택되고, 선택된 숙주 세포에서 요구되는 발현 및 조절 특성을 갖도록 선택할 수 있다. 사용될 수 있는 다른 세포주는 CHO-K1, NSO 및 PER.C6 (크루셀 (Crucell), 네덜란드 라이덴)을 포함하고, 이로 제한되지 않는다.

[0193] 특정 실시태양에서, 인간화 Fc γ RIIB 2B6 항체를 생산하는 방법은 다음을 포함한다. 2B6의 하이브리도마 세포로부터의 RNA를 cDNA로 전환시키고, VH 및 VL 세그먼트를 RLM-RACE 키트 (앰비온, 인크. (Ambion, Inc.))를 사용하여 PCR 증폭시켰다. VH에 대한 유전자 특이적 프라이머를 사용한다. VH에 대한 상기 프라이머의 예는 SJ15R, 서열 47 (5' GGT CAC TGT CAC TGG CTC AGG G 3') 및 SJ16R, 서열 48 (5' AGG CGG ATC CAG GGG CCA GTG GAT AGA C 3')을 포함하고, VL에 대한 프라이머의 예는 SJ17R, 서열 49 (5'GCA CAC GAC TGA GGC ACC TCC AGA TG 3') 및 SJ18R, 서열 50 (5' CGG CGG ATC CGA TGG ATA CAG TTG GTG CAG CAT C 3')를 포함한다. RACE 생성물을 TOPO TA 클로닝 키트 (인비트로젠, 인크.)를 사용하여 플라스미드 pCR2.1-TOPO 내로 삽입한다. 이어서 생성되는 플라스미드를 DNA 서열 분석하여 2B6에 대한 VH 및 VL 서열을 결정한다. 이어서 생성되는 서열을 번역하고, 각각에 대해 예측된 아미노산 서열을 결정한다. Kabat에 의해 규정된 바와 같이 이들 서열로부터 프레임워크 (FR) 및 상보성 결정 (CDR) 영역을 확인한다. 이어서 마우스 VH를 인간 C-Gamma1 불변 영역 및 Ig 리더 (leader) 서열에 연결시키고 포유동물 발현을 위해 pCI-neo 내로 삽입한다. 마우스 VL을 인간 C-kappa 세그먼트 및 Ig 리더 서열에 연결시키고 또한 포유동물 발현을 위해 pCI-neo 내로 클로닝한다. 인간화 2B6 VH는 인간 생식세포주 VH 세그먼트 VH1-18 및 JH6으로부터의 FR 세그먼트, 및 2B6 VH의 CDR 영역으로 이루어진다. 인간화 2B6 VL은 인간 생식세포주 VL 세그먼트 VK-A26 및 JK4로부터의 FR 세그먼트, 및 2B6 VL의 CDR 영역으로 이루어진다. 인간화 VH 및 VL 세그먼트는 PCR에 의해 합해지고 증폭된 올리고뉴클레오타이드로부터 드 노보 (de novo)로 조립된다. 이어서 생성되는 단편은 PCR에 의해 리더 서열과 합해지고, 적절한 불변 영역 세그먼트는 발현 벡터 pCI-neo 내로 클로닝된다. 생성되는 플라스미드의 DNA 서열은 서열 분석에 의해 확인한다. 이 과정 후에, 예상된 인간화 2B6 VL 서열을 갖는 경쇄 세그먼트를 확인한다. 대표적인 플라스미드인 pMGx608 (인간화 2B6 중쇄 포함) 및 pMGx611 (CDR2에 N₅₀ → Y 및 V₅₁ → A를 갖는 인간화 2B6 경쇄 포함) (각각 ATCC 기탁 번호 PTA-5963 및 PTA-5964)는 부다페스트 조약의 규정 하에 2004년 5월 7일 아메리칸 타입 컬처 콜렉션에 기탁되었고, 본원에 참고로 포함된다.

[0194] 본 발명의 벡터의 제조, 본 발명의 숙주 세포의 제조를 위한 세포의 형질감염, 본 발명의 항체의 제조를 위한 세포의 배양을 위한 일반적인 방법은 모두 통상적인 분자생물학 방법이다. 유사하게, 본 발명의 제조합 인간화 항체는 생성된 후에 형용동 여과, 황산암모늄 침전, 친화도 컬럼 크로마토그래피, 겔 전기영동 등을 포함하여 당업계의 표준 방법에 의해 정제할 수 있다.

[0195] 본 발명의 인간화 Fc γ RIIB 특이적 항체는 인간 또는 인간화 모노클로날 항체와 같은 다른 항체 (또는 그의 일부)와 함께 또는 그에 부착되어 사용될 수 있다. 상기 다른 항체는 본 발명의 항체가 작용하는 질병에 특징적인 다른 마커 (에피토프)와 반응할 수 있거나 예를 들어 질병 세포에 대한 인간 면역계의 분자 또는 세포를 동

원하도록 선택된 상이한 특이성을 가질 수 있다. 본 발명의 항체 (또는 그의 일부)는 별개로 투여되는 조성물로서 또는 두 물질이 통상적인 화학적 또는 분자생물학적 방법에 의해 연결된 단일 조성물로서 상기 항체 (또는 그의 일부)와 함께 투여될 수 있다. 추가로, 본 발명의 항체의 진단 및 치료적 가치는 검출가능한 시그널 (시험관 내 또는 생체 내에서)을 생성시키는 표지 또는 치료 특성을 갖는 표지로 인간화 항체를 표지함으로써 증가시킬 수 있다. 몇몇 표지, 예를 들어 방사성 핵종은 검출가능한 시그널을 생성시킬 수 있고, 치료 특성을 갖는다. 방사성 핵종 표지의 예는 ^{125}I , ^{131}I , ^{14}C 를 포함한다. 다른 검출가능한 표지의 예는 형광 현미경에 대한 형광 발색단, 예를 들어 플루오레신, 피코빌리프로테인 또는 테트라에틸 로다민; 형광, 흡광, 가시적인 색상 또는 응집에 의한 검출을 위해 형광 또는 착색 생성물을 생성시키거나 전자현미경에 의한 검출을 위해 전자 밀집 생성물을 생성시키는 효소; 또는 직접 또는 간접 전자현미경 가시화를 위한 페리틴, 퍼옥시다제 또는 금 비드와 같은 전자 밀집 분자를 포함한다. 치료 특성을 갖는 표지는 암치료용 약물, 예를 들어 메토틱렉세이트 등을 포함한다.

[0196] 본 발명은 뮤린 모노클로날 항체의 CDR 영역이 인간 수용 프레임워크 내로 스플라이싱되어 Fc γ RIIB에 특이적인 인간화 재조합 항체를 생성시킬 수 있다는 발견을 기초로 하여 Fc γ RIIB에 특이적인 많은 인간화 항체를 제공한다. 바람직한 인간화 Fc γ RIIB 특이적 항체는 Fc γ RIIB에 대한 결합을 증가시키기 위해 프레임워크 영역에 (또는 다른 영역에) 추가의 변경을 포함한다. 본 발명의 특히 바람직한 실시태양은 Fc γ RIIB에 대한 매우 우수한 결합 특성을 갖는 예시적인 인간화 항체 분자이다.

[0197] 본 발명은 본 발명의 CDR 이식된 항체를 코딩하는 DNA 서열 제조를 위한 표준 재조합 DNA 방법을 포함한다. DNA 서열은 완전히 또는 부분적으로 올리고뉴클레오타이드 합성 기술을 이용하여 합성될 수 있다. 올리고뉴클레오타이드 합성 방법은 당업계에 공지되어 있다. 본 발명은 추가로 당업계에 공지된 것과 같은 부위 지정 돌연변이 방법을 포함한다.

[0198] CDR 이식된 중쇄 및 경쇄를 코딩하는 DNA 서열의 발현을 위해 임의의 적합한 숙주 세포/백터 시스템을 사용할 수 있다. 세균, 예를 들어 이. 콜리 및 다른 미생물 시스템을 특히 항체 단편, 예를 들어 Fab 및 (Fab')₂ 단편, 특히 FV 단편 및 단쇄 항체 단편, 예를 들어 단쇄 FV의 발현을 위해 사용할 수 있다. 진핵세포 시스템, 예를 들어 포유동물 숙주 세포 발현 시스템을 완전 항체 분자를 포함하여 보다 큰 CDR 이식된 항체 생성물의 생산을 위해 사용할 수 있다. 적합한 포유동물 숙주 세포는 CHO 세포 및 골수종 또는 하이브리도마 세포주를 포함한다. 사용될 수 있는 다른 세포주는 CHO-K1, NSO 및 PER.C6 (크루셀)을 포함하고, 이로 제한되지 않는다.

[0199] 본 발명의 공여 뮤린 항체는 그 전부가 본원에 참고로 포함된 2002년 8월 14일 출원된 미국 특허 가출원 60/403,366 및 미국 특허 출원 공개 2004/0185045에 기재된 것을 포함하여 당업계에 공지된 임의의 방법을 사용하여 생산할 수 있다.

[0200] 특정 에피토프를 인식하는 항체 단편은 공지된 기술에 의해 생성시킬 수 있다. 예를 들어, Fab 및 F(ab')₂ 단편은 효소, 예를 들어 파파인 (Fab 단편 생성을 위해) 또는 펩신 (F(ab')₂ 단편 생성을 위해)을 사용하여 면역 글로불린 분자의 단백질분해 절단에 의해 생산될 수 있다. F(ab')₂ 단편은 완전한 경쇄 및 가변 영역, CH1 영역 및 중쇄의 적어도 일부의 힌지 영역을 포함한다.

[0201] 예를 들어, 항체는 또한 당업계에 공지된 다양한 파지 디스플레이 방법을 사용하여 생성시킬 수 있다. 파지 디스플레이 방법에서, 기능성 항체 도메인은 이들을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드 서열을 갖는 파지 입자의 표면에 디스플레이된다. 특정 실시태양에서, 상기 파지는 레퍼토리 또는 조합 항체 라이브러리 (예를 들어 인간 또는 뮤린)로부터 발현되는 항원 결합 도메인, 예를 들어 Fab 및 Fv 또는 디술피드 결합 안정화된 Fv를 디스플레이하기 위해 이용될 수 있다. 관심있는 항원에 결합하는 항원 결합 도메인을 발현하는 파지는 항원, 예를 들어 표지된 항원 또는 고체 표면 또는 비드상에 결합되거나 포획된 항원을 사용하여 선택되거나 확인될 수 있다. 이들 방법에서 사용된 파지는 전형적으로 fd 및 M13을 포함하여 필라멘트상 파지이다. 항원 결합 도메인은 파지 유전자 III 또는 유전자 VIII 단백질에 대해 재조합 방식으로 융합된 단백질로서 발현된다. 본 발명의 면역 글로불린 또는 그의 단편 제조에 사용될 수 있는 파지 디스플레이 방법의 예는 그 전부가 본원에 참고로 포함된 문헌 [Brinkman et al., J. Immunol. Methods, 182:41-50, 1995; Ames et al., J. Immunol. Methods, 184:177-186, 1995; Kettleborough et al., Eur. J. Immunol., 24:952-958, 1994; Persic et al., Gene, 187:9-18, 1997; Burton et al., Advances in Immunology, 57:191-280, 1994; PCT 출원 PCT/GB91/01134; PCT 공개 WO 90/02809; WO 91/10737; WO 92/01047; WO 92/18619; WO 93/11236; WO 95/15982; WO 95/20401; 및 미국 특허 5,698,426; 5,223,409; 5,403,484; 5,580,717; 5,427,908; 5,750,753; 5,821,047; 5,571,698;

5,427,908; 5,516,637; 5,780,225; 5,658,727; 5,733,743 및 5,969,108]에 개시된 것을 포함한다.

[0202] 상기 문헌에 기재된 바와 같이, 파지 선택 후, 파지로부터의 항체 코딩 영역은 단리되고, 예를 들어 아래에서 상세히 설명되는 포유동물 세포, 곤충 세포, 식물 세포, 효모 및 세균을 포함하여 임의의 요구되는 숙주에서 발현되는 인간 항체를 포함하는 전체 항체 또는 임의의 다른 요구되는 단편을 생성시키기 위해 사용된다. 예를 들어, 제조법 방식으로 Fab, Fab' 및 F(ab')₂ 단편을 생산하는 기술은 당업계에 공지된 기술, 예를 들어 PCT 공개 WO 92/22324; Mullinax et al., Biotechniques, 12(6):864-869, 및 Sawai et al., AJRI, 34:26-34, 1995; 및 Better et al., Science, 240:1041-1043, 1988 (그 전부가 본원에 참고로 포함됨)에 개시된 것을 사용하여 수행될 수 있다. 단쇄 Fv 및 항체 생산에 사용될 수 있는 기술의 예는 미국 특허 4,946,778 및 5,258,498; 문헌 [Huston et al., Methods in Enzymology, 203:46-88, 1991; Shu et al., Proc Natl Acad Sci USA, 90:7995-7999, 1993; 및 Skerra et al., Science, 240: 1038-1040, 1988]에 기재된 것을 포함한다.

[0203] 파지 디스플레이 기술은 Fc γ RIIB에 대한 본 발명의 항체의 친화도를 증가시키기 위해 사용될 수 있다. 이 기술은 본 발명의 조합 방법에 사용될 수 있는 고친화도 항체 수득에 유용할 것이다. 친화도 성숙으로 불리는 기술은 초기 또는 모 항체에 비교할 때 항원에 보다 큰 친화도로 결합하는 항체를 확인하기 위해 Fc γ RIIB 또는 그의 항원성 단편을 사용한 돌연변이 발생 또는 CDR 워킹 (walking) 및 재선택을 사용한다 (예를 들어 Glaser et al., 1992, J. Immunology 149: 3903). 단일 뉴클레오티드보다 전체 코돈의 돌연변이가 발생은 아미노산 돌연변이의 반랜덤화된 레퍼토리를 생성시킨다. 각각 단일 CDR에서 단일 아미노산 변경에 의해 상이하고 각각 CDR 잔기에 대한 각각의 가능한 아미노산 치환을 나타내는 변이체를 포함하는 변이체 클론의 풀로 이루어지는 라이브러리를 제조할 수 있다. 항원에 대한 결합 친화도가 증가된 돌연변이체는 고정된 돌연변이체를 표지된 항원과 접촉시켜 스크리닝할 수 있다. 당업계에 공지된 임의의 스크리닝 방법 (예를 들어 ELISA)을 사용하여 항원에 대한 결합력이 증가된 돌연변이체 항체를 확인할 수 있다 (Wu et al., 1998, Proc Natl. Acad Sci. USA 95: 6037; Yelton et al., 1995, J. Immunology 155: 1994). 경쇄를 랜덤화시키는 CDR 워킹도 가능하다 (Schier et al., 1996, J. Mol. Bio. 263:551 참조).

[0204] 5.2.1 생물학적 특성의 스크리닝

[0205] 본 발명의 인간화 항체는 항체의 Fc γ RIIB에 대한 상호작용의 정량화를 포함하여 특성화를 위해 당업계에 공지된 임의의 면역학 또는 생화학 기반 방법을 사용하여 Fc γ RIIB에 대한 특이적 결합에 대해 특성화할 수 있다. 본 발명의 인간화 항체의 Fc γ RIIB에 대한 특이적 결합은 ELISA 분석, 표면 플라즈몬 공명 분석, 면역침전 분석, 친화도 크로마토그래피, 형광 활성화 세포 분류 (FACS) 및 평형 투석을 포함하여 이로 제한되지 않는 면역학 또는 생화학 기반 분석을 사용하여 결정할 수 있다. 본 발명의 항체의 면역특이적 결합 및 교차 반응성을 분석하기 위해 사용될 수 있는 면역분석은 웨스턴 블롯, 방사성 면역분석, ELISA (효소 결합 면역흡수 분석), "샌드위치" 면역분석, 면역침전 분석, 침전소 반응, 겔 확산 침전소 반응, 면역확산 분석, 응집 분석, 보체 고정 분석, 면역방사측정 분석, 형광 면역분석, 단백질 A 면역분석 등과 같은 기술을 사용하는 경쟁 및 비경쟁 분석 시스템을 포함하고, 이로 제한되지 않는다. 상기 분석은 일상적인 것으로 당업계에 공지되어 있다 (예를 들어 그 전부가 본원에 참고로 포함된 Ausubel et al., eds, 1994, Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., New York 참조).

[0206] 본 발명의 인간화 항체를 시험관내 ELISA 분석을 사용하여 Fc γ RIIB에 대한 결합에 대해 특성화할 수 있다. 본 발명의 방법에 사용하기 위한 ELISA 분석의 예는 다음을 포함할 수 있다. 그 전부가 본원에 참고로 포함된 미국 특허 가출원 60/439,709 및 미국 특허 출원 10/756,153에 개시된 방법에 따라 제조된 2.5 ng/웰의 가용성 Fc γ RIIB-Fc 융합 단백질을 마우스 항-Fc γ RIIB 항체 3H7에 의해 실온에서 1시간 동안 96-웰 Maxisorp 플레이트 상에 포획한다. 25 ng/웰로부터 시작하여 ch2B6 또는 hu2B6Hc/Ch2B6Lc의 조건화 배지의 일련의 2배 희석액을 각 웰에 첨가한다. 플레이트를 실온에서 1시간 동안 인큐베이팅한 다음, 결합을 HRP 컨쥬게이팅된 F(ab')₂ 염소 항-인간 IgG F(ab')₂ 특이적 2차 항체에 의해 검출한다. 약 45분 동안 2차 항체와 함께 인큐베이팅한 후, 플레이트를 TMB 기질을 사용하여 현상한다. 5분 인큐베이션 후, 1% H₂SO₄에 의해 반응을 중지시킨다. OD_{450 nm}는 SOFTmax 프로그램에 의해 판독한다. 각 단계 사이에, 플레이트를 PBS/0.1% Tween 20으로 3회 세척한다. 플레이트를 30분 동안 실온에서 PBS/0.1% Tween 20 중 0.5% BSA에 의해 차단시킨 후, 가용성 Fc γ RIIB-Fc를 첨가한다.

[0207] 본 발명의 인간화 항체는 당업계의 숙련인에게 공지된 임의의 기술을 사용하여 형광 활성화 세포 분류 (FACS)를 사용하여 Fc γ RIIB 발현 세포, 예를 들어 Daudi 세포 및 Raji 세포에 대한 결합에 대해 특성화할 수 있다. 유

동 분류기는 많은 개별 세포를 신속하게 조사할 수 있다 (예를 들어 1천만 내지 1억개의 세포/시간) (Shapiro et al., Practical Flow Cytometry, 1995). 생물학적 세포를 분류 및 조사하기 위한 유동 세포측정기는 당업계에서 공지되어 있다. 공지된 유동 세포측정기는 예를 들어 그 전부가 본원에 참고로 포함된 미국 특허 4,347,935; 5,464,581; 5,483,469; 5,602,039; 5,643,796; 및 6,211,477에 기재되어 있다. 다른 공지된 유동 세포측정기는 벡톤 디킨슨 (Becton Dickinson and Company)에서 제조한 FACS Vantage™ 시스템 및 유니온 바이오메트리카 (Union Biometrika)에서 제조한 COPAS™ 시스템이다. 본 발명의 인간화 항체의 특성화를 위한 예시적인 FACS 분석은 다음을 포함할 수 있다. 약 10^6 Fc γ RIIB 발현 세포, 예를 들어 Daudi 세포 및 Raji 세포를 버퍼, 예를 들어 PBS로 적어도 1회 세척한다. 1차 항체 (예를 들어 Ch2B6, Hu2B6Hc/ch2B6Lc, 인간 IgG1)를 예를 들어 PBS/1%BSA 중에 0.5, 0.1, 0.02 μ g/mL로 희석하고, 100 μ l의 희석된 항체를 세포에 전달한다. 4°C에서 30분 인큐베이션 후, 세포를 1 ml PBS/1%BSA로 1회 세척한다. 염소 항-인간 IgG Fc 특이적 항체의 PE 컨쥬게이팅된 F(ab')₂ 단편 (색은 이뮤노리서치, 인크. (Jackson ImmunoResearch, Inc.))를 2차 항체로서 1:1000 희석액으로 사용한다. 4°C에서 30분 인큐베이션 후, 세포를 1 mL PBS/1% BSA로 1회 세척한다. 이어서, 세포를 500 μ l의 PBS/1% BSA 중에 재현탁시키고 FACS 분석한다. 본 발명의 방법에 사용될 수 있는 다른 세포주는 CD32B로 형질감염된 CHO-K1 (햄스터 세포주) 세포; CD32A로 형질감염된 CHO-K1 (햄스터 세포주) 세포; CD32B로 형질감염된 293H (인간 상피세포주) 세포; CD32A로 형질감염된 293H (인간 상피세포주) 세포; Raji (인간 버키트 림프종 세포주) 세포; Daudi (인간 버키트 림프종 세포주) 세포 [Raji 및 Daudi B 세포주는 내인성 CD32B만을 발현함]; 내인성 CD32A만을 발현하는 THP-1 (인간 단핵세포주) 세포; 내인성 CD32A 및 CD32B를 발현하는 U937 (인간 단핵세포주) 세포; K526; HL60을 포함하고, 이로 제한되지 않는다.

[0208] 본 발명의 인간화 항체는 Fc γ RIIA에 비해 Fc γ RIIB에 대한 가장 큰 특이성을 갖는 항체를 선택하기 위해 에피토프 맵핑에 의해 추가로 특성화할 수 있다. 항체의 에피토프 맵핑 방법은 당업계에 공지되어 있고, 본 발명의 방법에 포함된다. 특정 실시태양에서, Fc γ RIIB의 하나 이상의 영역을 포함하는 융합 단백질을 본 발명의 항체의 에피토프 맵핑에 사용할 수 있다. 특정 실시태양에서, 융합 단백질은 인간 IgG2의 Fc 부분에 융합된 Fc γ RIIB 영역의 아미노산 서열을 포함한다. 각각의 융합 단백질은 아래 표 2에 나타낸 바와 같은 상동성 수용체, 예를 들어 Fc γ RIIA로부터의 대응하는 영역으로 수용체의 아미노산 치환 및/또는 특정 영역의 치환을 추가로 포함할 수 있다. pMGX125 및 pMGX132는 Fc γ RIIB 수용체의 IgG 결합 부위를 포함하고, 전자는 Fc γ RIIB의 C-말단을 갖고, 후자는 Fc γ RIIA의 C-말단을 갖고, C-말단 결합을 구별하기 위해 사용될 수 있다. 다른 것들은 IgG 결합 부위의 Fc γ RIIA 치환 및 Fc γ RIIA 또는 Fc γ RIIB N-말단을 갖는다. 이들 분자는 항체가 결합하는 수용체 분자의 부분을 결정하는 것을 도울 수 있다.

표 2

[0209] 모노클로날 항-Fc γ RIIB 항체의 에피토프를 조사하기 위해 사용될 수 있는 융합 단백질의 목록. 잔기 172 내지 180은 Fc γ RIIA 및 B의 IgG 결합 부위에 속한다. Fc γ RIIA 서열로부터의 특이적 아미노산은 굵은 글씨로 나타낸다.

플라스미드	수용체	N-말단	172-180	서열	C-말단	서열
pMGX125	RIIb	IIb	KKFSRSDPN	51	APS-----SS (IIb)	57
pMGX126	RIIa/b	IIa	QKFSRLDPN	52	APS-----SS (IIb)	57
pMGX127		IIa	QKFSRLDPT	53	APS-----SS (IIb)	57
pMGX128		IIb	KKFSRLDPT	54	APS-----SS (IIb)	57
pMGX129		IIa	QKFSHLDPT	55	APS-----SS (IIb)	57
pMGX130		IIb	KKFSHLDPT	56	APS-----SS (IIb)	57
pMGX131		IIa	QKFSRLDPN	52	VPSMGSSS(IIa)	58
pMGX132		IIb	KKFSRSDPN	51	VPSMGSSS(IIa)	58
pMGX133	RIIa-131R	IIa	QKFSRLDPT	53	VPSMGSSS(IIa)	58
pMGX134	RIIa-131H	IIa	QKFSHLDPT	55	VPSMGSSS(IIa)	58
pMGX135		IIb	KKFSRLDPT	54	VPSMGSSS(IIa)	58
pMGX136		IIb	KKFSHLDPT	56	VPSMGSSS(IIa)	58

[0210] 본 발명의 인간화 항체는 또한 항체의 Fc γ RIIB와의 상호작용의 동역학적 파라미터를 특성화하기 위해 당업계에

공지된 임의의 표면 플라즈몬 공명 기반 분석을 사용하여 분석할 수 있다. BIAcore 도구 (바이아코어 에이비 (Biacore AB, 스웨덴 옘살라)); IAsys 도구 (어피니티 센서스 (Affinity Sensors, 미국 매사추세츠주 프랭클린)); IBIS 시스템 (윈저 사이언티픽 리미티드 (Windsor Scientific Limited, 영국 버크스)), SPR-CELLIA 시스템 (니폰 레이저 앤드 일렉트로닉스 랩 (Nippon Laser and Electronics Lab, 일본 홋카이도)) 및 SPR Detector Spreeta (텍사스 인스트루먼트 (Texas Instruments, 미국 텍사스주 댈러스))를 포함하여 이로 제한되지 않는 상업적으로 입수가능한 임의의 SPR 도구를 본 발명에서 사용할 수 있다. SPR 기반 기술은 그 전부가 본원에 참고로 포함된 문헌 [Mullet et al., 2000, Methods 22: 77-91; Dong et al., 2002, Review in Mol. Biotech., 82: 303-23; Fivash et al., 1998, Current Opinion in Biotechnology 9: 97-101; Rich et al., 2000, Current Opinion in Biotechnology 11: 54-61]을 참조한다. 추가로, 그 전부가 본원에 참고로 포함된 미국 특허 6,373,577; 6,289,286; 5,322,798; 5,341,215; 6,268,125에 기재된 임의의 SPR 도구 및 단백질-단백질 상호작용을 측정하기 위한 SPR 기반 방법도 본 발명의 방법에서 고려된다.

- [0211] 간단히 설명하면, SPR 기반 분석은 표면 상의 결합쌍의 한 멤버를 고정시키고 용액 내에서 그의 결합쌍의 다른 멤버와의 상호작용을 실시간으로 모니터링하는 것을 수반한다. SPR은 복합체 형성 또는 해리시에 발생하는 표면 근처의 용매의 굴절률 변화의 측정을 기초로 한 것이다. 그 위에서 고정이 발생하는 표면은 센서 칩이고, 이것은 SPR 기술의 핵심이고, 금의 박층으로 코팅된 유리 표면으로 이루어지고 분자의 표면에 대한 결합을 최적화하도록 디자인된 특수 표면의 영역에 대한 기초를 형성한다. 다양한 센서 칩은 특히 상기 나열한 회사로부터 상업적으로 입수가능하고, 그 모두가 본 발명의 방법에 사용될 수 있다. 센서 칩의 예는 바이아코어 에이비, 인크.로부터 입수가능한 것, 예를 들어 Sensor Chip CM5, SA, NTA 및 HPA를 포함한다. 본 발명의 분자는 아민기를 통한 직접 공유 커플링, 술폰히드릴기를 통한 직접 공유 커플링, 아비딘 코팅된 표면에 대한 비오틴 부착, 탄수화물기에 대한 알데히드 커플링 및 NTA 칩을 사용한 히스티딘 태그를 통한 부착을 포함하여 이로 제한되지 않는, 당업계에서 공지된 임의의 고정 방법 및 화학을 사용하여 센서 칩의 표면 상에 고정될 수 있다.
- [0212] 본 발명은 본 발명의 인간화 항체의 기능, 특히 Fc γ RIIB 신호전달을 조절하는 활성을 확인하기 위한 특정 특성화 분석을 사용하여 본 발명의 방법에 의해 생산된 항체의 특성화를 포함한다. 예를 들어, 본 발명의 특성화 분석은 Fc γ RIIB의 ITIM 모티프 내의 티로신 잔기의 인산화를 측정하거나, B세포 수용체-생성 칼슘 이동의 억제력을 측정할 수 있다. 본 발명의 특성화 분석은 세포 기반 또는 세포 부재 분석일 수 있다.
- [0213] Fc γ RIIB와 고친화도 IgE 수용체의 비만세포 동시응집에서, Fc ϵ RI이 항원-유도 탈과립, 칼슘 이동 및 시토킨 생산의 억제력을 야기한다는 것은 당업계에 잘 확립되어 있다 (Metcalf D.D. et al. 1997, Physiol. Rev. 77:1033; Long E.O. 1999 Annu Rev. Immunol 17: 875). 상기 신호전달 경로의 상세한 분자 수준의 내용은 최근에 규명되었다 (Ott V. L., 2002, J. Immunol. 162 (9):4430-9). Fc ϵ RI과 동시응집시에, Fc γ RIIB는 그의 모티프 내의 티로신 상에서 신속하게 인산화된 후, Src Homology-2 함유 이노시톨-5-포스파타제 (SHIP), SH2 도메인-함유 이노시톨 폴리포스페이트 5-포스파타제를 동원하고, 이들은 다시 인산화되어 Shc 및 p62^{dok} (p62^{dok}는 어댑터 분자의 패밀리의 원형이고, 신호전달 도메인, 예를 들어 아미노 말단 플렉스트린 상동성 도메인 (PH 도메인), PTB 도메인, 및 PXXP 모티프를 포함하는 카르복시 말단 영역 및 많은 인산화 부위를 포함한다)와 회합한다 (Carpino et al., 1997 Cell, 88: 197; Yamanshi et al., 1997, Cell, 88:205).
- [0214] 본 발명은 하나 이상의 IgE 매개된 반응의 조절시에 본 발명의 항-Fc γ RIIB 인간화 항체의 특성화를 포함한다. 바람직하게는, IgE에 대한 고친화도 수용체 및 Fc γ RIIB에 대한 저친화도 수용체를 동시 발현하는 세포주는 IgE 매개된 반응 조절시에 본 발명의 항-Fc γ RIIB 항체의 특성화에 사용될 것이다. 특정 실시태양에서, 전장 인간 Fc γ RIIB로 형질감염된 래트 호염기성 백혈병 세포주 (RBL-H23; 본원에 참고로 포함된 Barsumian E.L. et al. 1981 Eur. J. Immunol. 11:317)로부터의 세포가 본 발명의 방법에 사용될 것이다. RBL-2H3은 IgE-매개 세포 활성화 후의 신호전달 메카니즘 연구에 광범하게 사용되어 온, 특성이 잘 규명된 래트 세포주이다. RBL-2H3 세포에서 발현되어 Fc ϵ RI로 동시응집될 때, Fc γ RIIB는 Fc ϵ RI-유도 칼슘 이동, 탈과립 및 시토킨 생산을 억제한다 (Malbec et al., 1998, J. Immunol. 160:1647; Daeron et al., 1995 J. Clin. Invest. 95:577; Ott et al., 2002 J. of Immunol. 168:4430-4439).
- [0215] 몇몇 실시태양에서, 본 발명은 Fc ϵ RI 유도 비만세포 활성화 억제에 대한 본 발명의 항-Fc γ RIIB 인간화 항체의 특성화를 포함한다. 예를 들어, Fc γ RIIB로 형질감염된 래트 호염기성 백혈병 세포주 (RBL-H23; Barsumian E.L. et al. 1981 Eur. J. Immunol. 11:317)로부터의 세포는 IgE로 감작시키고, Fc ϵ RI만을 응집시키기 위해 토끼 항-마우스 IgG의 F(ab')₂ 단편으로 또는 Fc γ RIIB 및 Fc ϵ RI을 동시응집시키기 위해 전체 토끼 항-마우스 IgG로 자극한다. 이 시스템에서, 하류의 신호전달 분자의 간접적인 조절은 민감화되고 자극된 세포에 대한 본

발명의 항체 첨가시에 분석할 수 있다. 예를 들어, Fc γ RIIB의 티로신 인산화 및 SHIP의 동원 및 인산화, Erk1, Erk2, JNK 또는 p38을 포함하여 이로 제한되지 않는 MAP 키나제 패밀리 멤버의 활성화 및 p62^{dok}의 티로신 인산화 및 그의 SHIP 및 RasGAP과의 회합을 분석할 수 있다.

[0216] 본 발명의 항체에 의한 Fc ϵ RI 유도 비만세포 활성화의 억제를 결정하기 위한 한 예시적인 분석은 RBL-H23 세포를 인간 Fc γ RIIB로 형질감염시키고; RBL-H23 세포를 IgE로 감작시키고; RBL-H23 세포를 토끼 항-마우스 IgG의 F(ab')₂ (Fc ϵ RI만을 응집시켜 대조군으로서 Fc ϵ RI-매개 신호전달을 유도하기 위해)로 자극하거나, RBL-H23 세포를 전체 토끼 항-마우스 IgG (Fc γ RIIB 및 Fc ϵ RI를 동시응집시켜 Fc ϵ RI-매개 신호전달을 억제하기 위해)로 자극하는 것을 포함할 수 있다. 전체 토끼 항-마우스 IgG 항체로 자극된 세포는 추가로 본 발명의 항체와 예비인큐베이션될 수 있다. 본 발명의 항체와 예비인큐베이션된 세포와 본 발명의 항체로 예비인큐베이션되지 않은 세포의 Fc ϵ RI-의존적 활성화의 측정 및 상기 세포에서 Fc ϵ RI-의존적 활성화 수준의 비교는 본 발명의 항체에 의한 Fc ϵ RI-의존적 활성화의 조절을 나타낼 것이다.

[0217] 상기한 예시적인 분석은 예를 들어 Fc γ RIIB 수용체에 대한 리간드 (IgG) 결합을 차단하고 Fc γ RIIB 및 Fc ϵ RI의 동시응집을 억제함으로써 Fc ϵ RI 신호전달의 Fc γ RIIB-매개 억제를 길항하는 항체를 확인하기 위해 사용될 수 있다. 상기 분석은 유사하게 Fc γ RIIB 및 Fc ϵ RI의 동시응집을 향상시키고 Fc γ RIIB 및 Fc ϵ RI의 동시응집을 촉진함으로써 Fc ϵ RI 신호전달의 Fc γ RIIB-매개 억제를 표현하는 항체를 확인한다.

[0218] 바람직한 실시태양에서, Fc ϵ RI-의존 활성화는 Fc γ RIIB의 하류의 신호전달 분자의 조절, 예를 들어 Fc γ RIIB의 인산화 상태의 조절, SHIP 동원의 조절, MAP 키나제 활성화의 조절, SHIP의 인산화 상태의 조절, SHIP 및 Shc 회합의 조절, p62^{dok}의 인산화 상태의 조절, p62^{dok} 및 SHIP 회합의 조절, p62^{dok} 및 RasGAP 회합의 조절, 칼슘 이동의 조절, 탈과립의 조절, 및 시토킨 생산의 조절 중의 적어도 하나 이상이다. 또다른 바람직한 실시태양에서, Fc ϵ RI-의존 활성화는 세포토닌 방출 및/또는 세포의 Ca⁺⁺ 유입 및/또는 IgE 의존적 비만세포 활성화이다. Fc γ RIIB 및 Fc ϵ RI의 동시응집이 Fc γ RIIB 티로신 인산화를 자극하고, SHIP의 동원을 자극하고, SHIP 티로신 인산화 및 Shc와의 회합을 자극하고, Erk1, Erk2, JNK, p38을 포함하여 이로 제한되지 않는 MAP 키나제 패밀리 멤버의 활성화를 억제하는 것을 당업계의 숙련인에게 공지되어 있다. 또한, Fc γ RIIB 및 Fc ϵ RI의 동시응집이 p62^{dok}의 개선된 티로신 인산화 및 그의 SHIP 및 RasGAP과의 회합을 자극한다는 것이 당업계의 숙련인에게 공지되어 있다.

[0219] 몇몇 실시태양에서, 본 발명의 항-Fc γ RIIB 인간화 항체는 바람직하게는 세포 기반 분석에서 비만세포 또는 호염기구의 탈과립의 모니터링 및/또는 측정에 의해 IgE 매개된 반응을 조절하는 능력에 대해 특성화된다. 바람직하게는, 상기 분석에 사용하기 위한 비만세포 또는 호염기구는 당업계의 숙련인에게 공지된 표준 재조합 방법을 사용하여 인간 Fc γ RIIB를 포함하도록 공학처리되었다. 특정 실시태양에서, 본 발명의 항-Fc γ RIIB 항체는 세포 기반 β -헥소사미니다제 (과립에 포함된 효소) 방출 분석에서 IgE 매개된 반응을 조절하는 능력에 대해 특성화된다. 비만세포 및 호염기구로부터 β -헥소사미니다제 방출은 급성 알레르기 및 염증성 질환의 1차 사건이다 (Aketani et al., 2001 Immunol. Lett. 75:185-9; Aketani et al., 2000 Anal. Chem. 72:2653-8). 세포토닌 및 히스타민을 포함하여 이로 제한되지 않는 다른 염증 매개체의 방출은 본 발명의 방법에 따라 IgE 매개된 반응을 측정하기 위해 분석할 수 있다. 특정 작용 메커니즘에 매이기를 의도하지 않지만, 과립, 비만세포 및 호염기구로부터의 β -헥소사미니다제를 포함하는 것의 방출은 Fc γ RI의 다가 항원과의 가교결합에 의해 개시되는 세포내 칼슘 농도 의존 과정이다.

[0220] IgE 매개된 반응을 조절할 때 본 발명의 항-Fc γ RIIB 인간화 항체의 특성화를 위한 하나의 예시적인 분석은 RBL-H23 세포를 인간 Fc γ RIIB로 형질감염시키고; 세포를 마우스 IgE 단독으로 또는 마우스 IgE 및 본 발명의 항-Fc γ RIIB 항체로 감작시키고; 세포를 상이한 농도, 바람직하게는 0.03 μ g/mL 내지 30 μ g/mL의 염소 항-마우스 F(ab)₂로 약 1시간 동안 자극하고; 상등액을 수거하고; 세포를 용해시키고; p-니트로페닐 N-아세틸- β -D-글루코사미니드를 사용한 비색 분석에 의해 상등액에 방출된 β -헥소사미니다제 활성을 측정하는 것을 포함하는 β -헥소사미니다제 방출 분석이다. 방출된 β -헥소사미니다제 활성은 총 활성화에 대한 방출된 활성의 비율로서 표현된다. 방출된 β -헥소사미니다제 활성은 항원 단독으로; IgE 단독으로; IgE 및 본 발명의 항-Fc γ RIIB 항체로 처리된 세포에서 측정되어 비교될 것이다. 특정 작용 메커니즘에 매이기를 의도하지 않지만, 세포를 마우스 IgE 단독으로 감작시키고 폴리클로날 염소 항-마우스 IgG의 F(ab)₂ 단편으로 접종시험할 경우, 폴리클로날 항체가 Fc γ RI에 결합된 유리 IgE의 경계를 인식하기 때문에 Fc γ RI의 응집 및 가교결합이 발생하여 비만세포

활성화 및 탈과립을 야기한다. 다른 한편으로, 세포를 마우스 IgE 및 본 발명의 항-Fc γ RIIB 항체로 감작시켜 폴리클로날 염소 항-마우스 IgG의 F(ab)₂ 단편으로 접종시험할 경우, Fc γ RI 및 Fc γ RIIB의 가교결합이 발생하여 Fc γ RI 유도 탈과립의 억제를 야기한다. 어느 경우든, 염소 항-마우스 F(ab)₂는 투여량 의존적 β -헥소사미니다제 방출을 유도한다. 몇몇 실시태양에서, Fc γ RIIB 수용체에 결합되고 Fc γ RI에 가교결합된 항-Fc γ RIIB 항체는 억제 경로의 활성화에 영향을 주지 않는다. 즉, 항-Fc γ RIIB 항체의 존재 하에 탈과립 수준의 변경이 존재하지 않는다. 다른 실시태양에서, 항-Fc γ RIIB 항체는 항-Fc γ RIIB 항체에 의해 결합될 때 억제 수용체 Fc γ RIIB의 보다 강한 활성화를 매개하고, 이에 의해 Fc γ RI에 대한 효과적인 가교결합 및 동질 응집된 Fc γ RIIB의 억제 경로의 활성화가 가능해진다.

[0221] 본 발명은 또한 당업계의 숙련인에게 공지된 방법을 사용하여 칼슘 이동 분석을 사용하여 IgE 매개된 세포 반응에 대한 본 발명의 항-Fc γ RIIB 인간화 항체의 효과의 특성화를 포함한다. 예시적인 칼슘 이동 분석은 호염기구 또는 비만세포를 IgE를 사용하여 프라임링하고, 세포를 칼슘 표시제, 예를 들어 Fura 2와 함께 인큐베이팅하고, 상기한 바와 같이 세포를 자극하고, 유동 세포측정을 사용하여 세포내 칼슘 농도를 모니터링 및/또는 정량화하는 것을 포함할 수 있다. 본 발명은 당업계의 숙련인에게 공지된 임의의 방법에 의해 세포내 칼슘 농도를 모니터링 및/또는 정량화하는 것을 포함한다 (예를 들어 본원에 참고로 포함된 Immunology Letters, 2001, 75:185-9; British J. of Pharm., 2002, 136:837-45; J. of Immunology, 168:4430-9 및 J. of Cell Biol., 153(2):339-49 참조).

[0222] 바람직한 실시태양에서, 본 발명의 항-Fc γ RIIB 인간화 항체는 IgE 매개된 세포 활성화를 억제한다. 다른 실시태양에서, 본 발명의 항-Fc γ RIIB 항체는 Fc γ RIIB에 의해 조절되는 억제 경로를 차단하거나 Fc γ RIIB에 대한 리간드 결합 부위를 차단하여 면역 반응을 증강시킨다.

[0223] 몇몇 실시태양에서, 인간 비만세포가 당업계에 공지된 표준 방법, 예를 들어 FACS 염색을 사용하여 측정할 때 내인성 Fc γ RIIB을 저수준으로 발현할 경우, 본 발명의 항-Fc γ RIIB 항체에 의해 매개되는 억제 경로의 활성화의 차이를 모니터링 및/또는 검출하는 것이 어려울 수 있다. 따라서, 본 발명은 그에 의해 Fc γ RIIB 발현이 시토킨 및 특정 성장 조건을 사용하여 상향조절될 수 있는 별도의 방법을 포함한다. Fc γ RIIB는 IL4에 의해 인간 단핵구 세포주, 예를 들어 THP1 및 U937 (Tridandapani et al., 2002, J. Biol. Chem., 277 (7): 5082-5089) 및 1차 인간 단핵구 (Pricop et al., 2001, J. of Immunol., 166: 531-537)에서 크게 상향조절되는 것으로 기재되어 있다. 디부티릴 시클릭 AMP를 사용한 U937 세포의 분화는 Fc γ RIIB의 발현을 증가시키는 것으로 설명되었다 (Cameron et al., 2002 Immunology Letters 83, 171-179). 따라서, 본 발명의 방법에 사용하기 위한 인간 비만세포 내의 내인성 Fc γ RIIB 발현은 검출 감도를 향상시키기 위해 시토킨, 예를 들어 IL-4, IL-13을 사용하여 상향조절될 수 있다.

[0224] 본 발명은 또한 B-세포 수용체 (BCR)-매개 신호전달 억제를 위한 본 발명의 항-Fc γ RIIB 인간화 항체의 특성화를 포함한다. BCR-매개 신호전달은 적어도 하나 이상의 하류의 생물학적 반응, 예를 들어 B세포의 활성화 및 증식, 항체 생산 등을 포함할 수 있다. Fc γ RIIB 및 BCR의 동시응집은 세포 주기 진행 및 세포 생존의 억제를 야기한다. 또한, Fc γ RIIB 및 BCR의 동시응집은 BCR-매개 신호전달의 억제를 야기한다.

[0225] 구체적으로, BCR-매개 신호전달은 하류 신호전달 분자의 조절, 예를 들어 Fc γ RIIB의 인산화 상태, SHIP 동원, Btk 및/또는 PLC γ 의 편재화, MAP 키나제 활성화, Akt (항-세포자멸 신호)의 동원, 칼슘 이동, 세포 주기 진행 및 세포 증식의 조절 중의 적어도 하나 이상을 포함한다.

[0226] BCR 신호전달의 Fc γ RIIB-매개 억제의 많은 이펙터 기능은 SHIP을 통해 매개되지만, 최근에 SHIP 결핍 마우스로부터의 지질다당류 (LPS)-활성화된 B세포가 칼슘 이동, Ins(1,4,5)P₃ 생산 및 Erk 및 Akt 인산화의 유의한 Fc γ RIIB-매개 억제를 보임이 입증되었다 (Brauweiler A. et al., 2001, Journal of Immunology, 167(1): 204-211). 따라서, SHIP 결핍 마우스로부터의 생체의 B세포는 본 발명의 항체 특성화에 사용될 수 있다. 본 발명의 항체에 의한 BCR 신호전달의 Fc γ RIIB-매개 억제를 결정하기 위한 한 예시적인 분석은 SHIP 결핍 마우스로부터 비장 B세포를 분리하고, 상기 세포를 지질다당류로 활성화시키고, 상기 세포를 BCR을 응집시키기 위해 F(ab')₂ 항-IgM으로 또는 BCR을 Fc γ RIIB와 동시응집시키기 위해 항-IgM으로 자극하는 것을 포함할 수 있다. BCR을 Fc γ RIIB와 동시응집시키기 위해 온전한 항-IgM으로 자극시킨 세포는 본 발명의 항체와 추가로 예비인큐베이팅될 수 있다. 세포의 Fc γ RIIB-의존 활성화는 당업계에 공지된 표준 기술로 측정할 수 있다. 본 발명의 항체와 예비인큐베이팅된 세포와 예비인큐베이팅되지 않은 세포의 Fc γ RIIB-의존 활성화 수준의 측정 및 상기 수준의 비교는 본 발명의 항체에 의한 Fc γ RIIB-의존 활성화의 조절을 나타낼 것이다.

- [0227] Fc γ RIIB-의존 활성의 측정은 예를 들어 유동세포 측정에 의한 세포내 칼슘 이동 측정, Akt 및/또는 Erk의 인산화 측정, PI(3,4,5)P₃의 BCR-매개 축적의 측정 또는 B세포의 Fc γ RIIB-매개 증식 측정을 포함할 수 있다.
- [0228] 분석은 예를 들어 Fc γ RIIB 수용체에 대한 리간드 (IgG) 결합 부위를 차단하고 Fc γ RIIB 및 BCR의 동시응집 억제에 의한 BCR 신호전달의 Fc γ RIIB-매개 억제를 길항함으로써 BCR 신호전달의 Fc γ RIIB-매개 억제를 조절하는 항체를 확인하기 위해 사용될 수 있다. 분석은 또한 Fc γ RIIB 및 BCR의 동시응집을 향상시키고 BCR 신호전달의 Fc γ RIIB-매개 억제를 표현하는 항체를 확인하기 위해 사용될 수도 있다.
- [0229] 본 발명은 인간 단핵구/대식세포에서 Fc γ R-매개 신호전달에 대한 본 발명의 인간화 항-Fc γ RIIB 항체의 특성화에 관한 것이다. Fc γ RIIB와 면역수용체 티로신-계 활성화 모티프 (ITAM)을 갖는 수용체의 동시응집은 그의 이펙터로서 SHIP을 사용하는 Fc γ R-매개 포식작용을 하향 조절하는 작용을 한다 (Tridandapani et al., 2002, J. Biol. Chem. 277 (7):5082-9). Fc γ RIIA와 Fc γ RIIB의 동시응집은 Fc γ RIIB의 ITIM 모티프 상의 티로신 잔기의 신속한 인산화를 야기하여 SHIP의 인산화, SHIP의 Shc와의 회합 및 분자량이 120 및 60-65 kDa인 단백질의 인산화를 증가시킨다. 또한, Fc γ RIIA와 Fc γ RIIB의 동시응집은 세포성 조절에 관여하고 세포자멸 억제 기능을 수행하는 세린-트레오닌 키나제인 Akt의 인산화의 하향조절을 야기한다.
- [0230] 본 발명은 추가로 인간 단핵구/대식세포에서 Fc γ R-매개 포식작용의 억제에 대한 본 발명의 인간화 항-Fc γ RIIB 항체의 특성화를 포함한다. 예를 들어, 인간 단핵구 세포주 THP-1로부터의 세포는 Fc γ R에 대한 마우스 모노클로날 항체 IV.3 및 염소 항-마우스 항체의 Fab 단편 (Fc γ RIIA만을 응집시키기 위해), 또는 전체 IV.3 마우스 모노클로날 항체 및 염소 항-마우스 항체 (Fc γ RIIA 및 Fc γ RIIB를 동시응집시키기 위해)로 자극할 수 있다. 이 시스템에서, 하류 신호전달 분자, 예를 들어 Fc γ RIIB의 티로신 인산화, SHIP의 인산화, SHIP과 Shc의 회합, Akt의 인산화, 및 분자량이 120 및 60-65 kDa인 단백질의 인산화의 조절은 본 발명의 항체를 자극된 세포에 첨가할 때 분석할 수 있다. 또한, 단핵구 세포주의 Fc γ RIIB-의존성 식세포 효능은 본 발명의 항체의 존재 및 부재 하에 직접적으로 측정할 수 있다.
- [0231] 본 발명의 항체에 의한 인간 단핵구/대식세포의 Fc γ R-매개 포식작용의 억제를 결정하기 위한 추가의 예시적인 분석은 THP-1 세포를 IV.3 마우스 항-Fc γ R 항체 및 염소 항-마우스 항체의 Fab (Fc γ RIIA만을 응집시켜 Fc γ RIIA-매개 신호전달을 유도하기 위해) 또는 마우스 항-Fc γ R 항체 및 염소 항-마우스 항체 (Fc γ RIIA 및 Fc γ RIIB를 동시응집시켜 Fc γ RIIA-매개 신호전달을 억제하기 위해)로 자극하는 것을 포함할 수 있다. 마우스 항-Fc γ R 항체 및 염소 항-마우스 항체로 자극시킨 세포는 추가로 본 발명의 항체와 예비인큐베이션될 수 있다. 본 발명의 항체와 예비인큐베이션된 자극된 세포 및 본 발명의 항체와 예비인큐베이션되지 않은 세포의 Fc γ RIIA-의존 활성의 측정 및 이들 세포의 Fc γ RIIA-의존 활성의 수준의 비교는 본 발명의 항체에 의한 Fc γ RIIA-의존 활성의 조절을 나타낼 것이다.
- [0232] 상기한 예시적인 분석은 예를 들어 Fc γ RIIB 수용체의 리간드 결합을 차단하고 Fc γ RIIB 및 Fc γ RIIA의 동시응집을 억제하여 Fc γ RIIA 신호전달의 Fc γ RIIB-매개 억제를 길항하는 항체를 확인하기 위해 사용될 수 있다. 상기 분석은 유사하게 Fc γ RIIB 및 Fc γ RIIA의 동시응집을 증가시키고 Fc γ RIIA 신호전달의 Fc γ RIIB-매개 억제를 표현하는 항체를 확인한다.
- [0233] 본 발명의 또다른 실시태양에서, 본 발명은 문헌 [Tridandapani et al., 2000, J. Biol. Chem. 275: 20480-7]에 기재된 방법에 의해 플루오레신화된 IgG-옵소닌작용된 양 적혈구 (SRBC)를 포식하는 THP-1 세포의 능력을 측정함으로써 본 발명의 항체의 기능을 특성화하는 것에 관한 것이다. 예를 들어, 포식작용을 측정하는 예시적인 분석은 THP-1 세포를 본 발명의 항체 또는 Fc γ R에 결합하지 않는 대조 항체로 처리하고, 상기 세포의 활성 수준을 비교하는 것을 포함하고, 여기서 세포의 활성 (예를 들어 결합 (rosetting) 활성 (IgG-코팅된 SRBC에 결합하는 THP-1 세포의 수), 부착 활성 (THP-1 세포에 결합한 SRBC의 총수) 및 포식 비율)의 차이가 본 발명의 항체에 의한 Fc γ RIIA-의존 활성의 조절을 나타낼 것이다. 상기 분석은 예를 들어 Fc γ RIIB 수용체의 리간드 결합을 차단하고 포식작용의 Fc γ RIIB-매개 억제를 길항하는 항체의 확인에 사용될 수 있다. 상기 분석은 Fc γ RIIA 신호전달의 Fc γ RIIB-매개 억제를 증가시키는 항체도 확인할 수 있다.
- [0234] 바람직한 실시태양에서, 본 발명의 항체는 하류의 신호전달 분자의 조절 (예를 들어 Fc γ RIIB의 인산화 상태의 조절, SHIP 인산화의 조절, SHIP 및 Shc 회합의 조절, Akt의 인산화 조절, 약 120 및 60-65 kDa의 추가의 단백질의 인산화 조절) 및 포식작용의 조절 중의 적어도 하나 이상의 방식으로 인간 단핵구/대식세포에서 Fc γ RIIB-의존 활성을 조절한다.
- [0235] 본 발명은 치료 항체의 이펙터 세포 기능에 대한 항체의 효과, 예를 들어 치료 항체의 종양-특이적 ADCC 활성을

증강시키는 능력을 확인하기 위해 당업계의 숙련인에게 공지된 분석을 사용한 본 발명의 인간화 항체의 특성화를 포함한다. 본 발명에 따라 사용될 수 있는 치료 항체는 그 예가 본원 (섹션 5.4.6)에서 개시되는 항-종양 항체, 항바이러스 항체, 항균 항체 (예를 들어 세균 및 단세포 기생충)를 포함하여 이로 제한되지 않는다. 특히, 본 발명은 치료 항체, 예를 들어 종양-특이적 모노클로날 항체의 Fc γ R-매개 이펙터 세포 기능에 대한 그들의 효과에 대한 본 발명의 항체의 특성화를 포함한다. 본 발명에 따라 분석될 수 있는 이펙터 세포 기능의 예는 항체-의존성 세포 매개 세포독성, 포식작용, 옵소닌작용, 옵소닌 포식작용, C1q 결합, 및 보체 의존성 세포 매개 세포독성을 포함하여 이로 제한되지 않는다. 이펙터 세포 기능 활성을 결정하기 위해 당업계의 숙련인에게 공지된 임의의 세포 기반 또는 세포 부재 분석이 사용될 수 있다 (이펙터 세포 분석에 대해서는, 그 전부가 본원에 참고로 포함된 Perussia et al., 2000, Methods Mol. Biol. 121: 179-92; Baggiolini et al., 1998 Experientia, 44(10): Lehmann et al., 2000 J. Immunol. Methods, 243(1-2): Brown EJ. 1994, Methods Cell Biol., 45: 147-64; Munn et al., 1990 J. Exp. Med., 172:231-237, Abdul-Majid et al., 2002 Scand. J. Immunol. 55: 70-81; Ding et al., 1998, Immunity 8:403-411 참조).

[0236] 본 발명의 항체는 당업계의 숙련인에게 공지된 임의의 표준 방법을 사용하여 이펙터 세포, 예를 들어 천연 킬러 (killer) 세포에서 치료 항체의 Fc γ R-매개 ADCC 활성에 대한 그들의 효과에 대해 분석될 수 있다 (예를 들어 Perussia et al., 2000, Methods Mol. Biol. 121: 179-92 참조). 본원에서 사용되는 "항체 의존성 세포-매개 세포독성" 및 "ADCC"는 당업계에 통상적이고 관습적인 의미를 갖고 Fc γ R을 발현하는 비특이적인 세포독성 세포 (예를 들어 단핵구 세포, 예를 들어 천연 킬러 (NK) 세포 및 대식세포)가 표적 세포 상의 결합 항체를 인식한 후, 표적 세포의 용해를 야기하는 시험관내 세포-매개 반응을 의미한다. 원칙적으로, 활성화 Fc γ R을 갖는 임의의 이펙터 세포가 ADCC를 매개하기 위해 촉발될 수 있다. ADCC를 매개하는 1차 세포는 Fc γ RIII만을 발현하는 NK 세포이고, 단핵구는 그의 활성화, 편재 또는 분화 상태에 따라 Fc γ RI, Fc γ RII 및 Fc γ RIII를 발현할 수 있다. 조혈세포 상의 Fc γ R 발현은 예를 들어 그 전부가 본원에 참고로 포함된 문헌 [Ravetch et al., 1991, Annu. Rev. Immunol., 9: 457-92]을 참조한다.

[0237] 이펙터 세포는 하나 이상의 Fc γ R을 발현하고 이펙터 기능을 수행하는 백혈구이다. 바람직하게는, 세포는 적어도 Fc γ RIII를 발현하고 ADCC 이펙터 기능을 수행한다. 본 발명의 방법에 사용될 수 있는 이펙터 세포는 말초 혈액 단핵세포 (PBMC), 천연 킬러 (NK) 세포, 단핵구 및 호중구를 포함하고, 이로 제한되지 않고, PBMC 및 NK 세포가 바람직하다. 이펙터 세포는 본원에 기재된 바와 같이 그의 천연 공급원, 예를 들어 혈액 또는 PBMC로부터 분리할 수 있다. 바람직하게는, 본 발명의 ADCC 분석에 사용되는 이펙터 세포는 당업계의 숙련인에게 공지된 표준 방법, 예를 들어 Ficoll-Paque 밀도 구배 원심분리를 사용하여, 바람직하게는 정상 인간 혈액으로부터 정제된 말초 혈액 단핵세포 (PBMC)이다. 예를 들어, PBMC는 Ficoll-Hypaque 상에 전체 혈액을 적층하고 세포를 500 g에서 실온에서 30분 동안 회전시켜 분리할 수 있다. 백혈구층은 이펙터 세포로서 수거할 수 있다. 본 발명의 ADCC 분석에 사용될 수 있는 다른 이펙터 세포는 단핵구-유래 대식세포 (MDM)를 포함하고, 이로 제한되지 않는다. 본 발명의 방법에서 이펙터 세포로서 사용되는 MDM은 바람직하게는 동결 원액으로서 얻거나 신선한 것으로 사용된다 (예를 들어 어드밴스트 바이오테크놀로지스 (Advanced Biotechnologies), 미국 메릴랜드주). 가장 바람직한 실시태양에서, 정제된 인간 단핵구가 본 발명의 방법에서 이펙터 세포로서 사용된다. 정제된 인간 단핵구는 활성화 수용체 Fc γ RIIIA 및 Fc γ RIIA 및 억제 수용체 Fc γ RIIB를 발현한다. 인간 단핵구는 상업적으로 입수가능하고, 동결 원액으로서 입수하여 10% 인간 AB 혈청을 포함하는 기초 배지 또는 시토킨을 포함하는 인간 혈청을 갖는 기초 배지에서 해동된다. 세포에서 Fc γ R의 발현 수준은 예를 들어 FACS 분석을 사용하여 직접적으로 결정될 수 있다. 별법으로, 세포는 배양에서 대식세포로 성숙하도록 허용될 수 있다. Fc γ RIIB 발현 수준은 대식세포에서 증가할 수 있다. Fc γ R의 발현 수준 결정에 사용될 수 있는 항체는 항-인간 Fc γ RIIA 항체, 예를 들어 IV.3-FITC; 항-Fc γ RI 항체, 예를 들어 32.2 FITC; 및 항-Fc γ RIIIA 항체, 예를 들어 3G8-PE를 포함하여 이로 제한되지 않는다.

[0238] 본 발명의 ADCC 분석에 사용되는 표적 세포는 유방암 세포주, 예를 들어 ATCC 기탁 번호 HTB-30의 SK-BR-3 (예를 들어 Tremp et al., 1976, Cancer Res. 33-41); B-림프구; 버키트 림프종 유래 세포, 예를 들어 ATCC 기탁 번호 CCL-86의 Raji 세포 (예를 들어 Epstein et al., 1965, J. Natl. Cancer Inst. 34: 231-240 참조), ATCC 기탁 번호 CCL-213의 Daudi 세포 (예를 들어 Klein et al., 1968, Cancer Res. 28: 1300-10 참조); 난소 암종 세포주, 예를 들어 ATCC 기탁 번호 HTB-161의 OVCAR-3 (예를 들어 Hamilton, Young et al., 1983 참조), SK-OV-3, PA-1, CAO3, OV-90 및 IGROV-1 (NCI 기탁 보관소로부터 입수가능, 그 전부가 본원에 참고로 포함된 Benard et al., 1985, Cancer Research, 45: 4970-9)를 포함하여 이로 제한되지 않는다. 표적 세포는 분석되는 항체의 항원 결합 부위에 의해 인식되어야 한다. 본 발명의 방법에 사용하기 위한 표적 세포는 암 항원의 낮은, 중등 또는 높은 발현 수준을 보일 수 있다. 암 항원의 발현 수준은 당업계의 숙련인에게 공지된 일반적

인 방법, 예를 들어 FACS 분석을 사용하여 결정할 수 있다. 예를 들어, 본 발명은 난소암 세포, 예를 들어 Her2/neu가 상이한 수준에서 발현되는 IGROV-1 또는 OV-CAR-3 (ATCC 기탁 번호 HTB-161; SK-BR-3 유방 암종 세포주보다 낮은 Her2/neu의 발현이라는 특성을 가짐)의 사용을 포함한다. 본 발명의 방법에 표적 세포로서 사용될 수 있는 다른 난소 암종 세포주는 OVCAR-8 (그 전부가 본원에 참고로 포함된 Hamilton et al., 1983, Cancer Res. 43: 5379-89); SK-OV-3 (ATCC 기탁 번호 HTB-77); Caov-3 (ATCC 기탁 번호 HTB-75); PA-1 (ATCC 기탁 번호 CRL-1572); OV-90 (ATCC 기탁 번호 CRL-11732); 및 OVCAR-4를 포함한다. 본 발명의 방법에 사용될 수 있는 다른 유방암 세포주는 BT-549 (ATCC 기탁 번호 HTB-122), MCF7 (ATCC 기탁 번호 HTB-22) 및 Hs578T (ATCC 기탁 번호 HTB-126)를 포함하고, 이들은 모두 NCI 기탁 보관소 및 ATCC로부터 입수가능하고, 본원에 참고로 포함된다. 본 발명의 방법에 사용될 수 있는 다른 세포주는 CCRF-CEM (백혈병); HL-60 (TB, 백혈병); MOLT-4 (백혈병); RPMI-8226 (백혈병); SR (백혈병); A549 (비소세포 폐); EKVX (비소세포 폐); HOP-62 (비소세포 폐); HOP-92 (비소세포 폐); NC1-H226 (비소세포 폐); NC1-H23 (비소세포 폐); NC1-H322M (비소세포 폐); NC1-H460 (비소세포 폐); NC1-H522 (비소세포 폐); COLO 205 (결장); HCC-2998 (결장); HCT-116 (결장); HCT-15 (결장); HT29 (결장); KM12 (결장); SW-620 (결장); SF-268 (CNS); SF-295 (CNS); SF-539 (CNS); SNB-19 (CNS); SNB-75 (CNS); U251 (CNS); LOX 1MV1 (흑색종); MALME-3M (흑색종); M14 (흑색종); SK-MEL-2 (흑색종); SK-MEL-28 (흑색종); SK-MEL-5 (흑색종); UACC-257 (흑색종); UACC-62 (흑색종); IGR-OVI (난소); OVCAR-3, 4, 5, 8 (난소); SK-OV-3 (난소); 786-0 (신장); A498 (신장); ACHN (신장); CAK1-1 (신장); SN12C (신장); TK-10 (신장); UO-31 (신장); PC-3C (전립선); DU-145 (전립선); NC1/ADR-RES (유방); MDA-MB-231/ATCC (유방); MDA-MB-435 (유방); DMS 114 (소세포 폐); 및 SHP-77 (소세포 폐)을 포함하고, 이로 제한되지 않으며, 이들은 모두 NCI로부터 입수가능하다.

- [0239] 치료 항체의 ADCC 활성에 대한 본 발명의 항체의 효과를 결정하기 위한 예시적인 분석은 ^{51}Cr 방출 분석을 기초로 한 것으로서, 이는 바람직하게는 하나 이상의 종양 항원을 발현하는 표적 세포를 $[^{51}\text{Cr}]\text{Na}_2\text{CrO}_4$ (이 세포-멤브레인 투과성 분자는 세포질 단백질에 결합하고 세포로부터 느린 동역학으로 자연적으로 방출되지만 표적 세포 용해 후에 크게 방출되기 때문에 표지를 위해 통상 사용됨)로 표지하고, 본 발명의 항체, 예를 들어 2B6, 3H7의 존재 또는 부재 하에 표적 세포를 표적 세포의 세포 표면 상에 발현된 종양 항원에 면역특이적으로 결합하는 하나 이상의 항체로 흡소된 작용시키고, 흡소된 작용된 방사선표지된 표적 세포를 미량역가관에서 표적 세포 대 이펙터 세포의 적절한 비율로 이펙터 세포와 조합하고, 세포 혼합물을 바람직하게는 16-18시간 동안, 바람직하게는 37°C에서 인큐베이팅하고; 상등액을 수거하고, 상등액 샘플의 방사성을 분석하는 것을 포함한다. 본 발명의 항체의 존재 및 부재 하의 치료 항체의 세포독성은 예를 들어 다음 식을 사용하여 결정할 수 있다: 특이적 용해율 = (실험 용해 - 항체-독립적 용해/최대 용해 - 항체 독립적 용해) x 100%. 표적:이펙터 세포 비율 또는 항체 농도를 변경시켜 그래프를 그릴 수 있다.
- [0240] 또다른 실시태양에서, 본 발명의 항체는 문헌에 기재된 방법 (예를 들어 그 전부가 본원에 참고로 포함된 Ding et al., Immunity, 1998, 8:403-11 참조)에 따라 항체 의존성 세포성 세포독성 (ADCC)에 대해 특성화된다.
- [0241] 몇몇 실시태양에서, 본 발명은 시험관내 기반 분석 및/또는 동물 모델에서 치료 항체의 ADCC 활성을 증강시킬 때 본 발명의 항체 기능의 특성화를 포함한다.
- [0242] 특정 실시태양에서, 본 발명은 난소암 모델 및/또는 유방암 모델을 사용하여 종양 특이적 ADCC를 증강시킬 때 본 발명의 항체 기능을 결정하는 것을 포함한다.
- [0243] 바람직하게는, 본 발명의 ADCC 분석은 암 항원의 발현 수준이 사용되는 암 세포주 사이에서 상이한, 적어도 하나의 암 항원의 발현이라는 특징을 갖는 하나 초과와 암 세포주를 사용하여 수행된다. 특정 작용 메커니즘에 매이기를 의도하지 않지만, 암 항원의 발현 수준이 상이한 하나 초과와 세포주에서 ADCC 분석의 수행을 통해 본 발명의 항체의 종양 소실의 엄격성을 결정할 수 있다. 한 실시태양에서, 본 발명의 ADCC 분석은 암 항원의 상이한 발현 수준을 갖는 암 세포주를 사용하여 수행한다.
- [0244] 예시적인 분석에서, 난소 암종 세포주 OVCAR3이 종양 항원 Her2/neu 및 TAG-72를 발현하는 종양 표적으로 기능할 수 있고; 활성화 $\text{Fc}\gamma\text{RIIIA}$ 및 $\text{Fc}\gamma\text{RIIA}$ 및 억제성 $\text{Fc}\gamma\text{RIIB}$ 를 발현하는 인간 단핵구가 이펙터로서 사용될 수 있고; 종양 특이적 튜린 항체 ch4D5 및 chCC49가 종양 특이적 항체로서 사용될 수 있다. OVCAR-3 세포는 ATCC로부터 입수가능하다 (기탁 번호 HTB-161). 바람직하게는, OVCAR-3 세포는 0.01 mg/ml 소 인슐린으로 보충된 배지에서 증식한다. 5×10^6 생존가능 OVCAR-3 세포를 Matrigel (백톤 디킨슨)을 사용하여 연령과 중량을 매칭시킨 흉선제거 누드 마우스에 피하 (s.c) 주사할 수 있다. 추정 종양 중량은 길이x(폭)²/2로 계산할 수 있

고, 바람직하게는 3 g을 초과하지 않는다. 앵커리지 (anchorage)-의존성 종양은 6-8주 후에 단리할 수 있고, 세포는 종양 1 g당 1 μ g의 콜라게나제 (시그마 (Sigma)) 및 5 mg/mL RNase의 첨가에 의해 해리시키고, 세포 염색기 및 나일론망을 통과시켜 세포를 단리할 수 있다. 이어서, 세포는 이중이식 모델 확립을 위한 피하 주사를 위해 장기간 보관을 위해 동결될 수 있다.

[0245] CC49 및 4D5 항체를 분비하는 하이브리도마는 ATCC 기탁 번호 HB-9459 및 CRL-3D463로 입수가 가능하고, 중쇄 및 경쇄 뉴클레오타이드 서열은 공공 도메인에서 찾을 수 있다 (그 전부가 본원에 참고로 포함된 Murray et al., 1994 Cancer 73 (35):1057-66, Yamamoto et al., 1986 Nature, 319: 230-4). 바람직하게는, 4D5 및 CC49 항체는 이펙터 기능을 제공하기 위해 인간 Fc 서열, 예를 들어 IgG1의 인간 불변 영역을 무린 항체의 가변 영역 상에 이식하기 위해서 당업계의 숙련인에게 공지된 표준 방법을 사용하여 키메라 항체로 만든다. 키메라 4D5 및 CC49 항체는 그들의 가변 영역을 통해 표적 세포주에, 그들의 Fc 영역을 통해 인간 이펙터 세포 상에 발현된 Fc γ R에 결합한다. CC49는 많은 선암종 세포 및 난소 암종 상에 고도로 발현되는 고분자량 뮤신인 TAG-72에 대해 작용한다 (그 전부가 본원에 참고로 포함된 Lottich et al., 1985 Breast Cancer Res. Treat. 6(1):49-56; Mansi et al., 1989 Int. J. Rad. Appl. Instrum B. 16 (2):127-35; Colcher et al., 1991 Int. J. Rad. Appl. Instrum B. 18:395-41). 4D5는 인간 표피 성장 인자 수용체 2에 대해 작용한다 (본원에 참고로 포함된 Carter et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 4285-9). 본 발명의 항체는 이어서 억제성 Fc γ RIIB를 차단함으로써 종양 특이적 항체의 ADCC 활성의 증강을 조사하기 위해 이용될 수 있다. 특정 작용 메커니즘에 매이기를 의도하지 않지만, 적어도 하나의 활성화 Fc γ R, 예를 들어 Fc γ RIIA를 발현하는 이펙터 세포의 활성화 시에, 억제 수용체 (Fc γ RIIB)의 발현이 증강되고, 이것은 Fc γ RIIA의 ADCC 활성이 억제되기 때문에 종양 소실을 제한한다. 그러나, 본 발명의 항체는 차단 항체로서 기능할 수 있다. 즉, 억제 시그널의 활성화, 따라서 활성화 시그널, 예를 들어 ADCC 활성을 억제하는 항체는 보다 장기간 동안 유지되어 종양 소실을 효과적으로 발생시킬 수 있다.

[0246] 바람직하게는, ADCC 활성의 향상에 사용하기 위한 본 발명의 항체는 Fc γ R에 대한 그들의 결합을 감소시키기 위해, 가장 바람직하게는 제거하기 위해 적어도 하나의 아미노산 변형을 포함하도록 변형되었다. 몇몇 실시태양에서, 본 발명의 항체는 최대 Fc γ RIIB 차단 활성을 유지하면서 불변 도메인의 활성화 Fc γ R, 예를 들어 Fc γ RIIA, Fc γ RIIA에 대한 결합을 야생형 본 발명의 항체에 비해 감소시키는 적어도 하나의 아미노산 변형을 포함하도록 변형되었다. 본 발명의 항체는 당업계의 숙련인에게 공지되거나 본원에 개시된 임의의 방법에 따라 변형시킬 수 있다. 이펙터 기능을 붕괴시키는 것으로 공지된 임의의 아미노산 변형은 본 발명의 방법, 예를 들어 그 전부가 본원에 참고로 포함된 미국 특허 출원 60/439,498 (2003년 1월 9일 출원) 및 60/456,041 (2003년 3월 19일 출원)에 개시된 방법에 따라 사용될 수 있다. 몇몇 실시태양에서, 본 발명의 항체는 위치 265가 변형되도록, 예를 들어 위치 265가 알라닌으로 치환되도록 변형된다. 바람직한 실시태양에서, 본 발명의 항체의 무린 불변 영역은 Fc γ RIIB 차단 활성을 유지하면서 이펙터 기능이 제거되도록 위치 265의 아미노산이 알라닌으로 치환된 대응하는 인간 불변 영역으로 대체된다. IgG1 중쇄의 위치 265의 단일 아미노산 변경은 ELISA 분석을 기초로 하여 Fc γ R에 대한 결합을 유의하게 감소시키는 것으로 밝혀졌고 (Sheilds et al., 2001, J. Biol. Chem., 276 (9):6591-604), 종양 질량을 감소시켰다. 다른 실시태양에서, 본 발명의 항체는 위치 297이 변형되도록, 예를 들어 N-연결된 글리코실화 부위가 제거되도록 위치 297이 글루타민으로 치환되도록 변형된다 (예를 들어 그 전부가 본원에 참고로 포함된 Jefferies et al., 1995, Immunol. lett 44: 111-7;; Lund et al., 1996, J. Immunol., 157: 4963-69; Wright et al., 1994, J. Exp. Med. 180: 1087-96; White et al., 1997; J. Immunol. 158: 426-35 참조). 상기 부위의 변형은 Fc γ R과의 모든 상호작용을 파괴하는 것으로 보고되었다. 바람직한 실시태양에서, 본 발명의 항체의 무린 불변 영역은 Fc γ RIIB 차단 활성이 유지되면서 이펙터 기능이 제거되도록 위치 265 및/또는 297에서 아미노산이 치환된 대응하는 인간 불변 영역으로 교체된다.

[0247] 본 발명의 항체의 존재 또는 부재 하에 종양 특이적 항체의 ADCC 활성을 결정하기 위한 예시적인 분석은 비방사성 유로프 기반 형광 분석 (BATDA, 퍼킨 엘머 (Perkin Elmer))이고, 에스테르의 가수분해에 의해 세포막과 함께 친수성 리간드 (TDA)를 형성하는 형광-증강 에스테르의 아세톡실메틸 에스테르로 표적 세포를 표지하고, 여기서 상기 복합체는 세포를 이탈할 수 없고 이펙터에 의한 세포 용해 시에만 방출되고, 항-종양 항체 및 본 발명의 항체의 존재 하에 표지된 표적에 이펙터 세포를 첨가하고, 표적 및 이펙터 세포의 혼합물을 6 내지 16시간 동안, 바람직하게는 37°C에서 인큐베이션하는 것을 포함할 수 있다. ADCC 활성 정도는 방출되어 유로프 (DELFI A 시약; 퍼킨 엘머)과 상호작용하는 리간드의 양을 측정함으로써 분석할 수 있다. 리간드 및 유로프는 매우 안정한 고형광 킬레이트 (EuTDA)를 형성하고, 측정된 형광은 용해된 세포수에 정비례한다. 특이적 용해율은 다음 식을 사용하여 계산할 수 있다: (실험 용해 - 항체-독립적 용해/최대 용해 항체 - 항체 독립적 용해)

x 100%

- [0248] 일부 실시태양에서, 형광 기반 ADCC 분석의 감도가 치료 항체의 ADCC 활성을 검출하기에는 너무 낮은 경우, 본 발명은 방사성 기반 ADCC 분석, 예를 들어 ^{51}Cr 방출 분석을 포함한다. 방사성 기반 분석은 형광 기반 ADCC 분석 대신에 또는 이와 조합하여 수행할 수 있다.
- [0249] 본 발명의 항체의 특성화를 위한 예시적인 ^{51}Cr 방출 분석은 $1-2 \times 10^6$ 표적 세포, 예를 들어 OVCAR-3 세포를 ^{51}Cr 으로 표지하고; 표적 세포를 본 발명의 항체의 존재 및 부재 하에 항체 4D5 및 CC49로 오프소닌 작용시키고, 5×10^3 세포를 96웰 플레이트에 첨가하고, 바람직하게는 4D5 및 CC49의 농도는 $1-15 \mu\text{g/mL}$ 이고, 오프소닌 작용된 표적 세포를 단핵구-유래 대식세포 (MDM) (이펙터 세포)에 바람직하게는 10:1 내지 100:1의 비율로 첨가하고; 세포 혼합물을 16-18시간 동안 37°C 에서 인큐베이팅하고; 상등액을 수거하고, 상등액 내의 방사성을 분석하는 것을 포함할 수 있다. 본 발명의 항체의 존재 및 부재 하에 4D5 및 CC49의 세포독성은 예를 들어 다음 식을 사용하여 결정할 수 있다: 특이적 용해율 = (실험 용해 - 항체 독립적 용해/최대 용해 - 항체 독립적 용해) x 100%.
- [0250] 몇몇 실시태양에서, 본 발명의 $\text{Fc}\gamma\text{RIIB}$ 항체의 생체내 활성은 이종이식 인간 종양 모델에서 결정된다. 종양은 상기 설명된 임의의 암 세포주를 사용하여 확립할 수 있다. 몇몇 실시태양에서, 종양은 제1 암 세포주가 암 항원의 낮은 발현이라는 특징을 갖고 제2 암 세포주가 동일한 암 항원의 높은 수준이라는 특징을 갖는 2개의 암 세포주를 사용하여 확립될 것이다. 이어서, 종양 소실은 제1 및 제2 암 세포주 상의 암 항원에 면역특이적으로 결합하는 항-종양 항체, 및 적절한 마우스 모델, 예를 들어 이펙터 세포로서 이입 (adoptively) 전달된 인간 단핵구 및 MDM을 갖는 Balb/c 누드 마우스 모델 (예를 들어 잭슨 래브로토리즈 (Jackson Laboratories), 타코닉)을 사용하여 당업계의 숙련인에게 공지된 방법을 사용하여 결정할 수 있다. 상기 설명된 임의의 항체는 이어서 본 발명의 항- $\text{Fc}\gamma\text{RIIB}$ 항체의 종양 소실에서의 역할을 평가하기 위해 상기 동물 모델에서 시험할 수 있다. 본 발명에 사용될 수 있는 마우스는 예를 들어 $\text{Fc}\gamma\text{RIII}^{-/-}$ ($\text{Fc}\gamma\text{RIIIA}$ 가 녹아웃됨); $\text{Fc}\gamma^{-/-}$ 누드 마우스 ($\text{Fc}\gamma\text{RI}$ 및 $\text{Fc}\gamma\text{RIIIA}$ 가 녹아웃됨); 또는 인간 $\text{Fc}\gamma\text{RIIB}$ 녹인 (knock in) 마우스 또는 트랜스제닉 녹인 마우스 (염색체 1 상의 마우스 fcgr2 및 fcgr3 로커스는 불활성화되고 마우스는 인간 $\text{Fc}\gamma\text{RIIA}$, 인간 $\text{Fc}\gamma\text{RIIA}$ 인간 $\text{Fc}\gamma\text{RIIB}$, 인간 $\text{Fc}\gamma\text{RIIC}$, 인간 $\text{Fc}\gamma\text{RIIIA}$ 및 인간 $\text{Fc}\gamma\text{RIIIB}$ 를 발현함)를 포함한다.
- [0251] 본 발명의 항체의 생체내 활성을 시험하기 위한 예시적인 방법은 암 항원의 발현이라는 특징을 갖는 암 세포주를 사용하여 이종이식 무린 모델을 확립하고, 종양 소실 매개시에 암 세포주에서 발현되는 암 항원에 특이적인 항체에 대한 본 발명의 항체의 효과를 결정하는 것을 포함할 수 있다. 바람직하게는, 생체내 활성은 제1 암 세포주가 낮은 수준으로 발현되는 제1 암 항원이라는 특징을 갖고 제2 암 세포주가 제1 암 세포주에 비해 더 높은 수준으로 발현되는 동일한 암 항원이라는 특징을 갖는 2개의 암 세포주를 사용하여 동시에 시험된다. 이들 실험은 종양 소실에서 본 발명의 항체의 역할 평가의 엄격성을 증가시킬 것이다. 예를 들어, 종양은 IGROV-1 세포주를 사용하여 확립될 수 있고, Her2/neu 특이적 항체의 종양 소실에서 본 발명의 항- $\text{Fc}\gamma\text{RIIB}$ 항체의 효과를 평가할 수 있다. 이종이식 종양 모델을 확립하기 위해, 5×10^6 생존가능한 세포, 예를 들어 IGROV-1, SKBR3을 예를 들어 Matrigel (백톤 디킨슨)을 사용하여 예를 들어 8마리의 연령과 중량을 매칭시킨 홍선제거 암컷 누드 마우스에 피하 주사할 수 있다. 추정 종양 중량은 길이x(폭) $^2/2$ 로 계산할 수 있고 바람직하게는 3 g을 초과하지 않는다. IGROV-1 세포의 피하 주사는 성장하는 종양을 단식시키고, 복강내 경로는 2개월 내에 마우스를 치사시키는 복막 암종증을 유도한다 (Benard et al., 1985, Cancer Res. 45:4970-9). IGROV-1 세포는 5주 내에 종양을 형성하기 때문에 종양 세포 주사 1일 후에 이펙터로서 단핵구를 Her2/neu에 특이적인 치료 항체, 예를 들어 Ch4D5, 및 본 발명의 항체, 예를 들어 상기한 키메릭 2B6 또는 3H7와 함께 복강 내로 동시 주사한다. 바람직하게는, 항체는 각각 마우스 체중 (mbw) 1 g당 $4 \mu\text{g}$ 주사된다. 초기 주사 후에, 4-6주 동안 매주 $2 \mu\text{g/wk}$ 의 항체를 주사할 것이다. 인간 이펙터 세포는 2주 내에 1회 보충될 것이다. 일군의 마우스에게는 치료 항체를 투여하지 않지만, 각각 항-종양 및 항- $\text{Fc}\gamma\text{RIIB}$ 항체에 대한 이소형 대조군 항체로서 N297A 돌연변이를 포함하는 키메릭 4D5 및 인간 IgG1을 주사할 것이다. 마우스는 4마리의 군으로 분류하여 매주 3회 모니터링될 수 있다.
- [0252] 하기 표 3은 본 발명에 따른 종양 소실 연구를 위한 예시적인 셋업이다. 표 3에 나타난 바와 같이, 각각 8마리의 마우스의 6개 군이 종양 소실에서 본 발명의 항체의 역할을 시험하기 위해 필요할 것이고, 하나의 표적 및 이펙터 세포 조합이 사용되고, 2개의 상이한 항체 농도의 조합이 사용된다. 군 A에서, 단지 종양 세포만 주사하고, 군 B에는 종양 세포 및 단핵구를 주사하고, 군 C에는 종양 세포, 단핵구, 항-종양 항체 (ch4D5)를 주사하고, 군 D에는, 종양 세포, 단핵구, 항-종양 항체 및 항- $\text{Fc}\gamma\text{RII}$ 항체를 주사하고, 군 E에는, 종양 세포, 단핵구

및 항-Fc γ RIIB 항체가 주사되고, 군 F에는 종양 세포, 단핵구, Ch4D5 (N297Q) 및 인간 IgG1이 주사된다. 당업계의 숙련인은 상이한 항체 조합의 상이한 항체 농도를 설명된 종양 모델에서 시험할 수 있음을 이해할 것이다. 바람직하게는, 유방암 세포주, 예를 들어 SKBR3을 사용하는 연구를 상기한 실험과 병행하여 수행한다.

표 3

마우스에서 예시적인 실험 셋업

8마리 마우스/군	0일에 종양 세포 s.c 주사	1일에 단핵구 i.p 주사	1일에 ch4D5 4 μ g/g (mbw) i.p 주사	1일에 ch4D5 N297Q 4 μ g/g (mbw) i.p 주사	1일에 ch2B6 N297Q 4 μ g/g (mbw) i.p 주사	1일에 인간 IgG1 4 μ g/g (mbw) i.p 주사
A	+	-	-	-	-	-
B	+	+	-	-	-	-
C	+	+	+	-	-	-
D	+	+	+	-	+	-
E	+	+	-	-	+	-
F	+	+	-	+	-	+

[0254] 이중이식 종양 모델의 종말점은 당업계의 숙련인에게 공지된 방법을 사용하여 종양의 크기, 마우스의 체중, 생존 시간 및 암의 조직화학적 및 조직병리학적 검사를 기초로 결정된다. 표 3의 각각의 군의 마우스가 평가될 것이다. 마우스는 바람직하게는 매주 3회 모니터링한다. 종양 성장에 대한 기준은 복부 팽만, 복강내 촉진가능 덩어리의 존재일 수 있다. 바람직하게는, 종양 중량 대 집종후 일수의 추정치가 계산될 것이다. 다른 군에 대한 군 D의 마우스의 상기 기준 비교는 종양 소실 향상에서 본 발명의 항체의 역할을 규정할 것이다. 바람직하게는, 항체로 처리된 동물은 대조군보다 추가로 2개월 동안 관찰될 것이다.

[0255] 대체 실시태양에서, 무린 이펙터 세포 상에 인간 Fc γ RIIB를 발현하는 인간 Fc γ RIIB "낙인" 마우스는 이펙터 세포의 이입 전달보다는 본 발명의 항체의 생체내 활성 확립에 사용할 수 있다. 인간 Fc γ RIIB를 발현하는 시조 마우스는 인간 Fc γ RIIB를 마우스 Fc γ RIIB 로커스 상에 "낙킹 인 (knocking in)"시켜 생성시킬 수 있다. 시조 마우스는 이어서 누드 배경에 역교배될 수 있고, 인간 Fc γ RIIB 수용체를 발현할 것이다. 생성되는 무린 이펙터 세포는 내인성 활성화 Fc γ RI 및 Fc γ RIIA 및 억제 인간 Fc γ RIIB 수용체를 발현할 것이다.

[0256] 본 발명의 항체의 생체내 활성은 인간 원발 종양 유도 세포, 예를 들어 인간 일차난소 및 유방 암종 유도 세포를 갖는 이중이식 무린 모델에서 추가로 시험할 수 있다. 암 환자로부터의 복수 및 흉막삼출액 샘플은 당업계의 숙련인에게 공지된 방법을 사용하여 Her2/neu 발현에 대해 시험할 수 있다. 난소 암종 환자로부터의 샘플은 복수를 6370 g에서 20분 동안 4℃에서 원심분리한 후, 적혈구를 용해시키고 세포를 PBS로 세척하여 처리할 수 있다. 종양 세포에서 Her2/neu의 발현이 측정된 후, 2개의 샘플, 즉 중등도 발현체 및 고도 발현체를 이중이식 종양 모델 확립을 위한 피하 집종물로서 선택할 수 있다. 단리된 종양 세포는 이어서 세포를 팽창시키기 위해서 마우스에게 i.p. 주사될 것이다. 약 10마리의 마우스에게 i.p. 주사할 수 있고, 각각의 마우스 복수는 80마리의 마우스 군에게 주사하기 위해 사용될 수 있는, 총 20마리의 마우스로부터 복수를 얻기 위해 2마리의 마우스에게 추가로 계대접종된다. 흉막삼출액 샘플은 복수와 유사한 방법을 사용하여 처리될 수 있다. 흉막삼출액 샘플로부터의 Her2/neu+ 종양 세포는 마우스의 상부좌우 유방 패드 내에 주사할 수 있다.

[0257] 몇몇 실시태양에서, 복수 또는 흉막삼출액 샘플 내의 신생물 세포의 비율이 다른 세포 서브세트에 비해 낮을 경우, 신생물 세포는 시험관 내에서 팽창될 수 있다. 다른 실시태양에서, 종양 세포는 문헌에 기재된 바와 같이 CC49 항체 (항-TAG-72)-코팅 자기 비드를 사용하여 정제될 수 있다 (예를 들어 그 전부가 본원에 참고로 포함된 Barker et al., 2001, Gynecol. Oncol. 82:57, 63 참조). 간단히 설명하면, CC49 항체로 코팅된 자기 비드는 37℃에서 철야 인큐베이션에 의해 비드로부터 이탈되는 난소 종양 세포를 분리하기 위해 사용될 수 있다. 몇몇 실시태양에서, 종양 세포에 TAG-72 항원이 결여된 경우, 항체의 각테일, 예를 들어 스템 셀 테크놀로지스, 인크. (Stem Cell Technologies, Inc., 캐나다)에서 제공되는 것을 사용한 음성 고갈을 사용하여 종양 세포를 풍부화시킬 수 있다.

[0258] 다른 실시태양에서, Her2/neu 이외의 다른 종양 마커가 복수로부터 얻은 종양 세포 및 비종양 세포로부터의 흉막삼출액 샘플을 분리하기 위해 사용될 수 있다. 흉막삼출액 또는 유방 조직의 경우, 최근에 CD44 (부착 분

자), B38.1 (유방/난소암-특이적 마커), CD24 (부착 분자)가 마커로서 사용될 수 있음이 보고되었다 (예를 들어 그 전부가 본원에 참고로 포함된 Al Hajj, et al., 2003, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100:3983, 8 참조). 종양 세포가 정제된 후, 팽창을 위해 마우스 내로 s.c. 주사될 수 있다.

[0259] 바람직하게는, 신생물의 구조 특성을 분석하기 위해서 환자의 복수 및 흉막삼출액에 대해 면역조직화학 및 조직 화학 분석을 수행한다. 상기 방법은 당업계의 숙련인에게 공지되어 있고, 본 발명에 포함된다. 모니터링될 수 있는 마커, 예를 들어 사이토케라틴 (염증 및 중간엽 세포로부터 난소 신생물 및 종피 세포 확인을 위해); 칼레티닌 (Her2/neu 양성 신생물 세포로부터 종피세포 분리를 위해); 및 CD45 (샘플 내의 나머지 세포 집단으로부터 염증세포의 분리를 위해)를 포함한다. 사용될 수 있는 추가의 마커는 CD3 (T 세포), CD20 (B세포), CD56 (NK 세포) 및 CD14 (단핵구)를 포함한다. 상기한 면역조직화학 및 조직화학 방법은 본 발명의 방법에 사용하기 위한 임의의 종양 세포에 유사하게 적용됨을 당업계의 숙련인은 이해할 것이다. 종양 세포의 s.c. 접종 후에, 마우스의 임상적 및 해부학적 변화를 관찰한다. 필요한 바에 따라, 마우스는 총 종양 존재량을 특이적 장기 위치와 상호 관련시키기 위해 부검할 수 있다.

[0260] 특정 실시태양에서, 종양은 암종 세포주, 예를 들어 IGROV-1, OVCAR-8, SK-B 및 OVCAR-3 세포 및 인간 난소 암 종 복수 및 유방암 환자로부터의 흉막삼출액을 사용하여 확립된다. 복수는 바람직하게는 시험되는 항체에 대한 종양 표적과 이펙터를 모두 포함한다. 인간 단핵구는 이펙터로서 전달될 것이다.

[0261] 5.3 예방 및 치료 방법

[0262] 본 발명은 Fc γ RIIB의 비정상 수준 또는 활성과 연관되고/되거나 Fc γ RIIB 활성과 연관된 면역 기능을 변경시키거나, 제2 치료 항체의 세포독성 활성을 향상시키거나, 백신 조성물의 효능을 향상시킴으로써 치료가능한 질병, 질환 또는 감염과 연관된 증상을 예방하거나 치료하거나 개선시키기 위해 본 발명의 하나 이상의 인간화 항체를 동물, 바람직하게는 포유동물, 가장 바람직하게는 인간에 투여하는 것을 포함하는 항체 기반 치료법을 포함한다. 몇몇 실시태양에서, 본 발명의 하나 이상의 인간화 항체의 투여에 의한 치료법은 하나 이상의 치료법, 비제한적인 예를 들어 화학요법, 방사선요법, 호르몬요법 및/또는 생물학적 요법/면역요법의 투여와 조합된다.

[0263] Fc γ RIIB (CD32B)는 다음 조직 종류, 즉 지방조직, B-세포, 뼈, 뇌, 연골, 결장, 내분비, 눈, 태아, 위장관, 비뇨생식기, 생식 세포, 두경부, 신장, 폐, 림프절, 림프세망조직, 유선, 근육, 신경, 난소, 췌장, 췌장섬, 뇌하수체, 태반, 망막, 피부, 연조직, 윤활막, 및 자궁 (테이타는 the Cancer Genome Anatomy Project of the National Cancer Institute로부터 수집됨)에서 발현되는 것으로 밝혀졌다. 따라서, 본 발명의 항체는 임의의 이들 조직에서 Fc γ RIIB의 활성을 표현하거나 길항하기 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, Fc γ RIIB는 태반에서 발현되고, IgG를 태아에 수송하는데 및 또한 면역 복합체를 제거하는데 있어서 역할을 할 수 있다 (Lyden et al., 2001, J. Immunol. 166: 3882-3889). 본 발명의 특정 실시태양에서, 항-Fc γ RIIB 항체는 낙태약으로 사용될 수 있다.

[0264] 본 발명의 예방 및 치료 화합물은 번역후 변형된 단백질, 항체 등을 포함하는 펩티드, 폴리펩티드, 단백질을 포함하고 이로 제한되지 않는 단백질성 분자; 소분자 (1000 달톤 미만), 무기 또는 유기 화합물; 이중가닥 또는 단일가닥 DNA, 이중가닥 또는 단일가닥 RNA, 및 삼중나선 핵산 분자를 포함하고 이로 제한되지 않는 핵산 분자를 포함하고 이로 제한되지 않는다. 예방 및 치료 화합물은 임의의 공지의 유기체 (동물, 식물, 세균, 진균 및 원생생물, 또는 바이러스 포함, 이로 제한되지 않음) 또는 합성 분자의 라이브러리로부터 유래할 수 있다.

[0265] 인간화 항체는 당업계에 공지되거나 본원에 기재된 바와 같은 제약상 허용되는 조성물로 제공될 수 있다. 아래 상세히 설명된 바와 같이, 본 발명의 인간화 항체는 암 (특히 피동 면역요법 또는 암 백신의 효능을 향상시키기 위해), 자가면역 질병, 염증성 질환 또는 알레르기 (예를 들어 알레르기 치료용 백신의 효능을 향상시키기 위해)를 치료하는 방법에서 사용될 수 있다.

[0266] 질병, 질환, 또는 감염의 예방 및/또는 치료제로서 기능하는 본 발명의 인간화 항체는 질병, 질환, 또는 감염과 연관된 하나 이상의 증상을 치료하거나, 예방하거나 개선시키기 위해 동물, 바람직하게는 포유동물, 가장 바람직하게는 인간에게 투여될 수 있다. 본 발명의 항체는 비정상 수준 또는 활성의 Fc γ RIIB와 연관되고/되거나 Fc γ RIIB 활성과 연관된 면역 기능을 변경시킴으로써 치료가능한 질병, 질환, 또는 감염의 치료, 예방 또는 관리에 유용한 하나 이상의 다른 예방제 및/또는 치료제와 조합으로 투여될 수 있다. 특정 실시태양에서, 본 발명의 하나 이상의 인간화 항체는 암 치료에 유용한 하나 이상의 다른 치료제와 병행하여 포유동물, 바람직하게는 인간에게 투여된다. 용어 "병행하여"는 예방제 또는 치료제를 정확하게 동시에 투여하는 것에 제한되지 않

고, 대신 이들이 달리 투여되는 경우보다 증가된 잇점을 제공하기 위해 본 발명의 항체가 다른 치료제와 함께 작용할 수 있도록 하는 순서로 및 시간 간격 내에서 본 발명의 항체 및 다른 치료제가 대상체에게 투여되는 것을 의미한다. 예를 들어, 각각의 예방제 또는 치료제는 동시에 또는 순차적으로 임의의 순서로 상이한 시점에 투여될 수 있지만; 동시에 투여되지 않는 경우, 이들은 목적하는 치료 또는 예방 효과를 제공하도록 충분히 근접한 시간에 투여되어야 한다. 각각의 치료제는 임의의 적절한 형태로 임의의 적합한 경로에 의해 개별적으로 투여될 수 있다.

[0267] 각종 실시태양에서, 예방제 또는 치료제는 1시간 미만, 약 1시간, 약 1시간 내지 약 2시간, 약 2시간 내지 약 3시간, 약 3시간 내지 약 4시간, 약 4시간 내지 약 5시간, 약 5시간 내지 약 6시간, 약 6시간 내지 약 7시간, 약 7시간 내지 약 8시간, 약 8시간 내지 약 9시간, 약 9시간 내지 약 10시간, 약 10시간 내지 약 11시간, 약 11시간 내지 약 12시간, 24시간 이하 또는 48시간 이하의 간격으로 투여된다. 바람직한 실시태양에서, 2 이상의 성분은 환자의 동일한 방문 시기 내에 투여된다.

[0268] 본원에서 제공되는 투여의 투여량 및 빈도는 용어 "치료적으로 효과적인" 및 "예방적으로 효과적인"에 포함된다. 투여량 및 빈도는 또한 전형적으로 투여되는 구체적인 치료 또는 예방제, 암의 심도 및 종류, 투여 경로, 및 환자의 연령, 체중, 반응 및 과거 병력에 따른 각 환자에 특이적인 인자에 따라 변할 것이다. 적합한 치료법은 상기 인자를 고려함으로써 및 예를 들어, 문헌에 보고되고 문헌 [Physician's Desk Reference (56th ed., 2002)]에서 추천된 투여량에 따라 당업계의 숙련인이 선택할 수 있다.

[0269] 본 발명의 인간화 항체는 또한 다른 모노클로날 또는 키메라 항체, Fc 융합 단백질과, 또는 Fc γ RIIB를 향상시키는, 예를 들어, 항체와 상호작용하는 이펙터 세포의 수 또는 활성을 증가시키고 면역 반응을 증가시키는 역할을 하는 림포킨, 시토킨 또는 조혈 성장 인자 (예를 들어, IL-2, IL-3, IL-4, IL-7, IL-10 및 TGF- β)과 조합되어 유리하게 사용될 수 있다. 특정 실시태양에서, 시토킨은 항-Fc γ RIIB 항체에 컨주게이팅된다.

[0270] 본 발명의 인간화 항체는 또한 예를 들어 아래 섹션 5.4.6 및 5.4.5에 상세히 설명된 바와 같은 질병, 질환 또는 감염을 치료하기 위해 사용되는 하나 이상의 약물, 예를 들어 항암제, 항염증제 또는 항바이러스제와 조합되어 유리하게 사용될 수 있다.

[0271] 5.3.1 앞

[0272] 본 발명의 인간화 항체는 단독으로, 또는 원발 종양의 성장 또는 암성 세포의 전이를 예방하거나 억제하거나 감소시키기 위해 당업계에 공지된 다른 치료 항체와 조합되어 사용될 수 있다. 한 실시태양에서, 본 발명의 인간화 항체는 암 면역요법에서 사용된 항체와 조합되어 사용될 수 있다. 본 발명은 치료 항체의 이펙터 기능의 효능, 예를 들어 ADCC, CDC, 포식작용, 옵소닌작용 등을 증가시킴으로써 상기 면역요법의 효능을 향상시키기 위해 다른 치료 항체와 조합으로 본 발명의 항체의 사용을 포함한다. 특정 작용 메커니즘에 매이기를 의도하지 않지만, 본 발명의 항체는 바람직하게는 단핵구 및 대식세포 상에서 Fc γ RIIB를 차단하고, 따라서 예를 들어 Fc γ R을 활성화시킴으로써 매개된 종양의 소실을 향상시킴으로써 종양 특이적 항체의 치료상 잇점, 임상 효능을 향상시킨다.

[0273] 따라서, 본 발명은 암 항원에 특이적으로 결합하고 세포독성인 다른 항체와 조합되어 투여될 때 암 항원을 특징으로 하는 암을 예방 또는 치료하는 방법을 제공한다. 본 발명의 인간화 항체는 암의 예방 또는 치료를 위해, 특히 본 발명의 항체에 의한 종양 세포 치사를 향상시키도록 세포독성 활성을 갖는 암 항원-특이적 치료 항체의 세포독성 활성을 강화시키는데 및/또는 예를 들어 치료 항체의 ADCC 활성 또는 CDC 활성을 향상시키는데 유용하다. 본 발명의 특정 실시태양에서, 본 발명의 인간화 항체는 Fc 융합 단백질과 함께 투여된다. 특정 실시태양에서, 본 발명의 인간화 항체는 단독으로 또는 세포독성 치료 항체와 조합되어 투여될 때 원발 종양의 성장 또는 암성 세포의 전이를 본 발명의 항체의 부재 하의 원발 종양의 성장 또는 전이에 비해 적어도 99%, 적어도 95%, 적어도 90%, 적어도 85%, 적어도 80%, 적어도 75%, 적어도 70%, 적어도 60%, 적어도 50%, 적어도 45%, 적어도 40%, 적어도 35%, 적어도 30%, 적어도 25%, 적어도 20%, 또는 적어도 10% 억제하거나 감소시킨다. 바람직한 실시태양에서, 본 발명의 인간화 항체는 세포독성 치료 항체와 조합으로 원발 종양의 성장 또는 암의 전이를 상기 항체의 부재 하의 성장 또는 전이에 비해 적어도 99%, 적어도 95%, 적어도 90%, 적어도 85%, 적어도 80%, 적어도 75%, 적어도 70%, 적어도 60%, 적어도 50%, 적어도 45%, 적어도 40%, 적어도 35%, 적어도 30%, 적어도 25%, 적어도 20%, 또는 적어도 10% 억제하거나 감소시킨다.

[0274] 정상에서 악성 상태로의 전환은 유전적 및 후생유전적 변화를 포함하는 다단계 과정이다. 사실, 세포 조절 회로에서 종양 세포가 조직 항상성을 정상적으로 조절하는 종말 분화 및 정지에 대한 의무를 회피할 수 있게 하는

상기 진행을 촉진하는 수많은 변경이 일어난다. 특정 유전자, 예를 들어 CSF-1 (콜로니 자극 인자 1 또는 대식 세포 콜로니 자극 인자)가 암세포의 침범 및 전이 가능성에 관련되었다. 특정 작용 메커니즘에 매이기를 의도하지 않지만, CSF-1은 종양 진행을 촉진하는 종양 부위에 대식세포를 동원함으로써 종양 진행 및 전이를 매개할 수 있다. 대식세포는 아마도 혈관형성 인자, 예를 들어 티미딘 포스포릴라제, 혈관 내피-유래 성장 인자의 분비; 성장 인자, 예를 들어 종양 세포 상에서 주변분비 (paracrine) 인자로서 작용할 수 있는 표피 성장 인자의 분비에 의해 종양 진행 및 전이를 매개하는데 및 이에 따라 혈관 내로의 종양 세포 이동 및 침습을 촉진시키는데 있어서 자극 역할을 갖는 것으로 생각된다 (예를 들어 Lin et al., 2001, J. Exp. Med. 193(6): 727-739; Lin et al., 2002, Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia 7(2): 147-162; Scholl et al., 1993, Molecular Carcinogenesis, 7: 207-11; Clynes et al., 2000, Nature Medicine, 6(4): 443-446; Fidler et al., 1985, Cancer Research, 45: 4714-26 참조).

[0275] 본 발명은 대식세포 매개된 종양 세포 진행 및 전이를 차단하기 위해 본 발명의 항체를 사용하는 것을 포함한다. 본 발명의 항체는 대식세포 침윤이 일어나는 고형 종양의 치료에서 특히 유용하다. 본 발명의 길항 항체는 종양 부위에 국재화되는 대식세포의 집단 형성을 감소시키거나 제거함으로써 종양 세포 전이를 제어하기 위해, 예를 들어 감소시키거나 제거하기 위해 특히 유용하다. 몇몇 실시태양에서, 본 발명의 항체는 종양 세포 전이를 제어하기 위해 단독으로 사용된다. 특정 작용 메커니즘에 매이기를 의도하지 않지만, 본 발명의 길항 항체는 단독으로 투여될 때 대식세포 상의 억제성 Fc γ RIIB에 결합하고, 대식세포의 집단 형성을 효과적으로 감소시키고 따라서 종양 세포 진행을 제한시킨다. Fc γ RIIB는 활성화된 단핵구 및 대식세포, 예를 들어 종양-침윤 대식세포 상에서 우선적으로 발현되므로, 본 발명의 길항 항체는 종양 부위에서 국재화되는 대식세포를 감소시키거나 바람직하게는 제거한다. 몇몇 실시태양에서, 본 발명의 항체는 CSF-1의 과발현을 특징으로 하는 암, 비제한적인 예를 들어 유방암, 자궁암 및 난소암의 치료에 사용된다.

[0276] 본 발명은 Fc γ RIIB를 발현하는 대식세포 이외의 면역세포, 예를 들어 수지상 세포 및 B-세포를 효과적으로 고갈시키거나 제거하는 인간화 항체를 추가로 포함한다. 본 발명의 항체를 사용하는 면역세포의 효과적인 고갈 또는 제거는 면역세포의 집단에서 50%, 60%, 70%, 80%, 바람직하게는 90%, 가장 바람직하게는 99%의 감소일 수 있다. 따라서, 본 발명의 항체는 단독으로 또는 제2 항체, 예를 들어 치료 항체, 예를 들어 항-종양 항체, 항 바이러스 항체 및 항미생물 항체와 조합되어 향상된 치료 효능을 갖는다. 몇몇 실시태양에서, 치료 항체는 암 세포 또는 염증 세포에 특이성을 갖는다. 다른 실시태양에서, 제2 항체는 정상 세포에 결합한다. 특정 작용 메커니즘에 매이기를 의도하지 않지만, 본 발명의 항체는 Fc γ RIIB-발현 면역세포를 고갈시키기 위해 단독으로 사용될 때, 세포의 집단은 남아있는 세포가 활성화 Fc 수용체를 갖고, 따라서 Fc γ RIIB에 의한 억제가 개선되도록 효과적으로 재분포된다. 제2 항체, 예를 들어 치료 항체와 조합되어 사용될 때, 제2 항체의 효능은 항체의 Fc-매개 이펙터 기능을 증가시킴으로써 향상된다.

[0277] 본 발명의 방법 및 조성물에 의해 치료되거나 예방될 수 있는 암 및 관련 질환은 백혈병, 비제한적인 예를 들어 급성 백혈병, 급성 림프구성 백혈병, 급성 골수구성 백혈병, 예를 들어 골수모세포성, 전골수구성, 골수단핵구성, 단핵구성, 적백혈병성 백혈병 및 골수형성이상 증후군, 만성 백혈병, 비제한적인 예를 들어 만성 골수구성 (과립구성) 백혈병, 만성 림프구성 백혈병, 털세포 백혈병; 진성적혈구증가증; 림프종, 비제한적인 예를 들어 호지킨병, 비호지킨병; 다발골수종, 비제한적인 예를 들어 아급성 다발골수종, 비분비형 골수종, 골경화성 골수종, 형질세포 백혈병, 단일 형질세포종 및 골수의 형질세포종; 발덴스트롬 (Waldenstrom) 마크로글로불린혈증; 비결정 유의성의 모노클로날 감마글로불린병증; 양성 모노클로날 감마글로불린병증; 중쇄 질병; 뼈 및 결합 조직 육종, 비제한적인 예를 들어 뼈 육종, 골육종, 연골육종, 유잉 (Ewing) 육종, 악성 거대세포 종양, 뼈의 섬유육종, 척삭종, 골막 육종, 연조직 육종, 혈관육종 (맥관육종), 섬유육종, 카포시 육종, 평활근육종, 지방육종, 림프관육종, 신경집종, 횡문근육종, 활막육종; 뇌종양, 비제한적인 예를 들어 신경아교종, 별아교세포종, 뇌간 신경아교종, 뇌실막세포종, 희소돌기아교세포, 비교종양, 청신경초종, 두개인두종, 수모세포종, 수막종, 송과체종, 송과체모세포종, 일차 뇌 림프종; 유방암, 비제한적인 예를 들어 선암종, 소엽 (소세포) 암종, 관내 암종, 수질성 유방암, 점액 유방암, 관형 유방암, 유두상 유방암, 파제트 (Paget) 병, 및 염증성 유방암; 부신암, 비제한적인 예를 들어 크롬친화세포종 및 부신피질 암종; 갑상선암, 비제한적인 예를 들어 유두상 또는 소포 갑상선암, 수질성 갑상선암 및 역형성 갑상선암; 췌장암, 비제한적인 예를 들어 인슐린종, 가스트린종, 글루카곤종, VIP종, 소마토스타틴-분비 종양, 및 유암종 또는 섬세포 종양; 뇌하수체암, 비제한적인 예를 들어 쿠싱 (Cushing) 병, 프로락틴-분비 종양, 말단거대증 및 요붕증; 눈암, 비제한적인 예를 들어 눈 흑색종 예를 들어 홍채 흑색종, 맥락막 흑색종 및 섬모체 흑색종, 및 망막모세포종; 질암, 비제한적인 예를 들어 편평세포 암종, 선암종 및 흑색종; 외음부암, 비제한적인 예를 들어 편평세포 암종, 흑색종, 선암종, 기초세포 암종, 육종 및 파제트병; 자궁경부암, 비제한적인 예를 들어 편평세포 암종 및 선암종; 자궁암, 비제한적인 예를 들어 자궁

내막 암종 및 자궁 육종; 난소암, 비제한적인 예를 들어 난소 상피 암종, 경계 종양, 생식 세포 종양 및 기질 종양; 식도암, 비제한적인 예를 들어 편평세포암, 선암종, 선양 낭성 암종, 점막표피양 암종, 선편평세포 암종, 육종, 흑색종, 형질세포종, 사마귀 암종 및 귀리 세포 (소세포) 암종; 위암, 비제한적인 예를 들어 선암종, 돌출형 (폴립양), 궤양성, 표면 확산형, 광범위 확산형, 악성 림프종, 지방육종, 섬유육종, 및 암육종; 결장암; 직장암; 간암, 비제한적인 예를 들어 간세포 암종 및 간모세포종, 담낭암, 비제한적인 예를 들어 선암종; 담관 암종, 비제한적인 예를 들어 유두상, 결절 및 확산; 폐암, 비제한적인 예를 들어 비소세포 폐암, 편평세포 암종 (표피양 암종), 선암종, 대세포 암종 및 소세포 폐암; 고환암, 비제한적인 예를 들어 생식세포 종양, 생식세포 종, 역형성, 고전적 (전형적), 정모세포, 비생식세포종, 배아 암종, 기형종 암종, 융모막암종 (난황낭 종양), 전립선암, 비제한적인 예를 들어 선암종, 평활근육종 및 횡문근육종; 음경암; 구강암, 비제한적인 예를 들어 편평세포 암종; 기초암; 침샘암, 비제한적인 예를 들어 선암종, 점막표피양 암종 및 선양낭성 암종; 인두암, 비제한적인 예를 들어 편평세포암, 및 사마귀; 피부암, 비제한적인 예를 들어 기초세포 암종, 편평세포 암종 및 흑색종, 표면 확산 흑색종, 결절 흑색종, 흑색점 악성 흑색종, 말단 흑자 흑색종; 신장암, 비제한적인 예를 들어 신장 세포암, 선암종, 신세포암종, 섬유육종, 이행 세포암 (신우 및/또는 우터러 (uterer)); 윌름즈 (Wilms) 종양; 방광암, 비제한적인 예를 들어 이행 세포 암종, 편평세포암, 선암종, 암육종을 포함하고 이로 제한되지 않는다. 또한, 암은 점액육종, 골육종, 내피육종, 림프관내피육종, 증피종, 율활막종, 혈관모세포종, 상피 암종, 낭선암종, 기관지원성 암종, 땀샘 암종, 피지선 암종, 유두상 암종 및 유두상 선암종을 포함한다 (상기 질환의 개관을 위해 문헌 [Fishman et al., 1985, Medicine, 2d Ed., J.B. Lippincott Co., Philadelphia and Murphy et al., 1997, Informed Decisions: The Complete Book of Cancer Diagnosis, Treatment, and Recovery, Viking Penguin, Penguin Books U.S.A., Inc., United States of America] 참조).

[0278] 따라서, 본 발명의 방법 및 조성물은 또한 다양한 암 또는 다른 비정상적 증식성 질병, (비제한적인) 예를 들어 암종, 예를 들어 방광, 유방, 결장, 신장, 간, 폐, 난소, 췌장, 위, 자궁경부, 갑상선 및 피부의 암종; 편평세포 암종 포함; 림프계의 조혈계 종양, 예를 들어 백혈병, 급성 림프구성 백혈병, 급성 림프모세포성 백혈병, B-세포 림프종, T-세포 림프종, 버키트 림프종; 골수계의 조혈계 종양, 예를 들어 급성 및 만성 골수 백혈병 및 전골수구성 백혈병; 중간엽 기원의 종양, 예를 들어 섬유육종 및 횡문근육종; 다른 종양, 예를 들어 흑색종, 생식세포종, 기형암종, 신경모세포종 및 신경아교종; 중추 및 말초 신경계의 종양, 예를 들어 별아교세포종, 신경모세포종, 신경아교종 및 슈반세포종; 중간엽 기원의 종양, 예를 들어 섬유육종, 횡문근육종 및 골육종; 및 다른 종양, 예를 들어 흑색종, 색소성 건피증, 각질가시세포종, 생식세포종, 갑상선 소포 암 및 기형암종의 치료 또는 예방에 유용하다. 세포자멸의 이상에 의해 유발된 암이 또한 본 발명의 방법 및 조성물에 의해 또한 치료될 것으로 생각된다. 상기 암은 여포성 림프종, p53 돌연변이를 갖는 암종, 유방, 전립선 및 난소의 호르몬 의존성 종양, 및 전암성 병변, 예를 들어 가족성 대장폴립증, 및 골수형성이상 증후군을 포함할 수 있고, 이로 제한되지 않는다. 특정 실시태양에서, 악성종양 또는 증식이상적 변화 (예를 들어 화생 및 형성이상), 또는 과증식 질환이 난소, 방광, 유방, 결장, 폐, 피부, 췌장, 또는 자궁에서 본 발명의 방법 및 조성물에 의해 치료되거나 예방된다. 다른 특정 실시태양에서, 육종, 흑색종, 또는 백혈병이 본 발명의 방법 및 조성물에 의해 치료되거나 예방된다.

[0279] 암 항원과 연관된 암은 암 항원에 결합하고 세포독성인 항체와 조합으로 본 발명의 항체의 투여에 의해 치료되거나 예방될 수 있다. 한 특정 실시태양에서, 본 발명의 항체는 특정 암 항원에 지정된 항체의 항체 매개 세포독성 효과를 향상시킨다. 비제한적인 예를 들어, 다음 암 항원과 연관된 암이 본 발명의 방법 및 조성물에 의해 치료되거나 예방될 수 있다: KS 1/4 pan-암종 항원 (Perez and Walker, 1990, J. Immunol. 142:32-37; Bumal, 1988, Hybridoma 7(4):407-415), 난소 암종 항원 (CA125) (Yu et al., 1991, Cancer Res. 51(2):48-475), 전립선 산 포스페이트 (Tailor et al., 1990, Nucl. Acids Res. 18(1):4928), 전립선 특이적 항원 (Henttu and Vihko, 1989, Biochem. Biophys. Res. Comm. 10(2):903-910; Israeli et al, 1993, Cancer Res. 53:227-230), 흑색종-관련 항원 p97 (Estin et al., 1989, J. Natl. Cancer Instit. 81(6):445-44), 흑색종 항원 gp75 (Vijayasardahl et al., 1990, J. Exp. Med. 171(4):1375-1380), 고분자량 흑색종 항원 (HMW-MAA) (Natali et al., 1987, Cancer 59:55-3; Mittelman et al., 1990, J. Clin. Invest. 86:2136-2144), 전립선 특이적 막 항원, 암배아 항원 (CEA) (Foon et al., 1994, Proc. Am. Soc. Clin. Oncol. 13: 294), 다형 상피 점액소 항원, 인간 유지방 과립 항원, 결장직장 종양 관련 항원, 예를 들어: CEA, TAG-72 (Yokata et al., 1992, Cancer Res. 52:3402-3408), C017-1A (Ragnhammar et al., 1993, Int. J. Cancer 53:751-758); GICA 19-9 (Herlyn et al., 1982, J. Clin. Immunol. 2:135), CTA-1 및 LEA, 버키트 림프종 항원-38.13, CD19 (Ghetie et al., 1994, Blood 83:1329-1336), 인간 B-림프종 항원-CD20 (Reff et al., 1994, Blood 83:435-445), CD33 (Sgouros et al., 1993, J. Nucl. Med. 34:422-430), 흑색종 특이적 항원, 예를 들어 강글리오시드

GD2 (Saleh et al., 1993, J. Immunol., 151, 3390-3398), 강글리오시드 GD3 (Shitara et al., 1993, Cancer Immunol. Immunother. 36:373-380), 강글리오시드 GM2 (Livingston et al., 1994, J. Clin. Oncol. 12:1036-1044), 강글리오시드 GM3 (Hoon et al., 1993, Cancer Res. 53:5244-5250), 종양-특이적 이식 종류의 세포 표면 항원 (TSTA), 예를 들어 바이러스 유발 종양 항원, 예를 들어 T-항원 DNA 종양 바이러스 및 RNA 종양 바이러스의 엔벨롭 항원, 종양태아 항원-알파-태아단백, 예를 들어 결장의 CEA, 방광 종양 종양태아 항원 (Hellstrom et al., 1985, Cancer. Res. 45:2210-2188), 분화 항원, 예를 들어 인간 폐 암종 항원 L6, L20 (Hellstrom et al., 1986, Cancer Res. 46:3917-3923), 섬유육종의 항원, 인간 백혈병 T세포 항원-Gp37 (Bhattacharya-Chatterjee et al., 1988, J. of Immun. 141:1398-1403), 신생당단백질, 스핑고리피드, 유방암 항원, 예를 들어 EGFR (표피 성장 인자 수용체), HER2 항원 (p185^{HER2}), 다형 상피 점액소 (PEM) (Hilkens et al., 1992, Trends in Bio. Chem. Sci. 17:359), 악성 인간 림프구 항원-APO-1 (Bernhard et al., 1989, Science 245:301-304), 분화 항원 (Feizi, 1985, Nature 314:53-57), 예를 들어 태아 적혈구 및 일차 내배엽에서 발견된 I 항원, 위 선암종에서 발견된 I(Ma), 유방 상피에서 발견된 M18 및 M39, 골수 세포에서 발견된 SSEA-1, 결장직장암에서 발견된 VEP8, VEP9, My1, VIM-D5 및 D₁56-22, TRA-1-85 (혈액형 H), 결장 선암종에서 발견된 C14, 폐 선암종에서 발견된 F3, 위암에서 발견된 AH6, Y 합텐, 배 암종 세포에서 발견된 Le^y, TL5 (혈액형 A), A431 세포에서 발견된 EGF 수용체, 췌장암에서 발견된 E₁ 시리즈 (혈액형 B), 배 암종 세포, 위 선암종에서 발견된 FC10.2, 선암종에서 발견된 CO-514 (혈액형 Le^a), 선암종에서 발견된 NS-10, CO-43 (혈액형 Le^b), G49, EGF 수용체, 결장 선암종에서 발견된 (혈액형 AL^b/Le^y), 결장암에서 발견된 19.9, 위암 점액소, 골수 세포에서 발견된 T₅A₇, 흑색종에서 발견된 R₂₄, 4.2, G_{D3}, D1.1, OFA-1, G₁₂, OFA-2, G_{D2}, 배 암종 세포에서 발견된 M1:22:25:8 및 4-8-세포 단계 배에서 발견된 SSEA-3, SSEA-4. 다른 실시태양에서, 항원은 피부 T세포 림프종으로부터의 T세포 수용체 유래 펩티드이다 (Edelson, 1998, The Cancer Journal 4:62 참조).

[0280] 본 발명의 인간화 항체는 치료 효능을 향상시키기 위해 당업계에 공지된 임의의 치료적 암 항체와 조합되어 사용될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 인간화 항체는 암 치료에서 치료 효능을 나타낸 표 7의 임의의 항체와 함께 사용될 수 있다. 본 발명의 인간화 항체는 치료적 암 항체의 적어도 하나의 항체-매개 이펙터 기능을 향상시킴으로써 치료적 암 항체의 치료 효능을 향상시킨다. 한 특정 실시태양에서, 인간화 항체는 상기 치료적 암 항체의 보체 의존 캐스케이드를 향상시킴으로써 치료 효능을 향상시킨다. 본 발명의 또다른 실시태양에서, 본 발명의 인간화 항체는 표적화된 종양 세포의 포식작용 및 오프소닌작용을 향상시킴으로써 치료 효능을 향상시킨다. 본 발명의 또다른 실시태양에서, 본 발명의 인간화 항체는 표적화된 종양 세포의 파괴에서 항체의존성 세포-매개 세포독성 ("ADCC")을 향상시킴으로써 치료 효능을 향상시킨다.

[0281] 본 발명의 인간화 항체는 또한 이전에 개발되었거나 (콜리 파마슈티칼스 (Coley Pharmaceuticals)), 현재 선천 및 후천 면역 반응의 활성화제로서 개발되고 있는 시토신-구아닌 디뉴클레오티드 ("CpG")-계 생성물과 조합되어 사용될 수 있다. 예를 들어, 본 발명은 암 치료 및/또는 예방을 위해 본 발명의 방법 및 조성물에서 CpG 7909, CpG 8916, CpG 8954 (콜리 파마슈티칼스)의 사용을 포함한다 (또한 본원에 참고로 포함된 Warren et al., 2002, Semin Oncol., 29(1 Suppl 2):93-7; Warren et al., 2000, Clin Lymphoma, 1(1):57-61 참조).

[0282] 본 발명의 인간화 항체는 항체의 치료 활성을 강화시키기 위해 세포 치사를 통해 그의 치료 효과를 매개하지 않는 치료 항체와 조합되어 사용될 수 있다. 특정 실시태양에서, 본 발명은 효현제 활성을 갖는 치료적 세포자멸 유도 항체, 예를 들어 항-Fas 항체와 조합으로 본 발명의 항체의 사용을 포함한다. 항-Fas 항체는 당업계에 공지되어 있고 예를 들어, Jo2 (Ogasawara et al., 1993, Nature 364: 806) 및 HFE7 (Ichikawa et al., 2000, Int. Immunol. 12: 555)를 포함한다. 특정 작용 메커니즘에 매이기를 의도하지 않지만, Fc γ RIIB는 항-Fas 매개 세포자멸을 촉진하는데 관련되었다 (예를 들어 Xu et al., 2003, Journal of Immunology, 171: 562-568 참조). 사실상, Fc γ RIIB의 세포의 도메인은 Fas 수용체에 대한 가교결합체로서 기능할 수 있어서, 기능적 복합체를 생성시키고 Fas 의존적 세포자멸을 촉진시킨다. 몇몇 실시태양에서, 본 발명의 항체는 항-Fas 항체 및 Fc γ RIIB의 상호작용을 차단하여 Fas-매개 세포자멸 활성을 감소시킨다. Fas-매개 세포자멸 활성을 감소시키는 본 발명의 항체는 바람직하지 않은 부작용, 예를 들어 간독성을 갖는 항-Fas 항체와 조합되어 특히 유용하다. 다른 실시태양에서, 본 발명의 항체는 항-Fas 항체 및 Fc γ RIIB의 상호작용을 향상시켜 Fas-매개 세포자멸 활성을 향상시킨다. 본 발명의 항체를 효현제 활성을 갖는 치료적 세포자멸 유도 항체와 조합하면 향상된 치료 효능을 갖는다.

[0283] 본 발명의 방법에 사용된 치료적 세포자멸 유도 항체는 세포자멸 경로의 조절을 위해 당업계에 공지된 임의의

자멸 수용체, 예를 들어, TNFR 수용체 패밀리에 특이적일 수 있다.

[0284] 본 발명은 세포자멸 매개된 신호전달이 손상된 질병, 예를 들어 암, 자가면역 질병의 치료 방법을 제공한다. 특정 실시태양에서, 본 발명은 Fas-매개 세포자멸이 결핍된 질병의 치료 방법을 포함하고, 상기 방법은 본 발명의 항체를 항-Fas 항체와 조합하여 투여하는 것을 포함한다.

[0285] 몇몇 실시태양에서, 본 발명의 효현 항체는 비-조혈 기원의 종양, 예를 들어 흑색종 세포의 종양 치료에 특히 유용하다. 특정 작용 메카니즘에 매이기를 의도하지 않지만, 비-조혈 기원의 종양, 예를 들어 흑색종 세포의 종양이 Fc γ RIIB를 발현하므로 본 발명의 효현 항체의 효능은 부분적으로 Fc γ RIIB 억제 경로의 활성화로 인한 것이다. 최근 실험에서는 실제로 흑색종 세포에서 Fc γ RIIB의 발현이 세포질내-외존 방식으로 항-종양 항체와의 직접 상호작용에 의해 (예를 들어 항-종양 항체의 Fc 영역에 결합함으로써) 종양 성장을 조절하는 것을 보였다 (Cassard et al., 2002, Journal of Clinical Investigation, 110 (10): 1549-1557).

[0286] 몇몇 실시태양에서, 본 발명은 종양 세포 자체 상에 발현되지 않지만 대신 종양 기질을 포함하는 주변의 반응성의 종양 지지 비-악성 세포 상에 발현된 종양 항원에 면역특이적으로 결합하는 치료 항체와 조합으로 본 발명의 항체의 사용을 포함한다. 종양 기질은 새로운 혈관을 형성하는 내피 세포 및 종양 혈관구조를 둘러싸는 기질 섬유모세포를 포함한다. 특정 실시태양에서, 본 발명의 항체는 내피 세포 상의 종양 항원에 면역특이적으로 결합하는 항체와 조합되어 사용된다. 바람직한 실시태양에서, 본 발명의 항체는 섬유모세포 세포 상의 종양 항원, 예를 들어 섬유모세포 활성화 단백질 (FAP)에 면역특이적으로 결합하는 항체와 조합되어 사용된다. FAP는 많은 고형 종양, 비제한적인 예를 들어 폐, 유방 및 결장직장 암종의 기질 섬유모세포에서 고도로 발현되는 95 KDa 동종이량체 타입 II 당단백질이다 (예를 들어 Scanlan et al., 1994; Proc. Natl. Acad. USA, 91: 5657-61; Park et al., 1999, J. Biol. Chem., 274:36505-12; Rettig et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 3110-3114; Garin-Cheslea et al., 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 7235-7239 참조). FAP에 면역특이적으로 결합하는 항체는 당업계에 공지되어 있고 본 발명에 포함된다 (예를 들어 그 전부가 본원에 참고로 포함된 Wuest et al., 2001, Journal of Biotechnology, 159-168; Mersmann et al., 2001, Int. J. Cancer, 92: 240-248; 미국 특허 6,455,677 참조).

[0287] 최근에 IgE는 종양 성장의 매개자로서 관련되었고, 실제로 IgE-표적된 즉시형 과민성 및 알레르기성 염증 반응은 항-종양 반응에 관련된 가능한 자연 메카니즘으로서 제안되었다 (개관을 위해 예를 들어 Mills et al., 1992, Am. Journal of Epidemiol. 122: 66-74; Eriksson et al., 1995, Allergy 50: 718-722 참조). 실제로 최근 연구에서는 종양 세포에 IgE로 로딩하면 종양 성장을 감소시키고, 몇몇 경우에 종양 거부를 일으킨 것을 보여준다. 연구에 따르면, IgE 로딩된 종양 세포는 치료 가능성을 가질 뿐만 아니라, 또한 선천 면역 이펙터 메카니즘 및 T-세포 매개 적응 면역 반응의 활성화를 포함하는 장기 항종양 면역을 부여한다 (그 전부가 본원에 참고로 포함된 Reali et al., 2001, Cancer Res. 61: 5516-22 참조). 본 발명의 길항 항체는 IgE-매개 암 치료법의 효능을 향상시키기 위해 IgE의 투여와 조합으로 암의 치료 및/또는 예방에 사용될 수 있다. 특정 작용 메카니즘에 매이기를 의도하지 않지만, 본 발명의 항체는 억제 경로를 차단함으로써 종양의 IgE 치료의 치료 효능을 향상시킨다. 본 발명의 길항 항체는 IgE 단독으로 암을 치료하는 것에 비해 (i) 종양 성장에서 지연을 향상시킴으로써; (ii) 종양 진행 속도의 감소를 향상시킴으로써; (iii) 종양 거부를 향상시킴으로써; 또는 (iv) 보호 면역을 향상시킴으로써 IgE 매개된 암 치료법의 치료 효능을 향상시킬 수 있다.

[0288] 암 치료법 및 그들의 투여량, 투여 경로 및 추천 용도는 당업계에 공지되어 있고 문헌에 설명되어 있다 (예를 들어 본원에 참고로 포함된 Physician's Desk Reference (56th ed., 2002) 참조).

[0289] 5.3.2 B세포 악성종양

[0290] 본 발명의 효현 항체는 임의의 B세포 악성종양, 특히 비호지킨 림프종 및 만성 림프구성 백혈병을 치료하거나 예방하기 위해 유용하다. 다른 B-세포 악성종양은 소림프구성 림프종, 버키트 림프종, 외투 세포 림프종, 미만성 소분할 세포 림프종, 대부분의 여포성 림프종 및 몇몇 미만성 큰 B세포 림프종 (DLBCL)을 포함한다. Fc γ RIIB는 악성 림프종, 특히 B-세포 비호지킨 림프종에서 염색체 전위에 의한 탈조절에 대한 표적이다 (Callanan M.B. et al., 2000 Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 97(1):309-314 참조). 따라서, 본 발명의 항체는 B세포계의 임의의 만성 림프구성 백혈병을 치료하거나 예방하기 위해 유용하다. B세포계의 만성 림프구성 백혈병은 프리드만 (Freedman)에 의해 개관되었다 (Hemtaol. Oncol. Clin. North Am. 4:405 참조). 임의의 작용 메카니즘에 매이기를 의도하지 않지만, 본 발명의 효현 항체는 B세포 증식 및/또는 활성화를 억제함으로써 B세포 악성종을 억제하거나 예방한다. 본 발명은 또한 B세포 악성종양의 예방 및/또는 치료를 위해 당업계에 공지된 다른 치료법 (예를 들어 화학요법 및 방사선요법)과 조합으로 본 발명의 효현 항체의 사용을 포함한다. 본 발명은

또한 B-세포 악성종양의 치료 및/또는 예방을 위해 당업계에 공지된 다른 항체와 조합으로 본 발명의 효현 항체의 사용을 포함한다. 예를 들어, 본 발명의 효현 항체는 골든버그 (Goldenberg) 등 (미국 특허 6,306,393)에 의해 개시된 항-C22 또는 항-CD19 항체, 항-CD20 항체, 항-CD33 항체, 또는 항-CD52 항체와 조합되어 사용될 수 있다.

[0291] 본 발명의 항체는 또한 비제한적인 예를 들어 온코신트 (표적: CEA), 베르루마 (표적: GP40), 프로스타신트 (표적: PSMA), CEA-SCAN (표적: CEA), 리톡신 (표적: CD20), 헤르셉틴 (표적: HER-2), 캄파쓰 (표적: CD52), 마일로타게 (표적: CD33), 림포시드 (CD22), 림포시드 Y-90 (CD22) 및 제발린 (ZEVALIN) (표적: CD20)와 조합되어 사용될 수 있다.

[0292] 5.3.3 자가면역 질병 및 염증성 질병

[0293] 본 발명의 효현 항체는 자가면역 질병 또는 염증성 질병을 치료하거나 예방하기 위해 사용될 수 있다. 본 발명은 대상체에게 치료 유효량의 본 발명의 항체 또는 그의 단편을 투여하는 것을 포함하는, 대상체에서 자가면역 또는 염증성 질환과 관련된 하나 이상의 증상을 예방하거나 치료하거나 관리하는 방법을 제공한다. 본 발명은 또한 대상체에게 치료 유효량의 하나 이상의 항염증제를 투여하는 것을 추가로 포함하는, 대상체에서 염증성 질환과 관련된 하나 이상의 증상을 예방하거나 치료하거나 관리하는 방법을 제공한다. 본 발명은 또한 대상체에게 치료 유효량의 하나 이상의 면역조절제를 투여하는 것을 추가로 포함하는, 자가면역 질병과 관련된 하나 이상의 증상을 예방하거나 치료하거나 관리하는 방법을 제공한다. 섹션 5.4.5에서 항염증제 및 면역조절제의 비제한적 예를 제공한다.

[0294] 본 발명의 인간화 항체는 또한 자가면역 질병 또는 염증성 질병의 치료 및/또는 예방을 위해 당업계에 공지된 임의의 항체와 조합되어 사용될 수 있다. 염증성 질환의 치료 또는 예방을 위해 사용되는 항체 또는 Fc 융합 단백질의 비제한적 예를 표 6A에 제시하고, 자가면역 질환의 치료 또는 예방을 위해 사용되는 항체 또는 Fc 융합 단백질의 비제한적 예를 표 6B에 제시한다. 본 발명의 항체는 예를 들어, 표 6A 및 6B에 제시된 치료 항체 또는 Fc 융합 단백질의 치료 효능을 향상시킬 수 있다. 비제한적인 예를 들어, 본 발명의 항체는 표 6A 또는 6B의 임의의 항체 또는 Fc 융합 단백질을 사용하여 치료되는 대상체에서 면역 반응을 향상시킬 수 있다.

[0295] 본 발명의 인간화 항체는 또한 비제한적인 예를 들어 오르토클론 OKT3, ReoPro, 제나팍스, 시물렉, 리톡시맵, 시나기스 및 레미카테와 조합되어 사용될 수 있다.

[0296] 본 발명의 인간화 항체는 또한 이전에 개발되었거나 (콜리 파마슈티칼스) 현재 선천 및 후천 면역 반응의 활성화제로서 개발되고 있는 시토신-구아닌 디뉴클레오티드 ("CpG")-계 생성물과 조합되어 사용될 수 있다. 예를 들어, 본 발명은 자가면역 또는 염증성 질환의 치료 및/또는 예방을 위해 본 발명의 방법 및 조성물에서 CpG 7909, CpG 8916, CpG 8954 (콜리 파마슈티칼스)의 사용을 포함한다 (본원에 참고로 포함된 Weeratna et al., 2001, FEMS Immunol Med Microbiol., 32(1):65-71 참조).

[0297] 본 발명의 항체를 투여함으로써 치료될 수 있는 자가면역 질환의 예는 원형 탈모증, 강직성 척추염, 항인지질 증후군, 자가면역 애디슨병, 부신의 자가면역 질병, 자가면역 용혈성 빈혈, 자가면역 간염, 자가면역 난소염 및 고환염, 자가면역 저혈소판증, 베체트병, 수포성 유천포창, 심근병증, 비열대 스프루-피부염, 만성 피로 면역 기능이상 증후군 (CFIDS), 만성 염증 탈수초 다발신경병증, 처그-스트라우스(Churg-Strauss) 증후군, 반흔성 유천포창, CREST 증후군, 저온 응집소 질병, 크론병, 원판상 루푸스, 본태성 혼합 한랭글로불린혈증, 섬유근육통-섬유근육염, 사구체신염, 그레이브스병, 길랑-바레 (Guillain-Barre), 하시모토 갑상선염, 특발성 폐 섬유증, 특발성 혈소판감소성 자반 (ITP), IgA 신경병증, 유년기 관절염, 편평 태선, 전신성 홍반성 루푸스, 메니에르 (Meniere) 병, 혼합 결합 조직 질병, 다발성 경화증, 1형 또는 면역-매개 당뇨병, 중증 근무력증, 심상성 천포창, 악성 빈혈, 결절성 다발동맥염, 다발연골염, 다분비선 증후군, 류마티스성 다발 근육통, 다발근육염 및 피부근염, 원발성 무감마글로불린혈증, 원발성 담즙성 간경화증, 건선, 건선 관절염, 레이놀드 (Raynaud) 현상, 라이터 증후군, 류마티스성 관절염, 사코이드증, 피부경화증, 쇼그렌 증후군, 근강직 증후군, 전신성 홍반성 루푸스, 홍반성 루푸스, 다카야수 동맥염, 일시적 동맥염/ 거대세포 동맥염, 폐양성 대장염, 포도막염, 혈관염, 예를 들어 포진 피부부염 혈관염, 백반증, 및 베게너 (Wegener) 육아종증을 포함하고 이로 제한되지 않는다. 염증성 질환의 예는 천식, 뇌염, 염증성 장질환, 만성 폐색성 폐 질환 (COPD), 알레르기 질환, 패혈성 쇼크, 폐 섬유증, 미분화 척추관절염, 미분화 관절염, 관절염, 염증성 골용해, 및 만성 바이러스 또는 세균 감염으로 인한 만성 염증을 포함하고 이로 제한되지 않는다. 섹션 3.1에서 설명한 바와 같이, 일부 자가면역 질환은 염증 상태와 관련된다. 따라서, 자가면역 질환 및 염증성 질환으로 간주되는 것 중에 겹치는 것이 존재한다. 따라서, 일부 자가면역 질환은 염증성 질환으로서 특징지을 수도 있다. 본 발명의 방법에 따라 예방되거나 치료

되거나 관리될 수 있는 염증성 질환의 예는 천식, 뇌염, 염증성 장질환, 만성 폐색성 폐 질환 (COPD), 알레르기 질환, 패혈성 쇼크, 폐 섬유증, 미분화 척추관절병증, 미분화 관절병증, 관절염, 염증성 골용해, 및 만성 바이러스 또는 세균 감염으로 인한 만성 염증을 포함하고 이로 제한되지 않는다.

[0298] 본 발명의 특정 실시태양에서, 본 발명의 인간화 항체는 한 성별에서 보다 우세한 자가면역 질병을 치료하기 위해 사용할 수 있다. 예를 들어, 여성에서 그레이브스병의 유발물은 Fc γ RIIB2의 발현과 관련된다 (Estienne et al., 2002, FASEB J. 16:1087-1092 참조).

[0299] 본 발명의 인간화 항체는 또한 염증성 질환을 갖는 동물, 특히 포유동물이 경험하는 염증을 감소시키기 위해 사용될 수 있다. 특정 실시태양에서, 항체는 동물의 염증을 상기 항체를 투여하지 않은 동물의 염증에 비해 적어도 99%, 적어도 95%, 적어도 90%, 적어도 85%, 적어도 80%, 적어도 75%, 적어도 70%, 적어도 60%, 적어도 50%, 적어도 45%, 적어도 40%, 적어도 45%, 적어도 35%, 적어도 30%, 적어도 25%, 적어도 20% 또는 적어도 10% 감소시킨다. 다른 실시태양에서, 항체의 조합물은 동물의 염증을 상기 항체를 투여하지 않은 동물의 염증에 비해 적어도 99%, 적어도 95%, 적어도 90%, 적어도 85%, 적어도 80%, 적어도 75%, 적어도 70%, 적어도 60%, 적어도 50%, 적어도 45%, 적어도 40%, 적어도 45%, 적어도 35%, 적어도 30%, 적어도 25%, 적어도 20% 또는 적어도 10% 감소시킨다.

[0300] 본 발명의 인간화 항체는 또한 이식 거부를 방지하기 위해 사용될 수 있다.

표 4A

[0301] 본 발명의 항체와 조합되어 사용될 수 있는 염증성 질병 및 자가면역 질병에 대한 항체

항체명	표적항원	제품 종류	이소형	제조사	적응증
5G1.1	보체 (C5)	인간화	IgG	알렉시온 팜 인크 (Alexion Pharm Inc)	류마티스성 관절염
5G1.1	보체 (C5)	인간화	IgG	알렉시온 팜 인크	SLE
5G1.1	보체 (C5)	인간화	IgG	알렉시온 팜 인크	신장염
5G1.1-SC	보체 (C5)	인간화	ScFv	알렉시온 팜 인크	심폐우회술
5G1.1-SC	보체 (C5)	인간화	ScFv	알렉시온 팜 인크	심근경색
5G1.1-SC	보체 (C5)	인간화	ScFv	알렉시온 팜 인크	혈관성형술
ABX-CBL	CBL	인간		아브게닉스 인크	GvHD
ABX-CBL	CD147	뮤린	IgG	아브게닉스 인크	동종이식 거부
ABX-IL8	IL-8	인간	IgG2	아브게닉스 인크	건선
안테그렌	VLA-4	인간화	IgG	아테나(Athena)/엘란(Elan)	다발성 경화증
항-CD11a	CD11a	인간화	IgG1	제넨테크 인크/조마(Xoma)	건선
항-CD18	CD18	인간화	Fab'2	제넨테크 인크	심근경색
항-LFA1	CD18	뮤린	Fab'2	파스퇴르-메리유(Pasteur-Merieux)/이뮤노테크(Immunotech)	동종이식 거부
안토바	CD40L	인간화	IgG	바이오젠 (Biogen)	동종이식 거부
안토바	CD40L	인간화	IgG	바이오젠	SLE
BTI-322	CD2	랫트	IgG	메디뮴 인크 (Medimmune Inc)	GvHD, 건선
CDP571	TNF-알파	인간화	IgG4	셀테크 (Celltech)	크론병
CDP571	TNF-알파	인간화	IgG4	셀테크	류마티스성 관절염
CDP850	E-셀렉틴	인간화		셀테크	건선
코르세빈 M	Fact VII	키메라		센토코르 (Centocor)	항응고제
D2E7	TNF-알파	인간		CAT/BASF	류마티스성 관절염
Hu23F2G	CD11/18	인간화		ICOS 팜 인크 (ICOS Pharm Inc)	다발성 경화증
Hu23F2G	CD11/18	인간화	IgG	ICOS 팜 인크	뇌졸중
IC14	CD14			ICOS 팜 인크	독성 쇼크
ICM3	ICAM-3	인간화		ICOS 팜 인크	건선
IDEC-114	CD80	영장류화		IDEC 팜 (IDEC Pharm)/미쯔비시 (Mitsubishi)	건선

[0302]

항체명	표적항원	제품 종류	이소형	제조사	적응증
IDEC-131	CD40L	인간화		IDEC 팜/에이사이(Eisai)	SLE
IDEC-131	CD40L	인간화		IDEC 팜/에이사이	다발성 경화증
IDEC-151	CD4	영장류화	IgG1	IDEC 팜/ 글락소 스미스클라인 (Glaxo SmithKline)	류마티스성 관절염
IDEC-152	CD23	영장류화		IDEC 팜	천식/알레르기
인플릭시맵	TNF-알파	키메라	IgG1	센토코르	류마티스성 관절염
인플릭시맵	TNF-알파	키메라	IgG1	센토코르	크론병
LDP-01	베타2- 인테그린	인간화	IgG	밀레니엄 인크 (Millennium Inc) (류코사이트 인크. (LeukoSite Inc.))	뇌졸중
LDP-01	베타2- 인테그린	인간화	IgG	밀레니엄 인크 (류코사이트 인크.)	동종이식 거부
LDP-02	알파4베타7	인간화		밀레니엄 인크 (류코사이트 인크.)	궤양성 대장염
MAK-195F	TNF 알파	뮤린	Fab'2	크놀 팜 (Knoll Pharm), BASF	독성 쇼크
MDX-33	CD64 (FcR)	인간		메다렉스/센테온(Centeon)	자가면역 혈액학적 질환
MDX-CD4	CD4	인간	IgG	메다렉스/에이사이/ 젠맵(Genmab)	류마티스성 관절염
MEDI-507	CD2	인간화		메디툼 인크	건선
MEDI-507	CD2	인간화		메디툼 인크	GvHD
OKT4A	CD4	인간화	IgG	오르토 바이오테크 (Ortho Biotech)	동종이식 거부
오르토클론 OKT4A	CD4	인간화	IgG	오르토 바이오테크	자가면역 질병
오르토클론 항-CD3 OKT3	CD3	뮤린	mIgG2a	오르토 바이오테크	동종이식 거부
RepPro/ 압식시맵	gpIIbIIIa	키메라	Fab	센토코르/ 릴리 (Lilly)	관상동맥 혈관성형술 의 복합증
rhuMab-E25	IgE	인간화	IgG1	제넨테크/노바티스 (Novartis) /타녹스 바이오시스템즈 (Tanox Biosystems)	천식/알레르기

[0303]

항체명	표적항원	제품 종류	이소형	제조사	적응증
SB-240563	IL5	인간화		글락소 스미스클라인	천식/알레르기
SB-240683	IL-4	인간화		글락소 스미스클라인	천식/알레르기
SCH55700	IL-5	인간화		셀테크/쉐링 (Schering)	천식/알레르기
시몰렉트	CD25	키메라	IgG1	노바티스 팜 (Novartis Pharm)	동종이식 거부
SMART a-CD3	CD3	인간화		프로테인 디자인 랩 (Protein Design Lab)	자가면역 질병
SMART a-CD3	CD3	인간화		프로테인 디자인 랩	동종이식 거부
SMART a-CD3	CD3	인간화	IgG	프로테인 디자인 랩	건선
제나팍스	CD25	인간화	IgG1	프로테인 디자인 랩/호프만-라 로슈 (Hoffman-La Roche)	동종이식 거부

표 4B

[0304] 자가면역 질환에 대한 항체 및 Fc 융합 단백질

항체	적응증	표적 항원
ABX-RB2		T 세포, B 세포 및 NK 세포 상의 CBL 항원에 대한 항체 제노마우스 (Xenomouse)로부터의 완전 인간 항체
IL1-ra	류마티스성 관절염	제조합 소염 단백질
sTNF-RI	만성 염증성 질병 류마티스성 관절염	가용성 종양 괴사 인자 α-수용체 타입 I TNF 작용을 차단한다
5c8 (항 CD-40 리간드 항체)	II상 시험은 1999년 10월에 중단되었다 검사 "부작용"	CD-40
IDEC 131	전신성 홍반성 루푸스 (SLE)	항 CD40 인간화
IDEC 151	류마티스성 관절염	염장류화; 항-CD4
IDEC 152	천식	염장류화; 항-CD23
IDEC 114	건선	염장류화 항-CD80
MEDI-507	류마티스성 관절염; 다발성 경화증, 크론병, 건선	항-CD2
LDP-02 (항-b7 mAb)	염증성 장 질환, 크론병, 궤양성 대장염	백혈구 상의 a4b7 인테그린 수용체
SMART 항-감마 인터페론 항체	자가면역 질환	항-감마 인터페론
Verteportin	류마티스성 관절염	
Thalomid (탈리도마이드)	나병 - 시판 허용됨 크론병, 류마티스성 관절염	종양 괴사 인자 알파 (TNF 알파)의 억제제
SeICID (선택적 시토킨 억제제)		포스포디에스테라제 타입 4 효소 (PDE-4)의 고도 특이적 억제제 cAMP (시클릭 아데노신 모노포스페이트)의 수준을 증가시킴 단백질 키나제 A (PKA)를 활성화시킴 전사 인자 NF-κB를 차단함 TNF-α 유전자의 전사를 방지함 TNF-α의 생산을 감소시킴
IMiD (면역조절제)	전반적 자가면역 질환	탈리도마이드의 구조 유사체는 TNF-α를 억제한다
MDX-33	자가면역 반응에 의해 유발된 혈액 질환 특발성 혈소판감소성 자반 (ITP) 자가면역 용혈성 빈혈	Fc γ RI 수용체에 대한 모노클로날 항체

[0305]

항체	적응증	표적 항원
MDX-CD4	류마티스성 관절염 및 다른 자가면역을 치료함	CD4 수용체 분자에 대한 모노클로날 항체
VX-497	자가면역 질환, 다발성 경화증, 류마티스성 관절염, 염증성 장 질환, 루푸스, 건선	이노신 모노포스페이트 데히드로게나제 (립프구 증식에 필요한 뉴클레오타이드의 생산에 사용된 새로운 RNA 및 DNA를 제조하기 위해 필요한 효소)의 억제제
VX-740	류마티스성 관절염	ICE의 억제제 인터루킨-1 베타 (전환 효소는 공격적 면역 반응을 일으키는 경로를 제어한다 시토킨을 조절한다)
VX-745	염증에 특이적 면역 반응의 화학 신호전달에 관여 염증의 발생 및 진행	P38MAP 키나제의 억제제 미토겐 활성화된 단백질 키나제

Enbrel (에타네르셉트)		TNF (종양 괴사 인자)를 표적함
IL-8		IL-8 (인터루킨 8)에 대한 완전 인간 MAB (IL-8 차단 염증 반응을 차단한다)
5G1.1	류마티스성 관절염, 유사천포창 (위험한 피부 발진), 건선, 루푸스	C5 보체 억제제
Apogen MP4		재조합 항원 질병 관련 T-세포를 선택적으로 파괴함 세포자멸을 유도함 프로그래밍된 세포 사멸에 의해 제거된 T-세포 더이상 신체의 자기 세포를 공격하지 않음 특이적 아포젠은 특이적 T-세포를 표적함

[0306] 5.3.4 알레르기

[0307] 본 발명은 대상체에게 치료 유효량의 본 발명의 효현 항체 또는 그의 단편을 투여하는 것을 포함하는, 그를 필요로 하는 대상체에서 IgE-매개 및/또는 Fc γ RI 매개된 알레르기 질환을 치료하거나 예방하기 위한 방법을 제공한다. 특정 작용 메커니즘에 매이기를 의도하지 않지만, 본 발명의 항체는 급성 및 후기상 알레르기 반응에 기여하는 Fc ϵ RI-유도 비만세포 활성화를 억제하는데 유용하다 (Metcalf D. et al. 1997, Physiol. Rev. 77:1033). 바람직하게는, 본 발명의 효현 항체는 IgE 매개된 알레르기 질환의 치료 및/또는 예방을 위해 당업계에 사용된 통상적인 방법에 비해 향상된 치료 효능 및/또는 감소된 부작용을 갖는다. IgE 매개된 알레르기 질환의 치료 및/또는 예방을 위한 통상적인 방법은 항염증 약물 (예를 들어, 천식용 경구 및 흡입 코르티코스테로이드), 항히스타민제 (예를 들어, 알레르기성 비염 및 아토피 피부염용), 시스테이닐 류코트리엔 (예를 들어, 천식 치료용); 항-IgE 항체; 및 특이적 면역요법 또는 탈감작을 포함하고 이로 제한되지 않는다.

[0308] IgE-매개 알레르기 반응의 예는 천식, 알레르기성 비염, 위장관 알레르기, 호산구증가증, 결막염, 아토피 피부염, 두드러기, 과민증, 또는 사구체신염을 포함하고 이로 제한되지 않는다.

[0309] 본 발명은 Fc γ RI 및 인간 Fc γ RIIB와 복합체를 형성하도록, 즉 Fc γ RI 및 인간 Fc γ RIIB에 특이적으로 결합하도록 공학처리된 분자, 예를 들어 면역글로불린을 포함한다. 바람직하게는, 상기 분자는 IgE 및 Fc γ RI-매개 질환에서 치료 효능을 갖는다. 특정 작용 메커니즘에 매이기를 의도하지 않지만, 이들 공학처리된 분자의 치료 효능은 부분적으로 비만세포 및 호염기구 기능을 억제하는 그들의 능력으로 인한 것이다.

[0310] 특정 실시태양에서, Fc γ RI 및 인간 Fc γ RIIB에 특이적으로 결합하는 분자는 Fc γ RI에 대한 결합 부위 및 Fc γ RIIB에 대한 결합 부위를 포함하는 키메릭 융합 단백질이다. 상기 분자는 당업계의 숙련인에게 공지된 표준 재조합 DNA 방법에 따라 공학처리될 수 있다. 바람직한 특정 실시태양에서, 본 발명의 방법에 사용하기 위한 키메릭 융합 단백질은 huFc γ 를 항-Fc γ RIIB 모노클로날 항체의 F(ab') 단쇄의 C-말단 영역에 연결시키기 위한 브릿지로서 사용된 영역에 융합된 본 발명의 항-Fc γ RIIB 모노클로날 항체의 F(ab') 단쇄를 포함한다. 본 발명의 방법에 사용하기 위한 하나의 예시적인 키메릭 융합 단백질은 V_L/C_H (Fc γ RIIB)-힌지-V_H/C_H (Fc γ RIIB)-링커-C_H2-C_H3-C_H4를 포함한다. 키메릭 분자를 위한 링커는 5, 10, 바람직하게는 15개의 아미노산 길이일 수 있다. 링커의 길이는 Fc γ RIIB 및 Fc γ RI에 대한 분자의 최적 결합을 제공하기 위해 변할 수 있다. 특정 실시태양에서, 링커는 서열 (Gly₄Ser)₃으로 이루어지는 15개 아미노산의 링커이다. 특정 작용 메커니즘에 매이기를 의도하지 않지만, 탄력적 펩티드 링커는 사슬 페어링 (pairing)을 용이하게 하고 가능한 리폴딩 (refolding)을 최소화시키고, 이는 또한 키메릭 분자가 세포 상의 2개의 수용체, 즉 Fc γ RIIB 및 Fc γ RI에 도달하여 이들을 가교 결합시키도록 허용할 것이다. 바람직하게는, 키메릭 분자는 적합성 프로모터, 예를 들어 사이토메갈로바이러스 프로모터를 사용하여 포유동물 발현 벡터, 예를 들어 pCI-neo 내로 클로닝된다. 본 발명의 방법에 따라 제조된 융합 단백질은 Fc ϵ RI (CH2CH3) 및 Fc γ RIIB (VL/CL, -힌지-VH/CH)에 대한 결합 부위를 함유할 수 있다. 본 발명의 방법에 따라 제조된 융합 단백질을 코딩하는 핵산은 바람직하게는 293 세포 내로 형질감염되고, 분비된 단백질은 당업계에 공지된 일반적인 방법을 사용하여 정제된다.

- [0311] 인간 $Fc\epsilon RI$ 및 $Fc\gamma RIIB$ 모두에 대한 키메라 분자의 결합은 $Fc\gamma R$ 에 대한 결합을 측정하기 위하여 당업계의 숙련인에게 공지된 일반적인 방법을 사용하여 평가될 수 있다. 바람직하게는, 본 발명의 키메라 분자는 예를 들어 항원 유도된 탈과립 및 세포 활성화의 억제제를 억제함으로써 IgE 매개된 질환을 치료하는데 치료 효능을 갖는다. IgE 유도된 $Fc\epsilon RI$ -매개 비만세포 탈과립을 차단하는데 있어서 본 발명의 키메라 분자의 효능은 인간에 사용하기 이전에 인간 $Fc\epsilon R\alpha$ 및 인간 $Fc\gamma RIIB$ 를 발현하도록 공학처리된 트랜스제닉 마우스에서 결정될 수 있다.
- [0312] 본 발명은 IgE-매개 및/또는 $Fc\gamma RI$ -매개 알레르기 질환의 치료 및/또는 예방을 위한 이중특이적 항체의 용도를 제공한다. 이중특이적 항체 (BsAb)는 보통 별개의 항원 상의 2개의 상이한 에피토프에 결합한다. BsAb는 잠재적인 임상 효용을 갖고, 바이러스, 바이러스로 감염된 세포 및 세균 병원체를 표적화하기 위해 및 혈액에 혈전 용해제를 전달하기 위해 사용되었다 (Cao Y., 1998 Bioconj. Chem 9: 635-644; Koelemij et al., 1999, J. Immunother., 22, 514-524; Segal et al., Curr. Opin. Immunol., 11, 558-562). BsIgG 및 다른 관련 이중특이적 분자의 생산을 위한 기술이 이용가능하다 (예를 들어 그 전부가 본원에 참고로 포함된 Carter et al., 2001 J. of Immunol. Methods, 248, 7-15; Segal et al., 2001, J. of Immunol. Methods, 248, 7-15 참조). 본 발명은 동일한 세포 표면 상의 2개의 수용체, 즉 $Fc\gamma RIIB$ 및 $Fc\epsilon RI$ 를 응집시키는, 항- $Fc\gamma RIIB$ 항체의 하나의 F(ab') 및 이용가능한 모노클로날 항-huIgE 항체의 하나의 F(ab')를 함유하는 이중특이적 항체를 제공한다. 당업계에 공지되고 본원에 개시된 임의의 방법이 본 발명의 방법에 사용하기 위한 이중특이적 항체를 생성하기 위해 사용될 수 있다. 특정 실시태양에서, BsAb는 이전에 설명된 바와 같이 항- $Fc\gamma RIIB$ 항체 및 항-huIgE 항체의 F(ab') 단편들을 화학적으로 가교결합시킴으로써 생산될 것이다 (예를 들어 그 전부가 본원에 참고로 포함된 Glennie et al., 1995, Tumor Immunobiology, Oxford University press, Oxford, p. 225 참조). F(ab') 단편은 펩신을 사용하는 제한 단백질분해에 의해 생산되고 머캡토에탄올 아민으로 환원시켜 유리 힌지-영역 술폰히드릴 (SH)기를 갖는 Fab' 단편을 제공할 수 있다. 하나의 Fab' (SH) 단편 상의 SH기는 과잉의 O-페닐렌디말레이미드 (O-PDM)로 알킬화되어 유리 말레이미드기 (mal)를 제공할 수 있다. 2개의 제제 Fab'(mal) 및 Fab'(SH)는 이중이량체 구성체를 생성하기 위해 적절한 비, 바람직하게는 1:1로 혼합될 수 있다. BsAb는 당업계의 숙련인에게 공지된 방법을 이용하여 크기 배제 크로마토그래피에 의해 정제되고 HPLC에 의해 특성화될 수 있다.
- [0313] 특히, 본 발명은 중쇄-경쇄쌍이 $Fc\gamma RIIA$ 에 결합하는 것보다 더 큰 친화도로 $Fc\gamma RIIB$ 에 결합하는 제1 중쇄-경쇄쌍, 및 IgE 수용체에 결합하는 제2 중쇄-경쇄쌍을 포함하는 이중특이적 항체를 포함하고, 여기서 상기 제1 중쇄-경쇄쌍이 $Fc\gamma RIIB$ 에 먼저 결합한다. 본 발명의 이중특이적 항체는 $Fc\gamma RIIB$ 에 대한 결합이 IgE 수용체에 대한 결합에 앞서는 것을 보장하도록 당업계에 공지된 표준 기술을 이용하여 공학처리될 수 있다. 당업계의 숙련인은 예를 들어 이중특이적 항체를, 이중특이적 항체가 IgE 수용체에 결합하는 것보다 더 큰 친화도로 $Fc\gamma RIIB$ 에 결합하도록 공학처리하는 것을 이해할 것이다. 추가로, 이중특이적 항체는 예를 들어 동일한 세포 상의 IgE 수용체 및 $Fc\gamma RIIB$ 수용체에 결합하는 탄력성을 이중특이적 항체에 제공하기 위해 링커를 첨가함으로써 항체의 힌지 크기가 길이가 증가될 수 있도록 당업계에 공지된 기술에 의해 공학처리될 수 있다.
- [0314] 본 발명의 인간화 항체는 또한 IgE-매개 알레르기 질환의 치료 또는 예방을 위해 당업계에 공지된 다른 치료 항체 또는 약물과 조합되어 사용될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 항체는 아젤라스틴, 아스텔린, 베클로메타손 디프로피오네이트 흡입기, 반세틸, 베클로메타손 디프로피오네이트 코 흡입기/스프레이, 반세나제, 베코나제 부데소니드 코 흡입기/스프레이, 리노코르트 세티리진, 지르텍 클로르페니라민, 슈도에페드린, 데코나민, 수다페드, 크로몰린, 나살크롬, 인탈, 오퍼크롬, 테스로라타딘, 클라리넥스, 펙소페나딘 및 슈도에페드린, 알레그라-D, 펙소페나딘, 알레그라 플루티카손 코 스프레이, 나살리드 플루티카손 프로피오네이트 코 흡입기/스프레이, 플로나제 플루티카손 프로피오네이트 구강 흡입기, 플로벤트, 히드록시진, 비스타릴, 아타락스로라타딘, 슈도에페드린, 클라리틴-D, 로라타딘, 클라리틴, 프레드니솔론, 프레드니솔론, 페디아프레드 경구액, 메드롤 프레드니손, 텔타손, 액체 프레드니솔론, 세레벤트 트리암시놀론 아세토니드 흡입기, 아즈마코르트 트리암시놀론 아세토니드 코 흡입기/스프레이, 나사코르트 또는 나사코르트AQ 중 임의의 것과 조합되어 사용될 수 있다. 본 발명의 항체는 이전에 개발되었거나 (콜리 파마슈티칼스) 현재 선천 및 후천 면역 반응의 활성화제로서 개발되고 있는 시토신-구아닌 디뉴클레오타이드 ("CpG")-계 생성물과 조합되어 사용될 수 있다. 예를 들어, 본 발명은 IgE-매개 알레르기 질환의 치료 및/또는 예방을 위해 본 발명의 방법 및 조성물에서 CpG 7909, CpG 8916, CpG 8954 (콜리 파마슈티칼스)의 사용을 포함한다 (또한 본원에 참고로 포함된 Weeratna et al., 2001, FEMS Immunol Med Microbiol., 32(1):65-71 참조).
- [0315] 본 발명은 알레르기 질환의 치료를 위해 당업계에 공지된 임의의 치료 항체, 예를 들어 Xolair™ (오말리주맵;

제넨테크); rhuMAB-E25 (BioWorld Today, Nov. 10, 1998, p. 1; 제넨테크); CGP-51901 (인간화 항-IgE 항체) 등과 조합으로 본 발명의 인간화 항체의 사용을 포함한다.

[0316] 추가로, 본 발명은 알레르기 질환의 치료를 위해 당업계에 공지된 다른 조성물과 조합으로 본 발명의 인간화 항체의 사용을 포함한다. 특정 방법 및 조성물이 그 전부가 본원에 참고로 포함된 카슨 (Carson) 등 (US 6,426,336; US 2002/0035109A1; US2002/0010343)에 개시된다.

[0317] 5.3.5 면역조절제 및 항염증제

[0318] 본 발명의 방법은 다른 치료제와 함께 본 발명의 항체를 투여하는 것을 포함하는 자가면역 질병 및 염증성 질병의 치료 방법을 제공한다. 면역조절제의 예는 메토타렉세이트, ENBREL, 레미카데™, 레플루노미드, 시클로포스파미드, 시클로스포린 A, 및 마크롤리드 항생제 (예를 들어 FK506 (타크로리무스)), 메틸프레드니솔론 (MP), 코르티코스테로이드, 스테로이드, 미코페놀레이트 모페틸, 라파마이신 (시롤리무스), 미조리빈, 데옥시페르구알린, 브레퀴나르, 말로노니트릴로아미드 (예를 들어 레플루나미드), T세포 수용체 조절제, 및 시토킨 수용체 조절제를 포함하고 이로 제한되지 않는다.

[0319] 항염증제는 염증성 및 자가면역 질환의 치료에서 성공을 거두었고, 현재 상기 질환에 대한 일반적인 표준 치료이다. 당업계의 숙련인에게 잘 공지된 임의의 항염증제를 본 발명의 방법에 사용할 수 있다. 항염증제의 비제한적 예는 비-스테로이드성 항염증 약물 (NSAID), 스테로이드성 항염증 약물, 베타-아고니스트, 항콜린제, 및 메틸 잔틴을 포함한다. NSAID의 예는 아스피린, 이부프로펜, 셀레콕시브 (CELEBREX™), 디클로페낙 (VOLTAREN™), 에토돌락 (LODINE™), 페노프로펜 (NALFON™), 인도메타신 (INDOCIN™), 케토랄락 (TORADOL™), 옥사프로진 (DAYPRO™), 나부펜톤 (RELAFEN™), 술린락 (CLINORIL™), 톨멘틴 (TOLECTIN™), 로페콕시브 (VIOXX™), 나프록센 (ALEVE™, NAPROSYN™), 케토프로펜 (ACTRON™) 및 나부메톤 (RELAFEN™)을 포함하고 이로 제한되지 않는다. 상기 NSAID는 시클로옥시게나제 효소 (예를 들어 COX-1 및/또는 COX-2)를 억제함으로써 기능한다. 스테로이드성 항염증 약물의 예는 글루코코르티코이드, 덱사메타손 (DECADRON™), 코르티손, 히드로코르티손, 프레드니손 (DELTAONE™), 프레드니솔론, 트리암시놀론, 아줄피딘 및 에이코사노이드, 예를 들어 프로스타글란딘, 트롬복산 및 류코트리엔을 포함하고 이로 제한되지 않는다.

[0320] 5.3.6 항암제 및 치료 항체

[0321] 특정 실시태양에서, 본 발명의 방법은 하나 이상의 혈관신생 억제제, 비제한적인 예를 들어 안지오스타틴 (플라스미노겐 단편); 항혈관형성 안티트롬빈 III; 안지오자임; ABT-627; Bay 12-9566; 베네핀; 베바시주맵; BMS-275291; 연골-유래 억제제 (CDI); CAI; CD59 보체 단편; CEP-7055; Col 3; 콤프레타스타틴 A-4; 엔도스타틴 (콜라겐 XVIII 단편); EGFr 차단제/억제제 (Iressa(등록상표), Tarceva(등록상표), Erbitux(등록상표) 및 ABX-EGF); 피브로넥틴 단편; Gro-베타; 할로푸기논; 헤파리나제; 헤파린 헥사사카라이드 단편; HMV833; 인간 융모성 고나드트로핀 (hCG); IM-862; 인터페론 알파/베타/감마; 인터페론 유도가능 단백질 (IP-10); 인터루킨-12; 크링글 5 (플라스미노겐 단편); 마리마스타트; 메탈로프로테이나제 억제제 (TIMP); 2-메톡시에스트라디올; MMI 270 (CGS 27023A); MoAb IMC-1C11; 네오바스타트; NM-3; 판렘; PI-88; 태반 리보뉴클레아제 억제제; 플라스미노겐 활성화제 억제제; 혈소판 인자-4 (PF4); 프리노마스타트; 프로락틴 16kD 단편; 프로리페린-관련 단백질 (PRP); PTK 787/ZK 222594; 레티노이드; 솔리마스타트; 스쿠알아민; SS 3304; SU 5416; SU6668; SU11248; 테트라히드로코르티솔-S; 테트라티오몰리브데이트; 탈리도미드; 트롬보스폰딘-1 (TSP-1); TNP-470; 전환 성장 인자-베타 (TGF-β); 바스쿨로스타틴; 바조스타틴 (말레티쿨린 단편); ZD6126; ZD 6474; 파르네실 트랜스퍼라제 억제제 (FTI); 및 비스포스포네이트의 투여를 포함한다.

[0322] 본 발명의 제약 조성물 및 투여형 및 키트를 포함하여, 본 발명의 다양한 실시태양에서 본 발명의 항체와 조합되어 사용될 수 있는 항암제는 아시비신; 아클라루비신; 아코다졸 히드로클로라이드; 아크로닌; 아도젤레신; 알데스류킨; 알트레타민; 암보마이신; 아메탄트론 아세테이트; 아미노글루테치미드; 암사크린; 아나스트로졸; 안트라마이신; 아스파라기나제; 아스페를린; 아자시타딘; 아제테파; 아조토마이신; 바티마스타트; 벤조데파; 비갈루타미드; 비산트렌 히드로클로라이드; 비스나피드 디메실레이트; 비젤레신; 블레오마이신 술페이트; 브레퀴나르 나트륨; 브로피리딘; 부솔판; 캅티노마이신; 칼루스텐론; 카라세미드; 카르베티머; 카르보플라틴; 카르무스틴; 카루비신 히드로클로라이드; 카르젤레신; 세데핀골; 클로람부실; 시롤레마이신; 시스플라틴; 클라드리빈; 크리스나톨 메실레이트; 시클로포스파미드; 시타라빈; 다카르바진; 닥티노마이신; 다우노루비신 히드로클로라이드; 데시타빈; 텍소르마플라틴; 데자구아닌; 데자구아닌 메실레이트; 디아지쿠온; 도세탁셀; 독소루비신; 독소루비신 히드로클로라이드; 드롤록시펜; 드롤록시펜 시트레이트; 드로모스타놀론 프로피오네이트; 두아조마이신; 에다트렉세이트; 에플로미딘 히드로클로라이드; 엘사미트루신; 엔로플라틴; 엔프로메이트; 에피프로피딘; 에피

루비신 히드로클로라이드; 에르블로존; 에소루비신 히드로클로라이드; 에스트라무스틴; 에스트라무스틴 포스페이트 나트륨; 에타니다졸; 에토포시드; 에토포시드 포스페이트; 에토프린; 파드로졸 히드로클로라이드; 파자라빈; 펜레티니드; 플록스우리딘; 플루다라빈 포스페이트; 플루오로우라실; 플루로시타빈; 포스퀴돈; 포스트리에신 나트륨; 겐시타빈; 겐시타빈 히드로클로라이드; 히드록시우레아; 이다루비신 히드로클로라이드; 이포스파미드; 일모포신; 인터루킨 II (재조합 인터루킨 II 또는 rIL2 포함), 인터페론 알파-2a; 인터페론 알파-2b; 인터페론 알파-n1; 인터페론 알파-n3; 인터페론 베타-1a; 인터페론 감마-1b; 이프로플라틴; 이리노테칸 히드로클로라이드; 란레오티드 아세테이트; 레트로졸; 류프롤리드 아세테이트; 리아로졸 히드로클로라이드; 로메트렉솔 나트륨; 로무스틴; 로소잔트론 히드로클로라이드; 마소프로콜; 마이탄신; 메클로레타민 히드로클로라이드; 메게스트롤 아세테이트; 멜레게스트롤 아세테이트; 멜팔란; 메노가렐; 머캅토피린; 메토티렉세이트; 메토티렉세이트 나트륨; 메토프린; 마투레데파; 미틴도미드; 미토카르신; 미토크로민; 미토길린; 미토말신; 미토마이신; 미토스페르; 미토탄; 미토잔트론; 히드로클로라이드; 미코페놀산; 노코다졸; 노갈라마이신; 오르마플라틴; 옥시수란; 파클리탁셀; 페가스파르가제; 펠리오마이신; 펜타무스틴; 페플로마이신 술페이트; 페르포스파미드; 피포브로만; 피포술판; 피로잔트론 히드로클로라이드; 플리카마이신; 플로메스탄; 포르피머 나트륨; 포르피로마이신; 프레드니무스틴; 프로카르바진 히드로클로라이드; 퓨로마이신; 퓨로마이신 히드로클로라이드; 피라조푸린; 리보프린; 로글레티미드; 사핀골; 사핀골 히드로클로라이드; 세무스틴; 심트라젠; 스파르포세이트 나트륨; 스파르소마이신; 스피로게르마늄 히드로클로라이드; 스피로무스틴; 스피로플라틴; 스트렙토니그린; 스트렙토조신; 술로페누르; 탈리소마이신; 테코갈란 나트륨; 테카푸르; 텔로잔트론 히드로클로라이드; 테모포르핀; 테니포시드; 테록시론; 테스토락톤; 티아미프린; 티오구아닌; 티오테파; 티아조푸린; 티라파자민; 토레미펜 시트레이트; 트레스톨론 아세테이트; 트리시리빈 포스페이트; 트리메트렉세이트; 트리메트렉세이트 글루쿠로네이트; 트립토텐린; 투볼로졸 히드로클로라이드; 우라실 머스타드; 우레데파; 바프레오티드; 베르테포르핀; 빈블라스틴 술페이트; 빈크리스틴 술페이트; 빈데신; 빈데신 술페이트; 비네피딘 술페이트; 빈글리시네이트 술페이트; 빈류로신 술페이트; 비노렐빈 타르트레이트; 빈로시딘 술페이트; 빈줄리딘 술페이트; 보로졸; 제니플라틴; 지노스타틴; 조루비신 히드로클로라이드를 포함하고 이로 제한되지 않는다. 다른 항암약은 20-에피-1,25 디히드록시비타민 D3; 5-에티닐우라실; 아비라테론; 아클라루비신; 아실폴벤; 아데시페놀; 아도젤레신; 알테스류킨; ALL-TK 길항제; 알트레타민; 암바무스틴; 아미독스; 아미포스틴; 아미노레블린산; 암루비신; 암사크린; 아나그렐리드; 아나스트로졸; 안드로그라폴리드; 혈관신생 억제제; 길항제 D; 길항제 G; 안타렐릭스; 항-등모양 (dorsalizing) 형태형성 단백질-1; 항안드로젠, 전립선 암중; 항에스트로젠; 안티네오플라스톤; 안티센스 올리고뉴클레오티드; 아피디콜린 글리시네이트; 세포자멸 유전자 조절제; 세포자멸 조절제; 아퓨린산; 아라-CDP-DL-PTBA; 아르기닌 데아미나제; 아술라크린; 아타메스탄; 아트리무스틴; 악시나스타틴 1; 악시나스타틴 2; 악시나스타틴 3; 아자세트론; 아자톡신; 아자티로신; 박카틴 III 유도제; 발라놀; 발티마스타트; BCR/ABL 길항제; 벤조클로린; 벤조일 스타우로스포린; 베타 락탐 유도제; 베타-알레딘; 베타클라마이신 B; 베틀린산; bFGF 억제제; 비칼루타미드; 비산트렌; 비사지리디닐스페르민; 비스나피드; 비스트라텐 A; 비젤레신; 브레플레이트; 브로피리민; 부도티탄; 부티오닌 술포시민; 칼시포트리올; 칼포스틴 C; 캄프토테신 유도제; 카나리폭스 IL-2; 카페시타빈; 카르복사미드-아미노-트리아졸; 카르복시아미도트리아졸; CaRest M3; CARN 700; 연골 유래 억제제; 카르젤레신; 카제인 키나제 억제제 (ICOS); 카스타노스페르민; 세크로핀 B; 세트로렐릭스; 클로론스; 클로로퀴녹살린 술폰아미드; 시카프로스트; 시스-포르피린; 클라드리빈; 클로미펜 유사체; 클로트리마졸; 콜리스마이신 A; 콜리스마이신 B; 콤브레타스타틴 A4; 콤브레타스타틴 유사체; 코나게닌; 크람베시딘 816; 크리스나톨; 크립토포신 8; 크립토포신 A 유도제; 쿠라신 A; 시클로펜탄트라퀴논; 시클로플라탐; 시페마이신; 시타라빈 옥포스페이트; 세포용해 인자; 시토스타틴; 다클릭시맙; 데시타빈; 데히드로디텐닌 B; 데스로렐린; 텍사메타손; 텍시포스파미드; 텍스라죽산; 텍스베라파밀; 디아지쿠온; 디텐닌 B; 디독스; 디에틸노르스페르민; 디히드로-5-아자시타딘; 디히드로탁솔, 9-; 디옥사마이신; 디페닐 스피로무스틴; 도세탁셀; 도코사놀; 돌라세트론; 독시플루리딘; 드롤록시펜; 드로나비놀; 듀오카르마이신 SA; 엠셀렌; 에코무스틴; 에텔포신; 에드레콜로맘; 에플로니틴; 엘레멘; 에미테푸르; 에피루비신; 에프리스테리드; 에스트라무스틴 유사체; 에스트로젠 효현제; 에스트로젠 길항제; 에타니다졸; 에토포시드 포스페이트; 엑세메스탄; 파드로졸; 파자라빈; 펜레티니드; 필그라스티م; 피나스테리드; 플라보피리돌; 플레젤라스틴; 플루아스테론; 플루다라빈; 플루오로다우노루비신 히드로클로라이드; 포르페니맥스; 포르메스탄; 포스트리에신; 포테무스틴; 가돌리늄 텍사피린; 질산갈륨; 갈로시타빈; 가니렐릭스; 젤라티나제 억제제; 겐시타빈; 글루타치온 억제제; 헬솔팜; 헤레굴린; 헥사메틸렌 비스아세타미드; 히페리신; 이반드론산; 이다루비신; 이독시펜; 이드라만톤; 일모포신; 일로마스타트; 이미다조아크리돈; 이미퀴모드; 면역자극 펩티드; 인슐린 유사 성장 인자-1 수용체 억제제; 인터페론 효현제; 인터페론; 인터루킨; 이오벤구안; 요오도독소루비신; 이포메아놀, 4-; 이로플라트; 이르소글라딘; 이소벤가졸; 이소호모할리콘드린 B; 이타세트론; 자스플라키놀리드; 카할라리드 F; 라멜라린-N 트리아세테이트; 란레오티드; 레이나마이신; 레노그라스티م; 렌티

난 술페이트; 랩톨스타틴; 레트로졸; 백혈병 억제 인자; 백혈구 알파 인터페론; 류프롤리드+에스트로젠+프로게스테론; 류프로렐린; 레바미솔; 리아로졸; 선형 폴리아민 유사체; 친지성 이당체 펩티드; 친지성 백금 화합물; 리쏘클리나미드 7; 로바플라틴; 롬브리신; 로메트렉솔; 로니다민; 로소잔트론; 로바스타틴; 록소리빈; 루르토테칸; 루테튬 텍사피린; 리소필린; 용해 펩티드; 마이탄신; 만노스타틴 A; 마리마스타트; 마소프로콜; 마스핀; 마트릴리신 억제제; 매트릭스 메탈로프로테이나제 억제제; 메노가릴; 메르바론; 메테렐린; 메티오니나제; 메토클로프라마이드; MIF 억제제; 미페프리스톤; 밀테포신; 미리모스틴; 미스매치된 이중가닥 RNA; 미토구아존; 미토라톨; 미토마이신 유사체; 미토나피드; 미토톡신 섬유모세포 성장 인자-사포린; 미토잔트론; 모파로텐; 몰그라모스틴; 모노클로날 항체, 인간 용모성 고나도트로핀; 모노포스포릴 지질 A+미오박테리아 세포벽 sk; 모피다물; 다중약물 내성 유전자 억제제; 다중 종양 억제제 1-계 치료제; 머스타드 항암제; 미카페록시드 B; 미코박테리아 세포벽 추출물; 미리아포론; N-아세틸디날린; N-치환 벤즈아미드; 나파렐린; 나그레스티프; 날록손+펜타조신; 나파빈; 나프테르핀; 나르토그라스틴; 네다플라틴; 네모루비신; 네리드론산; 중성 엔도펩티다제; 닐루타미드; 니사마이신; 산화질소 조절제; 니트록시드 항산화제; 니트롤린; 06-벤질구아닌; 옥트레오티드; 오키세논; 올리고뉴클레오티드; 오나프리스톤; 온단세트론; 온단세트론; 오라신; 경구 시토킨 유도제; 오르마플라틴; 오사테론; 옥살리플라틴; 옥사우노마이신; 파클리탁셀; 파클리탁셀 유사체; 파클리탁셀 유도제; 팔라우아민; 팔미토일리족신; 파미드론산; 파낙시트리올; 파노미펜; 파라박틴; 파젤립틴; 페가스파르가제; 펠레신; 펜토산 폴리술페이트 나트륨; 펜토스타틴; 펜트로졸; 페르플루브론; 페르포스파미드; 페틸릴 알콜; 페나지노마이신; 페닐아세테이트; 포스파타제 억제제; 피시바닐; 필로카르핀 히드로클로라이드; 피라루비신; 피리드렉심; 플라세틴 A; 플라세틴 B; 플라스미노젠 활성화제 억제제; 백금 착물; 백금 화합물; 백금-트리아민 착물; 포르피머 나트륨; 포르피로마이신; 프레드니손; 프로필 비스-아크리돈; 프로스타글란딘 J2; 프로테아좀 억제제; 단백질 A-계 면역 조절제; 단백질 키나제 C 억제제; 단백질 키나제 C 억제제, 마이크로알갈; 단백질 티로신 포스파타제 억제제; 퓨린 뉴클레오시드 포스포릴라제 억제제; 푸르푸린; 피라졸로아크리딘; 피리독실화 헤모글로빈 폴리옥시에틸렌 컨쥬게이트; raf 길항제; 랄티트렉세드; 라모세트론; ras 파르네실 단백질 트랜스퍼라제 억제제; ras 억제제; ras-GAP 억제제; 레텔립틴 데메틸화; 레늄 Re 186 에티드로네이트; 리족신; 리보자임; RII 레티나미드; 로글레티미드; 로히투킨; 로무르티드; 로퀴니엑스; 로브기논 B1; 루복실; 사핀골; 사인토펜; SarCNU; 사르코피톨 A; 사르그라모스틴; Sdi 1 모방체; 세무스틴; 세네센스 유래 억제제 1; 센스 올리고뉴클레오티드; 신호 전달 억제제; 신호 전달 조절제; 단쇄 항원 결합 단백질; 시조피란; 소부족산; 나트륨 보로카프테이트; 나트륨 페닐아세테이트; 솔베를; 소마토메딘 결합 단백질; 소네르민; 스파르포스산; 스피카마이신 D; 스피로무스틴; 스플레노펜틴; 스폰기스타틴 1; 스쿠알라민; 줄기세포 억제제; 줄기세포 분열 억제제; 스티피아미드; 스트로멜리신 억제제; 솔피노신; 초활성 혈관작용 장애 펩티드 길항제; 수라디스타; 수라민; 스와인소닌; 합성 글리코사미노글리칸; 탈리무스틴; 타목시펜 메티오디드; 타우로무스틴; 타자로텐; 테코갈란 나트륨; 테가푸르; 텔루라피릴륨; 텔로머라제 억제제; 테모포르핀; 테모졸로미드; 테니포시드; 테트라클로로데카옥시드; 테트라조민; 탈리블라스틴; 티오코달린; 트롬보포이에틴; 트롬보포이에틴 모방체; 티말파신; 티모포이에틴 수용체 효현제; 티모트리난; 갑상선 자극 호르몬; 주석 에틸 에티오프루핀; 티라파자민; 티타노센 비클로라이드; 톱센틴; 토레미펜; 전능성 줄기세포 인자; 번역 억제제; 트레티노인; 트리아세틸우리딘; 트리시리빈; 트리메트렉세이트; 트립토헤린; 트로피세트론; 투로스테리드; 티로신 키나제 억제제; 티르포스틴; UBC 억제제; 우베니엑스; 비노생식동 유래 성장 억제 인자; 유로키나제 수용체 길항제; 바르페오티드; 바리올린 B; 벡터 시스템, 적혈구 유전자요법; 벨라세술; 베라민; 베르딘; 베르테포르핀; 비노렐빈; 빈잘틴; 비탁신 (VITAXIN); 보로졸; 자노테론; 제니플라틴; 질라스코르브 및 지노스타틴 스티말라머를 포함하고 이로 제한되지 않는다. 바람직한 추가의 항암약은 5-플루오로우라실 및 류코보린이다.

[0323] 본 발명의 방법에 사용될 수 있는 치료 항체의 예는 제1선 또는 이전에 비치료된 전이 직장 또는 결장암 환자의 치료제로서 인간화 항-VEGF 모노클로날 항체 정맥내 5-플루오로우라실 기반 화학요법제인 아바스틴(베바치주맵)(제넨테크(Genentech), 미국 캘리포니아주 사우쓰 샌프란시스코); 전이 유방암 환자 치료용 인간화 항-HER2 모노클로날 항체인 헤르셉틴(등록상표)(트라추주맵)(제넨테크); 혈병 형성 예방을 위한 혈소판 상의 항-당단백질 IIb/IIIa 수용체인 REOPRO(등록상표)(압식시맵)(센토코르); 급성 신장 동종이식 거부 예방을 위한 면역억제제 인간화 항-CD25 모노클로날 항체인 제나팍스(등록상표)(다클리주맵)(로슈 파마슈티칼스(Roche Pharmaceuticals, 스위스)); 무린 항-17-IA 세포 표면 항원 IgG2a 항체인 PANOREX™(에드레콜로맵)(글락소 웰컴(Glaxo Wellcome)/센토코르); 무린 항-개별특이형(GD3 에피토프) IgG 항체인 BEC2(임클론 시스템(ImClone System)); 키메릭 항-EGFR IgG 항체인 에르비투스(Erbitux)(등록상표)(세톡시맵)(임클론 시스템); 인간화 항-αVβ3 인테그린 항체인 비탁신(VITAXIN)™(어플라이드 몰레큘라 이볼루션(Applied Molecular Evolution)/메디문); 인간화 항-CD52 IgG1 항체인 캄파쓰 1H/LDP-03(류코사이트(Leukosite)); 인

간화 항-CD33 IgG 항체인 Smart M195 (프로테인 디자인 랩 (프로테인 디자인 랩)/카네보 (Kanebo)); 키메릭 항-CD20 IgG1 항체인 리툽산™ (리툽시맵) (IDEC 팜 (IDEC 팜)/제넨테크, 로슈/제티아쿠); 인간화 항-CD22 IgG 항체인 림포시드™ (에프라투주맵) (이뮤노메딕스 (ImmunoMedics)); 인간화 항-ICAM3 항체인 ICM3 (ICOS 팜); 영장류화 항-CD80 항체인 IDEC-114 (IDEC 팜/미쯔비시); 방사선표지된 류틴 항-CD20 항체인 제발린™ (IDEC/쉐링 아게); 인간화 항-CD40L 항체인 IDEC-131 (IDEC/에이사이); 영장류화 항-CD4 항체인 IDEC-151 (IDEC); 영장류화 항-CD23 항체인 IDEC-152 (IDEC/Seikagaku); 인간화 항-CD3 IgG인 SMART 항-CD3 (프로테인 디자인 랩); 인간화 항-보체 인자 5(C5) 항체인 5G1.1 (Alexion Pharm); 인간 항-TNF- α 항체인 Humira(등록상표) (Abbott Laboratories); 인간화 항-TNF- α Fab 단편인 CDP870 (셀테크); 영장류화 항-CD4 IgG1 항체인 IDEC-151 (IDEC 팜/SmithKline Beecham); 인간 항-CD4 IgG 항체인 MDX-CD4 (메다렉스/에이사이/젠맵); 인간화 항-TNF- α IgG4 항체인 CDP571 (셀테크); 인간화 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체인 LDP-02 (류코사이트/제넨테크); 인간화 항-CD4 IgG 항체인 오르토클론 OKT4A (오르토 바이오텍 (오르토 바이오테크)); 인간화 항-CD40L IgG 항체인 ANTOVA™ (바이오젠); 인간화 항-VLA-4 IgG 항체인 ANTEGREN™ (엘란); 및 인간 항-TGF- β_2 항체인 CAT-152 (Cambridge Ab Tech)를 포함하고 이로 제한되지 않는다.

[0324] 본 발명의 항체와 조합되어 사용될 수 있는 치료 항체의 다른 예가 표 5에 제시된다.

표 5

[0325] 본 발명의 항체와 조합되어 사용될 수 있는 암 치료를 위한 모노클로날 항체

회사	제품	질병	표적
아브게닉스	ABX-EGF	암	EGF 수용체
알타렉스	OvaRex	난소암	종양 항원 CA125
(AltaRex)	BravaRex	전이성 암	종양 항원 MUC1
안티소마	Theragyn	난소암	PEM 항원
(Antisoma)	(렘투모바이트륨-90)		
	Therex	유방암	PEM 항원
베링거 인겔하임	블바투주맵	두경부 암	CD44
(Boehringer Ingelheim)			
센토코르/J&J	Panorex	결장직장암	17-1A
	ReoPro	PTCA	gp IIIb/IIIa
	ReoPro	급성 MI	gp IIIb/IIIa
	ReoPro	허혈성 뇌졸중	gp IIIb/IIIa
코릭사	Bexocar	NHL	CD20b
CRC 테크놀로지	MAb, 특발성 105AD7	결장직장암	gp72
(CRC Technology)		백신	
크루셀	항-EpCAM	암	Ep-CAM
시토클로날	MAB, 폐암	비소세포 폐암	NA
(Cytoclonal)			
제넨테크	헤르셉틴	전이 유방암	HER-2
	헤르셉틴	초기 유방암	HER-2
	리툽산	재발된/불응성 저급 또는 여포성 NHL	CD20
	리툽산	중간&고급 NHL	CD20
	MAB-VEGF	NSCLC, 전이	VEGF
	MAB-VEGF	결장직장암, 전이	VEGF
	AMD Fab	연령관련 황반변성	CD18
	E-26 (2 nd gen. IgE)	알레르기성 천식&비염	IgE

회사	제품	질병	표적
IDEC	제발린 (리툽산 + 이트륨-90)	저등급의 여포, 재발된 또는 불응성, CD20-양성, B-세포 NHL 및 리툽시맵-불응성 NHL	CD20

임클론	세록시맵 + 이노테칸	불응성 결장직장 암종	EGF 수용체
	세록시맵 + 시스플라틴 & 방사선조사	새로 진단된 또는 재발 두경부암	EGF 수용체
	세록시맵 + 겐시타빈	새로 진단된 전이 췌장 암종	EGF 수용체
	세록시맵 + 시스플라틴 + 5FU 또는 탁솔	재발 또는 전이 두경부암	EGF 수용체
	세록시맵 + 카르보플라틴 + 파클리탁셀	새로 진단된 비소세포 폐 암종	EGF 수용체
	세록시맵 + 시스플라틴	두경부암 (광범한 불치의 국소-영역적 질환 & 원격 전이)	EGF 수용체
	세록시맵 + 방사선조사	국소 진행 두경부 암종	EGF 수용체
	BEC2 + 바실러스 칼메테 구에린 (Bacillus Calmette Guerin)	소세포 폐 암종	모방체 강글리오시드 GD3
	BEC2 + 바실러스 칼메테 구에린	흑색종	모방체 강글리오시드 GD3
이모노젠 (ImmonoGen)	IMC-1C11	간 전이를 갖는 결장직장암	VEGF-수용체
	nuC242-DM1	결장직장, 위, 및 췌장암	nuC242
이뮤노메딕스	림포시드	비-호지킨스 림프종	CD22
	림포시드 Y-90	비-호지킨스 림프종	CD22

[0327]

회사	제품	질병	표적
	CEA-Cide	전이 고형 종양	CEA
	CEA-Cide Y-90	전이 고형 종양	CEA
	CEA-Scan (Tc-99m-표지된 아르시투모 맵)	결장직장암 (방사성영상화)	CEA
	CEA-Scan (Tc-99m-표지된 아르시투모 맵)	유방암 (방사성영상화)	CEA
	CEA-Scan (Tc-99m-표지된 아르시투모 맵)	폐암 (방사성영상화)	CEA
	CEA-Scan (Tc-99m-표지된 아르시투모 맵)	수술중 종양 (방사성영상화)	CEA
	LeukoScan (Tc-99m-표지된 솔레소맵)	연조직 감염 (방사성영상화)	CEA
	LymphoScan (Tc-99m-표지된)	림프종 (방사성영상화)	CD22
	AFP-Scan (Tc-99m-표지된)	간 7 생식세포암 (방사성영상화)	AFP

[0328]

인트라셀 (Intracel)	HumaRAD-HN (+ 이트륨-90)	두경부 암	NA
	HumaSPECT	결장직장 영상화	NA
메다렉스	MDX-101 (CTLA-4)	전립선 및 다른 암	CTLA-4
	MDX-210 (her-2 과발현)	전립선암	HER-2
	MDX-210/MAK	암	HER-2
메디문	Vitaxin	암	$\alpha v \beta_3$
머크 (Merck) KGaA	Mab 425	각종 암	EGF 수용체
	IS-IL-2	각종 암	Ep-CAM
밀레니엄	캄파쓰 (알렘투주맵)	만성 림프구성 백혈병	CD52
NeoRx	CD20-스트렙타비딘 (+ 비오틴-이트륨 90)	비-호지킨 림프종	CD20
	아비디신 (알부민 + NRLU13)	전이 암	NA
페레그린 (Peregrine)	온콜림 (+ 요오드-131)	비-호지킨 림프종	HLA-DR 10 베타
	코타라 (+ 요오드-131)	절제불가능 악성 신경아교종	DNA-관련 단백질

파마시아 코포레이션 (Pharmacia Corporation)	C215 (+ 포도상구균 장독소)	췌장암	NA
	Mab, 폐/신장암	폐 & 신장암	NA

[0329]

회사	제품	질병	표적
	나콜로맙 타페나톡스 (C242 + 포도상구균 장독소)	결장 & 췌장암	NA
프로테인 디자인 랩스	Nuvion	T 세포 악성종양	CD3
	SMART M195	AML	CD33
	SMART 1D10	NHL	HLA-DR 항원
타이탄 (Titan)	CEAVac	결장직장암, 진행된	CEA
	TriGem	전이 흑색종 & 소세포 폐암	GD2-강글리오시드
	TriAb	전이 유방암	MUC-1
트릴렉스 (Trilex)	CEAVac	결장직장암, 진행된	CEA
	TriGem	전이 흑색종 & 소세포 폐암	GD2-강글리오시드
	TriAb	전이 유방암	MUC-1
비벤티아 바이오테크 (Viventia Biotech)	NovoMab-G2 방사선표지된	비-호지킨 림프종	NA
	Monopharm C	결장직장 & 췌장 암종	SK-1 항원
	GlioMab-H (+ 겔로닌 독소)	신경아교종, 흑색종 & 신경모세포종	NA
조마	리톡산	재발된/불응성 저등급 또는 여포 NHL	CD20
	리톡산	중등급 & 고등급 NHL	CD20
	ING-1	선암종	Ep-CAM

[0330] 5.3.7 백신 치료법 및 예방

[0331] 본 발명은 대상체에서 백신 조성물에 대한 면역 반응을 향상시키는 방법을 제공하고, 상기 방법은 상기 대상체에게 항체 또는 그의 단편이 Fc γ RIIA에 결합하는 것보다 더 큰 친화도로 Fc γ RIIB에 특이적으로 결합하는 본 발명의 인간화 항체 또는 그의 단편, 및 백신 조성물을 투여하는 것을 포함하고, 여기서 상기 항체 또는 그의 단편은 상기 백신 조성물에 대한 면역 반응을 향상시킨다. 한 특정 실시태양에서, 상기 항체 또는 그의 단편은 백신이 작용하는 항원의 항원 제시 및/또는 항원 프로세싱을 향상시킴으로써 상기 백신 조성물에 대한 면역 반응을 향상시킨다. 당업계에 공지된 임의의 백신 조성물이 본 발명의 항체 또는 그의 단편과 조합으로 유용하다.

[0332] 특정 작용 메커니즘에 매이기를 의도하지 않지만, 본 발명의 항체는 수지상 세포의 특정 집단 및/또는 종류 상에서 발현되는 Fc γ RIIB의 활성화를 차단하여 활성 백신 처리 동안 상기 수지상 세포의 활성을 증강시킬 수 있다. 이와 같이 증강된 수지상 세포 활성은 예방 또는 치료 백신 처리에 대한 반응을 증강 또는 개선시킬 수 있다.

[0333] 한 실시태양에서, 본 발명은 당업계에 공지된 임의의 암 백신, 예를 들어 CanvaxinTM (Cancer Vax, Corporation, 흑색종 및 결장암); Oncophage (HSPPC-96; Antigenics; 전이 흑색종); HER-2/neu 암 백신 등과 조합으로 본 발명의 인간화 항체의 사용을 포함한다. 본 발명의 방법 및 조성물에 사용된 암 백신은 예를 들어 항원-특이적 백신, 항-개별특이형 백신, 수지상 세포 백신, 또는 DNA 백신일 수 있다. 본 발명은 세갈 (Segal) 등 (그 전부가 본원에 참고로 포함된 미국 특허 6,403,080)에 설명된 바와 같은 세포 기반 백신과 함께 본 발명의 항체의 사용을 포함한다. 본 발명의 항체와 조합되어 사용되는 세포 기반 백신은 자가형 또는 동종형일 수 있다. 간단히 설명하면, 세갈 등에 의해 설명된 암-기반 백신은 제니트릭스, 엘엘씨. (Genitrix, LLC.)의 Opsonokine(TM)에 기반한다. Opsonokines (TM)은 종양 세포와 혼합될 때 자동으로 세포 표면에 부착하는 유전 공학처리된 시토킨이다. "장식된 (decorated)" 세포가 백신으로서 투여될 때, 세포 상의 시토킨은 수용자에서 중요한 항원 제시 세포를 활성화시키면서, 또한 항원 제시 세포가 종양 세포를 소화시키도록 한다. 이어서, 항원 제시 세포는 "킬러" T 세포가 신체 전체에서 유사한 종양 세포를 찾아 파괴하도록 지시할 수 있다. 따라서,

Opsonokine(TM)은 종양 세포를 강력한 항-종양 면역치료제로 전환시킨다.

[0334] 한 실시태양에서, 본 발명은 당업계에 공지된 임의의 알레르기 백신과 조합으로 본 발명의 인간화 항체의 사용을 포함한다. 본 발명의 인간화 항체는 예를 들어 본원에 참고로 포함된 문헌 [Linhart et al. (2000, FASEB Journal, 16 (10):1301-3]에 설명된 바와 같이 풀 화분 알레르기에 대한 예방접종에 사용된 주요 티모시 그라스 (timothy grass) 화분 알레르겐을 코딩하는 재조합 하이브리드 분자와 조합되어 사용될 수 있다. 또한, 본 발명의 인간화 항체는 본원에 참고로 포함된 문헌 [Homer et al. 2002, Allergy, 57 Suppl, 72: 24-9]에 설명된 DNA-기반 예방접종과 조합되어 사용될 수 있다. 본 발명의 항체는 IgE 분비를 하향조절하기 위해 그 전부가 본원에 참고로 포함된 문헌 [Choi et al. 2002, Ann. Allergy Asthma Immunology, 88(6): 584-91 및 Barlan et al. 2002, Journal Asthma, 39 (3):239-46]에 설명된 바와 같이 Bacille Clamett-Guerin ("BCG") 예방접종과 조합되어 사용될 수 있다. 본 발명의 인간화 항체는 식품 알레르기를 치료하는데 유용하다. 특히, 본 발명의 인간화 항체는 땅콩 알레르기의 치료를 위해 당업계에 공지된 백신 또는 다른 면역요법과 조합되어 사용될 수 있다 (Hourihane et al., 2002, Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol. 2(3):227-31 참조).

[0335] 본 발명의 방법 및 조성물은 항원(들)에 대한 면역이 요망되는 백신과 조합되어 사용될 수 있다. 상기 항원은 당업계에 공지된 임의의 항원일 수 있다. 본 발명의 항체는 예를 들어 감염제, 질병에 걸리거나 비정상인 세포, 비제한적인 예를 들어 세균 (예를 들어 그람 양성 세균, 그람 음성 세균, 호기성 세균, 스피로키타 (Spirochetes), 미코박테리움 (Mycobacteria), 리케차 (Rickettsias), 클라미디아 (Chlamydias) 등), 기생충, 진균 (예를 들어 칸디다 알비칸스 (Candida albicans), 아스페르길루스 (Aspergillus) 등), 바이러스 (예를 들어 DNA 바이러스, RNA 바이러스 등), 또는 종양에 대한 면역 반응을 향상시키기 위해 사용될 수 있다. 바이러스 감염은 인간 면역결핍 바이러스 (HIV); A형 간염 바이러스, B형 간염 바이러스, C형 간염 바이러스, D형 간염 바이러스, 또는 다른 간염 바이러스; 사이토메갈로바이러스, 헤르페스 심플렉스 바이러스-1 (-2, -3, -4, -5, -6), 인간 유두종 바이러스; 호흡기 신시티움 바이러스 (RSV), 파라인플루엔자 바이러스 (PIV), 엡스타인 바아 바이러스, 인간 페렴후바이러스 (HMPV), 인플루엔자 바이러스, 중증 급성 호흡기 증후군 (SARS) 또는 임의의 다른 바이러스 감염을 포함하고 이로 제한되지 않는다.

[0336] 본 발명은 본 발명의 인간화 항체, 항원 및 시토킨의 조합물을 포함하는 방법 및 백신 조성물을 포함한다. 바람직하게, 시토킨은 IL-4, IL-10 또는 TGF- β 이다.

[0337] 본 발명은 또한 백신 조성물의 항원(들)에 대한 체액 및/또는 세포 매개 반응을 향상시키기 위한 본 발명의 인간화 항체의 사용을 포함한다. 본 발명은 특정 항원(들)에 대한 향상된 면역 반응이 질병 또는 질환을 치료하거나 예방하기 위해 효과적인 특정 질환을 예방하거나 치료하기 위한 본 발명의 항체의 용도를 추가로 포함한다. 상기 질병 및 질환은 바이러스 감염, 예를 들어 HIV, CMV, 간염, 헤르페스 바이러스, 홍역 등, 세균 감염, 진균 및 기생충 감염, 암, 및 특정 항원(들)에 대한 면역 반응을 향상시킴으로써 치료 또는 예방가능한 임의의 다른 질병 또는 질환을 포함하고 이로 제한되지 않는다.

[0338] 5.4 조성물 및 투여 방법

[0339] 본 발명은 본 발명의 인간화 항체를 포함하는 방법 및 제약 조성물을 제공한다. 본 발명은 또한 대상체에게 본 발명의 유효량의 융합 단백질 또는 컨주게이팅된 분자, 또는 본 발명의 융합 단백질 또는 컨주게이팅된 분자를 포함하는 제약 조성물을 투여함으로써 질병, 질환 또는 감염과 관련된 하나 이상의 증상의 치료, 예방 및 개선 방법을 제공한다. 한 바람직한 측면에서, 항체 또는 융합 단백질 또는 컨주게이팅된 분자는 실질적으로 정제된다 (즉, 그의 효과를 제한하거나 바람직하지 않은 부작용을 일으키는 물질이 실질적으로 없다). 특정 실시태양에서, 대상체는 동물, 바람직하게는 포유동물, 예를 들어 비-영장류 (예를 들어 소, 돼지, 말, 고양이, 개, 래트 등) 및 영장류 (예를 들어 원숭이, 예를 들어 사이노몰거스 원숭이 및 인간)이다. 바람직한 실시태양에서, 대상체는 인간이다.

[0340] 다양한 전달 시스템, 예를 들어 리포솜, 미세입자, 미세캡슐 내 캡슐화, 항체 또는 융합 단백질을 발현할 수 있는 재조합 세포, 수용체-매개 세포내 이입 (예를 들어 Wu and Wu, 1987, J. Biol. Chem. 262: 4429-4432 참조), 레트로바이러스 또는 다른 벡터의 일부로서의 핵산의 구성물 등이 공지되어 있고 본 발명의 인간화 항체를 포함하는 조성물을 투여하기 위해 사용될 수 있다.

[0341] 몇몇 실시태양에서, 본 발명의 인간화 항체는 본 발명의 항체의 표적 전달을 위한 리포솜 내에 제제화된다. 리포솜은 수성상을 캡슐화하는 동심원으로 순서를 이룬 인지질 이중층으로 이루어진 베지클이다. 리포솜은 전형적으로 다양한 종류의 지질, 인지질 및/또는 계면활성제를 포함한다. 리포솜의 성분은 생물학적 막의 지질 배

열과 유사한 이중층 형상으로 배열된다. 리포솜은 부분적으로 그들의 생체적합성, 낮은 면역원성 및 낮은 독성으로 인해 특히 바람직한 전달 비히클이다. 리포솜의 제조 방법은 당업계에 공지되어 있고 본 발명에 포함된다 (예를 들어 그 전부가 본원에 참고로 포함된 Epstein et al., 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 3688; Hwang et al., 1980 Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4030-4; 미국 특허 4,485,045 및 4,544,545 참조).

[0342] 본 발명은 또한 미국 특허 5,013,556에 기재된 것과 같은 혈청 반감기가 연장된, 즉 순환 시간이 향상된 리포솜의 제조 방법을 제공한다. 본 발명의 방법에 사용되는 바람직한 리포솜은 순환혈로부터 신속하게 제거되지 않고, 즉, 단핵성 식세포계 (MPS) 내로 섭취되지 않는다. 본 발명은 당업계의 숙련인에게 공지된 일반적인 방법을 사용하여 제조되는 입체적으로 안정화된 리포솜을 포함한다. 특정 작용 메커니즘에 매이기를 의도하지 않지만, 입체적으로 안정화된 리포솜은 부피가 크고 가요성인 큰 친수성 잔기를 갖는 지질 성분을 함유하고, 이는 리포솜의 혈청 단백질과 원치 않는 반응을 감소시키고, 혈청 성분과의 흡수작용을 감소시키고, MPS에 의한 인식을 감소시킨다. 입체적으로 안정화된 리포솜은 바람직하게는 폴리에틸렌 글리콜을 사용하여 제조된다. 리포솜 및 입체적으로 안정화된 리포솜의 제조에 대해서는 예를 들어 그 전부가 본원에 참고로 포함된 문헌 [Bendas et al., 2001 BioDrugs, 15(4): 225-224; Allen et al., 1987 FEBS Lett. 223: 42-6; Klivanov et al., 1990 FEBS Lett., 268: 235-7; Blum et al., 1990, Biochim. Biophys. Acta., 1029: 91-7; Torchilin et al., 1996, J. Liposome Res. 6: 99-116; Litzinger et al., 1994, Biochim. Biophys. Acta, 1190: 99-107; Maruyama et al., 1991, Chem. Pharm. Bull., 39: 1620-2; Klivanov et al., 1991, Biochim Biophys Acta, 1062: 142-8; Allen et al., 1994, Adv. Drug Deliv. Rev, 13: 285-309]을 참조한다. 본 발명은 또한 특이적 장기 표적화 (예를 들어 미국 특허 4,544,545 참조), 또는 특이적 세포 표적화 (예를 들어 미국 특허 출원 공개 2005/0074403 참조)에 적용된 리포솜을 포함한다. 본 발명의 조성물 및 방법에 사용하기에 특히 유용한 리포솜은 포스파티딜콜린, 콜레스테롤, 및 PEG 유도체화 포스파티딜에탄올아민 (PEG-PE)를 포함하는 지질 조성물을 사용하는 역상 증발법에 의해 생성할 수 있다. 리포솜은 규정된 공극 크기의 필터를 통해 압출시켜 목적하는 직경을 갖는 리포솜을 수득한다. 몇몇 실시태양에서, 본 발명의 항체의 단편, 예를 들어 F(ab')는 앞서 설명된 방법을 이용하여 리포솜에 컨쥬게이팅될 수 있다 (예를 들어 그 전부가 본원에 참고로 포함된 Martin et al., 1982, J. Biol. Chem. 257: 286-288 참조).

[0343] 본 발명의 인간화 항체는 또한 면역리포솜으로서 제제화될 수 있다. 면역리포솜은 본 발명의 항체 또는 그의 단편이 리포솜 표면에 공유 또는 비공유 결합된 리포솜 조성물을 나타낸다. 항체를 리포솜 표면에 결합시키는 화학은 당업계에 공지되어 있고 본 발명에 포함된다 (예를 들어 그 전부가 본원에 참고로 포함된 미국 특허 6,787,153; Allen et al., 1995, Stealth Liposomes, Boca Rotan: CRC Press, 233-44; Hansen et al., 1995, Biochim. Biophys. Acta, 1239: 133-44 참조). 가장 바람직한 실시태양에서, 본 발명의 방법 및 조성물에 사용하기 위한 면역리포솜은 추가로 입체적으로 안정화된다. 바람직하게는, 본 발명의 항체는 리포솜의 지질 이중층에 안정하게 뿌리내린 소수성 앵커에 공유 또는 비공유 결합된다. 소수성 앵커의 예는 인지질, 예를 들어 포스파티딜에탄올아민 (PE), 포스파티딜이노시톨 (PI)을 포함하고 이로 제한되지 않는다. 항체 및 소수성 앵커 사이에 공유 결합을 달성하기 위해, 당업계의 임의의 공지된 생화학적 전략이 사용될 수 있다 (예를 들어 그 전부가 본원에 참고로 포함된 J. Thomas August, ed., 1997, Gene Therapy: Advances in Pharmacology, Volume 40, Academic Press, San Diego, CA., p. 399-435 참조). 예를 들어, 항체 분자 상의 관능기는 소수성 앵커와 관련된 리포솜 상의 활성기와 반응할 수 있고, 예를 들어 항체 상의 리신 측쇄의 아미노기는 수용성 카르보다이미드로 활성화된 리포솜 관련 N-글루타릴-포스파티딜에탄올아민에 커플링될 수 있거나; 환원된 항체의 티올기는 티올 반응성 앵커, 예를 들어 피리디티오프로피오닐-포스파티딜에탄올아민을 통해 리포솜에 커플링될 수 있다 (예를 들어 그 전부가 본원에 참고로 포함된 Dietrich et al., 1996, Biochemistry, 35: 1100-1105; Loughrey et al., 1987, Biochim. Biophys. Acta, 901: 157-160; Martinet., 1982, J. Biol. Chem. 257: 286-288; Martinet., 1981, Biochemistry, 20: 4429-38 참조). 특정 작용 메커니즘에 매이기를 의도하지 않지만, 본 발명의 항체를 포함하는 면역리포솜 제제는 항체를 표적 세포, 즉 항체가 결합하는 FcγRIIB 수용체를 포함하는 세포의 세포질에 전달하므로 치료제로서 특히 효과적이다. 면역리포솜은 바람직하게는 혈액, 특히 표적 세포에서 증가된 반감기를 갖고, 표적 세포의 세포질 내로 내재화될 수 있어서 치료제 손실 또는 리소솜내 경로에 의한 분해를 피할 수 있다.

[0344] 본 발명은 본 발명의 인간화 항체 또는 그의 단편을 포함하는 면역리포솜을 포함한다. 몇몇 실시태양에서, 면역리포솜은 본원에 개시된 것과 같은 하나 이상의 추가의 치료제를 추가로 포함한다.

[0345] 본 발명의 면역리포솜 조성물은 하나 이상의 베지클 형성 지질, 본 발명의 항체 또는 그의 단편 또는 유도체, 및 임의로 친수성 중합체를 포함한다. 베지클 형성 지질은 바람직하게는 2개의 탄화수소 사슬, 예를 들어 아실

사슬 및 극성 헤드기를 갖는 지질이다. 베키클 형성 지질의 예는 인지질, 예를 들어 포스파티딜콜린, 포스파티딜에탄올아민, 포스파티드산, 포스파티딜이노시톨, 스펡고미엘린 및 당지질, 예를 들어 세레브로시드, 강글리오시드를 포함한다. 본 발명의 제제화에 유용한 추가의 지질은 당업계의 숙련인에게 공지되어 있고 본 발명에 포함된다. 몇몇 실시태양에서, 면역리포좀 조성물은 친수성 중합체, 예를 들어 폴리에틸렌 글리콜, 및 강글리오시드 GM1을 추가로 포함하고, 이는 리포좀의 혈청 반감기를 증가시킨다. 친수성 중합체를 리포좀에 컨쥬게이팅하는 방법은 당업계에 잘 공지되어 있고 본 발명에 포함된다. 면역리포좀 및 그의 제조 방법의 개관을 위해 예를 들어 미국 특허 출원 공개 2003/0044407; PCT 국제 특허 출원 공개 WO 97/38731, 문헌 [Vingerhede et al., 1994, Immunomethods, 4: 259-72; Maruyama, 2000, Biol. Pharm. Bull. 23(7): 791-799; Abra et al., 2002, Journal of Liposome Research, 12(1&2): 1-3; Park, 2002, Bioscience Reports, 22(2): 267-281; Bendas et al., 2001 BioDrugs, 14(4): J. Thomas August, ed., 1997, Gene Therapy: Advances in Pharmacology, Volume 40, Academic Press, San Diego, CA., p. 399-435]를 참조한다.

[0346] 본 발명의 인간화 항체를 투여하는 방법은 비경구 투여 (예를 들어 피부내, 근육내, 복강내, 정맥내 및 피하), 경막외, 및 점막 (예를 들어 비강내 및 경구 경로)을 포함하고 이로 제한되지 않는다. 특정 실시태양에서, 본 발명의 항체는 근육내, 정맥내 또는 피하 투여된다. 조성물은 임의의 편리한 경로, 예를 들어, 주입 또는 볼러스 주사에 의해, 상피 또는 점막 내층 (예를 들어 경구 점막, 직장 및 장 점막 등)을 통한 흡수에 의해 투여될 수 있고, 다른 생물학적 활성제와 함께 투여될 수 있다. 투여는 전신적 또는 국소적일 수 있다. 또한, 예를 들어 흡입기 또는 네블라이저의 사용 및 에어로졸제를 사용하는 제제화에 의해 폐 투여가 또한 이용될 수 있다 (예를 들어 그 전부가 본원에 참고로 포함된 미국 특허 6,019,968; 5,985, 20; 5,985,309; 5,934,272; 5,874,064; 5,855,913; 5,290,540; 및 4,880,078; 및 PCT 공개 WO 92/19244; WO 97/32572; WO 97/44013; WO 98/31346; 및 WO 99/66903 참조).

[0347] 본 발명은 또한 본 발명의 인간화 항체가 기밀 용기, 예를 들어 항체의 양을 표시하는 앰플 또는 사체 (sachette) 내에 포장되는 것을 제공한다. 한 실시태양에서, 본 발명의 항체는 기밀 용기 내에 무수 멸균 동결 건조 분말 또는 무수 농축물으로서 공급되고, 대상체에 투여하기 위해 적절한 농도로 예를 들어 물 또는 염수로 재구성될 수 있다. 바람직하게는, 본 발명의 항체는 기밀 용기 내에 건조 멸균 동결건조 분말로서 적어도 5 mg, 보다 바람직하게는 적어도 10 mg, 적어도 15 mg, 적어도 25 mg, 적어도 35 mg, 적어도 45 mg, 적어도 50 mg, 또는 적어도 75 mg의 단위 투여량으로 공급된다. 본 발명의 동결건조 항체는 2 내지 8°C에서 원래 용기 내에 보관되어야 하고, 항체는 재구성한 후 12시간, 바람직하게는 6시간, 5시간, 3시간, 또는 1시간 내에 투여되어야 한다. 별도의 실시태양에서, 본 발명의 항체는 항체, 융합 단백질, 또는 컨쥬게이팅된 분자의 양 및 농도를 표시하는 기밀 용기 내에 액체 형태로 공급된다. 바람직하게는, 항체의 액체 형태는 기밀 용기 내에 적어도 1 mg/ml, 보다 바람직하게 적어도 2.5 mg/ml, 적어도 5 mg/ml, 적어도 8 mg/ml, 적어도 10 mg/ml, 적어도 15 mg/ml, 적어도 25 mg/ml, 적어도 50 mg/ml, 적어도 100 mg/ml, 적어도 150 mg/ml, 적어도 200 mg/ml의 항체로 공급된다.

[0348] 질환과 관련된 하나 이상의 증상의 치료, 예방 또는 개선에 효과적인 본 발명의 조성물의 양은 표준 임상 기술에 의해 결정될 수 있다. 제제에 사용되어야 하는 정확한 용량은 또한 투여 경로 및 병의 심도에 따라 것이고, 담당의의 판단과 각각의 환자 상황에 따라 결정되어야 한다. 효과적인 용량은 시험관내 또는 동물 모델 시험 시스템으로부터 유도된 용량-반응 곡선으로부터 외삽될 수 있다.

[0349] 본 발명에 포함된 항체의 경우, 환자에게 투여되는 투여량은 전형적으로 0.0001 mg/kg 내지 100 mg/kg (환자 체중)이다. 바람직하게는 환자에게 투여되는 투여량은 0.0001 mg/kg 내지 20 mg/kg, 0.0001 mg/kg 내지 10 mg/kg, 0.0001 mg/kg 내지 5 mg/kg, 0.0001 내지 2 mg/kg, 0.0001 내지 1 mg/kg, 0.0001 mg/kg 내지 0.75 mg/kg, 0.0001 mg/kg 내지 0.5 mg/kg, 0.0001 mg/kg 내지 0.25 mg/kg, 0.0001 내지 0.15 mg/kg, 0.0001 내지 0.10 mg/kg, 0.001 내지 0.5 mg/kg, 0.01 내지 0.25 mg/kg 또는 0.01 내지 0.10 mg/kg (환자 체중)이다. 일반적으로, 인간 항체는 외래 폴리펩티드에 대한 면역 반응으로 인해 다른 종의 항체보다 인체내 반감기가 더 길다. 따라서, 인간 항체는 보다 낮은 투여량과 보다 적은 투여 빈도가 종종 가능하다. 또한, 본 발명의 항체 또는 그의 단편의 투여량 및 투여 빈도는 변형, 예를 들어 지질화에 의해 항체의 흡수 및 조직 관통을 향상시킴으로써 감소시킬 수 있다.

[0350] 한 실시태양에서, 환자에게 투여되는 본 발명의 항체의 투여량은 단일제 요법으로 사용될 때 0.01 mg 내지 1000 mg/일이다. 다른 실시태양에서, 본 발명의 항체는 다른 치료 조성물과 조합되어 사용되고, 환자에게 투여되는 투여량은 상기 항체가 단일제 요법으로 사용될 때보다 더 적다.

- [0351] 특정 실시태양에서, 본 발명의 제약 조성물을 치료가 필요한 영역에 국소적으로 투여하는 것이 바람직할 수 있고; 이는 비제한적인 예를 들어 국소 주입, 주사 또는 임플란트에 의해 달성될 수 있고, 상기 임플란트는 다공성, 비다공성 또는 젤라틴성 물질, 예를 들어 멤브레인, 예를 들어 시알라스틱 (sialastic) 멤브레인, 또는 섬유이다. 바람직하게는, 본 발명의 항체를 투여할 때, 항체 또는 융합 단백질이 흡수하지 않는 물질을 사용하도록 주의해야 한다.
- [0352] 다른 실시태양에서, 조성물은 베지클, 특히 리포솜 내에서 전달될 수 있다 (Langer, Science 249: 1527-1533 (1990); Treat et al., in Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer, Lopez-Berestein and Fidler (eds.), Liss, New York, pp. 353-365 (1989); Lopez-Berestein, ibid., pp. 317-327; 일반적으로 상기 문헌 참조).
- [0353] 또다른 실시태양에서, 조성물은 제어 방출 또는 지연 방출 시스템 내에서 전달될 수 있다. 당업계의 숙련인에 공지된 임의의 기술이 본 발명의 하나 이상의 인간화 항체를 포함하는 지연 방출 제형을 제조하기 위해 사용될 수 있다 (그 전부가 본원에 참고로 포함된 예를 들어 미국 특허 4,526,938; PCT 공개 WO 91/05548; PCT 공개 WO 96/20698; Ning et al., 1996, "Intratumoral Radioimmunotherapy of Human Colon Cancer Xenograft Using a Sustained-Release Gel", Radiotherapy & Oncology 39: 179-189, Song et al., 1995, "Antibody Mediated Lung Targeting of Long-Circulating Emulsions", PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology 50:372-397; Cleek et al., 1997, "Biodegradable Polymeric Carriers for a bFGF Antibody for Cardiovascular Application", Pro. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater. 24:853-854; 및 Lam et al., 1997, "Microencapsulation of Recombinant Humanized Monoclonal Antibody for Local Delivery", Proc. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater. 24:759-760 참조). 한 실시태양에서, 펌프가 제어 방출 시스템에 사용될 수 있다 (Langer, 상기 문헌; Sefton, 1987, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:20; Buchwald et al., 1980, Surgery 88:507; 및 Saudek et al., 1989, N. Engl. J. Med. 321:574 참조). 다른 실시태양에서, 항체의 제어 방출을 달성하기 위해 중합체 물질이 사용될 수 있다 (예를 들어 Medical Applications of Controlled Release, Langer and Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Florida (1974); Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, Smolen and Ball (eds.), Wiley, New York (1984); Ranger and Peppas, 1983, J., Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23:61 참조; 또한 Levy et al., 1985, Science 228:190; During et al., 1989, Ann. Neurol. 25:351; Howard et al., 1989, J. Neurosurg. 71:105; 미국 특허 5,679,377; 미국 특허 5,916,597; 미국 특허 5,912,015; 미국 특허 5,989,463; 미국 특허 5,128,326; PCT 공개 WO 99/15154; 및 PCT 공개 WO 99/20253 참조). 지연 방출 제형에 사용된 중합체의 예는 폴리(2-히드록시 에틸 메타크릴레이트), 폴리(메틸 메타크릴레이트), 폴리(아크릴산), 폴리(에틸렌-코-비닐 아세테이트), 폴리(메타크릴산), 폴리글리콜리드 (PLG), 폴리안하이드라이드, 폴리(N-비닐 피롤리돈), 폴리(비닐 알콜), 폴리아크릴아미드, 폴리(에틸렌 글리콜), 폴리락티드 (PLA), 폴리(락티드-코-글리콜리드) (PLGA) 및 폴리오르토에스테르를 포함하고 이로 제한되지 않는다. 또다른 실시태양에서, 제어 방출 시스템은 치료 표적 (예를 들어 폐)에 근접하게 놓일 수 있어서, 전신 투여량의 단지 일부분만을 필요로 한다 (예를 들어 Goodson, in Medical Applications of Controlled Release, 상기 문헌, vol. 2, pp. 115-138 (1984) 참조). 다른 실시태양에서, 제어 방출 임플란트로서 유용한 중합체 조성물은 던 (Dunn) 등 (미국 특허 5,945,155 참조)에 따라 사용된다. 상기 특정 방법은 중합체 시스템으로부터 생체적 물질의 계내 제어 방출의 치료 효과에 기초한다. 이식은 일반적으로 치료 처치를 필요로 하는 환자의 신체 내에서 어디에서나 일어날 수 있다. 다른 실시태양에서, 대상체의 신체 내의 비-중합성 임플란트가 약물 전달 시스템으로서 사용되는 비-중합성 지연 전달 시스템이 사용된다. 체내 이식시, 임플란트의 유기 용매는 조성물로부터 주변의 조직액 내로 발산되거나 분산되거나 침출할 것이고, 비-중합성 물질은 점차 응고하거나 침전하여 고체, 미세다공성 매트릭스를 형성할 것이다 (미국 특허 5,888,533 참조).
- [0354] 제어 방출 시스템은 랭거 (Langer)의 문헌 (1990, Science 249: 1527-1533)에 논의되었다. 본 발명의 하나 이상의 치료제를 포함하는 지연 방출 제형을 제조하기 위해 당업계의 숙련인에 공지된 임의의 기술이 사용될 수 있다 (예를 들어 그 전부가 본원에 참고로 포함된 미국 특허 4,526,938, 국제 특허 출원 공개 WO 91/05548 및 WO96/20698; Ning et al., 1996, Radiotherapy & Oncology 39: 179-189; Song et al., 1995, PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology 50: 372-397; Cleek et al., 1997, Pro. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater. 24: 853-854; and Lam et al., 1997, Proc. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater. 24: 759-760 참조).
- [0355] 본 발명의 조성물이 항체를 코딩하는 핵산인 특정 실시태양에서, 핵산은 적절한 핵산 발현 벡터의 일부로서 구

성하고 예를 들어 레트로바이러스 벡터를 사용하여 (미국 특허 4,980,286 참조), 또는 직접 주사에 의해, 또는 미세입자 충격을 사용하여 (예를 들어 유전자 총; Biolistic, Dupont), 또는 지질 또는 세포 표면 수용체 또는 형질감염체로 코팅함으로써 이를 세포내 존재하도록 투여함으로써, 또는 이를 핵 내로 도입하는 것으로 공지된 호메오박스 (homeobox) 유사 펩티드와 연결 상태로 투여함으로써 (예를 들어 Joliot et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 1864-1868 참조) 그의 코딩된 항체의 발현을 촉진하도록 생체내 투여될 수 있다. 별법으로, 핵산은 세포 내에 도입되고 상동 재조합에 의한 발현을 위해 숙주 세포 DNA 내에 포함될 수 있다.

[0356] 항체에 있어서, 대상체에게 투여되는 치료적 또는 예방적 유효 투여량은 전형적으로 0.1 mg/kg 내지 200 mg/kg (대상체의 체중)이다. 바람직하게는, 대상체에게 투여되는 투여량은 0.1 mg/kg 내지 20 mg/kg (대상체의 체중)이고, 보다 바람직하게는 대상체에게 투여되는 투여량은 1 mg/kg 내지 10 mg/kg (대상체의 체중)이다. 본 발명의 항체 투여의 투여량 및 빈도는 변형, 예를 들어 지질화에 의해 항체 또는 용합 단백질의 흡수 및 조직 관통 (예를 들어 폐 내로)을 향상시킴으로써 감소될 수 있다.

[0357] 치료 또는 예방 유효량의 본 발명의 항체를 사용하여 대상체를 치료하는 것은 단일 치료를 포함할 수 있거나, 바람직하게는 일련의 치료를 포함할 수 있다. 바람직한 예에서, 대상체는 약 0.1 내지 30 mg/kg (체중)의 본 발명의 항체로 약 1 내지 10주, 바람직하게는 2 내지 8주, 보다 바람직하게는 약 3 내지 7주, 훨씬 더 바람직하게는 약 4, 5 또는 6주 동안 매주 1회 치료된다. 다른 실시태양에서, 본 발명의 제약 조성물은 1일 1회, 2회 또는 3회 투여된다. 다른 실시태양에서, 제약 조성물은 매주 1회, 매주 2회, 격주 1회, 매달 1회, 6주마다 1회, 격월 1회, 매년 2회 또는 매년 1회 투여된다. 치료에 사용된 항체의 유효 투여량은 구체적인 치료 과정에 걸쳐 증가하거나 감소시킬 수 있음이 또한 이해될 것이다.

[0358] 5.4.1 제약 조성물

[0359] 본 발명의 조성물은 제약 조성물의 제조에 유용한 벌크 약물 조성물 (예를 들어, 불순 또는 비멸균 조성물), 및 단위 투여형의 제조에 사용될 수 있는 제약 조성물 (즉, 대상체 또는 환자에 투여하기에 적합한 조성물)을 포함한다. 상기 조성물은 예방 또는 치료 유효량의 본원에 개시된 예방제 및/또는 치료제 또는 상기 약제의 조합물, 및 제약상 허용되는 담체를 포함한다. 바람직하게는, 본 발명의 조성물은 예방 또는 치료 유효량의 본 발명의 인간화 항체 및 제약상 허용되는 담체를 포함한다.

[0360] 한 특정 실시태양에서, 제약 조성물은 치료 유효량의 인간화 항체 또는 그의 단편이 Fc γ RIIA에 결합하는 것보다 더 큰 친화도로 Fc γ RIIB에 결합하는 항체 또는 그의 단편, 암 항원에 특이적으로 결합하는 세포독성 항체, 및 제약상 허용되는 담체로 이루어진다. 다른 실시태양에서, 상기 제약 조성물은 하나 이상의 항암제를 추가로 포함한다.

[0361] 특정 실시태양에서, 용어 "제약상 허용되는"은 동물, 보다 특히 인간에 사용하기 위해 미국 연방정부 또는 주정부의 관할 기관에 의해 승인되거나 미국 약전 또는 다른 일반적으로 인정된 약전에 나열되는 것을 의미한다. 용어 "담체"는 그를 사용하여 치료제가 투여되는 희석제, 보강제 (예를 들어 프로인트 보강제 (완전 및 불완전), 부형제 또는 비히클을 나타낸다. 상기 제약학적 담체는 멸균 액체, 예를 들어 물 및 오일, 예를 들어 석유, 동물, 식물 또는 합성 기원의 것, 예를 들어 낙화생유, 대두유, 광물유, 참기름 등일 수 있다. 제약 조성물이 정맥내 투여될 때 물이 바람직한 담체이다. 염수 용액 및 수성 텍스트로스와 및 글리세롤 용액이 또한 특히 주사용 용액을 위해 액체 담체로서 사용될 수 있다. 적합한 제약학적 부형제는 전분, 글루코스, 락토스, 수크로스, 젤라틴, 맥아, 쌀, 밀가루, 초크, 실리카겔, 나트륨 스테아레이트, 글리세롤 모노스테아레이트, 활석, 염화나트륨, 건조 탈지 우유, 글리세롤, 프로필렌, 글리콜, 물, 에탄올 등을 포함한다. 조성물은 원하는 경우 미량의 습윤 또는 유화제, 또는 pH 완충제를 또한 함유할 수 있다. 이들 조성물은 용액, 현탁액, 에멀전, 정제, 환제, 캡슐, 분말, 지연 방출 제형 등의 형태를 취할 수 있다.

[0362] 일반적으로, 본 발명의 조성물의 성분은 개별적으로 또는 단위 투여형으로, 예를 들어 기밀 용기, 예를 들어 활성제의 양을 표시하는 앰플 또는 사세 내의 건조 동결건조 분말 또는 무수 농축물로서 함께 혼합되어 공급된다. 조성물이 주입에 의해 투여되어야 하는 경우, 멸균 제약 등급 물 또는 염수를 함유하는 주입 병과 함께 분배될 수 있다. 조성물이 주사에 의해 투여되는 경우, 투여 전에 성분들이 혼합될 수 있도록 주사용 멸균수 또는 염수의 앰플이 제공될 수 있다.

[0363] 본 발명의 조성물은 중성 또는 염 형태로 제형화될 수 있다. 제약상 허용되는 염은 염산, 인산, 아세트산, 옥살산, 타르타르산 등으로부터 유래된 것과 같은 음이온과 함께 형성된 것, 및 나트륨, 칼륨, 암모늄, 칼슘, 철 수산화물, 이소프로필아민, 트리에틸아민, 2-에틸아미노 에탄올, 히스티딘, 프로카인 등으로부터 유래된 것과

같은 양이온과 함께 형성된 것을 포함하고 이로 제한되지 않는다.

[0364] 본 발명은 또한 B-세포 악성종양, 또는 그의 하나 이상의 증상의 예방, 치료, 관리 또는 개선에 사용하기 위한 Fc γ RIIB 길항제를 포함하는 제약 조성물 및 키트를 제공한다. 특히, 본 발명은 Fc γ RIIB 길항제, 유사체, 유도체 또는 항-Fc γ RIIB 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 포함하는 제약 조성물 및 키트를 제공한다.

[0365] 5.4.2 유전자요법

[0366] 특정 실시태양에서, 항체 또는 융합 단백질을 코딩하는 서열을 포함하는 핵산이 유전자요법에 의해 질병, 질환 또는 감염과 관련된 하나 이상의 증상을 치료하거나 예방하거나 개선시키기 위해 투여된다. 유전자요법은 대상체에게 발현된 또는 발현가능 핵산의 투여에 의해 수행되는 요법을 나타낸다. 본 발명의 상기 실시태양에서, 핵산은 치료 또는 예방 효과를 매개하는 그들의 코딩되는 항체 또는 융합 단백질을 생산한다.

[0367] 당업계에 이용가능한 유전자요법을 위한 임의의 방법이 본 발명에 따라 사용될 수 있다. 예시적인 방법을 아래에 설명한다.

[0368] 유전자요법의 방법의 일반적인 개관을 위해 문헌 [Goldspiel et al., 1993, Clinical Pharmacy 12:488-505; Wu and Wu, 1991, Biotherapy 3:87-95; Tolstoshev, 1993, Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32:573-596; Mulligan, Science 260:926-932 (1993); Morgan and Anderson, 1993, Ann. Rev. Biochem. 62:191-217; May, 1993, TIBTECH 11(5):155-215; 및 Scholl, 2003, J. Biomed Biotechnol 2003:35-47]을 참조한다. 사용될 수 있는 재조합 DNA 기술의 당업계에 일반적으로 공지된 방법은 문헌 [Ausubel et al. (eds.), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY (1993); 및 Kriegler, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY (1990)]에 기재되어 있다.

[0369] 한 바람직한 측면에서, 본 발명의 조성물은 항체를 코딩하는 핵산을 포함하고, 상기 핵산은 적합한 숙주에서 항체를 발현하는 발현 벡터의 일부이다. 특히, 상기 핵산은 항체 코딩 영역에 작동가능하게 연결된 프로모터, 바람직하게는 이중 프로모터를 갖고, 상기 프로모터는 유도적 또는 구성적이고, 임의로 조직-특이적이다. 또다른 특정 실시태양에서, 항체 코딩 서열 및 임의의 다른 목적하는 서열이 게놈 내의 목적하는 부위에서 상동 재조합을 촉진하여 항체 코딩 핵산의 염색체내 발현을 제공하는 영역에 인접하는 핵산 분자가 사용된다 (Koller and Smithies, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:8932-8935; 및 Zijlstra et al., 1989, Nature 342:435-438).

[0370] 다른 바람직한 측면에서, 본 발명의 조성물은 융합 단백질을 코딩하는 핵산을 포함하고, 상기 핵산은 적합한 숙주에서 융합 단백질을 발현하는 발현 벡터의 일부이다. 특히, 상기 핵산은 융합 단백질의 코딩 영역에 작동가능하게 연결된 프로모터, 바람직하게는 이중 프로모터를 갖고, 상기 프로모터는 유도적 또는 구성적이고, 임의로 조직-특이적이다. 또다른 특정 실시태양에서, 융합 단백질의 코딩 서열 및 임의의 다른 목적하는 서열이 게놈 내의 목적하는 부위에서 상동 재조합을 촉진하여 융합 단백질 코딩 핵산의 염색체내 발현을 제공하는 영역에 인접하는 핵산 분자가 사용된다.

[0371] 대상체에 대한 핵산의 전달은 대상체가 핵산 또는 핵산-보유 담체에 직접적으로 노출되는 바와 같이 직접적이거나, 세포가 먼저 시험관 내에서 핵산으로 형질감염된 후 대상체에게 이식되는 바와 같이 간접적일 수 있다. 이들 두 방법은 각각 생체내 또는 생체외 유전자요법으로 공지되어 있다.

[0372] 특정 실시태양에서, 핵산 서열은 생체 내에 직접 투여되고, 여기서 발현되어 코딩되는 생성물을 생산한다. 이는 당업계에 공지된 임의의 수많은 방법에 의해, 예를 들어 이들을 적절한 핵산 발현 벡터의 일부로서 구성하고, 이를 예를 들어 결합 또는 약독화 레트로바이러스 또는 다른 바이러스 벡터를 사용하는 감염에 의해 (미국 특허 4,980,286 참조), 또는 네이키드 DNA의 직접 주사에 의해, 또는 미세입자 충격을 이용하여 (예를 들어 유전자 총; Biolistic, Dupont) 세포 내에 존재하도록 투여함으로써, 또는 지질 또는 세포 표면 수용체 또는 형질감염제로 코팅함으로써, 리포솜, 미세입자 또는 미세캡슐 내 캡슐화에 의해, 또는 이들을 핵 내로 도입하는 것으로 공지된 펩티드와 연결 상태로 투여함으로써, 이를 수용체-매개 세포내 이입에 적용되는 리간드에 연결 상태로 투여함으로써 (예를 들어 Wu and Wu, 1987, J. Biol. Chem. 262: 4429-4432 참조) (이는 수용체를 특이적으로 발현하는 세포 종류를 표적화하기 위해 사용될 수 있다) 달성할 수 있다. 다른 실시태양에서, 핵산이 리소솜 파괴를 피하도록 엔도솜을 파괴하기 위해 리간드가 융합생성 바이러스 펩티드를 포함하는 핵산-리간드 복합체가 형성될 수 있다. 또다른 실시태양에서, 핵산은 특이적 수용체를 표적화함으로써 세포 특이적 업테이크 및 발현을 위해 생체내 표적화될 수 있다 (예를 들어 미국 특허 출원 공개 2005/0002903; PCT 공개 WO 92/06180; WO 92/22635; W092/20316; W093/14188; WO 93/20221 참조). 별법으로, 핵산은 상동 재조합에 의해

세포 내로 도입되고 발현을 위해 숙주 세포 DNA 내에 포함될 수 있다 (Koller and Smithies, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 8932-8935; 및 Zijlstra et al., 1989, Nature 342:435-438).

- [0373] 특정 실시태양에서, 항체 또는 융합 단백질을 코딩하는 핵산 서열을 함유하는 바이러스 벡터가 사용된다. 예를 들어, 레트로바이러스 벡터가 사용될 수 있다 (Miller et al., 1993, Meth. Enzymol. 217:581-599 참조). 이들 레트로바이러스 벡터는 바이러스 게놈의 정확한 패키징 및 숙주 세포 DNA 내로 통합을 위해 필요한 성분을 함유한다. 유전자요법에 사용될 항체 또는 융합 단백질을 코딩하는 핵산 서열은 뉴클레오티드 서열의 대상체로의 전달을 용이하게 하는 하나 이상의 벡터 내로 클로닝된다. 레트로바이러스 벡터에 대한 보다 상세한 내용은 줄기세포를 화학요법에 대해 보다 내성으로 만들도록 *mdr 1* 유전자를 조절 줄기세포로 전달하기 위해 레트로바이러스 벡터의 사용을 설명하는 문헌 [Boesen et al., 1994, Biotherapy 6:291-302]에서 찾을 수 있다. 유전자요법에서 레트로바이러스 벡터의 사용을 설명하는 다른 참조 문헌은 Clowes et al., 1994, J. Clin. Invest. 93:644-651; Klein et al., 1994, Blood 83:1467-1473; Salmons and Gunzberg, 1993, Human Gene Therapy 4:129-141; 및 Grossman and Wilson, 1993, Curr. Opin. in Genetics and Devel. 3:110-114이다.
- [0374] 아데노바이러스가 유전자요법에 사용될 수 있는 다른 바이러스 벡터이다. 아데노바이러스는 특히 호흡기 상피에 유전자를 전달하기 위한 매력적인 비히클이다. 아데노바이러스는 자연적으로 호흡기 상피를 감염시켜 악한 질병을 유발한다. 아데노바이러스-기반 전달 시스템을 위한 다른 표적은 간, 중추신경계, 내피 세포 및 근육이다. 아데노바이러스는 비-분할 세포를 감염시킬 수 있는 잇점이 있다. 문헌 [Kozarsky and Wilson, Current Opinion in Genetics and Development 3:499-503, 1993]에서는 아데노바이러스-기반 유전자요법의 검토를 제공한다. 문헌 [Bout et al., Human Gene Therapy, 5:3-10, 1994]에서는 붉은털 (rhesus) 원숭이의 호흡기 상피에 유전자를 전달하기 위해 아데노바이러스 벡터의 사용을 설명하였다. 유전자요법에서 아데노바이러스를 사용하는 다른 경우는 문헌 [Rosenfeld et al., 1991, Science 252:431-434; Rosenfeld et al., 1992, Cell 68:143-155; Mastrangeli et al., 1993, J. Clin. Invest. 91:225-234; PCT 공개 W094/12649; 및 Wang et al., 1995, Gene Therapy 2:775-783]에서 찾을 수 있다. 바람직한 실시태양에서, 아데노바이러스 벡터가 사용된다.
- [0375] 아데노-관련 바이러스 (AAV)가 또한 유전자요법에 사용에 대해 제안되었다 (예를 들어 Walsh et al., 1993, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 204:289-300 및 미국 특허 5,436,146 참조).
- [0376] 유전자요법에 대한 다른 방안은 전기천공, 리포펙션 (lipofection), 인산칼슘 매개 형질감염 또는 바이러스 감염과 같은 방법에 의해 조직 배양물 내 세포에 유전자를 전달하는 것을 포함한다. 보통, 전달 방법은 선택가능 마커를 세포에 전달하는 것을 포함한다. 이어서 세포를 흡수되어 전달된 유전자를 발현하는 세포를 분리하기 위한 선택 하에 놓는다. 이어서 이들 세포를 대상체에 전달한다.
- [0377] 상기 실시태양에서, 핵산은 생성되는 재조합 세포의 생체내 투여 전에 세포 내로 도입된다. 상기 도입은 당업계에서 공지된 임의의 방법, 비제한적인 예를 들어 형질감염, 전기천공, 미세주사, 핵산 서열을 함유하는 바이러스 또는 박테리오파지 벡터를 사용하는 감염, 세포 융합, 염색체-매개 유전자 전달, 미소세포 매개 유전자 전달, 스페로플라스트 (spheroplast) 융합 등에 의해 수행할 수 있다. 외래 유전자를 세포 내로 도입하기 위한 수많은 기술이 당업계에 공지되어 있고 (예를 들어 Loeffler and Behr, 1993, Meth. Enzymol. 217:599-618, Cohen et al., 1993, Meth. Enzymol. 217:618-644; 및 Clin. Pharma. Ther. 29:69-92, 1985 참조), 수용자 세포의 필수적인 발생 및 생리학적 기능이 파괴되지 않는다면 본 발명에 따라 사용될 수 있다. 기술은 핵산이 세포에 의해 발현가능하고 바람직하게는 그의 세포 자손체에 의해 유전되고 발현가능하도록 세포로 핵산의 안정한 전달을 제공해야 한다.
- [0378] 생성되는 재조합 세포는 당업계에 공지된 다양한 방법에 의해 대상체에게 전달될 수 있다. 재조합 혈액 세포 (예를 들어 조혈 줄기세포 또는 전구 세포)는 바람직하게는 정맥내 투여된다. 사용이 계획된 세포 양은 목적하는 효과, 환자 상태 등에 따르고 당업계의 숙련인에 의해 결정될 수 있다.
- [0379] 유전자치료의 목적으로 핵산이 도입될 수 있는 세포는 임의의 목적하는 이용가능한 세포 종류를 포함하고, 상피 세포, 내피 세포, 각질세포, 섬유모세포, 근육 세포, 간세포; 혈액 세포, 예를 들어 T 림프구, B 림프구, 단핵구, 대식세포, 호중구, 호산구, 거대핵세포, 과립구; 다양한 줄기 세포 또는 전구 세포, 특히 예를 들어 골수, 체대혈, 말초 혈액, 태아 간 등으로부터 수득한 것과 같은 조혈 줄기 또는 전구 세포를 포함하고 이로 제한되지 않는다.
- [0380] 바람직한 실시태양에서, 유전자요법에 사용되는 세포는 대상체에 자가성이다.

- [0381] 재조합 세포가 유전자요법에 사용되는 실시태양에서, 항체 또는 융합 단백질을 코딩하는 핵산 서열이 세포 또는 그의 자손체에 의해 발현가능하도록 세포 내로 도입되고, 이어서 재조합 세포는 치료 효과를 위해 생체내 투여된다. 특정 실시태양에서, 줄기 또는 전구 세포가 사용된다. 시험관 내에서 단리되고 유지될 수 있는 임의의 줄기 및/또는 전구 세포가 본 발명의 상기 실시태양에 따라 효과적으로 사용될 수 있다 (예를 들어 PCT 공개 WO 94/08598; Stemple and Anderson, 1992, Cell 71:973-985; Rheinwald, 1980, Meth. Cell Bio. 21A:229; 및 Pittelkow and Scott, 1986, Mayo Clinic Proc. 61:771 참조).
- [0382] 특정 실시태양에서, 유전자치료의 목적으로 도입될 핵산은 코딩 영역에 작동가능하게 연결된 유도성 프로모터를 포함하여, 핵산의 발현은 적절한 전사 유도제의 존재 또는 부재를 조절함으로써 제어가능하다.
- [0383] **5.4.3 키트**
- [0384] 본 발명은 본 발명의 인간화 항체로 채워진 하나 이상의 용기를 포함하는 제약학적 팩 (pack) 또는 키트를 제공한다. 추가로, 질병의 치료에 유용한 하나 이상의 다른 예방제 또는 치료제가 또한 제약학적 팩 또는 키트에 포함될 수 있다. 본 발명은 또한 본 발명의 제약 조성물의 하나 이상의 성분으로 채워진 하나 이상의 용기를 포함하는 제약학적 팩 또는 키트를 제공한다. 임의로, 약품 또는 생물학적 제품의 제조, 사용 또는 판매를 규제하는 정부 기관에 의해 규정된 형태로, 인간 투여용으로 제조, 사용 또는 판매에 대한 당국의 승인을 반영하는 고시가 상기 용기(들)에 결합될 수 있다.
- [0385] 본 발명은 상기 방법에서 사용될 수 있는 키트를 제공한다. 한 실시태양에서, 키트는 본 발명의 하나 이상의 인간화 항체를 포함한다. 다른 실시태양에서, 키트는 하나 이상의 용기 내에 암 치료에 유용한 하나 이상의 다른 예방제 또는 치료제를 추가로 포함한다. 다른 실시태양에서, 키트는 암과 관련된 하나 이상의 암 항원에 결합하는 하나 이상의 세포독성 항체를 추가로 포함한다. 특정 실시태양에서, 다른 예방제 또는 치료제는 화학요법제이다. 다른 실시태양에서, 예방제 또는 치료제는 생물학적 또는 호르몬 요법제이다.
- [0386] **5.5 치료 유용성의 특성화 및 증명**
- [0387] 본 발명의 제약 조성물 또는 예방제 또는 치료제의 몇몇 측면은 바람직하게는 인간에 사용하기 전에 목적하는 치료 활성에 대해 시험관내, 예를 들어 세포 배양 시스템에서, 이어서 생체내, 예를 들어 동물 모델 유기체, 예를 들어 설치류 동물 모델 시스템에서 시험된다. 예를 들어, 구체적인 제약 조성물의 투여가 지시되는지 여부를 결정하기 위해 사용될 수 있는 분석은 환자 조직 샘플을 배양물에서 성장시키고, 제약 조성물에 노출시키거나 달리 접촉시키고, 조직 샘플에 대한 상기 조성물의 효과, 예를 들어 반고형 한천 배지에서 성장 및/또는 콜로니 형성 또는 3차원 기저막 또는 세포외 매트릭스 제제에서 관모양 그물 형성의 억제 또는 감소를 관찰하는 세포 배양 분석을 포함한다. 조직 샘플은 환자로부터 생검에 의해 얻을 수 있다. 상기 시험은 각 개인 환자에 대한 치료상 가장 효과적인 예방 또는 치료 분자(들)의 확인을 허용한다. 별법으로, 환자로부터 세포를 배양하는 대신, 종양 또는 악성 세포주의 세포를 사용하여 치료제 및 방법을 스크리닝할 수 있다. 다양한 특정 실시태양에서, 시험관내 분석은 자가면역 또는 염증성 질환에 관여되는 세포 종류의 대표적인 세포 (예를 들어 T 세포)를 사용하여 본 발명의 제약 조성물이 상기 세포 종류에 대해 목적하는 효과를 갖는지 결정하기 위해 수행할 수 있다. 상기 생존력 및/또는 성장을 평가하기 위해 당업계의 많은 표준 분석이 사용될 수 있고; 예를 들어, 세포 증식은 ³H-티미딘 포함의 측정, 직접 세포 계수, 공지 유전자, 예를 들어 원발암유전자 (예를 들어 fos, myc)의 전사 활성의 변화 검출 또는 세포 주기 마커에 의해 분석될 수 있고; 세포 생존 능력은 트립판 블루 염색에 의해 평가될 수 있고, 분화는 형태학상 변화, 반고형 한천 배지에서 성장 및/또는 콜로니 형성 또는 3차원 기저막 또는 세포외 매트릭스 제제에서 관모양 그물 형성의 감소 등을 기준으로 시각적으로 평가될 수 있다. 추가의 분석은 당업계에 공지되고 실시예에 설명된 바와 같은 래프트 (raft) 회합, CDC, ADCC 및 세포자멸 분석을 포함한다.
- [0388] 예방제 및/또는 치료제의 조합물은 인간에 사용하기 전에 적합한 동물 모델 시스템에서 시험할 수 있다. 상기 동물 모델 시스템은 래트, 마우스, 닭, 소, 원숭이, 돼지, 개, 토끼 등을 포함하고 이로 제한되지 않는다. 당업계에 잘 공지된 임의의 동물 시스템이 사용될 수 있다. 본 발명의 특정 실시태양에서, 예방제 및/또는 치료제의 조합물을 마우스 모델 시스템에서 시험한다. 상기 모델 시스템은 널리 사용되고 당업계의 숙련인에게 잘 공지되어 있다. 예방제 및/또는 치료제는 반복적으로 투여될 수 있다. 예방제 및/또는 치료제를 투여하는 시간적 방법, 및 상기 약제가 개별적으로 또는 혼합물로 투여되는지 여부와 같은 절차의 몇가지 측면은 변할 수 있다.
- [0389] 본 발명의 방법에 사용하기 위해 바람직한 동물 모델은 예를 들어 마우스 이펙터 세포 상에 FcγR을 발현하는

트랜스제닉 마우스, 예를 들어 미국 특허 5,877,396 (그 전부가 본원에 참고로 포함됨)에 기재된 임의의 마우스 모델이다. 본 발명의 방법에 사용하기 위한 트랜스제닉 마우스는 인간 Fc γ RIIIA를 보유하는 마우스, 인간 Fc γ RIIA를 보유하는 마우스, 인간 Fc γ RIIB 및 인간 Fc γ RIIIA를 보유하는 마우스, 인간 Fc γ RIIB 및 인간 Fc γ RIIA를 보유하는 마우스를 포함하고 이로 제한되지 않는다.

[0390] 일단 본 발명의 예방제 및/또는 치료제가 동물 모델에서 시험되면 이들의 효능을 확립하기 위해 임상 시험으로 시험할 수 있다. 임상 시험의 확립은 당업계의 숙련인에게 공지된 일반적 방법에 따라 이루어질 것이고, 본 발명의 조성물의 최적 투여량 및 투여 경로와 독성 프로파일은 임상적 실험을 이용하여 확립될 수 있다.

[0391] 본 발명의 조합 요법의 소염 활성은 당업계에 공지되고 문헌 [Crofford L.J. and Wilder R.L., "Arthritis and Autoimmunity in Animals", in Arthritis and Allied Conditions: A Textbook of Rheumatology, McCarty et al. (eds.), Chapter 30 (Lee and Febiger, 1993)]에 설명된 염증성 관절염의 다양한 실험적 동물 모델을 사용하여 결정할 수 있다. 염증성 관절염 및 자가면역 류마티스 질병의 실험적 및 자발적 동물 모델이 또한 본 발명의 조합 요법의 소염 활성을 평가하기 위해 사용될 수 있다. 다음은 비제한적인 예로서 제공된 몇몇 분석이다.

[0392] 당업계에 공지되고 널리 사용되는 관절염 또는 염증성 질병에 대한 원칙적 동물 모델은 모두 그 전부가 본원에 참고로 포함된 문헌 [Crofford L.J. and Wilder R.L., "Arthritis and Autoimmunity in Animals", in Arthritis and Allied Conditions: A Textbook of Rheumatology, McCarty et al. (eds.), Chapter 30 (Lee and Febiger, 1993)]에 기재된 보강제-유도 관절염 래트 모델, 콜라겐-유도 관절염 래트 및 마우스 모델, 및 항원-유도 관절염 래트, 토끼 및 햄스터 모델을 포함한다.

[0393] 본 발명의 조합 요법의 소염 활성은 카라기이난-유도 관절염 래트 모델을 이용하여 평가될 수 있다. 카라기이난-유도 관절염은 또한 만성 관절염 또는 염증의 연구에서 토끼, 개 및 돼지에서 사용되어 왔다. 치료 효능을 결정하기 위해 정량적 조직형태학적 평가가 이용된다. 상기 카라기이난-유도 관절염 모델을 사용하는 방법은 문헌 [Hansra P. et al., "Carrageenan-Induced Arthritis in the Rat", Inflammation, 24(2):(2000)]에 기재되어 있다. 공지되고 당업계에 설명된 바와 같은 자이모산-유도 염증 동물 모델이 또한 일반적으로 이용된다.

[0394] 본 발명의 조합 요법의 소염 활성은 문헌 [Winter C.A. et al., "Carrageenan-Induced Edema in Hind Paw of the Rat as an Assay for Anti-inflammatory Drugs" Proc. Soc. Exp. Biol Med. 111, 544-547 (1962)]에 기재된 방법의 변형을 이용하여 래트에서 카라기이난-유도 발 부종의 억제를 평가함으로써 또한 평가될 수 있다. 상기 분석은 대부분의 NSAID의 소염 활성에 대한 일차적인 생체내 스크린으로서 사용되고 있고, 인간 효능의 예측으로 간주된다. 시험 예방제 또는 치료제의 소염 활성은 비히를 투여된 대조군에 비해 시험군의 뒷발 중량 증가의 억제%로서 표현된다.

[0395] 추가로, 염증성 장질환에 대한 동물 모델이 또한 본 발명의 조합 요법의 효능을 평가하기 위해 사용될 수 있다 (Kim et al., 1992, Scand. J. Gastroentrol. 27:529-537; Strober, 1985, Dig. Dis. Sci. 30(12 Suppl):3S-10S). 궤양성 대장염 및 크론병이 동물에서 유도될 수 있는 인간 염증성 장질환이다. 황산화 다당체, 비제한적인 예를 들어 아밀로펙틴, 카라기인, 아밀로펙틴 술페이트 및 텍스트란 술페이트, 또는 화학 자극제, 비제한적인 예를 들어 트리니트로벤젠술포산 (TNBS) 및 아세트산이 염증성 장질환을 유도하기 위해 동물에게 경구 투여될 수 있다.

[0396] 천식에 대한 동물 모델이 또한 본 발명의 조합 요법의 효능을 평가하기 위해 사용될 수 있다. 상기 한 모델의 예는 TH1 또는 TH2 수용 마우스의 에어로알레르겐 유발이 TH 이펙터 세포의 기도로의 이동을 일으키고 심한 호중구성 (TH1) 및 호산구성 (TH2) 폐 점막 염증 반응과 관련되는 류린 이입 전달 모델이다 (Cohn et al., 1997, J. Exp. Med. 186:1737-1747).

[0397] 자가면역 질환에 대한 동물 모델이 또한 본 발명의 조합 요법의 효능을 평가하기 위해 사용될 수 있다. 자가면역 질환, 예를 들어 1형 당뇨병, 갑상선 자가면역, 전신성 홍반성 루푸스 및 사구체신염에 대한 동물 모델이 개발되었다 (Flanders et al., 1999, Autoimmunity 29:235-246; Krogh et al., 1999, Biochimie 81:511-515; Foster, 1999, Semin. Nephrol. 19:12-24).

[0398] 또한, 당업계의 숙련인에게 공지된 임의의 분석이 자가면역 및/또는 염증성 질병에 대한 본원에 개시된 조합 요법의 예방 및/또는 치료 효능을 평가하기 위해 사용될 수 있다.

[0399] 본 발명의 예방 및/또는 치료 프로토콜의 독성 및 효능은 예를 들어 LD₅₀ (집단의 50%를 치사시키는 투여량) 및

ED₅₀ (집단의 50%에서 치료적으로 효과적인 투여량)을 결정하기 위해 세포 배양물 또는 실험 동물에서 표준 제약 절차에 의해 결정할 수 있다. 독성 및 치료 효과 사이의 비율은 치료 지수이고, 비율 LD₅₀/ED₅₀으로 표현할 수 있다. 큰 치료 지수를 나타내는 예방제 및/또는 치료제가 바람직하다. 독성 부작용을 나타내는 예방제 및/또는 치료제가 사용될 수 있지만, 미감염된 세포에 대한 잠재적인 손상을 최소화시키고 그에 의해 부작용을 감소시키기 위해 상기 약제를 침범된 조직 부위에 표적화하는 전달 시스템을 설계하기 위해 주의가 기울여야 한다.

[0400] 세포 배양 분석 및 동물 연구로부터 얻은 데이터는 인간에 사용하기 위한 예방제 및/또는 치료제의 투여량 범위를 계획하는데 사용될 수 있다. 상기 약제의 투여량은 바람직하게 독성이 거의 또는 전혀 없는 ED₅₀을 포함하는 순환 농도의 범위 내에 놓인다. 투여량은 사용된 투여형 및 이용된 투여 경로에 따라 상기 범위 내에서 변할 수 있다. 본 발명의 방법에 사용된 임의의 약제에 대해, 치료 유효 용량은 초기에 세포 배양 분석으로부터 추정될 수 있다. 용량은 세포 배양에서 측정된 IC₅₀ (즉, 증상의 최대 억제제의 1/2을 달성하는 시험 화합물의 농도)을 포함하는 순환 혈장 농도 범위를 달성하기 위해 동물 모델에서 계획될 수 있다. 상기 정보는 인간에서 유용한 용량을 보다 정확하게 결정하기 위해 사용될 수 있다. 혈장내 수준은 예를 들어 고성능 액체 크로마토그래피에 의해 측정될 수 있다.

[0401] 본 발명에 따라 사용된 치료제의 항암 활성은 또한 암 연구를 위한 다양한 실험 동물 모델, 예를 들어 당업계에 공지되고 그 전부가 본원에 참고로 포함된 문헌 [Relevance of Tumor Models for Anticancer Drug Development (1999, eds. Fiebig and Burger); Contributions to Oncology (1999, Karger); The Nude Mouse in Oncology Research (1991, eds. Boven and Winograd); 및 Anticancer Drug Development Guide (1997 ed. Teicher)]에 설명된 인간 이종이식편을 갖는 SCID 마우스 모델 또는 트랜스제닉 마우스 또는 누드 마우스, 동물 모델, 예를 들어 햄스터, 토끼 등을 사용함으로써 결정될 수 있다.

[0402] 본 발명의 프로토콜 및 조성물은 바람직하게는 인간에 사용하기 전에 목적하는 치료 또는 예방 활성에 대해 시험관내, 이어서 생체내 시험된다. 치료제 및 방법은 종양 세포 또는 악성 세포주를 사용하여 스크리닝될 수 있다. 상기 생존력 및/또는 성장을 평가하기 위해 당업계의 많은 표준 분석이 사용될 수 있고; 예를 들어, 세포 증식은 ³H-티미딘 포함의 측정, 직접 세포 계수, 공지 유전자, 예를 들어 원발암유전자 (예를 들어 fos, myc)의 전사 활성의 변화 검출 또는 세포 주기 마커에 의해 분석될 수 있고; 세포 생존 능력은 트립판 블루 염색에 의해 평가될 수 있고, 분화는 형태학상 변화, 반고형 한천 배지에서 성장 및/또는 콜로니 형성 또는 3차원 기저막 또는 세포외 매트릭스 제제에서 관모양 그물 형성의 감소 등을 기준으로 시각적으로 평가될 수 있다.

[0403] 치료법에 사용하기 위한 화합물은 인간에서 시험하기 전에 적합한 동물 모델 시스템, 비제한적인 예를 들어 래트, 마우스, 닭, 소, 원숭이, 토끼, 햄스터 등, 예를 들어, 상기 설명된 동물 모델에서 시험될 수 있다. 이어서 화합물은 적절한 임상 시험에서 사용될 수 있다.

[0404] 또한, 암, 염증성 질환 또는 자가면역 질병의 치료 또는 예방을 위해 본원에 개시된 조합 치료법의 예방 및/또는 치료 효용을 평가하기 위해 당업계의 숙련인에게 공지된 임의의 분석이 사용될 수 있다.

[0405] 5.6 진단 방법

[0406] 질병, 질환 또는 감염을 검출하거나 진단하거나 모니터링하기 위해 진단 목적을 위한 본 발명의 표지된 항체가 사용될 수 있다. 본 발명은 (a) FcγRIIB에 면역특이적으로 결합하는 하나 이상의 항체를 사용하여 대상체의 세포 또는 조직 샘플에서 FcγRIIB의 발현을 분석하고; (b) 항원 수준을 대조군 수준, 예를 들어 정상 조직 샘플 내의 수준과 비교하는 것을 포함하는, 질병, 질환 또는 감염, 특히 자가면역 질병의 검출 또는 진단을 제공하고, 여기서 대조군 항원 수준에 비해 분석된 항원 수준의 증가는 질병, 질환 또는 감염의 표시이다.

[0407] 본 발명의 항체는 본원에 설명되거나 당업계의 숙련인에게 공지된 전통적인 면역조직학적 방법을 이용하여 생물학적 샘플 내의 FcγRIIB 수준을 분석하기 위해 사용될 수 있다 (예를 들어 Jalkanen et al., 1985, J. Cell. Biol. 101:976-985; Jalkanen et al., 1987, J. Cell. Biol. 105:3087-3096 참조). 단백질 유전자 발현을 검출하기 위해 유용한 다른 항체 기반 방법은 면역분석, 예를 들어 효소 결합 면역흡수 분석 (ELISA) 및 방사성 면역분석 (RIA)를 포함한다. 적합한 항체 분석 표지는 당업계에 공지되고 효소 표지, 예를 들어, 알칼린 포스파타제, 글루코스 옥시다제; 방사성 동위원소, 예를 들어 요오드 (¹²⁵I, ¹³¹I), 탄소 (¹⁴C), 황 (³⁵S), 트리튬 (³H), 인듐 (¹²¹In) 및 테크네튬 (^{99m}Tc); 발광 표지, 예를 들어 루미놀; 및 형광 표지, 예를 들어 플루오레신 및 로다민을 포함한다.

- [0408] 본 발명의 한 측면은 인간에서 질병, 질환, 또는 감염의 검출 및 진단이다. 한 실시태양에서, 진단은 a) 대상체에게 Fc γ RIIB에 면역특이적으로 결합하는 유효량의 표지된 항체를 투여하고 (예를 들어, 비경구, 피하 또는 복강내); b) 투여 후에, 표지된 항체가 Fc γ RIIB가 발현되는 대상체의 부위에 우선적으로 농축되도록 허용하는 (및 비결합된 표지된 분자가 배경 수준으로 제거되도록 하는) 시간 간격 동안 기다리고; c) 배경 수준을 결정하고; d) 대상체에서 표지된 항체를 검출하는 것을 포함하고, 여기서 배경 수준을 넘는 표지된 항체 검출은 대상체가 질병, 질환 또는 감염을 보유하고 있음을 나타낸다. 상기 실시태양에 따라, 항체는 당업계 숙련인에게 공지된 영상화 시스템을 이용하여 검출가능한 영상화 잔기로 표지된다. 배경 수준은 검출된 표지된 분자의 양을 특정 시스템에 대해 기결정된 표준 값에 비교하는 것을 포함하는 다양한 방법에 의해 결정될 수 있다.
- [0409] 진단 영상을 생성하기 위해 필요한 영상화 잔기의 양을 대상체의 크기 및 사용된 영상화 시스템이 결정할 것임이 당업계에서 이해될 것이다. 방사성 동위원소 잔기의 경우, 인간 대상체에 대해, 주사된 방사능의 양은 정상적으로 약 5 내지 20 밀리퀴리의 ^{99m}Tc 범위일 것이다. 이어서 표지된 항체는 특이적 단백질을 함유하는 세포 위치에 우선적으로 축적될 것이다. 생체내 종양 영상화는 문헌 [S.W. Burchiel et al., "Immunopharmacokinetics of Radiolabeled Antibodies and Their Fragments." (Chapter 13 in Tumor Imaging: The Radiochemical Detection of Cancer, S.W. Burchiel and B. A. Rhodes, eds., Masson Publishing Inc. (1982))]에 기재되어 있다.
- [0410] 몇가지 변수, 예를 들어 사용된 표지의 종류 및 투여 방식에 따라, 표지된 분자가 대상체의 부위에 우선적으로 농축되도록 허용하고 비결합된 표지된 분자가 배경 수준으로 제거되도록 허용하는 투여후 시간 간격은 6 내지 48시간 또는 6 내지 24시간 또는 6 내지 12시간이다. 다른 실시태양에서, 투여후 시간 간격은 5 내지 20일 또는 5 내지 10일이다.
- [0411] 한 실시태양에서, 질병, 질환 또는 감염의 모니터링은 질병, 질환 또는 감염을 진단하는 방법을, 예를 들어 최초 진단 1개월 후, 최초 진단 6개월 후, 최초 진단 1년 후 반복함으로써 수행된다.
- [0412] 표지된 분자의 존재는 생체내 스캐닝을 위해 당업계에 공지된 방법을 이용하여 대상체에서 검출될 수 있다. 이들 방법은 사용된 표지의 종류에 따른다. 당업계의 숙련인은 특정 표지를 검출하기 위한 적절한 방법을 결정할 수 있을 것이다. 본 발명의 진단 방법에 사용될 수 있는 방법 및 장치는 컴퓨터 단층 촬영 (CT), 전신 스캔, 예를 들어 양전자 방사 단층 촬영 (PET), 자기 공명 영상 (MRI) 및 초음파 검사를 포함하고 이로 제한되지 않는다.
- [0413] 특정 실시태양에서, 분자는 방사성 동위원소로 표지되고 방사성 반응성 외과 기구 (Thurston et al., 미국 특허 5,441,050)를 사용하여 환자에서 검출된다. 다른 실시태양에서, 분자는 형광 화합물로 표지되고 형광 반응성 스캐닝 기구를 사용하여 환자에서 검출된다. 다른 실시태양에서, 분자는 양전자 방출 금속으로 표지되고 양전자 방출 단층 촬영을 사용하여 환자에서 검출된다. 또다른 실시태양에서, 분자는 상자성 표지로 표지되고 자기 공명 영상 (MRI)을 사용하여 환자에서 검출된다.
- [0414] **6. 실시예**
- [0415] **6.1 마우스 항-CD32B MAb 2B6의 인간화**
- [0416] RNA를 cDNA로 전환시키고, VH 및 VL 세그먼트를 RLM-RACE 키트 (앰비온, 인크.)를 사용하여 PCR 증폭시켰다. VH에 대한 유전자 특이적 프라이머는 SJ15R, 서열 47 (5' GGT CAC TGT CAC TGG CTC AGG G 3') 및 SJ16R, 서열 48 (5' AGG CGG ATC CAG GGG CCA GTG GAT AGA C 3')이었다. VL에 대한 유전자 특이적 프라이머는 SJ17R, 서열 49 (5' GCA CAC GAC TGA GGC ACC TCC AGA TG 3') 및 SJ18R, 서열 50 (5' CGG CGG ATC CGA TGG ATA CAG TTG GTG CAG CAT C 3')이었다. RACE 생성물을 TOPO TA 클로닝 키트 (인비트로젠, 인크.)를 사용하여 플라스미드 pCR2.1-TOPO 내로 삽입하였다. 이어서 생성되는 플라스미드를 DNA 서열 분석하여 2B6에 대한 VH 및 VL 서열을 결정하였다. 이어서 생성되는 서열을 번역하였고, 각각에 대해 예측된 아미노산 서열을 결정하였다. Kabat에 의해 규정된 바와 같이 이들 서열로부터 프레임워크 (FR) 및 상보성 결정 (CDR) 영역을 확인하였다. 이어서 마우스 VH를 인간 C-Gamma1 불변 영역 및 Ig 리더 서열에 연결시키고 포유동물 발현을 위해 pCI-neo 내로 삽입하였다. 마우스 VL을 인간 C-kappa 세그먼트 및 Ig 리더 서열에 연결시키고 또한 포유동물 발현을 위해 pCI-neo 내로 클로닝하였다.
- [0417] 인간화 2B6 VH는 인간 생식세포주 VH 세그먼트 VH1-18 및 JH6으로부터의 FR 세그먼트, 및 2B6 VH의 CDR 영역으로 이루어진다. 인간화 2B6 VL은 인간 생식세포주 VL 세그먼트 VK-A26 및 JK4로부터의 FR 세그먼트, 및 2B6 VL의 CDR 영역으로 이루어진다. 인간화 VH 및 VL 세그먼트는 PCR에 의해 합해지고 증폭된 올리고뉴클레오타이드로

부터 드 노보로 조립하였다. 이어서 생성되는 단편은 PCR에 의해 리더 서열과 합해지고, 적절한 불변 영역 세그먼트는 발현 벡터 pCI-neo 내로 NheI - EcoRI 단편으로서 클로닝되었다. 생성되는 플라스미드의 DNA 서열은 서열 분석에 의해 확인하였다. VL에 대해, 분석된 플라스미드 중 어느 것도 완전히 정확한 서열을 갖지 않았다. 2개의 최상의 삽입물을 합하여 부정확한 위치의 수를 감소시키고, 이어서 이들 위치를 부위 지정 돌연변이에 의해 교정하였다. 상기 절차 후, 예측된 인간화 2B6 VL 서열을 갖는 경쇄 세그먼트가 확인되었다.

[0418] 마우스 2B6 VH, 인간화 2B6 VH1-18 및 인간 JH6의 아미노산 서열의 정렬을 도 1A에 도시한다. 도 1B는 유전 2B6VL, 인간 2B6VL-1, 인간 2B6VL-2; 인간 2B6VL-3 및 인간 Jκ4의 아미노산 서열의 정렬을 도시한 것이다.

[0419] 6.2 인간화 2B6 중쇄 및 경쇄의 발현 및 특성화

[0420] 실험 1: hu2B6 중쇄 (HC) 발현 플라스미드를 ch2B6 경쇄 (LC)와 함께 HEK-293 세포 내로 동시형질감염시켰다. 동시에, ch2B6HC를 ch2B6LC와 함께 동시형질감염시켰다. 3일 후, 배양물 내 발현된 인간 IgG의 양을 ELISA로 정량하였다. 이어서, 이량체성 가용성 FcγRIIB-Fc에 대한 결합을 ELISA 분석으로 결정하였다.

[0421] ELISA 분석을 위한 프로토콜: 2.5 ng/웰의 가용성 FcγRIIB-Fc를 마우스 항-FcγRIIB 항체 3H7에 의해 실온에서 1시간 동안 96-웰 Maxisorp 플레이트 상에 포획하였다. 25 ng/웰로부터 시작하여 ch2B6 또는 hu2B6Hc/Ch2B6Lc의 조건화 배지의 일련의 2배 희석액을 각 웰에 첨가하였다. 플레이트를 실온에서 1시간 동안 인큐베이팅한 다음, 결합을 HRP 컨쥬게이팅된 F(ab')₂ 염소 항-인간 IgG F(ab')₂ 특이적 2차 항체에 의해 검출하였다. 약 45분 동안 2차 항체와 함께 인큐베이팅한 후, 플레이트를 TMB 기질을 사용하여 현상하였다. 5분 인큐베이션 후, 1% H₂SO₄에 의해 반응을 중지시켰다. OD_{450 nm}는 SOFTmax 프로그램에 의해 판독하였다. 각 단계 사이에, 플레이트를 PBS/0.1% Tween 20으로 3회 세척하였다. 플레이트를 30분 동안 실온에서 PBS/0.1% Tween 20 중 0.5% BSA에 의해 차단시킨 후, 가용성 FcγRIIB-Fc를 첨가하였다.

[0422] 결과: ELISA 분석의 결과를 도 2에 도시하고, 이는 hu2B6HC/ch2B6LC mAb가 ch2B6HC/ch2B6LC mAb와 유사한 친화도로 수용체에 결합된 것을 나타낸다.

[0423] 이어서, Daudi 세포에 대한 mAb의 결합을 측정하기 위해 FACS 분석을 수행하였다.

[0424] FACS 분석을 위한 프로토콜. 각각의 항체 염색을 위해 약 10⁶ Daudi 세포를 사용하였다. 세포를 PBS로 1회 세척하였다. 1차 항체 (Ch2B6, Hu2B6Hc/ch2B6Lc, 인간 IgG1)을 PBS/1% BSA 중에 0.5, 0.1, 0.02 μg/mL로 희석하고, 100 μL의 희석된 항체를 세포 내로 전달하였다. 4°C에서 30분 인큐베이션 후, 세포를 1 mL PBS/1% BSA로 1회 세척하였다. 염소 항-인간 IgG Fc 특이적 항체의 PE 컨쥬게이팅된 F(ab')₂ 단편 (잭슨 이뮤노리서치, 인크. (Jackson ImmunoResearch, Inc.))를 2차 항체로서 1:1000 희석액으로 사용하였다. 4°C에서 30분 인큐베이션 후, 세포를 1 mL PBS/1% BSA로 1회 세척하였다. 이어서 세포를 500 μL의 PBS/1% BSA 중에 재현탁시키고 FACS 분석하였다.

[0425] 결과: 결과는 hu2B6HC/ch2B6LC mAb가 키메릭 mAb와 동일한 친화도로 상기 인간 B세포 종양주에 결합하는 것을 나타낸다 (표 6).

표 6

1차 항체	농도 (μg/mL)	평균 형광
인간 IgG1	0.5	9.49
	0.1	N/A
	0.02	N/A
Ch2B6	0.5	647.48
	0.1	511.85
	0.02	172.68
Hu2B6Hc/Ch2B6Lc	0.5	648.99
	0.1	546.46
	0.02	196.93

[0427] 실험 2: HEK-293 세포의 형질감염을 다음 조합물을 사용하여 수행하였다: hu2B6HC/hu2B6LC, hu2B6HC/ch2B6LC,

ch2B6HC/hu2B6LC 및 ch2B6HC/ch2B6LC. 3일 후, 배양물 내 발현된 인간 IgG의 양을 상기 설명한 프로토콜을 사용하여 ELISA로 정량하였다. 이어서, 이량체성 가용성 Fc γ RIIB-Fc에 대한 결합을 ELISA 분석으로 결정하였다. 도 3에 도시된 본 실험의 결과는 모든 mAb가 유사한 친화도로 수용체에 결합하였음을 나타냈다. 이어서, Daudi 세포에 대한 mAb의 결합을 측정하기 위해 상기 설명한 프로토콜을 사용하여 FACS 분석을 수행하였다 (표 7). 결과는 hu2B6HC/hu2B6LC mAb가 ch2B6 mAb와 동일한 친화도로 상기 인간 B세포 종양주에 결합함을 나타낸다.

표 7

[0428]

1차 항체	농도 ($\mu\text{g/mL}$)	평균 형광
인간 IgG1	0.5	6.07
	0.1	N/A
	0.02	N/A
Ch2B6	0.5	551.52
	0.1	514.69
	0.02	168.17
Hu2B6	0.5	628.82
	0.1	618.13
	0.02	228.74

[0429]

6.3 HU2B6LC 변이체의 생성, 발현 및 결합

[0430]

Hu2B6LC CDR2 영역 (Asn₅₀-Val-Ser) 내에 N-글리코실화 부위 (Asn-Xaa-Ser/Thr)의 컨센서스 서열이 존재한다. 잔기 50에서 글리코실화를 제거하고, 따라서 생산시의 잠재적인 변동 및 제약 용도에서 잠재적인 면역원성을 제한하기 위해, 부위 지정 돌연변이 (스트라타젠 (Stratagene) 키트)를 이용하여 위치 50에서 다른 아미노산으로 치환하였다. Hu2B6LC의 2가지 상이한 버전 Hu2B6LC-N50Y, Hu2B6LC-N50Y,V51A이 생성되었다. 인간 생식세포주 유전자 세그먼트 내에서 티로신이 CDRL2 위치 50의 인간 수용자 잔기이고 알라닌이 CDRL2 위치 51의 잔기이므로 이들 아미노산이 선택되었다.

[0431]

HEK-293 세포의 형질감염을 다음 조합물을 사용하여 수행하였다: hu2B6HC/hu2B6LC; hu2B6HC/hu2B6LC(N50Y); hu2B6HC/hu2B6LC(N50Y,V51A); ch2B6HC/ch2B6LC. 3일 후, 배양물 내 발현된 인간 IgG의 양을 상기 설명한 방법을 사용하여 ELISA 분석으로 정량하였다. 이량체성 가용성 Fc γ RIIB-Fc에 대한 결합을 ELISA 분석으로 결정하였다. 도 4에 도시된 본 실험의 결과는 모든 mAb가 유사한 친화도로 수용체에 결합하였음을 나타냈다. 이어서, Daudi 세포에 대한 mAb의 결합을 측정하기 위해 FACS 분석을 수행하였다 (표 8). 결과는 hu2B6LC/hu2B6HC mAb의 2가지 변이체가 ch2B6 mAb와 동일한 친화도로 상기 인간 B세포 종양주에 결합함을 증명한다.

표 8

[0432]

1차 항체	농도 ($\mu\text{g/ml}$)	평균 형광
인간 IgG1	0.5	1.23
	0.1	N/A
	0.02	N/A
Ch2B6	0.5	192.88
	0.1	141.01
	0.02	45.59
Hu2B6	0.5	201.69
	0.1	174.37
	0.02	58.65
Hu2B6 N50Y	0.5	191.16
	0.1	134.56
	0.02	40.14
Hu2B6N50Y, V51A	0.5	167.16
	0.1	133.83
	0.02	45.95

[0433] 6.4 FcγRIIA에 대한 MAb의 결합

[0434] ELISA 분석을 위한 프로토콜: 카르보네이트 완충액 중 100 ng/웰의 가용성 FcγRIIA를 4℃에서 밤새 96-웰 Maxisorp 플레이트 상에 코팅하였다. 25 ng/웰로부터 시작하여 Ch2B6; hu2B6HC/hu2B6LC; hu2B6HC/hu2B6LC(N50Y); hu2B6HC/hu2B6LC(N50Y,V51A); 및 정제된 IV.3의 조건화 배지의 일련의 2배 희석액을 각 웰에 첨가하였다. 플레이트를 실온에서 1시간 동안 인큐베이팅하였다. 결합을 Ch2B6 및 모든 hu2B6 샘플에 대해 HRP 컨쥬게이팅된 F(ab')₂ 염소 항-인간 IgG F(ab')₂ 특이적 2차 항체, 및 IV.3에 대해 HRP 컨쥬게이팅된 F(ab')₂ 염소 항-마우스 IgG (H+L) 2차 항체에 의해 검출하였다. 약 45분 동안 2차 항체와 함께 인큐베이팅한 후, 플레이트를 TMB 기질을 사용하여 현상하였다. 5분 인큐베이션 후, 1% H₂SO₄에 의해 반응을 중지시켰다. OD_{450 nm}는 SOFTmax 프로그램에 의해 판독하였다. 각 단계 사이에, 플레이트를 PBS/0.1% Tween 20으로 3회 세척하였다. 플레이트를 30분 동안 실온에서 PBS/0.1% Tween 20 중 0.5% BSA에 의해 차단시킨 후, 일련의 희석된 항체를 첨가하였다.

[0435] 결과: 이들 데이터는 인간화 2B6 항체가 인간화 과정 동안 CD32B에 선택적으로 결합하는 그의 능력을 잃지 않았음을 보여준다 (도 5). 요약하면, IV.3 (FcγRIIA에 대한 무인 Mab)은 FcγRIIA에 결합하는 반면, 키메릭 및 인간화 2B6은 결합하지 않는다.

[0436] 본 발명은 본 발명의 개별 측면의 한 예시로서 의도된 상기한 특정 실시태양에 의해 그 범위가 제한되지 않고, 기능적으로 동등한 방법 및 성분은 본 발명의 범위에 포함된다. 실제로, 본원에서 제시되고 설명된 것 이외에 본 발명의 다양한 변형은 상기한 설명 및 첨부 도면으로부터 당업계의 숙련인에게 명백할 것이다. 상기 변형은 첨부되는 청구의 범위 내에 포함되는 것으로 의도된다.

[0437] 다양한 문헌이 본원에 인용되고, 그 개시 내용은 그 전부가 본원에 참고로 포함된다.

[0438] 국제 출원 번호: PCT/ /

[0439]

미생물 명세서의 제 면 제 줄에 참조된 미생물과 관련된 옵션 시트
A. 기탁물의 동정 추가 기탁물은 추가 면에서 동정된다.
기탁기관명 아메리칸 타입 컬처 콜렉션
기탁기관 주소 (국가 및 우편번호 포함) 미국 20110-2209 버지니아주 마나사스 유니버시티 불리바드 10801
기탁일 2002년 8월 13일 기탁 번호 PTA-4591
B. 추가 표시 (적절하지 않는 경우 공백으로 둡). 이 정보는 첨부된 별지 상에 연속된다.
C. 표시된 지정국 (모든 지정국이 표시되지 않는 경우)
D. 표시된 별도의 비품 (적절하지 않는 경우 공백으로 둡) 하기에 열거된 표시는 국제사무국에 제출될 것이다. (표시의 일반적 성격, 예컨대 "기탁 번호"를 특정함)
E. <input type="checkbox"/> 이 면은 출원시에 국제 출원과 함께 접수됨 (접수처에 의해 확인되기 위해) <div style="text-align: right;">(위임된 직원)</div> <input type="checkbox"/> 국제사무국에 의해 (출원인으로부터) 접수된 일자 <div style="text-align: right;">(위임된 직원)</div>

[0440] Form PCT/RO/134 (1981년 1월)

- [0441] Form PCT/RO/134 (계속)
- [0442] 아메리칸 타입 킬러 콜렉션
- [0443] 미국 20110-2209 버지니아주 마나사스 유니버시티 불러바드 10801

[0444]	<u>기탁 번호</u>	<u>기탁일</u>
[0445]	PTA-4592	2002년 8월 2일
[0446]	PTA-5958	2004년 5월 7일
[0447]	PTA-5959	2004년 5월 7일
[0448]	PTA-5960	2004년 5월 7일
[0449]	PTA-5961	2004년 5월 7일
[0450]	PTA-5962	2004년 5월 7일
[0451]	PTA-5963	2004년 5월 7일
[0452]	PTA-5964	2004년 5월 7일

도면

도면1A

```

          0          3      3
          1          1      6
Mu2B6VH  QVQLQQPVTELVRPGASVMLSCKASDYPFT NYWIH WVKQRPGQGLEWIG
Hu2B6VH-1 ----V-SGA-VKK-----KV-----G-T-- ----R-A-----M-
VH1-18    ----V-SGA-VKK-----KV-----G-T-- S-G-S --R-A-----M-
                                FR1          CDR1      FR2

          5          6
          0          6
Mu2B6VH  VIDPSDTYPNYNKKFKG KATLTVVSSSTAYMQLSSLTSDDSAVYYCAR
Hu2B6VH-1 -----RV-M-TDT-T-----E-R--R---T-----
VH1-18    W-SAYNGNT--AQ-LQ- RV-M-TDT-T-----E-R--R---T-----
                                CDR2          FR3

          1
          0
          5          3
Mu2B6VH  NGDSDYYSGLMDY WGQGTSTVTSS
Hu2B6VH-1 -----T-----
HuJH6     --Y--V -----T-----
                                CDR3      FR4

```

도면1B

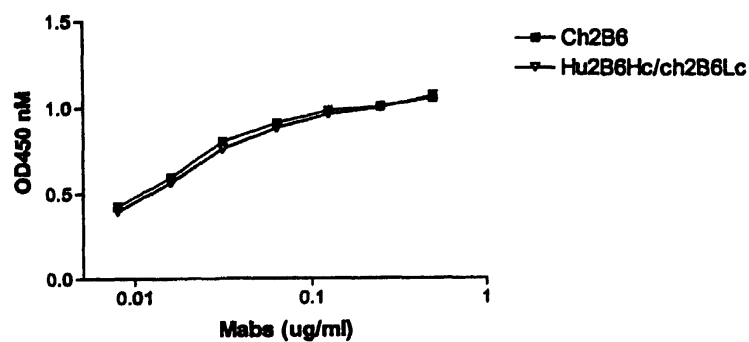
	0		2		3
	1		4		5
Mu2B6VL	DILLTQSPAILSVSPGERVVSFSC	RTSQSIGTNIH	WYQQRTNGFPRLLIK		
Hu2B6VL-1	E-V-----DFQ--T-K-K-TIT-	-----	-----KPDQS-K----		
Hu2B6VL-2	E-V-----DFQ--T-K-K-TIT-	-----	-----KPDQS-K----		
Hu2B6VL-3	E-V-----DFQ--T-K-K-TIT-	-----	-----KPDQS-K----		
VK-A26	E-V-----DFQ--T-K-K-TIT-	-A-----SSL-	-----KPDQS-K----		
		FR1	CDR1	FR2	

	5	5
	0	7
Mu2B6VL	NVSEIS	GIPSRFSGSGSGTDFILSINSVESEDIADYYC
Hu2B6VL-1	-----V-----	-----T-T---L-A--A-T---
Hu2B6VL-2	Y-----	-----V-----T-T---L-A--A-T---
Hu2B6VL-3	YA-----	-----V-----T-T---L-A--A-T---
VK-A26	YA-Q-F-	-----V-----T-T---L-A--A-T---
	CDR2	FR3

	8	9
	9	8
Mu2B6VL	QQSNTWPFFT	FGGGTKLEIK
Hu2B6VL-1	-----	-----V---
Hu2B6VL-2	-----	-----V---
Hu2B6VL-3	-----	-----V---
VK-A26	H-SSL-	
HuJX4		L- -----V---
	CDR3	FR4

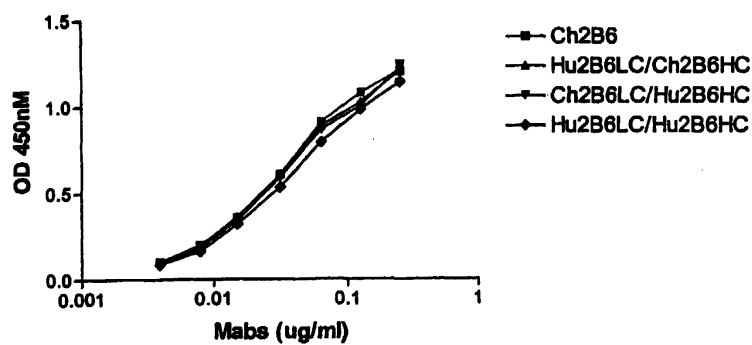
도면2

FcγRIIB에 대한 hu2B6HC/ch2B6LC mAB 및 ch2B6 mAb의 결합



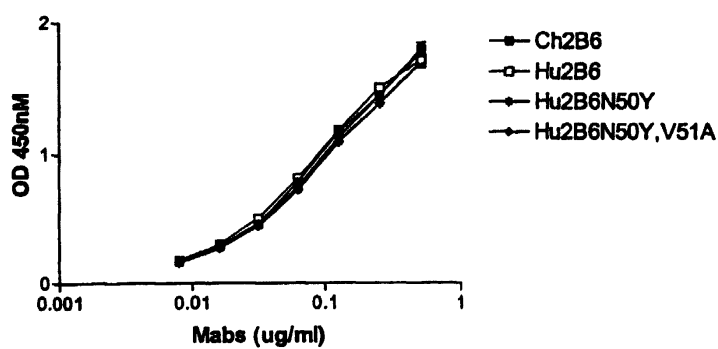
도면3

FcγRIIB에 대한 hu2B6LC/ch2B6HC mAB, ch2B6LC/hu2B6HC 및 ch2B6 mAb의 결합



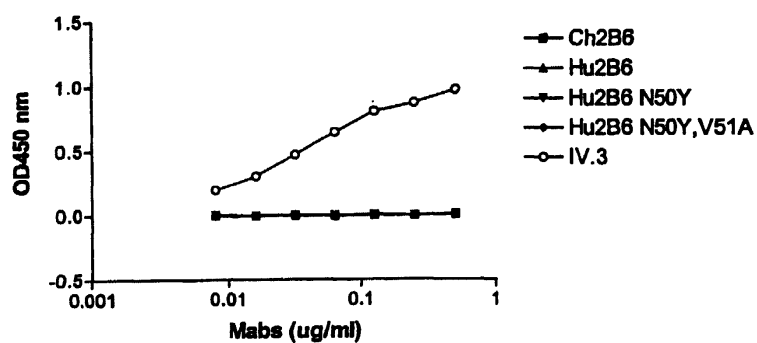
도면4

FcγRIIB에 대한 hu2B6 변이체의 결합



도면5

FcγRIIA에 대한 hu2B6 변이체의 결합



서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> MacroGenics, Inc.

<120> HUMANIZED FcγRIIB-SPECIFIC ANTIBODIES AND METHODS OF USE THEREOF

<130> 11183-018-228

<140>

<141>

<150> 60/582,043

<151> 2004-06-21

<150> 60/569,882

<151> 2004-05-10

<160> 58

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> 2B6 Heavy chain variable region - CDR1

<400> 1

Asn Tyr Trp Ile His

1 5

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> 2B6 Heavy chain variable region - CDR2

<400> 2

Val Ile Asp Pro Ser Asp Thr Tyr Pro Asn Tyr Asn Lys Lys Phe Lys
1 5 10 15
Gly

<210> 3

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> 2B6 Heavy chain variable region - CDR3

<400> 3

Asn Gly Asp Ser Asp Tyr Tyr Ser Gly Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 4

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Framework sequence from human germline VH1-18 and JH6 - FR1

<400> 4

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
20 25 30

<210> 5

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Framework sequence from human germline VH1-18 and JH6 - FR2

<400> 5

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly

1 5 10

<210> 6
<211> 32
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Framework sequence from human germline VH1-18 and JH6 - FR3

<400> 6
Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu
1 5 10 15
Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

<210> 7
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Framework sequence from human germline VH1-18 and JH6 - FR4

<400> 7
Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 8
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> 2B6 Light chain variable region - CDR1

<400> 8
Arg Thr Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn Ile His
1 5 10

<210> 9
<211> 7
<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> 2B6 Light chain variable region - CDR2

<400> 9

Asn Val Ser Glu Ser Ile Ser

1 5

<210> 10

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> 2B6 Light chain variable region - CDR2

<400> 10

Tyr Val Ser Glu Ser Ile Ser

1 5

<210> 11

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> 2B6 Light chain variable region - CDR2

<400> 11

Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser

1 5

<210> 12

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> 2B6 Light chain variable region - CDR3

<400> 12

Gln Gln Ser Asn Thr Trp Pro Phe Thr

1 5

<210> 13
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> Framework sequence from human germline VK-A26 and JK4 - FR1

<400> 13

Glu	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Asp	Phe	Gln	Ser	Val	Thr	Pro	Lys
1				5					10					15	
Glu	Lys	Val	Thr	Ile	Thr	Cys									
				20											

<210> 14
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> Framework sequence from human germline VK-A26 and JK4 - FR2

<400> 14

Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Asp	Gln	Ser	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Lys
1				5					10					15

<210> 15
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> Framework sequence from human germline VK-A26 and JK4 - FR3

<400> 15

Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr
1				5					10					15	
Leu	Thr	Ile	Asn	Ser	Leu	Glu	Ala	Glu	Asp	Ala	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys
				20				25					30		

<210> 16
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> Framework sequence from human germline VK-A26 and JK4 - FR4

<400> 16
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 1 5 10

<210> 17
 <211> 321
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Humanized 2B6 light chain variable region - Hu2B6VL-1

<400> 17
 gaaattgtgc tgactcagtc tccagacttt cagtctgtga ctccaaagga gaaagtcacc 60
 atcacctgca ggaccagtca gagcattggc acaaacatac actggtacca gcagaaacca 120
 gatcagtcctc caaagctcct catcaagaat gtttctgagt ctatctctgg agtcccatcg 180
 aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcaccctca ccatcaatag cctggaagct 240
 gaagatgctg caacgtatta ctgtcaacaa agtaatacct ggccgttcac gttcggcgga 300
 gggaccaagg tggagatcaa a 321

<210> 18
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Humanized 2B6 light chain variable region - Hu2B6VL-1

<400> 18
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys
 1 5 10 15
 Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn
 20 25 30
 Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Lys Asn Val Ser Glu Ser Ile Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

<210> 19
<211> 321
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Humanized 2B6 light chain variable region - Hu2B6VL-2

<400> 19
gaaattgtgc tgactcagtc tccagacttt cagtctgtga ctccaaagga gaaagtcacc 60
atcacctgca ggaccagtca gagcattggc acaaacatac actggtacca gcagaaacca 120
gatcagtcct caaagtcct catcaagtat gtttctgagt ctatctctgg agtcccatcg 180
aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcaccctca ccatcaatag cctggaagct 240
gaagatgctg caacgtatta ctgtcaacaa agtaatacct ggccgttcac gttcggcgga 300
gggaccaagg tggagatcaa a 321

<210> 20
<211> 107
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Humanized 2B6 light chain variable region - Hu2B6VL-2

<400> 20
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys
1 5 10 15
Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn
20 25 30
Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Lys Tyr Val Ser Glu Ser Ile Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

<210> 21

<211> 321
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Humanized 2B6 light chain variable region - Hu2B6VL-3

<400> 21
 gaaattgtgc tgactcagtc tccagacttt cagtctgtga ctccaaagga gaaagtcacc 60
 atcacctgca ggaccagtca gagcattggc acaaacatac actggtacca gcagaaacca 120
 gatcagtcctc caaagctcct catcaagtat gttctcgtg ctatctctgg agtcccatcg 180
 aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcacctca ccatcaatag cctggaagct 240
 gaagatgctg caacgtatta ctgtcaacaa agtaatacct ggccgttcac gttcggcgga 300
 gggaccaagg tggagatcaa a 321

<210> 22
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Humanized 2B6 light chain variable region - Hu2B6VL-3

<400> 22
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys
 1 5 10 15
 Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn
 20 25 30
 Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Lys Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala
 65 70 75 80
 Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Thr Trp Pro Phe
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 23
 <211> 363
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Humanized heavy chain variable region - Hu2B6VH-1

<400> 23

```
caggttcagc tggatgcagtc tggagctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
tcctgcaagg ctcttggtta cacctttacc aactactgga tacactgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggcttgagtg gatgggagtg attgacctt ctgatactta tccaaattac 180
aataaaaagt tcaagggcag agtcacatg accacagaca catccacgag cacagcctac 240
atggagctga ggagcctgag atctgacgac acggccgtgt attactgtgc gagaaacggt 300
gattccgatt attactctgg tatggactac tgggggcaag ggaccacggt caccgtctcc 360
tca 363
```

<210> 24

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Humanized heavy chain variable region

<400> 24

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

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

<210> 25

<211> 321

<212> DNA

<213> mus sp.

<220>

<223> Mouse 2B6 light chain variable region

<400> 25

```
gacatcttgc tgactcagtc tccagccatc ctgtctgtga gtccaggaga gagagtcagt 60
ttttcctgca ggaccagtca gagcattggc acaaacatac actggtatca gcaaagaaca 120
aatggttttc caaggtttct cataaagaat gttttctgagt ctatctctgg gatcccttcc 180
```


aggtttagtg gcagtggatc agggacagat tttattctta gcatcaacag tgtggagtct 240
gaagatattg cagattatta ttgtcaacaa agtaatacct ggccgttcac gttcggaggg 300
gggaccaagc tggaaataaa a 321

<210> 26
<211> 107
<212> PRT

<213> mus sp.

<220>
<223> Mouse 2B6 light chain variable region

<400> 26
Asp Ile Leu Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Val Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Arg Val Ser Phe Ser Cys Arg Thr Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn
20 25 30
Ile His Trp Tyr Gln Gln Arg Thr Asn Gly Phe Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45
Lys Asn Val Ser Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

<210> 27
<211> 363
<212> DNA
<213> mus sp.

<220>
<223> Mouse 2B6 heavy chain variable region

<400> 27
caggtccaat tgcagcagcc tgtgactgag ctggtagggc cgggggcttc agtgatgttg 60
tcctgcaagg ctctgacta ccccttcacc aactactgga tacactgggt aaagcagagg 120
cctggacaag gcctggagtg gatcgagtg attgacctt ctgatactta tccaaattac 180
aataaaaagt tcaagggcaa ggccacattg actgtagtcg tatcctccag cacagcctac 240
atgacgtca gcagcctgac atctgacgat tctgcggtct attactgtgc aagaacgggt 300
gattccgatt attactctgg tatggactac tgggggtcaag gaacctcagt caccgtctcc 360
tca 363

<210> 28
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> mus sp.

<220>
 <223> Mouse 2B6 heavy chain variable region

<400> 28
 Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Val Thr Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Met Leu Ser Cys Lys Ala Ser Asp Tyr Pro Phe Thr Asn Tyr
 20 25 30
 Trp Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Val Ile Asp Pro Ser Asp Thr Tyr Pro Asn Tyr Asn Lys Lys Phe
 50 55 60

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

<210> 29
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> 3H7 Heavy Chain Variable region - CDR1

<400> 29
 Asp Ala Trp Met Asp
 1 5

<210> 30
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> 3H7 Heavy Chian Variable region - CDR2

<400> 30

Glu Ile Arg Asn Lys Ala Asn Asn Leu Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu Ser
 1 5 10 15
 Val Lys Gly

<210> 31

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 3H7 Heavy Chian Variable region - CDR3

<400> 31

Tyr Ser Pro Phe Ala Tyr
 1 5

<210> 32

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 3H7 Heavy Chian Variable region - FWR1

<400> 32

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

<210> 33

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 3H7 Heavy Chian Variable region - FWR2

<400> 33

Trp Val Arg Gln Gly Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala
1 5 10

<210> 34

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 3H7 Heavy Chian Variable region - FWR3

<400> 34

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

<210> 35

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 3H7 Heavy Chian Variable region - FWR4

<400> 35

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
1 5 10

<210> 36

<211> 345

<212> DNA

<213> mus sp.

<220>

<223> mouse 3H7 Heavy Chain Variable Region

<400> 36

gaagtgaagt ttgaggagtc tggaggaggc ttggtgcaac ctggaggatc catgaaactc 60
tcttgtgctg cctctggatt cacttttagt gacgcctgga tggactgggt ccgccagggt 120
ccagagaagg ggcttgagtg ggttgcgtgaa attagaaaca aagctaataa tcttgcaaca 180
tactatgctg agtctgtgaa agggagggtc accatcccaa gagatgattc caaaagtagt 240
gtctacctgc acatgaacag ctttaagagct gaagacactg gcatttatta ctgttatagt 300

ccctttgctt actggggcca agggactctg gtcactgtct ctgca

345

<210> 37

<211> 115

<212> PRT

<213> mus sp.

<220>

<223> mouse 3H7 Heavy Chain Variable Region

<400> 37

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

<210> 38

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 3H7 Light Chain Variable region - CDR1

<400> 38

Arg	Ala	Ser	Gln	Glu	Ile	Ser	Gly	Tyr	Leu	Ser
1				5					10	

<210> 39

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 3H7 Light Chian Variable region - CDR2

<400> 39

Ala Ala Ser Thr Leu Asp Ser

1 5

<210> 40

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 3H7 Light Chian Variable region - CDR3

<400> 40

Leu Gln Tyr Val Ser Tyr Pro Tyr Thr

1 5

<210> 41

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 3H7 Light Chian Variable region - FWR1

<400> 41

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly

1 5 10 15

Glu Arg Val Ser Leu Thr Cys

20

<210> 42

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 3H7 Light Chian Variable region - FWR2

<400> 42

Trp Leu Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Ile Arg Arg Leu Ile Tyr

1 5 10 15

<210> 43
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> 3H7 Light Chian Variable region - FWR3

<400> 43
 Gly Val Pro Lys Arg Phe Ser Gly Ser Trp Ser Gly Ser Asp Tyr Ser
 1 5 10 15
 Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ser Glu Asp Phe Ala Asp Tyr Tyr Cys
 20 25 30

<210> 44
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> 3H7 Light Chian Variable region - FWR4

<400> 44
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 1 5 10

<210> 45
 <211> 321
 <212> DNA
 <213> mus sp.

<220>
 <223> mouse 3H7 Light Chain Variable Region

<400> 45
 gacatccaga tgaccacgtc tccatcctcc ttatctgcct ctctgggaga aagagtcagt 60
 ctcaactgtc gggcaagtca ggaattagt ggttacttaa gctggcttca gcagaaacca 120
 gatggaacta ttagacgcct gatctacgcc gcatccactt tagattctgg tgtcccaaaa 180
 aggttcagtg gcagttggtc tgggtcagat tattctctca ccatcagcag ccttgagtct 240
 gaagattttg cagactatta ctgtctacaa tatgttagtt atccgtatac gttcggaggg 300
 gggaccaagc tggaaataaa a 321

<210> 46
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> mus sp.

<220>
 <223> mouse 3H7 Light Chain Variable Region

<400> 46
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Val Ser Leu Thr Cys Arg Ala Ser Gln Glu Ile Ser Gly Tyr
 20 25 30
 Leu Ser Trp Leu Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Ile Arg Arg Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Asp Ser Gly Val Pro Lys Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

 Ser Trp Ser Gly Ser Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ser
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Asp Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Val Ser Tyr Pro Tyr
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 47
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Primer - SJ15R

<400> 47
 ggtcactgtc actggctcag gg

22

<210> 48
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Primer - SJ16R

<400> 48
aggcggatcc aggggccagt ggatagac 28

<210> 49
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer - SJ17R

<400> 49
gcacacgact gaggcacctc cagatg 26

<210> 50
<211> 34
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer - SJ18R

<400> 50
cggcggatcc gatggataca gttggtgcag catc 34

<210> 51
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Fusion protein - partial sequence

<400> 51
Lys Lys Phe Ser Arg Ser Asp Pro Asn
1 5

<210> 52
<211> 9
<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Fusion protein - partial sequence

<400> 52

Gln Lys Phe Ser Arg Leu Asp Pro Asn

1 5

<210> 53

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Fusion protein - partial sequence

<400> 53

Gln Lys Phe Ser Arg Leu Asp Pro Thr

1 5

<210> 54

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Fusion protein - partial sequence

<400> 54

Lys Lys Phe Ser Arg Leu Asp Pro Thr

1 5

<210> 55

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Fusion protein - partial sequence

<400> 55

Gln Lys Phe Ser His Leu Asp Pro Thr
1 5

<210> 56
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Fusion protein - partial sequence

<400> 56
Lys Lys Phe Ser His Leu Asp Pro Thr
1 5

<210> 57
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Fusion protein - partial sequence

<400> 57
Ala Pro Ser Ser Ser
1 5

<210> 58
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Fusion protein - partial sequence

<400> 58
Val Pro Ser Met Gly Ser Ser Ser
1 5