



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2012년07월27일
(11) 등록번호 10-1115797
(24) 등록일자 2012년02월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/18 (2006.01) C07K 16/46 (2006.01)
A61K 51/10 (2006.01) A61K 47/48 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2005-7001867
(22) 출원일자(국제) 2003년08월01일
심사청구일자 2008년07월29일
(85) 번역문제출일자 2005년02월01일
(65) 공개번호 10-2005-0027274
(43) 공개일자 2005년03월18일
(86) 국제출원번호 PCT/GB2003/003325
(87) 국제공개번호 WO 2004/013180
국제공개일자 2004년02월12일
(30) 우선권주장
60/399,707 2002년08월01일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
Clinical Cancer Research, Vol.5,
pp.3095s-3100s (1999.10.31.)
Protein Engineering, Vol.13:5, pp.361-367
(2000.12.31.)

(73) 특허권자
이뮤노메딕스, 인코오포레이티드
미국뉴저저지주 07950 모리스플레인즈 어메리칸로
오드300
(72) 발명자
한세한스
미국 미시시피주 39466 피카운, 앵글러 드라이브
6014
규정성
미국 뉴저지주 07059 와렌, 시카모아 웨이 15
골든베르그데이비드엠.
미국 뉴저저지주 07945 멘드함, 플리전트 밸리 로
드 300
(74) 대리인
특허법인태평양

전체 청구항 수 : 총 19 항

심사관 : 노은주

(54) 발명의 명칭 **알파 태아 단백질 Immu31 항체 및 융합단백질, 및 이들의 이용 방법**

(57) 요약

본 발명은 인간화된, 키메라 및 인간 항-알파 태아 단백질 항체, 융합 단백질 및 그 단편에 관한 것이다. 상기 항체, 융합 단백질 및 그 단편 뿐만 아니라 다른 적절한 항체와의 조합은 간세포 암종(Hepatocellular carcinoma), 간아세포종(肝芽細胞腫:hepatoblastoma), 생식세포 종양 암종 및 다른 AFP 생성 종양의 치료 및 진단을 위해 사용된다.

대표도

```

GTGAAGCTGCAGGAGTCAAGAACTGAACTGGTAAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGATGTCCTGCAAGGCTTCTGGATACGCTTTCCTACTAGC 90
 2 10 20 30
V K L Q E S G P E L V K P G A S V K M S C K A S G Y A F T S
TATGTTATACACTGGGTGAGGCAGAAGCCTGGGCAGGGCCTTTATTGGATTGGATATATTCATCCTTACAATGGTGGTACCAAGTACAAT 180
 40 50 52 A 60
Y V I E W V R Q K P G Q G L Y W I G Y I H P Y N G G T K Y N
CDR1 CDR2
GAGAAGTTCAAAGGCAAGGCCACACTGACTTCAGACAAATCGTCCAGCACAACTACATGGAGCTCAGCAGCCTGACCTCTGAGGACTCT 270
 70 80 82 A B C
E K F K G K A T L T S D K S S S T T Y M E L S S L T S E D S
GCGGTCTATTACTGTCAGATCTGGGGGGGAGACCCTTTTGCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA 351
 90 100 A 110 113
A V Y Y C A R S G G G D P F A Y W G Q G T L V T V S A
CDR3
    
```

특허청구의 범위

청구항 1

알파 태아 단백질(AFP) 항원에 결합하며, 경쇄 가변 영역의 상보성 결정 영역(CDR)은 CDR1(KASQDINKYIG, 서열번호 22), CDR2(YTSALLP, 서열번호 23) 및 CDR3(LQYDDLWT, 서열번호 24)를 포함하고; 및 중쇄 가변 영역의 상보성 결정 영역은 CDR1(SYVIH, 서열번호 25), CDR2(YIHPYNGGTKYNEKFKG, 서열번호 26) 및 CDR3(SGGGDPFAY, 서열번호 27)를 포함하는 키메라, 인간화 또는 인간 단클론항체(MAb) 또는 그 단편.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

제 1항에 있어서, 인간 항체의 구조 영역(FR) 및 불변 영역 서열을 더 포함하는 인간화 항체 또는 그 단편.

청구항 11

제 10항에 있어서, 상기 경쇄 및 중쇄 가변 영역의 구조 영역이 서열번호 10의 마우스 중쇄 가변 영역의 아미노산 잔기 5, 27, 28, 30, 46, 66, 67 및 94 또는 서열번호 13의 마우스 경쇄 가변 영역의 아미노산 잔기 4, 39, 48, 49, 58, 69, 100 및 107로 이루어진 군으로부터 선택되는 마우스 항-AFP 항체 또는 그 단편의 대응하는 구조 영역으로부터 치환된 하나 이상의 아미노산을 포함하는 인간화 항체 또는 그 단편.

청구항 12

삭제

청구항 13

제 1항에 있어서, 상기 항체 또는 그 단편이 서열번호 3의 IMM31 V_K 뉴클레오티드 서열에 의해 인코딩된 경쇄 가변 영역 서열 및 서열번호 1의 IMM31 V_H 뉴클레오티드 서열에 의해 인코딩된 중쇄 가변 영역 서열을 포함하

는 키메라 항체 또는 그 단편.

청구항 14

삭제

청구항 15

제 10항에 있어서, 상기 항체 또는 그 단편이 서열번호 20의 hIMMU31 V_K 뉴클레오티드 서열에 의해 인코딩된 경쇄 가변 영역 서열 및 서열번호 18의 hIMMU31 V_H 뉴클레오티드 서열에 의해 인코딩된 중쇄 가변 영역 서열을 포함하는 인간화 항체 또는 그 단편.

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

제 1항에 있어서, 상기 단편이 F_v, F(ab')₂, Fab' 및 Fab로 이루어진 군으로부터 선택되는 키메라, 인간화 또는 인간 항체 또는 그 단편.

청구항 22

제 1항, 제 10항, 제 11항, 제 13항, 제 15항 및 제 21항 중 어느 한 항의 키메라, 인간화 또는 인간 항-AFP항체 또는 그 단편 또는 제 1항, 제 10항, 제 11항, 제 13항, 제 15항 및 제 21항 중 어느 한 항의 키메라, 인간화 또는 인간 항-AFP항체 또는 그 단편을 포함하는 항체 융합 단백질을 포함하는 진단/검출용 또는 치료용 면역 접합체로서, 상기 키메라, 인간화 또는 인간 항체, 융합 단백질 또는 그 단편이 하나 이상의 진단/검출용 제제 또는 치료용 제제에 결합하는 진단/검출용 또는 치료용 면역 접합체.

청구항 23

제 22항에 있어서, 상기 진단/검출용 제제는 하나 이상의 광활성 진단/검출용 제제, 20 내지 10,000 keV 에너지의 방사성 핵종, 조영제, 상자성 이온 및 초음파 향상제를 포함하는 군에서 선택되는 진단/검출용 면역접합체.

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

제 22항에 있어서, 상기 치료용 제제가 방사성 핵종, 붕소, 가돌리늄, 우라늄, 면역조절제, 사이토카인, 호르몬, 호르몬 길항제, 효소, 효소 억제제, 광활성 치료제, 세포독성제, 독소, 혈관신생 억제제, 상이한 항체 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 치료용 면역접합체.

청구항 38

삭제

청구항 39

제 37항에 있어서, 상기 세포독성제가 유사분열억제제(antimitotic agent), 알킬화제, 대사길항제(antimetabolite agent), 혈관신생 억제제(antiangiogenic agent), 세포자가사멸제(apoptotic agent), 알카로이드제, COX-2 억제제 및 항생제로 이루어진 군으로부터 선택되는 치료용 면역접합체.

청구항 40

제 37항에 있어서, 상기 세포독성제가 질소 거자(nitrgen mustards), 에틸렌이민 유도체, 알킬 술포네이트, 니트로소우레아(nitrosourea), 트리아젠(triazenes), 폴릭산 유사체(folic acid analog), 안트라사이클린(anthracyclines), 탁산(taxanes), COX-2 억제제, 피리미딘 유사체, 퓨린 유사체, 항생제, 에피포도필로톡신

(epipodophyllotoxins), 백금 배위 착물, 빈카 알칼로이드(vinca alkaloid), 치환 우레아, 메틸 히드라진 유도체, 부신피질 반응 억제제, 호르몬 길항제, 효소 억제제, 엔도스타틴(endostatin), 탁솔(taxol), 탁산, 캄토테신(camptothecins) 및 독소루비신(doxorubicins)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 치료용 면역접합체.

청구항 41

삭제

청구항 42

제 37항에 있어서, 상기 독소가 리신(ricin), 아브린(abrin), 알파 독소(alpha toxin), 사포린(saporine), 리보뉴클레아제(RNase), DNase I, 스타필로코커스 장독소-A, 미국자리공 항바이러스 단백질(pokeweed antiviral protein), 겔로닌(gelonin), 디프테리아 독소(diphtheria toxin), 슈도모나스 외독소(pseudomonas exotoxin) 및 슈도모나스 내독소(pseudomonas endotoxin)로 이루어진 군으로부터 선택되는 치료용 면역접합체.

청구항 43

제 37항에 있어서, 상기 면역조절제가 사이토카인(cytokine), 줄기 세포 성장 인자(stem cell growth factor), 림포톡신(lymphotoxin), 조혈인자(hematopoietic factor), 콜로니 자극인자(colony stimulating factor, CSF), 인터페론(IFN), 줄기세포 성장 인자, 적혈구생성촉진인자(erythropoietin), 혈소판증식인자(thrombopoietin), 항체 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 치료용 면역접합체.

청구항 44

제 43항에 있어서, 상기 림포톡신이 종양 괴사 인자(tumor necrosis factor, TNF)이고, 상기 조혈인자가 인터루킨(IL)이고, 상기 콜로니 자극인자가 과립구-콜로니 자극인자(granulocyte-colony stimulating factor, G-CSF) 또는 과립구 대식세포-콜로니 자극인자(granulocyte macrophage-colony stimulating factor, GM-CSF)이고, 상기 인터페론이 인터페론- α , $-\beta$ 또는 $-\gamma$ 이고, 상기 줄기세포 성장 인자가 "S1 인자"로 표시되는 치료용 면역접합체.

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

제 37항에 있어서, 상기 방사성 핵종이 P-32, P-33, Sc-47, Fe-59, Cu-64, Cu-67, Se-75, As-77, Sr-89, Y-90, Mo-99, Rh-105, Pd-109, Ag-111, I-125, I-131, Pr-142, Pr-143, Pm-149, Sm-153, Tb-161, Ho-166, Er-169, Lu-177, Re-186, Re-188, Re-189, Ir-194, Au-198, Au-199, Pb-211, Pb-212, 및 Bi-213, Co-58, Ga-67, Br-80m, Tc-99m, Rh-103m, Pt-109, In-111, Sb-119, I-125, Ho-161, Os-189m, Ir-192, Dy-152, At-211, Bi-212, Ra-223, Rn-219, Po-215, Bi-211, Ac-225, Fr-221, At-217, Bi-213 및 Fm-255로 이루어진 군으로부터 선택되는 치료용 면역접합체.

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

청구항 58

삭제

청구항 59

제 1항에 따른 일차 항체 또는 그 단편 및 이차 항체 또는 그 단편을 포함하는 양특이성 항체 또는 그 단편 또는 융합 단백질.

청구항 60

제 59항에 있어서, 상기 이차 항체 또는 그 단편이 부착소에 결합하는 양특이성 항체 또는 그 단편 또는 융합 단백질.

청구항 61

삭제

청구항 62

삭제

청구항 63

삭제

청구항 64

삭제

청구항 65

삭제

청구항 66

삭제

청구항 67

삭제

청구항 68

삭제

청구항 69

삭제

청구항 70

삭제

청구항 71

삭제

청구항 72

삭제

청구항 73

삭제

청구항 74

삭제

청구항 75

삭제

청구항 76

삭제

청구항 77

제 59항에 있어서, 종양 관련 항원에 결합하는 상기 이차 항체 또는 그 단편이 CEA, EGP-1, EGP-2, MUC-1, MUC-2, MUC-3, MUC-4, 항원 특이성 PAM-4 항체, KC4, TAG-72, EGFR, HER2/neu, BrE3, Le-Y, A3, Ep-CAM, Tn, 톰슨-프리덴리히 항원(Thomson-Friedenreich antigen), 종양괴사항원(tumor necrosis antigens), 테나신(tenascin), 암유전자(oncogene), 암유전자 산물(oncogene product), IL-6, IGF-1, IGFR-1, 암 혈관신생 항원(tumor angiogenesis antigens), 혈관 내피 성장인자(vascular endothelium growth factor; VEGF), 태반 성장인자(placental growth factor: PIGF), ED-B 섬유결합소(ED-B fibronectin), 혈관 성장 인자(vascular growth factor), 페리틴(ferritin), 산성 이소페리틴(acidic isoferritin) 및 Ga733으로 이루어진 군으로부터 선택되는 양특이성 항체 또는 그 단편 또는 융합 단백질.

청구항 78

삭제

청구항 79

삭제

청구항 80

삭제

- 청구항 81
삭제
- 청구항 82
삭제
- 청구항 83
삭제
- 청구항 84
삭제
- 청구항 85
삭제
- 청구항 86
삭제
- 청구항 87
삭제
- 청구항 88
삭제
- 청구항 89
삭제
- 청구항 90
삭제
- 청구항 91
삭제
- 청구항 92
삭제
- 청구항 93
삭제
- 청구항 94
삭제
- 청구항 95
삭제
- 청구항 96
삭제

청구항 97

삭제

청구항 98

삭제

청구항 99

삭제

청구항 100

삭제

청구항 101

삭제

청구항 102

삭제

청구항 103

삭제

청구항 104

삭제

청구항 105

삭제

청구항 106

삭제

청구항 107

삭제

청구항 108

삭제

청구항 109

삭제

청구항 110

삭제

청구항 111

삭제

청구항 112

삭제

- 청구항 113
삭제
- 청구항 114
삭제
- 청구항 115
삭제
- 청구항 116
삭제
- 청구항 117
삭제
- 청구항 118
삭제
- 청구항 119
삭제
- 청구항 120
삭제
- 청구항 121
삭제
- 청구항 122
삭제
- 청구항 123
삭제
- 청구항 124
삭제
- 청구항 125
삭제
- 청구항 126
삭제
- 청구항 127
삭제
- 청구항 128
삭제

- 청구항 129
삭제
- 청구항 130
삭제
- 청구항 131
삭제
- 청구항 132
삭제
- 청구항 133
삭제
- 청구항 134
삭제
- 청구항 135
삭제
- 청구항 136
삭제
- 청구항 137
삭제
- 청구항 138
삭제
- 청구항 139
삭제
- 청구항 140
삭제
- 청구항 141
삭제
- 청구항 142
삭제
- 청구항 143
삭제
- 청구항 144
삭제

- 청구항 145
- 삭제
- 청구항 146
- 삭제
- 청구항 147
- 삭제
- 청구항 148
- 삭제
- 청구항 149
- 삭제
- 청구항 150
- 삭제
- 청구항 151
- 삭제
- 청구항 152
- 삭제
- 청구항 153
- 삭제
- 청구항 154
- 삭제
- 청구항 155
- 삭제
- 청구항 156
- 삭제
- 청구항 157
- 삭제
- 청구항 158
- 삭제
- 청구항 159
- 삭제
- 청구항 160
- 삭제

- 청구항 161
- 삭제
- 청구항 162
- 삭제
- 청구항 163
- 삭제
- 청구항 164
- 삭제
- 청구항 165
- 삭제
- 청구항 166
- 삭제
- 청구항 167
- 삭제
- 청구항 168
- 삭제
- 청구항 169
- 삭제
- 청구항 170
- 삭제
- 청구항 171
- 삭제
- 청구항 172
- 삭제
- 청구항 173
- 삭제
- 청구항 174
- 삭제
- 청구항 175
- 삭제
- 청구항 176
- 삭제

청구항 177

삭제

청구항 178

삭제

청구항 179

삭제

청구항 180

삭제

청구항 181

삭제

청구항 182

삭제

청구항 183

삭제

청구항 184

삭제

청구항 185

삭제

청구항 186

삭제

청구항 187

삭제

청구항 188

삭제

청구항 189

삭제

청구항 190

삭제

청구항 191

삭제

청구항 192

삭제

- 청구항 193
삭제
- 청구항 194
삭제
- 청구항 195
삭제
- 청구항 196
삭제
- 청구항 197
삭제
- 청구항 198
삭제
- 청구항 199
삭제
- 청구항 200
삭제
- 청구항 201
삭제
- 청구항 202
삭제
- 청구항 203
삭제
- 청구항 204
삭제
- 청구항 205
삭제
- 청구항 206
삭제
- 청구항 207
삭제
- 청구항 208
삭제

청구항 209

삭제

청구항 210

- (A) 제 59항에 따른 양특이성 항체 또는 그 단편 또는 융합 단백질;
- (B) 상기 양특이성 항체 또는 그 단편 또는 융합 단백질에 결합하는 부착소를 포함하고, 하나 이상의 치료용 제제와 접합된 표적화 가능한 접합체;
- (C) 선택적으로 비편중된 항체 또는 항체 단편을 제거하는데 유용한 제거 조성물; 및
- (D) 선택적으로 상기 표적화 가능한 접합체에 접합된 상기 치료용 제제가 효소일 때,
 - 1) 상기 효소가 표적 부위에서 프로드럭(prodrug)을 약물로 전환할 수 있는 경우의 프로드럭; 또는
 - 2) 상기 효소가 비독소 중간체를 독소 형태로 재전환하여 표적 부위에서 상기 약물의 독성을 증가시킬 수 있는 경우에 환자 내에서 비독소화되어 독성이 낮은 중간체를 형성할 수 있는 약물; 또는
 - 3) 상기 효소가 비독소 중간체를 독소 형태로 재전환하여 표적 부위에서 상기 약물의 독성을 증가시킬 수 있는 경우에 환자 내에서 자연적 과정을 통해 활성화되고 독성이 낮은 중간체로 전환되어 비독소화될 수 있는 프로드럭을 포함하는 환자의 간세포 암종, 간아세포종 및 생식세포 종양으로 이루어진 군으로부터 선택되는 AFP를 발현하는 종양의 치료용 또는 동정용 키트.

청구항 211

삭제

청구항 212

삭제

청구항 213

삭제

청구항 214

삭제

청구항 215

삭제

청구항 216

삭제

청구항 217

삭제

청구항 218

삭제

청구항 219

삭제

청구항 220

삭제

청구항 221

삭제

청구항 222

삭제

청구항 223

삭제

청구항 224

삭제

청구항 225

삭제

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 인간화된, 키메라 및 인간 알파 태아 단백질(alpha-fetoprotein; AFP) 항체에 관한 것으로, 특히 인간화된, 키메라 및 인간 형태의 치료 및 진단 접합체에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 Immu31 항체 및 인간화된, 키메라 및 인간 항체 형태를 이용하여 간세포 암종(Hepatocellular carcinoma), 생식세포 종양 암종 및 다른 AFP 생성 종양을 치료하는 방법을 포함한다. 또한 본 발명은 적어도 둘 이상의 Immu31 MAb 또는 그 단편, 또는 적어도 하나 이상의 Immu31 MAb 또는 그 단편 및 상기 Immu31 MAb 또는 그 단편 이외의 적어도 하나 이상의 두 번째 MAb 또는 그 단편을 포함하는 항체 융합단백질 또는 그 단편에 관한 것이다. 상기 인간화된, 키메라 및 인간 Immu31 MAb, 그 단편 및 이들의 항체 융합단백질 또는 그 단편은 단독으로, 진단제 및/또는 치료제에 접합되어, 치료 또는 진단 면역접합체와의 조합으로, 다른 항체 자체(naked MAbs) 또는 적어도 하나 이상의 치료제 및/또는 진단제와의 조합으로 투여될 수 있다. 또한 인간화된, 키메라 및 인간 Immu31 항체 및 그 단편, 항체 융합단백질 및 그 단편을 인코딩하는 DNA 서열, 상기 DNA 서열을 포함하는 벡터 및 숙주 세포 및 상기 인간화된, 키메라 및 인간 Immu31 항체를 제조하는 방법도 본 발명의 범주에 속한다.

배경기술

[0002] 단클론 항체(Monoclonal antibodies; MAbs)는 암에 대한 임상 실습에서 폭넓은 진단적 및 치료적 잠재력을 가진다. 초기 임상 시험은 암 환자에서 악성종양의 진단/검출(방사선면역검출법(radioimmunoassay : RIA)) 및 치료(방사선면역치료법(radioimmunotherapy: RIT))를 위한 방사성 라벨된 MAbs를 사용하여 촉진하는 결과를 보여주었다(Goldenberg *et al.*, (1993)(*Intl. J Oncol.* 3:5-11; Goldenberg *et al.*, (1995) *Immunol. Today* 16: 261-264; Goldenberg (1993) *Am. J Med.* 94: 297-312; Goldenberg(1991) *Adv. Exp. Med. Biol.*, 303 : 107-117). 단클론 항체들은 자체의 단독형태 또는 방사성 동위원소, 약물, 독소 또는 프로드럭(prodrug)-전환 효소와 같은 세포독성제와 접합하여 암의 면역치료에서 중추적인 역할을 한다(Goldenberg *et al.*, (1993) *Immunol. Today*, 14: 5-7). 이러한 접근들은 활성 평가에서 다른 수준의 개발적 및 임상적 성공을 나타낸다. MAbs 자체는 암세포에서 과발현되는 세포 표면 단백질에 결합하는 세포독성 효능을 유도하여 임상 반응을 잠재적으로 달성할 수 있다. 이러한 치료 효능이 예정된 세포 사멸(세포자가사멸(apoptosis))을 통한 종양 성장을 조절하거나 또는 항-종양 면역 반응의 유도로 인해 완성되는 것임을 연구를 통해 밝혀졌다(Cragg *et al.*, (1999) *Curr. Opin. Immunol.*, 11: 541-547).

[0003] 임상적으로 관심을 끄는 항체들의 대부분이 쥐에서 생성되었다. 인간에서 유래 MAbs의 면역원성(immunogenicity) 문제는 암 치료에서 최대 효과를 달성하는데 요구되는 많은 복용량 및 반복 투여가 그들의 임상 적용을 방해하는 주요 장애물이 되어 왔다. 이는 중요한 인간-항-쥐 항체(HAMA) 반응이 유래 MAb의 단독 주

입 후에 환자의 약 50%에서; 두 번 또는 세 번 반복 주입하여 HAMA가 발현된 환자의 90% 이상에서 검출됨으로써 증명되었다(Sears *et al.*, (1984) *J. Biol. Response Med.* 3: 138-150; Reynolds *et al.*, (1989) *Int. J. Rad. Appl. Instrum. B*, 16: 121-125; Shawler *et al.* (1985) *J. Immunol.*, 135: 1530-1535; Jaffers *et al.*, (1986) *Transplantation*, 41: 572-578). 또한 인간에서 이들 무린 MAb의 치료 효능은 보체결합(complement-fixing) 세포독성 T 세포와 같은 인간 주효 세포(effector cell)를 보충하는 이들의 단기 혈청 반감(short serum half-live) 및 불활성화로 더욱 완화된바, 분자 공학의 출현으로, 현재 HAMA 반응을 최소화 또는 제거하고 동시에 이들의 면역 작용 기전을 증강시키는 이들의 항원 특이성에 영향을 주지 않으면서 항체 구조를 유전적으로 변형할 수 있다. 상기 과정을 키메라화 및 인간화라고 부른다. 이러한 변형된 MAb는 감소된 면역원성, 인간에서 길어진 혈청 반감 및 작용 기전을 보충하는 능력과 같이 임상적 이용을 강화하기 위한 필수적인 특성을 가진다.

[0004] 알파 태아 단백질(AFP)은 일반적으로 태아의 혈액에서만 상당한 수준으로 발견되는 혈청 단백질이다. 성인의 혈액에서, 증가된 알파 태아 단백질 수준은 간 재생(liver regeneration), 및 간세포 암종, 간아세포종(肝芽細胞腫:hepatoblastoma) 및 생식세포 종양과 같은 특정 암종과 관련이 있다. 간세포 암종(HCC 또는 악성 간암)은 세계에서 특히, 아시아, 아프리카의 특정 지역에서 가장 일반적인 암의 하나이며, 대개 간염균 감염의 증가율과 관련하여 서양에서 발병이 증가하고 있다. 따라서, HCC 및 상기 다른 암을 치료하기 위한 새로운 방법 및 접근을 개발하기 위한 필요성이 여전히 남아 있다.

[0005] 본 발명은 무린, 키메라, 인간화된 및 온전한 인간 항-알파 태아 단백질 항체 및 그 단편, 그 중에서도 적어도 하나 이상의 항-AFP 항체 또는 그 단편을 포함하는 단클론 항체(MAbs), 치료 및 진단/검출 면역접합체 및 융합 단백질에 관한 것이다. 또한 인간화된, 키메라 및 온전한 인간 항-AFP 항체를 사용하여 암을 진단/검출 또는 치료하는 방법도 본 발명의 범주에 속한다. 인간화된, 키메라 및 온전한 인간 항-AFP 항체 및 그 단편, 및 항체 융합단백질 및 그 단편은 단독으로, 치료 및/또는 진단/검출 접합체 또는 치료 면역접합체와의 조합으로, 다른 항체 자체와의 조합으로 또는 다른 치료제와의 조합으로, 또는 진단/검출 접합체로 투여될 수 있다.

발명의 상세한 설명

[0006] 발명의 요약

[0007] 본 발명에서는 알파 태아 단백질(AFP) 항원과 결합하는 단클론 항체 또는 그 단편을 제공한다. 바람직하게는, 상기 항-AFP 항체 또는 그 단편은 하기에서 정의한 Immu31 항체 또는 그 단편이다. 또한 바람직하게는, 상기 항-AFP 항체 또는 그 단편은 키메라, 온전한 인간, 쥐 또는 인간화된 항체 또는 그 단편이다. 가장 바람직하게는, 상기 AFP 항체 또는 그 단편은 인간화된 항체 또는 그 단편이다.

[0008] 바람직한 구현예에서, 상기 인간화된 항-AFP 또는 Immu31 항체 또는 그 단편은 무린 항-AFP MAb의 경쇄 및 중쇄 가변부의 상보적-결정 영역(이하 "CDRs"라 한다) 및 인간 항체의 경쇄 및 중쇄 가변부 및 인간 항체의 경쇄 및 중쇄 특정부의 구조영역(이하 "FR"라 한다)을 포함하며, 여기에서 상기 인간화된 항-AFP MAb의 경쇄 가변부의 CDRs는 아미노산 서열 KASQDINKYIG를 포함하는 CDR1; 아미노산 서열 YTSALLP를 포함하는 CDR2; 및 아미노산 서열 LQYDDLWT를 포함하는 CDR3를 포함하고; 상기 인간화된 항-AFP MAb의 중쇄 가변부의 CDRs는 아미노산 서열 SYVIH를 포함하는 CDR1; 아미노산 서열 YIHPYNGGTYNEKFKG를 포함하는 CDR2; 및 아미노산 서열 SGGGDFPAY를 포함하는 CDR3를 포함한다.

[0009] 또 다른 구현예에서, 상기 인간화된 항-AFP 또는 Immu31 항체 또는 그 단편은 무린 항-AFP 항체 또는 그 단편의 FR에 대응하는 부위에서 치환된 적어도 하나 이상의 아미노산을 포함한다. 바람직하게는, 무린 항-AFP MAb 또는 그 단편에서 유래하는 무린 아미노산은 도 4A에 도시된 무린 중쇄 가변부의 아미노산 잔기 5, 27, 28, 30, 46, 48, 66, 67 및 94로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 아미노산이다. 또한 바람직하게는, 무린 항-AFP MAb 또는 그 단편에서 유래하는 무린 아미노산은 도 4B에 도시된 무린 경쇄 가변부의 아미노산 잔기 4, 39, 48, 49, 58, 69, 100 및 107로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 아미노산이다. 가장 바람직하게는, 상기 항-AFP 항체 또는 그 단편은 도 1B에 도시된 Immu31 V_K 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 또한 바람직하게는, 상기 항-AFP 항체 또는 그 단편은 도 1A에 도시된 Immu31 V_H 뉴클레오타이드 서열을 포함한다.

[0010] 또 다른 구현예에서, 인간화된 Immu31 항체 또는 그 단편은 도 5B에 도시된 hImmu31 V_K 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 보다 더욱 바람직하게는, 상기 Immu31 항체 또는 그 단편은 도 5A에 도시된 hImmu31 V_H 뉴클레오타이드

드 서열을 포함한다.

- [0011] 또 다른 구현예는 뮤린 Immu31 MAb의 상보성 결정 영역(CDRs) 및 인간 항체의 중쇄 가변부 및 인간 항체의 중쇄 특정부의 구조영역을 포함하는 CDR-접합된 인간화된 중쇄에 관한 것이며, 여기에서 인간화된 항-AFP MAb의 중쇄 가변부의 CDR은 아미노산 서열 SYVIH를 포함하는 CDR1; 아미노산 서열 YIHPYNGGTKYNEKFKG를 포함하는 CDR2; 및 아미노산 서열 SGGGDPFAY를 포함하는 CDR3를 포함한다.
- [0012] 유사하게, 뮤린 Immu31 MAb의 상보성 결정 영역(CDRs) 및 인간 항체의 경쇄 가변부 및 인간 항체의 경쇄 특정부의 구조 영역을 포함하는 CDR-접합된 인간화된 경쇄가 부가적 구현예로서 본 명세서에 기재되어 있으며, 여기에서 인간화된 항-AFP MAb의 경쇄 가변부의 CDRs는 아미노산 서열 KASQDINKYIG를 포함하는 CDR1; 아미노산 서열 YTSALLP를 포함하는 CDR2; 및 아미노산 서열 LQYDDLWT를 포함하는 CDR3를 포함한다.
- [0013] 바람직한 구현예에서, 본 발명의 항-AFP 또는 Immu31 단편은 Fv, F(ab')₂, Fab' 및 Fab로 이루어진 군에서 선택된 것이다.
- [0014] 또한 본 발명의 항-AFP 또는 Immu31 MAbs 또는 그 단편 중 어느 하나를 포함하는 항체 구성성분, 또는 본 발명의 항-AFP 또는 Immu31 항체 또는 그 단편 중 어느 하나를 포함하는 항체 융합단백질 또는 그 단편을 포함하는 진단/검출 또는 치료 면역접합체도 본 발명의 범주에 속하며, 여기에서 상기 항체 구성성분은 적어도 하나 이상의 진단제/검출제 또는 적어도 하나 이상의 치료제에 결합된다. 바람직하게는, 본 발명에 의한 면역접합체의 진단제/검출제 또는 치료제가 함수탄소 부분에 의하여 상기 MAb 또는 그 단편에 결합된다.
- [0015] 하나의 구현예에서, 상기 진단/검출 면역접합체는 색원체(chromagen) 또는 염료와 같은 적어도 하나 이상의 광활성 진단제/검출제; 감마-, 베타- 또는 양전자 방출 동위원소와 같이 20~10,000keV 사이의 에너지를 가지는 적어도 하나 이상의 방사성핵종; 방사선불투과성(radiopaque) 화합물과 같은 조영제; 크롬(III), 망간(II), 철(III), 철(II), 코발트(II), 니켈(II), 구리(II), 네오디뮴(III), 사마륨(III), 이테르븀(III), 가돌리늄(III), 바나듐(II), 테르븀(III), 디스프로슘(III), 홀름(III) 및 에르븀(III)을 포함하는 상자성 이온(paramagnetic ion); 또는 인간화된 Immu31 또는 그 단편에 접합된 리포솜을 포함하는 초음파 향상제(ultrasound-enhancing agent)를 포함한다. 상기 방사선불투과성 화합물은 요오드 화합물, 바륨 화합물, 갈륨 화합물 및 탈륨 화합물로 이루어진 군에서 선택될 수 있다. 또 다른 구현예에서, 본 명세서에 기재된 진단/검출은 수술 중(intraoperative), 내시경 검사 또는 혈관내 종양 검출/진단에 이용되는 것이다.
- [0016] 또한 방사성핵종, 붕소, 가돌리늄 또는 우라늄 원자, 사이토카인 등의 면역조절제, 줄기 세포 성장 인자, 종양 괴사 인자(tumor necrosis factor; TNF) 등의 림포톡신, 조혈인자, 콜로니자극인자(colony stimulating factor; CSF), 인터페론(IFN), 줄기 세포 성장 인자, 적혈구생성촉진인자(erythropoietin), 혈소판증식인자(thrombopoietin), 항체 및 이들의 조합; 상기 조혈 인자(造血因子, Hematopoietic Factor)는 인터루킨(interleukin; IL)이고, 상기 콜로니자극인자(CSF)는 과립구-콜로니자극인자(granulocyte-colony stimulating factor, G-CSF) 또는 과립구 대식세포-콜로니자극인자(granulocyte macrophage-colony stimulating factor, GM-CSF)이고, 상기 인터페론이 인터페론- α , - β 또는 - γ 이고, 상기 줄기세포 성장 인자는 "S1 인자"로 제작된 것이며; 사이토카인, 호르몬, 호르몬 길항제, 효소, 효소 억제제, 광활성 치료제; 유사분열억제제(antimitotic), 알킬화제(alkylating), 대사길항제(antimetabolite agent), 혈관신생 억제제, 세포자사멸제, 알카로이드제, COX-2 억제제 및 항생제 및 이들의 조합과 같은 세포독성 약물; 식물, 미생물 및 동물 독소 및 이들의 합성 변이체(synthetic variation)와 같은 세포독소; 혈관신생 억제제, 다른 항체 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택된 치료제를 포함하는 치료 면역접합체도 본 발명의 범주에 속한다. 바람직한 구현예에서, 상기 사이토카인은 IL-1, IL-2, IL-3, IL-6, IL-10, IL-12, IL-18, 인터페론- γ , TNF- α 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택된 것이며, 상기 방사성핵종은 P-32, P-33, Sc-47, Fe-59, Cu-64, Cu-67, Se-75, As-77, Sr-89, Y-90, Mo-99, Rh-105, Pd-109, Ag-111, I-125, I-131, Pr-142, Pr-143, Pm-149, Sm-153, Tb-161, Ho-166, Er-169, Lu-177, Re-186, Re-188, Re-189, Ir-194, Au-198, Au-199, Pb-211, Pb-212, 및 Bi-213, Co-58, Ga-67, Br-80m, Tc-99m, Rh-103m, Pt-109, In-111, Sb-119, I-125, Ho-161, Os-189m, Ir-192, Dy-152, At-211, Bi-212, Ra-223, Rn-219, Po-215, Bi-211, Ac-225, Fr-221, At-217, Bi-213, Fm-255, B-10, Gd-157, U-235 및 이들의 조합과 같은 오제 방출자(Auger emitter), 베타 방출자(beta-emitter) 및 알파 방출자(alpha-emitter)로 이루어진 군에서 선택된다. 바람직하게는 상기 방사성핵종은 20~10,000keV 사이의 에너지를 가진다.
- [0017] 또 다른 구현예에서, 항-AFP 또는 Immu31 항체 또는 그 단편에 접합된 치료제는 색원체 또는 염료와 같은 광활

성 치료제이다.

- [0018] 또한 본 발명은 AFP 표적 항원에 대한 친화력을 가지는 하나 또는 그 이상의 항원 결합 부위 및 부착소(hapten)에 대한 친화력을 가지는 하나 또는 그 이상의 부착소 결합 부위를 포함하는 다가(multivalent), 다특이성 항체 또는 그 단편에 관한 것이다. 바람직하게는, 항-AFP 또는 Imm31 항체 또는 그 단편은 인간화된 것이다. 또한 바람직하게는, 상기 항체 또는 그 단편은 온전한 인간 또는 키메라화된 것이다. 하나의 구현예에서, 상기 다가, 다특이성 항체 또는 그 단편은 진단제/검출제 또는 치료제를 포함한다.
- [0019] 또한 본 발명은 적어도 둘 이상의 항-AFP MAbs 또는 그 단편을 포함하는 항체 융합단백질 또는 그 단편에 관한 것이며, 여기에서 상기 MAbs 또는 그 단편은 본 발명의 항-AFP 또는 Imm31 단클론 항체 또는 그 단편 중 어느 하나로부터 선택된 것이다. 동일한 혈관에서, 본 발명에 의한 어느 하나의 항-AFP 항체 또는 그 단편의 적어도 하나 이상의 첫 번째 항-AFP MAb 또는 그 단편 및 본 발명에 의한 어느 하나의 항-AFP 항체 또는 그 단편 이외의 적어도 하나 이상의 두 번째 MAb 또는 그 단편을 포함하는 항체 융합단백질 또는 그 단편도 본 발명의 범주에 속한다. 바람직한 구현예에서, 두 번째 MAb는 암종 관련 항체이다. 또 다른 바람직한 구현예에서, 상기 항체 융합단백질 또는 그 단편은 상기 융합단백질 또는 그 단편에 접합된 진단제/검출제 또는 치료제를 더 포함한다.
- [0020] 본 발명은 악성종양 환자를 치료하는 방법에 관한 것으로서, 약제학적으로 허용가능한 운반제 내에서 제형화되거나 또는 단독 또는 다른 치료제 및/또는 진단제와의 조합으로 본 발명의 항체 자체 및/또는 접합된 항-AFP 항체, 융합단백질, 또는 그 단편의 치료학적 유효량을 환자에게 투여하는 단계를 포함한다. 바람직하게는, 상기 악성종양 환자를 치료하는 방법은 약제학적으로 허용가능한 운반제로 제형화된 본 발명의 면역접합체 또는 그 단편의 치료학적 유효량을 환자에게 투여하는 단계를 포함한다.
- [0021] 유사하게, 본 발명은 약제학적으로 허용가능한 운반제로 제형화된 본 발명의 항체 자체 또는 접합된 항-AFP 항체, 융합단백질 또는 그 단편의 진단적 유효량을 환자에게 투여하는 단계를 포함하는 악성종양 환자를 진단/검출하는 방법에 관한 것이다.
- [0022] 또 다른 구현예는 환자의 악성종양을 치료 또는 진단/검출하는 방법에 관한 것으로서, (i) 본 발명의 항-AFP 항체 또는 그 단편을 필요로 하는 환자에게 투여하는 단계; (ii) 환자의 혈액에서 결합하지 않은 단백질을 제거 하는데 필요한 충분한 시간동안 기다리는 단계; 및 (iii) 상기 항체의 결합 부위에 결합하는 진단제, 치료제, 또는 이들의 조합을 포함하는 담체 분자를 상기 환자에게 투여하는 단계;를 포함한다.
- [0023] 본 발명의 또 다른 구현예는 DAN 서열, DNA 서열을 포함하는 벡터, DNA 서열을 포함하는 숙주세포에 관한 것이며, 상기 DNA 서열은 (a) 본 발명의 항-AFP MAb 또는 그 단편; (b) 적어도 둘 이상의 상기 MAbs 또는 그 단편을 포함하는 항체 융합단백질 또는 그 단편; (C) 본 발명에 의한 항체 중 어느 하나의 상기 MAb 또는 그 단편을 포함하는 적어도 하나 이상의 첫 번째 AFP MAb 또는 그 단편 및 본 발명에 기재된 항-AFP MAb 또는 그 단편 이외의 적어도 하나 이상의 두 번째 MAb 또는 그 단편을 포함하는 항체 융합단백질 또는 그 단편; 및 (d) 본 발명에 의한 항체 중 어느 하나의 상기 MAb 또는 그 단편을 포함하는 적어도 하나 이상의 첫 번째 MAb 또는 그 단편 및 본 발명의 항체 중 어느 하나의 항-AFP MAb 또는 그 단편 이외의 적어도 하나 이상의 두 번째 MAb 또는 그 단편을 포함하는 항체 융합단백질 또는 그 단편으로 이루어진 군에서 선택된 항-AFP MAb 또는 그 단편을 인코딩하는 핵산을 포함하고; 여기에서, 상기 두 번째 MAbs는 CEA, EGP-1, EGP-2(예를 들면, 17-1A), MUC-1, MUC-2, MUC-3, MUC-4, PAM-4, KC4, TAG-72, EGFR, HER2/neu, BrE3, Le-Y, A3, Ep-CAM, Tn, 및 톰슨-프리던레이치 항원(Thomson-Friedenreich antigens), 종양 괴사 항원(tumor necrosis antigens), 페리틴(ferritin), 산성의 이소페리틴(acidic isoferritin), Ga 733, 또는 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택된 것이다. 다른 적절한 두 번째 항체는 테나신(tenascin), 암유전자(oncogene), 암유전자 산물, IL-6, IGF-1, IGFR-1, 혈관내피 성장인자(vascular endothelium growth factor; VEGF)와 같은 종양 혈관신생 항원, 태반 성장인자(placental growth factor; PlGF), ED-B 피브로넥틴(ED-B fibronectin)에 결합하고 다른 혈관 성장인자에 대항하는 항체를 포함한다.
- [0024] 또한 본 발명은 표적에 진단제/검출제 또는 치료제를 운반하는 방법에 관한 것으로서, (i) 본 발명의 항체, 융합단백질 또는 그 단편 중 어느 하나의 항체, 융합단백질 또는 그 단편을 포함하는 면역접합체를 포함하는 조성물을 제공하는 단계; 및 (ii) 본 발명에 기재된 상기 조성물을 필요로 하는 환자에게 투여하는 단계;를 포함한다. 바람직하게는, 상기 진단제/검출제는 색원체 또는 염료와 같은 적어도 하나 이상의 광활성 진단제; 상자성 이온과 같은 조영제; 초음파 향상제; 또는 요오드 화합물, 바륨 화합물, 갈륨 화합물 또는 탈륨 화합물과 같이 X-레이 또는 단층 X선 사진법에서 사용되는 방사선불투과성 화합물을 포함한다. 하나의 구현예에서, 상기 초음파 향상제는 인간화된 Imm31 또는 그 단편을 포함하는 리포솜이며, 상기 리포솜은 선택적으로 가스충전(gas-

filled)된다. 또 다른 구현예에서, 상기 진단제/검출제는 감마-, 베타- 또는 양전자-방출 동위원소와 같이 20 ~ 2,000keV 사이의 에너지를 가지는 방사성핵종인 것이 바람직하다. 더욱 바람직하게는, 상기 방사성핵종은 F-18, Mn-51, Mn-52m, Fe-52, Co-55, Cu-62, Cu-64, Ga-68, As-72, Br-75, Br-76, Rb-82m, Sr-83, Y-86, Zr-89, Tc-94m, In-110, I-120, I-124, Cr-51, Co-57, Co-58, Fe-59, Cu-67, Ga-67, Se-75, Ru-97, Tc-99m, In-111, In-114m, I-123, I-125, I-131, Yb-169, Hg-197 및 Tl-201로 이루어진 군에서 선택된 것이다. 또한 바람직하게는, 상기 방사선불투과성 화합물은 바륨, 디아트리지오에이트(diatrizoate), 에티오다이즈화 오일(ethiodized oil), 갈륨 구연산염, 아이오카르믹산(iocarmic acid), 아이오세타민산(iocetamic acid), 아이오다미드(iodamide), 아이오디파미드(iodipamide), 아이오독사민산(iodoxamic acid), 아이오글아미드(iogulamide), 아이오헥솔(iohexol), 아이오파미돌(iopamidol), 아이오파논산(iopanoic acid), 아이오프로세민산(ioprocemic acid), 아이오세파민산(iosefamic acid), 아이오세린산(ioseric acid), 아이오셀파미드 메글루민(iosulamide meglumine), 아이오세메틱산(iosemetic acid), 아이오타술(iotasul), 아이오테트릭산(iotetric acid), 아이오탈라믹산(iothalamic acid), 아이오트록식산(iotroxic acid), 아이옥사글릭산(ioxaglic acid), 아이옥소트리조익산(ioxotrizoic acid), 아이포데이트(ipodate), 메글루민(meglumine), 메트리즈아미드(metrizamide), 메트리조에이트(metrizoate), 프로필리오돈(propyl iodone) 및 탈로우스 클로라이드(thallos chloride)으로 이루어진 군에서 선택된 것이다.

[0025] 유사하게, 표적에 진단제/검출제 또는 치료제 또는 이들의 조합을 운반하는 방법에 있어서, 상기 치료제는 방사성핵종, 면역조절제, 호르몬, 호르몬 길항제, 효소, 효소 억제제, 광활성 치료제, 약물 또는 독소(식물, 미생물 및 동물 독소 및 이들의 합성 변이체를 포함)와 같은 세포독성제 및 이들의 조합으로부터 선택된 것이 바람직하다. 바람직하게는, 상기 약물은 유사분열억제제, 알킬화제, 대사길항제(antimetabolite agent), 혈관신생 억제제, 세포자가사멸제, 안트라사이클린(anthracyclines) 제제, 알카로이드제, COX-2 억제제 및 항생제 및 이들의 조합, 질소겨자, 에틸렌이민 유도체들, 알킬 설포네이트, 니트로소우레아(nitrosoureas), 트리아젠(triazenes), 염산 유사체, 안트라사이클린(anthracyclines), 타산(taxanes), COX-2 억제제, 피리미딘 유사체, 퓨린 유사체, 항생제, 효소, 효소 억제제, 에피포도필로톡신(epipodophyllotoxin), 백금 배위 착물(platinum coordination complex), 빈카 알카로이드(vinca alkaloids), 치환 우레아, 메틸 히드라진 유도체, 부신피질 반응 억제제, 호르몬, 호르몬 길항제, 엔도스타틴(endostatin), 탁솔(taxol), 캄토테신(camptothecins), 독소루비신(doxorubicins) 및 이들의 유사체, 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택된 것이다. 또한 바람직하게는, 상기 독소는 리신(ricin), 아브린(arbin), 알파 독소, 사포린, 리보뉴클레아제(RNase), DNase I, 스타필로코커스의 장독소-A, 미국자리공 항바이러스 단백질, 겔로닌(gelonin), 디프테리아 독소, 슈도모나스의 외독소 및 슈도모나스의 내독소로 이루어진 군에서 선택된 것이다.

[0026] 또한 본 발명은 표적에 진단제/검출제, 치료제 또는 이들의 조합을 운반하는 방법에 관한 것으로서, (i) 본 발명의 다가, 다특이성 항체 또는 그 단편을 환자에게 투여하는 단계; (ii) 환자의 혈액에서 결합하지 않은 단백질을 제거하는데 필요한 충분한 시간동안 기다리는 단계; 및 (iii) 상기 항체의 결합 부위에 결합하는 진단제/검출제, 치료제, 또는 이들의 조합을 포함하는 담체 분자를 상기 환자에게 투여하는 단계;를 포함한다. 바람직하게는, 상기 다가, 다특이성 항체 또는 그 단편은 AFP 표적 항원에 대한 친화력을 가지는 하나 또는 그 이상의 항원 결합 부위 및 부착소 분자에 대한 친화력을 가지는 하나 또는 그 이상의 부착소 결합 부위를 포함한다. 바람직하게는, 상기 담체 분자는 항체의 하나 이상의 결합 부위에 결합한다. 또한 바람직하게는, 상기 진단제/검출제 또는 치료제는 동위원소, 염료, 색원체, 조영제, 약물, 독소, 사이토카인, 효소, 효소 억제제, 호르몬, 호르몬 길항제, 성장인자, 방사성핵종 및 금속으로 이루어진 군에서 선택된 것이다.

[0027] 본 발명은 환자의 악성종양을 치료하는 방법에 관한 것으로서, (i) 항체 또는 그 단편 또는 (ii) 항체 융합단백질 또는 그 단편의 치료학적 유효량을 상기 환자에게 투여하는 단계를 포함하며, 상기에서 항체 또는 그 단편은 적어도 어느 하나가 본 발명의 적어도 하나 이상의 항-AFP MAb 또는 그 단편인 적어도 둘 이상의 MAbs 또는 그 단편을 포함하고, 상기 융합단백질 또는 그 단편은 약제학적으로 적절한 부형제로 제형화되는 적어도 하나 이상의 AFP 결합 부위를 포함한다. 바람직한 구현예에서, 적어도 하나 이상의 MAbs 또는 그 단편은 항체 자체 또는 그 단편이다. 또 다른 구현예에서, 상기 융합단백질은 AFP 이외의 종양 지표 물질과 반응하는 두 번째 결합 부위를 포함한다. 또한 본 발명에서는 항-AFP 항체 또는 그 단편, 또는 항-AFP 융합단백질 또는 그 단편을 적어도 하나 이상의 치료제 또는 진단제/검출제를 투여하기 전에, 동시에, 또는 투여한 이후에 투여한다.

[0028] 또 다른 구현예는 적어도 둘 이상의 MAbs 또는 그 단편을 포함하는 항체 또는 그 단편의 치료학적 유효량을 상기 환자에게 투여하는 단계를 포함하여 환자의 악성종양을 치료하는 방법에 관한 것이며, 상기에서 MAbs는 약제학적으로 적절한 부형제로 제형화되는 본 발명의 항-AFP 항체 중 어느 하나로부터 선택된 것이다. 바람직한 구

현예에서, 적어도 하나 이상의 MAbs 또는 그 단편은 항체 자체 또는 그 단편이다. 또한 본 발명에서는 항-AFP 항체 또는 그 단편, 또는 항-AFP 융합단백질 또는 그 단편을 적어도 하나 이상의 치료제 및/또는 진단제/검출제를 투여하기 전에, 동시에, 또는 투여한 이후에 투여한다.

[0029] 본 명세서에 기재된 치료 방법에서, 항-AFP 항체는 인간 이하의 영작류 항-AFP 항체, 무린 단클론 항-AFP 항체, 키메라 항-AFP 항체, 인간 항-AFP 항체 및 인간화된 항-AFP 항체로 이루어진 군에서 선택된 것이다. 바람직하게는, 상기 키메라, 인간 및 인간화된 항-AFP 항체 특정부 및 경첩부(hinge region)는 인간 IgG1의 특정부 및 경첩부를 포함한다. 또한 본 명세서에 기재된 치료 방법에서, 항-AFP 항체 또는 그 단편 또는 융합단백질 또는 그 단편은 상기 악성종양에 의해 발현되는 두 번째 종양 지표와 반응하는 두 번째 접합된 항체를 상기 환자에게 투여하기 전, 동시에 또는 투여한 후에 투여된다.

[0030] 또한 본 발명은 본 명세서에 기재된 항-AFP MAbs 또는 그 단편 또는 융합단백질 또는 그 단편을 포함하는 진단/검출 접합체의 진단적 유효량을 환자에게 투여하는 단계를 포함하여 환자의 악성종양을 진단 또는 검출하는 방법에 관한 것이며, 상기에서 항-AFP MAb 또는 그 단편, 또는 융합단백질 또는 그 단편은 약제학적으로 적절한 부형제로 제형화된 적어도 하나 이상의 진단제/검출제에 결합된다.

[0031] 본 발명의 또 다른 구현에는 환자의 암을 치료하는 방법에 관한 것으로서, (i) 본 발명에 기재된 항체 자체 또는 접합된 항-AFP MAb 또는 그 단편 또는 항체 자체 또는 접합된 항체 융합단백질 또는 그 단편을 포함하는 조성물의 치료학적 유효량을 환자에게 투여하는 단계; 및 (ii) 상기 항-AFP MAb 또는 그 단편 또는 항체 융합단백질 또는 그 단편을 약제학적으로 적절한 부형제로 제형화하는 단계;를 포함한다. 바람직하게는, 상기 항-AFP MAb, 항체 융합단백질, 또는 그 단편은 Immu31 항체, 융합단백질 또는 그 단편이다. 선택적으로, 상기 조성물은 항-AFP 항체, 융합단백질, 그 단편이거나 일 수 있는 또는 악성종양에 의해 발현되는 두 번째 종양 지표에 결합할 수 있는 두 번째 항체 자체 또는 접합된 항체 또는 그 단편, 또는 항체 자체 또는 접합된 항체 융합단백질 또는 그 단편을 더 포함할 수 있다. 또한 본 발명에서는 상기 항-AFP 항체, 항체 융합단백질, 또는 그 단편이 두 번째 항체, 융합단백질, 또는 그 단편이 상기 환자에게 투여되기 전에, 동시에, 또는 투여된 이후에 투여된다. 또한 상기 항-AFP 항체는 치료제 또는 진단제/검출제의 투여 전에, 동시에 또는 투여 후에 투여될 수 있다.

[0032] 또한 본 발명은 환자의 악성종양을 진단 또는 검출하는 방법에 관한 것으로서, (i) 본 명세서에 기재된 항-AFP MAb 또는 그 단편 또는 항체 융합단백질 또는 그 단편을 포함하는 조성물을 투여한 환자의 검체를 생체 밖에서 진단 분석하는 단계;를 포함한다. 바람직하게는, 상기 악성종양은 간세포 암종, 간아세포종, 생식세포 종양과 같이 AFP를 발현하는 암종이다. 또한 바람직하게는, 상기 생체 밖에서의 진단 분석은 면역분석법(immunoassays), RT-PCR법 및 면역조직화학법(immunohistochemistry)으로 이루어진 군에서 선택된 것이다. 상기 진단 분석이 RT-PCR법 또는 면역분석법인 경우, 상기 검체는 체액(body fluid) 또는 조직 또는 세포군(cell population)이 바람직하다. 상기 진단 분석이 면역조직화학법인 경우, 상기 검체는 세포 표본(cell aliquot) 또는 조직이 바람직하다.

[0033] 본 발명의 방법 중에서, 환자는 인간 또는 가정의 애완동물과 같은 포유동물이 바람직하다.

[0034] 본 발명의 또 다른 구현에는 환자의 질병 조직을 치료 또는 동정하는 방법에 관한 것으로서, (A) 질병 조직-관련 지표에 특이적으로 결합하는 적어도 하나 이상의 팔(arm) 및 표적가능한 접합체에 특이적으로 결합하는 적어도 하나 이상의 다른 팔을 가지는 양특이성(bi-specific) 항체 또는 항체 단편을 상기 환자에게 투여하는 단계, 여기에서 상기 질병 조직-관련 지표는 AFP이며; (B) 선택적으로, 상기 환자에게 제거 조성물을 투여하여 상기 조성물이 혈액순환으로부터 비-국부적인(non-localized) 항체를 제거하여 단계; (C) 상기 양특이성 항체 또는 항체 단편의 적어도 하나 이상의 다른 팔에 의해 인지할 수 있는 적어도 하나 이상의 에피토프 및 하나 또는 그 이상의 접합된 치료제 또는 진단제를 포함하거나 또는 제공하는 담체 부분을 포함하는 첫 번째 표적가능한 접합체를 환자에게 투여하는 단계; 및 (D) 상기 치료제가 효소인 경우, (i) 상기 효소가 표적 부위에서 프로드럭을 약물로 전환하는 능력이 있을 때는 프로드럭을; 또는 (ii) 상기 효소가 해독된 중간생성물을 독소 형태로 다시 전환하는 능력이 있고, 그 결과 표적 부위에서 상기 약물의 독성을 증가시키는 경우에는, 저독성 중간생성물을 생성하여 상기 환자에서 해독되는 능력이 있는 과물을; 또는 (iii) 상기 효소가 해독된 중간생성물을 독소 형태로 다시 전환하는 능력이 있고, 그 결과 표적 부위에서 상기 약물의 독성을 증가시키는 경우에는, 자연과정을 통해 상기 환자 내에서 활성화되고 저독성 중간생성물로의 전환에 의한 해독작용을 전제로 하는 프로드럭을; 또는 (iv) 상기 효소가 표적 부위에서 프로드럭을 약물로 전환하는 능력이 있을 때는, 상기 양특이성 항체 또는 항체 단편의 적어도 하나 이상의 다른 팔에 의해 인지될 수 있는 적어도 하나 이상의 에피토프 및 프로드럭을 포함하거나 또는 제공하는 담체 부분을 포함하는 두 번째 표적가능한 접합체를; 상기 환자에게 더 투여하는 단

계;를 포함한다. 바람직하게는, 표적 조직에 특이적으로 결합하는 적어도 하나 이상의 팔은 인간, 키메라 또는 인간화된 Immu31 항체의 인간, 키메라 또는 인간화된 Immu31 항체 또는 그 단편이다. 또한 바람직하게는, 상기 표적가능한 접합체는 적어도 둘 이상의 HSG 부착소를 포함한다. 바람직하게는, 상기 표적 조직은 종양이며, 보다 바람직하게는 상기 종양은 알파 태아 단백질(AFP)을 생성하거나 또는 결합되어 있다. 또한 바람직하게는, Immu31 항체 또는 그 단편은 MAb Immu31의 Fv를 포함한다.

[0035] 이러한 방법은 상기 첫 번째 표적가능한 접합체가 프로드럭을 포함하는 경우, 상기 양특이성 항체 또는 항체 단편의 적어도 하나 이상의 다른 팔에 의해 인지될 수 있는 적어도 하나 이상의 에피토프 및 상기 프로드럭을 약물로 전환하거나 또는 상기 약물의 해독된 중간생성물을 독소 형태로 다시 전환하는 능력이 있는 효소를 포함하거나 또는 제공하는 담체 부분을 포함하는 두 번째 표적가능한 접합체를 투여하는 단계를 더 포함한다. 바람직하게는, 상기 프로드럭은 에피루비신 글루쿠로나이드(epirubicin glucuronide), CPT-11, 에토포사이드 글루쿠로나이드(etoposide glucuronide), 다우노마이신 글루쿠로나이드(daunomicin glucuronide) 및 독소루비신 글루쿠로나이드(doxorubicin glucuronide)로 이루어진 군에서 선택된 것이다. 또한 바람직하게는, 상기 표적가능한 접합체는 질병 조직을 제거하기 위한 하나 또는 그 이상의 방사성 동위원소를 포함한다. 상기 표적가능한 접합체는 감광제(photosensitizer)와 같은 광선역학치료(photodynamic therapy)를 위한 하나 또는 그 이상의 제제를 포함할 수 있다. 바람직한 구현예에서, 상기 감광제는 벤조포르피린 모노산 링 A(benzoporphyrin monoacid ring A, BPD-MA), 주석 에티오퓨푸린(tin etiopurpurin, SnET2), 술포화된 알루미늄 프탈로시아닌(sulfonated aluminum phthalocyanine, AlSPc) 및 루테티움 텍사피린(lutetium texaphyrin, Lutex)으로 이루어진 군에서 선택된 것이다.

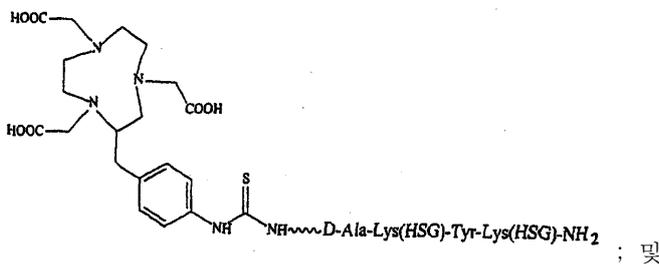
[0036] 본 발명은 포유동물에서 AFP를 발현하는 종양을 검출 또는 치료하는 방법에 관한 것으로서, (A) 표적 조직에 특이적으로 결합하는 적어도 하나 이상의 팔 및 표적가능한 접합체에 특이적으로 결합하는 적어도 하나 이상의 다른 팔을 포함하는 양특이성 항체 또는 항체 단편을 투여하는 단계, 여기에서 표적 조직에 특이적으로 결합하는 상기 하나의 팔은 Immu31 항체 또는 그 단편이며; (B) 하기와 같은 물질들로 이루어진 군에서 선택된 표적가능한 접합체를 투여하는 단계;를 포함한다:

[0037] (i) DOTA-Phe-Lys(HSG)-D-Tyr-Lys(HSG)-NH₂ ;

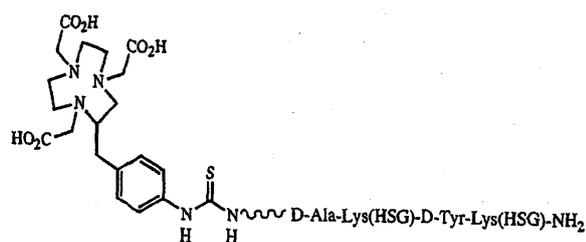
[0038] (ii) DOTA-Phe-Lys (HSG)-Tyr-Lys(HSG)-NH₂ ;

[0039] (iii) Ac-Lys(HSG)D-Tyr-Lys(HSG)-Lys(Tscg-Cys)-NH₂ ;

[0040] (iv)



[0042] (v)



[0043] 바람직하게는, 상기 방법은 환자에게 제거 구성물을 투여하는 단계; 및 상기 구성물이 혈액순환에서 비-국부적인(non-localized) 항체 또는 항체 단편의 제거를 증가시키는 단계;를 더 포함한다.

[0045] 또한 본 발명은 환자의 질병 조직을 치료 또는 동정하기 위하여 사용하는 키트에 관한 것으로서, 상기 키트는

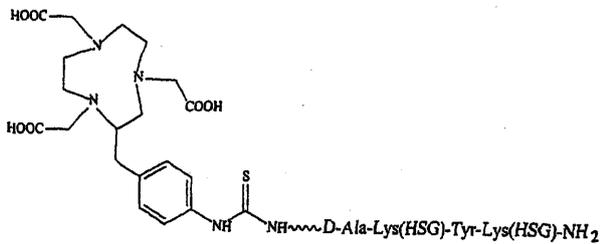
(A) 표적 조직에 특이적으로 결합하는 적어도 하나 이상의 팔 및 표적가능한 접합체에 특이적으로 결합하는 적어도 하나 이상의 다른 팔을 가지는 양특이성 항체 또는 항체 단편, 상기에서 표적 조직에 특이적으로 결합하는 상기 하나의 팔은 Immu31 항체 또는 그 단편이며; (B) 상기 양특이성 항체 또는 항체 단편의 적어도 하나 이상의 다른 팔에 의해 인지할 수 있는 적어도 하나 이상의 에피토프 및 하나 또는 그 이상의 접합된 치료제 또는 진단제를 포함하거나 또는 제공하는 담체 부분을 포함하는 첫 번째 표적가능한 접합체; 및 (C) 선택적으로, 비-국부적인(non-localized) 항체 또는 항체 단편을 제거하기 위하여 이용하는 제거 조성물; 및 (D) 선택적으로, 상기 첫 번째 표적가능한 접합체에 접합된 치료제가 효소인 경우, (i) 상기 효소가 표적 부위에서 프로드럭을 약물로 전환하는 능력이 있을 때는 프로드럭; 또는 (ii) 상기 효소가 해독된 중간생성물을 독소 형태로 다시 전환하는 능력이 있고, 그 결과 표적 부위에서 상기 약물의 독성을 증가시키는 경우에는, 저독성 중간생성물을 생성하여 상기 환자에서 해독되는 능력이 있는 약물; 또는 (iii) 상기 효소가 해독된 중간생성물을 독소 형태로 다시 전환하는 능력이 있고, 그 결과 표적 부위에서 상기 약물의 독성을 증가시키는 경우에는, 자연과정을 통해 상기 환자 내에서 활성화되고 저독성 중간생성물로의 전환에 의한 해독작용을 전제로 하는 프로드럭; 또는 (iv) 상기 효소가 표적 부위에서 프로드럭을 약물로 변형하는 능력이 있을 때는, 상기 양특이성 항체 또는 항체 단편의 적어도 하나 이상의 다른 팔에 의해 인지될 수 있는 적어도 하나 이상의 에피토프 및 프로드럭을 포함하거나 또는 제공하는 담체 부분을 포함하는 두 번째 표적가능한 접합체;를 포함한다. 바람직하게는, 상기 표적가능한 접합체는 하기와 같은 물질들로 이루어진 군에서 선택된 것이다:

[0046] (i) DOTA-Phe-Lys(HSG)-D-Tyr-Lys(HSG)-NH₂ ;

[0047] (ii) DOTA-Phe-Lys (HSG)-Tyr-Lys(HSG)-NH₂ ;

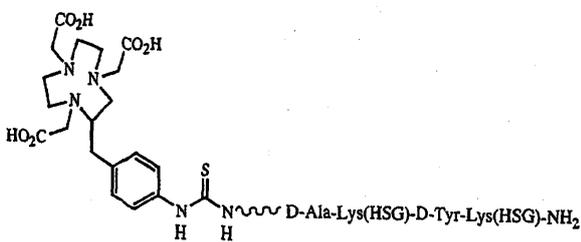
[0048] (iii) Ac-Lys(HSG)-D-Tyr-Lys(HSG)-Lys(Tscg-Cys)-NH₂ ;

[0049] (iv)



[0050] ; 및

[0051] (v)



[0052]

[0053] 또한 본 발명은 표적가능한 접합체를 스크리닝하는 방법에 관한 것으로서, (A) 표적 조직과 결합하는 지표에 특이적으로 결합하는 적어도 하나 이상의 팔, 여기에서 상기 지표는 AFP이고, 및 상기 표적가능한 접합체와 특이적으로 결합하는 적어도 하나 이상의 또 다른 팔을 가지는 양특이성 항체 또는 항체 단편과 상기 표적가능한 구조체를 접촉하여 혼합물을 제공하는 단계; (B) 선택적으로 상기 혼합물을 배양하는 단계; 및 (C) 상기 혼합물을 분석하는 단계;를 포함한다.

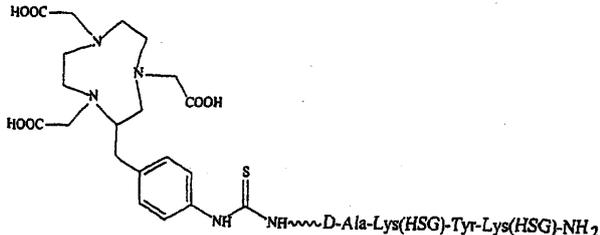
[0054] 또 다른 구현에는 AFP를 발현하는 포유동물에서 악성종양 조직을 영상화(imaging)하는 방법에 관한 것으로서, (A) 표적 조직과 결합하는 지표에 특이적으로 결합하는 적어도 하나 이상의 팔 및 표적가능한 접합체에 특이적으로 결합하는 적어도 하나 이상의 다른 팔을 포함하는 양특이성 항체 또는 항체 단편의 유효량을 투여하는 단계, 여기에서 상기 지표는 AFP이며; 및 (B) 하기와 같은 물질들로 이루어진 군에서 선택된 표적가능한 접합체를 투여하는 단계;를 포함한다:

[0055] (i) DOTA-Phe-Lys(HSG)-D-Tyr-Lys(HSG)-NH₂ ;

[0056] (ii) DOTA-Phe-Lys (HSG)-Tyr-Lys(HSG)-NH₂ ;

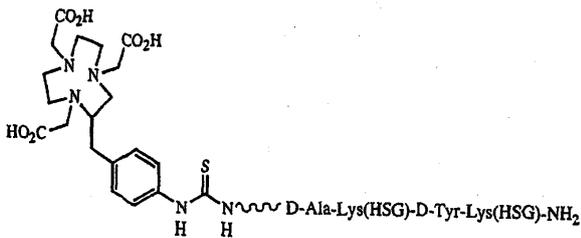
[0057] (iii) Ac-Lys(HSG)D-Tyr-Lys(HSG)-Lys(Tscg-Cys)-NH₂ ;

[0058] (iv)



[0059] ; 및

[0060] (v)



[0061]

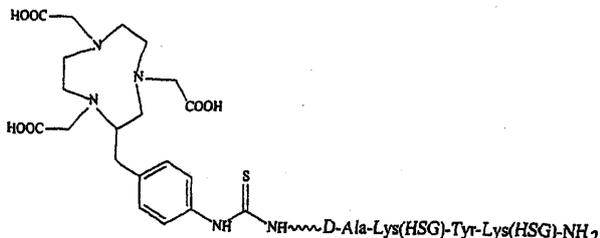
[0062] 또한 본 발명은 환자에서 AFP를 발현하는 질병 조직을 수술 중 동정/개시하는 방법에 관한 것으로서, (A) AFP에 특이적으로 결합하는 적어도 하나 이상의 팔 및 표적가능한 접합체에 특이적으로 결합하는 적어도 하나 이상의 다른 팔을 포함하는 양특이성 항체 또는 항체 단편의 유효량을 투여하는 단계, 여기에서 표적 조직에 특이적으로 결합하는 하나의 팔은 Immu31 항체 또는 그 단편이며; 및 (B) 하기와 같은 물질들로 이루어진 군에서 선택된 표적가능한 접합체를 투여하는 단계;를 포함한다:

[0063] (i) DOTA-Phe-Lys(HSG)-D-Tyr-Lys(HSG)-NH₂ ;

[0064] (ii) DOTA-Phe-Lys (HSG)-Tyr-Lys(HSG)-NH₂ ;

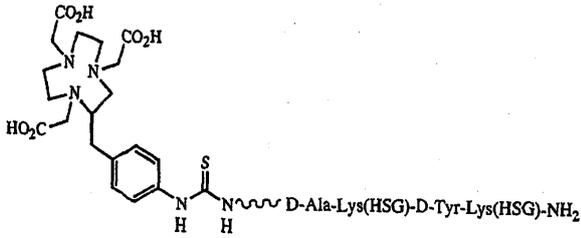
[0065] (iii) Ac-Lys(HSG)D-Tyr-Lys(HSG)-Lys(Tscg-Cys)-NH₂ ;

[0066] (iv)



[0067] ; 및

[0068] (v)



[0069]

[0070] 또한 본 발명은 환자에서 AFP를 발현하는 질병조직의 내시경검사로 동정하는 방법에 관한 것으로서, (A) AFP에 특이적으로 결합하는 적어도 하나 이상의 팔 및 표적가능한 접합체에 특이적으로 결합하는 적어도 하나 이상의 다른 팔을 포함하는 양특이성 항체 또는 항체 단편의 유효량을 투여하는 단계, 여기에서 표적 조직에 특이적으로 결합하는 하나의 팔은 Immu31 항체 또는 그 단편이며; 및 (B) 하기와 같은 물질들로 이루어진 군에서 선택된 표적가능한 접합체를 투여하는 단계;를 포함한다:

[0071]

(i) DOTA-Phe-Lys(HSG)-D-Tyr-Lys(HSG)-NH₂ ;

[0072]

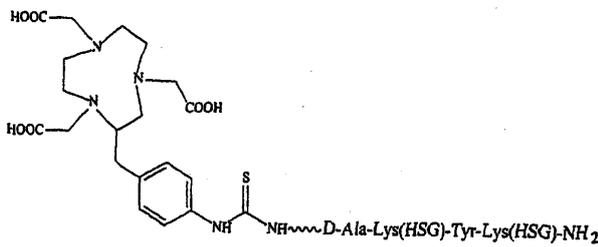
(ii) DOTA-Phe-Lys (HSG)-Tyr-Lys(HSG)-NH₂ ;

[0073]

(iii) Ac-Lys(HSG)D-Tyr-Lys(HSG)-Lys(Tscg-Cys)-NH₂ ;

[0074]

(iv)

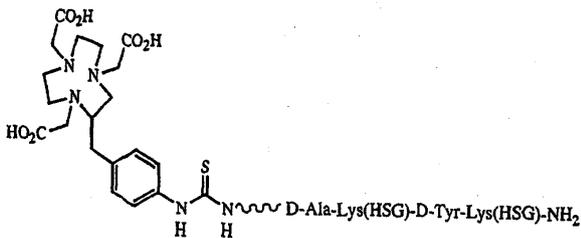


[0075]

; 및

[0076]

(v)



[0077]

[0078] 또 다른 구현예는 환자에서 AFP를 발현하는 질병조직의 혈관내 동정 방법에 관한 것으로서, (A) AFP에 특이적으로 결합하는 적어도 하나 이상의 팔 및 표적가능한 접합체에 특이적으로 결합하는 적어도 하나 이상의 다른 팔을 포함하는 양특이성 항체 또는 항체 단편의 유효량을 투여하는 단계, 여기에서 표적 조직에 특이적으로 결합하는 하나의 팔은 Immu31 항체 또는 그 단편이며; 및 (B) 하기와 같은 물질들로 이루어진 군에서 선택된 표적가능한 접합체를 투여하는 단계;를 포함한다:

[0079]

(i) DOTA-Phe-Lys(HSG)-D-Tyr-Lys(HSG)-NH₂ ;

[0080]

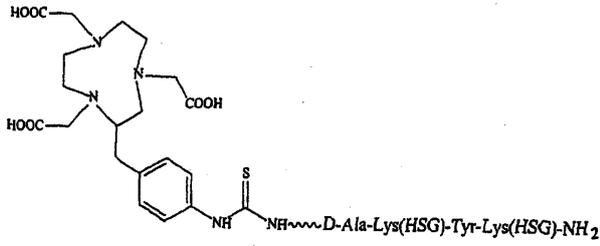
(ii) DOTA-Phe-Lys (HSG)-Tyr-Lys(HSG)-NH₂ ;

[0081]

(iii) Ac-Lys(HSG)D-Tyr-Lys(HSG)-Lys(Tscg-Cys)-NH₂ ;

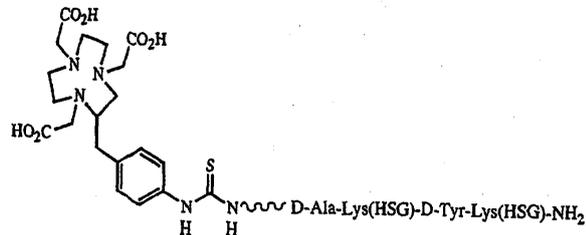
[0082]

(iv)



[0083] ; 및

[0084] (v)



[0085]

[0086]

또 다른 구현예는 병변(lesions)을 검출하는 방법, 바람직하게는 내시경 검사, 복강경 검사(laparoscopic), 혈관내 도관(intravascular catheter) 또는 수술절차 동안에 병변을 검출하는 방법에 관한 것으로서, 하기 단계를 포함한다: (A) 상기 절차를 경험하는 환자에게 양특이성 항체 F(ab)₂ 또는 F(ab')₂ 단편으로 주입하고, 여기서 양특이성 항체 또는 단편은 AFP 항원에 특이적으로 결합하는 첫 번째 항체 결합 부위 및 부착소에 특이적으로 결합하는 두 번째 항체 결합 부위를 가지며, 및 표적 부위에 부착시키는 항체 단편을 허용하는 단계; (B) 선택적으로 양특이성 항체를 주입하고 약 24시간 이내에 혈액순환에서 대부분 제거되지 않을 경우 갈락토실레이트화된 항-유전자형 제거제(galactosylated anti-idiotypic clearing agent)를 사용하여 비표적 항체 단편을 제거하고, 표적 부위에 빨리 위치하며 신장을 통해 제거되는 이가 라벨된 부착소를 주입하는 단계; (C) 첫 번째 주입후 48시간 이내에 검출 수단으로 표적 부위에서 부착된 라벨의 증가 수준을 폐쇄구역(close-range) 검출하여 부착소의 존재를 검출하는 단계 및 상기 절차를 수행하는 단계, 여기에서 상기 검출을 통해 조영제 또는 감산제(subtraction agent)의 사용없이 수행된다. 바람직한 구현예에서, 상기 부착소는 진단/검출 방사성 동위원소, MRI 영상향상제(image-enhancing agent) 또는 형광 라벨로 라벨된다.

[0087]

또한 본 발명은 수술, 정맥내, 복강경 또는 내시경 검사 절차 동안에 폐쇄구역 병변 검출하는 방법에 관한 것으로서, (A) Immu31 면역접합체 또는 그 단편의 유효량을 비경구적으로 상기 절차에서 환자에게 주입하는 단계; (B) 주입후 48시간 이내에 상기 절차를 수행하는 단계; (C) 상기 라벨된 항체 또는 그 단편의 존재를 검출하기 위한 검출 수단으로 폐쇄구역에서 환자의 발병된 내부를 스캔하는 단계; 및 (D) 검출수단으로 상기 부위에서 상기 라벨된 항체 또는 그 단편의 증가된 수준을 검출하여 상기 라벨된 항체 또는 그 단편의 침착 부위를 파악하는 단계;를 포함한다. 바람직하게는, 상기 Immu31 면역접합체 또는 그 단편은 20-1,000keV의 에너지에서 방출하는 방사성 동위원소를 포함한다. 또한 바람직하게는, 상기 방사성 동위원소는 테크네튬-99m, 요오드-125, 요오드-131, 요오드-123, 인듐-111, 불소-18, 갈륨-68 및 갈륨-67로 이루어진 군에서 선택된 것이다. 또 다른 구현예에서, Immu31 면역접합체 또는 그 단편은 광활성제와 같은 비-동위원소 제제(non-isotopic agent)를 포함한다.

[0088]

1. 개괄

[0089]

본 발명은 면역접합체 또는 다른 치료제 및/또는 진단제에 접합되지 않은 조합을 이용하여 포유동물 환자의 치료 및/또는 진단에 유용한 무린, 인간화된, 키메라 및 인간 항-알파 태아 단백질 항체, 융합단백질 또는 그 단편을 제공한다. 바람직한 구현예에서, 항-AFP 항체는 Immu31 항체이다. 상기 Immu31 항체 및 그 단편은 알파 태아 단백질에 결합한다. 본 명세서에서, "Immu31" 항체 또는 그 단편이라는 문구는 아미노산 서열 SYVIH를 포함하는 중쇄 가변부의 CDR1, 아미노산 서열 YIHPYNGGTYKNEKFKG를 포함하는 중쇄 가변부의 CDR2, 아미노산 서열 SGGGDPFAY를 포함하는 중쇄 가변부의 CDR3, 및 아미노산 서열 KASQDINKYIG를 포함하는 경쇄 가변부의 CDR1, 아미노산 서열 YTSALLP를 포함하는 경쇄 가변부의 CDR2, 및 아미노산 서열 LQYDDLWT를 포함하는 경쇄 가변부의 CDR3를 포함하는 항체 또는 항체 단편으로서 AFP 항원 표면의 동일한 에피토프에 결합하는 어떠한 항체 또는 단

편을 의미한다.

- [0090] 또한 본 발명의 Immu31 항체, 융합단백질 및 그 단편은 또 다른 접합된 또는 접합되지 않은 Immu31 항체, 융합단백질 또는 그 단편 또는 접합된 또는 접합되지 않은 비-Immu31 항체, 융합단백질 또는 그 단편과 함께 투여될 수 있다.
- [0091] 본 발명의 키메라 또는 인간화된 항-AFP MAb 및 그 단편은 특이적인 무린 CDRs 또는 하나 이상의 무린 또는 키메라 항-AFP MAb에서 유래하는 무린 CDRs의 결합체를 포함한다. 바람직하게는, 본 발명의 키메라 및 인간화된 항-AFP 항체는 무린 Immu31 항체에서 유래하는 CDRs를 포함한다. 본 발명의 Immu31 MAb 및 그 단편은 무린, 인간화된, 키메라 또는 온전한 인간 MAb이다. 상기 키메라 및 인간화된 항체는 무린 Immu31(mImmu31) MAb의 CDRs 및 인간 항체의 경쇄 및 중쇄 특정부의 아미노산 서열을 포함한다.
- [0092] 바람직한 실시예에서, 본 발명의 인간화된 Immu31 MAb 또는 그 단편은 무린 Immu31 MAb의 CDRs 및 인간 항체의 경쇄 및 중쇄 가변부 및 인간 항체의 경쇄 및 중쇄 특정부의 구조 영역을 포함한다. 바람직하게는, 인간화된 Immu31 MAb의 경쇄 가변부의 CDRs는 아미노산 서열 KASQDINKYIG를 포함하는 CDR1; 아미노산 서열 YTSALLP를 포함하는 CDR2; 및 아미노산 서열 LQYDDLWT를 포함하는 CDR3를 포함하며, Immu31 MAb의 중쇄 가변부의 CDRs는 아미노산 서열 SYVIH를 포함하는 CDR1; 아미노산 서열 YIHPYNGGTYNEKFKG를 포함하는 CDR2; 및 아미노산 서열 SGGGDPFAY를 포함하는 CDR3를 포함한다.
- [0093] 또 다른 구현예에서, 인간화된 Immu31 MAb 또는 그 단편은 무린 MAb의 대응되는 구조영역에서 유래하는 적어도 하나 이상의 아미노산을 hImmu31 항체의 경쇄 및 중쇄 가변부의 구조영역에 더 포함할 수 있다. 특히, 인간화된 hImmu31 MAb 또는 그 단편은 hImmu31V_H로 제작된 도 5A의 무린 중쇄 가변부의 적어도 하나 이상의 아미노산 잔기 5, 27, 28, 30, 46, 48, 66, 67 및 94, 및 hImmu31V_K로 제작된 도 5B의 무린 경쇄 가변부의 적어도 하나 이상의 아미노산 잔기 4, 39, 48, 49, 58, 69, 100 및 107을 포함한다. 하나 또는 그 이상의 무린 아미노산 서열은 적절한 결합을 유지하기 위하여 또는 AFP에 결합을 증가시키기 위하여 필요하다면 경쇄 및 중쇄 가변 사슬의 인간 구조 영역에서 유지될 수 있다. 보다 바람직하게는 본 발명의 인간화된 Immu31 MAb 또는 그 단편은 도 5A에 도시된 hImmu31VH 및 도 5B에 도시된 hImmu31VK를 포함한다.
- [0094] 혈관과 관련하여, 본 발명의 키메라 Immu31(chnmu31) MAb 또는 그 단편은 무린 Immu31 MAb의 CDRs 및 무린 Immu31 MAb의 경쇄 및 중쇄 가변부의 구조영역을 포함한다. 바꾸어 말하면, 상기 cImmu31 항체는 모체 무린(예를 들면, mImmu31) MAb의 Fvs 및 인간 항체의 경쇄 및 중쇄 특정부를 포함하고, 여기에서 상기 키메라 Immu31 MAb의 경쇄 가변부의 CDRs는 아미노산 서열 KASQDINKYIG를 포함하는 CDR1; 아미노산 서열 YTSALLP를 포함하는 CDR2; 및 아미노산 서열 LQYDDLWT를 포함하는 CDR3를 포함하며; 및 키메라 Immu31 MAb의 중쇄 가변부의 CDRs는 아미노산 서열 SYVIH를 포함하는 CDR1; 아미노산 서열 YIHPYNGGTYNEKFKG를 포함하는 CDR2; 및 아미노산 서열 SGGGDPFAY를 포함하는 CDR3를 포함한다.
- [0095] 보다 바람직하게는, 키메라 Immu31 MAb 또는 그 항체는 무린 Immu31 MAb의 상보성-결정 영역(CDRs) 및 무린 Immu31 MAb의 경쇄 및 중쇄 가변부 및 인간 항체의 경쇄 및 중쇄 특정부의 구조영역(FR)을 포함하고, 여기에서 키메라 Immu31 MAb의 중쇄 및 경쇄 가변부의 CDRs 및 구조영역은 각각 cImmu31VH 및 cImmu31VK로 제작된 도 2A 및 2B에서 보여지는 서열을 포함한다.
- [0096] 또한 본 발명은 적어도 둘 이상의 항-AFP MAb 또는 그 단편을 포함하는 항체 융합단백질 또는 그 단편에 관한 것이다. 바람직하게는, 상기 항-AFP 항체 및 그 단편은 본 발명의 Immu31 항체 및 그 단편이다. 또한 바람직하게는, 상기 본 발명의 항체 융합단백질은 하나의 항-AFP MAb 및 다른 항원에 특이성을 제공하는 하나 또는 그 이상의 두 번째 MAb로 이루어지고, 이하 보다 상세히 기술한다. 또한 본 발명의 항체 융합단백질은 또 다른 항체와의 결합에도 사용될 수 있다. 예를 들면, 상기 항체 융합단백질은 상기 융합단백질의 투여 전, 동시에 또는 투여한 후에 투여하여 또 다른 항체와의 병행요법(combination therapy)에서 사용될 수 있고, CEA, EGP-1, EGP-2(예를 들면, 17-1A), MUC-1, MUC-2, MUC-3, MUC-4, PAM-4, KC4, TAG-72, EGFR, HER2/neu, BrE3, Le-Y, A3, Ep-CAM, Tn, 및 톰슨-프리던레이치 항원(Thomson-Friedenreich antigens), 종양 괴사 항원(tumor necrosis antigens), 테나신(tenascin), 암유전자(oncogene), 암유전자 산물, IL-6, IGF-1, IGFR-1, 혈관내피 성장인자(vascular endothelium growth factor; VEGF)와 같은 종양 혈관신생 항원, 태반 성장인자(placental growth factor; PlGF), ED-B 피브로넥틴(ED-B fibronectin) 및 다른 혈관 성장인자, Ga 733, 페리틴(ferritin), 원발성 간암(primary hepatic carcinoma)의 산성 이소페리틴(acidic isoferritin), 또는 이들의 조합으로 이루어진

군에서 선택된 항원과 반응한다.

- [0097] 또 다른 바람직한 구현예에서, 항-AFP 항체는 Immu31 항체이고, 본 발명의 항체 융합단백질 또는 그 단편은 또한 상기에 기재된 적어도 하나 이상의 첫 번째 Immu31 MAb 또는 그 단편 및 적어도 하나 이상의 두 번째 비-Immu31 MAb 또는 그 단편을 포함하는 항체 융합단백질 또는 그 단편을 포함하는 것이다. 바람직하게는, 상기 비-Immu31 항체 또는 그 단편은 암종 관련 항체이다. 보다 바람직하게는, 상기 암종 관련 MAb는 본 명세서에 기재된 Immu31 MAb와 다른 항-AFP MAb일지라도, CEA, EGP-1, EGP-2(예를 들면, 17-1A), MUC-1, MUC-2, MUC-3, MUC-4, PAM-4, KC4, TAG-72, EGFR, HER2/neu, BrE3, Le-Y, A3,Ep-CAM, Tn, 및 톰슨-프리던레이치 항원(Thomson-Friedenreich antigens), 종양 괴사 항원(tumor necrosis antigens), 테나신(tenascin), 암유전자(oncogene), 암유전자 산물, IL-6, IGF-1, IGFR-1, 혈관내피 성장인자(vascular endothelium growth factor; VEGF)와 같은 종양 혈관신생 항원, 태반 성장인자(placental growth factor; PlGF), ED-B 피브로넥틴(ED-B fibronectin) 및 다른 혈관 성장인자, Ga 733, 페리틴(ferritin), 원발성 간암(primary hepatic carcinoma)의 산성 이소페리틴(acidic isoferritin), 또는 이들의 조합과 반응하는 MAb이다.
- [0098] 인간화된, 키메라 및 인간 Immu31 항체는 간세포 암종, 간아세포종, 생식세포 종양 암종 및 다른 α -태아 단백질(AFP) 생성 종양의 치료를 위한 우수한 치료제를 획득하기 위하여 CDR 돌연변이 및, CDR 및 가변부 내의 다른 서열의 조작 결과로 에피토프와 결합하는 증강된 친화력을 가질 수 있다. 친화력 성숙화(affinity maturation)로 인해 항체의 결합 특이성, 친화력 또는 결합력(avidity)을 변형하는 것은 국제특허공개공보 WO 98/44001에 기재되어 알려져 있으며, 이 출원에는 변형 방법이 간추려져 있고, 본 명세서에서 전체를 참고자료로 통합 수록하였다.
- [0099] 또한 항원의존성 세포로 조절되는 세포독성(antigen-dependent cell-mediated cytotoxicity; ADCC) 및/또는 보체의존성 세포독성(complement dependent cytotoxicity; CDC)을 증강하는 작용 기능을 향상시키기 위하여 본 발명의 항체를 변형할 수도 있다. Fc 영역에서 하나 또는 그 이상의 아미노산이 치환되거나 또는 시스테인을 도입하여 제조할 수 있으며, 이로 인하여 내재화 능력(internalization capability) 및/또는 증가된 보체-관련 세포 사멸 및 ADCC를 개선할 수 있다. Caron *et al.*, *J. Ex. Med.* 176: 1191-1195 (1991) 및 Shopes, *B. J. Immunol.* 148: 2918-2922 (1992) 참조, 본 명세서에서 전체를 참고자료로 통합 수록하였다. 항체 융합단백질은 증강된 보체 용해(complement lysis) 및 ADCC 능력을 모두 가지는 이중 Fc 영역을 가지도록 제조할 수 있다.
- [0100] 본 발명의 또 다른 구현예는 하기와 같이 이루어진 군에서 선택된 MAb 또는 그 단편을 인코딩하는 핵산을 포함하는 DNA 서열에 관한 것이다:
- [0101] (a) 본 명세서에 기재된 Immu31 MAb 또는 그 단편,
- [0102] (b) 적어도 하나 이상의 본 발명의 Immu31 MAb 또는 그 단편을 포함하는 항체 융합단백질 또는 그 단편,
- [0103] (c) 본 명세서에 기재된 Immu31 MAb 또는 그 단편을 포함하는 적어도 하나 이상의 첫 번째 MAb 또는 그 단편 및 본 명세서에 기재된 Immu31 MAb 또는 그 단편 이외의 적어도 하나 이상의 두 번째 MAb 또는 그 단편을 포함하는 항체 융합단백질 또는 그 단편, 및
- [0104] (d) Immu31 MAb 또는 그 단편을 포함하는 적어도 하나 이상의 첫 번째 MAb 또는 그 단편 및 적어도 하나 이상의 두 번째 MAb 또는 그 단편을 포함하는 항체 융합단백질 또는 그 단편, 여기에서 두 번째 MAb는 CEA, EGP-1, EGP-2(예를 들면, 17-1A), MUC-1, MUC-2, MUC-3, MUC-4, PAM-4, KC4, TAG-72, EGFR, HER2/neu, BrE3, Le-Y, A3,Ep-CAM, Tn, 및 톰슨-프리던레이치 항원(Thomson-Friedenreich antigens), 종양 괴사 항원(tumor necrosis antigens), 테나신(tenascin), 암유전자(oncogene), 암유전자 산물, IL-6, IGF-1, IGFR-1, 혈관내피 성장인자(vascular endothelium growth factor; VEGF)와 같은 종양 혈관신생 항원, 태반 성장인자(placental growth factor; PlGF), ED-B 피브로넥틴(ED-B fibronectin) 및 다른 혈관 성장인자, Ga 733, 페리틴(ferritin), 원발성 간암(primary hepatic carcinoma)의 산성 이소페리틴(acidic isoferritin), 또는 이들의 조합과 반응하는 MAb와 결합하는 암종이다.
- [0105] 혈관과 관련하여, 상기 DNA 서열을 포함하는 발현벡터도 또한 본 발명의 범주에 속한다. 인간화된, 키메라 및 인간 Immu31 MAb 또는 항체 융합단백질 또는 그 단편을 제조하는데 사용하는 벡터의 경우, 이들 벡터는 분비 신호 펩타이드뿐만 아니라 인간 면역글로불린의 경쇄 및 중쇄 특정부 및 경첩부를 코딩하는 서열을 포함한다. 이들 벡터는 필요에 따라 선발된 숙주 세포에서 Ig 유전자 발명을 개시하는 프로모터/인핸서(enhancer) 물질 및 형질감염된 세포의 선발을 위한 약물-내성 지표를 부가적으로 포함한다. 특히 본 발명에서 사용되는 벡터는 DHFR(pdHL2와 같은) 또는 GS-벡터이고, 특히 IgG와 같이 키메라, 인간화된 또는 인간 항체를 발현할 때 사용되

며, 상기 벡터는 IgG1의 중쇄 및 경쇄 특정부 및 경첩부를 코드한다. 보다 바람직하게는, 상기 경쇄 및 중쇄 특정부 및 경첩부는 인간 EU 골수종 면역글로불린에서 유래되고, 선택적으로 알로타입(allo type) 위치에서 적어도 하나 이상의 아미노산 잔기가 다른 IgG1 알로타입에서 발견되도록 변형되고, 여기에서 선택적으로 EU(EU 번호 체계를 기초로 함)의 중쇄 아미노산 I253이 알라닌으로 교체될 수 있다. Edelman *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 63: 78-85 (1969) 참조, 본 명세서에서 전체를 참고자료로 통합 수록하였다.

[0106] 본 발명의 Immu31 MAbs 또는 그 단편 또는 항체 융합단백질 또는 그 단편을 인코딩하는 DNA 서열을 포함하는 숙주 세포 또는 상기 DNA 서열들을 포함하는 벡터를 포함하는 숙주 세포도 본 발명의 범주에 속한다. 특히 유용한 숙주 세포는 포유동물이며, 보다 구체적으로는 Sp2/0, YB2/0, NSO, 및 DG-44와 같은 CHO 등의 골수종 세포주들을 수 있으며, 이하에서 보다 상세히 설명한다. 또한 단클론 항체 및 다른 융합단백질을 제조하는데 유용한 숙주 세포는 인간세포주인 PER.C6 이다.

[0107] 또 본 발명은 Immu31 또는 그 단편 또는 Immu31 융합단백질 또는 그 단편을 발현하는 방법에 관한 것으로서, (a) Immu31 MAb 또는 그 단편 또는 항체 융합단백질 또는 그 단편을 인코딩하는 DNA 서열을 포유동물에 형질감염시키는 단계; 및 (b) Immu31 또는 그 단편 또는 Immu31 항체 융합단백질 또는 그 단편을 분비하는 DNA 서열로 형질감염된 세포를 배양하는 단계;를 포함한다. MAb를 발현하고 지표를 쉽게 선별할 수 있는 숙주 세포를 위하여 벡터에 선별 지표를 포함하는 알려진 기술을 사용할 수 있다.

[0108] 또한 본 발명은 AFP 발현 세포에 결합하고 적어도 하나 이상의 진단제/검출제 및/또는 적어도 하나 이상의 치료제에 결합하는 항-AFP MAb 또는 그 단편 또는 항-AFP 융합단백질 또는 그 단편을 포함하고 간세포를 표적하는 진단/검출 또는 치료 면역접합체에 관한 것이다.

[0109] 바람직한 구현예에서, 상기 진단/검출 면역접합체는 Immu31 MAb 또는 그 단편 또는 항체 융합단백질 또는 그 단편 및 적어도 하나 이상의 진단제/검출제를 포함한다. 진단제/검출제의 예로는, 다양한 라벨, 방사성핵종, 킬레이터, 염료, 형광 화합물, 색원체 및 다른 지표 부분을 들 수 있다. 양전자 방출 단층 X선 사진법에 유용한 방사성핵종은 F-18, Mn-51, Mn-52m, Fe-52, Co-55, Cu-62, Cu-64, Ga-68, As-72, Br-75, Br-76, Rb-82m, Sr-83, Y-86, Zr-89, Tc-94m, In-110, I-120, 및 I-124를 포함하지만, 여기에만 한정되는 것은 아니다. 유용한 양전자-방출 방사성핵종의 전체 붕괴 에너지는 < 2,000 keV가 바람직하며, 보다 바람직하게는 1,000 keV 이하이고, 및 가장 바람직하게는 < 700 keV 이다. 감마선 검출에 이용하는 진단제로서 유용한 방사성핵종은 Cr-51, Co-57, Co-58, Fe-59, Cu-67, Ga-67, Se-75, Ru-97, Tc-99m, In-111, In-114m, I-123, I-125, I-131, Yb-169, Hg-197 및 Tl-201를 포함하지만, 여기에만 한정되는 것은 아니다. 유용한 감마선 방출 방사성핵종의 붕괴 에너지는 20-2000 keV가 바람직하고, 보다 바람직하게는 60-600 keV이며, 가장 바람직하게는 100-300 keV이다. 또한 본 발명의 진단제는 망간, 철 또는 가돌리늄과 같은 조영제일 수도 있다.

[0110] 또한 바람직하게는 본 발명의 치료 면역접합체는 Immu31 항체 또는 그 단편 또는 Immu31 융합단백질 또는 그 단편 및 적어도 하나 이상의 치료제를 포함한다. 상기 치료제의 예로는 방사성 라벨, 면역조절제, 호르몬, 광활성 치료제, 약물 또는 독소가 될 수 있는 세포독성제, 및 이들의 조합을 들 수 있다. 본 발명에서 유용한 약물은 유사분열억제제(antimitotic), 알킬화제(alkylating), 대사길항제(antimetabolite agent), 항생제, 혈관신생 억제제, 세포자가사멸제 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택된 약제학적 특성을 가지는 약물이다. 보다 구체적으로, 상기 약물은 질소겨자, 에틸렌이민 유도체들, 알킬 설포네이트, 니트로소우레아(nitrosoureas), 트리아젠(triazenes), 염산 유사체, COX-2 억제제, 피리미딘 유사체, 퓨린 유사체, 항생제, 효소, 에피포도필로톡신(epipodophyllotoxin), 백금 배위 착물(platinum coordination complex), 빈카 알칼로이드(vinca alkaloids), 치환 우레아, 메틸 히드라진 유도체, 부신피질 반응 억제제, 길항제, 엔도스타틴(endostatin), 탁솔(taxol), 캄토테신(camptothecins), 안트라사이클린(anthracyclines), 탁산(taxanes), 및 이들의 유사체, 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택된 것이다. 본 발명에 포함되는 독소는 세균, 식물 또는 동물 독소이며, 리신(ricin), 아브린(arbin), 알파 독소, 사포린, 온코나아제(onconase), 예를 들면, 리보뉴클레아제(RNase), DNase I, 스타필로코커스의 장독소-A, 미국자리공 항바이러스 단백질, 겔로닌(gelonin), 디프테리아 독소, 슈도모나스의 외독소 및 슈도모나스의 내독소로 이루어진 군에서 선택된 것이다.

[0111] 본 발명에서 유용한 면역조절제는 사이토카인, 줄기세포 성장인자, 림포톡신, 조혈인자, 콜로니자극인자(colony stimulating factor; CSF), 인터페론(IFN), 적혈구생성촉진인자(erythropoietin), 혈소판증식인자(thrombopoietin) 및 이들의 조합을 포함한다. 보다 구체적으로 림포톡신은 중앙괴사인자를 포함하고, 조혈인자는 인터루킨(IL-1, IL-2, IL-3, IL-6, IL-10, IL-12, IL-18)을 포함하며, 콜로니자극인자는 과립구-콜로니자극인자(granulocyte-colony stimulating factor, G-CSF) 또는 과립구 대식세포-콜로니자극인자(granulocyte

macrophage-colony stimulating factor, GM-CSF)를 포함하고, 인터페론은 인터페론- α , - β 또는 - γ 를 포함하며, 줄기세포 성장인자는 "S1 인자"로 제작된 것을 포함한다.

[0112] 특히 유용한 치료 면역접합체는 60~700 keV 사이의 에너지를 가지는 하나 또는 그 이상의 방사성 라벨을 포함한다. 상기 방사성 라벨은 ^{32}P , ^{33}P , ^{47}Sc , ^{59}Fe , ^{64}Cu , ^{67}Cu , ^{75}Se , ^{77}As , ^{89}Sr , ^{90}Y , ^{99}Mo , ^{105}Rh , ^{109}Pd , ^{111}Ag , ^{125}I , ^{131}I , ^{142}Pr , ^{143}Pr , ^{149}Pm , ^{153}Sm , ^{161}Tb , ^{166}Ho , ^{169}Er , ^{177}Lu , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{189}Re , ^{194}Ir , ^{198}Au , ^{199}Au , ^{211}Pb , ^{212}Pb , ^{213}Bi , ^{58}Co , ^{67}Ga , $^{80\text{m}}\text{Br}$, $^{99\text{m}}\text{Tc}$, $^{103\text{m}}\text{Rh}$, ^{109}Pt , ^{111}In , ^{119}Sb , ^{125}I , ^{161}Ho , $^{189\text{m}}\text{Os}$, ^{192}Ir , ^{152}Dy , ^{211}At , ^{212}Bi , ^{223}Ra , ^{219}Rn , ^{215}Po , ^{211}Bi , ^{225}Ac , ^{221}Fr , ^{217}At , ^{213}Bi 및 ^{255}Fm , 및 이들의 조합을 포함하지만, 여기에만 한정되는 것은 아니다. 다른 유용한 치료 접합체는 색원체 또는 염료 등의 광활성 치료제이다.

[0113] 특히 본 발명은 약제학적으로 허용가능한 운반체로 제형화된 본 발명의 항-AFP MAb 또는 그 단편의 치료학적 유효량을 환자에게 투여하는 단계를 포함하는 인간, 가축, 또는 개 및 고양이 등의 애완동물을 포함하는 포유동물 등의 환자의 간세포 암종, 간아세포종, 생식세포 종양 암종 및 다른 AFP-생성 종양을 치료하는 방법에 관한 것이다. 바람직하게는 상기 항-AFP 항체 또는 그 단편은 Immu31 항체 또는 그 단편이다. 상기 치료는 치료제와 결합하지 않은 형태의 "항체 자체"를 이용한다. "Immu31 항체 자체"의 투여는 표적세포의 표면에 있는 또 다른 항원과 결합하거나 또는 반응하는, 또는 본 발명에 기재된 치료용인 MAb의 Fc 부분에서의 작용기능과 같이 다른 작용기능을 가지는 "적어도 하나 이상의 다른 "항체 자체"의 치료학적 유효량을 환자에게 동시에 또는 순차적으로 투여하여 보충될 수 있다. 예를 들면, Immu31 항체 자체를 보충할 수 있는 바람직한 MAb는 인간화된, 키메라, 인간 또는 무린(비인간 동물인 경우) 암종 관련 항체 또는 그 단편이다. 상기 암종 관련 항체 또는 그 단편은 CEA, EGP-1, EGP-2(예를 들면, 17-1A), MUC-1, MUC-2, MUC-3, MUC-4, PAM-4, KC4, TAG-72, EGFR, HER2/neu, BrE3, Le-Y, A3,Ep-CAM, Tn, 및 톰슨-프리던레이치 항원(Thomson-Friedenreich antigens), 종양 괴사 항원(tumor necrosis antigens), 테나신(tenascin), 암유전자(oncogene), 암유전자 산물, IL-6, IGF-1, IGFR-1, 혈관내피 성장인자(vascular endothelium growth factor; VEGF)와 같은 종양 혈관신생 항원, 태반 성장인자(placental growth factor; PlGF), ED-B 피브로넥틴(ED-B fibronectin) 및 다른 혈관 성장인자, Ga 733, 페리틴(ferritin), 원발성 간암(primary hepatic carcinoma)의 산성 이소페리틴(acidic isoferritin), 또는 이들의 조합과 반응하는 MAb로 이루어진 군에서 선택된 것이 바람직하다.

[0114] 상기에 기재된 Immu31 항체 자체 치료 단독 또는 다른 MAb 자체 또는 그 단편과의 조합 모두 약제학적으로 허용가능한 운반체로 제형화된 적어도 하나 이상의 치료제의 치료학적 유효량을 동시에 또는 순차적으로 투여하여 더 보충될 수 있다. 본 명세서에 기재된 치료제는 약제학적으로 허용가능한 운반체로 제형화된 세포독성제, 방사성 라벨, 면역조절제, 호르몬 광활성 치료제 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다.

[0115] 또 다른 치료방법에서, Immu31 항체 자체 치료 단독 또는 상기에 기재된 다른 MAb 자체와의 조합 모두 약제학적으로 허용가능한 운반체로 제형화되고 본 명세서에 기재된 적어도 하나 이상의 치료 면역접합체의 치료학적 유효량을 동시에 또는 순차적으로 투여하여 더 보충될 수 있다. 상기 치료 면역접합체는 CEA, EGP-1, EGP-2(예를 들면, 17-1A), MUC-1, MUC-2, MUC-3, MUC-4, PAM-4, KC4, TAG-72, EGFR, HER2/neu, BrE3, Le-Y, A3,Ep-CAM, Tn, 및 톰슨-프리던레이치 항원(Thomson-Friedenreich antigens), 종양 괴사 항원(tumor necrosis antigens), 테나신(tenascin), 암유전자(oncogene), 암유전자 산물, IL-6, IGF-1, IGFR-1, 혈관내피 성장인자(vascular endothelium growth factor; VEGF)와 같은 종양 혈관신생 항원, 태반 성장인자(placental growth factor; PlGF), ED-B 피브로넥틴(ED-B fibronectin) 및 다른 혈관 성장인자, Ga 733, 페리틴(ferritin), 원발성 간암(primary hepatic carcinoma)의 산성 이소페리틴(acidic isoferritin), 또는 이들의 조합과 반응하는 MAb로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나 이상의 인간화된, 키메라, 인간 또는 무린(비인간 환자) MAb를 포함한다. 상기 치료 면역접합체는 약제학적으로 허용가능한 운반체로 제형화되는 세포독성제, 방사성 라벨, 면역조절제, 호르몬, 광활성 치료제 또는 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나 이상의 치료제와 결합될 수 있다.

[0116] 본 발명은 간세포 암종, 간아세포종, 생식세포 종양 암종 및 다른 AFP 생성 종양을 치료하기 위한 방법에 관한 것으로서, 본 발명에 의한 적어도 둘 이상의 항-AFP MAb 또는 그 단편을 포함하거나 또는 본 발명에 의한 적어도 하나 이상의 항-AFP MAb 또는 그 단편 및 적어도 하나 이상의 암종 관련 MAb를 포함하는 항체 융합단백질 또는 그 단편의 치료학적 유효량을 투여하는 단계를 포함한다. 바람직하게는 상기 암종 관련 항체는 CEA, EGP-1, EGP-2(예를 들면, 17-1A), MUC-1, MUC-2, MUC-3, MUC-4, PAM-4, KC4, TAG-72, EGFR, HER2/neu, BrE3, Le-Y, A3,Ep-CAM, Tn, 및 톰슨-프리던레이치 항원(Thomson-Friedenreich antigens), 종양 괴사 항원(tumor necrosis

antigens), 테나신(tenascin), 암유전자(oncogene), 암유전자 산물, IL-6, IGF-1, IGFR-1, 혈관내피 성장인자(vascular endothelium growth factor; VEGF)와 같은 종양 혈관신생 항원, 태반 성장인자(placental growth factor; PlGF), ED-B 피브로넥틴(ED-B fibronectin) 및 다른 혈관 성장인자, Ga 733, 페리틴(ferritin), 원발성 간암(primary hepatic carcinoma)의 산성 이소페리틴(acidic isoferritin), 또는 이들의 조합과 반응하는 MAb로 이루어진 군에서 선택된 것이다.

[0117] 상기 치료방법은 약제학적으로 허용가능한 운반제로 제형화되는 적어도 하나 이상의 치료제의 치료학적 유효량을 동시에 또는 순차적으로 환자에게 투여하여 보충될 수 있으며, 상기 치료제는 약제학적으로 허용가능한 운반제로 제형화되는 세포독성제, 방사성 라벨, 면역조절제, 호르몬, 광활성 치료제 또는 이들의 조합이 바람직하다.

[0118] 또한, 본 발명에 의한 상기 항체 융합단백질 또는 그 단편은 적어도 하나 이상의 치료제에 결합하는 적어도 하나 이상의 MAb를 포함하는 치료 접합체의 치료학적 유효량을 동시에 또는 순차적으로 환자에게 투여될 수 있으며, 여기에서 상기 접합체의 MAb 구성성분은 CEA, EGP-1, EGP-2(예를 들면, 17-1A), MUC-1, MUC-2, MUC-3, MUC-4, PAM-4, KC4, TAG-72, EGFR, HER2/neu, BrE3, Le-Y, A3.Ep-CAM, Tn, 및 톰슨-프리던레이치 항원(Thomson-Friedenreich antigens), 종양 괴사 항원(tumor necrosis antigens), 테나신(tenascin), 암유전자(oncogene), 암유전자 산물, IL-6, IGF-1, IGFR-1, 혈관내피 성장인자(vascular endothelium growth factor; VEGF)와 같은 종양 혈관신생 항원, 태반 성장인자(placental growth factor; PlGF), ED-B 피브로넥틴(ED-B fibronectin) 및 다른 혈관 성장인자, Ga 733, 페리틴(ferritin), 원발성 간암(primary hepatic carcinoma)의 산성 이소페리틴(acidic isoferritin), 또는 이들의 조합과 반응하는 MAb로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나 이상의 인간화된, 키메라, 인간 또는 무린(비인간 환자) MAb를 포함하는 것이 바람직하다.

[0119] 또한 상기 항체 융합단백질 자체는 적어도 하나 이상의 치료제와 접합될 수 있다. 이들 치료제는 상기 열거된 다른 제제 또는 두 개의 다른 치료 방사성 라벨과 같은 제제의 조합이 될 수 있다.

[0120] 또한 본 발명은 간세포 암종, 간아세포종, 생식세포 종양 암종 및 다른 AFP 생성 종양을 진단/검출하기 위한 방법에 관한 것으로서, 인간 및 가축 및 개, 고양이, 기니아 피그 등의 애완동물을 포함하는 포유동물의 환자에게 AFP 발현 세포에 결합하는 본 발명의 항-AFP MAb 또는 그 단편 또는 항-AFP 융합 단백질 또는 그 단편을 포함하는 진단/검출 면역접합체를 투여하는 단계를 포함하고, 여기에서 상기 항-AFP MAb 또는 그 단편 또는 항체 융합 단백질 또는 그 단편은 적어도 하나 이상의 진단제/검출제에 결합한다. 상기 항-AFP MAb, 융합단백질 또는 그 단편은 Imm31 항체, 융합단백질 또는 그 단편인 것이 바람직하다. 선택적으로, 상기 진단/검출 면역접합체는 약제학적으로 허용가능한 운반제로 제형화된다. 상기 유용한 진단제는 본 명세서에 기재된 것이다.

[0121] **2. 용어정의**

[0122] 이어지는 설명에서, 많은 수의 용어들이 사용되었고, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 상기 용어들을 아래와 같이 정의하였다.

[0123] 본 발명에 기재된 항체는 온-길리(자연적으로 발생하거나 또는 정상 면역글로불린 유전자 단편 재조합 과정에 의해 생성된 것이다) 면역글로불린 분자(IgG 항체 등) 또는 면역글로불린 분자의 면역적인 활성(특이적으로 결합) 부분, 이러한 항체의 단편을 말한다.

[0124] 항체 단편은 F(ab')₂, F(ab)₂, Fab', Fab, Fv 및 scFv와 같은 항체의 일부이다. 구조에 관계없이, 항체 단편은 온전한 항체에 의해 인지되는 동일 항원과 결합한다. 예를 들면, 항-AFP 단클론항체 단편은 AFP의 에피토프에 결합한다. 또한 용어 "항체 단편"은 복합체를 생성하기 위하여 특이 항원과 결합하여 항체와 같은 역할을 하는 어떤 합성적 또는 유전적으로 제조한 단백질을 포함한다. 예를 들면, 항체 단편은 중쇄 및 경쇄의 가변부를 구성하는 "Fv" 단편; 경쇄 및 중쇄 가변부가 펩티드 링커("scFv 단백질")에 의해 연결되는 재조합 단일쇄 폴리펩티드 분자; 및 과가변부(hypervariable region)에 흡사한 아미노산 잔기로 이루어진 최소 인지부와 같이 가변부를 구성하는 분리 단편을 포함한다.

[0125] 항체 자체는 일반적으로 치료제에 접합되지 않는 순수한 항체를 말한다. 항체 분자의 Fc 부분이 상보적 고착 및 ADCC(항체 의존 세포 독성) 등의 작동체 기능을 제공하기 때문에, 항체 자체가 세포를 용해하는 활성으로 대사한다. 항체 자체는 키메라, 인간화된 또는 인간 항체 등의 특정 재조합 항체뿐만 아니라, 폴리클론 및 단클론 항체를 모두 포함한다. 그러나, Fc 부분은 치료적 기능을 요구하지 않으며, 오히려 항체가 세포 주기의 휴지

(resting) 유도 및 세포자가사멸과 같은 다른 대사작용으로 인한 이들의 치료적 효능에 영향을 미친다. 이러한 경우, 항체 자체는 또한 상기에서 정의된 접합되지 않은 항체 단편을 포함한다.

[0126] 키메라 항체는 하나의 종에서 유래되는 항체, 바람직하게는 설치류 항체의 상보적 결정 영역(complementarity determining regions; CDRs)을 포함하는 가변 도메인을 포함하는 재조합 단백질이며, 반면에 항체 분자의 특정 도메인은 인간 항체로부터 유래된다. 수의사가 이용할 경우, 상기 키메라 항체의 특정 도메인은 고양이 또는 개와 같은 다른 종으로부터 유래될 수 있다.

[0127] 인간화된 항체는 하나의 종에서 유래된 항체의 CDRs를 가지는 재조합 단백질이고, 설치류 항체를 예로 들면, 설치류 항체의 중쇄 및 경쇄 가변 사슬을 인간의 중쇄 및 경쇄 가변 도메인으로 전달시킨 재조합 단백질이다. 항체 분자의 특정 도메인은 인간 항체로부터 유래된 것이다.

[0128] 인간 항체는 항원 면역성검사에 반응하는 특이 인간 항체를 제조하기 위해 “제작”된 형질전환 마우스로부터 획득한 항체이다. 이러한 기술에서, 인간 중쇄 및 경쇄 자리의 성분은 내생적인 중쇄 및 경쇄 자리의 표적화된 분열을 가지는 배아 줄기 세포주에서 유래된 쥐의 세포주로 도입된다. 상기 형질전환 쥐는 인간 항원에 특이적인 인간 항체를 합성할 수 있으며, 인간 항체를 분비하는 하이브리도마를 제조하는데 사용할 수 있다. 형질전환 마우스로부터 인간 항체를 획득하는 방법은 Green *et al.*, *Nature Genet.* 7: 13 (1994), Lonberg *et al.*, *Nature* 368: 856 (1994), 및 Taylor *et al.*, *Int. Immun.* 6:579 (1994)에 기재되어 있다. 또한 온전한 인간 항체는 파지 전사 기술(phage display technology) 및 유전자 또는 염색체 형질감염 방법 등 당업계에 알려진 방법에 의해 제작된다. 생체 밖에서 비면역화된 도너(donor)에서 유래하는 면역글로불린 가변 도메인 유전자로부터 인간 항체 및 그 단편을 제조하는 방법은 McCafferty *et al.*, *Nature* 348: 552-553 (1990)를 참고한다. 상기 기술에서, 항체 가변 도메인 유전자는 필라멘트 박테리오파지의 주요한 또는 부수적 외피단백질(coat protein) 유전자의 프레임내에서 클론화되고, 파지 입자의 표면에서 기능성 항체 단편으로 전사된다. 필라멘트 입자는 파지 게놈의 단일 가닥 DNA 복사본을 포함하기 때문에, 항체의 기능적 특성에 기초한 선택은 이러한 특성을 보이는 항체를 인코딩하는 유전자의 선택으로 인한 것이다. 이런 방법으로 파지는 B 세포의 일부 특성을 모방한다. 파지 전사는 전체 구성의 다양성으로 수행될 수 있으며, Johnson and Chiswell, *Current Opinion in Structural Biology* 3: 556-571 (1993)에 개시되어 있다.

[0129] 또한, 인간항체는 생체밖 활성화된 B 세포에 의해 생성될 수 있다. 예를들어, 전체가 인용예로 포함되는 미국특허 제5,567,610호 및 제5,229,275호를 보라.

[0130] 치료성 제제는 항체 부분 또는 항체부분에 접합된 것으로, 즉 항체 또는 항체 단편, 또는 서브단편과 개별적으로, 동시적으로 또는 연속적으로 투여되는 분자 또는 원자이며, 질병의 치료에 유용적이다. 치료성 제제의 예로는 항체, 항체 단편, 약물, 독소, 핵산가수분해효소(nuclease), 호르몬, 면역조절제, 킬레이터, 붕소화합물, 광활성(photoactive) 제제 또는 염료, 및 방사성동위원소를 포함한다.

[0131] 진단성 제제는 항체 부분에 접합된 것으로, 즉 항체 또는 항체 단편, 또는 서브단편으로 투여되는 분자 또는 원자이며, 항원을 함유하는 세포의 위치에 의해 질병을 진단하는데 유용하다. 유용한 진단성 제제는 특별히 한정적이지는 않지만, 방사성동위원소, 염료(예를들어, 비오틴(biotin)-스트렙타비딘(streptavidin) 복합체), 조영제, 형광화합물 또는 분자 및 자기공명 영상화(MRI)에의 향상제(상자성 이온)을 포함한다. 미국특허 제 6,331,175호에는 MRI 기술 및 MRI 향상제에 접합된 항체의 제조법이 기재되어 있다. 바람직하게, 진단성 제제는 방사성동위원소, 자기공명 영상에서 사용되는 향상제, 및 형광화합물을 포함한다. 항체성분을 방사성 금속 또는 상자성 이온과 부하하기 위해, 이온을 결합하는데 킬레이트기의 다수와 부착된 긴 꼬리를 갖는 반응물과 반응하는 것이 필요할 수도 있다. 상기의 꼬리는 폴리리신, 폴라사카라이드와 같은 고분자, 또는 에틸렌디아민테트라아세트산(EDTA), 디에틸렌트리아민펜타아세트산(DTPA; diethylenetriaminepentaacetic acid), 포르피린(porphyrin), 폴리아민, 크라운에테르, 비스-티오세미카르바존(thiosemicarbazone), 폴리옥시미(polyoximes)과 같은 킬레이트기와 결합될 수 있는 펜텐트기를 갖고 상기 목적에 유용하다고 알려진 기를 갖는 유도화되거나 유도될 수 있는 사슬일 수 있다. 킬레이트는 표준화학을 사용하여 항체에 결합된다. 킬레이트는 정상적으로 면역 반응성의 최소 손실과 최소 집합체 및/또는 내부 교차연결로 분자에 결합을 형성할 수 있는 기에 의해 항체에 연결되며, 항체에 킬레이트를 접합하는 예외적인 방법 및 반응물은 1989년 4월 25일에 등록된 미국특허 4,824,659호(명칭 “항체 접합체”에 기재되어 있다. 특히, 유용한 금속-킬레이트 조합은 진단성 동위원소와 60-4,000keV의 일반적인 에너지 범위에서 사용되는 2-벤질-DTPA 및 이의 모노메틸 및 시클로헥실 유사체를 포함하고, 예를 들어 방사성 영상화에 ¹²⁵I, ¹³¹I, ¹²³I, ¹²⁴I, ⁶²Cu, ⁶⁴Cu, ¹⁸F, ¹¹¹In, ⁶⁷Ga, ^{99m}Tc, ^{94m}Tc, ¹¹C, ¹³N, ¹⁵O, ⁷⁶Br이 있다. 망간, 철 및 가돌리늄과 같은 비-방사성 금속과 복합화될 경우, 같은 킬레이트는 본 발

명의 항체와 사용될 때 MRI에 유용하다. NOTA, DOTA, 및 TETA와 같은 거대고리(macroyclic) 킬레이트는 금속 및 방사성 금속의 종류와 사용되고, 바람직하게는 갈륨, 이트륨(yttrium) 및 구리의 방사성핵종과 각각 사용된다. 상기 금속-킬레이트 복합체는 대상의 금속에 고리크기를 맞춤으로써 매우 안정하게 제조될 수 있다. RAIT에 ²²³Ra와 같은 핵종과 안정하게 결합하는데 유용한 거대고리 폴리에테르류와 같은 고리형 킬레이트는 본 발명에 의해 성취된다.

[0132] 면역접합체(immunconjugate)는 치료성 또는 진단성 제제와 항체 성분의 접합체이다. 상기 진단성 제제는 방사성 또는 비방사성 라벨, 조영제(자기공명영상화, 컴퓨터단층촬영(computed tomography), 또는 초음파에 적절한 조영제)를 포함하고, 방사성 라벨은 감마-, 베타-, 알파-, 오제 전자- 또는 양전자 방출 동위원소일 수 있다.

[0133] 면역조절제는 본 발명에서 정의된 바와 같이 치료성 제제이며, 전형적으로 대식세포(macrophage), B-세포, 및/또는 T-세포와 같은 면역반응 캐스캐이드(immune response cascade)에서 증식하거나 활성화되는 면역세포를 자극한다. 상기 면역조절제의 예는 사이토카인이다. 당업자들은 인터루킨 및 인터페론이 T-세포 또는 기타 면역세포 활성을 자극하는 사이토카인의 일종임을 이해할 것이다.

[0134] 발현백터는 숙주세포에서 발현되는 유전자로 이루어진 DNA 분자이다. 전형적으로, 유전자 발현은 본질적 또는 유도적 프로모터(promoter)를 포함하는 조절인자, 조직-특이적 조절인자 및 증가제의 조절하에서 발생된다. 상기 유전자는 조절인자에 "조절가능하게 결합된" 것으로 인지된다.

[0135] 재조합 숙주(recombinant host)는 클로닝 벡터 또는 발현백터를 함유하는 원핵(prokaryotic) 또는 진핵(eukaryotic) 세포일 수 있다. 또한, 상기 용어는 숙주세포 또는 숙주세포의 세포의 염색체 또는 게놈에 클론화된 유전자를 함유하는 유전적으로 변형된 형질전환동물(transgenic animal)과 같은 원핵 또는 진핵세포를 포함한다. 적절한 포유류 숙주세포는 SP2/0세포와 같은 골수종세포(myeloma cell), 및 Chinese hamster ovary(CHO)와 같은 NS0세포, 하이브리도마(hybridoma) 세포, 및 항체를 발현하는데 유용한 기타 포유류 숙주세포를 포함한다. 또한, WO 0063403 A2에 공개된 인간세포라인, PER.C6이 MABs 및 기타 융합단백질을 발현하는데 유용하며, 이는 종래의 포유류 세포라인인 CHO, COS, Vero, Hela, BHK, 및 SP2-세포라인과 비교하여 2~200 홀드 이상의 재조합 단백질을 생성한다. 조절된 면역시스템을 갖는 특정 형질전환 동물은 인간 항체 전체를 제조하는데 유용하다.

[0136] 여기서, 항체 융합단백질의 용어는 2개이상의 같거나 상이한 천연항체, 단쇄 항체 또는 같거나 상이한 특이성을 갖는 항체 단편 시편이 결합된 항원-결합 분자를 재조합으로 생성하는 것이다. 항-AFP 융합단백질은 알파 태아 단백질(fetoprotein) 결합부위로 이루어진다. 바람직하게, 상기 항-AFP 융합단백질은 Immu31 융합단백질이다. 본 발명의 Immu31 융합단백질 및 이의 단편은 SYVIH 아미노서열로 이루어진 중쇄 가변부의 CDR1, YIHPYNGGTYKNEKFKG 아미노 서열로 이루어진 중쇄 가변부의 CDR2, SGGGDPFAY 아미노서열로 이루어진 중쇄 가변부의 CDR3, 및 KASQDINKYIG 아미노서열로 이루어진 경쇄 가변부의 CDR1, YTSALLP 아미노서열로 이루어진 경쇄 가변부의 CDR2, 및 LQYDDLWT 아미노서열로 이루어진 경쇄 가변부의 CDR3로 이루어진 동일한 AFP 에피토프 항체 또는 항체 단편에 결합된 적어도 하나의 팔(arm)로 이루어진다.

[0137] 융합단백질의 원자가는 융합단백질이 항원 또는 에피토프에 있는 팔 또는 부위의 전체 결합수이며, 즉 단가, 이가, 삼가 또는 다가이다. 항체 융합단백질의 다가는 항원에 결합하는데 다중 상호인력의 장점을 가질 수 있음을 의미하며, 항원 또는 상이한 항원에 결합의 갈망을 증가시킨다. 특이성은 항원 또는 에피토프 항체 융합단백질의 얼마나 많은 상이한 형태가 결합할 수 있는지를 의미하는 것이며; 단특이성, 양특이성, 삼특이성, 다특이성이다. 상기의 정의를 사용하여 천연항체, 예를들어 IgG는 2개의 결합 팔을 갖고 있기 때문에 이가이지만, 항원 또는 에피토프의 하나의 형태에 결합되기 때문에 단특이성이다. 단특이성, 다가 융합단백질은 동일한 항원 또는 에피토프에 하나 이상의 결합부위를 갖는다. 예를 들어, 단특이성 다이아바디(diabody)는 동일한 항원과 2개의 결합 활성부위를 갖는 융합단백질이다. 융합단백질은 상이한 항체성분 또는 동일한 항체성분의 여러 복제본의 다가 또는 다특이성 조합으로 이루어질 수 있다. 융합단백질은 부가적으로 치료성 제제를 포함할 수 있다. 융합단백질에 적절한 상기 치료성 제제의 예로는 면역조절제("항체-면역조절제 융합단백질") 및 독소("항체-독소융합단백질")를 포함한다. 바람직한 독소는 리보뉴클레아제(ribonuclease, RNase), 바람직하게는 재조합 RNase으로 이루어진다.

[0138] 다특이성 항체는 동일한 항원에 2개의 상이한 항원, 2개의 상이한 에피토프, 또는 부착소 및 항원 또는 에피토프와 같은 상이한 구조인 적어도 2개의 표적에 동시에 결합할 수 있는 항체이다. 예를들어, 하나의 특이성은 B-세포, T-세포, 골수(myeloid)-, 플라즈마-, 또는 비만세포(mast cell)항원 또는 에피토프일 수 있다. 다른 특이성은 B-세포에 CD20, CD19, CD21, CD23, CD46, CD80, HLA-DR, CD74, 또는 CD22와 같이 동일한 세포형태에 상

이한 항원일 수 있다. 다특이성, 다가 항체는 하나이상의 결합부위를 갖는 구조이고, 결합부위는 상이한 특이성이다. 예를들어, 하나의 결합부위가 하나의 항원과 반응하고, 다른 하나 결합부위는 다른 항원과 반응하는 것을 양특이성 다이어바디(diabody)이다.

[0139] 양특이성 항체는 상이한 구조인 2개의 표적에 동시에 결합할 수 있는 항체이다. 양특이성 항체(bsAb) 및 양특이성 항체 단편(bsFab)는 예를들어 B-세포, T-세포, 골수(myeloid)-, 플라즈마-, 또는 비만세포(mast cell)항원 또는 에피토프에 특이적으로 결합하는 적어도 하나의 팔, 및 치료성 또는 진단성 제제를 갖는 표적화할 수 있는 접합체에 특이적으로 결합하는 적어도 다른 하나의 팔을 갖는다. 양특이성 융합단백질의 다양성은 분자공학(molecular engineering)을 사용하여 생성될 수 있다. 하나의 형태로, 양특이성 융합단백질은 하나의 항원에 단 결합부위로 scFv 및 두번째 항원에 단 결합부위로 Fab 단편으로 이루어진 이가이다. 다른 형태로, 양특이성 융합단백질은 하나의 항원에 2개의 결합부위로 IgG 및 두번째 항원에 2개의 동일한 scFv로 이루어진 4가이다.

[0140] 개화된(Caninized) 또는 고양이화된(felinized) 항체는 단클론 항체(MAb)의 설치류동물(rodent) 상보성 결정부위가 설치류동물 면역글로불린(Immunoglobulin)의 중쇄 및 경쇄로부터 각각 개 또는 고양이 면역글로불린 가변 도메인으로 전이되는 재조합 단백질이다.

[0141] 가축(domestic animal)은 반려동물(Companion animal) 뿐만 아니라, 말, 소, 양, 염소, 일라마(Ilamas), 알파카스(alpacas), 및 돼지류와 같은 큰 동물을 포함한다. 바람직한 실시형태에서 가축은 말이다.

[0142] 반려동물은 애완동물처럼 적러온 동물을 포함한다. 예로는 기니아피그(guinea pig), 햄스터, 쥐 및 흰담비(ferret)와 같은 작은 설치류동물도 포함되지만, 주로 개 및 고양이이다. 바람직한 실시형태에서 반려동물은 개 또는 고양이이다.

[0143] **3. 키메라, 인간화 및 인간항체를 포함하는 단클론 항체의 제조**

[0144] 단클론 항체(MABs)는 특정 항원에 대한 항체의 동종집단이고, 항체는 단지 한 형태의 항원결합부위로 이루어지며 항원의 결정요소내에 단지 하나의 에피토프에 결합된다. 특이 항원에 설치류동물 단클론 항체는 당업자들에게 알려진 방법에 의해 얻어질 수 있다. 예를 들어, Kohler and Milstein, Nature 256 : 495 (1975), 및 Coligan et al. (eds.), CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY, VOL. 1, pages 2.5. 1-2.6. 7 (John Wiley & Sons 1991) (하기에서 "Coligan")을 보라. 간략하게, 단클론항체는 항원으로 이루어진 조성물을 쥐에 주입하고 세럼 시료를 제거함으로써 항체 생산의 존재를 확인하고, 비장을 제거하여 B-림프구(lymphocyte)를 얻고 상기 B-림프구를 골수종(myeloma) 세포와 융합하여 하이브리도마를 생산하고, 상기 하이브리도마를 클론하여 항원에 항체를 생산하는 양성 클론을 선택하고, 항원에 항체를 생산하는 클론을 배양하고, 하이브리도마 배양으로부터 항체를 분리함으로써 얻을 수 있다.

[0145] MAb는 잘 설립된 기술의 변화에 의해 하이브리도마 배양으로부터 분리되고 정제될 수 있다. 이러한 분리기술은 단백질-A Sepharose의 친화성 크로마토그래피, 크기배제 크로마토그래피 및 이온교환 크로마토그래피를 포함한다. 예를들어, Coligan pages 2.7.1-2.7.12 및 페이지 2.9.1-2.9.3을 보아라. 또한, Baines et al., "Purification of Immunoglobulin G (IgG), "in METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, VOL. 10, pages 79-104 (The Humana Press, Inc. 1992)을 보라.

[0146] 펩티드 골격에 Abs는 Ab 제조에 잘 알려진 방법에 의해 생성된다. 예를들어, 면역 적격 세포(immunocompetent) 동물에 (펩티드)_n-KLH, (여기서, 완전한 freund's adjuvant에서 KLH은 Keyhole-limpet-hemocyanin이고 n은 1-30임)와 같은 면역원의 주입, 이어 비완전한 freund's adjuvant에 부유된 동일한 면역원의 2번 연속 주입을 수행한다. 동물은 정맥주사로 항원을 증가시키고 3일 후 비장세포를 수확한다. 수확된 비장세포를 Sp2/0-Ag14 골수종세포와 융합하고 직접결합(direct binding) ELISA을 사용하여 항-펩티드 반응성의 분석된 결과 클론의 부유물을 배양한다. 생성된 Abs의 특이성을 원 면역원의 펩티드 단편을 사용하여 분석할 수 있다. 상기 단편은 자동 펩티드 합성기를 사용하여 제조될 수 있다. Ab제조에서 효소-결합(deficient) 하이브리도마는 융합 세포라인의 선택을 할 수 있도록 분리된다. 상기 기술은 링커, 예를들어, In(III)-DTPA 킬레이트와 같은 링커로 이루어진 하나이상의 킬레이트에 항체를 증가시키는데 사용될 수 있다. In(III)-di-DTPA에 단클론 쥐 항체는 알려져 있다(Barbet '395).

[0147] 면역원에 항체의 초기증가 후, 단클론 항체의 다양한 유전자는 하이브리도마 세포로부터 클론화되고 배열되고 실질적으로 재조합 기술에 의해 제조될 수 있다. 쥐과 항체 및 항체 단편의 인간화 및 키메라화는 당업자들에게

공지되어 있다. 예를 들면, 인간화 단클론 항체는 인간 가변 도메인에 쥐과 면역글로브린의 중쇄 및 경쇄 가변 사슬로부터 쥐과 상보성 결정부위로 전이하고, 쥐과 대조물의 골격 부위에서 인간 잔사로 대체함으로써 생산된다. 바람직한 실시형태에서, 인간화된 항-AFP 항체 또는 이의 단편들의 골격 부분에서 몇몇 인간 잔기들은 쥐류 대조물로 대체된다. 바람직하게, 인간화 항-AFP 항체는 인간화 Immu31 항체이다. 또한, 2개의 상이한 인간 항체로부터 골격배열의 조합은 V_H 로 사용되는 것이 바람직하다. 더 바람직하게는, 2개의 인간 항체가 EU 및 NEWM이다. 항체분자의 일정 도메인은 인간 항체의 것으로부터 유도된다. 인간화 단클론 항체로부터 유도된 항체 성분의 사용은 쥐류 일정 부위의 면역원성(immunogenicity)과 관련된 잠재적 문제들을 제거한다.

[0148] 예를들어, 쥐류 면역글로블린 가변 도메인을 클로닝하는 일반적인 기술은, 전체적으로 예가 되는 Orlandi et al., Proc. Nat 7 Acad. Sci. USA 86.-3833 (1989)에 기재되어 있다. 키메라 항체를 설계하는 기술은 당업계에 잘 알려져 있다. 예를들어, Leung et al., *Hybridoma* 13:469(1994)에는 인간 k 및 IgG₁ 일정 부위도메인과 LL2 단클론 항체, 항-CD22 항체의 V_k 및 V_H 도메인의 인코딩 DNA 서열을 조합함으로써 LL2 키메라를 어떻게 생성하는지를 기재하고 있다. 또한, 상기 공개는 LL2 경쇄 및 중쇄 가변부위, 각각 V_k 및 V_H 의 뉴클레오티드 서열을 제공한다. 예를들어 인간화 MABs를 생성하는 기술은 Jones et al., Nature 321: 522(1986), Riechmann et al., Nature 332:323(1988), Verhoeyen et al., Science 239: 1534(1998), Carter et al., Proc. Nat' Acad. Sci. USA 89: 4285(1992), Sandhu, Crit. Rev. Biotech. 12:437(1992) 및 Singer et al., J. Immun. 150: 2844(1993)에 기재되어 있다.

[0149] 본 발명의 항체를 생산하는 다른 방법은 형질전환 가축의 우유에서 생성된다. 전체가 예로 되는 Colman, A., Biochem. Soc. Symp., 63: 141-147, 1998; 미국특허 5,827,690호를 보라. 2개의 DNA구조는 각각 면역글로블린 중쇄 및 경쇄와 짝지은 DNA 시편인코딩을 함유하여 제조된다. DNA 시편은 우선적으로 유선 상피세포에서 발현된 프로모터 서열을 함유하는 발현벡터로 클로닝된다. 특별히 한정적이지 않지만, 구체적인 예로는 토끼, 소 및 양 카세인(casein) 유전자, 소 α -락토글로블린 유전자, 양 β -락토글로블린 및 쥐 유장(whey)산 단백질 유전자로부터의 프로모터를 포함한다. 바람직하게, 주입된 단편은 유선-특이적 유전자로부터 동종 계놈 서열에 의해 3'측에 접합된다. 이는 폴리아데닐레이션(polyadenylation) 부위 및 전이-안정 서열을 제공한다. 발현 카세트는 수정된, 포유류 달걀의 전핵(pronuclei)으로 주입되고, 수용 암컷의 자궁속으로 넣어주고 임신하도록 놓아두었다. 출생 후, 자손을 Southern 분석으로 전이 존재를 스크린한다. 존재하는 항체를 위해 중쇄 및 경쇄 유전자는 동일한 세포에서 동시에 발현되어야 한다. 형질전환 암컷의 우유를 당업계에서 공지된 표준 면역 방법을 사용하여 항체 또는 항체 단편의 존재 및 기능성을 분석한다. 항체는 당업계에서 공지된 표준방법을 사용하여 우유로부터 정제될 수 있다.

[0150] 키메라 항체는 설치류동물 항체와 같은 동물의 한 종에서 유도된 CDRs을 함유하는 가변 도메인을 포함하는 재조합 단백질이고, 항체분자의 잔여부분; 즉 일정 도메인은 인간항체로부터 유도된다. 따라서, 키메라 단클론 항체(MAb)는 하나이상의 다른 인간 FR과 키메라 MAB의 가변 도메인에서 쥐류 FR의 서열을 대체함으로써 인간화될 수 있다. 특히, 쥐류 CDRs는 쥐류 면역글로블린의 중쇄 및 경쇄 가변부위로부터 인간 항체의 대응되는 가변 도메인으로 전이된다. 쥐류 CDRs이 인간 FR로 간단히 전이되어 항체 친화력의 손실이 경감되지만, 부가적인 조절이 쥐류 항체의 원 친화력을 복원하기 위해 요구된다. 이는 에피토프와 우수한 결합친화력을 갖는 항체를 얻기 위해 쥐류 대조물과 FR 부위에서 하나이상의 인간 잔기의 대체로 이루어질 수 있다. 예를들어, Tempest et al., Biotechnology 9:266(1991) 및 Verhoeyen et al., Science 239:1534(1998)을 보라. 게다가, 특정 에피토프에 인간화, 키메라 및 인간 MABs의 친화력은 CDRs의 돌연변이로 증가될 수 있고, 항체의 저 복용량은 돌연변이에 앞서 낮은 친화력 MAB의 높은 복용량만큼 효과적일 수 있다. 예를들어, WO0029584A1을 보라.

[0151] 본 발명의 전체 인간 항체, 즉 인간 항체 항-AFP MAB 또는 다른 인간 항체, 예를들어 인간 또는 키메라 Immu31 항체와 조합 치료에 사용되는 항-CEA, 항-TAG-72, 항-Le(y), 항-MUC1, 항-MUC2, 항-MUC3, 항-MUC4, 항-EGFR, 항-HER2 및 항-TNF(종양괴사인자(tumor necrosis factor))는 형질전환 비인간 동물로부터 얻을 수 있다. 전체적으로 예가 되는 Mendez et al., Nature Genetics, 15: 146-156 (1997); 미국특허 제 5,633,425호를 보아라. 예를들어, 인간 항체는 인간 면역글로블린 유전자좌(loci)를 갖고 있는 형질전환 쥐로부터 회복될 수 있다. 바람직하게, 항-AFP 항체는 Immu31 항체이다. 쥐류 체액 면역시스템은 내생의 면역글로블린 유전자를 불활성화하고, 인간 면역글로블린 유전자좌를 조합함으로써 인간화된다. 인간 면역글로블린 유전자좌는 매우 복잡하고 인간 계놈의 거의 0.2%를 차지하는 다수의 구별된 단편들로 이루어진다. 형질전환 쥐는 항체의 적절한 레퍼토리를 생산하는 것을 확인하기 위해, 인간 중쇄 및 경쇄 유전자좌의 다수를 쥐 계놈으로 도입하여야한다. 이는 생식세포주(germline) 배열에서 인간 중쇄 또는 경쇄 면역글로블린 유전자좌를 함유하는 효모인조염색체(yeast artificial

chromosome, YAC)형성을 시작으로 단계과정으로 수행한다. 각각 삽입은 크기적으로 대략 1Mb이기 때문에 YAC 설계는 면역글로불린 유전자좌의 겹침 단편의 동족 재조합을 요구한다. 중쇄 유전자좌를 함유하는 하나와 경쇄 유전자좌를 함유하는 하나인 2개의 YAC는 쥐 배아줄기세포와 효모 등혈징체(spheroblast)를 함유하는 YAC의 용융을 통해 쥐속으로 개별적으로 도입된다. 다음, 배아줄기세포 클론은 쥐 배반포 기배아(blastocyst)로 마이크로주입된다. 키메라 숫컷은 그들의 생식세포주를 통해 YAC로 전달되는 능력으로 선별하고 쥐류 항체생성에 부족한 쥐와 생식한다. 인간 중쇄 유전자좌를 함유하는 하나와 인간 경쇄 유전자좌를 함유하는 하나인 2종의 형질전환 변형을 사육하는 것은 면역화에 대응하는 인간 항체를 생산하는 자손들을 제조한다.

[0152] 또한, 비재배열된 인간 면역글로불린 유전자는 염색체 전이기법(microcell-mediated chromosome transfer)으로 쥐류 배아기간세포(embryonic stem cell)로 도입될 수 있다. 예를들어, Tomizuka et al., Nature Genetics, 16: 133(1997)를 보라. 상기 방법론에서 인간 염색체를 함유하는 마이크로셀(microcell)은 쥐류 배아줄기세포와 융합된다. 형질전환된 염색체를 안정하게 유지되고, 성장한 키메라는 적합한 조직-특이적 발현을 나타낸다.

[0153] 선택적으로, 본 발명의 항체 또는 항체 단편은 조합 면역글로불린 라이브러리로 분리된 인간 항체 단편으로부터 유도될 수 있다. 예를들어, Barbas et al., METHODS: A Companion to Methods in Enzymology 2:119(1991) 및 Winter et al., Ann. Rev. Immunol. 12:433(1994)를 보아라. B-세포 불멸화(immortalization)에 의해 단클론 항체를 생성하는데 관련된 많은 어려움이 파지디스플레이(phage display)를 이용하여 *E. coli*에서 항체 단편을 변형하고 발현함으로써 극복될 수 있다. 높은 친화력의 회복을 확실히 하기 위해, 단클론 항체 조합 면역글로불린 라이브러리는 큰 레퍼토리 크기를 함유하여야 한다. 일반적인 전략은 역전사를 사용하여 cDNA 를 합성하기 위해 면역화된 쥐의 림프구 또는 비장세포로부터 얻은 mRNA를 사용하는 것이다. 중쇄 및 경쇄 유전자는 PCR를 사용하여 개별적으로 증가되고 파지 클로닝 벡터로 결합된다. 2개의 상이한 라이브러리가 생성되고, 하나는 중쇄 유전자를 함유하며 하나는 경쇄 유전자를 함유한다. 파지 DNA는 각 라이브러리로 분리되고, 중쇄 및 경쇄 서열은 함께 결합되며 조합 라이브러리를 형성한다. 각 파지는 중쇄 및 경쇄 cDNA의 임의 짝을 함유하고, *E. coli*의 전염은 전염세포에서 항체 사슬의 발현에 영향을 미친다. 항체를 인지하는 대상의 항체를 확인하기 위해, 파지 라이브러리를 씌우고 프라그(plaque)에 존재하는 항체분자는 여과기로 이동된다. 여과물은 방사적으로 라벨된 항원으로 배양되고, 과량의 비결합된 리간드를 제거하도록 세척한다. 자동방사성그램 위 방사성 점들은 항원에 결합된 항체를 함유하는 플라그를 나타낸다. 인간 면역글로불린 파지 라이브러리를 생성하는데 유용한 클로닝 및 발현벡터는 예를들어, STRATAGENE Cloning System(La Jolla, CA)로부터 얻을 수 있다.

[0154] 게다가, 양특이성 MAbs를 생성하는 최근 방법은 일반적인 면역글로불린 아이소타입(isotype)보다 강하게 교차결합하도록 부가적인 시스테인(cysteine) 잔기를 갖는 변형된 재조합 MAbs를 포함한다. 예를들어, FitaGerald et al., Protein Eng. 10(10):1221-1225, 1997을 보라. 다른 접근법은 2개이상의 다른 단쇄 항체 또는 항체 단편 시편을 필요한 두개의 특이성으로 연결하는 재조합 융합단백질을 변형하는 것이다. 예를들어, Coloma et al., Nature Biotech. 15:159-163, 1997를 보라. 양특이성 융합단백질의 변형은 분자공학을 사용하여 생성될 수 있다. 한 형태로, 양특이성 융합단백질은 예를들어 한 항원에 단일 결합부위로 scFv 및 두번째 항원에 단일 결합부위로 Fab단편으로 이루어진 단가이다. 다른 형태로, 양특이성 융합단백질은 예를 들어, 한 항원에 2개 결합부위로 IgG 및 두번째 항원에 2개 결합부위로 2개 scFv로 이루어진 2가이다.

[0155] 2개이상의 다른 단쇄 항체 또는 항체 단편을 연결하는 양특이성 융합단백질은 유사한 방법으로 생성된다. 재조합 방법은 융합단백질의 변형을 생성하는데 사용될 수 있다. 예를들어, 인간화 단클론 Immu31 항체로부터 유도된 Fab단편 및 쥐류 항-diDTPA로부터 유도된 scFv로 이루어진 융합단백질이 생성될 수 있다. GGGs와 같은 유연한 링커는 Immu31 항체의 중쇄의 일정 부위에 scFv를 연결한다. 선택적으로, scFv는 다른 인간화 항체의 경쇄의 특정부에 연결될 수 있다. scFv에 중쇄 Fd의 구조연결에 필요한 적절한 링커서열은 PCR 반응을 거쳐 VL 및 VK로 주입된다. DNA 단편 인코딩 scFv는 DNA 서열 인코딩 CH1 도메인을 함유하는 스테이징 벡터로 결합된다. 결과 scFv-CH1 구조는 절개되고 Immu31 항체의 DNA 서열 인코딩 VH 부위를 함유하는 벡터로 결합된다. 결과 벡터는 양특이성 융합단백질의 발현에 포유류 세포로 적절한 숙주세포를 전염시키는데 사용될 수 있다.

[0156] **키메라, 인간화 및 인간 항-AFP 항체의 제조**

[0157] 본 발명에서 사용되는 세포라인 및 배양배지는 Immu31 하이브리도마 세포 및 Sp2/0-Ag14 골수종 세포(ATTC, Rockville, MD)를 포함한다. Immu31을 생성하는 단클론 하이브리도마는 Sp2/0-Ag14과 알파 태아 단백질으로 면역화되어 있는 쥐로부터 제조된 비장세포를 융합함으로써 얻을 수 있다. 상기 세포는 10% 우태혈청(FBS :fetal bovine serum)(Hyclone Laboratorise, Logan, UT) 및 항생물질(antibiotic)이 보충된 하이브리도마 세럼-프리

배지(HSFM)(Life Technologies, Grand Island, NY)(완전배지)에서 배양될 수 있다. 선택적으로, 10% FCS 및 75 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 간타미신(gentamicin)을 함유(완전 HSFM)하는 10% FCS(Gibco/BRL, Gaithersburg, MA)으로 채워진 Dulbecco's modified Eagle's Medium(DMEM) 또는 단지 항생물질만을 함유하는 HSFM에서 배양될 수 있다. 이입세포(transfectoma)의 선택은 500 units/ml 하이그로마이신(hygroscopicin)(Calbiochem, San Diego, CA)을 함유하는 완전 HSFM에서 수행될 수 있다. 모든 세포라인은 바람직하게 5% CO₂에서 37°C로 유지된다.

[0158] V_K 및 V_H 유전자 분절(segment)의 수득

[0159] V_K 및 V_H 유전자 분절의 분리는 당업계에서 잘 알려진 여러 수단으로 수행될 수 있다. 특별히 한정적이지 않지만, 2종의 수단은 PCR 클로닝 및 cDNA 라이브러리 스크리닝을 포함한다.

[0160] PCR 클로닝은 당업계에서 잘 알려진 기술이다. 그러나, 간략하게 V_K 및 V_H 유전자 단편의 PCR 클로닝은 하기와 같이 수행된다. 전체 RNA는 Fast Track RNA Isolation kit(Invitrogen, San Diego, CA)와 같이 상업적으로 사용가능한 키트를 사용하여 Immu31 하이브리도마 세포라인으로부터 분리될 수 있다. 첫 가닥 cDNA는 cDNA 사이클(cycle) 키트(Invitrogen)를 사용하여 RNA로부터 역전사될 수 있다. 상기 과정에서 5 μg 전체 RNA는 올리고 dT 또는 랜덤 헥사머 프라이머, 또는 쥐류 IgG CH1-특이적 프라이머 또는 쥐류 Ck-특이적 프라이머로 어닐링된다. 상기 프라이머의 예로는 각각 CH1B(5'-ACA GTC ACT GAG CTG G-3') 및 Ck3-BH1(5'-GCC GGA TCC TGA CTG GAT GGT GGG AAG ATG GAT ACA-3')이다. 첫 가닥 cDNA는 Orlandi et al.에서 기재된 바와 같이 PCR에 의해 V_K 및 V_H 를 증폭시키는 주형(template)로 사용될 수 있다. V_K 부위로 VK1BACK(5'-GAC ATT CAG CTG ACC CAG TCT CCA-3') 및 IgKC3(5'-CTC ACT GGA TGG TGG GAA GAT GGA TAC AGT TGG-3')와 같은 프라이머 쌍이 사용될 수 있다. V_H 부위로 VH1BACK(5'-AGG T(C/G)(A/C)A(A/G)C TGC AG(C/G) AGT C(A/T)G G-3') 및 CH1B와 같은 프라이머 쌍이 사용될 수 있다. 증폭 후, V_K 및 V_H 단편은 겔-정제되어 디데옥시터미네이션 방법(dideoxytermination method)으로 서열분석을 하기 위해 TA 클로닝 벡터(Invitrogen)와 같은 클로닝 벡터로 클론화된다. 면역글로불린 근원의 서열은 Leung et al.,(Hybridoma, 13:469(1994)에서 기재된 방법을 사용하여 키메라 Ab 발현벡터를 설계하는데 사용될 수 있다.

[0161] PCR 클로닝에 의한 V_K 및 V_H 유전자 분절을 분리하는데 선택적으로 바람직한 것과 같이, cDNA 라이브러리 스크리닝도 사용될 수 있다. cDNA 라이브러리 스크리닝 방법은 당업계에서 잘 알려진 방법이다. 그러나, 간략히 설명하면 cDNA 라이브러리는 pSPORT 벡터(Life Technologies)에서 쥐류 Immu31 하이브리도마 세포로부터 추출된 mRNA로부터 설계될 수 있다. 첫 가닥 cDNA는 올리고 dT 프라이머-NotI 어댑터(Life Technologies)와 Immu31 하이브리도마로부터 ply ARNA를 일차처리(priming)하여 합성할 수 있다. 두번째 가닥 합성 및 SalI 어댑터의 부착 후, cDNA 풀(pool)은 cDNA 크기 분획(size fractionation)컬럼을 통해 크기 분획할 수 있다. 분획된 cDNA는 pSPORT 벡터로 결합되고, 다음 *Escherichia coli* DH5 α 로 전환된다. 다음, 라이브러리를 깔아놓고 여과하여 증폭한다.

[0162] cDNA 라이브러리의 스크리닝은 중쇄 및 경쇄로 특이적 라벨화된 프로브와 교잡반응(Hybridization)으로 수행될 수 있다. 예를들어, 중쇄로 MUCH-1(5'-AGA CTG CAG GAG AGC TGG GAA GGT GTG CAC-3') 및 경쇄로 MUCK-1(5'-GAA GCA CAC GAC TGA GGC ACC TCC AGA TGT-3')와 같이 [32-P]-라벨화된 프로브가 있다. 첫 스크리닝에 양성인 클론은 평판에 복제하도록 전이될 수 있으며, 동일한 프로브로 두번 스크린될 수 있다.

[0163] RNA분리, cDNA 합성 및 증폭은 하기와 같이 수행할 수 있다. 전체 세포 RNA는 Sambrook et al.,(Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second ed., Cold Spring Harbor Press, 1989)에 따라 약 10⁷ 전체세포를 사용하여 Immu31하이브리도마 세포라인으로부터 제조될 수 있다. 첫 가닥 cDNA는 SuperScript preamplification system(Gibco/BRL, Gaithersburg,MD.)를 사용하여 통상적으로 전체 RNA으로부터 역전사될 수 있다. 간략하게, 20 μl 반응부피에서 랜덤 헥사머 프라이머 50ng을 2 μl 10X 합성완충용액(200mM Tris-HCl(pH8.4), 500mM KCl, 25mM MgCl₂, 1mg/ml BSA), 1 μl 10mM dNTP mix, 2 μl 0.1M DTT, 및 200units SuperScript 역전사효소(reverse transcriptase)의 존재하에서 5 μg RNAs에 어닐링할 수 있다. 연장(elongation)단계는 10분동안 상온에서 수행되고, 이어 50분동안 42°C에서 배양한다. 반응은 5분동안 90°C에서 반응혼합물을 가열함으로써 종결할 수 있다.

[0164] 스크리닝 프로브를 합성하고 라벨하는 것은 잘 알려진 수단으로 수행될 수 있다. 사용되는 결정 시스템에 따라 프로브 라벨링은 변화될 것이다. 상기 목적으로 많은 키트가 상업적으로 사용된다. 올리고뉴클레오타이드의 32-P 라벨링의 한 방법은 [γ -³²P]ATP(Amersham Arlington Heights, IL) 및 T4 폴리뉴클레오타이드 키나아제(New

England Biolabs, Beverly, MA)로 사용하는 것을 포함한다.

[0165] *키메라 항-AFP 항체의 제조*

[0166] 일반적으로, 키메라 항-AFP MAb를 제조하는 것은 AFP 항체의 V_k 및 V_H 사슬은 상기의 방법으로 얻을 수 있으며, PCR에 의해 증폭될 수 있다. 바람직한 실시형태에서 키메라 항-AFP 항체는 Immu31 항체이다. V_k PCR 생성물은 Leung et al., Hybridoma, 13: 469 (1994)에 기재된 스테이징 벡터(VKpBR)계 pBR327로 서브클론될 수 있다. V_H PCR 생성물은 유사한 pBluescript-계 스테이징 벡터(VHpBR)로 서브클론될 수 있다. 프로모터 및 단 펩티드 서열을 따라 V_k 및 V_H 서열을 함유하는 단편은 HindIII-BamHI 제한효소(Restriction endonuclease)를 사용하여 스테이징 벡터로부터 절개할 수 있다. V_k 단편(약 600bp)은 통상적으로 포유류 발현벡터(예를들어, pKh)로 서브클론할 수 있다. pKh은 인간 카파(kappa) 특정부, Ig 증가제, 카파 증가제 및 하이그로마이신-제한 유전자의 유전적 서열을 함유하는 pSVhyg-계 발현벡터이다. 유사하게, 약 800bp V_H 단편은 pGlg, 인간 IgG1 특정부의 유전적 서열을 갖는 pSVgpt-계 발현벡터, Ig 증가제, 및 크산틴(Xanthine)-구아닌 포스포리보실기 전이효소(guanine phosphoribosyl transferase, gpt)유전자로 서브클론될 수 있다. 2개의 플라즈미드는 전기 천공법(electroporation) 및 하이그로마이신 저항을 선택하여 Sp2/0-Ag14세포와 같은 포유류 세포로 전이될 수 있다. 선택에 살아남은 콜로니들은 증대하고, cImmu31 MAb의 생성에 ELISA방법으로 모니터한다. 대략 $1-10 \times 10^6$ 세포의 이입효율성이 바람직하다. 0.1 및 $2.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ 의 항체 발현 수준이 본 시스템으로 기대될 수 있다.

[0167] 선택적으로, V_k 및 V_H 발현 카세트는 각각 XbaI/BamHI 및 XhoI/BamHI로서 절개되는 VKpBR2 및 VHpBS2인 변형 스테이징 벡터에서 집합될 수 있으며, Sp2/0-Ag14 세포에서의 발현으로 Gilles et al. J. Immunol. Methods 125: 191 (1989), Losman et al., Clin. Cancer Res.5:3101(1999) 및 Losman et al., Cancer, 80: 2660 (1997)에 기재된 pdHL2과 같은 단 발현벡터속으로 서브클론될 수 있다. 본 발명에서 유용한 다른 벡터들은 Barnes et al., Cytotechnology 32: 109-123(2000)에 기재된 GS 벡터이며, 이는 바람직하게 NS0세포라인 및 CHO 세포에서 발현된다. 다른 적절한 포유류 발현시스템은 Werner et al., Arzneim.-Forsch./Drug Res. 48(11), Nr. 8,870-880 (1998)에 기재된다.

[0168] *인간화된 항-AFP항체의 제조*

[0169] 바람직한 실시형태에서, 인간화된 항-AFP항체는 인간화된 Immu31 항체이다. hImmu31 V_k 및 V_H 도메인의 서열을 디자인할 때 CDR 유전자주입(engrafting)은 PCR 반응에서 주형으로써 긴 합성 DNA 올리고뉴클레오티드, 프라이머로써 짧은 올리고뉴클레오티드를 사용한 유전자 합성으로 수행될 수 있다. 대부분의 경우에서 DNA 인코딩 V_k 및 V_H 도메인은 대략 350bp길이일 것이다. 코돈(codon) 퇴보의 장점으로 V 유전자 DNA 서열의 중간에 근접한 부위에서 인코딩된 아미노산의 변화없이 유일한 제한부위가 용이하게 도입될 수 있다. 예를들면, hImmu31 V_H 도메인의 DNA 뉴클레오티드 위치 169-174(아미노산 위치 56-57)에서, 유일한 KpnI 부분이 원래 디자인된 아미노산 서열(도 5A서열 참조)을 유지하면서 도입될 수 있다. KpnI 부분의 2개의 긴 비-중복 단-가닥 DNA 올리고뉴클레오티드(~150bp) 상층 및 하층이 자동화 DNA 올리고뉴클레오티드 합성기(Cyclone Plus DNA Synthesizer, Milligen-Bioscience)로 생성될 수 있다. 전체 길이 DNA 올리고뉴클레오티드의 수율은 낮은 것이 기대되지만, 이는 PCR 반응에서 인접(flanking) 올리고뉴클레오티드의 2쌍으로 증폭될 수 있다. 프라이머는 다음의 서열집합 및 서브클로닝을 촉진시키기 위해 필요한 제한부위로 디자인될 수 있다. 올리고뉴클레오티드에서 프라이머는 결과 PCR 생성물이 KpnI 부분에서 틀로 접합하여 전체 길이 DNA 서열 인코딩 Immu31 V_H 도메인을 형성하도록 KpnI 부분에서 중복 서열을 함유하여야 한다. KpnI 부분에 올리고의 PCR 생성물들의 결합 및 스테이징 벡터, VHpBS의 Pst II/BstEII 부분으로 서브클로닝은 단 세-단편 결합단계에서 완성될 수 있다. VHpBS로의 정확한 서열의 서브클로닝은 먼저 제한효소 분석에 의해 분석될 수 있으며, 이어 Sanger et al. (Proc. Natl. Acad.Sci., USA, 74: 5463 (1977))에 따라 서열반응으로 수행될 수 있다.

[0170] Ig 프로모터, 리더 서열 및 hImmu31 V_H 서열을 함유하는 HindIII-BamHI 단편은 스테이징 벡터로부터 절개될 수 있으며, 인간 IgG 특정부, Ig 증가제 및 gpt 선택마커의 유전적 서열을 함유하는 pSVgpt-계 벡터, pGlg로 최종 발현벡터 hImmu31pG1을 형성하는 것에 대응되는 부분으로 서브클론될 수 있다. 유사한 전략이 hImmu31 V_k 서열

의 설계에 적용될 수 있다. 긴 올리고뉴클레오타이드를 위해 PCR 생성물의 절찰에 선택된 제한부위는 NsiI일 수 있다.

[0171] Ig 프로모터, 리더 서열 및 hImmu31 V_k 서열을 함유하는 DNA 서열은 BamHI/HindIII의 처리로 스테이징 벡터 VKpBR로부터 절개될 수 있으며, 인간 카파 사슬일정부위의 유전적 서열, 하이그로마이신 선택마커, Ig 및 카파 증가제를 함유하는 pSVgpt-계 벡터, pKh로 최종발현벡터 hImmu31pKh를 형성하는 것에 대응되는 부분으로 서브클론될 수 있다.

[0172] 2개의 플라스미드가 적절한 세포, 예를들어 골수종 Sp2/0-Ag14, 하이그로마이신(hygromycin) 제한에서 선택된 콜로니 및 예를들어 하기에 기재된 ELISA 분석에 의해 hImmu31의 생산에 모니터링된 상청액 유체인 적절한 세포속으로 감염시킬 수 있다. 선택적으로, V_k 및 V_H 발현카세트는 각각 XbaI/BamHI 및 XhoI/BamHI로서 절개되는 VKpBR2 및 VHpBS2인 변형 스테이징 벡터에서 집합될 수 있으며, Sp2/0-Ag14 세포에서의 발현으로 Gilles et al. J. Immunol. Methods 125: 191 (1989), Losman et al., Clin. Cancer Res.5:3101(1999) 및 Losman et al., Cancer, 80: 2660 (1997)에 기재된 pHL2과 같은 단 발현벡터속으로 서브클론될 수 있다. 본 발명에서 유용한 다른 벡터들은 Barnes et al., Cytotechnology 32: 109-123 (2000)에 기재된 GS 벡터이며, 이는 바람직하게 NS0세포라인 및 CHO 세포에서 발현된다. 다른 적절한 포유류 발현시스템은 Werner et al., Arzneim.-Forsch./Drug Res. 48(11), Nr. 8,870-880 (1998)에 기재된다.

[0173] ELISA에 의한 항체 분비 클론의 트랜스펙션(transfection) 및 분석은 하기와 같이 수행될 수 있다. 전체적으로 예가되는 Co et al., J Immunol., 148: 1149 (1992)에 따른 전기 충격법(electroporation) (BioRad, Richmond, CA)에 의해 10 μ g hImmu31pKh(경쇄발현 벡터) 및 20 μ g hImmu31pGIg(중쇄발현 벡터)를 5 X 10⁶ SP2/0 골수종세포의 이입(transfection)에 사용될 수 있다. 이어지는 이입에서 세포는 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂에서 완전 HSFM 배지(Life Technologies, Inc., Grand Island, NY)의 96-웰 구멍판에서 성장될 수 있다. 선택과정은 2일 후, 하이그로마이신(hygromycin) 선택배지의 첨가에 의해 하이그로마이신 500 μ g/ml의 최종농도에서 초기화될 수 있다. 전형적으로 콜로니는 후-전기충격법 2-3주에 나타난다. 다음, 배양은 분석으로 증대될 수 있다.

[0174] *클론의 스크리닝 및 항체의 분리*

[0175] 키메라 또는 인간화 중쇄 분비에 양성적인 이입세포 클론은 ELISA 분석으로 확인될 수 있다. 간략하게, 이입세포 배양으로부터의 상청액 시료(~100 μ l)는 염소 항-인간 GAH-IgG, F(ab $\&$ ap;os;)₂ 단편-특정항체(Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA)으로 예비코트된 ELISA 구멍판에 3배로 부가한다. 플레이트를 상온에서 1시간 동안 배양한다. 비결합된 단백질을 세척 완충용액(0.05% 폴리소르베이트(polysorbate) 20을 함유하는 PBS)으로 3회 세척하여 제거한다. GAH-IgG, Fc단편-특이성 항체(Jackson ImmunoResearch)와 집합된 Horseradish peroxidase(HRP)을 웰에 부가한다(항체 저장희석액 100 μ l \times 10⁴, 집합되지 않은 항체와 보충되어 1.0 μ g/ml의 최종농도로 된다). 1시간이 배양에 이어서, 플레이트를 전형적으로 3회 세척한다. 반응용액(100 μ l, PBS에 오르소페닐렌-디아민(OPD) 167 μ g(Sigma, St. Louis, MO), 0.025% 과산화수소를 함유한다)을 웰에 부가한다. 색깔은 30분동안 어둡게 발전한다. 반응을 자동화 ELISA판독기(Bio-Tek instruments, Winooski, VT)의 490nm에서 흡수력을 측정하기 전에 각 웰에 4N HCl용액 50 μ l을 첨가하여 멈추었다. 결합 키메라 항체는 부적절한 키메라 항체 표준(obtainable from Scotgen, Ltd., Edinburg, Scotland)과 상대적으로 결정된다.

[0176] 항체들은 하기와 같이 세포배양 배지로부터 분리될 수 있다. 이입세포 배양은 세럼-프리 배지에 적응된다. 키메라항체의 생산에서 세포는 HSFM을 사용하여 롤러 병에서 500ml 배양으로 성장된다. 배양균을 원심분리하고 상청액을 0.2 μ 막막으로 여과하였다. 여과된 배지를 1ml/분의 유속에서 단백질 A컬럼(1 \times 3cm)으로 통과시킨다. 다음, 수지를 PBS 10 컬럼부피로 세척하고, 단백질 A-결합 항체를 10mM EDTA를 함유하는 0.1M 글리신 완충용액(pH 3.5)로 컬럼으로 용출한다. 1.0ml분획을 10 μ l 3M 트리스(pH 8.6)을 함유하는 튜브로 수집하고, 단백질 농도는 280/260nm에서 흡광도로 결정한다. 피크분획을 모아서 PBS에 대하여 투석하고, 예를들어 Centricon 30(Amicon, Beverly, MA)로 항체를 농축하였다. 항체농도를 ELISA로 결정하고, 농도를 PBS로 1mg/ml로 조절한다. 아자이드나 트립(Sodium Azide) 0.01%(w/v)를 방부제로서 시료에 부가한다.

[0177] 키메라, 인간화 또는 인간 항-AFP 항체의 친화력은 직접결합측정법(direct binding assay)법 및 경쟁적결합측정(competitive binding assay)을 사용하여 측정할 수 있다.

[0178] *제조항체의 변형/최적화*

- [0179] 인간화가 항체 친화력의 감소 또는 손실을 초래하기 때문에, 추가적인 변형은 원래의 친화력을 복구하기 위해 요구된다(예를들어, 전체가 예가 되는 Tempest et al., Bio/Technology 9:266(1991); Verhoeyen et al., Science 239:1534(1988))를 보라). cImmu31이 쥐류의 대조부분과 비교할만한 결합친화력을 나타내므로, hImmu31의 원 버전에서 불충분한 디자인이면 인간화된 버전의 것에 cImmu31의 경쇄 및 중쇄를 혼합하고 조화함으로써 동정할 수 있다. 바람직하게, 골격부위에서 인간 잔기는 쥐류 대조물로 대체된다. 또한, 바람직하게 EU 및 NEWM과 같은 2개의 상이한 인간 항체로부터 골격서열의 조합은 V_H 로 사용된다. 예를들어, FR1-3은 EU 로부터, FR4는 NEWM로부터 유래될 수 있다.
- [0180] Asn-연결된 당화(glycosylation)부분과 같은 기타 변형은 종래의 올리고뉴클레오티드 방향 부위-특이적 돌연변이에 의해 키메라화, 인간 또는 인간화 Immu31 항체로 도입될 수 있다. 올리고뉴클레오티드-방향 돌연변이의 상세한 프로토콜 및 클론화된 DNA의 돌연변이의 관련기술은 잘 알려져 있다. 예를들어, Sambrook et al., 및 Ausubel et al.,를 보라.
- [0181] 예를들어, hImmu31 V_k (도 4B)의 위치 18에서 Asn을 도입하는 것은 Arg의 AGG로부터 Asn의 AAC로 코돈 18을 바꿀 수 있다. 이를 수행하기 위해, 항체 경쇄서열을 함유하는 단가닥 DNA 주형은 티미딘(thymidine)을 대신하여 우라실(uracil)의 소량을 함유하는 단가닥 DNA 분자를 얻기위해 E. coli(예를들어, dut^- , ung^-)의 적절한 균주로부터 제조된다. 상기 DNA 주형은 SP6 프로모터를 사용하여 생체막 전사에 의해 또는 M13 클로닝으로 얻을 수 있다. 예를들어, Ausubel et al., eds., CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, NY, 1987을 보라. 돌연변이된 서열을 함유하는 올리고뉴클레오티드는 통상적으로 합성하며, 단-가닥 템플레이트 및 T4 DNA 폴리메라아제(polymerase) 및 T4 DNA 리가제(ligase)로 처리된 생성물로 어닐링되어 이중-가닥 DNA 분자를 생성한다. 이중-가닥 DNA로 야생형(wild type) E. (dut^+ , ung^+) 세포의 형질전환은 돌연변이 DNA의 효율적인 회복력을 제공한다.
- [0182] 선택적으로, Asn-연결된 당화 부분은 프라이머로 돌연변이를 함유하는 올리고뉴클레오티드 및 V_k 사슬의 가변부위의 DNA 클론을 사용하거나 템플레이트로 대상의 항체를 생성하는 세포로부터 RNA를 사용함으로써 항체 경쇄로 도입될 수 있다. 또한, Huse, ANTIBODY ENGINEERING: A PRACTICAL GUIDE, Boerrebaeck, ed., W. H. Freeman & Co., pp. 103-120, 1992를 보라. 예를들어, 특정위치돌연변이(site-directed mutagenesis)은 제조자의 지시에 따라 TRANSFORMER™ 키트(Clonetech, Palo Alto, Calif.)를 사용하여 수행될 수 있다.
- [0183] 선택적으로, 당화부위는 원하는 돌연변이를 함유하는 것과 같은 올리고뉴클레오티드로 서로 일차처리한 항체 사슬을 합성함으로써 도입될 수 있다. 예를들어, 전체가 예가 되는 Uhlmann, Gene71:29(1998); Wosnick et al., Gene 60: 115(1988); Ausubel et al.,를 보아라.
- [0184] 상기 일반적 기술로 항체의 경쇄의 위치 18에서 Asn당화부분의 도입이 언급되어 있지만, 당업자에게 경쇄 또는 중쇄가변부위에서 Asn-연결 당화부분을 도입하는 것이 가능할 것이다.

[0185] **4. 항체 단편의 생산**

- [0186] 특정 에피토프를 인지하는 항체 단편들은 공지의 기술에 의해 생성될 수 있다. 항체 단편은 $F(ab')_2$, Fab', Fab, Fv, sFv 등의 항체의 항원결합 부분이다. 한정되는 것은 아니지만, 다른 항체 단편들은 항체분자의 펩신 소화에 의해 생산될 수 있는 $F(ab')_2$ 단편 및 $F(ab')_2$ 단편의 이황화물 다리를 감소함으로써 생성될 수 있는 Fab' 단편을 포함한다. 선택적으로, Fab' 발현 라이브러리는 원하는 특이성으로 단클론 Fab' 단편의 빠르고 용이한 동정으로 설계(Huse et al., 1989, Science, 246:1274-1281)될 수 있다.
- [0187] 단 사슬 Fv 분자(scFv)는 VL 도메인 및 VH 도메인으로 이루어진다. VL 도메인 및 VH 도메인은 표적 결합부위를 형성하는데 관련한다. 상기 두 도메인은 펩티드 링커(L)에 의해 공유적으로 더 결합된다. scFv 분자는 VL 도메인이 scFv 분자의 N-말단 부분이라면 VL-L-VH, 또는 VH 도메인이 scFv 분자의 N-말단 부분이라면 VH-L-VL로 나타낸다. ScFv 분자를 만들고 적절한 펩티드 링커를 제작하는 방법은 미국특허 제 4,704,692 호, 미국특허 제 4,946,778 호, R. Raag and M. Whitlow, "Single Chain Fvs." FASEB Vol 9: 73-80 (1995) and R. E. Bird and B. W. Walker, "Single Chain Antibody Variable Regions," TIBTECH, Vol 9: 132-137 (1991)에 기재되어 있다. 상기 자료들은 예로 배합된다.

[0188] 고 친화력 scFv를 얻기 위해, 큰 레퍼토리를 갖는 scFv 라이브러리는 잘 알려진 V_H , V_K , 및 V_L 유전자 종들에 대응하는 PCR 프라이머를 사용하여 비-면역화된 인간 제공자로부터 V-유전자를 분리함으로써 설계될 수 있다. 예를들어, Vaughn et al., Nat. Biotechnol., 14:309-314(1996)을 보라. 증폭에 이어, V_H , 및 V_K 풀은 하나의 풀로 형성하도록 결합된다. 상기 단편들은 파아지미드(Phagemid) 벡터로 결합된다. scFv 링커, (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)₃,을 V_L 단편의 파아지미드 상층으로 결합된다. V_H 및 링커- V_L 단편들을 증폭하고 J_H 부위에 집합된다. 결과 V_H -링커- V_L 단편은 파아지미드 벡터로 결합된다. 파아지미드 라이브러리는 상기에서 설명한 바와 같이, 여과기를 사용하거나 이뮤노튜브(immunotube)(Nunc;Maxisorp)를 사용하여 일어낼 수 있다. 면역화된 토끼의 림프구 또는 비장세포로부터 조합적 면역글로블린 라이브러리를 설계하고 P. pastoris에서 scFv 구조를 발현함으로써 유사한 결과를 수행할 수 있다. 예를들어, Ridder et al., Biotechnology, 13: 255-260(1995)를 보라. 게다가, 적절한 scFv의 분리에 이어 높은 결합친화력 및 느린 분리속도를 갖는 항체 단편이 CDR3 돌연변이 및 사슬 섞임(shuffling)과 같은 친화 성숙과정을 통하여 얻을 수 있다. 예를들어, Jackson et al., Br. J. Cancer,78:181-188(1998); Osbourn et al., Immunotechnology, 2: 181-196(1996)을 보아라.

[0189] 항체 단편은 전체 길이 항체의 단백질분해의 가수분해 또는 단편의 DNA 코딩의 다른 숙주 또는 E.coil에서 발현함으로써 제조될 수 있다. 항체 단편은 종래의 방법으로 전체 길이 항체의 펩신 또는 파파인(papain) 소화에 의해 얻을 수 있다. 예를들어, 항체 단편은 펩신과 항체의 효소적 분할에 의해 F(ab')₂로 표시되는 100Kd 단편을 제공하도록 생산될 수 있다. 상기 단편은 티올 환원제, 선택적으로 이황화물 결합의 분할의 결과인 설프히드릴(Sulfhydryl)기의 방지제를 사용하여 더 분할하여 50Kd Fab' 단가 단편을 생산한다. 선택적으로, 파파인을 사용한 효소적 분할은 2개의 단가 Fab 단편 및 Fc 단편을 직접적으로 생산한다. 상기 방법은 예를들어 Goldenberg, 미국특허 제 4,036, 945호 및 제 4,331, 647호에 기재되어 있으며, 전체가 예로 배합된다. 또한, Nisonoff et al., Arch Biochem. Biophys. 89 :230 (1960); Porter, Biochem. J. 73: 119 (1959), Edelman et al., in METHODS IN ENZYMOLOGY VOL. 1, page 422 (Academic Press 1967), and Coligan at pages 2.8. 1-2.8. 10 and 2.10.-2. 10.4을 보자.

[0190] 항체 단편의 다른 형태는 단 상보성 결정부위(CDR)의 펩티드 코딩이다. CDR은 항체가 결합하는 에피토프에 구조적으로 상보적인 항체의 가변부위의 단편이고, 가변부위의 나머지보다 더 가변된다. 따라서, CDR은 종종 아주 다양한 부위(hypervariable region)로 언급된다. 가변부위는 세개의 CDR로 이루어진다. CDR 펩티드는 대상의 항체의 유전자 인코딩 CDR을 설계함으로써 얻을 수 있다. 상기 유전자들은 예를들면 항체-생산세포의 RNA로부터 가변부위를 합성하는 폴리머라제 사슬반응을 사용함으로써 제조된다. 예를들어, Larrick et al., Methods : A Companion to Methods in Enzymology 2: 106(1991) ; Courtenay-Luck, "Genetic Manipulation of Monoclonal Antibodies,"in MONOCLONAL ANTIBODIES: PRODUCTION, ENGINEERING AND CLINICAL APPLICATION, Ritter et al. (eds.), pages 166-179 (Cambridge University Press 1995); and Ward et al., "Genetic Manipulation and Expression of Antibodies,"in MONOCLONAL ANTIBODIES: PRINCIPLES AND APPLICATIONS, Birchet et al., (eds.), pages 137-185 (Wiley-Liss, Inc. 1995)을 보자.

[0191] 단가 경-중쇄 단편을 형성하는 중쇄의 분리, 단편의 분할 또는 기타 효소적, 화학적, 또는 유전적 기술과 같은 분할 항체의 다른 방법들은 손상되지 않은 항체에 의해 인지되는 항원에 결합하는 단편이라면 사용될 수 있다.

[0192] **5. 융합단백질**

[0193] 본 발명의 항체 융합단백질은 2개 이상의 항체 또는 이의 단편으로 이루어지며, 상기 융합단백질을 이루는 항체의 각각은 치료성 제제 또는 진단성 제제를 함유할 수 있다. 즉, 항체 융합단백질 또는 이의 단편은 적어도 하나의 일차 항-AFP MAb 또는 이의 단편, 및 항-AFP MAb가 아닌 적어도 하나의 2차 MAb 또는 이의 단편으로 이루어질 수 있다. 바람직한 실시형태에서, 항-AFP 항체 또는 이의 단편은 Immu31 항체 또는 이의 단편이다. 바람직하게, 2차 MAb는 CEA, EGP-1, EGP-2(예를들어, 17-1A), MUC-1, MUC-2, MUC--3, MUC-4, PAM-4, KC4, TAG-72, EGFR, HER2/neu, BrE3, Le-Y, A3, Ep-CAM, Tn 및 Thomson-Friedenreich 항원에 대한 항체와 같은 암(carcinoma)관련 항체, 종양 괴사(tumor necrosis) 항원, 테나신(tenascin), 암유전자(Oncogene), 암유전자 산물, IL-6, IGF-1, IGFR-1, 혈관 내피세포 성장인자(VEGF:Vascular Endothelial Growth Factor), PIGF(placenta growth factor;태반성장인자), ED-B 피브리노넥틴(fibronectin), 및 기타 혈관성장인자와 같은 종양관련 혈관내피세포 항원, Ga 733, 17-1A, 페리틴 및 일차 간암(hepatic carcinoma)의 산성의 이소페리틴(acidic isoferritin, AIF), 또는 이의 조합이다.

[0194] 게다가, 하나 이상의 항체 용융단백질의 항체 또는 이의 단편은 하나이상의 치료성 및 진단성 제제를 부착할 수 있다. 게다가, 진단성/검출성 제제 또는 치료성 제제는 동일할 필요가 없으며 상이한 치료성 제제일 수 있고, 예를들어 동일 융합단백질에 약물 및 방사성동위원소를 부착할 수 있다. 특히, IgG는 ¹³¹I 로 방사선라벨화할 수 있으며, 약물에 부착할 수 있다. ¹³¹I 는 IgG의 티로신으로 배할될 수 있으며, 약물은 IgG 리신의 엡실론 아미노기에 부착될 수 있다. 또한, 치료성 및 진단성 제제 모두는 환원된 SH기에 부착될 수 있으며, 탄수화물 측쇄에 부착될 수 있다.

[0195] 또한, 바람직하게는 본 발명의 항체 융합단백질은 적어도 2개의 항-AFP 단클론 항체 또는 이의 단편으로 이루어져 있고, 이들은 알파 태아 단백질(alphafetoprotein)의 또는 상이한 인간 면역글로불린 골격 서열(또는 TgGs)의 상이한 에피토프일 수 있다. 바람직하게, 항-AFP 항체 또는 이의 단편은 Immu31 항체 또는 이의 단편이다.

[0196] **다특이성 및 다가 항체**

[0197] 본 발명의 다른 실시형태는 접합된 다가 Immu31 항체이다. 다가, 다특이성 제제의 조성 및 방법은 Rossi et al., 미국특허출원 제60/436,359호 (2002.12.24), 및 미국특허출원 제60/464,532(2003.4.23)호에 기재된다.

[0198] 조합치료에서 사용되는 상이한 특이성을 갖는 기타 항체 뿐만 아니라, 본 발명의 Immu31 항체 및 이의 단편은 알파 태아 단백질 항원에 적어도 하나의 결합부위 및 다른 항원에 적어도 하나의 결합부위로 이루어진 다특이성 항체, 또는 같은 에피토프 또는 항원에 여러 결합부위로 이루어진 다가 항체로 제조될 수 있다. 바람직한 실시형태에서, 다가 항체 또는 이의 단편은 Immu31 에피토프에 적어도 하나의 결합부위 및 AFP 항원이 아닌 적어도 하나의 결합부위에 이루어진다. Immu31 에피토프는 본 발명의 Immu31 항체에 의해 인지하는 AFP 항원위 에피토프이다. 또한, 바람직하게 다특이성 항체 또는 이의 단편은 Immu31 에피토프에 적어도 하나의 결합부위 및 AFP 항원위 다른 에피토프에 적어도 하나의 결합부위로 이루어진다.

[0199] 본 발명은 특이적으로 AFP를 결합하는 적어도 하나의 결합부위 및 다른 표적 화 세포마커 또는 표적화할 수 있는 접합체를 특이적으로 결합하는 적어도 하나의 결합부위를 갖는 양특이성 항체 또는 항체 단편을 제공한다. 표적화할 수 있는 접합체는 양특이성 항체 또는 항체 단편의 적어도 하나의 결합부위에 의해 인지되는 적어도 하나의 에피토프에서 이루어지거나 갖는 운반부분으로 이루어진다. 바람직하게, 양특이성 항체는 AFP 항원에서 Immu31 에피토프에 결합한다.

[0200] 재조합 방법의 변형은 양특이성 항체 및 항체 단편을 생산하는데 사용될 수 있다. 예를들어, 양특이성 항체 및 항체 단편은 형질전환 가축의 우유에서 생산될 수 있다. 예를들어 Colman, A., Biochem. Soc. Symp., 63: 141-147, 1998; 미국특허 제5,827,690을 보라. 2개의 DNA 구조는 각각 DNA 분절 인코딩 쌍 면역글로불린 중쇄 및 경쇄를 함유하도록 제조된다. 단편들은 유선상피세포(mammary epithelial cell)에서 우선적으로 발현되는 프로모터 서열을 함유하는 발현 벡터로 클론된다. 구체적인 예로는 특별히 한정되지 않지만, 토끼, 소 및 양 카세인 유전자, 소 α-락토글로불린 유전자, 양 β-락토글로불린 및 쥐 유장(whey)산 단백질 유전자로부터의 프로모터를 포함한다. 바람직하게, 삽입된 단편은 유선-특이적 유전자로부터 동종 계놈 서열에 의해 "측에 접합된다. 이는 폴리아데닐레이션(polyadenylation) 부위 및 전이-안정 서열을 제공한다. 발현 카세트는 수정된, 포유류 달걀의 전핵(pronuclei)으로 주입되고, 수용 암컷의 자궁속으로 넣어주고 임신하도록 놓아두었다. 출생 후, 자손을 Southern 분석으로 전이 존재를 스크린한다. 존재하는 항체를 위해 중쇄 및 경쇄 유전자는 동일한 세포에서 동시에 발현되어야 한다. 형질전환 암컷의 우유를 당업계에서 공지된 표준 면역 방법을 사용하여 항체 또는 항체 단편의 존재 및 기능성을 분석한다. 항체는 당업계에서 공지된 표준방법을 사용하여 우유로부터 정제될 수 있다.

[0201] bsAbs를 생성하는 다른 최근 방법은 일반적인 면역글로불린 아이소타입보다 더 강하게 교차결합하기 위해 부가적인 카세인 잔기를 갖는 변형된 재조합 Abs를 포함한다. 예를들어, FitzGerald et al., Protein Eng. 10(10):1221-1225, 1997을 보아라. 다른 접근법은 필요한 양특이성으로 2개이상의 상이한 단쇄 항체 또는 항체 단편 분절을 연결하는 재조합 융합단백질을 변형시키는 것이다. 예를들어, Coloma et al., Nature Biotech. 15:159-163, 1997을 보아라. 양특이성 융합단백질의 변형은 분자공학(molecular engineering)을 사용하여 생성될 수 있다. 하나의 형태로, 양특이성 융합단백질은 하나의 항원에 단 결합부위로 scFv 및 두번째 항원에 단 결합부위로 Fab 단편으로 이루어진 단가이다. 다른 형태로, 양특이성 융합단백질은 하나의 항원에 2개의 결합부위로 IgG 및 두번째 항원에 2개의 결합부위 scFv로 이루어진 이가이다.

[0202] 또한, 항-AFP 다가 항체 또는 이의 단편은 본 발명에서 고안된다. 바람직하게, 항-AFP 다가 항체 또는 이의 단편은 Immu31 다가 항체 또는 이의 단편이다. 상기 다가 항체는 일차 및 2차 폴리펩티드의 결합으로 설계된다. 일차 폴리펩티드는 바람직하게 면역글로불린 경쇄가변부위 도메인인 첫 면역글로불린 도메인에 공유적으로 연결된 첫 단쇄 Fv 분자로 이루어진다. 이차 폴리펩티드는 바람직하게 면역글로불린 중쇄가변부위 도메인인 두번째 면역글로불린 도메인에 공유적으로 연결된 두번째 단쇄 Fv 분자로 이루어진다. 상기 일차 및 2차 단쇄 Fv 분자는 표적결합 부위를 형성하고, 일차 및 이차 면역글로불린 도메인은 세번째 표적 결합부위를 형성하는데 관련있다.

[0203] VL-L-VH 구조를 갖는 단사슬 Fv분자(여기서, L은 링커임)는 VH-L-VL의 구조를 갖는 다른 단사슬 Fv분자와 결합하여 이가 이합체를 형성한다. 상기의 경우에 첫 scFv의 VL 도메인 및 2차 scFv 분자의 VH 도메인은 결합하여 하나의 표적결합 부위를 형성하고, 첫 scFv의 VH 도메인 및 2차 scFv 분자의 VL도메인이 결합하여 다른 표적결합부위를 형성한다.

[0204] 본 발명의 다른 실시형태는 3개의 결합부위를 형성하는 비공유적으로 결합된 2개의 이중(heterologous) 폴리펩티드 사슬, 하나의 표적에 친화력을 갖는 2개 및 진단성 및/또는 치료성 제제에 운반체에 부착되고 제조될 수 있는 부착소에 친화력을 갖는 3차로 이루어진 Immu31 양특이성, 3가 항체이다. 바람직하게, 항체는 2개의 Immu31결합부위 및 하나의 CEA 또는 MUC1 결합부위를 갖는다. 양특이성, 3가 표적화제는 2개의 다른 scFvs, 다른 항체의 VL도메인에 짧은 링커로 연결된 하나의 항체로부터 2개의 VH 도메인을 함유하는 하나의 scFvs, 및 다른 항체의 VH 도메인에 짧은 링커로 연결된 첫 항체로부터 2개의 VL 도메인을 함유하는 2차 scFvs를 갖는다. VH 및 VL 도메인으로부터 다가, 다특이성 제제를 생성하는 방법은 숙주 기관(Host Organism)에서 DNA 플라스미드로부터 합성된 개별적 사슬이 다가 및 다특이성 제제가 하나의 VL-사슬과 하나의 VH-사슬의 비 공유적 결합으로 생성될 수 있는 방식으로 전체적으로 VH 도메인(VH-사슬) 또는 전체적으로 VL 도메인(VL-사슬)로 이루어지는 것을 제공한다. 예를들어, 3가, 삼특이성 제제를 형성하는 것은 VH-사슬이 각각 상이한 특이성의 항체로부터 가변 길이의 펩티드 링커에 의해 접합된 3개의 VH 도메인의 아미노산 서열로 이루어질 것이고, VH-사슬에서 사용된 것과 유사하게 VL 사슬은 펩티드 링커에 의해 접합된 상보적 VL 도메인으로 이루어질 것이다. 항체의 VH 및 VL 도메인은 항-평행 방식으로 결합되어 있기때문에, 본 발명에서 바람직한 방법은 VH-사슬에서 VH 도메인의 역순으로 배열된 VL-사슬에서 VL 도메인을 갖는다.

[0205] **다이어바디(diabodies), 트리어바디(Triabodies) 및 테트라바디(Tetrabodies)**

[0206] 본 발명의 항-AFP 항체 및 이의 단편은 다이어바디로 불리우는 기능적 양특이성 단-사슬 항체(bscAb)를 제조하는데 사용될 수 있으며, 재조합 방법을 사용하여 포유류 세포에서 생성될 수 있다. 바람직하게, 항-AFP 항체 또는 이의 단편은 Immu31 항체 또는 이의 단편이다. 예를들어, Mack et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 92: 7021-7025, 1995를 보아라. 예를들어, bscAb는 재조합 방법을 사용하여 글리신-세린 링커로 2개의 단 사슬 Fv 단편을 결합함으로써 생성된다. 대상의 2개의 항체의 V 경쇄(VL) 및 V 중쇄(VH)는 표준 PCR 방법을 사용하여 분리된다. 다음, 각 하이브리도마로부터 얻어진 VH 및 VL cDNA를 2단계 융합 PCR에서 단사슬 단편을 형성하도록 접합한다. 첫 PCR 단계는 (Gly4-Ser1)₃링커를 도입하고, 2 단계에서는 VH 및 VL 산물(amplicon)을 접합한다. 다음, 각 단사슬 분자를 세균성 발현벡터로 클론한다. 증폭에 이어, 단사슬 분자의 하나를 절개하고 대상의 2차 단사슬 분자를 함유하는 다른 벡터로 서브클론한다. 결과 bscAb 단편은 진핵 발현벡터로 서브클론된다. 기능적 단백질 발현은 CHO(Chinese Hamster Ovary) 세포로 벡터를 이입함으로써 얻을 수 있다. 양특이성 융합단백질은 유사한 방법으로 제조된다. 양특이성 단-사슬 항체 및 양특이성 융합단백질은 본 발명의 범위내로 함유된다.

[0207] 예를들어, 인간화된, 키메라 또는 인간 또는 쥐류 Immu31 단클론 항체는 항원 특이적 다이어바디, 트리어바디 및 테트라바디를 생산하는데 사용될 수 있다. 단특이성 다이어바디, 트리어바디, 및 테트라바디는 표적화된 항원에 선택적으로 결합되고, 분자위 결합부위의 수가 증가함에 따라 표적세포의 친화력이 증가되며 원하는 위치에서 긴 잔류시간이 관측된다. 다이어바디에서 5개 아미노산 잔기 링커에 의해 인간화된 Immu31 MAb의 VK 폴리펩티드에 접합된 인간화된 Immu31 MAb의 VH 폴리펩티드로 이루어진 2개의 사슬이 사용된다. 각 사슬은 인간화된 Immu31 다이어바디의 반을 형성한다. 트리어바디의 경우에서 링커없이 인간화된 Immu31 MAb의 VK 폴리펩티드에

접합된 인간화된 Immu31 MAb의 V_H 폴리펩티드로 이루어진 3개의 사슬이 사용된다. 각 사슬은 hImmu31 트리머바디의 1/3을 형성한다.

[0208] 또한, 본 발명에서 고안된 것은 AFP와 같이 표적화된 조직에 대하여 반응하는 적어도 하나의 팔 및 표적화할 수 있는 구조에 대하여 반응성을 갖는 적어도 다른 팔을 갖는 양특이성 항체 또는 항체 단편이다. 바람직하게, 양특이성 항체의 하나의 팔은 Immu31 에피토프를 결합한다. 표적화할 수 있는 구조는 운반부분 및 인지가능한 부착소의 적어도 2단위로 이루어진다. 인지가능한 부착소의 구체적인 예는 특별히 한정되는 것은 아니지만, 히스타민 숙시닐 글리신(HSG) 및 플루오리신 이소티오시아네이트를 포함한다. 표적화할 수 있는 구조는 질병 조직을 치료하거나 확인하는데 유용한 다양한 제제에 접합될 수 있다. 표적화할 수 있는 구조는 별개의 구조일 수 있지만, bsAb 표적방법에 사용될 경우 면역반응을 알아내는 것을 피하는 것 뿐만 아니라, 생체내에서 신속히 제거되도록 선택된다. 소수성 제제는 강한 면역 반응을 이끌어내는데 최상인데 반하여, 친수성 제제는 생체내에서 신속한 제거에 바람직하며; 따라서 친수성 및 소수성 사이의 균형이 설립될 필요가 있다. 부분적으로 이는 많은 유기성 부분의 고유의 소수성을 상쇄하도록 친수성 킬레이트링 제제의 사용에 따라 수행된다. 또한, 표적화할 수 있는 구조의 서브유닛은 반대적 용액성질을 갖는 것으로 선택될 수 있으며, 예를들어 아미노산을 함유하는 펩티드는 약간은 소수성이고 약간은 친수성이다. 펩티드를 제외하고, 탄수화물이 사용될 수 있다.

[0209] bsAb 및 융합단백질의 대량은 *Escherichia coli* 발현시스템을 사용하여 생성될 수 있다. 예를들어, Zhenping et al., *Biotechnology*, 14:192-196, 1996을 보아라. 기능적 bsAb은 2개의 단편에서 V_L 및 V_H 도메인이 상이한 펩티드 사슬에 존재하는 2개의 "크로스오버(cross-over)" scFv 단편의 *E. coli*에서 같이 발현(coexpression)함으로써 생성될 수 있다. 대상의 2개의 항체의 V 경쇄(V_L) 및 V 중쇄(V_H)은 표준 PCR방법을 사용하여 분리된다. 다음, cDNA's은 대상의 첫 항체의 V_L 도메인의 C-말단이 2차 항체의 V_H 도메인의 N-말단에 링커를 통해 결합되는 것과 같이 세균 발현 벡터로 결합된다. 유사하게, 대상의 2차 항체의 V_L 도메인의 C-말단은 첫 항체의 V_H 도메인의 N-말단에 링커를 통해 결합된다. 생성 디시스트론 오페론(dicistronic operon)은 인산염 섭취감소에 의해 유도되는 *E. coli* 알카리성 포스파타아제(phosphatase) 프로모터와 같은 강한 프로모터의 전사 조절하에서 배치된다. 선택적으로, 단-사슬 융합구조는 lac 프로모터, 및 2% 글리신 및 1% 트리톤(Triton) X-100으로 이루어진 배지를 사용하여 *E. coli*에서 성공적으로 발현되었다. 예를들어, Yang et al., *Appl. Environ. Microbiol.*, 64: 2869-2874, 1998을 보아라. *E. coli*, 열안정성 장독소(enterotoxin) II 단 서열은 세포질주변(periplasmic space)에 펩티드를 배향하는데 사용된다. 분비 후, 2개의 펩티드 사슬은 항원 결합특이성을 갖는 비-공유 2분자체(heterodimer)를 형성하는데 관련한다. bsAb은 당업계에서 알려진 표준 과정, 예를들어 포도상균(staphylococcal) 단백질 A 크로마토그래피를 사용하여 정제된다.

[0210] 또한, 기능적 bsAb 및 융합단백질은 형질전환 가축의 우유에서 생성될 수 있다. 예를들어, Colman, A., *Biochem. Soc. Symp.*, 63:141-147, 1998; 미국특허 제5,827,690호를 보아라. 상기에서 얻어진 bsAb 단편은 포유류 상피세포에서 우선적으로 발현된 프로모터 서열을 함유하는 발현 벡터로 클론화된다. 특별히 한정적이지 않지만, 구체적인 예로는 토끼, 소 및 양 카세인(casein) 유전자, 소 α-락토글로불린 유전자, 양 β-락토글로불린 및 쥐 유장(whey)산 단백질 유전자로부터의 프로모터를 포함한다. 바람직하게, 주입된 bsAb은 유전-특이적 유전자로부터 동종 계통 서열에 의해 3'측에 접합된다. 이는 폴리아데닐레이션(polyadenylation) 부위 및 전이-안정 서열을 제공한다. 발현 카세트는 수정된, 포유류 달걀의 전핵(pronuclei)으로 주입되고, 수용 암컷의 자궁속으로 넣어주고 임신하도록 놓아두었다. 출생 후, 자손을 Southern 분석으로 도입된 DNA의 존재를 스크린한다. 형질전환 암컷의 우유를 당업계에서 공지된 표준 면역 방법을 사용하여 bsAb의 존재 및 기능성을 분석한다. bsAb는 당업계에서 공지된 표준방법을 사용하여 우유로부터 정제될 수 있다. 우유에서 bsAb의 형질전환 생성은 대량의 bsAb을 얻기 위한 효율적인 방법이다.

[0211] 또한, 기능적 bsAb 및 융합단백질은 형질전환 식물(transgenic plant)에서 생성될 수 있다. 예를들어, Fiedler et al., *Biotech.*, 13:1090-1093, 1995; Fiedler et al., *Immunotechnology*, 3:205-216, 1997을 보아라. 상기 생성물은 저가, 대량 생산 및 안정하고 긴 시간 저장성을 포함한 여러 장점을 제공한다. 상기에서 얻어진 bsAb 단편은 프로모터 서열을 함유하고 신호 펩티드 서열을 인코딩하는 발현 벡터로 클론화되어 단백질을 소포체(endoplasmic reticulum)에 배향되도록 한다. 프로모터의 변종은 식물에 특정 위치에 발현 생성물을 배향하는 실천자로 사용될 수 있다. 예를들어, 담배식물에서 유비쿼터스(ubiquitous) 발현은 강한 꽃양배추모자이크바이러스(cauliflower mosaic virus) 35S프로모터를 사용하여 수행될 수 있으며, 장기특이(organ-specific) 발현은 종자 특이적 레구민(legumin) B4프로모터를 통해 수행된다. 발현 카세트는 당업계에서 잘 알려진 표준방법으로 형질전환된다. 형질전환은 Southern 분석으로 확인된다. 형질전환 식물은 당업계에서 잘 알려진 표준면역방법을

사용하여 bscAb의 존재 및 기능성을 분석한다. bscAb은 당업계에서 잘 알려진 표준방법을 사용하여 식물 조직으로부터 정제될 수 있다.

[0212] 게다가, 형질전환 식물은 bscAb 및 융합단백질의 긴 시간 저장을 촉진시킨다. 기능적으로 활성화 scFv 단백질은 상온에서 저장 1주일 후, 담배잎으로부터 추출되어진다. 유사하게, 상온에서 1년동안 저장된 형질전환 담배 종자는 scFv 단백질 및 항원 결합 활성의 손실이 없는 것으로 나타났다.

[0213] 또한, 기능적 bscAb 및 융합단백질은 곤충세포(insect cell)에서 생성될 수 있다. 예를들어, Mahiouz, et al., J. Immunol. Methods, 212:149-160(1998)을 보아라. 곤충계 발현시스템은 동종의 대량 및 적절하게 홀드된 bscAb를 생산하는 수단으로 제공한다. 바큇로바이러스(baculovirus)는 곤충세포에 발현백터로 널리 사용되며, 재조합 항체 분자로 성공적으로 적용되어 왔다. 예를들어, miller, L.K., Ann. Rev. Microbiol., 42:177(1988); Bei et al., J. Immunol. Methods, 186:245(1995)를 보아라. 선택적으로, 유도성 발현(inducible expression)시스템은 유도성 프로모터의 형질전환 조절하에서 bscAb 구조를 함유하는 안정한 곤충세포라인을 생성함으로써 사용될 수 있다. 예를들어, Mahiouz, et al., J. Immunol. Methods, 212:149-160(1998)을 보아라. 상기에서 얻어진 bscAb 단편은 Drosophila metallothionein 프로모터 및 인간 HLA-A2리더 서열을 함유하는 발현 백터로 클론화된다. 다음, 구조를 D. melanogaster SC-2 세포로 감염된다. 발현은 구리, 아연 또는 카드뮴의 상승량을 세포에 노출함으로써 유도된다. bscAb의 존재 및 기능성은 당업계에서 잘 알려진 표준 면역방법을 사용하여 결정된다. 정제된 bscAb은 당업계에서 잘 알려진 표준 방법을 사용하여 얻는다.

[0214] 전기에서 기재된 양특이성 다이어바디의 최대 용도는 진단성/검출성 또는 치료성 제제의 특이성 전달에 Immu31 양성 종양을 예비표적화하는 것이다. 상기 다이어바디는 원하는 위치에서 증가된 친화력 및 긴 머무름시간으로 표적화된 항원에 선택적으로 결합한다. 게다가, 비-항원 결합 다이어바디는 몸에서 빠르게 제거되며, 정상 조직의 노출이 최소화된다. 진단성/검출 및 치료성 제제는 동위원소, 약물, 독소, 사이토카인, 호르몬, 성장인자, 접합체, 방사성핵종 및 금속류를 포함할 수 있다. 예를들어, 가돌리늄 금속은 자기공명영상화(MRI)에 사용된다. 방사성핵종의 예로는 ²²⁵Ac, ¹⁸F, ⁶⁸Ga, ⁶⁷Ga, ⁹⁰Y, ⁸⁶Y, ¹¹¹In, ¹³¹I, ¹²⁵I, ^{99m}Tc, ^{94m}Tc, ¹⁸⁶Re, ¹⁸⁸Re, ¹⁷⁷Lu, ⁶²Cu, ⁶⁴Cu, ⁶⁷Cu, ²¹²Bi, ²¹³Bi, ³²P, ¹¹C, ¹³N, ¹⁵O, ⁷⁶Br, 및 ²¹¹At가 있다. 또한, 다른 방사성핵종은 진단성 및 치료성 제제로 사용되고, 60~4,000keV의 에너지 범위이다.

[0215] 최근에 양특이성을 갖는 4가 탠덤(tandem) 다이어바디(diabody)(tandab로 표기)가 기록되어 있다(Cochlovius et al., Cancer Research(2000)60:4336-4341). 양특이성 tandab은 2개의 상이한 특이성의 2개의 잠재적 결합부위의 형성을 증진하는 배향에서 연결된 2개의 상이한 항체(V_{H1}, V_{L1}, V_{H2}, V_{L2})의 4개 가변 도메인을 함유하는 2개의 동일한 폴리펩티드의 이합체이다.

[0216] **7. Immu31 면역접합체(immunoconjugate)**

[0217] 본 발명의 항-AFP 항체 또는 이의 단편, 또는 항체 융합단백질 또는 이의 단편은 하나이상의 치료성 및/또는 진단성/검출성 제제와 접합될 수 있다. 일반적으로, 하나의 치료성 또는 진단성/검출성 제제는 각각 항체 또는 항체 단편에 부착되고, 하나이상의 치료성 제제 또는 진단성 제제는 동일한 항체, 융합단백질 또는 이의 단편에 부착될 수 있다. 상기 치료성 또는 진단성/검출성 제제는 진단성/검출성 또는 치료성제제를 갖는 펩티드일 수 있다. 면역접합체는 항체 성분의 면역반응성을 보유하며, 즉 항체부분은 결합 전과 같이 후에 동족 항원을 결합하는 동일하거나 약간 감소된 능력을 갖는다.

[0218] 진단성/검출성 및 치료성 제제의 광범위한 종류는 본 발명의 항체, 융합단백질, 또는 이의 단편에 유리하게 접합될 수 있다. 바람직한 실시형태에서, 진단성/검출성 제제는 핵영상화의 방사성동위원소, 수술적 및 내시경 검출, 자기공명영상 또는 초음파검사서 사용되는 항상제, X-선 및 컴퓨터단층촬영(computed tomography)의 조영제, 및 내시경 형광투시법을 포함하여 형광투시법(fluoroscopy)의 형광화합물로 이루어진 군에서 선택된다. 항체에 접합되거나 예비표적화방법에서 양특이성으로 사용되는 형광 및 방사성 제제는 Goldenberg 미국특허 제 5,716,595호, 제6,096,289호 및 미국특허출원 제09/348,818호에 기재된 바와 같이, 감마-, 베타-, 및 양전자 방사체와 함께 약성종양과 같은 전염 조직 또는 세포의 클러스터와 관련된 표적화된 항원의 내시경적, 수술적, 또는 혈관내 검출에 특히 유용하다. 특별히 한정적이지 않지만, 양전자 방출단층촬영에 유용한 방사성핵종은 F-18, Mn-51, Mn-52m, Fe-52, Co-55, Cu-62, Cu-64, Ga-68, As-72, Br-75, Br-76, Rb-82m, Sr-83, Y-86, Zr-89, Tc-94m, In-110, I-120, 및 I-124을 포함한다.

[0219] 여기에서 기재된 치료성 제제는 상기에서 언급한 바와 같이 항체 자체와 개별적으로 처리하는데 유용한 제제이다. 예를들면, 치료성 제제는 빈카 알칼로이드(vinca alkaloid), 안트라사이클린(anthracycline), 에피도필로톡신(epidophyllotoxin), 탁산, 대사길항제(antimetabolite agent), 알킬화제제, 항생물질, COX-2 억제제, 유사분열억제제(antimitotic), 및 세포자가사멸제(apoptotic) 제제와 같은, 바람직하게는 독소루비신, 독소루비신 유사체, 메토포레사트(methotrexate), 탁솔, CPT-11, 캄프토테칸(camptothecin), 및 항암제제, 메틸 하이드라진 유도체, 안드레노코르티콜 억제제, 길항제, 엔도스타틴(endostatin), 탁솔과 같은 기타 분류들과 같은 화학요법 제제를 포함한다. 면역접합체 및 항체 용융단백질의 제조에 유용한 암 화학요법 제제는 질소머스타드, 알킬 설포네이트, 니트로소우레아(nitrosoureas), 트리아젠, 엽산 유사체, COX-2 억제제, 피리미딘 유사체, 퓨린 유사체, 백금 동등 복합체, 호르몬, 독소(예를들어, RNase, 슈도모나스 외독소)를 포함한다. 적절한 화학요법 제제는 REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 19th Ed. (Mack Publishing Co. 1995), 및 GOODMAN AND GILMAN'S THE PHARMACOLOGICAL BASIS OF THERAPEUTICS, 7th Ed. (MacMillan Publishing Co. 1985)에 기재되어 있으며, 이의 교정본도 마찬가지이다. 실험적 약물과 같은 기타 적절한 화학요법제제는 당업계에 공지되어 있다.

[0220] 또한, 슈도모나스 외독소(pseudomonas exotoxin)와 같은 독소는 본 발명의 Immu31 항체 또는 이의 단편의 면역접합체의 치료성 제제를 형성하도록 복합될 수 있다. 게다가, 독소는 상이한 치료성 제제에 접합된 자체 Immu31 항체 또는 이의 단편, Immu31 융합단백질 또는 이의 단편, 또는 Immu31 항체 또는 이의 단편과 조합하여 사용될 수 있다. 상기 접합체 또는 기타 융합단백질의 제조에 적절하게 도입되는 기타 독소는 리신, 아브린(abrin), 리보뉴클레아제(Rnase), DNase I, 스타필로코코스의 장독소(staphylococcal enterotoxin)-A, 미국자리공 항바이러스(pokeweed antiviral) 단백질, 겔로닌(gelonin), 디프테린(diphtherin) 독소, 슈도모나스 외독소, 슈도모나스 내독소를 함유한다. 예를 들어, Pastan et al., Cell 47 : 641 (1986), 및 Goldenberg, CA-A Cancer Journal for Clinicians 44 : 43 (1994)를 보라. 본 발명에서 사용에 적절한 추가적인 독소는 당업계에서 공지된 것이며, 전체적으로 예가 되는 미국특허 제 6,077,499호에 공개된다. 예를들어, 이들은 키메라 또는 재조합적으로 변형된 동물, 식물 및 미생물 원천으로부터 유도될 수 있다. 독소는 식물, 미생물, 또는 동물 독소 또는 이의 합성적 변이일 수 있다.

[0221] 사이토카인과 같은 면역조절제는 Immu31 면역접합체의 치료성 제제부분을 형성하도록 접합되거나 본 발명의 키메라, 인간화 또는 인간 항-AFP 항체, 융합단백질 또는 이의 단편에 접합되지 않도록 처리할 수 있다. 여기에서 사용된 "면역조절제"는 사이토카인, 줄기세포 성장인자, 종양괴사 인자와 같은 림포톡신, 및 인터루킨(IL-1, IL-2, IL-3, IL-6, IL-10, IL-12, 및 IL-18), 콜로니 자극인자(granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) 및 granulocyte macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF)), 인터페론(interferons)(인터페론- α , β , 및 γ), SI 인자로 제작된 줄기세포 성장인자, 적혈구생성촉진인자(erythropoietin) 및 혈소판증식인자와 같은 조혈성(hematopoietic) 인자들을 포함한다. 적절한 면역조절제 부분의 구체적인 예는 IL-2, IL-6, IL-10, IL-12, IL-18, 인터페론- γ , TNF- α 등을 포함한다. 선택적으로, 목적물은 Immu31 항체 또는 이의 단편, 또는 융합단백질 자체 또는 이의 단편을 받을 수 있으며, 자체 Immu31 항체, 또는 이의 단편, 또는 자체 Immu31 융합단백질 또는 이의 단편의 조절 후 또는 전에 처리될 수 있는 처리 사이토카인을 받을 수 있다. 또한, Immu31 항체 또는 이의 단편, 또는 융합단백질 또는 이의 단백질은 면역조절제에 접합될 수 있다. 또한, 면역조절제는 상이한 항원에 결합하는 하나 이상의 항체 또는 항체 단편으로 이루어진 이중(hybrid) 항체에 접합될 수 있다. 상기 항원은 면역조절제일 수 있다. 예를들면, CD40 또는 기타 면역조절제는 항체조합을 투여하기 전 또는 후에 Immu31 항체 또는 이의 단편과 조합으로 투여될 수 있다.

[0222] 게다가, Immu31 항체 또는 이의 단편, 또는 융합단백질 또는 이의 단편은 진단영상화에 유용한 γ -방출 방사성 핵종 또는 양전자 방사체로 이루어질 수 있다. 진단성/검출성 제제의 예로는 다양한 라벨, 방사성핵종, 킬레이터, 염료, 조영제, 형광화합물, 색원체(chromogen), 및 기타 마커부분을 포함한다. 양전자 방출단출촬영에 유용한 방사성핵종은 특별히 한정적이지 않지만, ^{18}F , ^{51}Mn , $^{52\text{m}}\text{Mn}$, ^{52}Fe , ^{55}Co , ^{62}Cu , ^{64}Cu , ^{68}Ga , ^{72}As , ^{75}Br , ^{76}Br , $^{82\text{m}}\text{Rb}$, ^{83}Sr , ^{86}Y , ^{89}Zr , $^{94\text{m}}\text{Tc}$, ^{110}In , ^{120}I , 및 ^{124}I 을 포함한다. 양전자-방출 방사성핵종에 유용한 전체 붕괴에너지는 바람직하게 <2000keV, 더 바람직하게는 1000keV 이하, 특히 더 바람직하게는 <700keV이다. 특별히 한정적이지 않지만, 감마선 검출을 이용하는 진단성 제제에 유용한 방사성핵종은 Cr-51, Co-57, Co-58, Fe-59, Cu-67, Ga-67, Se-75, Ru-97, Tc-99m, In-111, In-114m, I-123, I-125, I-131, Yb-169, Hg-197, 및 Tl-201을 포함한다. 유용한 감마선 방출 방사성핵종의 붕괴에너지는 바람직하게 20~2000keV, 더 바람직하게는 60~600keV, 특히 더 바람직하게는 100~300keV이다.

[0223] 게다가, 질병 조직을 치료하는데 적절한 방사선 핵종은 특별히 한정적이지 않지만, P-32, P-33, Sc-47, Fe-59, Cu-64, Cu-67, Se-75, As-77, Sr-89, Y-90, Mo-99, Rh-105, Pd-109, Ag-111, I-125, I-131, Pr-142, Pr-143, Pm-149, Sm-153, Tb-161, Ho-166, Er-169, Lu-177, Re-186, Re-188, Re-189, Ir-194, Au-198, Au-199, Pb-211, Pb-212, 및 Bi-213, Co-58, Ga-67, Br-80m, Tc-99m, Rh-103m, Pt-109, In-111, Sb-119, I-125, Ho-161, Os-189m, Ir-192, Dy-152, At-211, Bi-212, Ra-223, Rn-219, Po-215, Bi-211, Ac-225, Fr-221, At-217, Bi-213, 및 Fm-255을 포함한다.

[0224] 적절한 진단성 영상 동위원소는 20~2000keV의 범위이며, 적절한 치료성 방사성핵종은 20~10000keV의 범위이다. 예를들어, 전체적으로 예가 되고, 영상목적으로 ¹⁸F, ⁶⁸Ga, ^{94m}Tc과 같은 양전자 방출체를 공개한 U. S. Patent Application entitled "Labeling Targeting Agents with Gallium-68"-Inventors G. L. Griffiths and W. J. McBride, (U. S. Provisional Application No. 60/342,104)을 보라. 적절한 방사성핵종은 오제방사체(Auger emitter)이고, 바람직하게 1000keV미만의 에너지를 갖는다. 또한, 바람직하게 20~5000keV에너지를 갖는 방사체 이거나, 2000~10000keV 사이의 에너지를 갖는 방사체이다.

[0225] 치료성 또는 진단성/검출성 제제는 이황화물 결합 형성을 통하여 환원 항체 성분의 경첩부위(hinge region)에서 부착될 수 있다. 선택적으로, 펩티드는 N-숙시닐3-(2-피리딜디티오) 프로피오네이트(SPDP)과 같은 이중기능성(heterobifunctional) 가교기를 사용하여 항체 성분에 부착할 수 있다(Yu et al., Int.R Cancer 56 : 244 (1994)). 상기 접합의 일반적인 방법은 당업계에서 공지된 것이다. 예를들어, Wong, CHEMISTRY OF PROTEIN CONJUGATION AND CROSS-LINKING (CRC Press 1991); Upešlaciš et al., "Modification of Antibodies by Chemical Methods," in MONOCLONAL ANTIBODIES: PRINCIPLES AND APPLICATIONS, Birchet al. (eds.), pages 187-230 (Wiley-Liss, Inc. 1995); Price, "Production and Characterization of Synthetic Peptide-Derived Antibodies," in MONOCLONAL ANTIBODIES: PRODUCTION, ENGINEERING AND CLINICAL APPLICATION, Ritter et al (eds.), pages 60-84 (Cambridge University Press 1995)을 보라. 선택적으로, 치료성 또는 진단성 제제는 항체의 Fc 부위에서 탄수화물 부위를 통하여 접합될 수 있다. 탄수화물기는 티올기에 결합된 동일한 펩티드의 부하를 증가시키는데 사용될 수 있거나, 탄수화물 부분은 상이한 펩티드를 결합하는데 사용될 수 있다.

[0226] 항체 탄수화물 부분을 매개로 항체 성분에 단백질을 접합하는 방법은 당업자들에게 공지된 기술이다. 예를 들어, 전체적으로 예로 배합되는 Shih et al., Int. J. Cancer41 : 832 (1988); Shih et al., Int.R Cancer46 : 1101 (1990); and Shih et al., U. S. Patent No. 5,057, 313을 보라. 일반적인 방법은 하나이상의 자유 아민 기능을 갖고 다수의 펩티드로 부하되는 운반체 폴리머와 산화된 탄수화물 부분을 갖는 항체 성분을 반응하는 것을 포함한다. 상기 반응은 2차아민을 환원하여 최종 접합체를 형성함으로써 안정화될 수 있는 초기 쉬프 염기(이민) 연결의 결과한다.

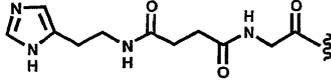
[0227] 그러나, Fc가 없다면(예를들어, 면역접합체의 항체성분으로 사용된 항체가 항체 단편일 경우), 진단성/검출성 또는 치료성 제제에 부착될 가능성이 있다. 탄수화물 부분은 전체길이 항체 또는 항체 단편의 경쇄 가변부위로 도입될 수 있다. 예를들어, 전체적으로 예로 되는 Leung et al., R Immunol. 154 : 5919 (1995); Hansen et al., U. S. Patent No. 5,443, 953 (1995), Leung et al., U. S. patent No. 6,254, 868를 보라. 변형된 탄수화물 부분은 치료성 또는 진단성 제제에 부착되어 사용된다.

[0228] **표적가능한 구조**

[0229] 표적화할 수 있는 구조는 별개의 구조일 수 있지만, bsAb 표적방법에 사용될 경우 면역반응을 알아내는 것을 피하는 것 뿐만 아니라, 생체내에서 신속히 제거되도록 선택된다. 소수성 제제는 강한 면역 반응을 이끌어내는데 최상인데 반하여, 친수성 제제는 생체내에서 신속한 제거에 바람직하며; 따라서 친수성 및 소수성 사이의 균형이 설립될 필요가 있다. 부분적으로 이는 많은 유기성 부분의 고유의 소수성을 상쇄하도록 친수성 킬레이팅 제제의 사용에 따라 수행된다. 또한, 표적화할 수 있는 구조의 서브유닛은 반대적 용액성질을 갖는 것으로 선택될 수 있으며, 예를들어 아미노산을 함유하는 펩티드는 약간은 소수성이고 약간은 친수성이다. 펩티드를 제외하고, 탄수화물이 사용될 수 있다.

[0230] 킬레이팅 제제와 같은 다른 부분에 결합된다면 2개의 아미노산 잔기를 갖는 펩티드가 사용될 수 있고, 바람직하게 2~10개 잔기이다. 링커는 바람직하게 50000달톤 미만의 분자량을 갖고, 유리하게 20000달톤, 10000달톤 또는 5000달톤 미만의 저분자량 접합체가어야한다. 예를들어, 공지된 펩티드는 DTPA-Tyr-Lys(DTPA)-OH(DTPA);

diethylenetriaminepentaacetic acid)은 분자의 인듐-DTPA 부분에 대하여 항체를 생성하는데 사용되어 왔다. 그러나, 비-인듐-함유 분자를 사용함으로써 적절한 스크리닝 단계에서 새로운 티로실-리신 디펩티드에 대한 Abs가 제조될 수 있다. 통상적으로, 항원 펩티드는 펩티드 DOTA-Phe-Lys(HSG)-Tyr-Lys(HSG)-NH₂(여기서 DOTA는 1,4,7,10-테트라아자사이클로도데칸테트라아세트산 및 HSG는 히스타민 숙시닐 글리실기이다)와 같은 4개 이상의 잔기를 갖고 있을 것이다.



- [0231]
- [0232] 펩타이드를 포함하고 있는 비금속은 면역원으로서 Phe-Lys-Tyr-Lys 주축에 대항하는 반응성을 스크린(screen)하는 반응물 Abs와 사용될 수 있다.
- [0233] 본 발명은 또한 최종 bsAb/결합자 시스템과 사용될 때 결합자 일부분을 인식하는 bsAb의 팔이 완벽하게 특이적이라는 것을 확보하기 위한 예를 들어 D-아미노산과 같은 자연적이지 않은 아미노산의 주축 구조로의 삽입을 의도한다. 본 발명은 나아가 비 자연적인 아미노산 및 펩타이드(peptoid)로부터 구조된 것들과 같은 다른 주축 구조체를 의도한다.
- [0234] 면역원으로 사용되는 펩타이드들은 편리하게 고체 상 지지와 반복적인 직각 디프로텍션(deprotection) 및 커플링(coupling)의 표준 기술을 사용하여 자동적인 펩타이드 합성기에서 합성된다. 후에 킬레이트 접합을 위해 사용되는 펩타이드의 자유 아미노 그룹은 이롭게는 아세틸 그룹과 같은 표준 보호 그룹으로 차단된다. 이러한 보호 그룹은 숙련된 기술자들에게 알려질 것이다. Greene and Wuts Protective Groups in Organic Synthesis, 1999 (Jhon Wiley and Sons, N.Y.)을 보라. 펩타이드가 bsAb 시스템에서 후에 사용될 것을 위해 준비될 때, 그것들은 생체조건 안에서 카르복실펩티데이즈 활성을 저해하기 위해 상응하는 C-말단 아미드를 유발하는 레진(resin)으로부터 절단된다.
- [0235] 면역원의 부착소는 예를 들어 화학적 부착소과 같은 면역성 인식 일부분을 포함한다. 화학적 부착소, 바람직하게는 HSG 부착소,의 이용은 항체에 대한 연결자의 강한 특이성을 나타낸다. 이것은 HSG 부착소에 일어나는 항체들이 알려져있고 쉽게 적절한 이종특이성 항체에 삽입될 수 있기 때문이다. 따라서, 부착된 부착소과 연결자의 결합은 항체 또는 항체 단편에 대한 높은 특이성을 가질 수 있다.
- [0236] *킬레이트 일부분들*
- [0237] 연결자 일부분의 친수성 킬레이트 일부분들의 존재는 생체내에서 빠른 제거를 확보하는데 도움이 된다. 친수성에 덧붙여, 킬레이터는 그들의 금속 결합성으로 선택되고, 최소한 그것들의 bsAb 에피토프(epitop)가 펩타이드의 부분 또는 비 킬레이트 화학적 부착소인 그 연결자에 대하여, 금속 킬레이트 복합체의 인식은 더 이상 화제가 되지 않기 때문에 마음대로 바뀐다.
- [0238] 형광성 분자와 같은 검출성 식별 또는 중 금속 또는 방사성핵종과 같은 세포독성 제제를 붙인 DTPA, DOTA, TETA 또는 NOTA 또는 적합한 펩타이드와 같은 킬레이터가 접합될 수 있다. 예를 들어, 치료상으로 유용한 면역접합체는 항체 융합단백질에 광활성 제제 또는 염료를 접합시킴으로써 얻어질 수 있다. 플로로크롬과 같은 형광 조성물 및 다른 색원체 또는 가시광선에 반응하는 포르피린과 같은 염료는 손상에 적합한 빛을 직접 쬐으로써 손상을 검출하고 치료하는데 사용되어왔다. 치료에 있어서, 이것은 광방사능, 광치료, 광활성 치료와 같은 말로 불려왔다(Jori et al.(eds.), PHOTODYNAMIC THERAPY OF TUMORS AND OTHER DISEASES (Libreia Progetto 1985); van den Bergh, Chem. Britain 22:430(1986)). 게다가 단일클론 항체는 광치료에 도달하기 위해 광활성된 염료에 짝지어져 왔다. Mew et al., J.Immunol. 130:1473(1983); idem, Cancer Res. 45:4380(1985); Oseroff et al.,Proc.Natl.Acad. Sci.USA 83:7844(1986); idem, Photochem.Photobiol. 46:83(1987); Hasan et al.,Prog. Clin.Biol.Res 288:471 (1989); Tatsuta et al., Lasers Surg.Med. 9:422(1989);Pelegri et al., Cancer 67:2529(1991). 그러나 이 선행 기술들은 내시경적인 치료 적용의 사용, 특히 항체 단편 또는 하위단편들의 사용을 포함하지 않고 있다. 따라서 본 발명은 광활성 제제 또는 염료를 포함하는 면역접합체의 치료상 사용을 의도한다. 특정하게 유용한 금속 킬레이터 조합은 방사성 영상 및 RAIT를 위해 ⁴⁷Sc, ⁵²Fe, ⁵⁵Co, ⁶⁷Ga, ⁶⁸Ga, ¹¹¹In, ⁸⁹Zr, ⁹⁰Y, ¹⁶¹Tb, ¹⁷⁷Lu, ²¹²Bi, ²¹³Bi 및 ²²⁵Ac와 사용되는 2-benzyl-DTPA 및 그것의 모노메틸 및 사이클로헥실 아날로그를 포함한다. 비 방사활성 금속과 복합되었을 때 Mn, Fe 및 Gd와 같은 동일한 킬레이터들은 본 발명의

bsAbs에 따라 사용될 때 MRI를 위해 사용될 수 있다. NOTA(1,4,7-triaza-cyclononane-N,N',','-triacetic acid), DOTA 및 TETA(p-bromoacetamido-benzyl-tetraethyaminetetraacetic acid)와 같은 매크로사이클릭 킬레이터들은 다양한 금속 및 방사성금속, 가장 특정한 것은 각각 Ga, Y 및 Cu와 사용된다.

[0239] 리간드(ligand)가 카르복실레이트 또는 아민 그룹과 같은 강염기 킬레이팅 기능을 포함하고 있는 DTPA 및DOTA-타입 킬레이터들은 강산 양이온, 특히 그룹 IIa 및 그룹 IIIa 금속 양이온의 킬레이트화에 가장 효과적이다. 이러한 금속 킬레이트 복합체는 관심있는 금속에 환 크기를 제한함으로써 매우 안정적으로 만들어질 수 있다. 매크로사이클릭 폴리에테르와 같은 다른 환 타입 킬레이터들은 RAIT를 위한 ²²³Ra와 같은 핵종과 안정적으로 결합하는 데 관심을 끈다. 포르피린 킬레이터들은 대량의 방사성금속과 사용될 수 있고 면역-광치료에 직접적 관련이 있는 bsAb를 위한 특정 차가운 금속 복합체로서 유용하다. 킬레이터의 한 타입 이상이 예를 들어 차가운 이온, 진단상 방사성핵종 및/또는 치료상 방사성핵종과 같은 다중 금속 이온과 결합하는 운반체에 접합될 수 있다. 특정하게 유용한 치료상 방사성 핵종은, 제한적이지는 않지만, ³²P, ³³P, ⁴⁷Sc, ⁶⁴Cu, ⁶⁷Cu, ⁶⁷Ga, ⁹⁰Y, ¹¹¹Ag, ¹¹¹In, ¹²⁵I, ¹³¹I, ¹⁴²Pr, ¹⁵³Sm, ¹⁶¹Tb, ¹⁶⁶Dy, ¹⁶⁶Ho, ¹⁷⁷Lu, ¹⁸⁶Re, ¹⁸⁸Re, ¹⁸⁹Re, ²¹²Pb, ²¹²Bi, ²¹³Bi, ²¹¹At, ²²³Ra 및 ²²⁵Ac를 포함한다. 특정하게 유용한 진단/검출 방사성 핵종은, 제한적이지는 않지만 ¹⁸F, ⁵²Fe, ⁶²Cu, ⁶⁴Cu, ⁶⁷Cu, ⁶⁷Ga, ⁶⁸Ga, ⁸⁶Y, ⁸⁹Zr, ^{94m}Tc, ⁹⁴Tc, ^{99m}Tc, ¹¹¹In, ¹²³I, ¹²⁴I, ¹²⁵I, ¹³¹I, ¹⁵⁴⁻¹⁵⁸Gd 및 ¹⁷⁵Lu를 포함한다.

[0240] 미국특허 제5,753,206호에 명시되어있는 것들과 같은 킬레이터들, 특히 티오세미-카르바조닐글리옥실시스템인 (Tscg-Cys) 및 티오세미카르바지닐-아세틸시스템인 (Tscs-Cys) 킬레이터들은 이롭게 Tc, Re, Bi 및 다른 전이 금속들의 약산 양이온, 약 염기 리간드, 특히 황- 또는 인-함유 리간드에 강하게 결합되는 란타나이드 및 액티나이드에 결합하는데 사용된다. 예를 들어 DTPA 또는 그것에 비슷한 킬레이터와 같은, 펩타이드에 대한 한 타입 이상의 킬레이터, In(III) 양이온 및 Tc 양이온에 대한 티올-함유 킬레이터, 예를 들어 Tscg-Cys를 결합하는 것은 유용할 수 있다. di-DTPA 부착소에 대한 항체는 알려져있고(Barbet '395, supra) bsAb를 형성하기 위해 항체를 표적화하기 위해 쉽게 짝지어지기 때문에 프로토콜(protocol)을 예비표적화하는데 있어 방사성동위원소를 표적하기 위해 방사성동위원소를 결합하기 위해 차가운 diDTPA 킬레이터 및 또다른 킬레이터와 펩타이드 부착소를 사용하는 것은 가능하다. 이러한 펩타이드의 한 예는 Ac-Lys(DTPA)-Tyr-Lys(DTPA)-Lys(Tscg-Cys)-NH₂이다. 이 펩타이드는 In(III)로 예비장착될 수 있고 그 뒤 ^{99m}Tc 양이온으로, 바람직하게 DTPA에 의하여 킬레이터되는 In(III) 및 바람직하게 티올-함유 Tscg-Cys에 결합된 Tc 양이온으로 표식화될 수 있다. NOTA, DOTA, TETA 및 기타 같은 종류의 것은 DTPA 그룹을 위해 치환될 수 있고 그것들에 특이적인 Mab는 항-di-DTPA-Mab를 유발하기 위해 사용되는 것들을 위한 아나로그적인 기술들을 사용하여 생산될 수 있다.

[0241] 양이온의 크기를 다르게 하는 것, 킬레이트 환의 구조 및 양이온의 바람직한 복합체 이온 구조때문에 서로 다른 두개의 강산 또는 약산 킬레이터들이 바람직하게는 서로 다른 강산 또는 약산 양이온들에 결합하기 위해 예를 들어 다른 킬레이트 환 크기로 연결자에 삽입될 수 있다. 이것은 서로 다른 두개의 금속들, 이 중 하나 또는 두개는 방사성활성이거나 MRI 증감을 위해 유용할 수 있다,을 예비표적화된 bsAb에 의해 최종 포획하기 위하여 연결자에 삽입되는 것을 허용할 것이다.

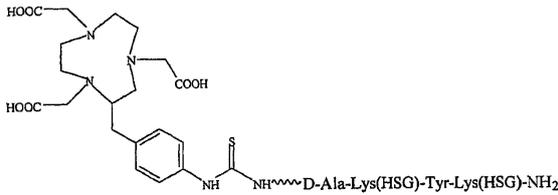
[0242] 바람직한 킬레이터는 NOTA, DOTA 및 Tscg 및 그것들의 조합을 포함한다. 이 킬레이터들은 하기 구조식에서 예시화된 것으로서 킬레이터-펩타이드 접합체 모티프에 합병되어왔다.

[0243] (a) DOTA-Phe-Lys(HSG)-D-Tyr-Lys(HSG)-NH₂;

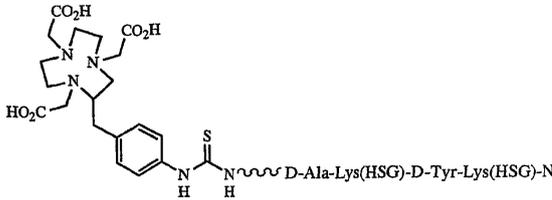
[0244] (b) DOTA-Phe-Lys(HSG)-Tyr-Lys(HSG)-NH₂;

[0245] (c) Ac-Lys(HSG)D-Tyr-Lys(HSG)-Lys(Tscg-Cys)-NH₂;

[0246] (d)



[0247] 및
 [0248] (e)



[0249]

[0250] 상기 킬레이터-펩타이드 접합체 (d) 및 (e)는 ⁶⁸Ga와 결합하는 것을 보여줘왔고 따라서 양전자 방출 단층촬영 (PET) 적용에서 유용하다.

[0251] 킬레이터들은 하기 실시되는 예에서 더 완전하게 논의되는 표준 화학을 사용하여 연결자 일부분에 짝지어진다. 간단하게, Ac-Lys(HSG)D-Tyr-Lys(HSG)-Lys(Tscg-Cys)-NH₂의 합성은 펩타이드 합성기에서 링크 아마이드 레진에 Aloc-Lys(Fmoc)-OH를 처음 붙이는 것에 의해 달성되었다. 보호 그룹의 약어 "Aloc" 및 "Fmoc"는 여기에서 그룹 알릴옥시카르보닐 및 플루오레닐메틸옥시 카르보닐을 언급하는 것으로 사용되었다. 그 후 Fmoc-Cys(Trt)-OH 및 TscG는 다음의 펩타이드를 형성하기 위하여 표준 Fmoc 자동 합성 프로토콜을 사용하여 라이신의 결 사슬에 더해 졌다; Aloc-Lys(Tscg-Cys(Tet))-rink resin. Aloc 그룹이 그 뒤 제거되었다. 펩타이드 합성은 그 후 다음 펩타이드를 만들기 위하여 합성기에서 계속적되었다; (Lys(Aloc)-D-Tyr-Lys(Aloc)-Lys(Tscg-Cys(Trt))-)-rink resin. N-말단 아실레이션을 따라 결 사슬 Aloc 보호 그룹의 제거. 결과 펩타이드는 그 뒤 카이저(Kaiser) 테스트를 사용하여 레진이 아민에 대하여 음성 테스트를 줄 때까지 활성화된 N-Trityl-HSG-OH로 처리된다. Karacay et al. Bioconjugate Chem, 11:842-854 (2000)을 보라. DOTA-Phe-Lys(HSG)-D-Tyr-Lys(HSG)-NH₂의 합성 뿐만 아니라 Ac-Lys(HSG)D-Tyr-Lys(HSG)-Lys(Tscg-Cys)-NH₂ 및 DOTA-Phe-Lys(HSG)-Tyr-Lys(HSG)-NH₂의 합성 또한 하기에서 더 자세하게 설명된다.

[0252] 금속 킬레이터의 제조

[0253] 킬레이터-펩타이드 접합체는 고체로 오랜 기간 동안 저장될 수 있다. 그들은 금속-결합 반응에 대한 단위량으로 측정되기도 하며 고체, 수용액 또는 반수용성 용액, 냉동된 용액 또는 냉동건조 준비로서 단위량으로 저장될 수 있다. 그들은 공지의 과정으로 식별될 수 있다. 전형적으로, 강산 양이온은 편리한 염의 용액으로서 주입되며 강산 킬레이터에 의해, 가능하게는 약산 킬레이터에 의해 흡유된다. 그러나, 약산 양이온의 후 첨가는 그 안에서 킬레이터될 수 있는 어떤 강산 양이온의 교체로 인해 약산 양이온에 의한 그것들의 결합을 유발할 수 있다. 예를 들어, 심지어 차가운 ¹¹¹InCl₃의 과도한 존재하에서, 주석 염소 및 Na^{99m}TcO₄와 원위치에서 유발된 99mTc(V) 글루코헵토네이트 또는 Na^{99m}TcO₄ 로 라벨링하는 것은 양적으로 약산 킬레이터에서 진행된다. ¹⁸⁶Re, ¹⁸⁸Re, ²¹³Bi과 같은 다른 약산 양이온 및 Mn, Co, Ni, Pb, Cu, Cd, Au, Fe, Ag(일가), Zn 및 Hg의 이가 또는 삼가 양이온, 특히 ⁶⁴Cu 및 ⁶⁷Cu 및 그와 같은 종류의 것들, 방사성면역진단 또는 방사성면역치료에 유용한 것들은 아날로그적인 방법에 의해 연결자 펩타이드에 장착될 수 있다. Re 양이온은 또한 페르헨네이트(perrhenate)로부터 원위치에서 유발될 수 있고 주석 이온 또는 예비환원된 레늄 글루코헵토네이트 또는 다른 전이킬레이터가 사

용될 수 있다. 페르네이트의 환원이 Tc의 환원에서 필요한 것보다도 더 많은 주석 이온(전형적으로 200 µg/mL 최종 농도 이상)을 필요도 하기 때문에 디설파이드-사이틀라이즈드 펩타이드의 존재와 같은 불안정한 디설파이드 결합을 환원시키지 않는 더 높은 단계의 주석이온을 확보하기 위한 부가적인 처리가 행해지는 거시 필요하다. 레늄의 방사성라벨링 동안에 비슷한 과정이 Tc-99m과 사용된 것과 같이 사용된다. Tscg-Cys-리간드의 ReO 금속 복합체의 제조하는 바람직한 방법은 $ReOCl_3(P(Ph_3)_2)$ 와 펩타이드를 반응으로 인하지만 또한 $ReO(atheylenediamine)_2$ 와 같은 다른 환원된 종을 사용하는 것도 가능하다.

[0254] **8. 치료 및 진단을 위한 인간화된, 키메라(chimeric) 및 인간 항체 이용**

[0255] 본 발명에서 의도되는 것은 치료 및 진단/검출 제제의 전달 방법, 및 치료 및 진단/검출 방법에서 뮤린(murin), 인간화된, 키메라 및 인간 항 P 항체 및 그것의 단편의 사용이다. 바람직하게는, 뮤린, 키메라, 인간화된 및 인간 항 AFP 항체 및 그것의 단편은 키메라, 인간화된 또는 인간 Immu31(Immu31) 항체이다.

[0256] 예를 들어, (i) 대상물에 항체 또는 그것의 단편, 항체, 융합 단백질 또는 그것의 단편을 투여하는 것; (ii) 대상물의 혈류에서 비결합 단백질의 양이 제거되는 충분한 시간을 기다리는 것; 및 (iii) 상기 항체의 결합 부위에 결합하는 진단/검출 제제, 치료 제제 또는 그것들의 조합을 대상물에 투여하는 것;을 포함하는 표적에 대한 진단/검출 제제, 치료 제제 또는 그것들의 조합을 전달하는 방법. 바람직하게는, 운반 분자는 항체의 하나 이상의 결합 부위에 결합한다.

[0257] 본 발명은 또한 대상물에서 악성 종양을 진단 또는 검출하는 방법을 의도한다. 진단/검출은 상기 항 AFP Mab 또는 그것의 단편 또는 융합 단백질 또는 그것의 단편이 적어도 하나의 진단/검출 제제에 결합되고 약학적으로 수용가능한 첨가제에서 제형화되고 상기 라벨을 검출하는, 항 AFP 단일 클론 항체 또는 그것의 단편 또는 융합단백질 또는 그것의 단편을 포함하는 진단/검출 면역결합체의 진단상으로 효과적인 양을 투여함으로써 달성될 수 있다. 바람직하게 항 AFP 항체, 융합 단백질 또는 그것의 단편은 Immu31 항체이다.

[0258] 관련된 정맥 내에서, 본 발명의 항 AFP Mab 또는 그것의 단편 또는 항체 융합 단백질 또는 어떤 한 항체의 그것의 단편, 융합 단백질, 또는 그것의 단편을 포함하는 조성과 함께 상기 대상물로부터의 표본에서 시험관 상의 진상 분석을 수행하는 것을 포함하는 대상물에서 종양을 진단하고 검출하는 방법은 또한 고려될 수 있다. 바람직하게 시험관 상의 진단 분석은 면역분석, RT-PCR 및 면역조직화학으로 이루어진 그룹으로부터 선택되어진다.

[0259] 여기에서 설명되는 방법에 있어서, 방사성 및 비 방사성 제제는 진단 제제로 사용될 수 있다. 적합한 비 방사성 진단 제제는 자기 공명 영상에 적합한 대조 제제, X 선 또는 컴퓨터 단층 촬영을 위한 방사성 불투과성 화합물 또는 초음파에 적합한 대조 제제이다. 자기 영상 제제는 본 발명의 항체에 따라 사용될 때 2-벤질-DTPA 및 그것의 모노메틸 및 사이클로헥실 아날로그를 포함하는 금속-킬레이트 조합과 복합된, 예를 들어, 망간, 철 및 가돌늄과 같은, 비 방사성 금속을 포함한다. 참고에 기재되어있는 2001년 10월 10에 등록된 미국 일련 번호 제 09/921,290호를 보라. 바람직한 실시예에서, 대조 제제는 초음파 증감 제제이다. 더 바람직하게는, 초음파 증감 제제는 리포솜이다. 방사능 불투과성 및 대조 물질은 X 선 및 컴퓨터 단층 촬영을 증감시키는 데 사용되고 이오딘 화합물, 바륨 화합물, 갈륨 화합물, 살리움 화합물, 기타 등등을 포함한다. 특이적 화합물은 바륨, 디아트 리조에이트, 에티오디아이드 오일, 갈륨 시트레이트, 이오카르믹산, 이오세타믹산, 이오다미드, 이오디파미드, 이오도사믹산, 이오글라미드, 이오헥솔, 이오파미들, 이오파노익산, 이오프로세믹산, 이오세파믹산, 이오세릭산, 이오설아미드 메글루민, 이오세메틱산, 이오타설, 이오테트릭산, 이오탈아믹산, 이오트록식산, 이오소트리조익산, 이포테이트, 메글루민, 메트리자미드, 메트리조에이트, 프로필오돈, 및 탈로스 클로라이드를 포함한다.

[0260] 또한 본 발명에서 설명되는 것은 악성 종양을 치료하기 위한 방법에 있어서 뮤린, 카리머릭, 인간화된 및 인간 항 AFP 항체 및 그것들의 조각의 사용이다. 때때로 난소 악성 종양이, 드물게는 위장 및 폐 암이 AFP를 생산할 수 있다. 바람직하게, 항 AFP 항체 및 그것들의 단편은 Immu31 항체 및 그것들의 단편이다. 방법은 적어도 하나의 항 AFP MAb 또는 그것의 단편 또는 융합 단백질 또는 그것의 단편이 본 발명의 어느 한 항체인, 적어도 두개의 MAb 또는 그것의 조각을 포함하고 약학적으로 수용가능한 첨가제내에서 제조된 치료상으로 효과적인 양의 항체 또는 그것의 단편 또는 항체 융합 단백질 또는 그것의 단편을 대상물에 투여하는 것을 포함한다. 다른 실시예에서, 두번째 MAb, 융합 단백질 또는 그것의 단편은 항 AFP 항체, 융합 단백질 또는 그것의 단편이 아니다.

[0261] 관련된 정맥 내에서, (i) 본 발명의 어느 한 항체, 융합 단백질 또는 그것의 단편의 노출된 또는 접합된 항 AFP

MAb 또는 그것의 단편 또는 항체 융합 단백질 또는 그것의 단편을 포함하는 치료상으로 효과가 있는 양의 조성물을 상기 대상물에 투여하는 것, (ii) 약학적으로 수용 가능한 첨가제 내에서 상기 항 AFP MAb 또는 그것의 단편 또는 항체 융합 단백질 또는 그것의 단편을 제조하는 것이 의도된다. 두번째 항체, 융합 단백질 또는 그것의 단편은 항 AFP 항체, 융합 단백질 또는 그것의 단편일 수도 있고 아닐 수도 있다. 또한 바람직하게는, 항 AFP 항체, 융합 단백질, 또는 그것의 단편은 Immu31 항체, 융합 단백질 또는 그것의 단편이다. 투여의 바람직한 양식은 비경구적이다. 또한 바람직하게는, 투약이 반복적으로 투여된다. 더 바람직하게는 항 AFP 항체가 투약 당 20 내지 2000 밀리그램의 투약량 내에서 투여된다.

[0262] 치료제의 조성물은 적어도 하나의 노출된 무린, 인간화된, 키메라 또는 인간 항 AFP 항체 또는 그것의 조각을 단독 또는 조합으로 다른 항 AFP 인간화된, 키메라 또는 인간 항체들과 같은 다른 항 AFP 항체 또는 그것의 항체 조각과 함께 포함한다. 바람직하게는 치료를 위한 조성물에서 항 AFP 항체, 융합 단백질 또는 그것의 조각은 투약 당 20 내지 2000 밀리그램의 투약량 내에서 투여된다. 또한 바람직하게는, 치료를 위한 조성물에서 항 AFP 항체 또는 그것의 조각은 Immu31 항체 또는 그것의 단편이다. 본 발명은 조합에서 또한 적어도 하나의 노출된 인간화된 키메라 또는 인간 항 AFP 항체 또는 그것의 단편과 항 AFP 항체가 아닌 다른 항체 또는 그것의 항체 단편과 함께, 이 다른 항체들이 적어도 하나의 진단/검출 또는 치료 제제와 비접합(노출된) 또는 접합되면서, 치료를 의도한다. 예를 들어, 조합 치료에 적합한 다른 항체는 제한적이지는 않지만 항체 CEA, EGP-1, EGP-2(예, 17-1A), MUC-1, MUC-2, MUC-3, MUC-4, PAM-4, KC4, TAG-72, EGFR, HER2/neu, BrE3, Le-Y, A3, Ep-CAM, Tn과 같은 악성 종양-관련 항체 및 그것의 조각, 톰슨-프리엔레이치(Tomson-Friedenreich) 항원, 종양 네크로시스 항원, 테나스신, 종양 유전자, 종양 유전자 산물, IL-6, IGF-1, IGFR-1, 엔도테리움 성장 인자(VEGF), 플라센탈 성장 인자(PIGF), ED-B 피브로넥틴 및 다른 바스쿨라 성장 인자와 같은 종양 안지오제네시스 항원, Ga 733, 페리틴 및 우선적인 간 악성 종양의 아시딕 이소페리틴(AIF) 또는 그것의 조합을 포함한다. 적합한 항체는 또한 종양 유전자 표시 또는 산물에 대하여 표적화된 것들 또는 안지오제네시스 인자와 같은 종양 마스클라쥬 표시에 대항하는 항체, VEGF 및 CD40에 대한 항원과 같은 특정 면역 반응 조절자에 대항하는 항체를 포함할 수 있다. 게다가, 치료는 적어도 하나의 인간화된, 키메라 또는 인간 항 AFP 면역 접합체 또는 그것의 조각을 단독으로 또는 조합해서 다른 항 AFP 인간화된, 키메라 또는 인간 항체와 같은 다른 항 AFP 항체 또는 그것의 항체 단편과 함께 영향 받을 수 있다. 바람직하게는 항 AFP 항체 또는 그것의 단편은 Immu31 항체 또는 그것의 단편이다. 더 바람직하게는, 치료를 위한 조성물은 적어도 하나의 인간화된, 키메라 또는 인간 항 AFP 면역접합체 또는 그것의 단편을 항 AFP 항체가 아닌 다른 항체 또는 그것의 항체 단편과 조합내에서 치료 제제에 노출되거나 접합된 상태로 포함할 수 있다.

[0263] 비슷하게 접합되고 노출된 항 AFP 인간화된, 키메라 또는 인간 항체 또는 그것의 단편은 단독으로 사용되거나, 접합되지 않은 상태로, 여기에 설명된 다양한 진단/검출 또는 치료제제와 함께 투여될 수 있다. 또한 같거나 혹은 다른 에피토프 또는 항원에 노출된 또는 접합된 항 AFP 항체는 또한 본 발명의 하나 이상의 항체와 조합될 수 있다. 바람직하게는, 항 AFP 항체 또는 그것의 단편은 이유 31 항체 또는 그것의 단편이다.

[0264] 따라서, 본 발명은 무린, 인간화된, 키메라 및 인간 Immu31 항체 및 그것의 단편을 단독으로, 노출된 항체로서, 또는 다중양식의 치료에 투여되는 투여를 의도한다. 본 발명의 다중양식의 치료는 나아가 다른 접합된 또는 접합되지 않은 항체, 융합 단백질 또는 그것의 단편의 투여로 보충되는 노출된 또는 접합된 항 AFP 항체와의 면역 치료를 포함한다. 예를 들어, 인간화된, 키메라 또는 인간 Immu31 항체는 다른 노출된 인간화된, 노출된 키메라 또는 노출된 인간 Immu31 항체나 동위원소, 하나 이상의 화학치료 제제, 사이토카인, 효소, 효소-저해자, 호르몬 또는 호르몬 안타고니스트, 금속, 독소, 또는 그것의 조합에 접합된 인간화된, 키메라 또는 인간 Immu31 항체와 같은 인간화된, 키메라 또는 인간 Immu31 항체와 조합될 수 있다. 무린, 인간화된, 키메라 또는 인간 Immu31 항체의 융합 단백질 및 독소는 또한 본 발명에서 사용될 수 있다. 많은 다른 항체 조합들은 노출된 항체로서나 부분적으로는 노출되고 치료 제제 또는 면역조절제와 부분적으로는 접합된 상태로, 드물게는 세포내 독성 약물 또는 방사성과 같은 또 다른 치료 제제와의 조합으로서 구성될 수 있다.

[0265] 치료를 위한 조성물은 적어도 하나의 무린, 인간화된, 키메라 또는 인간 만일클론 항 AFP 항체 또는 그것의 단편을 단독으로 또는 다른 노출 또는 접합된, 무린, 인간화된, 키메라, 또는 인간 항체 또는 그것의 단편과 같은 다른 항체 및 그것의 조각 또는 융합 단백질 또는 그것의 단편 또는 치료 제제와 조합하여 포함한다. 특정하게, 완전한 인간 항체와의 조합 치료는 또한 의도되고, 상기 4번째 세트로서 방법에 의해 생산된다.

[0266] 노출된 또는 접합된 항체, 융합 단백질 또는 그것의 단편은 또한 같거나 또는 다른 에피토프 또는 항원에 하나 이상의 항체, 융합 단백질 또는 그것의 단편과 조합될 수 있다. 예를 들어, 노출된, 무린, 인간화된, 키메라 또는 인간 Immu31 항체는 노출된 무린, 인간화된, 노출된 키메라 또는 노출된 인간 Immu31 항체와 조합될 수

있다; 무린, 인간화된, 키메라 또는 인간 노출된 Immu31 항체는 Immu31 면역접합체와 조합될 수 있다; 노출된 무린, 인간화된, 키메라, 인간 Immu31 항체는 다른 항체 방사성 접합체 또는 다른 노출된 항체와 조합될 수 있다; 무린, 인간화된, 키메라 또는 완전한 인간 Immu31 항체는 동위원소 또는 하나 이상의 화학치료 제제, 사이토카인, 독소, 효소, 효소 저해자, 호르몬, 호르몬 안타고니스트 또는 그것들의 조합에 접합된 무린, 인간화된, 키메라 또는 인간 Immu31 항체와 조합될 수 있다. 무린, 인간화된, 키메라 또는 인간 Immu31 항체의 용합 단백질 및 독소 또는 면역 조절자는 또한 본 발명에서 사용될 수 있다. 적어도 두개의 다른 항원을 표적화하는 것이 구성될 수 있는 많은 다른 항체 조합들은 노출된 항체로서 또는 부분적으로는 노출되고 부분적으로는 치료 제제 또는 면역조절제에 접합되어 또는 드물게는 세포내 독성 약물 또는 방사능과 같은 또 다른 치료 제제와 조합되어 사용될 수 있다.

[0267] 본 발명의 다중양식 치료는 나아가 접합된 또는 접합되지 않은 항체, 용합 단백질 또는 그것의 단편의 형태로 악성 종양에 관련된 항체의 투여로 보충되는 노출된 Immu31 항체 또는 그것의 단편의 면역치료를 포함한다. 바람직한 실시예에서, 다중 면역 치료를 위한 항체 또는 그것의 단편은 CEA, EGP-1, EGP-2(예, 17-1A), MUC-1, MUC-2, MUC-3, MUC-4, PAM-4, KC4, TAG-72, EGFR, HER2/neu, BrE3, Le-Y, A3, Ep-CAM, Tn에 대한 항체, 톰슨-프리에텐레이치(Tomson-Friedenreich) 항원, 종양 네크로시스 항원, 테나스신, 종양 유전자, 종양 유전자 산물, IL-6, IGF-1, IGFR-1, 엔도테리움 성장 인자(VEGF), 플라센탈 성장 인자 (PIGF), ED-B 피브로넥틴 및 다른 바스쿨라 성장 인자와 같은 종양 안지오제네시스 항원, Ga 733, 페리틴 및 우선적인 헤파틱 악성 종양의 아시딕 이소페리틴(AIF) 또는 그것의 조합을 포함한다. 이 항체는 이 항원적 결정소에 대한 적어도 하나의 에피토프를 인식하는 다클론, 단일클론, 키메라, 인간 또는 인간화된 항체 및 그것의 조각을 포함한다.

[0268] 다중양식 치료의 또 다른 형태에 있어서, 대상물은 노출된 항 AFP 항체 또는 그것의 단편, 및/또는 항 AFP 면역 접합체 또는 그것의 단편을 표준 암 화학치료와 접합으로 받는다. 바람직하게, 항 AFP 항체 및 그것의 단편은 Immu31 항체 또는 그것의 단편이다. 폴리닉산과의 조합에서 5-플로로우라실(5-fluorouracil)은 단독으로 또는 이리노테칸(CPT-11)과의 조합으로 결장 암을 치료하는데 사용되는 처방계획이다. 다른 적합한 조합 화학치료 처방계획은 단독 또는 이러한 다른 약물과의 조합으로 옥살리플라틴과 같은 당 분야에서 숙련된 기술자에게 잘 알려져 있다. 난소 암에 있어서, 쯤시타빈 및 세포내 독성 약물의 다른 더 최신 그룹 뿐만 아니라 어느 하나의 텍산 및 플라티넘 제제, 티오-TEPA 및 다른 알리레이팅 제제(예, 클로람부실)과 같은 다른 화학 치료 제제가 여전히 바람직할 수 있다. 바람직한 다중양식 치료에서, 화학치료 약물 및 사이토키네스 둘 다 본 발명에 따른 접합된 또는 접합되지 않은 항 ZFP 항체, 용합 단백질 또는 그것의 단편과 함께 투여된다(co-administered). 바람직하게, 항 AFP 항체 또는 그것의 단편은 Immu31 항체 또는 그것의 단편이다. 사이토카인, 화학치료 약물 및 항체, 용합 단백질 또는 그것의 단편은 어떤 순서로도 또는 함께 투여될 수 있다.

[0269] 본 발명은 또한 참고에 명시되어있는 미국 특허 제6,096,289호에서 설명된 바와 같이 외과수술중, 혈관내 및 내시경적인 종양 및 손상 검출, 생검법 및 치료에서 상기 설명된 연결자 일부분과 회합된 적어도 하나의 치료 또는 진단/검출 제제와 bsAb를 포함한다. 바람직하게, 이중특이성 항체는 AFP 항원, 더 바람직하게는 Immu31 에피토프와 결합하는 적어도 하나의 팔을 갖는다.

[0270] 본 발명의 항 AFP 항체, 용합 단백질 및 그것의 단편은 치료상 또는 영상 목적 뿐만 아니라 시험관 내에서 조사를 행하기 위한 수단으로 사용될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 bsAb는 만약 표적가능한 구조체가 하나 이상의 bsAb와 안정한 복합체를 형성할 수 있다면 아스세르타인(ascertain)에 시험관 내에서 사용될 수 있다. 이러한 분석은 bsAb와 안정한 복합체를 형성하는 표적가능한 구조체를 식별할 수 있는 숙련된 기술자를 도울 수 있다. 이것은, 차례로, 치료 및/또는 영상 제제로서 떨어날 것 같은 표적가능한 구조체를 식별하는 숙련된 기술자에게 허용된다. 바람직하게 항 AFP 항체, 용합 단백질 또는 그것의 단편은 Immu31 항체, 용합 단백질 또는 그것의 단편이다.

[0271] 분석은 이롭게는 bsAb의 적어도 2 몰의 등가와 질문에서 표적가능한 구조체를 결합함으로써 수행된다. 배양에 따라, 혼합물은 bsAb와 결합된 구조체인지 아닌지 결정하는 크기별배체크로마토그래피에 의해 분석된다. 대안적으로, 분석은 다양한 bsAb 용액이 표준 96-웰 플레이트에서 석출되는 표준 조합적인 방법을 이용하여 수행된다. 각 웰에서 표적 가능한 구조체의 용액이 더해진다. 배양과 분석에 따라 쉽게 bsAb에 가장 적합하게 결합하는 구조체를 결정할 수 있다.

[0272] 표적가능한 구조체에 bsAb를 첨가하는 순서는 중요하지 않다는 것이 이해되어야 한다; 그것은, bsAb가 구조체에 첨가될 수 있고 반대로도 가능하다. 이와 같이, bsAb 와 구조체 둘다 용액로서일 필요는 없다; 그것은, 그것들이 어느 쪽이든 가장 편한 쪽으로 용액의 형태 또는 순수한 형태로 첨가될 수 있다. 마지막으로, 결합을 위한

분석 방법은 결합이 정립하는 만큼 길게 중요하지 않다. 따라서 표준 분석 방법을 사용하는 결합을 위한 분석은 제한적이지는 않지만 크기별 배제 크로마토그래피와 접합에서 또는 장소에서 FABM, 하이-필드 NMR 또는 다른 적절한 방법을 포함한다.

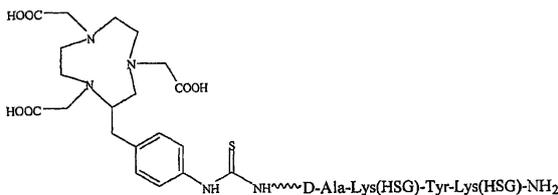
[0273] 이종특이성 항체 치료 및 진단

[0274] 본 발명은 표적화된 세포 표식에 특이적으로 결합하는 적어도 하나의 결합 부위 및 표적가능한 접합체에 특이적으로 결합하는 적어도 하나의 또 다른 결합 부위를 같은 이종특이성 항체 또는 항체 단편을 제공한다. 표적가능한 접합체는 이종 특이성 항체 또는 항체 단편의 적어도 하나의 결합 부위에 의해 인식되는 적어도 하나의 에피토프를 포함하거나 건디는 운반체 부분을 포함한다.

[0275] 예를 들어, (A) 상기 표적화된 조직에 특이적으로 결합하는 하나의 팔이 Immu31 항체인 표적화된 조직에 특이적으로 결합하는 적어도 하나의 팔 및 표적가능한 접합체에 특이적으로 결합하는 적어도 하나의 또 다른 팔을 갖는 이종특이성 항체 또는 항체 단편을 상기 대상물에 투여하는 것; (B) 선택적으로 제거 조성을 상기 대상물에 투여하는 것 및 순환에서 비-위치지정된 항체 또는 항체 단편을 제거하는 상기 조성을 허용하는 것; (C) 상기 대상물에 상기 이종특이성 항체 또는 항체 단편의 적어도 하나의 다른 팔에 의해 인식되는 적어도 하나의 에피토프를 포함하거나 건디는 운반 부분 및 하나 이상의 접합체 치료 또는 진단 제제를 포함하는 첫번째 표적가능한 접합체를 투여하는 것; 및 (D) 상기 치료 제제가 효소일때, 1) 상기 효소가 전구약물을 표적 부위에서 약물로 전환할 수 있을 때, 전구약물; 또는 2) 상기 효소가 상기 독성을 낮춘 중간체를 독성 형태로 재전환하고, 따라서, 표적 부위에서 상기 약물의 독성을 증가시킬 수 있을 때, 상기 대상물에서 낮은 독성의 중간체 형태로 독성이 낮아질 수 있는 약물; 또는 3) 상기 효소가 상기 독성을 낮춘 중간체를 독성 형태로 재전환하고, 따라서, 표적 부위에서 상기 약물의 독성을 증가시킬 수 있을 때, 낮은 독성의 중간체로 전환됨으로서 독성이 낮아지고 자연적인 과정을 통하여 상기 대상물에서 활성화되는 전구약물; 또는 4) 상기 효소가 상기 전구약물을 표적부위에서 전환할 수 있을 때, 상기 이종특이성 항체 또는 항체 단편의 상기 적어도 하나의 다른 팔에 의해 인식되는 적어도 하나의 에피토프를 포함하고 건디는 운반체 부분을 포함하는 두번째 표적가능한 접합체 및 전구약물; 나아가 상기 대상물에 투여하는 것;을 포함하는 대상물에서 질병 조직을 식별하거나 치료하는 방법이 설명된다. 상기 첫번째 표적가능한 접합체가 전구약물을 포함할 때 선택적으로 상기 이종특이성 항체 또는 항체 또는 항체 단편의 상기 적어도 하나의 다른 팔에 의해 인식될 수 있는 적어도 하나의 에피토프를 포함하거나 내성이 있는 운반체 부분을 포함하는 두 번째 표적가능한 접합체 및 상기 전구약물을 약물로 전환시키거나 상기 약물의 독성완화된 중간체를 독성이 있는 형태로 재전환시킬 수 있는 효소의 투여. 바람직하게는 표적가능한 접합체는 적어도 두개의 HSG 부착소를 포함한다.

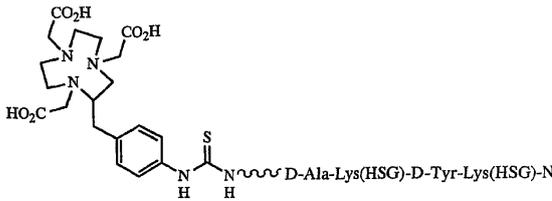
[0276] 관련된 정맥에 있어서, 포유류에서 AFP 발현 종양을 검출하고 치료하기 위한 방법이 설명된다. 이 방법은 (A) 표적화된 조직에 특이적으로 결합하는 상기 한 팔이 Immu31 항체 또는 그것의 조각인 표적화된 조직과 특이적으로 결합하는 적어도 하나의 팔 및 특이적으로 표적가능한 접합체에 결합하는 적어도 하나의 다른 팔을 포함하는 이종특이성 항체 또는 항체 단편의 효과적인 양의 투여; 및 (B) (i) DOTA-Phe-Lys(HSG)-D-Tyr-Lys(HSG)-NH₂; (ii) DOTA-Phe-Lys(HSG)-Tyr-Lys(HSG)-NH₂; (iii) Ac-Lys(HSG)D-Tyr-Lys(HSG)-Lys(Tscg-Cys)-NH₂;

[0277] (iv)



[0278] 및

[0279] (v)



[0280]

[0281] 로 구성되는 그룹으로부터 선택되어진 하나의 표적가능한 접합체의 투여;를 포함한다.

[0282] 선택적으로, 본 방법은 나아가 대상물에 제거 조성물을 투여하는 것을 포함하고 순환에서 위치지정되지 않은 항체 또는 항체 단편을 제거하는 조성물을 허용하는 것을 포함한다.

[0283] 본 발명의 이중특이성 항체 또는 그것의 단편은 예비표적화 방법에 유용하고 대상물에 두 치료 제제 또는 두 진단/검출 제제를 전달하는 바람직한 방법을 제공한다. 미국 일련번호 제09/382,186호에는 이중특이성 항체가 ¹²⁵I 로 표시되어있고 ^{99m}Tc로 표시된 이가의 펩타이드를 따라서 대상물에 전달되는 이중특이성 항체를 사용한 예비표적화 방법을 명시되어 있다. 전달은, 따라서 두 진단 방사성동위원소의 이용을 보여주는, ¹³¹I 및 ^{99m}Tc에 대한 탁월한 종양/정상 조직 비율을 야기한다. 알려진 치료 제제 또는 진단 제제의 어느 조합은 본 발명의 Immu31 항체, Immu31 융합단백질 및 그것의 단편을 표시하는데 사용될 수 있다. Immu31 면역접합체의 결합 특이성, 치료 제제 또는 진단 제제의 효율성 및 항체의 Fc 부분의 효과 활성은 접합체의 표준 테스트에 의해 결정될 수 있다.

[0284] 상기 논의된 연결자의 일부분과 회합하는 bsAb 및 치료 제제의 투여는 연결자의 일부분과 회합하는 치료 제제의 투여 얼마 전에 bsAb의 투여에 의해 실시될 수 있다. 시약의 투여량 및 투여시간은 숙련된 기술자에 의해 쉽게 정해될 수 있고 시약이 사용되는 특이적인 자연환경에 의존한다. 만약 bsAb-F(ab')₂ 유도체가 첫 번째로 주어진다면 연결자 일부분의 투여 전 24내지 72시간의 기다리는 시간이 적절하다. 만약 IgG-Fab' : bsAb 접합체가 우선적인 표적 벡터라면, 3 내지 10일의 범위내에서 연결자 일부분의 투여 전 더 긴 기다리는 시간이 정해진다.

[0285] bsAb가 질병 조직에 표적하는 충분한 시간이 지난 뒤에, 진단/검출 제제가 투여된다. 진단/검출 제제의 투여 후에 영상이 수행될 수 있다. 종양은 적절한 과량의 에너지가 전달되고 수집되는 다양한 구조를 보는 직접적이고 간접적인 수단에 의해 신체 강에서 검출될 수 있다. 어느 신체 부위의 손상도 이 구조들에 전달되고 다시 잡힐 수 있는 에너지나 방사능을 비이온화 하는 동안에 보여질 수 있다. 예를 들어 높은 해상도이고 비침습성이고 영상 기술인 PET는 인간 질병의 시각화를 위한 본 발명의 항체와 사용될 수 있다. PET에서 양전자 붕괴 동안 생산되는 511 keV 감마 포톤이 검출된다.

[0286] 연결자 일부분은 또한 신체의 독성완화 경로를 조절함으로써 표적 부위에서 전구약물을 활성화하거나 정상 치료의 효율성을 향상시킬 수 있는 효소와 접합될 수 있다. bsAb의 투여에 뒤따라 연결자 일부분과 접합된 효소, bsAb에 의해 인식되는 낮은 MH 부착소가 투여된다. 효소가 표적 부위에 예비표적화된 후에 표적 부위에서 활동하는 것으로 알려진 세포내 독성 약물이 주입된다. 약물은 포유류의 정상적인 독성완화 과정에 의해 독성이 완화되는 것 일 수 있다. 예를 들어, 약물은 간에서 잠재적으로 더 독성이 낮은 글루쿠로니드로 전환될 수 있다. 독성이 완화된 중간체는 그 뒤 표적 부위에서 예비표적화된 효소에 의해 더 독성이 있는 형태로 재전환될 수 있다. 대안적으로 투여된 전구약물은 예비표적화된 효소에 의해 활성이 있는 약물로 전환될 수 있다. 예비표적화된 효소는 독성완화된 약물을 재순환시킴으로써 치료의 효율을 향상시킨다. 이 접근은 어느 효소-약물 쌍과의 사용에 적용될 수 있다.

[0287] 신체의 독성완화 경로를 조절함으로써 표적 부위에서 전구약물을 활성화하거나 정상 치료의 효율성을 향상시킬 수 있는 효소는 대안적으로 부착소과 접합될 수 있다. 효소-부착소 접합체는 예비표적화 bsAb의 투여에 따라 대상물에 투여되고 표적 부위를 직접 향한다. 효소가 표적 부위에 위치 지정된 후에 표적 부위에서 활동하는 것으로 알려지거나 예비표적화된 효소에 의해 원 위치에서 약물로 전환되는 전구약물의 형태인 세포내 독성 약물이

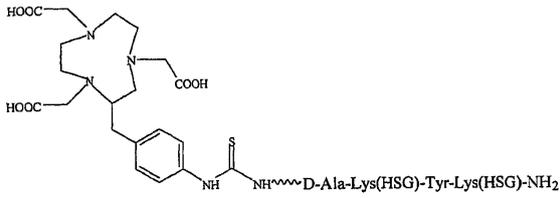
주입된다. 상기에서 논의된 바와 같이, 약물은 포유류의 정상적인 독성완화 과정에 의해 더 낮은 독성의 중간체, 가장 일반적으로는 글루쿠로니드,를 형성하는 독성완화된 것이다. 독성이 완화된 중간체, 예, 글루쿠리드, 는 예비표적화된 효소에 의해 더 독성이 있는 형태로 전환되고 따라서 표적 부위에서 세포내 독성을 증가시킨다. 이것은 약물의 재순환을 야기한다. 비슷하게, 투여된 전구약물은 정상적인 생물학적 과정을 통해서 활성 약물로 전환될 수 있다. 예비표적화된 효소는 독성이 완화된 약물의 재순환에 의해 치료의 효율성을 증가시킬 수 있다. 이 접근은 어느 효소-약물 쌍과의 사용에도 적용될 수 있다.

[0288] 본 발명은 나아가 붕소 중성자 포획 치료(BNCT) 프로토콜의 맥락에서 본 발명의 bsAb 및 진단 제제의 사용을 의도한다. BNCT는 종양에 위치지정된 ¹⁰B 원자의 중성자 방사에 의해 종양 세포에 이온화되는 방사능을 전달하도록 설계된 이중 시스템이다. BNCT는 동위원소적으로 ¹⁰B가 풍부한(19.8% 자연적인 풍부에서 존재) 안정적인 동위원소가 알파 입자 및 ⁷Li 핵을 생산하는 열 중성자와 함께 방사될 때 일어나는 핵 반응에 기초한다. 이 입자들은 높은 선 에너지 전이를 야기하는 약 한 세포 지름의 경로 길이를 가진다. 단지 이 핵반응에서 생산된 짧은 범위 1.7MeV 알파 입자의 소량이 세포 핵에 표적하고 그것을 파괴하는데 충분하다. 암의 BNCT와의 성공은 필수적으로 비 표적 기관을 붕소가 없는 상태로 남겨두는 동안 종양 부위에서 높은 농도의 ¹⁰B를 위치하게 하는 방법을 필요로 한다. BNCT를 위한 예비표적 bsAb를 사용하는 대상물에서 종양을 치료하기 위한 조성과 방법은 참고에 삽입되어 있는 미국 동시계속 특허 출원 제09/205,243호에 설명되어 있으며, 본 발명의 목적을 위해 쉽게 수정될 수 있다.

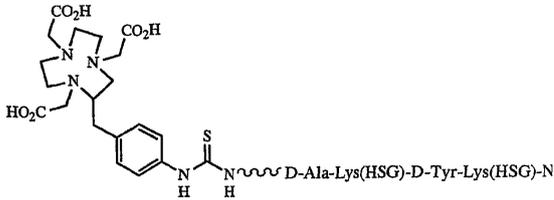
[0289] 제거 제제는 bsAb 및 연결자 일부분의 투약 사이에 주어지게 사용될 수 있다. 본 발명자들은 새로운 과정의 활동의 제거 제제, 즉 bsAb의 팔(들)을 표적화하는 질병에 대하여 표적화된 글리코실레이티드 항-이디오티픽(anti-Id) Fab 단편이 본 발명과 함께 사용될 수 있다는 것을 발견하였다. 예를 들어, 항-CsAp(Mu-9 Ab) x 항 펩타이드 bsAb가 주어지고 그것의 최고치의 확장을 위해 질병 표적에 부착하기 위해 허용된다. 잔여 bsAb를 제거하기 위해, 바람직하게는 글리코실레이티드 Fab 단편으로 Mu-9에 항-이디오티픽(anti-Id) Ab가 주어진다. 제거 제제는 그것의 덧붙여진 글리코실 잔여가 빠른 대사작용이 일어나는 간으로 전체 복합체를 직접 보내는 동안 일가 형태로 bsAb와 결합한다. 그 뒤 연결자 일부분과 회합된 치료가 대상물에 주어진다. bsAb의 Mu-9 팔의 anti-Id Ab는 높은 친화력을 갖고 제거 과정은 anti-Id Ab가 일가 일부분이기 때문에 교차-연결을 포함하지 않음으로서 다른 공개된 과정(Goodwin et al., ibid를 보라)과 다르다.

[0290] 여기서 의도된 것은 (A) 표적화된 조직과 특이적으로 결합하는 상기 한 팔이 Immu31 항체 또는 그것의 단편인 표적 부위에 특이적으로 결합하는 적어도 하나의 팔 및 표적 가능한 접합체에 특이적으로 결합하는 적어도 하나의 또 다른 팔을 갖는 이중특이성 항체 또는 항체 단편; (B) 상기 이중특이성 항체 또는 항체 단편의 적어도 하나의 다른 팔 및 하나 이상의 접합된 치료 또는 진단 제제에 의해 인식될 수 있는 적어도 하나의 에피토프를 포함하거나 내성을 갖는 운반체 부분을 포함하는 첫 번째 표적가능한 접합체; 및 (C) 선택적으로 위치하고 있지 않은 항체 및 항체 단편을 제거하기에 유용한 제거 조성물; 및 (D) 선택적으로 상기 첫 번째 표적가능한 접합체에 접합된 상기 치료 제제가 효소 일 때, 1) 상기 효소가 전구약물을 표적 부위에서 약물로 전환할 수 있을 때, 전구약물; 또는 2) 상기 효소가 상기 독성을 낮춘 중간체를 독성 형태로 재전환하고, 따라서, 표적 부위에서 상기 약물의 독성을 증가시킬 수 있을 때, 상기 대상물에서 낮은 독성의 중간체 형태로 독성이 낮아질 수 있는 약물; 또는 3) 상기 효소가 상기 독성을 낮춘 중간체를 독성 형태로 재전환하고, 따라서, 표적 부위에서 상기 약물의 독성을 증가시킬 수 있을 때, 낮은 독성의 중간체로 전환됨으로서 독성이 낮아지고 자연적인 과정을 통하여 상기 대상물에서 활성화되는 전구약물; 또는 4) 상기 효소가 상기 전구약물을 표적부위에서 전환할 수 있을 때,상기 이중특이성 항체 또는 항체 단편의 상기 적어도 하나의 다른 팔에 의해 인식되는 적어도 하나의 에피토프를 포함하고 견디는 운반체 부분을 포함하는 두번째 표적가능한 접합체;를 포함하는 대상물에서 질병 조직을 치료하거나 식별하는 것에 유용한 키트(kit)이다. 바람직하게, 표적가능한 접합체는 (i) DOTA-Phe-Lys(HSG)-D-Tyr-Lys(HSG)-NH₂; (ii) DOTA-Phe-Lys(HSG)-Tyr-Lys(HSG)-NH₂; (iii) Ac-Lys(HSG)-D-Tyr-Lys(HSG)-Lys(Tscg-Cys)-NH₂;

[0291] (iv)



[0292] 및
 [0293] (v)

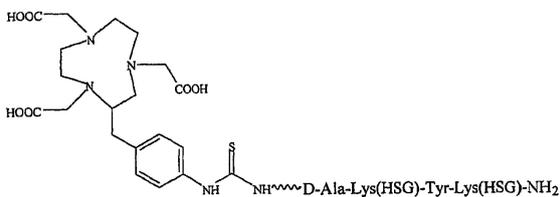


[0294]
 [0295] 로 구성된 그룹으로부터 선택되어진다.

[0296] (A)혼합물을 주기 위하여 상기 표적화된 조직에 특이적으로 결합하는 한 팔이 Immu31항체 또는 그것의 단편인 표적화된 조직에 특이적으로 결합하는 적어도 하나의 팔 및 상기 표적가능한 접합체에 특이적으로 결합하는 적어도 하나의 또 다른 팔을 갖는 이중특이성 항체 또는 항체 단편과 상기 표적가능한 구조체를 접촉시키는 것; 및 (B) 선택적으로 상기 혼합물을 배양하는 것; 및 (C) 상기 혼합물을 분석하는 것을 포함하는 표적가능한 접합체를 위한 스크린 방법이 또한 설명된다.

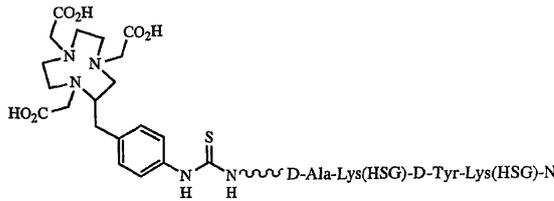
[0297] 본 발명은 나아가 AFP를 발현하는 포유류에서 악성 조직 및 세포를 이미징하는 방법; 대상물에서, AFP를 발현하는 질병 조직을 인식/노출시키는 방법; 대상물에서, AFP를 발현하는 질병 조직의 내시경적인 인식 방법 및 대상물에서 AFP를 발현하는 질병질환 혈관내 인식을 위한 방법을 제공한다. 이러한 방법들은 (A) AFP를 발현하는 표적화된 조직에 특이적으로 결합하는 적어도 하나의 팔 및 표적화된 조직에 특이적으로 결합하는 상기 한 팔이 Immu31 항체 또는 그것의 단편인 표적가능한 접합체에 특이적으로 결합하는 적어도 하나의 다른 팔을 포함하는 효과적인 양의 이중특이성 항체 또는 항체 단편의 투여; 및 (B) (i) DOTA-Phe-Lys(HSG)-D-Tyr-Lys(HSG)-NH₂; (ii) DOTA-Phe-Lys(HSG)-Tyr-Lys(HSG)-NH₂; (iii) Ac-Lys(HSG)-D-Tyr-Lys(HSG)-Lys(Tscg-Cys)-NH₂;

[0298] (iv)



[0299] 및

[0300] (v)



[0301]

[0302] 로 구성되는 그룹에서 선택된 하나의 표적가능한 접합체의 투여를 포함한다.

[0303] 또한 여기에서 고려된 것은 방법이 (A) 이중특이성 항체 또는 단편이 AFP 항원에 특이적으로 결합하는 첫번째 항체 결합 부위 및 부착소에 특이적으로 결합하는 두번째 항체 결합 부위를 갖는 것인 이중특이성 항체 F(ab)₂ 또는 F(ab')₂ 단편과의 이러한 과정을 겪는 대상에의 주입 및 표적 부위에 부착하기 위한 항체 단편의 허용; (B) 선택적으로는 만약 이중특이성 항체가 주입의 약 24시간 내의 순환으로부터 크게 제거되지않는다면 표적화되지 않은 항체 단편의 제거 및 표적 부위에서 빠르게 위치를 찾고 신장을 통해서 제거되는 이가 표시된 부착소의 주입; (C) 첫 번째 주입 후 48시간 내에 검출 수단과 표적 부위에서 부착된 표식의 높여진 단계의 교차-범위 검출에 의한 부착소의 존재 검출 및 상기 검출이 대조 제제 또는 제거 제제의 사용 없이 수행되는 상기상기 수행;을 포함하는 내시경적인, 복강경 검사법의, 혈관내 도뇨관의 또는 외과 수술과정 동안 손상의 검출 방법이다. 바람직하게는 부착소는 진단/검출 방사성동위원소, MRI 영상-증감 제제 또는 형광 표식으로 표시된다.

[0304] 관련된 정맥에 있어서, 방법이 (A) 대상물에게 비경구적으로 효과적인 양의 Immu31 면역접합체 또는 그것의 단편의 효과적인 양으로 이러한 과정을 주입하는 것, (B) 주입후 48시간 내에 과정을 수행하는 것; (C) 상기 표시된 항체 또는 그것의 단편의 존재를 검출하기 위하여 검출 수단으로 가까운 범위에서 대상물의 접근된 내부를 스캔하는 것; 및 (D) 검출 방법으로 이러한 부위에서 상기 표시된 항체 또는 그것의 단편의 높여진 단계를 검출함으로써 상기 표시된 항체 또는 그것의 단편의 부착의 부위를 위치지정하는 것;을 포함하는 수술중의, 혈관내의, 복강경의, 또는 내시경적인 과정동안에 교차-범위 손상 검출 방법이 또한 설명된다.

[0305] **9. 약학적으로 적합한 첨가제**

[0306] 대상물에 전달되는 뮤린, 인간화된, 키메라 및 인간 Immu31 MAb는 MAb 단독, 면역접합체, 융합단백질로 구성될 수 있거나 하나 이상의 약학적으로 적합한 첨가제, 하나 이상의 부가적인 구성물, 또는 이들의 어떤 조합을 포함할 수 있다.

[0307] 본 발명의 접합된 또는 접합되지 않은 항 AFP 항체 또는 그것의 단편 또는 융합단백질 및 그것의 단편은 약학적으로 유용한 조성물을 제조하는 종래의 방법에 따라 제형화될 수 있다. 바람직하게 항 AFP 항체 또는 그것의 단편은 Immu31 항체 또는 그것의 단편이다. 스테릴 파스페이스트-버퍼드 살린(sterile phosphate-buffered saline)은 약학적으로 적합한 첨가제 중 한 예이다. 다른 적합한 첨가제는 당 분야에서 잘 알려진 것들이다. 예를 들어, Ansel et al. PHARMACEUTICAL DOSAGE FORMS AND DRUG DELIVERY SYSTEMS, 5th Edition (Lea & Febiger 1990), Gennaro (ed.), REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 18th Edition (Mack Publishing Company 1990) 및 그것의 재발간된 편집본을 보라.

[0308] 본 발명의 접합된 또는 접합되지 않은 항 AFP 항체, 융합 단백질 또는 그것의 단편은 예를 들어 환약 주입 또는 연속적인 주입을 경유한 정맥내 투여를 위해 제형화될 수 있다. 바람직하게는 항 AFP 항체 또는 단편은 Immu31 항체 또는 그것의 단편이다. 주입을 위한 제형은 첨가된 방부제와 함께 예를 들어 앰플이나 다중-투약 운반체에서 단위 투약량 형태로 존재할 수 있다. 조성물은 유상 또는 수용액상 운반체(vehicle)에서 현탁액, 용액 또는 에멀전으로서 형태를 취할 수 있고, 현탁, 안정화 및/또는 분산 제제와 같은 제형 제제를 포함할 수 있다. 대안적으로 활성화된 구성물은 사용전에 예를 들어 스테릴 피로젠-프리 워터와 같은 적합한 운반체와 구성을 위한 분말 형태로 있을 수 있다.

[0309] 부가적인 약학적 방법은 치료 또는 진단/검출 면역접합체 또는 노출된 항체, 융합 단백질, 또는 그것의 단편의

활동의 내구성을 조절하기 위해서 사용될 수 있다. 조절 방출 준비는 면역접합체 또는 노출된 항체를 복합체로 만들거나 흡착하는 중합체의 사용을 통해서 준비된다. 예를 들어 생체 조직이나 기관과 잘 교합하는 중합체는 폴리(에틸렌-코-비닐 아세테이트)(poly(ethylene-co-vinyl acetate))의 매트릭스 및 스테아릭 산 2량체 및 세바식산의 다중수화물(polyanhydride) 공중합체의 매트릭스를 포함한다. Shewood et al., Bio/Technology 10:1446 (1996). 이러한 매트릭스로부터의 면역접합체 또는 항체의 방출 속도는 또는 접합체 또는 항체의 분자량, 면역접합체의 양, 매트릭스 사이의 항체 및 분산된 입자의 크기에 의존한다. Saltzman et al., Biophys. J. 55:163 (1989); Sherwood et al., supra. 다른 고체 투약 형태는 Ansel et al., PHARMACEUTICAL DOSAGE FORMS AND DRUG DELIVERY SYSTEMS, 5th Edition (Lea & Febiger 1990), Gennaro (ed.), REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 18th Edition (Mack Publishing Company 1990) 및 그것의 재발간된 편집본에 설명되어 있다.

[0310] 접합된 또는 접합되지 않은 항 AFP 항체, 용합 단백질 또는 그것의 단편은 또한 포유류에 피하에 또는 심지어 다른 비경구적인 경로로 투여될 수 있다. 게다가, 투여는 연속적인 주입 또는 단일 또는 다중 환약에 의할 수 있다. 일반적으로 인간을 위한 면역접합체 또는 노출된 항체, 용합 단백질 그것의 단편은 환자의 나이, 몸무게, 키, 성, 일반적인 치료 조건 및 개인적인 치료 역사와 같은 인자들에 다양하게 의존한다. 전형적으로 낮거나 높은 투여량 또한 순환 지시로서 투여될 수 있음에도 불구하고 단일 정맥주사 주입으로서 약 1mg/kg 내지 20 mg/kg 범위에서 면역접합체, 노출된 항체 용합 단백질, 노출된 항체 또는 그것의 단편이 수령인에게 제공되는 것이 바람직하다. 이 투여량은 예를 들어 4-10 주 동안 일주일에 한번, 바람직하게는 8주동안 일주일에 한번, 더 바람직하게는 4주동안 일주일에 한번과 같이 필요에 따라 반복될 수 있다. 그 것은 또한 몇 달동안 매 격주와 같이 덜 자주 주어질 수 있다. 투여량은 투여 및 계획의 적절한 판단과 함께 다양한 비경구적인 경로를 통해 주어질 수 있다.

[0311] 치료의 목적을 위해, 접합된 또는 접합되지 않은 항체, 용합 단백질 또는 그것의 단편은 치료상으로 효과적인 양 내에서 포유류에 투여된다. 바람직하게는 항 AFP 항체 또는 그것의 단편은 Immu31 항체 또는 그것의 단편이다. 본 발명의 적합한 대상물은 인간이 아닌 동물 대상물 또한 의도됨에도 불구하고 일반적으로 인간이다. 항체 준비는 만약 투여량이 생리학적으로 뚜렷하다면 "치료상으로 효과적인 양" 내에서 투여된다고 말해진다. 만약 그것의 존재가 수령 포유류의 생리기능에 검출될 만한 변화를 야기한다면 제제는 생리학적으로 뚜렷하다. 특정하게 본 발명의 항체 제조는 항 종양 반응을 야기하거나 자가면역 질병 잘세의 신호 및 증상을 완화시킨다면 생리학적으로 뚜렷한 것이다. 생리학적으로 뚜렷한 효과는 또한 수령 포유류에서 체액 및/또는 세포 면역 반응의 에보케이션(evocation)일 수 있다.

[0312] 10. 발현 벡터

[0313] 무린, 인간화된, 키메라 또는 인간 이뮤 31 MAb를 인코딩하는 DNA 서열은 핵산의 복제를 제공하는 다양한 알려진 숙주 벡터로 재조합적으로 공정될 수 있다. 이 벡터들은 알려진 방법을 사용하여 전달되는 곳으로 세포 안에서 핵산의 전사, 번역, 또는 둘 다를 직접하기 위하여 필요한 요소들을 포함하기 위해 설계될 수 있다. 알려진 방법론은 적절한 전사된/번역된 조절 시그널(signal)과 실시할 수 있게 연결된 단백질 코딩 서열을 갖는 발현 구조체를 야기하기 위해 사용될 수 있다. 이 방법들은 생체 내에서 재조합 DNA 기술 및 합성 기술을 포함한다. 예를 들어, Sambrook et al., 1989, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Laboratory (New York); Ausubel et al., 1997, CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons (New York)를 보라. 또한 본 발명에서 제공되는 것은 벡터와 회합되지 않은 폴리뉴클레오타이드의 전달이다.

[0314] 일시적인 발명에서 사용을 위해 적합한 벡터는 바이러스적 또는 비 바이러스적이다. 바이러스적인 벡터의 특정한 예는 아데노바이러스, AAV, 헤르페스 심플렉스 바이러스, 렌티바이러스 및 레트로바이러스 벡터를 포함한다. 비 바이러스적인 벡터의 예는 플라스미드이다. 바람직한 실시예에서 벡터는 플라스미드이다.

[0315] 여기서 설명된 바로서, 발현 벡터는 숙주 세포에서 발현하는 유전자를 포함하는 폴리뉴클레오타이드이다. 전형적으로 유전자 발현은 구성적인 또는 유도할 수 있는 프로모터, 조직-특이적인 조절 요소 및 인헨서를 포함하는 특정 조절 요소의 조절하에 위치한다. 이러한 유전자는 조절 요소에 "실시할 수 있게 연결"된다고 말해진다.

[0316] 바람직하게, 일시적인 발명의 표현 벡터는 중쇄와 경쇄의 가변 및 불변 부위를 둘다 포함하는 인간화된, 키메라 또는 인간 Immu31 MAbDNA 서열을 포함한다. 그러나, 두 발현 벡터가 중쇄의 가변 및 불변 부위를 포함하는 하나 및 경쇄의 가변 및 불변 부위를 포함하는 다른 것과 사용될 수 있다. 더 바람직하게는 발현 벡터는 나아가 프로

모터, 분비 시그널 펩타이드를 인코딩하는 DNA 서열, 인간 Ig 경쇄 또는 중쇄 지속적인 부위를 인코딩하는 유전자 서열, Ig 인헨서 요소와 적어도 하나의 선택 표지를 인코딩하는 DNA 서열을 포함한다.

실시예

[0324] 본 발명은 나아가 오직 설명을 제공하기 위한 하기 예들의 참고에 의해 설명된다. 본 발명은 여기서 제공된 것로부터의 증거인 모든 다양함을 포함하나 이 예들에 제한되지는 않는다.

[0325] **실시예 1. Immu31 중쇄 및 경쇄의 가변 부위를 위한 분자 클로닝 및 서열 명시**

[0326] Immu31의VH 및 Vk 유전자는 Orlandi et al.(PNAS 86:3833-3837(1989) and Leung et al.(Hybridoma 13:469-476(1994)에 설명된 RT-PCR에 의해 얻어졌다.

[0327] 전체 RNA는 Immu31 하이브리도마 세포로부터 준비되었고 RT-PCR은 Leung et al.(Hybridoma 13:469-476(1994)에 설명된 바로서 V 유전자를 분리하기 위해 수행되었다. 간단히 말해서, 첫 번째 가닥 cDNA는 랜덤 헥사머 프라이머 150ng으로 단련된 RNA 20 µg을 포함하는 60 µl 부피, 20mM Tris-HCl, pH 9.8, 15mM KCl, 2.5 mM MgCl₂, 5mM dNTP mix, 10mM DTT, 0.1 mg/ml BSA 및 600 단위의 수퍼스크립트 역 트랜스크립타제의 반응에서 수퍼스크립트 예비확대 시스템 (GIBCO/BRL)을 사용하여 전체 RNA로부터 역 전사되었다. 연장 단계는 42°C에서 50분 동안의 배양 후에 상온에서 10분동안 진행되도록 초기에 허용되었다. 반응은 90°C에서 5분동안 반응 혼합물을 가열함으로써 종결되었다. 그 후 주형으로서 첫번째 가닥 cDNA를 이용한 PCR 반응은 마우스 Ig VH 및 Vk 유전자를 확대하기 위해 수행되었다. Immu31의 Vk 서열은 프라이머 쌍 VK1BACK (Orlandi et al. PNAS 86:3833-3837(1989) CK3'-BH (Leung et al.(Leung et al.,1993))을 사용하여 확대되었다. 결과 PCR 생산물은 ~350 bp였다. VH 서열이 VH1BACK (Orlandi et al. PNAS 86:3833-3837(1989)) 및 ~500 bp의 PCR을 야기하는 뮤린 γ 사슬의 CH1 부위를 버리는 CH1-C(5'-AGCTGGGAAGGTGTGCAC-3')와 확대되는 동안. 양 Vk 및 VH PCR 단편은 pCR2.1 AT-클로닝 벡터 안으로 복제되었고 DNA 서열은 DNA 시퀀싱(Sanger et al.PNAS 74:5463-5467)에 의해 결정되었다.

[0328] 다중 클론 (각각에 대해 8)은 PCR 반응으로부터 야기된 가능한 오류들을 제거하기 위한 시퀀싱을 위해 선택되어졌다. 클론의 다수는 각각 Immu31VH 및 Immu31Vk로서 설계된 동일한 뮤린 Ig VH (6) 또는 Vk(7) 서열을 포함했다. 유전자에 의해 인코딩된 아미노산 서열은 추론되었고 또한 도 1에서 보여진다. 결합이 없는 변이는 서열 및 적절한 위치에서 위치되었던 인트라도메인 디설파이드 연결을 위한 시스템과 같은 중요한 잔여사이에서 식별되었다. 다른 마우스 Vk 서열과의 비교는 Immu31 VH가 마우스 Ig 경쇄 하위단계 IIA(Kabat et al.,1991)에 속하는 반면 Immu31 Vk는 카파 경쇄 하위단위 V라는 것을 나타냈다.

[0329] **실시예 2. 키메라 Immu31을 위한 발현 벡터의 건설**

[0330] 복제된 V 유전자 구획의 "확실성"을 평가하기 위하여, 추정되는 뮤린 Vk 및 VH가 인간 IgG 및 카파 지속 도메인을 포함하고 Sp2/0 세포에서 발현되는 키메라 Immu31(cImmu31)안으로 건설되었다. 발현 벡터를 야기하기 위한 Immu31Vk (도 1)의 서브클로닝을 용이하게 하기 위하여 DNA 서열이 프라이머 VK1BACK 및 VK1FOR (Orlandi et al. PNAS 86:3833-3837(1989))과 PCR 확대에 의해 Bgl II 제한 부위, AGATCT를 포함하는 3' 말단에서 수정되었다. 결과 PCR 생산물은 Pvu II 및 Bcl II와 소화되었고 pBR327-기초한 단계 벡터 (Pvu II 및 Bcl I와 소화되는), Ig 프로모터, 분비를 위한 시그널 펩타이드 서열 및 VkPCR 생산물(Leung et al.(Leung et al.,1994))의 구조내 리게이션을 용이하게 하기 위한 편리한 제한 부위를 포함하는 VKpBR로 강제 클론되었다. 비슷하게, hImmu31 VH(도 1B)의 336-346 위치에서 뉴클레오타이드의 서열은 프라이머 VH1BACK 및 VH1FOR (Orlandi et al.)와 PCR에 의해 BstE II 부위,GGTACC,에서 전환되었다. VHPCR 생산물은 그 뒤에 Ig 프로모터, 분비를 위한 시그널 펩타이드 서열 및 VH서열 구조내 리게이션을 위한 편리한 제한 부위를 포함하는 pBluescript-기초 단계 벡터인 VHpBR을 소화하는 Pvu II 및 Bcl II와 소화되었다. cImmu31에서 최종 V 서열은 DNA 시퀀싱에 의해 결정되는 cImmu31VH 및 Vk로서 설계되었고 도 2A 및 2B에서 보여진다.

[0331] cImmu31의 VH 및 Vk 서열을 포함하는 단편은 프로모터 및 시그널 펩타이드 서열과 함께 HindIII 및 BamHI과 이중 제한-소화에 의해 각각 단계 벡터, cImmu31VHpBS 및 cImmu31VKpBR,로부터 절개되어졌다. ca.850 bp VH 단편은 cImmu31 VH가 인간 γ1 지속 유전자(Leung et al.(Leung et al.,1994))의 유전적 서열에 연결되는 포유류 발현

벡터, pGlg,의 HindIII/BamHI 부위로 그 뒤 서브클론드 되었다. 비슷하게 ca.650 bp Vk 단편은 인간 k 지속 부위, Ig 인헨서, 및 트랜스펙턴트의 선택을 위한 표시로서의 하이그로마이신-저항 유전자(Leung et al.(Leung et al.,1994))의 유전적 서열을 옮기는 HindIII/BamHI 부위로 삽입되었다. 최종 발현 벡터는 각각 cImmu31pGlg 및 cImmu31pKh로서 설계되었다.

[0332] **실시예 3. 키메라 및 인간화된 Immu31의 트랜스펙션 및 발현**

[0333] 같은 과정이 Leung et al.(Hybridoma 13:469-476(1994))에 설명된 바와 같이 트랜스펙션에 의해 Sp2/0 세포에서 cImmu31 또는 hImmu31을 발현하기 위해 사용되었다. 예로서, cImmu31의 발현이 여기에 설명된다. 간단하게, 단선회된 cImmu31 및 cImmu31pGlg이 전기영동에 의해 Sp2/0 세포에 함께 트랜스펙트되었다. 트랜스펙트된 세포는 2일동안 96-웰 플레이트에서 키워졌고 그 후 최종농도가 500units/ml에서 하이그로마이신(hygromycin)의 첨가에 의해 모아졌다. 콜로니는 전기영동 후 10-14일에 나타나기 시작했다. 집합에서 살아있는 콜로니로부터의 상청액은 ELISA에 의해 마우스-인간 키메라 IgG의 존재를 위해 스크린되었다. 간단하게 살아있는 클론으로부터의 상청액 표본은 염소 항-인간 (GAH) IgG, F(ab')₂ 단편-특이성 항체 (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA)로 프리코트된 ELISA 마이크로틸터에 세배내에서 첨가되었다. 플레이트는 상온에서 1시간동안 배양되었다. 결합하지 않은 단백질은 세척 버퍼(0.05% 폴리소르베이트-20과 PBS)로 세번 세척됨으로서 제거되었다. 호르세라디시 페록시데이즈(HRP)-접합된 GAH IgG, Fc 단편-특이성 항체(Jackson ImmunoResearch)이 그 후에 웰로 첨가되었다. 1시간의 배양 후, 플레이트는 세척 버퍼로 여섯번 세척되었다. o-페닐렌디아민 디하이드로클로라이드(OPD)의 4mM 및 0.04% H₂O₂를 포함하는 기질 용액은 웰에 첨가되었다. 반응은 30분동안 어두운 곳에서 진행되는 것이 허용되었고 자동 ELISA 리더에 의해 490nm에서 흡착을 측정하기 전에 각 웰에 H₂SO₄ 용액을 첨가함으로써 중단되었다. 양성 세포 클론은 확대되었고 cImmu31은 단백질 A 컬럼에서 친화력 크로마토그래피에 의해 세포 배지 상청액으로부터 정제되었다. 경쟁 Ag-결합 분석은 키메라 및 무린 Immu31의 면역반응성을 비교하기 위해 수행되었다(실시예 4). 도 3에서 보여지듯이 cImmu31 및 무린 Immu31은 AFP 항원에 바이오티닐레이티드 무린 Immu31을 결합하기 위하여 똑같이 경쟁했다. 이 결과는 cImmu31의 면역반응성이 무린 Immu31의 것과 비교가능하고 따라서, 얻어진 Vk 및 VH 서열의 확실성을 확인을 증명하였다(도 1).

[0334] 비슷한 과정이 또한 실시예 5에서 설명된 바와 같이 또다른 발현 벡터, pdHL2와 사용되었다. 대략 30 μg의 hImmu31pdHL2이 SalI에 의한 소화에 의해 단선회되고 전기영동에 의해 Sp2/0 세포로 트랜스펙트되었다. 트랜스펙트된 세포는 96-웰 플레이트로 위치되었고 2일동안 회복되기가 허용되었다. 2일 후에, 최종농도 0.025 μM에서 MTX가 트랜스펙션을 선택하기 위한 배지에 첨가되었다. 2주내에 나타난 MTX-저항 클론 및 살아있는 집합의 콜로니로부터의 상청액은 상기에 설명된 바와 같이 엘라이자에 의해 인간 IgG 분비를 위해 모니터링되었다. 양성 세포 클론은 확대되었고 cImmu31은 단백질 A 컬럼에서 친화력 크로마토그래피에 의해 세포 배지 상청액으로부터 정제되었다.

[0335] **실시예 4. Ag-결합 활성 분석**

[0336] cImmu31 및 hImmu31의 Ag-결합 활성은 AFP로 덮여진 ELISA 마이크로플레이트 웰에서 ELISA로 결정되었다 (Scripps Research Institute, La Jolla, CA). 요약하면, 바이오티닐레이티드 무린 Immu31의 지속량은 시험 Abs(Immu31, cImmu31 또는 hImmu31)의 다양한 농도(0.01-100 μg/ml)와 혼합되었고 AFP가 덮여진 마이크로웰로 더해졌고 한 시간동안 상온에서 배양되었다. 세척후에, HRP 접합된 스트렙타비딘이 첨가되었고 상온에서 1시간 동안 배양되었다. AFP와 결합된 바이오티닐레이티드 Immu31에 결합된 HRP-접합된 스트렙타비딘의 양은 4mM OPD 및 0.04% H₂O₂를 포함하는 기질 용액의 첨가후에 ELISA 리더에서 490nm에서 OD를 읽음으로서 드러났다.

[0337] **실시예 5. hImmu31을 위한 인간 구조 및 서열 설계의 선택**

[0338] 카밧 데이터베이스(Sequences of Protein of Immunological Interest, Bethesda, MD : U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institute of Health, 1991)에서 무린 Immu31 V 부위 FR 서열을 인간 Ab와 비교함에 의해, 인간 REI 및 EU VH의 FR이 각각 Immu31 Vk 및 Immu31 VH의 것에 서열 상동성의 가장 높은 정도를 보이는 것이 찾아졌다(도 4). 한 예외는 NEWM VH의 것과 가장 높은 서열 상동성을 보였던 Immu31VH의 FR4이다(도 4A). 따라서 REI Vk(도 4B)의 FR 서열, EU VH의 FR1-3 및 NEWM VH의 FR4(도 4A)은 각각 Immu31의 CDR을 융합하기 위한 뼈대로서 선택되어졌다. Immu31의 추정되는 CDR의 측면에 있는

뮤린 FR에서 약간의 아미노산 잔여는 이 잔여들이 다른 FR잔여보다 Ag 결합에 더 많은 영향을 준다는 가정에 기초하여 hImmu31에서 유지되었다. 이 잔여들은 5Q, 27Y, 28A, 30T, 46Y, 48I, 66K, 67A 및 VH의 94R 및 4L, 39K, 48M, 49H, 58I, 69R, 100G 및 Vk의 107K이다. 게다가, LL2의 전 인간화의 결과에 기초하여(Leung et al. Mol. Immunol. 32:1413-1427(1995)), CDR 접촉의 잠재성을 갖고 결과 Ab의 면역반응성에 영향을 줄 수 있는 두 개의 차지드(charged) 잔여, Immu31 Vk의 FR2안의 39K 및 FR3안의 68R은 인간화된 FR 서열의 설계에서 유지되었다(도 4B). Ab의 결합 활성에 차지드 뮤린 잔여 39K 및 69R이 끼치는 영향을 평가하기 위하여 hImmu31VKT39 및 hImmu31VKT69, 인간화된 Vk의 두 대안적인 형태가 각각 상응하는 인간 잔여, 트레오닌과 잔여 39K나 69R을 치환함으로써 설계되었다(도 4C).

[0339] 도 3A는 인간 EU의 VH서열을 뮤린 및 인간화된 Immu31VH와 비교하고 3B는 인간 REI를 뮤린 및 인간화된 Immu31Vk와 비교한다. 점은 인간 VH 및 Vk 서열에서 상응하는 잔여에 동일한 Immu31 및 hImmu31에서 잔여를 가리킨다. 도 3C는 hImmu31Vk와 두 변형, hImmu31VkT69 및 hImmu31VKT39의 차이점을 보여준다. hImmu31VH 및 Vk의 DNA 와 아미노산 서열은 도 5A 및 5B에서 각각 보여진다.

[0340] **실시예 6. hImmu31의 발현 및 특성화**

[0341] Leung et al.(Leung et al.,1994)에 의해 설명된 전략은 긴 올리고뉴클레오타이드 합성 및 PCR의 조합을 사용하여 hImmu31을 위해 설계된 Vk 및 VH를 건설하기 위해 사용되었다. 각 가변 사슬은 각각 "A" 및 "B"로서 설계된 두 부분, a 5'- 및 3'-반쪽에서 건설되었다. 각 반쪽은 Taq 폴리머라아제를 사용하여 두 짧은 측면 프라미와 단일 사슬 합성 올리고뉴클레오타이드 주형의 PCR 확장에 의해 생산되었다. 확장된 골격은 Invitrogen(Carlsbad, CA)로부터 pCR2.1 TA 클로닝 벡터로 첫 번째 복제되었고 DNA 시퀀싱에 대상이 되었다. 주형과 프라이머 쌍은 하기와 같이 열거된다.

Template	Primers
hImmu31VHA	VHBACK/VHa
hImmu31VHB	VHb/VHFOR
hImmu31VKA	VKBACK/VKa
hImmu31VKB	VKb/VKFOR

hImmu31VH domain

[0342] [0343] hImmu31VH 도메인의 건설을 위하여, 두개의 긴 올리고뉴클레오타이드, hImmu31VHA (135-mer) 및 hImmu31VHB (151-mer)이 자동 DNA 합성기(Applied Biosystem)에서 합성되었다. nt 28 내지 nt 162의 상보적인 hImmu31VH 도메인의 뮤린 가닥 및 hImmu31VHB의 그것을 나타내는 긴 올리고 hImmu31VHA의 서열이 하기에 열거된 바와 같이 nt 181내지 331에 보완이었다.

hImmu31VHA (135 bp)

5'-GTAAGGATGA ATATATCCAA TCCAATACAG ACCCTGTCCA
GGTGCCTGCC TGACCCAGTG TATAACATAG CTAGTAAAAG
CGTAGCCAGA AGCCTTGCAG GAGACCTTCA CTGATGACCC
AGGTTTCTTG ACTTC-3'

hImmu31VHB (151 bp)

5'-CTTGGCCCCA GTAAGCAAAA GGGTCTCCCC CCCCAGATCT
TGCACAAAAA TAAATGCCG TGTCCTCAGA CCTCAGGCTG
CTCAGCTCCA TGTAGGCTGT ATTGGTGGAT TCGTCAGCTG
TTATTGTGGC CTTGCCTTTG AACTTTCAT T-3'

[0344]

[0345] hImmu31VHB가 VHB 및 VHFOR와 확장되는 동안 hImmu31VH는 프라이머 VHBACK 및 VHa의 쌍과의 PCR에 의해 확장되었다. 이 프라이머들의 서열은 하기에 열거된다.

VHBACK 5'-CAGCTGCAGC AATCAGGGGC TGAAGTCAAG
AAACCTG-3'

VHa 5'-GTACTTGGTA CCACCATTGT AAGGATGAAT
ATATCC-3'

VHb 5'-AATGGTGGTA CCAAGTACAA TGAGAAGTTC
AAAGGC-3'

VHFOR 5'-GGAGACGGTG ACCAGGGAGC CTTGGCCCCA
GTAAGC-3'

[0346]

[0347] 밑줄 친 서열은 각각 제한된 부위, PstI, KpnI, KpnI 및 BstEII를 나타냈다. 야기된 이중 나선 PCR 생산물, VHA 및 VHB는 각각 PstI/KpnI 및 KpnI/BstEII 소화되었고 젤 정제되었고 완전한 길이의 hImmu31VH 유전자를 형성하면서 중쇄 단계 벡터, VHpBS의 PstI/BstEII 부위로 모아졌다(도 5A). 인간화된 VH 서열은 pG1g 벡터로 서브클론되었고, 결과물 인간 IgG1 중쇄 발현 벡터는 hImmu31pG1pG1g로서 소화되었다.

[0348] hImmu31Vk 도메인

[0349] 비슷하게 hImmu31Vk 도메인의 건설을 위하여, 긴 올리고뉴클레오타이드, hImmu31VKA 및 hImmu31VKB이 hImmu31Vk 유전자의 건설을 위한 주형으로서 사용되었다. nt 23 내지 nt 135의 상보적인 hImmu31Vk 도메인의 무린 가닥 및 hImmu31VKB의 그것을 나타내는 긴 올리고 hImmu31VHA의 서열이 하기에 열거된 바와 같이 설계된 hImmu31Vk의 nt 155내지 306에 보완이었다(도 5B).

hImmu31VKA (113 bp)

5'-TTTAGGTGCT TTCCCTGGTT TCTGCTGGTA CCAACCTATA
TACTTGTTAA TGTCTTGGCT TGCCTTACAA GTGATAGTGA
CCCTATCTCC AACAGATGCG CTCAGAGATG ATG-3'

hImmu31VKB (152 bp)

5'-CTTGGTCCCT CCACCGAACG TCCACAGATC ATCATACTGT
AGACAATAAT ATGTTGCAAT GTCTTCTGGT TGAAGAGAGC

[0350]

TGATGGTGAA AGTATAATCT GTCCCAGATC CGCTGCCAGA
GAATCGCGAA GGGATACCTG GCAGTAATGC AG-3'

[0351]

[0352] hImmu31VKB가 VKb 및 VKFOR와 확장되는 동안 hImmu31VKA는 프라이머 VKBACK 및 VKa의 쌍과의 PCR에 의해 확장되었다. 이 프라이머들의 서열은 하기에 열거된다.

VKBACK 5'-GAC ATT CAG CTG ACC CAG TCT CCA TCA
TCT CTG AGC GC-3'

VKa 5'-A TGT GTA ATG CAT CAG CAG TTT AGG TGC TTT
CC-3'

VKb 5'-CTG CTG ATG CAT TAC ACA TCT GCA TTA CTG
CCA GG-3'

VKFOR 5'-GA CCG GCA GAT CTG CAG CTT GGT CCC
TCC AC-3'

[0353]

[0354]

VKBACK, VKa, VKb 및 VKFOR에서 밑줄 친 서열은 각각 제한된 부위, PvuII, NsiI, NsiI 및 BglII를 나타냈다. 야기된 이중 나선 PCR 생산물, VKa 및 VKb는 각각 PvuII/NsiI 및 NsiI/BglII와 소화되었고 젤 정제되었고 중쇄 단계 벡터, VKpBS의 PvuII/BclI 부위로 모아졌다. 최종적으로 인간화된 Vk 서열은 hImmu31pKh를 형성하며 경쇄 발현 벡터, pKh로 서브클론되었다.

[0355]

hImmu31VKT39 및 hImmu31VKT69는 비슷하게 건설되었고 이 두 변이를 위한 최종 발현 벡터는 각각 hImmu31T39pKh 및 hImmu31T69pKh 이었다.

[0356]

hImmu31을 위한 최종 발현 벡터

[0357]

Vk 및 VH 구조체의 가변 조합의 시험의 유용성을 제공할 수 있기 때문에 상기 설명된 두 발현 벡터 시스템, 예, pGlg 및 pKh,의 사용은 인간화의 초기 단계에서 바람직하다. 만약 개개의 경쇄 및 중쇄에서 남겨지는 어떤 결합이 있는 설계는 그들의 카리머릭 파트너와 인간화된 각 사슬을 혼합하고 짝지어보는 것으로서 체계적으로 식별되고 고쳐질 수 있다. 그러나 pGlg/pKh 시스템으로부터 유발된 트랜스펙트된 세포는 전형적으로 1mg/liter의 마지막 배지보다 더 적은 단계에서 항체를 생산한다. 높은 단계의 항체-생산 세포 라인을 유발하기 위해서는, 단일 발현 벡터, pdHL2가 hImmu31의 생산을 위해 바람직하다. pdHL2는 트랜스펙션의 선택 및 트랜스-유전자의 코-확장을 위한 표지자로서, 약한 SV40 프로모터에 의해 조절되는, 마우스 dhfr 유전자뿐만 아니라, IgH 인핸서 및 MT₁ 프로모터의 조절하에 인간 IgG 중쇄 및 경쇄 둘 다를 위한 발현 카세트를 포함한다(Gillies et al., J. Immunol. Methods 125:191 (1989); Losman et al., Cancer 80:2660 (1997)). pdHL2의 Vk 및 VH 구획을 교체함으로써 다른 키메라 또는 인간화된 Ab가 발현될 수 있다.

[0358]

hImmu31을 위한 pdHL2 발현 벡터를 건설하기 위하여, hImmu31VH 및 Vk 유전자 단편이 또 다른 단계 벡터, VHpBS2 및 VKpBR2 세트에 각각 서브클론되었다. VHpBS2는 VHpBS의 수정된 단계 벡터이고(Leung et al., Hybridoma, 13:469(1994)) XhoI 제한 부위로 번역 시작 코돈의 16 염기 상류에서 삽입되었다. 비슷하게, VKpBR2는 VKpBR의 수정된 단계 벡터이고(Leung et al., Hybridoma, 13:469(1994)) XbaI 제한 부위로 번역 시작 코돈의 14 염기 상류에서 삽입되었다. 최종 발현 벡터 hImmu31pdHL2는 pdHL2로 hImmu31Vk 및 VH의 XbaI-BamHI 및 XhoI/BamHI 단편을 각각 순차적으로 서브클로닝함으로써 건설되어졌다. 최종 발현 벡터는 hImmu31pdHL2로서 설계되었다.

[0359]

hImmu31을 위한 발현 및 결합 활성 분석

[0360]

hImmu31을 위한 트랜스펙션 방법, 양성 트랜스펙트된 클론의 스크리닝 및 결합 활성 분석은 cImmu31에 대한 설명과 동일하였다(실시예 3을 보라).

[0361]

인간화된 Ab, hImmu31, hImmu31T39 및 hImmu31T69의 세가지 형태는 카파 사슬 발현 벡터, hImmu31pKh, hImmu31T39pKh 또는 hImmu31T69pKh의 어느 것과 중쇄 발현 벡터의 코-트랜스펙션에 의하여 Sp2/0 세포내에서 발현되었다. 이 인간화된 Ab의 Ag-결합 활성은 같은 경쟁 결합 분석에 의해 평가되었다. hImmu31 및 hImmu31T69의 AFP 결합 친화력이 뮤린 Immu31 또는 cImmu31의 그것과 비슷한데 반해서, 비오틴-Immu31과 그것의 경쟁 비교로부터 판단하건데(도 6A), hImmu31은 뛰어난 무엇이 있었다(도 6B). 이 결과는 Immu31의 성공적인 인간화를 증명

하였고 Immu31의 면역활성을 유지하는데 R⁶⁹가 아니라 뮤린 카파 사슬 FR 잔여 K³⁹가 중요하다는 것을 나타내었다.

[0362] pKh 및 pG1g 발현 벡터 시스템을 사용한 트랜스펙트된 Sp2/0 세포로부터의 전형적인 Ab의 생산성은 치료 적용을 위한 많은 양의 Ab의 생산에 실제적으로 불충분한 리터 당 1 디지털(digit) 범위 밀리그램 내이다. hImmu31의 경우에 있어서, hImmu31pKh 및 hImmu31pG1g와 함께 코-트랜스펙트된 선택된 클론의 가장 높은 생산성이 2-3mg/L였다. hImmu31를 생산하기 위한 트랜스펙트된 세포의 능력을 향상하기 위하여 중쇄 및 카파 사슬 발현 카세트는 뮤린 dhfr 유전자를 포함하고 MTX 농도의 순차적인 증가와 함께 트랜스펙트된 유전자 생산물의 하위서열 확장이 허용되는 하나의 단일 발현 벡터, pdHL2 내로 재-건설되었다. 25nM MTX와 초기에 선택되고 hImmu31의 4, 15 및 8mg/L를 각각 생산하도록 정립된 세 hImmu31pdHL2 트랜스펙트된 클론, 314.2C11, 322.1G4 및 323.2H2는 Losman et al.(Cancer 80:2660(1997))에서 설명된 바와 같은 과정을 사용하여 확장되도록 대상이 되었다. 0.1에서 3μM로 점진적으로 증가하는 세포 배양 배지에서 MTX 농도에 따라, 이 세포들로부터의 hImmu31의 생산성은 동시적이고 최종적으로 최종 플러 보틀 배지에서 100mg/L를 초과하게 증가하였다(자료는 나타나있지 않음). hImmu31pdHL2-트랜스펙트된 세포로부터의 정제된 hImmu31는 그것의 뮤린 및 키메라 대응부의 그것으로서 상당한 면역활성을 보여주었다(도 6C).

[0363] **실시예 7. 간세포 암종을 가진 환자의 방사능표시되고 인간화된 항 AFP 단일클론 항체에 의한 치료**

[0364] 황달, 무기력, 체중의 감소 및 일반적인 약함을 보이는 57세의 남자는 컴퓨터 단층촬영에 의해 간의 우엽에서 지름이 약 6cm로 확장되고 또한 좌엽에서 3 cm 단일로서 보이는 수술이 불가능한 간세포 암종을 가지고 있는 것으로 진단된다. 그의 혈청 트랜스아미네이즈 및 빌리루빈 수준에서 40%의 증가 및 그의 LDH 수준에서 50% 증가와 함께 현재 시각에서 그의 혈청 AFP 단계는 150ng/mL로 측정된다. 우엽 손상부위는 AFP를 발현하는 간세포 암종인 생체검사에 의해 확인된다. 환자는 그 뒤 90-Y와 DOTA에 의해 접합된 인간화된 hImmu31 단일클론 항체의 두번의 순환이 주어지고 따라서 주입은 각 치료 당 25mCi 투여량(100mg 항체 단백질)으로 투여된다. 첫번째 치료는 외래 환자 설정에서 주어지고 그 후 6주 동안 반복된다. 각 치료에 앞서 종양 표적을 증명하고 종양 및 간, 신장 및 뼈 골수와 같은 다른 정상 조직에 전달되는 방사능의 양을 평가하기 위하여 항체에 DOTA에 의해 접합된 111-In의 진단 양이 또한 주입되고, 따라서 내성(예, 신장에 2000cGy)이 있다고 여겨지지 않는 정상 조직/기관 독성을 유도하지 않기 위하여 일주일 후에 주어지는 90-Y와 함께 치료 양이 조절될 수 있게 할 수 있다. 환자는 그 뒤 치료 후 4-8주 동안 매주 혈청 AFP, 빌리루빈, 트랜스아미네이즈 및 LDH 수준에 의해서 뿐만 아니라 반복되는 컴퓨터 단층촬영 스캔을 통해서 반응이 관찰되어야 한다. 90-Y로 표시된 항체의 두번째 치료 투여 후 9주에, 빌리루빈, 트랜스아미네이즈, LDH의 그의 혈청 수준이 약 정상보다 20% 위로 감소하고 그의 혈청 AFP 역가가 또한 향상을 구성하는 60ng/mL에서 측정된다. 그의 간 질병의 CT 측정은 좌엽 손상부위에서 거의 완벽하게 사라지고 우엽의 더 큰덩어리 중량의 40% 감소를 보여준다. 그 뒤 환자는 좌엽에 남은 작은 손상 부위가 암이 아니라 손상된 조직으로 여겨지기 때문에 우엽의 외과적인 절제를 위한 후보가 되었다. 이것은 더 나아가 좌엽이 아닌 우엽의 질량에서의 흡유를 보여주고 따라서 좌엽에서는 AFP 발현 질병이 없음을 나타내는 111-In-표시 Immu31 항체와 수행된 진단 연구에 의해서 확인된다.

[0365] 본 명세서에 언급된 모든 발행물, 특허 출원 및 특허는 참고에 명시되어 있다.

[0366] 특정한 바람직한 실시예를 언급하는 것을 보류했음에도 불구하고, 본 발명이 그것에 제한되지 않는다는 것이 이해될 것이다. 다양한 수정이 명시된 실시예에서 만들어질 수 있고 그러한 수정은 하기 청구항에 의해 정의되는 본 발명의 범위 내에서 의도된다는 것은 당분야에서 정상적인 기술에서 알려질 것이다.

도면의 간단한 설명

[0317] 도 1은 RT-PCR에 의해 클론된 뮤린 Immu31의 V_H 및 V_K 유전자 서열 및 추정된 아미노산 서열을 보여준다. 5'-말단에서 밀출된 부부는 클로닝에 사용한 PCR 프라이머 서열이다. 가변부의 서열만을 보여주는 것이므로, 3'-말단 PCR 프라이머 서열은 보이지 않는다. 도 1A는 Immu31 V_H의 DNA 및 아미노산 서열을 보여준다. 도 1B는 Immu31 V_K의 DNA 및 아미노산 서열을 보여준다. 대응하는 DNA 서열에 의해 인코딩되는 아미노산 서열은 뉴클레오타이드 서열 아래에 하나의 알파벳으로 표시되어 있다. 뉴클레오타이드 서열의 번호는 오른쪽 측면에 있다. CDR 영역의 아미노산 잔기는 굵게 밀출된 것이다. Kabat의 Ig 분자 번호는 상기 아미노산 잔기 번호에 의해 보여지는 아미노산 잔기를 위해 사용된다. 알파벳에 의해 번호화된 아미노산 잔기는 Kabat의 번호표에 의해 정의된 삽입 잔기이다. 상기 삽입 잔기는 선행된 잔기로서 동일한 앞의 숫자를 가진다. 예를 들면, 도 1A에 도시된

잔기 82, 82A, 82B 및 82C는 각각 82, A, B 및 C를 가리킨다.

- [0318] 도 2는 Sp2/0 세포에서 발현된 키메라 Immu31(cImmu31) 중쇄 및 경쇄 가변부의 DNA 및 아미노산 서열을 보여준다. 도 2A는 cImmu31 V_H의 DNA 및 아미노산 서열을 보여준다. 도 2B cImmu31 V_K의 DNA 및 아미노산 서열을 보여준다. 대응하는 DNA 서열에 의해 인코딩되는 아미노산 서열은 뉴클레오타이드 서열 아래에 하나의 알파벳으로 표시되어 있다. CDR 영역의 아미노산 잔기는 굵게 밑줄친 것이다. 뉴클레오타이드 서열의 번호는 오른쪽 측면에 있다. 아미노산의 번호는 상기 도 1과 동일하게 표시되어 있다. cImmu31의 구조체를 위해 사용되는 제한효소 부위는 박스로 표시되어 있다.
- [0319] 도 3은 cImmu31과 무린 Immu31의 결합 친화력을 비교하기 위하여 경쟁 세포 표면 결합 분석(competitive cell surface-binding assay)한 결과를 보여준다. 다양한 농도의 cImmu31(삼각형 선) 또는 mImmu31(마름모 선)를 바이오틴화(biotinylated) 무린 Immu31의 특정량과 혼합하고 AFP가 미리 도포된 96-웰 ELISA 플레이트의 웰에서 1시간동안 배양하였다. 세척 후, HRP-접합된 스트렙타비딘(streptavidin)을 첨가하고 상온에서 1시간동안 배양하였다. AFP-결합 바이오틴화된 Immu31에 결합된 HRP-접합된 스트렙타비딘의 양은 4mM 오르토-페닐렌디아민 디하이드로클로라이드(ortho-phenylenediamine dihydrochloride) 및 0.04% H₂O₂를 함유하는 기질 용액을 첨가한 다음 OD₄₉₀에서 판독하여 나타내었다. 상기 결과는 cImmu31 및 무린 Immu31이 방사성라벨된 Immu31이 AFP에 결합하는 것에 대하여 동등하게 경쟁함을 보여주었고, 클론된 V 유전자의 확인으로 확신할 수 있다.
- [0320] 도 4는 인간 항체, 쥐의 Immu31 및 hImmu31의 경쇄 및 중쇄 가변부의 아미노산 서열의 배열을 보여준다. 도 4A는 EU, NEWM, Immu31 및 hImmu31의 V_H 서열의 배열을 보여주고, 도 4B는 REI, Immu31 및 hImmu31의 V_K 서열의 배열을 보여준다. 점들은 인간 항체들에서 대응 잔기로 동정되는 Immu31 및 hImmu31 내의 잔기를 가리킨다. 대쉬(-)는 상기 배열을 조성하는 서열에 도입된 간격을 가리킨다. 박스 영역은 CDR 영역을 나타낸다. hImmu31의 N-말단 및 C-말단 잔기(밑줄친)는 모두 스테이징 벡터(staging vectors)를 사용하여 정착된다. Kabat의 Ig 분자 번호표는 상기 도 1A 및 도 1B에서 사용된 것이다. 도 4C는 hImmu31 V_K 및 변이체인 hImmu31 V_KT69 및 hImmu31V_KT39의 서열 배열을 보여준다. 점들은 hImmu31 V_K의 대응하는 잔기로 동정되는 hImmu31V_KT69 및 hImmu31 V_KT39 내의 잔기를 가리킨다.
- [0321] 도 5는 Sp2/0 세포에서 발현된 인간화된 Immu31(hImmu31) 중쇄 및 경쇄 가변부의 DNA 및 아미노산 서열을 보여준다. 도 5A는 hImmu31 V_H의 DNA 및 아미노산 서열을 보여주고, 도 5B는 hImmu31 V_K의 DNA 및 아미노산 서열을 보여준다. 대응하는 DNA 서열에 의해 인코딩되는 아미노산 서열은 하나의 알파벳 코드로 표시되어 있다. CDR 영역의 아미노산 잔기는 굵게 밑줄친 것이다. Kabat의 Ig 분자 번호표는 상기 도 1A 및 도 1B에서 사용된 것이다.
- [0322] 도 6은 hImmu31 및 두 개의 변이체인 hImmu31T39 및 hImmu31T69의 결합 친화력과 무린 및 키메라 Immu31의 결합 친화력을 비교하기 위하여 경쟁 세포 표면 결합 분석한 결과를 보여준다. 다양한 농도의 경쟁 항체(hImmu31, hImmu31T39, hImmu31T69, cImmu31, 또는 무린 Immu31)를 바이오틴화(biotinylated) 무린 Immu31의 특정량과 혼합하고 AFP가 미리 도포된 96-웰 ELISA 플레이트의 웰에서 1시간동안 배양하였다. 세척 후, HRP-접합된 스트렙타비딘(streptavidin)을 첨가하고 상온에서 1시간동안 배양하였다. AFP-결합 바이오틴화된 Immu31에 결합된 HRP-접합된 스트렙타비딘의 양은 4mM 오르토-페닐렌디아민 디하이드로클로라이드 및 0.04% H₂O₂를 함유하는 기질 용액을 첨가한 다음 OD₄₉₀에서 판독하여 나타내었다. 그래프 A는 hImmu31(삼각형) 및 hImmu31T69(십자 표시)와 cImmu31(사각형) 및 Immu31(마름모)의 결합 친화력을 비교한 것이다. 상기 결과는 hImmu31, cImmu31 및 Immu31이 AFP에 잘 결합하기 위하여 바이오틴-Immu31과 동등하게 경쟁하는 것을 보여주며, 이는 MAb Immu31의 결합 특이성 및 친화력이 인간화된 Immu31에서 유지됨을 나타낸다. 또한, AFP에 대한 hImmu31T69의 결합 친화력은 다른 Immu31 Abs와 필적할만 함을 보여주었다. 그래프 B는 hImmu31T39(삼각형)와 hImmu31(사각형) 및 Immu31(마름모)를 비교한 것이다. hImmu31T39의 결합 친화력은 현저하게 감소되었고, 이는 Ag 결합에서 전하를 가진 잔기 39K의 중요성을 나타낸다.
- [0323] 도 7은 키메라 Immu31을 가지는 pdHL2 벡터를 이용하는 hImmu31 발현의 결합 친화력을 비교하기 위한 경쟁 세포 표면 결합 분석 결과를 보여준다.

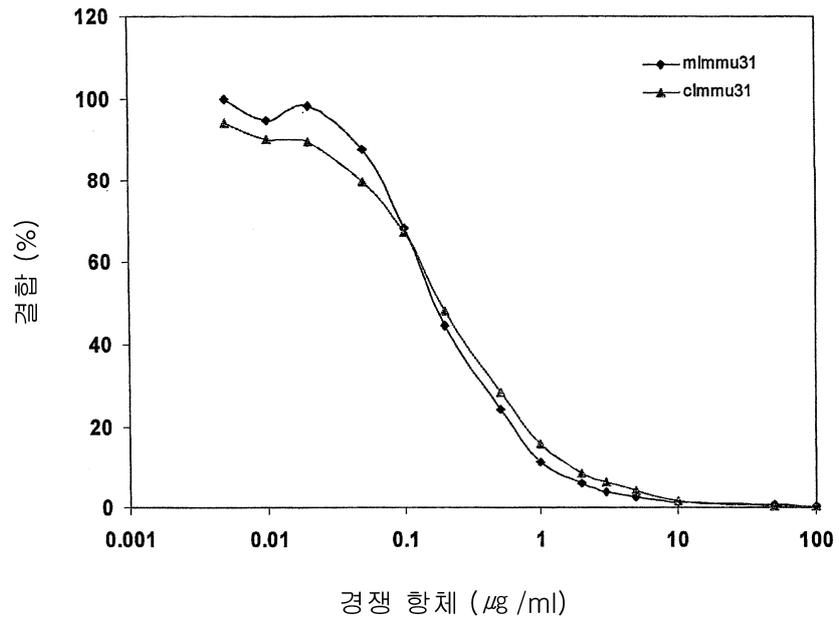
GTGAAGCTGCAGGAGTCAGGACCTGTGAACCTGGTAAAGCTGGGGCTTCAGTGAAGATGTCCCTGCAAGGCTTCTGGATACGCTTTCACCTAGC 90
 2 10 20 30
 V K L Q E S G P E L V K P G A S V K M S C K A S G Y A F T **S**
 TATGTTATACACTGGGTGAGGCAGAAAGCCTGGCGAGCCCTTTATTTGGATTGGATATATTCACTCCCTTACAAATGGTGGTACCACCAAGTACAAAT 180
 40 50 52 A 60
Y V I H W V R Q K P G Q G L Y W I G Y I H P Y N G G T K Y M
 CDR1 CDR2
 GAGAAGTTCAAAGGCAAGCCACACTGACTTCAGACAAATCCGTCCAGCACAACTTACATGGAGCTCAGCAGCCCTGACCTCTGAGGACTCT 270
 70 80 82 A B C
E K F K G K A T L T S D K S S T T Y M E L S S L T S E D S
 GCGGTCTATTACTGTGCAAGATCTGGGGGGGAGACCCCTTTTGGCTTACTGGGGCCCAAGGGACTTGGTCTCACTGTCTCTGCA 351
 90 100 A 110 113
 A V Y Y C A R **S G G G D P F A Y** W G Q G T L V T V S A
 CDR3

90 GACATTCAGCTGACCCAGTCTCCATCCTCCTCACCTGCTGCAATCTCTGGGAGGCAAAAGTCAACCATCACTTGCAGGCAAGCCCAAGACATTAAC
 10 20 30
 1 D I Q L T Q S P S S L S A S L G G K V T I T C K A S Q D I N
 20 30
 180 AAGTATATAGGTTGGTACCACCAACAAGCCTGGAAAAGGTCCTAGGCTACTCAGCAT TA CA ATCTGCAATTA CTGCCAGGCATCCCATCA
 40 50 60
K Y I G W Y Q H K P G K G P R L L M H Y T S A L L P G I P S
 CDR1
 270 AGGTTCAAGTGAAGTGGTCTGGGAGAGAGATTTTCCTTCAGCATCAGCAACCTGGAGCCCTGAGATATTGCAACTTATTATTGTCTACAG
 70 80 90
 R F S G S G S G R D Y S F S I S N L E P E D I A T Y Y C L Q
 321 TATGATGATCTGGACGTTCCGGTGGAGCCACCAAGCTGGAAATGAAAACGG
 94 96 100 108
Y D D L W T F G G G T K L E M K R
 CDR3

PstI
 CAGGTCACGCTGCAGGAGTCAAGACCTGAACTGGTAAAGCCCTGGGGCTTCAAGTGAAGATGTCCTGCAAGGCTTCTGGATACGGCTTCACT 90
 1 Q V Q L Q E S G P E L V K P G A S V K M S C K A S G Y A F T 30
 10
 20
 AGCTATGTTATACACTGGGTGAGGCAGAAGCCCTGGGCTTTATTTGGATTGGATATATTTCAATCCCTTACAAATGGTGGTACCAAGTAC 180
 40
 50 52 A
 S Y V I H W V R Q K P G Q G L Y W I G Y I H P Y N G G T K Y
 CDR1
 AATGAGAAGTTCAAAGGCCAAGCCACACTGACTTCAGACAAATCGTCCAGCACAACTTACATGGAGTCCAGCAGCCCTGACCTCTGAGGAC 240
 60 N E K F K G K A T L T S D K S S T T Y M E L S S L T S E D
 70 80 82 A B C
 BstEII
 TCTGCGGTCTATTTACTGTGCAAGATCTGGGGGGGAGACCCTTTTGTACTGGGGCCCAAGGGACCCACGGTCCACCGGTCTCTCA 333
 90 S A V Y Y C A R E G G G D P F A Y W G Q G T T V T V S S
 100 A 110 113
 CDR3

PvuII
 1 GACATCCTAGCTGACCAGTCTCCATCCCTCACTGTCTGCATCTCTGGGAGGCAAAAGTCACCCATCACTTCGCAAGGCCAAGCCAGACATTTAAC 90
 10 D I Q L T Q S P S L S A S L G G K V T I T C K A S Q D I N 30
 20
 AAGTATATAGGTTGGTACCACACAAGCCCTGGAAAGGTCCTAGGCTACTCATGCAATZACACATCTGCATTTACTGCCAGGCATCCCATCA 180
 40 K Y I G W Y Q H K P G K G P R L L M H Y T S A L L P G I P S 60
 CDR1
 AGGTTCAGTGGAAGTGGTCTGGGAGAGATTTATTCCTTCAGCATCAGCAACCTGGAGCCTGAAGATATTTGCAACTTATTTGTCACAG 90
 70 R F S G S G R D Y S F S I S N L E P E D I A T Y Y C L Q
 80
 BglII/BclI
 94 96 TATGATGATCTGTGGACGTTCCGTTGGAGGACCAAGCTGGAGATCAAACGA 336
 100 Y D D L W T F G G G T K L E I K R
 CDR3

도면3



EUVH PVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSRSALITWVRQA
 1 10 20 30 40
 Immu31VH -K·QE·P·LV·A·M·Y·T·SYV·E·K
 hImmu31VH Q·Q·Q·Y·A·T·SYV·E·

EUVH PGQGLEWVMGITVPMFGPPNYAQKFKGGRVTTITADESTNTAY
 50 52 A 60 70
 Immu31VH ·Y·I·Y·H·YN·GTK·NE·K·KA·L·S·K·SS·T·
 hImmu31VH ·Y·I·Y·H·YN·GTK·NE·K·KA·

EUVH MELSSLRSEDTAFYFCAGGYGIYS-PEFYNGGLVTVSS
 80 82 A B C 90 100 A 110 113
 Immu31VH ·T·S·V·Y·RSG·GDPFFAY
 hImmu31VH ·RSG·GDPFFAY

NEWMVH WGQGS�TVSS
 103 110 113
 Immu31VH ·T·A·
 hImmu31VH ·

1. hImmu31Vk DIQLTQSPSSLASVGDRTTTC**KASQDINKYIIG**WYQQKP 40
 hImmu31VkT69
 hImmu31VkT39T.

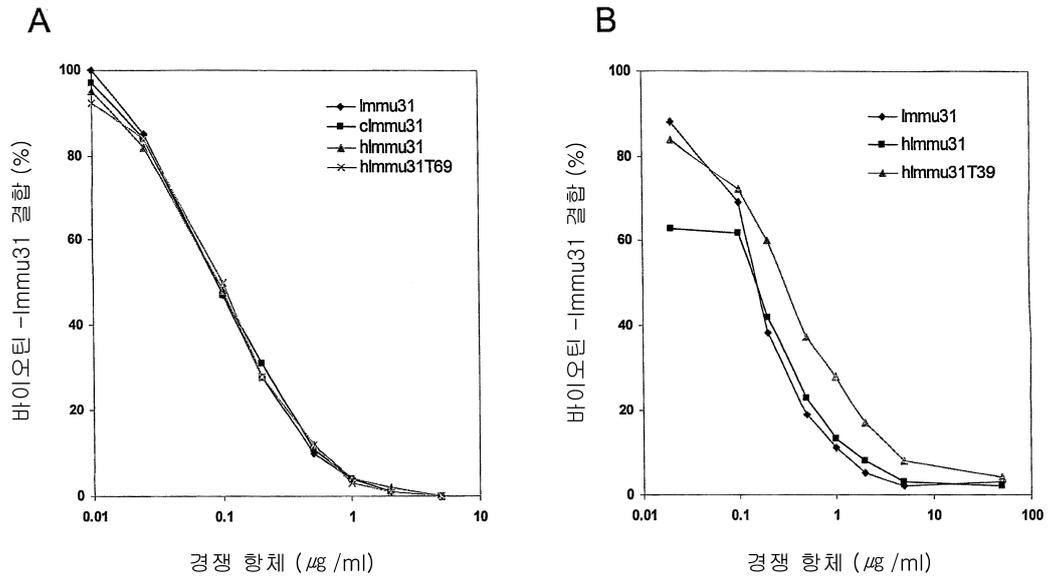
hImmu31Vk GKAPKLLMH**YTSALLP**GIPSRFSGSGRDTTFTISSLQP 80
 hImmu31VkT69T.
 hImmu31VkT39

hImmu31Vk EDIATYYC**LQYDDLWT**FGGGTKLQIKR 108
 hImmu31VkT69
 hImmu31VkT39

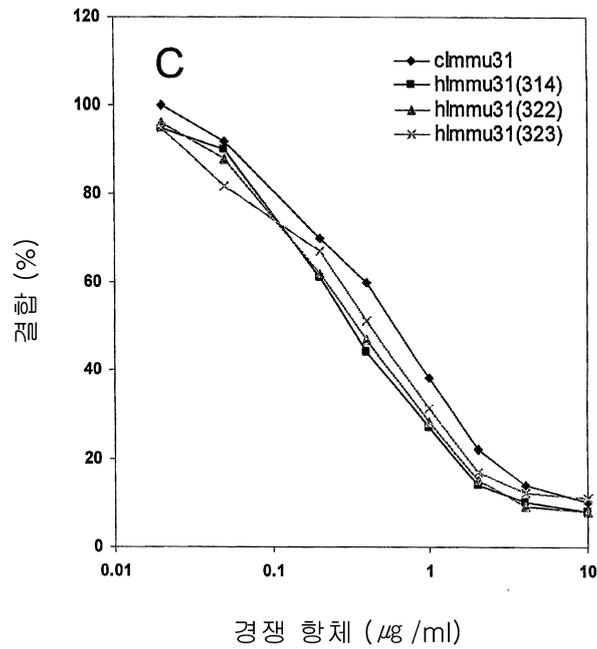
CAGGTCAGCTGCAGCAATCAGGGGCTGAAGTCAAGAAACCTGGGTCAACAGTGAAGGTCCTCTGCAAGGCTTCTGGCTACGGCTTTTACT 90
 10 20 30
 1 Q V Q L Q Q S G A E V K K P G S S V K V S C K A S G Y A F T
 AGCTATGTTATACACTGGGTCAGGCAGGCACCTGGACAGGGTCTGTATTGGATTGGATATATTCAATCCTTACAAATGGTGGTACCRAAGTAC 180
 40 50 52 A
S Y V I H W V R Q A P G Q G L Y W I G Y I H P Y N G G T K Y
 CDR1 CDR2
 AATGAGAAAGTTCAAAGGCAAGGCCACAATAACAGCTGACGAATCCACCAATACAGCCCTACATGGAGCTGAGCAGCCCTGAGGTCCTGAGGAC 270
 60 70 80 82 A B C
N E K F K G K A T I T A D E S T N T A Y M E L S S L R S E D
 ACGGCATTTTATTTTGTGCAAGATCTGGGGGGGAGACCCCTTTTGTCTACTTGGGGCCCAAGGCTCCCTGGTCAACCCGTCCTCTCA 354
 90 100 A 110 113
 T A F Y F C A R S G G G D P F A Y W G Q G S L V T V S S
 CDR3

GACATCCAGCTGACCCAGTCTCCCATCTCTGAGCGCATCTGTGGAGATAGGGTCACTATCACTTTGTAAGGCAAGCCAAGACATTAAAC 90
 1 10 20 30
 D I Q L T Q S P S L S A S V G D R V T I T C K A S Q D I M
 AAGTATATAGGTTGGTACCAGCAGAAAACAGGGAAGCACCTAAACTGCTGATGCAATTACACATCTGCCATTACTGCCAGGTATCCCTTCG 180
 40 50 60
K Y I G W Y Q Q K P G K A P K L L M H Y T S A L L P G I P S
 CDR1
 CGATTCTCTGGCAGCGGATCTGGGACAGATTATATACTTTCCACCATCAGCTCTCTTCAACCAGAAAGACATTTGCCAAACATATATTGTTCTACAG 270
 70 80 90
 R F S G S G T D Y T F T I S S L Q P E D I A T Y Y C L Q
 TATGATGATCTGTGGACCTTCGGTGGAGGGACCAAGCTGCAGATCAAACGA 321
 94 96 100
Y D D L W T F G G G T K L Q I K R
 CDR3

도면6



도면7



서열목록

- <110> IMMUNOMEDICS, INC.
- <120> ALPHA-FETOPROTEIN IMM31 ANTIBODIES AND FUSION PROTEINS AND METHODS OF USE THEREOF

<130> PCT-0501012

<140> PCT/GB03/03325

<141> 2003-08-01

<150> US 60/399,707

<151> 2002-08-01

<160> 52

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 351

<212> DNA

<213> Mus sp.

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(351)

<400> 1

gtg aag ctg cag gag tca gga cct gaa ctg gta aag cct ggg gct tca 48
 Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser
 1 5 10 15

gtg aag atg tcc tgc aag gct tct gga tac gct ttc act agc tat gtt 96
 Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Thr Ser Tyr Val
 20 25 30

ata cac tgg gtg agg cag aag cct ggg cag ggc ctt tat tgg att gga 144
 Ile His Trp Val Arg Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Tyr Trp Ile Gly
 35 40 45

tat att cat cct tac aat ggt ggt acc aag tac aat gag aag ttc aaa 192
 Tyr Ile His Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
 50 55 60

ggc aag gcc aca ctg act tca gac aaa tcg tcc agc aca acc tac atg 240
 Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ser Thr Thr Tyr Met
 65 70 75 80

gag ctc agc agc ctg acc tct gag gac tct gcg gtc tat tac tgt gca 288
 Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala

85 90 95

aga tct ggg ggg gga gac cct ttt gct tac tgg ggc caa ggg act ctg 336
 Arg Ser Gly Gly Gly Asp Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110

gtc act gtc tct gca 351
 Val Thr Val Ser Ala
 115

<210> 2
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Mus sp.

<400> 2
 Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser
 1 5 10 15

Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Thr Ser Tyr Val
 20 25 30

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

Tyr Ile His Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
 50 55 60

Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ser Thr Thr Tyr Met
 65 70 75 80

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

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

Val Thr Val Ser Ala
 115

<210> 3
 <211> 321
 <212> DNA

<213> Mus sp.

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(321)

<400> 3

gac att cag ctg acc cag tct cca tcc tca ctg tct gca tct ctg gga 48
 Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
 1 5 10 15

ggc aaa gtc acc atc act tgc aag gca agc caa gac att aac aag tat 96
 Gly Lys Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Lys Tyr
 20 25 30

ata ggt tgg tac caa cac aag cct gga aaa ggt cct agg cta ctc atg 144
 Ile Gly Trp Tyr Gln His Lys Pro Gly Lys Gly Pro Arg Leu Leu Met
 35 40 45

cat tac aca tct gca tta ctg cca ggc atc cca tca agg ttc agt gga 192
 His Tyr Thr Ser Ala Leu Leu Pro Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

agt ggg tct ggg aga gat tat tcc ttc agc atc agc aac ctg gag cct 240
 Ser Gly Ser Gly Arg Asp Tyr Ser Phe Ser Ile Ser Asn Leu Glu Pro
 65 70 75 80

gaa gat att gca act tat tat tgt cta cag tat gat gat ctg tgg acg 288
 Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Asp Leu Trp Thr
 85 90 95

ttc ggt gga ggc acc aag ctg gaa atg aaa cgg 321
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Met Lys Arg
 100 105

<210> 4

<211> 107

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 4

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
 1 5 10 15

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

Ile Gly Trp Tyr Gln His Lys Pro Gly Lys Gly Pro Arg Leu Leu Met
 35 40 45

His Tyr Thr Ser Ala Leu Leu Pro Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Arg Asp Tyr Ser Phe Ser Ile Ser Asn Leu Glu Pro
 65 70 75 80

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

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Met Lys Arg
 100 105

<210> 5
 <211> 354
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: cImmu31 nucleotide sequence

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(354)

<400> 5
 cag gtc cag ctg cag gag tca gga cct gaa ctg gta aag cct ggg gct 48
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

tca gtg aag atg tcc tgc aag gct tct gga tac gct ttc act cag gtc 96
 Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Thr Gln Val
 20 25 30

cag ctg cag gag tca gga cct gaa ctg gta aag cct ggg gct tca gtg 144
 Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val
 35 40 45

aag atg tcc tgc aag gct tct gga tac gct ttc act aat gag aag ttc 192
 Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Thr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

aaa ggc aag gcc aca ctg act tca gac aaa tcg tcc agc aca acc tac 240
 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ser Thr Thr Tyr
 65 70 75 80

atg gag ctc agc agc ctg acc tct gag gac tct gcg gtc tat tac tgt 288
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

gca aga tct ggg ggg gga gac cct ttt gct tac tgg ggc caa ggg acc 336
 Ala Arg Ser Gly Gly Gly Asp Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

acg gtc acc gtc tcc tca 354
 Thr Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 6
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<400> 6
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Thr Gln Val
 20 25 30

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

Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Thr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ser Thr Thr Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Ser Gly Gly Gly Asp Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 7
 <211> 321
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: cImmu31 nucleotide sequence

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(321)

<400> 7
 gac atc cag ctg acc cag tct cca tcc tca ctg tct gca tct ctg gga 48
 Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
 1 5 10 15

ggc aaa gtc acc atc act tgc aag gca agc caa gac att aac aag tat 96
 Gly Lys Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Lys Tyr
 20 25 30

ata ggt tgg tac caa cac aag cct gga aaa ggt cct agg cta ctc atg 144
 Ile Gly Trp Tyr Gln His Lys Pro Gly Lys Gly Pro Arg Leu Leu Met
 35 40 45

cat tac aca tct gca tta ctg cca ggc atc cca tca agg ttc agt gga 192
 His Tyr Thr Ser Ala Leu Leu Pro Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

agt ggg tct ggg aga gat tat tcc ttc agc atc agc aac ctg gag cct 240
 Ser Gly Ser Gly Arg Asp Tyr Ser Phe Ser Ile Ser Asn Leu Glu Pro
 65 70 75 80

gaa gat att gca act tat tat tgt cta cag tat gat gat ctg tgg acg 288
 Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Asp Leu Trp Thr
 85 90 95

ttc ggt gga ggg acc aag ctg gag atc aaa cga 321
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 8
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<400> 8
 Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
 1 5 10 15

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

Ile Gly Trp Tyr Gln His Lys Pro Gly Lys Gly Pro Arg Leu Leu Met
 35 40 45

His Tyr Thr Ser Ala Leu Leu Pro Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Arg Asp Tyr Ser Phe Ser Ile Ser Asn Leu Glu Pro
 65 70 75 80

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

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 9
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 9
 Pro Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Arg Ser
 20 25 30

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

Gly Gly Ile Val Pro Met Phe Gly Pro Pro Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Phe Tyr Phe Cys
 85 90 95

Ala Gly Gly Tyr Gly Ile Tyr Ser Pro Glu Glu Tyr Asn Gly Gly Leu
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 10
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Mus sp.

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

Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Thr Ser Tyr Val
 20 25 30

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

Tyr Ile His Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
 50 55 60

Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ser Thr Thr Tyr Met
 65 70 75 80

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

Arg Ser Gly Gly Gly Asp Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100

105

110

Val Thr Val Ser Ala
115

<210> 11
<211> 118
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: humanized hImmu31VH

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

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

Gly Tyr Ile His Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Phe Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Arg Ser Gly Gly Gly Asp Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Ser
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 12
<211> 108
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 12
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

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

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

Tyr Glu Ala Ser Asn Leu Gln Ala Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Gln Ile Thr Arg
 100 105

<210> 13
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Mus sp.

<400> 13
 Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
 1 5 10 15

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

Ile Gly Trp Tyr Gln His Lys Pro Gly Lys Gly Pro Arg Leu Leu Met
 35 40 45

His Tyr Thr Ser Ala Leu Leu Pro Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Arg Asp Tyr Ser Phe Ser Ile Ser Asn Leu Glu Pro

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: humanized hImmu31Vk

<400> 15

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

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

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

His Tyr Thr Ser Ala Leu Leu Pro Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

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

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Gln Ile Lys Arg
 100 105

<210> 16

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: humanized hImmu31VkT69

<400> 16

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

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

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

His Tyr Thr Ser Ala Leu Leu Pro Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

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

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Gln Ile Lys Arg
 100 105

<210> 17
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: humanized Immu31Vkt39

<400> 17
 Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

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

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

His Tyr Thr Ser Ala Leu Leu Pro Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

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

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Gln Ile Lys Arg

100 105

<210> 18
 <211> 354
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: humanized hImmu31VH

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(354)

<400> 18
 cag gtc cag ctg cag caa tca ggg gct gaa gtc aag aaa cct ggg tca 48
 Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15

tca gtg aag gtc tcc tgc aag gct tct ggc tac gct ttt act agc tat 96
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30

gtt ata cac tgg gtc agg cag gca cct gga cag ggt ctg tat tgg att 144
 Val Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Tyr Trp Ile
 35 40 45

gga tat att cat cct tac aat ggt ggt acc aag tac aat gag aag ttc 192
 Gly Tyr Ile His Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

aaa ggc aag gcc aca ata aca gct gac gaa tcc acc aat aca gcc tac 240
 Lys Gly Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

atg gag ctg agc agc ctg agg tct gag gac tct gcg gtc tat tac tgt 288
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

gca aga tct ggg ggg gga gac cct ttt gct tac tgg ggc caa ggg acc 336
 Ala Arg Ser Gly Gly Gly Asp Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

acg gtc acc gtc tcc tca
 Thr Val Thr Val Ser Ser
 115

354

<210> 19
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<400> 19
 Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30

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

Gly Tyr Ile His Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Ser Gly Gly Gly Asp Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 20
 <211> 321
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: humanized hImmu31Vk

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(321)

<400> 20
 gac atc cag ctg acc cag tct cca tcc tca ctg tct gca tct ctg gga 48
 Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
 1 5 10 15

ggc aaa gtc acc atc act tgc aag gca agc caa gac att aac aag tat 96
 Gly Lys Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Lys Tyr
 20 25 30

ata ggt tgg tac caa cac aag cct gga aaa ggt cct agg cta ctc atg 144
 Ile Gly Trp Tyr Gln His Lys Pro Gly Lys Gly Pro Arg Leu Leu Met
 35 40 45

cat tac aca tct gca tta ctg cca ggc atc cca tca agg ttc agt gga 192
 His Tyr Thr Ser Ala Leu Leu Pro Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

agt ggg tct ggg aga gat tat tcc ttc agc atc agc aac ctg gag cct 240
 Ser Gly Ser Gly Arg Asp Tyr Ser Phe Ser Ile Ser Asn Leu Glu Pro
 65 70 75 80

gaa gat att gca act tat tat tgt cta cag tat gat gat ctg tgg acg 288
 Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Asp Leu Trp Thr
 85 90 95

ttc ggt gga ggg acc aag ctg gag atc aaa cga 321
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 21
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<400> 21
 Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Gly Lys Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Lys Tyr
 20 25 30

Ile Gly Trp Tyr Gln His Lys Pro Gly Lys Gly Pro Arg Leu Leu Met
 35 40 45

His Tyr Thr Ser Ala Leu Leu Pro Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Arg Asp Tyr Ser Phe Ser Ile Ser Asn Leu Glu Pro
 65 70 75 80

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

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 22
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Mus sp.

<400> 22
 Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Lys Tyr Ile Gly
 1 5 10

<210> 23
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Mus sp.

<400> 23
 Tyr Thr Ser Ala Leu Leu Pro
 1 5

<210> 24
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Mus sp.

<400> 24
 Leu Gln Tyr Asp Asp Leu Trp Thr
 1 5

<210> 25
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Mus sp.

<400> 25
 Ser Tyr Val Ile His
 1 5

<210> 26
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Mus sp.

<400> 26
 Tyr Ile His Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 27
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Mus sp.

<400> 27
 Ser Gly Gly Gly Asp Pro Phe Ala Tyr
 1 5

<210> 28
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<220>
 <223> c-term may be amidated; see specification as filed for detailed

description of preferred embodiments

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (2)
 <223> Lys(HSG)

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (4)
 <223> Lys(HSG)

<400> 28
 Phe Lys Tyr Lys
 1

<210> 29
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 29
 Trp Gly Gln Gly Ser Leu Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10

<210> 30
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Linker peptide

<400> 30
 Gly Gly Gly Ser
 1

<210> 31
 <211> 16
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 31
 acagtcactg agctgg 16

<210> 32
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 32
 gccggatcct gactggatgg tgggaagatg gataca 36

<210> 33
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 33
 gacattcagc tgaccagtc tcca 24

<210> 34
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 34

ctcactggat ggtgggaaga tggatacagt tgg 33

<210> 35
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 35
 aggtsmarct gcagsagtcw gg 22

<210> 36
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Probe

<400> 36
 agactgcagg agagctggga aggtgtgcac 30

<210> 37
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Probe

<400> 37
 gaagcacacg actgaggcac ctccagatgt 30

<210> 38
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Linker peptide

<400> 38
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5 10 15

<210> 39
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<220>
 <223> c-term may be amidated; see specification as filed for detailed description of preferred embodiments

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)
 <223> Ac-Lys(DTPA)

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (3)
 <223> Lys(DTPA)

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (4)
 <223> Lys with Tscg-Cys side chain (Tscg-Cys not part of peptide backbone)

<400> 39
 Lys Tyr Lys Lys
 1

<210> 40
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 40
 agctgggaag gtgtgcac 18

<210> 41
 <211> 135
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: humanized hImmu31VHA

<400> 41
 gtaaggatga atatatcaa tccaatacag acctgtcca ggtgcctgcc tgaccagtg 60

tataacatag ctagtaaag cgtagccaga agccttcag gagacctca ctgatgacc 120

aggtttcttg acttc 135

<210> 42
 <211> 151
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: humanized hImmu31VHB

<400> 42
 ctggccca gtaagcaaaa ggtctccc cccagatct tgcacaaaa taaatgccg 60

tgctctcaga ctcagctg ctcagctcca ttagctgt attggtgat tctcagctg 120

ttattgtggc cttgcctttg aacttctcat t 151

<210> 43
 <211> 37
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 43
 cagctgcagc aatcaggggc tgaagtcaag aaacctg 37

<210> 44
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 44
 gtacttgga ccaccattgt aaggatgaat atatcc 36

<210> 45
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 45
 aatggtgga ccaagtacaa tgagaagttc aaaggc 36

<210> 46
 <211> 36
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 46
ggagacggtg accagggagc cttggcccca gtaagc 36

<210> 47
<211> 113
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: humanized hImmu31VKA

<400> 47
tttagtgct ttcctgggt tctgctggta ccaacctata tacttgtaa tgtcttgct 60

tgccctaca gtgatagtg ccctatctcc aacagatgcg ctcagagatg atg 113

<210> 48
<211> 152
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: humanized hImmu31VKB

<400> 48
cttgtcct ccaccgaacg tccacagatc atcactgt agacaataat atgttgcaat 60

gtcttctggt tgaagagagc tgatggtgaa agtataatct gtcccagatc cgctgccaga 120

gaatcgcgaa gggatacctg gcagtaatgc ag 152

<210> 49
<211> 38
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 49
gacattcagc tgaccagtc tccatcatct ctgagcgc 38

<210> 50
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 50
atgtgtaatg catcagcagt ttagtgctt tcc 33

<210> 51
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 51
ctgctgatgc attacacatc tgcattactg ccagg 35

<210> 52
<211> 31
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 52

gaccggcaga tctgcagctt ggteccctcca c

31