



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2014년02월06일
(11) 등록번호 10-1357813
(24) 등록일자 2014년01월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/44 (2006.01) C07H 21/04 (2006.01)
C12N 5/07 (2010.01) G01N 33/53 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2007-7003248
(22) 출원일자(국제) 2005년07월12일
심사청구일자 2010년04월21일
(85) 번역문제출일자 2007년02월09일
(65) 공개번호 10-2007-0050921
(43) 공개일자 2007년05월16일
(86) 국제출원번호 PCT/US2005/024645
(87) 국제공개번호 WO 2006/088494
국제공개일자 2006년08월24일
(30) 우선권주장
10/902,588 2004년07월28일 미국(US)
60/587,251 2004년07월12일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
WO2000042072 A2
전체 청구항 수 : 총 21 항

(73) 특허권자
마크로제닉스, 인크.
미국 메릴랜드주 20850 록빌 메디칼 센터 드라이브 9640
(72) 발명자
스타벤하젠 제프리
미국 메릴랜드 20833 브룩빌 트레드웨이 로드 19417
비지 수자타
미국 메릴랜드 20878 게더스버그 오차드 리지 드라이브 912-100
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
송봉식, 정삼영

심사관 : 이미옥

(54) 발명의 명칭 변이체 Fc 영역을 가진 항체의 확인 및 조작 및 이것의사용 방법

(57) 요약

본 발명은 변이체 Fc 영역을 포함한 분자, 특히 폴리펩티드, 더 특히 면역글로불린(예를 들면, 항체)에 관한 것이며, 상기 변이체 Fc 영역은 야생형 Fc 영역에 비해서 하나 이상의 아미노산 변형을 포함하고, 변이체 Fc 영역은 야생형 Fc 영역을 포함한 대비되는 분자에 비해서 더 큰 친화력으로 FcγRIIIA 및/또는 FcγRIIA와 결합한다. 본 발명의 분자는 질병, 장애, 또는 감염과 연관된 하나 이상의 징후를 예방, 치료, 또는 개선하는 데 특히 유용하다. 본 발명의 분자는 예를 들면, 암, 감염성 질환과 같이 FcγR에 의하여 매개된 작용자 세포 기능(예를 들면, ADCC)의 향상된 효능이 요구되는 질병, 장애의 치료 또는 예방 및 그 효과가 ADCC에 의하여 매개된 치료 항체의 치료 효능을 증대하는 데 특히 유용하다.

대표도



FIG. 1

(72) 발명자

랜킨 크리스토퍼

미국 매릴랜드 20871 클락스버그 피드몬트 트레일
로드 12656

고를라토프 세르게이

미국 매릴랜드 20877 게더스버그 코타지 힐 코트
8337

후앙 링

미국 매릴랜드 20879 게더스버그 스트라토스 라인
7107

특허청구의 범위

청구항 1

변이체 IgG1 Fc 영역을 갖는 폴리펩티드로서, 상기 변이체 IgG1 Fc 영역은

- (A) CH2 도메인 및 CH3 도메인을 함유하고;
- (B) 야생형 IgG1 Fc 영역에 비해 선택된 아미노산 변형을 포함함으로써 야생형 IgG1 Fc 영역의 아미노산 서열과 상이하게 된 아미노산 서열을 가지며, 이때 상기 선택된 아미노산 변형은 R292P 및 V305I를 포함하고, 여기서 넘버링은 Kabat에서와 같은 EU 인덱스의 넘버링이고;
- (C) Fc γ RIIIA와 결합할 수 있으며, 이러한 결합에 의해, 상기 야생형 IgG1 Fc 영역에 비해 항체-의존성 세포 매개 세포독성(ADCC)이 증가하고; 그리고
- (D) 상기 야생형 IgG1 Fc 영역에 비해, Fc γ RIIB에 대하여 감소된 친화력을 나타내는 것을 특징으로 하는 폴리펩티드.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 선택된 아미노산 변형은 F243L 변형을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 폴리펩티드.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 폴리펩티드의 상기 변이체 IgG1 Fc 영역은 추가로 C1q 결합을 증진시키는 변형을 포함하며, 상기 변형은 P396L인 것을 특징으로 하는 폴리펩티드.

청구항 4

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 선택된 아미노산 변형은 변형 N297S, N297D, N297E, 또는 N297A 을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 폴리펩티드.

청구항 5

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 폴리펩티드는 상기 변이체 IgG1 Fc 영역을 함유하는 항체, 또는 항체의 단편인 것을 특징으로 하는 폴리펩티드.

청구항 6

제3항에 있어서, 상기 폴리펩티드는 변이체 IgG1 Fc 영역을 포함하는 항체 또는 항체의 단편인 것을 특징으로 하는 폴리펩티드.

청구항 7

제4항에 있어서, 상기 폴리펩티드는 변이체 IgG1 Fc 영역을 포함하는 항체 또는 항체의 단편인 것을 특징으로 하는 폴리펩티드.

청구항 8

제5항에 있어서, 상기 변이체 IgG1 Fc 영역의 아미노산 서열은 모 항체의 야생형 IgG1 Fc 영역의 아미노산 서열과 상이하고, 상기 모 항체는 ATCC 승인번호 PTA-5958를 갖는 1D5, ATCC 승인번호 PTA-5959를 갖는 1F2, ATCC 승인번호 PTA-5960를 갖는 2D11, ATCC 승인번호 PTA-5961를 갖는 2E1 또는 ATCC 승인번호 PTA-5962를 갖는 2H9의 하이브리도마 클론으로부터 생성되는 것을 특징으로 하는 폴리펩티드.

청구항 9

암 항원으로 특정지어지는 암을 치료하기 위한 조성물로서, 상기 조성물은 제1항 또는 제2항에 따른 폴리펩티드의 치료적 유효량 및 제약학적으로 허용되는 담체를 포함하고, 상기 폴리펩티드는 상기 암 항원과 결합하는 항원-결합 부위를 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 암 항원은 MAGE-1, MAGE-3, BAGE, GAGE-1, GAGE-2, N-아세틸글루코사미닐트랜스퍼라제, p15, 베타-카테닌, MUM-1, CDK4, HER-2/neu, 사람 파필로마 바이러스-E6, 사람 파필로마 바이러스-E7 또는 MUC-1로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 11

제9항에 있어서, 상기 암 항원은 유방 암종, 난소 암종, 전립선 암종, 자궁경부 암종 또는 췌장 암종에 특유한 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 12

암 항원으로 특징지어지는 암을 치료하기 위한 조성물로서, 제3항에 따른 폴리펩티드의 치료적 유효량 및 제약학적으로 허용되는 담체를 포함하고, 상기 폴리펩티드는 상기 암 항원과 결합하는 항원-결합 부위를 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 암 항원은 유방 암종, 난소 암종, 전립선 암종, 자궁경부 암종 또는 췌장 암종에 특유한 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 14

암 항원으로 특징지어지는 암을 치료하기 위한 조성물로서, 제4항에 따른 폴리펩티드의 치료적 유효량 및 제약학적으로 허용되는 담체를 포함하고, 상기 폴리펩티드는 상기 암 항원과 결합하는 항원-결합 부위를 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 15

제14항에 있어서, 상기 암 항원은 유방 암종, 난소 암종, 전립선 암종, 자궁경부 암종 또는 췌장 암종에 특유한 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 16

암 항원으로 특징지어지는 암을 치료하기 위한 조성물로서, 제5항에 따른 항체 또는 항체의 단편의 치료적 유효량 및 제약학적으로 허용되는 담체를 포함하고, 상기 항체 또는 항체의 단편은 상기 암 항원에 결합하는 항원-결합 부위를 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 17

제16항에 있어서, 상기 암 항원은 MAGE-1, MAGE-3, BAGE, GAGE-1, GAGE-2, N-아세틸글루코사미닐트랜스퍼라제, p15, 베타-카테닌, MUM-1, CDK4, HER-2/neu, 사람 파필로마 바이러스-E6, 사람 파필로마 바이러스-E7 또는 MUC-1로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 18

제16항에 있어서, 상기 암 항원은 유방 암종, 난소 암종, 전립선 암종, 자궁경부 암종 또는 췌장 암종에 특유한 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 19

암 항원으로 특징지어지는 암을 치료하기 위한 조성물로서, 제8항에 따른 항체 또는 항체의 단편의 치료적 유효량 및 제약학적으로 허용되는 담체를 포함하고, 상기 항체 또는 항체의 단편은 상기 암 항원에 결합하는 항원-결합 부위를 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 20

제19항에 있어서, 상기 암 항원은 MAGE-1, MAGE-3, BAGE, GAGE-1, GAGE-2, N-아세틸글루코사미닐트랜스퍼라제, p15, 베타-카테닌, MUM-1, CDK4, HER-2/neu, 사람 파필로마 바이러스-E6, 사람 파필로마 바이러스-E7 또는

MUC-1로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 21

제19항에 있어서, 상기 암 항원은 유방 암종, 난소 암종, 전립선 암종, 자궁경부 암종 또는 췌장 암종에 특유한 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

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

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

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

삭제

청구항 60

삭제

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

삭제

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

명세서

기술분야

[0001] 본 출원은 각각이 본원에 전부 참고문헌으로 포함된 각각 2003년 1월 9일, 2003년 3월 19일, 및 2003년 10월 23일에 출원된 미국 가출원 제60/439,498호; 제60/456,041호; 및 제60/514,549호의 우선권을 주장하는 2004년 1월 9일에 출원된 미국 특허출원 제10/754,922호의 일부계속출원인 미국 특허출원 제10/902,588호의 우선권을 주장한다. 본 출원은 또한 본원에 전부 참고문헌으로 포함된 2004년 7월 12일에 출원된 미국 가출원 제60/587,257호의 제35절, 미국 법령 법제 35 제119조(e) 적용하에 이익을 주장한다.

[0002] 본 발명은 야생형 Fc 영역에 비해서 하나 이상의 아미노산 변형을 포함하고, 야생형 Fc 영역을 포함한 대비되는 분자에 비해서 더 큰 친화력으로 Fc γ RIIIA 및/또는 Fc γ RIIA와 결합하는 변이체 Fc 영역을 포함한 분자, 특히 폴리펩티드, 더 특히 면역글로불린(예를 들면, 항체)에 관한 것이다. 본 발명의 분자는 질병, 장애, 또는 감염과 연관된 하나 이상의 징후를 예방, 치료, 또는 개선하는 데 특히 유용하다. 본 발명의 분자는 Fc γ R에 의하여 매개된 작동자 세포 기능(예를 들면, ADCC)의 향상된 효능이 요구되는 질병 또는 장애, 예를 들면, 암, 감염성 질병의 치료 또는 예방 및 그 효과가 ADCC에 의하여 매개된 치료 항체의 치료 효능을 증대하는 데 특히 유용하다.

배경 기술

[0003] 2.1 Fc 수용체 및 면역계에서 이들의 기능

[0004] 항체-항원 복합체와 면역계 세포의 상호작용은 항체-의존성 세포독성, 비만세포 탈과립화, 및 식세포작용과 같은 작동자 기능으로부터 림프구 증식 및 항체 분비의 조절과 같은 면역조절 신호에 이르기까지 넓은 범위의 반응을 야기한다. 이들 모든 상호작용은 항체 또는 면역 복합체의 Fc 도메인이 조혈모세포 상의 특성화된 세포 표면 수용체와의 결합을 통하여 개시된다. 항체 및 면역 복합체에 의하여 유발된 세포 반응의 다양성은 Fc 수용체의 구조적 이종성으로부터 기인한다. Fc 수용체는 추측컨대 세포내 신호전달을 매개하는 구조적으로 관련된 리간드 결합 도메인을 공유한다.

[0005] 단백질의 면역글로불린 유전자 상과의 구성원인 Fc 수용체는 면역글로불린 분자의 Fc 부분에 결합할 수 있는 표면 당단백질이다. 과의 각 구성원은 Fc 수용체의 α 사슬 상의 인식 도메인을 통하여 하나 이상의 이소타입의 면역글로불린을 인식한다. Fc 수용체는 면역글로불린 하위유형에 대한 이들의 특이성에 의하여 정의된다. IgG에 대한 Fc 수용체는 Fc γ R, IgE에 대하여는 Fc ϵ R, 그리고 IgA에 대하여는 Fc α R로 언급된다. 다른 부속 세포는 다른 이소타입의 항체에 대한 Fc 수용체를 보유하고, 항체의 이소타입은 어떤 부속 세포가 주어진 반응에 관여할 것인지를 결정한다(문헌(Ravetch J. V. et al. 1991, Annu. Rev. Immunol. 9:457-92; Gerber J.S. et al. 2001 Microbes and Infection, 3:131-139; Billadeau D.D. et al. 2002, The Journal of Clinical Investigation, 2(109):161-1681; Ravetch J. V. et al. 2000, Science, 290:84-89; Ravetch J. V. et al., 2001 Annu. Rev. Immunol. 19:275-90; Ravetch J.V. 1994, Cell, 78(4):553-60)에 의한 리뷰). 다른 Fc 수용체, 이들을 발현하는 세포, 및 이들의 이소타입 특이성은 표 1에 요약된다(Immunobiology: The Immune System

in Health and Disease, 4판. 1999, Elsevier Science Ltd/Garland Publishing, New York)으로부터 적용)

- [0006] Fc γ 수용체
- [0007] 이 과의 각 구성원은 면역글로불린-관련 도메인, 단일막 신장 도메인 및 가변 길이의 세포질내 도메인에 관련된 세포외 도메인을 가진 내재성 막 당단백질이다. Fc γ RI(CD64), Fc γ RII(CD32), 및 Fc γ RIII(CD16)으로 지정된 세 개의 알려진 Fc γ R이 있다. 세 개의 수용체는 별개 유전자에 의하여 코딩되지만, 그러나 세 과 구성원 간의 광범위한 상동성은 아마도 유전자 복제에 의하여 공통 전구체로부터 발생했다는 것을 제시한다.
- [0008] Fc γ RII(CD32)
- [0009] Fc γ RII 단백질은 모노머 Ig(10^6 M $^{-1}$)에 대한 낮은 친화력으로 인해 복합체를 형성한 IgG에만 결합하는 40 KDa 내재성 막 당단백질이다. 이 수용체는 단핵구, 대식세포, B 세포, NK 세포, 호중구, 비만 세포 및 혈소판을 포함한 모든 조혈모세포 상에 존재하는 가장 넓게 발현되는 Fc γ R이다. Fc γ RII는 그 면역글로불린 결합 사슬에서 두 면역글로불린-유사 영역만을 가지고, 따라서 Fc γ RI보다 더욱 낮은 친화력을 가진다. 사람 Fc γ RII 유전자 (Fc γ RII-A, Fc γ RII-B, Fc γ RII-C)는 세 가지가 있는데, 이들 모두는 응집체 또는 면역복합체와 결합한다.
- [0010] Fc γ RII-A 및 Fc γ RII-B의 세포질 도메인 내의 특징적 차이는 수용체 결합에 대한 두 기능적으로 이질적 반응을 발생시킨다. 기본적 차이는 A 이소형태는 식세포작용 및 호흡성 과열과 같은 세포 활성화를 야기하는 세포내 신호전달을 개시하는 반면, B 이소형태는 예를 들면 B 세포 활성화를 억제하는 억제성 신호를 개시한다.
- [0011] Fc γ R을 통한 신호전달
- [0012] 활성화 및 억제 신호 모두는 결합을 수반한 Fc γ R을 통하여 전달된다. 이들 정반대로 대립하는 기능은 다른 수용체 이소형태 중의 구조적 차이로부터 기인한다. 수용체의 세포질 신호전달 도메인 내의 두 특징적 도메인은 다른 반응에 관여하는 면역수용체 티로신 기초 활성화 모티프(ITAM) 또는 면역수용체 티로신 기초 억제성 모티프(ITIMS)라고 불린다. 다른 세포질 효소를 이들 구조로 모집하는 것은 Fc γ R-매개된 세포 반응의 결과를 지시한다. ITAM-함유 Fc γ R 복합체는 Fc γ RI, Fc γ RIIA, Fc γ IIIA를 포함하는 반면, ITIM-함유 복합체는 Fc γ RIIB만을 포함한다.
- [0013] 사람 호중구는 Fc γ RIIA 유전자를 표현한다. 면역 복합체 또는 특이적 항체 교차-결합을 통한 Fc γ RIIA 클러스터형성은 ITAM 인산화를 촉진하는 수용체-연관 키나제와 함께 ITAM을 응집시키는 기능을 한다. ITAM 인산화는 Syk 키나제의 결합 부위로 작용하는데, 이것의 활성화는 다운스트림 기질(예를 들면, PI $_3$ K)의 활성화를 야기한다. 세포 활성화는 전-염증성 매개자의 분비를 유도한다.
- [0014] Fc γ RIIB 유전자는 B 림프구 상에서 발현된다: 그것의 세포외 도메인은 구별할 수 없는 방식으로 IgG 복합체에 결합하는 Fc γ RIIA와 96% 동일하다. Fc γ RIIB의 세포질 도메인에서 ITIM의 존재는 Fc γ R의 이 억제성 하위부류를 한정한다. 활성화 Fc γ R과 결합될 때, Fc γ RIIB에서 ITIM은 인산화되고 결과적으로 세포내 Ca $^{++}$ 유입을 방해하는 ITAM-함유 Fc γ R-매개된 티로신 키나제 활성화의 결과로 분비된 포스포이노시톨 전달자를 가수분해하는 이노시톨 폴리포스페이트 5'-포스파타제(SHIP)의 SH2 도메인을 유인한다. 따라서, Fc γ RIIB의 교차결합은 Fc γ R 결합에 대한 활성화 반응을 위축시키고, 세포 반응성을 억제한다. 따라서 B 세포 활성화, B 세포 증식 및 항체 분비는 중단된다.

표 1

면역글로불린 이소타입의 Fc 영역에 대한 수용체

수용체	FcγRI (CD64)	FcγRII-A (CD32)	FcγRII-B2 (CD32)	FcγRII-B1 (CD32)	FcγRIII (CD16)	FcεRI	FcαRI (CD89)
결합	IgG1 10^8 M^{-1}	IgG1 $2 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$	IgG1 $2 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$	IgG1 $2 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$	IgG1 $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$	IgE 10^{10} M^{-1}	IgA1, IgA2 10^7 M^{-1}
세포 유형	대식세포 호중구 호산구 수지상 세포	대식세포 호중구 호산구 수지상 세포 혈소판 망게르한스 세포	대식세포 호중구 호산구	B 세포 비만 세포	NK 세포 호산구 대식세포 호중구 비만 세포	비만 세포 호산구	대식세포 호중구 호산구 호염구
리게이션의 효과	흡수 자극 호출 터짐의 활성화 살해의 유도	흡수 과립 분비	흡수 자극의 억제	흡수하지 않음 자극의 억제	살해의 유도	과립의 분비	흡수 살해의 유도

2.2 관련 질병

2.2.1 암

신생물, 또는 종양은 양성 또는 악성일 수 있는 비정상적으로 통제되지않는 세포 성장으로부터 기인하는 신생 물질이다. 양성 종양은 일반적으로 국소화된다. 악성 종양을 포괄적으로 암이라고 한다. 용어 "악성"은 일반적으로 종양이 인접 체 구조를 공격하고 파괴하며 먼 부위까지 퍼져서 사망을 초래할 수 있다는 것을 의미한다(리뷰로서, 문헌(Robbins and Angell, 1976, Basic Pathology, 2판, W.B. Saunders Co., Philadelphia, pp. 68-122)을 참조하라). 암은 몸의 많은 부위에서 발생할 수 있고, 그것의 기원에 따라서 다르게 행동한다. 암성 세포는 그것들이 유래한 몸의 부분을 파괴시킨 후, 그것들이 새로운 성장을 시작하여 더욱 파괴를 야기하는 몸의 다른 부분(들)로 퍼진다.

120만 이상의 미국인이 매년 암에 걸린다. 암은 미국에서 사망의 두 번째 주요 원인이고, 현재 추세가 계속된다면, 암은 2010년까지 사망의 주요 원인이 될 것으로 예상된다. 폐 및 전립선암은 미국에서 남자의 제1 암 킬러다. 폐 및 유방암은 미국에서 여자의 제1 암 킬러다. 미국에서 두 명의 남자 중 한 명은 그의 생애 동안 어떤 시간에 암이라는 진단을 받을 것이다. 미국에서 세 명의 여자 중 한 명은 그녀의 생애 동안 어떤 시간에 암이라는 진단을 받을 것이다.

암 치료가 발견되었다. 수술, 화학치료 및 방사선 치료와 같은 현재의 치료 선택은 종종 비효율적이거나 심각한 부작용이 존재한다.

암 치료

현재, 암 치료는 환자에서 신생 세포를 제거하기 위하여 수술, 화학요법, 호르몬요법 및/또는 방사선 치료를 포함할 수 있다(예를 들면, 문헌(Stockdale, 1998, "Principles of Cancer Patient Management", in Scientific American: Medicine, vol. 3, Rubenstein and Federman, eds., Chapter 12, Section IV)을 참조하라). 최근, 암 치료는 또한 생물학적 요법 또는 면역요법을 포함할 수 있다. 이들 접근법 모두는 환자에 대한 중요한 약점을 노출시킨다. 예를 들면, 수술은 환자의 건강 때문에 금기시될 수 있고, 환자에게 수용불가일 수 있다. 추가로, 수술은 신생 조직을 완전히 제거하지 않을 수 있다. 방사선 치료는 신생 조직이 정상 조직보다 방사선에 더 높은 반응성을 나타낼 때만 효과적이고, 방사선 치료는 또한 종종 심각한 부작용을 일으킬 수 있다. 호르몬 요법은 단일 제제로 드물게 사용되고, 효과적일 수 있다 하더라도, 다른 치료가 대부분의 암 세포를 제거한 후에 암의 재발의 예방 또는 지연하는 데 자주 사용된다. 생물학적 요법/면역요법은 수적으로 제한되고, 발진, 또는 종기, 열, 오한 및 피로를 포함한 감기-유사 징후, 소화관 문제 또는 알레르기 반응과 같은 부작용을 일으킬 수 있다.

화학요법과 관련하여, 암 치료에 사용가능한 다양한 화학치료제가 있다. 암 화학치료제의 현저한 대다수는 DNA 복제 및 동시에 일어나는 세포 분열을 막기 위하여 디옥시리보뉴클레오타이드 트리포스페이트 전구체의 생합성을 억제하여 직접 또는 간접적으로 DNA 합성을 억제함으로써 작용한다(예를 들면, Gilman et al., Goodman and Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics, Eighth Ed. (Pergamom Press, New York, 1990)). 알킬화제, 예를 들면 니트로소우레아, 항-대사물질, 예를 들면 메토트렉세이트 및 히드록시우레아, 및 다른 제제,

예를 들면 에토포시드, 캠퍼테신, 블레오마이신, 독소루비신, 다우노루비신 등은 반드시 세포 주기에 특이적일 필요는 없더라도 DNA 복제에 대한 이들의 효과 때문에 S 기 동안 세포를 죽인다. 다른 제제, 구체적으로 콜히친 및 빈카 알칼로이드, 예를 들면 빈블라스틴 및 빈크리스틴은 유사분열 중지를 야기하는 마이크로튜블 조립을 방해한다. 화학요법 프로토콜은 일반적으로 치료의 효율을 증가시키는 화학치료제의 조합을 투여하는 것을 포함한다.

[0024] 다양한 화학치료제의 사용가능성에도 불구하고, 화학요법은 많은 약점을 가진다(예를 들면, 문헌(Stockdale, 1998, "Principles Of Cancer Patient Management" in *Scientific American Medicine*, vol. 3, Rubenstein and Federman, eds., ch. 12, sect. 10)을 참조하라). 거의 모든 화학치료제는 독성이 있으며, 화학요법은 구역질, 골수 침체, 면역거부반응 등을 포함한 현저하고 종종 위험한 부작용을 야기한다. 추가적으로, 화학치료제의 조합의 투여시, 많은 종양 세포는 화학치료제에 내성이 있거나 내성을 발전시킨다. 사실, 치료 프로토콜에 사용된 특정 화학치료제에 내성이 있는 세포들은 다른 약물, 심지어 특정 치료에 사용된 약물의 작용의 메커니즘과 다른 메커니즘으로 작용하는 제제에 내성이 있는 것으로 자주 입증되는데, 이 현상을 다면발현성 또는 다중약물 내성이라고 한다. 따라서, 약물 내성 때문에, 많은 암들은 표준 화학요법적 치료 프로토콜에 불응하는 것으로 입증된다.

[0025] 대안적 암 치료, 특히 예를 들면, 수술, 방사선 요법, 화학요법 및 호르몬 요법과 같은 표준 암 치료에 불응하는 것으로 입증된 암의 치료에 대한 현저한 필요성이 있다. 유망한 대안은 암 세포가 암 항원-특이적 항체 의하여 특이적으로 표적화되는 면역요법이다. 면역 반응의 특이성을 이용하는 방향으로 주요 노력이 기울여져 예를 들면 하이브리도마 기술은 종양 선택적 모노클로날 항체의 개발을 가능하게 하였고(문헌(Green M.C. et al., 2000 *Cancer Treat Rev.*, 26:269-286; Weiner LM, 1999 *Semin Oncol.* 26(suppl. 14):43-51) 참조), 지난 몇 년에, 미국 식품의약국(Food and Drug Administration)은 암 치료를 위하여 첫 번째 MAB: 비호즈킨 림프종을 위하여 리툭신(항-CD20) 그리고 전이성 유방암을 위하여 허셉틴[항-(c-erb-2/HER-2)](Suzanne A. Eccles, 2001, *Breast Cancer Res.*, 3:86-90)을 승인하였다. 그러나, 예를 들면, 항체 의존성 세포의 세포독성("ADC C")을 매개하는 항체 작동자 기능의 성능은 이러한 치료에 장애물이다. 따라서, 이러한 면역치료의 효능을 개선하는 방법이 필요하다.

[0026] 2.2.2 염증성 질환 및 자가면역 질환

[0027] 염증은 몸의 백혈구 세포 및 화학물질들이 박테리아 및 바이러스와 같은 외부 물질에 의한 감염으로부터 우리의 몸을 보호하는 과정이다. 이것은 대개 통증, 붓기, 영향받은 지역의 홍분 및 열상을 특징으로 한다. 사이토카인 및 프로스타글란딘으로 알려진 화학물질은 이 과정을 조절하고, 지시받고 자기-제한하는 캐스케이드로 혈액 또는 영향받은 조직으로 분비된다. 화학물질의 분비는 손상 또는 감염의 지역으로 혈류를 증가시키고, 열상 및 붓분을 초래할 수 있다. 화학물질 중 일부는 조직 내로 유체의 유출을 야기하고, 이는 붓기를 초래한다. 이 보호적 과정은 신경을 자극하여 통증을 야기할 수 있다. 관련 지역에서 제한된 기간 동안 발생할 때, 이들 변화는 몸에 이익이 되도록 작동한다.

[0028] 자가면역 및/또는 염증 장애에서, 면역계는 싸울 외래 물질이 없고 몸의 정상적인 보호적 면역계가 자신을 잘못 공격함으로써 그 자신의 조직에 손상을 야기할 때 염증 반응을 유발한다. 다른 방식으로 몸에 영향을 미치는 많은 다른 자가면역 장애가 있다. 예를 들면, 뇌는 다발성 경화증이 있는 개인에서 영향을 받고, 장은 크론씨 병이 있는 개인에서 영향을 받으며, 활액, 뼈 및 다양한 관절의 연골은 류마티스 관절염이 있는 개인에서 영향을 받는다. 자가면역 장애가 몸 조직의 하나 이상의 유형의 파괴를 진행시키기 때문에, 기관의 비정상적 성장 또는 기관 기능의 변화를 초래할 수 있다. 통상적으로 자가면역 장애에 의하여 영향을 받는 기관 및 장애는 적혈구 세포, 혈관, 연결 조직, 내분비선(예를 들면, 갑상선 또는 췌장), 근육, 관절 및 피부를 포함한다. 자가면역 장애의 예는, 한정하는 것은 아니지만, 하시모토 갑상선염, 악성빈혈, 애디슨병, 제1형 당뇨병, 류마티스 관절염, 전신성 홍반 루프스, 피부근염, 쇼그렌 증후군, 홍반 루프스, 다발성 경화증, 자가면역 내이 질환 중증근무력증, 라이터 증후군, 그레이브병, 자가면역 간염, 가족성 선종성 용종증 및 췌양성 대장염을 포함한다.

[0029] 류마티스 관절염(RA) 및 소아 류마티스 관절염은 염증성 관절염의 유형이다. 관절염은 관절에 염증을 설명하는 일반적 용어이다. 관절염의 전부는 아니지만, 일부 유형은 잘못 지시된 염증의 결과이다. 류마티스 관절염뿐만 아니라, 염증과 연관된 관절염의 다른 유형은 하기를 포함한다: 건선성 관절염, 라이터 증후군, 강직성 척추염, 관절염 및 통풍성 관절염. 류마티스 관절염은 (양손, 손목 또는 무릎과 같은) 몸의 양쪽 면의 관절에서 발생하는 만성 관절염의 유형이다. 이 대칭은 류마티스 관절염을 관절염의 다른 유형들과 구별하도록 도와준다. 관절

에 영향을 미치는 것뿐만 아니라, 류마티스 관절염은 가끔 피부, 눈, 폐, 심장, 혈액 또는 신경에 영향을 미칠 수 있다.

[0030] 류마티스 관절염은 세계 인구의 약 1%에 영향을 미치고 있고, 잠재적으로 무력하게 하고 있다. 미국에 류마티스 관절염의 약 290만 발병률이 있다. 여성이 남성보다 2 내지 3배 영향을 더 받는다. 류마티스 관절염이 발생하는 전형적 연령은 25세 내지 50세이다. 소아 류마티스 관절염은 소녀들에게 소년들의 6배의 영향을 미치면서, 71,000명의 미국 젊은이들(18세 이하의 나이)에게 영향을 미친다.

[0031] 류마티스 관절염은 몸의 면역계가 외래물질로서 관절에 윤활액을 분비하는 활액막을 부적절하게 확인하는 경우의 자가면역 장애이다. 염증 결과로, 관절에 그리고 관절 주변에 있는 연골 및 조직은 손상되거나 파괴된다. 중증의 경우에, 이 염증은 다른 관절 조직 및 주변 연골까지 넓혀져서 뼈와 연골을 부식 또는 파괴하고, 관절 기형을 야기할 수 있다. 몸은 관절 내의 정상적 공간이 좁혀지도록 하고 뼈가 융합되도록 하면서 손상된 조직을 반흔 조직으로 대체한다. 류마티스 관절염은 경직, 부어오름, 피로, 빈혈, 체중 감소, 열, 및 자주 심하게 손상된 통증을 발생시킨다. 류마티스 관절염의 통상적 징후는 깃을 때 1시간 이상 지속하는 관절 경직; 특정 손가락 또는 손목 관절에 부어오름; 관절 주변 연조직에 부어오름; 및 관절의 양면에 부어오름을 포함한다. 부어오름은 통증을 동반하거나 하지 않으면서 일어날 수 있고, 점진적으로 악화될 수 있거나 진행 전에 수년 동안 동일하게 남아 있을 수 있다.

[0032] 류마티스 관절염의 진단은 통증이 있는 관절의 특정 위치 및 대칭, 아침에 관절 경직의 존재, 피부 아래 혹 및 결절(류마티스 결절)의 존재, 류마티스 관절염을 제시하는 X선 시험의 결과, 및/또는 류마티스 인자라고 불리는 혈액 시험의 양성 결과를 포함한 인자들의 조합에 기초한다. 전부는 아니지만, 류마티스 관절염이 있는 많은 사람들이 그들의 혈액에 류마티스-인자 항체를 가진다. 류마티스 인자는 류마티스 관절염이 없는 사람들에서 존재할 수 있다. 다른 질환도 또한 류마티스 인자가 혈액에서 생성되도록 야기할 수 있다. 이것이 류마티스 관절염의 진단이 단지 혈액에 있는 류마티스 관절염의 존재가 아니라, 몇몇 인자의 조합에 기초하는지의 이유이다.

[0033] 질환의 전형적 과정은 지속적이지만 변동이 있는 관절 징후의 하나이며, 약 10년 후, 고생하는 사람들 중 90%는 뼈 및 연골에 구조적 손상을 나타낼 것이다. 작은 백분율은 완전히 낫는 약한 질병을 가질 것이고, 다른 작은 백분율은 많은 관절 기형을 가진 매우 심각한 질환 및 가끔 질환의 다른 증상을 가질 것이다. 염증 과정은 관절에 뼈 및 연골의 부식 또는 파괴를 야기한다. 류마티스 관절염에서, 지속적 항원 제시의 자가면역 순환, T-세포 자극, 사이토카인 분비, 활액 세포 활성화, 및 관절 파괴가 있다. 질환은 건강관리 비용 및 손실 비용에 지출하는 수백만 달러뿐만 아니라 심각한 통증, 손상된 기능 및 장애를 야기하는 등 개인과 사회 모두에 큰 충격을 준다. (예를 들면, NIH 웹사이트 및 NIAID 웹사이트를 참조하라).

[0034] 현재 사용하는 관절염 치료법은 항-염증성 또는 면역억제성 의약으로 관절의 염증을 감소시키는 데 초점을 모으고 있다. 임의의 관절염의 치료의 제1선은 대개 항-염증제, 예를 들면 아스피린, 이부프로펜 및 Cox-2 억제제, 예를 들면 셀레코싯 및 로페코싯이다. "제2선 약물"은 금, 메토티렉세이트 및 스테로이드를 포함한다. 이들이 관절염에 대해서 잘 확립된 치료법이라 하더라도, 매우 적은 수의 환자들만이 이러한 치료를 보낸다. 류마티스 관절염의 병인의 이해에 있어서의 최근 발전은 메토티렉세이트를 사이토카인에 대한 항체 또는 재조합 가용성 수용체와 조합하여 사용하도록 유도하였다. 예를 들면, 중앙 괴사 인자(TNF)- α 의 재조합 가용성 수용체는 관절염의 치료에 있어서 메토티렉세이트와 조합하여 사용되었다. 그러나, 메토티렉세이트 및 TNF- α 의 재조합 가용성 수용체와 같은 항-TNF- α 와 조합하여 투여된 환자의 약 50%만이 임상적으로 유의한 개선을 나타낸다. 많은 환자는 치료에도 불구하고 불응 상태이다. 어려운 치료 이슈는 류마티스 관절염이 있는 환자에게 여전히 남아있다. 많은 현 치료는 부작용의 높은 발병률을 가지거나 또는 질병 진행을 완전히 막을 수 없다. 이제 까지, 어떤 치료도 이상적이지 않고, 치료제도 없다. 류마티스 관절염 및 다른 자가면역 장애를 더 효과적으로 치료하는 신규 치료제가 필요하다.

[0035] 2.2.3 감염성 질병

[0036] 질병을 야기하는 감염성 인자는 5개 군으로 나뉜다: 바이러스, 박테리아, 균류, 원생동물 및 기생충(연충). 이들 병원체의 현저한 다양성은 적응성 면역의 두 중요한 특징의 자연 선택을 야기하였다. 첫째, 넓은 범위의 다른 병원체를 인식할 수 있는 이점은 동등하거나 더 큰 다양성의 B 및 T 세포 상에 수용체의 발생을 유도하였다. 둘째, 병원체의 별개 서식지 및 수명 주기는 별개 작동자 메커니즘의 범위에 의하여 계수되어야 한다. 각 병원체의 특징적 특성은 그것의 전달의 방식, 그것의 복제의 메커니즘, 그것의 병원 또는 그것이 질병을 야기하는 수단, 및 그것이 일으키는 반응이다.

[0037] 천연두, 콜레라, 티푸스, 이질, 말라리아 등으로 야기된 사람의 고통과 사망의 기록은 감염성 질병의 저명성을 확립한다. 개선된 공중위생, 면역화 및 항균성 치료에 의하여 허용된 제어에 있어서의 현저한 성공에도 불구하고, 감염성 질병은 현대 의학의 흔하고 중요한 문제가 되고 있다. 인류의 가장 흔한 질병인 일반 감기는 두려움을 일으키는 현대 질병인 AIDS와 마찬가지로 감염성 질병이다. 이전에 퇴행성 질병으로 생각되었던 일부 만성 신경학적 질병은 감염성인 것으로 입증되었다. 미래가 감염성 질병을 주요 의료 문제로서 계속 드러낼 것이라는 것은 의심의 여지가 없다.

[0038] 많은 수의 사람 및 동물 질병은 상기 언급한 감염성 인자 중 하나로부터의 악성 및 기회 감염으로 비롯된다(예를 들면, 문헌(Belshe (Ed.) 1984 Textbook of Human Virology, PSG 출판, Littleton, MA)을 참조하라).

[0039] 감염성 질병의 한 카테고리는 예를 들면 바이러스성 감염이다. 호흡관, CNS, 피부, 비노생식기로, 눈, 귀, 면역계, 위장관 및 골격근계를 포함한 다양한 조직의 바이러스성 질병은 모든 연령층의 많은 사람에게 영향을 미친다(예를 들면, 문헌(Wyngaarden and Smith, 1988, Cecil Textbook of Medicine, 18판, W.B. Saunders Co., Philadelphia, pp.1750-1753)에서 표 328-2를 참조하라). 효과적인 항-바이러스 치료의 설계에 상당한 노력이 투자되었는데도 불구하고, 바이러스성 감염은 전세계 수백만 인구의 생명을 계속 위협하고 있다. 대체로, 항-바이러스 약물을 개발하려는 시도는 바이러스의 생명 주기의 일부 단계에 초점을 맞추었다(예를 들면, 문헌(Mitsuya et al., 1991, FASEB J. 5:2369-2381, HIV에 대한 논의)를 참조하라). 그러나, 많은 현대 항-바이러스 약물의 사용과 연관된 일반적 약점은 숙주에 대한 독성 또는 특정 바이러스 군주에 의한 내성과 같은 이들의 해로운 부작용이다.

발명의 상세한 설명

[0040] 발명의 개요

[0041] 본 발명은 부분적으로 효모 디스플레이 시스템을 사용한 Fc γ R 수용체(예를 들면, 활성화 Fc γ R, 억제성 Fc γ R)에 대한 변경된 친화력을 가진 돌연변이체 사람 IgG1 중쇄 Fc 영역의 동정에 기초한다. 시험관내 동물 모델링 및 임상 실험은 Fc 영역이 모노클로날 항체 치료의 결과를 결정하는 데 필수적 역할을 한다는 것을 나타낸다. Fc 영역에 융합된 치료 모노클로날 항체 및 가용성 폴리펩티드에서 Fc 영역 기능을 최적화하려는 최근 접근법(예를 들면, 항체-의존성 세포 매개된 세포독성(ADCC), 보체 의존성 세포독성(CDC) 활성화)은 구조적 분석 및/또는 컴퓨터 보조 설계에 기초한 제한된 수의 단일 아미노산 변화에 초점을 맞추었다. Fc 영역을 조작하는 데 있어서 대안적 접근법은 Fc 영역 기능을 최적화하는 Fc 영역의 클리코실화에 초점을 맞추었다. 본 발명은 부분적으로 Fc 변이체의 불완전 라이브러리로부터, 한정하는 것은 아니지만, ADCC 및 CDC와 같은 하나 이상의 Fc 기능적 활성의 변경을 위한 가능한 돌연변이체를 선택하는 것에 기초한다. 본 발명은 Fc 영역을 조작하는 방법 및 구조 연구에 의하여 확인된 예상된 영역 바깥의 신규한 Fc 변이체의 확인 및 스크리닝을 위한 방법을 제공한다. 본원에 사용된 예상된 영역은 구조적 및/또는 생화학적 연구에 기초한 이들 영역이 Fc 리간드와 접촉한다는 것을 말한다.

[0042] 본 발명은 기술 자동화의 상태로 세포 기반 기능적 분석과 조합 라이브러리 구축을 조합함으로써 하나 이상의 Fc 작동자 기능 면에서 향상된 Fc 변이체의 확인을 위한 발견 플랫폼을 제공한다. 본 발명은 모든 가능한 아미노산 변화를 포괄하는 변형으로 Fc 내의 관심 영역을 포화시킴으로써 완전한 조합 라이브러리를 조립한다. 조합 라이브러리는 개선된 생물학적 기능에 기초하여 돌연변이체를 선택하는 한 세트의 결합 및 기능적 분석을 사용하여 테스트될 것이다.

[0043] 따라서, 본 발명은 하나 이상의 영역에 하나 이상의 아미노산 변형(예를 들면, 치환, 그러나 또한 삽입 또는 결실을 포함)을 가진 변이체 Fc 영역을 포함한 분자, 바람직하게는 폴리펩티드, 및 더욱 바람직하게는 면역글로불린(예를 들면, 항체)에 관한 것인데, 이 변형은 Fc γ R의 변이체 Fc 영역의 친화력을 변경, 예를 들면 증가 또는 감소시킨다. 바람직하게는, 상기 하나 이상의 아미노산 변형은 Fc γ RIIA 및/또는 Fc γ RIIA의 변이체 Fc 영역의 친화력을 증가시킨다. 바람직한 구체예에서, 본 발명의 분자는 야생형 Fc 영역을 포함한 대비되는 분자(즉, Fc 영역에서의 하나 이상의 아미노산 변형을 제외하고 본 발명의 분자와 동일한 아미노산 서열을 가짐)가 Fc γ RIIB에 결합하는 것보다 더 낮은 치환성으로 Fc γ RIIB에(Fc 영역을 통하여) 더 특이적으로 결합한다. 일부 구체예에서, 본 발명은 야생형 Fc 영역을 가진 대비되는 분자에 비해서 Fc γ RIIA 및/또는 Fc γ RIIA의 변이체 Fc 영역의 친화력을 증가시키고, Fc γ RIIB에 대한 돌연변이체 Fc 영역의 친화력을 향상시키는 하나 이상의 아미노산 변형을 가진, 돌연변이체 Fc 영역을 가진 분자를 포함한다. 다른 구체예에서, 본 발명은 야생형 Fc 영역을 가진 대비되는 분자에 비해서 하나 이상의 Fc γ RIIA 및/또는 Fc γ RIIA에 대한 돌연변이체 Fc 영역의 친화력을 증가시

키지만, Fc γ RIIB의 변이체 Fc 영역의 친화력을 변경하지 않는 하나 이상의 아미노산 변형을 가진, 변이체 Fc 영역을 가진 분자를 포함한다. 바람직한 구체예는 야생형 Fc 영역을 가진 대비되는 분자에 비해서 Fc γ RIIA 및 Fc γ RIIA에 대한 친화력을 증대시키지만 Fc γ RIIB에 대한 친화력을 감소시키는 변이체 Fc 영역이다.

[0044] 본 발명의 Fc 변이체는, 한정하는 것은 아니지만, 작동자 기능을 변경하는 변형을 포함한 다른 Fc 변형과 조합될 수 있다. 본 발명은 항체 또는 Fc 융합에 추가적, 상승작용적, 또는 신규 특성을 제공하기 위하여 본 발명의 Fc 변이체를 다른 Fc 변형과 조합하는 것을 포함한다. 바람직하게는, 본 발명의 Fc 변이체들은 이들이 조합된 변형의 표현형을 증대시킨다. 예를 들면, 본 발명의 Fc 변이체가 야생형 Fc 영역을 포함한 대비되는 분자보다 더 큰 친화력으로 Fc γ RIIA에 결합하는 것으로 알려진 돌연변이체와 조합되면, 본 발명의 돌연변이체와의 조합은 FcRIIA 친화력에 더 큰 배수의 증대를 초래한다.

[0045] 한 구체예에서, 본 발명의 Fc 변이체는 문헌(Duncan et al., 1988, Nature 332:563-564; Lund et al., 1991, J. Immunol 147:2657-2662; Lund et al., 1992, Mol Immunol 29:53-59; Alegre et al., 1994, Transplantation 57:1537-1543; Hutchins et al., 1995, Proc Natl. Acad Sci U S A 92: 11980-11984; Jefferis et al., 1995, Immunol Lett. 44:111-117; Lund et al., 1995, Faseb J 9: 115-119; Jefferis et al., 1996, Immunol Lett 54: 101-104; Lund et al., 1996, J Immunol 157:4963-4969; Armour et al., 1999, Eur J Immunol 29:2613-2624; Idusogie et al., 2000, J Immunol 164:4178-4184; Reddy et al., 2000, J Immunol 164:1925-1933; Xu et al., 2000, Cell Immunol 200:16-26; Idusogie et al., 2001, J Immunol 166:2571-2575; Shields et al., 2001, J Biol Chem 276:6591-6604; Jefferis et al., 2002, Immunol Lett 82:57-65; Presta et al., 2002, Biochem Soc Trans 30:487-490); 미국 특허 제5,624,821호; 미국 특허 제5,885,573호; 미국 특허 제6,194,551호; PCT WO 00/42072호; PCT WO 99/58572호에 개시된 것들과 같은 다른 공지된 Fc 변이체와 조합될 수 있으며, 이들 각각은 본원에 전부 참고문헌으로 포함된다.

[0046] 본 발명은 Fc 영역의 호모다имер 또는 헤테로다имер인 분자를 포함한다. Fc 영역을 포함한 헤테로다имер는 두 Fc 사슬이 동일한 또는 다른 서열을 가진 분자를 말한다. 일부 구체예에서, 변이체 Fc 영역을 포함한 헤테로다имер 분자에서, 각 사슬은 다른 사슬과 하나 이상의 다른 변형을 가진다. 다른 구체예에서, 변이체 Fc 영역을 포함한 헤테로다имер 분자에서, 한 사슬은 야생형 Fc 영역을 함유하고, 다른 사슬은 하나 이상의 변형을 포함한다. 헤테로다имер Fc 함유 분자를 조작하는 방법은 당업계에 공지되어 있고, 본 발명 내에 포함된다.

[0047] 일부 구체예에서, 본 발명은 야생형 Fc 영역에 비해서 하나 이상의 아미노산 변형을 포함하고, 당업계에 공지된 표준 분석(예를 들면, 시험관내 분석)에 의하여 결정된 바와 같이 임의의 Fc γ R과 결합하지 않거나 야생형 Fc 영역을 포함한 대비되는 분자에 비해서 감소된 친화력으로 결합하는 변이체 Fc 영역을 포함한 분자를 포함한다. 특정 구체예에서, 본 발명은 야생형 Fc 영역에 비해서 하나 이상의 아미노산 변형을 포함하고, Fc γ RIIA인 한 Fc γ R에만 결합하는 변이체 Fc 영역을 포함한 분자를 포함한다. 다른 특정 구체예에서, 본 발명은 야생형 Fc 영역에 비해서 하나 이상의 아미노산 변형을 포함하고, Fc γ RIIA인 한 Fc γ R에만 결합하는 변이체 Fc 영역을 포함한 분자를 포함한다. 또 다른 구체예에서, 본 발명은 야생형 Fc 영역에 비해서 하나 이상의 아미노산 변형을 포함하고, Fc γ RIIB인 한 Fc γ R에만 결합하는 변이체 Fc 영역을 포함한 분자를 포함한다.

[0048] Fc γ R에 대한 본 발명의 분자의 친화력 및 결합 특성은 Fc-Fc γ R 상호작용, 즉 한정하는 것은 아니지만, ELISA 분석, 표면 플라즈몬 공명 분석, 면역침전 분석을 포함한 Fc γ R에 대한 Fc 영역의 특이적 결합을 결정하기 위하여 당업계에 공지된 시험관내 분석(생화학적 또는 면역학적 기초 분석)을 사용하여 처음으로 결정된다(섹션 5.2.1 참조). 바람직하게는, 본 발명의 분자의 결합 특성은 또한 하나 이상의 Fc γ R 매개자 작동자세포 기능을 결정하기 위한 시험관내 기능적 분석을 특징으로 한다(섹션 5.2.6 참조). 대부분의 바람직한 구체예에서, 본 발명의 분자는 시험관내 기초 분석에서의 것과 같이 생체내 모델(예를 들면, 본원에 설명되고 개시되는 것들)에서 유사한 결합 특성을 가진다. 그러나, 본 발명은 시험관내 기초 분석에서 원하는 표현형을 나타내지 않지만 생체내에서 원하는 표현형을 나타내는 본 발명의 분자를 배제하지 않는다.

[0049] 특정 구체예에서, 본 발명은 변이체 Fc 영역을 포함한 분자를 포함하고, 상기 변이체 Fc 영역은 야생형 Fc 영역에 비해서 하나 이상의 아미노산 변형을 포함하여, 상기 폴리펩티드는 야생형 Fc 영역을 포함한 대비되는 분자가 Fc γ RIIA에 결합하는 것보다 더 큰 친화력으로 Fc γ RIIA에 특이적으로 결합하며, 단 하나 이상의 아미노산 변형이 329, 331, 또는 332번 위치 중 어느 하나에서 단독으로 치환을 가지지 않고, 256, 290, 298, 312, 333, 334, 359, 360, 326, 또는 430번 위치 중 어느 하나에서 알라닌; 330번 위치에 리신; 339번 위치에 트레오닌; 320번 위치에서 메티오닌; 326번 위치에서 세린; 326번 위치에서 글루탐산; 326번 위치에서 아스파르트산; 326번 위치에서 글루탐산; 334번 위치에서 글루타민; 334번 위치에서 글루탐산; 334번 위치에서 메티오닌; 334번

위치에서 히스티딘; 334번 위치에서 발린; 또는 334번 위치에서 류신; 335번 위치에서 리신 중 어느 하나로 치환을 포함하지 않거나 단독 치환이 아니다.

[0050] 다른 특정 구체예에서, 본 발명은 변이체 Fc 영역을 포함한 분자를 포함하고, 상기 변이체 Fc 영역은 야생형 Fc 영역에 비해서 하나 이상의 아미노산 변형을 포함하여, 상기 폴리펩티드가 야생형 Fc 영역을 포함한 대비되는 분자가 Fc γ RIIA에 결합하는 것보다 더 큰 친화력으로 Fc γ RIIA에 특이적으로 결합하며, 단 하나 이상의 아미노산 변형이 256, 290, 326, 255, 258, 267, 272, 276, 280, 283, 285, 286, 331, 337, 268, 272, 또는 430번 위치 중 어느 하나에서 알라닌; 268번 위치에서 아스파라긴; 272번 위치에서 글루타민; 286번 위치에서 글루타민, 세린, 또는 아스파르트산; 290번 위치에서 세린; 320번 위치에서 메티오닌, 글루타민, 글루탐산, 또는 아르기닌; 322번 위치에서 글루탐산; 326번 위치에서 세린, 글루탐산, 또는 아스파르트산; 330번 위치에서 리신; 335번 위치에서 글루타민; 또는 301번 위치에서 메티오닌으로 치환을 포함하지 않거나 단독 치환이 아니다.

[0051] 바람직한 특정 구체예에서, 본 발명은 변이체 Fc 영역을 포함한 분자를 포함하고, 상기 변이체 Fc 영역은 야생형 Fc 영역에 비해서 하나 이상의 아미노산 변형을 포함하여, 상기 분자는 Fc γ R에 대하여 변경된 친화력을 가지며, 단 상기 변이체 Fc 영역은 문헌(Sondermann et al., (2000 Nature, 406:267-273. 본원에 전부 참고문헌으로 포함됨)에 개시된 것들과 같은 Fc-Fc γ R 상호작용의 결정학적 및 구조적 분석에 기초하여 Fc γ R과 직접 접촉하는 위치에서 치환을 가지지 않는다. Fc γ R과 직접 접촉하는 Fc 영역 내의 위치의 예는 아미노산 234-239번(힌지 영역), 아미노산 265-269번(B/C 루프), 아미노산 297-299번(C'/E 루프) 및 아미노산 327-332번(F/G) 루프이다. 일부 구체예에서, 변이체 Fc 영역을 포함한 본 발명의 분자는 구조적 및 결정학적 분석에 기초한 Fc γ R과 직접 접촉하지 않는, 즉 Fc-Fc γ R 결합 부위 내에 있지 않은 하나 이상의 잔기의 변형을 포함한다.

[0052] 다른 바람직한 구체예에서, 본 발명은 야생형 Fc 영역에 비해서 하나 이상의 아미노산 변형을 포함하는 변이체 Fc 영역을 포함한 분자를 포함하여, 상기 분자는 야생형 Fc 영역을 포함한 분자에 비해서 변경된 친화력으로 Fc γ R에 결합하며, 단 상기 하나 이상의 아미노산 변형은 255, 256, 258, 267, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 300, 301, 303, 305, 307, 309, 312, 320, 322, 326, 329, 330, 332, 331, 333, 334, 335, 337, 338, 339, 340, 359, 360, 373, 376, 416, 419, 430, 434, 435, 437, 438, 439번 위치 중 어느 것에 치환을 포함하지 않거나 단독 치환이 아니다. 특정 구체예에서, 본 발명은 야생형 Fc 영역에 비해서 하나 이상의 아미노산 변형을 포함하는 변이체 Fc 영역을 포함한 분자를 포함하여, 상기 분자는 야생형 Fc 영역을 포함한 분자에 비해서 변경된 친화력으로 Fc γ R에 결합하며, 단 상기 변이체 Fc 영역은 255, 258, 267, 269, 270, 276, 278, 280, 283, 285, 289, 292, 293, 294, 295, 296, 300, 303, 305, 307, 309, 322, 329, 332, 331, 337, 338, 340, 373, 376, 416, 419, 434, 435, 437, 438, 439번 위치 중 어느 것에 치환을 포함하지 않거나 단독 치환이 아니고, 256, 290, 298, 312, 333, 334, 359, 360, 326, 또는 430번 위치 중 어느 것에 알라닌; 330번 위치에서 리신; 339번 위치에서 트레오닌; 320번 위치에서 메티오닌; 326번 위치에서 세린; 326번 위치에서 아스파라긴; 326번 위치에서 아스파르트산; 326번 위치에서 글루탐산; 334번 위치에서 글루타민; 334번 위치에서 글루탐산; 334번 위치에서 메티오닌; 334번 위치에서 히스티딘; 334번 위치에서 발린; 또는 334번 위치에서 류신; 335번 위치에서 리신; 268번 위치에서 아스파라긴; 272번 위치에서 글루타민; 286번 위치에서 글루타민, 세린, 또는 아스파르트산; 290번 위치에서 세린; 320번 위치에서 메티오닌, 글루타민, 글루탐산, 또는 아르기닌; 322번 위치에서 글루탐산; 326번 위치에서 세린, 글루탐산, 또는 아스파르트산; 330번 위치에서 리신; 335번 위치에서 글루타민; 또는 301번 위치에서 메티오닌을 가지지 않는다.

[0053] 특정 구체예에서, 본 발명은 268, 269, 270, 272, 276, 278, 283, 285, 286, 289, 292, 293, 301, 303, 305, 307, 309, 331, 333, 334, 335, 337, 338, 340, 360, 373, 376, 416, 419, 430, 434, 435, 437, 438 또는 439번 위치 중 어느 것에 치환을 포함하지 않거나 단독 치환이 없고, 280번 위치에서 히스티딘, 글루타민, 또는 티로신; 290번 위치에서 세린, 글리신, 트레오닌 또는 티로신, 300번 위치에서 류신 또는 이소류신; 294번 위치에서 아스파라긴, 296번 위치에서 프롤린; 298번 위치에서 프롤린, 아스파라긴, 아스파르트산, 또는 발린; 295번 위치에서 리신을 가지지 않는 변이체 Fc 영역을 포함한 분자를 포함한다. 또 다른 바람직한 구체예에서, 본 발명은 야생형 Fc 영역에 비해서 하나 이상의 아미노산 변형을 포함하는 변이체 Fc 영역을 포함한 분자를 포함하여, 상기 분자는 야생형 Fc 영역을 포함한 분자에 비해서 감소된 친화력으로 Fc γ R과 결합하며, 단 상기 변이체 Fc 영역은 252, 254, 265, 268, 269, 270, 278, 289, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 300, 301, 303, 322, 324, 327, 329, 333, 335, 338, 340, 373, 376, 382, 388, 389, 414, 416, 419, 434, 435, 437, 438, 또는 439번 위치 중 어느 것에 치환을 가지지 않거나 단독 치환을 가지지 않는다. 또 다른 바람직한 구체예에서, 본 발명은 야생형 Fc 영역에 비해서 하나 이상의 아미노산 변형을 포함하는 변이체 Fc 영역을 포함한 분자를 포함

하여, 상기 분자는 야생형 Fc 영역을 포함한 분자에 비해서 향상된 친화력으로 Fc γ R에 결합하며, 단 상기 변이체 Fc 영역은 280, 283, 285, 286, 290, 294, 295, 298, 300, 301, 305, 307, 309, 312, 315, 331, 333, 334, 337, 340, 360, 378, 398, 또는 430번 위치 중 어느 것에 치환을 가지지 않거나 단독 치환이 아니다.

[0054] 특정 구체예에서, 본 발명은 330, 243, 247, 298, 241, 240, 244, 263, 262, 235, 269, 또는 328번 위치 중 어느 것에 치환을 포함하지 않거나 단독 치환을 가지지 않고, 243번 위치에서 류신, 298번 위치에서 아스파라긴, 241번 위치에서 류신, 240번 위치에서 이소류신 또는 알라닌, 244번 위치에서 히스티딘, 330번 위치에서 발린, 또는 328번 위치에서 이소류신 중 어느 것에 치환을 포함하지 않거나 단독 치환을 가지지 않는 변이체 Fc 영역을 포함한 분자를 포함한다.

[0055] 특정 구체예에서, 본 발명의 분자는 야생형 Fc 영역을 포함한 대비되는 분자에 비해서, 2배 이상으로 Fc γ RIIA 및/또는 Fc γ RIIA에 대한 변이체 Fc 영역의 친화력을 증가시키는 하나 이상의 아미노산 변형(예를 들면, 치환)을 가진 변이체 Fc 영역을 포함한다. 특정 구체예에서, 본 발명의 분자는 야생형 Fc 영역을 포함한 대비되는 분자에 비해서, 2배, 4배 이상, 5배 이상, 6배 이상, 8배 이상, 또는 10배 이상 더 크게 Fc γ RIIA 및/또는 Fc γ RIIA의 변이체 Fc 영역의 친화력을 증가시키는 하나 이상의 아미노산 변형(예를 들면, 치환)을 가진 변이체 Fc 영역을 포함한다. 본 발명의 다른 구체예에서, 변이체 Fc 영역을 포함한 본 발명의 분자는 야생형 Fc 영역을 포함한 분자에 비해서 65% 이상, 75% 이상, 85% 이상, 95% 이상, 100% 이상, 150% 이상, 200% 이상 더 큰 친화력으로 Fc γ RIIA 및/또는 Fc γ RIIA에 특이적으로 결합한다. 이러한 측정은 시험관내 분석에서 이루어지는 것이 바람직하다.

[0056] 본 발명은 활성화 및/또는 억제성 Fc γ 수용체에 대한 변경된 친화력을 가진 분자를 포함한다. 특히, 본 발명은 야생형 Fc 영역을 가진 대비되는 분자에 비해서, Fc γ RIIB의 변이체 Fc 영역의 친화력을 증가시키지만, Fc γ RIIA 및/또는 Fc γ RIIA의 변이체 Fc 영역의 친화력을 감소시키는 하나 이상의 아미노산 변형을 가진, 변이체 Fc 영역을 가진 분자를 고려한다. 다른 구체예에서, 본 발명은 야생형 Fc 영역을 가진 대비되는 분자에 비해서 Fc γ RIIB의 변이체 Fc 영역의 친화력을 감소시키고, Fc γ RIIA 및/또는 Fc γ RIIA의 변이체 Fc 영역의 친화력을 또한 감소시키는 하나 이상의 아미노산 변형을 가진, 변이체 Fc 영역을 가진 분자를 포함한다. 또 다른 구체예에서, 본 발명은 야생형 Fc 영역을 가진 대비되는 분자에 비해서 변형이 Fc γ RIIA의 변이체 Fc 영역의 친화력을 감소시키지만, Fc γ RIIB의 변이체 Fc 영역의 친화력을 변경하지 않은, 변이체 Fc 영역을 가진 분자를 포함한다. 또 다른 구체예에서, 본 발명은 야생형 Fc 영역을 가진 대비되는 분자에 비해서 변형이 Fc γ RIIA 및/또는 Fc γ RIIA의 변이체 Fc 영역의 친화력을 증가시키지만, Fc γ RIIB의 변이체 Fc 영역의 친화력을 감소시키는, 변이체 Fc 영역을 가진 분자를 포함한다.

[0057] 특정 구체예에서, 본 발명의 분자는 야생형 친화력으로 Fc γ RIIA 및 Fc γ RIIB와 결합하는 야생형 Fc 영역을 포함한 대비되는 분자에 비해서, Fc γ RIIA의 변이체 Fc 영역의 친화력을 증가시키고 Fc γ RIIB의 변이체 Fc 영역의 친화력을 감소시키는 하나 이상의 아미노산 변형(예를 들면, 치환)을 가진 변이체 Fc 영역을 포함한다. 특정 구체예에서, 하나 이상의 아미노산 변형은 256, 298, 333, 또는 334번 위치 중 어느 곳에 알라닌과의 치환이 아니다.

[0058] 다른 특정 구체예에서, 본 발명의 분자는 야생형 친화력으로 Fc γ RIIA 및 Fc γ RIIB와 결합하는 야생형 Fc 영역을 포함한 대비되는 분자에 비해서, Fc γ RIIA의 변이체 Fc 영역의 친화력을 증가시키고 Fc γ RIIB의 변이체 Fc 영역의 친화력을 감소시키는 하나 이상의 아미노산 변형(예를 들면, 치환)을 가진 변이체 Fc 영역을 포함한다. 특정 구체예에서, 하나 이상의 아미노산 변형은 320번 위치에서 아르기닌과의 치환이 아니다.

[0059] 가장 바람직한 구체예에서, 변이체 Fc 영역을 가진 활성화 및/또는 억제성 수용체에 대하여 변경된 친화력을 가진 본 발명의 분자는 288번 위치에서 아스파라긴, 330번 위치에서 세린 및 396번 위치에서 류신으로 치환(MgFc10)(표 5 참조); 또는 334번 위치에서 글루탐산, 359번 위치에서 아스파라긴, 및 366번 위치에서 세린으로 치환(MgFc13); 또는 316번 위치에서 아스파르트산, 378번 위치에서 발린, 및 399번 위치에서 글루탐산으로 치환(MgFc27); 또는 392번 위치에서 트레오닌, 및 396번 위치에서 류신으로 치환(MgFc38); 또는 221번 위치에서 글루탐산, 270번 위치에서 글루탐산, 308번 위치에서 알라닌, 311번 위치에서 히스티딘, 396번 위치에서 류신, 및 402번 위치에서 아스파르트산으로 치환(MgFc42); 또는 240번 위치에서 알라닌 및 396번 위치에서 류신으로 치환(MgFc52); 또는 410번 위치에서 히스티딘, 및 396번 위치에서 류신으로 치환(MgFc53); 또는 243번 위치에서 류신, 305번 위치에서 이소류신, 378번 위치에서 아스파르트산, 404번 위치에서 세린, 및 396번 위치에서 류신으로 치환(MgFc54); 또는 255번 위치에서 이소류신, 및 396번 위치에서 류신으로 치환(MgFc55); 또는 370번 위치에서 글루탐산 및 396번 위치에서 류신으로 치환(MgFc59)인 하나 이상의 아미노산 변형을 가진다.

- [0060] 변경된 Fc γ R 친화력(예를 들면, 향상된 Fc γ RIIIA 친화력)을 가진 변이체 Fc 영역을 포함한 분자를 스크리닝하고 확인하기 위한 바람직한 방법은 효모 표면 디스플레이 기술이다(리뷰로서, 본원에 전부 참고문헌으로 포함된 문헌(Boder and Wittrup, 2000, Methods in Enzymology, 328:430-444)을 참조하라). 구체적으로, 효모 표면 디스플레이는 Fc 돌연변이체를 포함한 폴리펩티드가 Fc γ R과의 상호작용을 위하여 접근가능한 형태로 효모 세포벽에 발현되는 유전학적 방법이다. 본 발명의 폴리펩티드를 함유한 돌연변이체 Fc의 효모 표면 디스플레이는 당업자에게 공지된 기술 또는 본원에 설명된 특정 방법 중 어느 것에 따라서 수행될 수 있다. 효모 디스플레이는 그 수용체에 대한 결합을 향상시키는 변이체 Fc 영역을 확인하기 위하여 원하는 수용체에 대한 실제 결합을 이용하는 이점을 제공한다.
- [0061] 본 발명의 한 양태는 바람직한 결합 특성, 예를 들면 야생형 Fc 영역을 포함한 대비되는 폴리펩티드가 Fc γ RIIIA에 결합하는 것보다 더 큰 친화력으로 Fc γ RIIIA에 결합하는 돌연변이체 Fc 융합 단백질의 능력을 가진 돌연변이체 Fc 융합 단백질을 선택하기 위한 방법을 제공한다. 돌연변이체 Fc 융합 단백질을 디스플레이하는 효모 세포를 결합 상호작용을 평가하기 위하여 당업자에게 공지된 임의의 생화학적 또는 면역학적 기초 분석에 의하여 스크리닝하고 특성화할 수 있다. 특정 구체예에서, 돌연변이체 Fc 융합 단백질의 스크리닝은 하나 이상의 생화학적 기초 분석, 예를 들면 ELISA 분석을 사용하여 수행된다.
- [0062] 바람직한 구체예에서, 변경된 Fc γ R 친화력(예를 들면, 향상된 Fc γ RIIIA 친화력)으로 변이체 Fc 영역을 포함한 분자를 스크리닝 및 확인하는 단계는 바람직하게는 고 처리율 방식으로 하나 이상의 생화학적 기초 분석과 조합하여 본원에 설명된 효모 디스플레이 기술을 사용하여 수행된다. 하나 이상의 생화학적 분석은 한정하는 것은 아니지만, ELISA 분석, 표면 플라즈몬 공명 분석, 면역침전 분석, 친화력 크로마토그래피, 및 평형 투석을 포함한 Fc-Fc γ R 상호작용, 즉, Fc γ R에 대한 Fc 영역의 특이적 결합을 확인하기 위한 당업계에 공지된 임의의 분석이 될 수 있다. 일부 구체예에서, 일부 구체예에서, 변경된 Fc γ R 친화력(예를 들면, 향상된 Fc γ RIIIA 친화력)을 가진 변이체 Fc 영역을 포함한 분자를 스크리닝 및 확인하는 단계는 바람직하게는 고 처리율 방식으로 하나 이상의 기능적 기초 분석과 조합하여 본원에 설명된 효모 디스플레이 기술을 사용하여 수행된다. 기능적 기초 분석은 섹션 5.2.6에서 본원에 설명된 것들과 같은 하나 이상의 Fc γ R 매개된 작동자세포 기능을 특성화하기 위한 당업계에 공지된 임의의 분석일 수 있다. 본 발명의 방법에 따라서 사용될 수 있는 작동자세포 기능의 무한정한 예는, 한정하는 것은 아니지만, 항체-의존성 세포 매개 세포독성(ADCC), 항체-의존성 식세포작용, 식세포작용, 옵소닌화, 옵소닌성 식세포작용, 세포 결합, 로제팅, C1q 결합 및 보체 의존성 세포 매개 세포독성을 포함한다. 일부 구체예에서, 변경된 Fc γ R 친화력(예를 들면, 향상된 Fc γ RIIIA 친화력)을 가진 변이체 Fc 영역을 포함한 분자를 스크리닝 및 확인하는 단계는 바람직하게는 고 처리율 방식으로 하나 이상의 기능적 기초 분석과 조합 또는 병행한 하나 이상의 생화학적 기초 분석과 조합하여 본원에 설명된 효모 디스플레이 기술을 사용하여 수행된다.
- [0063] 본 발명에 따라서 Fc γ R-Fc 상호작용을 측정하기 위한 바람직한 방법은 예를 들면 Fc γ RIIB와 Fc γ RIIIA의 μ M 범위에서 수용체의 그것의 리간드에 대한 고유의 약한 친화력에도 불구하고, 상호작용의 검출 및 정량을 허용하는, 발명자에 의하여 개발된 분석이다. 상기 방법은 복합체를 형성하지 않은 Fc γ R에 비해서 Fc 영역에 대한 개선된 결합력을 가지는 Fc γ R 복합체(예를 들면, Fc γ RIIIA, Fc γ RIIB)의 형성을 포함한다. 특정 구체예에서, 본 발명은 Fc 영역의 모노머 Fc γ R의 친화력에 비해서 Fc 영역에 대한 향상된 친화력을 가진 테트라머 Fc γ R 복합체를 생성하기 위한 방법을 포함하는데, 상기 방법은 (i) Fc γ R의 가용성 영역에 작동가능하게 결합된 15 아미노산 AVITAG 서열과 같은 융합 단백질을 생산하는 단계; (ii) 대장균 BirA 효소를 사용하여 생성된 단백질을 비오티ن화하는 단계; (iii) 테트라머 Fc γ R 복합체가 형성되도록, 적합한 몰 비율로 생성된 비오티ن화된 단백질을 스트렙타비딘-피코에리트와 혼합하는 단계를 포함한다.
- [0064] 본 발명의 바람직한 구체예에서, Fc 영역을 포함한 폴리펩티드는 이들이 모노머 복합체를 형성하지 않은 Fc γ R에 결합하는 것보다 8배 이상 더 높은 친화력으로 본 발명의 방법에 따라서 형성된 테트라머 Fc γ R 복합체에 결합한다. 테트라머 Fc γ R 복합체에 대한 Fc 영역을 포함한 폴리펩티드의 결합은 예를 들면, 형광 활성화 세포 분류(FACS), 방사선면역분석, ELISA 분석 등과 같은 당업자에게 공지된 표준 방법을 사용하여 결정될 수 있다.
- [0065] 본 발명은 세포 기초 또는 무-세포 분석을 포함한 분자의 기능성을 결정하기 위한 전술한 방법에 따라서 형성된 면역 복합체의 사용을 포함한다.
- [0066] 특정 구체예에서, 본 발명은 Fc γ RIIIA 및/또는 Fc γ RIIA에 대한 향상된 친화력을 가진 변이체 Fc 영역을 포함한 변형된 면역글로불린을 제공한다. 이러한 면역글로불린은 Fc γ R 결합 영역(예를 들면, Fc γ RIIIA 및/또는 Fc γ RIIB 결합 영역) 또는 Fc γ R 결합 영역(예를 들면, Fc γ RIIIA 및/또는 Fc γ RIIB 결합 영역)을 함유하도록 조

작된 면역글로불린 유도체를 자연적으로 함유한 IgG 분자를 포함한다. 본 발명의 변형된 면역글로불린은 바람직하게는 면역특이적으로 결합하는, 즉 특이적 항원-항체 결합, Fc γ R 결합 영역(예를 들면, Fc γ RIIIA 및/또는 Fc γ RIIB 결합 영역)을 함유한 항원을 분석하기 위한 당업계에 잘 공지된 면역분석에 의하여 결정된 비특이적 결합과 경쟁하는 임의의 면역글로불린 분자를 포함한다. 이러한 항체는, 한정하는 것은 아니지만, 폴리클로날, 모노클로날, 이중특이적, 다중특이적, 사람, 사람화, 키메라 항체, 단쇄 항체, Fab 단편, F(ab')₂ 단편, 이황화-결합된 Fvs 및 특정한 경우에, Fc γ R 결합 영역을 함유하거나 Fc γ R 결합 영역에 융합되도록 조작된 항원과 특이적으로 결합하는 VL 또는 VH 도메인 또는 상보적 결정 영역(CDR)이라도 함유한 단편을 포함한다.

[0067] 특정 구체예에서, 본 발명은 면역글로불린이 향상된 작동자 기능, 예를 들면 항체 의존성 세포 매개 세포독성을 가지도록 Fc γ RIIIA 및/또는 Fc γ RIIA에 대한 향상된 친화력을 가진 변이체 Fc 영역을 포함한 면역글로불린을 포함한다. 본 발명의 분자의 작동자 기능은 본원에 설명되거나 당업자에게 공지된 임의의 분석을 사용하여 분석될 수 있다. 일부 구체예에서, Fc γ RIIIA 및/또는 Fc γ RIIA에 대한 향상된 친화력을 가진 변이체 Fc 영역을 포함한 면역글로불린은 야생형을 비해서 2 배 이상, 4 배 이상, 8 배 이상, 10 배 이상, 50 배 이상, 또는 100 배 이상 향상된 ADCC 활성을 가진다.

[0068] 본 발명은 Fc γ R 활성화 수용체 및/또는 Fc γ R 억제성 수용체에 대한 치료 항체의 친화력을 조절하는 하나 이상의 아미노산 잔기의 변형(예를 들면, 치환, 삽입, 결실)에 의한 Fc 영역에서의 사람 또는 사람화 치료 항체(예를 들면, 종양 특이적 모노클로날 항체)를 조작하는 단계를 포함한다. 한 구체예에서, 본 발명은 Fc γ RIIIA 및/또는 Fc γ RIIA에 대한 Fc 영역의 친화력을 증가시키는 하나 이상의 아미노산 잔기의 변형에 의한 Fc 영역에서의 사람 또는 사람화 치료 항체(예를 들면, 종양 특이적 모노클로날 항체)를 조작하는 것에 관한 것이다. 다른 구체예에서, 본 발명은 Fc γ RIIIA 및/또는 Fc γ RIIA에 대한 Fc 영역의 친화력을 증가시키고, Fc γ RIIB에 대한 Fc 영역의 친화력을 더 감소시키는 하나 이상의 아미노산 잔기의 변형에 의한 Fc 영역에서의 사람 또는 사람화 치료 항체(예를 들면, 종양 특이적 모노클로날 항체)를 조작하는 것에 관한 것이다. 조작된 치료 항체는 예를 들면, 당업자에게 공지된 표준 분석에 의하여 결정된 바와 같이 향상된 작동자 기능, 예를 들면 향상된 ADCC 활성, 식세포작용 활성 등을 더 가질 수 있다.

[0069] 특정 구체예에서, 본 발명은 Fc γ RIIIA 및/또는 Fc γ RIIA에 대한 Fc 영역의 친화력을 증가시키는 하나 이상의 아미노산 잔기의 변형(예를 들면, 치환, 삽입, 결실)에 의한 Her2/neu 원형암유전자에 특이적인 사람화된 모노클로날 항체(Carter et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci USA 89:4285-9)를 조작하는 단계를 포함한다. 다른 특정 구체예에서, 사람화된 Her2/neu 모노클로날 항체의 변형은 또한 Fc γ RIIB에 대한 Fc 영역의 친화력을 더 감소시킬 수 있다. 또 다른 특정 구체예에서, Her2/neu에 특이적으로 조작된 사람화된 모노클로날 항체는 당업계에 공지되고 본원에 개시되고 예시된 표준 분석에 의하여 결정된 향상된 작동자 기능을 더 가질 수 있다.

[0070] 다른 특정 구체예에서, 본 발명은 Fc γ RIIIA 및/또는 Fc γ RIIA에 대한 Fc 영역의 친화력을 증가시키는 하나 이상의 아미노산 잔기의 변형(예를 들면, 치환, 삽입, 결실)에 의한 마우스 사람 키메라 항-CD20 모노클로날 항체, 2H7을 조작하는 것을 포함한다. 다른 특정 구체예에서, 항-CD20 모노클로날 항체, 2H7의 변형은 또한 Fc γ RIIB에 대한 Fc 영역의 친화력을 더 감소시킬 수 있다. 또 다른 특정 구체예에서, 조작된 항-CD20 모노클로날 항체, 2H7은 당업계에 공지되고 본원에 개시되고 예시된 표준 분석에 의하여 결정된 바와 같이 향상된 작동자 기능을 더 가질 수 있다.

[0071] 다른 특정 구체예에서, 본 발명은, 한정하는 것은 아니지만, Fc γ RIIIA 및/또는 Fc γ RIIA에 대한 Fc 영역의 친화력을 증가시키는 하나 이상의 잔기의 변형(예를 들면, 치환, 삽입, 결실)에 의한, Attorney Docket No. 011183-010-999이고, 2002년 8월 12일에 출원된 미국 가출원 제60/403,266호 및 2003년 8월 14일 출원된 미국 가출원 제10/643,857호에 개시된 항체 중 어느 하나를 포함한 항-Fc γ RIIB 항체를 조작하는 것을 포함한다. 본 발명의 방법에 따라서 조작될 수 있는 항-Fc γ RIIB 항체의 예는 ATCC accession number PTA-4591을 가진 2B6 모노클로날 항체 및 ATCC accession number PTA-4592를 가진 3H7(본원에 참고 인용된 ATCC, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 02209-2011에 기탁됨)이다. 다른 특정 구체예에서, 조작된 항-Fc γ RIIB 항체는 당업계에 공지되고 본원에 개시되고 예시된 표준 분석에 의하여 결정된 향상된 작동자 기능을 더 가질 수 있다. 특정 구체예에서, 2B6 모노클로날 항체는 334번 위치에서 글루탐산, 359번 위치에서 아스파라긴, 및 366번 위치에서 세린(MgFc13)으로의 변형; 316번 위치에서 아스파르트산, 378번 위치에서 발린, 및 399번 위치에서 글루탐산(MgFc27)으로의 치환; 또는 243번 위치에서 이소류신, 379번 위치에서 류신, 및 420번 위치에서 발린(MgFc29)으로의 치환; 또는 392번 위치에서 트레오닌 및 396번 위치에서 류신(MgFc38)으로의 치환; 또는 221번 위치에서 글루탐산, 270번 위치에서 글루탐산, 308번 위치에서 알라닌, 311번 위치에서 히스티딘, 396번 위치에서 류신,

및 402번 위치에서 아스파르트산(MgFc42)으로의 치환; 또는 410번 위치에서 히스티딘 및 396번 위치에서 류신(MgFc53)으로의 치환; 또는 243번 위치에서 류신, 305번 위치에서 이소류신, 378번 위치에서 아스파르트산, 404번 위치에서 세린, 및 396번 위치에서 류신(MgFc54)으로의 치환; 또는 255번 위치에서 이소류신, 및 396번 위치에서 류신(MgFc55)으로의 치환; 또는 370번 위치에서 글루탐산 및 396번 위치에서 류신(MgFc59)으로의 치환을 포함한다.

[0072] 본 발명은 또한 본 발명의 방법에 의하여 확인된 폴리펩티드 및 항체를 포함한 본 발명의 분자를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 본 발명의 분자를 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 얻을 수 있고, 폴리뉴클레오티드의 뉴클레오티드 서열은 당업계에 공지된 임의의 방법에 의하여 결정될 수 있다. 본 발명은 또한 상기 핵산을 포함한 벡터를 제공한다. 본 발명은 본 발명의 벡터 또는 폴리뉴클레오티드를 함유한 숙주 세포를 더 제공한다.

[0073] 본 발명은 본 발명의 분자의 생성을 위한 방법을 더 제공한다. 폴리펩티드 및 항체를 포함한 본 발명의 분자는 당업자에게 공지된 임의의 방법, 특히 재조합 발현에 의하여 생성될 수 있다. 특정 구체예에서, 본 발명은 본 발명의 분자를 재조합으로 생성하기 위한 방법에 관한 것인데, 상기 방법은 (i) 상기 분자의 발현에 적합한 조건 하에서 상기 분자를 코딩하는 핵산을 포함한 숙주 세포를 배지에 배양하는 단계; 및 (ii) 상기 배지로부터 상기 분자를 회수하는 단계를 포함한다.

[0074] 본 발명의 방법에 따라서 확인된 방법은 질병, 장애, 또는 감염과 연관된 하나 이상의 징후를 예방, 치료, 또는 개선하는 데 유용하다. 본 발명의 분자는 Fc γ R에 의하여 매개된 작동자세포 기능(예를 들면, ADCC)의 향상된 효능이 필요한 질병 또는 장애, 예를 들면 암, 감염성 질병의 치료 또는 예방 및 그 효과가 ADCC에 의하여 매개되는 치료 항체의 치료 효능을 증대하는 데 특히 유용하다.

[0075] 한 구체예에서, 본 발명은 암 항원을 특징으로 하는 암을 가진 환자에서 암을 치료하는 방법을 포함하는데, 상기 방법은 본 발명의 방법에 따라서 조작된 암 항원에 결합하는 치료 항체의 치료적으로 유효한 양을 투여하는 단계를 포함한다. 특정 구체예에서, 본 발명은 암 항원을 특징으로 하는 암을 가진 환자에서 암을 치료하는 방법을 포함하고, 상기 방법은 변이체 Fc 영역을 포함한, 상기 암 항원에 특이적으로 결합하는 치료 항체의 치료적으로 유효한 양을 투여하는 단계를 포함하며, 상기 변이체 Fc 영역은 야생형 Fc 영역에 비해서 하나 이상의 아미노산 변형을 포함하여, 상기 치료 항체가 야생형 Fc 영역을 포함한 치료 항체가 Fc γ RIIIA에 결합하는 것보다 더 큰 친화력으로 Fc γ RIIIA에 특이적으로 결합하고, 단 상기 변이체 Fc 영역은 329, 331, 또는 332번 위치에서 치환을 가지지 않고, 256, 290, 298, 312, 333, 334, 359, 360, 또는 430번 위치 중 어느 하나에서 알라닌; 330번 위치에 리신; 339번 위치에서 트레오닌; 320번 위치에서 메티오닌; 326번 위치에서 세린; 326번 위치에서 아스파라긴; 326번 위치에서 아스파르트산; 326번 위치에서 글루탐산; 334번 위치에서 글루타민; 334번 위치에서 글루탐산; 334번 위치에서 메티오닌; 334번 위치에서 히스티딘; 334번 위치에서 발린; 또는 334번 위치에서 류신을 가지지 않는다. 다른 특정 구체예에서, 본 발명은 암 항원을 특징으로 하는 암을 가진 환자에서 암을 치료하는 방법을 포함하고, 상기 방법은 변이체 Fc 영역을 포함한, 암 항원에 특이적으로 결합하는 치료 항체의 치료적으로 유효한 양을 투여하는 단계를 포함하며, 상기 변이체 Fc 영역은 야생형 FC 영역에 비해서 하나 이상의 아미노산 변형을 포함하여, 상기 치료 항체는 야생형 Fc 영역을 포함한 치료 항체가 Fc γ RIIIA에 결합하는 것보다 더 큰 친화력으로 Fc γ RIIIA에 특이적으로 결합하고, 상기 치료 항체는 야생형 Fc 영역을 포함한 치료 항체가 Fc γ RIIB에 결합하는 것보다 더 낮은 친화력으로 Fc γ RIIB에 특이적으로 결합하며, 단 상기 변이체 Fc 영역은 256, 298, 333 또는 334번 위치 중 어느 하나에 알라닌을 가지지 않는다. 본 발명은 암 항원을 특징으로 하는 환자에서 암을 치료하기 위한 방법을 포함하는데, 상기 방법은 상기 암 항원을 특이적으로 결합하는 치료 항체의 치료적으로 유효한 양을 투여하는 단계를 포함하고, 상기 치료 항체는 항체가 향상된 ADCC 활성을 가지도록 변이체 Fc 영역을 포함한다.

[0076] 본 발명은 그것이 필요한 환자에서 자가면역 장애 및/또는 염증 장애를 치료하는 방법을 포함하는데, 상기 방법은 변이체 Fc 영역을 포함한 분자의 치료적으로 유효한 양을 상기 환자에게 투여하는 단계를 포함하고, 상기 변이체 Fc 영역은 상기 분자가 야생형 Fc 영역을 포함한 대비되는 분자보다 더 큰 친화력으로 Fc γ RIIB에 특이적으로 결합하고, 상기 분자가 야생형 Fc 영역을 포함한 대비되는 분자보다 더 낮은 친화력으로 Fc γ RIIIA에 더 특이적으로 결합하도록 야생형 Fc 영역에 비해서 하나 이상의 아미노산 변형을 포함하고, 상기 분자는 면역 복합체(예를 들면, 항원/항체 복합체)에 특이적으로 결합한다. 본 발명은 이러한 질병의 치료 및/또는 예방에 사용되는 하나 이상의 추가 예방제 또는 치료제, 예를 들면 면역조절제, 항-염증제를 투여하는 단계를 더 포함한 자가면역 장애 및/또는 염증 장애를 치료하는 방법을 포함한다.

[0077] 본 발명은 또한 감염성 인자 또는 그것의 세포 수용체에 결합하는 본 발명의 하나 이상의 분자의 치료적으로 또

는 예방적으로 유효한 양을 투여하는 단계를 포함하는, 피험체에서 감염성 질병을 치료 또는 예방하기 위한 방법을 포함한다. 본 발명의 분자에 의하여 치료 또는 예방될 수 있는 감염성 질병은, 한정하는 것은 아니지만, 바이러스, 박테리아, 균류, 원충류 및 바이러스를 포함한 감염성 인자에 의하여 야기된다.

[0078] 본 발명의 한 양태에 따르면, 변이체 Fc 영역을 포함한 본 발명의 분자는 야생형 Fc 영역을 포함한 대비되는 분자에 비해서 감염성 인자, 예를 들면 병원성 단백질에 대하여 향상된 항체 작동자 기능을 가진다. 특정 구체예에서, 본 발명의 분자는 감염성 질병을 야기하는 감염성 인자의 식세포 작용 및/또는 옹소닌화를 증대함으로써 감염성 질병의 치료의 효능을 증대한다. 다른 특정 구체예에서, 본 발명의 분자는 감염성 질병을 야기하는 전염된 세포의 ADCC를 증대함으로써 감염성 질병의 치료의 효능을 증대한다.

[0079] 일부 구체예에서, 본 발명의 분자는 감염성 질병의 치료 및/또는 예방에 대한 당업자에게 공지된 하나 이상의 치료제의 치료적으로 또는 예방적으로 유효한 양과 조합하여 투여될 수 있다. 본 발명은 감염성 질병의 치료 및/또는 예방에 대한 당업자에게 공지된 항생제와 조합하여 본 발명의 분자를 사용하는 것을 고려한다.

[0080] 본 발명은 본 발명의 분자, 예를 들면 변이체 Fc 영역을 포함한 폴리펩티드, 변이체 Fc 영역을 포함한 면역글로불린, 본 발명에 따라서 조작된 치료 항체 및 약학적으로 허용되는 담체를 포함한 약학적 조성물을 제공한다. 본 발명은, 한정하는 것은 아니지만, 항암제, 항염증제, 면역조절제를 포함한 하나 이상의 추가 치료제를 더 포함한 약학적 조성물을 추가로 제공한다.

[0081] 3.1 정의

[0082] 본원에 사용된 용어 "Fc 영역"은 IgG 중쇄의 C-말단 영역을 정의하는 데 사용된다. 경계가 조금 다양할 수 있지만, 사람 IgG 중쇄 Fc 영역은 Cys226에서 카르복시 말단까지 뻗어있는 것으로 정의된다. IgG의 Fc 영역은 두 불변 도메인, CH2 및 CH3를 포함한다. 사람 IgG Fc 영역의 CH2 도메인은 대개 아미노산 231번부터 아미노산 341번까지 미친다. 사람 IgG Fc 영역의 CH2 도메인("C_H2" 도메인이라고도 함)은 대개 아미노산 231-340번에서 연장된다. CH2 도메인은 다른 도메인과 가깝게 쌍을 이루지 않는다는 점에서 독특하다. 대신에, 두 N-결합된 분지 탄수화물 사슬은 무결 천연 IgG의 두 CH2 도메인 사이에 끼워진다.

[0083] 본 명세서 전반에 걸쳐서, IgG 중쇄의 잔기의 넘버링은 본원에 참고 인용된 문헌(Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5판, Public Health Service, NHI, MD (1991))에서와 같은 EU 인덱스의 것이다. "Kabat에서와 같은 EU 인덱스"는 사람 IgG1 EU 항체의 넘버링을 말한다.

[0084] "힌지 영역"은 일반적으로 사람 IgG1의 Glu216에서 Pro230까지 미치는 범위로 정의된다. 다른 IgG 이소형태의 힌지 영역은 중쇄간 S-S 결합을 형성하는 첫 번째 및 마지막 시스테인 잔기를 동일한 위치에 놓음으로써 IgG1 서열과 정렬될 수 있다.

[0085] 본원에 설명된 용어 "항체" 및 "항체들"은 모노클로날 항체, 다중특이적 항체, 사람 항체, 사람화 항체, 합성 항체, 키메라 항체, 폴리클로날 항체, 낙타화 항체, 단쇄 Fvs(scFv), 단쇄 항체, Fab 단편, F(ab') 단편, 이항화-결합 이중특이적 Fv(sdFv), 세포내항체, 및 항-이디오타입(항-Id) 항체(예를 들면, 본 발명의 항체에 대한 항-Id 및 항-항-Id 항체를 포함), 및 상기 중 어떤 것의 에피토프-결합 단편을 말한다. 특히, 항체는 면역글로불린 분자 및 면역글로불린 분자의 면역학적 활성 단편, 즉 항원 결합 부위를 함유한 분자를 포함한다. 면역글로불린 분자는 임의의 유형(예를 들면, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA 및 IgY), 부류(예를 들면, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ 및 IgA₂) 또는 하위부류일 수 있다.

[0086] 본원에 사용된 바와 같이, 폴리펩티드 또는 단백질의 문맥에서 용어 "유도체"는 아미노산 잔기 치환, 결실 또는 첨가의 도입에 의하여 변경된 아미노산 서열을 포함한 폴리펩티드 또는 단백질을 말한다. 본원에 사용된 용어 "유도체"는 또한 즉 폴리펩티드 또는 단백질에 임의의 유형의 분자의 공유 부착에 의하여 변형된 폴리펩티드 또는 단백질을 말한다. 예를 들면, 한정하는 방식은 아니지만, 항체는 예를 들면 알려진 보호기/차단기, 단백질 분해 절단, 세포의 리간드 또는 다른 단백질에 대한 결합에 의한 글리코실화, 아세틸화, PEG화, 인산화, 아미드화, 유도체화에 의하여 변형될 수 있다. 유도체 폴리펩티드 또는 단백질은, 한정하는 것은 아니지만, 특이적 화학적 절단, 아세틸화, 포르밀화, 투니카마이신의 대사 합성 등을 포함한 당업자에게 공지된 기술을 사용한 화학적 변형에 의하여 생성될 수 있다. 나아가, 유도체 폴리펩티드 또는 단백질 유도체는 그것이 유래된 폴리펩티드 또는 단백질과 유사하거나 동일한 기능을 가진다.

[0087] 본원에 사용된 바와 같이, 비단백질성 유도체의 문맥에서 용어 "유도체"는 첫 번째 유기 또는 무기 분자의 구조에 근거하여 형성된 두 번째 유기 또는 무기 분자를 말한다. 유기 분자의 유도체는, 한정하는 것은 아니지만,

예를 들면 히드록실, 메틸, 에틸, 카르복실 또는 아민기의 첨가 또는 결실에 의하여 변형된 분자를 포함한다. 유기 분자는 또한 에스테르화, 알킬화, 및/또는 인산화될 수 있다.

- [0088] 본원에 설명된 용어 "장애" 및 "질병"은 피험체의 상태를 말하는 것으로 교화하여 사용된다. 특히, 용어 "자가면역 질병"은 그 자신의 세포, 조직 및/또는 기관에대한 피험체의 면역학적 반응에 의하여 야기된 세포, 조직, 및/또는 기관 손상을 특징으로 하는 피험체의 상태를 말하는 용어 "자가면역 장애"와 교환하여 사용된다. 용어 "염증 질병"은 염증, 바람직하게는 만성 염증을 특징으로 하는 피험체의 상태를 말하는 용어 "염증 장애"와 교환하여 사용된다. 자가면역 장애는 염증과 연관될 수도 연관되지 않을 수도 있다. 더욱이, 염증은 자가면역 장애에 의하여 야기될 수도, 야기되지 않을 수도 있다. 따라서, 특정 장애는 자가면역과 염증 장애 둘 다를 특징으로 할 수 있다.
- [0089] 본원에 사용된 용어 "암"은 세포의 비정상 통제되지않는 성장으로부터 기인된 신생물 또는 종양을 말한다. 본원에 사용된 암은 명백히 백혈병 및 림프종을 포함한다. 일부 구체예에서, 암은 국소화된 채로 있는 양성 종양을 말한다. 다른 구체예에서, 암은 인접 신체 구조를 침입하고 파괴하며 먼 부위까지 퍼지는 악성 종양을 말한다. 일부 구체예에서, 암은 특이적 암 항원과 연관된다.
- [0090] 본원에 사용된 용어 "면역조절제" 및 그것의 변이는 숙주의 면역계를 조절하는 제제를 말한다. 특정 구체예에서, 면역조절제는 면역억제제이다. 특정 다른 구체예에서, 면역조절제는 면역자극제이다. 면역조절제는, 한정하는 것은 아니지만, 소분자, 펩티드, 폴리펩티드, 융합단백질, 항체, 무기분자, 모방제, 및 유기 분자를 포함한다.
- [0091] 본원에 사용된 용어 "에피토프"는 동물, 바람직하게는 포유동물, 및 가장 바람직하게는 사람에서 항원 또는 면역원 활성을 가진 폴리펩티드 또는 단백질 또는 비단백질 분자의 단편을 말한다. 면역원 활성을 가진 에피토프는 동물에서 항체 반응을 일으키는 폴리펩티드 또는 단백질의 단편이다. 항원 활성을 가진 에피토프는 항체가 면역특이적으로 당업자에게 잘 공지된 임의의 방법, 예를 들면 면역분석에 의하여 결정된 바와 같이 결합하는 폴리펩티드 또는 단백질의 단편이다. 항원 에피토프는 반드시 면역원성일 필요는 없다.
- [0092] 본원에 사용된 용어 "단편"은 다른 폴리펩티드의 아미노산 서열의 5개 이상의 인접 아미노산 잔기, 10개 이상의 인접 아미노산 잔기, 15개 이상의 인접 아미노산 잔기, 20개 이상의 인접 아미노산 잔기, 25개 이상의 인접 아미노산 잔기, 40개 이상의 인접 아미노산 잔기, 50개 이상의 인접 아미노산 잔기, 60개 이상의 인접 아미노산 잔기, 70개 이상의 인접 아미노산 잔기, 인접 80개 이상의 아미노산 잔기, 인접 90개 이상의 아미노산 잔기, 인접 100개 이상의 아미노산 잔기, 인접 125개 이상의 잔기, 150 개 이상의 인접 아미노산 잔기, 인접 175개 이상의 아미노산 잔기, 인접 200개 이상의 아미노산 잔기, 인접 200개 이상의 아미노산 잔기, 또는 인접 250개 이상의 잔기의 아미노산 서열을 포함한 펩티드 또는 폴리펩티드를 말한다. 특정 구체예에서, 폴리펩티드의 단편은 폴리펩티드의 하나 이상의 기능을 보유한다.
- [0093] 본원에 사용된 용어 "핵산" 및 "뉴클레오타이드 서열"은 DNA 분자(예를 들면, cDNA 또는 유전체 DNA), RNA 분자(예를 들면, mRNA), DNA와 RNA 분자의 조합, 또는 하이브리드 DNA/RNA 분자, 및 DNA 또는 RNA 분자의 유사체를 포함한다. 이러한 유사체는, 예를 들면, 한정하는 것은 아니지만, 이노신 또는 트리틸화된 염기를 포함한 뉴클레오타이드 유사체를 사용하여 생성될 수 있다. 이러한 유사체는 또한 예를 들면 뉴클레아제 내성 또는 증가된 세포막을 가로지르는 능력과 같이 분자에 이로운 기여를 제공하는 변형된 백본을 포함한 DNA 또는 RNA 분자를 포함할 수 있다. 핵산 또는 뉴클레오타이드 서열은 단일 가닥, 이중 가닥일 수 있고, 단일 가닥과 이중 가닥 부분 모두를 함유할 수 있으며, 삼중 가닥 부분을 포함할 수 있지만 바람직하게는 이중 가닥 DNA이다.
- [0094] 본원에 설명된 "치료적으로 유효한 양"은 질병 또는 장애를 치료 또는 처리하기에 충분한 치료제의 양을 말한다. 치료적으로 유효한 양은 질병의 발병을 지연 또는 최소화, 예를 들면 암의 진행을 지연 또는 최소화하기에 충분한 치료제의 양을 말할 수 있다. 치료적으로 유효한 양은 또한 질병의 치료 또는 처리에 치료적 이점을 제공하는 치료제의 양을 말할 수 있다. 나아가, 본 발명의 치료제와 관한 치료적으로 유효한 양은 치료제 단독의 양 또는 질병의 치료 또는 처리에 치료적 이점을 제공하는 다른 치료와 조합한 치료제의 양을 의미한다.
- [0095] 본원에 설명된 용어 "예방제" 및 "예방제들"은 장애의 예방, 또는 재발 또는 장애의 확산의 예방에 사용될 수 있는 임의의 제제(들)를 말한다. 예방적으로 유효한 양은, 한정하는 것은 아니지만, 고증식성 질병에 걸리기 쉬운 자들, 예를 들면 유전적으로 암에 걸리기 쉽거나 발암물질에 사전 노출된 자들을 포함한 환자에서 고증식성 질병, 특히 암의 재발 또는 확산, 또는 이러한 것들의 발생을 예방하기에 충분한 예방제의 양을 말할 수 있다. 예방적으로 유효한 양은 또한 질병의 예방에 예방적 이점을 제공하는 예방제의 양을 말할 수 있다. 나아가, 본

발명의 예방제에 관한 예방적으로 유효한 양은 예방제 단독의 양 또는 질병의 예방에 예방적 이점을 제공하는 다른 제제와 조합한 예방제의 양을 의미한다.

[0096] 본원에 설명된 용어 "예방하다", "예방하는" 및 "예방"은 예방제 또는 치료제의 투여의 결과로서 피험체에서의 하나 이상의 징후의 재발 또는 발병의 방지를 말한다.

[0097] 본원에 설명된 용어 "조합하여"는 하나 이상의 예방제 및/또는 치료제의 사용을 말한다. 용어 "조합하여"의 사용은 예방제 및/또는 치료제를 장애를 가진 피험체에게 투여하는 순서를 제한하지 않는다. 첫 번째 예방제 또는 치료제는 장애를 가진 피험체에게 두 번째 예방제 또는 치료제의 투여 전에(예를 들면, 5 분, 15 분, 30 분, 45 분, 1 시간, 2 시간, 4 시간, 6 시간, 12 시간, 24 시간, 48 시간, 72 시간, 96 시간, 1 주, 2 주, 3 주, 4 주, 5 주, 6 주, 8 주, 또는 12 주 전), 동시에, 또는 후에(예를 들면, 5 분, 15 분, 30 분, 45 분, 1 시간, 2 시간, 4 시간, 6 시간, 12 시간, 24 시간, 48 시간, 72 시간, 96 시간, 1 주, 2 주, 3 주, 4 주, 5 주, 6 주, 8 주, 또는 12 주 후) 투여될 수 있다.

[0098] 본원에 사용된 "작동자 기능"은 항체 Fc 영역과 Fc 수용체 또는 리간드의 상호작용으로부터 기인된 생화학적 기능을 의미한다. 작동자 기능은, 한정하는 것은 아니지만, 항체 의존성 세포 매개 세포독성(ADCC), 항체 의존성 세포 매개 식세포작용(ADCP), 및 보체 의존성 세포독성(CDC)을 포함한다. 작동자 기능은 항원의 결합 후에 작동하는 것들과 항원 결합에 의존하여 작동하는 것들 모두를 포함한다.

[0099] 본원에 사용된 "작동자세포"는 하나 이상의 Fc 수용체를 발현하고 하나 이상의 작동자 기능을 매개하는 면역계의 세포를 의미한다. 작동자세포는, 한정하는 것은 아니지만, 단핵구, 대식세포, 호중구, 수지상세포, 호산구, 비만세포, 혈소판, B 세포, 대 과립구 림프구, 랑게르한스 세포, 자연 살해(NK) 세포를 포함하고, 한정하는 것은 아니지만, 사람, 마우스, 래트, 토끼 및 원숭이를 포함한 임의의 생물로부터 유래할 수 있다.

[0100] 본원에 사용된 "Fc 리간드"는 항체의 Fc 영역에 결합하여 Fc-리간드 복합체를 형성하는 어떤 생물로부터의 분자, 바람직하게는 폴리펩티드를 의미한다. Fc 리간드는, 한정하는 것은 아니지만, Fc γ R, FcRn, C1q, C3, 스타필로코커스 단백질 A, 스트렙토코커스 단백질 G, 및 바이러스 Fc γ R를 포함한다. Fc 리간드는 Fc에 결합하는 발견되지 않은 분자를 포함할 수 있다.

실시예

[0580] 효모 디스플레이 시스템을 이용하여, 돌연변이체 사람 IgG1 중쇄 Fc 영역을 상이한 Fc 수용체에 대한 변경된 친화력에 대하여 선별하였다. 특히, 돌연변이체 Fc 라이브러리를 실수유발 PCR (Genomorph, Stratagene)에 의하여 생성시키고, 다음에 돌연변이체 Fc 단백질을 Aga2p 세포벽 단백질에 융합시켰는데, 이 세포벽 단백질은 융합 단백질이 분비되는 것을 허용하고 및 효모 세포벽 상에서 디스플레이되는 것을 허용하였다.

[0581] 사람 수용체의 가용성 형태(Fc γ RIIA 및 Fc γ RIIB)를 클로닝하였다. 그러나, 효모세포 표면상의 IgG1 Fc 도메인 검출은 리간드를 위한 Fc γ R의 낮은 친화력에 의해 저해된다. 이러한 한계를 회피하기 위하여, 효소적으로 비오틴화될 수 있고, 이어서 피코에리트린에 콘쥬게이트된 스트렙타비딘과 반응할 수 있는(SA-PE; Molecular Probes) AVITAG 서열을 사용하여, 가용성 Fc γ R 테트라머 복합체를 형성하였다. ELISA 분석은 가용성 Fc γ R 테트라머 복합체가 모노머 Fc γ R에 비하여 사람 IgG1에 대하여 더 높은 항원항체결합력을 갖는다는 것을 확인하였다. 효모 세포 표면상의 Fc 융합 단백질은 또한 FACS 분석에 의하여 평가되는 바와 같이 가용성 Fc γ R 테트라머 복합체에 결합하였다.

[0582] 효모 세포 표면상에서 발현되는 Fc 융합 단백질의 가용성 Fc γ R 테트라머 복합체로의 차별적 결합을 FACS 분석에 의하여 모니터링하였다. 하나 이상의 가용성 Fc γ R 테트라머 복합체에 대하여 바뀐 친화력을 갖는 Fc 융합 단백질을 따라서 식별한 후, 완전한 면역글로불린에 포함시키고, 포유동물 세포에서 발현시켰다. 포유동물 발현 생성물이 ELISA 분석에서 사용되어, 효모 표면 표시 시스템에서 얻어진 결과를 확인하였다. 마지막으로, 돌연변이체 Fc 영역을 시퀀싱하여 바뀐 잔기를 확인하였다.

[0583] **6.1 Fc γ RIIA의 복제, 발현 및 정제**

[0584] **재료 및 방법**

[0585] 가용성 Fc γ RIIB 및 Fc γ RIIA를 하기와 같이 클로닝하였다. 사람 Fc γ R 유전자(Fc γ RIIB 및 Fc γ RIIA)를 위한 cDNA 클론을 얻었다(Ravetch lab.으로부터 증여). Fc γ RIIA 유전자의 가용성 영역(아미노산 7-203)을 PCR에 의하여 증폭시키고(표 12), BamHI/HindIII로 분해시키고, pET25벡터(Novagen)에 리게이션하였다.

이 벡터를 SalI/NotI로 분해시키고, 370 단편을 겔 분리하였다. 벡터 hu3A(J. Ravetch로부터 기증받음)를 BamHI/SalI로 분해시키고, Fc γ RIIIA의 N-말단부를 함유하는 270 단편을 분리하였다. 단편 둘 다를 BamHI/NotI로 절단된 pcDNA3.1에 공동 리게이션하여, pcDNA3-Fc γ RIIIA를 생성하였다(아미노산 1-203). Fc γ RIIB의 가용성 영역(아미노산 33-180)을 PCR에 의하여 증폭시키고(표 12), BglIII/HindIII로 분해시키고, pET25b(+)(Novagen)으로 리게이션하였다. 이 벡터를 BamHI/NotI로 분해시키고, 140bp 단편을 겔 분리하였다. 벡터 huRIIb1(J. Ravetch로부터 기증)를 BamHI/EcoRI로 분해하였고, 440bp N-말단 Fc γ RIIB 단편을 분리하였다. 이들 단편 둘 다를 BamHI/NotI로 절단된 pcDNA3.1에 공동 리게이션하여, pcDNA3-Fc γ RIIB를 생성하였다(아미노산 1-180). 재조합 클론을 293H 세포에 트랜스펙션시키고, 세포 배양물로부터 상청액을 수집하고, 가용성 재조합 Fc γ R(rFc γ R) 단백질을 세파로스 칼럼 상에서 정제하였다.

[0586] **결과**

[0587] 재조합 가용성 Fc γ RIIIA(rFc γ IIIA) 및 재조합 가용성 Fc γ RIIB(rFc γ RIIB)를 동종이 되도록 정제하였다.

[0588] IgG 세파로스 칼럼 상에서 재조합 가용성 Fc γ R(rFc γ R) 단백질의 발현 및 정제 후, 정제된 가용성 재조합 수용체 단백질의 순도 및 겔보기 분자량을 SDS-PAGE에 의하여 측정하였다. 도 1에서 나타내는 바와 같이, 가용성 rFc γ RIIIA(도1, 레인1)은 ~35KDa의 예상 겔보기 분자량을 가졌으며, 가용성 rFc γ RIIB(도 1, 레인4)는 ~20KDa의 예상 겔보기 분자량을 가졌다. 도 1에서 나타내는 바와 같이, 가용성 Fc γ RIIIA(rFc γ IIIA)는 Fc γ RIIIA상에서 일반적으로 발견되는 높은 정도의 글리코실화에 기인한 확산 "퍼지" 밴드로 이동한다(Jefferis, et al., 1995 Immunol Lett. 44, 111-117).

[0589] **6.1.1 정제된 재조합 가용성 Fc γ RIIIA의 특성 분석**

[0590] **재료 및 방법**

[0591] 상술한 바에 따라 얻어진 정제된 가용성 Fc γ RIIIA를 ELISA 분석을 사용하여 사람 모노머 또는 응집 IgG에 대한 직접 결합에 대하여 분석하였다. 플레이트를 가용성 rFc γ RIIIA의 10 ng으로 밤새 1X PBS에서 코팅하였다. 코팅 이후, 플레이트를 1X PBS/0.1% Tween 20에서 3회 세정하였다. 사람 IgG, 비오틴화된 모노머 IgG 또는 비오틴화된 응집 IgG 중 어느 하나를 0.03 mg/mL 내지 2 mg/mL 범위의 농도로 웰에 첨가하였으며, 가용성 rFc γ RIIIA에 결합하는 것이 허용되었다. 반응을 37°C에서 1시간 동안 실시하였다. 플레이트를 1X PBS/0.1% Tween 20으로 다시 3회 세정하였다. 사람 IgG의 가용성 rFc γ RIIIA으로의 결합은 스트렙타비딘 양고추냉이과산화효소 콘쥬게이트로 650 nm에서 흡광도를 모니터링함으로써 검출하였다. 650 nm에서 흡광도는 결합된 응집 IgG에 비례한다.

[0592] 차단 ELISA 실험에서, 응집 IgG로의 수용체의 결합을 차단하는 Fc γ RIIIA 모노클로날 항체, 래트 항-Fc γ RIIIA 항체(Pharmingen)의 능력을 모니터하였다. 세정 및 인큐베이션 조건은 상술한 바와 같았으나, 다만 예외로서 IgG 첨가 이전에 다섯 배의 과량 물을 첨가하고 37°C에서 30분간 인큐베이션되도록 하였다.

[0593] **결과**

[0594] 정제된 재조합 가용성 Fc γ RIIIA는 응집 IgG와 특이적으로 결합한다.

[0595] 정제된 재조합 가용성 Fc γ RIIIA의 응집 및 모노머 IgG로의 직접 결합을 ELISA 분석(도 2)을 사용하여 테스트하였다. 2 μ g/ml의 IgG 농도에서, 응집 IgG로의 강한 결합을 관찰하였다. 하지만, 유사한 농도에서 모노머 IgG와의 결합은 검출되지 않았다. 응집 IgG 결합은 3G8, 리간드 결합 위치를 차단하는 래트 항-Fc γ RIIIA 모노클로날 항체에 의하여 차단되었는데, 이는 응집 IgG 결합이 정상 Fc γ RIIIA 리간드 결합 위치(도 2)의 그것을 통하여 이루어지는 것을 나타낸다. 가용성 rFc γ RIIB 또한 특성 분석이 되어, rFc γ RIIIA와 유사한 특성으로 IgG에 결합하는 것이 나타났다.

[0596] **6.2 가용성 Fc γ R 테트라머 복합체**

[0597] **재료 및 방법**

[0598] AVITAG 펩티드에 융합된 가용성 FcR γ IIIA 및 FcR γ IIB의 발현을 위한 플라스미드의 구성

[0599] 가용성 Fc γ R 테트라머 복합체를 생성하기 위하여, 사람 FcR γ IIIA 유전자의 가용성 영역(아미노산 7-203)을 PCR에 의하여 증폭시키고(표 12), BamHI/HindIII로 분해하고, pET25b(+)(Novagen)에 리게이션하였다. 이 벡터를 SalI/NotI로 분해하고, 370bp 단편을 아가로스 겔 전기영동법으로 분리하였다. 벡터 hu3A(J. Ravetch로부터 증여받음)를 BamHI/SalI로 분해하고, FcR γ IIIA의 N-말단을 함유하는 270bp 단편을 분리하였다. 두 단편을

BamHI/NotI으로 분해된 pcDNA3.1(Invitrogen)에 공동리게이션하여 pcDNA3-FcRγIIIA(아미노산 1-203)을 생성하였다.

[0600] FcRγ IIB의 가용성 영역(아미노산 33-180)을 PCR에 의하여 증폭시키고(표 1), BglII/HindIII로 분해하고, pET25(+)(Novagen)에 리게이션하였다. 이 벡터를 BamHI/NotI으로 분해하고, 140 bp 단편을 아가로스 겔 전기영동법에 의하여 분리하였다. 벡터 huRIIb₁(J. Ravatch로부터 증여)을 BamHI/EcoRI로 분해하고, FcRγ IIB N-말단에 의한 440 단편을 분리하였다. 이들 단편 둘 다를 BamHI/NotI로 분해된 pcDNA3.1에 공동 리게이션하여, pcDNA3-FcRγ IIB(아미노산 1-180)을 생성시켰다. 이어서, 링커-AVITAG 서열을 FcγRIIIA 및 FcγRIIB 둘 다의 C-말단에 융합시켰다. FcγRIIIA-링커-avitag 및 FcγRIIB-링커-avitag 구조를 생성하기 위하여, pcDNA3.1 FcγRIIIA 및 FcγRIIB 구조를 Not I 및 XbaI으로 분해하였고(둘 다 벡터 서열에서 절단됨), 5' 종단에서의 NotI 위치 및 3' 종단에서의 XbaI로 구성된 86 염기쌍의 두 가닥 올리고뉴클레오티드를 벡터에 리게이션하였다. 5'-인산화 역 상보적 올리고뉴클레오티드 두 개를 사전-설계된 NotI 및 XbaI를 위한 제한 위치로 어닐링함으로써, 이 86 bp 단편을 생성하였다(표 12에서 5' 및 3' 링커.avitag 프라이머로 나타냄). 각 프라이머의 동일 부피를 μ 당 100 ng에서 혼합하고, DNA를 90℃까지 15분간 가열하고, 실내 온도에서 1시간 동안 냉각하여 어닐링하였다. 이것은 두 가닥의 이 DNA 단편이 생성시켰고, 단편은 각각의 효소에 의하여 분해된 pcDNA3.1-FcγRIIIA 및 FcγRIIB 구조에 리게이션되기에 용이하였다. 따라서, pcDNA3.1-FcRγ IIIA-링커-AVITAG 및 pcDNA3.1-FcRγ IIB-링커-AVITAG를 구성하였다.

표 12

FcγR 및 IgG 벡터 구성을 위하여 사용된 프라이머

올리고머	서열
5' 링커 .avitag (SEQ. ID NO. 1)	GGCCGCAGGTGGTGGTGGTCTGGTGGTGGTGGTCTGGTCTGAACGACATCTT CGAGGCTCAGAAAA TCGAATGGCACGAATGAT
3' 링커 .avitag (SEQ. ID NO. 2)	CTAGATCATTCGTGCCATTTCGATTTTCTGAGCCTCGAAGATGTCGTTAGACCAG AACCACCACCACCAGAACCACCACCACCTGC
FcRIIIA 왼쪽 (SEQ. ID NO. 3)	G TTG GAT CCT CCA ACT GCT CTG CTA CTT CTA GTT T
FcRIIIA 오른쪽 (SEQ. ID NO. 4)	GAA AAG CTT AAA GAA TGA TGA GAT GGT TGA CAC T
FcRIIB 오른쪽 (SEQ. ID NO. 5)	GAA GTC GAC AAT GAT CCC CAT TGG TGA AGA G
FcRIIB 왼쪽 (SEQ. ID NO. 6)	G TTA GAT CTT GCT GTG CTA TTC CTG GCT CC
IgG1 오른쪽 (SEQ. ID NO. 7)	ATA GTC GAC CAC TGA TTT ACC CGG AGA
IgG1 왼쪽 (SEQ. ID NO. 8)	GGAA TTC AAC ACC AAG GTG GAC AAG AAA GTT
mcr025;chl (f') (SEQ. ID NO. 9)	AAA GGATCC GCG AGC TCA GCC TCC ACC AAG G
H021 (SEQ. ID NO. 10)	GTCTGCTCGAAGCATTAACC

[0601]

[0602] BirA에 의한 비오틴화

[0603] pcDNA3.1로 클로닝된 단백질의 C-말단에서 15 아미노산 AVITAG 서열(Avidity, CO)(Schatz P.J.,1993, Biotechnology, 11:1138-1143)에 융합된 가용성 Fc 수용체(FcγR)를 생성시켰는데, 리포펙타민 2000 시약(Invitrogen, Ca)을 사용한 293H 세포의 일시적으로 트랜스펙션에 의해서이다. 배양물로부터 상청액을 수집하고, 상청액을 IgG 세파로스 상에 통과시킴으로써, 가용성 FcR 단백질을 정제하였다. 가용성 FcR-AVITAG 융합 단백질의 농도를 280 nm에서의 흡광도에 의하여 정량화하였다. 가용성 FcR 단백질상에 존재하는 AVITAG를 제조사(Avidity, CO)의 프로토콜에 따라 대장균 BirA 효소, 비오틴 리가제로 비오틴화하였다. 프로티아제 억제

제(Sigma 카탈로그#P8849)의 각테일의 1:100 최종 희석물 및 1 mg/ml의 최종 농도인 류벡틴(Sigma L-8511)을 혼합물에 첨가하여 단백질 분해를 방지하였다. BirA 반응을 실내 온도에서 밤새 인큐베이션하였고, 이후 Biomax 10K-한외여과장치(Millipore)를 사용하여, 4℃에서 3500 rpm으로 원심분리함으로써 용액을 농축시켰다. 단백질을 Tris-HCL(20 mM, pH 8.0), 50 mM NaCl에서 FPLC Superdex 200HR 10/30 칼럼(Pharmacia Biotech) 상에 로딩하여, 자유 비오틴으로부터 표지된 가용성 Fc γ R을 분리하였다.

[0604] 스트렙타비딘 이동 분석에 의한 비오틴화도 측정

[0605] 단백질의 약 50-85%를 BirA 효소(Avidity, CO)에 의하여 비오틴화하였다. 스트렙타비딘-이동 분석을 사용하여 단백질의 비오틴화도를 측정하였다. 비오틴화된 단백질을 스트렙타비딘(MW 60,000 달톤)으로 상이한 비율에서 인큐베이트하였다. 비오틴화되지 않은 단백질 자체 및 스트렙타비딘 자체는 비오틴화도를 측정하기 위한 대조군에 포함되었다. 인큐베이션을 얼음 상에서 2시간 또는 4℃에서 밤새 실시하였다. 비오틴화된 단백질에 결합한 스트렙타비딘은 고분자량 밴드로서 이동하였다. 비오틴화도를 샘플에 남아있는 모노머 단백질의 양에 의하여 측정하였다. 모노머 저분자량 종류의 부재 및 스트렙타비딘 자체보다 더 높은 분자량을 갖는 복합체의 존재는 높은 비오틴화도를 표시한다.

[0606] Fc γ R 테트라머 복합체의 형성을 MHC 클래스 I 테트라머를 위하여 사전에 확립된 방법에 따라 수행하였다(Busch D. H. et al., 1998 *Immunity* 8:353-362; Altman, J. D. et al., 1996, *Science* 274:94-96). 비오틴화된 모노머 Fc γ R의 농도를 280 nm에서의 흡광도를 기초하여 계산하였다. 스트렙타비딘-피코에리트린(SA-PE)(Molecular Probes, OR)의 분자 하나는 비오틴의 분자 4개와 결합할 수 있는 용량을 갖는다. 모노머 비오틴화된 Fc γ R과 SA-PE의 5:1 몰비를 사용하여, 과잉의 비오틴화된 단백질을 확보하였다. SA-PE의 계산된 분자량은 300,000 달톤이고, 그러므로 스트렙타비딘-PE 수용액 1 mg/mL의 303 mL는 SA-PE의 1 nmole을 가지며, 이것은 단백질의 5 nmole에 첨가되었다. 테트라머 단백질의 효율적인 형성은 SA-PE를 단계적으로 증분하여 첨가하는 것을 요구한다. SA-PE 양의 절반을 먼저 첨가하고, 나머지 SA-PE를 작은 분획분으로 매 20-30분간 4℃로 암실에서 첨가하였다. 나머지 SA-PE 첨가에 있어 간격은 탄력적이다. SA-PE의 첨가가 완료된 후, 용액을 농축시키고, pH 7.4인 포스페이트 완충 염수에서 상기와 같이 FPLC 크기 배제 칼럼 상에 로딩하였다. SA-PE 자체보다 더 큰 분자량을 가지며, 비어있는 부피에서 용출된 분량을 수집하였다. 프로티아제 억제제를 보충하여 단백질 분해를 방지하였다. 용액을 농축시키고, 최종 복합체에 보관용으로 추가 프로티아제 억제제를 첨가하였다. 가용성 Fc γ R 테트라머 복합체의 최종 농도를 비오틴화된 모노머 단백질의 시작 농도를 기초하여 계산하였다. 예를 들면, 만약 비오틴화된 단백질의 500 μ g을 사용하여 테트라머 복합체를 만들었고, 최종 농축된 테트라머가 500 μ L의 부피였다면, 농도는 약 1 mg/mL로 측정될 것이다(테트라머 형성의 각 단계에서 어느 정도가 손실되었는지를 정확하게 측정하기 어렵기 때문에, 농축 도중 발생한 손실을 고려하지 않는다. PE로부터의 간섭 때문에 280 nm에서의 흡광도를 이용하여 농도를 측정하는 것 또한 가능하지 않다). 가용성 Fc γ R 테트라머 복합체를 -80℃에서 장기 저장을 위한 프로티아제 억제제와 함께 작은 분획분으로 분배하였다. 테트라머가 효모 표시 라이브러리를 선별하기 위하여 사용될 때, 나트륨 아지드를 이들 시료에 첨가하지 않았다. 분획분을 녹이는 때에, 테트라머를 4℃에서 1주일 이하로 보관하였다.

[0607] 테트라머 Fc γ R 복합체의 특성 분석을 위한 ELISA 분석

[0608] ELISA를 사용하여 테트라머 Fc γ R 복합체의 특성을 분석하였다. Maxisorb F96 웰 플레이트(Nunc)를 사람 IgG의 25 ng으로 PBS 완충액에서 코팅하였고, 4℃에서 밤새 인큐베이션하였다. 플레이트를 PBS/0.5% BSA/0.1% Tween 20(세정 및 희석 완충액)으로 세정하는데, 이는 3G8, 래트 항-사람 Fc γ RIIA 항체로의 하기와 같은 차단을 결정하기 위한 Fc γ RIIA 테트라머 및 테스트 항체의 첨가 전이다. 차단 단계를 하기와 같이 수행하였다: 가용성 Fc γ RIIA 테트라머를 0.5 mg/ml의 고정된 최종 농도로 항체와 함께 PBS/0.5% BSA/0.1% Tween 20 완충액에서 실내온도에서 1시간 동안 사전-인큐베이트 하였다. 항체의 최종 농도는 60 mg/mL 내지 0.25 mg/mL의 범위였다. 3G8은 래트 항-사람 Fc γ RIIA 항체이며, 이 실험의 목적을 위하여 키메라 버전을 사용하였는데, 즉 항체의 가변 영역이 래트 항-사람 Fc γ RIIA이고, 중쇄 또는 경쇄는 IgG1 사람 영역으로부터 나온다. 키메라 4.4.20.D265A가 또한 이 실험에서 사용되었는데, 이는 항-형광 항체이며, Fc 영역은, 아스파르트산이 사람 IgG1에서 알라닌으로의 치환되어 Fc γ R로의 감소된 결합을 초래하는 265위치에서의 돌연변이를 함유한다. 이 항체는 이전에 특성 분석되었다(Clynes et al., 2000, *Nat. Med.* 6:443-446; Shields et al., 2001, *J. Biol. Chem.*, 276:6591-6604를 참조). 이 항체를 음성 이소타입 대조군으로 사용되었다.

[0609] 실내온도에서 1시간 동안의 사전-인큐베이션에 의하여 항체가 Fc γ RIIA 테트라머에 결합되는 것을 허용하였다. 혼합물을 다음에 세정된 플레이트 상의 IgG에 첨가하고, 또 다른 1시간 동안 실내온도에서 인큐베이트하였다.

플레이트를 완충액으로 세정하고, DJ130c(덴마크의 DAKO로부터 입수할 수 있는 래트 항-사람 Fc γ RIIIA 항체; 이것의 에피토프는 3G8 항체의 그것과 구별된다) 1:5000의 희석물을 첨가하고, 결합한 Fc γ RIIIA 테트라머를 검출하기 위하여 실내 온도에서 1시간 동안 인큐베이트하였다. 미결합 항체를 완충액으로 세정하고, 결합된 DJ130c는 염소 항-래트 퍼옥시다제(Jackson 실험실)로 검출하였다. 이 시약은 사람 Fc를 검출하지 않을 것이다. 미결합 퍼옥시다제-콘쥬게이트된 항체를 세정한 후, 기질, TMB 시약(BioF $\times$)을 첨가하여 3G8에 대한 이소타입 대조군의 차단 정도를 검출하였고, 형성된 색을 650 nm에서 판독하였다.

[0610] ELISA에 의한 가용성 테트라머 Fc γ RIIIA의 IgG로의 직접 결합을 위해, 맥시소르브 플레이트를 상술한 바와 같이 25 ng IgG로 코팅하였다. 가용성 테트라머 Fc γ RIIIA를 20 mg/mL 내지 0.1 mg/mL로 첨가하고, 비오틴화된 모노머 가용성 테트라머 Fc γ RIIIA를 20 mg/mL 내지 0.16 mg/mL 범위의 농도로 첨가하였다. 검출은 상술한 바와 동일하게 DJ130c 이후 염소 항-래트-퍼옥시다제 항체로 이루어졌다. TMB 시약 및 플레이트에 의하여 나타난 색을 650 nm에서 읽었다.

[0611] 결과

[0612] 가용성 Fc γ RIIIA 테트라머 복합체는 이것의 정상 리간드 결합 위치를 통하여 모노머 사람 IgG에 결합한다.

[0613] 가용성 Fc γ RIIIA-AVITAG 융합 단백질을 ELISA 분석을 사용하여 "재료 및 방법"에 기술된 바에 따라 생성시키고, 분리 및 분석을 하였는데, 비-AVITAG 가용성 Fc γ RIIIA 단백질과 유사한 특성을 갖는 것으로 나타났다(데이터를 나타내지 않음). 융합 단백질을 비오틴화하고, 테트라머 복합체를 상술한 바와 같이 생성하였다.

[0614] 가용성 Fc γ R 테트라머 복합체를 이것의 리간드 모노머 사람 IgG로의 결합에 대하여 이후 ELISA 분석을 사용하여 평가하였다. ELISA에 의한 분석은 가용성 테트라머 Fc γ R 복합체가 모노머 사람 IgG에 특이적으로 결합하는 것을 나타냈다. 도 3A에 나타난 바와 같이, 가용성 테트라머 Fc γ RIIIA의 모노머 사람 IgG로의 결합은 3G8, 래트 항-사람 Fc γ IIIA 모노클로날 항체에 의하여 차단되고, 이는 650 nm에서의 흡광도에 의하여 모니터링 된 바와 같다. 또 다른 측면에서, D265A 돌연변이를 갖는 4-4-20 모노클로날 항체는 가용성 테트라머 Fc γ IIIA의 모노머 사람 IgG로의 결합을 차단할 수 없었다(도 3A). 이 실험은 따라서 가용성 테트라머 Fc γ RIIIA 복합체의 결합은 원래의 리간드 결합 위치에서 일어난다는 것을 확인한다.

[0615] 가용성 Fc γ RIIIA 테트라머 복합체는 모노머 가용성 Fc γ RIIIA보다 더 큰 항원항체결합력으로 모노머 사람 IgG에 결합한다.

[0616] 가용성 테트라머 Fc γ RIIIA의 응집된 사람 IgG로의 직접 결합을 ELISA 분석을 사용하여 평가하였고, 가용성 모노머 Fc γ RIIIA의 모노머 사람 IgG로의 직접 결합과 비교하였다. 도 3B에 나타내는 바와 같이, 가용성 테트라머 모노머는 Fc γ RIIIA는 가용성 모노머 수용체에 비하여 더 높은 항원항체결합력(8-10배)으로 사람 IgG에 결합하며, 이는 450 nm에서의 흡광도에 의하여 모니터링되는 바와 같다.

[0617] 가용성 Fc γ RIIIA 테트라머 복합체의 결합을 또한 IgG1으로부터 정제된 Fc 단편으로 코팅된 마그네틱 비드를 사용하여 분석하였다(도 4). 모노머 결합이 검출되지 않는 조건 하에서 가용성 Fc γ RIIIA 테트라머 복합체는 IgG1 Fc-코팅 비드에 결합한다. 결합의 특이성은 Fc 결합을 차단하는 항-Fc γ RIIIA 모노클로날 항체, LNK 16으로 수용체 복합체를 사전-인큐베이션함에 의하여 나타낸다. 이 분석은 가용성 Fc γ RIIIA 테트라머 복합체가 이것의 정상 리간드 결합 위치를 통하여 모노머 IgG에 결합하고, 수용체의 항원항체결합력은 복합체 내의 복수의 결합 위치에 기인하여 증가된다는 것을 더 확인한다.

[0618] 6.3 돌연변이체 IgG1 Fc 도메인의 디스플레이를 위한 효모 균주의 구성

[0619] 재료 및 방법

[0620] T-세포 수용체 및 많은 수의 scFV를 디스플레이하는데 성공적으로 사용된 효모 복제 벡터 pCT302로부터 pYD1 벡터(Invitrogen)를 직접 유도한다(Shusta, et al., 2000 Nat. Biotechnol. 18:754-569). 이 플라스미드는 동원체이고, 그리고 trp1 효모 균주에서 세포당 1-2 플라스미드의 상대적으로 고정된 카피수를 가능하게 하는 TRP1 유전자를 품고 있다. 폴리링커로의 방향 클로닝은 관심 유전자를 GAL1 프로모터 및 AGA2와의 인-프레임 조건 하에 두게 된다. IgG Fc 도메인의 효모 Aga2p로의 융합은 Aga2-FC 융합 단백질의 세포외 분비, 및 이어서 내부 세포벽 단백질인 효모 Aga1p 단백질과의 이항화 결합을 통한 세포벽 상의 Fc 단백질 디스플레이를 발생시킨다.

[0621] 표시 수준을 최적화하기 위하여, IgG1 중쇄로부터의 상이한 단편을 PCR에 의하여 증폭시키고, pYD1로 클로닝하였다. 특이하게, IgG1 중쇄의 Fc 영역(알로타이프 Ig1m(a); 아미노산 206-447)을 IMAGE 클론 182740으로부터 PCR에 의해 증폭시켰고(표1), EcoRI/SaII로 분해하고, pYD1 벡터(인비트로젠)에 리게이션하였다. IMAGE로부터의

초기 클론은 위치 319에서 단일 뉴클레오티드의 검출을 함유하였는데, 이 위치는 pYD-GIF206을 구성하기 위하여 돌연변이 생성이 유도된 생체 외 위치에 의하여 수정되었다(Quickchange, Stratagene).

[0622] CH1-CH3 단편(아미노산 118-447)을 MA6 B6.2의 중쇄 클론으로부터 pCINEO 벡터에서 5'올리고(mcr025;chl(f)) 및 3'올리고(H021)를 사용하여 증폭시켰다(표 8 참조). 단편을 BamHI/NotI로 분해시키고, pYD1 벡터에 리게이션 하여 pYD-CH1을 구성하였다.

[0623] 도 5는 구성물의 개략적인 표시를 나타낸다. CH1-CH3 구성은 중쇄의 힌지-CH2-CH3 도메인뿐만 아니라 CH1 도메인을 함유하고, GIF206은 힌지의 6 아미노산 잔기 상류를 함유하며, 그리고 GIF227은 힌지 영역 내의 내재성의 단백질 가수 분해 위치에서 시작한다(Jendeborg et al., 1997 J. Immunol. Meth. 201:25-34).

[0624] **6.4 효모 세포벽 상에 Fc 도메인의 면역국부화 및 특성화**

[0625] **재료 및 방법**

[0626] Aga2p-Fc 융합 단백질 및 대조 벡터, 임의의 삽입물이 없는 pYD1를 함유하는 구성물을 표준 리튬 아세테이트 효모 전환 프로토콜을 사용하여 효모 균주 EBY100(Invitrogen), *MATa ura3-52 trp1 leu2Δ1 his3Δ200 pep4::HIS3 prb1Δ1.6R can1 GAL::GAL-AGA1*로 전환하였다(Gietz et al., 1992 Nucleic Acids Res. 20:1425). 이어서, 트립토판 프로토포트를 정의된 배지 상에서 선택하였다. 독립 세포 집단의 증폭, 및 Aga1p 및 Aga2p-Fc 융합 단백질의 유도를 글루코스에서 성장시킨 후 1차 탄소 공급원인 갈락토스를 함유하는 배지에서 24-48시간 동안 20℃로 성장시킴으로써 달성하였다. 갈락토스에서의 성장은 Aga2-Fc 융합 단백질의 GAL1 프로모터를 통한 발현을 유도하며, 이어서 효모 세포 표면상에 Fc 융합 단백질의 디스플레이를 유도한다.

[0627] **결과**

[0628] *Fc 융합 단백질의 FACS 분석*

[0629] 효모 세포 표면상의 Fc 융합 단백질의 발현을 PE-콘주게이트된 폴리클로날 F(ab)₂ 염소 항-사람 FcγR 및 HP6017(Sigma) 항체(Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.)를 사용하는 면역염색법에 의하여 분석하였다. 형광현미경은 세 개의 Fc 융합 단백질을 위한 주변 염색을 보여준다. 벡터 단백질을 품고 있는 대조 균주는 염색이 거의 없거나 또는 전혀 없는 것을 보여준다(데이터는 나타내지 않음). FACS 분석을 사용하여 염색을 정량화하였다(도 6). CH1-CH3 융합을 함유한 효모 균주는 두 항체로 염색된 세포의 가장 높은 퍼센트를 나타내었다(도 6B 및 F). GIF227 구성은 가장 큰 평균 형광 강도를 보여주었다(도 6, 패널 C 및 G).

[0630] *효모 세포 표면상에 발현된 Fc 융합 단백질 결합의 특성화*

[0631] Fc 및 FcγR 단백질의 자연적 환경은 수용체를 세포 표면 및 수용성 리간드인 Fc 상에 위치시킨다; 하지만, 효모 Fc 표면 표시는 자연적 상호반응의 형태를 반대로 바꾼다. 효모 세포벽 표면상의 IgG1 Fc 단백질의 검출은 이것의 리간드에 대한 FcγR의 낮은 친화력 및 표시 시스템에서의 내재된 반대 형태에 때문에 복잡하게 된다.

[0632] 후자의 요인은 변경될 수 없지만, 리간드의 항원항체결합력은 상술한 바와 같이 효모 세포벽 표면상에서 발현된 Fc 융합 단백질에 결합하는 FcγR의 검출을 허용하는, 가용성 FcγR 테트라머 복합체를 형성함으로써 개선되었다.

[0633] Fc 융합 단백질을 표시한 표면상으로의 가용성 테트라머 FcγR의 결합을 특성 분석하기 위하여, 상이한 Fc 구성을 발현하는 효모 세포를 가용성 rFcγRIIIA 테트라머 복합체로 인큐베이션하고, FACS에 의하여 분석하였다. pYD-CH1을 품으며, 야생형 CH1-CH3 구성을 표시하는 효모 세포를, FACS 분석에 의하여 나타내는 바와 같이, 가용성 rFcγRIIIA 테트라머 복합체에 결합시켰다. 그러나 GIF206 및 GIF227 균주는 FACS 분석에 의하여 나타내는 바와 같이 가용성 rFcγRIIIA 테트라머 복합체로의 결합을 거의 또는 전혀 보여주지 않았다(데이터는 나타내지 않음).

[0634] FcγR로의 결합을 차단하는 Fc 영역에서의 돌연변이는 식별되었다(Shields et al., 2001; J Biol.Chem. 276:6591-6604). 이들 돌연변이 중 하나인 D265A를 pYD-CH1에 포함시켰고, 이 돌연변이체를 효모 세포 표면상에서 발현시켰다. 이들 세포를 고농도의 리간드(Fc의 0.15 mM; D265A의 7.5 mM)를 사용하여 가용성 FcγRIIIA 테트라머 복합체로 인큐베이션하였다. FACS 분석은 가용성 FcγRIIIA 테트라머 복합체가 야생형 Fc에 결합하지만(도 7A), 가용성 FcγRIIIA 테트라머 복합체는 D265A-Fc 돌연변이체에 결합하지 않는다는 것을 보여주는데, 이는 FcγR이 더 낮은 힌지-CH2 영역에서의 정상적인 FcR 결합 위치와 상호 작용을 한다는 것을 보여준다(도 7B).

[0635] FcγRIIIA 리간드 결합 위치에 대항하는 항체는 효모 세포벽 상에 발현된 야생형 Fc 단백질로의 가용성 Fcγ

RIIIA 테트라머 복합체의 결합을 차단하였고, 이는 FACS에 의하여 분석된 바와 같다(도 8). 가용성 Fc γ RIIIA 테트라머 복합체의 결합은 3G8 항체뿐만 아니라 LNK16 항체, 또 다른 항-Fc γ RIIIA 모노클로날 항체에 의하여 차단되며(Advanced Immunological)(Tam et al., 1996 J. Immunol. 157:, 1576-1581), 연관되지 않은 이소타입 대조군에 의하여 차단되지 않았다. 따라서, 표포 세포 표면상에 발현된 Fc 단백질로의 가용성 Fc γ RIIIA 테트라머 복합체의 결합은 통상적인 리간드 결합 위치를 통하여 일어난다. Fc γ RIIIA 테트라머 복합체의 제한된 결합은 세포의 하위집단이 Fc γ R로 접근 가능하며, 정확하게 접혀진 Fc를 갖는다는 것을 보여준다. 세포의 하위 집단만이 리간드에 결합할 수 있는 지에 대한 많은 이유가 있는데, 예를 들면, 이들이 세포 주기의 상이한 단계에 있기 때문이거나, 용합 단백질이 외부로 전달되지 않았다는 것이다.

[0636] 효모 세포 표면상에서 Fc 용합 단백질에 결합한 Fc γ RIIIA-테트라머의 해리 상수를 결정하기 위하여, Fc γ RIIIA 테트라머 복합체 범위의 결합을 FACS를 사용하여 분석하였다. Fc γ RIIIA 테트라머 복합체를 1.4 μ M 내지 0.0006 μ M의 농도에서 적정하였다. 결합 친화력 및 비선형 회귀 분석의 측정으로서 평균 형광 강도를 사용하여, K_D 는 0.006 μ M (+/-0.001)인 것으로 측정되었다(데이터를 나타내지 않음).

[0637] 6.5 Fc 돌연변이체 라이브러리의 구성

[0638] 돌연변이체 Fc 라이브러리를 Fc-CH1 구성에서 Fc 단편의 측면에 위치한 프라이머 및 실수 유발 PCR을 사용하여 구성하였다(Genemorph, Stratagene). 벡터 pYD-CHI에서 CH1-CH3 삽입은 돌연변이 유발 PCR을 사용하여 증폭시켰다(Genemorph, Stratagene). pYD-상류 및 pYD-하류 프라이머를 사용하여 다섯 반응을 실시하였다(Invitrogen). 결과의 증폭된 단편을 XhoI/BamHI로 분해하고, pYD1로 리게이션하였다. 리게이션 반응을 다음에 XL10 울트라컴피턴트 세포(Stratagene)로 형질 전환하여, $\sim 1 \times 10^6$ 형질전환체를 발생시키는데, 삽입물을 함유하는 형질전환체의 80%를 갖는다.

[0639] 라이브러리로부터의 28개의 무작위 플라스미드의 서열 분석은 kb당 $\sim 2-3$ 개 돌연변이의 돌연변이 빈도를 나타내며, 40%의 보존된 뉴클레오타이드 변화 및 아미노산 변화를 발생시키는 돌연변이의 60%의 발생을 갖는다.

[0640] 라이브러리는 효모 균주 EBY100, MAT α ura3-52 trp1 leu2 Δ 1 his3 Δ 200 pep4::HIS3 prb1 Δ 1.6R can 1 GAL GAL-AGA 1::URA 3으로 $\sim 3.3 \times 10^5$ 형질전환체/ μ g의 높은 효율을 가지며 형질 전환되어 30 개의 독립 형질전환 반응에서 $\sim 10^7$ 개의 전체 효모 형질전환체를 생성시켰다(Gietz, et al., 1992, Nucleic Acids Res. 20: 1425). 라이브러리를 모으고, 글루코스에서 성장시켜 증폭하였다.

[0641] 6.6 Fc 돌연변이체의 선별과 분석

[0642] 재료 및 방법

[0643] Fc 돌연변이체 스크리닝을 위한 ELISA 분석

[0644] ELISA 플레이트(Nunc F96 MaxiSorp Immunoplate)를 0.5 mg/ml BSA-FITC의 50 ml/웰로 카르보네이트 완충액에서 4 $^{\circ}$ C로 코팅하였고, 밤새 인큐베이션되도록 하였다. 플레이트를 1X PBS/0.1%Tween 20(PBST)로 3회 세척하였다. PBST/0.5%BSA의 200 ml/웰을 첨가하였고, 플레이트를 실내 온도에서 30분간 인큐베이션하였다. 플레이트를 PBST로 추가 3회 세척하였다. 야생형 또는 Fc 돌연변이체를 함유하며, 1:4로 희석된 4-4-20 항체(0.7-0.8 mg/웰의 최종 농도를 가져올 수 있는 약 3 mg/mL)의 50 ml/웰을 PBST/0.5%BSA에서 대조 배지로부터 첨가하고, 실내 온도에서 2 시간 동안 인큐베이션되도록 하였다. 정제되고, 비오틴화된 모노머 Fc γ RIIIA를 3 mg/ml로 (PBST/0.5%BSA에서) 플레이트에 첨가하고(50 μ l/웰), 실내온도에서 1.5 시간 동안 인큐베이션되도록 하였다. 플레이트를 PBST로 3회 세정하였다. 스트렙타비딘-HRP(Pharmacia, RPN 123v)의 1:5000 희석물의 50 ml/웰을 PBST/0.5%BSA에 첨가하고, 플레이트를 실내온도에서 30분간 인큐베이션하였다. 플레이트를 PBST로 3회 세척하였다. TMB 시약(BioFX)의 80 ml/웰을 다음에 플레이트에 첨가하고, 10-15분간 암실에서 인큐베이션되도록 하였다. 최종적으로 반응은 종결액(0.18 M 황산)의 40 ml/웰을 첨가함으로써 종결하였다. 플레이트를 다음에 450 nm의 흡광도에서 모니터하였다. 제 1 선별 이후, 더 나아가 관심 후보군을 면역-복합체를 기초한 결합 ELISA에서 4-4-20-Fc 돌연변이체의 연속 적정에 의하여 확인하였다. 이 ELISA에 몇 가지 변형이 있었다. 플레이트를 코팅하기 위하여, 2 mg/ml BSA-FITC를 사용하였다. IgG 정량 결과를 기초하여, 대조 배지로부터의 희석 4-4-20Fc(야생형 또는 돌연변이체)를 PBST-/0.5% BSA에서 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.063, 및 0 mg/ml의 최종 농도로 첨가하였다.

[0645] Fc 단백질 표시 세포 표면을 위한 FACS 선별

- [0646] 세포를 적어도 HSM-Trp-Ura, pH 5.5의 10 ml에서 글루코스와 함께 16-25 시간 동안, 또는 OD₆₀₀이 2.0보다 더 커질 때까지 성장시켰다. 세포를 ~2000 rpm에서 5 분간 스피ندا운시켰다. 세포를 HSM-Trp-Ura pH 7.0의 동일 부피에서 글루코스와 함께 재현탁시켰다. 125 ml 플라스크에서, 갈락토스 배지의 36 ml를 첨가하고, 배양물의 9 ml로 집중하였으며, 이를 20℃에서 24-48시간 동안 흔들면서 인큐베이션하였다. 성장은 8-16 시간 간격으로 OD₆₀₀을 측정함으로써 모니터링하였다. 세포를 2K rpm에서 5 분간 수확하였고, 1XPBS, pH 7.4의 동일 부피에서 재현탁하였다.
- [0647] 평형 스크린: 세포의 적절한 양을 리간드의 과량을 유지하면서 인큐베이션하였다. 예를 들면, 라이브러리의 10 배 범위를 확보하는데 필요한 많은 수의 세포로 시작하는 것이 바람직하다. 10⁷ 형질전환체를 함유하는 라이브러리로 제 1 분류를 하기 위하여, 10⁸개 세포를 사용해야 한다. 사실상 염색 프로토콜 중의 손실을 보충하기 위하여 10⁹개 세포로 시작하는 것이 가장 좋다.
- [0648] 인큐베이션은 통상적으로 회전기에 4℃ 암실에서 1 시간 동안 1.5 mL 튜브에서 20-100 ml의 부피로 행해졌다(인큐베이션 완충액: 1XPBS pH 7.4; 1 mg/ml BSA). 세포를 인큐베이션 완충액의 500 ml에서 1회 세척하였고, 4K rpm에서 2.5 분간 스피ندا운하였다. 세포를 100 ml 인큐베이션 완충액에서 재현탁하고, 제 2 염색 시약으로 인큐베이션하였다. Fc-CH1에 대하여, F(ab)₂ 염소 항-hFc F(ab)₂-FITC 항체(Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc)은 CH1 발현을 위하여 염색하는 데 사용될 수 있다. 염색을 1 mL로 30 분간 실시하였다. 세포를 추가로 인큐베이션 완충액의 500 ml에서 세척하였고, 4K rpm에서 2.5 분간 스피ندا운시켰으며, 1 ml 1X PBS 1 mg/mL BSA에서 재현탁하고, FACS에 의하여 분석하였다.
- [0649] 전형적인 평형 스크린 분류 게이트 및 수집한 세포의 수는 표 13에 나타낸다.

표 13

분류 게이트 및 분류된 세포의 수

분류	게이트	스크린된 전체 세포	수집된 세포
1차	5%	10 ⁸	5 x 10 ⁶
2차	1%	10 ⁷	1 x 10 ⁵
3차	0.2%	10 ⁷	2 x 10 ⁴
4차	0.2%	10 ⁷	2 x 10 ⁴

- [0650]
- [0651] 3차 및 4차 분류 이후, 세포를 직접 -trp-ura 플레이트 상에 플레이트하여 각각의 돌연변이체를 확인하였다. 이것은 전형적으로 플레이트당 ~200-400 콜로니를 회수하였다. 수집 후 세포를 50 mL 코니칼 튜브 중의 글루코스 배지 10 mL에 넣고, 30℃에서 성장시켰다. 전체 과정을 재 반복하였다.
- [0652] **결과**
- [0653] Fc 돌연변이체의 FACS 분석
- [0654] 갈락토스 배지에서 유도 이후, 세포를 수확하여, PE 표지된-가용성 FcγRIIIA 테트라머 복합체 및 FITC로 표지된 래트 항-사람 Fc의 F(ab₂)(Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.)와 함께 공동-염색시켰다. 세포를 FACS에 의하여 분석하고, 분류 게이트를 사용하여, 가용성 FcγRIIIA 테트라머 복합체와 비교하여, 세포 표면상의 Fc 발현량에 대한 가장 높은 친화력을 보이는 세포를 선택하였다(도 9). 예를 들면, 가용성 FcγRIIIA 테트라머 복합체에 대하여 보다 잘 결합하는 돌연변이체 Fc를 함유하는 세포는 효모 세포 표면상에서 보다 적은 Fc 융합 단백질을 발현시킬 수 있고, 이 세포는 분류 게이트의 아래 좌측 구석에 있을 것이다.
- [0655] 4개의 연속적 분류를 실시하여 가용성 FcγRIIIA 테트라머 복합체에 대하여 가장 높은 친화력을 보이는 이들 돌연변이체를 농축하였다. 연속 분류 각각에 대한 게이트는 5.5%, 1%, 0.2%, 및 0.1%였다. 최종 분류 후, 세포를 선택 배지 상에 플레이트하고, 개별 콜로니를 분리하였다. 개별 콜로니 각각은 Aga2-Fc 융합 단백질 내에서 단일 Fc 돌연변이체를 갖는 세포의 클론 집단을 나타내었다. 초기에 32개 독립 콜로니를 선택하고, FACS에 의하여 가용성 FcγRIIIA 테트라머 복합체로의 결합을 테스트하였다(도 10). 18개 돌연변이체는 가용성 FcγRIIIA 테트라머 복합체에 의하여 결합되는 세포의 퍼센트 및 결합된 세포의 평균 형광 강도에 의하여 측정된 바와 같이 결

합 강도의 증가를 나타내었다.

[0656] Fc γ RIIIA로의 결합에서의 증가를 나타낸 돌연변이체를 가용성 Fc γ RIIB 테트라머 복합체로의 결합에 대하여 또한 테스트하였다. 가용성 Fc γ RIIIA 테트라머 복합체로의 결합에서 증가를 가져온 대부분의 돌연변이체는 또한 Fc γ RIIB 테트라머 복합체 염색의 검출을 발생시켰다(도 10). 이전의 물리적 및 유전학적 데이터를 기초하여, Fc γ RIIIA로의 결합을 증가시키는 몇몇 돌연변이체 또한 Fc γ RIIB로의 결합을 증가시킨다는 것이 예상된다 (Shields et al., 2001, J Biol. Chem. 276:6591-6604; Sondermann et al., 2000, Nature 406: 267-273).

[0657] 사람 세포주에서 생성된 4-4-20 MAb에서 돌연변이체의 분석

[0658] 효모 시스템에서 돌연변이체의 분리 및 분석은 새로운 돌연변이체 대립 유전자의 확인을 가능하게 한다. 돌연변이체 분리를 위한 이중 시스템을 사용하여 잘못 접혀짐을 야기한 변경 또는 효모 특이적 글리코실화에서의 변경을 통하여 결합을 향상시키는 돌연변이체를 확인할 수 있다. 사람 세포에서 생성된 면역글로불린 분자에서 Fc 변이를 분석하기 위하여, 돌연변이체를 항-형광 모노클로날 항체의 중쇄, 4-4-20을 함유하는 포유류 발현 벡터에 서브클로닝하였다(Kranz et al., 1982 J.Biol.Chem, 257(12):6987-6995). 돌연변이체 4-4-20 중쇄를 사람 신장 세포주(293H)에서 경쇄 클론으로 일시적 공동발현시켰다. 상청액을 수집하고, ELISA에 의하여 분석하였다(도 11).

[0659] ELISA 분석에 따르면, 가용성 모노머 Fc γ RIIIA 복합체에 대하여 향상된 친화력을 가지는 것으로 확인된 가용성 모노머 돌연변이체 다수는 또한 가용성 Fc γ RIIIA 테트라머 복합체에 대한 결합 증가를 보여주었으며, 이는 4-4-20 사람 세포주에서 생성된 모노클로날 항체에 존재할 때이다(도 11A). 두 개의 돌연변이체, 16번 및 19번은 가용성 Fc γ RIIIA 모노머 복합체에 대한 결합 감소를 나타내었다.

[0660] 표 14는, 분석 및 ELISA 둘 다를 기초한 효모 디스플레이에 의하여 측정되었을 때 확인된 돌연변이 및 Fc γ RIIIA 및 Rc γ IIB에 대한 이것의 대응 결합 특성을 정리하였다. 표 14에서, 기호는 하기를 나타낸다: •는 친화력의 1배 증가에 해당한다; +는 친화력의 50% 증가에 해당한다; -는 1배 감소에 해당한다; →는 친화력의 변화가 없는 것에 해당하는 데, 이는 야생형 Fc 영역을 포함하는 비교 분자와 비교하였을 때이다.

표 14

식별된 돌연변이 및 결합 특성

클론 #	돌연변이 위치	도메인	IIIA 결합	IIB 결합
4	A339V, Q347H	CH2, CH3	+	+
5	L251P, S415I	CH2, CH3	+	+
7	Aga2p-T43I	주: 이것은 표시를 향상시킨 Aga2P에서의 돌연변이이다		Aga2p-T43I
8	V185M, K218N, R292L, D399E	CH1, 힌지, CH2, CH3	변화 없음	-
12	K290E, L142P	CH1, CH2	+	테스트하지 않음
16	A141V, H268L, K288E, P291S	CH1, CH2	-	테스트하지 않음
19	L133M, P150Y, K205E, S383N, N384K	CH1, CH2, CH3	-	테스트하지 않음

[0661]

클론 #	돌연변이 위치	도메인	IIIA 결합	IIB 결합
21	P396L	CH3	•	•+
25	P396H	CH3	***	**
6	K392R	CH3	변화 없음	변화 없음
15	R301C, M252L, S192T	CH1,CH2	-	테스트 하지않음
17	N315I	CH2	변화 없음	테스트 하지않음
18	S132I	CH1	변화 없음	테스트 하지않음
26	A162V	CH1	변화 없음	테스트 하지않음
27	V348M, K334N, F275I, Y202M, K147T	CH1,Ch2	+	+
29	H310Y, T289A, G337E	CH2	-	테스트 하지않음
30	S119F, G371S, Y407N, E258D	CH1,CH2,CH3	+	변화 없음
31	K409R, S166N	CH1,CH3	변화 없음	테스트 하지않음
20	S408I, V215I, V125I	CH1, 힌지, CH3	+	변화 없음
24	G385E, P247H	CH2, CH3	***	+
16	V379M	CH3	**	변화 없음
17	S219Y	힌지	•	-
18	V282M	CH2	•	-
31	F275I, K334N, V348M	CH2	+	변화 없음
35	D401V	CH3	+	변화 없음
37	V280L, P395S	CH2	+	-
40	K222N	힌지	•	변화 없음
41	K246T, Y319F	CH2	•	변화 없음
42	F243I, V379L	CH2,CH3	•+	-
43	K334E	CH2	•+	-
44	K246T, P396H	CH2,CH3	•	••+
45	H268D, E318D	CH2	•+	•••••

[0662]

클론 #	돌연변이 위치	도메인	IIIA 결합	IIB 결합
49	K288N, A330S, P396L	CH2,CH3	*****	***
50	F243L, R255L, E318K	CH2	*	-
53	K334E, T359N, T366S	CH2,CH3	*	변화 없음
54	I377F	CH3	*+	+
57	K334I	CH2	*	변화 없음
58	P244H, L358M, V379M, N384K, V397M	CH2,CH3	*+	*+
59	K334E, T359N, T366S (독립적 분리)	CH2,CH3	*+	변화 없음
61	I377F (독립적 분리)	CH3	***	**+
62	P247L	CH2	**	**+
64	P217S, A378V, S408R	Hinge, CH3	**	*****+
65	P247L, I253N, K334N	CH2	***	**+
66	K288M, K334E	CH2	***	-
67	K334E, E380D	CH2,CH3	*+	-
68	P247L (독립적 분리)	CH2	+	****
69	T256S, V305I, K334E, N390S	CH2,CH3	*+	변화 없음
70	K326E	CH2	*+	**+
71	F372Y	CH3	+	*****+
72	K326E (독립적 분리)	CH2	+	**
74	K334E, T359N, T366S (독립적 분리)	CH2,CH3	**	변화 없음
75	K334E (독립적 분리)	CH2	**+	변화 없음
76	P396L (독립적 분리)	CH3	*+	변화 없음
78	K326E (독립적 분리)	CH2	**	**+
79	K246I, K334N	CH2	*	****
80	K334E (독립적 분리)	CH2	*	변화 없음
81	T335N, K370E, A378, T394M, S424L	CH2,CH3	*	변화 없음
82	K320E, K326E	CH2	*	*

[0663]

클론 #	돌연변이 위치	도메인	IIIA 결합	IIB 결합
84	H224L	한지	*	*****
87	S375C, P396L	CH3	*+	*****+
89	E233D, K334E	CH2	*+	변화 없음
91	K334E (독립적 분리)	CH2	*	변화 없음
92	K334E (독립적 분리)	CH2	*	변화 없음
94	K334E, T359N, T366S, Q386R	CH2	*	변화 없음

[0664]

[0665]

가용성 Fc γ RIIB 테트라머 복합체 결합의 분석은 가용성 Fc γ RIIA 테트라머 복합체에 대한 결합에서의 증가를 보여줬던 8개의 돌연변이체 중 7개는 또한 가용성 Fc γ RIIB 테트라머 복합체로의 증가된 결합을 가졌다(도 11B). 8번인 돌연변이체 하나는 가용성 Fc γ RIIB 테트라머 복합체에 대한 결합에서의 감소를 보여줬다. 돌연변이체 중 세 개는 가용성 Fc γ RIIA 테트라머 복합체 또는 가용성 Fc γ RIIB 테트라머 복합체 중 어느 하나에 대한 결합에 있어 아무런 변화를 보여주지 않는데, 이는 아마도 효모 특이적 변형을 초래한 돌연변이에 기인한 것

이다.

[0666] **6.7 Fc 돌연변이체의 ADCC 분석**

[0667] 작동자 세포 제조: 말초 혈액 단핵구(PBMC)를 Ficoll-Paque(Pharmacia, 17-1440-02) Ficoll-Paque 밀도 구배 원심분리에 의하여 정상적인 말초 사람 혈액으로부터 정제하였다(Biowhittaker/Poietics, 1W-406). 혈액을 동일자에 주위 온도로 쉬핑하였으며, PBS 및 글루코스에서 1:1로 희석시키고(1 g/L), 15 mL 코니칼 튜브(3 mL Ficoll; 4 mL PBS/혈액) 또는 50 mL 코니칼 튜브(15 mL: Ficoll; 20 mL PBS/혈액)에서 Ficoll 상에 층을 만들었다. 실내 온도에서 40분간 1500 rpm(400 rcf)으로 원심분리를 하였다. PBMC층을 제거하고(50 mL 코니칼 튜브로부터 약 4-6 mL), 50 mL 코니탈 튜브에서, (Ca^{2+} 또는 Mg^{2+} 를 함유하지 않는) PBS에서 1:10으로 희석시키고, 실내온도에서 추가 10분간 1200 rpm(250 rcf)으로 회전시켰다. 상청액을 제거하고, 침전물을 (Ca^{2+} 또는 Mg^{2+} 를 함유하지 않는) PBS 10-12 mL에서 재현탁시키고, 15 mL 코니칼 튜브로 옮기고, 실내 온도에서 또 다른 10분간 1200 rpm으로 회전시켰다. 상청액을 제거하고, 침전물을 배지(Isocove's 배지(IMDM)+10% 우태혈청(FBS), 4 mM Gln, 페니실린/스트렙토마이신(P/S))의 최소 부피(1-2 mL)에서 재현탁하였다. 재현탁된 PBMC를 ADCC 분석을 위하여 적절한 부피로 희석시켰다; ELISA 96 웰 플레이트에서 2배로 희석하였다(Nunc F96 MaxiSorp Immunoplate). PBMC의 수율은 전체 혈액의 40-50 mL 당 대략 $3-5 \times 10^7$ 개의 세포였다.

[0668] 표적 세포 제조: 분석에서 사용되는 표적 세포는 SK-BR-3(ATCC Accession Number HTB-30; Trempe et al., 1976, Cancer Res. 33-41), Raji(ATCC Accession number CCL-86; Epstein et al., 1965, J. Natl. Cancer Inst. 34:231-40), 또는 Daudi 세포(ATCC Accession number CCL-213; Klein et al., 1968, Cancer Res.28:1300-10)(0.5 mL IMDM 배지에서 재현탁되었다)였으며, 이를 유로폼 킬레이트 비스(아세톡시메틸) 2,2''':6',2'' 터피리딘 6,6' 디카르복실레이트(BATDA 시약; Perkin Elmer DELFIA 시약; C136-100)으로 표지화하였다. K562 세포(ATCC Accession number CCL-243)을 NK 활성화에 대한 대조 세포로 사용하였다. Daudi 및 Raji 세포를 스핀다운하였다; SK-BR-3 세포를 2-5 분간 37°C에서 트립신화하였고, 5% CO₂ 및 배지를 200-350G로 스핀 다운하기 전에 중화시켰다. 분석에서 사용된 표적 세포의 수는 약 $4-5 \times 10^6$ 개였으며, 이것은 5×10^6 개를 초과하지 않는데, 표지화 효율은 2×10^6 개의 세포 정도일 때 제일 좋았기 때문이다. 일단 세포를 스핀다운한 후, 배지를 15 mL Falcon 튜브에서 0.5 mL로 흡입하였다. BATDA 시약의 2.5 μL 를 첨가하고, 혼합물을 37°C, 5% CO₂에서 30 분간 인큐베이션하였다. 세포를 PBS 및 0.125 mM 술핀피라졸 10 mL에서 2회 세척하고("SP";SIGMA S-9509); 10 mL 분석 배지(세포 배지+0.125 mM 술핀피라졸)에서 2회 세정하였다. 세포를 1 mL 분석 배지에서 재현탁하고, 계수하고, 희석하였다.

[0669] SK-BR-3 세포가 1차 PBS/SP 세척 후 표적 세포로 사용될 때, PBS/SP를 흡입하고, FITC의 500 $\mu\text{g/mL}$ (PIERCE 461110)을 SP, Gln, 및 P/S를 함유하는 IMDM 배지에서 첨가하고, 37°C, 5% CO₂에서 30분간 인큐베이션하였다. 세포를 분석 배지로 2회 세척하고; 1 mL 분석 배지에 재현탁시키고, 계수하고, 희석하였다.

[0670] 항체 흡소닌화: 표적 세포를 상기 인용된 바와 같이 제조한 후, 이들을 적절한 항체로 흡소닌화하였다. Fc 변이체의 경우, 1×10^5 세포/mL의 50 μL 를 Fc 변이체를 갖는 항체의 2x 농도로 첨가하였다. 최종 농도는 하기와 같다: Ch-4-4-20 최종 농도는 0.5-1 $\mu\text{g/mL}$ 이고; Ch4D5 최종 농도는 30 ng/mL-1 ng/mL였다.

[0671] 흡소닌화된 표적 세포를 작동자 세포에 첨가하여, Fc 변이체를 갖는 4-4-20 항체의 경우 75:1의 작동자:표적 비율을 생성시켰다. Fc 변이체를 갖는 Ch4D5 항체의 경우, 50:1 또는 75:1의 작동자:표적 비율을 달성하였다. 분석을 위한 효과적인 PBMC 구매는 100:1 내지 1:1의 범위이다. 자발적 방출(SR)은 세포에 분석 배지 100 μL 를 첨가함으로써 달성하였다; 최대 방출(MR)은 4% TX-100을 첨가함으로써 측정하였다. 세포를 Beckman 원심분리기에서 200 rpm으로 실내온도에서 1분간 57G로 스핀다운하였다. 세포를 3-3.5시간 동안 37°C, 5% CO₂에서 인큐베이션하였다. 인큐베이션 후, 세포를 Beckman 원심분리기에서 1000 rpm으로 10°C에서 5분간 회전시켰다. 상청액의 20 μL 를 수집하였다: Eu 용액의 200 μL 를 첨가하고, 혼합물을 회전 흔들기 상에서 120 rpm으로 실내 온도에서 15 분간 흔들었다. 시간 분해 형광기에서 형광을 정량하였다(Victor 1420, Perkin Elmer).

[0672] **결과**

[0673] 상술한 바와 같이, 변이체 Fc 영역을, 항-형광 모노클로날 항체인 4-4-20의 중쇄를 함유하는 포유동물 발현 벡터에 서브클로닝하였다(Kranz et al., 1982 J. Biol.Chem, 257(12):6987-6995). 변이체 4-4-20 중쇄를 사람 신

장 세포주(293H)에서 경쇄 클론과 함께 일시적으로 공동발현시켰다. 상청액을 수집하고, ADCC 분석을 사용하여 분석하였다. 도 12는 돌연변이체의 ADCC 활성이 농도-의존적이라는 것을 보여준다. 표 8에 정리된 바와 같이, 변이체 Fc 영역을 갖는 면역글로불린 다섯은 야생형 ch 4-4-20에 비하여 향상된 ADCC 활성을 갖는다. 돌연변이체 다섯은 하기와 같다: MGFc-27(G316D, A378V, D399E); MGFc-31(P247L, N421K); MGFc-10(K288N, A330S, P396L); MGFc-28(N315I, V379M, T394M); MGFc-29(F243I, V379L, G420V).

[0674] 변이체 Fc 영역을 갖는 또 다른 4-4-20 면역글로불린을 야생형 Fc 영역을 갖는 4-4-20 면역글로불린과 비교하여 이것의 ADCC 활성에 대하여 분석하였다. 이 결과를 표 15에 정리하였다.

[0675] ADCC 분석을 또한 4-4-20 항체에 대하여 상술한 프로토콜과 동일한 프로토콜을 사용하여 실시하였으나, 변이체 Fc 영역을 사람상피성장인자 수용체 2(HER2/neu)에 특이적인 사람화 항체(Ab4D5)로 클로닝하였다. 이 경우, SK-BR-3 세포를 변이체 Fc 영역을 운반하는 HER2/neu 항체에 의해 오프소닌화된 표적 세포로서 사용되었다. HER2/neu는 SK-BR-3 세포에 의하여 내인성으로 발현되고, 따라서 이들 세포의 표면에 존재한다. 도 13은 변이체 Fc 영역을 운반하는 HER2/neu 항체의 ADCC 활성을 보여준다. 표 16은 HER2/neu 항체의 환경에서 돌연변이체의 ADCC 활성 결과를 요약한다. 돌연변이체의 농도를 세포 용해 퍼센트의 특정값을 위하여 필요한 야생형 항체에 비교함으로써 정규화를 실시하였다.

[0676] 도 13A에 나타난 바와 같이, 사람화 항-HER2/neu 항체에 클로닝된 MGFc-5(V379M), MGFc-9(P243I, V379L), MGFc-10(K288N, A330S, P396L), MGFc-13(K334E, T359N, T366S), 및 MGFc-27(G316D, A378V, D399E) 돌연변이체는 야생 항체에 비하여 SK-BR-3 세포의 더 높은 %의 특이적 용해를 보여주었다.

표 15

돌연변이체의 ADCC 활성의 정리

표지	Fc 변이체		ADCC			
	Ref	아미노산 변이	1ug/ml		0.5ug/ml	
			% 특이적 세포 용해	표준화	% 특이적 세포 용해	표준화
MGFc-27	2C4	G316D, A378V, D399E	33%	2.24	22%	3.60
MGFc-31	3B9	P247L, N421K	30%	2.05	17%	2.90
MGFc-10	1E1	K288N, A330S, P396L	24%	1.66	10%	1.67
MGFc-28	2C5	N315I, V379M, T394M	20%	1.37	10%	1.69
MGFc-29	3D11	F243I, V379L, G420V	20%	1.35	7%	1.17
ch4-4-20 (P54008)			15%	1.00	6%	1.00
MGFc-35	3D2	R255Q, K326E	11%	0.79	3%	0.53
MGFc-36	3D3	K218R, G281D, G385R	10%	0.67	5%	0.78
MGFc-30	3A8	F275Y	9%	0.64	2%	0.37
MGFc-32	3C8	D280E, S354F, A431D, L441I	9%	0.62	4%	0.75
MGFc-33	3C9	K317N, F423 삭제됨	3%	0.18	-1%	-0.22
MGFc-34	3B10	F241L, E258G	-1%	-0.08	-4%	-0.71
MGFc-26		D265A	1%	0.08	-3%	-0.45

[0677]

표 16

돌연변이체의 정리

Fc 변이체	아미노산 변화	FcR3A, K _D /K _{off}	FcR2B, K _D /K _{off}	ELISA IIIA 결합	ELISA IIB 결합	식세포 작용 (돌연변이체/WT)	4-4-20 ADCC (돌연변이체/WT)	Anti-HER2 ADCC (돌연변이체/WT)
Wt	없음	198/0.170	94/0.094	1	1	1	1	1
MGFc 5	V379M	160/0.167	70/0.10	2X	N/C	0.86	2.09	1.77
MGFc 9	P243L, V379L	99.7/0.105	120/0.113	1.5X	감소됨	?	2.25	2.04
MGFc 10	K288N, A330S, P396L	128/0.115	33.4/0.050	5X	3X	1.2	2.96	2.50
MGFc 11	F243L, R255L	90/0.075	74.7/0.09	1x	감소됨	0.8	2.38	1.00
MGFc13	K334E, T359N, T366S	55.20.128	72/0.11	1.5X	N/C	1	1.57	3.67
MGFc 14	K288M, K334E	75.4/0.1	95.6/0.089	3X	감소됨	1	1.74	
MGFc 23	K334E, R292L	70.2/0.105	108/0.107			1	2.09	1.6
MGFc 27	G316D, A378V, D399E	72/0.117	46/0.06	1.5X	14X	1.4	3.60	6.88
MGFc 28	N315I, A379M, D399E			1X	9X	1.37	1.69	1.00
MGFc 29	P243L, V379L, G420V	108/0.082	93.4/0.101	2.5X	7X	0.93	1.17	1.00
MGFc 31	P247L, N421K	62/0.108	66/0.065	3X	N/C	1.35	2.90	1.00
MGFc 37	K248M	154/0.175	100/0.091	1.4X	감소됨	0.98	3.83	0.67
MGFc 38	K392T, P396L	84/0.104	50/0.041	4.5X	2.5X	1.4	3.07	2.50
MGFc 39	E293V, Q295E, A327T	195/0.198	86/0.074	1.4X	감소됨	1.5	4.29	0.50
MGFc 40	K248M	180/0.186	110/0.09	1.4X	감소됨	1.14	4.03	
MGFc 41	H268N, P396L	178/0.159	46.6/0.036	2.2X	4.5X	1.96	2.24	0.67
MGFc 43	Y319F, P352L, P396L	125/0.139	55.7/0.041	3.5X	2X	1.58	1.09	

6.8 Fc 돌연변이체의 동력학적 매개변수의 분석

Fc 돌연변이체를 갖는 ch4-4-20 항체의 Fc γ RIIIA 및 Fc γ RIIB로의 결합에 대한 동력학적 매개변수를 BIAcore 분석(BIAcore instrument 1000, BIAcore Inc., Piscataway, N.J.)을 사용하여 분석하였다. 이 분석에 사용된 Fc γ RIIIA는 가용성 모노머 단백질이었으며, Fc γ RIIIA의 세포외 영역을 상기 6.2 단락에서 기술한 바와 같은 링커-AVITAG 서열에 결합시켰다. 이 분석에 사용된 Fc γ RIIB는 2003년 1월 13일자로 출원된 미국의 가출원 제 60/439,709호에 기재된 방법에 따른 가용성 다이머 단백질이었으며, 이 가출원은 본 명세서에서 참조로 포함된다. 간략히 말하면, 사용된 Fc γ RIIB는 사람 IgG2의 힌지-CH2-CH3 도메인에 융합된 Fc γ RIIB의 세포외 도메인이었다.

BSA-FITC(pH 5.0인 10 mM 아세트이트 완충액에서 36 μ g/mL)를 아민 커플링 화학을 통하여 (NHS/EDC의 혼합물로 카르복시메틸기를 변경시킴으로 인해) 센서 칩 표면의 흐름 세포 4개 중 하나(흐름 세포 2)에 고정시켜, 약 BSA-FITC의 5000 반응 단위(RU)를 표면상에 고정시켰다. 이후 미반응 활성 에스테르를 1 M Et-NH2의 주입으로 "캡-오프" 시켰다. 적합한 표면이 준비되면, Fc 돌연변이를 운반하는 ch 4-4-20 항체를 5 μ g/mL 유속에서 20 μ g/mL의 1 분간 주입으로 표면에 통과시킨다. 표면에 결합한 ch-4-4-20 항체 수준은 400 내지 700 RU의 범위이었다. 다음, HBS-P 완충액(10 mM HEPES, 150 mM NaCl, .005% 계면활성제 P20, 3 mM EDTA, pH 7.4)에서 수용체 (Fc γ RIIIA 및 Fc γ RIIB-Fc 융합 단백질)의 희석물 계열을 100 μ l/분으로 표면에 주입하였다. 상이한 수용체 희석물 간의 항체 재생성은 100 mM NaHCO₃ pH 9.4; 3 M NaCl의 단일 5초간의 주입으로 실시하였다.

수용체의 동일 희석물을 또한 참조 주입으로서 분석의 시작 및 종결시 어떠한 ch-4-4-20 항체도 없는 BSA-FITC 표면상에 주입하였다.

전체 데이터 집합을 일단 수집하면, 결과 결합 곡선이 제조사인 BIAcore사(Piscataway, NJ)에 의하여 제공되는 컴퓨터 알고리즘을 사용하여 구형으로 맞추었다. 이들 알고리즘은 K_{on} 및 K_{off} 둘 다를 계산하는 데, 이로부터 명백한 두 속도 상수의 비율(즉, K_{off}/K_{on})인 평형 결합 상수 K_D가 유도된다. 개별적 속도 상수가 어떻게 유도되는 지에 관한 보다 상세한 취급은 BIAevaluation Software Handbook(BIAcore, Inc., Piscataway, NJ)에서 파악될 수 있다.

두 개의 상이한 농도(Fc γ RIIIA에 대한 융합 단백질의 200 nM 및 800 nM, 및 Fc γ RIIB-Fc 융합 단백질에 대한 200 nM 및 400 nM) 대한 결합 곡선을 정렬하고, 반응을 포획된 항체와 동일 수준으로 조절하였으며, 그리고 참조 곡선을 실험 곡선으로부터 제거하였다. 결합 및 해리 상을 분리하여 일치시켰다. 해리 속도 상수는 해리 상

의 32-34초 간격에 대하여 얻었으며, 결합 상 일치는 1:1 랑뮤르 모델에 의하여 구하였으며, 염기 일치는 $R_{\max}$ 및 χ^2 기준을 기초하여 선택하였다.

[0685] **결과**

[0686] 도 14는 BSA-FITC 고정화 센서칩 상에서 돌연변이체 Fc 영역을 갖는 ch 4-4-20 항체의 포획을 보여준다. 약 20 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 항체 6 μL 를 BSA-FITC 표면상에 5 μL /분으로 주입하였다. 도 15는 Fc γ RIIIA의 변이체 Fc 영역을 운반하는 ch-4-4-20 항체로의 실시간 결합의 센서그램이다. Fc γ RIIIA의 결합을 200 nM 농도에서 분석하였고, 공명 신호 반응을 야생형 ch-4-4-20 항체에 대하여 얻어진 반응 수준에서 정규화하였다. Fc γ RIIIA의 ch-4-4-20 항체로의 결합에 대한 동력학적 매개변수는 두 상이한 Fc γ RIIIA 농도, 200 및 800 nM에서 얻어진 데이터를 맞춤으로써 얻어졌다(도 16). 실선은 32-34초 간격에서 해리 곡선을 위하여 계산된 K_{off} 를 기준하여 얻어진 결합 맞춤을 나타낸다. K_D 및 K_{off} 는 사용된 두 상이한 Fc γ RIIIA 농도로부터 계산된 평균치를 나타낸다. 도 17은 Fc γ RIIB 융합 단백질의 ch-4-4-20 돌연변이체 Fc 영역을 운반하는 ch-4-4-20 항체로의 실시간 결합에 대한 센서그램이다. Fc γ RIIB-Fc 융합 단백질의 결합은 200 nM 농도에서 분석하고, 공명 신호 반응을 야생형 ch-4-4-20 항체에 대하여 얻어진 반응 수준에서 정규화하였다. Fc γ RIIB-Fc 융합단백질의 ch-4-4-20 항체로의 결합에 대한 동력학적 매개변수는 두 상이한 Fc γ RIIB-Fc 융합단백질의 농도, 200 및 800 nM에서 얻어진 데이터를 맞춤으로써 얻어졌다(도 18). 실선은 32-34초 간격에서 해리 곡선을 위하여 계산된 K_{off} 를 기준하여 얻어진 결합 맞춤을 나타낸다. K_D 및 K_{off} 는 사용된 두 상이한 Fc γ RIIB-Fc 융합 단백질 농도로부터 계산된 평균치를 나타낸다.

[0687] BIAcore 분석으로부터 결정된 동력학적 매개변수(K_{on} 및 K_{off})는 ELISA 분석에 의하여 결정되는 바와 같은 돌연변이체의 결합 특성, 및 ADCC 분석에 의하여 결정되는 바와 같은 항체의 기능 활성화에 연관되었다. 특히, 표 17에서 나타내는 바와 같이, 야생형 단백질에 비하여 향상된 ADCC 활성을 가지며, 그리고 ELISA 분석에 의하여 결정되는 바와 같이, Fc γ RIIIA로의 향상된 결합을 갖는 돌연변이체는 Fc γ RIIIA에 대한 개선된 K_{off} 를 가졌다(즉, 더 낮은 K_{off}). 따라서, 야생형 단백질에 비하여 Fc γ RIIIA의 돌연변이체 Fc 단백질에 대한 더 낮은 값은 향상된 ADCC 기능을 가질 수 있다. 다른 한편으로는, 표 18에서 보이는 바와 같이, 야생형 단백질에 비하여 향상된 ADCC 활성을 가지며, 그리고 ELISA 분석에 의하여 결정되는 바와 같이 Fc γ RIIB-Fc 융합 단백질을 위한 감소된 결합을 갖는 돌연변이체는 Fc γ RIIB-Fc 융합 단백질에 대한 더 높은 K_{off} 를 가졌다.

[0688] 따라서, Fc γ RIIIA 및 Fc γ RIIB에 대한 K_{off} 값이 돌연변이체가 ADCC분석 같은 기능성 분석에서 어떻게 움직일지에 대한 예상 측정을 위하여 사용될 수 있다. 실제로 야생형 단백질에 대한 돌연변이체의 Fc γ RIIIA 및 Fc γ RIIB-Fc 융합 단백질의 K_{off} 값의 비율을 ADCC 데이터와 대조하여 도면으로 나타내었다. 특히하게, Fc γ RIIIA에 대한 K_{off} 값의 경우, $K_{\text{off}}(\text{wt})/K_{\text{off}}(\text{돌연변이})$ 의 비율을 ADCC 데이터와 대조하여 도면으로 나타냈으며; Rc γ RIIB에 대한 K_{off} 값의 경우, $K_{\text{off}}(\text{mut})/K_{\text{off}}(\text{wt})$ 의 비율을 ADCC 데이터와 대조하여 도면으로 나타냈다. 1보다 더 큰 숫자는 야생형에 비하여 Fc γ RIIIA에 대한 감소된 해리 속도 및 증가된 Fc γ RIIB-Fc를 나타낸다. 표시된 상자 내에 해당하는 돌연변이체는 Fc γ RIIIA결합에 대한 더 낮은 오프 속도, 및 Fc γ RIIB-Fc 결합에 대한 더 높은 오프-속도를 가지며, 향상된 ADCC 기능을 보유하게 된다.

표 17

200nM 및 800nM 결합 곡선의 "개별 맞춤(fit)"에 의하여 얻어진 ch4-4-에 결합한 FcRIIIa의 동력학적 매개변수

Ch4-4-20Ab	BIAcore Kd,nM	K _{on} 1/Ms	K _{off} , 1/s	ELISA,OD	ADCC, %
Wt(0225)	319	6.0 x 10 ⁵	0.170	0.5	17.5
Mut11(0225)	90	8.22x10 ⁵	0.075	0.37	32
Mut5(0225)	214	8.2 x 10 ⁵	0.172	0.75	26
Mut6(0225)	264	6.67 x 10 ⁵	0.175	0.6	23
Mut8(0225)	234	8.3 x 10 ⁵	0.196	0.5	22
Mut10(0225)	128	9.04x10 ⁵	0.115	1.0	41
Mut12(0225)	111	1.04x 10 ⁶	0.115	1.0	37
Mut15(0225)	67.9	1.97 x 10 ⁶	0.133	1.0	15
Mut16(0225)	84.8	1.60 x 10 ⁶	0.133	1.0	15
Mut18(0225)	92	1.23 x 10 ⁶	0.112	1.0	28
Mut25(0225)	48.6	2.05 x 10 ⁶	0.1	1.0	41
Mut14(0225)	75.4	1.37 x 10 ⁶	0.1	1.1	28
Mut17(0225)	70.5	1.42 x 10 ⁶	0.1	1.25	30
Mut19(0225)	100	1.20 x 10 ⁶	0.120	0.75	11
Mut20(0225)	71.5	1.75 x 10 ⁶	0.126	0.5	10
Mut23(0225)	70.2	1.43x 10 ⁶	0.105	1.25	25

[0689]

표 18

야생형 및 200nM 및 800nM 결합 곡선의 "개별 맞춤(fit)"에 의하여 얻어진 돌연변이체 ch4-4-에 결합한 FcRIIB-Fc의 동력학적 매개변수

Ch4-4-20Ab	BIAcore Kd,nM	K _{on} 1/Ms	K _{off} , 1/s	ELISA,OD	ADCC, %
Wt(0225)	61.4		0.085	0.4	17.5
Mut11(0225)	82.3		0.1	0.08	32
Mut5(0225)	50		0.057	0.6	26
Mut6(0225)	66.5		0.060	0.35	23
Mut8(0225)	44.2		0.068	0.25	22
Mut10(0225)	41.3		0.05	1.2	41
Mut12(0225)	40.1		0.051	0.4	37
Mut15(0225)	37.8		0.040	1.55	15
Mut16(0225)	40		0.043	1.55	15
Mut18(0225)	51.7		0.043	1.25	28
Mut25(0225)			0.112	0.08	41
Mut14(0225)	95.6		0.089	0.13	28
Mut17(0225)	55.3		0.056	0.38	30
Mut19(0225)	45.3		0.046	1.0	11
Mut20(0225)	24.1		0.028	0.8	10
Mut23(0225)	108		0.107	0.1	25

[0690]

[0691]

6.9 교체상 분석을 사용하는 농축의 복수회를 사용한 Fc 돌연변이체에 대한 스크리닝

[0692] 하기 돌연변이체의 스크린은 Fc γ RIIIA에 대한 개선된 결합 및 Fc γ RIIB에 대한 감소된 결합을 보여주는 일단의 돌연변이체를 확인하는 데 그 목적이 있다. 선택된 Fc 변이체의 2차 스크리닝을 ELISA에 의하여 수행한 후 4-4-20 시스템에서 ADCC에 대하여 검사하였다. 다음에, 표적으로서 형광 코팅된 SK-BR3 세포, 및 작동자 세포 집단으로서 사람 공여체로부터 분리된 PBMC를 사용하여 4-4-20을 통하여 ADCC를 매개하는 돌연변이체의 능력을 주요 기준으로 돌연변이체를 선택하였다. ADCC에서 상대적 증가, 예를 들면 인자 2에 의한 향상을 보여주는 Fc 돌연변이체를 다음에 항-HER2/neu 또는 항-CD20 chAb로 클로닝하고, ADCC분석에서 표적으로서 적절한 종양 세포를 사용하여 테스트하였다. 돌연변이를 또한 BIAcore에 의하여 분석하고, 이들의 상대적 K_{off} 를 결정하였다.

[0693] 스크린1: 순차적 고체상 소모 및 Fc γ RIIB로 코팅된 마그네틱 비드 사용에 의한 선택 이후 Fc γ RIIIA로 코팅된 마그네틱 비드 사용에 의한 선택

[0694] 이 스크린의 목적은 Fc γ RIIB에 더 이상 결합하지 않거나, Fc γ RIIB로의 감소된 결합을 보이는 Fc 돌연변이체의 확인에 있었다. 10배 과량의 천연 라이브러리($\sim 10^7$ 개 세포)를 Fc γ RIIB로 코팅된 마그네틱 비드와 인큐베이션 하였다("My One", Dynal). 비드에 결합한 효모를 혼합물을 함유하는 튜브를 자기장에 넣음으로써 비-결합 부분 으로부터 분리하였다. 비드에 결합하지 않은 효모 세포를 제거하고, 신선한 배지에 넣었다. 이것을 다음에 Fc γ RIIIA로 코팅된 비드에 결합시켰다. 혼합물을 함유하는 튜브를 자기장에 넣음으로써 비드에 결합한 효모를 비-결합부분 으로부터 분리하였다. 비결합 효모를 제거하고, 결합된 세포를 격렬한 와동에 의하여 제거하였다. 회수 된 세포를 글루코스 함유 배지에서 재성장시키고, 갈락토스를 함유하는 선택 배지에서 재유도하였다. 선택 과정을 반복하였다. 다음에 최종 배양물을 사용하여 DNA를 채취하였다. Fc 도메인을 함유하는 삽입물을 PCR에 의하여 증폭시켰고, 4-4-20으로 클로닝하였다. 약 90 Fc 돌연변이체를 4-4-20 ELISA 및 ADCC 분석에 의하여 스크리닝하였고, 양성 결과인 돌연변이체를 표19에 나타낸다.

표 19

순차적 고체상 고갈 및 Fc γ RIIB로 코팅된 자기 비드를 사용한 선택 후 Fc γ RIIIA로 코팅된 자기 비드로의 선택에 의하여 선택된 돌연변이체

돌연변이체	아미노산 변화
MgFc37	K248M
MgFc38	K392T, P396L
MgFc39	E293V, Q295E, A327T
MgFc41	H268N, P396LN
MgFc43	Y319F, P352L, P396L
	D221E, D270E, V308A, Q311H, P396L,
MgFc42	G402D

[0695]

[0696] 스크린 2&3: FACS에 의해 선택된 돌연변이체, 평형 또는 동력학적 스크리닝: 1차 라이브러리 스크린은 396번 위치에서 돌연변이를 확인하였는데, 이는 아미노산을 프롤린 으로부터 류신으로 변화시켰다(P396L). 이 Fc 변이체는 Fc γ RIIIA 및 Fc γ IIB 둘 다에 대한 증가한 결합을 보여줬다. 2차 라이브러리는 P396L을 기준선으로 사용하여 구성하였다. PCR 돌연변이 유발이 사용되어 $\sim 10^7$ 개 돌연변이체를 생성하였고, 돌연변이체의 각각은 P396L 돌연변이 및 또 다른 뉴클레오티드 변화를 함유하고 있었다. P396L 라이브러리를 조건의 집합을 사용하여 스크리닝하였다.

[0697] 비오틴화된 Fc γ RIIIA-링커-avitag을 모노머로 사용하고, 이미 기술한 방법을 사용하여 평형 스크린을 수행하였다. 라이브러리의 약 10-배인 과량(10^8 세포)을 약 7nM Fc γ RIIIA의 0.5mL에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 혼합물을 FACS에 의하여 분류하였는데, 바인더의 상위 1.2%를 선택하였다. 선택된 효모 세포를 글루코스를 함유하는 선택 배지에서 성장시켰고, 갈락토스를 함유하는 선택 배지에서 재유도하였다. 평형 스크린을 2회 반복하고, 분류 게이트를 설치하여 바인더의 상위 0.2%를 수집하였다. 선택된 효모 세포를 다음에 글루코스에서의 선택 조건에서 성장시켰다. 다음에 이 배양물을 사용하여 DNA를 수확하였다. Fc 도메인을 함유하는 삽입물을 PCR에 의하여 증폭시키고, 상술한 방법을 사용하여 4-4-20 변이 도메인을 코드화하는 뉴클레오티드로 클로닝한다. 약 90 Fc 돌연변이체를 4-4-20 ELISA 및 ADCC에 의하여 스크리닝하고, 양성 결과의 돌연변이체를 표 20에 나타내었다.

표 20

약 7nM의 FcγRIIIA 농도로 평형 스크린을 사용한
FACS에 의하여 선택된 돌연변이체

돌연변이체	아미노산 변화
MgFc43b	K288R, T307A, K344E, P396L
MgFc44	K334N, P396L
MgFc46	P217S, P396L
MgFc47	K210M, P396L
MgFc48	V379M, P396L
MgFc49	K261N, K210M, P396L
MgFc60	P217S, P396L

[0698]

[0699]

동력학적 스크리닝을 또한 실시하여 돌연변이체를 FcγRIIIA를 결합시키는 데 있어 개선된 K_{off} 를 갖는 돌연변이체를 식별하였다. 효모 표면상에 디스플레이된 P396L Fc 돌연변이체를 갖는 균주를 사용하여, P396L 라이브러리를 스크리닝하기 위한 조건을 완성하였다. 유도 조건 하에서 성장된 세포를 0.1 μM 비오틴화 FcγRIIIA-링커-avitag 모노머로 1시간 동안 간단히 인큐베이션하였다. 세포를 세척하여 표지된 리간드를 제거하였다. 표지된 세포를 다음에 상이한 횟수에서 0.1 μM 비표지된 FcγRIIIA-링커-avitag 모노머로 인큐베이트하고, 세척하고, FACS 분석을 위하여 SA:PE로 염색하였다(도 20). 세포를 염소 항-사람 Fc로 또한 염색하여 Fc 표시가 실험 도중 유지되는 것을 보여주었다.

[0700]

경쟁 연구를 기초하여, 1분 인큐베이션은 세포 염색의 약 50% 손실을 초래하는 것이 결정되었다. P396L 라이브러리를 사용한 동력학적 스크리닝을 위하여 이 시점을 선택하였다. 라이브러리의 약 10배 과량(10^8 개 세포)을 0.5 mL 부피에서 0.1 μM 비오틴화된 FcγRIIIA-링커-avitag 모노머로 인큐베이션하였다. 세포를 세척한 후 비표지화된 리간드로 1분간 인큐베이션하였다. 이어서 세포를 세정한 후 SA:PE로 표지화하였다. 혼합물을 FACS에 의하여 분류하고, 바인더의 0.3%를 선택하였다. 선택된 효모 세포를 글루코스를 함유하는 선택 배지에서 성장시켰고, 갈락토스를 함유하는 선택 배지에서 재유도하였다. 동력학적 스크리닝을 2회 반복하고, 분류 게이트를 설치하여 바인더의 상부 0.2%를 수집하였다. 비선택된 P396L 라이브러리를 FACS에 의하여 개선된 결합에 대하여 효모 세포와 비교하였다(도 21). 히스토그램은 FcγRIIIA/PE 및 염소 항-사람 Fc/FITC 둘 다에 함유된 세포의 퍼센트를 보여준다(오른쪽 위).

[0701]

2차 분류에서부터 선택된 효모 세포를 선택 조건 하에서 글루코스에서 성장시켰다. 그 다음 배양물을 사용하여 DNA를 수확하였다. Fc 도메인을 함유하는 삽입물을 PCR에 의하여 증폭시켰고, 상기 방법을 사용하여 4-4-20 가변 도메인을 코딩화하는 뉴클레오타이드 서열에 클로닝하였다. 약 90 Fc 돌연변이체를 4-4-20 ELISA 및 ADCC에 의하여 스크린하였고, 양성 결과의 돌연변이체를 표 21에 나타내었다.

표 21

비표지된 CD16A의 같은 물량을 1분간 사용한
동력학적 스크린을 사용하는 FACS에 의하여 선택된 돌연변이체

돌연변이체	아미노산 변화
MgFc50	P247S, P396L
MgFc51	Q419H, P396L
MgFc52	V240A, P396L
MgFc53	L410H, P396L
MgFc54	F243L, V305I, A378D, F404S, P396L
MgFc55	R255I, P396L
MgFc57	L242F, P396L
MgFc59	K370E, P396L

[0702]

[0703]

스크린 4 및 5: FcγRIIIA 158V 대립 유전자를 사용하여, 고체상 FcγRIIB 결핍 단계를 FACS 분류에 의한 FcγRIIIA 선택과 결합

[0704]

스크린 1로부터의 Fc 변이체의 분석은 2차 스크린으로부터 선택된 돌연변이가 FcγRIIIA 및 FcγRIIB 둘 다에 대하여 개선된 결합을 갖는 것을 보여줬다. 따라서, 데이터는 확립된 조건 하에서 연속적 결핍 및 마그네틱 비드를 사용한 선택은 FcγRIIIA 및 FcγRIIB의 구별되는 결합에 대하여 효율적으로 선택하지 않았다는 것을 암시하였다. 따라서 FcγRIIIA에 결합하지만, FcγRIIB로의 결합이 전혀 없거나 감소된 돌연변이체를 보다 효율적으

로 스크리닝하기 위하여, 고체상 Fc γ RIIB 결핍 단계를 FACS 분류에 의한 Fc γ RIIIA 선택과 결합하였다. 이 결합은 야생형 Fc보다 더 크거나 동일한 친화력을 가지며 Fc γ RIIIA에 결합하는 Fc 변이체를 식별하였다.

[0705] 천연 라이브러리의 10배 과량($\sim 10^7$)을 Fc γ RIIB로 코팅된 마그네틱 비드로 인큐베이션하였다. 비드에 결합한 효모는 혼합물을 함유하는 튜브를 자기장에 넣음으로써 비-결합 부분으로부터 분리하였다. 비드에 결합하지 않은 이들 효모 세포를 제거하고, 새로운 배지에 넣었으며, 이어서 갈락토스를 함유하는 배지에서 재유도하였다. 마그네틱 비드에 의한 Fc γ RIIB 결핍을 5회 반복하였다. 결과인 효모 집단을 분석하였으며, 염소 항-사람 Fc로 염색되는 세포는 50%를 넘었으며, 세포의 매우 작은 퍼센트가 Fc γ RIIIA로 염색된다는 것을 발견하였다. 이들 세포를 다음에 0.1 μ M 비오틴화된 Fc γ RIIIA 링커-avitag를 사용하는 FACS 분류에 의하여 2회 선택하였다(데이터를 나타내지 않음). Fc γ RIIIA는 158V 알로타이프였다. 효모세포를 각 분류 후 Fc γ RIIIA 및 Fc γ RIIB 결합 둘 다에 대하여 분석하였으며, 야생형 Fc 도메인에 의한 결합과 비교하였다(도 22A-B).

[0706] 2차 분류로부터 선택된 효모 세포를 다음에 글루코스에 의한 선택조건 하에서 성장시켰다. 다음에 이 배양물을 사용하여 DNA를 채집하였다. Fc 도메인을 함유하는 삽입물을 PCR에 의하여 증폭시켰으며, 4-4-20 가변 도메인을 코드화하는 뉴클레오타이드 서열로 클로닝하였다. 약 90 Fc 돌연변이체를 4-4-20 ELISA 및 ADCC로 스크리닝하고, 양성 결과인 돌연변이체를 표 22에 나타냈다(돌연변이체 61-66).

표 22

CD32B로 코팅된 비드를 이용한 자기 비드 상실 및 Fc γ RIIIA 158발린 또는 158페닐알라닌을 이용한 FACS에 의한 최종 선택에 의하여 선택된 돌연변이체

돌연변이체	아미노산 변화
MgFc61	A330V
MgFc62	R292G
MgFc63	S298N, K360R, N361D
MgFc64	E233G
MgFc65	N276Y
MgFc66	A330V, V427M
MgFc67	V284M, S298N, K334E, R355W, R416T

[0707] Fc γ RIIIA의 158F 대립 유전자를 사용한 Fc 돌연변이체의 스크리닝: 존재하는 Fc γ RIIIA 수용체의 상이한 대립 유전자 두 개는 IgG1 Fc 도메인에 대하여 상이한 결합 친화력을 갖는다(Koene et al., 1997, Blood 90:1109-1114; Wu et al., 1997, J. Clin. Invest. 100:1059-70). 158F 대립 유전자는 158V 대립 유전자보다 5-10배 낮은 결합 상수를 가지며 Fc 도메인에 결합한다. 이전에 효모 표시를 사용한 Fc 스크리닝의 전부를 높은 결합 158V 대립 유전자를 리간드로서 사용하면서 실시하였다. 이 실험에서, Fc 돌연변이체를 Fc γ RIIB 결핍 효모 집단으로부터 선택하였는데, 비오틴화된 Fc γ RIIIA158F-링커-avitag 모노머를 리간드로 사용하였다. 분류 게이트를 설치하여 Fc γ RIIIA 158F 바인더의 상부 0.25 퍼센트를 선택하였다. 농축된 결과 집단을 FACS에 의하여 분석하였다(도 22B). 개별 클론을 다음에 분리하고, 상이한 Fc γ R로의 이들 결합을 FACS에 의하여 분석하였다(도 22B). 집단으로부터의 개별 클론에 대한 분석은 5개 돌연변이(V284M, S298N, K334E, R355W, R416S)를 가지며, 이는 Fc γ RIIIA로의 향상된 결합 및 Fc γ RIIB로의 감소된 결합을 갖는 단일 돌연변이체 MgFc77를 식별하게 하였다.

[0709] 스크린 1, 2, 및 3에 대하여 ADCC에 의한 돌연변이체의 2차 스크린

[0710] 다음에 상기 스크린에서 선택된 돌연변이체를 표준 ADCC 분석을 사용하여 분석하고, Fc 돌연변이체를 갖는 ch4-4-20에 의하여 매개된 용해의 상대적 속도를 결정하였다. Fc 변이체를 운반하는 ch4-4-20 항체를 이미 상술한 방법을 사용하여 구성하였다. SK-BR3 세포를 표적으로 사용하고, 작동자 세포는 상술한 바(6.7 단락)와 같이, Ficoll 구배를 사용하여 공여체로부터 분리된 PBMC였다. 돌연변이체에 대한 ADCC 활성 결과는 표 23에 정리되었다.

[0711] 표 23에서 보이는 바와 같이, Fc γ RIIB 결핍 및 Fc γ RIIIA 선택에 기초한 상기 1차 및 2차 스크린을 사용하여 분리된 돌연변이체는 야생형에 비하여 향상된 ADCC 활성을 보여주었다.

표 23

형광코팅된 SKBR3 상에서 4-4-20 항-형광 항체에 의하여 매개된 ADCC의 분석

돌연변이체	아미노산 변화	세포용해의 상대 속도
MgFc37	K248M	3.83
MgFc38	K392T, P396L	3.07
MgFc39	E293V, Q295E, A327T	4.29
MgFc41	H268N, P396LN	2.24
MgFc43	Y319F, P352L, P396L	1.09
MgFc42	D221E, D270E, V308A, Q311H, P396L, G402D	3.17
MgFc43b	K288R, T307A, K344E, P396L	3.3
MgFc44	K334N, P396L	2.43
MgFc46	P217S, P396L	2.04
MgFc47	K210M, P396L	2.02
MgFc48	V379M, P396L	2.01
MgFc49	K261N, K210M, P396L	2.06
MgFc50	P247S, P396L	2.1
MgFc51	Q419H, P396L	2.24
MgFc52	V240A, P396L	2.35
MgFc53	L410H, P396L	2
MgFc54	F243L, V305I, A378D, F404S, P396L	3.59
MgFc55	R255I, P396L	2.79
MgFc57	L242F, P396L	2.4
MgFc59	K370E, P396L	2.47
MgFc60	P217S, P396L	1.44

[0712]

[0713] 돌연변이체 37, 38, 39, 41, 43을 0.5 $\mu\text{g/mL}$ ch4-4-20을 사용하여 분석하였다. 모든 다른 항체를 1 $\mu\text{g/mL}$ 에서 테스트하였다. 모든 속도를 야생형 ch4-4-20(IgG1)으로 표준화하였다.

[0714] 돌연변이체를 추가적으로 항종양 모노클로날 항체 4D5(항-HER2/neu)의 중쇄 및 항-CD20 모노클로날 항체 2H7로 클로닝하였는데, 이는 이들 모노클로날 항체의 Fc 도메인 대체에 의해서이다. 이들 키메라 모노클로날 항체를 발현, 정제시키고, 293H 세포로의 일시적 트랜스펙션 및 단백질 G 칼럼에 대한 정제를 사용하는 ADCC 분석에서 테스트하였다. 표적으로 SK-BR3 세포를 사용하는 ADCC 분석에서 키메라 4D5 항체를 테스트하였는데(도 23), 반면 표적으로 Daudi 세포를 사용하는 ADCC 분석에서 키메라 2H7 항체를 테스트하였다.

[0715] BIAcore를 통한 돌연변이체의 2차 스크린: 상기 스크린에서 선택된 돌연변이체를 다음에 BIAcore에 의하여 분석하여, Fc γ RIIIA(158V) 및 Fc γ RIIB 결합에 대한 동력학적 매개변수를 결정하였다. 사용된 방법은 상기 단락 6.8에서 개시된 것과 유사하였다.

[0716] 표시된 데이터는 ch4-4-20 모노클로날 항체에서 Fc 돌연변이체를 사용한 실험으로부터 결정될 때 야생형 오프 속도에 대한 K_{off} 값이다. 1보다 큰 상대 수치는 K_{off} 값의 감소를 표시한다. 1보다 작은 수치는 오프 속도의 증가를 표시한다.

[0717] Fc γ RIIIA에 대한 오프 속도의 감소를 나타낸 돌연변이체는 MgFc38(K392, P396L), MgFc-43(Y319F, P352L, P396L), MgFc42(D221E, D270E, V308A, Q311H, P396L, G402D), MgFc43b(K288R, T307A, K344E, P396L), MgFc44(K334N, P396L), MgFc46(P217S, P396L), MgFc49(K261N, K210M, P396L) 이었다. Fc γ RIIB에 대한 오프 속도의 감소를 나타낸 돌연변이체는 MgFc38(K392, P396L), MgFc39(E293V, Q295E, A327T), MgFc43(K288R, T307A, K344E, P396L), MgFc44(K334N, P396L)이었다. Biacore 데이터는 표 24에 정리된다.

표 24

BIAcore 데이터

Fc 돌연변이체		AA 잔기	FcγRIIIA158V (Koff WT/ Mut)	FcγRIIB (Koff WT/ Mut)
MgFc37	K248M		0.977	1.03
MgFc38	K392T, P396L		1.64	2.3
MgFc39	E293V, Q295E, A327T		0.86	1.3
MgFc41	H268N, P396LN		0.92	1.04
MgFc43	Y319F, P352L, P396L		1.23	2.29
	D221E, D270E, V308A, Q311H, P396L,			
MgFc42	G402D		1.38	
MgFc43b	K288R, T307A, K344E, P396L		1.27	0.89
MgFc44	K334N, P396L		1.27	1.33
MgFc46	P217S, P396L		1.17	0.95
MgFc47	K210M, P396L			
MgFc48	V379M, P396L			
MgFc49	K261N, K210M, P396L		1.29	0.85
MgFc50	P247S, P396L			
MgFc51	Q419H, P396L			
MgFc52	V240A, P396L			
MgFc53	L410H, P396L			
MgFc54	F243L, V305I, A378D, F404S, P396L			
MgFc55	R255I, P396L			
MgFc57	L242F, P396L			
MgFc59	K370E, P396L			
MgFc60	P217S, P396L			
MgFc61	A330V		1	0.61
MgFc62	R292G		1	0.67
MgFc63	S298N, K360R, N361D		1	0.67
MgFc64	E233G		1	0.54
MgFc65	N276Y		1	0.64
MgFc66	A330V, G427M,		1	0.62
MgFc67	V284M, S298N, K334E, R355W, R416T			

[0718]

[0719]

6.10 PBMC 매개된 ADCC 분석

[0720]

재료 및 방법

[0721]

FcγRIIIA로의 개선된 결합을 보이는 Fc 돌연변이체를 60:1 작동자:표적 비율을 사용하는 PBMC 기반 ADCC에 의하여 테스트하였다. 두 개의 상이한 종양 모델 시스템을 표적으로 사용하였는데, SK-BR3(항-HER2/neu) 및 Daudi(항-CD20)이었다. 특이적 용해 퍼센트를 각 돌연변이체에 대하여 정량화하였다. 선형 회귀 분석을 사용하여 100%에서 최대 용해 퍼센트가 설정되도록 데이터를 도면화하였다.

[0722]

낮은 친화력 FcγR 및 면역 복합체 간의 상호 작용에 의하여 유발되는 신호 전달 경로를 통하여 ADCC는 면역 시스템 작동자 세포 상에서 활성화된다. 작동자 세포 집단을 1차 혈액 또는 활성화된 단핵구 유도 대식세포(MDM) 중 어느 하나로부터 유도하였다. 표적 세포를 유로폼으로 채우고, 키메라 MAb로 인큐베이트하였으며, 이어서 작동자 세포 집단으로 인큐베이트하였다. 유로폼은 ⁵¹Cr과 같은 방식으로 작용하지만 이것은 비-방사능이며, 방출된 유로폼은 형광 플레이트 판독기에서 검출된다. Ficoll-Paque 구매(Pharmacia)를 사용하여 공여체의 말초 혈액으로부터 채집된 림프구(PBM)는 자연 살해 세포(NK)를 주로 함유한다. ADCC 활성의 대부분은 NK 함유 FcγRIIIA를 통하여 발생할 것이나, 그들의 표면에서 FcγRIIB를 통하여는 그러하지 않을 것이다.

[0723]

두 상이한 표적 세포 집단을 사용하여 실험을 수행하였는데, SK-BR-3 및 Daudi이며, 각각 HER2/neu 및 CD20를 발현한다. Ch4-4-20/FITC 코팅된 SK-BR-3, Ch4D5/SKBR3, 및 Rituxan/Daudi를 사용하는 ADCC 분석을 구성하였다(데이터는 나타내지 않음). 키메라 MAb를 식별된 Fc 돌연변이를 이용하여 변경하였다. Fc 돌연변이체를 Ch4D5로 클로닝하였다. 정제된 Ab를 사용하여 SK-BR-3 세포 또는 Daudi세포를 오프소닌화하였다. Fc 돌연변이체를 Ch4D5로 클로닝하였다.

[0724]

결과. Fc 돌연변이체는 SK BR3 세포에서 개선된 PBMC 매개된 ADCC 활성을 보여줬다(도 27). 도면은 표준 ADCC 분석의 선형 회귀 분석을 보여준다. 항체를 75:1의 작동자 대비 표적 비율을 사용하여 3 로그에 대하여 적정하였다. % 세포 용해=(실험 방출 - SR)/(MR-SR) * 100.

- [0725] Fc 돌연변이체는 Daudi세포에서 개선된 PBMC 매개된 ADCC 활성을 보여줬다(도 28).
- [0726] **6.11 ADCC 분석을 기초한 단핵구 유래된 대식세포(MDM)**
- [0727] Fc γ R 종속인 종양 세포 살해는 래트 종양 모델에서 대식 세포 및 NK 세포에 의하여 매개되었다(Clynes et al., 1998, PNAS USA, 95:652-6). 기증자로부터 현탁분리된 단핵구를 작동자 세포로 사용하여, ADCC 분석에서 표적 세포의 세포 독성을 유발하는 Fc 돌연변이체 효율을 분석하였다. Fc γ RI, Fc γ R3A 및 Fc γ R2B의 발현 형태는 상이한 성장 조건에 의하여 영향을 받았다. 사이토킨 및 사람 혈청의 상이한 혼합을 함유하는 배지에서 배양된 냉동 단핵구로부터의 Fc γ R 발현을 FcR 특이적 MAb를 사용하는 FACS에 의하여 검사하였다(도 29). 배양된 세포를 Fc γ R 특이적 항체로 염색시키고, FACS에 의하여 분석하여 MDM Fc γ R 프로파일을 결정하였다. 생체 내 Fc γ R 발현에서 대식세포를 가장 잘 모방하는 조건, 즉 CD16 및 CD32B를 발현시키는 세포의 가장 큰 부분이 단핵구 유래 대식세포(MDM) 기반 ADCC 분석에서 사용되었다는 것을 보여줬다. 도 29의 실험을 위하여, 냉동 현탁분리된 단핵구를 DMEM 및 M-CSF(조건 1) 또는 GM-CSF(조건 2) 중 어느 하나를 함유하는 20% FBS에서 8일간 성장시켰다. 도 30에서의 실험을 위하여, 냉동 현탁분리된 단핵구를 ADCC 분석 이전에 DMEM 및 GM-CSF, IL-2과 INF γ 를 함유하는 20% FBS에서 2일간 성장시켰다. 높은 수준의 CD16 및 CD32B 발현을 허용하는 무혈청 조건 또한 전개하였다(데이터를 나타내지 않음). 간단히 말하면, 정제된 단핵구를 GM-CSF, M-CSF, IL-6, IL-10, 및 IL-1 β 를 함유하는 대식세포-SFM(Invitrogen)에서 6-8일간 성장시켰다. 시토킨의 혼합물을 사용할 때 이들 배양물에서 CD32B+/CD16+세포 발생이 가장 높았으나, 사이토킨 둘 이상의 조합은 또한 Fc γ R 발현을 향상시킬 것이다(M-CSF/IL-6, M-CSF/IL-10; 또는 M-CSF/IL-1 β). ADCC 분석에 대하여, INF γ 를 최종 24-48시간 동안 첨가하였다.
- [0728] MDM 기반 ADCC는 세포 살해를 관찰하기 위하여 >16시간의 인큐베이션 시간을 요구하였다. 표적세포 내에서 장기 인큐베이션을 위하여 채취되는 인덱스-111로 표적세포를 채웠다. 인덱스 방출을 감마 카운터를 사용하여 정량화하였다. 모든 다른 시약, Ab 및 표적세포는 PBMC 기반 ADCC 분석과 유사하였다. Fc γ RI에 기인하여 ADCC 활성은 항-FcRI 차단 항체(M21, Ancell) 사용으로 효율적으로 차단할 수 있다. 분석 조건은 PBMC 기반 분석과는 다소 상이하다. 20:1인 표적 대 작용자; 37℃에서 18-14시간 인큐베이션.
- [0729] 개선된 PBMC ADCC, Fc γ RIIIA로의 증가된 결합, 또는 Fc γ RIIB로의 감소된 결합을 보이는 Fc 돌연변이체를 테스트하였다(도 30).
- [0730] **6.12 보체 활성화에 대한 Fc 돌연변이체의 효과**
- [0731] Fc 돌연변이체를 Fc γ RIIIA로의 증가된 결합에 기초하여 초기에 식별하였다. 이어서 이들 돌연변이체를 모든 낮은 친화력 수용체에 대한 이들의 개선된 친화력 및 많은 경우 PBMC에 의하여 매개된 ADCC에서의 개선된 활성으로 확인하였다. 생체 내 항체 매개된 세포 독성은 복수의 메커니즘을 통하여 발생할 수 있다. ADCC에 추가하여, 다른 가능한 메커니즘은 보체 의존적 세포 독성(CDC) 및 세포자살을 포함한다. 면역글로불린의 Fc 영역으로의 C1q결합은 캐스케이드로서 개시되어, CDC에 의한 세포 용해를 발생시킨다. C1q 및 Fc간의 상호작용은 일련의 Fc 돌연변이체에서 연구되었다. 이들 실험의 결과는 C1q 및 낮은 친화력 FcRI가 Fc의 중첩 영역으로 결합하는 것을 나타내지만, Fc내의 정확한 접촉 잔기는 가변적이다.
- [0732] CDC에서 이들이 갖는 PBMC 기반 분석에서 개선된 ADCC를 보이는 돌연변이체에 관한 효과를 조사하였다. 항체를 항 CD20 Ch-mAb.2H7에서 분석하였다. 본 출원인은 테스트된 돌연변이체 ch-mAb 각각에 대하여 개선된 CDC를 검출하였다. 흥미롭게도, 이들 돌연변이체가 이들의 개선된 ADCC로 선택되었음에도 또한 향상된 CDC를 보여준다.
- [0733] **재료 및 방법.** 항-CD20 및 Daudi세포를 표적으로 사용하면서 CDC 분석을 사용하여 Fc 돌연변이체를 테스트하였다. 기니 돼지 혈청을 보체 공급원으로 사용하였다(US Biological). CDC 분석은 PBMC 기반 ADCC와 유사하였다. 표적 세포를 유포폼으로 채우고, ChMAb로 옅소닌화하였다. 그러나, 보체, 기니 돼지 혈청을 작동자 세포 대신 첨가하였다. 도 31은 분석의 플로우 차트를 보여준다. 항-CD20 ChMAb를 3배 규모 이상으로 적정하였다. % 세포 용해를 계산하였다. Daudi세포, (3×10^6)을 BADTA 시약으로 표지화하였다. 1×10^4 세포를 96 웰 플레이트의 웰로 분획하였다. 항체를 3배 희석을 사용하여 웰에 적정하였다. 옅소닌화 반응이 5% CO $_2$ 에서 37℃로 30-40분간 진행되도록 하였다. 기니 돼지 혈청을 20%의 최종농도로 첨가하였다. 반응이 5% CO $_2$ 에서 37℃로 3.5시간 동안 진행되도록 하였다. 이어서, 세포 배지의 10 μ l를 반응에 첨가하고, 세포를 스핀 다운하였다. 검출을 위하여 상청액의 20 μ l을 유포폼 용액의 200 μ l에 첨가하였고, 플레이트를 Victor2(Wallac)에서 판독하였다.
- [0734] **결과:** FcR 또는 C1q 중의 어느 하나를 활성화하기 위하여 개선된 결합을 보이는 모든 돌연변이체를 CDC 분석에 넣었다(도 32). Fc γ RIIIA로의 향상된 결합을 보였던 Fc 돌연변이체 또한 개선된 보체 활성을 보였다. 돌연변

이체의 각각은 야생형과 비교하여 향상된 보체 활성을 보인다. 테스트한 돌연변이체는 이중 돌연변이체이다. 각각의 경우 존재하는 돌연변이 중 하나는 P396L이다.

[0735] CDC에서의 증가가 C1q의 IgG1 Fc로의 증가된 결합과 상호 연관되었는 지를 결정하기 위하여, 두 단백질간의 결합을 표면 플라즈몬 공명을 사용, 실시간으로 측정하였다. C1q 및 IgG1 Fc 간의 결합을 검사하기 위하여, Fc 변이체를 항-CD32B ch-mAb, 2B6로 클로닝하였다. 이것은 본 출원인이 가용성 CD32B 단백질을 통하여 유리 슬라이드로 야생형(wt) 및 돌연변이 항체를 포획하는 것을 가능하게 하였다(도 34A). CDC에서 테스트한 네 돌연변이체 중 세 개를 또한 Biacore에서 검사하였다. 세 개 모두는 야생형 Fc와 비교하여 매우 향상된 K_{off} 를 보여줬다. 2B6으로의 C1q 결합을 위한 Biacore 포맷은 P396L 돌연변이를 갖는 돌연변이체의 향상된 결합을 증명한다(도 35). 돌연변이 D270E는 상이한 정도로 C1q 결합을 감소시킬 수 있다. Fc γ R 및 C1q 결합의 동력학적 분석의 정리를 하기 표 26에서 나타내었다.

표 25

돌연변이체 2B6에 결합하는 Fc γ R 및 C1q의 동력학적 분석

2B6 돌연변이체	3aV158	3aF158	2bfcagl	2aR131Fcagl	2aH131Fcagl	C1q
WT	0.192	0.434	0.056	0.070	0.053	0.124
MgFc38 (K392T,P396L)	0.114	0.243	0.024	0.028	0.024	0.096
MgFc51 (Q419H,P396L)	0.142	0.310	0.030	0.036	0.028	0.074
MgFc55 (R255L,P396L)	0.146	0.330	0.030	0.034	0.028	0.080
MgFc59 (K370E,P396L)	0.149	0.338	0.028	0.033	0.028	0.078
MgFc31/60	0.084	0.238	0.094	0.127	0.034	0.210
MgFc51/60	0.112	0.293	0.077	0.089	0.028	0.079
MgFc55/60	0.113	0.288	0.078	0.099	0.025	0.108
MgFc59/60	0.105	0.296	0.078	0.095	0.024	0.107

[0736]

[0737] 6.13 Fc γ RIIB로의 감소된 결합을 갖는 Fc 변이체 설계

[0738] Fc γ RIIB로의 결합을 감소시키고, Fc γ RIIA 131H로의 결합을 증가시키는 Fc 돌연변이체를 위한 선택을 기초로, D270E를 포함하는 많은 수의 돌연변이를 확인하였다. 각 돌연변이를 낮은 친화력 Fc 수용체로의 결합 및 이들의 대립형질 변이체에 대하여 개별적으로 테스트하였다.

[0739] D270E는 특이적으로 Fc γ RIIB 결합을 감소시킬 수 있다는 것을 암시하는 결합 특성을 가졌다. 모든 FcR로의 개선된 결합을 기초로, 이전에 식별된 돌연변이와 조합하여 D270E를 테스트하였다.

[0740] **결과:** 표 26 및 27 및 도 36 및 도 37에서 나타낸 바와 같이, D270E 돌연변이의 첨가는 Fc γ RIIA 및 Fc γ RIIA H131 결합을 향상시키고, Fc γ RIIB로의 결합을 감소시킨다. 도 38은 선택 돌연변이체를 위한 CD32A H131H 결합에 대하여 결정되는 때 K_{off} 와 대조한 MDM ADCC 데이터의 도면을 보여준다. γ

표 26

D270E 돌연변이의 첨가는 FcγRIIIA 및 FcγRIIA H131 결합을 향상시키고, FcγRIIB 결합을 감소시킨다.

4D5돌연변이체	3aV158	3aF158	2bfcagl	2aR131Fcagl	2aH131Fcagl
Wt 순수	0.175	0.408	0.078	0.067	0.046
MgFc55	0.148	0.381	0.036	0.033	0.029
MgFc55/60	0.120	0.320	0.092	0.087	0.013
MgFc55/60+R292G	0.116	0.405	0.124	0.112	0.037
MgFc55/60+Y300L	0.106	0.304	0.092	0.087	0.015
MgFc52	0.140	0.359	0.038	0.040	0.026
MgFc52/60	0.122	0.315	0.094	0.087	0.013
MgFc59	0.145	0.378	0.039	0.047	0.033
MgFc59/60	0.117	0.273	0.088	0.082	0.012
MgFc31	0.125	0.305	0.040	0.043	0.030
MgFc31/60	0.085	0.215	0.139	0.132	0.020
MgFc51	0.135	0.442	0.060	0.047	0.062
MgFc51/60	0.098	0.264	0.118	0.106	0.023
MgFc38	0.108	0.292	0.034	0.025	0.032
MgFc38/60	0.089	0.232	0.101	0.093	0.021

표 27

4D5 돌연변이체의 동력학적 특성

4D5돌연변이체	3aV158	3aF158	2bfcagl	2aR131Fcagl	2aH131Fcagl
MgFc70	0.101	0.250	0.030	0.025	0.025
MgFc71	0.074	0.212	0.102	0.094	0.020
MgFc73	0.132	0.306	0.190	-----	0.024
MgFc74	0.063	0.370	n.b.	0.311	0.166
WT023 안정	0.150	0.419	0.071	0.068	0.043

본 명세서에서 기재되고 청구된 본 발명은 본 명세서에서 개시된 특정 구체예에 의하여 범위가 제한되지 않는데, 이들 구체예는 본 발명의 몇몇 측면에 대한 예시로 의도되었기 때문이다. 균등한 어떠한 구체예도 본 발명의 범위 내에서 의도될 수 있다. 실제로, 본 명세서에서 나타내고 설명된 것들 이외에 본 발명의 다양한 변형이 전술한 기재로부터 당업자에게 파악될 것이다. 이런 변형 역시 첨부된 청구항의 범위 내에 있다.

본 출원서 전체에서 다양한 문헌이 인용된다. 이들의 내용 전체는 모든 목적을 위하여 본 출원에 참조로 포함된다.

도면의 간단한 설명

도1. 재조합 가용성 FcγR의 SDS-PAGE

재조합 가용성 FcγR 단백질의 순도는 10% 폴리아크릴아미드 겔 전기영동에 의하여 평가되었다. 겔을 쿠마시 블루로 염색하였다. 레인 1: 정제된 재조합 가용성 FcγRIIIA; 레인 2: 분자량 마커; 레인 3: 분자량 마커; 레인 4: 정제된 재조합 가용성 FcγRIIB. 줄은 위에서 아래까지 마커의 분자량을 가리키고, 그것들은 98, 50, 36 및 22 KDa의 분자량과 각각 일치한다.

- [0103] **도 2. 재조합 가용성 Fc γ R의 ELISA 분석**
- [0104] 응집되고 모노머인 IgG에 대한 정제된 재조합 가용성 Fc γ RIIIA의 직접 결합은 ELISA 분석을 사용하여 결정되었다. 3G8와 응집된 IgG(▲)의 결합; 비오틴화된 IgG(◆); 응집된 IgG(■); 마우스 IgG1과 응집된 IgG(X).
- [0105] **도 3 A 및 B. ELISA 분석을 사용한 Fc γ RIIIA 테트라머 복합체의 특성화**
- [0106] A. 가용성 테트라머 Fc γ RIIIA 복합체는 가용성 모노머 사람 IgG에 특이적으로 결합한다. 사람 IgG에 대한 가용성 테트라머 Fc γ RIIIA의 결합은 3G8(), 마우스 항-Fc γ RIIIA 모노클로날 항체에 의하여 차단되고; D265A 돌연변이를 포함하는 4-4-20 모노클로날 항체는 가용성 테트라머 Fc γ RIIIA가 응집된 사람 IgG(△)에 결합하는 것을 차단할 수 없었다.
- [0107] B. 가용성 테트라머 Fc γ RIIIA 복합체가 가용성 모노머 사람 IgG(■)에 결합하는 것은 모노머 가용성 Fc γ RIIIA가 가용성 모노머 사람 IgG(◆)에 결합하는 것과 비교된다.
- [0108] **도 4 A 및 B. 자기 비드 분석을 사용한 Fc γ RIIIA 테트라머 복합체의 특성화**
- [0109] A. Fc γ RIIIA 복합체: 두 Fc γ RIIIA(채워진 형태)는 모노클로날 항체 DJ139c(첫 번째 Ab)에 결합되고; 항-마우스 F(ab)₂는 PE(원)에 콘쥬게이션된다.
- [0110] B. Fc 코팅된 비드에 결합된 Fc γ RIIIA의 FACS 분석: (a) 비드 단독; (b) Fc γ RIIIA가 없는 복합체; (c) Fc γ RIIIA가 있는 복합체; (d) Fc γ RIIIA와 LNK16과의 복합체.
- [0111] **도 5. Fc 함유 구성체의 도식적 제시**
- [0112] pYD1에 클로닝된 IgG1 Fc 도메인의 도식적 도형이 제시된다. 열린 박스는 힌지-CH2-CH3 도메인을 나타내고; 평행 수직선은 CH1 도메인을 나타낸다. GIF206 및 227 구성체의 경우에, N-말단 아미노산이 나타난다. 밑줄친 잔기는 힌지 영역과 일치하고; *는 Xpress 에피토프 태그를 나타내며; 해칭된 박스는 Gly4-Ser 결합기를 나타내고; 줄무늬 박스는 Aga2p 유전자를 나타낸다.
- [0113] **도 6A-H. 효모 세포벽 상의 Fc 융합 단백질의 FACS 분석**
- [0114] 세포를 PE-콘쥬게이션된 폴리클로날 염소 항-사람 Fc 항체(도 6A-D) 또는 HP6017(Sigma), 마우스 항-사람 IgG1 Fc(CH3) 특이적 모노클로날 항체(도 6E-H)와 인큐베이션하였다. A 및 E는 백터 단독을 나타내고; 패널 B 및 F는 CH1-CH3 구성체를 나타내며; 패널 C 및 G는 GIF227을 나타내고; 패널 D 및 H는 GIF 206 구성체를 나타낸다.
- [0115] **도 7A-C. 표면 발현된 Fc 융합 단백질에 대한 가용성 테트라머 Fc γ RIIIA의 결합**
- [0116] pYD 1-CH1 (A); pYD-CH1-D265 A (B); 및 pYD 백터 (C)를 함유한 세포를 세포 표면 상에 Aga2p 융합 단백질을 발현하는 조건 하에서 성장시켰다. 세포를 0.15 mM, 7.5 mM, 및 7.5 mM의 Fc γ RIIIA와 각각 인큐베이션하고, FACS로 분석하였다.
- [0117] **도 8. 표면 발현된 Fc 융합 단백질에 대한 가용성 테트라머 Fc γ RIIIA의 특성화**
- [0118] 효모 세포 표면상의 Fc 융합 단백질에 대한 Fc γ RIIIA 테트라머 복합체의 결합을 분석하였다. PE-콘쥬게이션된 Fc γ RIIIA 테트라머 복합체를 다른 농도의 3G8(◆), LNK(▲) 또는 관련없는 이소타입 대조군(■)과 사전-인큐베이션하고, 그 후 효모 세포와 인큐베이션하였다. 세포를 PE 형광에 대하여 FACS로 분석하였다. Fc γ RIIIA 테트라머 복합체에 결합한 세포 백분율을 y 축에 플롯팅하였다.
- [0119] **도 9. Fc γ RIIIA와의 증가된 결합력을 가진 Fc 돌연변이체를 선택하기 위한 분류 게이트의 예**
- [0120] 세포를 PE-콘쥬게이션된 Fc γ RIIIA 테트라머 복합체(y 축) 및 항-Fc-FITC 콘쥬게이션된 항체(x 축)로 염색하였다. 박스를 친 영역은 세포 집단의 ~1.0%를 선택하기 위하여 설정된 분류 게이트를 나타낸다.
- [0121] **도 10A-N. Fc γ RIIIA 테트라머 복합체에 대한 증가된 친화력을 가진 것으로 확인된 Fc 돌연변이체의 일부의 FACS 분석**
- [0122] 독립적 Fc 돌연변이를 함유한 pYD-CH1을 가진 개별 클론을 글루코스를 함유한 선택적 배지에서 증폭하고, 갈락토스를 함유한 선택적 배지에서 Fc 발현에 대하여 유도하였으며, 그 후 FACS로 분석하였다. 도 10A 및 B는 야생형 Fc를 포함한 세포를 나타내고, 도 10C 및 D는 돌연변이체 #5를 나타내며; 도 10E 및 F는 돌연변이체 #20을 나타내고; 도 10G 및 H는 돌연변이체 #21을 나타내며; 도 10 I 및 J는 돌연변이체 #24를 나타내고; 도 10K 및 L

은 돌연변이체 #25를 나타낸다. 10M 및 N은 돌연변이체 #27을 나타낸다. 세포를 Fc γ RIIIA 테트라머 복합체(도 10A, C, E, G, I, K 및 M) 또는 Fc γ RIIB 테트라머 복합체(도 10B, D, F, H, J, L 및 N)로 염색하였다.

[0123] 도 11A-B. ELISA에 의한 4-4-20 모노클로날 항체에서의 Fc 돌연변이체의 특성화

[0124] pYD-CH1 플라스미드로부터의 Fc 도메인을 키메라 4-4-20 모노클로날 항체의 중쇄에 클로닝하였다. 4-4-20 모노클로날 항체를 293 세포에서 발현시키고, 상청액을 수집하였다. ELISA 플레이트를 플루오레세인 콘쥬게이션된 BSA로 코팅하여 키메라 4-4-20 돌연변이체 항체를 포획하였다. 그 후, Fc 도메인에 대한 변이체 수용체의 상대적 친화력을 결정하기 위하여 4-4-20 모노클로날 항체가 흡수된 ELISA 플레이트에 Fc γ RIIIA(A) 및 Fc γ RIIB(B) 수용체를 코팅하였다. 돌연변이체 #15 및 #29는 대조군으로 포함된 비결합 분리물이었다.

[0125] 도 12. 4-4-20 모노클로날 항체에서 돌연변이체의 ADCC 활성

[0126] 돌연변이체 Fc 영역을 함유한 4-4-20 항체를 이들의 ADCC 활성에 대하여 평가하고, 야생형 4-4-20 항체의 ADCC 활성과 비교하였다. 분석된 돌연변이체는 하기와 같다: MGFc-10 (K288N, A330S, P396L), MGFc-26 (D265A), MGFc-27 (G316D, A378V, D399E), MGFc-28 (N315L A379M, D399E), MGFc-29 (F243I, V379L, G420V), MGFc-30 (F275V), MGFc-31 (P247L, N421K), MGFc-32 (D280E, S354F, A431D, L441I), MGFc-33 (K317N, F423 결실됨), MGFc-34 (F241L, E258G), MGFc-35 (R255Q, K326E), MGFc-36 (K218R, G281D, G385R).

[0127] 도 13A 및 B. HER2/neu 사람화 모노클로날 항체의 ADCC 활성

[0128] A. 돌연변이체 Fc 영역을 함유한 사람화 HER2/neu 모노클로날 항체를 이들의 ADCC에 대하여 평가하고, 야생형 Her2/neu 항체의 ADCC 활성과 비교하였다. 분석된 돌연변이체는 하기와 같다: MGFc-5 (V379M), MGFc-9 (F243I, V379L), MGFc-10 (K288N, A330S, P396L), MGFc-13 (K334E, T359N, T366S), MGFc-27 (G316D, A378V, D399E).

[0129] B. 사람화 Her2/neu 모노클로날 항체 MGFc-37 (K248M), MGFc-39 (E293V Q295E, A327T), MGFc-38 (K392T, P396L), MGFc-41 (H268N, P396L), MGFc-23 (K334E, R292L), MGFc-44, MGFc-45의 문맥에서 추가 돌연변이체의 ADCC 활성

[0130] 도 14. BSA-FITC 표면상의 CH 4-4-20의 포획

[0131] 약 20 μ g/ml의 농도의 항체 6 μ L를 BSA-플루오로세인 이소티오시아네이트(FITC) 표면에 5 μ L/분으로 주사하였다. BSA-FITC 고정된 센서칩의 표면에 돌연변이체 Fc 영역과 ch 4-4-20 항체의 결합의 BIAcore 센소그램을 나타낸다. 마커를 야생형 포획된 항체 반응에 설정하였다.

[0132] 도 15. 변이체 Fc 영역을 운반하는 CH 4-4-20 항체에 대한 Fc γ RIIIA의 실시간 결합의 센서그램

[0133] 변이체 Fc 영역을 운반하는 ch-4-420 항체에 대한 Fc γ RIIIA의 결합을 200 nM 농도에서 분석하였다. 반응을 야생형에 대하여 얻은 ch-4-4-20 항체의 수준으로 표준화하였다.

[0134] 사용된 돌연변이체는 하기와 같다: Mut 6 (S219V), Mut 10 (P396L, A330S, K288N); Mut 18 (K326E); Mut 14 (K334E, K288N); Mut 11 (R255L, F243L); Mut 16 (F372Y); Mut 19 (K334N, K246I).

[0135] 도 16 A-H. 변이체 Fc 영역을 운반하는 항체에 결합하는 Fc γ RIIIA의 동력학적 매개변수의 분석

[0136] 변이체 Fc 영역을 운반하는 항체에 결합하는 Fc γ RIIIA에 대한 운동 매개변수는 200 nM 및 800 nM에 대한 별개의 최적의 곡선을 만들어서 얻어졌다. 굵은 선은 32-34 초 간격에서 해리 곡선에 대하여 계산된 k_{off} 값에 기초하여 얻어진 결합 적합성을 나타낸다. K_d 및 K_{off} 값은 두 농도로부터의 평균을 나타낸다.

[0137] 도 17. 변이체 Fc 영역을 운반하는 항체에 대한 Fc γ RIIB-Fc 융합 단백질의 실시간 결합의 센서그램.

[0138] 변이체 Fc 영역을 운반하는 ch-4-4-20 항체에 대한 Fc γ RIIB-Fc 융합 단백질의 결합을 200 nM 농도에서 분석하였다. 야생형에 대하여 얻어진 ch-4-4-20 항체의 수준에서 반응을 표준화하였다.

[0139] 도 18 A-C. 변이체 Fc 영역을 운반하는 항체에 대한 Fc γ RIIB-Fc 융합 단백질의 동력학적 매개변수의 분석

[0140] 변이체 Fc 영역을 운반하는 항체에 결합하는 Fc γ RIIB-Fc에 대한 동력학적 매개변수는 200 nM 및 800 nM에 대한 별개의 최적의 곡선을 만들어서 얻어졌다. 굵은 선은 32-34 초 간격에서 해리 곡선에 대하여 계산된 k_{off} 값에 기초하여 얻어진 결합 적합성을 나타낸다. K_d 및 K_{off} 값은 두 농도로부터의 평균을 나타낸다.

[0141] 사용된 돌연변이체는 하기와 같다: Mut 6 (S219V), Mut 10 (P396L, A330S, K288N); Mut 18 (K326E); Mut 14

(K334E, K288N); Mut 11 (R255L, F243L); Mut 16 (F372Y); Mut 19 (K334N, K246I).

도 19. ADCC 데이터에 대하여 플롯팅된 Fc γ RIIIa에 대한 K_{off}(WT)/K_{off}(Mut)의 비율

1 보다 큰 수는 야생형에 비해서 Fc γ RIIIa 결합에 대한 감소된 해리율과 Fc γ RIIB-Fc 결합에 대한 증가된 해리율을 나타낸다. 박스에 있는 돌연변이체는 Fc γ RIIIa 결합에 대하여 더 낮은 비율을 가지고, Fc γ RIIB-Fc 결합에 대하여 더 높은 비율을 가진다.

도 20. 표지되지 않은 Fc γ RIIIa와의 경쟁

동력학적 스크린을 실시하여 Fc γ RIIIa와의 결합에 대한 개선된 K_{off} 비율을 가진 Fc 영역 돌연변이체를 확인하였다. P396L 돌연변이를 함유한 Fc 영역 변이체의 라이브러리를 1 시간 동안 0.1 μ M 비오틴화된 Fc γ RIIIa-링커-Avitag와 인큐베이션한 후 세척하였다. 이어서, 0.8 μ M 표지되지 않은 Fc γ RIIIa를 다른 시점에서 표지된 효모와 인큐베이션하였다. 효모를 스핀다운시키고 표지되지 않은 Fc γ RIIIa를 제거하였다. 수용체 결합된 효모를 FACS 분석을 위하여 SA(스트렙타비딘): PE(피코에리트린)으로 염색하였다.

도 21 A-C. 동력학적 스크린에 기초한 FACS 분석

도 20에 제시된 데이터로부터 계산된 K_{off}에 기초하여, 1분 시점 선택을 선택하였다. 10 배 이상의 라이브러리를 0.1 μ M 비오틴화된 Fc γ RIIIa-링커-Avitag 모노머와 인큐베이션하였고; 세포를 세척하고 1분 동안 표지되지 않은 리간드와 인큐베이션하였으며; 그 후, 세척하고 SA:PE로 표지하였다. 그 후, 세포를 상부 0.3% 바인더를 선택하면서 FACS로 분류하였다. 선택되지 않은 P396L 라이브러리를 FACS에 의하여 개선된 결합에 대하여 선택된 효모 세포와 비교하였다. 히스토그램은 Fc γ RIIIa/PE와 염소 항-사람 Fc/FITC로 모두 염색된 세포의 백분율을 나타낸다.

도 22A-B. Fc γ RIIB Fc 바인더의 교체상 결핍에 기초한 선택

A. 자기 비드를 사용하여 Fc γ RIIB 결핍 및 Fc γ RIIIa 선택에 기초하여 P396L 라이브러리를 스크리닝하였다. 자기 비드에 의한 Fc γ RIIB의 결핍을 5회 반복하였다. 생성된 효모 집단을 분석하였는데, 염소 항-사람 Fc로 염색한 50% 세포보다 더 크게 보이는 것으로 확인되었고, 매우 작은 퍼센트의 세포가 Fc γ RIIIa로 염색되었다. 그 후, 세포를 0.1 μ M 비오틴화된 Fc γ RIIIa 링커-Avitag를 사용한 FACS에 의하여 2회 선택하였다. 효모 세포를 각 분류 후 Fc γ RIIIa 및 Fc γ RIIB 결합에 대하여 분석하였고, 야생형 결합과 비교하였다.

B. Fc 돌연변이체를 리간드인 비오틴화된 Fc γ RIIIa 158F 링커 avitag 모노머를 사용하여 Fc γ RIIB 결핍된 효모 집단으로부터 선택하였다. 분류 게이트를 상위 0.25% Fc γ RIIIa 158F 바인더를 선택하도록 설정하였다. 생성된 농축된 집단을 다른 Fc γ RIIIa(158F 및 158V), Fc γ RIIB 및 Fc γ RIIA(131R)에 대한 결합에 대하여 FACS로 분석하였다.

도 23. Fc 돌연변이체를 포함한 키메라 4D5에 의하여 매개된 SKBR3 표적 세포 용해의 상대 속도

용해의 상대 속도를 시험된 각 Fc 돌연변이체에 대하여 계산하였다. Fc 돌연변이체를 가진 4D5 항체에 대한 용해 속도를 야생형 4D5 항체에 의하여 매개된 용해의 속도로 나누었다. 2개 이상의 독립적 분석으로부터 데이터의 평균을 내고, 히스토그램 상에 플롯팅하였다. 각 Fc 돌연변이체의 경우, 두 다른 항체 농도로부터 얻은 데이터를 나타낸다. 항체 농도는 용해가 ~50%인 곡선을 따르는 점 양쪽에 인접하도록 선택되었다.

도 24. Fc 돌연변이체를 포함한 키메라 2H7에 의하여 매개된 DAUDI 세포 용해의 상대 속도

용해의 상대 속도를 시험된 각 Fc 돌연변이체에 대하여 계산하였다. Fc 돌연변이체를 가진 2H7 항체에 대한 용해 속도를 야생형 2H7 항체에 의하여 매개된 용해의 속도로 나누었다. 1-2개 이상의 독립적 분석으로부터 데이터의 평균을 내고, 히스토그램 상에 플롯팅하였다. 각 Fc 돌연변이체의 경우, 두 다른 항체 농도로부터 얻은 데이터를 나타낸다. 항체 농도는 용해가 ~50%인 곡선을 따르는 점에 기초하여 선택하였다.

도 25. 라이브러리 생성을 위한 개요

DNA 가닥을 나타낸다. 순방향 화살표는 돌연변이체 코돈을 함유한 프라이머를 나타낸다. 역방향 화살표는 반대쪽 유전자 특이적 올리고를 나타낸다.

도 26. 유전자 프로토콜을 구축함으로써 라이브러리의 생성을 위한 전략

직사각형 박스는 힌지, CH2 및 CH3 도메인을 각각 나타낸다. 작은 검은 선은 5' 돌출부를 가진 이중 가닥 올리고

고를 나타낸다.

- [0159] 도 27. 신규 Fc 돌연변이체는 SKBR3 세포에서 PBMC 매개된 ADCC를 개선한다.
- [0160] 플롯은 표준 ADCC 측정의 선형 회귀분석을 나타낸다. 항체를 75:1의 표적 비율에 대하여 효과기를 사용하여 3 로그에 걸쳐 적정하였다. 용해 % = (실험 분비 - SR)/(MR-SR)*100.
- [0161] 도 28. 신규 Fc 돌연변이체는 Daudi 세포에서 PBMC 매개된 ADCC를 개선한다.
- [0162] 플롯은 표준 ADCC 측정의 선형 회귀분석을 나타낸다. 항체를 75:1의 표적 비율에 대하여 효과기를 사용하여 3 로그에 걸쳐 적정하였다. 용해 % = (실험 분비 - SR)/(MR-SR)*100.
- [0163] 도 29. 단핵구의 사이토카인 처리시 FACS를 통한 Fc 수용체 프로파일
- [0164] 단핵구의 사이토카인 처리는 Fc 수용체 발현의 낮은 친화력을 증가시킨다. 현탁분리된 단핵구를 무혈청 배지에 서 특정 사이토카인을 사용하여 배양하였다. Fc 수용체 프로파일을 FACS를 사용하여 분석하였다.
- [0165] 도 30. 대식세포-유래된 단핵구 기초 ADCC에서 FC 돌연변이체를 사용한 개선된 종양 세포 살해.
- [0166] 2 로그에 걸쳐 Ch4D5 MAb 농도 35:1의 표적 비율로 효과기를 사용하여 시험하였다. 용해 %는 도 28에서와 같이 계산하였다.
- [0167] 도 31. 보체 의존성 세포독성 분석 흐름 차트
- [0168] 흐름 차트는 사용된 CDC 분석을 요약한다.
- [0169] 도 32. 보체 의존성 세포독성 활성
- [0170] Fc γ RIIIA에 대한 향상된 결합을 나타내는 Fc 돌연변이체는 또한 개선된 보체 활성을 나타내었다. 항-CD20 ChMAb를 3배 이상으로 적정하였다. 용해 %는 도 28에서와 같이 계산하였다.
- [0171] 도 33. Fc 돌연변이체의 선택을 위한 결정 트리
- [0172] Fc 돌연변이체를 선택하기 위한 예시적 프로토콜
- [0173] 도 34. 2B6 항체에 대한 C1q 결합
- [0174] A. 도형은 보체 캐스케이드의 첫 번째 성분에 대한 2B6 결합의 분석을 위한 BIAcore 포맷을 도시한다.
- [0175] B. C1q에 대한 변이체 Fc 영역을 운반하는 2B6 항체의 실시간 결합의 센서그램.
- [0176] 도 35 A-D. 2B6 돌연변이체 항체에 대한 C1q 결합
- [0177] C1q에 대한 2B6 돌연변이체의 실시간 결합의 센서그램(3.25 nM). 돌연변이체는 MgFc51 (Q419H, P396L); MgFc51/60 패널 A; MgFc55 및 MgFc55/60 (패널 B), MgFc59 및 MgFc59/60 (패널 C); 및 MgFc31/60 (패널 D)에 도시된다.
- [0178] 도 36 A-D. Fc γ RIIB에 감소된 결합을 가진 Fc 돌연변이체
- [0179] R255L, P396L 이중 돌연변이체(MgFc55)에 대한 D270E(60)의 효과를 비교하기 위한 ch4D5 항체에 대한 FcR의 결합. K_D는 FcR의 다른 농도; 400nM CD16A 158V; 800 nM CD16A 158F; 200 nM CD32B; 200 nM CD32A 131H에서 분석하였다. Biacore 3000 소프트웨어를 사용하여 별개의 K_D를 사용하여 분석을 수행하였다.
- [0180] 도 37 A-D. Fc γ RIIB 결핍/Fc γ RIIAH131 선택으로부터 선택된 4D5 돌연변이체의 동력학적 특징.
- [0181] CD32B 결핍 및 CD32A H131 스크리닝 전략에 의하여 선택된 다른 Fc 돌연변이를 운반하는 ch4D5 항체에 대한 FcR의 결합. K_D는 FcR의 다른 농도; 400 nM CD16A 158V; 800 nM CD16A 158F; 200 nM CD32B; 200 nM CD32A 131H에서 분석하였다. Biacore 3000 소프트웨어를 사용하여 별개의 K_D를 사용하여 분석을 수행하였다.
- [0182] 도 38. BIAcore에 의하여 결정된 CD32A 131H 결합에 대하여 결정된 K에 대한 MDM 데이터의 플롯.
- [0183] 돌연변이체는 하기와 같다: MgFc 25 (E333A, K334A, S298A); MgFc68 (D270E); MgFc38 (K392T, P396L); MgFc55 (R255L, P396L); MgFc31 (P247L, N421K); MgFc59(K370E, P396L).

[0184] **발명의 상세한 설명**

[0185] 본 발명은 하나 이상의 영역에 Fc γ R에 대한 변이체 Fc 영역의 친화력을 변경, 예를 들면 증가 또는 감소시키는 하나 이상의 아미노산 변형(예를 들면, 치환, 그러나 또한 삽입 또는 결실을 포함)을 가진, 변이체 Fc 영역을 포함한 분자, 바람직하게는 폴리펩티드, 및 더 바람직하게는 면역글로불린(예를 들면, 항체)에 관한 것이다. 일부 구체예에서, 본 발명은 야생형 Fc 영역에 비해서 하나 이상의 아미노산 변형을 포함한 변이체 Fc 영역을 포함한 분자를 제공하는데, 이 변이체 Fc 영역은 즉, 변이체 Fc 영역을 가진 상기 분자와 동일하지만, 하나 이상의 아미노산 변형을 가지지 않고, Fc-Fc γ R 상호작용을 결정하기 위하여 당업자에 공지된 방법 및 본원에 개시된 방법, 예를 들면 ELISA 분석 또는 표면 플라즈몬 공명 분석에 의하여 결정된 야생형 Fc 영역을 포함한 대비되는 분자에 비해서 더 큰 친화력으로 Fc γ RIIA와 결합한다. 또 다른 구체예에서, 본 발명은 야생형 Fc 영역에 비해서 하나 이상의 아미노산 변형을 포함하고, 야생형 Fc 영역을 포함한 대비되는 분자에 비해서 감소된 친화력으로 Fc γ RIIA와 결합하는 변이체 Fc 영역을 포함한 분자를 포함한다. 바람직한 구체예에서, 본 발명의 분자는 야생형 Fc 영역을 포함한 대비되는 분자가 Fc γ RIIB에 결합하는 것보다 더 낮은 친화력으로 Fc γ RIIB(Fc 영역을 통하여)에 더 특이적으로 결합한다. 일부 구체예에서, 본 발명은 야생형 Fc 영역에 비해서 하나 이상의 아미노산 변형을 가지고, 야생형 Fc 영역을 포함한 대비되는 분자에 비해서 더 큰 친화력으로 Fc γ RIIA 및 Fc γ RIIB와 결합하는 변이체 Fc 영역을 포함한 분자를 포함한다. 다른 구체예에서, 본 발명은 야생형 Fc 영역에 비해서 하나 이상의 아미노산 변형을 포함하고, 야생형 Fc 영역을 포함한 대비되는 분자에 비해서 더 큰 친화력으로 Fc γ RIIB에 결합하는 변이체 Fc 영역을 포함한 분자를 포함한다. 다른 구체예에서, 본 발명은 야생형 Fc 영역에 비해서 하나 이상의 아미노산 변형을 포함하고, 야생형 Fc 영역을 포함한 대비되는 분자에 비해서 감소된 친화력으로 Fc γ RIIB에 결합하는 변이체 Fc 영역을 포함한 분자를 포함한다.

[0186] 일부 구체예에서, 본 발명은 야생형 Fc 영역에 비해서 하나 이상의 아미노산 변형을 포함하고, 야생형 Fc 영역을 포함한 대비되는 분자에 비해서 임의의 Fc γ R에 대하여 검출가능한 결합을 나타내지 않는(예를 들면, ELISA 분석으로 결정할 때 Fc γ RIIA, Fc γ RIIB, 또는 Fc γ RIIA와 결합하지 않는) 변이체 Fc 영역을 포함한 분자를 포함한다.

[0187] 특정 구체예에서, 본 발명은 야생형 Fc 영역에 비해서 하나 이상의 아미노산 변형을 포함하고, Fc γ RIIA인 하나의 Fc γ R에만 결합하는 변이체 Fc 영역을 포함한 분자를 포함한다. 다른 특정 구체예에서, 본 발명은 야생형 Fc 영역에 비해서 하나 이상의 아미노산 변형을 포함하고, Fc γ RIIA인 하나의 Fc γ R에만 결합하는 변이체 Fc 영역을 포함한 분자를 포함한다. 또 다른 특정 구체예에서, 본 발명은 야생형 Fc 영역에 비해서 하나 이상의 아미노산 변형을 포함하고, Fc γ RIIB인 하나의 Fc γ R에만 결합하는 변이체 Fc 영역을 포함한 분자를 포함한다. 본 발명은 특히 예를 들면 치료 항체의 작동자 기능을 증대, 예를 들면 ADCC를 증대시킴으로써 치료 항체의 효능을 증대하기 위한 사람 또는 사람화 치료 항체(예를 들면, 종양 특이적 항-혈관신생 또는 항-염증 모노클로날 항체)의 변형에 관한 것이다.

[0188] Fc γ R을 위한 본 발명의 분자의 친화력 및 결합 특성은 처음에, 한정하는 것은 아니지만, ELISA 분석, 표면 플라즈몬 공명 분석, 면역침전 분석(섹션 5.2.1 참조)을 포함한, Fc-Fc γ R 상호작용, 즉 Fc γ R에 대한 Fc 영역의 특이적 결합을 결정하기 위하여 당업계에 공지된 시험관내 분석(생화학적 또는 면역학적 기초 분석)을 사용하여 결정된다. 바람직하게는, 본 발명의 분자의 결합 특성은 또한 하나 이상의 Fc γ R 매개자 작동자세포 기능을 결정하기 위한 시험관내 기능 분석에 의하여 특성화된다(섹션 5.2.6 참조). 가장 바람직한 구체예에서, 본 발명의 분자는 시험관내 기초 분석에서의 것들과 같이 생체내 모델(예를 들면, 본원에 설명되고 개시된 것들)에서 유사한 결합 특성을 가진다. 그러나, 본 발명은 시험관내 기초 분석에서 원하는 표현형을 나타내지 않지만 생체내에서 원하는 표현형을 나타내는 본 발명의 분자를 배제하지 않는다.

[0189] 일부 구체예에서, 변이체 Fc 영역을 포함한 본 발명의 분자는 아미노산 342-447로부터 연장된 것으로 한정된 Fc 영역의 CH3 도메인에 하나 이상의 아미노산 변형을 포함한다. 다른 구체예에서, 변이체 Fc 영역을 포함한 본 발명의 분자는 아미노산 231-341로부터 연장된 것으로 한정된 Fc 영역의 CH2 도메인에 하나 이상의 아미노산 변형을 포함한다. 일부 구체예에서, 본 발명의 분자는 두 개 이상의 아미노산 변형을 포함하는데, 한 변형은 CH3 영역에 있고, 한 변형은 CH2 영역에 있다. 본 발명은 힌지 영역에 아미노산 변형을 더 포함한다. CH2 및/또는 CH3 도메인에 하나 이상의 아미노산 변형을 가진 본 발명의 분자는 본원에 설명되거나 당업자에게 공지된 방법을 사용하여 결정된 바와 같이 Fc γ R에 대한 친화력을 변경시켰다.

[0190] 특정 구체예에서, 본 발명은 Fc 영역의 CH1 도메인에 아미노산 변형을 포함한다.

[0191] 특히 바람직한 구체예에서, 본 발명은 당업자에게 공지되고 본원에 예시된 방법을 사용하여 측정된 바와 같이

FcγRIIA(CD32A)에 대하여 증가된 결합 및/또는 증가된 ADCC 활성을 가진 변이체 Fc 영역을 포함한 분자를 포함한다. 본원의 방법에 따라서 사용된 ADCC 분석은 NK 의존성 또는 대식세포 의존성일 수 있다.

[0192] 본 발명의 Fc 변이체는, 한정하는 것은 아니지만, 작동자 기능을 변경하는 변형 및 FcγR 결합 친화력을 변경하는 변형을 포함한 다른 공지된 Fc 변형과 조합될 수 있다. 특정 구체예에서, CH3 도메인, CH2 도메인 또는 힌지 영역에 첫 번째 아미노산 변형을 포함한 발명의 Fc 변이체는 첫 번째 Fc 변형이 두 번째 Fc 변형에 추가적, 상승작용적 또는 신규 특성을 부여하기 위해서 두 번째 Fc 변형이 첫 번째와 동일한 도메인에 없도록 두 번째 Fc 변형과 조합될 수 있다. 일부 구체예에서, 본 발명의 Fc 변이체는 CH2 도메인에 어떤 아미노산 변형도 가지지 않는다.

[0193] 본 발명의 Fc 변이체는 하기 표2에 개시된 것들과 같은 당업계에 공지된 Fc 변형 중 임의의 것과 조합될 수 있다.

표 2

지환(들)
V264A
V264L
V264I
F241W
F241L
F243W
F243L
F241L/F243L/V262I/V264I
F241W/F243W
F241W/F243W/V262A/V264A
F241L/V262I
F243L/V264I
F243L/V262I/V264W
F241Y/F243Y/V262T/V264T
F241E/F243R/V262E/V264R
F241E/F243Q/V262T/V264E
F241R/F243Q/V262T/V264R
F241E/F243Y/V262T/V264R
L328M
L328E
L328F
I332E
L328M/I332E

[0194]

P244H
 P245A
 P247V
 W313F
 P244H/P245A/P247V
 P247G
 V264I/I332E
 F241E/F243R/V262E/V264R/I332E
 F241E/F243Q/V262T/V264E/I332E
 F241R/F243Q/V262T/V264R/I332E
 F241E/F243Y/V262T/V264R/I332E
 S298A
 S298A/I332E
 S298A/E333A/K334A
 S239E/I332E
 S239Q/I332E
 S239E
 D265G
 D265N
 S239E/D265G
 S239E/D265N
 S239E/D265Q
 Y296E
 Y296Q
 S298T
 S298N
 T299I
 A327S
 A327N
 S267Q/A327S
 S267L/A327S
 A327L
 P329F
 A330L
 A330Y
 I332D
 N297S
 N297D
 N297S/I332E
 N297D/I332E
 N297E/I332E
 D265Y/N297D/I332E
 D265Y/N297D/T299L/I332E
 D265F/N297E/I332E
 L328I/I332E
 L328Q/I332E
 I332N
 I332Q
 V264T
 V264F
 V240I
 V263I
 V266I
 T299A
 T299S

[0195]

T299V
 N325Q
 N325L
 N325I
 S239D
 S239N
 S239F
 S239D/I332D
 S239D/I332E
 S239D/I332N
 S239D/I332Q
 S239E/I332D
 S239E/I332N
 S239E/I332Q
 S239N/I332D
 S239N/I332E
 S239N/I332N
 S239N/I332Q
 S239Q/I332D
 S239Q/I332N
 S239Q/I332Q
 K326E
 Y296D
 Y296N
 F241Y/F243Y/V262T/V264T/N297D/I332E
 A330Y/I332E
 V264I/A330Y/I332E
 A330L/I332E
 V264I/A330L/I332E
 L234D
 L234E
 L234N
 L234Q
 L234T
 L234H
 L234Y
 L234I
 L234V
 L234F
 L235D
 L235S
 L235N
 L235Q
 L235T
 L235H
 L235Y
 L235I
 L235V
 L235F
 S239T
 S239H
 S239Y
 V240A
 V240T
 V240M

[0196]

V263A
V263T
V263M
V264M
V264Y
V266A
V266T
V266M
E269H
E269Y
E269F
E269R
Y296S
Y296T
Y296L
Y296I
A298H
T299H
A330V
A330I
A330F
A330R
A330H
N325D
N325E
N325A
N325T
N325V
N325H
L328D/I332E
L328E/I332E
L328N/I332E
L328Q/I332E
L328V/I332E
L328T/I332E
L328H/I332E
L328I/I332E
L328A
I332T
I332H
I332Y
I332A
S239E/V264I/I332E
S239Q/V264I/I332E
S239E/V264I/A330Y/I332E
S239E/V264I/S298A/A330Y/I332E
S239D/N297D/I332E
S239E/N297D/I332E
S239D/D265V/N297D/I332E
S239D/D265I/N297D/I332E
S239D/D265L/N297D/I332E
S239D/D265F/N297D/I332E
S239D/D265Y/N297D/I332E
S239D/D265H/N297D/I332E
S239D/D265T/N297D/I332E

[0197]

V264I/N297D/I332E
 Y296D/N297D/I332E
 Y296E/N297D/I332E
 Y296N/N297D/I332E
 Y296Q/N297D/I332E
 Y296H/N297D/I332E
 Y296T/N297D/I332E
 N297D/T299V/I332E
 N297D/T299I/I332E
 N297D/T299L/I332E
 N297D/T299F/I332E
 N297D/T299H/I332E
 N297D/T299E/I332E
 N297D/A330Y/I332E
 N297D/S298A/A330Y/I332E
 S239D/A330Y/I332E
 S239N/A330Y/I332E
 S239D/A330L/I332E
 S239N/A330L/I332E
 V264I/S298A/I332E
 S239D/S298A/I332E
 S239N/S298A/I332E
 S239D/V264I/I332E
 S239D/V264I/S298A/I332E
 S239D/V264I/A330L/I332E
 T256A
 K290A
 D312A
 *K326A
 S298A
 E333A
 K334A
 E430A
 T359A
 K360A
 E430A
 K320M
 K326S
 K326N
 K326D
 K326E
 K334Q
 K334E
 K334M
 K334H
 K334V
 K334L
 A330K
 T335K
 A339T
 E333A, K334A
 T256A, S298A
 T256A, D280A, S298A, T307A
 S298A, E333A, K334A S298A, K334A
 S298A, E333A

[0198]

T256A
 K290A
 K326A
 R255A
 E258A
 S267A
 E272A
 N276A
 D280A
 E283A
 H285A
 N286A
 P331A
 S337A
 H268A
 E272A
 E430A
 A330K
 R301M
 H268N
 H268S
 E272Q
 N286Q
 N286S
 N286D
 K290S
 K320M
 K320Q
 K320E
 K320R
 K322E
 K326S
 K326D
 K326E
 A330K
 T335E
 S267A, E258A
 S267A, R255A
 S267A, D280A
 S267A, E272A
 S267A, E293A
 S267A, E258A, D280A, R255A
 P238A
 D265A
 E269A
 D270A
 N297A
 P329A
 A327Q
 S239A
 E294A
 Q295A
 V303A
 K246A
 I253A

[0199]

T260A
K274A
V282A
K288A
Q311A
K317A
E318A
K338A
K340A
Q342A
R344A
E345A
Q347A
R355A
E356A
M358A
K360A
N361A
Q362A
Y373A
S375A
D376A
E380A
E382A
S383A
N384A
Q386A
E388A
N389A
N390A
Y391A
K392A
L398A
S400A
D401A
D413A
K414A
S415A
R416A
Q418A
Q419A
N421A
V422A
S424A
E430A
H433A
N434A
H435A
Y436A
T437A
Q438A
K439A
S440A
S442A
S444A

[0200]

K447A
K246M
K248M
Y300F
A330Q
K338M
K340M
A378Q
Y391F

[0201]

[0202] 다른 구체예에서, 본 발명의 Fc 변이체는 하기 표 3A 및 B에 개시된 것들과 같은 당업계에 공지된 Fc 변형 중 임의의 것과 조합될 수 있다.

표 3A

출발 변이체	300번 위치	298번 위치	296번 위치	295번 위치	294번 위치
Y3001 + →	—	S298N, S298V, S298D, S298P, S298A, S298G, S298T, 또는 S298L.	Y296P, Y296F, 또는 N276Q.	Q295K, Q295L, 또는 Q295A.	E294N, E294A, E294Q, 또는 E294D.
Y300L + →	—	S298N, S298V, S298D, S298P, S298A, S298G, S298T, 또는 S298L.	Y296P, Y296F, 또는 N276Q.	Q295K, Q295L, 또는 Q295A.	E294N, E294A, E294Q, 또는 E294D.
S298N + →	Y3001, Y300L, 또는 Y300F.	—	Y296P, Y296F, 또는 N276Q.	Q295K, Q295L, 또는 Q295A.	E294N, E294A, E294Q, 또는 E294D.
S298V + →	Y3001, Y300L, 또는 Y300F.	—	Y296P, Y296F, 또는 N276Q.	Q295K, Q295L, 또는 Q295A.	E294N, E294A, E294Q, 또는 E294D.
S298D + →	Y3001, Y300L, 또는 Y300F.	—	Y296P, Y296F, 또는 N276Q.	Q295K, Q295L, 또는 Q295A.	E294N, E294A, E294Q, 또는 E294D.
S298P + →	Y3001, Y300L, 또는 Y300F.	—	Y296P, Y296F, 또는 N276Q.	Q295K, Q295L, 또는 Q295A.	E294N, E294A, E294Q, 또는 E294D.
Y296P + →	Y3001, Y300L, 또는 Y300F.	S298N, S298V, S298D, S298P, S298A, S298G, S298T, 또는 S298L.	—	Q295K, Q295L, 또는 Q295A.	E294N, E294A, E294Q, 또는 E294D.
Q295K + →	Y3001, Y300L, 또는 Y300F.	S298N, S298V, S298D, S298P, S298A, S298G,	Y296P, Y296F, 또는 N276Q.	—	E294N, E294A, E294Q, 또는 E294D.

[0203]

출발 변이체	300번 위치	298번 위치	296번 위치	295번 위치	294번 위치
		S298T, 또는 S298L.			
Q295L + →	Y3001, Y300L, 또는 Y300F.	S298N, S298V, S298D, S298P, S298A, S298G, S298T, 또는 S298L.	Y296P, Y296F, 또는 N276Q.	—	E294N, E294A, E294Q, 또는 E294D.
E294N + →	Y3001, Y300L, 또는 Y300F.	S298N, S298V, S298D, S298P, S298A, S298G, S298T, 또는 S298L.	Y296P, Y296F, 또는 N276Q.	Q295K, Q295L, 또는 Q295A.	—
** 표는 Kabat에서와 같은 EU 번호링을 사용함을 유의.					

[0204]

표 3B

출발 변이체	334번 위치	333번 위치	324번 위치	286번 위치	276번 위치
Y3001 + →	K334A, K334R, K334Q, K334N, K334S, K334E, K334D, K334M, K334Y, K334W, K334H, K334V, 또는 K334L.	E33A, E333Q, E333N, E333S, E333K, E333R, E333D, 또는 E333G.	S324A, S324N, S324Q, S324K, 또는 S324E.	N286Q, N286S, N286A, 또는 N286D.	N276Q, N276A, 또는 N276K.
Y300L + →	K334A, K334R, K334Q, K334N, K334S, K334E, K334D, K334M, K334Y, K334W, K334H, K334V, 또는 K334L.	E33A, E333Q, E333N, E333S, E333K, E333R, E333D, 또는 E333G.	S324A, S324N, S324Q, S324K, 또는 S324E.	N286Q, N286S, N286A, 또는 N286D.	N276Q, N276A, 또는 N276K.
S298N + →	K334A, K334R, K334Q, K334N, K334S, K334E, K334D, K334M, K334Y, K334W, K334H, K334V, 또는 K334L.	E33A, E333Q, E333N, E333S, E333K, E333R, E333D, 또는 E333G.	S324A, S324N, S324Q, S324K, 또는 S324E.	N286Q, N286S, N286A, 또는 N286D.	N276Q, N276A, 또는 N276K.
S298V + →	K334A, K334R, K334Q, K334N, K334S, K334E, K334D, K334M, K334Y, K334W, K334H, K334V, 또는 K334L.	E33A, E333Q, E333N, E333S, E333K, E333R, E333D, 또는 E333G.	S324A, S324N, S324Q, S324K, 또는 S324E.	N286Q, N286S, N286A, 또는 N286D.	N276Q, N276A, 또는 N276K.
S298D + →	K334A, K334R, K334Q, K334N, K334S, K334E, K334D, K334M, K334Y, K334W, K334H, K334V, 또는 K334L.	E33A, E333Q, E333N, E333S, E333K, E333R, E333D, 또는 E333G.	S324A, S324N, S324Q, S324K, 또는 S324E.	N286Q, N286S, N286A, 또는 N286D.	N276Q, N276A, 또는 N276K.
S298P + →	K334A, K334R, K334Q, K334N, K334S, K334E, K334D, K334M, K334Y, K334W, K334H, K334V, 또는 K334L.	E33A, E333Q, E333N, E333S, E333K, E333R, E333D, 또는 E333G.	S324A, S324N, S324Q, S324K, 또는 S324E.	N286Q, N286S, N286A, 또는 N286D.	N276Q, N276A, 또는 N276K.
Y296P + →	K334A, K334R, K334Q, K334N, K334S, K334E, K334D, K334M, K334Y, K334W, K334H, K334V, 또는 K334L.	E33A, E333Q, E333N, E333S, E333K, E333R, E333D, 또는 E333G.	S324A, S324N, S324Q, S324K, 또는 S324E.	N286Q, N286S, N286A, 또는 N286D.	N276Q, N276A, 또는 N276K.
Q295K + →	K334A, K334R, K334Q, K334N, K334S, K334E, K334D, K334M, K334Y, K334W, K334H, K334V, 또는 K334L.	E33A, E333Q, E333N, E333S, E333K, E333R, E333D, 또는 E333G.	S324A, S324N, S324Q, S324K, 또는 S324E.	N286Q, N286S, N286A, 또는 N286D.	N276Q, N276A, 또는 N276K.
Q295L + →	K334A, K334R, K334Q, K334N, K334S, K334E, K334D, K334M, K334Y, K334W, K334H, K334V, 또는 K334L.	E33A, E333Q, E333N, E333S, E333K, E333R, E333D, 또는 E333G.	S324A, S324N, S324Q, S324K, 또는 S324E.	N286Q, N286S, N286A, 또는 N286D.	N276Q, N276A, 또는 N276K.

[0205]

출발 변이체	334번 위치	333번 위치	324번 위치	286번 위치	276번 위치
E294N + →	K334A, K334R, K334Q, K334N, K334S, K334E, K334D, K334M, K334Y, K334W, K334H, K334V, 또는 K334L.	E33A, E333Q, E333N, E333S, E333K, E333R, E333D, 또는 E333G.	S324A, S324N, S324Q, S324K, 또는 S324E.	N286Q, N286S, N286A, 또는 N286D.	N276Q, N276A, 또는 N276K.

[0206]

[0207]

바람직한 특정 구체예에서, 본 발명은 변이체 Fc 영역을 포함한 분자를 포함하고, 상기 변이체 Fc 영역은 야생형 Fc 영역에 비해서 하나 이상의 아미노산 변형을 포함하여, 상기 분자는 Fc γ R에 대하여 변경된 친화력을 가지며, 단 상기 변이체 Fc 영역은 문헌(Sondermann et al., 2000 (본원에 전부 참고문헌으로 포함된 Nature 406:267-273))에 개시된 것들과 같이 Fc-Fc γ R 상호작용의 결정학적 및 구조적 분석에 기초한 Fc γ R과의 직접 접촉하는 위치에서 치환을 가지지 않는다. Fc γ R과 직접 접촉하는 Fc 영역 내의 위치의 예는 아미노산 234-239(힌지 영역), 아미노산 265-269(B/C 루프), 아미노산 297-299(C'/E 루프) 및 아미노산 327-332(F/G) 루프이다. 일부 구체예에서, 변이체 Fc 영역을 포함한 본 발명의 분자는 구조적 및 결정학적 분석에 기초한 Fc γ R과 직접 접촉하는 하나 이상의 잔기의 변형을 포함한다.

[0208]

Fc γ R 상호작용 도메인은 더 낮은 힌지 영역까지 맵핑하고 IgG 중쇄의 CH2 및 CH3 도메인 내의 부위를

선택한다. 실제 접촉 위치 양쪽에 인접한 아미노산 잔기와 CH3 도메인에 있는 아미노산 잔기는 돌연변이유발 연구 및 소 펩티드 억제제를 이용한 연구에 의하여 각각 나타난 바와 같이 IgG/Fc γ R 상호작용에서 기능을 한다 (본원에 전부 참고문헌으로 포함된 문헌(Sondermann et al., 2000 Nature, 406:267-273; Diesenhofer et al., 1981, Biochemistry, 20:2361-2370; Shields et al., 2001, J. Biol. Chem. 276:6591-6604)). 본원에 사용된 직접적 접촉은 각각의 약 1Å 이상, 2Å 이상, 또는 3Å 이상 또는 1Å, 1.2Å, 1.5Å, 1.7Å 또는 2Å 반데르 발스 반지름 내인 아미노산을 말한다. Fc 상호작용 단백질의 결합에 영향을 미치는 Fc 상의 사전에 확인된 부위의 예시적 목록은 하기 표 4에 열거된다. 일부 구체예에서, 본 발명은 하기에 열거된 부위에 임의의 변형을 가지지 않는 Fc 변이체를 포함한다. 다른 구체예에서, 본 발명은 이러한 변형이 돌연변이체의 특성에 상승작용적 또는 추가적 효과를 미치도록 본원에 개시된 다른 변형과 조합하여 하기에 열거된 하나 이상의 부위에 아미노산 변형을 포함한 Fc 변이체를 포함한다.

표 4

Fc 상호작용 단백질의 결합에 영향을 미치는
Fc 상의 이미 확인된 부위

FcR-Fc	도메인	잔기	FcRI	FcRII	FcRIII	C1q	FcRn
A,B	CH2	233	C	C	C		C
A,B	CH2	234	C	C	C	G	C
A,B	CH2	235	C	C	C	G	C
A,B	CH2	236	C	C	C		C
A,B	CH2	237					
A,B	CH2	238	D				
A,B	CH2	239			C		
	CH2	241	D				
	CH2	243	D				
	CH2	248	D				
	CH2	250					E
	CH2	254					C
	CH2	255		C			
	CH2	256		C	C		
	CH2	258		C	C		
B	CH2	265	C	C	C	F	C
B	CH2	267		C	C		
	CH2	268		C	C		
B	CH2	269		C	C		
	CH2	270		C	C	F	
	CH2	272		C	C		
	CH2	276		C	C		
	CH2	285		C	C		
	CH2	286		C			
	CH2	288					C
	CH2	290		C	C		
	CH2	292		C			
	CH2	293			C		
	CH2	295		C	C		
	CH2	296		C	C		
B	CH2	297	X	X	X	X	
B	CH2	298					
B	CH2	299					
	CH2	301	D	C	C		
	CH2	311					C
	CH2	312					C
	CH2	315		C			
	CH2	317					C
	CH2	322		C	C	F	
	CH2	326		C	C	F	
A,B	CH2	327	D,C	C	C		
A	CH2	328					
A	CH2	329	D,C	C	C	F	
A	CH2	330					
	CH2	331		C		F	
A	CH2	332					
	CH2	333			C	F	
	CH2	334			C		
	CH2	337		C			
	CH2	338			C		
	CH3	339			C		
	CH3	360					C
	CH3	362					C
	CH3	376			C		
	CH3	378		C			
	CH3	380					C
	CH3	382					C
	CH3	414		C			
	CH3	415					
	CH3	424					C
	CH3	428					C
	CH3	430		C			
	CH3	433					C
	CH3	434					C
	CH3	435					C
	CH3	436					C

표 4는 Fc-FcR 상호작용을 위하여 중요한 것으로 사전에 확인된 Fc 영역 내의 부위를 열거한다. 칼럼 표지된 FcR-Fc는 FcR에 의하여 접촉된 Fc 사슬과 일치된다. 문자들은 데이터가 인용된 참고문헌과 일치된다. C는 본원

에 전부 참고문헌으로 포함된 문헌(Shields et al., 2001, J. Biol. Chem. 276:6591-6604)이고; D는 문헌(Jefferis et al., 1995, Immunol. Lett. 44:111-7)이며; E는 문헌(Hinton et al; 2004, J. Biol. Chem. 279(8):6213-6)이고; F는 문헌(Idusogie et al., 2000, J. Immunol. 164:4178-4184)이다.

[0211]

다른 바람직한 구체예에서, 본 발명은 야생형 Fc 영역에 비해서 하나 이상의 아미노산 변형을 포함한 변이체 Fc 영역을 포함한 분자를 포함하여, 상기 분자는 야생형 Fc 영역을 포함한 분자에 비해서 변경된 친화력으로 Fc γ R에 결합하며, 단 상기 변이체 Fc 영역은 255, 256, 258, 267, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 300, 301, 303, 305, 307, 309, 312, 320, 322, 326, 329, 330, 332, 331, 333, 334, 335, 337, 338, 339, 340, 359, 360, 373, 376, 416, 419, 430, 434, 435, 437, 438, 439번 위치 중 어느 하나에서 치환을 가지지 않거나 단독 치환이 아니다. 특정 구체예에서, 본 발명은 야생형 Fc 영역에 비해서 하나 이상의 아미노산 변형을 포함한 변이체 Fc 영역을 포함한 분자를 포함하여, 상기 분자는 야생형 Fc 영역을 포함한 분자에 비해서 변경된 친화력으로 Fc γ R에 결합하며, 단 상기 변이체 Fc 영역은 255, 258, 267, 269, 270, 276, 278, 280, 283, 285, 289, 292, 293, 294, 295, 296, 300, 303, 305, 307, 309, 322, 329, 332, 331, 337, 338, 340, 373, 376, 416, 419, 434, 435, 437, 438, 439번 위치 중 어느 하나에서 치환을 가지지 않거나 단독 치환이 아니고, 256, 290, 298, 312, 333, 334, 359, 360, 326, 또는 430번 위치에 알라닌을 가지지 않으며; 330번 위치에서 리신; 339번 위치에서 트레오닌 ; 320번 위치에서 메티오닌; 326번 위치에서 세린; 326번 위치에서 아스파라긴; 326번 위치에서 아스파르트산; 326번 위치에서 글루탐산; 334번 위치에서 글루타민; 334번 위치에서 글루탐산; 334번 위치에서 메티오닌; 334번 위치에서 히스티딘; 334번 위치에서 발린; 또는 334번 위치에서 류신; 335번 위치에서 리신, 268번 위치에서 아스파라긴; 272번 위치에서 글루타민; 286번 위치에서 글루타민, 세린, 또는 아스파르트산; 290번 위치에서 세린; 320번 위치에서 메티오닌, 글루타민, 글루탐산, 또는 아르기닌; 322번 위치에서 글루탐산; 326번 위치에서 세린, 글루탐산, 또는 아스파르트산; 330번 위치에서 리신; 335번 위치에서 글루타민; 또는 301번 위치에서 메티오닌을 가지지 않는다. 특정 구체예에서, 본 발명은 야생형 Fc 영역에 비해서 하나 이상의 아미노산 변형을 포함한 변이체 Fc 영역을 포함한 분자를 포함하여, 상기 분자는 야생형 Fc 영역을 포함한 분자에 비해서 감소된 친화력으로 Fc γ R에 결합하며, 단 268, 269, 270, 272, 276, 278, 283, 285, 286, 289, 292, 293, 301, 303, 305, 307, 309, 331, 333, 334, 335, 337, 338, 340, 360, 373, 376, 416, 419, 430, 434, 435, 437, 438 또는 439번 위치 중 어느 하나에 치환을 가지지 않거나 단독 치환이 아니고, 280번 위치에서 히스티딘, 글루타민, 또는 티로신, 290번 위치에서 세린, 글리신, 트레오닌 또는 티로신; 300번 위치에서 류신 또는 이소류신; 294번 위치에서 아스파라긴, 296번 위치에서 프롤린; 298번 위치에서 프롤린, 아스파라긴, 아스파르트산, 또는 발린; 295번 위치에서 리신을 가지지 않는 변이체 Fc 영역을 포함한 분자를 포함한다. 또 다른 바람직한 구체예에서, 본 발명은 상기 변이체 Fc 영역이 252, 254, 265, 268, 269, 270, 278, 289, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 300, 301, 303, 322, 324, 327, 329, 333, 335, 338, 340, 373, 376, 382, 388, 389, 414, 416, 419, 434, 435, 437, 438, 또는 439번 위치 중 어느 하나에서 치환을 가지지 않거나 단독 치환이 아니다. 또 다른 바람직한 구체예에서, 본 발명은 야생형 Fc 영역에 비해서 하나 이상의 아미노산 변형을 포함한 변이체 Fc 영역을 포함한 분자를 포함하여, 상기 분자는 야생형 Fc 영역을 포함한 분자에 비해서 향상된 친화력으로 Fc γ R과 결합하며, 상기 변이체 Fc 영역은 280, 283, 285, 286, 290, 294, 295, 298, 300, 301, 305, 307, 309, 312, 315, 331, 333, 334, 337, 340, 360, 378, 398, 또는 430번 위치 중 어느 하나에서 치환을 가지지 않거나 단독 치환이 아니다. 특정 구체예에서, 본 발명은 330, 243, 247, 298, 241, 240, 244, 263, 262, 235, 269, 또는 328번 위치 중 어느 하나에 치환을 포함하지 않거나 단독 치환이 아니고, 243번 위치에서 류신, 298번 위치에서 아스파라긴, 241번 위치에서 류신, 240번 위치에서 이소류신 또는 알라닌, 244번 위치에서 히스티딘, 330번 위치에서 발린, 또는 328번 위치에서 이소류신을 가지지 않는 변이체 Fc 영역을 포함한 분자를 포함한다.

[0212]

가장 바람직한 구체예에서, 변이체 Fc 영역을 가진 활성화 및/또는 억제성 수용체에 대한 변경된 친화력을 가진 본 발명의 분자는 288번 위치에서 아스파라긴, 330번 위치에서 세린 및 396번 위치에서 류신으로 치환(MgFc10)(표 5 참조); 또는 334번 위치에서 글루탐산, 359번 위치에서 아스파라긴, 및 366번 위치에서 세린으로 치환(MgFc13); 또는 316번 위치에서 아스파르트산, 378번 위치에서 발린 및 399번 위치에서 글루탐산으로 치환(MgFc27); 또는 392번 위치에서 트레오닌, 및 396번 위치에서 류신으로 치환(MgFc38); 또는 221번 위치에서 글루탐산, 270번 위치에서 글루탐산, 308번 위치에서 알라닌, 311번 위치에서 히스티딘, 396번 위치에서 류신, 및 402번 위치에서 아스파르트산으로 치환(MgFc42); 또는 240번 위치에서 알라닌 및 396번 위치에서 류신으로 치환(MgFc52); 또는 410번 위치에서 히스티딘, 및 396번 위치에서 류신으로 치환(MgFc53); 또는 243번 위치에서 류신, 305번 위치에서 이소류신, 378번 위치에서 아스파르트산, 404번 위치에서 세린, 및 396번 위치에서 류신으로 치환(MgFc54); 또는 255번 위치에서 이소류신, 및 396번 위치에서 류신으로 치환(MgFc55); 또는 370번 위치

에서 글루탐산 및 396번 위치에서 류신으로 치환(MgFc59)인 하나 이상의 아미노산 변형을 가진다.

[0213] 한 특정 구체예에서, 본 발명은 396번 위치에서 류신, 270번 위치에서 글루탐산 및 243번 위치에서 류신으로 치환하는 것을 포함한 변이체 Fc 영역을 포함한 분자를 포함한다.

[0214] 일부 구체예에서, 본 발명은 하기 위치 중 하나 이상에서 아미노산 변형을 가진 변이체 Fc 영역을 포함한 분자를 포함한다: 185, 142, 192, 141, 132, 149, 133, 125, 162, 147, 119, 166, 251, 292, 290, 291, 252, 288, 268, 256, 262, 218, 214, 205, 215, 247, 275, 202, 289, 258, 219, 279, 222, 246, 233, 246, 268, 244, 217, 253, 246, 224, 298, 280, 255, 218, 281, 284, 216, 223, 235, 221, 252, 241, 258, 227, 231, 215, 274, 287, 244, 229, 287, 291, 240, 281, 232, 269, 225, 246, 246, 293, 295, 248, 276, 268, 210, 288, 227, 221, 217, 261, 210, 242, 255, 240, 250, 247, 258, 246, 282, 219, 225, 270, 263, 272, 292, 233, 247, 254, 243, 347, 339, 392, 399, 301, 315, 383, 396, 385, 348, 333, 334, 310, 337, 371, 359, 366, 359, 379, 330, 318, 395, 319, 380, 305, 309, 335, 370, 378, 394, 386, 377, 358, 384, 397, 372, 326, 320, 375, 327, 381, 354, 385, 335, 387, 353, 375, 383, 397, 345, 375, 389, 335, 394, 316, 399, 315, 394, 382, 390, 369, 377, 304, 323, 313, 388, 339, 317, 365, 367, 340, 311, 312, 398, 343, 352, 362, 303, 308, 327, 307, 344, 328, 393, 355, 360, 306, 361, 355, 415, 408, 409, 407, 424, 401, 402, 435, 421, 431, 441, 440, 435, 431, 442, 400, 422, 406, 411, 422, 433, 406, 423, 420, 412, 447, 443, 414, 433, 428, 446, 402, 419, 410, 404, 427, 417, 433, 436, 438, 416. 바람직하게는, 이러한 돌연변이는 본원에 개시되고 예시되며, 당업자에게 공지된 방법을 사용하여 결정된 바와 같이 Fc γR에 대한 변경된 친화력을 가지고/거나 변경된 작동자세포 매개된 기능을 가진 분자를 야기한다.

[0215] 본 발명은 하기 표 5에 열거된 돌연변이 중 어느 하나로 구성되거나 포함하는 변이체 Fc 영역을 포함한 분자를 포함한다.

표 5

예시적 돌연변이

단일 부위 돌연변이체	이중 부위 돌연변이체
K392R	Q347H, A339V
N315I	S415I, L251F
S132I	K290E, L142P
P396L	G285E, P247H
P396H	K409R, S166N
A162V	E334A, K334A
R292L	R292L, K334E
T359N	K288N, A330S
T366S	R255L, E318K
V379L	F243L, E318K
K288N	V279L, P395S
A330S	K246T, Y319F
F243L	F243I, V379L
E318K	K288M, K334E
V379M	K334E, E308D
S219Y	E233D, K334E
V282M	K246T, P396H
D401V	H268D, E318D
K222N	K246I, K334N
K334I	K320E, K326E
K334E	S375C, P396L
I377F	K288N, K326N
P247L	P247L, N421K
F372Y	S298N, W381R
K326E	R255Q, K326E
H224L	V284A, F372L
F275Y	T394M, V397M
L398V	P247L, E389G
K334N	K290T, G371D
S400P	P247L, L398Q
S407I	P247L, I377F
F372Y	K326E, G385E
T366N	S298N, S407R
K414N	E258D, N384K
M352L	F241L, E258G
T225S	K370N, S440N
I377N	K317N, F423-결실
K248M	P227S, K290E
R292G	K334E, E380D
S298N	P291S, P353Q
D270E	V240I, V281M
E233G	P232S, S304G
	P247L, L406F
	D399E, M428L
	L251F, F372L
	D399E, G402D
	D399E, M428L
	K392T, P396L
	H268N, P396L
	K326I, P396L
	H268D, P396L
	K210M, P396L

[0216]

L358P, P396L
K334N, P396L
V379M, P396L
P227S, P396L
P217S, P396L
Q419H, P396L
K370E, P396L
L242F, P396L
R255L, P396L
V240A, P396L
T250A, P396L
P247S, P396L
L410H, P396L
Q419L, P396L
V427A, P396L
E258D, P396L
N384K, P396L
V323I, P396L
P244H, P396L
V305L, P396L
S400F, P396L
V303I, P396L
A330V, Q419H
V263Q, E272D
K326E, A330T

[0217]

[0218]

또 다른 구체예에서, 본 발명은 두 개 이상의 아미노산 변형을 가진 변이체 Fc 영역을 포함한 분자를 포함한다. 이러한 변이체의 무한정 실시예는 하기 표(표 6)에 열거된다. 본 발명은 본원에 개시된 것들과 같은 하나 이상의 아미노산 변형을 더 포함하는, 표 6에 열거된 돌연변이를 포함한다.

표 6

예시적 조합 변이체

D399E, R292L, V185M
R301C, M252L, S192T
P291S, K288E, H268L, A141V
S383N, N384K, T256N, V262L, K218E, R214I, K205E, F149Y, K133M
S408I, V215I, V125L
G385E, P247H
V348M, K334N, F275I, Y202M, K147T
H310Y, T289A, Y407V, E258D
R292L, P396L, T359N
F275I, K334N, V348M
F243L, R255L, E318K
K334E, T359N, T366S
T256S, V305I, K334E, N390S
T335N, K370E, A378V, T394M, S424L
K334E, T359N, T366S, Q386R

[0219]

K288N, A330S, P396L
P244H, L358M, V379M, N384K, V397M
P217S, A378V, S408R
P247L, I253N, K334N
D312E, K327N, I378S
D280E, S354F, A431D, L441I
K218R, G281D, G385R
P247L, A330T, S440G
T355N, P387S, H435Q
P247L, A431V, S442F
P343S, P353L, S375I, S383N
E216D, E345K, S375I
K288N, A330S, P396L
K222N, T335N, K370E, A378V, T394M
G316D, A378V, D399E
N315I, V379M, T394M
K326Q, K334E, T359N, T366S
A378V, N390I, V422I
V282E, V369I, L406F
V397M, T411A, S415N
T223I, T256S, L406F
L235P, V382M, S304G, V305I, V323I
P247L, W313R, E388G
D221Y, M252I, A330G, A339T, T359N, V422I, H433L
F243I, V379L, G420V
A231V, Q386H, V412M
T215P, K274N, A287G, K334N, L365V, P396L
P244A, K326I, C367R, S375I, K447T
R301H, K340E, D399E
C229Y, A287T, V379M, P396L, L443V
E269K, K290N, Q311R, H433Y
E216D, K334R, S375I
T335N, P387S, H435Q
K246I, Q362H, K370E
K334E, E380D, G446V
V303I, V369F, M428L
K246E, V284M, V308A
E293V, Q295E, A327T
Y319F, P352L, P396L
D221E, D270E, V308A, Q311H, P396L, G402D
K290T, N390I, P396L
K288R, T307A, K344E, P396L
V273I, K326E, L328I, P396L
K326I, S408N, P396L
K261N, K210M, P396L
F243L, V305I, A378D, F404S, P396L
K290E, V369A, T393A, P396L
K210N, K222I, K320M, P396L
P217S, V305I, I309L, N390H, P396L
K246N, Q419R, P396L

[0220]

P217A, T359A, P396L
V215I, K290V, P396L
F275L, Q362H, N384K, P396L
A330V, H433Q, V427M
V263Q, E272D, Q419H
N276Y, T393N, W417R
V282L, A330V, H433Y, T436R
V284M, S298N, K334E, R355W
A330V, G427M, K438R
S219T, T225K, D270E, K360R
K222E, V263Q, S298N
E233G, P247S, L306P
S219T, T225K, D270E
S254T, A330V, N361D, P243L
V284M, S298N, K334E, R355W R416T
D270E, G316D, R416G
K392T, P396L, D270E
R255L, P396L, D270E
V240A, P396L, D270E
Q419H, P396L, D270E
K370E, P396L, D270E
P247L, N421K, D270E
R292P, V305I
R292P, V305I, F243L
V284M, R292L, K370N

[0221]

[0222]

일부 구체예에서, 본 발명의 분자, 바람직하게는 면역글로불린은 하나 이상의 탄수화물 부분이 분자에 공유 부착되도록 하나 이상의 글리코실화 부위를 더 포함한다. 바람직하게는, 하나 이상의 글리코실화 부위 및/또는 Fc 영역에서 하나 이상의 변형을 가진 본 발명의 항체는 증가된 항체 매개된 작동자 기능, 예를 들면 향상된 ADCC 활성을 가진다. 일부 구체예에서, 본 발명은, 한정하는 것은 아니지만, 241, 243, 244, 245, 245, 249, 256, 258, 260, 262, 264, 265, 296, 299, 및 301번 위치의 아미노산을 포함한 항체의 탄수화물 부분과 상호작용하는 것으로 직접 또는 간접적으로 알려진 아미노산의 하나 이상의 변형을 포함한 항체를 더 포함한다. 항체의 탄수화물 부분과 직접 또는 간접적으로 상호작용하는 아미노산은 당업계에 공지되어 있다. 예를 들면, 본원에 전 부 참고문헌으로 포함된 문헌(Jefferis et al., 1995 Immunology Letters, 44:111-7)을 참조하라.

[0223]

본 발명은 바람직하게는 항체의 기능, 예를 들면 Fc γ Rd에 대한 결합 활성을 변경하지 않고 하나 이상의 글리코실화 부위를 항체의 하나 이상의 부위에 도입함으로써 변형된 항체를 포함한다. 글리코실화 부위는 본 발명의 항체의 가변 및/또는 불변 영역에 도입될 수 있다. 본원에 사용된 "글리코실화 부위"는 올리고당(즉, 함께 결합된 두 개 이상의 단순당을 함유한 탄수화물)이 특이적으로 및 공유적으로 부착될 항체의 임의의 특이적 아미노산 서열을 포함한다. 올리고당 측쇄는 전형적으로 N- 또는 O-결합을 통하여 항체의 백본에 결합된다. N-결합된 글리코실화는 아스파라긴 잔기의 측쇄에 올리고당 부분의 부착을 말한다. O-결합된 글리코실화는 히드록시아미노산, 예를 들면 세린, 트레오닌에 올리고당 부분의 부착을 말한다. 본 발명의 항체는 N-결합 및 O-결합된 글리코실화 부위를 포함한 하나 이상의 글리코실화 부위를 포함할 수 있다. 당업계에 공지된 N-결합 또는 O-결합 글리코실화를 위한 임의의 글리코실화 부위는 본 발명에 따라서 사용될 수 있다. 본 발명의 방법에 따라서 유용한 예시적 N-결합된 글리코실화 부위는 아미노산 서열 Asn-X-Thr/Ser인데, X는 임의의 아미노산일 수 있고, Thr/Ser은 트레오닌 또는 세린을 나타낸다. 이러한 부위 또는 부위들은 본 발명이 속한 당업계에 잘 알려진 방법을 사용하여 본 발명의 항체에 도입될 수 있다. 예를 들면, 본원에 전 부 참고문헌으로 포함된 문헌("In Vitro Mutagenesis," Recombinant DNA: A Short Course, J. D. Watson, et al. W.H. Freeman and Company, New York, 1983, 8장. pp. 106-116)을 참조하라. 글리코실화 부위를 본 발명의 항체에 도입하기 위한 예시적 방법은 원하는 Asn-X-Thr/Ser 서열을 얻기 위해서 항체의 아미노산 서열을 변형 또는 돌연변이유발하는 것을 포함한다.

[0224]

일부 구체예에서, 본 발명은 글리코실화 부위를 첨가 또는 제거함으로써 본 발명의 항체의 탄수화물 양을 변형하는 방법을 포함한다. 항체의 탄수화물 양을 변형하기 위한 방법은 당업계에 잘 알려져 있고, 본 발명 내에 포함된다. 예를 들면, 본원에 전 부 참고문헌으로 포함된, 미국 특허 제6,218,149호; EP 0 359 096 B1: 미국 특허 공보 제2002/0028486호; WO 03/035835; 미국 특허공보 제2003/0115614호; 미국 특허 제6,218,149호; 미국 특허 제6,472,511호를 참조하라. 다른 구체예에서, 본 발명은 항체의 하나 이상의 내생 탄수화물 부분을 제거함으로써 본 발명의 항체의 탄수화물 양을 변형하는 방법을 포함한다. 특정 구체예에서, 본 발명은 297번 에 인접한 위치를 변형함으로써 항체의 Fc 영역의 글리코실화 부위를 이동시키는 단계를 포함한다. 특정 구체예에서, 본

발명은 297번 위치가 아닌, 296번 위치가 글리코실화되도록 296번 위치를 변형하는 단계를 포함한다.

[0225] **5.1 변이체 Fc 영역을 가진 폴리펩티드 및 항체**

[0226] 본 발명은 부분적으로 효모 디스플레이 시스템을 사용하여 다른 Fc γ R 수용체에 대한 변경된 친화력을 가진 돌연변이체 사람 IgG1 중쇄 Fc 영역의 확인에 기초한다. 따라서, 본 발명은 하나 이상의 영역에서 Fc γ R에 대한 변이체 Fc 영역의 친화력을 변경하는 하나 이상의 변형(예를 들면, 치환, 그러나 또한 삽입 또는 결실을 포함)을 가진 변이체 Fc 영역을 포함한, 분자, 바람직하게는 폴리펩티드, 및 더 바람직하게는 면역글로불린(예를 들면, 항체)에 관한 것이다

[0227] 아미노산 치환을 제외하고, 본 발명은 하나 이상의 변경된 특성, 예를 들면 변경된 작동자 기능을 가진 Fc 영역 변이체를 발생시키기 위하여 Fc 영역 아미노산 서열의 다른 변형을 고려한다는 것을 당업자는 이해할 것이다. 본 발명은 Fc γ R에 대한 결합을 감소시키기 위하여 Fc 영역의 하나 이상의 아미노산 잔기의 결실을 고려한다. 바람직하게는, 5개 이하, 10개 이하, 20개 이하, 30개 이하, 50개 이하의 Fc 영역 잔기는 본 발명의 이 구체예에 따라서 결실될 것이다. 하나 이상의 아미노산 결실을 포함한 Fc 영역은 바람직하게는 야생형 Fc 영역의 약 80% 이상, 및 바람직하게는 약 90% 이상, 및 가장 바람직하게는 95% 이상을 보유할 것이다. 일부 구체예에서, 분자의 하나 이상의 특성, 예를 들면 비-면역원성, Fc γ RIIIA 결합, Fc γ RIIA 결합 또는 이들 특성의 조합은 유지된다.

[0228] 대체 구체예에서, 본 발명은 변경된 작동자 기능을 포함한 변경된 특성을 가진, Fc 영역 변이체를 발생시키기 위하여 아미노산 삽입을 포함한다. 한 특정 구체예에서, 본 발명은 본원에서 확인된 하나 이상의 Fc 영역 위치에 인접한 한 개 이상의 아미노산 잔기, 예를 들면 한 개 내지 두 개의 아미노산 잔기 및 바람직하게는 10개 이하의 아미노산 잔기를 도입하는 것을 포함한다. 대체 구체예에서, 본 발명은 Fc γ R 상호작용 및/또는 결합에 충격을 주면서, 당업계에 공지된 하나 이상의 Fc 영역 위치에 인접한 한 개 이상의 아미노산 잔기, 예를 들면 한 개 내지 두 개 아미노산 잔기 및 바람직하게는 10 개 이하의 아미노산 잔기를 도입하는 것을 포함한다.

[0229] 본 발명은 본 발명의 Fc 변이체를 발생시키기 위한 비자연적 아미노산의 혼입을 포함한다. 비자연적 아미노산을 단백질에 혼입시키는 자연적 생합성 기계장치를 사용하는 것들과 같은 방법들은 당업자에게 공지되어 있다. 예를 들면, 본원에 전부 참고문헌 포함된 문헌(Wang et al., 2002 Chem. Comm. 1:1-11; Wang et al., 2001, Science, 292:498-500; van Hest et al., 2001. Chem. Comm. 19:1897-1904)을 참조하라. 대안적 전략은 아미노아실-tRNA의 생합성에 관여하는 효소에 초점을 맞춘다. 예를 들면, 본원에 전부 참고문헌으로 포함된 문헌(Tang et al., 2001, J. Am. Chem. 123(44):11089-11090; Kiick et al., 2001, FEBS Lett. 505(3):465)을 참조하라.

[0230] Fc γ R에 대한 본 발명의 분자의 친화력 및 결합 특성은 처음에, 한정하는 것은 아니지만, ELISA, 표면 플라즈몬 분석, 면역침전 분석을 포함한, Fc-Fc γ R 상호작용, 즉 Fc γ R에 대한 Fc 영역의 특이적 결합을 결정하기 위한, 당업계에 공지된 시험관내 분석(생화학적 또는 면역학적 기초 분석)을 사용하여 결정된다(섹션 5.2.1 참조). 바람직하게는, 본 발명의 분자의 결합 특성은 또한 하나 이상의 Fc γ R 매개자 작동자세포 기능을 결정하기 위한 시험관내 기능 분석에 의하여 특성화된다(섹션 5.2.6 참조). 가장 바람직한 구체예에서, 본 발명의 분자는 시험관내 기초 분석에서와 같이 생체내 모델(예를 들면, 본원에 설명되고 개시된 것들)에서 유사한 결합 특성을 가진다. 그러나, 본 발명은 시험관내 기초 분석에서 원하는 표현형을 나타내지 않지만, 생체내에서 원하는 표현형을 나타내는 본 발명의 분자를 배제하지 않는다. 본 발명의 분자의 스크리닝 및 특성화의 대표적 흐름 차트는 도 33에 도시된다.

[0231] 본 발명은 하나 이상의 Fc γ R에 대하여 더 큰 친화력으로 결합하는 변이체 Fc 영역을 포함한 분자를 포함한다. 이러한 분자는 바람직하게는 아래에서 논의되는 바와 같이 작동자 기능을 더 효과적으로 매개한다. 다른 구체예에서, 본 발명은 하나 이상의 Fc γ R에 대하여 더 약한 친화력으로 결합하는 변이체 Fc 영역을 포함한 분자를 포함한다. 작동자 기능의 감소 또는 제거는 특정 경우에, 예를 들면 항체의 경우에 바람직한데, 이것의 작용의 메커니즘은 표적 항원을 보유한 세포를 죽이지 않고 차단 또는 길항작용을 포함한다. 작동자 기능의 감소 또는 제거는 작동자세포에서 Fc γ R 활성화 수용체를 차단하는 자가면역 질환의 경우에 바람직하다(이 유형의 기능은 숙주 세포에 존재한다). 대체로, 증가된 작동자 기능은 종양 및 외래 세포로 유도된다.

[0232] 본 발명의 Fc 변이체는, 한정하는 것은 아니지만, 작동자 기능을 변경하는 변형을 포함한 다른 Fc 변형과 조합될 수 있다. 본 발명은 항체 또는 Fc 융합에 추가적, 상승작용적, 또는 신규 특성을 제공하기 위하여 본 발명의 Fc 변이체를 다른 Fc 변형과 조합하는 것을 포함한다. 바람직하게는, 본 발명의 Fc 변이체는 이들과 조합된 변형의 표현형을 증대시킨다. 예를 들면, 본 발명의 Fc 변이체가 야생형 Fc 영역을 포함한 대비되는 분자보다 더

큰 친화력으로 Fc γ RIIIA와 결합하는 것으로 알려진 돌연변이체와 조합되면, 본 발명의 돌연변이체와의 조합은 Fc γ RIIIA 친화력의 더 큰 배수의 증대를 야기한다.

[0233] 한 구체예에서, 본 발명의 Fc 변이체는 다른 공지된 Fc 변이체, 예를 들면 본원에 전부 참고문헌으로 포함된 문헌(Duncan et al., 1988, Nature 332:563-564; Lund et al., 1991, J. Immunol 147:2657-2662; Lund et al., 1992, Mol Immunol 29:53-59; Alegre et al., 1994, Transplantation 57:1537-1543; Hutchins et al., 1995, Proc Natl. Acad Sci U S A 92:11980-11984; Jefferis et al., 1995, Immunol Lett. 44:111-117; Lund et al., 1995, Faseb J 9:115-119; Jefferis et al., 1996, Immunol Lett 54:101-104; Lund et al., 1996, J Immunol 157:4963-4969; Armour et al., 1999, Eur J Immunol 29:2613-2624; Idusogie et al., 2000, J Immunol 164:4178-4184; Reddy et al., 2000, J Immunol 164:1925-1933; Xu et al., 2000, Cell Immunol 200:16-26; Idusogie et al., 2001, J Immunol 166:2571-2575; Shields et al., 2001, J Biol Chem 276:6591-6604; Jefferis et al., 2002, Immunol Lett 82:57-65; Presta et al., 2002, Biochem Soc Trans 30:487-490); 미국 특허 제5,624,821호; 미국 특허 제5,885,573호; 미국 특허 제6,194,551호; PCT WO 00/42072호; PCT WO 99/58572호에 개시된 것들과 조합될 수 있다.

[0234] 일부 구체예에서, 본 발명의 Fc 변이체는 하나 이상의 조작된 단백당형, 즉 Fc 영역을 포함한 분자에 공유 부착된 탄수화물 조성을 포함한 항체 또는 Fc 융합 내로 혼입되는데, 상기 탄수화물 조성물은 Fc 영역을 포함한 분자의 조성고 화학적으로 다르다. 조작된 단백당형은, 한정하는 것은 아니지만, 작동자 기능을 증대 또는 감소시키는 것을 포함한 다양한 목적을 위해 유용할 수 있다. 조작된 단백당형은 당업자에게 공지된 임의의 방법에 의하여, 예를 들면 조작된 또는 변이체 발현 균주를 사용함으로써, 하나 이상의 효소, 예를 들면 DI N-아세틸글루코사미닐트랜스퍼라제 III(GnTIII)와 공동-발현함으로써, 다양한 생물 또는 다양한 생물로부터의 세포주에서 Fc 영역을 포함한 분자를 발현시킴으로써, 또는 Fc 영역을 포함한 분자가 발현된 후에 탄수화물(들)을 변형시킴으로써 생성될 수 있다. 조작된 단백당형을 생성하기 위한 방법은 당업계에 공지되어 있으며, 한정하는 것은 아니지만, 각각이 본원에 전부 참고문헌으로 포함된 문헌(Umana et al., 1999, Nat. Biotechnol 17:176-180; Davies et al., 2001, Biotechnol Bioeng 74:288-294; Shields et al., 2002, J Biol Chem 277:26733-26740; Shinkawa et al., 2003, J Biol Chem 278:3466-3473) US 6,602,684; USSN 10/277,370; USSN 10/113,929; PCT WO 00/61739A1; PCT WO 01/292246A1; PCT WO 02/311140A1; PCT WO 02/30954A1; PotillegentTM 기술(Biowa, Inc. Princeton, NJ); GlycoMabTM 글리코실화 조작 기술(GLYCART biotechnology AG, Zurich, Switzerland)에 개시된 것들을 포함한다. 예를 들면, 각각이 본원에 전부 참고문헌으로 포함된 WO 00061739; EA01229125; US 20030115614; 문헌(Okazaki et al., 2004, JMB, 336:1239-49)을 참조하라.

[0235] 본 발명의 Fc 변이체는 다양한 특성에 적합화될 수 있다. 적합화될 수 있는 특성은, 한정하는 것은 아니지만, Fc γ R에 대한 향상된 또는 감소된 친화력, 향상된 또는 감소된 작동자 기능을 포함한다. 바람직한 구체예에서, 본 발명의 Fc 변이체는 사람 활성화 Fc γ R, 바람직하게는 Fc γ R, Fc γ RIIA, Fc γ RIIc, Fc γ RIIIA, 및 Fc γ RIIIB, 가장 바람직하게는 Fc γ RIIIA에 대한 향상된 친화력을 갖도록 최적화된다. 대체의 바람직한 구체예에서, Fc 변이체는 사람 억제성 수용체 Fc γ RIIB에 대한 감소된 친화력을 갖도록 최적화된다. 이들 바람직한 구체예는 사람에서 향상된 치료적 특성, 예를 들면 본원에 설명되고 예시된 향상된 작동자 기능 및 더 큰 항암 효능을 가진 항체 및 Fc 융합을 제공할 것으로 예상된다. 이들 바람직한 구체예는 마우스 이중이식 종양 모델에서 향상된 종양 제거를 가진 항체 및 Fc 융합을 제공할 것으로 예상된다.

[0236] 대체 구체예에서, 본 발명의 Fc 변이체는, 한정하는 것은 아니지만, Fc γ RI, Fc γ RIIA, Fc γ RIIIB, Fc γ RIIc, Fc γ RIIIA 및 Fc γ RIIIB를 포함한 사람 Fc γ R에 대한 감소된 친화력을 가지도록 적합화된다. 이들 구체예는 사람에서 향상된 치료적 특성, 예를 들면 감소된 작동자 기능 및 감소된 독성을 가진 항체 및 Fc 융합을 제공할 것으로 예상된다.

[0237] 대체 구체예에서, 본 발명의 Fc 변이체는, 한정하는 것은 아니지만, 마우스, 래트, 토끼 및 원숭이를 포함한 비-사람 생물로부터의 Fc γ R에 대한 향상된 또는 감소된 친화력을 가진다. 비-사람 Fc γ R에 결합하기 위하여 최적화된 Fc 변이체를 실험에 사용할 수 있다. 예를 들면, 마우스 모델은 다양한 질병에서 사용가능하여, 주어진 약물 후보물질에 대한 효능, 독성 및 약물동력학과 같은 특성을 시험할 수 있다. 당업계에 공지된 바와 같이, 암 세포는 사람 암을 모방하는 마우스에 이식 또는 주입될 수 있는데, 이 과정을 이중이식이라고 부른다. 하나 이상의 마우스 Fc γ R에 대하여 적합화된 Fc 변이체를 포함한 항체 또는 Fc 융합의 시험은 항체 또는 Fc 융합, 그것의 작용 메커니즘 등에 관한 가치있는 정보를 제공할 수 있다.

[0238] Fc γ R에 대한 결합을 변경하는 것이 바람직하지만, 본 발명은 신생아 수용체에 대한 변경된 결합 친화력을 가진

Fc 변이체(FcRn)를 더 고려한다. 작용의 특정 메커니즘에 얽매이는 것을 의도하지는 않지만, FcRn에 대한 개선된 친화력을 가진 Fc 영역 변이체는 더 긴 혈청 반감기를 가질 것으로 예상되고, 이러한 분자는 예를 들면 만성 질환 또는 장애를 치료하기 위해서 투여된 폴리펩티드의 긴 반감기가 바람직한 동물을 치료하는 방법에서 유용하게 적용할 수 있을 것이다. 작용의 특정 메커니즘에 얽매이는 것을 의도하지는 않지만, 감소된 FcRn 결합 친화력을 가진 Fc 영역 변이체는, 반대로, 더 감소된 반감기를 가질 것으로 예상되고, 이러한 분자는 짧아진 순환 시간이 예를 들면, 생체내 진단 이미지화 또는 연장된 기간 동안 혈류에서 좌 순환할 때 독성 부작용을 갖는 폴리펩티드의 경우에 유리할 수 있는 포유동물에게 투여될 수 있다. 감소된 Fc γ 결합 친화력을 가진 Fc 영역 변이체는 태반을 가로지를 가능성이 작을 것으로 예상되고, 따라서 임신한 여성에서 질병 또는 장애의 치료에 이용될 수 있다.

[0239] 다른 구체예에서, 이들 변이체는 각각이 본원에 전부 참고문헌으로 포함된 국제 공보 WO 98/23289; 및 WO 97/34631; 및 미국 특허 제6,277,375호에 개시된 것들과 같은 변경된 FcRn 친화력을 가진 다른 공지된 Fc 변형과 조합될 수 있다.

[0240] 본 발명은 예를 들면 하나 이상의 아미노산 변형(즉, 치환, 삽입 또는 결실)을 IgG 불변 도메인, 또는 그것의 FcRn 결합 단편(바람직하게는, Fc 또는 힌지-Fc 도메인 단편)에 도입함으로써 생체내에서 증가된 반감기를 가진 항체를 생성하기 위한 당업계에 공지된 임의의 다른 방법을 포함한다. 예를 들면, 각각이 본 발명의 Fc 변이체와 조합하여 사용되도록 본원에 전부 참고문헌으로 포함된 국제 공보 WO 98/23289; 및 WO 97/34631; 및 미국 특허 제6,277,375호를 참조하라. 나아가, 본 발명의 항체는 생체 내에서 더 안정한 항체 또는 항체 단편을 만들거나 생체내에서 더 긴 반감기를 가지기 위해서 알부민에 콘주게이션될 수 있다. 당업계에 공지된 기술, 예를 들면 본원에 전부 참고문헌으로 포함된 WO 93/15199, WO 93/15200, 및 WO 01/77137, 및 유럽 특허 EP 413,622를 참조하라.

[0241] 본원에 설명된 변이체는 종종 변이체의 의도된 사용에 따라서 추가 변형을 시킬 수 있다. 이러한 변형은 아미노산 서열의 추가 변경(아미노산 잔기의 치환, 삽입 및/또는 결실), 이중 폴리펩티드(들)에 융합 및/또는 공유결합에 의한 변형을 포함할 수 있다. 이러한 추가 변형은 Fc 수용체 결합 및/또는 ADCC 활성의 변경과 같은 변경된 특성을 야기하는 본원에 개시된 아미노산 변형(들) 전에, 동시에 또는 후에 이루어질 수 있다.

[0242] 대안적으로 또는 추가적으로, 본 발명은 시험관내 및/또는 생체내에서 결정된 바와 같이 본원에 개시된 아미노산 변형을 C1q 결합 및/또는 보체 의존성 세포독성 기능을 변경하는 하나 이상의 추가 아미노산 변형과 조합하는 단계를 포함한다. 바람직하게는, 본원에서 특히 관심대상의 시작 분자는 대개 C1q에 결합하고 보체 의존성 세포독성(CDC)을 발현하는 분자이다. 본원에 설명된 추가 아미노산 치환은 일반적으로 C1q에 결합하는 시작 분자의 능력을 변경하고/거나 예를 들면 이들 작동자 기능을 감소시키고 바람직하게는 파괴하는 그것의 보체 의존성 세포독성 기능을 변형하는 역할을 할 것이다. 다른 구체예에서, 개선된 C1q 결합 및/또는 보체 의존성 세포독성(CDC) 기능을 가진 하나 이상의 설명된 위치에 치환을 포함한 분자는 본원에서 고려된다. 예를 들면, 시작 분자는 C1q에 결합하고/거나 CDC를 매개할 수 없고, 그것이 이들 추가 작동자 기능을 획득하도록 본원의 지침에 따라서 변형될 수 있다. 더욱이, 선택적으로 CDC를 매개하는 능력을 더 가진, 사전존재하는 C1q 결합 활성을 가진 분자는 이들 활성들 중 하나 또는 둘이 변경, 예를 들면 증대되도록 변형될 수 있다. 일부 구체예에서, 본 발명은 C1q 결합에 어떤 변경도 없이 변경된 CDC 활성을 가진 변이체 Fc 영역을 포함한다. 또 다른 구체예에서, 본 발명은 변경된 CDC 활성 및 변경된 C1q 결합을 가진 변이체 Fc 영역을 포함한다.

[0243] 변경된 C1q 결합 및/또는 보체 의존성 세포독성(CDC) 기능을 가진 Fc 영역을 발생시키기 위해서, 변형되는 아미노산 위치는 일반적으로 270, 322, 326, 327, 329, 331, 333, 및 334번 위치에서 선택되며, 이때 IgG 중쇄에서 잔기의 넘버링은 문헌(Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (199))의 것이다. 이들 아미노산 변형은 C1q 결합 및/또는 CDC 활성에 상승작용적 또는 추가적 효과를 제공하기 위하여 본원에 개시된 하나 이상의 Fc 변형과 조합될 수 있다. 다른 구체예에서, 본 발명은 396번 위치에 류신 및 255번 위치에 류신으로 아미노산 치환; 또는 396번 위치에 류신 및 419번 위치에 히스티딘으로 아미노산 치환; 396번 위치에 류신 및 370번 위치에 글루탐산으로 아미노산 치환; 396번 위치에 류신 및 240번 위치에 알라닌으로 아미노산 치환; 396번 위치에 류신 및 392번 위치에 트레오닌으로 아미노산 치환; 247번 위치에 류신 및 421번 위치에 리신으로 아미노산 치환을 포함한 변경된 C1q 결합 및/또는 보체 의존성 세포독성(CDC)을 가진 FC 변이체를 포함한다. 본 발명은 각각이 본원에 전부 참고문헌으로 포함된 문헌(Idusogie et al., 2001, J. Immunol. 166(4) 2571-5; Idusogie et al., J. Immunol. 2000 164(8):4178-4184)에 개시된 것들과 같은 C1q 변경 및/또는 보체 의존성 세포독성(CDC) 기능

을 변경하는 Fc 영역의 임의의 공지된 변형을 포함한다.

[0244] 상기에 개시된 바와 같이, 본 발명은 변경된 작동자 기능, 예를 들면 변형된 C1q 결합 및/또는 FcR 결합 및 그 결과로써 변경된 CDC 활성 및/또는 ADCC 활성을 가진 Fc 영역을 포함한다. 특정 구체예에서, 본 발명은 개선된 C1q 결합 및 개선된 Fc γ RIII 결합, 예를 들면 개선된 ADCC 활성 및 개선된 CDC 활성 모두를 가진 변이체 Fc 영역을 포함한다. 대안적 구체예에서, 본 발명은 감소된 CDC 활성 및/또는 감소된 ADCC 활성을 가진 변이체 Fc 영역을 포함한다. 다른 구체예에서, 예를 들면 개선된 ADCC 활성 그러나 감소된 CDC 활성, 그리고 그 반대를 가진 Fc 영역 변이체를 발생시키기 위해서, 이들 활성들 중 단지 하나를 증가시키고, 선택적으로 또한 다른 활성을 감소시킬 수 있다.

[0245] **A. Fc γ RIIIA 및/또는 Fc γ RIIA에 대한 향상된 변경된 친화력을 가진 돌연변이체**

[0246] 본 발명은 하나 이상의 영역에서 활성화 Fc γ R에 대한 변이체 Fc 영역의 친화력을 변경하는 하나 이상의 아미노산 변형(예를 들면, 치환)을 가진 변이체 Fc 영역을 포함한 분자를 포함한다. 일부 구체예에서, 본 발명의 분자는 하나 이상의 영역에 Fc γ RIIIA 및/또는 Fc γ RIIA에 대한 변이체 Fc 영역의 친화력을 야생형 Fc 영역을 포함한 대비되는 분자에 비해서 2배 이상 증가시킨 하나 이상의 변형(예를 들면, 치환)을 가진 변이체 Fc 영역을 포함한다. 다른 특정 구체예에서, 본 발명의 분자는 하나 이상의 영역에 Fc γ RIIIA 및/또는 Fc γ RIIA에 대한 변이체 Fc 영역의 친화력을 야생형 Fc 영역을 포함한 대비되는 분자에 비해서 2배보다 크게 증가시킨 하나 이상의 변형(예를 들면, 치환)을 가진 변이체 Fc 영역을 포함한다. 본 발명의 다른 구체예에서, 하나 이상의 아미노산 변형은 Fc γ RIIA 및/또는 Fc γ RIIA에 대한 변이체 Fc 영역의 친화력을 야생형 Fc 영역을 포함한 대비되는 분자에 비해서 3배, 4배, 5배, 6배, 8배 또는 10배 이상 증가시킨다. 본 발명의 또 다른 구체예에서, 하나 이상의 아미노산 변형은 Fc γ RIIA 및/또는 Fc γ RIIA에 대한 변이체 Fc 영역의 친화력을 야생형 Fc 영역을 포함한 대비되는 분자에 비해서 3배, 4배, 5배, 6배, 8배 또는 10배 이상 감소시킨다. 이러한 배 증가는 바람직하게는 ELISA 또는 표면 플라즈몬 공명 분석에 의하여 결정된다. 특정 구체예에서, 하나 이상의 아미노산 변형은 329, 331, 또는 322번 위치 중 어느 하나에 임의의 아미노산으로 치환하는 것을 포함하지 않거나 단독 치환이 아니다. 특정 구체예에서, 하나 이상의 아미노산 변형은 256, 290, 298, 312, 333, 334, 359, 360, 또는 430번 위치에 알라닌; 330번 위치에 리신; 339번 위치에 트레오닌; 320번 위치에 메티오닌; 326번 위치에 세린, 아스파라긴. 아스파르트산, 또는 글루탐산; 334번 위치에 글루타민, 글루탐산, 메티오닌, 히스티딘, 발린, 또는 류신 중 어느 하나로 치환하는 것을 포함하지 않거나 단독 치환이 아니다. 다른 특정 구체예에서, 하나 이상의 아미노산 변형은 280, 290, 300, 294, 또는 295번 위치 중 어느 것에 치환을 포함하지 않거나 단독 치환이 아니다. 다른 더 특정 구체예에서, 300번 위치에서 류신 또는 이소류신; 295번 위치에서 리신; 294번 위치에서 아스파라긴; 298번 위치에서 발린; 아스파르트산 프롤린, 아스파라긴, 또는 발린; 280번 위치에서 히스티딘, 글루타민 또는 티로신; 290번 위치에서 세린, 글리신, 트레오닌 또는 티로신으로 치환하는 것을 포함하지 않고, 단독 치환이 아니다.

[0247] 다른 특정 구체예에서, 본 발명은 야생형 Fc 영역에 비해서 하나 이상의 아미노산 변형을 포함한 변이체 Fc 영역을 포함한 분자를 포함하여, 상기 폴리펩티드는 야생형 Fc 영역을 포함한 대비되는 분자보다 더 큰 친화력으로 Fc γ RIIA에 특이적으로 결합하며, 단 상기 변이체 Fc 영역은 256, 290, 326, 255, 258, 267, 272, 276, 280, 283, 285, 286, 331, 337, 268, 272, 또는 430번 위치 중 어느 것에서 알라닌; 268번 위치에서 아스파라긴; 272번 위치에서 글루타민; 286번 위치에서 글루타민, 세린, 또는 아스파르트산; 290번 위치에서 세린; 320번 위치에서 메티오닌, 글루타민, 글루탐산, 또는 아르기닌; 322번 위치에서 글루탐산; 326번 위치에서 세린, 글루탐산, 또는 아스파르트산; 330번 위치에서 리신; 335번 위치에서 글루타민; 301번 위치에서 메티오닌을 가지지 않는다. 특정 구체예에서, 본 발명의 분자는 하나 이상의 영역에 야생형 Fc 영역을 포함한 친화력을 증가시키는 하나 이상의 아미노산 변형(예를 들면, 치환)을 가진 변이체 Fc 영역을 포함한다. 다른 특정 구체예에서, 본 발명의 분자는 하나 이상의 영역에 야생형 Fc 영역을 포함한 대비되는 분자에 비해서 2배보다 크게 Fc γ RIIA에 대한 변이체 Fc 영역의 친화력을 증가시키는 하나 이상의 아미노산 변형(예를 들면, 치환)을 가지는 변이체 Fc 영역을 포함한다. 본 발명의 다른 구체예에서, 하나 이상의 아미노산 변형은 야생형 Fc 영역을 포함한 대비되는 분자에 비해서 3배, 4배, 5배, 6배, 8배, 또는 10배 이상 Fc γ RIIA에 대한 변이체 Fc 영역의 친화력을 증가시킨다.

[0248] 특정 구체예에서, 본 발명은 야생형 Fc 영역을 포함한 대비되는 분자에 비해서 65% 이상, 70% 이상, 75% 이상, 85% 이상, 99% 이상, 100% 이상, 150% 이상, 및 200% 이상 Fc γ RIIIA 및/또는 Fc γ RIIA에 대한 변이체 Fc 영역의 친화력을 증가시키는 아미노산 변형(예를 들면, 치환 그러나 또한 삽입 또는 결실을 포함)을 가진 변이체 Fc 영역을 포함한 분자, 바람직하게는 폴리펩티드, 및 더 바람직하게는 면역글로불린(예를 들면, 항체)을

포함한다.

[0249]

특정 구체예에서, 변이체 Fc 영역의 친화력을 증가시킨 하나 이상의 아미노산 변형은 347번 위치에서 히스티딘 및 339번 위치에서 발린으로 치환; 또는 425번 위치에서 이소류신 및 215번 위치에서 페닐알라닌으로의 치환; 또는 408번 위치에서 이소류신, 215번 위치에서 이소류신, 및 125번 위치에서 류신으로의 치환; 또는 385번 위치에서 글루탐산 및 247번 위치에서 히스티딘으로의 치환; 또는 348번 위치에서 메티오닌, 334번 위치에서 아스파라긴, 275번 위치에서 이소류신, 202번 위치에서 메티오닌, 및 147번 위치에서 트레오닌으로의 치환; 또는 275번 위치에서 이소류신, 334번 위치에서 아스파라긴, 및 348번 위치에서 메티오닌으로의 치환; 또는 279번 위치에서 류신 및 395번 위치에서 세린으로의 치환; 또는 246번 위치에서 트레오닌 및 319번 위치에서 페닐알라닌으로의 치환; 또는 243번 위치에서 이소류신 및 379번 위치에서 류신으로의 치환; 또는 243번 위치에서 류신, 255번 위치에서 류신 및 318번 위치에서 리신으로의 치환; 또는 334번 위치에서 글루탐산, 359번 위치에서 아스파라긴, 및 366번 위치에서 세린으로의 치환; 또는 288번 위치에서 메티오닌 및 334번 위치에서 글루탐산으로의 치환; 또는 334번 위치에서 글루탐산 및 380번 위치에서 아스파르트산으로의 치환; 또는 256번 위치에서 세린, 305번 위치에서 이소류신, 334번 위치에서 글루탐산 및 390번 위치에서 세린으로의 치환; 또는 335번 위치에서 아스파라긴, 370번 위치에서 글루탐산, 378번 위치에서 발린, 394번 위치에서 메티오닌, 및 424번 위치에서 류신으로의 치환; 또는 233번 위치에서 아스파르트산 및 334번 위치에서 글루탐산으로의 치환; 또는 334번 위치에서 글루탐산, 359번 위치에서 아스파라긴, 366번 위치에서 세린, 및 386번 위치에서 아르기닌으로의 치환; 또는 246번 위치에서 트레오닌 및 396번 위치에서 히스티딘으로의 치환; 또는 268번 위치에서 아스파르트산 및 318번 위치에서 아스파르트산으로의 치환; 또는 288번 위치에서 아스파라긴, 330번 위치에서 세린, 및 396번 위치에서 류신으로의 치환; 또는 244번 위치에서 히스티딘, 358번 위치에서 메티오닌, 379번 위치에서 메티오닌, 384번 위치에서 리신 및 397번 위치에서 메티오닌; 또는 217번 위치에서 세린, 378번 위치에 발린, 및 408번 위치에서 아르기닌으로의 치환; 또는 247번 위치에서 류신, 253번 위치에서 아스파라긴, 및 334번 위치에서 아스파라긴으로의 치환; 또는 246번 위치에서 이소류신, 및 334번 위치에서 아스파라긴으로의 치환; 또는 320번 위치에서 글루탐산 및 326번 위치에서 글루탐산으로의 치환; 또는 375번 위치에서 시스테인 및 396번 위치에서 류신으로의 치환을 포함한다. 시험관내에서 Fc γ R11A에 대한 향상된 친화력을 야기하는 다른 아미노산 치환의 예는 하기에 개시되고 표5에 요약된다.

[0250]

본 발명은 변이체 Fc 영역을 포함한 분자를 포함하고, 상기 변이체 Fc 영역은 243번 위치에서 이소류신 및 379번 위치에서 류신으로의 치환을 포함하여, ELISA 분석에 의하여 결정할 때, 상기 분자는 야생형 Fc 영역을 포함한 대비되는 분자가 Fc γ R11A에 결합하는 것보다 1.5배 더 높은 친화력으로 Fc γ R11A에 결합한다. 특정 구체예에서, 본 발명은 변이체 Fc 영역을 포함한 분자를 포함하고, 상기 변이체 Fc 영역은 288번 위치에서 아스파라긴, 330번 위치에서 세린, 및 396번 위치에서 류신으로의 치환을 포함하여, ELISA 분석에 의하여 결정할 때, 상기 분자는 야생형 Fc 영역을 포함한 대비되는 분자가 Fc γ R11A에 결합하는 것보다 약 5배 더 높은 친화력으로 Fc γ R11A에 결합한다. 특정 구체예에서, 본 발명은 변이체 Fc 영역을 포함한 분자를 포함하고, 상기 변이체 Fc 영역은 243번 위치에서 류신 및 255번 위치에서 류신으로의 치환을 포함하여, ELISA 분석에 의하여 결정할 때 상기 분자는 야생형 Fc 영역을 포함한 대비되는 분자가 Fc γ R11A에 결합한 것보다 약 1배 더 높은 친화력으로 Fc γ R11A에 결합한다. 특정 구체예에서, 본 발명은 변이체 Fc 영역을 포함한 분자를 포함하고, 상기 변이체 Fc 영역은 334번 위치에서 글루탐산, 359번 위치에서 아스파라긴, 및 366번 위치에서 세린으로의 치환을 포함하여, ELISA 분석에 의하여 결정할 때, 상기 분자는 야생형 Fc 영역을 포함한 대비되는 분자가 Fc γ R11A에 결합한 것보다 약 1.5배 더 높은 친화력으로 Fc γ R11A에 결합한다. 특정 구체예에서, 본 발명은 변이체 Fc 영역을 포함한 분자를 포함하고, 상기 변이체 Fc 영역은 288번 위치에서 메티오닌 및 334번 위치에서 글루탐산으로의 치환을 포함하여, ELISA 분석에 의하여 결정할 때, 상기 분자는 야생형 Fc 영역을 포함한 대비되는 분자가 Fc γ R11A에 결합한 것보다 약 3배 더 높은 친화력으로 Fc γ R11A에 결합한다. 특정 구체예에서, 본 발명은 변이체 Fc 영역을 포함한 분자를 포함하고, 상기 변이체 Fc 영역은 316번 위치에서 아스파르트산, 378번 위치에서 발린, 및 399번 위치에서 글루탐산으로의 치환을 포함하여, ELISA 분석에 의하여 결정할 때, 상기 분자는 야생형 Fc 영역을 포함한 대비되는 분자가 Fc γ R11A에 결합한 것보다 약 1.5배 더 높은 친화력으로 Fc γ R11A에 결합한다. 특정 구체예에서, 본 발명은 변이체 Fc 영역을 포함한 분자를 포함하고, 상기 변이체 Fc 영역은 243번 위치에서 이소류신, 379번 위치에서 메티오닌, 및 399번 위치에서 글루탐산으로의 치환을 포함하여, ELISA 분석에 의하여 결정할 때, 상기 분자는 야생형 Fc 영역을 포함한 대비되는 분자가 Fc γ

RIIIA에 결합한 것보다 약 2.5배 더 높은 친화력으로 Fc γ RIIIA에 결합한다. 특정 구체예에서, 본 발명은 변이체 Fc 영역을 포함한 분자를 포함하고, 상기 변이체 Fc 영역은 247번 위치에서 류신, 및 421번 위치에서 리신으로의 치환한 것을 포함하여, ELISA 분석에 의하여 결정할 때, 상기 분자는 야생형 Fc 영역을 포함한 대비되는 분자가 Fc γ RIIIA에 결합한 것보다 약 3배 더 높은 친화력으로 Fc γ RIIIA에 결합한다. 특정 구체예에서, 본 발명은 변이체 Fc 영역을 포함한 분자를 포함하고, 상기 변이체 Fc 영역은 392번 위치에서 트레오닌 및 396번 위치에서 류신으로의 치환을 포함하여, ELISA 분석에 의하여 결정할 때, 상기 분자는 야생형 Fc 영역을 포함한 대비되는 분자가 Fc γ RIIIA에 결합한 것보다 약 4.5배 더 높은 친화력으로 Fc γ RIIIA에 결합한다. 특정 구체예에서, 본 발명은 변이체 Fc 영역을 포함한 분자를 포함하고, 상기 변이체 Fc 영역은 293번 위치에서 발린, 295번 위치에서 글루탐산, 및 327번 위치에서 트레오닌으로의 치환을 포함하여, ELISA 분석에 의하여 결정할 때, 상기 분자는 야생형 Fc 영역을 포함한 대비되는 분자가 Fc γ RIIIA에 결합한 것보다 약 1.5배 더 높은 친화력으로 Fc γ RIIIA에 결합한다. 특정 구체예에서, 본 발명은 변이체 Fc 영역을 포함한 분자를 포함하고, 상기 변이체 Fc 영역은 268번 위치에서 아스파라긴 및 396번 위치에서 류신으로의 치환을 포함하여, ELISA 분석에 의하여 결정할 때, 상기 분자는 야생형 Fc 영역을 포함한 대비되는 분자가 Fc γ RIIIA에 결합한 것보다 약 2배 더 높은 친화력으로 Fc γ RIIIA에 결합한다. 특정 구체예에서, 본 발명은 변이체 Fc 영역을 포함한 분자를 포함하고, 상기 변이체 Fc 영역은 319번 위치에서 페닐알라닌, 352번 위치에서 류신, 및 396번 위치에서 류신으로의 치환을 포함하여, ELISA 분석에 의하여 결정할 때, 상기 분자는 야생형 Fc 영역을 포함한 대비되는 분자가 Fc γ RIIIA에 결합한 것보다 약 2배 더 높은 친화력으로 Fc γ RIIIA에 결합한다.

[0251]

특정 구체예에서, 본 발명은 변이체 Fc 영역을 포함한 분리된 폴리펩티드를 포함하고, 상기 변이체 Fc 영역은 야생형 Fc 영역에 비해서 하나 이상의 아미노산 변형을 포함하여, 상기 폴리펩티드는 야생형 Fc 영역을 포함한 대비되는 폴리펩티드보다 더 큰 친화력으로 Fc γ RIIIA에 특이적으로 결합하며, 상기 하나 이상의 아미노산 변형은 396번 위치에서 히스티딘으로의 치환을 포함한다. 특정 구체예에서, 본 발명은 변이체 Fc 영역을 포함한 분리된 폴리펩티드를 포함하고, 상기 변이체 Fc 영역은 야생형 Fc 영역에 비해서 하나 이상의 아미노산 변형을 포함하여, 상기 폴리펩티드는 야생형 Fc 영역을 포함한 대비되는 폴리펩티드보다 더 큰 친화력으로 Fc γ RIIIA에 특이적으로 결합하며, 상기 하나 이상의 아미노산 변형은 248번 위치에서 메티오닌으로의 치환을 포함한다. 특정 구체예에서, 본 발명은 변이체 Fc 영역을 포함한 분리된 폴리펩티드를 포함하고, 상기 변이체 Fc 영역은 야생형 Fc 영역에 비해서 하나 이상의 아미노산 변형을 포함하여, 상기 폴리펩티드는 야생형 Fc 영역을 포함한 대비되는 폴리펩티드와 유사한 친화력으로 Fc γ RIIIA에 특이적으로 결합하며, 상기 하나 이상의 아미노산 변형은 392번 위치에서 아르기닌으로의 치환을 포함한다. 특정 구체예에서, 본 발명은 변이체 Fc 영역을 포함한 분리된 폴리펩티드를 포함하고, 상기 변이체 Fc 영역은 야생형 Fc 영역에 비해서 하나 이상의 아미노산 변형을 포함하여, 상기 폴리펩티드는 야생형 Fc 영역을 포함한 대비되는 폴리펩티드와 유사한 친화력으로 Fc γ RIIIA에 특이적으로 결합하며, 상기 하나 이상의 아미노산 변형은 315번 위치에서 이소류신으로의 치환을 포함한다. 특정 구체예에서, 본 발명은 변이체 Fc 영역을 포함한 분리된 폴리펩티드를 포함하고, 상기 변이체 Fc 영역은 야생형 Fc 영역에 비해서 하나 이상의 아미노산 변형을 포함하여, 상기 폴리펩티드는 야생형 Fc 영역을 포함한 대비되는 폴리펩티드와 유사한 친화력으로 Fc γ RIIIA에 특이적으로 결합하며, 상기 하나 이상의 아미노산 변형은 132번 위치에서 이소류신으로의 치환을 포함한다. 특정 구체예에서, 본 발명은 변이체 Fc 영역을 포함한 분리된 폴리펩티드를 포함하고, 상기 변이체 Fc 영역은 야생형 Fc 영역에 비해서 하나 이상의 아미노산 변형을 포함하여, 상기 폴리펩티드는 야생형 Fc 영역을 포함한 대비되는 폴리펩티드보다 큰 친화력으로 Fc γ RIIIA에 특이적으로 결합하며, 상기 하나 이상의 아미노산 변형은 162번 위치에서 발린으로의 치환을 포함한다. 특정 구체예에서, 본 발명은 변이체 Fc 영역을 포함한 분리된 폴리펩티드를 포함하고, 상기 변이체 Fc 영역은 야생형 Fc 영역에 비해서 하나 이상의 아미노산 변형을 포함하여, 상기 폴리펩티드는 야생형 Fc 영역을 포함한 대비되는 폴리펩티드보다 큰 친화력으로 Fc γ RIIIA에 특이적으로 결합하며, 상기 하나 이상의 아미노산 변형은 379번 위치에서 메티오닌으로의 치환을 포함한다. 특정 구체예에서, 본 발명은 변이체 Fc 영역을 포함한 분리된 폴리펩티드를 포함하고, 상기 변이체 Fc 영역은 야생형 Fc 영역에 비해서 하나 이상의 아미노산 변형을 포함하여, 상기 폴리펩티드는 야생형 Fc 영역을 포함한 대비되는 폴리펩티드보다 큰 친화력으로 Fc γ RIIIA에 특이적으로 결합하며, 상기 하나 이상의 아미노산 변형은 219번 위치에서 티로신으로의 치환을 포함한다. 특정 구체예에서, 본 발명은 변이체 Fc 영역을 포함한 분리된 폴리펩티드를 포함하고, 상기 변이체 Fc 영역은 야생형 Fc 영역에 비해서 하나 이상의 아미노산 변형을 포함하여, 상기 폴리펩티드는 야생형

함하고, 상기 변이체 Fc 영역은 야생형 Fc 영역에 비해서 하나 이상의 아미노산 변형을 포함하여, 상기 폴리펩티드는 야생형 Fc 영역을 포함한 대비되는 폴리펩티드보다 큰 친화력으로 Fc γ R11A에 특이적으로 결합하며, 상기 하나 이상의 아미노산 변형은 372번 위치에서 티로신으로의 치환을 포함한다. 본 발명은 변이체 Fc 영역을 포함한 분리된 폴리펩티드를 포함하고, 상기 변이체 Fc 영역은 야생형 Fc 영역에 비해서 하나 이상의 아미노산 변형을 포함하여, 상기 폴리펩티드는 야생형 Fc 영역을 포함한 대비되는 폴리펩티드와 유사한 친화력으로 Fc γ R11A에 특이적으로 결합하며, 상기 하나 이상의 아미노산 변형은 366번 위치에서 아스파라긴으로의 치환을 포함한다. 본 발명은 변이체 Fc 영역을 포함한 분리된 폴리펩티드를 포함하고, 상기 변이체 Fc 영역은 야생형 Fc 영역에 비해서 하나 이상의 아미노산 변형을 포함하여, 상기 폴리펩티드는 야생형 Fc 영역을 포함한 대비되는 폴리펩티드보다 감소된 친화력으로 Fc γ R11A에 특이적으로 결합하며, 상기 하나 이상의 아미노산 변형은 414번 위치에서 아스파라긴으로의 치환을 포함한다. 본 발명은 변이체 Fc 영역을 포함한 분리된 폴리펩티드를 포함하고, 상기 변이체 Fc 영역은 야생형 Fc 영역에 비해서 하나 이상의 아미노산 변형을 포함하여, 상기 폴리펩티드는 야생형 Fc 영역을 포함한 대비되는 폴리펩티드보다 감소된 친화력으로 Fc γ R11A에 특이적으로 결합하며, 상기 하나 이상의 아미노산 변형은 225번 위치에서 세린으로의 치환을 포함한다. 본 발명은 변이체 Fc 영역을 포함한 분리된 폴리펩티드를 포함하고, 상기 변이체 Fc 영역은 야생형 Fc 영역에 비해서 하나 이상의 아미노산 변형을 포함하여, 상기 폴리펩티드는 야생형 Fc 영역을 포함한 대비되는 폴리펩티드보다 감소된 친화력으로 Fc γ R11A에 특이적으로 결합하며, 상기 하나 이상의 아미노산 변형은 377번 위치에서 아스파라긴으로의 치환을 포함한다.

[0253] 특정 구체예에서, 본 발명은 변이체 Fc 영역을 포함한 분리된 폴리펩티드를 포함하고, 상기 변이체 Fc 영역은 야생형 Fc 영역에 비해서 하나 이상의 아미노산 변형을 포함하여, ELISA 분석에 의하여 결정할 때, 상기 폴리펩티드는 야생형 Fc 영역을 포함한 대비되는 폴리펩티드보다 약 2배 더 큰 친화력으로 Fc γ R11A에 특이적으로 결합하며, 상기 하나 이상의 아미노산 변형은 379번 위치에서 메티오닌으로의 치환을 포함한다. 다른 특정 구체예에서, 본 발명은 변이체 Fc 영역을 포함한 분리된 폴리펩티드를 포함하고, 상기 변이체 Fc 영역은 야생형 Fc 영역에 비해서 하나 이상의 아미노산 변형을 포함하여, ELISA 분석에 의하여 결정할 때, 상기 폴리펩티드는 야생형 Fc 영역을 포함한 대비되는 폴리펩티드보다 약 1.5배 더 큰 친화력으로 Fc γ R11A에 특이적으로 결합하며, 상기 하나 이상의 아미노산 변형은 248번 위치에서 메티오닌으로의 치환을 포함한다.

[0254] 일부 구체예에서, 본 발명의 분자는, 한정하는 것은 아니지만, ELISA 분석, 표면 플라즈몬 공명 분석, 면역침전 분석을 포함한 Fc-Fc γ R 상호작용, 즉 Fc γ R에 대한 Fc 영역의 특이적 결합을 결정하기 위하여 당업계에 공지된 시험관내 분석을 사용하여 결정할 때 Fc γ R11A 및/또는 Fc γ R11A에 대한 변경된 친화력을 가진다(섹션 5.2.1 참조). 바람직하게는, 활성화 Fc γ R 수용체에 대한 변경된 친화력을 가진 이들 분자들의 결합 특성은 또한 하나 이상의 Fc γ R 매개자 작동자 세포 기능을 결정하기 위하여 시험관내 기능 분석에 의하여 결정된 이들 활성화 서로 관련되는데(섹션 5.2.6 참조), 예를 들면, Fc γ R11A에 대한 향상된 친화력을 가진 변이체 Fc 영역을 가진 분자는 향상된 ADCC 활성을 가진다. 가장 바람직한 구체예에서, 시험관내 분석에서 활성화 Fc 수용체, 예를 들면 Fc γ R11A에 대한 변경된 결합 특성을 가진 본 발명의 분자는 또한 생체내 모델(예를 들면, 본원에 설명되고 개시된 것들)에서 변경된 결합 특성을 가진다. 그러나, 본 발명은 시험관내 기초 분석에서 변경된 Fc γ R 결합을 나타내지 않지만, 생체내에서 원하는 표현형을 나타내는 본 발명의 분자를 배제하지 않는다.

[0255] **B. Fc γ R11A에 대한 향상된 친화력 및 Fc γ R11B에 대한 감소된 친화력 또는 어떤 친화력도 없는 돌연변이체**

[0256] 특정 구체예에서, 본 발명의 분자는 야생형 친화력으로 Fc γ R11A 및 Fc γ R11B에 결합하는 야생형 Fc 영역을 포함한 대비되는 분자에 비해서, 하나 이상의 영역에서 Fc γ R11A에 대한 변이체 Fc 영역의 친화력을 증가시키고 Fc γ R11B에 대한 변이체 Fc 영역의 친화력을 감소시키는 하나 이상의 아미노산 변형(즉, 치환)을 가진 변이체 Fc 영역을 포함한다. 특정 구체예에서, 하나 이상의 아미노산 변형은 256, 298, 333, 334, 280, 290, 294, 298, 또는 296번 위치 중 어느 것에서 알라닌으로의 치환; 또는 298번 위치에서 아스파라긴, 발린, 아스파르트산, 또는 프롤린으로의 치환; 또는 290번 위치에서 세린으로의 치환을 포함하지 않거나 단독 치환이 아니다. 특정 구체예에서, 하나 이상의 아미노산 변형은 Fc γ R11A에 대한 변이체 Fc 영역의 친화력을 65% 이상, 70% 이상, 75% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 95% 이상, 99% 이상, 100% 이상, 200% 이상, 300% 이상, 400% 이상 증가시키고, Fc γ R11B에 대한 변이체 Fc 영역의 친화력을 65% 이상, 70% 이상, 75% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 95% 이상, 99% 이상, 100% 이상, 200% 이상, 300% 이상, 400% 이상 감소시킨다.

[0257] 특정 구체예에서, 변이체 Fc 영역을 운반하는 ch-4-4-20 항체를 사용한 ELISA 분석 및/또는 ADCC 기초 분석에 기초하여 결정된, Fc γ R11A에 대한 향상된 친화력 및 Fc γ R11B에 대한 감소된 친화력 또는 어떤 친화력도 없는 변이체 Fc 영역을 포함한 본 발명의 분자는 275번 위치에서 이소류신, 334번 위치에서 아스파라긴, 및 348번 위

치에서 메티오닌 중 어느 하나에서의 치환; 279번 위치에서 류신 및 395번 위치에서 세린으로의 치환; 또는 246번 위치에서 트레오닌 및 319번 위치에서 페닐알라닌으로의 치환; 또는 243번 위치에서 류신, 255번 위치에서 류신, 및 318번 위치에서 리신으로의 치환; 또는 334번 위치에서 글루탐산, 359번 위치에서 아스파라긴 및 366번 위치에서 세린으로의 치환; 또는 334번 위치에서 글루탐산 및 380번 위치에서 아스파르트산으로의 치환; 256번 위치에서 세린, 305번 위치에서 이소류신, 334번 위치에서 글루탐산, 및 390번 위치에서 세린으로의 치환; 또는 335번 위치에서 아스파라긴, 370번 위치에서 글루탐산, 378번 위치에서 발린, 394번 위치에서 메티오닌 및 424번 위치에서 류신으로의 치환; 또는 233번 위치에서 아스파르트산 및 334번 위치에서 글루탐산으로의 치환; 또는 334번 위치에서 글루탐산, 359번 위치에서 아스파라긴, 366번 위치에서 세린 및 386번 위치에서 아르기닌으로의 치환; 또는 312번 위치에서 글루탐산, 327번 위치에서 아스파라긴, 및 378번 위치에서 세린으로의 치환; 또는 288번 위치에서 아스파라긴 및 326번 위치에서 아스파라긴으로의 치환; 또는 247번 위치에서 류신 및 421번 위치에서 리신으로의 치환; 또는 298번 위치에서 아스파라긴 및 381번 위치에서 아르기닌으로의 치환; 또는 280번 위치에서 글루탐산, 354번 위치에서 페닐알라닌, 431번 위치에서 아스파르트산, 및 441번 위치에서 이소류신으로의 치환; 또는 255번 위치에서 글루타민 및 326번 위치에서 글루탐산으로의 치환; 또는 218번 위치에서 아르기닌, 281번 위치에서 아스파르트산 및 385번 위치에서 아르기닌으로의 치환; 또는 247번 위치에서 류신, 330번 위치에서 트레오닌 및 440번 위치에서 글리신으로의 치환; 또는 284번 위치에서 알라닌 및 372번 위치에서 류신으로의 치환; 또는 335번 위치에서 아스파라긴, 387번 위치에서 세린 및 435번 위치에서 글루타민으로의 치환; 또는 247번 위치에서 류신, 431번 위치에서 발린 및 442번 위치에서 페닐알라닌으로의 치환을 포함한다.

[0258] 특정 구체예에서, 변이체 Fc 영역을 운반하는 ch-4-4-20 항체를 사용한 ELISA 분석 및/또는 ADCC 기초 분석에 기초하여 결정된, Fc γ RIIIA에 대한 향상된 친화력 및 Fc γ RIIB에 대한 감소된 친화력 또는 어떤 친화력도 없는 변이체 Fc 영역을 포함한 본 발명의 분자는 379번 위치에서 메티오닌; 219번 위치에서 티로신; 282번 위치에서 메티오닌; 401번 위치에서 발린; 222번 위치에서 아스파라긴; 334번 위치에서 이소류신; 334번 위치에서 글루탐산; 275번 위치에서 티로신; 398번 위치에서 발린으로의 치환을 포함한다.

[0259] 본 발명은 변이체 Fc 영역을 포함한 분리된 폴리펩티드를 포함하고, 상기 변이체 Fc 영역은 야생형 Fc 영역에 비해서 하나 이상의 아미노산 변형을 포함하여, ELISA 분석으로 결정할 때 상기 폴리펩티드는 야생형 Fc 영역을 포함한 대비되는 폴리펩티드보다 약 3배 더 낮은 친화력으로 특이적으로 Fc γ RIIB에 결합하며, 상기 하나 이상의 아미노산 변형은 288번 위치에서 아스파라긴, 330번 위치에서 세린, 및 396번 위치에서 류신으로의 치환을 포함한다. 본 발명은 변이체 Fc 영역을 포함한 분리된 폴리펩티드를 포함하고, 상기 변이체 Fc 영역은 야생형 Fc 영역에 비해서 하나 이상의 아미노산 변형을 포함하여, ELISA 분석으로 결정할 때 상기 폴리펩티드는 야생형 Fc 영역을 포함한 대비되는 폴리펩티드보다 약 10-15배 더 낮은 친화력으로 특이적으로 Fc γ RIIB에 결합하며, 상기 하나 이상의 아미노산 변형은 316번 위치에서 아스파르트산, 378번 위치에서 발린, 및 399번 위치에서 글루탐산으로의 치환을 포함한다. 본 발명은 변이체 Fc 영역을 포함한 분리된 폴리펩티드를 포함하고, 상기 변이체 Fc 영역은 야생형 Fc 영역에 비해서 하나 이상의 아미노산 변형을 포함하여, ELISA 분석으로 결정할 때 상기 폴리펩티드는 야생형 Fc 영역을 포함한 대비되는 폴리펩티드보다 약 10배 더 낮은 친화력으로 특이적으로 Fc γ RIIB에 결합하며, 상기 하나 이상의 아미노산 변형은 315번 위치에서 이소류신, 379번 위치에서 메티오닌, 및 399번 위치에서 글루탐산으로의 치환을 포함한다. 본 발명은 변이체 Fc 영역을 포함한 분리된 폴리펩티드를 포함하고, 상기 변이체 Fc 영역은 야생형 Fc 영역에 비해서 하나 이상의 아미노산 변형을 포함하여, ELISA 분석으로 결정할 때 상기 폴리펩티드는 야생형 Fc 영역을 포함한 대비되는 폴리펩티드보다 약 7배 더 낮은 친화력으로 특이적으로 Fc γ RIIB에 결합하며, 상기 하나 이상의 아미노산 변형은 243번 위치에서 이소류신, 379번 위치에서 류신, 및 420번 위치에서 발린으로의 치환을 포함한다. 본 발명은 변이체 Fc 영역을 포함한 분리된 폴리펩티드를 포함하고, 상기 변이체 Fc 영역은 야생형 Fc 영역에 비해서 하나 이상의 아미노산 변형을 포함하여, ELISA 분석으로 결정할 때 상기 폴리펩티드는 야생형 Fc 영역을 포함한 대비되는 폴리펩티드보다 약 3배 더 낮은 친화력으로 특이적으로 Fc γ RIIB에 결합하며, 상기 하나 이상의 아미노산 변형은 392번 위치에서 트레오닌 및 396번 위치에서 류신으로의 치환을 포함한다. 본 발명은 변이체 Fc 영역을 포함한 분리된 폴리펩티드를 포함하고, 상기 변이체 Fc 영역은 야생형 Fc 영역에 비해서 하나 이상의 아미노산 변형을 포함하여, ELISA 분석으로 결정할 때 상기 폴리펩티드는 야생형 Fc 영역을 포함한 대비되는 폴리펩티드보다 약 5배 더 낮은 친화력으로 특이적으로 Fc γ RIIB에 결합하며, 상기 하나 이상의 아미노산 변형은 268번 위치에서 아스파라긴 및 396번 위치에서 류신으로의 치환을 포함한다. 본 발명은 변이체 Fc 영역을 포함한 분리된 폴리펩티드를 포함하고, 상기 변이체 Fc 영역은 야생형 Fc 영역에 비해서 하나 이상의 아미노산 변형을 포함하여, ELISA 분석으로 결정할 때 상기 폴리펩티드는 야생형 Fc 영역을 포함한 대비되는 폴리펩티드보다 약 2배 더 낮은 친화력으로 특이적으로 Fc γ RIIB에 결합하며, 상기 하나 이상의 아미노산 변형은 319번 위치에서 페닐알라닌, 352번 위치에서 류신, 및 396번 위치

에서 류신으로의 치환을 포함한다.

[0260] **C. Fc γ RIIIA 및 Fc γ RIIB에 대한 향상된 친화력을 가진 돌연변이체**

[0261] 본 발명은 Fc γ RIIIA 및 Fc γ RIIB에 대한 변이체 Fc 영역의 친화력을 65% 이상, 70% 이상, 75% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 95% 이상, 99%, 100% 이상, 200% 이상, 300% 이상, 400% 이상 증가시키고, Fc γ RIIB에 대한 변이체 Fc γ RIIB에 대한 변이체 Fc 영역의 친화력을 65% 이상, 70% 이상, 75% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 95% 이상, 99% 이상, 100% 이상, 200% 이상, 300% 이상, 400% 이상 감소시키는 하나 이상의 아미노산 변형을 가진 변이체 Fc 영역을 포함한 분자를 포함한다. 특정 구체예에서, (본원에 설명된 변이체 Fc 영역을 운반하는 ch-4-4-20 항체를 사용한 ELISA 분석 및/또는 ADCC 기초 분석에 기초하여 결정된) Fc γ RIIIA에 대한 향상된 친화력 및 Fc γ RIIB에 대한 향상된 친화력을 가진 변이체 Fc 영역을 포함한 본 발명의 분자는 415번 위치에서 이소류신 및 251번 위치에서 페닐알라닌으로의 치환; 또는 399번 위치에서 글루탐산, 292번 위치에서 류신, 및 185번 위치에서 메티오닌으로의 치환; 또는 408번 위치에서 이소류신, 215번 위치에서 이소류신, 및 125번 위치에서 류신으로의 치환; 또는 385번 위치에서 글루탐산 및 247번 위치에서 히스티딘으로의 치환; 또는 348번 위치에서 메티오닌, 334번 위치에서 아스파라긴, 275번 위치에서 이소류신, 202번 위치에서 메티오닌 및 147번 위치에서 트레오닌으로의 치환; 또는 246번 위치에서 트레오닌 및 396번 위치에서 히스티딘으로의 치환; 또는 268번 위치에서 아스파르트산 및 318번 위치에서 아스파르트산으로의 치환; 또는 288번 위치에서 아스파라긴, 330번 위치에서 세린 및 396번 위치에서 류신으로의 치환; 또는 244번 위치에서 히스티딘, 358번 위치에서 메티오닌, 379번 위치에서 메티오닌, 384번 위치에서 리신 및 397번 위치에서 메티오닌으로의 치환; 또는 217번 위치에서 세린, 378번 위치에서 발린, 및 408번 위치에서 아르기닌으로의 치환; 또한 247번 위치에서 류신, 253번 위치에서 아스파라긴, 및 334번 위치에서 아스파라긴으로의 치환; 또는 246번 위치에서 이소류신 및 334번 위치에 아스파라긴으로의 치환; 또는 320번 위치에서 글루탐산 및 326번 위치에서 글루탐산으로의 치환; 375번 위치에서 시스테인 및 396번 위치에서 류신으로의 치환; 또는 343번 위치에서 세린, 353번 위치에서 류신, 375번 위치에서 이소류신, 383번 위치에서 아스파라긴으로의 치환; 또는 394번 위치에서 메티오닌 및 397번 위치에서 메티오닌으로의 치환; 또는 216번 위치에서 아스파르트산, 345번 위치에서 리신 및 375번 위치에서 이소류신으로의 치환; 또는 288번 위치에서 아스파라긴, 330번 위치에서 세린, 396번 위치에서 류신으로의 치환; 또는 247번 위치에서 류신, 389번 위치에서 글리신으로의 치환; 또는 222번 위치에서 아스파라긴, 335번 위치에서 아스파라긴, 370번 위치에서 글루탐산, 378번 위치에서 발린 394번 위치에서 메티오닌으로의 치환; 또는 316번 위치에서 아스파르트산, 378번 위치에서 발린, 399번 위치에서 글루탐산; 또는 315번 위치에서 이소류신, 379번 위치에서 메티오닌, 394번 위치에서 메티오닌으로의 치환; 또는 290번 위치에서 트레오닌, 371번 위치에서 아스파르트산으로의 치환; 또는 247번 위치에서 류신, 398번 위치에서 글루타민으로의 치환; 또는 326번 위치에서 글루타민; 334번 위치에서 글루탐산, 359번 위치에서 아스파라긴, 366번 위치에서 세린으로의 치환; 또는 247번 위치에서 류신 및 377번 위치에서 페닐알라닌으로의 치환; 또는 378번 위치에서 발린, 390번 위치에서 이소류신, 422번 위치에서 이소류신으로의 치환; 또는 326번 위치에서 글루탐산, 385번 위치에서 글루탐산으로의 치환; 또는 282번 위치에서 글루탐산, 369번 위치에서 이소류신, 406번 위치에서 페닐알라닌으로의 치환; 또는 397번 위치에서 메티오닌; 411번 위치에서 알라닌, 415번 위치에서 아스파라긴으로의 치환; 또는 223번 위치에서 이소류신, 256번 위치에서 세린, 406번 위치에서 페닐알라닌으로의 치환; 또는 298번 위치에서 아스파라긴, 407번 위치에서 아르기닌으로의 치환; 또는 246번 위치에서 아르기닌, 298번 위치에서 아스파라긴, 377번 위치에서 페닐알라닌으로의 치환; 또는 235번 위치에서 프롤린, 382번 위치에서 메티오닌, 304번 위치에서 글리신, 305번 위치에서 이소류신, 323번 위치에서 이소류신으로의 치환; 또는 247번 위치에서 류신, 313번 위치에서 아르기닌, 388번 위치에서 글리신으로의 치환; 또는 221번 위치에서 티로신, 252번 위치에서 이소류신, 330번 위치에서 글리신, 339번 위치에서 트레오닌, 359번 위치에서 아스파라긴, 422번 위치에서 이소류신, 433번 위치에서 류신으로의 치환; 또는 258번 위치에서 아스파르트산, 384번 위치에서 리신으로의 치환; 241번 위치에서 류신 및 258번 위치에서 글리신으로의 치환; 또는 370번 위치에서 아스파라긴 및 440번 위치에서 아스파라긴으로의 치환; 또는 317번 위치에서 아스파라긴으로의 치환 및 423번 위치에서 결실; 또는 243번 위치에서 이소류신, 379번 위치에서 류신 및 420번 위치에서 발린으로의 치환; 또는 227번 위치에서 세린 및 290번 위치에서 글루탐산으로의 치환; 또는 231번 위치에서 발린, 386번 위치에서 히스티딘, 및 412번 위치에서 메티오닌으로의 치환; 또는 215번 위치에서 프롤린, 274번 위치에서 아스파라긴, 287번 위치에서 글리신, 334번 위치에서 아스파라긴, 365번 위치에서 발린, 및 396번 위치에서 류신으로의 치환; 또는 293번 위치에서 발린, 295번 위치에서 글루탐산, 및 327번 위치에서 트레오닌으로의 치환; 319번 위치에서 페닐알라닌, 352번 위치에서 류신, 및 396번 위치에서 류신으로의 치환; 또는 392번 위치에서 트레오닌, 및 396번 위치에서 류신으로의 치환; 268번 위치에서 아스파라긴, 및 396번 위치에서 류신으로의 치환; 또는 290번 위치에서 트레오닌, 390번 위치에서 이소류신, 및 396번 위치

에서 류신으로의 치환; 또는 326번 위치에서 이소류신, 및 396번 위치에서 류신으로의 치환; 또는 268번 위치에서 아스파르트산, 396번 위치에서 류신으로의 치환; 또는 210번 위치에서 메티오닌, 및 396번 위치에서 류신으로의 치환; 또는 358번 위치에서 프롤린, 및 396번 위치에서 류신으로의 치환; 또는 288번 위치에서 아르기닌, 307번 위치에서 알라닌, 344번 위치에서 글루탐산, 및 396번 위치에서 류신; 또는 273번 위치에서 이소류신, 326번 위치에서 글루탐산, 328번 위치에서 이소류신, 및 396번 위치에서 류신으로의 치환; 또는 326번 위치에서 이소류신, 408번 위치에서 아스파라긴, 및 396번 위치에서 류신으로의 치환; 또는 334번 위치에서 아스파라긴, 및 396번 위치에서 류신으로의 치환; 또는 379번 위치에서 메티오닌, 및 396번 위치에서 류신으로의 치환; 또는 227번 위치에서 세린, 및 396번 위치에서 류신으로의 치환; 또는 217번 위치에서 세린, 및 396번 위치에서 류신으로의 치환; 또는 261번 위치에서 아스파라긴, 210번 위치에서 메티오닌, 및 396번 위치에서 류신으로의 치환; 또는 419번 위치에서 히스티딘, 및 396번 위치에서 류신으로의 치환; 또는 370번 위치에서 글루탐산, 및 396번 위치에서 류신으로의 치환; 또는 242번 위치에서 페닐알라닌, 및 396번 위치에서 류신으로의 치환; 또는 255번 위치에서 류신, 및 396번 위치에서 류신으로의 치환; 또는 240번 위치에서 알라닌, 및 396번 위치에서 류신으로의 치환; 또는 250번 위치에서 세린, 및 396번 위치에서 류신으로의 치환; 또는 247번 위치에서 세린, 및 396번 위치에서 류신으로의 치환; 410번 위치에서 히스티딘, 및 396번 위치에서 류신으로의 치환; 또는 419번 위치에서 류신, 및 396번 위치에서 류신으로의 치환; 또는 427번 위치에서 알라닌, 및 396번 위치에서 류신으로의 치환; 또는 258번 위치에서 아스파르트산, 396번 위치에서 류신으로의 치환; 또는 384번 위치에서 리신, 및 396번 위치에서 류신으로의 치환; 또는 323번 위치에서 이소류신, 및 396번 위치에서 류신으로의 치환; 또는 244번 위치에서 히스티딘, 및 396번 위치에서 류신으로의 치환; 또는 305번 위치에서 류신, 및 396번 위치에서 류신으로의 치환; 또는 400번 위치에서 페닐알라닌, 및 396번 위치에서 류신으로의 치환; 또는 303번 위치에서 이소류신, 및 396번 위치에서 류신으로의 치환; 또는 243번 위치에서 류신, 305번 위치에서 이소류신, 378번 위치에서 아스파르트산, 404번 위치에서 세린, 및 396번 위치에서 류신으로의 치환; 또는 290번 위치에서 글루탐산, 369번 위치에서 알라닌, 393번 위치에서 알라닌, 및 396번 위치에서 류신으로의 치환; 또는 210번 위치에서 아스파라긴, 222번 위치에서 이소류신, 320번 위치에서 메티오닌, 및 396번 위치에서 류신으로의 치환; 또는 217번 위치에서 세린, 305번 위치에서 이소류신, 309번 위치에서 류신, 390번 위치에서 히스티딘, 및 396번 위치에서 류신으로의 치환; 또는 246번 위치에서 아스파라긴으로의 치환; 419번 위치에서 아르기닌, 및 396번 위치에서 류신으로의 치환; 또는 217번 위치에서 알라닌, 359번 위치에서 알라닌, 및 396번 위치에서 류신으로의 치환; 또는 215번 위치에서 이소류신, 290번 위치에서 발린, 및 396번 위치에서 류신으로의 치환; 또는 275번 위치에서 류신, 362번 위치에서 히스티딘, 384번 위치에서 리신 및 396번 위치에서 류신으로의 치환; 또는 334번 위치에서 아스파라긴으로의 치환; 또는 400번 위치에서 프롤린으로의 치환; 또는 407번 위치에서 이소류신으로의 치환; 또는 372번 위치에서 티로신으로의 치환; 또는 366번 위치에서 아스파라긴으로의 치환; 또는 414번 위치에서 아스파라긴으로의 치환; 또는 352번 위치에서 류신으로의 치환; 또는 225번 위치에서 세린으로의 치환; 또는 377번 위치에서 아스파라긴으로의 치환; 또는 248번 위치에서 메티오닌으로의 치환을 포함한다.

[0262] **D. 어떤 Fc γ R과도 결합하지 않는 돌연변이체**

[0263] 일부 구체예에서, 본 발명은 변이체 Fc 영역을 포함한 분자를 포함하고, 상기 변이체 Fc 영역은 야생형 Fc 영역에 비해서 하나 이상의 아미노산 변형을 포함하며, 변이체 Fc 영역은 당업계에 공지되고 본원에 개시된 표준 분석으로 결정할 때 야생형 Fc 영역을 포함한 대비되는 분자에 비해서 어떤 Fc γ R과도 결합하지 않는다. 특정 구체예에서, 모든 Fc γ R에 대한 결합을 파괴한 하나 이상의 아미노산 변형은 232번 위치에서 세린 및 304번 위치에서 글리신으로의 치환; 또는 269번 위치에서 리신, 290번 위치에서 아스파라긴, 311번 위치에서 아르기닌, 및 433번 위치에서 티로신으로의 치환; 또는 252번 위치에서 류신으로의 치환; 또는 216번 위치에서 아스파르트산, 334번 위치에서 아르기닌, 및 375번 위치에서 이소류신으로의 치환; 또는 247번 위치에서 류신, 및 406번 위치에서 페닐알라닌으로의 치환, 또는 335번 위치에서 아스파라긴, 387번 위치에서 세린, 및 435번 위치에서 글루타민으로의 치환; 또는 334번 위치에서 글루탐산, 380번 위치에서 아스파르트산, 및 446번 위치에서 발린으로의 치환; 또는 303번 위치에서 이소류신, 369번 위치에서 페닐알라닌, 및 428번 위치에서 류신으로의 치환; 또는 251번 위치에서 페닐알라닌, 및 372번 위치에서 류신으로의 치환; 또는 246번 위치에서 글루탐산, 284번 위치에서 메티오닌 및 308번 위치에서 알라닌으로의 치환; 또는 399번 위치에서 글루탐산 및 402번 위치에서 아스파르트산으로의 치환; 또는 399번 위치에서 글루탐산 및 428번 위치에서 류신으로의 치환을 포함한다.

[0264] **D. 변경된 Fc γ R-매개된 작동자 기능을 가진 돌연변이체**

[0265] 본 발명은 변경된 작동자 기능을 가진 Fc 변이체를 포함한 면역글로불린을 포함한다. 일부 구체예에서, 면역글로불린은 당업계에 공지되고 본원에 예시된 분석을 사용하여 결정할 때 작동자세포의 존재 하에서 더 효과적으

로 작동자 기능을 매개한다. 다른 구체예에서, Fc 변이체를 포함한 면역글로불린은 당업계에 공지되고 본원에 예시된 분석을 사용하여 결정할 때 작동자세포의 존재 하에서 덜 효과적으로 작동자 기능을 매개한다. 특정 구체예에서, 본 발명의 Fc 변이체는 조합이 추가적, 상승효과적 효과를 가지도록 작동자 기능을 변경하는 다른 공지된 Fc 변형과 조합될 수 있다. 본 발명의 Fc 변이체는 시험관내 및/또는 생체내에서 작동자 기능을 변경하였다.

[0266] 특정 구체예에서, Fc γ RIIIA 및/또는 Fc γ RIIA에 대한 향상된 친화력을 가진 본 발명의 면역글로불린은 본원에 개시된 ADCC 활성 분석을 사용하여 결정할 때 향상된 Fc γ R-매개된 작동자 기능을 가진다. 본 발명의 분자에 의하여 매개될 수 있는 작동자 기능의 예는, 한정하는 것은 아니지만, C1q 결합, 보체-의존성 세포독성, 항체-의존성 세포 매개 세포독성(ADCC), 식세포작용 등을 포함한다. 본 발명의 분자의 작동자 기능은 당업계에 공지된 표준 방법을 사용하여 분석될 수 있고, 그 예는 섹션 5.2.6에 개시된다. 특정 구체예에서, Fc γ RIIIA 및/또는 Fc γ RIIA에 대한 향상된 친화력을 가진 변이체 Fc 영역을 포함한 본 발명의 면역글로불린은 야생형 Fc 영역을 포함한 면역글로불린보다 2배 더 효과적으로 항체 의존성 세포 매개된 세포독성(ADCC)을 매개한다. 다른 구체예에서, Fc γ RIIIA 및/또는 Fc γ RIIA에 대한 향상된 친화력을 가진 변이체 Fc 영역을 포함한 본 발명의 면역글로불린은 야생형 Fc 영역을 포함한 면역글로불린보다 4 배, 8 배, 10 배, 100 배, 1000 배, 10^4 배, 10^5 배 이상 더 효과적으로 항체 의존성 세포 매개된 세포독성(ADCC)을 매개한다. 다른 특정 구체예에서, Fc γ RIIIA 및/또는 Fc γ RIIA에 대한 향상된 친화력을 가진 본 발명의 면역글로불린은 C1q 결합 활성을 변경하였다. 일부 구체예에서, Fc γ RIIIA 및/또는 Fc γ RIIA에 대한 향상된 친화력을 가진 본 발명의 면역글로불린은 야생형 Fc 영역을 포함한 면역글로불린보다 2 배, 4 배, 8 배, 10 배, 100 배, 1000 배, 10^4 배, 10^5 배 이상 더 높은 C1q 결합 활성을 가진다. 또 다른 특정 구체예에서, Fc γ RIIIA 및/또는 Fc γ RIIA에 대한 향상된 친화력을 가진 본 발명의 면역글로불린은 보체 의존성 세포독성을 변경하였다. 또 다른 특정 구체예에서, Fc γ RIIIA 및/또는 Fc γ RIIA에 대한 향상된 친화력을 가진 본 발명의 면역글로불린은 야생형 Fc 영역을 포함한 면역글로불린보다 향상된 보체 의존성 세포독성을 가진다. 일부 구체예에서, Fc γ RIIIA 및/또는 Fc γ RIIA에 대한 향상된 친화력을 가진 본 발명의 면역글로불린은 야생형 Fc 영역을 포함한 면역글로불린보다 2 배, 4 배, 8 배, 10 배, 100 배, 1000 배, 10^4 배, 10^5 배 더 높은 보체 의존성 세포독성을 가진다.

[0267] 다른 구체예에서, Fc γ RIIIA 및/또는 Fc γ RIIA에 대한 향상된 친화력을 가진 본 발명의 면역글로불린은 당업자에게 공지됐거나 본원에 개시된 표준 분석에 의하여 결정할 때 야생형 Fc 영역을 포함한 면역글로불린에 비해서 향상된 식세포작용 활성을 가진다. 일부 구체예에서, Fc γ RIIIA 및/또는 Fc γ RIIA에 대한 향상된 친화력을 가진 본 발명의 면역글로불린은 야생형 Fc 영역을 포함한 면역글로불린에 비해서 2 배, 4 배, 8 배, 10 배 이상 더 높은 식세포작용 활성을 가진다.

[0268] 특정 구체예에서, 본 발명은 면역글로불린이 향상된 작동자 기능, 예를 들면, 항체 의존성 세포 매개된 세포독성 또는 식세포작용을 가지도록 Fc γ RIIIA 및/또는 Fc γ RIIA에 대한 향상된 친화력을 가진, 하나 이상의 아미노산 변형을 가진 변이체 Fc 영역을 포함한 면역글로불린을 포함한다. 특정 구체예에서, Fc γ RIIIA 및/또는 Fc γ RIIA에 대한 변이체 Fc 영역의 친화력을 증가시키고, 면역글로불린의 ADCC 활성을 증가시키는 하나 이상의 아미노산 변형은 379번 위치에서 메티오닌으로의 치환; 또는 243번 위치에서 이소류신 및 379번 위치에서 류신으로의 치환; 또는 288번 위치에서 아스파라긴, 330번 위치에서 세린, 및 396번 위치에서 류신으로의 치환; 또는 243 류신 255번 위치에서 류신으로의 치환; 또는 334번 위치에서 글루탐산, 359번 위치에서 아스파라긴, 및 366번 위치에서 세린으로의 치환; 또는 288번 위치에서 메티오닌 및 334번 위치에서 글루탐산으로의 치환; 또는 334번 위치에서 글루탐산 및 292번 위치에서 류신으로의 치환; 또는 316번 위치에서 아스파르트산, 378번 위치에서 발린, 및 399번 위치에서 글루탐산으로의 치환; 또는 315번 위치에서 이소류신, 379번 위치에서 메티오닌, 및 399번 위치에서 글루탐산으로의 치환; 또는 243번 위치에서 이소류신, 379번 위치에서 류신, 및 420번 위치에서 발린으로의 치환; 또는 247번 위치에서 류신 및 421번 위치에서 리신으로의 치환; 또는 248번 위치에서 메티오닌으로의 치환; 또는 392번 위치에서 트레오닌 및 396번 위치에서 류신으로의 치환; 또는 293번 위치에서 발린, 295번 위치에서 글루탐산, 및 327번 위치에서 트레오닌으로의 치환; 또는 268번 위치에서 아스파라긴 및 396번 위치에서 류신으로의 치환; 또는 319번 위치에서 페닐알라닌, 352번 위치에서 류신, 및 396번 위치에서 류신으로의 치환을 포함한다.

[0269] 다른 특정 구체예에서, 면역글로불린의 ADCC 활성을 증가시키는 하나 이상의 아미노산 변형은 하기 표 7에 열거된 돌연변이 중 어느 하나이다.

표 7

ADCC를 증가시키는 아미노산 변형

E333A, K334A
R292L, K334E
V379M
S219Y
V282M
K222N
F243I, V379L
F243L, R255L, E318K
K334I
K334E, T359N, T366S
K288M, K334E
K288N, A330S, P396L
K326E
G316D, A378V, D399E
N315I, V379M, T394M
F243I, V379L, G420V
E293V, Q295E, A327T
Y319F, P352L, P396L
K392T, P396L
K248M
H268N, P396L
K290T, N390I, P396L
K326I, P396L
H268D, P396L
K210M, P396L
L358P, P396L
K288R, T307A, K344E, P396L
V273I, K326E, L328I, P396L
K326I, S408N, P396L
K334N, P396L
V379M, P396L
P227S, P396L
P217S, P396L
K261N, K210M, P396L
Q419H, P396L
K370E, P396L
L242F, P396L
F243L, V305I, A378D, F404S, P396L
R255L, P396L
V240A, P396L
T250S, P396L
P247S, P396L
K290E, V369A, T393A, P396L
K210N, K222I, K320M, P396L
L410H, P396L
Q419L, P396L
V427A, P396L
P217S, V305I, I309L, N390H, P396L
E258D, P396L
N384K, P396L

[0270]

V323I, P396L
K246N, Q419R, P396L
P217A, T359A, P396L
P244H, P396L
V215I, K290V, P396L
F275L, Q362H, N384K, P396L
V305L, P396L
S400F, P396L
V303I, P396L
D270E, G316D, R416G
P247L, N421K
P247L, N421K, D270E
Q419H, P396L, D270E
K370E, P396L, D270E
R255L, P396L, D270E
V240A, P396L, D270E
K392T, P396L, D270E

[0271]

[0272] 대안적으로 또는 추가적으로, 상기 아미노산 변형 또는 본원에 개시된 임의의 다른 아미노산 변형을 Fc 영역의 C1q 결합 및/또는 보체 의존성 세포독성 기능을 변경하는 하나 이상의 추가 아미노산 변형과 조합하는 것이 유용할 수 있다. 본원에서 특히 관심대상의 출발 분자는 대개 C1q에 결합하고 보체 의존성 세포독성(CDC)을 나타내는 것이다. 본원에 설명된 추가 아미노산 치환은 일반적으로 예를 들면 이들 작동자 기능을 감소시키고 바람직하게는 파괴하기 위해서, C1q에 결합 및/또는 그것의 보체 의존성 세포독성 기능을 변형하는 출발 분자의 능력을 변경하는 역할을 할 것이다. 그러나, 개선된 C1q 결합 및/또는 보체 의존성 세포독성(CDC) 기능을 가진 하나 이상의 설명된 위치에서 치환을 포함한 분자는 본원에서 고려된다. 예를 들면, 출발 분자는 C1q에 결합할 수 없고/없거나 CDC를 매개할 수 없고 이것이 이들 추가 작동자 기능을 얻도록 본원의 지침에 따라서 변형될 수 있다. 더욱이, 선택적으로 CDC를 매개하는 능력을 더 가진, 이미 존재하는 C1q 결합 활성을 가진 분자는 이들 활성 중 하나 또는 둘이 증대되도록 변형될 수 있다.

[0273] 상기에 개시된 바와 같이, C1q 결합 및/또는 FcR 결합을 변형하고, 그럼으로써 CDC 활성 및/또는 ADCC 활성을 변화시킴으로써 변경된 작동자 기능을 가진 Fc 기능을 가진 Fc 영역을 만들 수 있다. 예를 들면, 개선된 C1q 결합 및 개선된 FcγRIII 결합; 예를 들면 개선된 ADCC 활성 및 개선된 CDC 활성을 가진 변이체 Fc 영역을 발생시킬 수 있다. 대안적으로, 작동자 기능이 감소되거나 제거되기를 바라는 경우, 감소된 CDC 활성 및/또는 감소된 ADCC 활성을 가진 변이체 Fc 영역을 조작할 수 있다. 다른 구체예에서, 예를 들면, 개선된 ADCC 활성, 그러나 감소된 CDC 활성 및 그 반대를 가진 Fc 영역 변이체를 발생시키기 위하여 이들 활성 중 하나만을 증가시키고, 선택적으로 또한 다른 활성을 감소시킬 수 있다.

[0274] 본 발명은 분류의 2 번째-4 번째-라운드가 표 8에 열거된 후 돌연변이체의 효모 라이브러리로부터 본 발명의 방법을 사용하여 확인된 Fc 영역의 특이적 변이체를 포함한다. 표 8은 본 발명의 방법을 사용하여 확인된 다양한 돌연변이체를 요약한다. 돌연변이체를 FcγRIIIA 및 FcγRIIB에 대한 결합을 결정하기 위한 ELISA 분석을 사용하여 분석하였다. 또한 돌연변이체를 본원에 개시되고 예시된 방법을 사용하여 Fc 변이체를 ch 4-4-20 항체에 클로닝함으로써 ADCC 분석에서 시험하였다. 굵은 글씨의 항목은 ADCC 분석 전에 ch4-4-20을 정제한 실험을 말한다. 사용된 항체 농도는 0.5 μg/mL - 1.0 μg/mL 범위에 있다.

표 8

Fc 영역에서 확인된 돌연변이

돌연변이	도메인	FcγRIIIA 에 대한 결합 (ELISA)	FcγRIIB 에 대한 결합 (ELISA)	4-4-20 ADCC (상대적 용해 (Mut/Wt))
3A 데트라마를 가진 pYD-CH1 라이브러리 FACS 스크린				
Q347H; A339V	CH3	↑0.5x	NT	
S415I; L251F	CH2,CH3	↑0.5x	↑.75x	0.82
K392R	CH3	N/C	NT	
D399E; R292L; V185M	CH1,CH2,CH3	N/C	↑0.5x	0.65
K290E; L142P	CH1, CH2	N/C	NT	0.9
R301C; M252L; S192T	CH1,CH2	↓.5x	NT	
P291S; K288E; H268L; A141V	CH1,CH2	↓.5x	NT	
N315I	CH2	N/C	↑.75x	
S132I	CH1	N/C	NT	
S383N; N384K; T256N; V262L; K218E; R214I; K205E; F149Y; K133M	All	↑0.5x	NT	
S408I; V215I; V125L	CH1,CH2,CH3	↑0.5x	↑.75x	0.62
P396L	CH3	↑1x	↑1x	0.55
G385E; P247H;	CH2, CH3	↑1x	↑.75x	0.44
P396H	CH3	↑1x	↑1x	0.58
A162V	CH1	N/C	NT	
V348M; K334N; F275I; Y202M; K147T	CH1,CH2,CH3	↑0.5x	↑.75x	0.33
H310Y; T289A; G337E	CH2	↑.5x	NT	
S119F; G371S; Y407V; E258D	CH1,CH2,CH3	N/C	N/C	0.29
K409R; S166N	CH1, CH3	N/C	NT	
시험관내 부위 지정 돌연변이체				
R292L	CH2	NT	NT	0.82
T359N	CH3	NT	NT	1.06
T366S	CH3	NT	NT	0.93

[0275]

돌연변이	도메인	FcγRIIIA 에 대한 결합 (ELISA)	FcγRIIB 에 대한 결합 (ELISA)	4-4-20 ADCC (상대적 용해 (Mut/Wt))
E333A, K334A	CH2	NT	NT	1.41
R292L, K334E	CH2	NT	NT	1.41; 1.64
R292L, P396L, T359N	CH2, CH3	NT	NT	0.89; 1.15
V379L	CH3	NT	NT	0.83
K288N	CH2	NT	NT	0.78
A330S	CH2	NT	NT	0.52
F243L	CH2	NT	NT	0.38
E318K	CH2	NT	NT	0.86
K288N, A330S	CH2	NT	NT	0.08
R255L, E318K	CH2	NT	NT	0.82
F243L, E318K	CH2	NT	NT	0.07
4-4-20 미니-라이브러리에서의 돌연변이체 증가된 FcγRIIIA 결합, 감소된 또는 어떤 변화도 없는 FcγRIIB 결합 N/C는 무변화; N/B는 무결합; NT는 무시됨을 의미한다				
V379M	CH3	↑2x	N/C	1.47
S219Y	힌지	↑1x	↓또는 N/B	1.28
V282M	CH2	↑1x	↓또는 N/B	1.25; 1
F275I, K334N, V348M	CH2	↑0.5x	N/C	
D401V	CH3	↑0.5x	N/C	
V279L, P395S	CH2	↑1x	N/C	
K222N	힌지	↑1x	↓또는 N/B	1.33; 0.63
K246I, Y319F	CH2	↑1x	N/C	
F243L, V379L	CH2, CH3	↑1.5x	↓또는 N/B	1.86; 1.35
F243L, R255L, E318K	CH2	↑1x	↓또는 N/B	1.81; 1.45
K334I	CH2	↑1x	N/C	2.1; 1.97
K334E, T359N, T366S	CH2, CH3	↑1.5x	N/C	1.49; 1.45
K288M, K334E	CH2	↑3x	↓또는 N/B	1.61; 1.69

[0276]

돌연변이	도메인	FcγRIIIA 에 대한 결합 (ELISA)	FcγRIIB 에 대한 결합 (ELISA)	4-4-20 ADCC (상대적 용해 (Mut/Wt))
K334E, E380D	CH2, CH3	↑1.5x	N/C	
T256S, V305I, K334E, N390S	CH2, CH3	↑1.5x	N/C	
K334E	CH2	↑2.5x	N/C	1.75; 2.18
T335N, K370E, A378V, T394M, S424L	CH2, CH3	↑0.5x	N/C	
E233D, K334E	CH2	↑1.5x	N/C	0.94; 1.02
K334E, T359N, T366S, Q386R	CH2	↑1x	N/C	
FcγRIIIA 및 FcγRIIB에 대한 증가된 결합				
K246I, P396H	CH2, CH3	↑1x	↑2.5x	
H268D, E318D	CH2	↑1.5x	↑5x	
K288N, A330S, P396L	CH2, CH3	↑5x	↑3x	2.34; 1.66; 2.54
I377F	CH3	↑1.5x	↑0.5x	
P244H, L358M, V379M, N384K, V397M	CH2, CH3	↑1.75x	↑1.5x	
P217S, A378V, S408R	CH3	↑2x	↑4.5x	
P247L, I253N, K334N	CH2	↑3x	↑2.5x	
P247L	CH2	↑0.5x	↑4x	0.91; 0.84
F372Y	CH3	↑0.75x	↑5.5x	0.88; 0.59
K326E	CH2	↑2x	↑3.5x	1.63; 2
K246I, K334N	CH2	↑0.5x	↑4x	0.66; 0.6
K320E, K326E	CH2	↑1x	↑1x	
H224L		↑0.5x	↑5x	0.55; 0.53
S375C, P396L	CH3	↑1.5x	↑4.5x	
D312E, K327N, I378S	CH2, CH3	↑0.5x	N/C	
K288N, K326N	CH2	↑1x	N/C	
F275Y	CH2	↑3x	N/C	0.64

[0277]

돌연변이	도메인	FcγRIIIA 에 대한 결합 (ELISA)	FcγRIIB 에 대한 결합 (ELISA)	4-4-20 ADCC (상대적 용해 (Mut/Wt))
P247L,N421K	CH2,CH3	↑ 3x	N/C	2.0
S298N,W381R	CH2,CH3	↑ 2x	N/C	
D280E,S354F,A431D,L441I	CH2,CH3	↑ 3x	N/C	0.62
R255Q,K326E	CH2	↑ 2x	N/C	0.79
K218R,G281D,G385R	H,CH2,CH3	↑ 3.5x	N/C	0.67
L398V	CH3	↑ 1.5x	N/C	
P247L,A330T,S440G	CH2,CH3	↑ 0.75x	↓ 0.25x	
V284A,F372L	CH2,CH3	1x	N/C	
T335N,P387S,H435Q	CH2,CH3	1.25x	N/C	
P247L,A431V,S442F	CH2,CH3	1x	N/C	
FcγRIIIA 및 FcγRIIB에 대한 증가된 결합				
P343S,P353L,S375I,S383N	CH3	↑ 0.5x	↑ 6x	
T394M,V397M	CH3	↑ 0.5x	↑ 3x	
E216D,E345K,S375I	H, CH2,CH3	↑ 0.5x	↑ 4x	
K334N,	CH2	↑ 0.5x	↑ 2x	
K288N,A330S,P396L	CH2,CH3	↑ 0.5x	↑ 9x	
P247L,E389G	CH2,CH3	↑ 1.5x	↑ 9x	
K222N,T335N,K370E,A378V,T394M	H, CH2,CH3	↑ 1x	↑ 7x	
G316D,A378V,D399E	CH2,CH3	↑ 1.5x	↑ 14x	2.24
N315I,V379M,T394M	CH2,CH3	↑ 1x	↑ 9x	1.37
K290T,G371D,	CH2,CH3	↑ 0.25x	↑ 6x	
P247L,L398Q	CH2,CH3	↑ 1.25x	↑ 10x	
K326Q,K334E,T359N,T366S	CH2,CH3	↑ 1.5x	↑ 5x	
S400P	CH3	↑ 1x	↑ 6x	
P247L,I377F	CH2,CH3	↑ 1x	↑ 5x	

[0278]

돌연변이	도메인	FcγRIIIA 에 대한 결합 (ELISA)	FcγRIIB 에 대한 결합 (ELISA)	4-4-20 ADCC (상대적 용해 (Mut/Wt))
A378V,N390I,V422I	CH3	↑ 0.5x	↑ 5x	
K326E,G385E	CH2,CH3	↑ 0.5x	↑ 15x	
V282E,V369I,L406F	CH2,CH3	↑ 0.5x	↑ 7x	
V397M,T411A,S415N	CH3	↑ 0.25x	↑ 5x	
T223I,T256S,L406F	H, CH2,CH3	↑ 0.25x	↑ 6x	
S298N,S407R	CH2,CH3	↑ 0.5x	↑ 7x	
K246R,S298N,I377F	CH2,CH3	↑ 1x	↑ 5x	
S407I	CH3	↑ 0.5x	↑ 4x	
F372Y	CH3	↑ 0.5x	↑ 4x	
L235P,V382M,S304G,V305I,V323I	CH2,CH3	↑ 2x	↑ 2x	
P247L,W313R,E388G	CH2,CH3	↑ 1.5x	↑ 1x	
D221Y,M252I,A330G,A339T,T359N,V422I,H433L	H, CH2,CH3	↑ 2.5x	↑ 6x	
E258D,N384K	CH2,CH3	↑ 1.25x	↑ 4x	
F241L,E258G	CH2	↑ 2x	↑ 2.5x	-0.08
K370N,S440N	CH3	↑ 1x	↑ 3.5x	
K317N,F423-deleted	CH2,CH3	↑ 2.5x	↑ 7x	0.18
F243I,V379L,G420V	CH2,CH3	↑ 2.5x	↑ 3.5x	1.35
P227S,K290E	H, CH2	↑ 1x	↑ 0.5x	
A231V,Q386H,V412M	CH2,CH3	↑ 1.5x	↑ 6x	
T215P,K274N,A287G,K334N,L365V,P396L	H, CH2,CH3	↑ 2x	↑ 4x	
FcγRIIIA가 아닌 FcγRIIB에 대한 증가된 결합				
K334E,E380D	CH2,CH3	N/C	↑ 4.5x	
T366N	CH3	N/C	↑ 5x	
P244A,K326I,C367R,S375I,K447T	CH2,CH3	N/C	↑ 3x	

[0279]

돌연변이	도메인	FcγRIIIA 에 대한 결합 (ELISA)	FcγRIIB 에 대한 결합 (ELISA)	4-4-20 ADCC (상대적 용해 (Mut/Wt))
C229Y,A287T,V379M,P396L,L443V	H, CH2,CH3	↓ 0.25x	↑10x	
FcγRIIIA 및 FcγRIIB에 대한 감소된 결합				
R301H, K340E,D399E	CH2,CH3	↓ 0.50x	↓ 0.25x	
K414N	CH3	↓ 0.25x	N/B	
P291S,P353Q	CH2,CH3	↓ 0.50x	↓ 0.25x	
V240I, V281M	CH2	↓ 0.25x	↓ 0.25x	
P232S, S304G	CH2	N/B	N/B	
E269K,K290N,Q311R,H433Y	CH2,CH3	N/B	N/B	
M352L	CH3	N/B	N/B	
E216D,K334R,S375I	H, CH2,CH3	N/B	N/B	
P247L,L406F	CH2,CH3	N/B	N/B	
T335N,P387S,H435Q	CH2,CH3	N/B	N/B	
T225S	CH2	↓ 0.25x	↓ 0.50x	
D399E,M428L	CH3	↓ 0.50x	↓ 0.50x	
K246I,Q362H,K370E	CH2,CH3	N/B	↓ 0.50x	
K334E,E380D,G446V	CH2,CH3	N/B	N/B	
I377N	CH3	↓ 0.50x	N/B	
V303I,V369F,M428L	CH2,CH3	N/B	N/B	
L251F,F372L	CH2,CH3	N/B	N/B	
K246E,V284M,V308A	CH2,CH3	N/B	N/B	
D399E,G402D	CH3	N/B	N/B	
D399E,M428L	CH3	N/B	N/B	

[0280]

돌연변이	도메인	FcγRIIIA 에 대한 결합 (ELISA)	FcγRIIB 에 대한 결합 (ELISA)	4-4-20 ADCC (상대적 용해 (Mut/Wt))
FcγRIIB 결실/FcγRIIIA 선택: 천연 Fc 라이브러리				
E293V,Q295E,A327T	CH2	↑0.4x	↓ or N/B	4.29
Y319F,P352L,P396L	CH2,CH3	↑3.4x	↑2x	1.09
K392T,P396L	CH3	↑ 4.5x	↑ 2.5x	3.07
K248M	CH2	↑0.4x	↓ or N/B	4.03
H268N,P396L	CH2,CH3	↑ 2.2x	↑ 4.5x	2.24
용액 경쟁 40X FcγRIIB-G2: P396L 라이브러리				
D221E, D270E, V308A, Q311H, P396L, G402D		↑3.6x	↑0.1x	3.17
평형 스크린: 0.8 μM FcγRIIIA 모노머: P396L				
K290T, N390I, P396L	CH2, CH3	↑2.8x	↑ 6.1x	1.93
K326I, P396L	CH2, CH3	↑2.9x	↑ 5.9x	1.16
H268D, P396L	CH2, CH3	↑3.8x	↑13.7x	2.15
K210M, P396L	CH1, CH3	↑1.9x	↑ 4.6x	2.02
L358P, P396L	CH3	↑1.9x	↑ 4.2x	1.58
K288R, T307A, K344E,P396L	CH2, CH3	↑ 4.1x	↑ 2.3x	3.3
V273I, K326E, L328I, P396L	CH2, CH3	↑ 1.3x	↑10.8x	0.78
K326I, S408N, P396L	CH2, CH3	↑4x	↑ 9.3x	1.65
K334N, P396L	CH2, CH3	↑3.1x	↑ 3x	2.43
V379M, P396L	CH3	↑1.9x	↑5.6x	2.01
P227S, P396L	CH2, CH3	↑1.5x	↑ 4x	2.01
P217S, P396L	H, CH3	↑1.6x	↑4.5x	2.04
K261N, K210M, P396L	CH2, CH3	↑ 2x	↑ 4.2x	2.06
운동 스크린: 0.8 μM, 차가운 8 μM FcγRIIIA를 가진 1' : P396L				
홍어는M, P396L	CH3	↑1.9x	↑ 7.2x	3.09
Q419H, P396L	CH3	↑ 2x	↑ 6.9x	2.24

[0281]

돌연변이	도메인	FcγRIIIA 에 대한 결합 (ELISA)	FcγRIIB 에 대한 결합 (ELISA)	4-4-20 ADCC (상대적 용해 (Mut/Wt))
K370E, P396L	CH3	↑2x	↑6.6x	2.47
L242F, P396L	CH2, CH3	↑2.5x	↑4.1x	2.4
F243L, V305I, A378D, F404S, P396L	CH2, CH3	↑1.6x	↑5.4x	3.59
R255L, P396L	CH2, CH3	↑1.8x	↑6x	2.79
V240A, P396L	CH2, CH3	↑1.3x	↑4.2x	2.35
T250S, P396L	CH2, CH3	↑1.5x	↑6.8x	1.60
P247S, P396L	CH2, CH3	↑1.2x	↑4.2x	2.10
K290E, V369A, T393A, P396L	CH2, CH3	↑1.3x	↑6.7x	1.55
K210N, K222I, K320M, P396L	H, CH2, CH3	↑2.7x	↑8.7x	1.88
L410H, P396L	CH3	↑1.7x	↑4.5x	2.00
Q419L, P396L	CH3	↑2.2x	↑6.1x	1.70
V427A, P396L	CH3	↑1.9x	↑4.7x	1.67
P217S, V305I, I309L, N390H, P396L	H, CH2, CH3	↑2x	↑7x	1.54
E258D, P396L	CH2, CH3	↑1.9x	↑4.9x	1.54
N384K, P396L	CH3	↑2.2x	↑5.2x	1.49
V323I, P396L	CH2, CH3	↑1.1x	↑8.2x	1.29
K246N, Q419R, P396L	CH2, CH3	↑1.1x	↑4.8x	1.10
P217A, T359A, P396L	H, CH2, CH3	↑1.5x	↑4.8x	1.17
P244H, P396L	CH2, CH3	↑2.5x	↑4x	1.40
V215I, K290V, P396L	H, CH2, CH3	↑2.2x	↑4.6x	1.74
F275L, Q362H, N384K, P396L	CH2, CH3	↑2.2x	↑3.7x	1.51
V305L, P396L	CH2, CH3	↑1.3x	↑5.5x	1.50
S400F, P396L	CH3	↑1.5x	↑4.7x	1.19
V303I, P396L	CH3	↑1.1x	↑4x	1.01
FcγRIIB 결실 FcγRIIA 158V 교체상 선택: 미처리 라이브러리				
A330V, H433Q, V427M	CH2, CH3	NT	NT	NT
V263Q, E272D, Q419H	CH2, CH3	NT	NT	NT

[0282]

돌연변이	도메인	FcγRIIIA 에 대한 결합 (ELISA)	FcγRIIB 에 대한 결합 (ELISA)	4-4-20 ADCC (상대적 용해 (Mut/Wt))
N276Y, T393N, W417R	CH2, CH3	NT	NT	NT
V282L, A330V, H433Y, T436R	CH2, CH3	NT	NT	NT
A330V, Q419H	CH2, CH3	NT	NT	NT
V284M, S298N, K334E, R355W	CH2, CH3	NT	NT	NT
A330V, G427M, K438R	CH2, CH3	NT	NT	NT
S219T, T225K, D270E, K360R	CH2, CH3	NT	NT	NT
K222E, V263Q, S298N	CH2	NT	NT	NT
V263Q, E272D	CH2	NT	NT	NT
R292G	CH2	NT	NT	NT
S298N	CH2	NT	NT	NT
E233G, P247S, L306P	CH2	NT	NT	NT
D270E	CH2	NT	NT	NT
S219T, T225K, D270E	CH2	NT	NT	NT
K326E, A330T	CH2	NT	NT	NT
E233G	CH2	NT	NT	NT
S254T, A330V, N361D, P243L	CH2, CH3	NT	NT	NT
FcγRIIB 결실 FcγRIIA 158F 교체상 선택: 미처리 라이브러리				
FACS 상위 0.2%에 의한 158F				
V284M, S298N, K334E, R355W, R416T	CH2, CH3	NT	NT	
FcγRIIB 결실 FcγRIIA 131H 교체상 선택: 미처리 라이브러리				
R292P, V305I	CH2, CH2	NT	NT	
D270E, G316D, R416G	CH2, CH3	NT	NT	
V284M, R292L, K370N	CH2, CH3	NT	NT	
R292P, V305I, F243L	CH2	NT	NT	

[0283]

[0284]

바람직한 구체예에서, 본 발명은 FcγRIIIA 및/또는 FcγRIIA에 대한 분자의 친화력을 증가시키는 하나 이상의 아미노산 변형을 가진, 변이체 Fc 영역을 가진 변형된 면역글로불린 분자(예를 들면, 항체)를 제공한다. 이러한 면역글로불린은 자연적으로 FcγR 결합 영역(예를 들면, FcγRIIIA 및/또는 FcγRIIB 결합 영역)을 함유하는 Ig 분자, 또는 FcγR 결합 영역(예를 들면, FcγRIIIA 및/또는 FcγRIIB 결합 영역)을 함유하도록 조작된 면역글로불린 유도체를 포함한다. 본 발명의 변형된 면역글로불린은 바람직하게는 면역특이적으로 항원에 결합하고, 즉 특이적 항원-항체 결합을 위한 당업계에 잘 알려진 면역분석에 의하여 결정할 때 비특이적 결합을 경쟁에서 떨어뜨리고, FcγR 결합 영역(예를 들면, FcγRIIIA 및/또는 FcγRIIB 결합 영역)을 함유한 임의의 면역글로불린 분자를 포함한다. 이러한 항체는, 한정하는 것은 아니지만, 폴리클로날, 모노클로날, 이-특이적, 다중-특이적, 사람, 사람화, 키메라 항체, 단쇄 항체, Fab 단편, F(ab')₂ 단편, 이항화 결합된 Fv, 및 VL 또는 VH 도메인을 함유한 단편 또는 어떤 경우에 FcγR 결합 영역을 함유하도록 조작되거나 FcγR 결합 영역에 융합된, 항원에 특이적으로 결합하는 상보적 결정 영역(CDR)까지도 포함한다.

[0285]

일부 구체예에서, 본 발명의 분자는 Fc 영역의 부분을 포함한다. 본원에 사용된 용어 "Fc 영역의 부분"은 Fc 영역의 단편, 바람직하게는 작동자활성 및/또는 FcγR 결합 활성(또는 이러한 활성이 결핍된 돌연변이체의 대비되는 영역)을 가진 부분을 말한다. Fc 영역의 단편은 크기 면에서 5 개 아미노산으로부터 1 개 아미노산을 뺀 전체 Fc 영역까지의 범위일 수 있다. Fc 영역의 단편은 N-말단 또는 C-말단으로부터 10 개 아미노산까지, 20 개

아미노산까지, 30개 아미노산까지 결실될 수 있다.

- [0286] 본 발명의 IgG 분자는 바람직하게는 IgG의 IgG1 하위부류이지만, 또한 제공된 동물의 어떤 다른 IgG 하위부류일 수 있다. 예를 들면, 사람의 경우, IgG 부류는 IgG1, IgG2, IgG3, 및 IgG4를 포함하고; 마우스 IgG는 IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG2c 및 IgG3을 포함한다.
- [0287] 면역글로불린(및 본원에 사용된 다른 폴리펩티드)은 조류 및 포유동물을 포함한 어떤 동물 기원으로부터 유래할 수 있다. 바람직하게는, 항체는 사람, 쥐과(예를 들면, 마우스 및 레트), 당나귀, 양, 토끼, 염소, 기니피그, 낙타, 말, 또는 닭이다. 본원에 사용된 "사람" 항체는 하기 및 예를 들면 Kucherlapati et al.의 미국 특허 제 5,939,598호에 설명된, 사람 면역글로불린의 아미노산 서열을 가진 항체를 포함하고, 사람 면역글로불린 라이브러리로부터 또는 하나 이상의 사람 면역글로불린에 대하여 형질전환된 동물로부터 분리된 항체를 포함한다.
- [0288] 본 발명의 항체는 단일특이적, 이중특이적, 삼중특이적, 또는 더 큰 다중특이적일 수 있다. 다중특이적 항체는 폴리펩티드의 다른 에피토프에 대하여 특이적일 수 있거나 이중 에피토프, 예를 들면 이중 폴리펩티드 또는 고체 지지체 물질에 대하여 특이적일 수 있다. 예를 들면, WO 93/17715; WO 92/08802; WO 91/00360; WO 92/05793; 문헌(Tutt, et al., J. Immunol., 147:60-69, 1991); 미국 특허 제4,474,893호; 제4,714,681호; 제4,925,648호; 제5,573,920호; 제5,601,819호; 문헌(Kostelny et al., J. Immunol., 148:1547-1553, 1992)을 참조하라.
- [0289] 다중특이적 항체는 2 개 이상의 다른 항원에 대한 결합 특이성을 가진다. 이러한 분자가 정상적으로 두 항원(즉, 이중특이적 항체, BsAb)에만 결합하는 경우, 삼중특이적 항체와 같은 추가 특이성을 가진 항체는 본 항원에 의하여 포함된다. BsAb의 예는, 한정하는 것은 아니지만, 종양 세포 항원에 대하여 유도된 한쪽 팔과 세포독성 분자에 대하여 유도된 다른 쪽 팔을 가진 것들을 포함한다.
- [0290] 이중특이적 항체를 만들기 위한 방법은 당업계에 공지되어 있다. 전체 길이 이중특이적 항체의 전통적 생산은 두 사슬이 다른 특이성을 가지는 두 면역글로불린 중쇄-경쇄 쌍의 공동발현에 기초한다(본원에 전부 참고문헌으로 포함된 문헌(Millstein et al., Nature, 305:537-539 (1983))). 면역글로불린 중쇄 및 경쇄의 무작위 구분 때문에, 이들 하이브리도마(퀴드로마)는 하나만 정확한 이중특이적 구조를 가지는 10 개의 다른 항체 분자의 잠재적 혼합물을 생성한다. 대개 친화력 크로마토그래피 단계에 의하여 수행된, 정확한 분자의 정제는 상당히 번거롭고, 생성물 수율이 낮다. 유사한 과정은 WO 93/08829, 및 문헌(Traunecker et al., EMBO J., 10:3655-3659 (1991))에 개시된다.
- [0291] 다른 접근법에 따라서, 원하는 결합 특이성(항체-항원 결합 부위)을 가진 항체 가변 도메인은 면역글로불린 불변 도메인 서열과 융합된다. 융합은 바람직하게는 적어도 힌지의 부분, CH2 및 CH3 영역을 포함한 면역글로불린 중쇄 불변 도메인과 이루어진다. 융합의 하나 이상에 존재하는 경쇄 결합에 필요한 부위를 함유한 첫 번째 중쇄 불변 영역(CH1)을 가지는 것이 바람직하다. 면역글로불린 중쇄 융합 및 원한다면 면역글로불린 단쇄를 코딩하는 DNA를 별개의 발현 벡터에 삽입하고, 적합한 숙주 생물에 트랜스펙션한다. 이것은 구성에 사용된 세 폴리펩티드 사슬의 불균등한 비율이 최적 수율을 제공할 때 구체예에서 세 폴리펩티드 단편의 상호 비율을 조절하는데 큰 유연성을 제공한다. 그러나, 동등한 비율로 2 개 이상의 폴리펩티드 사슬의 발현이 고수율을 가져오거나 비율이 특별히 중요하지 않을 때, 발현 벡터에 두 개 또는 세 개 모든 폴리펩티드 사슬에 대한 코딩 서열을 삽입하는 것은 가능하다.
- [0292] 이 접근법의 바람직한 구체예에서, 이중특이적 항체는 한 팔에 첫 번째 결합 특이성을 가진 하이브리드 면역글로불린 중쇄 및 다른 팔에 하이브리드 면역글로불린 중쇄-경쇄 쌍(두 번째 결합 특이성을 제공하는)으로 구성된다. 이중특이적 분자의 1/2에서만 면역글로불린 경쇄의 존재가 분리의 손쉬운 방법을 제공하기 때문에, 이 비대칭 구조는 원하지 않는 면역글로불린 사슬 조합으로부터 원하는 이중특이적 화합물의 분리를 촉진한다는 것이 확인되었다. 이 접근법은 WO 94/04690에 개시된다. 이중특이적 항체를 발생시키는 것에 대한 더 상세한 것은 예를 들면 문헌(Suresh et al., Methods in Enzymology, 121:210 (1986))을 참조하라. WO 96/27011에 설명된 다른 접근법에 따라서, 항체 분자의 쌍은 재조합 세포 배양으로부터 회수된 헤테로다имер의 백분율을 최대화하도록 조작될 수 있다. 바람직한 경계면은 항체 불변 도메인의 CH3 도메인의 적어도 한 부분을 포함한다. 이 방법에서, 첫 번째 항체 분자의 경계면으로부터 하나 이상의 작은 아미노산 측쇄는 더 큰 측쇄(예를 들면, 티로신 또는 트립토판)로 대체된다. 큰 측쇄(들)와 동일한 또는 유사한 크기의 보충의 "공동"은 큰 아미노산 측쇄를 유사한 것들(예를 들면, 알라닌 또는 트레오닌)로 대체함으로써 두 번째 항체 분자의 경계면에 형성된다. 이것은 호모다имер와 같은 다른 원하지 않는 최종생성물보다 헤테로다имер의 수득율을 증가시키기 위한 메커니즘을 제공한다.

- [0293] 이종특이적 항체는 교차-결합된 또는 "헤테로콘주게이트" 항체를 포함한다. 예를 들면, 헤테로콘주게이트에서 항체 중 하나는 아비딘과 결합되고, 다른 것은 비오티न과 결합될 수 있다. 이러한 항체들은 예를 들면 면역계 세포를 원하지 않는 세포에 표적화하기 위해서(미국 특허 제4,676,980호), 그리고 HIV 감염을 치료하기 위해서(WO 91/00360, WO 92/200373, 및 EP 03089) 제안되었다. 헤테로콘주게이트 항체는 임의의 편리한 교차-결합 방법을 사용하여 제조될 수 있다. 적합한 교차-결합은 당업계에 잘 알려져 있고, 많은 교차-결합 기술과 함께, 미국 특허 제4,676,980호에 개시된다.
- [0294] 2 이상의 원자가를 가진 항체가 고려된다. 예를 들면, 삼중특이적 항체가 제조될 수 있다. 예를 들면, 본원에 참고문헌으로 포함된 문헌(Tutt et al. J. Immunol. 147: 60 (1991))을 참조하라.
- [0295] 본 발명의 항체는 즉 공유 부착이 항체가 항원에 결합하고/하거나 항-이디오타입 반응을 발생하는 것을 막지 않도록 어떤 유형의 분자를 항체에 공유 부착시킴으로써 다르게 변형된 유도체를 포함한다. 예를 들면, 한정하는 방식은 아니지만, 항체 유도체는 예를 들면, 공지된 보호/차단기, 단백질분해 절단, 세포 리간드 또는 다른 단백질에 대한 결합 등에 의한 글리코실화, 아세틸화, PEG화, 인산화, 아마이드화, 유도체형성에 의하여 변형된 항체들을 포함한다. 많은 화학 변형 중 어느 것은, 한정하는 것은 아니지만, 튜니카마이신 등의 특이적 화학 절단, 아세틸화, 포르밀화, 대사성 합성을 포함한 공지된 기술에 의하여 수행될 수 있다. 추가적으로, 유도체는 하나 이상의 비-분류 아미노산을 함유할 수 있다.
- [0296] 사람에서의 항체의 생체내 사용 및 시험관내 검출 분석을 포함한 일부 사용의 경우, 키메라, 사람화 또는 사람 항체를 사용하는 것이 바람직할 수 있다. 키메라 항체는 쥐와 모노클로날 항체에서 유래된 가변 영역 및 사람 면역글로불린에서 유래된 불변 영역을 가진 항체와 같이, 항체의 다른 부분이 다른 동물 종에서 유래된 분자이다. 키메라 항체를 생산하기 위한 방법은 당업계에 공지되어 있다. 예를 들면, 본원에 전부 참고문헌으로 포함된 문헌(Morrison, Science, 229:1202, 1985; Oi et al., BioTechniques, 4:214 1986; Gillies et al., J. Immunol. Methods, 125:191-202, 1989); 미국 특허 제5,807,715호; 제4,816,567호; 및 제4,816,397호를 참조하라. 사람화 항체는 비-사람 종으로부터의 하나 이상의 상보성 결정 영역(CDR) 및 사람 면역글로불린 분자로부터 틀 영역 및 불변 도메인을 가진 원하는 항원에 결합하는 비-사람 종으로부터의 항체 분자이다. 종종, 사람 틀 영역에서의 틀 잔기는 항원 결합을 변경, 바람직하게는 개선하기 위해서 CDR 공여자 항체로부터 상용하는 잔기로 치환될 것이다. 이들 틀 치환은 예를 들면, 항원 결합에 중요한 골격 잔기를 확인하고, 특정 위치에서 특이한 골격 잔기를 확인하기 위해서 CDR과 골격 잔기의 상호작용을 모델링함으로써 당업계에 잘 알려진 방법에 의하여 확인된다. 예를 들면, 본원에 전부 참고문헌으로 포함된 문헌(Queen et al., 미국 특허 제5,585,089호; Riechmann et al., Nature, 332:323, 1988)을 참조하라. 항체는 예를 들면 CDR-이식(EP 239,400; PCT 공보 WO 91/09967; 미국 특허 제5,225,539호; 제5,530,101호 및 제5,585,089호), 베니어링 또는 재포장(EP 592,106; EP 30 519,596; Padlan, Molecular Immunology, 28(4/5):489-498, 1991; Studnicka et al., Protein Engineering, 7(6):805-814, 1994; Roguska et al., Proc Natl. Acad. Sci USA, 91:969-973, 1994), 및 연쇄 서플링(미국 특허 제5,565,332호)을 포함한 당업계에 공지된 다양한 기술을 사용하여 사람화될 수 있는데, 이들 문헌 모두는 본원에 전부 참고문헌으로 포함된다. 사람화 항체는 미국 특허 제5,693,762호(Protein Design Labs), 제5,693,761호(Protein Design Labs), 제5,585,089호(Protein Design Labs), 제6,180,370호(Protein Design Labs) 및 미국 특허공보 제20040049014호, 제200300229208호에 개시된 방법 중 어느 것을 사용하여 생성될 수 있으며, 이들 각각은 본원에 전부 참고문헌으로 포함된다.
- [0297] 완전히 사람 항체는 사람 환자의 치료적 처치에 대하여 특히 바람직하다. 사람 항체는 사람 면역글로불린 서열로부터 유래된 항체 라이브러리를 사용한 전술한 파지 발현 방법을 포함한 당업계에 공지된 다양한 방법에 의하여 제조될 수 있다. 각각이 본원에 전부 참고문헌으로 포함된 미국 특허 제4,444,887호 및 제4,716,111호; 및 PCT 공보 WO 98/46645; WO 98/50433; WO 98/24893; WO 98/16654; WO 96/34096; WO 96/33735; 및 WO 91/10741를 참조하라.
- [0298] 사람 항체는 또한 기능적 내생 면역글로불린을 발현할 수 없지만, 사람 면역글로불린 유전자를 발현할 수 있는 형질전환 마우스를 사용하여 생성될 수 있다. 사람 항체를 생성하기 위한 이 기술의 개관은 문헌(Lonberg and Huszar, Int. Rev. Immunol, 13:65-93, 1995)을 참조하라. 사람 항체 및 사람 모노클로날 항체를 생산하기 위한 이 기술 및 이러한 항체를 생산하기 위한 프로토콜의 상세한 논의는 예를 들면 본원에 전부 참고문헌으로 포함된 PCT 공보 WO 98/24893; WO 92/01047; WO 96/34096; WO 96/33735; 유럽 특허 제0 598 877호; 미국 특허 제5,413,923호; 제5,625,126호; 제5,633,425호; 제5,569,825호; 제5,661,016호; 제5,545,806호; 제5,814,318호; 제5,885,793호; 제5,916,771호; 및 제5,939,598호를 참조하라. 뿐만 아니라, Abgenix, Inc. (Freemont, CA), Medarex (NJ) 및 Genpharm (San Jose, CA)와 같은 회사들은 전술한 것과 유사한 기술을 사용하여 선택된 항원

에 대하여 유도된 사람 항체를 제공하는 데 관여할 수 있다.

- [0299] 선택된 에피토프를 인식하는 완전히 사람 항체는 "인도된 선택"이라고 불리는 기술을 사용하여 생성될 수 있다. 이 접근법에서 선택된 비-사람 모노클로날 항체, 예를 들면 마우스 항체는 동일한 에피토프를 인식하는 완전히 사람 항체의 선택을 인도하는 데 사용된다(Jespersen et al., Bio/technology, 12:899-903, 1988).
- [0300] 본 발명은 Fc γ RIIIA 및/또는 Fc γ RIIA에 대한 Fc 영역의 친화력을 증가시키는 하나 이상의 아미노산 잔기의 변형(예를 들면, 치환, 삽입, 결실)에 의하여 사람 또는 사람화 치료 항체를 조작하는 것을 포함한다. 다른 구체예에서, 본 발명은 Fc γ RIIIA 및/또는 Fc γ RIIA에 대한 Fc 영역의 친화력을 증가시키고 Fc γ RIIB에 대한 Fc 영역의 친화력을 더 감소시키는 하나 이상의 아미노산 잔기의 변형에 의하여 Fc 영역에서 사람 또는 사람화 치료 항체(예를 들면, 종양 특이적 모노클로날 항체)를 조작하는 것에 관한 것이다. 조작된 치료 항체는 당업자에게 공지된 표준 분석에 의하여 결정할 때, 향상된 작동자 기능, 예를 들면 향상된 ADCC 활성, 식세포작용 활성 등을 더 가질 수 있다.
- [0301] 특정 구체예에서, 본 발명은 하나 이상 아미노산 잔기의 변형(예를 들면, 치환, 삽입, 결실)으로서, Fc γ RIIIA 및/또는 Fc γ RIIA의 Fc 영역의 친화력을 증가시키는 변형에 의해 Her2/neu 원형암유전자(예를 들면, Carter et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:4285-9에서 개시한 바와 같은 Ab4D5 사람화 항체)에 특이적인 사람화 모노클로날 항체를 조작하는 것을 포함한다. 다른 특정 구체예에서, 사람화 Her2/neu 모노클로날 항체의 변형은 또한 Fc γ RIIB에 대한 Fc 영역의 친화력을 더 증가시킬 수도 있다. 또 다른 특정 구체예에서, Her2/neu에 특이적인 조작된 사람화 모노클로날 항체는 당업계에 공지되어 있고 본원에서 개시 및 예시되는 표준 분석법에 의해 결정되는 바와 같은 향상된 작동자 기능을 가질 수도 있다.
- [0302] 다른 특정 구체예에서, 본 발명은 하나 이상 아미노산 잔기의 변형(예를 들면, 치환, 삽입, 결실)으로서, Fc γ RIIIA 및/또는 Fc γ RIIA의 Fc 영역의 친화력을 증가시키는 변형에 의해 마우스 사람 키메라 항-CD20 모노클로날 항체, 2H7을 조작하는 것을 포함한다. 다른 특정 구체예에서, 항-CD20 모노클로날 항체, 2H7의 변형은 또한 Fc γ RIIB에 대한 Fc 영역의 친화력을 더 증가시킬 수도 있다. 또 다른 특정 구체예에서, 조작된 항-CD20 모노클로날 항체, 2H7은 당업계에 공지되어 있고 본원에서 개시 및 예시되는 표준 분석법에 의해 결정되는 바와 같은 향상된 작동자 기능을 가질 수도 있다.
- [0303] 다른 특정 구체예에서, 본 발명은 하나 이상 아미노산 잔기의 변형(예를 들면, 치환, 삽입, 결실)으로서, Fc γ RIIIA 및/또는 Fc γ RIIA의 Fc 영역의 친화력을 증가시키는 변형에 의해, 2002년 8월 12일자로 출원된 미국 가출원 제60/403,266호, 및 2003년 8월 14일자로 출원된 미국 출원 제10/643,857호(Attorney Docket No. 011183-010-999), 2004년 4월 16일자로 출원된 미국 가출원 제60/562,804호 (Attorney Docket No. 011183-014-888); 2004년 5월 10일자로 출원된 미국 가출원 제60/569,882호 (Attorney Docket No. 011183-013-888) 및 각각 2004년 6월 21일자로 출원된 미국 가출원 제_호(Attorney Docket No. 011183-016-888, 011183-017-888, 및 011183-018-888)에서 개시된 항체 중 하나를 포함하지만, 이에 한정되지는 않는 항-Fc γ RIIB 항체를 조작하는 것을 포함한다. 상기 각각의 출원들은 전체가 참고로서 본원에서 인용된다. 본 발명의 방법에 따라 조작될 수도 있는 항-Fc γ RIIB 항체의 예는 ATCC 수탁 번호 PTA-4591을 갖는 2B6 모노클로날 항체 및 ATCC 수탁 번호 PTA-4592를 갖는 3H7, ATCC 수탁 번호 PTA-5958을 갖는 1D5 모노클로날 항체, ATCC 수탁 번호 PTA-5959를 갖는 1F2 모노클로날 항체, ATCC 수탁 번호 PTA-5960을 갖는 2D11 모노클로날 항체, ATCC 수탁 번호 PTA-5961을 갖는 2E1 모노클로날 항체 및 ATCC 수탁 번호 PTA-5962를 갖는 2H9 모노클로날 항체(모두 10801 University Boulevard, Manassas, VA 02209-2011에 기탁됨)이며, 이들은 본원에서 참고로 인용된다. 다른 특정 구체예에서, 항-Fc γ RIIB 항체의 변형은 또한 Fc γ RIIB에 대한 Fc 영역의 친화력을 추가로 감소시킬 수도 있다. 또 다른 특정 구체예에서, 조작된 항-Fc γ RIIB 항체는 당업계에 공지되어 있고 본원에서 개시 및 예시되는 표준 분석법에 의해 결정되는 바와 같은 향상된 작동자 기능을 추가로 가질 수도 있다. 특정 구체예에서, 2B6 모노클로날 항체 위치 334에서 글루탐산을 갖는 변형, 위치 359에서 아스파라긴을 갖는 변형, 및 위치 366에서 세린(MgFc13)을 갖는 변형; 또는 위치 316에서 아스파르트산으로의 치환, 위치 378에서 발린으로의 치환, 및 위치 399에서 글루탐산(MgFc27)으로의 치환; 또는 위치 243에서 이소류신으로의 치환, 위치 379에서 류신으로의 치환, 및 위치 420에서 발린(MgFc29)으로의 치환; 또는 위치 392에서 트레오닌으로의 치환 및 위치 396에서 류신(MgFc38)으로의 치환; 또는 위치 221에서 글루탐산으로의 치환, 위치 270에서 글루탐산으로의 치환, 위치 308에서 알라닌으로의 치환, 위치 311에서 히스티딘으로의 치환, 위치 396에서 류신으로의 치환, 및 위치 402에서 아스파르트(MgFc42)로의 치환; 또는 위치 410에서 히스티딘으로의 치환, 및 위치 396에서 류신 (MgFc53)으로의 치환; 또는 위치 243에서 류신으로의 치환, 위치 305에서 이소류신으로의 치환, 위치 378에서 아스파르트산으로의 치환, 위치 404에서 세린으로의 치환, 및 위치 396에서 류신 (MgFc54)으로의 치환; 또는 위치 255에서 이소류신으로의

치환, 및 위치 396 류신 (MgFc55)으로의 치환; 또는 위치 370에서 글루탐산으로의 치환, 및 위치 396에서 류신 (MgFc59)으로의 치환을 포함한다(표 5 참조).

[0304] **5.1.1 폴리펩티드 및 항체 콘주게이트**

[0305] 변이체 Fc 영역을 포함하는 본 발명의 분자(즉, 폴리펩티드, 항체)를 이중 폴리펩티드(즉, 비연관 폴리펩티드; 또는 폴리펩티드의 일부, 바람직하게는 10개 이상, 20개 이상, 30개 이상, 40개 이상, 50개 이상, 60개 이상, 70개 이상, 80개 이상, 90개 이상 또는 100개 이상의 아미노산)로 재조합으로 융합하거나 화학적으로 콘주게이트시켜서(공유결합 및 비공유적 콘주게이션) 융합 단백질을 생성할 수도 있다. 융합은 반드시 직접적인 필요는 없으나, 링커 서열을 통하여 발생할 수도 있다.

[0306] 추가적으로, 변이체 Fc 영역을 포함하는 본 발명의 분자(즉, 폴리펩티드, 항체)는 주어진 생물학적 반응을 변형시키는 치료제 또는 약물 부분에 콘주게이션될 수도 있다. 치료제 또는 약물 부분은 전통적 화학 치료제로 제한하는 것으로 해석되지 않는다. 예를 들면, 약물 부분은 바람직한 생물학적 활성을 지니는 단백질 또는 폴리펩티드일 수도 있다. 이러한 단백질들은 예를 들면, 아브린, 리신 A, 슈도모나스 외독소(즉, PE-40), 또는 디프테리아 독소, 리신, 겔로닌, 및 자리공 항바이러스 단백질과 같은 독소, 종양 괴사 인자와 같은 단백질, 인터페론(α -인터페론(IFN- α), β -인터페론(IFN- β))을 포함하지만, 이에 한정되지는 않음), 신경 성장 인자(NGF), 혈소판 유래 성장 인자(PDFG), 조직 플라스미노겐 활성화제(TPA), 아포프토시스 제제(예를 들면, PCT 공보 WO 97/33899호에서 개시된 바와 같은 TFN- α , TFN- β , AIM I), AIM II(PCT 공보 WO 97/34911 참조), Fas 리간드(Takahashi et al., J. Immunol., 6:1567-1574, 1994), 및 VEGI(PCT 공보 제 WO 99/23105호), 항혈전제 또는 항-혈관 신생제(예를 들면, 엔지오스타틴 또는 엔도스타틴), 또는 예를 들면, 림포킨(예를 들면, 인터루신-1("IL-1"), 인터루킨-2("IL-2"), 인터루킨-6("IL-6"), 과립구 대식세포 콜로니 자극 인자("GM-CSF"), 및 과립구 콜로니 자극 인자("G-CSF"), 대식세포 콜로니 자극 인자("M-CSF"), 또는 성장 인자(예를 들면, 성장 호르몬("GH")); 프로테아제, 또는 리보뉴클레아제와 같은 생물학적 반응 조절제를 포함할 수도 있다.

[0307] 본 발명의 분자(즉, 폴리펩티드, 항체)는 펩티드와 같은 마커 서열에 융합되어 정제를 용이하게 할 수 있다. 바람직한 구체예에서, 마커 아미노산 서열은 많은 시중 구매 가능한 것들 중에서, pQE 벡터(QIAGEN, Inc., 9259 Eton Avenue, Chatsworth, CA, 91311)에 제공된 태그와 같은 헥사-히스티딘 펩티드이다. 예를 들면, 문헌(Gentz et al., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:821-824)에서 설명한 바와 같이, 헥사-히스티딘은 융합 단백질의 정제에 편의를 제공한다. 정제에 유용한 다른 펩티드 태그들은 인플루엔자헤마글루티닌 단백질로부터 유도된 에피토프에 상응하는 헤마글루티닌 "HA" 태그(Wilson et al., Cell, 37:767 1984) 및 "플래그" 태그(Knappik et al., Biotechniques, 17(4):754-761, 1994)를 포함하지만, 이에 한정되지는 않는다.

[0308] 추가적 융합 단백질은 유전자-서플링, 모티프-서플링, 엑손-서플링, 및/또는 코돈-서플링(모두 합하여 "DNA 서플링"이라고 칭함) 기술을 통해 생성될 수도 있다. DNA 서플링을 사용하여 본 발명 분자의 활성(예를 들면, 높은 친화력 및 낮은 해리율을 갖는 항체)을 변형시킬 수도 있다. 일반적으로, 다음을 참조로 한다: 미국 특허 제 5,605,793호; 제5,811,238호; 제5,830,721호; 제5,834,252호; 및 제5,837,458호, 및 문헌(Patten et al., 1997, Curr. Opin. Biotechnol. 8:724-33; Harayama, 1998, Trends Biotechnol. 16:76; Hansson, et al., 1999, J. Mol. Biol. 287:265; 및 Lorenzo and Blasco, 1998, BioTechniques 24:308)(이들 각각의 특허 및 문헌들은 본원에서 그 전체가 참고로 인용됨). 변이체 Fc 영역을 포함하는 본 발명의 분자, 또는 본 발명의 분자를 코딩하는 핵산은 오류 유발 PCR에 의해 무작위적 돌연변이 유발에 놓이게 하여 추가로 변형시킬 수도 있다. 본 발명의 분자를 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 하나 이상의 부분들은 하나 이상의 이중 분자 중 하나 이상의 성분, 모티프, 섹션, 부, 도메인, 단편 등과 재조합될 수도 있다.

[0309] 또한, 본 발명은 진단제 또는 치료제에 콘주게이트 된 변이체 Fc 영역(즉, 항체, 폴리펩티드)을 포함하는 본 발명의 분자, 또는 혈청 반감기가 증가하는 것이 바람직하고/바람직하거나 특정한 세포의 서브세트에 표적되는 임의의 다른 분자를 포괄한다. 본 발명의 분자는 예를 들면, 임상 실험 과정의 일부로서 질병, 질환 또는 감염의 발달 또는 진행을 모니터링하도록 진단적으로 사용되어 예를 들면, 주어진 치료 섭생의 효능을 결정할 수 있다. 본 발명의 분자를 검출가능 물질에 결합시킴으로써 검출을 용이하게 할 수 있다. 검출가능 물질의 예는 각종 효소, 보결 분자단, 형광성 재료, 발광성 재료, 생체발광성 재료, 방사성 재료, 양전자 방출 재료, 및 비방사성 상자성 금속 이온을 포함한다. 검출가능 물질은 본 발명의 분자에 직접, 또는, 당업계 공지 기술을 사용하여 중간물(예를 들면, 당업계 공지의 링커와 같은 것)을 통하여 간접적으로 결합되거나 콘주게이션될 수도 있다. 예를 들면, 본 발명에 따른 진단상 사용을 위한 항체에 콘주게이션될 수 있는 금속 이온에 대한 미국 특허 제 4,741,900호를 참조하시오. 이러한 진단 및 검출은 본 발명의 분자를 검출가능 물질에 결합시킴으로써 이루어질

수 있으며, 상기 검출가능 물질은 각종 효소로서, 양고추냉이 퍼옥시다제, 알칼리 포스파타아제, 베타-갈락토시다제, 또는 아세틸콜린스테라제를 포함하지만, 이에 한정되지는 않는 효소들; 스트렙타비딘/비오틴 및 아비딘/비오틴과 같지만, 이에 한정되지는 않는 보결 분자단; 움벨리페론, 플루오레신, 플루오레신 이소티오시아네이트, 로다민, 디클로로트리아진일아민 플루오레신, 단실 클로라이드 또는 피코에리트린과 같지만, 이에 한정되지는 않는 형광 재료; 루시페라제, 루시페린, 및 아테쿠오린과 같지만, 이에 한정되지는 않는 생체발광성 재료; 비스무트 (^{213}Bi), 탄소 (^{14}C), 크롬 (^{51}Cr), 코발트 (^{57}Co), 플루오르 (^{18}F), 가돌리늄 (^{153}Gd , ^{159}Gd), 갈륨 (^{68}Ga , ^{67}Ga), 게르마늄 (^{68}Ge), 홀름 (^{166}Ho), 인듐 (^{115}In , ^{113}In , ^{112}In , ^{111}In), 요오드 (^{131}I , ^{125}I , ^{123}I , ^{121}I), 란타넘 (^{140}La), 루테튬 (^{177}Lu), 망간 (^{54}Mn), 몰리브덴 (^{99}Mo), 팔라듐 (^{103}Pd), 인 (^{32}P), 프라세오디뮴 (^{142}Pr), 프로메튬 (^{149}Pm), 레늄 (^{186}Re , ^{188}Re), 로듐 (^{105}Rh), 루테튬 (^{97}Ru), 사마륨 (^{153}Sm), 스칸듐 (^{47}Sc), 셀레늄 (^{75}Se), 스트론튬 (^{85}Sr), 황 (^{35}S), 테크네튬 (^{99}Tc), 티타늄 (^{201}Ti), 주석(^{113}Sn , ^{117}Sn), 트리튬 (^3H), 크세논 (^{133}Xe), 이테르븀 (^{169}Yb , ^{175}Yb), 이트륨 (^{90}Y), 아연(^{65}Zn)과 같으나, 이에 한정되지는 않는 방사성 재료; 각종 양전자 방출 단층 촬영을 사용하는 양전자 방출 금속, 및 비방사성 상자성 금속 이온을 포함하지만, 이에 한정되지는 않는다.

[0310] 변이체 Fc 영역을 포함하는 본 발명의 분자(즉, 항체, 폴리펩티드)는 세포독소(예를 들면, 세포분열 억제제 또는 살세포제), 치료제 또는 방사성 원소(예를 들면, α -방사제, γ -방사제 등)와 같은 치료제 부분에 콘주게이션될 수도 있다. 세포독소 또는 세포 독성제는 세포에 해로운 어떤 체제를 포함한다. 파클리탁솔, 사이토살라신 B, 그레이시딘 D, 에티뮴 브로마이드, 에메틴, 미토마이신, 에토포시드, 테노포시드, 빈크리스틴, 빈블라스틴, 콜히친, 독소루비신, 다뉴로루비신, 디히드로시 안트라신 디온, 미톡산트론, 미트라마이신, 악티노마이신 D, 1-데히드로테스토스테론, 글루코코르티코이드, 프로카인, 테트라카인, 리도카인, 프로프라놀롤, 및 푸로마이신 및 그것들의 유사체 및 동종체가 예에 포함된다. 치료제는 대사길항물질(예를 들면, 메토크사트, 6-머캅토피린, 6-티오구아닌, 시타라빈, 5-플루오로우라실 데카르바진), 알킬화제(예를 들면, 메클로르에타민, 티오에파 클로르암부실, 멜팔란, 카르부스틴(BSNU) 및 로무스틴(CCNU), 시클로토스파미드, 부설판, 디브로모만니톨, 스트렙토조토신, 미토마이신 C, 및 시스디클로로디아민 팔라늄(II)(DDP) 시스플라틴), 안트라사이클린(예를 들면, 다우노루비신(상기 다우노마이신) 및 독소루비신), 항생제(예를 들면, 닥티노마이신(상기 악티노마이신), 블레오마이신, 미트라마이신, 및 안트라마이신(AMC), 및 항-유사분열제(예를 들면, 빈크리스틴 및 빈블라스틴)를 포함하지만, 이에 한정되지는 않는다.

[0311] 이에 더하여, 본 발명의 분자는 라디오메탈 이온(예로써, 상기 방사성 재료를 참조)을 콘주게이션 하기에 유용한 방사성 재료 또는 거대 고리 킬레이트제와 같은 치료제 부분에 콘주게이션 될 수 있다. 특정 구체예에서, 거대 고리 킬레이트제는 링커 분자를 통해 항체에 부착될 수 있는 1,4,7,10-테트라아자시클로도데칸-N,N',N'',N'''-테트라아세트산 (DOTA)이다. 이러한 링커 분자는 통상적으로 당업계에 공지되어 있으며 각각 본원에서 전체가 참고로 인용되는 문헌(Denardo et al., 1998, Clin Cancer Res. 4:2483-90; Peterson et al., 1999, Bioconjug. Chem. 10:553); 및 (Zimmerman et al., 1999, Nucl. Med. Biol. 26:943-50)에서 설명된다.

[0312] 이러한 치료제 부분을 항체에 콘주게이션 하기 위한 기술이 주지되어 있다; 예를 들면, 문헌(Arnon et al., "Monoclonal antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", in Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeld et al. (eds.), 1985, pp. 243-56, Alan R. Liss, Inc.); Hellstrom et al., "Antibodies For Drug Delivery", in Controlled Drug Delivery (2nd Ed.), Robinson et al. (eds.), 1987, pp. 623-53, Marcel Dekker. Inc.); Thorpe, "Antibodies Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", in Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, Pinchera et al.(eds.), 1985, pp. 475-506); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", in Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy, Baldwin et al. (eds.), 1985, pp. 303-16, Academic Press; and Thorpe et al., Immunol. Rev., 62:119-58, 1982) 참조하라.

[0313] 한 구체예에서, 본 발명의 분자가 변이체 Fc 영역을 포함하는 항체인 경우, 상기 분자는 그것에 콘주게이션된 치료제 부분을 포함하거나 또는 이를 포함하지 않고서 투여되거나, 단독으로 투여되거나, 또는 치료적 처치에 유용한 세포독성 인자(들) 및/또는 사이토카인(들)과 함께 투여될 수 있다. 대안으로, 본 발명의 항체는 2차 항체에 콘주게이트 되어 본원에서 전체가 참고로 인용되는 미국 특허 제4,676,980호에 설명한 바와 같은 항체 헤테로콘주게이트를 형성할 수 있다. 또한, 본 발명의 항체는 표적 항원의 면역 분석 또는 정제에 특히 유용한, 고정 지지체에 부착될 수도 있다. 이러한 고정 지지체들은 유리, 셀룰로스, 폴리아크릴아미드, 나일론, 폴리스

티렌, 폴리비닐 클로라이드 또는 폴리프로필렌을 포함하지만, 이에 한정되지는 않는다.

[0314] **5.2 향상된 Fc γ RIII 결합을 위한 변이체 Fc 영역을 포함하는 분자의 스크리닝 및 그것의 특성화**

[0315] 바람직한 구체예에서, 1 가지 이상의 생화학적 기재 분석과 함께, 바람직하게는 고 처리량 방식으로, 본원에서 설명된 효모 디스플레이 기술을 사용하여 변경된 Fc γ R 친화력(예를 들면, 향상된 Fc γ RIIIA 친화력)를 갖는 변이체 Fc 영역을 포함하는 분자를 스크리닝하고 확인한다. 하나 이상의 생화학적 분석법은 Fc-Fc γ R 상호작용, 즉, Fc γ R에 대한 Fc 영역의 특이적 결합을 확인하기 위한 당업계 공지된 임의의 분석법일 수 있으며, ELISA 분석법, 표면 플라즈몬 공명 분석법, 면역침전 분석법, 친화력 크로마토그래피, 평형 투석법을 포함하지만, 이에 한정되지는 않는다. 일부 구체예에서, 하나 이상의 기능성을 기초로 한 분석법과 함께, 바람직하게는 고 처리량 방식으로, 본원에서 설명된 효모 디스플레이 기술을 사용하여 변경된 Fc γ R 친화력(예를 들면, 향상된 Fc γ RIIIA 친화력)를 갖는 변이체 Fc 영역을 포함하는 분자를 스크리닝하고 확인한다. 기능성을 기초로 한 분석법은 본원의 5.2.7 섹션에서 설명한 바와 같이 한 가지 이상의 Fc γ R 매개 작동자 세포 기능의 특성을 규명하기 위한 당업계 공지된 임의의 분석법일 수 있다. 본 발명의 방법에 의해 사용될 수 있는 작동자 세포 기능의 무제한적 예는 항체-의존성 세포 매개 세포독성(ADCC), 항체-의존성 식균 작용, 식균 작용, 오프온 작용, 오프온성 식균 작용, 세포 결합, 로제트법, C1q 결합, 및 보체 의존성 세포 매개 세포독성을 포함하지만 이에 한정되지는 않는다. 일부 구체예에서, 한 가지 이상의 생화학적 기재 분석법과 함께 또는 한 가지 이상의 기능성을 기초로 한 분석법과 병행하여, 바람직하게는 고 처리량 방식으로, 본원에서 설명된 효모 디스플레이 기술을 사용하여 변경된 Fc γ R 친화력(예를 들면, 향상된 Fc γ RIIIA 친화력)를 갖는 변이체 Fc 영역을 포함하는 분자를 스크리닝하고 확인한다.

[0316] Fc 영역의 Fc γ R에 대한 "특이적 결합"이라는 용어는 Fc 영역과 특정 Fc γ R과의 상호작용을 의미하며, 이것은 예를 들면, ELISA 또는 표면 플라즈몬 공명 분석법(예를 들면, BIAcoreTM)을 사용하여 결정되는 바와 같이, 모노머 Fc γ RIIIA의 경우, 약 150 nM 이상 및 다이머 Fc γ RIIB의 경우 약 60 nM 이상의 일정한 친화력을 갖는다. Fc 영역의 모노머 Fc γ RIIIA에 대한 일정한 친화력은 150 nM, 200 nM 또는 300 nM일 수 있다. Fc 영역의 다이머 Fc γ RIIB에 대한 일정한 친화력은 60 nM, 80 nM, 90 nM, 또는 100 nM일 수 있다. 본 발명의 방법에서 사용하기 위한 다이머 Fc γ RIIB는 당업계 숙련자에게 공지된 방법을 사용하여 생성될 수도 있다. 일반적으로, Fc γ RIIB의 세포외 영역은 다이머화 할 수 있는 이중 폴리펩티드에 공유 결합되어서, 이러한 결과의 융합 단백질은 다이머이며, 예를 들면, 본원에서 전체가 참고로 인용되는 2003년 1월 13일자로 출원된 미국 특허 제60/439,709호 (Attorney Docket No. 11183-005-888)를 참조하라. 특이적 상호작용은 일반적으로, 예를 들면, 사람 또는 기타 척추동물과 같은 살아 있는 개체 내에서 발생하는 조건, 및 포유동물 세포 또는 다른 척추동물 생체 또는 무척추동물 생체에서 얻은 세포를 유지 및 배양하기 위해 사용된 조건과 같이, 세포 배양에서 발생하는 조건을 포함하는, 생리학적 상태에서 안정하다.

[0317] 특정 구체예에서, 변이체 Fc 영역 및 변경된 Fc γ R 친화력을 갖는 분자를 스크리닝하고 확인하는 것은 다음을 포함한다: Fc-Fc γ R 상호작용을 결정하기 위한 생화학적 분석법, 바람직하게는 ELISA 기재 분석법을 사용하여, 효모 표면상에서 변이체 Fc 영역을 포함하는 분자를 디스플레이하는 단계; 및 변이체 Fc 영역을 포함하는 분자의 Fc γ R(1 가지 이상)에 대한 결합을 특성화하는 단계. 변이체 Fc 영역을 포함하는 분자가 1 가지 이상의 생화학적 기재 분석법, 예를 들면, ELISA 분석법에 의해, 1 가지 이상의 Fc γ R과의 상호작용에 대하여 특성화되고 1 가지 이상의 Fc γ R에 대한 변형된 친화력을 갖는 것으로 결정되었다면, 상기 분자는 당업계 공지된 표준 재조합 DNA 기술법을 사용하여 완전한 면역글로불린으로, 그리고 추가적 생화학적 특성화를 위해 포유동물 세포에서 발현된 변이체 Fc 영역을 포함하는 면역글로불린으로 조작될 수도 있다. 본 발명의 변이체 Fc 영역이 도입(예를 들면, 면역글로불린의 Fc 영역을 치환)되는 면역글로불린은 폴리클로날 항체, 모노클로날 항체, 이중특이적 항체, 다중-특이적 항체, 사람화 항체, 및 키메라 항체를 포함하지만, 이에 한정되지는 않는 임의의 면역글로불린일 수 있다. 바람직한 구체예에서, 변이체 Fc 영역은 세포 표면 수용체, 종양 항원, 또는 암 항원에 특이적인 면역글로불린으로 도입된다. 본 발명의 변이체 Fc 영역이 도입되는 면역글로불린은 암 또는 종양 항원에 특이적으로 결합할 수도 있으며, 상기 암 또는 종양 항원은 KS 1/4 범-암종 항원(Perez and Walker, 1990, J. Immunol. 142: 3662-3667; Bumal, 1988, Hybridoma 7(4): 407-415), 난소 암종 항원(CA125) (Yu et al., 1991, Cancer Res. 51(2): 468-475), 전립선 산성 포스파타제 (Tailor et al., 1990, Nucl. Acids Res. 18(16): 4928), 전립선 특이적 항원 (Henttu and Vihko, 1989, Biochem. Biophys. Res. Comm. 160(2): 903-910; Israeli et al., 1993, Cancer Res. 53: 227-230), 흑색종-관련 항원 p97 (Estin et al., 1989, J. Natl. Cancer Instit. 81(6): 445-446), 흑색종 항원 gp75 (Vijayasardahl et al., 1990, J. Exp. Med. 171(4): 1375-1380), 고분자량 흑색종 항원 (HMW-MAA) (Natali et al., 1987, Cancer 59: 55-63; Mittelman

et al., 1990, J. Clin. Invest. 86: 2136-2144), 전립선 특이적 막 항원, 암태아성 항원(CEA) (Foon et al., 1994, P roc. Am. Soc. Clin. Oncol. 13: 294), 다형 상피 무친 항원, 사람 젖 지방 글로불린 항원, 직장 종양-관련 항원으로서, 예를 들면 CEA, TAG-72 (Yokata et al., 1992, Cancer Res. 52: 3402- 3408), CO17-1A (Ragnhammar et al., 1993, Int. J. Cancer 53: 751-758)와 같은 것들; GICA 19-9 (Herlyn et al., 1982, J. Clin. Immunol. 2: 135), CTA-I 및 LEA, Burkitt 림프종 항원-38.13, CD19 (Ghetie et al., 1994, Blood 83: 1329-1336), 사람 B-림프종 항원-CD20 (Reff et al., 1994, Blood 83:435-445), CD33 (Sgouros et al., 1993, J. Nucl Med. 34:422-430), 강글리오시드 GD2 (Saleh et al., 1993, J. Immunol, 151, 3390-3398), 강글리오시드 GD3 (Shitara et al., 1993, Cancer Immunol Immunother. 36:373-380), 강글리오시드 GM2 (Livingston et al., 1994, J. Clin. Oncol 12: 1036-1044), 강글리오시드 GM3 (Hoon et al., 1993, Cancer Res. 53: 5244-5250)와 같은 흑색종 특이성 항원, T-항원 DNA 종양 바이러스를 포함하는 바이러스 유도성 종양 항원 및 RNA 종양 바이러스의 엔벨로프 항원과 같은 세포 표면 항원의 종양-특이성 이식 유형(TSTA), 결장의 CEA와 같은 종양태아성(oncofetal) 항원-알파-태아단백질, 방광 종양 태아성 항원(Hellstrom et al., 1985, Cancer. Res. 45:2210-2188), 사람 폐 암종 항원 L6, L20와 같은 분화 항원 (Hellstrom et al., 1986, Cancer Res. 46: 3917-3923), 섬유육종의 항원, 사람 백혈병 T-세포 항원-Gp37 (Bhattacharya-Chatterjee et al., 1988, J. of Immun. 141:1398-1403), 신당단백질, 스펅고지질, EGFR (표피 성장 인자 수용체)과 같은 유방암 항원, HER2 항원 (p185^{HER2}), 다형 표피 무친(PEM)(Hilkens et al., 1992, Trends in Bio. Chem. sci. 17:359), 악성 사람 림프종 항원-APO-1 (Bernhard et al., 1989, Science 245: 301-304), 분화 항원(Feizi, 1985, Nature 314: 53-57)으로서, 예를 들면 태아 적혈구에서 발견된 I 항원, 성인 적혈구, 착상 전 초기 배아에서 발견된 1차 내피 I 항원, 위 샘암종에서 발견된 I(Ma), 유방 상피에서 발견된 M18, M39, 골수세포에서 발견된 SSEA-1, 직장암에서 발견된 VEP8, VEP9, My1. VIM-D5, D56-22, 결장 샘암종에서 발견된 TRA-1-85(혈 군 H), C14, 폐 샘암종에서 발견된 F3, 위암에서 발견된 AH6, 배아 암종 세포에서 발견된 Y 합텐, Le^y, A431 세포에서 발견된 TL5 (혈 군 A), EGF 수용체, 췌장암에서 발견된 E₁ 시리즈(혈 군 B), 배아 암종 세포에서 발견된 FC10.2, 위 샘암종 항원, 샘암종에서 발견된 CO-514(혈 군 Le^a), 샘암종에서 발견된 NS-10, A431 세포의 EGF 수용체에서 발견된 CD-43(혈 군 Le^b), G49, 결장 샘암종에서 발견된 MH2(혈 군 AL^b/Le^y), 결장 암에서 발견된 19.9, 위암 무친, 골수종에서 발견된 T₅A₇, 흑색종에서 발견된 R₂₄, 배아 암종 세포에서 발견된 4.2, GD₃, D1.1, OFA-1, G_{M2}, OFA-2, G_{D2}, 및 M 1:22:25:8, 및 4 내지 8-세포 단계 배아에서 발견된 SSEA-3 및 SSEA-4를 포함하지만, 이에 한정되지는 않는다. 한 구체예에서, 항원은 피부 T 세포 림프종으로부터의 T 세포 수용체 유도성 펩티드이다 (Edelson, 1998, The Cancer Journal 4:62 참조).

[0318] 일부 구체예에서, 본 발명의 변이체 Fc 영역은 항-플루오레신 모노클로날 항체, 4-4-20으로 도입된다(Kranz et al., 1982 J. Biol. Chem. 257(12): 6987-6995; 이것은 본원에서 전체가 참고로 인용됨). 다른 구체예에서, 본 발명의 변이체 Fc 영역은 마우스-사람 키메라 항-CD20 모노클로날 항체 2H7으로 도입되며, 이것은 B 세포 상의 CD20 세포 표면 인단백질을 인지한다(Liu et al., 1987, Journal of Immunology, 139: 3521-6; 이것은 본원에서 전체가 참고로 인용됨). 또 다른 구체예에서, 본 발명의 변이체 Fc 영역은 Carter 등(1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 4285-9; 이것은 본원에서 전체가 참고로 인용됨)에 의해 설명되는 바와 같이 사람 표피 성장 인자 수용체 2(p185 HER2)에 대하여 사람화 항체(Ab4D5)로 도입된다. 또 다른 구체예에서, 본 발명의 변이체 Fc 영역은 사람화 항-TAG72 항체 (CC49)로 도입된다(Sha et al., 1994 Cancer Biother. 9(4):341-9). 다른 구체예에서, 본 발명의 변이체 Fc 영역은 림프종을 치료하는데 사용되는 리톡산으로 도입된다.

[0319] 다른 특정 구체예에서, 본 발명은 1 가지 이상의 아미노산 잔기의 변형(예를 들면, 치환, 삽입, 결실)으로서, Fc γ RIIIA 및/또는 Fc γ RIIA에 대한 Fc 영역의 친화력을 증가시키는 변형에 의해, 다음에서 개시한 항체 중 임의의 것을 포함하지만, 이에 한정되지는 않는 항-Fc γ RIIB 항체를 조작하는 것을 포함한다: 2002년 8월 12일자 로 출원된 미국 가출원 제60/403,266호; 2003년 8월 14일자 로 출원된 미국 출원 제10/643,857호 (Attorney Docket No. 011183-010-999); 2004년 4월 16일자 로 출원된 미국 가출원 제60/562,804 (Attorney Docket No. 011183-014-888); 2004년 5월 10일자 로 출원된 미국 가출원 제60/569,882호 (Attorney Docket No. 011183-013-888) 및 각각 2004년 6월 21자로 출원된 미국 가출원 제_호(Attorney Docket Nos. 011183-016-888, 011183-017-888, 및 011183-018-888). 본 발명의 방법에 의해 조작될 수도 있는 항-Fc γ RIIB 항체의 예는 ATCC 수탁 번호 PTA-4591을 갖는 2B6 모노클로날 항체 및 ATCC 수탁 번호 PTA-4592를 갖는 3H7, ATCC 수탁 번호 PTA-5958을 갖는 1D5 모노클로날 항체, ATCC 수탁 번호 PTA-5959를 갖는 1F2 모노클로날 항체, ATCC 수탁 번호 PTA-

5960를 갖는 2D11 모노클로날 항체, ATCC 수탁 번호 PTA-5961을 갖는 2E1 모노클로날 항체 및 ATCC 수탁 번호 PTA-5962를 갖는 2H9 모노클로날 항체 (모두 10801 University Boulevard, Manassas, VA 02209-2011에 기탁됨)를 포함하며, 이것들은 본원에 참고로 수록된다. 다른 특정 구체예에서, 항-Fc γ RIIB 항체의 변형은 또한 Fc γ RIIB에 대한 Fc 영역의 친화력을 추가로 감소시킬 수도 있다. 또 다른 특정 구체예에서, 조작된 항-Fc γ RIIB 항체는 추가적으로 당업계 공지되고 본원에서 개시 및 예시되어 있는 표준 분석법에 의해 결정되는 바와 같이, 향상된 작동자 기능을 가질 수도 있다. 일부 구체예에서, 본 발명의 변이체 Fc 영역은 암 항원 또는 세포 표면 수용체에 특이적인 치료적 모노클로날 항체로 도입되며, 상기 모노클로날 항체는 ErbituxTM (IMC-C225로도 알려짐) (ImClone Systems Inc.), EGFR에 대한 키메라 모노클로날 항체; 전이성 유방암에 걸린 환자의 치료를 위한 사람화 항-HER2 모노클로날 항체인 HERCEPTIN[®] (Trastuzumab) (Genentech, CA); 혈병 형성을 막기 위한 혈소판 상의 항-당단백질 IIb/IIIa 수용체인 REOPRO[®](abciximab)(Centocor); 급성 신장 동종이식 거부 예방을 위한 면역억제성, 사람화 항-CD25 모노클로날 항체인 ZENAPAX[®] (daclizumab) (Roche Pharmaceuticals, Switzerland)을 포함하지만, 이에 한정되지는 않는다. 기타의 예는 사람화 항-CD 18 F(ab')₂ (Genentech); 사람화 항-CD18 F(ab')₂인 CDP860 (Celltech, UK); CD4와 융합된 항-HIV gp120 항체인 PRO542(Progenics/Genzyme Transgenics); 항-CD14 항체인 C14 (ICOS Pharm); 사람화 항-VEGF IgG1 항체 (Genentech); 쥐과 항-CA 125 항체인 OVAREXTM (Altarex); 쥐과 항-17-IA 세포 표면 항원 IgG2a 항체인 PANOREXTM (Glaxo Wellcome/Centocor); 키메라 항-EGFR IgG 항체인 IMC-C225(ImClone System); 사람화 항- α V β 3 인테그린 항체인 VITAXINTM (Applied Molecular Evolution/MedImmune); 사람화 항 CD52 IgG1 항체인 Campath 1H/LDP-03(Leukosite); 사람화 항-CD33 IgG 항체인 Smart M195 (Protein Design Lab/Kanebo); 키메라 항-CD20 IgG1 항체인 RITUXANTM (IDEC Pharm/Genentech, Roche/Zettyaku); 사람화 항-CD22 IgG 항체인 LYMPHOCIDETM (Immunomedics); 사람화 항-HLA 항체인 Smart ID10(Protein Design Lab); 방사성 표지된 쥐과 항-HLA DR 항체인 ONCOLYMTM (Lym-1)(Techniclone); 사람화 IgG1 항체인 항-CD 11a (Genetech/Xoma); 사람화 항-ICAM3 항체인 ICM3(ICOS Pharm); 영장류화 항-CD80 항체인 IDEC-114(IDEC Pharm/Mitsubishi); 방사성 표지된 쥐과 항-CD20 항체인 ZEVALINTM (IDEC/Schering AG); 사람화 항-CD40L 항체인 IDEC-131(IDEC/Eisai); 영장류화 항-CD4 항체인 IDEC-151(IDEC); 영장류화 항-CD23 항체인 IDEC-152(IDEC/Seikagaku); 사람화 항-CD3 IgG인 SMART 항-CD3(Protein Design Lab); 사람화 항-보체 인자 5 (C5) 항체인 5G1.1 (Alexion Pharm); 영장류화 항-CD4 IgG1 항체인 IDEC-151(IDEC Pharm/SmithKline Beecham); 사람 항-CD4 IgG 항체인 MDX-CD4(Medarex/Eisai/Genmab); 사람화 항-TNF- α IgG4 항체인 CDP571(Celltech); 사람화 항- α 4 β 7 항체인 LDP-02(LeukoSite/Genentech); 사람화 항-CD4 IgG 항체인 OrthoClone OKT4A(Ortho Biotech); 사람화 항-CD40L IgG 항체인 ANTOVATM (Biogen); 사람화 항-VLA-4 IgG 항체인 ANTEGRENTM (Elan); 사람 항-CD64(Fc γ R)인 항체인 MDX-33(Medarex/Centocor); 사람화 항-IgE IgG1 항체인 rhuMab-E25 (Genentech/Norvartis/Tanox Biosystems); 영장류화 항-CD23 항체인 IDEC-152(IDEC Pharm); 쥐과 항 CD-147 IgM 항체인 ABX-CBL(Abgenix); 래트 항-CD2 IgG 항체인 BTI-322(Medimmune/Bio Transplant); 쥐과 항-CD3 IgG2a 항체인 Orthoclone/OKT3 (ortho Biotech); 키메라 항-CD25 IgG1 항체인 SIMULECTTM (Novartis Pharm); 사람화 항-p2-인테그린 IgG 항체인 LDP-01(LeukoSite); 쥐과 항 CD 18 F(ab')₂인 항-LFA-1(Pasteur-Merieux/Immunotech); 사람 항-TGF- β 2 항체인 CAT-152(Cambridge Ab Tech); 키메라 항-Factor VII 항체인 Corsevin M (Centocor)이다.

[0320]

본 발명의 변이체 Fc 영역은, 바람직하게는 면역글로불린의 문맥에서, 1 가지 이상의 생화학적 분석법 및/또는 1 가지 이상의 기능상 분석법을 사용하여, 바람직하게는 고 처리량 방식으로 추가로 특성화될 수 있다. 일부 대안의 구체예에서, 본 발명의 변이체 Fc 영역은 면역글로불린으로 도입되지 않으며 1 가지 이상의 생화학적 분석법 및/또는 1 가지 이상의 기능상 분석법을 사용하여, 바람직하게는 고 처리량 방식으로 추가로 특성화된다. 1 가지 이상의 생화학적 분석법은 Fc-Fc γ R 상호작용의 동역학적 매개변수를 결정하기 위한 ELISA 분석법, 및 표면 플라즈몬 공명-기재 분석법, 예를 들면, BIAcore 분석법을 포함하지만, 이에 한정되지는 않는, Fc-Fc γ R을 확인하기 위한 당업계 공지된 임의의 분석법일 수 있다. 1 가지 이상의 기능상 분석법은 당업자에게 공지되어 있거나 본원에서 설명된 바와 같이 1 가지 이상의 Fc γ R 매개 작동자 세포 기능을 특성화하기 위한 당업계 공지된 임의의 분석법일 수 있다. 특정 구체예에서, 변이체 Fc 영역을 포함하는 면역글로불린은 1 가지 이상의 Fc γ R, 예를 들면, Fc γ RIIA, Fc γ RIIA, Fc γ RIIA에 대한 결합에 대하여 ELISA 분석법에서 분석한 다음, 1 가지 이상의 ADCC 분석법에서 분석한다. 일부 구체예에서, 변이체 Fc 영역을 포함하는 면역글로불린은 표면 플라즈몬

공명-기재 분석법, 예를 들면, BIAcore를 사용하여 추가로 분석된다. 표면 플라스몬 공명-기재 분석법은 당업계 주지되어 있으며, 추가적으로 5.2.7 섹션에서 논의되고 본원의 실시예 6.8에서 예시된다.

[0321] 변이체 Fc 영역을 포함하는 면역글로불린을 특성화하기 위한 전형적인 고 처리량 분석법은 예를 들면, 4-4-20 항체 내에, 표준 재조합 DNA 기술법에 의해, 본 발명의 변이체 Fc 영역을 도입하는 단계; ELISA 분석법에서, 변이체 Fc 영역을 포함하는 4-4-20 항체의 Fc γ R (예를 들면, Fc γ RIIA, Fc γ RIIB)에 대한 특이적 결합을 특성화하는 단계; ADCC 분석법에서 (본원에 개시된 방법으로 사용하여) 변이체 Fc 영역을 포함하는 4-4-20 항체를 특성화하는 단계를 포함할 수도 있으며, 이때 표적 세포는 변이체 Fc 영역을 포함하는 4-4-20 항체로 오프소닌화되고; 이어서, 변이체 Fc 영역은 2차 면역글로불린, 예를 들면, 4D5, 2H7, 및 ADCC 분석법에서 특성화된 상기 2차 면역글로불린으로 클로닝될 수도 있으며, 이때 표적 세포는 변이체 Fc 영역을 포함하는 2차 항체로 오프소닌화된다. 후속하여 변이체 Fc 영역을 포함하는 2차 항체는 ELISA-기재 분석법을 사용하여 추가로 분석되어 Fc γ R에 대한 특이적 결합을 확증한다.

[0322] 바람직하게는, 본 발명의 변이체 Fc 영역은 ELISA 분석법에서 결정되는 바와 같이 야생형 Fc 영역보다 더 높은 친화력으로 Fc γ RIIA 및/또는 Fc γ RIIA에 결합한다. 가장 바람직하게는, 본 발명의 변이체 Fc 영역은 ELISA 분석법에서 결정되는 바와 같이 야생형 Fc 영역보다 더 높은 친화력으로 Fc γ RIIA 및/또는 Fc γ RIIA에 결합하고 더 낮은 친화력으로 Fc γ RIIB에 결합한다. 일부 구체예에서, 변이체 Fc 영역은 ELISA 분석법에서 결정되는 바와 같이, 야생형 Fc 영역이 Fc γ RIIA 및/또는 Fc γ RIIA에 결합하는 것보다, 변이체 Fc 영역은 적어도 2배 이상, 적어도 4배 이상, 더 바람직하게는 적어도 6배 이상, 가장 바람직하게는 8 내지 10배 이상의 친화력으로 Fc γ RIIA 및/또는 Fc γ RIIA에 결합하며, 야생형 Fc 영역이 Fc γ RIIB에 결합하는 것보다, 변이체 Fc 영역은 적어도 2배 이하, 적어도 4배 이하, 더 바람직하게는 적어도 6배 이하, 가장 바람직하게는 적어도 8배 내지 10배 이하의 친화력으로 Fc γ RIIB에 결합한다.

[0323] 변이체 Fc 영역을 포함하는 면역글로불린은 본원에서 개시되고 당업계 숙련자에게 공지된 방법을 사용하여, Fc-Fc γ R 상호작용의 동역학적 매개변수를 규정하기 위해, 표면 플라스몬 기재 공명 기재 분석법, 예를 들면, BIAcore를 사용하여 임의의 지점에서 분석될 수도 있다. 바람직하게는, BIAcore 분석법에 의해 결정되는 바와 같이, 본 발명의 변이체 Fc 영역의 모노머 Fc γ RIIA 및/또는 Fc γ RIIA에 대한 결합에 관한 Kd는 약 100 nM, 바람직하게는 약 70 nM, 가장 바람직하게는 약 40 nM이며; 본 발명의 변이체 Fc 영역의 다이머 Fc γ RIIB에 대한 결합에 관한 Kd는 약 80 nM, 약 100 nM, 더 바람직하게는 약 200 nM이다.

[0324] 가장 바람직한 구체예에서, 변이체 Fc 영역을 포함하는 면역글로불린은 Fc γ R과의 상호작용에 대하여 동물 모델에서 추가로 특성화된다. 본 발명의 방법에서 사용하기 위해 바람직한 동물 모델은 예를 들면, 사람 Fc γ R을 발현시키는 유전자 변형 마우스로서, 예를 들면, 본원에서 전체가 참고로 인용되는 미국 특허 제5,877,397호, 및 제6,676,927호에서 설명된 임의의 동물 모델이다. 본 발명의 방법에서 사용하기 위한 유전자 변형 마우스는 사람 Fc γ RIIA를 지니는 누드 녹아웃 Fc γ RIIA 마우스; 사람 Fc γ RIIA를 지니는 누드 녹아웃 Fc γ RIIA 마우스; 사람 Fc γ RIIB 및 사람 Fc γ RIIA를 지니는 누드 녹아웃 Fc γ RIIA 마우스; 사람 Fc γ RIIB 및 사람 Fc γ RIIA를 지니는 누드 녹아웃 Fc γ RIIA 마우스; 사람 Fc γ RIIA 및 Fc γ RIIA를 지니는 누드 녹아웃 Fc γ RIIA 및 Fc γ RIIA 마우스, 및 사람 Fc γ RIIA, Fc γ RIIA 및 Fc γ RIIB를 지니는 누드 녹아웃 Fc γ RIIA, Fc γ RIIA 및 Fc γ RIIB 마우스를 포함하지만, 이에 한정되지는 않는다.

[0325] 5.2.1 설계 전략

[0326] 본 발명은 컴퓨터 설계 전략, 라이브러리 생성법, 및 실험적 생산 및 스크리닝법을 포함하지만, 이에 한정되지는 않는 Fc 변이체를 생성하기 위한 조작법을 포함한다. 이 전략은 개별적으로 또는 다양한 조합으로 적용되어 본 발명 Fc 변이체를 조작할 수도 있다.

[0327] 가장 바람직한 구체예에서, 본 발명의 조작법은 Fc 영역 및 Fc 리간드 사이의 경계면에서 아미노산이 변형되지 않는 방법을 포함한다. Fc 리간드는 Fc γ R, Clq, FcRn, C3, 만노스 수용체, 단백질 A, 단백질 G, 만노스 수용체, 및 Fc에 결합하는 미발견된 분자들을 포함하지만, 이에 한정되지는 않는다. Fc 영역과 Fc 리간드 사이의 경계면에서 아미노산은 Fc 영역 및 그 리간드 사이에서 직접 및/또는 간접 접촉하거나, 경계면의 입체 형태를 결정하는 구조상의 역할을 수행하거나, 또는 X선 결정학 및 분자 모델링과 같은 구조적 분석에 의해 결정되는 바와 같이, 상호간 3Å 이상, 바람직하게는 2 Å 이상인 아미노산으로 정의된다. Fc 영역과 Fc 리간드 사이의 경계면에서 아미노산은 Sondermann 등(2000, Nature, 406: 267-273; 이것은 본원에서 전체가 참고로 인용된다)에 의해 개시된 바와 같이 Fc-Fc γ R 상호작용의 결정학 및 구조적 분석을 기초로 하여 Fc γ R과 직접 접촉하는 아미노산을 포함한다. Fc γ R과 직접 접촉하는 Fc 영역 내 위치의 예는 아미노산 234-239 (경첩 부위), 아미

노산 265-269 (B/C 루프), 아미노산 297-299 (C'/E 루프), 및 아미노산 327-332 (F/G) 루프이다. 일부 구체예에서, 변이체 Fc 영역을 포함하는 본 발명의 분자는 구조적 및 결정학적 분석을 기초로 하였을 때, Fc γ R과의 직접 접촉을 하지 않는, 즉, Fc-Fc γ R 결합 부위 내에 존재하지 않는 1 개 이상의 잔기의 변형을 포함한다.

[0328] 바람직하게는, 본 발명의 조작법은 Shields 등에 의해 확인된 바와 같이, 경첩 부위에 인접한 Fc 영역의 CH2 도메인, 예를 들면, Leu234-Pro238; Ala327, Pro329에 위치하는 아미노산 중 임의의 것을 변형시키지 않고, Fc 영역의 모든 사람 Fc γ R에 대한 결합에 영향을 미치는 않는다.

[0329] 다른 구체예에서, 본 발명은 변경된 Fc γ R 친화력 및/또는 변형된 작동자 기능을 갖는 Fc 변이체를 포함하며, 이러한 Fc 변이체는 Fc 영역과 Fc 리간드 사이 경계면의 위치에 아미노산 변형을 갖지 않는다. 바람직하게는, 이러한 Fc 변이체는 Fc 영역과 Fc 리간드 사이의 경계면에 존재하는 1 가지 이상의 다른 아미노산 변형과 함께, 추가적으로 특정한 변형된 특성, 예를 들면, 변경된 Fc γ R 친화력에 영향을 미친다. Fc 및 Fc 리간드 사이의 경계면에서 아미노산 변형은 당업계 공지 방법, 예를 들면, Fc-리간드 복합체의 구조적 분석을 기초로 하여 이루어질 수도 있다. 이에 한정되지는 않는 예로써, 결합 경계면에 영향을 미치는 Fc 위치에서의 효과적으로 유리한 치환을 조사함으로써, 변이체는 상기 샘플을 새로운 경계면 형태로 조작할 수 있으며, 이들 중 일부는 Fc 리간드에 대한 결합을 향상시킬 수도 있으며, 이들 중 일부는 Fc 리간드 결합을 감소시킬 수도 있고, 이들 중 일부는 다른 유리한 특성을 가질 수도 있다. 이러한 새로운 경계면 형태는 예를 들면, 경계면을 형성하는 Fc 리간드 잔기와의 직접 상호작용으로 인한 것이거나, 측쇄 또는 백본 형태의 동요와 같은 아미노산 변형에 기인한 간접 효과의 결과일 수 있다.

[0330] 본 발명은 위치 297에서 Fc 탄수화물의 형태가 변형되어 있는 다른 변형과 함께 본원에 개시된 아미노산 변형 중 임의의 것을 포함하는 조작 Fc 변이체를 포함한다. 본 발명은 N297 탄수화물의 형태 및 구성상 변화를 포함하며, 상기 변화로 인하여 바람직한 특성, 예를 들면, Fc γ R에 대한 친화력이 증가되거나 감소된다. 이러한 변형은 추가적으로 본 발명의 Fc 변이체의 본래 아미노산의 표현형 변형을 증가시킬 수도 있다. 특정 메커니즘의 작용에 얽매고자 하지는 않지만, 이러한 전략은 탄수화물 구조 및 형태가 Fc-Fc γ R 및 Fc/Cl q 결합에 현저히 영향을 미친다는 관찰에 의해 지지된다(Umaha et al., 1999, Nat Biotechnol 17:176-180; Davies et al., 2001, Biotechnol Bioeng 74:288-294; Mimura et al., 2001, J Biol Chem 276:45539; Radaev et al., 2001, J Biol Chem 276:16478-16483; Shields et al. 2002, J Biol Chem 277:26733-26740; Shinkawa et al., 2003, J Biol Chem 278:3466-3473).

[0331] 본 발명에 따른 Fc 변이체를 생성하기 위한 다른 설계 전략이 제공되며, 이때 Fc 영역이 다시 조작되어 당화에 있어서 구조 및 기능상 의존성을 제거한다. 이 설계 전략은 N297 탄수화물의 부재시 Fc 구조, 안정성, 가용성, 및/또는 Fc 기능(예를 들면, 1개 이상의 Fc 리간드에 대한 Fc의 친화력)의 최적화를 수반한다. 하나의 접근법에서, 당화의 부재시 용매에 노출되는 위치는 안정하고, Fc 구조와 구조적으로 일관되며, 응집하는 경향을 갖지 않도록 조작된다. 비당화 Fc를 최적화하기 위한 접근법은 Cg2-Cg2 다이머 축을 향하여 마주보도록 극성 및/또는 하전된 잔기를 통합시킴으로써 비당화 Fc 안정성 및/또는 가용성을 향상시키는 아미노산 변형을 설계하고, 비당화 Fc-Fc γ R 경계면 및 비당화 Fc와 임의의 다른 Fc 리간드와의 경계면을 직접 증가시키는 아미노산 변형을 설계하는 것을 포함하지만, 이에 한정되지는 않을 수 있다.

[0332] 본 발명의 Fc 변이체는 작동자 기능을 변형시키는 변형을 포함하지만, 이에 한정되지는 않는 다른 Fc 변형과 조합될 수도 있다. 본 발명은 본 발명의 Fc 변이체를 다른 Fc 변형과 조합하여 항체 또는 Fc 융합에 있어서 부가적이고, 상승적이거나, 신규한 특성을 제공하는 것을 포함한다. 이러한 변형은 CH1, CH2, 또는 CH3 도메인 또는 그들의 조합일 수도 있다. 바람직하게 본 발명의 Fc 변이체는 조합되는 변형의 특성을 향상시킨다. 예를 들면, 본 발명의 Fc 변이체가 야생형 Fc 영역을 포함하는 유사한 분자보다 더 높은 친화력으로 Fc γ RIIIA에 결합하는 것으로 알려진 돌연변이체와 결합되는 경우, 본 발명의 돌연변이체와의 결합으로 인하여 Fc γ RIIIA 친화력에 있어서 몇 배 이상 증가된다.

[0333] 한 구체예에서, 본 발명의 Fc 변이체는 본원에서 참고로 전체가 인용되는 하기에서 개시한 바와 같이 기타 공지 Fc 변이체와 결합될 수도 있다: Duncan et al., 1988, Nature 332:563-564; Lund et al., 1991, J. Immunol 147:2657-2662; Lund et al., 1992, Mol Immunol 29:53-59; Alegre et al., 1994, Transplantation 57:1537-1543; Hutchins et al., 1995, Proc Natl. Acad Sci U S A 92:11980-11984; Jefferis et al., 1995, Immunol Lett. 44:111-117; Lund et al., 1995, Faseb J 9:115-119; Jefferis et al., 1996, Immunol Lett 54:101-104; Lund et al., 1996, J Immunol 157:4963-4969; Armour et al., 1999, Eur J Immunol 29:2613-2624; Idusogie et al., 2000, J Immunol 164:4178-4184; Reddy et al., 2000, J Immunol 164:1925-1933; Xu et al.,

2000, Cell Immunol 200:16-26; Idusogie et al., 2001, J Immunol 166:2571-2575; Shields et al., 2001, J Biol Chem 276:6591-6604; Jefferis et al., 2002, Immunol Lett 82:57-65; Presta et al., 2002, Biochem Soc Trans 30:487-490); US 5,624,821; US 5,885,573; US 6,194,551; PCT WO 00/42072; PCT WO 99/58572.

[0334] **5.2.2 FcγR-Fc 결합 분석**

[0335] FcγR-Fc 결합 분석은 변이체 Fc 영역을 포함하는 본 발명의 분자의 FcγR에 대한 결합을 결정하기 위해 개발되었으며, 이는 그것의 리간드에 대한 수용체의 고유의 약한 친화력에도 불구하고, 예를 들면, FcγRIIB 및 FcγRIIIA에 대한 마이크로몰 범위에서, 상호작용의 검출 및 정량화를 허용하였다. 본 방법은 복합체화 되지 않은 FcγR과 비교하여, Fc 영역에 대한 향상된 항원항체결합력을 갖는 FcγR 복합체의 형성을 포함한다. 본 발명에 의하면, 바람직한 분자 복합체는 테트라머 FcγR 복합체를 형성하기 위해 (a) FcγR의 가용성 영역 (예를 들면, FcγRIIIA, FcγRIIA 또는 FcγRIIB의 가용성 영역); (b) FcγR의 가용성 영역 (예를 들면, FcγRIIIA, FcγRIIA 또는 FcγRIIB의 가용성 영역)의 C-말단에 작동가능하게 연결된 비오틴화된 15개의 아미노산 AVITAG 서열 (AVITAG); 및 (c) 몰비로(바람직하게는, 5:1의 몰비로) 스트렙타비딘-피코에리트린(SA-PE)을 포함하는 테트라머 면역 복합체이다. 본 발명의 바람직한 구체예에 의하면, 융합 단백질은 예를 들면, 15 아미노산 AVITAG 서열 내 리신 잔기를 특이적으로 비오틴화하는 대장균 Bir A 효소, 비오틴 리가제를 사용하여 효소로 비오틴화한다. 본 발명의 특정 구체예에서, 스트렙타비딘 이동 분석을 포함하지만, 이에 한정되지는 않는 당업계 숙련자에게 공지된 표준 방법에 의해 결정되는 바와 같이, 85%의 융합 단백질이 비오틴화된다. 본 발명의 바람직한 구체예에 의하면, 비오틴화 가용성 FcγR 단백질을 1X SA-PE:5X 비오틴화 가용성 FcγR 몰비로 SA-PE와 혼합하여 테트라머 FcγR 복합체를 형성한다.

[0336] 본 발명의 바람직한 구체예에서, Fc 영역을 포함하는 폴리펩티드는 모노머 비복합체 FcγR 보다 8배 이상 높은 친화력으로, 본 발명의 방법에 의해 형성된 테트라머 FcγR 복합체에 결합한다. Fc 영역을 포함하는 폴리펩티드의 테트라머 FcγR 복합체에 대한 결합은 예를 들면, 형광성 활성화 세포 분류(FACS), 방사성면역분석법, ELISA 분석법 등과 같은 당업계 숙련자에게 공지된 표준 기술을 사용하여 결정될 수도 있다.

[0337] 본 발명은 세포 기재 또는 무세포 분석법에서 Fc 영역을 포함하는 분자의 기능성을 결정하기 위해, 상기 설명된 방법에 따라 형성된 면역 복합체의 사용을 포함한다.

[0338] 편의상, 시약은 분석 키트, 즉, 변이체 Fc 영역을 포함하는 분자가 FcγR 테트라머 복합체에 결합하는 능력에 대하여 분석하기 위한 시약의 포장된 조합으로 제공될 수도 있다. 또한, Fc-FcγR 상호작용을 결정하는데 사용하기 위한 분자 복합체의 다른 형태가 본 발명의 방법에서 사용하기 위해 고려되며, 예를 들면, 본원에서 전체가 참고로 인용되는 2003년 1월 13일자로 출원된 미국 가출원 60/439,709호(Attorney Docket No. 11183-005-888)에서 설명한 바와 같이 형성된 융합 단백질이다.

[0339] **5.2.3 효모 디스플레이 라이브러리의 돌연변이유발 및 구성**

[0340] IgG Fc 및 Fc 수용체 간의 분자 상호작용은 구조적 기술 및 유전적 기술 모두에 의해 이미 연구되었다. 이들 연구는 상이한 FcγR에 대한 Fc의 기능상 결합에 중요한 아미노산 잔기를 확인하였다. 이들 변화 중 어느 것도 동물 모델 내 치료 항체의 사람 FcγR 매개 효능을 향상시키는 것으로 나타나지 않았다. 이들 잔기 또는 다른 잠재적으로 중요한 잔기에서 모든 잠재적인 아미노산 변화들의 완전한 분석이 보고되지는 않았다. 본원에서 설명된 플랫폼은 모든 가능한 아미노산 변화를 갖는 돌연변이 라이브러리를 구성하고, 복합 기능 분석을 사용하여 라이브러리를 스크리닝하는 능력, 및 최종적으로 관련된 사람화 동물 모델 내 라이브러리를 분석하는 능력을 갖는다.

[0341] 본 발명은 당업계 공지되어 있거나 개발 중인 유전적 데이터 및 구조적 데이터 모두를 기초로 한 다수의 라이브러리의 구성을 포함한다. 본원에서 설명되고 예시된 방법은 돌연변이를 함유하는 개별 라이브러리를 통합시켜서 Fc 영역 내 3-6 잔기에서 모든 20개 아미노산의 변화를 테스트한다. 돌연변이의 완전한 세트는 모든 가능한 돌연변이의 조합으로 집합될 것이다. 생성된 각각의 돌연변이의 수는 라이브러리 어셈블리 중에 포함되는 부위의 수를 근거로 한다(하기 표 9A). 라이브러리 크기는 최초 스크린의 선택 및 그 결과 초기 클로닝 단계에 대한 벡터의 선택을 결정할 것이다.

표 9A

표적 부위의 수를 기초로 한 독립 돌연변이의 수

라이브러리	잔기의#	독립 돌연변이#	1차 스크린
소형	3 이하	최대 8000	ELISA
대형	4-6	$1.6 \times 10^5 - 6.4 \times 10^7$	표면 디스플레이

[0342]

[0343]

본 발명은 제한적 수의 중요한 잔기(예를 들면, 3-6)에 집중되는, 조합적 라이브러리의 구성을 포함한다. 무작위 돌연변이 유발된 IgG1 Fc의 라이브러리 및 본원에서 설명되고 예시된 스크리닝 분석법을 사용하여, Fc 변이체를 확인한다. 초기 라운드에서, FcR 결합 프로파일 및 기능상 활성을 기초로 하여 최고 5 개의 돌연변이를 선별한다. 모든 가능한 아미노산 변화 및 5개 위치에서 그들의 조합을 채우는데 20^5 개별 돌연변이체가 필요할 것이다. 각각의 돌연변이에 대하여 적어도 10 배 적용 범위를 갖는 라이브러리를 생성할 것이다. 추가적으로, 영역은 이용가능한 정보, 예를 들면, 결정 구조 데이터, 마우스/사람 이소타입 FcγR 결합 차, 유전적 데이터, 및 돌연변이 유발로 확인된 추가의 부위를 기초로 하여 선택될 것이다.

[0344]

현재의 부위 특이적 돌연변이 유발 프로토콜의 가장 큰 약점은 치우친 개체군이 생성되고, 일부 영역에서 변이들이 과잉 존재하며, 나머지 영역에서 돌연변이가 못 미치게 존재하거나 완전히 결핍한다는 것이다. 본 발명은 증폭 PCR 및 역 PCR과 같은 PCR 기반 접근법에 의해 라이브러리 구성에 도입된 바이어스를 제거하기 위해 충분히 개발된 유전자 구축 기술을 사용하여 바람직한 Fc 돌연변이의 비편향적 배열을 생성함으로써 이 문제점을 극복한다. 본 발명의 접근법의 주요한 특징은 1) 변성된 프라이머를 대신하여 모든 표적 코돈에 대하여 20개 각각의 올리고의 동일물 혼합의 사용이다. 이 방법에서 각각의 아미노산은 단일, 가장 많이 사용된 코돈으로 표시되는 반면, 변성된 프라이머는 더 적은 수의 코돈에 의해 코딩된 것들 상에서 그 이상의 코돈에 의해 코딩된 아미노산을 표시한다. 2) 사슬 치환 접근법에 의한 돌연변이 구축. 이것은 모든 바람직한 사슬의 비편향적 도입이 최종 생성물을 보증한다.

[0345]

전형적인 프로토콜은 하기 단계를 포함한다: 1) 동일한 가닥에 대하여 모두 상보적인, 1 개 또는 몇 개의 위치에 바람직한 변화가 존재하는 인산화 올리고를 열안정성, 5'>3' 엑소뉴클레아제 결핍, DNA 중합효소 및 리가제와 함께 주형에 첨가하는 단계(도 25a). 2) 모든 혼합물을 바람직한 양의 생성물을 생성하기에 충분한 많은 중합/리게이션 사이클을 겪게 하는 단계. 5'>3' 엑소뉴클레아제 결핍 DNA 중합효소의 사용은 프라이머 서열 및 그것의 포스파타제 잔기의 보전성을 보증하며, 이때 열안정성 리가제는 개별 프라이머-확장된 단편들을 인접 단일 가닥 사슬로 모은다. 반응 사이클은 최종 생성물로의 편향을 이끌어 내지 않으면서 올리고 풀의 완전한 소모 시까지 계속할 수 있다(도 25 b). 3) 단일 가닥 돌연변이의 생성된 풀이 반응물에 역 유전자-특이적 프라이머를 첨가함으로써 이중 가닥 DNA로 전환된다. 4) 이중 가닥 생성물은 말단으로 설계된 제한 부위에서 가수분해되며 적절한 발현 벡터로 클로닝된다(도 25 1d).

[0346]

라이브러리의 질을 보증하기 위해, PCR 증폭된 단편을 전기 영동에 의해 분석하여 최종 PCR 생성물의 길이를 결정한다. PCR 산물의 >99%가 예상된 길이인 경우 반응은 성공적인 것으로 특성화될 것이다. 최종 라이브러리는 발현 벡터로 클로닝될 것이다. 돌연변이 라이브러리의 단편은 돌연변이 코돈 통합 비율을 결정하기 위해 시퀀싱될 것이다. 시퀀싱된 단편의 수는 돌연변이 된 표적 부위의 수를 기초로 할 것이며 라이브러리 유효성은 표적 부위에서 돌연변이가 관찰된 비율로서 결정될 것이다(표 10). 삽입체가 없는 벡터의 비율은 2% 미만이어야 한다. 비표적화 부위에서 돌연변이의 비율은 8% 미만이어야 한다. 90% 미만의 정확한 삽입체가 있는 클론을 함유하는 라이브러리는 본 연구자들이 스크리닝 타임라인을 유지하도록 허용할 것이다.

표 10

라이브러리에 대한 돌연변이의 기대율

표적화 잔기	서열 반응의#	라이브러리 유효성에 대한 돌연변이의 대략적 비율					
		단일	2중	3중	4중	5중	6중
3	20	42%	43%	15%	NA	NA	NA
4	50	29%	43%	21%	7%	NA	NA
5	75	18%	35%	32%	11%	4%	NA
6	100	12%	20%	40%	20%	6%	2%

[0347]

[0348]

다른 구체예에서, 본 발명은 라이브러리의 구성을 위한 중복 또는 역 PCR을 포함한다. 비편향을 유지하기 위해, 각 코돈에 대한 개별 프라이머를 변성 프라이머 대신에 사용할 것이다. 상기 개시된 바와 같은 유사한 유효 반응도가 사용될 것이다.

[0349]

가장 바람직하게 자동화된 프로토콜이 고 처리량 라이브러리 생성을 위해 사용될 것이다. 자동화는 향상된 처리량, 작동 중단, 및 지루한 반복 작동을 필요로 하는 과업에 대한 실험상의 오류의 전반적 감소를 허용한다. 올리고 합성 능력은 12 시간당 575 60mer 올리고의 총 생산 능력을 갖는 2 Mermade DNA 합성기(Bioautomation, Inc.)를 기초로 한다. 독점 소프트웨어는 최종 올리고뉴클레오타이드의 설계, 합성, 및 저장의 모든 측면을 다룬다. 로봇식 액체 핸들러를 사용하여 총 길이 Fc 돌연변이의 합성을 위해 올리고머를 시작하고 돌연변이 Fc를 항체 중쇄 발현 벡터로 통합시키기 위한 리게이션 반응을 시작할 것이다. 리게이션 후, 라이브러리 클론을 배열하고 3 부위에서 포화된 조합 라이브러리와 동량인 ~8000 미니프랩을 생성하는데 1 FTE~10 일이 걸리는 것으로 추정된다. 박테리아 형질전환에 이어서, Qpix-2 클론 집게 로봇을 96 딥 웰 플레이트로 콜로니를 집기 위해 사용할 것이다. 배양액 성장은 12 플레이트를 인큐베이션할 수 있는, 전자 부상 교반기를 사용하여 이루어질 것이며 그 결과로 37°C에서 12-16 시간 내에 고밀도 성장한다. Qiagen 미니프랩 로봇을 사용하여 2.5 시간 내 4 96 웰 플레이트의 비율에서 DNA 프랩을 수행할 것이다. 중복 과업에 의해 5개의 이러한 라이브러리가 1 FTE와 함께 9 개월 내에 구성될 수 있다.

[0350]

친화력 돌연변이는 선별된 프로토콜에 의해 풍부해질 수 있는 미리 선택된 돌연변이 풀 또는 유전자 패밀리의 구성원으로부터 돌연변이의 새로운 세트의 조합의 어셈블리를 필요로 한다. 바람직한 표현형을 갖는 돌연변이체의 분리가 이루어질 때까지 과정이 몇 회 반복된다. 이 과정을 완수하기 위한 현재의 효소 접근법, DNA 서플링의 약점은 뉴클레아제의 핫 스팟인 유전자 내 특이적 부위로 인하여 도입될 수 있는 편향, 최종 다시 어셈블리된 풀 내 특이적 돌연변이의 우세 및 최종 풀 내 원래의 돌연변이의 일부의 손실이다. 이러한 단점을 극복하기 위해, 빌드-에이-진(build-a-gene)(BAG) 기술을 사용하여 수용체(들) 결합에 중요할 수도 있는 모든 잠재적 위치에서 무작위 아미노산 변화를 함유하는 Fc 돌연변이체의 고도 복합체 라이브러리를 생성할 것이다. IgG Fc의 특이적 영역을 덮는 세트의 변성 올리고가 사용될 것이다(도 26 참조).

[0351]

올리고는 ~30 nt일 것이며 1 개(4 올리고) 또는 2 개 AA(8 올리고)를 변화시키기 위해 합성된 변성 올리고가 구성될 것이다. 올리고는 어떠한 간격도 없이 중복되도록 설계된다. 모든 2000+ 올리고가 개별적으로 및 조합으로 사용되어 상기 개략된 프로토콜을 사용하는 Fc 돌연변이의 어레이를 생성할 것이다(A.20). 본 발명자들은 돌연변이 및 야생형 올리고의 선택된 조합을 풀링하기 위해 홈-제작(home-written) 무작위자 프로그램 및 로봇식 액체 핸들러를 사용할 것이다. 대형 라이브러리가 벡터로 클로닝될 것이며 이것은 효모 표면 디스플레이를 사용하는 스크리닝에 대하여 허용될 것이다. 이 접근법은 자기 비드 선별을 이용한 다음 유세포 측정을 이용하고 10^9 이상이의 복잡성을 갖는 라이브러리로 성공적으로 적용되었다(Feldhaus et al., 2003, Nat. Biotech. 21(2):163-170; 이것은 본원에서 전체가 참고로 인용됨). 이것은 1 풀 내지 7 중 임의의 것에서 테스트하기 위한 부위의 수를 제한하여, 1.3×10^9 가능 돌연변이/풀을 결과로 한다.

[0352]

라이브러리의 질을 보증하기 위해 PCR 증폭 단편을 전기영동에 의해 분석하여 최종 PCR 산물의 길이를 결정할 것이다. 반응은 PCR 산물의 >99%가 예상된 길이 인 경우, 반응은 성공적인 것을 특성화될 것이다. 돌연변이 라이브러리의 단편이 시퀀싱되어 돌연변이 코돈 통합율을 결정할 것이다. 시퀀싱된 단편의 수는 돌연변이된 표적 부위의 수를 기반으로 할 것이며 라이브러리 유효성은 표적 부위에서 돌연변이의 관찰된 비율로서 결정될 것이

다(표 10). 삽입체가 없는 벡터의 비율은 2% 미만이어야 한다. 비표적화 부위에서 돌연변이의 비율은 8% 미만이어야 한다.

[0353] 이 접근법에 의해 돌연변이 유발의 효능의 바람직한 수준을 달성하는 능력은 클론의 서브세트를 시퀀싱함으로써 결정될 것이다. BAG에 대한 대안은 "DNA 서플링" 프로토콜을 사용하는 것이다. 이것은 모든 돌연변이, 단일, 더블, 트리플 등의 풀링을 필요로 한다. DNA 제조 후, Fc 영역은 Fc의 돌연변이화 영역, ~700 bp를 선택적으로 증폭하는 양 측면에 접하는 프라이머를 사용하여 PCR에 의해 증폭될 것이다. 신규한 돌연변이를 증폭 DNA의 DNaseI 처리 및 150-200 bp 단편의 분리를 통하여 Fc 내 돌연변이의 리서플링에 의해 구성된다(예를 들면, Stemmer et al., 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 91:10747-51 참조). 단편은 다시 리게이션되고, 네스티드 프라이머로 PCR 증폭되며 효모 표면 디스플레이 벡터, pYD1으로 클로닝될 것이다. 재조합된 라이브러리를 본원에서 설명되고 예시한 바와 같이 효모 Fc 디스플레이 스크린에서 다시 선별될 것이다.

[0354] BAG 라이브러리는 조합적 라이브러리와 가장 동일한 장비를 이용할 것이다. 그러나, 클로닝은 효모 표면 디스플레이에 적당한 벡터 내이고, 개별 클론의 어레이를 필요로 하지 않을 것이며, 효모 표면 디스플레이가 초기에 대형 라이브러리의 농축을 위해 사용될 것이기 때문이다. 농축 개별 클론의 적절한 수준에 따라 어레이 될 것이다.

[0355] 변이체 Fc 영역을 포함하는 분자의 초기 라이브러리는 당업계 공지된 돌연변이 유발 기술을 임의의 무작위를 사용하여 생성된다. Fc 영역의 아미노산 서열 변이체가 당업계 숙련자에게 공지된 임의의 돌연변이 유발 기술에 의해 얻어질 수도 있는 것으로 당업자에게 이해될 것이다. 이들 기술의 일부는 본원에서 간략히 설명되지만, 대안의 과정은 동량의 결과를 생산할 수도 있음이 인지될 것이다. 바람직한 구체예에서, 변이체 Fc 영역을 포함하는 본 발명의 분자는 하기, 실시예 6에서 예시한 바와 같은 오류 유발 PCR에 의해 제조된다(Leung et al., 1989, Technique, 1:11 참조). 본 발명의 방법에서 사용하기 위한 2-3 bp/Kb의 오류율을 갖는 것이 특히 바람직하다. 한 구체예에서, 오류 유발 PCR을 사용하여 2-3 돌연변이/kb의 빈도를 얻는다.

[0356] 돌연변이 유발은 항체 Fc 영역(예를 들면, CH2 또는 CH3 도메인)을 포함하는 항체 또는 폴리펩티드의 Fc 영역의 서열 내 1 개 이상의 변화를 갖는 올리고뉴클레오타이드를 합성하여 변형시키는 것을 포함하지만, 이에 한정되지는 않는 당업계 공지된 임의의 기술에 따라 수행될 수도 있다. 부위 특이적 돌연변이는 원하는 돌연변이, 및 충분한 수의 인접 뉴클레오타이드의 DNA 서열을 코딩하여 가로지르는 결실 연결의 2개의 면 모두에 안정한 듀플렉스를 형성하기 위해 충분한 크기 및 서열 복잡성의 프라이머 서열을 제공하는 특이적 올리고뉴클레오타이드 서열의 사용을 통한 돌연변이체의 생산을 허용한다. 일반적으로, 길이가 약 30 내지 45 개 뉴클레오타이드인 프라이머는 변형된 서열의 연결 중 2개 모두의 면에 약 10 내지 약 25 개 이상의 잔기를 갖는 것이 바람직하다. 1 개 이상의 위치에 각종 상이한 돌연변이를 도입하는 이러한 다수의 프라이머들이 돌연변이의 라이브러리를 생성하는데 사용될 수도 있다.

[0357] 부위 특이적 돌연변이 유발 기술은 각종 문헌으로 예증되는 바와 같이, 당업계 주지되어 있다(예를 들면, 본원에서 전체가 참고로 인용되는 Kunkel et al., Methods Enzymol., 5 154:367-82, 1987 참조). 일반적으로, 부위 특이적 돌연변이 유발은 원하는 펩티드를 코딩하는 DNA 서열을 그것의 서열 내에 포함하는 단일 가닥 벡터를 처음에 얻거나 이중 가닥 벡터의 2개의 가닥을 따로 용해함으로써 수행된다. 원하는 돌연변이된 서열을 함유하는 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 일반적으로는 합성으로 제조한다. 후속하여 프라이머를 단일 가닥 벡터로 어닐링하고, 돌연변이 함유 가닥의 합성을 완결하기 위해, T7 DNA 중합효소와 같은 DNA 중합화 효소에 놓이게 한다. 이렇게 하여, 헤테로듀플렉스가 형성되어 거기서 하나의 가닥이 원래의 비돌연변이 서열을 코딩하고 두 번째 가닥이 원하는 돌연변이를 함유한다. 후속하여 이 헤테로듀플렉스 벡터를 사용하여 대장균과 같은 적절한 세포를 형질 전환 또는 트랜스펙션하고, 돌연변이된 서열 배열을 함유하는 재조합 벡터를 포함하는 클론을 선별한다. 이해되는 바와 같이, 기술은 일반적으로 단일 가닥 및 이중 가닥 형태 모두로 존재하는 파지 벡터를 사용한다. 전형적인 벡터는 M13 파지와 같은 벡터를 포함하는 부위 특이적 돌연변이 유발에 유용하다. 이들 파지는 용이하게 상업적으로 이용가능하며 그들의 사용은 일반적으로 당업자에게 주지되어 있다. 또한, 이중 가닥 플라스미드는 플라스미드로부터 파지에 이르는 관심있는 유전자를 옮기는 단계를 제거하는 부위 특이적 돌연변이 유발에서 일반적으로 사용된다.

[0358] 대안으로, Taq DNA 중합효소와 같은 상업상 이용가능한 열안정성 효소와 함께 PCRTM의 사용은 돌연변이 유발된 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 증폭된 DNA 단편으로 통합시키는데 사용될 수도 있으며, 후속하여 적절한 클로닝 또는 발현 벡터로 클로닝될 수 있다. 예를 들면, PCRTM-매개 돌연변이 유발 과정에 대하여, 본원에서 전체가 참고로 인용되는 Tomic et al. Nucleic Acids Res., 18(6): 1987, 및 Uperider et al., Biotechniques,

18(1):29-30, 32, 1995를 참조하라. 열안정성 중합효소 이외에 열안정성 리가제를 사용하는 PCR™은 또한 인산화 돌연변이된 올리고뉴클레오타이드를 증폭된 DNA 단편을 통합시킨 다음 적절한 클로닝 또는 발현 벡터로 클로닝 시키는데 사용될 수도 있다(예를 들면, 본원에서 전체가 참고로 인용되는 문헌(Michael, Biotechniques, 16(3):410-2, 1994)을 참조하라)

[0359] 본 발명에서 사용하기 위한 변이체를 제조하는 다른 방법은 Wells 등(1985, Gene, 34: 315)에서 설명되는 기술을 기초로 한 카세트 돌연변이 유발이다. 출발 물질은 돌연변이될 단백질을 코딩하는 원하는 DNA(예를 들면, Fc 영역을 포함하는 폴리펩티드를 코딩하는 DNA)를 포함하는 플라스미드이다. 돌연변이 될 DNA 서열 내 코돈(들)이 확인되며; 확인된 돌연변이 부위(들)의 각각의 면에 특유의 제한 엔도뉴클레아제가 존재하여야 한다. 이러한 제한 부위가 존재하지 않는다면, 올리고뉴클레오타이드 특이적 돌연변이 유발에 의해 생성될 수도 있다. 제한 부위가 플라스미드로 도입된 후, 플라스미드를 이들 부위에서 잘라서 선형으로 만든다. 제한 부위 사이에 DNA의 서열을 코딩하지만, 돌연변이를 함유하지는 않는 이중 가닥 올리고뉴클레오타이드는 당업계 숙련자에게 공지된 표준 과정을 사용하여 합성한다. 이중 가닥 올리고뉴클레오타이드를 카세트라고 칭한다. 이 카세트는 선형 플라스미드의 말단과 호환가능한 3' 및 5' 말단을 갖는 것으로 설계되며, 이와 같이 해서 플라스미드에 직접 리게이션될 수 있다.

[0360] Fc 영역을 포함하는 항체 또는 폴리펩티드의 Fc 영역의 서열 변이체를 생산하기 위한 당업계 숙련자에게 공지된 다른 방법들이 사용될 수 있다. 예를 들면, 항체 또는 그것의 단편의 불변 도메인의 아미노산 서열을 코딩하는 재조합 벡터는 히드록실아민과 같은 돌연변이원 제제로 처리되어 서열 변이체를 얻을 수도 있다.

[0361] 돌연변이체 라이브러리가 설명된 방법에 따라 제조되면, 돌연변이 된 라이브러리는 당업계 숙련자에 공지된 표준 리튬 아세테이트 형질 전환 프로토콜(참고 문헌)을 사용하여, 효모 균주, 바람직하게는 EBY100(Invitrogen), *MATa ura3-52 trp1 leu2Δ1 his3Δ200 pep4::HIS3 prb1Δ1.6R can1 GAL:: GAL-AGA1*로 형질전환시킨다.

[0362] 바람직한 결합 특성을 갖는 본 발명의 분자(예를 들면, 1개 이상의 아미노산 변형을 갖는 변이체 Fc 영역이 있는 분자로서, 상기 변형은 야생형 Fc 영역을 포함하는 대비되는 분자와 비교하여 Fc γRIIIA에 대한 변이체 Fc 영역의 친화력을 향상시킴)가 본 발명의 방법에 의해 확인되면(섹션 5.1 및 표 2 참조), 다른 분자들(즉, 치료 항체)은 본 섹션에서 설명한 바와 같이, 표준 재조합 DNA 기술 및 임의의 공지된 돌연변이 유발 기술을 사용하여 조작되어 확인된 돌연변이 부위를 함유하는 조작된 분자를 생성할 수도 있음이 당업자에게 이해될 것이다.

[0363] 5.2.4 효모 표면 디스플레이

[0364] 변경된 Fc γR 친화력(즉, 증가된 Fc γRIIIA 친화력 및/또는 Fc γRIIA)을 갖는 변이체 Fc 영역을 포함하는 분자를 스크리닝하고 확인하는 바람직한 방법은 효모 표면 디스플레이 기술이며(개관을 위해, 본원에서 전체가 참고로 인용되는 문헌(Boder and Wittrup, 2000, Methods in Enzymology, 328: 430-444)을 참조하라), 이것은 세포 외 번역 후 변형된 단백질의 결합 상호작용을 스크리닝하기 위한 선행기술의 결합을 해결한다. 구체적으로, 효모 표면 디스플레이는 Fc 돌연변이체를 포함하는 폴리펩티드를 Fc γR과 상호작용하기에 접근가능한 형태로 효모 세포벽 상에 발현시키는 유전학적 방법이다. 본 발명의 폴리펩티드를 함유하는 돌연변이체 Fc의 효모 표면 디스플레이는 당업계 숙련자에 공지된 임의의 기술에 따라 수행될 수도 있다. 이들 모두가 본원에서 전체적으로 참고로써 인용되는 미국 특허 제6,423,538호; 제6,114,147호; 및 제6,300,065호를 참조하시오. 문헌(Boder et al., 1997 Nat. Biotechnol., 15:553-7; Boder et al., 1998 Biotechnol. Prog., 14:55-62; Boder et al., 2000 Methods Enzymol., 328:430-44; Boder et al., 2000 Proc. Natl Acad. Sci U.S.A., 2000, 97:10701-5; Shusta et al., 1998 Nat. Biotechnol., 1998, 16:773-7; Shusta et al., 1999, Mol. Biol., 292:949-56; Shusta et al., 1999 Curr. Opin. Biotechnol., 10:117-22; Shusta et al., 2000 Nat. Biotechnol., 18:754-9; Wittrup et al., 1994 Ann. NY. Acad. Sci., 745:321-30; Wittrup et al., 1994 Cytometry, 16:206-13; Wittrup, 1995 Curr. Opin. Biotechnol., 6:203-8; Wittrup, 1999 Trends Biotechnol., 17:423-4; Wittrup, 2000 Nat. Biotechnol., 18:1039-40; Wittrup, 2001 Curr. Opin. Biotechnol., 12:395-9)을 참조하라.

[0365] 효모 표면 디스플레이는 $>10^7$ 의 독립적 클론을 함유하는 라이브러리를 농축하는데 사용될 것이다. 이 접근법은 단일 종류로 >20 배의 대형 라이브러리를 농축하는 능력을 제공할 것이다. $>10,000$ 독립적 돌연변이체(4 개 이상의 부위)를 갖는 Fc 돌연변이체 라이브러리는 효모 표면 디스플레이에 적절한 벡터로 클로닝될 것이며 <8000 돌연변이체가 하기 설명한 바와 같은 기타 생화학적 및 기능적 분석에 의해 테스트될 수 있을 때까지 FACS 분류에 의해 농축될 것이다.

[0366] 본 발명은 섹션 5.2.2에서 설명한 바와 같이 돌연변이된 Fc 영역을 포함하는 분자를 디스플레이하기 위한 효모

내 Fc 돌연변이체 라이브러리를 구성하는 방법을 제공한다. 바람직하게는, 본 발명의 방법에서 사용하기 위한 Fc 돌연변이체 라이브러리는 최소 10^7 세포, 최대 10^9 세포를 함유한다. 본 발명의 방법에서 사용하기 위한 Fc 라이브러리를 구성하는 하나의 전형적인 방법은 다음을 포함한다: Fc 영역을 포함하는 분자를 코딩하는 핵산을 효모 복제 벡터, 예를 들면, pCT302로부터 유래된 벡터의 다중 클로닝 부위로 클로닝시키고, 이러한 Fc를 코딩하는 핵산을 GAL1 갈락토스-유도성 프로모터 및 짝짓기 응집소 세포 벽 단백질인, Aga2P를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 갖는 내-골격의 억제하에 발현시킨다. 바람직한 구체예에서, Fc 영역을 포함하는 분자를 코딩하는 핵산은 Aga2P 코딩 영역에 대하여 C-말단으로 클로닝되어, 이러한 Fc-영역 Aga2p 융합 단백질이 코딩된다. Fc 영역을 포함하는 Aga2p 단백질 및 폴리펩티드를 포함하는 융합 단백질을 세포외로 분리하고 본 발명의 바람직한 구성을 사용하여, 필수 구성의 세포 벽 단백질인 Aga1p 단백질에 대한 이황화 결합을 통해 세포 벽 상에 디스플레이될 것이다. 대안의 구체예에서, 구성은 에피토프 태그를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 더 포함할 수도 있다. 당업계 숙련자에게 공지된 서열을 코딩하는 임의의 에피토프 태그 뉴클레오타이드를 본 발명에 따라 사용할 수 있으며, 적혈구 응집소(HA), c-myc Xpress TAG, His-TAG, 또는 V5TAG를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하지만, 이에 한정되지는 않는다. 효모 세포 표면상의 융합 단백질의 존재는 이들 모두가 당업계 숙련자에게 공지되어 있는 FACS 분석, 공초점 형광성 검경 또는 표준 면역염색법을 사용하여 검출될 수도 있다. 한 구체예에서, 효모 세포 표면 상의 본 발명의 Fc 융합 단백질의 존재는 IgG1 Fc-특이적 모노클로날 항체, HP6017(Sigma), JL512(Immunotech), 및 본원에서 참고로 전체가 인용되는 문헌(Partridge et al., 1986, Molecular Immunology, 23 (12): 1365-72)에서 개시된 임의의 항체를 포함하지만, 이에 한정되지는 않는 Fc-특이적 모노클로날 항체(CH3 특이적)를 사용하여 검출된다. 다른 구체예에서, 본 발명의 Fc 융합 단백질의 존재는 당업계 숙련자에게 공지된 기술을 사용하여 에피토프 태그의 면역형광성 라벨에 의해 검출된다. 그것은 에피토프 태그를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 이용하여 내부 제어로서, Fc 융합 단백질을 코딩하는 핵산을 양 측면에 접하도록 하고, 융합 단백질이 부분적으로 가수분해된 형태로 세포 벽에 디스플레이되는지 여부를 검출하는 본 발명의 방법에서 특히 유용하다.

[0367] 5.2.5 효모 디스플레이 라이브러리의 스크리닝

[0368] 본 발명은 세포 기재 분석, 용액 기재 분석, 및 고체상 기재 분석을 포함하지만, 이에 한정되지는 않는 면역학적 기재 분석을 사용하여 효모 디스플레이 라이브러리를 스크리닝하는 것을 포함한다.

[0369] 일부 구체예에서, 본 발명은 당업계 공지되고 본원에 포함되는 친화력 성숙 방법을 사용하여 변경된 Fc γ R 친화력을 갖는 Fc 돌연변이체의 확인을 포함한다. 간단히 말해서, 친화력 성숙은 돌연변이 라이브러리에 존재하는 무작위 재조합 개별 돌연변이에 의한 신규한 대립 유전자를 생성하며, 예를 들면, 이들 모두가 본원에서 전체가 참고로 인용되는 문헌(Hawkins et al., 1992, J. Mol. Biol. 226:889-896; Stemmer et al., 1994 Nature, 370:389-91)을 참조하라. 그것은 항체, T 세포 수용체 및 다른 단백질들의 친화력을 증가시키는데 성공적으로 사용되었다. 본 발명은 향상된 표현형을 갖는 신규한 돌연변이체 라이브러리를 구성하기 위한 기준선으로서 증가된 Fc γ R 결합을 보이는 돌연변이를 사용하는 것을 포함한다. 본 발명의 방법을 사용하여, Fc γ R, 예를 들면, Fc γ RIIIA에 대한 증가된 결합을 위하여 효모 표면 디스플레이에 의한 농축된 IgG1 Fc 돌연변이의 집단을 선택할 수도 있다. DNA를 제조한 다음, Fc 영역은 Fc의 돌연변이된 영역을 선택적으로 증폭시키는 양 측면에 접하는 프라이머를 사용하여 PCR에 의해 증폭시킬 수 있으며, 이 영역은 당업계 공지되고 본원에서 예시 또는 개시된 방법을 사용하여 약 ~700 bp이다. 이렇게 하여, 신규한 돌연변이체는 예를 들면, 본원에서 전체가 참고로 인용되는 문헌(Stemmer et al., 1994 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:10747-51)에 의해 개시된 바와 같은 방법을 사용하여 증폭 DNA를 DNaseI로 처리하고 단편을 분리시켜서 Fc 영역 내 돌연변이의 리서플링에 의해 구성될 수 있다. 이어서, 단편은 리게이션 시키고, 네스티드 프라이머로 PCR 증폭하고 당업계 공지된 방법을 사용하여, 효모 디스플레이 벡터, 예를 들면, pYD1으로 클로닝시킬 수 있다. 이어서 재조합된 라이브러리는 효모 Fc 디스플레이 스크린에서 재선별될 수 있다. KD가 10 nM 이하로 감소함에 따라, 조건은 본원에서 전체가 참고로 인용되는 문헌(Boder et al., 1998, Biotechnol. Prog. 14: 55-62)에서 개시한 바와 같은 당업계 공지 발명을 사용하여 Fc 수용체로부터 Fc γ RIIIA 리간드의 오프율의 감소를 기초로 한 친화력의 추가적 증가를 허용하도록 확립될 수 있다. 본 발명은 효모 라이브러리의 동역학적 스크린을 포함한다. 동역학적 스크린은 표지된 리간드, 예를 들면, 형광성 리간드로 포화될 때까지 Fc 디스플레이 세포를 표지한 다음, 사전 결정된 기간 동안 과량의 비표지 리간드와 함께 인큐베이션함으로써 성립될 수도 있다. 과량의 버퍼(예를 들면, IX PBS, 0.5 mg/ml BSA)를 첨가하여 반응을 종결시킨 후, 세포는 FACS 및 선별을 위한 분류 게이트 세트에 의해 분석될 것이다. 각각의 농축 라운드 후, 개별 돌연변이체들을 친화력의 배 증가에 대하여 테스트하고 다양성에 대하여 시퀀싱하였다. 시험관 내 재조합 과정을 반복할 수 있다. 일부 구체예에서, 시험관 내에서 3회 이상 반복한다.

- [0370] 본 발명의 Fc 변이체의 선별은 Fc γ R의 다형 변이체를 포함하지만, 이에 한정되지는 않는 임의의 Fc γ R을 사용하여 이루어질 수도 있다. 일부 구체예에서, Fc 변이체의 선별은 위치 158에서 페닐알라닌을 함유하는 Fc γ RIIIA의 다형 변이체를 사용하여 이루어진다. 다른 구체예에서, Fc 변이체의 선별은 위치 158에 발린을 함유하는 Fc γ RIIIA의 다형 변이체를 이용하여 이루어진다. Fc γ RIIIA 158V는 158F 보다 더 높은 IgG1에 대한 친화력 및 증가된 ADCC 활성을 나타내며(예를 들면, 본원에서 전체가 참고로 인용되는 문헌(Koene et al., 1991, Blood, 90:1109-14; Wu et al., 1997, 7. Clin. Invest. 100:1059-70)을 참조하라); 이 장기는 사실상 IgG1-Fc γ RIIIA 공동 결정화 연구에서 최근 나타난 바와 같이 IgG1의 낮은 가장자리 영역과 직접 상호작용하며, 예를 들면, 본원에서 참고로 인용되는 문헌(Sonderman et al., 2000, Nature, 100:1059-70)을 참조하라. 연구는 일부 경우에, 치료 항체가 Fc γ RIIIA-158V 이소타입 환자에서 향상된 효능이 있다는 것을 나타냈다. 예를 들면, 사람화 항-CD20 모노클로날 항체 리툽시맴은 Fc γ RIIIA 158F 이소타입 환자와 비교하여 Fc γ RIIIA-158V 이소타입 환자에서 치료적으로 더 유효하다(예를 들면, 문헌(Cartron et al., 2002 Blood, 99(3):754-8)을 참조). 특정한 메커니즘의 작용에 구속되고자 하지는 않지만, Fc γ RIIIA-158F 알로타입과 함께 본 발명의 Fc 변이체를 선별하여 변이체를 제공할 수도 있으며, 이것이 일단 치료 항체로 유전자 조작되면 Fc γ RIIIA 158F 이소타입 환자에 대하여 임상적으로 더 효능이 있을 것이다.
- [0371] 본 발명은 Fc γ RIIIA에 대한 향상된 친화력을 가질 뿐만 아니라, Fc γ RIIAB에 대한 감소된 친화력을 갖는 Fc 돌연변이체가 선별되도록, Fc γ RIIB 고갈 및 Fc γ RIIIA 선별을 기초로 효모 라이브러리를 스크리닝하는 것을 포함한다. 효모 라이브러리는 예를 들면, Fc γ RIIB로 코팅된 자기 비드가 있는 효모 라이브러리를 인큐베이션함으로써, 순차적 고갈 방법에 의하여 Fc γ RIIB에 대한 감소된 친화력을 갖는 클론에 대하여 농축될 수 있다. Fc γ RIIB 고갈은 바람직하게는 순차적으로 수행되어 라이브러리가 Fc γ RIIB에 대한 감소된 친화력을 갖는 클론에서 농축된다. 일부 구체예에서, Fc γ RIIB 고갈 단계는 단지 30%, 바람직하게는 단지 10%, 더 바람직하게는 단지 5%, 가장 바람직하게는 1% 미만인 Fc γ RIIB에 결합하도록 세포의 집단을 야기한다. 일부 구체예에서, Fc γ RIIB 고갈은 최소 3 사이클, 최소 4 사이클, 최소 6 사이클 내에 수행된다. Fc γ RIIB 고갈 단계는 Fc γ RIIIA에 대한 증가된 친화력을 갖는 Fc 변이체가 선택되도록, 예를 들면, FACS 분류를 사용하는 Fc γ RIIIA 선별 단계와 합하여 진다.
- [0372] **5.2.5.1 FACS 분석법; 고체상 분석법 및 면역학적 기재 분석법**
- [0373] 본 발명은 섹션 5.2.3.에서 설명한 방법에 따라, 효모 표면 세포벽 상에 디스플레이되어 있는 돌연변이체 Fc 융합 단백질의 특성 규명을 포함한다. 본 발명의 한 양태는 바람직한 결합 특성, 구체적으로, 야생형 Fc 영역을 포함하는 대비되는 폴리펩티드가 Fc γ RIIIA 및/또는 Fc γ RIIA에 결합하는 것보다 돌연변이 Fc 융합 단백질을 더 높은 친화력으로 Fc γ RIIIA 및/또는 Fc γ RIIA에 결합하는 능력을 갖는 돌연변이 Fc 융합 단백질을 선별하는 방법을 제공한다. 다른 구체예에서, 본 발명은 바람직한 결합 특성, 구체적으로, 야생형 Fc 영역을 포함하는 대비되는 폴리펩티드가 Fc γ RIIIA 및/또는 Fc γ RIIA에 결합하는 것보다 돌연변이 Fc 융합 단백질이 더 높은 친화력으로 Fc γ RIIIA 및/또는 Fc γ RIIA에 결합하는 능력, 및 추가적으로 야생형 Fc 영역을 포함하는 대비되는 폴리펩티드가 Fc γ RIIB에 결합하는 것보다 더 높은 친화력으로 돌연변이 Fc 융합 단백질이 Fc γ RIIB에 결합하는 능력을 갖는 돌연변이 Fc 융합 단백질을 선별하는 방법을 제공한다. 본 발명의 방법은 어떤 바람직한 결합 특성을 갖는 분자의 Fc 영역 내 임의의 돌연변이를 확인하고 스크리닝하는데 사용될 수 있음이 당업자에게 이해될 것이다.
- [0374] 돌연변이 Fc 융합 단백질을 디스플레이하는 효모 세포는 결합 상호작용을 평가하기 위한 당업계 숙련자에게 공지된 임의의 생화학적 또는 면역학적 기재 분석법에 의해 스크리닝되고 특성화될 수 있다.
- [0375] 바람직하게는, 당업계 숙련자에게 공지된 임의의 기술을 사용하여, 형광 활성화 세포 분류(FACS)를 Fc γ RIIIA, 바람직하게는 Fc γ RIIIA 테트라머 복합체, 또는 선택적으로 Fc γ RIIB에 결합하기 위해 효모 세포 표면 상에 디스플레이된 돌연변이 Fc 융합 단백질을 스크리닝하는데 사용된다. 유동 분류기는 라이브러리 삼입체(예를 들면, 1시간 당 10,000,000-100,000,000 세포수)를 함유하는 개별 세포의 많은 수를 신속하게 조사할 수 있다(Shapiro et al., Practical Flow Cytometry, 1995). 추가적으로, 리간드 농도(즉, Fc γ RIIA 테트라머 복합체), 동역학적 경쟁 시간, FACS 스트린전시를 포함하지만, 이에 한정되지는 않는 최적화에 사용되는 특이적 매개변수는 야생형 Fc 영역을 포함하는 대비되는 폴리펩티드와 비교하여 특이적 결합 특성, 예를 들면, Fc γ RIIA에 대한 더 높은 친화력을 갖는 Fc 융합 단백질을 디스플레이하는 세포에 대하여 선별하기 위해 변화될 수도 있다. 생물학적 세포를 분류하고 조사하기 위한 유세포 측정기는 당업계에 공지되어 있다. 공지된 유세포 측정기는 예를 들면, 본원에서 전체 내용이 참고로 인용되는 미국 특허 제 4,347,935호; 제5,464,581호; 제5,483,469호; 제5,602,039호; 제5,643,796호; 및 제6,211,477호에서 설명된다. 다른 공지된 유세포 측정기는 Becton Dickinson

and Company에서 제조된 FACS Vantage™ 시스템, 및 Union Biometrica에서 제조된 COPAS™ 시스템이다.

- [0376] 본 발명의 바람직한 구체예에 따라서, 효모 세포는 형광 활성화 세포 분류(FACS)에 의해 분석된다. 가장 바람직한 구체예에서, 효모 세포의 FACS 분석은 반복적 방식으로, 최소 2회, 최소 3회, 또는 최소 5회 이상으로 이루어진다. 선별의 각 라운드 중에 세포는 다시 성장되고 감소되어 Fc 영역이 효모 세포 표면의 최대 수를 디스플레이한다. 특정 방식의 작용에 구속되고자 하지는 않지만, 이 반복 과정은 특정 표현형, 예를 들면, Fc γ RIIA에 대한 고도의 결합을 갖는 세포 집단을 농축하도록 돕는다.
- [0377] 바람직한 구체예에서, 본 발명의 Fc 변이체를 스크리닝하는 것은 다수의 라운드의 스크리닝, 예를 들면, 2 라운드 이상의 스크리닝을 갖는 선별 과정을 포함한다. 한 구체예에서, Fc γ RIIA에 대한 증가된 친화력을 갖는 Fc 변이체에 대한 스크리닝은 하기 단계를 포함할 수도 있다: 제 1 라운드의 스크리닝에서, 효모 세포의 라이브러리, 예를 들면, 10⁷ 세포의 고유의 라이브러리를 FACS에 의해, 바람직하게는 표지된 테트라머 Fc γ RIIA를 사용하여 반복적 방식으로 농축시켜서 Fc γ RIIA에 대한 향상된 친화력을 갖는 Fc 변이체에 대하여 선택한다; 후속하여, 바람직한 표현형, 예를 들면, Fc γ RIIA에 대한 향상된 결합으로 선택된 변이체 Fc 영역을 항체, 예를 들면, 4-4-20 항체로 도입하고, 조작된 항체를 Fc γ R에 대한 결합에 대하여 2차 스크린, 예를 들면, ELISA를 사용하여 분석한다. 제 2 라운드의 스크리닝에서, 단일 돌연변이 라이브러리는 Fc 영역이 Fc γ RIIA에 대한 향상된 친화력을 디스플레이하는 변이체를 함유하고; 예를 들면, 비표지 수용체의 존재 및 부재시에 표지된 모노머 Fc γ RIIA를 사용하여 FACS를 농축하도록 1차 스크린을 기초로 하여 생성될 수도 있으며; 후속하여 변이체 Fc 영역은 항체, 예를 들면, 4-4-20 항체로 도입시키고, 조작된 항체를 Fc γ R에 대한 결합에 대하여 2차 스크린, 예를 들면, ELISA를 사용하여 분석한다. 일부 구체예에서, 2차 스크린은 본원에서 개시된 방법을 사용하여 ADCC 또는 BIAcore 기재 분석에서 Fc 변이체를 포함하는 항체를 특성화하는 것을 추가로 포함할 수도 있다.
- [0378] 본 발명은 평형 또는 동역학적 조건하에 돌연변이 효모 디스플레이에 대한 FACS 스크리닝을 포함한다. 스크리닝이 평형 조건하에 수행되는 경우, Fc 돌연변이체를 함유하는 효모 라이브러리를 Fc γ RIIA, 바람직하게는 표지된 Fc γ RIIA와 함께 농도 5-10 배 이하 Kd에서, 평형 조건하에 Fc γ RIIA에 대한 Fc 돌연변이의 결합을 허용하기 위한 최소 1시간 이상 동안 인큐베이션한다. 스크리닝이 동역학적 상태에서 수행되는 경우, 돌연변이 효모 라이브러리는 표지된 Fc γ RIIA와 함께 인큐베이션시키고; 이어서, 세포를 미리 선택된 시간 동안 동일 몰의 비표지 Fc γ RIIA와 함께 배양한 다음, 결합된 Fc γ RIIA를 모니터링한다.
- [0379] 돌연변이체 Fc 융합 단백질을 발현시키는 효모 세포를 FACS로 분석하는 하나의 전형적인 방법은 PE와 같은 형광성 표지로 표지된 Fc γ RIIA-테트라머 복합체, 및 형광성 표지된 F(ab)₂ 항-Fc와 같은 항-Fc 항체로 세포를 함께 염색하는 것이다. 본 발명에 의해 생산된 효모 라이브러리의 형광성 측정은 바람직하게는 대조군, 예를 들면, Fc 영역(음성 대조군)을 포함하는 분자를 코딩하는 삽입체를 결핍한 효모 세포와의 비교를 포함한다. 유동 분류기는 고속에서 세포 내 형광성 신호를 측정하는 능력뿐 아니라, 특이화된 형광성 특성을 갖는 세포를 수집하는 능력을 갖는다. 이 양태는 야생형 Fc 영역을 포함하는 대비되는 폴리펩티드와 비교하여 특이적인 결합 특성, 예를 들면, Fc γ RIIA에 대한 더 높은 친화력을 갖는 Fc 융합 단백질을 발현시키는 세포로 초기 라이브러리 집단을 농축하는 본 발명의 바람직한 구체예에서 사용될 수도 있다. 본 발명의 바람직한 구체예에서, 효모 세포는 FACS 및 효모 세포 표면 상에서 Fc 발현의 양에 비하여 Fc γ RIIA에 대한 높은 친화력을 보이는 세포에 대하여 선별하기 위해 확립된 분류 게이트에 의해 분석된다. 바람직한 구체예에 따라, 4개의 연속적 분류를 성립시키고, 이때 각각의 연속적 분류에 대한 게이트는 5.5%, 1%, 0.2%, 및 0.1%이다. 본 발명의 방법에 따라 형성된 효모 디스플레이 라이브러리를 10 배 이상 과량 샘플링하여 희박한 클론을 분리시키는 가능성을 향상시킨다(예를 들면, 10⁷ 클론의 라이브러리로부터 ~10⁸ 세포를 분석함). 대안으로, 2-5 분류를 성립하여 원하는 표현형의 세포를 선택한다. 분류 게이트는 당업계 숙련자에 의해 경험적으로 성립될 수 있다.
- [0380] 다른 바람직한 구체예에서, 효모 세포 표면 상에서 디스플레이된 돌연변이체 Fc 융합 단백질은 고체상 기재 분석, 예를 들면 바람직하게는 Fc γ R, 예를 들면, Fc γ RIIA에 결합하기 위한 고 처리량 방식으로, Dynal에 의해 공급되는 예를 들면, 자기 비드를 사용하는 분석법을 사용하여 스크리닝된다. 한 구체예에서, 자기 비드 분석법은 Fc γ RIIA에 대한 향상된 친화력 및/또는 Fc γ RIIB에 대한 감소된 친화력을 갖는 돌연변이체를 확인하는데 사용될 수도 있다. Fc γ RIIA에 대한 향상된 친화력 및/또는 Fc γ RIIB에 대한 감소된 친화력을 갖는 돌연변이체를 확인하기 위한 전형적인 분석법은 Fc γ RIIB로 코팅된 자기 비드를 사용하여 순차적 고체상 고갈에 의해 돌연변이체를 선별한 다음 Fc γ RIIA로 코팅된 자기 비드로 선별하는 것을 포함할 수도 있다. 예를 들면, 하나의 분석법은 다음 단계를 포함할 수도 있다: 본 발명에 따라 생성된 효모 세포의 라이브러리를 Fc γ RIIB로 코팅된 자

기 비드와 함께 인큐베이션하는 단계; 비드에 결합된 효모 세포를 자기장 내에 혼합물을 놓음으로써 결합되지 않은 단편으로부터 분리시키고, 비결합된 효모 세포를 제거시키고, 신선한 배지 내에 그들을 놓는 단계; 효모 세포를 Fc γ RIIIA로 코팅된 비드에 결합시키고, 비드에 결합된 효모세포를 자기장 내에 혼합물을 놓음으로써 비결합된 단편들로부터 분리시키고, 비결합된 효모세포를 제거시키는 단계; 격렬한 와동에 의해 결합된 세포를 제거시키는 단계; 회수된 세포를 글루코스 함유 배지에서 성장시키는 단계; 갈락토스를 함유하는 선택 배지에서 다시 감소시키는 단계. 선별 과정은 1회 이상 반복된다. 후속하여, Fc 도메인을 함유하는 삼입체를 당업계 공지된 통상의 방법, 예를 들면, PCR을 사용하여 증폭시키고, 추가적 특성화를 위해 이미 설명된 방법에 의해 항체로 도입시킨다.

[0381] 대안의 구체예에서, 비효모 기재 시스템을 사용하여 본 발명의 분자의 결합 특성을 특성화한다. 본 발명의 분자를 특성화하기 위한 하나의 전형적인 시스템은 변이체 Fc 영역을 갖는 본 발명의 분자를 코딩하는 핵산이 클로닝되는, 항-플루오레세인 모노클로날 항체 4-4-20의 중쇄를 함유하는 포유동물 발현 벡터를 포함한다. 결과의 재조합 클론을 포유동물 숙주 세포주(즉, 사람 신장 세포주 293H)로 발현시키고, 결과의 재조합 면역글로불린을 ELISA 및 FACS를 포함하지만, 이에 한정되지는 않는 당업계 공지된 임의의 표준 분석법을 사용하여 Fc γ R에 대한 결합에 대하여 분석한다.

[0382] 본 발명의 분자(즉, 항체, 융합 단백질, 콘주게이트된 분자)는 각종 방식으로 특성화될 수도 있다. 특히, 변형된 Fc 영역을 포함하는 본 발명의 분자는 리간드, 예를 들면, Fc γ RIIIA 테트라머 복합체에 면역특이적으로 결합하는 능력에 대하여 분석될 수도 있다. 이러한 분석법은 용액 내에서(예를 들면, Houghten, Bio/Techniques, 13:412-421, 1992), 비드 상에서(Lam, Nature, 354:82-84, 1991, 칩 상에서(Fodor, Nature, 364:555-556, 1993), 박테리아에서(미국 특허 제5,223,409호), 포자 상에서(미국 특허 제5,571,698호; 제5,403,484호; 및 제5,223,409호), 플라스미드 상에서(Cull et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:1865-1869, 1992) 또는 파지 상에서(Scott and Smith, Science, 249:386-390, 1990; Devlin, Science, 249:404-406, 1990; Cwirla et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6378-6382, 1990; 및 Felici, J. Mol. Biol., 222:301-310, 1991) 수행될 수도 있다(이들 각각이 본원에 전체적으로 참고로써 인용됨). 리간드, 예를 들면, Fc γ RIIIA에 면역특이적으로 결합하는 것으로 확인된 분자는 그들의 리간드에 대한 그들의 특이성 및 친화력에 대하여 분석될 수 있다.

[0383] 변형된 Fc 영역(예를 들면, 치료 항체)을 포함하도록 조작되거나 원하는 표현형을 갖도록(섹션 5.1 참조) 효모 디스플레이 시스템에서 확인된 본 발명의 분자는 당업계 공지된 임의의 방법에 의해 항원(예를 들면, 암 항원)에 대한 면역특이적 결합 및 다른 항원(예를 들면, Fc γ R)과의 상호 반응성에 대하여 분석될 수도 있다. 면역특이적 결합 및 상호 반응성을 분석하는데 사용될 수 있는 면역 분석법은 웨스턴 블롯, 방사성면역분석법, ELISA(효소 연관 면역흡착 분석법), "샌드위치" 면역분석법, 면역침전 분석법, 침강소 반응, 겔 확산 침강 반응, 면역확산 분석법, 응집 분석법, 보체-고정 분석법, 면역 방사분석법, 형광성 면역분석법, 단백질 A 면역 분석법 등이라 명명되어 지는 것들을 포함하지만, 이에 한정되지는 않는다. 이러한 분석법은 일반적이며 당업계에 주지되어 있다(예를 들면, 본원에서 전체가 참고로 인용되는 문헌(Ausubel et al., eds, 1994, Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., New York)을 참조하라).

[0384] 리간드, 예를 들면, Fc γ R 테트라머 복합체에 대한 변형된 Fc 영역을 포함하는 본 발명의 분자의 결합 친화력 및 상호작용의 오프율은 경쟁적 결합 분석에 의해 결정될 수 있다. 경쟁적 결합 분석의 한 예는 테트라머 Fc γ R과 같은 비표지 리간드의 증가량 존재시, 관심있는 분자(예를 들면, 변형된 Fc 영역을 포함하는 본 발명의 분자)의 테트라머 Fc γ R(예를 들면, 3H 또는 125I)와 같은 표지된 리간드와의 인큐베이션, 및 표지된 리간드에 결합된 분자의 검출을 포함하는 방사성 면역분석법이다. 리간드에 대한 본 발명의 분자의 친화력 및 결합 오프율은 스캐치드 분석법에 의한 포화 데이터로부터 결정될 수 있다.

[0385] 바람직한 구체예에서, BIAcore 동역학적 분석을 사용하여 Fc γ R과 같은 리간드에 대한 본 발명 분자의 결합 및 오프율을 결정한다. BIAcore 동역학적 분석법은 리간드 표면 상에 고정된 분자(예를 들면, 변형된 Fc 영역을 포함하는 분자)가 있는 칩으로부터 리간드의 결합 및 해리를 분석하는 것을 포함한다.

[0386] 5.2.6 돌연변이의 시퀀싱

[0387] 당업계에 공지된 각종 시퀀싱 반응 중 일부를 사용하여 변이체 Fc 영역을 포함하는 본 발명의 분자를 직접 시퀀싱할 수 있다. 시퀀싱 반응의 예는 Maxim 및 Gilbert(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74:560, 1977) 또는 Sanger(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74:5463, 1977)에 의해 개발된 기술을 기초로 한 것들을 포함한다. 또한, 질량 분광법을 포함하는, 각종 자동화 시퀀싱 과정 중 임의의 것이 이용될 수 있는 것(Bio/Technique, 19:448, 1995)으로 해석된다(예를 들면, PCT 공보 제 WO 94/16101호, Cohen et al., Adv. Chromatogr., 36:127-162,

1996, 및 Griffin et al., Appl. Biochem. Biotechnol., 38:147-159, 1993 참조).

[0388] 5.2.7 변이체 Fc 영역이 있는 분자의 기능적 분석

[0389] 본 발명은 분자의 작동자 세포 기능을 확인하기 위한 당업계 숙련자에게 공지된 분석법을 사용하는 본 발명의 분자(예를 들면, 상기 인용 문헌에서 설명된 효모 디스플레이 기술에 의해 확인된 변이체 Fc 영역을 포함하는 항체; 또는 본 발명의 방법에 따라 조작된 치료적 모노클로날 항체)의 특성화를 포함한다. 특히, 본 발명은 Fc γ R-매개 작동자 세포 기능에 대한 본 발명의 분자의 특성화를 포함한다. 본 발명에 따라 분석될 수 있는 작동자 세포 기능의 예는 항체-의존성 세포 매개 세포독성, 식균 작용, 옵소닌 작용, 옵소닌성 식균작용, C1q 결합, 및 보체 의존성 세포 매개 세포독성을 포함하지만, 이에 한정되지는 않는다. 작동자 세포 기능 활성을 결정하기 위해 당업계 숙련자에게 공지된 세포 기재 또는 무세포 분석법 중 임의의 것이 사용될 수 있다(작동자 세포 분석법을 위해, 각각 본원에서 전체가 참고로 인용되는 문헌(Perussia et al., 2000, Methods Mol Biol. 121:179-92; Baggiolini et al., 1998 Experientia, 44(10):841-8; Lehmann et al., 2000 J. Immunol. Methods, 243(1-2): 229-42; Brown EJ. 1994, Methods Cell Biol., 45:147-64; Munn et al., 1990 J. Exp. Med., 172:231-237, Abdul-Majid et al., 2002 Scand. J. Immunol. 55:70-81; Ding et al., 1998, Immunity 8:403-411)을 참조하라).

[0390] 한 구체예에서, 본 발명의 분자는 사람 단핵구 내 Fc γ R-매개 식균 작용에 대하여 분석될 수 있다. 대안으로, 본 발명의 분자의 Fc γ R-매개 식균 작용은 기타 식균 세포, 예를 들면, 호중성 백혈구(다형핵 백혈구; PMN); 사람 말초 혈관 단핵구, 단핵구-유래 대식세포에서 분석될 수도 있으며, 이것은 당업계 숙련자에게 공지된 표준 과정을 사용하여 얻을 수 있다(예를 들면, Brown EJ. 1994, Methods Cell Biol., 45: 147-164 참조). 한 구체예에서, 본 발명의 분자의 기능은 앞서 설명한 방법(Tridandapani et al., 2000, J. Biol. Chem. 275: 20480-7)에 의해 플루오레신으로 처리된 IgG-옵소닌화 양 적혈구를 식균작용하는 THP-1 세포의 능력을 측정함으로써 특성화된다. 예를 들면, Fc γ RIIIA에 대한 향상된 친화력을 갖는 변이체 Fc 영역을 포함하는 본 발명의 분자의 식균 작용을 측정하기 위한 전형적인 분석법은 다음을 포함한다: THP-1 세포를 본 발명의 분자 또는 Fc γ RIIIA에 결합하지 않는 대조군 항체로 처리하는 단계, 상기 세포의 활성 수준을 비교하는 단계로서, 상기 세포의 활성에 있어서의 상위점(예를 들면, 로제트 형성(THP-1 세포 결합성 IgG-코팅된 SRBC의 수), 부착 형성(THP-1 세포에 결합하는 SRBP의 총 수), 및 식균작용 비율)은 본 발명의 분자의 기능성을 가리킨다. 상기 전형적인 분석법을 사용하여 본 발명의 방법에 의해 확인된 임의의 분자를 분석할 수 있음이 당업계 숙련자에게 이해될 수 있다.

[0391] 본 발명의 분자의 식균 작용을 결정하기 위한 다른 전형적인 분석법은 하기 과정을 포함할 수 있는 항체-의존성 옵소닌성 식균 작용 분석법(ADCP)이다: 대장균-표지된 FITC(Molecular Probes) 또는 포도상구균(*Staphylococcus aureus*)-FYTC와 같은 표적 생입자를 (i) Fc γ R-의존성 ADCP에 대한 대조군 항체로서, 야생형 4-4-20 항체, 플루오레신에 대한 항체(See Bedzyk et al., 1989, J. Biol. Chem, 264(3):1565-1569, 이것은 본원에서 전체가 참고로 인용됨); 또는 (ii) Fc γ R-의존성 ADCP에 대한 배경 대조군으로서, Fc γ RIII에 대한 결합을 녹아웃한 D265A 돌연변이를 지니는 4-4-20 항체 (iii) 본 발명의 방법 및 실시예 6.6에서 예시된 과정에 의해 확인된 변이체 Fc 영역을 함유하는 4-4-20 항체로 코팅하는 단계; 및 옵소닌화 입자를 형성하는 단계; 60:1 비율로 THP-1 작동자 세포(ATCC로부터 구매가능한 단핵구 세포주)에 (i-iii)에서 설명된 상기 옵소닌화 입자 중 임의의 것을 첨가하여 Fc γ R-매개 식균 작용이 일어나도록 허용하는 단계; 바람직하게는 37°C에서 1.5 시간 동안 세포 및 대장균-FITC/항체를 인큐베이션하는 단계; 인큐베이션 후 세포에 트리판 블루를 첨가하여 흡수되지 않고 세포 표면의 바깥에 부착되는 박테리아의 형광성을 켜치시키는 단계; 세포를 FACS 버퍼(예를 들면, 0.1%, PBS 중 BSA, 0.1%, 아지드화 나트륨)로 옮기고, FACS(예를 들면, BD FACS Calibur)를 사용하여 THP1 세포의 형광성을 분석하는 단계. 바람직하게는, 상기 분석에서 사용되는 THP-1 세포는 세포 표면 상 Fc γ R의 발현에 대하여 FACS에 의해 분석된다. THP-1 세포는 CD32A 및 CD64 모두를 발현시킨다. CD64는 높은 친화력 Fc γ R이며 이는 본 발명의 방법에 의한 ADCP 분석법을 수행할 때 차단된다. THP-1 세포는 바람직하게는 100 μ g/mL 가용성 IgG1 또는 10% 사람 혈청과 함께 차단된다. ADCP의 범위를 분석하기 위해, 게이트를 바람직하게는 THP-1 세포 상에 세팅하고 정중 형광 강도를 측정한다. 개별 돌연변이체에 대한 ADCP 활성을 계산하고 획득한 야생형 chMab 4-4-20에 대한 평균값으로 보고한다. 옵소닌화 입자를 THP-1 세포에 대한 옵소닌화 입자의 비율이 30:1 또는 60:1이 되도록 THP-1 세포에 첨가한다. 가장 바람직한 구체예에서, ADDCP 분석법은 배지 내 대장균-FITC와 같은 대조군, 대장균-FITC 및 THP-1 세포 (Fc γ R-독립성 ADCP 활성으로서 역할을 함), 대장균-FITC, THP-1 세포 및 야생형 4-4-20 항체 (Fc γ R-의존성 ADCP 활성으로서 역할을 함), 대장균-FITC, THP-1 세포, 4-4-20 D265A (Fc γ R-의존성 ADCP 활성에 대한 배경 대조군으로서 역할을 함)와 함께 수행된다.

- [0392] 다른 구체예에서, 본 발명의 분자는 당업계 숙련자에게 공지된 표준 방법 중 임의의 것을 사용하여, 작동자 세포, 예를 들면, 자연 살해 세포 내 Fc γ R-매개 ADCC 활성화에 대하여 분석될 수 있다(예를 들면, Perussia et al., 2000, Methods Mol. Biol. 121: 179-92 참조). 본 발명의 분자의 ADCC 활성을 결정하기 위한 전형적인 분석법은 표적 세포를 [⁵¹Cr]Na₂CrO₄ (이 세포막 침투가능 분자는 일반적으로 세포 단백질에 결합하기 때문에 표지 용으로 사용되며 느린 동역학으로 세포로부터 자발적으로 방출되지만, 표적 세포 괴사 이후 대량으로 방출됨)로 표지하는 단계; 표적 세포를 변이체 Fc 영역을 포함하는 본 발명의 분자로 옹소닌화 하는 단계; 작동자 세포에 대한 표적 세포의 적절한 비율로, 마이크로적정 플레이트에서 옹소닌화 방사성 표지된 표적 세포를 작동자 세포와 혼합시키는 단계; 37°C에서 16-18 시간 동안 세포의 혼합물을 인큐베이션하는 단계; 상청액을 모으는 단계; 및 방사성을 분석하는 단계를 포함하는 ⁵¹Cr 방출 분석법을 기초로 한다. 이어서, 본 발명의 분자의 세포독성은 예를 들면, 하기식을 사용하여 결정될 수 있다: 용리율 = (실험상의 cpm - 표적 누수 cpm)/(세정 용리 cpm - 표적 누수 cpm) X 100%. 대안으로, 용리율 = (ADCC-AICC)/(최대 방출-자발적 방출). 특이적 용리는 하기식을 사용하여 계산될 수 있다: 특이적 용리 = 본 발명의 분자가 있는 용리율 - 본 발명의 분자의 부재시 용리율. 그래프는 표적:작동자 세포 비율 또는 항체 농도를 변화시킴으로써 생성될 수 있다.
- [0393] 또 다른 구체예에서, 본 발명의 분자는 항체 의존성 세포매개성 세포독성(ADCC)에 대하여 특성화되며, 예를 들면, 본원에서 전체가 참고로 인용되는 문헌(Ding et al., Immunity, 1998, 8:403-11)을 참조로 한다.
- [0394] 바람직하게는, 본 발명의 ADCC 분석에서 사용되는 작동자 세포는 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)이며, 이것은 바람직하게는 당업계 숙련자에게 공지된 표준 방법, 예를 들면, Ficoll-Paque 밀도 기울기 원심분리를 사용하여, 정상 사람 혈액으로부터 정제된다. 본 발명의 방법에서 사용하기 위한 바람직한 작동자 세포는 상이한 Fc γ R 작용성 수용체를 발현시킨다. 본 발명은 작동자 세포인, Fc γ RI, Fc γ RIIA 및 Fc γ RIIB를 발현시키는 THP-1, 및 Fc γ RIIIA 및 Fc γ RIIB 모두를 발현시키는 전체 사람 혈액으로부터 유래된 1차 대식세포로부터 유래된 단핵구를 포함하여, Fc 항체 돌연변이체가 야생형 IgG1 항체와 비교하여 증가된 ADCC 활성 및 식균 작용을 보이는지 여부를 결정한다.
- [0395] 사람 단핵구 세포주인 THP-1은 높은 친화력 수용체 Fc γ RI 및 낮은 친화력 수용체 Fc γ RIIA의 발현을 통해 식균 작용을 활성화 한다(Fleit et al., 1991, J. Leuk. Biol. 49: 556). THP-1 세포는 Fc γ RIIA 또는 Fc γ RIIB를 구조적으로 발현시키지 않는다. 이들 세포를 사이토카인으로 자극시키면 FcR 발현 패턴에 영향을 미친다(Pricop et al., 2000 J. Immunol. 166: 531-7). 사이토카인 IL-4의 존재시 THP-1 세포의 성장은 Fc γ RIIB 발현을 유도하고 Fc γ RIIA 및 Fc γ RI 발현의 감소를 야기한다. 또한, Fc γ RIIB 발현은 증가된 세포 밀도에 의해 향상될 수 있다(Tridandapani et al., 2002, J. Biol Chem. 277: 5082-9). 이와는 반대로, IFN γ 가 Fc γ RIIA의 발현을 유도할 수 있는 것으로 보고되었다(Pearse et al., 1993 PNAS USA 90:4314-8). 세포 표면 상 수용체의 존재 및 부재는 당업계 숙련자에게 공지된 통상의 방법을 사용하여 FACS에 의해 결정될 수 있다. 세포 표면 상에서 Fc γ R의 사이토카인 유도성 발현은 Fc γ RIIB의 존재시 활성 및 억제 모두를 테스트하는 시스템을 제공한다. THP-1 세포가 Fc γ RIIB를 발현시킬 수 없는 경우, 본 발명은 또한 다른 사람 단핵구 세포주, U937을 포함한다. 이들 세포는 IFN γ 및 TNF의 존재시 대식 세포로 말단 분화되는 것으로 나타났다(Koren et al., 1979, Nature 279:328-331).
- [0396] Fc γ R 의존성 종양 세포 살해는 마우스 종양 모델에서 대식세포 및 NK 세포에 의해 이루어진다(Clynes et al., 1998, PNAS USA 95:652-656). 본 발명은 식균 작용 및 ADCC 분석법 모두에서 표적 세포의 세포 매개 세포독성을 유발시키는 Fc 돌연변이체의 효능을 분석하기 위해 작동자 세포로서 공여체로부터의 현탁 분리시킨 단핵구의 사용을 포함한다. Fc γ RI, Fc γ RIIIA, 및 Fc γ RIIB의 발현 패턴은 상이한 성장 조건에 의해 영향받는다. FBS + GM-CSF에서 및 또는 사람 혈청 내에서 배양된 냉동 현탁 분리 단핵구, 신선한 현탁 분리 단핵구, 10% FBS 중에 유지시킨 단핵구, 및 단핵구로부터의 Fc γ R 발현은 당업계 숙련자에게 공지된 통상의 방법을 사용하여 결정할 수도 있다. 예를 들면, 세포는 Fc γ R 특이적 항체로 염색되고 FACS에 의해 분석되어 FcR 프로파일을 결정할 수 있다. 그 후, 대식세포의 생체 내 Fc γ R 발현을 최대로 모방하는 조건이 본 발명의 방법을 위해 사용된다.
- [0397] 일부 구체예에서, 본 발명은 특히 적당한 Fc γ R 프로파일을 갖는 사람 세포를 얻을 수 없는 경우 마우스 세포의 사용을 포함한다. 일부 구체예에서, 본 발명은 사람 Fc γ IIIA 및 당업계 숙련자에게 공지된 방법을 사용하여 분리시킨 안정한 트랜스펙턴트로 트랜스펙션될 수 있는 마우스 대식세포 세포주 RAW264.7(ATCC)를 포함한다(예를 들면, 문헌(Ralph et al., J. Immunol. 119:950-4)을 참조). 트랜스펙턴트는 일반적 실험을 사용하여 FACS 분석에 의한 Fc γ RIIIA 발현에 대하여 정량될 수 있으며 높은 발현자들이 본 발명의 ADCC 분석에서 사용될 수 있다. 다른 구체예에서, 본 발명은 본원에 개시된 바와 같이 사람 Fc γ R을 발현시키는 비장 복막 대식세포를 녹아

웃 유전자 변형 마우스로부터 분리시키는 것을 포함한다.

- [0398] 림프구는 Ficoll-Paque 기울기(Pharmacia)를 사용하여 공여체의 말초 혈액(PBM)으로부터 수확할 수도 있다. 세포의 분리된 단핵 집단 내에서 주요한 ADCC 활성은 세포 표면 상에 Fc γ RIIIA를 함유하지만 Fc γ RIIB를 함유하지는 않는 천연 살해 세포(NK)를 발생시킨다. 이들 세포와 함께 결과는 NK 세포 ADCC를 유발함에 있어서 돌연변이체의 효능을 나타내고 현탁 분리된 단핵구와 함께 테스트하기 위한 시약을 성립시킨다.
- [0399] 본 발명의 ADCC 분석에서 사용된 표적 세포는 유방암 세포주, 예를 들면, ATCC 수탁 번호 HTB-30의 SK-BR-3 (예를 들면, 문헌(Tremp et al., 1976, Cancer Res. 33-41)을 참조); B-림프구; Burkitts 림프종으로부터 유도된 세포, 예를 들면, ATCC 수탁 번호 CCL-86의 Raji 세포 (예를 들면, 문헌(Epstein et al., 1965, J. Natl. Cancer Inst. 34:231-240)을 참조), 및 ATCC 수탁 번호 CCL-213의 Daudi 세포(예를 들면, 문헌(Klein et al., 1968, Cancer Res. 28: 1300-10)을 참조)를 포함하지만, 이에 한정되지는 않는다. 표적 세포는 분석되는 면역글로불린의 항원 결합 부위에 의해 인지되어야 한다.
- [0400] ADCC 분석법은 아포프토시스 경로를 통해 세포사를 매개하는 NK 세포의 능력을 기초로 한다. NK 세포는 세포 표면 상 항원에 결합된 IgG의 Fc γ RIIIA의 인지에 의해 부분적으로 세포사를 매개한다. 본 발명의 방법에 따라 사용된 ADCC 분석법은 방사성 기재 분석법 또는 형광성 기재 분석법일 수도 있다. 변이체 Fc 영역을 포함하는 본 발명의 분자를 특성화하는데 사용된 ADCC 분석법은 표적 세포 예를 들면, SK-BR-3, MCF-7, OVCAR3, Raji, Daudi 세포, 읍소닌화 표적 세포를 그것의 항원 결합 부위를 통해 표적 세포 상 세포 표면 수용체를 인지하는 항원으로 표지하는 단계; 루틴한 실험으로 결정될 수 있는 적절한 비율로 표지된 읍소닌화 표적 세포 및 작동자 세포를 혼합하는 단계; 세포를 수확하는 단계; 사용된 표지를 기초로 하여 적절한 검출 계획을 사용하여 용리된 표적 세포의 상청액에서 표지를 검출하는 단계를 포함한다. 표적 세포는 당업계 공지된 표준 방법을 사용하여 방사성 표지 또는 형광성 표지로 표지될 수도 있다. 예를 들면, 표지는 [⁵¹Cr]Na₂CrO₄; 및 형광성 향상 리간드, 2,2':6',2"-테르피리딘-6-6"-디카르복실레이트(TDA)의 아세톡시메틸 에스테르를 포함하지만, 이에 한정되지는 않는다.
- [0401] 특이적 바람직한 구체예에서, 시간 분해 형광 분석법이 형광성 향상 리간드, 2,2':6',2"-테르피리딘-6-6"-디카르복실레이트(TDA)의 아세톡시메틸 에스테르로 표지된 표적 세포에 대한 ADCC 활성을 측정하기 위해 사용된다. 이러한 형광 분석법은 당업계에 공지되어 있으며, 예를 들면, 본원에서 전체가 참고로 인용되어 있는 문헌(Blomberg et al., 1996, Journal of Immunological Methods, 193:199-206)을 참조하라. 간단히 말해, 표적 세포를 TDA (비스(아세톡시메틸) 2,2':6',2"-테르피리딘-6-6"-디카르복실레이트, (BATDA)의 막 침투가능 아세톡시메틸 에스테르로 표지시키며, 이것은 생존 세포의 세포막을 통해 빠르게 확산한다. 세포내 에스테라제는 에스테르 기를 분리시키고 재생된 막 침투가능 TDA 분자는 세포 내부에 포획된다. 예를 들면, 2시간 이상, 최대 3.5 시간 동안, 37℃에서, 5% CO₂ 하에, 작동자 세포 및 표적 세포를 인큐베이션한 후, 용리된 표적 세포에서 방출된 TDA를 시간 분해 형광 분석기(예를 들면, Victor 1420, Perkin Elmer/Wallac)에서 정량한다.
- [0402] 다른 특정 구체예에서, 변이체 Fc 영역을 포함하는 본 발명의 분자를 특성화하는데 사용되는 ADCC 분석법은 다음 단계를 포함한다: 바람직하게는, 4-5x10⁶ 표적 세포 (예를 들면, SK-BR-3, MCF-7, OVCAR3, Raji 세포)를 비스(아세톡시메틸) 2,2':6',2"-테르피리딘-t-6"-디카르복실레이트(DELTA BATDA Reagent, Perkin Elmer/Wallac)로 표지한다. 최적의 표지 효율을 위해, ADCC 분석에서 사용되는 표적 세포의 수는 바람직하게는 5x10⁶을 넘지 않아야 한다. BATDA 시약을 세포에 첨가하고 혼합물을 37℃에서, 바람직하게는 적어도 30분 동안, 5% CO₂ 하에 인큐베이션한다. 후속하여 세포를 0.125 mM 설파피라졸을 함유하는 생리학적 버퍼, 예를 들면, PBS, 및 0.125 mM 설파피라졸을 함유하는 배지로 세척한다. 후속하여, 표지된 표적 세포를 변이체 Fc 영역을 포함하는 본 발명의 분자, 즉, 본 발명의 변이체 Fc 영역을 포함하는 면역글로불린으로서, 폴리클로날 항체, 모노클로날 항체, 이중특이적 항체, 복합 특이적 항체, 사람화 항체, 또는 키메라 항체를 포함하지만, 이에 한정되지는 않는 것으로 읍소닌화(코팅)한다. 바람직한 구체예에서, ADCC 분석에서 사용된 변이체 Fc 영역을 포함하는 면역글로불린은 세포 표면 수용체, 종양 항원, 또는 암 항원에 특이적이다. 본 발명의 변이체 Fc 영역이 도입되는 면역글로불린은 섹션 5.4에 열거한 바와 같이, 임의의 암 또는 종양 항원에 특이적으로 결합할 수도 있다. 추가적으로, 본 발명의 변이체 Fc 영역이 도입되는 면역글로불린은 섹션 5.4에 열거한 바와 같은 암 하위에 특이적인 임의의 치료 항체일 수도 있다. 일부 구체예에서, ADCC 분석에서 사용되는 변이체 Fc 영역을 포함하는 면역글로불린은 항-플루오레신 모노클로날 항체, 4-4-20(Kranz et al., 1982 J. Biol. Chem. 257(12):6987-6995) 마우스-사람 키메라 항-CD20 모노클로날 항체 2H7 (Liu et al., 1987, Journal of Immunology, 139:3521-6); 또는 사람 표

피 성장 인자 수용체 2(p185 HER2)에 특이적인 사람화 항체 (Ab4D5)(Carter et al. (1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:4285-9)이다. ADCC 분석법에서 표적 세포는 본 발명의 변이체 Fc 영역이 도입되는 면역글로불린에 따라 선택되어 상기 면역글로불린은 표적 세포의 세포 표면 수용체에 특이적으로 결합한다. 바람직하게는, 본 발명의 ADCC 분석법은 1 가지 이상의 조작된 항체, 예를 들면, 본 발명의 Fc 변이체를 지니는 항 Her2/neu, 4-4-20, 2B6, 리툭산, 및 2H7를 사용하여 수행된다. 가장 바람직한 구체예에서, 본 발명의 Fc 변이체는 3 개 이상의 항체로 도입되며 그들의 ADCC 활성이 테스트된다. 작용의 특정 메커니즘에 구속되고자 하지는 않지만, 이들 기능 분석법에서 3개 이상의 항체를 조사하여 생존 Fc 돌연변이체를 실수로 제거하는 위험을 감소시킬 것이다.

[0403] 흡소닌화 표적 세포를 작동자 세포, 예를 들면, PBMC에 첨가하여 대략 50:1, 75:1, 또는 100:1의 작동자:표적비를 만든다. 특정 구체예에서, 변이체 Fc 영역을 포함하는 면역글로불린이 4-4-20의 생존 도메인을 갖는 경우, 작동자:표적은 75:1이다. 작동자 및 표적 세포를 2시간 이상, 최대 3.5 시간 동안, 37°C에서, 5% CO₂ 하에서 인큐베이션한다. 세포 상청액을 수확하고 산 유로프 용액(예를 들면, DELFIA 유로프 용액, Perkin Elmer/Wallac)에 첨가한다. 형성된 유로프-TDA 킬레이트의 형광성을 시간 분해 형광 분석기에서 정량한다(예를 들면, Victor 1420, Perkin Elmer/Wallac). 최대 방출(MR) 및 자발적 방출(SR)은 각각 1% TX-100 및 단독 배지와 함께 표적 세포를 인큐베이션하여 결정된다. 항체 독립적 세포매개 세포독성(AICC)은 항체의 부재시 표적 세포 및 작동자 세포의 인큐베이션에 의해 측정된다. 각 분석법은 바람직하게는 3번 수행된다. 특이적 용해의 평균 백분율은 다음과 같이 계산된다: 실험적 방출(ADCC) - AICC)/(MR-SR) x 100.

[0404] 본 발명은 NK-의존성 및 대식 세포 의존성 ADCC 분석법 모두에서 Fc 변이체의 특성화를 포함한다. 본 발명의 Fc 변이체는 NK 의존성 또는 대식세포 의존성 분석에서 분석된 바와 같은 변형된 작동자 기능과 같은 변형된 표현형을 갖는다.

[0405] 본 발명은 C1q에 결합하고 보체 의존성 세포독성(CDC)을 매개하는, 당업계에 공지되고 본원에서 예시된 분석법을 포함한다. C1q 결합을 결정하기 위해, C1q 결합 ELISA를 수행할 수도 있다. 전형적인 분석법은 다음을 포함할 수도 있다: 분석 플레이트를 코팅 버퍼 내에 폴리펩티드 변이체 또는 출발 폴리펩티드(대조군)와 함께 밤새 4°C에서 코팅시킬 수도 있다. 후속하여 플레이트를 세척하고 차단시킬 수도 있다. 세척 후, 사람 C1q의 분취량을 각각의 웰에 첨가하고 실온에서 2시간 동안 인큐베이션할 수도 있다. 추가적 세척 후, 항체에 콘쥬게이션된 100 μL의 양 항-보체 C1q 퍼옥시다제를 각각의 웰에 첨가하고 실온에서 1시간 동안 인큐베이션할 수도 있다. 플레이트는 다시 세척 버퍼로 세척될 수도 있으며 OPD(0-페닐렌디아민 디히드로클로라이드 (Sigma))를 함유하는 100 μL의 기질 버퍼를 각각의 웰에 첨가할 수도 있다. 황색이 출현이 관찰된 산화 반응을 30분 동안 진행되도록 허용할 수도 있으며 100 μL의 4.5 NH₂ CO₄를 첨가하여 중단시킬 수도 있다. 후속하여 흡광도를 (492-405) nm에서 읽을 수도 있다.

[0406] 본 발명에 따른 바람직한 변이체는 상기 분석법 또는 유사한 분석법에서 검출되고 측정된 바와 같이, C1q 결합에 있어서 현저한 감소를 보이는 것이다. 바람직하게 Fc 변이체를 포함하는 분자는 돌연변이되지 않은 IgG1 Fc 영역을 갖는 대조군 항체와 비교하여 C1q 결합에 있어서 약 50 배 감소, 약 60 배, 약 80 배, 또는 약 90 배 감소를 보인다. 가장 바람직한 구체예에서, Fc 변이체를 포함하는 분자는 C1q에 결합하지 않으며, 즉 변이체는 대조군 항체와 비교하여 Cq1 결합에 있어서 약 100 배 이상의 감소를 보인다.

[0407] 다른 전형적인 변이체는 야생형 Fc 변이체를 포함하는 분자보다 사람 C1q에 대한 더 높은 결합 친화력을 갖는 것이다. 이러한 분자는 야생형 Fc 영역을 포함하는 부모 분자와 비교하여 사람 C1q 결합에 있어서 예를 들면, 약 2배 이상, 및 바람직하게는 약 5 배 이상의 증가를 보인다. 예를 들면, 사람 C1q 결합은 야생형 Fc 영역을 포함하는 분자와 비교하여, 약 2 배 내지 약 500 배, 및 바람직하게는 약 2 배 또는 약 5 배 내지 약 1000 배 증가될 수도 있다.

[0408] 보체 활성을 평가하기 위해, 보체 의존성 세포독성(CDC) 분석법은 예를 들면, 본원에서 전체가 참고로 인용되는 문헌(Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods 202:163 (1996))에서 설명한 바와 같이 수행될 수도 있다. 간단히 말해서, 변이체 Fc 영역을 포함하는 분자 및 사람 보체를 버퍼로 희석시킬 수도 있다. 변이체 Fc 영역을 포함하는 분자가 결합하는 항원을 발현시키는 세포를 약 1 x 10⁶ 세포수/ml의 농도로 희석시킬 수도 있다. 변이체 Fc 영역을 포함하는 분자, 희석된 사람 보체 및 항원을 발현시키는 세포의 혼합물이 평평 바닥 조직 배양 96 웰 플레이트에 첨가하고 2시간 동안 37°C에서 5% CO₂ 하에 인큐베이션을 허용하여 보체 매개 세포 용해를 촉진할 수도 있다. 이어서, 50 μL의 알라마 블루(Accumed International)를 각 웰에 첨가하고 37°C에서 밤새 인큐베이션시킬 수도 있다. 96-웰 형광계를 사용하여 흡광도를 측정하며, 530 nm에서 여기이고 590 nm에서

방출이다. 결과는 상대적 형광성 단위(RFU)로 표현될 수도 있다. 샘플 농도는 표준 곡선으로부터 계산될 수도 있으며 비변이체 분자, 즉, 야생형 Fc 영역을 포함하는 분자와 비교되는 활성%를 관심의 변이체에 대하여 보고한다.

[0409] 일부 구체예에서, 본 발명의 Fc 변이체는 보체를 활성화하지 않는다. 바람직하게 변이체는 상기 CDC 분석에서 임의의 CDC 활성을 갖는 것으로 보이지 않는다. 또한, 본 발명은 모 분자(야생형 Fc 영역을 포함하는 분자)와 비교하여 향상된 CDC를 갖는 변이체, 예를 들면, 시험관 내 또는 생체 내 CDC 활성의 (예를 들면, 비교되는 각각의 분자에 대한 IC50 값에서) 약 2 배 내지 약 100 배 증가를 보이는 변이체에 관련한다. 보체 분석법은 기니아 피그, 래빗 또는 사람 혈청으로 수행될 수도 있다. 표적 세포의 보체 용해는 각각이 본원에서 전체가 참고로서 인용되는 문헌(Korzeniewski et al., 1983 Immunol. Methods 64(3):313-20; 및 Decker et al., 1988 J. Immunol Methods 115(1):61-9)에서 설명한 바와 같이, 락테이트 탈수소효소(LDH)와 같은 세포내 효소의 방출; 또는 본원에서 설명한 바와 같이 표지된 표적 세포 내 유로폼, 크로뮴 51 또는 이듐 111과 같은 세포 내 표지의 방출을 모니터링함으로써 검출될 수도 있다.

[0410] 5.2.8 기타 분석법

[0411] 또한, 변이체 Fc 영역을 포함하는 본 발명의 분자는 Fc-Fc γ R 상호작용 결합의 동역학적 매개변수를 특성화하기 위한 당업계 공지된 임의의 표면 플라스몬 기제 분석법을 사용하여 분석될 수도 있다. Biacore AB (Uppsala, Sweden)로부터 구매가능한 BIAcore 기구; Affinity Sensors (Franklin, MA.)로부터 구매가능한 IAsys 기구; Windsor Scientific Limited (Berks, UK)로부터 구매가능한 IBIS 시스템, Nippon Laser and Electronics Lab (Hokkaido, Japan)으로부터 구매가능한 SPR-CELLIA 시스템, 및 Texas Instruments (Dallas, TX)로부터 구매가능한 SPR Detector Spreeta를 포함하지만, 이에 한정되지는 않는 시중 구매 가능한 임의의 SPR 기구가 본 발명에서 사용될 수 있다. SPR-기제 기술의 개관을 위해, 그 전체가 본원에서 참고로 인용되는 문헌(Mullet et al., 2000, Methods 22:77-91; Dong et al., 2002, Review in Mol. Biotech., 82:303-23; Fivash et al., 1998, Current Opinion in Biotechnology 9:97-101; Rich et al., 2000, Current Opinion in Biotechnology 11:54-61)을 참조하라. 추가적으로, 미국 특허 제6,373,577호; 제6,289,286호; 제5,322,798호; 제5,341,215호; 제6,268,125호에서 설명된 단백질-단백질 상호작용을 측정하기 위한 SPR 기구 및 SPR을 기반으로 하는 방법 중 임의의 것이 본 발명의 방법에서 고려되며, 이들 모두가 본원에서 전체가 참고로 인용된다.

[0412] 간단히 말해서, SPR 기제 분석법은 표면 상의 수많은 결합 쌍을 고정시키는 단계, 및 실시간으로 그것의 상호작용을 용액 내 결합 쌍의 나머지 수를 모니터링하는 단계를 포함한다. SPR은 복합체 형성 또는 해리가 발생하는 표면 부근의 용매의 굴절률 변화를 측정하는 것을 기반으로 한다. 고정이 이루어지는 표면은 센서 칩이며, 이것은 SPR 기술의 핵심부이며; 그것은 박층의 금으로 코팅된 유리 표면으로 이루어져 있으며 상기 표면으로 분자의 결합을 최적화하기 위해 설계된 특이화 표면의 범위를 기초로 형성된다. 각종 센서 칩은 구체적으로 상기 열거된 회사들로부터 구매가능하며, 이들 모두가 본 발명의 방법에서 사용될 수도 있다. 센서 칩의 예는 BIAcore AB 사로부터 구매가능한 것들, 예를 들면, Sensor Chip CM5, SA, NTA, 및 HPA를 포함한다. 본 발명의 분자는 아민기를 통한 직접 공유결합, 술포히드릴기를 통한 직접 공유결합, 아비딘 코팅된 표면으로의 비오틴 부착, 탄수화물 기로의 알데히드 결합, 및 NTA 칩과 함께 히스티딘 태그를 통한 부착을 포함하지만, 이에 한정되지는 않는 당업계 공지된 임의의 고정 방법 및 화학을 사용하여 센서 칩의 표면상으로 고정시킬 수도 있다.

[0413] 일부 구체예에서, 변이체 Fc 영역을 포함하는 본 발명의 분자, 예를 들면, 변이체 Fc 영역을 포함하는 면역글로불린의 Fc γ R에 대한 결합의 동역학적 매개변수는 BIAcore 기구(예를 들면, BIAcore instrument 1000, BIAcore Inc., Piscataway, NJ)를 사용하여 결정될 수도 있다. 임의의 Fc γ R을 사용하여 변이체 Fc 영역을 포함하는 본 발명의 분자와의 상호작용을 평가할 수 있다. 특정 구체예에서, Fc γ R은 Fc γ RIIIA, 바람직하게는 가용성 모노머 Fc γ RIIIA이다. 예를 들면, 한 구체예에서, 가용성 모노머 Fc γ RIIIA는 링커-AVITAG 서열에 결합된 Fc γ RIIIA의 세포외 영역이다(본원에서 전체가 참고로서 인용되는, 2003년 1월 9일자로 출원된 미국 가출원 제60/439,498호 (Attorney Docket No. 11183-004-888) 및 2003년 3월 19일자로 출원된 미국 가출원 제60/456,041호를 참조할 것). 다른 특정 구체예에서, Fc γ R은 Fc γ RIIB, 바람직하게는 가용성 다이머 Fc γ RIIB이다. 예를 들면, 한 구체예에서, 가용성 다이머 Fc γ RIIB 단백질은 본원에서 전체가 참고로 인용되는, 2003년 1월 13일자로 출원된 미국 가출원 제 60/439,709 호에서 설명된 방법에 따라 제조된다.

[0414] BIAcore 기구를 이용하여, 변이체 Fc 영역을 포함하는 분자(이때, 분자는 4-4-20 항체임)의 Fc γ R에 대한 동역학적 매개변수를 결정하기 위한 전형적인 분석법은 다음을 포함한다: BSA-FITC는 바람직하게는, 아민 결합 화학을 통해 센서 칩 표면의 4개의 유동 세포 중 하나에 고정되어서, BSA-FITC의 약 5000 반응 단위(RU)가 표면 상

에 고정된다. 적당한 표면이 준비되면, Fc 돌연변이체를 함유하는 4-4-20 항체를 바람직하게는 5 μ L/mL 유속에서 20 μ g/mL 용액을 1분 주사에 의해 표면 상에 통과시킨다. 표면에 결합하는 4-4-20 항체의 수준은 400 내지 700 RU에 이른다. 다음으로, HBS-P 버퍼(20mM HEPES, 150 mM NaCl, 3mM EDTA, pH 7.5) 중 수용체 (Fc γ RIIA 및 Fc γ RIIB-Fc 융합 단백질)의 희석 연속물을 100 μ L/분으로 표면상에 주사한다. 상이한 수용체 희석물들 사이에서 항체 재생은 바람직하게는, 100mM NaHCO₃ pH 9.4; 3M NaCl의 단일 5초 주사에 의해 수행된다. 당업계 공지된 임의의 재생 기술이 본 발명의 방법에서 고려된다.

[0415] 전체 데이터 세트가 모아지면, 결과의 결합 곡선을 SPR 기구 제조사, 예를 들면, BIAcore 사(Piscataway, NJ)에 의해 공급된 컴퓨터 알고리즘을 사용하여 광범위하게 적합화한다. 이들 알고리즘은 K_{on} 및 K_{off} 모두를 계산하며, 이로부터 명백한 평형 결합 상수인 K_d 는 2개의 속도 상수의 비(즉, K_{off}/K_{on})로서 추론된다. 개별 속도 상수가 유도되는 보다 상세한 처리법은 BIAevaluation Software Handbook (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ)에서 찾을 수 있다. 생성된 데이터의 분석은 당업계 숙련자에게 공지된 임의의 방법을 사용하여 수행될 수도 있다. 발생한 동역학적 데이터를 해석하는 각종 방법의 개관을 위해, 문헌(Myszka, 1997, Current Opinion in Biotechnology 8:50-7; Fisher et al., 1994, Current Opinion in Biotechnology 5:389-95; O'Shannessy, 1994, Current Opinion in Biotechnology, 5:65-71; Chaiken et al., 1992, Analytical Biochemistry, 201:197-210; Morton et al., 1995, Analytical Biochemistry 227:176-85; O'Shannessy et al., 1996, Analytical Biochemistry 236:275-83)을 참조로 하며, 이들 모두는 본원에서 그 전체가 참고로 인용된다.

[0416] 바람직한 구체예에서, SPR 분석법, 예를 들면, BIAcore를 사용하여 결정된 동역학적 매개변수는 본 발명의 분자가 기능상 분석법, 예를 들면, ADCC에서 기능하는 방법의 예상 측정치로서 사용될 수도 있다. SPR 분석법에서 얻은 동역학적 매개변수를 기초로 한 본 발명의 분자의 효능을 예상하는 전형적인 방법은 다음을 포함할 수도 있다: 본 발명의 분자의 Fc γ RIIIA 및 Fc γ RIIB에 대한 결합의 K_{off} 값을 결정하는 단계; ADCC 데이터에 대하여 Fc γ RIIIA의 (1) K_{off} (wt)/ K_{off} (mut) (2) Fc γ RIIB의 K_{off} (mut)/ K_{off} (wt)를 좌표로 그리는 단계. 1 보다 큰 수는 야생형과 비교하여 Fc γ RIIIA에 대한 감소된 해리율 및 Fc γ RIIB에 대한 증가된 해리율을 나타내며, 향상된 ADCC 기능을 지닌다.

[0417] 5.3 본 발명의 분자를 재조합 생산하는 방법

[0418] 5.3.1 본 발명의 분자를 코딩하는 폴리뉴클레오티드

[0419] 또한, 본 발명은 본 발명의 방법에 의해 확인된 본 발명의, 폴리펩티드 및 항체를 포함하는 분자를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 본 발명의 분자를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 및 당업계 공지된 임의의 방법에 의해 결정된 폴리뉴클레오티드의 뉴클레오티드 서열을 얻을 수도 있다.

[0420] 본 발명의 방법에 의해 확인된 분자(예를 들면, 항체)의 뉴클레오티드 서열이 결정되면, 뉴클레오티드 서열은 당업계 공지의 방법, 예를 들면, 재조합 DNA 기술, 부위 특이적 돌연변이 유발, PCR 등(예를 들면, 이들 모두 본원에서 전체가 참고로서 인용되는 문헌(Sambrook et al., 2001, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 3판, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY; 및 Ausubel et al., eds., 1998, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY)을 참조)을 사용하여 조작되어 예를 들면, 아미노산 치환, 결실, 및/또는 삽입을 발생시켜서 상이한 아미노산 서열을 갖는 항체를 만들 수도 있다.

[0421] 특정 구체예에서, 핵산이 항체를 코딩하는 경우, 1개 이상의 CDR을 일반적인 재조합 DNA 기술을 사용하여 골격 영역에 삽입된다. 골격 영역은 천연 발생 또는 일차 골격 영역, 및 바람직하게는 사람 골격 영역일 수도 있다 (예를 들면, 사람 골격 영역의 리스트에 대하여 문헌(Chothia et al., 1998, J. Mol Biol. 278:457-479)를 참조).

[0422] 다른 구체예에서, 사람 라이브러리 또는 당업계에서 이용가능한 임의의 다른 라이브러리를 당업계 공지의 표준 기술에 의해 스크리닝하여 본 발명의 분자를 코딩하는 핵산을 클로닝할 수 있다.

[0423] 5.3.2 본 발명의 분자의 재조합 발현

[0424] 본 발명의 분자(즉, 항체)를 코딩하는 핵산 서열을 얻으면, 분자의 생산을 위한 벡터를 당업계 주지의 기술을 사용하여 재조합 DNA 기술에 의해 생산할 수도 있다. 당업계 숙련자에게 공지된 방법은 본 발명의 분자에 대한 코딩 서열을 함유하는 발현 벡터 및 적절한 전사 및 번역 억제 신호를 구성하는데 사용될 수 있다. 이들 방법은 예를 들면, 시험관 내 재조합 DNA 기술, 합성 기술, 및 생체 내 유전자 재조합을 포함한다. (예를 들면, 문헌(Sambrook et al., 1990, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2판, Cold Spring Harbor Laboratory,

Cold Spring Harbor, NY 및 Ausubel et al. eds., 1998, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY)에서 설명된 기술을 참조하라).

- [0425] 본 발명의 방법에 의해 확인된 분자(즉, 항체)의 뉴클레오티스 서열을 포함하는 발현 벡터를 전통적 기술(예를 들면, 전기 천공법, 리포솜 트랜스펙션, 및 칼슘 포스파타제 침전)에 의해 숙주 세포로 옮길 수 있으며 후속하여 트랜스펙션된 세포를 전통적 기술에 의해 배양하여 본 발명의 분자를 생산한다. 특정 구체예에서, 본 발명의 분자의 발현은 구조적, 유도성 또는 조직, 특이적 프로모터에 의해 조절된다.
- [0426] 본 발명의 방법에 의해 확인된 분자를 발현시키는데 사용되는 숙주 세포는 대장균과 같은 박테리아 세포, 또는 바람직하게는 특히 재조합 면역글로불린 분자의 발현을 위한 진핵 세포일 수도 있다. 특히, 중국 햄스터 난소 세포(CHO)와 같은 포유동물 세포는, 사람 사이토메갈로 바이러스로부터의 주요 중간체 초기 유전자 프로모터 요소와 같은 벡터와 함께, 면역글로불린에 대한 효과적인 발현 시스템이다(Foecking et al., 1998, Gene 45:101; Cockett et al., 1990, Bio/Technology 8:2).
- [0427] 각종 숙주-발현 벡터 시스템이 이용되어 본 발명의 방법에 의해 확인된 분자를 발현시킬 수도 있다. 이러한 숙주-발현 시스템은 본 발명의 분자의 코딩 서열이 생산되고 후속하여 정제될 수도 있는 비히클을 나타낼 뿐만 아니라, 적절한 코딩 서열로 형질 전환되거나 트랜스펙션 되는 경우, 원 위치에서 본 발명의 분자를 발현할 수도 있는 세포를 나타낸다. 이들은 본 발명의 방법에 의해 확인된 분자에 대한 코딩 서열을 함유하는 재조합 박테리오파지 DNA, 플라스미드 DNA 또는 코스미드 DNA 발현 벡터로 형질 전환된 박테리아(예를 들면, 대장균 및 B. 서브틸리스)와 같은 미생물; 본 발명의 방법에 의해 확인된 분자를 코딩하는 서열을 함유하는 재조합 효모 디스플레이 벡터로 형질 전환된 효모(예를 들면, 사카로마이세스 피치아(*Saccharomyces Pichia*)); 본 발명의 방법에 의해 확인된 분자를 코딩하는 서열을 함유하는 재조합 바이러스 발현 벡터(예를 들면, 바콜로바이러스)로 감염된 곤충 세포 시스템; 재조합 바이러스 발현 벡터(예를 들면, 콜리플라워 모자이크 바이러스(CaMV) 및 담배 모자이크 바이러스)로 감염되거나 본 발명의 방법에 의해 확인된 분자를 코딩하는 서열을 함유하는 재조합 플라스미드 발현 벡터(예를 들면, Ti 플라스미드)로 형질 전환된 식물 세포 시스템; 또는 포유동물 세포의 계놈(예를 들면, 메탈로티오닌 프로모터) 또는 포유동물 바이러스(예를 들면, 아데노바이러스 후기 프로모터; 우두 바이러스 7.5K 프로모터)로부터 유도된 프로모터를 함유하는 재조합 발현 구성을 지니는 포유동물 세포 시스템(예를 들면, COS, CHO, BHK, 293, 293T, 3T3 세포, 림프 세포(미국 특허 제5,807,715호 참조), Per C.6 세포(Crucell)에 의해 개발된 사람 망막 세포)를 포함하지만, 이에 한정되지는 않는다.
- [0428] 박테리아 시스템에서, 발현 벡터의 수는 발현될 분자에 대한 의도된 사용에 따라서 유리하게 선택될 수도 있다. 예를 들면, 이러한 단백질이 대량 생산되는 경우, 항체의 약학적 조성물의 생산을 위해, 용이하게 정제되는 융합 단백질 산물의 고수준의 발현을 향하게 하는 벡터가 바람직할 수도 있다. 이러한 벡터는 대장균 발현 벡터 pUR278 (Ruther et al., 1983, EMBO J. 2: 1791)(이때 항체 코딩 서열이 lac Z 코딩 서열과 함께 프레임 내 벡터로 각각 리게이션되어 융합 단백질이 생산될 수도 있음); pIN 벡터 (Inouye & Inouye, 1985, Nucleic Acids Res. 13:3101-3109; Van Heeke & Schuster, 1989, J. Biol. Chem. 24:5503-5509) 등을 포함하지만, 이에 한정되지는 않는다. 또한, pGEX 벡터를 사용하여 글루타티온 S-트랜스퍼라제(GST)와 함께 융합 단백질로서 외래 폴리펩티드를 발현시킬 수도 있다. 일반적으로, 이러한 융합 단백질은 가용성이며 매트릭스 글루타티온-아가로스 비드로의 흡착 및 결합 후 유리 글루타티온의 존재시 용리에 의해 용해된 세포로부터 용이하게 정제될 수 있다. pGEX 벡터는 트롬빈 또는 인자 Xa 프로테아제 절단 부위를 포함하도록 설계하여 클로닝된 표적 유전자 생산은 GST 부분으로부터 방출될 수 있다.
- [0429] 곤충 시스템에서, 오토그라파 캘리포니카(*Autographa californica*) 핵 다면체 바이러스(AcNPV)를 벡터로서 사용하여 외래 유전자를 발현시킨다. 바이러스는 스포돔테라 프루지페르다(*Spodoptera frugiperda*) 세포에서 성장한다. 항체 코딩 서열은 바이러스의 비본질적 영역(예를 들면, 폴리헤드린 유전자)으로 각각 클로닝되고 AcNPV 프로모터(예를 들면, 폴리헤드린 프로모터)의 억제하에 위치시킬 수도 있다.
- [0430] 포유동물 숙주 세포에서, 많은 바이러스 기제 발현 시스템이 이용될 수도 있다. 아데노바이러스가 발현 벡터로서 사용되는 경우, 관심있는 항체 코딩 서열이 아데노바이러스 전사/번역 억제 복합체, 예를 들면, 후기 프로모터 및 3부 리더 서열로 리게이션시킬 수도 있다. 후속하여, 이 키메라 유전자를 시험관 내 또는 생체 내 재조합에 의해 아데노바이러스 계놈으로 삽입시킬 수도 있다. 바이러스 계놈의 비본질적인 영역(예를 들면, E1 또는 E3 영역) 내 삽입은 생존가능하며 감염된 숙주 내 면역글로불린 분자를 발현시킬 수 있는 재조합 바이러스를 결과로 한다(예를 들면, Logan & Shenk, 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:355-359 참조). 또한, 특이적 개시 신호는 삽입된 항체 코딩 서열의 효율적인 전사를 위해 필요할 수도 있다. 이들 신호는 ATG 개시 코돈 및 인접

서열을 포함한다. 이에 더하여, 개시 코돈은 개시 코돈은 전체 삽입체의 전사를 확실히 하기 하기 위해 원하는 코딩 서열의 리딩 프레임과 함께 상 내에 존재해야만 한다. 이들 외인성 전사 억제 신호 및 개시 코돈은 천연 및 합성 모두인 각종 기원일 수 있다. 발현의 효율은 적절한 전사 인핸서 요소, 전사 종결자 등을 포함함으로써 향상될 수도 있다(Bittner et al., 1987, Methods in Enzymol. 153:51-544 참조).

[0431] 이에 더하여, 숙주 세포 균주가 선택될 수도 있으며, 이것은 삽입된 서열의 발현을 조절하거나, 원하는 특이적 방식으로 유전자 생산을 변형시키거나 처리한다. 단백질 산물의 이러한 변형(예를 들면, 당화) 및 처리(예를 들면, 절단)가 단백질의 기능상 중요할 수도 있다. 상이한 숙주 세포는 단백질 및 유전자 산물의 전사 후 프로세싱 및 변형에 대한 특징적이고 특이적인 메커니즘을 갖는다. 적절한 세포주 또는 숙주 시스템은 발현되는 외래 단백질의 정확한 변형 및 프로세싱을 보증하도록 선택될 수 있다. 마지막으로, 1차 전사체의 적절한 프로세싱, 당화, 및 유전자 산물의 인산화를 위한 세포 기구를 갖는 진핵 숙주 세포가 사용될 수도 있다. 이러한 포유동물 숙주 세포는 CHO, VERY, BHK, Hela, COS, MDCK, 293, 293T, 3T3, WI38, BT483, Hs578T, HTB2, BT20 및 T47D, CRL7030 및 Hs578Bst를 포함하지만, 이에 한정되지는 않는다.

[0432] 장기간, 높은 수득량의 재조합 단백질을 위해, 안정한 발현이 바람직하다. 예를 들면, 본 발명의 항체를 안정하게 발현시키는 세포주를 조작할 수도 있다. 복제의 바이러스 개시점을 함유하는 발현 벡터를 사용하기보다는, 숙주 세포가 적절한 제어 요소(예를 들면, 프로모터, 인핸서, 서열, 전사 종결자, 폴리아데닐화 부위 등), 및 선택가능 마커에 의해 제어된 DNA로 형질전환될 수 있다. 외래 DNA를 도입한 후, 조작된 세포를 농축 배지에서 1-2일 동안 성장하도록 허용한 다음, 선택 배지로 옮긴다. 재조합 플라스미드 내 선택가능 마커는 선택에 대한 내성을 제공하고 세포가 플라스미드를 그들의 염색체로 안정적으로 통합시키도록 허용하며 성장하여 차례로 클로닝되고 세포주로 확장될 수 있는 초점을 형성한다. 이 방법은 유리하게 사용되어 본 발명의 항체를 발현시키는 세포주를 조작할 수도 있다. 이러한 조작된 세포주는 특히 본 발명의 항체와 직접 또는 간접적으로 상호작용하는 화합물의 스크리닝 및 평가에 유용할 수도 있다.

[0433] 단순 헤르페스 바이러스 티미딘 키나제(Wigler et al., 1911, Cell 11: 223), 히포산틴-구아닌 포스포리보실트랜스퍼라제(Szybalska & Szybalski, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci USA 48:202) 및 아데닌 포스포리보실트랜스퍼라제 (Lowy et al., 1980, Cell 22: 817)를 포함하지만, 이에 한정되지는 않는 많은 선별 시스템이 사용될 수도 있으며, 유전자는 각각 tk-, hgprrt- 또는 aprt- 세포에서 사용될 수 있다. 또한, 항대사물질 내성이 다음 유전자를 위한 선별의 근거로서 사용될 수 있다: 메토타렉사트에 대한 내성을 제공하는 dhfr (Wigler et al., 1980, Proc. Natl. Acad. Sci USA 77:357; O'Hare et al., 1981, Proc. Natl. Acad. Sci USA 78:1527); 마이코페놀산에 대한 내성을 제공하는 gpt (Mulligan & Berg, 1981, Proc. Natl. Acad. Sci USA 78:2072); 아미노글리코사이드 G-418에 대한 내성을 제공하는 neo (Clinical Pharmacy 12:488-505; Wu and Wu, 1991. 3:87-95; Tolstoshev, 1993, Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32:573-596; Mulligan, 1993, Science 260:926-932; 및 Morgan and Anderson, 1993, Ann. Rev. Biochem. 62:191-217; May, 1993, TIB TECH 11(5):155-215). 사용될 수 있는 재조합 DNA 기술의 당업계 일반적으로 공지된 방법은 다음에서 설명되어 있다: Ausubel et al. (eds.), 1993, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY; Kriegler, 1990, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY; and in Chapters 12 and 13, Dracopoli et al. (eds), 1994, Current Protocols in Human Genetics, John Wiley & Sons, NY.; Colberre-Garapin et al., 1981, J. Mol. Biol. 150:1; 및 히그로마이신에 대한 내성을 제공하는 hygrr (Santerre et al., 1984, Gene 30:147).

[0434] 본 발명의 항체의 발현 수준은 벡터 증폭에 의해 증가될 수 있다(개관을 위해, Bebbington and Hentschel, The use of vector based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning, Vol. 3 (Academic Press, New York, 1987) 참조). 항체를 발현시키는 벡터 시스템 내 마커는 증폭가능한 경우, 숙주 세포의 배양액에 존재하는 억제제의 수준은 마커 유전자의 사본의 수를 증가시킬 것이다. 증폭된 영역이 항체의 뉴클레오티드 서열과 연관되어 있기 때문에, 항체의 생산도 증가할 것이다(Crouse et al., 1983, Mol. Cell. Biol. 3:257).

[0435] 숙주 세포는 본 발명의 2개의 발현 벡터, 폴리펩티드로부터 유도된 중쇄를 코딩하는 1차 벡터 및 폴리펩티드로부터 유도된 경쇄를 코딩하는 2차 벡터와 공동 트랜스펙션될 수도 있다. 2 개의 벡터들은 중쇄 및 경쇄 폴리펩티드의 동일한 발현을 가능케하는 동일한 선택가능 마커를 함유할 수도 있다. 대안으로, 단일 벡터가 중쇄 및 경쇄 폴리펩티드 모두를 코딩하는데 사용될 수도 있다. 이러한 정황에서, 경쇄는 중쇄 전에 위치하여 과량의 독성 유리 중쇄를 피해야 한다(Proudfoot, 1986, Nature 322:52; Kohler, 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA

77:2197). 중쇄 및 경쇄에 대한 코딩 서열은 cDNA 또는 게놈 DNA를 포함할 수도 있다.

[0436] 본 발명의 분자(즉, 항체)가 재조합적으로 발현되는 경우, 그것은 폴리펩티드 또는 항체의 정제를 위해 당업계 공지된 임의의 방법, 예를 들면, 크로마토그래피(예를 들면, 이온 교환, 친화력, 특히 단백질 A 이후에 특이 항원에 대한 친화력, 및 크기별 칼럼 크로마토그래피), 원심 분리, 상이한 용해도에 의해, 또는 폴리펩티드 또는 항체의 정제를 위한 임의의 다른 표준 기술에 의해 정제될 수도 있다.

[0437] 5.4 예방 및 치료 방법

[0438] 본 발명은 질병, 질환, 또는 감염과 관련한 1 가지 이상의 증상을 예방, 치료, 또는 완화하기 위해 동물, 바람직하게는 포유동물, 가장 바람직하게는 사람에 본 발명의 분자(예를 들면, 항체)의 1개 이상을 투여하는 단계를 포함한다. 본 발명의 분자는 Fc γ R에 의해 매개된 작동자 세포 기능(예를 들면, ADCC)의 향상된 효율이 바람직한 질병 또는 질환의 치료 또는 예방에 특히 유용하다. 본 발명의 방법 및 조성물은 원발성 또는 전이성 종양 질병(즉, 암), 및 감염성 질병의 치료 또는 예방에 특히 유용하다. 본 발명의 분자는 당업계에 공지되어 있거나 본원에서 설명된 바와 같이 약학적으로 허용가능한 조성물로 제공될 수도 있다. 하기 상세히 설명하는 바와 같이, 본 발명의 분자는 암(특히, 수동적 면역요법에서), 자가면역 질병, 염증성 질환 또는 감염성 질병의 치료 또는 예방법에서 사용될 수 있다.

[0439] 또한, 본 발명의 분자는 암, 자가면역 질병, 염증성 질환 또는 감염성 질병의 치료 또는 예방을 위한 당업계 공지된 기타 치료 시약과 함께 유리하게 이용될 수도 있다. 특정 구체예에서, 본 발명의 분자는 모노클로날 또는 키메라 항체, 림포카인, 또는 조혈 성장 인자(예를 들면, IL-2, IL-3 및 IL-7과 같은 것)와 함께 사용될 수도 있으며, 이것은 예를 들면, 분자와 상호작용하고, 면역 반응을 증가시키는 작동자 세포의 수 또는 활성을 증가시키는 역할을 한다. 본 발명의 분자는 또한, 예를 들면, 하기 섹션 5.4.1.2 및 5.4.2.1에서 상세히 설명한 바와 같이, 1 가지 이상의 약물과 함께 유리하게 사용되어 예를 들면, 항암제, 항염증제 또는 항바이러스제와 같이, 질병, 질환, 또는 감염을 치료하는데 사용될 수도 있다.

[0440] 5.4.1 암

[0441] 본 발명은 변이체 Fc 영역을 포함하는 1 가지 이상의 분자의 치료적 유효량을 피험체에 투여하는 것을 포함하는 피험체 내 암 또는 전이의 치료 또는 예방을 위한 방법 및 조성물을 포함한다.

[0442] 변이체 Fc 영역을 포함하는 본 발명의 분자(즉, 폴리펩티드, 항체)는 원발성 암의 성장 또는 암세포의 전이를 예방, 억제 또는 감소시키는데 사용될 수 있다. 한 구체예에서, 본 발명의 분자는 Fc γ RIIIA 및/또는 Fc γ RIIA에 결합하는 야생형 Fc 영역을 포함하는 대비되는 폴리펩티드보다 더 높은 친화력을 가지고 Fc γ RIIIA 및/또는 Fc γ RIIA에 결합하는 변이체 Fc를 포함하며, 상기 변이체 Fc 영역은 향상된 작동자 기능, 예를 들면, ADCC, CDC, 식균작용, 옵소닌 작용 등을 갖는다. 이러한 분자들은 암을 치료하거나 예방하는데 단독으로 사용될 수 있다. 다른 구체예에서, 본 발명의 분자는 야생형 Fc 영역을 포함하는 대비되는 폴리펩티드가 Fc γ RIIIA 및/또는 Fc γ RIIA에 결합하는 것보다 더 높은 친화력으로 Fc γ RIIIA 및/또는 Fc γ RIIA에 결합하고, 추가적으로 야생형 Fc 영역을 포함하는 대비되는 폴리펩티드가 Fc γ RIIB에 결합하는 것보다 더 낮은 친화력으로 Fc γ RIIB에 결합하는 변이체 Fc 영역을 포함하며, 및/또는 상기 변이체 Fc 영역은 향상된 작동자 기능, 예를 들면, ADCC, CDC, 식균 작용, 옵소닌 작용 등을 갖는다. 이러한 분자들은 또한 단독으로 사용되어 암을 치료하거나 예방할 수 있다.

[0443] 일부 구체예에서, 본 발명은 F γ RIIIA-158V 또는 Fc γ RIIIA-158F 대립 유전자에 대해 동종 접합인 것들과 같은 Fc γ R 다형태들과 함께 피험체 내 암의 치료 또는 예방을 위한 방법 및 조성물을 포함한다. 일부 구체예에서, 본 발명은 조작 치료 항체, 예를 들면, 본 발명의 방법에 따른 종양 특이적 모노클로날 항체를 포함하며, 이러한 조작된 항체는 Fc γ RIIIA(158F)의 낮은 친화력 대립 유전자에 대하여 이소타입의 환자에서 향상된 효능을 갖는다. 다른 구체예에서, 본 발명은 조작된 치료 항체, 예를 들면, 본 발명에 따른 종양 특이적 모노클로날 항체를 포함하며, 이러한 조작된 항체는 Fc γ RIIIA(158F)의 높은 친화력 대립 유전자에 대하여 이소타입인 환자에서 증가된 효능을 갖는다.

[0444] 일부 구체예에서, 본 발명의 조작된 항체는 비호지킨 림프종(NHL)을 치료 및/또는 예방하는데 특히 효과적이다. 본 발명의 조작된 항체는 화학 요법, 항-CD20 mAb, 리툭시맙을 포함하지만, 이에 한정되지는 않는, NHL에 대한 현재의 치료법보다 치료적으로 더 효과적이다. 그러나, 항-CD-20 모노클로날 항체의 효능은 피험체의 Fc γ R 다형태에 의존적이다(Carton et al., 2002 Blood, 99:754-8; Weng et al., 2003 J Clin Oncol.21(21):3940-7; 이들 모두가 본원에서 전체가 참고로 인용됨). 이들 수용체들은 작동자 세포의 표면상에서 발현되며 ADCC를 매개한다. 낮은 친화력 활성화와 수용체의 높은 친화력 대립 유전자는 ADCC를 매개하는 작동자 세포의 능력을 향상

시킨다. 본 발명의 방법은 Fc 돌연변이를 함유하는 항-CD20 항체가 그들의 변형된 Fc 도메인을 통해 작동자 세포 상의 Fc γ R에 대한 친화력을 증가시키도록 허용한다. 본 발명의 조작된 항체는 그들의 Fc γ R 다형태에도 불구하고 환자에 대하여 더 나은 면역요법 제제를 제공한다.

[0445] 피험체에서 조작된 항-CD20 항체의 효능을 결정하기 위한 전형적인 방법은 다음을 포함할 수도 있다: ADCC에서 실질적으로 증가된 살해를 보이는 Fc 돌연변이와 함께 키메라 항-HER2/neu 중쇄 유전자를 함유하는 플라스미드가 백본으로서 사용되어 리톡시맙 중쇄 유전자로부터 가변 도메인으로 옮겨질 수 있다. 항-HER2/neu Fc 변이체로부터의 가변 영역을 리톡시맙으로부터 가변 부위와 대체시킨다. 야생형 Fc 도메인 또는 FcR 결합을 폐기하기 위한 D265A 돌연변이, 또는 항-CD20 Fc 변이체를 함유하는 플라스미드를 일시적으로 리톡시맙 경쇄 유전자와 함께 293H 세포로 공동 트랜스펙션하고, 조건화 배지 및 항체는 일반적 방법을 사용하여 단백질 G 칼럼 상에서 정제한다.

[0446] Fc 변이체를 함유하는 항-CD20 mAb는 배양된 B 세포주를 사용하여 ADCC를 테스트하여 ADCC를 증가시키는 Fc 변이체의 능력을 결정한다. 표준 ADCC는 본원에 개시된 방법을 사용하여 수행된다. 림프구는 Ficoll-Paque 성분(Pharmacia)를 사용하여 말초 혈액으로부터 수확한다. 표적 Daudi 세포, CD20을 발현하는 B-세포주를 유로폼(PerkinElmer)과 함께 로딩시키고 37°C에서 4시간 동안 작동자와 함께 배양한다. 방출된 유로폼은 형광 플레이트 판독기(Wallac)를 사용하여 검출된다. 결과의 ADCC 데이터는 NK 세포 매개 세포독성을 유발하고 환자 샘플 및 현탁 분리된 단핵구 두 가지와 함께 테스트될 수 있는 항-CD20 Fc 변이체를 확립시키는 Fc 변이체의 효능을 나타낸다. 후속하여 항-CD20 항체의 효능을 증가시키기 위한 가장 큰 잠재력을 보이는 Fc 변이체를 환자로부터의 PBMC를 사용하여 ADCC 분석에서 테스트한다. 건강한 기증자로부터의 PBMC를 작동자 세포로서 사용한다. 항-CD20 변이체 및 리톡시맙을 사용하는 시험관 내 ADCC 분석은 소포 림프종에 걸린 환자로부터의 초기 림프종 세포에서 수행한다. 기증자의 특이적 Fc γ R 다형태는 당업계 공지된 방법을 사용하여 결정하고 목록으로 작성한다. ADCC 분석은 상이한 Fc γ RIIIA 및 Fc γ RIIA 이디오타입을 갖는 환자로부터 작동자 세포에 의해 수행한다.

[0447] 본 발명의 한 양태에 따라서, 변이체 Fc 영역을 포함하는 본 발명의 분자(예를 들면, 항체)는 야생형 Fc 영역을 함유하는 분자에 비하여 항체 작동자 기능의 잠재력, 예를 들면, ADCC, CDC, 식균 작용, 옹소닌 작용 등을 증가시킴으로써 암 면역요법의 효능을 향상시킨다. 특정 구체예에서, 항체 의존성 세포매개 세포독성 및/또는 종양 세포의 식균 작용은 변이체 Fc 영역을 갖는 본 발명의 분자를 사용하여 향상시킨다. 본 발명의 분자는 적어도 하나의 항체 매개 작동자 기능의 향상에 의해 면역 요법 암 치료의 효능을 향상시킬 수도 있다. 한 특정한 구체예에서, 변이체 Fc 영역을 포함하는 본 발명의 분자는 보체 의존성 캐스케이드를 향상시킴으로써 면역 요법 치료의 효능을 향상시킨다. 본 발명의 다른 구체예에서, 변이체 Fc 영역을 포함하는 본 발명의 분자는 표적 종양 세포의 식균 작용 및/또는 옹소닌 작용을 향상시킴으로써 면역 요법 치료의 효능을 향상시킨다. 본 발명의 다른 구체예에서, 변이체 Fc 영역을 포함하는 본 발명의 분자는 표적 종양 세포의 파괴에 있어서 항체-의존성 세포매개 세포독성("ADCC")을 향상시킴으로써 치료의 효능을 향상시킨다.

[0448] 추가적으로 본 발명은 예를 들면, 치료 항체의 작동자 기능(예를 들면, ADCC)을 향상시킴으로서, 치료 항체의 치료 효능을 향상시키기 위하여 치료 항체(예를 들면, 종양 특이적 모노클로날 항체)를 조작하는 단계를 고려한다. 바람직하게는, 치료 항체는 세포독성 및/또는 옹소닌화 항체이다. 바람직한 결합 특성을 갖는 본 발명의 분자(예를 들면, 1개 이상의 아미노산 변형을 갖는 변이체 Fc 영역을 갖는 분자로서, 이 변형은 야생형 Fc 영역을 포함하는 대비되는 분자에 비하여 Fc γ RIIIA 및/또는 Fc γ RIIA에 대한 변이체 Fc 영역의 친화력을 향상시킴)가 본 발명의 방법에 의해 확인되면(섹션 5.2 및 표 8 참조), 치료 항체를 섹션 5.2.2에서 설명한 바와 같이, 재조합 DNA 기술 및 임의의 공지 돌연변이 유발 기술을 사용하여 조작하여 원하는 결합 특성을 갖는 확인된 돌연변이 부위를 함유하는 조작된 치료제를 생산한다. 암 치료에서 치료적 유용성을 증명한 표 9B에 열거된 임의의 치료 항체는 본 발명의 방법에 따라, 예를 들면, 야생형 Fc 영역을 갖는 치료 항체와 비교하여 Fc γ RIIIA 및/또는 Fc γ RIIA에 대한 향상된 친화력을 갖도록 Fc 영역을 변형시킴으로써, 조작될 수도 있으며, 암 항원에 의해 특성화된 암의 치료 및 또는 예방에 사용될 수도 있다. 다른 치료 항체는 스트렙토코커스 뉴모니아(*Streptococcus pneumoniae*)혈청형 6B에 대한 항원들과 같은 병원체에 대한 항원들을 포함하며, 예를 들면, 문헌(Sun et al., 1999, Infection and Immunity, 67(3):1172-9)을 참고하라.

[0449] 본 발명의 Fc 변이체는 본원에서 개시된 바와 같은 치료 항체들 또는 기타 Fc 융합 임상 후보자들, 즉 임상적 실험에서 본 발명자들에게 승인된 Fc 영역을 포함하는 분자 또는 본 발명의 Fc 변이체로부터 이룰 수 있는 임의의 다른 분자, 그것의 사람화, 친화력 성숙된, 변형되거나 조작된 버전으로 통합될 수도 있다.

[0450]

또한, 본 발명은 예를 들면, Fc 영역을 포함하는 폴리펩티드의 작동자 기능을 향상시킴으로써, 폴리펩티드의 치료 효능을 향상시키기 위해, 본 발명에 따라서, ENBREL을 포함하지만, 이에 한정되지는 않는, 치료적 유용성을 갖는 Fc 영역을 포함하는 임의의 다른 폴리펩티드를 조작하는 단계를 포함한다.

표 9B

본 발명의 방법에 따라 조작될 수 있는 치료 항체

제조사	제품	질병	표적
Abgenix	ABX-EGF	암	EGF 수용체
AltaRex	OvaRex	난소 암	종양 항원 CA125
	BravaRex	전이성 암	종양 항원 MUC1
Antisoma	Theragyn (pentumomabytrrium-90)	난소암	PEM 항원
	Therex	유방암	PEM 항원
Boehringer Ingelheim	Blvatuzumab	두경부암	CD44
Centocor/J&J	Panorex	직장암	17-1A
	ReoPro	PTCA	gp IIb/IIIa
	ReoPro	급성 MI	gp IIb/IIIa
	ReoPro	허혈성 뇌졸중	gp IIb/IIIa
Corixa	Bexocar	NHL	CD20

[0451]

제조사	제품	질병	표적
CRC Technology	MAb, 이디오타입 105AD7	직장암 백신	gp72
Crucell	Anti-EpCAM	암	Ep-CAM
Cytoclonal	MAb, 폐암	소세포 폐암	NA
Genentech	Herceptin	전이성 유방암	HER-2
	Herceptin	초기 단계 유방암	HER-2
	Rituxan	재발성/불응성 저급 또는 난포성 NHL	CD20
	Rituxan	중간물 & 고등급 NHL	CD20
	MAb-VEGF	NSCLC, 전이성	VEGF
	MAb-VEGF	직장암, 전이성	VEGF
	AMD Fab	연령-관련 시력감퇴	CD18
	E-26 (2 nd gen. IgE)	알레르기성 천식 & 비염	IgE
IDEC	Zevalin (Rituxan + yttrium-90)	저등급의 난포성 재발성 또는 불응성, CD20-양성, B-세포 NHL 및 Rituximab- 불응성 NHL	CD20
ImClone	Cetuximab + 이노테칸	불응성 직장 암종	EGF
	Cetuximab + 시스플라틴 & 방사선	새로이 진단되거나 재발성의 두경부암	EGF
	Cetuximab + 켄시타빈	새로이 진단된 전이성 췌장 암종	EGF
	Cetuximab + 시스플라틴 + 5FU 또는 Taxol	재발성 또는 전이성 두경부암	EGF

[0452]

제조사	제품	질병	표적
	Cetuximab + carboplatin + 파클리탁셀	새로이 진단된 비소세포 폐암	EGF 수용체
	Cetuximab + 시스플라틴	두경부암 (확장성 병기의 국소부위 질병 & 먼거리 전이)	EGF 수용체
	Cetuximab + 방사능	국소 진행성 두경부암	EGF 수용체
	BEC2 + Bacillus Calmette Guerin	소세포 폐암	모방체 강글리오시드 GD3
	BEC2 + Bacillus Calmette Guerin	흑색종	모방체 강글리오시드 GD3
	IMC-1C11	간 전이를 갖는 직장암	VEGF-수용체
ImmonoGen	nuC242-DM1	직장, 유방, 헤징암	nuC242
ImmunoMedics	LymphoCide	비호지킨 림프종	CD22
	LymphoCide Y-90	비호지킨 림프종	CD22
	CEA-Cide	전이성 고형암	CEA
	CEA-Cide Y-90	전이성 고형암	CEA
	CEA-Scan (Tc-99m-표지된 arcitumomab)	직장암 (방사성영상)	CEA
	CEA-Scan (Tc-99m-표지된 arcitumomab)	유방암 (방사성영상)	CEA
	CEA-Scan (Tc-99m-표지된 arcitumomab)	폐암 (방사성영상)	CEA
	CEA-Scan (Tc-99m-표지된 arcitumomab)	수술중 종양 (방사성영상)	CEA
	LeukoScan (Tc-99m-	연조직 감염	CEA

[0453]

제조사	제품	질병	표적
	표지된 솔레소마브)	(방사성영상)	
	LymphoScan (Tc-99m-표지됨)	림프종 (방사성영상)	CD22
	AFP-Scan (Tc-99m-표지됨)	간 7 gem 세포 암 (방사성영상)	AFP
Intracel	HumaRAD-HN (+yttrium-90)	두경부암	NA
	HumaSPECT	직장 영상	NA
Medarex	MDX-101 (CTLA-4)	전립선 및 기타 암	CTLA-4
	MDX-210 (her-2 과잉발현)	전립선암	HER-2
	MDX-210/MAK	암	HER-2
MedImmune	Vitaxin	암	$\alpha v \beta_3$
Merck KGaA	MAb 425	각종 암	EGF 수용체
	IS-IL-2	각종 암	Ep-CAM
Millennium	Campath (alemtuzumab)	만성 림프구 백혈병	CD52
NeoRx	CD20-streptavidin (+ biotin-yttrium 90)	비호지킨 림프종	CD20
	Avidicin (albumin + NRLU13)	전이성암	NA
Peregrine	Oncolym (+ iodine-131)	비호지킨 림프종	HLA-DR 10 베타
	Cotara (+ iodine-131)	절제불가능한 악성 신경아교종	DNA-연관 단백질
Pharmacia Corporation	C215 (+ staphylococcal enterotoxin)	폐장암	NA
	MAb, 폐/신장암	폐 & 신장암	NA
	nacolomab tafenatox (C242 + staphylococcal enterotoxin)	결장 & 폐장암	NA
Protein Design Labs	Nuvion	T 세포 암	CD3
	SMART M195	AML	CD33
	SMART 1D10	NHL	HLA-DR 항원

[0454]

제조사	제품	질병	표적
Titan	CEAVac	직장암, 진행성	CEA
	TriGem	전이성 흑색종 & 소세포 폐암	GD2-₁ 강글리오시드
	TriAb	전이성 유방암	MUC-1
Trilex	CEAVac	직장암, 진행성	CEA
	TriGem	전이성 흑색종 & 소세포 폐암	GD2-₁ 강글리오시드
	TriAb	전이성 유방암	MUC-1
Viventia Biotech	NovoMAb-G2 방사성표지됨	비호지킨 림프종	NA
	Monopharm C	결장 암종	SK-1 항원
	GlioMAb-H (+젤로닌 독소)	신경아교종, 흑색종 & 신경모세포종	NA
Xoma	Rituxan	재발성/불응성 저등급 또는 난포성 NHL	CD20
	Rituxan	중간물 & 고등급 NHL	CD20
	ING-1	샘암종	Ep-CAM

[0455]

[0456] 따라서, 본 발명은 암 항원에 결합하고 세포독성이며 모 치료 항체보다 더 높은 친화력으로 Fc γ RIIIA 및/또는 Fc γ RIIA에 결합하도록, 본 발명에 따라서, Fc 영역 내 1 개 이상의 부위에서 변형되며/변형되거나, 보다 효과적으로 작동자 기능(예를 들면, ADCC, 식균 작용)을 매개하는 치료 항체를 사용하는, 암 항원을 특징으로 하는 암을 예방하거나 치료하는 방법을 제공한다. 다른 구체예에서, 본 발명은 암 항원에 결합하고 세포 독성이며, 모 치료 항체보다 더 높은 친화력으로 Fc γ RIIIA 및/또는 Fc γ RIIA에 결합하고 더 낮은 친화력으로 Fc γ RIIB에 결합하도록 본 발명에 따라 조작되고/조작되거나 보다 효과적으로 작동자 기능(예를 들면, ADCC, 식균 작용)을 매개하는 치료 항체를 사용하는, 암 항원을 특징으로 하는 암을 예방하거나 치료하는 방법을 제공한다. 본 발명에 따라 조작된 치료 항체는 그들이 향상된 세포 독성 활성(예를 들면, 향상된 종양 세포 살해 및/또는 예를 들면, ADCC 활성 또는 CDC 활성의 향상)을 가지므로, 암의 예방 또는 치료에 유용하다.

[0457] 암 항원과 연관된 암은 암 항원에 결합하고 세포독성이며, 예를 들면, 향상된 작동자 기능을 갖도록 본 발명에 따라 조작된 치료 항체의 투여에 의해 치료 또는 예방할 수도 있다. 한 특정 구체예에서, 본 발명의 방법에 따른 조작된 치료 항체는 특정 암 항원에 특이적인 항체의 항체-매개 세포독성 효과를 향상시킨다. 예를 들면, 한정하는 것은 아니지만, 하기 암 항원과 연관된 암은 본 발명의 방법 및 조성물에 의해 치료되거나 예방될 수도 있다: KS 1/4 범-암종 항원 (Perez and Walker, 1990, J. Immunol. 142:32-37; Bumal, 1988, Hybridoma 7(4):407-415), 난소 암종 항원 (CA 125) (Yu et al., 1991, Cancer Res. 51(2):48-475), 전립선 산성 인산분해효소 (Tailor et al., 1990, Nucl. Acids Res. 18(1):4928), 전립선 특이 항원 (Henttu and Vihko, 1989, Biochem. Biophys. Res. Comm. 10(2):903-910; Israeli et al., 1993, Cancer Res. 53:227-230), 흑색종-관련 항원 p97 (Estin et al., 1989, J. Natl. Cancer Instit. 81(6):445-44), 흑색종 항원 gp75 (Vijayasardahl et al., 1990, J. Exp. Med. 171(4): 1375-1380), 고 분자량 흑색종 항원 (HMW-MAA) (Natali et al., 1987, Cancer 59:55-3; Mittelman et al., 1990, J. Clin. Invest. 86:2136-2144)), 전립선 특이적 막 항원, 암태아

성 항원 (CEA) (Foon et al., 1994, Proc. Am. Soc. Clin. Oncol. 13:294), 다형 상피 무친 항원, 사람 젖 지방 글로블린 항원, 직장 종양-관련 항원으로서, 예를 들면 CEA, TAG-72 (Yokata et al., 1992, Cancer Res. 52:3402-3408), C017-1A (Ragnhammar et al., 1993, Int. J. Cancer 53:751-758)와 같은 것들; GICA 19-9 (Herlyn et al., 1982, J. Clin. Immunol. 2:135), CTA-I 및 LEA, Burkitt 림프종 항원-38.13, CD19 (Ghetie et al., 1994, Blood 83:1329-1336), 사람 B-림프종 항원-CD20 (Reff et al., 1994, Blood 83:435-445), CD33 (Sgouros et al., 1993, J. Nucl. Med. 34:422-430), 흑색종 특이성 항원으로서, 강글리오시드 GD2 (Saleh et al., 1993, J. Immunol., 151, 3390-3398), 강글리오시드 GD3 (Shitara et al., 1993, Cancer Immunol Immunother. 36:373-380), 강글리오시드 GM2 (Livingston et al., 1994, 7. Clin. Oncol 12:1036-1044), 강글리오시드 GM3 (Hoon et al., 1993, Cancer Res. 53:5244-5250)와 같은 것, 세포 표면 항원의 종양 특이성 이식 유형(TSTA)으로서, T-항원 DNA 종양 바이러스를 포함하는 바이러스 유도성 종양 항원 및 RNA 종양 바이러스의 엔벨로프 항원과 같은 것, 결장의 CEA와 같은 종양태아성 항원-알파-태아단백질, 방광 종양태아성 항원 (Hellstrom et al., 1985, Cancer. Res. 45:2210-2188), 사람 폐 암종 항원 L6, L20과 같은 분화 항원 (Hellstrom et al., 1986, Cancer Res. 46: 3917-3923), 섬유육종의 항원, 사람 백혈병 T-세포 항원-Gp37 (Bhattacharya-Chatterjee et al., 1988, J. of Immun. 141:1398-1403), 신당단백질, 스핑고지질, EGFR(표피 성장 인자 수용체)과 같은 유방암 항원, HER2 항원 (p185^{HER2}), 다형 표피 무친(PEM)(Hilken et al., 1992, Trends in Bio. Chem. sci. 17:359), 악성 사람 림프종 항원-AP0-1 (Bernhard et al., 1989, Science 245:301-304), 분화 항원(Feizi, 1985, Nature 314:53-57)으로서, 예를 들면 태아 적혈구에서 발견된 I 항원 및 일차 내배엽, 위 샘암종에서 발견된 I(Ma), 유방 상피에서 발견된 M18, M39, 골수세포에서 발견된 SSEA-1, 직장암에서 발견된 VEP8, VEP9, Myl. VIM-D5, D156-22, 결장 샘암종에서 발견된 TRA-1-85(혈 군 H), C14, 폐 샘암종에서 발견된 F3, 위암에서 발견된 AH6, 배아 암종 세포에서 발견된 Y 합텐, Le^y, A431 세포에서 발견된 TL5(혈 군 A), EGF 수용체, 췌장암에서 발견된 E₁ 시리즈(혈 군 B), 배아 암종 세포에서 발견된 FC10.2, 위 샘암종 항원, 샘암종에서 발견된 CO-514(혈 군 Le^a), CO-43(혈 군 Le^b), G49, EGF 수용체, 결장 샘암종에서 발견된 (혈 군 Ale^b/Le^y), 결장 암에서 발견된 19.9, 위암 무친, 골수종에서 발견된 TsA7, 흑색종에서 발견된 R₂₄, 배아 암종 세포에서 발견된 4.2, GD₃, D1.1, OFA-1, G_{M2}, OFA-2, G_{D2}, 및 M 1:22:25:8, 및 4 내지 8-세포 단계 배아에서 발견된 SSEA-3 및 SSEA-4. 한 구체예에서, 항원은 피부 T 세포 림프종으로부터의 T 세포 수용체 유도성 펩티드이다(Edelson, 1998, The Cancer Journal 4:62 참조).

[0458]

본 발명의 방법 및 조성물에 의해 치료되거나 예방될 수 있는 암 및 관련 질환은 다음을 포함하지만, 이에 한정되지는 않는다: 급성 백혈병, 급성 림프구성 백혈병, 급성 골수구성 백혈병으로서, 골수모구 백혈병, 전골수구 백혈병, 골수 단핵구 백혈병, 단핵구 백혈병, 적백혈구 백혈병 및 골수 형성 이상 증후군과 같은 것들, 만성 백혈병으로서, 만성 골수구성 (과립구성) 백혈병, 만성 림프구성 백혈병, 털세포 백혈병과 같으나, 이에 한정되지는 않는 것들을 포함하지만, 이에 한정되지는 않는 백혈병; 진성 적혈구 증가증; 호지킨병, 비호지킨 병과 같으나, 이에 한정되지는 않는 림프종; 노출성 다발성 골수종, 비분비성 골수종, 골경화성 골수종, 혈장 세포 백혈병, 고립 형질세포종 및 골수외성 형질세포종과 같으나, 이에 한정되지는 않는 다발성 골수종; 왈덴스트롬 거대 글로브린혈증; 비결정 유의성의 모노클로날 감마글로블린병증; 양성 모노클로날 감마글로블린병증; 중쇄 질환; 육종, 골육종, 연골육종, 유방 육종, 악성 거대 세포 종양, 골의 섬유육종, 척삭종, 골막 육종, 연조직 육종, 맥관육종(혈관육종), 섬유육종, 카포시 육종, 평활근육종, 지방육종, 림프관육종, 신경집종, 횡문근육종, 윤활막 육종과 같으나, 이에 한정되지는 않는 골 및 결합 조직 육종; 신경아교종, 별아교세포종, 뇌 줄기 신경아교종, 뇌실막 세포종, 희소돌기 아교세포종, 비신경교종, 속귀 신경집종, 두개 인두종, 속질모 세포종, 수막종, 송과 샘종, 송과 체모 세포종, 원발 뇌 림프종을 포함하지만, 이에 한정되지는 않는 뇌 종양; 샘암종, 소엽(소세포) 암종, 관내 암종, 속질 유방암, 점액성 유방암, 관상 유방암, 유두 유방암, 파제트병, 및 염증성 유방암을 포함하지만, 이에 한정되지는 않는 유방암; 크롬친화세포종 및 부신피질 암종을 포함하지만, 이에 한정되지는 않는 부신암; 유두 또는 난포성 갑상선암, 속질 갑상선암 및 미분화 갑상선암과 같으나, 이에 한정되지는 않는 갑상선암; 인슐린종, 가스스트린종, 글루카곤종, VIP종, 성장억제호르몬-분비성 종양, 및 유암종 또는 섬세포 종양을 포함하지만, 이에 한정되지는 않는 췌장 암; 쿠싱병, 프로락틴 분비 종양, 말단비대증, 및 요붕증을 포함하지만, 이에 한정되지는 않는 뇌하수체 암; 홍채 흑색종, 맥락막 흑색종, 및 섬모체 흑색종과 같은 안 흑색종, 및 망막모세포종을 포함하지만, 이에 한정되지는 않는 안암; 편평세포 암종, 샘암종, 및 흑색종을 포함하지만, 이에 한정되지는 않는 질암; 편평세포 암종, 흑색종, 샘암종, 기저세포 암종, 육종, 및 파제트병을 포함하지만, 이에 한정되지는 않는 외음부암; 편평세포 암종, 샘암종을 포함하지만, 이에 한정되지는 않는 자궁 경

부 암; 자궁내막 암종 및 자궁 육종을 포함하지만, 이에 한정되지는 않는 자궁암; 난소 상피 암종, 경계 종양, 배아세포 종양, 및 간질성 종양을 포함하지만, 이에 한정되지는 않는 난소암; 편평 암종, 샘암종, 샘낭암종, 점막표피모양 암종, 선편평 암종, 육종, 흑색종, 형질세포종, 사마귀모양 암종, 및 귀리 세포(소세포) 암종을 포함하지만, 이에 한정되지는 않는 식도암; 샘암종, 종괴형(폴립모양), 궤양성, 표재 확장성, 광범위 확장성, 악성 림프종, 지방육종, 섬유육종, 및 암육종을 포함하지만, 이에 한정되지는 않는 위암; 간세포 암종 및 간모세포종을 포함하지만, 이에 한정되지는 않는 간암, 샘암종을 포함하지만 이에 한정되지는 않는 담낭암; 유두, 결절, 및 확산을 포함하지만, 이에 한정되지는 않는 담관암종; 비소세포 폐암, 편평세포 암종(표피유사 암종), 샘암종, 대세포 암종 및 소세포 폐암을 포함하지만, 이에 한정되지는 않는 폐암; 종자 종양, 생식세포종, 미분화, 고전(전형적), 정보세포, 비생식세포종, 배아 암종, 기형종 암종, 융모막암종(난황난 종양)을 포함하지만, 이에 한정되지는 않는 고환암; 샘암종, 평활근육종, 및 횡문근육종을 포함하지만, 이에 한정되지는 않는 전립선암; 편평 세포 암종을 포함하지만, 이에 한정되지는 않는 구강 암; 기저 암; 샘암종, 점막표피성 암종, 및 샘낭 암종을 포함하지만, 이에 한정되지는 않는 침샘 암; 편평 세포 암, 및 사마귀 모양을 포함하지만, 이에 한정되지는 않는 인두암; 기저 세포 암종, 편평 세포 암종 및 흑색종, 표재 확산 흑색종, 결절성 흑색종, 흑점 악성 흑색종, 말단성 흑점 흑색종을 포함하지만, 이에 한정되지는 않는 피부암; 신장 세포 암, 샘암종, 신장세포암종, 섬유육종, 이행세포 암(신우 및/또는 수뇨관)을 포함하지만, 이에 한정되지는 않는 신장암; 윌름즈 종양; 이행세포 암종, 편평 세포 암, 샘암종, 암육종을 포함하지만, 이에 한정되지는 않는 방광암. 또한, 암은 점액육종, 골원성 육종, 내피육종, 림프관내피종, 종괴종, 유헤락종, 혈관 모세포종, 상피 암종, 낭샘암종, 기관지 유래 암종, 땀샘 암종, 피지샘 암종, 유두 암종 및 유두 샘암종을 포함한다(이들 질환의 개관을 위해, 문헌(Fishman et al., 1985, Medicine, 2d Ed., J.B. Lippincott Co., Philadelphia and Murphy et al., 1997, Informed Decisions: The Complete Book of Cancer Diagnosis, Treatment, and Recovery, Viking Penguin, Penguin Books U.S.A., Inc., United States of America)을 참조하라).

[0459] 따라서, 본 발명의 방법 및 조성물은 또한 다음을 포함하는(그러나, 이에 한정되지는 않음), 각종 암 또는 기타 이상 증식성 질병의 치료 또는 예방에 유용하다: 방광암, 유방암, 결장암, 신장암, 간암, 폐암, 난소암, 췌장암, 위암, 전립선암, 자궁경부암, 전립선암 및 피부암을 포함하는 암종; 백혈병, 급성 림프구성 백혈병, 급성 림프 모세포 백혈병, B-세포 림프종, T-세포 림프종, Burketts 림프종을 포함하는 골수 계통의 조혈 종양; 급성 및 만성 골수성 백혈병 및 전골수성 백혈병을 포함하는, 골수 계통의 조혈 종양; 섬유육종 및 횡문근육종을 포함하는, 중간엽 기원의 종양; 골수종, 생식세포종, 기형 암종, 신경모세포종 및 신경아교종을 포함하는, 기타 암종; 별아교세포종, 신경모세포종, 신경아교종, 및 신경집종을 포함하는, 중추 및 말초 신경계의 종양; 섬유육종, 횡문근육종, 및 골육종을 포함하는, 중간엽 기원의 종양; 및 골수종, 제노더마 페그멘토섬, 케라토악탄도마, 생식세포종, 갑상선 난포 암 및 기형 암종을 포함하는 기타 암종.

[0460] 또한, 아포프토시스의 이상으로 인한 암이 본 발명의 방법 및 조성물에 의해 치료될 수 있는 것으로 고려된다. 이러한 암들은 난포성 림프종, p53 돌연변이를 갖는 암종, 유방, 전립선 및 난소의 호르몬 의존성 종양, 및 가족성 샘종성 폴립증, 및 골수형성이상 증후군과 같은 전암성 장애를 포함하지만, 이에 한정되지는 않을 수도 있다. 특정 구체예에서, 악성 또는 이상증식성 변화(화생 및 형성이상과 같은 것), 또는 과다 증식성 질환은 난소, 방광, 유방, 결장, 폐, 피부, 췌장, 또는 자궁에 있어서 본 발명의 방법 및 조성물에 의해 치료 또는 예방된다. 다른 특정 구체예에서, 육종, 골수종, 또는 백혈병은 본 발명의 방법 및 조성물에 의해 치료 또는 예방된다.

[0461] 특정 구체예에서, 본 발명의 분자(예를 들면, 변이체 Fc 영역을 포함하는 항체, 또는 본 발명의 방법에 따라 조작된 치료적 모노클로날 항체)는 상기 본 발명의 분자가 부재하는 경우, 1차 종양 또는 전이의 성장에 비하여 99% 이상, 95% 이상, 90% 이상, 85% 이상, 80% 이상, 75% 이상, 70% 이상, 60% 이상, 50% 이상, 45% 이상, 40% 이상, 45% 이상, 35% 이상, 30% 이상, 25% 이상, 20% 이상, 또는 10% 이상으로 1차 종양의 성장 또는 암 세포의 전이를 억제시키거나 감소시킨다.

[0462] 5.4.1.1 조합 요법

[0463] 또한, 본 발명은 현재의 표준 및 실험적 화학요법, 호르몬 요법, 생물학적 요법, 면역요법, 방사선 요법, 또는 외과 수술을 포함하지만, 이에 한정되지는 않는, 암의 치료 또는 예방을 위한 당업계 숙련자에게 공지된 다른 요법들과 조합하여 본 발명의 분자를 투여하는 단계를 포함한다. 일부 구체예에서, 본 발명의 분자는 1 가지 이상의 항암제, 치료 항체(예를 들면, 표 9B에 열거된 항체), 또는 암의 치료 및/또는 예방을 위한 당업계 숙련자에게 공지된 다른 제제들의 치료적 또는 예방적으로 유효한 양과 함께 투여될 수도 있다.

- [0464] 특정 구체예에서, 본 발명의 1 가지 이상의 분자는 암의 치료에 유용한 1 가지 이상의 다른 치료제와 동시에, 포유동물, 바람직하게는 사람에게 투여된다. 용어 "동시에"는 정확히 동일한 시간에 예방 또는 치료제의 투여에 한정되지는 않으며, 그보다는 본 발명의 분자 및 다른 제제가 연속으로, 그리고 시간 간격 내에 포유동물에 투여되어 본 발명의 분자가 그들이 달리 투여되는 경우보다 증가된 이익을 제공하도록 다른 제제와 함께 작용할 수 있다. 예를 들면, 각각의 예방 또는 치료제(예를 들면, 화학요법, 방사선 요법, 호르몬 요법 또는 생물학적 요법)는 상이한 시간의 지점에서 임의의 순서로 동일한 시간에 또는 순차적으로 투여될 수도 있으며; 그러나, 동일한 시간에 투여되지 않는 경우, 그들은 원하는 치료 또는 예방적 효과를 제공하기 위해 시간에 있어서 충분히 근접하게 투여되어야 한다. 각각의 치료제는 임의의 적절한 형태 및 임의의 적당한 루트로, 분리되어 투여될 수 있다. 각종 구체예에서, 예방 또는 치료제들은 1 시간 미만 간격, 약 1 시간 간격, 약 1 시간 내지 약 2 시간 간격, 약 2 시간 내지 약 3 시간 간격, 약 3 시간 내지 약 4 시간 간격, 약 4 시간 내지 약 5 시간 간격, 약 5 시간 내지 약 6 시간 간격, 약 6 시간 내지 약 7 시간 간격, 약 7 시간 내지 약 8 시간 간격, 약 8 시간 내지 약 9 시간 간격, 약 9 시간 내지 약 10 시간 간격, 약 10 시간 내지 약 11 시간 간격, 약 11 시간 내지 약 12 시간 간격, 24 시간 이하 간격 또는 48 시간 이하 간격으로 투여된다. 바람직한 구체예에서, 2가지 이상의 성분들이 동일한 환자 방문 안에 투여된다.
- [0465] 다른 구체예에서, 예방 또는 치료제는 약 2 내지 4 일 간격, 약 4 내지 6 일 간격, 약 1 주 간격, 약 1 내지 2 주 간격, 또는 2주 이상 간격으로 투여된다. 바람직한 구체예에서, 예방 또는 치료제는 2 개의 제제가 여전히 활성인 시간 프레임 내에 투여된다. 당업계 숙련자는 투여되는 제제의 반감기를 결정함으로써 이러한 시간 프레임을 결정할 수 있을 것이다.
- [0466] 특정 구체예에서, 본 발명의 예방 또는 치료제는 피험체에 주기적으로 투여된다. 주기적 요법은 소정의 시간 동안 제 1 제제를 투여한 다음, 소정의 시간 동안 제 2 제제 및/또는 제 3 제제를 투여하고 이 연속적 투여를 반복하는 것을 포함한다. 주기적 요법은 1 가지 이상의 요법에 대한 내성의 발달을 감소시키고, 요법 중 하나의 부작용을 피하거나 감소시키며, 및/또는 치료의 효능을 증가시킬 수 있다.
- [0467] 특정 구체예에서, 예방 또는 치료제는 약 3 주 미만, 2주에 약 1번, 10일에 약 1번 또는 1주에 약 1번의 주기로 투여된다. 하나의 주기는 1 주기당 약 90 분, 1 주당 약 1 시간, 1 주기당 약 45 분 이상 주입에 의한 치료 또는 예방제의 투여를 포함할 수 있다. 각각의 주기는 1주 이상의 휴식, 2주 이상의 휴식, 3주 이상의 휴식을 포함할 수 있다. 투여되는 주기의 수는 약 1 내지 약 12 주기, 보다 일반적으로는 약 2 내지 약 10 주기, 더욱 일반적으로는 약 2 내지 약 8 주기이다.
- [0468] 또 다른 구체예에서, 본 발명의 치료 및 예방제는 확장된 휴지기 없이 연속 주입 또는 빈번한 투여에 의해, 기계적으로 규칙적인 투여량 섭생으로 투여된다. 이러한 기계적으로 규칙적인 투여는 휴지기 없이 일정한 간격으로 투여량을 포함할 수 있다. 일반적으로, 치료제, 특히 세포독성 제제가 낮은 투여량으로 사용된다. 이러한 투여량 섭생은 확장된 시간의 기간 동안 상대적으로 낮은 투여량의 장기간의 일일 투여를 포함한다. 바람직한 구체예에서, 낮은 투여량의 사용은 독성 부작용을 최소화하여 휴지기를 제거할 수 있다. 특정 구체예에서, 치료 및 예방제는 약 24 시간 내지 약 2일, 약 1 주, 약 2 주, 약 3 주, 약 1 개월, 약 2 개월, 약 3 개월, 약 4 개월, 약 5 개월, 약 6 개월의 범위에 이르는 장기간의 저투여량 또는 연속 주입에 의해 송달된다. 이러한 투여량 섭생의 계획은 숙련된 종양학자에 의해 최적화될 수 있다.
- [0469] 다른 구체예에서, 치료의 경로는 동시에 포유동물에 투여되며, 즉, 개별 투여량의 치료제는 시간 간격 내에 더 분리되어 투여되어 본 발명의 분자는 다른 제제 또는 제제들과 함께 작용할 수 있다. 예를 들면, 하나의 성분은 2주에 1번 또는 3주에 1번 투여될 수 있는 다른 성분들과 함께 1주에 1번 투여될 수도 있다. 달리 말하면, 치료용 투여량 섭생은 치료제가 동시에 또는 동일한 환자 방문 내에 투여되지 않는 경에도, 동시에 수행된다.
- [0470] 다른 예방 및/또는 치료제와 함께 사용되는 경우, 본 발명의 분자 및 예방 및/또는 치료적 제제는 추가적으로 또는, 더 바람직하게는 상승적으로 작용할 수 있다. 한 구체예에서, 본 발명의 분자는 동일한 약학적 조성물로 1 가지 이상의 치료제와 동시에 투여된다. 다른 구체예에서, 본 발명의 분자는 분리된 약학적 조성물로 1 가지 이상의 치료제와 동시에 투여된다. 또 다른 구체예에서, 본 발명의 분자는 다른 예방 또는 치료제의 투여 전에 또는 후속하여 투여된다. 본 발명은 동일하거나 상이한 루트의 투여, 예를 들어 경구 및 비경구에 의해 다른 예방 또는 치료제와 함께 본 발명의 분자의 투여를 고려한다. 특정 구체예에서, 본 발명의 분자가 독성을 포함하지만, 이에 한정되지는 않는 부작용을 잠재적으로 일으키는 다른 예방 또는 치료제와 동시에 투여되는 경우, 예방 또는 치료제는 부작용이 야기되는 역치 미만에 해당하는 투여량으로 유리하게 투여될 수 있다.
- [0471] 본원에서 제공된 투여의 양 및 빈도는 치료적으로 유효하고 예방상 유효한 조건을 포함한다. 투여량 및 빈도는

일반적으로 투여되는 특이적인 치료 또는 예방제, 암의 심각도 및 유형, 투여의 루트, 및 환자의 연령, 체중, 반응, 및 과거 병력에 따라서, 각각의 환자에 특이적인 인자들에 따라 다양해질 것이다. 적당한 섭생은 이러한 인자들 및 예를 들면, 문헌에서 보고되고 Physician's Desk Reference (56판, 2002)에서 권장된 투여량을 고려하여 당업계 숙련자에 의해 선택될 수 있다.

[0472] 5.4.1.2 다른 치료/예방제

[0473] 특정 구체예에서, 본 발명의 방법은 암의 치료 및/또는 예방을 위해 사용된 1 가지 이상의 치료제와 함께 본 발명의 1 가지 이상의 분자의 투여를 포함한다. 한 구체예에서, 혈관형성 억제제가 본 발명의 분자와 함께 투여될 수도 있다. 본 발명의 방법 및 조성물에서 사용될 수 있는 혈관형성 억제제는 다음을 포함하지만, 이에 한정되지는 않는다: 안지오테나틴(플라스미노겐 단편): 항혈관형성 안티트롬빈 III; 안지오테나틴; ABT-627; Bay 12-9566; 베네핀; 베바시주맙; BMS-275291; 연골-유래 억제제(CDI); CAI; CD59 보체 단편; CEP-7055; Col 3; 콤브레타스타틴 A-4; 엔도스타틴(콜라겐 XVIII 단편): 피브로넥틴 단편; Gro-베타; 할로푸지논; 헤파리나세스; 헤파린 육당류 단편; HMV833; 사람 융모성 고나도트로핀(hCG); IM-862; 인터페론 알파/베타/감마; 인터페론 유도성 단백질(BP-10); 인터루킨-12; 크링글 5 (플라스미노겐 단편); 마리아스타트; 메탈로프로테아제 억제제(TIMP); 2-메톡시에스트라디올; MMI 270 (CGS 27023A); MoAb IMC-1C11; 네오바스타트; NM-3; 판렘; PI-88; 태반 리보뉴클레아제 억제제; 플라스미노겐 활성화 억제제; 혈소판 인자-4 (PF4); 프리노마스타트; 프로락틴 16kD 단편; 프롤리페린-관련 단백질 (PRP); PTK 787/ZK 222594; 레티노이드; 솔리마스타트; 스킨라민; SS 3304; SU 5416; SU6668; SU11248; 테트라히드로코티솔-S; 테트라티오피리브테이트; 탈리도마이드; 트롬보스폰딘-1(TSP-I); TNP-470; 형질전환 성장 인자-베타(TGF-β); 베칼로스타틴; 바소스타틴(칼레티쿨린 단편); ZD6126; ZD 6474; 파네실 트랜스퍼라제 억제제 (FTI); 및 비포스포네이트.

[0474] 본 발명의 약학적 조성물 및 투여량 형태 및 키트를 포함하여, 본 발명의 각종 구체예에서 본 발명의 분자와 함께 사용될 수 있는 항암제는 다음을 포함하지만, 이에 한정되지는 않는다: 아시비신; 아클라루비신; 아코다졸 히드로클로라이드; 아크로닌; 아도젤레신; 알데스류킨; 알트레타민; 앰보마이신; 아메탄트론 아세테이트; 아미노글루테티미드; 암사크린; 아나스트로졸; 안트라마이신; 아스파라기나제; 아스페를린; 아자시티딘; 아제테파; 아조토마이신; 바티마스테트; 벤조테파; 비칼루타미드; 비산트렌 히드로클로라이드; 비스나피드 디메실레이트; 비젤레신; 블레오마이신 설페이트; 브레퀴나르 나트륨; 브로피리민; 부셀판; 캅티노마이신; 칼루스테론; 카라세미드; 카베티머; 카보플라틴; 카무스틴; 카루비신 히드로클로라이드; 카젤레신; 세도핀골; 클로르암부실; 시롤레마이신; 시스플라틴; 클라드리빈; 크리스나톨 메실레이트; 시클로포스파미드; 시타라빈; 다카바진; 닥티노마이신; 다우노루비신 히드로클로라이드; 데시타빈; 텍소마플라틴; 데자구아닌; 데자구아닌 메실레이트; 디아지쿠온; 도데탁셀; 독소루비신; 독소루비신 히드로클로라이드; 드롤록시펜; 드롤록시펜 시트레이트; 드로모스타놀론 프로피오네이트; 두아조마이신; 에다트렉사트; 에플로르니틴 히드로클로라이드; 엘사미드루신; 엔로플라틴; 엔프로메이트; 에피프로피딘; 에피루비신 히드로클로라이드; 에루부롤; 에소루비신 히드로클로라이드; 에스트라무스틴; 에스트라무스틴 포스페이트 나트륨; 에타나리제; 에토포시드; 에토포시드 포스페이트; 에토프린; 파드로졸 히드로클로라이드; 파자라빈; 펜레티니드; 플록수리딘; 플루다라빈 포스페이트; 플루오로우라실; 플루로시타빈; 포스퀴돈; 포스트리에신 나트륨; 켈시타빈; 켈시타빈 히드로클로라이드; 수산화 요소; 이다루비신 히드로클로라이드; 이포스파미드; 일모포신; 인터루킨 II (재조합 인터루킨 II, 또는 rIL2 포함), 인터페론 알파-2a; 인터페론 알파-2b; 인터페론 알파-n1; 인터페론 알파-n3; 인터페론 베타-I a; 인터페론 감마-I b; 이프로플라틴; 이리노테칸 히드로클로라이드; 라레오티드 아세테이트; 레트로졸; 류프롤리드 아세테이트; 리아로졸 히드로클로라이드; 로메트렉솔 나트륨; 로무스틴; 로속산트론 히드로클로라이드; 마소프로콜; 메이탄신; 메클로레타민 히드로클로라이드; 메게스트롤 아세테이트; 멜렌세스트롤 아세테이트; 멜팔란; 메노가렐; 머캅토프린; 메토포렉사트; 메토포렉사트 나트륨; 메토프린; 메튜레데파; 미티도미드; 미토카신; 미토크로민; 미토길린; 미토말신; 미토마이신; 미토스파; 미토탄; 미톡산트론 히드로클로라이드; 마이코페놀산; 노코다졸; 노갈라마이신; 오르마플라틴; 옥시수란; 파클리탁셀; 페가스파르가제; 펠리오마이신; 펜타무스틴; 페플로마이신 설페이트; 피포스파미드; 피포브로만; 피포셀판; 피록산트론 히드로클로라이드; 폴리카마이신; 플로메스탄; 포르피머 나트륨; 포르피로마이신; 프레드니무스틴; 프로카바진 히드로클로라이드; 푸로마이신; 푸로마이신 히드로클로라이드; 피라조푸린; 리보프린; 로글레티미드; 사핀골; 사핀골 히드로클로라이드; 세무스틴; 심트라젠; 스파르포사트 나트륨; 스파르소마이신; 스피로게르마늄 히드로클로라이드; 스피로무스틴; 스피로플라틴; 스트렙토니그린; 스트렙토조신; 설로페너; 탈리소마이신; 테코갈란 나트륨; 테가푸르; 텔록산트론 히드로클로라이드; 테모포르핀; 테니포시드; 테록시론; 테스토락톤; 티아미프린; 티오구아닌; 티오테파; 티아조푸린; 티라파자민; 토레미펜 시트레이트; 트레스트론 시트레이트; 트리시리빈 포스페이트; 트리메트렉사트; 트리메트렉사트 글루쿠로네이트; 트리프로렐린; 투블로졸 히드로클로라이드; 우라실 머스타드; 우레아에파; 베르테포르핀; 빈블라스틴

설페이트; 빈크리스틴 설페이트; 빈데신; 빈데신 설페이트; 비네피딘 설페이트; 빈글리시네이트 설페이트; 빈루로신 설페이트; 비노렐빈 타르트레이트; 빈로시딘 설페이트; 빈줄리딘 설페이트; 보로졸; 제니플라틴; 지노스타틴; 조루비신 히드로클로라이드. 다른 항암 약물은 다음을 포함하지만, 이에 한정되지는 않는다: 20-epi-1,25 디히드록시비타민 D3; 5-에티닐우라실; 아비라테론; 아클라루비신; 아실폴벤; 아데시페놀; 아도젤레신; 알테스루킨; ALL-TK 길항제; 알트레타민; 암바무스틴; 아미독스; 아미포스틴; 아미노레불린산; 암루비신; 암사크린; 아나그렐리드; 아나스트로졸; 안드로그래폴리드; 혈관형성 억제제; 길항제 D; 길항제 G; 안타렐릭스; 항-배화 형태발생 단백질-1; 항안드로겐, 전립선 암중; 항에스트로겐; 안티네오폴라스톤; 안티센스 올리고뉴클레오타이드; 아피디콜린 글리시네이트; 아포프토시스 유전자 조절제; 아포프토시스 조절제; 아푸린산; ara-CDP-DL-PTBA; 아르기닌 탈아민화효소; 아설아크린; 아타메스탄; 아트리무스틴; 악시나스타틴 1; 악시나스타틴 2; 악시나스타틴 3; 아자세트론; 아자톡신; 아자티로신; 박카틴 III 유도체; 발라놀; 바티마스타트; BCR/ABL 길항제; 벤조클로린; 벤조일스타우로스포르린; 베타 락탐 유도체; 베타-알레틴; 베타클라마이신 B; 베타롤린산; bFGF 억제제; 비칼루타미드; 비산트렌; 비사지리디닐스페르민; 비스나피드; 비스트라텐 A; 비젤레신; 브레펠레이트; 브로피리민; 부도티탄; 부티오닌 설폭시민; 칼시포트리올; 칼포스틴 C; 캠프토테신 유도체; 카나리폭스 IL-2; 카페시타빈; 카르복사미드-아미노-트리아졸; 카르복시아미도트리아졸; CaRest M3; CARN 700; 연골 유래 억제제; 카젤레신; 카제인 키나제 억제제(ICOS); 카스타노스퍼민; 세크로핀 B; 20 세트로레릭스; 클로르론; 클로로퀴녹살린 설폰아미드; 시카프로스트; 시스-포르피린; 클라드리빈; 클로미펜 유사체; 클로트리마졸; 콜리스마이신 A; 콜리스마이신 B; 콤브레타스타틴 A4; 콤브레타스타틴 유사체; 코나제닌; 크램베시딘 816; 크리스나톨; 크립토피신 8; 크립토피신 A 유도체; 쿠라신 A; 시클로펜탄트라퀴논; 시클로플라탐; 시페마이신; 시타라빈 옥스포레이트; 세포융해인자; 시토스타틴; 다클리시마브; 데시타빈; 데히드로디텐닌 B; 데스로렐린; 텍사메타손; 텍시포스파미드; 텍스라족산; 텍스베라파밀; 디아지쿠온; 디텐닌B; 디독스; 디에틸노르스퍼민; 디히드로-5-아자시티딘; 디히드로탁솔, 9-; 디옥사마이신; 디페닐 스피로무스틴; 도세탁셀; 도코사놀; 돌라세트론; 독시플루리딘; 드롤록시펜; 드로나비롤; 듀오카르마이신 SA; 엠셀렌; 에코무스틴; 에텔포신; 에드레콜로마브; 에플로르니틴; 엘레멘; 에미테푸르; 에피루비신; 에프리스테리드; 에스트라무스틴 유사체; 에스트로젠 아고니스트; 에스트로젠 길항제; 에타니다졸; 에토포시드 포스페이트; 엑세메스탄; 파드로졸; 파자라빈; 펜레티나이드; 필그라스티م; 피나스테리드; 플라보피리돌; 플레제라스틴; 플루아스테론; 플루다라빈; 플루오로다우노루니신 히드로클로라이드; 포르페니맥스; 포르메스탄; 포스트리에신; 포테무스틴; 가돌리늄 텍사피린; 갈륨 니트레이트; 갈로시타빈; 가니레릭스; 젤라티나제 억제제; 젠시타빈; 글루타티온 억제제; 헬설팜; 헤레글린; 핵사메틸렌 비사세타미드; 하이퍼리신; 이반드론산; 이다루비신; 이독시펜; 이드라만톤; 일모포신; 일로마스타트; 아미다조아크리돈; 이미퀴모드; 면역자극 펩티드; 인슐린-유사 성장 인자-1 수용체 억제제; 인터페론 아고니스트; 인터페론; 인터루킨; 이오벤구안; 이오도독소루비신; 이포메아놀, 4-; 이로플라트; 이르소글라딘; 이소벤가졸; 이소호모할리콘드린 B; 이타세트론; 자스플라키놀리드; 카할라리드 F; 라멜라린-N 트리아세테이트; 란레오티드; 레나마이신; 레노그라스티م; 렌티난 설페이트; 램툴스타틴; 레트로졸; 백혈병 억제성 인자; 백혈구 알파 인터페론; 류프롤리드+에스트로젠+프로게스테론; 류프로렐린; 레바미솔; 리아로졸; 선형 폴리아민 유사체; 지방친화력 이당류 펩티드; 지방친화력 백금 화합물; 리소클린아미드 7; 로바플라틴; 롬브리신; 로메트렉솔; 로니다민; 로속산트론; 로바스타틴; 록소리빈; 루토테칸; 루테늄 텍사피린; 리소필린; 용해성 펩티드; 마이탄신; 만노스타틴 A; 마리마스타트; 마소프로콜; 마스핀; 마트릴리신 억제제; 매트릭스 메탈로프로테나제 억제제; 메노갈릴; 메마론; 메테렐린; 메티오니나제; 메토클로프라미드; MIF 억제제; 미페프리스톤; 밀테포신; 미리모스틴; 잘못 매칭된 이중 가닥 RNA; 미토구아존; 미톨락톨; 미토마이신 유사체; 미토나피드; 미토독신 섬유모세포 성장 인자-사포린; 미토산트론; 모파로텐; 물그라모스틴; 모노클로날 항체, 사람 용모성 고나도트로핀; 모노포스포릴 지질 A+ 미오박테리아 세포 벽 sk; 모피다몰; 복합 약물 내성 유전자 억제제; 복합 종양 억제자 1-기재 요법; 머스타드 항암제; 마이카페록시드 B; 마이코박테리아 세포벽 추출물리 미리아포론; N-아세틸딘알린; N-치환 벤자미드; 나파렐린; 나그레스티프; 날록손+펜타조신; 나파빈; 나프테핀; 나르토그라스티م; 네다플라틴; 네모루비신; 네리드론산; 중성 엔도펩티다제; 닐루타미드; 니사마이신; 산화질소 조절제; 니트록시드 항산화제; 니트롤린; O6-벤질구아닌; 옥트레오티드; 오키세논; 올리고뉴클레오타이드; 오나프리스톤; 온단스테론; 온단세트론; 오라신; 경구 사이토카인 도입제; 오르마플라틴; 오사테론; 옥살리플라틴; 옥사우노마이신; 파클리탁셀; 파클리탁셀 유사체; 파클리탁셀 유도체; 팔라우아민; 팔미토일리족신; 파미드론사니 파나시트리올; 파노미펜; 파라박틴; 파젤립틴; 폐가스파가제; 펠데신; 펜토산 폴리설페이트 소듐염; 펜토스타틴; 펜트로졸; 퍼플루브론; 퍼포스파미드; 페릴릴 알콜; 페나지노마이신; 페닐아세테이트; 포스파타제 억제제; 피시바닐; 필로카핀 히드로클로라이드; 피라루비신; 피리트렉심; 플라세틴 A; 플라세틴 B; 플라스미노겐 활성화 억제제; 백금 복합체; 백금 화합물; 백금-트리아민 복합체; 포르피머 소듐염; 포르피로마이신; 프레드니손; 프로필 비스-아크리돈; 프로스타글란딘 J2; 프로테아좀 억제제; 단백질 A-기재 면역 조절제; 단백질 키나제 C 억제제; 단백질 키나제 C 억제제, 마이크로알갈; 단백질 티

로신 포스파타제 억제제; 퓨린 뉴클레오시드 포스포릴라제 억제제; 퍼퓨린; 피라졸로아크리딘; 피리독실화 헤모글로빈 폴리옥시에틸렌 콘주게이트; raf 길항제; 칼티트렉세드; 라모세트론; ras 파네실 단백질 전이효소 억제제; ras 억제제; ras-GAP 억제제; 레텔립틴 탈메틸화; 레늄 Re 186 에티드로네이트; 리족신; 리보자임; RII 레틴아미드; 로글레티미드; 로히투킨; 로무티드; 로퀴니멕스; 루비지논 B1; 루복실; 사핀글; 사인토펜; SarCNU; 사코피톨 A; 사그라모스탐; Sdi 1 모방체; 세무스틴; 세네센스 유도성 억제제 1; 센스 올리고뉴클레오타이드; 신호 도입 억제제; 신호 도입 조정제; 단일 사슬 항원 결합 단백질; 시조피란; 소부족산; 소듐 보로캅테이트; 소듐 페닐아세테이트; 솔베롤; 소마토메딘 결합 단백질; 소네르민; 스파포스산; 스피카마이신 D; 스피로무스틴; 스피레노펜틴; 스폰지스타틴 1; 스쿠알라민; 줄기 세포 억제제; 줄기 세포 분할 억제제; 스티피아미드; 스트로멜리신 억제제; 설피노신; 초활성 혈관 작용성 장 펩티드 길항제; 수라디스타; 수라민; 스와인소닌; 합성 글리코사미노글리칸; 탈리무스틴; 타목시펜 메티오다이드; 타우로무스틴; 타자로텐; 테코갈란 소듐; 테가푸르; 텔루라피릴리움; 텔로머라제 억제제; 테모프로핀; 테모졸로미드; 테니포시드; 테트라클로로데카옥시드; 테트라조민; 탈리블라스틴; 티오코랄린; 트롬보포이에틴; 트롬보포이에틴 모방체; 티말파신; 티모포이에틴 수용체 아고니스트; 티모트리난; 갑상선 자극 호르몬; 틴 에틸 에티오퍼퓨린; 티라파자민; 티타노센 2염화물; 톱센틴; 토레미펜; 분화전능성 줄기세포 인자; 전사 억제제; 트레티노인; 트리아세틸우리딘; 트리시리빈; 트리메트렉사트; 트리프트렐린; 트로피세트론; 투로스테리드; 티로신 키나제 억제제; 티포스틴; UBC 억제제; 우베니멕스; 비노생식-굴 유도성 성장 억제 인자; 우로키나제 수용체 길항제; 바프레오타이드; 바리올린 B; 벡터 시스템; 적혈구 유전자 요법; 벨라레솔; 베라민; 베르딘; 베테포르핀; 비노렐빈; 빈살틴; 비탁신; 보로졸; 자노테론; 제니플라틴; 질라스코르브; 및 진코스타틴 스티말라머.

[0475] 본 발명의 방법에서 사용될 수 있는 치료 항체의 예는 다음을 포함하지만, 이에 한정되지는 않는다: 면역 억제성인 ZENAPAX® (daclizumab) (Roche Pharmaceuticals, Switzerland), 급성 신장 동종이식 거부를 예방하기 위한 사람화 항-CD25 모노클로날 항체; 쥐과 항-17-1A 세포 표면 항원 IgG2a 항체인 PANOREX™ (Glaxo Wellcome/Centocor); 쥐과 항-이디오타입(GD3 에피토프) IgG 항체인 BEC2 (ImClone System); 키메라 항-EGFR IgG 항체인 IMC-C225 (ImClone System); 사람화 항- α V β 3 인테그린 항체인 VITAXIN™ (Applied Molecular Evolution/MedImmune); 사람화 항-CD33 IgG 항체인 Smart M195 (Protein Design Lab/Kanebo); 사람화 항-CD22 IgG 항체인 LYMPHOCIDE™ (Immunomedics); 사람화 항-ICAM3 항체인 ICM3 (ICOS Pharm); 영양류화 항-CD80 항체인 IDEC-114 (IDEC Pharm/Mitsubishi); 사람화 항-CD40L 항체인 IDEC-131 (IDEC/Eisai); 영양류화 항-CD4 항체인 IDEC-151 (IDEC); 영양류화 항-CD23 항체인 IDEC-152 (IDEC/Seikagaku); 사람화 항-CD3 IgG인 SMART 항-CD3 (Protein Design Lab); 사람화 항-보체 인자 5(C5)인 5G1.1 (Alexin Pharm); 사람화 항-TNF- α 항체인 D2E7 (CAT/BASF); 사람화 항-TNF- α Fab 단편인 CDP870 (Celltech); 영양류화 항-CD4 IgG1 항체인 IDEC-151 (IDEC Pharm/SmithKline Beecham); 사람 항-CD4 IgG 항체인 MDX-CD4 (Medarex/Eisai/Genmab); 사람화 항-TNF- α IgG4 항체인 CDP571(Celltech); 사람화 항- α 4 β 7 항체인 LDP-02 (LeukoSite/Genentech); 사람화 항-CD4 IgG 항체인 OrthoClone OKT4A (Ortho Biotech); 사람화 항-CD40L IgG 항체인 ANTOVA™ (Biogen); 사람화 항-VLA-4 IgG 항체인 ANTEGREN™ (Elan); 및 사람 항-TGF- β 2 항체인 CAT-152(Cambridge Ab Tech). 본 발명에 따라 사용될 수 있는 치료 항체의 다른 예는 표 9B에 제시되어 있다.

[0476] 5.4.2 자가면역 질환 및 염증성 질환

[0477] 일부 구체예에서, 본 발명의 분자는 하나 이상의 영역에 하나 이상의 아미노산 변형을 갖는 변이체 Fc 영역을 포함하며, 이 변형은 Fc γ RIIB에 대한 변이체 Fc 영역의 친화력을 증가시키고, Fc γ RIIA 및/또는 Fc γ RIIA에 대한 변이체 Fc 영역의 친화력을 감소시킨다. 이러한 결합 특성을 갖는 본 발명의 분자는 면역반응을 조절하는데, 예를 들어 자가면역 질환 또는 염증성 질환과 관련된 면역반응을 저해하는데 유용하다. 어떤 작용 메커니즘과 연결하려는 의도는 아니지만, Fc γ RIIB에 대한 친화력이 향상되고 Fc γ RIIA 및/또는 Fc γ RIIA에 대한 친화력은 감소된 본 발명의 분자는 Fc γ R에 대한 활성화 반응을 약화시키고 세포 반응성을 저해할 수 있다.

[0478] 일부 구체예에서, 변이체 Fc 영역을 포함하는 본 발명의 분자는 면역글로불린이 아니며, 야생형 Fc 영역을 포함하는 분자에 비하여 Fc γ RIIB에 대한 변이체 Fc 영역의 친화력을 증가시키는 적어도 하나의 아미노산 변형을 포함한다. 다른 구체예에서, 상기 분자는 하나 이상의 아미노산 변형을 더 포함하며, 이 변형은 활성화 Fc γ R에 대한 분자의 친화력을 감소시킨다. 일부 구체예에서, 분자는 가용성(즉, 막 결합되지 않는다) Fc 영역이다. 본 발명은, 본원에 설명된 바와 같은 당업자에게 공지된 것들을 포함하여, 다양한 Fc 수용체에 대한 친화력을 조정하는 가용성 Fc 영역 내의 다른 아미노산 변형을 고찰한다. 다른 구체예에서, 분자(예를 들어, 적어도 하나 이

상의 아미노산 변형을 포함하는 Fc 영역)는 Fc 영역의 생체내 반감기를 증가시키기 위해 당업자에게 공지되고 본원에 설명된 기술을 사용하여 변형된다. 그러한 분자는 자가면역 장애를 치료 및/또는 예방하는데 치료적 유용성을 가진다. 어떤 작용 메커니즘과 결부하려는 의도는 없지만, Fc γ RIIB에 대한 친화력이 향상된 분자는 활성화 수용체를 약화시킴으로써 면역반응을 약화시키고, 자가면역 장애를 치료 및/또는 예방하는데 치료적 효능을 가진다.

[0479] 일부 구체예에서, Fc γ RIIB에 대한 변이체 Fc 영역의 친화력을 증가시키고, Fc γ RIIIA에 대한 변이체 Fc 영역의 친화력을 감소시키는, 하나 이상의 아미노산 변형은 246번 위치에서 트레오닌 치환과 396번 위치에서 히스티딘 치환; 또는 268번 위치에서 아스파르트산 치환과 318번 위치에서 아스파르트산 치환; 또는 217번 위치에서 세린 치환, 378번 위치에서 발린 치환, 및 408번 위치에서 아르기닌 치환; 또는 375번 위치에서 시스테인 치환과 396번 위치에서 류신 치환; 또는 246번 위치에서 이소류신 치환과 334번 위치에서 아스파라긴 치환을 포함한다. 한 구체예에서, Fc γ RIIB에 대한 변이체 Fc 영역의 친화력을 증가시키고, Fc γ RIIIA에 대한 변이체 Fc 영역의 친화력을 감소시키는, 하나 이상의 아미노산 변형은 247번 위치에서 류신 치환을 포함한다. 다른 구체예에서, Fc γ RIIB에 대한 변이체 Fc 영역의 친화력을 증가시키고, Fc γ RIIIA에 대한 변이체 Fc 영역의 친화력을 감소시키는, 하나 이상의 아미노산 변형은 372번 위치에서 티로신 치환을 포함한다. 또 다른 구체예에서, Fc γ RIIB에 대한 변이체 Fc 영역의 친화력을 증가시키고, Fc γ RIIIA에 대한 변이체 Fc 영역의 친화력을 감소시키는, 하나 이상의 아미노산 변형은 326번 위치에서 글루탐산 치환을 포함한다. 한 구체예에서, Fc γ RIIB에 대한 변이체 Fc 영역의 친화력을 증가시키고, Fc γ RIIIA에 대한 변이체 Fc 영역의 친화력을 감소시키는, 하나 이상의 아미노산 변형은 224번 위치에서 류신 치환을 포함한다.

[0480] 야생형 Fc 영역을 포함하는 비교 분자에 비하여 Fc γ RIIB에 대한 향상된 친화력 및 Fc γ RIIIA 및/또는 Fc γ RIIA에 대한 감소된 친화력을 갖는 변이체 Fc 영역은 자가면역 질환 또는 염증성 질환을 치료 또는 예방하는데 사용될 수 있다. 본 발명은 피험자에서 자가면역 장애나 염증성 장애와 관련된 하나 이상의 증상을 예방, 치료, 또는 관리하는 방법을 제공하며, 이 방법은 야생형 Fc 영역을 포함하는 비교 분자에 비하여 Fc γ RIIB에 대한 친화력이 향상되고 Fc γ RIIIA 및/또는 Fc γ RIIA에 대한 친화력이 감소된 변이체 Fc 영역을 갖는 본 발명의 하나 이상의 분자의 치료적 또는 예방적 유효량을 상기 피험자에게 투여하는 것을 포함한다.

[0481] 또한, 본 발명은 피험자에서 염증성 장애와 관련된 하나 이상의 증상을 예방, 치료, 또는 관리하는 방법을 제공하며, 이 방법은 하나 이상의 항염제의 치료적 또는 예방적 유효량을 상기 피험자에게 투여하는 것을 더 포함한다. 또한, 본 발명은 피험자에서 자가면역 질환과 관련된 하나 이상의 증상을 예방, 치료, 또는 관리하는 방법을 제공하며, 이 방법은 하나 이상의 면역조절제의 치료적 또는 예방적 유효량을 상기 피험자에게 투여하는 것을 더 포함한다. 5.4.2.1 절이 항염제 및 면역조절제의 무제한적인 예를 제공한다.

[0482] 본 발명의 분자를 투여함으로써 치료될 수 있는 자가면역 장애의 예는, 원형탈모증, 강직성 척추염, 항인지질 증후군, 자가면역 에디슨병, 부신의 자가면역 질환, 자가면역 용혈성 빈혈, 자가면역 간염, 자가면역 난소염 및 고환염, 자가면역 혈소판감소증, 베체트병, 수포성 유사천포창, 심근병증, 복강부전증-피부염, 만성피로 면역장애 증후군(CFIDS), 만성염증성 탈수초 다발성 신경병증, 처그-스트라우스 증후군, 흉터성 유사천포창, CREST 증후군, 한냉 응집소 질환, 크론병, 원관상 루푸스, 본태성 혼합 한냉글로불린혈증, 섬유근통-섬유근염, 사구체신염, 그레이브스병, 길랑-바레 증후군, 하시모토 갑상선염, 특발성 폐섬유증, 특발성 혈소판감소성 자반증(ITP), IgA 신경병증, 소아 관절염, 편평태선, 홍반성 루푸스, 메니에르병, 혼합성 결합조직 질환, 다발성 경화증, 1형 또는 면역-매개 당뇨병, 중증 근무력증, 심상성 천포창, 악성 빈혈, 결절성 다발성 동맥염, 다발연골염, 다선성 증후군, 류마티스성 다발성 근통, 다발성 근염 및 피부근염, 원발성 무감마글로불린혈증, 원발성 담즙성 경변, 건선, 건선성 관절염, 레이노 현상, 라이터 증후군, 류마티스성 관절염, 유육종증, 피부경화증, 쇼그렌 증후군, 강직인간 증후군, 전신성 홍반성 루푸스, 홍반성 루푸스, 다가야스 동맥염, 측두 동맥염/거대세포 동맥염, 궤양성 결장염, 포도막염, 포진상 피부염 혈관염과 같은 혈관염, 백반증, 및 웨게너 육아종증을 포함하며, 이들에 제한되는 것은 아니다. 염증성 장애의 예는, 천식, 뇌염, 염증성 장질환, 만성 폐쇄성 폐질환(COPD), 알레르기성 장애, 패혈쇼크, 폐섬유증, 미분화 척추관절병증, 미분화 관절병증, 관절염, 염증성 골용해, 및 만성 바이러스성 또는 세균성 감염으로 인한 만성적 염증을 포함하며, 이들에 제한되는 것은 아니다. 본원의 2.2.2 절에서 설명된 대로, 일부 자가면역 장애는 염증성 상태와 관련된다. 따라서, 자가면역 장애로 여겨지는 것과 염증성 장애로 여겨지는 것이 중첩된다. 따라서, 일부 자가면역 장애는 또한 염증성 장애로서 특징지어질 수도 있다. 본 발명의 방법에 따라서 예방, 치료 또는 관리될 수 있는 염증성 장애의 예는, 천식, 뇌염, 염증성 장질환, 만성 폐쇄성 폐질환(COPD), 알레르기성 장애, 패혈쇼크, 폐섬유증, 미분화 척추관절병증, 미분화 관절병증, 관절염, 염증성 골용해, 및 만성 바이러스성 또는 세균성 감염으로 인한 만성적 염증을 포함하며, 이들에 제한되지

는 않는다.

[0483] 야생형 Fc 영역을 포함하는 비교 분자에 비하여 Fc γ RIIB에 대한 친화력이 향상되고 Fc γ RIIIA에 대한 친화력은 감소된 변이체 Fc 영역을 갖는 본 발명의 분자는 또한 염증성 장애를 가진 동물, 특히 포유동물에 의해 경험되는 염증을 줄이는데 사용될 수 있다. 특정 구체예에서, 본 발명의 분자는 상기 분자를 투여하지 않은 동물에서의 염증에 비하여 동물에서 염증을 적어도 99%, 적어도 95%, 적어도 90%, 적어도 85%, 적어도 80%, 적어도 75%, 적어도 70%, 적어도 60%, 적어도 50%, 적어도 45%, 적어도 40%, 적어도 35%, 적어도 30%, 적어도 25%, 적어도 20%, 또는 적어도 10%까지 줄인다.

[0484] 야생형 Fc 영역을 포함하는 비교 분자에 비하여 Fc γ RIIB에 대한 친화력이 향상되고 Fc γ RIIIA에 대한 친화력은 감소된 변이체 Fc 영역을 갖는 본 발명의 분자는 또한 이식 거부를 예방하는데 사용될 수 있다.

[0485] 더 나아가, 본 발명은 자가면역 질환 또는 염증성 질환의 치료 및/또는 예방을 위해 본 분야에 공지된 어떤 항체를 조작하여, 항체가 하나 이상의 아미노산 변형을 포함하는 변이체 Fc 영역을 포함하도록 하는 것을 고찰하며, 이것은 야생형 Fc 영역을 포함하는 비교 분자에 비하여 Fc γ RIIB에 대한 향상된 친화력 및 Fc γ RIIIA에 대한 감소된 친화력을 가지도록 하는 본 발명의 방법에 의해 확인된다. 본 발명에 따라 조작될 수 있는 염증성 장애의 치료 또는 예방에 사용되는 항체의 무제한적인 예가 표 10A에 제시되며, 자가면역 장애의 치료 또는 예방에 사용되는 항체의 무제한적인 예가 표 10B에 제시된다.

표 10A

본 발명에 따라서 조작될 수 있는 염증성 질환 및 자가면역 질환을 위한 항체

항체 명칭	표적 항원	제품 타입	이소타입	스폰서	처방
5G1.1	보체 (C5)	사람화	IgG	Alexion Pharm Inc	류마티스 관절염
5G1.1	보체 (C5)	사람화	IgG	Alexion Pharm Inc	SLE
5G1.1	보체 (C5)	사람화	IgG	Alexion Pharm Inc	신장염
5G1.1-SC	보체 (C5)	사람화	ScFv	Alexion Pharm Inc	심폐 우회술
5G1.1-SC	보체 (C5)	사람화	ScFv	Alexion Pharm Inc	심근경색
5G1.1-SC	보체 (C5)	사람화	ScFv	Alexion Pharm Inc	혈관성형술
ABX-CBL	CBL	사람		Abgenix Inc	GvHD
ABX-CBL	CD147	쥐과	IgG	Abgenix Inc	동종이식거부
ABX-IL8	IL-8	사람	IgG2	Abgenix Inc	건선
Antegren	VLA-4	사람화	IgG	Athena/Elan	다발성 경화증
Anti-CD11a	CD11a	사람화	IgG1	Genentech Inc/Xoma	건선
Anti-CD18	CD18	사람화	Fab'2	Genentech Inc	심근경색
Anti-LFA1	CD18	쥐과	Fab'2	Pasteur-Merieux/Immunotech	동종이식거부
Antova	CD40L	사람화	IgG	Biogen	동종이식거부
Antova	CD40L	사람화	IgG	Biogen	SLE
BTI-322	CD2	랫	IgG	Medimmune Inc	GvHD, 건선
CDP571	TNF- 알파	사람화	IgG4	Celltech	크론병
CDP571	TNF- 알파	사람화	IgG4	Celltech	류마티스 관절염
CDP850	E- 셀렉틴	사람화		Celltech	건선
Corsevin M	Fact VII	키메라		Centocor	항응고
D2E7	TNF- 알파	사람		CAT/BASF	류마티스 관절염
Hu23F2G	CD11/18	사람화		ICOS Pharm Inc	다발성 경화증
Hu23F2G	CD11/18	사람화	IgG	ICOS Pharm Inc	뇌졸중
IC14	CD14			ICOS Pharm Inc	독성쇼크

[0486]

항체 명칭	표적 항원	제품 타입	이소타입	스폰서	처방
ICM3	ICAM-3	사람화		ICOS Pharm Inc	건선
IDEC-114	CD80	영장류화		IDEC Pharm/Mitsubishi	건선
IDEC-131	CD40L	사람화		IDEC Pharm/Eisai	SLE
IDEC-131	CD40L	사람화		IDEC Pharm/Eisai	다발성 경화증
IDEC-151	CD4	영장류화	IgG1	IDEC Pharm/Glaxo SmithKline	류마티스 관절염
IDEC-152	CD23	영장류화		IDEC Pharm	천식/알레르기
Infliximab	TNF- 알파	키메라	IgG1	Centocor	류마티스 관절염
Infliximab	TNF- 알파	키메라	IgG1	Centocor	크론병
LDP-01	베타2-인테그린	사람화	IgG	Millennium Inc (LeukoSite Inc.)	뇌졸중
LDP-01	베타2-인테그린	사람화	IgG	Millennium Inc (LeukoSite Inc.)	동종이식거부
LDP-02	알파4베타7	사람화		Millennium Inc (LeukoSite Inc.)	궤양성 결장염
MAK-195F	TNF 알파	쥐과	Fab'2	Knoll Pharm, BASF	독성쇼크
MDX-33	CD64 (FcR)	사람		Medarex/Centeon	자가면역 혈액원성 장애
MDX-CD4	CD4	사람	IgG	Medarex/Eisai / Genmab	류마티스 관절염
MEDI-507	CD2	사람화		Medimmune Inc	건선
MEDI-507	CD2	사람화		Medimmune Inc	GvHD
OKT4A	CD4	사람화	IgG	Ortho Biotech	동종이식거부

[0487]

항제 명칭	표적 항원	제품 타입	이소타입	스폰서	처방
OrthoClone OKT4A	CD4	사람화	IgG	Ortho Biotech	자가면역 질환
Orthoclone/anti-CD3 OKT3	CD3	쥐과	mIgG2a	Ortho Biotech	동종이식거부
RepPro/Abciximab	gpIIb/IIIa	키메라	Fab	Centocor/Lilly	심장 혈관성형술 합병증
rhMab-E25	IgE	사람화	IgG1	Genentech/Novartis/Tanox Biosystems	천식/알레르기
SB-240563	IL5	사람화		GlaxoSmithKline	천식/알레르기
SB-240683	IL-4	사람화		GlaxoSmithKline	천식/알레르기
SCH55700	IL-5	사람화		Celltech/Schering	천식/알레르기
Simulect	CD25	키메라	IgG1	Novartis Pharm	동종이식거부
SMART a-CD3	CD3	사람화		Protein Design Lab	자가면역 질환
SMART a-CD3	CD3	사람화		Protein Design Lab	동종이식거부
SMART a-CD3	CD3	사람화	IgG	Protein Design Lab	건선
Zenapax	CD25	사람화	IgG1	Protein Design Lab/Hoffman-La Roche	동종이식거부

[0488]

표 10B

본 발명에 따라 조작될 수 있는 자가면역 장애를 위한 항체

항체	처방	표적 항원
ABX-RB2		T 세포, B 세포 및 NK 세포 상의 CBL 항원에 대한 항체 Xenomouse로부터의 완전 사람 항체
5c8 (항 CD-40 리간드 항체)	"부작용"을 시험하는 2차 단계 시험을 99년 10월에 마무리했다	CD-40
IDEC 131	전신성 홍반성 루푸스 (SLE)	항 CD40 사람화
IDEC 151	류마티스 관절염	염장류화; 항-CD4
IDEC 152	천식	염장류화; 항-CD23
IDEC 114	건선	염장류화; 항-CD80
MEDI-507	류마티스 관절염 다발성 경화증 크론병 건선	항-CD2
LDP-02 (항-b7 mAb)	염증성 장질환 크론병 게양성 결장염	백혈구 상의 a4b7 인테그린 수용체
SMART Anti-Gamma Interferon antibody	자가면역 장애	항-감마 인터페론
Verteportin	류마티스 관절염	
MDX-33	자가면역 반응에 의한 혈액 장애 특발성 혈소판감소자색반병 (ITP) 자가면역 용혈성 빈혈	FcRI 수용체에 대한 모노클로날 항체
MDX-CD4	류마티스 관절염 및 다른 자가면역성의 치료	CD4 수용체 분자에 대한 모노클로날 항체
VX-497	자가면역 장애 다발성 경화증 류마티스 관절염 염증성 장질환 루푸스 건선	이노신 모노포스페이트 탈수소효소의 억제제 (림프구 증식에 필요한 뉴클레오타이드의 생산에 사용되는 새로운 RNA 및 DNA를 만드는 데 필요한 효소)
VX-740	류마티스 관절염	ICE 억제제

[0489]

항제	처방	표적 항원
		인터류킨-1 베타 (공격적인 면역반응을 가져오는 경로를 제어하는 전환효소)
VX-745	면역반응 개시 및 염증 전생의 화학적 신호화에 연관된 염증에 특이적	P38MAP 키나제 억제제 유사분열물질 활성화 단백질 키나제
Enbrel (etanercept)		TNF (종양괴사인자) 표적화
IL-8		IL-8 (인터류킨-8)에 대한 완전 사람 모노클로날 항체
Apogen MP4		재조합 항원 질환 관련 T-세포의 선택적 파괴 프로그래밍된 세포사멸에 의해 제거된 T-세포의 세포자살 유도 신체의 자기 세포를 더 이상 공격하지 않음 특이적 T-세포를 표적화하는 특이적 아포겐

[0490]

[0491]

5.4.2.1 면역조절제 및 항염제

[0492]

본 발명은 $\text{Fc}\gamma\text{RIIB}$ 에 대한 친화력이 향상되고 $\text{Fc}\gamma\text{RIIA}$ 및/또는 $\text{Fc}\gamma\text{RIIA}$ 에 대한 친화력은 감소된 변이체 Fc 영역을 갖는 본자를 다른 치료제와 함께 투여하는 것을 포함하는 자가면역 질환 및 염증성 질환의 치료 방법을 제공한다. 면역조절제의 예는, 메토티렉세이트, ENBREL, REMICADETM, 레플루노미드, 시클로포스파미드, 시클로스로린 A, 및 마크롤라이드 항생제류(예를 들어, FK506(타크롤리무스)), 메틸프레드니솔론(MP), 코르티코스테로이드류, 스테로이드류, 미코페놀레이트 모페틸, 라파마이신(시롤리무스), 미조리빈, 디옥시스페르구알린, 브레퀴나르, 말로노니트릴로아미드류(예를 들어, 레플루아미드), T 세포 수용체 조절제, 및 사이토카인 수용체 조절제를 포함하며, 이들에 제한되는 것은 아니다.

[0493]

항염제는 염증성 장애 및 자가면역 장애의 치료에 성공적인 것으로 나타났으며, 현재 그러한 장애를 위한 일반적인 표준 치료제이다. 당업자가 잘 알고 있는 어떤 항염제도 본 발명의 방법에 사용될 수 있다. 항염제의 무제한적인 예는, 비스테로이드계 항염제(NSAID류), 스테로이드계 항염제, 베타-아고니스트류, 항콜린제, 및 메틸크산틴류를 포함한다. NSAID의 예는, 아스피린, 이부프로펜, 셀레콕시브(CELEBREXTM), 디클로페낙(VOLTARENTM), 에토돌락(LODINETM), 페노프로펜(NALFONTM), 인도메타신(INDOCINTM), 케토랄락(TORADOLTM), 옥사프로진(DAYPROTM), 나부멘톤(RELAFENTM), 술린닥(CLINORILTM), 톨멘틴(TOLECTINTM), 로페콕시브(VIOXXTM), 나프록센(ALEVETM, NAPROSYNTM), 케토프로펜(ACTRONTM) 및 나부메톤(RELAFENTM)을 포함하며, 이들에 제한되지는 않는다. 이러한 NSAID 류는 시클로옥시게나제 효소(예를 들어, COX-1 및/또는 COX-2)를 저해함으로써 기능한다. 스테로이드계 항염제의 예는, 글루코코르티코이드류, 데카메타손(DECADRONTM), 코르티손, 히드로코르티손, 프레드니손(DELTAONETM), 프레드니솔론, 트리암시놀론, 아줄피딘, 및 프로스타글란딘, 트롬복산 및 류코트리엔와 같은 에이코사노이드를 포함하며, 이들에 제한되는 것은 아니다.

[0494]

5.4.3 감염성 질환

[0495]

또한, 본 발명은 본 발명의 하나 이상의 분자의 치료적 또는 예방적 유효량을 투여하는 것을 포함하는, 피험자에서 감염성 질환을 치료 또는 예방하는 방법을 포함한다. 본 발명의 분자에 의해 치료 또는 예방될 수 있는 감염성 질환은 제한은 없지만 바이러스, 세균, 진균, 원충 및 바이러스를 포함하는 감염원에 의해 일어난다.

[0496]

본 발명의 방법과 함께 본 발명의 분자를 사용하여 치료 또는 예방될 수 있는 바이러스성 질환은, A형 간염, B형 간염, C형 간염, 인플루엔자, 수두, 아데노바이러스, I형 단순포진(HSV-I), II형 단순포진(HSV-II), 소 페스

트, 리노 바이러스, 에코 바이러스, 로타 바이러스, 호흡기 합포체 바이러스, 유두종 바이러스, 파포바 바이러스, 시토메갈로바이러스, 에키노 바이러스, 아르보 바이러스, 한타 바이러스, 콕사키 바이러스, 유행성 이하선염 바이러스, 홍역 바이러스, 풍진 바이러스, 소아마비 바이러스, 천연두 바이러스, 엡스타인 바 바이러스, 사람 면역결핍 바이러스 I형(HIV-I), 사람 면역결핍 바이러스 II형(HIV-II), 및 바이러스성 뇌막염, 뇌염, 뎅그열 또는 천연두와 같은 바이러스성 질환의 발생원에 의해 일어나는 것들을 포함하며, 이들에 제한되지는 않는다.

[0497] 세균에 의해 일어나는, 본 발명의 방법과 함께 본 발명의 분자를 사용하여 치료 또는 예방될 수 있는 세균성 질환은, 미코박테리아 리케차, 미코플라스마, 네이세리아(*Neisseria*), S. 뉴모니아(*S. pneumonia*), 라임 관절염(*Borrelia burgdorferi*), 탄저병(*Bacillus anthracis*), 과상풍, 연쇄상구균, 포도상구균, 과상풍, 백일해, 콜레라, 페스트, 디프테리아, 클라미디아, 황색포도상구균(*S. aureus*) 및 레지오넬라를 포함하며, 이들에 제한되지는 않는다.

[0498] 원충에 의해 일어나는, 본 발명의 방법과 함께 본 발명의 분자를 사용하여 치료 또는 예방될 수 있는 원충 질환은, 리슈만편모충, 코크지디오아, 파동편모충 또는 말라리아를 포함하며, 이들에 제한되지는 않는다.

[0499] 기생충에 의해 일어나는, 본 발명의 방법과 함께 본 발명의 분자를 사용하여 치료 또는 예방될 수 있는 기생충 질환은 클라미디아 및 리케차를 포함하며, 이들에 제한되지는 않는다.

[0500] 본 발명의 한 양태에 따라서, 야생형 Fc 영역을 포함하는 비교 분자에 비하여 향상된 항체 작동자를 갖는 변이체 Fc 영역을 포함하는 본 발명의 분자는 감염원, 예를 들어 병원성 단백질에 관해 기능한다. 감염원의 예는, 제한되지는 않지만 세균(예를 들어, 대장균(*Escherichia coli*), 클레브시엘라 뉴모니에(*Klebsiella pneumoniae*), 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*), 엔테로코커스 파에시알스(*Enterococcus faecials*), 캔디다 알비칸스(*Candida albicans*), 프로테우스 불가리스(*Proteus vulgaris*), 스태필로코커스 비리단스(*Staphylococcus viridans*), 및 슈도모나스 에루기노사(*Pseudomonas aeruginosa*)), 병원체(예를 들어, B-림프 친화력 파포바바이러스(LPV); 백일해균; 보르나병 바이러스(BDV); 소 코로나바이러스; 맥락수막염 바이러스; 뎅그열 바이러스; 바이러스, 대장균; 에볼라; 에코바이러스-I; 에코바이러스-II(EV); 내독소(LPS); 장내 세균; 소화기 고아 바이러스; 엔테로바이러스; 고양이 백혈병 바이러스; 수족구병 바이러스; 기본 원숭이 백혈병 바이러스(GALV); 그람-음성 세균; 헬리오박터 파이로리; B형 간염 바이러스(HBV); 단순포진 바이러스; HIV-1; 사람 시토메갈로바이러스; 사람 코로나바이러스; 인플루엔자 A, B & C; 레지오넬라; 멕시코 리슈만편모충; 리스테리아 모노시토키테네스(*Listeria monocytogenes*); 홍역 바이러스; 수막염균; 모빌리 바이러스; 마우스 간염 바이러스; 쥐과 백혈병 바이러스; 쥐과 감마포진 바이러스; 쥐과 레트로바이러스; 쥐과 코로나바이러스; 마우스 간염 바이러스; 미코박테리움 아비움-M; 임질균; 뉴캐슬병 바이러스; 파보바이러스 B19; 플라즈모듐 팔시파룸(*Plasmodium falciparum*); 폭스 바이러스; 슈도모나스(*Pseudomonas*); 로타 바이러스; 살모넬라 티피우리움(*Salmonella typhurium*); 시겔라; 스트렙토코키(*Streptococci*); T-세포 림프친화력 바이러스 1; 우두바이러스)을 포함한다.

[0501] 특정 구체예에서, 본 발명의 분자는 감염성 질환을 일으키는 감염원의 포식작용 및/또는 흡수인화를 향상시킴으로써 감염성 질환의 치료 효능을 향상시킨다. 다른 특정한 구체예에서, 본 발명의 분자는 감염성 질환을 일으키는 감염된 세포의 ADCC를 향상시킴으로써 감염성 질환의 치료 효능을 향상시킨다.

[0502] 일부 구체예에서, 본 발명의 분자는 감염성 질환의 치료 및/또는 예방을 위해 당업자에게 공지된 하나 또는 추가의 치료제의 치료적 또는 예방적 유효량과 함께 투여될 수 있다. 본 발명은 감염성 질환의 치료 및/또는 예방을 위한 당업자에게 공지된 항생제와 함께 본 발명의 분자를 사용하는 것을 고찰한다. 본 발명의 분자와 함께 사용될 수 있는 항생제는, 제한되는 것은 아니지만, 마크롤라이드(예를 들어 토브라마이신(Tobi[®])), 세팔로스포린(예를 들어 세팔렉신(Keflex[®]), 세프라딘(Velosef[®]), 세푸록심(Ceftin[®]), 세프프로질(Cefzil[®]), 세파클로(Ceclor[®]), 세픽심(Suprax[®]) 또는 세파드록실(Duricef[®])), 클라리트로마이신(예를 들어 클라리트로마이신(Biaxin[®])), 에리트로마이신(예를 들어 에리트로마이신(EMycin[®])), 페니실린(예를 들어 페니실린 V(V-Cillin K[®] 또는 Pen Vee K[®])) 또는 퀴놀론(예를 들어 오픈록사신(Floxin[®]), 시프로플록사신(Cipro[®]) 또는 노르플록사신(Noroxin[®])), 아미노글리코시드 항생제류(예를 들어, 아프라마이신, 아베카신, 밤베마이신, 부티로신, 디베카신, 네오마이신, 네오마이신, 운테실레네이트, 네틸미신, 파로모마이신, 리보스타마이신, 시소미신 및 스펙티노마이신), 암페니콜 항생제류(예를 들어, 아지담페니콜, 클로람페니콜, 플로르페니콜 및 티암페니콜), 안사마이신 항생제류(예를 들어, 리파마이드 및 리팜핀), 카르바세렘류(예를 들어 로라카르베프), 카르바페넴류(예를 들어 비아페넴 및 이미페넴), 세팔로스포린류(예를 들어, 세파클로, 세파드록실, 세파만돌, 세파

트리진, 세파제돈, 세포조프란, 세프피미줄, 세프피라미드 및 세프피롬), 세파마이신류(예를 들어, 세프부페라존, 세프메타줄 및 세프미녹스), 모노박탐류(예를 들어, 아즈트레오남, 카루모남 및 티게모남), 옥사세팸류(예를 들어, 플록세프 및 목살락탐), 페니실린류(예를 들어, 암디노실린, 암디노실린 피복실, 아목시실린, 바캄피실린, 벤질페니실린산, 벤질페니실린 나트륨, 에피실린, 펜베니실린, 플록사실린, 페남실린, 페네타메이트 하이드리오타이드, 페니실린 o-베네타민, 페니실린 O, 페니실린 V, 페니실린 V 벤자틴, 페니실린 V 히드라바민, 페니메피시클린 및 페니실린 칼륨), 린코사미드류(예를 들어, 클린다마이신 및 린코마이신), 암포마이신, 바시트라신, 카프레오마이신, 콜리스틴, 엔두라시딘, 엔비오마이신, 테트라시클린류(예를 들어, 아피시클린, 클로르테트라시클린, 클로모시클린 및 데메클로시클린), 2,4-디아미노피리미딘류(예를 들어 브로디모프림), 니트로푸란류(예를 들어, 푸랄타돈 및 푸라졸람 염화물), 퀴놀론류 및 유사체(예를 들어, 시녹사신, 클리나플록사신, 플루메퀸 및 그레파글록사신), 술폰아미드류(예를 들어, 아세틸 술폰아메톡시피라진, 벤질술폰아미드, 노프틸술폰아미드, 프탈틸술폰세타미드, 술폰아미드소이딘 및 술폰아미드), 술폰류(예를 들어, 디아티모술폰, 글루코술폰 나트륨 및 솔라술폰), 시클로세린, 무피로신 및 투베린을 포함한다.

[0503] 일부 구체예에서, 본 발명의 분자는 하나 이상의 항진균제의 치료적 또는 예방적 유효량과 함께 투여될 수 있다. 본 발명의 분자와 함께 사용될 수 있는 항진균제는, 제한되는 것은 아니지만, 암포테리신 B, 이트라코나졸, 케토코나졸, 플루코나졸, 인트라테칼, 플루시토신, 미코나졸, 부토코나졸, 클로트리마졸, 니스타틴, 터코나졸, 티오코나졸, 시클로피록스, 에코나졸, 할로프로그린, 나프티핀, 터비나핀, 운데실레네이트 및 그리세오폴딘을 포함한다.

[0504] 일부 구체예에서, 본 발명의 분자는 하나 이상의 항바이러스제의 치료적 또는 예방적 유효량과 함께 투여될 수 있다. 본 발명의 분자와 함께 사용될 수 있는 유용한 항바이러스제는, 제한되는 것은 아니지만, 프로테아제 억제제, 뉴클레오시드 역전사효소 억제제, 비-뉴클레오시드 역전사효소 억제제 및 뉴클레오시드 유사체를 포함한다. 항바이러스제의 예는, 제한은 없지만, 지도부딘, 아시클로비르, 간그시클로비르, 비다라빈, 이독수리딘, 트리플루리딘 및 리바비린뿐만 아니라, 포스카네트, 아만타딘, 리만타딘, 사퀴나비르, 인디나비르, 암프레나비르, 로피나비르, 리토나비르, 알파-인터페론; 아데포비르, 클레바딘, 엔테카비르, 플레코나빌을 포함한다.

[0505] 5.5 백신 요법

[0506] 더 나아가서, 본 발명은 제한은 없지만 암 항원 및 감염성 질환 항원(이들의 예는 하기 개시된다)을 포함하는 항원성 또는 면역원성 발생원에 대한 면역반응을 유도하기 위해 본 발명의 조성물을 사용하는 것을 포함한다. 본 발명의 백신 조성물은 그것에 대한 면역반응을 원하는 항원성 또는 면역원성 발생원을 하나 이상 포함하며, 여기서 하나 이상의 항원성 또는 면역원성 발생원은 Fc γ RIIIA에 대한 친화력이 향상된 본 발명의 변이체 항체로 코팅된다. 특정한 작용 메커니즘과 결부하려는 의도는 없지만, Fc γ RIIIA에 대한 친화력이 향상된 본 발명의 변이체 항체로 항원성 또는 면역원성 발생원을 코팅하는 것은 체액 및 세포-매개 반응을 유도함으로써 원하는 항원성 또는 면역원성 발생원에 대한 면역반응을 향상시킨다. 본 발명의 백신 조성물은 면역반응, 바람직하게는 항원성 또는 면역원성 발생원에 대한 보호 면역반응을 도출하는데 특히 효과적이다.

[0507] 일부 구체예에서, 본 발명의 백신 조성물 내의 항원성 또는 면역원성 발생원은 그것에 대한 면역반응을 원하는 바이러스를 포함한다. 바이러스는 재조합 또는 키메라 바이러스일 수 있으며 바람직하게는 감독된다. 재조합, 키메라 또는 감독된 바이러스의 제조는 당업자에게 공지된 표준 방법을 이용하여 수행될 수 있다. 본 발명은 본 발명에 따라서 조제되는 재조합 바이러스 생 백신 또는 불활성화된 재조합 바이러스 백신을 포함한다. 숙주에서의 증식이 자연적 감염시에 발생하는 것과 유사한 종류 및 크기의 장기적 자극을 가져오으로써 실질적으로 오래 지속되는 면역성을 부여하기 때문에 생 백신이 바람직하다. 이러한 재조합 바이러스 생 백신 제조의 제조는 세포 배양물 또는 닭 배아 요막에서의 바이러스 증식 후 정제 과정을 포함하는 종래의 방법을 이용하여 달성될 수 있다.

[0508] 특정 구체예에서, 재조합 바이러스는 그것이 투여되는 피험자에 대해 비-병원성이다. 이와 관련하여, 백신 목적을 위해 유전조작된 바이러스의 사용은 이들 균주에 있어서의 감독 특성의 존재를 필요로 할 수 있다. 트랜스팩션에 사용되는 주형에 적합한 돌연변이(예를 들어 결실)의 도입이 감독 특성을 갖는 새로운 바이러스를 제공할 수 있다. 예를 들어, 온도 민감성 또는 냉각 적응과 관련되는 특정한 미스센스 돌연변이가 결실 돌연변이로만 들어질 수 있다. 이들 돌연변이는 냉각 또는 온도 민감성 돌연변이체와 관련된 점 돌연변이보다 더욱 안정해야 하며 복귀 빈도는 극도로 낮아야 한다. 유전조작 재조합 바이러스를 위한 재조합 DNA 기술은 본 분야에 공지되어 있으며 본 발명에 포함된다. 예를 들어, 음성 가닥 RNA 바이러스를 변형하는 기술이 본 분야에 공지이며, 예를 들어 본원에 참고자료로 전체가 포함되는 미국특허 제5,166,057호를 참조한다.

- [0509] 또는 달리, "자살" 특성을 갖는 키메라 바이러스가 본 발명의 피내 백신 제제에의 사용을 위해 구성될 수 있다. 그러한 바이러스는 숙주 안에서 단지 1회 또는 적은 횟수의 복제 라운드를 거칠 것이다. 백신으로 사용될 때, 재조합 바이러스는 제한된 복제 사이클(들)을 거쳐 충분한 수준의 면역반응을 유도하지만, 그것은 사람 숙주 안에서 더 진행하여 질환을 일으키지는 않는다. 또는 달리, 불활성화된 (죽은) 바이러스가 본 발명에 따라서 조제될 수 있다. 불활성화된 백신 제제는 키메라 바이러스를 "죽이는" 종래의 기술을 이용하여 제조될 수 있다. 불활성화된 백신은 그들의 감염성이 파괴되었다는 의미에서 "죽은" 것이다. 이상적으로 말하면, 바이러스의 감염성은 그것의 면역원성에 아무 영향 없이 파괴된다. 불활성화 백신을 제조하기 위해서, 키메라 바이러스가 세포 배양물 또는 닭 배아의 융막에서 성장되고 띠 모양 초원심분리에 의해 정제되고 포름알데히드 또는 β -프로피오락톤에 의해 불활성화되어 집체화된다.
- [0510] 일부 구체예에서, 다른 바이러스 또는 비-바이러스 병원체로부터 유래된 항원을 포함하는 완전한 외인성 에피토프가 본 발명의 내피 백신 제제에 사용하기 위한 바이러스 내로 유전조작될 수 있다. 예를 들어, HIV(gp160, gp120, gp41)와 같은 비-관련 바이러스의 항원, 기생충 항원(예를 들어, 말라리아), 세균 또는 진균 항원 또는 종양 항원이 감득된 균주 내로 유전조작될 수 있다.
- [0511] 실제로, 어떤 이중성 유전자 서열이 내피 백신 제제에 사용하기 위한 본 발명의 키메라 바이러스 내에 구성될 수 있다. 바람직하게, 이중성 유전자 서열은 생물학적 반응 변형제로 작용하는 부분 및 펩티드이다. 바람직하게, 중화 항체에 결합하는 여러 병원체 또는 항원 중 어느 것에 대한 보호 면역반응을 유도하는 에피토프가 키메라 바이러스에 의해 또는 키메라 바이러스의 부분으로서 발현될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 키메라 바이러스 내에 구성될 수 있는 이중성 유전자 서열은, 제한은 없지만, 인플루엔자 및 파라인플루엔자 적혈구 응집소 뉴라미니다제 및 사람 PIV3의 HN 및 F 유전자와 같은 융합 당단백질을 포함한다. 또 다른 구체예에서, 키메라 바이러스 내로 유전조작될 수 있는 이중성 유전자 서열은 면역-조정 활성을 갖는 단백질을 암호화하는 것들을 포함한다. 면역-조정 단백질의 예는, 제한은 없지만, 시토카인, 인터페론 타입 1, 감마 인터페론, 콜로니 자극 인자, 인터류킨 -1, -2, -4, -5, -6, -12, 및 이들 제제의 길항제를 포함한다.
- [0512] 또 다른 구체예에서, 본 발명은 표면에서 변이체 항체를 발현하는 병원성 세포 또는 바이러스, 바람직하게는 감득된 바이러스를 포함한다.
- [0513] 다른 구체예에서, 본 발명의 백신 조성물은 항원성 또는 면역원성 발생원이 $\text{Fc}\gamma\text{RIIIA}$ 에 대한 친화력이 향상된 본 발명의 변이체 항체에 작동가능하게 연결된 융합 폴리펩티드를 포함한다. 본 발명의 백신 조성물에 사용하기 위한 융합 폴리펩티드의 유전조작은 통상적인 재조합 DNA 기술을 이용하여 수행되며 이것은 일반적인 수준 내이다.
- [0514] 더 나아가서, 본 발명은 본 발명의 조성물을 투여함으로써 피험자에서 내성을 유도하는 방법을 포함한다. 바람직하게, 피험자에서 내성을 유도하기 위한 적합한 조성물은 본 발명의 변이체 항체로 코팅된 항원성 또는 면역원성 발생원을 포함하며, 여기서 변이체 항체는 $\text{Fc}\gamma\text{RIIB}$ 에 대해 더 높은 친화력을 가진다. 특정한 작용 메커니즘과 결부하려는 의도는 없지만, 그러한 조성물은 $\text{Fc}\gamma\text{RIIB}$ 매개 저해성 경로를 활성화함으로써 내성을 유도하는데 효과적이다.
- [0515] **5.6 조성물 및 투여 방법**
- [0516] 본 발명은 변이체 Fc 영역을 포함하는 본 발명의 분자(즉, 항체, 폴리펩티드)를 포함하는 약학적 조성물 및 방법을 제공한다. 또한, 본 발명은 본 발명의 융합 단백질 또는 콘주게이트 분자, 또는 본 발명의 융합 단백질 또는 콘주게이트 분자를 포함하는 약학적 조성물의 유효량을 피험자에게 투여하는 것에 의한 질환, 장애 또는 감염과 관련된 하나 이상의 증상의 치료, 예방, 및 개선 방법을 제공한다. 바람직한 양태에서, 항체, 융합 단백질, 또는 콘주게이트 분자는 실질적으로 정제된다(즉, 그 효과를 제한하거나 바람직하지 않은 부작용을 야기하는 물질을 실질적으로 함유하지 않는다). 특정한 구체예에서, 피험자는 동물이며, 바람직하게는 포유동물, 예를 들어 비-영장류(예를 들어, 소, 돼지, 말, 고양이, 개, 래트 등) 및 영장류(예를 들어, 원숭이, 예를 들어 시아노몰거스 원숭이 및 사람)이다. 바람직한 구체예에서 피험자는 사람이다. 또 다른 바람직한 구체예에서, 본 발명의 항체는 피험자와 동일한 종으로부터 유래한다.
- [0517] 다양한 송달 시스템이 공지되어 있으며, 변이체 Fc 영역을 포함하는 본 발명의 분자(즉, 항체, 폴리펩티드)를 포함하는 조성물을 투여하는데 사용될 수 있고, 예를 들어 리포솜 캡슐화, 미소입자, 미소캡슐, 항체 또는 융합 단백질을 발현할 수 있는 재조합 세포, 수용체-매개 세포내이입(예를 들어, Wu 및 Wu, 1987, J. Biol. Chem. 262:4429-4432), 레트로바이러스 또는 다른 벡터의 일부분으로서 핵산의 구성 등이 있다. 본 발명의 분자의 투

여 방법은, 제한은 없지만, 비경구 투여(예를 들어, 피내, 근육내, 복강내, 정맥내 및 피하), 경막외 및 점막(예를 들어, 비강내 및 경구 경로)를 포함한다. 특정한 구체예에서, 본 발명의 분자는 근육내, 정맥내 또는 피하 경로로 투여된다. 조성물은 어떤 종래의 경로, 예를 들어 주입 또는 일시 주사에 의해, 상피 또는 점막피부 내층(예를 들어, 경구 점막, 직장 및 장 점막 등)을 통한 흡수에 의해 투여될 수 있고, 다른 생물학적 활성제와 함께 투여될 수 있다. 투여는 전신투여 또는 국소투여일 수 있다. 게다가, 폐 투여도 사용될 수 있는데, 예를 들어 흡입기 또는 분무기를 사용하여 그리고 에어로졸화제와 함께 조제하여 이용한다. 예를 들어, 미국특허 제 6,019,968호; 제5,985,320호;

[0518] 제5,985,309호; 제5,934,272호; 제5,874,064호; 제5,855,913호; 제5,290,540호; 및 제4,880,078호; 및 PCT 공보 WO 92/19244; WO 97/32572; WO 97/44013; WO 98/31346; 및 WO 99/66903을 참조하며, 이들 각각은 그 전체가 본원에 참고자료로서 포함된다.

[0519] 또한, 본 발명은 변이체 Fc 영역을 포함하는 본 발명의 분자(즉, 항체, 폴리펩티드)가 항체의 양을 나타낸 앰플 또는 사세와 같은 밀폐 밀봉 용기에 포장된 것을 제공한다. 한 구체예에서, 본 발명의 분자는 밀폐 밀봉 용기에 들어 있는 멸균 동결건조 가루 또는 물 무함유 농축물로서 공급되며, 피험자에게 투여하기 적합한 농도로, 예를 들어 물이나 식염수를 사용하여 복원된다. 바람직하게, 본 발명의 분자는 적어도 5mg, 더 바람직하게는 적어도 10 mg, 적어도 15 mg, 적어도 25 mg, 적어도 35 mg, 적어도 45 mg, 적어도 50 mg, 또는 적어도 75 mg의 단위 용량으로 밀폐 밀봉 용기 내에 멸균 동결건조 가루로 공급된다. 본 발명의 동결건조 분자는 원래 용기에 들은 채로 2 내지 8°C에서 보관되어야 하며, 이 분자는 복원된 후 12시간 이내, 바람직하게는 6시간 이내, 5시간 이내, 3시간 이내, 또는 1시간 이내에 투여되어야 한다. 다른 구체예에서, 본 발명의 분자는, 분자, 용합 단백질, 또는 콘주게이트 분자의 양과 농도를 나타낸 밀폐 밀봉 용기에 들은 액체 형태로 공급된다. 바람직하게, 본 발명의 분자의 액체 형태는 적어도 1 mg/ml, 더 바람직하게는 적어도 2.5 mg/ml, 적어도 5 mg/ml, 적어도 8 mg/ml, 적어도 10 mg/ml, 적어도 15 mg/kg, 적어도 25 mg/ml, 적어도 50 mg/ml, 적어도 100 mg/ml, 적어도 150 mg/ml, 적어도 200 mg/ml의 분자로 밀폐 밀봉 용기에 공급된다.

[0520] 장애와 관련된 하나 이상의 증상을 치료, 예방 또는 개선하는데 효과적인 본 발명의 조성물의 양은 표준 임상기술에 의해 결정될 수 있다. 제제에 사용되는 정확한 용량은 투여 경로, 및 상태의 심한 정도에 의존하며, 의사의 판단과 각 환자의 환경에 따라 결정되어야 한다. 효과적인 용량은 시험관내 또는 동물 모델 테스트 시스템으로부터 유도된 용량-반응 곡선으로부터 외삽될 수 있다.

[0521] 본 발명에 의해 포함되는 항체에 대하여, 환자에게 투여되는 용량은 전형적으로 0.0001 mg/kg 내지 100 mg/kg 환자 체중이다. 바람직하게는, 환자에게 투여되는 용량은 0.0001 mg/kg 내지 20 mg/kg, 0.0001 mg/kg 내지 10 mg/kg, 0.0001 mg/kg 내지 5 mg/kg, 0.0001 mg/kg 내지 2 mg/kg, 0.0001 mg/kg 내지 1 mg/kg, 0.0001 mg/kg 내지 0.75 mg/kg, 0.0001 mg/kg 내지 0.5 mg/kg, 0.0001 mg/kg 내지 0.25 mg/kg, 0.0001 mg/kg 내지 0.15 mg/kg, 0.0001 mg/kg 내지 0.10 mg/kg, 0.001 mg/kg 내지 0.5 mg/kg, 0.01 mg/kg 내지 0.25 mg/kg 또는 0.01 mg/kg 내지 0.10 mg/kg 환자 체중이다. 일반적으로는, 사람 항체가 외래 폴리펩티드에 대한 면역반응 때문에 다른 종으로부터 유래한 항체보다 사람의 체내에서 더 긴 반감기를 가진다. 따라서, 사람 항체는 더 낮은 용량과 덜 빈번한 투여가 가능하다. 더욱이, 본 발명의 항체 또는 그 단편의 용량과 투여 빈도는 지질화와 같은 변형에 의해 항체의 흡수 및 조직 침투를 향상시킴으로써 감소될 수 있다.

[0522] 한 구체예에서, 환자에게 투여되는 본 발명의 분자의 용량은 단일 제제 요법으로 사용했을 때 0.01 mg 내지 1000 mg/일이다. 다른 구체예에서, 본 발명의 분자는 다른 치료 조성물과 함께 사용될 수 있고, 환자에게 투여되는 용량은 상기 분자가 단일 제제 요법으로 사용되었을 때보다 더 낮은 것이다.

[0523] 특정한 구체예에서, 본 발명의 약학적 조성물은 치료가 필요한 부위에 국소적으로 투여하는 것이 바람직할 수 있는데, 이것은 예를 들어 국소 주입, 주사, 또는 이식물 수단에 의해서 달성될 수 있으며, 이들에 제한되는 것은 아니고, 상기 이식물은 다공성, 비-다공성, 또는 실라스틱 멤브레인 및 같은 멤브레인을 포함하는 젤라틴성 물질 또는 섬유이다. 바람직하게는, 본 발명의 분자를 투여할 때, 분자가 흡수되지 않는 재료를 사용하도록 주의해야 한다.

[0524] 다른 구체예에서, 조성물은 소포, 특히 리포솜으로 송달될 수 있다(Langer, Science 249:1527-1533(1990); Treat et al., Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer, Lopez-Berestein 및 Fidler(편저), Liss, New York, pp. 353-365 (1989); Lopez-Berestein, 상동, pp. 317-327; 일반적으로 상동 참조).

[0525] 다른 구체예에서, 조성물은 제어방출형 또는 지속방출형 시스템으로 송달될 수 있다. 당업자에게 공지된 어떤

기술을 사용하여 본 발명의 하나 이상의 분자를 포함하는 지속방출형 제제를 제조할 수 있다. 예를 들어 미국특허 제4,526,938호; PCT 공보 WO 91/05548; PCT 공보 WO 96/20698; Ning et al., 1996 "Intratumoral Radioimmunotherapy of a Human Colon Cancer Xenograft Using a Sustained-Release Gel", *Radiotherapy & Oncology* 39:179-189, Song et al., 1995, "Antibody Mediated Lung Targeting of Long-Circulating Emulsions", *PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology* 50:372-397; Cleek et al., 1997, "Biodegradable Polymeric Carriers for a bFGF Antibody for Cardiovascular Application", *Pro.Int'l.Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.* 24:853-854; 및 Lam et al., 1997, "Microencapsulation of Recombinant Humanized Monoclonal Antibody for Local Delivery", *Proc.Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater.* 24:759-760을 참조하며, 이들 각각은 그 전체가 참고자료로 본원에 포함된다. 다른 구체예에서, 중합체 재료를 이용하여 항체의 제어방출을 달성할 수 있다(예를 들어, *Medical Applications of Controlled Release*, Langer 및 Wise (편저), CRC Pres., Boca Raton, Florida (1974); *Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance*, Smolen and Ball (편저), Wiley, New York (1984); Ranger 및 Peppas, 1983, *J. Macromol. Sci. REv. Macromol. Chem.* 23:61 참조; 또, Levy et al., 1985, *Science* 228:190; During et al., 1989, *Ann. Neurol.* 25:351; Howard et al., 1989, *J. Neurosurg.* 71:105 참조; 미국특허 제5,679,377호; 미국특허 제5,916,597호; 미국특허 제5,912,015호; 미국특허 제5,989,463호; 미국특허 제5,128,326호; PCT 공보 WO 99/15154; 및 PCT 공보 WO 99/20253 참조). 지속방출형 제제에 사용되는 중합체의 예는, 제한은 없지만, 폴리(2-히드록시 에틸 메타크릴레이트), 폴리(메틸 메타크릴레이트), 폴리(아크릴산), 폴리(에틸렌-코-비닐 아세테이트), 폴리(메타크릴산), 폴리글리콜리드(PLG), 폴리무수물류, 폴리(N-비닐피롤리돈), 폴리(비닐알콜), 폴리(아크릴아미드), 폴리(에틸렌 글리콜), 폴리락티드류(PLA), 폴리(락티드-코-글리콜리드)(PLGA), 및 폴리오르토에스테르를 포함한다. 다른 구체예에서, 제어방출형 시스템은 치료 표적(예를 들어, 폐) 근처에 위치됨으로써 전신 용량의 일부만 필요할 수 있다(예를 들어, Goodson, *Medical Applications of Controlled Release*, 상동, vol. 2, pp. 115-138 (1984)). 다른 구체예에서, 제어방출형 이식물에 유용한 중합체 조성물은 Dunn et al.(U.S. 5,945,155 참조)에 따라서 사용된다. 이 특정한 방법은 중합체 시스템으로부터 생체활성 물질의 원위 치 제어방출의 치료적 효과에 기초한다. 이식은 일반적으로 치료가 필요한 환자의 신체의 어느 곳에서나 일어날 수 있다. 다른 구체예에서, 비-중합체 지속형 송달 시스템이 사용되며, 여기서는 피험자의 신체의 비-중합체 이식물이 약물 송달 시스템으로 사용된다. 신체의 이식시에, 이식물의 유기용매는 조성물로부터 주변 조직액으로 방산, 분산 또는 누출되고, 비-중합체 재료가 점차 응고 또는 침전되어 고체 미소다공성 매트릭스를 형성한다(U.S. 5,888,533 참조).

[0526] 제어방출형 시스템은 Langer(1990, *Science* 249:1527-1533)에서 논의된다. 당업자에게 공지된 어떤 기술을 이용하여 본 발명의 하나 이상의 치료제를 포함하는 지속방출형 제제를 제조할 수 있다. 예를 들어, 미국특허 제4,526,938호; 국제공보 WO 91/05548 및 WO 96/20698; 문헌(Ning et al., 1996, *Radiotherapy & Oncology* 39:179-189; Song et al., 1995, *PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology* 50:372-397; Cleek et al., 1997, *Pro. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.* 24: 853-854; 및 Lam et al., 1997, *Proc. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater.* 24: 759-760)을 참조하며, 이들 각각은 그 전체가 참고자료로 본원에 포함된다.

[0527] 본 발명의 조성물이 항체를 암호화하는 핵산인 특정 구체예에서, 적합한 핵산 발현 벡터의 일부분으로서 그것을 구성하고, 예를 들어 레트로바이러스 벡터(미국특허 제4,980,286호 참조)의 사용에 의해, 또는 직접 주사에 의해, 또는 미소입자 충격(예를 들어, 유전자 총; Biolistic, Dupont)의 사용에 의해, 또는 지질 또는 세포 표면 수용체 또는 트랜스펙팅 제제로의 코팅에 의해 그것을 투여하여 세포내에 위치시킴으로써, 또는 핵을 진입시킨다고 알려진 호메오박스-형 펩티드와 연결시켜 투여하는 것(예를 들어, Joliot et al., 1991, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:1864-1868 참조) 등에 의해, 핵산이 생체내 투여되어 암호화된 항체의 발현을 촉진한다. 또는 달리, 핵산은 상동성 재조합에 의해 세포내 도입되어 발현을 위한 숙주세포 DNA 안으로 통합된다.

[0528] 항체에 대하여, 피험자에게 투여되는 치료적 또는 예방적 유효량은 전형적으로 0.1 mg/kg 내지 200 mg/kg 피험자 체중이다. 바람직하게는, 피험자에게 투여되는 용량은 0.1 mg/kg 내지 20 mg/kg 피험자 체중이고, 더 바람직하게 피험자에게 투여되는 용량은 1 mg/kg 내지 10 mg/kg 피험자 체중이다. 본 발명의 항체의 투여 용량 및 빈도는 또한 지질화와 같은 변형에 의해 항체 또는 융합 단백질의 흡수 및 조직 침투(예를 들어 폐로의)를 향상시킴으로써 감소될 수 있다.

[0529] 본 발명의 분자의 치료적 또는 예방적 유효량을 사용한 피험자의 치료는 단일 치료를 포함할 수 있거나, 또는 바람직하게는 연속 치료를 포함할 수 있다. 바람직한 예로서, 피험자는 약 1 내지 10주, 바람직하게는 2 내지 8

주, 더 바람직하게는 약 3 내지 7주, 더욱더 바람직하게는 약 4, 5, 또는 6주 동안 매주 1회씩 약 0.1 내지 30mg/kg 체중 범위의 본 발명의 분자로 치료된다. 다른 구체예에서, 본 발명의 약학적 조성물은 1일 1회, 1일 2회, 또는 1일 3회 투여된다. 다른 구체예에서, 약학적 조성물은 매주 1회, 매주 2회, 2주마다 1회, 매월 1회, 6주마다 1회, 2개월마다 1회, 연 2회 또는 연 1회 투여된다. 또한, 치료에 사용되는 분자의 유효량은 특정 치료의 경과에 따라 증가 또는 감소될 수 있음이 인정될 것이다.

[0530] **5.6.1 약학적 조성물**

[0531] 본 발명의 조성물은 약학적 조성물의 제조에 유용한 벌크 약물 조성물(예를 들어, 순수하지 않은 또는 멸균되지 않은 조성물) 및 단위 제형의 제조에 사용될 수 있는 약학적 조성물(즉, 피험자나 환자에의 투여에 적합한 조성물)을 포함한다. 그러한 조성물은 예방적 또는 치료적 유효량의 본원에 개시된 예방 및/또는 치료 제제 또는 이들 제제와 약학적으로 허용되는 담체의 조합을 포함한다. 바람직하게, 본 발명의 조성물은 본 발명의 하나 이상의 분자의 예방적 또는 치료적 유효량과 약학적으로 허용되는 담체를 포함한다.

[0532] 한 특정한 구체예에서, 약학적 조성물은 변이체 Fc 영역을 포함하는 본 발명의 하나 이상의 분자의 치료적 유효량과 약학적으로 허용되는 담체를 포함하며, 여기서 상기 변이체 Fc 영역은 야생형 Fc 영역을 포함하는 비교 분자가 Fc γ RIIIA 및/또는 Fc γ RIIA와 결합하는 것보다 더 큰 친화력으로 Fc γ RIIIA 및/또는 Fc γ RIIA와 결합하고, 및/또는 상기 변이체 Fc 영역은 야생형 Fc 영역을 포함하는 비교 분자보다 적어도 2배 더 더 효과적으로 작동자 기능을 매개한다. 다른 구체예에서, 약학적 조성물은 변이체 Fc 영역을 포함하는 본 발명의 하나 이상의 분자의 치료적 유효량과 약학적으로 허용되는 담체를 포함하며, 여기서 상기 변이체 Fc 영역은 야생형 Fc 영역을 포함하는 비교 분자가 Fc γ RIIIA와 결합하는 것보다 더 큰 친화력으로 Fc γ RIIIA와 결합하고, 상기 변이체 Fc 영역은 야생형 Fc 영역을 포함하는 비교 분자가 Fc γ RIIB와 결합하는 것보다 더 낮은 친화력으로 Fc γ RIIB와 결합하고, 및/또는 상기 변이체 Fc 영역은 야생형 Fc 영역을 포함하는 비교 분자보다 적어도 2배 더 효과적으로 작동자 기능을 매개한다. 다른 구체예에서, 상기 약학적 조성물은 하나 이상의 항암제를 더 포함한다.

[0533] 또한, 본 발명은 본 발명에 따라서 측정했을 때 Fc 영역에 하나 이상의 아미노산 변형을 포함하는, 특정한 항원에 특이적인 치료 항체(예를 들어, 중앙 특이적 모노클로날 항체)와 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약학적 조성물을 포함한다.

[0534] 특정한 구체예에서, 용어 "약학적으로 허용되는"은 동물, 더 구체적으로는 사람의 사용에 대해 연방정부나 주 정부의 규제 기관에 의해 승인되거나, 미국 약전 또는 다른 일반적으로 인정된 약전에 등록된 것을 의미한다. 용어 "담체"는 이와 함께 치료제가 투여되는 희석제, 보강제(예를 들어, 프로인즈 보강제(완전 및 비완전)), 부형제, 또는 비히클을 말한다. 그러한 제약학적 담체는 멸균 액체, 예를 들어 물 및 낙화생유, 대두유, 미네랄오일, 참기름 등과 같은 석유, 동물, 식물 또는 합성 기원의 것들을 포함하는 기름일 수 있다. 약학적 조성물이 정맥내 투여될 때는 물이 바람직한 담체이다. 식염수 용액 및 수성 텍스트로스 및 글리세롤 용액이 특히 주사액을 위한 액체 담체로서 또한 사용될 수 있다. 적합한 제약학적 부형제는 녹말, 글루코스, 락토스, 수크로스, 젤라틴, 맥아, 쌀, 밀가루, 호분, 실리카겔, 나트륨 스테아레이트, 글리세롤 모노스테아레이트, 활석, 염화나트륨, 건조 탈지우유, 글리세롤, 프로필렌, 글리콜, 물, 에탄올 등을 포함한다. 원한다면 조성물은 또한 소량의 습윤제나 유화제, 또는 pH 완충제를 함유할 수 있다. 이들 조성물은 용액, 현탁액, 에멀전, 정제, 환약, 캡슐, 가루, 서방형 제제 등의 형태를 취할 수 있다.

[0535] 일반적으로 본 발명의 조성물의 성분은, 예를 들어 활성제의 양을 나타낸 앰플 또는 사세와 같은 밀폐 밀봉 용기에 들은 동결건조 가루 또는 물 무함유 농축물로서, 개별적으로 공급되거나 단위 제형으로 함께 혼합된 형태로 공급된다. 조성물이 주입에 의해 투여되어야 하는 경우에 그것은 멸균된 제약학적 등급의 물이나 식염수를 담은 주입병에 나누어 넣어질 수 있다. 조성물이 주사에 의해 투여되는 경우, 주사용 멸균수나 식염수의 앰플이 제공되며 성분들은 투여 전에 혼합될 수 있다.

[0536] 본 발명의 조성물은 중성 또는 염 형태로 조제될 수 있다. 약학적으로 허용되는 염은, 제한은 없지만, 염산, 인산, 아세트산, 옥살산, 타르타르산 등으로부터 유래된 것들과 같은 음이온과 함께 형성된 것들과 나트륨, 칼륨, 암모늄, 칼슘, 수산화철, 이소프로필아민, 트리에틸아민, 2-에틸아미노 에탄올, 히스티딘, 프로카인 등으로부터 유래된 것들과 같은 양이온과 함께 형성된 것들을 포함한다.

[0537] **5.6.2 유전자 요법**

[0538] 특정한 구체예에서, 본 발명의 분자를 암호화하는 서열을 포함하는 핵산이 유전자 요법의 방식으로 질환, 장애

또는 감염과 관련된 하나 이상의 증상의 치료, 예방 또는 개선을 위해 투여된다. 유전자 요법은 발현된 또는 발현가능한 핵산을 피험자에게 투여하는 것에 의해 수행되는 요법을 말한다. 본 발명의 이 구체예에서, 핵산은 치료 또는 예방 효과를 매개하는 암호화된 항체 또는 융합 단백질을 생산한다.

- [0539] 본 분야에서 이용가능한 유전자 요법의 방법 중 어느 것도 본 발명에 따라서 사용될 수 있다. 전형적인 방법들이 하기 설명된다.
- [0540] 유전자 요법의 방법에 대한 일반적인 리뷰는, 문헌(Goldspiel et al., 1993, Clinical Pharmacy 12:488-505; Wu 및 Wu, 1991 Biotherapy 3:87-95; Tolstoshev, 1993 Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32:573-596; Mulligan, Science 260:926-932(1993); 및 Morgan 및 Anderson, 1993, Ann. Rev. Biochem. 62:191-217; May, 1993, TIBTECH 11(5):155-215)를 참조하라. 본 분야에 통상적으로 공지된 방법인 재조합 DNA 기술이 사용될 수 있으며, 이것은 문헌(Ausubel et al. (편저) Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY (1993); 및 Kriegler, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY (1990))에 설명된다.
- [0541] 바람직한 양태에서, 본 발명의 조성물은 항체를 암호화하는 핵산을 포함하며, 상기 핵산은 적합한 숙주에서 항체를 발현하는 발현 벡터의 일부이다. 특히, 그러한 핵산은 프로모터, 바람직하게는 항체 코딩 영역과 작동가능하게 연결된 이중성 프로모터를 가지며, 상기 프로모터는 유도성이거나 구성성이고, 선택적으로는 조직-특이적이다. 다른 특정 구체예에서, 게놈의 원하는 부위에서 상동성 재조합을 촉진하는 영역이 항체 코딩 서열과 어떤 다른 바람직한 서열 측면에 위치한 핵산 분자가 사용되며, 이로써 항체 암호화 핵산의 염색체내 발현이 제공된다(Koller 및 Smithies, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:8932-8935; 및 Zijlstra et al., 1989, Nature 342:435-438).
- [0542] 다른 바람직한 양태에서, 본 발명의 조성물은 융합 단백질을 암호화하는 핵산을 포함하며, 상기 핵산은 적합한 숙주에서 융합 단백질을 발현하는 발현 벡터의 일부이다. 특히, 그러한 핵산은 프로모터, 바람직하게는 융합 단백질 코딩 영역과 작동가능하게 연결된 이중성 프로모터를 가지며, 상기 프로모터는 유도성이거나 구성성이고, 선택적으로는 조직-특이적이다. 다른 특정 구체예에서, 게놈의 원하는 부위에서 상동성 재조합을 촉진하는 영역이 융합 단백질 코딩 서열과 어떤 다른 바람직한 서열 측면에 위치한 핵산 분자가 사용되며, 이로써 융합 단백질의 염색체내 발현이 제공된다.
- [0543] 피험자로의 핵산의 송달은 직접적으로 이루어지거나 간접적으로 이루어질 수 있는데, 직접 송달은 피험자가 핵산 또는 핵산을 지닌 벡터에 직접 노출되는 경우이고, 간접 송달은 시험관내에서 세포가 먼저 핵산으로 형질전환되고, 그 다음 피험자에게 이식되는 경우이다. 이들 두 접근법은 각각 생체내 또는 생체의 유전자 요법으로서 공지되어 있다.
- [0544] 특정 구체예에서, 핵산 서열이 직접 생체내 투여되는데, 이 경우 핵산 서열이 발현되어 암호화된 산물을 생성한다. 이것은 본 분야에 공지된 수많은 방법 중 어느 것에 의해서, 예를 들어 적합한 핵산 발현 벡터의 일부분으로서 서열을 구성하고, 예를 들어 결합 있는 또는 감독된 레트로바이러스 벡터 또는 다른 바이러스 벡터(미국특허 제4,980,286호 참조)의 사용에 의해, 또는 네이키드 DNA의 직접 주사에 의해, 또는 미소입자 충격(예를 들어, 유전자 총; Biolistic, Dupont)의 사용에 의해, 또는 지질 또는 세포표면 수용체 또는 트랜스펙팅 제제로의 코팅에 의해, 리포솜에 의한 캡슐화, 미소입자, 또는 미소캡슐에 의해 그것을 투여하여 세포내에 위치시킴으로써, 또는 핵을 진입시킨다고 알려진 펩티드와 연결시켜 투여하는 것, 수용체-매개 세포내이입 리간드를 연결하여 투여하는 것(예를 들어, Wu 및 Wu, J. Biol. Chem. 262:4429-4432, 1987 참조)(이것은 수용체를 특이적으로 발현하는 세포 종류를 표적화하는데 사용될 수 있다) 등에 의해서 달성될 수 있다. 다른 구체예에서, 리간드가 엔도솜을 파괴하는 용해성 바이러스 펩티드를 포함하는 핵산-리간드 복합체가 형성될 수 있으며, 이것은 핵산이 리포솜 변성을 피할 수 있도록 한다. 또 다른 구체예에서, 핵산은 특이적 수용체를 표적화함으로써 세포 특이적 흡수 및 발현을 위해 생체내 표적화될 수 있다(예를 들어, PCT 공보 WO 92/06180; WO 92/22635; WO 92/20316; WO 93/14188; WO 93/20221 참조). 또는 달리, 핵산은 상동성 재조합에 의해서 세포내 도입되어 발현을 위한 숙주 세포 DNA 내로 통합될 수 있다(Koller 및 Smithies, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:8932-8935; 및 Zijlstra et al., 1989, Nature 342:435-438).
- [0545] 특정 구체예에서, 본 발명의 분자(예를 들어, 항체 또는 융합 단백질)을 암호화하는 핵산 서열을 함유하는 바이러스 벡터가 사용된다. 예를 들어, 레트로바이러스 벡터가 사용될 수 있다(Miller et al., 1993, Meth. Enzymol. 217:581-599). 이들 레트로바이러스 벡터는 바이러스 게놈의 정확한 패키징 및 숙주세포 DNA로의 통합에 필요한 성분들을 함유한다. 유전자 요법에 사용되는 항체 또는 융합 단백질을 암호화하는 핵산 서열은 하나

이상의 벡터로 클로닝되며, 이것은 피험자로서의 뉴클레오타이드 서열의 송달을 용이하게 한다. 레트로바이러스 벡터에 대한 더욱 상세한 사항은 Boesen et al.(1994, *Biotherapy* 6:291-302)에서 찾을 수 있는데, 이것은 조혈 줄기세포로 *mdr 1* 유전자를 송달하여 줄기세포를 화학요법에 대해 더욱 내성으로 만들기 위한 레트로바이러스 벡터의 사용을 설명한다. 유전자 요법에서 레트로바이러스 벡터의 사용을 예시하고 있는 다른 참고문헌은 Clowes et al., 1994, *J. Clin. Invest.* 93:644-651; Klein et al., 1994, *Blood* 83:1467-1473; Salmons 및 Gunzberg, 1993, *Human Gene Therapy* 4:129-141; 및 Grossman 및 Wilson, 1993, *Curr. Opin. Genetics and Devel.* 3:110-114가 있다.

[0546] 아데노바이러스가 유전자 요법에 사용될 수 있는 다른 바이러스 벡터이다. 아데노바이러스는 호흡기 상피로 유전자를 송달하기 위한 특히 매력적인 비히클이다. 아데노바이러스는 호흡기 상피를 자연적으로 감염시키며 거기서 이들은 가벼운 질환을 일으킨다. 아데노바이러스-기반 송달 시스템의 다른 표적은 간, 중추신경계, 내피세포 및 근육이다. 아데노바이러스는 비분할 세포를 감염시킬 수 있다는 장점이 있다. Kozarsky 및 Wilson, *Current Opinion in Genetics and Development* 3:499-503, 1993이 아데노바이러스-기반 유전자 요법을 고찰하고 있다. Bout et al., *Human Gene Therapy*, 5:3-10, 1994는 아데노바이러스 벡터를 사용하여 붉은털 원숭이의 호흡기 상피로 유전자를 전달하는 것을 증명했다. 유전자 요법에서 아데노바이러스를 사용하는 다른 예들은 Rosenfeld et al., 1991, *Science* 252:431-434; Rosenfeld et al., 1992, *Cell* 68:143-155; Mastrangeli et al., 1993, *J. Clin. Invest.* 91:225234; PCT 공보 WO 94/12649; 및 Wang et al., 1995, *Gene Therapy* 2:775-783에서 찾을 수 있다. 바람직한 구체예에서 아데노바이러스 벡터가 사용된다.

[0547] 아데노-관련 바이러스(AAV)가 또한 유전자 요법에서 사용하도록 제안되었다(예를 들어, Walsh et al., 1993, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 204:289-300 및 미국특허 제5,436,146호 참조).

[0548] 유전자 요법에 대한 다른 접근법은 전기천공, 리포펙션, 인산칼슘 매개 트랜스펙션, 또는 바이러스 감염과 같은 방법에 의해 조직 배양물 중에서 세포로 유전자를 전달하는 것을 포함한다. 통상, 전달 방법은 세포에 대한 선택성 마커의 전달을 포함한다. 다음에, 세포를 선택하여 전달된 유전자를 흡수한 이 유전자를 발현하는 세포를 분리한다. 다음에, 이들 세포를 피험자에게 송달한다.

[0549] 이 구체예에서, 핵산은 생성된 재조합 세포의 생체내 투여 전에 세포로 도입된다. 그러한 도입은 제한은 없지만 트랜스펙션, 전기천공, 미소주사, 핵산 서열을 함유하는 바이러스 또는 박테리오파지 벡터를 사용한 감염, 세포 융합, 염색체-매개 유전자 전달, 미소세포-매개 유전자 전달, 세포벽불완전제거균 융합 등을 포함하는 본 분야에 공지된 어떤 방법에 의해 수행될 수 있다. 세포로 외래 유전자를 도입하는 많은 기술이 본 분야에 공지되어 있고(예를 들어, Loeffler 및 Behr, 1993, *Meth. Enzymol.* 217:599-618, Cohen et al., 1993, *Meth. Enzymol.* 217-618-644; 및 *Clin. Pharma. Ther.* 29:69-92, 1985 참조), 본 발명에 따라서 사용될 수 있으나, 단 수용 세포의 필수 발생적 및 생리학적 기능은 파괴되지 않는다. 이 기술은 세포로의 핵산의 안전한 전달을 제공해야 하며, 이로써 핵산은 세포에 의해 발현될 수 있고, 바람직하게는 세포 자손에 의해 유전되어 발현될 수 있다.

[0550] 생성된 재조합 세포는 본 분야에 공지된 다양한 방법에 의해 피험자에게 송달될 수 있다. 재조합 혈액 세포(예를 들어, 조혈줄기세포 또는 선조세포)가 바람직하게 정맥내 투여된다. 사용이 계획되는 세포의 양은 원하는 효과, 환자상태 등에 의존하며, 당업자에 의해 결정될 수 있다.

[0551] 유전자 요법의 목적을 위해 핵산이 도입될 수 있는 세포는 어떤 바람직한 이용가능한 세포 타입을 포함하며, 제한은 없지만 상피세포, 내피세포, 각질세포, 섬유모세포, 근육세포, 간세포; T 림프구, B 림프구, 단구, 대식세포, 호중구, 호산구, 거대핵세포, 과립구와 같은 혈액 세포; 다양한 줄기 또는 선조 세포, 특히 골수, 제대혈, 말초혈, 태아 간으로부터 얻어지는 조혈줄기세포 또는 선조세포 등을 포함한다.

[0552] 바람직한 구체예에서, 유전자 요법에 사용되는 세포는 피험자에 자가이식성일 수 있다.

[0553] 유전자 요법에 재조합 세포가 사용되는 구체예에서, 항체 또는 융합 단백질을 암호화하는 핵산 서열이 세포로 도입되며, 이로써 이들은 세포 또는 그 자손에 의해 발현되고, 그 후 재조합 세포가 치료 효과를 위해 생체내 투여된다. 특정 구체예에서, 줄기 또는 선조 세포가 사용된다. 분리되어 생체내 유지될 수 있는 어떤 줄기 및/또는 선조 세포가 본 발명의 이 구체예에 따라서 잠재적으로 사용될 수 있다(예를 들어, PCT 공보 WO 94/08598; Stemple 및 Anderson, 1992, *Cell* 71:973-985; Rheinwald, 1980, *Meth. Cell Bio.* 21A:229; 및 Pittelkow 및 Scott, 1986, *Mayo Clinic Proc.* 61:771 참조).

[0554] 특정 구체예에서, 유전자 요법의 목적을 위해 도입되는 핵산은 코딩 영역에 작동가능하게 연결된 유도성 프로모터를 포함함으로써 핵산의 발현이 적합한 전사 유도인자의 존재 또는 부재하에 제어됨으로써 제어될 수 있다.

[0555] 5.6.3 키트

[0556] 본 발명은 본 발명의 분자(즉, 변이체 Fc 영역을 포함하는 항체, 폴리펩티드)로 채워진 하나 이상의 용기를 포함하는 제약학적 팩 또는 키트를 제공한다. 추가로, 질환의 치료에 유용한 하나 이상의 다른 예방적 또는 치료적 제제가 제약학적 팩 또는 키트에 또 포함될 수 있다. 또한, 본 발명은 본 발명의 약학적 조성물의 성분들 중 하나 이상으로 채워진 하나 이상의 용기를 포함하는 제약학적 팩 또는 키트를 제공한다. 선택적으로, 그러한 용기(들)에 관련된 제약 또는 생물학적 제품의 제조, 사용 또는 판매를 통제하는 정부기관에 의해 규정된 형태의 통지가 있을 수 있으며, 이 통지는 사람 투여를 위한 제조, 사용 또는 판매에 대한 기관에 의한 승인을 반영한다.

[0557] 본 발명은 상기 방법에 사용될 수 있는 키트를 제공한다. 한 구체예에서 키트는 본 발명의 하나 이상의 분자를 포함한다. 다른 구체예에서, 키트는 하나 이상의 용기에 암 치료에 유용한 하나 이상의 다른 예방적 또는 치료적 제제를 더 포함한다. 다른 구체예에서, 키트는 암과 관련된 하나 이상의 암 항원에 결합하는 하나 이상의 세포독성 항체를 더 포함한다. 일부 구체예에서 다른 예방적 또는 치료적 제제는 화학치료제이다. 다른 구체예에서, 예방적 또는 치료적 제제는 생물학적 또는 호르몬 치료제이다.

[0558] 5.7 치료적 유용성의 특성화 및 증명

[0559] 본 발명의 약학적 조성물, 예방적, 또는 치료적 제제의 몇몇 양태가 바람직하게 사람에게 사용하기 전에 원하는 치료 활성에 대해 시험관내, 세포 배양 시스템, 및 설치류 동물 모델 시스템과 같은 동물 모델 생물에서 시험된다. 예를 들어, 특정한 약학적 조성물의 투여가 바람직한지를 결정하기 위해 사용될 수 있는 분석은 세포 배양 분석을 포함하며, 여기서는 환자 조직 샘플이 배양물에서 성장되고, 본 발명의 약학적 조성물에 노출되거나 접촉되고, 조직 샘플에 대한 그러한 조성물의 효과가 관찰된다. 조직 샘플은 환자로부터 생체검사에 의해서 얻어질 수 있다. 이 시험은 각 개별 환자에 대한 치료적으로 가장 효과적인 예방적 또는 치료적 분자(들)의 확인을 허용한다. 다양한 특정 구체예에서, 시험관내 분석은 자가면역 또는 염증성 장애에 연관된 세포 타입의 대표적인 세포(예를 들어, T 세포)를 사용하여 수행될 수 있으며, 이로써 본 발명의 약학적 조성물이 그러한 세포 타입에 대해 바람직한 효과를 가지는지를 결정한다.

[0560] 예방적 및/또는 치료적 제제의 조합이 사람에게 사용되기 전에 적합한 동물 모델 시스템에서 시험될 수 있다. 그러한 동물 모델 시스템은, 제한은 없지만 래트, 마우스, 닭, 소, 원숭이, 돼지, 개, 토끼 등을 포함한다. 본 분야에 공지된 어떤 동물 시스템도 사용될 수 있다. 본 발명의 특정 구체예에서, 예방적 및/또는 치료적 제제의 조합이 마우스 모델 시스템에서 시험된다. 그러한 모델 시스템은 널리 사용되고 있고 당업자에게 잘 공지되어 있다. 예방적 및/또는 치료적 제제는 반복 투여될 수 있다. 이 과정의 몇몇 양태는 변할 수 있다. 상기 양태는 예방적 및/또는 치료적 제제를 투여하는 시간에 따른 섭생과, 그러한 제제들이 개별적으로 또는 혼합물로서 투여되는지의 여부를 포함한다.

[0561] 본 발명의 방법에서 사용되는 바람직한 동물 모델은, 예를 들어 마우스 작동자 세포에서 사람 Fc γ R을 발현하는 트랜스젠 마우스가며, 예를 들어 U.S. 5,877,396 (본원에 그 전체가 참고자료로 포함됨)에 설명된 어떤 마우스 모델이 본 발명에서 사용될 수 있다. 본 발명의 방법에서 사용되는 트랜스젠 마우스는, 제한은 없지만 사람 Fc γ RIIIa를 지닌 마우스, 사람 Fc γ RIIa를 지닌 마우스, 사람 Fc γ RIIB 및 사람 Fc γ RIIIa를 지닌 마우스, 사람 Fc γ RIIB 및 사람 Fc γ RIIa를 지닌 마우스를 포함한다.

[0562] 바람직하게는, 상기 설명된 기능 분석에서 최고 수준의 활성을 나타내는 돌연변이가 사람에게 사용하기 전에 동물 모델 연구에서 사용이 시험될 것이다. 2 개의 항-Erb-B2 항체 ch4D5 및 ch520C9, 및 항-TAG72 항체 chCC49를 포함하는 본 발명의 방법에서 사용하려고 확인되고 ADCC 분석으로 확인된 Fc 돌연변이를 숨긴 항체가 이들이 이중이식 동물 모델에서 이미 사용된 적이 있으므로 동물 모델에서 사용하는데 바람직하다(Hudsiak et al., 1989, Mol. Cell. Biol. 9:1165-72; Lewis et al., 1993, Cancer Immunol. Immunother. 37:255-63; Bergman et al., 2001 Clin. Cancer Res. 7: 2050-6; Johnson et al., 1995, Anticancer Res. 1387-93). 충분한 양의 항체가 상기 설명된 방법을 사용하여, 예를 들어 본원에 개시되고 예시된 포유동물 발현 시스템 및 IgG 정제 방법을 사용하여 동물 모델에서 사용하기 위해 제조될 수 있다. 전형적인 실험에는 적어도 약 5.4 mg의 돌연변이 항체가 필요하다. 이 계산은 4 μ g/g의 로딩 용량 및 10주 동안 매주 2 μ g/g의 유지 용량을 따르는 8-10 마리의 30 g 마우스를 예방하는데 필요한 야생형 항체의 평균 양에 기초한 것이다. 본 발명은 유방 선암종을 가진 환자로부터 유래된 SK-BR-3, BT474 및 HT29와 같은 이중이식 종양의 공급원인 종양 세포주를 포함한다. 이들 세포는 표면에 Erb-B2와 프로락틴 수용체를 모두 가진다. SK-BR-3 세포는 ADCC 및 이중이식 종양 모델로서 모두 성공적으로 사용되었다. 다른 분석에서, 사람 난소 선암종으로부터 유래된 OVCAR3 세포가 사용될 수 있다. 이들 세포

는 세포 표면에서 항원 TAG72를 발현하며, chCC49 항체와 함께 사용될 수 있다. 상이한 항체들 및 다수의 종양 모델의 사용은 항체 특이적 Fc 돌연변이 부적합으로 인한 어떤 특이적 돌연변이의 손실을 피할 것이다.

[0563] 마우스 이종이식 모델은 항체 분자의 CDR 영역의 친화력 및 특이성과 면역반응을 도출하는 항체의 Fc 영역의 능력에 기초하여 종양 특이적 표적에 대해 생긴 마우스 항체의 효능을 시험하는데 사용될 수 있다(Wu et al., 2001 Trends Cell Biol. 11: S2-9). 마우스 작동자 세포에서 사람 Fc γ R을 발현하는 트랜스젠 마우스는 유일하며, 사람 Fc-Fc γ R 상호작용의 효능을 시험하기 위해 맞춤형 제작된 동물 모델이다. 하기 표 11에 기재된 것들과 같은, Jeffrey Ravetch 박사(Rockefeller U.과 Sloan Kettering Cancer center의 실시 계약을 통하여)의 실험실에서 생성된 Fc γ RIIA, Fc γ RIIB 및 Fc γ RIIA 트랜스젠 마우스 계통의 쌍이 사용될 수 있다.

표 11

마우스 군주

군주 설명	사람 FcR
누드 /CD16A KO	없음
누드 /CD16A KO	Fc γ RIIA
누드 /CD16A KO	Fc γ R IIA
누드 /CD16A KO	Fc γ R IIA 및 IIA
누드 /CD32B KO	없음
누드 /CD32B KO	Fc γ R IIB

[0564]

[0565] 바람직하게는, ADCC 및 포식작용 분석에서 증가된 활성인, Fc γ RIIA와의 향상된 결합 및 Fc γ RIIB와의 감소된 결합을 모두 나타내는 Fc 돌연변이를 동물 모델 실험에서 시험한다. 동물 모델 실험은 자생 항체를 투여한 대조군과 비교하여 Fc γ RIIA 트랜스젠 누드 mCD16A 녹아웃 마우스에서 Fc 돌연변이를 지닌 항체의 효능의 증가를 시험한다. 바람직하게, 8-10 마리 마우스의 군이 표준 프로토콜을 사용하여 시험된다. 전형적인 동물 모델 실험은 다음 단계들을 포함할 수 있다: 유방암 모델에서, $\sim 2 \times 10^6$ SK-BR-3 세포가 Matrigel(Becton Dickinson)과 혼합된 0.1 mL PBS와 함께 1일째에 피하 주사된다. 초기에, 야생형 키메라 항체 및 이소타입 대조군을 투여하여 정해진 치료 용량에 대한 곡선을 작성하는데, 1일째에 4D5의 정맥내 주사는 4 μ g/g의 초기 용량을 사용하고 이어서 매주 2 μ g/g를 주사한다. 종양 부피를 6-8 주간 모니터링하여 질환의 진행을 측정한다. 반면에, 매우 적은 종양 성장이 4D5 주사 군에서 발생해야 한다. 표준 용량 연구의 결과를 사용하여 Fc 돌연변이를 시험하는 실험에 대한 상한을 설정한다. 이들 연구는 Fc 돌연변이 함유 항체의 치료 용량 이하를 사용하여 행한다. Fc γ RIIB 녹아웃 마우스에서 행해진 실험에서 이종이식 모델에 대해 1/10 용량을 사용했는데(Clynes et al., 2000, Nat. Med. 6:443-6 참조), 그 결과 종양 세포 성장은 차단되었다. 본 발명의 돌연변이는 바람직하게는 Fc γ RIIA 활성화 증가 및 Fc γ RIIB 결합 감소를 나타내므로, 이 돌연변이는 1/10 치료 용량으로 시험된다. 상이한 간격으로 종양 크기를 시험한 것은 더 낮은 용량에서의 항체의 효능을 나타낸다. t 테스트를 이용한 데이터의 통계적 분석은 데이터가 유의한지를 결정하는 방식을 제공한다. 증가된 효능을 나타내는 Fc 돌연변이를 용량을 점점 감소시키면서 시험하여 이들의 효능이 측정되는 최소 가능한 용량을 결정한다.

[0566] 본 발명의 조합 요법의 항-염증성 활성이 본 분야에 공지된 염증성 관절염의 다양한 실험 동물 모델을 이용하여 결정될 수 있으며, 이것은 문헌(Crofford L. J. 및 Wilder R. L. "Arthritis and Autoimmunity in Animals", Arthritis and Allied Conditions: A Textbook of Rheumatology, McCarty 등 (편저), Chapter 30(Lee and Febiger, 1993))에 설명된다. 또한, 염증성 관절염 및 자가면역 류마티스성 질환의 실험 및 자발적 동물 모델을 이용하여 본 발명의 조합 요법의 항-염증성 활성을 평가할 수 있다. 다음에 어떤 분석들이 예로서 제공되나, 이들에 제한되는 것은 아니다.

[0567] 본 분야에 공지되고 널리 사용되는 관절염 또는 염증성 질환에 대한 원칙적 동물 모델은 보강제-유발 관절염 래트 모델, 콜라겐-유발 관절염 래트 모델 및 마우스 모델 및 항원-유발 관절염 래트, 토끼 및 햄스터 모델을 포함하며, 이들은 모두 본원에 참고자료로 그 전체가 포함되는 Crofford L.J. 및 Wilder R. L. "Arthritis and Autoimmunity in Animals", Arthritis and Allied Conditions: A Textbook of Rheumatology, McCarty 등 (편저), Chapter 30(Lee and Febiger, 1993)에 설명된다.

[0568] 본 발명의 조합 요법의 항-염증성 활성은 카라게닌-유발 관절염 래트 모델을 이용하여 평가될 수 있다. 카라게닌-유발 관절염은 또한 만성 관절염 또는 염증의 연구에서 토끼, 개 및 돼지에서 사용되었다. 정량적 조직계측학적 평가를 이용하여 치료 효능을 측정한다. 그러한 카라게닌-유발 관절염 모델을 사용하는 방법은 Hansra P. 등 "Carrageenan-Induced Arthritis in the Rat, "Inflammation, 24(2): 141-155 (2000)에 설명된다. 또한,

본 분야에 공지되고 설명된 치모산-유발 염증 동물 모델이 통상적으로 사용된다.

- [0569] 본 발명의 조합 요법의 항-염증성 활성은 래트에서 카라게닌-유발 발 부종의 저해를 측정함으로써 평가될 수 있으며, 이것은 문헌(Winter C. A. et al., "Carrageenan-Induced Edema in Hind Paw of the Rat as an Assay for Anti-Inflammatory Drugs" Proc. Soc. Exp. Biol Med. 111, 544-547(1962))에 설명된 방법의 변형을 이용한다. 이 분석은 대부분의 NSAID의 항-염증성 활성에 대한 1차 생체내 스크리닝으로서 사용되었으며, 사람에 대한 효능을 예측한다고 여겨진다. 시험된 예방적 또는 치료적 제제의 항-염증성 활성은 비히클을 투약한 대조군과 비교하여 시험군의 뒷발 중량의 증가에 대한 억제 %로서 나타낸다.
- [0570] 추가로, 염증성 장질환의 동물 모델을 사용하여 본 발명의 조합 요법의 효능을 평가할 수 있다(Kim et al., 1992, Scand. J. Gastroenterol. 27:529-537; Strober, 1985, Dig. Dis. Sci. 30(12 Suppl): 3S-10S). 궤양성 결장염 및 크론병이 동물에서 유발될 수 있는 사람의 염증성 장질환이다. 제한은 없지만, 아밀로펙틴, 카라겐, 아밀로펙틴 술페이트, 및 텍스트란 술페이트를 포함하는 술페이트화된 다당류 또는 제한은 없지만, 트리니트로벤젠술포산(TNBS) 및 아세트산을 포함하는 화학적 자극제를 동물에게 경구 투여하여 염증성 장질환을 유발시킬 수 있다.
- [0571] 또한, 자가면역 장애의 동물 모델을 사용하여 본 발명의 조합 요법의 효능을 평가할 수 있다. 1형 당뇨병, 갑상선 자가면역성, 전신성 홍반성 루푸스, 및 사구체신염과 같은 자가면역 장애의 동물 모델이 개발되었다(Flanders et al., 1999, Auto-immunity 29:235-246; Krogh et al., 1999, Biochimie 81:511-515; Foster 1999, Semin. Nephrol. 19:12-24).
- [0572] 더 나아가, 본 분야에 공지된 어떤 분석도 자가면역 및/또는 염증성 질환을 위해 본원에 개시된 조합 요법의 예방적 및/또는 치료적 유용성을 평가하는데 사용될 수 있다.
- [0573] 본 발명의 예방적 및/또는 치료적 프로토콜의 독성 및 효능은 세포 배양 또는 실험 동물에서 표준 제약학적 과정에 의해, 예를 들어 LD₅₀(집단의 50%에서 치사 용량) 및 ED₅₀(집단의 50%에서 치료적으로 효과적인 용량)를 측정하여 측정될 수 있다. 독성 효과와 치료 효과 간의 용량 비가 치료 지수이며, 이것은 LD₅₀/ED₅₀ 비로 표현될 수 있다. 더 큰 치료 지수를 나타내는 예방적 및/또는 치료적 제제가 바람직하다. 독성 부작용을 나타내는 예방적 및/또는 치료적 제제가 사용될 수도 있지만, 감염되지 않은 세포에 대한 잠재적 손상을 최소화함으로써 부작용을 줄이기 위해서 그러한 제제를 질환 조직의 부위로 표적화하는 송달 시스템의 설계에 주의를 기울여야 한다.
- [0574] 세포 배양 분석 및 동물 연구로부터 얻어진 데이터는 사람에게 사용하기 위한 예방적 및/또는 치료적 제제의 용량 범위를 처방하는데 사용될 수 있다. 그러한 제제의 용량은 바람직하게는 독성이 거의 또는 전혀 없는 ED₅₀을 포함하는 혈중 농도의 범위 내이다. 용량은 사용된 제형 및 이용된 투여 경로에 의존하여 이 범위 내에서 변할 수 있다. 본 발명의 방법에서 사용되는 어떤 제제에 대하여, 치료적으로 효과적인 용량은 세포 배양 분석으로부터 초기에 추정될 수 있다. 용량은 세포 배양에서 측정된 IC₅₀(즉, 증상의 최대-반 억제를 달성하는 시험 화합물의 농도)를 포함하는 혈중 혈장 농도 범위를 달성하도록 동물 모델에서 처방될 수 있다. 그러한 정보를 사용하여 사람에서의 유용한 용량을 더욱 정확하게 결정할 수 있다. 혈장 내 수준은, 예를 들어 고성능 액체 크로마토그래피에 의해 측정될 수 있다.
- [0575] 또한, 본 발명에 따라서 사용되는 치료요법의 항암 활성이, 사람 이종이식편을 갖는 SCID 마우스 모델 또는 트랜스젠 마우스 또는 누드 마우스와 같은, 암 연구를 위한 다양한 실험 동물 모델을 이용하여 측정될 수 있는데, 이들은 햄스터, 토끼 등의 동물 모델로서 본 분야에 공지되어 있고, Relevance of Tumor Models for Anti-cancer Drug Development(1999, 편저, Fiebig 및 Burger); Contributions to Oncology(1999, Karger); The Nude Mouse in Oncology Research(1999, 편저, Boven 및 Winograd); 및 Anticancer Drug Development Guide(1997, 편저, Teicher)에 설명되며, 이들은 모두 본원에 참고자료로 포함된다.
- [0576] 본 발명의 분자의 치료 효능을 측정하는데 바람직한 동물 모델은 마우스 이종이식 모델이다. 이종이식 종양의 공급원으로서 사용될 수 있는 종양 세포주는, 제한은 없지만 유방 선암종을 가진 환자로부터 유래될 수 있는 SKBR3 및 MCF7 세포를 포함한다. 이들 세포는 erbB2와 프로락틴 수용체를 모두 가진다. SKBR3 세포는 본 분야에서 ADCC 및 이종이식 종양 모델로서 통상 사용되고 있다. 또는 달리, 사람 난소 선암종으로부터 유래된 OVCAR3 세포가 이종이식 종양의 공급원으로서 사용될 수 있다.
- [0577] 본 발명의 프로토콜 및 조성물은 바람직하게는 사람에게 사용하기 전에 원하는 치료적 또는 예방적 활성에 대해서 시험관내 시험되고 그 후 생체내 시험된다. 치료제 및 방법은 종양 또는 악성 세포주의 세포를 사용하여 스

크리닝될 수 있다. 본 분야의 많은 분석 표준을 사용하여 그러한 생존 및/또는 성장을 평가하는데, 예를 들어 세포 증식은 ^3H -티미딘 결합 측정, 직접 세포 계수, 원발암유전자(예를 들어, fos, myc)와 같은 기지의 유전자 또는 세포 사이클 마커의 전사 활성의 변화를 검출함으로써 평가될 수 있고; 세포 생육성은 트립판 블루 염색에 의해 평가될 수 있고; 분화는 형태의 변화, 소프트 아가에서 성장 및/또는 콜로니 형성의 감소, 또는 3차원 기부 멤브레인 또는 세포외 매트릭스 제제 등에서 관상 망구조의 형성에 의하여 육안 평가될 수 있다.

[0578] 치료요법에 사용되는 화합물은 사람에게 시험되기 전에 적합한 동물 모델 시스템에서 시험될 수 있는데, 이들 동물은 제한은 없지만 래트, 마우스, 닭, 소, 원숭이, 토끼, 햄스터 등을 포함하며, 예를 들어 상기 설명된 동물 모델이다. 화합물은 그 다음 적합한 임상 시험에 사용될 수 있다.

[0579] 나아가, 당업자에게 공지된 어떠한 분석이라도 사용하여 암, 염증성 장애, 또는 자가면역 질환의 치료 또는 예방을 위한 본원에 개시된 조합 요법의 예방적 및/또는 치료적 유용성을 평가할 수 있다.

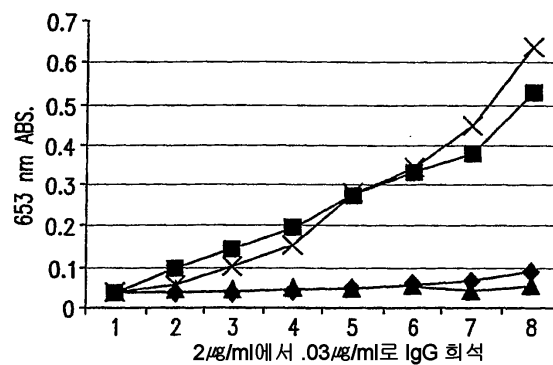
도면

도면1

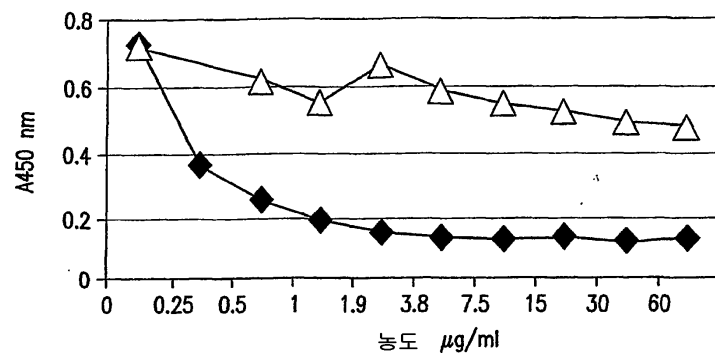


FIG.1

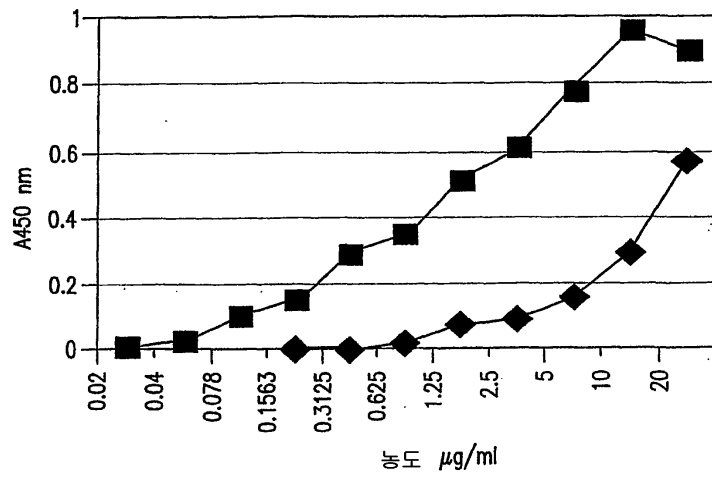
도면2



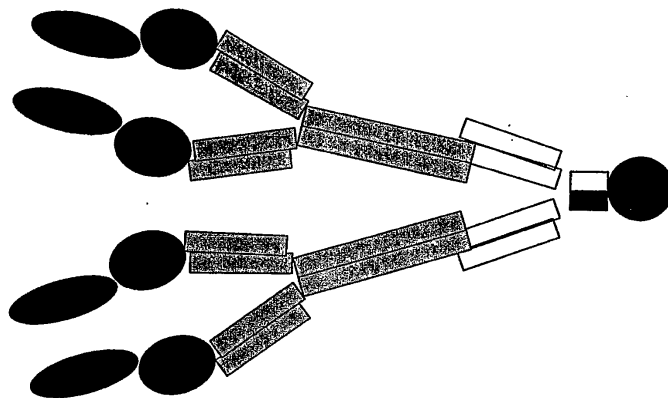
도면3A



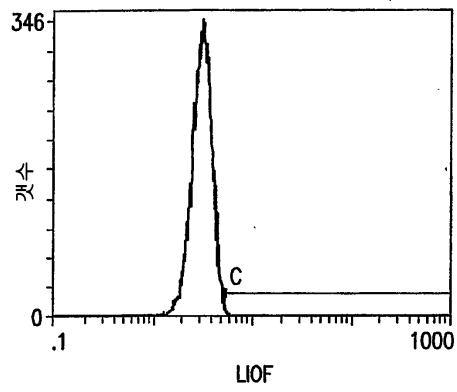
도면3B



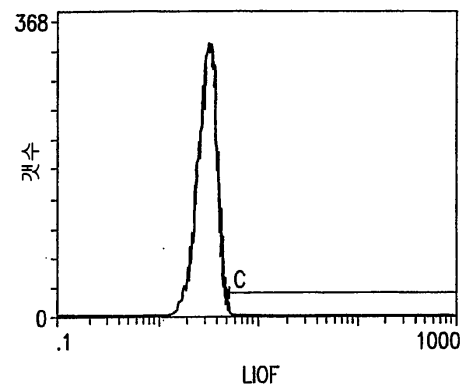
도면4A



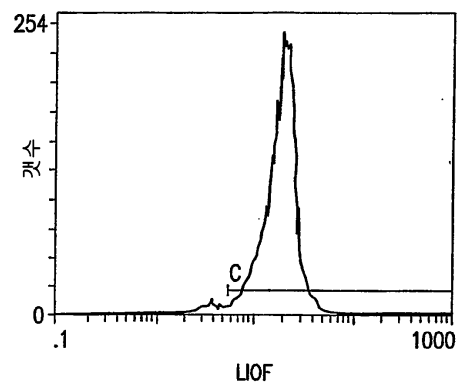
도면4BA



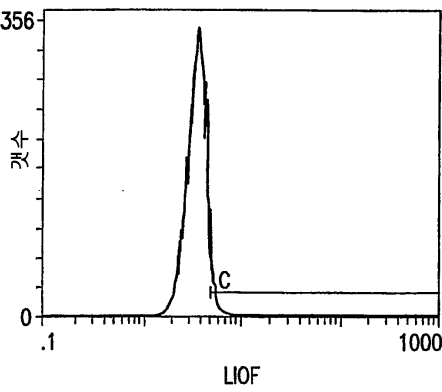
도면4BB



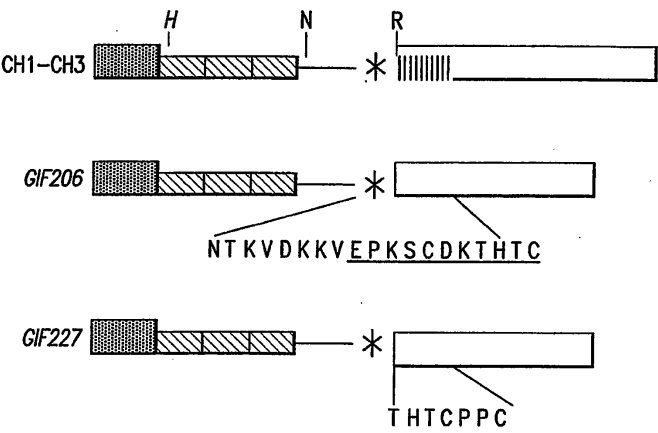
도면4BC



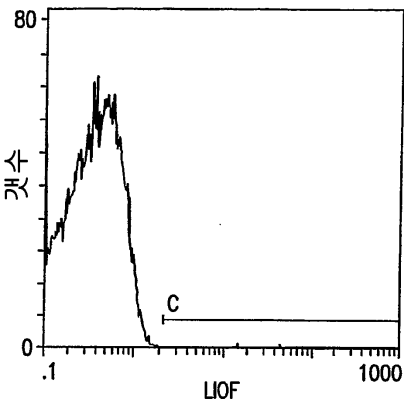
도면4BD



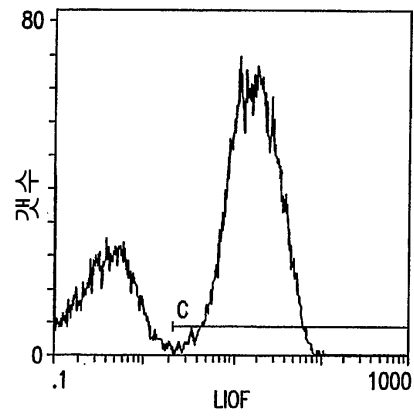
도면5



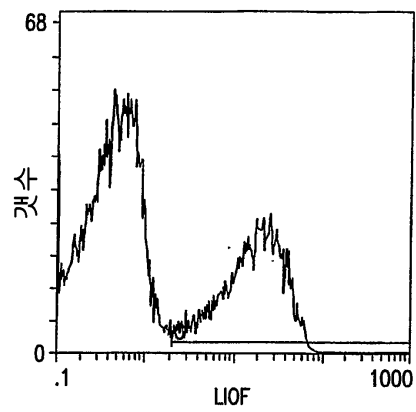
도면6A



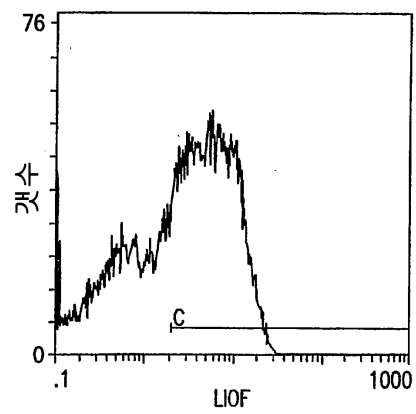
도면6B



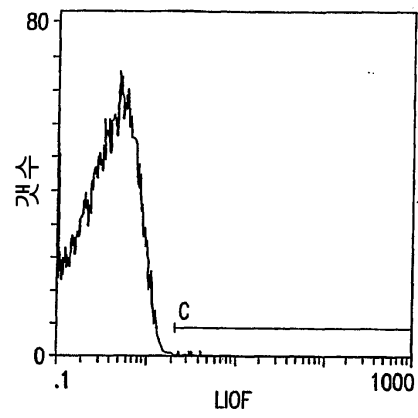
도면6C



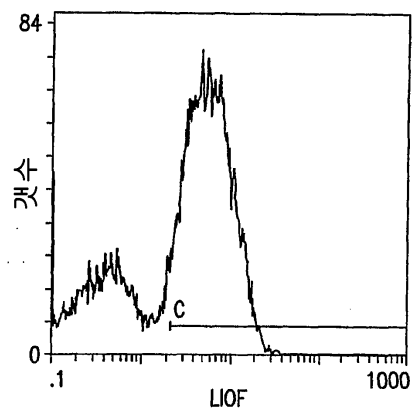
도면6D



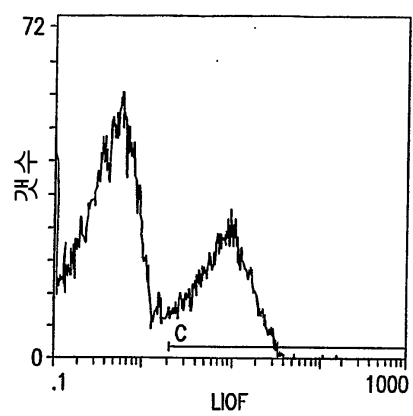
도면6E



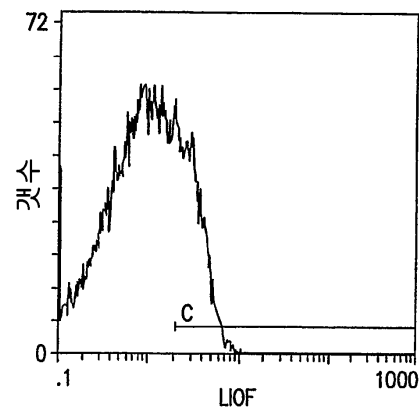
도면6F



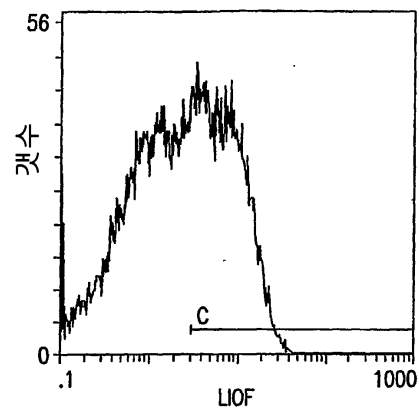
도면6G



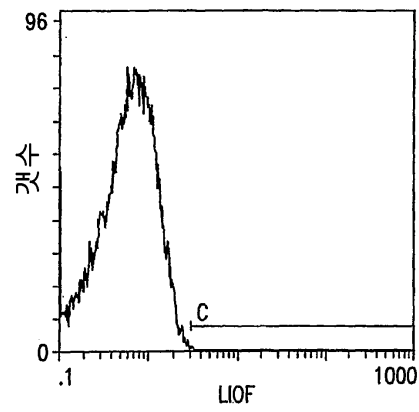
도면6H



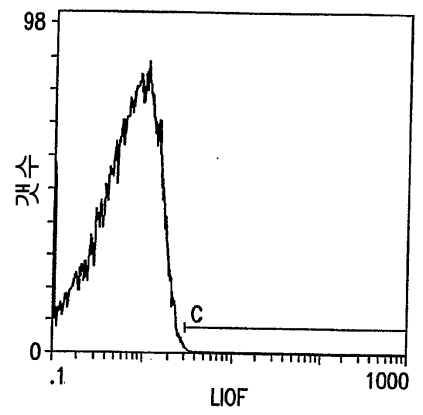
도면7A



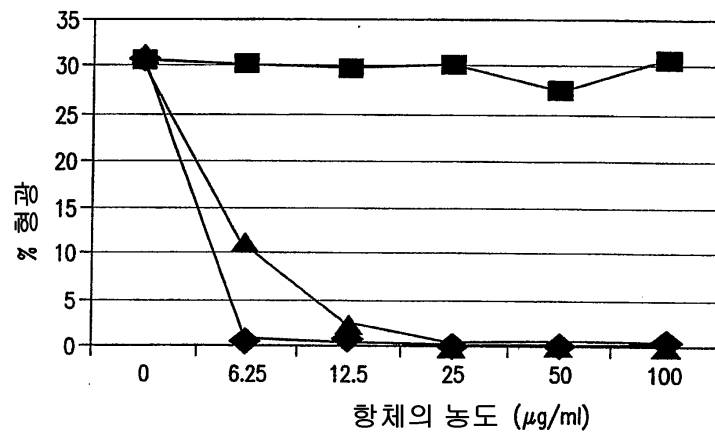
도면7B



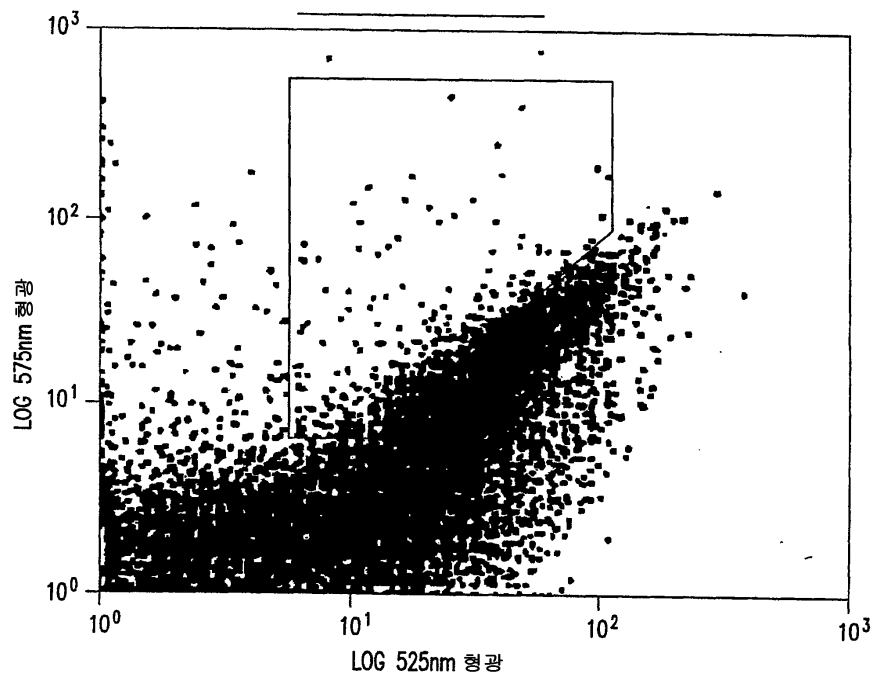
도면7C



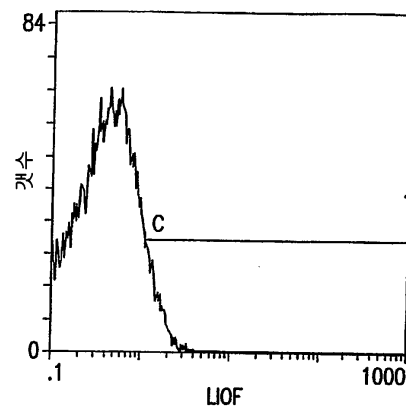
도면8



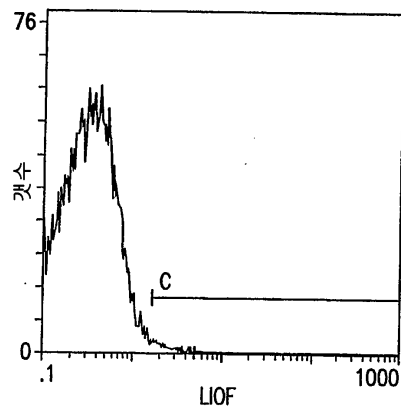
도면9



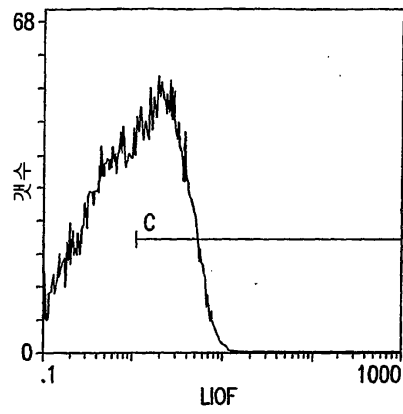
도면10A



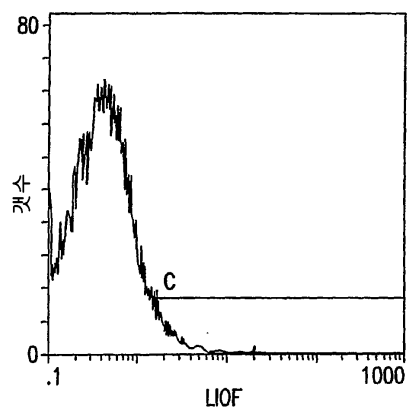
도면10B



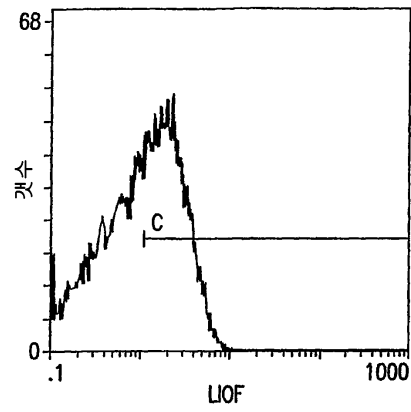
도면10C



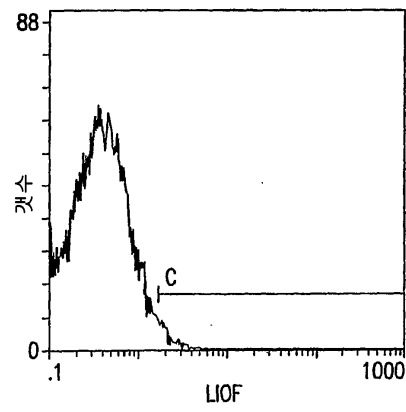
도면10D



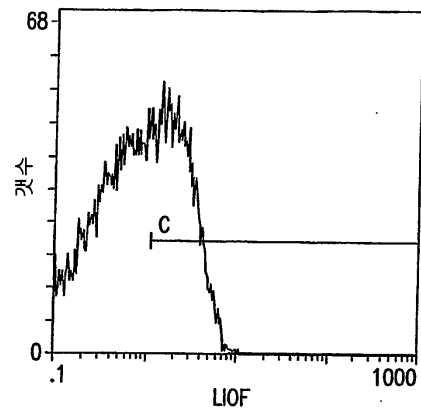
도면10E



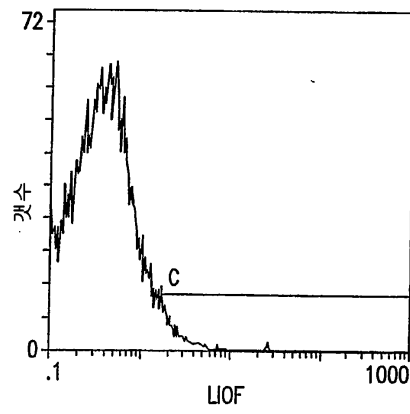
도면10F



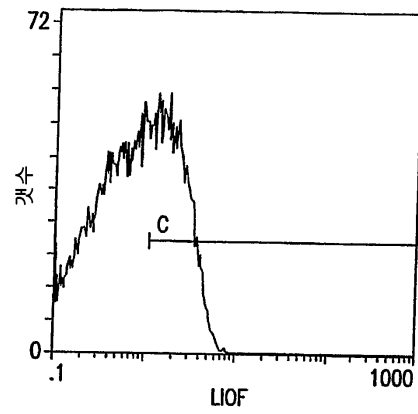
도면10G



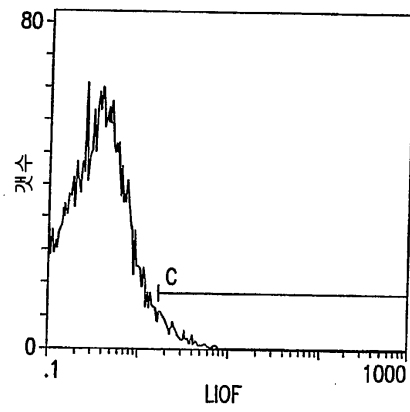
도면10H



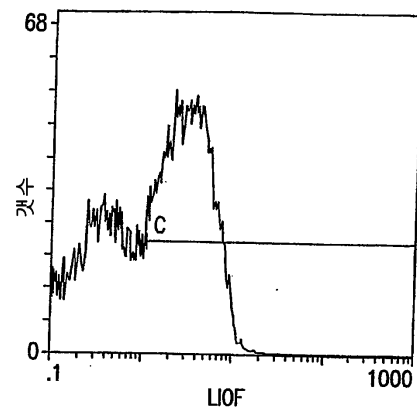
도면10I



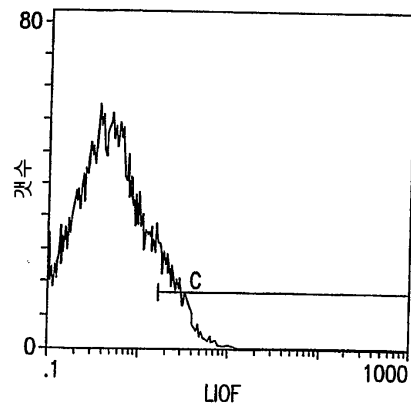
도면10J



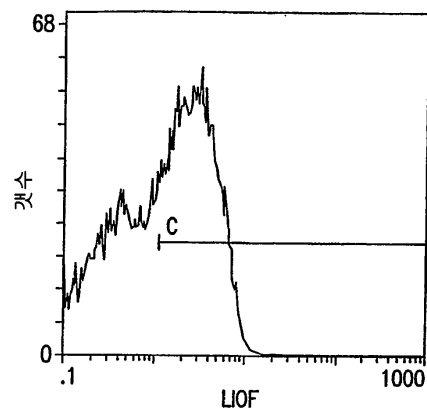
도면10K



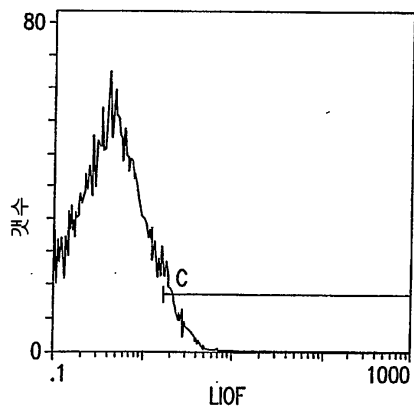
도면10L



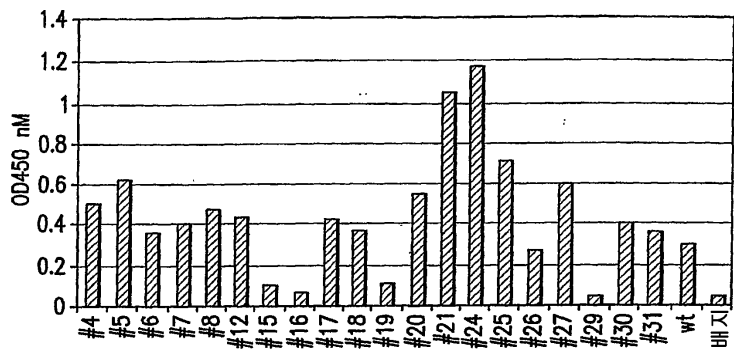
도면10M



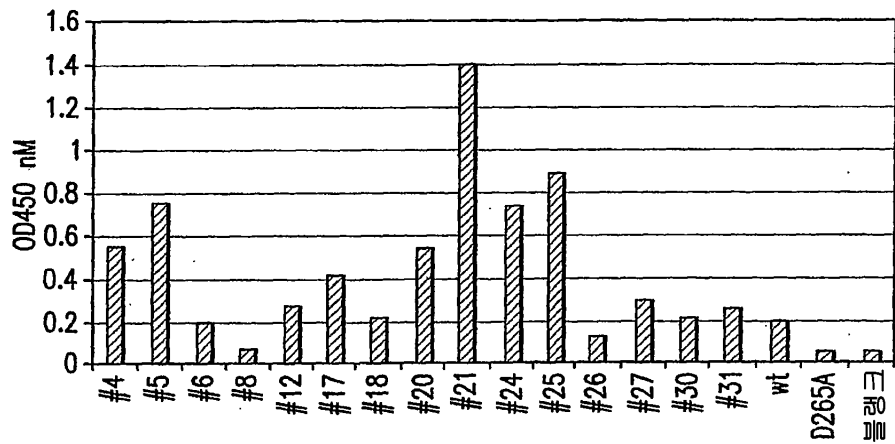
도면10N



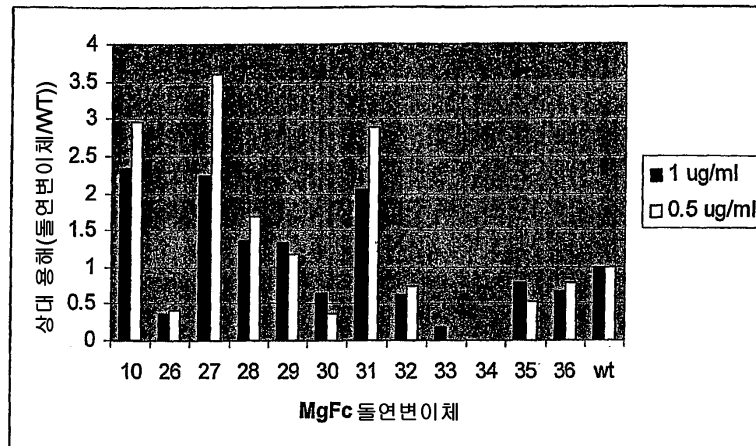
도면11A



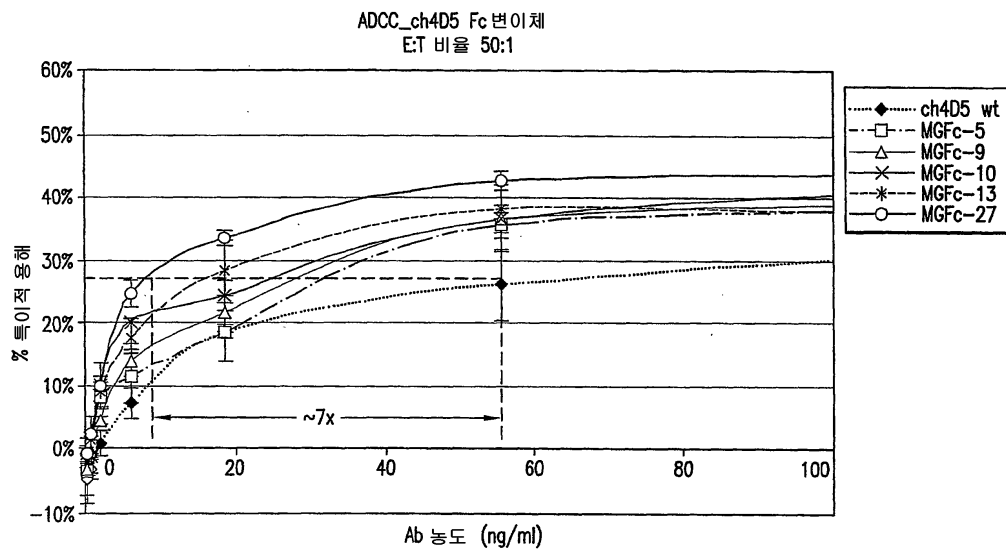
도면11B



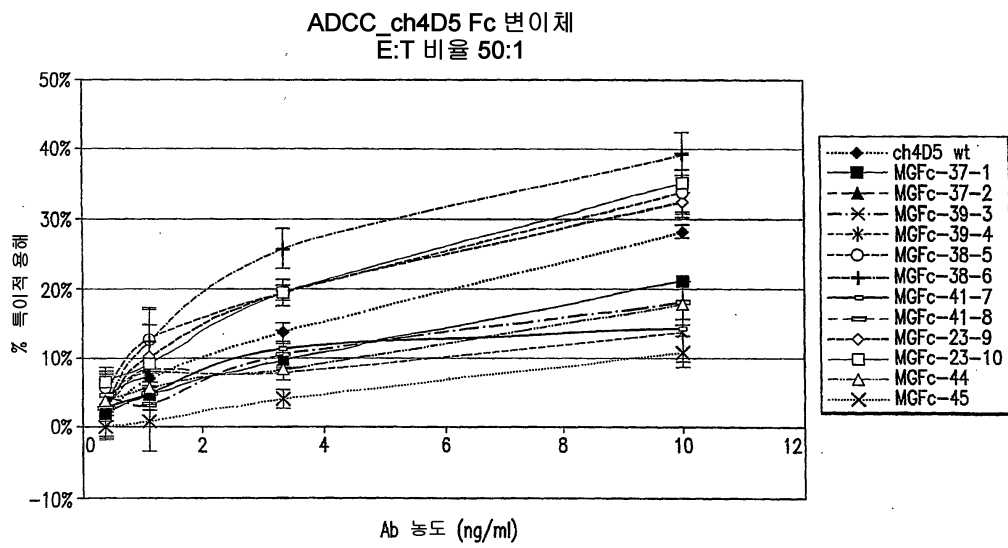
도면12



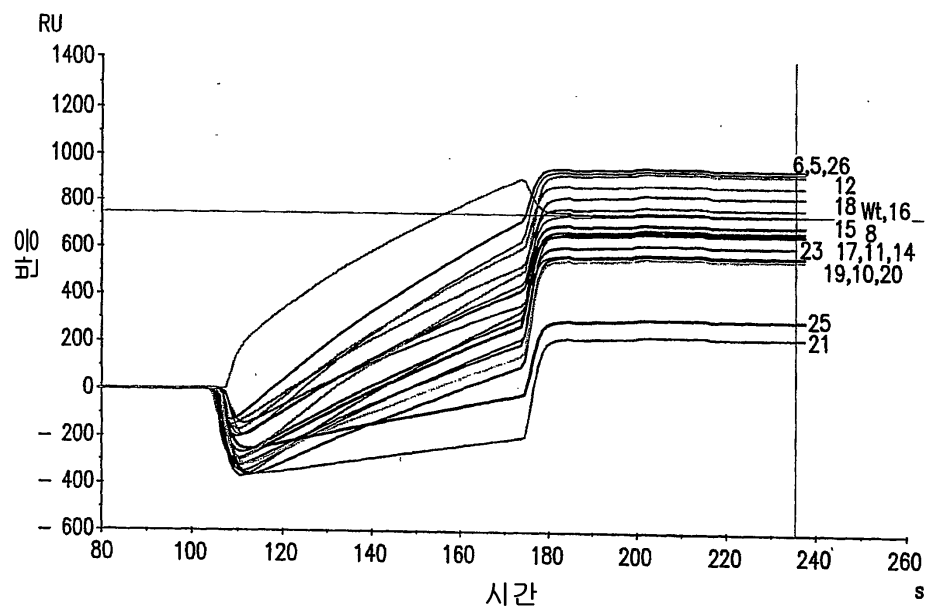
도면13A



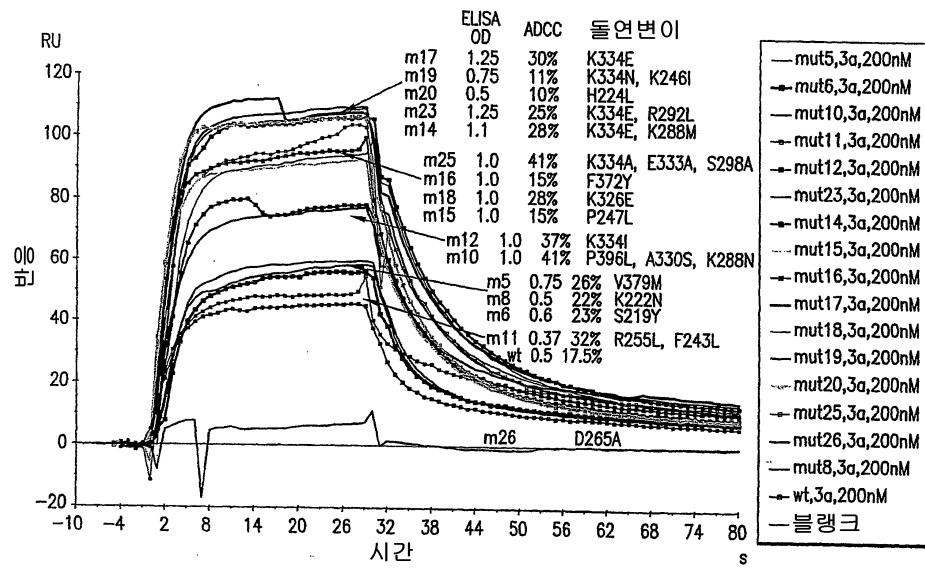
도면13B



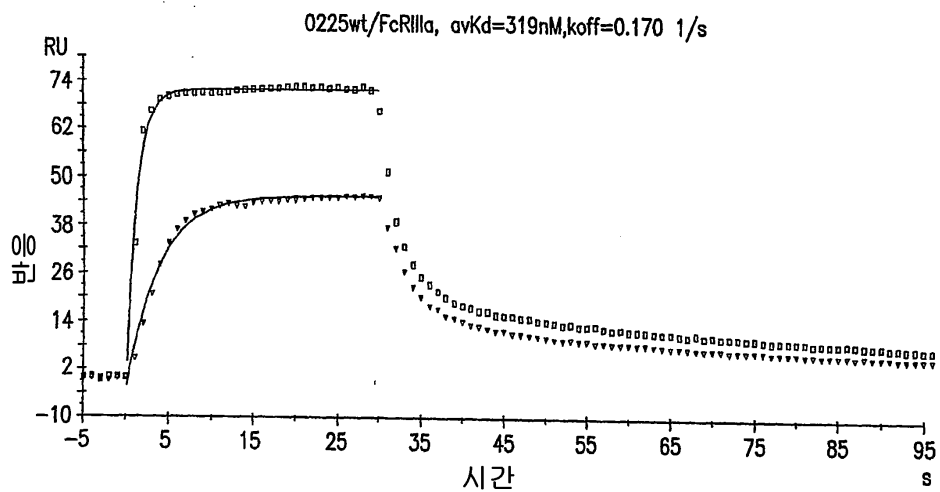
도면14



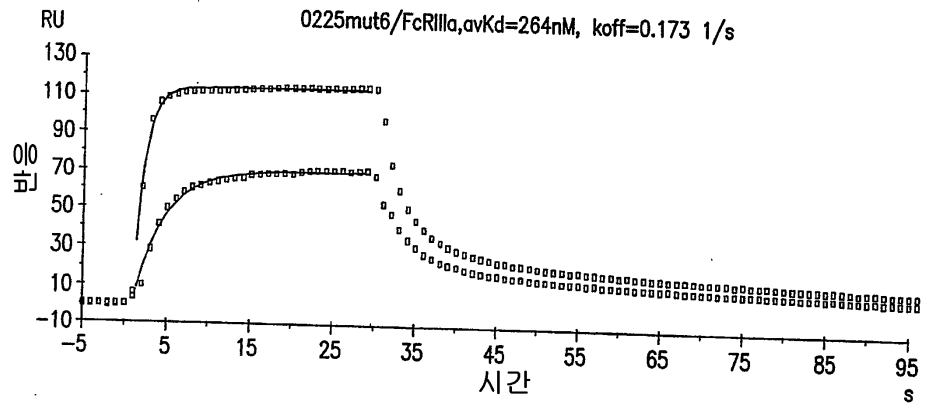
도면15



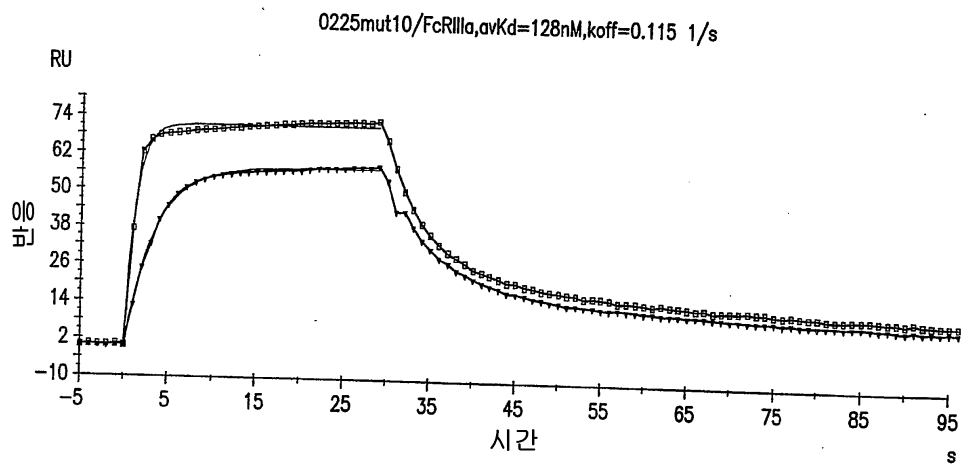
도면16A



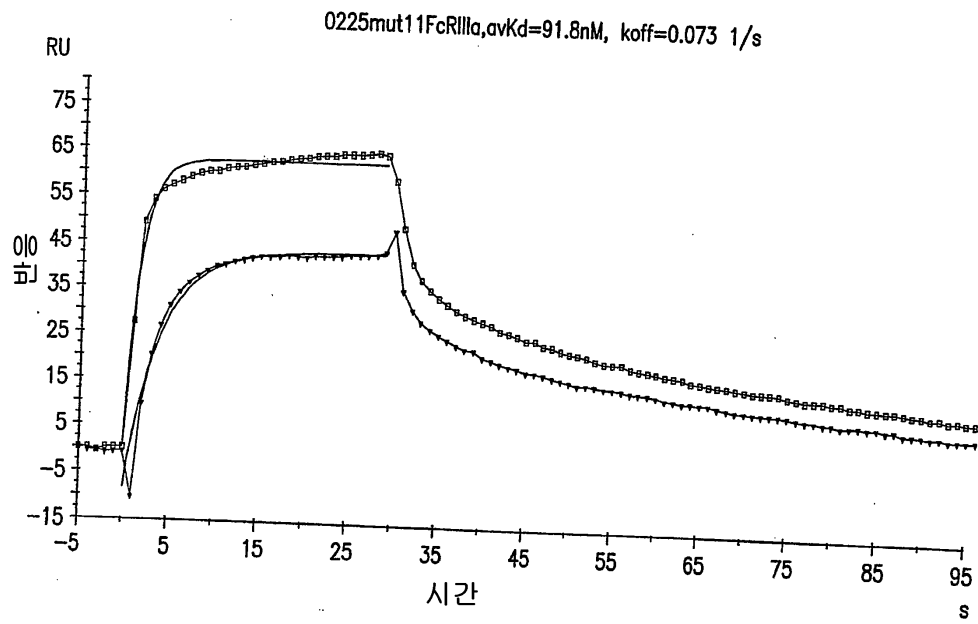
도면16B



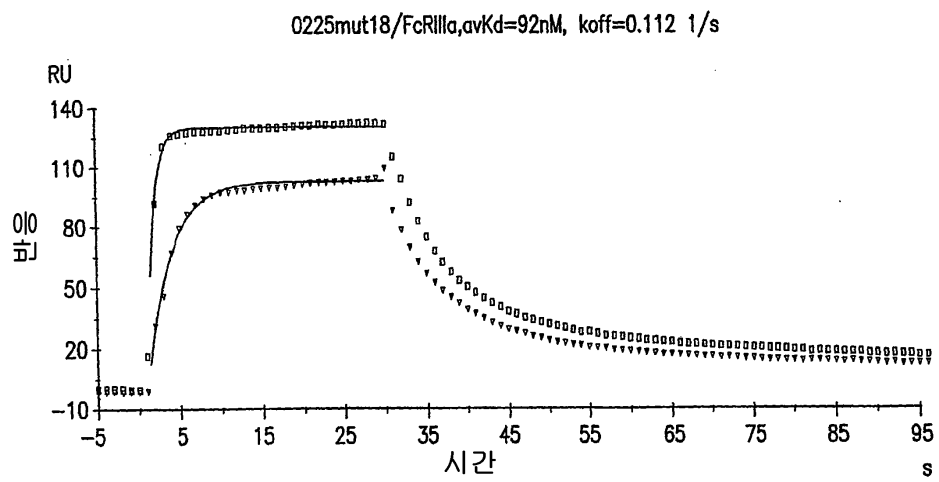
도면16C



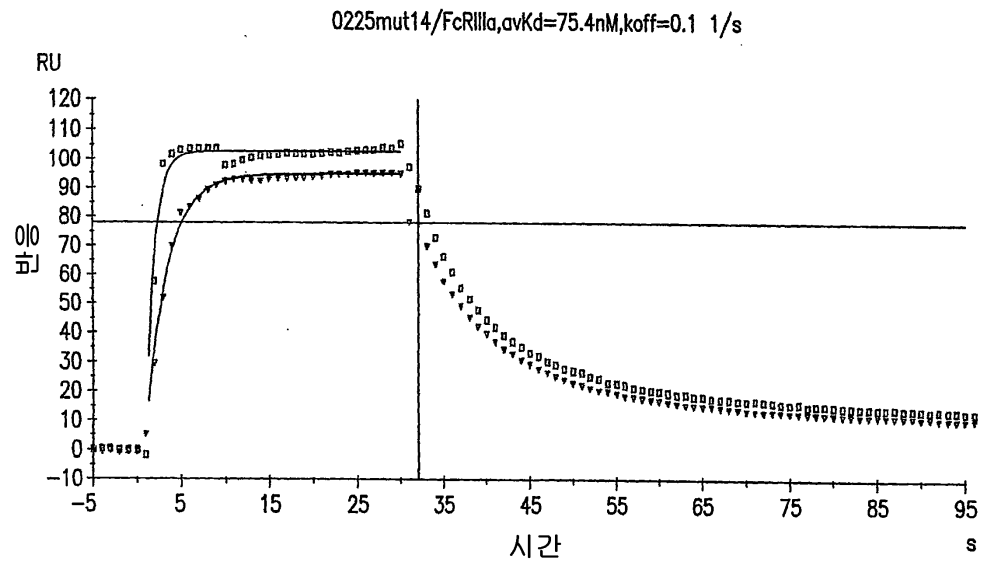
도면16D



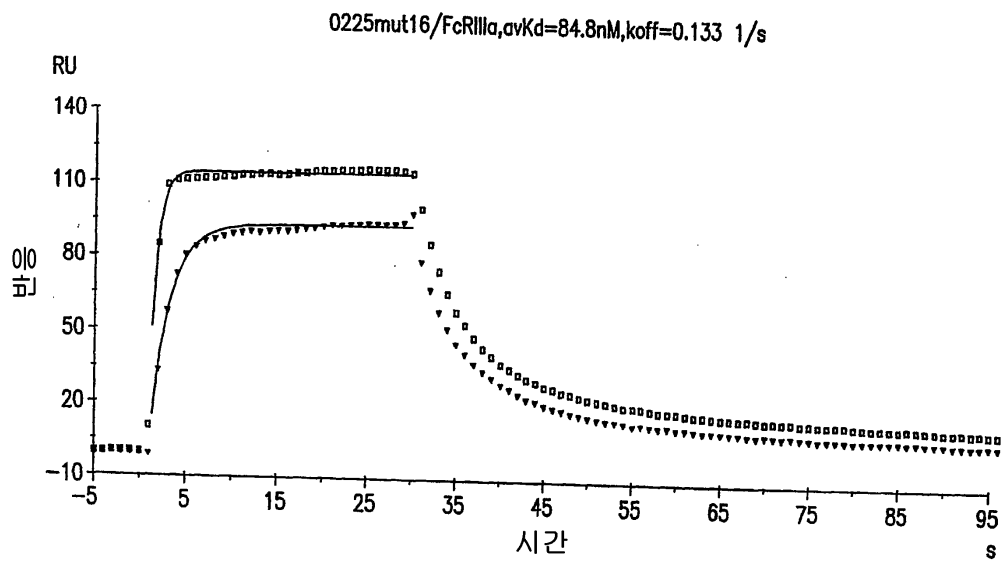
도면16E



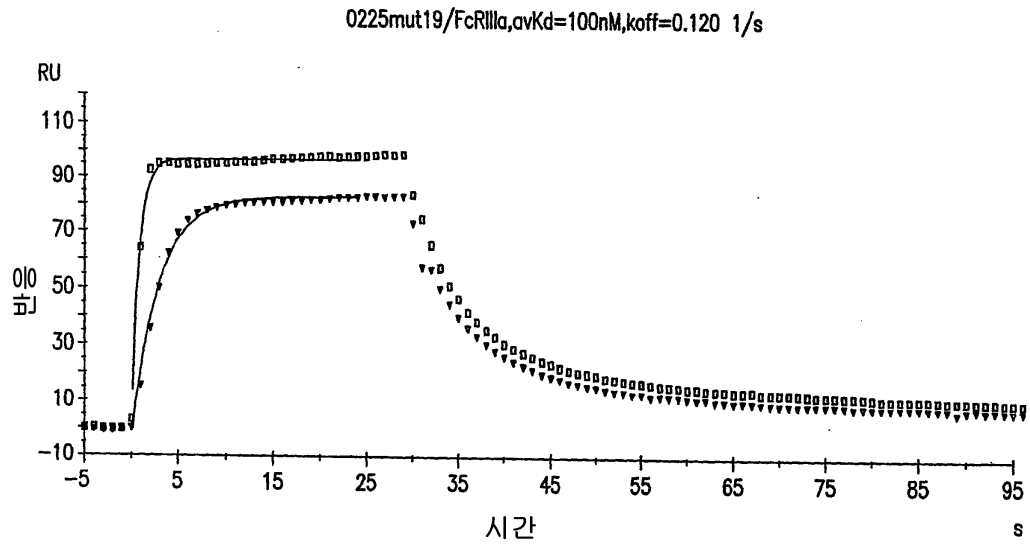
도면16F



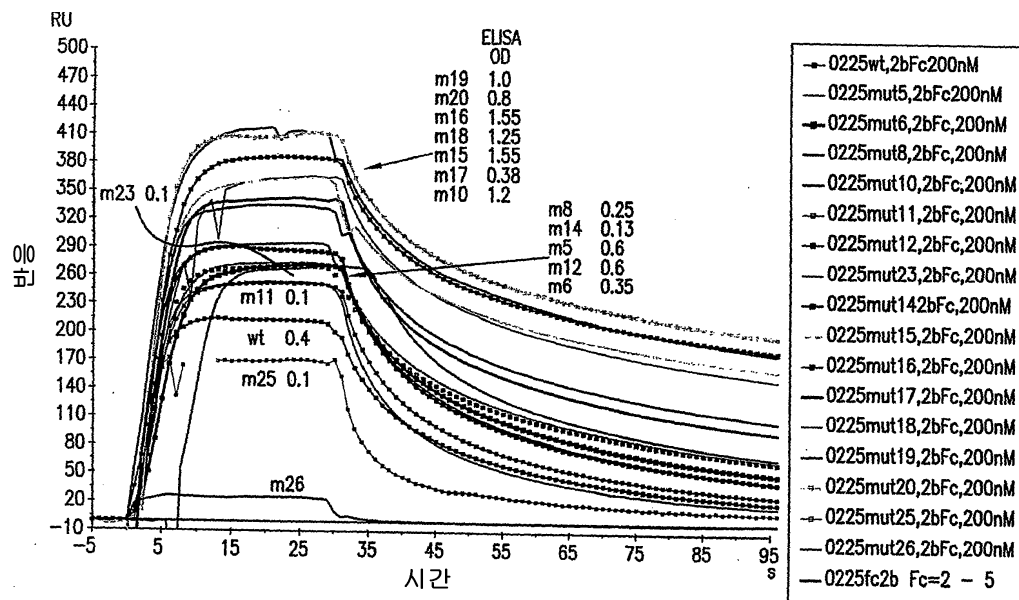
도면16G



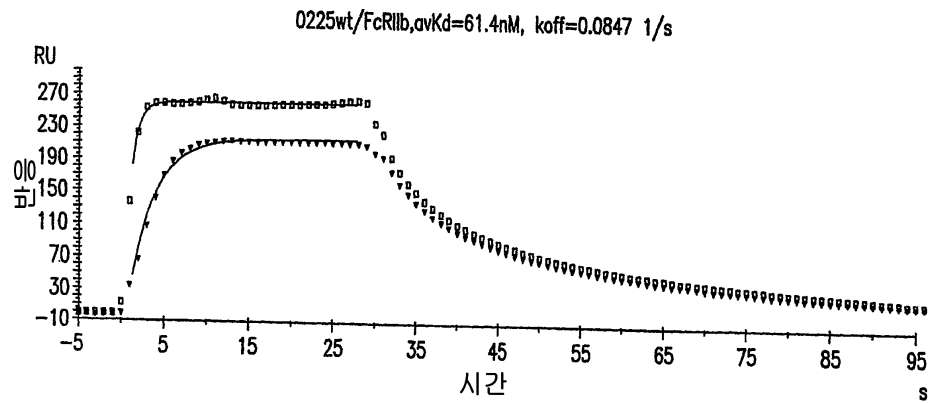
도면16H



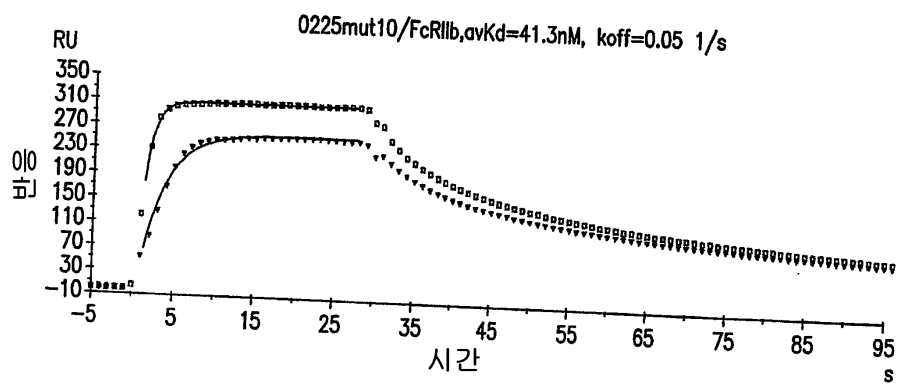
도면17



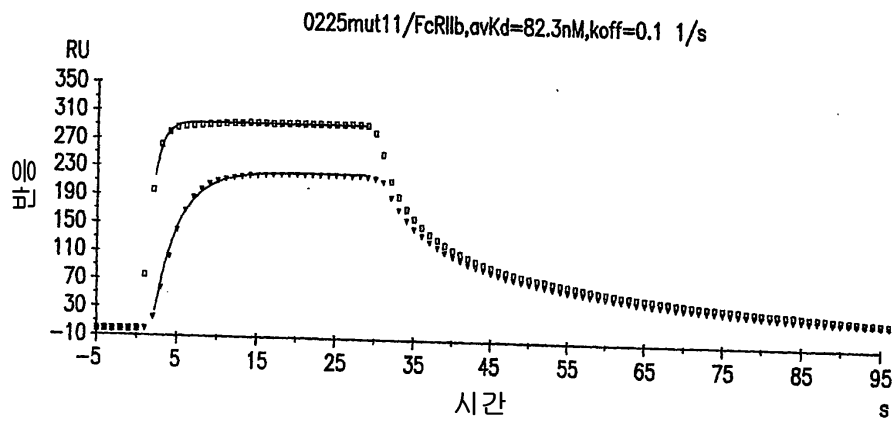
도면18A



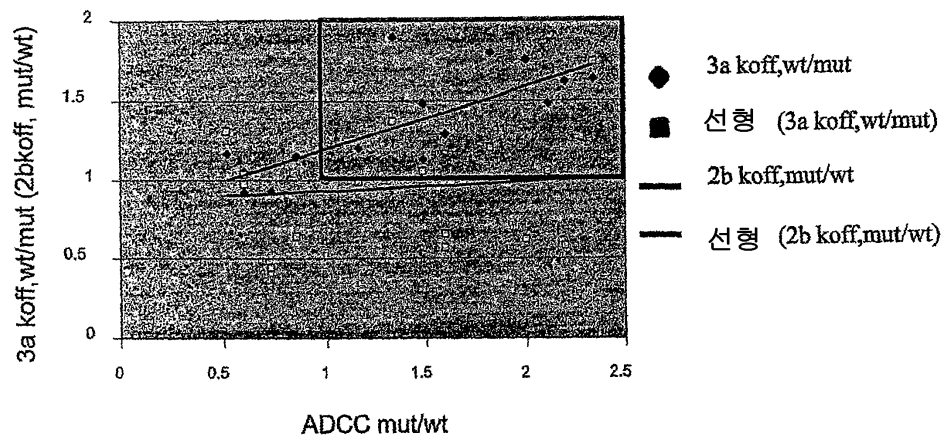
도면18B



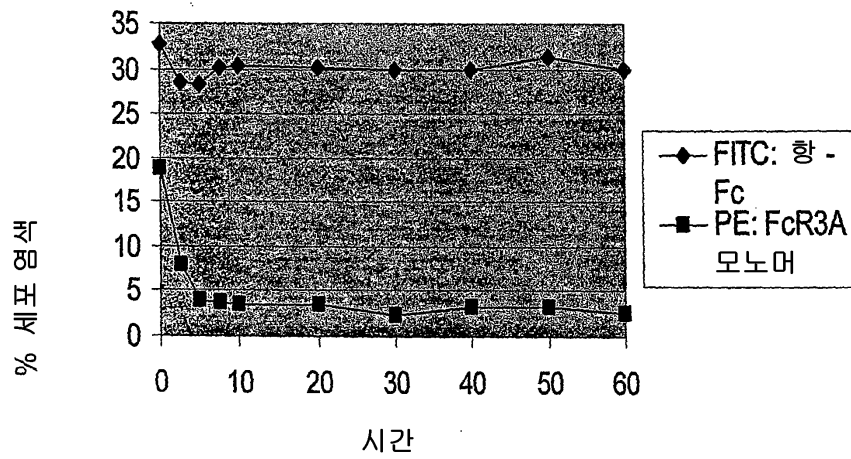
도면18C



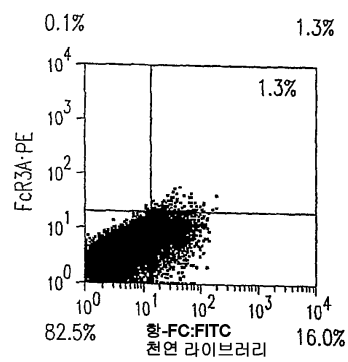
도면19



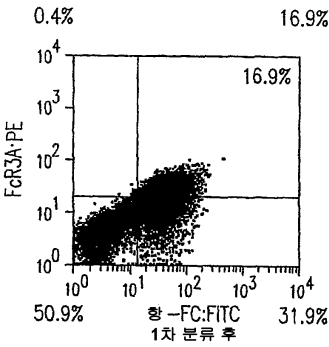
도면20



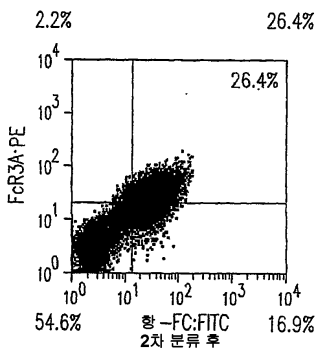
도면21A



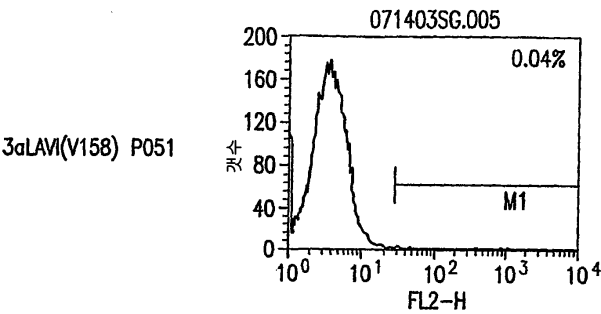
도면21B



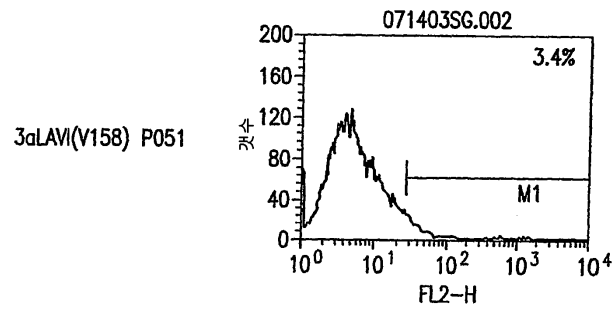
도면21C



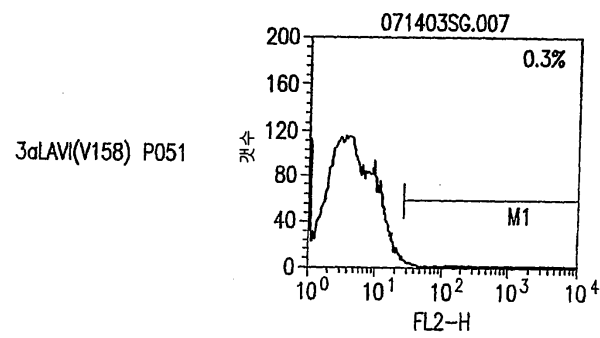
도면22A1



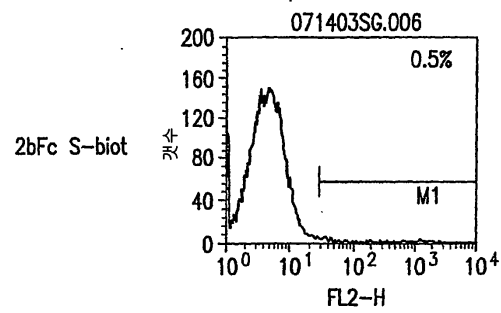
도면22A2



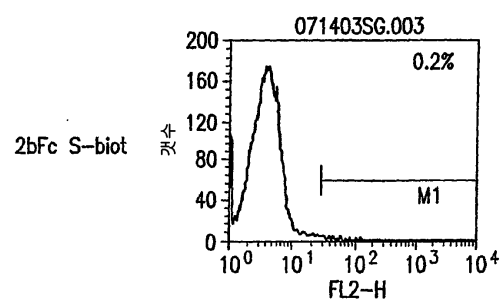
도면22A3



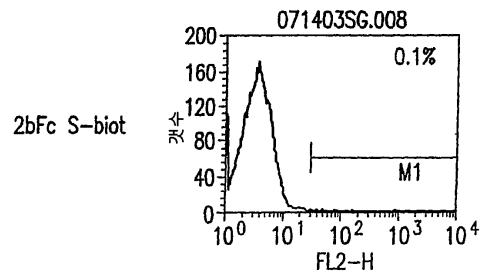
도면22A4



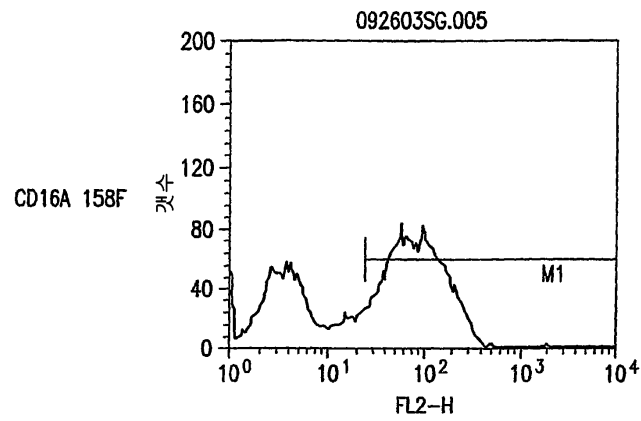
도면22A5



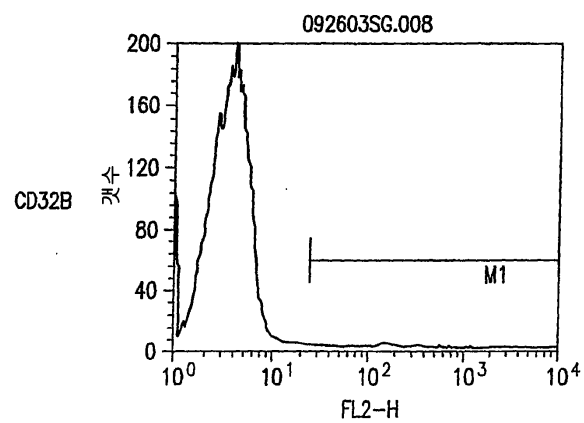
도면22A6



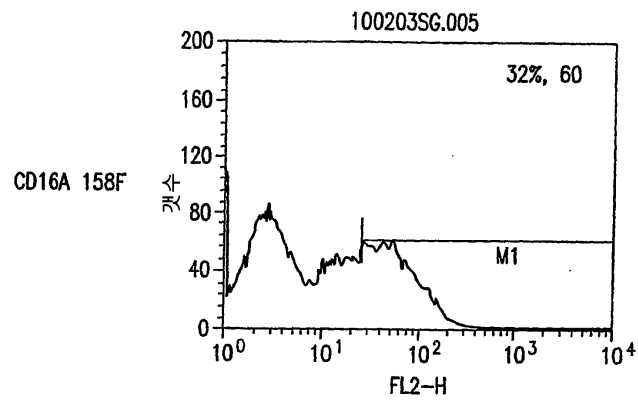
도면22B1



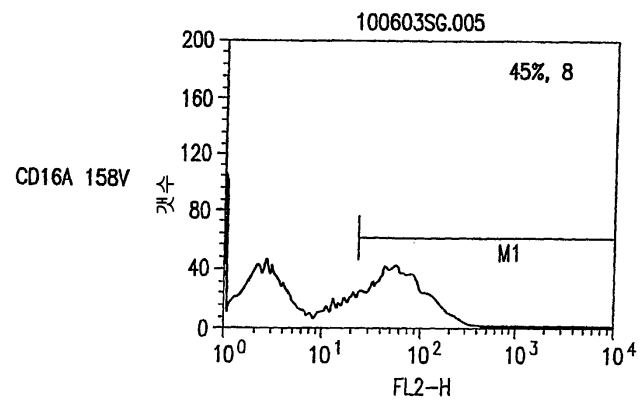
도면22B2



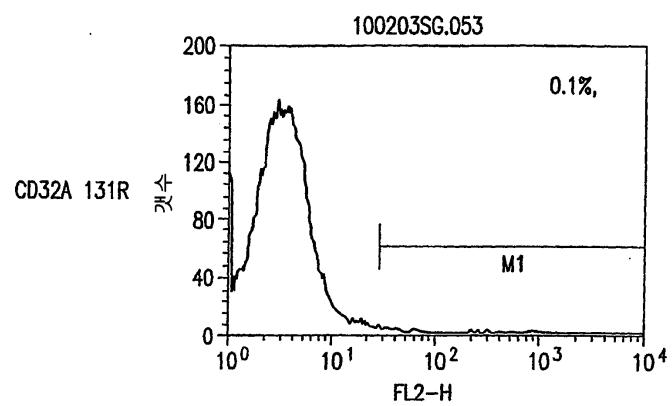
도면22B3



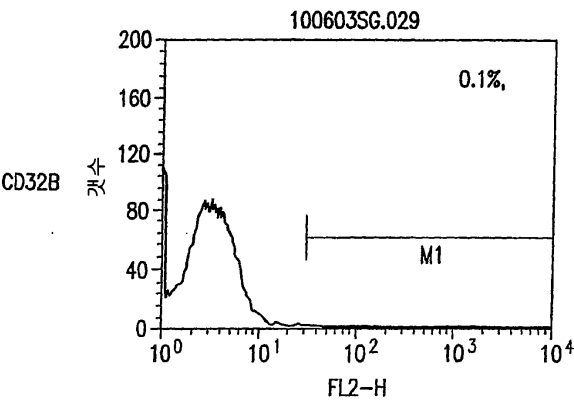
도면22B4



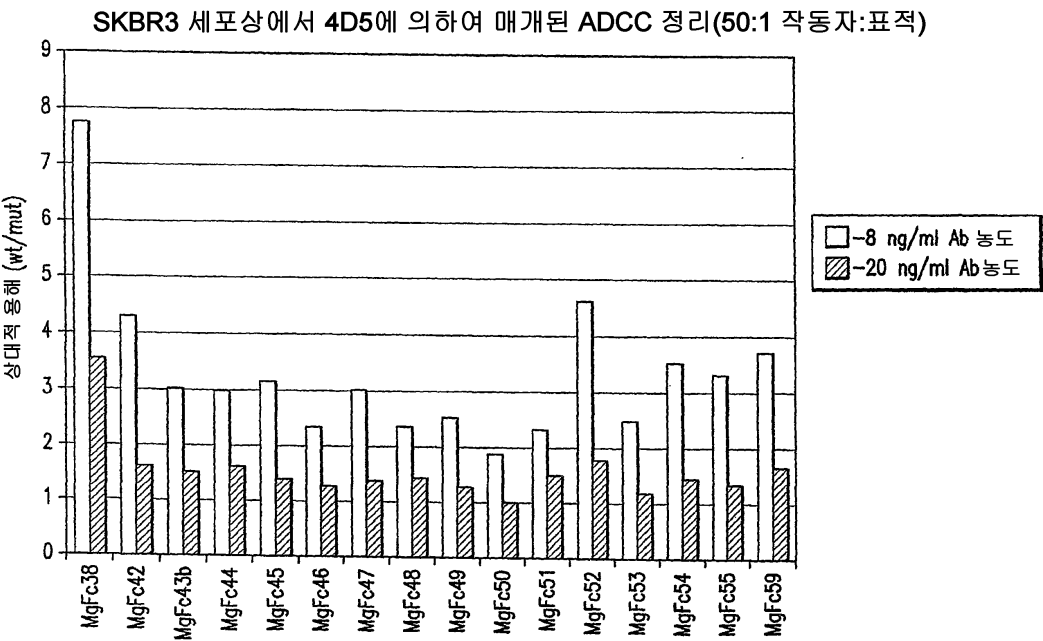
도면22B5



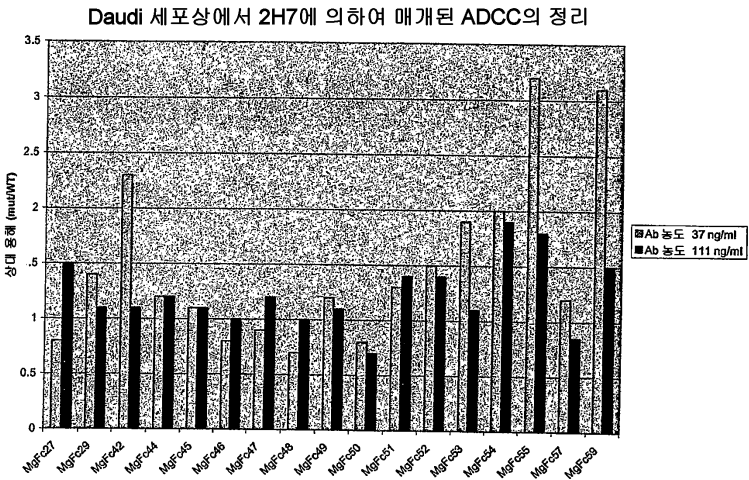
도면22B6



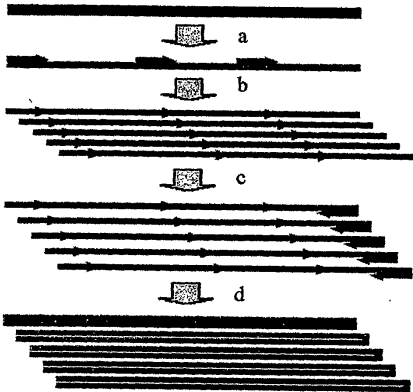
도면23



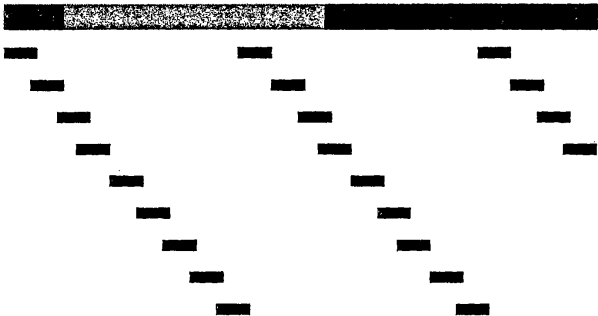
도면24



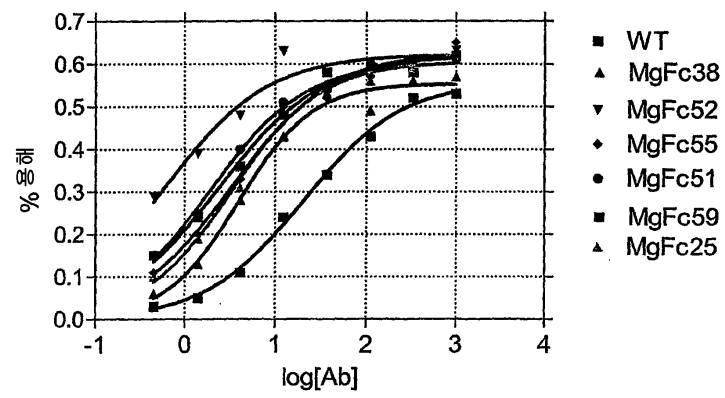
도면25



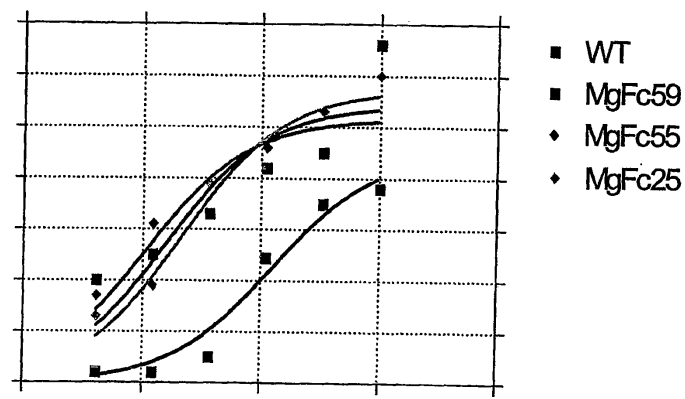
도면26



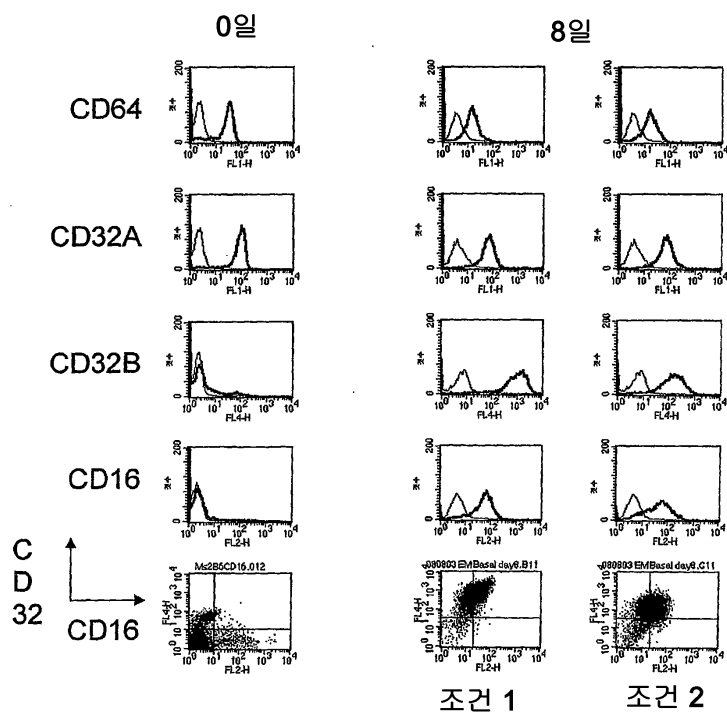
도면27



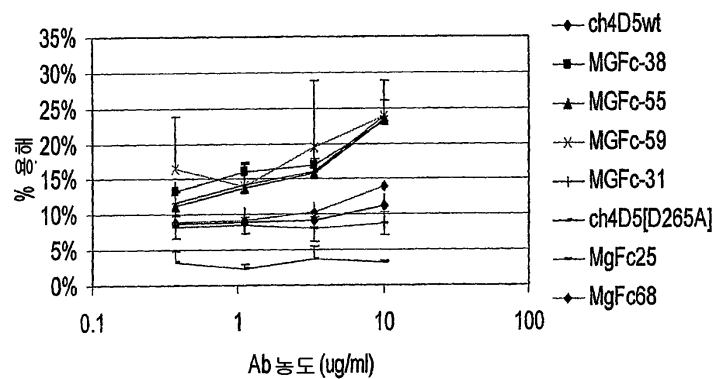
도면28



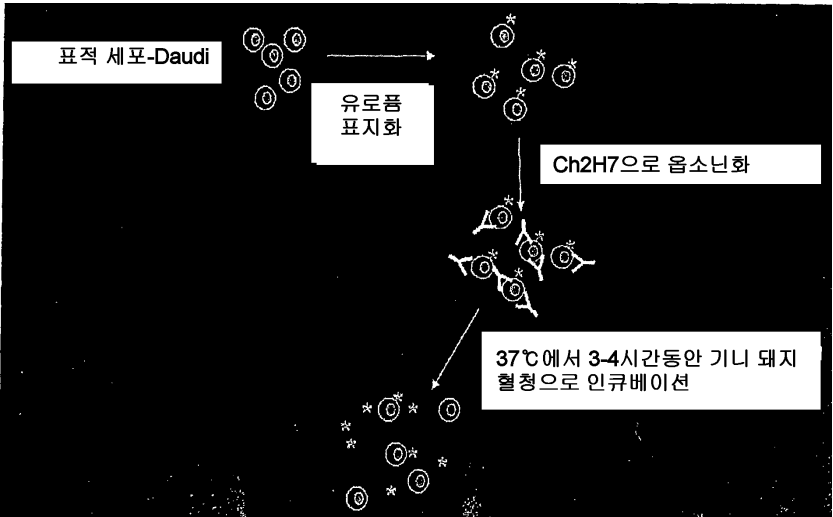
도면29



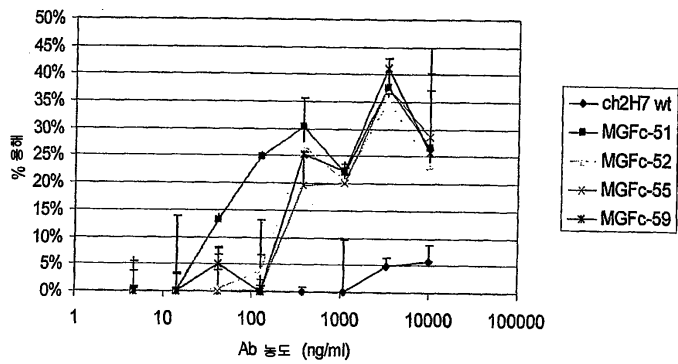
도면30



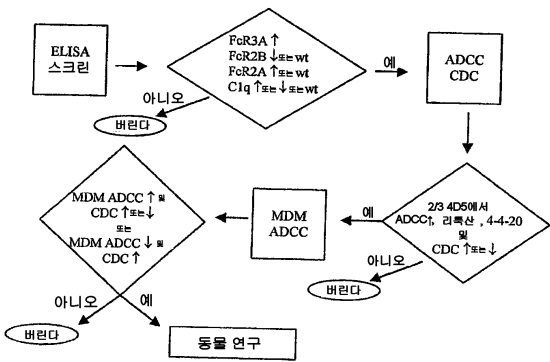
도면31



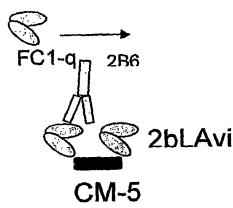
도면32



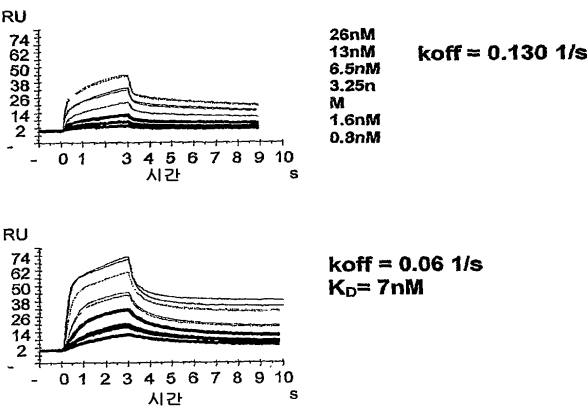
도면33



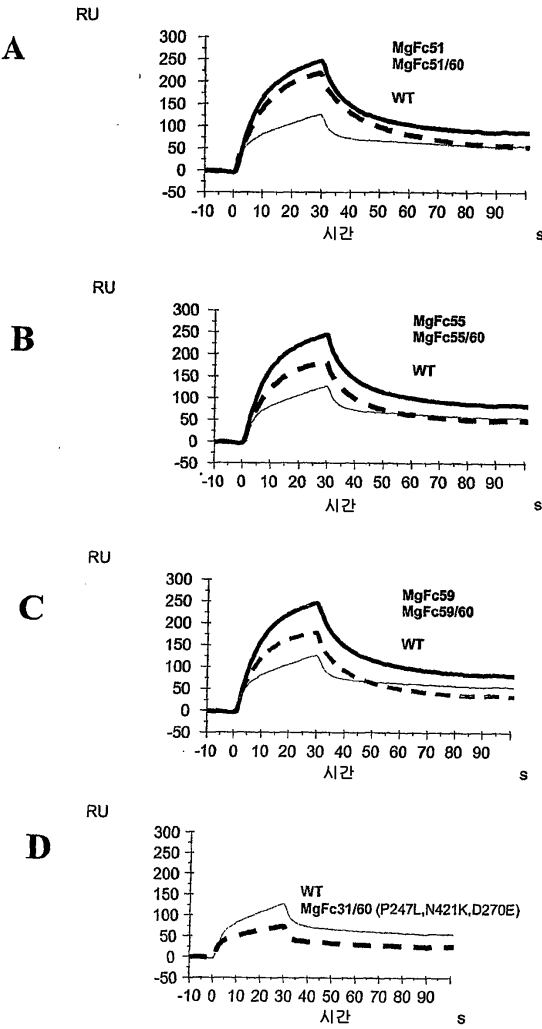
도면34A



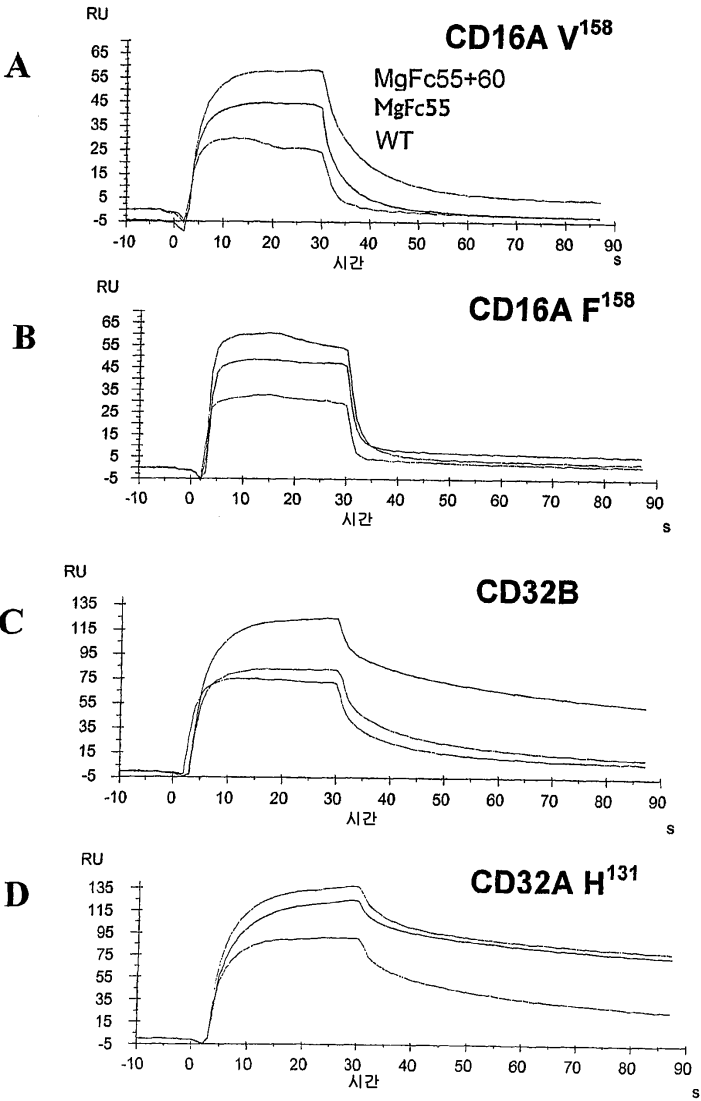
도면34B



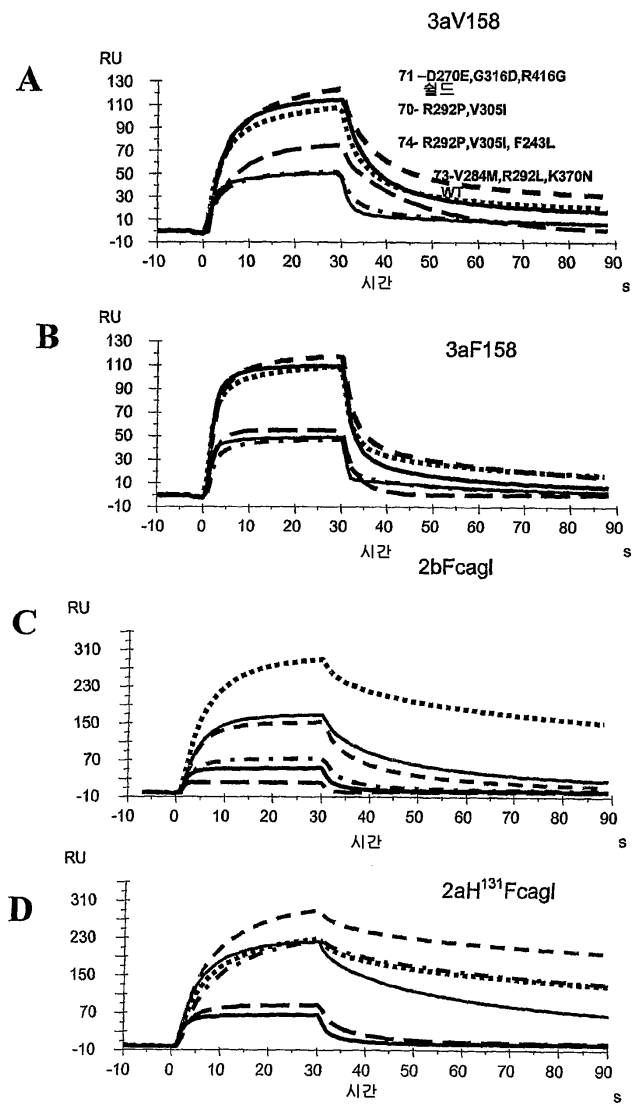
도면35



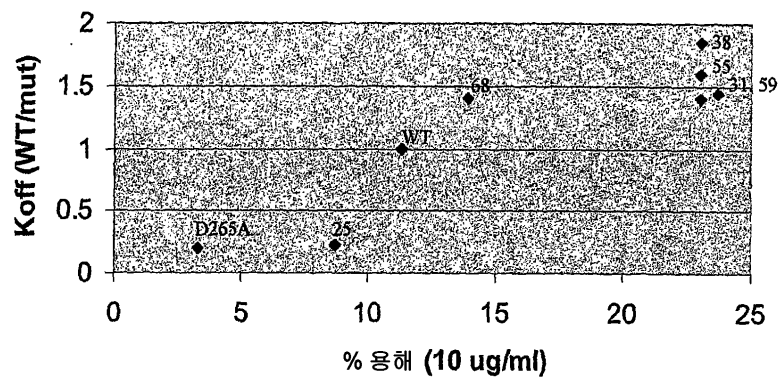
도면36



도면37



도면38



서열 목록

- <110> MACROGENICS, INC.
- <120> IDENTIFICATION AND ENGINEERING OF ANTIBODIES WITH VARIANT FC REGIONS AND METHODS OF USING THE SAME
- <130> 11183-020-228
- <150> US10/902,588
<151> 2004-07-28
- <150> US10/754,922
<151> 2004-01-09
- <150> US60/439,498
<151> 2003-01-09
- <150> US60/456,041
<151> 2003-03-19
- <150> US60/514,549
<151> 2003-10-23
- <160> 10
- <170> Kopatent In 1.71
- <210> 1
<211> 86
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
- <220>
<223> Primer: 5' linker.avitag
- <400> 1
ggccgcaggt ggtggtggtt ctggtggtgg tggttctggt ctgaacgaca tcttcgaggc

tcagaaaatc gaatggcacg aatgat 86

<210> 2
<211> 86
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer: 3' linker.avitag

<400> 2
ctagatcatt cgtgccattc gattttctga gcctcgaaga tgcgttcag accagaacca 60

ccaccaccag aaccaccacc acctgc 86

<210> 3
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer: FcR3A left

<400> 3
gttgatcct ccaactgctc tgctacttct agttt 35

<210> 4
<211> 34
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer: FcR3A Right

<400> 4
gaaaagctta aagaatgatg agatggttga cact 34

<210> 5
<211> 31

<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer: FcR2B right

<400> 5
gaagtcgaca atgatcccca ttggtgaaga g 31

<210> 6
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer: FcR2B left

<400> 6
gttagatctt gctgtgctat tctggctcc 30

<210> 7
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer: IgG1 right

<400> 7
atagtcgacc actgatttac ccggaga 27

<210> 8
<211> 31
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer: IgG1 left

<400> 8
ggaattcaac accaaggtgg acaagaaagt t 31

<210> 9
<211> 31
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer: mcr025;chl (f')

<400> 9
aaaggatccg cgagctcagc ctccaccaag g 31

<210> 10
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer: H021

<400> 10
gtctgctcga agcattaacc 20