



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0048292
(43) 공개일자 2014년04월23일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/30 (2006.01) *A61K 39/395* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
- (21) 출원번호 10-2014-7004344
- (22) 출원일자(국제) 2012년08월21일
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2014년02월20일
- (86) 국제출원번호 PCT/EP2012/066214
- (87) 국제공개번호 WO 2013/026832
국제공개일자 2013년02월28일
- (30) 우선권주장
11178393.2 2011년08월23일
유럽특허청(EPO)(EP)

- (71) 출원인
로슈 글리카트 아게
스위스 솔리렌-취리히 체하-8952 바기슈트라쎄 18
- (72) 발명자
프레이타그 올리비에
스위스 체하-5028 우에켄 오베르도르프스트라쎄 9
조지 가이
독일 82392 하바크 암 베르크그라벤 11
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
제일특허법인

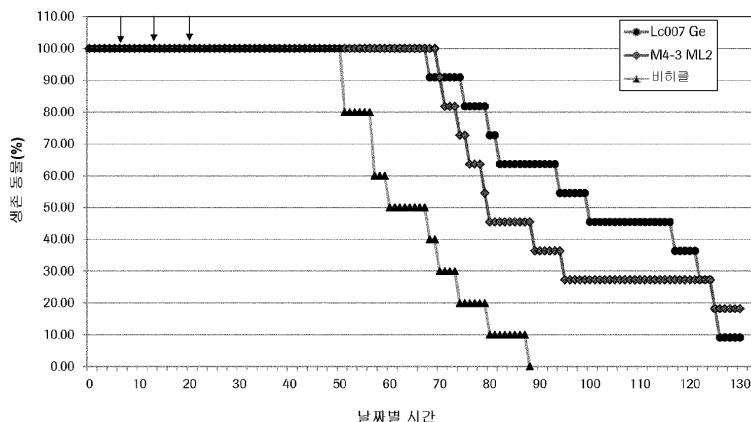
전체 청구항 수 : 총 41 항

(54) 발명의 명칭 항-MCSP 항체

(57) 요 약

본 발명은 항-MCSP 항체 및 이를 사용하는 방법을 제공한다.

대 표 도



(72) 발명자

모스너 에크하드

스위스 체하-8280 크뤼츨링겐 펠센부르크베크 5

문디글 올라프

독일 82362 바일하임 타실로링 16

투핀 제랄드

프랑스 애프-68100 월루즈 뤼 드 리스트 24

우마나 파블로

스위스 체하-8832 볼레라우 펠센라인스트라쎄 28

특허청구의 범위

청구항 1

콘드로이틴 설레이트 프로테오글리칸(CSPG: chondroitin sulfate proteoglycan) 반복부-포함 도메인을 포함하는 인간 흑색종 콘드로이틴 설레이트 프로테오글리칸(MCSP: melanoma chondroitin sulfate proteoglycan)의 막 근위 에피토프에 결합하고, Fc 영역중의 올리고당을 개질하기 위해 글리코조작되고, 글리코조작되지 않은 항체에 비하여 ADCC 효과자 기능이 증가된 단리된 항체.

청구항 2

제1항에 있어서,

CSPG 반복부-포함 도메인이 CSPG 반복부 14(서열 번호 3)를 포함하는 항체.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서,

Fc 영역이 글리코조작되지 않은 항체에 비하여 감소된 수의 푸코스 잔기를 갖는 항체.

청구항 4

제1항 내지 제3항중 어느 한 항에 있어서,

글리코조작되지 않은 항체에 비하여 Fc 영역중의 푸코스 잔기에 대한 N-아세틸 글루코사민(GlcNAc: N-acetyl glucosamine) 잔기의 비가 증가된 항체.

청구항 5

제1항 내지 제4항중 어느 한 항에 있어서,

Fc 영역이 글리코조작되지 않은 항체에 비하여 증가된 비율의 2등분된 올리고당을 갖는 항체.

청구항 6

제1항 내지 제5항중 어느 한 항에 있어서,

단일클론성 항체인 항체.

청구항 7

제1항 내지 제6항중 어느 한 항에 있어서,

인간 항체, 인간화된 항체, 또는 키메라성(chimeric) 항체인 항체.

청구항 8

제7항에 있어서,

전장(full-length) IgG 부류 항체인 항체.

청구항 9

제1항 내지 제8항중 어느 한 항에 있어서,

(a) 서열 번호 14의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1; (b) 서열 번호 15의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; 및 (c) 서열 번호 16의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3을 포함하는 항체.

청구항 10

제9항에 있어서,

(a) 서열 번호 10의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (b) 서열 번호 11의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (c) 서열 번호 12의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 추가로 포함하는 항체.

청구항 11

제1항 내지 제8항중 어느 한 항에 있어서,

(a) 서열 번호 10의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (b) 서열 번호 11의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (c) 서열 번호 12의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함하는 항체.

청구항 12

제1항 내지 제8항중 어느 한 항에 있어서,

(a) 서열 번호 17의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1; (b) 서열 번호 18의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; 및 (c) 서열 번호 16의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3을 포함하는 항체.

청구항 13

제12항에 있어서,

(a) 서열 번호 13의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (b) 서열 번호 11의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (c) 서열 번호 12의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 추가로 포함하는 항체.

청구항 14

제1항 내지 제8항중 어느 한 항에 있어서,

(a) 서열 번호 13의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (b) 서열 번호 11의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (c) 서열 번호 12의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함하는 항체.

청구항 15

제1항 내지 제8항중 어느 한 항에 있어서,

(a) 서열 번호 27의 아미노산 서열에 95% 이상의 서열 동일성을 갖는 VH 서열; (b) 서열 번호 26의 아미노산 서열에 95% 이상의 서열 동일성을 갖는 VL 서열; 또는 (c) (a)에서와 같은 VH 서열 및 (b)에서와 같은 VL 서열을 포함하는 항체.

청구항 16

제15항에 있어서,

서열 번호 27의 VH 서열을 포함하는 항체.

청구항 17

제15항에 있어서,

서열 번호 26의 VL 서열을 포함하는 항체.

청구항 18

제15항에 있어서,

서열 번호 27의 VH 서열 및 서열 번호 26의 VL 서열을 포함하는 항체.

청구항 19

제1항 내지 제8항중 어느 한 항에 있어서,

(a) 서열 번호 32의 아미노산 서열에 95% 이상의 서열 동일성을 갖는 VH 서열; (b) 서열 번호 31의 아미노산 서열에 95% 이상의 서열 동일성을 갖는 VL 서열; 또는 (c) (a)에서와 같은 VH 서열 및 (b)에서와 같은 VL 서열을

포함하는 항체.

청구항 20

제19항에 있어서,

서열 번호 32의 VH 서열을 포함하는 항체.

청구항 21

제19항에 있어서,

서열 번호 31의 VL 서열을 포함하는 항체.

청구항 22

제19항에 있어서,

서열 번호 32의 VH 서열 및 서열 번호 31의 VL 서열을 포함하는 항체.

청구항 23

제1항 내지 제22항중 어느 한 항의 항체를 암호화하는 단리된 핵산.

청구항 24

제23항의 핵산을 포함하는 숙주 세포.

청구항 25

항체가 생산되도록 제24항의 숙주 세포를 배양하는 단계를 포함하는, 항체의 제조 방법.

청구항 26

제1항 내지 제22항중 어느 한 항의 항체 및 세포독성제를 포함하는 면역컨주게이트(immunoconjugate).

청구항 27

제1항 내지 제22항중 어느 한 항의 항체 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 약학 제형.

청구항 28

약제로서 사용하기 위한 제1항 내지 제22항중 어느 한 항의 항체 또는 제26항의 면역컨주게이트.

청구항 29

암을 치료하는데 있어서의 제1항 내지 제22항중 어느 한 항의 항체 또는 제26항의 면역컨주게이트의 용도.

청구항 30

제29항에 있어서,

암이 MCSP를 발현하는 암인 용도.

청구항 31

제30항에 있어서,

암이 피부암(흑색종 및 기저 세포 암종 포함), 신경교종(교모세포종 포함), 골암(예컨대, 골육종), 및 백혈병(ALL 및 AML 포함)으로 구성된 군에서 선택되는 용도.

청구항 32

세포 용해를 유도하는데 있어서의 제1항 내지 제22항중 어느 한 항의 항체의 용도.

청구항 33

약제의 제조에 있어서의 제1항 내지 제22항중 어느 한 항의 항체 또는 제26항의 면역くん주게이트의 용도.

청구항 34

제33항에 있어서,

약제가 암을 치료하기 위한 용도.

청구항 35

제33항에 있어서,

약제가 세포 용해를 유도하기 위한 용도.

청구항 36

효과량의 제1항 내지 제22항중 어느 한 항의 항체 또는 제26항의 면역くん주게이트를 개별체에게 투여함을 포함하는, 암을 앓는 개별체를 치료하는 방법.

청구항 37

제36항에 있어서,

암이 MCSP를 발현하는 암인 방법.

청구항 38

제37항에 있어서,

암이 피부암(흑색종 및 기저 세포 암종 포함), 신경교종(교모세포종 포함), 골암(예컨대, 골육종), 및 백혈병(ALL 및 AML 포함)으로 구성된 군에서 선택되는 방법.

청구항 39

세포 용해를 유도하기 위해 효과량의 제1항 내지 제22항중 어느 한 항의 항체 또는 제26항의 면역くん주게이트를 개별체에게 투여함을 포함하는, 개별체에서 세포 용해를 유도하는 방법.

청구항 40

제1항 내지 제22항중 어느 한 항의 항체 및 샘플에 존재하는 항체와 MCSP 사이에 항체-MCSP 착체를 형성하도록 허용하는 조건하에 샘플을 상기 항체와 접촉시키는 단계, 및 착체의 존재 또는 부재를 면역검출 방법에 의해 검출하는 단계를 포함하는, MCSP 면역조직화학 검정.

청구항 41

제40항에 있어서,

샘플이 신선한 조직 샘플, 동결된 조직 샘플, 또는 포르말린-고정되고 파라핀-함침된 조직 샘플인 검정.

명세서

기술분야

[0001]

본원은 2011년 8월 23일자로 출원된 유럽 특허 출원 제EP 11178393.2호에 대한 우선권을 청구하고, 이의 개시내용은 본원에 참고로 그의 전체가 인용되어 있다.

[0002]

본 발명은 항-MCSP 항체 및 이를 질병의 치료 및 진단에 사용하는 방법에 관한 것이다.

배경기술

[0003]

MCSP

[0004]

흑색종 콘드로이틴 설레이트 프로테오글리칸(MCSP: melanoma chondroitin sulfate proteoglycan)은 대부분의 흑색종 암에서 발현되는 거대한 막간 프로테오글리칸이다. MCSP는 교모세포종, 골육종, 연골육종, 몇몇 유형의 ALL 및 AML을 비롯한 다른 암 상에서, 및 기저 세포 암종내에서 또한 발현된다. 이는 초기 세포 표면 흑색종 진행 마커로서 작용하고, 종양 세포 증식, 전이, 이동, 침입, 및 혈관신생에 관여된다[스타우베(Staube, E.) 등의 문헌 "FEBS Letters, 527:114-118 (2002)"; 캄폴리(Campoli, M.) 등의 문헌 "Crit. Rev. Immun. 24:267-296 (2004)"; 베길리스(Vergilis, I. J.)의 문헌 "J Invest Dermatol, 125:526-531 (2005)"; 양(Yang, J.)의 문헌 "JCB, 165:881-891 (2004)"; 루오(Luo, W.)의 문헌 "J. Immune, 176:6046-6054 (2006)".]

[0005]

항체 글리코실화

[0006]

올리고당 성분은 물리적 안정성, 프로테아제 공격에 대한 내성, 면역 시스템과의 상호작용, 약물동력학, 및 특이적 생물학적 활성을 비롯한 치료학적 당단백질의 효능에 관한 특성에 크게 영향을 줄 수 있다. 이러한 특성은 올리고당의 존재 또는 부재, 뿐만 아니라 이의 특정 구조에 좌우된다. 올리고당 구조 및 당단백질 기능 사이에 몇몇 일반화가 이루어질 수 있다. 예를 들면, 특정 올리고당 구조는 특정 탄수화물 결합 단백질과의 상호작용을 통해 혈류로부터 당단백질의 신속한 소거를 중재하는 반면, 다른 구조는 항체에 의해 결합될 수 있고 원치 않는 면역 반응을 개시할 수 있다[jenkins(Jenkins) 등의 문헌 "Nat Biotechnol 14, 975-81 (1996)".]

[0007]

암 면역요법에서 가장 흔히 사용되는 항체인 IgG₁ 유형 항체는, 각각의 CH2 도메인에서 Asn297에 보존된 N-연결된 글리코실화 부위를 갖는 당단백질이다. Asn297에 결합된 2개의 복합 2촉각(biantennary) 올리고당이 CH2 도메인 사이에 매립되어, 폴리펩타이드 주쇄와의 함께 광범위한 접촉부를 형성하고, 이들의 존재는 항체가 효과자기능, 예컨대, 항체 의존성 세포-중재된 세포독성(ADCC: antibody dependent cell-mediated cytotoxicity)을 중재하는데 있어서 필수적이다[라이플리(Lifely) 등의 문헌 "Glycobiology 5, 813-822 (1995)"; 제페리스(Fefferis) 등의 문헌 "Immuno Rev 163, 59-76 (1998)"; 라이트(Wright) 및 모리슨(Morrison) 등의 문헌 "Trends Biotechnol 15, 26-32 (1997)".]

[0008]

단일클론성 항체의 세포-중재된 효과자 기능은 우마나(Umana) 등의 문헌 "Nat Biotechnol 17, 176-180 (1999)" 및 미국 특허 제6,602,684호(국제 특허출원 공개공보 제WO 99/54342호)에 기재된 바와 같이 이들의 올리고당 성분을 조작함으로써 증진될 수 있다. 우마나 등은 중국 햄스터 난소(CHO: Chinese hamster ovary) 세포에서 2등분된 올리고당의 형성을 촉매화하는 글리코실전달효소인 .베타.(1,4)-N-아세틸글루코사미닐전달효소 III(GnTIII)의 과발현이 이를 세포에서 생산된 항체의 생체내 ADCC 활성을 크게 증가시킴을 보여준다. Asn297 탄수화물의 조성에서의 변경 또는 이의 제거는 Fc.감마.R 및 Clq 단백질로의 항체 Fc-도메인의 결합에도 영향을 준다[우마나(Umana) 등의 문헌 "Nat Biotechnol 17, 176-180 (1999)"; 테이비스(Davies) 등의 문헌 "Biotechnol Bioeng 74, 288-294 (2001)"; 미무라(Mimura) 등의 문헌 "J Biol Chem 276, 45539-45547 (2001)"; 라다에브(Radaev) 등의 문헌 "J Biol Chem 276, 16478-16483 (2001)"; 쉴즈(Shields) 등의 문헌 "J Biol Chem 276, 6591-6604 (2001)"; 쉴즈 등의 문헌 "J Biol Chem 277, 26733-26740 (2002)"; 시몬스(Simmons) 등의 문헌 "J Immuno Methods 263, 133-147 (2002)".]

발명의 내용

[0009]

본 발명은 항-MCSP 항체, 및 이를 사용하는 방법을 제공한다. 본 발명의 하나의 양태는 인간 MCSP의 막 근위 에피토프에 결합하는 단리된 항체를 제공하고, 여기서 항체는 Fc 영역에서 올리고당을 개질하도록 글리코조작되고, 항체는 글리코조작되지 않은 항체에 비하여 증가된 ADCC 효과자 기능을 갖는다. 하나의 실시태양에서, 인간 MCSP의 막 근위 에피토프는 CSPG 반복부-포함 도메인을 포함한다. 하나의 실시태양에서, CSPG 반복부-포함 도메인은 CSPG 반복부 14(서열 번호 3)를 포함한다. 하나의 실시태양에서, 항체의 Fc 영역은 글리코조작되지 않은 항체에 비하여 푸코스 잔기의 수가 적다. 하나의 실시태양에서, 항체는 글리코조작되지 않은 항체에 비하여 Fc 영역에서 푸코스 잔기에 대한 GlcNAc 잔기의 비가 높다. 하나의 실시태양에서, 항체의 Fc 영역은 글리코조작되지 않은 항체에 비하여 2등분된 올리고당의 비율이 높다. 특정 실시태양에서, 항체는 단일클론성 항체이다. 특정 실시태양에서, 항체는 인간 항체, 인간화된 항체, 또는 키메라성(chimeric) 항체이다. 특정 실시태양에서, 항체는 전장(full-length) IgG 부류 항체이다.

[0010]

하나의 실시태양에서, 항-MCSP 항체는 서열 번호 14의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1, 서열 번호 15의 아미-

노산 서열을 포함하는 HVR-H2, 및 서열 번호 16의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3을 포함한다. 하나의 실시태양에서, 항-MCSP 항체는 서열 번호 10의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; 서열 번호 11의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 서열 번호 12의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함한다. 하나의 실시태양에서, 항-MCSP 항체는 서열 번호 14의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1; 서열 번호 15의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; 서열 번호 16의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3; 서열 번호 10의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; 서열 번호 11의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 서열 번호 12의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함한다.

[0011] 하나의 실시태양에서, 항-MCSP 항체는 서열 번호 17의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1, 서열 번호 18의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2, 및 서열 번호 16의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3을 포함한다. 하나의 실시태양에서, 항-MCSP 항체는 서열 번호 13의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; 서열 번호 11의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 서열 번호 12의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함한다. 하나의 실시태양에서, 항-MCSP 항체는 서열 번호 17의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1, 서열 번호 18의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2, 및 서열 번호 16의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3; 서열 번호 13의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; 서열 번호 11의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 서열 번호 12의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함한다.

[0012] 하나의 실시태양에서, 항-MCSP 항체는 서열 번호 29의 아미노산 서열에 95% 이상의 서열 동일성을 갖는 VH 서열; 서열 번호 28의 아미노산 서열에 95% 이상의 서열 동일성을 갖는 VL 서열; 또는 서열 번호 29의 아미노산 서열에 95% 이상의 서열 동일성을 갖는 VH 서열 및 서열 번호 28의 아미노산 서열에 95% 이상의 서열 동일성을 갖는 VL 서열을 포함한다.

[0013] 하나의 실시태양에서, 항-MCSP 항체는 서열 번호 29의 VH 서열; 서열 번호 28의 VL 서열을 포함한다. 하나의 실시태양에서, 항-MCSP 항체는 서열 번호 29의 VH 서열 및 서열 번호 28의 VL 서열을 포함한다.

[0014] 하나의 실시태양에서, 항-MCSP 항체는 서열 번호 32의 아미노산 서열에 95% 이상의 서열 동일성을 갖는 VH 서열; 서열 번호 31의 아미노산 서열에 95% 이상의 서열 동일성을 갖는 VL 서열; 또는 서열 번호 32의 아미노산 서열에 95% 이상의 서열 동일성을 갖는 VH 서열 및 서열 번호 32의 아미노산 서열에 95% 이상의 서열 동일성을 갖는 VL 서열을 포함한다.

[0015] 하나의 실시태양에서, 항-MCSP 항체는 서열 번호 29의 VH 서열; 서열 번호 28의 VL 서열을 포함한다. 하나의 실시태양에서, 항-MCSP 항체는 서열 번호 29의 VH 서열 및 서열 번호 28의 VL 서열을 포함한다.

[0016] 본 발명의 또 다른 양태는 상기 기재된 바와 같은 항-MCSP 항체를 암호화하는 단리된 핵산을 제공한다. 본 발명의 또 다른 양태는 이러한 핵산을 포함하는 숙주 세포를 제공한다. 본 발명의 또 다른 양태는 항체가 생산되도록 이러한 숙주 세포를 배양하는 단계를 포함하는 항체의 제조 방법을 제공한다.

[0017] 본 발명의 또 다른 양태는 상기 기재된 바와 같은 항-MCSP 항체 및 세포독성제를 포함하는 면역컨주게이트(immunoconjugate)를 제공한다. 본 발명의 또 다른 양태는 상기 기재된 바와 같은 항-MCSP 항체 및 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 면역컨주게이트를 제공한다.

[0018] 본 발명의 또 다른 양태는 약제로서 사용하기 위한 상기 기재된 바와 같은 항-MCSP 항체를 포함하는 면역컨주게이트를 제공한다. 본 발명의 또 다른 양태는 암, 구체적으로 MCSP를 발현하는 암, 예컨대, 피부암(흑색종 및 기저 세포 암종 포함), 신경교종(교모세포종 포함), 골암(예컨대, 골육종), 및 백혈병(ALL 및 AML 포함)을 치료하기 위한 상기 기재된 바와 같은 항-MCSP 항체 또는 이의 면역컨주게이트를 제공한다.

[0019] 본 발명의 또 다른 양태는 세포 용해를 유도하는데 있어서의 상기 기재된 바와 같은 항-MCSP 항체의 용도를 제공한다. 본 발명의 또 다른 양태는 약제, 예컨대, 암 치료용 약제 또는 세포 용해를 유도하기 위한 약제의 제조에 있어서의 상기 기재된 바와 같은 항-MCSP 항체 또는 이의 면역컨주게이트의 용도를 제공한다.

[0020] 본 발명의 또 다른 양태는 효과량의 상기 기재된 바와 같은 항-MCSP 항체 또는 이의 면역컨주게이트를 암을 앓는 개별체에게 투여함을 포함하는, 암을 앓는 개별체를 치료하는 방법을 제공한다. 암은, 예를 들면, MCSP를 발현하는 암, 예컨대, 피부암(흑색종 및 기저 세포 암종), 신경교종(교모세포종 포함), 골암(예컨대, 골육종), 및 백혈병(ALL 및 AML 포함)이다.

[0021] 본 발명의 또 다른 양태는 세포 용해를 유도하기 위해 효과량의 상기 기재된 바와 같은 항-MCSP 항체 또는 이의 면역컨주게이트를 개별체에게 투여함을 포함하는, 개별체에서 세포 용해를 유도하는 방법을 제공한다.

[0022] 본 발명의 또 다른 양태는 샘플에 존재하는 MCSP와 항체 사이에 항체-MCSP 착체를 형성하도록 허용하는 조건하

에 샘플을 상기 기재된 바와 같은 항-MCSP 항체와 접촉시키는 단계, 및 착제의 존재 또는 부재를 면역검출 방법에 의해 검출하는 단계를 포함하는, MCSP 면역조직화학 검정을 제공한다. 하나의 실시태양에서, 샘플은 신선한 조직 샘플이다. 하나의 실시태양에서, 샘플은 동결된 조직, 또는 포르말린-고정되고, 파라핀-함침된 조직(FFPET: formalin-fixed, paraffin-embedded tissue)이다.

도면의 간단한 설명

[0023]

도 1은 Colo38 세포에서 표면 MCSP에 대한 키메라성 항체 LC007의 결합 친화도를 보여주는 FAC 검정의 결과를 도시하는 그래프이다.

도 2는 A2058 및 A375 암 세포에서 표면 MCSP에 대한 키메라성 항체 LC007의 결합 친화도를 보여주는 FAC 검정의 결과를 도시하는 그래프이다.

도 3은 MCSP의 구조물을 포함하는 CSPG 반복부의 개략도이다.

도 4는 MCSP CSPG 반복 구조물에 대한 LC007의 결합 친화도를 보여주는 그래프이다.

도 5는 항체 LC007이 인간 발현 작성물에 대해서와 유사한 친화도로 상응하는 사이노몰구스(cynomolgus) 작성물에 결합함을 보여주는 FAC 검정의 결과를 도시하는 그래프이다.

도 6은 글리코조작되지 않은 LC007 항체 및 글리코조작된 LC007 항체 둘 다의 ADCC 효과를 보여주는 그래프이다.

도 7은 글리코조작된 LC007 항체의 ADCC 효과가 인간 U86MG 교모세포종 세포주에서 관찰됨을 보여주는 그래프이다.

도 8은 LC007 항체의 몇몇 인간화된 변형체의 결합 특성을 보여주는 그래프이다.

도 9는 LC007의 인간화된 변형체가 모 글리코조작된 LC007 항체의 ADCC 활성을 보유함을 보여주는 그래프이다.

도 10은 LC007의 인간화된 변형체가 모 글리코조작된 LC007 항체의 ADCC 활성을 보유함을 보여주는 그래프이다.

도 11은 인간화된 글리코조작된 항-MCSP 항체가 MV3 종양 세포주를 갖는 FcgR3A 형질감염 SCID 마우스에서 비히를 대조군에 비하여 생존 기간을 크게 증가시킴을 보여주는 생존 곡선을 도시한다.

도 12는 키메라성 글리코조작된 항-MCSP 항체가 MDA-MB-435 종양 세포주를 갖는 FcgR3A 형질감염 SCID 마우스에서 비히를 대조군에 비하여 생존 기간을 크게 증가시킴을 보여주는 생존 곡선을 도시한다.

도 13은 키메라성 글리코조작된 항-MCSP 항체 및 이의 인간화된 변형체, M4-3 ML2가 MDA-MB-435 종양 세포주를 갖는 FcgR3A 형질감염 SCID 마우스에서 비히를 대조군에 비하여 생존 기간을 크게 증가시킴을 보여주는 생존 곡선을 도시한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0024]

I. 정의

[0025]

본원에서의 목적을 위해 "수용체 인간 골격구조"는, 상기 정의된 바와 같이, 인간 면역글로불린 골격구조 또는 인간 컨센서스(consensus) 골격구조로부터 유도화된, 경쇄 가변성 도메인(VL) 골격구조 또는 중쇄 가변성 도메인(VH) 골격구조의 아미노산 서열을 포함하는 골격구조이다. 인간 면역글로불린 골격구조 또는 인간 컨센서스 골격구조"로부터 유도화된" 수용체 인간 골격구조는 이의 동일한 아미노산 서열을 포함하거나, 아미노산 서열 변화를 포함할 수 있다. 몇몇 실시태양에서, 아미노산 변화의 수는 10개 이하, 9개 이하, 8개 이하, 7개 이하, 6개 이하, 5개 이하, 4개 이하, 3개 이하, 또는 2개 이하이다. 몇몇 실시태양에서, VL 수용체 인간 골격구조는 서열에 있어서 VL 인간 면역글로불린 골격구조 서열 또는 인간 컨센서스 골격구조 서열과 동일하다.

[0026]

"친화도"는 분자의 단일 결합 부위(예를 들어, 항체)와 그의 결합 파트너(예를 들어, 항원) 사이의 비공유적 상호작용의 총합의 강도를 지칭한다. 별도로 지시되지 않는 한, 본원에서 사용될 경우, "결합 친화도"는 결합 쌍의 구성원들(예를 들어, 항체 및 항원) 사이의 1:1 상호작용을 반영하는 고유 결합 친화도를 지칭한다. 분자 X의 그의 파트너 Y에 대한 친화도는 일반적으로 해리 상수(K_d)에 의해 표시될 수 있다. 친화도는 본원에 기재된 방법을 비롯하여, 당분야에 공지된 통상의 방법에 의해 측정될 수 있다. 결합 친화도를 측정하기 위한 구체적이고 예시적인 실시양태들이 아래에 기재되어 있다.

- [0027] "친화도 성숙된" 항체는 변경되지 않는 모 항체에 비하여 하나 이상의 과가변성 영역(HVR: hypervariable region)에서 하나 이상의 변경을 갖는 항체를 지칭하고, 이러한 변경으로 인하여 항원에 대한 항체의 친화도가 개선된다.
- [0028] "혈관신생성 질환"은 비종양성 및 종양성 증상을 비롯한 혈관신생의 임의의 조절 장애를 지칭한다. 종양성 증상으로는 제한되지 않지만 이후 기재된 증상이 포함된다. 비종양성 증상으로는 제한되지 않지만 바람직하지 않거나 비정상적인 비대증, 관절염, 류마티스 관절염(RA), 건선, 판상 건선, 유육종증, 아테롬성 동맥경화증, 동맥경화반, 당뇨병 및 다른 증식성 당뇨망막병증, 예컨대, 조산아의 당뇨망막병증, 후수정체 섬유증식, 출혈성 녹내장, 노인성 황반 변성, 당뇨성 황반 부종, 각막 신혈관 형성, 각막 이식 신혈관 형성, 각막 이식 거부, 망막/맥락막 신혈관 형성, 앞방각(angle)의 신혈관 형성(피부조홍), 눈의 신혈관 형성 질환, 혈관 재협착증, 동정 맥 기형(AVM: arteriovenous malformations), 뇌수막종, 혈관종, 맥관섬유종, 갑상선 비후[그레이브(Grave)병 포함], 각막 및 다른 조직 이식, 만성 염증, 폐 염증, 급성 폐 손상/ARDS, 폐혈증, 원발성 폐고혈압, 악성 폐유출, 뇌 부종(예를 들어, 급성 뇌출증/폐쇄된 두부 손상/트라우마와 연관됨), 활액 염증, RA에서의 파누스(pannus) 형성, 골화근육염, 비대성 골 형성, 퇴행성관절염(OA), 난치성 복수병, 다낭성 난소증, 자궁내막증, 체액의 제3 공간 질환(3rd spacing of fluid disease)(췌장염, 구획 증후군, 화상, 장 질환), 자궁 섬유증, 조산, 만성 염증, 예컨대, IBD[크론(Crohn)병 및 케양성 대장염], 신장 이형이식 거부, 염증성 장 질환, 신증후군, 바람직하지 않거나 비정상적인 조직체 성장(비-암), 혈우병성 관절, 비대흉터, 모발 성장의 저해, 오시에르-웨버(Osier-Weber) 증후군, 화농성 육아종, 섬유 증식증, 강피증, 트라코마(trachoma), 혈관 유착, 활막염, 피부염, 임신중독증, 복수병, 심낭 삼출증(예컨대, 심낭염과 연관된 질환), 및 흉막 삼출증이 포함된다.
- [0029] 용어 "항-MCSP 항체" 및 "MCSP에 결합하는 항체"는 항체가 MCSP를 표적화하는데 있어서 진단학적 및/또는 치료학적 제제로서 유용하기에 충분한 친화도로 MCSP에 결합할 수 있는 항체를 지칭한다. 하나의 실시태양에서, 관련되지 않은 비-MCSP 단백질로의 항-MCSP 항체의 결합 정도는, 예를 들어, 방사성면역검정(RIA)에 의해 측정될 경우, MCSP로의 항체의 결합의 약 10% 미만이다. 특정 실시태양에서, MCSP에 결합하는 항체는 $\leq 1 \mu M$, $\leq 100 nM$, $\leq 10 nM$, $\leq 1 nM$, $\leq 0.1 nM$, $\leq 0.01 nM$, 또는 $\leq 0.001 nM$ (예를 들어, $10^{-8} M$ 이하, 예를 들어, $10^{-8} M$ 내지 $10^{-13} M$, 예를 들어, $10^{-9} M$ 내지 $10^{-13} M$)의 해리 상수(Kd)를 갖는다. 특정 실시태양에서, 항-MCSP 항체는 상이한 종으로부터의 MCSP에서 보존된 MCSP의 에피토프에 결합한다.
- [0030] 용어 "항체"는 본원에서 가장 넓은 의미로 사용되고 다양한 항체 구조물, 예컨대, 제한되지 않지만 단일클론성 항체, 다중클론성 항체, 다중특이적 항체(예를 들어, 이특이적 항체), 및 항체 단편을, 이들이 원하는 항원-결합 활성을 나타내는 한, 내포한다.
- [0031] "항체 단편"은 손상되지 않은 항체가 결합하는 항원에 결합하는 손상되지 않은 항체의 일부를 포함하는 손상되지 않은 항체 이외의 분자를 지칭한다. 항체 단편의 예로는, 제한되지 않지만, Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂; 디아바디(diabody); 선형 항체; 단일-쇄 항체 분자(예를 들어, scFv); 및 항체 단편으로부터 형성된 다중특이적 항체가 포함된다.
- [0032] 기준 항체와 "동일한 에피토프에 결합하는 항체"는 기준 항체의 그의 항원으로의 결합을 경쟁 검정에서 50% 이상 차단하는 항체를 지칭하고, 역으로 기준 항체는 항체의 그의 항원으로의 결합을 결합 검정에서 50% 이상 차단한다. 예시적인 경쟁 검정법은 본원에 제공된다.
- [0033] 용어 "암" 및 "암을 앓는"은 조절되지 않은 세포 성장/증식에 의해 전형적으로 특징지워 지는 포유동물에서의 생리학적 증상을 지칭하거나 설명한다. 암의 예로는, 제한되지 않지만, 암종, 림프종[예를 들어, 호지킨(Hodgkin)성 및 비호지킨성 림프종], 아세포종, 육종 및 백혈병이 포함된다. 이러한 암의 보다 구체적인 예로는 편평상피 세포 암, 소-세포 폐암, 비-소 세포 폐암, 폐의 선암, 폐의 편평상피 암종, 복막암, 간세포 암, 골암[예를 들어, 골육종, 연골육종, 에윙(Ewing)의 육종], 위장암, 췌장암, 신경교종, 경부암, 난소암, 간암, 방광암, 간세포암, 유방암, 결장암, 결장직장암, 자궁내막 또는 자궁 암종, 타액선 암종, 신장암, 간암, 전립선암, 피부암(예를 들어, 흑색종 및 기저 세포 암종), 음문암, 갑상선암, 간 암종, 백혈병 및 기타 림프증식성 질환, 및 다양한 유형의 두경부암이 포함된다.
- [0034] 용어 "세포 증식성 질환" 및 "증식성 질환"은 비정상적 세포 증식 정도와 연관된 질환을 지칭된다. 하나의 실시태양에서, 세포 증식성 질환은 암이다.
- [0035] 용어 "키메라성" 항체는 중쇄 및/또는 경쇄의 일부가 특정 근원 또는 종으로부터 유도되고 중쇄 및/또는 경쇄의

나머지 부분이 상이한 근원 또는 종으로부터 유도되는 항체를 지칭한다.

[0036] 항체의 "부류"는 그의 중쇄에 의해 소유되는 불변성 도메인 또는 불변성 영역의 유형을 지칭한다. 항체의 5가지 주요 부류인 IgA, IgD, IgE, IgG, 및 IgM이 존재하고, 이들중 몇몇은 추가로 하위부류(이소타입: isotype), 예를 들어, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁, 및 IgA₂로 나눠진다. 면역글로불린의 상이한 부류에 상응하는 중쇄 불변성 도메인은 각각 α , δ , ϵ , γ , 및 μ 로 지칭된다.

[0037] 용어 "세포독성제"는 본원에 사용될 경우 세포 기능을 억제 또는 방지하고/하거나 세포 사멸 또는 파괴를 일으키는 물질을 지칭한다. 세포독성제로는, 제한되지 않지만, 방사성 동위원소(예를 들어, At²¹¹, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹², P³², Pb²¹² 및 Lu의 방사성 동위원소); 화학치료제 또는 약물(예를 들어, 메토트랙세이트, 아드리아미신, 빈카 알칼로이드(빈스크린, 빈블라스틴, 에토포시드), 독소루비신, 멜팔란, 미토마이신 C, 클로람부실, 다우노루비신 또는 다른 삽입 제제); 성장 억제제; 효소 및 이의 단편, 예컨대, 핵용해(nucleolytic) 효소; 항생제; 독소, 예컨대, 소분자 독소, 또는 박테리아, 균류, 식물 또는 동물 기원의 효소적 활성 독소(이의 단편 및/또한 변형물 포함); 및 이후 기재되는 다양한 항종양제 또는 항암제가 포함된다.

[0038] "효과자 기능"은 항체 이소타입에 따라 상이한, 항체의 Fc 영역에 기인하는 생물 활성을 지칭한다. 항체 효과자 기능의 예로는 Clq 결합 및 보체 의존성 세포독성(CDC); Fc 수용체 결합; 항체-의존성 세포-중재된 세포독성(ADCC); 식세포작용; 세포 표면 수용체(예를 들어, B 세포 수용체)의 하향 조절; 및 B 세포 활성화가 포함된다.

[0039] 제제, 예를 들어, 약학 제형의 "효과량"은 원하는 치료학적 또는 예방학적 결과를 달성하기 위해 필요한 시간의 기간 동안 및 투여량에서의 효과적인 양을 지칭한다.

[0040] 용어 "Fc 영역"은 본원에서 불변성 영역의 적어도 일부를 포함하는 면역글로불린 중쇄의 C-말단 영역을 규정하기 위해 사용된다. 이 용어는 고유의 서열 Fc 영역 및 변형 Fc 영역을 포함한다. 하나의 실시태양에서, 인간 IgG 중쇄 Fc 영역은 Cys226, 또는 Pro230으로부터 중쇄의 카복실-말단으로 연장된다. 그러나, Fc 영역의 C-말단 라이신(Lys447)은 존재하거나 존재하지 않을 수 있다. 본원에서 달리 특정화되지 않는 한, Fc 영역 또는 불변성 영역중 아미노산 잔기의 번호매김은 카밧(Kabat, E.A.) 등의 문헌 "Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)"에 기재된 바와 같이, EU 색인으로도 불리는 EU 번호매김 체계에 따른다.

[0041] "골격구조" 또는 "FR"은 과가변성 영역(HVR) 잔기 이외의 가변성 도메인 잔기를 지칭한다. 가변성 도메인의 FR은 일반적으로 다음의 4가지 FR 도메인으로 구성된다: FR1, FR2, FR3, 및 FR4. 따라서, HVR 및 FR 서열은 일반적으로 VH(또는 VL)에서 하기 서열로 나타난다: FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4.

[0042] 용어 "전장 항체", "손상되지 않은 항체", 및 "전체 항체"는 본원에서 상호교환적으로 고유의 항체 구조와 실질적으로 유사한 구조를 갖는 항체 또는 본원에 정의된 바와 같은 Fc 영역을 포함하는 중쇄를 갖는 항체를 지칭하기 위해 사용된다.

[0043] 용어 "숙주 세포", "숙주 세포주", 및 "숙주 세포 배양액"은 상호교환적으로 사용되고, 이러한 세포의 자손체를 비롯하여 외래성 핵산이 도입되어진 세포를 지칭한다. 숙주 세포는 "형질전환체" 및 "형질전환 세포"를 포함하고, 이는 계대배양의 수와 무관하게 1차 형질전환된 세포 및 이로부터 유도된 자손체를 포함한다. 자손체는 핵산 함량에 있어서 모 세포와 완전히 동일하지 않을 수 있고, 돌연변이를 포함할 수 있다. 고유적으로 형질전환된 세포에서 스크리닝되거나 선택될 때 동일한 기능 또는 생물학적 활성을 갖는 돌연변이 자손체가 본원에 포함된다.

[0044] "인간 항체"는 인간 또는 인간 세포에 의해 생산되거나, 인간 항체 레파토리(repertoire) 또는 다른 인간 항체-암호화 서열을 이용하는 인간 이외의 근원으로부터 유도된 항체의 아미노산 서열에 상응하는 아미노산 서열을 소유하는 항체이다. 인간 항체에 대한 이러한 정의는 인간 이외의 항원-결합 잔기를 포함하는 인간화된 항체를 특별히 배제한다.

[0045] "인간 컨센서스 골격구조"는 인간 면역글로불린 VL 또는 VH 골격구조 서열의 선택시 가장 통상적으로 발생하는 아미노산 잔기를 나타내는 골격구조이다. 일반적으로, 인간 면역글로불린 VL 또는 VH 서열의 선택은 가변성 도메인 서열의 하위군으로부터이다. 일반적으로, 서열의 하위군은 카밧 등의 문헌 "Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., NIH Publication 91-3242, Bethesda MD (1991), Vols. 1-3"에서와 같은 하위군이다. 하나의 실시태양에서, VL의 경우, 하위군은 상기 카밧 등의 문헌에서와 같은 하위군 카파 I이다.

하나의 실시태양에서, VH의 경우, 하위군은 상기 카밧 등의 문헌에서와 같은 하위군 III이다.

[0046] "인간화된" 항체는 인간 이외의 HVR로부터의 아미노산 잔기 및 인간 FR로부터의 아미노산 잔기를 포함하는 키메라성 항체를 지칭한다. 특정 실시태양에서, 인간화된 항체는 실질적으로 모든 적어도 하나의, 전형적으로 2개의 가변성 도메인을 포함하고, 여기서 모든 또는 실질적으로 모든 HVR(예를 들어, CDR)은 인간 이외의 항체의 HVR에 상응하고, 모든 또는 실질적으로 모든 FR은 인간 항체의 FR에 상응한다. 인간화된 항체는 임의적으로 인간 항체로부터 유도된 항체 불변성 영역의 적어도 일부를 포함할 수 있다. 항체의 "인간화된 형태", 예를 들어, 인간 이외의 항체는 인간화를 겪은 항체를 지칭한다.

[0047] 용어 "과가변성 영역" 또는 "HVR"은, 서열에서 과가변성이고/이거나 구조적으로 한정된 루우프(loop)("과가변성 루우프")를 형성하는 항체 가변성 도메인의 각각의 영역을 지칭한다. 일반적으로, 고유의 4개-쇄 항체는 6개의 HVR을 포함한다; VH에 3개(H1, H2, H3), VL에 3개(L1, L2, L3). HVR은 일반적으로 과가변성 루우프로부터 및/또는 "상보성 결정 영역"(CDR)으로부터의 아미노산 잔기를 포함하고, 후자는 가장 높은 서열 가변성이고/이거나 항원 인식에 연관된다. 예시적인 과가변성 루우프는 아미노산 잔기 26 내지 32(L1), 50 내지 52(L2), 91 내지 96(L3), 26 내지 32(H1), 53 내지 55(H2), 및 96 내지 101(H3)에서 초래된다[코티아(Chothia) 및 레스크(Lesk)의 문헌 "*J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)".] 예시적인 CDR(CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3, CDR-H1, CDR-H2, 및 CDR-H3)은 L1의 아미노산 잔기 24 내지 34, L2의 50 내지 56, L3의 89 내지 97, H1의 31 내지 35B, H2의 50 내지 65, 및 H3의 95 내지 102에서 초래된다[카밧 등의 문헌 "*Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)".] VH에서의 CDR1을 제외하고, CDR은 일반적으로 과가변성 루우프를 형성하는 아미노산 잔기를 포함한다. CDR은 또한 항원에 접촉하는 잔기인 "특이성 결정 잔기" 또는 "SDR(specificity determining residue)"을 포함한다. SDR은 CDR의 영역내에 포함되고, 약자화된-CDR, 또는 a-CDR로 불린다. 예시적인 a-CDR(a-CDR-L1, a-CDR-L2, a-CDR-L3, a-CDR-H1, a-CDR-H2, 및 a-CDR-H3)은 L1의 아미노산 잔기 31 내지 34, L2의 50 내지 55, L3의 89 내지 96, H1의 31 내지 35B, H2의 50 내지 58, 및 H3의 95 내지 102에서 초래된다[알마그로(Almagro) 및 프란손(Fransson)의 문헌 "*Front. Biosci.* 13:1619-1633 (2008)" 참조]. 달리 지시되지 않는 한, 가변성 도메인중 HVR 잔기 및 기타 잔기(예를 들어, FR 잔기)는 본원에서 상기 카밧 등의 문헌에 따라 번호매김된다.

[0048] "면역컨주게이트(immunoconjugate)"는 하나 이상의 이종성 분자(들), 제한되지 않지만, 예로서 세포독성제에 컨주게이트되는 항체이다.

[0049] "개별체" 또는 "피험체"는 포유동물이다. 포유동물로는, 제한되지 않지만, 가축 동물(예를 들어, 소, 양, 고양이, 개 및 말), 영장류(예를 들어, 인간 및 인간 이외의 영장류, 예컨대, 원숭이), 토끼, 및 설치류(예를 들어, 마우스 및 래트)가 포함된다. 특정 실시태양에서, 개별체 또는 피험체는 인간이다.

[0050] "단리된" 항체는 그의 자연 환경의 성분들로부터 분리된 것이다. 몇몇 실시태양에서, 항체는, 예를 들면, 전기 영동(예를 들어, SDS-PAGE, 등전점 전기영동(IEF: isolectric focusing), 모세관 전기영동) 또는 크로마토그래피(예를 들어, 이온 교환 또는 역상 HPLC)에 의해 결정될 경우 95% 또는 99% 초과의 순도로 정제된다. 항체 순도의 평가 방법을 검토하기 위해, 예를 들어, 플랫만(Flatman) 등의 문헌 "*J. Chromatogr. B* 848:79-87 (2007)"을 참조한다.

[0051] "단리된" 핵산은 그의 자연 환경의 성분으로부터 분리된 핵산 분자를 지칭한다. 단리된 핵산은, 대개는 핵산 분자를 함유하는 세포에 포함된 핵산 분자를 포함하지만, 핵산 분자는 그의 천연 염색체 자리로부터 상이한 염색체 자리에 또는 염색체 밖에 존재한다.

[0052] "항-MCSP 항체를 암호화하는 단리된 핵산"은 항체 중쇄 및 경쇄(또는 이의 단편)을 암호화하는 하나 이상의 핵산 분자를 지칭하고, 예컨대, 단일 벡터 또는 별도의 벡터들중의 핵산 분자(들), 및 숙주 세포에서 하나 이상의 자리에 존재하는 핵산 분자(들)가 포함된다.

[0053] 용어 "단일클론성 항체"는 본원에 사용될 경우 실질적으로 동종성인 항체의 모집단으로부터 수득된 항체를 지칭하고, 즉 모집단을 구성하는 개별 항체는 동일하고/하거나 동일한 에피토프에 결합하지만, 예를 들어, 자연 발생 돌연변이를 포함하거나 단일클론성 항체 제제의 생산 동안 야기된 가능한 변형 항체는 제외하고, 이러한 변형체는 일반적으로 소량으로 존재한다. 전형적으로 상이한 결정자(에피토프)에 대해 유도되는 상이한 항체를 포함하는 다중클론성 항체 제제와 대조적으로, 단일클론성 항체 제제의 각각의 단일클론성 항체는 항원 상의 단일한 결정자에 대해 유도된다. 이와 같이, 한정어 "단일클론성"은, 항체의 실질적으로 동종성인 모집단으로부터 수득된 항체의 특성을 지시하고, 이는 임의의 특정 방법에 의해 항체의 생산을 필요로 하는 것으로 해석되지

않아야 한다. 예를 들면, 본 발명에 따라 사용되는 단일클론성 항체는 다양한 기법에 의해 제조될 수 있고, 제한되지 않지만, 하이브리도마 방법, 재조합 DNA 방법, 파아지 디스플레이(phage display) 방법, 및 인간 면역글로불린 유전자자리의 전부 또는 일부를 포함하는 형질감염 동물을 이용하는 방법이 포함되고, 이러한 방법 및 단일클론성 항체를 제조하는 다른 예시적인 방법은 본원에 기재되어 있다.

[0054] "네이키드(naked) 항체"는 이종성 부분체(moietry)(예를 들어, 세포독성 부분체) 또는 방사능표지에 친수계이션되지 않는 항체를 지칭한다. 네이키드 항체는 약학 제형에 존재할 수 있다.

[0055] "고유의 항체"는 다양한 구조를 갖는 자연 발생 면역글로불린을 지칭한다. 예를 들면, 고유의 IgG 항체는 디설파이드-결합된 2개의 동일한 경쇄 및 2개의 동일한 중쇄로 구성된 약 150,000 달톤의 이종성사량체 당단백질이다. N-말단에서 C-말단까지, 각각의 중쇄는 3개의 불변성 도메인(CH1, CH2, 및 CH3)이 뒤따르는 가변성 중쇄도메인 또는 중쇄 가변성 도메인으로도 불리는 가변성 영역(VH)을 갖는다. 유사하게, N-말단에서 C-말단까지, 각각의 경쇄는 불변성 경쇄(CL) 도메인이 뒤따르는 가변성 경쇄 도메인 또는 경쇄 가변성 도메인으로도 불리는 가변성 영역(VL)을 갖는다. 항체의 경쇄는 그의 불변성 도메인의 아미노산 서열에 기초하여, 카파(κ) 및 람다(λ)로 불리는 2가지 유형중 하나로 할당된다.

[0056] 용어 "패키지 삽입물"은, 지시사항, 용법, 투여량, 투여법, 조합 치료법, 사용금지사유에 관한 정보, 및/또는 이러한 치료 제품의 사용에 관한 경고문 등을 포함하는, 치료 제품의 상업적 패키지에 관례상 포함되는 설명서를 지칭한다.

[0057] 기준 폴리펩타이드 서열에 대한 "아미노산 서열 동일성 퍼센트(%)"는, 필요할 경우, 최대 서열 동일성 퍼센트를 달성을 위해 서열을 정렬하고 갭(gap)을 도입한 후, 서열 동일성의 일부로서 임의의 보존적 치환을 고려하지 않고, 기준 폴리펩타이드 서열중의 아미노산 잔기와 동일한 후보 서열중의 아미노산 잔기의 백분율로 정의된다. 아미노산 서열 동일성 퍼센트를 결정하기 위한 정렬은 당분야의 기술에 속하는 다양한 방식으로, 예를 들어, 공개적으로 입수가능한 컴퓨터 소프트웨어, 예컨대, BLAST, BLAST-2, ALIGN 또는 메그얼라인(Megalign)(DNASTAR) 소프트웨어를 사용하여 달성이 될 수 있다. 당분야의 숙련가라면, 비교되는 서열의 전장에 대하여 최대 정렬을 달성을 위해 요구되는 임의의 알고리즘을 비롯하여, 서열 정렬을 위한 적절한 매개변수를 결정할 수 있다. 그러나, 본원의 목적을 위해, 아미노산 서열 동일성% 값은 서열 비교 컴퓨터 프로그램 ALIGN-2를 사용하여 생성된다. ALIGN-2 서열 비교 컴퓨터 프로그램은 제넨테크 인코포레이티드(Genentech, Inc.)에 의해 제조되고, 원시 코드(source code)는 사용자 기록문서와 함께 워싱턴 디.씨. 20559 소재의 미국 저작권 사무소(Copyright Office)에 보관되어 있고, 여기서 이는 미국 저작권 등록 번호 제TXU510087호하에 등록되어 있다. ALIGN-2 프로그램은 캘리포니아주 사우쓰 샌 프란시스코 소재의 제넨테크 인코포레이티드로부터 공개적으로 입수가능하거나, 또는 원시 코드로부터 컴파일링될 수 있다. ALIGN-2 프로그램은, 디지털 UNIX V4.0D를 비롯하여, UNIX 작동 시스템 상에서 사용하기 위해 컴파일링되어야 한다. 모든 서열 비교 매개변수는 ALIGN-2 프로그램에 의해 설정되고, 달라지지 않는다.

[0058] ALIGN-2가 아미노산 서열 비교를 위해 이용되는 상황에서, 소정의 아미노산 서열 B로의, B와의, 또는 B에 대한 소정의 아미노산 서열 A의 아미노산 서열 동일성%(이는 다르게는 소정의 아미노산 서열 B로의, B와의 또는 B에 대한 특정한 아미노산 서열 동일성을 갖거나 포함한 소정의 아미노산 서열 A로서도 표현됨)은 다음과 같이 계산된다:

[0059] X/Y 분율×100

[0060] 여기서,

[0061] X는 A 및 B의 프로그램 정렬에서 서열 정렬 프로그램 ALIGN-2와의 동일한 부합성으로서 획득된 아미노산 잔기의 수이고, Y는 B에서의 아미노산 잔기의 총 수이다. 아미노산 서열 A의 길이가 아미노산 서열 B의 길이와 동일하지 않은 경우, B에 대한 A의 아미노산 서열 동일성%는 A에 대한 B의 아미노산 서열 동일성%와 동일하지 않을 것임을 이해할 것이다. 달리 특별히 언급되지 않는 한, 본원에서 사용된 모든 아미노산 서열 동일성% 값은 ALIGN-2 컴퓨터 프로그램을 사용하여 바로 앞 문단에서 기재된 바와 같이 수득된다.

[0062] 용어 "약학 제형"은 이에 포함된 활성 구성성분의 생물학적 활성이 효과적이도록 허용하는 형태이고, 제형이 투여되는 피험체에 허용되지 않도록 독성인 추가의 성분을 함유하지 않는 제제를 지칭한다.

[0063] "약학적으로 허용가능함 담체"는 피험체에 무독성인 활성 구성성분 이외의 약학 제형중의 활성 구성성분을 지칭한다. 약학적으로 허용가능함 담체로는, 제한되지 않지만, 완충제, 부형제, 안정화제 또는 보존제가 포함된다.

[0064]

용어 "MCSP"는, 본원에서 사용될 경우, 달리 지시되지 않는 한, 포유동물, 예컨대, 영장류(예를 들어, 인간) 및 설치류(예를 들어, 마우스 및 래트)를 비롯한 임의의 척추동물 근원으로부터의 임의의 고유의 MCSP(흑색종 콘드로이틴 설페이트 프로테오글리칸)를 지칭한다. 이 용어는 "전장"의 가공되지 않은 MCSP 뿐만 아니라 세포에서 가공으로부터 생성된 임의의 MCSP 형태를 내포한다. 이 용어는 또한 MCSP의 천연 발생 변형체, 예를 들어, 스플라이스(splice) 변형체 또는 대립형질(allelic) 변형체를 내포한다. MCSP는 또한 콘드로이틴 설페이트 프로테오글리칸 4(CSPG4), 콘드로이틴 설페이트 프로테오글리칸 NG2, 고분자량-흑색종 화합된 항원(HMW-MAA), 및 흑색종 콘드로이틴 설페이트 프로테오글리칸으로도 공지되어 있다. 예시적인 인간 MCSP의 아미노산 서열은 서열 번호 1에 제시되어 있다. 플루쉬케(Pluschke G.) 등의 문헌 "인간 흑색종-화합된 콘드로이틴 설페이트 프로테오글리칸의 분자 클로닝(Molecular cloning of a human melanoma-associated chondroitin sulfate proteoglycan), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93:9710-9715(1996)", 스타우브(Staub E.) 등의 문헌 "흑색종-화합된 콘드로이틴 설페이트 프로테오글리칸에서의 신규 반복부는 신규 단백질 계열을 정의한다(A novel repeat in the melanoma-associated chondroitin sulfate proteoglycan defines a new protein family), *FEBS Lett.* 527:114-118(2002); 유전자은행(Genbank) 수탁 번호: NP_001888"을 참조한다.

[0065]

본원에서 사용될 경우, 용어 "치료"(및 이의 문법적인 변형어, 예컨대, "치료하다" 또는 "치료하는")는 치료될 개별체의 자연적 과정을 변경시키는 시도에 있어서의 임상적 개입을 지칭하고, 임상적 병리 과정 동안 또는 예방을 위해 수행될 수 있다. 요망되는 치료 효과로는, 제한되지 않지만, 질병의 발생 또는 재발의 방지, 증후의 경감, 질병의 임의의 직접적 또는 간접적인 병리학적 결과의 감소, 전이의 방지, 질병 진행 속도의 감소, 질병 상태의 개선 또는 일시적 억제, 및 경감 또는 개선된 예후가 포함된다. 몇몇 실시태양에서, 본 발명의 항체는 질병의 전개를 지연시키거나 질병의 진행을 둔화시키기 위해 사용된다.

[0066]

용어 "가변성 영역" 또는 "가변성 도메인"은 항원으로의 항체의 결합에 관여되는 항체 중쇄 또는 경쇄의 도메인을 지칭한다. 고유의 항체의 중쇄 및 경쇄(각각 VH 및 VL)의 가변성 도메인은 일반적으로 유사한 구조를 갖고, 각각의 도메인은 4개의 보존된 골격구조 영역(FR: framework region) 및 3개의 과가변성 영역(HVR)을 포함한다 [예를 들어, 키드트(Kindt) 등의 문헌 "Kuby Immunology, 6th ed., W.H. Freeman and Co., page 91 (2007)"을 참조한다]. 단일 VH 또는 VL 도메인은 항원-결합 특이성을 부여하기에 충분할 수 있다. 더욱이, 특정 항원에 결합하는 항체는 각각 상보적 VL 또는 VH 도메인의 라이브러리를 스크리닝하기 위해 항원에 결합하는 항체로부터 VH 또는 VL 도메인을 사용하여 단리될 수 있다. 예를 들어, 포르토란(Portolano) 등의 문헌 "J. Immunol. 150:880-887 (1993)"; 클락슨(Clackson) 등의 문헌 "Nature 352:624-628 (1991)"을 참조한다.

[0067]

용어 "벡터"는, 본원에서 사용될 경우, 이것이 연결되는 또 다른 핵산을 증식시킬 수 있는 핵산 분자를 지칭한다. 이 용어는 자가-복제 핵산 구조물, 뿐만 아니라 이것이 도입되는 숙주 세포의 게놈내로 혼입된 벡터를 포함한다. 특정 벡터는 이들이 작동적으로 연결된 핵산의 발현을 유도할 수 있다. 이러한 벡터는 "발현 벡터"로서 본원에 지칭된다.

[0068]

II. 조성물 및 방법

[0069]

본 발명은 세포 증식 질환, 예컨대, 암을 치료 및/또는 진단하는데 유용한 항-MCSP 항체를 제공한다. 특정 실시태양에서, MCSP의 막 근위 에피토프에 결합하는 항체가 제공된다. 특정 실시태양에서, MCSP에 결합하는 효과자 기능이 증진된 항체가 제공된다.

[0070]

A. 예시적인 항-MCSP 항체

[0071]

하나의 양태에서, 본 발명은 MCSP에 결합하는 단리된 항체를 제공한다. 특별히, 본 발명을 위해 제공된 항-MCSP 항체는 인간 MCSP의 막 근위 에피토프에 결합한다. 스타우브(Staub E.) 등의 문헌 "FEBS Lett. 527:114-118(2002)"에 논의된 바와 같이, MCSP의 막 근위 영역은, CSPG 반복 도메인으로서 지칭되는, 신규한 다중 반복된 도메인으로 구성된다(도 3). 본 발명의 항-MCSP 항체는 CSPG 반복부-포함 도메인을 포함하는 인간 MCSP의 막 근위 도메인에 존재하는 에피토프에 결합한다. 하나의 실시태양에서, CSPG 반복부-포함 도메인은 CSPG 반복부 14를 포함하고, 이는 인간 MCSP의 아미노산 1937 내지 2043에 상응한다. 하나의 실시태양에서, CSPG 반복부 14 도메인은 서열 번호 3에 제시된 아미노산 서열을 갖는다. 또 다른 실시태양에서, CSPG 반복부-포함 도메인은 CSPG 반복부 14 및 적어도 일부의 CSPG 반복부 15를 포함한다. CSPG 반복부 15 도메인은 인간 MCSP의 아미노산 2044 내지 2246에 상응한다. 하나의 실시태양에서, CSPG 반복부-15 도메인은 서열 번호 4의 아미노산 서열을 갖는다. 하나의 실시태양에서, CSPG 반복부-포함 도메인은 서열 번호 5의 아미노산 서열을 갖는다. 하나의 실시태양에서, CSPG 반복부-포함 도메인은 고유의 막간 도메인이 없는 서열 번호 5의 아미노산 서열을 갖는다.

다. 하나의 실시태양에서, CSPG 반복부-포함 도메인은 CSPG 반복부 13 내지 15를 포함한다. 하나의 실시태양에서, CSPG 반복부-포함 도메인은 서열 번호 6의 아미노산 서열을 포함한다. 하나의 실시태양에서, CSPG 반복부-포함 도메인은 고유의 막간 도메인이 없는 서열 번호 6의 아미노산 서열을 갖는다. 하나의 실시태양에서, CSPG 반복부-포함 도메인은 CSPG 반복부 12 내지 15를 포함한다. 하나의 실시태양에서, CSPG 반복부-포함 도메인은 서열 번호 7의 아미노산 서열을 포함한다. 하나의 실시태양에서, CSPG 반복부-포함 도메인은 고유의 막간 도메인이 없는 서열 번호 7의 아미노산 서열을 포함한다. 특정 실시태양에서, 고유의 막간 도메인은 VIIIPMC LVLLLLALIL PLLFY[유니프로트 엔트리(UniProt entry) Q6UVK1](서열 번호 44)이다.

[0072] 하나의 실시태양에서, 항-MCSP 항체는 MCSP를 발현하는 세포의 용해를 유도한다. 용해는 임의의 기작에 의해, 예컨대, 효과자 기능, 예컨대, Clq 결합 및 보체 의존성 세포독성(CDC: complement dependent cytotoxicity); Fc 수용체 결합; 항체-의존성 세포-중재된 세포독성(ADCC); 식세포작용; 세포 표면 수용체(예를 들어, B 세포 수용체)의 하향 조절; 및 B 세포 활성화를 중재함으로써, 또는 세포의 아포토시스(apoptosis)를 직접 유도함으로써 유도될 수 있다.

[0073] 하나의 실시태양에서, 항-MCSP 항체는 글리코조작되지 않은 모 항-MCSP 항체와 비교하여 적어도 효과자 기능이 증가되도록 글리코조작된다. 효과자 기능의 증가는 Fc 수용체로의 증가된 결합 친화도, 증가된 항체-의존성 세포 세포독성(ADCC); NK 세포로의 증가된 결합; 대식세포로의 증가된 결합; 다형핵 세포로의 증가된 결합; 단핵세포로의 증가된 결합; 아포토시스를 유도하는 직접적인 신호화; 증가된 수지상(dendritic) 세포 돌연변이; 또는 증가된 T 세포 프라이밍(priming)이다. 글리코조작된 항-MCSP 항체는 MCSP를 발현하는 암을 앓는 피험체에서 MCSP의 동일한 에피토프로 유도되는 글리코조작되지 않은 항체에 비교하여 생존 이점을 제공한다.

[0074] 하나의 양태에서, 본 발명은 (a) 서열 번호 14의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1; (b) 서열 번호 15의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; (c) 서열 번호 16의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3; (d) 서열 번호 10의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (e) 서열 번호 11의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (f) 서열 번호 12의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3으로부터 선택된 적어도 1개, 2개, 3개, 4개, 5개 또는 6개의 HVR을 포함하는 항-MCSP 항체를 제공한다.

[0075] 하나의 양태에서, 본 발명은 (a) 서열 번호 14의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1; (b) 서열 번호 15의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; 및 (c) 서열 번호 16의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3으로부터 선택된 적어도 1개, 적어도 2개, 또는 3개 모두의 VH HVR 서열을 포함하는 항-MCSP 항체를 제공한다. 추가의 실시태양에서, 항체는 (a) 서열 번호 14의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1; (b) 서열 번호 15의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; 및 (c) 서열 번호 16의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3을 포함한다.

[0076] 하나의 양태에서, 본 발명은 (a) 서열 번호 10의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (b) 서열 번호 11의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (c) 서열 번호 12의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3으로부터 선택된 적어도 1개, 적어도 2개, 또는 3개 모두의 VL HVR 서열을 포함하는 항-MCSP 항체를 제공한다. 하나의 실시태양에서, 항체는 (a) 서열 번호 10의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (b) 서열 번호 11의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (c) 서열 번호 12의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함한다.

[0077] 또 다른 양태에서, 본 발명의 항-MCSP 항체는 (a) (i) 서열 번호 14의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1; (ii) 서열 번호 15의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; 및 (iii) 서열 번호 16의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3으로부터 선택된 적어도 1개, 적어도 2개, 또는 3개 모두의 VH HVR 서열을 포함하는 VH 도메인; 및 (b) (i) 서열 번호 10의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (ii) 서열 번호 11의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (iii) 서열 번호 12의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3으로부터 선택된 적어도 1개, 적어도 2개, 또는 3개 모두의 VL HVR 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함한다.

[0078] 또 다른 양태에서, 본 발명은 (a) 서열 번호 14의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1; (b) 서열 번호 15의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; (c) 서열 번호 16의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3; (d) 서열 번호 10의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (e) 서열 번호 11의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (f) 서열 번호 12의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함하는 항-MCSP 항체를 제공한다.

[0079] 하나의 양태에서, 본 발명은 (a) 서열 번호 17의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1; (b) 서열 번호 18의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; (c) 서열 번호 16의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3; (d) 서열 번호 13의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (e) 서열 번호 11의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (f) 서열 번호 12의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3으로부터 선택된 적어도 1개, 2개, 3개, 4개, 5개 또는 6개의 HVR을 포함하는 항

-MCSP 항체를 제공한다.

- [0080] 하나의 양태에서, 본 발명은 (a) 서열 번호 17의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1; (b) 서열 번호 18의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; 및 (c) 서열 번호 16의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3으로부터 선택된 적어도 1개, 적어도 2개, 또는 3개 모두의 VH HVR 서열을 포함하는 항-MCSP 항체를 제공한다. 추가의 실시태양에서, 항체는 (a) 서열 번호 17의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1; (b) 서열 번호 18의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; 및 (c) 서열 번호 16의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3을 포함한다.
- [0081] 하나의 양태에서, 본 발명은 (a) 서열 번호 13의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (b) 서열 번호 11의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (c) 서열 번호 12의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3으로부터 선택된 적어도 1개, 적어도 2개, 또는 3개 모두의 VL HVR 서열을 포함하는 항-MCSP 항체를 제공한다. 하나의 실시태양에서, 항체는 (a) 서열 번호 13의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (b) 서열 번호 11의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (c) 서열 번호 12의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함한다.
- [0082] 또 다른 양태에서, 본 발명의 항-MCSP 항체는 (a) (i) 서열 번호 17의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1; (ii) 서열 번호 18의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; 및 (iii) 서열 번호 16의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3으로부터 선택된 적어도 1개, 적어도 2개, 또는 3개 모두의 VH HVR 서열을 포함하는 VH 도메인; 및 (b) (i) 서열 번호 13의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (ii) 서열 번호 11의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (iii) 서열 번호 12의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3으로부터 선택된 적어도 1개, 적어도 2개, 또는 3개 모두의 VL HVR 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함한다.
- [0083] 또 다른 양태에서, 본 발명은 (a) 서열 번호 17의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1; (b) 서열 번호 18의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; (c) 서열 번호 16의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3; (d) 서열 번호 13의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (e) 서열 번호 11의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (f) 서열 번호 12의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함하는 항-MCSP 항체를 제공한다.
- [0084] 또 다른 양태에서, 본 발명은 (a) 서열 번호 17의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1; (b) 서열 번호 18의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; (c) 서열 번호 16의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3; (d) 서열 번호 10의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (e) 서열 번호 11의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (f) 서열 번호 12의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함하는 항-MCSP 항체를 제공한다.
- [0085] 또 다른 양태에서, 본 발명은 (a) 서열 번호 14의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1; (b) 서열 번호 18의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; (c) 서열 번호 16의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3; (d) 서열 번호 10의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (e) 서열 번호 11의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (f) 서열 번호 12의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함하는 항-MCSP 항체를 제공한다.
- [0086] 또 다른 양태에서, 본 발명은 (a) 서열 번호 14의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1; (b) 서열 번호 18의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; (c) 서열 번호 16의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3; (d) 서열 번호 13의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (e) 서열 번호 11의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (f) 서열 번호 12의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함하는 항-MCSP 항체를 제공한다.
- [0087] 하나의 양태에서, 항-MCSP 항체는 서열 번호 27의 아미노산 서열에 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 서열 동일성을 갖는 VH 서열을 포함한다. 특정 실시태양에서, 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일성을 갖는 VH 서열은 기준 서열에 비하여 치환(예를 들어, 보존적 치환), 삽입 또는 결실을 포함하지만, 이러한 서열을 포함하는 항-MCSP 항체는 MCSP에 결합하는 능력을 보유한다. 특정 실시태양에서, 서열 번호 27에서 총 1 내지 10개의 아미노산이 치환, 삽입 및/또는 결실된다. 특정 실시태양에서, 치환, 삽입 또는 결실은 HVR의 바깥쪽 영역에서(즉, FR에서) 초래된다. 임의적으로, 항-MCSP 항체는 서열 번호 27의 VH 서열을 포함하고, 이러한 서열의 번역후 개질이 포함된다. 특정 실시태양에서, VH는 (a) 서열 번호 14의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1; (b) 서열 번호 15의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; 및 (c) 서열 번호 16의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3으로부터 선택된 1개, 2개, 또는 3개의 HVR을 포함한다.
- [0088] 또 다른 양태에서, 서열 번호 26의 아미노산 서열에 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 서열 동일성을 갖는 경쇄 가변성 도메인(VL)을 포함하는 항-MCSP 항체가 제공된다. 특정 실시태양에서, 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일성을 갖는 VL 서열은 기준 서열에 비하여 치환(예를 들어, 보존적 치환), 삽입, 또는 결실을 포함하지만, 이러한 서열을 포함하는 항-MCSP 항체는 MCSP에

결합하는 능력을 보유한다. 특정 실시태양에서, 서열 번호 26에서 총 1 내지 10개의 아미노산이 치환, 삽입 및/또는 결실된다. 특정 실시태양에서, 치환, 삽입 또는 결실은 HVR의 바깥쪽 영역에서(즉, FR에서) 초래된다. 임의적으로, 항-MCSP 항체는 서열 번호 26의 VL 서열을 포함하고, 이러한 서열의 번역후 개질이 포함된다. 특정 실시태양에서, VL은 (a) 서열 번호 10의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (b) 서열 번호 11의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (c) 서열 번호 12의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3으로부터 선택된 1개, 2개, 또는 3개의 HVR을 포함한다.

[0089] 또 다른 양태에서, 상기 제공된 임의의 실시태양에서와 같은 VH, 및 상기 제공된 임의의 실시태양에서와 같은 VL을 포함하는, 항-MCSP 항체가 제공된다. 하나의 실시태양에서, 항체는 서열 번호 27의 아미노산 서열을 포함하는 VH, 및 서열 번호 26에서의 VL 서열을 포함하고, 이러한 서열의 번역후 개질이 포함된다.

[0090] 또 다른 양태에서, 항-MCSP 항체는 서열 번호 32의 아미노산 서열에 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 서열 동일성을 갖는 VH 서열을 포함한다. 특정 실시태양에서, 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일성을 갖는 VH 서열은 기준 서열에 비하여 치환(예를 들어, 보존적 치환), 삽입 또는 결실을 포함하지만, 이러한 서열을 포함하는 항-MCSP 항체는 MCSP에 결합하는 능력을 보유한다. 특정 실시태양에서, 서열 번호 32에서 총 1 내지 10개의 아미노산이 치환, 삽입 및/또는 결실된다. 특정 실시태양에서, 치환, 삽입 또는 결실은 HVR의 바깥쪽 영역에서(즉, FR에서) 초래된다. 임의적으로, 항-MCSP 항체는 서열 번호 32의 VH 서열을 포함하고, 이러한 서열의 번역후 개질이 포함된다. 특정 실시태양에서, VH는 (a) 서열 번호 17의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1; (b) 서열 번호 18의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; 및 (c) 서열 번호 16의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3으로부터 선택된 1개, 2개, 또는 3개의 HVR을 포함한다.

[0091] 또 다른 양태에서, 항-MCSP 항체는 서열 번호 31의 아미노산 서열에 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 서열 동일성을 갖는 VL 서열을 포함한다. 특정 실시태양에서, 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일성을 갖는 VL 서열은 기준 서열에 비하여 치환(예를 들어, 보존적 치환), 삽입, 또는 결실을 포함하지만, 이러한 서열을 포함하는 항-MCSP 항체는 MCSP에 결합하는 능력을 보유한다. 특정 실시태양에서, 서열 번호 31에서 총 1 내지 10개의 아미노산이 치환, 삽입 및/또는 결실된다. 특정 실시태양에서, 치환, 삽입 또는 결실은 HVR의 바깥쪽 영역에서(즉, FR에서) 초래된다. 임의적으로, 항-MCSP 항체는 서열 번호 31의 VL 서열을 포함하고, 이러한 서열의 번역후 개질이 포함된다. 특정 실시태양에서, VL은 (a) 서열 번호 13의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (b) 서열 번호 11의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (c) 서열 번호 12의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3으로부터 선택된 1개, 2개, 또는 3개의 HVR을 포함한다.

[0092] 또 다른 양태에서, 상기 제공된 임의의 실시태양에서와 같은 VH, 및 상기 제공된 임의의 실시태양에서와 같은 VL을 포함하는, 항-MCSP 항체가 제공된다. 하나의 실시태양에서, 항체는 서열 번호 32의 아미노산 서열을 포함하는 VH, 및 서열 번호 31의 아미노산 서열을 포함하는 VL을 포함하고, 이러한 서열의 번역후 개질이 포함된다.

[0093] 또 다른 양태에서, 항-MCSP 항체는 서열 번호 29의 아미노산 서열에 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 서열 동일성을 갖는 VH 서열을 포함한다. 특정 실시태양에서, 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일성을 갖는 VH 서열은 기준 서열에 비하여 치환(예를 들어, 보존적 치환), 삽입 또는 결실을 포함하지만, 이러한 서열을 포함하는 항-MCSP 항체는 MCSP에 결합하는 능력을 보유한다. 특정 실시태양에서, 치환, 삽입 또는 결실은 HVR의 바깥쪽 영역에서(즉, FR에서) 초래된다. 임의적으로, 항-MCSP 항체는 서열 번호 29의 VH 서열을 포함하고, 이러한 서열의 번역후 개질이 포함된다. 특정 실시태양에서, VH는 (a) 서열 번호 14의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1; (b) 서열 번호 18의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; 및 (c) 서열 번호 16의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3으로부터 선택된 1개, 2개, 또는 3개의 HVR을 포함한다.

[0094] 또 다른 양태에서, 항-MCSP 항체는 서열 번호 28의 아미노산 서열에 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 서열 동일성을 갖는 VL 서열을 포함한다. 특정 실시태양에서, 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일성을 갖는 VL 서열은 기준 서열에 비하여 치환(예를 들어, 보존적 치환), 삽입, 또는 결실을 포함하지만, 이러한 서열을 포함하는 항-MCSP 항체는 MCSP에 결합하는 능력을 보유한다. 특정 실시태양에서, 치환, 삽입 또는 결실은 HVR의 바깥쪽 영역에서(즉, FR에서) 초래된다. 임의적으

로, 항-MCSP 항체는 서열 번호 28의 VL 서열을 포함하고, 이러한 서열의 번역후 개질이 포함된다. 특정 실시태양에서, VL은 (a) 서열 번호 10의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (b) 서열 번호 11의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (c) 서열 번호 12의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3으로부터 선택된 1개, 2개, 또는 3개의 HVR을 포함한다.

[0095] 또 다른 양태에서, 상기 제공된 임의의 실시태양에서와 같은 VH, 및 상기 제공된 임의의 실시태양에서와 같은 VL을 포함하는, 항-MCSP 항체가 제공된다. 하나의 실시태양에서, 항체는 서열 번호 29의 아미노산 서열을 포함하는 VH, 및 서열 번호 28의 아미노산 서열을 포함하는 VL을 포함하고, 이러한 서열의 번역후 개질이 포함된다.

[0096] 또 다른 양태에서, 항-MCSP 항체는 서열 번호 35의 아미노산 서열에 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 서열 동일성을 갖는 중쇄 서열을 포함한다. 특정 실시태양에서, 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일성을 갖는 중쇄 서열은 기준 서열에 비하여 치환(예를 들어, 보존적 치환), 삽입 또는 결실을 포함하지만, 이러한 서열을 포함하는 항-MCSP 항체는 MCSP에 결합하는 능력을 보유한다. 특정 실시태양에서, 서열 번호 35에서 총 1 내지 10개의 아미노산이 치환, 삽입 및/또는 결실된다. 특정 실시태양에서, 치환, 삽입 또는 결실은 HVR의 바깥쪽 영역에서(즉, FR에서) 초래된다. 임의적으로, 항-MCSP 항체는 서열 번호 35의 중쇄 서열을 포함하고, 이러한 서열의 번역후 개질이 포함된다.

[0097] 또 다른 양태에서, 서열 번호 34의 아미노산 서열에 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 서열 동일성을 갖는 경쇄를 포함하는 항-MCSP 항체가 제공된다. 특정 실시태양에서, 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일성을 갖는 경쇄 서열은 기준 서열에 비하여 치환(예를 들어, 보존적 치환), 삽입, 또는 결실을 포함하지만, 이러한 서열을 포함하는 항-MCSP 항체는 MCSP에 결합하는 능력을 보유한다. 특정 실시태양에서, 서열 번호 34에서 총 1 내지 10개의 아미노산이 치환, 삽입 및/또는 결실된다. 특정 실시태양에서, 치환, 삽입 또는 결실은 HVR의 바깥쪽 영역에서(즉, FR에서) 초래된다. 임의적으로, 항-MCSP 항체는 서열 번호 34의 경쇄 서열을 포함하고, 이러한 서열의 번역후 개질이 포함된다.

[0098] 또 다른 양태에서, 상기 제공된 임의의 실시태양에서와 같은 중쇄, 및 상기 제공된 임의의 실시태양에서와 같은 경쇄를 포함하는 항-MCSP 항체가 제공된다. 하나의 실시태양에서, 항체는 서열 번호 35의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄, 및 서열 번호 34의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함하고, 이러한 서열의 번역후 개질이 포함된다.

[0099] 또 다른 양태에서, 항-MCSP 항체는 서열 번호 37의 아미노산 서열에 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 서열 동일성을 갖는 중쇄 서열을 포함한다. 특정 실시태양에서, 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일성을 갖는 중쇄 서열은 기준 서열에 비하여 치환(예를 들어, 보존적 치환), 삽입 또는 결실을 포함하지만, 이러한 서열을 포함하는 항-MCSP 항체는 MCSP에 결합하는 능력을 보유한다. 특정 실시태양에서, 서열 번호 37에서 총 1 내지 10개의 아미노산이 치환, 삽입 및/또는 결실된다. 특정 실시태양에서, 치환, 삽입 또는 결실은 HVR의 바깥쪽 영역에서(즉, FR에서) 초래된다. 임의적으로, 항-MCSP 항체는 서열 번호 37의 중쇄 서열을 포함하고, 이러한 서열의 번역후 개질이 포함된다.

[0100] 또 다른 양태에서, 서열 번호 36의 아미노산 서열에 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 서열 동일성을 갖는 경쇄를 포함하는 항-MCSP 항체가 제공된다. 특정 실시태양에서, 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일성을 갖는 경쇄 서열은 기준 서열에 비하여 치환(예를 들어, 보존적 치환), 삽입, 또는 결실을 포함하지만, 이러한 서열을 포함하는 항-MCSP 항체는 MCSP에 결합하는 능력을 보유한다. 특정 실시태양에서, 서열 번호 36에서 총 1 내지 10개의 아미노산이 치환, 삽입 및/또는 결실된다. 특정 실시태양에서, 치환, 삽입 또는 결실은 HVR의 바깥쪽 영역에서(즉, FR에서) 초래된다. 임의적으로, 항-MCSP 항체는 서열 번호 36의 경쇄 서열을 포함하고, 이러한 서열의 번역후 개질이 포함된다.

[0101] 또 다른 양태에서, 상기 제공된 임의의 실시태양에서와 같은 중쇄, 및 상기 제공된 임의의 실시태양에서와 같은 경쇄를 포함하는, 항-MCSP 항체가 제공된다. 하나의 실시태양에서, 항체는 서열 번호 37의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄, 및 서열 번호 36의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함하고, 이러한 서열의 번역후 개질이 포함된다.

[0102] 하나의 실시태양에서, 서열 번호 27의 아미노산 서열을 포함하는 VH 및 서열 번호 26의 아미노산 서열을 포함하는 VL을 갖는 항-MCSP 항체와 동일한 에피토프에 결합하는 항체가 제공된다. 또 다른 실시태양에서, 서열 번호 32의 아미노산 서열을 포함하는 VH 및 서열 번호 31의 아미노산 서열을 포함하는 VL을 갖는 항-MCSP 항체와 동일한 에피토프에 결합하는 항체가 제공된다.

- [0103] 다른 실시태양에서, 본원에 기재된 바와 같은 항-MCSP 항체와 동일한 에피토프로의 결합을 위해 경쟁하는 항체가 제공된다.
- [0104] 하나의 실시태양에서, 항-MCSP 항체와 동일한 에피토프에 결합하고/하거나 이로의 결합을 위해 경쟁하는 항체는 효과자 기능 활성, 예컨대, 예를 들면, Fc-중재된 세포 세포독성, 예컨대, ADCC 활성을 나타낸다.
- [0105] 하나의 실시태양에서, 항-MCSP 항체는 인간 MCSP의 막 근위 에피토프에 결합한다. 하나의 실시태양에서, 항-MCSP 항체는 CSPG 반복부-포함 도메인을 포함하는 인간 MCSP의 막 근위 에피토프에 결합한다. 하나의 실시태양에서, 항-MCSP 항체는 서열 번호 5의 아미노산 서열로부터이거나, 서열내에 존재하거나, 이와 중첩하는 인간 MCSP의 막 근위 에피토프에 결합한다. 하나의 실시태양에서, 항-MCSP 항체는 서열 번호 4의 아미노산 서열로부터이거나, 서열내에 존재하거나, 이와 중첩하는 인간 MCSP의 막 근위 에피토프에 결합한다. 하나의 실시태양에서, 항-MCSP 항체는 서열 번호 3의 아미노산 서열로부터이거나, 서열내에 존재하거나, 이와 중첩하는 인간 MCSP의 막 근위 에피토프에 결합한다.
- [0106] 본 발명의 추가의 양태에서, 임의의 상기 실시태양에 따른 항-MCSP 항체는 단일클론성 항체, 예컨대, 키메라성 항체, 인간화된 항체 또는 인간 항체이다. 하나의 실시태양에서, 항-MCSP 항체는 항체 단편, 예를 들어, Fv, Fab, Fab', scFv, 디아바디, 또는 $F(ab')_2$ 단편이다. 또 다른 실시태양에서, 항체는 전장 항체, 예를 들어, 손상되지 않은 IgG₁ 항체 또는 본원에 정의된 바와 같은 다른 항체 부류 또는 이소타입이다.
- [0107] 하나의 실시태양에서, 항-MCSP 항체는 마우스 단일클론성 항체 LC007이다. 이러한 항체의 중쇄 및 경쇄를 위한 핵산 서열은 각각 서열 번호 37 및 36에 제시된다. 하나의 실시태양에서, 항-MCSP 항체는 마우스 단일클론성 항체 LC007로부터 유도화된 키메라성 항체이다. 하나의 실시태양에서, 항-MCSP 항체는 마우스 단일클론성 항체 LC007로부터 유도화된 인간화된 항체이다. 하나의 실시태양에서, 항-MCSP 항체는 마우스 단일클론성 항체 LC007로부터 유도화된 인간 항체이다.
- [0108] 추가의 양태에서, 임의의 상기 실시태양에 따른 항-MCSP 항체는, 하기 섹션 1 내지 7에 기재된 바와 같이, 임의의 특징부를 단독으로 또는 조합하여 혼입할 수 있다:
- [0109] 1. 항체 친화도
- [0110] 특정 실시태양에서, 본원에 제공된 항체는 $\leq 1 \mu M$, $\leq 100 nM$, $\leq 10 nM$, $\leq 1 nM$, $\leq 0.1 nM$, $\leq 0.01 nM$, 또는 $\leq 0.001 nM$ (예를 들어, $10^{-8} M$ 이하, 예를 들어, $10^{-8} M$ 내지 $10^{-13} M$, 예를 들어, $10^{-9} M$ 내지 $10^{-13} M$)의 해리 상수(Kd)를 갖는다.
- [0111] 한 실시태양에서, Kd는 하기 검정에 의해 기재되는 바와 같이 흥미로운 항체의 Fab 형태 및 그의 항원에 의해 수행되는 방사능표지된 항원 결합 검정(RIA: radiolabeled antigen binding assay)에 의해 결정된다. 항원에 대한 Fab의 용액 결합 친화도는 표지화되지 않은 항원의 일련의 적정의 존재하에 (¹²⁵I)-표지화된 항원의 최소 농도로 Fab를 평형화하고, 이어서 항-Fab 항체-코팅된 플레이트로 결합된 항원을 포획함으로써 측정된다[예를 들어, 첸(Chen) 등의 문헌 "J. Mol. Biol. 293:865-881 (1999)" 참조]. 검정을 위한 조건을 확립하기 위해, 마이크로타이터(MICROTITER: 등록상표) 멀티-웰 플레이트[써모 사이언티픽(Thermo Scientific)]가 50 mM 탄산나트륨(pH 9.6)중에서 5 $\mu g/ml$ 의 포획 항-Fab 항체[카펠 램스(Cappel Labs)]로 하룻밤 코팅되고, 후속적으로 PBS 중에서 2%(중량/부피) 소 혈청 일부분으로 2 내지 5시간 동안 실온에서 차단된다(대략 23°C). 비-흡착성 플레이트(Nunc #269620)에서, 100 pM 또는 26 pM [¹²⁵I]-항원은 흥미로운 Fab의 일련의 희석물과 혼합된다[예를 들어, 항-VEGF 항체, Fab-12의 평가와 일치함; 프레스타(Presta) 등의 문헌 "Cancer Res. 57:4593-4599 (1997)". 흥미로운 Fab는 이어서 하룻밤 항온처리되고; 그러나, 평형 도달을 확보하기 위해 더 오랜 기간 동안(예를 들어, 약 65 시간) 항온처리가 지속될 수 있다. 이후, 혼합물은 항온처리 동안 실온에서 포획 플레이트로 전달된다(예를 들어, 1시간 동안). 이어서 용액은 제거되고 플레이트는 PBS중 0.1% 풀리소르베이트 20[트윈(TWEEN)-20(등록상표)]으로 8회 세척된다. 플레이트가 건조되면, 150 μl /웰의 신틸런트(scintillant)[마이크로신트(MICROSCINT)-20(등록상표); 패커드(Packard)]가 첨가되고, 플레이트는 10분 동안 탑카운트(TOPCOUNT: 상표) 감마 계수기(패커드) 상에서 계수된다. 최대 결합의 20% 이하를 제공하는 Fab 각각의 농도가 경쟁 결합 검정에 사용하기 위해 선택된다.
- [0112] 또 다른 실시태양에 따라서, Kd는 약 10 반응 단위(RU: response unit)에서 고정화된 항원 CM5 칩을 갖는 비아코어(BIACORE: 등록상표)-2000 또는 비아코어(등록상표)-3000[비아코어 인코포레이티드(BIAcore, Inc.), 뉴저지

주 피스카타웨이 소재]을 이용하는 표면 플라스몬 공명 검정을 25°C에서 사용하여 결정된다. 간단히, 카복시메틸화된 텍스트란 바이오센서 칩(CM5, 비아코어 인코포레이티드)은 공급업체의 지시에 따라 N-에틸-N'-(3-디메틸아미노프로필)-카보디이미드 하이드로클로라이드(EDC) 및 N-하이드록시석신이미드(NHS)로 활성화된다. 항원은 10 mM 아세트산 나트륨(pH 4.8)으로 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (약 0.2 μM)로 희석된 후, 대략 10 반응 단위(RU)의 커플링된 단백질을 달성하기 위해 5 μl /분의 유속으로 주입된다. 항원을 주입한 후, 1 M 에탄올아민이 주입되어 미반응된 기를 차단한다. 동역학 측정을 위하여, Fab의 2배의 일련의 희석물(0.78 nM 내지 500 nM)이 PBS중에서 0.05 % 폴리소르베이트 20(트윈-20(상표)) 계면활성제(PBST)와 함께 25°C에서 대략 25 μl /분의 유속으로 주입된다. 회합 속도($k_{\text{회합}}$) 및 해리 속도($k_{\text{해리}}$)는, 회합 및 해리 센서그램을 동시에 정합시킴으로써 단순 일-대-일 랑류 결합 모델(simple one-to-one Langmuir binding model)(비아코어(등록상표) 평가 소프트웨어 버전 3.2)을 사용하여 계산된다. 평형 해리 상수(K_d)는 $k_{\text{해리}}/k_{\text{회합}}$ 비로 계산된다[예를 들어, 천(Chen) 등의 문헌 "J. Mol. Biol. 293:865-881 (1999)" 참조]. 회합-속도가 상기 표면 플라스몬 공명 검정에 의해 $10^6 \text{ M}^{-1} \text{s}^{-1}$ 을 초과한다면, 회합-속도는 분광기, 예컨대, 정지-유동(stop-flow)이 구비된 분광광도기[아비브 인스트루먼츠(Aviv Instruments)] 또는 교반 큐벳(stirred cuvette)이 장착된 8000-시리즈 SLM-AMINCO(등록상표) 분광광도계[씨모스펙트로닉(ThermoSpectronic)]에서 측정될 경우 증가하는 농도의 항원의 존재하에 PBS(pH 7.2)중에서 20 nM 항-항원 항체(Fab 형태)의 25°C에서의 형광 발광 강도(여기 = 295 nm; 발광 = 340 nm, 16 nm 대역)의 증가 또는 감소를 측정하는 형광 소광(fluorescent quenching) 기법을 사용하여 결정될 수 있다.

[0113] 2. 항체 단편

특정 실시태양에서, 본원에 제공된 항체는 항체 단편이다. 항체 단편으로는, 제한되지 않지만, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂, Fv, 및 scFv 단편, 및 이후 기재된 다른 단편들이 포함된다. 특정 항체 단편에 대한 고찰을 위해, 허드슨(Hudson) 등의 문헌 "Nat. Med. 9:129-134 (2003)"을 참조한다. scFv 단편에 대한 고찰을 위해, 예를 들어, 플럭스(Pluckthun)의 문헌 "The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, Vol. 113, Rosenburg and Moore eds., (Springer-Verlag, New York), pp. 269-315 (1994)"을 참조하고; 또한 국제 특허출원 공개공보 제WO 93/16185호; 및 미국 특허 제5,571,894호 및 제5,587,458호를 참조한다. 살비지(salvage) 수용체 결합 에피토프 잔기를 포함하고 생체내 반감기가 증가된 Fab 및 F(ab')₂ 단편에 대한 논의를 위해 미국 특허 제5,869,046호를 참조한다.

[0115] 디아바디는 2가 또는 이특이적일 수 있는 2개의 항원-결합 부위를 갖는 항체 단편이다. 예를 들면, EP 제404,097호; 국제 특허출원 공개공보 제WO 1993/01161호; 허드슨(Hudson) 등의 문헌 "Nat. Med. 9:129-134 (2003)"; 및 홀리거(Holliger) 등의 문헌 "Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448 (1993)"을 참조한다. 트리아바디(triabody) 및 테트라바디(tetrabody)는 또한 허드슨 등의 문헌 "Nat. Med. 9:129-134 (2003)"에 기재되어 있다.

[0116] 단일-도메인 항체는 항체의 중쇄 가변성 도메인의 전체 또는 일부, 또는 경쇄 가변성 도메인의 전체 또는 일부를 포함하는 항체 단편이다. 특정 실시태양에서, 단일-도메인 항체는 인간 단일-도메인 항체이다[도만티스 인코포레이티드(Domantis, Inc.), 미국 매사추세츠주 월터 소재; 예를 들어, 미국 특허 제6,248,516 B1호 참조].

[0117] 항체 단편은 다양한 기법, 예컨대, 제한되는 것은 아니지만, 본원에 기재된 바와 같이, 손상되지 않은 항체의 단백질분해적 분해, 뿐만 아니라 재조합 숙주 세포(예를 들어, 이. 콜라이(*E. coli*) 또는 파아지)에 의한 생산에 의해 제조될 수 있다.

[0118] 3. 키메라성 항체 및 인간화된 항체

특정 실시태양에서, 본원에 제공된 항체는 키메라성 항체이다. 특정 키메라성 항체는, 예를 들어, 미국 특허 제4,816,567호; 및 모리슨(Morrison) 등의 문헌 "Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855 (1984)"에 기재되어 있다. 한 실시예에서, 키메라성 항체는 인간 이외의 가변성 영역(예를 들어, 마우스, 래트, 햄스터, 토끼, 또는 인간 이외의 영장류, 예컨대, 원숭이로부터 유도화된 가변성 영역) 및 인간 불변성 영역을 포함한다. 추가의 예에서, 키메라성 항체는 부류 또는 하위부류가 모 항체의 부류 또는 하위부류에서 변화된 "부류-전환된(class switched)" 항체이다. 키메라성 항체는 이의 항원-결합 단편을 포함한다.

[0120] 특정 실시태양에서, 키메라성 항체는 인간화된 항체이다. 전형적으로, 인간 이외의 항체는 인간 이외의 모 항체의 친화도 및 특이성을 보유하면서 인간에 대한 면역원성이 감소되도록 인간화된다. 일반적으로, 인간화된 항체는 하나 이상의 가변성 도메인을 포함하고, 여기서 HVR, 예를 들어, CDR(또는 이의 일부분)은 인간 이외의

항체로부터 유도화되고, FR(또는 이의 일부분)은 인간 항체 서열로부터 유도화된다. 인간화된 항체는 임의적으로 또한 인간 불변성 영역의 적어도 일부분을 포함할 것이다. 몇몇 실시태양에서, 인간화된 항체중 몇몇 FR 잔기는, 예를 들어, 항체 특이성 또는 친화도를 회복하거나 개선시키기 위해, 인간 이외의 항체(예를 들어, HVR 잔기가 유도화되어지는 항체)로부터의 상응하는 잔기로 치환된다.

[0121] 인간화된 항체 및 이를 제조하는 방법은, 예를 들어, 알마그로(Almagro) 및 프란손(Fransson)의 문헌 "Front. Biosci. 13:1619-1633 (2008)"에 검토되어 있고, 추가로, 예를 들어, 리에흐만(Riechmann) 등의 문헌 "Nature 332:323-329 (1988)"; 퀸(Queen) 등의 문헌 "Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:10029-10033 (1989)"; 미국 특허 제5,821,337호, 제7,527,791호, 제6,982,321호, 및 제7,087,409호; 카쉬미르(Kashmiri) 등의 문헌 "Methods 36:25-34 (2005)(SDR (a-CDR) 그라프팅에 대해 기재)"; 패들란(Padlan)의 문헌 "Mol. Immunol. 28:489-498 (1991) ("재보수(resurfacing)"에 대해 기재)"; 달라쿠아(Dall'Acqua) 등의 문헌 "Methods 36:43-60 (2005) ("FR 셔플링(shuffling)"에 대해 기재)"; 및 오스본(Osbourn) 등의 문헌 "Methods 36:61-68 (2005)" 및 클림카(Klimka) 등의 문헌 "Br. J. Cancer 83:252-260 (2000)(FR 셔플링에 대한 "안내된 선택" 접근에 대해 기재)"에 기재되어 있다.

[0122] 인간화를 위해 사용될 수 있는 인간 골격구조 영역으로는 제한되지 않지만 "최적-정합(best-fit)" 방법을 사용하여 선택된 골격구조 영역[예를 들어, 심스(Sims) 등의 문헌 "J. Immunol. 151:2296 (1993)" 참조]; 경쇄 또는 중쇄 가변성 영역의 특정 하위군의 인간 항체의 컨센서스 서열로부터 유도된 골격구조 영역[예를 들어, 카터(Carter) 등의 문헌 "Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285 (1992)"; 및 프레스타 등의 문헌 "J. Immunol. 151:2623 (1993)" 참조]; 인간 성숙(체세포적으로 성숙된) 골격구조 영역 또는 인간 생식계열 골격구조 영역[예를 들어, 알마그로 및 프란손의 문헌 "Front. Biosci. 13:1619-1633 (2008)" 참조]; 및 FR 라이브러리를 스크리닝하여 유도화된 골격구조 영역[예를 들어, 바카(Baca) 등의 문헌 "J. Biol. Chem. 272:10678-10684 (1997)" 및 로속(Rosok) 등의 문헌 "J. Biol. Chem. 271:22611-22618 (1996)" 참조]이 포함된다.

4. 인간 항체

[0124] 특정 실시태양에서, 본원에 제공된 항체는 인간 항체이다. 인간 항체는 당분야에 공지된 다양한 기법을 사용하여 생산될 수 있다. 인간 항체는 일반적으로 반 디지크(van Dijk) 및 반 데 윈켈(van de Winkel)의 문헌 "Curr. Opin. Pharmacol. 5:368-74 (2001)" 및 론베르그(Lonberg)의 문헌 "Curr. Opin. Immunol. 20:450-459 (2008)"에 기재되어 있다.

[0125] 인간 항체는 손상되지 않은 인간 항체, 또는 항원 챌린지(challenge)에 대한 반응으로 인간 가변성 영역을 갖는 손상되지 않은 항체를 생산하도록 개질된 형질감염 동물에 면역원을 투여함으로써 제조될 수 있다. 이러한 동물은 전형적으로 내생성 면역글로불린 유전자자리를 대체하거나, 염색체 밖에 존재하거나 동물의 염색체내로 무작위로 조립된 인간 면역글로불린 유전자자리의 전부 또는 일부를 포함한다. 이러한 형질감염 마우스에서, 내생성 면역글로불린 유전자자리는 일반적으로 비활성화되었다. 형질감염 동물로부터 인간 항체를 수득하기 위한 방법을 검토하기 위해, 론베르그의 문헌 "Nat. Biotech. 23:1117-1125 (2005)"을 참조한다. 또한, 예를 들어, 제노마우스(XENOMOUSE: 상표) 기술을 기재하는 미국 특허 제6,075,181호 및 제6,150,584호; 후맵(HUMAB: 등록상표) 기술을 기재하는 미국 특허 제5,770,429호; 케이-엠 마우스(K-M MOUSE: 등록상표) 기술을 기재하는 미국 특허 제7,041,870호, 및 벨로시마우스(VELOCIMOUSE: 등록상표) 기술을 기재하는 미국 특허출원 공개공보 제2007/0061900호를 참조한다. 이러한 동물에 의해 생성된 손상되지 않은 항체로부터의 인간 가변성 영역은, 예를 들어, 상이한 인간 불변성 영역과 조합함으로써 추가로 개질될 수 있다.

[0126] 인간 항체는 또한 하이브리도마에 기초한 방법에 의해 제조될 수 있다. 인간 단일클론성 항체의 생산을 위한 인간 골수종 및 마우스-인간 이종골수종 세포주가 기재되어 있다[예를 들어, 코즈보(Kozbor)의 문헌 "J. Immunol., 133:3001 (1984)"; 브로더(Brodeur) 등의 문헌 "Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)"; 및 브르너(Boerner) 등의 문헌 "J. Immunol., 147:86 (1991)" 참조]. 인간 B-세포 하이브리도마 기술을 통해 생성된 인간 항체는 또한 리(Li) 등의 문헌 "Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103:3557-3562 (2006)"에 기재되어 있다. 추가의 방법은, 예를 들면, 미국 특허 제7,189,826호(하이브리도마 세포주로부터의 단일클론성 인간 IgM 항체의 생산을 기재함) 및 니(Ni)의 문헌 "Xiandai Mianyxue, 26(4):265-268 (2006)"(인간-인간 하이브리도마를 기재함)에 기재된 방법을 포함한다. 인간 하이브리도마 기술[트리오마(Trioma) 기술]은 또한 볼머스(Vollmers) 및 브란드레인(Brandlein)의 문헌 "Histology and Histopathology, 20(3):927-937 (2005)" 및 볼머스 및 브란드레인의 문헌 "Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology, 27(3):185-191 (2005)"에 기재되어 있다.

[0127] 인간 항체는 또한 인간-유도화된 파아지 디스플레이 라이브러리로부터 선택된 Fv 클론 가변성 도메인 서열을 단리함으로써 생성될 수 있다. 이어서 이러한 가변성 도메인 서열은 원하는 인간 불변성 도메인과 조합될 수 있다. 인간 항체를 항체 라이브러리로부터 선택하는 기법은 하기에 기재되어 있다.

5. 라이브러리-유도화된 항체

[0129] 본 발명의 항체는 원하는 활성 또는 활성들을 갖는 항체를 위해 조합적 라이브러리를 스크리닝함으로써 단리될 수 있다. 예를 들면, 파지 디스플레이 라이브러리를 생성하고, 원하는 결합 특징을 갖는 항체를 위해 이러한 라이브러리를 스크리닝하기 위한 다양한 방법이 당분야에 공지되어 있다. 이러한 방법은, 예를 들어, 후겐붐(Hoogenboom) 등의 문헌 "Methods in Molecular Biology 178:1-37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ, 2001)"에 검토되어 있고, 추가로, 예를 들어, 맥카퍼티(McCafferty) 등의 문헌 "Nature 348:552-554"; 클랙슨(Clackson) 등의 문헌 "Nature 352:624-628(1991)"; 마크스(Marks) 등의 문헌 "J. Mol. Biol. 222:581-597 (1992)"; 마크스 및 브라드베리(Bradbury)의 문헌 "Methods in Molecular Biology 248:161-175 (Lo, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2003)"; 시드후(Sidhu) 등의 문헌 "J. Mol. Biol. 338(2):299-310 (2004)"; 리(Lee) 등의 문헌 "J. Mol. Biol. 340(5):1073-1093 (2004)"; 펠라우스(Fellouse)의 문헌 "Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101(34):12467-12472 (2004)"; 및 리 등의 문헌 "J. Immunol. Methods 284(1-2):119-132 (2004)"에 기재되어 있다.

[0130] 특정 파아지 디스플레이 방법에서, VH 및 VL 유전자의 레퍼토리는 폴리머라아제 연쇄 반응(PCR: polymerase chain reaction)에 의해 별도로 클로닝되고, 파아지 라이브러리에서 무작위로 재조합되고, 이는 이어서 윈터(Winter) 등의 문헌 "Ann. Rev. Immunol., 12:433-455 (1994)"에 기재된 바와 같이 항원-결합 파아지를 위해 스크리닝될 수 있다. 파아지는 전형적으로 항체 단편을, 단일-쇄 Fv(scFv) 단편으로서 또는 Fab 단편으로서 표시한다. 면역화된 근원으로부터의 라이브러리는 하이브리도마를 작성할 필요없이 면역원에 대해 높은 친화성을 갖는 항체를 제공한다. 다르게는, 그리피쓰(Griffiths) 등의 문헌 "EMBO J. 12:725-734 (1993)"에 기재된 바와 같이 임의의 면역화없이 비-자가 항원 내지 자가 항원에 이르는 넓은 범위로 항체의 단일 근원을 제공하기 위해 순수한(naive) 레퍼토리가 (예를 들어, 인간으로부터) 클로닝될 수 있다. 최종적으로, 순수한 라이브러리는 또한 후겐붐 및 윈터의 문헌 "J. Mol. Biol. 227:381-388 (1992)"에 기재된 바와 같이, 줄기 세포로부터 재배열되지 않은 V-유전자 구획을 클로닝하고, 무작위 서열을 포함하는 PCR 프라이머를 사용하여 고 가변성 CDR3 영역을 암호화하고 시험관내에서 재배열을 달성함으로써 합성적으로 제조될 수 있다. 인간 항체 파아지 라이브러리를 기재하는 특허 공보로는, 예를 들면 미국 특허 제5,750,373호, 및 미국 특허출원 공개공보 제2005/0079574호, 제2005/0119455호, 제2005/0266000호, 제2007/0117126호, 제2007/0160598호, 제2007/0237764호, 제2007/0292936호, 및 제2009/0002360호가 포함된다.

[0131] 인간 항체 라이브러리로부터 단리된 항체 또는 항체 단편은 본원에서 인간 항체 또는 인간 항체 단편으로 고려된다.

6. 다중특이적 항체

[0133] 특정 실시태양에서, 본원에 제공된 항체는 다중특이적 항체, 예를 들어, 이중특이적 항체이다. 다중특이적 항체는 적어도 2개의 상이한 부위에 대해 결합 특이성을 갖는 단일클론성 항체이다. 특정 실시태양에서, 결합 특이성 중 하나는 MCSPI에 대한 것이고, 나머지는 임의의 다른 항원에 대한 것이다. 특정 실시태양에서, 이중특이적 항체는 MCSPI의 2개의 상이한 에피토프에 결합한다. 이중특이적 항체는 또한 MCSPI를 발현하는 세포에 세포독성제를 편재화시키기 위해 사용될 수 있다. 이중특이적 항체는 전장 항체 또는 항체 단편으로서 제조될 수 있다.

[0134] 다중특이적 항체를 제조하는 기법으로는, 제한되지 않지만, 상이한 특이성을 갖는 2개의 면역글로불린 중쇄-경쇄 쌍의 재조합 공동-발현[밀스타인(Milstein) 및 쿠엘로(Cuello)의 문헌 "Nature 305:537 (1983)", 국제 특허 출원 공개공보 제WO 93/08829호, 및 트라우네커(Traunecker) 등의 문헌 "EMBO J. 10:3655 (1991)" 참조], 및 "눕-인-홀(knob-in-hole)" 조작(예를 들어, 미국 특허 제5,731,168호 참조)이 포함된다. 다중특이적 항체는 또한 항체 Fc-이종이량체 분자를 제조하기 위한 정전기적 조정 효과를 조작함으로써(국제 특허출원 공개공보 제WO 2009/089004A1호); 둘 이상의 항체 또는 단편을 가교결합시킴으로써[예를 들어, 미국 특허 제4,676,980호, 및 브렌난(Brennan) 등의 문헌 "Science, 229:81 (1985)" 참조]; 이중특이적 항체를 생산하기 위해 로이신 지퍼(zipper)를 사용함으로써[예를 들어, 코스텔니(Kostelny) 등의 문헌 "J. Immunol., 148:1547-1553 (1992)" 참조]; 이중특이적 항체 단편을 제조하기 위해 "디아바디" 기술을 사용함으로써[예를 들어, 홀린거(Hollinger) 등의 문헌 "Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993)" 참조]; 단일-쇄 Fv(sFv) 이량체를 사용함으로

써[예를 들어, 그루버(Gruber) 등의 문헌 "J. Immunol., 152:5368 (1994)" 참조]; 예를 들어, 투트(Tutt) 등의 문헌 "J. Immunol. 147:60 (1991)"에 기재된 바와 같은 삼중특이적 항체를 제조함으로써 제조될 수 있다.

[0135] "옥토퍼스(Octopus) 항체"를 비롯하여, 3개 이상의 작용성 항원 결합 부위를 갖는 조작된 항체 또한 본원에 포함된다(예를 들어, US 제2006/0025576A1호 참조).

[0136] 항체 또는 단편은 본원에서 또한 MCSP에 결합하는 항원 결합 부위, 뿐만 아니라 또 다른 상이한 항원을 포함하는 "이중 작용 FAb" 또는 "DAF"를 포함한다(예를 들면, US 제2008/0069820호 참조).

7. 항체 변형체

[0138] 특정 실시태양에서, 본원에 제공된 항체의 아미노산 서열 변형체가 고려된다. 예를 들면, 항체의 결합 친화도 및/또는 항체의 다른 생물학적 특성을 개선시키는 것이 바람직할 수 있다. 항체의 아미노산 서열 변형체는 항체를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열내로 적절히 개질을 도입하거나, 웨타이드 합성에 의해 제조될 수 있다. 이러한 개질로는, 예를 들면, 항체의 아미노산 서열로부터의 결실, 및/또는 서열내로의 삽입 및/또는 서열의 치환이 포함된다. 결실, 삽입, 및 치환의 임의의 조합은 최종 작성물에 도달되도록 이루어지지만, 단 최종 작성물은 원하는 특징, 예를 들어, 항원-결합 특징을 소유해야 한다.

a) 치환, 삽입, 및 결실 변형체

[0140] 특정 실시태양에서, 하나 이상의 아미노산 치환을 갖는 항체 변형체가 제공된다. 치환적 돌연변이생성에 흥미로운 부위로는 HVR 및 FR이 포함된다. 보존적 치환은 "보존적 치환"이라는 표제하에 표 1에 제시되어 있다. 보다 실질적인 변화는 "예시적인 치환"이라는 표제하에 표 1에 제공되고, 참고로 아미노산 측쇄 부류에 대해서는 하기 추가로 기재된 바와 같다. 아미노산 치환은 흥미로운 항체에 도입되고 생성물은 원하는 활성, 예를 들어, 보유된/개선된 항원 결합, 감소된 면역원성, 또는 개선된 ADCC 또는 CDC에 대해 스크리닝된다.

표 1

고유 잔기	예시적 치환	바람직한 치환
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Lcu; Val; Met; Ala; Phe; Norleucine	Lcu
Leu (L)	Norleucine; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Norleucine	Leu

[0141]

[0142] 아미노산은 공통적인 측쇄 특성에 따라 분류될 수 있다:

[0143] (1) 소수성: 노르류신(Nor leucine), Met, Ala, Val, Leu, Ile;

[0144] (2) 중성 친수성: Cys, Ser, Thr, Asn, Gin;

[0145] (3) 산성: Asp, Glu;

[0146] (4) 염기성: His, Lys, Arg;

[0147] (5) 쇄 배향에 영향을 주는 잔기: Gly, Pro;

[0148] (6) 방향족: Trp, Tyr, Phe.

[0149] 비-보존적 치환은 이들 부류중 하나의 구성원을 또다른 부류로 교환함을 수반할 것이다.

[0150] 치환적 변형체의 한가지 유형은 모 항체(예를 들어, 인간화된 항체 또는 인간 항체)의 하나 이상의 과가변성 영역 잔기를 치환함을 포함한다. 일반적으로, 추가의 연구를 위해 선택된 생성된 변형체(들)은, 모 항체에 비하여 특정 생물학적 특성에 있어서 개질(예를 들어, 개선)될 수 있고/있거나(예를 들어, 증가된 친화도, 감소된 면역원성), 모 항체의 특정 생물학적 특성을 실질적으로 보유할 것이다. 예시적인 치환적 변형체는 친화도 성숙된 항체이고, 이는 편리하게, 예를 들어, 파아지 디스플레이에 기초한 친화도 성숙 기법, 예컨대, 본원에 기재된 기법에 의해 생성될 수 있다. 간단하게, 하나 이상의 HVR 잔기는 돌연변이되고 변형 항체는 파아지 상에 디스플레이되고 특정 생물학적 활성(예를 들어, 결합 친화도)에 대해 스크리닝된다.

[0151] 변경(예를 들어, 치환)은 HVR에서 이루어져서, 예를 들어, 항체 친화도를 개선시킬 수 있다. 이러한 변경은 HVR "핫스폿(hot spot)", 즉 체세포 돌연변이 과정 동안 높은 빈도로 돌연변이를 겪는 코돈에 의해 암호화되는 잔기[예를 들어, 초우드허리(Chowdhury)의 문헌 "Methods Mol. Biol. 207:179-196 (2008)" 참조], 및/또는 SDR(a-CDR)에서 이루어지고, 생성된 변형체 VH 또는 VL은 결합 친화도에 대해 시험된다. 2차 라이브러리로부터의 작성 및 재선택에 의한 친화도 돌연변이는, 예를 들어, 후겐붐 등의 문헌 "Methods in Molecular Biology 178:1-37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ, (2001))"에 기재되어 있다. 친화도 돌연변이의 몇몇 실시태양에서, 돌연변이를 위해 채택된 변형가능한 유전자내로 임의의 다양한 방법(예를 들어, 오류-발생 PCR, 쇄 셔플링(shuffling), 또는 올리고뉴클레오타이드-유도된 돌연변이생성)에 의해 변형이 도입된다. 이어서 2차 라이브러리가 생성된다. 이어서 라이브러리는 스크리닝되어 원하는 친화도를 갖는 임의의 항체 변형체를 식별한다. 변형을 도입하는 또 다른 방법은 HVR-유도된 접근법과 관련되고, 여기서 수 개의 HVR 잔기(예를 들어, 한 시점에 4 내지 6개 잔기)가 무작위화된다. 항원 결합에 관여된 HVR 잔기는, 예를 들어, 알라닌 스캐닝 돌연변이생성 또는 모델링(modeling)을 사용하여 특이적으로 식별될 수 있다. CDR-H3 및 CDR-L3은 특별히 종종 표적화된다.

[0152] 특정 실시태양에서, 치환, 삽입, 또는 결실은 이러한 변경이 항원에 결합하는 항체의 능력을 실질적으로 감소시키지 않는 한 하나 이상의 HVR 내에서 초래될 수 있다. 예를 들면, 결합 친화도를 실질적으로 감소시키지 않는 보존적 변경(예를 들어, 본원에 제공된 바와 같은 보존적 치환)이 HVR에 만들어 진다. 이러한 변경은 HVR "핫스폿" 또는 SDR의 바깥쪽일 수 있다. 상기 제공된 변형체 VH 및 VL 서열의 특정 실시태양에서, 각각의 HVR은 변경되지 않거나, 단지 1개, 2개 또는 3개의 아미노산 치환을 포함한다.

[0153] 돌연변이생성을 위해 표적화될 수 있는 항체의 잔기 또는 영역을 식별하는 유용한 방법은 커닝햄(Cunningham) 및 웰스(Wells)의 문헌 "Science, 244:1081-1085 (1989)"에 기재된 바와 같은 "알라닌 스캐닝 돌연변이생성"으로 지칭된다. 이러한 방법에서, 표적 잔기의 잔기 또는 기(예를 들어, 하전된 잔기, 예컨대, arg, asp, his, lys, 및 glu)는, 항체의 항원과의 상호작용이 영향을 받는지의 여부를 결정하기 위해 중성 또는 음성으로 하전된 아미노산(예를 들어, 알라닌 또는 폴리알라닌)에 의해 식별되거나 대체된다. 초기 치환에 작용적 감수성을 나타내는 아미노산 위치에 추가의 치환이 도입될 수 있다. 다르게는, 또는 추가적으로, 항원-항체 착체의 결정 구조는 항체와 항원 사이의 접촉 지점을 식별한다. 이러한 접촉 잔기 및 이웃한 잔기는 치환을 위한 후보로서 표적화되거나 제거될 수 있다. 변형체는 이들이 원하는 특성을 포함하는지의 여부를 결정하기 위해 스크리닝될 수 있다.

[0154] 아미노산 서열 삽입은 1개의 잔기로부터 100개 이상의 잔기를 포함하는 폴리펩타이드에 이르는 길이 범위의 아미노- 및/또는 카복실 말단 축합, 뿐만 아니라 단일 또는 다중 아미노산 잔기의 서열내 삽입을 포함한다. 말단

삽입의 예로는 N-말단 메티오닐 잔기를 갖는 항체를 포함한다. 항체 분자의 다른 삽입 변형으로는 효소(예를 들어, ADEPT의 경우) 또는 항체의 혈청 반감기를 증가시키는 폴리펩타이드로의 항체의 N- 또는 C-말단의 축합이 포함된다.

b) 글리코실화 변형체

[0155] 특정 실시태양에서, 본원에 제공된 항체는 항체가 글리코실화되는 정도를 증가 또는 감소시키도록 변경된다. 항체로의 글리코실화 부위의 침가 또는 이의 결실은 하나 이상의 글리코실화 부위가 생성되거나 제거되도록 아미노산 서열을 변경함으로써 편리하게 달성된다.

[0156] 항체가 Fc 영역을 포함하는 경우, 이에 부착된 탄수화물은 변경될 수 있다. 포유동물 세포에 의해 생산된 고유의 항체는 Fc 영역의 CH₂ 도메인의 Asn297로의 N-결합에 의해 일반적으로 결합된 분지화된 2촉각 올리고당을 전형적으로 포함한다. 예를 들어, 라이트 등의 문헌 "TIBTECH 15:26-32 (1997)"을 참조한다. 올리고당은 다양한 탄수화물, 예를 들어, 만노스, N-아세틸 글루코사민(GlcNAc: N-acetyl glucosamine), 갈락토스, 및 시알산, 뿐만 아니라 2촉각 올리고당 구조의 "줄기"에 있는 GlcNAc에 결합된 푸코스를 포함한다. 몇몇 실시태양에서, 본 발명의 항체중 올리고당의 개질은 특정한 개선된 특성을 갖는 항체 변형체를 생성하기 위해 이루어진다.

[0157] 한 실시태양에서, Fc 영역에 (직접적으로 또는 간접적으로) 결합된 푸코스가 결핍된 탄수화물 구조를 갖는 항체 변형체가 제공된다. 예를 들면, 이러한 항체중 푸코스의 양은 1% 내지 80%, 1% 내지 65%, 5% 내지 65% 또는 20% 내지 40%이다. 푸코스의 양은 예를 들면 국제 특허출원 공개공보 제WO 2008/077546호에 기재된 바와 같이, MALDI-TOF 질량 분석법에 의해 측정되는 경우, Asn297에 결합된 모든 당구조물(예를 들어, 착체, 하이브리드 및 고 만노스 구조물)의 합에 대한, Asn297에서의 당 쇄 내의 푸코스의 평균 양을 계산함으로써 결정된다. Asn297은 Fc 영역에서 대략 297 위치(Fc 영역 잔기의 Eu 번호매김)에 위치한 아스파라긴 잔기를 지칭하지만; Asn297은 또한 항체중 작은 서열 변형에 기인하여 297 위치의 약 ± 3의 아미노산 상류 또는 하류, 즉 294 내지 300 위치에 위치될 수 있다. 이러한 푸코실화 변형체는 개선된 ADCC 기능을 가질 수 있다. 예를 들어, US 제 2003/0157108호[프레스타(Presta, L.)]; 및 US 제2004/0093621호[교와 하코 고교 캄파니 리미티드(Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.)]를 참조한다. "푸코스제거된" 또는 "푸코스-부족" 항체 변형체에 관한 문헌의 예로는 US 제 2003/0157108호; 국제 특허출원 공개공보 제WO 2000/61739호; 국제 특허출원 공개공보 제WO 2001/29246호; US 제2003/0115614호; US 제2002/0164328호; US 제2004/0093621호; US 제2004/0132140호; US 제2004/0110704호; US 제2004/0110282호; US 제2004/0109865호; 국제 특허출원 공개공보 제WO 2003/085119호; 제WO 2003/084570호; 제WO 2005/035586호; 제WO 2005/035778호; 제WO 2005/053742호; 제WO 2002/031140호; 오카자키(Okazaki) 등의 문헌 "J. Mol. Biol. 336:1239-1249 (2004)"; 야만-오누키(Yamane-Ohnuki) 등의 문헌 "Biotech. Bioeng. 87:614 (2004)"이 포함된다. 푸코스제거된 항체를 생산할 수 있는 세포주의 예로는 단백질 푸코실화가 결핍된 Lec13 CHO 세포[리프카(Ripka) 등의 문헌 "Arch. Biochem. Biophys. 249:533-545 (1986)"; US 제2003/0157108A1호(프레스타); 및 국제 특허출원 공개공보 제WO 2004/056312A1호[아담스(Adams) 등; 특히 실시예 11], 및 네아웃(knockout) 세포주, 예컨대, 알파-1,6-푸코실전달효소 유전자, FUT8, 네아웃 CHO 세포[예를 들어, 야만 오누키 등의 문헌 "Biotech. Bioeng. 87:614 (2004)"; 칸다(Kanda, Y.) 등의 문헌 "Biotechnol. Bioeng., 94(4):680-688 (2006)"; 및 국제 특허출원 공개공보 제WO 2003/085107호 참조]가 포함된다.

[0158] 2등분된 올리고당을 갖는 항체 변형체가 추가로 제공되고, 예를 들어, 여기서 항체의 Fc 영역에 결합된 2촉각 올리고당은 GlcNAc에 의해 2등분된다. 이러한 항체 변형체는 감소된 푸코실화 및/또는 개선된 ADCC 기능을 가질 수 있다. 이러한 항체 변형체의 예는, 예를 들어, 국제 특허출원 공개공보 제WO 2003/011878호[진-마이레트(Jean-Mairet) 등]; 미국 특허 제6,602,684호(우마나 등); 및 US 제2005/0123546호(우마나 등)에 기재되어 있다. Fc 영역에 결합된 올리고당에서 적어도 하나의 갈락토스 잔기를 갖는 항체 변형체가 또한 제공된다. 이러한 항체 변형체는 CDC 기능이 개선될 수 있다. 이러한 항체 변형체는, 예를 들어, 국제 특허출원 공개공보 제WO 1997/30087호[파텔(Patel) 등]; 국제 특허출원 공개공보 제WO 1998/58964호[라주(Raju, S.)]; 및 국제 특허출원 공개공보 제WO 1999/22764호(라주)에 기재되어 있다.

[0159] 따라서, 본 발명은 추가로 숙주 세포에서 본 발명의 항-MCSP 항체를 암호화하는 핵산 및 글리코실전달효소 활성을 갖는 폴리펩타이드를 암호화하는 핵산, 또는 이러한 핵산을 포함하는 벡터를 발현시키는 단계를 포함하는, 숙주 세포에 의해 생산된 본 발명의 항-MCSP 항체의 글리코실화 프로파일을 변경시키기 위한 방법에 관한 것이다. 글리코실전달효소 활성을 갖는 유전자는 β(1,4)-N-아세틸글루코사미닐전달효소 III(GnTII), α-만노시다아제 II(ManII), β(1,4)-갈락토실전달효소(GaIT), β(1,2)-N-아세틸글루코사미닐전달효소 I(GnTI), 및 β(1,2)-N-아세틸글루코사미닐전달효소 II(GnTII)를 포함한다. 하나의 실시태양에서, 글리코실전달효소 활성을

갖는 유전자의 조합물이 숙주 세포에서 발현된다(예를 들어, GnTIII 및 Man II). 이와 같이, 방법은 또한 항-MCSP 항체를 암호화하는 하나 이상의 폴리뉴클레오타이드(들)를 글리코실전달효소 유전자가 과열되거나 달리는 실활된 숙주 세포(예를 들어, α1-6 코어 푸코실전달효소를 암호화하는 유전자의 활성이 넉 아웃된 숙주 세포)에서 발현시킴을 포함한다. 또 다른 실시태양에서, 본 발명의 항-MCSP 항체는 글리코실화 패턴을 바꾸기 위해 GnTIII 활성을 갖는 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 추가로 발현하는 숙주 세포에서 생산될 수 있다. 한 구체적인 실시태양에서, GnTIII 활성을 갖는 폴리펩타이드는 골지(Golgi) 거주 폴리펩타이드의 골지 편재화 도메인을 포함하는 융합 폴리펩타이드이다. 용어 골지 편재화 도메인은 골지 착체내의 위치에 폴리펩타이드를 고정시키는데 책임이 있는 골지 거주 폴리펩타이드의 아미노산 서열을 지칭한다. 일반적으로, 편재화 도메인은 효소의 아미노 말단 "테일"을 포함한다. 또 다른 바람직한 실시태양에서, GnTIII 활성을 갖는 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 발현하는 숙주 세포에서 본 발명의 항-MCSP 항체를 발현시키면 증가된 Fc 수용체 결합 친화도 및 증가된 효과자 기능을 갖는 항-MCSP 항체가 생성된다. 따라서, 하나의 실시태양에서, 본 발명은 (a) GnTIII 활성을 갖는 폴리펩타이드를 암호화하는 서열을 포함하는 단리된 핵산; 및 (b) 본 발명의 항-MCSP 항체, 예컨대, 인간 MCSP에 결합하는 키메라성 항체, 영장류화된 항체 또는 인간화된 항체를 암호화하는 단리된 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 숙주에 관한 것이다. 한 바람직한 실시태양에서, GnTIII 활성을 갖는 폴리펩타이드는 GnTIII의 촉매 도메인을 포함하는 융합 폴리펩타이드이고, 골지 편재화 도메인은 만노시다아제 II의 편재화 도메인이다. 이러한 융합 폴리펩타이드를 생성하고 이들을 이용하여 효과자 기능이 증가된 항체를 생산하기 위한 방법은 미국 가특허 출원 제60/495,142호 및 미국 특허 출원 공개공보 제2004/0241817호에 개시되어 있고, 이의 전체 내용은 분명히 본원에 참고로 인용되어 있다. 특정 실시태양에서, 숙주 세포에 의해 생산된 개질된 항-MCSP 항체는 Fc 영역을 포함하는 IgG 불변성 영역 또는 이의 단편을 갖는다. 또 다른 특정 실시태양에서 항-MCSP 항체는 Fc 영역을 포함하는 인간화된 항체 또는 이의 단편이다.

[0161]

본 발명의 숙주 세포에 의해 생산된 변경된 글리코실화를 갖는 항-MCSP 항체는 전형적으로 숙주 세포의 개질 결과로서(예를 들어, 글리코실전달효소 유전자의 발현에 의해) 증가된 Fc 수용체 결합 친화도 및/또는 증가된 효과자 기능을 나타낸다. 바람직하게, 증가된 Fc 수용체 결합 친화도는 Fc γ 활성화 수용체, 예컨대, Fc γ RIIia 수용체로의 증가된 결합이다. 증가된 효과자 기능은 바람직하게 하기 특성중 하나 이상에서의 증가이다: 증가된 항체-의존성 세포 세포독성, 증가된 항체-의존성 세포 식세포작용(ADCP), 증가된 사이토킨 분비, 항원-제공 세포에 의한 증가된 면역-착체-중재된 항원 수득, 증가된 Fc-중재된 세포 세포독성, NK 세포로의 증가된 결합, 대식세포로의 증가된 결합, 다형핵 세포(PMN)로의 증가된 결합, 단핵세포로의 증가된 결합, 표적-결합된 항체의 증가된 가교결합, 아포토시스를 유도하는 증가된 직접 신호전달, 증가된 수지상 세포 돌연변이, 및 증가된 T 세포 프라이밍.

[0162]

하나의 양태에서, 본 발명은 글리코조작되지 않은 항-MCSP 항체와 비교하여 증가된 효과자 기능, 예컨대, 항체-의존성 세포 세포독성을 갖는 항-MCSP 항체(예를 들어, 변형 항체)의 글리코형(glycoform)을 제공한다. 항체의 글리코실화 조작은 이전에 기재되어 있다. 예를 들어, 본원에 참고로 전체가 인용된 미국 특허 제6,602,684호를 참조한다. 글리코실화에 관여된 유전자의 활성이 변경된 숙주 세포로부터 항-MCSP 항체를 제조하는 방법 또한 본원에 상세히 기재되어 있다(예를 들어, "발현 벡터 및 숙주 세포"란 명칭의 앞선 단락을 참조한다). 본 발명의 항-MCSP 항체의 ADCC에서의 증가는 MCSP에 대한 항체의 친화도를 증가시키므로써, 예를 들면 친화도 돌연변이 또는 친화도를 개선시키는 다른 방법들에 의해 또한 달성된다[탕(Tang) 등의 문헌 "J. Immunol. 2007, 179:2815-2823" 참조]. 이들 접근법의 조합 또한 본 발명에 의해 내포된다.

[0163]

몇몇 유형의 암의 치료를 위해 친수계이션되지 않은 단일클론성 항체(mAb)의 임상적 시험은 최근에 고무된 결과를 낳았다. 딜만(Dillman)의 문헌 "Cancer Biother. & Radiopharm. 12:223-25 (1997)"; 데오(Deo) 등의 문헌 "Immunology Today 18:127 (1997)"을 참조한다. 키메라성의 친수계이션되지 않은 IgG₁은 저-등급 또는 소낭성 B-세포 비-호지킨의 림프종에 대해 승인된 한편[딜만의 문헌 "Cancer Biother. & Radiopharm. 12:223-25 (1997)"], 또 다른 친수계이션되지 않은 mAb인, 고형 유방 종양을 표적화하는 인간화된 IgG₁은 또한 III 상 임상적 시험에서 보장된 결과를 보여주었다[데오 등의 문헌 "Immunology Today 18:127 (1997)"]. 이들 2개의 mAb의 항원은 이들 각각의 종양 세포에서 고도로 발현되고 항체는 시험관내 및 생체내에서 효과자 세포에 의해 강력한 종양 파괴를 중재한다. 대조적으로, 미세한 종양 특이성을 갖는 많은 다른 친수계이션되지 않은 mAb들은 임상적으로 유용하기에 충분한 효능의 효과자 기능을 개시할 수 없다[프로스트(Frost) 등의 문헌 "Cancer 80:317-33 (1997)"; 서푸스(Surfus) 등의 문헌 "J. Immunother. 19:184-91 (1996)"]. 이러한 몇몇 더 약한 mAb들을 위해, 부수적인 사이토킨 치료법이 현재 시험되고 있다. 사이토킨의 첨가는 순환 림프구의 활성 및 수를 증가시킴으로써 항체-의존성 세포 세포독성(ADCC)을 자극할 수 있다[프로스트 등의 문헌 "Cancer 80:317-33

(1997)"; 서푸스 등의 문헌 "*J. Immunother.* 19:184-91 (1996)". 표적화된 세포 상의 용해성 공격인 ADCC는 항체의 불변성 영역(Fc)에 백혈구 수용체가 결합될 때 개시된다[데오 등의 문헌 "*Immunology Today* 18:127 (1997)".]

[0164] 컨주케이션되지 않은 IgG₁의 ADCC 활성을 증가시키기 위한 상이하지만 상보적인 접근법은 항체의 Fc 영역을 조작하는 것이다. 단백질 조작 연구로부터, Fc γ R이 IgG CH2 도메인의 더 아래 헌지 영역과 상호작용함을 알 수 있었다[룬드(Lund) 등의 문헌 "*J. Immunol.* 157:4963-69 (1996)". 그러나, Fc γ R 결합은 또한 CH2 영역내에서 보존된 Asn297에서 공유적으로 결합된 올리고당의 존재를 필요로 한다. 룬드 등의 문헌 "*J. Immunol.* 157:4963-69 (1996)"; 라이트 및 모리슨의 문헌 "*Trends Biotech.* 15:26-31 (1997)"은, 올리고당 및 폴리펩타이드 둘다가 상호작용 부위에 직접적으로 기여하거나, 올리고당이 활성 CH2 폴리펩타이드 배좌를 유지하기 위해 요구된다고 제안한다. 올리고당 구조의 개질은 따라서 상호작용의 친화도를 증가시키는 수단으로서 연구될 수 있다.

[0165] IgG 분자는 2개의 N-연결된 올리고당을 그의 Fc 영역내에 수반하고, 하나씩 각 중쇄에 존재한다. 임의의 당단 백질로서, 항체는 글리코형의 모집단으로서 생산되고, 이는 동일한 폴리펩타이드 주체를 공유하지만 글리코실화 부위에 결합된 상이한 올리고당을 갖는다. 혈청 IgG의 Fc 영역에서 일반적으로 발견되는 올리고당은 말단 시알산이 수준이 낮고 2등분 N-아세틸글루코사민(GlcNAc)을 가지며, 말단 갈락토실화 및 코어 푸코실화가 다양한 착체 이촉각성 유형이다[워말드(Wormald) 등의 문헌 "*Biochemistry* 36:130-38 (1997)". 몇몇 연구에 따르면, Fc γ R 결합에 필요한 최소 탄수화물 구조는 올리고당 코어에 놓이는 것으로 제안된다[룬드 등의 문헌 "*J. Immunol.* 157:4963-69 (1996)".]

[0166] 컨주케이션되지 않은 치료적 mAb의 생산을 위해 산업 및 학계에서 사용되는 마우스- 또는 햄스터-유도화된 세포 주는 필요한 올리고당 결정자를 Fc 부위에 결합시킨다. 그러나 이를 세포주에서 발현된 IgG는, 혈청 IgG에서 소량으로 발견되는 2등분 GlcNAc가 결핍된다[라이플리(Lifely) 등의 문헌 "*Glycobiology* 318:813-22 (1995)". 대조적으로, 래트 골수종-생산된, 인간화된 IgG₁(CAMPATH-1H)이 이의 몇몇 글리코형에서 2등분 GlcNAc를 수반하는 것으로 최근에 관찰되었다[라이플리 등의 문헌 "*Glycobiology* 318:813-22 (1995)". 래트 세포-유도화된 항체는 표준 세포주에서 생산된 CAMPATH-1H 항체와 유사하지만 상당히 더 낮은 항체 농도로 최대 시험관내 ADCC 활성을 도달하였다.

[0167] CAMPATH 항원은 정상적으로 럼프종 세포 상에 높은 수준으로 존재하고, 이러한 키메라성 mAb는 2등분 GlcNAc의 부재하에 높은 ADCC 활성을 갖는다[라이플리 등의 문헌 "*Glycobiology* 318:813-22 (1995)". N-연결된 글리코실화 경로에서, 2등분 GlcNAc는 GnTIII에 의해 첨가된다[샤흐터(Schachter)의 문헌 "*Biochem. Cell Biol.* 64:163-81 (1986)".]

[0168] 이전 연구들은 상이한 수준의 클로닝된 GnTIII 효소 유전자를 외부적으로 조절된 방식으로 발현하도록 미리 조작된 단일한 항체-생산 CHO 세포주를 사용하였다[우마나 등의 문헌 "*Nature Biotechnol.* 17:176-180 (1999)". 이러한 접근법은 글리코실전달효소(예를 들어, GnTIII)의 발현 및 개질된 항체의 ADCC 활성 사이의 엄격한 상관관계를 최초로 확립하였다. 따라서, 본 발명은 항체-생산 숙주 세포에서 글리코실전달효소 유전자의 발현 수준을 변화시킴으로써 생성된 변경된 글리코실화를 갖는 Fc 영역 또는 Fc 영역에 상응하는 영역을 포함하는 항-MCSP 항체를 고려한다. 한 구체적인 실시태양에서, 유전자 발현 수준에서의 변화는 GnTIII 활성의 증가이다. 증가된 GnTIII 활성은 항체의 Fc 영역에서 2등분된 올리고당의 백분율의 증가, 뿐만 아니라 푸코스 잔기의 백분율의 감소를 초래한다. 이러한 항체, 또는 이의 단편은 증가된 Fc 수용체 결합 친화도 및 증가된 효과자 기능을 갖는다.

[0169] 본 발명은 또한 (a) 글리코실전달효소 활성을 갖는 폴리펩타이드를 암호화하는 하나 이상의 핵산을 발현하도록 조작된 숙주 세포를 본 발명에 따른 항-MCSP 항체가 생산되도록 허용하는 조건하에 배양하는 단계(여기서, 글리코실전달효소 활성을 갖는 상기 폴리펩타이드는 상기 숙주 세포에 의해 생산된 상기 항-MCSP 항체의 Fc 영역에서 올리고당을 개질하기에 충분한 양으로 발현된다); 및 (b) 상기 항-MCSP 항체를 단리하는 단계를 포함하는, 개질된 올리고당을 갖는 본 발명의 항-MCSP 항체를 제조하는 방법에 관한 것이다. 하나의 실시태양에서, 글리코실전달효소 활성을 갖는 폴리펩타이드는 GnTIII이다. 또 다른 실시태양에서, 글리코실전달효소 활성을 갖는 2개의 폴리펩타이드는 GnTIII 및 ManII이다. 또 다른 실시태양에서, 글리코실전달효소 활성을 갖는 폴리펩타이드는 GnTIII의 촉매적 도메인을 포함하는 융합 폴리펩타이드이다. 보다 구체적인 실시태양에서, 융합 폴리펩타이드는 골지 거주 폴리펩타이드의 골지 편재화 도메인을 추가로 포함한다. 바람직하게, 골지 편재화 도메인은 만노시다아제 II 또는

GnTI의 편재화 도메인이다. 다르게는, 골지 편재화 도메인은 만노시다아제 I의 편재화 도메인, GnTII의 편재화 도메인, 및 α1-6 코어 푸코실전달효소의 편재화 도메인으로 구성된 군에서 선택된다. 본 발명의 방법에 의해 제조된 항-MCSP 항체는 증가된 Fc 수용체 결합 친화도 및/또는 증가된 효과자 기능을 갖는다. 일반적으로, 증가된 효과자 기능은 다음중 하나 이상의 기능이다: 증가된 Fc-중재된 세포 세포독성(증가된 항체-의존성 세포 세포독성 포함), 증가된 항체-의존성 세포 식세포작용(ADCP), 증가된 사이토킨 분비, 항원-제공 세포에 의한 증가된 면역-착체-중재된 항원 수득, NK 세포로의 증가된 결합, 대식세포로의 증가된 결합, 단핵세포로의 증가된 결합, 다형핵 세포로의 증가된 결합, 아포토시스를 유도하는 증가된 직접 신호전달, 표적-결합된 항체의 증가된 가교결합, 증가된 수지상 세포 돌연변이, 또는 증가된 T 세포 프라이밍. 증가된 Fc 수용체 결합 친화도는 바람직하게는 Fc 활성화 수용체, 예컨대, Fc γRIIa로의 증가된 결합이다. 특히 바람직한 실시태양에서, ABM은 인간화된 항체 또는 이의 단편이다.

[0170] 하나의 실시태양에서, 항-MCSP 항체의 Fc 영역에서 이분된 N-연결된 올리고당의 백분율은 총 올리고당의 약 10% 이상 내지 약 100%, 구체적으로 약 50% 이상, 더 구체적으로, 약 60% 이상, 약 70% 이상, 약 80% 이상, 또는 약 90% 이상 내지 95%이다. 또 다른 실시태양에서, 본 발명의 방법에 의해 제조된 항체는 본 발명의 방법에 의한 그의 올리고당의 개질 결과로서 Fc 영역에서 푸코실화되지 않은 올리고당의 증가된 비율을 갖는다. 하나의 실시태양에서, 푸코실화되지 않은 올리고당의 백분율은 약 20% 이상 내지 약 100%이고, 구체적으로 약 50% 이상, 약 60% 이상 내지 약 70%, 더 구체적으로, 약 75% 이상이다. 푸코실화되지 않은 올리고당은 하이브리드 또는 착체 유형일 수 있다. 또 다른 실시태양에서, 본 발명의 방법에 의해 제조된 항체는 본 발명의 방법에 의한 그의 올리고당의 개질의 결과로서 Fc 영역에서 2등분된 올리고당의 증가된 비율을 갖는다. 하나의 실시태양에서, 2등분된 올리고당의 백분율은 약 20% 이상 내지 약 100%, 구체적으로 약 50% 이상, 약 60% 이상 내지 약 70%, 더 구체적으로, 약 75% 이상이다. 특히 바람직한 실시태양에서, 숙주 세포 및 본 발명의 방법에 의해 제조된 항-MCSP 항체는 Fc 영역에서 2등분된 푸코실화되지 않은 올리고당의 증가된 비율을 갖는다. 2등분된, 푸코실화되지 않은 올리고당은 하이브리드 또는 착체일 수 있다. 구체적으로, 본 발명의 방법은 항체의 Fc 영역중의 올리고당의 약 10% 이상 내지 약 100%, 구체적으로 약 15% 이상, 더 구체적으로 약 20% 이상 내지 약 50%, 더 구체적으로 약 20% 이상 내지 약 25%, 더 구체적으로 약 30% 이상 내지 약 35%가 2등분되고 푸코실화되지 않은 항체를 제조하기 위해 사용될 수 있다. 본 발명의 항-MCSP 항체는 또한 항-MCSP 항체의 Fc 영역중의 올리고당의 약 10% 이상 내지 약 100%, 구체적으로 약 15% 이상, 더 구체적으로 약 20% 이상 내지 약 25%, 더 구체적으로 약 30% 이상 내지 약 35%가 푸코실화되지 않은 2등분된 하이브리드인 Fc 영역을 포함한다.

[0171] 또 다른 실시태양에서, 본 발명은 본 발명의 방법에 의해 제조된, 증가된 효과자 기능 및/또는 증가된 Fc 수용체 결합 친화도를 갖도록 조작된 항-MCSP 항체에 관한 것이다. 증가된 효과자 기능은, 제한되지 않지만, 다음 중 하나 이상의 기능을 포함할 수 있다: 증가된 Fc-중재된 세포 세포독성(증가된 항체-의존성 세포 세포독성 포함), 증가된 항체-의존성 세포 식세포작용(ADCP), 증가된 사이토킨 분비, 항원-제공 세포에 의한 증가된 면역-착체-중재된 항원 수득, NK 세포로의 증가된 결합, 대식세포로의 증가된 결합, 단핵세포로의 증가된 결합, 다형핵 세포로의 증가된 결합, 아포토시스를 유도하는 증가된 직접 신호전달, 표적-결합된 항체의 증가된 가교결합, 증가된 수지상 세포 돌연변이, 및 증가된 T 세포 프라이밍. 한 바람직한 실시태양에서, 증가된 Fc 수용체 결합 친화도는 Fc 활성화 수용체, 가장 바람직하게 Fc γRIIa로의 증가된 결합이다. 하나의 실시태양에서, 항체는 손상되지 않은 항체이다. 하나의 실시태양에서, 항체는 Fc 영역, 또는 면역글로불린의 Fc 영역에 동등한 영역을 포함하는 융합 단백질을 포함하는 항체 단편이다.

[0172] 본 발명은 추가로 증가된 Fc 수용체 결합 친화도, 바람직하게 증가된 Fc 활성화 수용체로의 증가된 결합, 및/또는 증가된 효과자 기능, 예컨대, 항체-의존성 세포 세포독성을 갖는 본 발명의 항체의 글리코형의 생산을 위한 숙주 세포 시스템을 생성하기 위한 방법 및 이의 용도를 제공한다. 본 발명의 항체에 사용될 수 있는 글리코조작 방법은 미국 특허 제6,602,684호, 미국 특허 출원 공개공보 제2004/0241817 A1호, 미국 특허출원 공개공보 제2003/0175884 A1호, 미국 가특허 출원 제60/441,307호 및 국제 특허출원 공개공보 제WO 2004/065540호에 더 상세히 기재되어 있고, 이를 각각의 전체 내용은 본원에 참고로 그의 전체가 인용되어 있다. 본 발명의 항체는 다르게는 미국 특허출원 공개공보 제2003/0157108호[제넨테크], 또는 유럽 특허출원 공개공보 제EP 1 176 195 A1호, 국제 특허출원 공개공보 제WO 03/084570호, 국제 특허출원 공개공보 제WO 03/085119호 및 미국 특허출원 공개공보 제2003/0115614호, 제2004/093621호, 제2004/110282호, 제2004/110704호, 제2004/132140호[교와]에 개시된 기법에 따라 Fc 영역에서 푸코스 잔기가 감소하도록 글리코조작될 수 있다. 이를 문현 각각의 내용은 본원에 참고로 전체가 인용되어 있다. 본 발명의 글리코조작된 항체는 또한 개질된 당단백질을 생산하는 밸현 시스템, 예컨대, 미국 특허출원 공개공보 제60/344,169호 및 국제 특허출원 공개공보 제WO 03/056914호[글리코파이 인코포레이티드(GlycoFi, Inc.)] 또는 국제 특허출원 공개공보 제WO 2004/057002호 및 국제 특허출원 공개

공보 제WO 2004/024927호[그린노베이션(Greenovation)]에 교시된 시스템에서 생산될 수 있고, 이들 각각의 내용은 본원에 참고로 전체가 인용되어 있다.

[0173] 또 다른 양태에서, 본 발명은 개질된 글리코실화 패턴을 갖는 본 발명의 항체의 생산을 위한 숙주 세포 발현 시스템을 제공한다. 특별히, 본 발명은 개선된 치료 가치를 갖는 본 발명의 항체의 글리코형의 생성을 위한 숙주 세포 시스템을 제공한다. 따라서, 본 발명은 글리코실전달효소 활성을 갖는 폴리펩타이드를 발현하도록 선택되거나 조작된 숙주 세포 발현 시스템을 제공한다. 한 구체적인 실시태양에서, 글리코실전달효소 활성은 GnTIII 활성이이다. 하나의 실시태양에서, GnTIII 활성을 갖는 폴리펩타이드는 이종성 골지 거주 폴리펩타이드의 골지 편재화 도메인을 포함하는 융합 폴리펩타이드이다. 구체적으로, 이러한 숙주 세포 발현 시스템은, 구성 프로모터 또는 조절된 프로모터 시스템에 작동적으로 연결된, GnTIII를 갖는 폴리펩타이드를 암호화하는 재조합 핵산분자를 포함하도록 조작될 수 있다.

[0174] 하나의 구체적인 실시태양에서, 본 발명은 이종성 골지 거주 폴리펩타이드의 골지 편재화 도메인을 포함하고 GnTIII 활성을 갖는 융합 폴리펩타이드를 암호화하는 하나 이상의 핵산을 발현하도록 조작된 숙주 세포를 제공한다. 하나의 양태에서, 숙주 세포는 이종성 골지 거주 폴리펩타이드의 골지 편재화 도메인을 포함하고 GnTIII 활성을 갖는 융합 폴리펩타이드를 암호화하는 하나 이상의 유전자를 포함하는 핵산 분자로 조작된다.

[0175] 일반적으로, 상기 논의된 세포주를 비롯하여 임의의 유형의 배양된 세포주는 본 발명의 숙주 세포주를 조작하는 배경으로서 사용될 수 있다. 한 바람직한 실시태양에서, CHO 세포, BHK 세포, NSO 세포, SP2/0 세포, YO 골수종 세포, P3X63 마우스 골수종 세포, PER 세포, PER.C6 세포 또는 하이브리도마 세포, 다른 포유동물 세포, 효모 세포, 곤충 세포, 또는 식물 세포는 본 발명의 조작된 숙주 세포를 생성하기 위한 배경 세포주로서 사용된다.

[0176] 본 발명은 본원에 정의된 바와 같은 이종성 골지 거주 폴리펩타이드의 골지 편재화 도메인을 포함하는 융합 폴리펩타이드를 비롯하여, 글리코실전달효소 활성, 예를 들어, GnTIII 활성을 갖는 폴리펩타이드를 발현하는 임의의 숙주 세포를 내포하는 것으로 고려된다.

[0177] 글리코실전달효소 활성, 예를 들어, GnTIII 활성을 갖는 폴리펩타이드를 암호화하는 1개 또는 수 개의 핵산은 구성 프로모터, 또는 다르게는 조절된 발현 시스템의 제어하에 발현될 수 있다. 이러한 시스템은 당분야에 잘 공지되어 있고, 상기 논의된 시스템을 포함한다. 글리코실전달효소 활성, 예를 들어, GnTIII 활성을 갖는 융합 폴리펩타이드를 암호화하고 이종성 골지 거주 폴리펩타이드의 골지 편재화 도메인을 포함하는 수 개의 상이한 핵산이 숙주 세포 시스템에 포함된다면, 이들중 몇몇은 구성 프로모터의 제어하에 발현될 수 있는 한편, 다른 것들은 조절된 프로모터의 제어하에 발현된다. 글리코실전달효소 활성, 예를 들어, GnTIII 활성을 갖는 융합 폴리펩타이드의 발현 수준은, 웨스턴 블롯 분석, 노던 블롯 분석, 리포터(reporter) 유전자 발현 분석 또는 글리코실전달효소 활성, 예를 들어, GnTIII 활성의 측정을 비롯하여, 당분야에 일반적으로 공지된 방법에 의해 결정된다. 다르게는, GnTIII의 생합성 생성물에 결합하는 렉틴, 예를 들면, E4-PHA 렉틴이 이용될 수 있다. 다르게는, 글리코실전달효소 활성, 예를 들어, GnTIII 활성을 갖는 폴리펩타이드를 암호화하는 핵산으로 조작된 세포에 의해 생산된 항체에 의해 중재된 증가된 효과자 기능 또는 증가된 Fc 수용체 결합을 측정하는 기능적 검정이 사용될 수 있다.

[0178] 본 발명의 항체의 코딩 서열을 포함하고 생물학적으로 활성인 유전자 생성물을 발현하는 숙주 세포는 적어도 4 가지 일반적 접근법에 의해 식별될 수 있다: (a) DNA-DNA 또는 DNA-RNA 하이브리드화; (b) "마커" 유전자 기능의 존재 또는 부재; (c) 숙주 세포에서 개개의 mRNA 전사물의 발현에 의해 측정되는 경우 전사 수준의 평가; 및 (d) 유전자 생성물의 생물학적 활성 또는 면역검정에 의해 측정되는 경우 유전자 생성물의 검출.

[0179] 첫번째 접근법에서, 항-MCSP 항체의 코딩 서열 및/또는 글리코실전달효소(예를 들어, GnTIII) 활성을 갖는 폴리펩타이드의 코딩 서열의 존재는 개개 코딩 서열에 동종성인 뉴클레오타이드 서열, 또는 이의 일부분 또는 유도체를 포함하는 프로브를 사용하는 DNA-DNA 또는 DNA-RNA 하이브리드화에 의해 검출될 수 있다.

[0180] 두번째 접근법에서, 재조합 발현 벡터/숙주 시스템은 특정 "마커" 유전자 기능[예를 들어, 티미딘 키나아제 활성, 항생물질에 대한 내성, 메토트렉세이트(methotrexate)에 대한 내성, 형질전환 표현형, 바큘로바이러스(baculovirus)에서의 폐색체(occlusion body) 형성 등]의 존재 또는 부재에 기초하여 식별되고 선택될 수 있다. 예를 들면, 본 발명의 항체, 또는 이의 단편의 코딩 서열, 및/또는 글리코실전달효소(예를 들어, GnTIII) 활성을 갖는 폴리펩타이드의 코딩 서열이 벡터의 마커 유전자 서열내에 삽입된다면, 개개의 코딩 서열을 포함하는 재조합체는 마커 유전자 기능의 부재에 의해 식별될 수 있다. 다르게는, 마커 유전자는 코딩 서열의 발현을 조

절하기 위해 사용되는 동일하거나 상이한 프로모터의 제어하에 코딩 서열과 나란히 위치될 수 있다. 유도 또는 선택에 반응하는 마커의 발현은 본 발명의 항체의 코딩 서열 및/또는 글리코실전달효소(예를 들어, GnTIII) 활성을 갖는 폴리펩타이드의 코딩 서열의 발현을 지시한다.

[0181] 세번째 접근법에서, 본 발명의 항체, 또는 이의 단편의 코딩 영역, 및/또는 글리코실전달효소(예를 들어, GnTIII) 활성을 갖는 폴리펩타이드의 코딩 서열에 대한 전사 활성은 하이브리드화 검정에 의해 평가될 수 있다. 예를 들면, RNA는 본 발명의 항체, 또는 이의 단편의 코딩 서열, 및/또는 글리코실전달효소(예를 들어, GnTIII) 활성을 갖는 폴리펩타이드 또는 이의 특정 부분의 코딩 서열에 동종성인 프로브를 사용하여 노던 블롯에 의해 단리되고 분석될 수 있다. 다르게는, 숙주 세포의 총 핵산은 추출되고 이러한 프로브로의 하이브리드화에 대해 분석된다.

[0182] 네번째 접근법에서, 단백질 생성물의 발현은 면역학적으로, 예를 들면 웨스턴 블롯, 면역검정, 예컨대, 방사성 면역-침전, 효소-연결된 면역검정 등에 의해 평가될 수 있다. 그러나, 발현 시스템의 성공에 대한 궁극적 시험은 생물학적 활성 유전자 생성물의 검출과 관련된다.

c) Fc 영역 변형체

[0184] 특정 실시태양에서, 하나 이상의 아미노산 개질이 본원에 제공된 항체의 Fc 영역내로 도입될 수 있고, 이로써 Fc 영역 변형체를 생성한다. Fc 영역 변형체는 아미노산 개질(예를 들어, 치환)을 하나 이상의 아미노산 위치에 갖는 인간 Fc 영역 서열(예를 들어, 인간 IgG₁, IgG₂, IgG₃ 또는 IgG₄ Fc 영역)을 포함한다.

[0185] 특정 실시태양에서, 본 발명은 생체내 항체 반감기가 중요하지만 특정 효과자 기능(예컨대, 보체 및 ADCC)이 불필요하거나 유해한 적용분야를 위해 그 자체를 바람직한 후보로 만드는, 몇몇(그러나 전부는 아님) 효과자 기능을 갖는 항체 변형체를 고려한다. 시험관내 및/또는 생체내 세포독성 검정은 CDC 및/또는 ADCC 활성의 감소/결핍을 확인하기 위해 수행될 수 있다. 예를 들면, Fc 수용체(FcR) 결합 검정은 항체가 Fc γ R 결합이 결핍되었지만(이에 따라 유사하게 ADCC 활성이 결핍됨), FcRn 결합 능력을 보유함을 보장하도록 수행될 수 있다. ADCC를 중재하기 위한 1차 세포, NK 세포는 Fc(RIII)만을 발현하지만, 단핵백혈구는 Fc γ RI, Fc γ RII 및 Fc γ RIII를 발현한다. 조혈 세포 상에서의 FcR 발현은 라베취(Ravetch) 및 키넷(Kinet) 등의 문헌 "Annu. Rev. Immunol. 9:457-492 (1991)"의 464 페이지 표 3에 요약되어 있다. 흥미로운 분자의 ADCC 활성을 평가하기 위한 시험관내 검정의 비제한적 예는 미국 특허 제5,500,362호[예를 들어, 헬스트롬(Hellstrom, I.) 등의 문헌 "Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:7059-7063 (1986)"; 및 헬스트롬 등의 문헌 "Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:1499-1502 (1985)" 참조]; 미국 특허 제5,821,337호[브루게만(Bruggemann, M.) 등의 문헌 "J. Exp. Med. 166:1351-1361 (1987)" 참조]에 기재되어 있다. 다르게는, 비-방사성 검정 방법이 사용될 수 있다[예를 들면, 유세포분석을 위한 ACTI(상표) 비-방사성 세포독성 검정(셀테크놀로지 인코포레이티드(CellTechnology, Inc.), 미국 캘리포니아주 마운틴뷰 소재); 및 사이토톡스(CytoTox) 96(등록상표) 비-방사성 세포독성 검정(프로메가(Promega), 미국 위스콘신주 매디슨 소재)]. 이러한 검정에 유용한 효과자 세포로는 말초 혈액 단핵 세포(PBMC) 및 천연 킬러(NK) 세포가 포함된다. 다르게는, 또는 추가적으로, 흥미로운 분자의 ADCC 활성은 생체내, 예를 들어, 동물 모델, 예컨대, 클리네스(Clynes) 등의 문헌 "Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:652-656 (1998)"에 개시된 바와 같은 동물 모델에서 평가될 수 있다. C1q 결합 검정은 또한 항체가 C1q에 결합할 수 없고 이에 따라 CDC 활성이 결핍됨을 확인하기 위해 실행될 수 있다. 예를 들어, 국제 특허출원 공개공보 제WO 2006/029879호 및 제WO 2005/100402호에서의 C1q 및 C3c 결합 ELISA를 참조한다. 보체 활성화를 평가하기 위해, CDC 검정이 수행될 수 있다[예를 들면, 가자노-산토로(Gazzano-Santoro) 등의 문헌 "J. Immunol. Methods 202:163 (1996)"; 크래그(Cragg, M.S.) 등의 문헌 "Blood 101:1045-1052 (2003)"; 및 크래그 및 글렌니(M.J. Glennie) 등의 문헌 "Blood 103:2738-2743 (2004)" 참조]. FcRn 결합 및 생체내 소거/반감기 결정은 또한 당분야에 공지된 방법을 사용하여 실행될 수 있다[예를 들어, 페트코바(Petkova, S.B.) 등의 문헌 "Int. Immunol. 18(12):1759-1769 (2006)" 참조].

[0186] 하나의 허용된 시험관내 ADCC 검정은 다음과 같다:

1) 검정은 항체의 항원-결합 영역에 의해 인식된 표적 항원을 발현하는 것으로 공지된 표적 세포를 사용한다;

2) 검정은 랜덤하게 선택된 건강한 공여자의 혈액으로부터 단리된 인간 말초 혈액 단핵 세포(PBMC: human peripheral blood mononuclear cell)를 효과자 세포로서 사용한다;

3) 검정은 하기 프로토콜에 따라 수행된다:

- [0190] i) PBMC는 표준 밀도 원심분리 절차에 의해 단리되고 RPMI 세포 배양 배지중 5×10^6 세포/ mL 로 혼탁된다;
- [0191] ii) 표적 세포는 표준 조직 배양 방법에 의해 성장되고, 90% 초과의 생존력을 갖는 대수증식기로부터 수확되고, RPMI 세포 배양 배지에서 세척되고, 100 마이크로큐리의 ^{51}Cr 로 표지화되고, 세포 배양 배지로 2회 세척되고, 10^5 세포/ mL 의 밀도로 세포 배양 배지에 재현탁된다;
- [0192] iii) 100 μl 의 상기 최종 표적 세포 혼탁액은 96-웰 미세적정 플레이트의 각각의 웰에 전달된다;
- [0193] iv) 항체는 세포 배양 배지에서 4000 ng/ mL 에서 0.04 ng/ mL 로 연속적으로 희석되고 50 μl 의 생성된 항체 용액은 96-웰 미세적정 플레이트중의 표적 세포에 첨가되어, 상기 전체 농도 범위를 포함하는 다양한 항체 농도가 3중으로 시험된다.
- [0194] v) 최대 방출(MR: maximum release) 조절을 위하여, 표지화된 표적 세포를 포함하는 플레이트에서 3개의 추가의 웰에 50 μl 의 2%(V/V) 비이온성 세정제 수용액[노니데트(Nonidet), 시그마(Sigma), 미국 세인트 루이스 소재]이 항체 용액 대신 공급된다(상기 (iv) 시점);
- [0195] vi) 자발적 방출(SR: spontaneous release) 제어를 위하여, 표지화된 표적 세포를 포함하는 플레이트에서 3개의 추가의 웰에 50 μl 의 RPMI 세포 배양 배지가 항체 용액 대신 공급된다(상기 (iv) 시점);
- [0196] vii) 이어서 96-웰 미세적정 플레이트는 1분 동안 50 \times g으로 원심분리되고, 1 시간 동안 4°C에서 항온처리된다;
- [0197] viii) 50 μl 의 PBMC 혼탁액(상기 (i) 시점)이 각각의 웰에 첨가되어 25:1의 효과자:표적 세포 비를 산출하고 플레이트는 5% CO_2 분위기하에 37°C에서 4 시간 동안 항온처리기에 위치된다;
- [0198] ix) 각각의 웰로부터의 세포-부체 상청액이 수거되고 실험적으로 방출된 방사능(ER)은 감마 계수기를 사용하여 정량화된다;
- [0199] x) 특이적 용해의 백분율은 식 $(\text{ER}-\text{MR})/(\text{MR}-\text{SR}) \times 100$ 에 따라 각각의 항체 농도에 대해 계산되고, 여기서 ER은 항체 농도에 대해 정량화된 평균 방사능이고(상기 (ix) 시점 참조), MR은 MR 대조군(상기 (v) 시점 참조)에 대해 정량화된 평균 방사능이고(상기 (ix) 시점 참조), SR은 SR 대조군(상기 (vi) 시점 참조)에 대해 정량화된 평균 방사능이다(상기 (ix) 시점 참조).
- [0200] 4) "증가된 ADCC"는 상기 시험된 항체 농도 범위내에서 관찰된 특정 용해의 최대 백분율에서의 증가, 및/또는 상기 시험된 항체 농도 범위내에서 관찰된 특정 용해의 최대 백분율의 반을 달성하기 위해 필요한 항체의 농도에서의 감소로서 정의된다. ADCC에서의 증가는 당분야의 숙련가에게 공지된 동일한 표준 생산, 정제, 제형화 및 저장 방법을 사용하여, 상기 검정에 의해 측정되고, 동일한 항체에 의해 중재되고, 동일한 유형의 숙주 세포에 의해 생산되지만, GnTIII을 과발현하도록 조작된 숙주 세포에 의해서는 생산되지 않는 ADCC에 관련된다.
- [0201] 효과자 기능이 감소된 항체로는 Fc 영역 잔기 238, 265, 269, 270, 297, 327 및 329중 하나 이상이 치환된 항체가 포함된다(미국 특허 제6,737,056호). 이러한 Fc 돌연변이체로는 2개 이상의 아미노산 위치 265, 269, 270, 297 및 327에서 치환된 Fc 돌연변이체가 포함되고, 예로서 잔기 265 및 297이 알라닌으로 치환된, 소위 "DANA" Fc 돌연변이체가 있다(미국 특허 제7,332,581호).
- [0202] FcR로의 결합이 향상되거나 감소된 특정 항체 변형체가 기재되어 있다[미국 특허 제6,737,056호; 국제 특허출원 공개공보 제WO 2004/056312호, 및 쉴즈 등의 문헌 "J. Biol Chem. 276:6591-6604 (2001)" 참조].
- [0203] 특정 실시태양에서, 항체 변형체는 ADCC를 개선시키는 하나 이상의 아미노산 치환, 예를 들어, Fc 영역의 298, 333, 및/또는 334 위치에서의 치환(잔기의 EU 번호매김)을 갖는 Fc 영역을 포함한다.
- [0204] 몇몇 실시태양에서, 예를 들어, 미국 특허 제6,194,551호, 국제 특허출원 공개공보 제WO 99/51642호, 및 이두소 기에(Idusogie) 등의 문헌 "J. Immunol. 164:4178-4184 (2000)"에 기재된 바와 같이, 변경된(즉, 향상되거나 감소된) Clq 결합 및/또는 보체 의존성 세포독성(CDC)을 일으키는 변경이 Fc 영역에서 이루어진다.
- [0205] 모 IgG의 태아로의 전달에 책임이 있는, 신생아 Fc 수용체(FcRn)로의 결합이 개선되고 반감기가 증가된 항체[구이어(Guyer) 등의 문헌 "J. Immunol. 117:587 (1976)" 및 김(Kim) 등의 문헌 "J. Immunol. 24:249 (1994)"]는 US 제2005/0014934A1호[힌تون(Hinton) 등]에 기재되어 있다. 이를 항체는 FcRn으로의 Fc 영역의 결합을 개선시키는 하나 이상의 치환을 내부에 갖는 Fc 영역을 포함한다. 이러한 Fc 변형체로는, 다음의 하나 이상의 Fc 영

역 잔기에서 치환된 변형체가 포함되고 238, 256, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424 또는 434; 예를 들어, Fc 영역 잔기 434의 치환을 갖는다(미국 특허 제7,371,826호).

[0206] 또한 Fc 영역 변형체의 다른 예에 관한 던칸(Duncan) 및 윈터(Winter)의 문헌 "Nature 322:738-740(1988)"; 미국 특허 제5,648,260호; 미국 특허 제5,624,821호; 및 국제 특허출원 공개공보 제W0 94/29351호를 참조한다.

d) 시스테인 조작된 항체 변형체

[0208] 특정 실시태양에서, 항체의 하나 이상의 잔기가 시스테인 잔기로 치환된 시스테인 조작된 항체, 예를 들어, "티오MAB"를 생성하는 것이 바람직할 수 있다. 특별한 실시태양에서, 치환된 잔기는 항체의 허용가능한 부위에서 초래된다. 이들 잔기를 시스테인으로 치환함으로써, 반응성 티올 기는 항체의 허용가능한 부위에 위치되고, 본원에 추가로 기재된 바와 같이, 다른 부분체, 예컨대, 약물 부분체 또는 연결기-약물 부분체에 항체를 전주케이션하여 면역컨주케이트를 생성하기 위해 사용될 수 있다. 특정 실시태양에서, 하기 잔기들중 임의의 하나 이상은 시스테인으로 치환될 수 있다: 경쇄의 V205(카밧 번호매김); 중쇄의 A118(EU 번호매김); 및 중쇄 Fc 영역의 S400(EU 번호매김). 시스테인 조작된 항체는, 예를 들어, 미국 특허 제7,521,541호에 기재된 바와 같이 생성될 수 있다.

e) 항체 유도체

[0210] 특정 실시태양에서, 본원에 제공된 항체는 당분야에 공지되고 쉽게 이용가능한 추가의 비단백질성 부분체를 함유하도록 추가로 개질될 수 있다. 항체의 유도화에 적합한 부분체로는, 제한되지 않지만 수용성 중합체가 포함된다. 수용성 중합체의 비제한적인 예로는, 제한되지 않지만, 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 에틸렌 글리콜/프로필렌 글리콜의 공중합체, 카복시메틸셀룰로스, 텍스트란, 폴리비닐 알콜, 폴리비닐 피롤리돈, 폴리-1,3-디옥솔란, 폴리-1,3,6-트리옥산, 에틸렌/말레산 무수물 공중합체, 폴리아미노산(단독중합체 또는 무작위 공중합체), 및 텍스트란 또는 폴리(n-비닐 피롤리돈)폴리에틸렌 글리콜, 프로프로필렌 글리콜 단독중합체, 폴리프로필렌 산화물/에틸렌 산화물 공중합체, 폴리옥시에틸화된 폴리올(예를 들어, 글리세롤), 폴리비닐 알콜, 및 이들의 혼합물이 포함된다. 폴리에틸렌 글리콜 프로피온알데히드는 그의 수중 안정성에 기인하여 제작시 이점을 가질 수 있다. 중합체는 임의의 문자량일 수 있고, 분지화되거나 분지화되지 않을 수 있다. 항체에 결합된 중합체의 수는 다양할 수 있고, 하나 보다 많은 중합체가 결합된다면, 이들은 동일하거나 상이한 문자일 수 있다. 전반적으로, 유도화를 위해 사용되는 중합체의 수 및/또는 유형은, 제한되지 않지만, 개선될 항체의 특성 또는 기능, 항체 유도체가 규정된 조건하에서 치료에 사용될 것인지의 여부 등을 비롯한 고려사항에 기초하여 결정될 수 있다.

[0211] 또 다른 실시태양에서, 방사선 노출에 의해 선택적으로 가열될 수 있는 비단백질성 부분체 및 항체의 전주케이트가 제공된다. 하나의 실시태양에서, 비단백질성 부분체는 탄소 나노튜브(nanotube)이다[캄(Kam) 등의 문헌 "Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102:11600-11605 (2005)".] 방사선은 임의의 과장일 수 있고, 제한되지 않지만, 통상적인 세포에 해를 주지 않지만 항체-비단백질성 부분체에 근접한 세포가 사멸되는 온도로 비단백질성 부분체를 가열하는 과장이 포함된다.

B. 재조합 방법 및 조성물

[0213] 항체는, 예를 들어, 미국 특허 제4,816,567호에 기재된 바와 같은 재조합 방법 및 조성물을 사용하여 제조될 수 있다. 하나의 실시태양에서, 본원에 기재된 항-MCSP 항체를 암호화하는 단리된 핵산이 제공된다. 이러한 핵산은 항체의 VL을 포함하는 아미노산 서열 및/또는 항체의 VH를 포함하는 아미노산 서열을 암호화할 수 있다(예를 들어, 항체의 경쇄 및/또는 중쇄). 추가의 실시태양에서, 이러한 핵산을 포함하는 하나 이상의 벡터(예를 들어, 밸현 벡터)가 제공된다. 추가의 실시태양에서, 이러한 핵산을 포함하는 숙주 세포가 제공된다. 이러한 하나의 실시태양에서, 숙주 세포는 (1) 항체의 VL을 포함하는 아미노산 서열 및/또는 항체의 VH를 포함하는 아미노산 서열을 암호화하는 핵산을 포함하는 벡터, 또는 (2) 항체의 VL을 포함하는 아미노산 서열을 암호화하는 핵산을 포함하는 제2 벡터를 포함한다(예를 들어, 이들로 형질전환된다). 하나의 실시태양에서, 숙주 세포는 진핵 세포, 예를 들어, 중국 햄스터 난소(CHO) 세포 또는 럼프조직 세포(예를 들어, YO, NSO, Sp2/0 세포)이다. 하나의 실시태양에서, 항-MCSP 항체를 제조하는 방법이 제공되고, 여기서 이 방법은, 상기 제공된 바와 같이, 항체를 암호화하는 핵산을 포함하는 숙주 세포를 항체의 발현에 적합한 조건하에 배양하는 단계, 및 임의적으로 숙주 세포(또는 숙주 세포 배양 배지)로부터 항체를 회수하는 단계를 포함한다.

[0214] 항-MCSP 항체의 재조합 생산을 위해, 항체, 예를 들어, 상기 기재된 바와 같은 항체를 암호화하는 핵산은 단리

되고 숙주세포에서 추가의 클로닝 및/또는 발현을 위해 하나 이상의 벡터내로 삽입된다. 이러한 핵산은 쉽게 단리될 수 있고, 통상적인 절차를 사용하여 (예를 들어, 항체의 중쇄 및 경쇄를 암호화하는 유전자에 특이적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오타이드 프로브를 사용함으로써) 서열화된다.

[0215] 항체-암호화 벡터의 클로닝 또는 발현에 적합한 숙주 세포는 본원에 기재된 원핵 또는 진핵 세포를 포함한다. 예를 들면, 항체는, 특히 글리코실화 및 Fc 효과자 기능이 필요하지 않는 경우 박테리아에서 생산될 수 있다. 박테리아에서의 항체 단편 및 폴리펩티드의 발현을 위해, 예를 들어, 미국 특허 제5,648,237호, 제5,789,199호, 및 제5,840,523호를 참조한다[또는 이]. 콜라이에서의 항체 단편의 발현을 기재하는 찰턴(Charlton)의 문헌 "Methods in Molecular Biology, Vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ, 2003), pp. 245-254"를 참조한다]. 발현 후, 항체는 가용성 분별물에서 박테리아 세포 페이스트로부터 단리될 수 있고, 추가로 정제될 수 있다.

[0216] 원핵세포에 더하여, 진핵세포 미생물, 예컨대, 필라멘트형 진균류 또는 효모는 항체-암호화 벡터에 적합한 클로닝 또는 발현 숙주이고, 글리코실화 경로가 "인간화"되어 부분적인 또는 완전한 인간 글리코실화 패턴을 갖는 항체를 생성하는 진균류 및 효모 균주가 포함된다[게른그로스(Gerngross)의 문헌 "Nat. Biotech. 22:1409-1414 (2004)"; 및 리(Li) 등의 문헌 "Nat. Biotech. 24:210-215 (2006)" 참조].

[0217] 글리코실화된 항체의 발현에 적합한 숙주 세포는 또한 다세포 유기체(무척추동물 및 척추동물)로부터 유도화된다. 무척추동물 세포의 예로는 식물 및 곤충 세포가 포함된다. 특히 스포돕테라 프루기페르타(*Spodoptera frugiperda*) 세포의 형질감염을 위해, 곤충 세포와 함께 사용될 수 있는 다수의 바클로바이러스 균주가 식별되었다.

[0218] 식물 세포 배양액이 또한 숙주로서 이용될 수 있다. 예를 들어, 미국 특허 제5,959,177호, 제6,040,498호, 제6,420,548호, 제7,125,978호, 및 제6,417,429호[형질감염 식물에서 항체를 생산하기 위한 플랜티바디스(PLANTIBODIES: 상표) 기술을 기재함]를 참조한다.

[0219] 또한 척추동물 세포가 숙주 세포로서 사용될 수 있다. 예를 들면, 혼탁액에서 성장하도록 적응된 포유동물 세포주가 유용할 수 있다. 유용한 포유동물 숙주 세포주의 다른 예는 SV40(COS-7)에 의해 형질전환된 원숭이 신장 CV1 세포주; 인간 배아 신장 세포주[예를 들어, 그라함(Graham) 등의 문헌 "J. Gen Virol. 36:59 (1977)"에 기재된 바와 같은 293 또는 293 세포]; 베이비 햄스터 신장 세포(BHK); 마우스 세르톨리(sertoli) 세포[예를 들어, 매터(Mather)의 문헌 "Biol. Reprod. 23:243-251 (1980)"에 기재된 바와 같은 TM4 세포]; 원숭이 신장 세포(CV1); 아프리카 녹색 원숭이 신장 세포(VERO-76); 인간 뇌 암종 세포(HELA); 개과 동물 신장 세포(MDCK); 베팔로 래트 간 세포(BRL 3A); 인간 폐 세포(W138); 인간 간 세포(Hep G2); 마우스 유방 종양(MMT 060562); 예를 들어, 매터 등의 문헌 "Annals N.Y. Acad. Sci. 383:44-68 (1982)"에 기재된 바와 같은 TRI 세포; MRC 5 세포; 및 FS4 세포이다. 다른 유용한 포유동물 숙주 세포주로는 중국 햄스터 난소(CHO) 세포, 예컨대, DHFR CHO 세포[우를라우브(Urlaub) 등의 문헌 "Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216 (1980)"]; 및 골수종 세포주, 예컨대, Y0, NS0 및 Sp2/0가 포함된다. 항체 생산에 적합한 특정 포유동물 숙주 세포주를 고찰하기 위해, 예를 들어, 야자키(Yazaki) 및 우(Wu)의 문헌 "Methods in Molecular Biology, Vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ), pp. 255- 268 (2003)"을 참조한다.

C. 검정

[0220] 본원에 제공된 항-MCSP 항체는 당분야에 공지된 다양한 검정에 의해 이들의 물리적/화학적 특성 및/또는 생물학적 활성에 대해 식별되거나, 스크리닝되거나, 또는 특징화될 수 있다.

1. 결합 검정 및 기타 검정

[0221] 하나님의 양태에서, 본 발명의 항체는, 예를 들어, 공지된 방법들, 예컨대, ELISA, 웨스턴 블롯 등에 의해 그의 항원 결합에 대해 시험된다.

[0222] 또 다른 양태에서, 경쟁 검정은 MCSP에 결합하는데 대하여 본원에 기재된 항-MCSP 항체와 경쟁하는 항체를 식별하기 위해 사용될 수 있다. 특정 실시태양에서, 이러한 경쟁 항체는 본원에 기재된 항-MCSP 항체에 의해 결합된 동일한 에피토프(예를 들어, 선형 또는 배좌 에피토프)에 결합한다. 항체가 결합하는 에피토프를 매핑(mapping)하기 위한 상세화된 예시적인 방법은 모리스(Morris)의 문헌 "Methods in Molecular Biology vol. 66 (1996) (Humana Press, Totowa, NJ)"의 에피토프 매핑 프로토콜(Epitope Mapping Protocols)에 제공되어 있다.

[0223] 예시적인 경쟁 검정에서, 고정화된 MCSP는 MCSP에 결합하는 제1의 표지화된 항체, 및 MCSP에 결합하는데 대하여

제1 항체와 경쟁하는 능력에 대해 시험되는 제2의 표지화되지 않은 항체를 포함하는 용액에서 항온처리된다. 제2 항체는 하이브리도마 상청액에 존재할 수 있다. 대조군으로서, 고정화된 MCSP는 제1의 표지화된 항체를 포함하지만 제2의 표지화되지 않은 항체를 포함하지 않는 용액에서 항온처리된다. MCSP로의 제1 항체의 결합에 대해 허용되는 조건하에 항온처리된 후, 과량의 결합되지 않은 항체는 제거되고, 고정화된 MCSP와 화합된 표지의 양이 측정된다. 고정화된 MCSP와 화합된 표지의 양이 대조 샘플에 비하여 시험 샘플에서 실질적으로 감소된다면, 이는 제2 항체가 MCSP로의 결합에 대해 제1 항체와 경쟁함을 지시한다. 하로우(Harlow) 및 레인(Lane)의 문헌 "Antibodies: A Laboratory Manual ch.14 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY)(1988)"을 참조한다.

[0226] 2. 활성 검정

[0227] 하나의 양태에서, 검정은 생물학적 활성을 갖는 항-MCSP 항체를 식별하기 위해 제공된다. 생체내 및/또는 시험관내에서의 이러한 생물학적 활성을 갖는 항체가 또한 제공된다.

[0228] 특정 실시태양에서, 본 발명의 항체는 이러한 생물학적 활성에 대해 시험된다.

[0229] D. 면역컨주케이트

[0230] 본 발명은 또한 하나 이상의 세포독성제, 예컨대, 화학치료제 또는 약물, 성장 저해제, 독소(예를 들어, 박테리아, 진균류, 식물 또는 동물 기원의 단백질 독소, 효소적으로 활성인 독소, 또는 이들의 단편), 또는 방사성 동위원소에 컨주케이션된 항-MCSP 항체를 포함하는 면역컨주케이트를 제공한다.

[0231] 하나의 실시태양에서, 면역컨주케이트는 항체-약물 컨주케이트(ADC: antibody-drug conjugate)이고, 여기서 항체는 하나 이상의 약물, 예컨대, 제한되지 않지만 메이탄시노이드(maytansinoid)(미국 특허 제5,208,020호, 제5,416,064호 및 유럽 특허 제EP 0 425 235 B1호 참조); 아우리스타틴(auristatin), 예컨대, 모노메틸아우리스타틴(monomethylauristatin) 약물 부분체 DE 및 DF(MMAE 및 MMAF)(미국 특허 제5,635,483호 및 제5,780,588호, 및 제7,498,298호 참조); 돌라스타틴(dolastatin); 칼리헤아미신(calicheamicin) 또는 이들의 유도체[미국 특허 제5,712,374호, 제5,714,586호, 제5,739,116호, 제5,767,285호, 제5,770,701호, 제5,770,710호, 제5,773,001호, 및 제5,877,296호; 힌만(Hinman) 등의 문헌 "Cancer Res. 53:3336-3342 (1993)"; 및 로데(Lode) 등의 문헌 "Cancer Res. 58:2925-2928 (1998)"]; 안트라사이클린(anthracycline), 예컨대, 다우노마이신(daunomycin) 또는 독소루비신(doxorubicin)[크라츠(Kratz) 등의 문헌 "Current Med. Chem. 13:477-523 (2006)"; 제프레이(Jeffrey) 등의 문헌 "Bioorganic & Med. Chem. Letters 16:358-362 (2006)"; 토르고브(Torgov) 등의 문헌 "Bioconj. Chem. 16:717-721 (2005)"; 나기(Nagy) 등의 문헌 "Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:829-834 (2000)"; 두보우치크(Dubowchik) 등의 문헌 "Bioorg. & Med. Chem. Letters 12:1529-1532 (2002)"; 킹(King) 등의 문헌 "J. Med. Chem. 45:4336-4343 (2002)"; 및 미국 특허 제6,630,579호]; 메토트렉세이트(methotrexate); 빈데신(vindesine); 탁산(taxane), 예컨대, 도세탁셀(docetaxel), 파클리탁셀(paclitaxel), 라로탁셀(larotaxel), 태세탁셀(tesetaxel), 및 오르타탁셀(ortataxel); 트리코테센(trichothecene); 및 CC1065에 컨주케이션된다.

[0232] 또 다른 실시태양에서, 면역컨주케이트는 효소적으로 활성인 독소 또는 이의 단편, 예컨대, 제한되지 않지만, 디프테리아(diphtheria) A 쇄, 디프테리아 독소의 비결합 활성 단편, 엑소톡신(exotoxin) A 쇄[슈도모나스 아에루기노사(*Pseudomonas aeruginosa*)로부터], 리신(ricin) A 쇄, 아브린(abrin) A 쇄, 모데신(modeccin) A 쇄, 알파-사르신(sarcin), 알레우리테스 포르디(*Aleurites fordii*) 단백질, 디안틴(dianthin) 단백질, 파이토락카아메리카나(*Phytolaca americana*) 단백질(PAPI, PAPII, 및 PAP-S), 모모르디카 카란티아(*momordica charantia*) 저해제, 쿠르신(curcin), 크로틴(crotin), 사파오나리아 오피시날리스(*sapaponaria officinalis*) 저해제, 젤로닌(gelonin), 미토겔린(mitogellin), 레스트릭토신(restrictocin), 페노마이신(phennomycin), 에노마이신(enomycin), 및 트리코테세네스(tricothecenes)에 컨주케이션된 본원에 상기 기재된 바와 같은 항체를 포함한다.

[0233] 또 다른 실시태양에서, 면역컨주케이트는 방사성 원자에 컨주케이트되어 방사성컨주케이트를 형성하는 본원에 기재된 바와 같은 항체를 포함한다. 다양한 방사성 동위원소가 방사성컨주케이트의 생산에 이용가능하다. 예로는 At^{211} , I^{131} , I^{125} , Y^{90} , Re^{186} , Re^{188} , Sm^{153} , Bi^{212} , P^{32} , Pb^{212} 및 Lu 의 방사성 동위원소가 포함된다. 방사성 컨주케이트가 검출을 위해 사용될 경우, 이는 신티그라프(scintigraphic) 연구를 위한 방사성 원자, 예를 들면 tc^{99m} 또는 I^{123} , 또는 핵자기 공명(NMR: nuclear magnetic resonance) 영상화(또한 자기 공명 영상화, mri로도 공지됨)를 위한 스픬 표지, 예컨대, 요오드-123, 요오드-131, 인듐-111, 플루오르-19, 탄소-13, 질소-15, 산

소-17, 가돌리늄, 망간 또는 철을 포함할 수 있다.

[0234] 항체 및 세포독성제의 컨주케이트는 다양한 이작용성 단백질 커플링제, 예컨대, N-석신이미딜-3-(2-피리딜디티오) 프로페오네이트(SPDP), 석신이미딜-4-(N-말레이미도메틸)사이클로헥산-1-카복실레이트(SMCC), 이미노티올란(IT), 이미도에스테르의 이작용성 유도체(예컨대, 디메틸 아디페미레이트 HC1), 활성 에스테르(예컨대, 디석신 이미딜 수베레이트), 알데히드(예컨대, 글루타르알데히드), 비스-아지도 화합물(예컨대, 비스(p-아지도벤조일)헥산디아민), 비스-디아조늄 유도체(예컨대, 비스-(p-디아조늄벤조일)-에틸렌디아민), 디이소시아네이트(예컨대, 톨루엔 2,6-디이소시아네이트), 및 비스-활성 플루오르 화합물(예컨대, 1,5-디플루오로-2,4-디니트로벤젠)을 사용함으로써 제조될 수 있다. 예를 들면, 리신 면역독소는 비테타(Vitetta) 등의 문헌 "Science 238:1098 (1987)"에 기재된 바와 같이 제조될 수 있다. 탄소-14-표지화된 1-이소티오시아네이토벤질-3-메틸디에틸렌 트리아민펜타아세트산(MX-DTPA)은 항체로의 방사성뉴클레오타이드의 컨주케이션을 위한 예시적인 킬레이트화제이다. 국제 특허출원 공개공보 제W094/11026호를 참조한다. 연결기는 세포에서 세포독성 약물의 방출을 촉진시키는 "분할가능한 연결기"일 수 있다. 예를 들면, 산-불안정성 연결기, 펩티다아제-민감성 연결기, 광불안정성 연결기, 디메틸 연결기 또는 디설파이드-함유 연결기[차리(Charri) 등의 문헌 "Cancer Res. 52:127-131 (1992)"; 미국 특허 제5,208,020호]가 사용될 수 있다.

[0235] 면역컨주케이트 또는 ADC는 본원에서, 제한되지 않지만, 상업적으로 입수가능한 BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, 설포-EMCS, 설포-GMBS, 설포-KMUS, 설포-MBS, 설포-SIAB, 설포-SMCC 및 설포-SMPB, 및 SVSB(석신이미딜-(4-비닐셀론)벤조에이트)[예를 들어, 미국 일리노이주 랙포드 소재의 피어스 바이오테크놀로지 인코포레이티드(Pierce Biotechnology, Inc.)로부터]를 비롯한 가교-결합제에 의해 제조된 이러한 컨주케이트를 명백히 고려한다.

E. 진단 및 검출을 위한 방법 및 조성물

[0237] 특정 실시태양에서, 본원에 제공된 임의의 항-MCSP 항체는 생물학적 샘플에서 MCSP의 존재를 검출하기 위해 유용하다. 특별히, LC007 항체는 웨스턴 블로트 뿐만 아니라 신선한 동결되고 고정된 조직 상의 MCSP를 인식하는 것으로 결정되어, LC007과 동일한 에피토프를 인식하는 이러한 항체 및 이의 변형체가 MCSP의 존재를 검출하기 위한 다양한 기법에 적합한 항체임을 지시한다.

[0238] 하나의 실시태양에서, 진단 또는 검출의 방법에서 사용하기 위한 항-MCSP 항체가 제공된다. 추가의 양태에서, 생물학적 샘플에서 MCSP의 존재를 검출하는 방법이 제공된다. 특정 실시태양에서, 이 방법은 항-MCSP 항체가 MCSP에 결합하는 것을 허용하는 조건하에 생물학적 샘플을 본원에 기재된 바와 같은 항-MCSP 항체와 접촉시키는 단계, 및 항-MCSP 항체 및 MCSP 사이에 착체가 형성되는지의 여부를 검출하는 단계를 포함한다. 이러한 방법은 시험관내 또는 생체내 방법일 수 있다. 하나의 실시태양에서, 이 방법은 면역조직화학(IHC: immunohistochemistry)에 기초한 검정이다. MCSP IHC 검정은, 일반적으로, 항-MCSP 항체가 MCSP에 결합하는 것을 허용하는 조건하에 항-MCSP 항체를 조직 샘플과 접촉시키는 단계, 및 항-MCSP 항체 및 MCSP 사이에 착체가 형성되는지의 여부를 검출하는 단계를 포함한다. 항체-MCSP 항원 착체의 존재 또는 부재는 당분야에 공지된 임의의 면역검출 방법, 예컨대, 형광, 면역금, 또는 효소-증재된 염색 방법에 의해 검출될 수 있다. 분석은 신선한 조직 샘플 상에서 또는 동결되거나 고정된 샘플(예를 들면, 포름알데히드-고정되고, 파라핀-함침된 조직(FFPET) 상에서 수행될 수 있다. 예를 들면, 밀러(Miller) 등의 문헌 "진단 면역조직화학에서의 고정 및 에피토프 회수: 실행적 고려에 의한 간결한 고찰(Fixation and epitope retrieval in diagnostic immunohistochemistry: a concise review with practical considerations); Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol. (2000) 8(3):228-235"을 참조한다.

[0239] 하나의 실시태양에서, 항-MCSP 항체는 항-MCSP 항체에 의한 치료에 대해 적합한 피험체를 선택하기 위해 사용되고, 예를 들어, MCSP는 환자의 선택을 위한 바이오마커이다.

[0240] 본 발명의 항체를 사용하여 진단될 수 있는 예시적인 질환으로는 세포 증식성 질환 또는 혈관신생성 질환을 비롯하여 MCSP의 발현에 의해 특징지워 지는 질환이 포함된다. 하나의 실시태양에서, 질환은 암, 예컨대, 피부암(흑색종 및 기저 세포 암종 포함), 신경교종(교모세포종 포함), 골암(예컨대, 골육종), 및 백혈병(ALL 및 AML 포함)이다.

[0241] 특정 실시태양에서, 표지화된 항-MCSP 항체가 제공된다. 표지로는, 제한되지 않지만, 직접적으로 검출되는 표지 또는 부분체(예컨대, 형광물질, 발색단, 고전자밀도, 화학발광체, 및 방사성 표지), 뿐만 아니라 예를 들어, 효소 반응 또는 분자 상호작용을 통해 간접적으로 검출되는 부분체, 예컨대, 효소 또는 리간드가 포함된다. 예

시적인 표지로는, 제한되지 않지만, 방사성동위원소 ^{32}P , ^{14}C , ^{125}I , ^3H , 및 ^{131}I , 형광단, 예컨대, 희토류 칼레이트 또는 플루오레세인(fluorescein) 및 그의 유도체, 로다민 및 그의 유도체, 단실(dansyl), 웜밸리페론(umbelliferone), 루시페라아제, 예를 들어, 반딧불 루시페라아제 및 박테리아 루시페라아제(미국 특허 제4,737,456호), 루시페린, 2,3-디하이드로프탈라진디온, 서양고추냉이 과산화효소(HRP: horseradish peroxidase), 알칼리성 포스파타아제, β -갈락토시다아제, 글루코아밀라아제, 라이소자임, 당류 산화효소, 예를 들어, 글루코스 산화효소, 갈락토스 산화효소, 및 글루코스-6-포스페이트 탈수소효소, 헤테로환식 산화효소, 예컨대, 유리카아제(uricase) 및 잔틴 산화효소(염료 전구체를 산화시키기 위해 과산화수소를 사용하는 효소, 예컨대, HRP, 락토과산화효소, 또는 마이크로과산화효소와 커플링됨), 비오틴/아비딘, 스펀 표지, 박테리오파아지 표지, 안정한 유리 라디칼 등이 포함된다.

[0242]

F. 약학 제형

[0243]

본원에 기재된 바와 같은 항-MCSP 항체의 약학 제형은 원하는 순도를 갖는 이러한 항체를 하나 이상의 임의적인 약학적으로 허용가능한 담체와 혼합함으로써[레밍턴(Remington)의 문헌 "Pharmaceutical Sciences, 16th edition, Osol, A. (ed.) (1980)"], 동결건조된 제형 또는 수성 용액의 형태로 제조된다. 약학적으로 허용가능한 담체는 일반적으로 사용된 투여량 및 농도에서 수용체에 무독성이고, 제한되지 않지만, 완충액, 예컨대, 포스페이트, 시트레이트, 및 다른 유기산; 항산화제, 예컨대, 아스코르브산 및 메티오닌; 보존제(예컨대, 옥타데실디메틸벤질 암모늄 클로라이드; 헥사메토늄 클로라이드; 벤즈알코늄 클로라이드; 벤제토늄 클로라이드; 페놀, 부틸 또는 벤질 알코올; 알킬 파라벤, 예컨대, 메틸 또는 프로필 파라벤; 카테콜; 래소르시놀; 사이클로헥사놀; 3-펜타놀; 및 m-크레솔); 저분자량(약 10개 미만의 잔기) 폴리펩티드; 단백질, 예컨대, 혈청 알부민, 젤라틴, 또는 면역글로불린; 친수성 중합체, 예컨대, 폴리비닐 피롤리돈; 아미노산, 예컨대, 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 히스티딘, 아르기닌, 또는 라이신; 일당류, 이당류, 및 기타 탄화수소, 예로서 글루코스, 만노스, 또는 헥스트란; 키레이트화제, 예컨대, EDTA; 당류, 예컨대, 수크로스, 만니톨, 트레할로스 또는 솔비톨; 염-형성 대이온, 예컨대, 나트륨; 금속 치체(예를 들어, Zn-단백질 치체); 및/또는 비-이온성 계면활성제, 예컨대, 폴리에틸렌 글리콜(PEG)이 포함된다. 예시적인 약학적으로 허용가능한 담체는 본원에서 추가로 간질성(interstitial) 약물 분산제, 예컨대, 가용성 중성-활성 히알루로니다아제(hyaluronidase) 당단백질(sHASEGP), 예를 들면, 인간 가용성 PH-20 히알루로니다아제 당단백질, 예컨대, rhuPH20[하이레넥스(HYLENEX: 등록상표), 박스터 인터내셔널 인코포레이티드]을 포함한다. 특정한 예시적인 sHASEGP 및 이의 사용 방법(rhuPH20 포함)은 미국 특허 공개출원 제2005/0260186호 및 제2006/0104968호에 기재되어 있다. 한 양태에서, sHASEGP는 하나 이상의 추가의 글리코사미노글리카나아제, 예컨대, 콘드로이티나아제와 조합된다.

[0244]

예시적인 동결건조된 항체 제형은 미국 특허 제6,267,958호에 기재되어 있다. 수성 항체 제형은 미국 특허 제6,171,586호 및 국제 특허출원 공개공보 제W0 2006/044908호에 기재된 제형을 포함하고, 후자의 제형으로는 히스티딘-아세테이트 완충액이 포함된다.

[0245]

제형은 본원에서 또한 치료될 특정 증상에 필수적인 하나 보다 많은 활성 구성성분들, 바람직하게는 서로 부정적으로 영향을 주지 않는 상보적 활성을 갖는 구성성분을 포함할 수 있다. 이러한 활성 구성성분들은 의도된 목적으로 효과적인 양으로 조합물에 적절히 존재한다.

[0246]

활성 구성성분들은, 예를 들면, 코아세르베이션 기법에 의해 또는 계면 중합에 의해 제조된 마이크로캡슐, 예를 들면, 하이드록시메틸셀룰로스 또는 젤라틴-마이크로캡슐 및 폴리-(메틸 메타크릴레이트) 마이크로캡슐, 각각, 콜로이드성 약물 전달 시스템(예를 들면, 리포솜, 알부민 미소구체, 마이크로에멀젼(microemulsion), 나노-입자 및 나노캡슐) 또는 매크로에멀젼(macroemulsion)에 트래핑될 수 있다. 이러한 기법들은 레밍턴의 문헌 "Pharmaceutical Sciences, 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)"에 개시되어 있다.

[0247]

지효성(sustained-release) 제제가 제조될 수 있다. 지효성 제제의 접합한 예로는 항체를 포함한 고체 소수성 중합체의 반투과성 매트릭스가 포함되고, 이러한 매트릭스는 성형 제품, 예를 들어, 필름 또는 마이크로캡슐의 형태이다.

[0248]

생체내 투여에 사용되는 제형은 일반적으로 멸균성이다. 멸균성은, 예를 들어, 멸균 여과막에 의해 쉽게 달성이 될 수 있다.

[0249]

G. 치료 방법 및 조성물

[0250]

본원에 제공된 임의의 항-MCSP 항체는 치료 방법에 사용될 수 있다.

- [0251] 하나의 양태에서, 약제로서 사용하기 위한 항-MCSP 항체가 제공된다. 추가의 양태에서, 암을 치료하는데 사용하기 위한 항-MCSP 항체가 제공된다. 특정 실시태양에서, 치료 방법에 사용하기 위한 항-MCSP 항체가 제공된다. 특정 실시태양에서, 본 발명은 개별체에게 효과량의 항-MCSP 항체를 투여함을 포함하는, 암을 앓는 개별체를 치료하는 방법에 사용하기 위한 항-MCSP 항체를 제공한다. 하나의 이러한 실시태양에서, 방법은 개별체에게 효과량의 하나 이상의 추가의 치료제, 예를 들어, 하기 기재된 바와 같은 치료제를 투여함을 추가로 포함한다. 추가의 실시태양에서, 본 발명은 흑색종의 치료에 사용하기 위한 항-MCSP 항체를 제공한다. 임의의 상기 실시태양에 따른 "개별체"는 바람직하게는 인간이다.
- [0252] 추가의 양태에서, 본 발명은 약제의 제작 또는 제조에 있어서의 항-MCSP 항체의 용도를 제공한다. 하나의 실시태양에서, 약제는 암 치료를 위한 것이다. 추가의 실시태양에서, 약제는 암을 앓는 개별체에게 효과량의 약제를 투여함을 포함하는 암 치료 방법에서 사용하기 위한 것이다. 하나의 이러한 실시태양에서, 방법은 개별체에게 효과량의 하나 이상의 추가의 치료제, 예를 들어, 하기 기재된 바와 같은 치료제를 투여함을 추가로 포함한다. 임의의 상기 실시태양에 따른 "개별체"는 인간일 수 있다.
- [0253] 추가의 양태에서, 본 발명은 암을 치료하기 위한 방법을 제공한다. 하나의 실시태양에서, 방법은 이러한 암을 앓는 개별체에게 효과량의 항-MCSP 항체를 투여함을 포함한다. 하나의 이러한 실시태양에서, 방법은 개별체에게 효과량의 하나 이상의 추가의 치료제, 예를 들어, 하기 기재된 바와 같은 치료제를 투여함을 추가로 포함한다. 임의의 상기 실시태양에 따른 "개별체"는 인간일 수 있다.
- [0254] 하나의 실시태양에서, 상기 양태에서의 암은 그의 구성 세포의 표면 상에 MCSP를 발현한다. 하나의 실시태양에서, 상기 양태에서의 암은 피부암(흑색종 및 기저 세포 암종 포함), 신경교종(교모세포종 포함), 골암(예컨대, 골육종), 및 백혈병(ALL 및 AML 포함) 중에서 선택된다. 하나의 실시태양에서, 상기 양태에서의 암은 흑색종이다.
- [0255] 추가의 양태에서, 본 발명은 본원에 제공된, 예를 들어, 상기 임의의 치료 방법에서 사용하기 위한 임의의 항-MCSP 항체를 포함하는 약학 제형을 제공한다. 하나의 실시태양에서, 약학 제형은 본원에 제공된 임의의 항-MCSP 항체 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함한다. 또 다른 실시태양에서, 약학 제형은 본원에 제공된 임의의 항-MCSP 항체 및 적어도 하나의 추가의 치료제, 예를 들어, 하기 기재된 치료제를 포함한다.
- [0256] 본 발명의 항체는 치료법에서 다른 제제와 함께 또는 단독으로 사용될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 항체는 1종 이상의 추가의 치료제와 공동 투여될 수 있다.
- [0257] 상기 주지된 이러한 조합 치료법은 조합된 투여(여기서 2종 이상의 치료제는 동일하거나 별도의 제형에 포함됨), 및 별도의 투여를 내포하고, 이 경우 본 발명의 항체의 투여는 추가의 치료제 및/또는 보조제의 투여 이전에, 동시에, 및/또는 이후에 초래될 수 있다. 본 발명의 항체는 또한 방사선 요법과 함께 사용될 수 있다.
- [0258] 본 발명의 항체(및 임의의 추가의 치료제)는 임의의 적합한 수단에 의해 투여될 수 있고, 예컨대, 비경구적, 폐내, 및 비강내, 필요에 따라 국소적 치료를 위해 병변내 투여가 포함된다. 비경구적 주입으로는 근육내, 정맥내, 동맥내, 복막내, 또는 폐하 투여가 포함된다. 투약은, 부분적으로는 투여가 단기인지 장기인지에 따라, 임의의 적합한 경로에 의해, 예를 들어, 주사에 의해, 예컨대, 정맥내 또는 폐하 주사에 의해 수행될 수 있다. 제한되지 않지만 다양한 시점에 걸친 다중 투여 또는 단일 투여, 거환 투여, 및 맥동 주입 등을 비롯한 다양한 투약 계획이 본원에서 고려된다.
- [0259] 본 발명의 항체는 양호한 의료행위와 일치하는 방식으로 제형화되고, 투약되고, 투여될 것이다. 본원과 관련하여 고려되는 인자로는 치료될 특정 질환, 치료되는 특정 포유동물, 개별 환자의 임상적 증상, 질환의 원인, 제제의 전달 부위, 투여 방법, 투여 계획, 및 의료진에게 공지된 다른 인자들이 포함된다. 항체는, 필수적이지는 않지만, 임의적으로 해당 질환을 예방 또는 치료하기 위해 현재 사용되는 하나 이상의 제제와 함께 제형화된다. 이러한 다른 제제의 효과적인 양은 제형에 존재하는 항체의 양, 질환 또는 치료의 유형 및 상기 언급된 다른 인자들에 좌우된다. 이들은 일반적으로 본원에 기재된 바와 동일한 투여량으로 및 투여 경로에 의해, 또는 본원에 기재된 투여량의 약 1% 내지 99%의 양으로, 또는 실험적/임상적으로 적절한 것으로 결정된 임의의 투여량으로 및 임의의 경로에 의해 사용된다.
- [0260] 질환의 예방 또는 치료를 위해, 본 발명의 항체의 적절한 투여량(단독으로 사용될 경우, 또는 하나 이상의 다른 추가의 치료제와 조합하여 사용될 경우)은 치료될 질환의 유형, 항체의 유형, 질환의 위중성 및 과정, 항체가 예방을 목적으로 투여되는지 치료를 목적으로 투여되는지의 여부, 이전 치료법, 환자의 임상적 병력 및 항체에 대한 반응, 및 참여 의사의 견해에 좌우될 것이다. 항체는 적합하게는 환자에게 1회 또는 일련의 치료로 투여

된다. 질환의 유형 및 위중성에 따라서, 약 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 내지 15 mg/kg (예를 들어, 0.1 mg/kg 내지 10 mg/kg)의 항체는, 예를 들면 하나 이상의 별도의 투여에 의해서인지 연속적인 주입에 의해서인지와 무관하게, 환자에게 투여하기 위한 초기 후보 투여량일 수 있다. 하나의 전형적인 1일 투여량은 상기 언급된 인자들에 따라서, 약 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 내지 100 mg/kg 이상의 범위일 수 있다. 수 일 이상에 걸친 반복된 투여를 위해, 증상에 따라서, 치료는 질환 증후의 원하는 억제가 초래될 때까지 유지될 것이다. 항체의 한 예시적인 투여량은 약 0.05 mg/kg 내지 약 10 mg/kg 의 범위내일 수 있다. 이와 같이, 약 0.5 mg/kg , 2.0 mg/kg , 4.0 mg/kg 또는 10 mg/kg (또는 이의 임의의 조합)중 하나 이상의 용량이 환자에게 투여될 수 있다. 이러한 용량은 간헐적으로, 예를 들어, 매주 마다 또는 3주마다 투여될 수 있다(예를 들어, 환자가 항체를 약 2 내지 약 20회, 또는 예를 들어, 약 6회 용량으로 수여받도록). 초기에 더 높은 적재 용량이 투여된 후 하나 이상의 더 낮은 용량이 투여될 수 있다. 이러한 치료법의 진행은 종래의 기법 및 검정에 의해 쉽게 모니터링된다.

[0261] 임의의 상기 제형 또는 치료 방법이 항-MCSP 항체 대신 또는 이에 더하여 본 발명의 면역컨주케이트를 사용하여 수행될 수 있음을 알아야 한다.

H. 제품

[0263] 본 발명의 또 다른 양태에서, 상기 기재된 질환의 치료, 예방 및/또는 진단에 유용한 물질을 포함하는 제품이 제공된다. 제품은 용기 및 이의 위에 또는 이와 연결된 라벨 또는 패키지 삽입물을 포함한다. 적합한 용기로는, 예를 들면, 병, 바이알, 주사기, IV 용액 백 등이 포함된다. 용기는 다양한 물질, 예컨대, 유리 또는 플라스틱으로 형성될 수 있다. 용기는 그 자체의, 또는 증상을 치료, 예방 및/또는 진단하는데 효과적인 다른 조성물과 조합된 조성물을 보유하고, 멀균 접근 포트를 가질 수 있다(예를 들면 용기는 피하내 주사 바늘에 의해 침투 가능한 스토퍼(stopper)를 갖는 정맥내 용액 백 또는 바이알일 수 있음). 조성물중 적어도 하나의 활성화제는 본 발명의 항체이다. 라벨 또는 패키지 삽입물은, 조성물이 선택된 증상을 치료하기 위해 사용됨을 지시한다. 게다가, 제품은 (a) 조성물이 포함된 제1 용기(여기서 조성물은 본 발명의 항체를 포함함); 및 (b) 조성물이 포함된 제2 용기(여기서 조성물은 추가의 세포독성제 또는 달리는 치료제를 포함함)를 포함할 수 있다. 본 발명의 이러한 실시태양에서 제품은 조성물이 특정 증상을 치료하기 위해 사용될 수 있음을 지시하는 패키지 삽입물을 추가로 포함할 수 있다. 다르게는, 또는 추가적으로, 제품은 약학적으로 허용가능한 완충액, 예컨대, 주사용 정균수(BWFI: bacteriostatic water for injection), 포스페이트-완충된 염수, 링거의 용액 및 텍스트로즈 용액을 포함하는 제2 (또는 제3) 용액을 추가로 포함할 수 있다. 추가로 다른 완충액, 희석제, 충전제, 바늘, 및 주사기를 비롯하여, 상업적 관점 및 사용자 관점에서 바람직한 다른 물질을 추가로 포함할 수 있다.

[0264] 임의의 상기 제품이 항-MCSP 항체 대신에 또는 이에 더하여 본 발명의 면역컨주케이트를 포함할 수 있음을 알아야 한다.

실시예

[0266] 본 발명의 방법 및 조성물의 예는 다음과 같다. 상기에 일반적 설명이 제공되었지만 다양한 다른 실시태양이 실행될 수 있음을 알아야 한다.

실시예 1: 항-MCSP 항체의 생성

면역화 및 하이브리도마 생성

[0269] Balb/c 마우스를 KLH(SVPE AARTEAGKPE SSTPTGEPGPMASSPEPAVA KGGFLSFLEAN (서열 번호 2))에 커플링된 인간 MCSP 서열의 아미노산 2177 내지 2221에 상응하는 합성 웹타이드로 매 4주마다 4회 복강내로 면역화하고, MCSP를 발현하는 Colo38 세포[기아코미니(Giacomini P), 나탈리(Natali P), 페론(Ferrone S)의 문헌 "J Immunol. 1985 Jul;135(1):696-702"]로 2회 면역화하였다. 초기 면역화를 CFA에서 수행하고, 모두를 IFA에서 부스팅(boosting)하였다.

[0270] 혈청 시험 채혈을 수행하고, 최대 혈청 역가 반값을 비오틴에 커플링되고 스트렙타비딘(Streptavidin) ELISA 미세적정 플레이트 상으로 코팅된 MCSP 웹타이드 아미노산 2177 내지 2221에 의해 결정하였다. 1:50,000의 최대 역가 반값을 갖는 마우스를 정맥내 부스트에 대해 선택하였다. MCSP 웹타이드(20 μg) 및 Colo38 세포를 사용하여 융합 이전 4일째 정맥내 부스트를 수행하였다. 정맥내 부스트를 수행한 후 3일 째, 지라세포를 수확하고, Ag8 골수종 세포와 융합하였다.

스크리닝 및 하이브리도마 특징

- [0272] 스트렙타비딘 미세적정 플레이트 상으로 코팅된 MCSP-비오틴 웨타이드 아미노산 2177 내지 2221(서열 번호 2)에 결합하는 항체를 식별함으로써 MCSP 특이적 항체를 위한 스크리닝을 시작하였다. 이어서 고정화된 MCSP 웨타이드에 결합하는 양성 클론을 혈청 부재 배지[하이클론(Hyclone) ADFC-Mab; 써모 사이언티픽(Thermo Scientific), 카탈로그 번호 SH30349.02]에서 팽창시켰다.
- [0273] 높은 수준의 인간 MCSP를 천연적으로 발현하는 Colo38 세포 상에서의 FACS 분석에 의하여 MCSP의 고유의 형태로의 결합을 수행하였다. 검출가능한 수준의 MCSP를 발현하지 않는 전립선 암종 세포주 PC3을 음성 대조군으로서 사용하였다. 리드(lead) 항체의 특이성을 추가로 특정짓기 위해, 키메라성 리드 항체(인간 Fc 발현)와 조합된 2중 염색에 대하여 확립된 상업용 항-MCSP 항체[인비트로겐 코포레이션(Invitrogen Corp.), 카탈로그 넘버 41-2000호, 클론 LHM2]를 사용하여 Colo38 세포 상에서 이중 면역세포화학 분석을 수행하였다. 면역형광 표지화에 의해 알 수 있듯이, 하나의 항체, LC007은 Colo38 세포에서 MCSP 표면을 강하게 염색하였지만, 이는 PC3 세포 상에서 음성이었다.
- [0274] **실시예 2: 키메라화**
- [0275] 항체 클론 LC007을 발현하는 하이브리도마 세포주로부터 mRNA를 단리하고, 상업적으로 입수가능한 키트를 사용하여 cDNA로 전환시켰다. 중쇄(서열 번호 39) 및 경쇄(서열 번호 38)를 위한 cDNA 단리물을 서열화하고, 각각의 구획을 카파 및 인간 IgG₁의 불변성 영역에 융합시켰다.
- [0276] HEK-EBNA 세포에서 인간 면역글로불린으로부터의 신호 웨타이드를 사용하여 서열을 발현시키고, 종래의 단백질 A 및 크기 배제 크로마토그래피(SEC: size exclusion chromatography)를 사용하여 정제하였다.
- [0277] 결합 활성을 하기 방법에 의해 결정하였다. 표적 세포를 세포 해리 완충액이 포함된 배양 플라스크로부터 분리하고, 계수하고, 생존력에 대해 검사하였다. 세포를 재현탁하고, PBS-0.1% BSA 중 1.111×10^6 (생존가능함) 세포/mL로 조정하였다. 이러한 혼탁액(180 μL)을 환저 96-웰 플레이트에서 각각의 웰(웰당 200,000 세포)에 옮기고, 4분 동안 400 g에서 원심분리하고, 재현탁하였다. PBS-0.1% BSA(10 μg/mL 내지 0.002 μg/mL) 중 항체 회색액(20 μL)을 각각의 웰에 첨가하였다. 샘플을 4분 동안 400 g에서 원심분리하고, 재현탁하였다. 2차 항체인 FITC-컨주게이션된 어피니퓨어(AffiniPure) F(ab')2 단편 염소 항-인간 IgG Fcg 프래그먼트 스페시픽(Fragment Specific)[잭슨 이뮤노 리씨치 랩(Jackson Immuno Research Lab) # 109-096-098]을 첨가하고, 샘플을 4분 동안 400 g에서 원심분리하고, 재현탁하였다. 형광성을 유세포분석기[예를 들어, FACS 칸토(Canto) II]에서 측정하였다. 적정 결과는 도 1 및 2에 제시되어 있다. 모르간(Morgan AC Jr), 갈로웨이(Galloway DR), 레이스펠드(Reisfeld RA)의 문헌 "Hybridoma. 1981;1(1):27-36."에 기재된 항체 9.2.27(경쇄 및 중쇄 각각에 대한 유전자은행 수탁 번호: GI:20797193 및 GI:20797189)을 기준 항체로서 사용하였다(도 2). 인간 흑색종 세포주 Colo38, A2058, 및 A375를 사용하였다[기아코미니(Giacomini) 등의 문헌(1985)(Colo38에 대해); 마르퀴드트(Marquardt H), 토다로(Todaro GJ)의 문헌 "J Biol Chem. 1982 May 10;257(9):5220-5"(A2058에 대해); 가이서(Geiser M), 숀츠(Schultz D), 르 카디날(Le Cardinal A), 보솔(Voshol H), 가르시아-에체베리아(Garcia-Echeverria C.)의 문헌 "Cancer Res. 1999 Feb 15;59(4):905-10"(A375에 대해)].
- [0278] **실시예 3: MCSP 항원 상에서의 LC007 항체의 결합 에피토프의 결정**
- [0279] LC007 항체는 흑색종 세포 상에서 양호한 결합을 나타내었지만, 고유의 면역원 상에서 단지 약한 결합을 나타내었다. 따라서, 항원 상에서의 정확한 결합 부위를 결정하기 위해 항체 LC007의 에피토프 매핑을 실행하였다. 이를 위하여 MCSP 항원의 몇몇 개의 끝이 절단된 형태를 생성하였고, 각각은 CSPG 반복부로서 지칭되는 다양한 수의 인간 MCSP의 막 근위 반복 영역을 포함한다[스타우브(Staub E.) 등의 문헌 "FEBS Lett. 527:114-118(2002)"].
- [0280] 작성물 1은 CSPG 반복부 15(서열 번호 4)를 포함하고, 작성물 2는 CSPG 반복부 14 및 15(서열 번호 5)를 포함하고, 작성물 3은 CSPG 반복부 13 내지 15(서열 번호 6)를 포함하고, 작성물 4는 CSPG 반복부 12 내지 15(서열 번호 7)를 포함하였다. 도 3은 MCSP의 CSPG 반복부 포함 구조물의 개략도를 제공한다. 이들 작성물은 고유의 막간 영역을 포함하고, FACS에 의한 LC007의 검출을 위해 HEK-EBNA 세포 상에서 발현되었다. 도 4는 이러한 실험의 결과를 도시한다. MCSP 반복부 15 및 천연 막간 도메인을 포함하는 작성물은 상당한 결합을 나타내지 않았다. 대조적으로, 도메인 14 및 15를 포함하는 모든 작성물은 상당한 결합을 나타내었다. 이로부터, 결합 에피토프는 반복부 14 내에 있거나, 단지 반복부 14가 존재할 경우 재구성되고, 또한 CSPG 반복부 및 막간 도메인 사이에 구조화되지 않은 영역 또는 반복부 15의 일부를 잠재적으로 포함함을 알 수 있다.

[0281] LC007은 웨스턴 블롯(변성된 선형 에피토프) 뿐만 아니라 신선한 동결된 조직 및 고정된 조직 상에서 MCSP를 인식하는 것으로 또한 결정되었다. 웨스턴 블롯 분석으로부터, LC007이 MCSP 단백질 및 글리코실화 변형체를 인식하지만, MCSP 음성적 세포주 상의 단백질을 인식하지 않음을 알 수 있다. 이와 같이, LC007 항체는 면역조직화학(IHC)에 기초한 분석, 예컨대, 포르말린-고정되고, 파라핀-함침된 조직(FFPET) IHC 분석을 비롯한, MCSP의 존재를 검출하기 위한 다양한 기법에 적합한 항체이다.

실시예 4: 인간 및 사이노몰구스 항원과의 교차반응성에 대한 결정

[0283] 사이노몰구스 항원에 대한 교차반응성을 시험하기 위해 사이노몰구스 MCSP 단백질의 C-말단 부분, 분비를 위한 신호 펩타이드 및 N-말단 FLAG-태그(서열 번호 8)를 포함하는 발현 작성물을 생성하였다. 이러한 도메인은 D3 도메인으로 지칭되었다[틸레트(Tillett, F.) 등의 문헌 "AI, J. Biol. Chem. 272:10769-10776 (1997)]. 유사한 작성물을 인간 대응물(서열 번호 9)을 위해 실행하였다. 이들 2가지 작성물을 암호화하는 발현 플라스미드를 HEK-EBNA 세포내로 전기천공하고, 발현을 항-FLAG 항체로 확인하였다. 이어서 LC007 항체의 결합을 유세포분석에 의해 시험하였다. 도 5는 상응하는 인간 발현 작성물에 대해서와 유사한 친화도로 사이노몰구스 작성물에 결합함을 보여준다.

실시예 5: 글리코조작된 LC007 항체

[0285] GnT-III 글리코실전달효소 발현 벡터, 또는 GnT-III 발현 벡터 + 골지 만노시다아제 II 발현 벡터와 함께 항체 발현 벡터의 공동-형질감염에 의해 LC007 항체의 글리코조작된 변형체를 생산하였다.

실시예 6: 글리코조작된 LC007 항체의 ADCC

ADCC 검정

[0288] 상이한 농도의 글리코조작된 LC007 항체 및 대조 항체 샘플의 존재하에 1:19의 표적:효과자 비로 37°C에서 16시간의 항온처리 동안 인간 램프구(효과자)에 의한 Colo38 인간 악성 흑색종 세포(표적)의 용해를 형광 염색의 보유를 통해 측정하였다[콜버(Kolber) 등의 문헌 "J. Immunol. Methods 108:255-264, 1988"]. IMR-32 세포를 형광 염료 칼세린(Calcein) AM으로 20분 동안 표지화하였다(최종 농도: 3.3 μM). 표지화된 세포(80,000 세포/웰)를 1 시간 동안 상이한 농도의 글리코조작된 LC007 항체 및 대조 항체 샘플과 함께 항온처리하였다. 이어서, 단핵백혈구 결핍 단핵 세포를 첨가하고(1,500,000 세포/웰) 세포 혼합물을 16 시간 동안 37°C에서 5% CO₂ 분위기하에 항온처리하였다. 상청액을 따라 버리고 세포를 HBSS로 1회 세척하고 트리톤(Triton) X-100(0.1%)에서 용해시켰다. Colo38 세포에서의 형광 염료의 보유를 형광강도 측정기[퍼킨 엘머(Perkin Elmer), 루미네센스 스펙트로미터(Luminescence Spectrometer) LS 50B(미국 캘리포니아주 포스터 시티 소재)]로 측정하고, 항체로의 노출 대신 세정제에 표적을 노출시켜 생성된 총 용해 대조군에 대하여 비용해(specific lysis)를 계산하였다. 항체의 부재하에서의 신호를 0% 세포독성으로 설정하였다. 각각의 항체 농도를 3중으로 분석하고, 검정을 3회의 별도의 시간에 반복하였다. 도 6에서 알 수 있듯이, 글리코조작되지 않은 LC007 항체(LC007 wt)는 ADCC 효과를 나타내었다. 이와 같이, 글리코조작되지 않은 LC007 항체 자체는 일부 ADCC 활성을 나타내는데, 이는 글리코조작에 의해 추가로 증진될 수 있다. 대조적으로, 부라기(Burraggi G) 등의 문헌 "Int J Biol Markers. 1986 Jan-Apr;1(1):47-54"]에 기재된 항체 225.28S의 인간화된 형태인 항-MCSP 항체 MHLG KV9 G2는 이러한 검정에서 어떠한 상당한 ADCC 유도도 나타내지 않았다. 225.28 항체의 결합 에피토프는 MCSP 항원의 막 원위 부분, 또는 N-말단 부분에 존재하는 것으로 결정되었다. Colo38 세포 상에 존재하지 않는, EGF 수용체에 결합하는 글리코조작된 GA201 항체는 대조군으로서 포함되었다. 이러한 항체에 의한 ADCC의 부재는 NK 세포의 활성화가 종양 세포 상에 존재하는 표적을 통해 초래되어야 함을 보여준다.

[0289] 도 7은 글리코조작된 LC007 항체의 ADCC가 인간 U86MG 교모세포종 세포주에 대해 또한 관찰됨을 보여준다.

실시예 7: 글리코조작된 LC007 항체의 인간화

[0291] 인간화 절차를 고전적인 루프-그라프팅(loop-grafting) 절차에 따라 실행하였다[존스(Jones PT), 디어(Dear PH), 푸테(Foote J), 뉴버거(Neuberger MS), 및 윈터(Winter G)의 문헌 "Nature. 1986 May 29-Jun 4;321(6069):522-5"; 카터(P. Carter) 등의 문헌 "Proc. Natl. Acad. Sci. USA; Vol. 89, pp. 4285-4289, May 1992"]. 간단히, 뮤린 항체의 CDR(서열 번호 10, 11, 12, 14, 15, 및 16)을 인간 골격구조 서열 상으로 그라프팅하여(경쇄의 경우 IMGT 수탁 번호는 IGKV1D-39*01 및 IGKJ1이고, 중쇄의 경우 IMGT 수탁 번호는IGHV4-31*02 및IGHJ4임), 서열 번호 29의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 서열 번호 28의 아미노산 서열을 포함하

는 경쇄를 갖는 항체를 생성하였다.

[0292] 표적 MCSP 항원에 대한 결합 친화도를 보유하도록 항체 작성을 최적화하였다. 도 8은 상이한 인간화된 변형체의 결합 특성을 도시한다. 인간 잔기 Val171 및 Arg94를 각각 이들의 상응하는 뮤린 대응물, 아르기닌 및 아스파르트산으로 대체하였고, 이때 인간 잔기를 갖는 항체 작성을 나타내는 것으로 결정되었다. 도 8에서 알 수 있듯이, 중쇄의 94 위치에서(카밧 번호매김)(서열 번호 30(이러한 서열에서 D98R에 상응함)) Arg을 갖는 작성을 M4-2 ML1, 및 중쇄의 위치 74에서(카밧 번호매김)(서열 번호 33(이러한 서열에서 R72V에 상응함)) Val을 갖는 작성을 M4-6 ML1은 MCSP 항원에 대해 감소된 결합을 보여주었고, 이는 항체의 결합 특이성에 대한 이들 잔기가 관련됨을 나타낸다. 이를 위치에서 각각 상응하는 뮤린 대응물, 아르기닌 및 아스파르트산을 갖는 작성을 결합 활성을 보유하였고, 예를 들면 M4-1(서열 번호 29) 및 M4-3(서열 번호 32)의 중쇄 작성을 갖는 항체이다.

[0293] CDR-H1 잔기 Asn35를 상응하는 인간 생식-계열 세린 잔기에 대해 치환하였다. 도 8에서 알 수 있듯이, 이러한 치환을 갖는 작성을 M4-7 ML1(서열 번호 25)은 표적 MCSP 항원에 대한 결합이 감소되었고, 이는 이러한 잔기가 항원 결합 강도를 보유하는 것에 관여됨을 나타낸다.

[0294] 추가의 작성을 갖는 항-MCSP 항체의 결합 특성에 있어서 다른 잔기들의 관련성을 나타내었다. HVR-L1(서열 번호 21)의 위치 7에서 아르기닌 잔기를 세린으로 대체한 결과 MCSP 항원에 대해 감소된 결합 활성을 나타내었다. HVR-L2(서열 번호 21)의 위치 1에서 아스파르트산 티로신을 아스파르트산으로 대체하고 위치 2에서 알라닌을 트레오닌으로 대체한 결과 MCSP 항원에 대한 결합 활성이 감소하였다.

[0295] 키메라성 LC007 및 인간화된 변형체 M4-3 ML2에 대한 1가 결합 친화도를 비아코어 검정에 의해 결정하였다. 간단히, 항체를 아민-커플링을 통해 CM5 칩(비아코어) 상에서 화학적으로 고정화시켰다(EDC-NHS에 의한 활성화, 각각의 항체에 대해 5000 RU의 커플링, 에탄올아민에 의한 실활). MCSP의 재조합체 D3 도메인을 분석물질로서 사용하였다. 실험을 비아코어 T100 상에서 25°C 및 37°C 하에 HBS-EP+ 이동 완충액중에서 수행하였다. MCSP D3의 1:2 희석 연속물(50 nM에서 1.56 nM로)을 240초 동안 침 표면 상으로 주입하고(회합), 이후 완충액을 300초 동안 이동시켰다(해리). 30초 동안 10 mM 글리신(pH 2)에 의한 주입 사이에 표면을 재생시켰다. 센서그램을 1:1 결합 모델과 정합시켜($RI=0$ 및 $R_{최대} = \text{국소적}$) K_d 를 결정하였다.

[0296] 키메라성 LC007 항체에 대한 K_d 는 25°C에서 9.8 nM이고 37°C에서 10.8 nM인 것으로 결정되었다. M4-3 ML2 항체의 K_d 는 25°C에서 11.4 nM이고 37°C에서 16.6 nM인 것으로 결정되었다.

실시예 8: 글리코조작된 LC007 항체의 인간화된 변형체의 ADCC

[0298] Colo38 세포를 표적 세포로 사용하여 락테이트 탈수소효소에 의해 글리코조작된 LC007 항체의 인간화된 변형체에 관한 ADCC 활성을 측정하였다. 인간 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)를 효과자 세포로서 사용하였고, 이는 히스토파크(Histopaque)-1077[시그마 디에그노스틱스 인코포레이티드(Sigma Diagnostics Inc.), 미국 미주리주 63178 세인트 루이스 소재]을 사용하여 본질적으로 제조업체의 지시에 따라 제조하였다. 간단히, 혜파린화된 주사기에 의해 건강한 지원자로부터 정맥혈을 채취하였다. 혈액을 1:0.75 내지 1.3으로 PBS(Ca^{++} 또는 Mg^{++} 를 포함하지 않음)에 의해 희석시키고, 히스토파크-1077 상에서 적층시켰다. 구배물을 $400 \times g$ 에서 30분 동안 실온(RT)에서 휴식없이 원심분리하였다. PBMC를 포함하는 내부상(interphase)을 수집하고 PBS로 세척하고(2회의 구배물로부터 세포당 50 mL), $300 \times g$ 에서 10분 동안 RT에서 원심분리하여 수거하였다. PBS에 의해 펠릿을 재현탁한 후, PBMC를 계수하고, $200 \times g$ 에서 10분 동안 RT에서 원심분리하여 2회 세척하였다. 이어서 세포를 후속적인 절차를 위해 적절한 배지에 재현탁하였다.

[0299] ADCC 검정을 위해 사용된 표적에 대한 효과자의 비율은 PBMC 및 NK 세포의 경우 각각 25:1 및 10:1이었다. 환자 96 웰 플레이트의 웰당 50 μl 를 첨가하도록 효과자 세포를 AIM-V 배지에서 적절한 농도로 제조하였다. 표적 세포는 Colo30 세포였다. 표적 세포를 PBS에서 세척하고, 계수하고, 마이크로웰당 100 μl 중 30,000 세포가 첨가되도록 AIM-V에 0.3 밀리온/ mL 로 재현탁하였다. 항체를 AIM-V에 희석시키고, 미리-도말된 표적 세포에 50 μl 로 첨가하고, 표적에 결합하도록 10분 동안 실온에 두었다. 이어서 효과자 세포를 첨가하고, 플레이트를 4 시간 동안 37°C에서 5% CO_2 를 포함하는 습윤화된 분위기중에서 항온처리하였다. 세포 독성 검출 키트[로슈 디아그노스틱스(Roche Diagnostics), 스위스 로트크레우츠 소재]를 사용하여 손상된 세포로부터의 락테이트 탈수소효소(LDH) 방출을 측정함으로써 표적 세포의 사멸을 평가하였다. 4시간 동안 항온처리한 후, 플레이트를 $800 \times g$ 에서 원심분리하였다. 각각의 웰로부터의 상청액(100 μl)을 새로운 투명한 평저 96 웰 플레이트로 옮겼다. 키트로부터의 색 기질 완충액(100 μl)을 웰마다 첨가하였다. ELISA 판독기에서 490 nm에서 10분 이상 동안

SOFTmax PRO 소프트웨어[몰레큘라 디바이시즈(Molecular Devices), 미국 캘리포니아주 94089 서니베일 소재]를 사용하여 색 반응의 $V_{\text{최대값}}$ 을 결정하였다. 표적 및 효과자 세포를 포함하지만 항체를 포함하지 않는 웰로부터 자발적 LDH 방출을 측정하였다. 단지 표적 세포 및 1% 트리톤 X-100을 포함한 웰로부터 최대 방출을 결정하였다. 특이적 항체-중재된 사멸의 백분율을 다음과 같이 계산하였다: $((x-\text{SR})/(\text{MR}-\text{SR})) \times 100$, 여기서 x는 특이적 항체 농도에서의 $V_{\text{최대값}}$ 의 평균이고, SR은 자발적 방출의 $V_{\text{최대값}}$ 의 평균이고, MR은 최대 방출의 $V_{\text{최대값}}$ 의 평균이다.

[0300] 도 9는 이러한 검정의 결과를 도시하고, 인간화된 변형체가 모글리코조작된 LC007 항체의 ADCC 활성을 보유하였음을 확인한다.

[0301] 실시예 6에 기재된 바와 같은 검정에 의해, 0.1 % 트리톤 X-100을 포함하는 5 mM 보레이트 완충액을 사용하여 세척하고 세포 용해한 후, 칼세인 측정[왈락 빅터(Wallac Victor) 3 1420 멀티라벨 카운터(Multilabel Counter)]에 의해 생존 표적 세포를 추가로 정량화하였다. 이러한 검정의 결과는 도 10에 제시되어 있다.

[0302] 실시예 9: 마우스 이종이식 검정

[0303] 9.1 FcgR3 형질감염 SCID 마우스에서의 MV3 세포

[0304] 20 마리 FcgR3A tg SCID 마우스[프랑스 리옹 소재의 찰스 리버(Charles River)로부터 구매됨]를 협정된 지침서 [GV-솔라스(GV-Solas); 페라사(Felasa); 티에르쉬쥐(TierschG)]에 따라 매일 12 시간씩의 명암 주기를 갖는 단리된 통풍 케이지(IVC: Isolated Ventilated Cages) 조건하에 유지시켰다. 실험적 연구 프로토콜은 지방 정부에 의해 검토되고 승인되었다(P 2005086). 도착된 동물을 1주일 동안 새로운 환경 및 관찰에 익숙해지도록 유지시켰다. 연속적인 건강 모니터링을 정기적으로 실행하였다.

[0305] MV3 종양 세포주[반 무이젠(van Muijen GN) 등의 문헌 "Int J Cancer. 48(1):85-91 (1991)"]를 10% 태내 소 혈청[인비트로겐(Invitrogen), 스위스 소재]으로 보충된 DMEM 배지[깁코(GIBCO), 스위스 소재]에서 37°C에서 수-포화 분위기 하에 5% CO₂에서 통상적으로 배양하였다. 계대배양을 3일마다 분할하여 트립신/ EDTA 1×(깁코, 스위스 소재)에 의해 수행하였다. 주사일에, 트립신-EDTA(깁코, 스위스 소재)를 사용하여 배양 플라스크[그라이너 바이오-원(Greiner Bio-One)]로부터 종양 세포를 수확하고, 배양 배지(50 ml)로 전달하고, AIM V(깁코, 스위스 소재)로 1회 세척하고 재현탁하였다. AIM V로 추가로 세척한 후, 세포 계수기를 사용하여 세포 농도를 결정하였다. AIM V 배지(200 μl)중 0.2×10^6 세포를 각각의 FcgR3A tg SCID 마우스의 꼬리 정맥에 주사하였다.

[0306] 치료법

[0307] 이종이식 마우스를 치료군 또는 비히를 대조군으로 나누었고, 각각의 군은 9마리의 마우스로 구성되었다. 치료군에게 25 mg/kg의 인간화된 글리코조작된 항-MCSP mAb M4-3 ML2를 정맥내로 투여하였다. 비히를 대조군에게는 비히를만을 정맥내로 투여하였다. 양쪽 군 모두 7일, 14일, 및 21에 3회 투약되었다.

[0308] 로그-랭크[만텔-콕스(Mantel-Cox)] 테스트($p=0.0033$) 및 게한-브레스로우-윌콕슨(Gehan-Breslow-Wilcoxon) 테스트($p=0.0039$)를 사용하여 치료로부터 수득된 데이터에 대해 통계적 분석을 수행하였다.

[0309] 결과

[0310] 도 11에 도시된 바와 같이, 인간화된 글리코조작된 항-MCSP 항체는 비히를 대조군에 비하여 상기 모델에서 생존 시간을 상당히 증가시킨다.

[0311] 9.2 FcgR3 형질감염 SCID 마우스에서의 MDA-MB-435 세포

[0312] MDA-MB435 세포를 균원적으로 ATCC로부터 수득하고, 팽창후 글리카트 내부 세포 은행에 기탁하였다. MDA-MB435 종양 세포주를 10% 태내 소 혈청(인비트로겐, 스위스 소재) 및 1% 글루타맥스(Glutamax)가 보충된 RPMI 배지(깁코, 스위스 소재) 중에서 37°C에서 수-포화 분위기 하에 5% CO₂에서 통상적으로 배양하였다. 계대배양을 3일마다 분할하여 트립신/ EDTA 1×(깁코, 스위스 소재)에 의해 수행하였다.

[0313] FcgR3A tg SCID 마우스(프랑스 리옹 소재의 찰스 리버로부터 구매함)를 협정된 지침서(GV-솔라스; 페라사; 티에르쉬쥐)에 따라 매일 12 시간씩의 명암 주기를 갖는 단리된 통풍 케이지(IVC) 조건하에 유지시켰다. 실험적 연구 프로토콜은 지방 정부에 의해 검토되고 승인되었다(P 2005086). 도착된 동물을 1주일 동안 새로운 환경 및 관찰에 익숙해지도록 유지시켰다. 연속적인 건강 모니터링을 정기적으로 실행하였다.

- [0314] 주사일에, 트립신-EDTA(깁코, 스위스 소재)를 사용하여 배양 플라스크(그라이너 바이오-원)로부터 종양 세포를 수확하고, 배양 배지(50 ml)로 전달하고, AIM V(깁코, 스위스 소재)로 1회 세척하고 재현탁하였다. AIM V로 추가로 세척한 후, 세포 계수기를 사용하여 세포 농도를 결정하였다. AIM V 배지(200 μl)중 0.2×10^6 세포를 각각의 FcgR3A tg SCID 마우스의 꼬리 정맥에 주사하였다.
- [0315] 치료법
- [0316] 이종이식 마우스를 치료군 또는 비히를 대조군으로 나누었다. 치료군에게 25 mg/kg의 키메라성 글리코조작된 항-MCSP mAb를 정맥내로 투여하였다. 비히를 대조군에게는 비히를만을 정맥내로 투여하였다. 양쪽 군 모두 7일, 14일, 및 21에 3회 투약되었다.
- [0317] 결과
- [0318] 도 12에 도시된 바와 같이, 키메라성 글리코조작된 항-MCSP 항체는 비히를 대조군에 비하여 상기 모델에서 생존 시간을 상당히 증가시킨다.
- [0319] 9.3 FcgR3 형질감염 SCID 마우스에서의 MDA-MB-435 세포
- [0320] 인간화된 항체 M4-3 ML2(서열 번호 32의 VH 및 서열 번호 31의 VL을 포함함)를 그의 모, 키메라성 항체 LC007과 비교함을 제외하고 실시예 9.2에서와 동일한 프로토콜을 수행하였다. 이를 항체 둘다 글리코조작되었다.
- [0321] 결과
- [0322] 도 13에 도시된 바와 같이, 모, 키메라성 항체 LC007 및 이의 인간화된 글리코조작된 변형체는 비히를 대조군에 비하여 상기 모델에서 생존 시간을 상당히 증가시킨다.
- [0323] [표 A]

[0324]

서열 목록 설명

서열 번호	설명
서열 번호 1	인간 MCSP
서열 번호 2	MCSP 웨타이드(인간 MCSP의 아미노산 2177 내지 2221)
서열 번호 3	CSPG 반복부 14(인간 MCSP의 아미노산 1937 내지 2043)
서열 번호 4	CSPG 반복부 15(인간 MCSP의 아미노산 2044 내지 2246)
서열 번호 5	CSPG 반복부 14-15(인간 MCSP의 아미노산 1937 내지 2246)
서열 번호 6	CSPG 반복부 13-15(인간 MCSP의 아미노산 1828 내지 2246)
서열 번호 7	CSPG 반복부 12-15(인간 MCSP의 아미노산 1702 내지 2246)
서열 번호 8	사이노몰구스 MCSP의 D3 도메인(세포와 부분)
서열 번호 9	인간 MCSP의 D3 도메인(세포와 부분)
서열 번호 10	LC007 키메라성 항체 HVR-L1 ML1 HVR-L1
서열 번호 11	LC007 키메라성 항체 HVR-L2 ML1 HVR-L2 ML2 HVR-L2
서열 번호 12	LC007 키메라성 항체 HVR-L3 LC007 인간화된 항체 ML1 HVR-L3 LC007 인간화된 항체 ML2 HVR-L3
서열 번호 13	LC007 인간화된 항체 ML2 HVR-L1
서열 번호 14	LC007 키메라성 항체 HVR-H1 LC007 인간화된 항체 M4-1 HVR-H1
서열 번호 15	LC007 키메라성 항체 HVR-H2
서열 번호 16	LC007 키메라성 항체 HVR-H3 LC007 인간화된 항체 M4-1 HVR-H3 LC007 인간화된 항체 M4-3 HVR-H3
서열 번호 17	LC007 인간화된 항체 M4-3 HVR-H1
서열 번호 18	LC007 인간화된 항체 M4-1 HVR-H2 LC007 인간화된 항체 M4-3 HVR-H2
서열 번호 19	LC007 인간화된 항체 ML3 HVR-L1
서열 번호 20	LC007 인간화된 항체 L7A HVR-L1
서열 번호 21	LC007 인간화된 항체 L7B HVR-L1
서열 번호 22	LC007 인간화된 항체 ML5 HVR-L2
서열 번호 23	LC007 인간화된 항체 L7C HVR-L2
서열 번호 24	LC007 인간화된 항체 LTD HVR-L2
서열 번호 25	LC007 인간화된 항체 M4-7 HVR-H1
서열 번호 26	LC007 키메라성 항체 VL
서열 번호 27	LC007 키메라성 항체 VH
서열 번호 28	LC007 인간화된 항체 ML1 VL
서열 번호 29	LC007 인간화된 항체 M4-1 VH
서열 번호 30	LC007 인간화된 항체 M4-2 VH
서열 번호 31	LC007 인간화된 항체 ML2 VL
서열 번호 32	LC007 인간화된 항체 M4-3 VH
서열 번호 33	LC007 인간화된 항체 M4-6 VH
서열 번호 34	LC007 키메라성 항체 경쇄
서열 번호 35	LC007 키메라성 항체 중쇄
서열 번호 36	LC007 인간화된 항체 ML2 경쇄
서열 번호 37	LC007 인간화된 항체 M4-3 중쇄
서열 번호 38	LC007 뮤린 항체 경쇄 혼산 서열
서열 번호 39	LC007 뮤린 항체 중쇄 혼산 서열
서열 번호 40	LC007 키메라성 항체 경쇄 혼산 서열
서열 번호 41	LC007 키메라성 항체 중쇄 혼산 서열
서열 번호 42	LC007 인간화된 항체 ML2 경쇄 혼산 서열
서열 번호 43	LC007 인간화된 항체 M4-3 중쇄 혼산 서열
서열 번호 44	MCSP 막간 도메인

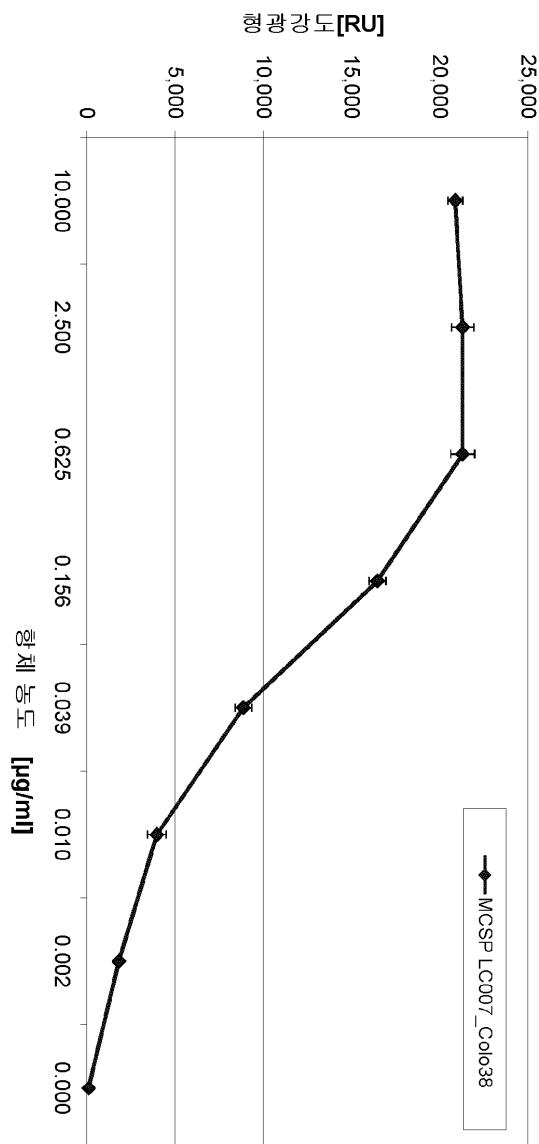
[0325]

[0326]

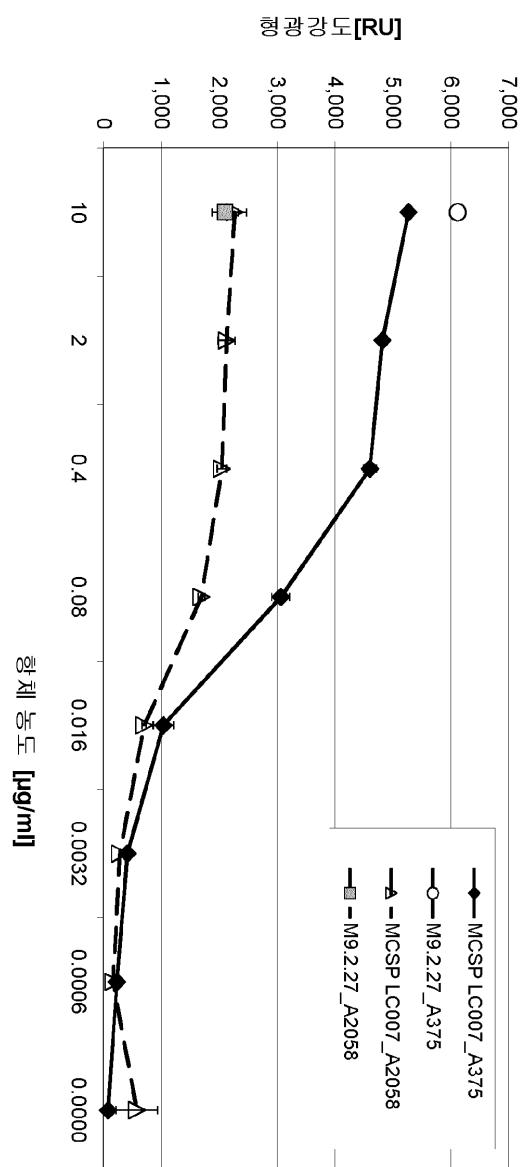
상기 발명이 이해를 분명히 할 목적으로 예시 및 실시예에 의해 상세히 설명되었지만, 설명 및 실시예는 본 발명의 범주를 제한하려는 것으로 해석되어서는 안된다. 본원에 언급된 모든 특허 및 과학 문헌의 개시내용은 이들의 전체가 참고로 명백히 인용되어 있다.

도면

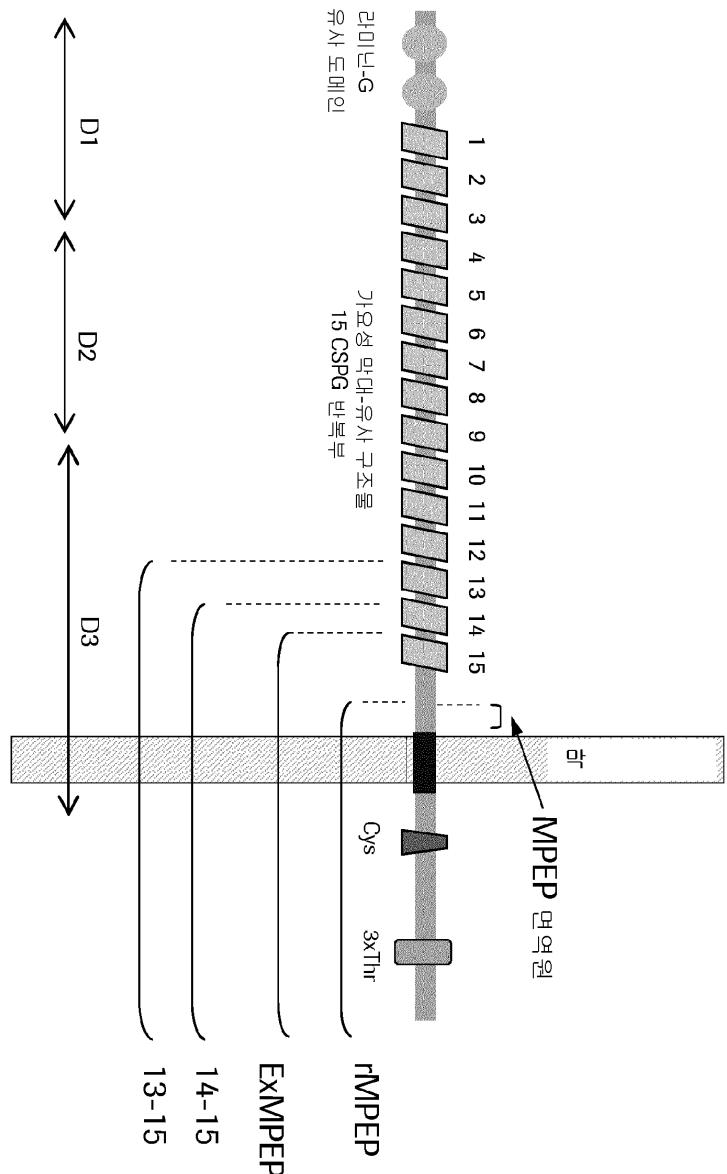
도면1



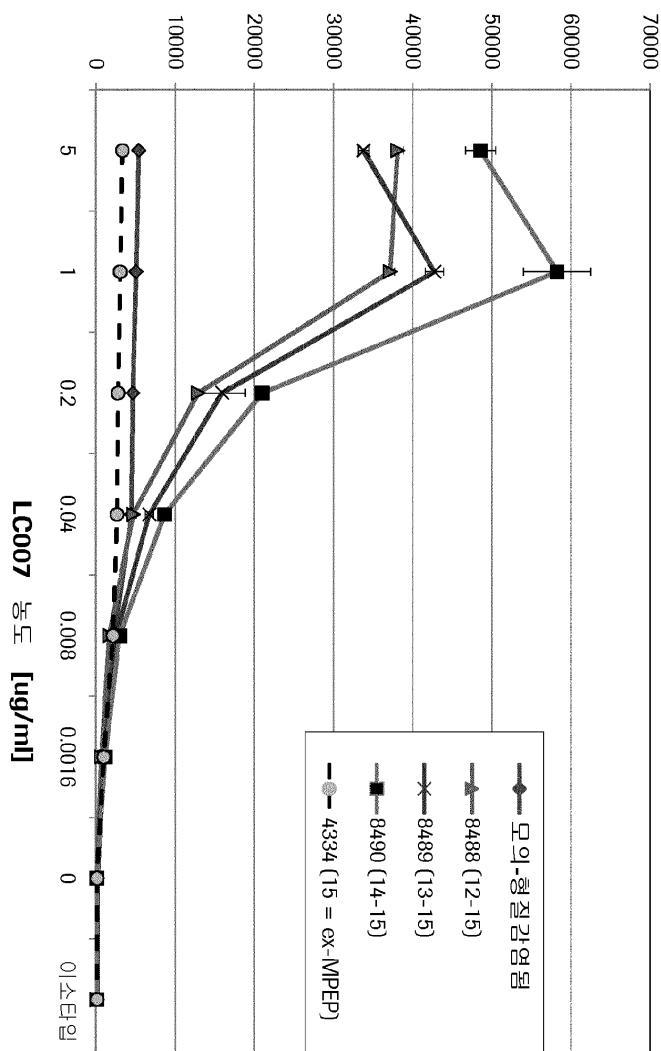
도면2



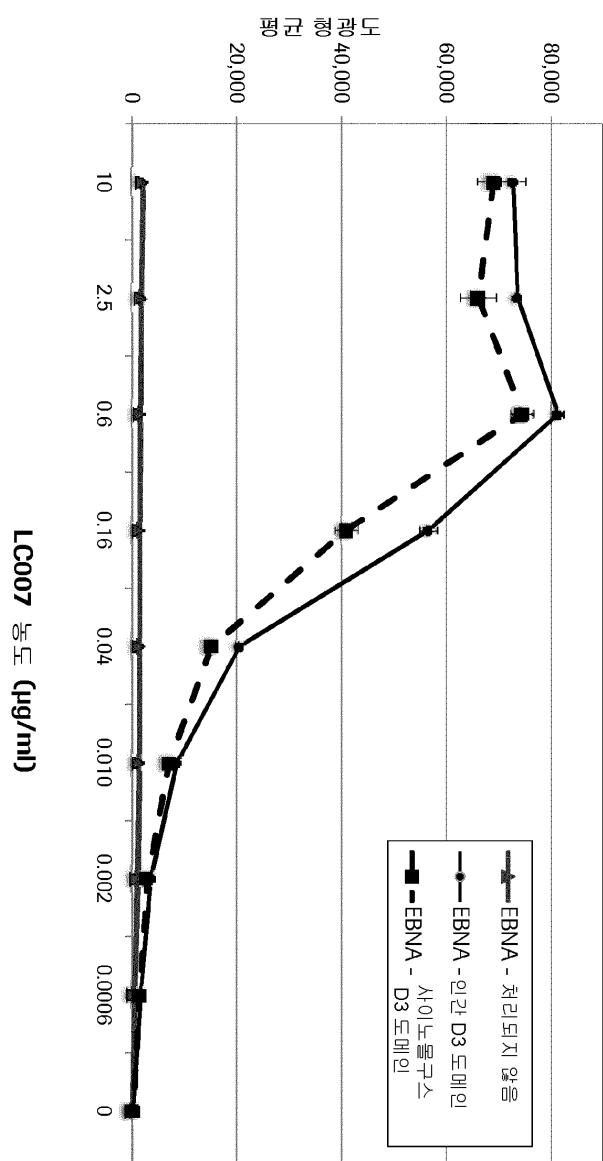
도면3



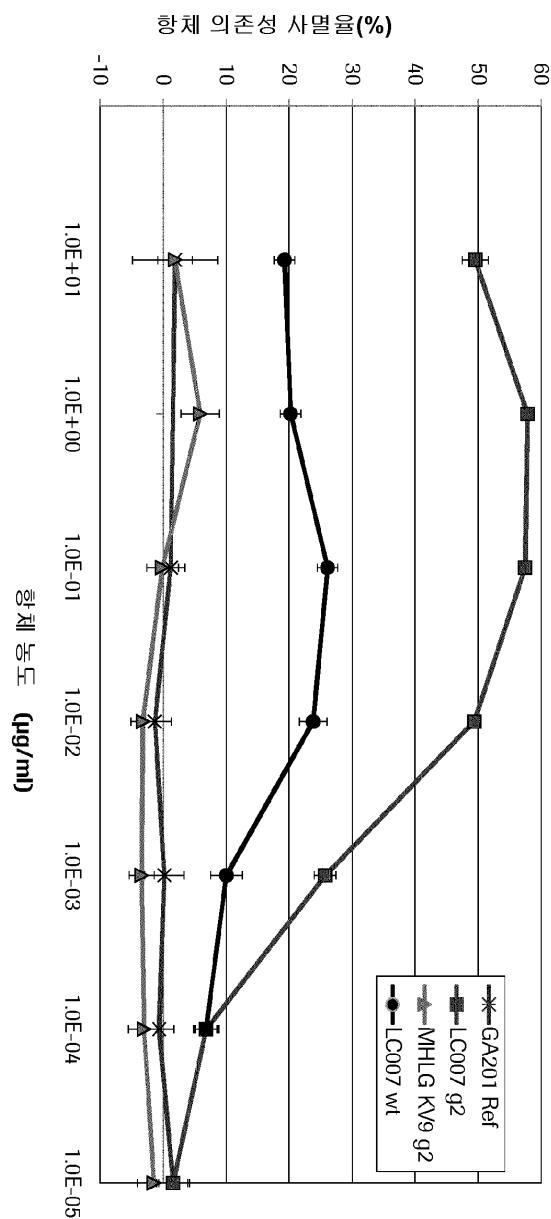
도면4



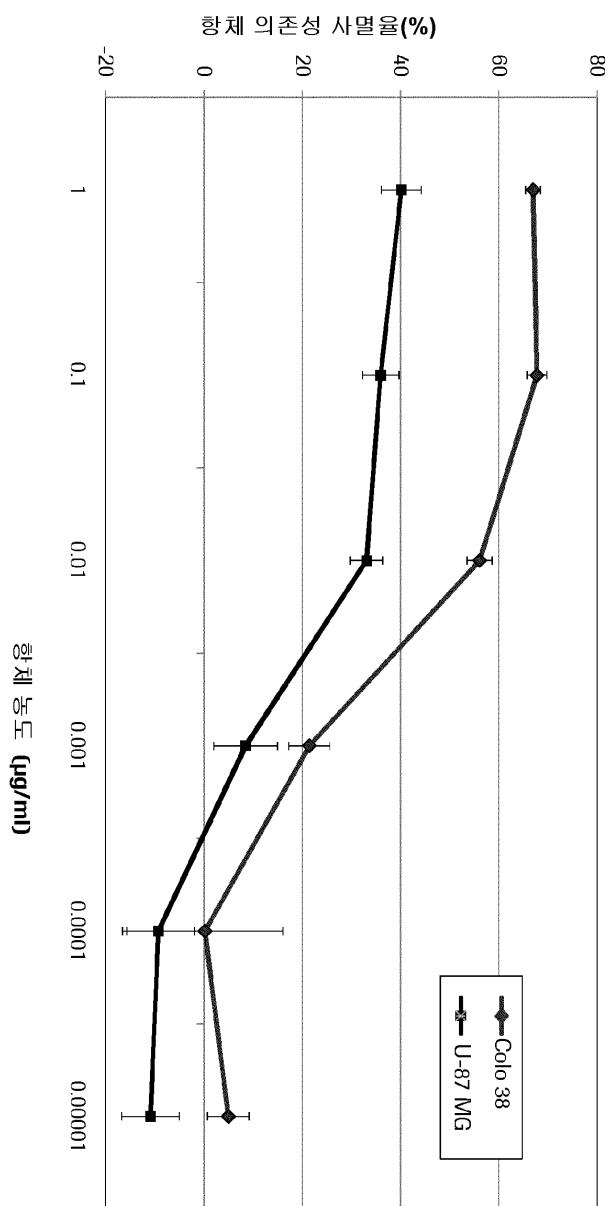
도면5



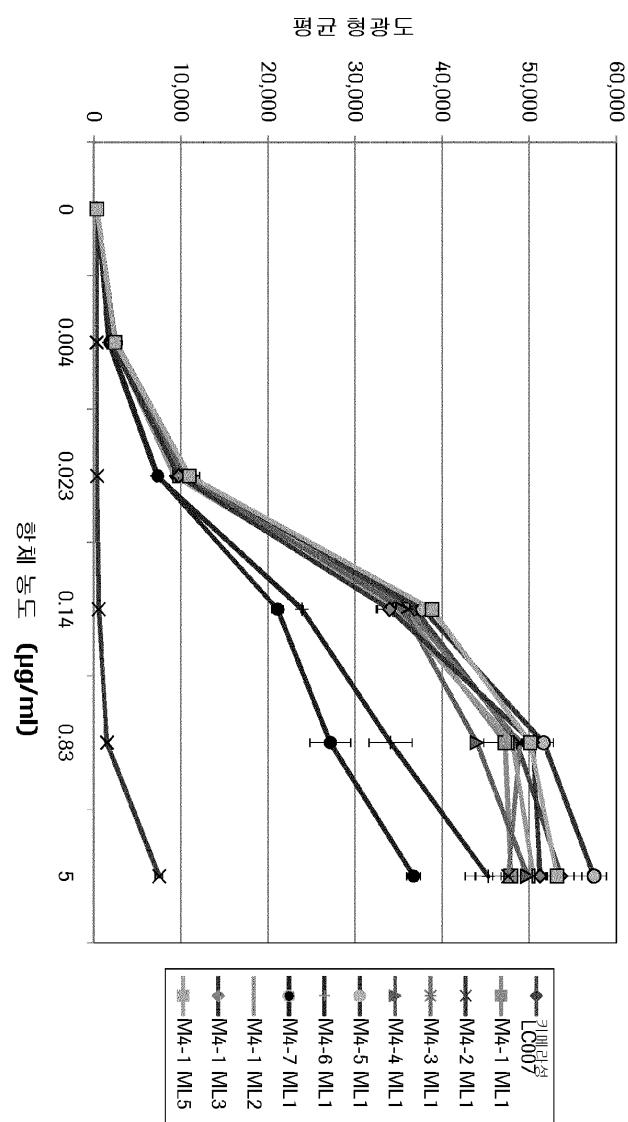
도면6



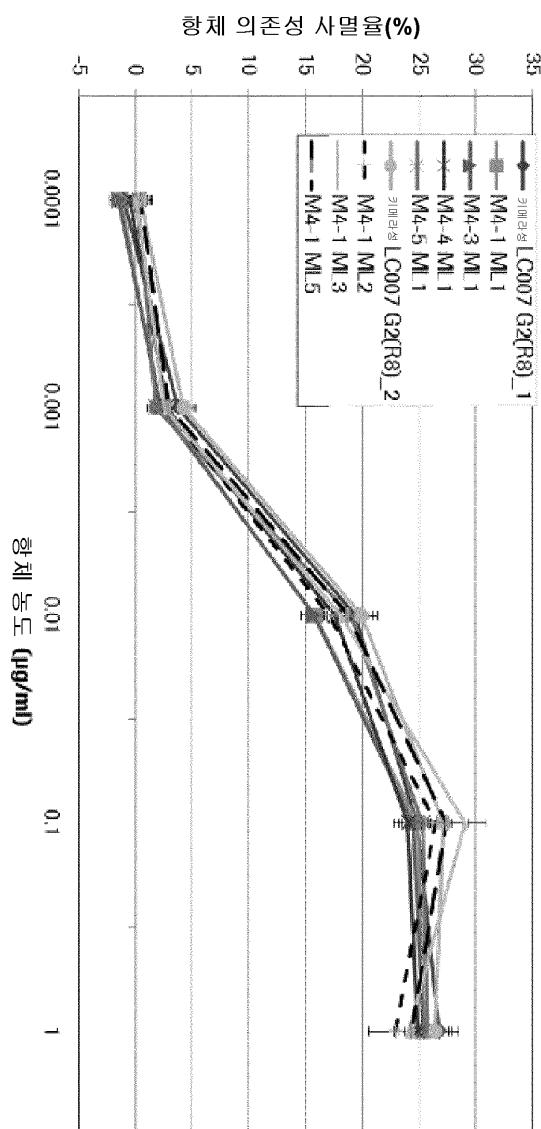
도면7



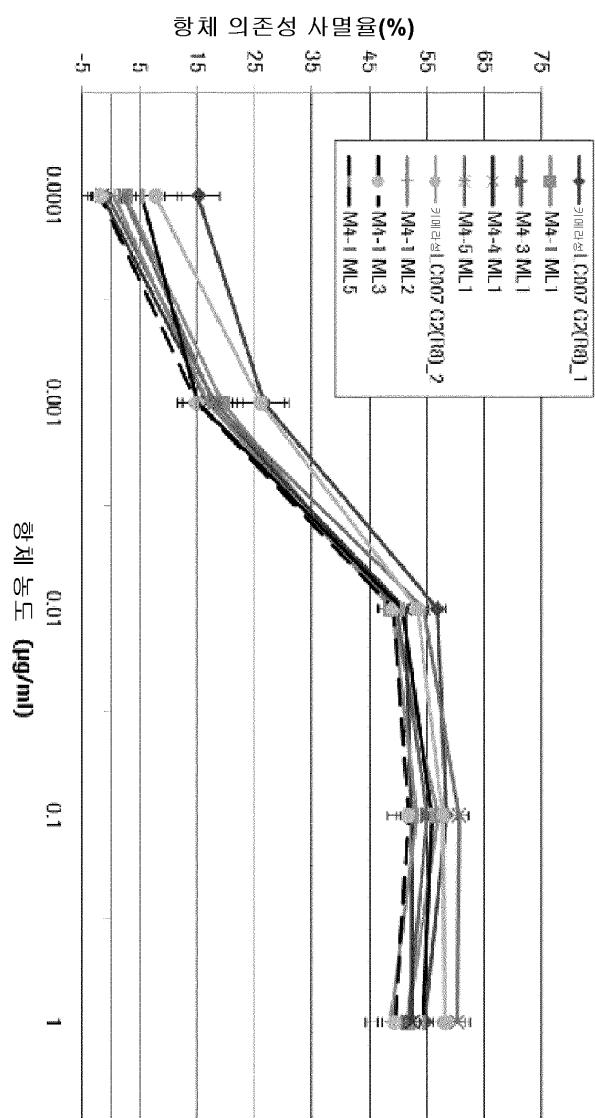
도면8



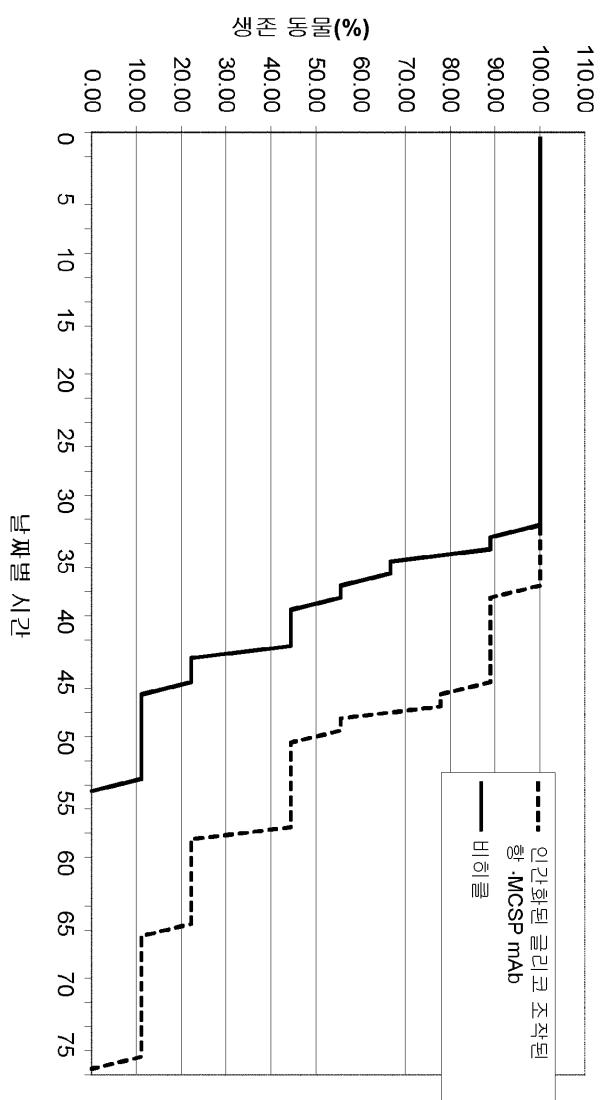
도면9



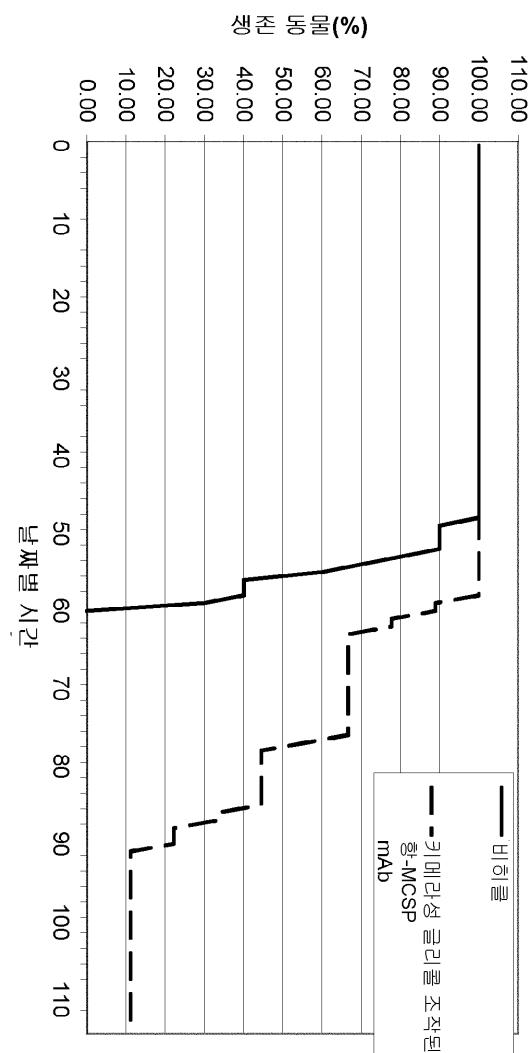
도면10



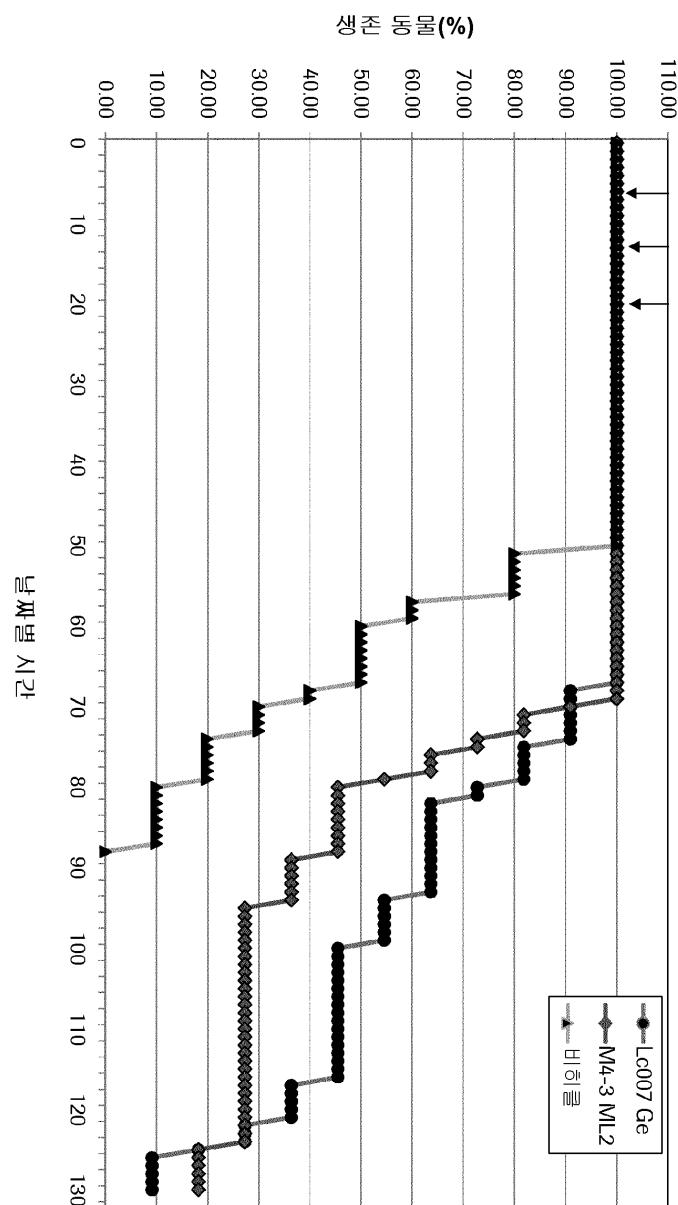
도면11



도면12



도면13



서 열 목록

- <110> Roche Glycart AG
- <120> Anti-MCSP Antibodies
- <130> 30603
- <140> PCT/EP2012/066214
- <141> 2012-08-21
- <150> EP 11178393.2
- <151> 2011-08-23
- <160> 44

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 2322

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Gln Ser Gly Pro Arg Pro Pro Leu Pro Ala Pro Gly Leu Ala Leu

1	5	10	15
---	---	----	----

Ala Leu Thr Leu Thr Met Leu Ala Arg Leu Ala Ser Ala Ala Ser Phe

20	25	30
----	----	----

Phe Gly Glu Asn His Leu Glu Val Pro Val Ala Thr Ala Leu Thr Asp

35	40	45
----	----	----

Ile Asp Leu Gln Leu Gln Phe Ser Thr Ser Gln Pro Glu Ala Leu Leu

50	55	60
----	----	----

Leu Leu Ala Ala Gly Pro Ala Asp His Leu Leu Leu Gln Leu Tyr Ser

65	70	75	80
----	----	----	----

Gly Arg Leu Gln Val Arg Leu Val Leu Gly Gln Glu Glu Leu Arg Leu

85	90	95
----	----	----

Gln Thr Pro Ala Glu Thr Leu Leu Ser Asp Ser Ile Pro His Thr Val

100	105	110
-----	-----	-----

Val Leu Thr Val Val Glu Gly Trp Ala Thr Leu Ser Val Asp Gly Phe

115	120	125
-----	-----	-----

Leu Asn Ala Ser Ser Ala Val Pro Gly Ala Pro Leu Glu Val Pro Tyr

130	135	140
-----	-----	-----

Gly Leu Phe Val Gly Gly Thr Gly Thr Leu Gly Leu Pro Tyr Leu Arg

145	150	155	160
-----	-----	-----	-----

Gly Thr Ser Arg Pro Leu Arg Gly Cys Leu His Ala Ala Thr Leu Asn

165	170	175
-----	-----	-----

Gly Arg Ser Leu Leu Arg Pro Leu Thr Pro Asp Val His Glu Gly Cys

180	185	190
-----	-----	-----

Ala Glu Glu Phe Ser Ala Ser Asp Asp Val Ala Leu Gly Phe Ser Gly

195	200	205
-----	-----	-----

Pro His Ser Leu Ala Ala Phe Pro Ala Trp Gly Thr Gln Asp Glu Gly

210 215 220

Thr Leu Glu Phe Thr Leu Thr Thr Gln Ser Arg Gln Ala Pro Leu Ala

225 230 235 240

Phe Gln Ala Gly Gly Arg Arg Gly Asp Phe Ile Tyr Val Asp Ile Phe

245 250 255

Glu Gly His Leu Arg Ala Val Val Glu Lys Gly Gln Gly Thr Val Leu

260 265 270

Leu His Asn Ser Val Pro Val Ala Asp Gly Gln Pro His Glu Val Ser

275 280 285

Val His Ile Asn Ala His Arg Leu Glu Ile Ser Val Asp Gln Tyr Pro

290 295 300

Thr His Thr Ser Asn Arg Gly Val Leu Ser Tyr Leu Glu Pro Arg Gly

305 310 315 320

Ser Leu Leu Leu Gly Leu Asp Ala Glu Ala Ser Arg His Leu Gln

325 330 335

Glu His Arg Leu Gly Leu Thr Pro Glu Ala Thr Asn Ala Ser Leu Leu

340 345 350

Gly Cys Met Glu Asp Leu Ser Val Asn Gly Gln Arg Arg Gly Leu Arg

355 360 365

Glu Ala Leu Leu Thr Arg Asn Met Ala Ala Gly Cys Arg Leu Glu Glu

370 375 380

Glu Glu Tyr Glu Asp Asp Ala Tyr Gly His Tyr Glu Ala Phe Ser Thr

385 390 395 400

Leu Ala Pro Glu Ala Trp Pro Ala Met Glu Leu Pro Glu Pro Cys Val

405 410 415

Pro Glu Pro Gly Leu Pro Pro Val Phe Ala Asn Phe Thr Gln Leu Leu

420 425 430

Thr Ile Ser Pro Leu Val Val Ala Glu Gly Gly Thr Ala Trp Leu Glu

435 440 445

Trp Arg His Val Gln Pro Thr Leu Asp Leu Met Glu Ala Glu Leu Arg

450	455	460
Lys Ser Gln Val Leu Phe Ser Val Thr Arg Gly Ala Arg His Gly Glu		
465	470	475
Leu Glu Leu Asp Ile Pro Gly Ala Gln Ala Arg Lys Met Phe Thr Leu		
485	490	495
Leu Asp Val Val Asn Arg Lys Ala Arg Phe Ile His Asp Gly Ser Glu		
500	505	510
Asp Thr Ser Asp Gln Leu Val Leu Glu Val Ser Val Thr Ala Arg Val		
515	520	525
Pro Met Pro Ser Cys Leu Arg Arg Gly Gln Thr Tyr Leu Leu Pro Ile		
530	535	540
Gln Val Asn Pro Val Asn Asp Pro Pro His Ile Ile Phe Pro His Gly		
545	550	555
Ser Leu Met Val Ile Leu Glu His Thr Gln Lys Pro Leu Gly Pro Glu		
565	570	575
Val Phe Gln Ala Tyr Asp Pro Asp Ser Ala Cys Glu Gly Leu Thr Phe		
580	585	590
Gln Val Leu Gly Thr Ser Ser Gly Leu Pro Val Glu Arg Arg Asp Gln		
595	600	605
Pro Gly Glu Pro Ala Thr Glu Phe Ser Cys Arg Glu Leu Glu Ala Gly		
610	615	620
Ser Leu Val Tyr Val His Arg Gly Gly Pro Ala Gln Asp Leu Thr Phe		
625	630	635
Arg Val Ser Asp Gly Leu Gln Ala Ser Pro Pro Ala Thr Leu Lys Val		
645	650	655
Val Ala Ile Arg Pro Ala Ile Gln Ile His Arg Ser Thr Gly Leu Arg		
660	665	670
Leu Ala Gln Gly Ser Ala Met Pro Ile Leu Pro Ala Asn Leu Ser Val		
675	680	685
Glu Thr Asn Ala Val Gly Gln Asp Val Ser Val Leu Phe Arg Val Thr		
690	695	700

Gly Ala Leu Gln Phe Gly Glu Leu Gln Lys Gln Gly Ala Gly Val

705 710 715 720

Glu Gly Ala Glu Trp Trp Ala Thr Gln Ala Phe His Gln Arg Asp Val

725 730 735

Glu Gln Gly Arg Val Arg Tyr Leu Ser Thr Asp Pro Gln His His Ala

740 745 750

Tyr Asp Thr Val Glu Asn Leu Ala Leu Glu Val Gln Val Gly Gln Glu

755 760 765

Ile Leu Ser Asn Leu Ser Phe Pro Val Thr Ile Gln Arg Ala Thr Val

770 775 780

Trp Met Leu Arg Leu Glu Pro Leu His Thr Gln Asn Thr Gln Gln Glu

785 790 795 800

Thr Leu Thr Thr Ala His Leu Glu Ala Thr Leu Glu Glu Ala Gly Pro

805 810 815

Ser Pro Pro Thr Phe His Tyr Glu Val Val Gln Ala Pro Arg Lys Gly

820 825 830

Asn Leu Gln Leu Gln Gly Thr Arg Leu Ser Asp Gly Gln Gly Phe Thr

835 840 845

Gln Asp Asp Ile Gln Ala Gly Arg Val Thr Tyr Gly Ala Thr Ala Arg

850 855 860

Ala Ser Glu Ala Val Glu Asp Thr Phe Arg Phe Arg Val Thr Ala Pro

865 870 875 880

Pro Tyr Phe Ser Pro Leu Tyr Thr Phe Pro Ile His Ile Gly Gly Asp

885 890 895

Pro Asp Ala Pro Val Leu Thr Asn Val Leu Leu Val Val Pro Glu Gly

900 905 910

Gly Glu Gly Val Leu Ser Ala Asp His Leu Phe Val Lys Ser Leu Asn

915 920 925

Ser Ala Ser Tyr Leu Tyr Glu Val Met Glu Arg Pro Arg His Gly Arg

930 935 940

Leu Ala Trp Arg Gly Thr Gln Asp Lys Thr Thr Met Val Thr Ser Phe

945	950	955	960
Thr Asn Glu Asp Leu Leu Arg Gly Arg Leu Val Tyr Gln His Asp Asp			
965	970	975	
Ser Glu Thr Thr Glu Asp Asp Ile Pro Phe Val Ala Thr Arg Gln Gly			
980	985	990	
Glu Ser Ser Gly Asp Met Ala Trp Glu Glu Val Arg Gly Val Phe Arg			
995	1000	1005	
Val Ala Ile Gln Pro Val Asn Asp His Ala Pro Val Gln Thr Ile			
1010	1015	1020	
Ser Arg Ile Phe His Val Ala Arg Gly Gly Arg Arg Leu Leu Thr			
1025	1030	1035	
Thr Asp Asp Val Ala Phe Ser Asp Ala Asp Ser Gly Phe Ala Asp			
1040	1045	1050	
Ala Gln Leu Val Leu Thr Arg Lys Asp Leu Leu Phe Gly Ser Ile			
1055	1060	1065	
Val Ala Val Asp Glu Pro Thr Arg Pro Ile Tyr Arg Phe Thr Gln			
1070	1075	1080	
Glu Asp Leu Arg Lys Arg Arg Val Leu Phe Val His Ser Gly Ala			
1085	1090	1095	
Asp Arg Gly Trp Ile Gln Leu Gln Val Ser Asp Gly Gln His Gln			
1100	1105	1110	
Ala Thr Ala Leu Leu Glu Val Gln Ala Ser Glu Pro Tyr Leu Arg			
1115	1120	1125	
Val Ala Asn Gly Ser Ser Leu Val Val Pro Gln Gly Gly Gln Gly			
1130	1135	1140	
Thr Ile Asp Thr Ala Val Leu His Leu Asp Thr Asn Leu Asp Ile			
1145	1150	1155	
Arg Ser Gly Asp Glu Val His Tyr His Val Thr Ala Gly Pro Arg			
1160	1165	1170	
Trp Gly Gln Leu Val Arg Ala Gly Gln Pro Ala Thr Ala Phe Ser			
1175	1180	1185	

Gln Gln Asp Leu Leu Asp Gly Ala Val Leu Tyr Ser His Asn Gly
 1190 1195 1200
 Ser Leu Ser Pro Arg Asp Thr Met Ala Phe Ser Val Glu Ala Gly
 1205 1210 1215
 Pro Val His Thr Asp Ala Thr Leu Gln Val Thr Ile Ala Leu Glu
 1220 1225 1230

Gly Pro Leu Ala Pro Leu Lys Leu Val Arg His Lys Lys Ile Tyr
 1235 1240 1245
 Val Phe Gln Gly Glu Ala Ala Glu Ile Arg Arg Asp Gln Leu Glu
 1250 1255 1260
 Ala Ala Gln Glu Ala Val Pro Pro Ala Asp Ile Val Phe Ser Val
 1265 1270 1275
 Lys Ser Pro Pro Ser Ala Gly Tyr Leu Val Met Val Ser Arg Gly
 1280 1285 1290

Ala Leu Ala Asp Glu Pro Pro Ser Leu Asp Pro Val Gln Ser Phe
 1295 1300 1305
 Ser Gln Glu Ala Val Asp Thr Gly Arg Val Leu Tyr Leu His Ser
 1310 1315 1320
 Arg Pro Glu Ala Trp Ser Asp Ala Phe Ser Leu Asp Val Ala Ser
 1325 1330 1335
 Gly Leu Gly Ala Pro Leu Glu Gly Val Leu Val Glu Leu Glu Val
 1340 1345 1350

Leu Pro Ala Ala Ile Pro Leu Glu Ala Gln Asn Phe Ser Val Pro
 1355 1360 1365
 Glu Gly Gly Ser Leu Thr Leu Ala Pro Pro Leu Leu Arg Val Ser
 1370 1375 1380
 Gly Pro Tyr Phe Pro Thr Leu Leu Gly Leu Ser Leu Gln Val Leu
 1385 1390 1395
 Glu Pro Pro Gln His Gly Ala Leu Gln Lys Glu Asp Gly Pro Gln
 1400 1405 1410

Ala Arg Thr Leu Ser Ala Phe Ser Trp Arg Met Val Glu Glu Gln

1415	1420	1425
Leu Ile Arg Tyr Val His Asp Gly Ser Glu Thr Leu Thr Asp Ser		
1430	1435	1440
Phe Val Leu Met Ala Asn Ala Ser Glu Met Asp Arg Gln Ser His		
1445	1450	1455
Pro Val Ala Phe Thr Val Thr Val Leu Pro Val Asn Asp Gln Pro		
1460	1465	1470

Pro Ile Leu Thr Thr Asn Thr Gly Leu Gln Met Trp Glu Gly Ala		
1475	1480	1485
Thr Ala Pro Ile Pro Ala Glu Ala Leu Arg Ser Thr Asp Gly Asp		
1490	1495	1500
Ser Gly Ser Glu Asp Leu Val Tyr Thr Ile Glu Gln Pro Ser Asn		
1505	1510	1515
Gly Arg Val Val Leu Arg Gly Ala Pro Gly Thr Glu Val Arg Ser		
1520	1525	1530

Phe Thr Gln Ala Gln Leu Asp Gly Gly Leu Val Leu Phe Ser His		
1535	1540	1545
Arg Gly Thr Leu Asp Gly Gly Phe Arg Phe Arg Leu Ser Asp Gly		
1550	1555	1560
Glu His Thr Ser Pro Gly His Phe Phe Arg Val Thr Ala Gln Lys		
1565	1570	1575
Gln Val Leu Leu Ser Leu Lys Gly Ser Gln Thr Leu Thr Val Cys		
1580	1585	1590

Pro Gly Ser Val Gln Pro Leu Ser Ser Gln Thr Leu Arg Ala Ser		
1595	1600	1605
Ser Ser Ala Gly Thr Asp Pro Gln Leu Leu Leu Tyr Arg Val Val		
1610	1615	1620
Arg Gly Pro Gln Leu Gly Arg Leu Phe His Ala Gln Gln Asp Ser		
1625	1630	1635
Thr Gly Glu Ala Leu Val Asn Phe Thr Gln Ala Glu Val Tyr Ala		
1640	1645	1650

Gly Asn Ile Leu Tyr Glu His Glu Met Pro Pro Glu Pro Phe Trp
 1655 1660 1665
 Glu Ala His Asp Thr Leu Glu Leu Gln Leu Ser Ser Pro Pro Ala
 1670 1675 1680
 Arg Asp Val Ala Ala Thr Leu Ala Val Ala Val Ser Phe Glu Ala
 1685 1690 1695
 Ala Cys Pro Gln Arg Pro Ser His Leu Trp Lys Asn Lys Gly Leu
 1700 1705 1710

Trp Val Pro Glu Gly Gln Arg Ala Arg Ile Thr Val Ala Ala Leu
 1715 1720 1725
 Asp Ala Ser Asn Leu Leu Ala Ser Val Pro Ser Pro Gln Arg Ser
 1730 1735 1740
 Glu His Asp Val Leu Phe Gln Val Thr Gln Phe Pro Ser Arg Gly
 1745 1750 1755
 Gln Leu Leu Val Ser Glu Glu Pro Leu His Ala Gly Gln Pro His
 1760 1765 1770

Phe Leu Gln Ser Gln Leu Ala Ala Gly Gln Leu Val Tyr Ala His
 1775 1780 1785
 Gly Gly Gly Gly Thr Gln Gln Asp Gly Phe His Phe Arg Ala His
 1790 1795 1800
 Leu Gln Gly Pro Ala Gly Ala Ser Val Ala Gly Pro Gln Thr Ser
 1805 1810 1815
 Glu Ala Phe Ala Ile Thr Val Arg Asp Val Asn Glu Arg Pro Pro
 1820 1825 1830

Gln Pro Gln Ala Ser Val Pro Leu Arg Leu Thr Arg Gly Ser Arg
 1835 1840 1845
 Ala Pro Ile Ser Arg Ala Gln Leu Ser Val Val Asp Pro Asp Ser
 1850 1855 1860
 Ala Pro Gly Glu Ile Glu Tyr Glu Val Gln Arg Ala Pro His Asn
 1865 1870 1875
 Gly Phe Leu Ser Leu Val Gly Gly Gly Leu Gly Pro Val Thr Arg

1880	1885	1890
Phe Thr Gln Ala Asp Val Asp Ser Gly Arg Leu Ala Phe Val Ala		
1895	1900	1905
Asn Gly Ser Ser Val Ala Gly Ile Phe Gln Leu Ser Met Ser Asp		
1910	1915	1920
Gly Ala Ser Pro Pro Leu Pro Met Ser Leu Ala Val Asp Ile Leu		
1925	1930	1935
Pro Ser Ala Ile Glu Val Gln Leu Arg Ala Pro Leu Glu Val Pro		
1940	1945	1950
Gln Ala Leu Gly Arg Ser Ser Leu Ser Gln Gln Gln Leu Arg Val		
1955	1960	1965
Val Ser Asp Arg Glu Glu Pro Glu Ala Ala Tyr Arg Leu Ile Gln		
1970	1975	1980
Gly Pro Gln Tyr Gly His Leu Leu Val Gly Gly Arg Pro Thr Ser		
1985	1990	1995
Ala Phe Ser Gln Phe Gln Ile Asp Gln Gly Glu Val Val Phe Ala		
2000	2005	2010
Phe Thr Asn Phe Ser Ser Ser His Asp His Phe Arg Val Leu Ala		
2015	2020	2025
Leu Ala Arg Gly Val Asn Ala Ser Ala Val Val Asn Val Thr Val		
2030	2035	2040
Arg Ala Leu Leu His Val Trp Ala Gly Gly Pro Trp Pro Gln Gly		
2045	2050	2055
Ala Thr Leu Arg Leu Asp Pro Thr Val Leu Asp Ala Gly Glu Leu		
2060	2065	2070
Ala Asn Arg Thr Gly Ser Val Pro Arg Phe Arg Leu Leu Glu Gly		
2075	2080	2085
Pro Arg His Gly Arg Val Val Arg Val Pro Arg Ala Arg Thr Glu		
2090	2095	2100
Pro Gly Gly Ser Gln Leu Val Glu Gln Phe Thr Gln Gln Asp Leu		
2105	2110	2115

Glu Asp Gly Arg Leu Gly Leu Glu Val Gly Arg Pro Glu Gly Arg

2120 2125 2130

Ala Pro Gly Pro Ala Gly Asp Ser Leu Thr Leu Glu Leu Trp Ala

2135 2140 2145

Gln Gly Val Pro Pro Ala Val Ala Ser Leu Asp Phe Ala Thr Glu

2150 2155 2160

Pro Tyr Asn Ala Ala Arg Pro Tyr Ser Val Ala Leu Leu Ser Val

2165 2170 2175

Pro Glu Ala Ala Arg Thr Glu Ala Gly Lys Pro Glu Ser Ser Thr

2180 2185 2190

Pro Thr Gly Glu Pro Gly Pro Met Ala Ser Ser Pro Glu Pro Ala

2195 2200 2205

Val Ala Lys Gly Gly Phe Leu Ser Phe Leu Glu Ala Asn Met Phe

2210 2215 2220

Ser Val Ile Ile Pro Met Cys Leu Val Leu Leu Leu Leu Ala Leu

2225 2230 2235

Ile Leu Pro Leu Leu Phe Tyr Leu Arg Lys Arg Asn Lys Thr Gly

2240 2245 2250

Lys His Asp Val Gln Val Leu Thr Ala Lys Pro Arg Asn Gly Leu

2255 2260 2265

Ala Gly Asp Thr Glu Thr Phe Arg Lys Val Glu Pro Gly Gln Ala

2270 2275 2280

Ile Pro Leu Thr Ala Val Pro Gly Gln Gly Pro Pro Pro Gly Gly

2285 2290 2295

Gln Pro Asp Pro Glu Leu Leu Gln Phe Cys Arg Thr Pro Asn Pro

2300 2305 2310

Ala Leu Lys Asn Gly Gln Tyr Trp Val

2315 2320

<210> 2

<211> 45

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Ser Val Pro Glu Ala Ala Arg Thr Glu Ala Gly Lys Pro Glu Ser Ser

1 5 10 15

Thr Pro Thr Gly Glu Pro Gly Pro Met Ala Ser Ser Pro Glu Pro Ala

20 25 30

Val Ala Lys Gly Gly Phe Leu Ser Phe Leu Glu Ala Asn

35 40 45

<210> 3

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Ile Leu Pro Ser Ala Ile Glu Val Gln Leu Arg Ala Pro Leu Glu Val

1 5 10 15

Pro Gln Ala Leu Gly Arg Ser Ser Leu Ser Gln Gln Gln Leu Arg Val

20 25 30

Val Ser Asp Arg Glu Glu Pro Glu Ala Ala Tyr Arg Leu Ile Gln Gly

35 40 45

Pro Gln Tyr Gly His Leu Leu Val Gly Arg Pro Thr Ser Ala Phe

50 55 60

Ser Gln Phe Gln Ile Asp Gln Gly Glu Val Val Phe Ala Phe Thr Asn

65 70 75 80

Phe Ser Ser Ser His Asp His Phe Arg Val Leu Ala Leu Ala Arg Gly

85 90 95

Val Asn Ala Ser Ala Val Val Asn Val Thr Val

100 105

<210> 4

<211> 203

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> DOMAIN

<222> (182)..(203)

<223> Transmembrane Domain

<400> 4

Arg Ala Leu Leu His Val Trp Ala Gly Gly Pro Trp Pro Gln Gly Ala

1 5 10 15

Thr Leu Arg Leu Asp Pro Thr Val Leu Asp Ala Gly Glu Leu Ala Asn

20 25 30

Arg Thr Gly Ser Val Pro Arg Phe Arg Leu Leu Glu Gly Pro Arg His

35 40 45

Gly Arg Val Val Arg Val Pro Arg Ala Arg Thr Glu Pro Gly Ser

50 55 60

Gln Leu Val Glu Gln Phe Thr Gln Gln Asp Leu Glu Asp Gly Arg Leu

65 70 75 80

Gly Leu Glu Val Gly Arg Pro Glu Gly Arg Ala Pro Gly Pro Ala Gly

85 90 95

Asp Ser Leu Thr Leu Glu Leu Trp Ala Gln Gly Val Pro Pro Ala Val

100 105 110

Ala Ser Leu Asp Phe Ala Thr Glu Pro Tyr Asn Ala Ala Arg Pro Tyr

115 120 125

Ser Val Ala Leu Leu Ser Val Pro Glu Ala Ala Arg Thr Glu Ala Gly

130 135 140

Lys Pro Glu Ser Ser Thr Pro Thr Gly Glu Pro Gly Pro Met Ala Ser

145 150 155 160

Ser Pro Glu Pro Ala Val Ala Lys Gly Gly Phe Leu Ser Phe Leu Glu

165 170 175

Ala Asn Met Phe Ser Val Ile Ile Pro Met Cys Leu Val Leu Leu

180 185 190

Leu Ala Leu Ile Leu Pro Leu Leu Phe Tyr Leu

195 200

<210> 5

<211> 310

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> Domain

<222> (289)..(310)

<223> Transmembrane Domain

<400> 5

Ile Leu Pro Ser Ala Ile Glu Val Gln Leu Arg Ala Pro Leu Glu Val

1 5 10 15

Pro Gln Ala Leu Gly Arg Ser Ser Leu Ser Gln Gln Gln Leu Arg Val

20 25 30

Val Ser Asp Arg Glu Glu Pro Glu Ala Ala Tyr Arg Leu Ile Gln Gly

35 40 45

Pro Gln Tyr Gly His Leu Leu Val Gly Gly Arg Pro Thr Ser Ala Phe

50 55 60

Ser Gln Phe Gln Ile Asp Gln Gly Glu Val Val Phe Ala Phe Thr Asn

65 70 75 80

Phe Ser Ser Ser His Asp His Phe Arg Val Leu Ala Leu Ala Arg Gly

85 90 95

Val Asn Ala Ser Ala Val Val Asn Val Thr Val Arg Ala Leu Leu His

100 105 110

Val Trp Ala Gly Gly Pro Trp Pro Gln Gly Ala Thr Leu Arg Leu Asp

115 120 125

Pro Thr Val Leu Asp Ala Gly Glu Leu Ala Asn Arg Thr Gly Ser Val

130 135 140

Pro Arg Phe Arg Leu Leu Glu Gly Pro Arg His Gly Arg Val Val Arg

145 150 155 160

Val Pro Arg Ala Arg Thr Glu Pro Gly Gly Ser Gln Leu Val Glu Gln

165 170 175

Phe Thr Gln Gln Asp Leu Glu Asp Gly Arg Leu Gly Leu Glu Val Gly

180 185 190

Arg Pro Glu Gly Arg Ala Pro Gly Pro Ala Gly Asp Ser Leu Thr Leu

195 200 205

Glu Leu Trp Ala Gln Gly Val Pro Pro Ala Val Ala Ser Leu Asp Phe
 210 215 220
 Ala Thr Glu Pro Tyr Asn Ala Ala Arg Pro Tyr Ser Val Ala Leu Leu

 225 230 235 240
 Ser Val Pro Glu Ala Ala Arg Thr Glu Ala Gly Lys Pro Glu Ser Ser
 245 250 255
 Thr Pro Thr Gly Glu Pro Gly Pro Met Ala Ser Ser Pro Glu Pro Ala
 260 265 270
 Val Ala Lys Gly Gly Phe Leu Ser Phe Leu Glu Ala Asn Met Phe Ser
 275 280 285
 Val Ile Ile Pro Met Cys Leu Val Leu Leu Leu Ala Leu Ile Leu

 290 295 300
 Pro Leu Leu Phe Tyr Leu
 305 310
 <210> 6
 <211> 419
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220><221> Domain
 <222> (398)..(419)
 <223> Transmembrane Domain
 <400> 6

 Val Asn Glu Arg Pro Pro Gln Pro Gln Ala Ser Val Pro Leu Arg Leu
 1 5 10 15
 Thr Arg Gly Ser Arg Ala Pro Ile Ser Arg Ala Gln Leu Ser Val Val
 20 25 30

 Asp Pro Asp Ser Ala Pro Gly Glu Ile Glu Tyr Glu Val Gln Arg Ala
 35 40 45
 Pro His Asn Gly Phe Leu Ser Leu Val Gly Gly Leu Gly Pro Val
 50 55 60
 Thr Arg Phe Thr Gln Ala Asp Val Asp Ser Gly Arg Leu Ala Phe Val
 65 70 75 80

Ala Asn Gly Ser Ser Val Ala Gly Ile Phe Gln Leu Ser Met Ser Asp

85	90	95
----	----	----

Gly Ala Ser Pro Pro Leu Pro Met Ser Leu Ala Val Asp Ile Leu Pro

100	105	110
-----	-----	-----

Ser Ala Ile Glu Val Gln Leu Arg Ala Pro Leu Glu Val Pro Gln Ala

115	120	125
-----	-----	-----

Leu Gly Arg Ser Ser Leu Ser Gln Gln Leu Arg Val Val Ser Asp

130	135	140
-----	-----	-----

Arg Glu Glu Pro Glu Ala Ala Tyr Arg Leu Ile Gln Gly Pro Gln Tyr

145	150	155	160
-----	-----	-----	-----

Gly His Leu Leu Val Gly Gly Arg Pro Thr Ser Ala Phe Ser Gln Phe

165	170	175
-----	-----	-----

Gln Ile Asp Gln Gly Glu Val Val Phe Ala Phe Thr Asn Phe Ser Ser

180	185	190
-----	-----	-----

Ser His Asp His Phe Arg Val Leu Ala Leu Ala Arg Gly Val Asn Ala

195	200	205
-----	-----	-----

Ser Ala Val Val Asn Val Thr Val Arg Ala Leu Leu His Val Trp Ala

210	215	220
-----	-----	-----

Gly Gly Pro Trp Pro Gln Gly Ala Thr Leu Arg Leu Asp Pro Thr Val

225	230	235	240
-----	-----	-----	-----

Leu Asp Ala Gly Glu Leu Ala Asn Arg Thr Gly Ser Val Pro Arg Phe

245	250	255
-----	-----	-----

Arg Leu Leu Glu Gly Pro Arg His Gly Arg Val Val Arg Val Pro Arg

260	265	270
-----	-----	-----

Ala Arg Thr Glu Pro Gly Ser Gln Leu Val Glu Gln Phe Thr Gln

275	280	285
-----	-----	-----

Gln Asp Leu Glu Asp Gly Arg Leu Gly Leu Glu Val Gly Arg Pro Glu

290	295	300
-----	-----	-----

Gly Arg Ala Pro Gly Pro Ala Gly Asp Ser Leu Thr Leu Glu Leu Trp

305	310	315	320
-----	-----	-----	-----

Ala Gln Gly Val Pro Pro Ala Val Ala Ser Leu Asp Phe Ala Thr Glu

325	330	335	
Pro Tyr Asn Ala Ala Arg Pro Tyr Ser Val Ala Leu Leu Ser Val Pro			
340	345	350	
Glu Ala Ala Arg Thr Glu Ala Gly Lys Pro Glu Ser Ser Thr Pro Thr			
355	360	365	
Gly Glu Pro Gly Pro Met Ala Ser Ser Pro Glu Pro Ala Val Ala Lys			
370	375	380	
Gly Gly Phe Leu Ser Phe Leu Glu Ala Asn Met Phe Ser Val Ile Ile			
385	390	395	400
Pro Met Cys Leu Val Leu Leu Leu Ala Leu Ile Leu Pro Leu Leu			
405	410	415	

Phe Tyr Leu

<210>	7		
<211>	545		
<212>	PRT		
<213>	Homo sapiens		
<220><221>	Domain		
<222>	(524)..(545)		
<223>	Transmembrane Domain		
<400>	7		
Gln His Pro Ser His Leu Trp Lys Asn Lys Gly Leu Trp Val Pro Glu			
1	5	10	15
Gly Gln Arg Ala Arg Ile Thr Val Ala Ala Leu Asp Ala Ser Asn Leu			
20	25	30	
Leu Ala Ser Val Pro Ser Pro Gln Arg Ser Glu His Asp Val Leu Phe			
35	40	45	

Gln Val Thr Gln Phe Pro Ser Arg Gly Gln Leu Leu Val Ser Glu Glu			
50	55	60	
Pro Leu His Ala Gly Gln Pro His Phe Leu Gln Ser Gln Leu Ala Ala			
65	70	75	80
Gly Gln Leu Val Tyr Ala His Gly Gly Gly Thr Gln Gln Asp Gly			

85	90	95
----	----	----

Phe His Phe Arg Ala His Leu Gln Gly Pro Ala Gly Ala Ser Val Ala		
---	--	--

100	105	110
-----	-----	-----

Gly Pro Gln Thr Ser Glu Ala Phe Ala Ile Thr Val Arg Asp Val Asn		
---	--	--

115	120	125
-----	-----	-----

Glu Arg Pro Pro Gln Pro Gln Ala Ser Val Pro Leu Arg Leu Thr Arg		
---	--	--

130	135	140
-----	-----	-----

Gly Ser Arg Ala Pro Ile Ser Arg Ala Gln Leu Ser Val Val Asp Pro		
---	--	--

145	150	155	160
-----	-----	-----	-----

Asp Ser Ala Pro Gly Glu Ile Glu Tyr Glu Val Gln Arg Ala Pro His		
---	--	--

165	170	175
-----	-----	-----

Asn Gly Phe Leu Ser Leu Val Gly Gly Leu Gly Pro Val Thr Arg		
---	--	--

180	185	190
-----	-----	-----

Phe Thr Gln Ala Asp Val Asp Ser Gly Arg Leu Ala Phe Val Ala Asn		
---	--	--

195	200	205
-----	-----	-----

Gly Ser Ser Val Ala Gly Ile Phe Gln Leu Ser Met Ser Asp Gly Ala		
---	--	--

210	215	220
-----	-----	-----

Ser Pro Pro Leu Pro Met Ser Leu Ala Val Asp Ile Leu Pro Ser Ala		
---	--	--

225	230	235	240
-----	-----	-----	-----

Ile Glu Val Gln Leu Arg Ala Pro Leu Glu Val Pro Gln Ala Leu Gly		
---	--	--

245	250	255
-----	-----	-----

Arg Ser Ser Leu Ser Gln Gln Gln Leu Arg Val Val Ser Asp Arg Glu		
---	--	--

260	265	270
-----	-----	-----

Glu Pro Glu Ala Ala Tyr Arg Leu Ile Gln Gly Pro Gln Tyr Gly His		
---	--	--

275	280	285
-----	-----	-----

Leu Leu Val Gly Gly Arg Pro Thr Ser Ala Phe Ser Gln Phe Gln Ile		
---	--	--

290	295	300
-----	-----	-----

Asp Gln Gly Glu Val Val Phe Ala Phe Thr Asn Phe Ser Ser Ser His		
---	--	--

305	310	315	320
-----	-----	-----	-----

Asp His Phe Arg Val Leu Ala Leu Ala Arg Gly Val Asn Ala Ser Ala		
---	--	--

325	330	335
-----	-----	-----

Val Val Asn Val Thr Val Arg Ala Leu Leu His Val Trp Ala Gly Gly

340 345 350

Pro Trp Pro Gln Gly Ala Thr Leu Arg Leu Asp Pro Thr Val Leu Asp

355 360 365

Ala Gly Glu Leu Ala Asn Arg Thr Gly Ser Val Pro Arg Phe Arg Leu

370 375 380

Leu Glu Gly Pro Arg His Gly Arg Val Val Arg Val Pro Arg Ala Arg

385 390 395 400

Thr Glu Pro Gly Gly Ser Gln Leu Val Glu Gln Phe Thr Gln Gln Asp

405 410 415

Leu Glu Asp Gly Arg Leu Gly Leu Glu Val Gly Arg Pro Glu Gly Arg

420 425 430

Ala Pro Gly Pro Ala Gly Asp Ser Leu Thr Leu Glu Leu Trp Ala Gln

435 440 445

Gly Val Pro Pro Ala Val Ala Ser Leu Asp Phe Ala Thr Glu Pro Tyr

450 455 460

Asn Ala Ala Arg Pro Tyr Ser Val Ala Leu Leu Ser Val Pro Glu Ala

465 470 475 480

Ala Arg Thr Glu Ala Gly Lys Pro Glu Ser Ser Thr Pro Thr Gly Glu

485 490 495

Pro Gly Pro Met Ala Ser Ser Pro Glu Pro Ala Val Ala Lys Gly Gly

500 505 510

Phe Leu Ser Phe Leu Glu Ala Asn Met Phe Ser Val Ile Ile Pro Met

515 520 525

Cys Leu Val Leu Leu Leu Ala Leu Ile Leu Pro Leu Leu Phe Tyr

530 535 540

Leu

545

<210> 8

<211> 643

<212> PRT

<213> Cynomologus

<400> 8

Leu Ser Leu Glu Gly Ser Arg Thr Leu Thr Val Cys Pro Gly Ser Val

1 5 10 15

Gln Pro Leu Ser Ser Gln Thr Leu Arg Ala Ser Ser Ser Ala Gly Thr

20 25 30

Asp Pro Gln Leu Leu Leu Tyr Arg Val Val Arg Gly Pro Gln Leu Gly

35 40 45

Arg Leu Phe His Ala Gln Gln Asp Ser Thr Gly Glu Ala Leu Val Asn

50 55 60

Phe Thr Gln Ala Glu Val Tyr Ala Gly Asn Ile Leu Tyr Glu His Glu

65 70 75 80

Met Pro Thr Glu Pro Phe Trp Glu Ala His Asp Thr Leu Glu Leu Gln

85 90 95

Leu Ser Ser Pro Pro Ala Arg Asp Val Ala Ala Thr Leu Ala Val Ala

100 105 110

Val Ser Phe Glu Ala Ala Cys Pro Gln Arg Pro Ser His Leu Trp Lys

115 120 125

Asn Lys Gly Leu Trp Val Pro Glu Gly Gln Arg Ala Lys Ile Thr Met

130 135 140

Ala Ala Leu Asp Ala Ser Asn Leu Leu Ala Ser Val Pro Ser Pro Gln

145 150 155 160

Arg Leu Glu His Asp Val Leu Phe Gln Val Thr Gln Phe Pro Ser Arg

165 170 175

Gly Gln Leu Leu Val Ser Glu Glu Pro Leu His Ala Gly Gln Pro His

180 185 190

Phe Leu Gln Ser Gln Leu Ala Ala Gly Gln Leu Val Tyr Ala His Gly

195 200 205

Gly Gly Gly Thr Gln Gln Asp Gly Phe His Phe Arg Ala His Leu Gln

210 215 220

Gly Pro Ala Gly Ala Thr Val Ala Gly Pro Gln Thr Ser Glu Ala Phe

225 230 235 240

Ala Ile Thr Val Arg Asp Val Asn Glu Arg Pro Pro Gln Pro Gln Ala

245 250 255

Ser Val Pro Leu Arg Ile Thr Arg Gly Ser Arg Ala Pro Ile Ser Arg

260 265 270

Ala Gln Leu Ser Val Val Asp Pro Asp Ser Ala Pro Gly Glu Ile Glu

275 280 285

Tyr Glu Val Gln Arg Ala Pro His Asn Gly Phe Leu Ser Leu Val Gly

290 295 300

Gly Gly Pro Gly Pro Val Thr His Phe Thr Gln Ala Asp Val Asp Ser

305 310 315 320

Gly Arg Leu Ala Phe Val Ala Asn Gly Ser Ser Val Ala Gly Val Phe

325 330 335

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

340 345 350

Ala Val Asp Ile Leu Pro Ser Ala Ile Glu Val Gln Leu Gln Ala Pro

355 360 365

Leu Glu Val Pro Gln Ala Leu Gly Arg Ser Ser Leu Ser Gln Gln Gln

370 375 380

Leu Arg Val Val Ser Asp Arg Glu Glu Pro Glu Ala Ala Tyr Arg Leu

385 390 395 400

Ile Gln Gly Pro Lys Tyr Gly His Leu Leu Val Gly Gly Arg Pro Ala

405 410 415

Ser Ala Phe Ser Gln Leu Gln Ile Asp Gln Gly Glu Val Val Phe Ala

420 425 430

Phe Thr Asn Phe Ser Ser His Asp His Phe Arg Val Leu Ala Leu

435 440 445

Ala Arg Gly Val Asn Ala Ser Ala Val Val Asn Ile Thr Val Arg Ala

450 455 460

Leu Leu His Val Trp Ala Gly Gly Pro Trp Pro Gln Gly Ala Thr Leu

465 470 475 480

Arg Leu Asp Pro Thr Ile Leu Asp Ala Gly Glu Leu Ala Asn Arg Thr

485	490	495
Gly Ser Val Pro His Phe Arg Leu Leu Glu Gly Pro Arg His Gly Arg		
500	505	510
Val Val Arg Val Pro Arg Ala Arg Thr Glu Pro Gly Gly Ser Gln Leu		

515	520	525
Val Glu Gln Phe Thr Gln Gln Asp Leu Glu Asp Gly Arg Leu Gly Leu		
530	535	540
Glu Val Gly Arg Pro Glu Gly Arg Ala Pro Ser Pro Thr Gly Asp Ser		
545	550	555
Leu Thr Leu Glu Leu Trp Ala Gln Gly Val Pro Pro Ala Val Ala Ser		
565	570	575
Leu Asp Phe Ala Thr Glu Pro Tyr Asn Ala Ala Arg Pro Tyr Ser Val		

580	585	590
Ala Leu Leu Ser Val Pro Glu Ala Thr Arg Met Glu Ala Gly Lys Pro		
595	600	605
Glu Ser Ser Thr Pro Thr Gly Glu Pro Gly Pro Met Ala Ser Ser Pro		
610	615	620
Val Pro Ala Val Ala Lys Gly Gly Phe Leu Gly Phe Leu Glu Ala Asn		
625	630	635
Met Phe Ser		

<210> 9

<211> 643

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

Leu Ser Leu Lys Gly Ser Gln Thr Leu Thr Val Cys Pro Gly Ser Val		
1	5	10
Gln Pro Leu Ser Ser Gln Thr Leu Arg Ala Ser Ser Ser Ala Gly Thr		
20	25	30
Asp Pro Gln Leu Leu Tyr Arg Val Val Arg Gly Pro Gln Leu Gly		
35	40	45

Arg Leu Phe His Ala Gln Gln Asp Ser Thr Gly Glu Ala Leu Val Asn

50 55 60

Phe Thr Gln Ala Glu Val Tyr Ala Gly Asn Ile Leu Tyr Glu His Glu

65 70 75 80

Met Pro Pro Glu Pro Phe Trp Glu Ala His Asp Thr Leu Glu Leu Gln

85 90 95

Leu Ser Ser Pro Pro Ala Arg Asp Val Ala Ala Thr Leu Ala Val Ala

100 105 110

Val Ser Phe Glu Ala Ala Cys Pro Gln His Pro Ser His Leu Trp Lys

115 120 125

Asn Lys Gly Leu Trp Val Pro Glu Gly Gln Arg Ala Arg Ile Thr Val

130 135 140

Ala Ala Leu Asp Ala Ser Asn Leu Leu Ala Ser Val Pro Ser Pro Gln

145 150 155 160

Arg Ser Glu His Asp Val Leu Phe Gln Val Thr Gln Phe Pro Ser Arg

165 170 175

Gly Gln Leu Leu Val Ser Glu Glu Pro Leu His Ala Gly Gln Pro His

180 185 190

Phe Leu Gln Ser Gln Leu Ala Ala Gly Gln Leu Val Tyr Ala His Gly

195 200 205

Gly Gly Gly Thr Gln Gln Asp Gly Phe His Phe Arg Ala His Leu Gln

210 215 220

Gly Pro Ala Gly Ala Ser Val Ala Gly Pro Gln Thr Ser Glu Ala Phe

225 230 235 240

Ala Ile Thr Val Arg Asp Val Asn Glu Arg Pro Pro Gln Pro Gln Ala

245 250 255

Ser Val Pro Leu Arg Leu Thr Arg Gly Ser Arg Ala Pro Ile Ser Arg

260 265 270

Ala Gln Leu Ser Val Val Asp Pro Asp Ser Ala Pro Gly Glu Ile Glu

275 280 285

Tyr Glu Val Gln Arg Ala Pro His Asn Gly Phe Leu Ser Leu Val Gly

290	295	300
Gly Gly Leu Gly Pro Val Thr Arg Phe Thr Gln Ala Asp Val Asp Ser		
305	310	315
Gly Arg Leu Ala Phe Val Ala Asn Gly Ser Ser Val Ala Gly Ile Phe		
325	330	335
Gln Leu Ser Met Ser Asp Gly Ala Ser Pro Pro Leu Pro Met Ser Leu		
340	345	350
Ala Val Asp Ile Leu Pro Ser Ala Ile Glu Val Gln Leu Arg Ala Pro		
355	360	365
Leu Glu Val Pro Gln Ala Leu Gly Arg Ser Ser Leu Ser Gln Gln Gln		
370	375	380
Leu Arg Val Val Ser Asp Arg Glu Glu Pro Glu Ala Ala Tyr Arg Leu		
385	390	395
Ile Gln Gly Pro Gln Tyr Gly His Leu Leu Val Gly Gly Arg Pro Thr		
405	410	415
Ser Ala Phe Ser Gln Phe Gln Ile Asp Gln Gly Glu Val Val Phe Ala		
420	425	430
Phe Thr Asn Phe Ser Ser His Asp His Phe Arg Val Leu Ala Leu		
435	440	445
Ala Arg Gly Val Asn Ala Ser Ala Val Val Asn Val Thr Val Arg Ala		
450	455	460
Leu Leu His Val Trp Ala Gly Gly Pro Trp Pro Gln Gly Ala Thr Leu		
465	470	475
Arg Leu Asp Pro Thr Val Leu Asp Ala Gly Glu Leu Ala Asn Arg Thr		
485	490	495
Gly Ser Val Pro Arg Phe Arg Leu Leu Glu Gly Pro Arg His Gly Arg		
500	505	510
Val Val Arg Val Pro Arg Ala Arg Thr Glu Pro Gly Gly Ser Gln Leu		
515	520	525
Val Glu Gln Phe Thr Gln Gln Asp Leu Glu Asp Gly Arg Leu Gly Leu		
530	535	540

Glu Val Gly Arg Pro Glu Gly Arg Ala Pro Gly Pro Ala Gly Asp Ser
 545 550 555 560
 Leu Thr Leu Glu Leu Trp Ala Gln Gly Val Pro Pro Ala Val Ala Ser
 565 570 575

Leu Asp Phe Ala Thr Glu Pro Tyr Asn Ala Ala Arg Pro Tyr Ser Val
 580 585 590
 Ala Leu Leu Ser Val Pro Glu Ala Ala Arg Thr Glu Ala Gly Lys Pro
 595 600 605
 Glu Ser Ser Thr Pro Thr Gly Glu Pro Gly Pro Met Ala Ser Ser Pro
 610 615 620
 Glu Pro Ala Val Ala Lys Gly Gly Phe Leu Ser Phe Leu Glu Ala Asn
 625 630 635 640

Met Phe Ser

<210> 10
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> HVR-L1
 <400> 10
 Ser Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Tyr Leu Asn

1 5 10

<210> 11
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> HVR-L2

<400> 11

Tyr Thr Ser Ser Leu His Ser

1 5

<210> 12
 <211> 9
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> HVR-L3

<400> 12

Gln Gln Tyr Ser Lys Leu Pro Trp Thr

1 5

<210> 13

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> HVR-L1

<400> 13

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Tyr Leu Asn

1 5 10

<210> 14

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> HVR-H1

<400> 14

Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Gly Tyr Tyr Trp Asn

1 5 10

<210> 15

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> HVR-H2

<

400> 15

Tyr Ile Thr Tyr Asp Gly Ser Asn Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Asn

1 5 10 15

<210> 16

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> HVR-H3

<400> 16

Phe Asp Tyr

1

<210> 17

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> HVR-H1

<400> 17

Gly Gly Ser Ile Thr Ser Gly Tyr Tyr Trp Asn

1	5	10
---	---	----

<210> 18

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> HVR-H2

<400> 18

Tyr Ile Thr Tyr Asp Gly Ser Asn Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser

1	5	10	15
---	---	----	----

<210> 19

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> HVR-L1

<400> 19

Ser Ala Ser Gln Ser Ile Arg Asn Tyr Leu Asn

1	5	10
---	---	----

<210> 20

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> HVR-L1

<400> 20

Ser Ala Ser Gln Asp Ile Arg Asn Tyr Leu Asn

1 5 10

<210> 21

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> HVR-L1

<400> 21

Ser Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Tyr Leu Asn

1 5 10

<210> 22

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> HVR-L2

<400> 22

Tyr Thr Ser Ser Leu Gln Ser

1 5

<210> 23

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> HVR-L2

<400> 23

Asp Ala Ser Ser Leu His Ser

1 5

<

210> 24

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> HVR-L2

<400> 24

Tyr Thr Ser Asn Leu Glu Thr

1 5

<210> 25

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> HVR-H1

<400> 25

Ser Gly Tyr Tyr Trp Ser

1 5

<210> 26

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> LC007 Chimeric Antibody VL

<400> 26

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Tyr Tyr Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Lys Leu Pro Trp

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 27

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> LC007 Chimeric Antibody VH

<400> 27

Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln

1 5 10 15

Ser Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Gly

20 25 30

Tyr Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Trp

35 40 45

Met Gly Tyr Ile Thr Tyr Asp Gly Ser Asn Asn Tyr Asn Pro Ser Leu

50 55 60

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

65 70 75 80

Leu Lys Leu Asn Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Asp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser

100 105 110

<210> 28

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> LC007 Humanized Antibody ML1 VL

<400> 28

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Tyr

20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Ile

35 40 45

Tyr Tyr Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Lys Leu Pro Trp

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 29

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> LC007 Humanized Antibody M4-1 VH

<400> 29

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Gly

20 25 30

Tyr Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp

35 40 45

Ile Gly Tyr Ile Thr Tyr Asp Gly Ser Asn Asn Tyr Asn Pro Ser Leu

50 55 60

Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Asp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

100 105 110

<210> 30

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> LC007 Humanized Antibody M4-2 VH

<400> 30

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln

1 5 10 15

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

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

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

<210> 31

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> LC007 Humanized Antibody ML2 VL

<400> 31

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

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Lys Leu Pro Trp
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 32
<211> 112
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> LC007 Humanized Antibody M4-3 VH
<400> 32

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Thr Ser Gly
20 25 30

Tyr Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp

35 40 45

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

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

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

Ala Asp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

100 105 110

<210> 33
<211> 112
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> LC007 Humanized Antibody M4-6 VH
<400> 33

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

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

Tyr Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp

35 40 45

Ile Gly Tyr Ile Thr Tyr Asp Gly Ser Asn Asn Tyr Asn Pro Ser Leu
 50 55 60
 Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser
 65 70 75 80
 Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Asp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

100 105 110

<210> 34

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> LC007 Chimeric Antibody Light Chain

<400> 34

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

35 40 45

Tyr Tyr Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser G1y Ser G1y Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Lys Leu Pro Trp
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala

100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala

130	135	140	
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln			
145	150	155	160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser			

165	170	175	
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr			
180	185	190	
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser			
195	200	205	
Phe Asn Arg Gly Glu Cys			

210			
<210> 35			
<211> 442			
<212> PRT			
<213> Artificial Sequence			
<220><223> LC007 Chimeric Antibody Heavy Chain			
<400> 35			

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

Lys Asn Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Phe			
65	70	75	80
Leu Lys Leu Asn Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys			
85	90	95	
Ala Asp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser			
100	105	110	
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys			

115	120	125
-----	-----	-----

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

130	135	140
-----	-----	-----

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser

145	150	155	160
-----	-----	-----	-----

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser

165	170	175
-----	-----	-----

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr

180	185	190
-----	-----	-----

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys

195	200	205
-----	-----	-----

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys

210	215	220
-----	-----	-----

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro

225	230	235	240
-----	-----	-----	-----

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys

245	250	255
-----	-----	-----

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp

260	265	270
-----	-----	-----

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu

275	280	285
-----	-----	-----

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu

290	295	300
-----	-----	-----

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn

305	310	315	320
-----	-----	-----	-----

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly

325	330	335
-----	-----	-----

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu

340	345	350
-----	-----	-----

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr

355	360	365
-----	-----	-----

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 370 375 380

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 385 390 395 400

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 405 410 415

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 420 425 430

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440

<210> 36

<211> 214

<212>

PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> LC007 Humanized Antibody ML2 Light Chain

<400> 36

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

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

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

Tyr Tyr Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Lys Leu Pro Trp
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly

115	120	125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala		
130	135	140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln		
145	150	155
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser		
165	170	175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr		

180	185	190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser		
195	200	205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys		

210		
<210> 37		
<211> 442		
<212> PRT		
<213> Artificial Sequence		
<220><223> LC007 Humanized Antibody M4-3 Heavy Chain		
<400> 37		

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Thr Ser Gly		
20	25	30
Tyr Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp		
35	40	45
Ile Gly Tyr Ile Thr Tyr Asp Gly Ser Asn Asn Tyr Asn Pro Ser Leu		
50	55	60
Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser		
65	70	75
		80

Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
85	90	95
Ala Asp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser		

100	105	110
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys		
115	120	125
Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr		
130	135	140
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser		
145	150	155
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser		
165	170	175
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr		
180	185	190
Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys		
195	200	205
Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys		
210	215	220
Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro		
225	230	235
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys		
245	250	255
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp		
260	265	270
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu		
275	280	285
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu		
290	295	300
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn		
305	310	315
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly		
325	330	335
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu		
340	345	350

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 355 360 365

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 370 375 380

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 385 390 395 400

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 405 410 415

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 420 425 430

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440

<210> 38

<211> 324

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> LC007 Murine Antibody Light Chain

<400> 38

gatattgtgc tcacacagtc tccatcctcc ctgtctgcct ctctggaga cagagtacc	60
---	----

atcagttgca gtgcaagtca gggcattaga aattattaa actggtatca gcagagacca	120
--	-----

gatggaactg ttaaactcct gatctattac acatcaagtt tacactcagg agtcccatca	180
---	-----

aggttcagtgc gcagtgggtc tgggacagat tattctctca ccatcagcaa cctggAACCT	240
--	-----

gaagatattgc ccaactacta ttgtcagcag tatagtaagc ttccttgac gttcggtgaa	300
---	-----

ggcaccaagc tgaaatcaa acgg	324
---------------------------	-----

<210> 39

<211> 339

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> LC007 Murine Antibody Heavy Chain

<400> 39

gagggtccagc tgcaaggagtc aggacctggc ctcgtgaaac cttctcagtc tctgtctctc	60
---	----

acctgctctg tcactggcta ctccatcacc agtggttatt actggaaactg gatccggcag	120
--	-----

tttccagggaa acaagctgga atggatggc tacataacct acgacggtag caataactac 180
 aaccatctc tcaaaaatcg aatctccatc actcgtgaca catctaagaa ccagttttc 240
 ctgaagttga attctgtgac tactgaggac acagctacat attactgtgc ggactttgac 300
 tactgggcc aaggcaccac tctcacagtc tcctcagcc 339

<210> 40

<211> 645

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> LC007 Chimeric Antibody Light Chain

<400> 40

gatattgtgc tcacacagtc tccatcctcc ctgtctgcct ctctgggaga cagagtacc 60
 atcagttgca gtgcaagtca gggcattaga aattatttaa actggtatca gcagagacca 120
 gatgaaactg taaaactcct gatctattac acatcaagtt tacactcagg agtcccatca 180
 aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagat tattctctca ccatcagcaa cctggAACCT 240
 gaagatattg ccacttacta ttgtcagcag tatagtaagc ttccctggac gttcggtgaa 300
 ggcaccaagc tgaaatcaa acgtacggtg gctgcaccat ctgtcttcatttcccgcca 360
 tctgatgagc agttgaaatc tgaaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat 420

cccagagagg ccaaagtaca gtggaaggtg gataacgccc tccaatcggtt taactccag 480
 gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg 540
 ctgagcaaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaaagtac ccattcaggc 600
 ctgagctcgc ccgtcacaaa gagttcaac aggggagagt gttag 645

<210> 41

<211> 1329

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> LC007 Chimeric Antibody Heavy Chain

<400> 41

gagggtccagc tgcaaggagtc aggacctggc ctcgtgaaac cttctcagtc tctgtctctc 60

acctgctctg tcactggcta ctccatcacc agtggttatt actggaactg gatccggcag 120
 tttccagggaa acaagctgga atggatggc tacataacct acgacggtag caataactac 180
 aaccatctc tcaaaaatcg aatctccatc actcgtgaca catctaagaa ccagttttc 240
 ctgaagttga attctgtgac tactgaggac acagctacat attactgtgc ggactttgac 300

tactgggcc aaggcaccac tctcacagtc tcctcagcta gcaccaaggg cccatcggtc	360
ttccccctgg caccctctc caagagcacc tctggggca cagcgccct gggctgcctg	420
gtcaaggact acttccccga accggtgacg gtgtcgtgga actcaggcgc cctgaccagc	480
ggcgtgcaca cttcccgcc tgcctacag tcctcaggac tctactccct cagcagcgtg	540
gtgaccgtgc cttcccgcc cttggcacc cagacatcata tctgcaacgt gaatcacaag	600
cccagcaaca ccaaggtgga caagaaagt gagccaaat ctgtgacaa aactcacaca	660
tgcccacgt gcccagcacc tgaactccctg gggggaccgt cagtcttcccttccccca	720
aaacccaagg acaccctcat gatctcccg acccctgagg tcacatgcgt ggtggtgac	780
gtgagccacg aagaccctga ggtcaagttc aacttgtacg tggacggcgt ggagggtcat	840
aatgccaaga caaagccgcn ggaggagcag tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc	900
ctcaccgtcc tgaccaggaa ctggctgaat ggcaaggagt acaagtgc当地 ggtctccaac	960
aaagccctcc cagccccat cgagaaaacc atctccaaag ccaaaggca gccccgagaa	1020
ccacagggtt acaccctgcc cccatcccg gatgagctga ccaagaacca ggtcagcctg	1080
acctgcctgg tcaaaggctt ctatcccacg gacatcgccg tggagtgga gagcaatggg	1140
cagccggaga acaactacaa gaccacgcct cccgtgctgg actccgacgg ctccttcttc	1200
ctctacagca agtcaccgtt ggacaagagc aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc	1260
tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac tacacgcaga agaccctctc cctgtctccg	1320
ggtaaatga	1329
<210> 42	
<211> 321	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> LC007 Humanized Antibody ML2 Light Chain	
<400> 42	
gacatccaga tgaccaggag cccagcagc ctgagcgc当地 gcgtggcga cagagtgacc	60
atcacctgcc gggccagc当地 gggcatccgg aactacctga actggtatca gcagaagccc	120
ggcaaggccc ccaagctgct gatctactac accagcagcc tgcacagcgg cgtgcctagc	180
cggtagcgc gcagcggctc cggcaccgac ttccaccctga ccattagctc cctgcagccc	240
gaggacttcg ccacctacta ctgccagcag tacagcaagc tgccctggac cttcgccag	300
ggaacaaagg tggagatcaa g	321
<210> 43	

<211> 336

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> LC007 Humanized Antibody M4-3 Heavy Chain

<400> 43

caggtgcagc	tgcaggaaag	cggccctggc	ctggtaagc	ccagccagac	cctgagcctg	60
acctgcacct	tgtccggcgg	cagcatcacc	agcggtact	actggaactg	gatccggcag	120
cacccggca	aggcctgga	atggatcgcc	tacatcacct	acgacggcag	caacaactac	180

aaccccagcc	tgaagtccag	agtgaccatc	agccggacca	ccagcaagaa	ccagttcagc	240
ctgaagctgt	ccagcgtgac	agccgcccac	accggctgt	actactgcgc	cgacttcgac	300
tactggggcc	aggcaccct	ggtcaccgtg	tccagc			336

<210> 44

<211> 21

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 44

Val Ile Ile Pro Met Cys Leu Val Leu Leu Leu Ala Leu Ile Leu

1 5 10 15

Pro Leu Leu Phe Tyr

20