

(19)대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)

(51) Int. Cl.⁷

C07K 16/42

C07K 16/46

A61K 39/395

(11) 공개번호

10-2004-0101428

(43) 공개일자

2004년12월02일

(21) 출원번호 10-2004-7016156

(22) 출원일자 2004년10월08일

번역문 제출일자 2004년10월08일

(86) 국제출원번호 PCT/EP2003/003580

(87) 국제공개번호

WO 2003/084996

(86) 국제출원출원일자 2003년04월07일

(87) 국제공개일자

2003년10월16일

(30) 우선권주장

02007885.3

2002년04월09일

EP(EP)

(71) 출원인

메르크 파텐트 게엠베하

독일 64293 다름스타트 프랑크푸르터 스트라세 250

(72) 발명자

카터그레이엄

영국 에이비21 7엑스비 애버딘셔 뉴마차 롱힐스 카티지

카프랜시스제이

영국 에이비23 8엑스유 애버딘셔 발메디 더 홀딩스 버치리

(74) 대리인

특허법인코리아나

심사청구 : 없음

(54) 항유전인자형 항-CEA 항체 분자 및 암백신으로서의이의 용도

요약

본 발명은 CEA 양성 종양에 대하여 항유전인자형 백신으로 사용하기에 적합한 분자들, 바람직하게는 설계된 면역글로불린들을 제공한다. 상기 분자들은 효율적이고 지속적인 숙주 항종양 반응을 위한, CEA 운반 종양 세포들에 대하여 MHC class I 및 MHC class II 매개성 면역 반응 둘 다를 유도한다. 본 발명은 향상된 백신화 특성들을 가지는 항유전인자형 항-CEA 항체들의 변형본들, 바람직하게는 마우스 항체 708을 제공한다. 상기 변형들은, 예로서 CEA, CD55 항원 및 CEA 암특이 MHC 항원결정기들로부터 유래하는 서열 트랙들을 상기 항체 분자들의 가변부위내로 도입하는 것과 관련되어 있다.

대표도

도 1

색인어

면역글로불린, 항유전인자형 항-CEA 항체, 마우스 항체 708

명세서

기술분야

본 발명은 CEA (암 배아 항원(carcinoembryonic antigen)) 양성 종양에 대하여 항유전인자형(anti-idiotypic) 백신으로 사용하기에 적합한 분자들, 바람직하게는 설계된 면역글로불린들을 제공한다. 상기 분자들은 효율적이고 지속적인 숙주 항종양 반응을 위한, CEA 운반 종양 세포들에 대하여 MHC class I 및 MHC class II 매개성 면역 반응을 둘 다를 유도한다. 본 발명은 항상된 백신화(vaccination) 특성들을 가지는 항유전인자형 항-CEA 항체들의 변형본들, 바람직하게는 마우스(mouse) 항체 708을 제공한다. 상기 변형들은, 예로서 CEA, CD55 항원 및 CEA 암특이(cancer-specific) MHC 항원결정기(epitope)들로부터 유래하는 서열 트랙(sequence tract)들을 상기 항체 분자들의 가변 부위(variable region)내로 도입하는 것과 관련되어 있다.

배경기술

신체로부터 암세포들을 제거하기 위하여 인간의 면역 체계와 암세포들간의 상호작용을 자극하거나 증폭시킬 수 있는 조성물을 제공하고자 하는 오랜 소망이 있어 왔다. 감염원에 대한 면역을 제공하는 백신화와는 반대로, 암세포 제거를 위하여 상기 면역 체계를 이용하는 것은 보다 더 도전적인 기술적 목표인데, 이는 특히 상기 면역 체계가 확립된 면역 내성이 있는 세포들에게로 향하도록 해야 하거나 또는 일부 경우, 상기 암성 세포들은 그 자신들이 정상적인 면역학적 검출 또는 제거를 피할 수 있게 하는 특성들을 획득해 왔을 수 있기 때문이다.

본 발명은 암세포에 대하여 T-세포 의존 면역반응을 유도하는 것과 관련되어 있다. 이전의 대부분의 연구는 CD8 양성 T-세포 및 MHC class I 제한 항원들에 초점이 맞춰져 왔으나, 본 발명은 MHC class II 제한 CD4 양성 T-세포 반응의 중요성을 인식하며, 바람직한 구현예에서 class I 및 class II 둘 다의 제한 암 항원결정기를 운반할 수 있는 백신을 제공한다.

본 발명의 분자들의 표적이 되는 암 항원은 암 배아 항원(CEA)이다. CEA는 광범위한 고형암들에서 널리 발현되는 세포표면단백질이며, 전세계 다수의 서로 다른 단체들에서 백신 개발의 표적으로서 초점이 되어 왔다. 상기 분자는, 직장결장암의 90%, 위암, 췌장암 및 비(非)소세포 폐암의 70% 및 유방암의 50%에서 발현되는 180kDa의 gpi-고정 당단백질이다. 상기 단백질은 비특이 교차반응 항원(NCP) 및 정상적인 과립백혈구에서 발견되는 담도 당단백질(BGP)와 상당한 상동성을 보인다. CEA는 CEA 양성 종양을 가진 대다수의 환자들의 혈액순환에서 검출할 수 있으며, 또한 인간 태아의 정상적인 소화관에서 발견된다. 상기 단백질은 부착분자(adhesion molecule)로 기능하는 것으로 보이며, CEA에 관한 치료가 종양의 전이를 방지하는데 이로울지 모른다는 약간의 기대가 있다. CEA는, 예방접종 계획을 포함한 암 면역요법에서의 매력적인 목표물인데, 이는 이것이 발생하는 종양 표면에서 일반적으로 높은 수준으로 존재하기 때문이다.

이전의 많은 연구들이 백신화 치료법에 있어서 CEA 유래 단백질 서열들을 이용해왔다. 쥐에서의 연구들은 종두증(vaccinia)에서 발현되는 CEA (rV-CEA)가 재조합 CEA에 비하여 백신으로서 보다 탁월하다는 것을 증명해 왔으며, 세포독성 T 림프구(CTL) 반응을 유도하는 것이 확립된 종양의 퇴행으로 귀착된다는 것을 보여주었다[Kantor, J. et al (1992), *J. Natl. Cancer. Inst.* 84:1084-1091]. 상기 rV-CEA는, 전이암종(metastatic carcinoma)을 가진 환자들에 대하여 1단계 임상연구에 적용하였을때, CEA에 대한 CTL 반응, 즉, 종양세포 사멸을 유도할 수 있었다[Tsang, K. Y. et al (1995) *J. Natl. Cancer. Inst.* 87:982-990]. 그러나, 상기 종두증에 대한 유의미한 면역반응 또한 유도되었는데, 이는 이러한 환자들에서의 이후의 면역화가 유용한 임상적 성과를 달성할 가능성을 제한하였다. rV-CEA를 가지는 시동용량(priming dose)을 포함시킨 후 조류포식(avipox) 벡터 내에 발현 암호화된(encoded) CEA를 증폭시키는 기타 임상 연구들은, 또한 GM-CSF 및 낮은 양의 IL-2를 투여받는 환자들에서 전도유망한 반응들을 이룩하였다[Marshall, J. L. et al (2000) *J. Clin. Oncology*. 18:3964-3973]. 나아가, 이러한 복잡한 백신화 체제의 유용성이 증명될 수 있기 전에 임상 연구들이 요구된다.

CEA를 표적으로 하는데에 사용되는 대안적인 접근방법은 항유전인자형 면역화이다. 항종양 항체의 결합부위를 인식하는 항유전인자형 항체들은 상기 항원의 기능성 모방체(mimic)로 작용할 수 있다. 이들은 따라서 체액성 및 세포성 반응 둘 다를 자극시키는데 사용될 수 있다. CEA를 모방하는 쥐의 항유전인자형 3H1에 대한 1단계 임상시험이 진행성(advanced) 직장결장암을 가진 환자들에서 수행되어 왔다. 상기 3H1 항체는 미국특허 제 5,977,315호에 광범위하게 기술되었으며, 상기 항체는 환자들에서 항-CEA 항체 반응을 유도하는 것으로 나타났는데, 이중 다수는 CEA에 대하여 증식 반응을 보였다[Foon, K. A. et al (1995) *J. Clin. Invest.* 96:334-342]. 미세잔존질환(minimal residual disease)을 가진 환자들을 치료한 다른 연구들은 상기 항유전인자형 항체 및 CEA 둘 다에 대한 T 세포 반응을 가지는 환자들을 보여주었다. 이 연구에서, 그러나, 상기 항유전인자형은 CTL 반응을 유도하는데는 실패하였다[Foon, K. A., et al (1999) *J. Clin. Oncology*. 17:2889-2895].

CEA 외의 다른 종양 항원을 모방하는 항유전인자형 항체들에 대하여, 치료적 백신으로서의 이들의 유용성에 대한 임상적 조사가 수행되어 왔다. 예로서, 유명한 그러나 소수인, GD2 항원 및 항유전인자형 항체 1A7 [US 6,509,016],

또한 상기 GD3 항원에 대한 항유전인자형 항체 [US 5,529,922 및 EP0473721] 및 흑색종(melanoma) 관련 p97 항원 [US 4,918,164]이 있다. 예로서 US 5,766,588에 교시된 것과 같은, 항유전인자형 항체를 이용하는, 채용되고 있는 보다 더 복잡한 면역요법학적 방법들 또한 진척되어 왔다.

항유전인자형 항체를 이용하는 백신화 계획의 한가지 특정 예가 인간 단클론항체 107AD5에 의하여 제공된다. 이 항체는 직장결장암 세포에서 발견되는 종양 관련 항원 791T/gp72로도 알려진 CD55 단백질의 분자 모방체를 제공하는 것으로 밝혀졌다. 상기 CD55 단백질은 보체매개성(complement-mediated) 공격으로부터 세포를 보호하는 기능을 하며, 암세포에서 이 단백질은 높은 수준으로 흔히 발견된 [Li, L., et al (2001) *Br. J. Cancer* 84:80-86]. 상기 107AD5 항체는 많은 임상시험에서 가망성을 나타내었으며, 다수의 환자들에서 IL-2 유도를 포함하는 항종양 면역반응을 측정할 수 있었다[Robins, R.A et al (1991) *Cancer Res.* 51:5425-5429; Denton, G.W.L., et al (1994) *Int. J. Cancer* 57:10-14; 및, WO90/04415]. 보다 최근의 시험들은 그러나 상기 항체로만은 종양 존재량이 많은 환자들에서 효과적일 것 같지 않으며 이 항체를 이용한 백신화 전략은 미세잔존질환을 가진 환자들에서 보다 이로울 수 있다는 것을 나타내었다[Maxwell-Armstrong, C.A. et al (2001) *Bri. J. Cancer* 84:1443-1446].

상기 명백한 진보에도 불구하고, 일반적으로 인간 암세포에 대한 면역반응을 유도할 수 있고 특히 CEA 양성 암세포 및/또는 CD55 과발현에 대해 양성인 암에 대하여 면역반응을 유도할 수 있는 개선된 분자에 대한 필요성이 계속적으로 존재한다.

발명의 상세한 설명

본 발명은 CEA 양성 종양에 대한 항유전인자형 백신으로의 사용에 적합한 폴리펩티드를 제공한다. 본 발명자들은 효율적이고 지속적인 숙주 항종양 반응에 있어서, CEA 운반 종양 세포들에 대한 MHC class I 및 MHC class II 매개 면역 반응 둘 다를 유도해야 할 필요의 중요성을 인식하였다. 본 발명의 폴리펩티드 조성물은 MHC class I 및 MHC class II 제한 CEA 항원결정기 둘 다를 제공할 수 있다.

본 발명은, 그 서열이 주로 쥐의 항유전인자형 항체 708로부터 유래되는 변형 폴리펩티드를 제공한다. 상기 폴리펩티드 서열이 항체 708의 V 부위(V-region)와 유사한 서열 트랙을 공유하는 곳에 CEA 및/또는 상기 CD55 항원으로 부터의 서열 트랙들이 부가적으로 제공되는 다수의 구현예가 제공된다. 추가적인 구현예에서, 아미노산 치환이 수행되어 원치 않는 T 세포 항원결정기들을 제거하게 된 폴리펩티드 서열이 제공된다. 이러한 조성물에서 그 목적은, 상기 CEA 및/또는 CD55 항원결정기 성분에 대하여 유도된 면역반응에 초점을 맞추고 원하는 항암 반응에 기여하지 않는 경쟁(competing) 펩티드 항원결정기를 제거하는 것이다.

항원으로 항-CEA 항체 NCRC23을 사용하여 부모 708 항체를 생산하였다. 상기 NCRC23 단클론항체는 그 자체가 CEA 특이 항원결정기에 결합하며 정상 조직과 최소한의 교차반응성을 보인다[Price, M. R. et al (1987), *Cancer, Immunology and Immunotherapy*. 25: 10-15]. 항유전인자형 항체 708은 NCRC23을 특이적으로 인식하며, CEA를 인식하는 마우스 및 래트의 Ab3 항체를 유도할 수 있다. 상기 708 항유전인자형 항체가 또한 암환자들로부터 CEA 또는 CEA 발현 종양 세포를 인식하는 인간 T 림프구를 초회항원자극할 수 있다는 것은 특히 의미심장하다[Durrant, L. G. et al (1992), *Int. J. Cancer*. 50:811-816].

상기 708 항체의 가변부위 서열들을 획득하여 상기 CEA 단백질의 부위들에 대하여 상동성 있는 서열 요소들이 존재하는지를 분석하였다. H쇄(H-chain) (CDRH2 및 CDRH3)의 첫번째 및 두번째 상보성 결정부위(complementarity determining region)들은 CEA와의 상동성을 보이나 밀접하게 관련된 분자들인 NCA 또는 BGP에 대하여는 그렇지 않다. 상기 H쇄의 708 가변부위 및 상보성 결정부위(CDR)들은 특히 상기 CEA 분자의 특정 요소들의 분자 모방을 나타내며, CEA에 대한 708 항체의 유전자형 특성에 대한 기초를 제공할 가능성이 있다.

본 발명은 상기 부모 항체 708의 변형 유도체들을 포함한다. 모든 바람직한 구현예에서, 상기 변형 708 분자들은 상기 부모 쥐 C 부위 대신 인간 C 부위 영역(domain)을 포함한다. 기타 변형들은 상기 분자의 V 부위 영역들에서 수행된다. 이러한 변형들은 하기 목적들에 초점이 맞춰진 하나 이상의 변화들을 포함하는 것으로 요약될 수 있는데, 이때 CEA 서열로 하나 이상의 변화가 포함되어야 한다:

- I. 기존 CEA 상동성 부위들을 CEA 서열 동일성 부위 내로 변환.
- II. 기존의 짧은 서열 트랙들을 CEA 유래 서열 트랙들로 교체.
- III. 기존의 짧은 서열 트랙들을 항체 107AD5 유래 서열 트랙들로 교체.
- IV. 기존의 짧은 서열 트랙들을 CD55 유래 서열 트랙들로 교체.

V.특정 아미노산 잔기들의 대안적인 아미노산 잔기들로의 교체에 의하여 원하지 않는 T 세포 항원결정기 제거.

본 발명은 이로써, 각각 상기한 목적 하나 이상에 따라 설계되고 본래의 708 V 부위, 인간 CEA 분자, 및/또는 인간 CD55 분자 또는 쥐의 항체 107AD5의 형태의 상기 CD55 분자에 대한 유전자형과의 동일성을 가진 또는 밀접한 상동성을 가진서열 요소들이 특징인 신규한 폴리펩티드 서열을 제공한다. 본 발명은 상기 나열한 '설계 요소들' 모두를 포함하는 다수의 폴리펩티드 서열들을 포함한다. 이에 개시된 각 폴리펩티드는 본 발명에 따르는 한 구현예이다.

요컨대, 본 발명은 하기의 논점들에 관련되어 있다:

- 부모 항유전인자형 항-CEA 항체로부터 유래하고, 및 인간 기원의 불변부위(constant region) 및 인간 종양 항원 CEA(암 배아 항원)으로부터 유래한 4개 이상의, 바람직하게는 5 내지 20의 연속 아미노산 잔기의 하나 이상의 서열 트랙들을 포함하는 합성적으로 설계된 가변부위를 가지는 면역글로불린 분자 또는 이의 절편. 가장 바람직한 것은 대응하는 항유전인자형 항체의 경쇄(light chain) 또는 중쇄(heavy chain)의 CDR의 길이(아미노산 잔기의 수)(예로서, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 17, 18)를 정확하게 가지는 서열 트랙들임.

- 대응 면역글로불린 분자, 이때 상기 서열 트랙 중 하나 이상은 상기 면역글로불린의 중쇄 및/또는 경쇄의 상보성 결정부위(CDR)의 성분이거나 또는 상기 CDR에 인접한 골격 부위(framework region)의 인접한 잔기들과 겹침.

- 대응 면역글로불린 분자, 이때 상기 성분은 상기 CDR의 아미노산 잔기의 30 내지 100%, 바람직하게는 80 내지 100%를 형성함.

- 대응 면역글로불린 분자, 이때 상기 부모 항유전인자형 항체는 마우스 항체 708임. 그러나, 또한 다른 항유전인자형 항-CEA 항체들도 본 발명에 적합함.

- 인간 CD55 항원으로부터 유래한 5 내지 25, 바람직하게는 10 내지 20개의 연속 아미노산 잔기들의 서열 트랙 또는 항유전인자형 항-CD55 항체, 바람직하게는 항체 105AD7의 고변이부위(hypervariable region)를 가변부위 내에 부가적으로 포함하는 대응 면역글로불린 분자.

- 가변부위 내에서 부가적으로 아미노산 치환에 의하여, CEA 양성 인간 암세포에 대한 면역반응에 기여하지 않는 잠재적인 MHC class II 항원결정기가 제거된 대응 면역글로불린 분자.

- CEA 양성 인간 암세포에 반응하는 MHC class I 항원결정기들인 CEA 유래 서열 트랙들, 바람직하게는 TLLSVTRNDV 및 YLSGANLNL을 가변부위 내에 부가적으로 포함하는 대응 면역글로불린 분자, 이때 본 발명의 바람직한 구현예에서 상기 서열들은 상기 면역글로불린의 경쇄 CDR의 일부이거나 또는 하나 이상을 완전하게 형성함.

- CEA 양성 인간 암세포에 대한 면역반응에 기여하는 MHC class II 항원결정기들인 CEA 유래 서열 트랙들을 가변부위 내에 부가적으로 포함하는 대응 면역글로불린 분자.

- 도 4 내지 7에 나타난 서열 중 임의의 것으로부터 선택되는 가변 중쇄 및/또는 도 8 및 9에 나타난 서열 중 임의의 것으로부터 선택되는 가변 경쇄를 포함하는 대응 면역글로불린 분자.

- 그 가변 중쇄 및/또는 경쇄가 하기 군으로부터 선택되는 서열 트랙들과 상동성이 있는 하나 이상의 서열 트랙들을 포함하는 대응 면역글로불린 분자:

(i) 인간 CEA의 345-354

(ii) 인간 CEA의 387-396

(iii) 인간 CEA의 571-579

(iv) 인간 CEA의 629-645

(v) 인간 CD55의 148-167.

- 생물학적으로 유효한 양의 상기 기술한 면역글로불린 분자, 면역보강제(adjuvant) 및 선택적으로 약학적으로 허용가능한 담체(carrier), 희석제 또는 부형제(excipient)를 함유하는 약학적 조성물, .

· 상기 상술한 임의 청구항의 면역글로불린 분자 또는 약학적 조성물의, CEA 양성 고형의 또는 전이성의 종양을 가진 인간 개체의 백신화를 위한 의학의 제조를 위한 용도, 이때 바람직하게는 상기 백신화는 상기 개체 내에서 CD8 및/또는 CD4 양성 T 세포의 자극 향상을 유발함.

· 하기의 단계들을 포함하는, CEA(암 배아 항원) 양성 고형의 또는 전이성의 종양을 가진 인간 개체의 치료에 적합한 합성적으로 설계된 면역글로불린 분자에 기초한 백신 분자의 제조 방법:

(i) 비인간 항유전인자형 항-CEA 항체, 바람직하게는 마우스 항체 708을 선택하는 단계,

(ii) 상기 비인간 불변부위를 인간 불변부위로 교체하는 단계,

(iii) 하나 이상의 고변이부위 (CDR) 를, 상기 CDR에 인접한 골격 잔기들이 포함되도록, CEA 유래의 서열 트랙들로 부분적으로 또는 완전히 교체하는 단계, 및 선택적으로 하기 군으로부터 선택되는 단계들 하나 이상을 포함하는 방법:

(iv) 가변부위 내의 서열 트랙들을 CD55 항원 유래의 서열 트랙 또는 항유전인자형 항-CD55 항체의 CDR들로 교체하는 단계,

(v) 가변부위 내의 서열 트랙들을 CEA 양성 인간 암세포에 대한 면역반응에 기여하는 MHC class I 및/또는 MHC class II 항원결정기들인 서열 트랙들로 교체하는 단계,

(vi) 가변부위 내에서 CEA 양성 인간 암세포에 대한 면역반응에 기여하지 않는 잠재적 MHC class II 항원결정기들을 제거하는 단계.

본 발명의 첫번째 구현예는 인간 불변부위를 가지는 항체 708을 포함하는 항체 분자의 준비이다.

두번째 구현예는 인간 불변부위를 가지며 V 부위 영역의 변형이 특징인 항체 708의 준비이다. 상기 분자의 하나 이상의 CDR 부위 내로 바람직한 변형을 수행하며 그 결과로서 인간 CEA와의 상동성을 가진 서열 트랙들이 존재하게 된다. 이러한 인간 CEA 서열 요소들을 '원하는' 항원결정기로 간주한다. 추가적인 구현예들에서, 다른 CEA 유래의 서열 요소들의 도입으로 원하는 CEA 항원결정기들의 수를 추가적으로 증가시킨다. 또 다른 구현예들에서, 아미노산 잔기들을 치환함으로써 상기 서열내로 대안적인 원하는 항원결정기들을 포함시킨다. 특별히 원하는 대안적인 항원결정기들은 인간 CD55 항원 또는, 그 자신이 상기 CD55 단백질의 분자 모방체를 제공하는 항유전인자형 단클론항체인 105AD7로 칭하는 쥐의 항체로부터의 서열 요소들이다[Maxwell-Armstrong, C. A., et al (2001) *Bri. J. Cancer* 84 : 1433-1436]. 이러한 원하는 부가적인 항원결정기들을 상기 항체 V 부위 내의, CDR 및/또는 인접 골격 영역을 포함하고 있을 수 있는 위치로 삽입한다.

본 발명의 추가적인 구현예에서, 원하지 않는 항원결정기 서열들이 제거된 V 부위 영역 내에 하나 이상의 원하는 항원결정기 서열들이 포함된 항체 서열들이 제공된다. 상기 예에서 그러한 서열들은 MHC class II 유도 항원결정기들이며, 인간 개체군에 남아있는 하나 이상의 MHC class II 동종이형(allotype)에 대한 리간드(ligand)를 구성하는 펩티드 내의 구별(judicial) 아미노산 치환으로 제거된다.

본 발명의 방법하에서, 4개의 서로 다른 H쇄 V 부위 서열 및 2개의 서로 다른 L쇄 V 부위 서열이 제공된다. 본 명세서에서는 완전한 항체 분자를 구성하기 위하여 제공될 수 있는 H쇄 및 L쇄의 가능한 조합들에 대한 제한이 없다. 상기 완전한 항체 분자의 구성은 재조합 DNA 방법 및 당업계에 잘 알려진 항체 분자 정제 및 조작 방법에 의하여 성취될 수 있다. 이에 기술된 폴리펩티드 서열을 코딩하는 폴리뉴클레오티드(예로서 DNA) 분자들은 동등하게 본 발명의 영역하에 있는 것으로 간주되며 바람직한 구현예들이다.

본 발명의 항체 분자들은 무손상 상태로 사용하는 것으로 의도되었으나, 이는 한정을 의미하는 것이 아니며, 상기 항체들의 면역원성 절편들의 사용 역시 고려된다. 따라서 재조합 방법 또는 통상적인 항체 단백질 분해성 절단 및 정제 방법을 사용하여 제조되는 재조합 절편들을 사용하여, Fv, Fab 또는 F(ab')₂ 또는 기타 유도체들을 제조할 수 있다.

본 발명의 목적은 이에 개시된 항체들이 면역반응 유발의 및 가장 바람직하게는 치료적 양의 본 발명의 하나 이상의 변형 항체 분자를 포함하는 조성물에서 유용하다는 것을 보여주는 것이다. 상기 면역반응 유발의 또는 치료적 양은 치료를 받는 환자 내에서 면역반응을 자극할 수 있는 및 그 면역반응이 가장 바람직하게는 체액성 및 세포성 반응 둘 다인 항체 조성물의 양이다. 가장 바람직한 것은 치료적 양이 결과적으로 환자들의 면역체계로 하여금 CEA를 발현하는 종양 세포들에 대하여 증가된 활성을 나타내도록 하게 하는 조성물을 제공하는 것이다. 상기 조성물들은 종양 세포를 제거하거나 또는 종양의 성장을 정지시키는데 있어서 치료 효과를 가질 것이다.

도면의 간단한 설명

도 1은 708 항유전인자형 항체와 CEA의 CDR 부위의 서열 비교를 제공한다. 볼드체의 아미노산은 상동성을 보이는 것이며 밑줄친 것은 그 다음의 아미노산에서의 상동성 또는 유사성을 가진 것이다.

도 2는 상기 708 항유전인자형의 중쇄의 CDR2 및 CDR3 가변부위의 MHC 결합 모티프(motif) 분석의 예를 제공한다. 볼드체의 아미노산은 상동성을 보이는 것이며 밑줄친 것은 그 다음의 아미노산에서의 상동성 또는 유사성을 가진 것이다.

도 3은 항체 708의 가변부위의 단백질 서열(단일 문자 코드)을 보여준다. A = 중쇄; B = 경쇄. 밑줄친 서열들은 CDR이다. FR = 골격 서열. CDR 지정은 Kabat의 방법에 따르나[Martin, A. C. R. (1996), *PROTEINS: Structure, Function and Genetics*, 25 130-133], 잔기에의 번호부여(numbering)는 본 발명에 따라 개별적으로 변경되었다.

도 4는 708VH1의 단백질 서열(단일 문자 코드)을 보여준다. 이 서열에는 원하지 않는 항원결정기가 제거된 708VH가 포함되어 있다. 밑줄친 서열들은 CDR들이다.

도 5는 708VH2의 단백질 서열(단일 문자 코드)을 보여준다. 이 서열에는 원하지 않는 항원결정기가 제거되어 있으며 추가적인 CEA 관련 서열들이 포함된 708VH가 포함되어 있다. 밑줄친 서열들은 CDR들이다.

도 6은 708VH3의 단백질 서열(단일 문자 코드)을 보여준다. 이 서열에는 원하지 않는 항원결정기가 제거되어 있으며 추가적인 CEA 및 CD55 유래 서열들이 포함된 708VH가 포함되어 있다. 밑줄친 서열들은 CDR들이다.

도 7은 708VH4의 단백질 서열(단일 문자 코드)을 보여준다. 이 서열에는 원하지 않는 항원결정기가 제거되어 있으며 추가적인 CEA 및 105AD7 유래 서열들이 포함된 708VH가 포함되어 있다. 밑줄친 서열들은 CDR들이다.

도 8은 708VL1의 단백질 서열(단일 문자 코드)을 보여준다. 이 서열에는 원하지 않는 항원결정기가 제거된 708VL이 포함되어 있다. 밑줄친 서열들은 CDR들이다.

도 9는 708VL2의 단백질 서열(단일 문자 코드)을 보여준다. 이 서열에는 원하지 않는 항원결정기가 제거되어 있으며 추가적인 CEA 관련 서열들이 포함된 708VL이 포함되어 있다. 밑줄친 서열들은 CDR들이다.

도 10은 CEA의 단백질 서열(단일 문자 코드)을 보여준다.

도 11은 CD55 항원의 단백질 서열(단일 문자 코드)을 보여준다.

실시예

본 발명의 분자들은 항암 백신의 활성 성분으로서의 유용성을 가지는 변형된 항체 분자들이다. 따라서 본 발명은 인간 질병의 치료적 처치에 관련되어 있다. 상기 분자들은 708로 칭하는 항유전인자형 항체로 출발한다. 상기 708 단클론항체는 항-CEA 단클론항체인 NCRC23에 대항하여 일어났다. 본래의 708 항체는 NCRC23과 이의 항원과의 상호작용을 차단할 수 있으며 이 항원에 특이적으로 반응하는 항체 및 T 세포 반응 둘 다를 유도할 수 있으나, 천연의 마우스 708 항체는 정상적인 공여자들로부터의 림프구를 자극할 수 없었다[Durrant, L. G. et al (1992), *ibid*].

항암 백신으로서 기능할 수 있는 능력을 개선시키기 위하여, 상기 본래의 708 항체에 다수의 변형을 일으켰다. 상기 변형들의 결과는 이에 개시된 조성물들이었으며, 이들은 본 발명의 구현예들이다. 본래의(부모의) 마우스 708 항체에 대한 모든 변형은 당업계에 널리 공지된 유전공학적인 방법을 이용하여 수행할 수 있다.

첫번째 이러한 변형은 변이 708 분자들 각각에 대하여 공통적이다. 이 변형은 이들의 불변부위 영역들을 이들이 인간의 불변부위 단백질 서열들이 되도록 조작하는 것이다. 당 분야에서 통상 이러한 유전자 조작된 항체들을 키메라 항체(chimeric antibody)라고 칭한다. 본 발명의 맥락 안에서, 상기 마우스 708 항체의 키메라 항체로의 전환은 상기 변형된 708 분자의 항암 백신으로서 작용하는 능력에 관하여 매우 의미심장한 결과를 가진다. 본 발명자들은 미감작(naive) T 세포 반응의 자극에는 수지상세포(dendritic cell) 등의 항원 제시 세포(antigen presenting cell)에 대한 우수한 표적화가 필요하다는 것을 인식하였다. 본 발명의 상기 변형된 708 분자들 각각의 인간 불변부위 영역은 수지상 및 다른 세포 상의 Fc (CD64) 수용체(receptor)를 통한 상기 분자의 흡수(uptake)를 가능하게 한다. 상기 경로를 통한 흡수는 보조(helper) 및 세포독성 T 세포 반응 둘 다를 초회항원자극하는 결과로 나타났다[Durrant, L. G., et al (2001), *Int. J. Cancer*, 92 : 414-420]. 원칙적으로 상기 Fc 수용체 체계에 의하여 인식될 수 있는 아형(isotype)은 어떠한 것이라도 본 발명의 개요 하에 포함될 수 있는 것이 자명함에도 불구하고, 본 경우에, 인간의 IgG1 아형이

708 유래의 V-부위로 유전자 조작되었다.

상기 708 항체의 첫번째 변형이 키메라 항체로의 전환이며 따라서 그 불변부위의 유전자 조작이 포함될 때, 이후의 변형들, 및 따라서 본 발명의 구현예들은 상기 부모 708 항체의 V 부위의 유전자 조작 쪽으로 유도된다. 708의 V 부위 서열들은 이전에 기술되었으며[W098/52976], 그 단백질 서열들은 도 3으로서 여기서 다시 제공된다. 그 상보성 결정부위(CDR) 서열이 CEA 및, NCA 등의 관련 서열들과의 상동성 부위가 있는지에 대하여 분석되었다. CDRH2는 CEA의 세 특정 부위와의 상동성을 보이며 이 중 둘은 또한 NCA와의 상동성을 공유한다. 세번째 부위는 CEA에 특이적인 영역에 있다. 본래의 Ab1 NCRC23가 CEA 특이적 부위에 결합되기 때문에, 상기 항유전인자형 708이 CEA-상동 서열을 포함한다는 것을 발견한 것이 예상치 못한 일은 아니다. CDRH2에서 발견된 상기 부위 외에, CDRH3는 CEA의 세 부위와의 상동성을 보였으며, 이들은 또한 NCA와의 상동성을 공유한다. 폴리펩티드 및 폴리뉴클레오티드 서열들의 비교 분석은 당업계에 잘 알려져 있으며, 다수의 소프트웨어 도구들이 이 방법들을 가능하게 한다. 상기 기술한 항체 708 및 CEA 서열들의 비교에 사용되는 이러한 것들 중 한가지는 'DNASTAR'인데(DNASTAR Inc, 메디슨, 위스콘신, 미국), 이는 단백질 서열 유사성에 유용한 Lipman amp; Pearson[Lipman amp; Pearson (1985), *Science* 227 :1435-1441]을 포함하는 여러 정렬 알고리즘(alignment algorithm)을 수행한다.

또한, 인식된 T 세포 항원결정기 모티프와 일치하는 상기 항체 708의 중쇄 및 경쇄 및 인간 CEA의 영역들에 대한 분석이 수행되었다. 이러한 분석은, 예를 들어 W098/52976에 기술된 바 또는 SYFPEITHI[Rammensee, H. G. et al (1999) *Immunogenetics* 50 :213-219] 등의 데이터베이스 참조 등 당업계에 공지된 방법들을 사용하여 수행할 수 있다. 한 분석은 HLA-A3, A11, Aw68, B35, B53, DR1, DR3, DR7 및 DR8 결합 모티프들을 포함하고 있는 CDRH2 부위를 보여준다. CEA 서열 분석은 동시에 상기 HLA-A3, DR1 및 DR7 모티프들이 CDRH2에 대한 상동성을 가지는 CEA 특이적 영역에도 존재한다는 것을 확증하였다. CDRH3 부위는 HLA-A2, A3, A11, A24, B27, DQ7, pan DR 및 DR1 결합 모티프들을 포함하고 있었다. 상기 HLA-A3 모티프는 또한 CEA의 상동 부위 내에서도 발견되었다. CEA의 이 부위는 또한 NCA와의 상동성을 보이나, 류신(leucine)에서 아르기닌(arginin)까지의 NCA 내에서 하나의 아미노산 차이가 있다. 상기 류신은 A3 결합에 있어서 핵심 포켓(pocket) 잔기이기 때문에, NCA를 발현하는 세포들이 HLA-A3의 정황에 있어서 이 항원결정기를 나타낼 것 같지는 않다. 이 결과들은 HLA-DR1 또는 7 및 HLA-A3 표현형을 가진 환자들이 상기 본래의 708에 대하여 보조 및 세포독성 T 세포 반응 둘 다를 보인다는 것과 가장 가망성있게는 자신들의 CEA 양성 종양들에 대하여 반응한다는 것을 암시하였다.

이러한 결과들 및 관찰들을 종합할 때, 상기 본래의 708 V-부위 서열들이 CEA 분자의 분자 모방체를 제공한다는 해석에 도달하게 되었다. 나아가 상기 모방은 CEA 서열 상의 다수의 서로 다른 위치로 향해지는 것으로 보이며, 차례로, 이러한 서열들은 다수의 T-보조 및 세포독성 T 세포 유형의 모티프들을 따른다. 본 발명자들은 상기 분자 내에 CEA 유사 서열의 정도가 증가되도록 서열 변형을 일으킴으로써 상기 본래의 708 서열의 고유의 CEA 유사 면역원성 수준을 증가시키고자 하였다. 상기 전략은, 부가적인 CEA 유래의 서열 요소들을 부모 708 V 부위의, 도입되는 CEA 유래 서열과의 상동성이 기존에는 존재하지 않던 위치에 도입하는 것을 포함하는 것으로 확장되었다. 이는, 특정 구역(zone)(CDR)에서 서열 과변이(sequence hypervariability)를 허용할 수 있는 상기 면역글로불린 V 부위 고유의 유연성 및 임의의 다른 면역글로불린 분자로 발현되고 처리될 수 있는 능력에 의하여 가능하게 되었다. 이 과정은 유전자 조작된 항체가 임의 형태의 항원 결합 활성을 유지하는데 대하여 임의의 필요조건이 없기 때문에 더욱 촉진되며, 실제로, 본 발명의 상기 준비에 의하여 임의의 항원, 특히 세포 결합 항원과의 상호작용 부재가 가능하게 된 것은 가장 바람직한 것이다.

본 발명의 폴리펩티드 분자들은, 환자의 면역체계가 CEA를 발현하는 세포들을 제거하는데로 다시 향하도록 대상 환자의 면역체계에 대한 면역원성 항원결정기를 제공하는 것을 목적으로 설계된다. 따라서, 면역체계의 체액성 및 세포성 완(arm)을 일으키는 것이 중요하며, 이는 유력한 T 보조 항원결정기 및 MHC class I 제한 항원결정기 둘 다에 의하여 제공된다. 다수의 MHC class I 제한 항원결정기는 이전에 CEA 서열 내에서 확인되었으며, 일부 경우 임상 시험의 대상이었다[Kwong, Y. et al (1995) *JNCI* 87 :982-990]. 본 발명에서, MHC class I 항원결정기로 알려진 CEA 유래의 서열 트랙인 TLLSVTRNDV (잔기 345-353) 및 YLSGANLNL (잔기 571-579)를 상기 경쇄의 CDR 내로 유전자 조작하였다.

CEA 유래의 서열 트랙들의 상기 용도 외에, 본 발명의 추가적인 중요한 특징은 CD55 서열들 및 항체 105AD7로부터의 서열 트랙들의 형태인 CD55 일부의 모방본의 도입이다.

상기 CD55 분자는 정상적인 인간 조직들에서 널리 발현되며, 거기에서 이는 보충 및 자연 세포독성(NK) 세포 매개의 용해(lysis)로부터 세포를 보호하는 작용을 한다. 면역요법의 표적으로서의 CD55의 타당성은 다양한 종양 유형들 상에서의 CD55의 발현 증가에 대한 관찰 및 항체 105AD7을 사용한 연구들에서 유래한다. 이 항체는 CD55에 대한 항원결정기를 모방하며, 임상 시험들은 백신화 전략에서 완전한 105AD7 항체로 처리된 환자에서 T 세포 반응의 자극을 증명하였다[W097/32021 및 그에 개시된 모든 참조문헌].

본 발명은 CEA, CD55 및/또는 105AD7로부터 유래하는 면역원성 항원결정기 조합의 특색을 가지는 조성물을 처음으로 제공한다. 나아가, 예로서 등가의 항원결정기들이 합성 펩티드로서 개별적으로 제공되는 방법들에 비하여 유의

미한 기술적 및 생물학적 장점을 제공하는 면역글로불린 분자의 일부로서, 인간 면역 반응의 자극에 관하여 각각 증명된 생물학적 효능을 가지는 항원결정기들이 제공된다. 분자 실체들로서, 본 발명의 폴리펩티드는 '항원화된 항체'로 기술될 수 있을 것이다. 문헌에서, MHC class I 및 MHC class II 형의 항원결정기 조합의 특색을 가지는, 항원화된 항체가 포함된 항체가 보고되어 있다[Zaghouani, H. et al (1993) *Eur. J. Immunol.* 23 :2746-2750; Xiong, S. et al (1997) *Nature Biotech.* 15 :882-886 및 이에 기술된 참조문헌]. 본 발명자들이 이해하고 있는 바로는, 이러한 접근방법들 중 자가 항원에 초점이 맞춰져 있거나, 유전자형 결정인자를 이용하였거나 또는 본 발명에 따른, 원하지 않는 면역원성 항원결정기들의 유전자조작되지 않은 서열들을 제거하는 단계들을 취한 것이 없다. 유사하게, 이전의 이러한 연구들 중 암 면역요법에 초점이 맞춰진 조성물을 제공한 것이 없다.

따라서 본 발명은 상기 CEA 분자의 부위에 대하여 동일성을 공유하는 서열 트랙들을 포함하는 변형 V 부위 서열을 제공한다. 본 발명은 또한 상기 CD55 분자 내에 존재하는 서열 트랙들과 동일성을 공유하는 V 부위 서열을 개시한다. 또다른 추가적인 구현예에서, 항체 107AD5로부터의 서열 트랙을 포함하도록 변형된 V 부위 서열이 개시된다. 구체적으로, CEA 서열로부터의 잔기 345-354, 386-397, 571-579 및 629-645와 동일한 잔기; 및 CD55 분자의 잔기 148-167과 동일한 잔기들을 포함하는 V 부위 서열이 제공된다. 항체 107AD5의 VH쇄의 골격 1의 대다수에 해당하는 서열이 본 발명의 한 개시된 변이체 내에 삽입된다. 구체적으로 도 7의 서열에 따르는 조성물이 바람직하며 이는, 본원에 기술된 708VH3 서열 내의 해당 부위를 대체하는, 107AD5 VH 골격 1 부위의 서열 요소를 포함하고 있다.

상기 변형된 708 분자의 VH쇄 내로 삽입된 CEA 서열 요소들에 대하여, 상기 삽입이, 부모 분자 내에 상기 CEA 서열에 대한 유의미한 상동성이 존재하였던 부위내로 이루어졌다는 것은 자명할 것이다. 따라서, 도 5에 나타난 바와 같은 바람직한 VH 조성물은 VH쇄 내의 CDRH2 부위를 포함하는 구역으로 삽입된 CEA 잔기 629-645를 포함하며, 또한 VH쇄 내의 CDRH3 부위를 포함하는 구역으로 삽입된 CEA 잔기 386-397을 포함한다. 바람직한 VL쇄 조성물은 상기 VL쇄 내의 CDRL1 및 CDRL3 구역을 각각 포함하는 부위로 삽입된 CEA 서열 요소 345-354 및 571-579를 제공한다(도 9). 148-167 부위 등의 CD55 서열 요소들을 포함하는 바람직한 조성물은 VH쇄 내의 골격 1의 원위부(distal part) 및 CDRH1 전체를 포함하는 구역 내로 삽입된 상기 CD55 서열을 포함한다(도 6).

본원에서, '면역원성(immunogenicity)'이라는 용어는, 숙주 동물에서, 특히 상기 '숙주 동물'이 인간인, 체액성의 및 또는 T 세포 매개의 반응을 일으키거나, 유도하거나, 또는 다르게는 촉진하는 능력을 포함한다는 것은 자명하다.

본원에서, '항체' 또는 '면역글로불린'이라는 용어는 그의 가장 넓은 의미로 사용되며, 구체적으로, 원하는 생물학적 활성을 나타내는 한, 무손상의 단클론항체, 다클론항체, 둘 이상의 무손상 항체로부터 형성되는 다중특이(multispecific) 항체(예로서 이중특이(bispecific) 항체) 및 항체 절편들을 포함한다. 상기 용어는 일반적으로 서로 결합되며 상이한 결합 특이성을 가지는 둘 이상의 항체 또는 이들의 절편으로 구성된 이중항체(heteroantibody)를 포함한다.

무손상 항체들은 그들의 불변부위의 아미노산 서열에 좌우되어 상이한 '항체 (면역글로불린) 부류들'로 할당될 수 있다. 5개의 주요 무손상 항체 부류(class)가 있으며: IgA, IgD, IgE, IgG, 및 IgM, 및 이들 중 몇몇은, 예로서 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, 및 IgA2 등, 추가로 '하위부류(subclass)'(아형)로 분할될 수 있다. 상기 상이한 항체 부류들에 대응하는 중쇄 불변영역은 각각 α , δ , ϵ , γ 및 μ 로 불린다. 본 발명에 따르는 바람직한 주요 항체 부류는 IgG, 보다 자세히는 IgG1 및 IgG2이다.

항체들은 보통 두 개의 동일한 경(L)쇄 및 두 개의 동일한 중(H)쇄로 구성된 약 150,000의 분자량을 가지는 당단백질(glycoprotein)이다. 각 경쇄는 하나의 공유 이황화 결합으로 중쇄에 연결되어 있으며, 한편 이황화 결합의 수는 서로 다른 면역글로불린 아형의 중쇄들에 따라 다양하다. 각 중쇄 및 경쇄는 또한 규칙적인 간격으로 떨어져 있는 쇠내 이황화 다리들을 가진다. 각 중쇄는 한쪽 말단에 다수의 불변영역으로 이어지는 가변영역(VH)을 가진다. 상기 가변부위는, 항원 결합 부위를 포함하며 상기 항체의 특이성을 제공하는 고변이부위 또는 'CDR' 부위, 및 상기 항체의 친화성/결합력(avidity)에 관하여 중요한 'FR' 부위를 포함하고 있다. 상기 고변이부위는 통상 '상보성 결정부위' 또는 'CDR'로부터의 아미노산 잔기 (예로서, 경쇄 가변영역 내의 잔기 24-34 (L1), 50-56 (L2) 및 89-97 (L3) 및 중쇄 가변영역 내의 31-35 (H1), 50-65 (H2) 및 95-102 (H3)); 및/또는 '고변이 루프'로부터의 아미노산 잔기 (예로서, 경쇄 가변영역 내의 26-32 (L1), 50-52 (L2) 및 91-96 (L3) 및 중쇄 가변영역 내의 26-32 (H1), 53-55 (H2) 및 96-101 (H3); Chothia and Lesk *J. Mol. Biol.* 196: 901-917 (1987))를 포함하고 있다. 상기 'FR' 잔기들 (골격 부위)은 본원에서 정의된 바와 같은 고변이부위가 아닌 다른 가변영역 잔기들이다. 각 경쇄는 한쪽 말단에 가변영역(VL)을 가지며 다른 말단에 불변영역을 가진다. 상기 경쇄의 불변영역은 상기 중쇄의 첫번째 불변영역과 일직선상에 있으며, 상기 경쇄 가변영역은 상기 중쇄의 가변영역과 일직선상에 있다. 특정 아미노산 잔기들은 상기 경쇄 및 중쇄의 가변영역들 사이의 경계면을 형성하는 것으로 여겨진다. 임의 척추동물 종으로부터의 항체의 '경쇄'는, 그 불변영역의 아미노산 서열에 기초하여 카파(κ) 및 람다(λ)라고 불리는 명백히 다른 두 유형 중 하나에 할당될 수 있다.

'상보성 결정부위' (CDR)라는 용어는 상기 V-부위 영역의 나머지에 관련된 서열 내의 고변이성의 항체 V-부위 내의 서열 구역(segment)들을 지칭한다. 항원 결합 항체들의 CDR은 상기 항체 항원 상호작용을 결정함에 있어서 중요하다. 각 V부위는 세 개의 CDR을 포함하며, 협약에 의하여 상기 VH로부터의 CDR은 CDRH1, CDRH2 및 CDRH3로 칭하여진다. 유사하게, 경쇄의 CDR은 CDRL1, CDRL2 및 CDRL3로 칭하여진다. 상기 CDR들의 곳곳에 '골격' (FR) 구

역 또는 영역으로 칭하는 비교적 불변인 서열 부위들이 산재해 있다.

본 발명에서, VH 및 VL 쇠 둘 다의 CDR 및 골격 부위에 대하여 변형을 가하였다. 상기 변형 중 일부는 분산된 단일 아미노산 치환이며, 다른 경우, 새로운 서열 트랙들을 상기 부모 V부위 서열 내로 삽입하였다.

본원에서 사용된 바, VH는 길이가 약 110 내지 125 아미노산 잔기이며 그 서열이 VL과 협력하여 면역글로불린 분자를 구성할 수 있는 본원의 특화된 임의의 VH 쇠에 해당하는 폴리펩티드를 의미한다. 유사하게, VL은 길이가 약 95-130 아미노산 잔기이며 그 서열이 VH와 협력하여 공동 연합 및 상기 완전한 면역글로불린 사량체 구성의 능력이 있는 본원의 특화된 임의의 VL 쇠에 해당하는 폴리펩티드를 의미한다. 완전한 길이의 면역글로불린 중쇄는 분자량이 약 50 kDa이며, N 말단에서는 VH 유전자로 암호화되어 있고 C 말단에서는 그 불변부위 유전자들 중 하나 (예로서 γ) 로 암호화되어 있다. 유사하게, 완전한 길이의 경쇄는 분자량이 약 25 kDa이며, N 말단에서는 V부위 유전자로 암호화되어 있고 C 말단에서는 κ 또는 λ 불변부위 유전자로 암호화되어 있다.

당업계에서, '항체'라는 용어는 항원과 결합, 상호작용 또는 다르게는 연합할 수 있는 분자를 가리키는 것으로 받아들여지며, '항원'이라는 용어는 상기 항체와 상호작용할 수 있는 물질을 지칭하는데 사용된다.

본 발명의 맥락에서, 상기 정의되어 있으며 하기에 나오는 바 변형된 면역글로불린 서열은 특이적 면역원성 펩티드 서열의 전달을 위한 운반체로서 작용하도록 구성되며 본원에 개시된 임의의 폴리펩티드 서열들의 조합으로부터 생기는 면역글로불린이 항원에 대한 결합 실체물로 기능하리라는 예상 또는 그러한 바램이 없다는 것은 쉽게 인지될 것이다. 항원 결합 외의 모든 면에서, 본원에 개시된 분자들은 항체로서 동일한 영역 구조 및 불변부위 서열을 유지하며, 이로써 계속하여 항체로 간주된다.

본원에 사용된 바 '단클론항체'라는 용어는 실질적으로 동종의 항체 집단으로부터 수득한 항체를 지칭하는 데, 즉, 상기 집단을 구성하는 개별 항체들은 소량으로 존재할 수 있는 가능한 자연발생적인 돌연변이를 제외하고는 동일하다. 단클론항체는 고도로 특이적이어서 단일 항원 부위로 이끌린다. 나아가 상이한 결정인자(항원결정기)들로 이끌리는 서로 다른 항체를 포함하는 다클론항체 표본과 달리, 각 단클론항체는 상기 항원의 단일 결정인자로 이끌린다. 상기 특이성에 더하여, 상기 단클론항체들은 다른 항체들로 오염되지 않고 합성될 수 있다는 점에서 이롭다. 단클론항체를 만드는 방법에는, Kohler and Milstein (1975, *Nature* 256,495) 에 의한 및 'Monoclonal Antibody Technology, The Production and Characterization of Rodent and Human Hybridomas' (1985, Burdonet al., Eds, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Volume 13, Elsevier Science Publishers, Amsterdam)에 기술된 하이브리도마 방법이 있으며, 주지의 재조합 DNA 방법으로도 제조할 수 있다(참조, 예로서, US 4,816,567). 단클론항체는 또한, 예를 들어, Clackson *et al.*, *Nature*, 352:624-628 (1991) 및 Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222: 58,1-597(1991)에 기술된 방법들을 이용하여, 파지(phase) 항체로부터 분리할 수 있다.

'키메라 항체'라는 용어는 그 중쇄 및/또는 경쇄 일부가 특정 종으로부터 유래한 또는 특정 항체 부류 또는 하위부류에 속하는 항체 내의 상응하는 서열과 동일하거나 또는 상동인 한편 상기 쇠(들)의 나머지 부분은 또다른 종으로부터 유래한 또는 또다른 항체 부류 또는 하위부류에 속하는 항체 및 원하는 생물학적 활성을 나타내는 한 이러한 항체들의 절편과 동일하거나 또는 상동인 항체를 의미한다(예로서, US 4,816,567; Morrison *et al.*, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855 (1984)). 키메라 및 인간화 항체를 제조하는 방법 또한 당업계에 공지되어 있다. 예를 들어, 키메라 항체를 만드는 방법에는 Boss (Celltech) 및 Cabilly (Genentech)에 의한 특허들(US 4,816,397; US 4,816,567)에 기술된 것 등이 있다.

본 발명의 면역글로불린은 완전한 항체이거나 이들의 절편일 수 있다. '항체 절편'은 무손상 항체의 일부를 포함하며, 바람직하게는 이의 항원-결합 또는 변이 부위를 포함한다. 항체 절편의 예로는 Fab, Fab', F(ab')₂, Fv 및 Fc 절편, 디아바디(diabody), 선형 항체, 단일사슬 항체 분자; 및 항체절편(들)으로부터 형성된 다중특이 항체가 있다. '무손상' 항체는 항원결합 변이 부위, 뿐만 아니라, 경쇄 불변 영역(CL) 및 중쇄 불변 영역 CH1, CH2 및 CH3를 포함하는 항체이다. 바람직하게는, 상기 무손상 항체는 하나 이상의 효과기 작용을 가진다. 항체를 파파인(papain)으로 소화시키면 'Fab' 절편이라고 불리는 두 개의 동일한 항원결합 절편이 생산되는데, 각각 단일한 항원결합 부위(site) 및 CL 및 CH1 부위, 및, 그 이름이 그의 쉽게 결정화하는 능력을 반영하는 잔류 'Fc' 절편을 포함한다. 상기 항체의 'Fc' 부위는 대개 IgG1 또는 IgG2 항체 주요 부류의 CH2, CH3 및 경첩부위(hinge region)를 포함한다. 상기 경첩부위는 상기 CH1 부위를 CH2-CH3 부위에 결합시키는 약 15개의 아미노산 잔기 군이다. 펩신(pepsin)으로 처리할 경우 두 개의 항원결합 부위를 가지며 여전히 항원을 교차결합시킬 수 있는 'F(ab')₂' 절편이 산출된다. 'Fv'는 완전한 항원인식 및 항원결합 부위를 포함하고 있는 최소한도의 항체 절편이다. 이 부위는 치밀한 비공유 결합 상태인 하나의 중쇄 및 하나의 경쇄 가변 영역의 이량체(dimer)로 구성되어 있다. 바로 이러한 형태로서 각 가변 영역의 세 고변이 부위(CDR)가 상호작용하여 VH-VL 이량체의 표면에 항원결합 부위를 규정짓는다. 집합적으로, 상기 6개의 고변이 부위는 상기 항체에 대한 항원결합 특이성을 부여한다. 그러나, 완전한 결합 부위보다는 친화성이 더 낮지만, 단일한 가변 영역 (또는 항원에 대하여 특이적인 세 고변이 부위만을 포함하는 Fv의 절편)이라도 항원을 인식하고 결합할 능력을 가진다. 상기 Fab 절편은 또한 상기 경쇄의 불변 영역 및 상기 중쇄의 첫번째 불변 영역(CH1)을 포함한다. 'Fab'' 절편은 상기 항체 경첩부위로부터의 하나 이상의 시스테인(cysteine)을 포함하는, 중쇄 CH1 영역의 카르복시 말단에서의 몇

몇 잔기의 부가로서 Fab 절편과 다르다. F(ab')₂ 항체 절편은 처음에는 그들 사이에 경첩 시스템을 가지는 Fab' 절편 쌍으로 생산되었다. 항체 절편의 다른 화학적 결합이 또한 공지되어 있다(참조, 예로서 Hermanson, Bioconjugate Techniques, Academic Press, 1996; US 4,342,566). '단일사슬 Fv' 또는 'scFv' 항체 절편은 항체의 V 및 V' 영역을 포함하며, 이때 이 영역들은 단일 폴리펩티드 사슬에 존재한다. 바람직하게는, 상기 Fv 폴리펩티드는 상기 VH 및 VL 영역 사이에, 상기 scFv가 원하는 항원 결합 구조를 형성하도록 하는 폴리펩티드 연결가닥(linker)을 추가로 포함한다. 단일사슬 Fv 항체는, 예를 들어 Pluckthun (The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, Vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994)), W093/16185; US 5,571,894; US 5,587,458; Huston et al. (1988, Proc. Natl. Acad. Sci. 85, 5879) 또는 Skerra 및 Plueckthun (1988, Science 240,1038)로부터 공지되어 있다.

본 발명의 면역글로불린은 또한 이중특이 항체일 수 있다. '이중특이 항체'는 서로 다르게 특이적인 두 개의 항원결합 부위를 가지는 단일의 2가(divalent) 항체 (또는 면역요법적으로 유효한 이의 절편)이다. 예를 들어 첫번째 항원결합 부위는 혈관형성(angiogenesis) 수용체(예로서, 인테그린(integrin) 또는 VEGF 수용체)로 유도되는 반면, 두번째 항원결합 부위는 ErbB 수용체(예로서, EGFR 또는 Her 2)로 유도된다. 이중특이 항체는 화학적 방법(예로서, Kranz et al. (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 5807 참조), '폴리도마(polydome)' 방법(US 4,474,893 참조) 또는 재조합 DNA 방법으로 제조될 수 있으며, 이들은 모두 그 자체로서 공지되어 있다. 추가적인 방법이 WO 91/00360, WO 92/05793 및 WO 96/04305에 기술되어 있다. 이중특이 항체는 또한 단일사슬 항체로부터 제조될 수 있다(예로서, Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. 85, 5879; Skerra 및 Plueckthun (1988) Science 240, 1038 참조).

본 발명의 면역글로불린은 또한 면역접합체(immunoconjugate)일 수 있다. '면역접합체'라는 용어는 항체 또는 면역글로불린 각각 또는 면역학적으로 유효하지 않은 분자에 공유결합으로 융합되어 있는 이들의 면역학적으로 유효한 절편을 지칭한다. 바람직하게는 이 융합 상대는 펩티드 또는 단백질이며, 이는 당화(glycosylation)되어 있을 수 있다. 상기 비항체 분자는 상기 항체의 불변 중쇄의 C-말단 또는 가변 경- 및/또는 중쇄의 N-말단에 연결될 수 있다. 상기 융합 상대는 연결 분자를 통하여 연결될 수 있는데, 이는 대개 3 내지 15의 아미노산 잔기를 포함하는 펩티드이다. 본 발명에 따르는 면역접합체는 수용체 티로신 키나아제(receptor tyrosine kinase), 바람직하게는 ErbB(ErbB1/ErbB 2) 수용체 및 인테그린 길항제 펩티드, 또는 혈관형성 수용체, 바람직하게는 인테그린 또는 VEGF 수용체로 유도되는 면역글로불린 또는 이의 면역요법적으로 유효한 절편 및, 그의 N-말단이 상기 면역글로불린의 C-말단, 바람직하게는 이의 Fc 부분에 연결되는 TNF α 또는 필수적으로 TNF α 및 IFN γ 로 이루어진 융합 단백질 또는 또다른 적당한 시토카인(cytokine)으로 이루어진다. 상기 용어는 또한 이중- 또는 다중-특이 면역글로불린 (항체) 또는 이의 절편을 포함하는 상응하는 융합 구성체를 포함한다.

본 발명의 항체 분자는 백신 제조의 활성 (예로서, 면역원성) 성분으로 기능하는 것으로 이해되며, 이때 '백신'이라는 용어는 면역 반응을 유도하기 위한 대상체 투여용 제제를 설명한다. 본 맥락에서, 상기 면역 반응은, 백신이 부속 요법으로 사용될 수 있음에도 불구하고 종양의 외과적 제거 또는 질병 또는 질병 재발의 예방을 위한 치료적 목적을 가진다.

'T 세포 항원결정기'라는 용어는 본 발명의 이해에 따라 MHC class I 또는 class II에 결합할 수 있고 T 세포를 자극할 수 있으며 및 또는 또한 MHC class I 또는 class II와 복합적으로 (반드시 측정가능하게 활성화시키지는 않고) T 세포에 결합할 수 있는 아미노산 서열을 의미한다.

본원 명세서 및 첨부된 청구항에서 사용된 바 '펩티드'라는 용어는 둘 이상의 아미노산을 포함하는 화합물이다. 상기 아미노산은 (하기 본원에 정의된) 펩티드 결합으로 서로 연결되어 있다. 20개의 상이한 자연발생적인 아미노산들이 펩티드의 생물학적 생산에 관계되어 있으며, 이들 중 임의의 수는 펩티드 사슬 또는 고리를 형성하기 위하여 연결되어 있을 것이다. 펩티드의 생물학적 생산에 이용된 상기 자연발생적인 아미노산은 L-형태를 가진다. 합성 펩티드는, L-아미노산, D-아미노산 또는 상기 상이한 두 형태의 아미노산의 다양한 조합을 이용하는 통상적인 합성 방법을 이용하여 제조할 수 있다. 일부 펩티드는 단지 수 개의 아미노산 단위를 포함한다. 예로서 10개 미만의 아미노산 단위를 가지는 등의 짧은 펩티드는 간혹 '올리고펩티드'로 언급된다. 기타 펩티드들은 많은 수, 예로서 100까지의 또는 그 이상의 아미노산 잔기를 포함하며, '폴리펩티드'로 언급된다. 통상, '폴리펩티드'는 셋 이상의 아미노산을 포함하는 임의의 펩티드 사슬로 간주될 수 있는 반면, '올리고펩티드'는 보통 '짧은' 폴리펩티드의 특정 유형으로 간주된다. 따라서, 본원에서 사용된 바와 같이, '폴리펩티드'에 대한 임의 언급은 또한 올리고펩티드를 포함한다는 것은 자명하다. 나아가, '펩티드'에 대한 임의 언급은 폴리펩티드, 올리고펩티드 및 단백질을 포함한다. 아미노산의 각 다른 배열은 상이한 폴리펩티드 또는 단백질을 형성한다. 형성될 수 있는 폴리펩티드의 수- 및 따라서 상이한 단백질의 수는 실질상 제한이 없을 수 있다.

본 발명은 일련의 변형된 VH 및 변형된 VL 서열을 제공한다. 앞서 언급한 바와 같이, IgG형의 항체 분자는 이항화 다리로 연결된 두 개의 H쇄 및 두 개의 L쇄를 포함한다. 원칙적으로 H쇄 및 L쇄의 임의 조합이 만들어질 수 있다는 것은 자명할 것이며, 한 가지 경로는 동일 세포 내로부터의 관련 항체 유전자의 공동 발현일 것이다. 본 발명에 개시된 다양한 H쇄 및 L쇄 서열에 대하여, 한가지 특히 바람직한 조합의 집합이 H쇄 1개와 L쇄 1개; H쇄 2개와 L쇄 2개, H쇄 3개와 L쇄 2개 및 H쇄 4개와 L쇄 2개의 조합이지만, 임의 특정 H쇄와 임의 특정 L쇄의 조합에 대하여는 제한을

둘 의도는 없다. 기타 조합이 고려될 수 있으며 예를 들어 도 3의 부모 708 V부위 둘 중 하나의 특징을 가진 조합을 포함할 수 있을 것이다.

단백질 유래의 항원의 MHC class I 또는 class II 분자로의 특이적 전달에 있어서, 상기 단백질은, 이후의 방출 및 MHC class I 또는 class II 분자 상에서의 펩티드 제시를 위하여 적절한 구획내에서 바르게 처리되어야 한다. 인간의 불변부위 영역 및 특히 본 발명의 분자의 바람직한 IgG1 아형의 존재는 상기 단백질이 Fc (CD65) 표면 수용체를 통하여 흡수될 항원제시세포 (APC) 로 들어갈 기회를 최대화한다. 일반적으로, 상기 단백질이 세포질 내에서 처리되는 경우에는 MHC class I의 펩티드 제시가 촉진되고, 상기 단백질이 엔도솜 구획(endosomal compartment)내에서 처리되는 경우 MHC class II 상의 펩티드 제시가 촉진된다. 외인성 단백질 항원은 종종 상당한 MHC class II 매개 반응 (특히 보조 T 세포 증식) 그러나 빈약한 MHC class I 매개 반응을 야기한다. 상기 Fc (CD65) 수용체를 통한 흡수는 특별한 경우를 나타내며 그 결과로서 class I 및 class II 항원결정기 둘 다가 최적으로 제시된다[Durrant, L.G.(2001), *ibid*].

상기 CEA 단백질로부터 발생하며 T 세포에 의하여 인식될 수 있는 등의 MHC class I 및 MHC class II 둘 다의 제한 조직-특이적 펩티드들의 공통된 특징은 그 MHC 펩티드 결합 홈에 대한 친화성이 낮다는 것이다[Pardoll, D. (1998) *Nat. Medicine* 4 :525-531]. 이러한 항원결정기들은 따라서, 이와 관련하여, 상기 APC의 표면에 대한 낮은 효율로 제시되며, 이들의 동종 T 세포 집단은 상기 암 항원의 자가-펩티드에 대하여 관대해지지 않았을 수 있다. 따라서, 상기 원하는 암 항원 제시 확률을 최대화할 수 있으며 제시 가능성 있는 경쟁 펩티드의 수가 최소화된, 운반체 내에서 상기 암 항원을 제공할 수 있는 백신 제제를 제공하는 것이 매우 바람직하다. 이러한 점에서, 본 발명의 분자에 대하여 MHC class II 분자와 결합할 수 있는 펩티드가 존재하는지 분석되었으며, 본 발명의 한가지 구현예에서는 상기 결합 상호작용이 더 이상 일어날 수 없도록 그러한 바람직하지 않는 MHC class II 결합 능력을 가진 펩티드 서열을 변경하였다.

APC 표면상에서의 제시를 위한, 펩티드의 주어진 MHC class II 분자에의 결합 능력은 다수의 요인에 좌우되나, 가장 두드러지게는 그의 일차 서열이다. 이는 그의 단백질분해 절단 성향 및 또한 MHC class II 분자의 펩티드 결합 틈(cleft) 내에서의 결합 친화력 둘 다에 영향을 미칠 것이다. 상기 APC 표면 상의 상기 MHC class II 펩티드 복합체는, 상기 펩티드의 노출된 잔기들 및 상기 MHC class II 분자 둘 다에 의하여 주어진 결정인자들을 인식할 수 있는 특정 T 세포 수용체 (TCR) 에 결합면(binding face)을 제공한다. 당업계에는, 예를 들어 널리 반응성 있는 DR 제한 항원결정기를 찾는 방법[W099/61916]을 포함하여, MHC class II 분자에 결합할 수 있는 합성 펩티드를 동정하는 방법들이 있으나, 이러한 펩티드들은 공정 경로 또는 기타 현상들에 기인하여, 모든 상황, 특히 생체 내에서 T 세포 항원결정기로 기능하지 않을 수 있다. 실험적으로 결정된 T 세포 항원결정기 내의 인식되는 서열 모티프를 스캐닝하는 전산 수단에 의하여 또는 다르게는 MHC class II 결합 펩티드를 예측하는 전산 기법을 이용하여 T 세포 항원결정기를 검출할 수 있는 방법이 또한 제공되어 왔다. 한가지 예는 W002/069232에서 제공되는데, 이는 인간의 MHC class II DR 동종이형의 하위 집합에 결합할 잠재 능력을 가진 폴리펩티드 서열 동정에 대한 전산적 트래딩(threading) 접근 방법을 교시한다.

본 발명의 특정 목적은 백신에 대한 면역반응이 원하는 T 세포 항원결정기 집합에 최대한 집중되어 있으며 원치 않는 잠재적 T 세포 항원결정기의 수가 감소된 폴리펩티드 백신 분자를 제공하는 것이다. 이전에 개시된 MHC class II 분자에 대한 708 유래의 펩티드의 결합 성향을 규명하는 임의 방법을 응용하는 것이 가능하다[W098/59244; W098/52976; W000/34317, W002/069232]. 실제로, 본 발명에서 구현된 조성물은 W002/069232에 개요된 방법을 이용하는 소프트웨어 툴을 사용하여 수행되는 하기 분석으로부터 유도되었다. 간단히 말해서, 상기 소프트웨어는, 상기 펩티드 MHC class II 결합 상호작용 수준에서의 항원 제시의 생물학적 과정을 모의 실험하여 임의의 주어진 펩티드 서열에 대한 결합 점수를 제공한다. 이러한 점수는 인간 집단에서 우세한 다수의 MHC class II 동종이형에 대하여 결정된다. 이러한 방법은 임의의 단백질 서열을 검사할 수 있기 때문에, MHC class II 결합 홈과 상호작용할 수 있는 펩티드의 능력에 관한, 아미노산 치환, 부가 또는 결실(deletion)의 결과를 예측할 수 있다. 결론적으로, MHC class II와 상호작용할 수 있는 펩티드를 감소된 수로 함유하고 있어서 이로써 면역원성의 T 세포 항원결정기로 작용하는 새로운 서열 조성물이 설계될 수 있다.

따라서, 본원에 개시된 조성물에 도달하는 과정은 첫째로 원하지 않는 MHC class II 결합 펩티드의 존재를 동정하는 단계, 둘째로 상기 원하지 않는 MHC class II 결합 서열을 아미노산 치환으로 제거하여 상기 서열이 더 이상 상기 MHC class II 체계와 결합할 수 없도록 하는 단계, 셋째로 상기 변형된 서열에 MHC class II 분자에 결합할 수 있는 임의의 지속된 능력이 있는지 또는 상기 변형 동안에 도입되었을 수 있는 임의의 추가적인 MHC class II 리간드가 존재하는지에 대하여 재분석하는 단계를 수반하였다.

MHC class II 항원결정기 제거는 따라서 원하지 않는 T 세포 항원결정기가 제거된 변형된 변이체를 생성하는 아미노산 치환을 수반하였다. 상기 아미노산 치환은 상기 원하지 않는 T 세포 항원결정기의 활성의 실질적인 저하 또는 제거를 달성하리라고 예측되는, 상기 펩티드 서열 내의 적절한 지점들에서 이루어졌다. '적절한 지점'은 상기 MHC class II 결합 홈 내에 제공되는 결합 포켓 중 하나의 내에서 결합하는 한 아미노산 잔기에 해당한다. 상기 펩티드의 소위 P1 또는 P1 고정(anchor) 위치에서 틈의 첫번째 포켓 내에서의 결합을 변경하는 것이 가장 바람직하다. 상기 펩티드

의 P1 고정 잔기 및 상기 MHC class II 결합 홈의 첫번째 포켓 사이의 결합 상호작용의 질은 상기 펩티드 전체에 대한 전체적인 결합 친화성에 대한 주요한 결정인자로 인식된다. 상기 펩티드의 이 위치에서의 적절한 치환, 예를 들어 보다 친수성인 잔기로의 치환은, 한 잔기에 대하여 상기 포켓내에 적응하기가 보다 덜 용이하게 할 것이다. 상기 펩티드 내의, MHC 결합 틈 내의 다른 포켓 부위 내에서 결합에 상응하는 위치들에서의 아미노산 잔기들 또한 고려되며 본 발명의 영역에 속한다.

당업계의 숙련된 자에게 자명할 것이지만, 원하지 않는 항원결정기 제거의 목적을 달성하는 다수의 대안적인 치환 집합들이 일어날 수 있을 것이다. 결과적으로 생기는 서열들은 그러나 본원에 개시된 특정 조성물과 넓게 상동으로 남아있을 것이며, 따라서 본 발명의 영역에 속한다. 적어도 상동인 부위에 대하여 본 상술한 서열들과 대략 70% 이상 상동이었으며 여전히 기능적으로는 등가로 남아있는 서열들에 이르는 것이 일반적일 것이다.

본 발명은 상기 CEA 분자의 부위들과 상동성을 공유하는 서열 트랙들을 포함하는 변형된 V부위 서열들을 개시한다. 이러한 상동성이 존재하는 곳에서, 이들은 상기 부모 708 항체 서열의 본질적인 특징들이다. 본 발명은 상기 708 부모 서열의 변형된 형태를 제공하며, 이와 관련하여 그 항체의 골격 영역 부위들이, 피실험자에 투여시 상기 분자에 대한 원치 않는 면역원성 활성을 제거하거나 감소시키는 것을 목적으로 하는 잔기 치환을 포함하는 서열들을 제공한다. 원치 않는 면역원성 활성은 상기 부모 쥐의 V부위로부터 기원하는 서열 요소들에 관한 것이며, 인간 CEA, 인간 CD55 또는 상기 서열 내로 고의적으로 조작된 105AD7 항체의 요소들에 대한 상동성을 가진 서열 요소들을 포함하지 않을 것이다. 본원에 정의된 바 상기 원치 않는 또는 바람직하지 않는 항원결정기들은, 상기 바람직하지 않는 서열 요소들이 MHC class II 분자에 결합하는 능력 또는 MHC class II 분자 내에서의 제시를 통한 T 세포 자극 능력 또는 인간 T 세포 또는 T 세포 수용체 복합체에 결합할 수 있는 가용성 MHC class II 복합체에 결합하는 능력으로 측정될 수 있다.

본 발명의 방법하에서, 4개의 상이한 H쇄 V부위 서열 및 2개의 상이한 L쇄 V부위 서열이 제공된다. 본 명세서는 완전한 항체 분자를 구성하기 위하여 제공될 수 있는 H쇄 및 L쇄의 가능한 조합에 대하여 제한을 두지 않는다. 상기 완전한 항체 분자의 구성은 당업계에 주지된 재조합 DNA 기법 및 항체 분자 정제 및 조작 방법으로 성취될 수 있다. 필수적인 기법들이, 'Molecular Cloning: A Laboratory Manual', second edition (Sambrook et al., 1989); 'Oligonucleotide Synthesis' (M. J. Gait, ed., 1984); 'Animal Cell Culture' (R. I. Freshney, ed., 1987); 'Methods in Enzymology' (Academic Press, Inc.); 'Handbook of Experimental Immunology' (D. M. Weir amp; C. C. Blackwell, ed s.); 'Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells' (J. M. Miller amp; M. P. Calos, eds., 1987); 'Current Protocols in Molecular Biology' (F. M. Ausubel et al., eds., 1987); 'PCR: The Polymerase Chain Reaction', (Mullis et al., eds., 1994); 'Current Protocols in Immunology' (J. E. Coligan et al., eds., 1991) 등의 문헌에 온전히 설명되어 있다.

본 발명의 바람직한 분자는 임의의 여러 방법으로 제조될 수 있으나, 가장 바람직하게는 일상적인 재조합 방법을 이용하여 수행된다. 본원에서 제공된 상기 단백질 서열 및 정보를 사용하여 상기 임의의 바람직한 항체 V부위를 암호화하는 폴리뉴클레오티드 (DNA)를 이끌어내는 것이 비교적 손쉬운 방법이다. 이는 예를 들어 DNASTAR 소프트웨어 스위트[DNASTAR Inc, Madison, WI, USA] 또는 그와 유사한 것 등의 컴퓨터 소프트웨어 툴을 사용하여 성취할 수 있다. 본 발명의 바람직한 폴리펩티드 또는 이의 현저한 상동체를 암호화하는 능력을 가진 그러한 임의의 DNA 서열은 본 발명의 구현예로 간주되어야 한다.

일반적인 방법으로서, 유전자 합성을 사용하여 임의의 VH 또는 VL 쇄 유전자를 제조하고 적당한 발현 벡터 내로 클로닝할 수 있다. 교대로 상기 발현 벡터를 숙주 세포 내로 도입하고 세포를 선택 및 배양한다. 상기 항체 분자는 상기 배양 배지로부터 용이하게 정제되며 치료상의 투여를 위한 백신 제제 내로 조제된다.

비제한적인 예로서, 그러한 한가지 방법은 합성 올리고뉴클레오티드의 패널을 이용한 유전자 합성 방법을 포함한다. 상기 유전자들은 리가제연쇄반응(LCR)을 사용하여 제조되며, 이때 상보성 말단의 특징을 이루는 올리고뉴클레오티드는 아닐링(annealing)되고 이후 중합효소연쇄반응(PCR)을 사용하여 증폭 및 채우기(fill-in)가 수행된다. 프라이머(primer)로 작용할 증가된 농도의 양끝의 올리고뉴클레오티드의 첨가로 PCR이 구동된다. 상기 PCR 산물은, 추가적인 PCR에 의하여 5' 및 3' 면역글로불린 유전자 양끝 부위를 포함하는 벡터로부터 완전한 길이의 항체 유전자로 조합되며 전체 항체의 발현을 위하여 발현 벡터 내로 서브클로닝된다. 상기 조합된 VH 및 VL 유전자는 변이유발(mutagenesis) 및 본원에 개시된 임의의 것 등의 다양한 변이 항체 서열 구축에 있어서 주형(template)으로 기능할 수 있다. Higuchi et al에 의하여 기술된 'overlap extension PCR' 전략 [Higuchi et al (1988) *Nucleic Acids Res.* **16**: 7351] 을 사용하는 것이 특히 편리하나, 기타의 방법론 및 시스템도 용이하게 적용될 수 있다.

중복(overlapping) PCR을 사용하여 변이부위 카세트를 포함하는 완전한 길이의 면역글로불린 유전자를 조합한다. 간단히 말해서, 주형으로 벡터 M13-VHPCR1 및 M13-VKPCR1의 DNA [Orlandi et al (1989), *PNAS*, **89**: 3833-7] 를 사용하여 각 원하는 VH 및 VL쇄에 대하여 상기 쥐의 중쇄 면역글로불린 촉진자(promoter)를 가지는 5' 말단 서열을 포함하고 선도 신호 펩티드 및, 접착 부위(splice site) 및 인트론 서열을 포함하는 3' 말단 서열을 암호화하는 추가적인 두 중복 PCR 절편을 생산한다. 이렇게 각 VH 및 VL쇄에 대하여 생산된 DNA 절편은 완전한 길이의 D

NA 서열을 얻기 위해 필요한 양끝 프라이머를 사용하여 PCR에서 결합된다.

5' 및 3' 말단 서열을 갖춘 상기 중쇄 유전자를, 인간 IgG1 불변부위 영역 [Takahashi et al (1982) *Cell*, 29: 671] 및 포유류의 세포에서의 선택을 위한 *gpt* 유전자를 포함하는 발현 벡터 pSV *gpt* [Reichmann et al (1988) *Nature*, 332: 323] 내로 클로닝한다. 5' 및 3' 말단 서열을 갖춘 상기 경쇄 유전자는, *gpt* 유전자가 하이그로마이신 저항성 (*hyg*) 유전자로 대체되어 있으며 인간 카파 불변부위 영역 [Heiter et al (1980) *Cell*, 22: 197]을 포함하는 발현 벡터 pSVH *yg* [Reichmann et al *ibid*] 내로 클로닝된다. 양 벡터에 대하여, 완전히 조립된 VH 또는 VL 유전자를 겔 전기영동으로 정제된 HindIII/BamHI 절편으로 서브클로닝하고 주지된 과정 및 시약 체계를 이용하여 처리한다.

상기 중쇄 및 경쇄 발현 벡터를 전기천공법(electroporation)을 이용하여, European Collection of Animal Cell Cultures (ECACC)로부터 수득한 비면역글로불린 생산 쥐 골수종인 NSO로 동시형질전이(co-transfection)한다. 10% (v/v) 소태아혈청 및 항생제 (예로서 Gibco로부터의, Paisley, UK) 및 0.8μg/ml 미코페노트산(mycophenotic acid) 및 250μg/ml 의 잔틴(xanthine) (Sigma, Poole, UK)으로 보충된 돌베코 변형 이글 배지(DMEM)에서 상기 *gpt* 유전자를 발현하는 집락을 선택한다. 형질전이된 세포 클론들에 의한 인간 항체 생산은 인간 IgG에 대한 ELISA로 용이하게 측정된다 [Tempest et al (1991) *BioTechnology* 9: 266]. 항체를 방출하는 세포주들을 증식 후 단백질 A 친화 크로마토그래피로 항체를 정제한다 [Harlow E. amp; Lane D.; *ibid*]. 상기 정제된 항체의 농도는 관심 항체의 인간 카파 불변부위를 검출하는 ELISA를 사용하여 결정된다.

본 발명에 따르는 분자는 단일제 요법에서 단독으로 또는 기타 약학적으로 유효한 약물들과 함께 투여될 수 있다. 이러한 약물은 세포독성 효력이 있는 방사선 표지 동위원소 또는, 세포독성 펩티드 (예로서 시토카인) 또는 세포독성 약물 등의 기타 세포독성 물질을 함유하는 면역요법제 또는 화학요법제를 포함할 수 있다. 본원에서 사용된 바 '세포독성 물질'이라는 용어는 세포의 기능을 저해 또는 방해하거나 및/또는 세포의 파괴를 유발하는 물질을 지칭한다. 상기 용어는 방사성 동위원소, 화학요법제 및, 세균, 진균, 식물 또는 동물 기원의 효소적으로 활성인 독소 또는 이들의 절편 등의 독소를 포함하는 것으로 의도된다. 상기 용어는 또한 시토카인 계통의 일원들, 바람직하게는 IFN γ 및 역시 세포독성 활성을 가지는 항신생물제(anti-neoplastic agent)를 포함할 수 있다. '화학요법 제' 또는 '항종양약제'라는 용어는 본 발명의 이해에 따라 상기 상술한 바 '세포독성 물질'의 부류의 일원으로 간주되며, 생물학적 반응 조절 등의 기전을 통한 간접적으로가 아니라 종양 세포에 대하여 직접적으로, 예로서 성장억제 또는 세포독성 효과로서 항종양 효과를 발휘하는, 즉, 종양성 세포의 발달, 성숙 또는 확산을 방지하는 화학적 약제를 포함한다. 본 발명에 따르는 적당한 화학요법제는 바람직하게는 천연의 또는 합성의 화학적 화합물이지만, 단백질, 폴리펩티드 등의 생물학적 분자도 명백히 배제되지는 않는다. 상업적 용도로, 임상 평가로 및 전임상 개발로 입수가능한 수많은 항종양약제가 있으며, 이들은 TNF α 및 상기 언급한 항 혈관신생제와 함께, 선택적으로 EGF 수용체 길항제 등의 기타 약제와 함께의 복합 요법을 통한 항종양/신생종양의 치료를 위하여 본 발명에 포함될 수 있다. 상기 화학요법제가 선택적으로 상기 약물 조합과 함께 투여될 수 있다는 것이 지적되어야 한다. 화학요법제의 예로는, 예를 들어 질소 겨자, 에틸렌이민 화합물, 알킬 술포네이트 및, 니트로소우레아, 시스플라틴 및 다카르바진 등의 알킬화 작용을 가지는 기타 화합물 등의 알킬화제; 예를 들어, 엽산(folic acid), 퓨린 또는 피리미딘 길항제 등의 항대사물질; 예를 들어, 빈카 알칼로이드 및 포도필로톡신 유도체 등의 유사분열 저해제; 세포독성 항생제 및 캄토테신(camptothecin) 유도체가 있다. 바람직한 화학요법제 또는 화학요법에는 아미포스틴(에티올), 시스플라틴, 다카르바진 (DTIC), 닥티노마이신, 메클로레타민 (질소 겨자), 스트렙토조신, 사이클로포스파마이드, 카르누스틴 (BCNU), 로무스틴 (CCNU), 독소루비신 (아드리아마이신), 독소루비신 리포 (독실(doxil)), 젬시타빈 (젬자(gemzar)), 다우노 루비신, 다우노루비신 리포 (다우노옥소(daunoxome)), 프로카르바진, 미토마이신, 시타라빈, 에토포시드, 메토포렉세이트, 5-플루오로우라실 (5-FU), 빈블라스틴, 빈크리스틴, 블레오마이신, 파클리탁셀 (택솔), 도세탁셀 (탁소텔), 알데스루킨, 아스파라지나제, 부셀판, 카보플라틴, 클라드리빈, 캄토테신, CPT-11, 10-히드록시-7-에틸-캄토테신 (SN38), 다카르바진, 플록수리딘, 플루다라빈, 히드록시우레아, 이포스파미드, 아이다루비신, 메스나, 인터페론 알파, 인터페론 베타, 이리노테칸, 미토잔트론, 토포테칸, 루프로라이드, 메게스트롤, 멜파란, 메르캅토포린, 플리카마이신, 미토탄, 페가스파르가제, 펜토스타틴, 피포브로만, 플리카마이신, 스트렙토조신, 타목시펜, 테니포사이드, 테스토락톤, 티오구아닌, 티오테파, 우라실 머스타드, 비노렐빈, 클로람부실 및 이들의 조합이 있다. 본 발명에 따르는 가장 바람직한 화학요법제는 시스플라틴, 젬시타빈, 독소루비신, 파클리탁셀 (택솔) 및 블레오마이신이다.

본 발명의 추가적인 면은, 본 발명이, 상기 변형 항체 조성물을 사용한, 인간에 대한 치료적 처치 방법에 관한 것이라는 점이다. 개체에의 투여를 위하여는, 임의의 상기 변형 항체 조성물은 바람직하게는 80% 이상의 순도로 및 파이로젠 및 기타 오염물질이 제거된 상태로 생산될 것이다. 상기 변형 항체 단백질의 치료적 조성물이 당업계에 통상적으로 알려진 면역보강제 및 담체 물질과 함께 사용될 수 있다는 것 또한 자명하다. 이러한 물질은 그 자체로서 아무런 면역원성 항원결정기를 제공하지 않는다. 주지의 면역보강제는 광유(mineral oil) 유탁액을 포함하며 프리인즈 면역보강제(Freunds adjuvant)라고 칭하여 지는 것이나, 다른 조제물이 동등하게 고려될 수 있는데, 예를 들어 EP-A-0745388, EP-A-0781559, US 5,057,540; US 5,407,684; US 5,077,284; US 4,436,728; US 5,171,568; 및 US 4,726,947 또는 그와 유사한 것 등이 있다. 상기 백신 조제물은 바람직하게는 약학적으로 허용가능한 부형제와 함께 투여될 것이다. 이러한 부형제는 희석제로서 작용할 것이나, 안정화제, 습윤 및 유화제, 염, 피막형성제, 완충제, 및 피부 투과강화제를 포함할 수 있다. 예들이 Remington's Pharmaceutical Sciences (Alfonso R. Gennaro, ed., 18th edition,

1990)에 기술되어 있다. 치료상의 사용을 위하여 상기 단백질을 제제화하는 한 방법으로 리포솜 피막형성을 또한 고려할 수 있으며, 이러한 용도는 또한 GM-CSF 및 또는 IL-2 또는 기타 단백질 등의 생물학적 반응조절제를 수반하는 치료 전략을 포함할 수 있다.

CEA 관련 종양에 대하여 면역반응을 도출하거나 또는 개체를 치료하기 위하여 상기 백신 조제물을 개체에 비경구적으로 투여하는 것이 인식되어 있으며, 피부내, 근육내 또는 진피내 투여를 포함할 수 있을 것이다. '암' 및 '종양'이라는 용어는 전형적으로 조절되지 않은 세포 성장으로 특징지어지는 포유류의 생리적 상태를 지칭하거나 기술한다. 본 발명에 따르는 분자 및 약학적 조성물로, 유방, 심장, 폐, 소장, 결장, 비장, 신장, 방광, 두부(head) 및 경부, 난소, 전립선, 뇌, 췌장, 피부, 뼈, 골수, 혈액, 가슴샘(thymus), 자궁, 고환, 자궁경부, 및 간 종양 등의 종양, 바람직하게는, CEA 관련 종양을 치료할 수 있다. 본 발명에 따르는 바람직한 암은 직장결장암, 위암, 췌장암, 비소세포 폐암 및 유방암이다.

본 발명에 따르는 분자는 약학적 조성물로 개체에 투여된다. 본 발명의 '약학적 조성물'은, 이에 제한되는 것은 아니나, 예를 들어 항암 약물의 유독 효과를 감소시키는 약제, 예로서, 골흡수 저해제, 심장보호제를 포함하는, 본 발명의 복합 요법('부속 요법')과 관련한 부작용을 감소시키거나 예방하는 약제를 포함할 수 있다. 상기 부속 약제는 화학요법, 방사선치료 또는 수술과 관련된 메스꺼움 및 구토 발생을 방지 또는 감소시키거나, 또는 골수기능 저하성 항암 약물의 투여와 관련한 감염 발생수를 감소시킨다. 부속 약제는 당업계에 주지되어 있다.

본 발명에 따르는 면역글로불린 약제는 바람직하게는 BCG 등의 면역보강제 및 면역체계 자극제와 함께 투여된다.

투여되는 백신 조제물의 양은 여러 요인, 예를 들어 환자의 상태 및 투여 경로에 따라 다르다. 비제한적인 예로서의 투여량 계획으로서, 약 0.1 mg 내지 약 20 mg의 범위일 것이며, 상기 투여량 계획은, 4번의 주사를 위하여 격주로 할 수 있으며, 이후 필요시 월단위로 주사할 수 있을 것이다. 유지 복용량은 치료되는 개체의 상태 및 반응에 따라 다를 것이다.

본 발명의 백신 조제물은 특히, 통상적인 외과적 암수술에 대한 치료상의 부가물로서 유용한 것으로 고려되며, 따라서, 종양 재연 및 임상적 재발의 가망성을 감소시키는데 공헌할 것이다.

상기 백신 투여의 효과는 암의 진행을 결정하는 임상적 검사, 예로서, 염증 지시계, 유방촬영법, 방사선 스inti그래피(radioscintigraphy) 및 기타 당업계에 주지된 임의의 임상 조사법을 포함할 것이다.

본 발명의 백신을 받는 환자에서의 세포 면역반응을 측정하는 것은 특히 바람직하다. 특히 바람직한 분석법은 특이적 T 세포 활성화에 초점을 맞추며, 예로서 T 세포 증식 측정을 포함할 것이다. 이 분석법에서, 전체 혈액 시료로부터 말초 혈액 단핵세포(PBMC)를 수득한다. 상기 세포를 인간 CEA 또는 인간 CD55에서 유래한 것 등의 합성 펩티드의 존재 하에서 배양하거나 다르게는 전체 CEA 단백질 또는 방사선조사된 CEA 발현 세포로 면역성 테스트를 한다. 바람직하게는, 상기 자극자 세포는 상기 반응자 세포와 자가유래적(autologous)이다. 자극 지표(SI)는 전형적으로 세포 증식의 표지자로서 ^3H -티미딘 편입을 이용하여 측정된다. 이러한 분석에서, 상기 측정된 SI가 2.0 이상 바람직하게는 2.5 이상의 값이라면, 양성 CEA 또는 CD55 유도 증식으로 결론내릴 수 있을 것이다. 이러한 분석에서, 상기 SI는 CPM 검사 배양액 / CPM로 처리되지 않은 대조군 배양액이다.

세포독성 T 세포의 형성에 도움을 주는 Th1 T 세포의 자극은, 8 내지 10일째의 배양 상청액 내의 인터페론-감마 생산 분석으로 측정될 수 있다. 인터페론-감마 생산은 시중에서 구입할 수 있는 ELISA 기반 방법을 사용하여 용이하게 측정된다.

CEA 또는 CD55 특이적 세포독성 T 세포의 활성화는 또한 특히 유익할 것이다. 이러한 유형의 특히 적당한 분석법이 Kantor et al [Kantor, J. et al (1992) *Cancer Res.* 52:6917-6925 and; *JNCI* (1992) 84:1084-1091] 및 Kwong et al [Kwong, Y. et al (1995) *JNCI* 87:982-990] 둘 다에 기술되어 있다. 상기 분석법은 표지된 CEA 발현 표적 세포로부터 배지내로 방출되는 ^{51}Cr 량 측정을 수반하며, 표지된 단독 배양의 표적 세포 (음성 대조군) 및 계면활성제로 용해된 표적 세포 (양성 대조군) 와 비교한, 상기 배지내의 ^{51}Cr 의 백분율 방출량이 측정된다.

추가적인 비제한적인 예로서, 상기 본 발명의 바람직한 단백질 서열 유도 방법이 이제 기술된다: 키메라 708의 생산은 이전에 기술되어 왔다 (Durrant, L. G., et al (2001), *Int. J. Cancer.* 92:414-420). W098/52976에 기술된 방법 및 설계된 서열 변이체를 이용하여 변이부위 단백질 서열에 원치 않는 T 세포 항원결정기가 존재하는지 검사하였다. 인간 CEA 단백질 서열 [Schrewe, H. et al (1990), *Mol. Cell. Biol.* 10:2738-2748], 인간 CD55 단백질 서열 [Caras, I. W. et al (1987) *Nature* 325:545-549] 및 항체 107AD5 변이부위 서열 [W097/32021]에 대하여 추가적인 분석을 수행하였다. 분석에는 시중에서 구입할 수 있는 소프트웨어 수트 (예로서 'DNASTAR', DNASTAR Inc, Madison, WI, USA)를 사용한 상동성 정렬 및 그 외의 다른 곳에서 기술된 항원결정기 분석 [W098/59244; W098/52976; WO/34317; Rammensee, H.G. et al (1999) *ibid*]이 포함되었다. MHC class II 결합 리간드로 작용할 잠재력 있는 펩티드 서열에 대한 분석 방법은 이전에 상세히 기술되었다 [WO02/069232]. 이 방법을 사용하여, 항체 708 V부위

영역 내에서 하나 이상의 동종이형에 대한 다양한 MHC class II 리간드를 동정하였다. MHC class II 리간드가 제거된 변이체 서열을 수집하였다. 반복적인 아미노산 치환 및 재분석으로 이를 수행하여 항원결정기 제거를 확인하였다. 상기 원하는 조 성물의 단백질 서열은 도 4 내지 9에 나타난다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

부모 항유전인자형 (anti-idiotypic) 항 -CEA 항체로부터 유래하고, 인간 기원의 불변부위 및 인간 종양 항원 CEA (암배아 항원) 으로부터 유래한 4개 이상의 연속 아미노산 잔기의 서열 트랙 (sequence tract) 들을 하나 이상 포함하는 합성적으로 설계된 가변부위를 가지는 면역글로불린 분자 또는 이의 절편.

청구항 2.

제 1 항에 있어서, 상기 서열 트랙 중 하나가 5 내지 20개의 연속 아미노산 잔기를 포함하는 면역글로불린 분자.

청구항 3.

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 상기 서열 트랙 중 하나 이상이 상기 면역글로불린의 중쇄 및/또는 경쇄의 상보성 결정부위 (CDR) 의 성분이거나 또는 상기 CDR에 인접한 골격 부위 (framework region) 의 인접한 잔기들과 겹치는 면역글로불린 분자.

청구항 4.

제 3 항에 있어서, 상기 성분이 상기 CDR 아미노산 잔기의 30 내지 100%를 형성하는 면역글로불린 분자.

청구항 5.

제 3 항 또는 제 4 항에 있어서, 상기 CDR이 상기 면역글로불린의 중쇄의 CDR인 면역글로불린 분자.

청구항 6.

제 3 항에 있어서, 각 중쇄 및/또는 경쇄의 CDR 둘 이상은 완전히 CEA 유래의 서열 트랙들로만 구성된 면역글로불린 분자.

청구항 7.

제 1 항 내지 제 6 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 부모 항유전인자형 항체가 마우스 항체 708인 면역글로불린 분자.

청구항 8.

제 1 항 내지 제 7 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 가변부위 내에 부가적으로 인간 CD55 항원으로 유래한 5 내지 25개의 연속 아미노산 잔기들의 서열 트랙 또는 항유전인자형 항 -CD55 항체의 고변이부위를 포함하는 면역글로불린 분자.

청구항 9.

제 8 항에 있어서, 상기 항유전인자형 항 -CD55 항체가 마우스 항체 105AD7인 면역글로불린 분자.

청구항 10.

제 1 항 내지 제 9 항 중 어느 한 항에 있어서, 부가적으로 상기 가변부위 내에서 아미노산 치환에 의하여, CEA 양성 인간 암세포에 대한 면역반응에 기여하지 않는 잠재적인 MHC class II 항원결정기 (epitope) 가 제거된 면역글로불린 분자.

청구항 11.

제 1 항 내지 제 10 항 중 어느 한 항에 있어서, 가변부위 내에 부가적으로 MHC class I 항원결정기들인 CEA 유래 서열 트랙들을 포함하는 면역글로불린 분자.

청구항 12.

제 11 항에 있어서, 상기 CEA 유래 서열 트랙들이 TLLSVTRNDV 및 YLSGANLNL인 면역글로불린 분자.

청구항 13.

제 11 항 또는 제 12 항에 있어서, 상기 CEA 유래 서열 트랙들이 상기 면역글로불린의 경쇄 CDR의 일부이거나 또는 상기 경쇄 CDR 하나 이상을 완전하게 형성하는 것을 특징으로 하는 면역글로불린 분자.

청구항 14.

제 1 항 내지 제 12 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 가변부위 내에 부가적으로 CEA 양성 인간 암세포에 대한 면역반응에 기여하는 MHC class II 항원결정기들인 CEA 유래 서열 트랙들을 포함하는 면역글로불린 분자.

청구항 15.

제 1 항 내지 제 13 항 중 어느 한 항에 있어서, 도 4 내지 7에 나타난 서열 중 임의의 것으로부터 선택되는 가변 중쇄를 포함하는 면역글로불린 분자.

청구항 16.

제 1 항 내지 제 13 항 중 어느 한 항에 있어서, 도 8 및 9에 나타난 서열 중 임의의 것으로부터 선택되는 가변 경쇄를 포함하는 면역글로불린 분자.

청구항 17.

제 1 항 내지 제 13 항 중 어느 한 항에 있어서, 도 4 내지 7에 나타난 서열 중 임의의 것으로부터 선택되는 중쇄 및 도 8 및 9에 나타난 서열 중 임의의 것으로부터 선택되는 경쇄를 포함하는 면역글로불린 분자.

청구항 18.

제 1 항 내지 제 11 항 중 어느 한 항에 있어서, 가변 중쇄 및/또는 경쇄가 하기 군으로부터 선택되는 서열 트랙들과 상동성이 있는 하나 이상의 서열 트랙들을 포함하는 면역글로불린 분자:

- (i) 인간 CEA의 345-354
- (ii) 인간 CEA의 387-396
- (iii) 인간 CEA의 571-579
- (iv) 인간 CEA의 629-645
- (v) 인간 CD55의 148-167.

청구항 19.

생물학적으로 유효한 양의 제 1 항 내지 제 18 항 중 어느 한 항의 면역글로불린 분자, 면역보강제, 및 임의적으로, 약학적으로 허용가능한 담체, 희석제 또는 부형제를 포함하는 약학적 조성물.

청구항 20.

CEA 양성 고형의 또는 전이성의 종양을 가진 인간 개체의 백신화를 위한 의학의 제조를 위한, 제 1 항 내지 제 20 항 중 어느 한 항의 면역글로불린 분자 또는 약학적 조성물의 용도.

청구항 21.

제 20 항에 있어서, 상기 백신화가 상기 개체 내에서 CD8 및/또는 CD4 양성 T 세포의 향상된 자극을 유발하는 것을 특징으로 하는 용도.

청구항 22.

하기의 단계들을 포함하는, CEA(암 배아 항원) 양성 고형의 또는 전이성의 종양을 가진 인간 개체의 치료에 적합한 합성적으로 설계된 면역글로불린 분자에 기초한 백신 분자의 제조 방법:

- (i) 비인간 항유전인자형 항-CEA 항체를 선택하는 단계,
- (ii) 상기 비인간 불변부위를 인간 불변부위로 교체하는 단계, 및
- (iii) 하나 이상의 고변이부위 (CDR) 를, 상기 CDR에 인접한 골격 잔기들이 포함될 수 있도록, CEA 유래의 서열 트랙들로 부분적으로 또는 완전히 교체하는 단계.

청구항 23.

제 22 항에 있어서, 부가적으로 하기 군으로부터 선택되는 단계들 하나 이상을 포함하는 방법:

(iv) 가변부위 내의 서열 트랙들을 CD55 항원 유래의 서열 트랙 또는 항유전인자형 항-CD55 항체의 고변이부위들로 교체하는 단계,

(v) 가변부위 내의 서열 트랙들을 CEA 양성 인간 암세포에 반응하는 MHC class I 및/또는 MHC class II 항원결정기들인 서열 트랙들로 교체하는 단계,

(vi) 가변부위 내에서 CEA 양성 인간 암세포에 대한 면역반응에 기여하지 않는 잠재적 MHC class II 항원결정기들을 제거하는 단계.

청구항 24.

제 22 항 또는 제 23 항에 있어서, 상기 비인간 항유전인자형 항-CEA 항체가 마우스 항체 708인 방법.

도면

도면1

CDRH2

1.	50	<u>GINPNNVGS</u> IYNQKFRG	66	708
	254	NITVNNSGS <u>YTCQA</u> HNS	290	CEA
	288	NITVNNSGS <u>YMCQA</u> HNS	304	NCA
2.	50	GINPNNVGS <u>IYNQK</u> FRG	66	708
	610	KITPNNNGT <u>YACFV</u> SNL	626	CEA
	288	NITVNNSGS <u>YMCQA</u> HNS	304	NCA
3.	50	GINPNNVGS <u>IYNQK</u> FRG	66	708
	629	GRNNSIVKS <u>ITVSAS</u> GT	645	CEA

CDRH3

1	100	GYGNY <u>VAY</u>	107	708
	30	GY <u>S</u> WYKGE	37	CEA
	59	GY <u>S</u> WYKGE	72	NCA
2.	100	GYGNY <u>VAY</u>	107	708
	389	<u>S</u> YTYRPG	396	CEA
	242	<u>S</u> KANYRPG	255	NCA
3.	100	GYGNY <u>VAY</u>	107	708
	480	EDKDA <u>VAF</u>	487	CEA
	159	EDKDA <u>VAF</u>	165	NCA

도면2

<u>CDRH2</u>		
HLA-A3	NVGS <u>I</u> YNQK	708
	IVKSITVSA	CEA
Pan DR	INPN <u>N</u> VGSI	708
	SIVKSITVSA	CEA
HLA-DR1	VGS <u>I</u> YNQKF	708
	SIVKSITVS	CEA
HLA-DR1	INPN <u>N</u> VGSI	708
	LATRNN <u>S</u> I	CEA
HLA-DR7	VGS <u>I</u> YN	708
	IVKSITV	CEA
<u>CDRH3</u>		
HLA-A3	CARGY <u>G</u> NYV	708
	HLFGY <u>S</u> WYK	CEA
	NRFGY <u>S</u> WYK	NCA

도면3

A:

```

1      10      20      30      40      50      60      70
·
EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKTSGHTFTEYNMQWVKQSLGQSLIEWIGGINPNNVGSIYNQKFRGKATL
-----FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2-----

71      80      90      100     110
·
TVDKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCARGYGNIVAYWGQGTLLTVSA
-----FR3-----CDR3-----FR4-----

```

B:

```

1      10      20      30      40      50      60      70
·
DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSVTCASQNVNTNVAWYQQKPGQSPKSLIYSASYRYSQVPSDRFTGSGSGTD
-----FR1-----CDR 1-----FR2-----CDR 2-----

71      80      90      100
·
ETLTISNVQSEDLAEFFCQQYNRYPTFGGQTKLELK
-----FR3-----CDR 3-----FR4-----

```

도면4

EVQLQQSGPETGKPGASGKMSCKTSGHTSTEHNGQWAKQSPGQSLIEWIGGINPNNVGSI
YNQKFRGKATLTADKSSSTAHEMELRSPSTEDTAVYYCARGYGNIVAYWGQGTLLTVSA

도면5

EVQLQQSGPETGKPGASGKMSCKTSGHTSTEHNGQWAKQSPGQSLWNGGRNNSIVKSI
TVSASGTKATLTADKSSSTAHEMLRSPTSEDTAVYYCSPSYTYRPGWGQGTSLVTVSA

도면6

EVQLQQSGPETGKFGATISFSCNTGYKLFGSTSGQWARQSPGQSLWNGGRNNSIVKSI
TVSASGTKATLTADKSSSTAHEMLRSPTSEDTAVYYCSPSYTYRPGWGQGTSLVTVSA

도면7

EVQLQQSGPTLVKPTQTTLTCTLSGFSFGSTSMNRLRQSPGQSLWNGGRNNSIVKSI
TVSASGTKATLTADKSSSTAHEMLRSPTSEDTAVYYCSPSYTYRPGWGQGTSLVTVSA

도면8

DIQTTQSQKSQSTSAGDRASTTCKASQNVSTNAAWYQQTGGQSPKSLIYAASSLQSGVP
DRFTGSGSGTDFTQTTNAQSEDSAEFFCQYNNRYPHTFGGGTKLELK

도면9

DIQTTQSQKSQSTSAGDRASTTCTLLSVTRNDVANYQQTGGQSPKSLIYAASSLQSGVP
DRFTGSGSGTDFTQTTNAQSEDSAEFFCYLSGANLNLFGGGTKLELK

도면10

1 KLTIESTPFN VAEGKEVLLL VHNLPQHLFG YSWYKGERVD GNRQIIGYVI GTQQATPGPA
61 YSGREIIYPN ASLLIQNIQ NDTGFYTLHV IKSDLVNEEA TGQFRVYPEL PKPSISSNNS
121 KPVEDKDAVA FTCEPETQDA TYLWVNNQS LPVSPRLQLS NGNRTLTFLN VTRNDTASYK
181 CETQNPVSAR RSDSVILNVL YGPDAPTISP LNTSYRSGEN LNLSCHAASN PPAQYSWFVN
241 GTFQQTQEL FIPNITVNNS GSYTCQAHNS DTGLNRTVT TITVYAEPPK PFITSNNSNP
301 VEDEDAVALT CEPEIQNTTY LWWVNNQSLP VSPRLQLSND NRTLTLLSVT RNDVGPYECG
361 IQNELSVDHS DPVILNVLYG PDDPTISPSY TYRPGVNLS LSCHAASNPP AQYSWLIDGN
421 IQQHTQELFI SNITEKNLGL YTCQANNSAS GHSRTTVKTI TVSAELPKPS ISSNNSKPVE
481 DKDAVAFTCE PEAQNTTYLW WVNGQSLPVS PRLQLSNGNR TLTLFNVTRN DARAYVCGIQ
541 NSVSANRSDP VTLDVLYGPD TPIISPPDSS YLSGANLNL CHSASNPSPO YSWRINGIPQ
601 QHTQVLEFIK ITPNNNGTYA CFVSNLATGR NNSIVKSITV SASGT

도면11

1 DCGLPPDVFN AQPALGRTS FPEDTVITYK CEESFVKIPG EKDSVICLKG SQWSDIEEFC
61 NRSCEVPTRL NSASLKQPYI TQNYFPVGT VYECPGYPY REPSLSPKLT CLQNLKWSTA
121 VEFCKKSCP NPGEIRNGQI DVPGGILFGA TISFSCNTGY KLFGSTSSFC LISGSSVQWS
181 DPLPECREIY CPAPPQIDNG IIQGERDHYG YRQSVTYACN KGFTMIGEHS IYCTVNNDG
241 EWSGPPPECR GKSLTSKVPP TVQKPTTVNV PTTEVSPTSQ KTTKTTTPN AQATRSTPVS
301 RTTKHFHETT PNKSGTTS GTRLLSGHTC FTLTGLLGTL VTMGLLT