



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2014년12월02일
(11) 등록번호 10-1467566
(24) 등록일자 2014년11월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01) C07K 16/00 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2007-7020499
(22) 출원일자(국제) 2006년02월07일
심사청구일자 2011년02월07일
(85) 번역문제출일자 2007년09월07일
(65) 공개번호 10-2007-0119629
(43) 공개일자 2007년12월20일
(86) 국제출원번호 PCT/IB2006/000238
(87) 국제공개번호 WO 2006/082515
국제공개일자 2006년08월10일
(30) 우선권주장
60/650,115 2005년02월07일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
JP09510605 A*
WO2004065540 A2*
British Journal of Cancer 73(2):
228-235(1996)
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
로슈 글리카트 아게
스위스 솔리렌-취리히 체하-8952 바기슈트라쎄 18
(72) 발명자
우마나 파블로
스위스 체하-8032 취리히 프라이슈트라쎄 159
모스너 에케하르트
스위스 체하-8952 취리히 솔리렌 바기슈트라쎄 18
글리카트 바이오테크놀로지 아게
(74) 대리인
특허법인코리아나

전체 청구항 수 : 총 40 항

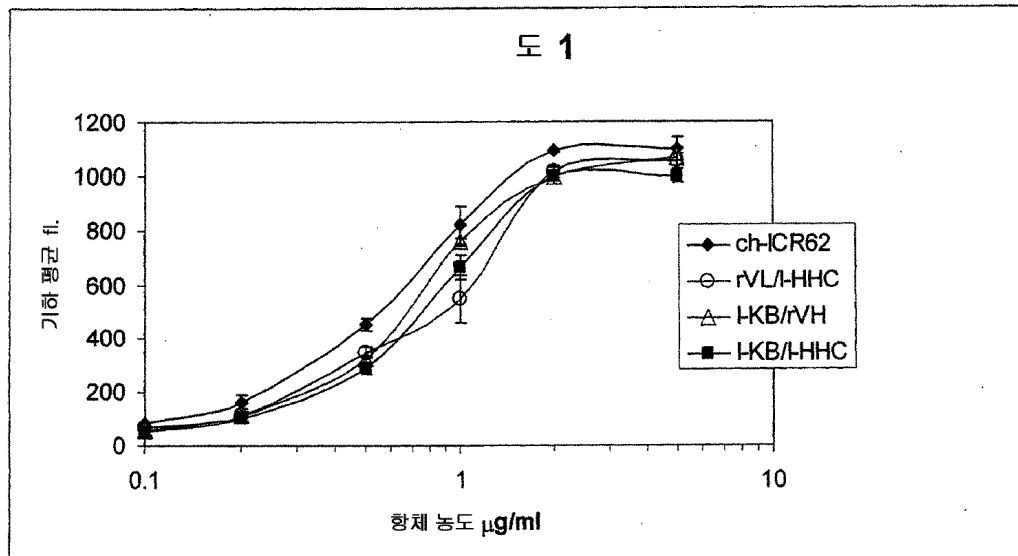
심사관 : 조경주

(54) 발명의 명칭 E G F R 에 결합하는 항원 결합 분자, 이를 코딩하는벡터, 및 그의 용도

(57) 요약

본 발명은 항원 결합 분자 (ABM) 에 관한 것이다. 특정 구현예에서, 본 발명은 인간 EGFR 에 특이적인 키메라성, 영장화 또는 인간화 항체를 포함하는, 재조합 단일클론 항체에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 이러한 ABM 을 코딩하는 핵산 분자, 및 이러한 핵산 분자를 포함하는 벡터 및 숙주 세포에 관한 것이다. 본 발명은 또한 본 발명의 ABM 의 제조 방법, 및 질환의 치료에서의 상기 ABM 의 사용 방법에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 증가된 Fc 수용체 결합 및 증가된 효과기 작용을 갖는 항체를 포함하는, 개선된 치료적 특성을 갖는 개질된 글리코실화를 갖는 ABM 에 관한 것이다.

대표도



특허청구의 범위

청구항 1

삭제

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

청구항 58

삭제

청구항 59

삭제

청구항 60

삭제

청구항 61

삭제

청구항 62

삭제

청구항 63

삭제

청구항 64

삭제

청구항 65

삭제

청구항 66

삭제

청구항 67

삭제

청구항 68

삭제

청구항 69

삭제

청구항 70

삭제

청구항 71

삭제

청구항 72

삭제

청구항 73

삭제

청구항 74

삭제

청구항 75

삭제

청구항 76

삭제

청구항 77

삭제

청구항 78

삭제

청구항 79

삭제

청구항 80

삭제

청구항 81

삭제

청구항 82

중쇄 가변 영역, 경쇄 가변 영역 및 Fc 영역을 포함하는, 인간 EGFR 에 특이적으로 결합하는 당조작된 항-EGFR 항원 결합 분자로서,

상기 Fc 영역이 대응되는 비당조작된 항원 결합 분자에 비해 감소된 수의 푸코오스 잔기를 갖고,

상기 중쇄 가변 영역이

(a) SEQ ID NO:53 인 중쇄 상보성 결정 영역 1 (CDR1);

(b) SEQ ID NO:79 인 중쇄 CDR2; 및

(c) SEQ ID NO:107 인 중쇄 CDR3 을 포함하고;

상기 경쇄 가변 영역이

(d) SEQ ID NO:113 인 경쇄 CDR1;

(e) SEQ ID NO:115 인 경쇄 CDR2; 및

(f) SEQ ID NO:117 인 경쇄 CDR3 을 포함하는,

당조작된 항-EGFR 항원 결합 분자.

청구항 83

삭제

청구항 84

삭제

청구항 85

삭제

청구항 86

삭제

청구항 87

삭제

청구항 88

삭제

청구항 89

삭제

청구항 90

삭제

청구항 91

삭제

청구항 92

제 82 항에 있어서, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:37 및 SEQ ID NO:39 로 이루어진 군에서 선택되는 서열을 포함하는 폴리펩티드를 포함하는 항원 결합 분자.

청구항 93

제 82 항에 있어서, SEQ ID NO:15 의 서열을 포함하는 폴리펩티드를 포함하는 항원 결합 분자.

청구항 94

제 82 항에 있어서, SEQ ID NO:45 및 SEQ ID NO:49 로 이루어진 군에서 선택되는 서열을 포함하는 폴리펩티드를 포함하는 항원 결합 분자.

청구항 95

제 82 항에 있어서, SEQ ID NO:45 의 서열을 포함하는 폴리펩티드를 포함하는 항원 결합 분자.

청구항 96

제 82 항에 있어서, SEQ ID NO:15 의 서열을 포함하는 제 1 폴리펩티드 및 SEQ ID NO:45 의 서열을 포함하는 제 2 폴리펩티드를 포함하는 항원 결합 분자.

청구항 97

제 82 항에 있어서, 재조합 항체인 항원 결합 분자.

청구항 98

제 82 항에 있어서, 항체 분절인 항원 결합 분자.

청구항 99

제 82 항에 있어서, 인간화된 항원 결합 분자.

청구항 100

제 82 항에 있어서, Fc 영역이 인간 Fc 영역인 항원 결합 분자.

청구항 101

삭제

청구항 102

삭제

청구항 103

제 82 항에 있어서, Fc 영역이 대응되는 비당조작된 항원 결합 분자에 비해 증가된 비율의 양분된 올리고당을 갖는 항원 결합 분자.

청구항 104

제 82 항에 있어서, Fc 영역이 양분된 복합체 올리고당을 갖는 항원 결합 분자.

청구항 105

제 82 항에 있어서, Fc 영역이 대응되는 비당조작된 항원 결합 분자에 비해 증가된 비율의 양분된, 비푸코실화

올리고당을 갖는 항원 결합 분자.

청구항 106

제 82 항에 있어서, Fc 영역이 대응되는 비당조작된 항원 결합 분자에 비해 증가된 비율의 GlcNAc 잔기 대 푸코 오스 잔기를 갖는 항원 결합 분자.

청구항 107

제 105 항에 있어서, 양분된, 비푸코실화 올리고당이 잡종인 항원 결합 분자.

청구항 108

제 105 항에 있어서, 양분된, 비푸코실화 올리고당이 복합체인 항원 결합 분자.

청구항 109

제 82 항에 있어서, Fc 영역에서 20% 내지 100% 의 올리고당이 양분된, 비푸코실화된 항원 결합 분자.

청구항 110

제 109 항에 있어서, Fc 영역에서 30% 내지 100% 의 올리고당이 양분된, 비푸코실화된 항원 결합 분자.

청구항 111

제 109 항에 있어서, Fc 영역에서 35% 내지 100% 의 올리고당이 양분된, 비푸코실화된 항원 결합 분자.

청구항 112

제 109 항에 있어서, Fc 영역에서 70% 내지 100% 의 올리고당이 양분된, 비푸코실화된 항원 결합 분자.

청구항 113

제 82 항에 있어서, Fc 영역에서 50% 내지 100% 의 올리고당이 양분된 항원 결합 분자.

청구항 114

제 113 항에 있어서, Fc 영역에서 60% 내지 100% 의 올리고당이 양분된 항원 결합 분자.

청구항 115

제 113 항에 있어서, Fc 영역에서 70% 내지 100% 의 올리고당이 양분된 항원 결합 분자.

청구항 116

제 113 항에 있어서, Fc 영역에서 80% 내지 100% 의 올리고당이 양분된 항원 결합 분자.

청구항 117

제 113 항에 있어서, Fc 영역에서 90% 내지 100% 의 올리고당이 양분된 항원 결합 분자.

청구항 118

제 82 항에 있어서, Fc 영역에서 50% 내지 100% 의 올리고당이 비푸코실화된 항원 결합 분자.

청구항 119

제 118 항에 있어서, Fc 영역에서 60% 내지 100% 의 올리고당이 비푸코실화된 항원 결합 분자.

청구항 120

제 118 항에 있어서, Fc 영역에서 70% 내지 100% 의 올리고당이 비푸코실화된 항원 결합 분자.

청구항 121

제 118 항에 있어서, Fc 영역에서 75% 내지 100% 의 올리고당이 비푸코실화된 항원 결합 분자.

청구항 122

제 82 항에 있어서, 대응되는 비당조작된 항원 결합 분자에 비해 증가된 효과기 작용을 갖는 항원 결합 분자로서, 상기 증가된 효과기 작용이 증가된 Fc-매개된 세포성 세포독성, NK 세포에 대한 증가된 결합, 대식세포에 대한 증가된 결합, 단핵구에 대한 증가된 결합, 다핵형 세포에 대한 증가된 결합, 세포자멸사를 유도하는 직접 신호, 증가된 수지상 세포 성숙, 증가된 T 세포 초회감작 (priming) 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택되는 항원 결합 분자.

청구항 123

하기를 포함하는, 샘플에서의 EGFR 존재의 생체내 또는 시험관내 검출 방법:

- (a) 시험될 샘플을, 항원 결합 분자와 EGFR 사이의 복합체의 형성을 가능하게 하는 조건 하에 임의로 대조군 샘플과, 제 82 항에 따른 항원 결합 분자와 접촉시키고;
- (b) 상기 항원 결합 분자-EGFR 복합체를 검출함.

청구항 124

제 82 항에 따른 항원 결합 분자 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 암 치료 또는 예방용 약학 조성물.

청구항 125

대상에서 암을 치료 또는 예방하기 위한, 제 82 항에 따른 항원 결합 분자를 포함하는 약제.

청구항 126

제 125 항에 있어서, 대상이 인간인 약제.

청구항 127

제 125 항에 있어서, 항원 결합 분자가 1.0 mg/kg 내지 15 mg/kg, 1.5 mg/kg 내지 12 mg/kg, 1.5 mg/kg 내지 4.5 mg/kg, 4.5 mg/kg 내지 12 mg/kg, 1.5 mg/kg, 4.5 mg/kg, 또는 12 mg/kg 의 치료적 유효량으로 사용되는 약제.

청구항 128

제 82 항에 있어서, 암에 대한 약제로서 사용하기 위한 항원 결합 분자.

청구항 129

제 125 항에 있어서, 상기 암이 유방암, 방광암, 두경부암, 피부암, 이자암, 폐암, 난소암, 결장암, 전립선암, 신장암 및 뇌암으로 이루어진 군에서 선택되는 약제.

청구항 130

제 82 항에 있어서, 혈청 1 밀리리터 (ml) 당 1 마이크로그램 (μg) 초과 농도로 포유류 대상에게 투여되는 경우 상기 포유류 대상에서 임상적으로 유의한 독성 수준을 야기하지 않는 항원 결합 분자.

청구항 131

치료가 4 주 이상의 기간 동안 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 내지 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 항원 결합 분자의 혈청 농도를 야기하고, 상기 치료가 포유류에서 임상적으로 유의한 독성 수준을 야기하지 않는, 이의 치료를 필요로 하는 포유류에서의 암을 치료 또는 예방하기 위한, 제 82 항에 따른 항원 결합 분자를 포함하는 약제.

청구항 132

제 125 항에 있어서, 항원 결합 분자가 당조작된 항체를 포함하고, 상기 항체가 대응되는 항체의 비-당조작된 형태에 비해 증가된 Fc γ RIII 결합 친화성을 갖는 약제.

청구항 133

삭제

청구항 134

삭제

청구항 135

삭제

청구항 136

삭제

청구항 137

삭제

청구항 138

삭제

청구항 139

삭제

청구항 140

삭제

청구항 141

삭제

청구항 142

삭제

청구항 143

삭제

청구항 144

삭제

청구항 145

삭제

청구항 146

삭제

청구항 147

삭제

청구항 148

삭제

청구항 149

삭제

청구항 150

삭제

청구항 151

삭제

청구항 152

삭제

청구항 153

삭제

청구항 154

삭제

청구항 155

삭제

청구항 156

삭제

청구항 157

삭제

청구항 158

삭제

청구항 159

삭제

청구항 160

삭제

청구항 161

삭제

청구항 162

삭제

청구항 163

삭제

청구항 164

삭제

청구항 165

삭제

청구항 166

삭제

청구항 167

삭제

청구항 168

삭제

청구항 169

삭제

청구항 170

삭제

청구항 171

삭제

청구항 172

삭제

청구항 173

삭제

청구항 174

삭제

청구항 175

삭제

청구항 176

삭제

청구항 177

삭제

청구항 178

삭제

청구항 179

삭제

청구항 180

삭제

청구항 181

삭제

청구항 182

삭제

청구항 183

삭제

청구항 184

삭제

청구항 185

삭제

청구항 186

삭제

청구항 187

삭제

청구항 188

삭제

청구항 189

삭제

청구항 190

삭제

청구항 191

삭제

청구항 192

삭제

청구항 193

삭제

청구항 194

삭제

청구항 195

삭제

청구항 196

삭제

청구항 197

삭제

청구항 198

삭제

청구항 199

삭제

청구항 200

삭제

청구항 201

삭제

청구항 202

삭제

청구항 203

삭제

청구항 204

삭제

청구항 205

삭제

청구항 206

삭제

청구항 207

삭제

청구항 208

삭제

청구항 209

삭제

청구항 210

삭제

청구항 211

삭제

청구항 212

삭제

청구항 213

삭제

청구항 214

삭제

청구항 215

삭제

청구항 216

삭제

청구항 217

삭제

청구항 218

삭제

청구항 219

삭제

청구항 220

삭제

청구항 221

삭제

청구항 222

삭제

청구항 223

삭제

청구항 224

삭제

청구항 225

삭제

청구항 226

삭제

청구항 227

삭제

청구항 228

삭제

청구항 229

삭제

청구항 230

삭제

청구항 231

삭제

청구항 232

삭제

청구항 233

삭제

청구항 234

삭제

청구항 235

삭제

청구항 236

삭제

청구항 237

삭제

청구항 238

삭제

청구항 239

삭제

청구항 240

삭제

청구항 241

삭제

청구항 242

삭제

청구항 243

삭제

청구항 244

삭제

명세서

기술분야

- [0001] 본 발명은 항원 결합 분자 (ABM) 에 관한 것이다. 특정 구현예에서, 본 발명은 인간 상피세포 성장 인자 수용체 (EGFR) 에 특이적인 키메라성, 영장화 (primatized) 또는 인간화 항체를 포함하는, 재조합 단일클론 항체에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 이러한 ABM 을 코딩하는 핵산 분자, 및 이러한 핵산 분자를 포함하는 벡터 및 숙주 세포에 관한 것이다. 본 발명은 또한 본 발명의 ABM 의 제조 방법, 및 질환의 치료에서의 상기 ABM 의 사용 방법에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 증가된 Fc 수용체 결합 및 증가된 효과기 작용을 갖는 항체를 포함하는, 개선된 치료적 특성을 갖는 개질된 글리코실화를 갖는 ABM 에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] EGFR 및 항-EGFR 항체
- [0003] 인간 상피세포 성장 인자 수용체 (또한 HER-1 또는 Erb-B1 로서 공지되고, 본원에서 "EGFR" 로 언급됨) 는 c-erbB 원발암유전자에 의해 코딩되는 170 kDa 막투과 수용체이고, 고유의 티로신 키나아제 활성을 나타낸다 (Modjtahedi 등, Br. J. Cancer 73:228-235 (1996); Herbst and Shin, Cancer 94:1593-1611 (2002)). SwissProt 데이터베이스 기입 번호 P00533 은 EGFR 의 서열을 제공한다. 또한 Swissprot 데이터베이스 기입 번호 P00533-1, P00533-2, P00533-3, 및 P00533-4 에 의해 확인되는 것들을 포함하나 이에 제한되지 않는, EGFR 의 동형체 및 변이체 (예, 대안적인 RNA 전사물, 잘려진 이형물, 다형성, 등) 가 있다. EGFR 는 상피세포 성장 인자 (EGF), 전환 성장 인자- α (TGF- α), 암피레굴린, 헤파린-결합 EGF (hb-EGF), 베타셀룰린, 및 에피레굴린을 포함하는 리간드에 결합하는 것으로 알려져 있다 (Herbst and Shin, Cancer 94:1593-1611 (2002); Mendelsohn and Baselga, Oncogene 19:6550-6565 (2000)). EGFR 는 세포 증식, 분화, 세포 생존, 세포자멸사, 혈관신생, 유사분열생식 (mitogenesis), 및 전이를 제어하는 신호 전달 경로의 활성화를 포함하나 이에 제한되지 않는, 티로신-키나아제 매개 신호 전달 경로를 통해 수 많은 세포 과정을 조절한다 (Atalay 등, Ann. Oncology 14:1346-1363 (2003); Tsao and Herbst, Signal 4:4-9 (2003); Herbst and Shin, Cancer 94:1593-1611 (2002); Modjtahedi 등, Br. J. Cancer 73:228-235 (1996)).
- [0004] EGFR 의 과발현은 방광, 뇌, 두경부, 이자, 폐, 유방, 난소, 결장, 전립선 및 신장의 암을 포함하는 수 많은 인간 악성 상태에서 보고되어 있다. (Atalay 등, Ann. Oncology 14:1346-1363 (2003); Herbst and Shin, Cancer 94:1593-1611 (2002) Modjtahedi 등, Br. J. Cancer 73:228-235 (1996)). 많은 상기 조건에서, EGFR 의 과발현은 환자의 나쁜 예후와 관련 또는 연관된다. (Herbst and Shin, Cancer 94:1593-1611 (2002); Modjtahedi 등, Br. J. Cancer 73:228-235 (1996)). EGFR 은 또한 일반적으로 악성 세포보다 더 낮은 수준이긴 하지만, 정상 조직, 특히 피부, 간 및 위장관의 상피 조직의 세포에서 발현된다 (Herbst and Shin, Cancer 94:1593-1611 (2002)).
- [0005] 비공액 단일클론 항체 (mAb) 는 미국 식약청에서 승인된, 진행된 유방암의 치료용 트라스투주맙 (Trastuzumab) (Herceptin™; Genentech Inc.) (Grillo-Lopez, A.J. 등, Semin. Oncol. 26:66-73 (1999); Goldenberg, M. M., Clin. Ther. 21:309-18 (1999)), CD20 양성 B-세포, 낮은-등급 또는 소포 비-호지킨 (Non-Hodgkin's) 림프종의 치료용 리툭시맙 (Rituximab) (Rituxan™; IDEC Pharmaceuticals, San Diego, CA, and Genentech Inc., San Francisco, CA), 재발된 급성 골수 백혈병의 치료용 겐투주맙 (Gemtuzumab) (Mylotarg™, Celltech/Wyeth-Ayerst), 및 B 세포 만성 림프구 백혈병의 치료용 알렘투주맙 (Alemtuzumab) (CAMPATH™, Millenium Pharmaceuticals/Schering AG) 에서 나타나는 바와 같이, 암의 치료용으로 유용한 의약품일 수 있다. 상기 생성물의 성공은 그들의 효능뿐 아니라, 그들의 두드러진 안정성 프로파일 때문이다 (Grillo-Lopez, A.J. 등, Semin. Oncol. 26:66-73 (1999); Goldenberg, M. M., Clin. Ther. 27:309-18 (1999)). 상기 약물의 성취에도 불구하고, 현재 비공액 mAb 요법에 의해 전형적으로 제공되는 것보다 더 높은 특이적인 항체 활성을 수득하는데 더 큰 관심이 있다.
- [0006] 수 많은 연구 결과는 Fc-수용체-의존적 메카니즘이 종양에 대항하는 세포독성 항체의 작용에 실질적으로 기여한다는 것을 제시하고, 종양에 대항하는 최적의 항체가 우선적으로는 활성화 Fc 수용체에, 최소한으로는 억제성 파트너 Fc γ RIIB 에 결합할 것이라는 것을 나타낸다. (Clynes, R. A. 등, Nature Medicine 6(4):443-446 (2000); Kalergis, A.M., and Ravetch, J. V., J. Exp. Med. 195(12):1653-1659 (June 2002)). 예를 들어, 하나 이상의 연구 결과는 Fc γ RIIIa 수용체의 다형성이 특히, 항체 요법의 효능과 강하게 관련된다는 것을 암시

한다. (Cartron, G. 등, Blood 99(3):754-757 (February 2002)). 상기 연구는 Fc γ RIIIa 에 대해 상동 접합 환자가 이종접합 환자보다 리톡시맵에 대해 더 나은 반응을 보인다고 나타냈다. 저자는 더 우세한 반응이 Fc γ RIIIa 에 대한 항체의 더 나은 생체 내 결합 때문이고, 이것이 림프종 세포에 대항하는 더 나은 ADCC 활성을 야기하게 한 것이라고 결론을 내렸다. (Cartron, G. 등, Blood 99(3):754-757 (February 2002)).

[0007] EGFR 에 표적하고, EGFR 신호 경로를 차단하기 위한 다양한 전략이 보고되어 있다. 제피티니브 (gefitinib), 에르로티니브 (erlotinib), 및 CI-1033 과 같은 소-분자 티로신 키나아제 억제제는 세포내 티로신 키나아제 영역 중의 EGFR 의 자가인산화를 차단하여, 하부방향 신호 사건을 억제한다 (Tsao and Herbst, Signal 4: 4-9 (2003)). 반면, 단일클론 항체는 EGFR 의 세포외부 부분에 표적하고, 리간드 결합을 차단하는 결과를 가져와서, 세포 증식과 같은 하부방향 사건을 억제한다 (Tsao and Herbst, Signal 4: 4-9 (2003)).

[0008] 각종 쥐과 단일클론 항체는 이러한 시험관내 차단을 달성하고, 마우스 이종이식 모델에서의 종양 성장에 영향을 주는 능력에 대해 평가되는 것으로 생성되었다 (Masui, 등, Cancer Res. 46:5592-5598 (1986); Masui, 등, Cancer Res. 44:1002-1007 (1984); Goldstein, 등, Clin. Cancer Res. 1: 1311-1318 (1995)). 예를 들어, EMD 55900 (EMD Pharmaceuticals) 은 인간 표피양 암종 세포주 A431 에 대항하여 길러진 쥐과 항-EGFR 단일클론 항체이고, 후두 또는 하인두의 진행된 편평세포 암종을 가진 환자의 임상 연구에서 시험되었다 (Bier 등, Eur. Arch. Otorhinolaryngol. 252:433-9 (1995)). 또한, EGFR 의 세포외부 도메인에 결합하는 래트 단일클론 항체 ICR16, ICR62, 및 ICR80 은, EGF 및 TGF- α 수용체의 결합을 억제하는데 효과적인 것으로 제시되어 있다. (Modjtahedi 등, Int. J. Cancer 75:310-316 (1998)). 쥐과 단일클론 항체 425 는 인간 A431 암종 세포주에 대항하여 길러진 또다른 Mab 이고, 인간 상피세포 성장 인자 수용체의 외부 도메인 상의 폴리펩티드 에피토프에 결합하는 것으로 밝혀졌다. (Murthy 등, Arch. Biochem. Biophys. 252(2):549-560 (1987)). 치료성 치료에서의 쥐과 항체의 사용에서의 잠재적인 문제는 비-인간 단일클론 항체가 인간 숙주에 의해 외부 단백질을 인지될 수 있다는 것이다; 그러므로, 이러한 외부 항체의 반복되는 주사는 해로운 과민 반응을 야기하는 면역 반응을 유도할 수 있다. 쥐과-기반 단일클론 항체로서, 이것은 종종 인간 항-마우스 항체 응답, 또는 "HAMA" 응답, 또는 인간 항-래트 항체, 또는 "HARA" 응답으로서 언급된다. 부가적으로, 상기 "외부" 항체는 숙주의 면역계에 의해 공격받아 사실상, 표적 부위에 도달하기 전에 무력화될 수 있다. 게다가, 비-인간 단일클론 항체 (예, 쥐과 단일클론 항체) 는 전형적으로 인간 효과기 작용성이 결핍되어, 즉 이들은 특히, 보체 의존적 용해를 매개하거나, 항체 의존적 세포 독성 또는 Fc-수용체 매개된 포식작용을 통해 인간 표적 세포를 용해시키는 것이 불가능하다.

[0009] 2 이상의 상이한 종 (예, 마우스 및 인간) 으로부터의 항체의 부분을 포함하는 키메라성 항체는 "공액" 항체에 대한 대안으로서 개발되고 있다. 예를 들어, 미국 특허 번호 제 5,891,996 호 (Mateo de Acosta del Rio 등.) 는 EGFR 에 대항하여 지시된 마우스/인간 키메라성 항체, R3 에 대해 논의하고 있고, 미국 특허 번호 제 5,558,864 호는 쥐과 항-EGFR Mab 425 의 키메라성 및 인간화 형태의 생성에 대해 논의하고 있다. 또한, IMC-C225 (Erbix®; ImClone) 는 다양한 인간 이종이식 모델에서 항종양 효능을 나타내는 것으로 보고된, 키메라성 마우스/인간 항-EGFR 단일클론 항체 (인간 임상 시험에서 HAMA 응답을 야기함, 마우스 M225 단일클론 항체에 기반함) 이다. (Herbst and Shin, Cancer 94:1593-1611 (2002)). IMC-C225 의 효능은 EGFR 신호 경로에 의해, 그리고 가능하게는 증가된 항체-의존적 세포 독성 (ADCC) 활성에 의해 조절된 세포 사건의 억제를 포함하는, 각종 메카니즘에 기여하고 있다 (Herbst and Shin, Cancer 94:1593-1611 (2002)). IMC-C225 는 또한 방사능요법 및 화학요법을 함께 포함하여, 임상 시험에서 사용되었다 (Herbst and Shin, Cancer 94:1593-1611 (2002)). 최근에, Abgenix, Inc. (Fremont, CA) 는 암 요법에 대한 ABX-EGF 를 개발하였다. ABX-EGF 는 전체 인간 항-EGFR 단일클론 항체이다. (Yang 등, Crit. Rev. Oncol./Hematol. 38: 17-23 (2001)).

[0010] 항체 글리코실화

[0011] 올리고당 성분은 물리적 안정성, 프로테아제 공격에 대한 내성, 면역계와의 상호영향, 약동학, 및 특정 생물학적 활성을 포함하여, 치료적 당단백질의 효능과 관련된 특성에 두드러지게 영향을 미칠 수 있다. 이러한 특성은 올리고당의, 존재 또는 부재 뿐 아니라, 특정 구조에 따라 다를 수 있다. 올리고당 구조와 당단백질 작용 사이의 일부 일반화가 있을 수 있다. 예를 들어, 특정 올리고당 구조는 특이적인 탄수화물 결합 단백질과의 상호작용을 통해 혈류로부터 당단백질의 빠른 제거를 매개하는 반면, 다른 것은 항체에 의해 결합되어 원하지 않는 면역 반응을 촉발할 수 있다. (Jenkins 등, Nature Biotechnol. 14:975-81 (1996)).

[0012] 포유류 세포는 단백질을 인간 적용에 가장 상용성인 형태로 글리코실화하는 역량 때문에, 치료적 당단백질의 제조를 위해 바람직한 숙주이다. (Cumming 등, Glycobiology 1:115-30 (1991); Jenkins 등, Nature

Biotechnol. 14:975-81 (1996)). 박테리아는 매우 드물게 단백질을 글리코실화하고, 기타 유형의 통상의 숙주와 같이 (예컨대 이스트, 사상 진균, 곤충 및 식물 세포), 혈류로부터의 빠른 제거, 원하지 않는 면역 상호작용, 및 일부 특정한 경우에서, 감소된 생물학적 활성과 관련된 글리코실화 패턴을 산출한다. 포유류 세포 중에서, 중국 햄스터 난소 (CHO) 세포가 지난 20 년 동안 가장 통상적으로 사용되어 왔다. 적합한 글리코실화 패턴을 제공하는 것 외에도, 상기 세포는 유전적으로 안정한, 고도로 증식성인 클론 세포주의 일관된 발생을 가능하게 한다. 이들은 간단한 생물 반응장치에서 혈청이 없는 배지를 사용하여 고밀도로 배양할 수 있고, 안전하고 번식가능한 생물학적공정의 개발을 허용할 수 있다. 기타 통상적으로 사용되는 동물 세포에는 어린 햄스터 신장 (BHK) 세포, NS0- 및 SP2/0- 마우스 골수종 세포가 포함된다. 더욱 최근에는, 트랜스제닉 동물로부터의 제조를 또한 시험하고 있다. (Jenkins 등, Nature Biotechnol. 14:975-81 (1996)).

[0013] 모든 항체는 각 동종형이 단백질 어셈블리 (assembly), 분비 또는 작용 활성에 다양하게 영향을 끼치는, N-연결된 탄수화물 구조의 구별되는 어레이를 갖는, 중쇄 불변 영역에서의 보존된 위치에서 탄수화물 구조를 함유한다. (Wright, A., and Morrison, S. L., Trends Biotech. 15:26-32 (1997)). 부착된 N-연결된 탄수화물의 구조는 처리 정도에 따라 상당히 다양하고, 고-만노즈, 복합-분지된 뿐 아니라, 비안테나리 (biantennary) 복합체 올리고당이 포함될 수 있다. (Wright, A., and Morrison, S. L., Trends Biotech. 15:26-32 (1997)). 전형적으로, 심지어 단일클론 항체가 복합 글리코형태로서 존재하도록 특정 글리코실화 부위에 부착된 코어 올리고당 구조의 이중 처리가 있다. 마찬가지로, 항체 글리코실화의 주요한 차이점이 세포주 사이에서 발생하고, 심지어 덜 중요한 차이점은 상이한 배양 조건하에서 성장된 제공된 세포주에 대해 관찰된다는 것이 제시되어 있다. (Lifely, M. R. 등, Glycobiology 5(8):813-22 (1995)).

[0014] 간단한 제조 방법을 유지하고, 잠재적으로 뚜렷한, 원하지 않는 부작용을 피하면서, 잠재성의 큰 증가를 수득하기 위한 한 방법은, 그 내용이 본원에 전체가 참조로서 인용된 [Umana, P. 등, Nature Biotechnol. 17:176-180 (1999)] 및 미국 특허 번호 제 6,602,684 호에 기재된 바와 같이 올리고당 성분을 유전공학설계로 단일클론 항체의 천연, 세포-매개 효과기 작용을 향상시키는 것이다. 암 면역요법에서 가장 통상적으로 사용되는 항체인, IgG1 유형 항체는, 각 CH2 도메인의 Asn297 에서 보존된 N-연결된 글리코실화 부위를 갖는 당단백질이다. Asn297 에 부착된 2 개의 복합체 비안테나리 올리고당은 CH2 도메인 사이에 묻혀, 폴리펩티드 백본과 광범위하게 접촉하고, 이들의 존재는 항체 의존적 세포성 세포독성 (ADCC) 과 같은 효과기 작용을 매개하기 위해 항체에 대해 필수적이다 (Lifely, M. R. 등, Glycobiology 5:813-822 (1995); Jefferis, R. 등, Immunol Rev. 163:59-76 (1998); Wright, A. and Morrison, S. L., Trends Biotechnol 75:26-32 (1997)).

[0015] Umana 등은 양분된 올리고당의 형성을 촉매화하는 글리코실트랜스페라아제인 β (1,4)-N-아세틸글루코사미닐트랜스페라아제 III ("GnTIII") 의 중국 햄스터 난소 (CHO) 세포에서의 과발현이, 유전공학설계된 CHO 세포에 의해 제조된 항-신경모세포종 키메라성 단일클론 항체 (chCE7) 의 시험관내 ADCC 활성을 뚜렷하게 증가시킨다는 것을 이미 제시하였다. 본원에 전체 내용이 참조로서 인용된, (Umana, P. 등, Nature Biotechnol 17:176-180 (1999); 및 국제 공개 번호 WO 99/54342 참조, 됨). 항체 chCE7 은 높은 종양 친화성 및 특이성을 가지나, GnTIII 효소가 결핍된 표준 산업적 세포주에서 제조되는 경우 임상적으로 유용한 잠재성이 거의 없는, 비공액 mAbs 의 큰 계열에 속한다 (Umana, P. 등, Nature Biotechnol. 17:176-180 (1999)). 그 연구는 첫째로 ADCC 활성의 큰 증가가 GnTIII 을 발현하기 위해 항체-제조 세포를 유전공학설계하여 수득될 수 있었고, 이것은 또한 양분된, 비포고실화 올리고당을 포함하는 불변 영역 (Fc)-연관, 양분된 올리고당의 비율을, 자연 발생적 항체에서 발견되는 수준 초과파의 증가를 야기할 수 있다는 것을 제시하기 위한 것이었다.

[0016] 인간을 포함하나 이에 제한되지 않는 영장류에서의 세포 증식 장애의 치료를 위해 EGFR 를 표적하는 향상된 치료적 접근법에 대한 요구가 남아 있으며, 여기서 이러한 장애는 방광, 뇌, 두경부, 이차, 폐, 유방, 난소, 결장, 전립선 및 신장의 암을 포함하나 이에 제한되지 않는, EGFR 발현, 특히 비정상 발현 (예, 과발현) 을 특징으로 한다.

발명의 상세한 설명

[0017] 래트 ICR62 항체의 결합 특이성을 갖고 (예를 들어, 동일한 에피토프에 결합함), Fc 수용체 결합 친화성 및 효과기 작용을 향상시키기 위해 당조작된 (glycoengineered) 항원 결합 분자 (ABM) 의 중대한 치료적 잠재력을 인지하여, 본 출원인은 이러한 ABM 의 제조 방법을 개발하였다. 특히, 상기 방법에는 그의 재조합, 키메라성 항체 또는 키메라성 분절의 제조가 포함된다. 상기 ABM 의 효능은 항체 Fc 영역의 글리코실화 프로파일을 유전공학설계하여 추가로 향상된다.

[0018] 따라서, 하나의 양상에서, 본 발명은 하기를 포함하는 단리된 폴리뉴클레오티드에 관한 것이다: (a) SEQ ID

NO:54, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:58, SEQ ID NO:60, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:64, SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:68, SEQ ID NO:70, SEQ ID NO:72, SEQ ID NO:74, SEQ ID NO:122, 및 SEQ ID NO:124 로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열; (b) SEQ ID NO:76, SEQ ID NO:78, SEQ ID NO:80, SEQ ID NO:82, SEQ ID NO:84, SEQ ID NO:86, SEQ ID NO:88, SEQ ID NO:90, SEQ ID NO:92, SEQ ID NO:94, SEQ ID NO:96, SEQ ID NO:98, SEQ ID NO:100, SEQ ID NO:102, SEQ ID NO:104, SEQ ID NO:106, 및 SEQ ID NO:126 으로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열; 및 (c) SEQ ID NO:108. 또다른 양상에서, 본 발명은 하기를 포함하는 단리된 폴리뉴클레오티드에 관한 것이다: (a) SEQ ID NO:112 및 SEQ ID NO:114 로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열; (b) SEQ ID NO:116 및 SEQ ID NO:118 로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열; 및 (c) SEQ ID NO:119. 하나의 구현예에서, 임의의 상기 폴리뉴클레오티드는 융합 폴리펩티드를 코딩한다.

[0019] 추가 양상에서, SEQ ID NO:2; SEQ ID NO:4; SEQ ID NO:6; SEQ ID NO:8; SEQ ID NO:10; SEQ ID NO:12; SEQ ID NO:14; SEQ ID NO:16; SEQ ID NO:18; SEQ ID NO:20; SEQ ID NO:22; SEQ ID NO:24; SEQ ID NO:26; SEQ ID NO:28; SEQ ID NO:30; SEQ ID NO:32; SEQ ID NO:34; SEQ ID NO:36; SEQ ID NO:38; SEQ ID NO:40 및 SEQ ID NO:120 로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열을 포함하는 단리된 폴리뉴클레오티드에 관한 것이다. 또다른 양상에서, SEQ ID NO:44; SEQ ID NO:46; SEQ ID NO:50; 및 SEQ ID NO:52 로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열을 포함하는 단리된 폴리뉴클레오티드에 관한 것이다. 하나의 구현예에서, 이러한 폴리뉴클레오티드는 융합 폴리펩티드를 코딩한다.

[0020] 본 발명은 또한 SEQ ID NO:2; SEQ ID NO:4; SEQ ID NO:6; SEQ ID NO:8; SEQ ID NO:10; SEQ ID NO:12; SEQ ID NO:14; SEQ ID NO:16; SEQ ID NO:18; SEQ ID NO:20; SEQ ID NO:22; SEQ ID NO:24; SEQ ID NO:26; SEQ ID NO:28; SEQ ID NO:30; SEQ ID NO:32; SEQ ID NO:34; SEQ ID NO:36; SEQ ID NO:38; SEQ ID NO:40 및 SEQ ID NO:120 으로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열과 80% 이상, 85%, 90%, 95%, 또는 99% 일치성을 갖는 서열을 포함하는 단리된 폴리뉴클레오티드에 관한 것이며, 여기서 상기 단리된 폴리뉴클레오티드는 융합 폴리펩티드를 코딩한다. 추가적 양상에서, 본 발명은 SEQ ID NO:44; SEQ ID NO:46; SEQ ID NO:50; 및 SEQ ID NO:52 로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열과 80% 이상 일치성을 갖는 서열을 포함하는 단리된 폴리뉴클레오티드에 관한 것이며, 여기서 상기 단리된 폴리뉴클레오티드는 융합 폴리펩티드를 코딩한다.

[0021] 또한 본 발명은 SEQ ID NO:1 의 서열을 갖는 키메라성 폴리펩티드를 코딩하는 단리된 폴리뉴클레오티드에 관한 것이다. 하나의 구현예에서, 폴리뉴클레오티드는 SEQ ID NO:1 의 서열을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 서열; 및 래트 이외의 종으로부터, 항체 Fc 영역의 서열을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 서열, 또는 그의 분절을 포함한다. 또한 본 발명은 SEQ ID NO:3; SEQ ID NO:5; SEQ ID NO:7; SEQ ID NO:9; SEQ ID NO:11; SEQ ID NO:13; SEQ ID NO:15; SEQ ID NO:17; SEQ ID NO:19; SEQ ID NO:21; SEQ ID NO:23; SEQ ID NO:25; SEQ ID NO:27; SEQ ID NO:29; SEQ ID NO:31; SEQ ID NO:33; SEQ ID NO:35; SEQ ID NO:37; SEQ ID NO:39; 및 SEQ ID NO:121 로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열을 갖는 키메라성 폴리펩티드를 코딩하는 단리된 폴리뉴클레오티드에 관한 것이다. 하나의 구현예에서, 폴리뉴클레오티드는 SEQ ID NO:3; SEQ ID NO:5; SEQ ID NO:7; SEQ ID NO:9; SEQ ID NO:11; SEQ ID NO:13; SEQ ID NO:15; SEQ ID NO:17; SEQ ID NO:19; SEQ ID NO:21; SEQ ID NO:23; SEQ ID NO:25; SEQ ID NO:27; SEQ ID NO:29; SEQ ID NO:31; SEQ ID NO:33; SEQ ID NO:35; SEQ ID NO:37; SEQ ID NO:39; 및 SEQ ID NO:121 로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 서열; 및 래트 이외의 종으로부터, 항체 Fc 영역의 서열을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 서열, 또는 그의 분절을 포함한다.

[0022] 또다른 양상에서, 본 발명은 SEQ ID NO:43 의 서열을 갖는 키메라성 폴리펩티드를 코딩하는 단리된 폴리뉴클레오티드에 관한 것이다. 하나의 구현예에서, 폴리뉴클레오티드는 SEQ ID NO:43 의 서열을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 서열; 및 래트 이외의 종으로부터, 항체 Fc 영역의 서열을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 서열, 또는 그의 분절을 포함한다. 또다른 양상에서, 본 발명은 SEQ ID NO:45; SEQ ID NO:49; 및 SEQ ID NO:51 로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열을 갖는 키메라성 폴리펩티드를 코딩하는 단리된 폴리뉴클레오티드에 관한 것이다. 하나의 구현예에서, 폴리뉴클레오티드는 SEQ ID NO:45; SEQ ID NO:49; 및 SEQ ID NO:51 로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 서열, 및 래트 이외의 종으로부터, 항체 경쇄 불변 영역 (CL) 의 서열을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 서열, 또는 그의 분절을 포함한다.

[0023] 또한 본 발명은 ICR62 항체의 VH 영역을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 서열, 또는 그의 작용적 변이체, 및 래트 이외의 종으로부터, 항체 Fc 영역의 서열을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 서열, 또는 그의 분절을 포함하는 단리된 폴리뉴클레오티드에 관한 것이다. 또다른 양상에서, 본 발명은 ICR62 항체의 VL 영역을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 서열, 또는 그의 작용적 변이체, 및 래트 외의 종으로부터의 항체 CL 영역의 서열을 갖는 폴리펩티

드를 코딩하는 서열, 또는 그의 분절을 포함하는 단리된 폴리뉴클레오티드에 관한 것이다.

[0024] 본 발명은 또한 상기 기재된 임의의 단리된 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터, 및 이러한 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포에 관한 것이다. 추가적 양상에서, 본 발명은 상기 기재된 임의의 단리된 폴리뉴클레오티드를 포함하는 숙주 세포에 관한 것이다.

[0025] 하나의 양상에서, 본 발명은 하기를 포함하는 단리된 폴리펩티드에 관한 것이며: (a) SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:57, SEQ ID NO:59, SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:63, SEQ ID NO:65, SEQ ID NO:67, SEQ ID NO:69, SEQ ID NO:71, SEQ ID NO:73, SEQ ID NO:123, 및 SEQ ID NO:125 로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열; (b) SEQ ID NO:75, SEQ ID NO:77, SEQ ID NO:79, SEQ ID NO:81, SEQ ID NO:83, SEQ ID NO:85, SEQ ID NO:87, SEQ ID NO:89, SEQ ID NO:91, SEQ ID NO:93, SEQ ID NO:95, SEQ ID NO:97, SEQ ID NO:99, SEQ ID NO:101, SEQ ID NO:103, SEQ ID NO:105, 및 SEQ ID NO:127 로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열; 및 (c) SEQ ID NO:107, 여기서 상기 폴리펩티드는 융합 폴리펩티드이다. 또다른 양상에서, 본 발명은 (a) SEQ ID NO:111 및 SEQ ID NO:113 으로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열; (b) SEQ ID NO:115; 및 (c) SEQ ID NO:117 을 포함하는 단리된 폴리펩티드에 관한 것이며, 여기서 상기 폴리펩티드는 융합 폴리펩티드이다.

[0026] 또한 본 발명은 SEQ ID NO:1 의 서열 또는 그의 변이체를 포함하는 키메라성 폴리펩티드에 관한 것이다. 또한 본 발명은 SEQ ID NO:43 의 서열 또는 그의 변이체를 포함하는 키메라성 폴리펩티드에 관한 것이다. 하나의 구현예에서, 상기 폴리펩티드 중 임의의 하나는 추가로 인간 Fc 영역 및/또는 인간 CL 영역을 포함한다. 또한 본 발명은 SEQ ID NO:3; SEQ ID NO:5; SEQ ID NO:7; SEQ ID NO:9; SEQ ID NO:11; SEQ ID NO:13; SEQ ID NO:15; SEQ ID NO:17; SEQ ID NO:19; SEQ ID NO:21; SEQ ID NO:23; SEQ ID NO:25; SEQ ID NO:27; SEQ ID NO:29; SEQ ID NO:31; SEQ ID NO:33; SEQ ID NO:35; SEQ ID NO:37; SEQ ID NO:39; 및 SEQ ID NO:121 로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열, 또는 그의 변이체를 포함하는 키메라성 폴리펩티드에 관한 것이다. 본 발명은 추가로 SEQ ID NO:45; SEQ ID NO:49; 및 SEQ ID NO:51 로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열, 또는 그의 변이체를 포함하는 키메라성 폴리펩티드에 관한 것이다. 하나의 구현예에서, 상기 폴리펩티드 중 임의의 하나는 추가로 인간 Fc 영역 및/또는 인간 CL 영역을 포함한다. 하나의 구현예에서, 인간 Fc 영역은 IgG1 을 포함한다.

[0027] 또다른 양상에서, 본 발명은 ICR62 항체 유래의 서열 및 이중 폴리펩티드 유래의 서열을 포함하는 폴리펩티드 및 이러한 폴리펩티드를 포함하는 항원-결합 분자에 관한 것이다. 하나의 구현예에서, 항원-결합 분자는 항체이다. 바람직한 구현예에서, 항체는 키메라성이다. 또다른 바람직한 구현예에서, 항체는 인간화되거나 영장화된다.

[0028] 또다른 양상에서, 본 발명은 EGFR 에 결합하기 위해 래트 ICR62 항체와 경쟁할 수 있고, 키메라성인 ABM 에 관한 것이다. 하나의 구현예에서, ABM 은 항체 또는 그의 분절이다. 추가의 구현예에서, ABM 은 SEQ ID NO:1; SEQ ID NO:3; SEQ ID NO:5; SEQ ID NO:7; SEQ ID NO:9; SEQ ID NO:11; SEQ ID NO:13; SEQ ID NO:15; SEQ ID NO:17; SEQ ID NO:19; SEQ ID NO:21; SEQ ID NO:23; SEQ ID NO:25; SEQ ID NO:27; SEQ ID NO:29; SEQ ID NO:31; SEQ ID NO:33; SEQ ID NO:35; SEQ ID NO:37; SEQ ID NO:39; 및 SEQ ID NO:121 로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 갖는 VH 영역을 포함하는 재조합 항체이다. 또다른 구현예에서, ABM 은 SEQ ID NO:43, SEQ ID NO:45; SEQ ID NO:49; 및 SEQ ID NO:51 로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 갖는 VL 영역을 포함하는 재조합 항체이다. 추가의 구현예에서, ABM 은 영장화된 재조합 항체이다. 추가의 구현예에서, ABM 은 인간화된 재조합 항체이다. 또다른 구현예에서, ABM 은 인간 Fc 영역을 포함하는 재조합 항체이다. 추가의 구현예에서, 상기 논의된 임의의 ABM 은 독소 또는 방사선표지와 같은 부분에 공액될 수 있다.

[0029] 본 발명은 추가로 ABM 이 개질된 올리고당을 가진, 본 발명의 ABM 에 관한 것이다. 하나의 구현예에서, 개질된 올리고당은 비-개질된 올리고당에 비해 푸코실화가 감소된다. 다른 구현예에서, 개질된 올리고당은 잡종 또는 복합체이다. 추가의 구현예에서, ABM 은 상기 분자의 Fc 영역에서 증가된 비율의 비푸코실화 올리고당 또는 양분된, 비푸코실화 올리고당을 갖는다. 하나의 구현예에서, 양분된, 비푸코실화 올리고당은 잡종이다. 추가의 구현예에서, 양분된, 비푸코실화 올리고당은 복합체이다. 하나의 구현예에서, 상기 폴리펩티드의 Fc 영역에서 20% 이상의 올리고당이 비푸코실화 또는 양분된, 비푸코실화된다. 더욱 바람직한 구현예에서, 30% 이상, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70% 또는 75% 의 올리고당이 비푸코실화 또는 양분된, 비푸코실화된다.

[0030] 본 발명은 추가로 상기 기재된 임의의 ABM 을 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 및 이러한 폴리뉴클레오티드를 포함

하는 발현 벡터 및 세포에 관한 것이다.

- [0031] 본 발명은 추가로 하기를 포함하는, EGFR 에 결합하기 위해 래트 ICR62 항체와 경쟁할 수 있고, 키메라성인 ABM 의 제조 방법에 관한 것이다: (a) 본 발명의 ABM 을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 숙주 세포를, 상기 ABM 을 코딩하는 상기 폴리뉴클레오티드의 발현을 가능하게 하는 조건 하의 배지에서 배양함; 및 (b) 수득 배양 물로부터 상기 ABM 을 회수함.
- [0032] 또다른 양상에서, 본 발명은 본 발명의 ABM 을 포함하는 약학 조성물에 관한 것이다. 약학 조성물은 약학적으로 허용가능한 담체, 항원보강제 또는 그의 조합을 추가로 포함할 수 있다는 것이 고려된다.
- [0033] 추가 양상에서, 본 발명은 EGFR 의 발현 (예, EGFR 의 비정상 또는 과발현) 을 특징으로 하는 질환의 치료 방법에 관한 것이다. 상기 방법은 치료적 유효량의 본 발명의 ABM 을 이를 필요로 하는 대상에게, 바람직하게는 포유류 대상에게, 더욱 바람직하게는 인간에게 투여하는 것을 포함한다. 바람직한 구현예에서, 질환은 키메라성 (예, 인간화) 항체, 또는 항체의 키메라성 분절인 ABM 을 투여하여 치료한다. 하나의 구현예에서, ABM 은 약 1.0 mg/kg 내지 약 15.0 mg/kg 의 양으로 투여한다. 또다른 구현예에서, ABM 은 약 1.5 mg/kg 내지 약 12.0 mg/kg 의 양으로 투여한다. 추가의 구현예에서, ABM 은 약 1.5 mg/kg 내지 약 4.5 mg/kg 의 양으로 투여한다. 추가의 구현예에서, ABM 은 약 4.5 mg/kg 내지 약 12.0 mg/kg 의 양으로 투여한다. 추가의 구현예에서, ABM 은 약 1.5, 약 4.5, 및 약 12.0 mg/kg 으로 이루어진 군으로부터 선택되는 양으로 투여한다.
- [0034] 또다른 양상에서, 본 발명은 숙주 세포에 의해 제조된 ABM 의 Fc 영역에서 올리고당을 개질시키기에 충분한 양으로 GnTIII 활성을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 하나 이상의 핵산을 발현하기 위해 유전공학설계된 숙주 세포에 관한 것이며, 여기서 ABM 은 EGFR 에 결합하기 위해 래트 ICR62 항체와 경쟁할 수 있고, 상기 ABM 은 키메라성이다. 하나의 구현예에서, GnTIII 활성을 갖는 폴리펩티드는 융합 폴리펩티드이다. 또다른 구현예에서, 숙주 세포에 의해 제조된 ABM 은 항체 또는 항체 분절이다. 하나의 구현예에서, 항체 또는 항체 분절은 인간화된다. 추가의 구현예에서, ABM 은 인간 IgG 의 Fc 영역과 동등한 영역을 포함한다.
- [0035] 또한 본 발명은 래트 ICR62 항체의 하나 이상의 (예, 1, 2, 3, 4, 5, 또는 6 개의) 상보성 결정 영역, 또는 상기 상보성 결정 영역에 대해 적어도 특이성-결정 잔기를 함유하는 그의 변이체 또는 잘려진 형태를 포함하는 단리된 폴리뉴클레오티드에 관한 것이며, 여기서 상기 단리된 폴리뉴클레오티드는 융합 폴리펩티드를 코딩한다. 바람직하게는, 이러한 단리된 폴리뉴클레오티드는 항원 결합 분자인 융합 폴리펩티드를 코딩한다. 하나의 구현예에서, 폴리뉴클레오티드는 래트 ICR62 항체의 3 개의 상보성 결정 영역, 또는 각각의 상기 3 개의 상보성 결정 영역에 대해 적어도 특이성-결정 잔기를 함유하는 그의 변이체 또는 잘려진 형태를 포함한다. 또다른 구현예에서, 폴리뉴클레오티드는 키메라성 (예, 인간화) 항체의 경쇄 또는 중쇄의 전체 가변 영역을 코딩한다. 본 발명은 추가로 이러한 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩된 폴리펩티드에 관한 것이다.
- [0036] 또다른 구현예에서, 본 발명은 래트 ICR62 항체의 하나 이상의 (예, 1, 2, 3, 4, 5, 또는 6 개의) 상보성 결정 영역, 또는 상기 상보성 결정 영역에 대해 적어도 특이성-결정 잔기를 함유하는 그의 변이체 또는 잘려진 형태를 포함하고, 이중 폴리펩티드 유래의 서열을 포함하는 항원 결합 분자에 관한 것이다. 하나의 구현예에서, 항원 결합 분자는 래트 ICR62 항체의 3 개의 상보성 결정 영역, 또는 상기 각각의 3 개의 상보성 결정 영역에 대해 적어도 특이성-결정 잔기를 함유하는 그의 변이체 또는 잘려진 형태를 포함한다. 또다른 양상에서, 항원 결합 분자는 항체 경쇄 또는 중쇄의 가변 영역을 포함한다. 하나의 특히 유용한 구현예에서, 항원 결합 분자는 키메라성, 예를 들어, 인간화 항체이다. 또한 본 발명은 이러한 항원 결합 분자의 제조 방법, 및 방광, 뇌, 두경부, 이자, 폐, 유방, 난소, 결장, 전립선 및 신장의 암과 같은 악성종양을 포함하는 질환의 치료에서의 이의 용도에 관한 것이다.
- [0037] 본 발명의 숙주 세포는 HEK293-EBNA 세포, CHO 세포, BHK 세포, NS0 세포, SP2/0 세포, YO 골수종 세포, P3X63 마우스 골수종 세포, PER 세포, PER.C6 세포 또는 하이브리도마 세포를 포함하나 이에 제한되는 것은 아닌 군으로부터 선택될 수 있다. 하나의 구현예에서, 본 발명의 숙주 세포는 추가로 래트 ICR62 항체의 VL 영역을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 또는 그의 변이체 및 인간 면역글로불린의 Fc 영역과 동등한 영역을 코딩하는 서열을 포함하는 트랜스팩션된 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 또다른 구현예에서, 본 발명의 숙주 세포는 추가로 래트 ICR62 항체의 VH 영역을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 또는 그의 변이체 및 인간 면역글로불린의 Fc 영역과 동등한 영역을 코딩하는 서열을 포함하는 트랜스팩션된 폴리뉴클레오티드를 포함한다.
- [0038] 추가 양상에서, 본 발명은 올리고당의 개질의 결과로서 증가된 Fc 수용체 결합 친화성 및/또는 증가된 효과기

작용을 나타내는 ABM 을 제조하는 숙주 세포에 관한 것이다. 하나의 구현예에서, 증가된 결합 친화성은 Fc 수용체, 특히, Fc γ RIIIA 수용체에 대한 것이다. 본원에 고려된 효과기 작용은 증가된 Fc-매개된 세포성 세포독성; NK 세포에 대한 증가된 결합; 대식세포에 대한 증가된 결합; 다핵형 세포에 대한 증가된 결합; 단핵구에 대한 증가된 결합; 세포자멸사를 포함하는 증가된 직접 신호; 증가된 수지상 세포 성숙; 및 증가된 T 세포 초회감작 (priming) 을 포함하나 이에 제한되지 않는 군으로부터 선택될 수 있다.

[0039] 추가의 구현예에서, 본 발명의 숙주 세포는 구성적 프로모터 요소에 작동가능하게 연결된 GnTIII 활성을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 하나 이상의 핵산을 포함한다.

[0040] 또다른 양상에서, 하기를 포함하는, 숙주 세포에서 ABM 의 제조 방법에 관한 것이다: (a) GnTIII 활성을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 하나 이상의 폴리뉴클레오티드를 발현하도록 유전공학설계된 숙주 세포를, 상기 ABM 의 제조가 가능하고, 상기 ABM 의 Fc 영역에 존재하는 올리고당의 개질을 가능하게하는 조건 하에서 배양함; 및 (b) 상기 ABM 을 단리함 (여기서 상기 ABM 은 EGFR 에 결합하기 위해 래트 ICR62 항체와 경쟁할 수 있고, 상기 ABM 은 키메라성 (예, 인간화) 임). 하나의 구현예에서, GnTIII 활성을 갖는 폴리펩티드는 융합 폴리펩티드 이고, 바람직하게는 GnTIII 의 촉매성 도메인 및 만노시다아제 II 의 위치화 도메인, β (1,2)-N-아세틸글루코사미닐트랜스페라아제 I ("GnTI") 의 위치화 도메인, 만노시다아제 I 의 위치화 도메인, β (1,2)-N-아세틸글루코사미닐트랜스페라아제 II ("GnTII") 의 위치화 도메인, 및 α 1-6 코어 푸코실트랜스페라아제의 위치화 도메인으로 이루어진 군으로부터 선택된 이중 골지 (Golgi) 체류 폴리펩티드의 골지 위치화 도메인을 포함한다. 바람직하게는, 골지 위치화 도메인은 만노시다아제 II 또는 GnTI 유래이다.

[0041] 추가 양상에서, 본 발명은 본 발명의 하나 이상의 핵산 또는 발현 벡터를 숙주 세포 내로 도입하는 것을 포함하는, 숙주 세포에 의해 제조된 항-EGFR ABM 의 글리코실화 프로파일의 개질 방법에 관한 것이다. 하나의 구현예에서, ABM 은 항체 또는 그의 분절이고; 바람직하게는 IgG 의 Fc 영역을 포함한다. 대안적으로는, 폴리펩티드는 인간 IgG 의 Fc 영역과 동등한 영역을 포함하는 융합 단백질이다.

[0042] 하나의 양상에서, 본 발명은 EGFR 에 대한 결합을 위해 래트 ICR62 항체와 경쟁할 수 있고 푸코실화가 감소된 제조합, 키메라성 항체, 또는 그의 분절에 관한 것이다.

[0043] 또다른 양상에서, 본 발명은 GnTIII 활성을 갖고, 이중 골지 체류 폴리펩티드의 골지 위치화 도메인을 포함하는 융합 폴리펩티드를 사용함에 의한 본 발명의 제조합 항체 또는 그의 분절의 글리코실화의 개질 방법에 관한 것이다. 하나의 구현예에서, 본 발명의 융합 폴리펩티드는 GnTIII 의 촉매성 도메인을 포함한다. 또다른 구현예에서, 골지 위치화 도메인은, 만노시다아제 II 의 위치화 도메인, GnTI 의 위치화 도메인, 만노시다아제 I 의 위치화 도메인, GnTII 의 위치화 도메인 및 α 1-6 코어 푸코실트랜스페라아제의 위치화 도메인으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 바람직하게는, 골지 위치화 도메인은 만노시다아제 II 또는 GnTI 유래이다.

[0044] 하나의 구현예에서, 본 발명의 방법은 개질된 올리고당으로 제조합, 키메라성 항체 또는 그의 분절을 제조하는 것에 대한 것이며, 상기 개질된 올리고당은 비-개질된 올리고당에 비해 푸코실화가 감소된다. 본 발명에 따르면, 상기 개질된 올리고당은 잡종 또는 복합체일 수 있다. 또다른 구현예에서, 본 발명의 방법은 상기 폴리펩티드의 Fc 영역에서 증가된 비율의 양분된, 비푸코실화 올리고당을 갖는 제조합, 키메라성 (예, 인간화) 항체 또는 그의 분절을 제조하는 것에 대한 것이다. 하나의 구현예에서, 양분된, 비푸코실화 올리고당은 잡종이다. 또다른 구현예에서, 양분된, 비푸코실화 올리고당은 복합체이다. 추가의 구현예에서, 본 발명의 방법은 양분된, 비푸코실화된 상기 폴리펩티드의 Fc 영역에서 20% 이상의 올리고당을 갖는 제조합, 키메라성 항체 또는 그의 분절을 제조하는 것에 대한 것이다. 바람직한 구현예에서, 상기 폴리펩티드의 Fc 영역에서 30% 이상의 올리고당이 양분, 비푸코실화된다. 또다른 바람직한 구현예에서, 상기 폴리펩티드의 Fc 영역에서 35% 이상의 올리고당이 양분, 비푸코실화된다.

[0045] 추가 양상에서, 본 발명은 올리고당의 개질의 결과로서 증가된 Fc 수용체 결합 친화성 및/또는 증가된 효과기 작용을 나타내는 제조합, 키메라성 항체 또는 그의 분절에 관한 것이다. 하나의 구현예에서, 증가된 결합 친화성은 Fc 활성화와 수용체에 대한 것이다. 추가의 구현예에서, Fc 수용체는 Fc γ 활성화와 수용체, 특히, Fc γ RIIIA 수용체이다. 본원에 고려된 효과기 작용은 증가된 Fc-매개된 세포성 세포독성; NK 세포에 대한 증가된 결합; 대식세포에 대한 증가된 결합; 다핵형 세포에 대한 증가된 결합; 단핵구에 대한 증가된 결합; 세포자멸사를 포함하는 증가된 직접 신호; 증가된 수지상 세포 성숙; 및 증가된 T 세포 초회감작을 포함하나 이에 제한되지 않는 군으로부터 선택될 수 있다.

[0046] 또다른 양상에서, 본 발명은 본 발명의 임의의 방법에 의해 제조된 증가된 효과기 작용을 갖도록 유전공학설계

된, 래트 ICR62 항체의 결합 특이성을 갖고, Fc 영역을 함유하는 제조합, 키메라성 (예, 인간화) 항체 분절에 관한 것이다.

[0047] 또다른 양상에서, 본 발명은 SEQ ID NO:1; SEQ ID NO:3; SEQ ID NO:5; SEQ ID NO:7; SEQ ID NO:9; SEQ ID NO:11; SEQ ID NO:13; SEQ ID NO:15; SEQ ID NO:17; SEQ ID NO:19; SEQ ID NO:21; SEQ ID NO:23; SEQ ID NO:25; SEQ ID NO:27; SEQ ID NO:29; SEQ ID NO:31; SEQ ID NO:33; SEQ ID NO:35; SEQ ID NO:37; SEQ ID NO:39; 및 SEQ ID NO:121 로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열, 및 면역글로불린의 Fc 영역과 동등하고 본 발명의 임의의 방법에 의해 제조된 증가된 효과기 작용을 갖도록 유전공학설계된 영역을 갖는 폴리펩티드를 포함하는 융합 단백질에 관한 것이다.

[0048] 또다른 양상에서, 본 발명은 SEQ ID NO:43, SEQ ID NO:45; SEQ ID NO:49; 및 SEQ ID NO:51 로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열, 및 면역글로불린의 Fc 영역과 동등하고 본 발명의 임의의 방법에 의해 제조된 증가된 효과기 작용을 갖도록 유전공학설계된 영역을 갖는 폴리펩티드를 포함하는 융합 단백질에 관한 것이다.

[0049] 하나의 양상에서, 본 발명은 본 발명의 임의의 방법에 의해 제조된 제조합, 키메라성 (예, 인간화) 항체, 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 약학 조성물에 관한 것이다. 또다른 양상에서, 본 발명은 본 발명의 임의의 방법에 의해 제조된 제조합, 키메라성 (예, 인간화) 항체 분절, 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 약학 조성물에 관한 것이다. 또다른 양상에서, 본 발명은 본 발명의 임의의 방법에 의해 제조된 융합 단백질, 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 약학 조성물에 관한 것이다.

[0050] 추가 양상에서, 본 발명은 EGFR 을 발현하는 세포의 생체내 또는 시험관내 표적 방법에 관한 것이다. 하나의 구현예에서, 본 발명은 본 발명의 ABM 을 포함하는 조성물을 대상에게 투여하는 것을 포함하는, 대상에서의 EGFR 을 발현하는 세포의 표적 방법에 관한 것이다.

[0051] 또다른 양상에서, 본 발명은 예를 들어 EGFR 발현과 관련된 장애의 진단을 위해, 샘플에서의 EGFR 의 존재의 생체내 또는 시험관내 측정 방법에 관한 것이다. 하나의 구현예에서, 측정은 시험될 샘플을, ABM 과 EGFR 사이의 복합체의 형성을 가능하게 하는 조건하에서, 임의로 대조군 샘플과, 본 발명의 ABM 과 접촉시켜 수행한다. 그 다음 복합체 형성을 측정한다 (예, ELISA 또는 당업계에 공지된 기타 방법에 의해). 대조군 샘플을 시험 샘플과 사용하는 경우, 시험 및 대조군 샘플과 비교할 때 ABM-EGFR 복합체 형성에서 임의의 통계적으로 유의한 차이가 시험 샘플에서의 EGFR 의 존재의 지표이다.

[0052] 본 발명은 추가로 본 발명의 임의의 방법에 의해 제조된, 치료적 유효량의 제조합, 키메라성 (예, 인간화) 항체 또는 그의 분절을, 이를 필요로 하는 인간 대상에게 투여하는 것을 포함하는, EGFR 발현과 관련된 장애, 특히, EGFR 이 발현된, 더욱 특히, EGFR 이 비정상적으로 발현된 (예, 과발현된), 방광, 뇌, 두경부, 이자, 폐, 유방, 난소, 결장, 전립선, 피부 및 신장의 암을 포함하는 세포 증식 장애의 치료 방법에 관한 것이다.

실시예

[0284] 다르게 언급되지 않는다면, 하기 실시예에서 특이적 아미노산 잔기 위치의 넘버링에 대한 참조는 Kabat 넘버링 시스템에 따른다. 다르게 표시되지 않는다면, 본 작업 실시예에서 기재된 항체를 제조하기 위해 사용된 재료 및 방법은 본원에 전체가 참조로서 인용된 미국 특허 출원 번호 제 10/981,738 호의 실시예에서 언급된 것들을 따른다.

[0285] 실시예 1

[0286] 재료 및 방법

[0287] 고 상동성 수용체 접근법

[0288] 래트 ICR62 단백질 서열을 인간 생식선 (germ-line) 서열의 집단에 정렬시키고, 모든 정준 잔기를 작용 수준 상에 보존하면서 가장 높은 서열 일치성을 나타내는 인간 서열을 선택하여 고 상동성 항체 수용체 골격 조사를 수행하였다. 여기서, VBase 데이터베이스 내의 VH1 패밀리로부터 서열 1-e 를 중쇄 골격 수용체 서열로부터 선택하고, VBase 데이터베이스의 VK1 패밀리로부터 A30 서열을 경쇄에 대한 골격 수용체로 선택하였다. 상기 2 개의 수용체 골격 상에서, 래트 ICR62 중 및 경 가변 도메인의 이들 CDR 의 3 개의 상보성 결정 영역 (CDR) 및/또는 특이성-결정 잔기를 이식하였다. 골격 4 영역이 생식선 유전자의 가변 영역의 일부가 아니므로, 그 위치에 대한 정렬을 개별적으로 수행하였다. JH6 영역을 중쇄에 대해 선택하였고, JK2 영역을 경쇄에 대해 선택하였다. 고안된 면역글로불린 도메인의 분자 모델링은 Kabat CDR1 의 외부의 한 위치가 잠재적

으로 CDR 외부의 인간의 것 대신에 쥐과 아미노산 잔기를 필요로 한다는 것을 밝혔다. 쥐과 아미노산 잔기의 인간 골격 내로의 재도입은 소위 "복귀 (back) 돌연변이" 를 발생시킬 것이다. 예를 들어, Kabat 위치 27 에서 인간 수용체 아미노산 잔기 (1-e 의 글리신) 를 티로신 잔기로 복귀 돌연변이시켰다. 항원 결합에 대한 잔기의 중요성을 나타내기 위해, 인간화 항체 변이체를 복귀 돌연변이가 포함 또는 생략되도록 고안하였다. 인간화 항체 경쇄는 임의의 복귀 돌연변이를 필요로 하지 않았다. 단백질 서열을 고안한 후, 상기 단백질을 코딩하는 DNA 서열을 하기 상세화된 바와 같이 합성하였다.

[0289] 혼합된 골격 접근법

[0290] 인간 수용체 골격의 결정적인 위치 (양호한 항원 결합 친화성 또는 항체 작용을 보유하기에 결정적임) 에서 복귀 돌연변이를 도입할 필요가 없도록 하기 위해, 작용적 인간화 항체의 골격 영역 1 (FR1), 골격 영역 1 (FR1) 및 2 (FR2) 함께, 또는 골격 영역 3 (FR3) 이 이미 공여자 잔기를 가진 인간 항체 서열, 또는 공여자 잔기와 작용적으로 동등한 아미노산 잔기에 의해, 중성 인간 생식선 서열 내의 중요한 잔기 위치에서 대체될 수 있었는지 여부를 조사하였다. 상기 목적을 위해, 래트 ICR62 VH 서열의 VH 골격 1, 2 및 3 을 인간 생식선 서열에 대해 개별적으로 정렬하였다. 여기서, 수용체 골격을 선택하기 위해 가장 높은 서열 일치성을 사용하지 않았고; 대신에 여러 결정적 잔기의 매칭을 수행하였다. 이들 결정적 잔기는 소위 정준 잔기, 및 Kabat 의 CDR1 정의의 외부에 놓이나, 종종 항원 결합에 관여하는 또한 위치 27, 28, 및 30 (Kabat 넘버링) 에서의 이들 잔기를 포함한다. 또한, 결정적 잔기는 분자 모델링을 사용하여 측정되는 바와 같이 CDR 과 중요한 상호작용을 나타내는 것들이다. IMGT 서열 IGHV1-58 (접근 번호 M29809), IGHV5-51 (접근 번호 M99686) 뿐 아니라, VH1 패밀리로부터의 VBase 서열 1-02 를 FR1, 2, 또는 3 을 대체하기 위한 적합한 서열로서 선택하였다. 요약하면: IGHV1-58 은 Kabat 위치 27 내지 30 에서 약속하는 패턴을 제시하였지만, 정준 위치 71 에 대한 기준을 수행하지 않는다. IGHV5-51 은 매칭 잔기 71 을 가져, 그의 FR3 을 사용할 수 있었다. 또한 그의 FR1 은 바람직한 FR1 서열과 가깝다.

[0291] VH1 의 1-e 는 위치 27 과 관계없는 모든 기준을 수행하였다. 서열 1-02 는 FR1 및 FR2 영역에 대해 허용가능하게 고려되었으나, FR3 에서 복귀 돌연변이를 필요로 하지 않을 것이다.

[0292] 단백질 서열을 고안한 후, 상기 단백질을 코딩하는 DNA 서열을 하기 상세화된 바와 같이 합성하였다. 상기 접근법을 사용하여, 복귀 돌연변이는 양호한 수준의 항원 결합을 보유하기 위해, 중쇄의 대부분의 구축물은 필요하지 않았다. 혼합된 골격 구축물의 연대순 배열 및 추론은 결과 섹션에서 설명된다.

[0293] 항체 유전자의 합성

[0294] 인간화 항체 V 영역의 아미노산 서열을 고안한 후, DNA 서열을 생성하였다. 개개의 골격 영역에 대한 DNA 서열 데이터는 인간 생식선 서열에 대한 데이터베이스 (예, IMGT 또는 VBase) 에서 발견되었다. CDR 영역의 DNA 서열 정보를 래트 ICR62 항체의 공개된 서열 (예를 들어, PCT 공개 WO 95/20045 참조) 로부터 취하였다. 상기 서열로, 전체 DNA 서열을 가상적으로 조립하였다. 상기 DNA 서열 데이터를 가지고, 진단 제한 부위를 제한 엔도뉴클레아제에 대한 인식 부위를 만드는, 침묵 돌연변이를 도입하여 가상적 서열에 도입하였다.

[0295] 물리적 DNA 사슬을 수득하기 위해, 유전자 합성을 수행하였다 (예를 들어, Wheeler 등. 1995 참조). 상기 방법에서, 일련의 올리고뉴클레오타이드가 코딩 가닥 유래이고, 또 다른 일련은 비-코딩 가닥 유래이도록, 올리고뉴클레오타이드를 관심의 유전자로부터 고안하였다. 각각의 올리고뉴클레오타이드의 3' 및 5' 말단 (열의 가장 첫번째 및 마지막 제외) 은 반대 가닥 유래의 2 개의 프라이머에 대해 항상 상보 서열을 나타낸다. 상기 올리고뉴클레오타이드를 임의의 열 안정성 폴리머라아제에 적합한 반응 완충제에 넣고, Mg^{2+} , dNTP 및 DNA 폴리머라아제를 첨가할 때, 각각의 올리고뉴클레오타이드를 그의 3' 말단으로부터 확장시킨다. 새롭게 형성된 하나의 프라이머의 3' 말단을 반대 가닥의 옆 프라이머로 어닐링시키고, 그의 서열을 주형 의존적 DNA 사슬 신장에 대한 적합한 조건하에서 추가로 확장시킨다. 최종 생성물을 E. coli 에서 제조하기 위해 통상적인 벡터 내에 클론화시켰다.

[0296] 항체 제조

[0297] 키메라성 (즉, 전체 래트 V 영역 및 인간 C 영역) 및 인간화 항-EGFR 경쇄 및 중쇄 발현 벡터의 구축을 위해, 인간 중쇄 및 경쇄 리더 서열 (분비를 위한) 을 가변 영역 DNA 서열의 상부방향에 부가하였다. 가변 영역의 하부방향, 중쇄에 대한 IgG1 의 불변 영역, 및 경쇄에 대한 카파 불변 영역을 표준 분자 생물학 기술을 사용해서 부가하였다. 수득되는 전체 항체 중쇄 및 경쇄 DNA 서열을 MPSV 프로모터의 제어 하에 합성 폴리A 부위의 상부방향에, 포유류 발현 벡터 (하나는 경쇄에 대한 것 및 하나는 중쇄에 대한 것) 내에 서브클론화하였다

(각 벡터는 EBV OriP 서열을 함유함).

- [0298] 칼슘 포스페이트-트랜스펙션 접근법을 사용하여 HEK293-EBNA 세포를 포유류 항체 중쇄 및 경쇄 발현 벡터와 함께 공동-트랜스펙션시켜 항체를 제조하였다. 기하급수적으로 성장하는 HEK293-EBNA 세포를 칼슘 포스페이트법에 의해 트랜스펙션시켰다. 비개질된 항체의 제조를 위해, 세포를 항체 중쇄 및 경쇄 발현 벡터만으로 1:1 비율로 트랜스펙션시켰다. 당조작된 항체의 제조를 위해, 세포를 4 개의 플라스미드 (2 개는 항체 발현을 위해, 1 개는 융합 GnTIII 폴리펩티드 발현을 위해, 및 하나는 만노시다아제 II 발현을 위해) 로 각각 4:4:1:1 의 비율로 공동-트랜스펙션시켰다. 세포를 10% FCS 가 보충된 DMEM 배양 배지를 사용하여 T 플라스크에서 부착된 단층 배양물로서 성장시키고, 이들이 50 내지 80% 컨플루언스일 때 트랜스펙션시켰다. T75 플라스크의 트랜스펙션을 위해, FCS (10% V/V 최종), 250 µg/ml 네오마이신이 보충된 14 ml DMEM 배양 배지에서 트랜스펙션 24 시간 전에 8 백만 세포를 시딩하고, 세포를 5% CO₂ 분위기의 인큐베이터, 37°C 에서 밤새 두었다. 트랜스펙션되는 각 T75 플라스크에 대해, DNA, CaCl₂ 및 물의 용액을, 경쇄 중쇄 발현 벡터와 동등하게 나뉜 47 µg 총 플라스미드 벡터 DNA, 235 µl 의 1M CaCl₂ 용액, 및 최종 부피가 469 µl 이 되도록 첨가하는 물을 혼합하여 제조하였다. 상기 용액에, pH 7.05 에서 50 mM HEPES, 280 mM NaCl, 1.5 mM Na₂HPO₄ 용액 469 µl 을 첨가하고, 즉시 10 초 동안 혼합하고, 실온에서 20 초 동안 방치하였다. 현탁액을 2% FCS 가 보충된 DMEM 12 ml 로 희석하고, 존재하는 배지 대신에 T75 에 첨가하였다. 세포를 37°C, 5% CO₂ 에 약 17 내지 20 시간 동안 인큐베이션한 다음, 배지를 12 ml DMEM, 10% FCS 로 대체하였다. 조건화된 배양 배지를 트랜스펙션-후 5 내지 7 일에 1200 rpm 에서 5 분 동안 원심분리한 후, 4000 rpm 에서 10 분 동안 제 2 차 원심분리에 의해 수확하고, 4°C 에 보관하였다.
- [0299] 분비된 항체를, 완충액을 인산염 완충 식염수로 교환하고, 순수한 단량체 IgG1 항체를 수집하는, 단백질 A 친화성 크로마토그래피 후, 양이온 교환 크로마토그래피 및 Superdex 200 컬럼 (Amersham Pharmacia) 상의 최종 크기 배제 크로마토그래피 단계에 의해 정제하였다. 항체 농도를 분광광도계를 사용하여 280 nm 에서의 흡광도로부터 추정하였다. 항체를 pH 6.7 의 25 mM 칼륨 포스페이트, 125 mM 나트륨 클로라이드, 100 mM 글리신 용액에서 제형화하였다.
- [0300] 인간화 항체의 당조작된 변이체를 GnT-III 글리코실트랜스페라아제 발현 벡터와 함께, 또는 GnT-III 발현 벡터 및 글리 만노시다아제 II 발현 벡터와 함께 항체 발현 벡터의 공동-트랜스펙션에 의해 제조하였다. 당조작된 항체를 비-당조작된 항체에 대해 상기 기재된 바와 같이 정제 및 제형화하였다. 항체의 Fc 영역에 결합된 올리고당을 하기 기재된 바와 같이 MALDI/TOF-MS 에 의해 분석하였다.
- [0301] 올리고당 분석
- [0302] PNGaseF 소화에 의해 항체 (항체 PVDF 막 상에 또는 용액 중에 고정되어 있음) 로부터 올리고당을 효소적으로 방출시켰다.
- [0303] 방출된 올리고당을 함유하는 수득된 소화 용액을 MALDI/TOF-MS 분석을 위해 직접적으로 제조하거나, MALDI/TOF-MS 분석에 대한 샘플 제조 전에 EndoH 글라이코시다아제로 추가 소화시켰다.
- [0304] PVDF 막-고정된 항체에 대한 올리고당 방출법
- [0305] PVDF (Immobilon P, Millipore, Bedford, Massachusetts) 막으로 만들어진 96-웰 플레이트의 웰을 100 µl 메탄올로 적시고, 액체를 Multiscreen 진공 다기관 (Millipore, Bedford, Massachusetts) 에 적용된 진공을 사용하여 PVDF 막을 통해 빼냈다. PVDF 막을 300 µl 의 물로 3 회 세척하였다. 그 다음 웰을 50 µl RCM 완충액 (8M 우레아, 360 mM Tris, 3.2 mM EDTA, pH 8.6) 으로 세척하였다. 30 내지 40 µg 항체를 10 µl RCM 완충액을 함유하는 웰에 적재하였다. 웰 내의 액체를 진공을 적용하여 막을 통해 빼내고, 이어서 막을 50 µl RCM 완충액으로 2 회 세척하였다. 디숄파이드 연결의 환원을 RCM 중의 0.1 M 디티오프레이톨 50 µl 의 첨가 및 1 h 동안 37°C 에서의 인큐베이션에 의해 수행하였다.
- [0306] 환원 후, 진공을 적용하여 웰로부터 디티오프레이톨 용액을 제거하였다. 웰을 300 µl 물로 3 회 세척한 후, RCM 완충액 중의 0.1 M 요오도아세트산 50 µl 을 첨가 및 어둠속의 실온에서 30 분 동안 인큐베이션에 의해 시스테인 잔기의 카르복시메틸화를 수행하였다.
- [0307] 카르복시메틸화 후, 웰을 진공으로 제거하고, 이어서 300 µl 물로 3 회 세척하였다. 그 다음 PVDF 막을 블로킹하여, 실온에서 1 시간 동안 폴리비닐피롤리돈 360 의 1% 수용액 100 µl 인큐베이션에 의해, 엔도글리코시다아제의 흡수를 방지하였다. 그 다음 블로킹 시약을 완전한 진공에 의해 제거한 후, 300 µl 물로 3 회 세

적하였다.

- [0308] 2.5 mU 펩티드-N-글리코시다아제 F (제조함 N-글리카나아제, GLYKO, Novato, CA) 및 0.1 mU 시알리다아제 (GLYKO, Novato, CA) 의 첨가에 의해 N-연결된 올리고당을 방출시켜, 임의의 잠재적 전하된 당당류 잔기를 제거하였다 (20 mM NaHCO₃ 중의 최종 부피 25 μ l, pH7.0). 소화를 37°C 에서 3 시간 동안 수행하였다.
- [0309] 용액 중의 항체에 대한 올리고당 방출법
- [0310] 40 내지 50 μ g 의 항체를 2 mM Tris 중의 PNGaseF (Glyko, U.S.A.) 2.5 mU (pH7.0 최종 부피 25 마이크로리터) 과 혼합하고, 혼합물을 37°C 에서 3 시간 동안 인큐베이션하였다.
- [0311] MALDI/TOF-MS 중성 올리고당 피크에 대한 잡종 양분된 올리고당 구조의 배열을 위한 PNGaseF-방출된 올리고당의 엔도글라이코시다아제 H 소화의 용도
- [0312] 이어서 PNGaseF 방출된 올리고당을 엔도글라이코시다아제 H (EC 3.2.1.96) 로 소화시켰다. EndoH 소화를 위해, 15 mU 의 EndoH (Roche, Switzerland) 를 PNGaseF 소화 (상기 용액 방법 중의 항체) 에 첨가하여 최종 부피 30 마이크로리터를 산출하고, 혼합물을 37°C 에서 3 시간 동안 인큐베이션하였다. EndoH 는 N-연결된 올리고당의 키토바이오세 코어 (chitobiose core) 의 N-아세틸글루코사민 잔기 사이를 분할한다. 효소는 올리고만노오스 및 가장 큰 잡종 유형 글리칸 만을 소화시킬 수 있는 반면 복합체 유형 올리고당은 가수분해되지 않는다.
- [0313] MALDI/TOF-MS 에 대한 샘플 제조
- [0314] 방출된 올리고당을 함유하는 효소 소화물에 최종 농도 150 mM 으로 아세트산을 첨가한 후 실내에서 추가 3 시간 동안 인큐베이션하고, 이어서 양이온 및 단백질을 제거하기 위해 마이크로-바이오-스핀 크로마토그래피 컬럼 (BioRad, Switzerland) 내로 패킹된 0.6 ml 의 양이온 교환 수지 (AG50W-X8 수지, 수소 형태, 100 내지 200 메쉬, BioRad, Switzerland) 를 통과시켰다. 수득된 샘플 1 마이크로리터를 스테인레스 스틸 표적 플레이트에 적용하고, 1 μ l 의 sDHB 매트릭스와 함께 플레이트 상에 혼합하였다. sDHB 매트릭스를 1 ml 의 에탄올/10 mM 수성 나트륨 클로라이드 1:1 (v/v) 에 2 mg 의 2,5-디히드록시벤조산 및 0.1 mg 의 5-메톡시살리실산을 용해시켜 제조하였다. 샘플을 공기 건조하고, 0.2 μ l 에탄올을 첨가하고, 샘플을 마지막으로 공기 하에서 재-결정시켰다.
- [0315] MALDI/TOF-MS
- [0316] 질량 스펙트럼을 수득하기 위해 사용된 MALDI-TOF 질량분석기는 Voyager Elite (Perspective Biosystems) 였다. 기구를 20 kV 의 가속 및 80 ns 지연으로, 선형 배향으로 조작하였다. 올리고당 표준을 사용하는 외부 검정을 이온의 질량 할당에 대해 사용하였다. 200 레이저 쇼트로부터의 스펙트럼을 최종 스펙트럼을 수득하기 위해 합산하였다.
- [0317] 항원 결합 검정법
- [0318] 정제된, 단량체성 인간화 항체 변이체를 유세포분석-기재 검정법을 사용하여, A431 인간 상피 세포주 상에서 인간 상피세포 성장 인자 수용체 (EGFR, 또한 문헌에서 HER-1 또는 ErbB1 로서 불림) 에 대한 결합에 대해 시험하였다. 180 μ l FACS 완충액 (2% FCS 및 5 mM EDTA 함유 PBS) 중의 200,000 세포 (예, 인간 A431 세포주로부터) 를 5 ml 폴리스티렌 튜브에 옮기고, 20 μ l 10 배 농축된 항-EGFR 항체 (1 차 항체) 샘플 (1 내지 5000 ng/ml 최종 농도) 또는 PBS 만을 첨가하였다. 샘플을 완만하게 혼합한 후, 튜브를 어둠속에서 4°C 에서 30 분 동안 인큐베이션하였다. 이어서, 샘플을 FACS 완충액으로 2 회 세척하고, 300 x g 에서 3 분 동안 펠렛화하였다. 상청액을 흡인기로 빨아내어 제거하고, 세포를 50 μ l FACS 완충액 중에 취하고, 2 μ l 2 차 항체 (항-Fc-특이적 F(ab')₂-FITC 분질 (Jackson Immuno Research Laboratories, USA)) 를 첨가하고, 튜브를 4°C 에서 30 분 동안 인큐베이션하였다. 샘플을 FACS 완충액으로 2 회 세척하고, 유세포분석에 의한 분석을 위해 500 μ l 의 FACS 완충액 중에 취하였다. 항체 농도에 대항하는 기하 평균 형광을 플롯팅하여 결합을 측정하였다.
- [0319] Fc γ RIIIA-발현 CHO 세포주에 대한 단량체성 IgG1 당변이체의 결합
- [0320] Fc γ RIIIA-Va1158 α -사슬 및 γ -사슬을 코딩하는 발현 벡터로 전기천공법 (280 V, 950 μ F, 0.4 cm) 에 의해 CHO 세포를 트랜스펙션시켰다. 트랜스펙션체를 6 μ g/ml 푸로마이신의 첨가에 의해 선별하고, 안정한 클론을 10⁶ 세포에 대해 10 μ l FITC-공액-항-Fc γ RIII 3G8 단일클론 항체 (BD Biosciences,

Allschwil/Switzerland) 를 사용하여 FACS 에 의해 분석하였다. Fc γ RIIIA-Va1158-발현 CHO 세포에 대한 IgG1 의 결합을 수행하였다. 간략히는, 항-Fc γ RIIIA 3G8 F(ab')₂ 분질 (Ancell, Bayport, MN/USA) 을 10 μ g/ml 의 농도로 첨가하여, 항체 당변이체의 결합을 완료하였다 (3 μ g/ml). 결합된 항체 변이체를 말하는 형광 강도를 FACSCalibur (BD Biosciences, Allschwil /Switzerland) 상에서 측정하였다.

[0321] ADCC 검정법

[0322] 인간 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC) 를 효과기 세포로서 사용하였고, 본질적으로 제조자의 지침에 따라 Histopaque-1077 (Sigma Diagnostics Inc., St. Louis, MO63178 USA) 을 사용하여 제조하였다. 간략히는, 정맥혈을 건강한 지원자로부터 헤파린화 주사기로 취하였다. 혈액을 PBS (Ca⁺⁺ 또는 Mg⁺⁺ 을 함유하지 않음) 로 1:0.75 내지 1.3 희석하고, Histopaque-1077 상에 층으로 만들었다. 구배를 400 x g 에서 30 분 동안 실온에서 (RT) 휴식 없이 원심분리하였다. PBMC 를 함유하는 중간상을 수집하고, PBS (2 구배로부터 세포 당 50 ml) 로 세척하고, 300 x g 에서 10 분 동안 RT 에서 원심분리에 의해 수확하였다. PBS 로 펠렛을 재현탁한 후, PBMC 의 수를 세고, 200 x g 에서 10 분 동안 RT 에서 원심분리에 의해 2 회 세척하였다. 그 다음 연이은 절차를 위한 적합한 배지에서 세포를 재현탁하였다.

[0323] ADCC 검정법을 위해 사용되는 효과기 대 표적 비율은 PBMC 및 NK 세포, 각각에 대해 25:1 및 10:1 이었다. 둥근 바닥 96 웰 플레이트의 웰 당 50 μ l 을 첨가하기 위해 적합한 농도로 효과기 세포를 AIM-V 배지에서 준비하였다. 표적 세포는 10% FCS 를 함유하는 DMEM 에서 성장된 인간 EGFR 발현 세포 (예, A431, EBC-1, 또는 LN229) 였다. 표적 세포를 PBS 로 세척하고, 수를 세고, 마이크로웰 당 100 μ l 로 30,000 세포를 첨가하기 위해, ml 당 30 만으로 AIM-V 에 재현탁하였다. 항체를 AIM-V 에 희석하고, 미리 평판배양된 표적 세포에 50 μ l 으로 첨가하고, 10 분 동안 RT 에서 표적에 대해 결합시켰다. 그 다음 효과기 세포를 첨가하고, 플레이트를 5% CO₂ 를 함유하는 습윤 분위기 중의 37 $^{\circ}$ C 에서 4 시간 동안 인큐베이션하였다. 표적 세포의 치사를 세포독성 검출 키트 (Roche Diagnostics, Rotkreuz, Switzerland) 를 사용하여 손상된 세포로부터 락테이트 디히드로게나아제 (LDH) 방출의 측정에 의해 측정하였다. 4-시간 인큐베이션 후, 플레이트를 800 x g 에서 원심분리 하였다. 각 웰로부터의 100 μ l 상청액을 새로운 투명한 평평한 바닥 96 웰 플레이트로 옮겼다. 키트로부터의 100 μ l 색조 기질 완충액을 웰 당 첨가하였다. 색조 반응의 V_{최대} 값을 SOFTmax PRO 소프트웨어 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA94089, USA) 를 사용하여 10 분 이상 동안 490 nm 에서 ELISA 판독기에서 측정하였다. 자발적 LDH 방출은 오직 표적 및 효과기 세포만을 함유하나 항체가 없는 웰로부터 측정된다. 최대 방출은 오직 표적 세포 및 1% Triton X-100 만을 함유하는 웰로부터 측정된다. 특이적 항체-매개 치사 백분율은 하기와 같이 계산되었다: ((x - SR)/(MR - SR)* 100,

[0324] (식 중 x 는 특정 항체 농도에서의 V_{최대} 의 평균이고, SR 은 자발적 방출의 V_{최대} 의 평균이고 MR 은 최대 방출의 V_{최대} 의 평균이다).

[0325] 실시예 2

[0326] 결과 및 논의

[0327] 키메라성 ICR62 경쇄 또는 인간화 ICR62 경쇄 (I-KA, I-KB, 또는 I-KC) 와 복합된 항체 변이체 I-HHA, I-HHB, I-HHC, I-HLA, I-HLB, I-HLC, I-HLA1, I-HLA2, I-HLA3, I-HLA4, I-HLA5, I-HLA6, I-HLA7, I-HLA8, I-HLA-9, I-HHD, I-HHE, I-HHF, 및 I-HHG 의 인간 EGF-수용체 및 모, 키메라성 항체 ch-ICR62 에 대한 결합의 비교는 모든 항체가 1 로그 단위 내의 유사한 EC50 값을 갖는다는 것을 나타낸다. 오직 I-HHA 만이 결합 활성이 강하게 사라진다 (도 2 참조). 도 1 은 인간화 구축물 I-HHC 및 I-KB, 각각과 조합된 경우 개개의 키메라성 ICR62 (ch-ICR62) 폴리펩티드 사슬의 작용적 활성을 나타낸다. 상기 실험에서, 경쇄, 중쇄 또는 ch-ICR62 의 두 사슬은 동시에 상기 언급된 인간화 구축물로 대체되었다. 이것은 VH/VL 경계면 형성이 설치류 항체에서 뿐 아니라, 인간화 구축물에서도 작동하는 것 같다는 것을 나타낸다.

[0328] 도 2 에서 나타나는 바와 같이, 인간화 중쇄 I-HHA 는 I-KA, 또는 I-KB 경쇄와의 결합 활성을 복구하지 못했다. I-HLA 가 I-KA, 및 I-KB 둘 다와의 결합을 나타내지 않았으므로, 본 출원인은 I-HHA 의 중쇄는 항원 결합에 작용하지 않는다고 결론을 내렸다. 도 1 및 2 는, 도 3 과 조합하여 경쇄 구축물 I-KA, I-KB, 및 I-KC 가 설치류 대응체와 구별가능한 결합 거동을 나타낸다는 것을 나타낸다. 변이체 I-KC 는 임의의 복귀 돌연변이를 갖지 않으며, 부가적으로는 잔기 24 내지 29 가 인간 수용체 서열 (상기 언급된 바와 같이, VK1 의 A30) 유래일 수 있는 부분적으로 인간화된 그의 CDR1 을 갖는다.

- [0329] 일련 I-HHA, I-HHB, 및 I-HHC 에서, 오직 후자의 2 가지 변이체만이 만족스러운 결합 거동을 나타냈다 (도 2 및 3). I-HHA 의 서열 분석은 상기 거동을 담당하는 3 개의 잠재적 아미노산 잔기를 밝혔다: Lys33, His35, 및 Tyr50. 티로신에 의해 대체된 Lys33 을 갖는 구축물은, 트립토판에 의해 대체된 Tyr50 을 갖는 구축물과 함께 양호한 결합을 나타내었다. 오직 상기 2 개의 잔기가 알려진 및 글리신, 각각에 의해 대체된 경우만, 결합을 상실하였다. I-HHC 가 I-HHB 보다 더 양호한 결합을 나타내지 않았으므로, 본 출원인은 잔기 Asn60, Glu61, Lys64, 및 Ser65 이 설치류 기원의 것에 필요하지 않거나; 또는 이들을 Ala, Gln, Gln, 및 Gly, 각각에 의해 대체할 수 있다고 결론을 내렸다. 상기 절차는 아미노산 위치 60 내지 65 가 Kabat CDR 정의의 부분이므로, CDR2 가 더욱 인간화된 구축물을 야기하나, 상기 항체에 대한 설치류 공여자 잔기를 이식할 필요는 없다.
- [0330] 도 4 및 5 는 일련 I-HLA1, I-HLA2, I-HLA3, I-HLA4, I-HLA5, 및 I-HLA6 의 구축물을 비교한다. 최고의 결합 거동은 EC50 값이 대략 300 ng/ml 인, 구축물 ch-ICR62, I-HLA1, 및 IHLA2 에서 관찰되었다. 기타 구축물은 2 개의 인자에 의해 상기 값이 증가하고, 그러므로 결합 활성이 약간 감소된다. 상기 데이터로부터의 첫번째 결론은 Kabat CDR1 내의, Lys33Tyr, 및 Ile34Met 치환이 용인되었다는 것이다. 상기 2 개 위치는 CDR1 의 Kabat 정의 내에, 그러나 Chothia CDR 경계의 외부에 위치한다 (서열 분석보다 구조에 근거함). 그러면 CDR1 의 후반 부분에서, 적어도 일부의 무차별 혼합이 허용된다.
- [0331] 두번째 결론은 CDR2 내의, 비-공여자 잔기에 의한 잔기 Asn60 및 Glu61 의 상기 언급된 대체 외에, Kabat CDR 내의 Asn60Ser, Glu61Pro, 및 Lys62Ser 비-공여자 치환이 또한 허용되었다는 것이다. 상기 잔기는 FR3 수용체 서열로서 사용되었던 인간 생식선 IGHV5-51 수용체 서열 유래였다. 구축물 I-HLA3 및 I-HLA4 는 단지 Phe27Tyr 복귀 돌연변이의 제거에 의해 I-HLA1 및 I-HLA2 와 상이하고, 두 가지 I-HLA3 및 I-HLA4 구축물은 그들의 모 구축물과 비교하여 친화성을 상실한다. 그러므로, I-HLA1, I-HLA2, I-HLA3, I-HLA4, I-HLA5, 및 I-HLA6 의 비교의 3 번째 결론은, CDR1 의 루프 형태의 개질을 통한, 직접적 또는 간접적 항원 결합에서의 Phe27 의 관여이다.
- [0332] 변이체 I-HLA5 및 I-HLA6 은 I-HLA1 및 I-HLA2, 각각의 FR1 이, 중성으로 존재하는 Phe27 로 (즉, IGHV1-58) 또다른 생식선 수용체 서열에 의해 대체된다. 이것은 단지 Val2Met, Ala9Pro, 및 Ala16Thr 인 여러 기타 돌연변이를 동시에 도입하여 달성할 수 있었다. 이렇게 함으로써, Phe27 을 (제-)도입하는 유리한 효과가 다시 폐기되었다.
- [0333] I-HLA7 구축물을, I-HLA6 구축물의 중쇄 CDR1 및 CDR2 에서 추가적인 공여자 잔기의 복구가 ICR62 와 비교하여 완전한 결합 활성을 복구할 것인지의 여부를 측정하기 위해 평가하였다. 도 6 에서 제시되는 바와 같이, 이것은 사실이 아니었다.
- [0334] 도 7 및 8 에서 제시되는 바와 같이, 2 개의 추가적인 구축물, I-HLA8 및 I-HLA9 를, ch-ICR62 과 비교해 완전한 결합 활성을 달성할 수 있을지의 여부를 측정하기 위해 시험하였다. I-HHB 구축물로부터 출발하여, FR1 영역을 Chothia CDR1 영역 내의 최대 상동성을 갖는 FR1 영역으로 대체하였다. I-HLA8 구축물은 IGHV1-58 서열의 FR1 을 갖고, I-HLA9 는 IGHV5-51 FR1 영역을 갖는다. 두 구축물은 항원에, 적어도 ch-ICR62 항체에도 결합하였다. I-HLA8 구축물은 2 개 인자에 의해 낮아진 EC50 으로, 사실상 더욱 양호할 수 있다. I-HLA8 구축물은 I-HLA5 및 I-HLA6 구축물과 동일한 FR1 서열을 가지므로, 동일한 비-공여자 잔기 (즉, Val2Met, Ala9Pro, 및 Ala16Thr) 를 갖고, 상기 비-공여자 잔기의 존재는 결합 상에 부정적인 효과를 갖지 않는다는 것을 암시한다. I-HLA5 및 6 에서 발생하는 비-이득 돌연변이는 VH5 FR3 과 짝지어진 VH1 FR1 의 조합으로부터 발생하고, 이것은 동일한 VH 패밀리의 FR1 및 FR3 을 갖는 것에 대해 잠재적으로 보상될 수 있었다.
- [0335] 도 8 에서 나타난 것은 CDR 내에 비-공여자 잔기를 함유하는 구축물이다. 그러므로, 상기 구축물은 비-공여자 잔기가 상기 구축물에 대해 선택되었던 인간 골격 영역에서 발생하기 때문에 CDR 내에서 심지어 추가 인간화된다. I-HHE (His35Ser), I-HHF (Thr58Asn) 및 I-HHG (Ser57Ala) 구축물은 모두 인간화된 CDR1 또는 CDR2 내에 하나의 잔기를 갖는다 (I-HHB 구축물과 비교해). 구축물 I-HHD (Gly24Ala) 을 또한 검정하였다. I-HHF 는 Thr58 의 중요성을 나타내는 결합이 감소되었다. Kabat CDR 잔기 58 과는 반대로, Ser57Ala 돌연변이가 결합에 대해 명백하게 영향을 주지 않으므로, 아미노산 57 은 치환에 대해 더욱 용인된다 (도 8).
- [0336] IGHV5-51 의 FR3 영역이 I-HLA1 및 2 구축물에서 약속하는 특성을 나타내는 것 같고, 동일한 생식선 서열의 FR1 이 I-HLA9 구축물에서 유용한 것으로 입증되었으므로, IGHV5-51 의 FR1, FR2, 및 FR3 을 루프 이식에 대한 수용체로서 함께 사용하기 위해 고안하였다.
- [0337] 인간화 ICR62 구축물 내의 정준 잔기의 분석의 요약:

- [0338] VL: Kabat 위치 2: Ile 가 아마도 필요함.
- [0339] Kabat 위치 71: Ile 또는 Phe 가 허용됨.
- [0340] VH: Pos. 24, Gly, Thr, Ala, Val, Ser 가 허용됨.
- [0341] Pos. 26, Gly 가 허용됨.
- [0342] Pos. 29, Phe, Ile, Leu, Val, Ser 가 허용됨.
- [0343] Pos. 34, Ile, Met, Leu, Val, Trp, Tyr, Thr 가 허용됨.
- [0344] Pos. 71, Ala, Leu, Val, Thr 가 허용됨.
- [0345] Pos 94, Arg, Gly, Asn, Lys, Ser, His, Thr, Ala 가 허용됨.
- [0346] ADCC 실험의 결과
- [0347] 도 9 는 항체 매개된 세포성 세포독성 (ADCC) 의 비교를 키메라성 ICR62 항체의 다양한 단백당형 뿐 아니라, 인간화 변이체 I-HLA4 에 대해 보여준 것을 나타낸다. 상이한 단백당형은 비-당조작된 (WT), 단백당형 1 (G1), 또는 단백당형 2 (G2) 를 표시하는 표지에 의해 지정된다. "G1" 은 GnTIII 과의 공동발현에 의한 항체의 당조작을 말한다. "G2" 는 GnTIII 및 ManII 과의 공동발현에 의한 항체의 당조작을 말한다. "WT" 는 당조작되지 않은 항체를 말한다. 모든 인간화 구축물에 대한 경쇠는 I-KC 변이체이고, 명백하게 표시되지 않았다.
- [0348] 키메라성뿐 아니라, 인간화 항체는 2 가지 상이한 당조작 접근법에 의해 그들의 잠재성 및 효능이 개선되었다. ch-ICR62 구축물은 야생형 또는 단백당형, 각각에 대해 I-HLA4 보다 약간 더 양호하게 수행하였다. 도 4 에서 보여주는 바와 같이, 2 가지 항체를 그들의 항원에 대해 친화성을 비교하는 경우, ch-ICR62 는 EC50 값이 2 배 더 낮다. 여기서 친화성의 상기 차이는 효능의 차이를 반영한다.
- [0349] 도 10 은 인간화 ICR62 항체 구축물 I-HHB 및 I-HLA7 의 비-당조작된 ("야생형") 및 G2 단백당형에 대한 항체 매개된 세포성 세포독성 (ADCC) 의 비교를 나타낸다. 동일한 항체를 2 개의 상이한 표적 세포주에 적용하였다. 도 10 의 패널 A 에서, 표적 세포주 LN229 를 사용하였고; 도 10 의 패널 B 에서, 세포주 A431 을 사용하였다. A431 세포는 LN229 세포보다 더욱 명백하게 항체 매개 세포 치사되기 쉽다. 더욱 중요하게는, 당조작은 두 항체의 잠재성을 향상시켰다. 상기 효과는 I-HHB 에 대한 것보다 I-HLA7 에 대해 더욱 두드러지는 것 같았다. I-HHB 에 대한 최대 항체 농도에서의 세포 치사 백분율은 LN229 표적 세포주를 사용하는 경우, G2 당조작된 변이체의 도입에 의해 -30% 내지 -40% 이동할 수 있었다. A431 세포주를 사용하는 경우, 상기 값은 명백하게 변하지 않았다. 상기 거동은 I-HLA7 항체와 완전히 상이하였다. 최대 항체 농도에서 표적 세포 살해는 G2 당조작 변이체의 도입에 의해, LN229 세포에 대해 약 10% 내지 약 50%, A431 세포에 대해 약 40% 내지 약 70% 이동하였다. 상기 경우에서, I-HHB 에 비해, I-HLA7 에 대해 비-당조작된 항체에서 더 낮은 활성을 가짐에도 불구하고, 활성 순위는 당조작된 항체에 대해 반대가 된다. 또한 도 11 및 12 는 키메라성 ICR62 및 인간화 ICR62 항체 구축물 I-HHB 및 I-HLA7 의 비-당조작된 형태 (WT) 및 G2 단백당형의 비교를 나타낸다.
- [0350] 실시예 3
- [0351] 사이노물거스 원숭이에 대한 정맥내 (거환) 투여에 의한 사전 독성 연구 - 생물분석학 분석
- [0352] 서론
- [0353] 당조작된 항-EGFR 검정법
- [0354] 상기 생물분석학 분석은 하기 본원에 언급된 프로토콜에 기재된 바와 같이 항-EGFR (상기 기재된 바와 같고, 상기 기재된 바와 같이 정제된 중쇄 I-HHB 및 경쇠 I-KC 유전자를 가지고 있는 항체 발현 벡터와 함께 배지에서 트랜스펙션된 포유류 세포로부터 제조된 제조합, 당조작된 항-EGFR 항체) 의 정맥내 (거환) 투여 후 사이노물거스 원숭이로부터 기원한 샘플에서의 항-EGFR 의 측정을 기재한다. 총 78 마리의 원숭이 혈청 샘플을 사용할 때까지 약 -20℃ 에서 얼려 저장하였다.
- [0355] 항-EGFR 의 측정을 위해 사용된 생물분석학 방법은 항-EGFR 의 혈청 농도를 측정하기 위해 ELISA 방법을 사용하였다. 허용 기준은 정확 및 부정확에 대해 $\pm 20\%$ ($\pm 25\%$ 낮은 QC) 에서 설정되었다.

[0356] 재료 및 방법

[0357] 대상: 본 연구의 대상은 사이노물거스 원숭이에 대한 Glyco-mAb (항-EGFR) 정맥내 (거환) 투여 후 8 주 회복 기간의 전신성 독성 잠재성의 측정이었다.

[0358] 표 8

[0359]	동물 모델	관리 기관에 의해 허용된, 사이노물거스 원숭이 (배경 데이터 이용가능함).
	영장류의 사용을 위한 정당화	영장류는 이것이 단독으로 하기 2 가지 결정적인 파라미터를 보유하고 있기 때문에 선택된 비-설치류 종이였다: 시험 항체에 의한 EGFR 항원 인식, 및 면역계 Fc 수용체에 의한 시험 항체 Fc 영역 인식.
	경로	임상 투여의 상태를 자극하기 위한 정맥내 (거환).

[0360] 표 9: 치료군 및 투여량

[0361]	그룹	1	2	3
[0362]	화합물	글리코-mAb(항-EGFR)		
[0363]	투여량 (mg/kg/일)	1.5	4.5	12

[0362] 투여량 수준 선택에 대한 이론적 해석

[0363] 1.5 내지 7.5 mg/kg 이 인간 연구에 대한 기대 범위이다 (7.5 mg/kg 은 인간에서 동일한 화합물에 대한 상응하는 투여량임).

[0364] 표 10: 치료군의 확인

그룹	처리	투여량 (mg/kg/일) #	동물의 수		동물 ID 번호	
			수컷	암컷	수컷	암컷
1	글리코-mAb (항-EGFR)	1.5	1	1	623	590
2	글리코-mAb (항-EGFR)	4.5	1	1	461	462
3	글리코-mAb (항-EGFR)	12	1	1	463	612

[0365] # 공급된 시험물질에 대해 표현됨

[0366] 표 11 : 동물

[0367]	종	사이노물거스 원숭이 (목적 사육됨).
	수여받은 나이	대략 15 개월.
	주문된 체중 범위	1.5 내지 2.5 kg.

[0368] 표 12: 항-EGFR 의 투여

[0369]	경로	정맥내 주사.
	치료	계속적 투여량 (mg/kg/사건).
	부피 투여량	가장 최근에 기록된 체중에 근거해, 미리 계산됨.
	개개의 투여량 부피	1 ml/kg/일
	빈도	제 1, 8 15 및 22 일, 급식 전 즉시.
	순서	그룹으로.
	투여 부위	좌복재 동맥을 사용.
	주사	거환, 동물 당 새롭게 소독한 일회용 바늘.
	제형	제형 사용의 기록은 중량을 기준으로 유지되었다. 상기 균형은 올바른 투여 점검으로 예상된 사용과 비교한다.

[0370] 표 13: 임상적 관찰

[0371]	동물 및 그들의 우리 트레이	치료에 대한 반응의 증거 또는 건강 상태에 대해 매일 2 회 이상 시각적으로 조사됨
	각각에 대해 시간에 기록된 정상으로 부터의 편차	특성 및 경중도. 발병 일자 및 시간. 관찰된 상태의 지속 및 과정.
	신체 검사	모든 동물에 대해 각 주 1 회.
	우리 트레이의 일일 기록	설사, 출혈, 설사 등에 대해.

[0372] 표 14: 투여 빈도:

[0373]	빈도	1. 투여-전 즉시. 2. 투여 완료 후 ½ 내지 2 시간 3. 작업 일에 가능하면 늦게.
	주사 부위	매일.

[0374] 표 15: 독성동태시험

[0375]	일	동물	투여 후 샘플 시간
	1	모든 동물	1, 4, 12, 24, 72, 120.
	8	모든 동물	투여전, 투여후 1 시간 (제 1 일 투여 후 169 시간)
	15	모든 동물	투여전, 투여후 1 시간 (제 1 일 투여 후 337 시간)
	22	모든 동물	투여전, 투여후 1 시간 (제 1 일 투여 후 505 시간)
	29	모든 동물	제 1 일 투여 후 672 시간

[0376] 표 16: 샘플

[0377]	샘플 부위	적합한 정맥.
	항응고제/샘플 부피	항응고제 없음/0.7 ml.
	취해진 샘플의 총 수	104.
	혈청 분리	다르게 표시되지 않는다면, 최소 0.3 ml 을 제공하기 위해 주위 온도에서 원심분리함 (가능한 경우).
	혈청 저장	적합하게 표시된 플라스틱 튜브. 생물분석학을 기다리는 동안 꽂꽂 얼려짐 (대략 -20℃).

[0378] 조직학

[0379] 표 17: 조직 고정

[0380]	표준	10% 중성 완충 포르말린.
	기타	고환 및 부고환: 보우인 (Bouin) 유액에서 처음으로. 눈: 데이빗슨 (Davidson) 유액에서 처음으로.

[0381] 표 18: 조직학

[0382]	절차	모든 동물.
	정규적 염색	헤마톡실린 및 에오신으로 염색된 4 내지 5 μm 섹션.

- [0383] 면역검정법 절차
- [0384] 플레이트를 11495 μ l 비카르보네이트 완충액 (0.05 M, pH9.6) 이 첨가된 웰 당 100 μ l 의 코팅 용액 (5 μ l 양 항-인간 IgG (원숭이 흡수된 IgG, the Binding Site, UK) 으로 코팅하고, 실온에서 대략 2 시간 동안 인큐베이션하였다. 플레이트를 웰 당 400 μ l 의 세척 용액 (PBS (Sigma Chemical Co., UK) 0.01% (v/v) Triton-X100 (Sigma Chemical Co., UK)) 으로 3 회 세척하고, 가볍게 두드려 건조시켰다.
- [0385] 검정법 완충액 (1% w/v BSA, Sigma Chemical Co., UK) 을 웰 당 200 μ l 로 첨가하고, 실온에서 대략 1 시간 동안 인큐베이션하였다. 플레이트를 웰 당 400 μ l 의 세척 용액으로 3 회 세척하고, 가볍게 두드려 건조시켰다.
- [0386] 검정 표준, 품질 관리 (QC) 및/또는 샘플을 웰 당 100 μ l 로 첨가하고, 실온에서 대략 2 시간 동안 인큐베이션한 후, 플레이트를 웰 당 400 μ l 의 세척 용액으로 3 회 세척하고, 가볍게 두드려 건조시켰다.
- [0387] 공액 용액 (12 ml 검정법 완충액에 첨가된 6 μ l 염소 항-인간 IgG 카파-HRP 공액 (Bethyl Laboratories Inc., USA)) 을 웰 당 100 μ l 로 첨가하고, 실온에서 대략 1 시간 동안 인큐베이션하였다. 플레이트를 웰 당 400 μ l 의 세척 용액으로 3 회 세척하고, 가볍게 두드려 건조시켰다.
- [0388] 트리메틸벤지딘 (TMB; Europa Bioproducts, Ely, UK) 을 웰 당 100 μ l 로 첨가하였다. 플레이트를 덮고 실온에서 대략 15 분 동안 인큐베이션하였다. 그 다음 100 μ l 의 정지 용액 (0.5M HCl, Fisher, UK) 을 각 웰에 첨가하였다. DYNATECH MRX 마이크로플레이트 판독기 (Mettler Instruments, UK) 의 450 nm (참조 필터 630 nm) 에서 흡광도를 읽었다.
- [0389] 결과 및 논의
- [0390] 시험 샘플 분석
- [0391] 항-EGFR 의 농도를 상기 본원에 기재된 프로토콜에 따라 생성된 78 마리 원숭이 혈청 샘플에서 면역검정법 (ELISA) 방법에 의해 측정하였다. 상기 결과를 하기 표 19 내지 21 에 제시한다.
- [0392] 표 29
- [0393] 제 1, 8, 15 및 22 일에 1.5 mg/kg 항-EGFR 의 정맥내 투여 후 원숭이 혈청에서의 항-EGFR 의 혈청 농도 (μ g/ml)

(그룹 1)

시점	동물 번호		평균	sd
	1M 623	1F 590		
제1일 1 시간	33.42	30.86	32.14	1.8
제1일 4 시간	27.33	27.49	27.41	0.1
제1일 12 시간	13.09	17.01	15.05	2.8
제1일 24 시간	9.656	9.468	9.562	0.1
제1일 72 시간	2.528	0.786	1.657	1.2
제1일 120 시간	0.845	0.431	0.638	0.3
제8일 투여전	0.538	0.287	0.413	0.2
제8일 1 시간	30.02	19.07	24.55	7.7
제15일 투여전	0.902	0.382	0.642	0.4
제15일 1 시간	17.91	33.08	25.50	10.7
제22일 투여전	1.065	0.595	0.830	0.3
제22일 1 시간	19.41	33.00	26.21	9.6
제1일 672 시간	1.202	0.362	0.782	0.6

sd 표준 편차

[0394]

[0395] 표 20

[0396] 제 1, 8, 15 및 22 일에 5.0 mg/kg 항-EGFR 의 정맥내 투여 후 원숭이 혈청에서의 항-EGFR 의 혈청 농도 (μ g/ml)

(그룹 2)

시점	동물 번호		평균	sd
	2M 461	2F 462		
제 1 일 1 시간	32.45	29.51	30.98	2.1
제 1 일 4 시간	32.39	29.57	30.98	2.0
제 1 일 12 시간	28.05	25.88	26.97	1.5
제 1 일 24 시간	23.70	23.78	23.74	0.1
제 1 일 72 시간	14.03	14.38	14.21	0.2
제 1 일 120 시간	10.42	8.137	9.279	1.6
제 8 일 투여전	4.672	3.683	4.178	0.7
제 8 일 1 시간	25.91	31.06	28.49	3.6
제 15 일 투여전	5.752	5.450	5.601	0.2
제 15 일 1 시간	32.20	35.38	33.79	2.2
제 22 일 투여전	BLQ	6.497	3.249	-
제 22 일 1 시간	26.98	30.23	28.61	2.3
제 1 일 672 시간	BLQ	4.845	2.423	-

BLQ 양의 한계 미만 (<0.195 μ g/ml)

sd 표준 편차

노트: BLQ 는 계산상 0으로 기입됨

[0397]

[0398] 표 21

[0399] 제 1, 8, 15 및 22 일에 15 mg/kg 항-EGFR 의 정맥내 투여 후 원숭이 혈청에서의 항-EGFR 의 혈청 농도 (μ g/ml)

(그룹 3)

시점	동물 번호		평균	sd
	3M 463	3F 612		
제1일 1 시간	262.2	168.0	215.1	66.6
제1일 4 시간	223.3	174.5	198.9	34.5
제1일 12 시간	164.9	165.7	165.3	0.6
제1일 24 시간	141.7	146.0	143.9	3.0
제1일 72 시간	99.54	86.64	93.09	9.1
제1일 120 시간	86.64	69.08	77.86	12.4
제8일 투여전	65.86	45.21	55.54	14.6
제8일 1 시간	282.1	209.9	246.0	51.1
제15일 투여전	98.43	71.21	84.82	19.2
제15일 1 시간	385.9	231.4	308.7	109.2
제22일 투여전	117.3	105.6	111.5	8.3
제22일 1 시간	234.1	402.5	318.3	119.1
제1일 672 시간	127.5	122.9	125.2	3.3

sd 표준 편차

[0400]

[0401]

실시예 4

[0402]

사이노몰거스 원숭이에 대한 정맥내 (거환) 투여에 의한 사전 독성 연구 - 독성동태시험

[0403]

요약

[0404]

항-EGFR 에 대한 동물의 전신성 노출을 평가하기 위해, 3 그룹의 사이노몰거스 원숭이 (그룹 당 1 마리 수컷 및 1 마리 암컷) 에 28-일 독성 연구의 제 1, 8, 15 및 22 일에 항-EGFR 의 정맥내 거환 투여를 투여하였다. 첫번째 투여 후 672 시간까지 수집된 샘플 중의 항-EGFR 의 혈청 농도를 면역검정법 방법에 의해 측정하였다. 혈청 농도-시간 데이터의 약동학 분석은 하기 약동학 파라미터를 야기하였다:

[0405]

표 22

투여량 (mg/kg)	동물	C _{최대} (µg/mL)	T _{최대} (h)	AUC _t (µg.h/mL)	AUC (µg.h/mL)	CL (mL/h/kg)	V _{ss} (mL/kg)	k (1/h)	t _{1/2} (h)
1.5	1M623	33.42	1	830.4	849.4	1.778	60.79	0.0214	32.5
1.5	1F590	30.86	1	748.4	774.9 ^a	1.962 ^a	57.85 ^a	0.0105 ^a	66.0 ^a
4.5	2M461	32.45	1	2537	3005	1.488	133.6	0.0110	63.1
4.5	2F462	29.57	4	2378	2719	1.663	133.2	0.0121	57.4
12	3M463	262.2	1	18310	29870 ^a	0.4058 ^a	71.33 ^a	0.0056 ^a	124.3 ^a
12	3F612	174.5	4	15980	21400 ^a	0.5552 ^a	66.94 ^a	0.0082 ^a	84.4 ^a
^a 상기 값은 데이터가 데이터 처리에서 정의된 모든 허용 기준을 충족하지 않았던 것으로 추정되고, 신중히 처리되어야만 한다.									

[0406]

[0407]

혈청 항-EGFR 농도-시간 곡선 하의 면적 (AUC₁₆₈) 과 제 1 일에서의 투여량 사이의 관계를 하기에 제시한다:

[0408] 표 23

투여량 (mg/kg/사건)	투여량 비	AUC ₁₆₈ 비	
		수컷	암컷
1.5	1	1	1
4.5	3.0	3.1	3.2
12	8.0	22.0	21.4

[0409]

[0410] AUC₁₆₈ 을 특징으로 하는, 항-EGFR 에 대한 원숭이의 전신성 노출의 비율 및 범위는 1.5 내지 4.5 mg/kg/사건 투여 범위로 증가하는 투여량과 대략 비례하여, 그러나 제 1 일의 4.5 내지 12 mg/kg/사건 투여 범위로 비례 투여량 초과로 증가한다. 가장 높은 투여량에서 (12 mg/kg/사건) AUC₁₆₈ 은 선형 관계식에 의해 예상되는 것보다 대략 2.8 배 더 높다.

[0411] 항-EGFR 에 대한 암컷 원숭이의 전신성 노출의 범위 (AUC₁₆₈) 는 일반적으로 수컷 원숭이에서의 노출과 유사하였다.

[0412] 반복된 정맥내 투여 후, 항-EGFR 의 투여전 혈청 농도는 일반적으로 단일 투여 후 상기 값보다 더 높으며, 연구 기간에 걸친 혈청 중의 항-EGFR 의 축적을 나타내었다.

[0413] 최종 반감기는 모든 동물에 대해 충분히 추정되지 않았을 것이나, 추정될 수 있었던 경우, 32.5 내지 63.1 시간 범위이고, 수컷 동물에서 투여량이 증가하는 것으로 나타났다. 항-EGFR 의 총 혈청 제거는 1.5 내지 4.5 mg/kg/사건 범위 이상에 대해 투여량 독립적으로 나타났으나, 수컷 및 암컷 원숭이에서 최고 투여량 수준으로 감소되었다.

[0414] 결론적으로, 항-EGFR 에 대한 사이노몰거스 원숭이의 전신성 노출의 범위는 정맥내 독성 연구의 제 1 일에서의 1.5 내지 12 mg/kg/사건 투여량 범위에 대해 비-선형 (투여량-의존적) 동역학을 특징으로 하는 것으로 보였다. 항-EGFR 의 투여량을 4.5 mg/kg/사건 초과로 증가시키는 것은 선형 관계식으로부터 예상될 것보다 더 높은 전신성 노출을 야기할 것 같으며, 이것은 항-EGFR 의 제거에 대한 용량 제한적 방법의 가능성과 일치한다.

[0415] 또한, 연구는 일반적으로 항-EGFR 에 대한 수컷 및 암컷 원숭이의 전신성 노출에서의 차이가 없으며, 반복된 정맥내 투여 후의 축적이 있다는 증거를 또한 제공한다.

[0416] 서론

[0417] 3 그룹의 1 마리 수컷 및 1 마리 암컷 사이노몰거스 원숭이에 사전 독성 연구의 제 1, 8, 15 및 22 일에 1.5, 4.5 및 12 mg/kg/사건의 투여 수준으로 정맥내 거환 주사에 의해 항-EGFR 을 투여하였다. 각 동물로부터 하기 시점, 하기 투여 제 1 일: 투여 후 1, 4, 12, 24, 72 및 120 시간에 혈액 샘플을 취하였다. 또한, 샘플을 제 8, 15 및 22 일에 투여전 및 투여 후 1 시간에, 및 제 1 일 첫번째 투여 후 672 시간에 취하였다. 분리된 혈청을 면역검정법 방법에 의한 항-EGFR 의 혈청 농도의 분석 전에 대략 -20℃ 에서 얼렸다.

[0418] 약어

[0419] AUC 무한대까지의 혈청 농도-시간 곡선 하의 면적

[0420] AUC₁₆₈ 168-시간 투여 간격 동안의 혈청 농도-시간 곡선 하의 면적

[0421] BLQ 양의 한계 미만

[0422] CL 총 혈청 제거

[0423] C_{최대} 최대 혈청 농도

[0424] F 암컷

[0425] k 최종 비율 상수

[0426] M 수컷

[0427] t_½ 최종 반감기

- [0428] $T_{\text{최대}}$ $C_{\text{최대}}$ 가 발생한 시간
- [0429] V_{ss} 안정한 상태에서 분포 부피
- [0430] 연구에 사용된 항체
- [0431] Glyco-mAb (항-EGFR), 증가된 Fc-Fc γ RIII 수용체 결합 친화성 및 증가된 ADCC 를 위해 Fc-유전공학설계된 항-EGFR 항체는 상기 정의된 바와 같이 제조, 정제 및 특징화된다. 간략히는, 항체는 HEK-293-EBNA 세포를 I-HHB 항체 중쇄, I-KC 항체 경쇄, GnT-III 및 ManII 의 발현을 위한 플라스미드 DNA 벡터로 공동-트랜스펙션하여 제조된다. T-플라스크 대신에 롤러 병에 배양된 세포 단층을 트랜스펙션하여, 상기 기재된 트랜스펙션 방법의 선형으로 확대된 버전을 사용하였다. Q-세파로오스 매트릭스를 사용하는 음이온-교환 크로마토그래피 단계를 통해 추가적 유량을 상기 기재된 크기 배제 크로마토그래피 단계 바로 직전에 정제 공정에 포함시켰다.
- [0432] Fc-유전공학설계된 항체의 글리코실화 패턴을 효소적으로 방출된 Fc-유래 올리고당의 MALDI/TOF-MS 질량분석을 사용하여 상기 기재된 바와 같이 분석하였다. 올리고당 프로파일을 도 23 에 제시한다.
- [0433] 인간 EGFR 및 원숭이 EGFR 에 대한 결합을 A431 및 COS-7 세포, 각각을 사용하여 상기 기재된 바와 같이 전체-세포 결합, 및 FACS-기재 분석에 의해 나타내었다. 결합 곡선을 도 24 및 25 에 각각 제시한다.
- [0434] 적용된 Fc-유전공학설계으로부터 야기된 증가된 Fc γ RIII 수용체 결합을 인간 Fc γ RIII 의 표면 발현을 위해 유전공학설계된 CHO 세포에 대한 전체 세포 결합 및 FACS-기재 분석을 사용하여 상기 기재된 바와 같이 나타내었다. 결과는 도 26 에 제시한다. 부가적으로는, 유전공학설계된 항체는 그 밖의 문헌 (Ferrara, C. 등, J Biol Chem. 2005 Dec 5; [인쇄 전 E-발행]) 에 기재된 "Glyco-2" 항체 (Fc-올리고당의 75% 는 비-푸코실화 유형임) 에 대한 동등한 정도의 Fc-유전공학설계를 갖는다. 이러한 Fc-유전공학설계된 항체는 표준 비-Fc 유전공학설계된 항체에 비해 인간 Fc γ RIII 에 대해 50 배까지의 증가된 결합 친화성을 갖는다 (비-Fc 유전공학설계된 인간 IgG1 항체에 결합하는 경우, 인간 수용체의 158V 및 158F 다형성 변이체에 대한 15 및 150 nM 대 동일한 수용체 변이체에 대한 750 및 5000 nM 의 각각의 평형 해리 상수).
- [0435] ADCC 는 2 가지 표적 세포주: A549 인간 폐 암종 세포 및 CYNOM-K1 사이노물거스 원숭이 각질세포 세포를 사용하여 상기 기재된 바와 같이 측정된다. 결과는 도 27 및 28 에, 각각 제시된다.
- [0436] 데이터 처리
- [0437] 컴퓨터 프로그램 WinNonlin Pro 버전 3.3 (Pharsight Corporation, USA) 을 사용하여 약동학 파라미터를 계산하였다.
- [0438] 본 연구의 부분으로서 공급되는 모든 혈청 농도를 4 유효 숫자 또는 3 소수점으로 보고하였다. 약동학 파라미터를 하기와 같이 보고하였다: $C_{\text{최대}}$, AUC_{168} , CL 및 V_{ss} 는 4 유효 숫자; k 는 4 소수점; $t_{1/2}$ 는 1 소수점.
- [0439] BLQ (<0.195 μ g/mL) 였던 값을 약동학 처리에 0 으로서 입력하였다.
- [0440] 독성동태시험
- [0441] 항-EGFR 의 최대 혈청 농도 ($C_{\text{최대}}$) 및 그들의 발생 시간 ($T_{\text{최대}}$) 은 관찰값이었다. 168-시간 투여 간격 내의 혈청 항-EGFR 농도-시간 곡선 하의 면적 (AUC_{168}) 을, 선형 사다리꼴 법칙에 의해 추정하였다. AUC_{168} 값의 계산에서, 0 시간에서의 혈청 항-EGFR 농도를 처음 2 샘플링 시간에 기초하여, 로그-선형 회귀 분석을 사용하는 복귀 (back) 외삽법에 의해 추정하였으나, 혈청 농도가 상기 기간 동안 감소하지 않았다면, 0 시간에서의 혈청 농도를 첫번째 샘플링 시간에서의 농도와 동등한 것으로 간주하였다. 무한대까지의 혈청 항-EGFR 농도-시간 곡선 하의 면적 (AUC) 을 하기 표현에 의해 추정하였다:
- [0442] $AUC = AUC_{168} + Clast/k$
- [0443] (식 중, Clast 는 마지막 적격 샘플 지점에서의 예상되는 혈청 농도이고, k 는 최종 비율 상수이다).
- [0444] 최종 비율 상수 (k) 는 log 농도의 선형 회귀를 정해진 시간 내에 맞추어 추정하였다. 신뢰성있는 것으로 허용되는 k 의 추정을 위해, 하기 기준을 부여하였다:
- [0445] 1. 최종 데이터 지점은 단일 직선 주위에 명백하게 무작위로 분포되었다 (시각 검사 상)

- [0446] 2. 최소 3 데이터 지점이 회귀에 대해 이용가능하였다
- [0447] 3. 회귀 계수는 0.95 이상이고, 차지하는 분산의 분율은 0.90 이상이었다
- [0448] 4. 회귀에 대해 선택된 데이터 지점을 포함하는 간격은 반감기 그 자체보다 2 배 이상 더 컸다.
- [0449] 최종 반감기 ($t_{1/2}$) 를 $\ln 2/k$ 로서 계산하였다. 총 혈청 제거 (CL) 를 투여량/AUC 로서 계산하였다. 안정한 상태에서의 분포 부피 (V_{ss}) 를 투여량·AUC/AUC2 로서 계산하였다. 축적 (R) 을 마지막 투여 (제 22 일) 후 최저 농도 대 첫번째 투여 (제 1 일) 후 최저 농도의 비, 즉 672 시간에서의 혈청 농도/168 시간에서의 혈청 농도 (제 8 일 투여전) 로서 측정하였다.

[0450] 결과 및 논의

[0451] 항-EGFR 에 대한 수컷 및 암컷 원숭이의 전신성 노출을 평가하기 위해, 연구의 제 1, 8, 15 및 22 일에 1.5, 4.5 및 12 mg/kg/사건의 투여량 수준으로 항-EGFR 의 정맥내 거환 투여 후, 독성 연구 동안 제 1 일 투여 후 120 시간; 제 8, 15 및 22 일 투여 전 및 투여후 1 시간, 및 제 1 일 투여후 672 시간에 혈액 샘플을 취하였다. 투여후 168 시간까지 취해진 샘플 중의 항-EGFR 의 혈청 농도를 표 27 내지 29 에 제시하고, 평균 혈청 농도-시간 프로파일을 도 18 및 19 에 예증하였다.

[0452] 항-EGFR 의 약동학 파라미터를 표 50 에 제시하고, AUC_{168} 값을 하기에 요약한다:

[0453] 표 24

투여량	AUC_{168} ($\mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$)	
(mg/kg/사건)	수컷	암컷
1.5	830.4	748.4
4.5	2537	2378
12	18310	15980

[0454]

[0455] 최대 혈청 농도가 발생한 시간 ($T_{\text{최대}}$) 은 일반적으로 투여후 1 시간 (첫번째 샘플 지점) 이지만, 암컷 2F462 (4.5 mg/kg) 및 3F612 (12 mg/kg) 에서 투여후 4 시간 (두번째 샘플 지점) 에 발생하였다. 그러나, 두 상기 암컷에 대해, 투여후 4 시간에서의 농도는 투여후 1 시간에서의 상기 농도와 매우 유사하였고, 아마도 검정법의 변량 내에 있었다. 그러므로 $T_{\text{최대}}$ 에서의 명백한 지연은 유의한 것 같지 않다.

[0456] 연속 투여 전의 항-EGFR 의 혈청 농도는 제 22 일에 수컷 2M461 을 제외한 모든 동물에서 적격이었고 (4.5 mg/kg/사건 투여량 수준), 그러므로 일반적으로, 동물을 투여 간격 동안 적격 농도의 항-EGFR 에 연속적으로 노출시켰다.

[0457] 혈청 항-EGFR 농도-시간 곡선 하의 면적 (AUC_{168}) 과 제 1 일에서의 투여 수준 사이의 관계를 하기에 제시한다:

[0458] 표 25

투여량	투여량	AUC_{168} 비	
(mg/kg/사건)	비	수컷	암컷
1.5	1	1	1
4.5	3.0	3.1	3.2
12	8.0	22.0	21.4

[0459]

[0460] AUC_{168} 을 특징으로 하는, 항-EGFR 에 대한 원숭이의 전신성 노출의 비율 및 범위는 1.5 내지 4.5 mg/kg/사건 투여 범위로 증가하는 투여량과 대략 비례하여, 그러나 제 1 일의 4.5 내지 12 mg/kg/사건 투여 범위로 비례 투여량 초과로 증가한다. 가장 높은 투여량에서 (12 mg/kg/사건) AUC_{168} 은 선형 관계에 의해 예상되는 것보다 대략 2.8 배 더 높다 (도 20).

[0461] 항-EGFR 에 대한 암컷 원숭이의 전신성 노출의 범위 (AUC_{168}) 는 일반적으로 수컷 원숭이에서의 노출과 유사하였

다.

[0462] 반복된 정맥내 투여 후, 항-EGFR 의 투여전 혈청 농도는 일반적으로 단일 투여 후 상기 값보다 더 높으며 (도 21 내지 22), 연구 기간에 걸친 혈청 중의 항-EGFR 의 축적을 나타내었다. 상기 축적은, 가장 높은 투여량 수준을 제외하고는, 일반적으로 수컷에서보다 암컷에서 더 낮았다. 제 22 일에 마지막 투여 (제 1 투여후 672 시간) 후 최저 (투여전) 농도 대 제 1 일에서의 첫번째 투여 후 최저 농도의 비를 하기 표 26 에 제시한다:

[0463] 표 26

투여량 (mg/kg/사건)	R	
	수컷	암컷
1.5	2.23	1.26
4.5	*	1.32
12	1.94	2.72
* 농도가 BLQ 였으므로 계산할 수 없었음		

[0464]

[0465] 제 1 일에서의 항-EGFR 의 최종 비율 상수 (k) 및 해당하는 최종 반감기 ($t_{1/2}$) 는 표 30 에 제시된다. 최종 반감기는 모든 동물에 대해 충분히 추정되지 않았을 것이나, 추정될 수 있었던 경우, 32.5 내지 63.1 시간 범위 이고, 수컷 동물에서 투여량이 증가하는 것으로 나타났다. 항-EGFR 의 총 혈청 제거는 1.5 내지 4.5 mg/kg/사건 범위 이상에 대해 투여량 독립적으로 나타났으나, 수컷 및 암컷 원숭이에서 최고 투여량 수준으로 감소되었다.

[0466] 결론적으로, 항-EGFR 에 대한 사이노몰거스 원숭이의 전신성 노출의 범위는 정맥내 독성 연구의 제 1 일에서의 1.5 내지 12 mg/kg/사건 투여량 범위에 대해 비-선형 (투여량-의존적) 동역학을 특징으로 하는 것으로 보였다.

항-EGFR 의 투여량을 4.5 mg/kg/사건 초과로 증가시키는 것은 선형 관계로부터 예상될 것보다 더 높은 전신성 노출을 야기할 것 같으며, 이것은 항-EGFR 의 제거에 대한 용량 제한적 방법의 가능성과 일치한다.

[0467] 또한, 연구는 일반적으로 항-EGFR 에 대한 수컷 및 암컷 원숭이의 전신성 노출에서의 차이가 없으며, 반복된 정맥내 투여 후의 축적이 있다는 증거를 또한 제공한다.

[0468] 표 27

[0469] 제 1, 8, 15 및 22 일에 1.5 mg/kg 항-EGFR 의 정맥내 투여 후 원숭이 혈청에서의 항-EGFR 의 혈청 농도 (μ g/ml)

시점	동물 번호	
	1M 623	1F 590
제 1 일 1 시간	33.42	30.86
제 1 일 4 시간	27.33	27.49
제 1 일 12 시간	13.09	17.01
제 1 일 24 시간	9.656	9.468
제 1 일 72 시간	2.528	0.786
제 1 일 120 시간	0.845	0.431
제 8 일 투여전	0.538	0.287
제 8 일 1 시간	30.02	19.07
제 15 일 투여전	0.902	0.382
제 15 일 1 시간	17.91	33.08
제 22 일 투여전	1.065	0.595
제 22 일 1 시간	19.41	33.00
제 1 일 672 시간	1.202	0.362

[0470]

[0471] 표 28

[0472] 제 1, 8, 15 및 22 일에 4.5 mg/kg 항-EGFR 의 정맥내 투여 후 사이노몰거스 원숭이 혈청에서의 항-EGFR 의 혈

청 농도 ($\mu\text{g/ml}$)

시점	동물 번호	
	2M 461	2F 462
제1일 1 시간	32.45	29.51
제1일 4 시간	32.39	29.57
제1일 12 시간	28.05	25.88
제1일 24 시간	23.70	23.78
제1일 72 시간	14.03	14.38
제1일 120 시간	10.42	8.137
제8일 투여전	4.672	3.683
제8일 1시간	25.91	31.06
제15일 투여전	5.752	5.450
제15일 1 시간	32.20	35.38
제22일 투여전	BLQ	6.497
제22일 1 시간	26.98	30.23
제1일 672 시간	BLQ	4.845

[0473]

[0474]

표 29

[0475]

제 1, 8, 15 및 22 일에 12 mg/kg 항-EGFR 의 정맥내 투여 후 사이노물거스 원숭이 혈청에서의 항-EGFR 의 혈청 농도 ($\mu\text{g/ml}$)

시점	동물 번호	
	1M 623	1F 590
제1일 1 시간	262.2	168.0
제1일 4 시간	223.3	174.5
제1일 12 시간	164.9	165.7
제1일 24 시간	141.7	146.0
제1일 72 시간	99.54	86.64
제1일 120 시간	86.64	69.08
제8일 투여전	65.86	45.21
제8일 1시간	282.1	209.9
제15일 투여전	98.43	71.21
제15일 1 시간	385.9	231.4
제22일 투여전	117.3	105.6
제22일 1 시간	234.1	402.5
제1일 672 시간	127.5	122.9

[0476]

[0477]

표 30

[0478] 사이노몰거스 원숭이에 대한 항-EGFR 의 매 주 정맥내 투여 제 1 일에서의 항-EGFR 의 약동학 파라미터

투여량 (mg/kg)	동물	C _{최대} (μg/mL)	T _{최대} (h)	AUC _t (μg.h/mL)	AUC (μg.h/mL)	CL (mL/h/kg)	V _{ss} (mL/kg)	k (1/h)	t _{1/2} (h)
1.5	1M623	33.42	1	830.4	849.4	1.778	60.79	0.0214	32.5
1.5	1F590	30.86	1	748.4	774.9 ^a	1.962 ^a	57.85 ^a	0.0105 ^a	66.0 ^a
4.5	2M461	32.45	1	2537	3005	1.488	133.6	0.0110	63.1
4.5	2F462	29.57	4	2378	2719	1.663	133.2	0.0121	57.4
12	3M463	262.2	1	18310	29870 ^a	0.4058 ^a	71.33 ^a	0.0056 ^a	124.3 ^a
12	3F612	174.5	4	15980	21400 ^a	0.5552 ^a	66.94 ^a	0.0082 ^a	84.4 ^a

a 상기 값은 데이터가 데이터 처리에서 정의된 모든 허용 기준을 충족하지 않았던 것으로 추정되고, 신중히 처리되어야만 한다.

[0479]

[0480] 혈액 화학 및 혈액학

[0481] 제 1, 8, 15, 및 22 일에 GlycoMAB 항-EGFR 의 정맥내 거환 주사를 투여받은 사이노몰거스 원숭이의 대퇴부 정맥으로부터 혈액 샘플을 취하였다. 밤새 음식을 주지 않은 후, 투약 투여에 대해 사용되지 않은 사지로부터 샘플을 취하였다 (죽은 것은 아님). 샘플을 예비치료, 2 번째 투여 후 3 일, 및 종료시에 리튬 헤파린을 항응고제로서 사용하여, 하기 파라미터에 대해 시험하였다:

[0482] 알칼린 포스페이트

[0483] 알라닌 아미노-트랜스페라아제

[0484] 아스파르테이트 아미노-트랜스페라아제

[0485] 빌리루빈 - 총

[0486] 우레아

[0487] 크레아티닌

[0488] 글루코스

[0489] 콜레스테롤 - 총

[0490] 트리글리세리드

[0491] 나트륨

[0492] 칼륨

[0493] 클로라이드

[0494] 칼슘

[0495] 인

[0496] 총 단백질

[0497] 단백질 전기영동도

[0498] 알부민/글로불린 비

[0499] 평균 정상 사이노몰거스 원숭이 혈액 화학 분석 데이터를 표 31 에 제시한다.

[0500] 표 31

[0501] 사이노몰거스 원숭이 (모리셔스 (Mauritius) 기원) - 혈액 화학

파라미터	성별	n	1%	5%	50%	95%	99%	평균	s.d.
ALP	M	949	837	1339	2147	3201	3899	2175.5	565.44
	F	881	946	1342	2144	3163	3740	2164.1	552.82
ALP-N	M	511	481	579	881	1453	1771	928.0	260.88
	F	499	427	546	846	1362	1694	879.5	240.24
ALT	M	1489	24	30	50	87	127	53.7	19.07
	F	1407	23	28	46	84	111	49.3	18.65
AST	M	1487	26	30	41	63	101	43.6	17.57
	F	1404	25	29	39	61	89	41.7	13.59

[0502]

파라미터	성별	n	1%	5%	50%	95%	99%	mean	s.d.
gGT	M	663	95	118	178	292	342	188.5	52.47
	F	641	81	102	153	232	266	158.6	38.38
LAP	M	207	18	26	40	79	217	45.1	28.25
	F	205	15	20	35	62	89	37.1	12.73
GLDH	M	159	8	10	17	35	126	20.1	16.46
	F	159	6	8	15	27	35	16.3	5.97
빌리루빈	M	1494	1	1	3	8	11	3.8	2.04
	F	1413	1	2	4	8	11	4.1	2.07
LDH	M	99	160	596	808	1166	2029	838.3	218.75
	F	82	477	529	711	945	1021	715.0	117.07
CPK	M	331	68	83	179	713	1867	287.4	464.03
	F	335	57	77	184	925	2628	309.7	534.02
간접형 빌리루빈	M	59	1	2	4	10	11	4.2	2.15
	F	57	1	2	4	5	7	3.6	1.13
직접형 빌리루빈	M	59	0	0	0	2	3	0.2	0.65
	F	57	0	0	0	1	3	0.2	0.52
담즙산	M	386	0.9	2.5	6.4	15.3	23.4	7.38	4.574
	F	380	1.4	3.0	7.0	12.9	17.8	7.41	3.474
우레아	M	1457	3.01	3.66	5.50	8.81	10.53	5.775	1.5710
	F	1379	2.77	3.42	5.33	8.56	9.90	5.559	1.5432
크레아티닌	M	1458	55	59	71	87	94	71.6	8.67
	F	1383	56	60	72	87	85	72.7	8.36
글루코스	M	1455	2.22	2.64	3.71	5.21	6.37	3.809	0.8135
	F	1380	2.23	2.65	3.63	5.18	6.34	3.735	0.7990
콜레스테롤	M	1455	1.69	1.93	2.68	3.55	3.96	2.706	1.4909
	F	1382	1.83	2.15	2.86	3.69	4.05	2.885	0.4813
콜레스테롤HDL	M	45	1.26	1.34	1.79	2.23	2.59	1.784	0.3128
	F	45	1.09	1.31	1.82	2.43	2.55	1.844	0.3179
콜레스테롤VLDL	M	45	0.00	0.00	0.00	0.03	0.11	0.004	0.0175
	F	45	0.00	0.00	0.00	0.12	0.19	0.012	0.0370
NEFA	M	132	0.10	0.28	0.98	1.84	2.44	0.994	0.4700
	F	132	0.14	0.22	1.06	1.90	2.18	1.070	0.4704
트리글리세리드	M	1453	0.26	0.32	0.53	0.86	1.30	0.561	0.2051
	F	1374	0.26	0.34	0.57	0.90	1.14	0.587	0.1778
Ph 지질	M	64	1.65	1.68	2.18	2.91	3.15	2.254	0.3769
	F	49	1.77	1.83	2.44	2.91	2.98	2.405	0.3267
요산	M	17	0	0	0	8	8	1.1	2.34
	F	17	0	0	0	1	1	0.4	0.51

[0503]

파라미터	성별	n	1%	5%	50%	95%	99%	mean	s.d.
Na	M	1461	141	142	147	152	155	146.8	3.00
	F	1382	140	142	147	153	157	147.3	3.34
K	M	1460	3.2	3.4	4.0	5.0	5.6	4.08	0.511
	F	1382	3.2	3.3	4.0	4.9	5.4	4.01	0.484
Cl	M	1461	102	104	108	112	115	107.7	2.71
	F	1382	102	104	108	113	116	108.4	2.83
Ca	M	1462	2.31	2.39	2.56	2.76	2.87	2.568	0.1176
	F	1382	2.32	2.39	2.57	2.77	2.89	2.572	0.1168
Phos	M	1172	1.16	1.40	1.93	2.43	2.69	1.921	0.3126
	F	1098	1.17	1.37	1.84	2.35	2.60	1.844	0.2978
콜레스테롤LDL	M	45	0.54	0.62	1.20	1.87	1.92	1.253	0.3694
	F	45	0.69	0.78	1.19	1.83	1.88	1.233	0.2906
비카르보네이트	M	288	7	10	17	22	25	16.5	3.51
	F	283	6	10	16	22	25	15.9	3.81
총 단백질	M	1455	71	74	80	87	90	80.2	4.06
	F	1381	71	74	81	89	92	81.2	4.32
알부민 (화학적)	M	346	34	38	43	46	49	42.6	2.67
	F	342	36	38	43	47	49	42.7	2.60
알부민	M	1089	33	36	45	51	54	44.3	4.46
	F	1019	34	37	45	52	55	44.7	4.58
글로불린	M	289	31	32	36	41	45	36.3	2.83
	F	285	30	32	37	43	48	37.5	3.59
A/G 비 (화학적)	M	340	0.79	0.98	1.17	1.39	1.45	1.172	0.1215
	F	336	0.84	0.95	1.14	1.34	1.42	1.143	0.1274
A/G 비	M	1068	0.68	0.80	1.26	1.65	1.82	1.252	0.2522
	F	998	0.67	0.79	1.26	1.66	1.81	1.247	0.2647
A1 글로불린	M	1105	2	2	3	4	4	2.8	0.62
	F	1035	2	2	3	4	5	2.8	0.64
A2 글로불린	M	1105	3	3	4	6	7	4.2	0.92
	F	1035	3	3	4	6	7	4.2	1.01
베타 글로불린	M	1105	12	13	16	22	24	16.6	2.63
	F	1035	12	13	16	22	25	16.8	2.85
감마 글로불린	M	1105	8	9	12	17	18	12.6	2.26
	F	1035	8	9	13	17	20	13.1	2.52

[0504]

파라미터	성별	n	1%	5%	50%	95%	99%	mean	s.d.
알도라아제	M	96	9	14	21	38	57	22.0	7.48
	F	97	10	13	19	48	84	21.9	11.91
혈장 CHE	M	17	4159	4159	5745	9160	9160	5919.8	1181.68
	F	17	3371	3371	5869	8367	8367	5689.2	1512.98
CRP	M	57	0.000	0.000	0.002	0.013	0.026	0.0032	0.00414
	F	56	0.000	0.000	0.002	0.004	0.007	0.0017	0.00167
T3	M	40	1.90	1.90	2.50	3.38	3.58	2.537	0.4011
	F	40	1.71	1.96	2.59	3.06	4.02	2.631	0.3799
T4	M	40	35	42	59	86	92	59.7	11.84
	F	40	38	40	56	81	107	58.6	14.37

[0505]

[0506]

제 1, 8, 15, 및 22 일에 GlycoMAB 항-EGFR 의 정맥내 거환 주사를 투여받은 사이노몰거스 원숭이의 대퇴부 정맥으로부터 혈액학적, 말초 혈액 분석에 대한 샘플을 취하였다. 밤새 음식을 주지 않은 후, 투약 투여에 대해 사용되지 않은 사지로부터 샘플을 취하였다 (죽은 것은 아님). 샘플을 예비치료, 2 번째 투여 후 3 일, 및 종료시에, 하기 파라미터에 대해 시험하였다:

[0507]

1) EDTA 를 항응고제로서 사용함 -

[0508]	헤마토크리트헤모글로빈 농도
[0509]	적혈구 계수
[0510]	망상적혈구
[0511]	평균 세포 헤모글로빈
[0512]	평균 세포 헤모글로빈 농도
[0513]	평균 세포 부피
[0514]	총 백혈구 계수
[0515]	분화된 백혈구 계수
[0516]	혈소판 계수
[0517]	혈액 형태학의 기형
[0518]	적혈구부동증
[0519]	소적혈구증
[0520]	대적혈구증
[0521]	저염색 (Hypochromasia)
[0522]	과염색 (Hyperchromasia)
[0523]	2) 시트레이트를 항응고제로서 사용함 -
[0524]	프로트롬빈 시간
[0525]	활성화된 일부분의 트롬보플라스틴 시간
[0526]	평균 정상 사이노물거스 원숭이 혈액학 분석 데이터를 표 32 에 제시한다.
[0527]	표 32

[0528] 사이노몰거스 원숭이 (모리셔스 (Mauritius) 기원) - 혈액학

파라미터	성별	n	1%	5%	50%	95%	99%	평균	s.d.
HCT	M	1495	0.385	0.401	0.443	0.488	0.512	0.4435	0.02776
	F	1426	0.376	0.399	0.442	0.489	0.508	0.4424	0.02947
헤모글로빈	M	1495	11.4	12.1	13.3	14.5	15.1	13.31	0.769
	F	1426	11.2	11.9	13.2	14.5	15.1	13.21	0.855
RBC	M	1495	5.67	6.04	6.74	7.51	7.92	6.744	0.4792
	F	1426	5.58	5.96	6.71	7.45	7.73	6.707	0.4894
망상 (1) %	M	20	0.1	0.1	0.4	1.8	1.8	0.48	0.438
	F	20	0.1	0.1	0.3	0.9	0.9	0.42	0.268
망상 (2) %	M	1476	0.21	0.27	0.49	0.95	1.58	0.551	0.3804
	F	1408	0.22	0.28	0.54	1.06	1.60	0.595	0.2934
MCH	M	1495	17.0	17.8	19.8	21.6	22.5	19.80	1.432
	F	1425	16.7	17.7	19.7	21.8	22.6	19.74	1.216
MCHC	M	1495	27.2	28.2	30.1	31.9	32.7	30.06	1.801
	F	1425	27.0	27.9	29.9	31.8	32.6	29.88	1.174
MCV	M	1495	57.9	60.5	65.8	71.4	73.5	65.88	3.278
	F	1425	58.3	60.4	66.0	71.7	74.5	66.07	3.353
RDW	M	280	12.6	12.9	14.4	16.1	16.7	14.40	0.934
	F	285	12.4	12.8	14.2	15.7	16.3	14.21	0.879
WBC	M	1507	5.61	6.62	10.52	18.59	30.24	11.372	4.7766
	F	1432	5.39	6.58	10.62	19.55	28.79	11.637	4.7307
호중구	M	1507	0.88	1.28	3.49	10.24	16.27	4.319	3.1741
	F	1432	1.06	1.62	4.45	12.27	17.41	5.392	3.4777
림프구	M	1507	2.19	2.96	5.53	9.81	15.91	6.021	3.4066
	F	1432	2.16	2.67	4.86	8.55	13.95	5.265	2.9997
호산구	M	1507	0.00	0.01	0.17	0.81	1.49	0.254	0.3127
	F	1432	0.00	0.01	0.14	0.73	1.55	0.232	0.3188
호염기구	M	1507	0.01	0.02	0.04	0.10	0.25	0.053	0.0627
	F	1432	0.01	0.02	0.04	0.10	0.21	0.051	0.0540
단핵구	M	1507	0.17	0.25	0.51	1.03	1.45	0.562	0.2575
	F	1432	0.16	0.23	0.49	1.04	1.56	0.547	0.2705
큰 미염색 세포	M	1507	0.04	0.06	0.14	0.32	0.60	0.163	0.1330
	F	1432	0.04	0.06	0.13	0.29	0.50	0.148	0.1147

[0529]

파라미터	성별	n	1%	5%	50%	95%	99%	평균	s.d.
혈소판	M	1495	158	238	359	497	575	362.1	81.69
	F	1426	181	234	359	496	560	360.5	80.04
PT	M	1481	9.6	9.9	10.8	12.0	14.8	10.88	0.877
	F	1406	9.7	10.0	10.8	12.1	14.1	10.93	0.847
Act PTT	M	1483	23.1	24.4	29.1	37.9	50.1	30.06	5.267
	F	1408	22.8	24.4	29.4	37.4	47.2	30.19	5.185
피브리노겐	M	265	1.61	1.86	2.61	3.51	4.88	2.664	0.6178
	F	252	1.58	1.84	2.43	3.27	3.89	2.487	0.4545

[0530]

[0531] 원숭이에 대한 생화학 누적 개별 값을 하기 표 33a 내지 h 에 제시한다:

[0532] 표 33a

동물 번호	그룹/ 성별	사건 코드	ALP U/L	ALT U/L	AST U/L	빌리 μmol/L	우레아 mmol/L	크라아티닌 μmol/L	글루코스 mmol/L	콜레스테롤 mmol/L
615	1M	PT	740	36	39	3	5.35	69	3.65	2.34
		D11	743	35	33	3	5.43	73	3.66	2.00
		TERM	597	29	31	2	5.16	76	3.74	2.30
465	2M	PT	647	44	33	3	5.73	70	4.69	2.50
		PD	775	47	36	2	3.60	73	4.50	2.72
		D11	655	74	46	5	4.34	74	3.35	2.64
		TERM	768	48	38	3	4.42	73	3.67	2.54
639	2M	PD	741	29	26	2	4.41	87	3.31	3.22
		D11	629	29	28	3	3.87	99	2.64	2.99
		TERM	599	34	22	2	3.62	83	3.46	2.45
613	3M	PT	1003	37	31	5	3.80	90	5.72	2.61
		D11	793	36	29	4	4.45	80	3.28	2.70
		TERM	931	34	32	5	5.16	83	2.78	2.46
631	4M	PD	590	34	37	2	3.43	83	3.92	2.49
		D11	508	38	36	3	3.33	82	3.38	2.30
		TERM	578	25	25	2	4.00	89	3.70	2.26

[0533]

[0534] 표 33b

동물 번호	그룹/ 성별	사건 코드	Trig mmol/L	Na mmol/L	K mmol/L	Cl mmol/L	Ca mmol/L	Phos mmol/L	총 단백질 g/L	Alb g/L
615	1M	PT	0.24	146	4.7	108	2.54	1.77	91	35
		D11	0.39	145	3.9	106	2.55	1.85	94	41
		TERM	0.34	147	4.2	107	2.47	1.63	87	38
465	2M	PT	0.74	147	3.7	108	2.71	1.32	81	37
		PD	0.93	147	4.1	109	2.70	1.54	84	46
		D11	0.66	151	3.9	111	2.70	1.98	83	39
		TERM	0.51	146	3.6	105	2.67	1.85	80	40
639	2M	PD	0.27	146	4.2	107	2.68	1.85	84	44
		D11	0.32	150	4.8	108	2.81	2.07	85	42
		TERM	0.38	146	4.5	107	2.70	2.03	74	39
613	3M	PT	0.47	151	4.5	106	2.75	1.85	83	41
		D11	0.44	147	4.2	106	2.69	1.76	80	45
		TERM	0.69	147	4.3	106	2.63	1.62	76	40
631	4M	PD	0.45	149	4.2	107	2.67	2.00	87	46
		D11	0.77	151	5.0	112	2.68	2.00	84	39
		TERM	0.64	150	4.7	107	2.77	1.89	86	46

[0535]

[0536] 표 33c

동물 번호	그룹/ 성별	사건 코드	a1 g/L	a2 g/L	베타 g/L	감마 g/L	A/G Ratio	Alb %	a1 %	a2 %
615	1M	PT	3	5	25	23	0.63	39.0	3.4	5.1
		D11	3	4	22	25	0.77	43.1	3.0	4.5
		TERM	3	4	21	21	0.78	43.5	3.3	4.9
465	2M	PT	4	5	22	13	0.84	45.7	4.5	5.9
		PD	3	4	18	12	1.21	54.9	3.6	5.0
		D11	4	5	20	15	0.89	46.7	4.9	6.4
		TERM	3	5	20	11	1.00	50.5	4.0	5.8
639	2M	PD	3	5	17	14	1.10	52.9	3.5	5.8
		D11	3	6	18	16	0.98	49.1	4.1	6.6
		TERM	3	4	17	11	1.11	52.2	3.7	6.0
613	3M	PT	4	4	20	14	0.98	49.5	5.0	4.7
		D11	3	3	17	13	1.29	55.8	3.7	3.7
		TERM	3	3	15	14	1.11	53.0	4.6	3.9
631	4M	PD	3	4	18	16	1.12	53.3	3.6	4.3
		D11	4	4	19	18	0.87	46.4	4.4	4.4
		TERM	3	4	19	15	1.15	53.1	3.4	4.3

[0537]

[0538] 표 33d

동물 번호	그룹/ 성별	사건 코드	베타 %	감마 %
615	1M	PT	27.3	25.3
		D11	23.2	26.2
		TERM	24.4	23.9
465	2M	PT	27.4	16.6
		PD	21.8	14.7
		D11	24.0	17.9
		TERM	25.5	14.2
639	2M	PD	20.7	17.0
		D11	21.5	18.7
		TERM	23.2	14.9
613	3M	PT	24.5	16.3
		D11	21.0	15.8
		TERM	20.0	18.5
631	4M	PD	20.7	18.0
		D11	22.8	22.0
		TERM	22.1	17.1

[0539]

[0540] 표 33e

동물 번호	그룹/ 성별	사건 코드	ALP U/L	ALT U/L	AST U/L	빌리 μmol/L	우레아 mmol/L	크라아티닌 μmol/L	글루코스 mmol/L	콜레스테롤 mmol/L
614	1F	PT	687	71	50	3	4.92	60	4.45	2.77
		D11	576	63	44	2	5.22	63	4.32	2.73
		TERM	517	59	41	3	4.78	70	3.98	2.83
652	1F	PT	598	43	25	3	7.26	69	3.26	2.42
		D11	540	40	28	3	6.94	78	3.28	2.46
		TERM	511	40	27	4	6.78	80	3.46	2.38
624	2F	PD	533	56	35	3	3.85	73	3.91	2.31
		D11	410	40	34	13	4.18	78	2.72	2.56
		TERM	432	41	25	3	3.70	78	3.30	2.16
632	3F	PT	559	35	34	5	5.44	80	3.08	2.47
		D11	510	37	31	5	4.36	85	3.89	2.61
		TERM	428	37	34	5	5.32	88	3.10	2.63
640	4F	PD	343	23	32	4	4.09	65	3.46	1.24
		D11	292	25	28	4	4.12	63	2.69	1.13
		TERM	266	22	27	2	4.55	69	3.69	1.00

[0541]

[0542] 표 33f

동물 번호	그룹/ 성별	사건 코드	Trig mmol/L	Na mmol/L	K mmol/L	Cl mmol/L	Ca mmol/L	Phos mmol/L	총 단백질 g/L	Alb g/L
614	1F	PT	0.37	148	4.6	109	2.69	2.03	80	39
		D11	0.33	147	4.1	109	2.72	2.08	82	43
		TERM	0.54	148	3.6	108	2.59	1.84	80	41
652	1F	PT	0.57	147	4.3	105	2.58	1.52	78	35
		D11	0.43	149	4.7	108	2.74	1.80	88	43
		TERM	0.59	149	4.4	108	2.59	1.51	80	40
624	2F	PD	0.60	145	4.1	108	2.54	1.50	77	40
		D11	0.51	148	4.0	111	2.58	1.42	77	39
		TERM	0.43	146	3.9	108	2.56	1.46	76	44

[0543]

동물 번호	그룹/ 성별	사건 코드	Trig mmol/L	Na mmol/L	K mmol/L	Cl mmol/L	Ca mmol/L	Phos mmol/L	총 단백질 g/L	Alb g/L
632	3F	PT	0.31	151	4.5	109	2.48	1.72	76	34
		D11	0.34	149	4.6	109	2.58	1.85	80	39
		TERM	0.49	150	4.5	111	2.55	1.47	78	38
640	4F	PD	0.36	144	4.8	111	2.31	1.45	68	29
		D11	0.31	145	4.3	112	2.24	1.53	63	25
		TERM	0.27	144	4.7	108	2.20	1.33	60	25

[0544]

[0545] 표 33g

동물 번호	그룹/ 성별	사건 코드	a1 g/L	a2 g/L	베타 g/L	감마 g/L	A/G 비	Alb %	a1 %	a2 %
614	1F	PT	4	5	20	13	0.95	49.2	4.4	5.9
		D11	3	4	19	13	1.10	52.7	3.3	4.9
		TERM	3	4	18	13	1.05	51.7	3.8	5.2
652	1F	PT	4	5	19	15	0.81	45.1	4.6	5.9
		D11	3	5	20	17	0.96	49.3	3.4	5.5
		TERM	4	5	18	14	1.00	49.4	4.7	6.2
624	2F	PD	3	4	16	14	1.08	52.2	4.1	5.4
		D11	4	4	17	14	1.03	50.1	4.9	5.5
		TERM	3	4	15	10	1.38	58.5	3.4	5.3
632	3F	PT	4	4	19	15	0.81	44.7	5.1	5.0
		D11	3	4	17	16	0.95	49.2	4.2	4.7
		TERM	4	4	17	15	0.95	49.2	4.6	4.9
640	4F	PD	4	4	17	15	0.74	42.2	5.7	5.6
		D11	4	3	17	13	0.66	40.1	6.6	5.5
		TERM	4	3	16	13	0.71	41.4	6.4	4.6

[0546]

[0547] 표 33h

동물번호	그룹/ 성별	사건 코드	베타 %	감마 %
614	1F	PT	24.8	15.7
		D11	23.1	16.0
		TERM	22.8	16.5
652	1F	PT	24.7	19.7
		D11	22.3	19.4
		TERM	22.1	17.6
624	2F	PD	20.7	17.6

[0548]

동물 번호	그룹/ 성별	사건 코드	베타 %	감마 %
		D11	21.6	18.0
		TERM	19.9	12.9
632	3F	PT	24.9	20.2
		D11	21.5	20.4
		TERM	21.8	19.5
640	4F	PD	24.9	21.6
		D11	26.9	20.9
		TERM	26.5	21.1

[0549]

[0550] 원숭이에 대한 혈액학 누적 개별 값을 하기 표 34a 내지 1 에 제시한다:

[0551] 표 34a

동물 번호	그룹/ 성별	사건 코드	Hct L/L	Hb g/dL	RBC $\times 10^{12}/L$	망상 %	MCH pg	MCHC g/dL	MCV fL
615	1M	PT	0.389	12.4	5.94	0.38	20.9	31.9	65.5
		D11	0.366	11.5	5.59	0.76	20.6	31.4	65.5
		TERM	0.381	11.8	5.91	0.25	20.0	31.0	64.5
465	2M	PT	0.439	13.2	6.76	0.56	19.5	30.1	65.0
		PTR							
		PD	0.460	13.7	7.22	0.50	19.0	29.9	63.8
		D11	0.391	11.7	6.11	1.62	19.1	29.9	64.0
		TERM	0.441	13.6	6.93	0.65	19.7	30.9	63.7
639	2M	PD	0.419	12.7	6.23	0.51	20.4	30.3	67.2
		D11	0.400	11.7	5.99	0.52	19.6	29.3	66.7
		TERM	0.388	12.2	5.70	1.14	21.4	31.4	68.1
613	3M	PT	0.461	14.1	6.79	0.48	20.7	30.5	67.8
		PTR							
		D11	0.396	12.7	6.05	0.92	21.0	32.1	65.4
		TERM	0.410	12.9	6.23	0.49	20.8	31.5	65.9

[0552]

[0553] 표 34b

동물 번호	그룹/ 성별	사건 코드	WBC $\times 10^9/L$	N $\times 10^9/L$	L $\times 10^9/L$	E $\times 10^9/L$	호염 기구 $\times 10^{-9}/L$	단핵구 $\times 10^{-9}/L$	LUC $\times 10^9/L$	Plt $\times 10^9/L$
615	1M	PT	7.57	3.06	3.68	0.06	0.03	0.53	0.20	236
		D11	7.56	2.78	4.35	0.06	0.02	0.21	0.13	284
		TERM	7.93	3.77	3.52	0.06	0.02	0.49	0.07	254

[0554]

동물 번호	그룹/ 성별	사건 코드	WBC $\times 10^9/L$	N $\times 10^9/L$	L $\times 10^9/L$	E $\times 10^9/L$	호염 기구 $\times 10^{-9}/L$	단핵구 $\times 10^{-9}/L$	LUC $\times 10^9/L$	Plt $\times 10^9/L$
465	2M	PT	14.19	1.78	10.37	1.24	0.05	0.55	0.20	302
		PTR	13.69	3.69	8.25	0.93	0.04	0.47	0.29	
		PD	13.36	1.55	9.95	1.01	0.04	0.58	0.25	325
		D11	12.26	4.70	5.63	1.27	0.04	0.51	0.11	403
		TERM	15.45	1.54	11.57	1.65	0.07	0.42	0.20	356
639	2M	PD	10.02	5.21	3.42	0.90	0.01	0.39	0.10	306
		D11	8.26	4.06	2.47	1.17	0.01	0.45	0.10	371
		TERM	8.70	2.55	4.20	1.04	0.02	0.80	0.09	253
613	3M	PT	20.21	12.99	6.45	0.02	0.04	0.50	0.21	438
		PTR	16.85	8.87	6.90	0.08	0.06	0.67	0.26	
		D11	10.85	6.11	4.15	0.03	0.02	0.41	0.12	441
		TERM	23.26	17.70	4.27	0.05	0.04	1.11	0.08	434

[0555]

[0556] 표 34c

동물 번호	그룹/ 성별	사건 코드	PT 초	APTT 초
615	1M	PT	11.3	37.3
		D11	10.3	32.7
		TERM	11.3	33.3
465	2M	PT	10.0	33.9
		PTR		
		PD	9.9	26.1
		D11	10.0	31.6
		TERM	10.2	29.4
639	2M	PD	10.6	22.6
		D11	10.5	26.3
		TERM	10.3	28.9
613	3M	PT	10.3	35.5
		PTR		
		D11	11.4	26.7
		TERM	10.3	30.8

[0557]

[0558] 표 34d

동물 번호	그룹/ 성별	사건 코드	적혈구 부동증	소 적혈구증	대 적혈구증	저염색	과염색
615	1M	PT	-	-	-	-	+
		D11	-	-	-	-	-
		TERM	-	-	-	-	+
465	2M	PT	-	-	-	-	-

[0559]

동물 번호	그룹/ 성별	사건 코드	적혈구 부동증	소 적혈구증	대 적혈구증	저염색	과염색
		PTR					
		PD	-	-	-	-	-
		D11	-	-	-	-	-
		TERM	-	-	-	-	-
639	2M	PD	-	-	-	-	-
		D11	-	-	-	-	-
		TERM	-	-	-	-	-
613	3M	PT	-	-	-	-	-
		PTR					
		D11	-	-	-	-	+
		TERM	-	-	-	-	-

[0560]

[0561] 표 34e

동물 번호	그룹/ 성별	사건 코드	Hct L/L	Hb g/dL	RBC x10 ¹² /L	Retic %	MCH pg	MCHC g/dL	MCV fL
631	4M	PD	0.460	13.6	7.11	0.43	19.1	29.5	64.6
		D11	0.395	11.9	6.36	0.45	18.7	30.2	62.1
		TERM	0.449	13.7	6.97	0.30	19.6	30.5	64.4
614	1F	PT	CTD	CTD	CTD	CTD	CTD	CTD	CTD
		PTR							
		D11	0.404	13.1	6.33	0.57	20.6	32.3	63.8
652	1F	PT	0.390	11.3	5.72	1.15	19.8	29.1	68.2
		D11	0.374	11.9	5.55	1.06	21.4	31.7	67.4
		TERM	0.384	11.5	5.71	0.58	20.2	30.0	67.2
624	2F	PD	0.407	11.8	7.14	0.73	16.6	29.0	57.1
		D11	0.377	10.8	6.69	0.48	16.1	28.6	56.3
		TERM	0.401	11.7	6.99	1.07	16.7	29.1	57.4

[0562]

[0563] 표 34f

동물 번호	그룹/ 성별	사건 코드	WBC x10 ⁹ /L	N x10 ⁹ /L	L x10 ⁹ /L	E x10 ⁹ /L	호염 기구	단핵구	LUC x10 ⁹ /L	Plt x10 ⁹ /L
631	4M	PD	10.53	2.82	6.36	0.62	0.02	0.58	0.13	378
		D11	7.97	2.86	3.81	0.61	0.01	0.53	0.16	424
		TERM	8.08	1.73	5.04	0.63	0.02	0.60	0.05	384

[0564]

동물 번호	그룹/ 성별	사건 코드	WBC x10 ⁹ /L	N x10 ⁹ /L	L x10 ⁹ /L	E x10 ⁹ /L	호염 기구	단핵구	LUC x10 ⁹ /L	Plt x10 ⁹ /L
614	1F	PT	CTD	CTD	CTD	CTD	CTD	CTD	CTD	CTD
		PTR	11.32	3.47	6.36	0.17	0.05	0.96	0.31	
		D11	9.70	4.74	3.73	0.09	0.02	0.84	0.28	429
		TERM	9.64	3.65	5.09	0.13	0.01	0.62	0.13	414
652	1F	PT	10.66	3.21	6.05	0.42	0.03	0.80	0.15	373
		D11	12.01	5.53	5.20	0.34	0.02	0.78	0.13	380
		TERM	11.88	7.59	3.24	0.35	0.02	0.61	0.08	338
624	2F	PD	9.06	3.10	5.02	0.41	0.02	0.33	0.18	362
		D11	7.82	5.14	2.06	0.14	0.02	0.34	0.13	353
		TERM	11.69	4.33	5.46	0.96	0.02	0.76	0.16	426

[0565]

[0566] 표 34g

동물 번호	그룹/ 성별	사건 코드	PT 초	APTT 초
631	4M	PD	10.9	29.3
		D11	11.3	27.9
		TERM	10.8	32.1
614	1F	PT	CTD	CTD
		PTR		
		D11	10.2	32.1
		TERM	10.5	29.3
652	1F	PT	10.2	33.0
		D11	9.6	27.9
		TERM	10.3	30.3
624	2F	PD	10.6	27.1
		D11	10.6	29.7
		TERM	10.8	33.3

[0567]

[0568] 표 34h

동물 번호	그룹/ 성별	사건 코드	적혈구 부동증	소 적혈구증	대 적혈구증	저염색	과염색
631	4M	PD	-	-	-	-	-
		D11	-	-	-	-	-
		TERM	-	-	-	-	-
614	1F	PT	CTD	CTD	CTD	CTD	CTD
		PTR	-	-	-	-	-
		D11	-	-	-	-	-
		TERM	-	-	-	-	-

[0569]

동물 번호	그룹/ 성별	사건 코드	적혈구 부동증	소 적혈구증	대 적혈구증	저염색	과염색
652	1F	PT	-	-	-	-	-
		D11	-	-	-	-	-
		TERM	-	-	-	-	-
624	2F	PD	-	+	-	-	-
		D11	-	+	-	-	-
		TERM	+	+	-	-	-

[0570]

[0571] 표 34i

동물 번호	그룹/ 성별	사건 코드	Hct L/L	Hb g/dL	RBC x10 ¹² /L	망상 %	MCH pg	MCHC g/dL	MCV fL
632	3F	PT	0.416	12.4	6.36	0.83	19.6	29.9	65.4
		PTR	0.410	12.2	6.29	0.64	19.5	29.8	65.3
		D11	0.392	12.2	6.19	0.73	19.7	31.0	63.4
		TERM	0.412	12.3	6.46	0.55	19.1	29.9	63.8
640	4F	PD	0.398	11.8	5.81	0.95	20.3	29.7	68.5
		D11	0.369	11.0	5.30	1.17	20.7	29.8	69.6
		TERM	0.401	11.9	5.58	0.83	21.3	29.6	71.9

[0572]

[0573] 표 34j

동물 번호	그룹/ 성별	사건 코드	WBC x10 ⁹ /L	N x10 ⁹ /L	L x10 ⁹ /L	E x10 ⁹ /L	호염 기구	단핵구	LUC x10 ⁹ /L	Plt x10 ⁹ /L
632	3F	PT	18.12	10.58	5.61	1.07	0.04	0.61	0.21	335
		PTR	15.16	5.99	7.24	0.95	0.03	0.63	0.31	308
		D11	10.23	4.69	4.15	0.66	0.01	0.48	0.23	348
		TERM	13.04	6.89	4.62	0.44	0.03	0.93	0.13	321
640	4F	PD	12.49	8.29	2.91	0.46	0.02	0.64	0.17	567
		D11	13.71	10.31	2.18	0.34	0.01	0.74	0.12	578
		TERM	11.49	5.41	4.18	0.63	0.03	1.12	0.12	555

[0574]

[0575] 표 34k

동물 번호	그룹/ 성별	사건 코드	PT 초	APTT 초
632	3F	PT	10.6	47.8
		PTR	10.6	44.7
		D11	10.2	33.1
		TERM	10.6	37.2
640	4F	PD	12.0	25.8
		D11	12.4	28.0
		TERM	12.8	30.1

[0576]

[0577] 표 34l

동물 번호	그룹/ 성별	사건 코드	적혈구 부동증	소 적혈구증	대 적혈구증	저염색	과염색
632	3F	PT	-	-	-	-	-
		PTR	-	-	-	-	-
		D11	-	-	-	-	-
		TERM	-	-	-	-	-
640	4F	PD	-	-	-	-	-
		D11	-	-	-	-	-
		TERM	-	-	-	-	-

[0578]

[0579] 현미경적 병리학 - 치료-관련 발견

[0580] 12 mg/kg/day 로 투여받은 암컷 원숭이에서 담도주위염 (담도 주위의 결합 조직의 염증) 이 보고되었으나, 임의의 기타 암컷 또는 수컷 원숭이에서는 그렇지 않았다. 상기 발견은 Glyco-mAb (항-EGFR) 로의 치료와 관련될 수 있으나, 이러한 소수의 동물로는 유의성이 불명확하다. 모든 기타 발견은 부수적인 것으로, 독성학적 유의성이 없는 것으로 간주되었다.

[0581] 마크로병리학 및 조직병리학

[0582] 시험된 모든 동물에 대한 조직병리학적 요약은 하기 표 35 에 언급한다:

[0583] 표 35

[0584] 조직병리학 - 그룹 분포 및 모든 동물에 대한 발견의 경중도

그룹	1	2	3
화합물	- 글리코 -MAB (항-EGFR)-		
투여량	1.5	4.5	12

[0585]

	성별	수행된 동물 수					
		수컷			암컷		
	그룹	1	2	3	1	2	3
시험된 기관/조직	수	1	1	1	1	1	1
결장	시험되지 않음	1	1	1	1	1	1
심장	시험되지 않음	1	1	1	1	1	1
신장	시험되지 않음	1	1	1	1	1	1
피질 림프구 침윤	최소	1	1	0	0	1	1
	약간	0	0	0	1	0	[?]
	총	1	1	0	1	1	1
좌두부	시험되지 않음	0	0	0	0	0	0
좌복재	시험되지 않음	1	1	1	1	1	1
--상피 증식	최소	0	0	0	1	0	0
	총	0	0	0	1	0	0
간 -- 염증성 세포 병변	시험되지 않음	1	1	1	1	1	1
	최소	1	1	1	1	1	1
	총	1	1	1	1	1	1
-- 담관 증식	최소	0	0	0	0	0	1
	총	0	0	0	0	0	1
-- 간세포 공포형성 - 중앙 틈	최소	0	1	0	0	0	0
	총	0	1	0	0	0	0
--담도주위염	최소	0	0	0	0	0	1
	총	0	0	0	0	0	1
폐 & 기관지	시험되지 않음	1	1	1	1	1	1
--기관지/기관세지- 점막/점막하 염증성 세포	약간	1	0	0	0	0	0
	총	1	0	0	0	0	0
--폐포 대식세포	최소	0	1	0	0	0	1
	총	0	1	0	0	0	1
-- 혈관주위 염증성/림프구 세포	최소	0	0	1	0	0	1
	총	0	0	1	0	0	1
--림프구 응집	최소	0	0	1	0	0	0
	총	0	0	1	0	0	0
식도	시험되지 않음	1	1	1	1	1	1
--림프구 응집	최소	0	0	0	0	0	1
	총	0	0	0	0	0	1

[0586]

	성별	수행된 동물 수					
		수컷			암컷		
		1	2	3	1	2	3
시험된 기관/조직	번호	1	1	1	1	1	1
난소	시험되지 않음	0	0	0	1	1	1
--난포낭(들)	존재함	0	0	0	1	0	0
	총	0	0	0	1	0	0
--현저한 위축 황체	존재함	0	0	0	0	1	0
	총	0	0	0	0	1	0
이자	시험되지 않음	1	1	1	1	1	1
--과리 위축	최소	0	0	1	1	0	1
	총	0	0	1	1	0	1
--림프구 응집	최소	0	0	0	1	0	0
	총	0	0	0	1	0	0
우두부	시험되지 않음	0	0	0	0	0	0
우복재	시험되지 않음	0	0	0	0	0	0
피부(프로토콜)	시험되지 않음	1	1	1	1	1	1
--상피 증식	최소	0	0	0	0	0	1
	적당함	0	0	0	1	0	0
	총	0	0	0	1	0	1
척수	시험되지 않음	1	1	1	1	1	1
--출혈	최소	0	0	1	1	1	1
	약간	0	1	0	0	0	0
	총	0	1	1	1	1	1
비장	시험되지 않음	1	1	1	1	1	1
흉골 & 골수	시험되지 않음	0	0	0	0	0	0
위	시험되지 않음	1	1	1	1	1	1
고환	시험되지 않음	1	1	1	0	0	0
--미숙	존재함	1	1	1	0	0	0
	총	1	1	1	0	0	0
흉선	시험되지 않음	1	1	1	1	1	1
--낭(들)	존재함	0	0	0	0	1	0
	총	0	0	0	0	1	0
--퇴화/위축	최소	0	0	0	0	1	0
	총	0	0	0	0	1	0

[0587]

	성별	수행된 동물 수					
		수컷			암컷		
		1	2	3	1	2	3
시험된 기관/조직	수	1	1	1	1	1	1
방광	시험되지 않음	1	1	1	1	1	1
자궁 경부	시험되지 않음	0	0	0	1	1	1
--상피 점액분비	존재함	0	0	0	1	1	1
	총	0	0	0	1	1	1
자궁	시험되지 않음	0	0	0	1	1	1
--출혈	최소	0	0	0	0	1	0
	총	0	0	0	0	1	0
맹장	시험되지 않음	1	0	0	1	0	0
--두드러진 점막하 지방 조직	최소	1	0	0	1	0	0
	총	1	0	0	1	0	0
난관	시험되지 않음	0	0	0	1	1	1
장간막	시험되지 않음	0	0	0	1	0	0
--증가된 착색된 대식세포	약간	0	0	0	1	0	0
	총	0	0	0	1	0	0

[0588]

- [0589] 모든 동물에 대한 개별적 발견
- [0590] 개별적 동물에 대한 병리적 관찰을 하기 표 36 에 언급한다:
- [0591] 표 36
- [0592] 마크로병리학 및 조직병리학 - 모든 동물에 대한 개별적 발견

그룹	1	2	3
화합물	- 글리코 -MAB (항-EGFR)-		
투여량	1.5	4.5	12

- [0593]
- [0594] 병리학 관찰

성별	수컷	투여 그룹	1
동물 번호	0623	희생 연구주	11
최종 체중	2715.0 그램	희생 연구일	77
부검		조직학	
맹장 :		맹장 :	
상승 영역(들);점막양상, 다수, 3mm 이하.		두드러진 점막하 지방 조직,- 최소,국소적	

- [0595]

결장:		결장:	
-상승 영역(들);점막양상, 다수, 2mm 이하.		뚜렷한 병소 없음	
		신장:	
		-피질 림프구 침윤, -최소	
간 :		간 :	
-중앙툰경계 영역(들);1개, 피막하, 3mm.		-염증성 세포 병변, 최소	
		폐 & 기관지:	
		-기관지/기관세지 점막/점막하 염증성 세포,- 약간	
위 :		위 :	
-신체 상승영역(들);점막, 1개, 방 근저, 3mm.		>뚜렷한 병소 없음	
		고환 :	
		-미숙, -존재함	
성별	수컷	투여 그룹	2
동물 번호	0461	희생 연구주	18
최종 체중	2573.0 그램	희생 연구일	125
부검		조직학	
		신장	
		-피질 림프구 침윤, -최소	
간:		간	
-중앙툰경계 영역(들);1개, 피막하, 4mm.		-염증성 세포 병변, 최소 -간세포 공포형성- 중앙 툰, 최소	
폐 & 기관지:		폐 & 기관지:	
-불완전 허탈; 우엽		-폐포 대식세포, -최소	
		척수:	
		-출혈, -약간, 다수-병변	
		고환 :	
		-미숙, -존재함	
성별	수컷	투여 그룹	3
동물 번호	0463	희생 연구주	18
최종 체중	2919.0 그램	희생 연구일	125
부검		조직학	
		간 :	
		-염증성 세포 병변, 최소	
		폐 & 기관지:	

[0596]

	-혈관주위 염증성/림프구 세포,- 최소 -림프구 응집,-최소,국소적		
	이차 :		
	-파리 위축,-최소,국소적		
	척수:		
	-출혈,-최소		
	고환 :		
	-미숙,-존재함		
*** 동물은 기록된 총체적 관찰이 없다 ***			
성별	암컷	투여 그룹	1
동물 번호	0590	희생 연구주	11
최종 체중	3176.0 그램	희생 연구일	77
부검		조직학	
맹장 :		맹장 :	
-상승 영역(들);점막양상, 다수, 2mm 이하.		-두드러진 점막하 지방 조직,- 최소, 다수-국소적	
결장:		결장:	
-상승 영역(들);점막양상, 다수, 2mm 이하.		>뚜렷한 병소 없음	
		신장:	
		-피질 림프구 침윤,-약간, 국소적	
		좌복재 :	
		-상피 증식,-최소	
간 :		간 :	
-중앙툰 경계 영역(들);1개, 피막하, 3mm .		-염증성 세포 병변, 최소	
장간막 :		장간막:	
-울혈됨, 최소		-증가된 착색된 대식세포,-약간	
난소 :		난소 :	
-낭(들);좌, 1개, 맑은유액-채워짐 4mm.		-난포낭(들)-존재함	
		이차 :	
		-파리 위축,-최소	
		-림프구 응집,-최소	
		피부(프로토콜):	
		-상피 증식,-적당함	
		척수:	
		-출혈,-최소	
비장 :		비장 :	
-비대된 낭 ;면적, 확산.		>뚜렷한 병소 없음	
		자궁 경부:	
		-상피 점액분비,-존재함	

[0597]

성별	암컷	투여 그룹	2
동물 번호	0462	희생 연구주	18
최종 체중	2910.0 그램	희생 연구일	125
부검		조직학	
		신장:	
		-피질 림프구 침윤, 최소, 국소적	
		간:	
		-염증성 세포 병변, 최소	
폐 & 기관지:		폐 & 기관지:	
-불완전 허탈; 좌엽.		뚜렷한 병소 없음	
난소:		난소:	
-상승 영역(들); 각각 1개, 좌, 3mm, 우, 2mm. (난포)		-현저한 위축 황체, 존재함	
		척수:	
		-출혈, 최소	
흉선:		흉선:	
-작음; 1.066g.		-낭(들), 존재함	
		-퇴화/위축, 최소	
		자궁 경부:	
		-상피 점액분비, 존재함	
자궁:		자궁:	
-울혈됨, 최소		-출혈, 최소	
성별	암컷	투여 그룹	3
동물 번호	0612	희생 연구주	18
최종 체중	2934.0 그램	희생 연구일	125
부검		조직학	
		신장:	
		-피질 림프구 침윤, 최소, 국소적	
간:		간:	
-중앙동경계영역(들); 1개, 피막하, 3mm.		-염증성 세포 병변, 최소	
-낭(들); 틈내, 1개, 진한 유액 채워짐, 녹색, 2mm.		-담관 증식, 최소	
		-담도주위염, 최소	
폐 & 기관지:		폐 & 기관지:	
-불완전 허탈; 좌엽.		-폐포 대식세포, 최소	
		-혈관주위 염증성/림프구 세포, 최소	
		식도:	
		-림프구 응집, 최소	

[0598]

	이자:
	-꽂리 위축, 최소, 국소적
	피부(프로토피):
	-상피 증식, 최소
	척수:
	-출혈, 최소
	자궁 경부:
	-상피 점액분비, 존재함

[0599]

[0600]

사이노물거스 원숭이의 개별 체중을 하기 표 37 에 제시한다:

[0601] 표 37: 체중: 개별 값

마우스 번호	날짜에서의 체중 (kg)													체중 변화 (kg)	
	-17	-9	1*	8*	15*	22*	29	36	50	57	64	71	77	D 1에서 71	D 29에서 71
그룹 1: GA201-ge, 1.5 mg/kg/사건															
623m	2.67	2.65	2.69	2.72	2.76	2.62	2.72	2.65	2.71	2.73	2.74	2.71	2.75	+0.06	+0.03
		(-0.02)	(+0.04)	(+0.03)	(+0.04)	(-0.14)	(+0.10)	(-0.07)	(+0.06)	(+0.02)	(+0.13)	(-0.03)	(+0.04)		
590f	2.98	2.92	2.97	3.14	3.13	3.01	3.06	3.00	3.19	3.16	3.18	3.27	3.23	+0.27	+0.17
		(-0.06)	(+0.05)	(+0.17)	(+0.01)	(-0.12)	(+0.05)	(-0.06)	(+0.19)	(-0.03)	(+0.07)	(+0.09)	(-0.04)		
그룹 2: GA201-ge, 4.5 mg/kg/사건															
461m	2.50	2.56	2.53	2.47	2.53	2.53	2.53	2.61	2.53	2.45	2.60	2.59		+0.03	+0.06
		(+0.06)	(-0.03)	(-0.06)	(+0.06)	NC	NC	(+0.08)	(-0.08)	(-0.08)	(+0.06)	(-0.01)			
462f	2.87	2.96	2.91	2.82	2.95	2.89	2.88	2.79	2.91	2.95	3.02	2.96		+0.05	+0.08
		(+0.09)	(-0.05)	(-0.09)	(+0.13)	(-0.06)	(-0.01)	(-0.09)	(+0.12)	(+0.04)	(-0.03)	(-0.06)			
그룹 3: GA201-ge, 12 mg/kg/사건															
463m	2.69	2.81	2.86	2.74	2.81	2.81	2.81	2.81	2.75	2.71	2.92	2.98	3.09	+0.23	+0.28
		(+0.12)	(+0.05)	(-0.12)	(+0.07)	NC	NC	NC	(-0.06)	(-0.04)	(+0.21)	(+0.06)	(+0.11)		
612f	2.84	2.96	2.92	2.98	3.06	3.01	3.01	2.94	2.91	2.81	3.04	3.05	3.10	+0.18	+0.09
		(+0.12)	(-0.04)	(+0.06)	(+0.08)	(-0.05)	NC	(-0.07)	(-0.03)	(-0.10)	(+0.23)	(+0.01)	(0.05)		

[0602]

[0603]

결론

[0604]

주사 부위에서의 치료 효과 및 Glyco-mAb (항-EGFR) 로의 치료와 관련되는 것으로 고려된 임상 발견이 없었다. 체중 변화는 정상 기대 범위 내였다. 현미경 시험에서의 치료와 관련된 것으로 고려되는 발견이 없었고, 동물의 장기 중량은 정상 기대 범위 내였다. 결론적으로, 1.5, 4.5 또는 12 mg/kg/사건으로의 치료는 전신성 독성의 뚜렷한 발견 없이 용인되었다.

[0605]

EGFR 은 간, 신장 및 피부를 포함하는 다양한 정상 조직의 피부 상에 존재하므로 종양 특이적 표적이 아니다. 인간 IgG1 Fc 영역을 갖는 항-EGFR 항체는 인간에게 이전에 투여되었으며, 용인가능한 부작용 프로파일을 나타내었다 (Vanhoefer, U. 등, Clin. Oncol. 2004 Jan 1;22(1): 175-84; Needle MN, Semin Oncol. 2002 Oct;29 (5 Suppl 14):55-60). 명백하게는, 간, 신장 및 피부와 같은 중대한 정상 조직에 대하여 나타날 수 있는 향상된 치사 활성 때문에, 유의하게 증가된 ADCC 를 갖는 항-EGFR 항체를 인간 또는 기타 포유류에 투여하는 것에 대해 우려가 있을 것이다. 놀랍게도, 본 출원인은 예컨대, 상기 기재된 바와 같이 Fc 유전공학설계되고, 1000 배까지의 증가된 ADCC 활성을 갖는 항-EGFR 항체를 포유류에게 생체내 투여하는 것이 유의한 독성을 야기하지 않았다는 것을 발견하였다. 항체의 농도를 4 주 이상 동안 밀리리터 당 1 마이크로그램 초과 (및 일부 동물에 대해 밀리리터 당 100 마이크로그램 초과) 로 유지하였다. 이러한 노출 수준은 항체 요법에 대해 전형적이다. 본 연구의 항체에 대한 최대 ADCC 는 밀리리터 당 1 마이크로그램의 농도에서 이미 달성된다.

인간 암 환자에 대한 항-EGFR 항체 (모 래트 ICR62 항체) 40 및 100 mg 의 투여량의 단일 투약 투여는 생체내 중량의 특이적 표적을 나타낸다 (Modjtahedi, H. 등, Br J Cancer. 1996 Jan;73(2):228-35.). 사이노몰거스 원숭이 효과기 세포는 높은-상동 Fc γ RIII 수용체를 가지고, Fc 유전공학설계된 항체와 함께 (Fc 영역에서 증가된 수준의 비-푸코실화 올리고당을 위해 당조작된 항체와 함께) 향상된 ADCC 를 매개하는 것으로 나타났다. ADCC 증가 수준은 인간 효과기 세포 (PBMC) 에서 관찰되는 것과 매우 유사하다.

[0606] 요약하면, 증가된 Fc-Fc γ RIII 결합 친화성 및 증가된 ADCC 를 위해 Fc 유전공학설계된 항-EGFR 항체를, 유의한 독성을 야기하지 않으면서, 생체내 표적 세포에 대한 항체의 유의한 축적과 정상적으로 관련된 약물 노출을 제공하기 위해, 4 주 이상의 기간 동안 혈청 밀리리터 당 항체 1 마이크로그램 초과 농도를 제공하기 위해 포유류에게 투여할 수 있다는 것을 발견하였다.

[0607] 본 발명의 항원 결합 분자의 독성은 상기 본원에 기재된 임의의 방법 및/또는 파라미터 (예, 혈액 화학 값, 조직병리학적 지표, 등) 를 사용하여, 또는 당업자에게 공지된 임의의 수단에 의해 측정 및/또는 결정될 수 있다. 임상적으로 유의한 수준의 독성은 당업자에게 임상적으로 투여된 항체에 대해 미국 식약청에 의해 일반적으로 허용되는 수준을 초과하는 수준인 것으로 이해된다.

[0608] 실시예 5

[0609] 경쇄 CDR 에 대한 개질

[0610] 상기 기재된 방법을 사용하여, 항-EGFR 경쇄 가변 영역 변이체를 I-KC 경쇄 가변 영역 구축물 (SEQ ID NO:43 및 SEQ ID NO:45) 로부터 생성하였고, 여기서 래트 ICR62 CDR 중의 다양한 위치에서 아미노산 잔기를 코딩하는 서열을 인간 생식선 가변 유전자 서열로부터의 해당하는 아미노산 잔기로 대체하였다. 표 38 은 I-KC 경쇄 가변 영역 구축물 (SEQ ID NO:45) 의 CDR 내에서 만들어진 치환을 제시한다:

[0611] 표 38: 최소화된 경쇄 CDR

구축물 명칭	SEQ ID NO:45 에서 만들어진 아미노산 치환	치환이 만들어진 경쇄 CDR
I-KC1	N30R*	CDR1
I-KC2	Y32W	CDR1
I-KC3	N34G	CDR1
I-KC4	N50T	CDR2
I-KC5	T51A	CDR2
I-KC6	N52S	CDR2
I-KC7	N53S	CDR2
I-KC8	T56S	CDR2
I-KC9	F94Y	CDR3

* 표준 명명법에 따라 확인됨 (예, "N30R" 은 SEQ ID NO:45 의 위치 30 에서의 아스파라긴 (N) 잔기가 아르기닌 (R) 잔기로 대체된 것을 의미함).

[0612]

[0613] 상기 확인된 모든 치환 잔기는 Y32W 교환 (여기서 관련된 인간 생식선 서열의 W 는 SEQ ID NO:45 의 위치 32 에서의 Y 에 대해 치환됨) 을 제외하고 인간 VK1_6 수용체 서열 유래였다.

[0614] 각각의 I-KC 변이체 구축물 (I-KC1 내지 I-KC9) 은 구축물 I-HHD 를 포함하는 중쇄 가변 영역 (SEQ ID NO:16 및 SEQ ID NO:15) 과 짝을 이루고, 결합 검정법은 상기 실시예에서 기재된 방법에 따라 수행되었다. 구축물 I-KC1 내지 I-KC9 를 I-KC 구축물 (SEQ ID NO:46 및 SEQ ID NO:45) 과 A431 표적 세포 중의 EGFR 에 대한 결합 친화성에 대해 비교하였다 (도 29). 도 29 에서 보여지는 바와 같이, 오직 해당하는 인간 서열에 대한 잔기 34 의 개질 (N34G) 만이 결합 친화성의 약간의 감소를 야기하였다 (10 인자에 의해 증가된 EC50 값). 모든 기타 구축물은 I-KC 구축물 (SEQ ID NO:45) 과 비교해서 결합 활성을 보유하였다. 그러므로, EGFR 에 특이적인 키메라성 (예, 인간화) 중쇄 구축물과 짝을 이루는 경우, 경쇄는 완전히 인간 (예, 인간 경쇄 V 유전자 서

열로부터) 일 수 있고, 여전히 EGFR 에 대한 특이적인 결합을 보유할 수 있다. 특히, CDR2 및 CDR3 은 완전한 인간 생식선 형태일 수 있다.

[0615] EGFR-특이적 CDR 을 포함하는 항원 결합 분자

[0616] 그러므로 본 발명은 경쇄 가변 영역과 짝을 이룬 EGFR-특이적 CDR 을 포함하는 키메라성 (예, 인간화) 중쇄 가변 영역을 포함하는 항원 결합 분자를 포함하고, 여기서 경쇄 가변 영역은 10 미만의 비-인간 아미노산 잔기를 갖는다. 다른 구현예에서, 경쇄 가변 영역은 9 미만, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 또는 1 개의 비-인간 아미노산 잔기(들) 를 갖는다. 바람직한 구현예에서, 경쇄 가변 영역은 2 미만의, 또는 1 미만의 (즉, 없음) 비-인간 아미노산 잔기를 갖는다. 하나의 구현예에서, 경쇄 가변 영역은 하나 이상의 인간 생식선 가변 영역 유전자 서열을 포함한다. 경쇄 가변 영역을 코딩하는 인간 생식선 가변 영역 유전자 서열은 당업계에 공지되고, 예를 들어, <http://imgt.cines.fr/home.html> 에서 이용가능한 IMGT 데이터베이스에서 찾을 수 있다. 바람직한 구현예에서, 인간 생식선 서열은 VK1_6 생식선 서열 유래이다. 다른 구현예에서, 인간 생식선 경쇄 가변 영역 아미노산 서열 내의 아미노산 잔기는 또다른 인간 생식선 경쇄 가변 영역 서열로부터의 하나 이상의 잔기로 치환될 수 있다.

[0617] 하나의 구현예에서, 본 발명은 SEQ ID NO:1; SEQ ID NO:3; SEQ ID NO:5; SEQ ID NO:7; SEQ ID NO:9; SEQ ID NO:11; SEQ ID NO:13; SEQ ID NO:15; SEQ ID NO:17; SEQ ID NO:19; SEQ ID NO:21; SEQ ID NO:23; SEQ ID NO:25; SEQ ID NO:27; SEQ ID NO:29; SEQ ID NO:31; SEQ ID NO:33; SEQ ID NO:35; SEQ ID NO:37; SEQ ID NO:39; 및 SEQ ID NO:121 로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열, 및 하나 이상의 인간 생식선 가변 유전자 서열에 의해 코딩되는 폴리펩티드를 포함하는 경쇄를 포함하는 항원 결합 분자에 관한 것이다. 바람직한 구현예에서, 인간 생식선 서열은 VK1_6 생식선 서열 유래이다.

[0618] 또다른 구현예에서, 본 발명은 하기를 포함하는 항원 결합 분자에 관한 것이다: SEQ ID NO:54, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:58, SEQ ID NO:60, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:64, SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:68, SEQ ID NO:70, SEQ ID NO:72, SEQ ID NO:74, SEQ ID NO:122, 및 SEQ ID NO:124 로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열; (b) SEQ ID NO:76, SEQ ID NO:78, SEQ ID NO:80, SEQ ID NO:82, SEQ ID NO:84, SEQ ID NO:86, SEQ ID NO:88, SEQ ID NO:90, SEQ ID NO:92, SEQ ID NO:94, SEQ ID NO:96, SEQ ID NO:98, SEQ ID NO:100, SEQ ID NO:102, SEQ ID NO:104, SEQ ID NO:106, 및 SEQ ID NO:126 으로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열; (c) SEQ ID NO:108; 및 (d) 하나 이상의 인간 생식선 유전자 서열에 의해 코딩되는 인간 경쇄 가변 영역을 포함하는 폴리펩티드. 특정 구현예에서, 인간 생식선 서열은 VK1_6 생식선 서열 유래이다. 또다른 구현예에서, 인간 생식선 가변 영역 유전자 서열은 상이한 인간 생식선 경쇄 가변 영역 유전자 서열로부터의 서열을 갖는 하나 이상의 아미노산 코돈으로의 치환을 갖는 VK1_6 생식선 유전자 서열을 포함한다.

[0619] 다른 구현예에서, 본 발명의 항원 결합 분자는 본 발명의 EGFR-특이적 중쇄 가변 영역, 및 SEQ ID NO:45 의 변이체를 포함한다. 하나의 구현예에서, SEQ ID NO:45 의 변이체는 상보성 결정 영역 (CDR) 에서의 하나 이상의 위치에서 아미노산 치환을 포함한다. 특정 구현예에서, 치환은, SEQ ID NO:45 의 아미노산 위치 30; SEQ ID NO:45 의 아미노산 위치 32; SEQ ID NO:45 의 아미노산 위치 34; SEQ ID NO:45 의 아미노산 위치 50; SEQ ID NO:45 의 아미노산 위치 51; SEQ ID NO:45 의 아미노산 위치 52; SEQ ID NO:45 의 아미노산 위치 53; SEQ ID NO:45 의 아미노산 위치 56; SEQ ID NO:45 의 아미노산 위치 94; 및 그의 치환의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 위치에서의 아미노산 잔기의 것이다. 더욱 구체적인 구현예에서, SEQ ID NO:45 에서의 치환은, SEQ ID NO:45 의 위치 30 에서 아스파라긴 (N) 에 대한 아르기닌 (R) 의 치환; SEQ ID NO:45 의 위치 32 에서 티로신 (Y) 에 대한 트립토판 (W) 의 치환; SEQ ID NO:45 의 위치 34 에서 아스파라긴 (N) 에 대한 글리신 (G) 의 치환; SEQ ID NO:45 의 위치 50 에서 아스파라긴 (N) 에 대한 트레오닌 (T) 의 치환; SEQ ID NO:45 의 위치 51 에서 트레오닌 (T) 에 대한 알라닌 (A) 의 치환; SEQ ID NO:45 의 위치 52 에서 아스파라긴 (N) 에 대한 세린 (S) 의 치환; SEQ ID NO:45 의 위치 53 에서 아스파라긴 (N) 에 대한 세린 (S) 의 치환; SEQ ID NO:45 의 위치 56 에서 트레오닌 (T) 에 대한 세린 (S) 의 치환; SEQ ID NO:45 의 위치 94 에서 페닐알라닌 (F) 에 대한 티로신 (Y) 의 치환; 및 그의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 특정 구현예에서, SEQ ID NO:45 에서의 아미노산 잔기의 모든 상기 치환은 단일 경쇄 변이체 내에 혼입된다. 바람직한 구현예에서, ICR62 CDR 에 대한 아미노산 치환을 갖는 경쇄 변이체를 포함하는 항원 결합 분자는, 경쇄 변이체가 본 발명의 중쇄 가변 영역을 포함하는 폴리펩티드와 짝을 이루는 경우, EGFR 에 대한 특이적 결합을 보유한다 (SEQ ID NO:45 의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항원 결합 분자와 비교할 때).

[0620] 본 발명은 또한 임의의 상기 폴리펩티드 및/또는 항원 결합 분자를 코딩하는 폴리뉴클레오티드에 관한 것이다.

본 발명은 추가로 약학적으로 허용가능한 담체와 함께, 상기 기재된 항원 결합 분자에 관한 것이다.

[0621]

* * *

[0622]

본 명세서에 언급된 모든 출판물, 예컨대 교과서, 정기 간행물 기사, GenBank 또는 기타 서열 데이터베이스 기재사항, 공개 출원 및 특허 출원은 각각의 개별 공개 또는 특허 출원이 구체적으로, 그리고 개별적으로 참조로서 인용된 것으로 표시되지 않았다면 동일한 범위로 참조로서 인용된다.

도면의 간단한 설명

[0053]

도 1 은 인간화 ICR62 구축물 I-HHC (중쇄) 및 I-KB (경쇄) 와 조합된 경우 개별적인 키메라성 래트-인간 ICR62 폴리펩티드 중쇄 및 경쇄의 작용기적 활성을 나타낸다. rVL 은 키메라성 경쇄를 나타내고, rVH 는 키메라성 중쇄를 나타낸다. "r" 지칭은 가변 도메인이 본래의 래트 항체 유래인 것을 표시한다.

[0054]

도 2 는 중쇄 가변 영역 구축물 I-HHC, I-HHA 및 I-HLA 및 다양한 배열로 짝지어진 인간화 경쇄 가변 영역 구축물 I-KA 및 I-KB 를 포함하는 인간화 ICR62 항체의 결합 활성을 나타낸다.

[0055]

도 3 은 중쇄 가변 영역 구축물 I-HLB, I-HLC 및 I-HLA 및 다양한 배열로 짝지어진 인간화 경쇄 가변 영역 구축물 I-KA 및 I-KC 를 포함하는 인간화 ICR62 항체의 결합 활성을 나타낸다.

[0056]

도 4 는 키메라성 래트-인간 ICR62 항체와 비교하여 중쇄 가변 영역 구축물 I-HLA2, I-HLA3 및 I-HLA4 및 인간화 경쇄 가변 영역 구축물 I-KC 를 포함하는 인간화 ICR62 항체의 결합 활성을 나타낸다.

[0057]

도 5 는 키메라성 래트-인간 ICR62 항체와 비교하여 중쇄 가변 영역 구축물 I-HLA1, I-HLA3, I-HLA5 및 I-HLA6 및 인간화 경쇄 가변 영역 구축물 I-KC 를 포함하는 인간화 ICR62 항체의 결합 활성을 나타낸다.

[0058]

도 6 은 키메라성 래트-인간 ICR62 항체와 비교하여 중쇄 가변 영역 구축물 I-HLA7, I-HLA6, 및 I-HHB 및 인간화 경쇄 가변 영역 구축물 I-KC 를 포함하는 인간화 ICR62 항체의 결합 활성을 나타낸다.

[0059]

도 7 은 키메라성 래트-인간 ICR62 항체와 비교하여 중쇄 가변 영역 구축물 I-HHF, I-HLA9, 및 I-HLA8 및 인간화 경쇄 가변 영역 구축물 I-KC 를 포함하는 인간화 ICR62 항체의 결합 활성을 나타낸다.

[0060]

도 8 은 중쇄 가변 영역 구축물 I-HHB, I-HHD, I-HHG, I-HHF, I-HLA7, 및 I-HLA9 및 인간화 경쇄 가변 영역 구축물 I-KC 를 포함하는 인간화 항체의 결합 활성을 나타낸다.

[0061]

도 9 는 키메라성 ICR62 항체의 다양한 단백질형 (glycoform) 뿐 아니라, 인간화 변이체 I-HLA4 에 대한 항체 매개된 세포성 세포독성 (ADCC) 의 비교를 나타낸다. "G1" 은 GnTIII 과의 공동발현에 의한 항체의 당조작을 말한다. "G2" 는 GnTIII 및 ManII 과의 공동발현에 의한 항체의 당조작을 말한다. "WT" 는 당조작되지 않은 항체를 말한다. 인간화된 중쇄 구축물은 I-KC 경쇄 구축물과 짝을 이루었다.

[0062]

도 10 은 인간화 ICR62 항체 구축물 I-HHB 및 I-HLA7 의 비-당조작된 형태 (WT) 및 G2 단백질형 (즉, GnTIII 및 ManII 과의 공동발현에 의해 당조작됨) 에 대한 ADCC 의 비교를 나타낸다. 동일한 항체를 2 가지 상이한 표적 세포주에 적용하였다: 패널 A 에서, 표적 세포주 LN229 를 사용하였다; 패널 B 에서, 세포주 A431 을 사용하였다. 인간화된 중쇄 구축물은 I-KC 경쇄 구축물과 짝을 이루었다.

[0063]

도 11A 및 11B 는 키메라성 ICR62 및 인간화 ICR62 항체 구축물 I-HHB 및 I-HLA7 의 비-당조작된 형태 (WT) 및 G2 단백질형에 대한 ADCC 의 비교를 나타낸다. 표적 세포주 A431 을 사용하였다. 인간화된 중쇄 구축물은 I-KC 경쇄 구축물과 짝을 이루었다.

[0064]

도 12 는 키메라성 ICR62 및 인간화 ICR62 항체 구축물 I-HHB 및 I-HLA7 의 G2 단백질형에 대한 72h ADCC 의 비교를 나타낸다. 인간화된 중쇄 구축물은 I-KC 경쇄 구축물과 짝을 이루었다.

[0065]

도 13 은 래트 ICR62 서열과 비교하여 인간화 ICR62 중쇄 가변 영역 구축물의 아미노산 서열 정렬을 나타낸다. 점은 시공된 구축물 내에서의 제시된 위치에서 아미노산 잔기의 일치성을 나타낸다.

[0066]

도 14 는 재조합 인간 Fc γ RIIIa 를 나타내는 CHO 세포를 사용하는 Fc γ RIIIa-Fc 결합 검정법을 나타낸다. 당조작된 I-HHB/KC 인간화 항-EGFR IgG1 항체를 비-당조작된 (Wt) 항체와 비교하였다.

[0067]

도 15 는 당조작된 인간화 항-EGFR IgG1 항체, I-HHB/KC 에 대한 MALD/TOF-MS 올리고당 프로파일을 나타낸다. GnTIII 및 글리코시다아제 II 활성을 가진 효소를 코딩하는 유전자의 항체-제조 세포에서의 과발현에 의해 달성된 당조작은, 70% 초과 비-푸코실화 Fc-Asn297-연결된 올리고당을 산출하였다.

- [0068] 도 16 은 1% 원숭이 혈청 매트릭스 (HLS 에 의해 공급된, 원숭이 혈청 집단 CMS25/31/33) 중의 항-EGFR 의 측정을 위한 항-EGFR 정밀도 프로파일 (n=6 은 검정 범위를 교차하여 복제된다) 을 나타낸다.
- [0069] 도 17 은 1% 원숭이 혈청 매트릭스 중의 항-EGFR 의 측정을 위한 대표적 항-EGFR 검정 곡선을 나타낸다.
- [0070] 도 18 은 수컷 사이노물거스 원숭이에 대한 항-EGFR 의 매주 정맥내 투여의 , 예컨대 일에서의 항-EGFR 의 혈청 농도를 나타낸다.
- [0071] 도 19 는 암컷 사이노물거스 원숭이에 대한 항-EGFR 의 매주 정맥내 투여의 제 1 일에서의 항-EGFR 의 혈청 농도를 나타낸다.
- [0072] 도 20 은 혈청 항-EGFR 농도-시간 곡선 (AUC_{168}) 하의 면적과 사이노물거스 원숭이에 대한 항-EGFR 의 매주 정맥내 투여의 제 1 일에서의 투여량 사이의 관계를 나타낸다.
- [0073] 도 21 은 수컷 사이노물거스 원숭이에 대한 항-EGFR 의 매주 정맥내 투여 동안의 항-EGFR 의 혈청 농도를 나타낸다.
- [0074] 도 22 는 암컷 사이노물거스 원숭이에 대한 항-EGFR 의 매주 정맥내 투여 동안의 항-EGFR 의 혈청 농도를 나타낸다.
- [0075] 도 23 은 본원의 하기 실시예에서 생체내 원숭이 연구를 위해 사용된 Fc-유전공학설계된 (당조작된) 항-EGFR 항체로부터의 올리고당의 MALDI/TOF-MS 프로파일을 나타낸다.
- [0076] 도 24 는 인간 A431 표피양 암종 세포의 표면 상에 발현된 EGFR 에 대한 결합을 나타낸다. 결합 연구를 위해 사용된 항체는 본원의 하기 실시예에서 생체내 원숭이 연구를 위해 사용된 Fc-유전공학설계된 항-EGFR 항체 (I-HHB 구축물) 였다.
- [0077] 도 25 는 원숭이 COS-7 신장 세포의 표면 상에 발현된 EGFR 에 대한 결합을 나타낸다. 사용된 항체는 항-EGFR 항체 (I-HHB 중쇄; I-KC 경쇄) 였다. 참조로서, 낮은 인간 EGFR-발현 세포, MCF-7 유방암 세포에 대한 결합을 나타낸다.
- [0078] 도 26 은 전체 세포 (표면 상에 인간 FcγRIIIa 를 발현시키기 위해 유전공학설계된 CHO 세포) 를 사용하는 Fc-γRIIIa 결합을 나타낸다. 사용된 항체는 본원의 하기 실시예에서 생체내 원숭이 연구를 위해 사용된 Fc-유전공학설계된 (당조작된) 항-EGFR 항체였다. 비-Fc-유전공학설계된 (비개질된) 대조군 IgG1 항체에 대한 결합은 비교를 위해 나타낸다.
- [0079] 도 27 은 Fc-유전공학설계된 (당조작된) 항-EGFR 항체에 의해 매개된 ADCC 를 나타낸다. 표적 세포는 A549 인간 폐 암종 세포이다. 항체의 비-Fc 유전공학설계된 (비개질된) 형태에 대한 ADCC 활성은 비교를 위해 나타낸다.
- [0080] 도 28 은 Fc-유전공학설계된 (당조작된) 항-EGFR 항체에 의해 매개된 ADCC 를 나타낸다. 표적 세포는 CYNOM-K1 사이노물거스 원숭이 각질세포 세포주이다. 항체의 비-Fc 유전공학설계된 (비개질된) 형태에 대한 ADCC 활성은 비교를 위해 나타낸다.
- [0081] 도 29 는 중쇄 I-HHD 구축물과 짝지어진 I-KC 구축물에 기반한 다양한 경쇄 구축물 변이체의 EGFR 표적 결합을 나타낸다.
- [0082] 발명의 상세한 설명
- [0083] 용어는, 하기와 같이 다르게 정의되지 않는다면, 당업계에서 일반적으로 사용되는 바와 같이 본원에서 사용된다.
- [0084] 본원에서 사용되는 바와 같은, 용어 항체는 모노클론, 폴리클론 및 다중특이성 (예, 2중특이성) 항체뿐 아니라, Fc 영역을 갖고 결합 특이성을 보유하는 항체 분절, 및 결합 특이성을 보유하는 면역글로불린의 Fc 영역과 동등한 영역을 포함하는 융합 단백질을 포함하는, 전체 항체 분자가 포함되는 것으로 의도된다. 또한 VH 분절, VL 분절, Fab 분절, F(ab')₂ 분절, scFv 분절, Fv 분절, 미니바디, 디아바디 (diabody), 트리아바디 (triabody), 및 테트라바디 (tetrabody) 를 포함하나 이에 제한되지 않는, 결합 특이성을 보유하는 항체 분절이 포함된다 (예, Hudson and Souriau, Nature Med. 9: 129-134 (2003) 참조). 또한 인간화, 영장류화 및 키메라성 항체도 포함된다.

- [0085] 본원에서 사용되는 바와 같은, 용어 *Fc 영역*은 IgG 중쇄의 C-말단 영역을 말하는 것으로 의도된다. IgG 중쇄의 Fc 영역의 경계가 약간 다를 수 있음에도 불구하고, 인간 IgG 중쇄 Fc 영역은 일반적으로 위치 Cys226 에서의 아미노산 잔기로부터 카르복실-말단까지 뻗어나는 것으로 정의된다.
- [0086] 본원에서 사용되는 바와 같은, 용어 *면역글로불린의 Fc 영역과 동등한 영역*은 면역글로불린의 Fc 영역의 자연 발생적 대립유전자 변이체 뿐 아니라, 치환, 부가, 또는 결실을 제조하는 대안을 갖지만, 효과기 작용 (예컨대 항체 의존적 세포성 세포독성) 을 매개하는 면역글로불린의 능력을 실질적으로 감소시키지 않는, 변이체를 포함하는 것으로 의도된다. 예를 들어, 하나 이상의 아미노산은 생물학적 작용의 실질적인 손실 없이 면역글로불린의 Fc 영역의 N-말단 또는 C-말단으로부터 결실될 수 있다. 이러한 변이체는 활성에 최소 영향을 갖도록 당업계에서 공지된 일반적인 법칙에 따라 선택될 수 있다. (예, Bowie, J. U. 등, Science 247:1306-1310 (1990) 참조).
- [0087] 본원에서 사용되는 바와 같은, 용어 *EGFR* 은 인간 상피세포 성장 인자 수용체 (또한 HER-1 또는 Erb-B1 으로서 공지됨) (Ulrich, A. 등, Nature 309:418-425 (1984); SwissProt 접근 번호 P00533; 2차 접근 번호: 000688, 000732, P06268, Q14225, Q92795, Q9BZS2, Q9GZX1, Q9H2C9, Q9H3C9, Q9UMD7, Q9UMD8, Q9UMG5) 뿐 아니라, 그의 자연 발생적 동종형 및 변이체를 말한다. 이러한 동종형 및 변이체에는 EGFRvIII 변이체, 대안적 스플라이싱 (splicing) 생성물 (예, SwissProt 접근 번호 P00533-1, P00533-2, P00533-3, P00533-4 에 의해 확인되는 바와 같음), 변이체 GLN-98, ARG-266, Lys-521, ILE-674, GLY-962, 및 PRO-988 (Livingston, R.J. 등, NIEHS-SNP, 환경 게놈 프로젝트, NIEHS ES15478, Department of Genome Sciences, Seattle, WA (2004)), 및 하기 접근 번호: NM_005228.3, NM_201282.1, NM_201283.1, NM_201284.1 (REFSEQ mRNAs); AF125253.1, AF277897.1, AF288738.1, AI217671.1, AK127817.1, AL598260.1, AU137334.1, AW163038.1, AW295229.1, BC057802.1, CB160831.1, K03193.1, U48722.1, U95089.1, X00588.1, X00663.1; H54484S1, H54484S3, H54484S2 (MIPS 어셈블리); DT.453606, DT.86855651, DT.95165593, DT.97822681, DT.95165600, DT.100752430, DT.91654361, DT.92034460, DT.92446349, DT.97784849, DT.101978019, DT.418647, DT.86842167, DT.91803457, DT.92446350, DT.95153003, DT.95254161, DT.97816654, DT.87014330, DT.87079224 (DOTS 어셈블리) 에서 확인된 기타를 포함하나 이에 제한되지 않는다.
- [0088] 본원에서 사용되는 바와 같은, 용어 *EGFR 리간드*는 EGFR 에 결합하고/하거나 이를 활성화시키는 폴리펩티드를 말한다. 용어에는 EGFR 리간드의 막-결합된 전구체 형태뿐 아니라, EGFR 리간드의 단백질 가수분해 조작된 가용성 형태가 포함된다.
- [0089] 본원에서 사용되는 바와 같은, 용어 *EGFR 의 리간드 활성화*는 EGFR 리간드 결합에 의해 매개된 신호 전달 (예, EGFR 중의 티로신 잔기를 인산화시키는 EGFR 수용체의 세포내 키나아제 도메인 또는 기질 폴리펩티드에 의해 야기됨) 을 말한다.
- [0090] 본원에서 사용되는 바와 같은, 용어 *EGFR 또는 EGFR 리간드의 비정상 활성화 또는 생성을 특징으로 하는 질환 또는 장애 또는 EGFR 발현과 관련된 장애*는, EGFR 및/또는 EGFR 리간드의 비정상 활성화 및/또는 생성이 질환 또는 장애를 가진, 또는 그에 걸리기 쉬운 대상의 세포 또는 조직에서 발생하는, 악성종양 또는 암을 포함할 수 있는 또는 포함할 수 없는 상태를 말한다.
- [0091] 본원에서 사용되는 바와 같은, EGFR 을 발현하는 세포와 관련해서 사용되는, 용어 *과발현하다, 과발현된, 및 과발현*은 동일한 조직 유형의 정상 세포와 비교하여, 그의 표면 상에 측정가능하게 더 높은 수준의 EGFR 을 갖는 세포를 말한다. 이러한 과발현은 유전자 증폭에 의해 또는 증가된 전사 또는 번역에 의해 야기될 수 있다. EGFR 발현 (및, 그러므로 과발현) 은 당업계에 공지된 기술: 예를 들어, 면역조직화학 검정법, 면역형광 검정법, 면역효소 검정법, ELISA, 유세포분석, 방사면역검정법, 웨스턴 블롯 (Western blot), 리간드 결합, 키나아제 활성, 등을 통해, 세포의 표면 상에 또는 세포 용해물 중에 존재하는 EGFR 의 수준을 평가하여 진단 또는 징후 검정법으로 측정할 수 있다 (일반적으로, CELL BIOLOGY: A LABORATORY HANDBOOK, Celis, J., ed., Academic Press (2d ed., 1998); CURRENT PROTOCOLS IN PROTEIN SCIENCE, Coligan, J.E. 등, eds., John Wiley & Sons (1995-2003) 참조; 또한, Sumitomo 등, Clin. Cancer Res. 10: 794-801 (2004) (웨스턴 블롯, 유세포분석, 및 면역조직화학을 기재함) 참조, 전체 내용이 본원에 참조로서 인용됨)). 대안적으로는, 또는 부가적으로는, 세포에서 EGFR-코딩 핵산 분자의 수준을, 예를 들어, 형광 제자리 혼성화, 서던 (Southern) 블롯팅, 또는 PCR 기술을 통해 측정할 수 있다. EGFR 가 과발현되었는지의 여부를 측정하기 위해, 정상 세포에서의 EGFR 의 수준을 세포 증식 장애 (예, 암) 에 의해 영향을 받은 세포의 수준과 비교한다.
- [0092] 본원에서 사용되는 바와 같은, 용어 *항원 결합 분자*는 넓은 의미로는 항원 결정기에 특이적으로 결합하는 분자

를 말한다. 더욱 구체적으로는, *EGFR* 에 결합하는 항원 결합 분자는, 전형적으로는 상피세포 성장 인자 수용체 (*EGFR*) 로서 지정되나 또한 *HER-1* 또는 *ErbB1* 로 공지된, 170 kDa 의 막투과 수용체에 특이적으로 결합하는 분자이다. "특이적으로 결합한다" 라는 것은 결합이 항원에 대해 선별적이고, 원하지 않거나 비특이적인 상호작용과 구별될 수 있는 것을 의미한다.

[0093] 본원에서 사용되는 바와 같은, 용어 *융합* 및 *키메라성*은, ABM 과 같은 폴리펩티드를 참조로서 사용되는 경우, 상이한 종 유래의 항체의 일부분과 같은, 2 이상의 이종 폴리펩티드 유래의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 말한다. 키메라성 ABM 에 대해, 예를 들어, 비-항원 결합 성분은 침팬지 및 인간과 같은 영장류를 포함하여, 다양한 종 유래일 수 있다. 키메라성 ABM 의 불변 영역은 가장 바람직하게는 천연 인간 항체의 불변 영역과 실질적으로 동일하고; 키메라성 항체의 가변 영역은 가장 바람직하게는 쥐과 가변 영역의 아미노산 서열을 갖는 재조합 항-*EGFR* 항체의 것과 실질적으로 동일하다. 인간화 항체는 융합 또는 키메라성 항체의 특히 바람직한 형태이다.

[0094] 본원에서 사용되는 바와 같은, *GnTIII* 활성을 갖는 폴리펩티드는 N-연결된 올리고당의 트리만노실 코어의 β -연결된 만노시드에 대한 β -1-4 연결 중의 N-아세틸글루코사민 (GlcNAc) 잔기의 첨가를 촉매할 수 있는 폴리펩티드를 말한다. 여기에는 용량 의존적으로 또는 의존적이지 않고, 특정 생물학적 검정법으로 측정된 바와 같은 국제 생화학 및 분자생물학 연맹 명명법 위원회 (NC-IUBMB) 에 따라, β (1,4)-N-아세틸글루코사미닐트랜스페라아제 III 의 활성, 또한 β -1,4-만노실-당단백질 4-베타-N-아세틸글루코사미닐-트랜스페라아제로서 공지된 (EC 2.4.1.144) 활성과 유사한, 그러나 반드시 동일하지는 않은 효소 활성을 나타내는 융합 폴리펩티드가 포함된다. 용량 의존성이 존재하는 경우, *GnTIII* 의 것과 동일할 필요는 없으나, *GnTIII* 과 비교하여 제공된 활성이 용량-의존적으로 실질적으로 유사하다 (즉, 후보 폴리펩티드는 *GnTIII* 에 비해 더 큰 활성 또는 약 25 배 미만, 바람직하게는, 약 10 배 미만 활성, 가장 바람직하게는, 약 3 배 미만 활성을 나타낼 것이다).

[0095] 본원에서 사용되는 바와 같은, 용어 *변이체* (또는 *유사체*) 는 예를 들어, 재조합 DNA 기술을 사용하여 제작된 아미노산 삽입, 결실, 및 치환에 의해 구체적으로 언급된 본 발명의 폴리펩티드와 상이한 폴리펩티드를 말한다. 본 발명의 ABM 의 변이체에는 하나 또는 여러 개의 아미노산 잔기가 항원 (예, *EGFR*) 결합 친화성에 실질적으로 영향을 미치지 않는 방식으로 치환, 첨가 및/또는 결실에 의해 개질된, 키메라성, 영장화 또는 인간화 항원 결합 분자가 포함된다. 아미노산 잔기를 관심 있는 활성을 파괴하지 않으면서 대체, 부가 또는 결실시킬 수 있는 측정 지침은, 특정 폴리펩티드의 서열을 상동 펩티드의 서열과 비교하고 높은 상동성 영역 (보존 영역) 에서 만들어진 아미노산 서열 변화의 수를 최소화하거나 아미노산을 보존 서열로 대체하여 발견할 수 있다.

[0096] 대안적으로는, 상기 동일한 또는 유사한 폴리펩티드를 코딩하는 재조합 변이체는 유전 코돈 중의 "중복성" 을 사용하여 합성 또는 선별할 수 있다. 다양한 코돈 치환, 예컨대 다양한 제한 부위를 제조하는 침묵 변화는, 플라스미드 또는 바이러스 벡터 내로의 클로닝 또는 특정 원핵 또는 진핵 시스템에서의 발현을 적정화하기 위해 도입할 수 있다. 폴리뉴클레오타이드 서열 중의 돌연변이는 리간드-결합 친화성, 사슬간 (interchain) 친화성, 또는 분해/교체율과 같은 특성을 변화시키기 위해, 폴리펩티드의 임의의 부분의 특성을 개질시키기 위해 폴리펩티드에 부착된 기타 펩티드의 폴리펩티드 또는 도메인에 반영될 수 있다.

[0097] 바람직하게는, 아미노산 "치환" 은 하나의 아미노산을 유사한 구조적 및/또는 화학적 특성을 갖는 또다른 아미노산으로 대체하는, 즉, 보존성 아미노산 대체의 결과이다. "보존성" 아미노산 치환은 관여된 잔기의 극성, 전하, 용해도, 소수성, 친수성, 및/또는 양친매성의 유사성에 근거하여 이루어질 수 있다. 예를 들어, 무극성 (소수성) 아미노산에는 알라닌, 류신, 이소류신, 발린, 프롤린, 페닐알라닌, 트립토판, 및 메티오닌이 포함되고; 극성 중성 아미노산에는 글리신, 세린, 트레오닌, 시스테인, 티로신, 아스파라긴, 및 글루타민이 포함되고; 양성 전하 (염기성) 아미노산에는 아르기닌, 라이신, 및 히스티딘이 포함되고; 음성 전하 (산성) 아미노산에는 아스파르트산 및 글루탐산이 포함된다. "삽입" 또는 "결실" 은 바람직하게는 약 1 내지 20 개 아미노산, 더욱 바람직하게는 1 내지 10 개 아미노산의 범위이다. 허용되는 변이는 재조합 DNA 기술을 사용하고 수득된 재조합 변이체를 활성에 대해 검정하여 폴리펩티드 분자 중의 아미노산의 삽입, 결실, 또는 치환을 조직적으로 만들어 실험적으로 측정할 수 있다.

[0098] 본원에서 사용되는 바와 같은, 용어 *인간화*는 모 분자의 항원-결합 특성을 보유하거나 실질적으로 보유하나, 인간에서 덜 면역원성인, 비-인간 항원-결합 분자, 예를 들어, 쥐과 항체 유래의 항원-결합 분자를 언급하기 위해 사용된다. 이것은 하기를 포함하는 다양한 방법에 의해 달성될 수 있다 (a) 전체 비-인간 가변 도메인을 인간 불변 영역 상에 그래프트시켜 키메라성 항체를 생성함, (b) 오직 비-인간 CDR 만을 결정적인 골격 잔기 (예, 양호한 항원 결합 친화성 또는 항체 작용을 보유하기 위해 중요한 것들) 를 보유하는 또는 보유하지 않는, 인간

골격 및 불변 영역 상에 그래프트시킴, 또는 (c) 전체 비-인간 가변 도메인을 이식하나, 표면 잔기의 대체에 의해 인간-유사 섹션으로 이들을 "뒤덮음". 이러한 방법은, 전체가 본원에 참조로서 인용된 [Jones 등, Morrison 등, Proc. Natl. Acad. Sci, 81:6851-6855 (1984); Morrison and Oi, Adv. Immunol., 44:65-92 (1988); Verhoeyen 등, Science, 239:1534-1536 (1988); Padlan, Molec. Immun., 28:489-498 (1991); Padlan, Molec. Immun., 31(3):169-217 (1994)] 에 기재되어 있다. 항체의 각각의 중쇄 및 경쇄 가변 도메인에 4 개의 골격 서브영역 (즉, FR1, FR2, FR3, 및 FR4) 에 의해 측면에 위치된, 항체의 각각의 중쇄 및 경쇄 가변 도메인에, 일반적으로 3 상보성 결정 영역, 또는 CDR (CDR1, CDR2 및 CDR3) 이 있다: FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4. 인간화 항체에 대한 논의는 특히, 둘 다 전체가 본원에 참조로서 인용된, 미국 특허 번호 제 6,632,927 호, 및 공개 미국 출원 번호 제 2003/0175269 호에서 발견할 수 있다.

[0099] 유사하게는, 본원에서 사용되는 바와 같은, 용어 **영장류**는 모 분자의 항원-결합 특성을 보유하거나 실질적으로 보유하나, 영장류에서 덜 면역원성인 비-영장류 항원-결합 분자, 예를 들어, 쥐와 항체 유래의 항원-결합 분자를 말하기 위해 사용된다.

[0100] 당업계에서 사용되고/되거나 허용되는 2 개 이상의 용어의 정의가 있는 경우, 본원에 사용되는 용어의 정의는 명백히 반대로 언급되지 않는다면 모든 이러한 의미를 포함하는 것으로 의도된다. 구체적인 예는 중쇄 및 경쇄 폴리펩티드 둘 다의 가변 영역 내에서 발견되는 비-인접 항원 조합 부위를 기재하기 위한 용어 "상보성 결정 영역" ("CDR") 의 사용이다. 상기 특정 영역은 참조로서 본원에 인용된 [Kabat 등, U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequences of Proteins of Immunological Interest" (1983)] 및 [Chothia 등, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)] 에 의해 기재되어 있으며, 여기서 정의는 서로를 비교하는 경우 아미노산 잔기의 중첩 및 서브세트를 포함한다. 그럼에도 불구하고, 항체 또는 그의 변이체의 CDR 을 말하기 위한 양쪽 정의의 적용은 본원에 정의되고 사용된 용어의 범위 내에 있는 것으로 의도된다. 상기 언급된 참조의 각각에 의해 정의된 CDR 을 포함하는 적합한 아미노산 잔기는 비교로서 하기 표 I 에 언급된다. 특정 CDR 에 포함되는 정확한 잔기 번호는 CDR 의 서열 및 크기에 따라 다를 것이다. 당업자는 잔기가 항체의 가변 영역 아미노산 서열이 제공된 특정 CDR 을 포함하는 것을 정규적으로 측정할 수 있다.

[0101] 표 1. CDR 정의¹

	Kabat	Chothia	AbM²
V_H CDR1	31-35	26-32	26-35
V_H CDR2	50-65	52-58	50-58
V_H CDR3	95-102	95-102	95-102
V_L CDR1	24-34	26-32	24-34
V_L CDR2	50-56	50-52	50-56
V_L CDR3	89-97	91-96	89-97

¹ 표 1에서의 모든 CDR 정의의 넘버링은 Kabat 등에 의해 언급된 넘버링 규정을 따른다.(하기 참조)

² "AbM" 은 Oxford Molecular's "AbM" 항체 모델링 소프트웨어에 의해 정의된 CDR 을 말한다

[0102]

[0103] Kabat 등은 또한 임의의 항체에 적용할 수 있는 가변 도메인 서열에 대한 넘버링 시스템을 정의하였다. 당업자는 "Kabat 넘버링" 의 상기 시스템을, 서열 그 자체 너머의 임의의 실험 데이터에 의지하지 않고 임의의 가변 도메인 서열에 명백하게 할당할 수 있다. 본원에서 사용되는 바와 같은, "Kabat 넘버링" 은 [Kabat 등, U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequence of Proteins of Immunological Interest" (1983)] 에 의해 언급된 넘버링 시스템을 말한다. 다르게 구체화되지 않는다면, ABM 중의 구체적인 아미노산 잔기 위치의 넘버링에 대한 참조는 Kabat 넘버링 시스템에 따른다. 서열 목록 (즉, SEQ ID NO:1 내지 SEQ ID NO:127) 의 서열은 Kabat 넘버링 시스템에 따라 넘버링되지 않는다. 그러나, 상기 언급된 바와 같이, 여기 제시된 서열의 넘버링에 기반한 서열 목록 중의 임의의 가변 영역 서열의 Kabat 넘버링 요강을 측정하는 것은 당업자의 역량이다.

[0104] 본 발명의 참조 뉴클레오타이드 서열과 예를 들어, 95% 이상 "일치하는" 뉴클레오타이드 서열을 갖는 핵산 또는 폴리뉴클레오타이드는, 폴리뉴클레오타이드 서열이 참조 뉴클레오타이드 서열의 각 100 개 뉴클레오타이드 당 5 개 이하 지점 돌연변이를 포함할 수 있다는 것을 제외하고는, 폴리뉴클레오타이드의 뉴클레오타이드 서열은 참조 서열과 일

치하는 것으로 의도된다. 다른 말로 하면, 참조 뉴클레오티드 서열과 95% 이상 일치하는 뉴클레오티드 서열을 갖는 폴리뉴클레오티드를 수득하기 위해, 참조 서열 중의 5% 이하의 뉴클레오티드를 또다른 뉴클레오티드로 결실 또는 치환할 수 있거나, 참조 서열 중의 총 뉴클레오티드의 5% 이하의 뉴클레오티드의 수를 참조 서열 내로 삽입할 수 있다.

[0105] 실질적인 문제로서, 임의의 특정 핵산 분자 또는 폴리펩티드가 본 발명의 뉴클레오티드 서열 또는 폴리펩티드 서열과 80% 이상, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 일치하는지의 여부는 공지된 컴퓨터 프로그램을 사용하여 통상적으로 측정할 수 있다. 의문 서열 (본 발명의 서열) 과 대상 서열 사이의 최선의 총체적인 매치를 측정하기 위한 바람직한 방법은 (또한 총괄적 서열 정렬로 불림), [Brutlag 등, Comp. App. Biosci. 6:237-245 (1990)] 의 알고리즘에 기반한 FASTDB 컴퓨터 프로그램을 사용하여 측정할 수 있다. 서열 정렬에서, 의문 및 대상 서열은 둘 다 DNA 서열이다. RNA 서열은 U 를 T 로 전환하여 비교할 수 있다.

[0106] 상기 총괄적 서열 정렬의 결과는 % 일치성이다. % 일치성을 계산하기 위한 DNA 서열의 FASTDB 정렬에 사용된 바람직한 파라미터는: 행렬=단위, k-튜플 (tuple)=4, 미스매치 벌점=1, 합치 벌점=30, 랜덤화 그룹 길이=0, 컷오프 점수=1, 갭 벌점=5, 갭 크기 벌점 0.05, 윈도우 크기=500 또는 대상 뉴클레오티드 서열의 길이 (어느 쪽이든지 더 짧은 것) 이다.

[0107] 대상 서열이 내부 결실 때문이 아닌, 5' 또는 3' 결실 때문에 의문 서열보다 더 짧은 경우, 결과에 대해 수작업 정정을 해야만 한다. 이것은 FASTDB 프로그램이 % 일치성을 계산할 때 대상 서열의 5' 및 3' 절단을 계산하지 않기 때문이다. 의문 서열에 관해 5' 또는 3' 말단에서 절단된 대상 서열에 대해, % 일치성을 의문 서열의 총 염기의 % 로서 매치/정렬되지 않은, 대상 서열의 5' 및 3' 인 의문 서열의 염기의 수를 계산하여 정정한다. 뉴클레오티드가 매치/정렬되는지의 여부는 FASTDB 서열 정렬의 결과로서 측정된다. 그 다음 구체화된 파라미터를 사용하는 상기 FASTDB 프로그램에 의해 계산된 % 일치성으로부터 상기 % 를 빼서, 최종 % 일치성 점수에 도달한다. 상기 정정된 점수는 본 발명의 목적을 위해 사용된 것이다. 의문 서열과 매치/정렬되지 않는 FASTDB 정렬에 의해 제시된 바와 같은 오직 대상 서열의 5' 및 3' 염기 외부의 염기만이, % 일치성 점수를 수작업으로 조정하려는 목적을 위해 고려된다.

[0108] 예를 들어, % 일치성을 측정하기 위해 90 염기 대상 서열을 100 염기 의문 서열에 정렬시킨다. 대상 서열의 5' 말단에서 결실이 발생하므로, FASTDB 정렬은 5' 말단에서 첫번째 10 염기의 매치/정렬을 보여주지 않는다. 10 짝없는 염기가 서열의 10% 를 나타내므로 (매치되지 않은 5' 및 3' 말단에서의 염기의 수/의문 서열 중의 총 염기의 수), 10% 를 FASTDB 프로그램에 의해 계산된 % 일치성 점수로부터 뺀다. 나머지 90 염기가 완벽하게 매치된다면, 최종 % 일치성은 90% 일 것이다. 또다른 예에서, 90 염기 대상 서열을 100 염기 의문 서열과 비교한다. 이번엔 결실은 내부 결실이어서, 의문과 매치/정렬되지 않는 대상 서열의 5' 또는 3' 상의 염기가 없다. 상기 경우에서, FASTDB 에 의해 계산된 % 일치성은 수작업으로 정정하지 않는다. 다시 한번, 오직 의문 서열과 매치/정렬되지 않는 대상 서열의 염기 5' 및 3' 를 수작업으로 정정한다. 기타 수작업 정정은 본 발명의 목적을 위해 하지 않는다.

[0109] 본 발명의 의문 아미노산 서열과 예를 들어, 95% 이상 "일치하는" 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드는, 대상 폴리펩티드 서열이 의문 아미노산 서열의 각 100 개 아미노산 당 5 개 이하 아미노산 변형을 포함할 수 있다는 것을 제외하고는, 대상 폴리펩티드의 아미노산 서열은 의문 서열과 일치하는 것으로 의도된다. 다른 말로 하면, 의문 아미노산 서열과 95% 이상 일치하는 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드를 수득하기 위해, 대상 서열 중의 5% 이하의 아미노산 잔기를 또다른 아미노산으로 삽입, 결실 또는 치환할 수 있다. 참조 서열의 상기 변형은 참조 아미노산 서열의 아미노 또는 카르복시 말단 위치 또는 상기 말단 위치에서, 또는 참조 서열 중의 잔기 중에서 개별적으로 또는 참조 서열 내의 하나 이상의 인접 기에 산재된 임의의 위치에서 발생할 수 있다.

[0110] 실질적인 문제로서, 임의의 특정 폴리펩티드가 참조 폴리펩티드와 80% 이상, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 일치하는지의 여부는 공지된 컴퓨터 프로그램을 사용하여 통상적으로 측정할 수 있다. 의문 서열 (본 발명의 서열) 과 대상 서열 사이의 최선의 총체적인 매치를 측정하기 위한 바람직한 방법은 (또한 총괄적 서열 정렬로 불림), [Brutlag 등, Comp. App. Biosci. 6:237-245 (1990)] 의 알고리즘에 기반한 FASTDB 컴퓨터 프로그램을 사용하여 측정할 수 있다. 서열 정렬에서, 의문 및 대상 서열은 둘 다 뉴클레오티드 서열 또는 둘 다 아미노산 서열이다. 상기 총괄적 서열 정렬의 결과는 % 일치성이다. FASTDB 아미노산 정렬에 사용된 바람직한 파라미터는: 행렬=PAM 0, k-튜플=2, 미스매치 벌점=1, 합치 벌점=20, 랜덤화 그룹 길이=0, 컷오프 점수=1, 윈도우 크기=서열 길이, 갭 벌점=5, 갭 크기 벌점=0.05, 윈도우 크기=500 또는 대상 뉴클레오티드 서열의 길이 (어느 쪽이든지 더 짧은 것) 이다.

- [0111] 대상 서열이 내부 결실 때문이 아닌, N- 또는 C-말단 결실 때문에 의문 서열보다 더 짧은 경우, 결과에 대해 수작업 정정을 해야만 한다. 이것은 FASTDB 프로그램이 총체적 % 일치성을 계산할 때 대상 서열의 N- 및 C-말단 절단을 계산하지 않기 때문이다. 의문 서열에 관해 N- 및 C-말단에서 절단된 대상 서열에 대해, % 일치성을 의문 서열의 총 염기의 % 로서, 해당하는 대상 잔기와 매치/정렬되지 않은, 대상 서열의 N- 및 C-말단인 의문 서열의 잔기의 수를 계산하여 정정한다. 잔기가 매치/정렬되는 지의 여부는 FASTDB 서열 정렬의 결과로서 측정된다. 그 다음 구체화된 파라미터를 사용하는 상기 FASTDB 프로그램에 의해 계산된 % 일치성으로부터 상기 % 를 빼서, 최종 % 일치성 점수에 도달한다. 상기 최종 % 일치성 점수는 본 발명의 목적을 위해 사용된 것이다. 의문 서열과 매치/정렬되지 않는 오직 대상 서열의 N- 및 C-말단에 대한 잔기만이, % 일치성 점수를 수작업으로 조정하려는 목적을 위해 고려된다. 즉, 오직 의문 잔기만이 대상 서열의 가장 먼 N- 및 C-말단 잔기 외부에 위치한다.
- [0112] 예를 들어, % 일치성을 측정하기 위해 90 아미노산 잔기 대상 서열을 100 잔기 의문 서열에 정렬시킨다. 대상 서열의 N-말단에서 결실이 발생하므로, FASTDB 정렬은 N-말단에서 첫번째 10 잔기의 매치/정렬을 보여주지 않는다. 10 짝없는 잔기가 서열의 10% 를 나타내므로 (매치되지 않은 N- 및 C-말단에서의 잔기의 수/의문 서열 중의 총 잔기의 수), 10% 를 FASTDB 프로그램에 의해 계산된 % 일치성 점수로부터 뺀다. 나머지 90 잔기가 완벽하게 매치된다면, 최종 % 일치성은 90% 일 것이다. 또다른 예에서, 90 잔기 대상 서열을 100 잔기 의문 서열과 비교한다. 이번엔 결실은 내부 결실이어서, 의문과 매치/정렬되지 않는 대상 서열의 N- 또는 C-말단에 잔기가 없다. 상기 경우에서, FASTDB 에 의해 계산된 % 일치성은 수작업으로 정정하지 않는다. 다시 한번, 오직 의문 서열과 매치/정렬되지 않는 FASTDB 정렬에 의해 제시된 바와 같은 대상 서열의 N- 및 C-말단 외부의 잔기 위치만을 수작업으로 정정한다. 기타 수작업 정정은 본 발명의 목적을 위해 하지 않는다.
- [0113] 본원에서 사용되는 바와 같은, 본 발명의 핵산 서열에 대해 "엄격한 조건 하에서의 혼성화" 되는 핵산은, 50% 포름아미드, 5x SSC (750 mM NaCl, 75 mM 나트륨 시트레이트), 50 mM 나트륨 포스페이트 (pH 7.6), 5x Denhardt's 용액, 10% 텍스트란 술페이트, 및 20 µg/ml 변성된, 전단된 연어 정자 DNA 를 포함하는 용액 중에서 42°C 에서 밤새 인큐베이션한 후, 약 65°C 에서 0.1 x SSC 에서 필터를 세척하여 혼성화된 폴리뉴클레오티드를 말한다.
- [0114] 본원에서 사용되는 바와 같은, 용어 *굴지 위치화 도메인*은 굴지 복합체 내의 위치에 폴리펩티드를 고정시키는 것을 담당하는 굴지 체류 폴리펩티드의 아미노산 서열을 말한다. 일반적으로, 위치화 도메인은 효소의 아미노 말단 "꼬리" 를 포함한다.
- [0115] 본원에서 사용되는 바와 같은, 용어 *효과기 작용*은 항체의 Fc 영역 (천연 서열 Fc 영역 또는 아미노산 서열 변이체 Fc 영역) 에 기인하는 상기 생물학적 활성을 말한다. 항체 효과기 작용의 예에는 Fc 수용체 결합 친화성, 항체-의존적 세포성 세포독성 (ADCC), 항체-의존적 세포성 포식작용 (ADCP), 사이토카인 분비, 항원-제시 세포에 의한 면역-복합체-매개 항원 섭취, 세포 표면 수용체의 하향-조절, 등이 포함되나 이에 제한되지 않는다.
- [0116] 본원에서 사용되는 바와 같은, 용어 *공학설계자*, *공학설계된*, *공학설계* 및 *글리코실화 조작*은 자연 발생적 또는 재조합 폴리펩티드 또는 그의 분절의 글리코실화 패턴의 임의의 조작을 포함하는 것으로 고려된다. 글리코실화 조작에는 세포에서 발현되는 당단백질의 변경된 글리코실화를 달성하기 위해 올리고당 합성 경로의 유전적 조작을 포함하는, 세포의 글리코실화 절차의 대사 공학이 포함된다. 게다가, 글리코실화 조작에는 글리코실화에 대한 돌연변이 및 세포 환경의 영향이 포함된다. 하나의 구현예에서, 글리코실화 조작은 글리코실트랜스페라아제 활성의 변경이다. 특정 구현예에서, 공학은 변경된 글루코사미닐트랜스페라아제 활성 및/또는 푸코실트랜스페라아제 활성을 야기한다.
- [0117] 본원에서 사용되는 바와 같은, 용어 *숙주 세포*는 본 발명의 폴리펩티드 및 항원-결합 분자를 생성하기 위해 유전공학설계될 수 있는 임의의 종류의 세포 시스템을 포함한다. 하나의 구현예에서, 숙주 세포는 개질된 단백당형을 갖는 항원 결합 분자의 제조를 허용하기 위해 유전공학설계된다. 바람직한 구현예에서, 항원 결합 분자는 항체, 항체 분절, 또는 융합 단백질이다. 특정 구현예에서, 숙주 세포는 GnTIII 활성을 갖는 하나 이상의 폴리펩티드의 증가된 수준을 발현하기 위해 추가로 조작된다. 숙주 세포에는 배양된 세포, 예를 들어, 포유류의 배양된 세포, 예컨대 CHO 세포, HEK293-EBNA 세포, BHK 세포, NSO 세포, SP2/0 세포, YO 골수종 세포, P3X63 마우스 골수종 세포, PER 세포, PER.C6 세포 또는 하이브리도마 세포, 효모 세포, 곤충 세포, 및 식물 세포, 몇 가지를 말하자면, 또한 트랜스제닉 동물, 트랜스제닉 식물 또는 배양된 식물 또는 동물 조직 내

에 포함되는 세포가 포함된다.

- [0118] 본원에서 사용되는 바와 같은, 용어 *Fc-매개된 세포성 세포독성*에는 항체-의존적 세포성 세포독성 및 인간 Fc-영역을 함유하는 가용성 Fc-융합 단백질에 의해 매개되는 세포성 세포독성이 포함된다. 그것은 "인간 면역 효과기 세포"에 의해 "항체-표적된 세포"의 용해를 가져오는 면역 메카니즘이다.
- [0119] 인간 면역 효과기 세포는 항체 또는 Fc-융합 단백질의 Fc-영역에 결합하고, 효과기 작용을 수행하는 그의 표면에 Fc 수용체를 나타내는 백혈구의 집단이다. 이러한 집단에는 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC) 및/또는 자연 살해 (NK) 세포가 포함될 수 있으나 이에 제한되지 않는다.
- [0120] 항체-표적된 세포는 항체 또는 Fc-융합 단백질에 의해 결합된 세포이다. 항체 또는 Fc 융합-단백질은 Fc 영역에 대한 단백질 부분 N-말단을 통해 표적 세포에 결합한다.
- [0121] 본원에서 사용되는 바와 같은, 용어 *증가된 Fc-매개된 세포성 세포독성*은 상기 정의된 Fc-매개된 세포성 세포독성의 메카니즘에 의해 표적 세포를 둘러싸는 배지에서 항체, 또는 Fc-융합 단백질의 제시된 농도에서, 제시된 시간에 용해되는 "항체-표적된 세포"의 수의 증가, 및/또는 Fc-매개된 세포성 세포독성의 메카니즘에 의해, 제시된 시간에서 제시된 수의 "항체-표적된 세포"의 용해를 달성하기에 필요한 표적 세포를 둘러싸는 배지에서 항체, 또는 Fc-융합 단백질의 농도 감소로서 정의된다. Fc-매개된 세포성 세포독성의 증가는 당업자에게 공지된, 동일한 표준 제조, 정제, 제형화 및 저장 방법을 사용하여 동일한 유형의 숙주 세포에 의해 제조된, 그러나 본원에 기재된 방법에 의해 글리코실트랜스페라아제 GnTIII 을 발현하도록 유전공학설계된 숙주 세포에 의해 제조되지 않은 동일한 항체, 또는 Fc-융합 단백질에 의해 매개되는 세포성 세포독성에 관한 것이다.
- [0122] 용어가 본원에 정의된 바와 같은 *증가된 항체 의존적 세포성 세포독성 (ADCC)* 을 가진 항체는, 당업자에게 공지된 임의의 적합한 방법에 의해 측정된 바와 같이 증가된 ADCC 를 갖는 항체를 의미한다. 하나의 허용되는 시험관내 ADCC 검정법은 하기와 같다:
- [0123] 1) 검정법은 항체의 항원-결합 영역에 의해 인지되는 표적 항원을 발현하는 것으로 알려진 표적 세포를 사용한다;
- [0124] 2) 검정법은 효과기 세포로서, 건강한 공여자로부터 무작위로 선택된 혈액으로부터 분리된 인간 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC) 를 사용한다;
- [0125] 3) 검정법은 하기 프로토콜에 따라 수행한다:
- [0126] i) PBMC 를 표준 밀도 원심분리 절차를 사용하여 분리하고, 5×10^6 세포/RPMI 세포 배양 배지 ml 로 현탁한다;
- [0127] ii) 표적 세포를 표준 조직 배양 방법에 의해 성장시키고, 90% 초과와 생존력을 가진 지수 성장기로부터 수확하고, RPMI 세포 배양 배지에서 세척하고, 100 마이크로-Curies 의 ^{51}Cr 로 표지하고, 세포 배양 배지로 2 회 세척하고, 10^5 세포/ml 의 밀도로 세포 배양 배지에 재현탁한다;
- [0128] iii) 100 마이크로리터의 상기 최종 표적 세포 현탁액을 96-웰 마이크로리터 플레이트의 각 웰에 옮긴다;
- [0129] iv) 항체를 세포 배양 배지에서 4000 ng/ml 에서 0.04 ng/ml 까지 연속 희석하고, 50 마이크로리터의 수득 항체 용액을 상기 전체 농도 범위를 포함하는 다양한 항체 농도로 삼중으로 시험하는, 96-웰 마이크로리터 플레이트 중의 표적 세포에 첨가한다;
- [0130] v) 최대 방출 (MR) 대조군으로서, 표지된 표적 세포를 함유하는 플레이트 중의 3 개의 추가 웰에, 항체 용액 (상기 iv 지점) 대신에, 50 마이크로리터의 비-이온성 세제의 2% (V/V) 수용액 (Nonidet, Sigma, St. Louis) 을 제공한다;
- [0131] vi) 자발적 방출 (SR) 대조군으로서, 표지된 표적 세포를 함유하는 플레이트 중의 3 개의 추가 웰에, 항체 용액 (상기 iv 지점) 대신에, 50 마이크로리터의 RPMI 세포 배양 배지를 제공한다;
- [0132] vii) 그 다음 96-웰 마이크로리터 플레이트를 1 분 동안 $50 \times g$ 에서 원심분리하고, 4°C 에서 1 시간 동안 인큐베이션한다;
- [0133] viii) 50 마이크로리터의 PBMC 현탁액 (상기 i 지점) 을 각 웰에 첨가하여 효과기:표적 세포 비를 25:1 로 산출하고, 플레이트를 4 시간 동안 37°C 에서 5% CO_2 분위기 하의 인큐베이터에 둔다;
- [0134] ix) 각 웰로부터 세포가 없는 상청액을 수확하고, 실험적으로 방출된 방사능 활성 (ER) 을 감마 계측기를 사용

하여 정량화한다;

- [0135] x) 특정 용해물의 백분율을 식 $(ER-MR)/(MR-SR) \times 100$ (여기서 ER 은 항체 농도에 대해 정량화된 평균 방사능활성 (상기 ix 지점 참조) 이고, MR 은 MR 대조군에 대해 (상기 v 지점 참조) 정량화된 평균 방사능활성 (상기 ix 지점 참조) 이고, SR 은 SR 대조군에 대해 (상기 vi 지점 참조) 정량화된 평균 방사능활성 (상기 ix 지점 참조) 임) 에 따라 각 항체 농도에 대해 계산한다;
- [0136] 4) "증가된 ADCC" 는 상기 시험된 항체 농도 범위 내에서 관찰된 특정 용해물의 최대 백분율의 증가, 및/또는 상기 시험된 항체 농도 범위 내에서 관찰된 특정 용해물의 최대 백분율의 반을 달성하기 위해 필요한 항체 농도의 감소로서 정의된다. ADCC 의 증가는 당업자에게 공지된, 동일한 표준 제조, 정제 및 저장 방법을 사용하여 동일한 유형의 숙주 세포에 의해 제조된, 그러나 GnTIII 을 과발현하도록 유전공학설계된 숙주 세포에 의해 제조되지 않은 동일한 항체에 의해 매개되는, 상기 검정법으로 측정된 ADCC 에 관한 것이다.
- [0137] 하나의 양상에서, 본 발명은 래트 ICR62 의 결합 특이성을 가진 (즉, 실질적으로 동일한 에피토프에 결합함) 항원 결합 분자, 및 그들의 효과기 작용이 변경된 글리코실화에 의해 향상될 수 있다는 발견에 관한 것이다. 하나의 구현예에서, 항원 결합 분자는 키메라성 항체이다. 바람직한 구현예에서, 본 발명은 SEQ ID NO:53 내지 108 및/또는 SEQ ID NO:122 내지 127 중 하나 이상의 (예, 1, 2, 3, 4, 5, 또는 6 개의) 임의의 CDR 을 포함하는 키메라성 항체, 또는 그의 분절에 관한 것이다. 구체적으로는, 바람직한 구현예에서, 본 발명은 하기를 포함하는 단리된 폴리뉴클레오티드에 관한 것이다: (a) SEQ ID NO:54 SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:58, SEQ ID NO:60, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:64, SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:68, SEQ ID NO:70, SEQ ID NO:72, SEQ ID NO:74, SEQ ID NO:122, 및 SEQ ID NO:124 로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열; (b) SEQ ID NO:76, SEQ ID NO:78, SEQ ID NO:80, SEQ ID NO:82, SEQ ID NO:84, SEQ ID NO:86, SEQ ID NO:88, SEQ ID NO:90, SEQ ID NO:92, SEQ ID NO:94, SEQ ID NO:96, SEQ ID NO:98, SEQ ID NO:100, SEQ ID NO:102, SEQ ID NO:104, SEQ ID NO:106, 및 SEQ ID NO:126 으로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열; 및 (c) SEQ ID NO:108. 또다른 바람직한 구현예에서, 본 발명은 (a) SEQ ID NO:112 및 SEQ ID NO:114 로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열; (b) SEQ ID NO:116 및 SEQ ID NO:118 로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열; 및 (c) SEQ ID NO:119 를 포함하는 단리된 폴리뉴클레오티드에 관한 것이다. 하나의 구현예에서, 임의의 상기 폴리뉴클레오티드는 융합 폴리펩티드를 코딩한다.
- [0138] 또다른 구현예에서, 항원 결합 분자는 SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2 에 의해 코딩되는 래트 ICR62 항체의 VH 도메인, 또는 그의 변이체; 및 비-취과 폴리펩티드를 포함한다. 또다른 바람직한 구현예에서, 본 발명은 SEQ ID NO:43 또는 SEQ ID NO:44 에 의해 코딩되는 래트 항체의 VL 도메인, 또는 그의 변이체; 및 비-취과 폴리펩티드를 포함하는 항원 결합 분자에 관한 것이다.
- [0139] 또다른 양상에서, 본 발명은 ICR62 의 하나 이상의 (예, 1, 2, 3, 4, 5, 또는 6 개의) 잘려진 CDR 을 포함하는 항원 결합 분자에 관한 것이다. 이러한 잘려진 CDR 은 제시된 CDR 에 대한 특이성-결정 아미노산 잔기를 최소로 함유할 것이다. "특이성-결정 잔기" 는 항원과의 상호작용에 직접적으로 관여하는 잔기를 의미한다. 일반적으로, 제시된 CDR 중의 오직 약 1/5 내지 1/3 의 잔기만이 항원에 대한 결합에 참여한다. 특정 CDR 중의 특이성-결정 잔기는 예를 들어, 그 내용이 본원에 전체가 참조로서 인용된 [Padlan 등, FASEB J. 9(1):133-139 (1995)] 에 기재된 방법에 따라 제시된 잔기 위치에서 서열 변이성의 측정 및 3 차원 모델링으로부터의 원자 상호간 접촉의 산정에 의해 확인될 수 있다.
- [0140] 따라서, 또한 본 발명은 래트 ICR62 항체의 하나 이상의 (예, 1, 2, 3, 4, 5, 또는 6 개의) 상보성 결정 영역, 또는, 상기 상보성 결정 영역에 대해 적어도 특이성-결정 잔기를 함유하는 그의 변이체 또는 잘려진 형태를 포함하는 단리된 폴리뉴클레오티드에 관한 것이며, 여기서 상기 단리된 폴리뉴클레오티드는 융합 폴리펩티드를 코딩한다. 바람직하게는, 이러한 단리된 폴리뉴클레오티드는 항원 결합 분자인 융합 폴리펩티드를 코딩한다. 하나의 구현예에서, 폴리뉴클레오티드는 래트 ICR62 항체의 3 개의 상보성 결정 영역, 또는 상기 3 개의 상보성 결정 영역 각각에 대한 적어도 특이성-결정 잔기를 함유하는 그의 변이체 또는 잘려진 형태를 포함한다. 하나의 구현예에서, 폴리뉴클레오티드는 하기 표 2 내지 5 에서 언급되는 하나 이상의 CDR 을 포함한다. 또다른 구현예에서, 폴리뉴클레오티드는 키메라성 (예, 인간화) 항체의 경쇄 또는 중쇄의 전체 가변 영역을 코딩한다. 본 발명은 추가로 이러한 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩되는 폴리펩티드에 관한 것이다.
- [0141] 또다른 구현예에서, 본 발명은 래트 ICR62 항체의 하나 이상의 (예, 1, 2, 3, 4, 5, 또는 6 개의) 상보성 결정 영역, 또는, 상기 상보성 결정 영역에 대해 적어도 특이성-결정 잔기를 함유하는 그의 변이체 또는 잘려진 형태를 포함하고, 이중 폴리펩티드 유래의 서열을 포함하는 항원 결합 분자에 관한 것이다. 하나의 구현예에서,

항원 결합 분자는 래트 ICR62 항체의 3 개의 상보성 결정 영역, 또는 상기 3 개의 상보성 결정 영역 각각에 대한 적어도 특이성-결정 잔기를 함유하는 그의 변이체 또는 잘려진 형태를 포함한다. 하나의 구현예에서, 항원 결합 분자는 하기 표 2 내지 5 에서 언급되는 하나 이상의 CDR 을 포함한다. 또다른 양상에서, 항원 결합 분자는 항체 경쇄 또는 중쇄의 가변 영역을 포함한다. 하나의 특히 유용한 구현예에서, 항원 결합 분자는 키메라성, 예를 들어, 인간화 항체이다. 또한 본 발명은 이러한 항원 결합 분자의 제조 방법, 및 EGFR 이 발현된, 특히 EGFR 이 동일한 세포 유형의 정상 조직에 비해 비정상적으로 발현된 질환, 특히 세포 증식 장애의 치료에서의 이의 용도에 관한 것이다. 이러한 장애에는 방광, 뇌, 두경부, 이자, 폐, 유방, 난소, 결장, 전립선, 피부 및 신장의 암이 포함되나 이에 제한되지 않는다. EGFR 발현 수준은 당업계에 공지되고 본원에 기재된 방법 (예, 면역조직화학 검정법, 면역형광 검정법, 면역효소 검정법, ELISA, 유세포분석, 방사면역 검정법, 웨스턴 블롯, 리간드 결합, 키나아제 활성 등) 에 의해 측정할 수 있다

[0142]

또한 본 발명은 EGFR 을 발현하는 세포의 생체내 또는 시험관내 표적 방법에 관한 것이다. EGFR 을 발현하는 세포는 치료 목적 (예, EGFR-매개된 신호의 파괴에 의해, 예를 들어 리간드 결합을 차단시켜, 또는 면역계에 의한 파괴를 위해 EGFR-발현 세포를 표적함에 의해 치료가능한 장애를 치료하기 위해) 을 위해 표적될 수 있다. 하나의 구현예에서, 본 발명은 본 발명의 ABM 을 포함하는 조성물을 대상에게 투여하는 것을 포함하는, 대상에서의 EGFR 을 발현하는 세포의 표적 방법에 관한 것이다. EGFR 을 발현하는 세포는 진단 목적 (예, 이들이 EGFR 를, 정상적으로 또는 비정상적으로 발현하고 있는 지를 측정하기 위해) 을 위해 표적될 수 있다. 그러므로, 또한 본 발명은 EGFR 의 존재의 또는 EGFR 을 발현하는 세포의, 생체내 또는 시험관내 검출 방법에 관한 것이다. 본 발명에 따라 EGFR 발현을 검출하는 하나의 방법은 시험될 샘플을, 본 발명의 ABM, ABM 과 EGFR 사이의 복합체의 형성을 가능하게 하는 조건하에서, 임의로 대조군 샘플과, 본 발명의 ABM 과 접촉시키는 것을 포함한다. 그 다음 복합체 형성을 측정한다 (예, ELISA 또는 당업계에 공지된 기타 방법에 의해). 대조군 샘플을 시험 샘플과 사용하는 경우, 시험 및 대조군 샘플을 비교할 때 ABM-EGFR 복합체 형성에서 임의의 통계적으로 유의한 차이가 시험 샘플에서의 EGFR 의 존재의 지표이다.

[0143] 표 2

CDR		뉴클레오타이드 서열	SEQ ID NO
중쇄 CDR1	Kabat	GACTACAAGATACAC	54
		GACTACGCCATCAGC	56
		GACTACTATATGCAC	58
		GACTACAAGATATCC	122
	Chothia	GGTTTTACATTCACCTGACTAC	60
		GGTTACACATTCACCTGACTAC	62
		GGTTATTCATTCACCTGACTAC	64
	AbM	GGTTTTACATTCACCTGACTACAAGATACAC	66
		GGTTTTACATTCACCTGACTACGCCATCAGC	68
		GGTTTTACATTCACCTGACTACTATATGCAC	70
		GGTTACACATTCACCTGACTACTATATGCAC	72
		GGTTATTCATTCACCTGACTACAAGATACAC	74
중쇄 CDR2	Kabat	GGTTTCACATTCACCTGACTACAAGATATCC	124
		TATTTTAATCCTAACAGTGGTTATAGTACCTA	76
		CAATGAAAAGTTCAAGAGC	
		GGGATCAATCCTAACAGTGGTTATAGTACCTA	78
		CGCACAGAAGTTCCAGGGC	
		TATTTCAACCCTAACAGCGGTTATAGTACCTA	80
		CGCACAGAAGTTCCAGGGC	
		TGGATCAATCCTAACAGTGGTTATAGTACCTA	82
		CGCACAGAAGTTTCAGGGC	
		TGGATCAATCCTAACAGTGGTTATAGTACCTA	84
		CAGCCCAAGCTTCCAAGGC	
		TGGATCAATCCTAACAGTGGTTATAGTACCTA	86
	Chothia	CAACGAGAAGTTCCAAGGC	
		TATTTCAACCCTAACAGCGGTTATTCGAACCTA	88
		CGCACAGAAGTTCCAGGGC	
		TATTTCAACCCTAACAGCGGTTATGCCACGTA	90
		CGCACAGAAGTTCCAGGGC	
		TACTTCAATCCTAACAGTGGTTATAGTACCTA	126
		CAGCCCAAGCTTCCAAGGC	
		AATCCTAACAGTGGTTATAGTACC	92
		AACCCTAACAGCGGTTATTCGAAC	94
		AACCCTAACAGCGGTTATGCCACG	96
		TATTTTAATCCTAACAGTGGTTATAGTACC	98
		GGGATCAATCCTAACAGTGGTTATAGTACC	100
	AbM	TGGATCAATCCTAACAGTGGTTATAGTACC	102
		TATTTCAACCCTAACAGCGGTTATTCGAAC	104
		TATTTCAACCCTAACAGCGGTTATGCCACG	106
중쇄 CDR3	Kabat Chothia AbM	CTATCCCCAGGCGGTTACTATGTTATGGATGC	108
		C	

[0144]

[0145] 표 3

CDR		아미노산 서열	SEQ ID NO
중쇄 CDR1	Kabat	DYKIH	53
		DY AIS	55
		DYYMH	57
		DYKIS	123
	Chothia	GFIFTDY	59
		GYTFTDY	61
		GYSFTDY	63
	AbM	GFIFTDYKIH	65
		GFIFTDY AIS	67
		GFIFTDYYMH	69
		GYTFTDYYMH	71
		GYSFTDYKIH	73
중쇄 CDR2	Kabat	GFIFTDYKIS	125
		YFNPN SGYSTYNEKFKS	75
		GINPN SGYSTYAQKFQG	77
		YFNPN SGYSTYAQKFQG	79
		WINPN SGYSTYAQKFQG	81
		WINPN SGYSTYSPSFQG	83
		WINPN SGYSTYNEKFQG	85
		YFNPN SGYSNYAQKFQG	87
		YFNPN SGYATYAQKFQG	89
		YFNPN SGYSTYSPSFQG	127
	Chothia	NPNSGYST	91
		NPNSGYSN	93
		NPNSGYAT	95
	AbM	YFNPN SGYST	97
		GINPN SGYST	99
		WINPN SGYST	101
		YFNPN SGYSN	103
		YFNPN SGYAT	105
중쇄	Kabat Chothia	LSPGGYYVMDA	107
CDR3	AbM		

[0146]

[0147] 표 4

CDR	아미노산 서열	SEQ ID NO
Kabat 경쇄 CDR1	KASQNINNYLN	111
	RASQGINNYLN	113
Kabat 경쇄 CDR2	NTNNLQT	115
Kabat 경쇄 CDR3	LQHNSFPT	117

[0148]

[0149] 표 5

CDR	뉴클레오타이드 서열	SEQ ID NO
Kabat 경쇄 CDR1	AAAGCAAGTCAGAATATTAACAATTACTTAAAC	112
	CGGGCAAGTCAGGGCATTAAACAATTACTTAAAT	114
Kabat 경쇄 CDR2	AATACAAACAATTGCAAACA	116
	AATACCAACAACCTGCAGACA	118
Kabat 경쇄 CDR3	TTGCAGCATAATAGTTTCCACG	119

[0150]

- [0151] 여러 메카니즘이 EGFR 에 결합하는 리간드 (예, EGF, TGF- α , 등) 및 신호 경로의 연이는 활성화의 차단, 항체의존적 세포성 세포독성 (ADCC), 성장 정지 또는 말단 분화의 유도를 포함하는 항-EGFR 항체의 치료적 효능에 관여한다는 것이 알려져 있다.
- [0152] 래트 단일클론 항체 ICR62 (IgG2b) 는 본원에 전체가 참조로서 인용된 PCT 공개 번호 WO 95/20045 에서 논의되었다. 이것은 EGFR 의 C 에피토프에 대한 것이고, 리간드 결합을 억제하고, EGFR 을 발현하는 평편세포 암종의 시험관내 성장을 억제하고, 비흉선 마우스에서 종양의 이종이식의 퇴행을 유도하는 것을 보여주었다 (WO 95/20045; Modjtahedi 등, Br. J. Cancer 73:228-235 (1996)). 전체 설치류 항체로서, 인간에 대한 ICR62 래트 단일클론 항체의 투여는 심지어 단일 투여 후에도 일부 환자에서 HARA 응답을 야기하였다. (WO 95/20045; Modjtahedi 등, Br. J. Cancer 73:228-235 (1996)).
- [0153] 키메라성 마우스/인간 항체는 기재되어 있다. 예를 들어, Morrison, S. L. 등, PNAS 11:6851-6854 (November 1984); 유럽 특허 공개 번호 제 173494 호; Boulianna, G. L. 등, Nature 312:642 (December 1984); Neuberger, M. S. 등, Nature 314:268 (March 1985); 유럽 특허 공개 번호 제 125023 호; Tan 등, J. Immunol. 135:8564 (November 1985); Sun, L. K 등, Hybridoma 5(1):517 (1986); Sahagan 등, J. Immunol. 137:1066-1074 (1986) 을 참조한다. 일반적으로, Muron, Nature 312:597 (December 1984); Dickson, Genetic Engineering News 5(3) (March 1985); Marx, Science 229:455 (August 1985); 및 Morrison, Science 229:1202-1207 (September 1985) 을 참조한다. IMC-C225 (Erbix[®], Imclone) 은 EGFR 에 대항하고 마우스 가변 영역 및 인간 불변 영역을 갖는 키메라성 단일클론 항체이다 (Herbst and Shin, Cancer 94: 1593-1611 (2002) 참조). IMC-225 의 쥐과 부분은 M225 유래의 것이고, 이것은 EGFR 에 결합하고 EGF-유도된 티로신 키나아제-의존적 인산화뿐 아니라, EGFR 을 과발현하는 종양 세포주에서 세포자멸사의 유도를 억제하는 것으로 밝혀졌다 (Herbst and Shin, Cancer 94: 1593-1611 (2002)). 그러나, M225 는 1 상 임상 시험에서 항체로 치료한 환자에서 HAMA 반응을 도출하였다 (Herbst and Shin, Cancer 94: 1593-1611 (2002)). IMC-225 는 생체내 및 시험관내에서 시험되었고, 열악한 예후와 관련된 것들을 포함하는, 다수의 종양 유형에서 방사능 요법 및 화학요법과 조합으로 사용되었다 (Herbst and Shin, Cancer 94: 1593-1611 (2002)). 그러나, IMC-225 는 임상 시험에서 IMC-225 항체를 투여한 환자에서 알러지 및 피부 반응과 같은 독성과 관련되었다 (Herbst and Shin, Cancer 94: 1593-1611 (2002)).
- [0154] 특히 바람직한 구현예에서, 본 발명의 키메라성 ABM 은 인간화 항체이다. 비-인간 항체의 인간화 방법은 당 업계에 공지되어 있다. 예를 들어, 본 발명의 인간화 ABM 은 각각의 전체 내용이 본원에 참조로서 인용된, 미국 특허 번호 제 5,225,539 호 (Winter), 미국 특허 번호 제 6,180,370 호 (Queen 등), 미국 특허 번호 제 6,632,927 호 (Adair 등), 또는 미국 특허 출원 공개 번호 제 2003/0039649 호 (Foote) 의 방법에 따라 제조될 수 있다. 바람직하게는, 인간화 항체는 비-인간인 공급원으로부터 도입된 하나 이상의 아미노산 잔기를 갖는다. 상기 비-인간 아미노산 잔기는 종종 "수입" 잔기로서 불리고, 이것은 전형적으로는 "수입" 가변 도메인으로부터 취해진다. 인간화는 하기 Winter 와 동료들 (Jones 등, Nature, 321:522-525 (1986); Riechmann 등, Nature, 332:323-327 (1988); Verhoeven 등, Science, 239:1534-1536 (1988)) 의 방법에 따라, 인간 항체의 상응하는 서열에 대한 과가변 영역 서열의 치환에 의해 본질적으로 수행될 수 있다. 따라서, 이러한 "인간화" 항체는 실질적으로 더 적은 손상되지 않은 인간 가변 도메인이 비-인간 중 유래의 상응하는 서열에 의해 치환된 키메라성 항체 (미국 특허 번호 제 4,816,567 호) 이다. 실제로, 인간화 항체는 전형적으로는 일부 과가변 영역 잔기 및 가능하게는 일부 FR 잔기가 설치류 항체 중의 유사 부위 유래의 잔기에 의해 치환된 인간 항체이다. 주제 인간화 항-EGFR 항체는 인간 면역글로불린의 불변 영역을 포함할 것이다.
- [0155] 인간화 항체의 제조에 사용되는 인간 가변 도메인, 경쇄 및 중쇄 둘 다의 선택은 항원성을 감소시키기 위해 매우 중요하다. 소위 "최선의-맞춤" 으로 불리는 방법에 따르면, 설치류 항체의 가변 도메인의 서열을 공지된 인간 가변-도메인 서열의 전체 라이브러리에 대항하여 스크리닝한다. 그 다음 설치류의 서열과 가장 근접한 인간 서열을 인간화 항체를 위한 인간 골격 영역 (FR) 으로서 허용한다 (Sims 등, J. Immunol., 151:2296 (1993); Chothia 등, J. Mol. Biol., 196:901 (1987)). 인간 골격 서열의 또다른 선별 방법은 전체 설치류 골격의 각 개별 서브영역 (즉, FR1, FR2, FR3, 및 FR4) 또는 그 골격 서브영역에 해당하는 (예, Kabat 넘버링에 의해 측정된 바와 같음) 공지된 인간 가변 영역 서열의 라이브러리에 대항하는 개별 서브영역 (예, FR1 및 FR2) 의 일부 조합의 서열을 비교하고, 각 서브영역 또는 설치류의 것과 가장 근접한 조합에 대한 인간 서열을 선택하는 것이다 (2003 년 2 월 27 일 공개된, Leung, 미국 특허 출원 공개 번호 제 2003/0040606 A1 호) (전체 내용이 본원에 참조로서 인용됨). 또다른 방법은 경쇄 또는 중쇄의 특정 서브그룹의 모든 인간 항체의 보존 서열 유래의 특정 골격 영역을 사용한다. 동일한 골격을 여러 상이한 인간화 항체에 대해 사용할 수 있다

(Carter 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285 (1992); Presta 등, J. Immunol., 151:2623 (1993)) (각각의 전체 내용이 본원에 참조로서 인용됨).

[0156] 항체가 항원에 대한 높은 친화성의 보유 및 기타 바람직한 생물학적 특성을 갖도록 인간화되는 것이 더욱 중요하다. 상기 목표를 달성하기 위해, 바람직한 방법에 따르면, 인간화 항체는 모 서열 및 인간화 서열의 3 차원 모델을 사용하는 모 서열 및 다양한 개념 인간화 생성물의 분석 방법에 의해 제조된다. 3 차원 번역글로불린 모델은 당업자에게 익숙한 컴퓨터 프로그램을 사용하여 생성할 수 있다 (예, InsightII, Accelrys, Inc. (이전의 MSI), 또는 <http://swissmodel.expasy.org>). 상기 컴퓨터 프로그램은 선별된 후보 번역글로불린 서열의 가능한 3 차원 배열 구조를 예측 및 제시할 수 있다. 상기 제시의 점검은 후보 번역글로불린 서열의 작용에서의 잔기의 알맞은 역할, 즉, 그의 항원에 결합하기 위한 후보 번역글로불린의 능력에 영향을 미치는 잔기의 분석을 가능하게 한다. 상기 방식으로, FR 잔기는 수여자로부터 선별 및 조합될 수 있고, 바람직한 항체 특성, 예컨대 표적 항원(들)에 대한 증가된 친화성이 달성되도록, 서열을 수입할 수 있다. 일반적으로, 과가변 영역 잔기는 항원 결합에 영향을 미치는 것에 직접적으로 및 가장 실질적으로 관여된다.

[0157] 하나의 구현예에서, 본 발명의 항체는 인간 Fc 영역을 포함한다. 구체적인 구현예에서, 인간 불변 영역은 SEQ ID NO:109 및 110 에서 언급되고, 하기에 언급되는 바와 같은 IgG1 이다:

IgG1 뉴클레오타이드 서열 (SEQ ID NO:110)

```
ACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGG
GGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTG
ACGGTGTCTGGAAGTCAAGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGG
CTGTCCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCC
TCCAGCAGCTTGGGCACCCAGAACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCA
GCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGCAGAGCCCAATCTTGTGACAAAACCTC
ACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGACCGTCAGTCTTC
CTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGT
CACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAAC
TGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAG
GAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACC
AGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCT
CCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAA
CCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGG
TCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAG
TGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGC
TGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGC
AGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGTCCGTGATGCATGAGGCTCTGC
ACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA
```

IgG1 아미노산 서열 (SEQ ID NO:109)

```
TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
QSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKAEPKSCDKTHTCPPCP
APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA
KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT
PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
```

[0158]

[0159] 그러나, 인간 Fc 영역의 변이체 및 동종형이 또한 본 발명에 포함된다. 예를 들어, 본 발명의 용도에 적합한 변이체 Fc 영역은 각각의 내용이 본원에 전체가 참조로서 인용된 미국 특허 번호 제 6,737,056 호 (Presta) (하나 이상의 아미노산 개질로 인한 변형된 효과기 작용을 갖는 Fc 영역 변이체); 또는 미국 특허 출원 번호 제 60/439,498 호; 제 60/456,041 호; 제 60/514,549 호; 또는 WO 2004/063351 (아미노산 개질로 인한 증가된 결합 친화성을 갖는 변이체 Fc 영역); 또는 미국 특허 출원 번호 제 10/672,280 호 또는 WO 2004/099249 (아미노산 개질로 인한 변경된 Fc γ R에 대한 결합을 갖는 Fc 변이체)에 교시된 방법에 따라 제조할 수 있다.

[0160] 또다른 구현예에서, 본 발명의 항원 결합 분자는 예를 들어, 전체 내용이 본원에 참조로서 인용된, 미국 특허 출원 공개 번호 제 2004/0132066 호 (Balint 등)에 기재된 방법에 따라 향상된 결합 친화성을 갖도록 유전공학 설계된다.

[0161] 하나의 구현예에서, 본 발명의 항원 결합 분자는 부가적인 부분, 예컨대 방사능표지 또는 독소에 공액된다.

이러한 공액 ABM 은 당업계에 잘 공지된 다양한 방법에 의해 제조될 수 있다.

[0162] 다양한 방사능핵종은 본 발명에 적용가능하고, 당업자는 다양한 환경 하에서 어떤 방사능핵종이 가장 적합한가를 쉽게 결정할 수 있는 능력이 인정된다. 예를 들어, ^{131}I 요오드는 표적된 면역요법에 대해 사용되는 잘 공지된 방사능핵종이다. 그러나, ^{131}I 요오드의 임상적 유용성은 하기를 포함하는 각종 인자에 의해 제한될 수 있다: 8-일 물리적 반감기; 혈액 내 및 종양 부위 둘 다에서 요오드화된 항체의 탈할로겐화; 및 종양에서 위치화된 투여 침전에 대한 차선택이 될 수 있는 방출 특성 (예, 대량 감마 성분). 우세한 킬레이트제의 출현으로, 단백질에 금속 킬레이트기를 부착시키기 위한 기회가 기타 방사능핵종, 예컨대 ^{111}In 인듐 및 ^{90}Y 이트륨을 사용하기 위한 기회를 증가시켰다. ^{90}Y 이트륨은 방사면역치료적 적용에 사용하에 각종 장점을 제공한다: ^{90}Y 이트륨의 64 시간 반감기는 종양에 의한 항체 축적을 허용하기에 충분히 길고, 예를 들어, ^{131}I 요오드와 달리, ^{90}Y 이트륨은 100 내지 1000 세포 직경의 조직 내의 범위로, 붕괴시 감마 방사를 동반하지 않는 고에너지의 순수 베타 방사체이다. 게다가, 최소 량의 투과 방사는 ^{90}Y 이트륨-표지된 항체의 외래환자를 위해 허용된다. 부가적으로는, 표지된 항체의 내재화는 세포 살해를 위해 필요하지 않으며, 이온화 방사의 국부적 방출은 표적 항원이 결핍된 인접 종양 세포에 대해 치명적이어야만 한다.

[0163] ^{90}Y 이트륨 표지된 항-EGFR 항체의 유효한 단일 치료 투여량 (즉, 치료적 유효량) 범위는 약 5 내지 약 75 mCi, 더욱 바람직하게는 약 10 내지 약 40 mCi 이다. ^{131}I 요오드 표지된 항-EGFR 항체의 유효한 단일 치료 비-골수 절제 투여량 범위는 약 5 내지 약 70 mCi, 더욱 바람직하게는 약 5 내지 약 40 mCi 이다. ^{131}I 요오드 표지된 항-EGFR 항체의 유효한 단일 치료 절제 투여량 (즉, 자가조직 골수 이식을 필요로 할 수 있음) 범위는 약 30 내지 약 600 mCi, 더욱 바람직하게는 약 50 내지 약 500 mCi 미만이다. 키메라성 항-EGFR 항체와 함께, 쥐과 항체와 비교해서 더 긴 순환 반감기 때문에, ^{131}I 요오드 표지된 키메라성 항-EGFR 항체의 유효한 단일 치료 비-골수 절제 투여량 범위는 약 5 내지 약 40 mCi, 더욱 바람직하게는 약 30 mCi 미만이다. 예를 들어, ^{111}In 인듐 표지에 대한 이미지화 범주는, 전형적으로는 약 5 mCi 미만이다.

[0164] 방사능표지된 항-EGFR 항체에 관해, 그것으로의 요법은 또한 단일 요법 치료를 사용하여 또는 복합 치료를 사용하여 발생시킬 수 있다. 방사능핵종 성분 때문에, 치료 전에, 방사능으로부터 유래하는 잠재적으로 치명적인 골수 독성을 경험하는 환자에 대해 말초 줄기 세포 ("PSC") 또는 골수 ("BM") 를 "수확" 하는 것이 바람직하다. 표준 기술을 사용하여 BM 및/또는 PSC 를 수확한 다음, 가능한 재수혈을 위해 퍼지 및 동결시킨다. 부가적으로는, 치료 전에, 치료적으로 표지된 항체 (예, ^{90}Y 이트륨 사용) 가 임의의 정상 기관 또는 조직에 불필요하게 "농축되지" 않을 것이라는 것을 확실히 할 목적으로, 환자에 진단용 표지된 항체 (예, ^{111}In 인듐 사용) 를 사용하는 진단 선량측정 연구를 수행하는 것이 바람직하다.

[0165] 바람직한 구현예에서, 본 발명은 하기 표 7 의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 서열을 포함하는 단리된 폴리뉴클레오티드에 관한 것이다. 바람직한 구현예에서, 본 발명은 하기 표 6 에 제시된 서열을 포함하는 단리된 폴리뉴클레오티드에 관한 것이다. 본 발명은 추가로 하기 표 6 에 제시된 뉴클레오티드 서열과 80% 이상, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 일치하는 서열을 포함하는 단리된 핵산에 관한 것이다. 또다른 구현예에서, 본 발명은 하기 표 7 의 아미노산 서열과 80% 이상, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 일치하는 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 서열을 포함하는 단리된 핵산에 관한 것이다. 또한 본 발명은 보존성 아미노산 치환을 갖는 하기 표 7 의 임의의 구축물의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 서열을 포함하는 단리된 핵산을 포함한다.

[0166] 표 6

구축물	뉴클레오타이드 서열	SEQ ID NO
ICR62 VH	CAGGTCAACCTACTGCAGTCTGGGGCTGCACTGGT GAAGCCTGGGGCCTCTGTGAAGTTGTCTTGCAAAAG GTTCTGGTTTTACATTCAGTACTACAAGATACAC TGGGTGAAGCAGAGTCATGGAAAGAGCCTTGAGT GGATTGGGTATTTTAATCCTAACAGTGGTTATAGT ACCTACAATGAAAAGTTCAAGAGCAAGGCCACAT TGAAGTGCAGACAAATCCACCGATACAGCCTATATG GAGCTTACCAGTCTGACATCTGAGGACTCTGCAAC CTATTACTGTACAAGACTATCCCCAGGGGGTACT ATGTTATGGATGCCTGGGGTCAAGGAGCTTCAGTC ACTGTCCTCTC	2
I-HHA	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGA AGAAGCCTGGGTCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAG GCTTCTGGATTTACATTCAGTACTACGCCATCAG CTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTCGAG TGGATGGGAGGGATCAATCCTAACAGTGGTTATAG TACCTACGCACAGAAGTTCCAGGGCAGGGTCACC ATTACCGCGACAAAATCCACGAGCACAGCCTACAT GGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCC GTGTATTACTGTGCGAGACTATCCCCAGGCGGTTA CTATGTTATGGATGCCTGGGGCCAAGGGACCACCG TGACCGTCTCCTCA	4

[0167]

구축물	뉴클레오타이드 서열	SEQ ID NO
I-HHB	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGA AGAAGCCTGGGTCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAG GGTTCTGGTTTTACATTCAGTACTACAAGATACA CTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTCGAG TGGATGGGATATTTCAACCCTAACAGCGGTTATAG TACCTACGCACAGAAGTTCCAGGGCAGGGTCACC ATTACCGCGACAAAATCCACGAGCACAGCCTACAT GGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCC GTGTATTACTGTGCGAGACTATCCCCAGGCGGTTA CTATGTTATGGATGCCTGGGGCCAAGGGACCACCG TGACCGTCTCCTCA	6
I-HHC	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGA AGAAGCCTGGGTCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAG GGTTCTGGTTTTACATTCAGTACTACAAGATACA CTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTCGAG TGGATGGGATATTTCAACCCTAACAGCGGTTATAG TACCTACAATGAAAAGTTCAAGAGCAGGGTCACC ATTACCGCGACAAAATCCACGAGCACAGCCTACAT GGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCC GTGTATTACTGTGCGAGACTATCCCCAGGCGGTTA CTATGTTATGGATGCCTGGGGCCAAGGGACCACCG TGACCGTCTCCTCA	8
I-HLA	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGA AGAAGCCTGGGGCCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAA GGCCTCTGGTTTTACATTCAGTACTACTATATGCA CTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTCGAG TGGATGGGCTGGATCAATCCTAACAGTGGTTATAG TACCTACGCACAGAAGTTTCCAGGGCAGGGTCACCA TGACCGCCGACACGTCCATCAGCACAGCCTACATG GAGCTGAGCAGGCTGAGATCTGACGACACGGCCG TGTATTACTGTGCGAGACTATCCCCAGGCGGTTAC TATGTTATGGATGCCTGGGGCCAAGGGACCACCGT GACCGTCTCCTCA	10
I-HLB	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGA AGAAGCCTGGAGCCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAA GGGTCTGGTTTTACATTCAGTACTACAAGATCC ACTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTCGA GTGGATGGGATACTTCAACCCTAACAGCGGTTATA GTACCTACGCACAGAAGTTCCAGGGCAGGGTCAC CATGACCGCCGACACGTCCATCAGCACAGCCTACA TGGAGCTGAGCAGGCTGAGATCTGACGACACGGC CGTGTATTACTGTGCGAGACTATCCCCAGGCGGTT ACTATGTTATGGATGCCTGGGGCCAAGGGACCACCG TGACCGTCTCCTCA	12

[0168]

구축물	뉴클레오타이드 서열	SEQ ID NO
I-HLC	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGA AGAAGCCTGGAGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAA GGGTCTGGTTTACATTCACTGACTACAAGATCC ACTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTCGA GTGGATGGGATACTTCAACCCTAACAGCGGTTACA GTACTTACAACGAGAAGTTCAAGAGCCGGGTAC CATGACCGCCGACACGTCCATCAGCACAGCCTACA TGGAGCTGAGCAGGCTGAGATCTGACGACACGGC CGTGATTACTGTGCGAGACTATCCCCAGGGGGTT ACTATGTTATGGATGCCTGGGGCCAAGGGACCACC GTGACCGTCTCCTCA	14
I-HHD	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGA AGAAGCCTGGGTCTCCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAG GCCTCTGGTTTACATTCACTGACTACAAGATACA CTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTCGAG TGGATGGGATATTTCAACCCTAACAGCGGTTATAG TACCTACGCACAGAAGTCCAGGGCAGGGTCACC ATTACCGCGGACAAATCCACGAGCACAGCCTACAT GGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCC GTGTATTACTGTGCGAGACTATCCCCAGGCGGTTA CTATGTTATGGATGCCTGGGGCCAAGGGACCACCG TGACCGTCTCCTCA	16
I-HHE	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGA AGAAGCCTGGGTCTCCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAG GGTTCTGGTTTACATTCACTGACTACAAGATATC CTGGGTGCGACAGGCTCCTGGACAAGGGCTCGAG TGGATGGGATATTTCAACCCTAACAGCGGTTATAG TACCTACGCACAGAAGTCCAGGGCAGGGTCACC ATTACCGCGGACAAATCCACGAGCACAGCCTACAT GGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCC GTGTATTACTGTGCGAGACTATCCCCAGGCGGTTA CTATGTTATGGATGCCTGGGGCCAAGGGACCACCG TGACCGTCTCCTCA	18
I-HHF	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGA AGAAGCCTGGGTCTCCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAG GGTTCTGGTTTACATTCACTGACTACAAGATACA CTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTCGAG TGGATGGGATATTTCAACCCTAACAGCGGTTATTC GAACTACGCACAGAAGTCCAGGGCAGGGTCACC ATTACCGCGGACAAATCCACGAGCACAGCCTACAT GGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCC GTGTATTACTGTGCGAGACTATCCCCAGGCGGTTA CTATGTTATGGATGCCTGGGGCCAAGGGACCACCG TGACCGTCTCCTCA	20

[0169]

구축물	뉴클레오타이드 서열	SEQ ID NO
I-HHG	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGA AGAAGCCTGGGTCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAA GGTCTGGTTTTACATTCACTGACTACAAGATACA CTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTCGAG TGGATGGGATATTTCAACCTAACAGCGTTATGC CACGTACGCACAGAAGTTCCAGGGCAGGGTCACC ATTACCGCGACAAATCCACGAGCACAGCCTACAT GGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCC GTGTATTACTGTGCGAGACTATCCCCAGGCGGTTA CTATGTTATGGATGCCTGGGGCCAAGGGACCACCG TGACCGTCTCCTCA	22
I-HLA1	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGA AGAAGCCTGGAGCCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAA GGCCTCTGGTTTTACATTCACTGACTACTATATGCA CTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTCGAG TGGATGGGCTGGATCAATCCTAACAGTGTTATAG TACCTACAGCCCAAGCTTCCAAGGCCAGGTCACCA TCTCAGCCGACAAGTCCATCAGCACCGCCTACCTG CAGTGGAGCAGCCTGAAGGCCTCGGACACCGCCA TGTATTACTGTGCGAGACTATCCCCAGGCGGTTAC TATGTTATGGATGCCTGGGGCCAAGGGACCACCGT GACCGTCTCCTCA	24
I-HLA2	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGA AGAAGCCTGGAGCCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAA GGCCTCTGGTTTTACATTCACTGACTACTATATGCA CTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTCGAG TGGATGGGCTGGATCAATCCTAACAGTGTTATAG TACCTACAACGAGAAGTTCCAAGGCCAGGTCACC ATCTCAGCCGACAAGTCCATCAGCACCGCCTACCT GCAGTGGAGCAGCCTGAAGGCCTCGGACACCGCC ATGTATTACTGTGCGAGACTATCCCCAGGCGGTTA CTATGTTATGGATGCCTGGGGCCAAGGGACCACCG TGACCGTCTCCTCA	26
I-HLA3	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGA AGAAGCCTGGAGCCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAA GGCCTCTGGTTACACATTCACTGACTACTATATGC ACTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTCGA GTGGATGGGCTGGATCAATCCTAACAGTGTTATA GTACCTACAGCCCAAGCTTCCAAGGCCAGGTCACC ATCTCAGCCGACAAGTCCATCAGCACCGCCTACCT GCAGTGGAGCAGCCTGAAGGCCTCGGACACCGCC ATGTATTACTGTGCGAGACTATCCCCAGGCGGTTA CTATGTTATGGATGCCTGGGGCCAAGGGACCACCG TGACCGTCTCCTCA	28

[0170]

구축물	뉴클레오타이드 서열	SEQ ID NO
I-HLA4	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGA AGAAGCCTGGAGCCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAA GGCCTCTGGTTACACATTCAGTACTACTATATGC ACTGGGTGCGACAGGCCCCCTGGACAAGGGCTCGA GTGGATGGGCTGGATCAATCCTAACAGTGGTTATA GTACCTACAACGAGAAGTTCCAAGGCCAGGTCAC CATCTCAGCCGACAAGTCCATCAGCACCGCCTACC TGCAGTGGAGCAGCCTGAAGGCCTCGGACACCGC CATGTATTACTGTGCGAGACTATCCCCAGGCGGTT ACTATGTTATGGATGCCTGGGGCCAAGGGACCACC GTGACCGTCTCCTCA	30
I-HLA5	CAGATGCAGCTGGTGCAGTCTGGGCCAGAGGTGA AGAAGCCTGGAACTCGGTGAAGGTCTCCTGCAA GGCCTCTGGTTTACATTCACTGACTACTATATGCA CTGGGTGCGACAGGCCCCCTGGACAAGGGCTCGAG TGGATGGGCTGGATCAATCCTAACAGTGGTTATAG TACCTACAGCCCAAGCTTCCAAGGCCAGGTCACCA TCTCAGCCGACAAGTCCATCAGCACCGCCTACCTG CAGTGGAGCAGCCTGAAGGCCTCGGACACCGCCA TGTATTACTGTGCGAGACTATCCCCAGGCGGTTAC TATGTTATGGATGCCTGGGGCCAAGGGACCACCGT GACCGTCTCCTCA	32
I-HLA6	CAGATGCAGCTGGTGCAGTCTGGGCCAGAGGTGA AGAAGCCTGGAACTCGGTGAAGGTCTCCTGCAA GGCCTCTGGTTTACATTCACTGACTACTATATGCA CTGGGTGCGACAGGCCCCCTGGACAAGGGCTCGAG TGGATGGGCTGGATCAATCCTAACAGTGGTTATAG TACCTACAACGAGAAGTTCCAAGGCCAGGTCACC ATCTCAGCCGACAAGTCCATCAGCACCGCCTACCT GCAGTGGAGCAGCCTGAAGGCCTCGGACACCGCC ATGTATTACTGTGCGAGACTATCCCCAGGCGGTTA CTATGTTATGGATGCCTGGGGCCAAGGGACCACCG TGACCGTCTCCTCA	34
I-HLA7	CAGATGCAGCTGGTGCAGTCTGGGCCAGAGGTGA AGAAGCCTGGAACTCGGTGAAGGTCTCCTGCAA GGCCTCTGGTTTACATTCACTGACTACAAGATCC ACTGGGTGCGACAGGCCCCGCGGACAACGGCTCGA GTGGATCGGCTGGATCAATCCTAACAGTGGTTATA GTACCTACAACGAGAAGTTCCAAGGCCAGGTCAC CATCTCAGCCGACAAGTCCATCAGCACCGCCTACC TGCAGTGGAGCAGCCTGAAGGCCTCGGACACCGC CATGTATTACTGTGCGAGACTATCCCCAGGCGGTT ACTATGTTATGGATGCCTGGGGCCAAGGGACCACC GTGACCGTCTCCTCA	36

[0171]

구축물	뉴클레오타이드 서열	SEQ ID NO
I-HLA8	CAGATGCAGCTGGTGCAGTCTGGGCCAGAGGTGA AGAAGCCTGGAACCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAA GGCCTCTGGTTTACATTCAGTACTACAAGATCC ACTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTCGA GTGGATGGGATATTTCAACCCTAACAGCGTTATA GTACCTACGCACAGAAAGTTCCAGGGCAGGGTCAC CATTACCGCGACAAATCCACGAGCACAGCCTAC ATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGG CCGTGTATTACTGTGCGAGACTATCCCCAGGCGGT TACTATGTTATGGATGCCTGGGGCCAAGGGACCAC CGTGACCGTCTCCTCA	38
I-HLA9	GAGGTGCAGCTCGTGCAGTCTGGCGCTGAGGTGA AGAAGCCTGGCGAGTCTGTTGAAGATCTCCTGCAAG GGTTCTGGTTATTTCATTCAGTACTACAAGATCCA CTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTCGAG TGGATGGGATATTTCAACCCTAACAGCGTTATAG TACCTACGCACAGAAAGTTCCAGGGCAGGGTCACC ATTACCGCGACAAATCCACGAGCACAGCCTACAT GGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCC GTGTATTACTGTGCGAGACTATCCCCAGGCGGTTA CTATGTTATGGATGCCTGGGGCCAAGGGACCACCG TGACCGTCTCCTCA	40
I-HLA10	GAGGTGCAGCTCGTGCAGTCTGGCGCTGAGGTGA AGAAGCCTGGCGAGTCTGTTGAAGATCTCCTGCAAG GGTTCTGGTTATTTCATTCAGTACTACAAGATCCA CTGGGTGCGACAGATGCCTGGAAAGGGCTCGAG TGGATGGGCTACTTCAATCCTAACAGTGGTTATAG TACCTACAGCCCAAGCTTCCAAGGCCAGGTACCA TCTCAGCCGACAAGTCCATCAGCACCGCCTACCTG CAGTGGAGCAGCCTGAAGGCCTCGGACACCGCCA TGTATTACTGTGCGAGACTATCCCCAGGCGGTTAC TATGTTATGGATGCCTGGGGCCAAGGGACCACCGT GACCGTCTCCTCAG	120
VH 신호 서열	ATGGACTGGACCTGGAGGATCCTCTTCTTGGTGGC AGCAGCCACAGGAGCCCACTCC	42
ICR62 VL	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCTTCATTCCTGTCT GCATCTGTGGGAGACAGAGTCACTATCAACTGCAA AGCAAGTCAGAATATTAACAATTACTTAACTGGT ATCAGCAAAAGCTTGGAGAAGCTCCCAAACGCCT GATATATAATACAAACAATTTGCAAACAGGCATCC CATCAAGGTTCAAGTGGCAGTGGATCTGGTACAGAT TACACACTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGA TTTTGCCACATATTCTGCTTGCAGCATAATAGTTT TCCCACGTTTGGAGCTGGGACCAAGCTGGAAGTGA AACGTACG	44

[0172]

구축물	뉴클레오타이드 서열	SEQ ID NO
I-KC	GATATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCTGTCT TGCATCTGTGCGAGACCGGGTCAACATCACCTGCC GGGCAAGTCAGGGCATTAAACAATTACTTAAATTGG TACCAGCAGAAGCCAGGGAAAGCCCCTAAGCGCC TGATCTATAATACCAACAACCTGCAGACAGGCGTC CCATCAAGGTTCAAGCGCAGTGGATCCGGGACAG AATTCAGTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAA GATTTTGCCACCTATTACTGCTTGCAGCATAATAG TTTTCCACGTTTGGCCAGGGCACCAAGCTCGAGA TCAAGCGTACG	46
VL 신호 서열	ATGGACATGAGGGTCCCCGCTCAGCTCCTGGGCCT CCTGCTGCTCTGGTTCCCAAGGTGCCAGGTGT	48
I-KA	GATATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCTGTCT TGCATCTGTGCGAGACCGGGTCAACATCACCTGCC GGGCAAGTCAGGGCATTAAACAATTACTTAAATTGG TACCAGCAGAAGCCAGGGAAAGCCCCTAAGCGCC TGATCTATAATACCAACAACCTGCAGACAGGCGTC CCATCAAGGTTCAAGCGCAGTGGATCCGGGACAG AATACACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAA GATTTTGCCACCTATTACTGCTTGCAGCATAATAG TTTTCCACGTTTGGCCAGGGCACCAAGCTCGAGA TCAAGCGTACGGTG	50
I-KB	GATATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCTGTCT TGCATCTGTGCGAGACCGGGTCAACATCACCTGCA AAGCAAGTCAGAATATTAACAATTACTTAAACTGG TACCAGCAGAAGCCAGGGAAAGCCCCTAAGCGCC TGATCTATAATACCAACAACCTGCAGACAGGCGTC CCATCAAGGTTCAAGCGCAGTGGATCCGGGACAG AATACACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAA GATTTTGCCACCTATTACTGCTTGCAGCATAATAG TTTTCCACGTTTGGCCAGGGCACCAAGCTCGAGA TCAAGCGTACGGTG	52

[0173]

[0174] 표 7

구축물	아미노산 서열	SEQ ID NO
ICR62 VH	QVNLLQSGAALVKPGASVKLSCKGSGFTFTDYKIHVVK QSHGKSLEWIGYFNPNSGYSTYNEKFKSKATLTADKSTD TAYMELTSLSSEDSATYYCTRLSPGGYYVMDAWGQGA SVTVSS	1
I-HHA	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFTFTDYAISWVR QAPGQGLEWMGGINPNSGYSTYAQKFQGRVTITADKST STAYMELSSLRSEDTAVYYCARLSPGGYYVMDAWGQG TTVTVSS	3
I-HHB	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFTFTDYKIHVVR QAPGQGLEWMGYFNPNSGYSTYAQKFQGRVTITADKST STAYMELSSLRSEDTAVYYCARLSPGGYYVMDAWGQG TTVTVSS	5

[0175]

구축물	아미노산 서열	SEQ ID NO
I-HHC	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFTFTDYKIHVVR QAPGQGLEWMGYFNPNSGYSTYNEKFKSRVTITADKST STAYMELSSLRSEDTAVYYCARLSPGGYYVMDAWGQG TTVTVSS	7
I-HLA	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFTFTDYMHVVR ROAPGQGLEWMGWINPNSGYSTYAQKFQGRVTITADT SISTAYMELSRLSDDTAVYYCARLSPGGYYVMDAWGQ GTTVTVSS	9
I-HLB	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFTFTDYKIHVVR QAPGQGLEWMGYFNPNSGYSTYAQKFQGRVTITADTSI STAYMELSRLSDDTAVYYCARLSPGGYYVMDAWGQG TTVTVSS	11
I-HLC	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFTFTDYKIHVVR QAPGQGLEWMGYFNPNSGYSTYNEKFKSRVTITADTSI STAYMELSRLSDDTAVYYCARLSPGGYYVMDAWGQG TTVTVSS	13
I-HHD	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFTFTDYKIHVVR QAPGQGLEWMGYFNPNSGYSTYAQKFQGRVTITADKST STAYMELSSLRSEDTAVYYCARLSPGGYYVMDAWGQG TTVTVSS	15
I-HHE	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFTFTDYKISWVR QAPGQGLEWMGYFNPNSGYSTYAQKFQGRVTITADKST STAYMELSSLRSEDTAVYYCARLSPGGYYVMDAWGQG TTVTVSS	17
I-HHF	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFTFTDYKIHVVR QAPGQGLEWMGYFNPNSGYSTYAQKFQGRVTITADKST STAYMELSSLRSEDTAVYYCARLSPGGYYVMDAWGQG TTVTVSS	19
I-HHG	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFTFTDYKIHVVR QAPGQGLEWMGYFNPNSGYATYAQKFQGRVTITADKST STAYMELSSLRSEDTAVYYCARLSPGGYYVMDAWGQG TTVTVSS	21
I-HLA1	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFTFTDYMHVVR ROAPGQGLEWMGWINPNSGYSTYSPFQGVVTISADKSI STAYLQWSSLKASDTAMYYCARLSPGGYYVMDAWGQ GTTVTVSS	23
I-HLA2	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFTFTDYMHVVR RQAPGQGLEWMGWINPNSGYSTYNEKFQGVVTISADKS ISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARLSPGGYYVMDAWGQ GTTVTVSS	25
I-HLA3	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYFTDYMHVVR RQAPGQGLEWMGWINPNSGYSTYSPFQGVVTISADKSI STAYLQWSSLKASDTAMYYCARLSPGGYYVMDAWGQ GTTVTVSS	27
I-HLA4	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYFTDYMHVVR RQAPGQGLEWMGWINPNSGYSTYNEKFQGVVTISADKS ISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARLSPGGYYVMDAWGQ GTTVTVSS	29

[0176]

구축물	아미노산 서열	SEQ ID NO
I-HLA5	QMQLVQSGPEVKKPGTSVKVSCASGFTFTDYYMHVW ROAPGQGLEWMGWNPNSGYSTYSPSFQGOVTISADKSI STAYLOWSSLKASDTAMYYCARLSPGGYYVMDAWGO GTTTVTVSS	31
I-HLA6	QMQLVQSGPEVKKPGTSVKVSCASGFTFTDYYMHVW ROAPGQGLEWMGWNPNSGYSTYNEKFQGOVTISADKS ISTAYLOWSSLKASDTAMYYCARLSPGGYYVMDAWGO GTTTVTVSS	33
I-HLA7	QMQLVQSGPEVKKPGTSVKVSCASGFTFTDYKIHVV QARGQRLEWIGWINPNSGYSTYNEKFQGOVTISADKS TAYLQWSSLKASDTAMYYCARLSPGGYYVMDAWGQG TTTVTVSS	35
I-HLA8	QMQLVQSGPEVKKPGTSVKVSCASGFTFTDYKIHVV QAPGQGLEWMGYFNPNSGYSTYAQKFQGRVTITADKST STAYMELSSLRSEDATVYYCARLSPGGYYVMDAWGQG TTTVTVSS	37
I-HLA9	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTDYKIHVV APGQGLEWMGYFNPNSGYSTYAQKFQGRVTITADKSTS TAYMELSSLRSEDATVYYCARLSPGGYYVMDAWGOGT TTTVTVSS	39
I-HLA10	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTDYKIHVV MPGKGLEWMGYFNPNSGYSTYSPSFQGOVTISADKS ISTAYLOWSSLKASDTAMYYCARLSPGGYYVMDAWGOGT TTTVTVSS	121
VH Signal Sequence	MDWTWRILFLVAAATGAHS	41
ICR62 VL	DIQMTQSPSFLSASVGDRTINCKASONINNYLNWYQQK LGEAPKRLIYNTNNTLTGTPSRFSGSGSDYTLTISSLQ PEDIATYFCLOHNSFPTFGAGTKLEIKRT	43
I-KC	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGINNYLNWYQQK PGKAPKRLIYNTNNTLTGTPSRFSGSGSGTEFTLTISLQ PEDIATYCYCLQHNSFPTFGQGTKEIKRT	45
VL Signal Sequence	MDMRVPAQLLGLLLWFPGARC	47
I-KA	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGINNYLNWYQQK PGKAPKRLIYNTNNTLTGTPSRFSGSGSGTEYTLTISSLQ PEDIATYCYCLQHNSFPTFGQGTKEIKRTV	49
I-KB	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQINNYLNWYQQK PGKAPKRLIYNTNNTLTGTPSRFSGSGSGTEYTLTISSLQ PEDIATYCYCLQHNSFPTFGQGTKEIKRTV	51

[0177]

[0178]

또다른 구현예에서, 본 발명은 본 발명의 하나 이상의 단리된 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터 및/또는 숙주 세포에 관한 것이다.

[0179]

일반적으로, 임의의 유형의 배양된 세포주는 본 발명의 ABM 을 발현하기 위해 사용될 수 있다. 바람직한 구현예에서, HEK293-EBNA 세포, CHO 세포, BHK 세포, NS0 세포, SP2/0 세포, YO 골수종 세포, P3X63 마우스 골수종 세포, PER 세포, PER.C6 세포 또는 하이브리도마 세포, 기타 포유류 세포, 효모 세포, 곤충 세포 또는 식물 세포가 본 발명의 유전공학설계된 숙주 세포를 생성하기 위한 배경 세포주로서 사용된다.

[0180]

본 발명의 ABM 의 치료적 효과는 GnTIII 활성을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 추가로 발현하는 숙주 세포에서의 이들의 제조에 의해 향상될 수 있다. 바람직한 구현예에서, GnTIII 활성을 갖는 폴리펩티드는 골지 체류 폴리펩티드의 골지 위치화 도메인을 포함하는 융합 폴리펩티드이다. 또다른 바람직한 구현예에서, GnTIII 활성을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 발현하는 숙주 세포에서의 본 발명의 ABM 의 발현은 증가된 Fc 수용체 결합 친화성 및 증가된 효과기 작용을 갖는 ABM 을 야기한다. 따라서, 하나의 구현예에서, 본 발명은 하기를 포함하는 숙주 세포에 관한 것이다 (a) GnTIII 활성을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 서열을 포함하는 단리된 핵산; 및 (b) 인간 EGFR 에 결합하는 키메라성, 영장화 또는 인간화 항체와 같은 본 발명의 ABM 을 코딩하는 단리된 폴리뉴클레오티드. 바람직한 구현예에서, GnTIII 활성을 갖는 폴리펩티드는 GnTIII 의 촉매성 도메인을 포함하는 융합 폴리펩티드이고, 골지 위치화 도메인은 만노시다아제 II 의 위치화 도메인이다. 이러한 융합 폴리펩티드의 제조 및 증가된 효과기 작용을 갖는 항체의 제조에서의 이의 사용 방법은 각각의 전체 내용이 본원에 명백히 인용된 미국 특허 가출원 번호 제 60/495,142 호 및 미국 특허 출원 공개 번호 제 2004/0241817 A1 호에 기재되어 있다. 또다른 바람직한 구현예에서, 키메라성 ABM 은 래트 ICR62 항체의 결합 특이성을 가진 키메라성 항체 또는 그의 분절이다. 특히 바람직한 구현예에서, 키메라성 항체는 인간 Fc 를 포함한다. 또다른 바람직한 구현예에서, 항체는 영장화 또는 인간화된다.

[0181]

하나의 구현예에서, 본 발명의 ABM 을 코딩하는 하나 또는 수 개의 폴리뉴클레오티드는 구성적 프로모터, 또는 교대로, 조절된 발현 시스템의 제어 하에 발현될 수 있다. 적합한 조절된 발현 시스템에는 테트라사이클린-조절된 발현 시스템, 엑시존-유도성 발현 시스템, lac-스위치 발현 시스템, 글루코코르티코이드-유도성 발현 시스템, 온도-유도성 프로모터 시스템, 및 메탈로티오네인 금속-유도성 발현 시스템이 포함되나 이에 제한되지 않

는다. 본 발명의 ABM 을 코딩하는 여러 상이한 핵산이 숙주 세포 시스템 내에 포함되는 경우, 이들 중 일부는 구성적 프로모터의 제어 하에 발현될 수 있는 반면, 나머지는 조절된 프로모터의 제어 하에 발현된다. 최대 발현 수준은 세포 성장물에 뚜렷한 역효과를 갖지 않는 안정한 폴리펩티드 발현의 최고 가능한 수준으로 고려되며, 정규 실험을 사용하여 측정할 것이다. 발현 수준은 ABM 에 특이적인 항체 또는 ABM 에 융합된 펩티드 태그에 특이적인 항체를 사용하는 웨스턴 블롯 분석; 및 노던 (Northern) 블롯 분석을 포함하는, 당업계에 일반적으로 공지된 방법에 의해 측정된다. 추가 대안으로, 폴리뉴클레오티드는 리포터 유전자에 작동가능하게 연결될 수 있고; 래트 ICR62 항체의 실질적으로 동일한 결합 특이성을 갖는 키메라성 (예, 인간화) ABM 의 발현 수준은 리포터 유전자의 발현 수준과 관련된 신호를 측정하여 측정된다. 리포터 유전자는 단일 mRNA 분자로서 상기 융합 폴리펩티드를 코딩하는 핵산(들) 과 함께 전사될 수 있고; 각각의 코딩 서열은 내부 리보솜 진입 부위 (IRES) 또는 cap-독립적 번역 증강자 (CITE) 에 의해 연결될 수 있다. 리포터 유전자는 래트 ICR62 항체의 실질적으로 동일한 결합 특이성을 갖는 키메라성 (예, 인간화) ABM 을 코딩하는 하나 이상의 핵산과 함께 단일 폴리펩티드 사슬이 형성되는 식으로 번역될 수 있다. 본 발명의 ABM 을 코딩하는 핵산은 단일 프로모터의 제어 하에 리포터 유전자에 작동가능하게 연결될 수 있고, 융합 폴리펩티드 및 리포터 유전자를 코딩하는 핵산은 대안적으로는 2 개의 별도의 메신저 RNA (mRNA) 분자로 스플라이싱되는 RNA 분자로 전사되고; 수득 mRNA 중 하나는 상기 리포터 단백질로 번역되고, 나머지는 상기 융합 폴리펩티드로 번역된다.

[0182] 당업자에게 잘 공지된 방법은 래트 ICR62 항체의 실질적으로 동일한 결합 특이성을 갖는 ABM 코딩 서열을 함유하는 구축물 발현 벡터에, 적합한 전사/번역 제어 신호와 함께 사용할 수 있다. 상기 방법에는 시험관내 재조합 DNA 기술, 합성 기술 및 생체내 재조합/유전자 재조합이 포함된다. 예를 들어, [Maniatis et al, Molecular Cloning A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, N. Y. (1989)] 및 [Ausubel 등, Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y (1989)] 에 기재된 기술을 참조한다.

[0183] 다양한 숙주-발현 벡터 시스템은 본 발명의 ABM 의 코딩 서열을 발현하기 위해 사용될 수 있다. 바람직하게는, 포유류 세포는 관심 단백질의 코딩 서열 및 융합 폴리펩티드의 코딩 서열을 함유하는 재조합 플라스미드 DNA 또는 코스미드 DNA 발현 벡터로 트랜스펙션된 숙주 세포 시스템으로서 사용된다. 가장 바람직하게는, HEK293-EBNA 세포, CHO 세포, BHK 세포, NS0 세포, SP2/0 세포, YO 골수종 세포, P3X63 마우스 골수종 세포, PER 세포, PER.C6 세포 또는 하이브리도마 세포, 기타 포유류 세포, 효모 세포, 곤충 세포, 또는 식물 세포가 숙주 세포 시스템으로서 사용된다. 발현 시스템 및 선별 방법의 일부 예는 하기 참조, 및 그 안의 참조에 기재되어 있다: Borth 등, Biotechnol. Bioeng. 71(4):266-73 (2000-2001), Werner 등, Arzneimittelforschung/Drug Res. 48(8):870-80 (1998), Andersen and Krummen, Curr. Op. Biotechnol. 13:117-123 (2002), Chadd and Chamow, Curr. Op. Biotechnol. 12:188-194 (2001), 및 Giddings, Curr. Op. Biotechnol. 12: 450-454 (2001). 대안적인 구현예에서, 기타 진핵 숙주 세포 시스템이, 본 발명의 ABM 의 코딩 서열을 함유하는 재조합 효모 발현 벡터로 형질전환된 효모 세포, 예컨대 미국 특허 출원 번호 제 60/344,169 호 및 WO 03/056914 (비-인간 진핵 숙주 세포에서의 인간-유사 당단백질의 제조 방법) (각각의 내용이 전체가 참조로서 인용됨) 에서 교시된 발현 시스템; 래트 ICR62 항체의 실질적으로 동일한 결합 특이성을 갖는 키메라성 ABM 의 코딩 서열을 함유하는 재조합 바이러스 발현 벡터 (예, 베클로바이러스) 로 감염된 곤충 세포 시스템; 미국 특허 번호 제 6,815,184 호 (유전적으로 유전공학설계된 개구리밥으로부터의 생물학적으로 활성인 폴리펩티드의 발현 및 분비 방법); WO 2004/057002 (글리코실 트랜스페라아제 유전자의 도입에 의한 선택적 식물 세포에서의 글리코실화 단백질의 제조) 및 WO 2004/024927 (이끼 원생동물에서의 세포외 이중 비-식물 단백질의 발생 방법); 및 미국 특허 출원 번호 제 60/365,769 호, 제 60/368,047 호, 및 WO 2003/078614 (작용화 포유류 GnTIII 효소를 포함하는 트랜스제닉 식물에서의 당단백질 처리) (각각의 내용이 전체가 참조로서 본원에 인용됨) 에 교시된 발현 시스템이 포함되나 이에 제한되지 않는, 재조합 바이러스 발현 벡터 (예, 양배추 모자이크 바이러스, CaMV; 담배 모자이크 바이러스, TMV) 로 감염된 또는 본 발명의 ABM 의 코딩 서열을 함유하는 재조합 플라스미드 발현 벡터 (예, Ti 플라스미드) 로 형질전환된 식물 세포 시스템; 또는 이중-미소 (double-minute) 염색체 (예, 쥐과 세포주) 에서 안정적으로 증폭된 (CHO/dhfr) 또는 불안정적으로 증폭된 래트 ICR62 항체의 실질적으로 동일한 결합 특이성을 갖는 키메라성 ABM 을 코딩하는 DNA 의 다중 복사본을 함유하도록 유전공학설계된 세포주를 포함하는 재조합 바이러스 발현 벡터 (예, 아데노바이러스, 백시니아 바이러스) 로 감염된 동물 세포 시스템을 포함하여, 사용될 수 있다. 하나의 구현예에서, 본 발명의 ABM 을 코딩하는 폴리뉴클레오티드(들) 을 포함하는 벡터는 폴리시스트론성이다. 또한, 하나의 구현예에서, 상기 논의된 ABM 은 항체 또는 그의 분절이다. 바람직한 구현예에서, ABM 은 인간화 항체이다.

[0184] 본 발명의 방법에 대해, 안정한 발현이 일시적 발현보다 일반적으로 바람직하며, 이것은 전형적으로는 더욱 번

식가능한 결과를 달성하고, 또한 더욱 대량 제조를 할 수 있기 때문이다. 바이러스 복제 기원을 함유하는 발현 벡터를 사용하는 것보다, 숙주 세포는 적합한 발현 제어 요소 (예, 프로모터, 증강자, 서열, 전사 종결자, 폴리아데닐화 부위 등), 및 선별가능 마커에 의해 제어되는 각각의 코딩 핵산으로 형질전환될 수 있다. 외부 DNA 의 도입 후, 유전공학설계된 세포를 풍부한 배지에서 1 내지 2 일 동안 성장시킨 다음, 선별 배지로 바꿀 수 있다. 재조합 플라스미드 중의 선별가능 마커는 선별에 대한 내성을 부여하고, 그의 염색체 내로 플라스미드가 안정하게 통합되고, 성장하여 그 다음 세포주 내에서 클론화되고 팽창될 수 있는 병변 (foci) 을 형성하는 세포의 선별을 가능하게 한다.

[0185] 다수의 선별 시스템은 헤르페스 심플렉스 바이러스 타이미딘 키나아제 (Wigler 등, Cell 11:223 (1977)), 하이포크산틴-구아닌 포스포리보실트랜스페라아제 (Szybalska & Szybalski, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48:2026 (1962)), 및 아데닌 포스포리보실트랜스페라아제 (Lowy 등, Cell 22:817 (1980)) 유전자 (이것은 tk-, hgprrt- 또는 aprt- 세포, 각각에 사용될 수 있음) 를 포함하나 이에 제한되지 않고 사용될 수 있다. 또한, 항대사물질 내성은, 메토타렉세이트에 대한 내성을 부여하는 dhfr (Wigler 등, Natl. Acad. Sci. USA 77:3567 (1989); O'Hare 등, Proc. Natl Acad. Sci. USA 78:1527 (1981)); 마이코페놀산에 대한 내성을 부여하는 gpt (Mulligan & Berg, Proc. Natl Acad. Sci. USA 78:2072 (1981)); 아미노글리코시드 G-418 에 대한 내성을 부여하는 neo (Colberre-Garapin 등, J. Mol Biol. 150:1 (1981)); 및 하이그로마이신에 대한 내성을 부여하는 hygro (Santerre 등, Gene 30: 147 (1984) 유전자에 대한 선별 근거로서 사용될 수 있다. 최근, 부가적인 선별가능 유전자가 기재되어 있는데, 즉, 세포가 트립토판 대신에 인돌을 사용하도록 허용하는 trpB; 세포가 히스티딘 대신에 히스티놀을 사용하도록 허용하는 hisD (Hartman & Mulligan, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:8047 (1988)); 글루타민 신타아제 시스템; 및 오르니틴 데카르복실라아제 억제제, 2-(디플루오로메틸)-DL-오르니틴, DFMO 에 대한 내성을 부여하는 ODC (오르니틴 데카르복실라아제) (McConlogue, Current Communications in Molecular Biology, Cold Spring Harbor Laboratory ed. (1987)) 가 있다.

[0186] 본 발명은 추가로 숙주 세포에서 본 발명의 ABM 을 코딩하는 핵산 및 GnTIII 활성을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 핵산, 또는 이러한 핵산을 포함하는 벡터를 발현시키는 것을 포함하는, 상기 숙주 세포에 의해 제조된 본 발명의 ABM 의 글리코실화 프로파일의 개질 방법에 관한 것이다. 바람직하게는, 개질된 폴리펩티드는 Fc 영역을 포함하는 IgG 또는 그의 분절이다. 특히 바람직한 구현예에서, ABM 은 인간화 항체 또는 그의 분절이다.

[0187] 본 발명의 숙주 세포에 의해 제조된 개질된 ABM 은 개질의 결과로서 증가된 Fc 수용체 결합 친화성 및/또는 증가된 효과기 작용을 나타낸다. 특히 바람직한 구현예에서, ABM 은 Fc 영역을 함유하는 인간화 항체 또는 그의 분절이다. 바람직하게는, 증가된 Fc 수용체 결합 친화성은 Fc γ 활성화 수용체, 예컨대 Fc γ RIIIa 수용체에 대한 증가된 결합이다. 증가된 효과기 작용은 바람직하게는 하기의 하나 이상에서의 증가이다: 증가된 항체-의존적 세포성 세포독성, 증가된 항체-의존적 세포성 포식작용 (ADCP), 증가된 사이토카인 분비, 항원-제시 세포에 의한 증가된 면역-복합체-매개된 항원 섭취, 증가된 Fc-매개된 세포성 세포독성, NK 세포에 대한 증가된 결합, 대식세포에 대한 증가된 결합, 다핵형 세포 (PMN) 에 대한 증가된 결합, 단핵구에 대한 증가된 결합, 표적-결합된 항체의 증가된 가교, 세포자멸사를 포함하는 증가된 직접 신호, 증가된 수지상 세포 성숙, 및 증가된 T 세포 초회감작.

[0188] 또한 본 발명은 하기를 포함하는, 숙주 세포에서의 개질된 올리고당을 갖는 본 발명의 ABM 의 제조 방법에 관한 것이다: (a) GnTIII 활성을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 하나 이상의 핵산을 발현하도록 유전공학설계된 숙주 세포를, 본 발명에 따른 ABM 의 제조를 허용하는 조건 하에서 배양함 (여기서 상기 GnTIII 활성을 갖는 폴리펩티드는 상기 숙주 세포에 의해 제조된 상기 ABM 의 Fc 영역에서 올리고당을 개질시키기에 충분한 양으로 발현됨); 및 (b) 상기 ABM 을 회수함. 바람직한 구현예에서, GnTIII 활성을 갖는 폴리펩티드는 GnTIII 의 촉매성 도메인을 포함하는 융합 폴리펩티드이다. 특히 바람직한 구현예에서, 융합 폴리펩티드는 추가로 골지 체류 폴리펩티드의 골지 위치화 도메인을 포함한다.

[0189] 바람직하게는, 골지 위치화 도메인은 만노시다아제 II 또는 GnTI 의 위치화 도메인이다. 대안적으로는, 골지 위치화 도메인은 만노시다아제 I 의 위치화 도메인, GnTII 의 위치화 도메인, 및 α 1-6 코어 푸코실트랜스페라아제의 위치화 도메인으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 본 발명의 방법에 의해 제조된 ABM 은 증가된 Fc 수용체 결합 친화성 및/또는 증가된 효과기 작용을 갖는다. 바람직하게는, 증가된 효과기 작용은 하기의 하나 이상이다: 증가된 Fc-매개된 세포성 세포독성 (증가된 항체-의존적 세포성 세포독성 포함), 증가된 항체-의존적 세포성 포식작용 (ADCP), 증가된 사이토카인 분비, 항원-제시 세포에 의한 증가된 면역-복합체-매개된 항원 섭취, NK 세포에 대한 증가된 결합, 대식세포에 대한 증가된 결합, 단핵구에 대한 증가된 결합, 다핵형 세포에 대한 증가된 결합, 세포자멸사를 포함하는 증가된 직접 신호, 표적-결합된 항체의 증가된 가교, 증가된 수

지상 세포 성숙, 또는 증가된 T 세포 초회감작. 증가된 Fc 수용체 결합 친화성은 바람직하게는 Fc 활성화 수용체, 예컨대 FcγRIIIa 에 대한 증가된 결합이다. 특히 바람직한 구현예에서, ABM 은 인간화 항체 또는 그의 분절이다.

[0190] 또다른 구현예에서, 본 발명은 폴리펩티드의 Fc 영역에서 증가된 비율의 양분된 올리고당을 갖는 본 발명의 방법에 의해 제조된 래트 ICR62 항체의 실질적으로 동일한 결합 특이성을 갖는 키메라성 ABM 에 관한 것이다. ABM 이 항체 및 Fc 영역을 포함하는 그의 분절을 포함하는 것으로 포함된다. 바람직한 구현예에서, ABM 은 인간화 항체이다. 하나의 구현예에서, ABM 의 Fc 영역에서의 양분된 올리고당의 백분율은 총 올리고당의 50% 이상, 더욱 바람직하게는, 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 또는 90% 이상, 가장 바람직하게는 90 이상 내지 95% 이다. 또다른 구현예에서, 본 발명의 방법에 의해 제조된 ABM 은 본 발명의 방법에 의한 올리고당의 Fc 영역 개질의 결과로서 증가된 비율의 비푸코실화 올리고당을 갖는다. 하나의 구현예에서, 비푸코실화 올리고당의 백분율은 50% 이상, 바람직하게는, 60% 내지 70% 이상, 가장 바람직하게는 75% 이상이다. 비푸코실화 올리고당은 잡종 또는 복합체 유형의 것일 수 있다. 특히 바람직한 구현예에서, 숙주 세포 및 본 발명의 방법에 의해 제조된 ABM 은 Fc 영역에서 증가된 비율의 양분된, 비푸코실화 올리고당을 갖는다. 양분된, 비푸코실화 올리고당은 잡종 또는 복합체일 수 있다. 구체적으로, 본 발명의 방법은 ABM 의 Fc 영역에서의 올리고당의 15% 이상, 더욱 바람직하게는 20% 이상, 더욱 바람직하게는 25% 이상, 더욱 바람직하게는 30% 이상, 더욱 바람직하게는 35% 이상이 양분된, 비푸코실화된 ABM 을 제조하기 위해 사용할 수 있다. 본 발명의 방법은 또한 폴리펩티드의 Fc 영역에서의 올리고당의 15% 이상, 더욱 바람직하게는 20% 이상, 더욱 바람직하게는 25% 이상, 더욱 바람직하게는 30% 이상, 더욱 바람직하게는 35% 이상이 양분된 잡종 비푸코실화된 폴리펩티드를 제조하기 위해 사용할 수 있다.

[0191] 또다른 구현예에서, 본 발명은 본 발명의 방법에 의해 제조된, 증가된 효과기 작용 및/또는 증가된 Fc 수용체 결합 친화성을 갖도록 유전공학설계된 래트 ICR62 항체의 실질적으로 동일한 결합 특이성을 갖는 키메라성 ABM 에 관한 것이다. 바람직하게는, 증가된 효과기 작용은 하기의 하나 이상이다: 증가된 Fc-매개된 세포성 세포독성 (증가된 항체-의존적 세포성 세포독성 포함), 증가된 항체-의존적 세포성 포식작용 (ADCP), 증가된 사이토카인 분비, 항원-제시 세포에 의한 증가된 면역-복합체-매개된 항원 섭취, NK 세포에 대한 증가된 결합, 대식 세포에 대한 증가된 결합, 단핵구에 대한 증가된 결합, 다핵형 세포에 대한 증가된 결합, 세포자멸사를 포함하는 증가된 직접 신호, 표적-결합된 항체의 증가된 가교, 증가된 수지상 세포 성숙, 또는 증가된 T 세포 초회감작. 바람직한 구현예에서, 증가된 Fc 수용체 결합 친화성은 Fc 활성화 수용체, 가장 바람직하게는 FcγRIIIa 에 대한 증가된 결합이다. 하나의 구현예에서, ABM 은 항체, Fc 영역을 함유하는 항체 분절, 또는 면역글로불린의 Fc 영역과 동등한 영역을 포함하는 융합 단백질이다. 특히 바람직한 구현예에서, ABM 은 인간화 항체이다.

[0192] 본 발명은 추가로 본 발명의 ABM 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 약학 조성물에 관한 것이다.

[0193] 본 발명은 추가로 암 치료 방법에서의 이러한 약학 조성물의 용도에 관한 것이다. 구체적으로, 본 발명은 치료적 유효량의 본 발명의 약학 조성물을 투여하는 것을 포함하는 암 치료 방법에 관한 것이다.

[0194] 본 발명은 추가로 증가된 Fc 수용체 결합 친화성, 바람직하게는 Fc 활성화 수용체에 대한 증가된 결합을 갖는/갖거나 항체-의존적 세포성 세포독성을 포함하여, 증가된 효과기 작용을 갖는 본 발명의 ABM 의 단백질형의 제조를 위한 숙주 세포 시스템의 생성 및 사용에 대한 방법을 제공한다. 본 발명의 ABM 을 사용할 수 있는 당조작 방법론은 각각의 전체 내용이 본원에 전체가 참조로서 인용된 미국 특허 번호 제 6,602,684 호, 미국 특허 출원 공개 번호 제 2004/0241817 A1 호, 미국 특허 출원 공개 번호 제 2003/0175884 A1 호, 미국 특허 가출원 번호 제 60/441,307 호 및 WO 2004/065540 에 더욱 상세히 기재되어 있다. 본 발명의 ABM 은 대안적으로는 미국 특허 출원 공개 번호 제 2003/0157108 호 (Genentech), 또는 EP 1 176 195 A1, WO 03/084570, WO 03/085119 및 미국 특허 출원 공개 번호 제 2003/0115614 호, 제 2004/093621 호, 제 2004/110282 호, 제 2004/110704 호, 제 2004/132140 호 (Kyowa) 에 기재된 기술에 따라 Fc 영역에서 감소된 푸코오스 잔기를 갖도록 당조작될 수 있다. 상기 문헌 각각의 내용은 본원에 전체가 참조로서 인용된다. 본 발명의 당조작된 ABM 은 또한 각각의 내용이 본원에 전체가 참조로서 인용된 미국 특허 출원 공개 번호 제 60/344,169 호 및 WO 03/056914 (GlycoFi, Inc.) 또는 WO 2004/057002 및 WO 2004/024927 (Greenovation) 에 교시된 바와 같이, 개질된 당단백질을 제조하는 발현 시스템에서 제조할 수 있다.

[0195] 변경된 글리코실화 패턴을 갖는 단백질의 제조를 위한 세포주의 생성

[0196] 본 발명은 개질된 글리코실화 패턴을 갖는 본 발명의 ABM 의 생성을 위한 숙주 세포 발현 시스템을 제공한다.

특히, 본 발명은 개선된 치료적 가치를 갖는 본 발명의 ABM 의 단백당형의 생성을 위한 숙주 세포 시스템을 제공한다. 그러므로, 본 발명은 GnTIII 활성을 갖는 폴리펩티드를 발현하도록 선별 또는 유전공학설계된 숙주 세포 발현 시스템을 제공한다. 하나의 구현예에서, GnTIII 활성을 갖는 폴리펩티드는 이중 골지 체류 폴리펩티드의 골지 위치화 도메인을 포함하는 융합 폴리펩티드이다. 구체적으로, 이러한 숙주 세포 발현 시스템은 구조적 또는 조절된 프로모터 시스템에 작동가능하게 연결된, GnTIII 을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 재조합 핵산 분자를 포함하도록 유전공학설계될 수 있다.

[0197] 하나의 구체적인 구현예에서, 본 발명은 GnTIII 활성을 가지고, 이중 골지 체류 폴리펩티드의 골지 위치화 도메인을 포함하는 융합 폴리펩티드를 코딩하는 하나 이상의 핵산을 발현하도록 유전공학설계된 숙주 세포를 제공한다. 하나의 양상에서, 숙주 세포는 GnTIII 활성을 가지고, 이중 골지 체류 폴리펩티드의 골지 위치화 도메인을 포함하는 융합 폴리펩티드를 코딩하는 하나 이상의 유전자를 포함하는 핵산 분자로 유전공학설계된다.

[0198] 일반적으로, 상기 논의된 세포주를 포함하여, 임의의 유형의 배양된 세포주는 본 발명의 숙주 세포주를 유전공학설계하기 위한 배경으로서 사용될 수 있다. 바람직한 구현예에서, HEK293-EBNA 세포, CHO 세포, BHK 세포, NS0 세포, SP2/0 세포, YO 골수종 세포, P3X63 마우스 골수종 세포, PER 세포, PER.C6 세포 또는 하이브리도마 세포, 기타 포유류 세포, 효모 세포, 곤충 세포, 또는 식물 세포가 본 발명의 유전공학설계된 숙주 세포를 발생시키기 위한 배경 세포주로서 사용된다.

[0199] 본 발명은 본원에 정의된 이중 골지 체류 폴리펩티드의 골지 위치화 도메인을 포함하는 융합 폴리펩티드를 포함하여, GnTIII 활성을 갖는 폴리펩티드를 발현하는 임의의 유전공학설계된 숙주 세포를 포함하는 것으로 고려된다.

[0200] GnTIII 활성을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 하나 또는 수 개의 핵산은 구성적 프로모터 또는 교대로, 조절된 발현 시스템의 제어 하에 발현될 수 있다. 이러한 시스템은 당업계에 잘 공지되고, 상기 논의된 시스템이 포함된다. 이중 골지 체류 폴리펩티드의 골지 위치화 도메인을 포함하는 융합 폴리펩티드를 코딩하는 여러 상이한 핵산이 숙주 세포 시스템 내에 포함되는 경우, 이들 중 일부는 구성적 프로모터의 제어 하에 발현될 수 있는 반면, 나머지는 조절된 프로모터의 제어 하에 발현된다. GnTIII 활성을 갖는 융합 폴리펩티드의 발현 수준은 일반적으로 웨스턴 블롯 분석, 노던 블롯 분석, 리포터 유전자 발현 분석 또는 GnTIII 활성의 측정을 포함하는, 당업계에 일반적으로 공지된 방법에 의해 측정된다. 대안적으로는, GnTIII 의 생합성 생성물에 결합하는 렉틴, 예를 들어, E₄-PHA 렉틴을 사용할 수 있다. 대안적으로는, GnTIII 활성을 가진 폴리펩티드를 코딩하는 핵산으로 유전공학설계된 세포에 의해 제조된 항체에 의해 매개된, 증가된 Fc 수용체 결합 또는 증가된 효과기 작용을 측정하는 작용적 검정법을 사용할 수 있다.

[0201] 개질된 글리코실화 패턴을 갖는 단백질을 발현하는 트랜스펙션체 또는 형질전환체의 확인

[0202] 래트 ICR62 항체의 실질적으로 동일한 결합 특이성을 갖는 키메라성 (예, 인간화) ABM 의 코딩 서열을 함유하고 생물학적으로 활성인 유전자 생성물을 발현하는 숙주 세포는 하기 4 가지 이상의 일반적 접근법에 의해 확인될 수 있다; (a) DNA-DNA 또는 DNA-RNA 혼성화; (b) "마커" 유전자 작용의 존재 또는 부재; (c) 숙주 세포에서 각각의 mRNA 전사의 발현에 의해 측정되는 전사 수준의 평가; 및 (d) 면역검정법에 의해 또는 그의 생물학적 활성에 의해 측정되는 유전자 생성물의 검출.

[0203] 제 1 접근법에서, 래트 ICR62 항체의 실질적으로 동일한 결합 특이성을 갖는 키메라성 (예, 인간화) ABM 의 코딩 서열 및 GnTIII 활성을 갖는 폴리펩티드의 코딩 서열의 존재는 각각의 코딩 서열과 상동인 뉴클레오타이드 서열, 각각, 또는 그의 부분 또는 유도체를 포함하는 탐침을 사용하는 DNA-DNA 또는 DNA-RNA 혼성화에 의해 검출될 수 있다.

[0204] 제 2 접근법에서, 재조합 발현 벡터/숙주 시스템은 특정 "마커" 유전자 작용 (예, 타이미딘 키나아제 활성, 항생제에 대한 내성, 메토타렉세이트에 대한 내성, 형질전환 표현형, 베쿨로바이러스에서의 폐색체 형성, 등) 의 존재 또는 부재에 근거해 확인 및 선별할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 ABM 의 코딩 서열, 또는 그의 분절, 및 GnTIII 활성을 갖는 폴리펩티드의 코딩 서열을 벡터의 마커 유전자 서열 내에 삽입하는 경우, 각각의 코딩 서열을 함유하는 재조합은 마커 유전자 작용의 부재에 의해 확인될 수 있다. 대안적으로는, 마커 유전자는 코딩 서열의 발현을 제어하기 위해 사용된 동일 또는 상이한 프로모터의 제어 하에 코딩 서열과 나란히 위치할 수 있다. 유도 또는 선별에 대한 응답으로 마커의 발현은 본 발명의 ABM 의 코딩 서열 및 GnTIII 활성을 갖는 폴리펩티드의 코딩 서열의 발현을 나타낸다.

[0205] 제 3 접근법에서, 본 발명의 ABM 의 코딩 영역, 또는 그의 분절, 및 GnTIII 활성을 갖는 폴리펩티드의 코딩 서

열에 대한 전사 활성을 혼성화 검정법에 의해 평가할 수 있다. 예를 들어, RNA 는 본 발명의 ABM 의 코딩 서열, 또는 그의 분절, 및 GntIII 활성을 갖는 폴리펩티드의 코딩 서열 또는 그의 특정 부분에 상동인 탐침을 사용하는 노던 블롯에 의해 단리 및 분석될 수 있다. 대안적으로는, 숙주 세포의 총 핵산을 이러한 탐침에 대한 혼성화를 위해 추출 및 검정할 수 있다.

[0206] 제 4 접근법에서, 단백질 생성물의 발현은 예를 들어 웨스턴 블롯, 면역검정법, 예컨대 방사면역-침전, 효소-연결된 면역검정법 등에 의해, 면역학적으로 평가될 수 있다. 발현 시스템의 성공의 궁극적인 시험에는, 그러나, 생물학적으로 활성인 유전자 생성물의 검출이 포함된다.

[0207] 항체-의존적 세포성 세포독성을 포함하는, 증가된 효과기 작용을 갖는 ABM 의 생성 및 용도

[0208] 바람직한 구현예에서, 본 발명은 래트 ICR62 항체의 실질적으로 동일한 결합 특이성을 갖고, 항체-의존적 세포성 세포독성을 포함하는 증가된 효과기 작용을 갖는 키메라성 (예, 인간화) ABM 의 단백질형을 제공한다. 항체의 글리코실화 조작은 이전에 기재되었다. 예를 들어 본원에 전체가 참조로서 인용된 미국 특허 번호 제 6,602,684 호를 참조한다.

[0209] 일부 유형의 암 치료용 비공액 단일클론 항체 (mAb) 에 대한 임상 시험은 최근 유망한 결과를 산출하였다 [Dillman, Cancer Biother. & Radiopharm. 12:223-25 (1997); Deo 등, Immunology Today 18:127 (1997)]. 키메라성, 비공액 IgG1 은 저등급 또는 소포성 B-세포 비-호지킨 림프종에 대해 승인된 반면 [Dillman, Cancer Biother. & Radiopharm. 12:223-25 (1997)], 다른 비공액 mAb, 고품 유방 종양을 표적하는 인간화 IgG1 은, 또한 3 상 임상 시험에서 유망한 결과를 보여주었다 [Deo 등, Immunology Today 18:127 (1997)]. 상기 2 가지 mAb 의 항원은 각각의 종양 세포에서 높게 발현되고, 항체는 시험관내 및 생체내 효과기 세포에 의한 강력한 종양 파괴를 매개한다. 반대로, 양호한 종양 특이성을 갖는 다수의 기타 비공액 mAb 는 임상적으로 유용한 충분한 잠재력의 효과기 작용을 촉발할 수 없다 [Frost 등, Cancer 80:317-33 (1997); Surfus 등, J. Immunother. 19:184-91 (1996)]. 상기 더 약한 mAb 중 일부에 대해, 부속 사이토카인 요법이 현재 시험되고 있다. 사이토카인의 첨가는 활성 및 순환하는 림프구의 수를 증가시켜 항체-의존적 세포성 세포독성 (ADCC) 을 자극할 수 있다 [Frost 등, Cancer 80:317-33 (1997); Surfus 등, J. Immunother. 19:184-91 (1996)]. 항체-표적된 세포에 대한 용해적 공격인 ADCC 는, 항체의 불변 영역 (Fc) 에 대한 백혈구 수용체의 결합을 촉발한다 [Deo 등, Immunology Today 18:121 (1997)].

[0210] 비공액 IgG1 의 ADCC 활성을 증가시키기 위한 상이한, 그러나 상보적인 접근은 항체의 Fc 영역을 유전공학설계하는 것이다. 단백질 유전공학설계 연구는 Fc γ R 가 IgG CH2 도메인의 경첩 영역과 더 적은 상호작용을 하는 것을 보여주었다 [Lund 등, J. Immunol. 157:4963-69 (1996)]. 그러나, Fc γ R 결합은 또한 CH2 영역의 보존된 Asn 297 에 공유 결합된 올리고당의 존재를 필요로 하며 [Lund 등, J. Immunol. 157:4963-69 (1996); Wright and Morrison, Trends Biotech. 15:26-31 (1997)], 이는 올리고당 및 폴리펩티드 둘 다 상호작용 부위에 직접적으로 기여하거나, 올리고당이 활성 CH2 폴리펩티드 형태를 유지하기 위해 필요하다는 것을 제안한다. 그러므로 올리고당 구조의 개질은 상호작용의 친화성을 증가시키기 위한 수단으로 탐구될 수 있다.

[0211] IgG 분자는 그의 Fc 영역에 2 개의 N-연결된 올리고당을, 각 중쇄 상에 하나씩 갖는다. 임의의 당단백질로서, 항체는 동일한 폴리펩티드 백본을 공유하나 글리코실화 부위에 결합된 상이한 올리고당을 갖는 단백질형의 집단으로서 제조된다. 혈청 IgG 의 Fc 영역에서 정상적으로 발견된 올리고당은 낮은 수준의 말단 시알산 및 양분된 N-아세틸글루코사민 (GlcNAc), 및 다양한 정도의 말단 갈락토실화 및 코어 푸코실화를 갖는, 복합체 비안테나리 유형 (Wormald 등, Biochemistry 36:130-38 (1997) 의 것이다. 일부 연구는 Fc γ R 결합을 위해 필요한 최소 탄수화물 구조는 올리고당 코어 내에 놓인 것이라고 제안한다 [Lund 등, J. Immunol. 157:4963-69 (1996)].

[0212] 비공액 치료적 mAb 의 제조를 위해 산업적 및 학문적으로 사용되는 마우스- 또는 햄스터-유래 세포주는 Fc 위치에 대한 필요한 올리고당 결정소를 정상적으로 결합한다. 그러나, 상기 세포주에서 발현된 IgG 는 혈청 IgG 에서 적은 양으로 발견된 양분된 GlcNAc 가 결핍된다 [Lifely 등, Glycobiology 318:812-22 (1995)]. 반대로, 최근 래트 골수종-제조된, 인간화 IgG1 (CAMPATH-1H) 이 단백질형 중 일부 중에 양분된 GlcNAc 를 갖는 것이 발견되었다 [Lifely 등, Glycobiology 318:813-22 (1995)]. 래트 세포-유래된 항체는 표준 세포주에서 제조된 CAMPATH-1H 항체보다, 그러나 유의하게 더 낮은 항체 농도에서, 더 작은 최대 시험관내 ADCC 활성에 도달하였다.

- [0213] CAMPATH 항원은 정상적으로 림프종 세포에서 높은 수준으로 존재하고, 상기 키메라성 mAb 는 양분된 GlcNAc 의 부재에서 높은 ADCC 활성을 갖는다 [Lifely 등, Glycobiology 318:813-22 (1995)]. N-연결된 글리코실화 경로에서, 양분된 GlcNAc 는 GnTIII 에 의해 첨가된다 [Schachter, Biochem. Cell Biol. 64: 163-81 (1986)].
- [0214] 이전 연구는 외부 조절 방식으로, 상이한 수준의 클론된 GnTIII 유전자 효소를 발현하도록 미리 유전공학설계된 단일 항체-제조 CHO 세포주를 사용했다 (Umana, P. 등, Nature Biotechnol. 17:176-180 (1999)). 상기 접근법은 개질된 항체의 ADCC 활성과 GnTIII 의 발현 사이에 엄격한 상관관계를 처음으로 달성하였다. 그러므로, 본 발명은 증가된 GnTIII 활성으로부터 야기된 변경된 글리코실화를 갖는, 래트 ICR62 항체의 결합 특이성을 갖는 재조합, 키메라성 항체 또는 그의 분절을 포함한다. 증가된 GnTIII 활성은 양분된 올리고당의 백분율의 증가뿐 아니라, ABM 의 Fc 영역 중의 푸코오스 잔기의 백분율의 감소를 야기한다. 상기 항체, 또는 그의 분절은, 증가된 Fc 수용체 결합 친화성 및 증가된 효과기 작용을 갖는다. 또한, 본 발명은 면역글로불린의 Fc 영역과 동등한 영역을 포함하는 항체 분절 및 융합 단백질에 관한 것이다. 바람직한 구현예에서, 항체는 인간화된다.
- [0215] 본 발명의 방법에 따라 제조된 ABM 의 치료적 적용.
- [0216] 넓은 의미로, 본 발명의 ABM 은 EGFR 을 발현하는 생체내 또는 시험관내 표적 세포를 사용할 수 있다. EGFR 을 발현하는 세포는 진단 또는 치료적 목적을 위해 표적될 수 있다. 하나의 양상에서, 본 발명의 ABM 은 샘플에서의 EGFR 의 존재를 검출하기 위해 사용할 수 있다. 또다른 양상에서, 본 발명의 ABM 은 표면 상에 EGFR 을 발현하는 세포에서 EGFR-매개된 신호 전달을 억제 또는 감소시키기 위해 사용할 수 있다. EGFR 은 동일한 세포 유형의 비-종양 조직과 비교해서, 많은 인간 종양에서 비정상적으로 발현된다 (예, 과발현된다). 그러므로, 본 발명의 ABM 은 특히 종양 형성의 예방, 종양의 소거 및 종양 성장의 억제에 유용하다. EGFR 에 대한 EGFR 리간드의 결합을 차단함으로써, 본 발명의 ABM 은 EGFR 티로신 인산화, 증가된 세포의 산성화 비율, 및 세포 증식을 포함하는, EGF-의존적 종양 세포 활성화를 억제한다. 또한 본 발명의 ABM 은 세포 주기를 정지시키고, 표적 세포 (예, 종양 세포) 의 세포자멸사를 야기하고, 표적 세포의 혈관신생 및/또는 분화를 억제하기 위한 작용을 한다. 본 발명의 ABM 은 EGFR 을 발현하는 임의의 종양을 치료하기 위해 사용할 수 있다. 본 발명의 ABM 으로 치료할 수 있는 특정 악성종양에는 상피 및 평판 세포 암종, 비-소 세포 폐암종, 신경아교종, 이자암, 난소암, 전립선암, 유방암, 방광암, 두경부암, 및 눈 세포 암종이 포함되나 이에 제한되지 않는다.
- [0217] 본 발명의 ABM 은 생체내 종양 세포를 표적 및 치사시키기 위해 단독으로 사용될 수 있다. ABM 은 또한 인간 암종을 치료하기 위한 적합한 치료제와 함께 사용될 수 있다. 예를 들어, ABM 은 표준 또는 통상적인 치료 방법, 예컨대 화학요법, 방사능 요법과 함께 사용될 수 있거나, 암종의 부위에 치료제 전달을 위해 치료적 약물, 또는 독소뿐 아니라, 림포카인 또는 종양-억제성 성장 인자에 공액되거나 연결될 수 있다. 가장 중요한 본 발명의 ABM 의 공액은 (1) 면역독소 (ABM 및 세포독성 부분의 공액) 및 (2) 표지가 표지된 ABM 을 포함하는 면역 복합체를 확인하기 위한 수단을 제공하는 표지된 (예, 방사능표지된, 효소-표지된, 또는 플루오로코롬-표지된) ABM 이다. ABM 은 또한 천연 보체 과정을 통한 용해를 유도하기 위해, 정상적으로 존재하는 항체의존적 세포독성 세포와 상호작용하기 위해 사용될 수 있다.
- [0218] 면역독소의 세포독성 부분은 세포독성 약물 또는 박테리아 또는 식물 기원의 효소적으로 활성인 독소, 또는 이러한 독소의 효소적으로 활성인 분절 ("A 사슬") 일 수 있다. 사용되는 효소적으로 활성인 독소 및 그의 분절은 디프테리아 A 사슬, 디프테리아 독소의 비결합 활성 분절, 엑소톡신 A 사슬 (녹농균으로부터), 리신 A 사슬, 아브린 A 사슬, 모데신 A 사슬, 알파-사르신, 유동 (Aleurites fordii) 단백질, 디안틴 단백질, 미국 자리공 단백질 (PAPI, PAPII, 및 PAP-S), 여주 (momordica charantia) 억제제, 쿠르신, 코르틴, 사파오나리아 (sapaonaria) 약용 억제제, 겔로닌, 미토겔린, 레스트릭토신, 페노마이신, 및 에노마이신이다. 또다른 구현예에서, ABM 은 소분자 항암 약물에 공액된다. ABM 및 이러한 세포독성 부분의 공액은 다양한 2작용성 단백질 커플링제를 사용하여 만들어진다. 이러한 시약의 예는 SPDP, IT, 이미도에스테르의 2작용성 유도체, 예컨대 디메틸 아디피미데이트 HCl, 활성 에스테르, 예컨대 디숙신이미딜 수베레이트, 알데하이드, 예컨대 글루타알데하이드, 비스-아지도 화합물, 예컨대 비스(p-아지도벤조일)핵산디아민, 비스-디아조늄 유도체, 예컨대 비스-(p-디아조늄벤조일)-에틸렌디아민, 디이소시아네이트, 예컨대 톨릴렌 2,6-디이소시아네이트, 및 비스-활성 불소 화합물, 예컨대 1,5-디플루오로-2,4-디니트로벤젠이다. 독소의 용해 부분은 ABM 의 Fab 분절과 연결될 수 있다. 추가적인 적합한 독소는 본원에 전체가 참조로서 인용된 예를 들어, 공개 미국 특허 출원 번호 제 2002/0128448 호에서 증명되는 바와 같이, 당업계에 공지되어 있다.

- [0219] 하나의 구현예에서, 래트 ICR62 항체의 실질적으로 동일한 결합 특이성을 갖는 키메라성 (예, 인간화) 당조작된 ABM 은 리신 A 사슬에 공액된다. 가장 유리하게는, 리신 A 사슬은 재조합 수단을 통해 탈글리코실화 및 제조된다. 리신 면역독소의 유리한 제조 방법은 본원에 참조로서 인용된 Vitetta 등, Science 238, 1098 (1987) 에 기재되어 있다.
- [0220] 진단 목적을 위해 인간 암 세포 시험관내 치사를 위해 사용되는 경우, 공액은 전형적으로는 세포 배양 배지에 약 10 nM 이상의 농도로 첨가될 것이다. 시험관내 용도를 위한 투여 제형 및 방식은 중요하지 않다. 배양 또는 관류 배지와 상용성인 수성 제형이 정상적으로 사용될 것이다. 세포독성은 암의 존재 또는 정도를 측정하기 위한 통상적인 기술에 의해 판독될 수 있다.
- [0221] 상기 논의된 바와 같이, 암 치료용 세포독성 방사능약학은 방사능 동위원소 (예, I, Y, Pr) 를, 래트 ICR62 항체의 실질적으로 동일한 결합 특이성을 갖는 키메라성, 당조작된 ABM 에 공액시켜 제조할 수 있다. 본원에 사용되는 바와 같은 용어 "세포독성 부분" 은 이러한 동위원소를 포함하는 것으로 의도된다.
- [0222] 또다른 구현예에서, 리포솜을 세포독성 약물로 채우고, 리포솜을 본 발명의 ABM 로 코팅한다. EGFR-발현 악성 세포의 표면 상에 많은 EGFR 분자가 있기 때문에, 상기 방법은 올바른 세포 유형에 다량의 약물의 전달을 허용한다.
- [0223] 이러한 치료제를 항체에 공액시키는 기술은 잘 공지되어 있다 (예를 들어, Arnon 등, "Monoclonal Antibodies for Immunotargeting of Drugs in Cancer Therapy", Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Reisfeld 등. (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom 등, "Antibodies For Drug Delivery", in Controlled Drug Delivery (2nd Ed.), Robinson 등. (eds.), pp. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, Pinchera 등. (eds.), pp. 475-506 (1985); 및 Thorpe 등, "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", Immunol. Rev., 62:119-58 (1982) 참조).
- [0224] 본 발명의 ABM 에 대한 또 다른 치료적 적용에는 프로드러그를 세포독성 약물로 전환할 수 있는 효소에, 예를 들어, 재조합 DNA 기술에 의한 공액 또는 연결 및 프로드러그를 종양 부위에서 세포독성체로 전환시키는 프로드러그와 함께 항체-효소 공액의 사용이 포함된다 (예를 들어, Senter 등, "Anti-Tumor Effects of Antibody-alkaline Phosphatase", Proc. Natl Acad. Sci. USA 55:4842-46 (1988); "Enhancement of the in vitro and in vivo Antitumor Activities of Phosphorylated Mitocycin C and Etoposide Derivatives by Monoclonal Antibody-Alkaline Phosphatase Conjugates", Cancer Research 49:5789-5792 (1989); 및 Senter, "Activation of Prodrugs by Antibody-Toxin Conjugates: A New Approach to Cancer Therapy," FASEB J. 4: 188-193 (1990) 참조).
- [0225] 본 발명의 ABM 에 대한 또 다른 치료적 용도에는 암 환자의 골수로부터 종양 세포를 제거하기 위해 보체의 존재 하에, 비공액, 또는 항체-약물 또는 항체-독소 공액의 일부로의 용도가 포함된다. 상기 접근법에 따르면, 자가 골수는 항체 치료에 의해 생체 외에서 퍼지될 수 있으며, 골수는 환자 내로 다시 주입된다 [예를 들어, Ramsay 등, "Bone Marrow Purging Using Monoclonal Antibodies", J. Clin. Immunol., 8(2):81-88 (1988) 참조].
- [0226] 게다가, 본 발명이 래트 ICR62 항체와 실질적으로 동일한 결합 특이성을 허용하는 항원 결합 도메인 (예, 래트 ICR62 항체의 CDR 을 포함하는 폴리펩티드) 을 포함하고 추가로 독소 폴리펩티드를 포함하는 단일쇄 면역독소를 포함하는 것으로 고려된다. 본 발명의 단일쇄 면역독소는 인간 암종 생체내 치료를 위해 사용할 수 있다.
- [0227] 유사하게는, 항-종양 활성을 갖는 제 2 단백질, 예, 림포카인 또는 온코스타틴의 적어도 작용적으로 활성인 부분과 연결된 본 발명의 ABM 의 항원-결합 영역 이상을 포함하는 융합 단백질은, 인간 암종 생체내 치료를 위해 사용할 수 있다.
- [0228] 본 발명은 EGFR 을 발현하는 종양 세포를 선별적으로 치사시키는 방법을 제공한다. 상기 방법은 본 발명의 면역공액 (예, 면역독소) 를 상기 종양 세포와 반응시키는 것을 포함한다. 상기 종양 세포는 인간 암종 유래일 수 있다.
- [0229] 부가적으로는, 본 발명은 생체내 암종 (예를 들어, 인간 암종) 의 치료 방법을 제공한다. 상기 방법은 하나 이상의 본 발명의 면역공액 (예, 면역독소) 을 함유하는 약학적 유효량의 조성물을 대상에 투여하는 것을 포함

한다.

- [0230] 추가 양상에서, 본 발명은 이를 필요로 하는 인간 대상에 치료적 유효량의 본 발명의 ABM 을 투여하는 것을 포함하는, EGFR 이 발현되는, 특히 EGFR 이 비정상적으로 발현되는 (예, 과발현된) 방광, 뇌, 두경부, 폐, 유방, 난소, 결장, 전립선, 피부 및 신장의 암이 포함되는 세포 증식 장애의 개선된 치료 방법에 관한 것이다. 바람직한 구현예에서, ABM 은 래트 ICR62 항체의 것과 실질적으로 동일한 결합 특이성을 갖는 당조작된 항-EGFR 항체이다. 또다른 바람직한 구현예에서, 항체는 인간화된다. 본 발명의 ABM 에 의해 치료될 수 있는 세포 증식 장애의 예에는 복부, 뼈, 유방, 소화계, 간, 이자, 복막, 내분비선 (부신, 부갑상선, 뇌하수체, 고환, 난소, 흉선, 갑상선), 눈, 두경부, 신경계 (중추 및 말초), 림프계, 골반, 피부, 연조직, 비장, 흉부 영역, 및 비노생식계에 위치한 신생물이 포함되나 이에 제한되지 않는다.
- [0231] 유사하게는, 기타 세포 증식 장애는 또한 본 발명의 ABM 에 의해 치료될 수 있다. 이러한 세포 증식 장애의 예에는 하기가 포함되나 이에 제한되지 않는다: 고감마글로불린혈증, 림프세포증식성 장애, 파라프로테인혈증, 자색반증, 사코이드증, 세자리 증후군 (Sezary Syndrome), 발덴스트럼 마크로글로불린혈증, 고혈 질환, 조직구증, 및 상기 열거된 장기계에 위치한 신생물 이외의 임의의 기타 세포 증식 질환.
- [0232] 본 발명의 실시예에 따르면, 대상은 인간, 말, 돼지, 소과, 쥐과, 개과, 고양이과, 및 조류 대상일 수 있다. 기타 온혈 동물이 또한 본 발명에 포함된다.
- [0233] 주제 발명은 추가로 인간 종양 세포의 성장 억제, 대상에서의 종양 치료, 및 대상에서의 증식성 유형 질환 치료를 위한 방법을 제공한다. 상기 방법은 유효량의 본 발명의 조성물을 대상에 투여하는 것을 포함한다.
- [0234] 본 발명은 추가로 치료적 유효량의 본 발명의 ABM 을 포유류에 투여하는 것을 포함하는, EGFR 또는 하나 이상의 EGFR 리간드의 비정상 활성화 또는 제조를 특징으로 하는, 포유류에서의 비-악성 질환 또는 장애의 치료 방법에 관한 것이다. 주제는 일반적으로, 예를 들어 본 발명의 ABM 이 대상 내에서 세포에 결합할 수 있는 그의 질환 조직에서 EGFR-발현 세포를 가질 것이다.
- [0235] EGFR 또는 EGFR 리간드의 비정상 활성화 또는 발현은 대상의 세포에서, 예를 들어 대상의 질환 조직에서 발생할 수 있다. EGFR 의 비정상 활성화는 EGFR 및/또는 EGFR 리간드의 증폭, 과발현 또는 비정상 제조에 기여할 수 있다. 본 발명의 하나의 구현예에서, 진단 또는 예후 검정법은 EGFR (또는 EGFR 리간드) 의 비정상 제조 또는 활성화가 대상에서 일어나는지의 여부를 측정하기 위해 수행될 것이다. 예를 들어, EGFR 및/또는 리간드의 유전자 증폭 및/또는 과발현은 측정될 수 있다. 이러한 증폭/과발현을 측정하기 위한 다양한 검정법이 당업계에서 사용가능하고, 상기 기재된 IHC, FISH 및 shed (shed) 항원 검정법이 포함된다. 대안적으로는, 또는 부가적으로는, 샘플에서의 또는 이와 관련된 EGFR 리간드, 예컨대 TGF- α 의 수준은 공지된 방법에 따라 측정할 수 있다. 이러한 검정법은 시험되는 샘플에서 이를 코딩하는 단백질 및/또는 핵산을 검출할 수 있다. 하나의 구현예에서, 샘플에서의 EGFR 리간드 수준은 면역조직화학 (IHC) 을 사용하여 측정할 수 있다; 예를 들어, Scher 등. Clin. Cancer Research 1:545-550 (1995) 를 참조한다. 대안적으로는, 또는 부가적으로는, 예를 들어 FISH, 서던 블롯팅, 또는 PCR 기술을 통해, 시험되는 샘플에서의 EGFR-코딩 핵산의 수준을 평가할 수 있다.
- [0236] 게다가, EGFR 또는 EGFR 리간드 과발현 또는 증폭은 생체내 진단 검정법을 사용하여, 예를 들어 검출되는 분자에 결합하고 검출가능한 표지 (예, 방사능 동위원소) 로 태깅된 분자 (예컨대 항체) 를 투여하고, 표지의 위치를 환자 외부에서 스캐닝하여 평가할 수 있다.
- [0237] 대안적으로는, EGFR 헤테로이량체, 특히 EGFR-ErbB2, EGFR-ErbB3 또는 EGFR-ErbB4 헤테로이량체를 환자에서, 예를 들어 그의 질환 조직에서, 요법 전에 검출할 수 있다. 비공유 단백질-단백질 상호작용을 검출하기 위한 다양한 방법 또는 관심의 단백질 사이의 접근을 표시하는 다른 방법이 사용가능하다. EGFR 헤테로이량체의 예시적인 검출 방법에는, 면역침화성-기재 방법, 예컨대 면역침전; 형광 공명 에너지 전달 (FRET) (Selvin, Nat. Struct. Biol. 7:730-34 (2000); Gadella & Jovin, J. Cell Biol. 129:1543-58 (1995); 및 Nagy 등, Cytometry 32:120-131 (1998)); 표준 직접 또는 간접 면역형광 기술 및 공초점 레이저 스캐닝 현미경을 사용하는 EGFR 과 ErbB2 또는 ErbB3 의 공-위치화; 항체 결합 및 EGFR 과 ErbB2 또는 ErbB3 의 공-위치화를 고-처리량 포맷으로 검출하기 위한 레이저 스캐닝 이미징 (LSI), 예컨대 마이크로웰 플레이트 (Zuck 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96:11122-11127 (1999)); 또는 eTag/m 검정법 시스템 (Aclara Bio Sciences, Mountain View, Calif; 및 2001 년 12 월 6 일에 공개된 미국 특허 출원 번호 제 2001/0049105 호) 이 포함되나 이에 제한되지 않는다.

- [0238] 그러므로, 본 발명은 방광, 뇌, 두경부, 이자, 폐, 유방, 난소, 결장, 전립선 및 신장의 암과 같은 인간 악성종양의 치료를 위한 약학 조성물, 조합 및 방법이 포함되는 것이 명백하다. 예를 들어, 본 발명에는 약학적 유효량의 본 발명의 항체 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 인간 악성종양의 치료에 사용하기 위한 약학 조성물이 포함된다.
- [0239] 본 발명의 ABM 조성물은 정맥내, 복강내, 경구, 림프선내 (intralymphatic) 또는 종양 내로 직접적으로 투여를 포함하나 이에 제한되지 않는 통상적인 투여 방식을 사용하여 투여할 수 있다. 정맥내 투여가 바람직하다.
- [0240] 본 발명의 하나의 양상에서, 본 발명의 ABM 을 함유하는 치료적 제형은 원하는 정도의 순도를 갖는 항체와 임의의 약학적으로 허용가능한 담체, 부형제 또는 안정화제 (REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)) 를 동결건조된 제형 또는 수용액의 형태로 혼합하여 저장을 위해 제조한다. 허용가능한 담체, 부형제, 또는 안정화제는 사용되는 투여량 및 농도에서 수여자에게 비독성이고, 완충제, 예컨대 포스페이트, 시트레이트, 및 기타 유기산; 아스코르브산 및 메티오닌을 포함하는 항산화제; 방부제 (예컨대 옥타데실디메틸벤질 암모늄 클로라이드; 헥사메토늄 클로라이드; 벤즈알코늄 클로라이드, 벤즈에토늄 클로라이드; 페놀, 부틸 또는 벤질 알콜; 알킬 파라벤, 예컨대 메틸 또는 프로필 파라벤; 카테콜; 레소르시놀; 시클로헥사놀; 3-펜타놀; 및 m-크레졸); 저분자량 (약 10 잔기 미만) 폴리펩티드; 단백질, 예컨대 혈청 알부민, 젤라틴, 또는 면역글로불린; 친수성 중합체, 예컨대 폴리비닐피롤리돈; 아미노산, 예컨대 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 히스티딘, 아르기닌, 또는 라이신; 단당류, 이당류, 및 글루코스, 만노오스 또는 텍스트린을 포함하는 기타 탄수화물; 킬레이트제, 예컨대 EDTA; 당, 예컨대 수크로오스, 만니톨, 트레할로오스 또는 소르비톨; 염-형성 반대이온, 예컨대 나트륨; 금속 복합체 (예, Zn-단백질 복합체); 및/또는 비-이온성 계면활성제, 예컨대 TWEEN™, PLURONIC™ 또는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG) 이 포함된다.
- [0241] 본 발명의 ABM 은 비정상 EGFR 또는 EGFR 리간드 활성을 특징으로 하는 질환 또는 장애, 예컨대 종양을 치료하기 위해, 단독으로 또는 예를 들어, 화학치료제 및/또는 방사능 요법과 조합 요법으로 대상에 투여할 수 있다. 예시적인 항-EGFR 항체 제형은 [Herbst and Shen, Cancer 94(5):1593-1611] 에 기재되어 있다. 적합한 화학치료제에는 시스플라틴, 독소루비신, 토포데칸, 파클리탁셀, 빈블라스틴, 카르보플라틴 및 에토포시드가 포함된다.
- [0242] 피하 투여에 적합한 동결건조 제형은 W097/04801 에 기재되어 있다. 이러한 동결건조 제형은 고 단백질 농도에 대해 적합한 희석액과 함께 재구성될 수 있고, 재구성된 제형은 본원에서 치료되는 포유류에 피하 투여될 수 있다.
- [0243] 본원의 제형은 또한 치료되는 특정 징후에 필요한 하나 이상의 활성 화합물, 바람직하게는 서로 역효과를 주지 않는 상보적 활성을 가진 것들을 함유할 수 있다. 예를 들어, 추가로 세포독성제, 화학치료제, 사이토카인 또는 면역억제제를 제공하는 것이 바람직할 수 있다 (예, T 세포에 작용하는 것, 예컨대 시클로스포린 또는 T 세포에 결합하는 항체, 예를 들어, LFA-1 에 결합하는 것). 이러한 기타 작용제의 유효량은 제형에 존재하는 길항제의 양, 질환 또는 장애 또는 치료의 유형, 및 상기 언급된 기타 인자에 따라 다르다. 일반적으로 상기 동일한 투여량 및 투여 경로로, 또는 상기 사용된 투여량의 약 1 내지 99% 로 사용된다.
- [0244] 활성 성분은 또한 예를 들어, 코아세르베이션 기술에 의해 또는 계면 중합에 의해 제조된 마이크로캡슐, 예를 들어, 히드록시메틸셀룰로오스 또는 젤라틴-마이크로캡슐 및 폴리-(메틸메타크릴레이트) 마이크로캡슐, 각각에, 콜로이드 약물 전달 시스템 (예를 들어, 리포솜, 알부민 마이크로스피어, 마이크로에멀션, 나노-입자 및 나노캡슐) 에 또는 마크로에멀션에 포획될 수 있다. 이러한 기술은 [Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)] 에 기재되어 있다.
- [0245] 서방성 제제를 제조할 수 있다. 서방성 제제의 적합한 예에는 매트릭스가 형성화된 품목, 예를 들어, 필름, 또는 마이크로캡슐의 형태인, 길항제를 함유하는 고체 소수성 중합체의 반투과성 매트릭스가 포함된다. 서방성 매트릭스의 예에는 폴리에스테르, 히드로겔 (예를 들어, 폴리(2-히드록시에틸-메타크릴레이트), 또는 폴리(비닐알콜)), 폴리락타이드 (미국 특허 번호 제 3,773,919 호), L-글루탐산 및 γ 에틸-L-글루타메이트의 공중합체, 비-분해가능 에틸렌-비닐 아세테이트, 분해가능 락트산-글리콜산 공중합체, 예컨대 LUPRON DEPOT™ (락트산-글리콜산 공중합체 및 루프롤라이드 아세테이트로 구성된 주사가능한 마이크로스피어), 및 폴리-D-(-)-3-히드록시부티르산이 포함된다.
- [0246] 생체내 투여를 위해 사용되는 제형은 살균되어야만 한다. 이것은 살균 여과막을 통한 여과에 의해 쉽게 달성된다.

- [0247] 본 발명의 조성물은 액체 용액 또는 현탁액, 정제, 알약, 분말, 좌약, 중합체성 마이크로캡슐 또는 마이크로소포, 리포솜, 및 주사가능 또는 주입가능 용액이 포함되나 이에 제한되지 않는 다양한 투여 형태일 수 있다. 바람직한 형태는 투여 방식 및 치료적 용도에 따라 다르다.
- [0248] 본 발명의 조성물에는 또한 바람직하게는 당업계에 공지된 통상적인 약학적으로 허용가능한 담체 및 항원보강제, 예컨대 인간 혈청 알부민, 이온 교환제, 알루미늄, 레시틴, 완충제 물질, 예컨대 포스페이트, 글리신, 소르브산, 칼륨 소르베이트, 및 염 또는 전해질, 예컨대 프로타민 술페이트가 포함된다.
- [0249] 본 발명의 약학 조성물에 대한 가장 유효한 투여 방식 및 투여 섭생은 질환의 경중도 및 경과, 환자의 건강 및 치료에 대한 응답 및 치료하는 외과의사의 판단에 따라 다르다. 따라서, 조성물의 투여는 개개인의 환자에 대해 적정되어야만 한다. 그럼에도 불구하고, 본 발명의 조성물의 유효한 투여량은 일반적으로 약 0.01 내지 약 2000 mg/kg 의 범위일 것이다. 하나의 구현예에서, 유효한 투여량은 약 1.0 mg/kg 내지 약 15.0 mg/kg 의 범위이다. 더욱 구체적인 구현예에서, 투여량은 약 1.5 mg/kg 내지 약 12 mg/kg 의 범위이다. 다른 구현예에서, 투여량은 약 1.5 mg/kg 내지 약 4.5 mg/kg, 또는 약 4.5 mg/kg 내지 약 12 mg/kg 의 범위이다. 본 발명의 투여량은 또한 1.0 mg/kg, 1.5 mg/kg, 2.0 mg/kg, 2.5 mg/kg, 3.0 mg/kg, 3.5 mg/kg, 4.0 mg/kg, 4.5 mg/kg, 5.0 mg/kg, 5.5 mg/kg, 6.0 mg/kg, 6.5 mg/kg, 7.0 mg/kg, 7.5 mg/kg, 8.0 mg/kg, 8.5 mg/kg, 9.0 mg/kg, 9.5 mg/kg, 10.0 mg/kg, 10.5 mg/kg, 11.0 mg/kg, 11.5 mg/kg, 12.0 mg/kg, 12.5 mg/kg, 13.0 mg/kg, 13.5 mg/kg, 14.0 mg/kg, 14.5 mg/kg, 또는 15.0 mg/kg 을 포함하나 이에 제한되지 않는 이러한 범위 내의 임의의 투여량일 수 있다.
- [0250] 본원에 기재된 분자는 액체 용액 또는 현탁액, 정제, 알약, 분말, 좌약, 중합체성 마이크로캡슐 또는 마이크로소포, 리포솜, 및 주사가능 또는 주입가능 용액이 포함되나 이에 제한되지 않는 다양한 투여 형태일 수 있다. 바람직한 형태는 투여 방식 및 치료적 용도에 따라 다르다.
- [0251] 본 발명의 투여량은 일부 경우에서, 예견적 생마커의 사용에 의해 측정될 수 있다. 예견적 생마커는 종양 관련 유전자 또는 단백질의 발현 및/또는 활성화의 패턴, 또는 종양 관련 신호 경로의 세포 성분을 측정 (즉, 관찰 및/또는 정량화) 하기 위해 사용되는 분자 마커이다. 종양 조직에서 표적된-요법의 생물학적 효과를 해명하고, 상기 효과를 임상 응답에 관련시키는 것은 종양에서 조작되는 두드러진 성장 및 생존 경로의 확인을 도와, 있음직한 응답자의 프로파일을 수립하고, 거꾸로 내성을 극복하는 전략을 고안하기 위한 추론을 제공한다. 예를 들어, 항-EGFR 요법에 대한 생마커는 Akt, RAS, RAF, MAPK, ERK1, ERK2, PKC, STAT3, STAT5 가 포함되나 이에 제한되지 않는 세포 증식 장애를 야기하는 EGFR 하부방향 신호 경로에 있는 분자를 포함할 수 있다 (Mitchell, Nature Biotech. 22: 363-364 (2004); Becker, Nature Biotech 22:15-18 (2004); Tsao and Herbst, Signal 4:4-9 (2003)). 항-EGFR 요법에 대한 생마커는 또한 성장 인자 수용체, 예컨대 EGFR, ErbB-2 (HER2/neu), 및 ErbB-3 (HER3) 을 포함할 수 있고, 항-EGFR 요법에 대한 환자 응답의 양성 또는 음성 예견자일 수 있다. 예를 들어, 성장 인자 수용체 ErbB-3 (HER3) 은 항-EGFR 항체 ABX-EGF 에 대한 음성 예견적 생마커인 것으로 측정되었다 (미국 특허 출원 공개 번호 제 2004/0132097 A1 호).
- [0252] 예견적 생마커는 면역조직화학, 유세포분석, 면역형광, 포획-및-검출 검정법, 및 역상 검정법, 및/또는 전체 내용이 본원에 참조로서 인용된 미국 특허 출원 공개 번호 제 2004/0132097 A1 호에 언급된 검정법을 포함하나 이에 제한되지 않는, 당업계에 잘 공지된 세포 검정법에 의해 측정될 수 있다. 항-EGFR 요법의 예견적 생마커, 그 자체는, 전체 내용이 본원에 전체가 참조로서 인용된 미국 특허 출원 공개 번호 제 2003/0190689 A1 호에 언급된 기술에 따라 확인될 수 있다.
- [0253] 하나의 양상에서, 본 발명은 요법 전에 인간 대상으로부터의 샘플을 EGFR-관련 장애, 예컨대 암에 대한 예견적 생마커의 발현 및/또는 활성화를 검출하는 하나 또는 다수의 시약으로 검정하여, 치료가 필요한 인간 대상에서 항-EGFR 요법에 대한 응답을 예견하고; 하나 이상의 예견적 생마커의 발현 및/또는 활성화의 패턴을 측정하고 (여기서 패턴은 항-EGFR 요법에 대한 인간 대상의 응답을 예견함); 항-EGFR 치료에 대해 양성적으로 응답할 것으로 예상되는 인간 대상에, 치료적 유효량의 본 발명의 ABM 을 포함하는 조성물을 투여하는 것을 포함하는, EGFR-관련 장애의 치료 방법을 제공한다. 본원에서 사용되는 바와 같은, 항-EGFR 치료에 대해 양성적으로 응답할 것으로 예상되는 인간 대상은 항-EGFR 이 EGFR-관련 장애에 대해 측정가능한 효과를 가질것이며 (예, 종양 퇴화/수축), 항-EGFR 요법의 장점이 역효과 (예, 독성) 에 의해 능가되지 않는 대상이다. 본원에서 사용되는 바와 같은, 샘플은 유기체, 특히 인간으로부터의 임의의 생물학적 샘플, 임의의 기원의 단일 세포를 포함하는 하나 이상의 세포, 유방, 폐, 위장관, 피부, 자궁경부, 난소, 전립선, 신장, 뇌, 두경부, 또는 신체의 기타 장기 또는 조직과 같은 장기로부터 제거된 조직 또는 생검 샘플, 및 도말, 가래, 분비물, 뇌척수액, 담즙,

혈액, 림프액, 소변 및 대변을 포함하나 이에 제한되지 않는 기타 신체 샘플을 의미한다.

- [0254] 본 발명의 ABM 을 포함하는 조성물은 양호한 의학 관행에 부합하는 방식으로 제형화, 투약, 및 투여될 것이다. 상기 문맥에서의 고려 인자에는 치료될 특정 질환 또는 장애, 치료될 특정 포유류, 개개인의 환자의 임상 상태, 질환 또는 장애의 원인, 작용제의 전달 부위, 투여 방법, 투여 스케줄, 및 의학 업계인에게 공지된 기타 인자가 포함된다. 투여되는 길항제의 치료적 유효량은 이러한 고려에 의해 좌우될 것이다.
- [0255] 일반적인 조건으로, 투여량 당 비경구로 투여되는 항체의 치료적 유효량은 1 일 당 약 0.1 내지 20 mg/kg 환자 체중의 범위일 것이며, 사용되는 길항제의 전형적인 초기 범위는 약 2 내지 10 mg/kg 이다. 하나의 구현예에서, 치료적 유효량은 약 1.0 mg/kg 내지 약 15.0 mg/kg 의 범위이다. 더욱 구체적인 구현예에서, 투여량은 약 1.5 mg/kg 내지 약 12 mg/kg 의 범위이다. 다른 구현예에서, 투여량은 약 1.5 mg/kg 내지 약 4.5 mg/kg, 또는 약 4.5 mg/kg 내지 약 12 mg/kg 의 범위이다. 본 발명의 투여량은, 1.0 mg/kg, 1.5 mg/kg, 2.0 mg/kg, 2.5 mg/kg, 3.0 mg/kg, 3.5 mg/kg, 4.0 mg/kg, 4.5 mg/kg, 5.0 mg/kg, 5.5 mg/kg, 6.0 mg/kg, 6.5 mg/kg, 7.0 mg/kg, 7.5 mg/kg, 8.0 mg/kg, 8.5 mg/kg, 9.0 mg/kg, 9.5 mg/kg, 10.0 mg/kg, 10.5 mg/kg, 11.0 mg/kg, 11.5 mg/kg, 12.0 mg/kg, 12.5 mg/kg, 13.0 mg/kg, 13.5 mg/kg, 14.0 mg/kg, 14.5 mg/kg, 또는 15.0 mg/kg 의 범위 내의, 그러나 이에 제한되지 않는 임의의 투여량일 수 있다.
- [0256] 바람직한 구현예에서, ABM 은 항체, 바람직하게는 인간화 항체이다. 이러한 비공액 항체에 대한 적합한 투여량은 예를 들어, 약 20 mg/m^2 내지 약 1000 mg/m^2 범위이다. 예를 들어, 실질적으로 375 mg/m^2 미만의 하나 이상의 항체 투여량을, 예를 들어, 투여량 약 20 mg/m^2 내지 약 250 mg/m^2 , 예를 들어 약 50 mg/m^2 내지 약 200 mg/m^2 의 범위로 환자에게 투여할 수 있다.
- [0257] 게다가, 항체의 하나 이상의 초기 투여(들) 후에 하나 이상의 연이은 투여(들) 를 투여할 수 있다 (여기서 연이은 투여(들) 에서의 항체의 mg/m^2 투여량은 초기 투여(들) 에서의 항체의 mg/m^2 투여량을 초과한다). 예를 들어, 초기 투여량은 약 20 mg/m^2 내지 약 250 mg/m^2 (예, 약 50 mg/m^2 내지 약 200 mg/m^2) 의 범위일 수 있고, 연이은 투여량은 약 250 mg/m^2 내지 약 1000 mg/m^2 의 범위일 수 있다.
- [0258] 그러나, 상기 나타난 바와 같이, 상기 제안된 양의 ABM 은 크게 치료적 재량하에 있다. 적합한 투약 및 스케줄 선택에서의 주요 인자는 상기 지시된 바와 같이, 수득되는 결과이다. 예를 들어, 비교적 더 높은 투여량이 진행중의 및 급성 질환의 치료를 위해 초기에 필요할 수 있다. 질환 또는 장애에 따라 가장 효과적인 결과를 수득하기 위해, 길항제는 질환 또는 장애의 첫번째 징후, 진단, 외양 또는 발생과 가능한 한 가깝게, 또는 질환 또는 장애의 경감 동안 투여된다.
- [0259] 종양을 치료하기 위해 사용된 항-EGFR 항체의 경우에서, 최적 치료적 결과는 일반적으로 표적 세포 상의 EGF 수용체를 완전히 포화시키기에 충분한 투여량으로 투여된다. 포화를 달성하기 위해 필요한 투여량은 종양 세포 당 발현되는 EGF 수용체의 수에 따라 다를 것이다 (이것은 상이한 종양 유형 간에 유의하게 다를 수 있다). 30 nM 정도로 낮은 혈청 농도가 일부 종양을 치료하는데 유효한 반면, 100 nM 초과의 농도가 기타 종양과의 최적 치료적 효과를 달성하기에 필요할 수 있다. 제시된 종양에 대한 포화를 달성하기에 필요한 투여량은 방사면역검정법 또는 면역침전에 의해 쉽게 시험관내에서 측정될 수 있다.
- [0260] 일반적으로, 방사능과의 조합 요법을 위해, 하나의 적합한 치료적 섭생에는 100 내지 500 mg/m^2 의 적재 투여량으로 본 발명의 항-EGFR ABM 의 8 주의 주입 후, 100 내지 250 mg/m^2 의 유지 투여량 및 매일 2.0 Gy 의 투여량으로 70.0 Gy 양의 방사능이 포함된다. 화학요법과의 조합 요법을 위해, 하나의 적합한 치료적 섭생에는 본 발명의 항-EGFR ABM 을 매 주 100/100 mg/m^2 , 400/250 mg/m^2 , 또는 500/250 mg/m^2 의 적재/유지 투여량으로, 매 3 주 100 mg/m^2 의 투여량으로 시스플라틴과 조합으로 투여하는 것이 포함된다. 대안적으로는, 젬시타빈 또는 이리노테칸을 시스플라틴 대신에 사용할 수 있다.
- [0261] 본 발명의 ABM 은 비경구, 피하, 복강내, 폐내, 및 비강내, 그리고 필요한 경우 국소 면역억제 치료를 위해, 병변내 투여가 포함되는 임의의 적합한 방법에 의해 투여된다. 비경구 주입에는 근육내, 정맥내, 동맥내, 복강내, 또는 피하 투여가 포함된다. 또한, 길항제는 적합하게는 펄스 주입에 의해, 예를 들어 감소하는 투여량의 길항제와 함께 투여될 수 있다. 바람직하게는 투여는 일부분 투여가 단시간 또는 만성적인 지의 여부에 따라, 주사, 가장 바람직하게는 정맥내 또는 피하 주사에 의해 제공된다.

- [0262] 기타 화합물, 예컨대 세포독성제, 화학치료제, 면역억제제 및/또는 사이토카인을 본원의 길항제와 함께 투여할 수 있다. 조합된 투여에는 개별 제형 또는 단일 약학 제형을 사용하는 공투여, 및 어느 한쪽 순서의 연속 투여가 포함되며, 여기서 바람직하게는 두 가지 (또는 모든) 활성제가 그들의 생물학적 활성을 동시에 발휘하는 시간대가 있다.
- [0263] 치유를 달성하는데 필요한 본 발명의 조성물의 투여량이 스케줄 최적화와 함께 추가로 감소될 수 있다는 것이 명백할 것이다.
- [0264] 본 발명의 실시예에 따라서는, 약학적 담체는 지질 담체일 수 있다. 지질 담체는 인지질일 수 있다. 또한, 지질 담체는 지방산일 수 있다. 또한, 지질 담체는 세제일 수 있다. 본원에서 사용되는 바와 같은, 세제는 액체의 표면 장력을 바꾸는, 일반적으로 감소시키는 임의의 물질이다.
- [0265] 본 발명의 하나의 예에서, 세제는 비이온성 세제일 수 있다. 비이온성 세제의 예에는 폴리소르베이트 80 (또한 Tween 80 또는 (폴리옥시에틸렌소르비탄 모노올레에이트) 로 공지됨), Brij, 및 Triton (예를 들어 Triton WR-1339 및 Triton A-20) 가 포함되나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0266] 대안적으로는, 세제는 이온성 세제일 수 있다. 이온성 세제의 예에는 알킬트리메틸암모늄 브로미드가 포함되나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0267] 부가적으로는, 본 발명에 따르면, 지질 담체는 리포솜일 수 있다. 본 적용에서 사용되는 바와 같은, "리포솜" 은 본 발명의 임의의 분자 또는 그의 조합을 함유하는 임의의 막 결합된 소포이다.
- [0268] 또다른 구현예에서, 본 발명은 의약으로서 사용하기 위한, 특히 암의 치료 또는 예방에서 사용하기 위한 또는 전암성 상태 또는 병변에서 사용하기 위한, 본 발명에 따른 ABM 에 관한 것이다. 암은, 예를 들어, 폐암, 비소세포폐 (NSCL) 암, 기관지 폐포 세포 폐암, 뼈암, 이자암, 피부암, 두경부의 암, 피부 또는 안구 흑색종, 자궁암, 난소암, 눈암, 항문부의 암, 위암, 위샘암, 결장암, 유방암, 자궁암, 난관의 암종, 자궁내막의 암종, 자궁경부의 암종, 질의 암종, 음문의 암종, 호지킨 질환, 식도의 암, 소장의 암, 내분비계의 암, 갑상선의 암, 부갑상선의 암, 부신의 암, 연조직의 육종, 요도의 암, 음경의 암, 전립선암, 방광의 암, 신장 또는 수뇨관의 암, 눈세포 암종, 신우의 암종, 중피종, 간세포암, 담관암, 만성 또는 급성 백혈병, 림프구 림프종, 중추신경계 (CNS) 의 신생물, 척수 축 종양, 뇌줄기신경아교종, 다형성아교 모세포종, 별아교세포종, 신경집종, 뇌실막세포종, 수모세포종, 수막종, 평편 세포 암종, 하수체선종 (임의의 상기 암의 고질 상태를 포함함), 또는 하나 이상의 상기 암의 조합일 수 있다. 전암성 상태 또는 병변에는 예를 들어, 구강 백색판증, 광선-각화증 (일광각화증), 결장 또는 직장의 전암성 폴립, 위 상피세포 형성이상, 샘종 형성이상, 유전적 비폴립증 결장암 증후군 (HNPCC), 바레트 (Barrett's) 식도, 방광 형성이상, 및 전암성 자궁경부 상태로 이루어진 군이 포함된다.
- [0269] 바람직하게는, 상기 암은 유방암, 방광암, 두경부암, 피부암, 이자암, 폐암, 난소암, 결장암, 전립선암, 신장암, 및 뇌암으로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0270] 또다른 구현예는 암의 치료 또는 예방을 위한 의약의 제조를 위한 본 발명에 따른 ABM 의 용도이다. 암은 상기와 같이 정의된다.
- [0271] 바람직하게는, 상기 암은 유방암, 방광암, 두경부암, 피부암, 이자암, 폐암, 난소암, 결장암, 전립선암, 신장암, 및 뇌암으로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0272] 또한 바람직하게는, 상기 항원 결합 분자는 약 1.0 mg/kg 내지 약 15 mg/kg 의 치료적 유효량으로 사용된다.
- [0273] 또한 더욱 바람직하게는, 상기 항원 결합 분자는 약 1.5 mg/kg 내지 약 12 mg/kg 의 치료적 유효량으로 사용된다.
- [0274] 또한 더욱 바람직하게는, 상기 항원 결합 분자는 약 1.5 mg/kg 내지 약 4.5 mg/kg 의 치료적 유효량으로 사용된다.
- [0275] 또한 더욱 바람직하게는, 상기 항원 결합 분자는 약 4.5 mg/kg 내지 약 12 mg/kg 의 치료적 유효량으로 사용된다.
- [0276] 가장 바람직하게는, 상기 항원 결합 분자는 약 1.5 mg/kg 의 치료적 유효량으로 사용된다.
- [0277] 또한 가장 바람직하게는, 상기 항원 결합 분자는 약 4.5 mg/kg 의 치료적 유효량으로 사용된다.
- [0278] 또한 가장 바람직하게는, 상기 항원 결합 분자는 약 12 mg/kg 의 치료적 유효량으로 사용된다.

[0279] 또다른 구현예에서, 본 발명은 본 발명의 ABM 을 포유류에게 투여하는 것을 포함하는, 그의 치료가 필요한 포유류에서의 EGFR-관련 장애의 치료 방법에 관한 것이며, 여기서 치료는 4 주 이상의 기간 동안, 상기 ABM 의 혈청 농도 약 1 내지 약 500 $\mu\text{g/ml}$ 를 야기하고, 치료는 상기 포유류에서 임상적으로 유의한 수준의 독성을 야기하지 않는다. 다른 구현예에서, 혈청 농도는 1 $\mu\text{g/ml}$ 초과, 25 $\mu\text{g/ml}$ 초과, 50 $\mu\text{g/ml}$ 초과, 100 $\mu\text{g/ml}$ 초과, 200 $\mu\text{g/ml}$ 초과, 300 $\mu\text{g/ml}$ 초과, 400 $\mu\text{g/ml}$ 초과, 500 $\mu\text{g/ml}$ 초과, 약 1 내지 약 100 $\mu\text{g/ml}$, 약 1 내지 약 200 $\mu\text{g/ml}$, 약 1 내지 약 300 $\mu\text{g/ml}$, 약 1 내지 약 400 $\mu\text{g/ml}$, 및 약 1 내지 약 500 $\mu\text{g/ml}$ 로 이루어진 군으로부터 선택되는 양이다. 바람직한 구현예에서, 포유류는 인간이다. 하나의 구현예에서, ABM 은 항체이다. 바람직한 구현예에서, 항체는 당조작되고, 항체의 비-당조작된 형태에 비해 증가된 Fc γ RIII 결합을 갖는다.

[0280] 제조 품목

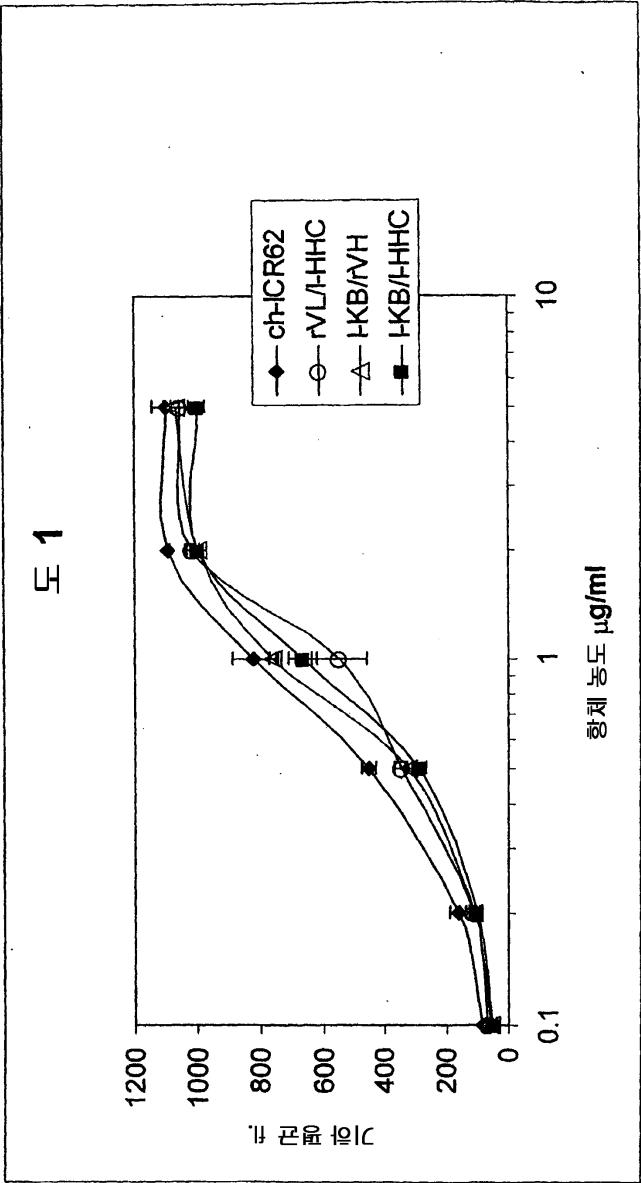
[0281] 본 발명의 또다른 구현예에서, 상기 기재된 장애의 치료에 유용한 재료를 함유하는 제조 품목이 제공된다. 제조 품목은 용기 및 용기 상에 또는 이와 관련된 라벨 또는 패키지 삽입물을 포함한다. 적합한 용기에는 예를 들어, 병, 바이알, 주사기 등이 포함된다. 용기는 다양한 재료, 예컨대 유리 또는 플라스틱으로 제조할 수 있다. 용기에는 상태의 치료에 유효한 조성물을 함유하고, 살균 접근 포트를 가질 수 있다 (예를 들어 용기는 피하 주사 바늘에 의해 꿰뚫을 수 있는 스토퍼를 갖는 정맥내 용액 백 또는 바이알일 수 있다). 조성물 중의 하나 이상의 활성제는 항-EGFR 항체이다. 라벨 또는 패키지 삽입물은 조성물이 선택 상태, 예컨대 질환 또는 장애에 EGFR 수용체 및/또는 EGFR-리간드의 비정상 활성화 또는 제도가 포함되는 비-악성 질환 또는 장애, 예를 들어 양성 과증식성 질환 또는 장애의 치료에 사용되는 것을 의미한다. 게다가, 제조 품목은 (a) 조성물이 EGFR 에 결합하고, EGFR 을 과발현하는 세포의 성장을 억제하는 제 1 항체를 포함하는, 그 안에 함유된 조성물을 갖는 제 1 용기; 및 (b) 조성물이 EGFR 에 결합하고, EGFR 수용체의 리간드 활성화를 차단하는 제 2 항체를 포함하는, 그 안에 함유된 조성물을 갖는 제 2 용기를 포함할 수 있다. 본 발명의 상기 구현예에서의 제조 품목은 추가로 제 1 및 제 2 항체 조성물이 상기 정의 섹션에서의 그러한 질환 또는 장애의 목록으로부터의 비-악성 질환 또는 장애를 치료하기 위해 사용할 될 수 있다는 것을 나타내는 패키지 삽입물을 포함할 수 있다. 게다가, 패키지 삽입물은 조성물 (EGFR 에 결합하고, EGFR 수용체의 리간드 활성화를 차단하는 항체를 포함함) 의 사용자에게 항체로의 요법과 상기 섹션에서 기재된 임의의 부속 요법 (예, 화학치료제, EGFR-표적 약물, 항-혈관신생제, 면역억제제, 티로신 키나아제 억제제, 항-호르몬 화합물, 심장보호제 및/또는 사이토카인) 을 조합하도록 지시할 수 있다. 대안적으로는, 또는 부가적으로는, 제조 품목은 약학적으로 허용가능한 완충제, 예컨대 정균처리한 주사용수 (BWFJ), 인산염 식염수, 링거 용액 및 텍스트로오스 용액을 포함하는 제 2 (또는 제 3) 용기를 추가로 포함할 수 있다. 또한 기타 완충제, 희석제, 필터, 바늘 및 주사기를 포함하는, 상업적 및 소비자 관점에서 바람직한 기타 재료가 추가로 포함될 수 있다.

[0282] 하기 실시예는 본 발명을 더욱 상세히 설명한다. 하기 제제 및 실시예는 당업자가 본 발명을 더욱 명확하게 이해하고 실시하기 위해 제공된다. 그러나 본 발명이, 구체화된 구현예에 의해 범주가 제한되는 것은 아니고, 이것은 본 발명의 한 단면의 예증으로 의도되며, 기능상으로 동등한 방법은 본 발명의 범주 내에 있다. 게다가, 본원에 기재된 것 외에도 이하 명세서 및 첨부된 도면으로부터 본 발명의 다양한 변경이 당업자에게 명백할 것이다. 이러한 변경은 청구의 범위 내에 있는 것으로 의도된다.

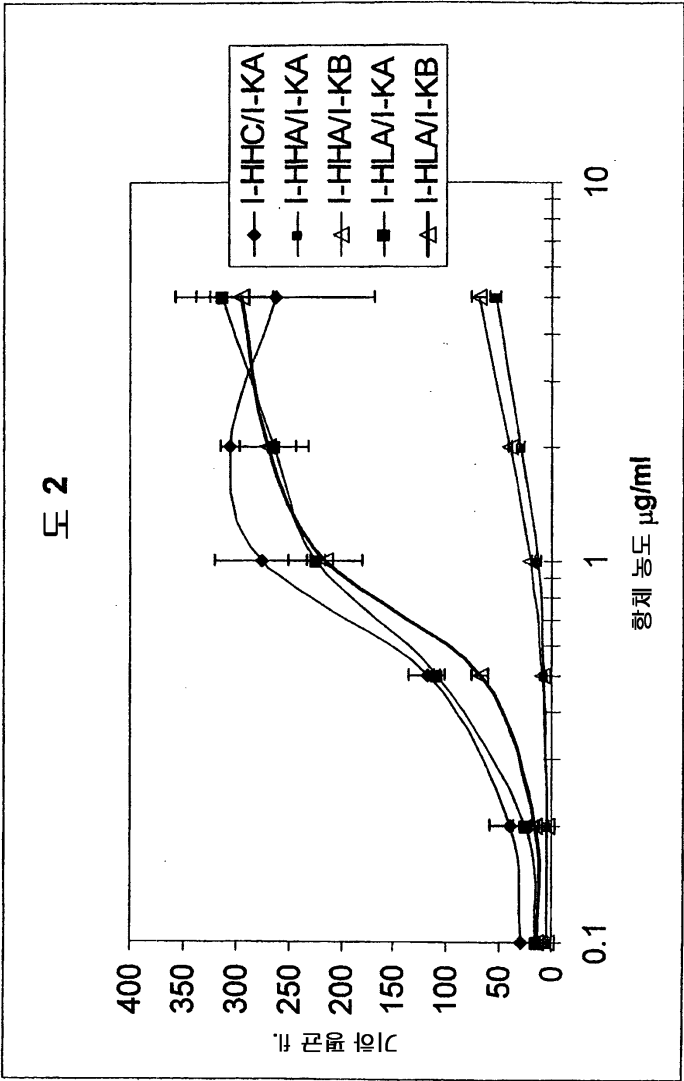
[0283] 본 출원에 언급된 모든 특허, 출원 및 공개는 본원에 전체가 참조로서 인용된다.

도면

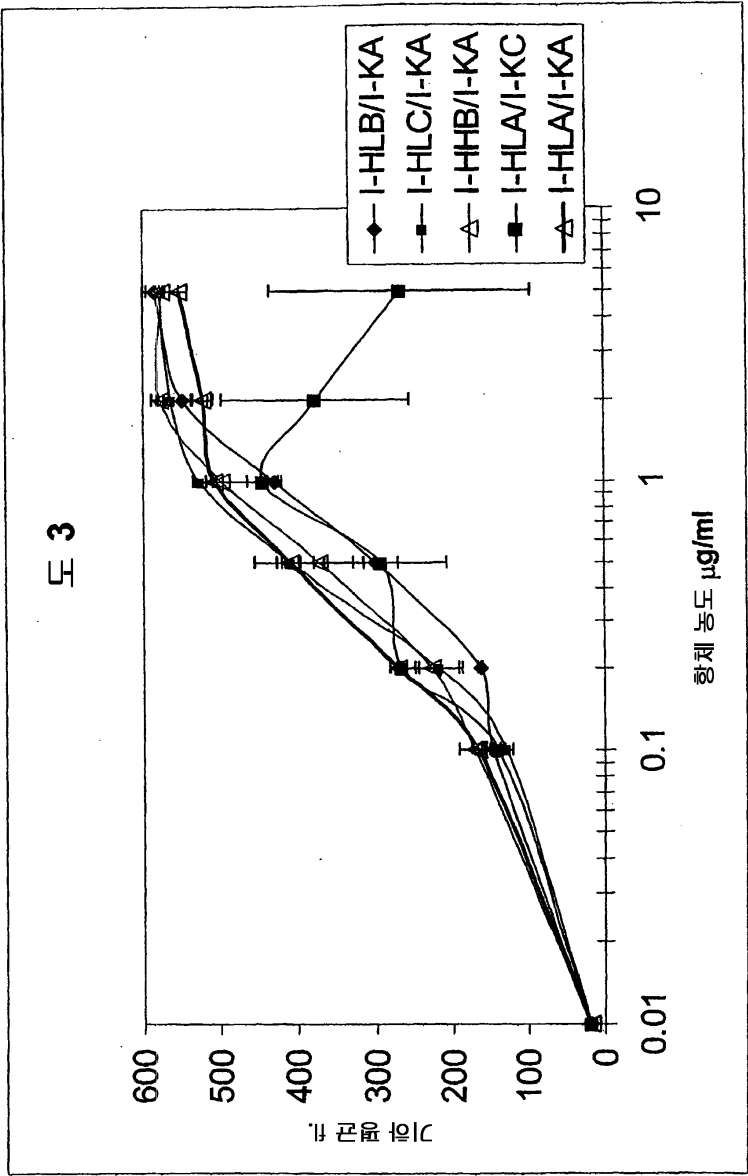
도면1



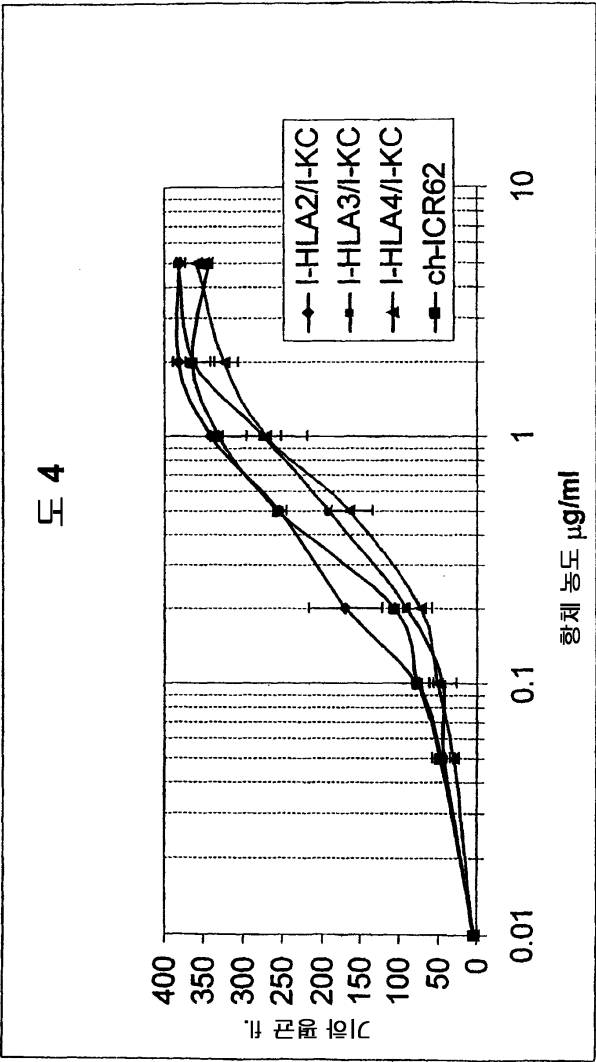
도면2



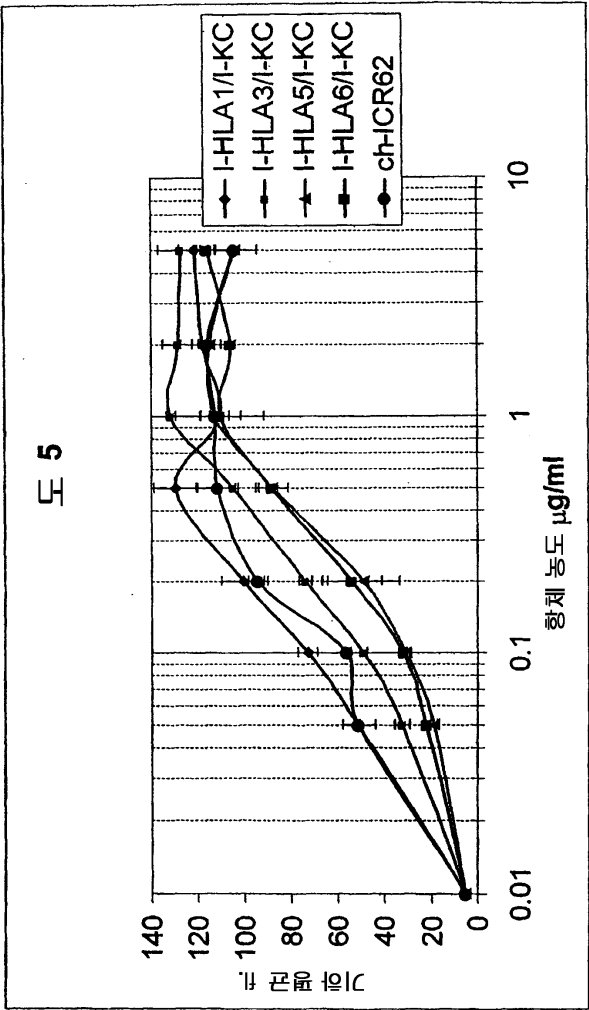
도면3



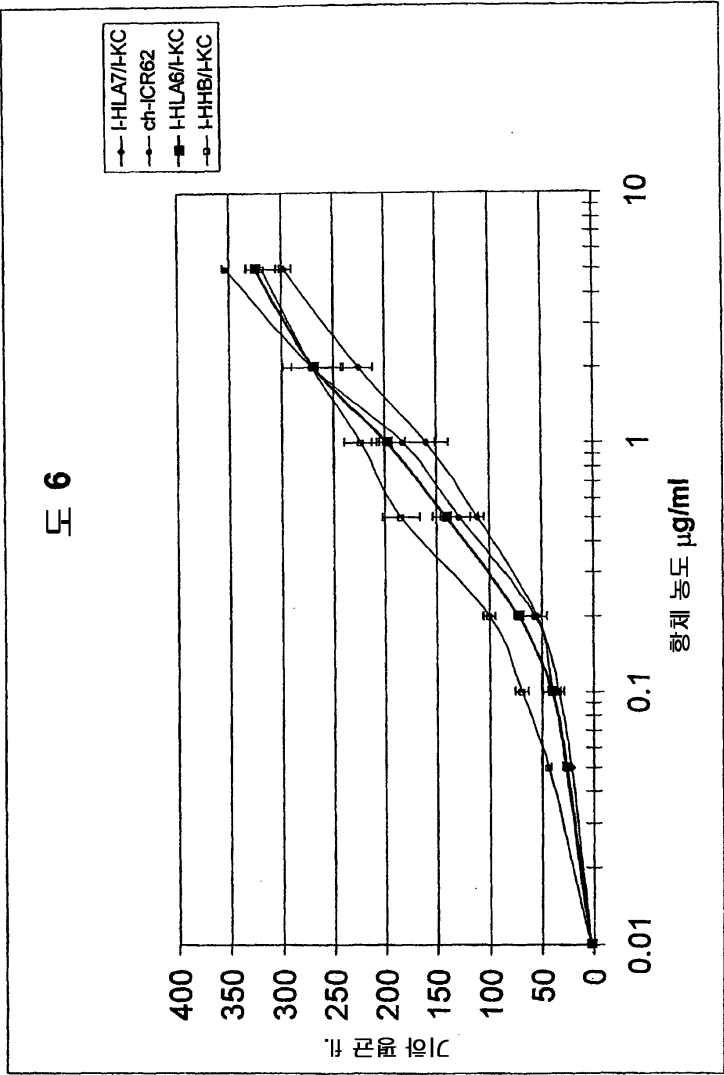
도면4



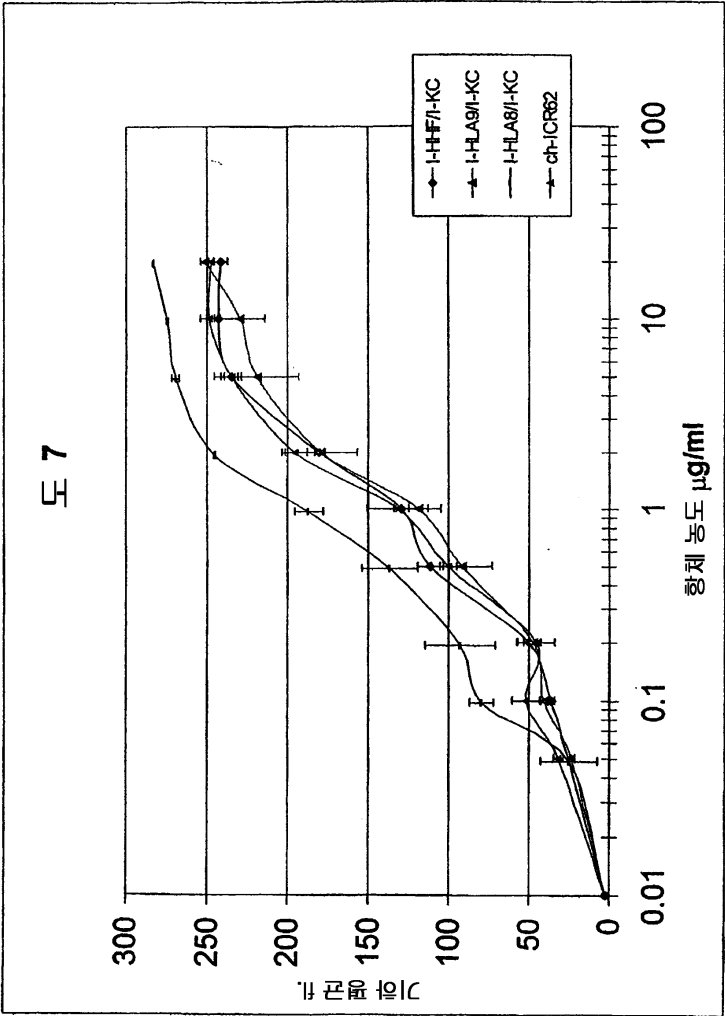
도면5



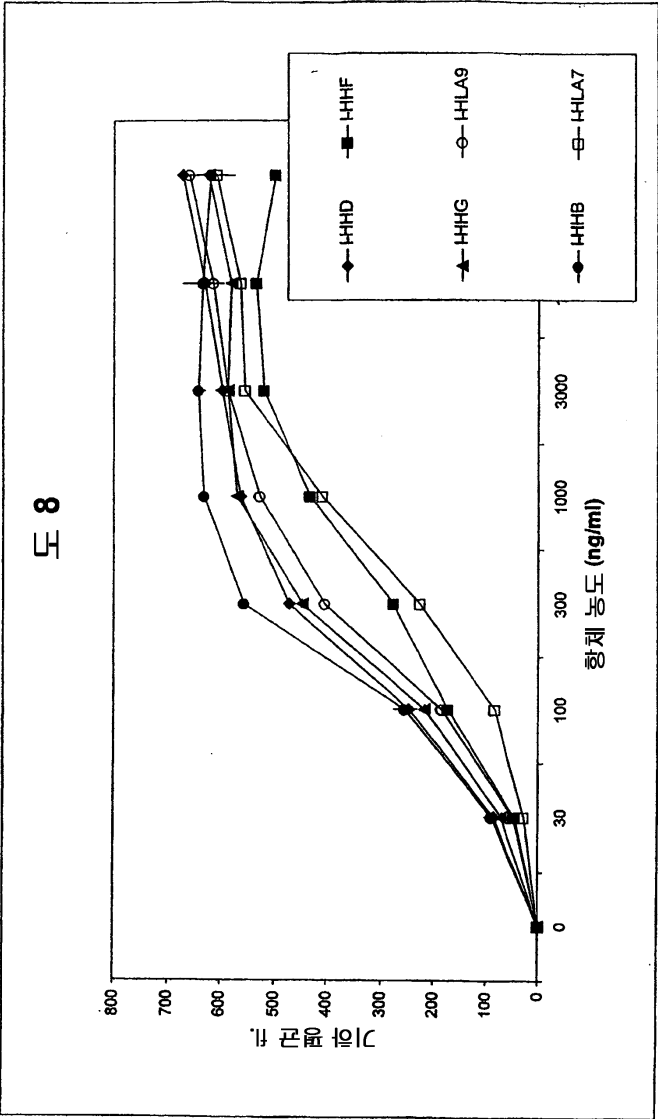
도면6



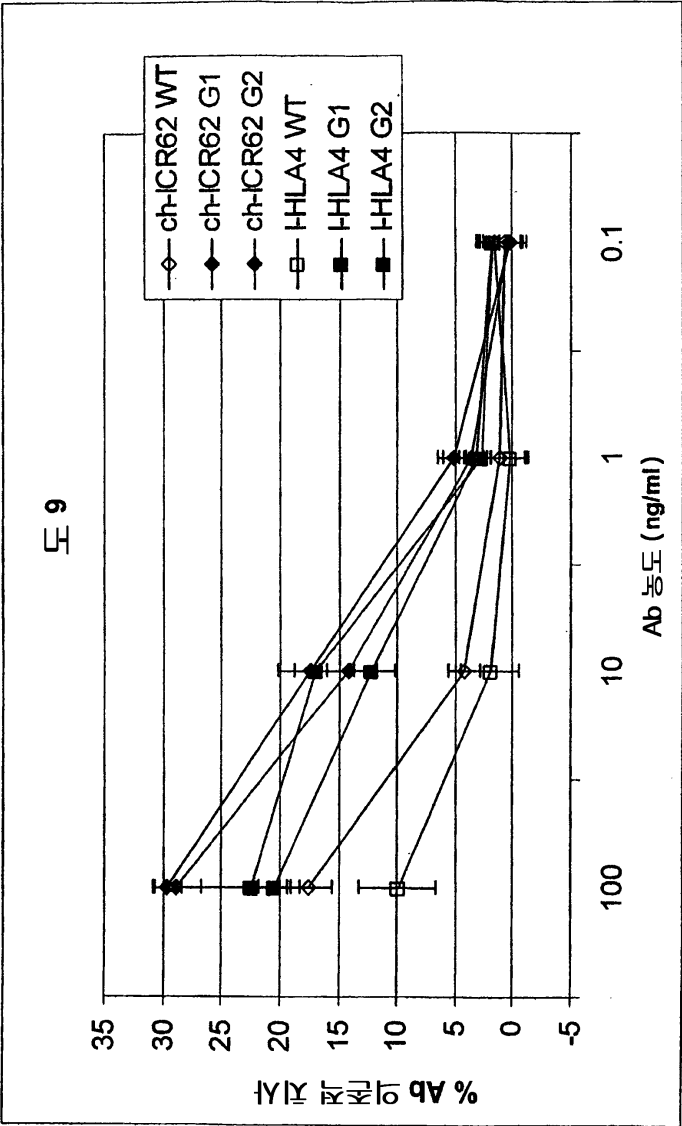
도면7



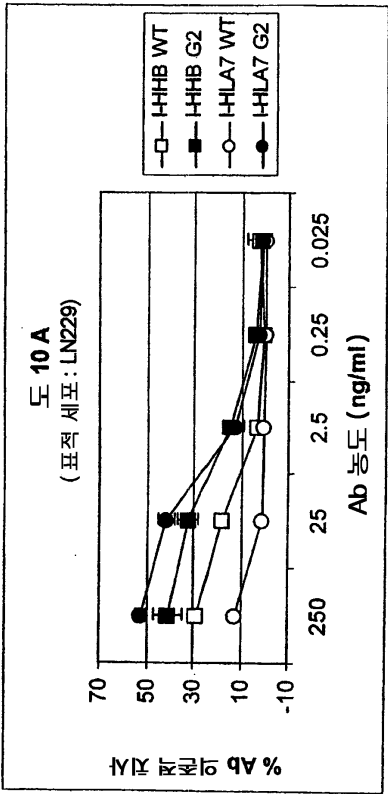
도면8



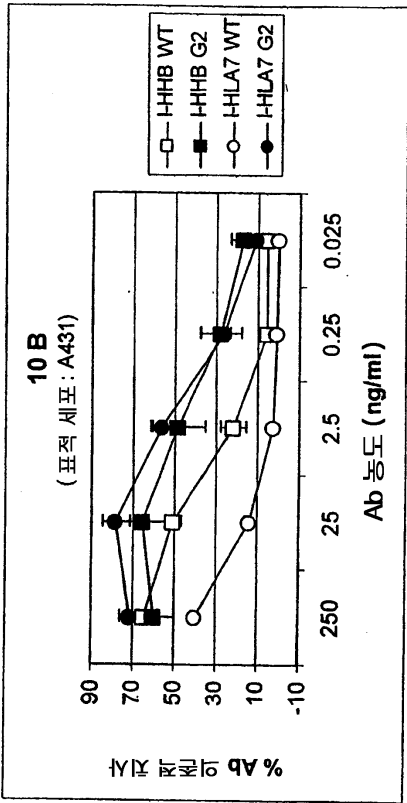
도면9



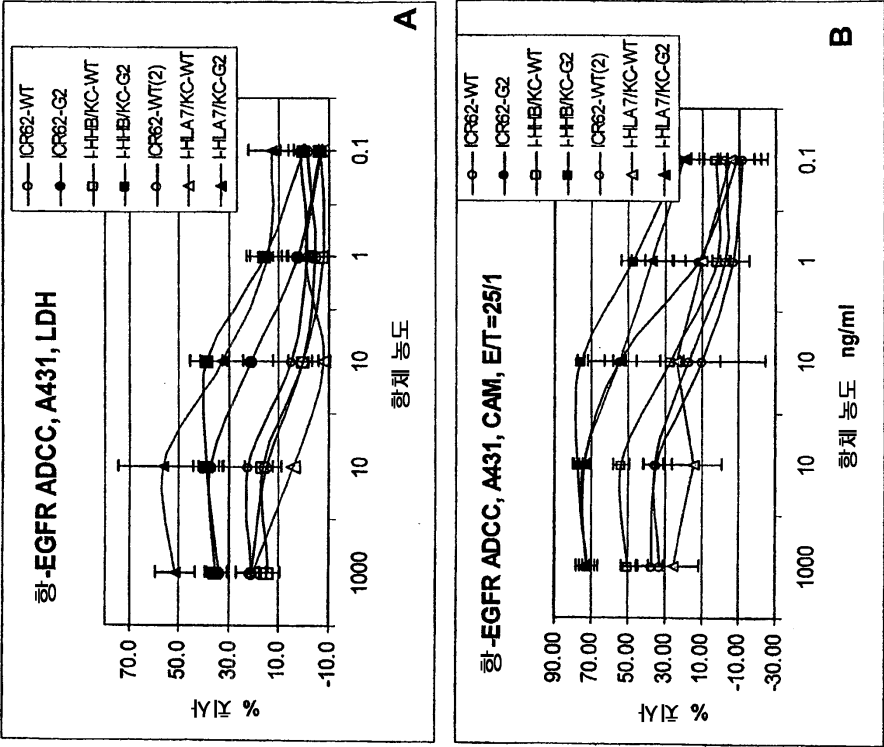
도면10a



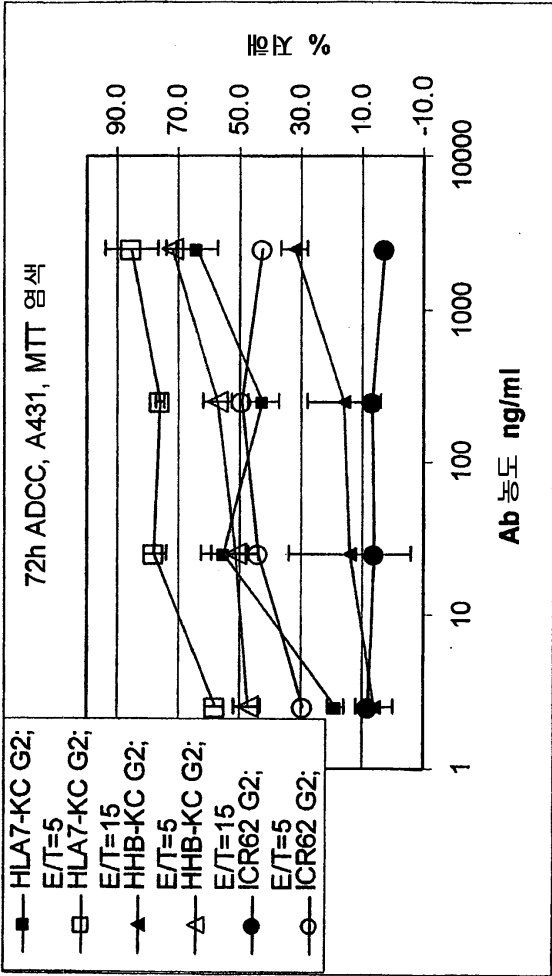
도면10b



도면11

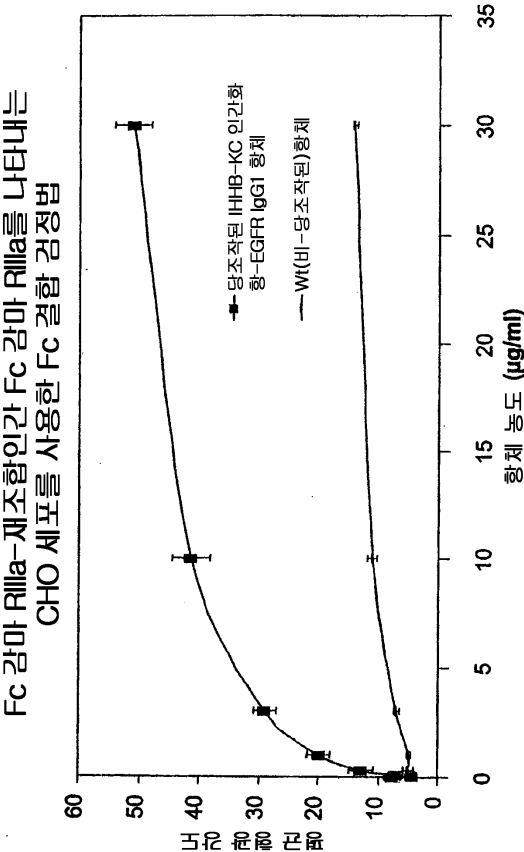


도면12



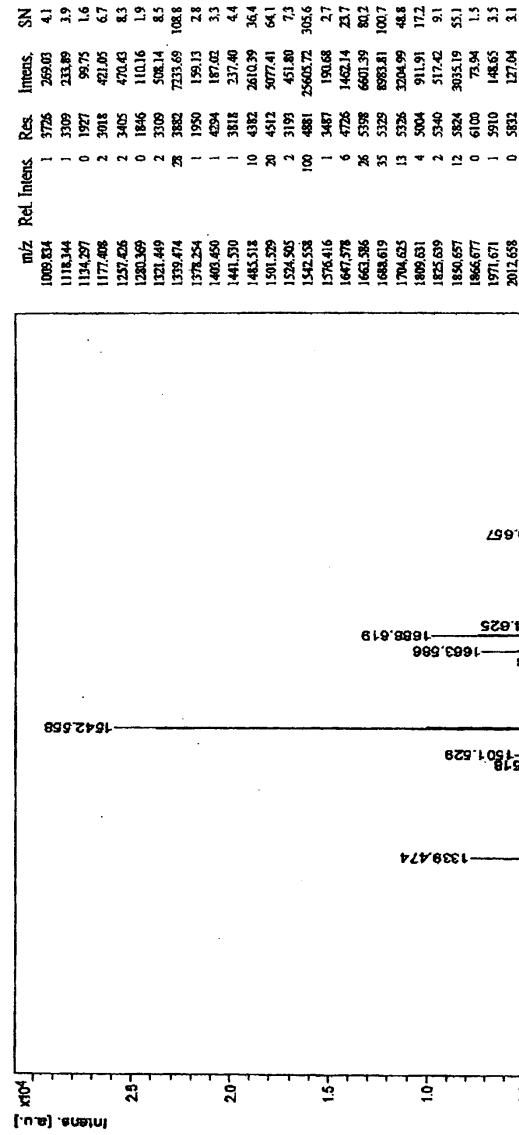
13
H[illegible]

도면14



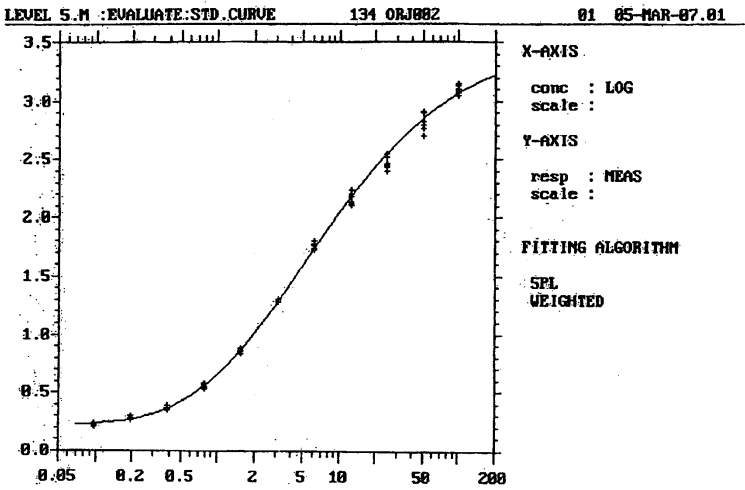
도면15

당조작된 인간화 항-EGFR IgG1 항체 IHHB-KC에 대한
MALDI/TOF-MS 올리고당 프로파일



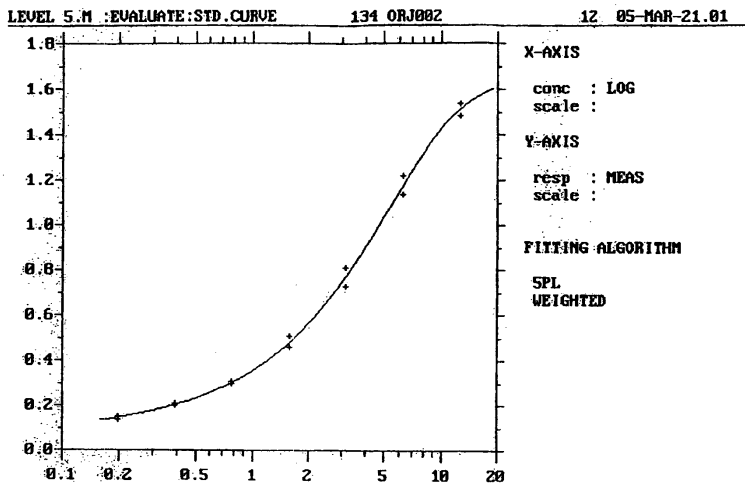
도면16

항-EGFR 정밀도 프로파일



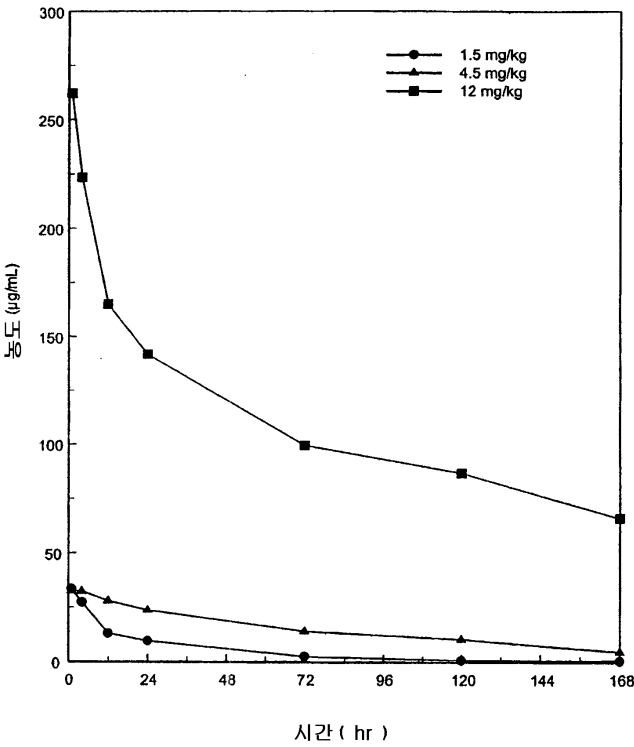
도면17

대표적인 항-EGFR 검정 곡선



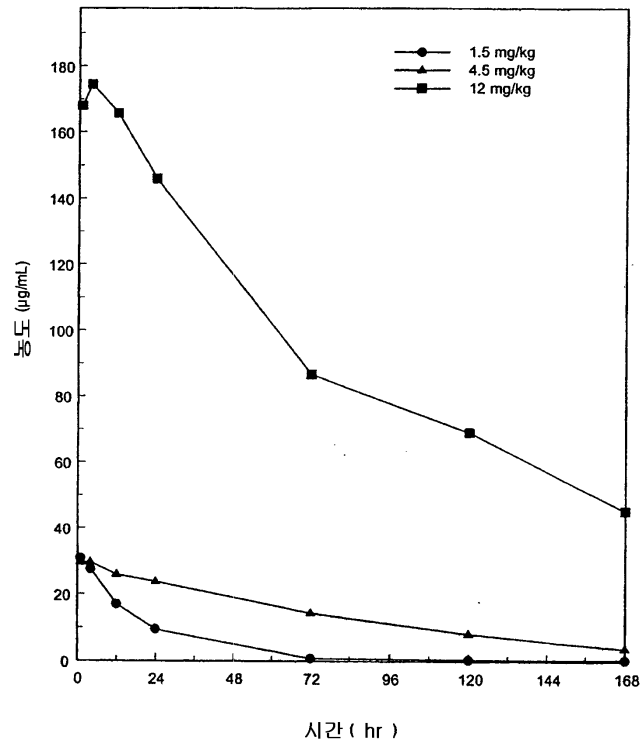
도면18

수컷 사이노몰거스 원숭이에 대한 항-EGFR의 매주 정맥내 투여의
제 1 일에서의 항-EGFR의 혈청 농도



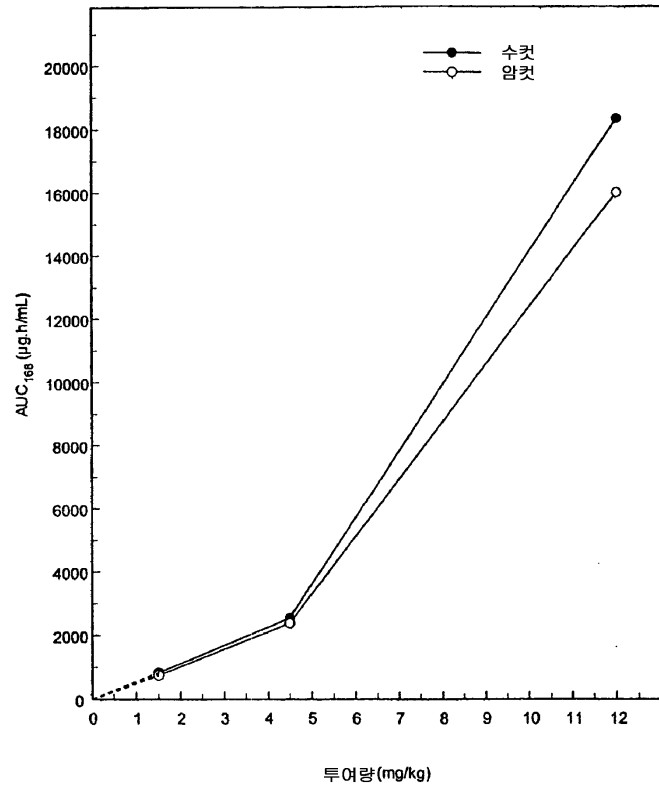
도면19

암컷 사이노몰거스 원숭이에 대한 항-EGFR의 매주 정맥내 투여의
제 1 일에서의 항-EGFR의 혈청 농도



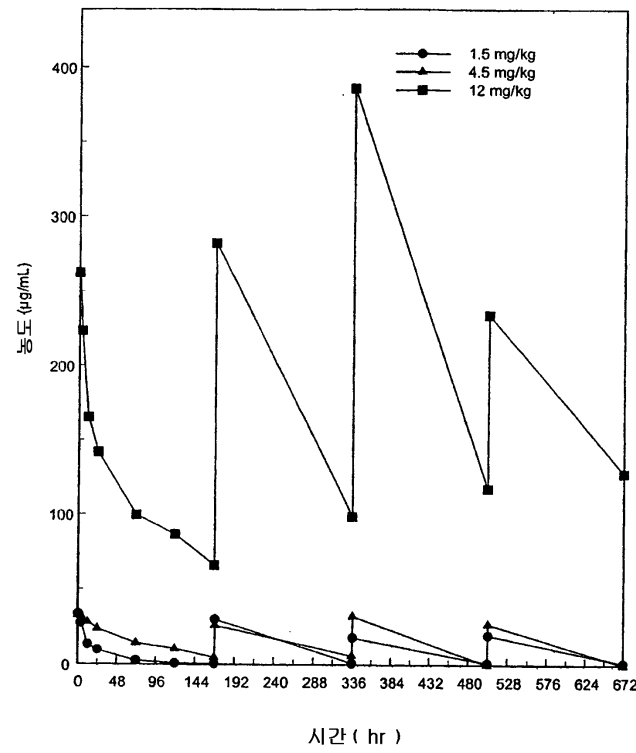
도면20

혈청 항-EGFR 농도-시간곡선하의 면적 (AUC_{168}) 과
사이노몰거스 원숭이에 대한 항-EGFR의 매주 정맥내
투여의 제 1일에서의 투여량 사이의 관계



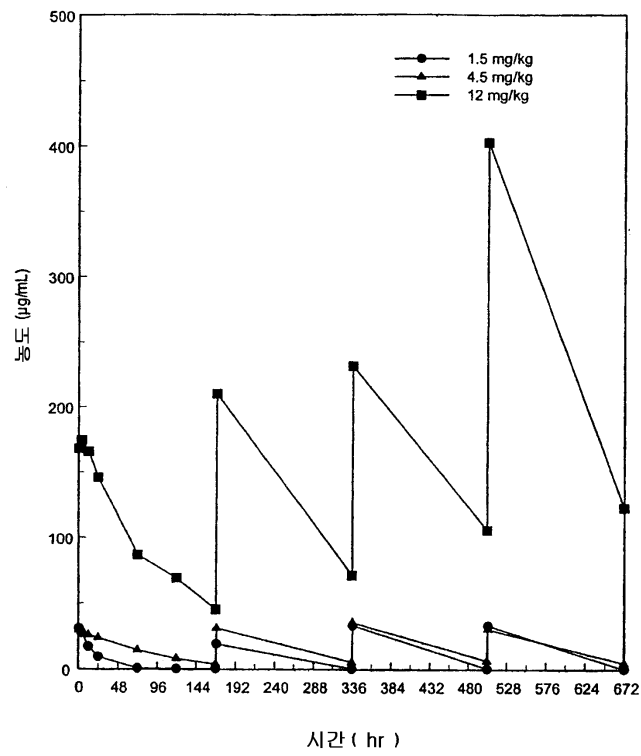
도면21

수컷 사이노몰거스 원숭이에 대한 항-EGFR의 매주 정맥내 투여 동안
항-EGFR의 혈청 농도

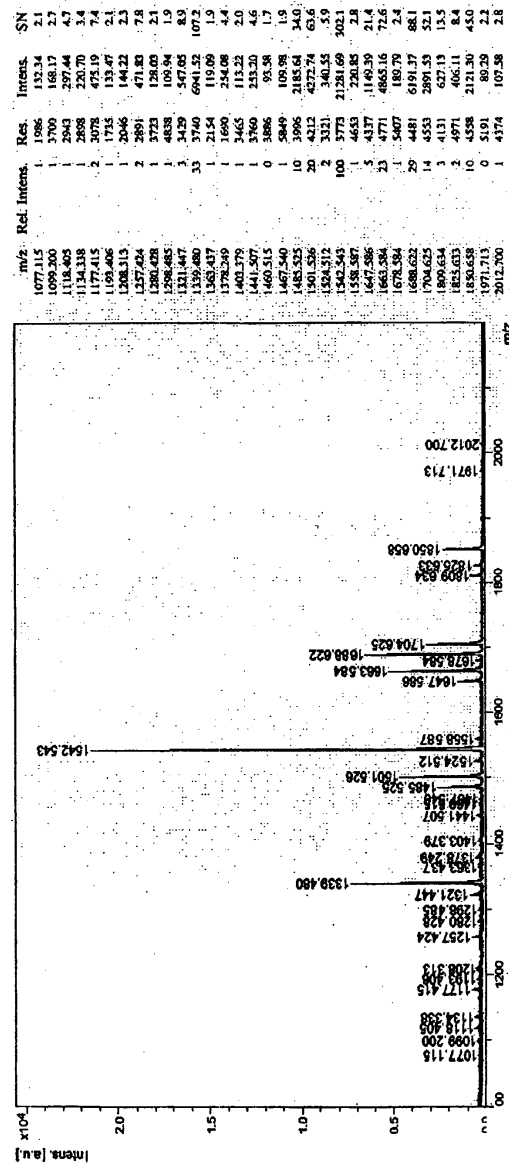


도면22

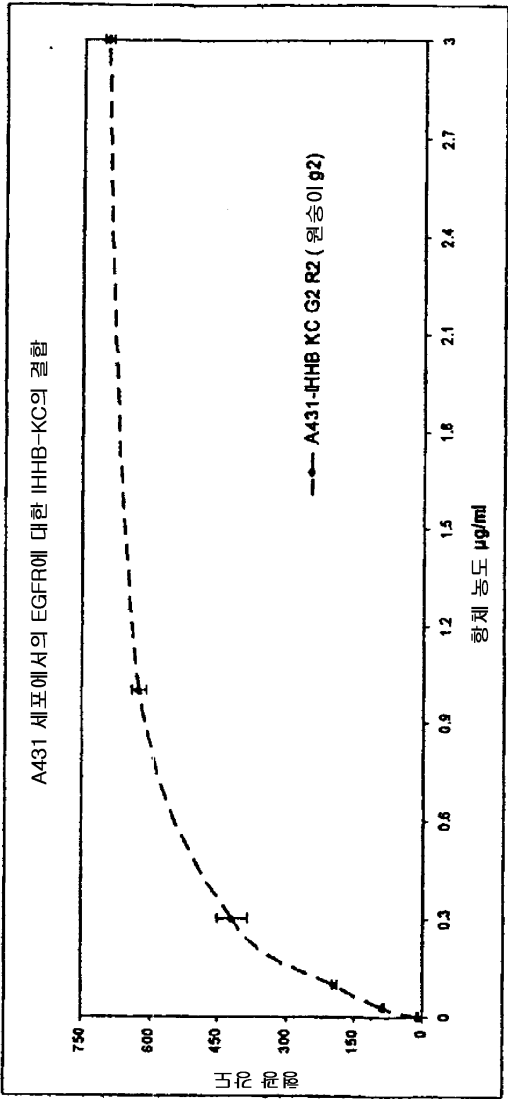
암컷 사이노몰거스 원숭이에 대한 항-EGFR의 매주 정맥내 투여 동안
항-EGFR의 혈청 농도



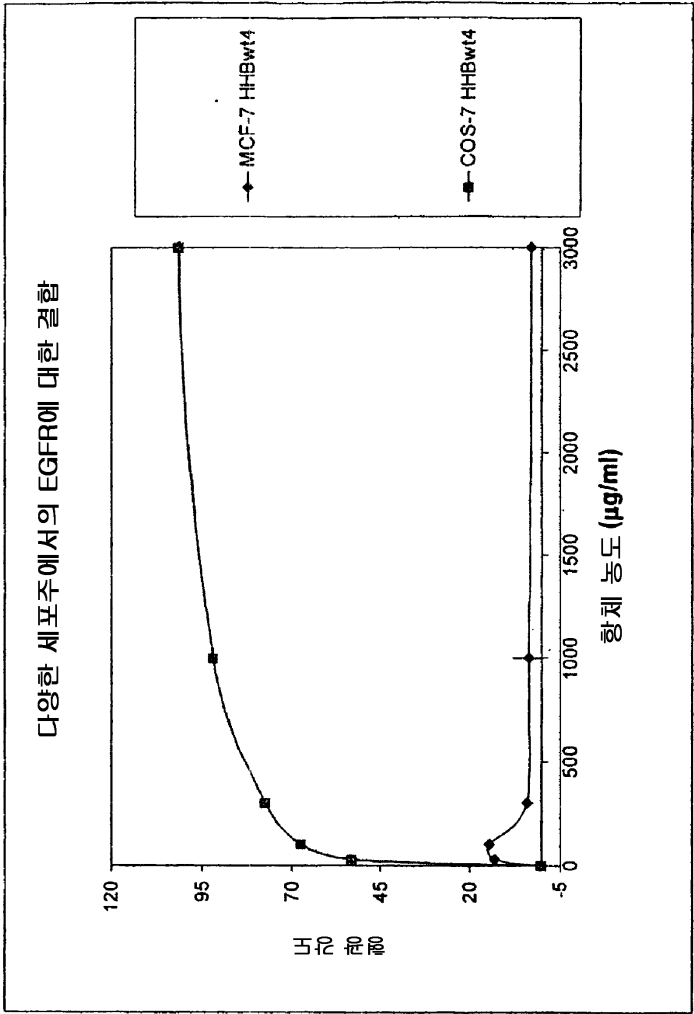
도면23



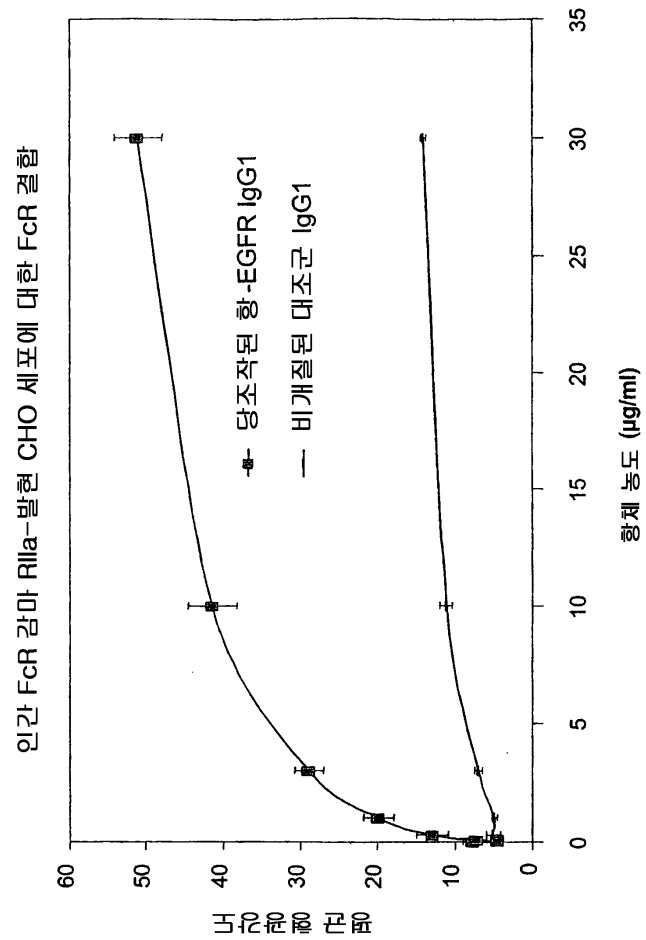
도면24



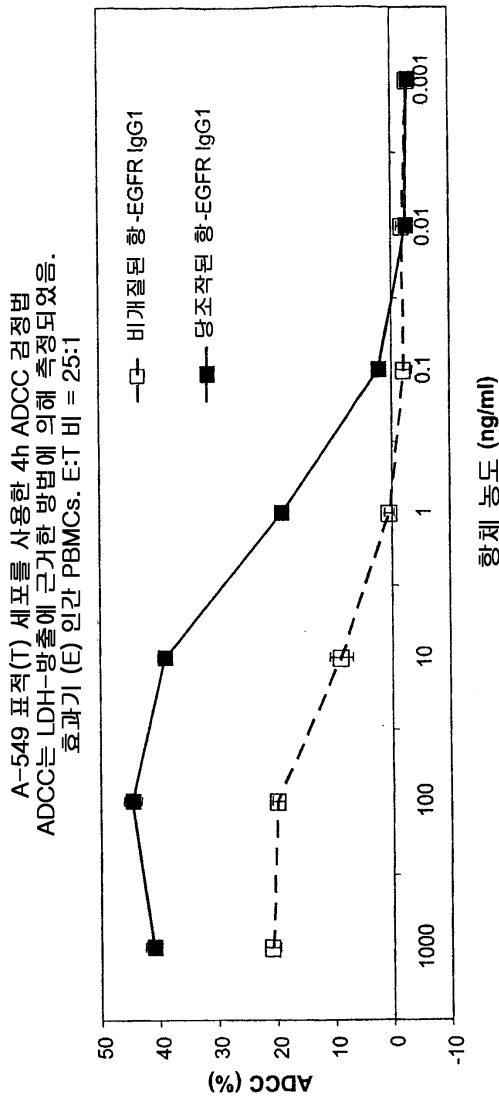
도면25

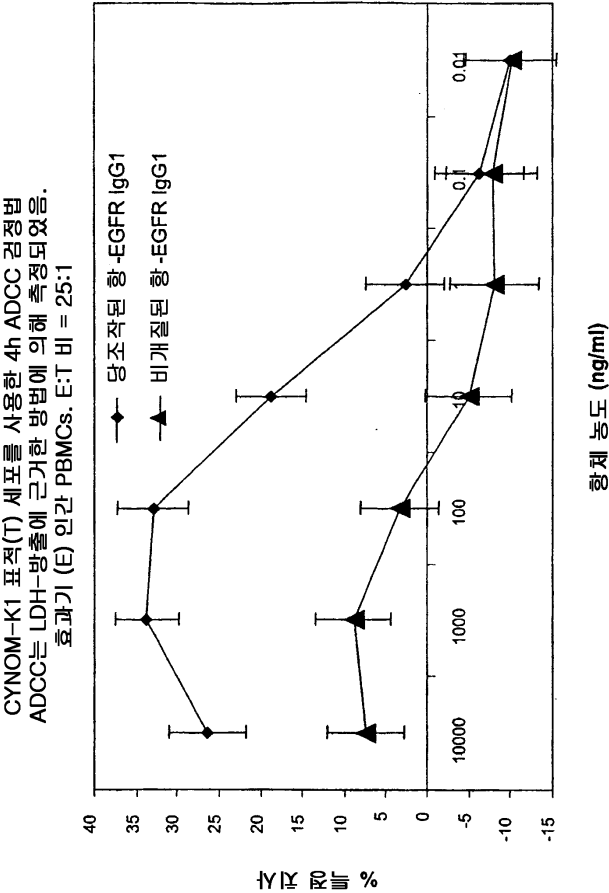


도면26

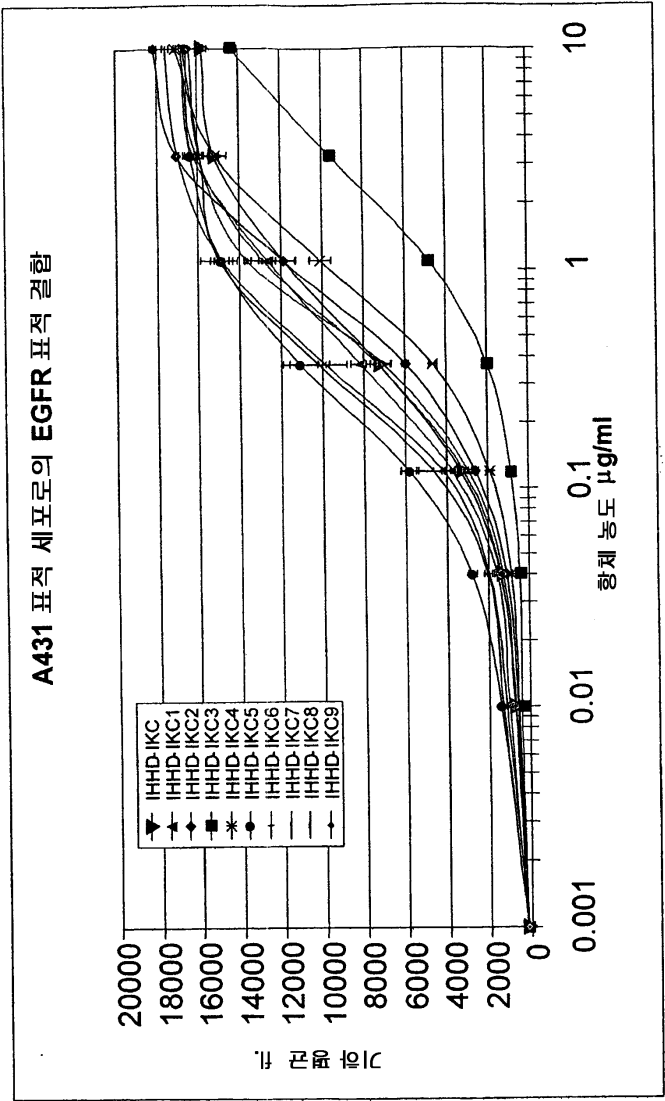


도면27





도면29



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> GlycArt Biotechnology AG

<120> Antigen Binding Molecules That Bind EGFR, Vectors Encoding Same, And Uses Thereof

<130> 1975.043PC02/TJS/T-M

<150> 60/650,115

<151> 2005-02-07

<160> 127

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 120

<212> PRT

<213> Rattus sp.

<220>

<223> ICR62 VH

<400> 1

Gln Val Asn Leu Leu Gln Ser Gly Ala Ala Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Gly Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

Lys Ile His Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Tyr Phe Asn Pro Asn Ser Gly Tyr Ser Thr Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

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

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

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

Gly Ala Ser Val Thr Val Ser Ser

115

120

<210> 2
<211> 359
<212> DNA
<213> Rattus sp.

<220>
<223> ICR62 VH

<400> 2
caggtcaacc tactgcagtc tggggctgca ctggtgaagc ctggggcctc tgtgaagttg 60

tcttgcaaag gttctggttt tacattcact gactacaaga tacactgggt gaagcagagt 120

catggaaaga gccttgagtg gattgggtat tttaatccta acagtgggtta tagtacctac 180

aatgaaaagt tcaagagcaa ggccacattg actgcagaca aatccaccga tacagcctat 240

atggagctta ccagtctgac atctgaggac tctgcaacct attactgtac aagactatec 300

ccaggggggtt aciatgttat ggatgcctgg ggtcaaggag cttcagtcac tgtctcctc 359

<210> 3
<211> 120
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> I-HHA

<400> 3

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

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

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

35

40

45

Gly Gly Ile Asn Pro Asn Ser Gly Tyr Ser Thr Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Leu Ser Pro Gly Gly Tyr Tyr Val Met Asp Ala Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 4

<211> 360

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> I-HHA

<400> 4

caggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc 60

tcctgcaagg cttctggatt tacattcact gactacgcca tcagctgggt gcgacaggcc 120

cctggacaag ggctcgagtg gatgggaggg atcaatccta acagtgggtta tagtacctac 180

gcacagaagt tccagggcag ggtcaccatt accgcggaca aatccacgag cacagcctac 240

atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagactatcc 300

ccaggcggtt actatgttat ggatgcctgg ggccaaggga ccaccgtgac cgtctcctca 360

<210> 5
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> I-HHB

<400> 5

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

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

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

Gly Tyr Phe Asn Pro Asn Ser Gly Tyr Ser Thr Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

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

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

Ala Arg Leu Ser Pro Gly Gly Tyr Tyr Val Met Asp Ala Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 6
 <211> 360
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> I-HHB

<400> 6

caggtgcagc tggatgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc 60

tcctgcaagg gttctggttt tacattcact gactacaaga tacactgggt gcgacaggcc 120

cctggacaag ggctcgagtg gatgggatat ttcaacccta acagcgggta tagtacctac 180

gcacagaagt tccagggcag ggtcaccatt accgcggaca aatccacgag cacagcctac 240

atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagactatcc 300

ccaggcgggtt aciatgttat ggatgcctgg ggccaaggga ccaccgtgac cgtctcctca 360

<210> 7

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> I-HHC

<400> 7

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

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

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

Gly Tyr Phe Asn Pro Asn Ser Gly Tyr Ser Thr Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Ser Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

<400> 9

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Tyr Ser Thr Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Leu Ser Pro Gly Gly Tyr Tyr Val Met Asp Ala Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 10

<211> 360

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> I-HLA

<400> 10

caggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc ggtgaaggtc 60

tcctgcaagg cctctggttt tacattcact gactactata tgcaactgggt gcgacaggcc 120

cctggacaag ggctcgagtg gatgggctgg atcaatccta acagtggta tagtacctac 180
gcacagaagt ttcagggcag ggtcaccatg accgccgaca cgtccatcag cacagcctac 240
atggagctga gcaggctgag atctgacgac acggccgtgt attactgtgc gagactatcc 300
ccaggcggtt actatgttat ggatgcctgg ggccaaggga ccacgtgac cgtctcctca 360

<210> 11
<211> 120
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> I-HLB

<400> 11

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

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

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

Gly Tyr Phe Asn Pro Asn Ser Gly Tyr Ser Thr Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Leu Ser Pro Gly Gly Tyr Tyr Val Met Asp Ala Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 12
<211> 360
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> I-HLB

<400> 12
caggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggagcctc ggtgaaggtc 60

tcctgcaagg gttctggttt tacattcact gactacaaga tccactgggt gcgacaggcc 120

cctggacaag ggctcgagtg gatgggatac ttcaacccta acagcgggta tagtacctac 180

gcacagaagt tccagggcag ggtcaccatg accgccgaca cgtccatcag cacagcctac 240

atggagctga gcaggctgag atctgacgac acggccgtgt attactgtgc gagactatcc 300

ccaggcgggtt actatgttat ggatgcctgg ggccaaggga ccaccgtgac cgtctcctca 360

<210> 13
<211> 120
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> I-HLC

<400> 13

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Gly Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp Tyr

20 25 30

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

Gly Tyr Phe Asn Pro Asn Ser Gly Tyr Ser Thr Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Ser Arg Val Thr Met Thr Ala Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Leu Ser Pro Gly Gly Tyr Tyr Val Met Asp Ala Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 14
<211> 360
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> I-HLC

<400> 14
caggtgcagc tggatgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggagcctc agtgaaggtc 60

tcctgcaagg gttctggttt tacattcact gactacaaga tccactgggt gcgacaggcc 120

cctggacaag ggctcgagtg gatgggatac ttcaacccta acagcgggta cagtacttac 180

aacgagaagt tcaagagccg ggatccatg accgccgaca cgtccatcag cacagcctac 240

atggagctga gcaggctgag atctgacgac acggccgtgt attactgtgc gagactatcc 300

ccagggggtt actatgttat ggatgcctgg ggccaagga ccaccgtgac cgtctcctca 360

<210> 15
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> I-HHD

<400> 15

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

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

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

Gly Tyr Phe Asn Pro Asn Ser Gly Tyr Ser Thr Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

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

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

Ala Arg Leu Ser Pro Gly Gly Tyr Tyr Val Met Asp Ala Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 16

<211> 360
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> I-HHD

<400> 16
 caggtgcagc tggatgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc 60
 tcctgcaagg cctctggttt cacattcact gactacaaga tacactgggt gcgacaggcc 120
 cctggacaag ggctcgagtg gatgggatat ttcaacccta acagcggtta tagtacctac 180
 gcacagaagt tccagggcag ggtcaccatt accgcggaca aatccacgag cacagcctac 240
 atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagactatcc 300
 ccaggcggtt actatgttat ggatgcctgg ggccaaggga ccaccgtgac cgtctcctca 360

<210> 17
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> I-HHE

<400> 17

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

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

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

Gly Tyr Phe Asn Pro Asn Ser Gly Tyr Ser Thr Tyr Ala Gln Lys Phe

50

55

60

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

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

Ala Arg Leu Ser Pro Gly Gly Tyr Tyr Val Met Asp Ala Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 18

<211> 360

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> I-HHE

<400> 18

caggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggct 60

tcctgcaagg gtctctggttt cacattcact gactacaaga tctcctgggt gcgacaggct 120

cctggacaag ggctcgagtg gatgggatat ttcaacccta acagcgggta tagtacctac 180

gcacagaagt tccagggcag ggtcaccatt accgcggaca aatccacgag cacagcctac 240

atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagactatcc 300

ccaggcggtt actatgttat ggatgcctgg ggccaaggga ccaccgtgac cgtctcctca 360

<210> 19

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> I-HHF

<400> 19

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

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

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

Gly Tyr Phe Asn Pro Asn Ser Gly Tyr Ser Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Leu Ser Pro Gly Gly Tyr Tyr Val Met Asp Ala Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 20

<211> 360

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> I-HHF

<400> 20
caggtgcagc tggctgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc 60

tcctgcaagg gttctggttt tacattcact gactacaaga tacactgggt gcgacaggcc 120

cctggacaag ggctcgagtg gatgggatat ttcaacccta acagcgggta ttcgaactac 180

gcacagaagt tccagggcag ggtcaccatt accgcggaca aatccacgag cacagcctac 240

atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagactatcc 300

ccaggcggtt aciatgttat ggatgcctgg ggccaaggga ccacgtgac cgtctcctca 360

<210> 21
<211> 120
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> I-HHG

<400> 21

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

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

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

Gly Tyr Phe Asn Pro Asn Ser Gly Tyr Ala Thr Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Leu Ser Pro Gly Gly Tyr Tyr Val Met Asp Ala Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 22
<211> 360
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> I-HHG

<400> 22
caggtgcagc tggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc 60

tcctgcaagg gtctcggttt tacattcact gactacaaga tacactgggt gcgacaggcc 120

cctggacaag ggctcgagtg gatgggatat ttcaacccta acagcggtta tgccacgtac 180

gcacagaagt tccagggcag ggtcaccatt accgcggaca aatccacgag cacagcctac 240

atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagactatcc 300

ccaggcggtt actatgttat ggatgcctgg ggccaaggga ccaccgtgac cgtctcctca 360

<210> 23
<211> 120
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> I-HLA1

<400> 23

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

1 5 10 15

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

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

Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Tyr Ser Thr Tyr Ser Pro Ser Phe
50 55 60

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Leu Ser Pro Gly Gly Tyr Tyr Val Met Asp Ala Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 24
<211> 360
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> I-HLA1

<400> 24
caggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggagcctc ggtgaaggtc 60

tcctgcaagg cctctggttt tacattcact gactactata tgcactgggt gcgacaggcc 120

cctggacaag ggctcgagtg gatgggctgg atcaatccta acagtgggta tagtacctac 180

agcccaagct tccaaggcca ggtcaccatc tcagccgaca agtccatcag caccgcctac 240

ctgcagtgga gcagcctgaa ggcctcggac accgccatgt attactgtgc gagactatcc 300

ccaggcgggtt actatgttat ggatgcctgg ggccaaggga ccaccgtgac cgtctcctca 360

<210> 25

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> I-HLA2

<400> 25

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

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

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

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

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Leu Ser Pro Gly Gly Tyr Tyr Val Met Asp Ala Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115

120

<210> 26
<211> 360
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> I-HLA2

<400> 26
caggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggagcctc ggtgaaggtc 60

tcctgcaagg cctctggttt tacattcact gactactata tgcactgggt gcgacaggcc 120

cctggacaag ggctcgagtg gatgggctgg atcaatccta acagtggta tagtacctac 180

aacgagaagt tccaaggcca ggtcaccatc tcagccgaca agtccatcag caccgcctac 240

ctgcagtgga gcagcctgaa ggccctggac accgcatgt attactgtgc gagactatcc 300

ccaggcggtt aciatgttat ggatgcctgg ggccaaggga ccacgtgac cgtctcctca 360

<210> 27
<211> 120
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> I-HLA3

<400> 27

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

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

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

35

40

45

Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Tyr Ser Thr Tyr Ser Pro Ser Phe
50 55 60

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Leu Ser Pro Gly Gly Tyr Tyr Val Met Asp Ala Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 28

<211> 360

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> I-HLA3

<400> 28

caggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggagcctc ggtgaaggtc 60

tcctgcaagg cctctggtta cacattcact gactactata tgcaactgggt gcgacaggcc 120

cctggacaag ggctcgagtg gatgggctgg atcaatccta acagtgggtta tagtacctac 180

agcccaagct tccaaggcca ggtcaccatc tcagccgaca agtccatcag caccgcctac 240

ctgcagtgga gcagcctgaa ggctcggac accgccatgt attactgtgc gagactatcc 300

ccaggcgggtt actatgttat ggatgcctgg ggccaaggga ccaccgtgac cgtctcctca 360

<210> 29
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> I-HLA4

<400> 29

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

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

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

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

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Leu Ser Pro Gly Gly Tyr Tyr Val Met Asp Ala Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 30
 <211> 360
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> I-HLA4

<400> 30

caggtgcagc tggatgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggagcctc ggtgaaggtc 60

tcctgcaagg cctctggtta cacattcact gactactata tgcactgggt gcgacaggcc 120

cctggacaag ggctcgagtg gatgggctgg atcaatccta acagtgggtta tagtacctac 180

aacgagaagt tccaaggcca gggtaccatc tcagccgaca agtccatcag caccgcctac 240

ctgcagtgga gcagcctgaa ggcctcggac accgcatgt attactgtgc gagactatcc 300

ccaggcgggtt aciatgttat ggatgcctgg ggccaaggga ccaccgtgac cgtctcctca 360

<210> 31

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> I-HLA5

<400> 31

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Tyr Ser Thr Tyr Ser Pro Ser Phe
50 55 60

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Leu Ser Pro Gly Gly Tyr Tyr Val Met Asp Ala Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

$\langle 210 \rangle$	32
$\langle 211 \rangle$	360
$\langle 212 \rangle$	DNA
$\langle 213 \rangle$	Artificial Sequence

<220>
<223> I-HLA5

<400> 32
 cagatgcagc tggatgcagtc tgggccagag gtgaagaagc ctggaacctc ggtgaaggct 60

tcctgcaagg cctctggttt tacattcact gactactata tgcactgggt gcgacaggcc 120

cctggacaag ggctcgagtg gatgggctgg atcaatccta acagtgggta tagtacctac 180

agcccaagct tccaaggcca ggtcaccatc tcagccgaca agtccatcag caccgcctac 240

ctgcagtggga gcagcctgaa ggcctcggac accgccatgt attactgtgc gagactatcc 300

ccaggcggtt actatgttat ggatgcctgg ggccaaggga ccaccgtgac cgtctctca 360

<210>	33
<211>	120
<212>	PRT
<213>	Artificial Sequence

<220>
<223> I-HLA6

<400> 33

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

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

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

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

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Leu Ser Pro Gly Gly Tyr Tyr Val Met Asp Ala Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 34

<211> 360

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> I-HLA6

<400> 34

cagatgcagc tgggtgcagtc tgggccagag gtgaagaagc ctggaacctc ggtgaaggtc 60

tcctgcaagg cctctggttt tacattcact gactactata tgcaactgggt gcgacaggcc 120

cctggacaag ggctcgagtg gatgggctgg atcaatccta acagtggta tagtacctac 180
 aacgagaagt tccaaggcca ggtcaccatc tcagccgaca agtccatcag caccgcctac 240
 ctgcagtgga gcagcctgaa ggcctcggac accgccatgt attactgtgc gagactatcc 300
 ccaggcgggtt actatgttat ggatgcctgg ggccaaggga ccacgtgac cgtctcctca 360

<210> 35
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> I-HLA7

<400> 35

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

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

Lys Ile His Trp Val Arg Gln Ala Arg Gly Gln Arg Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

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

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Leu Ser Pro Gly Gly Tyr Tyr Val Met Asp Ala Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 36
<211> 360
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> I-HLA7

<400> 36
cagatgcagc tggatgcagtc tgggccagag gtgaagaagc ctggaacctc ggtgaaggtc 60

tcctgcaagg cctctggttt tacattcact gactacaaga tccactgggt gcgacaggcc 120

cgcggaacaac ggctcgagtgc gatcggtctg atcaatccta acagtgggta tagtacctac 180

aacgagaagt tccaaggcca ggtcaccatc tcagccgaca agtccatcag caccgcctac 240

ctgcagtggg gcagcctgaa ggcctcggac accgccatgt attactgtgc gagactatcc 300

ccaggcgggtt actatgttat ggatgcctgg ggccaaggga ccaccgtgac cgtctcctca 360

<210> 37
<211> 120
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> I-HLA8

<400> 37

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

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

20 25 30

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

Gly Tyr Phe Asn Pro Asn Ser Gly Tyr Ser Thr Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Leu Ser Pro Gly Gly Tyr Tyr Val Met Asp Ala Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 38
<211> 360
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> I-HLA8

<400> 38
cagatgcagc tggatgcagtc tgggccagag gtgaagaagc ctggaacctc ggtgaagtc 60

tcctgcaagg cctctggttt tacattcact gactacaaga tccactgggt gcgacaggcc 120

cctggacaag ggctcgagtg gatgggatat ttcaacccta acagcgggta tagtacctac 180

gcacagaagt tccagggcag ggtcaccatt accgcggaca aatccacgag cacagcctac 240

atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagactatcc 300

ccaggcggtt actatgttat ggatgcctgg ggccaagga ccaccgtgac cgtctcctca 360

<210> 39
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> I-HLA9

<400> 39

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

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30

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

Gly Tyr Phe Asn Pro Asn Ser Gly Tyr Ser Thr Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

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

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

Ala Arg Leu Ser Pro Gly Gly Tyr Tyr Val Met Asp Ala Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 40

<211> 360
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> I-HLA9

<400> 40
 gaggtgcagc tcgtgcagtc tggcgctgag gtgaagaagc ctggcgagtc gtgaagatc 60
 tcctgcaagg gttctgggta ttcatctact gactacaaga tccactgggt gcgacaggcc 120
 cctggacaag ggctcgagtg gatgggatat ttcaacccta acagcgggta tagtacctac 180
 gcacagaagt tccagggcag ggtcaccatt accgcggaca aatccacgag cacagcctac 240
 atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagactatcc 300
 ccaggcggtt actatgttat ggatgcctgg ggccaaggga ccaccgtgac cgtctcctca 360

<210> 41
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Signal Sequence

<400> 41

Met Asp Trp Thr Trp Arg Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Gly
 1 5 10 15

Ala His Ser

<210> 42
 <211> 57
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Signal Sequence

<400> 42

atggactgga cctggaggat cctcttcttg gtggcagcag ccacaggagc ccactcc 57

<210> 43

<211> 108

<212> PRT

<213> Rattus sp.

<220>

<223> ICR62 VL

<400> 43

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

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

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

Tyr	Asn	Thr	Asn	Asn	Leu	Gln	Thr	Gly	Ile	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly
						55					60				

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

Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Phe	Cys	Leu	Gln	His	Asn	Ser	Phe	Pro	Thr
				85					90					95	

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

<210> 44

<211> 324
<212> DNA
<213> Rattus sp.

<220>
<223> ICR62 VL

<400> 44
gacatccaga tgacccagtc tccttcattc ctgtctgcat ctgtgggaga cagagtcact 60

atcaactgca aagcaagtc gaattattaac aattacttaa actggtatca gcaaaagctt 120

ggagaagctc ccaaagcct gatataataat acaacaatt tgcaaacagg catcccatca 180

aggttcagtg gcagtggatc tggtagatg tacacactca ccatcagcag cctgcagcct 240

gaagattttg ccacatatct ctgcttgcag cataatagtt ttccacggtt tggagctggg 300

accaagctgg aactgaaacg tacg 324

<210> 45
<211> 108
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> I-KC

<400> 45

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 Asn Asn Tyr
20 25 30

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

Tyr Asn Thr Asn Asn Leu Gln Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50

55

60

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Asn Ser Phe Pro Thr
85 90 95

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

<210> 46
<211> 324
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> I-KC

<400> 46
gatatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtcggaga ccgggtcacc 60

atcacctgcc gggcaagtca gggcattaac aattacttaa attggtacca gcagaagcca 120

gggaaagccc ctaagcgctt gatctataat accaacaact tgcagacagg cgtcccatca 180

aggttcagcg gcagtggatc cgggacagaa ttactctca ccatcagcag cctgcgcct 240

gaagattttg ccacctatta ctgcttgcag cataatagtt ttcccaggtt tggccagggc 300

accaagctcg agatcaagcg tacg 324

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

<220>
<223> Signal Sequence

<400> 47

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15

Phe Pro Gly Ala Arg Cys
20

<210> 48

<211> 66

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Signal Sequence

<400> 48

atggacatga gggccccgc tcagctcctg gccctcctgc tgctctgggt cccaggtgcc 60

aggtgt 66

<210> 49

<211> 109

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> I-KA

<400> 49

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 Asn Asn Tyr
20 25 30

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

35

40

45

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

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Asn Ser Phe Pro Thr
85 90 95

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

<210> 50
<211> 327
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> I-KA

<400> 50
gatatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtcggaga ccgggtcacc 60

atcacctgcc gggcaagtca gggcattaac aattacttaa attggtacca gcagaagcca 120

gggaaagccc ctaagcgcct gatctataat accaacaact tgcagacagg cgtcccatca 180

aggttcagcg gcagtggatc cgggacagaa tacactctca ccatcagcag cctgcagcct 240

gaagattttg ccacctatta ctgcttgcag cataatagtt ttccacggtt tggccagggc 300

accaagctcg agatcaagcg tacggtg 327

<210> 51
<211> 109
<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> I-KB

<400> 51

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 Lys Ala Ser Gln Asn Ile Asn Asn Tyr
20 25 30

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Asn Ser Phe Pro Thr
85 90 95

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

<210> 52

<211> 327

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> I-KB

<400> 52

gatatccaga tgaccacgac tccatcctcc ctgtctgcat ctgtcggaga ccgggtcacc 60

atcacctgca aagcaagtica gaatattaac aattacttaa actggtacca gcagaagcca 120

gggaaagccc ctaagcgctt gatctataat accaacaact tgcagacagg cgtcccatca 180

aggttcagcg gcagtggatc cgggacagaa tacactctca ccatcagcag cctgcagcct 240

gaagatittg ccacctatta ctgcttgcag cataatagtt ttcccacgtt tggccagggc 300

accaagctcg agatcaagcg tacggtg 327

<210> 53
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Heavy Chain CDR1 Kabat

<400> 53

Asp Tyr Lys Ile His
 1 5

<210> 54
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Heavy Chain CDR1 Kabat

<400> 54
 gactacaaga tacac 15

<210> 55
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
<223> Heavy Chain CDR1 Kabat

<400> 55

Asp Tyr Ala Ile Ser
1 5

<210> 56
<211> 15
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Heavy Chain CDR1 Kabat

<400> 56
gactacgcc a tcagc 15

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

<220>
<223> Heavy Chain CDR1 Kabat

<400> 57

Asp Tyr Tyr Met His
1 5

<210> 58
<211> 15
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Heavy Chain CDR1 Kabat

<400> 58
gactactata tgcac 15

<210> 59
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Heavy Chain CDR1 Chothia

<400> 59

Gly Phe Thr Phe Thr Asp Tyr
 1 5

<210> 60
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Heavy Chain CDR1 Chothia

<400> 60
 ggttttacat tcactgacta c 21

<210> 61
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Heavy Chain CDR1 Chothia

<400> 61

Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 1 5

<210> 62
 <211> 21
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Heavy Chain CDR1 Chothia

<400> 62

ggttacacat tcactgacta c

21

<210> 63

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Heavy Chain CDR1 Chothia

<400> 63

Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr

1 5

<210> 64

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Heavy Chain CDR1 Chothia

<400> 64

ggttattcat tcactgacta c

21

<210> 65

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Heavy Chain CDR1 AbM

<400> 65

Gly Phe Thr Phe Thr Asp Tyr Lys Ile His
1 5 10

<210> 66
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Heavy Chain CDR1 AbM

<400> 66
ggttttacat tcactgacta caagatacac 30

<210> 67
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Heavy Chain CDR1 AbM

<400> 67

Gly Phe Thr Phe Thr Asp Tyr Ala Ile Ser
1 5 10

<210> 68
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Heavy Chain CDR1 AbM

<400> 68
ggttttacat tcactgacta cgccatcagc 30

<210> 69
<211> 10

<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Heavy Chain CDR1 AbM

<400> 69

Gly	Phe	Thr	Phe	Thr	Asp	Tyr	Tyr	Met	His
1				5					10

<210> 70
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Heavy Chain CDR1 AbM

<400> 70	
ggttttacat tcactgacta ctatatgcac	30

<210> 71
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Heavy Chain CDR1 AbM

<400> 71

Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Asp	Tyr	Tyr	Met	His
1				5					10

<210> 72
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Heavy Chain CDR1 AbM

<400> 72

ggttacacat tcactgacta ctatatgcac

30

<210> 73

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Heavy Chain CDR1 AbM

<400> 73

Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr Lys Ile His
1 5 10

<210> 74

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Heavy Chain CDR1 AbM

<400> 74

ggttattcat tcactgacta caagatacac

30

<210> 75

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Heavy Chain CDR2 Kabat

<400> 75

Tyr Phe Asn Pro Asn Ser Gly Tyr Ser Thr Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15

Ser

<210> 76
 <211> 51
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Heavy Chain CDR2 Kabat

<400> 76
 tattttaatc ctaacagtgg ttatagtacc tacaatgaaa agttcaagag c 51

<210> 77
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Heavy Chain CDR2 Kabat

<400> 77

Gly	Ile	Asn	Pro	Asn	Ser	Gly	Tyr	Ser	Thr	Tyr	Ala	Gln	Lys	Phe	Gln
1			5					10						15	

Gly

<210> 78
 <211> 51
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Heavy Chain CDR2 Kabat

<400> 78

gggatcaatc ctaacagtgg ttatagtacc tacgcacaga agttccaggg c 51

<210> 79
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Heavy Chain CDR2 Kabat

<400> 79

Tyr	Phe	Asn	Pro	Asn	Ser	Gly	Tyr	Ser	Thr	Tyr	Ala	Gln	Lys	Phe	Gln
1				5					10					15	

Gly

<210> 80
<211> 51
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Heavy Chain CDR2 Kabat

<400> 80
tatttcaacc ctaacagcgg ttatagtacc tacgcacaga agttccaggg c 51

<210> 81
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Heavy Chain CDR2 Kabat

<400> 81

Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Tyr Ser Thr Tyr Ala Gln Lys Phe Gln

1 5 10 15

Gly

<210> 82
<211> 51
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Heavy Chain CDR2 Kabat

<400> 82
tggatcaatc ctaacagtgg ttatagtacc tacgcacaga agtttcaggg c 51

<210> 83
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Heavy Chain CDR2 Kabat

<400> 83

Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Tyr Ser Thr Tyr Ser Pro Ser Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 84
<211> 51
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Heavy Chain CDR2 Kabat

<400> 84

tggatcaatc ctaacagtgg ttatagtacc tacagcccaa gttccaagg c 51

<210> 85
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Heavy Chain CDR2 Kabat

<400> 85

Trp	Ile	Asn	Pro	Asn	Ser	Gly	Tyr	Ser	Thr	Tyr	Asn	Glu	Lys	Phe	Gln
1			5						10					15	

Gly

<210> 86
 <211> 51
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Heavy Chain CDR2 Kabat

<400> 86
 tggatcaatc ctaacagtgg ttatagtacc tacaacgaga agttccaagg c 51

<210> 87
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Heavy Chain CDR2 Kabat

<400> 87

Tyr Phe Asn Pro Asn Ser Gly Tyr Ser Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln

1 5 10 15

Gly

<210> 88
<211> 51
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Heavy Chain CDR2 Kabat

<400> 88
tatttcaacc ctaacagcgg ttattcgaac tacgcacaga agttccaggg c 51

<210> 89
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Heavy Chain CDR2 Kabat

<400> 89

Tyr Phe Asn Pro Asn Ser Gly Tyr Ala Thr Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 90
<211> 51
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Heavy Chain CDR2 Kabat

<400> 90

tatttcaacc ctaacagcgg ttatgccacg tacgcacaga agttccaggg c 51

<210> 91
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Heavy Chain CDR2 Chothia

<400> 91

Asn Pro Asn Ser Gly Tyr Ser Thr
 1 5

<210> 92
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Heavy Chain CDR2 Chothia

<400> 92
 aatcctaaca gtggttatag tacc 24

<210> 93
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Heavy Chain CDR2 Chothia

<400> 93

Asn Pro Asn Ser Gly Tyr Ser Asn
 1 5

<210> 94
 <211> 24

<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Heavy Chain CDR2 Chothia

<400> 94
aacctaaca gcggttatc gaac 24

<210> 95
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Heavy Chain CDR2 Chothia

<400> 95

Asn Pro Asn Ser Gly Tyr Ala Thr
1 5

<210> 96
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Heavy Chain CDR2 Chothia

<400> 96
aacctaaca gcggttatgc cacg 24

<210> 97
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Heavy Chain CDR2 AbM

<400> 97

Tyr Phe Asn Pro Asn Ser Gly Tyr Ser Thr
1 5 10

<210> 98

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Heavy Chain CDR2 AbM

<400> 98

tattttaatc ctaacagtgg ttatagtacc

30

<210> 99

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Heavy Chain CDR2 AbM

<400> 99

Gly Ile Asn Pro Asn Ser Gly Tyr Ser Thr
1 5 10

<210> 100

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Heavy Chain CDR2 AbM

<400> 100

gggatcaatc ctaacagtgg ttatagtacc

30

<210> 101

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

<220>
 <223> Heavy Chain CDR2 AbM

<400> 101

Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Tyr Ser Thr
 1 5 10

<210> 102
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Heavy Chain CDR2 AbM

<400> 102
 tggatcaatc ctaacagtgg ttatagtacc 30

<210> 103
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Heavy Chain CDR2 AbM

<400> 103

Tyr Phe Asn Pro Asn Ser Gly Tyr Ser Asn
 1 5 10

<210> 104
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Heavy Chain CDR2 AbM

<400> 104

tatttcaacc ctaacagcgg ttattcgaac

30

<210> 105

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Heavy Chain CDR2 AbM

<400> 105

Tyr Phe Asn Pro Asn Ser Gly Tyr Ala Thr
1 5 10

<210> 106

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Heavy Chain CDR2 AbM

<400> 106

tatttcaacc ctaacagcgg ttatgccacg

30

<210> 107

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Heavy Chain CDR3 Kabat Chothia AbM

<400> 107

Leu Ser Pro Gly Gly Tyr Tyr Val Met Asp Ala
1 5 10

<210> 108
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Heavy Chain CDR3 Kabat Chothia AbM

<400> 108
 ctatccccag gcggttacta tggttatggat gcc 33

<210> 109
 <211> 328
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> IgG1 constant region

<400> 109

Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr
 1 5 10 15

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

Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val
 35 40 45

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

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

Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Ala

85

90

95

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
100 105 110

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
115 120 125

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
130 135 140

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
145 150 155 160

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
165 170 175

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
180 185 190

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
195 200 205

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
210 215 220

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
225 230 235 240

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
245 250 255

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
260 265 270

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr

275	280	285
Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe		
290	295	300
Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys		
305	310	315 320
Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
325		
<210> 110		
<211> 987		
<212> DNA		
<213> Homo sapiens		
<220>		
<223> IgG1 constant region		
<400> 110		
accaagggcc catcggtctt ccccttgga cctctctcca agagcacctc tgggggcaca	60	
gcggccctgg gctgcctggt caaggactac ttccccgaac cggtgacggt gtcgtggaac	120	
tcaggcgccc tgaccagcgg cgtgcacacc ttcccggctg tcctacagtc ctcaggactc	180	
tactccctca gcagcgtggt gaccgtgccc tccagcagct tgggcaccca gacctacatc	240	
tgcaacgtga atcacaagcc cagcaacacc aaggtggaca agaaagcaga gccc aaatct	300	
tgtgacaaaa ctcacacatg cccaccgtgc ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca	360	
gttttctct tcccccaaa acccaaggac accctcatga tctcccgac cctgaggtc	420	
acatgcgtgg tgggtggacgt gagccacgaa gacctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg	480	
gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgctgg aggagcagta caacagcacg	540	
taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac	600	

aagtgcagg tctccaacaa agccctccca gcccccatcg agaaaacat ctccaaagcc 660

aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catcccggga tgagctgacc 720

aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg 780

gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac 840

tccgacggct ccttcttctt ctacagcaag ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag 900

gggaacgtct tctcatgtc cgtgatgcat gaggtcttgc acaaccacta cagcagaag 960

agcctctccc tgtctccggg taaatga 987

<210> 111
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Kabat Light Chain CDR1

<400> 111

Lys Ala Ser Gln Asn Ile Asn Asn Tyr Leu Asn
 1 5 10

<210> 112
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Kabat Light Chain CDR1

<400> 112
 aaagcaagtc agaataattaa caattactta aac 33

<210> 113

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

<220>
 <223> Kabat Light Chain CDR1

<400> 113

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

<210> 114
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Kabat Light Chain CDR1

<400> 114
 cgggcaagtc agggcattaa caattactta aat 33

<210> 115
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Kabat Light Chain CDR2

<400> 115

Asn Thr Asn Asn Leu Gln Thr
 1 5

<210> 116
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Kabat Light Chain CDR2

<400> 116

aatacaaaca atttgcaaac a

21

<210> 117

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Kabat Light Chain CDR3

<400> 117

Leu Gln His Asn Ser Phe Pro Thr
1 5

<210> 118

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Kabat Light Chain CDR2

<400> 118

aataccaaca acttgacagac a

21

<210> 119

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Kabat Light Chain CDR3

<400> 119

ttgcagcata atagttttcc cacg

24

<210> 120
 <211> 361
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> I-HLA10

<400> 120
 gaggtgcagc tcgtgcagtc tggcgctgag gtgaagaagc ctggcgagtc gttgaagatc 60

 tcctgcaagg gttctggtta ttcattcact gactacaaga tccactgggt gcgacagatg 120

 cctggaaagg gcctcgagtg gatgggctac ttcaatccta acagtggta tagtacctac 180

 agcccaagct tccaaggcca ggtcaccatc tcagccgaca agtccatcag caccgcctac 240

 ctgcagtggg gcagcctgaa ggccctggac accgccatgt attactgtgc gagactatcc 300

 ccaggcggtt actatgttat ggatgcctgg ggccaaggga ccaccgtgac cgtctcctca 360

 g 361

<210> 121
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> I-HLA10

<400> 121

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

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30

Lys Ile His Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met

35

40

45

Gly Tyr Phe Asn Pro Asn Ser Gly Tyr Ser Thr Tyr Ser Pro Ser Phe

505560

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr

65707580

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys

859095

Ala Arg Leu Ser Pro Gly Gly Tyr Tyr Val Met Asp Ala Trp Gly Gln

100105110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115120

<210> 122

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Kabat Heavy Chain CDR1

<400> 122

gactacaaga tatcc

15

<210> 123

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Kabat Heavy Chain CDR1

<400> 123

Asp Tyr Lys Ile Ser

1 5

<210> 124
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> AbM Heavy Chain CDR1

<400> 124
ggtttcacat tcaactgacta caagatatcc 30

<210> 125
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> AbM Heavy Chain CDR1

<400> 125

Gly Phe Thr Phe Thr Asp Tyr Lys Ile Ser
1 5 10

<210> 126
<211> 51
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Kabat Heavy Chain CDR2

<400> 126
tacttcaatc ctaacagtgg ttatagtacc tacagcccaa gcttccaagg c 51

<210> 127
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Kabat Heavy Chain CDR2

<400> 127

Tyr	Phe	Asn	Pro	Asn	Ser	Gly	Tyr	Ser	Thr	Tyr	Ser	Pro	Ser	Phe	Gln
1				5					10					15	

Gly

- 46 -

- 1 -