



(24) 등록일자 2023년 07월 05일

- 심사관 : 강덕희

## 대표도 - 도1

- 1 -

을 제공하며, 상기 항체 또는 기능적 단편은 본원에 제공된 아미노산 서열을 갖는 가변 중쇄 도메인 및 가변 경쇄 도메인을 포함한다. 본 발명은 추가로 진단제, 검출제 또는 치료제에 결합되어 있거나 재조합적으로 융합되어 있는 항체 결합체(conjugate) 또는 이의 기능적 단편, 및 질환의 치료, 예방 또는 진단을 필요로 하는 대상체에 서의 질환의 치료, 예방 또는 진단 방법을 제공한다.

(52) CPC특허분류

**A61P 35/00** (2018.01)

**G01N 33/574** (2013.01)

A61K 2039/505 (2013.01)

C07K 2317/21 (2013.01)

C07K 2317/52 (2013.01)

C07K 2317/626 (2013.01)

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

시알릴-루이스<sup>a</sup>(Sialyl-Lewis<sup>a</sup>)에 결합하고 ADCC 또는 CDC 활성을 야기하는 분리된 항체로서, 상기 항체는 가변 중쇄(VH) 도메인 및 가변 경쇄(VL) 도메인을 포함하고, 상기 VH 도메인은 서열번호 2의 잔기 55 내지 62, 70 내지 77 및 116 내지 131의 아미노산 서열을 포함하고, 상기 VL 도메인은 서열번호 4의 잔기 45 내지 52, 70 내지 72 및 109 내지 120의 아미노산 서열을 포함하는, 분리된 항체.

#### 청구항 2

항체 중쇄를 코드화하는 분리된 폴리뉴클레오타이드로서, 상기 항체 중쇄는 서열번호 2의 잔기 55 내지 62, 70 내지 77 및 116 내지 131의 아미노산 서열을 갖는 가변 중쇄(VH) 도메인을 포함하는, 분리된 폴리뉴클레오타이드.

#### 청구항 3

항체 경쇄를 코드화하는 분리된 폴리뉴클레오타이드로서, 상기 항체 경쇄는 서열번호 4의 잔기 45 내지 52, 70 내지 72 및 109 내지 120의 아미노산 서열을 갖는 가변 경쇄(VL) 도메인을 포함하는, 분리된 폴리뉴클레오타이드.

#### 청구항 4

항체 중쇄를 코드화하는 분리된 폴리뉴클레오타이드 및 항체 경쇄를 코드화하는 분리된 폴리뉴클레오타이드로서, 상기 항체 중쇄는 서열번호 2의 잔기 55 내지 62, 70 내지 77 및 116 내지 131의 아미노산 서열을 갖는 가변 중쇄(VH) 도메인을 포함하고, 상기 항체 경쇄는 서열번호 4의 잔기 45 내지 52, 70 내지 72 및 109 내지 120의 아미노산 서열을 갖는 가변 경쇄(VL) 도메인을 포함하고, 상기 항체 중쇄 및 상기 항체 경쇄를 포함하는 항체는 시알릴-루이스<sup>a</sup>에 결합하고 ADCC 또는 CDC 활성을 야기하는, 분리된 폴리뉴클레오타이드.

#### 청구항 5

제2항 또는 제4항에 있어서,

상기 VH 도메인 아미노산 서열은 서열번호 1의 잔기 133 내지 156, 208 내지 231 및 346 내지 393을 포함하는 핵산 서열에 의해 코드화되는, 분리된 폴리뉴클레오타이드.

#### 청구항 6

제3항 또는 제4항에 있어서,

상기 VL 도메인 아미노산 서열은 서열번호 3의 잔기 133 내지 156, 208 내지 216 및 325 내지 360을 포함하는 핵산 서열에 의해 코드화되는, 분리된 폴리뉴클레오타이드.

#### 청구항 7

제1항에 있어서,

상기 항체는 사람 항체, 또는 사람 항체의 IgG 또는 IgM 아이소타입(isotype), 또는 사람 항체의 IgG 1 서브클래스인, 분리된 항체.

#### 청구항 8

제1항 또는 제7항의 항체 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제학적 조성물로서, 상기 약제학적 조성물의 치료학적 유효량을 이를 필요로 하는 대상체에 투여하는 것을 포함하는 암 또는 종양 형성의 치료 또는 예

방에 사용하기 위한, 약제학적 조성물.

#### 청구항 9

제8항에 있어서, 상기 암 또는 상기 종양의 세포가 sLe<sup>a</sup>를 발현하거나; 상기 암 또는 종양이 위장관 종양, 결장암, 결장직장 샘암종, 전이성 결장암, 결장직장암, 췌장암, 췌장 샘암종, 폐의 소세포 암종, 방광 샘암종, 반지세포 난소암, 난소암, 전이성 암종, 위의 샘암종, 식도의 샘암종, 인후의 샘암종, 비뇨생식기관의 샘암종 및 유방의 샘암종으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 약제학적 조성물.

#### 청구항 10

제8항에 있어서, 상기 약제학적 조성물은 제2 치료제를 동시에 또는 연속적으로 투여하기에 적합한, 약제학적 조성물.

#### 청구항 11

제10항에 있어서, 상기 제2 치료제는 탁솔인, 약제학적 조성물.

#### 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

### 발명의 설명

### 기술 분야

[0002] 본원은 전문이 본원에 참조로 도입된, 2013년 8월 26일자로 출원된 미국 가특허원 제61/870,137호를 우선권으로 주장한다.

[0003] 본 발명은 국립암연구소, NIH에 의해 수여된 승인 번호 CA-128362하에 정부 지원을 받았다. 정부는 본 발명에 대한 일정 권리를 갖는다.

### 배경 기술

[0005] 본 발명은 전반적으로 시알릴-루이스<sup>a</sup>(Sialyl-Lewis<sup>a</sup>: sLe<sup>a</sup>)에 대항하는 항체, 보다 구체적으로 항-sLe<sup>a</sup> 항체를 코드화하는 폴리뉴클레오타이드 및 상응하는 코드화된 항체 또는 이의 단편에 관한 것이다.

[0006] 종양 특이적 항원에 대항하는 항체의 수동적 투여는 암의 진행 동안 종양 세포 및 조기 전이를 제거할 수 있다. 이러한 치료는 또한 암의 재발에 상당한 영향을 줄 수 있다. 종양 특이적 탄수화물에 대항하는 항체가 이러한 암 치료에 유용한 지원자일 수 있다. 예를 들어, 사람 암세포를 갖는 마우스의 면역화로부터 생성된 다수의 종양-제한된 단클론 항체는 상기 세포 표면에 당지질 또는 당단백으로서 발현된 탄수화물 항원에 대항하는 것으로 나타났다. 탄수화물 sLe<sup>a</sup>는 소화관 종양에서 발현되는 것으로 나타났다. sLe<sup>a</sup>의 발현은 또한 전이 가능성에 영향을 주고 사람 결장암 및 췌장 샘암종의 증가된 전이 가능성과 상호관련된다. 그러나, 탄수화물 화학은 상당히 도전적이었고 이러한 종양 특이적 탄수화물을 인지하는 항체의 임상적 개발에는 시간이 오래 걸렸다.

[0007] 췌장 암종은 가장 공격적인 샘암종 중의 하나이고 흔히 좋지 않은 예후와 관계가 있다. 췌장 암종은 암으로 인한 사망의 네 번째 주된 원인이다. 다른 암종의 선별에는 진전이 있음에도 불구하고, 췌장에서 생긴 악성 병변의 검출에 대한 신뢰성은 낮다. 플루오로데옥시글루카제를 이용한 양전자 방출 단층촬영(FDG-PET)이 췌장암의 검출 및 병기를 나타내어 왔다. 그러나, FDG-PET는 췌장염을 악성 종양과 구별하는데 둔감하고 작은 원발성 병변(< 7mm) 및 간 전이(< 1cm)의 병기를 결정하는데 문제가 있다. 환자의 췌장관 샘암종(PDAC) 상태를 모니터링하는 데 사용되는 하나의 진단성 선별법은 혈청 내 순환하는 sLe<sup>a</sup> 항원의 상승된 수준을 검출하는 것을 포함한다. 환자의 순환하는 sLe<sup>a</sup> 항원이 37U/ml을 넘는 경우 암의 재발을 나타낸다. 그러나, 이러한 종양 특이적 탄수화물을 이용하는 대체 진단 도구의 개발에는 시간이 오래 걸렸다.

[0008] 따라서, 재발 암의 치료 및 악성 병변과 전이의 검출을 위해, sLe<sup>a</sup>와 같은 종양 특이적 탄수화물을 특별히 인지하는 항체를 동정하고 생성시킬 필요가 있다. 본 발명은 이러한 요구를 만족시키고 관련 이점을 제공한다.

### 발명의 내용

#### [0010] 발명의 요약

[0011] 본 발명에 따르면, sLe<sup>a</sup>에 결합하는 항체 또는 이의 기능적 단편을 제조하기 위한 조성물이 제공된다. 상기 조성물은 항체 또는 이의 기능적 단편을 코드화하는 분리된 폴리뉴클레오타이드를 포함하고, 상기 항체는 본원에 제공된 아미노산 서열을 갖는 가변 중쇄(VH) 도메인을 포함한다. 본 발명의 분리된 폴리뉴클레오타이드는 또한 본원에 제공된 핵산 서열을 포함할 수 있고, 상기 핵산 서열은 항체 또는 이의 기능적 단편의 VH 도메인을 코드화한다.

[0012] 본 발명의 다른 실시양태에서, 분리된 폴리뉴클레오타이드는 항체 또는 이의 기능적 단편을 코드화할 수 있고, 상기 항체는 본원에 제공된 아미노산 서열을 갖는 가변 경쇄(VL) 도메인을 포함한다. 본 발명의 분리된 폴리뉴클레오타이드는 또한 본원에 제공된 핵산 서열을 포함할 수 있고, 상기 핵산 서열은 항체 또는 이의 기능적 단편의 VL 도메인을 코드화한다.

- [0013] 본 발명의 조성물은 또한 분리된 항체 또는 이의 기능적 단편을 포함하고, 상기 항체는 sLe<sup>a</sup>에 결합한다. 몇몇 실시양태에서, 본 발명은 sLe<sup>a</sup>에 결합하는 분리된 항체 또는 이의 기능적 단편을 제공하고, 상기 항체 또는 이의 기능적 단편은 본원에 제공된 아미노산 서열을 갖는 VH 도메인을 포함한다.
- [0014] 몇몇 실시양태에서, 본 발명은 sLe<sup>a</sup>에 결합하는 분리된 항체 또는 이의 기능적 단편을 제공하고, 상기 항체 또는 이의 기능적 단편은 본원에 제공된 아미노산 서열을 갖는 VL 도메인을 포함한다.
- [0015] 몇몇 실시양태에서, 본 발명은 sLe<sup>a</sup>에 결합하는 분리된 항체 또는 이의 기능적 단편을 제공하고, 상기 항체 또는 이의 기능적 단편은 VH 도메인 및 VL 도메인을 둘 다 포함하고, 상기 VH 도메인 및 상기 VL 도메인은 각각 본원에 제공된 클론 분리주(isolate)의 각각의 VH 도메인 및 VL 도메인에 대한 아미노산 서열을 포함한다.
- [0016] 몇몇 실시양태에서, 본 발명은 진단제, 검출제 또는 치료제에 결합되어 있거나 재조합적으로 융합되어 있는 본원에 제공된 항체 또는 이의 기능적 단편을 갖는 결합체를 제공한다. 본 발명의 몇몇 실시양태에서, 검출제를 포함하는 본 발명의 결합체가 대상체에서 종양 형성을 검출 및/또는 진단하기 위한 방법에 사용될 수 있다. 이러한 방법은 결합체 유효량을 이를 필요로 하는 대상체에 투여함을 포함할 수 있다.
- [0017] 몇몇 실시양태에서, 본 발명은 본 발명의 항체 또는 이의 기능적 단편 하나 이상과 약제학적으로 허용되는 담체를 갖는 약제학적 조성물을 제공한다. 몇몇 실시양태에서, 본 발명은 또한 본 발명의 약제학적 조성물의 치료학적 유효량을 투여함으로써, 질환의 치료 또는 예방을 필요로 하는 대상체에서 질환을 치료 또는 예방하는 방법을 제공한다. 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 제2 치료제를 본 발명의 항체 또는 이의 기능적 단편과 동시에 또는 연속적으로 투여함을 제공한다.

### 도면의 간단한 설명

- [0019] 극 1은 클론 5B1의 가변 중쇄(VH) 도메인의 뉴클레오타이드 서열 및 코드화된 아미노산 서열, 및 재조합 발현에 사용될 수 있는 리더 서열을 나타낸다. 이 도면의 최상부는 서열번호 1의 뉴클레오타이드 서열과 서열번호 2의 아미노산 서열사이의 정렬을 나타낸다. 3개의 상보성 결정 부위(CDR1, CDR2 및 CDR3)가 또한 확인된다.
- 도 2는 클론 5B1의 가변 경쇄(VL) 도메인의 뉴클레오타이드 서열 및 코드화된 아미노산 서열, 및 재조합 발현에 사용될 수 있는 리더 서열을 나타낸다. 이 도면의 최상부는 서열번호 3의 뉴클레오타이드 서열과 서열번호 4의 아미노산 서열사이의 정렬을 나타낸다. 3개의 상보성 결정 부위(CDR1, CDR2 및 CDR3)가 또한 확인된다.
- 도 3은 클론 9H3의 가변 중쇄(VH) 도메인의 뉴클레오타이드 서열 및 코드화된 아미노산 서열, 및 재조합 발현에 사용될 수 있는 리더 서열을 나타낸다. 이 도면의 최상부는 서열번호 5의 뉴클레오타이드 서열과 서열번호 6의 아미노산 서열사이의 정렬을 나타낸다. 3개의 상보성 결정 부위(CDR1, CDR2 및 CDR3)가 또한 확인된다.
- 도 4는 클론 9H3의 가변 경쇄(VL) 도메인의 뉴클레오타이드 서열 및 코드화된 아미노산 서열, 및 재조합 발현에 사용될 수 있는 리더 서열을 나타낸다. 이 도면의 최상부는 서열번호 7의 뉴클레오타이드 서열과 서열번호 8의 아미노산 서열사이의 정렬을 나타낸다. 3개의 상보성 결정 부위(CDR1, CDR2 및 CDR3)가 또한 확인된다.
- 도 5는 클론 5H11의 가변 중쇄(VH) 도메인의 뉴클레오타이드 서열 및 코드화된 아미노산 서열, 및 재조합 발현에 사용될 수 있는 리더 서열을 나타낸다. 이 도면의 최상부는 서열번호 9의 뉴클레오타이드 서열과 서열번호 10의 아미노산 서열사이의 정렬을 나타낸다. 3개의 상보성 결정 부위(CDR1, CDR2 및 CDR3)가 또한 확인된다.
- 도 6은 클론 5H11의 가변 경쇄(VL) 도메인의 뉴클레오타이드 서열 및 코드화된 아미노산 서열, 및 재조합 발현에 사용될 수 있는 리더 서열을 나타낸다. 이 도면의 최상부는 서열번호 11의 뉴클레오타이드 서열과 서열번호 12의 아미노산 서열사이의 정렬을 나타낸다. 3개의 상보성 결정 부위(CDR1, CDR2 및 CDR3)가 또한 확인된다.
- 도 7은 클론 7E3의 가변 중쇄(VH) 도메인의 뉴클레오타이드 서열 및 코드화된 아미노산 서열, 및 재조합 발현에 사용될 수 있는 리더 서열을 나타낸다. 이 도면의 최상부는 서열번호 13의 뉴클레오타이드 서열과 서열번호 14의 아미노산 서열사이의 정렬을 나타낸다. 3개의 상보성 결정 부위(CDR1, CDR2 및 CDR3)가 또한 확인된다.
- 도 8은 클론 7E3의 가변 경쇄(VL) 도메인의 뉴클레오타이드 서열 및 코드화된 아미노산 서열, 및 재조합 발현에 사용될 수 있는 리더 서열을 나타낸다. 이 도면의 최상부는 서열번호 15의 뉴클레오타이드 서열과 서열번호 16의 아미노산 서열사이의 정렬을 나타낸다. 3개의 상보성 결정 부위(CDR1, CDR2 및 CDR3)가 또한 확인된다.

도 9는 클론 5B1의 가변 중쇄(VH) 도메인 및 가변 경쇄(VL) 도메인 둘 다의 CDR1, CDR2 및 CDR3을 갖는 5B1CysDb로 지정된 디아바디(diabody)의 뉴클레오타이드 서열 및 코드화된 아미노산 서열을 나타낸다. 이 도면의 최상부는 서열번호 17의 뉴클레오타이드 서열과 서열번호 18의 아미노산 서열사이의 정렬을 나타낸다. VH 도메인 및 VL 도메인 둘 다에 대한 3개의 상보성 결정 부위(CDR1, CDR2 및 CDR3)가 밀줄친 굵은 활자체로 확인된다. 링커 서열 및 아미노산이 부가된 폴리히스티딘 태그(poly His-Tag)를 또한 밀줄친 이탤릭체로 나타낸다.

도 10은 클론 7E3의 가변 중쇄(VH) 도메인 및 가변 경쇄(VL) 도메인 둘 다의 CDR1, CDR2 및 CDR3을 갖는 7E3CysDb로 지정된 디아바디의 뉴클레오타이드 서열 및 코드화된 아미노산 서열을 나타낸다. 이 도면의 최상부는 서열번호 19의 뉴클레오타이드 서열과 서열번호 20의 아미노산 서열사이의 정렬을 나타낸다. VH 도메인 및 VL 도메인 둘 다에 대한 3개의 상보성 결정 부위(CDR1, CDR2 및 CDR3)가 밀줄친 굵은 활자체로 확인된다. 링커 서열 및 아미노산이 부가된 폴리히스티딘 태그(poly His-Tag)를 또한 밀줄친 이탤릭체로 나타낸다.

도 11abc 및 도 11def의 패널 A 내지 E는 유동 세포 분석법으로 분석된 종양 세포로의 사람 항-sLe<sup>a</sup> 항체의 결합을 나타낸다. 패널 A는 제조합(r) 5B1, 9H3, 5H11 및 7E3 항체로 염색된 DMS-79 세포를 나타낸다. 패널 B 내지 F는 실시예 1에 기재된 바와 같이 1 내지 2 $\mu$ g/mL의 r5B1 또는 r7E3 + IgG 또는 IgM-특이적 항체로 염색된 HT29, BxPC3, SW626, SK-MEL28 및 Colo205-luc 세포를 각각 나타낸다.

도 12의 패널 A 및 B는 DMS-79 세포에 대해 측정된, 사람 보체(Hu C') 존재하의 쥐과 121SLE(IgM)와 비교한 r5B1 및 r7E3 항체의 CDC 활성을 나타낸다. 사람 아이소타입 대조용 항체 Hu IgG( $\diamond$ ) 및 Hu IgM( $\blacklozenge$ )은 4% 미만의 세포독성을 나타냈다. r5B1 IgG( $\blacksquare$ ), r7E3 IgM( $\bullet$ ) 및 121SLE mIgM( $\blacktriangle$ ) 항체에 대한 용량 반응을 패널 A에 나타냈다. r5B1(IgG), r7E3(IgM) 및 121SLE(mIgM) 항체에 대한 계산된 EC50( $\mu$ g/mL)를 패널 B에 나타냈다.

도 13의 패널 A 내지 C는 r5B1 항체의 항체 의존 세포 매개 세포독성(ADCC)을 나타낸다. 패널 A는 DMS-79 세포에 대해 사람 PBMC를 사용한 r5B1 매개 ADCC를 나타낸다. PBMC는 2 $\mu$ g/mL r5B1의 존재 또는 부재하에 DMS-79 종양 세포를 사용하여 100:1 내지 12.5:1의 E:T 비율에서 시험하였다. 패널 B는 DMS-79 세포에 대해 원발성 사람 NK 세포를 사용한 r5B1 매개 ADCC를 나타낸다. NK 세포는 2 $\mu$ g/mL r5B1의 존재 또는 부재하에 DMS-79 종양 세포를 사용하여 5:1 내지 0.6:1의 보다 낮은 E:T 비율에서 시험하였다. 패널 C는 제시된 농도의 r5B1의 존재하에 DMS-79 종양 세포를 사용하여 1:100의 E:T 비율에서 두 공여자로부터의 PBMC를 사용한 다양한 농도의 r5B1의 ADCC를 나타낸다.

도 14는 sLe<sup>a</sup>의 BxPC3 세포로의 내재화를 나타낸다. BxPC3 체장 종양 세포는 사포린 결합 항-사람 IgG인 Hum-ZAP와 복합된 r5B1(항-sLe<sup>a</sup>) 또는 r1B7(항-GD2) 항체의 존재하에 성장시켰다. 3일 후, 3-(4,5-디메틸티아졸-2-일)-2,5-디페닐테트라졸륨 브로마이드(MTT) 분석을 사용하여 상기 세포의 생존력을 측정하고 샘플 값을 미처리 배양액의 값에 대해 정규화하였다.

도 15는 Colo205-luc 세포를 사용한 이중이식 모델에서의 r5B1 항체의 활성을 나타낸다. 중증 복합 면역결핍(SCID) 마우스(그룹당 5마리)에 50만개의 Colo205-luc 세포를 0일에 꼬리 정맥 주사하였다. 마우스에 r5B1 100  $\mu$ g을 1일, 7일 14일 및 21일(실험 1)에, 또는 1일, 4일, 7일, 10일, 14일 및 21일(실험 2)에 총 용량 600 $\mu$ g으로 복강내 주사하였다. 대조용 동물에 PBS를 모의주사(mock injection)하였다.

도 16은 SCID 마우스의 Colo205-luc 종양에 대한 r5B1의 효과를 나타낸다. 마우스에 주사당 100 $\mu$ g( $\blacktriangledown$ ), 300 $\mu$ g( $\blacksquare$ ) 또는 1mg( $\blacklozenge$ )의 r5B1 항체를 실시예 1에 기재된 바와 같이 투여하였다. 대조용( $\blacksquare$ ) 동물에 PBS를 모의주사하였다.

도 17은 Colo205-luc 종양을 갖는 마우스를 0일 및 5주에 r5B1 처리한, 그룹당 5마리의 마우스의 형광 영상을 나타낸다. 마우스에 도 16에 도시하고 실시예 1에 기재한 치료 요법을 적용하였다.

도 18a 및 18b는 DMS-79 세포를 사용한 치료학적 피하 이중이식 모델에서의 항종양 활성을 나타낸다. 도 18a는 사람 IgG(IgG 단독( $\blacklozenge$ ) 또는 IgG+cRGD( $\bullet$ )) 및 PBS 주사한 대조군( $\blacksquare$ )과 비교한 5B1 처리된 마우스(5B1 단독( $\blacktriangle$ ) 또는 5B1+cRGD( $\blacktriangledown$ ))의 억제 또는 퇴행을 나타낸다. 화살표는 항체 또는 PBS를 주사한 날을 가리킨다. 도 18b는 처리된 마우스의 대표 영상을 나타낸다. 화살표는 어떠한 시각적 종양도 없음을 가리킨다.

도 19의 패널 A 내지 F는 5B1의 다양한 유형의 종양으로의 결합을 나타낸다. 패널 A는 체장관 샘암종 단계 III 종양이다. 패널 B는 S자 결장 암종 단계 IIIB 종양이다. 패널 C는 폐 샘암종 단계 IB 종양이다. 패널 D는 방광 점액 샘암종 단계 IV 종양이다. 패널 E는 결장 종양으로부터의 난소 전이성 암종이다. 패널 F는 림프절 전이성



암종 단계 IIIA 종양이다.

도 20은 BxPC3 췌장 종양이 피하 이식된 암컷 SCID 마우스에  $^{89}\text{Zr}$  방사능표지된-5B1 항체( $^{89}\text{Zr}$ -5B1)를 정맥내 투여하여 2 내지 120시간(h) 동안 획득된 일련의 PET 최대 강도 투사(MIP) 영상을 나타낸다. PET-MIP 영상은 주사 후 24시간(h p.i.)과 같이 일찍 비특이적으로 결합된 추적자(tracer)의 청소와 함께 종양의 높은 흡수를 입증한다.

도 21은 도 20의 PET 데이터와 일치하는, 관찰된 종양 흡수가  $84.73 \pm 12.28\% \text{ID/g}$ 인 생물분배 결과를 나타낸다. 종양 중량이 작기 때문에, %ID 대 시간으로 나타낸 종양 흡수 플롯을 삽입 그래프로 표시했다. 종양 %ID는 모든 시점에서  $^{89}\text{Zr}$ -5B1에 의해 현저한 종양 흡수를 나타내고, 비특이적  $^{89}\text{Zr}$ -IgG에 비해 7배 이상 크다. 냉 5B1(200  $\mu\text{g}$ )을 사용한 경쟁적 역제는 종양 축적이 감소됨을 보여준다.

도 22의 패널 A 내지 C는 DMS-79(패널 A) 및 Colo205-luc 이종이식(패널 B)을 갖는 마우스의 PET-MIP 영상이다.  $^{89}\text{Zr}$ -5B1에 의한 종양(T), 심장(H) 및 간(L)의 PET-MIP 영상 윤곽을 보여준다. 결장직장 Colo205-luc 이종이식 모델은 24h에  $^{89}\text{Zr}$ -5B1 축적이 최고임을 나타내며, 이는 간으로의 비특이적 결합이 증가되는 동안 종국에는 감소된다(패널 C).

도 23은 5B1 항체와 탁솔(파클리탁셀)을 연속적으로 공동투여하여 치료한 DMS-79 소세포 폐 암종 이종이식 모델에서의 종양 성장의 용량 의존적 억제 및 퇴행을 나타낸다. X축의 큰 화살표는 5B1 치료를 나타낸다. 5B1 항체와 탁솔의 공동투여는 종양 성장을 유의적으로 제한하였고, 대조군인 사람 IgG(HuIgG) 또는 5B1 항체와 탁솔을 따로 투여한 것에 비해 종양이 퇴행하였다.  $p < 0.01$  (\*\*) 및  $p < 0.001$  (\*\*\*)에서의 이원 ANOVA에 의하면 대조군과 유의적 차이가 있는 것으로 나타난다.  $N=5$ .

도 24는 5B1 항체와 탁솔(파클리탁셀)을 연속적으로 공동투여하여 치료한 BxPC3 췌장 암종 이종이식 모델에서의 종양 성장 억제를 나타낸다. X축의 큰 화살표는 탁솔+5B1 치료를 나타내는 반면, 작은 화살표는 5B1 단독 치료를 나타낸다. 5B1 항체와 탁솔의 공동투여는 대조군(PBS-Ctrl; 사람 IgG - HuIgG) 또는 5B1 항체와 탁솔을 따로 투여한 것에 비해 종양 성장이 유의적으로 제한되었다.

도 25의 패널 A 및 B는 BxPC3-luc 췌장 종양 이종이식물이 정위 이식된 마우스의 대표적 영상을 보여준다. 패널 A: FDG-PET 및 컴퓨터 단층촬영(CT)의 공동 등록(왼쪽) 및 FDG-PET 단독의 평면 단면(오른쪽)은 고도의 신진대사 조직(즉, 심장 H 및 방광 B)에서 추적자의 높은 흡수에 의한 최소 종양 검출을 나타냈다. 패널 B: CT가 공동 등록된 동일한 마우스의  $^{89}\text{Zr}$  방사능표지된-5B1 항체( $^{89}\text{Zr}$ -5B1) PET 영상은 BxPC3-luc 종양 이종이식물의 예외적인 종양 검출을 나타냈다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0020]

종양 세포 표면에 발현된 탄수화물은 수동적인 면역요법을 위한 목표일 수 있다. 본원에 제공된 조성물은, 적어도 부분적으로, 시알릴-루이스<sup>a</sup>-키홀 림프 헤모시아민(sLe<sup>a</sup>-KLH) 결합 백신으로 면역화된 개체의 혈액 림프구로부터 생성된 사람 항체의 동정 및 특징화를 기초로 한다. sLe<sup>a</sup>에 대해 친화도가 높은 적어도 4개의 항체(5B1, 9H3, 5H11 및 7E3)가 확인되었다. 이들 항체 중 2개는 제조항체(r5B1 및 r7E3)로서 표시되었고 시험관내 및 생체내 모델에서 추가로 특징화되었다. 두 항체 모두 보체 의존 세포독성(CDC) 분석에서 강력했고, 5B1 항체는 항체 의존적 세포독성 분석에서도 매우 활성이었다. 상기 항체들의 생체내 효능을 중증 복합 면역결핍(SCID) 마우스에 이식된 Colo205 종양 세포 또는 DMS-79 종양 세포를 사용하여 2개의 이종이식 모델에서 시험하였다. 본원에 제공된 발명의 번역 타당성은 두 가지이다: 첫 번째, 본원에 제공된 접근법은 sLe<sup>a</sup>-KLH 백신에 의해 유도된 항체 반응이 백신 자체로서 유용함을 입증한다. 두 번째, 임상 실험에서 생성된 가장 강력한 항체가 보존될 수 있고, 궁극적으로 표적 암군(cancer population)에 대해 치료제로서 또는 치료제의 제조에 사용될 수 있다. 본원에 제공된 항체의 높은 친화도 및 항체의 높은 작동(effector) 기능은 이 번역 잠재력을 지원한다.

[0021]

본원에 사용된 용어 "항체"는 폴리펩타이드의 면역글로불린 클래스 내의 B 세포의 폴리펩타이드 생성물을 의미하고자 하는 것으로, 상기 생성물은 특정 분자 항원에 결합할 수 있고 2개의 동일한 쌍의 폴리펩타이드쇄로 이루어지며, 이의 각각의 쌍은 하나의 중쇄(약 50 내지 70kDa) 및 하나의 경쇄(약 25kDa)를 갖고, 각각의 쌍의 각 아미노 말단부는 약 100개 내지 약 130개 또는 그 이상의 아미노산의 가변 부위를 포함하고, 각각의 쌍의 각 카복시 말단부는 불변 부위를 포함한다(참조: Borrebaeck(ed.)(1995) Antibody Engineering, Second Edition,



Oxford University Press.; Kuby(1997) Immunology, Third Edition, W.H. Freeman and Company, New York).  
본 발명의 맥락에서, 본 발명의 항체와 결합할 수 있는 특정 분자 항원은 표적 탄수화물 sLe<sup>a</sup>를 포함한다.

[0022] 항체 또는 이의 기능적 단편에 관해 사용된 경우, 용어 "사람"은, 사람 생식계열 면역글로불린 서열에 상응하는 사람 가변 부위 및/또는 사람 불변 부위 또는 이의 일부를 갖는 항체 또는 이의 기능적 단편을 말한다. 이러한 사람 생식계열 면역글로불린 서열은 "Kabat et al.(1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242"에 기재되어 있다. 본 발명의 맥락에서, 사람 항체는 sLe<sup>a</sup>에 결합되고 사람 생식계열 면역글로불린 핵산 서열의 자연 발생적 체세포 변이체인 핵산 서열에 의해 코드화되는 항체를 포함할 수 있다. 사람 항체의 제조방법의 예는 실시예 1에 제공되어 있으나, 당해 분야의 숙련가에게 잘 알려진 방법을 사용할 수 있다.

[0023] 용어 "단클론 항체"는 단일 세포 클론 또는 하이브리도마 또는 단일 세포로부터 유도된 세포군의 생성물인 항체를 지칭한다. 단클론 항체는 또한 단일 분자 면역글로불린 중을 생산하기 위해 면역글로불린 유전자를 코드화하는 중쇄 및 경쇄로부터 재조합 방법에 의해 생성된 항체를 지칭하려는 것이다. 단클론 항체 제제 내의 항체에 대한 아미노산 서열은 실질적으로 균일하고 이러한 제제 내의 항체의 결합 활성은 실질적으로 동일한 항원 결합 활성을 나타낸다. 이에 반해, 다클론 항체는 군 내의 특정 항원에 결합하는 면역글로불린 분자들의 조합인 상이한 B 세포들로부터 수득된다. 다클론 항체의 각각의 면역글로불린은 동일한 항원의 상이한 에피토프에 결합할 수 있다. 단클론 항체 및 다클론 항체 둘 다의 제조방법은 당해 분야에 잘 알려져 있다(Harlow and Lane., Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989) and Borrebaeck (ed.), Antibody Engineering: A Practical Guide, W.H. Freeman and Co., Publishers, New York, pp. 103-120 (1991)).

[0024] 항체에 관해 사용된 경우, 본원에 사용된 용어 "기능적 단편"은 항체로부터 단편이 유도될 때 결합 활성 중 일부 또는 전부를 유지하는 중쇄 또는 경쇄 폴리펩타이드를 포함하는 항체의 일부를 지칭하려는 것이다. 이러한 기능적 단편은, 예를 들어, Fd, Fv, Fab, F(ab'), F(ab)<sub>2</sub>, F(ab')<sub>2</sub>, 단쇄 Fv(scFV), 디아바디, 트리아바디(triobody), 테트라바디(tetrabody) 및 미니바디(minibody)를 포함할 수 있다. 기타 기능적 단편은, 예를 들어, 중쇄 또는 경쇄 폴리펩타이드, 가변 부위 폴리펩타이드 또는 CDR 폴리펩타이드, 또는 이러한 기능적 단편이 결합 활성을 유지하는 한 이의 일부를 포함할 수 있다. 이러한 항체 결합 단편은, 예를 들어, "Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1989); Myers (ed.), Molec. Biology and Biotechnology: A Comprehensive Desk Reference, New York: VCH Publisher, Inc.; Huston et al., Cell Biophysics, 22:189-224 (1993); Pluckthun and Skerra, Meth. Enzymol., 178:497-515 (1989) and in Day, E.D., Advanced Immunochemistry, Second Ed., Wiley-Liss, Inc., New York, NY (1990)"에 기재된 것을 찾을 수 있다.

[0025] 항체에 관해 사용된 경우, 본원에 사용된 용어 "중쇄"는 약 50 내지 70kDa의 폴리펩타이드쇄를 말하며, 아미노 말단부는 약 120개 내지 130개 또는 그 이상의 아미노산의 가변 부위를 포함하고 카복시 말단부는 불변 부위를 포함한다. 불변 부위는 중쇄 불변 부위의 아미노산 서열을 기준으로 알파( $\alpha$ ), 델타( $\delta$ ), 엡실론( $\epsilon$ ), 감마( $\gamma$ ) 및 뮤( $\mu$ )로 지칭되는 별개의 다섯 가지 유형 중 하나일 수 있다. 별개의 중쇄는 크기면에서 상이한데;  $\alpha$ ,  $\delta$  및  $\gamma$ 는 약 450개의 아미노산을 함유하는 반면,  $\mu$  및  $\epsilon$ 는 약 550개의 아미노산을 함유한다. 이들 별개의 중쇄 유형은, 경쇄와 조합되는 경우, 잘 알려진 다섯 클래스의 항체인 IgA, IgD, IgE, IgG 및 IgM이 각각 생기게 하며, IgG의 4개의 서브클래스, 즉 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4를 포함한다. 중쇄는 사람 중쇄일 수 있다.

[0026] 항체에 관해 사용된 경우, 용어 "경쇄"는 약 25kDa의 폴리펩타이드쇄를 말하며, 아미노 말단부는 약 100개 내지 약 110개 또는 그 이상의 아미노산의 가변 부위를 포함하고 카복시 말단부는 불변 부위를 포함한다. 경쇄의 대략적 길이는 211개 내지 217개의 아미노산이다. 불변 도메인의 아미노산 서열을 기준으로 카파( $\kappa$ ) 및 람다( $\lambda$ )로 지칭되는 2개의 별개의 유형이 있다. 경쇄 아미노산 서열은 당해 분야에 잘 알려져 있다. 경쇄는 사람 경쇄일 수 있다.

[0027] 용어 "가변 도메인" 또는 "가변 부위"는 경쇄 또는 중쇄의 아미노 말단에 일반적으로 위치하고 중쇄의 길이가 약 120개 내지 130개의 아미노산이고 경쇄의 길이가 약 100개 내지 110개의 아미노산인 항체의 경쇄 또는 중쇄의 일부를 말하고, 특정 항원에 대한 각각의 특정 항체의 결합 및 특정화에 사용되는 경쇄 또는 중쇄의 일부를 말한다. 가변 도메인은 상이한 항체들간의 서열이 광범위하게 상이하다. 서열 가변성은 CDR에 집중되는 반면, 가변 도메인의 보다 덜 가변적인 부분은 골격 부위(FR)로 지칭된다. 경쇄 및 중쇄의 CDR은 주로 항체와 항원의

상호작용에 책임이 있다. 본원에 사용된 아미노산 위치의 넘버링은 "Kabat et al. (1991) Sequences of proteins of immunological interest. (U.S. Department of Health and Human Services, Washington, D.C.) 5<sup>th</sup> ed"에서와 같이 EU 인덱스에 따른 것이다. 가변 부위는 사람 가변 부위일 수 있다.

[0028] CDR은 면역글로불린(Ig 또는 항체) VH β-시트 골격의 비-골격 부위 내의 3개의 과가변 부위(H1, H2 또는 H3) 중 하나, 또는 항체 VL β-시트 골격의 비-골격 부위 내의 3개의 과가변 부위(L1, L2 또는 L3) 중 하나를 지칭한다. 따라서, CDR은 골격 부위 서열 내에 배치된 가변 부위 서열이다. CDR 부위는 당해 분야의 숙련가에 잘 알려져 있고, 예를 들어, 항체 가변(V) 도메인 내의 최고 과가변 부위로서 Kabat에 의해 정의되었다(Kabat et al., *J. Biol. Chem.* 252:6609-6616 (1977); Kabat, *Adv. Prot. Chem.* 32:1-75 (1978)). CDR 부위 서열은 또한 보존된 β-시트 골격의 일부가 아니어서 상이한 구조를 개조할 수 있는 잔기로서 Chothia에 의해 구조적으로 정의되었다(Chothia and Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)). 두 용어들은 당해 분야에 널리 인지되어 있다. 정규 항체 가변 도메인 내의 CDR의 위치는 다수의 구조를 비교함으로써 측정되었다(Al-Lazikani et al., *J. Mol. Biol.* 273:927-948 (1997); Morea et al., *Methods* 20:267-279 (2000)). 과가변 부위 내의 잔기의 수가 각각의 항체에서 변하기 때문에, 정규 위치에 관해 추가의 잔기가 정규 가변 도메인 넘버링 스킴에서 잔기 번호 뒤에 관례상 a, b, c 등으로 넘버링된다(Al-Lazikani et al., *supra* (1997)). 유사하게 이러한 명명법이 당해 분야의 숙련가에게 잘 알려져 있다.

[0029] 예를 들어, Kabat(과가변) 또는 Chothia(구조적) 명칭에 따라 정의된 CDR을 하기 표 1에 나타낸다.

[0030] 표 1

CDR 정의

Kabat <sup>1</sup>	Chothia <sup>2</sup>	루프(loop) 위치
V <sub>H</sub> CDR1	31-35	26-32 B 및 C 가닥 연결
V <sub>H</sub> CDR2	50-65	53-55 C' 및 C" 가닥 연결
V <sub>H</sub> CDR3	95-102	96-101 F 및 G 가닥 연결
V <sub>L</sub> CDR1	24-34	26-32 B 및 C 가닥 연결
V <sub>L</sub> CDR2	50-56	50-52 C' 및 C" 가닥 연결
V <sub>L</sub> CDR3	89-97	91-96 F 및 G 가닥 연결

<sup>1</sup> 잔기 넘버링은 앞의 Kabat et al.의 명명법에 따름.

<sup>2</sup> 잔기 넘버링은 앞의 Chothia et al.의 명명법에 따름.

[0031]

[0033] 하나 이상의 CDR은 또한 공유적으로 또는 비공유적으로 분자에 도입되어 면역접합체(immunoadhesin)가 될 수 있다. 면역접합체는 CDR(들)을 보다 큰 폴리펩타이드쇄의 일부로서 도입할 수 있거나, CDR(들)을 다른 폴리펩타이드쇄에 공유적으로 결합시킬 수 있거나, CDR(들)을 비공유적으로 도입할 수 있다. CDR은 면역접합체가 관심있는 특정 항원에 결합하는 것을 가능케 한다.

[0034] 항체, 항체 기능적 단편 또는 폴리뉴클레오타이드에 관해 사용되는 경우, 본원에 사용된 용어 "분리된"은 언급된 분자가 자연 상태에서 발견될 때와 같은 성분이 하나 이상 없는 것을 의미하려는 것이다. 이 용어는 자연 상태에서 발견될 때와 같은 성분 중 일부 또는 전부가 제거된 항체, 항체 기능적 단편 또는 폴리뉴클레오타이드를 포함한다. 항체의 천연 환경의 성분은, 예를 들어, 적혈구, 백혈구, 혈소판, 혈장, 단백질, 핵산, 염 및 영양소를 포함한다. 항체 기능적 단편 또는 폴리뉴클레오타이드의 천연 환경의 성분은, 예를 들어, 지질막, 세포 소기관, 단백질, 핵산, 염 및 영양소를 포함한다. 본 발명의 항체, 항체 기능적 단편 또는 폴리뉴클레오타이드는 또한 세포로부터 분리되거나 재조합적으로 생성되는 상기 성분 또는 기타 임의의 성분이 모두 없거나 실질적으로 없을 수 있다.

[0035] 본원에 사용된 용어 "아이소타입"은 중쇄 불변 부위 유전자에 의해 코드화되는 항체 클래스를 지칭한다. 제시된 항체 또는 기능적 단편의 중쇄는 그 항체 또는 기능적 단편의 클래스인 IgM, IgG, IgA, IgD 또는 IgE를 결정한다. 각 클래스는 κ 또는 λ 경쇄를 가질 수 있다. 용어 "서브클래스"는 서브클래스와 구별되는 중쇄의 아미노산 서열의 작은 차이를 말한다. 사람의 경우, IgA는 2개의 서브클래스(서브클래스 IgA1 및 IgA2)가 있고, IgG는 4개의 서브클래스(서브클래스 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4)가 있다. 이러한 클래스 및 서브클래스는 당해 분야의

숙련가에게 잘 알려져 있다.

- [0036] 본원에 사용된 용어 "결합하다" 또는 "결합"은 분자들 간의 상호작용으로 복합체가 생성되는 것을 말한다. 상호작용은, 예를 들어, 수소결합, 이온결합, 소수성 상호작용 및/또는 반 데르 발스 상호작용을 포함한, 비공유 상호작용일 수 있다. 복합체는 또한 공유 또는 비공유 결합, 상호작용 또는 힘에 의해 결합된 2개 이상의 분자들의 결합을 포함할 수 있다. 항체 또는 이의 기능적 단편의 결합은, 예를 들어, 효소 결합 면역 흡착법, 실시예 1에 제공된 방법 또는 당해 분야의 숙련가에게 잘 알려진 다수의 방법 중 임의의 것을 사용하여 검출할 수 있다.
- [0037] 항체 또는 기능적 단편 상의 단일 항원 결합 위치와  $sLe^a$ 와 같은 표적 분자의 단일 에피토프 사이의 전체 비공유 상호작용의 강도는 그 에피토프에 대한 항체 또는 기능적 단편의 친화도이다. 항체 또는 이의 기능적 단편의 1가 항원( $k_1/k_{-1}$ )에 대한 결합( $k_1$ ) 대 해리( $k_{-1}$ ) 비율은 결합상수  $K$ 로서, 이는 친화도의 척도이다.  $K$ 값은 항체 또는 기능적 단편과 항원의 상이한 복합체에 따라 변하며  $k_1$  및  $k_{-1}$  둘 다에 좌우된다. 본 발명의 항체 또는 기능적 단편에 대한 결합상수  $K$ 는 본원에 제공된 임의의 방법 또는 당해 분야의 숙련가에게 잘 알려진 기타 임의의 방법을 사용하여 측정할 수 있다.
- [0038] 하나의 결합 위치의 친화도가 항상 항체 또는 기능적 단편과 항원 사이의 상호작용의 실제 강도를 반영하는 것은 아니다. 다가  $sLe^a$ 와 같은 다중 반복적 항원 결정부위를 함유하는 복합체 항원이 다중 결합 위치를 함유하는 항체와 접촉하고 있는 경우, 한 위치에서의 항체 또는 기능적 단편과 항원의 상호작용은 두 번째 위치에서의 작용 가능성을 증가시킬 것이다. 다가 항체와 항원 사이의 이러한 다중 상호작용 강도를 결합력(avidity)이라 부른다. 항체 또는 기능적 단편의 결합력은 각각의 결합 위치의 친화도보다 결합 능력의 척도로서 더 좋을 수 있다.
- [0039] 예를 들어, IgG보다 친화도는 더 낮을 수 있지만 그 다가성으로 인한 IgM의 높은 결합력이 효과적으로 결합하는 것을 가능하게 하는 오량체(pentameric) IgM 항체들에서 종종 발견되는 바와 같이, 높은 결합력은 낮은 친화도를 보완할 수 있다.
- [0040] 항체 또는 이의 기능적 단편의 특이성은 각각의 항체 또는 이의 기능적 단편이 오직 하나의 항원과 반응하는 능력을 말한다. 항체 또는 기능적 단편은 항원 또는 항원의 이성체 형태의 1차, 2차 또는 3차 구조의 차이를 구별할 수 있는 경우 특이적인 것으로 여겨질 수 있다.
- [0041] 용어 "폴리뉴클레오타이드"는 데옥시리보뉴클레오타이드 또는 리보뉴클레오타이드 또는 이의 유사체인 임의의 길이의 뉴클레오타이드의 중합체 형태를 지칭한다. 폴리뉴클레오타이드의 서열은 다음 4개의 뉴클레오타이드 염기로 이루어진다: 아데닌(A), 시토신(C), 구아닌(G), 티민(T), 및 폴리뉴클레오타이드가 RNA인 경우 티민 대신 우라실(U). 따라서, 용어 "뉴클레오타이드 서열" 또는 "핵산 서열"은 폴리뉴클레오타이드를 알파벳으로 표시한 것이다. 폴리뉴클레오타이드는 유전자 또는 유전자 단편(예를 들어, 프로모터, 프라이머, EST 또는 SAGE 태그), 엑손, 인트론, 메신저 RNA(mRNA), 전달 RNA, 리보솜 RNA, 리보솜자임, cDNA, 재조합 폴리뉴클레오타이드, 분지된 폴리뉴클레오타이드, 플라스미드, 벡터, 임의 서열의 분리된 DNA, 임의 서열의 분리된 RNA, 핵산 프로브 및 프라이머를 포함할 수 있다. 폴리뉴클레오타이드는 또한 이중가닥 및 단가닥 분자 둘 다를 지칭한다. 달리 특정되지 않거나 요구되지 않는 한, 폴리뉴클레오타이드에 대한 본 발명의 임의 실시양태는 이중가닥 형태, 및 이중가닥을 구성하는 것으로 알려져 있거나 예측되는 2개의 상보적 단가닥 형태 각각을 포함한다. 본원에 기재된 분리된 폴리뉴클레오타이드 및 핵산은 자연 발생적으로 생기지 않는 폴리뉴클레오타이드 및 핵산인 것으로 생각된다. 자연 발생적으로 생기지 않는 폴리뉴클레오타이드 및 핵산은 cDNA 및 화학적으로 합성된 분자를 포함할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [0042] 폴리뉴클레오타이드에 관해 사용되는 용어 "코드화" 또는 이와 문법적으로 동등한 용어는 천연 상태의 폴리뉴클레오타이드를 말하거나, 당해 분야의 숙련가에게 잘 알려진 방법에 의해 조작되는 경우 mRNA를 생성시키기 위해 전사되고, 이어서 폴리펩타이드 및/또는 이의 단편으로 번역될 수 있는 폴리뉴클레오타이드를 말한다. 안티센스 스트랜드는 이러한 폴리뉴클레오타이드의 보체이고, 이로부터 코드화 서열이 추론될 수 있다.
- [0043] 구절 "치료제"는  $sLe^a$ 의 발현과 관련된 질환 및/또는 이와 관련된 증상의 치료, 관리 또는 개선에 사용될 수 있는 임의 제제를 말한다. 특정 실시양태에서, 치료제는 본 발명의 항체 또는 기능적 단편을 지칭한다. 한 실시양태에서, 치료제는 본 발명의 항체 또는 기능적 단편 이외의 제제를 지칭한다. 치료제는  $sLe^a$ 의 발현과 관련된 질

환 및/또는 이와 관련된 하나 이상의 증상의 치료, 관리 또는 개선에 유용한 것으로 잘 알려져 있거나, 상기한 치료, 관리 또는 개선에 사용됐거나 현재 사용되고 있는 제제일 수 있다.

[0044] 구절 "진단제"는 질환의 진단을 돕는, 대상체에 투여되는 물질을 말한다. 이러한 물질은 질환을 일으키는 과정의 병소부위를 드러내고, 정확히 찾아내고, 및/또는 규정하는데 사용할 수 있다. 특정 실시양태에서, 진단제는 본 발명의 항체 또는 기능적 단편에 결합되고 대상체에 투여되거나 대상체로부터의 샘플에 접촉되는 경우 암 또는 종양 생성의 진단을 돕는 물질을 포함한다.

[0045] 구절 "검출제"는 샘플 또는 대상체에서 본 발명의 항체 또는 기능적 단편과 같은 목적한 분자의 실제 또는 존재를 확인하는데 사용할 수 있는 물질을 지칭한다. 검출제는 시각화할 수 있는 물질일 수 있거나, 아니면 (예를 들어, 정량화에 의해) 밝혀질 수 있고/있거나 측정될 수 있는 물질일 수 있다.

[0046] "유효량"은 유리한 또는 목적한 결과를 가져오기에 충분한 양이다. 유효량은 1회 이상의 투여, 도포 또는 투여량으로 투여될 수 있다. 이러한 전달은 개별 투여 단위가 사용되는 기간, 제제의 생체이용률, 투여 경로 등을 포함한 다수의 변수에 좌우된다.

[0047] 본원에 사용된 구절 "치료학적 유효량"은 제시된 질환의 중증도 및/또는 기간 및/또는 이와 관련된 증상을 감소 및/또는 개선시키기에 충분한 치료제(예를 들어, 본원에 제공된 항체 또는 기능적 단편, 또는 본원에 제공된 기타 임의의 치료제)의 양을 지칭한다. 치료제의 치료학적 유효량은 제시된 질환의 진행 또는 진전의 감소 또는 개선, 제시된 질환의 재발, 진행 또는 개시의 감소 또는 개선, 및/또는 기타 요법(예를 들어, 본원에 제공된 항체 또는 기능적 단편이 투여 이외의 요법)의 예방 또는 치료 효과의 향상 또는 강화에 필요한 양일 수 있다.

[0048] 시알릴  $Le^a$ , 시알릴-루이스 A, 시알릴화 루이스 a 및 CA 19.9로도 알려져 있는 화합물 "시알릴-루이스<sup>a</sup>"( $sLe^a$ )는 분자식이  $C_{31}H_{52}N_{2}O_{23}$ 이고 몰 질량이 820.74g/mol인 테트라사카라이드이다.  $sLe^a$ 의 구조는 Neu5Ac  $\alpha$ 2-3Gal  $\beta$ 1-3(Fuc  $\alpha$ 1-4)GlcNAc  $\beta$  및 Neu5Gc  $\alpha$ 2-3Gal  $\beta$ 1-3(Fuc  $\alpha$ 1-4)GlcNAc  $\beta$ 를 포함할 수 있다.  $sLe^a$ 는 위장관 종양에서 널리 나타나고 체장암과 결장암의 종양 마커로서 사용된다.  $sLe^a$ 는 또한 내피 백혈구 부착 분자(ELAM)로도 알려져 있는 E-선택소에 대해 공지된 리간드이다.

[0049] 몇몇 실시양태에서, 본 발명은 항체 중쇄 또는 경쇄 또는 이의 기능적 단편을 코드화하는 분리된 폴리뉴클레오타이드를 제공하며, 여기서 항체 또는 항체 중쇄 또는 경쇄를 사용하여 생성된 기능적 단편은  $sLe^a$ 에 결합된다. 따라서, 몇몇 실시양태에서, 본 발명은 항체 또는 이의 기능적 단편을 코드화하는 분리된 폴리뉴클레오타이드를 제공하며, 여기서 항체는 서열번호 2의 잔기 20 내지 142, 서열번호 6의 잔기 20 내지 142, 서열번호 10의 잔기 20 내지 142 및 서열번호 14의 잔기 20 내지 145로 이루어진 그룹으로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 VH 도메인을 포함한다. 본 발명의 분리된 폴리뉴클레오타이드는 또한 서열번호 1의 잔기 58 내지 426, 서열번호 5의 잔기 58 내지 426, 서열번호 9의 잔기 58 내지 426 또는 서열번호 13의 잔기 58 내지 435의 핵산 서열을 포함할 수 있고, 여기서 핵산 서열은 항체 또는 이의 기능적 단편의 VH 도메인을 코드화한다.

[0050] 본 발명의 다른 실시양태에서, 분리된 폴리뉴클레오타이드는 항체 또는 이의 기능적 단편을 코드화할 수 있고, 여기서 항체는 서열번호 4의 잔기 20 내지 130, 서열번호 8의 잔기 20 내지 129, 서열번호 12의 잔기 20 내지 130 및 서열번호 16의 잔기 23 내지 130으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 VL 도메인을 포함한다. 본 발명의 분리된 폴리뉴클레오타이드는 또한 서열번호 3의 잔기 58 내지 390, 서열번호 7의 잔기 58 내지 387, 서열번호 11의 잔기 58 내지 390 또는 서열번호 15의 잔기 67 내지 390의 핵산 서열을 포함할 수 있고, 여기서 핵산 서열은 항체 또는 이의 기능적 단편의 VL 도메인을 코드화한다.

[0051] 다른 실시양태에서, 본 발명은 항체 중쇄 또는 경쇄 또는 이의 기능적 단편을 코드화하는 분리된 폴리뉴클레오타이드를 제공하며, 여기서 본 발명의 폴리뉴클레오타이드를 코드화하는 항체 중쇄 또는 경쇄 또는 이의 기능적 단편은 도 1 내지 8에 도시된 또는 표 2에 열거된 상보적 결정 부위(CDR)를 하나 이상 갖는다. 하나 이상의 CDR을 포함하는 항체 또는 이의 기능적 단편은 본원에 기재된 대로  $sLe^a$ 에 특이적으로 결합할 수 있다.  $sLe^a$ 로의 특이적 결합은 본원에 제공된 항체 중 임의의 것에 대해 실시예 I에 제공된 바와 같은 특이성, 친화도 및/또는 결합력을 포함할 수 있다. 다른 실시양태에서, 본 발명의 폴리뉴클레오타이드를 코드화하는 항체 또는 이의 기능적 단편은 본원에 기재된 클론 분리주 5B1, 9H3, 5H11 또는 7E3 중 임의의 하나의 보체 의존 세포독성(CDC) 활성 및/또는 항체 의존 세포 매개 세포독성(ADCC) 활성을 포함할 수 있다. 항체 또는 이의 기능적 단편의



특이성, 친화도 및/또는 결합력을 평가하는 방법은 당해 분야에 잘 알려져 있고 예시적 방법이 본원에 제공되어 있다.

[0052] 표 2

클론 분리주의 CDR

가변 도메인	핵산 잔기 (서열번호(No))			아미노산 잔기 (서열번호(No))		
	CDR1	CDR2	CDR3	CDR1	CDR2	CDR3
5B1 VH	133-156 (NO: 1)	208-231 (NO: 1)	346-393 (NO: 1)	55-62 (NO: 2)	70-77 (NO: 2)	116-131 (NO: 2)
5B1 VL	133-156 (NO: 3)	208-216 (NO: 3)	325-360 (NO: 3)	45-52 (NO: 4)	70-72 (NO: 4)	109-120 (NO: 4)
9H3 VH	133-156 (NO: 5)	208-231 (NO: 5)	346-393 (NO: 5)	45-52 (NO: 6)	70-77 (NO: 6)	116-131 (NO: 6)
9H3 VL	133-156 (NO: 7)	208-216 (NO: 7)	325-357 (NO: 7)	45-52 (NO: 8)	70-72 (NO: 8)	109-119 (NO: 8)
5H11 VH	133-156 (NO: 9)	208-231 (NO: 9)	346-393 (NO: 9)	45-52 (NO: 10)	70-77 (NO: 10)	116-131 (NO: 10)
5H11 VL	134-156 (NO: 11)	208-216 (NO: 11)	325-360 (NO: 11)	45-52 (NO: 12)	70-72 (NO: 12)	109-120 (NO: 12)
7E3 VH	133-156 (NO: 13)	208-231 (NO: 13)	346-402 (NO: 13)	45-52 (NO: 13)	70-77 (NO: 13)	116-134 (NO: 14)
7E3 VK	145-162 (NO: 15)	214-222 (NO: 15)	331-360 (NO: 15)	49-53 (NO: 16)	72-74 (NO: 16)	111-120 (NO: 16)

[0053]

[0055] 몇몇 실시양태에서, 본 발명의 항체 또는 이의 기능적 단편은 6개 미만의 CDR을 포함한다. 몇몇 실시양태에서, 항체 또는 이의 기능적 단편은 VH CDR1, VH CDR2, VH CDR3, VL CDR1, VL CDR2 및/또는 VL CDR3으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 CDR을 1개, 2개, 3개, 4개 또는 5개 포함한다. 특정 실시양태에서, 항체 또는 이의 기능적 단편은 본원에 기재된 클론 분리주 5B1, 9H3, 5H11 또는 7E3의 VH CDR1, VH CDR2, VH CDR3, VL CDR1, VL CDR2 및/또는 VL CDR3으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 CDR을 1개, 2개, 3개, 4개 또는 5개 포함한다.

[0056] 몇몇 실시양태에서, 본 발명은 항체 또는 이의 기능적 단편을 코드화하는 분리된 폴리뉴클레오타이드를 제공하며, 여기서 항체 또는 기능적 단편은 클론 분리주 5B1, 9H3, 5H11 또는 7E3의 CDR1, CDR2 및 CDR3 아미노산 서열을 갖는 가변 중쇄(VH) 도메인을 포함한다. 이러한 VH 도메인은 서열번호 2의 아미노산 잔기 55 내지 62, 70 내지 77 및 116 내지 131, 또는 대안으로 서열번호 6의 아미노산 잔기 45 내지 52, 70 내지 77 및 116 내지 131, 또는 대안으로 서열번호 10의 아미노산 잔기 45 내지 52, 70 내지 77 및 116 내지 131, 또는 대안으로 서열번호 14의 아미노산 잔기 45 내지 52, 70 내지 77 및 116 내지 134를 포함할 수 있다. 다른 실시양태에서, VH 도메인의 CDR1, CDR2 및 CDR3을 코드화하는 뉴클레오타이드 서열은 각각 서열번호 1의 잔기 133 내지 156, 208 내지 231 및 346 내지 393의 뉴클레오타이드 서열, 또는 대안으로 서열번호 5의 잔기 133 내지 156, 208 내지 231 및 346 내지 393의 뉴클레오타이드 서열, 또는 대안으로 서열번호 9의 잔기 133 내지 156, 208 내지 231 및 346 내지 393의 뉴클레오타이드 서열, 또는 대안으로 서열번호 13의 잔기 133 내지 156, 208 내지 231 및 346 내지 402의 뉴클레오타이드 서열을 포함할 수 있다.

[0057] 다른 실시양태에서, 본 발명은 항체 또는 이의 기능적 단편을 코드화하는 분리된 폴리뉴클레오타이드를 제공하며, 여기서 항체는 클론 분리주 5B1, 9H3, 5H11 또는 7E3의 CDR1, CDR2 및 CDR3 아미노산 서열을 갖는 가변 경쇄(VL) 도메인을 포함한다. 이러한 VL 도메인은 서열번호 4의 아미노산 잔기 45 내지 52, 70 내지 72 및 109 내지 120, 또는 대안으로 서열번호 8의 아미노산 잔기 45 내지 52, 70 내지 72 및 109 내지 119, 또는 대안으로 서열번호 12의 아미노산 잔기 45 내지 52, 70 내지 72 및 109 내지 120, 또는 대안으로 서열번호 16의 아미노산 잔기 49 내지 53, 72 내지 74 및 111 내지 120을 포함할 수 있다. 다른 실시양태에서, VH 도메인의 CDR1, CDR2 및 CDR3을 코드화하는 뉴클레오타이드 서열은 각각 서열번호 3의 잔기 133 내지 156, 208 내지 216 및 325 내지 360의 뉴클레오타이드 서열, 또는 대안으로 서열번호 7의 잔기 133 내지 156, 208 내지 216 및 325 내지 357의 뉴클레오타이드 서열, 또는 대안으로 서열번호 11의 잔기 134 내지 156, 208 내지 216 및 325 내지 360의 뉴클레오타이드 서열, 또는 대안으로 서열번호 15의 잔기 145 내지 162, 214 내지 222 및 331 내지 360의 뉴클레오타이드 서열을 포함할 수 있다.

[0058] 다른 실시양태에서, 본 발명은 본원에 제공된 폴리뉴클레오타이드의 변이체를 제공한다. 폴리뉴클레오타이드에 대해 사용되는 경우 변이체는 메틸화 뉴클레오타이드 또는 뉴클레오타이드 유사체와 같은(이에 한정되지 않음)

하나 이상의 개질된 뉴클레오타이드를 갖는 폴리뉴클레오타이드를 포함한다. 추가로, 변이체 폴리뉴클레오타이드는 비-뉴클레오타이드 성분에 의해 차단된 폴리뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 폴리뉴클레오타이드에 대한 개질은 당해 분야의 숙련자에게 잘 알려진 방법을 사용하여 폴리뉴클레오타이드의 조립 전 또는 후에 부여할 수 있다. 예를 들어, 폴리뉴클레오타이드는 중합 후에 효소적 또는 화학적 기술을 사용하여 표지화 성분과 결합시킴으로써 개질시킬 수 있다(예를 들어, "Gottfried and Weinhold, 2011, *Biochem. Soc. Trans.*, 39(2):523-628; Paredes et al., 2011, *Methods*, 54(2):251-259"에 기재되어 있는 대로).

[0059] 당해 분야에 잘 알려진 임의의 방법에 의해 폴리뉴클레오타이드가 수득될 수 있고 폴리뉴클레오타이드의 뉴클레오타이드 서열이 결정될 수 있다. 5B1, 9H3, 5H11 또는 7E3의 가변 중쇄 및 경쇄 도메인의 아미노산 서열이 공지되어 있기 때문에(예를 들어, 서열번호 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 및 16 참조), 항체 및 이들 항체의 개질된 형태를 코드화하는 뉴클레오타이드 서열을 당해 분야에 잘 알려진 방법을 사용하여 결정할 수 있는데, 즉 특정 아미노산을 코드화하는 것으로 알려진 뉴클레오타이드 코돈을 항체를 코드화하는 핵산을 생성하도록 조립한다. 항체를 코드화하는 이러한 폴리뉴클레오타이드는 화학적으로 합성된 올리고뉴클레오타이드로부터 조작할 수 있고(예를 들어, "Kutmeier et al., 1994, *BioTechniques* 17:242"에 기재되어 있는 대로), 이는 간단히 말하면 항체를 코드화하는 서열 부분을 함유하는 겹치는 올리고뉴클레오타이드의 합성, 이러한 올리고뉴클레오타이드의 어닐링 및 결합, 및 이어서 결합된 올리고뉴클레오타이드의 PCR에 의한 증폭을 포함한다.

[0060] 본 발명의 항체 또는 이의 기능적 단편을 코드화하는 폴리뉴클레오타이드는 분리주 5B1, 9H3, 5H11 또는 7E3의 가변 중쇄 및/또는 경쇄 도메인의 핵산 서열(예를 들어, 서열번호 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 및 15)을 사용하여 생성시킬 수 있다. 항체 또는 기능적 단편을 코드화하는 핵산은 그 서열의 3' 및 5' 엔드에 하이브리드화될 수 있는 합성 프라이머를 사용한 PCR 증폭에 의해 또는 특정 핵산 서열에 특이적인 올리고뉴클레오타이드 프로브를 사용하여 클론화함으로써 화학적으로 합성되거나 적합한 공급원(예를 들어, 항체 또는 이의 기능적 단편을 발현시키기 위해 선택된 하이브리도마 세포와 같은, 항체 또는 이의 기능적 단편을 발현을 발현시키는 세포로부터 분리된 cDNA)으로부터 수득할 수 있다. 이어서, PCR에 의해 생성된 증폭된 핵산을 당해 분야에 잘 알려진 임의의 방법을 사용하여 복제가능한 클론화 벡터내로 클론화할 수 있다.

[0061] 몇몇 실시양태에서, 본 발명은 sLe<sup>a</sup>에 결합된 분리된 항체 또는 이의 기능적 단편을 제공한다. 따라서, 몇몇 실시양태에서, 본 발명은 sLe<sup>a</sup>에 결합된 분리된 항체 또는 이의 기능적 단편을 제공하고, 여기서 항체 또는 이의 기능적 단편은 서열번호 2의 잔기 20 내지 142, 서열번호 6의 잔기 20 내지 142, 서열번호 10의 잔기 20 내지 142 및 서열번호 14의 잔기 20 내지 145로 이루어진 그룹으로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 VH 도메인을 포함한다.

[0062] 몇몇 실시양태에서, 본 발명은 sLe<sup>a</sup>에 결합된 분리된 항체 또는 이의 기능적 단편을 제공하고, 여기서 항체 또는 이의 기능적 단편은 서열번호 4의 잔기 20 내지 130, 서열번호 8의 잔기 20 내지 129, 서열번호 12의 잔기 20 내지 130 및 서열번호 16의 잔기 23 내지 130으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 VL 도메인을 포함한다.

[0063] 몇몇 실시양태에서, 본 발명은 sLe<sup>a</sup>에 결합된 분리된 항체 또는 이의 기능적 단편을 제공하고, 여기서 항체 또는 이의 기능적 단편은 VH 도메인 및 VL 도메인을 포함하고, VH 도메인 및 VL 도메인은 각각 서열번호 2의 잔기 20 내지 142, 서열번호 6의 잔기 20 내지 142, 서열번호 10의 잔기 20 내지 142 및 서열번호 14의 잔기 20 내지 145로 이루어진 그룹으로부터 선택된 아미노산 서열, 및 서열번호 4의 잔기 20 내지 130, 서열번호 8의 잔기 20 내지 129, 서열번호 12의 잔기 20 내지 130 및 서열번호 16의 잔기 23 내지 130으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함한다.

[0064] 몇몇 실시양태에서, sLe<sup>a</sup>에 결합하기 위해, 본 발명의 항체 또는 이의 기능적 단편은 도 1 내지 8에 도시된 또는 표 2에 열거된 CDR을 하나 이상 갖는다. 하나 이상의 CDR, 특히 CDR3을 포함하는 항체 또는 이의 기능적 단편은 본원에 기재된 대로 sLe<sup>a</sup>에 특이적으로 결합할 수 있다. sLe<sup>a</sup>로의 특이적 결합은 본원에 제공된 항체 중 임의의 것에 대해 실시예 I에 제공된 바와 같은 특이성 및 친화도를 포함할 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 본 발명의 항체 또는 이의 기능적 단편은 본원에 기재된 클론 분리주 5B1, 9H3, 5H11 또는 7E3 중 임의의 하나의 CDC 활성 및/또는 ADCC 활성을 포함할 수 있다.

[0065] 몇몇 실시양태에서, 본 발명은 분리된 항체 또는 이의 기능적 단편을 제공하고, 여기서 항체는 클론 분리주 5B1, 9H3, 5H11 또는 7E3의 CDR1, CDR2 및 CDR3 아미노산 서열을 갖는 VH 도메인을 포함한다. 이러한 VH 도메

인은 서열번호 2의 아미노산 잔기 55 내지 62, 70 내지 77 및 116 내지 131, 또는 대안으로 서열번호 6의 아미노산 잔기 45 내지 52, 70 내지 77 및 116 내지 131, 또는 대안으로 서열번호 10의 아미노산 잔기 45 내지 52, 70 내지 77 및 116 내지 131, 또는 대안으로 서열번호 14의 아미노산 잔기 45 내지 52, 70 내지 77 및 116 내지 134를 포함할 수 있다.

[0066] 몇몇 실시양태에서, 본 발명은 분리된 항체 또는 이의 기능적 단편을 제공하고, 여기서 항체는 클론 분리주 5B1, 9H3, 5H11 또는 7E3의 CDR1, CDR2 및 CDR3 아미노산 서열을 갖는 VL 도메인을 포함한다. 이러한 VL 도메인은 서열번호 4의 아미노산 잔기 45 내지 52, 70 내지 72 및 109 내지 120, 또는 대안으로 서열번호 8의 아미노산 잔기 45 내지 52, 70 내지 72 및 109 내지 119, 또는 대안으로 서열번호 12의 아미노산 잔기 45 내지 52, 70 내지 72 및 109 내지 120, 또는 대안으로 서열번호 16의 아미노산 잔기 49 내지 53, 72 내지 74 및 111 내지 120을 포함할 수 있다.

[0067] 본 발명의 몇몇 실시양태에서, 분리된 항체 또는 이의 기능적 단편은 단클론 항체이다. 본 발명의 몇몇 실시양태에서, 본원에 제공된 분리된 항체 또는 이의 기능적 단편은 IgG 또는 IgM 아이소타입이다. 본 발명의 추가의 실시양태에서, 항체 또는 이의 기능적 단편은 IgG1 서브클래스의 항체이다.

[0068] 몇몇 실시양태에서, 본 발명의 항체 기능적 단편은 Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fabc, scFV, 디아바디, 트리아바디, 미니바디 또는 단일 도메인 항체(sdAB)일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다. 몇몇 실시양태에서, 본 발명은 서열번호 18 또는 20의 아미노산 서열을 포함하는 디아바디를 제공한다. 본 발명의 이러한 디아바디는, 몇몇 실시양태에서, 서열번호 17 또는 19의 핵산 서열을 갖는 폴리뉴클레오타이드에 의해 코딩될 수 있다. 항체 및 이의 기능적 단편에 대해, 다양한 형태, 변경된 것 및 개질된 것이 당해 분야에 잘 알려져 있다. 본 발명의 sLe<sup>a</sup> 특이적 항체는 이러한 다양한 항체 형태, 변경된 것 및 개질된 것 중 어느 것이라도 포함할 수 있다. 당해 분야에 공지된 이러한 다양한 형태의 예 및 용어를 아래에 기재한다.

[0069] 몇몇 실시양태에서, 본 발명은 본 발명의 항체 또는 이의 기능적 단편의 제조방법을 제공한다. 본 발명의 방법은 본 발명의 폴리뉴클레오타이드를 숙주 세포에 도입하고, 숙주 세포를, 본 발명의 항체 또는 이의 기능적 단편의 코딩된 중쇄 및/또는 경쇄를 생성시키는 조건하에 이를 생성시키는 충분한 시간 동안 배양하고, 항체 또는 기능적 단편의 중쇄 및/또는 경쇄를 정제함을 포함할 수 있다.

[0070] sLe<sup>a</sup> 항원에 결합하는 본 발명의 항체 또는 이의 기능적 단편의 재조합 발현은 본 발명의 항체 또는 이의 기능적 단편의 중쇄 및/또는 경쇄를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 함유하는 발현 벡터의 구성을 포함할 수 있다. 일단 본 발명의 항체 또는 이의 기능적 단편(바람직하게는 중쇄 및/또는 경쇄 가변 도메인을 함유하나, 필수적인 것은 아님)을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드가 수득되면, 당해 분야에 잘 알려진 기술을 사용하여 재조합 DNA 기술로 항체 또는 기능적 단편의 제조를 위한 벡터를 제조할 수 있다. 항체 또는 이의 기능적 단편 코딩 뉴클레오타이드 서열을 함유하는 폴리뉴클레오타이드를 발현시킴으로써 단백질을 제조하는 방법이 본원에 기재되어 있다.

[0071] 당해 분야의 숙련가에게 잘 알려진 방법을 사용하여 항체 또는 이의 기능적 단편 코딩 서열을 함유하는 발현 벡터 및 적합한 전사 및 번역 조절 시그널을 구성할 수 있다. 이러한 방법은, 예를 들어, 시험관내 재조합 DNA 기술, 합성 기술 및 생체내 유전적 재조합을 포함한다. 따라서, 본 발명은 사용가능하게 촉진자에 연결된 본 발명의 항체 또는 이의 기능적 단편을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 복제가능한 벡터를 제공한다. 이러한 벡터는 항체 분자의 불변 부위를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함할 수 있고(예를 들어, 국제 공개공보 WO 86/05807 및 WO 89/01036, 및 미국 특허 제 5,122,464호 참조), 항체의 가변 도메인은 중쇄 전체, 경쇄 전체, 또는 중쇄 전체와 경쇄 전체 둘 다의 발현을 위해 이러한 벡터내로 클론화될 수 있다.

[0072] 발현 벡터는 통상의 기술로 숙주 세포로 이동시킬 수 있고, 이어서 감염된 세포를 통상의 기술로 배양하여 본 발명의 항체 또는 이의 기능적 단편을 제조할 수 있다. 따라서, 본 발명은 사용가능하게 이중 촉진자에 연결된 본 발명의 항체 또는 이의 기능적 단편을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 함유하는 숙주 세포를 포함한다. 이중 중쇄 항체의 발현을 위한 몇몇 실시양태에서, 중쇄 및 경쇄 둘 다를 코딩하는 벡터는, 아래에 상세히 기재한 바와 같이, 숙주 세포내에서 전체 면역글로불린 분자의 발현을 위해 공동 발현될 수 있다.

[0073] 다양한 숙주 발현 벡터 시스템을 사용하여 본 발명의 항체 또는 이의 기능적 단편을 발현시킬 수 있다(예를 들어, 미국 특허 제 5,807,715호 참조). 이러한 숙주 발현 시스템은 비히클(이것에 의해 관심있는 코딩 서열이 생산되고, 후속적으로 정제될 수 있다)을 나타내나, 또한 적합한 뉴클레오타이드 코딩 서열로 형질전환시키는



나 감염되는 경우, 원 위치(in situ)에 본 발명의 항체 분자를 발현할 수 있는 세포를 또한 나타낸다. 이들은 항체 코드화 서열을 함유하는 재조합 박테리오파지 DNA, 플라스미드 DNA 또는 코스미드 DNA 발현 벡터로 형질전환된 세균(예를 들어, *E. coli* 및 *B. subtilis*); 항체 코드화 서열을 함유하는 재조합 이스트 발현 벡터로 변형된 이스트(예를 들어, *Saccharomyces Pichia*); 항체 코드화 서열을 함유하는 재조합 바이러스 발현 벡터(예를 들어, 배칼로바이러스)로 감염된 곤충 세포 시스템; 항체 코드화 서열을 함유하는 재조합 바이러스 발현 벡터(예를 들어, 콜리플라워 모자이크 바이러스 CaMV; 담배 모자이크 바이러스 TMV)로 감염된 또는 재조합 플라스미드 발현 벡터(예를 들어, Ti 플라스미드)로 변형된 식물 세포 시스템; 또는 포유동물 세포의 계놈으로부터 유도된 촉진자(예를 들어, 메탈로티오닌 촉진자) 또는 포유동물 바이러스로부터 유도된 촉진자(예를 들어, 아데노바이러스 후기 촉진자; 우두 바이러스 7.5K 촉진자)를 함유하는 재조합 발현 구성을 숨기는 포유동물 세포 시스템(예를 들어, COS, CHO, BHK, 293, NS0 및 3T3 세포)과 같은 미생물을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 몇몇 실시양태에서, 특히 전체 재조합 항체의 발현을 위하여 대장균과 같은 세균성 세포, 또는 진핵세포, 재조합 항체 또는 기능적 단편의 발현을 위해 사용된다. 예를 들어, 사람 시토크로마리노바이러스로부터의 주요 조기발현유전자 촉진자 요소와 같은 벡터와 함께, 중국 햄스터 난소세포(CHO)와 같은 포유동물 세포는 항체에 대한 효과적인 발현 시스템이다(Foecking et al., 1986, *Gene* 45:101; and Cockett et al., 1990, *Bio/Technology* 8:2). 몇몇 실시양태에서, 본 발명의 항체 또는 이의 단편은 CHO 세포내에서 생산된다. 한 실시양태에서, sLe<sup>a</sup>에 결합하는 본 발명의 항체 또는 이의 기능적 단편을 코드화하는 뉴클레오타이드 서열의 발현은 구성 촉진자, 유도 촉진자 또는 조직 특이적 촉진자에 의해 조절된다.

[0074] 세균 시스템에서, 다수의 발현 벡터가 발현되는 항체 분자에 의도된 용도에 따라 유리하게 선택될 수 있다. 예를 들어, 이러한 항체가 다량 생산되는 경우, 항체 분자의 약제학적 조성물의 생산을 위해, 쉽게 정제되는 융합 단백질 생성물의 고도의 발현을 지시하는 벡터가 바람직할 수 있다. 이러한 벡터는 항체 코드화 서열이 lac Z 코드화 부위를 갖는 프레임의 벡터에 개별적으로 결합되어 융합 단백질을 생산할 수 있는 *E. coli* 발현 벡터 pUR278(Ruther et al., 1983, *EMBO* 12:1791); pIN 벡터(Inouye & Inouye, 1985, *Nucleic Acids Res.* 13:3101-3109; Van Heeke & Schuster, 1989, *J. Biol. Chem.* 24:5503-5509) 등을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. pGEX 벡터가 또한 글루타티온 5-트랜스퍼라제(GST)와의 융합 단백질로서 이중 폴리펩타이드를 발현하는데 사용될 수 있다. 일반적으로, 이러한 융합 단백질은 가용성이고 용해된 세포로부터 흡착 및 매트릭스 글루타티온 아가로스 비즈로의 결합, 이어서 유리 글루타티온의 존재에서의 용출에 의해 쉽게 정제될 수 있다. pGEX 벡터는 트롬빈 또는 인자 Xa 프로테아제 분열 부위를 포함하도록 제조되어 클론화된 표적 유전자 생성물이 GST 잔기로부터 방출될 수 있다.

[0075] 곤충 시스템에서, *Autographa clifornica* 핵 다면체형성 바이러스(AcNPV)가 이중 유전자를 발현시키기 위한 벡터로서 사용된다. 바이러스는 *Spodoptera frugiperda* 세포에서 성장한다. 항체 또는 기능적 단편 코드화 서열을 개별적으로 바이러스의 비필수 부위(예를 들어, 폴리헤드린 유전자)내로 클론화할 수 있고 AcNPV 촉진자(예를 들어, 폴리헤드린 촉진자)의 조절하에 둘 수 있다.

[0076] 포유동물 숙주 세포에서, 다수의 바이러스 기초한 발현 시스템을 사용할 수 있다. 아데노바이러스가 발현 벡터로 사용된 경우, 관심있는 항체 코드화 서열을 아데노바이러스 전사/번역 조절 복합체, 예를 들어, 후기 촉진자 및 셋으로 나뉜 리더 서열에 결합할 수 있다. 이어서 이 키메라 유전자를 시험관내 또는 생체내 재조합에 의해 아데노바이러스 계놈에 삽입할 수 있다. 바이러스 계놈의 비필수 부위(예를 들어, 부위 E1 또는 E3)로의 삽입으로 재조합 바이러스가 생존가능하고 감염된 숙주에서 항체 분자를 발현할 수 있을 것이다(예를 들어, "Logan & Shenk, 1984, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:355-359" 참조). 특이적 개시 시그널이 또한 삽입된 항체 코드화 서열의 효과적인 번역에 사용될 수 있다. 이들 시그널은 ATG 개시 코돈 및 인접한 서열을 포함한다. 또한, 개시 코돈은 전체 삽입물을 번역하기 위해 목적인 코드화 서열의 관독 프레임을 갖는 단계에 있을 것이다. 이들 외인성 번역 조절 시그널 및 개시 코돈은 천연 및 합성 둘 다의 다양한 기원을 가질것이다. 적합한 전사 개시 요소, 전사 종결자 등을 포함시켜 발현 효율을 증가시킬 수 있다(예를 들어, "Bittner et al., 1987, *Methods in Enzymol.* 153:51-544" 참조).

[0077] 또한, 삽입된 서열의 발현을 조절하거나 목적인 특정 방식으로 유전자 생성물을 개질시키고 가공하는 숙주 세포주를 선택할 수 있다. 단백질 생성물의 이러한 개질(예를 들어, 글리코실화) 및 가공(예를 들어, 분열)은 항체 또는 기능적 단편의 기능에 중요할 수 있다. 상이한 숙주 세포는 단백질 및 유전자 생성물의 후-번역 가공 및 개질을 위한 특정 및 특정 메카니즘을 갖는다. 발현된 이중 단백질의 개질 및 가공이 정확하게 되도록 적합한 세포주 또는 숙주 시스템을 선택할 수 있다. 이 목적을 위해, 유전자 생성물의 일차 전사, 글리코실화 및 포스포릴화의 적합한 가공을 위한 세포 기계를 갖는 진핵 숙주 세포를 사용할 수 있다. 이러한 포유동물 숙주

세포는 CHO, VERY, BHK, HeLa, COS, MDCK, 293, 3T3, W138, BT483, Hs578T, HTB2, BT20 및 T47D, NS0(어떠한 면역글로불린 쇄도 내부에서 발생되지 않는 쥐과 골수종 세포주), CRL7030 및 HsS78Bst 세포를 포함하나, 이에 한정되지 않는다.

[0078] 재조합 단백질의 장시간 고수율 생산의 경우, 안정한 발현이 바람직하다. 예를 들어, 본 발명의 항체 또는 기능적 단편을 안정하게 발현하는 세포주가 제작될 수 있다. 복제의 바이러스 기원을 함유하는 발현 벡터를 사용하기 보다는, 숙주 세포를 적합한 발현 조절 요소(예를 들어, 촉진자, 증진자, 서열, 전사 종결자, 폴리아데닐화 부위 등)에 의해 조절된 DNA 및 선택가능한 마커로 변형시킬 수 있다. 이중 DNA의 도입 후, 제작된 세포를 영양 강화 배지에서 1 내지 2일 동안 성장시킨 다음, 선택 배지로 바꾼다. 재조합 플라스미드내의 선택가능한 마커는 선택 내성을 부여하고, 세포가 플라스미드를 세포의 염색체내로 안전하게 통합시키고 성장하도록 하여 차례 차례 클론화되고 세포주로 확대될 수 있는 부위를 형성한다. 이 방법은 항체 분자를 발현시키는 세포주를 제작하는데 유리하게 사용될 수 있다.

[0079] 각각 tk-, hgprrt- 또는 aprt-세포에 사용될 수 있는, 단순 헤르페스 바이러스 티미딘 키나제(Wigler et al., 1977, *Cell* 11:223), 하이포잔틴구아닌 포스포리보실트랜스퍼라제(Szybalska & Szybalski, 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 48:202) 및 아데닌 포스포리보실트랜스퍼라제(Lowy et al., 1980, *Cell* 22:8-17) 유전자를 포함한, 그러나 이에 한정되지 않는, 다수의 선택 시스템을 사용할 수 있다. 또한, 항대사물질 내성이 다음 유전자에 대한 선택의 기초로 사용될 수 있다: 메토타렉세이트에 내성을 부여하는 *dhfr*(Wigler et al., 1980, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 77(6):3567-70; O'Hare et al., 1981, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:1527); 글루타메이트 및 암모니아를 이용한 글루타민의 생합성을 책임지는 효소인 글루타민 합성효소(GS)(Bebbington et al., 1992, *Biototechnology* 10:169); 마이코페놀산에 내성을 부여하는 *gpt*(Mulligan & Berg, 1981, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:2072); 아미노글리코사이드 G-418에 내성을 부여하는 neo(Wu and Wu, 1991, *Biotherapy* 3:87-95; Tolstoshev, 1993, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 32:573-596; Mulligan, 1993, *Science* 260:926-932; and Morgan and Anderson, 1993, *Ann. Rev. Biochem.* 62:191-217; May, 1993, *TIB TECH* 11(5):155-215); 및 하이그로마이신에 내성을 부여하는 *hygro*(Santerre et al., 1984, *Gene* 30:147). 일상적으로 재조합 DNA 기술 분야에서 잘 알려진 방법을 목적한 재조합 클론을 선택하는 데 사용할 수 있고, 이러한 방법은, 예를 들어, 전문이 본원에 참조로 도입된 "Ausubel et al. (eds.), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, NY (1993); Krieglner, *Gene Transfer and Expression*, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY (1990); and in Chapters 12 and 13, Dracopoli et al. (eds.), *Current Protocols in Human Genetics*, John Wiley & Sons, NY (1994); Colberre-Garapin et al., 1981, *J. Mol. Biol.* 150:1"에 기재되어 있다.

[0080] 항체 분자의 발현 수준은 벡터 증폭에 의해 증가될 수 있다(검토를 위해, "Bebbington and Hentschel, The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning, Vol. 3 (Academic Press, New York, 1987)" 참조). 항체 또는 이의 기능적 단편을 발현하는 벡터 시스템에서의 마커가 증폭가능한 경우, 숙주 세포 배지에 존재하는 억제제의 수준 증가는 마커 유전자의 복제물의 수를 증가시킬 것이다. 증폭된 부위는 항체 유전자와 관련되기 때문에, 항체의 생산이 또한 증가할 것이다(Crouse et al., 1983, *Mol. Cell. Biol.* 3:257).

[0081] 숙주 세포는 본 발명의 2개의 발현 벡터로 공동 감염될 수 있는데, 첫 번째 발현 벡터는 중쇄 유도된 폴리펩타이드를 코딩화하고, 두 번째 벡터는 경쇄 유도된 폴리펩타이드를 코딩화한다. 상기 두 벡터는 중쇄 및 경쇄 폴리펩타이드를 똑같이 발현시킬 수 있는 동일한 선택가능한 마커를 함유할 수 있다. 대안으로, 중쇄 및 경쇄 폴리펩타이드 둘 다를 코딩화하고 발현시킬 수 있는 단일 벡터를 사용할 수 있다. 이러한 상황에서, 경쇄가 중쇄 앞에 위치하여 과잉의 독성 유리 중쇄를 방지할 수 있다(Proudfoot, 1986, *Nature* 322:52; 및 Kohler, 1980, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:2197-2199). 중쇄 및 경쇄에 대한 코딩화 서열은 cDNA 또는 게놈 DNA를 포함할 수 있다.

[0082] 추가로, 본 발명의 항체 또는 기능적 단편의 중쇄 및/또는 경쇄를 코딩화하는 폴리뉴클레오타이드를 당해 분야에 잘 알려진 기술을 사용하여 코돈 최적화시켜 목적한 숙주 세포내에서 본 발명의 항체 또는 기능적 단편의 최적화된 발현을 성취할 수 있다. 예를 들어, 코돈 최적화의 한 방법에서, 자연 코돈(native codon)은 참조용 유전자 세트로부터의 가장 흔한 코돈으로 치환되고, 여기서 각 아미노산에 대한 코돈 번역 비율은 높게 계획된다. 본 발명의 항체 또는 기능적 단편의 중쇄 및/또는 경쇄에 적용할 수 있는, 목적한 단백질의 발현을 위해 최적화된 폴리뉴클레오타이드를 생성시키는 추가의 예시적 방법이 "Kanaya et al., *Gene*, 238:143-155 (1999), Wang et al., *Mol. Biol. Evol.*, 18(5):792-800 (2001), 미국 특허 제5,795,737호, 미국 공보 2008/0076161 및 WO

2008/000632"에 기재되어 있다.

- [0083] 일단 본 발명의 항체 분자가 재조합 발현에 의해 생성되면, 이를 면역글로불린 분자의 정제에 대해 당해 분야에 알려진 임의의 방법으로, 예를 들어, 크로마토그래피(예를 들어, 이온 교환, 친화도, 특히 단백질 A 다음의 특정 항원에 대한 친화도, 및 사이징 컬럼 크로마토그래피), 원심분리, 차등 용해도 또는 단백질 정제를 위한 기타 임의의 표준 기술로 정제할 수 있다. 또한, 본 발명의 항체 또는 기능적 단편을 정제를 용이하게 하기 위해 본원에 제공된 또는 당해 분야에 공지된 이중 폴리펩타이드 서열에 융합시킬 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 항체 또는 기능적 단편을 무엇보다도 시판중인 폴리히스티딘 태그(His-태그), FLAG-태그, 헤마글루티닌 태그(HA-태그) 또는 myc-태그를 재조합적으로 첨가하고 당해 분야의 숙련자에게 잘 알려진 정제 방법을 사용함으로써 정제할 수 있다.
- [0084] Fab 단편은 VL, VH, CL 및 CH1 도메인으로 이루어진 1가 단편을 말하고; F(ab')<sub>2</sub> 단편은 2개의 Fab 단편이 힌지 부위에서 다이설파이드 브릿지에 의해 연결되어 있는 2가 단편이며; Fd 단편은 VH 및 CH1 도메인으로 이루어지고; Fv 단편은 항체의 단일 암(arm)의 VL 및 VH 도메인으로 이루어지고; dAb 단편(Ward et al., *Nature* 341:544-546, (1989))은 VH 도메인으로 이루어진다.
- [0085] 항체는 하나 이상의 결합 부위를 가질 수 있다. 만약 결합 부위가 하나보다 많다면, 결합 부위는 서로 동일할 수 있거나 상이할 수 있다. 예를 들어, 자연 발생적으로 생기는 면역글로불린은 2개의 동일한 결합 부위를 갖고, 단쇄 항체 또는 Fab 단편은 하나의 결합 부위를 갖는 반면, "이중특이" 또는 "이작용성" 항체는 2개의 상이한 결합 부위를 갖는다.
- [0086] 단쇄 항체(scFv)는 VL 및 VH 부위가 링커(예를 들어, 합성 아미노산 서열)를 통해 연결되어 연속 폴리펩타이드쇄를 생성하는 항체로서, 상기 링커는 단백질쇄 자체가 다시 폴딩(folding)되어 1가 항원 결합 부위를 생성할만큼 충분히 길다(예를 들어, "Bird et al., *Science* 242:423-26 (1988) and Huston et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-83 (1988)" 참조). 디아바디는 2개의 폴리펩타이드쇄를 포함하는 2가 항체를 말하는데, 각각의 폴리펩타이드쇄는 링커에 의해 연결된 VH 및 VL 도메인을 포함하고, 링커는 동일쇄 상의 2개의 도메인을 페어링(pairing)하기에는 너무 짧아서 각각의 도메인이 다른 폴리펩타이드쇄 상의 상보적 도메인과 페어링되도록 한다(예를 들어, "Holliger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-48 (1993), 및 Poljak et al., *Structure* 2:1121-23 (1994)" 참조). 만약 디아바디의 2개의 폴리펩타이드쇄가 동일하다면, 이들쇄의 페어링으로부터 생성된 디아바디는 2개의 동일한 항원 결합 부위를 가질 것이다. 상이한 서열을 갖는 폴리펩타이드쇄가 2개의 상이한 항원 결합 부위를 갖는 디아바디를 만드는데 사용될 수 있다. 유사하게, 트리아바디 및 테트라바디는 각각 3개 및 4개의 폴리펩타이드쇄를 포함하고 각각 동일하거나 상이할 수 있는 3개 및 4개의 항원 결합 부위를 생성시키는 항체이다.
- [0087] 본 발명은 또한 sLe<sup>a</sup>에 결합하는, 5B1, 9H3, 5H11 및/또는 7E3의 유도체인 항체 또는 이의 기능적 단편을 제공한다. 예를 들어, 아미노산 치환을 야기하는 PCR 매개 돌연변이 생성 및 부위 특이적 돌연변이 생성을 비롯하여 당해 분야의 숙련자에게 잘 알려진 표준 기술을 본 발명의 항체 또는 이의 기능적 단편을 코드화하는 뉴클레오타이드 서열에서 돌연변이를 도입하는 데 사용할 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 상기 유도체는 원래 분자에 비해 25 미만의 아미노산 치환, 20 미만의 아미노산 치환, 15 미만의 아미노산 치환, 10 미만의 아미노산 치환, 5 미만의 아미노산 치환, 4 미만의 아미노산 치환, 3 미만의 아미노산 치환, 또는 2 미만의 아미노산 치환을 포함한다.
- [0088] 몇몇 실시양태에서, 본 발명은 자연 발생적으로 생기는 아미노산, 보존적 치환, 자연 발생적으로 생기지 않는 아미노산, 아미노산 유사체 및 모사체의 개질 형태를 갖는 항체 또는 이의 기능적 단편(항체 또는 이의 기능적 단편이 본원에 정의된 바와 같은 기능적 활성을 유지하는 한)을 제공한다. 한 실시양태에서, 상기 유도체는 하나 이상의 예측된 비필수 아미노산 잔기에서 보존적 아미노산 치환이 일어난다. 보존적 아미노산 치환은 아미노산 잔기가 유사한 전하를 갖는 측쇄를 갖는 아미노산 잔기로 대체된 것이다. 유사한 전하를 갖는 측쇄를 갖는 아미노산 잔기군은 당해 분야에 정의되어 있다. 이들 군은 염기성 측쇄(예를 들어, 리신, 아르기닌, 히스티딘), 산성 측쇄(예를 들어, 아스파르트산, 글루탐산), 하전되지 않은 극성 측쇄(예를 들어, 글리신, 아스파라긴, 글루타민, 세린, 트레오닌, 티로신, 시스테인), 비극성 측쇄(예를 들어, 알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 프롤린, 페닐알라닌, 메티오닌, 트립토판), 베타-분지된 측쇄(예를 들어, 트레오닌, 발린, 이소류신) 및 방향족 측쇄(예를 들어, 티로신, 페닐알라닌, 트립토판, 히스티딘)를 갖는 아미노산을 포함한다. 대안으로, 코드화 서열의 전부 또는 일부를 따라 돌연변이가, 예를 들어, 포화 돌연변이에 의해 무작위로 도입될 수 있고, 생성된 돌연변이체를 생물학적 활성에 따라 선별하여 활성을 유지하는 돌연변이체를 확인할 수 있다. 돌연변이 후, 코드화된 항



체 또는 이의 기능적 단편이 발현될 수 있고 항체 또는 기능적 단편의 활성을 측정할 수 있다.

[0089] 몇몇 실시양태에서, 본 발명은 본 발명의 항체 또는 기능적 단편에 함유된 Fc 단편이 푸코실화, 갈락토실화 및/또는 시알릴화로 개질된 항체 또는 이의 기능적 단편을 제공한다. Fc 단편의 이러한 개질은 "Peipp et al., *Blood*, 112(6):2390-2399 (2008)"에 논의된 바와 같이 Fc 수용체 매개 활성을 달성할 수 있다. 예를 들어, Fc N-글리칸으로부터의 코어 푸코오스(fucose) 잔기가 결핍된 글리코 조작된(glycoengineered) 치료학적 항체는 푸코실화된 것에 비해 훨씬 높은 효능과 함께 더 낮은 농도에서 강한 ADCC를 나타낸다(Shields et al., *J. Biol. Chem.*, 277(30):26733-40 (2002); Okazaki et al., *J Mol Biol.*, 336:1239-1249 (2004); Natsume et al., *J. Immunol. Methods.*, 306:93-103 (2005)). 항체 또는 이의 기능적 단편의 푸코실화, 갈락토실화 및/또는 시알릴화를 개질시키기 위한 방법은 당해 분야에 잘 알려져 있다. 예를 들어, 데푸코실화(defucosylation) 방법을 "Yamane-Ohnuki et al., *MAbs.*, 1(3):230-236 (2009)"에 기재된 대로, 3개의 방법으로 분류할 수 있다: (1) 비포유동물 세포의 N-글리코실화 경로의 "인간화" 비푸코실화 경로로의 전환; (2) 포유동물 세포의 N-글리칸 푸코실화 경로의 불활성화 및 (3) 비푸코실화 N-당단백의 시험관내 화학적 합성 또는 N-글리칸의 비푸코실화 형태의 효소적 개질. 이들 방법 중 임의의 하나 또는 당해 분야의 잘 알려진 기타 임의의 방법을 푸코실화, 갈락토실화 및/또는 시알릴화로 개질된 항체 또는 이의 기능적 단편을 제조하는데 사용할 수 있는 것으로 생각된다.

[0090] sLe<sup>a</sup>에 결합하는, 본 발명의 항체 또는 이의 기능적 단편은 항체 합성을 위해 당해 분야에 알려진 임의의 방법에 의해, 특히 화학적 합성 또는 재조합 발현 기술에 의해 제조될 수 있다. 본 발명의 실행에는, 달리 지시된 것이 없는 한, 분자 생물학, 미생물학, 유전 분석, 재조합 DNA, 유기 화학, 생화학, PCR, 올리고뉴클레오타이드 합성 및 개질, 핵산 하이브리드화 및 당해 분야의 기술 내의 관련 분야에서의 통상의 기술을 이용한다. 이러한 기술은 본원에 인용된 참조문헌에 기재되어 있고 문헌에 상세히 설명되어 있다. 예를 들어, 각각의 전문이 본원에 참조로 도입된 "Maniatis et al. (1982) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Sambrook et al. (1989), Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Sambrook et al. (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987 and annual updates); Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons (1987 and annual updates) Gait (ed.)(1984) Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach, IRL Press; Eckstein (ed.)(1991) Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach, IRL Press; Birren et al. (eds.)(1999) Genome Analysis: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Borrebaeck (ed.)(1995) Antibody Engineering, Second Edition, Oxford University Press; Lo (ed.)(2006) Antibody Engineering: Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology); Vol. 248, Humana Press, Inc"를 참조한다.

[0091] 단클론 항체는 하이브리도마 및 재조합 기술 또는 이의 조합의 사용을 포함한, 당해 분야에 공지된 매우 다양한 기술을 사용하여 제조할 수 있다. 예를 들어, 단클론 항체는 당해 분야에 알려져 있고, 예를 들어, 각각의 전문이 본원에 참조로 도입된 "Harlow et al., Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988); Hammerling et al., in: Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas 563 681 (Elsevier, N.Y., 1981)"에 교시된 것을 포함한 하이브리도마 기술을 사용하여 제조할 수 있다. 단클론 항체는 하이브리도마 기술을 통해 제조된 항체에 한정되지 않는다. 단클론 항체를 제조하는 다른 예시적 방법이 당해 분야에 알려져 있다. 단클론 항체를 제조하는 추가의 예시적 방법이 본원 실시예 I에 제공되어 있다.

[0092] sLe<sup>a</sup>에 결합하는 항체 기능적 단편은 당해 분야의 숙련가에게 잘 알려진 임의의 기술로 제조할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 Fab 및 F(ab')<sub>2</sub> 단편은 파파인(Fab 단편의 제조를 위함) 또는 펩신(F(ab')<sub>2</sub> 단편의 제조를 위함)과 같은 효소를 사용하여 면역글로불린 분자의 단백질분해성 분열을 통해 제조할 수 있다. F(ab')<sub>2</sub> 단편은 가변 부위, 경쇄 불변 부위 및 중쇄의 CH1 도메인을 함유한다.

[0093] 본 발명의 항체 또는 기능적 단편은 또한 당해 분야에 알려진 다양한 파지 디스플레이 방법을 사용하여 만들 수 있다. 예를 들어, 파지 디스플레이 방법에서, 본원에 제공된 CDR을 1개, 2개, 3개, 4개, 5개 또는 6개 갖는 중쇄 및/또는 경쇄 가변 부위와 같은 기능적 항체 도메인이 파지 입자를 코드화하는 폴리뉴클레오타이드 서열을 함유하는 파지 입자의 표면에 표시된다. VH 및 VL 도메인을 코드화하는 DNA는 PCR에 의해 scFv 링커와 함께 재조합되고 파지 플라스미드 복합체(phagemid) 벡터로 클론화된다. 상기 벡터는 *E. coli*에 전기천공되고 *E. coli*는 조력파지로 감염된다. 이들 방법에 사용된 파지는 통상 fd 및 M13을 포함하는 사상 파지이고, VH 및 VL 도메

인은 보통 파지 유전자 III 또는 유전자 VIII에 재조합적으로 융합된다. sLe<sup>a</sup>와 같은 특정 항원에 결합하는 항원 결합 도메인을 발현하는 파지는 항원을 이용하여, 예를 들어, 표지된 항원, 또는 고체 표면 또는 비드에 결합되거나 포획된 항원을 사용하여 선택하거나 확인할 수 있다. 본 발명의 항체 기능적 단편을 만드는 데 사용될 수 있는 파지 디스플레이 방법의 예는, 각각의 전문이 본원에 참조로 도입된 "Brinkman et al., 1995, *J. Immunol. Methods* 182:41-50; Ames et al., 1995, *J. Immunol. Methods* 184:177-186; Kettleborough et al., 1994, *Eur. J. Immunol.* 24:952-958; Persic et al., 1997, *Gene* 187:9-18; Burton et al., 1994, *Advances in Immunology* 57:191-280; PCT 출원 제PCT/GB91/01134호; 국제 공개공보 WO 90/02809, WO 91/10737, WO 92/01047, WO 92/18619, WO 93/11236, WO 95/15982, WO 95/20401 및 WO 97/13844; 및 미국 특허 제5,698,426호, 제5,223,409호, 제5,403,484호, 제5,580,717호, 제5,427,908호, 제5,750,753호, 제5,821,047호, 제5,571,698호, 제5,427,908호, 제5,516,637호, 제5,780,225호, 제5,658,727호, 제5,733,743호 및 제5,969,108호"에 기재된 것을 포함한다.

[0094] 위의 참조문헌에 기재된 대로, 파지 선택 후, 항체 코드화 부위가 파지로부터 분리될 수 있고, 사람 항체 또는 기타 임의의 바람직한 결합 단편을 포함한 전(whole) 항체를 생성하는 데 사용될 수 있고, 본원에 기재된 바와 같은 포유동물 세포, 곤충 세포, 식물 세포, 이스트 및 세균 등을 포함한 임의의 바람직한 숙주에서 발현될 수 있다.

[0095] Fab, Fab' 및 F(ab')<sub>2</sub> 단편을 재조합적으로 제조하기 위한 기술이 또한 각각의 전문이 본원에 참조로 도입된 "PCT 공개공보 WO 92/22324; Mullinax et al., 1992, *BioTechniques* 12(6):864-869; Sawai et al., 1995, *AJRI* 34:26-34; 및 Better et al., 1988, *Science* 240:1041-1043"에 기재된 것과 같은 당해 분야에 알려진 방법을 이용하여 사용될 수 있다.

[0096] 전 항체를 제조하기 위해, VH 또는 VL 뉴클레오타이드 서열, 제한 부위, 및 제한 부위를 보호하기 위한 플랭킹(flanking) 서열을 포함하는 PCR 프라이머를 scFv 클론에서 VH 또는 VL 서열을 증폭시키는 데 사용할 수 있다. 당해 분야의 숙련가에게 잘 알려진 클론화 기술을 사용하여, PCR 증폭된 VH 도메인을 VH 불변 부위, 예를 들어, 사람 감마 1 불변 부위를 발현하는 벡터내로 클론화할 수 있고, PCR 증폭된 VL 도메인을 VL 불변 부위, 예를 들어, 사람 카파 또는 람다 불변 부위를 발현하는 벡터내로 클론화할 수 있다. VH 및 VL 도메인을 또한 필수 불변 부위를 발현하는 하나의 벡터내로 클론화할 수 있다. 이어서, 당해 분야의 숙련가에게 잘 알려진 기술을 사용하여 중쇄 전환 벡터 및 경쇄 전환 벡터를 세포주내로 함께 감염시켜 전장 항체, 예를 들어, IgG를 발현하는 안정한 또는 일시적인 세포주를 생성시킨다.

[0097] 몇몇 실시양태에서, 본 발명의 항체 또는 기능적 단편이 하나 이상의 진단제, 검출제 또는 치료제 또는 기타 임의의 바람직한 분자에 결합(공유 또는 비공유 결합)되거나 재조합적으로 융합된다. 결합된 또는 재조합적으로 융합된 항체 또는 기능적 단편은 특정 요법의 효능 측정과 같은 임상적 시험 과정의 일부로서 sLe<sup>a</sup>의 발현과 관련된 질환, 예를 들어, 암 또는 종양 생성의 개시, 발전, 진행 및/또는 중증도를 모니터링하거나 진단하는데 유용할 수 있다.

[0098] 검출 및 진단은, 예를 들어, 본 발명의 항체 또는 기능적 단편을 지르코늄(<sup>89</sup>Zr), 요오드(<sup>131</sup>I, <sup>125</sup>I, <sup>124</sup>I, <sup>123</sup>I 및 <sup>121</sup>I), 탄소(<sup>14</sup>C, <sup>11</sup>C), 황(<sup>35</sup>S), 삼중수소(<sup>3</sup>H), 인듐(<sup>115</sup>In, <sup>113</sup>In, <sup>112</sup>In 및 <sup>111</sup>In), 테크네튬(<sup>99</sup>Tc), 티튬(<sup>201</sup>Ti), 갈륨(<sup>68</sup>Ga, <sup>67</sup>Ga), 팔라듐(<sup>103</sup>Pd), 몰리브덴(<sup>99</sup>Mo), 크세논(<sup>133</sup>Xe), 불소(<sup>18</sup>F), <sup>15</sup>O, <sup>13</sup>N, <sup>64</sup>Cu, <sup>94m</sup>Tc, <sup>153</sup>Sm, <sup>177</sup>Lu, <sup>159</sup>Gd, <sup>149</sup>Pm, <sup>140</sup>La, <sup>175</sup>Yb, <sup>166</sup>Ho, <sup>86</sup>Y, <sup>90</sup>Y, <sup>47</sup>Sc, <sup>186</sup>Re, <sup>188</sup>Re, <sup>142</sup>Pr, <sup>105</sup>Rh, <sup>97</sup>Ru, <sup>68</sup>Ge, <sup>57</sup>Co, <sup>65</sup>Zn, <sup>85</sup>Sr, <sup>32</sup>P, <sup>153</sup>Gd, <sup>169</sup>Yb, <sup>51</sup>Cr, <sup>54</sup>Mn, <sup>75</sup>Se, <sup>113</sup>Sn 및 <sup>117</sup>Sn과 같은 방사능 물질(이에 한정되지 않음); 및 다양한 양전자방출 단층촬영 사용 양전자 방출 금속, 다양한 효소(예: 겨자무과산화효소, 알칼리 포스파타제, 베타-갈락토시다제 또는 아세틸콜린에스테라제)(이에 한정되지 않음); 보결 그룹(예: 스트렙타비딘/바이오틴 및 아비딘/바이오틴)(이에 한정되지 않음); 형광 물질(예: 옴벨리페론, 플루오레세인, 플루오레세인 이소티오시네이트, 로다민, 디클로로트리아지닐아민 플루오레세인, 단실 클로라이드 또는 피코에리트린)(이에 한정되지 않음); 발광 물질(예: 루미놀)(이에 한정되지 않음); 생물발광 물질(예: 루시페라제, 루시페린 및 에퀴린)(이에 한정되지 않음); 및 비방사능 상자성 금속 이온을 포함하는 검출가능 물질(이에 한정되지 않음)에 커플링시킴으로써 성취할 수 있다.

[0099] 본 발명은 하나 이상의 치료제에 결합(공유 또는 비공유 결합)되거나 재조합적으로 융합된 본 발명의 항체 또는 기능적 단편의 치료학적 용도를 추가로 포함한다. 본 문맥에서, 예를 들어, 항체는 세포독소(예: 세포종식억제

제 또는 살세포제) 또는 방사능 금속 이온(예: 알파 방출제)과 같은 치료제에 결합되거나 재조합적으로 융합될 수 있다. 세포독소 또는 세포독성제는 세포에 유해한 임의의 물질을 포함한다. 치료제는 안트라사이클린(예: 독소루비신 및 다우노루비신(구 다우노마이신)); 타산(예: 파클리탁셀(탁솔) 및 도세탁셀(탁소테레)); 항대사약(예: 메토트렉세이트, 6-머캅토피린, 6-티오구아닌, 시타라빈, 5-플루오로우라실 및 테카바진); 알킬화제(예: 메클로로에타민, 티오에프 클로람부실, 멜팔란, 카르무스틴(BCNU), 로무스틴(CCNU), 사이클로토스파미드, 부실판, 디브로모만니톨, 스트렙토조토신, 미토마이신 C, 시스디클로로디아민 백금(II)(DDP) 및 시스플라틴); 항생제(예: 액티노마이신 D, 블레오마이신, 미트라마이신 및 안트라마이신(AMC)); 아우리스타틴 분자(예: 아우리스타틴 PHE, 브리오스타틴 I, 솔라스타틴 10, 모노메틸 아우리스타틴 E(MMAE) 및 모노메틸아우리스타틴 F(MMAF)); 호르몬(예: 글루코코르티코이드, 프로게스틴, 안드로젠 및 에스트로겐); 뉴클레오사이드 유사체(예: 겐시타빈), DNA 복구 효소 억제제(예: 에토포사이드 및 토포테칸), 키나제 억제제(예: 글리벡으로또는 이마티닙 메실레이트로도 알려진 화합물 ST1571); 세포독성제(예: 메이탄신, 파클리탁셀, 시토칼라신 B, 그라미시딘 D, 에티도브로마이드, 에메틴, 미토마이신, 에토포사이드, 테노포사이드, 빈크리스틴, 빈블라스틴, 콜키신, 독소루비신, 다우노루비신, 디하이드록시 안트라신 디온, 미톡산트론, 미트라마이신, 1-테하이드로테스토스테론, 글루코코르티코이드, 프로카이, 테트라카인, 리도카인, 프로프라놀롤, 프로마인 및 이의 유사체 또는 동족체, 및 미국 특허 제 6,245,759호, 제6,399,633호, 제6,383,790호, 제6,335,156호, 제6,271,242호, 제6,242,196호, 제6,218,410호, 제6,218,372호, 제6,057,300호, 제6,034,053호, 제5,985,877호, 제5,958,769호, 제5,925,376호, 제5,922,844호, 제5,911,995호, 제5,872,223호, 제5,863,904호, 제5,840,745호, 제5,728,868호, 제5,648,239호, 제5,587,459호에 기재된 화합물들); 파르네실 트랜스퍼라제 억제제(예: R115777, BMS-214662, 및 예를 들어 미국 특허 제6,458,935호, 제6,451,812호, 제6,440,974호, 제6,436,960호, 제6,432,959호, 제6,420,387호, 제6,414,145호, 제6,410,541호, 제6,410,539호, 제6,403,581호, 제6,399,615호, 제6,387,905호, 제6,372,747호, 제6,369,034호, 제6,362,188호, 제6,342,765호, 제6,342,487호, 제6,300,501호, 제6,268,363호, 제6,265,422호, 제6,248,756호, 제6,239,140호, 제6,232,338호, 제6,228,865호, 제6,228,856호, 제6,225,322호, 제6,218,406호, 제6,211,193호, 제6,187,786호, 제6,169,096호, 제6,159,984호, 제6,143,766호, 제6,133,303호, 제6,127,366호, 제6,124,465호, 제6,124,295호, 제6,103,723호, 제6,093,737호, 제6,090,948호, 제6,080,870호, 제6,077,853호, 제6,071,935호, 제6,066,738호, 제6,063,930호, 제6,054,466호, 제6,051,582호, 제6,051,574호 및 제6,040,305호에 기재된 것); 토포이소머라제 억제제(예: 캄프토테신, 이리노테칸, SN-38, 토포테칸, 9-아미노캄프토테신, GG-211(GI147211), DX-8951f, IST-622, 루비테칸, 피라줄로아크리딘, XR-5000, 사인토펜, UCE6, UCE1022, TAN-1518A, TAN 1518B, KT6006, KT6528, ED-110, NB-506, ED-110, NB-506, 파가로닌, 코칼라인, 베타-라파콘 및 레베카마이신); DNA 마이너 그루브 결합제(minor groove binder)(예: Hoescht 염료 33342 및 Hoescht 염료 33258); 아데노신 데아미나제 억제제(예: 플루다라빈 포스페이트 및 2-클로로데옥시아데노신); 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염, 용매화물, 클라트레이트 또는 프로드럭과 같은 화학요법제일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다. 치료제는 세톡시마, 베바시주마, 헤셉틴, 리톡시마과 같은 면역요법제일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[0100] 또한, 본 발명의 항체 또는 기능적 단편은 <sup>213</sup>Bi와 같은 알파 방출제와 같은 방사능 금속 이온 또는 <sup>131</sup>In, <sup>131</sup>Lu, <sup>131</sup>Y, <sup>131</sup>Ho, <sup>131</sup>Sm를 포함하나 이에 한정되지 않는 라디오메탈 이온을 결합시키는 데 유용한 마크로사이클릭 킬레이터; 또는 링커 분자를 통해 항체 또는 기능적 단편에 결합될 수 있는 1,4,7,10-테트라아자사이클로도테칸-N,N',N'',N'''-테트라아세트산(DOTA)과 같은 마크로사이클릭 킬레이터와 같은 치료제에 결합될 수 있다. 이러한 링커 분자는 통상 당해 분야에 알려져 있고 "Denardo *et al.*, 1998, Clin Cancer Res. 4(10):2483-90; Peterson *et al.*, 1999, Bioconj. Chem. 10(4):553-7; 및 Zimmerman *et al.*, 1999, Nucl. Med. Biol. 26(8):943-50"에 기재되어 있다.

[0101] 추가로, 본 발명의 항체 또는 기능적 단편은 제시된 생물학적 반응을 개질시키는 치료제에 결합(공유 또는 비공유 결합)되거나 재조합적으로 융합될 수 있다. 따라서, 치료제가 통상의 화학적 치료제로 제한되는 것으로 이해되어서는 안된다. 예를 들어, 치료제는 바람직한 생물학적 활성을 갖는 단백질, 펩타이드 또는 폴리펩타이드일 수 있다. 이러한 단백질은, 예를 들어, 독소(예: 아브린, 리신 A, 슈도모나스 외독소, 콜레라 독소 및 디프테리아 독소); 종양 괴사 인자,  $\gamma$ -인터페론,  $\alpha$ -인터페론, 신경 성장인자, 혈소판 유도된 성장인자, 조직 플라스미노겐 활성화인자, 세포사멸제(예: TNF- $\gamma$ , AIM I, AIM II, Fas 리간드 및 VEGF), 항-혈관신생제(예: 안지오테라틴, 엔도스테라틴 및 조직 인자와 같은 응고 경로 성분)와 같은 단백질; 생물학적 반응 개질제(예: 인터페론 감마, 인터류킨-1, 인터류킨-2, 인터류킨-5, 인터류킨-6, 인터류킨-7, 인터류킨-9, 인터류킨-10, 인터류

킨-12, 인터류킨-15, 인터류킨-23, 과립구 대식세포 콜로니 자극인자 및 과립구 콜로니 자극인자); 성장인자(예: 성장 호르몬), 또는 응고제(예: 칼슘, 비타민 K, Hageman 인자(인자 XII)와 같은, 그러나 이에 한정되지 않는 조직인자, 고분자량 키니노겐(HMWK), 프리칼리크레인(PK), 응고 단백질-인자 II(프로트롬빈), 인자 V, XIIa, VIII, XIIa, XI, XIa, IX, IXa, X, 인지질 및 피브린 단량체)를 포함할 수 있다.

[0102] 본 발명은 융합 단백질을 생성시키기 위해 이중 단백질 또는 폴리펩타이드에 재조합적으로 융합되거나 화학적으로 결합(공유 또는 비공유 결합)된 본 발명의 항체 또는 기능적 단편을 포함한다. 몇몇 실시양태에서, 이러한 폴리펩타이드는 길이가 약 10개, 약 20개, 약 30개, 약 40개, 약 50개, 약 60개, 약 70개, 약 80개, 약 90개 또는 약 100개의 아미노산일 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 본 발명은 본 발명의 항체의 기능적 단편(예를 들어, Fab 단편, Fd 단편, Fv 단편, F(ab)<sub>2</sub> 단편, VH 도메인, VH CDR, VL 도메인 또는 VL CDR) 및 이중 단백질 또는 폴리펩타이드를 갖는 융합 단백질을 제공한다. 한 실시양태에서, 항체 또는 기능적 단편이 융합되는 이중 단백질 또는 폴리펩타이드는 항체 또는 기능적 단편이 sLe<sup>a</sup>를 발현하는 세포와 같은 특정 세포 유형을 표적화하는 데 유용하다.

[0103] 본 발명의 결합 또는 융합 단백질은 진단제, 검출제 또는 치료제에 결합(공유 또는 비공유 결합)되거나 재조합적으로 융합된 본원에 제공된 본원의 임의의 항체 또는 기능적 단편을 포함한다. 한 실시양태에서, 본 발명의 결합 또는 융합 단백질은 5B1, 9H3, 5H11 또는 7E3 항체, 및 진단제, 검출제 또는 치료제를 포함한다. 다른 실시양태에서, 본 발명의 결합 또는 융합 단백질은 5B1, 9H3, 5H11 또는 7E3 항체의 기능적 단편, 및 진단제, 검출제 또는 치료제를 포함한다. 다른 실시양태에서, 본 발명의 결합 또는 융합 단백질은 서열번호 2의 잔기 20 내지 142, 서열번호 6의 잔기 20 내지 142, 서열번호 10의 잔기 20 내지 142 또는 서열번호 14의 잔기 20 내지 145로 서술된 VH 도메인 중 임의의 하나의 아미노산 서열을 갖는 VH 도메인 및/또는 서열번호 4의 잔기 20 내지 130, 서열번호 8의 잔기 20 내지 129, 서열번호 12의 잔기 20 내지 130 및 서열번호 16의 잔기 23 내지 130으로 서술된 VL 도메인 중 임의의 하나의 아미노산 서열을 갖는 VL 도메인, 및 진단제, 검출제 또는 치료제를 포함한다. 다른 실시양태에서, 본 발명의 결합 또는 융합 단백질은 서열번호 2, 6, 10 또는 14에 서술된 VH CDR 중 임의의 하나의 아미노산 서열을 갖는 VH CDR 하나 이상, 및 진단제, 검출제 또는 치료제를 포함한다. 다른 실시양태에서, 결합 또는 융합 단백질은 서열번호 4, 8, 12 또는 16에 서술된 VL CDR 중 임의의 하나의 아미노산 서열을 갖는 VL CDR 하나 이상, 및 진단제, 검출제 또는 치료제를 포함한다. 다른 실시양태에서, 본 발명의 결합 또는 융합 단백질은 서열번호 2의 잔기 20 내지 142, 서열번호 6의 잔기 20 내지 142, 서열번호 10의 잔기 20 내지 142 또는 서열번호 14의 잔기 20 내지 145로 서술된 VH 도메인 하나 이상 및 서열번호 4의 잔기 20 내지 130, 서열번호 8의 잔기 20 내지 129, 서열번호 12의 잔기 20 내지 130 및 서열번호 16의 잔기 23 내지 130으로 서술된 VL 도메인 하나 이상, 및 진단제, 검출제 또는 치료제를 포함한다.

[0104] 진단제, 검출제 또는 치료제(폴리펩타이드 포함)를 항체에 융합 또는 결합시키는 방법은 잘 알려져 있고, 예를 들어, 전문이 본원에 참조로 도입된 "Arnon *et al.*, "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", in Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeld *et al.* (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom *et al.*, "Antibodies For Drug Delivery", in Controlled Drug Delivery (2nd Ed.), Robinson *et al.* (eds.), pp. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", in Monoclonal Antibodies 84: Biological And Clinical Applications, Pinchera *et al.* (eds.), pp. 475-506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", in Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy, Baldwin *et al.* (eds.), pp. 303-16 (Academic Press 1985), Thorpe *et al.*, 1982, Immunol. Rev. 62:119-58"; 미국 특허 제5,336,603호, 제5,622,929호, 제5,359,046호, 제5,349,053호, 제5,447,851호, 제5,723,125호, 제5,783,181호, 제5,908,626호, 제5,844,095호, 제5,112,946호, 제7,981,695호, 제8,039,273호, 제8,142,784호; 미국 공보 2009/0202536, 2010/0034837, 2011/0137017, 2011/0280891, 2012/0003247; EP 307,434; EP 367,166; EP 394,827; PCT 공개공보 WO 91/06570, WO 96/04388, WO 96/22024, WO 97/34631 및 WO 99/04813; Ashkenazi *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88: 10535-10539, 1991; Trautnecker *et al.*, Nature, 331:84-86, 1988; Zheng *et al.*, J. Immunol., 154:5590-5600, 1995; Vil *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:11337-11341, 1992; 및 Senter, Current Opinion in Chemical Biology, 13:235-244 (2009)"를 참조한다.

[0105] 다른 실시양태에서, 진단제, 검출제 또는 치료제는 환원된 항체 성분의 힌지 부위에 다이설파이드 결합 형성을 통해 결합될 수 있다. 그렇지 않으면, 상기 제제는 N-석시닐 3-(2-피리딜디티오)프로프리오네이트(SPDP)와 같은 헤테로이관능성 가교결합제를 사용하여 항체 성분에 결합될 수 있다(Yu *et al.*, Int. J. Cancer 56: 244



(1994)). 이러한 결합을 위한 일반 기술은 당해 분야에 잘 알려져 있다. 예를 들어 "Wong, CHEMISTRY OF PROTEIN CONJUGATION AND CROSS-LINKING (CRC Press 1991); Upešlacis et al., "Modification of Antibodies by Chemical Methods," in MONOCLONAL ANTIBODIES: PRINCIPLES AND APPLICATIONS, Birch et al. (eds.), pages 187-230 (Wiley-Liss, Inc. 1995); Price, "Production and Characterization of Synthetic Peptide-Derived Antibodies," in MONOCLONAL ANTIBODIES: PRODUCTION, ENGINEERING AND CLINICAL APPLICATION, Ritter et al. (eds.), pages 60-84 (Cambridge University Press 1995)"를 참조한다.

[0106] 대안으로, 진단제, 검출제 또는 치료제를 항체의 Fc 부위의 탄수화물 잔기를 통해 결합시킬 수 있다. 펩타이드를 항체 탄수화물 잔기를 통해 항체 성분에 결합시키는 방법은 당해 분야의 숙련가에게 잘 알려져 있다. 예를 들어, 전문이 본원에 참조로 도입된 "Shih et al., *Int. J. Cancer*. 41:832-839 (1988); Shih et al., *Int. J. Cancer*. 46:1101-1106 (1990); 및 Shih et al., 미국 특허 제5,057,313호"를 참조한다. 일반적 방법은 산화된 탄수화물 부분을 갖는 항체 성분을 하나 이상의 유리 아민 관능기를 갖고 복수의 펩타이드가 적재된 캐리어 중합체와 반응시킴을 포함한다. 이 반응은 초기 쉬프(Schiff) 염기(이민) 연결을 생성시키고, 이는 환원에 의해 2차 아민으로 안정화되어 최종 결합체를 생성시킨다.

[0107] 그러나, Fc 부위가 없으면, 예를 들어, 본원에 제공된 항체 기능적 단편이 바람직한 경우, 여전히 진단제, 검출제 또는 치료제를 결합시킬 수 있다. 탄수화물 잔기는 전장 항체 또는 항체 단편의 경쇄 가변 부위에 도입될 수 있다. 예를 들어, 전문이 본원에 참조로 도입된 "Leung et al., *J. Immunol.*, 154: 5919 (1995); 미국 특허 제5,443,953호 및 제6,254,868호"를 참조한다. 진단제, 검출제 또는 치료제를 결합시키는 데는 가공된 탄수화물 잔기가 사용된다.

[0108] sLe<sup>a</sup>에 결합하는 본 발명의 항체 기능적 단편에 결합되거나 제조합적으로 융합된 치료제는 목적인 예방 또는 치료 효과(들)를 성취하도록 선택할 수 있다. 어느 치료제를 본 발명의 항체 또는 기능적 단편에 결합시키거나 제조합적으로 융합시킬지를 결정할 때 임상적 또는 기타 의료인의 기술 수준내에서 다음을 고려할 것으로 생각된다: 질환의 유형, 질환의 중증도 및 대상체의 상태.

[0109] 본원에 제공된 대로 검출가능하게 표지되고 sLe<sup>a</sup>에 결합하는 본 발명의 결합 또는 융합 항체 또는 기능적 단편을 질환의 검출, 진단 또는 모니터링의 목적으로 사용할 수 있고, 상기 질환을 일으키거나 상기 질환과 관련된 세포는 sLe<sup>a</sup>를 발현시킨다. 예를 들어, 본원에 제공된 대로, 위장관 종양, 유방암, 난소암, 결장암, 결장직장 샘암종, 췌장암, 췌장 샘암종, 폐의 소세포 암종, 방광 샘암종, 전이성 결장암, 결장직장암, 반지세포 난소암 및 전이성 암종(이에 한정되지 않음)과 같은 암 세포 및 종양은 sLe<sup>a</sup>를 발현시키는 것으로 보인다. 따라서, 본 발명은 유효량의 결합 또는 융합 항체 또는 기능적 단편을 이를 필요로 하는 대상체에 투여함으로써 대상체의 암 또는 종양 생성을 검출하는 방법을 제공한다. 몇몇 실시양태에서, 검출방법은 sLe<sup>a</sup>에 결합하는 본 발명의 결합 또는 융합 항체 또는 기능적 단편을 하나 이상 사용하여 대상체의 세포 또는 조직 샘플에서의 sLe<sup>a</sup>의 발현을 분석하고, sLe<sup>a</sup>의 수준을 대조군 수준, 예를 들어, 정상 조직 샘플(예를 들어, 질환을 갖지 않는 대상체로부터의 또는 질환 개시 전의 동일 대상체로부터의)의 수준과 비교함을 추가로 포함하며, 대조군의 sLe<sup>a</sup> 수준과 비교하여 분석된 sLe<sup>a</sup> 수준이 증가된 것은 질환의 지표이다. 이러한 진단 방법으로 의료 종사자가 다른 가능한 것보다 먼저 예방적 조치 또는 적극적 치료를 사용함으로써 질환의 진전 또는 추가 진행을 막을 수 있다.

[0110] 본 발명의 항체 또는 기능적 단편은 또한 본원에 제공되거나 당해 분야의 숙련가에게 잘 알려진 통상의 면역조직학적 방법을 사용하여 생물학적 샘플내의 sLe<sup>a</sup> 항원 수준을 분석하는 데 사용될 수 있다(예를 들어, "Jalkanen et al., 1985, *J. Cell. Biol.* 101:976-985; 및 Jalkanen et al., 1987, *J. Cell Biol.* 105:3087-3096" 참조). sLe<sup>a</sup>를 검출하는 데 유용한 기타 항체 기초 방법은 효소 결합 면역흡착 측정법(ELISA) 및 방사면역분석(RIA)과 같은 면역분석을 포함한다. 적합한 항체 분석 표지는 당해 분야에 알려져 있고, 글루코즈 옥시다제와 같은 효소 표지; 요오드(<sup>125</sup>I, <sup>121</sup>I), 탄소(<sup>14</sup>C), 황(<sup>35</sup>S), 삼중수소(<sup>3</sup>H), 인듐(<sup>121</sup>In) 및 테크네튬(<sup>99</sup>Tc)과 같은 방사성 동위원소; 루미놀과 같은 발광 표지; 및 플루오레세인 및 로다민과 같은 형광 표지, 및 바이오틴을 포함한다.

[0111] 한 실시양태에서, 본 발명은 사람에서의 질환 검출 및 진단을 제공한다. 한 실시양태에서, 진단은 다음을 포함

한다: a)  $sLe^a$ 에 결합하는 본 발명의 결합체 또는 융합 단백질의 유효량을 대상체에 투여(예를 들어, 비경구, 피하 또는 복강내); b) 결합 또는 융합 단백질이  $sLe^a$ 이 발현되는 대상체의 부위에 우선적으로 집중되도록 하는 (몇몇 실시양태에서는 결합되지 않은 결합체 또는 융합 단백질이 백그라운드 수준으로 제거될) 투여 후 시간 간격을 기다림; c) 백그라운드 수준을 측정; d) 대상체에서 결합체 또는 융합 단백질을 검출(백그라운드 수준을 넘는 결합체 또는 융합 단백질의 검출은 대상체가 질환을 갖고 있음을 나타냄). 백그라운드 수준은 검출된 결합체 또는 융합 단백질의 양을 특정 시스템에 대해 미리 결정된 표준값과 비교함을 포함한 다양한 방법으로 측정할 수 있다.

[0112] 대상체의 크기 및 사용된 영상 시스템은 진단 영상을 생성시키는 데 필요한 영상 부분의 양을 결정할 것이고 당해 분야의 숙련가에 의해 쉽게 결정될 것으로 생각된다. 예를 들어, 본 발명의 항체 또는 기능적 단편에 결합된 방사성 동위원소의 경우, 주입된 방사능의 양은 사람 대상체에 대해 보통  $^{99}TC$  약 5 내지 20밀리퀴리 범위일 것이다. 이어서 결합체가 우선적으로  $sLe^a$ 를 발현하는 세포 위치에 축적될 것이다. 생체내 종양 영상화가 "S.W. Burchiel *et al.*, "Immunopharmacokinetics of Radiolabeled Antibodies and Their Fragments." (Chapter 13 in Tumor Imaging: The Radiochemical Detection of Cancer, S.W. Burchiel and B.A. Rhodes, eds., Masson Publishing Inc. (1982))에 기재되어 있다.

[0113] 사용된 검출제 유형 및 투여 방식을 포함한 몇몇 변수에 따라, 결합체가 대상체의 부위에 우선적으로 집중되도록 하고 결합되지 않은 결합체가 백그라운드 수준으로 제거될 투여 후 시간 간격은 6 내지 48시간 또는 6 내지 24시간 또는 6 내지 12시간이다. 다른 실시양태에서, 투여 후 시간 간격은 5 내지 20일 또는 5 내지 10일이다. 한 실시양태에서, 질환의 모니터링은 본원에 제공된 대로 진단 방법을 반복함으로써 수행되는데, 예를 들어, 초기 진단 후 1개월, 초기 진단 후 6개월, 초기 진단 후 1년, 또는 그 이후에 반복할 수 있다.

[0114] 결합체 또는 융합 단백질의 존재는 대상체에서 생체내 스캐닝에 대해 당해 분야에 알려진 방법을 사용하여 검출할 수 있다. 이들 방법은 사용된 검출제 유형에 좌우된다. 숙련가는 특정한 검출제를 검출하기 위한 적합한 방법을 결정할 수 있다. 본 발명의 진단 방법에 사용될 수 있는 방법 및 장치는 컴퓨터 단층촬영(CT), 양전자방출 단층촬영(PET)과 같은 전신 스캔, 자기공명영상(MRI) 및 초음파촬영을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 한 실시양태에서, 본 발명의 항체 또는 기능적 단편은 방사성 동위원소에 결합되고 대상체에서 방사선 반응 외과 기구를 사용하여 검출한다. 다른 실시양태에서, 본 발명의 항체 또는 기능적 단편은 형광성 화합물에 결합되고 대상체에서 형광 반응 스캐닝 기구를 사용하여 검출한다. 다른 실시양태에서, 본 발명의 항체 또는 기능적 단편은 지르코늄( $^{89}Zr$ )과 같은 양전자 방출 금속 또는 본원에 제공되거나 양전자 방출 단층촬영에 의해 검출가능한 당해 분야에 잘 알려진 기타 임의의 양전자 방출 금속에 결합되고 대상체에서 양전자 방출 단층촬영을 사용하여 검출한다. 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 항체 또는 기능적 단편은 상자성 표지에 결합되고 대상체에서 자기공명 영상(MRI)을 사용하여 검출한다.

[0115] 한 실시양태에서, 본 발명은 본 발명의 항체 또는 기능적 단편 및 약제학적으로 허용되는 담체를 갖는 약제학적 조성물을 제공한다. 본 발명의 약제학적 조성물에 사용될 수 있는 약제학적으로 허용되는 담체는 포스페이트 완충 염수, 물 및 오일-물 에멀전과 같은 유액, 및 다양한 유형의 습윤제와 같은 당해 분야에 알려진 임의의 표준 약제학적 담체를 포함한다. 이들 약제학적 조성물은 액체 단위 투여형 또는 본 발명의 항체 또는 기능적 단편을 치료를 필요로 하는 대상체의 표적 영역에 전달하기에 충분한 기타 임의의 투여형으로 제조할 수 있다. 예를 들어, 약제학적 조성물은 선택된 투여 방식, 예를 들어, 정맥내, 근육내, 피하, 복강내 등에 적합한 임의의 방법으로 제조할 수 있다. 기타 선택적 성분, 예를 들어, 약제학적 등급 안정화제, 완충제, 보존제, 부형제 등이 당해 분야의 숙련가에 의해 쉽게 선택될 것이다. 적절한 pH, 등장성, 안정성 등을 갖는 약제학적 조성물이 당해 기술 수준내에 있다.

[0116] 본원에 제공된 본 발명의 항체 또는 기능적 단편을 하나 이상 함유하는 약제학적 제제는 목적인 순도를 갖는 항체를 선택적인 약리학적으로 허용되는 담체, 부형제 또는 안정화제와 혼합함으로써 동결건조 제제 또는 수용액 형태로 보관할 수 있게 제조할 수 있다(Remington's Pharmaceutical Sciences (1990) Mack Publishing Co., Easton, PA). 허용되는 담체, 부형제 또는 안정화제는 사용된 투여량 및 농도로 수령인에게 비독성이고, 포스페이트, 시트레이트 및 기타 유기산과 같은 완충제; 아스코르브산 및 메티오닌을 포함하는 항산화제; 보존제(예를 들어, 옥타데실디메틸벤질 암모늄 클로라이드; 헥사메토늄 클로라이드; 벤즈알코늄 클로라이드; 페놀, 부틸 또는 벤질 알콜; 알킬 파라벤(예: 메틸 또는 프로필 파라벤)); 카테콜; 레조르시놀; 사이클로헥산올; 3-펜탄올; 및 m-클레졸); 저분자량(약 10개 잔기 미만) 폴리펩타이드; 혈청 알부민, 젤라틴 또는 면역글로불린과 같은

단백질; 폴리비닐피롤리돈과 같은 친수성 중합체; 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 히스티딘, 아르기닌 또는 리신과 같은 아미노산; 글루코즈, 만노즈 또는 텍스트린을 포함한 단당류, 이당류 및 기타 탄수화물; EDTA와 같은 킬레이트제; 수크로즈, 만니톨, 트레할로즈 또는 소르비톨과 같은 당; 나트륨과 같은 염 형성 카운터이온; 금속 복합체(예: Zn-단백질 복합체); 및/또는 TWEEN<sup>TM</sup>, PLURONICS<sup>TM</sup> 또는 폴리에틸렌 글리콜(PEG)과 같은 비이온성 계면활성제를 포함한다.

[0117] 따라서, 몇몇 실시양태에서, 본 발명은 질환의 치료 또는 예방을 필요로 하는 대상체에서의 질환의 치료 또는 예방 방법을 제공한다. 본 발명의 이 방법은 본원에 제공된 약제학적 조성물의 치료학적 유효량을 대상체에 투여함을 포함할 수 있다. 예를 들어, 약제학적 조성물은 본원에 제공된 항체 또는 기능적 단편을 하나 이상 포함할 수 있다. 본 발명의 방법을 사용하여 치료하거나 예방할 수 있는 질환은 암, 종양 생성 및/또는 전이를 포함한다. 특히, 본 발명의 방법은 암 세포 또는 종양이 탄수화물 sLe<sup>a</sup>를 발현하는 암 또는 종양 생성을 치료하는데 유용하다. 본 발명의 방법을 사용하여 치료하거나 예방할 수 있는 암 또는 종양의 비제한적 예는 위장관 종양, 예를 들어, 결장암, 결장직장 샘암종, 전이성 결장암, 결장직장암, 췌장암, 췌장 샘암종; 폐의 소세포암종; 방광 샘암종; 반지세포 난소암; 난소암, 전이성 암종; 및 위, 식도, 인후, 비뇨생식기관 또는 유방의 샘암종을 포함한다.

[0118] 따라서, 몇몇 실시양태에서, 본 발명은 항체 또는 이의 기능적 단편을 갖는 약제학적 조성물의 치료학적 유효량을 투여함으로써 이를 필요로 하는 대상체에서의 암의 치료방법 또는 종양 전이의 예방방법을 제공하며, 상기 항체 또는 기능적 단편은 sLe<sup>a</sup>에 결합하고 서열번호 2의 잔기 20 내지 142, 서열번호 6의 잔기 20 내지 142, 서열번호 10의 잔기 20 내지 142 및 서열번호 14의 잔기 20 내지 145로 이루어진 그룹으로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 VH 도메인을 포함한다. 다른 실시양태에서, 본 발명은 항체 또는 이의 기능적 단편을 갖는 약제학적 조성물의 치료학적 유효량을 투여함으로써 이를 필요로 하는 대상체에서의 암의 치료방법 또는 종양 전이의 예방방법을 제공하며, 상기 항체 또는 기능적 단편은 sLe<sup>a</sup>에 결합하고 서열번호 4의 잔기 20 내지 130, 서열번호 8의 잔기 20 내지 129, 서열번호 12의 잔기 20 내지 130 및 서열번호 16의 잔기 23 내지 130으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 VL 도메인을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 항체 또는 이의 기능적 단편을 갖는 약제학적 조성물의 치료학적 유효량을 투여함으로써 이를 필요로 하는 대상체에서의 암의 치료방법 또는 종양 전이의 예방방법을 제공하며, 상기 항체 또는 기능적 단편은 sLe<sup>a</sup>에 결합하고 VH 도메인 및 VL 도메인 둘 다를 포함하며, VH 도메인 및 VL 도메인은 각각 서열번호 2의 잔기 20 내지 142, 서열번호 6의 잔기 20 내지 142, 서열번호 10의 잔기 20 내지 142 및 서열번호 14의 잔기 20 내지 145로 이루어진 그룹으로부터 선택된 아미노산 서열, 및 서열번호 4의 잔기 20 내지 130, 서열번호 8의 잔기 20 내지 129, 서열번호 12의 잔기 20 내지 130 및 서열번호 16의 잔기 23 내지 130으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함한다.

[0119] 본원에 기재된 것과 같은 제제는 또한 특정 질환의 치료에 필요한 활성 화합물을 하나보다 많이 함유할 수 있다. 특정 실시양태에서, 제제는 본 발명의 항체 또는 기능적 단편과 서로 역효과를 내지 않는 상보적 활성을 갖는 활성 화합물을 하나 이상 포함한다. 이러한 분자들은 의도된 목적에 효과적인 양으로 적합하게 조합하여 존재한다. 예를 들어, 본 발명의 항체 또는 기능적 단편은 하나 이상의 기타 치료제와 조합될 수 있다. 이러한 조합 요법이 대상체에 동시에 또는 연속적으로 부여될 수 있다.

[0120] 따라서, 몇몇 실시양태에서, 본 발명은 본원에 제공된 약제학적 조성물의 치료학적 유효량을 이를 필요로 하는 대상체에 투여함으로써 질환을 치료 또는 예방하는 방법을 제공하고, 상기 약제학적 조성물은 본 발명의 항체 또는 기능적 단편과 제2 치료제를 포함한다. 적합한 제2 치료제는 본원에 논의된 대로 통상의 기술자가 쉽게 결정할 수 있다. 실시예 IV에 제공된 바와 같이, 본 발명의 몇몇 실시양태에서 제2 치료제는 탁술일 수 있다.

[0121] 본원에 제공된 약제학적 조성물은 본원에 제공된 본 발명의 하나 이상의 항체의 치료학적 유효량 및 임의로 하나 이상의 부가적 치료제를 약제학적으로 허용되는 담체에 함유한다. 이러한 약제학적 조성물은 암 또는 종양 생성과 같은 질환 또는 이의 증상의 하나 이상의 예방, 치료, 관리 또는 개선에 유용하다.

[0122] 약제학적 조성물은 본 발명의 항체 또는 기능적 단편을 하나 이상 함유할 수 있다. 한 실시양태에서, 항체 또는 기능적 단편은 비경구 투여용 무균 용액 또는 현탁액과 같은 적합한 약제학적 제제로 제형화된다. 한 실시양태에서, 본원에 제공된 항체 또는 기능적 단편은 당해 분야에 잘 알려진 기술 및 방법을 사용하여 약제학적 조성물로 제형화된다(예를 들어, "Ansel (1985) Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms, 4<sup>th</sup> Ed., p. 126"

참조).

- [0123] 본 발명의 항체 또는 기능적 단편은 치료되는 대상체에 바람직하지 않은 부작용이 없을 때 치료학적으로 유용한 효과를 발휘하기에 충분한 치료학적 유효량으로 약제학적 조성물에 포함될 수 있다. 치료학적 유효 농도는 화합물을 시험관내 및 생체내에서 통상의 방법으로 시험한 다음 이로부터 사람을 위한 투여량을 외삽법으로 추론하여 경험적으로 결정할 수 있다. 약제학적 조성물 중의 항체 또는 기능적 단편의 농도는, 예를 들어, 항체 또는 기능적 단편의 물리화학적 특징, 투여 계획 및 투여량 뿐만 아니라 당해 분야의 숙련가에게 잘 알려진 인자에 좌우될 것이다.
- [0124] 한 실시양태에서, 치료학적 유효 용량은 항체 또는 기능적 단편의 혈청 농도를 약 0.1ng/ml 내지 약 50-100 $\mu$ g/ml로 만든다. 다른 실시양태에서, 약제학적 조성물은 약 0.001mg 내지 500mg/kg(체중)/일의 용량을 제공한다. 약제학적 투여 단위형은 투여 단위형당 항체 또는 기능적 단편 및/또는 기타 선택적인 필수 성분들의 조합을 약 0.01mg, 0.1mg 또는 1mg 내지 약 30mg, 100mg 또는 500mg을 제공하도록, 및 다른 실시양태로는 약 10mg 내지 약 500mg을 제공하도록 제조할 수 있다.
- [0125] 본 발명의 항체 또는 기능적 단편은 한꺼번에 또는 시간 간격을 두고 다수의 소용량으로 나누어 투여할 수 있다. 정확한 용량 및 치료 기간은 치료되는 질환과함수 관계에 있고, 공지된 시험 프로토콜을 사용하여, 또는 생체내 또는 시험관내 시험 데이터로부터 외삽에 의해 경험적으로 결정할 수 있을 것으로 생각된다. 농도 및 용량값이 또한 개선시키려는 병태의 중증도에 따라 변할 수 있음을 주의해야 한다. 추가로 임의의 특정 대상체의 경우, 특정 투여 요법이 개별적 요구 및 조성물을 투여하거나 투여를 감독하는 사람의 전문적 판단에 따라 시간에 걸쳐 흐르면서 조절할 수 있고, 본원에 기재된 농도 범위는 예시일 뿐이며 청구된 조성물의 범위 또는 실행을 제한하려는 것이 아닌 것으로 생각된다.
- [0126] 본 발명의 항체 또는 기능적 단편을 혼합하거나 첨가하면, 생성된 혼합물은 용액, 현탁액 등일 수 있다. 생성된 혼합물의 형태는 의도된 투여 방식 및 선택된 담체 또는 비히클내에서의 화합물의 용해도를 포함한 다수의 인자에 좌우된다. 유효 농도는 치료되는 질환, 장애 또는 병태의 증상을 개선시키기에 충분하고 경험적으로 결정할 수 있다.
- [0127] 약제학적 조성물은 적합한 양의 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용되는 유도체를 함유하는 무균 비경구 용액 또는 현탁액과 같은 단위 투여형으로 사람 및 동물 투여용으로 제공된다. 한 실시양태에서, 항체 또는 기능적 단편은 단위 투여형 또는 다중 투여형으로 제형화되고 투여될 수 있다. 단위 투여형은 당해 분야에 공지된 바와 같이 사람 및 동물 대상체에 적합하고 개별적으로 포장된 물리적 개별 단위를 말한다. 각각의 단위 투여형은 목적인 치료학적 효과를 생성시키기에 충분한 본 발명의 항체 또는 기능적 단편의 예정된 양을 필요한 약제학적 담체, 비히클 또는 희석제와 함께 함유한다. 단위 투여형의 예는 앰플 및 주사기를 포함한다. 단위 투여형은 이를 나누어 또는 배수로 투여할 수 있다. 다중 투여형은 분리된 단위 투여형으로 투여되는 단일 용기에 포장된 복수개의 동일한 단위 투여형이다. 다중 투여형의 예는 파인트 또는 깡통의 바이알 또는 병을 포함한다. 따라서, 다중 투여형은 포장내에 분리되어 있지 않은 단위 용량의 배수이다.
- [0128] 한 실시양태에서, 본 발명의 항체 또는 기능적 단편의 하나 이상은 액체 약제학적 제제 형태이다. 약제학적으로 투여가능한 액체 조성물은, 예를 들어, 본원에 제공된 항체 또는 기능적 단편과 선택적인 약제학적 보조제를, 예를 들어, 물, 염수, 수성 텍스트로즈, 글리세롤, 글리콜, 에탄올 등에 용해, 분산 또는 다르게는 혼합하여 용액을 생성시킴으로써 제조할 수 있다. 경우에 따라, 투여되는 약제학적 조성물은 또한 습윤제, 유화제, 가용화제, pH 완충제 등, 예를 들어 아세테이트, 시트르산나트륨, 사이클로텍스트린 유도체, 소르비탄 모노라우레이트, 트리에탄올아민 나트륨 아세테이트, 트리에탄올아민 올레이트 및 이러한 기타 제제와 같은 비독성 보조제 물질을 소량 함유할 수 있다. 이러한 투여형을 제조하는 실제 방법은 당해 분야의 숙련가에게 공지되어 있거나 명백할 것이고, 예를 들어 "Remington's Pharmaceutical Sciences (1990) Mack Publishing Co., Easton, PA"를 참조한다.
- [0129] 본 발명의 약제학적 조성물의 투여 방법은 당해 분야에 잘 알려져 있다. 약제학적 조성물의 적합한 투여 경로는 숙련된 임상 의에 의해 쉽게 결정될 수 있다고 생각된다. 예시적 투여 경로는 정맥내 주사, 근육내 주사, 피부내 주사 또는 피하 주사를 포함한다. 또한, 약제학적 조성물의 제제는 투여 경로를 제공하도록 쉽게 조절될 수 있다. 본 발명은 또한 본 발명의 약제학적 조성물의 투여에 따라, 본원에 제공된 바와 같이, 하나 이상의 약제학적 조성물의 지연, 연속 및/또는 반복 투여량을 대상체에 투여할 수 있음을 제공한다.
- [0130] 본 발명의 질환의 치료방법은 (1) 질환의 예방, 즉 질환의 임상적 증상이 질환에 걸릴 수 있지만 아직 그 질환



에 걸리지 않았거나 그 질환의 증상을 보이지 않는 대상체에서 진전되지 않도록 함; (2) 질환의 억제, 즉 질환 또는 그 임상적 증상의 진전의 저지 또는 저감; 또는 (3) 질환의 경감, 즉 질환 또는 그 임상적 증상의 퇴행을 포함하려고 한다. 본 발명의 질환의 예방방법은 암 또는 종양 생성을 가리키는 임상적 증상의 방지를 포함하려는 것이다. 이러한 방지는, 예를 들어, 대상체에서의 정상의 생리적 지표의 유지를 포함한다. 그러므로, 예방은 대상체를 종양 전이의 발생으로부터 보호하기 위한 예방적 치료를 포함할 수 있다.

[0131] 본 발명의 방법에 사용된 약제학적 조성물의 치료학적 유효량은 사용된 약제학적 조성물, 질환 및 그 중증도, 치료되는 대상체의 연령, 체중 등에 따라 변할 것이며, 이는 모두 주치의인 임상치의 기술 내에 있다. 본 발명의 방법에 의해 치료될 수 있는 대상체는 척추동물, 바람직하게는 포유동물, 보다 바람직하게는 사람을 포함한다.

[0132] 본 발명의 다양한 실시양태의 활성화에 실질적으로 영향을 미치지 않는 수정이 또한 본원에 제공된 발명의 정의 내에서 제공되는 것으로 생각된다. 따라서, 아래 실시예는 본 발명을 설명하기 위함이지 한정하려는 것은 아니다.

#### [0134] 실시예 1

[0135] **sLe<sup>a</sup>에 대한 사람 단클론 항체는 강력한 항종양 활성을 갖는다**

[0136] 탄수화물 항원 sLe<sup>a</sup>는 위장관, 유방 및 췌장의 상피 종양 및 소세포 폐암에서 널리 발현된다. sLe<sup>a</sup>의 과발현이 많은 종양의 침입 및 전이에 중요 사건으로 보이고 항체 매개 용해에 대한 감수성을 야기하기 때문에, sLe<sup>a</sup>는 종양 요법을 위한 매력적인 분자 표적이다. 따라서, 본원에 기재된 대로, sLe<sup>a</sup>-KLH 백신으로 면역화된 개체로부터의 혈액 림프구로부터 완전한 사람 단클론 항체(mAb)가 생성되고 특징화된다. sLe<sup>a</sup>에 대해 친화도가 높은 2개의 mAb(5B1 및 7E3, 각각의 결합 친화도는 0.14 및 0.04nmol/L)를 포함한 몇몇 mAb를 ELISA 및 FACS에 근거하여 선택하고 추가로 특징화하였다. 두 항체는 글리칸 배열 분석에 의해 측정된 바와 같이 Neu5Ac α 2-3Gal β 1-3(Fuc α 1-4)GlcNAc β 및 Neu5Gc α 2-3Gal β 1-3(Fuc α 1-4)GlcNAc β에 대해 특이적이었다. DMS-79 세포에 대한 보체의 의존적 세포독성은 r5B1(IgG1)에 대해서 보다 r7E3(IgM)에 대해 더 높았다(EC50 0.1μg/ml 대 1.7μg/ml). 또한, r5B1 항체는 사람 NK 세포 또는 말단혈 단핵 세포를 갖는 DMS-79 세포에 대해 높은 수준의 항체 의존적 세포 매개 세포독성 활성을 보였다. 생체내 효능을 평가하기 위해, 항체를 중증 복합 면역결핍(SCID) 마우스에 이식된 Colo205 종양 세포 또는 DMA-79 종양 세포를 갖는 이종이식 모델로 시험하였다. Colo205 이종이식 모델에서, 4 회 용량의 r5B1(용량당 100μg)을 사용한 처음 21일간의 치료로 종양 생존시간이 207일로 2배가 되었고, 5마리의 동물 중 3마리가 6회 용량으로 생존하였다. DMA-79 이종이식 모델에서, 확립된 DMA-79 종양의 성장이 r5B1 항체로 처리된 동물에서 억제되거나 퇴행하였다. 면역 공격, 및 친화도, 특이성 및 작동 기능을 위한 표적으로서의 sLe<sup>a</sup>의 잠재력을 기반으로, 5B1 및 7E3은 암의 치료에 임상적 유용성을 갖는다.

#### [0138] 재료, 세포 및 항체

[0139] DMS-79(Pettengill et al., *Cancer*, 45:906-18 (1980)), SW626, EL4, HT29, BxPC3, SK-MEL28 및 P3×63Ag8.653 세포주를 ATCC(American Type Culture Collection)에서 구입하였다. Colo205-luc 세포(Bioware ultra)를 칼리퍼 라이프 사이언시스(Caliper Life Sciences)에서 입수하였다. 쥐과 대조용 mAb 121SLE(IgM)를 진 텍스(Gene Tex)에서 구입하였다. sLe<sup>a</sup> 테트라사카라이드(Cat# S2279)를 시그마-알드리치(Sigma-Aldrich)에서 구입하였다. sLe<sup>a</sup>-HSA(사람 혈청 알부민) 결합체(Cat# 07-011), 1가 바이오티닐화 sLe<sup>a</sup>(sLe<sup>a</sup>-sp-바이오틴; Cat# 02-044), 다가 바이오티닐화 sLe<sup>a</sup>-PAA(Cat# 01-044), 바이오틴 표지된 Le<sup>a</sup>-PAA(Cat# 01-035) 및 sLe<sup>x</sup>-PAA-바이오틴(Cat# 01-045)을 글리코텍(GlycoTech)에서 구입하였다. 다가 프리젠테이션에서, 상기 테트라사카라이드가 폴리아크릴아미드 매트릭스(PAA)로 도입됨으로써, 중합체쇄의 대략 5번째 아미드 그룹마다 4:1의 비율로 바이오틴으로 N-치환되고 대략 탄수화물 함량이 20%인, 30kDa 다가 중합체를 생성시킨다. 본 연구에 사용된 기타 HSA 또는 BSA 당결합체를 기재된 대로 sLe<sup>a</sup> 펜테닐 글리코사이드를 사용하여 내부에서 제조하였다(Ragupathi et al., *Cancer Immunol Immunother*, 58:1397-405 (2009)). GD3, 푸코실-GM1, GM2 및 GM3를 매트레야(Matrea)에서 구입하였고, GD2를 어드밴스트 이뮤노케미칼(Advanced ImmunoChemical)에서 구입하였다.

[0140]

[0141] 항-sLe<sup>a</sup> mAb 생산 하이브리도마의 제조

[0142] MSKCC 및 FDA 승인된 IRB 프로토콜 및 IND하에 MSKCC에서 개시된 유방암을 갖는 환자에서의 sLe<sup>a</sup>-KLH 결합체 백신을 사용한 지속적 시험으로 3명의 환자로부터 혈액 샘플을 수득하였다. 혈액 시료를 3 또는 4회의 백신 접종 후에 2명의 환자로부터 선택하였고, 이는 sLe<sup>a</sup>에 대해 각각 1/160 및 1/320의 항체 역가를 보였다. 혈청(및 쥐 과 mAb 19.9)은 FACS 분석으로 sLe<sup>a</sup>-양성 세포와 잘 반응하고 강력한 CDC를 중재한다(Ragupathi et al., *Cancer Immunol Immunother*, 58:1397-405 (2009)). 말단혈 단핵 세포(PBMC)를 Histopaque-1077(Sigma-Aldrich) 상에서 구배 원심분리로 대략 80 내지 90mL의 혈액으로부터 분리하였다.

[0143] PBMC를 L-글루타민, 비필수 아미노산, 나트륨 피루베이트, 비타민, 페니실린/스트렙토마이신, 10% FBS(Omega Scientific), 10ng/mL IL-21(Biosource) 및 1μg/mL 항-CD40 mAb(G28-5 하이브리도마 상청액; ATCC)이 보강된 RPMI-1640 배지에서 배양하였다. 세포를 전기세포융합에 의해 P3×63Ag8.653 골수종 세포로 융합시켰다.

[0144]

[0145] sLe<sup>a</sup> ELISA

[0146] sLe<sup>a</sup> ELISA를 위해, 플레이트를 sLe<sup>a</sup>-HSA 결합체, 1가 바이오티닐화 sLe<sup>a</sup> 1μg/mL로, 또는 Neutr-Avidin 피복된 플레이트에 포획된 다가 바이오티닐화 sLe<sup>a</sup>-PAA로 코팅하였다. 코팅되지 않은 웰(PBS) 및 HSA 피복된 웰을 대조군으로 사용하였다. 결합된 항체를 먼저 거자무과산화효소(HRP) 표지된 염소 항-사람 IgA+G+M(Jackson ImmunoResearch)으로 검출하였고, 이어서 아이소토프를 측정하기 위해 양성 웰을 IgG-Fc- 또는 IgM-특이적 2차 항체로 탐사하였다.

[0148] 탄수화물 특이성 분석

[0149] 밀접히 관련된 항원인 Le<sup>a</sup> 및 sLe<sup>x</sup>에 대한 교차 반응성을 표면 플라스몬 공명(SPR)으로 평가했고 바이오틴 표지된 Le<sup>a</sup>-PAA 및 바이오틴-sLe<sup>x</sup>-PAA를 사용하여 ELISA로 확인하였다. 강글리오사이드 GD2, GD3, 푸코실-GM1, GM2 및 GM3에 대한 결합을 ELISA로 시험하였다. 경쟁 ELISA를 이용하여 몇 개의 다른 관련 탄수화물 잔기에 대한 mAb의 특이성을 평가하였다. 간단히 말하면, 2μg/mL sLe<sup>a</sup>-HSA 결합체를 플레이트 위에 코팅한 다음, PBS 중 3% BSA로 블로킹하였다. 이어서, HSA 또는 BSA에 결합되지 않은 또는 결합된 상이한 탄수화물 잔기(1mg/mL 원액으로부터 제조된 PBS 중 40μg/mL) 30μL를 시험 항체 30μL와 따로 따로 혼합하고 실온에서 샘플 플레이트에서 인큐베이팅하였다. 30분 후, 혼합물 50μL를 코팅된 분석 플레이트로 옮기고 1시간 동안 인큐베이팅한 다음, HRP 표지된 염소 항-사람 IgA+G+M과 함께 인큐베이팅하고, 세척하고, 버사맥스(Versamax) 분광형광계를 사용하여 결합 항체를 비색 검출하였다(모든 단계는 실온에서 수행하였다). 시험된 탄수화물 잔기는 globo H, Lewis Y, Lewis X, sTn(sialyl-Thomson-nouveaux), 클러스터 sTn, TF(Thomson Friedenreich), Tighe Le<sup>b</sup>/Le<sup>y</sup> 뮤신, 돼지 상악하선 뮤신(PSM) 및 sLe<sup>a</sup> 테트라사카리아드와 sLe<sup>a</sup>-HSA의 결합체를 포함하였다. 항체의 정밀한 특이성을 측정하기 위해, 글리칸 배열 분석을 Consortium for Functional Glycomics Core H 그룹으로 수행하였다. 5B1 및 7E3 항체를 6개의 복제물에 465개의 글리칸으로 이루어진 프린트 배열 버전 4.1을 사용하여 10μg/mL에서 시험하였다.

[0151] 면역글로불린 cDNA 클론화 및 재조합 항체 발현

[0152] 이전에 기재된 바와 같이 사람 mAb 중쇄 및 경쇄 cDNA의 가변 부위를 별도의 하이브리도마 세포로부터 RT-PCR로 회수하고 IgG1 또는 IgM 중쇄, 또는 IgK 또는 IgL 경쇄 발현 벡터내로 서브클론화하였다(Sawada-Hirai et al., *J. Immune Based Ther. Vaccines*, 2:5 (2004)). Ig 중쇄 또는 경쇄 발현 벡터를 Not I 및 Sal I로 이중 다이제스트한 다음, 두 단편을 결합시켜 이중 유전자 발현 벡터를 생성하였다. 6웰 플레이트내의 CHO 세포를 리포펙타민(Lipofectamine) 2000(Invitrogen)을 사용하여 이중 유전자 발현 벡터로 감염시켰다. 24시간 후, 감염된 세포를 선택 배지[10% 투석된 FBS로 보강된 DMEM(Invitrogen), 50μmol/L L-메티오닌 설펡스이민(MSX), GS 보강물(Sigma-Aldrich) 및 페니실린/스트렙토마이신(Omega Scientific)]를 함유하는 10cm 접시로 옮겼다. 2주 후, MSX 내성 감염체를 분리하였고 확대하였다. 높은 항-sLe<sup>a</sup>-항체 생성 클론을 sLe<sup>a</sup> 특이적 ELISA 분석으로 상청액내의 항체 수준을 측정함으로써 선택하였고 대규모 mAb 생산을 위해 확대하였다.

[0153] **사람 mAb 정제**

[0154] 유니콘(Unicorn) 5.0 소프트웨어가 작동되는 액타 일스플로러(Akta Explorer)(GE Healthcare)를 사용하여 항체를 정제하였다. 간단히 말하면, 안정한 클론 5B1 또는 7E3을 웨이브(Wave) 생물반응장치내 혈청 비함유 배지에서 성장시켰고 수집된 상청액을 원심분리 및 여과로 분류하고 사용할 때까지 저장하였다. 사람 IgG 항체를, 10mmol/L PBS 및 150mmol/L NaCl 작동 완충제를 사용하여 적합한 크기의 단백질 A 컬럼으로 정제하였다. 사람 IgM 항체를 수산화인회석 컬럼에서 정제하였고, IgM을 500mmol/L 포스페이트 구배로 용출하였다. IgG 및 IgM에 대해 각각 1.4 및 1.18의  $E^{1\%}$ 를 사용하여 OD<sub>280</sub>으로 항체 농도를 측정하였다. 각 제제의 순도는 환원 조건하에 SDS-PAGE 분석(레인당 1 내지 5 $\mu$ g)으로 평가하였고, 순도는 중쇄와 경쇄의 합을 기준으로 90%를 초과하였다.

[0155]

[0156] **유동 세포 분석법**

[0157] sLe<sup>a</sup>-양성 또는 -음성 종양 세포주(병태당 0.5 $\times 10^6$ 개의 세포)를 PBS/2% FBS (PBSF)에서 세척하였다. 이어서 시험용 또는 대조군 사람 mAb를 첨가하고(완전 배지중 1 내지 2 $\mu$ g/mL) 얼음에서 30분 동안 인큐베이팅하였다(Gilewski et al., *Clin Cancer Res*, 6:1693-701 (2000); Gilewski et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 98:3270-5 (2001)). PBSF에서 세척한 후, 세포를 Alexa-488 항-사람 IgG-Fc $\gamma$  또는 항-사람 IgM- $\mu$  (Invitrogen)와 함께 얼음에서 30분 동안 인큐베이팅하였다. 세포를 PBSF에서 2회 세척하고 Guava Personal Cell Analysis-96(PCA-96) System (Millipore)을 사용하여 유동 세포 분석법으로 분석하였다. Colo205-luc 세포를 1차 항체 2 $\mu$ g/mL와 함께 인큐베이팅하였고, 이어서 서던바이오텍(SouthernBiotech)으로부터의 2차 항체로 염색하였고, FlowJo 7.2.4 소프트웨어를 사용하여 Becton Dickinson FACS Advantage IV 기구로 분석하였다.

[0158] **친화도 측정**

[0159] 친화도 상수를 바이아코어(Biacore) 3000(GE Healthcare)과 함께 SPR 원리를 사용하여 측정하였다. 바이오틴 표지된 1가 sLe<sup>a</sup>(Cat# 02-044) 또는 다가 sLe<sup>a</sup>-PAA-바이오틴(Cat# 01-044)을 생산자 지시에 따라 SPA 바이오센서 칩의 유동 세포를 분리하기 위해 커플링시켰다. HSA와 유리 바이오틴을 함유하는 배지로 블로킹된 유동 세포를 참조용 세포로 사용하였다. 결합 키네틱 매개변수를, sLe<sup>a</sup>-PAA-바이오틴 코팅된 유동 세포를 이용하여 HBS-EP 완충제(10mmol/L HEPES, pH 7.4, 150mmol/L NaCl, 3.4mmol/L EDTA, 0.005% 계면활성제 P20)로 희석된 항체의 몇몇 공지된 농도로부터 측정하였다. 바이아코어(Biacore) 기구에 의해 제공된 커브 적합 소프트웨어를 사용하여 결합 속도 및 해리 속도를 평가하고 이로부터 친화도를 계산하였다.

[0161] **CDC 분석**

[0162] 앞서 설명한 바와 같이 양성 대조군 mAb를 가지고 또는 정제된 사람 mAb의 여러 농도 희석액(0.1 내지 25 $\mu$ g/mL) 및 사람 보체(Quidel; Cat# A113)를 사용하여 90분 세포독성 분석(Guava PCA-96 Cell-Toxicity kit; Millipore; Cat # 4500-0200)에 sLe<sup>a</sup> 항원-양성 및 -음성 세포주를 사용하였다(Ragupathi et al. *Clin Cancer Res* 2003, 9:5214; Ragupathi et al. *Int J Cancer* 2000, 85:659; Dickler et al. *Cancer Res* 1999, 5:2773). 간단히 말하면, 2.5 $\times 10^6$ 개의 표적 세포를 카복시플루오레세인 디아세테이트 석시니닐 에스테르(CSFE)로 페인팅하여 녹색/황색 형광 표적 세포를 수득하였다. 페인팅된 세포(1 $\times 10^5$ 개/50 $\mu$ L 샘플)를 40분 동안 100 $\mu$ L의 항체와 함께 얼음에서 인큐베이팅하였다. 이어서, 완전 배지(RPMI-1640, 10% FCS)내에서 1:2로 희석된 50 $\mu$ L의 인간 보체 또는 단독 배지를 첨가하여 샘플을 3중화하고 90분 동안 37 $^{\circ}$ C에서 인큐베이팅하였다. 따라서, 이 분석에서 최종 보체 희석률은 1:8이었다. 인큐베이팅 시간 동안 사멸한 세포는 막 불투과성 염료 7-아미노-액티노마이신 D(7-AAD)를 첨가해 표지화하였고, Guava CellToxicity 소프트웨어 모듈을 사용한 이중 색상 면역형광법으로 샘플을 분석하였다. NP40을 수용한 대조군 샘플은 최대 사멸을 측정하는 데 사용하였고 보체만 수용한 샘플은 기준선으로 제공되었다. 세포 사멸률(%)은 적합한 게이팅으로 측정하였고 다음 식에 따라 계산하였다: 사멸률(%)=[(샘플% - 보체 단독%)/(NP40% - 보체 단독%)] $\times 100$ .

[0163] **항체 의존 세포 매개 세포독성 분석**

[0164] MSKCC IRB 승인된 프로토콜하에 수득된 혈액 샘플로부터 Ficoll-Hypaque 밀도 원심분리로 PBMC 작동 세포를 분



리하였다. 표적 세포를 0.1% 칼세인-AM 용액(Sigma-Aldrich) 15  $\mu$ L를 함유한 완전 성장 배지 내에서  $5 \times 10^6$  개의 세포/mL로 30분 동안 37°C에서 5% CO<sub>2</sub> 존재하에 인큐베이팅하였다. 세포를 PBS-0.02% EDTA 15mL로 2회 세척하였고 완전 성장 배지 1mL에 재현탁시켰다. 표지된 표적 세포 50 마이크로터터(10,000개의 세포)를 도 13에 기재된 농도의 항체의 존재 또는 부재하에 96웰 플레이트내로 플레이팅하였고, 이에 따라 새로 분리된 말단혈 단핵 세포(작동 세포, E:T 비 100:1) 50  $\mu$ L와 함께 인큐베이팅하였다. 인큐베이팅한 지 2시간 후, 플레이트를 10분 동안 300 $\times$ g에서 원심분리하였고, 상청액 75  $\mu$ L를 새로운 평저 96웰 플레이트로 옮겼다. 상청액 형광성을 Fluoroskan Ascent(Thermo Scientific)로 485nm 여기광 및 535nm 방출광에서 측정하였다. 작동 세포가 없고 30% FBS를 함유한 RPMI-1640 배지 중 표적 세포로부터 자연 방출을 측정하였고, 작동 세포가 없고 30% FBS 및 6% Triton X-100을 함유하는 RPMI-1640 배지 중 표적 세포로부터 최대 방출을 측정하였다. 세포독성(%)을 [(샘플 중의 개수-자연 방출)/(최대 개수-자연 방출)] $\times$ 100으로서 계산하였다.

[0165]

[0166] **mAb 내재화 분석**

[0167] 5B1 항체의 내재화를, 96웰 플레이트(2,000개의 세포/90  $\mu$ L/웰)내로 플레이팅되고 밤새 복제물로 인큐베이팅된 sLe<sup>a</sup> 발현 BxPC3 세포에 대한 r5B1과 Hum-ZAP 2차 결합체(Advanced Targeting Systems) 복합체의 세포독성 활성을 측정함으로써 평가하였다. 다양한 농도의 5B1 항체를 제조자의 지시에 따라 RT에서 Hum-ZAP 이차 결합체와 함께 인큐베이팅하였다. 이어서, r5B1과 Hum-ZAP 복합체 10  $\mu$ L/웰을 세포에 첨가했고 3일 동안 인큐베이팅하였다. 티아졸릴 블루 테트라졸륨 브로마이드(Sigma-Aldrich) 용액(PBS 중 5mg/mL) 25 마이크로터터를 각각의 웰에 첨가했고 37°C에서 인큐베이팅하였다. 인큐베이팅한지 2시간 후, 가용화 용액(20% SDS/50% N,N-디메틸포름아미드) 100  $\mu$ L/웰을 각각의 웰에 첨가했고 37°C에서 추가로 16시간 동안 인큐베이팅하였다. OD를 570/690nm에서 측정했고, 중간값만을 갖는 수득된 값을 플레이트 백그라운드 감산에 사용하였다. 항체가 없는 8개의 아주 유사한 배지를 사용하여 샘플 값(샘플/미처리 평균 $\times$ 100)을 정규화하였다.

[0168]

[0169] **이종이식 모델**

[0170] 암컷 CB17 SCID 마우스(5 내지 8주령)를 타코닉(Taconic)에서 구입하였다. Colo205 이종이식 모델을 위해, 0.1mL 완전 성장 배지 중 Colo205-luc 세포( $0.5 \times 10^6$ )를 꼬리 정맥을 통해 0일에 28G 니들이 있는 BD 인슐린 주사기(Becton Dickinson & Co)를 사용하여 주사하였다. 첫 번째 연구를 위해, mAb 5B1 100 $\mu$ g을 1일, 7일, 14일 및 21일에(실험 1) 또는 1일, 4일, 7일, 10일, 14일 및 21일에(실험 2) 복강내 주사하였다. 두 번째 연구를 위해, mAb 5B1 100 $\mu$ g, 300 $\mu$ g 또는 1mg을 종양 세포 주입 후 4일에 복강에 주사한 다음, 처음 2주 동안은 주 2회로, 다음 7주 동안은 주 1회로 주사하였다. 마우스에서의 종양 진행을 모니터링하였다. DMS-79 이종이식 모델을 위해, DMS-79 세포( $1 \times 10^6$ )를 암컷 CB17 SCID 마우스에 피하주사하였고, 마우스를 종양 길이가 5mm( $\sim$  20 mm<sup>3</sup>)에 달한 후에 19일에 치료하기 시작했다. 이어서 동물을 제시된 사람 IgG 또는 5B1 항체로 용량당 200 $\mu$ g으로 복강내 주사로, 또한 cRGD를 정맥내 주사로 치료하여 혈관 투과도를 처음에 80 $\mu$ g에서 그다음 주당 5일로 37일까지 용량당 40 $\mu$ g으로 증가시켰다.

[0171] 모든 과정은 Memorial Sloan Kettering Cancer Center Institutional Animal Care and Use Committee에 의해 승인된 프로토콜하에 이루어졌다. GraphPad Prism 5.1(GraphPad Software)을 사용하여 카플란 마이어(Kaplan-Meier) 생존 곡선을 생성시켰고 맨텔-헨젤(Mantel-Haenszel) 로그 순위법을 사용하여 분석하였다.

[0173] **결과**

[0174] **ELISA에 의한 사람 단클론 항체의 동정 및 재조합 항체의 제조**

[0176] 3명의 백신 접종된 환자로부터의 혈액 샘플을 하이브리도마 제조 작업에 사용하였고 다수의 양성 세포를 항원 특이적 ELISA 분석으로 검출하였다(표 3). 광범위한 선별로 불량한 또는 비특이적 결합을 보였던 항체를 제거하였다. sLe<sup>a</sup>에 대해 강한 활성을 갖는 8개의 사람 항체 발현 하이브리도마 세포(1개의 IgM 및 7개의 IgG)를 처음에 선택하고, 확대하고, 추가 특징화를 위해 서브클론화하였다. 2개의 항체(9H1 및 9H3)가 sLe<sup>a</sup>-HSA 결합체에 대해 강한 결합을 나타냈으나 sLe<sup>a</sup>-PAA 코팅된 플레이트에 대해서는 아니었다. ELISA 분석으로 측정하였을 때 3

개의 항체(5B1, 5H11 및 7E3)가 1가 및 다가 sLe<sup>a</sup> 및 sLe<sup>a</sup>-HSA 결합체에 대해 강한 결합을 나타냈다(표 4).

표 3

IgG 또는 IgM 단클론 항체를 함유하는 지원자 하이브리도마 상청액의 sLe<sup>a</sup>-

아세틸페닐렌디아민(APD)-사람 혈청 알부민(HSA) 결합체(sLe<sup>a</sup>-HuSA)로의 결합

상청액	아이소타입	OD (490 nm)*		
		HuSA	sLe <sup>a</sup> -HuSA	PBS
EF41-5B1	G	0.000	2.240	0.020
EF41-5H11	G	0.020	2.180	-0.010
EF41-6F7	G	0.010	0.480	-0.010
EF41-9H1	G	0.010	0.730	-0.020
EF41-9H3	G	0.010	1.100	-0.020
EF41-9A10	G	0.010	2.140	-0.010
EF41-10C1	G	0.000	0.040	-0.020
EF40-3C4	G	0.000	0.500	0.000
EF40-10H3	G	0.000	0.130	0.000
EF41-7E3	M	-0.020	2.130	0.010
EF41-9A7	M	2.700	2.540	2.610
EF40-5B7	M	0.070	0.070	0.080

\* 공제된 아이소타입 대조군 블랭크. HuSA는 사람 혈청 알부민 대조군을 가리킨다.

PBS는 포스페이트 완충 염수 대조군을 가리킨다.

표 4

선택된 항체의 1가(모노-) sLe<sup>a</sup>, 다가(폴리-) sLe<sup>a</sup> 또는 sLe<sup>a</sup>-HSA 형태로서

제시된 sLe<sup>a</sup>로의 결합

상청액	OD (490 nm)				
	PBS	NAV	NAV+ 모노-sLe <sup>a</sup>	NAV+ 폴리-sLe <sup>a</sup>	SLeA-HSA *
EF41-5B1(G)	0.050	0.050	0.900	2.280	1.740
EF41-5H11(G)	0.040	0.050	1.280	2.130	1.900
EF41-6F7(G)	0.050	0.050	0.050	0.080	0.100
EF41-9H1(G)	0.050	0.050	0.050	0.060	0.300
EF41-9H3 (G)	0.050	0.050	0.050	0.050	0.750
EF41-9A10 (G)	0.040	0.040	0.170	0.870	1.330
EF40-3C4 (G)	0.040	0.050	0.040	0.050	0.070
EF41-7E3 (M)	0.050	0.050	0.970	0.920	1.310

HuSA는 사람 혈청 알부민 대조군을 가리킨다. PBS는 포스페이트 완충 염수

대조군을 가리킨다. NAV는 중성 아비딘 대조군을 가리킨다.

4개의 선택된 항체로부터의 중쇄 및 경쇄 가변 부위를 RT-PCR로 회수하였고 본원의 전장 IgG1 또는 IgM 발현 벡터내로 클론화하였다. IMGT/V-Quest(Brochet et al., *Nucleic Acids Res.*, 36:W503-8 (2008))를 사용한 분자서열 분석으로 3개의 선택된 IgG 항체 5B1(IgG/λ), 9H3(IgG/λ) 및 5H11(IgG/λ)이 동일한 VH군 및 모든 사용된 람다 경쇄로부터 유도된 것으로 드러났다. 이들 IgG1 항체는 생식계열에서 벗어나는 각각 16, 5 또는 3개의 돌연변이를 갖는 상이한 CDR 서열을 나타냈다(도 1 내지 6 및 표 5). IgM 항체(7E3)는 카파 경쇄를 활용하고 6개의 중쇄 돌연변이를 갖는다(도 7 및 8, 및 표 5). 5B1에서의 증가된 돌연변이는 친화도 성숙의 지표이다. 제조항체가 웨이브(Wave) 생물반응장치 시스템내 CHO 세포주에서 생성되었고, IgG 및 IgM에 대해 각각 단백질 A 또는 수산화인회석 크로마토그래피를 사용하여 정제하였다. 정제된 제조항체는 ELISA 결합 및 특이성에 대해 본래의 하이브리도마 유도된 항체의 특성을 유지하였다.

[0184] 표 5

백신 접종된 혈액 공여자로부터 유도된 선택된 사람 항-sLe<sup>a</sup> 항체의 cDNA 분류

항체 클론 ID	VH					VL			
	VH	생식계열 로부터의 돌연변이	DH (RF)	JH	CDR 길이	VL	생식계열 로부터의 돌연변이	JL	CDR 길이
5B1	3-9*01	16	6-25*01 (1)	4*02	8, 8, 16	L1-47*01	4	JL1*01	8, 3, 12
9H3	3-9*01	5	2-8*01 (2)	4*02	8, 8, 16	L1-47*01	2	JL2*01	8, 3, 11
5H11	3-9*01	3	6-25*01 (1)	4*02	8, 8, 16	L1-47*01	1	JL1*01	8, 3, 12
7E3	3-30*0 3	6	2-15*01 (2)	4*02	8, 8, 19	K3-15*01	3	JK2*01	6, 3, 10

[0185]

[0187] 중앙 세포 결합 분석

[0188] 세포 표면 결합은 세포독성 활성을 위해 중요하므로 다음에 시험하였다. 유동 세포 분석법은 소세포 폐암 현탁액 세포주인 DMS-79 세포로의 5B1, 9H3, 5H11 및 7E3의 강한 결합을 나타냈다(도 11abc의 A). r5B1 및 r7E3의 결합 역시 HT29 결장암 세포(도 11abc의 B), BxPC3 췌장암 세포(도 11abc의 C), SW626 난소암 세포(도 11def의 D) 및 Colo205-luc 결장암 세포(도 11def의 F)에서 확인되었다. 이들 항체는 sLe<sup>a</sup>-음성(SLE121-음성) SK-MEL28 흑색종 세포(도 11def의 E) 또는 EL4 마우스 림프종 세포에 결합하지 않았다(데이터는 기재하지 않음).

[0190] 친화도 측정

[0191] sLe<sup>a</sup>로의 결합의 상대적 친화도/친화력을 바이오틴화 sLe<sup>a</sup>-PPA를 포획하기 위한 스트랩트아미딘 코팅된 칩을 사용하여 SPR로 조사하였다. 표 6에 나타낸 바와 같이, r5B1 및 r7E3은 sLe<sup>a</sup>-PPA에 신속히 결합하고 비교용으로 사용된 시판중인 쥐과 IgM 항-sLe<sup>a</sup> 항체인 121SLE에 비해 현저히 느린 오프-레이트(off-rate)를 보인다. r5B1의 친화도는 0.14nmol/L로 측정되었고, 7E3의 외관상 친화도/친화력의 대략 4배가 넘었다(표 6). 9H3 친화도는 9H3 항체(자연 및 재조합)가 sLe<sup>a</sup>-PPA 코팅된 바이오센서 칩에 결합되지 않았기 때문에 측정하지 못했다.

[0192] 표 6

SPR에 의한 항-sLe<sup>a</sup> 항체의 키네틱 매개변수의 측정

mAb	친화도 nmol/L	$K_d$ , mol/L	$K_a$ , 1/mol/L	결합 $k_a$ , 1/mol/L s)	해리 kd, 1/s	아이소타입
r5B1	0.14	$1.4 \times 10^{-10}$	$7.0 \times 10^9$	$1.1 \times 10^6$	$1.6 \times 10^{-4}$	IgG1/ $\lambda$
r7E3	0.04	$3.6 \times 10^{-11}$	$2.8 \times 10^{10}$	$8.8 \times 10^5$	$3.2 \times 10^{-5}$	IgM/ $\kappa$
121SLE	0.35	$3.5 \times 10^{-10}$	$2.8 \times 10^9$	$2.7 \times 10^6$	$9.4 \times 10^{-4}$	m-IgM

[0193]

[0195] 특이성 분석

[0196] 탄수화물 특이성을 조사하기 위한 예비 분석을 ELISA 또는 SPR로 측정한 바, 5B1, 9H3 및 7E3이 밀접히 관련된 sLe<sup>x</sup>, Le<sup>a</sup> 또는 Le<sup>y</sup> 항원, 또는 강글리오사이드 GD2, GD3, 푸코실-GM1, GM2 및 GM3에 결합하지 않는 것으로 나타났다. 바이아코어 아비딘 칩에 포획된 sLe<sup>a</sup>-PAA-바이오틴 또는 sLe<sup>a</sup>-sp-바이오틴으로의 7E3, 5B1 및 121SLE 결합의 추가 분석은 3개의 항체 모두 sLe<sup>a</sup>의 다가 형태에 결합한 반면, 7E3 및 5B1은 1가 형태에 결합하는 것으로 나타났다. 5B1의 sLe<sup>a</sup>-PAA로의 결합은 또한 바이아코어 농도 분석 시리즈의 용량 의존 방식으로 sLe<sup>a</sup> 테트라사카라이드에 의해 억제되었다(데이터는 기재하지 않음). 이러한 결과는 높은 항-sLe<sup>a</sup> 항체 역가를 갖는 혈청이

ELISA에 의해 sLe<sup>a</sup>에 대해 특이적인, 즉 강글리오사이드 GM2, GD2, GD3, 푸코실-GM1 또는 중성 당지질 globo H 및 Le<sup>y</sup>와 반응하지 않는 것으로 밝혀진 이전 관찰과 일치한다(Ragupathi et al., *Cancer Immunol Immunother* 58:1397-405 (2009)). 다양하게 제공되는(예를 들어, 세라미드로서, 또는 BSA 또는 HSA에 결합된) 9개의 뚜렷이 다른 관련 탄수화물 잔기를 사용한 경쟁 분석에서, sLe<sup>a</sup> 테트라사카라이드 및 sLe<sup>a</sup>-HSA 결합체만이 sLe<sup>a</sup>-HSA 결합체로의 결합을 억제할 수 있었다(표 7).

표 7

다양한 관련된 당결합체의 존재하에서의 sLeA-PAA-HSA로의 결합

	r5B1		r9H3		r7E3	
항원	Exp 1	Exp 2	Exp 1	Exp 2	Exp 1	Exp 2
시알릴 Tn-HSA	1.866	1.981	1.882	1.970	2.218	2.259
GloboH-세라미드	1.866	1.852	1.906	1.821	2.098	2.201
sTn(c)-HSA (다이렉트)	1.896	1.864	1.947	1.883	2.131	2.136
sTn-M2-HSA (모노)	1.937	1.857	1.843	1.826	2.040	2.066
LeX-gal-cer	1.893	1.863	1.791	1.810	2.173	2.175
dPSM	1.897	1.890	1.757	1.700	2.218	2.110
Tn-모노 알릴 M2-HSA	1.837	1.905	2.041	1.991	2.083	2.107
Tighe Leb/LeY 무신	1.808	1.837	1.951	1.964	2.106	2.065
LeX-PAA	1.830	1.873	2.053	2.036	2.099	2.108
LeY-세라미드	1.824	1.821	1.940	1.980	2.143	2.085
Lewis Y 세라미드	1.833	1.844	1.941	1.874	2.090	2.111
Tn(c)-HSA	1.881	1.711	1.893	1.917	2.146	2.030
T-세린-BSA	1.809	1.830	2.128	2.089	2.137	2.039
TF(c) HSA	1.874	1.909	2.031	2.032	2.119	2.094
Tn LY-BSA	1.901	1.863	1.944	1.959	2.084	2.118
NPrGBMP-HSA	1.892	1.797	1.944	1.964	2.090	2.111
sLeA - HSA	<b>1.329</b>	<b>1.298</b>	<b>1.373</b>	<b>1.266</b>	<b>1.542</b>	<b>1.621</b>
sLeA 테트라사카라이드	<b>0.371</b>	<b>0.312</b>	<b>0.797</b>	<b>0.814</b>	2.114	2.041
None	1.809	1.809	1.993	1.993	2.096	2.096
블랭크	0.101	0.093	0.093	0.092	0.108	0.100

탄수화물 특이성을 추가로 상세히 조사하기 위해, 5B1 및 7E3 항체를 또한 Consortium for Functional Glycomics Core H 그룹에 의해 수행된 글리칸 배열 분석으로 시험하였다. 두 항체를 6개의 복제물 중 465개의 글리칸으로 이루어진 프린팅된 배열 위에서 10µg/mL에서 시험하였다. 이 결과로 sLe<sup>a</sup> 테트라사카라이드, Neu5Ac α2-3Gal β1-3(Fuc α1-4)GlcNAc β 및 Neu5Gc α2-3Gal β1-3(Fuc α1-4)GlcNAc β를 선택적으로 인지하는 두 항체의 높은 특이성과 sLe<sup>x</sup>, Le<sup>a</sup>, Le<sup>x</sup> 및 Le<sup>y</sup>를 포함한, 배열에 존재하는 밀접히 관련된 항원으로서의 결합의 사실상의 부재를 확인하였다. 결과를 표 8에 요약하였고, 이는 465개의 글리칸 구조중 상위 5개가 각각의 항체에 의해 인지되었음을 보여준다.



[0201] 표 8

글리칸 배열 선별에 의한 탄수화물 특이성의 분석

A. 5B1

차트 번호	통상의 명칭	글리칸 구조	평균	StDev	%CV
237	sLe <sup>a</sup>	Neu5Ac $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-3(Fuc $\alpha$ 1-4)GlcNAc $\beta$ -Sp8	38,851	2,797	7
278	sLe <sup>a</sup>	Neu5Gc $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-3(Fuc $\alpha$ 1-4)GlcNAc $\beta$ -Sp0	32,714	2,624	8
329	sLe <sup>a</sup> Le <sup>a</sup>	Neu5Ac $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-3(Fuc $\alpha$ 1-4)GlcNAc $\beta$ 1-3Gal $\beta$ 1-3(Fuc $\alpha$ 1-4)GlcNAc $\beta$ -Sp0	6,477	399	9
238	sLe <sup>a</sup> Le <sup>x</sup>	Neu5Ac $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-3(Fuc $\alpha$ 1-4)GlcNAc $\beta$ 1-3Gal $\beta$ 1-4(Fuc $\alpha$ 1-3)GlcNAc $\beta$ -Sp0	1,344	131	10
349		Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-2Man $\alpha$ 1-3(Man $\alpha$ 1-6)Man $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ -Sp12	129	62	48

B. 7E3

차트 번호	통상의 명칭	글리칸 구조	평균	StDev	%CV
237	sLe <sup>a</sup>	Neu5Ac $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-3(Fuc $\alpha$ 1-4)GlcNAc $\beta$ -Sp8	40,920	4,676	11
329	sLe <sup>a</sup> Le <sup>a</sup>	Neu5Ac $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-3(Fuc $\alpha$ 1-4)GlcNAc $\beta$ 1-3Gal $\beta$ 1-3(Fuc $\alpha$ 1-4)GlcNAc $\beta$ -Sp0	40,210	2,095	5
238	sLe <sup>a</sup> Le <sup>x</sup>	Neu5Ac $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-3(Fuc $\alpha$ 1-4)GlcNAc $\beta$ 1-3Gal $\beta$ 1-4(Fuc $\alpha$ 1-3)GlcNAc $\beta$ -Sp0	39,848	3,621	9
278	sLe <sup>a</sup>	Neu5Gc $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-3(Fuc $\alpha$ 1-4)Glc $\beta$ -NAc $\beta$ -Sp0	36,707	2,733	7
349		Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-2Man $\alpha$ 1-3(Man $\alpha$ 1-6)Man $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ -Sp12	692	52	8

[0202]

[0204]

CDC 활성

[0205]

5B1 및 7E3의 기능적 활성을 평가하기 위해, 본 발명자들은 보체의 공급원으로서 사람 혈청의 존재하에 DMS-79 세포를 사용하여 세포독성 활성을 시험하였다. 두 항체는 몇몇 분석에서 10 $\mu$ g/mL에서 100% 사멸 활성을 보인 반면, 상이한 특이성을 갖는 대조군 항체(1B7, 항-GD-2 IgG1 mAb)는 동일 농도에서 효과가 없었다(데이터는 기재하지 않음). CDC 활성은 농도 의존적이고, 7E3은 이 분석에서 5B1보다 현저히 활성이었고(도 12), 이는 IgM 항체가 보체 매개 세포독성 분석에서 보다 효과적인 것으로 알려져 있기 때문에 예측된다. EC<sub>50</sub>(50% 세포독성)은 5B1의 경우 1.7 $\mu$ g/mL였고 7E3의 경우 0.1 $\mu$ g/mL였으며, 이는 물 기준으로 7E3이 대략 85배 더 효능이 있는 것으로 해석된다(도 12).

[0207]

ADCC 활성

[0208]

7E3이 CDC 분석에서 상당히 더 강력한 반면, IgG 항체는 생체내 종양 사멸에 중요한 것으로 생각되는 항체 의존 세포 매개 세포독성(ADCC) 활성을 갖는 것으로 알려져 있다. 고수준의 세포독성을, 5B1 항체를 다양한 E:T 비율에서 사람 PBMC 및 DMS-79 표적 세포와 함께 사용하여 측정하였다(도 13의 A). 원발성 NK 세포를 사용하여 보다 낮은 E:T 비율에서 비슷한 수준의 세포독성을 관찰하였다(도 13의 B). 100:1의 E:T 비율에서 측정된 2명의 공여 자로부터의 PBMC를 사용한 용량 반응 실험은 유사한 효능을 나타냈고, 5B1 0.5 $\mu$ g/mL 이상의 농도에서 85%를 넘는 세포독성에 이르렀다(도 13의 C). 5B1에 의해 매개된 세포독성은 Fc $\gamma$ RIII 수용체를 필요로 하는데, 이것이 3G8 항-CD16 항체로 블로킹될 수 있기 때문이다. 고수준의 세포독성을 또한 5B1 항체를 100:1의 E:T 비율에서 Colo205-luc 세포에 대해 사람 PBMC와 함께 사용하여 측정하였다. 5B1 항체 1 $\mu$ g/mL로 성취된 ADCC 활성은 GM2, 푸코실-GM1, globo H 또는 폴리시알산에 대한 항체로 관찰된 활성보다 우수했다. 예상한 대로, 7E3 및 쥐과 121SLE(둘 다 IgM)는 이 분석에서 불활성이었다.

[0210]

5B1 내재화 분석

[0211]

Lewis Y에 "밀접하게 관련된" 항체에서 유도된 항체 결합체는 이전에 신속하게 내재화되고 동물 모델에서 매우

효과적인 것으로 나타났다(Hellstrom et al., *Cancer Res* 50:2183-90 (1990); Trail et al., *Science* 261:212-5 (1993)). sLe<sup>a</sup>가 내재화되는지를 조사하기 위해, 췌장 세포주 BxPC3을 5B1과 함께 인큐베이팅한 다음, 리보솜-불활성화 단백질 사포린에 결합된 항-사람 IgG인 Hum-ZAP를 첨가하였다(Kohls et al., *Biotechniques* 28:162-5 (2000)). 사포린 함유 복합체를 내재화하는 세포가 사멸되는 반면, 비내재화된 사포린은 상기 세포를 손상시키지 않는다. 도 14에 도시한 바와 같이, BxPC3 세포는 증가되는 용량의 5B1의 존재하에 효과적으로 사멸되는 반면, 상기 세포에서 발현되지 않는, GD2에 대한 아이소타입-매치드 IgG1 항체의 존재는 상기 세포를 사멸시키지 않는다.

[0213] 전이에 대한 이중이식 동물 모델에서의 활성

[0214] 생체내 5B1의 활성을 평가하기 위해, SCID 마우스에서 Colo205-luc 종양 세포 또는 DMS-79 종양 세포를 사용한 2종의 이중이식 모델로 항체를 시험하였다. Colo205-luc 종양 세포를 사용한 이중이식 모델의 경우, 그룹당 5마리의 마우스에 0일에  $0.5 \times 10^6$  개의 세포를 꼬리 정맥으로 주사하였고, IVIS 200 생체내 영상 시스템(Caliper Life Sciences)을 사용하여 동물들을 영상화함으로써 세포의 성공적인 주사를 확인하였다. 하루 후, 동물들은 5B1 항체를 복강내 투여하거나 PBS 모의 주사로 처리하였다. 실험 1에서, 5B1 100 $\mu$ g을 1일, 7일, 14일 및 21일 (총 용량 400 $\mu$ g)에 제공했고, 실험 2에서 동물들은 1일, 4일, 7일, 10일, 14일 및 21일에 5B1 100 $\mu$ g을 제공받았다(총 용량 600 $\mu$ g). 미처리 동물들의 평균 중간 생존은 2개의 실험에서 102일이었고, 모든 미처리 동물들은 155일 내에 죽었다(도 15). 동물의 치료는 생존을 현저히 개선시켰고; 중간 생존은 5B1을 4회 투여받은 그룹에서 207일로 2배였고, 5마리의 동물 중 2마리가 301일 후 실험이 종결될 때까지 생존했다(룽-랭크 시험, P=0.0499; HR=3.46). 생존동물의 비율은 6회가 투여되었을 때 5마리의 마우스 중 3마리로 추가로 증가했다(룽-랭크 시험, P=0.0064; HR=6.375). 두 번째 시험은 308일 후 종결되었고, 생존 동물들은 영상 시스템의 최고 민감도에서 Colo205-luc 종양을 밝혀내지 못했다(데이터는 기재하지 않음).

[0215] 두 번째 연구로, 위에서 기재한 바와 같이 마우스에 유사하게 Colo205-luc 종양 세포를 주사하였고, 5B1 또는 7E3 항체의 용량을 증가시키면서 치료하였다(100 $\mu$ g, 300 $\mu$ g 또는 1mg). 모든 동물들은 먼저 종양 세포 투여 후 4일에, 이어서 처음 2주 동안은 주당 2회, 다음 7일 동안은 주당 1회로 5B1 또는 7E3 항체를 복강내 투여하거나 PBS를 모의주사(대조용)하였다. 다양한 용량의 5B1을 사용한 지연 치료는 Colo205-luc 종양 세포가 이식된 SCID 마우스에서의 완전 치유까지 용량 의존 보호를 나타냈다(도 16 및 17). 7E3 항체를 사용한 치료는 명백히 증가된 친화도에도 불구하고 보다 높은 보호는 나타내지 않았다(데이터는 기재하지 않음).

[0216] DMS-79 세포를 사용한 이중이식 모델의 경우, 그룹당 5마리의 마우스에 0일에  $1 \times 10^6$  개의 세포를 피하 주사하였고, 종양 길이가 5mm(~ 20mm)에 도달한 후 19일에 치료를 시작했다. 이어서, 동물들을 사람 IgG 또는 5B1 항체를 복강내 주사로 용량당 200 $\mu$ g으로 치료하고, 또한 cRGD를 초기에 80 $\mu$ g으로, 그다음 주당 5일로 37일까지 용량당 40 $\mu$ g으로 정맥내 주사하여 치료하였다. 확립된 DMS-79 종양의 성장이 5B1 또는 5B1+cRGD의 조합으로 치료된 동물에서 억제되거나 퇴보하였다(도 18a 및 18b). 피하 모델에서 DMS-79 세포가 이식된 날에 5B1을 사용한 동물의 치료는 종양 성장을 완전히 예방하였다(데이터는 기재하지 않음).

[0217] 위의 데이터는 확립된 종양을 억제하거나 퇴보시키는 뚜렷한 능력을 입증하며 5B1 항체 치료를 사용한 생존 이점을 제공한다.

[0219] 실시예 II

[0220] 방사능표지된 단클론 항체 5B1을 사용한 췌장암 및 기타 sLe<sup>a</sup> 양성 샘암종의 면역 PET 검출 및 진단

[0221] 샘암종은 암으로 인한 주된 사망 원인이다. 췌장의 검출은 특히 종종 말기 단계에서 이루어지는 진단으로는 여전히 어렵다. 원발성 및 전이성 췌장암의 조기 검출에 대한 접근법은 상당한 임상적 영향이 있을 수 있다. 임상적 관행으로, 췌장암을 갖는 환자에서의 의심되는 잠재 악성종양을 확인하기 위해 sLe<sup>a</sup> 항원의 상승된 수준이 모니터링된다. 본원에 기재한 바와 같이, 췌장암 및 기타 sLe<sup>a</sup> 양성 샘암종의 전임상 모델에서 sLe<sup>a</sup>를 표적화하는 새로운 면역 PET 영상 프로브의 가능성을 조사하였다. 사람 항-sLe<sup>a</sup> 단클론 항체 5B1은 sLe<sup>a</sup> 양성인 것으로 알려진 사람 샘암종 염색에 양성을 나타냈으나, sLe<sup>a</sup> 음성 악성종양 또는 대부분의 정상 조직에 대해서는 아니었다.<sup>89</sup>Zr 방사능표지된 5B1(<sup>89</sup>Zr-5B1)은 높은 표지화(> 80%) 및 정제 수율(> 95%)을 나타냈다. <sup>89</sup>Zr-5B1을 사용한 영상을 암컷 SCID 마우스에서의 피하, 정위 및 전이성 췌장암 이중이식에서 조사하였다. 수득한 PET 영상 및 생물

분류 연구는 건강한 조직에 대해 최소의 비특이적 결합을 갖는 BxPC3 이중이식을 과발현하는 sLe<sup>a</sup>에 대한 <sup>89</sup>Zr-5B1의 예외적 특이성 및 국소화를 나타냈다. 결장암 및 소세포 폐암 피하 이중이식 모델에서의 추가 분석은 <sup>89</sup>Zr-5B1에 의한 우수한 종양 윤곽을 제공한다. 따라서, 이들 결과는 <sup>89</sup>Zr-5B1이 임상적으로 sLe<sup>a</sup> 발현 악성종양의 조기 검출에 대한 분자 프로브로서 사용될 수 있음을 나타낸다.

[0223] 세포주 및 조직 배양액

[0224] 모든 조직 배양액 조작을 다음 무균 기술에 따라 수행하였다. 소세포 폐암 DMS-79 및 BxPC3 췌장암 세포를 ATCC(American Type Culture Collection, Manassas, VA)에서 입수하였다. Colo250-luc 결장직장암 세포(Bioware Ultra)를 칼리퍼 라이프 사이언시즈(Caliper Life Sciences; CLS, Hopkinton, MA)로부터 구입하였다. 모든 세포를 ATCC 및 CLS의 제안에 따라 37°C하에 5% CO<sub>2</sub> 가습 대기를 사용하여 성장시켰다.

[0226] FACS를 통한 sLe<sup>a</sup> 발현 수준의 시험관내 평가

[0227] 제시된 배양된 암세포주를 사용한 유동 세포 분석법을 본원의 실시예 I에 기재된 대로 수행하였다. 간단히 말하면, 튜브당 1×10<sup>6</sup>개의 배양 종양 세포의 단일 세포 현탁액을 3% 소 혈청 태아(FBS)를 함유하는 PBS 중에서 세척하였다. 이어서, 사람 단클론 항체 r5B1(sLe<sup>a</sup>에 대항하는 IgG)을 튜브당 20μg/ml으로 첨가하였고, 얼음에서 30분 동안 인큐베이팅하였다. 3% FBS를 함유하는 PBS 중에서 세척한 후, 플루오레세인-이소티오시아네이트로 표지된 1:25 희석된 염소 항-사람 IgG(FITC, Southern Biotechnology, Birmingham, AL) 20μl를 첨가하였고, 혼합물을 얼음에서 추가로 30분 동안 인큐베이팅하였다. 최종 세척 후, 염색된 세포의 양성군 및 중간 형광 강도를 FACS Scan(Becton & Dickinson, San Jose, CA)을 사용하여 차별화하였다. 플루오레세인-이소티오시아네이트로 표지된 염소 항-사람 IgG로만 염색된 세포를, 원발성 mAb로 염색된 양성 세포%에 대한 비교를 위한 백그라운드로서 FACS Scan 결과를 1%로 세팅하기 위해 사용하였다.

[0228] <sup>89</sup>Zr 표지된 항체의 제조

[0229] 제조합 5B1 항체를 본원에 기재된 대로 제조하였고 정제하였다. 5B1 항체 및 비특이적 사람 IgG를 p-이소티오시아네이트벤질-테스페리옥사민(DFO-Bz-NCS, Macrocylics, Inc., Dallas, TX)으로 1:4의 mAb:DFO-Bz-NCS 비율로 관능화하였다. 예를 들어, 5B1(PBS 중 1.23mg, pH ~9) 300μL까지 DFO-Bz-NCS(DMSO 중 4.25mM) 7.2μL의 용적을 첨가하였다. 반응을 37°C에서 1 내지 1.5h 동안 인큐베이팅하였다. 관능화된 항체를 PD10 탈염 컬럼(GE Healthcare) 또는 10kDA 원심분리 필터(Amicon)를 통해 정제하였다.

[0230] 이트륨 호일의 양성자 빔 충격을 통해 Zr-89를 생성하였고 이전에 확립된 방법에 따라 MSKCC에서 Zr-89 옥살레이트로서 고순도로 분리하였다(Holland et al., *Nuclear Medicine and Biology* 36:729-39 (2009)). 항체의 표지화는 "Holland et al., *Journal of Nuclear Medicine official publication, Society of Nuclear Medicine* 51:1293-300 (2010)"에 기재된 방법을 통해 진행시켰다. 일반적으로, Zr-89 옥살레이트를 1M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>를 사용하여 pH 7.0 내지 7.2로 중화시켰다. 이어서, DFO-항체를 첨가하였다. 반응을 실온에서 1 내지 2시간 동안 인큐베이팅하였다. 후속 정제를 0.9% 염수를 사용한 PD10 탈염 컬럼을 사용하여 수행하였다.

[0232] 시험관내 실험

[0233] <sup>89</sup>Zr-5B1을 0.9% 염수 및 1% 소 혈청 알부민 내에서 5일 동안 37°C에서 시험관내 안정성에 대해 조사하였다. 방사능화학 순도의 변화를 이동상으로서 50mM DTPA를 사용한 radio iTLC를 통해 t=0 내지 5일에서 모니터링하였다. Zr-89 방사능표지된 항체의 완전성을 입증하기 위해 "Lindmo et al., *Journal of Immunological Methods* 72:77-89 (1984))"에 기재된 프로토콜에 따라 시험관내 면역반응성 분석을 수행하였다.

[0235] 동물 모델

[0236] 모든 동물 연구는 동물실험윤리위원회(Institutional Animal Care and Use Committee)가 정한 가이드라인에 따라 수행하였다. 암컷 CB17SC-F SCID 마우스(Jackson Laboratories, 6 내지 8주령, 20 내지 22g) 또는 누드 마우스(nu/nu)의 뒷다리에 종양을 도입하였다. 모든 세포주에 1:1의 매질:Matrigel(BD Biosciences) 용액 200μL를 피하 접종하였고 사용 전 250mm<sup>2</sup>의 최대 종양 부피로 성장시켰다.



- [0238] 생물분류 연구
- [0239] 생물분류 연구는 별개의 Colo205-luc 결장직장, BxPC3 췌장 및 DMS-79 소세포 폐 이종이식(n=3-5)을 갖는 마우스의 몇몇 코호트로 수행하였다. 0.9% 염수 100  $\mu$ L 중 Zr-89 mAb(10 내지 20  $\mu$ Ci, 1 내지 2 $\mu$ g)를 측면 정맥에 정맥내 투여하였다. 추가의 비표지된 mAb(10 내지 50 $\mu$ g)를 추적자와 함께 공동 주사하였다. 마우스 코호트에서의 sLe<sup>a</sup>에 대한 항체의 특이성을 다루기 위해 250 $\mu$ g의 과다한 비표지된 mAb를 사용한 블로킹 연구를 수행하였다. 각각의 시점 후에(t=24, 48, 120h p.i.), 마우스를 CO<sub>2</sub>로 질식사시켜 안락사시켰다. 선택된 기관과 함께 중량을 채취하면서 심장천자를 통해 혈액을 즉시 수집하였다. 각각의 조직의 습윤 중량을 측정하였고, 각각의 기관의 방사능을 Wizard<sup>2</sup> 2480 감마 계수기(Perkin Elmer)를 사용하여 계수하였다. 그램당 주입된 용량(%ID/g)로 표시되는 추적자 흡수의 백분율로서 계수 시간으로 붕괴 보정된 실제 주사된 용량당 기관 중량당 조직의 활성으로서 계산하였다.
- [0241] 소동물 면역-PET
- [0242] 영상화 실험을 마이크로PET Focus 120 또는 R4 스캐너(Concorde Microsystems)로 완수하였다. 마우스(n=3 내지 5)에 Zr-89 표지된 항체(200 내지 300  $\mu$ Ci, 15 내지 25 $\mu$ g)를 측면 꼬리 정맥 주사를 통해 0.9% 염수 제제 100 내지 200  $\mu$ L로 투여하였다. PET 전신 수집물을, 산소 중 1.5 내지 2.0% 이소플루오란(Baxter Healthcare)으로 마취하면서 24 내지 96h p.i.에서 마우스에 대해 기록하였다. ASIPro VM<sup>TM</sup> 소프트웨어(Concorde Microsystems)를 사용하여 영상을 분석하였다. 관심영역(ROI)을 표시하고 시간에 대해 플로팅하였다.
- [0244] 면역조직화학
- [0246] 20배 물 과잉의 Sulfo-NHS-LC-바이오티ن(Thermo Scientific/Pierce cat# 21327)을 30분 동안 실온에서 인큐베이션하여 바이오티닐화 5B1을 제조하였다. 유리 바이오티닐을 제조자의 지시에 따라 Zebra<sup>TM</sup> 탈염 스핀 컬럼(Thermo Scientific/Pierce, cat# 89889)으로 제거하였다. 항체를 1.1mg/ml 농도의 0.01% 나트륨 아지드 함유 PBS로 완충 교환시켰다. DMA-79 세포에 대한 결합은 FACS로 확인하였고 모(parent) 5B1 항체에 필적했다.
- [0247] 예비 면역조직화학 염색 조건을 양성 대조군으로서 Colo250 세포를 사용하고 음성 대조군으로서 SK-MEL28 세포를 사용하여 결정하였다. 세포 펠렛을 준비하고, 포르말린 고정시키고, 파라핀을 봉입하였다. 슬라이드를 PBS 중 10%(v/v) 정상 사람 혈청으로 희석된 바이오티닐화 5B1(Jackson ImmunoResearch Labs; cat# 009-000-121)과 함께 인큐베이션하였다. 염색 방법으로서 표준 스트렙타비딘-바이오티닌 면역과산화효소법 및 DAB 검출 시스템을 사용하여 벤타나(Ventana) 자동화기(Discovery XT platform-Ventana Medical Systems, Inc, Tucson, AZ)로 염색을 수행하였다. 열 및 벤타나(Ventana)의 CCI 컨디셔닝 용액을 사용하여 항원 회수를 수행하였다. 시그넷(Signet)(Covance)으로부터의 CA 19.9 마우스 단클론(클론 116-NS-19-9)은 파일럿 연구에 비교될만한 결과를 제공했다. Colo205 세포는 10 $\mu$ g/ml로 사용된 바이오티닐화 5B1에 강한 양성인 반면, SK-MEL28 세포는 완전히 음성이었다. Histo-Array<sup>TM</sup> 조직 마이크로아레이를 임제넥스(Imgenex, San Diego, CA)로부터 구입하였다. 종양 생검 코어 뿐만 아니라 몇몇 정상 조직을 함유하는 다음의 슬라이드들을 사용하였다: IMH-327(통상의 암, 59개의 샘플), IMH-359(결장직장: 암-전이-정상; 59개의 샘플) 및 IMH-324(난소로의 전이성 암). 췌장 종양 조직 코어가 IMH-327에 존재하였다.
- [0249] 생체내 sLe<sup>a</sup> 혈청 농도
- [0250] sLe<sup>a</sup> 항원 분석을 위해 Colo205, BxPC3 및 DMS-79의 이종이식을 갖는 마우스에서 채혈하였다. 종양이 없는 마우스 그룹을 대조군으로서 제공하였다. 마우스 혈청 중 sLe<sup>a</sup> 수준을 ST AIA-PACK CA19.9 키트(Cat# 025271, TOSOH Bioscience Inc, South San Francisco, CA)를 사용하여 측정하였다. 이 분석의 원리는 2개의 부위 면역효소 측정 분석을 기초로 한다. 제조자의 지시 매뉴얼에 기재된 대로 분석을 수행하였다. 면역분석 플레이트의 광학 밀도를 TOSOH AIA2000 자동 면역분석 분석기(Automated immunoassay analyzer)(TOSOH Bioscience, Inc, San Francisco, CA)로 측정하였다.
- [0252] 통계적 분석
- [0253] 데이터 값을, 달리 언급된 것이 없는 한, 평균 $\pm$ SD로 표시하였다. 일원 ANOVA를 사용한 GraphPad Prism 버전 5.03 소프트웨어와 후속 던넬트(Dunnett) 시험을 사용하여 통계적 분석을 수행하였다. 0.05 미만의 p값은 통계적으로 유의한 것으로 여겨진다.

[0255] 결과

[0256] 5B1의 결합 특이성을 선택된 악성 및 정상 조직 마이크로레이를 염색함으로써 조사하였다. 5B1 반응성은 악성 종양 및 가끔은 sLe<sup>a</sup>를 과발현하는 것으로 사전에 알려진 정상 조직으로 제한되었다(도 19 및 표 9). 대부분의 정상 조직은 완전히 음성이었다(표 9). 그에 반해, 강한 양성 염색이 다양한 단계에서 34개의 결장 샘암종 중 21개(62%), 57개의 난소로의 샘암종 전이 중 33개(58%) 및 9개의 췌장관 암 중 7개(66%)에서 발견되었다(표 10). 도 19에 나타낸 바와 같이, 통상의 반응성은 세포막의 뚜렷한 염색을 선명히 보이는 몇몇 종양 세포의 세포질 염색을 확산시켰다. 추가로, 몇몇 반지세포 난소암, 및 폐 및 유방의 몇몇 암이 또한 강한 양성인 것으로 밝혀졌다. 그에 반해, 43개의 전립선암 샘플 중 4개만이, 51개의 GIST 경우에는 0개가 양성이었다(데이터는 기재하지 않음).

[0257] 표 9

5B1의 정상 조직으로의 결합에 대한 조사

정상 조직	염색
뇌	음성
유방	양성
결장	양성
신장	음성
간	음성
폐	음성
림프절	음성
근육	음성
췌장	양성
태반	음성
피부	음성
비장	음성
위	음성

[0258]

[0260] 표 10

5B1을 사용한 췌장관 샘암종의 염색

IHC 5B1	단계	연령	성별	조직학
음성	II	71	M	중간 정도의 분화
양성++	III	68	M	중간 정도의 분화
음성	III	64	F	중간 정도의 분화
양성++	III	46	M	중간 정도의 분화
양성++	III	54	M	중간 정도의 분화
양성++	III	40	M	중간 정도의 분화
양성+/-	IVA	66	M	중간 정도의 분화
양성++	IVA	45	M	중간 정도의 분화
불량 조직	IVA	64	F	중간 정도의 분화
양성++	IVA	69	M	불량한 분화

[0261]

[0263] sLe<sup>a</sup>를 발현하는 암 조직에 대한 5B1 면역염색의 높은 특이성은 PET 프로브로서 이 mAb를 사용하기 위한 기초이다. 테스페리옥사민의 벤질-이소티오시아네이트 유사체(DFO-Bz-NCS)를 사용하여 5B1을 4:1(킬레이트:mAb)의 비율로 개질시키고 후속적으로 세척 완충액으로서 염수를 사용하여 원심분리 여과로 정제하였다. Zr-89를 사용하여 쉽게 방사능표지를 실온에서 진행시킨 후 pH를 7.0 내지 7.2로 조절하였다. 중성에 가까운 좁은 pH 범위가 80%를 초과하는 최적의 방사능표지 수율을 수득하는데 필요하다. 유리된, 결합되지 않은 Zr-89를 PD 10 탈염 컬럼을 통해 제거하였다. 생성물을 원심분리 여과기를 사용하여 농축시켰다(MWCO: 10kDa). 12.1±1.1mCi/mg의 비교적 높은 특이적 활성이 확인되었다. 95%를 넘는 방사화학 순도가 사용 전에 확인되었다. 면역반응성 분석은 sLe<sup>a</sup>에 대한 활성 유지를 나타냈다(72.4±1.1%, n=3). 5일에 걸쳐 37℃의 소 혈청 알부민내 안정성이 95%를 초과하여 유지되었다(데이터는 기재하지 않음). 염수 중, 탈금속화가 일찌기 24h(85% 초과 복합체화됨)에 관측되었고 37℃에서 120h 후 약 75% 초과 결합된 방사금속이 관측되었다.

[0264] 왼쪽 뒷다리에 BxPC3 췌장암 이종이식이 피하 이식된 암컷 SCID 마우스를 사용하여 소동물 PET 영상화 및 생물

분류 연구를 수행하였다. 수득된 PET 영상으로  $^{89}\text{Zr}$ -5B1에 의한 종양 결합된  $\text{sLe}^a$ 의 실질적 윤곽을 확인했다. 도 20의 최대 강도 투사(MIP)로부터, BxPC3 이종이식(n=3)은 정맥내 투여된 방사성추적자의 예외적 유착을 나타냈다. PET 영상으로부터 종양에 표시된 관심 영역(ROI)은  $5.0 \pm 0.4\% \text{ID/g}(2\text{h})$ ,  $16.2 \pm 2.5\% \text{ID/g}(24\text{h})$ ,  $23.8 \pm 4.7\% \text{ID/g}(48\text{h})$ ,  $36.8 \pm 6.1\% \text{ID/g}(96\text{h})$  및  $49.5 \pm 7.7\% \text{ID/g}(120\text{h})$ 의 흡수를 나타냈다. 혈액 풀과 정상 조직 결합 형성은 24h p.i. 후 없어지는 것으로 나타났다. 생물분류 실험으로부터의 결과는 PET 결과와 일치한다. 24h( $84.7 \pm 12.3\% \text{ID/g}$ , n=4)에서  $^{89}\text{Zr}$ -5B1에 의한 높은 종양 국소화가 관찰되었고; 증가된 흡수가 120h p.i.( $114 \pm 23.1\% \text{ID/g}$ , n=4)에서 추가로 나타났다(도 21). 종양 흡수는 작은 중량( $62.4 \pm 0.03\text{mg}$ )으로 인해 100%를 초과한다. 24h p.i.에서의 %ID는 유사한 시점에서의 비특이적 IgG에 비해 10배 더 높은 것으로 밝혀졌다(도 21 삽화). 24h p.i.에서 비-방사능표지된 5B1 250 $\mu\text{g}$ 을 사용한 경쟁적 역제는 흡수의 특이성을 정의하는 추적자 축적을 차단하였다. 정상 채장 및 채취한 나머지 정상 조직에 대한  $^{89}\text{Zr}$ -5B1의 최소 결합이 관찰되었고, 이는 모든 시점에서 높은 종양-대-조직 대비를 제공하였다.

[0265] 위의 결과에 따라,  $^{89}\text{Zr}$ -5B1을 정위 BxPC3 채장 종양 모델에서 분석하였다. 정위 모델은 임상적으로 적절하고 PET 프로브 효능의 임상적으로 허용되는 시험을 제공한다. 채장에 접종한 후, 종양 성장을 생물발광 광학 영상화를 통해 매주 모니터링하였다. 종양이 축적되면 PET 영상화 실험을 수행하였다. FDG-PET와  $^{89}\text{Zr}$ -5B1간의 프로브 종양 윤곽 특성을 비교하였다(도 25). PET를 사용한 일련의 컴퓨터 단층촬영은 관심있는 해부 영역의 증대된 가시화를 제공하였다.

[0266] 다른  $\text{sLe}^a$  발현 샘플중에서 PET 프로브로서의  $^{89}\text{Zr}$ -5B1을 평가하기 위해,  $^{89}\text{Zr}$ -5B1을 폐암 및 결장암 모델에서 분석하였다. 암컷 SCID 마우스의 오른쪽 뒷다리에 피하 주사한 DMS-79 소세포 폐암 세포 및 Colo205-luc 결장암 세포를 사용하여 소동물 실험을 수행하였다. PET MIP 영상을 정맥내 주사된 200 내지 300  $\mu\text{Ci}$ (16 내지 25 $\mu\text{g}$ )의 24 내지 120h p.i. 후에 수득하였다. 이질 DMS-79 종양 흡수는 24h p.i.와 같이 일찍 백그라운드에 대한 우수한 시그널로  $38.15 \pm 2.12\% \text{ID/g}$ 으로 나타났다(도 22의 A). 추적자 종양 축적의 증가가 48h p.i.( $44.60 \pm 6.47\% \text{ID/g}$ ) 후에 발생하고 120h p.i.( $41.97 \pm 12.23\% \text{ID/g}$ )에 유지됐다. 비특이적 결합된  $^{89}\text{Zr}$ -5B1은 48h p.i.에 백그라운드 흡수가 최소 내지 없는 정상 조직으로부터 신속히 없어졌다. 또한, 종양 윤곽이 24 내지 120h p.i.에 도 22의 B에 나타난 바와 같이 Colo205-luc 이종이식에서 관찰되었다. ROI는 각각 2h, 24h, 48h, 96h 및 120h에서  $10.5 \pm 0.76$ ,  $23.5 \pm 2.7$ ,  $24.8 \pm 4.0$ ,  $18.4 \pm 4.7$ ,  $16.5 \pm 2.3\% \text{ID/g}$ 로 종양 축적을 나타냈다. 간 축적에서 관찰할 수 있는 증가는 PET 영상에 표시된 관심있는 영역에서 나타난 바와 같이 시간에 걸쳐 종양 흡수의 결과적 감소를 초래하였다(도 22의 C). 생물분류 연구로부터 생성된 데이터는 관찰된 PET 결과와 상당히 연관성이 있다(데이터는 기재하지 않음).

[0267] 종양이 진행되면서 마우스 혈청내의  $\text{sLe}^a$  수준을 정량화하였다. 종양이 없는 마우스 그룹을 대조군으로서 제공하면서 Colo205, DMS-79 및 BxPC3의 이종이식을 갖는 마우스로부터 채혈하였다.  $\text{sLe}^a$  값은 채장 BxPC3 및 DMS-79 이식된 마우스와 비교해 Colo205가 접종된 마우스에서 높은 수준의  $\text{sLe}^a$ 를 보였다(표 11).

[0268] 표 11

대조군과 비교한, 결장직장(Colo205), 췌장(BxPC3) 및 소세포 폐(DMS79) 종양 이중이식을 갖는 마우스로부터의 sLe<sup>a</sup> 혈청값

종양 유형	동물 #	종양 부피, mm <sup>3</sup>	sLe <sup>a</sup> , U/ml
Colo205-luc	M1	269.5	3227
	M2	257.3	2957
	M3	281.3	1318
BxPC3	M1	232.38	N.D.
	M2	320.00	N.D.
	M3	220.50	N.D.
DMS79	M1	288.0	N.D.
	M2	245.0	N.D.
	M3	232.4	N.D.
대조군	M1	-	3
	M2	-	3
	M3	-	3

N.D. = 검출되지 않음.

[0269]

[0270] 이들 결과는 방사능표지된 항-sLe<sup>a</sup> 항체(<sup>89</sup>Zr-5B1)가 췌장 샘암종 및 기타 sLe<sup>a</sup> 양성 샘암종의 검출 및 진단에 특이적임을 나타낸다. <sup>89</sup>Zr-5B1은 높은 특이적 활성 및 보유된 면역반응성과 함께 우수한 수율 및 순도로 생성되었다. 피하, 정위 및 전이성 췌장 종양 모델에서의 <sup>89</sup>Zr-5B1의 평가는 우수한 종양 윤곽 및 진단을 제공하였다. 결장 및 소세포 폐 종양-함유 소동물에서의 이 추적자의 전임상 평가는 이 추적자의 sLe<sup>a</sup> 발현 악성종양에 대한 보편적 유용성을 입증하였다.

[0272] 실시예 III

[0273] 항-sLe<sup>a</sup> 디아바디는 다양한 암세포주에 결합한다

[0274] 각각 5B1CysDb 및 7E3CysDb로 지정된, 본원에 기재된 5B1 및 7E3 클론 분리주의 VH 및 VL 도메인을 사용하여 2개의 디아바디를 제조하였다(도 9 및 10). 양 디아바디를 VH 도메인과 VL 도메인 사이의 5개의 아미노산 링커 부위에 함유시켰다. 정제 및 검출용으로 사용되었던 C-말단 상의 폴리히스티딘 태그가 또한 양 디아바디에 포함되었다.

[0275] 5B1CysDb 및 7E3CysDb의 3개의 암 세포주: (1) DMS-79 세포, 소세포 폐암 현탁 세포주; (2) Capan-2 세포, 췌장 샘암종 세포; 및 (3) BxPC3 세포, 췌장암 세포로의 결합을, 각각 25만개의 세포를 10μg/ml 5B1CysDb 또는 7E3CysDb를 함유하는 0.2ml 내에서 인큐베이팅함으로써 분석하였다. 세포와 디아바디의 배합물을 PBS/2% FBS 중에서 40분 동안 얼음에서 인큐베이팅하였다.

[0276] 세척 후, 세포를 1:1000로 희석된 ALEXA-488-표지된 항-His 항체(Life Technology, Cat# A21215) 0.2ml와 함께 40분 동안 인큐베이팅하였다. 두 번째 세척 후, 세포를 Guava 유동 세포분석기로 분석하였다. 5B1CysDb 및 7E3CysDb 둘 다 DMS-79, Capan-2 및 BxPC3 세포에 대해 유의한 결합을 나타냈다(표 12).



[0277] 표 12

5B1CysDb 및 7E3CysDb의 세포주로의 결합

세포주	5B1CysDb		7E3CysDb	
	% (+)	MFI	% (+)	MFI
DMS-79	98.1	113.0	93.8	124.6
Capan-2	63.8	98.5	65.9	235.3
BxPC3	51.3	39.9	50.2	49.7

MFI - 평균 형광 강도

[0278]

[0280] 실시예 IV

[0281] 5B1 및 탁솔의 투여는 종양 성장을 억제한다

[0282] 항-sLe<sup>a</sup> 항체(5B1)와 화학요법제 탁솔(파클리탁셀)의 공동투여의 항종양 활성을 췌장암 및 소세포 폐암의 이종 이식 모델에서 평가하였다. 본원에 이미 기재한 바와 같이, 백만개의 BxPC3 세포(췌장 종양 세포) 또는 5백만개의 DMS-79 세포(소세포 폐암 세포)를 6주령의 암컷 CB17 SCID 마우스의 뒤쪽 옆구리에 주사하였다(0일; N=5).

[0283] DMS-79 종양을 21일 동안 평균 종양 크기가  $193 \pm 64 \text{mm}^3$ 이 될 때까지 성장시켰다. 사람 IgG 또는 5B1(0.5 또는 1 mg)을 일주일에 두 번(21일에 개시) 복강에 투여하고, 탁솔(0.2mg/용량)을 23일, 30일, 37일 및 44일에 정맥내 투여하였다. DMS-79 이종이식 모델에서, 5B1 항체와 탁솔의 공동투여는 종양 성장을 상당히 제한하였고 대조군 인 사람 IgG 또는 5B1 항체와 탁솔을 따로 투여한 것에 비해 종양 퇴행을 초래했다(도 23).

[0284] BxPC3 이종이식 모델에서, 종양은 14일 동안 성장하였는데, 이때 종양은 평균  $126 \pm 30 \text{mm}^3$ 에 달했다. 탁솔은 14일, 21일 28일 및 34일(매주)에 정맥내 투여하였고 5B1은 14일에 개시하여 주당 2회 투여하였다. 5B1 항체와 탁솔의 공동투여는 대조군 또는 5B1 항체와 탁솔을 따로 투여한 것에 비해 종양 성장을 상당히 제한하였다(도 24). 이들 결과는 췌장암 및 소세포 폐암의 종양 성장 및/또는 종양 크기의 감소에서의 항-sLe<sup>a</sup> 항체와 화학요법제의 상승 효과를 입증한다.

[0285] 본원 전반에 걸쳐 다양한 문헌들이 언급되었다. 이들 문헌의 기재내용은 본 발명이 속하는 분야의 상태를 보다 상세히 기재하기 위해 그 전문이 본원에 참조로 도입된다. 본원을 위의 실시예를 참조로 기재하였지만, 본 발명의 취지에서 벗어나지 않고 다양한 수정이 가능한 것으로 생각해야 한다.

도면

도면1

## 리더

```

M E F G L S W L F L V A I L K E V Q C Q
1 ATGGAGTTTG GGTGAGCTG GCTTTTCTT GTGGCTATTT TAAAAGCGT ACAGTGCCAG
V Q L V E S G G G S V Q P G R S L R L S
61 GTGCAGCTGG TGGAGTCTGG GGGAGGCTCG GTGCAGCCTG GCAGGTCCCT GAGACTCTCC

CDR1
C E A S G F T F E A Y A M H W V R Q P P
121 TGTGAAGCCT CTGGATTCAC CTTTGAGGCC TATGCCATGC ACTGGGTCCG GCAAGCTCCA

CDR2
G K G L E W V S S I N W N S G R I A Y A
181 GGGAGGGCC TGGAGTGGT CTCAAGTATT AATTGGAATA GTGGTCGCAT AGCCTATGCG
D S V K G R F T I S R D N A R N S L Y L
241 GACTCTGTGA AGGGCCGATT CACCATCTCC AGAGACAACG CCAGGAATTC CCTGTATCTG
Q M N S L R L E D T A F Y Y C A K D I R
301 CAAATGAACA GTCTGAGACT TGAGGACACG GCCTTCTATT ACTGTGCAA AGATATACGG

CDR3
R F S T G G A E F E Y W G Q G T L V T V
361 AGGTTTAGTA CCGGGGGGGC GGAGTTTGAG TACTGGGGCC AGGGAACCTT GGTCAACGTC
S S
421 TCCTCA

```

## 서열번호 1(5B1 VH)

```

1 ATGGAGTTTG GGTGAGCTG GCTTTTCTT GTGGCTATTT TAAAAGCGT ACAGTGCCAG
61 GTGCAGCTGG TGGAGTCTGG GGGAGGCTCG GTGCAGCCTG GCAGGTCCCT GAGACTCTCC
121 TGTGAAGCCT CTGGATTCAC CTTTGAGGCC TATGCCATGC ACTGGGTCCG GCAAGCTCCA
181 GGGAGGGCC TGGAGTGGT CTCAAGTATT AATTGGAATA GTGGTCGCAT AGCCTATGCG
241 GACTCTGTGA AGGGCCGATT CACCATCTCC AGAGACAACG CCAGGAATTC CCTGTATCTG
301 CAAATGAACA GTCTGAGACT TGAGGACACG GCCTTCTATT ACTGTGCAA AGATATACGG
361 AGGTTTAGTA CCGGGGGGGC GGAGTTTGAG TACTGGGGCC AGGGAACCTT GGTCAACGTC
421 TCCTCA

```

## 서열번호 2(5B1 VH)

```

1 MEFGLSWFL VAILKGVQCQ VQLVESGGGS VQPGKSLRLS CEASGFTFEA YAMHWVRQPP
61 GKGLEWVSSI NWNSGRIAYA DSVKGRFTIS RDNARNSLYL QMNSLRLEDY AFYYCAKDIR
121 RFSTGGAEFE YWGQGTILVTV SS

```

도면2

리더

```

M A G F P L L L T L L T H C A G S W A Q
1 ATGGCGGGCT TCCCTCTCCT CCTCAGCCCTC CTCACCTCACT GTGCAGGGTC TTGGGCCCCAG
S V L T Q P P S A S G T P G Q R V T I S
61 TCTGTGCTGA CTCAGCCGCC CTCAGCGTCT GGGACCCCGG GGCAGAGGGT CACCATCTCT
CDR1
C S G S S S N I G S N F V Y W Y Q Q L P
121 TGTTCTGGAA GCAGCTCCAA CATCGGAAGT AATTTTGTAT ACTGGTACCA GCAGCTCCCA
CDR2
G T A P K L L I Y R N N Q R P S G V P D
181 GGAACGGCCC CCAAACTCCT CATATATAGG AATAATCAGC GGCCTCAGG GGTCCCTGAC
R F S G S R S G T S A S L A I S G L R S
241 CGATTCTCTG GCTCCAGGTC TGGCACCTCA GCCTCCCTGG CCATCAGTGG ACTCCGGTCC
CDR3
E D E A D Y Y C A A W D D S L G G H Y V
301 GAGGATGAGG CTGATTATTA CTGTGCAGCA TGGGATGACA GCCTGGGAGG CCATTATGTC
F G T G T K V T V L
361 TTCGGAACIS GGACCAAGGT CACCGTCCTT

```

서열번호 3(5B1 VL)

```

1 ATGGCGGGCT TCCCTCTCCT CCTCAGCCCTC CTCACCTCACT GTGCAGGGTC TTGGGCCCCAG
61 TCTGTGCTGA CTCAGCCGCC CTCAGCGTCT GGGACCCCGG GGCAGAGGGT CACCATCTCT
121 TGTTCTGGAA GCAGCTCCAA CATCGGAAGT AATTTTGTAT ACTGGTACCA GCAGCTCCCA
181 GGAACGGCCC CCAAACTCCT CATATATAGG AATAATCAGC GGCCTCAGG GGTCCCTGAC
241 CGATTCTCTG GCTCCAGGTC TGGCACCTCA GCCTCCCTGG CCATCAGTGG ACTCCGGTCC
301 GAGGATGAGG CTGATTATTA CTGTGCAGCA TGGGATGACA GCCTGGGAGG CCATTATGTC
361 TTCGGAACIS GGACCAAGGT CACCGTCCTT

```

서열번호 4(5B1 VL)

```

1 MAGFPLLLTL LTHCAGSWAQ SVLTQPPSAS GTPGQRVTIS CSGSSSNIGS NFVYWYQQLP
61 GTAPKLLIYR NNQRFSGVFD RFSGSRSGTS ASLALSGLRS EDEADYYCAA WDDSLGGHYV
121 FGTGKVTIVL

```

도면3

# 리더

```

M E F G L S W L F L V A I L K G V Q C E
1 ATGGAGTTTG GGCTGAGCTG GCTTTTCTT GTGGCTATT TAAAAGGCGT ACAGTGCAGAA
V Q L L E S G S G L V Q P G R S L R L S
61 GTGCAGCTGT TGGAGTCTGG GGGAGGCTG GTACAGCCTG GCAGGTCCT GAGACTCTCC

CDR1
C A A S G F T F D D Y V M H W V R Q A P
121 TGTGCGGCTT CTGGATTAC CTTTGATGAT TATGTCATGC ACTGGGTCCG GCAAGCTCCA

CDR2
G K G L E W V S S I S W N S G S I G Y A
181 GGGAAAGGCC TGGAGTGGGT CTCAAGTATT AGTTGGAATA GTGGTAGCAT AGGCTATGCG
D S V K G R F I I S R D N A K N S L Y L
241 GACTCTGTGA AGGCGCGATT CATCATCTCC AGAGACAACG CCAAGAACTC CCTGTATCTG
Q M N S L R A E D T A L Y Y C A K D R R
301 CAAATGAACA GTCTGAGAGC TGAGGACACG GCCTTGATT ACTGTGCAA AGATCGTCGT

CDR3
I R G D S G F E G D Y W G Q G T L V T V
361 ATTAGGGGTG ACTCGGGGT CGAGGGTGAC TACTGGGGCC AGGGAACCT GTTACCGTC
S S
421 TCCTCA

```

## 서열번호 5(9H3 VH)

```

1 ATGGAGTTTG GGCTGAGCTG GCTTTTCTT GTGGCTATT TAAAAGGCGT ACAGTGCAGAA
61 GTGCAGCTGT TGGAGTCTGG GGGAGGCTG GTACAGCCTG GCAGGTCCT GAGACTCTCC
121 TGTGCGGCTT CTGGATTAC CTTTGATGAT TATGTCATGC ACTGGGTCCG GCAAGCTCCA
181 GGGAAAGGCC TGGAGTGGGT CTCAAGTATT AGTTGGAATA GTGGTAGCAT AGGCTATGCG
241 GACTCTGTGA AGGCGCGATT CATCATCTCC AGAGACAACG CCAAGAACTC CCTGTATCTG
301 CAAATGAACA GTCTGAGAGC TGAGGACACG GCCTTGATT ACTGTGCAA AGATCGTCGT
361 ATTAGGGGTG ACTCGGGGT CGAGGGTGAC TACTGGGGCC AGGGAACCT GTTACCGTC
421 TCCTCA

```

## 서열번호 6(9H3 VH)

```

1 MEFGLSWFL VAILKGVQCE VQLLESGGGL VQPGRLRLS CAASGFTFDD YVMHWVRQAP
61 GKGLEWVSSI SWNSGSI GYA DSVKGRFII S RDNAKNSLYL QMNSLR AEDT ALYYCAKDRR
121 IRGDSGFEGD YWGQGLVTV SS

```



도면4

리더

```

M A G F P L L L T L L T H C A G S W A Q
1 ATGGCCGGCT TCCCTCTCCT CCTACCCCTC CTCACTCACT GTGCAGGGTC TTGGGCCAG
S V L T Q P P S A S G T P G Q R V T I S
61 TCTGTGTGA CGCAGCCGCC CTCAGGCTCT GGGACCCCG GGCAGAGGT CACCATCTCT

      CDR1
C S G S S S N I G S N Y V Y W Y Q Q L P
121 TGTTCTGGAA GCAGCTCCAA CATCGGAAGT AATTATGAT ACTGGTACCA GCAGCTCCCA

      CDR2
G T A P K L L I Y R N N Q R P S G V P D
181 GGAACGGCC CCAAATCCT CATCTATAGG AATAATCAGC GGCCCTCAGG GGTCCCTGAC
R F S G S K S G T S A S L A I S G L R S
241 CGATTCTCTG GCTCCAAGTC TGGCACCTCA GCCTCCCTGG CCATCASTGG GCTCCGGTCC

      CDR3
E D E A D Y Y C A A W D A S L S G V V F
301 GAGGATGAGG CTGATTATTA CTGTGCAGCA TGGGATGCCA GCCTGAGTGG TGTGGTATTC
G G G T K L T V L
361 GGGGGAGGGA CCAAGCTGAC CGTCCTA

```

서열번호 7(9H3 VL)

```

1 ATGGCCGGCT TCCCTCTCCT CCTACCCCTC CTCACTCACT GTGCAGGGTC TTGGGCCAG
61 TCTGTGTGA CGCAGCCGCC CTCAGGCTCT GGGACCCCG GGCAGAGGT CACCATCTCT
121 TGTTCTGGAA GCAGCTCCAA CATCGGAAGT AATTATGAT ACTGGTACCA GCAGCTCCCA
181 GGAACGGCC CCAAATCCT CATCTATAGG AATAATCAGC GGCCCTCAGG GGTCCCTGAC
241 CGATTCTCTG GCTCCAAGTC TGGCACCTCA GCCTCCCTGG CCATCASTGG GCTCCGGTCC
301 GAGGATGAGG CTGATTATTA CTGTGCAGCA TGGGATGCCA GCCTGAGTGG TGTGGTATTC
361 GGGGGAGGGA CCAAGCTGAC CGTCCTA

```

서열번호 8(9H3 VL)

```

1 MAGFPLLLT LTHCAGSWAQ SVLTQPPSAS GTPGQRVTL CSGLSSNIGS NYVYWYQQLF
61 GTAPKLLIYR NNQRPSSGVFD RPSGSKSGTS ASLAISGLRS EDEADYYCAA WDASISGVVF
121 GGGTKLTVL

```

도면5

**리더**

```

M E F G L S W L F L V A I L K G V Q C Q
1 ATGGAGTTTG GGCTGAGCTG GCTTTTCTTT GTGGCTATTT TAAAAGGCGT ACAGTGCCAG
V Q L L E S G G G L V Q P G R S L R L S
61 GTGCAGCTGT TGGAGTCTGG GGGAGGCTTG GTACAGCCTG GCAGGTCCCT GAGACTCTCC
CDR1
C A A S G F T F D E Y A M H W V R Q A P
121 TGTGCAGCCT CTGGATTCAC CTTTGATGAA TATGCCATGC ACTGGGTCCG GCAAGCTCCA
CDR2
G K G L E W V S S V S W N S G S I G Y A
181 GGGAGGGGCC TGGAGTGGGT CTCAAGTGT AGTTGGAATA GTGGTAGCAT AGGCTATGCG
D S V K G R F T I S R D N A K N S L Y L
241 GACTCTGTGA AGGGCCGATT CACCATCTCC AGAGACAACG CCAAGAACTC CCTGTATCTA
Q M N S L R A E D T A L Y Y C A K D I R
301 CAAATGAACA GTCTGAGAGC TGAGGACACG GCCTTGATT ACTGTGCAA AGATATACGG
CDR3
T Y S T G G A E F A S W G Q G T L V T A
361 ACCTATAGCA CCGGGGGGCG GGAGTTTGCC TCC TGGGGCC AGGGAACCCG GGTACCGGCC
S S
421 TCCCA
  
```

### 서열번호 9(5H11 VH)

```

1 ATGGAGTTTG GGCTGAGCTG GCTTTTCTTT GTGGCTATTT TAAAAGGCGT ACAGTGCCAG
61 GTGCAGCTGT TGGAGTCTGG GGGAGGCTTG GTACAGCCTG GCAGGTCCCT GAGACTCTCC
121 TGTGCAGCCT CTGGATTCAC CTTTGATGAA TATGCCATGC ACTGGGTCCG GCAAGCTCCA
181 GGGAGGGGCC TGGAGTGGGT CTCAAGTGT AGTTGGAATA GTGGTAGCAT AGGCTATGCG
241 GACTCTGTGA AGGGCCGATT CACCATCTCC AGAGACAACG CCAAGAACTC CCTGTATCTA
301 CAAATGAACA GTCTGAGAGC TGAGGACACG GCCTTGATT ACTGTGCAA AGATATACGG
361 ACCTATAGCA CCGGGGGGCG GGAGTTTGCC TCC TGGGGCC AGGGAACCCG GGTACCGGCC
421 TCCCA
  
```

### 서열번호 10(5H11 VH)

```

1 MEEGLSWLFL VAILKGVQCC VQLLESGGGL VQPGKSLRLS CAASGFTFDE YAMHWVRQAP
61 GKGLWVSSV SWNSGSI GYA DSVKGRFTIS RDNAKNSLYL QMNSLRAEDT ALYCAKDIR
121 TYSTGGAEFA SWGQGLVTA SS
  
```

도면6

리더

```

M A G F P L L L T L L T H C A G S W A Q
1 ATGGCGGGCT TCCCTCTCCT CCTCACCTC CTCACCTACT GTGCAGGGTC TTGGGCCAG
S V L T Q P P S A S G T P G Q R V T I S
61 TCTGTGTGA CGCAGCCGCC CTCAGCGTCT GGGACCCCG GGCAGAGGT CACCATCTCT
CDR1
C S G S S S N I G S N Y V Y W Y Q Q V P
121 TGTTCGGAA GCAGCTCCAA CATCGGAAGT AATTATGTAT ACTGGTAGCA GCAGGTCCCA
CDR2
G T A P K L L I Y R N N Q R P S G V P D
181 GGAACGGCC CCAAACTCCT CATCTATAGG AATAATCAGC GGCCTCAGG GGTCCCTGAC
R F S G S K S G T S A S L A I S G L R S
241 CGATTCTCTG GCTCCAAGTC TGGCACCTCA GCCTCCCTGG CCATCAGTGG GTCGGGTCC
CDR3
E D E A D Y Y C A A W D D S L S G H Y V
301 GAGGATGAGG CTGATTATTA CTGTGCAGCA TGGGATGACA GCCTGAGTGG CCATTATGTC
F G T G T K V T V L
361 TTCGGAAC TGACCAAGGT CACCGTCTTA

```

서열번호 11(5H11 VL)

```

1 ATGGCGGGCT TCCCTCTCCT CCTCACCTC CTCACCTACT GTGCAGGGTC TTGGGCCAG
61 TCTGTGTGA CGCAGCCGCC CTCAGCGTCT GGGACCCCG GGCAGAGGT CACCATCTCT
121 TGTTCGGAA GCAGCTCCAA CATCGGAAGT AATTATGTAT ACTGGTAGCA GCAGGTCCCA
181 GGAACGGCC CCAAACTCCT CATCTATAGG AATAATCAGC GGCCTCAGG GGTCCCTGAC
241 CGATTCTCTG GCTCCAAGTC TGGCACCTCA GCCTCCCTGG CCATCAGTGG GTCGGGTCC
301 GAGGATGAGG CTGATTATTA CTGTGCAGCA TGGGATGACA GCCTGAGTGG CCATTATGTC
361 TTCGGAAC TGACCAAGGT CACCGTCTTA

```

서열번호 12(5H11 VL)

```

1 MAGFPLLLHL LTHCAGSWAQ SVLTQPPSAS GTPGQRVTIS CSGSSSNIGS NYVYWYQVVP
61 STAPKLLIYR NNQRFSGVDP RFSGSKSGTS ASLAISGLRS EDEADYYCAA WDDSLSGHYV
121 FGTGTRKVFVL

```

도면7

## 리더

```

      M E F G L S W L F L V A I L K G V Q C Q
1  ATGGAGTTTG GGTGAGCTG GCTTTTCTT GTGGCTATT TAAAGGCGT ACAGTGCCAA
   V Q L L E S G G G V V Q P G R S L R L S
61 GTGCAGCTGT TGGAGTCTGG GGGAGGCGTG GTCCAGCCTG GGAGGTCCCT GAGACTCTCC

      CDR1
      C A A S G F T F S F Y G M H W V R Q A P
121 TGTGCAGCCT CTGGATTAC CTCAGTTTC TATGGCATGC ACTGGGTCCG CCAGGCTCCA

      CDR2
      G K G L E W V A A I S Y D G S N K Y Y A
181 GGCAAGGGGC TGGAGTGGGT GGCAGCTATA TCATATGATG GAAGTAATAA ATACTATGCA
   D S V K G R F T I S R D N S K N T L Y L
241 GACTCCGTGA AGGGCCGATT CACCATCTCC AGAGACAATT CCAAGAACAC GCTGTATCTG
   Q M N S L R A E D T A V Y Y C A K R P N
301 CAAATGAACA GCTGAGAGC TGAGGACACG GCTGTGTATT ACTGTGCGAA AAGGCCCAAC

      CDR3
      Q F Y C S D G R C Y S I D Y W G Q G T L
361 CAATTTTATT GTAGTGATGG TAGATGCTAC TCCATTGACT ACTGGGGCCA GGAACCCCTG
   V T V S S
421 GTCACCGTCT CCTCA
  
```

## 서열번호 13(7E3 VH)

```

1  ATGGAGTTTG GGTGAGCTG GCTTTTCTT GTGGCTATT TAAAGGCGT ACAGTGCCAA
61 GTGCAGCTGT TGGAGTCTGG GGGAGGCGTG GTCCAGCCTG GGAGGTCCCT GAGACTCTCC
121 TGTGCAGCCT CTGGATTAC CTCAGTTTC TATGGCATGC ACTGGGTCCG CCAGGCTCCA
181 GGCAAGGGGC TGGAGTGGGT GGCAGCTATA TCATATGATG GAAGTAATAA ATACTATGCA
241 GACTCCGTGA AGGGCCGATT CACCATCTCC AGAGACAATT CCAAGAACAC GCTGTATCTG
301 CAAATGAACA GCTGAGAGC TGAGGACACG GCTGTGTATT ACTGTGCGAA AAGGCCCAAC
361 CAATTTTATT GTAGTGATGG TAGATGCTAC TCCATTGACT ACTGGGGCCA GGAACCCCTG
421 GTCACCGTCT CCTCA
  
```

## 서열번호 14(7E3 VH)

```

1  MEEGLSNLPL VAILKGVQQQ VQLLESGGGV VQPGRSRLRLS CAASGRTFSF YGMHWVRQAP
61 GKGLSNVAAI SYDGSNKYYA DSVKGRFTLS RDNSKNFLYL QMNSLRAEDT AVYYCAKRPN
121 QFYCSDGRCY SIDYWGQGL VTVSS
  
```



도면8

**리더**

	<u>M D M R V P A Q L L G L L L L W L R G A</u>
1	<u>ATGGACATGA GGGTCCCCGC TCAGCTCCTG GGGCTCCTGC TACTCTGGCT CCGAGGTGCC</u>
	<u>R C E I V M T Q S P A T L S V S P G E R</u>
61	<u>CGGTGTGAAA TTGTAATGAC GCAGTCTCCA GCCACCCGTG CTGTGTCTCC AGGGGAGAGA</u>
	<b>CDR1</b>
	<u>A T L S C R A S Q S V S S N L A W Y Q Q</u>
121	<u>GCCACCTCT CCTGCAGGCG CAGTCAGAGT GTTAGCAGCA ACCTAGCCTG GTACCAGCAG</u>
	<b>CDR2</b>
	<u>K P G Q A P R L L I Y G A S T R A T G I</u>
181	<u>AAACCTGGCC AGGCTCCAG GCTCCTCATC TATGGTGCAT CCACCAGGGC CACTGGTATC</u>
	<u>P A R F S G S G S G T D F T L T I S S L</u>
241	<u>CCAGCCAGGT TCAGTGGCAG TGGGTCTGGG ACAGACTTCA CTCTCACCAT CAGCAGCCTG</u>
	<b>CDR3</b>
	<u>Q S V D S A V Y Y C Q Q Y N N W P P Y T</u>
301	<u>CAGTCTGTAG ATTCTGCAGT TTATTACTGT CAGCAGTATA ATAAGTGGCC TCCGTACACT</u>
	<u>F G Q G T K L E I K</u>
361	<u>TTTGGCCAGG GGACCAAGCT GGAGATCAAA</u>

**서열번호 15(7E3 VK)**

1	<u>ATGGACATGA GGGTCCCCGC TCAGCTCCTG GGGCTCCTGC TACTCTGGCT CCGAGGTGCC</u>
61	<u>CGGTGTGAAA TTGTAATGAC GCAGTCTCCA GCCACCCGTG CTGTGTCTCC AGGGGAGAGA</u>
121	<u>GCCACCTCT CCTGCAGGCG CAGTCAGAGT GTTAGCAGCA ACCTAGCCTG GTACCAGCAG</u>
181	<u>AAACCTGGCC AGGCTCCAG GCTCCTCATC TATGGTGCAT CCACCAGGGC CACTGGTATC</u>
241	<u>CCAGCCAGGT TCAGTGGCAG TGGGTCTGGG ACAGACTTCA CTCTCACCAT CAGCAGCCTG</u>
301	<u>CAGTCTGTAG ATTCTGCAGT TTATTACTGT CAGCAGTATA ATAAGTGGCC TCCGTACACT</u>
361	<u>TTTGGCCAGG GGACCAAGCT GGAGATCAAA</u>

**서열번호 16(7E3 VK)**

1	<u>MDMRVPAQLL GLLLLWLRGA RCEIVMTQSP ATLSVSPGER ATLSCPASQS VSSNLAWYQQ</u>
61	<u>KPGQAPRLLI YGASFRATGI PARFSGSGSG TDFTLTISL QSVDSAVYYC QQYNNWPPYT</u>
121	<u>FGQGTEKLEIK</u>

도면9

```

1   Q S V L T Q P P S A S G T P G Q R V T I
   CAGTCTGTGC TGACGCAGCC GCCCTCAGCG TCTGGGACCC CCGGGCAGAG GGTCAACATC
           VL CDR1
61  S C S G S S S N I G S N F V Y W Y Q Q L
   TCTTGTTCCTG GAAGCAGCTC CAACATCGGA AGTAATTTTG TATACTGGTA CCAGCAGCTC
           VL CDR2
121 P G T A P K L L I Y R N N Q R P S G V P
   CCAGGAACGG CCCCCAAACT CCTCATATAT AGGAATAATC AGCGGCCCTC AGGGGTCCCT
181 D R F S G S R S G T S A S L A I S G L R
   GACCGATTCT CTGGCTCCAG GTCTGGCACC TCAGCCTCCC TGGCCATCAG TGGACTCCGG
           VL CDR3
241 S E D E A D Y Y C A A W D D S L G G H Y
   TCCGAGGATG AGGCTGATTA TTACTGTGCA GCATGGGATG ACAGCCTGGG AGGCCATTAT
           Linker
301 V F G T G T K V T V L S G G G Q V Q L
   GTCTTCGGAA CTGGGACCAA GGTCAACGTC CTTTCTGGTG GTGGTGGTCA GGTGCAGCTG
361 V E S G G G S V Q P G R S L R L S C E A
   GTGGAGTCTG GGGGAGGCTC GGTGCAGCCT GGCAGGTCCC TGAGACTCTC CTGTGAAGCC
           VH CDR1
421 S G F T F E A Y A M H W V R Q P P G K G
   TCTGGATTCA CCTTTGAGGC CTATGCCATG CACTGGGTCC GGCAACCTCC AGGGAAGGGC
           VH CDR2
481 L E W V S S I N W N S G R I A Y A D S V
   CTGGAGTGGG TCTCAAGTAT TAATTGGAAT AGTGGTCGCA TAGCCTATGC GGACTCTGTG
541 K G R F T I S R D N A R N S L Y L Q M N
   AAGGCCGAT TCACCATCTC CAGAGACAAC GCCAGGAATT CCCTGTATCT GCAAAATGAAC
           VH CDR3
601 S L R L E D T A F Y Y C A K D I R R F S
   AGTCTGAGAC TTGAGGACAC GGCCTTCTAT TACTGTGCAA AAGATATACG GAGGTTTAGT
661 T G G A E F E Y W G Q G T L V T V S S G
   ACCGGGGGGG CGGAGTTTGA GTACTGGGGC CAGGGAACCC TGGTCACCGT CTCCTCAGGT
           Poly His-Tag
721 S H H H H H H G G C
   TCTCACCATC ACCATCACCA TGGCGGTTGC

```

서열번호 17

```

1   CAGTCTGTGC TGACGCAGCC GCCCTCAGCG TCTGGGACCC CCGGGCAGAG GGTCAACATC
61  TCTTGTTCCTG GAAGCAGCTC CAACATCGGA AGTAATTTTG TATACTGGTA CCAGCAGCTC
121 CCAGGAACGG CCCCCAAACT CCTCATATAT AGGAATAATC AGCGGCCCTC AGGGGTCCCT
181 GACCGATTCT CTGGCTCCAG GTCTGGCACC TCAGCCTCCC TGGCCATCAG TGGACTCCGG
241 TCCGAGGATG AGGCTGATTA TTACTGTGCA GCATGGGATG ACAGCCTGGG AGGCCATTAT
301 GTCTTCGGAA CTGGGACCAA GGTCAACGTC CTTTCTGGTG GTGGTGGTCA GGTGCAGCTG
361 GTGGAGTCTG GGGGAGGCTC GGTGCAGCCT GGCAGGTCCC TGAGACTCTC CTGTGAAGCC
421 TCTGGATTCA CCTTTGAGGC CTATGCCATG CACTGGGTCC GGCAACCTCC AGGGAAGGGC
481 CTGGAGTGGG TCTCAAGTAT TAATTGGAAT AGTGGTCGCA TAGCCTATGC GGACTCTGTG
541 AAGGCCGAT TCACCATCTC CAGAGACAAC GCCAGGAATT CCCTGTATCT GCAAAATGAAC
601 AGTCTGAGAC TTGAGGACAC GGCCTTCTAT TACTGTGCAA AAGATATACG GAGGTTTAGT
661 ACCGGGGGGG CGGAGTTTGA GTACTGGGGC CAGGGAACCC TGGTCACCGT CTCCTCAGGT
721 TCTCACCATC ACCATCACCA TGGCGGTTGC

```

서열번호 18

```

1   QSVLTQPPSA SGTPGQRVTI SCSGSSSNIG SNEVYVYQQL PGTAPKLLIY RNNORPSGVP
61  DRFSGSRSGT SASLAISGLR SEDRDYCYA AWDDSLGCHY VFGTGKVTW LSGGGGQVQL
121 VESGGGSVQP GRSLRLSCEA SGFTFEAYAM HWVRQPPGKG LEWSSINWN SGRIAYADSV
181 KGRFTISRDN ARNSLYLQMN SIRLEDYAFY YCAKDIRRFS TGGAEFEYWG QGTLVTVSSG
241 SHHHHHHGGC

```

도면10

```

1   D V V L T Q S P A T L S V S P G E R A T
   GATGTTGTGC TGACGCAGTC TCCAGCCACC CTGTCTGTGT CTCCAGGGGA GAGAGCCACC
           VL CDR1
61  L S C R A S Q S V S S N L A W Y Q Q K P
   CTCTCCTGCA GGGCCAGTCA GAGTGTTAGC AGCAACTTAG CCTGGTACCA GCAGAAACCT
           VL CDR2
   G Q A P R L L I Y G A S T R A T G I P A
121 GGCCAGGCTC CCAGGCTCCT CATCTATGGT GCATCCACCA GGGCCACTGG TATCCAGGCC
   R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q S
181 AGGTTTCAGTG GCAGTGGGTC TGGGACAGAC TTCACTCTCA CCATCAGCAG CCTGCAGTCT
           VL CDR3
   E D S A V Y Y C Q Q Y N N W P P Y T F G
241 GAAGATTCTG CAGTTTATTA CTGTACGAG TATAATAACT GGCCTCCGTA CACTTTTGGC
           Linker
   Q G T K V D I K S G G G G E V Q L V E S
301 CAGGGGACCA AGGTGGATAT CAAATCTGGT GGTGGTGGTG AAGTGCAGCT GGTGGAGTCT
   G G G V V Q P G R S L R L S C A A S G F
361 GGGGGAGGCG TGGTCCAGCC TGGGAGGTCC CTGAGACTCT CCTGTGCAGC CTCTGGATTC
           VH CDR1
   T F S F Y G M H W V R Q A P G K G L E W
421 ACCTTCAGTT TCTATGGCAT GCACTGGGTC CGCCAGGCTC CAGGCAAGGG GCTGGAGTGG
           VH CDR2
   V A A I S Y D G S N K Y Y A D S V K G R
481 GTGGCAGCTA TATCATATGA TGGAGTAAT AAATACTATG CAGACTCCGT GAAGGGCCGA
   F T I S R D N S K N T L Y L Q M N S L R
541 TTCACCATCT CCAGAGACAA TTCCAAGAAC ACGCTGTATC TGCAAATGAA CAGCCTGAGA
           VH CDR3
   A E D T A V Y Y C A K R P N Q F Y C S D
601 GCTGAGGACA CGGCTGTGTA TTA CTGTGCG AAAAGGCCCA ACCAATTTTA TTGTAGTGAT
   G R C Y S I D Y W G Q G T L V T V S S G
661 GG TAGATGCT ACTCCATTGA CTACTGGGGC CAGGGAACCC TGGTCACCGT CTCCTCAGGT
           Poly His-Tag
   S H H H H H H G G C
721 TCTCACCATC ACCATCACCA TGGCGGTTGC

```

서열번호 19

```

1   GATGTTGTGC TGACGCAGTC TCCAGCCACC CTGTCTGTGT CTCCAGGGGA GAGAGCCACC
61  CTCTCCTGCA GGGCCAGTCA GAGTGTTAGC AGCAACTTAG CCTGGTACCA GCAGAAACCT
121 GGCCAGGCTC CCAGGCTCCT CATCTATGGT GCATCCACCA GGGCCACTGG TATCCAGGCC
181 AGGTTTCAGTG GCAGTGGGTC TGGGACAGAC TTCACTCTCA CCATCAGCAG CCTGCAGTCT
241 GAAGATTCTG CAGTTTATTA CTGTACGAG TATAATAACT GGCCTCCGTA CACTTTTGGC
301 CAGGGGACCA AGGTGGATAT CAAATCTGGT GGTGGTGGTG AAGTGCAGCT GGTGGAGTCT
361 GGGGGAGGCG TGGTCCAGCC TGGGAGGTCC CTGAGACTCT CCTGTGCAGC CTCTGGATTC
421 ACCTTCAGTT TCTATGGCAT GCACTGGGTC CGCCAGGCTC CAGGCAAGGG GCTGGAGTGG
481 GTGGCAGCTA TATCATATGA TGGAGTAAT AAATACTATG CAGACTCCGT GAAGGGCCGA
541 TTCACCATCT CCAGAGACAA TTCCAAGAAC ACGCTGTATC TGCAAATGAA CAGCCTGAGA
601 GCTGAGGACA CGGCTGTGTA TTA CTGTGCG AAAAGGCCCA ACCAATTTTA TTGTAGTGAT
661 GG TAGATGCT ACTCCATTGA CTACTGGGGC CAGGGAACCC TGGTCACCGT CTCCTCAGGT
721 TCTCACCATC ACCATCACCA TGGCGGTTGC

```

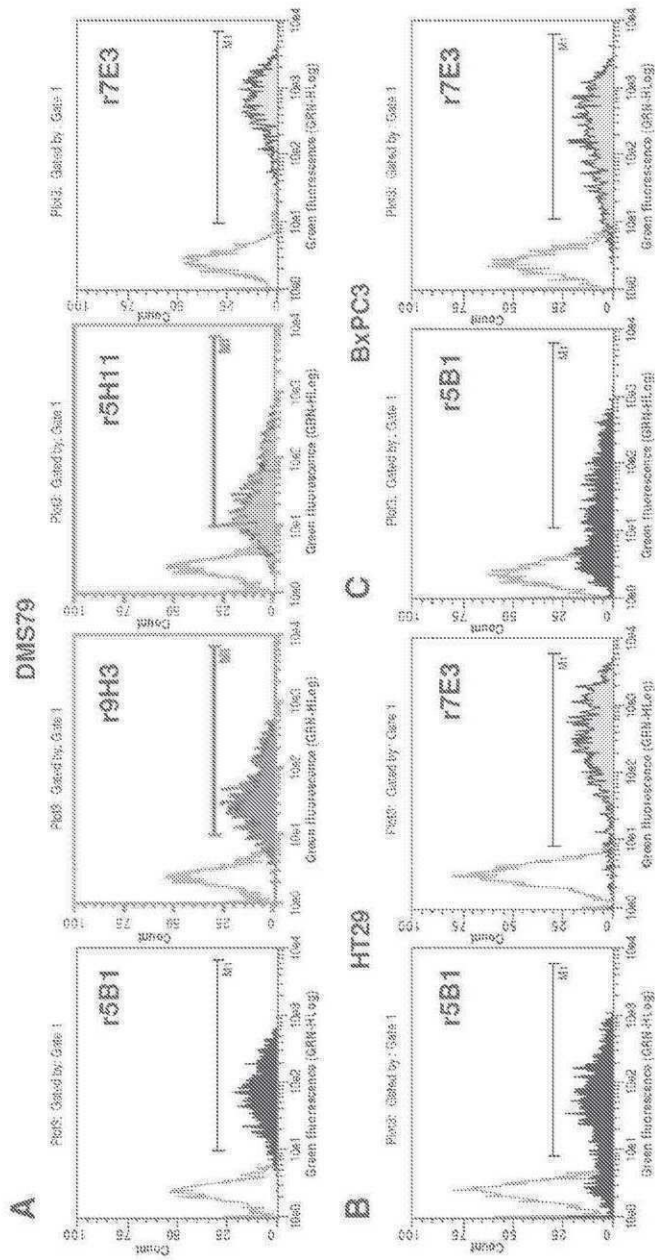
서열번호 20

```

1   DVVLTSQSPAT LSVSPGERAT LSCRASQSVS SNLAWYQOKP QAPRLLIYGA STRATGIPAR
61  FSGSGSGTDF TLTISSLQSE DSAVYYCQQY NNWPPYTFGQ GTRVDIKSGG GGEVQLVESG
121 GGVVQPRSL RLSCASGFT FSYGMMHWVR QAPGKLEWV AAISYDGSNK YYADSVKGRF
181 TISRDN SKNT LYLQMN SLRA EDIAVYYCAK RPNQFYCSDG RCYSIDYWGQ GTLTVSSGS
241 HHHHHHGGC

```

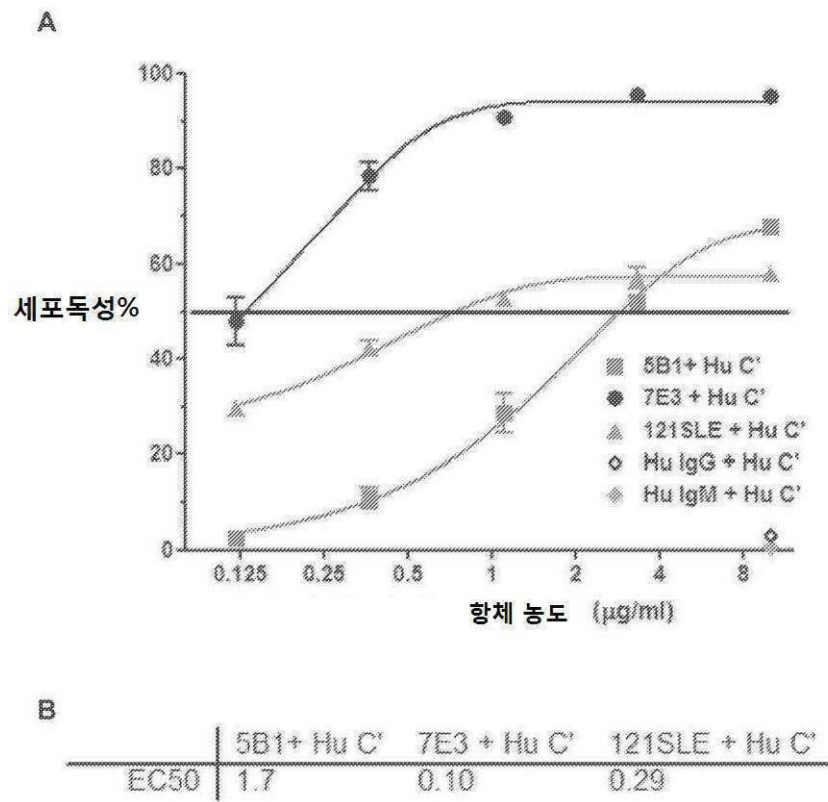
도면11abc



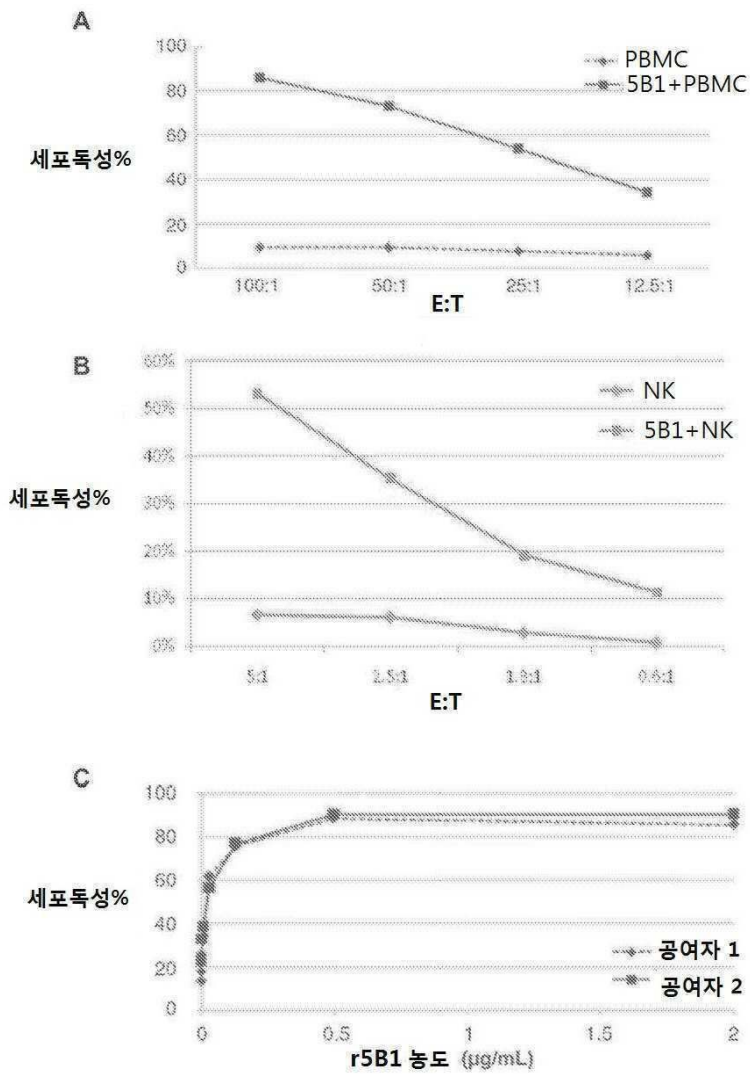




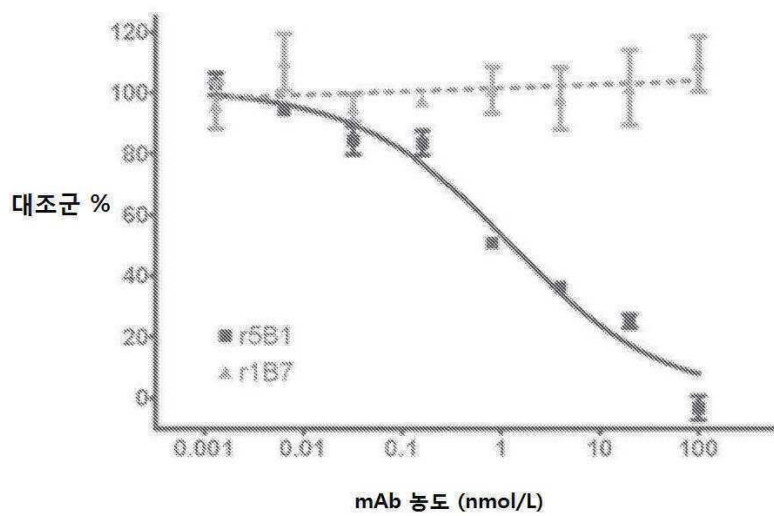
도면12



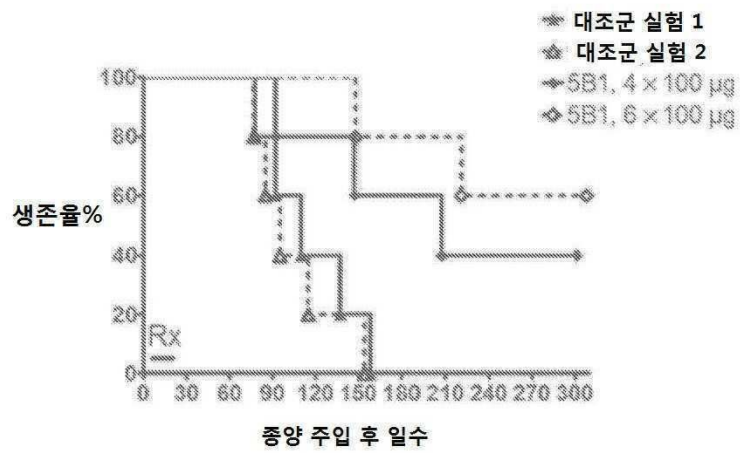
도면13



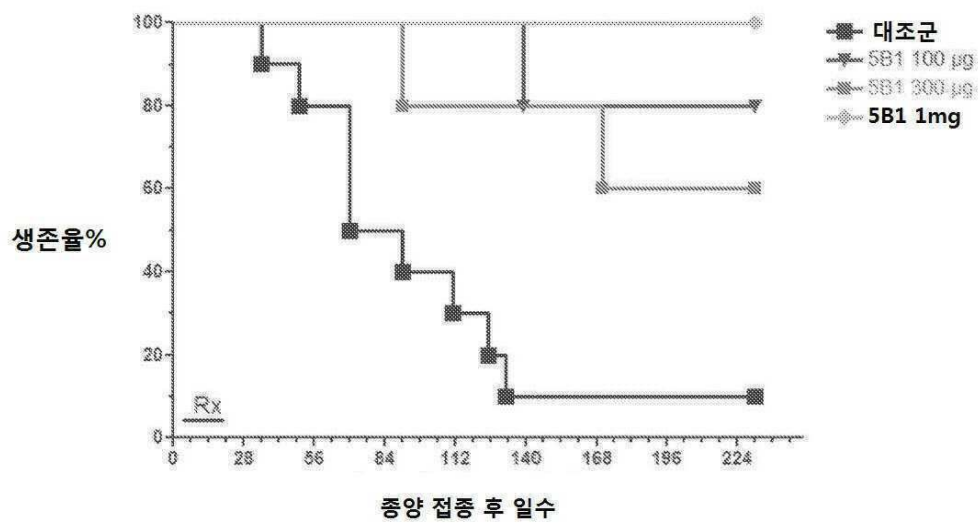
도면14



도면15

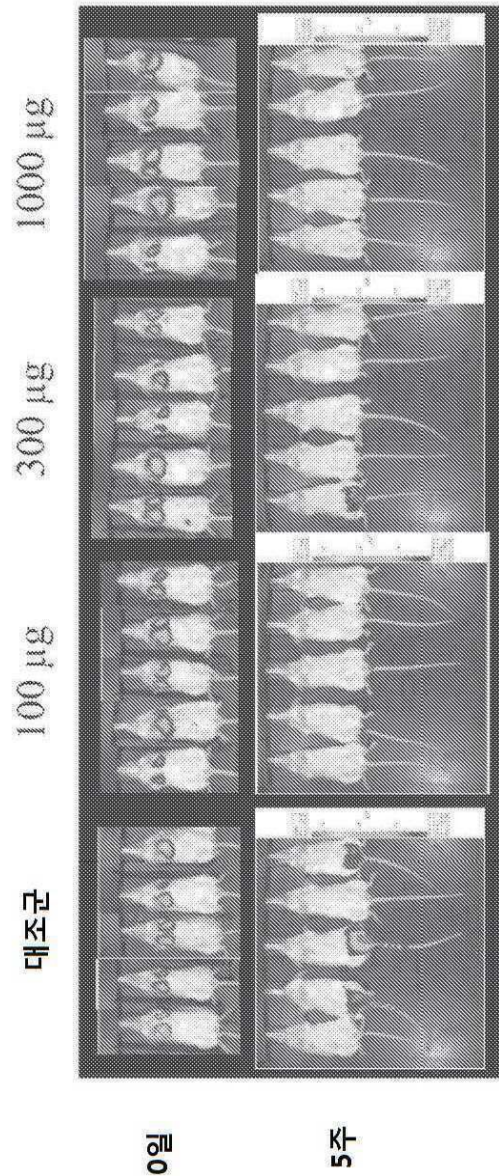


도면16

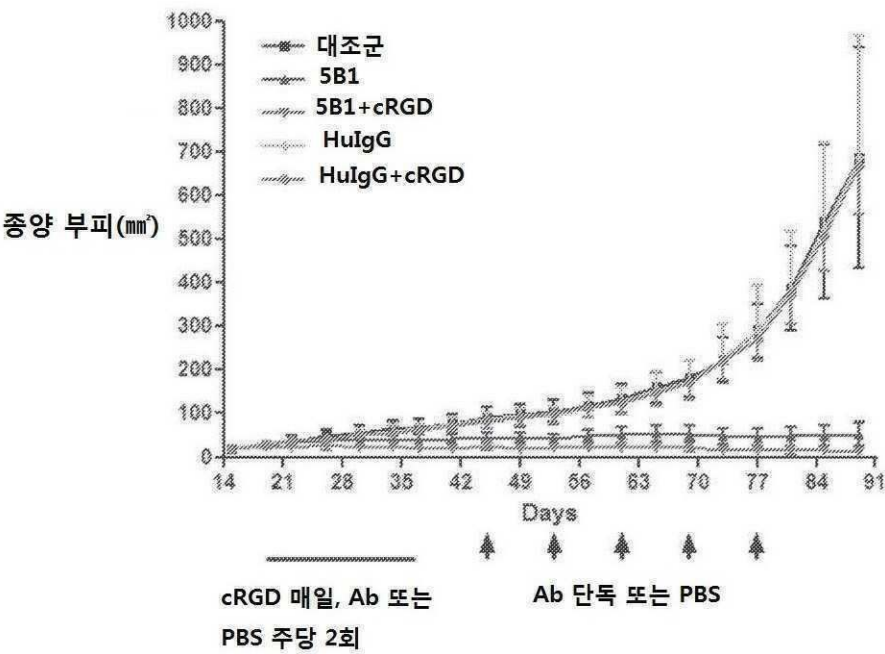




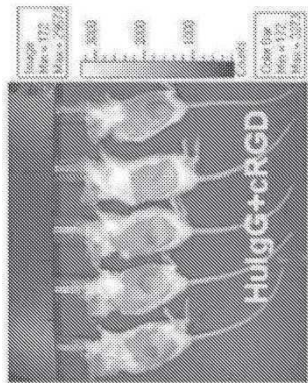
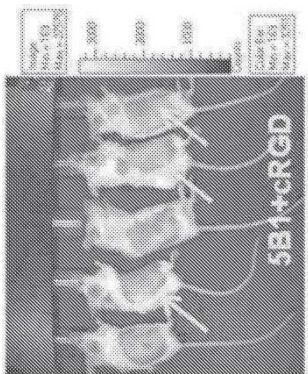
도면17



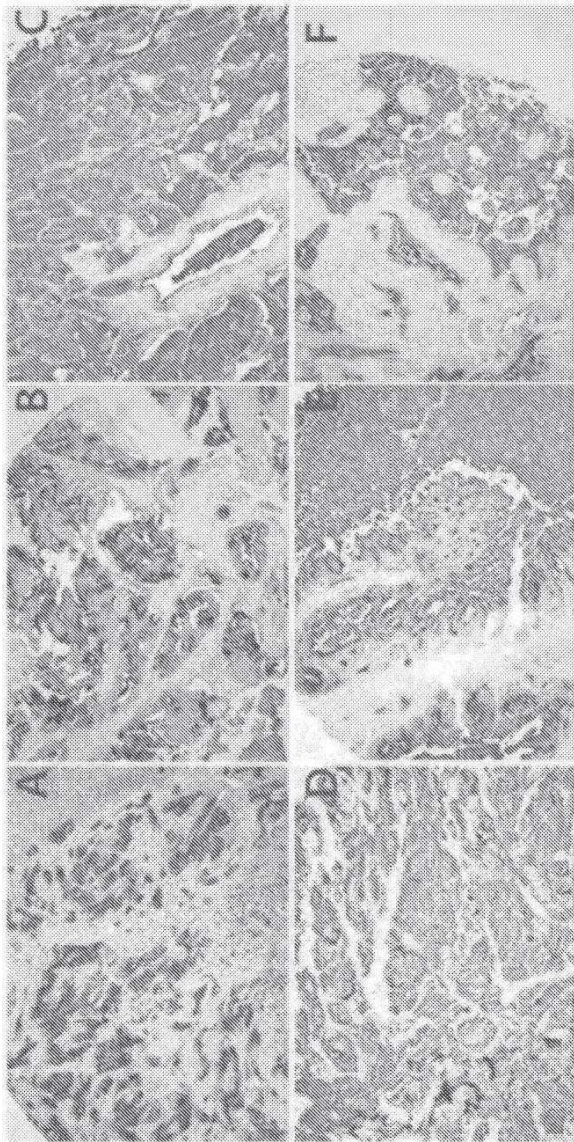
도면18a



도면18b

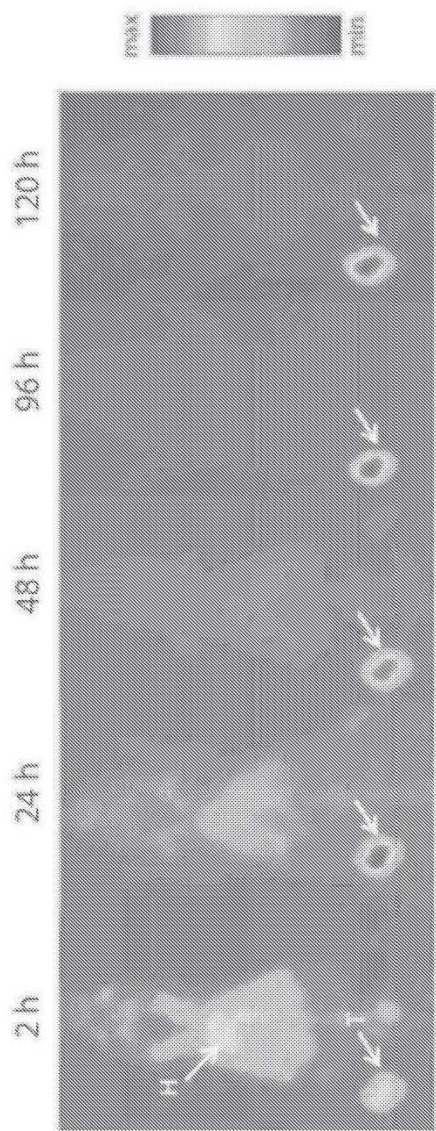


도면19



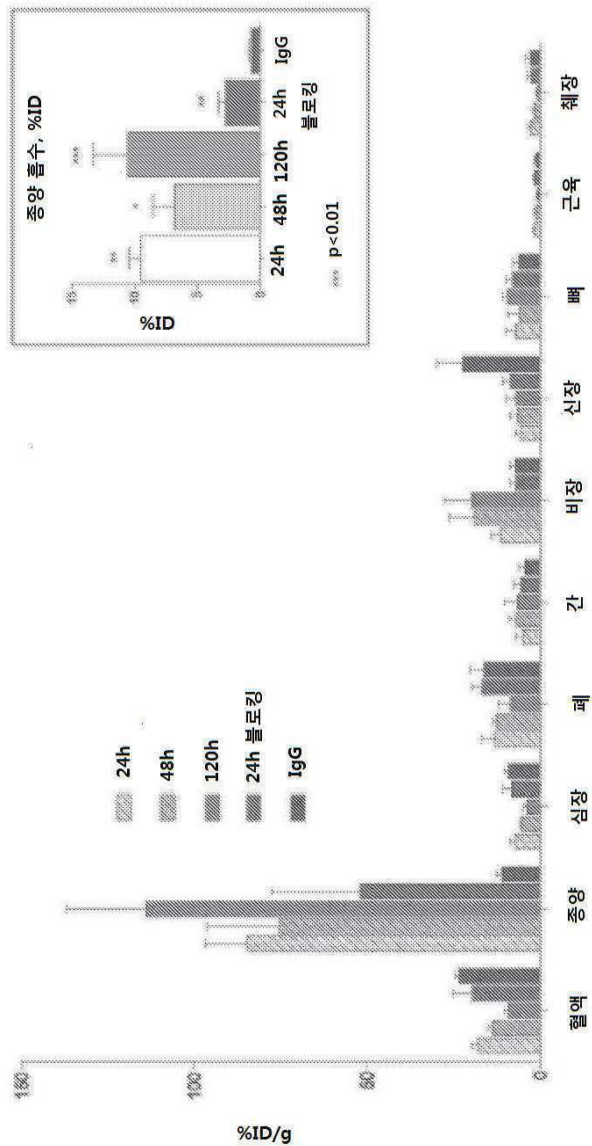


도면20

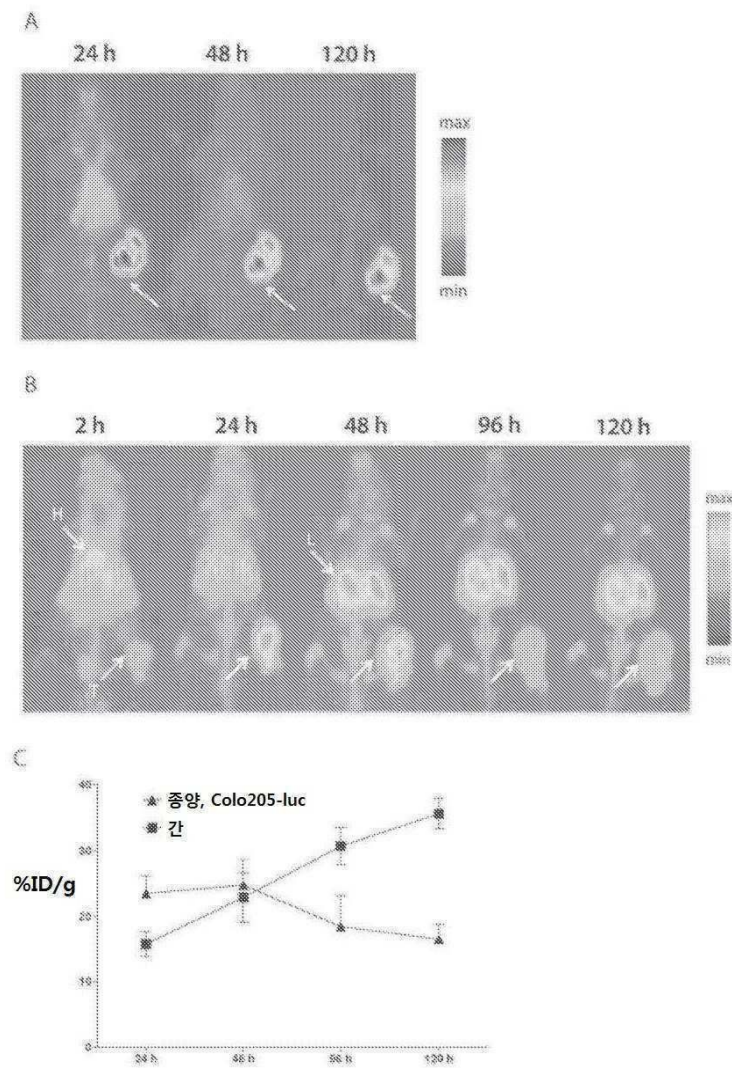




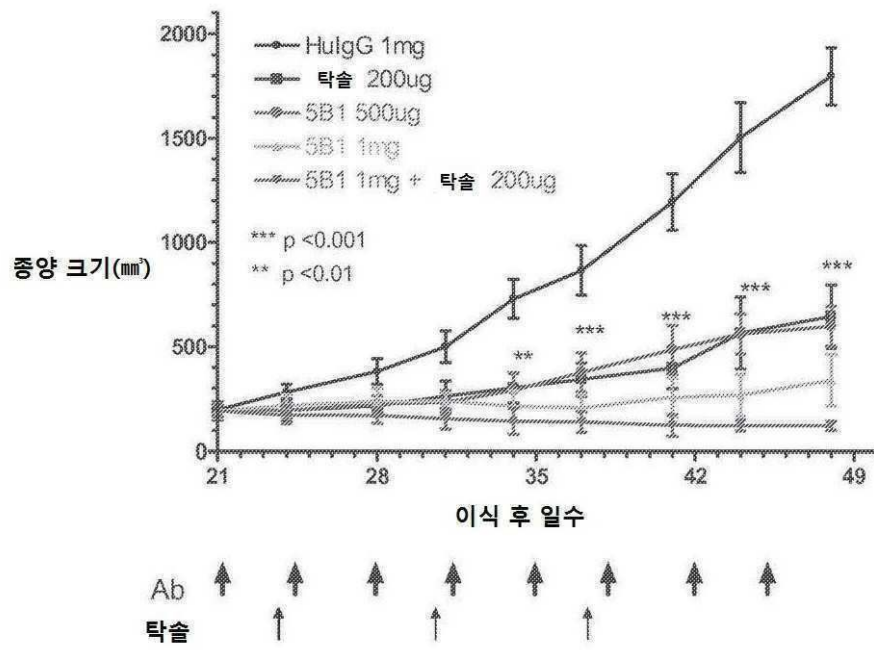
도면21



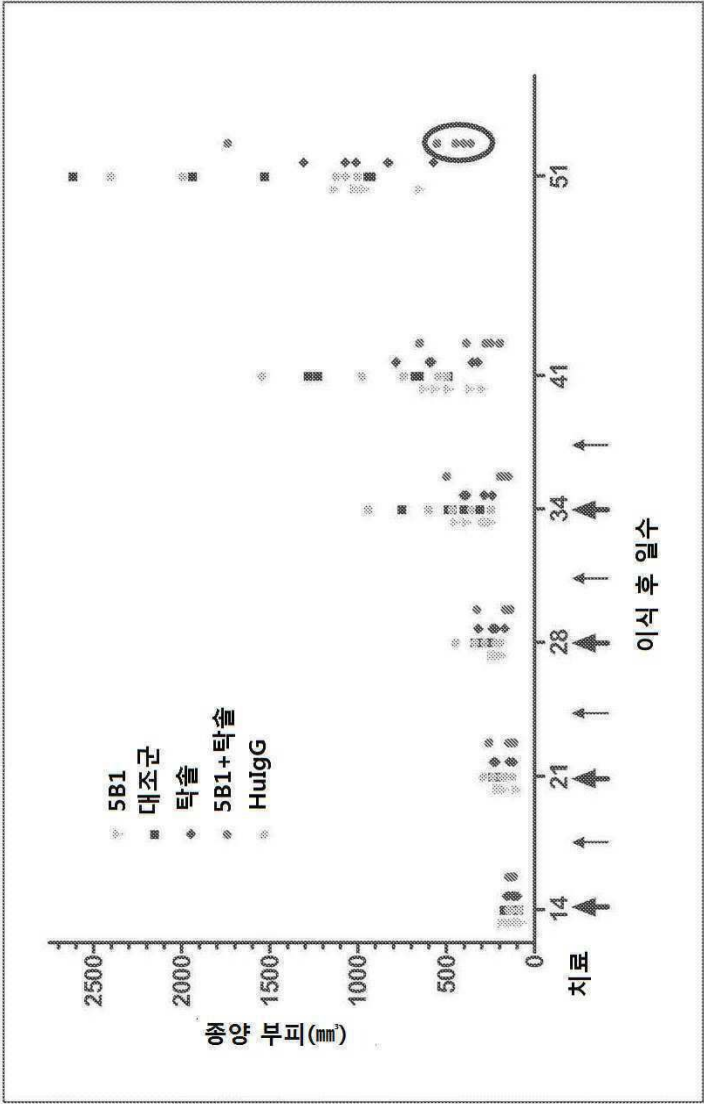
도면22



도면23

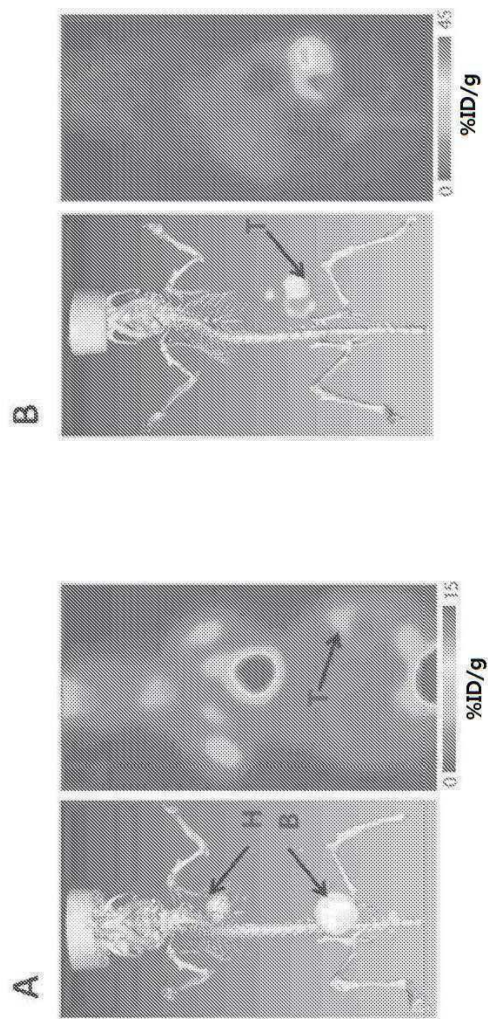


도면24





도면25



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> MabVax Therapeutics, Inc.

<120> Nucleic Acids Encoding Human Antibodies To Sialyl-Lewis A

<130> 12967-033-228

<140> TBA

<141> 2014-08-26

<150> US 61/870,137

<151> 2013-08-26

<160> 20

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 426

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH chain domain of clone 5B1

<400> 1

```

atggagtttg ggctgagctg gctttttctt gtggctatatt taaaaggcgt acagtgccag      60
gtgcagctgg tggagtctgg gggaggctcg gtgcagcctg gcaggtcctt gagactctcc      120

tgtgaagcct ctggattcac ctttgaggcc tatgccatgc actgggtccg gcaacctcca      180
gggaagggcc tggagtgggt ctcaagtatt aattggaata gtggtcgcat agcctatgcg      240
gactctgtga agggccgatt caccatctcc agagacaacg ccaggaattc cctgtatctg      300
caaatgaaca gtctgagact tgaggacacg gccttctatt actgtgcaaa agatatacgg      360
aggttttagta ccgggggggc ggagtttgag tactggggcc agggaaccct ggtcacccgc      420
tcctca                                           426

```

<210> 2

<211> 142

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH chain domain of clone 5B1

<400> 2

```

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Leu Phe Leu Val Ala Ile Leu Lys Gly
1           5           10          15
Val Gln Cys Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Ser Val Gln
          20          25          30
Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Glu Ala Ser Gly Phe Thr Phe
          35          40          45
Glu Ala Tyr Ala Met His Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu

          50          55          60
Glu Trp Val Ser Ser Ile Asn Trp Asn Ser Gly Arg Ile Ala Tyr Ala
65          70          75          80
Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Arg Asn
          85          90          95
Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Leu Glu Asp Thr Ala Phe
          100         105         110

```

Tyr Tyr Cys Ala Lys Asp Ile Arg Arg Phe Ser Thr Gly Gly Ala Glu

115 120 125  
Phe Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

130 135 140

<210> 3

<211> 390

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL chain domain of clone 5B1

<400> 3

atggccggct tccctctcct cctcaccctc ctcaactcact gtgcagggtc ttgggcccag 60  
tctgtgctga ctgagccgcc ctgagcgtct gggacccccg ggcagagggt caccatctct 120  
tgttctggaa gcagctccaa catcggaagt aattttgtat actggtacca gcagctccca 180

ggaacggccc ccaaactcct catatatagg aataatcagc ggcctcagg ggtccctgac 240  
cgattctctg gctccaggtc tggcacctca gcctccctgg ccatcagtgg actccggtcc 300  
gaggatgagg ctgattatta ctgtgcagca tgggatgaca gcctgggagg ccattatgct 360  
ttcggaactg ggaccaaggt caccgtcctt 390

<210> 4

<211> 130

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL chain domain of clone 5B1

<400> 4

Met Ala Gly Phe Pro Leu Leu Leu Thr Leu Leu Thr His Cys Ala Gly

1 5 10 15

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

20 25 30

Pro Gly Gln Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile

35 40 45

Gly Ser Asn Phe Val Tyr Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro

50 55 60

Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp

[illegible]

130

<210> 5

<211> 426

<212> DNA

### <213> Artificial Sequence

<220><223> VH chain domain of clone 9H3

<400> 5

atggagtttg	ggctgagctg	gctttttctt	gtggctattt	taaaaggcgt	acagtgcgaa	60
gtgcagctgt	tggagctggg	gggaggcttg	gtacacgctg	gcaggtcctt	gagactctcc	120
tgtgcggcct	ctggatttac	ctttgatgat	tatgtcatgc	actgggtccg	gcaagctcca	180
gggaagggcc	tggagtgggt	ctcaagtatt	agttggaata	gtggtagcat	aggctatgcg	240
gactctgtga	agggccgatt	catcatctcc	agagacaacg	ccaagaactc	cctgtatctg	300
caaatgaaca	gtctgagagc	tgaggacacg	gccttgtatt	actgtgcaaa	agatcgtcgt	360
attaggggtg	actcgggggt	cgagggtgac	tactggggcc	agggaacctt	ggtcaccgtc	420

tcctca 426

<210> 6

<211> 142

<212> PRT

### <213> Artificial Sequence

<220><223> VH chain domain of clone 9H3

<400> 6

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Leu Phe Leu Val Ala Ile Leu Lys Gly

1                      5                      10                      15

Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln



20 25 30  
Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe

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

50 55 60  
Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile Gly Tyr Ala

65 70 75 80  
Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Ile Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn

85 90 95  
Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu

100 105 110  
Tyr Tyr Cys Ala Lys Asp Arg Arg Ile Arg Gly Asp Ser Gly Phe Glu

115 120 125  
Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

130 135 140

<210> 7

<211> 387

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL chain domain of clone 9H3

<400> 7

atggcgggt tccctctcct ctcaccctc ctcaactcact gtgcagggtc ttgggccag 60

tctgtgttga cgcagccgcc ctcaagctct gggacccccg ggcagagggt caccatctct 120

tgttctggaa gcagctccaa catcggaagt aattatgtat actgtacca gcagctccca 180

ggaacggccc ccaaactcct catctatagg aataatcage ggcctcagg ggtccctgac 240

cgattctctg gctccaagtc tggcacctca gcctccctgg ccatcagtgg gtcctgggtcc 300

gaggatgagg ctgattatta ctgtgcagca tgggatgcca gcctgagtgg tgttggtattc 360

ggcggaggga ccaagctgac cgtccta 387

<210> 8

<211> 129

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL chain domain of clone 9H3

<400> 8

Met Ala Gly Phe Pro Leu Leu Leu Thr Leu Leu Thr His Cys Ala Gly

1 5 10 15

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

20 25 30

Pro Gly Gln Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile

35 40 45

Gly Ser Asn Tyr Val Tyr Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro

50 55 60

Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp

65 70 75 80

Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser

85 90 95

Gly Leu Arg Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp

100 105 110

Ala Ser Leu Ser Gly Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val

115 120 125

Leu

<210> 9

<211> 426

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH chain domain of clone 5H11

<400> 9

atggagtttg ggetgagctg gctttttcitt gtggctatatt taaaaggcgt acagtgccag 60

gtgcagctgt tggagtctgg gggaggcttg gtacagcctg gcaggtccct gagactctcc 120

tgtgcagcct ctggattcac ctttgatgaa tatgccatgc actgggtccg gcaagctcca 180

gggaagggcc tggagtgggt ctcaagtgtt agttggaata gtggtagcat aggctatgcg 240

gactctgtga agggccgatt caccatctcc agagacaacg ccaagaactc cctgtatcta 300

caaatgaaca gtctgagagc tgaggacacg gccttgtatt actgtgcaaa agatatacgg 360

acctatagca ccgggggggc ggagtttggc tcctggggcc agggaaccct ggtcacggcc 420

tcctca 426

<210> 10

<211> 142

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH chain domain of clone 5H11

<400> 10

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Leu Phe Leu Val Ala Ile Leu Lys Gly

1 5 10 15

Val Gln Cys Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln

20 25 30

Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe

35 40 45

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

50 55 60

Glu Trp Val Ser Ser Val Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile Gly Tyr Ala

65 70 75 80

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn

85 90 95

Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu

100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Lys Asp Ile Arg Thr Tyr Ser Thr Gly Gly Ala Glu

115 120 125

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

130 135 140

<210> 11

<211> 390

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL chain domain of clone 5H11

<400> 11

```
atggccggct tcctctctct cctcaccttc ctactcact gtgcagggtc ttgggccag      60
tctgtgttga cgcagccgcc ctacagctct gggacccccg ggcagagggt caccatctct      120
tgtttcggaa gcagctccaa catcggaagt aattatgtat actggtacca gcaggtccea      180
ggaacggccc ccaaactcct catctatagg aataatcagc ggccctcagg ggtccctgac      240
cgattctctg gtcceaagtc tggcacctca gcctccctgg ccatcagtgg gctccggtec      300
gaggatgagg ctgattatta ctgtgcagca tgggatgaca gcctgagtgg ccattatgtc      360

ttcggaaactg ggaccaaggt caccgtccta                                     390
```

<210> 12

<211> 130

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL chain domain of clone 5H11

<400> 12

```
Met Ala Gly Phe Pro Leu Leu Leu Thr Leu Leu Thr His Cys Ala Gly
1           5           10          15
Ser Trp Ala Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr
          20          25          30
Pro Gly Gln Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile

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

          100          105          110
Asp Ser Leu Ser Gly His Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr
```

115 120 125

Val Leu

130

<210> 13

<211> 435

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH chain domain of clone 7E3

<400> 13

atggagtttg ggctgagctg gctttttctt gtggctatatt taaaaggcgt acagtgccaa 60

gtgcagctgt tggagtctgg gggaggcgtg gtccagcctg ggaggtccct gagactctcc 120

tgtgcagcct ctggattcac cttcagtttc tatggcatgc actgggtccg ccaggtccca 180

ggcaaggggc tggagtgggt ggcagctata tcatatgatg gaagtaataa atactatgca 240

gactccgtga agggccgatt caccatctcc agagacaatt ccaagaacac gctgtatctg 300

caaatgaaca gcctgagagc tgaggacacg gctgtgtatt actgtgcgaa aaggcccaac 360

caatatttatt gtagtgatgg tagatgctac tccattgact actggggcca gggaaccctg 420

gtcacctgt cctca 435

<210> 14

<211> 145

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH chain domain of clone 7E3

<400> 14

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Leu Phe Leu Val Ala Ile Leu Lys Gly

1 5 10 15

Val Gln Cys Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln

20 25 30

Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe

35 40 45

Ser Phe Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu

50 55 60

Glu Trp Val Ala Ala Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala



65                      70                      75                      80  
 Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn  
                          85                      90                      95  
 Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val  
                          100                      105                      110  
 Tyr Tyr Cys Ala Lys Arg Pro Asn Gln Phe Tyr Cys Ser Asp Gly Arg  
                          115                      120                      125  
 Cys Tyr Ser Ile Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser

130                      135                      140  
 Ser

145

<210> 15

<211> 390

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL chain domain of clone 7E3

<400> 15

atggacatga ggggtccccgc tcagctcctg gggctcctgc tactctggct ccgaggtgcc                      60  
 cgggtgtgaaa ttgtaatgac gcagctctcca gccaccctgt ctgtgtctcc aggggagaga                      120  
 gccaccctct cctgcagggc cagtcagagt gttagcagca acttagcctg gtaccagcag                      180  
 aaacctggcc aggtctccag gctctcatc tatggtgcat ccaccagggc cactggtatc                      240  
 ccagccaggt tcagtggcag tgggtctggg acagacttca ctctcaccat cagcagcctg                      300

cagtctgtag attctgcagt ttattactgt cagcagtata ataactggcc tccgtacact                      360  
 tttggccagg ggaccaagct ggagatcaaa                      390

<210> 16

<211> 130

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL chain domain of clone 7E3

<400> 16

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Trp  
 1                      5                      10                      15  
 Leu Arg Gly Ala Arg Cys Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr

20	25	30	
Leu Ser Val Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser			
35	40	45	
Gln Ser Val Ser Ser Asn Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln			
50	55	60	
Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile			
65	70	75	80
Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr			
85	90	95	
Ile Ser Ser Leu Gln Ser Val Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln			
100	105	110	
Tyr Asn Asn Trp Pro Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu			
115	120	125	
Ile Lys			
130			
<210>	17		
<211>	750		
<212>	DNA		
<213>	Artificial Sequence		
<220><223>	Diabody 5B1CysDb sequence		
<400>	17		
cagtctgtgc tgacgcagcc gccctcagcg tctgggaccc ccgggcagag ggtcaccatc			60
tcttgttctg gaagcagctc caacatcgga agtaattttg tatactggta ccagcagctc			120
ccaggaacgg cccccaaact cctcatatat aggaataatc agcggccctc aggggtccct			180
gaccgattct ctggctccag gtctggcacc tcagcctccc tggccatcag tggactccgg			240
tccgaggatg aggctgatta ttactgtgca gcatgggatg acagcctggg aggccattat			300
gtcttcggaa ctgggaccaa ggtcaccgtc ctttctggtg gtggtggtca ggtgcagctg			360
gtggagtctg ggggaggtc ggtgcagcct ggcaggctcc tgagactctc ctgtgaagcc			420
tctggattca cctttgaggc ctatgccatg cactgggtcc ggcaacctcc agggaagggc			480
ctggagtggg tctcaagtat taattggaat agtggtcgca tagcctatgc ggactctgtg			540
aagggccgat tcaccatctc cagagacaac gccaggaatt ccctgtatct gcaaatgaac			600

agtcctgagac ttgaggacac ggccttctat tactgtgcaa aagatatagc gaggtttagt 660  
accggggggg cggagtttga gtactggggc cagggaaccc tggtcaccgt ctctcaggt 720  
tctcaccatc accatcacca tggcggttgc 750

<210> 18

<211> 250

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Diabody 5B1CysDb sequence

<400> 18

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

1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn

20 25 30

Phe Val Tyr Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu

35 40 45

Ile Tyr Arg Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser

50 55 60

Gly Ser Arg Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg

65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu

85 90 95

Gly Gly His Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Ser

100 105 110

Gly Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Ser Val

115 120 125

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

130 135 140

Phe Glu Ala Tyr Ala Met His Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly

145 150 155 160

Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile Asn Trp Asn Ser Gly Arg Ile Ala Tyr

165 170 175

Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Arg

180	185	190	
Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Leu Glu Asp Thr Ala			
195	200	205	
Phe Tyr Tyr Cys Ala Lys Asp Ile Arg Arg Phe Ser Thr Gly Gly Ala			
210	215	220	
Glu Phe Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly			
225	230	235	240
Ser His His His His His His Gly Gly Cys			
245	250		
<210> 19			
<211> 750			
<212> DNA			
<213> Artificial Sequence			
<220><223> Diabody 7E3CysDb sequence			
<400> 19			
gatgttgtgc tgacgcagtc tccagccacc ctgtctgtgt ctccagggga gagagccacc			60
ctctcctgca gggccagtc gagtgtagc agcaacttag cctggtacca gcagaaacct			120
ggccaggctc ccaggctcct catctatggt gcatccacca gggccactgg tatccagcc			180
aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttactctca ccatcagcag cctgcagtct			240
gaagattctg cagtttatta ctgtcagcag tataataact ggctccgta cacttttggc			300
caggggacca aggtggatat caaatctggt ggtggtggtg aagtcagct ggtggagtct			360
gggggaggcg tgggccagcc tgggaggtcc ctgagactct cctgtgcagc ctctggattc			420
accttcagtt tctatggcat gcactgggtc cgccaggctc caggcaagg gctggagtgg			480
gtggcagcta tatcatatga tggaagtaat aaatactatg cagactccgt gaagggccga			540
ttcaccatct ccagagacaa ttccaagaac acgctgtatc tgcaaatgaa cagcctgaga			600
gctgaggaca cggctgtgta ttactgtgcg aaaaggccca accaatttta ttgtatgat			660
ggtagatgct actccattga ctactggggc cagggaaccc tggtcaccgt ctctcaggt			720
tctcaccatc accatcacca tggcggttgc			750
<210> 20			
<211> 249			
<212> PRT			
<213> Artificial Sequence			

<220><223> Diabody 7E3CysDb sequence

<400> 20

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

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

65 70 75 80  
Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Asn Trp Pro Pro Tyr  
85 90 95  
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys Ser Gly Gly Gly Gly  
100 105 110  
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg  
115 120 125  
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Phe Tyr

130 135 140  
Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
145 150 155 160  
Ala Ala Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
165 170 175  
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
180 185 190  
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

195 200 205  
Ala Lys Arg Pro Asn Gln Phe Tyr Cys Ser Asp Gly Arg Cys Tyr Ser  
210 215 220  
Ile Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Ser



225	230	235	240
His His His His His His Gly Gly Cys			
	245		