



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0146623
(43) 공개일자 2023년10월19일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 51/10 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01) C07K 16/30 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
A61K 51/1096 (2013.01)
A61K 51/1045 (2020.05)
- (21) 출원번호 10-2023-7031810
(22) 출원일자(국제) 2022년02월18일
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2022년09월18일
(86) 국제출원번호 PCT/CN2022/076810
(87) 국제공개번호 WO 2022/174809
국제공개일자 2022년08월25일
- (30) 우선권주장
PCT/CN2021/076910 2021년02월19일 중국(CN)
PCT/CN2022/074750 2022년01월28일 중국(CN)

- (71) 출원인
쑤저우 트랜스젠타 테라퓨틱스 컴퍼니 리미티드
중국 215123 장쑤 쑤저우 싱후 스트리트 218
비6-501
베이징 캔서 호스피탈
중국 100142 베이징 하이디안 디스트릭트 푸청 로
드 넘버. 52
- (72) 발명자
치안 쉬에밍
중국 215123 장쑤 쑤저우 싱후 스트리트 218
비6-501
주 후아
중국 100142 베이징 하이디안 디스트릭트 푸청 로
드 넘버. 52
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
김진희, 김태홍

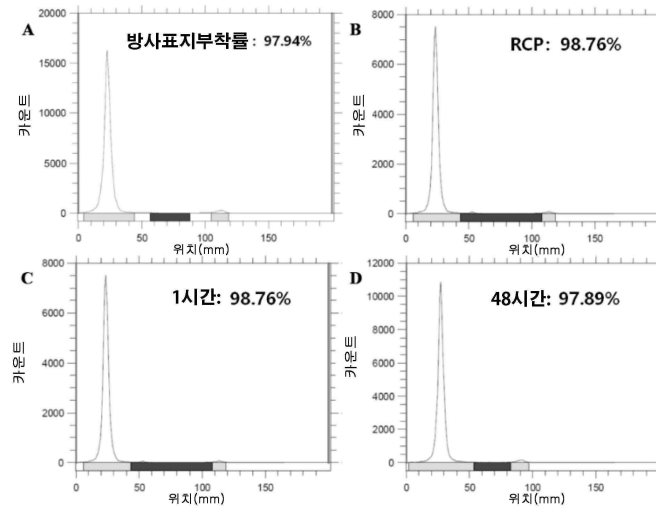
전체 청구항 수 : 총 50 항

(54) 발명의 명칭 항-CLDN18.2 항체 접합체

(57) 요약

본 개시내용은 본원에서 항-CLDN18.2 항체 또는 이의 항원 결합 단편과 방사성핵종의 접합체, 이를 함유하는 약학 조성물, 및 영상화, 환자 스크리닝, 치료 과정 모니터링 및 효능 평가에 있어서 이의 용도를 제공한다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61P 35/00 (2018.01)

C07K 16/28 (2013.01)

C07K 16/30 (2013.01)

C07K 2317/24 (2013.01)

C07K 2317/30 (2013.01)

C07K 2317/732 (2013.01)

C07K 2317/734 (2013.01)

C07K 2317/92 (2013.01)

(72) 발명자

팅 페이

중국 215123 장쑤 쑤저우 싱후 스트리트 218
비6-501

리 홍준

중국 215123 장쑤 쑤저우 싱후 스트리트 218
비6-501

양 지

중국 100142 베이징 하이디안 디스트릭트 푸청 로
드 넘버. 52

구 이

중국 215123 장쑤 쑤저우 싱후 스트리트 218
비6-501

딩 진

중국 100142 베이징 하이디안 디스트릭트 푸청 로
드 넘버. 52

왕 평

중국 100142 베이징 하이디안 디스트릭트 푸청 로
드 넘버. 52

명세서

청구범위

청구항 1

방사성핵종에 접합된 항-CLDN18.2 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 항-CLDN18.2 항체 접합체로서, 상기 방사성핵종이 치료 방사성핵종 또는 진단 방사성핵종을 포함하는 것인 항-CLDN18.2 항체 접합체.

청구항 2

제1항에 있어서, 치료 방사성핵종이 ^{111}In , $^{111\text{m}}\text{In}$, ^{177}Lu , ^{212}Bi , ^{213}Bi , ^{211}At , ^{62}Cu , ^{64}Cu , ^{67}Cu , ^{90}Y , ^{125}I , ^{131}I , ^{32}P , ^{33}P , ^{47}Sc , ^{111}Ag , ^{67}Ga , ^{142}Pr , ^{153}Sm , ^{161}Tb , ^{166}Dy , ^{166}Ho , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{189}Re , ^{212}Pb , ^{223}Ra , ^{225}Ac , ^{59}Fe , ^{75}Se , ^{77}As , ^{89}Sr , ^{99}Mo , ^{105}Rh , ^{109}Pd , ^{143}Pr , ^{149}Pm , ^{169}Er , ^{194}Ir , ^{198}Au , ^{199}Au , ^{199}Au 및 ^{211}Pb 로 구성된 군으로부터 선택된 것인 항-CLDN18.2 항체 접합체.

청구항 3

제1항에 있어서, 진단 방사성핵종이 ^{18}F , ^{32}P , ^{33}P , ^{45}Ti , ^{47}Sc , ^{52}Fe , ^{59}Fe , ^{62}Cu , ^{64}Cu , ^{67}Cu , ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{75}Sc , ^{77}As , ^{86}Y , ^{90}Y , ^{89}Sr , ^{89}Zr , ^{94}Tc , ^{94}Tc , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{99}Mo , ^{105}Pd , ^{105}Rh , ^{111}Ag , ^{111}In , ^{123}I , ^{124}I , ^{125}I , ^{131}I , ^{142}Pr , ^{143}Pr , ^{149}Pm , ^{153}Sm , ^{154}Gd , ^{158}Gd , ^{161}Tb , ^{166}Dy , ^{166}Ho , ^{169}Er , ^{175}Lu , ^{177}Lu , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{189}Re , ^{194}Ir , ^{198}Au , ^{199}Au , ^{211}At , ^{211}Pb , ^{212}Bi , ^{212}Pb , ^{213}Bi , ^{223}Ra 및 ^{225}Ac 로 구성된 군으로부터 선택된 것인 항-CLDN18.2 항체 접합체.

청구항 4

제1항에 있어서, 진단 방사성핵종이 양전자 방출 단층촬영(PET) 또는 단일 광자 방출 컴퓨터 단층촬영(SPECT)에 의해 검출될 수 있는 것인 항-CLDN18.2 항체 접합체.

청구항 5

제1항에 있어서, 방사성핵종이 ^{64}Cu , ^{67}Cu , ^{89}Zr , ^{124}I , ^{86}Y , ^{90}Y , ^{111}In , $^{123/131}\text{I}$, ^{177}Lu , ^{11}C , ^{14}C , ^{41}Ca , ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{13}N , ^{15}O , ^{44}Sc , ^{18}F , $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 및 $^{90\text{m}}\text{Tc}$ 로 구성된 군으로부터 선택된 것인 항-CLDN18.2 항체 접합체.

청구항 6

제2항에 있어서, 방사성핵종이 ^{124}I , ^{123}I 또는 ^{131}I 인 항-CLDN18.2 항체 접합체.

청구항 7

제2항에 있어서, 방사성핵종이 ^{64}Cu , ^{67}Cu 또는 ^{89}Zr 인 항-CLDN18.2 항체 접합체.

청구항 8

제6항에 있어서, ^{64}Cu , ^{67}Cu 또는 ^{89}Zr 이 킬레이터를 통해 항체 또는 이의 항원 결합 단편에 표지부착되는 것인 항-CLDN18.2 항체 접합체.

청구항 9

제7항에 있어서, 킬레이터가 킬레이트화를 위한 3개 이상의 원자를 포함하고, 이때 각각의 원자가 질소, 황, 산소 및 인으로 구성된 군으로부터 선택된 것인 항-CLDN18.2 항체 접합체.

청구항 10

제9항에 있어서, 킬레이터가 DFO(테르페록사민), DOTA(1,4,7,10-테트라아자사이클로도데칸-1,4,7,10-테트라아세트산), DTPA(NR-디에틸렌트리아민펜타아세트산), NOTA(1,4,7-트리아자사이클로노난-1,4,7-아세트산), 1,4,7,10-테트라아자사이클로트리데칸-N,N',N'',N'''-테트라아세트산(본원에서 TRITA로서 약칭됨); 1,4,8,11-테트라아자사이클로테트라데칸-N,N',N'',N'''-테트라아세트산(본원에서 TETA로서 약칭됨); 및 1,5,9,13-테트라아자사이클로헥사데칸-N,N',N'',N'''-테트라아세트산(본원에서 HETA로서 약칭됨), 에틸렌디아민테트라아세트산(본원에서 EDTA로서 약칭됨) 또는 디에틸렌트리아민펜타아세트산(DTPA)을 포함하는 것인 항-CLDN18.2 항체 접합체.

청구항 11

제10항에 있어서, 방사성핵종이 ^{64}Cu 또는 ^{67}Cu 이고 킬레이터가 TETA, NOTA, NODA 또는 NODGA를 포함하거나, 방사성핵종이 ^{89}Zr 이고 킬레이터가 DFO를 포함하는 것인 항-CLDN18.2 항체 접합체.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 항-CLDN18.2 항체 또는 이의 항원 결합 단편이 중쇄 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3 및/또는 경쇄 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3 서열을 포함하고, 이때

HCDR1 서열이 GYMN(서열번호 1) 또는 TYFIGVG(서열번호 13), 또는 적어도 80% 서열 동일성을 가진 이의 상동 서열을 포함하고;

HCDR2 서열이 X₁IDPYYX₂X₃TX₄YNQKFX₅G(서열번호 32) 또는 HIWWNDNKYYNTALKS(서열번호 15), 또는 적어도 80% 서열 동일성을 가진 이의 상동 서열을 포함하고;

HCDR3 서열이 X₆X₇X₈GNAFDY(서열번호 33) 또는 MGSGAWFTY(서열번호 17), 또는 적어도 80% 서열 동일성을 가진 이의 상동 서열을 포함하고;

LCDR1 서열이 KSSQX₉LX₁₀NX₁₁GNX₁₂KNYLT(서열번호 34), 또는 적어도 80% 서열 동일성을 가진 이의 상동 서열을 포함하고;

LCDR2 서열이 WASTRX₁₃S(서열번호 35), 또는 적어도 80% 서열 동일성을 가진 이의 상동 서열을 포함하고;

LCDR3 서열이 QNDYX₁₄X₁₅PX₁₆T(서열번호 36), 또는 적어도 80% 서열 동일성을 가진 이의 상동 서열을 포함하고;

이때 X₁이 N 또는 Y 또는 H이고, X₂가 G 또는 V이고, X₃이 A 또는 G 또는 T이고, X₄가 R 또는 T 또는 S이고, X₅가 K 또는 R이고, X₆이 S 또는 M이고, X₇이 Y 또는 F이고, X₈이 Y 또는 H이고, X₉가 S 또는 N이고, X₁₀이 L 또는 F이고, X₁₁이 S 또는 N이고, X₁₂가 Q 또는 L이고, X₁₃이 E 또는 K이고, X₁₄가 S 또는 Y이고, X₁₅가 F 또는 Y이고, X₁₆이 F 또는 L인 항-CLDN18.2 항체 접합체.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 항-CLDN18.2 항체 또는 이의 항원 결합 단편이 다음을 포함하는 것인 항-CLDN18.2 항체 접합체:

중쇄 가변 영역은 서열번호 1의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열번호 3의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열번호 5의 서열을 포함하는 HCDR3을 포함하고; 경쇄 가변 영역은 서열번호 2의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열번호 4의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열번호 6의 서열을 포함하는 LCDR3을 포함하거나;

중쇄 가변 영역은 서열번호 1의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열번호 7의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열번호 5의 서열을 포함하는 HCDR3을 포함하고; 경쇄 가변 영역은 서열번호 2의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열번호 4의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열번호 8의 서열을 포함하는 LCDR3을 포함하거나;

중쇄 가변 영역은 서열번호 1의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열번호 9의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열번호 11의 서열을 포함하는 HCDR3을 포함하고; 경쇄 가변 영역은 서열번호 10의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열번호 4의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열번호 6의 서열을 포함하는 LCDR3을 포함하거나;

중쇄 가변 영역은 서열번호 13의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열번호 15의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열번호

17의 서열을 포함하는 HCDR3을 포함하고; 경쇄 가변 영역은 서열번호 2의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열번호 4의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열번호 12의 서열을 포함하는 LCDR3을 포함하거나;

중쇄 가변 영역은 서열번호 1의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열번호 19의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열번호 21의 서열을 포함하는 HCDR3을 포함하고; 경쇄 가변 영역은 서열번호 14의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열번호 16의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열번호 18의 서열을 포함하는 LCDR3을 포함하거나;

중쇄 가변 영역은 서열번호 1의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열번호 22의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열번호 5의 서열을 포함하는 HCDR3을 포함하고; 경쇄 가변 영역은 서열번호 20의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열번호 4의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열번호 6의 서열을 포함하는 LCDR3을 포함한다.

청구항 14

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 중쇄 가변 영역이 중쇄 HFR1, HFR2, HFR3 및 HFR4 중 하나 이상을 추가로 포함하고/하거나, 경쇄 가변 영역이 경쇄 LFR1, LFR2, LFR3 및 LFR4 중 하나 이상을 추가로 포함하고, 이때

HFR1이 **QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGY₁₇FT**(서열번호 54), 또는 적어도 80% 서열 동일성을 가진 이의 상동 서열을 포함하고,

HFR2가 **WVX₁₈QAPGQGLEWX₁₉G**(서열번호 55), 또는 적어도 80% 서열 동일성을 가진 이의 상동 서열을 포함하고,

HFR3 서열이 **RVTX₂₀TIDKSTSTVYMELSSLRSEDAVYYCAR**(서열번호 56), 또는 적어도 80% 서열 동일성을 가진 이의 상동 서열을 포함하고,

HFR4가 **WGQGTTTVVSS**(서열번호 57), 또는 적어도 80% 서열 동일성을 가진 이의 상동 서열을 포함하고,

LFR1이 **DIVMTQSPDSLAVSLGERATX₂₁NC**(서열번호 58), 또는 적어도 80% 서열 동일성을 가진 이의 상동 서열을 포함하고,

LFR2가 **WYQKPGQPPKLLIY**(서열번호 59), 또는 적어도 80% 서열 동일성을 가진 이의 상동 서열을 포함하고,

LFR3이 **GVPDRFX₂₂GS GSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYC**(서열번호 60), 또는 적어도 80% 서열 동일성을 가진 이의 상동 서열을 포함하고,

LFR4가 **FGGGTKVEIK**(서열번호 61), 또는 적어도 80% 서열 동일성을 가진 이의 상동 서열을 포함하고,

이때 X_{17} 이 T 또는 S이고, X_{18} 이 R 또는 K이고, X_{19} 가 M 또는 I이고, X_{20} 이 M 또는 L이고, X_{21} 이 I 또는 M이고, X_{22} 가 S 또는 T인 항-CLDN18.2 항체 집합체.

청구항 15

제14항에 있어서,

HFR1이 서열번호 62 및 63으로 구성된 군으로부터 선택된 서열을 포함하고,

HFR2가 서열번호 64 및 65로 구성된 군으로부터 선택된 서열을 포함하고,

HFR3이 서열번호 66 및 67로 구성된 군으로부터 선택된 서열을 포함하고,

HFR4가 서열번호 57의 서열을 포함하고,

LFR1이 서열번호 68 및 69로 구성된 군으로부터 선택된 서열을 포함하고,

LFR2가 서열번호 59의 서열을 포함하고,

LFR3이 서열번호 70 및 71로 구성된 군으로부터 선택된 서열을 포함하고,

LFR4가 서열번호 61의 서열을 포함하는 것인 항-CLDN18.2 항체 집합체.

청구항 16

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 중쇄 가변 영역이 서열번호 25, 서열번호 27, 서열번호 29, 서열번호

호 37, 서열번호 39, 서열번호 41, 서열번호 43, 서열번호 45 및 서열번호 47, 및 적어도 80% 서열 동일성을 갖지만 CLDN18.2에 대한 특이적 결합 친화성을 유지하는 이의 상동 서열로 구성된 군으로부터 선택된 서열을 포함하는 것인 항-CLDN18.2 항체 접합체.

청구항 17

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 경쇄 가변 영역이 서열번호 26, 서열번호 28, 서열번호 38, 서열번호 40, 서열번호 42, 서열번호 44, 서열번호 46, 서열번호 48, 및 적어도 80% 서열 동일성을 갖지만 CLDN18.2에 대한 특이적 결합 친화성을 유지하는 이의 상동 서열로 구성된 군으로부터 선택된 서열을 포함하는 것인 항-CLDN18.2 항체 접합체.

청구항 18

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서,

중쇄 가변 영역이 서열번호 23의 서열을 포함하고, 경쇄 가변 영역이 서열번호 24의 서열을 포함하거나;

중쇄 가변 영역이 서열번호 25의 서열을 포함하고, 경쇄 가변 영역이 서열번호 26의 서열을 포함하거나;

중쇄 가변 영역이 서열번호 27의 서열을 포함하고, 경쇄 가변 영역이 서열번호 28의 서열을 포함하거나;

중쇄 가변 영역이 서열번호 29의 서열을 포함하고, 경쇄 가변 영역이 서열번호 26 또는 28의 서열을 포함하거나;

중쇄 가변 영역이 서열번호 37의 서열을 포함하고, 경쇄 가변 영역이 서열번호 38의 서열을 포함하거나;

중쇄 가변 영역이 서열번호 39의 서열을 포함하고, 경쇄 가변 영역이 서열번호 40의 서열을 포함하거나;

중쇄 가변 영역이 서열번호 41의 서열을 포함하고, 경쇄 가변 영역이 서열번호 42의 서열을 포함하거나;

중쇄 가변 영역이 서열번호 43의 서열을 포함하고, 경쇄 가변 영역이 서열번호 44의 서열을 포함하거나;

중쇄 가변 영역이 서열번호 45의 서열을 포함하고, 경쇄 가변 영역이 서열번호 46의 서열을 포함하거나;

중쇄 가변 영역이 서열번호 47의 서열을 포함하고, 경쇄 가변 영역이 서열번호 48의 서열을 포함하는 것인 항-CLDN18.2 항체 접합체.

청구항 19

제1항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 항-CLDN18.2 항체 또는 이의 항원 결합 단편이 하나 이상의 아미노산 잔기 치환 또는 변형을 추가로 포함하지만 인간 CLDN18.2에 대한 특이적 결합 친화성을 유지하는 것인 항-CLDN18.2 항체 접합체.

청구항 20

제19항에 있어서, 치환 또는 변형 중 적어도 하나가 CDR 서열 중 하나 이상, 및/또는 VH 또는 VL 서열의 비-CDR 영역 중 하나 이상에 있는 것인 항-CLDN18.2 항체 접합체.

청구항 21

제12항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 항-CLDN18.2 항체 또는 이의 항원 결합 단편이 면역글로불린 불변 영역, 임의로 인간 Ig의 불변 영역, 또는 임의로 인간 IgG의 불변 영역을 추가로 포함하는 것인 항-CLDN18.2 항체 접합체.

청구항 22

제21항에 있어서, 불변 영역이 인간 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4의 불변 영역을 포함하는 것인 항-CLDN18.2 항체 접합체.

청구항 23

제22항에 있어서, 인간 IgG1의 불변 영역이 서열번호 49, 또는 적어도 80% 서열 동일성을 가진 이의 상동 서열

을 포함하는 것인 항-CLDN18.2 항체 접합체.

청구항 24

제1항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, 항-CLDN18.2 항체 또는 이의 항원 결합 단편이 인간화된 것인 항-CLDN18.2 항체 접합체.

청구항 25

제1항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, 항-CLDN18.2 항체 또는 이의 항원 결합 단편이 디아바디, Fab, Fab', F(ab')₂, Fd, Fv 단편, 디설파이드 안정화 Fv 단편(dsFv), (dsFv)₂, 이중특이적 dsFv(dsFv-dsFv'), 디설파이드 안정화 디아바디(ds 디아바디), 단일 쇠 항체 분자(scFv), scFv 이량체(2가 디아바디), 다중특이적 항체, 낙타화 단일 도메인 항체, 나노바디, 도메인 항체 및 2가 도메인 항체인 항-CLDN18.2 항체 접합체.

청구항 26

제1항 내지 제25항 중 어느 한 항의 항체 접합체, 및 하나 이상의 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약학 조성물.

청구항 27

제26항에 있어서, 방사화학적 순도가 적어도 95%(예를 들어, 97%, 98%, 99%)인 약학 조성물.

청구항 28

대상체의 관심 있는 부위의 영상을 획득하는 방법으로서,

- 유효량의 제1항 내지 제25항 중 어느 한 항의 항체 접합체 및/또는 제26항 또는 제27항의 약학 조성물을 대상체에게 투여하는 단계;
- 상기 대상체의 관심 있는 부위에 대해 양전자 방출 단층촬영(PET) 또는 SPECT를 수행하는 단계;
- 상기 대상체에서 방사성핵종으로부터의 검출 가능한 신호를 식별하는 단계;
- 검출 가능한 신호의 영상을 생성함으로써, 대상체의 관심 있는 부위의 영상을 획득하는 단계를 포함하는, 대상체의 관심 있는 부위의 영상을 획득하는 방법.

청구항 29

제28항에 있어서, 관심 있는 부위가 클라우딘 18.2를 발현하거나 발현하는 것으로 의심되는 부위인 방법.

청구항 30

제28항 또는 제29항에 있어서, 관심 있는 부위가 종양을 갖거나 가진 것으로 의심되는 것인 방법.

청구항 31

비침습적 방식으로 대상체에서 클라우딘 18.2 발현을 검출하거나 시각화하는 방법으로서,

- 유효량의 제1항 내지 제25항 중 어느 한 항의 항체 접합체 및/또는 제26항 또는 제27항의 약학 조성물을 대상체에게 투여하는 단계;
- 상기 대상체에 대해 양전자 방출 단층촬영(PET) 또는 SPECT를 수행하는 단계;
- 상기 대상체의 관심 있는 부위에서 방사성핵종으로부터의 검출 가능한 신호를 식별하는 단계;
- 식별된 검출 가능한 신호를 기반으로 상기 대상체의 관심 있는 부위에서 클라우딘 18.2 발현을 확인하거나 시각화하는 단계

를 포함하는, 비침습적 방식으로 대상체에서 클라우딘 18.2 발현을 검출하거나 시각화하는 방법.

청구항 32

제31항에 있어서, 치료 유효량의 항-클라우딘 18.2 요법을, 관심 있는 부위에 클라우딘 18.2 발현을 가진 것으로 식별된 대상체에게 수행하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 33

제31항에 있어서, 식별된 검출 가능한 신호를 기반으로 대상체의 관심 있는 부위에서의 클라우딘 18.2 발현의 분포를 확인하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 34

제33항에 있어서, 대상체의 관심 있는 부위에서의 클라우딘 18.2 발현의 불균질성을 확인하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 35

제31항 내지 제34항 중 어느 한 항에 있어서, 관심 있는 부위가 종양인 방법.

청구항 36

치료 기간 동안 치료를 받은 대상체에서 비침습적 방식으로 치료 효능, 치료에 대한 반응성, 또는 내성 또는 재발 또는 전이의 발생을 모니터링하는 방법으로서,

- a) 유효량의 제1항 내지 제25항 중 어느 한 항의 항체 접합체 및/또는 제26항 또는 제27항의 약학 조성물을 대상체에게 투여하는 단계;
- b) 상기 대상체에 대해 양전자 방출 단층촬영(PET) 또는 SPECT를 수행하는 단계;
- c) 상기 대상체의 관심 있는 부위에서 방사성핵종으로부터의 검출 가능한 신호를 식별하는 단계;
- d) 식별된 검출 가능한 신호를 기반으로 상기 대상체의 관심 있는 부위에서 치료 후의 클라우딘 18.2 발현을 확인하는 단계;
- e) 치료 후의 클라우딘 18.2 발현 수준 또는 분포를, 각각 치료 기간 전에 대상체로부터 획득된 기준시점 클라우딘 18.2 발현 수준 또는 분포와 비교하여, 상기 대상체에서 클라우딘 18.2 발현 수준 또는 분포의 치료 후의 변화를 확인하는 단계; 및
- f) 단계 (e)에서 확인된 변화를 기반으로 치료 효능, 치료에 대한 반응성, 또는 내성 또는 재발 또는 전이의 발생을 확인하는 단계

를 포함하는, 치료 기간 동안 치료를 받은 대상체에서 비침습적 방식으로 치료 효능, 치료에 대한 반응성, 또는 내성 또는 재발 또는 전이의 발생을 모니터링하는 방법.

청구항 37

제36항에 있어서, 클라우딘 18.2 발현의 증가된 수준 또는 확산이 감소된 치료 효능, 감소된 치료에 대한 반응성, 또는 내성의 존재 또는 재발의 존재를 나타내는 것인 방법.

청구항 38

제37항에 있어서, 대상체가 암을 가진 것인 방법.

청구항 39

CLDN18.2 관련 질환 또는 병태의 치료를 필요로 하는 대상체에서 CLDN18.2 관련 질환 또는 병태를 치료하는 방법으로서, 치료 유효량의 제1항 내지 제25항 중 어느 한 항의 항-CLDN18.2 항체 접합체 및/또는 제26항 또는 제27항의 약학 조성물을 상기 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 40

제39항에 있어서, 질환 또는 병태가 암, 임의로 CLDN18.2 발현 암인 방법.

청구항 41

제40항에 있어서, 대상체가 CLDN18.2 발현 암을 가진 것으로 식별되는 것인 방법.

청구항 42

제1항 내지 제25항 중 어느 한 항의 항-CLDN18.2 항체 접합체 또는 제26항 또는 제27항의 조성물을 포함하는 키트.

청구항 43

제1항 내지 제25항 중 어느 한 항의 제1 항-CLDN18.2 항체 접합체, 및 제1항 내지 제25항 중 어느 한 항의 제2 항-CLDN18.2 항체 접합체를 포함하는 키트로서, 제1 항-CLDN18.2 항체 접합체가 진단 방사성핵종을 포함하고, 제2 항-CLDN18.2 항체 접합체가 치료 방사성핵종을 포함하는 것인 키트.

청구항 44

제42항 또는 제43항에 있어서, 키트는 제28항 내지 제41항 중 어느 한 항에 따른 방법에 사용하기 위한 것인 키트.

청구항 45

제28항 내지 제38항 중 어느 한 항에 따른 방법에 사용하기 위한 의약의 제조에 있어서의 제1항 내지 제25항 중 어느 한 항의 항-CLDN18.2 항체 접합체 또는 제26항 또는 제27항의 조성물의 용도로서, 항-CLDN18.2 항체 접합체가 진단 방사성핵종을 포함하는 것인 용도.

청구항 46

제39항 내지 제41항 중 어느 한 항에 따른 방법에 사용하기 위한 의약의 제조에 있어서의 제1항 내지 제25항 중 어느 한 항의 항-CLDN18.2 항체 접합체 또는 제26항 또는 제27항의 조성물의 용도로서, 항-CLDN18.2 항체 접합체가 치료 방사성핵종을 포함하는 것인 용도.

청구항 47

제6항의 항-CLDN18.2 항체 접합체를 제조하는 방법으로서, 효소적 또는 화학적 산화제의 존재 하에서 항-CLDN18.2 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 ^{124}I , ^{123}I 또는 ^{131}I 로 표지부착된 요오다이드 화합물과 반응시키는 단계를 포함하는, 상기 항-CLDN18.2 항체 접합체를 제조하는 방법.

청구항 48

제47항에 있어서, 화학적 산화제가 N-브로모석신이미드, 요오도젠(Iodogen) 또는 클로라민(Chloramine)-T인 제조 방법.

청구항 49

제7항 내지 제10항 중 어느 한 항의 항-CLDN18.2 항체 접합체를 제조하는 방법으로서, 항-CLDN18.2 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 킬레이터와 접합시켜 킬레이터-항체 접합체를 수득하는 단계, 및 상기 킬레이터-항체 접합체를 ^{64}Cu 또는 ^{89}Zr 과 반응시키는 단계를 포함하는, 상기 항-CLDN18.2 항체 접합체를 제조하는 방법.

청구항 50

제49항에 있어서, 킬레이터가 DFO(테르페록사민), DOTA(1,4,7,10-테트라아자사이클로도데칸-1,4,7,10-테트라아세트산), DTPA(NR-디에틸렌트리아민펜타아세트산), NOTA(1,4,7-트리아자사이클로노난-1,4,7-아세트산), TRITA(1,4,7,10-테트라아자사이클로트리데칸-N,N',N'',N'''-테트라아세트산); TETA(1,4,8,11-테트라아자사이클로테트라데칸-N,N',N'',N'''-테트라아세트산); 및 HETA(1,5,9,13-테트라아자사이클로헥사데칸-N,N',N'',N'''-테트라아세트산), EDTA(에틸렌디아민테트라아세트산), NETA({4-[2-(비스-카르복시메틸아미노)-에틸]-7-카르복시메틸-[1,4,7]트리아조난-1-일}-아세트산), TACN-TM(N,N',N'', 트리스(2-머캅토에틸)1,4,7-트리아자사이클로노난), TRAP(1,4,7-트리아자사이클로노난-1,4,7-트리스[메틸(2-카르복시에틸)포스핀산]), CP256, PCTA(3,6,9,15-테트라아자비사이클로[9.3.1]헵타데카-1(15),11,13-트리엔-3,6,9-트리아세트산), 포르피린, 폴리아민, 크라운 에테르, 비스-티오세미카르바존, 폴리옥심 및 이들의 유도체를 포함하는 것인 제조 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 핵의학, 구체적으로 방사성 표지부착된 CLDN18.2 항체 접합체의 제조 및 적용에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 전 세계적으로, 위암의 발병률과 사망률은 각각 5위와 3위를 차지한다. 위암의 발병률은 중국에서 2위를 차지한다. 현재, 진행성 위암의 1차 치료에서 생존 이익이 있는 유일한 약물은 인간 표피 성장 인자 수용체 2(HER2)를 표적화하는 단일클론 항체인 트라스투주맙이다. 최근에, HER2를 표적화하는 신약(항체-약물 접합체, 이중특이적 항체, 소분자 억제제 등)의 좋은 소식이 자주 보고되고 있지만, HER2 양성 위암 환자의 비율이 낮고(단지 10% 내지 12%), 이들 중 대다수는 1년 이내에 약물 내성을 발생시키고 약물 내성 후 정확하고 효과적인 표적화 약물이 없다는 당혹스러운 상황을 여전히 끝낼 수 없다. 따라서, 위암 치료를 위한 새로운 표적을 탐색하는 것은 진행성 위암 치료의 병목현상을 돌파하는 열쇠이다.

[0003] 2016년 FAST 연구는 CLDN18.2를 표적화하는 단일클론 항체인 IMAB362에 대한 일련의 실험을 통해 위암의 "새로운 스타" 표적인 클라우딘(Claudin) 18.2(클라우딘 18 스플라이스 변이체 2, CLDN18.2)를 검증하였다. 그러나, 현재까지 항-CLDN18.2 핵종 프로브의 보고는 공개되지 않았다.

[0004] 현대 분자 영상화 기술의 포괄적, 비침습적, 실시간 및 동적 특성을 이용하여 CLDN18.2의 진단을 위한 높은 특이성을 가진 분자 프로브를 개발하는 것은 큰 의미가 있다. 따라서, 신규 항-CLDN18.2 핵종 프로브 및 치료제에 대한 상당한 요구가 존재한다.

발명의 내용

[0005] 본 개시내용 전반에 걸쳐, 단수형 용어는 이 용어의 하나 또는 하나 초과(즉, 적어도 하나)의 문법적 객체를 지칭하기 위해 본원에서 사용된다. 예를 들어, "항체"는 하나의 항체 또는 하나 초과의 항체를 의미한다.

[0006] 한 측면에서, 본 개시내용은 방사성핵종에 접합된 항-CLDN18.2 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 항-CLDN18.2 항체 접합체를 제공하는 것으로, 이때 상기 방사성핵종은 치료 방사성핵종 또는 진단 방사성핵종을 포함한다.

[0007] 일부 실시양태에서, 치료 방사성핵종은 ^{111}In , $^{111\text{m}}\text{In}$, ^{177}Lu , ^{212}Bi , ^{213}Bi , ^{211}At , ^{62}Cu , ^{64}Cu , ^{67}Cu , ^{90}Y , ^{125}I , ^{131}I , ^{32}P , ^{33}P , ^{47}Sc , ^{111}Ag , ^{67}Ga , ^{142}Pr , ^{153}Sm , ^{161}Tb , ^{166}Dy , ^{166}Ho , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{189}Re , ^{212}Pb , ^{223}Ra , ^{225}Ac , ^{59}Fe , ^{75}Se , ^{77}As , ^{89}Sr , ^{99}Mo , ^{105}Rh , ^{109}Pd , ^{143}Pr , ^{149}Pm , ^{169}Er , ^{194}Ir , ^{198}Au , ^{199}Au , ^{199}Au 및 ^{211}Pb 로 구성된 군으로부터 선택된다.

[0008] 일부 실시양태에서, 진단 방사성핵종은 ^{18}F , ^{32}P , ^{33}P , ^{45}Ti , ^{47}Sc , ^{52}Fe , ^{59}Fe , ^{62}Cu , ^{64}Cu , ^{67}Cu , ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{75}Sc , ^{77}As , ^{86}Y , ^{90}Y , ^{89}Sr , ^{89}Zr , ^{94}Tc , ^{94}Tc , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{99}Mo , ^{105}Pd , ^{105}Rh , ^{111}Ag , ^{111}In , ^{123}I , ^{124}I , ^{125}I , ^{131}I , ^{142}Pr , ^{143}Pr , ^{149}Pm , ^{153}Sm , ^{154}Gd , $^{154\text{m}}\text{Gd}$, ^{161}Tb , ^{166}Dy , ^{166}Ho , ^{169}Er , ^{175}Lu , ^{177}Lu , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{189}Re , ^{194}Ir , ^{198}Au , ^{199}Au , ^{211}At , ^{211}Pb , ^{212}Bi , ^{212}Pb , ^{213}Bi , ^{223}Ra 및 ^{225}Ac 로 구성된 군으로부터 선택된다.

[0009] 일부 실시양태에서, 진단 방사성핵종은 양전자 방출 단층촬영(PET) 또는 단일 광자 방출 컴퓨터 단층촬영(SPECT)에 의해 검출될 수 있다.

[0010] 일부 실시양태에서, 방사성핵종은 ^{64}Cu , ^{67}Cu , ^{89}Zr , ^{124}I , ^{86}Y , ^{90}Y , ^{111}In , $^{123/131}\text{I}$, ^{177}Lu , ^{11}C , ^{14}C , ^{41}Ca , ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{13}N , ^{15}O , ^{44}Sc , ^{18}F , $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 및 $^{90\text{m}}\text{Tc}$ 로 구성된 군으로부터 선택된다.

[0011] 일부 실시양태에서, 방사성핵종은 ^{124}I , ^{123}I 또는 ^{131}I 이다.

[0012] 일부 실시양태에서, 방사성핵종은 ^{64}Cu , ^{67}Cu 또는 ^{89}Zr 이다.

[0013] 일부 실시양태에서, ^{64}Cu , ^{67}Cu 또는 ^{89}Zr 은 킬레이터를 통해 항체 또는 이의 항원 결합 단편에 표지부착된다.

- [0014] 일부 실시양태에서, 킬레이터는 킬레이트화를 위해 3개 이상의 원자를 포함하고, 이때 각각의 원자는 질소, 황, 산소 및 인으로 구성된 군으로부터 선택된다.
- [0015] 일부 실시양태에서, 킬레이터는 DFO(테르페록사민), DOTA(1,4,7,10-테트라아자사이클로도데칸-1,4,7,10-테트라아세트산), DTPA(NR-디에틸렌트리아민펜타아세트산), NOTA(1,4,7-트리아자사이클로노난-1,4,7-아세트산), 1,4,7,10-테트라아자사이클로트리데칸-N,N',N'',N'''-테트라아세트산(본원에서 TRITA로서 약칭됨); 1,4,8,11-테트라아자사이클로테트라데칸-N,N',N'',N'''-테트라아세트산(본원에서 TETA로서 약칭됨); 및 1,5,9,13-테트라아자사이클로헥사데칸-N,N',N'',N'''-테트라아세트산(본원에서 HETA로서 약칭됨), 에틸렌디아민테트라아세트산(본원에서 EDTA로서 약칭됨) 또는 디에틸렌트리아민펜타아세트산(DTPA)을 포함한다.
- [0016] 일부 실시양태에서, 방사성핵종은 ^{64}Cu 또는 ^{67}Cu 이고 킬레이터는 TETA, NOTA, NODA 또는 NODGA를 포함하거나, 방사성핵종은 ^{89}Zr 이고 킬레이터는 DFO를 포함한다.
- [0017] 일부 실시양태에서, 항-CLDN18.2 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 중쇄 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3, 및/또는 경쇄 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3 서열을 포함하고, 이때:
- [0018] HCDR1 서열은 GYNN(서열번호 1) 또는 TYFIGVG(서열번호 13), 또는 적어도 80% 서열 동일성을 가진 이의 상동 서열을 포함하고;
- [0019] HCDR2 서열은 $X_1IDPYYX_2X_3TX_4YNQKFX_5G$ (서열번호 32) 또는 HIWWNDNKYYNTALKS(서열번호 15), 또는 적어도 80% 서열 동일성을 가진 이의 상동 서열을 포함하고;
- [0020] HCDR3 서열은 $X_6X_7X_8GNAFDY$ (서열번호 33) 또는 MGSGAWFTY(서열번호 17), 또는 적어도 80% 서열 동일성을 가진 이의 상동 서열을 포함하고;
- [0021] LCDR1 서열은 $KSSQX_9LX_{10}NX_{11}GNX_{12}KNYLT$ (서열번호 34), 또는 적어도 80% 서열 동일성을 가진 이의 상동 서열을 포함하고;
- [0022] LCDR2 서열은 $WASTRX_{13}S$ (서열번호 35), 또는 적어도 80% 서열 동일성을 가진 이의 상동 서열을 포함하고;
- [0023] LCDR3 서열은 $QNDYX_{14}X_{15}PX_{16}T$ (서열번호 36), 또는 적어도 80% 서열 동일성을 가진 이의 상동 서열을 포함하고;
- [0024] 이때 X_1 은 N 또는 Y 또는 H이고, X_2 는 G 또는 V이고, X_3 은 A 또는 G 또는 T이고, X_4 는 R 또는 T 또는 S이고, X_5 는 K 또는 R이고, X_6 은 S 또는 M이고, X_7 은 Y 또는 F이고, X_8 은 Y 또는 H이고, X_9 는 S 또는 N이고, X_{10} 은 L 또는 F이고, X_{11} 은 S 또는 N이고, X_{12} 는 Q 또는 L이고, X_{13} 은 E 또는 K이고, X_{14} 는 S 또는 Y이고, X_{15} 는 F 또는 Y이고, X_{16} 은 F 또는 L이다.
- [0025] 일부 실시양태에서, 항-CLDN18.2 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 다음을 포함한다:
- [0026] 중쇄 가변 영역은 서열번호 1의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열번호 3의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열번호 5의 서열을 포함하는 HCDR3을 포함하고; 경쇄 가변 영역은 서열번호 2의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열번호 4의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열번호 6의 서열을 포함하는 LCDR3을 포함하거나;
- [0027] 중쇄 가변 영역은 서열번호 1의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열번호 7의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열번호 5의 서열을 포함하는 HCDR3을 포함하고; 경쇄 가변 영역은 서열번호 2의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열번호 4의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열번호 8의 서열을 포함하는 LCDR3을 포함하거나;
- [0028] 중쇄 가변 영역은 서열번호 1의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열번호 9의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열번호 11의 서열을 포함하는 HCDR3을 포함하고; 경쇄 가변 영역은 서열번호 10의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열번호 4의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열번호 6의 서열을 포함하는 LCDR3을 포함하거나;
- [0029] 중쇄 가변 영역은 서열번호 13의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열번호 15의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열번호 17의 서열을 포함하는 HCDR3을 포함하고; 경쇄 가변 영역은 서열번호 2의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열번호 4의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열번호 12의 서열을 포함하는 LCDR3을 포함하거나;
- [0030] 중쇄 가변 영역은 서열번호 1의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열번호 19의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열번호 21의 서열을 포함하는 HCDR3을 포함하고; 경쇄 가변 영역은 서열번호 14의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열번호 16의

서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열번호 18의 서열을 포함하는 LCDR3을 포함하거나;

- [0031] 중쇄 가변 영역은 서열번호 1의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열번호 22의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열번호 5의 서열을 포함하는 HCDR3을 포함하고; 경쇄 가변 영역은 서열번호 20의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열번호 4의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열번호 6의 서열을 포함하는 LCDR3을 포함한다.
- [0032] 일부 실시양태에서, 중쇄 가변 영역은 중쇄 HFR1, HFR2, HFR3 및 HFR4 중 하나 이상을 추가로 포함하고/하거나, 경쇄 가변 영역은 경쇄 LFR1, LFR2, LFR3 및 LFR4 중 하나 이상을 추가로 포함하고, 이때
- [0033] HFR1은 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYX₁₇FT(서열번호 54), 또는 적어도 80% 서열 동일성을 가진 이의 상동 서열을 포함하고,
- [0034] HFR2는 WVX₁₈QAPGQGLEWX₁₉G(서열번호 55), 또는 적어도 80% 서열 동일성을 가진 이의 상동 서열을 포함하고,
- [0035] HFR3 서열은 RVTX₂₀TIDKSTSTVYMELSSLRSEDVAVYYCAR(서열번호 56), 또는 적어도 80% 서열 동일성을 가진 이의 상동 서열을 포함하고,
- [0036] HFR4는 WGQGTITVTVSS(서열번호 57), 또는 적어도 80% 서열 동일성을 가진 이의 상동 서열을 포함하고,
- [0037] LFR1은 DIVMTQSPDLSAVSLGERATX₂₁NC(서열번호 58), 또는 적어도 80% 서열 동일성을 가진 이의 상동 서열을 포함하고,
- [0038] LFR2는 WYQQKPGQPPKLLIY(서열번호 59), 또는 적어도 80% 서열 동일성을 가진 이의 상동 서열을 포함하고,
- [0039] LFR3은 GVPDRFX₂₂GSGSGTDFLTITSSLAEDVAVYYC(서열번호 60), 또는 적어도 80% 서열 동일성을 가진 이의 상동 서열을 포함하고,
- [0040] LFR4는 FGGGTKEVEIK(서열번호 61), 또는 적어도 80% 서열 동일성을 가진 이의 상동 서열을 포함하고,
- [0041] 이때 X₁₇은 T 또는 S이고, X₁₈은 R 또는 K이고, X₁₉는 M 또는 I이고, X₂₀은 M 또는 L이고, X₂₁은 I 또는 M이고, X₂₂는 S 또는 T이다.
- [0042] 일부 실시양태에서, HFR1은 서열번호 62 및 63으로 구성된 군으로부터 선택된 서열을 포함하고,
- [0043] HFR2는 서열번호 64 및 65로 구성된 군으로부터 선택된 서열을 포함하고,
- [0044] HFR3은 서열번호 66 및 67로 구성된 군으로부터 선택된 서열을 포함하고,
- [0045] HFR4는 서열번호 57의 서열을 포함하고,
- [0046] LFR1은 서열번호 68 및 69로 구성된 군으로부터 선택된 서열을 포함하고,
- [0047] LFR2는 서열번호 59의 서열을 포함하고,
- [0048] LFR3은 서열번호 70 및 71로 구성된 군으로부터 선택된 서열을 포함하고,
- [0049] LFR4는 서열번호 61의 서열을 포함한다.
- [0050] 일부 실시양태에서, 중쇄 가변 영역은 서열번호 25, 서열번호 27, 서열번호 29, 서열번호 37, 서열번호 39, 서열번호 41, 서열번호 43, 서열번호 45 및 서열번호 47, 및 적어도 80% 서열 동일성을 가지면서도 CLDN18.2에 대한 특이적 결합 친화성을 유지하는 이의 상동 서열로 구성된 군으로부터 선택된 서열을 포함한다.
- [0051] 일부 실시양태에서, 경쇄 가변 영역은 서열번호 26, 서열번호 28, 서열번호 38, 서열번호 40, 서열번호 42, 서열번호 44, 서열번호 46, 서열번호 48, 및 적어도 80% 서열 동일성을 가지면서도 CLDN18.2에 대한 특이적 결합 친화성을 유지하는 이의 상동 서열로 구성된 군으로부터 선택된 서열을 포함한다.
- [0052] 일부 실시양태에서,
- [0053] 중쇄 가변 영역은 서열번호 23의 서열을 포함하고 경쇄 가변 영역은 서열번호 24의 서열을 포함하거나;
- [0054] 중쇄 가변 영역은 서열번호 25의 서열을 포함하고, 경쇄 가변 영역은 서열번호 26의 서열을 포함하거나;
- [0055] 중쇄 가변 영역은 서열번호 27의 서열을 포함하고 경쇄 가변 영역은 서열번호 28의 서열을 포함하거나;

- [0056] 중쇄 가변 영역은 서열번호 29의 서열을 포함하고, 경쇄 가변 영역은 서열번호 26 또는 28의 서열을 포함하거나;
- [0057] 중쇄 가변 영역은 서열번호 37의 서열을 포함하고 경쇄 가변 영역은 서열번호 38의 서열을 포함하거나;
- [0058] 중쇄 가변 영역은 서열번호 39의 서열을 포함하고 경쇄 가변 영역은 서열번호 40의 서열을 포함하거나;
- [0059] 중쇄 가변 영역은 서열번호 41의 서열을 포함하고 경쇄 가변 영역은 서열번호 42의 서열을 포함하거나;
- [0060] 중쇄 가변 영역은 서열번호 43의 서열을 포함하고 경쇄 가변 영역은 서열번호 44의 서열을 포함하거나;
- [0061] 중쇄 가변 영역은 서열번호 45의 서열을 포함하고 경쇄 가변 영역은 서열번호 46의 서열을 포함하거나;
- [0062] 중쇄 가변 영역은 서열번호 47의 서열을 포함하고 경쇄 가변 영역은 서열번호 48의 서열을 포함한다.
- [0063] 일부 실시양태에서, 항-CLDN18.2 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 하나 이상의 아미노산 잔기 치환 또는 변형을 추가로 포함하면서도 인간 CLDN18.2에 대한 특이적 결합 친화성을 유지한다.
- [0064] 일부 실시양태에서, 치환 또는 변형 중 적어도 하나는 CDR 서열 중 하나 이상, 및/또는 VH 또는 VL 서열의 비-CDR 영역 중 하나 이상에 존재한다.
- [0065] 일부 실시양태에서, 항-CLDN18.2 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 면역글로불린 불변 영역, 임의로 인간 Ig의 불변 영역, 또는 임의로 인간 IgG의 불변 영역을 추가로 포함한다.
- [0066] 일부 실시양태에서, 불변 영역은 인간 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4의 불변 영역을 포함한다.
- [0067] 일부 실시양태에서, 인간 IgG1의 불변 영역은 서열번호 49, 또는 적어도 80% 서열 동일성을 가진 이의 상동 서열을 포함한다.
- [0068] 일부 실시양태에서, 항-CLDN18.2 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 인간화된다.
- [0069] 일부 실시양태에서, 항-CLDN18.2 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 디아바디, Fab, Fab', F(ab')₂, Fd, Fv 단편, 디설파이드 안정화 Fv 단편(dsFv), (dsFv)₂, 이중특이적 dsFv(dsFv-dsFv'), 디설파이드 안정화 디아바디(ds 디아바디), 단일 쇠 항체 분자(scFv), scFv 이량체(2가 디아바디), 다중특이적 항체, 낙타화 단일 도메인 항체, 나노바디, 도메인 항체 및 2가 도메인 항체이다.
- [0070] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 본원에서 제공된 항체 접합체 및 하나 이상의 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약학 조성물을 제공한다.
- [0071] 일부 실시양태에서, 방사화학적 순도는 적어도 95%(예를 들어, 97%, 98%, 99%)이다.
- [0072] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 대상체의 관심 있는 부위의 영상을 획득하는 방법으로서,
- [0073] a) 본원에서 제공된 항체 접합체 및/또는 본원에서 제공된 약학 조성물을 유효량으로 대상체에게 투여하는 단계;
- [0074] b) 상기 대상체의 관심 있는 부위에 대해 양전자 방출 단층촬영(PET) 또는 SPECT를 수행하는 단계;
- [0075] c) 상기 대상체에서 방사성핵종으로부터 검출 가능한 신호를 식별하는 단계; 및
- [0076] d) 검출 가능한 신호의 영상을 생성함으로써, 대상체의 관심 있는 부위의 영상을 획득하는 단계
- [0077] 를 포함하는 방법을 제공한다.
- [0078] 일부 실시양태에서, 관심 있는 부위는 클라우딘 18.2를 발현하거나 발현하는 것으로 의심되는 부위이다.
- [0079] 일부 실시양태에서, 관심 있는 부위는 종양을 갖거나 가진 것으로 의심된다.
- [0080] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 비침습적 방식으로 대상체에서 클라우딘 18.2 발현을 검출하거나 시각화하는 방법으로서,
- [0081] a) 본원에서 제공된 항체 접합체 및/또는 본원에서 제공된 약학 조성물을 유효량으로 대상체에게 투여하는 단계;
- [0082] b) 상기 대상체에 대해 양전자 방출 단층촬영(PET) 또는 SPECT를 수행하는 단계;

- [0083] c) 상기 대상체의 관심 있는 부위에서 방사성핵종으로부터 검출 가능한 신호를 식별하는 단계; 및
- [0084] d) 식별된 검출 가능한 신호를 기반으로 상기 대상체의 관심 있는 부위에서 클라우딘 18.2 발현을 확인하거나 시각화하는 단계
- [0085] 를 포함하는 방법을 제공한다.
- [0086] 일부 실시양태에서, 상기 방법은 치료 유효량의 항-클라우딘 18.2 요법을, 관심 있는 부위에서 클라우딘 18.2 발현을 가진 것으로 식별된 대상체에게 투여하는 단계를 추가로 포함한다.
- [0087] 일부 실시양태에서, 상기 방법은 식별된 검출 가능한 신호를 기반으로 대상체의 관심 있는 부위에서 클라우딘 18.2 발현의 분포를 확인하는 단계를 추가로 포함한다.
- [0088] 일부 실시양태에서, 상기 방법은 대상체의 관심 있는 부위에서 클라우딘 18.2 발현의 불균질성을 확인하는 단계를 추가로 포함한다.
- [0089] 일부 실시양태에서, 관심 있는 부위는 종양이다.
- [0090] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 치료 기간 동안 치료를 받은 대상체에서 비침습적 방식으로 치료 효능, 치료에 대한 반응성, 또는 내성 또는 재발 또는 전이의 발생을 모니터링하는 방법으로서,
- [0091] a) 본원에서 제공된 항체 접합체 및/또는 본원에서 제공된 약학 조성물을 유효량으로 대상체에게 투여하는 단계;
- [0092] b) 상기 대상체에 대해 양전자 방출 단층촬영(PET) 또는 SPECT를 수행하는 단계;
- [0093] c) 상기 대상체의 관심 있는 부위에서 방사성핵종으로부터 검출 가능한 신호를 식별하는 단계;
- [0094] d) 식별된 검출 가능한 신호를 기반으로 상기 대상체의 관심 있는 부위에서 치료 후 클라우딘 18.2 발현을 확인하는 단계;
- [0095] e) 치료 후 클라우딘 18.2 발현 수준 또는 분포를, 각각 치료 기간 전에 대상체로부터 획득된 기준시점 클라우딘 18.2 발현 수준 또는 분포와 비교하여, 상기 대상체에서 클라우딘 18.2 발현 수준 또는 분포의 치료 후 변화를 확인하는 단계; 및
- [0096] f) 단계 (e)에서 확인된 변화를 기반으로 치료 효능, 치료에 대한 반응성, 또는 내성 또는 재발 또는 전이의 발생을 확인하는 단계
- [0097] 를 포함하는 방법을 제공한다.
- [0098] 일부 실시양태에서, 기준시점 클라우딘 18.2 발현 수준 또는 분포는 유사한 방법을 이용함으로써 확인된다.
- [0099] 일부 실시양태에서, 기준시점 클라우딘 18.2 발현 수준 또는 분포는 본원에서 제공된 항체 접합체 및/또는 본원에서 제공된 약학 조성물을 유효량으로 대상체에게 투여하고, 상기 대상체에 대해 양전자 방출 단층촬영(PET) 또는 SPECT를 수행하고, 상기 대상체의 관심 있는 부위에서 방사성핵종으로부터 검출 가능한 신호를 식별하고, 식별된 검출 가능한 신호를 기반으로 상기 대상체의 관심 있는 부위에서 기준시점 클라우딘 18.2 발현을 확인함으로써, 치료 기간 전(즉, 치료 전)에 확인된다. 일부 실시양태에서, 기준시점 클라우딘 18.2 발현을 확인하기 위한 관심 있는 부위는 치료 후 클라우딘 18.2 발현을 확인하기 위한 관심 있는 부위와 동일하거나 적어도 유사하다.
- [0100] 일부 실시양태에서, 클라우딘 18.2 발현의 증가된 수준 또는 확산은 감소된 치료 효능, 치료에 대한 감소된 반응성, 또는 내성의 존재 또는 재발의 존재를 표시한다.
- [0101] 일부 실시양태에서, 대상체는 암을 가진다.
- [0102] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 CLDN18.2 관련 질환 또는 병태의 치료를 필요로 하는 대상체에서 CLDN18.2 관련 질환 또는 병태를 치료하는 방법으로서, 본원에서 제공된 항-CLDN18.2 항체 접합체 및/또는 본원에서 제공된 약학 조성물을 치료 유효량으로 상기 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다.
- [0103] 일부 실시양태에서, 질환 또는 병태는 암, 임의로 CLDN18.2 발현 암이다.
- [0104] 일부 실시양태에서, 대상체는 CLDN18.2 발현 암을 가진 것으로 식별된다.

- [0105] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 본원에서 제공된 항-CLDN18.2 항체 접합체 또는 본원에서 제공된 조성물을 포함하는 키트를 제공한다.
- [0106] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 본원에서 제공된 제1 항-CLDN18.2 항체 접합체 및 본원에서 제공된 제2 항-CLDN18.2 항체 접합체를 포함하는 키트를 제공하는 것으로, 이때 제1 항-CLDN18.2 항체 접합체는 진단 방사성핵종을 포함하고, 제2 항-CLDN18.2 항체 접합체는 치료 방사성핵종을 포함한다.
- [0107] 일부 실시양태에서, 상기 키트는 본원에서 제공된 방법에 사용하기 위한 것이다.
- [0108] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 본원에서 제공된 대상체의 관심 있는 부위의 영상을 획득하는 방법에 사용하기 위한, 또는 본원에서 제공된 비침습적 방식으로 대상체에서 클라우딘 18.2 발현을 검출하거나 시각화하는 방법에 사용하기 위한, 또는 본원에서 제공된 비침습적 방식으로 대상체에서 치료 효능, 치료에 대한 반응성, 또는 내성 또는 재발 또는 전이의 발생을 모니터링하는 방법에 사용하기 위한 의약의 제조에 있어서 본원에서 제공된 항-CLDN18.2 항체 접합체 또는 본원에서 제공된 조성물의 용도를 제공하는 것으로, 이때 상기 항-CLDN18.2 항체 접합체는 진단 방사성핵종을 포함한다.
- [0109] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 본원에서 제공된 CLDN18.2 관련 질환 또는 병태의 치료를 필요로 하는 대상체에서 CLDN18.2 관련 질환 또는 병태를 치료하는 방법에 사용하기 위한 의약의 제조에 있어서 본원에서 제공된 항-CLDN18.2 항체 접합체 또는 본원에서 제공된 조성물의 용도를 제공하는 것으로, 이때 상기 항-CLDN18.2 항체 접합체는 치료 방사성핵종을 포함한다.
- [0110] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 본원에서 제공된 항-CLDN18.2 항체 접합체를 제조하는 방법으로서, 효소적 또는 화학적 산화제의 존재 하에서 항-CLDN18.2 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 ^{124}I , ^{123}I 또는 ^{131}I 로 표지부착된 요오다이드 화합물과 반응시키는 단계를 포함하는 방법을 제공한다.
- [0111] 일부 실시양태에서, 화학적 산화제는 N-브로모석신이미드, 요오도젠(Iodogen) 또는 클로라민(Chloramine)-T이다.
- [0112] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 본원에서 제공된 항-CLDN18.2 항체 접합체를 제조하는 방법으로서, 항-CLDN18.2 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 킬레이터와 접합시켜 킬레이터-항체 접합체를 획득하는 단계, 및 상기 킬레이터-항체 접합체를 ^{64}Cu 또는 ^{89}Zr 과 반응시키는 단계를 포함하는 방법을 제공한다.
- [0113] 일부 실시양태에서, 킬레이터는 DFO(데르페록사민), DOTA(1,4,7,10-테트라아자사이클로도데칸-1,4,7,10-테트라아세트산), DTPA(NR-디에틸렌트리아민펜타아세트산), NOTA(1,4,7-트리아자사이클로노난-1,4,7-아세트산), TRITA(1,4,7,10-테트라아자사이클로트리데칸-N,N',N'',N'''-테트라아세트산); TETA(1,4,8,11-테트라아자사이클로테트라데칸-N,N',N'',N'''-테트라아세트산); 및 HETA(1,5,9,13-테트라아자사이클로헥사데칸-N,N',N'',N'''-테트라아세트산), EDTA(에틸렌디아민테트라아세트산), NETA({4-[2-(비스-카르복시메틸아미노)-에틸]-7-카르복시메틸-[1,4,7]트리아조난-1-일}-아세트산), TACN-TM(N,N',N'',N'''-트리스(2-머캅토에틸)1,4,7-트리아자사이클로노난), TRAP(1,4,7-트리아자사이클로노난-1,4,7-트리스[메틸(2-카르복시에틸)포스핀산]), CP256, PCTA(3,6,9,15-테트라아자비사이클로[9.3.1]헵타데카-1(15),11,13-트리엔-3,6,9-트리아세트산), 포르피린, 폴리아민, 크라운 에테르, 비스-티오세미카르바존, 폴리옥심 및 이들의 유도체를 포함한다.

도면의 간단한 설명

- [0114] 도 1은 ^{124}I -18B10 프로브의 방사표지부착물 및 방사화학적 순도를 보여준다: A) 정제 후 방사화학적 순도; B) 정제 후 방사화학적 순도; C) PBS에서 1시간 후 방사화학적 순도; D) PBS에서 48시간 후 방사화학적 순도.
- 도 2는 MKN45-CLND18.2 high/MKN45 세포에서의 ^{124}I -18B10 및 이의 대조군의 흡수를 보여준다.
- 도 3은 정상 쿤밍(Kunming) 마우스에서의 ^{124}I -18B10의 생체분포를 보여준다.
- 도 4는 본 발명의 실시예 5의 CLDN18.2 양성/음성 PDX 모델에서 ^{124}I -18B10 및 이의 대조군과 18F-FDG의 마이크로(Micro)-PET 영상화 비교를 보여준다.
- 도 5a 및 5b는 에피토프 맵핑을 이용하여 돌연변이된 hCLDN 18.2 변이체에 대한 키메라 항체의 결합 신호를 보여주는 막대 그래프이다. E56이 Q로 돌연변이되었을 때 18B10-C의 결합이 완전히 상실되었다. 이 변화는 59A9-C

를 제외한 IMAB362 및 다른 키메라 항체에도 적용되었다. A42, N45와 같은 다른 아미노산도 IMAB362 및 다른 항체의 결합에 어느 정도 기여하였지만, 18B10-C의 경우에는 그렇지 않았다.

도 6은 PDX 마우스에서의 ^{124}I -18B10의 생체분포를 보여준다.

도 7은 처음 5명의 환자의 영상으로부터 도출된, 환자의 ^{124}I -18B10의 생체분포를 보여준다.

도 8은 환자의 난소 병변에서의 ^{124}I -18B10의 축적을 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0115] 본 개시내용의 다음 설명은 단지 본 개시내용의 다양한 실시양태를 예시하기 위한 것이다. 따라서, 논의된 특정 변형은 본 개시내용의 범위에 대한 제한으로서 해석되어서는 안 된다. 본 개시내용의 범위를 벗어나지 않으면서 다양한 균등물, 변화 및 변형을 수행할 수 있다는 것은 당업자에게 자명할 것이고, 이러한 균등한 실시양태도 본원에 포함되는 것으로 이해되어야 한다. 간행물, 특허 및 특허 출원을 포함하는, 본원에서 인용된 모든 참고 문헌은 전체적으로 본원에 참고로 포함된다.

[0116] 정의

[0117] 본원에서 사용된 바와 같이, 본원에서 달리 표시되어 있지 않거나 문맥상 명확히 모순되지 않는 한, 본 발명의 맥락(특히 청구범위의 맥락)에서 단수형 용어 및 유사한 용어는 단수형 및 복수형 둘 다를 커버하는 것으로 해석되어야 한다.

[0118] 본원에서 사용된 용어 "항체"는 특정 항원에 결합하는 임의의 면역글로불린, 단일클론 항체, 다중클론 항체, 다 가 항체, 2가 항체, 1가 항체, 다중특이적 항체 또는 이중특이적 항체를 포함한다. 천연 온전한 항체는 2개의 중쇄(H)와 2개의 경쇄(L)를 포함한다. 포유동물 중쇄는 알파, 델타, 엡실론, 감마 및 뮤로서 분류되며, 각각의 중쇄는 가변 영역(V_H), 제1 불변 영역, 제2 불변 영역 및 제3 불변 영역(각각 C_{H1} , C_{H2} 및 C_{H3})으로 구성되고; 포유동물의 경쇄는 λ 또는 κ 로서 분류되지만, 각각의 경쇄는 가변 영역(V_L) 및 불변 영역으로 구성된다. 항체는 "Y" 모양을 갖고, 이때 Y의 줄기는 디설파이드 결합을 통해 함께 결합된 2개의 중쇄의 제2 불변 영역 및 제3 불변 영역으로 구성된다. Y의 각각의 아암은 단일 경쇄의 가변 영역 및 불변 영역에 결합된 단일 중쇄의 가변 영역 및 제1 불변 영역을 포함한다. 경쇄 및 중쇄의 가변 영역은 항원 결합을 담당한다. 두 쇠에서 가변 영역은 일반적으로 상보성 결정 영역(CDR)(LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 경쇄 CDR, 및 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하는 중쇄 CDR)으로 불리는 3개의 고도 가변 루프를 함유한다. 본원에 개시된 항체 및 항원 결합 도메인에 대한 CDR 경계는 카바트(Kabat), IMGT, AbM, 초티아(Chothia) 또는 A1-라지카니(Lazikani)의 관례에 의해 정의될 수 있거나 식별될 수 있다(A1-Lazikani, B., Chothia, C., Lesk, A. M., J. Mol. Biol., 273(4), 927 (1997); Chothia, C. et al., J. Mol Biol. Dec 5;186(3):651-63 (1985); Chothia, C. and Lesk, A.M., J. Mol. Biol., 196, 901 (1987); N. R. Whitelegg et al, Protein Engineering, v13(12), 819-824 (2000); Chothia, C. et al., Nature. Dec 21-28;342(6252):877-83 (1989); Kabat E.A. et al., National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991); Marie-Paule Lefranc et al, Developmental and Comparative Immunology, 27: 55-77 (2003); Marie-Paule Lefranc et al, Immunome Research, 1(3), (2005); Marie-Paule Lefranc, Molecular Biology of B cells (second edition), chapter 26, 481-514, (2015)). 3개의 CDR은 CDR보다 더 잘 보존되어 있고 초가변 루프를 지지하는 스캐폴드를 형성하는 프레임워크 영역(FR)으로서 알려진 플랭킹 스트레치 사이에 삽입되어 있다. 중쇄 및 경쇄의 불변 영역은 항원 결합에 관여하지 않으나, 다양한 이펙터 기능을 나타낸다. 항체는 그의 중쇄의 불변 영역의 아미노산 서열을 기준으로 클래스로 지정된다. 항체의 5가지 주요 클래스 또는 이소타입은 각각 알파, 델타, 엡실론, 감마 및 뮤 중쇄의 존재를 특징으로 하는 IgA, IgD, IgE, IgG 및 IgM이다. 몇몇 주요 항체 클래스는 IgG1(감마1 중쇄), IgG2(감마2 중쇄), IgG3(감마3 중쇄), IgG4(감마4 중쇄), IgA1(알파1 중쇄) 또는 IgA2(알파2 중쇄)와 같은 서브클래스로 나뉜다. 특정 실시양태에서, 본원에서 제공된 항체는 그의 임의의 항원 결합 단편을 포함한다.

[0119] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "항원 결합 단편"은 하나 이상의 CDR을 포함하는 항체의 단편으로부터 형성된 항체 단편, 또는 항원에 결합하지만 온전한 천연 항체 구조를 포함하지 않는 임의의 다른 항체 부분을 지칭한다. 항원 결합 단편의 예는 디아바디, Fab, Fab', F(ab')₂, Fd, Fv 단편, 디설파이드 안정화 Fv 단편(dsFv), (dsFv)₂, 이중특이적 dsFv(dsFv-dsFv'), 디설파이드 안정화 디아바디(ds 디아바디), 단일 쇠 항체 분자

(scFv), scFv 이량체(2가 디아바디), 다중특이적 항체, 낙타화 단일 도메인 항체, 나노바디, 도메인 항체 및 2가 도메인 항체를 포함하나 이들로 제한되지 않는다. 항원 결합 단편은 모 항체가 결합하는 항원과 동일한 항원에 결합할 수 있다. 특정 실시양태에서, 항원 결합 단편은 특정 인간 항체로부터의 하나 이상의 CDR을 포함할 수 있다.

[0120] 항체와 관련하여 "Fab"는 디설파이드 결합에 의해 단일 중쇄의 가변 영역 및 제1 불변 영역에 결합된 단일 경쇄(가변 영역 및 불변 영역 둘 다)로 구성된 항체의 1가 항원 결합 단편을 지칭한다. Fab는 힌지 영역의 중쇄 사이의 디설파이드 결합의 N-말단에 가까운 잔기에서 항체의 파파인 분해에 의해 수득될 수 있다.

[0121] "Fab'"는 힌지 영역의 일부를 포함하는 Fab 단편을 지칭하고, 이 단편은 힌지 영역의 중쇄 사이의 디설파이드 결합의 C-말단에 가까운 잔기에서 항체의 펩신 분해에 의해 수득될 수 있으므로 힌지 영역 내의 (하나 이상의 시스테인을 포함하는) 소수의 잔기가 Fab와 상이하다.

[0122] "F(ab')₂"는 2개의 경쇄 및 2개의 중쇄의 일부를 포함하는 Fab'의 이량체를 지칭한다.

[0123] 항체와 관련하여 "Fc"는 디설파이드 결합을 통해 제2 중쇄의 제2 불변 영역 및 제3 불변 영역에 결합된 제1 중쇄의 제2 불변 영역 및 제3 불변 영역으로 구성된 항체의 부분을 지칭한다. IgG 및 IgM Fc 영역은 3개의 중쇄 불변 영역(각각의 쇠에서 제2 중쇄 불변 영역, 제3 중쇄 불변 영역 및 제4 중쇄 불변 영역)을 함유한다. 이것은 항체의 파파인 분해에 의해 수득될 수 있다. 항체의 Fc 부분은 ADCC, ADCP 및 CDC와 같은 다양한 이펙터 기능을 담당하지만, 항원 결합에서는 작용하지 않는다.

[0124] 항체와 관련하여 "Fv"는 완전한 항원 결합 부위를 보유하는 항체의 가장 작은 단편을 지칭한다. Fv 단편은 단일 중쇄의 가변 영역에 결합된 단일 경쇄의 가변 영역으로 구성된다. "dsFv"는 단일 경쇄의 가변 영역과 단일 중쇄의 가변 영역 사이의 결합이 디설파이드 결합인 디설파이드 안정화 Fv 단편을 지칭한다.

[0125] "단일 쇠 Fv 항체" 또는 "scFv"는 직접적으로 또는 펩티드 링커 서열을 통해 서로 연결된 경쇄 가변 영역과 중쇄 가변 영역으로 구성된 조작된 항체를 지칭한다(Huston JS *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 85:5879(1988)). "scFv 이량체"는 링커와 함께 2개의 중쇄 가변 영역 및 2개의 경쇄 가변 영역을 포함하는 단일 쇠를 지칭한다. 특정 실시양태에서, "scFv 이량체"는 하나의 모이어티의 V_H가 다른 모이어티의 V_L과 배위결합하고 동일한 항원(또는 에피토프) 또는 상이한 항원(또는 에피토프)을 표적화할 수 있는 2개의 결합 부위를 형성하도록 또 다른 V_H-V_L 모이어티와 이량체화된 V_H-V_L(펩티드 링커에 의해 연결됨)을 포함하는 2가 디아바디 또는 2가 ScFv(BsFv)이다. 다른 실시양태에서, "scFv 이량체"는 V_{H1}과 V_{L1}이 배위결합하고 V_{H2}와 V_{L2}가 배위결합하고 각각의 배위결합된 쌍이 상이한 항원 특이성을 갖도록 V_{L1}-V_{H2}(펩티드 링커에 의해 연결됨)와 회합된 V_{H1}-V_{L2}(마찬가지로 펩티드 링커에 의해 연결됨)를 포함하는 이중특이적 디아바디이다.

[0126] "단일 쇠 Fv-Fc 항체" 또는 "scFv-Fc"는 항체의 Fc 영역에 연결된 scFv로 구성된 조작된 항체를 지칭한다.

[0127] "낙타화 단일 도메인 항체", "중쇄 항체", "나노바디" 또는 "HCAb"는 2개의 V_H 도메인을 함유하고 경쇄를 함유하지 않는 항체를 지칭한다(Riechmann L. and Muyldermans S., *J Immunol Methods*. Dec 10;231(1-2):25-38 (1999); Muyldermans S., *J Biotechnol*. Jun;74(4):277-302 (2001); 국제 특허 출원 공개 제WO 94/04678호; 국제 특허 출원 공개 제WO 94/25591호, 미국 특허 제6,005,079호). 중쇄 항체는 원래 낙타과(낙타, 단봉낙타,라마)로부터 수득되었다. 경쇄가 결여되어 있음에도 불구하고, 낙타화 항체는 확실한 항원 결합 레퍼토리를 가진다(Hamers-Casterman C. *et al.*, *Nature*. Jun 3;363(6428):446-8 (1993); Nguyen VK. *et al.* "Heavy-chain antibodies in Camelidae; a case of evolutionary innovation," *Immunogenetics*. Apr;54(1):39-47 (2002); Nguyen VK. *et al.* *Immunology*. May;109(1):93-101 (2003)). 중쇄 항체의 가변 도메인(V_H 도메인)은 후천성 면역 반응에 의해 생성된 가장 작은 알려진 항원 결합 유닛을 대표한다(Koch-Nolte F. *et al.*, *FASEB J*. Nov;21(13):3490-8. Epub 2007 Jun 15 (2007)). "디아바디"는 2개의 항원 결합 부위를 가진 작은 항체 단편을 포함하고, 이때 상기 단편은 단일 폴리펩티드 쇠로 V_L 도메인에 연결된 V_H 도메인(V_H-V_L 또는 V_L-V_H)을 포함한다(예를 들어, 문헌[Holliger P. *et al.*, *Proc Natl Acad Sci U S A*. Jul 15;90(14):6444-8 (1993)]; 유럽 특허 제404097호; 국제 특허 출원 공개 제WO 93/11161호 참조). 동일한 쇠에 있는 2개의 도메인들은 링커가 너무 짧기 때문에 페어링될 수 없으므로, 이 도메인들은 또 다른 쇠의 상보적 도메인과 어플 수 없이 페어링됨으로써, 2개의 항원 결합 부위를 생성한다. 항원 결합 부위는 동일하거나 상이한 항원(또는 에피토프)을 표적화할 수 있다.

- [0128] "도메인 항체"는 중쇄의 가변 영역 또는 경쇄의 가변 영역만을 함유하는 항체 단편을 지칭한다. 특정 실시양태에서, 2개 이상의 V_H 도메인은 펩티드 링커와 공유결합되어 2가 또는 다가 도메인 항체를 형성한다. 2가 도메인 항체의 2개의 V_H 도메인은 동일하거나 상이한 항원을 표적화할 수 있다.
- [0129] 특정 실시양태에서, "(dsFv)₂"는 3개의 펩티드 쇠를 포함한다: 펩티드 링커에 의해 연결되고 디설파이드 가교에 의해 2개의 V_L 모이어티에 결합된 2개의 V_H 모이어티.
- [0130] 특정 실시양태에서, "이중특이적 ds 디아바디"는 V_{H1} 과 V_{L1} 사이의 디설파이드 가교를 통해 V_{L1} - V_{H2} (펩티드 링커에 의해 연결됨)에 결합된 V_{H1} - V_{L2} (마찬가지로 펩티드 링커에 의해 연결됨)를 포함한다.
- [0131] 특정 실시양태에서, "이중특이적 dsFv" 또는 "dsFv-dsFv"는 3개의 펩티드 쇠를 포함한다: 중쇄가 펩티드 링커(예를 들어, 길고 유연한 링커)에 의해 결합되고 디설파이드 가교를 통해 각각 V_{L1} 및 V_{L2} 모이어티와 페어링되는 V_{H1} - V_{H2} 모이어티. 각각의 디설파이드 페어링된 중쇄 및 경쇄는 상이한 항원 특이성을 가진다.
- [0132] 본원에서 사용된 용어 "인간화"는 항체 또는 항원 결합 단편이 비인간 동물로부터 유래한 CDR, 인간으로부터 유래한 FR 영역, 및 적용 가능한 경우 인간으로부터 유래한 불변 영역을 포함한다는 것을 의미한다. 특정 실시양태에서, 인간화 CLDN18.2 항체의 가변 영역 프레임워크의 아미노산 잔기는 서열 최적화를 위해 치환된다. 특정 실시양태에서, 인간화 CLDN18.2 항체 쇠의 가변 영역 프레임워크 서열은 상응하는 인간 가변 영역 프레임워크 서열과 적어도 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 100% 동일하다.
- [0133] 본원에서 사용된 용어 "키메라"는 한 종으로부터 유래한 중쇄 및/또는 경쇄의 일부, 및 상이한 종으로부터 유래한 중쇄 및/또는 경쇄의 나머지 부분을 가진 항체 또는 항원 결합 단편을 지칭한다. 예시적인 예에서, 키메라 항체는 인간으로부터 유래한 불변 영역, 및 비인간 종, 예컨대, 마우스로부터 유래한 가변 영역을 포함할 수 있다.
- [0134] 용어 "생식계열 서열"은 생식계열 면역글로불린 가변 영역 서열에 의해 코딩된 모든 다른 공지된 가변 영역 아미노산 서열에 비해 기준 가변 영역 아미노산 서열 또는 하위서열과 가장 높은 확인된 아미노산 서열 동일성을 공유하는 가변 영역 아미노산 서열 또는 하위서열을 코딩하는 핵산 서열을 지칭한다. 생식계열 서열은 또한 모든 다른 평가된 가변 영역 아미노산 서열에 비해 기준 가변 영역 아미노산 서열 또는 하위서열에 대해 가장 높은 아미노산 서열 동일성을 가진 가변 영역 아미노산 서열 또는 하위서열을 지칭할 수 있다. 생식계열 서열은 프레임워크 영역 단독, 상보성 결정 영역 단독, 프레임워크와 상보성 결정 영역, 가변 분절(상기 정의된 바와 같음), 또는 가변 영역을 포함하는 서열 또는 하위서열의 다른 조합일 수 있다. 서열 동일성은 본원에 기재된 방법을 이용함으로써, 예를 들어, BLAST, ALIGN, 또는 당분야에 공지된 또 다른 정렬 알고리즘을 이용하여 2개의 서열을 정렬함으로써 측정될 수 있다. 생식계열 핵산 또는 아미노산 서열은 기준 가변 영역 핵산 또는 아미노산 서열에 대해 적어도 약 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 서열 동일성을 가질 수 있다. 생식계열 서열은 예를 들어, 공개적으로 입수 가능한 국제 ImMunoGeneTics 데이터베이스(IMG) 및 V-base를 통해 확인될 수 있다.
- [0135] 본원에서 사용된 "항-CLDN18.2 항체" 또는 "CLDN18.2에 대한 항체"는 예를 들어, 진단 및/또는 치료 용도를 제공하기에 충분한 친화성으로 CLDN18.2(예를 들어, 인간 또는 비인간 CLDN18.2)에 특이적으로 결합할 수 있는 항체를 지칭한다.
- [0136] 본원에서 사용된 용어 "친화성"은 면역글로불린 분자(즉, 항체) 또는 이의 단편과 항원 사이의 비공유 상호작용의 강도를 지칭한다.
- [0137] 본원에서 사용된 용어 "특이적 결합" 또는 "특이적으로 결합한다"는 2개의 분자들 사이, 예를 들어, 항체와 항원 사이의 비-무작위적 결합 반응을 지칭한다. 특정 실시양태에서, 본원에서 제공된 항체 또는 항원 결합 단편은 $\leq 10^{-6}$ M(예를 들어, $\leq 5 \times 10^{-7}$ M, $\leq 2 \times 10^{-7}$ M, $\leq 10^{-7}$ M, $\leq 5 \times 10^{-8}$ M, $\leq 2 \times 10^{-8}$ M, $\leq 10^{-8}$ M, $\leq 5 \times 10^{-9}$ M, $\leq 4 \times 10^{-9}$ M, $\leq 3 \times 10^{-9}$ M, $\leq 2 \times 10^{-9}$ M, 또는 $\leq 10^{-9}$ M)의 결합 친화성(K_D)으로 인간 및/또는 비인간 CLDN18.2에 특이적으로 결합한다. 본원에서 사용된 K_D 는 표면 플라즈몬 공명 방법, 마이크로크기 열영동 방법, HPLC-MS 방법 및 유세포 분석(예컨대, FACS) 방법을 포함하나 이들로 제한되지 않는, 당분야에 공지되어 있는 임의의 통상적인 방법을 이용함으로써 측정될 수 있는, 결합 속도에 대한 해리 속도의 비(k_{off}/k_{on})를 의미한다. 특정 실시양태에서, K_D

값은 유세포분석 방법을 이용함으로써 적절하게 측정될 수 있다. 다양한 면역어세이 포맷을 이용하여 특정 단백질과 특이적으로 면역반응하는 항체를 선택할 수 있다. 예를 들어, 고체상 ELISA 면역어세이를 관용적으로 이용하여 단백질과 특이적으로 면역반응하는 항체를 선택한다(특이적 면역반응성을 확인하는 데 이용될 수 있는 면역어세이 포맷 및 조건의 설명에 대해서는 예를 들어, 문헌[Harlow & Lane, Using Antibodies, A Laboratory Manual (1998)] 참조). 전형적으로, 특이적 또는 선택적 결합 반응은 배경 신호에 비해 적어도 2배, 보다 전형적으로는 배경에 비해 적어도 10배 내지 100배의 신호를 생성할 것이다.

[0138] 아미노산 서열(또는 핵산 서열)에 관한 "퍼센트(%) 서열 동일성"은 서열을 정렬하고 필요한 경우 최대 상응을 달성하기 위해 갭을 도입한 후에 기준 서열의 아미노산(또는 핵산) 잔기와 동일한 후보 서열의 아미노산(또는 핵산) 잔기의 퍼센트로서 정의된다. 퍼센트 아미노산(또는 핵산) 서열 동일성을 측정하기 위한 정렬은 예를 들어, 공개적으로 입수 가능한 도구, 예컨대, BLASTN, BLASTp(미국 국립 생명공학 정보 센터(NCBI)의 웹사이트에서 입수 가능함, 문헌[Altschul S.F. et al, J. Mol. Biol., 215:403-410 (1990); Stephen F. et al, Nucleic Acids Res., 25:3389-3402 (1997)] 또한 참조), ClustalW2(유럽 생물정보학 연구소의 웹사이트에서 입수 가능함, 문헌[Higgins D.G. et al, Methods in Enzymology, 266:383-402 (1996); Larkin M.A. et al, Bioinformatics (Oxford, England), 23(21): 2947-8 (2007)] 또한 참조), 및 ALIGN 또는 Megalign(DNASTAR) 소프트웨어를 이용함으로써 달성될 수 있다. 당업자는 상기 도구에 의해 제공된 디폴트 파라미터를 사용할 수 있거나, 예를 들어, 적합한 알고리즘을 선택함으로써 정렬에 적절하게 파라미터를 주문제작할 수 있다. 특정 실시양태에서, 동일하지 않은 잔기 위치는 보존적 아미노산 치환에 의해 상이할 수 있다. "보존적 아미노산 치환"은 아미노산 잔기가 유사한 화학적 성질(예를 들어, 전하 또는 소수성)을 가진 측쇄(R 기)를 가진 또 다른 아미노산 잔기로 치환되는 아미노산 치환이다. 일반적으로, 보존적 아미노산 치환은 단백질의 기능적 성질을 실질적으로 변화시키지 않을 것이다. 2개 이상의 아미노산 서열이 보존적 치환에 의해 서로 상이한 경우, 유사성의 퍼센트 또는 정도는 치환의 보존적 성질을 바로잡기 위해 상향 조절될 수 있다. 이 조절을 하기 위한 수단은 당업자에게 잘 알려져 있다. 예를 들어, 본원에 참고로 포함되는 문헌[Pearson (1994) Methods Mol. Biol. 24: 307-331]을 참조한다.

[0139] 본원에서 사용된 바와 같이, "상동체 서열" 및 "상동 서열"은 교환 가능하게 사용되고, 임의로 정렬될 때 또 다른 서열에 대해 적어도 80%(예를 들어, 적어도 85%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%)의 서열 동일성을 가진 폴리뉴클레오타이드 서열(또는 이의 상보적 가닥) 또는 아미노산 서열을 의미한다.

[0140] "단리된" 물질은 인간의 손에 의해 천연 상태에서부터 변경되어 있다. "단리된" 조성물 또는 물질이 자연에서 발생하는 경우, 이 조성물 또는 물질은 그의 원래 환경으로부터 변경되거나 제거되거나, 변경되고 제거된다. 예를 들어, 살아있는 동물에 천연적으로 존재하는 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리펩티드는 "단리"되어 있지 않으나, 상기 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리펩티드는 실질적으로 순수한 상태로 존재할 정도로 그의 천연 상태의 공존 물질로부터 충분히 분리되어 있는 경우 "단리"되어 있다. 단리된 "핵산" 또는 "폴리뉴클레오타이드"는 교환 가능하게 사용되고 단리된 핵산 분자의 서열을 지칭한다. 특정 실시양태에서, "단리된 항체 또는 이의 항원 결합 단편"은 전기영동 방법(예컨대, SDS-PAGE, 등전점 포커싱, 모세관 전기영동) 또는 크로마토그래피 방법(예컨대, 이온 교환 크로마토그래피 또는 역상 HPLC)에 의해 측정될 때 적어도 60%, 70%, 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%의 순도를 가진 항체 또는 항원 결합 단편을 지칭한다.

[0141] 본원에서 사용된 "결합을 차단"하거나 "동일한 에피토프에 대해 경쟁"하는 능력은 2개의 분자들(예를 들어, 인간 CLDN18.2와 항-CLDN18.2 항체) 사이의 결합 상호작용을 임의의 검출 가능한 정도까지 억제하는 항체 또는 항원 결합 단편의 능력을 의미한다. 특정 실시양태에서, 2개의 분자들 사이의 결합을 차단하는 항체 또는 항원 결합 단편은 2개의 분자들 사이의 결합 상호작용을 적어도 50% 억제한다. 특정 실시양태에서, 이러한 억제는 60% 초과, 70% 초과, 80% 초과 또는 90% 초과일 수 있다.

[0142] 본원에서 사용된 용어 "항체 접합체"는 항체 또는 이의 항원 결합 단편과 또 다른 작용제, 예컨대, 방사성핵종의 연결을 의미한다.

[0143] 용어 "대상체"는 인간 및 비인간 동물을 포함한다. 비인간 동물은 모든 척추동물, 예를 들어, 포유동물 및 비포유동물, 예컨대, 비인간 영장류, 마우스, 래트, 고양이, 토끼, 양, 개, 소, 닭, 양서류 및 파충류를 포함한다. 명시된 경우를 제외하고, 용어 "환자" 또는 "대상체"는 본원에서 교환 가능하게 사용된다.

[0144] 용어 "항종양 활성"은 종양 세포 증식, 생존율 또는 전이 활성의 감소를 의미한다. 예를 들어, 항종양 활성은 치료 동안 발생하는 비정상 세포의 성장 속도의 감소, 또는 치료받지 않은 대조군에 비해 치료로 인한 종양 크

기 안정성 또는 감소, 또는 더 긴 생존에 의해 확인될 수 있다. 이러한 활성은 이중이식 모델, 동종이식 모델, 마우스 유선 종양 바이러스(MMTV) 모델, 및 항종양 활성의 조사용으로 당분야에 공지되어 있는 다른 공지된 모델을 포함하나 이들로 제한되지 않는 허용된 시험관내 또는 생체내 종양 모델을 사용함으로써 평가될 수 있다.

[0145] 본원에서 사용된 바와 같이 병태를 "치료하는" 또는 병태의 "치료"는 병태의 예방 또는 완화, 병태의 발병 또는 발생 속도의 지연, 병태를 발생시킬 위험의 감소, 병태와 관련된 증상의 발생 예방 또는 지연, 병태와 관련된 증상의 감소 또는 종결, 병태의 완전한 또는 부분적 퇴행의 발생, 병태의 치유, 또는 이들의 일부 조합을 포함한다.

[0146] 용어 "CLDN18.2"는 포유동물, 예컨대, 영장류(예를 들어, 인간, 원숭이) 및 설치류(예를 들어, 마우스)로부터 유래한 클라우딘-18 스플라이스 변이체 2를 지칭한다. 특정 실시양태에서, CLDN18.2는 인간 CLDN18.2이다. 인간 CLDN18.2의 예시적인 서열은 인간 CLDN18.2 단백질(NCBI 기준 서열번호 NP_001002026.1, 또는 서열번호 30)을 포함한다. CLDN18.2의 예시적인 서열은 무스 무스쿨루스(Mus musculus)(마우스) CLDN18.2 단백질(NCBI 기준 서열번호 NP_001181852.1), 마카카 파시쿨라리스(Macaca fascicularis)(게 먹는 마카크(crab-eating macaque)) CLDN18.2 단백질(NCBI 기준 서열번호 XP_015300615.1)을 포함한다. CLDN18.2는 암세포에서 발현된다. 한 실시양태에서, 상기 CLDN18.2는 암 세포의 표면에서 발현된다.

[0147] 용어 "CLDN18.1"은 포유동물, 예컨대, 영장류(예를 들어, 인간, 원숭이) 및 설치류(예를 들어, 마우스)로부터 유래한 클라우딘-18 스플라이스 변이체 1을 지칭한다. 특정 실시양태에서, CLDN18.1은 인간 CLDN18.1이다. 인간 CLDN18.1의 예시적인 서열은 인간 CLDN18.1 단백질(NCBI 기준 서열번호 NP_057453.1, 또는 서열번호 31), 무스 무스쿨루스(마우스) CLDN18.2 단백질(NCBI 기준 서열번호 NP_001181851.1), 마카카 파시쿨라리스(게 먹는 마카크) CLDN18.2 단백질(NCBI 기준 서열번호 XP_005545920.1)을 포함한다.

[0148] 본원에서 사용된 바와 같이, "CLDN18.2 관련" 질환 또는 병태는 CLDN18.2의 발현 또는 활성의 증가 또는 감소에 의해 야기되거나 악화되거나, 다른 방식으로 이러한 증가 또는 감소와 연관된 임의의 질환 또는 병태를 지칭한다. 일부 실시양태에서, CLDN18.2 관련 병태는 예를 들어, 암이다.

[0149] 본원에서 사용된 바와 같이, "암"은 악성 세포 성장 또는 신생물, 비정상적인 증식, 침윤 또는 전이를 특징으로 하는 임의의 의학적 상태를 지칭하고, 고형 종양 및 비-고형 암(예를 들어, 혈액 악성 종양), 예컨대, 백혈병 둘 다를 포함한다. 본원에서 사용된 바와 같이, "고형 종양"은 신생물 및/또는 악성 세포의 고형 덩어리를 지칭한다.

[0150] 용어 "약학적으로 허용되는"은 지정된 담체, 비히클, 희석제, 부형제(들) 및/또는 염이 일반적으로 제제를 구성하는 다른 성분과 화학적 및/또는 물리적으로 양립 가능하고 이의 수용자와 생리학적으로 양립 가능하다는 것을 표시한다.

[0151] 본원에서 "약" 값 또는 파라미터의 언급은 그 값 또는 파라미터 자체에 관한 실시양태를 포함한다(그리고 설명한다). 예를 들어, "약 X"를 언급하는 설명은 "X"의 설명을 포함한다. 수치 범위는 범위를 정의하는 숫자를 포함한다. 일반적으로, 용어 "약"은 변수의 표시된 값, 및 표시된 값의 실험 오차(예를 들어, 평균에 대한 95% 신뢰 구간) 이내 또는 표시된 값의 10% 이내(둘 중 더 큰 값)에 있는 변수의 모든 값을 의미한다. 용어 "약"이 기간(수년, 수개월, 수주, 수일 등)의 맥락 내에서 사용되는 경우, 용어 "약"은 그 기간 플러스 또는 마이너스 다음 차수 기간의 1 양(예를 들어, 약 1년은 11개월 내지 13개월을 의미하고; 약 6개월은 6개월 플러스 또는 마이너스 1주를 의미하고; 약 1주는 6일 내지 8일을 의미함) 또는 표시된 값의 10% 이내의 값(둘 중 더 큰 값)을 의미한다.

[0152] 항-CLDN18.2 항체 접합체

[0153] 본 개시내용은 항-CLDN18.2 항체 방사선택중 접합체를 제공한다.

[0154] 클라우딘-18(CLDN18) 분자(진뱅크(Genbank) 수탁번호: 스플라이스 변이체 1(CLDN18A1 또는 CLDN18.1): NP_057453, NM_016369, 및 스플라이스 변이체 2(CLDN18A2 또는 CLDN18.2): NM_001002026, NP_001002026)는 분자량이 대략 27.9/27.72 kD인 일체형 막형단 단백질이다. CLDN18 단백질은 인접 세포들 사이에 막내 입자의 상호연결된 가닥의 네트워크를 조직화하는 상피와 내피의 밀착 연결부 내에 위치한다. CLDN18 및 오클루딘(occludin)은 상기 밀착 연결부에서 가장 눈에 띄는 막형단 단백질 구성요소이다. 이 밀착 연결부 단백질들은 이들의 강한 세포간 부착성으로 인해 용질의 세포주위 수송을 방지하고 제어하는 1차 장벽을 생성하고, 또한 막 지질 및 단백질의 측면 확산을 제한하여 세포 극성을 유지한다.

- [0155] CLDN18은 항체에 의해 선택적으로 접근될 수 있는 여러 상이한 입체구조를 표시한다(문헌[Sahin U, Koslowski M, Dhaene K, et al. Claudin-18 splice variant 2 is a pan-cancer target suitable for therapeutic antibody development[J]. Clinical Cancer Research, 2008, 14(23): 7624-7634] 참조). CLDN 계열 구성원들 대다수에 대해 기재된 바와 같이, CLDN18-입체구조-1은 막횡단 도메인(TM)으로서 작용하는 모든 4개의 소수성 영역을 갖고, 2개의 세포외 루프(소수성 영역 1 및 소수성 영역 2에 의해 포괄된 루프 1; 소수성 영역 3 및 4에 의해 포괄된 루프 2)가 형성된다. 제2 입체구조(CLDN18-입체구조-2)는 PMP22에 대해 기재된 바와 같이, 제2 소수성 도메인 및 제3 소수성 도메인이 원형질막을 완전히 횡단하지 않으므로, 제1 막횡단 도메인과 제4 막횡단 도메인 사이의 부분(루프 D3)이 세포외에 있음을 암시한다. 제3 입체구조(CLDN18-입체구조-3)는 제1 소수성 영역 및 제4 소수성 영역에 의해 포괄된 2개의 내부 소수성 영역을 가진 큰 세포외 도메인을 보여준다. 루프 D3의 고전적인 N-글리코실화 부위 때문에, CLDN-18 토폴로지(topology) 변이체 CLDN18 토폴로지-2 및 CLDN18 토폴로지-3은 추가 세포외 N-글리코실화 부위를 보유한다.
- [0156] CLDN18은 마우스 및 인간 둘 다에 존재하는 2개의 상이한 스플라이스 변이체를 가진다. 스플라이스 변이체 CLDN18.1 및 CLDN18.2는 제1 TM 및 루프 1을 포함하는 N-말단에서 처음 21개의 아미노산이 상이한 반면, C-말단의 단백질 서열은 동일하다(문헌[Niimi T, Nagashima K, Ward J M, et al. Claudin-18, a novel downstream target gene for the T/EBP/NKX2. 1 homeodomain transcription factor, encodes lung-and stomach-specific isoforms through alternative splicing[J]. Molecular and cellular biology, 2001, 21(21): 7380-7390] 참조).
- [0157] CLDN18.1은 정상 폐 및 위 상피에서 선택적으로 발현되는 반면, CLDN18.2는 위 세포에서만 발현된다. 가장 중요한 것은 CLDN18.2 발현이 위 상피의 분화된 단기 생존 세포로 제한되지만, 위 줄기 세포 영역에 결여되어 있다는 것이다. 민감한 RT-PCR을 이용하여, 임의의 다른 정상 인간 장기에서 상기 두 변이체들을 검출할 수 없다. 그러나, 이들은 인간 암 세포주뿐만 아니라 위 종양, 식도 종양, 췌장 종양 및 폐 종양을 포함하는 여러 암 유형에서 고도로 발현된다(문헌[Matsuda Y, Semba S, Ueda J, et al. Gastric and intestinal claudin expression at the invasive front of gastric carcinoma[J]. Cancer science, 2007, 98(7): 1014-1019] 참조).
- [0158] 임의의 이론에 구속받고자 하지는 않지만, CLDN18.2의 분자적 및 기능적 특성은 이를 항체 기반 암 진단 및 치료를 위한 매우 흥미로운 표적으로 만드는 것으로 여겨진다. 이러한 특성은 (i) CLDN18이 독성 관련 정상 조직 대다수에 부재한다는 점, (ii) CLDN18.2 변이체 발현이 위의 표적 음성 줄기 세포에 의해 보충될 수 있는 분화된 위 세포로서 불필요한 세포 집단으로 제한된다는 점, (iii) 정상 세포와 신생물 세포 사이의 잠재적인 차등적 글리코실화, 및 (iv) 상이한 입체구조적 토폴로지의 존재를 포함한다.
- [0159] CLDN18 단백질의 분자량은 종양과 인접 정상 조직 사이에 상이하다는 것을 발견하였다. 더 높은 분자량의 CLDN18 단백질은 건강한 조직에서 관찰되고, 이 분자량은 정상 조직 용해물을 탈글리코실화 화합물 PNGase F로 처리함으로써 종양에서 관찰된 분자량과 동일한 분자량까지 감소될 수 있다. 이것은 CLDN18이 그의 정상 조직 대응물에 비해 종양에서 덜 N-글리코실화됨을 암시한다. 고전적인 N-글리코실화 모티프는 CLDN18 분자의 루프 D3 도메인 내의 아미노산 잔기 116에 있다. 분자량 차이 및 추론된 구조적 차이는 항체 결합을 위한 변경된 에피토프를 나타낼 수 있다.
- [0160] 또한, 밀착 연결부 단백질로서 CLDN18은 진단을 위한 우수한 특이성 및 치료를 위한 우수한 치료 윈도우에도 기여할 수 있다. 종양 세포는 CLDN을 발현하지만, 정상 상피 조직에서 발견되는 CLDN의 동형 및 이형 회합으로 고전적인 밀착 연결부를 종종 형성하지 않기 때문에, 세포외 항체 결합 및 면역요법에 적합한 유리 CLDN의 상당한 풀을 가질 가능성이 높다. 건강한 상피에서 CLDN의 결합 에피토프는 밀착 연결부 내에서 항체 결합에 접근하지 못하도록 차폐될 가능성이 있다.
- [0161] 본 개시내용은 방사성핵종에 접합된 항-CLDN18.2 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 항-CLDN18.2 항체 접합체를 제공한다.
- [0162] **i. 방사성핵종**
- [0163] 방사성핵종은 방사성 붕괴를 겪을 수 있는 불안정한 핵을 특징으로 하는 작용제이다. 본 개시내용 내에서 유용한 방사성핵종은 감마 방출체, 양성자 방출체, 오거(Auger) 전자 방출체, X-선 방출체 및 형광 방출체를 포함한다. 방사성핵종은 치료 또는 진단 방사성핵종일 수 있다.
- [0164] 특정 실시양태에서, 방사성핵종은 치료 방사성핵종이다. 베타, 알파 및 오거 전자와 같은 단거리 높은 LET 방출

로 붕괴하는 방사성핵종은 세포독성이 높으므로, 방사선치료 목적으로 설계된 물질을 표지부착하는 데 유용하다. 치료 방사성핵종은 20 내지 6,000 keV의 범위, 예를 들어, 오거 방출체의 경우 60 내지 200 keV, 베타 방출체의 경우 100 내지 2,500 keV, 및 알파 방출체의 경우 4,000 내지 6,000 keV의 범위 내에서 붕괴 에너지를 가질 수 있다. 당업자는 특히 방사성핵종 반감기, 방출된 입자의 에너지, 방출된 입자가 이동할 수 있는 최대 범위, 충분한 농도 및 암 세포에 의한 방사성핵종의 연장된 보유를 포함하는 요인을 기반으로 본원에서 제공된 항체 접합체에 사용될 적합한 치료 방사성핵종을 선택할 수 있다.

[0165] 치료 방사성핵종의 예는 ^{111}In , $^{111\text{m}}\text{In}$, ^{177}Lu , ^{212}Bi , ^{213}Bi , ^{211}At , ^{62}Cu , ^{64}Cu , ^{67}Cu , ^{90}Y , ^{125}I , ^{131}I , ^{32}P , ^{33}P , ^{47}Sc , ^{111}Ag , ^{67}Ga , ^{142}Pr , ^{153}Sm , ^{161}Tb , ^{166}Dy , ^{166}Ho , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{189}Re , ^{212}Pb , ^{223}Ra , ^{225}Ac , ^{59}Fe , ^{75}Se , ^{77}As , ^{89}Sr , ^{99}Mo , ^{105}Rh , ^{109}Pd , ^{143}Pr , ^{149}Pm , ^{169}Er , ^{194}Ir , ^{198}Au , ^{199}Au , ^{199}Au 및 ^{211}Pb 를 포함하나 이들로 제한되지 않는다.

[0166] 오거 방출 입자로 실질적으로 붕괴하는 추가 치료 방사성핵종의 예는 Co-58, Ga-67, Br-80m, Tc-99m, Rh-103m, Pt-109, In-111, Sb-119, I-125, Ho-161, Os-189m 및 Ir-192를 포함한다.

[0167] 알파 입자의 생성으로 실질적으로 붕괴하는 추가 방사성핵종의 예는 Dy-152, At-211, Bi-212, Ra-223, Rn-219, Po-215, Bi-211, Ac-225, Fr-221, At-217, Bi-213 및 Fm-255를 포함하나 이들로 제한되지 않는다.

[0168] 추가 잠재적 치료 방사성동위원소는 ^{11}C , ^{13}N , ^{15}O , ^{75}Br , ^{198}Au , ^{224}Ac , ^{126}I , ^{133}I , ^{77}Br , $^{113\text{m}}\text{In}$, ^{95}Ru , ^{97}Ru , ^{103}Ru , ^{105}Ru , ^{107}Hg , ^{203}Hg , $^{121\text{m}}\text{Te}$, $^{122\text{m}}\text{Te}$, $^{125\text{m}}\text{Te}$, ^{165}Tm , ^{167}Tm , ^{168}Tm , ^{197}Pt , ^{109}Pd , ^{105}Rh , ^{142}Pr , ^{143}Pr , ^{161}Tb , ^{166}Ho , ^{199}Au , ^{57}Co , ^{58}Co , ^{51}Cr , ^{59}Fe , ^{75}Se , ^{201}Tl , ^{225}Ac , ^{76}Br , ^{169}Yb 등을 포함한다.

[0169] 특정 실시양태에서, 방사성핵종은 진단 방사성핵종이다.

[0170] 진단 방사성핵종은 영상화제로서 사용될 수 있다. 영상화제는 동물 또는 인간 대상체의 세포 또는 조직, 또는 시험관내 조건 하의 세포 또는 조직에서 방사성핵종 및 이의 부착물의 위치를 표시할 수 있다. 특정 실시양태에서, 방사성핵종은 생체내 투여 후 비침습적 방식으로 외부에서 검출될 수 있는 방사성핵종이다. 진단 용도, 예컨대, 영상화제를 위한 방사성핵종은 바람직하게는 상대적으로 세포독성이 낮지만 영상화에 적합한 방출로 붕괴한다. 진단 용도를 가진 방사성핵종은 예를 들어, ^{18}F , ^{32}P , ^{33}P , ^{45}Ti , ^{47}Sc , ^{52}Fe , ^{59}Fe , ^{62}Cu , ^{64}Cu , ^{67}Cu , ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{75}Sc , ^{77}As , ^{86}Y , ^{90}Y , ^{89}Sr , ^{89}Zr , ^{94}Tc , ^{94}Tc , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{99}Mo , ^{105}Pd , ^{105}Rh , ^{111}Ag , ^{111}In , ^{123}I , ^{124}I , ^{125}I , ^{131}I , ^{142}Pr , ^{143}Pr , ^{149}Pm , ^{153}Sm , ^{154}Sm , ^{158}Gd , ^{161}Tb , ^{166}Dy , ^{166}Ho , ^{169}Er , ^{175}Lu , ^{177}Lu , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{189}Re , ^{194}Ir , ^{198}Au , ^{199}Au , ^{211}At , ^{211}Pb , ^{212}Bi , ^{212}Pb , ^{213}Bi , ^{223}Ra 및 ^{225}Ac 를 포함할 수 있다. 본 개시내용의 실시양태에 따라 진단제로서 사용될 수 있는 상자성 이온은 전이 이온 및 란타넘 금속(예를 들어, 6 내지 9, 21 내지 29, 42, 43, 44, 또는 57 내지 71의 원자번호를 가진 금속)을 포함하나 이들로 제한되지 않는다. 이 금속은 Cr, V, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, La, Ce, Pr, Nd, Pm, Sm, Eu, Gd, Tb, Dy, Ho, Er, Tm, Yb 및 Lu의 이온을 포함한다.

[0171] 특정 실시양태에서, 방사성핵종은 방사성 금속 이온, 감마 방출 방사성 할로겐 및 양전자 방출 방사성 비금속이다. 특정 실시양태에서, 방사성핵종은 양전자 방출 단층촬영(PET) 또는 단일 광자 방출 컴퓨터 단층촬영(SPECT)에 의해 검출될 수 있다. 예를 들어, 감마 방출로 붕괴하는 방사성핵종은 평면 및 단일 광자 컴퓨터 방출 단층촬영(SPECT) 영상화에 적합한 반면, 양전자(베타) 방출 및 소멸 광자로 붕괴하는 방사성핵종은 양전자 방출 단층촬영(PET)에 적합하다. PET 또는 SPECT 영상화 기술에 의해 검출될 수 있는 진단 방사성핵종 표지는 예를 들어, ^{64}Cu , ^{67}Cu , ^{89}Zr , ^{124}I , ^{86}Y , ^{90}Y , ^{111}In , $^{123/131}\text{I}$, ^{177}Lu , ^{11}C , ^{14}C , ^{41}Ca , ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{13}N , ^{15}O , ^{44}Sc , ^{18}F , $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 등을 포함하나 이들로 제한되지 않는다.

[0172] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "양전자 방출 단층촬영(PET)"은 표적 조직 또는 장기 또는 활성을 시각화하기 위해 의료 분야에서 이용되는 핵 영상화 기법을 의미한다. PET는 생화학 수준에서 신체의 특정 기능을 표시하기 위해 선택된, 방사성핵종 접합된 트래이서(tracer) 분자로부터의 양전자 방출 후 연이어 생성되는 2개의 소멸 광자를 측정한다. PET는 해부학적 구조 대신에 생물학적 기능의 분자 영상화를 제공한다. PET는 다른 영상화 기법에 의해 수득될 수 없는 인체의 많은 기능들의 사진을 생성함으로써 환자를 검사할 수 있게 한다. 단기 생존 양전자 방출 방사성 트래이서는 대상체 내로 주사된 후, 안정한 대응물과 관련된 생리학적 경로에 따라 체내에 분포할 수 있다. 트래이서가 관심 있는 표적에 특이적으로 지향되는 표적화 분자인 경우, 트래이서는 이러한 표적을 발현하는 조직 또는 장기의 시각화를 허용한다.

- [0173] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "SPECT"는 감마선을 사용하는 핵의학 단층촬영 영상화 기법인 "단일 광자 방출 컴퓨터 단층촬영"을 지칭한다. 이것은 감마 카메라를 이용하는 통상적인 핵의학 평면 영상화와 유사하고, 진정한 3D 정보를 제공할 수 있다. 이 정보는 전형적으로 환자를 통해 횡단면 슬라이스로서 제공되지만, 요구되는 경우 자유롭게 재포맷팅될 수 있거나 조작될 수 있다. 감마 방출 방사성핵종 또는 이의 집합체를 대상체 내로 주사하는 것이 영상화를 위해 필요하다.
- [0174] 방사성핵종 집합된 항체 및 항원 결합 단편을 제조하는 방법은 당분야에 공지되어 있다. 일반적으로, 금속성 방사성핵종과 비금속성 방사성핵종에 대한 방법은 상이하다. 금속성 방사성핵종의 집합은 전형적으로 집합을 위해 킬레이터를 요구하지만, 이러한 킬레이터는 비금속성 방사성핵종에는 필요하지 않을 수 있다.
- [0175] 예를 들어, 적합한 킬레이터를 통해 금속성 방사성핵종을 항체에 집합시키는 방법은 당분야에 공지되어 있다(예를 들어, 국제 특허 출원 공개 제WO 94/11026호; 문헌[Current Protocols in Immunology, Volumes 1 and 2, Coligen et al, Ed. Wiley-Interscience, New York, N.Y., Pubs. (1991)] 참조).
- [0176] 본원에서 사용된 용어 "킬레이터"는 2개 이상의 결합으로 금속을 결합할 수 있는 화학 구조물을 지칭한다. 킬레이터는 금속 이온에 결합할 수 있는 하나 이상의 킬레이팅 기를 가질 수 있다. 예를 들어, 킬레이터는 금속 이온과의 배위결합에 적합한 적어도 하나의 헤테로원자를 포함할 수 있으며, 수용액으로부터 금속 이온을 격리할 수 있다.
- [0177] 일부 실시양태에서, 킬레이터는 킬레이트화를 위해 3개 이상의 원자를 포함하고, 이때 각각의 원자는 질소, 황, 산소 및 인으로 구성된 군으로부터 선택된다.
- [0178] 본 개시내용에 따라 사용될 수 있는 킬레이터의 예는 DFO(테르페록사민), DOTA(1,4,7,10-테트라아자사이클로데칸-1,4,7,10-테트라아세트산), DTPA(NR-디에틸렌트리아민펜타아세트산), NOTA(1,4,7-트리아자사이클로노난-1,4,7-아세트산), TRITA(1,4,7,10-테트라아자사이클로트리데칸-N,N',N'',N'''-테트라아세트산); TETA(1,4,8,11-테트라아자사이클로테트라데칸-N,N',N'',N'''-테트라아세트산); 및 HETA(1,5,9,13-테트라아자사이클로헥사데칸-N,N',N'',N'''-테트라아세트산), EDTA(에틸렌디아민테트라아세트산), NETA({4-[2-(비스-카르복시메틸아미노)-에틸]-7-카르복시메틸-[1,4,7]트리아조난-1-일}-아세트산), TACN-TM(N,N',N'', 트리스(2-머캅토에틸)1,4,7-트리아자사이클로노난), TRAP(1,4,7-트리아자사이클로노난-1,4,7-트리스[메틸(2-카르복시에틸)포스핀산]), CP256, PCTA(3,6,9,15-테트라아자비사이클로[9.3.1]펜타데카-1(15),11,13-트리엔-3,6,9-트리아세트산), 포르피린, 폴리아민, 크라운 에테르, 비스-티오세미카르바존, 폴리옥심 및 이들의 유도체를 포함하나 이들로 제한되지 않는다.
- [0179] 일부 실시양태에서, 본원에서 제공된 항체 집합체는 킬레이터를 통해 본원에서 제공된 항-CLDN18.2 항체 또는 이의 항원 결합 단편에 집합된 금속성 방사성핵종을 포함한다. 당업자는 당분야에 공지되어 있는, 예를 들어, 문헌[Price E. W et al, Chem. Soc. Rev., 2014, **43**, 260-290]에 기재되어 있는 지식을 기반으로 방사성핵종에 적합한 킬레이터를 선택할 수 있다.
- [0180] 일부 실시양태에서, 금속성 방사성핵종은 ^{64}Cu , ^{67}Cu , ^{89}Zr , ^{86}Y , ^{90}Y , ^{111}In , ^{177}Lu , ^{67}Ga , ^{44}Sc 또는 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 일 수 있다. 일부 실시양태에서, 방사성핵종은 ^{64}Cu , ^{67}Cu 또는 ^{89}Zr 이다. 일부 실시양태에서, ^{64}Cu , ^{67}Cu 또는 ^{89}Zr 은 킬레이터를 통해 항체 또는 이의 항원 결합 단편에 표지부착된다.
- [0181] 일부 실시양태에서, 킬레이터는 항체에의 집합을 위해 반응성 작용기를 추가로 포함한다. 킬레이터는 예를 들어, 전체적으로 본원에 참고로 포함되는 미국 특허 제4,824,659호에 개시된 바와 같이 항체 또는 펩티드에 직접 연결될 수 있다. 이러한 반응성 기는 킬레이터가 항체의 하나 이상의 아미노산 잔기, 예를 들어, 유리 시스테인, 라이신 등의 작용기와 반응할 수 있게 한다. 반응성 기의 예는 말레이미드, 아미노벤질, N-하이드록시석신아미드 에스테르 등을 포함한다.
- [0182] 특정 실시양태에서, 킬레이터는 이작용성 링커 시약에 의해 본원에서 제공된 항체 또는 이의 항원 결합 단편에 집합된다. 이러한 이작용성 링커의 예는 N-석신아미드-3-(2-피리딜티오)프로피오네이트(SPDP), 석신아미드-4-(N-말레이미도메틸)사이클로헥산-1-카르복실레이트(SMCC), N-석신아미드-4-(2-피리딜티오)펜타노에이트(SPP), 이미노티올란(IT), 이미노에스테르의 이작용성 유도체(예컨대, 디메틸 아디피메이트 HCl), 활성 에스테르(예컨대, 디석신아미드 수베레이트), 알데하이드(예컨대, 글루타르알데하이드), 비스-아지도 화합물(예컨대, 비스(p-아지도벤조일)헥산디아민), 비스-디아조늄 유도체(예컨대, 비스-(p-디아조늄벤조일)-에틸렌디아민), 디이소시아네이트(예컨대, 톨루엔 2,6-디이소시아네이트), 비스-활성 불소 화합물(예컨대, 1,5-디플루오-2,4-디니트로

벤젠), BMPS, EMCS, GMBs, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPRH, SBAP, SIA, SIAB, SMPB, SMPH, 설폰-EMCS, 설폰-GMBs, 설폰-KMUS, 설폰-MBS, 설폰-SIAB, 설폰-SMCC, 설폰-SMPB, 및 SVSG(석신이미딜-(4-비닐설폰)벤조에이트)를 포함하나 이들로 제한되지 않는다. 이러한 링커 시약은 상업적으로 입수될 수 있다(예를 들어, 피어스 바이오테크놀로지 인코포레이티드(Pierce Biotechnology, Inc.)로부터 입수, 미국 일리노이주 록퍼드, 문헌[2003-2004 Applications Handbook and Catalog]의 제467면 내지 제498면 참조).

[0183] 일부 실시양태에서, 방사성핵종은 ^{64}Cu 또는 ^{67}Cu 이고, 킬레이터는 TETA, NOTA, NODA 또는 NODGA를 포함한다. 일부 실시양태에서, 방사성핵종은 ^{89}Zr 이고 킬레이터는 DFO를 포함한다.

[0184] 일부 실시양태에서, 방사성핵종은 비금속성 방사성핵종이다. 일부 실시양태에서, 방사성핵종은 방사성 할로젠을 포함한다. 일부 실시양태에서, 방사성핵종은 ^{124}I 또는 ^{123}I 또는 ^{131}I 이다. 방사성요오드가 부착된 항체를 제조하는 방법은 당분야에 공지되어 있다(예를 들어, 전체적으로 본원에 참고로 포함되는 문헌[Grassi, J. et al. (1987). Radioiodination and Other Labeling Techniques. Handbook of Experimental Pharmacology, 91-141, Ecclelman, W.C. et al, Cancer Research, 40, 3036-3042, 1998] 참조).

[0185] 일부 실시양태에서, ^{124}I 또는 ^{123}I 또는 ^{131}I 는 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 적어도 하나의 페닐 하이드록실기에 표지부착된다.

[0186] 특정 실시양태에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 Na^{124}I 와 같은 방사성 요오드의 존재 하에서 티로신 잔기 내로의 친전자성 치환에 의해 직접적으로 요오드에 부착된다. 특정 실시양태에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 사전표지부착된 화합물, 또는 연결 후 표지부착될 수 있는 화합물, 예를 들어, 펩티드용 볼튼(Bolton)과 헌터(Hunter) 시약의 공유결합에 의해 간접적으로 요오드에 부착된다.

[0187] 일부 실시양태에서, ^{124}I 또는 ^{123}I 또는 ^{131}I 는 산화제의 존재 하에서 항체 또는 이의 항원 결합 단편에 표지부착된다. 화학적 산화제 및 효소적 산화제를 포함하여 임의의 적합한 산화제가 사용될 수 있다. 예시적인 산화제는 N-브로모석신이미드, 클로라민 T, 염소 기체 또는 락토퍼록시다제를 포함하나 이들로 제한되지 않는다.

[0188] 일부 실시양태에서, ^{124}I 또는 ^{123}I 또는 ^{131}I 는 N-브로모석신이미드(NBS) 반응에 의해 항체 또는 이의 항원 결합 단편에 표지부착된다.

[0189] 일부 실시양태에서, 본원에서 제공된 항체 접합체는 나노입자에 추가로 접합될 수 있다. 예를 들어, 나노입자는 본 발명의 CLDN18.2 특이적 항체 또는 단편에 접합될 때 화학요법제, 방사선요법제, 독소, 또는 당분야에 공지되어 있는 임의의 다른 세포독성제 또는 항암제를, 세포 표면에서 CLDN18.2를 과발현하는 암 세포로 전달하는 약물 담체로서 치료 적용에 사용될 수 있다.

[0190] 일부 실시양태에서, 본원에서 제공된 항체 접합체는 (예를 들어, 라이신 잔기의 엡실론 아미노 기에서) 약물에 추가로 접합될 수 있고, 담체는 추가 치료제 또는 진단제를 포함할 수 있다.

[0191] i. 항체 서열

[0192] 특정 실시양태에서, 본원에서 제공된 항체 접합체는 중쇄 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3, 및/또는 경쇄 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3 서열을 포함하는 항-CLDN18.2 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하고, 이때

[0193] HCDR1 서열은 GYNMN(서열번호 1) 또는 TYFIGVG(서열번호 13), 또는 적어도 80% 서열 동일성을 가진 이의 상동 서열을 포함하고;

[0194] HCDR2 서열은 $\text{X}_1\text{IDPYYYX}_2\text{TX}_3\text{YNQKFX}_4\text{G}$ (서열번호 32) 또는 HIWWNDNKYYNTALKS(서열번호 15), 또는 적어도 80%(또는 적어도 85%, 90%, 95%) 서열 동일성을 가진 이의 상동 서열을 포함하고;

[0195] HCDR3 서열은 $\text{X}_5\text{X}_6\text{X}_7\text{GNAFDY}$ (서열번호 33) 또는 MGSRAWFTY(서열번호 17), 또는 적어도 80% 서열 동일성을 가진 이의 상동 서열을 포함하고;

[0196] LCDR1 서열은 $\text{KSSQX}_9\text{LX}_{10}\text{NX}_{11}\text{GNX}_{12}\text{KNYLT}$ (서열번호 34) 또는 적어도 80%(또는 적어도 85%, 90%, 95%) 서열 동일성을 가진 이의 상동 서열을 포함하고;

[0197] LCDR2 서열은 $\text{WASTRX}_{13}\text{S}$ (서열번호 35). 또는 적어도 80% 서열 동일성을 가진 이의 상동 서열을 포함하고;

- [0198] LCDR3 서열은 QNDYX₁₄X₁₅PX₁₆T(서열번호 36). 또는 적어도 80% 서열 동일성을 가진 이의 상동 서열을 포함하고;
- [0199] 이때 X₁은 N 또는 Y 또는 H이고, X₂는 G 또는 V이고, X₃은 A 또는 G 또는 T이고, X₄는 R 또는 T 또는 S이고, X₅는 K 또는 R이고, X₆은 S 또는 M이고, X₇은 Y 또는 F이고, X₈은 Y 또는 H이고, X₉는 S 또는 N이고, X₁₀은 L 또는 F이고, X₁₁은 S 또는 N이고, X₁₂는 Q 또는 L이고, X₁₃은 E 또는 K이고, X₁₄는 S 또는 Y이고, X₁₅는 F 또는 Y이고, X₁₆은 F 또는 L이다.
- [0200] 특정 실시양태에서, 본원에서 제공된 항체 접합체는 항-CLDN18.2 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하고, 이때 중쇄 가변 영역은
- [0201] a) 서열번호 1 및 서열번호 13으로부터 선택된 서열을 포함하는 HCDR1,
- [0202] b) 서열번호 3, 서열번호 7, 서열번호 9, 서열번호 15, 서열번호 19 및 서열번호 22로부터 선택된 서열을 포함하는 HCDR2, 및
- [0203] c) 서열번호 5, 서열번호 11, 서열번호 17 및 서열번호 21로부터 선택된 서열을 포함하는 HCDR3
- [0204] 을 포함하고/하거나;
- [0205] 경쇄 가변 영역은
- [0206] d) 서열번호 2, 서열번호 10, 서열번호 14 및 서열번호 20의 서열을 포함하는 LCDR1,
- [0207] e) 서열번호 4 및 서열번호 16의 서열을 포함하는 LCDR2, 및
- [0208] f) 서열번호 6, 서열번호 8, 서열번호 12 및 서열번호 18로부터 선택된 서열을 포함하는 LCDR3
- [0209] 을 포함한다.
- [0210] 특정 실시양태에서, 중쇄 가변 영역은
- [0211] a) 서열번호 1의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열번호 3의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열번호 5의 서열을 포함하는 HCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역;
- [0212] b) 서열번호 1의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열번호 7의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열번호 5의 서열을 포함하는 HCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역;
- [0213] c) 서열번호 1의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열번호 9의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열번호 11의 서열을 포함하는 HCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역;
- [0214] d) 서열번호 13의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열번호 15의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열번호 17의 서열을 포함하는 HCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역;
- [0215] e) 서열번호 1의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열번호 19의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열번호 21의 서열을 포함하는 HCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및
- [0216] f) 서열번호 1의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열번호 22의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열번호 5의 서열을 포함하는 HCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역
- [0217] 으로 구성된 군으로부터 선택된다.
- [0218] 특정 실시양태에서, 경쇄 가변 영역은
- [0219] a) 서열번호 2의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열번호 4의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열번호 6의 서열을 포함하는 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역;
- [0220] b) 서열번호 2의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열번호 4의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열번호 8의 서열을 포함하는 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역;
- [0221] c) 서열번호 10의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열번호 4의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열번호 6의 서열을 포함하는 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역;
- [0222] d) 서열번호 2의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열번호 4의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열번호 12의 서열을 포함

하는 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역;

- [0223] e) 서열번호 14의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열번호 16의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열번호 18의 서열을 포함하는 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역; 및
- [0224] f) 서열번호 20의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열번호 4의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열번호 6의 서열을 포함하는 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역
- [0225] 으로 구성된 군으로부터 선택된다.
- [0226] 특정 실시양태에서, 본원에서 제공된 항체 집합체에서:
- [0227] a) 중쇄 가변 영역은 서열번호 1의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열번호 3의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열번호 5의 서열을 포함하는 HCDR3을 포함하고; 경쇄 가변 영역은 서열번호 2의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열번호 4의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열번호 6의 서열을 포함하는 LCDR3을 포함하거나;
- [0228] b) 중쇄 가변 영역은 서열번호 1의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열번호 7의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열번호 5의 서열을 포함하는 HCDR3을 포함하고; 경쇄 가변 영역은 서열번호 2의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열번호 4의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열번호 8의 서열을 포함하는 LCDR3을 포함하거나;
- [0229] c) 중쇄 가변 영역은 서열번호 1의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열번호 9의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열번호 11의 서열을 포함하는 HCDR3을 포함하고; 경쇄 가변 영역은 서열번호 10의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열번호 4의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열번호 6의 서열을 포함하는 LCDR3을 포함하거나;
- [0230] d) 중쇄 가변 영역은 서열번호 13의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열번호 15의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열번호 17의 서열을 포함하는 HCDR3을 포함하고; 경쇄 가변 영역은 서열번호 2의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열번호 4의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열번호 12의 서열을 포함하는 LCDR3을 포함하거나;
- [0231] e) 중쇄 가변 영역은 서열번호 1의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열번호 19의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열번호 21의 서열을 포함하는 HCDR3을 포함하고; 경쇄 가변 영역은 서열번호 14의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열번호 16의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열번호 18의 서열을 포함하는 LCDR3을 포함하거나;
- [0232] f) 중쇄 가변 영역은 서열번호 1의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열번호 22의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열번호 5의 서열을 포함하는 HCDR3을 포함하고; 경쇄 가변 영역은 서열번호 20의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열번호 4의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열번호 6의 서열을 포함하는 LCDR3을 포함한다.
- [0233] 특정 실시양태에서, 본원에서 제공된 항체 집합체는 CLDN18.2 항체 7C12, 11F12, 26G6, 59A9, 18B10 및 12E9의 하나 이상(예를 들어, 1개, 2개, 3개, 4개, 5개 또는 6개)의 CDR 서열을 포함한다.
- [0234] 본원에서 사용된 바와 같이, "7C12"는 서열번호 37의 중쇄 가변 영역 및 서열번호 38의 경쇄 가변 영역을 가진 마우스 항체를 지칭한다.
- [0235] 본원에서 사용된 바와 같이, "11F12"는 서열번호 39의 중쇄 가변 영역 및 서열번호 40의 경쇄 가변 영역을 가진 마우스 항체를 지칭한다.
- [0236] 본원에서 사용된 바와 같이, "26G6"은 서열번호 41의 중쇄 가변 영역 및 서열번호 42의 경쇄 가변 영역을 가진 마우스 항체를 지칭한다.
- [0237] 본원에서 사용된 바와 같이, "59A9"는 서열번호 43의 중쇄 가변 영역 및 서열번호 44의 경쇄 가변 영역을 가진 마우스 항체를 지칭한다.
- [0238] 본원에서 사용된 바와 같이, "18B10"은 서열번호 45의 중쇄 가변 영역 및 서열번호 46의 경쇄 가변 영역을 가진 마우스 항체를 지칭한다.
- [0239] 본원에서 사용된 바와 같이, "12E9"는 서열번호 47의 중쇄 가변 영역 및 서열번호 48의 경쇄 가변 영역을 가진 마우스 항체를 지칭한다.
- [0240] 표 1은 이들 CLDN18.2 항체의 CDR 서열을 보여준다. 중쇄 및 경쇄 가변 영역 서열도 아래 표 2에서 제공된다.

표 1

CLDN18.2 항체의 CDR 영역의 서열

항체	영역	CDR1	CDR2	CDR3
7C12	HCDR	서열번호 1 GYNMN	서열번호 3 NIDPYYGATRYNQK FKG	서열번호 5 SYYGNAFD Y
	LCDR	서열번호 2 KSSQSLLNSGN QKNYLT	서열번호 4 WASTRES	서열번호 6 QNDYSFPFT
11F12	HCDR	서열번호 1 GYNMN	서열번호 7 YIDPYYGGTRYNQ KFKG	서열번호 5 SYYGNAFD Y
	LCDR	서열번호 2 KSSQSLLNSGN QKNYLT	서열번호 4 WASTRES	서열번호 8 QNDYSYPFT
26G6	HCDR	서열번호 1 GYNMN	서열번호 9 HIDPYYVTTTYNQK FRG	서열번호 11 SFYGNAFDY
	LCDR	서열번호 10 KSSQSLLNSGN QKNYLT	서열번호 4 WASTRES	서열번호 6 QNDYSFPFT
59A9	HCDR	서열번호 13 TYFIGVG	서열번호 15 HIWWNDNKYYNTA LKS	서열번호 17 MSGAWFT Y
	LCDR	서열번호 2 KSSQSLLNSGN QKNYLT	서열번호 4 WASTRES	서열번호 12 QNDYYYPLT
18B10	HCDR	서열번호 1 GYNMN	서열번호 19 NIDPYYGGTSYNQK FKG	서열번호 21 MYHGNAFD Y
	LCDR	서열번호 14 KSSQSLLNSGN LKNYLT	서열번호 16 WASTRKS	서열번호 18 QNDYSYPLT
12E9	HCDR	서열번호 1 GYNMN	서열번호 22 NIDPYYGGTRYNQ KFKG	서열번호 5 SYYGNAFD Y
	LCDR	서열번호 20 KSSQNLLNNGN QKNYLT	서열번호 4 WASTRES	서열번호 6 QNDYSFPFT

[0241]

표 2

마우스/키메라 항체 VH/VL의 서열

	VH	VL
7C12	서열번호 37 EFQLQQSGPELEKPGASVRISCKT SGYSFTGYNMNWVKQSNGESLE WIGNIDPYYGATRYNQKFKGKAT LTVDKSSSTAYMQLKSLTSEDSAV YYCARSYYGNAFDYWGQGTTLT VSS	서열번호 38 DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSC KSSQSLNLSGNQKNYLTWYQQK PGQPPKLLIYWASTRESGVDRFT GSGSGTDFLTITSSVQAEDLAVYY CQNDYSFPFTFGSGTKLEIK
11F12	서열번호 39 EFQLQQSGPELEKPGASVRISCKT SGYSFTGYNMNWVKQSNGESLE WIGYIDPYYGGTRYNQKFKGKAT LTVDKSSSTAYMQLKSLTSEDSAV YYCARSYYGNAFDYWGQGTTLT VSS	서열번호 40 DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSC KSSQSLNLSGNQKNYLTWYQQK PGQPPKLLIYWASTRESGVDRFT GSGSGTDFLTITSSVQAEDLAVYY CQNDYSYPFTFGSGTKLEIK
26G6	서열번호 41 EFQLQQSGPELEKPGASVKISCKT SGYSFTGYNMNWVKQSNQSLE WIGHIDPYYVTTTYNQKFRGKAT LTVDKSSSTAYMQLKSLTSEDSAV YYCARSFYGNAFDYWGQGTTLT VSS	서열번호 42 DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSC KSSQSLFNSGNQKNYLTWYQQK PGQPPKLLIYWASTRESGVDRFT GSGSGTDFLTITSSVQAEDLAVYY CQNDYSFPFTFGSGTKLEIK
59A9	서열번호 43 QITQKESGPGILQPSQTLSTCSLS GFSLSYFIGVGWIRQPSGKGLEW LAHIWWNDNKYYNTALKSRLTIS KDTSNQVFLKIASVDTADTATYY CARMGSGAWFTYWGQGLTVTS A	서열번호 44 DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSC KSSQSLNLSGNQKNYLTWYQQK PGQPPKLLIYWASTRESGVDRFT GSGSGTDFLTITSSVQAEDLAVYY CQNDYYPFTFGSGTKLEIK
18B10	서열번호 45 EFQLQQSGPELEKPGASVRISCKT SGYSFTGYNMNWVKQSNGESLE WIGNIDPYYGGTSYNQKFKGKAT LTVDKSSSTAYMQLKSLTSEDSAV YYCARMYHGNAFDYWGQGTTLT VSS	서열번호 46 DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSC KSSQSLNLSGNLKNYLTWYQQK PGQPPKLLIYWASTRKSVPDRF TGSGSGTDFLTLSVQAEDLAV YYCQNDYSYPLTFGAGTKLELK
12E9	서열번호 47 EFQLQQSGPELEKPGASVRISCKT SGYSFTGYNMNWVKQSNGESLE WIGNIDPYYGGTRYNQKFKGKAT LTVDKSSSTAYMQLKSLTSEDSAV YYCARSYYGNAFDYWGQGTTLT VSS	서열번호 48 DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSC KSSQNLNLSGNQKNYLTWYQQ KPGQPPKLLIYWASTRESGVDR FTGSGSGTDFLTITSSVQAEDLAV YYCQNDYSFPFTFGAGTKLELK

[0242]

[0243]

본원에서 제공된 항-CLDN18.2 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 단일클론 항체, 인간화 항체, 키메라 항체, 재조합 항체, 이중특이적 항체, 표지부착된 항체, 2가 항체 또는 항-이디오타입 항체일 수 있다. 재조합 항체는 동물에서 제조되기 보다는 오히려 재조합 방법을 이용함으로써 시험관내에서 제조된 항체이다.

[0244]

CDR은 항원 결합을 담당하는 것으로 알려져 있으나, 6개의 CDR 모두가 반드시 필수불가결하거나 변경 불가능한 것은 아닌 것으로 밝혀졌다. 즉, 항-CLDN18.2 항체 7C12, 11F12, 26G6, 59A9, 18B10 또는 12E9(서열번호 1 내지 22 중 어느 하나에 상응함)에서 1개, 2개 또는 3개의 CDR을 교체하거나, 변경시키거나 변형시키면서도 CLDN18.2에 대한 특이적 결합 친화성을 실질적으로 유지할 수 있다.

[0245]

특정 실시양태에서, 본원에서 제공된 항-CLDN18.2 항체 접합체는 항-CLDN18.2 항체 7C12, 11F12, 26G6, 59A9,

18B10 또는 12E9 중 하나의 중쇄 CDR3 서열을 포함한다. 특정 실시양태에서, 본원에서 제공된 항체 접합체는 서열번호 5, 11, 17 및 21의 중쇄 CDR3 서열을 포함한다. 중쇄 CDR3 영역은 항원 결합 부위의 중심에 위치하므로, 항원과 가장 많이 접촉하고 항원에 대한 항체의 친화성에 가장 많은 자유 에너지를 제공하는 것으로 여겨진다. 또한, 중쇄 CDR3은 다수의 다양화 기작들에 의해 길이, 아미노산 조성 및 입체구조의 측면에서 항원 결합 부위의 가장 다양한 CDR인 것으로 여겨진다(Tonegawa S. *Nature*. 302:575-81). 중쇄 CDR3의 다양성은 바람직한 항원 결합 친화성(Schier R, etc. *J Mol Biol.* 263:551-67)뿐만 아니라 대부분의 항체 특이성(Xu JL, Davis MM. *Immunity*. 13:37-45)도 생성하기에 충분하다.

[0246] 일부 실시양태에서, 본원에서 제공된 항-CLDN18.2 항체 접합체는 중쇄 가변 도메인의 전부 또는 일부 및/또는 경쇄 가변 도메인의 전부 또는 일부를 포함한다. 한 실시양태에서, 본원에서 제공된 항-CLDN18.2 항체 및 항원 결합 단편은 본원에서 제공된 중쇄 가변 도메인의 전부 또는 일부로 구성된 단일 도메인 항체이다. 이러한 단일 도메인 항체의 추가 정보는 당분야에서 입수 가능하다(예를 들어, 미국 특허 제6,248,516호 참조).

[0247] 특정 실시양태에서, 본원에서 제공된 항-CLDN18.2 항체 접합체는, 항체 및 이의 항원 결합 단편이 CLDN18.2에 특이적으로 결합할 수 있는 한, 적합한 프레임워크 영역(FR) 서열을 포함한다. 표 1에서 제공된 CDR 서열은 마우스 항체로부터 획득되지만, 이들은 당분야에 공지되어 있는 적합한 방법, 예컨대, 재조합 기법을 이용함으로써, 임의의 적합한 종, 예컨대, 특히 마우스, 인간, 래트, 토끼의 임의의 적합한 FR 서열에 이식될 수 있다.

[0248] 특정 실시양태에서, 본원에서 제공된 항-CLDN18.2 항체 접합체는 인간화된다. 인간화 항체 또는 항원 결합 단편은 인간에서 그의 면역원성이 감소된다는 점에서 바람직하다. 비인간 CDR 서열이 인간 또는 실질적으로 인간 FR 서열에 이식되기 때문에, 인간화 항체는 그의 가변 영역에서 키메라이다. 항체 또는 항원 결합 단편의 인간화는 본질적으로 인간 면역글로불린 유전자에서 상응하는 인간 CDR 유전자를 비인간(예컨대, 무린) CDR 유전자로 치환함으로써 수행될 수 있다(예를 들어, 문헌[Jones et al. (1986) *Nature* 321:522-525; Riechmann et al. (1988) *Nature* 332:323-327; Verhoeyen et al. (1988) *Science* 239:1534-1536] 참조).

[0249] 적합한 인간 중쇄 및 경쇄 가변 도메인은 당분야에 공지되어 있는 방법을 이용하여 이 목적을 달성하도록 선택될 수 있다. 예시적인 예에서, 비인간(예를 들어, 설치류) 항체 가변 도메인 서열이 공지된 인간 가변 도메인 생식계열 서열의 데이터베이스에 대해 스크리닝되거나 BLAST되는(BLASTed) "최적 피트(best-fit)" 접근법이 이용될 수 있고, 비인간 질의 서열에 가장 가까운 인간 서열이 식별되고 비인간 CDR 서열을 이식하기 위한 인간 스캐폴드로서 사용된다(예를 들어, 문헌[Sims et al, (1993) *J. Immunol.* 151:2296; Chothia et al. (1987) *J. Mol. Biol.* 196:901] 참조). 대안적으로, 모든 인간 항체의 컨센서스 서열로부터 유래한 프레임워크는 비인간 CDR의 이식을 위해 사용될 수 있다(예를 들어, 문헌[Carter et al. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285; Presta et al. (1993) *J. Immunol.*, 151:2623] 참조).

[0250] 특정 실시양태에서, 본원에서 제공된 인간화 항체 접합체는 비인간인 CDR 서열을 제외하고 실질적으로 모든 인간 서열로 구성된다. 일부 실시양태에서, 가변 영역 FR 및, 존재하는 경우, 불변 영역은 전체적으로 또는 실질적으로 인간 면역글로불린 서열로부터 유래한다. 인간 FR 서열 및 인간 불변 영역 서열은 상이한 인간 면역글로불린 유전자로부터 유래할 수 있으며, 예를 들어, FR 서열은 한 인간 항체로부터 유래할 수 있고 불변 영역은 또 다른 인간 항체로부터 유래할 수 있다. 일부 실시양태에서, 인간화 항체 또는 항원 결합 단편은 인간 중쇄/경쇄 FR1-4를 포함한다.

[0251] 일부 실시양태에서, 인간으로부터 유래한 FR 영역은 이것이 유래한 인간 면역글로불린과 동일한 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 인간 FR의 하나 이상의 아미노산 잔기는 모 비인간 항체의 상응하는 잔기로 치환된다. 이것은 특정 실시양태에서 인간화 항체 또는 이의 단편을 비인간 모 항체 구조에 가깝게 만들어 면역원성을 감소시키거나 회피하고/하거나 결합 활성 또는 결합 친화성을 개선하거나 유지하는 데 바람직할 수 있다.

[0252] 특정 실시양태에서, 본원에서 제공된 인간화 항체 접합체는 각각의 인간 FR 서열에서 10개, 9개, 8개, 7개, 6개, 5개, 4개, 3개, 2개 또는 1개 이하의 아미노산 잔기 치환을 포함하거나, 중쇄 또는 경쇄 가변 도메인의 모든 FR에서 10개, 9개, 8개, 7개, 6개, 5개, 4개, 3개, 2개 또는 1개 이하의 아미노산 잔기 치환을 포함한다. 일부 실시양태에서, 아미노산 잔기의 이러한 변화는 중쇄 FR 영역에만 존재할 수 있거나, 경쇄 FR 영역에만 존재할 수 있거나, 이들 둘 다에 존재할 수 있다. 특정 실시양태에서, 하나 이상의 아미노산 잔기는 CDR 서열이 유래하는 비인간 모 항체(예를 들어, 마우스 프레임워크 영역)에서 발견되는 상응하는 잔기로 돌연변이, 예를 들어, 역돌연변이된다. 돌연변이에 적합한 위치는 당분야에 공지되어 있는 원리에 따라 숙련된 자에 의해 선택될 수 있다. 예를 들어, 돌연변이를 위한 위치는 다음과 같은 경우에 선택될 수 있다: 1) 인간 생식계열 서열의

프레임워크 내의 잔기가 드문 경우(예를 들어, 인간 가변 영역 서열에서 20% 미만 또는 10% 미만); 2) 위치가 CLDN18.2의 잔기와 상호작용할 가능성이 높기 때문에, 인간 생식계열 쇠의 1차 서열에서 3개의 CDR 중 하나 이상에 바로 인접해 있는 경우; 또는 3) 위치가 3차원 모델에서 CDR에 가까우므로, CDR의 아미노산과 상호작용할 가능성이 높을 수 있는 경우. 선택된 위치의 잔기는 모 항체의 상응하는 잔기로 역돌연변이될 수 있거나, 인간 생식계열 서열의 상응하는 잔기가 아니고 모 항체의 상응하는 잔기도 아니지만, 인간 서열의 전형적인 잔기, 즉 인간 생식계열 서열과 동일한 하위군에 속하는 공지된 인간 서열의 해당 위치에서 더 자주 발견되는 잔기로 역돌연변이될 수 있다(미국 특허 제5,693,762호 참조).

[0253] 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 인간화 경쇄 및 중쇄는 인간에서 실질적으로 번역원성을 나타내지 않고 CLDN18.2에 대해 모 항체와 실질적으로 동일한 친화성 또는 심지어 모 항체보다 훨씬 더 높은 친화성을 유지한다.

[0254] 특정 실시양태에서, 본원에서 제공된 이의 인간화 항체 집합체는 역돌연변이 없이 인간 생식계열 프레임워크 서열 VK/4-1의 하나 이상의 경쇄 FR 서열, 및/또는 인간 생식계열 프레임워크 서열 VH/1-46의 하나 이상의 중쇄 FR 서열을 포함한다. 필요한 경우, 역돌연변이는 인간 생식계열 프레임워크 서열에 도입될 수 있다. 특정 실시양태에서, 인간화 항체 18B10은 중쇄 프레임워크 서열 VH/1-46에서 R71I, T73K, T28S, M69L, R38K 및 M48I(모두 카바트 넘버링을 기반으로 함)로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 역돌연변이를 함유할 수 있다. 인간화 항체 18B10은 경쇄 프레임워크 서열 VK/4-1에서 S63T 및 I21M(모두 카바트 넘버링을 기반으로 함)으로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 역돌연변이를 함유할 수 있다.

[0255] 특정 실시양태에서, 본원에서 제공된 항-CLDN18.2 항체 집합체에서, 항-CLDN18.2 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호 25, 서열번호 27, 서열번호 29, 서열번호 37, 서열번호 39, 서열번호 41, 서열번호 43, 서열번호 45 및 서열번호 47, 및 적어도 80%(예를 들어, 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%) 서열 동일성을 가지면서도 CLDN18.2, 특히 인간 CLDN18.2에 대한 특이적 결합 친화성을 유지하는 이의 상동 서열로 구성된 군으로부터 선택된 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함한다.

[0256] 특정 실시양태에서, 본원에서 제공된 항-CLDN18.2 항체 집합체에서, 항-CLDN18.2 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호 26, 서열번호 28, 서열번호 38, 서열번호 40, 서열번호 42, 서열번호 44, 서열번호 46, 서열번호 48, 및 적어도 80%(예를 들어, 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%) 서열 동일성을 가지면서도 CLDN18.2, 특히 인간 CLDN18.2에 대한 특이적 결합 친화성을 유지하는 이의 상동 서열로 구성된 군으로부터 선택된 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.

[0257] 특정 실시양태에서, 본원에서 제공된 항-CLDN18.2 항체 집합체는

[0258] 서열번호 25의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열번호 26의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역;

[0259] 서열번호 27의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열번호 28의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역;

[0260] 서열번호 29의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열번호 26 또는 28의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역;

[0261] 서열번호 37의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열번호 38의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역;

[0262] 서열번호 39의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열번호 40의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역;

[0263] 서열번호 41의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열번호 42의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역;

[0264] 서열번호 43의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열번호 44의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역;

[0265] 서열번호 45의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열번호 46의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역; 또는

[0266] 서열번호 47의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열번호 48의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역

[0267] 을 포함한다.

[0268] 특정 실시양태에서, 본원에서 제공된 항-CLDN18.2 항체 집합체는 중쇄 HFR1, HFR2, HFR3 및 HFR4 중 하나 이상, 및/또는 경쇄 LFR1, LFR2, LFR3 및 LFR4 중 하나 이상을 추가로 포함하고, 이때

[0269] HFR1은 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGY₁₇FT(서열번호 54) 또는 적어도 80%(또는 적어도 85%, 90%, 95%) 서열 동일성을 가진 이의 상동 서열을 포함하고,

[0270] HFR2는 WVX₁₈QAPQGGL₁₉EWX₁₉G(서열번호 55) 또는 적어도 80%(또는 적어도 90%) 서열 동일성을 가진 이의 상동 서열

을 포함하고,

- [0271] HFR3 서열은 RVTX₂₀TIDKSTSTVYMESSLRSEDVAVYYCAR(서열번호 56) 또는 적어도 80%(또는 적어도 85%, 90%, 95%) 서열 동일성을 가진 이의 상동 서열을 포함하고,
- [0272] HFR4는 WGGGTTTVVSS(서열번호 57) 또는 적어도 80% 서열 동일성을 가진 이의 상동 서열을 포함하고,
- [0273] LFR1은 DIVMTQSPDSLAVSLGERATX₂₁NC(서열번호 58) 또는 적어도 80%(또는 적어도 85%, 90%, 95%) 서열 동일성을 가진 이의 상동 서열을 포함하고,
- [0274] LFR2는 WYQKPGQPPKLLIY(서열번호 59) 또는 적어도 80%(또는 적어도 85%, 90%) 서열 동일성을 가진 이의 상동 서열을 포함하고,
- [0275] LFR3은 GVPDRFX₂₂GSGSGTDFLTISLQAEDVAVYYC(서열번호 60) 또는 적어도 80%(또는 적어도 85%, 90%, 95%) 서열 동일성을 가진 이의 상동 서열을 포함하고,
- [0276] LFR4는 FGGGTKVEIK(서열번호 61) 또는 적어도 80%(또는 적어도 90%) 서열 동일성을 가진 이의 상동 서열을 포함하고,
- [0277] 이때 X₁₇은 T 또는 S이고, X₁₈은 R 또는 K이고, X₁₉는 M 또는 I이고, X₂₀은 M 또는 L이고, X₂₁은 I 또는 M이고, X₂₂는 S 또는 T이다.
- [0278] 특정 실시양태에서, HFR1은 서열번호 62 및 63으로 구성된 군으로부터 선택된 서열을 포함하고, HFR2는 서열번호 64 및 65로 구성된 군으로부터 선택된 서열을 포함하고, HFR3은 서열번호 66 및 67로 구성된 군으로부터 선택된 서열을 포함하고, HFR4는 서열번호 57의 서열을 포함하고, LFR1은 서열번호 68 및 69로 구성된 군으로부터 선택된 서열을 포함하고, LFR2는 서열번호 59의 서열을 포함하고, LFR3은 서열번호 70 및 71로 구성된 군으로부터 선택된 서열을 포함하고, LFR4는 서열번호 61의 서열을 포함한다.

[0279] [표 3-1]

인간화 CLDN18.2 항체 18B10의 프레임워크(FR) 서열

항체 쇄	FR1	FR2	FR3	FR4
Hu18B10-Ha	서열번호 62	서열번호 64	서열번호 66	서열번호 57
	QVQLVQSG AEVKKPGA SVKVSCKA SGYTFT	WVRQAPGQ GLEWMG	RVTMTIDKS TSTVYMELS SLRSEDVAV YYCAR	WGQGTTV TVSS
Hu18B10-Hb	서열번호 63	서열번호 64	서열번호 67	서열번호 57
	QVQLVQSG AEVKKPGA SVKVSCKA SGYSFT	WVRQAPGQ GLEWMG	RVTLTIDKST STVYMELSS LRSEDVAVY YCAR	WGQGTTV TVSS
Hu18B10-Hc	서열번호 63	서열번호 65	서열번호 67	서열번호 57
	QVQLVQSG AEVKKPGA SVKVSCKA SGYSFT	WVKQAPGQ GLEWIG	RVTLTIDKST STVYMELSS LRSEDVAVY YCAR	WGQGTTV TVSS
Hu18B10-La	서열번호 68	서열번호 59	서열번호 70	서열번호 61
	DIVMTQSP DSLAVSLG ERATINC	WYQQKPGQ PPKLLIY	GVPDRFSGS GSGTDFTLTI SSLQAEDVA VYYC	FGGGTKVE IK
Hu18B10-Lb	서열번호 69	서열번호 59	서열번호 71	서열번호 61
	DIVMTQSP DSLAVSLG ERATMNC	WYQQKPGQ PPKLLIY	GVPDRFSGS GSGTDFTLTI SSLQAEDVA VYYC	FGGGTKVE IK

[0280]

[0281] 표 3-2는 인간화 18B10 항체의 가변 영역의 서열을 예시한다.

[0282] [표 3-2]

인간화 18B10의 서열

항체쇄	서열
18B10 HC 생식계열	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYMHWVR QAPGQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTTRDTSTST VYMELSSLRSEDVAVYYCAR (서열번호 23)
Hu18B10-Ha	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYNMNWVR QAPGQGLEWMGNIDPYYGGTSYNQKFKGRVTMTIDKSTS TVYMELSSLRSEDVAVYYCARMYHGNAFDYWGQGTTVT VSS (서열번호 25)
Hu18B10-Hb	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTGYNMNWVR QAPGQGLEWMGNIDPYYGGTSYNQKFKGRVTLTIDKSTS TVYMELSSLRSEDVAVYYCARMYHGNAFDYWGQGTTVT VSS (서열번호 27)
Hu18B10-Hc	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTGYNMNWVK QAPGQGLEWIGNIDPYYGGTSYNQKFKGRVTLTIDKSTST VYMELSSLRSEDVAVYYCARMYHGNAFDYWGQGTTVT SS (서열번호 29)
18B10-LC 생식계열	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQNNKNYLAWYQQK PGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAE DVAVYYCQQYYSTP (서열번호 24)
Hu18B10_La	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSGNLKNYLT WYQQKPGQPPKLLIYWASTRKSVPDRFSGSGSGTDFTLT

[0283]

	ISSLQAEDVAVYYCQNDYSYPLTFGGGTKVEIK(서열번호 26)
Hu18B10_Lb	DIVMTQSPDSLAVSLGERATMCKSSQSLLNSGNLKNYLT WYQQKPGQPPKLLIYWASTRKSVPDRFTGSGSGTDFTLT ISSLQAEDVAVYYCQNDYSYPLTFGGGTKVEIK(서열번호 28)

[0284]

[0285] 특정 실시양태에서, 본원에서 제공된 인간화 항체는 인간 IgG1 이소타입의 불변 영역에 융합된 중쇄 가변 영역, 및 인간 카파쇄의 불변 영역에 융합된 경쇄 가변 영역을 포함할 수 있다.

[0286] 본원에서 제공된 인간화 항-CLDN18.2 항체 접합체는 CLDN18.2 발현 세포에 대한 특이적 결합 친화성을

유지하고, 그 측면에서 모 항체에 적어도 필적할 만하거나 심지어 모 항체보다 더 우수하다. 본원에서 제공된 인간화 항체는 또한 모든 항체가 종양 세포 표면에서 표적의 교차결합에 의해 유도된 ADCC, CDC 및 아포토시스 유도에 의한 세포 사멸 및 증식의 직접적인 억제를 매개할 수 있다는 점에서 CLDN18.2 발현 세포, 예컨대, NUGC4 세포, SNU-620 세포, SNU-601 세포 또는 KATOIII 세포와 의 그의 기능적 상호작용을 유지할 수 있다. 특정 실시양태에서, 본원에서 제공된 항-CLDN18.2 항체 및 이의 단편은 면역글로불린 불변 영역, 임의로 인간 Ig의 불변 영역, 또는 임의로 인간 IgG의 불변 영역을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 면역글로불린 불변 영역은 중쇄 및/또는 경쇄 불변 영역을 포함한다. 중쇄 불변 영역은 CH1, 힌지 및/또는 CH2-CH3 영역을 포함한다. 특정 실시양태에서, 중쇄 불변 영역은 Fc 영역을 포함한다. 특정 실시양태에서, 경쇄 불변 영역은 C κ 또는 C λ 를 포함한다.

- [0287] 특정 실시양태에서, 본원에서 제공된 항-CLDN18.2 항체 및 이의 단편은 인간 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4의 불변 영역을 추가로 포함한다. 특정 실시양태에서, 본원에서 제공된 항-CLDN18.2 항체 및 이의 항원 결합 단편은 IgG1 이소타입의 불변 영역을 포함한다. 특정 실시양태에서, 인간 IgG1의 불변 영역은 서열번호 49, 또는 적어도 80%(예를 들어, 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%) 서열 동일성을 가진 이의 상동 서열을 포함한다.
- [0288] IgG1 이소타입의 불변 영역은 ADCC 또는 CDC와 같은 이펙터 기능을 유도할 수 있다. 본원에서 제공된 항-CLDN18.2 항체 및 이의 항원 결합 단편의 이펙터 기능은 CLDN18.2를 발현하는 세포에 대한 세포독성을 유발할 수 있다. 이펙터 기능은 다양한 어세이, 예컨대, Fc 수용체 결합 어세이, C1q 결합 어세이 및 세포 용해 어세이, 및 ADCC 또는 CDC를 측정하는 전달된 어세이들 중 임의의 어세이를 이용함으로써 평가될 수 있다.
- [0289] 놀랍게도, 본 발명자들은 본원에서 제공된 항-CLDN18.2 항체 및 이의 단편이 인간 CLDN18.2 중간 발현 세포주(예를 들어, NUGC4 세포), 저발현 세포주(예를 들어, SNU-620, SNU-601 및 KATOIII 세포)에 대한 높은 친화성을 가진다는 사실을 발견하였다. 이것은 인간 CLDN18.2 저발현 세포에 대한 특이적 또는 필적할 만한 결합을 보이지 못하는 기존 항체, 예컨대, IMAB362와 구별된다. 키메라 IgG1 항체 IMAB362는 미국 특허 출원 공개 제 2009169547A1호에 개시된 아미노산 서열(IMB362의 중쇄 및 경쇄 가변 영역 서열은 서열번호 72 및 서열번호 73 으로서 본원에 포함됨) 및 CAS 번호 1496553-00-4를 가진, 가니메드 파마슈티칼스 아게(Ganymed Pharmaceuticals AG)에 의해 개발된 항-인간 CLDN18.2 항체이다. IMAB362는 CLDN18.2의 제1 세포의 도메인(ECD1)을 인식하고 클라우딘 18의 밀접하게 관련된 스플라이스 변이체 1(CLDN18.1)을 비롯한 임의의 다른 클라우딘 계열 구성원에 결합하지 않는다.
- [0290] NUGC4 세포는 암 환자의 위주변 림프절로부터 확립된 세포주이다(문헌[Akiyama S et al, Jpn J Surg. 1988 Jul;18(4):438-46] 참조). NUGC4 세포주는 수탁번호 JCRB0834 하에 JCRB 세포 은행(Cell Bank)으로부터 입수 가능하다.
- [0291] SNU-601 세포 및 SNU-620 세포는 둘 다 서울 대학교(SNU)에 의해 암 환자의 복수로부터 확립된 인간 위 암종 세포주이다(KU JL et al, Cancer Res Treat. 2005 Feb; 37(1): 1-19; Park et al., Int J Cancer. 1997 Feb 7;70(4):443-449). SNU-601 세포 및 SNU-620 세포는 각각 수탁번호 00601 및 00620 하에 한국 세포주 은행으로부터 입수 가능하다.
- [0292] KATO III 세포는 위암 환자의 전이 부위로부터 유래한 세포주이다(문헌[Sekiguchi M, et al. Jpn. J. Exp. Med. 48: 61-68, 1978] 참조). KATO III 세포주는 수탁번호 ATCC HTB-103 하에 ATCC로부터 입수 가능하다.
- [0293] 특정 실시양태에서, 본원에서 제공된 항-CLDN18.2 항체, 이의 항원 결합 단편 및 항-CLDN18.2 항체 접합체는 KinExA 어세이에 의해 측정될 때 2.5 nM 이하(또는 2.4, 2.3, 2.2, 2.1, 2.0, 1.9, 1.8, 1.7, 1.6, 1.5, 1.4, 1.3, 1.2, 1.1, 1.0, 0.9, 0.8, 0.7, 0.6, 0.5, 0.4 nM 이하)의 K_D 값으로 인간 CLDN18.2 발현 세포(예를 들어, NUGC4 세포주 또는 KATOIII 세포주)에 특이적으로 결합한다. 특정 실시양태에서, 본원에서 제공된 항-CLDN18.2 항체, 이의 항원 결합 단편 및 항-CLDN18.2 항체 접합체는 KinExA 어세이에 의해 측정될 때 IMAB362의 K_D 값의 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 15% 이하의 K_D 값으로 인간 CLDN18.2 발현 세포에 특이적으로 결합한다. 특정 실시양태에서, K_D 값은 NUGC4 세포, KATOIII 세포, SNU-601 세포 또는 SNU-620 세포의 인간 CLDN18.2 단백질 발현 수준에 필적할 만하거나 이 발현 수준 이하인 인간 CLDN18.2 단백질 발현 수준을 가진 NUGC4 세포, KATOIII 세포, SNU-601 세포, SNU-620 세포 또는 이의 필적할 만한 세포를 사용함으로써 측정된다. 특정 실시양태에서, K_D 값은 인간 CLDN18.2 고발현 세포주 또는 인간 CLDN18.2 중간 발현 세포주를 사용함으로써 측정된다.

- [0294] 특정 실시양태에서, 본원에서 제공된 항-CLDN18.2 항체, 이의 항원 결합 단편 및 항-CLDN18.2 항체 접합체는 유세포분석 어세이에 의해 측정될 때 인간 CLDN18.2(또는 마우스 CLDN18.2) 발현 세포와의 결합에 대해 70 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이하(또는 65, 60, 55, 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 12, 또는 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 또는 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이하)의 EC50 값을 가진다. 특정 실시양태에서, 본원에서 제공된 항-CLDN18.2 항체, 이의 항원 결합 단편 및 항-CLDN18.2 항체 접합체는 유세포분석 어세이에 의해 측정될 때 IMAB362의 EC50 값의 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 15%, 10%, 1% 또는 0.1% 이하의 EC50 값으로 인간 CLDN18.2 발현 세포에 특이적으로 결합한다. 특정 실시양태에서, EC50은 NUGC4 세포주, KATOIII 세포주, SNU-601 세포주 또는 SNU-620 세포주, 예를 들어, 인간 CLDN18.2 저발현 세포주 또는 인간 CLDN18.2 중간 발현 세포주의 인간 CLDN18.2 단백질 발현 수준에 필적할 만하거나 이 발현 수준 이하인 인간 CLDN18.2 단백질 발현 수준을 가진 NUGC4 세포주, KATOIII 세포주, SNU-601 세포주, SNU-620 세포주, 또는 이의 필적할 만한 세포를 사용함으로써 측정된다. 특정 실시양태에서, EC50은 인간 CLDN18.2 고발현 세포주를 사용함으로써 측정된다.
- [0295] 특정 실시양태에서, 본원에서 제공된 항-CLDN18.2 항체, 이의 항원 결합 단편 및 항-CLDN18.2 항체 접합체는 인간 CLDN18.2 고발현 세포주 또는 인간 CLDN18.2 중간 발현 세포주와의 결합에 대해 5, 4, 3 또는 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이하의 EC50 값을 가진다.
- [0296] 특정 실시양태에서, 본원에서 제공된 항-CLDN18.2 항체, 이의 항원 결합 단편 및 항-CLDN18.2 항체 접합체는 유세포분석 어세이에 의해 측정될 때 NUGC4 세포와의 결합에 대해 70 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이하(또는 65, 60, 55, 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 12, 또는 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 또는 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이하)의 EC50 값을 가진다.
- [0297] 특정 실시양태에서, 본원에서 제공된 항-CLDN18.2 항체 접합체는 CLDN18.1(예를 들어, 인간 CLDN18.1 또는 마우스 CLDN18.1)에 결합하지 않는다.
- [0298] 특정 실시양태에서, 본원에서 제공된 항-CLDN18.2 항체, 이의 항원 결합 단편 및 항-CLDN18.2 항체 접합체는 유세포분석에 의해 측정될 때 1.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이하의 EC50 값으로 마우스 CLDN18.2(예를 들어, 마우스 CLDN18.2를 발현하는 세포)에 특이적으로 결합할 수 있다. 특정 실시양태에서, 본원에서 제공된 항-CLDN18.2 항체 접합체는 유세포분석에 의해 측정될 때 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 내지 1.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (예를 들어, 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 내지 1.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 내지 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 내지 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 0.6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 내지 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 0.6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 내지 0.8 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 또는 0.67 $\mu\text{g}/\text{ml}$)의 EC50으로 마우스 CLDN18.2에 결합한다.
- [0299] 특정 실시양태에서, 본원에서 제공된 항-CLDN18.2 항체 및 본원에서 제공된 항-CLDN18.2 항체 접합체는 다양한 수준의 인간 CLDN18.2를 발현하는 세포에서 항체 의존적 세포 매개 세포독성(ADCC) 활성 및/또는 CDC 활성을 유도할 수 있다.
- [0300] 본원에서 사용된 바와 같이, "항체 의존적 세포 매개 세포독성" 또는 "ADCC"는 Fc 수용체(FcR)를 발현하는 비특이적 세포독성 세포(예를 들어, 천연 킬러(NK) 세포, 호중구 및 대식세포)가 표적 세포 상의 결합된 항체를 인식한 후 표적 세포의 용해를 야기하는 세포 매개 반응을 의미한다. 표적 세포의 용해는 세포외에서 일어나고, 직접적인 세포 대 세포 접촉을 필요로 하고, 보체를 이용하지 않는다. ADCC는 항원 제시 및 종양 지향성 T 세포 반응의 유도로 이어지는 다양한 정도의 즉각적인 종양 파괴를 직접적으로 유도하는 기작으로서 간주될 수 있다. ADCC의 생체내 유도는 종양 지향성 T 세포 반응 및 숙주 유래 항체 반응으로 이어지는 것으로 여겨진다.
- [0301] ADCC를 수행하는 방법은 당분야에 알려져 있다. 일반적으로, CLDN18.2 발현 세포와 같은 표적 세포를 다양한 농도의 항-CLDN18.2 항체와 함께 인큐베이션하고, 세척 후, Fc 수용체 발현 세포와 같은 이펙터 세포를 첨가하여 ADCC가 일어나도록 한다. ADCC의 수준을 정량하기 위해 표적 세포와 이펙터 세포를 혼합한 지 몇 시간 후에 한 시점에서 세포독성 또는 세포 생존율을 측정한다. 세포독성은 용해된 표적 세포로부터의 표지(예를 들어, 방사성 기질, 형광 염료 또는 천연 세포내 단백질, 예컨대, 락테이트 탈하이드로게나제(LDH))의 방출에 의해 검출될 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 세포 생존율은 배양물 내의 살아있는 세포의 수에 비례하는 발광 신호를 생성하는 루시퍼라제 리포터 유전자(즉, ADCC 리포터 어세이)를 사용함으로써, 대사 활성 세포의 지표(예컨대, ATP)에 의해 측정된다(예를 들어, 문헌[Crouch, S.P. et al. (1993) J. Immunol. Methods 160, 81-8] 참조). 이펙터 세포의 예는 NK 세포, PBMC 또는 Fc γ RIII 발현 세포이다.
- [0302] "보체 의존적 세포독성" 또는 "CDC"는 보체의 존재 하에서 표적을 용해시킴으로써 항체에 의해 유도될 수 있는 또 다른 세포 사멸 방법이다. IgM은 보체 활성화에 가장 효과적인 이소타입이다. IgG1 및 IgG3은 둘 다 고전적인 보체 활성화 경로를 통해 CDC를 유도하는 데 매우 효과적이다. 이 캐스케이드에서, 항원-항체 복합체의 형성은 동족 항원과 복합체를 형성한 참여 항체 분자, 예컨대, IgG 분자(C1q는 보체 C1의 3개 하위구성요소들 중 하

나임)의 CH2 도메인에 가깝게 인접한 다수의 C1q 결합 부위들을 노출시킨다. 이 노출된 C1q 결합 부위는 앞선 저친화성 C1q-IgG 상호작용을 높은 결합력의 C1q-IgG 상호작용으로 전환시키고, 이것은 일련의 다른 보체 단백질을 사용하는 사건의 캐스케이드를 촉발하고 이펙터-세포 화학주성제/활성화제 C3a 및 C5a의 단백질용해성 방출을 유발한다. 보체 캐스케이드는 물 및 용질이 세포 안팎으로 자유롭게 통과하는 것을 촉진하는 공극을 세포 막에서 생성하는 막 공격 복합체(MAC)의 형성으로 끝난다.

[0303] CDC 활성은 이펙터 세포가 사용되지 않고 인간 혈청으로부터 유래한 보체의 존재가 요구된다는 점을 제외하고 ADCC 활성에 대해 상기 논의된 방법과 유사한 방법에 의해 측정될 수 있다. 요약하건대, 항체 샘플을 어세이 배지에 연속적으로 희석하고, 인간 혈청 보체의 존재 하에서 CLDN18.2를 발현하는 표적 세포와 함께 인큐베이션하였다. 인큐베이션 후, 용해된 표적 세포로부터의 표지 방출 또는 대사 활성 세포의 지표(예컨대, ATP)로 세포독성 또는 세포 생존율을 측정한다. 대사 활성 세포에서 ATP에 대해 어세이하는 CellTiter-Glo 시약을 사용할 수 있으며, 적절한 관독기로 발광의 강도를 측정하여 세포 용해의 정도를 정량할 수 있다.

[0304] 특정 실시양태에서, 본원에서 제공된 항-CLDN18.2 항체, 이의 항원 결합 단편 및 항-CLDN18.2 항체 접합체를 통한 ADCC 또는 CDC 유도 세포 사멸은 요오드화 프로피듐(PI), 트리판 블루(문헌[Moore et al. Cytotechnology 17:1-11 (1995)] 참조) 또는 7AAD의 흡수에 의해 평가될 때 비처리 세포에 비해 막 온전성의 상실에 의해 측정될 수 있다.

[0305] 특정 실시양태에서, 본원에서 제공된 항-CLDN18.2 항체, 이의 항원 결합 단편 및 항-CLDN18.2 항체 접합체는 세포독성 어세이에 의해 측정될 때 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이하(또는 0.9, 0.8, 0.7, 0.6, 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이하)의 EC50 값으로 인간 CLDN18.2를 발현하는 세포에 대한 보체 의존적 세포독성(CDC)을 유도할 수 있다. 특정 실시양태에서, 본원에서 제공된 항-CLDN18.2 항체 및 이의 단편은 세포독성 어세이에 의해 측정될 때 IMAB362의 EC50 값의 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 10% 또는 5% 이하의 EC50 값으로 인간 CLDN18.2를 발현하는 세포에 대한 CDC를 유도할 수 있다. 특정 실시양태에서, CDC는 인간 CLDN18.2 중간 발현 세포주 또는 인간 CLDN18.2 고발현 세포주를 사용함으로써 측정된다.

[0306] 특정 실시양태에서, 본원에서 제공된 항-CLDN18.2 항체, 이의 항원 결합 단편 및 항-CLDN18.2 항체 접합체는 ADCC 리포터 어세이에 의해 측정될 때 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이하(또는 1.9, 1.8, 1.7, 1.6, 1.5, 1.4, 1.3, 1.2, 1.1, 1.0, 0.9, 0.8, 0.7, 0.6, 0.5, 0.4, 0.3, 0.2 또는 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이하)의 EC50 값으로 인간 CLDN18.2를 발현하는 세포에 대한 항체 의존적 세포 세포독성(ADCC)을 유도할 수 있다. 특정 실시양태에서, 본원에서 제공된 항-CLDN18.2 항체, 이의 항원 결합 단편 및 항-CLDN18.2 항체 접합체는 ADCC 리포터 어세이에 의해 측정될 때 IMAB362의 EC50 값의 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 10%, 5% 또는 1% 이하의 EC50 값, 또는 IMAB362의 총 ADCC 능력의 적어도 120%, 150%, 180% 또는 200%의 총 ADCC 능력(예를 들어, 항체 농도 대 ADCC 활성 수준의 플롯에서 관찰된 ADCC 활성의 최대 수준에 의해 표시됨)으로 인간 CLDN18.2를 발현하는 세포에 대한 ADCC를 유도한다. 특정 실시양태에서, ADCC는 NUGC4 세포주, KATOIII 세포주, SNU-601 세포주 또는 SNU-620 세포주, 예를 들어, 인간 CLDN18.2 중간 발현 세포주 또는 인간 CLDN18.2 저발현 세포주의 인간 CLDN18.2 단백질 발현 수준에 필적할 만하거나 이 발현 수준 이하인 인간 CLDN18.2 단백질 발현 수준을 가진 NUGC4 세포주, KATOIII 세포주, SNU-601 세포주, SNU-620 세포주 또는 이의 필적할 만한 세포를 사용함으로써 측정된다.

[0307] 특정 실시양태에서, 본원에서 제공된 항-CLDN18.2 항체, 이의 항원 결합 단편 및 항-CLDN18.2 항체 접합체는 ADCC 리포터 어세이에 의해 측정될 때 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이하(또는 1.9, 1.8, 1.7, 1.6, 1.5, 1.4, 1.3, 1.2, 1.1, 1.0, 0.9, 0.8, 0.7, 0.6, 0.5, 0.4, 0.3, 0.2 또는 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이하)의 EC50 값으로 NUGC4 세포에 대한 ADCC를 유도할 수 있다.

[0308] 특정 실시양태에서, 본원에서 제공된 항-CLDN18.2 항체, 이의 항원 결합 단편 및 항-CLDN18.2 항체 접합체는 서열번호 30의 아미노산 서열을 가진 인간 CLDN18.2의 위치 D28, W30, V43, N45, Y46, L49, W50, R51, R55, E56, F60, E62, Y66, L72, L76, V79 및 R80에서 적어도 하나 이상(예를 들어, 1개, 2개, 3개 이상)의 아미노산 잔기를 포함하는 에피토프에 결합한다.

[0309] 본원에서 사용된 용어 "에피토프"는 항체가 결합하는 항원 상의 특정 원자 또는 아미노산 군을 지칭한다. 에피토프는 항체와 직접 접촉하는 특정 아미노산, 당 측쇄, 포스포릴 또는 설포닐 기를 포함할 수 있다. 당업자는 두 항체들이 CLDN18.2 항원 폴리펩티드와의 결합을 위해 경쟁하는지를 확인함으로써 항체가 본 개시내용의 항체(예를 들어, 본원에서 제공된 하이브리도마/키메라 또는 인간화 항체 7C12, 11F12, 26G6, 59A9, 18B10 및 이들의 임의의 키메라 및 인간화 변이체)와 동일하거나, 중첩되거나 인접한 에피토프에 결합하는지를 과도한 실험 없이 확인할 수 있음을 인식할 것이다.

- [0310] 2개의 항원 결합 단백질(예를 들어, 항체)과 관련하여 본원에서 사용된 용어 "결합을 위해 경쟁한다"는 경쟁 결합 어세이에 의해 확인될 때 하나의 항원 결합 단백질이 다른 항원 결합 단백질과 항원(예를 들어, 인간/마우스 CLDN18.2)의 결합을 차단하거나 감소시키는 것을 의미한다. 경쟁 결합 어세이는 당분야에 잘 알려져 있으며, 예를 들어, 직접 또는 간접 방사면역어세이(RIA), 직접 또는 간접 효소 면역어세이(EIA) 및 샌드위치 경쟁 어세이를 포함한다(예를 들어, 문헌[Stahli et al., 1983, *Methods in Enzymology* 9:242-253] 참조). 전형적으로, 이러한 어세이는 항원을 보유하는 고체 표면 또는 세포에 결합된 정제된 항원, 표지부착되지 않은 시험 항체 및 표지부착된 기준 항체의 사용을 수반한다. 경쟁 억제제는 시험 항체의 존재 하에서 고체 표면 또는 세포에 결합된 표지의 양을 측정함으로써 측정된다. 통상적으로, 시험 항체는 과량으로 존재한다. 2개의 항체가 CLDN18.2와의 결합을 위해 경쟁하는 경우, 2개의 항체는 동일하거나 중첩되는 에피토프에 결합하거나, 입체 장애가 발생할 정도로 다른 항체에 의해 결합된 에피토프에 충분히 가까운 인접 에피토프에 결합한다. 통상적으로, 경쟁 항체가 과량으로 존재할 때, 경쟁 항체는 시험 항체와 공통 항원의 특이적 결합을 최소한 50% 내지 55%, 55% 내지 60%, 60% 내지 65%, 65% 내지 70%, 70% 내지 75%, 75% 내지 80%, 80% 내지 85%, 85% 내지 90% 이상 억제할(예를 들어, 감소시킬) 것이다.
- [0311] 특정 실시양태에서, 항체가 결합하는 에피토프 또는 에피토프 내의 아미노산 잔기는 항원, 즉 CLDN18.2의 특정 잔기를 돌연변이시킴으로써 확인될 수 있다. 항체가 그와 야생형 CLDN18.2의 결합에 비해 상당히 감소된 수준으로, 예를 들어, 알라닌으로 돌연변이된 아미노산 잔기를 가진 돌연변이체 CLDN18.2에 결합하는 경우, 이것은 돌연변이된 잔기가 이 항체와 CLDN18.2 항원의 결합에 직접적으로 관여하거나, 항원에 결합될 때 항체에 가깝게 인접해 있음을 표시할 것이다. 이러한 돌연변이된 잔기는 에피토프 내에 있는 것으로 간주되며, 항체는 잔기를 포함하는 에피토프에 특이적으로 결합하는 것으로 간주된다. 본원에서 사용된 바와 같이, 상당히 감소된 결합 수준은 항체와 돌연변이체 CLDN18.2 사이의 결합 친화성(예를 들어, EC50, Kd 또는 결합 능력)이 항체와 야생형 CLDN18.2 사이의 결합에 비해 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 이상 감소됨을 의미한다. 이러한 결합 측정은 당분야에 공지되어 있고 본원에 개시되어 있는 임의의 적합한 방법, 예를 들어, 제한 없이 KinExA 어세이 및 유세포분석을 이용함으로써 수행될 수 있다.
- [0312] 특정 실시양태에서, 본원에서 제공된 항-CLDN18.2 항체, 이의 항원 결합 단편 및 항-CLDN18.2 항체 접합체는 야생형 CLDN18.2 내의 잔기가 알라닌으로 치환되어 있고, 상기 잔기가 인간 CLDN18.2의 D28, W30, V43, N45, Y46, L49, W50, R51, R55, E56, F60, E62, Y66, L72, L76, V79 및 R80으로 구성된 군으로부터 선택된 것인 돌연변이체 CLDN18.2에 대해 상당히 더 낮은 결합을 나타낸다. 특정 실시양태에서, 상기 잔기는 E56이다. 특정 실시양태에서, 상기 잔기는 W30, L49, W50, R55 및 E56으로 구성된 군으로부터 선택된다. 특정 실시양태에서, 상기 잔기는 T41, N45, Y46, R51, F60, E62 및 R80으로 구성된 군으로부터 선택된다. 특정 실시양태에서, 상기 잔기는 D28, V43, N45, Y46, Y66, L72, L76 및 V79로 구성된 군으로부터 선택된다.
- [0313] 특정 실시양태에서, 본원에서 제공된 항-CLDN18.2 항체, 이의 항원 결합 단편 및 항-CLDN18.2 항체 접합체는 항체와 야생형 CLDN18.2 사이의 결합에 비해 인간 CLDN18.2의 E56A를 포함하는 돌연변이체 CLDN18.2에 대해 적어도 80%, 90%, 95% 또는 99% 이상의 결합 감소를 나타낸다.
- [0314] 특정 실시양태에서, 본원에서 제공된 항-CLDN18.2 항체, 이의 항원 결합 단편 및 항-CLDN18.2 항체 접합체는 항체와 야생형 CLDN18.2 사이의 결합에 비해 인간 CLDN18.2의 W30A, L49A, W50A, R55A 및 E56A로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 돌연변이된 잔기를 포함하는 돌연변이체 CLDN18.2에 대해 적어도 50%, 60%, 70%, 80% 또는 90%의 결합 감소를 나타낸다.
- [0315] 특정 실시양태에서, 본원에서 제공된 항-CLDN18.2 항체, 이의 항원 결합 단편 및 항-CLDN18.2 항체 접합체는 항체와 야생형 CLDN18.2 사이의 결합에 비해 인간 CLDN18.2의 D28, V43, N45, Y46, Y66, L72, L76 및 V79로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 돌연변이된 잔기를 포함하는 돌연변이체 CLDN18.2에 대해 적어도 30%, 35%, 40%, 45% 또는 50%의 결합 감소를 나타낸다.
- [0316] 특정 실시양태에서, 본원에서 제공된 항-CLDN18.2 항체, 이의 항원 결합 단편 및 항-CLDN18.2 항체 접합체는 항체와 야생형 CLDN18.2 사이의 결합에 비해 인간 CLDN18.2의 T41A, N45A, Y46A, R51A, F60A, E62A 및 R80A로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 돌연변이된 잔기를 포함하는 돌연변이체 CLDN18.2에 대해 적어도 10%, 15%, 20%, 25% 또는 30%의 결합 감소를 나타낸다.
- [0317] 특정 실시양태에서, 본원에서 제공된 항-CLDN18.2 항체, 이의 항원 결합 단편 및 항-CLDN18.2 항체 접합체는 A42 및/또는 N45에 결합하지 않는다.

- [0318] 특정 실시양태에서, 본원에서 제공된 항-CLDN18.2 항체, 이의 항원 결합 단편 및 항-CLDN18.2 항체 접합체는 본원에서 제공된 에피토프에 결합할 수 있고, 인간 CLDN18.2 중간 발현 세포주 또는 인간 CLDN18.2 저발현 세포주에서 ADCC 또는 CDC 활성을 유도할 수 있다.
- [0319] **ii. 항체 변이체**
- [0320] 본원에서 제공된 항-CLDN18.2 항체 접합체의 항-CLDN18.2 항체 및 이의 항원 결합 단편은 본원에서 제공된 항체 서열의 다양한 유형의 변이체도 포함한다.
- [0321] 특정 실시양태에서, 변이체는 표 1에서 제공된 1개, 2개 또는 3개의 CDR 서열, 하나 이상의 FR 서열, 본원에서 제공된 중쇄 또는 경쇄 가변 영역 서열 및/또는 불변 영역(예를 들어, Fc 영역)에서 하나 이상의 변형(들) 또는 치환(들)을 포함한다. 이러한 항체 변이체는 그의 모 항체의 CLDN18.2에 대한 특이적 결합 친화성을 유지하지만, 상기 변형(들) 또는 치환(들)에 의해 부여되는 하나 이상의 바람직한 성질을 가진다. 예를 들어, 항체 변이체는 몇 가지 예를 들면, 개선된 항원 결합 친화성, 개선된 글리코실화 패턴, 감소된 글리코실화 위험, 감소된 탈아민화, 감소 또는 증가된 이펙터 기능(들), 개선된 FcRn 수용체 결합, 증가된 약동학적 반감기, pH 민감성, 및/또는 접합에 대한 적합성(예를 들어, 하나 이상의 도입된 시스테인 잔기)을 가질 수 있다.
- [0322] 모 항체 서열은 당분야에 공지되어 있는 방법, 예를 들어, "알라닌 스캐닝 돌연변이유발"을 이용하여 변형시키거나 치환시키기에 적합하거나 바람직한 잔기를 식별하기 위해 스크리닝될 수 있다(예를 들어, 문헌[Cunningham and Wells (1989) Science, 244:1081-1085] 참조). 간단히 말하면, 표적 잔기(예를 들어, Arg, Asp, His, Lys 및 Glu과 같은 하전된 잔기)를 식별하고 중성 또는 음으로 하전된 아미노산(예를 들어, 알라닌 또는 폴리알라닌)으로 대체할 수 있고, 변형된 항체를 생성하고 관심 있는 성질에 대해 스크리닝한다. 특정 아미노산 위치에서의 치환이 관심 있는 기능적 변화를 나타내는 경우, 그 위치는 변형시키거나 치환시킬 잠재적 잔기로서 식별될 수 있다. 상이한 유형의 잔기(예를 들어, 시스테인 잔기, 양으로 하전된 잔기 등)로 치환시킴으로써 잠재적 잔기를 더 평가할 수 있다.
- [0323] **a) 친화성 변이체**
- [0324] 친화성 변이체는 모 항체의 CLDN18.2에 대한 특이적 결합 친화성을 유지하거나, 심지어 모 항체에 비해 개선된 CLDN18.2 특이적 결합 친화성을 가진다. 이 목적을 달성하기 위해 당분야에 공지되어 있는 다양한 방법을 이용할 수 있다. 예를 들어, 항체 변이체(예컨대, Fab 또는 scFv 변이체)의 라이브러리를 생성하고 파지 디스플레이 기술로 발현시킨 후, 인간 CLDN18.2에 대한 결합 친화성에 대해 스크리닝할 수 있다. 또 다른 예를 들어, 컴퓨터 소프트웨어를 사용하여 항체와 인간 CLDN18.2의 결합을 가상으로 시뮬레이션하고 결합 계면을 형성하는 항체의 아미노산 잔기를 식별할 수 있다. 이러한 잔기는 결합 친화성의 감소를 방지하기 위해 치환에서 회피될 수 있거나, 더 강한 결합을 제공하기 위해 치환의 표적이 될 수 있다.
- [0325] 특정 실시양태에서, CDR 서열, FR 서열 또는 가변 영역 서열의 치환(들) 중 적어도 하나(또는 전부)는 보존적 치환을 포함한다. 아미노산 서열과 관련하여 "보존적 치환"은 아미노산 잔기를, 유사한 물리화학적 성질을 가진 측쇄를 가진 상이한 아미노산 잔기로 대체하는 것을 의미한다. 예를 들어, 소수성 측쇄를 가진 아미노산 잔기들(예를 들어, Met, Ala, Val, Leu 및 Ile) 사이, 중성 친수성 측쇄를 가진 잔기들(예를 들어, Cys, Ser, Thr, Asn 및 Gln) 사이, 산성 측쇄를 가진 잔기들(예를 들어, Asp, Glu) 사이, 염기성 측쇄를 가진 아미노산들(예를 들어, His, Lys 및 Arg) 사이, 또는 방향족 측쇄를 가진 잔기들(예를 들어, Trp, Tyr 및 Phe) 사이에 보존적 치환이 이루어질 수 있다. 당분야에 공지되어 있는 바와 같이, 보존적 치환은 통상적으로 단백질 입체구조적 구조의 상당한 변화를 야기하지 않으므로, 단백질의 생물학적 활성을 유지할 수 있다.
- [0326] 특정 실시양태에서, 본원에서 제공된 항체 또는 항원 결합 단편은 하나 이상의 CDR 서열 및/또는 하나 이상의 FR 서열에서 하나 이상의 아미노산 잔기 치환을 포함한다. 특정 실시양태에서, 친화성 변이체는 CDR 서열 및/또는 FR 서열 중 하나 이상에서 총 10개, 9개, 8개, 7개, 6개, 5개, 4개, 3개, 2개 또는 1개 이하의 치환을 포함한다.
- [0327] 특정 실시양태에서, 항-CLDN18.2 항체 및 이의 항원 결합 단편은 표 1에 나열된 서열(또는 서열들)에 대한 적어도 80%(예를 들어, 적어도 85%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%) 서열 동일성을 가진 1개, 2개 또는 3개의 CDR 서열을 포함하고, 한편으로 그의 모 항체와 유사한 수준 또는 심지어 그의 모 항체보다 더 높은 수준으로 CLDN18.2에 대한 결합 친화성을 유지한다.

- [0328] 특정 실시양태에서, 항-CLDN18.2 항체 및 이의 항원 결합 단편은 서열번호 23 내지 29 및 37 내지 48의 서열(또는 서열들)에 대한 적어도 80%(예를 들어, 적어도 85%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%) 서열 동일성을 가진 하나 이상의 가변 영역 서열을 포함하고, 한편으로 그의 모 항체와 유사한 수준 또는 심지어 그의 모 항체보다 더 높은 수준으로 CLDN18.2에 대한 결합 친화성을 유지한다. 일부 실시양태에서, 총 1개 내지 10개의 아미노산이 서열번호 25 내지 29 및 37 내지 48로부터 선택된 서열에서 치환되거나, 삽입되거나 결실된다. 일부 실시양태에서, 치환, 삽입 또는 결실은 CDR 외부의 영역(즉, FR)에서 일어난다.
- [0329] **b) 글리코실화 변이체**
- [0330] 본원에서 제공된 항-CLDN18.2 항체 접합체의 항-CLDN18.2 항체 및 항원 결합 단편은 항체 또는 항원 결합 단편의 글리코실화 정도를 증가시키거나 감소시키기 위해 수득될 수 있는 글리코실화 변이체도 포함한다. 본원에서 사용된 용어 "글리코실화"는 푸코스, 자일로스, 만노스 또는 GlcNAc 포스포세린 글리칸과 같은 글리칸을 단백질, 지질 또는 다른 유기 분자에 부착시키는 효소 과정을 의미한다. 글리칸에 연결된 탄소에 따라, 글리코실화는 N-연결 글리코실화, O-연결 글리코실화, 인-글리코실화, C-연결 글리코실화 및 글리피화를 포함하는 5가지 클래스로 나눌 수 있다.
- [0331] 항체의 글리코실화는 전형적으로 N-연결되거나 O-연결된다. N-연결은 탄수화물 모이어티를 아스파라긴 잔기, 예를 들어, 트리펩티드 서열, 예컨대, 아스파라긴-X-세린 및 아스파라긴-X-트레오닌(이때 X는 프롤린을 제외한 임의의 아미노산임)의 아스파라긴 잔기의 측쇄에 부착시키는 것을 의미한다. O-연결 글리코실화는 당 N-아세틸갈락토사민, 갈락토스 또는 자일로스 중 하나를 하이드록시아미노산, 가장 일반적으로 세린 또는 트레오닌에 부착시키는 것을 의미한다.
- [0332] 특정 실시양태에서, 본원에서 제공된 항-CLDN18.2 항체 및 항원 결합 단편은 개선된 이펙터 기능, 예컨대, ADCC 또는 CDC를 가진 글리코실화 변이체를 포함한다.
- [0333] 특정 실시양태에서, 본원에서 제공된 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 어푸코실화된다(afucosylated). 용어 "어푸코실화" 또는 "어푸코실화된"은 항체에 부착된 N-글리칸에서 코어-푸코스가 감소되거나 제거되는 것을 의미한다. 인간 IgG 항체의 대부분의 글리칸은 0개, 1개 또는 2개의 말단 갈락토스를 보유하는 핵심 푸코스 잔기를 가진 복잡한 이중안테나(biantennary) 분자인 G0, G1 및 G2로서 알려져 있다.
- [0334] 어푸코실화된 항체 변이체는 당분야에 공지되어 있는, 예를 들어, 미국 특허 출원 공개 제2003/0157108호; 국제 특허 출원 공개 제WO 2000/61739호; 국제 특허 출원 공개 제WO 2001/29246호; 미국 특허 출원 공개 제2003/0115614호; 미국 특허 출원 공개 제2002/0164328호; 미국 특허 출원 공개 제2004/0093621호; 미국 특허 출원 공개 제2004/0132140호; 미국 특허 출원 공개 제2004/0110704호; 미국 특허 출원 공개 제2004/0110282호; 미국 특허 출원 공개 제2004/0109865호; 국제 특허 출원 공개 제WO 2003/085119호; 국제 특허 출원 공개 제WO 2003/084570호; 국제 특허 출원 공개 제WO 2005/035586호; 국제 특허 출원 공개 제WO 2005/035778호; 국제 특허 출원 공개 제WO 2005/053742호; 국제 특허 출원 공개 제WO 2002/031140호; 문헌[Okazaki et al. J. Mol. Biol. 336:1239-1249 (2004)]; 문헌[Yamane-Ohnuki et al. Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004)]에 기재되어 있는 방법을 이용함으로써 만들어질 수 있다.
- [0335] 특정 실시양태에서, 항체 글리코실화 변이체는 항체의 Fc 내의 CH2 영역의 Asn297 부위에서 어푸코실화된다. Asn297은 Fc 영역의 약 위치 297(Fc 영역 잔기의 EU 넘버링)에 위치한 아스파라긴 잔기를 지칭하나; Asn297은 항체의 경미한 서열 변이로 인해 위치 297의 약 ±3개 아미노산 업스트림 또는 다운스트림, 즉 위치 294와 300 사이에 위치할 수도 있다.
- [0336] 특정 실시양태에서, 항체 글리코실화 변이체는 예를 들어, N-연결 글리코실화 부위를 위한 트리펩티드 서열 또는 O-연결 글리코실화 부위를 위한 세린 또는 트레오닌 잔기가 항체 또는 Fc 서열에 더 이상 존재하지 않도록(예를 들어, N297A 치환으로) 천연 글리코실화 부위를 제거함으로써 수득될 수 있다. 대안적으로, 특정 실시양태에서, 항체 글리코실화 변이체는 선택된 당 기(들)를 항체의 성숙 코어 탄수화물 구조에 추가하는 데 있어서 결함을 가진 숙주 세포주에서 항체를 생성함으로써 수득될 수 있다.
- [0337] **c) 시스테인 조작된 변이체**
- [0338] 본원에서 제공된 항-CLDN18.2 항체 접합체의 항-CLDN18.2 항체 및 항원 결합 단편은 하나 이상의 도입된 유리 시스테인 아미노산 잔기를 포함하는 시스테인 조작된 변이체도 포함한다.
- [0339] 유리 시스테인 잔기는 디설파이드 가교의 일부가 아닌 잔기이다. 시스테인 조작된 변이체는 예를 들어, 말레이

미드 또는 할로아세틸을 통해 조작된 시스템 부위에서 예를 들어, 특히 세포독성 및/또는 영상화 화합물, 표지 또는 방사성동위원소와 접합시키는 데 유용하다. 유리 시스템 잔기를 도입하기 위해 항체 또는 항원 결합 단편을 조작하는 방법은 당분야에 공지되어 있다(예를 들어, 국제 특허 출원 공개 제WO 2006/034488호 참조).

[0340] **d) Fc 변이체**

[0341] 본원에서 제공된 항-CLDN18.2 항체 접합체의 항-CLDN18.2 항체 및 항원 결합 단편은 Fc 영역 및/또는 힌지 영역에서 하나 이상의 아미노산 잔기 변형 또는 치환을 포함하는 Fc 변이체도 포함한다.

[0342] 특정 실시양태에서, 본원에서 제공된 항-CLDN18.2 항체 접합체는 야생형 불변 영역에 비해 증가된 CDC 또는 ADCC를 부여하는 하나 이상의 아미노산 잔기 치환 또는 변형을 포함하는 불변 영역을 포함한다. Fc 영역의 CH2 도메인에서 특정 아미노산 잔기는 예를 들어, Fc γ R111A에 대한 Fc 도메인의 친화성을 향상시킴으로써 향상된 ADCC 활성을 제공하도록 치환될 수 있다. 항체 조작으로 ADCC 활성을 변경시키는 방법은 당분야에 설명되어 있다(예를 들어, 문헌[Shields RL. et al., J Biol Chem. 2001. 276(9): 6591-604; Idusogie EE. et al., J Immunol. 2000. 164(8):4178-84; Steurer W. et al., J Immunol. 1995, 155(3): 1165-74; Idusogie EE. et al., J Immunol. 2001, 166(4): 2571-5; Lazar GA. et al., PNAS, 2006, 103(11): 4005-4010; Ryan MC. et al., Mol. Cancer Ther., 2007, 6: 3009-3018; Richards JO, et al., Mol Cancer Ther. 2008, 7(8): 2517-27; Shields R. L. et al, J. Biol. Chem, 2002, 277: 26733-26740; Shinkawa T. et al, J. Biol. Chem, 2003, 278: 3466-3473] 참조).

[0343] 특정 실시양태에서, 본원에서 제공된 항-CLDN18.2 항체 접합체는 예를 들어, C1q 결합 및/또는 보체 의존적 세포독성(CDC)을 개선하거나 감소시킴으로써 보체 의존적 세포독성(CDC)을 변경시키는 하나 이상의 아미노산 치환(들)을 포함한다(예를 들어, Fc 영역 변이체의 다른 예에 관해서는 국제 특허 출원 공개 제WO 99/51642호; 문헌[Duncan & Winter Nature 322:738-40 (1988)]; 미국 특허 제5,648,260호; 미국 특허 제5,624,821호; 및 국제 특허 출원 공개 제WO 94/29351호 참조).

[0344] 특정 실시양태에서, 본원에서 제공된 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 불변 영역은 서열번호 49(즉, 야생형 서열)에 비해 L235V, F243L, R292P, Y300L, P396L 또는 이들의 임의의 조합으로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 아미노산 잔기 치환을 포함한다. 특정 실시양태에서, 불변 영역은 서열번호 51의 서열을 포함한다.

[0345] 특정 실시양태에서, 본원에서 제공된 항-CLDN18.2 항체 접합체는 신생아 Fc 수용체(FcRn)와의 pH 의존적 결합을 개선하는 하나 이상의 아미노산 치환(들)을 포함한다. 이러한 변이체는 라이소좀 내의 분해로부터 탈출한 후 전위되어 세포 외부로 방출되게 하는 산성 pH에서 FcRn에 결합하기 때문에 연장된 약동학적 반감기를 가질 수 있다. FcRn과의 결합 친화성을 개선하기 위해 항체 및 이의 항원 결합 단편을 조작하는 방법은 당분야에 잘 공지되어 있다(예를 들어, 문헌[Vaughn, D. et al, Structure, 6(1): 63-73, 1998; Kontermann, R. et al, Antibody Engineering, Volume 1, Chapter 27: Engineering of the Fc region for improved PK, published by Springer, 2010; Yeung, Y. et al, Cancer Research, 70: 3269-3277 (2010); and Hinton, P. et al, J. Immunology, 176:346-356 (2006)] 참조).

[0346] **iii. 항원 결합 단편**

[0347] 본원에서 제공된 항-CLDN18.2 항체 접합체는 또한 항-CLDN18.2 항원 결합 단편을 포함할 수 있다. 다양한 유형의 항원 결합 단편이 당분야에 공지되어 있고, 예를 들어, 표 1에 제시된 CDR 서열을 가진 예시적인 항체 및 이들의 다양한 변이체들(예컨대, 친화성 변이체, 글리코실화 변이체, Fc 변이체, 시스템 조작된 변이체 등)을 포함하는, 본원에서 제공된 항-CLDN18.2 항체를 기반으로 개발될 수 있다.

[0348] 특정 실시양태에서, 본원에서 제공된 항-CLDN18.2 항원 결합 단편은 디아바디, Fab, Fab', F(ab')₂, Fd, Fv 단편, 디설파이드 안정화 Fv 단편(dsFv), (dsFv)₂, 이중특이적 dsFv(dsFv-dsFv'), 디설파이드 안정화 디아바디(ds 디아바디), 단일 쇠 항체 분자(scFv), scFv 이량체(2가 디아바디), 다중특이적 항체, 낙타화 단일 도메인 항체, 나노바디, 도메인 항체 또는 2가 도메인 항체이다.

[0349] 다양한 기법이 이러한 항원 결합 단편의 생성에 이용될 수 있다. 예시적인 방법은 온전한 항체의 효소 분해(예를 들어, 문헌[Morimoto et al., Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117 (1992)]; 및 문헌[Brennan et al., Science, 229:81 (1985)] 참조), 대장균과 같은 숙주 세포에 의한 재조합 발현(예를 들어, Fab, Fv 및 ScFv 항체 단편의 경우), 상기 논의된 파지 디스플레이 라이브러리로부터의 스크리닝(예를 들어, ScFv의 경우), 및 F(ab')₂ 단편을 형성하기 위한 2개의 Fab'-SH 단편의 화학적 커플링(Carter et al.,

Bio/Technology 10:163-167 (1992))을 포함한다. 다른 항체 단편 제조 기법은 숙련된 당업자에게 자명할 것이다.

[0350] 특정 실시양태에서, 항원 결합 단편은 scFv이다. scFv의 생성은 예를 들어, 국제 특허 출원 공개 제WO 93/16185호; 미국 특허 제5,571,894호; 및 미국 특허 제5,587,458호에 기재되어 있다. scFv는 아미노 또는 카르복실 말단에서 이펙터 단백질에 융합되어 융합 단백질을 제공할 수 있다(예를 들어, 문헌[Antibody Engineering, ed. Borrebaeck] 참조).

[0351] 특정 실시양태에서, 본원에서 제공된 항-CLDN18.2 항체 접합체의 항-CLDN18.2 항체 및 이의 항원 결합 단편은 2가, 4가, 6가 또는 다가이다. 본원에서 사용된 용어 "가"는 특정된 수의 항원 결합 부위가 주어진 분자에 존재함을 의미한다. 따라서, 용어 "2가", "4가" 및 "6가"는 각각 2개의 결합 부위, 4개의 결합 부위 및 6개의 결합 부위가 항원 결합 분자에 존재함을 의미한다. 예를 들어, 3가, 4가, 6가 등을 포함하는, 2가보다 더 큰 결합가를 가진 임의의 분자는 다가 분자로서 간주된다.

[0352] 2개의 결합 부위가 둘 다 동일한 항원 또는 동일한 에피토프와의 결합에 특이적인 경우 2가 분자는 단일특이적일 수 있다. 특정 실시양태에서, 이것은 1가 대응물보다 항원 또는 에피토프와의 더 강한 결합을 제공한다. 유사하게, 다가 분자는 단일특이적일 수도 있다. 특정 실시양태에서, 2가 또는 다가 항원 결합 모이어티에서, 제1가의 결합 부위와 제2가의 결합 부위는 구조적으로 동일하거나(즉, 동일한 서열을 가짐) 구조적으로 상이하다(즉, 동일한 특이성을 가짐에도 불구하고 상이한 서열을 가짐).

[0353] 2개의 결합 부위가 상이한 항원 또는 에피토프에 특이적인 경우, 2가는 이중특이적일 수도 있다. 이것은 다가 분자에도 적용된다. 예를 들어, 2개의 결합 부위가 제1 항원(또는 에피토프)에 단일특이적이고 제3 결합 부위가 제2 항원(또는 에피토프)에 특이적인 경우, 3가 분자는 이중특이적일 수 있다.

[0354] 이중특이적 항체

[0355] 특정 실시양태에서, 본원에서 제공된 항-CLDN18.2 항체 접합체는 이중특이적이다. 본원에서 사용된 용어 "이중특이적"은 2종 이상의 특이성을 가진 분자 및 2종 이상의 특이성을 가진 분자, 즉 다중특이적 분자를 포괄한다. 특정 실시양태에서, 본원에서 제공된 이중특이적 항체 및 이의 항원 결합 단편은 CLDN18.2의 제1 에피토프 및 제2 에피토프에 특이적으로 결합할 수 있거나, CLDN18.2 및 제2 항원에 특이적으로 결합할 수 있다. 특정 실시양태에서, CLDN18.2의 제1 에피토프와 제2 에피토프는 서로 구별되거나 중첩되지 않는다. 특정 실시양태에서, 이중특이적 항체 및 이의 항원 결합 단편은 제1 에피토프와 제2 에피토프 둘 다에 동시에 결합할 수 있다. 특정 실시양태에서, 제2 항원은 CLDN18.2와 상이하다.

[0356] 특정 실시양태에서, 제2 항원은 종양 항원을 포함한다. 본원에서 사용된 바와 같이, "종양 항원"은 종양 특이적 항원(예를 들어, 종양 세포에 고유하고 일반적으로 비-종양 세포에서는 발견되지 않는 항원), 종양 관련 항원(예를 들어, 종양 세포와 비-종양 세포 둘 다에서 발견되지만 종양 세포에서는 상이하게 발현되는 항원), 및 종양 신생항원(예를 들어, 단백질 서열을 변경시키거나 관련되지 않은 두 서열들 사이에 융합 단백질을 생성하는 체세포 돌연변이 때문에 암 세포에서 발현되는 항원)을 지칭한다.

[0357] 제조 방법

[0358] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 본원에서 제공된 항-CLDN18.2 항체 접합체를 제조하는 방법으로서, 효소적 또는 화학적 산화제의 존재 하에서 항-CLDN18.2 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 ¹²⁴I, ¹²³I 또는 ¹³¹I로 표지부착된 요오다이드 화합물과 반응시키는 단계를 포함하는 방법을 제공한다.

[0359] 일부 실시양태에서, 화학적 산화제는 N-브로모석신이미드, 요오도겐 또는 클로라민-T이다.

[0360] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 본원에서 제공된 항-CLDN18.2 항체 접합체를 제조하는 방법으로서, 항-CLDN18.2 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 킬레이터와 접합시켜 킬레이터-항체 접합체를 수득하는 단계, 및 상기 킬레이터-항체 접합체를 금속성 방사성핵종, 예를 들어, ⁶⁴Cu 또는 ⁸⁹Zr과 반응시키는 단계를 포함하는 방법을 제공한다.

[0361] 일부 실시양태에서, 킬레이터는 DFO(테르페록사민), DOTA(1,4,7,10-테트라아자사이클로도데칸-1,4,7,10-테트라아세트산), DTPA(NR-디에틸렌트리아민펜타아세트산), NOTA(1,4,7-트리아자사이클로노난-1,4,7-아세트산), TRITA(1,4,7,10-테트라아자사이클로트리데칸-N,N',N'',N'''-테트라아세트산); TETA(1,4,8,11-테트라아자사이클로테트라데칸-N,N',N'',N'''-테트라아세트산); 및 HETA(1,5,9,13-테트라아자사이클로헥사데칸-N,N',N'',N'''-테트라아

세트산), EDTA(에틸렌디아민테트라아세트산), NETA({4-[2-(비스-카르복시메틸아미노)-에틸]-7-카르복시메틸-[1,4,7]트리아자노-1-일}-아세트산), TACN-TM(N,N',N'', 트리스(2-머캅토에틸)1,4,7-트리아자사이클로노난), TRAP(1,4,7-트리아자사이클로노난-1,4,7-트리스[메틸(2-카르복시에틸)포스핀산]), CP256, PCTA(3,6,9,15-테트라아자비사이클로[9.3.1]펜타데카-1(15),11,13-트리엔-3,6,9-트리아세트산), 포르피린, 폴리아민, 크라운 에테르, 비스-티오세미카르바존, 폴리옥심 및 이들의 유도체를 포함한다.

[0362] **약학 조성물**

[0363] 본 개시내용은 항-CLDN18.2 항체 접합체 및 하나 이상의 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약학 조성물을 추가로 제공한다. 특정 실시양태에서, 본원에서 제공된 약학 조성물은 비경구 투여에 적합하며, 예를 들어, 볼루스, 정맥내 또는 종양내 주사에 적합하다. 특정 실시양태에서, 약학 조성물은 유닛 용량 주사용 제형으로 존재한다.

[0364] 본원에 개시된 약학 조성물에 사용하기 위한 약학적으로 허용되는 담체는 예를 들어, 약학적으로 허용되는 액체, 젤 또는 고체 담체, 수성 비히클, 비수성 비히클, 항균제, 등장제, 완충제, 항산화제, 마취제, 현탁제/분배제, 격리제 또는 킬레이팅제, 희석제, 보조제, 부형제 또는 무독성 보조 물질, 당분야에 공지되어 있는 다른 성분, 또는 이들의 다양한 조합을 포함할 수 있다.

[0365] 적합한 성분은 예를 들어, 항산화제, 충전제, 결합제, 붕해제, 완충제, 방부제, 윤활제, 향미제, 증점제, 착색제, 유화제 또는 안정화제, 예컨대, 당 및 사이클로덱스트린을 포함할 수 있다. 적합한 항산화제는 예를 들어, 메티오닌, 아스코르브산, EDTA, 티오황산나트륨, 백금, 카탈라제, 구연산, 시스테인, 티오글리세롤, 티오글리콜산, 티오소르비톨, 부틸화 하이드록시아니솔, 부틸화 하이드록시톨루엔 및/또는 프로필 갈레이트를 포함할 수 있다. 본원에 개시된 바와 같이, 본원에서 제공된 항체 또는 항원 결합 단편 및 접합체를 포함하는 조성물에 하나 이상의 항산화제, 예컨대, 메티오닌을 포함시키면, 항체 또는 항원 결합 단편의 산화가 감소된다. 이러한 산화 감소는 결합 친화성의 손실을 방지하거나 감소시킴으로써, 항체 안정성을 개선하고 저장 수명을 최대화한다. 따라서, 특정 실시양태에서, 본원에 개시된 하나 이상의 항체 접합체 및 하나 이상의 항산화제, 예컨대, 메티오닌을 포함하는 조성물을 제공한다.

[0366] 추가 예시를 위해, 약학적으로 허용되는 담체는 예를 들어, 수성 비히클, 예컨대, 염화나트륨 주사제, 링거 주사제, 등장성 텍스트로스 주사제, 멸균수 주사제, 또는 텍스트로스 및 젯산첨가된 링거 주사제, 비수성 비히클, 예컨대, 식물 유래의 고정유, 면실유, 옥수수유, 참깨유 또는 땅콩유, 정균 또는 정진균 농도의 항균제, 등장제, 예컨대, 염화나트륨 또는 텍스트로스, 완충제, 예컨대, 인산염 또는 구연산염 완충제, 항산화제, 예컨대, 중황산나트륨, 국소 마취제, 예컨대, 프로카인 염산염, 현탁제와 분산제, 예컨대, 나트륨 카르복시메틸셀룰로스, 하이드록시프로필 메틸셀룰로스 또는 폴리비닐피롤리돈, 유화제, 예컨대, 폴리소르베이트 80(TWEEN-80), 격리제 또는 킬레이팅제, 예컨대, EDTA(에틸렌디아민테트라아세트산) 또는 EGTA(에틸렌 글리콜 테트라아세트산), 에틸 알코올, 폴리에틸렌 글리콜, 프로필렌 글리콜, 수산화나트륨, 염산, 구연산 또는 젯산을 포함할 수 있다. 페놀 또는 크레졸, 수은, 벤질 알코올, 클로로부탄올, 메틸 및 프로필 p-하이드록시벤조산 에스테르, 티메로살, 염화벤즈알코올 및 염화벤즈에토늄을 포함하는, 담체로서 사용되는 항균제는 다회 용량 용기 내의 약학 조성물에 첨가될 수 있다. 적합한 부형제는 예를 들어, 물, 식염수, 텍스트로스, 글리세롤 또는 에탄올을 포함할 수 있다. 적합한 무독성 보조 물질은 예를 들어, 습윤제 또는 유화제, pH 완충제, 안정화제, 용해도 향상제, 또는 아세트산나트륨, 소르비탄 모노라우레이트, 트리에탄올아민 올레이트 또는 사이클로덱스트린과 같은 작용제를 포함할 수 있다.

[0367] 특정 실시양태에서, 약학 조성물은 주사용 조성물로 제제화된다. 주사용 약학 조성물은 임의의 통상적인 형태, 예를 들어, 액체 용액, 현탁액, 유화액, 또는 액체 용액, 현탁액 또는 유화액을 생성하기에 적합한 고체 형태로 제조될 수 있다. 주사용 제제는 주사용으로 준비가 된 멸균 및/또는 비-발열성 용액, 사용 직전에 용매와 조합될 준비가 된, 피하 정제를 포함하는 멸균 건조 가용성 생성물, 예컨대, 동결건조된 분말, 주사용으로 준비가 된 멸균 현탁액, 사용 직전에 비히클과 조합될 준비가 된 멸균 건조 불용성 생성물, 및 멸균 및/또는 비-발열성 유화액을 포함할 수 있다. 용액은 수성 또는 비수성 용액일 수 있다.

[0368] 특정 실시양태에서, 유닛 용량 비경구 제제는 바늘과 함께 앰플, 바이알 또는 주사기에 포장된다. 비경구 투여를 위한 모든 제제는 당분야에 공지되어 있고 당분야에서 실시되는 바와 같이 멸균되어야 하며 발열성을 갖지 않아야 한다.

[0369] 특정 실시양태에서, 본원에 개시된 항체 또는 항원 결합 단편을 적합한 용매에 용해시킴으로써 멸균 동결건조된

분말을 제조한다. 용매는 분말, 또는 분말로부터 제조된 재구성된 용액의 안정성 또는 다른 약리학적 성분을 개선하는 부형제를 함유할 수 있다. 사용될 수 있는 부형제는 물, 텍스트로스, 소르비탈, 프럭토스, 옥수수 시럽, 자일리톨, 글리세린, 글루코스, 수크로스 또는 다른 적합한 작용제를 포함하나 이들로 제한되지 않는다. 한 실시양태에서, 용매는 약 중성 pH에서 완충제, 예컨대, 구연산염, 인산나트륨 또는 인산칼륨, 또는 당업자에게 공지되어 있는 다른 이러한 완충제를 함유할 수 있다. 용액의 후속 멸균 여과를 수행한 후, 당업자에게 공지되어 있는 표준 조건 하에서 동결건조를 수행하는 것은 바람직한 제제를 제공한다. 한 실시양태에서, 생성된 용액은 동결건조용 바이알에 분배될 것이다. 각각의 바이알은 일회 용량 또는 다회 용량의 항-CLDN18.2 항체 접합체 또는 이의 조성물을 함유할 수 있다. 정확한 샘플 회수 및 정확한 투약을 용이하게 하기 위해 용량 또는 용량 세트에 필요한 양을 (예를 들어, 약 10%) 초과하는 소량으로 바이알을 과충전하는 것이 허용된다. 동결건조된 분말은 적절한 조건 하에서, 예컨대, 약 4℃ 내지 실온에서 보관될 수 있다.

[0370] 주사용수를 사용한 동결건조된 분말의 재구성은 비경구 투여에 사용될 제제를 제공한다. 한 실시양태에서, 재구성을 위해 멸균 및/또는 비-발열성 물 또는 다른 적합한 액체 담체를 동결건조된 분말에 첨가한다. 정확한 양은 제공되는 선택된 요법에 의해 좌우되고 실험적으로 결정될 수 있다.

[0371] CLDN18.2 관련 병태를 치료하고 진단하는 방법

[0372] 본원에서 제공된 항-CLDN18.2 항체 접합체는 CLDN18.2 관련 병태를 진단하거나 치료하는 방법에 유용할 수 있다. 특정 실시양태에서, CLDN18.2 관련 병태는 암이다. 특정 실시양태에서, CLDN18.2 관련 병태는 CLDN18.2 발현 암이다.

[0373] 특정 실시양태에서, 암은 위암, 폐암, 기관지암, 췌장암, 간 및 담관암, 췌장암, 유방암, 간암, 난소암, 고환암, 신장암, 방광암, 두경부암, 척추암, 뇌암, 자궁경부암, 자궁암, 자궁내막암, 결장암, 대장암, 직장암, 항문암, 식도암, 위장암, 피부암, 전립선암, 뇌하수체암, 위암, 질암, 갑상선암, 교모세포종, 성상세포종, 흑색종, 골수 이형성 증후군, 육종, 기형종 및 선암종으로부터 선택된다.

[0374] 암의 예는 비소세포 폐암(편평/비편평), 소세포 폐암, 신장세포암, 대장암, 결장암, 난소암, 유방암(기저 유방암종, 관암종 및 소엽 유방 암종을 포함함), 췌장암, 위 암종, 방광암, 식도암, 중피종, 흑색종, 두경부암, 갑상선암, 육종, 전립선암, 교모세포종, 자궁경부암, 흉선 암종, 흑색종, 골수종, 진균증 식육종, 메르켈 세포암, 간세포 암종(HCC), 섬유육종, 점액육종, 지방육종, 연골육종, 골원성 육종 및 기타 육종, 윤활막종, 중피종, 유잉 종양, 평활근육종, 횡문근육종, 림프성 악성종양, 기저 세포 암종, 선암종, 땀샘 암종, 수질 갑상선 암종, 유두상 갑상선 암종, 크롬친화세포종 피지선 암종, 유두상 암종, 유두상 선암종, 수질 암종, 기관지원성 암종, 간종, 담관 암종, 용모막암종, 윌름스 종양, 자궁경부암, 고환 종양, 정상피종, 고전적 호지킨 림프종(CHL), 원발성 종격동 거대 B 세포 림프종, T 세포/조직구 풍부 B 세포 림프종, 급성 림프구성 백혈병, 급성 골수구성 백혈병, 급성 골수성 백혈병, 만성 골수구성(과립구성) 백혈병, 만성 골수성 백혈병, 만성 림프구성 백혈병, 진성 적혈구증가증, 비만세포 유래 종양, EBV 양성 및 음성 PTL, 및 미만성 거대 B 세포 림프종(DLBCL), 형질모세포성 림프종, 림프절외 NK/T 세포 림프종, 비인두 암종, HHV8 관련 원발성 삼출 림프종, 비-호지킨 림프종, 다발성 골수종, 발덴스트롬 마크로글로블린혈증, 중쇄 질환, 골수이형성 증후군, 털세포 백혈병 및 골수이형성증, 원발성 CNS 림프종, 척수축 종양, 뇌간 신경교종, 성상세포종, 수모세포종, 두개인두종, 뇌실막종, 송과체종, 혈관모세포종, 청신경종, 희소돌기교종, 수막종, 흑색종, 신경모세포종 및 망막모세포종을 포함하나 이들로 제한되지 않는다.

[0375] 본원에서 사용된 "CLDN18.2 발현 암"은 CLDN18.2를 발현하는 암 세포를 포함하는 임의의 암 또는 종양을 지칭한다. CLDN18.2 발현 암의 예는 위암, 식도암, 췌장암, 폐암, 예컨대, 비소세포 폐암(NSCLC) 및 소세포 폐암(SCLC), 난소암, 결장암, 대장암, 위장 간질 종양(GIST), 위장 카르시노이드 종양, 직장암, 항문암, 담관암, 소장암, 충수암, 전립선암, 신장암(예를 들어, 신장 세포 암종), 간암, 두경부암 및 담낭암, 및 이들의 전이, 예를 들어, 위암 전이, 예컨대, 크루켄베르그(Krukenberg) 종양, 복막 전이 및 림프절 전이를 포함한다.

[0376] 특정 실시양태에서, CLDN18.2 발현 암은 선암종, 예를 들어, 진행성 선암종일 수 있다. 특정 실시양태에서, 암은 위, 식도, 췌장관, 담관, 폐 및 난소의 선암종으로부터 선택된다. 특정 실시양태에서, CLDN18.2 발현 암은 위암, 식도암, 특히 하부 식도암, 식도-위 연결부의 암 및 위식도암을 포함한다.

[0377] CLDN18.2 관련 병태를 검출하고, 시각화하고, 진단하고, 병기분류하고 모니터링하는 방법

[0378] 본원에서 제공된 항체 접합체는 CLDN18.2 발현을 검출하는 데, 특히 비침습적 방식으로 생체내에서 검출하는 데 유용하다.

- [0379] 본원에서 제공된 항체 접합체는 CLDN18.2 관련 병태를 시각화하고, 진단하고, 병기분류하고 모니터링하는 데에도 유용하다. 특정 실시양태에서, CLDN18.2 관련 병태는 암이다. 특정 실시양태에서, CLDN18.2 관련 병태는 CLDN18.2 발현 암이다.
- [0380] 본원에서 제공된 항체 방사성핵종 접합체는 (i) CLDN18.2의 발현, (ii) CLDN18.2의 분포, 및 (iii) CLDN18.2의 발현 또는 분포의 변화에 대한 정보를 제공하기 위해 생체내에서 사용될 수 있다. 현재 이용 가능한 CLDN18.2 진단 방법, 예컨대, 면역조직화학(IHC)에 비해, 본원에서 제공된 항체 방사성핵종 접합체는 비침습적 치료, 정량 가능한 전신 평가 및 여러 시점에서의 반복 투약과 평가에 유리하다.
- [0381] 본원에서 제공된 항-CLDN18.2 항체 접합체는 대상체의 신체의 토포그래피 내에서 표적 세포를 시각화하기 위해 생체내 핵 영상화 방식과 함께 사용될 수 있다. CLDN18.2 발현과 관련된 암을 진단하는 것 외에도, 본원에서 제공된 항-CLDN18.2 항체 방사성핵종 접합체는 본원에서 제공된 방법에 따라 암 진행을 병기분류하고 모니터링하는 데 사용될 수도 있다.
- [0382] 본원에 기재된 방법에 따라 사용될 수 있는 생체내 핵 영상화의 적합한 방법은 양전자 방출 단층촬영(PET), PET/CT 조합 영상화 장치 및 단일 광자 방출 컴퓨터 단층촬영(SPECT)을 포함하나 이들로 제한되지 않는다.
- [0383] 한 측면에서, 본 개시내용은 대상체의 관심 있는 부위의 영상을 획득하는 방법으로서,
- [0384] a) 본원에서 제공된 항체 접합체 및/또는 본원에서 제공된 약학 조성물을 유효량으로 대상체에게 투여하는 단계;
- [0385] b) 대상체의 관심 있는 부위에 대해 양전자 방출 단층촬영(PET) 또는 SPECT를 수행하는 단계;
- [0386] c) 대상체에서 방사성핵종으로부터 검출 가능한 신호를 식별하는 단계; 및
- [0387] d) 검출 가능한 신호의 영상을 생성함으로써, 대상체의 관심 있는 부위의 영상을 획득하는 단계
- [0388] 를 포함하는 방법을 제공한다.
- [0389] 일부 실시양태에서, 관심 있는 부위는 클라우딘 18.2를 발현하거나 발현하는 것으로 의심되는 부위이다.
- [0390] 일부 실시양태에서, 관심 있는 부위는 종양을 갖거나 종양을 갖는 것으로 의심된다. 일부 실시양태에서, 관심 있는 부위는 전신, 몸통, 머리 또는 사지일 수 있다.
- [0391] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 비침습적 방식으로 대상체에서 클라우딘 18.2 발현을 검출하거나 시각화하는 방법으로서,
- [0392] a) 본원에서 제공된 항체 접합체 및/또는 본원에서 제공된 약학 조성물을 유효량으로 대상체에게 투여하는 단계;
- [0393] b) 상기 대상체에 대해 양전자 방출 단층촬영(PET) 또는 SPECT를 수행하는 단계;
- [0394] c) 대상체의 관심 있는 부위에서 방사성핵종으로부터 검출 가능한 신호를 식별하는 단계; 및
- [0395] d) 식별된 검출 가능한 신호를 기반으로 대상체의 관심 있는 부위에서 클라우딘 18.2 발현을 확인하거나 시각화하는 단계
- [0396] 를 포함하는 방법을 제공한다.
- [0397] 일부 실시양태에서, 본원에서 제공된 CLDN18.2 항체 접합체는 대상체에게 정맥내 주사될 수 있다. 대상체는 주사 후 일정 시간이 지난 후 PET에 의해 스캐닝될 수 있다.
- [0398] 특정 실시양태에서, 상기 방법은 대상체에 대해 X-선 컴퓨터 단층촬영(CT)을 수행하여, 검사 중인 신체 부위의 단면의 영상을 획득하는 단계를 추가로 포함한다. 특정 실시양태에서, 신체 기준 프레임의 상부에서 CLDN18.2 발현 및 분포를 보여주기 위해 CT와 PET의 병합된 영상을 획득할 수 있다.
- [0399] 일부 실시양태에서, 상기 방법은 치료 유효량의 항-클라우딘 18.2 요법을, 관심 있는 부위에서 클라우딘 18.2 발현을 가진 것으로 식별된 대상체에게 투여하는 단계를 추가로 포함한다.
- [0400] 항-클라우딘 18.2 요법은 항-CLDN18.2 항체, 항-CLDN18.2 항체-약물 접합체, CLDN18.2를 표적화하는 소분자 화합물, CLDN18.2를 표적화하는 핵산 또는 CLDN18.2를 표적화하는 세포 요법을 포함하나 이들로 제한되지 않는, CLDN18.2를 표적화하는 임의의 치료제일 수 있다.

- [0401] 일부 실시양태에서, 상기 방법은 식별된 검출 가능한 신호를 기반으로 대상체의 관심 있는 부위에서 클라우딘 18.2 발현의 분포를 확인하는 단계를 추가로 포함한다.
- [0402] 일부 실시양태에서, 상기 방법은 대상체의 관심 있는 부위에서 클라우딘 18.2 발현의 불균질성을 확인하는 단계를 추가로 포함한다.
- [0403] 일부 실시양태에서, 관심 있는 부위는 종양이다.
- [0404] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 치료 기간 동안 치료를 받은 대상체에서 비침습적 방식으로 치료 효능, 치료에 대한 반응성, 또는 내성 또는 재발 또는 전이의 발생을 모니터링하는 방법으로서,
- [0405] a) 본원에서 제공된 항체 접합체 및/또는 본원에서 제공된 약학 조성물을 유효량으로 대상체에게 투여하는 단계;
- [0406] b) 상기 대상체에 대해 양전자 방출 단층촬영(PET) 또는 SPECT를 수행하는 단계;
- [0407] c) 상기 대상체의 관심 있는 부위에서 방사성핵종으로부터 검출 가능한 신호를 식별하는 단계;
- [0408] d) 식별된 검출 가능한 신호를 기반으로 상기 대상체의 관심 있는 부위에서 치료 후 클라우딘 18.2 발현을 확인하는 단계;
- [0409] e) 치료 후 클라우딘 18.2 발현 수준 또는 분포를, 각각 치료 기간 전에 대상체로부터 획득된 기준시점 클라우딘 18.2 발현 수준 또는 분포와 비교하여, 상기 대상체에서 클라우딘 18.2 발현 수준 또는 분포의 치료 후 변화를 확인하는 단계; 및
- [0410] f) 단계 (e)에서 확인된 변화를 기반으로 치료 효능, 치료에 대한 반응성, 또는 내성 또는 재발 또는 전이의 발생을 확인하는 단계
- [0411] 를 포함하는 방법을 제공한다.
- [0412] 일부 실시양태에서, 유사한 방법을 이용하여 기준시점 클라우딘 18.2 발현 수준 또는 분포를 확인한다.
- [0413] 일부 실시양태에서, 기준시점 클라우딘 18.2 발현 수준 또는 분포는 본원에서 제공된 항체 접합체 및/또는 본원에서 제공된 약학 조성물을 유효량으로 대상체에게 투여하고, 상기 대상체에 대해 양전자 방출 단층촬영(PET) 또는 SPECT를 수행하고, 대상체의 관심 있는 부위에서 방사성핵종으로부터 검출 가능한 신호를 식별하고, 식별된 검출 가능한 신호를 기반으로 상기 대상체의 관심 있는 부위에서 기준시점 클라우딘 18.2 발현을 확인함으로써, 치료 기간 전(즉, 치료 전)에 확인된다.
- [0414] 일부 실시양태에서, 클라우딘 18.2 발현의 증가된 수준 또는 확산은 감소된 치료 효능, 치료에 대한 감소된 반응성, 또는 내성의 존재 또는 재발의 존재를 표시한다. 일부 실시양태에서, 전이는 클라우딘 18.2 발현이 이전에 검출 가능하지 않았던 부위로의 클라우딘 18.2 발현의 확산에 의해 표시될 수 있다.
- [0415] 일부 실시양태에서, 대상체는 암을 가진다.
- [0416] 일부 실시양태에서, 기준시점 클라우딘 18.2 발현을 확인하기 위한 관심 있는 부위는 치료 후 클라우딘 18.2 발현을 확인하기 위한 관심 있는 부위와 동일하거나 적어도 유사하다. 관심 있는 부위는 관심 있는 부위와 또 다른 관심 있는 부위가 동일한 유형의 조직이거나 동일한 병변 내에 위치할 때 상기 또 다른 관심 있는 부위와 유사하다.
- [0417] 일부 실시양태에서, 기준시점 클라우딘 18.2 발현을 확인하기 위한 관심 있는 부위는 치료 후 클라우딘 18.2 발현을 확인하기 위한 관심 있는 부위와 상이할 수도 있다.
- [0418] **치료 방법**
- [0419] 또 다른 측면에서, CLDN18.2 활성의 조절로부터 이익을 얻을 수 있는 대상체의 질환 또는 병태를 치료하는 방법으로서, 본원에서 제공된 CLDN18.2 항체 접합체 및/또는 약학 조성물을 치료 유효량으로, 이러한 치료를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다.
- [0420] 특정 실시양태에서, 질환 또는 병태는 CLDN18.2 관련 질환 또는 병태이다. 일부 실시양태에서, CLDN18.2 관련 질환 또는 병태는 암이다. 일부 실시양태에서, CLDN18.2 관련 질환 또는 병태는 CLDN18.2 발현 암이다.
- [0421] 특정 실시양태에서, CLDN18.2 항체 접합체는 치료 방사성핵종을 포함한다.

- [0422] 특정 실시양태에서, 치료 방사성핵종은 ^{111}In , $^{111\text{m}}\text{In}$, ^{177}Lu , ^{212}Bi , ^{213}Bi , ^{211}At , ^{62}Cu , ^{64}Cu , ^{67}Cu , ^{90}Y , ^{125}I , ^{131}I , ^{32}P , ^{33}P , ^{47}Sc , ^{111}Ag , ^{67}Ga , ^{142}Pr , ^{153}Sm , ^{161}Tb , ^{166}Dy , ^{166}Ho , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{189}Re , ^{212}Pb , ^{223}Ra , ^{225}Ac , ^{59}Fe , ^{75}Se , ^{77}As , ^{89}Sr , ^{99}Mo , ^{105}Rh , ^{109}Pd , ^{143}Pr , ^{149}Pm , ^{169}Er , ^{194}Ir , ^{198}Au , ^{199}Au , ^{199}Au 및 ^{211}Pb 로 구성된 군으로부터 선택된다.
- [0423] 특정 실시양태에서, 치료 방사성핵종은 ^{131}I , ^{177}Lu , ^{153}Sm , ^{223}Ra , ^{89}Sr , ^{90}Y , ^{213}Bi , ^{212}Pb , ^{166}Ho 로 구성된 군으로부터 선택된다.
- [0424] 본원에서 제공된 CLDN18.2 항체 접합체의 치료 유효량은 당분야에 공지되어 있는 다양한 요인, 예를 들어, 체중, 연령, 과거 병력, 현재 약물, 대상체의 건강 상태 및 교차반응에 대한 가능성, 알레르기, 민감성 및 불리한 부작용뿐만 아니라, 투여 경로 및 질환 발생의 정도에 의해서도 좌우될 것이다. 용량은 이러한 상황 및 다른 상황 또는 요구사항에 의해 표시될 때 당분야에서 통상의 기술을 가진 자(예를 들어, 의사 또는 수의사)에 의해 비례적으로 감소될 수 있거나 증가될 수 있다. 본원에 개시된 CLDN18.2 항체 접합체는 당분야에 공지되어 있는 임의의 경로, 예를 들어, 비경구(예를 들어, 피하, 복강내, 정맥내 주입을 비롯한 정맥내, 근육내 또는 피내 주사)에 의해 투여될 수 있다.
- [0425] 일부 실시양태에서, 상기 방법은 본원에서 제공된 CLDN18.2 항체 접합체를 치료 유효량으로 대상체에게 투여하는 단계를 추가로 포함한다.
- [0426] 특정 실시양태에서, 대상체는 CLDN18.2 발현 암 세포를 가진 것으로서 식별된다. 암 세포에서의 CLDN18.2의 존재 및/또는 발현 수준은 당분야에서 공지되어 있는 다양한 방법, 예컨대, 정량 형광 세포분석, 면역조직화학(IHC), qPCR, 역전사효소 PCR, 마이크로어레이, SAGE, FISH 등에 의해 측정될 수 있다. 본원에서 제공된 방법을 기반으로 대상체에서의 CLDN18.2의 존재 및/또는 발현 수준을 측정할 수도 있다.
- [0427] 특정 실시양태에서, 대상체는 본원에서 제공된 방법을 이용함으로써 CLDN18.2 발현 암을 가진 것으로서 진단된다.
- [0428] 특정 실시양태에서, 대상체는 본원에서 제공된 진단 방사성핵종을 포함하는 본원에서 제공된 항체 접합체를 사용함으로써 CLDN18.2 발현 암을 가진 것으로서 진단된다.
- [0429] 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 CLDN18.2 항체 접합체는 단독으로, 또는 하나 이상의 추가 치료 수단 또는 작용제와 함께 투여될 수 있다. 예를 들어, 본원에 개시된 CLDN18.2 항체 접합체는 제2 치료제, 예를 들어, 화학요법제, 항암 약물, 방사선 요법, 면역요법, 항혈관신생제, 표적화 요법, 세포 요법, 유전자 요법, 호르몬 요법, 완화 치료, 암 치료를 위한 수술(예를 들어, 종양절제술), 또는 화학 요법으로부터 비롯된 합병증에 대한 하나 이상의 진통제 또는 다른 치료제와 함께 투여될 수 있다.
- [0430] 이 실시양태들 중 특정 실시양태에서, 하나 이상의 추가 치료제와 함께 투여되는 본원에 개시된 CLDN18.2 항체 접합체, 및 이 실시양태들 중 특정 실시양태에서 CLDN18.2 항체 접합체 및 추가 치료제(들)는 동일한 약학 조성물의 일부로서 투여될 수 있다. 그러나, 또 다른 치료제와 "함께" 투여되는 CLDN18.2 항체 접합체는 해당 치료제와 동시에 또는 동일한 조성물로 투여될 필요는 없다. CLDN18.2 항체 접합체와 제2 작용제가 상이한 경로를 통해 투여되더라도, 또 다른 작용제 전 또는 후에 투여되는 CLDN18.2 항체 접합체는 상기 용어가 본원에서 사용될 때 해당 작용제와 "함께" 투여되는 것으로 간주된다. 가능한 경우, 본원에 개시된 항체 또는 항원 결합 단편과 함께 투여되는 추가 치료제는 추가 치료제의 제품 정보 시트에 나열된 일정에 따라, 또는 문헌[Physicians' Desk Reference 2003 (Physicians' Desk Reference, 57th Ed; Medical Economics Company; ISBN: 1563634457; 57th edition (November 2002))] 또는 당분야에 잘 공지되어 있는 프로토콜에 따라 투여된다.
- [0431] **키트**
- [0432] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 본원에서 제공된 항-CLDN18.2 항체 접합체 또는 본원에서 제공된 조성물을 포함하는 키트를 제공한다.
- [0433] 일부 실시양태에서, 키트는 대상체에서 CLDN18.2의 존재 또는 양 또는 분포를 검출하는 데 유용할 수 있거나, 본원에서 제공된 진단 방법에 유용할 수 있다.
- [0434] 일부 실시양태에서, 키트는 대상체에서 CLDN18.2 발현 암을 치료하는 데 유용할 수 있거나, 본원에서 제공된 치료 방법에 유용할 수 있다.

- [0435] 일부 실시양태에서, 키트는 본원에 개시된 치료 방사성핵종을 포함하는 본원에서 제공된 제1 항-CLDN18.2 항체 접합체를 포함하는 제1 조성물, 및 본원에 개시된 진단 방사성핵종을 포함하는 본원에서 제공된 제2 항-CLDN18.2 항체 접합체를 포함하는 제2 조성물을 포함한다. 일부 실시양태에서, 치료 방사성핵종은 ^{111}In , $^{111\text{m}}\text{In}$, ^{177}Lu , ^{212}Bi , ^{213}Bi , ^{211}At , ^{62}Cu , ^{64}Cu , ^{67}Cu , ^{90}Y , ^{125}I , ^{131}I , ^{32}P , ^{33}P , ^{47}Sc , ^{111}Ag , ^{67}Ga , ^{142}Pr , ^{153}Sm , ^{161}Tb , ^{166}Dy , ^{166}Ho , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{189}Re , ^{212}Pb , ^{223}Ra , ^{225}Ac , ^{59}Fe , ^{75}Se , ^{77}As , ^{89}Sr , ^{99}Mo , ^{105}Rh , ^{109}Pd , ^{143}Pr , ^{149}Pm , ^{169}Er , ^{194}Ir , ^{198}Au , ^{199}Au , ^{199}Au 및 ^{211}Pb 로 구성된 군로 구성된 군으로부터 선택되고/되거나, 진단 방사성핵종은 ^{18}F , ^{32}P , ^{33}P , ^{45}Ti , ^{47}Sc , ^{52}Fe , ^{59}Fe , ^{62}Cu , ^{64}Cu , ^{67}Cu , ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{75}Sc , ^{77}As , ^{86}Y , ^{90}Y , ^{89}Sr , ^{89}Zr , ^{94}Tc , ^{94}Tc , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{99}Mo , ^{105}Pd , ^{105}Rh , ^{111}Ag , ^{111}In , ^{123}I , ^{124}I , ^{125}I , ^{131}I , ^{142}Pr , ^{143}Pr , ^{149}Pm , ^{153}Sm , ^{154}Sm , $^{158\text{m}}\text{Gd}$, ^{161}Tb , ^{166}Dy , ^{166}Ho , ^{169}Er , ^{175}Lu , ^{177}Lu , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{189}Re , ^{194}Ir , ^{198}Au , ^{199}Au , ^{211}At , ^{211}Pb , ^{212}Bi , ^{212}Pb , ^{213}Bi , ^{223}Ra 및 ^{225}Ac 로 구성된 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 제1 항-CLDN18.2 항체와 제2 항-CLDN18.2 항체는 동일하거나 상이하다. 일부 실시양태에서, 제1 항-CLDN18.2 항체와 제2 항-CLDN18.2 항체는 둘 다 서열번호 1의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열번호 19의 서열을 포함하는 HCDR2 및 서열번호 21의 서열을 포함하는 HCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및 서열번호 14의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열번호 16의 서열을 포함하는 LCDR2 및 서열번호 18의 서열을 포함하는 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0436] 일부 실시양태에서, 키트는 본원에서 제공된 방법에 사용하기 위한 것이다.
- [0437] 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 본원에서 제공된 항체 또는 이의 항원 결합 단편 및 제2 치료제를 포함하는 키트를 제공한다. 이 키트는 CLDN18.2 관련 질환의 치료, 예방 및/또는 완화에 유용할 수 있다.
- [0438] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 본원에서 제공된 방법에 사용하기 위한 의약 또는 진단 제품의 제조에 있어서 본원에서 제공된 항-CLDN18.2 항체 접합체 또는 본원에서 제공된 조성물의 용도를 제공한다.
- [0439] 특정 실시양태에서, 키트는 일부 다른 경로를 통해 키트 구성요소를 전달할 수 있는 장치를 추가로 포함할 수 있다. 예를 들어, 비경구 전달과 같은 적용을 위한 주사기는 조성물을 대상체의 신체에 주입하기 위한 주사기이다. 특정 실시양태에서, 본원에서 제공된 항-CLDN18.2 항체 접합체는 항체의 멸균 액체 제제 또는 동결건조된 제제를 함유하는 사전충진된 주사기 또는 자동주사 펜의 형태로 제공될 수 있다(예를 들어, 문헌[Kivitz et al., Clin. Ther. 2006, 28:1619-29] 참조).
- [0440] 키트 구성요소는 함께 포장될 수 있거나 2개 이상의 용기 내로 분리될 수 있다. 일부 실시양태에서, 용기는 재구성에 적합한 조성물의 멸균 동결건조된 제제를 함유하는 바이알일 수 있다. 키트는 다른 시약의 재구성 및/또는 희석에 적합한 하나 이상의 완충제도 함유할 수 있다. 사용될 수 있는 다른 용기는 파우치, 트레이, 상자, 튜브 등을 포함하나 이들로 제한되지 않는다. 키트 구성요소는 용기 내에 포장되어 멸균 상태로 유지될 수 있다. 포함될 수 있는 또 다른 구성요소는 키트의 사용에 대한 설명서이다.
- [0441] **실시예**
- [0442] 본 개시내용은 특정 실시양태(이들 중 일부는 바람직한 실시양태임)를 참조하면서 구체적으로 제시되고 설명되었지만, 당업자는 본원에 개시된 본 개시내용의 사상 및 범위를 벗어나지 않으면서 형태 및 세부사항을 다양하게 변경시킬 수 있음을 이해해야 한다.
- [0443] **실시예 1 도입**
- [0444] 일련의 연구는 위암의 표적화 요법을 위한 새로운 표적으로서 CLDN18.2가 광범위한 적용 가능성을 가짐을 보여주었다. 정확한 치료를 목표로, 어떻게 잠재적 수혜자를 최대화할 수 있을지와, CLDN18.2 양성 위암 환자의 분자 병리학적 특성을 얼마나 빨리 포괄적으로 평가할 수 있는지가 해결할 시급한 문제이다.
- [0445] 상기 문제를 해결한다는 것은 CLDN18.2의 검출 기술에 대한 더 높은 요구사항을 제시하는 것을 의미한다. 그러나 CLDN18.2의 검출에는 여전히 많은 한계가 있다.
- [0446] (1) 단일 검출 방법. 현재, 시판되는 항체는 조직 파라핀 박편, 냉동된 조직 박편 면역조직화학(IHC) 검출에만 사용된다. CLDN18.2와 CLDN18.1의 아미노산 서열은 높은 상동성(아미노산 서열의 91%가 동일함)을 갖기 때문에, 이 항체는 식별력이 좋지 않고 민감성이 낮아 CLDN18.2 또는 CLDN18.1(클라우딘 18의 또 다른 스플라이스 변이체)을 구별할 수 없다.

- [0447] (2) 검출 방법은 침습적이다. 단일 검출 방법으로 인해 CLDN18.2 검출 샘플은 조직 박편으로만 제한되며, 샘플 수집은 침습적이고 번거로워, 환자에 대한 더 높은 요구사항을 가진다.
- [0448] (3) 검출 표본의 불균질성: 진행성 위암의 불균질성은 중요하다. 본 발명자들은 조직 발현 공간 및 강도의 불균질성이 있을 수 있고, CLDN18.2의 조직 및 액체 생검 표본의 불균질성이 있을 수 있음을 발견하였다. 진행된 병기를 가진 환자의 통상적인 병리학적 분자 진단 표본은 주로 더 적은 조직 함량 및 제한된 샘플링 부위를 가진 내시경 생검 표본이므로, 단일 내시경 조직 표본 검사는 CLDN18.2 발현의 불균질성으로 인해 일부 잠재적 수혜자를 놓칠 수 있다.
- [0449] (4) 정적 검사 결과: 연구는 표적 발현의 강도 및 공간적 분포, 약물 치료 전 및 후 종양 조직의 면역 미세환경 상태의 상당한 차이가 있고, 이것이 후속 치료의 효능에 영향을 미침을 보여주었다. 샘플링 및 검출 방법의 한계로 인해, CLDN18.2는 동적 모니터링이라는 탐색을 뒷받침하기 어렵다. 따라서, 이러한 문제로 인해, 비침습적이고 포괄적인 CLDN18.2 실시간 동적 검출 기술을 탐색하고 통합하여 모든 병변의 포괄적인 평가를 달성하고 치유 효과와 조합된 잠재적 수혜자의 특성을 요약하고 진단 및 치료를 안내하는 것이 가장 좋은 해법이다.
- [0450] 따라서, 현대 분자 영상화 기술의 포괄적이고 비침습적인 실시간 및 동적 특성을 사용함으로써, CLDN18.2의 진단 및 후속 면역 체크포인트 항체 반응의 평가를 위해 높은 특이성을 가진 분자 프로브를 개발하는 것은 매우 중요하다. HER2 양성 위암에 초점을 맞춘 많은 핵종 분자 프로브가 있고 기술이 비교적 성숙되어 있지만, 국내외 CLDN18.2 핵종 프로브의 보고는 여전히 없다. 본 발명은 CLDN18.2 표적화 단일클론 항체 18B10을 예로 들었고, 차세대 핵종 $^{124}\text{I}/^{64}\text{Cu}/^{89}\text{Zr}$ 을 사용하여 18B10 항체를 표지부착하였고, 생체내 연구는 이 항체가 CLDN18.2 고 발현 종양에서 상당히 높은 흡수를 가짐을 보여줌으로써, 핵종으로 표지부착된 18B10 항체가 CLDN18.2를 표적화하는 특이적 프로브로서 종양 면역요법 스크리닝, 치료 과정 모니터링 및 효능 평가를 위한 잠재적 영상화제임을 암시하였다.
- [0451] 본 발명은 적어도 부분적으로, 표지부착된 CLDN18.2 표적화 단일클론 항체(예를 들어, 18B10)에 대한 차세대 핵종 $^{124}\text{I}/^{64}\text{Cu}/^{89}\text{Zr}$, 및 이의 제조 방법 및 적용을 제공한다.
- [0452] 본 발명의 개념은 다음과 같다: $^{124}\text{I}(T_{1/2}=4.2\text{일})$, $^{64}\text{Cu}(T_{1/2}=12.7\text{시간})$, $^{89}\text{Zr}(T_{1/2}=78.4\text{시간})$ 은 광범위한 임상 적용 가능성을 가진 새로운 고체 표적 PET 핵종이다. $^{18}\text{F}(T_{1/2}=110\text{분})$ 및 $^{11}\text{C}(T_{1/2}=20.4\text{분})$ 에 비해, $^{124}\text{I}/^{64}\text{Cu}/^{89}\text{Zr}$ 은 방사성핵종의 장기간 영상화 연구 및 수술에 기여하는 상대적으로 긴 반감기를 갖고, 간 흡수가 낮아 간 병변의 검출에 기여한다. 항원 분자에서 하나의 에피토프(항원성 결정인자)에만 결합하는 단일클론 항체는 항원의 구조와 기능을 연구하고 기작을 밝히기 위한 분자 프로브로서 사용될 수 있다. 핵종 표지부착된 단일클론 항체를 사용하여 생체내에서 생체거대분자(단백질, 핵산, 효소 등)의 위치와 분포를 확인하는 것은 쉽다.
- [0453] 본 발명의 목적을 달성하기 위해, 제1 측면에서, 본 발명은 방사성핵종 $^{124}\text{I}/^{64}\text{Cu}/^{89}\text{Zr}$ 표지부착된 CLDN18.2 표적화 단일클론 항체인 차세대 핵종 표지부착된 CLDN18.2 표적화 단일클론 항체를 제공한다.
- [0454] 제2 측면에서, 본 발명은 $^{124}\text{I}/^{64}\text{Cu}/^{89}\text{Zr}$ -CLDN18.2 표적화 단일클론 항체(예를 들어, 18B10)의 제조 방법을 제공한다. NBS 방법으로, ^{124}I 를 단일클론 항체의 분자 구조에서 페닐 하이드록실 기의 오르토 파라 위치에 표지부착하였고, 상기 방법은 다음 단계를 포함한다: 0.5 내지 1.5 ml 0.1 M pH 7.2 PB 완충제, 0.5 내지 10 mg 18B10 및 6 내지 120 μg N-브로모석신이미드를 0.5 내지 1.0 ml 25 내지 90 $\text{KBq}/\mu\text{l}$ ^{124}I 용액에 첨가하고, 37°C에서 60초 동안 배양한 후, 0.05 내지 0.2 ml 10% 인간 혈청 알부민을 첨가하여 반응을 종결시켰고; 최종 반응 용액을 PD-10 컬럼으로 정제하여 표적 생성물을 수득하였다.
- [0455] 이작용성 킬레이터(예를 들어, 18B10)를 사용하여 $^{64}\text{Cu}/^{89}\text{Zr}$ 표지부착된 CLDN18.2 표적화 단일클론 항체를 달성하였다: 6 몰의 단일클론 항체에 해당하는 DFO를 2 내지 5 mg/ml 의 농도로 18B10 용액에 첨가하였고, 반응 시스템의 pH 값을 탈이온화된 0.1 M 중탄산나트륨 용액으로 8.5까지 조절하였고; 4°C 내지 37°C에서 4시간 내지 24시간 동안 반응시켜 DFO-18B10을 수득하였다. 15 μg 내지 2 mg 의 표지부착된 전구체를 pH가 5.5인 0.1 내지 1.0 ml의 0.1 M 아세트산나트륨 용액에 첨가한 다음, 25 내지 100 MBq의 새로운 $^{64}\text{Cu}/^{89}\text{Zr}$ 용액을 첨가하고 pH 값을 7.0까지 조절하였고; 온도를 40°C에서 30분 동안 조절하였고; 최종 반응 용액을 PD-10 컬럼으로 정제하여 표적 생성물을 수득하였다.

- [0456] 표지부착율이 95% 이상이고 PD-10 컬럼에 의해 정제되었을 때, 표적 생성물의 방사화학적 순도는 98.76%이었다.
- [0457] 사용 전, PD-10 컬럼을 먼저 0.01 M pH 7.4 PBS 용액으로 평형화하고, 매회 5 ml PBS를 첨가하고, 컬럼을 중력 유속으로 건조하고, 이를 5회 반복한 후; 표적 생성물을 0.01 M pH 7.4 PBS 용액으로 정제하였다.
- [0458] ^{124}I -18B10의 시험관내 안정성 분석은 ^{124}I -18B10이 25℃에서 48시간 동안 0.01 M의 pH 7.4 PBS 용액에서 우수한 안정성을 유지할 수 있고, 방사화학적 순도가 $97.89 \pm 0.05\%$ 임을 보여주었다.
- [0459] 제3 측면에서, 본 발명은 종양 영상화제 및 CLDN18.2를 표적화하는 치료 약물의 제조에 있어서 $^{124}\text{I}/^{64}\text{Cu}/^{89}\text{Zr}$ -CLDN18.2 표적화 단일클론 항체(예를 들어, 18B10)의 적용을 제공한다.
- [0460] 제4 측면에서, 본 발명은 PET/CT 분자 영상화 프로브의 제조에 있어서 $^{124}\text{I}/^{64}\text{Cu}/^{89}\text{Zr}$ -CLDN18.2 표적화 단일클론 항체(예를 들어, 18B10)의 적용을 제공한다.
- [0461] 제5 측면에서, 본 발명은 핵종 표지부착된 CLDN18.2 표적화 단일클론 항체를 포함하는, CLDN18.2를 표적화하는 종양 영상화제를 제공한다.
- [0462] 차세대 핵종 표지부착된 단일클론 항체(^{124}I -18B10)는 종양 세포 표면의 CLDN18.2에 특이적으로 결합할 수 있고; 정상 마우스에서 혈액을 제외한 장기 및 조직의 특이적 분포가 없었고; PDX 보유 마우스의 PET 영상화 연구에서, ^{18}F -FDG 흡수는 도 4에 나타난 바와 같이 CLDN18.2 양성 종양 보유 모델 및 CLDN18.2 음성 종양 보유 모델 둘 다에서 매우 낮았다. CLDN18.2 양성 PDX 보유 마우스에서 ^{124}I -18B10의 분포는 시간에 따라 동적으로 변하였다: 종양 부위의 흡수 신호는 2시간에 비해 60시간에서 상당히 증가하였고; 120시간에서, 심장 혈액 풀의 흡수 신호는 사라졌고, 종양의 신호만이 관찰될 수 있었다. CLDN18.2 음성 PDX 보유 마우스의 종양 부위에서는 ^{124}I -18B10이 특이적으로 축적되지 않았고, CLDN18.2 양성 PDX 보유 마우스에서는 ^{124}I -IgG가 특이적으로 축적되지 않았다. 이러한 결과는 ^{124}I -18B10 프로브가 CLDN18.2 양성 종양에서 특이적으로 축적되고 높은 민감성 및 특이성이라는 특성을 가짐을 시사한다. 이것은 향후 환자의 종양에서 CLDN18.2의 발현을 비침습적으로 검출하기 위한 영상화제로서 사용될 수 있다.
- [0463] 요약하건대, 본 발명은 적어도 하기 장점 및 유리한 효과를 가진다: 본 발명에 의해 제공된 신규 PET 분자 프로브 $^{124}\text{I}/^{64}\text{Cu}/^{89}\text{Zr}$ -CLDN18.2 표적화 단일클론 항체는 CLDN18.2에 대한 안정성, 우수한 영상화 효과, 높은 친화성 및 기능적 활성을 갖고, 전신 병변에서 CLDN18.2의 발현을 실시간 및 비침습적으로 모니터링하고 동일한 병변 및 상이한 병변에서 CLDN18.2 발현의 불균질성을 모니터링하고 치료 동안 CLDN18.2 발현의 변화를 관찰하여, 환자를 스크리닝하고, 치유 효과를 모니터링하고, 약물 내성 및/또는 재발 및 전이를 조기에 경고하고, 표적화 종양 약물의 맞춤형된 정확한 치료를 실현하는 데 사용될 것으로 예상된다.
- [0464] 본 발명에서, 단일클론 항체의 표지부착을 실현할 수 있고 단일클론 항체의 활성화에 거의 영향을 미치지 않고; 또한, 간 비특이적 흡수가 낮아, 간 병변의 검출에 기여할 뿐만 아니라, 전신의 배경이 낮아, 우수한 종양 대 비-종양 비를 갖고 종양 병변의 관찰에 기여하는 차세대 PET 핵종 $^{124}\text{I}/^{64}\text{Cu}/^{89}\text{Zr}$ 이 사용된다.
- [0465] **실시예 2 CLDN18.2를 표적화하는 차세대 핵종 표지부착된 단일클론 항체(예를 들어, ^{124}I -18B10)의 제조**
- [0466] 인간 및 마우스 CLDN18.2 둘 다와 교차반응하고 임상 전 연구를 위해 마우스에서 시험될 수 있는, 연구에 사용된 CLDN18.2 표적화 단일클론 항체 18B10은 맵스페이스 바이오사이언시스(쑤저우) 컴퍼니 리미티드(MabSpace Biosciences (Suzhou) Co., Ltd)에 의해 제공되었다. PD-10 사전로딩된 컬럼은 GE(미국)로부터 구입되었다.
- [0467] ^{124}I -18B10을 NBS 반응으로 제조하였다: 0.8 ml 0.1 M pH 7.2 PB 완충제, 0.1 ml(29.2 mg/ml) 18B10 단일클론 항체 용액(H_2O 로 제조함) 및 36 μg NBS를 1.0 ml 59.2 KBq/ μl ^{124}I 용액에 차례로 첨가하고, 37℃에서 60초 동안 배양한 후, 0.1 ml의 10% 인간 혈청 알부민을 첨가하여 반응을 종결하였고; 최종 반응 용액을 PD-10 컬럼으로 정제하여 표적 생성물을 수득하였다.
- [0468] 사용 전, PD-10 컬럼을 먼저 0.01 M pH 7.4 PBS 용액으로 평형화하고, 매회 5 ml PBS를 첨가하고, 컬럼을 중력 유속으로 건조하고, 이를 5회 반복한 후, 표적 생성물을 0.01 M pH 7.4 PBS 용액으로 정제하였다.

- [0469] 방사-TLC 및 방사-HPLC를 이용하여 방사표지부착율 및 방사화학적 순도를 측정하였다. 방사-TLC 검출: 방사성이 37 내지 74 kBq(1 내지 2 μ Ci)인 2 μ l 유리 Na¹²⁴I 및 정제된 ¹²⁴I-18B10을 20 μ l의 포화 EDTA에 첨가하였다. 2 μ l의 상기 용액을 신화(Xinhua) 제1번 필터지의 바닥으로부터 1 cm 위에서 떨어뜨려 일반 식염수 전개 시스템에 넣었다. 완전한 현상 후, 필터지를 꺼내어 방사-TLC 검출을 위해 건조하였다. 방사-HPLC 검출: 방사-HPLC 분석을 위해 방사성이 37 내지 74 kBq(1 내지 2 μ Ci)인 2 μ l 유리 Na¹²⁴I 및 정제된 ¹²⁴I-18B10을 50 μ l 0.01 M pH 7.4 PBS로 희석하였다. 분석 조건: 아질런트 바이오(Agilent Bio) SEC-3 겔 여과/부피 배제 크로마토그래피 컬럼, 유속 1 ml/분, 이동상 0.01 M pH 7.4 PBS.
- [0470] 표적 생성물 ¹²⁴I-18B10의 방사표지부착율 및 방사화학적 순도는 각각 97.94% 및 98.76%이었다. 표적 생성물 ¹²⁴I-18B10의 방사화학적 순도는 PBS에서 48시간 후 약 98%로 유지되었다(도 1).
- [0471] **실시예 3 CLDN18.2를 표적화하는 차세대 핵종 표지부착된 단일클론 항체(예를 들어, ¹²⁴I-18B10)의 흡수**
- [0472] CLDN18.2를 MKN45 세포에 형질감염시키고 스크리닝함으로써, CLDN18.2의 발현이 높은 MKN45-CLDN18.2 high 세포주를 획득하였다. MKN45 세포를 음성 대조군 세포로서 사용하였다. 시딩된 세포를 24웰 플레이트에서 밤새 균일하게 배양하여, 이 세포가 벽에 완전히 부착되도록 하였다. 둘째 날, 1 mCi ¹²⁴I-18B10 또는 ¹²⁴I-hIgG를 첨가하고 각각 10분, 30분, 60분 및 120분 동안 배양하였다. 차단군에서, 흡수 신호를 차단하기 위해 0.5 mg/웰의 냉각된 전구체 18B10을 첨가하였다. 배양 후, 세포를 PBS로 3회 세척하고, 용해물을 모았다. 흡수 신호를 검출하고 γ 카운터로 분석하였다.
- [0473] 결과(도 2)는 MKN45-CLDN18.2 high 세포가 10분에서 ¹²⁴I-18B10의 높은 흡수율을 보였고, 이것이 시간 경과에 따라 증가했음을 보여주었다. 차단을 위해 냉각된 전구체를 첨가하였을 때, 상기 흡수율은 상당히 감소하였는데, 이는 흡수 신호가 CLDN18.2에 특이적임을 시사한다. MKN45-CLDN18.2 high 세포에 의한 ¹²⁴I-hIgG의 흡수 및 MKN45 세포에 의한 ¹²⁴I-18B10의 흡수는 둘 다 낮았다.
- [0474] **실시예 4 정상 마우스에서 CLDN18.2를 표적화하는 차세대 핵종 표지부착된 단일클론 항체(예를 들어, ¹²⁴I-18B10)의 생체분포**
- [0475] 꼬리 정맥을 통해 ¹²⁴I-18B10(0.74 MBq, 200 μ l)을 정상 쿤밍 마우스에 주사하였다. 마우스의 심장, 간, 폐, 신장, 비장, 위, 뼈, 근육, 대장, 소장, 뇌, 혈액 및 다른 장기와 조직을 주사 후 2시간, 24시간, 60시간 및 120시간에서 분리하였다. 분쇄 후, 흡수 신호를 검출하고 γ 카운터로 분석하였고, ¹²⁴I-18B10 프로브의 ID%/g를 수득하였다.
- [0476] 정상 마우스(도 3)에서, 혈액 흡수는 모든 시점에서 가장 높았다. 혈액 이외에, 2시간에서 간, 신장, 폐 및 비장에서의 흡수는 다른 장기 및 조직에서의 흡수보다 더 높았다. 모든 장기의 흡수는 시간 경과에 따라 감소하였다. 혈액에 비해, 다른 장기의 흡수는 더 낮은 경향이 있다.
- [0477] **실시예 5 PDX 종양 보유 마우스에서 CLDN18.2를 표적화하는 차세대 핵종 표지부착된 단일클론 항체(예를 들어, ¹²⁴I-18B10)의 PET 영상화**
- [0478] 면역조직화학(IHC) 방법으로, CLDN18.2 양성 PDX(양성 강도 3+) 및 CLDN18.2 음성 PDX를 접종용으로 선택하였다. 모든 종양 조직을 누드 마우스의 오른쪽 하지에 피하 주사하였다. PDX 종양의 직경이 0.8 cm일 때, 종양 보유 마우스를 군으로 나누었다. CLDN18.2 양성 PDX 보유 마우스를 3개의 군, 즉 ¹⁸F-FDG 군, ¹²⁴I-18B10 군 및 ¹²⁴I-hIgG 군으로 나누었다. 꼬리 정맥을 통해 각각 ¹⁸F-FDG, 18.5 MBq ¹²⁴I-18B10 및 18.5 MBq ¹²⁴I-hIgG를 이들 3개의 군에 주사하였다. CLDN18.2 음성 PDX 종양 보유 마우스도 상기 3개의 군으로 나누었다. 주사 후 2시간, 60시간 및 120시간에서, 동물을 이소플루란(2% 이소플루란-30% 산소/공기)으로 마취시키고 마이크로 PET/CT에서 영상화를 수행하였다.
- [0479] 도 4에 나타난 바와 같이, ¹⁸F-FDG 흡수는 CLDN18.2 양성 종양 보유 모델 및 CLDN18.2 음성 종양 보유 모델 둘다에서 매우 낮았다. CLDN18.2 양성 PDX 보유 마우스에서 ¹²⁴I-18B10의 분포는 시간 경과에 따라 동적으로 변화

였다: 2시간에서, 흡수 신호는 심장 혈액 풀 및 CLDN18.2 양성 종양 부위에서 검출되었고; 60시간에서, 심장 혈액 풀의 흡수 신호는 상당히 감소된 반면, 종양에서는 증가되었고; 120시간에서, 심장 혈액 풀의 흡수 신호는 사라졌고 종양의 신호만이 관찰될 수 있었다. 모든 조직 및 종양에서 CLDN18.2 음성 PDX 보유 마우스에서 ^{124}I -18B10의 흡수 신호는 상이한 시점에서 상당히 유사했는데, 이는 CLDN18.2 음성 종양에서 특이적 축적이 없었음을 시사한다. 음성 대조군으로서, CLDN18.2 양성 PDX 보유 마우스에서 ^{124}I -IgG의 흡수 신호는 각각의 시점에서 종양보다는 오히려 심장 혈액 풀에서 높게 발견되었다. 이러한 결과는 ^{124}I -18B10 프로브가 CLDN18.2 양성 종양에서 특이적으로 축적되고, 장시간(120시간) 영상화 후에도 여전히 상당한 신호가 있었음을 시사한다. 이것은 높은 민감성 및 특이성이라는 특성을 갖고, 향후 환자의 종양에서 CLDN18.2의 발현을 비침습적으로 검출하기 위한 영상화제로서 사용될 수 있다.

- [0480] 본 발명에 의해 제공된 차세대 핵종 $^{124}\text{I}/^{64}\text{Cu}/^{89}\text{Zr}$ 표지부착된 CLDN18.2 표적화 단일클론 항체는 CLDN18.2에 대한 안정성, 우수한 영상화 효과, 높은 친화성 및 기능적 활성을 가지며, CLDN18.2 양성 종양 병변의 진단 및 정확한 병기분류에 기여한다. 임상 전 동물 연구는 이 항체가 우수한 적용 가능성을 가진 표적화 CLDN18.2 영상화제가 될 잠재력을 가짐을 확인시켜준다.
- [0481] **실시예 6: CLDN18.1과 상이한 CLDN18.2 아미노산에 대한 부위 지정 돌연변이유발을 통한 선택된 항체의 에피토프 맵핑**
- [0482] **1. 인간 CLDN18.2-mRFP 및 인간 CLDN18.1-mRFP 구축물의 생성**
- [0483] 인간 CLDN18.1(아미노산 1 내지 261, 서열번호 31)-mRFP1(아미노산 1 내지 225) 및 인간 CLDN18.2(아미노산 1 내지 261, 서열번호 30)-mRFP1(아미노산 1 내지 225)을 코딩하는 cDNA를 시험관내에서 합성하였다(서열번호 52 및 서열번호 53은 각각 아미노산 서열이다). 그 다음, 제조업체의 설명서에 따라 Syno 어셈블리 혼합물 시약(Synbio)을 사용하여 상동 재조합 방법으로 PCR 생성물을 pcDNA3.1(+) 벡터에 클로닝하였다. 퀴아젠(QIAGEN) 플라스미드 메가 키트(QIAGEN)를 사용하여 플라스미드를 정제하였다.
- [0484] 인간 CLDN18.1 및 CLDN18.2(진뱅크 수탁번호: 스플라이스 변이체 1(CLDN18.1): NP_057453, NM_016369, 및 스플라이스 변이체 2(CLDN18.2): NM_001002026, NP_001002026)의 서열에 따르면, CLDN18.1이 아닌 인간 CLDN18.2과의 특이적 결합의 결정인자일 수 있는 8개의 상이한 아미노산이 28과 70 사이에 위치한다. 위에서 생성된 야생형 인간 CLDN18.2-mRFP 플라스미드를 주형으로서 사용하여, 통합된 서열의 두 분절을 프라이머로 생성하였다. 지정된 위치에서 단일 아미노산이 인간 CLDN18.1의 아미노산으로 변경된 인간 CLDN18.2-mRFP의 변이체를, 프라이머를 사용한 중첩 PCR로 증폭시켰다. 구체적인 돌연변이는 Q29M, N37D, A42S, N45Q, Q47E, E56Q, G65P 및 L69I이다. 지정된 위치에서 단일 아미노산이 변경된 인간 CLDN18.1-mRFP의 변이체를, 프라이머를 사용한 중첩 PCR로 증폭시켰다. 구체적인 돌연변이는 M29Q, D37N, S42A, Q45N, E47Q, Q56E, P65G, I69L이다. 이어서, PCR 생성물을 상동 재조합 방법으로 pcDNA3.1(+) 벡터에 클로닝하였다. 개별 양성 클론의 시퀀싱으로 인간 CLDN18.2-mRFP 변이체를 식별하고 확인하였다.
- [0485] 그 후, 이 돌연변이체 및 야생형 인간 CLDN18.2-mRFP 또는 인간 CLDN18.1-mRFP의 플라스미드를 HEK293 세포주에 형질감염시켰다. 먼저, 형질감염을 위해 5×10^6 개의 HEK293 세포를 60 mm 접시에 60% 내지 80%의 비율로 시딩하였다. 400 μl 1xHBS 및 10 μl 25 kDa 선형 PEI 형질감염 시약(1xHBS에 용해됨, 1 mg/ml 저장 용액) 중의 10 μg DNA를 1:2.5의 DNA/PEI 비에 도달하도록 혼합하였다. 다음으로, 혼합물을 HEK293 세포 배양물에 한 방울씩 첨가하였다. 6시간 내지 8시간 후, 형질감염된 세포를 밤새 완전한 DMEM으로 교체하였다. 형질감염 24시간 후, 키메라 항체를 사용한 FACS 분석을 위해 세포를 모았다.

인간 CLDN18.1의 아미노산 서열(서열번호 31)

MSTTTCQVVAFLLSILGLAGCIAATGMDMWSTQDLYDNPVTSVFQYEGLWR
SCVRQSSGFTECRPYFTILGLPAMLQAVRALMIVGIVLGAIGLLVSIFALKCIRI
GSMEDSAKANMTLTSGIMFIVSGLCAIAGVSVFANMLVTNFWMSTANMYTG
MGGMVQTVQTRYTFGAALFVGWVAGGLTLIGGVMMCIACRGLAPEETNYK
AVSYHASGHSVAYKPGGFKASTGFGSNTKNKKIYDGGARTEDEVQSYPSKH
DYV

[0486]

인간 CLDN18.1-mRFP1의 아미노산 서열(서열번호 52)

MSTTTCQVVAFLLSILGLAGCIAATGMDMWSTQDLYDNPVTSVFQYEGLWR
SCVRQSSGFTECRPYFTILGLPAMLQAVRALMIVGIVLGAIGLLVSIFALKCIRI
GSMEDSAKANMTLTSGIMFIVSGLCAIAGVSVFANMLVTNFWMSTANMYTG
MGGMVQTVQTRYTFGAALFVGWVAGGLTLIGGVMMCIACRGLAPEETNYK
AVSYHASGHSVAYKPGGFKASTGFGSNTKNKKIYDGGARTEDEVQSYPSKH
DYVMASSEDVIKEFMRFKVRMEGSVNGHEFEIEGEGEGRPYEGTQTAKLKVT
KGGPLPFAWDILSPQFQYGSKAYVKHPADIPDYLKLSFPEGFKWERVMNFED
GGVTVTQDSSLQDGEFIYKVKLRGTNFPDGPVMQKKTMGWEASTERMYP
EDGALKGEIKMRLKLKDGGHYDAEVKTTYMAKKPVQLPGAYKTDIKLDITS
HNEDYTIVEQYERAEGRHSTGA

[0487]

인간 CLDN18.2의 아미노산 서열(서열번호 30)

MAVTACQGLGFVVSILIGIAGIIAATCMDQWSTQDLYNNPVTAVFNYQGLWR
SCVRESSGFTECRGYFTLLGLPAMLQAVRALMIVGIVLGAIGLLVSIFALKCIRI
GSMEDSAKANMTLTSGIMFIVSGLCAIAGVSVFANMLVTNFWMSTANMYTG
MGGMVQTVQTRYTFGAALFVGWVAGGLTLIGGVMMCIACRGLAPEETNYK
AVSYHASGHSVAYKPGGFKASTGFGSNTKNKKIYDGGARTEDEVQSYPSKH
DYV

[0488]

인간 CLDN18.2-mRFP1의 아미노산 서열(서열번호 53)

MAVTACQGLGFVVSILIGIAGHIAATCMDQWSTQDLYNPVTAVFNYQGLWR
SCVRESSGFTECRGYFTLLGLPAMLQAVRALMIVGIVLGAIGLLVSIFALKCIRI
GSMEDSAKANMTLTSGIMFIVSGLCAIAGVSVFANMLVTNFWMSTANMYTG
MGGMVQTVQTRYTFGAALFVGWVAGGLTLIGGVMMCIACRGLAPEETNYK
AVSYHASGHSVAYKPGGFKASTGFGSNTKNKKIYDGGARTEDEVQSYPSKH
DYVMASSEDVIKEFMRFKVRMEGSVNGHEFEIEGEGEGRPYEGTQTAKLKVT
KGGPLPFAWDILSPQFQYGSKAYVKHPADIPDYLKLSFPEGFKWERVMNFED
GGVVTVTQDSSLQDGEFIYKVKLRGTNFPDGPVMQKKTMGWEASTERMYP
EDGALKGEIKMRLKLDGGHYDAEVKTTYMAKKPVQLPGAYKTDIKLDITS
HNEDYTIVEQYERAEGRHSTGA

[0489]

[0490] 2. CLDN18.2 키메라 항체와 부위 돌연변이된 HEK293-CLDN18.2 또는 HEK293-CLDN18.1 세포의 결합

[0491] 형질감염된 HEK293-CLDN18.2 또는 HEK293-CLDN18.1 세포를 2% BSA가 함유된 PBS에 10⁵/웰의 밀도로 웰당 100 μ l씩 재현탁하였다. 세포를 FACS 세척 완충제(PBS+2% FBS)로 3회 세척하고 4℃에서 30분 동안 각각의 웰에서 100 μ l/웰 10 μ g/ml 키메라 항체 및 IMAB362와 함께 인큐베이션하였다. 다음으로, 세포를 FACS 세척 완충제로 3회 세척하고 4℃에서 30분 동안 100 μ l/웰 염소 항-hIgG(H+L)-FITC(1:200 희석)와 함께 인큐베이션하였다. 마지막으로, 세포를 FACS 세척 완충제로 3회 세척하고 유세포분석기로 분석하였다. CLDN18.2 형질감염된 세포와의 결합을 분석하기 위해, RFP 양성 세포를 대조군 게이팅에 사용하였다.

[0492] IMAB362를 미국 특허 출원 공개 제2009169547A1호에 개시된 서열에 따라 발현시켰다. 가장 높은 신호를 가진 단일 세포 클론을 선택하고 세포 보관을 위해 증폭시켰다.

IMAB362의 중쇄 가변 영역(서열번호 72)

QVQLQQPGAELVRPGASVKLSCKASGYTFTSYWINWVKQRPGQGLEWIGNI
YPSDSYTNYNQKFKDKATLTVDKSSSTAYMQLSSPTSSEDSAVYYCTRSWRG
NSFDYWGGQTTLTVSS

[0493]

IMAB362의 경쇄 가변 영역(서열번호 73)

DIVMTQSPSSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLNLSGNQKNYLTWYQQKP
GQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISVQAEDLAVYYCQNDYS
YPFTFGSGTKLEIK

[0494]

[0495] 야생형에 비해 돌연변이된 CLDN18.2 변이체에 대한 이들 키메라 항체의 결합 신호의 퍼센트를 계산하고 표 4에 요약하였다. 도 5a 및 5b에 나타난 바와 같이, 18B10-C(즉, 인간 IgG1 불변 영역에 융합된 18B10의 키메라 항체)의 결합은 E56이 Q로 돌연변이되었을 때 완전히 상실되었다. 이 변화는 59A9-C를 제외한 IMAB362 및 다른 키메라 항체에도 적용되었다. 또한, 본 발명자들은 다른 아미노산, 예컨대, A42, N45도 IMAB362 및 다른 항체의 결합에 어느 정도 기여했으나, 18B10-C의 경우에는 그렇지 않았음을 발견하였다.

표 4

야생형 CLDN18.2 와 비교된 돌연변이된 인간 CLDN18.2 의 결합 퍼센트(%)							
CLDN18.2 에 대한 돌연변이	IMAB362	7C12-C	11F12-C	12E9-C	26G6-C	59A9-C	18B10-C
야생형	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
Q29M	113.89	83.52	107.78	106.33	106.53	90.37	83.50
N37D	121.11	80.20	102.19	102.71	117.72	92.66	105.63
A42S	15.76	38.69	56.86	55.10	82.23	90.02	69.23
N45Q	18.87	52.10	57.38	50.77	88.69	65.04	91.97
Q47E	108.17	74.74	86.13	89.07	116.12	87.47	109.00
E56Q	0.83	0.48	0.27	0.35	0.34	52.74	6.57
G65P	119.26	79.44	92.67	96.73	118.87	85.55	118.11
L69I	89.27	90.38	74.28	58.10	79.74	105.74	111.70

[0496]

[0497]

실시예 7: 인간화 항체의 생성 및 특징규명

[0498]

1. 인간화 항체의 생성, 발현 및 정제

[0499]

18B10

[0500]

중쇄에 대한 인간 생식계열 프레임워크 서열 VK/4-1 및 중쇄에 대한 인간 생식계열 프레임워크 서열 VH/1-46을 각각 CDR 이식에 사용하였다.

[0501]

3개의 CDR을 생식계열 서열(18B10 HC 생식계열, 서열번호 23)에 직접 이식하고 각각 HC 변이체 1(Hu18B10_Ha, 서열번호 25)의 경우 역돌연변이 R71I 및 T73K, HC 변이체 2(Hu18B10_Hb, 서열번호 27)의 경우 역돌연변이 R71I, T73K, T28S 및 M69L, 및 HC 변이체 3(Hu18B10_Hc, 서열번호 29)의 경우 역돌연변이 R71I, T73K, T28S, M69L, R38K 및 M48I를 유발함으로써 중쇄(HC) 변이체 1, 2 및 3을 획득하였다.

[0502]

(1) 18B10 HC에 대한 생식계열 서열:

VH/1-46(18B10-생식계열, 서열번호 23)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYMHVWRQAPGQGLEWMGI
INPSGGSTSYAQKFQGRVTMTTRDTSTSTVYMELSSLRSEDVAVYYCAR

[0503]

VH/1-46 변이체 1(Hu18B10_Ha, 서열번호 25)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYNMNVWRQAPGQGLEWMG
NIDPYYGGTSYNQKFKGRVTMTIDKSTSTVYMELSSLRSEDVAVYYCARMY
HGNAFDYWGQGTTVTVSS

[0504]

VH/1-46 변이체 2(Hu18B10_Hb, 서열번호 27)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTGYNMNVWRQAPGQGLEWMG
NIDPYYGGTSYNQKFKGRVTLTIDKSTSTVYMELSSLRSEDVAVYYCARMYH
GNAFDYWGQGTTTVTVSS

[0505]

VH/1-46 변이체 3(Hu18B10_Hc, 서열번호 29)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTGYNMNVWKQAPGQGLEWIGN
IDPYYGGTSYNQKFKGRVTLTIDKSTSTVYMELSSLRSEDVAVYYCARMYHG
NAFDYWGQGTTTVTVSS

[0506]

[0507]

3개의 CDR을 생식계열 서열(18B10 LC 생식계열, 서열번호 24)에 직접 이식하고 각각 변이체 1(Hu18B10_La, 서열번호 26)의 경우 역돌연변이시키지 않고 LC 변이체 2(Hu18B10_Lb, 서열번호 28)의 경우 역돌연변이 S63T 및 I21M을 유발함으로써 경쇄(LC) 변이체 1 및 2를 획득하였다.

[0508]

(2) 18B10 LC에 대한 생식계열 서열:

VK/4-1(18B10 LC 생식계열, 서열번호 24)

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIWAS
TRESGVPRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSTP

[0509]

VK/4-1 변이체 1(Hu18B10_La, 서열번호 26)

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLNLSGNLKNYLTWYQQKPGQPPKL
LIYWASTRKSGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQNDYSYPLTFG
GGTKVEIK

[0510]

VK/4-1 변이체 2(Hu18B10_Lb, 서열번호 28)

DIVMTQSPDSLAVSLGERATMNCSSQSLNLSGNLKNYLTWYQQKPGQPPKL
LIYWASTRKSGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQNDYSYPLTFG
GGTKVEIK

[0511]

[0512]

상기 중쇄 가변 영역과 경쇄 가변 영역의 조합은 하기 인간화 18B10 항체를 생성한다: 18B10-HaLa(서열번호 25의 VH 및 서열번호 26의 VL을 가짐), 18B10-HbLa(서열번호 27의 VH 및 서열번호 26의 VL을 가짐), 18B10-HcLa(서열번호 29의 VH 및 서열번호 26의 VL을 가짐), 18B10-HaLb(서열번호 25의 VH 및 서열번호 28의 VL을 가짐), 18B10-HbLb(서열번호 27의 VH 및 서열번호 28의 VL을 가짐), 18B10-HcLb(서열번호 29의 VH 및 서열번호 28의 VL을 가짐).

[0513]

18B10의 중쇄 및 경쇄의 인간화 변이체는 아래 표시된 바와 같이 인간 IgG1 중쇄 불변 영역 및 카파 경쇄 불변 영역에 연결된다:

인간 IgG1 중쇄 불변 영역(서열번호 49)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF
PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKT
HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN
KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV
EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHE
ALHNHYTQKSLSLSPGK

[0514]

인간 카파 경쇄 불변 영역(서열번호 50)

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS
QESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR
GEC

[0515]

[0516]

상기 중쇄 및 경쇄 cDNA의 가변 영역을 합성하고 인간 IgG1 및 인간 카파의 불변 영역과 융합시켰다. 선택된 항체 유전자의 중쇄 및 경쇄를 발현 벡터에 클로닝하고 퀴아젠의 플라스미드 맥시프렙 시스템(Plasmid Maxiprep System)을 사용하여 대규모 DNA를 제조하였다. 제조업체의 프로토콜에 따라 인비트로젠(Invitrogen)의 ExpiFectamine™ CHO 시약을 사용하여 형질감염을 수행하였다. 세포 생존율이 약 60%일 때 상청액을 수거하였다. 0.22 μ m 여과 캡슐을 통해 세포 배양 상청액을 여과하여 세포 잔해물을 제거하였다. 상청액을 사전 평형화된 단백질-A 친화성 컬럼에 로딩하였다. 그 다음, 컬럼 내부의 단백질 A 수지를 평형화 완충제(PBS)로 세척하고 25 mM 구연산염(pH 3.5)을 사용하여 항체를 용출하였다. 1 M Tris-염기(pH 9.0)를 사용하여 pH를 약 6.0 내지 7.0까지 조절하였다. 내독소를 1 EU/mg 미만으로 조절하였다. 그 다음, 정제된 항체를 SDS-PAGE 및 SEC-HPLC로 특징규명하였다.

[0517]

2. 인간 및 마우스 CLDN18.2와의 결합

[0518]

대수기 HEK293-CLDN18.2 및 NUGC4 세포를 PBS에 재현탁하였다. FACS 세척 완충제(PBS+2% FBS)를 사용하여 세포를 3회 세척한 후, 400 nM 내지 0.002 nM의 100 μ l/웰 희석된 인간화 항체를 각각의 웰에 첨가하고 4℃에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 다시, FACS 세척 완충제를 사용하여 세포를 3회 세척한 후, 4℃에서 또 다시 30분 동안 100 μ l/웰 염소 항-mIgG-FITC(1:400 희석)와 함께 인큐베이션하였다. FACS 세척 완충제를 사용하여 최종 3회 세척한 후, 세포를 유세포분석으로 분석하였다.

[0519]

가장 우수한 것을 스크리닝하기 위해 모든 인간화 항체 변이체를 키메라 항체 변이체와 직접 비교 시험하였다. 모든 변이체들은 그들의 결합을 완전히 유지하였다. 다음으로, 하나의 역돌연변이만을 가진 18B10-HaLa를 HEK293-마우스 CLDN18.2 세포와의 결합에 대해 시험하였다. 18B10-HaLa는 IMAB362보다 더 우수한 효능과 더 높은 MFI로 마우스 CLDN18.2에 잘 결합할 수 있었으며, 이는 18B10-HaLa가 마우스에 대한 우수한 교차반응성을 가짐을 시사한다.

[0520]

3. KinExA에 의한 인간화 CLDN18.2 항체의 친화성 분석

[0521]

KinExA로 18B10-HaLa 및 IMAB362를 CLDN18.2 발현 세포와의 친화성 결합에 대해 직접 비교 평가하였다. KinExA 4000(Sapidyne Instruments Inc.)의 설명서에 따라, 200 mg PMMA 경질 비드(Sapidyne, #440176)를 30 μ g 염소 항-인간 IgG Fc 항체로 2시간 동안 코팅한 후, 1시간 동안 10 mg/ml BSA로 차단하였다. 2종의 위 세포주인 NUGC4 및 KATOIII(ATCC, Cat# HTB-103)를 대수기에서 모으고 0.2 nM 18B10-HaLa 또는 IMAB362와 혼합하였다. 0.2 nM 18B10-HaLa 또는 IMAB362를 사용하여 세포-항체 혼합물을 2배 희석하고 실온에서 3시간 동안 인큐베이션하였다. 유리 항체의 양은 희석과 함께 증가하였다. 이 유리 항체를 염소 항-인간 IgG Fc 코팅된 비드로 포획한 후, 판독을 위해 1 μ g/ml 알렉사 플루오르(Alexa Fluor) 647-항-인간 IgG로 표지부착하였다.

[0522]

각각의 항체의 결합 친화성은 표 5에 요약되어 있다. NUGC4 세포 및 KATOIII에 결합하는 18B10-HaLa의 Kd는 대

약 0.3 nM이었으며, 이는 IMAB362의 Kd보다 8배 이상 더 높았다. 이것은 상기 FACS 결합 결과와 일치하였다.

표 5

위 세포주에 대한 CLDN18.2 항체의 Kd

Kd(nM)	18B10-HaLa	IMAB362
NUGC4	0.303	2.58
KATOIII	0.315	ND

4. HEK293-CLDN18.2 세포에 대한 CDC 어세이

18B10-HaLa를 CDC 활성 어세이에서 IMAB362와 직접 비교 시험하였다. 18B10-HaLa는 IMAB362보다 20배 이상 더 높은 CDC 활성을 가졌다. 18B10-HaLa 의존적 특이적 세포 사멸의 퍼센트는 0.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 86%에 도달한 반면, IMAB362는 동일한 농도에서 세포 사멸을 갖지 않았다.

5. MKN45-CLDN18.2 세포에 대한 결합 및 세포독성 효과

세포 결합 어세이는 전술된 바와 동일하였다. 18B10의 모든 인간화 변이체는 키메라 18B10과 필적할 만한 친화성으로 세포에 결합하였다. 하나의 역돌연변이만을 가진 18B10-HaLa를 추가 ADCC 활성 연구를 위해 선택하였다.

Jurkat-NFAT-luc-Fc γ RIIIA-V176 세포를 이펙터 세포로서 사용하고 MKN45-CLDN18.2 세포를 표적 세포로서 사용하여 ADCC 활성을 시험하였다. 18B10-HaLa는 IMAB362보다 훨씬 더 낮은 EC50(0.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$)을 가졌는데, 이는 키메라 18B10의 EC50과 일치한다.

6. NUGC4 세포에 대한 결합 및 세포독성 효과

세포 결합 및 ADCC 어세이는 전술된 바와 동일하였다. 18B10-HaLa는 IMAB362에 비해 훨씬 더 우수한 ADCC 효능(EC50 약 0.59 $\mu\text{g}/\text{mL}$)을 보였다.

7. 표적 세포로서 NUGC4 및 이펙터 세포로서 PBMC를 사용한 ADCC 어세이

대수기 NUGC4 세포를 10% FBS가 함유된 RPMI1640에 재현탁하였다. 세포를 웰당 1×10^4 개 세포로 96웰 U 바닥 플레이트에 사전시딩하였다. 항-CLDN18.2 항체 및 IMAB362를 10% FBS가 함유된 RPMI1640으로 구매 희석하고 200 내지 0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 최종 농도로 상기 플레이트에 첨가하고 37°C에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 미아오쑤(상하이) 바이올로지칼 & 테크놀로지 컴퍼니 리미티드(Miao Shun (Shanghai) Biological & Technology Co., Ltd)의 냉동된 PBMC를 액체 질소로부터 꺼내고 즉시 37°C 수조에 넣었다. 원심분리 후, 세포를 RPMI1640 + 10% FBS에 재현탁하고 웰당 40×10^4 개 세포로 상기 96웰 U 바닥 플레이트에 시딩하였다. 그 다음, 상기 플레이트를 37°C의 인큐베이터에서 5시간 동안 두었다.

인큐베이션 후, 플레이트를 22°C로 평형화하였다. 프로메가 사이토독스-원 균질 막 통합성 어세이 키트(Promega CytoTox-ONE Homogeneous Membrane Integrity Assay Kit)(G7892) 또는 사이토독스 96® 비방사성 세포독성 어세이(Non-Radioactive Cytotoxicity Assay)(G1780)를 이용하여 LDH를 검출하였다. 제조업체의 설명서에 따라 용해 시약 및 중단 용액을 첨가한 후, 560 nm의 여기 파장 및 590 nm의 방출 파장(G7892), 또는 490 nm 또는 492 nm에서의 흡광도(G1780) 하에서 형광을 측정하였다.

18B10-HaLa는 IMAB362보다 훨씬 더 우수한 ADCC 효능을 보였다. 회귀 곡선에 피팅되지 않기 때문에, EC50을 정확하게 계산할 수 없다.

8. 인간 CLDN18.2에 대한 부위 지정 돌연변이유발을 이용한 선택된 항체의 에피토프 맵핑

동일한 방법 및 인간 CLDN18.2-mRFP 플라스미드를 사용하여, 인간 CLDN18.2 28과 80 사이에 있는 아래 나열된 42개의 아미노산을 한 번에 하나씩 알라닌으로 교체하였다. 프라이머를 사용한 중첩 PCR로 이 변이체들을 증폭시켰다. 구체적인 돌연변이는 Q28A, Q29A, W30A, S31A, T32A, Q33A, D34A, L35A, Y36A, N37A, N38A, V40A, T41A, V43A, F44A, N45A, Y46A, Q47A, L49A, W50A, R51A, S52A, V54A, R55A, E56A, E56A, S57A, S58A, F60A, T61A, E62A, R64A, Y66A, F67A, T68A, L69A, L70A, L72A, M75A, L76A, Q77A, V79A, R80A이었다. 그 다음, 제

조업체의 설명서에 따라 Syno 어셈블리 혼합물 시약(Synbio)을 사용하여 상동 재조합 방법으로 PCR 생성물을 pcDNA3.1(+) 벡터에 클로닝하였다. 퀴아젠 플라스미드 메가 키트(QIAGEN)을 사용하여 플라스미드를 정제하였다.

[0537] 이어서, 이러한 돌연변이체 및 야생형 CLDN18.2-mRFP의 플라스미드를 HEK293 세포에 형질감염시켰다. 세포를 형질감염 24시간 후 유세포분석으로 분석하였다.

[0538] 18B10-HaLa의 결합은 W30, L49, W50, E56이 A로 돌연변이되었을 때 완전히 상실되었는데(결합 퍼센트<10%), 이는 이 4개의 아미노산이 인간 CLDN18.2에 결합하는 데 중요하다는 것을 시사한다. 특히 E56은 결합 에피토프를 구성하는 가장 중요한 아미노산이다. 이 4개의 중요한 아미노산 이외에, R51, F60, E62, R80과 같은 여러 다른 아미노산도 알라닌으로 교체되면 결합(10% 내지 25%의 결합 퍼센트)에 영향을 미친다. 59A9-C와 부위 돌연변이된 CLDN18.2의 결합은 E56에 부분적으로만 의존하였다(결합 퍼센트 약 22%). 야생형과 비교되었을 때, 항체에 대한 돌연변이된 CLDN18.2의 결합 퍼센트는 표 6에 요약되어 있다.

표 6

야생형 CLDN18.2 와 비교된 돌연변이된 CLDN18.2 의 결합 퍼센트(%)		
CLDN18.2 에 대한 돌연변이	18B10-HaLa	59A9-C
야생형	100.00	100.00
Q28A	28.47	46.38
Q29A	82.85	54.83
W30A	0.38	3.20
S31A	92.24	76.85
T32A	91.56	85.59
Q33A	57.11	59.78
D34A	97.47	96.29
L35A	89.80	75.44
Y36A	79.92	78.03
N37A	61.20	60.72
N38A	66.62	57.63
V40A	103.48	128.07
T41A	60.27	41.63
V43A	36.83	59.41
F44A	59.86	70.03
N45A	36.19	35.16
Y46A	51.55	14.98
Q47A	105.11	57.45
L49A	1.20	2.32
W50A	0.86	5.05
R51A	39.39	22.12
S52A	86.58	98.97
V54A	84.22	87.24
R55A	49.94	49.69
E56A	0.27	21.92
S57A	112.14	77.16
S58A	62.08	39.38
F60A	26.32	64.43
T61A	84.08	51.64
E62A	8.42	23.13
R64A	87.70	51.00
Y66A	53.19	52.45
F67A	76.37	79.89

[0539]

T68A	70.92	71.30
L69A	88.60	54.83
L70A	75.64	82.08
L72A	56.61	53.03
M75A	75.98	73.58
L76A	43.12	52.06
Q77A	80.06	63.42
V79A	43.72	39.11
R80A	27.27	13.64

[0540]

[0541]

실시예 8 PDX 마우스에서 CLDN18.2를 표적화하는 차세대 핵종 표지부착된 단일클론 항체(예를 들어, ^{124}I -18B10)의 생체분포

[0542]

꼬리 정맥을 통해 ^{124}I -18B10(0.74 MBq, 군당 200 μl)을, 위암 환자의 종양의 종양 조직을 중증 면역결핍 마우스(NSG)에 이식함으로써 형성된 환자 유래 이중이식편(PDX) 모델(클라우딘 18.2 과발현에 의해 확인됨, 북경 대학 암 병원의 위장 종양학과에 의해 제공됨)에 주사하였다. 생체분포 실험을, 시험군의 경우 PDX 마우스의 ^{124}I -18B10, 및 차단군의 경우 표지부착되지 않은 18B10(200 mg/마우스)과 함께 첨가된 ^{124}I -18B10을 포함하는 2개의 군으로 나누었다. 마우스의 심장, 간, 폐, 신장, 비장, 위, 뼈, 근육, 대장, 소장, 뇌 및 종양을 주사 후 240시간에서 분리하였다. 분쇄 후, 흡수 신호를 검출하고 γ 카운터로 분석하였고, ^{124}I -18B10 프로브의 ID%/g를 획득하였다.

[0543]

PDX 마우스(도 6)에서, 종양에서의 ^{124}I -18B10 흡수는 다른 군에 비해 가장 높았다. 표지부착되지 않은 18B10과의 경쟁으로 인해, 차단군은 정상 조직 및 종양 조직 둘 다에서 상당히 감소된 흡수를 보였다. 결과는 ^{124}I -18B10이 종양 세포에 농축되어 있음을 보여주는데, 이는 질환 진단에서의 그의 사용을 뒷받침한다.

[0544]

실시예 9 환자에서 CLDN18.2를 표적화하는 차세대 핵종 표지부착된 단일클론 항체(예를 들어, ^{124}I -18B10)의 맵핑

[0545]

조사 임상 연구에서, 클라우딘 18.2 발현 암으로 진단된 환자는 ^{124}I -18B10 PET/CT 영상화 전 또는 후 1주 이내에 ^{124}I -18B10 PET/CT 스캔 및 ^{18}F -FDG PET/CT를 받았다(정맥내 주사에 의해 환자당 11.1 내지 18.5 MBq). ^{124}I -18B10 PET 영상화를 위해, ^{124}I -18B10 투여 3일 전 및 7일 후에 루골(Lugol)의 요오드화칼륨(매회 10 방울, 1일 3회)을 복용하여 환자의 갑상선을 차단하였다. ^{124}I -18B10의 투여 후 2시간, 24시간, 72시간 및 96시간에서 지멘스 바이오그래프(Siemens Biograph) mCT 플로우 64 스캐너(독일 에를랑겐)로 ^{124}I -18B10 PET/CT 스캔을 수행하였다. 머리부터 발 또는 상부 허벅지까지 각각 2시간, 24시간, 48시간 및 72시간에서 0.8 mm/s, 0.5 mm/s, 0.4 mm/s, 0.3 mm/s 및 0.2 mm/s의 스캔 속도로 PET 영상을 획득하고, 순서화된 서브세트 기대 최대화 방법을 이용하여 재구성하였다.

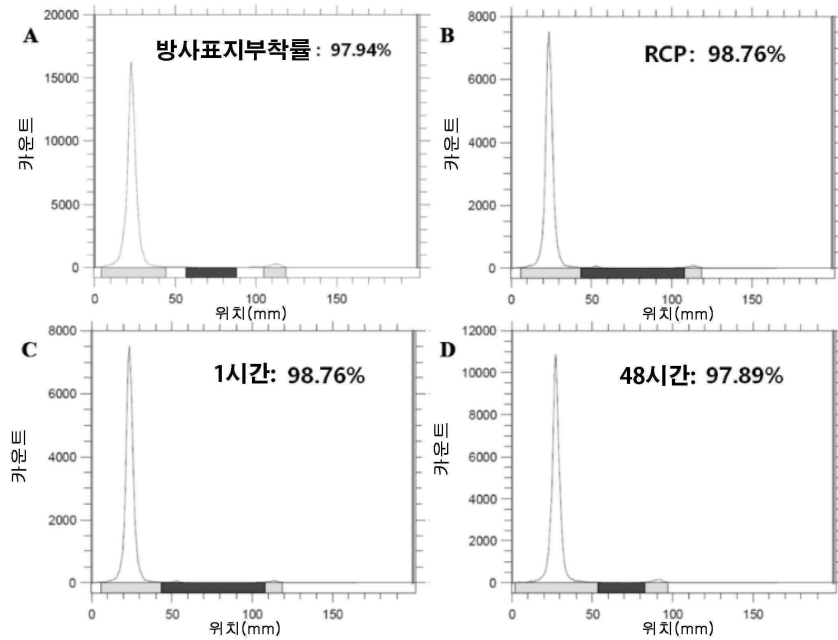
[0546]

처음 5명의 환자의 영상으로부터 환자의 ^{124}I -18B10의 생체분포를 도출하였다(도 7). 갑상선은 환자에서 충분히 차단되었다. 트레이서는 주사 후 혈액에 농축되었고 시간 경과에 따라 감소하였으며, 비장과 간에서의 농도는 시간 경과에 따라 증가하였다. 비장은 24시간, 48시간 및 72시간에서 가장 높은 활성을 가진 장기가 되었다. 신장에서도 트레이서 흡수가 있었고 뇌, 폐 및 뼈에서의 흡수는 낮았다. 정상 위벽에서는 명확한 트레이서 흡수가 관찰되지 않았다. 또한, 도 8은 클라우딘 18.2 발현 암이 난소로 전이된 환자의 난소 병변에서 ^{124}I -18B10이 축적되었음을 보여주었다. ^{18}F -FDG PET/CT 결과에 비해, ^{124}I -18B10 PET/CT 24시간 및 ^{124}I -18B10 PET/CT 48시간의 결과는 ^{124}I -18B10이 난소 병변 내의 클라우딘 18.2 발현 암 조직에서 더 높은 흡수를 가짐을 보여주었다(^{18}F -FDG PET/CT SUVmax: 3(왼쪽), 2.9(오른쪽); ^{124}I -18B10 PET/CT 24시간 SUVmax: 25.1(왼쪽), 22.2(오른쪽); ^{124}I -

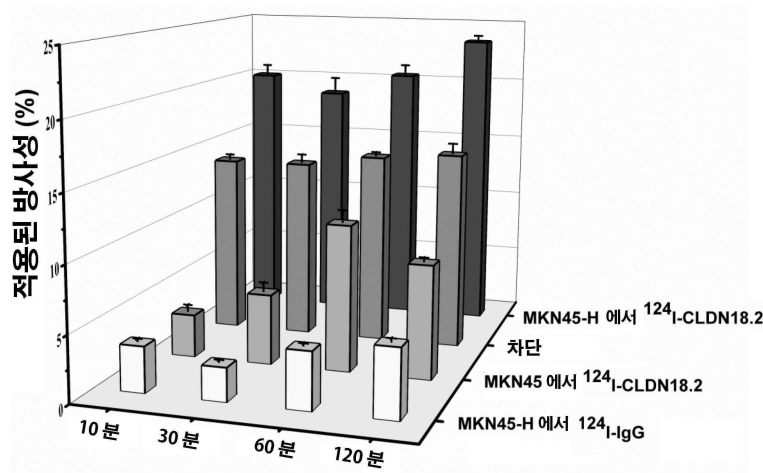
18B10 PET/CT 48시간 SUV_{max}: 12.5(왼쪽), 17.6(오른쪽)).

도면

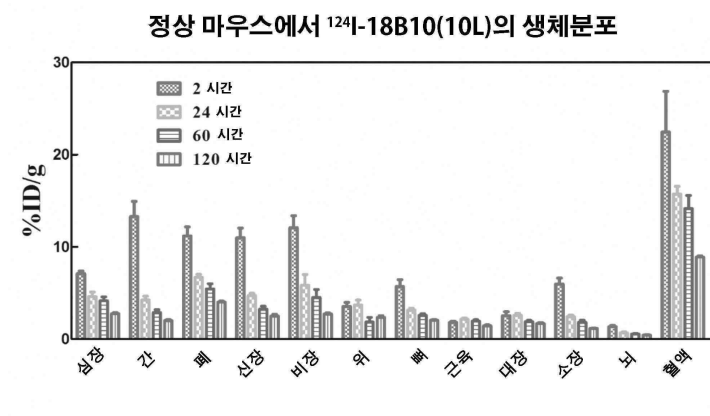
도면1



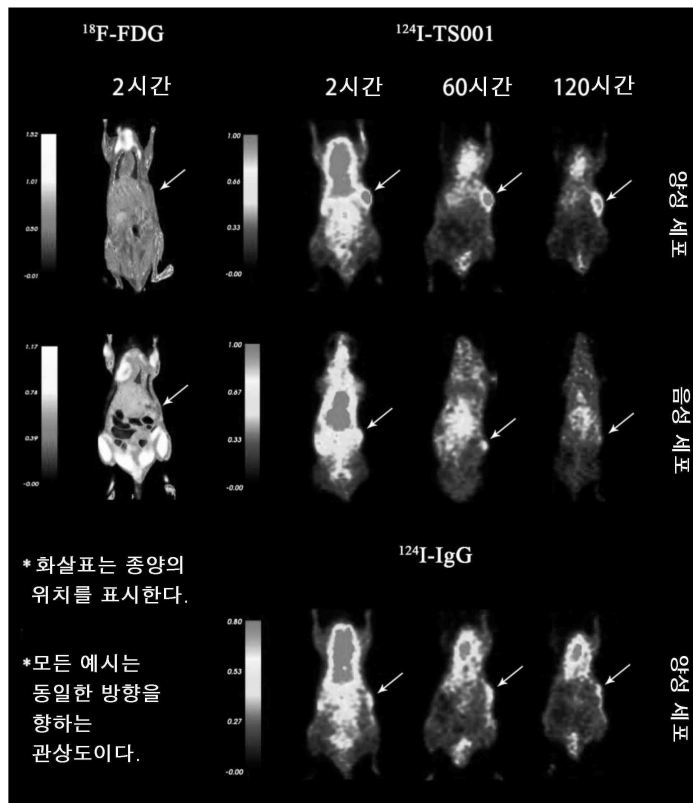
도면2



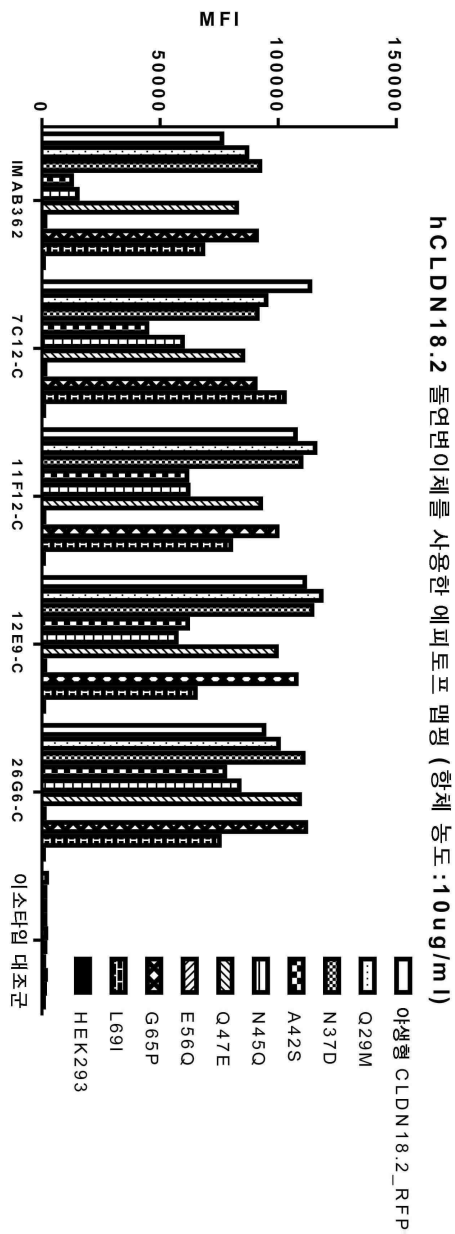
도면3



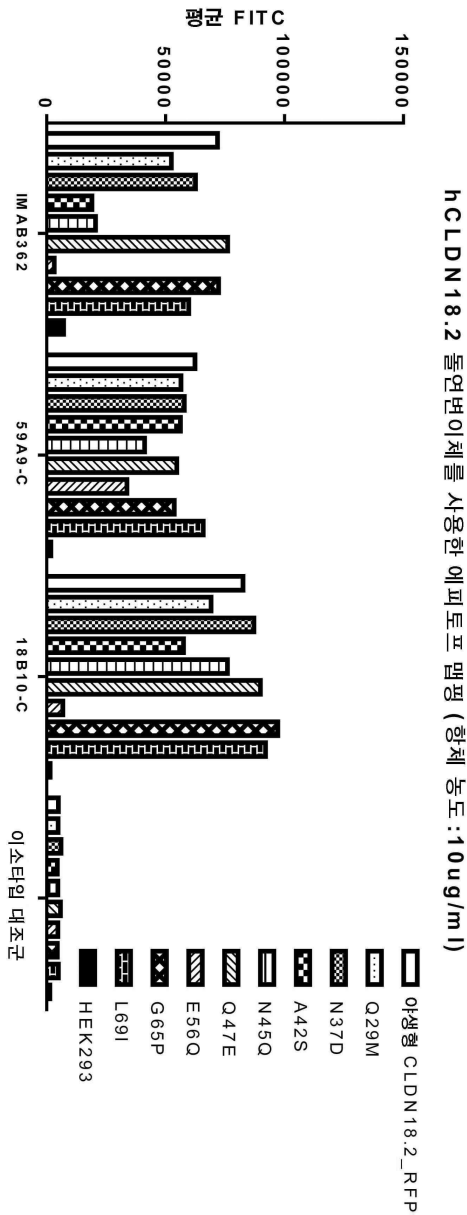
도면4



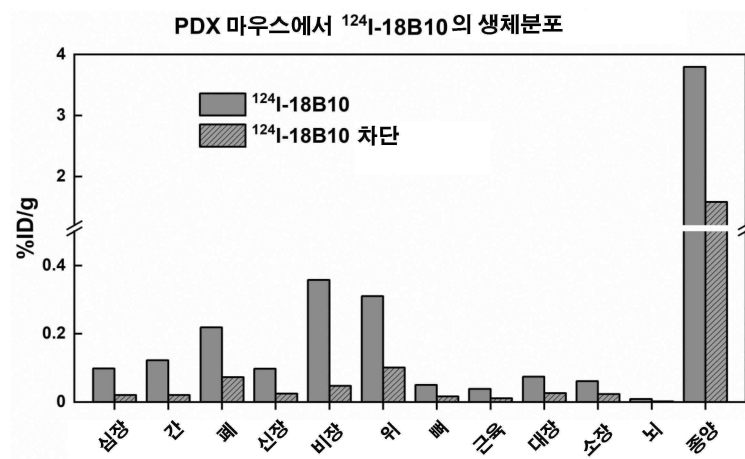
도면5a



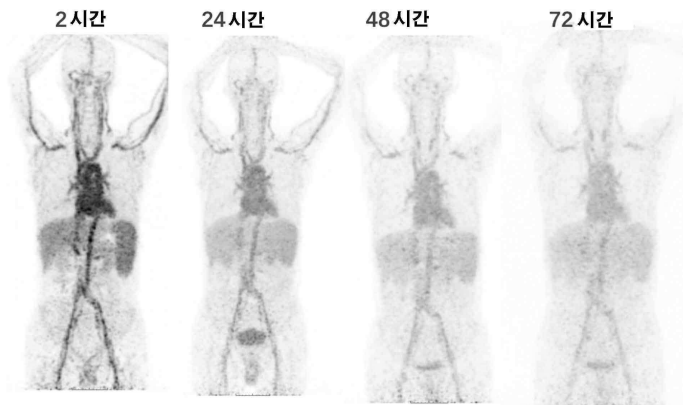
도면5b



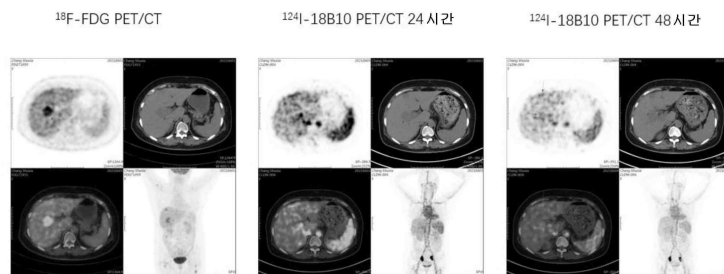
도면6



도면7



도면8



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> MabSpace Biosciences (Suzhou) Co., Limited

<120> ANTI-CLDN18.2 ANTIBODY CONJUGATES

<130> 063694-8008W003

<150> PCT/CN2021/076910

<151> 2021-02-19

<150> PCT/CN2022/074750

<151> 2022-01-28

<160> 73

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 1

Gly Tyr Asn Met Asn

1 5

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 2

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu

1 5 10 15

Thr

<210> 3

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 3

Asn Ile Asp Pro Tyr Tyr Gly Ala Thr Arg Tyr Asn Gln Lys Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 4

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 4

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser

1 5

<210> 5

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 5

Ser Tyr Tyr Gly Asn Ala Phe Asp Tyr

1 5

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 6

Gln Asn Asp Tyr Ser Phe Pro Phe Thr

1 5

<210> 7

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 7

Tyr Ile Asp Pro Tyr Tyr Gly Gly Thr Arg Tyr Asn Gln Lys Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 8

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 8

Gln Asn Asp Tyr Ser Tyr Pro Phe Thr

1 5

<210> 9

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 9

His Ile Asp Pro Tyr Tyr Val Thr Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe Arg

1 5 10 15

Gly

<210> 10

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 10

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Phe Asn Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu

1 5 10 15

Thr

<210> 11

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 11

Ser Phe Tyr Gly Asn Ala Phe Asp Tyr

1 5

<210> 12

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 12

Gln Asn Asp Tyr Tyr Tyr Pro Leu Thr

1 5

<210> 13

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 13

Thr Tyr Phe Ile Gly Val Gly

1 5

<210> 14

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 14

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser Gly Asn Leu Lys Asn Tyr Leu

1 5 10 15

Thr

<210> 15

<211> 16

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 15

His Ile Trp Trp Asn Asp Asn Lys Tyr Tyr Asn Thr Ala Leu Lys Ser

1 5 10 15

<210> 16

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 16

Trp Ala Ser Thr Arg Lys Ser

1 5

<210> 17

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 17

Met Gly Ser Gly Ala Trp Phe Thr Tyr

1 5

<210> 18

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 18

Gln Asn Asp Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr

1 5

<210> 19

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 19

Asn Ile Asp Pro Tyr Tyr Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 20

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 20

Lys Ser Ser Gln Asn Leu Leu Asn Asn Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu

1 5 10 15

Thr

<210> 21

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 21

Met Tyr His Gly Asn Ala Phe Asp Tyr

1 5

<210> 22

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 22

Asn Ile Asp Pro Tyr Tyr Gly Gly Thr Arg Tyr Asn Gln Lys Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 23

<211> 98

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 23

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

1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr

20 25 30
Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45
Gly Ile Ile Asn Pro Ser Gly Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe

50 55 60
Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr

65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95
Ala Arg

<210> 24

<211> 95

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 24

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

1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Asn Asn Lys Asn Tyr

20 25 30

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

Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Thr Pro
85 90 95

<210> 25

<211> 118

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 25

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Asn Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Asn Ile Asp Pro Tyr Tyr Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe

50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Ile Asp Lys Ser Thr Ser Thr Val Tyr

65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Met Tyr His Gly Asn Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 26

<211> 113

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 26

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

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser

20 25 30

Gly Asn Leu Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45
 Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Lys Ser Gly Val
 50 55 60
 Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 65 70 75 80
 Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn
 85 90 95
 Asp Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile
 100 105 110
 Lys

<210> 27
 <211> 118
 <212> PRT

<213> Homo sapiens
 <400> 27

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr
 20 25 30
 Asn Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Asn Ile Asp Pro Tyr Tyr Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Val Thr Leu Thr Ile Asp Lys Ser Thr Ser Thr Val Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Met Tyr His Gly Asn Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Thr Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 28

<211> 113

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<

400> 28

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

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Met Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser

20 25 30

Gly Asn Leu Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln

35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Lys Ser Gly Val

50 55 60

Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr

65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn

85 90 95

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

100 105 110

Lys

<210> 29

<211> 118

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 29

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45
 Gly Asn Ile Asp Pro Tyr Tyr Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Val Thr Leu Thr Ile Asp Lys Ser Thr Ser Thr Val Tyr

 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Met Tyr His Gly Asn Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Thr Val Thr Val Ser Ser
 115
 <210> 30
 <211> 261
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 30
 Met Ala Val Thr Ala Cys Gln Gly Leu Gly Phe Val Val Ser Leu Ile

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

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

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

130

135

140

Thr Asn Phe Trp Met Ser Thr Ala Asn Met Tyr Thr Gly Met Gly Gly

145

150

155

160

Met Val Gln Thr Val Gln Thr Arg Tyr Thr Phe Gly Ala Ala Leu Phe

165

170

175

Val Gly Trp Val Ala Gly Gly Leu Thr Leu Ile Gly Gly Val Met Met

180

185

190

Cys Ile Ala Cys Arg Gly Leu Ala Pro Glu Glu Thr Asn Tyr Lys Ala

195

200

205

Val Ser Tyr His Ala Ser Gly His Ser Val Ala Tyr Lys Pro Gly Gly

210

215

220

Phe Lys Ala Ser Thr Gly Phe Gly Ser Asn Thr Lys Asn Lys Lys Ile

225

230

235

240

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

245

250

255

Lys His Asp Tyr Val

260

<210

> 31

<211> 261

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 31

Met Ser Thr Thr Thr Cys Gln Val Val Ala Phe Leu Leu Ser Ile Leu

1

5

10

15

Gly Leu Ala Gly Cys Ile Ala Ala Thr Gly Met Asp Met Trp Ser Thr

20

25

30

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

35

40

45

Leu Trp Arg Ser Cys Val Arg Gln Ser Ser Gly Phe Thr Glu Cys Arg

50

55

60

Pro Tyr Phe Thr Ile Leu Gly Leu Pro Ala Met Leu Gln Ala Val Arg
65 70 75 80
Ala Leu Met Ile Val Gly Ile Val Leu Gly Ala Ile Gly Leu Leu Val
85 90 95
Ser Ile Phe Ala Leu Lys Cys Ile Arg Ile Gly Ser Met Glu Asp Ser
100 105 110
Ala Lys Ala Asn Met Thr Leu Thr Ser Gly Ile Met Phe Ile Val Ser
115 120 125
Gly Leu Cys Ala Ile Ala Gly Val Ser Val Phe Ala Asn Met Leu Val
130 135 140
Thr Asn Phe Trp Met Ser Thr Ala Asn Met Tyr Thr Gly Met Gly Gly
145 150 155 160
Met Val Gln Thr Val Gln Thr Arg Tyr Thr Phe Gly Ala Ala Leu Phe
165 170 175
Val Gly Trp Val Ala Gly Gly Leu Thr Leu Ile Gly Gly Val Met Met
180 185 190
Cys Ile Ala Cys Arg Gly Leu Ala Pro Glu Glu Thr Asn Tyr Lys Ala
195 200 205
Val Ser Tyr His Ala Ser Gly His Ser Val Ala Tyr Lys Pro Gly Gly
210 215 220
Phe Lys Ala Ser Thr Gly Phe Gly Ser Asn Thr Lys Asn Lys Lys Ile
225 230 235 240
Tyr Asp Gly Gly Ala Arg Thr Glu Asp Glu Val Gln Ser Tyr Pro Ser
245 250 255
Lys His Asp Tyr Val
260
<210> 32
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> synthesic
<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> Xaa can be Asn, Tyr or His

<220><221> misc_feature

<222> (7)..(7)

<223> Xaa can be Gly or Val.

<220><221> misc_feature

<222> (8)..(8)

<223> Xaa can be Ala, Gly or Thr.

<220><221> misc_feature

<222> (10)..(10)

<223> Xaa can be Arg, Thr or Ser.

<220><221> misc_feature

<222> (16)..(16)

<223> Xaa can be Lys or Arg.

<400> 32

Xaa Ile Asp Pro Tyr Tyr Xaa Xaa Thr Xaa Tyr Asn Gln Lys Phe Xaa

1 5 10 15

Gly

<210> 33

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthesic

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> Xaa can be Ser or Met.

<220><221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> Xaa can be Tyr or Phe.

<220><221> misc_feature

<222> (3)..(3)

<223> Xaa can be Tyr or His.

<400> 33

Xaa Xaa Xaa Gly Asn Ala Phe Asp Tyr

1 5

<210> 34

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthesic

<220><221> misc_feature

<222> (5)..(5)

<223> Xaa can be Ser or Asn.

<220><221> misc_feature

<222> (7)..(7)

<223> Xaa can be Leu or Phe.

<220><221> misc_feature

<222> (9)..(9)

<223> Xaa can be Ser or Asn.

<220><221> misc_feature

<222> (12)..(12)

<223> Xaa can be Gln or Leu.

<400> 34

Lys Ser Ser Gln Xaa Leu Xaa Asn Xaa Gly Asn Xaa Lys Asn Tyr Leu

1 5 10 15

Thr

<210> 35

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthesic

<220><221> misc_feature

<222> (6)..(6)

<223> Xaa can be Glu or Lys.

<400> 35

Trp Ala Ser Thr Arg Xaa Ser

1 5

<210> 36

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthesic

<220><221> misc_faecture

<222> (5)..(5)

<223> Xaa can be Ser or Tyr.

<220><221> misc_faecture

<222> (6)..(6)

<223> Xaa can be Phe or Tyr.

<220><221> misc_faecture

<222> (8)..(8)

<223> Xaa can be Phe or Leu.

<400> 36

Gln Asn Asp Tyr Xaa Xaa Pro Xaa Thr

1 5

<210> 37

<211> 118

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 37

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

1 5 10 15

Ser Val Arg Ile Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr

20 25 30

Asn Met Asn Trp Val Lys Gln Ser Asn Gly Glu Ser Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Asn Ile Asp Pro Tyr Tyr Gly Ala Thr Arg Tyr Asn Gln Lys Phe

50 55 60

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

Met Gln Leu Lys Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys

Ala Arg Ser Tyr Tyr Gly Asn Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

Thr Leu Thr Val Ser Ser

115

<210> 38

<211> 113

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 38

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

1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser

20 25 30

Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln

35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val

50 55 60

Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr

65 70 75 80

Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn

85 90 95

Asp Tyr Ser Phe Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile

100 105 110

Lys

<210> 39

<211> 118

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 39

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

1 5 10 15

Ser Val Arg Ile Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr

20 25 30

Asn Met Asn Trp Val Lys Gln Ser Asn Gly Glu Ser Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Tyr Ile Asp Pro Tyr Tyr Gly Gly Thr Arg Tyr Asn Gln Lys Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

Met Gln Leu Lys Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Ser Tyr Tyr Gly Asn Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110

Thr Leu Thr Val Ser Ser

115

<210> 40

<211> 113

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 40

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

1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser

20 25 30

Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln

35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val

50 55 60

Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr

65 70 75 80

Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn
85 90 95

Asp Tyr Ser Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile
100 105 110

Lys

<210> 41

<211> 118

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 41

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

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

Asn Met Asn Trp Val Lys Gln Ser Asn Gly Gln Ser Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly His Ile Asp Pro Tyr Tyr Val Thr Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Ser Phe Tyr Gly Asn Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110

Thr Leu Thr Val Ser Ser

115

<210> 42

<211> 113

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 42

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Thr Val Thr Ala Gly
1 5 10 15
Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Phe Asn Ser
20 25 30
Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45
Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60
Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80
Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn
85 90 95
Asp Tyr Ser Phe Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile
100 105 110
Lys

<210> 43

<211> 119

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 43

Gln Ile Thr Gln Lys Glu Ser Gly Pro Gly Ile Leu Gln Pro Ser Gln
1 5 10 15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Leu Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Tyr
20 25 30
Phe Ile Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45
Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asn Asp Asn Lys Tyr Tyr Asn Thr Ala
50 55 60
Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Asn Asn Gln Val
65 70 75 80
Phe Leu Lys Ile Ala Ser Val Asp Thr Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr

85 90 95
Cys Ala Arg Met Gly Ser Gly Ala Trp Phe Thr Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ala

115
<210> 44
<211> 113
<212> PRT
<213> Mus musculus
<400> 44

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

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

Lys

<210> 45
<211> 118
<212> PRT
<213> Mus musculus
<400> 45

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

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

 50 55 60
 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Gln Leu Lys Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Met Tyr His Gly Asn Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Thr Leu Thr Val Ser Ser
 115

<210> 46

<211> 113

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 46

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

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

Asp Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu
100 105 110

Lys

<210> 47

<211> 118

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 47

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

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

<210> 48

<211> 113

<212> PRT

<213> Mus musculus

<

400> 48

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

Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Asn Leu Leu Asn Asn
20 25 30
Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45
Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

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

<210> 49

<211> 330

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 49

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

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

65 70 75 80
Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95
Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys

100	105	110	
Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro			
115	120	125	
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys			
130	135	140	
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp			
145	150	155	160
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu			
165	170	175	
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu			
180	185	190	
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn			
195	200	205	
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly			
210	215	220	
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu			
225	230	235	240
Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr			
245	250	255	
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn			
260	265	270	
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe			
275	280	285	
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn			
290	295	300	
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr			
305	310	315	320
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys			
325	330		

<210> 50

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 50

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln

35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser

50 55 60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu

65 70 75 80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser

85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

100 105

<210> 51

<211> 330

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthesic

<400> 51

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65						70						75						80	
Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys				
					85					90					95				
Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys				
					100					105					110				
Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Val	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Leu	Pro	Pro				
					115					120					125				
Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys				
					130					135					140				
Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp				
145					150					155					160				
Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Pro	Glu				
					165					170					175				
Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Leu	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu				
					180					185					190				
His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn				
195					200					205									
Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly				
210					215					220									
Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu				
225					230					235					240				
Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr				
					245					250					255				
Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn				
260					265					270									
Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Leu	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe				
275					280					285									
Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn				
290					295					300									
Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr				
305					310					315					320				

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

325 330

<210> 52

<211> 486

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 52

Met Ser Thr Thr Thr Cys Gln Val Val Ala Phe Leu Leu Ser Ile Leu

1 5 10 15

Gly Leu Ala Gly Cys Ile Ala Ala Thr Gly Met Asp Met Trp Ser Thr

20 25 30

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

35 40 45

Leu Trp Arg Ser Cys Val Arg Gln Ser Ser Gly Phe Thr Glu Cys Arg

50 55 60

Pro Tyr Phe Thr Ile Leu Gly Leu Pro Ala Met Leu Gln Ala Val Arg

65 70 75 80

Ala Leu Met Ile Val Gly Ile Val Leu Gly Ala Ile Gly Leu Leu Val

85 90 95

Ser Ile Phe Ala Leu Lys Cys Ile Arg Ile Gly Ser Met Glu Asp Ser

100 105 110

Ala Lys Ala Asn Met Thr Leu Thr Ser Gly Ile Met Phe Ile Val Ser

115 120 125

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

130 135 140

Thr Asn Phe Trp Met Ser Thr Ala Asn Met Tyr Thr Gly Met Gly Gly

145 150 155 160

Met Val Gln Thr Val Gln Thr Arg Tyr Thr Phe Gly Ala Ala Leu Phe

165 170 175

Val Gly Trp Val Ala Gly Gly Leu Thr Leu Ile Gly Gly Val Met Met

180 185 190

Cys Ile Ala Cys Arg Gly Leu Ala Pro Glu Glu Thr Asn Tyr Lys Ala

195	200	205	
Val Ser Tyr His Ala Ser Gly His Ser Val Ala Tyr Lys Pro Gly Gly			
210	215	220	
Phe Lys Ala Ser Thr Gly Phe Gly Ser Asn Thr Lys Asn Lys Lys Ile			
225	230	235	240
Tyr Asp Gly Gly Ala Arg Thr Glu Asp Glu Val Gln Ser Tyr Pro Ser			
245	250	255	
Lys His Asp Tyr Val Met Ala Ser Ser Glu Asp Val Ile Lys Glu Phe			
260	265	270	
Met Arg Phe Lys Val Arg Met Glu Gly Ser Val Asn Gly His Glu Phe			
275	280	285	
Glu Ile Glu Gly Glu Gly Glu Gly Arg Pro Tyr Glu Gly Thr Gln Thr			
290	295	300	
Ala Lys Leu Lys Val Thr Lys Gly Gly Pro Leu Pro Phe Ala Trp Asp			
305	310	315	320
Ile Leu Ser Pro Gln Phe Gln Tyr Gly Ser Lys Ala Tyr Val Lys His			
325	330	335	
Pro Ala Asp Ile Pro Asp Tyr Leu Lys Leu Ser Phe Pro Glu Gly Phe			
340	345	350	
Lys Trp Glu Arg Val Met Asn Phe Glu Asp Gly Gly Val Val Thr Val			
355	360	365	
Thr Gln Asp Ser Ser Leu Gln Asp Gly Glu Phe Ile Tyr Lys Val Lys			
370	375	380	
Leu Arg Gly Thr Asn Phe Pro Ser Asp Gly Pro Val Met Gln Lys Lys			
385	390	395	400
Thr Met Gly Trp Glu Ala Ser Thr Glu Arg Met Tyr Pro Glu Asp Gly			
405	410	415	
Ala Leu Lys Gly Glu Ile Lys Met Arg Leu Lys Leu Lys Asp Gly Gly			
420	425	430	
His Tyr Asp Ala Glu Val Lys Thr Thr Tyr Met Ala Lys Lys Pro Val			
435	440	445	

Gln Leu Pro Gly Ala Tyr Lys Thr Asp Ile Lys Leu Asp Ile Thr Ser
450 455 460
His Asn Glu Asp Tyr Thr Ile Val Glu Gln Tyr Glu Arg Ala Glu Gly
465 470 475 480
Arg His Ser Thr Gly Ala
485
<210> 53
<211> 486
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400>
> 53
Met Ala Val Thr Ala Cys Gln Gly Leu Gly Phe Val Val Ser Leu Ile
1 5 10 15
Gly Ile Ala Gly Ile Ile Ala Ala Thr Cys Met Asp Gln Trp Ser Thr
20 25 30
Gln Asp Leu Tyr Asn Asn Pro Val Thr Ala Val Phe Asn Tyr Gln Gly
35 40 45
Leu Trp Arg Ser Cys Val Arg Glu Ser Ser Gly Phe Thr Glu Cys Arg
50 55 60

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

Gly Leu Cys Ala Ile Ala Gly Val Ser Val Phe Ala Asn Met Leu Val
130 135 140
Thr Asn Phe Trp Met Ser Thr Ala Asn Met Tyr Thr Gly Met Gly Gly
145 150 155 160
Met Val Gln Thr Val Gln Thr Arg Tyr Thr Phe Gly Ala Ala Leu Phe

165 170 175
 Val Gly Trp Val Ala Gly Gly Leu Thr Leu Ile Gly Gly Val Met Met
 180 185 190

 Cys Ile Ala Cys Arg Gly Leu Ala Pro Glu Glu Thr Asn Tyr Lys Ala
 195 200 205
 Val Ser Tyr His Ala Ser Gly His Ser Val Ala Tyr Lys Pro Gly Gly
 210 215 220
 Phe Lys Ala Ser Thr Gly Phe Gly Ser Asn Thr Lys Asn Lys Lys Ile
 225 230 235 240
 Tyr Asp Gly Gly Ala Arg Thr Glu Asp Glu Val Gln Ser Tyr Pro Ser
 245 250 255

 Lys His Asp Tyr Val Met Ala Ser Ser Glu Asp Val Ile Lys Glu Phe
 260 265 270
 Met Arg Phe Lys Val Arg Met Glu Gly Ser Val Asn Gly His Glu Phe
 275 280 285
 Glu Ile Glu Gly Glu Gly Glu Gly Arg Pro Tyr Glu Gly Thr Gln Thr
 290 295 300
 Ala Lys Leu Lys Val Thr Lys Gly Gly Pro Leu Pro Phe Ala Trp Asp
 305 310 315 320

 Ile Leu Ser Pro Gln Phe Gln Tyr Gly Ser Lys Ala Tyr Val Lys His
 325 330 335
 Pro Ala Asp Ile Pro Asp Tyr Leu Lys Leu Ser Phe Pro Glu Gly Phe
 340 345 350
 Lys Trp Glu Arg Val Met Asn Phe Glu Asp Gly Gly Val Val Thr Val
 355 360 365
 Thr Gln Asp Ser Ser Leu Gln Asp Gly Glu Phe Ile Tyr Lys Val Lys
 370 375 380

 Leu Arg Gly Thr Asn Phe Pro Ser Asp Gly Pro Val Met Gln Lys Lys
 385 390 395 400
 Thr Met Gly Trp Glu Ala Ser Thr Glu Arg Met Tyr Pro Glu Asp Gly
 405 410 415

Ala Leu Lys Gly Glu Ile Lys Met Arg Leu Lys Leu Lys Asp Gly Gly
 420 425 430
 His Tyr Asp Ala Glu Val Lys Thr Thr Tyr Met Ala Lys Lys Pro Val
 435 440 445

Gln Leu Pro Gly Ala Tyr Lys Thr Asp Ile Lys Leu Asp Ile Thr Ser
 450 455 460
 His Asn Glu Asp Tyr Thr Ile Val Glu Gln Tyr Glu Arg Ala Glu Gly
 465 470 475 480
 Arg His Ser Thr Gly Ala
 485

<210> 54

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthesic

<220><221> misc_feature

<222> (28)..(28)

<223> Xaa can be Thr or Ser.

<400> 54

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 55

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthesic

<220><221> misc_faecture

<222> (3)..(3)

<223> Xaa can be Arg or Lys.

<220><221> misc_faecture

<222> (13)..(13)

<223> Xaa can be Met or Ile.

<400> 55

Trp Val Xaa Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Xaa Gly

1 5 10

<210> 56

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthesic

<220><221> misc_feature

<222> (4)..(4)

<223> Xaa can be Met or Leu.

<400> 56

Arg Val Thr Xaa Thr Ile Asp Lys Ser Thr Ser Thr Val Tyr Met Glu

1 5 10 15

Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg

20 25 30

<210> 57

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 57

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 58

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthesic

<220><221> misc_feature

<222> (21)..(21)

<223> Xaa can be Ile or Met.

<400> 58

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

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Xaa Asn Cys

20

<210> 59

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 59

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

1 5 10 15

<210> 60

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthesic

<220><221> misc_feature

<222> (7)..(7)

<223> Xaa can be Ser or Thr.

<400> 60

Gly Val Pro Asp Arg Phe Xaa Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr

1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys

20 25 30

<210> 61

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 61

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

1 5 10

<210> 62

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 62

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 63

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 63

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 64

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 64

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

1 5 10

<210>

> 65

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 65

Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly

1 5 10

<210> 66

<211> 32

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 66

Arg Val Thr Met Thr Ile Asp Lys Ser Thr Ser Thr Val Tyr Met Glu

1 5 10 15

Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg

20 25 30

<210> 67

<211> 32

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 67

Arg Val Thr Leu Thr Ile Asp Lys Ser Thr Ser Thr Val Tyr Met Glu

1 5 10 15

Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg

20 25 30

<210> 68

<211> 23

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 68

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

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys

20

<210> 69

<211> 23

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 69

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

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Met Asn Cys

20

<210> 70

<211> 32

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 70

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr

1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys

20 25 30

<210> 71

<211> 32

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 71

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr

1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys

20 25 30

<210> 72

<211> 118

<212> PRT

<213>

Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 72

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gly Asn Ile Tyr Pro Ser Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe

50

55

60

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

<210> 73

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthesic

<400> 73

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Thr Val Thr Ala Gly
1 5 10 15
Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
20 25 30
Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45
Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60
Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80
Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn
85 90 95
Asp Tyr Ser Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile
100 105 110
Lys