



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2022년01월18일
(11) 등록번호 10-2352573
(24) 등록일자 2022년01월13일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) A61K 45/06 (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C07K 16/28 (2013.01)
A61K 39/39558 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2016-7030748
- (22) 출원일자(국제) 2015년04월02일
심사청구일자 2020년01월28일
- (85) 번역문제출일자 2016년11월02일
- (65) 공개번호 10-2016-0142360
- (43) 공개일자 2016년12월12일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2015/024162
- (87) 국제공개번호 WO 2015/153916
국제공개일자 2015년10월08일
- (30) 우선권주장
61/975,589 2014년04월04일 미국(US)
62/081,497 2014년11월18일 미국(US)
- (56) 선행기술조사문헌
W02013067055 A1
W02013149159 A1*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

- (73) 특허권자
바이오노믹스 인코포레이티드
미합중국 캘리포니아 92121, 샌디에고 세인트 107
소렌토 밸리 로드 11585
- (72) 발명자
레예스 크리스토퍼
미합중국 캘리포니아 92121, 샌디에고 세인트 107
소렌토 밸리 로드 11585
츄 피터
미합중국 캘리포니아 92121, 샌디에고 세인트 107
소렌토 밸리 로드 11585
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
이명진

전체 청구항 수 : 총 7 항

심사관 : 박정민

(54) 발명의 명칭 LGR5에 결합하는 인간화된 항체들

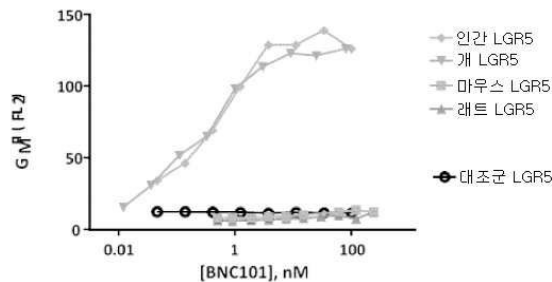
(57) 요약

LGR5에 결합하는 인간화된 항체들

요약

여기에 개시된 것은 암의 치료를 위한 인간화된 항-LGR5 항체들이다. 여기에 개시된 항체들은 LGR5-RSP01 결합 또는 신호전달을 방해하는 것 없이 LGR5에 결합할 수 있고, 그리고 RSP01에 독립적인 Wnt를 통하여 LGR5 신호전달을 방해할 수 있다. 또한, 예를 들어 LGR5-RSP01 결합 또는 신호전달의 방해 없이 LGR5의 결합을 위한 무거운 그리고 가벼운 사슬 폴리펩타이드 서열들이 개시된다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 45/06 (2013.01)
C07K 16/30 (2013.01)
A61K 2039/505 (2013.01)
C07K 2317/21 (2013.01)
C07K 2317/24 (2013.01)
C07K 2317/33 (2013.01)
C07K 2317/34 (2013.01)
C07K 2317/73 (2013.01)
C07K 2317/732 (2013.01)

(72) 발명자

스미스 크리스틴 엠

미합중국 캘리포니아 92121, 샌디에고 세인트 107
소렌토 벨리 로드 11585

캠벨 리오우밀라 에이

미합중국 캘리포니아 92121, 샌디에고 세인트 107
소렌토 벨리 로드 11585

쇼제이 파보드

미합중국 캘리포니아 92121, 샌디에고 세인트 107
소렌토 벨리 로드 11585

노튼 존 토마스

미합중국 캘리포니아 92121, 샌디에고 세인트 107
소렌토 벨리 로드 11585

명세서

청구범위

청구항 1

G-단백질-커플링된 수용체 5 (LGR5)를 포함하는 류신-풍부 반복에 특이적으로 결합하는, 인간화된 단일클론 항체로서,

상기 항체는 서열번호: 19로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 무거운 사슬 가변 도메인 및 서열번호: 21로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 가벼운 사슬 가변 도메인을 포함하는, 인간화된 단일클론 항체.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 항체는 LGR5 (서열번호: 47)의 아미노산 T175, E176, Q180, R183, S186, A187, Q189, D247, E248, T251, R254, S257, N258, K260 내 에피토프에 결합하는 것을 특징으로 하는, 인간화된 단일클론 항체.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 항체는 LGR5-RSPO(R-Spondin) 결합을 방해하지 않는 것을 특징으로 하는, 인간화된 단일클론 항체.

청구항 4

제1항의 항체 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 암 치료용 약학적 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 조성물은 화학요법 제제를 더 포함하는 것을 특징으로 하는, 암 치료용 약학적 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 화학요법 제제는 폴린산, 플루오로우라실, 이리노테칸, 켈시타빈 및 아브라칸으로 이루어진 군으로부터 선택된 것을 특징으로 하는, 암 치료용 약학적 조성물.

청구항 7

제4항에 있어서,

상기 암은 결장 암, 결장직장(colorectal) 암, 췌장 암, 유방암, 및 폐암으로 이루어진 군으로부터 선택된 것을 특징으로 하는, 암 치료용 약학적 조성물.

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

- 청구항 24
- 삭제
- 청구항 25
- 삭제
- 청구항 26
- 삭제
- 청구항 27
- 삭제
- 청구항 28
- 삭제
- 청구항 29
- 삭제
- 청구항 30
- 삭제
- 청구항 31
- 삭제
- 청구항 32
- 삭제
- 청구항 33
- 삭제
- 청구항 34
- 삭제
- 청구항 35
- 삭제
- 청구항 36
- 삭제
- 청구항 37
- 삭제
- 청구항 38
- 삭제
- 청구항 39
- 삭제

- 청구항 40
삭제
- 청구항 41
삭제
- 청구항 42
삭제
- 청구항 43
삭제
- 청구항 44
삭제
- 청구항 45
삭제
- 청구항 46
삭제
- 청구항 47
삭제
- 청구항 48
삭제
- 청구항 49
삭제
- 청구항 50
삭제
- 청구항 51
삭제
- 청구항 52
삭제
- 청구항 53
삭제
- 청구항 54
삭제
- 청구항 55
삭제

- 청구항 56
- 삭제
- 청구항 57
- 삭제
- 청구항 58
- 삭제
- 청구항 59
- 삭제
- 청구항 60
- 삭제
- 청구항 61
- 삭제
- 청구항 62
- 삭제
- 청구항 63
- 삭제
- 청구항 64
- 삭제
- 청구항 65
- 삭제
- 청구항 66
- 삭제
- 청구항 67
- 삭제
- 청구항 68
- 삭제
- 청구항 69
- 삭제
- 청구항 70
- 삭제
- 청구항 71
- 삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 보통 암 생물학의 영역에 대한 것이다. 더욱 특히, 예들은 인간화된 항체들 및 이러한 항체들의 이용들에 대한 것이다. 몇몇 예들은 LGR5에 대한 단일클론, 인간화된 또는 완전히 인간 항체들, 하이브리도마들(hybridomas) 또는 이러한 항체들을 발현시키는 다른 세포주들, 핵산들 및 이러한 항체들을 코딩하는 핵산들을 포함하는 벡터들 및 이러한 항체들로 암 줄기 세포 성장을 차단하는 방법들에 대한 것이다.

배경 기술

[0002] GPR49/HG38/FEX로도 알려진, G-단백질-커플링된(coupled) 수용체(receptor) 5 (LGR5)을 포함하는 류신-풍부 반복은 당단백질 호르몬 수용체들과 구조적으로 유사한 수용체 단백질들의 G-단백질-커플링된(coupled) 수용체(receptor) (LGR) / G-단백질-커플링된(coupled) 수용체(Receptor) (GPR) 단백질 패밀리를 포함하는 류신(leucine)-풍부 반복(repeat)에 속한다. LGR들은 3 개의 하위 그룹들로 나뉜다: (1) 갑상선-자극 호르몬 (TSH) 수용체, 여포-자극 호르몬 (FSH) 수용체, 및 황체 형성 호르몬 (LH) 수용체를 포함하는 당단백질 호르몬 수용체들; (2) 릴랙신(relaxin) 수용체들 LGR7 및 LGR8; 및 (3) LRG4, LGR5, 및 LGR6. LGR5는 창자, 골격근, 태반, 뇌 및 척수를 포함하는 몇몇 조직들에서 발현된다.

도면의 간단한 설명

- [0003] 도 1은 인간화된 단일클론 항체 18G7H6A3의 인간 LGR5에 대한 직접적인 FACS 결합을 보여주는 그래프이다 (CHO).
- 도 2는 FOLFIRI, 단독 및 18G7H6A3와의 조합이 CT3 CRC 종양 부피에 미치는 영향을 보여주는 그래프이다.
- 도 3은 18G7H6A3 처리가 MDA-MB-231-LM3 원발성(primary) 종양 부피를 상당히 감소시켰다는 것을 보여주는 그래프이다.
- 도 4는 CT1, 또는 CT3 종양들을 지닌 마우스들에서 FolFiri 처리가 LGR5의 상향조절을 야기한다는 것을 보여주는 그래프를 묘사한다.
- 도 5는 화학요법이 JH109 종양들에서 LGR5의 (4 배보다 많은) 상향조절을 야기한다는 것을 보여주는 막대 그래프이다.
- 도 6은 화학요법 (젠타빈)과 조합하여 투여될 때 관찰되는 18G7H6A3의 중요한 활성을 보여주는 그래프이다.
- 도 7은 항체 18G7H6A3가 CT1 암 줄기 세포 군집에서 살아있는(live) 이벤트들(events)의 수를 감소시키는 것을 보여주는 포인트 도표이다.
- 도 8은 FOLFIRI과 조합으로 항-LGR5 항체 18G7H6A3로 처리된 마우스들로부터 분리된 세포들이 FOLFIRI 단독으로 처리된 마우스들로부터 분리된 세포들에 비하여 훨씬 감소된 종양형성(tumorigenicity)을 가졌다는 것을 보여주는 선 그래프이다.
- 도 9는 18G7H6A3 FOLFIRI 조합으로부터 재-이식된 세포들이 진행까지 상당히 지연된 시간을 가졌다는 것을 보여주는 선 그래프이다.
- 도 10은 화학요법 (FOLFIRI)과 조합으로 예방적으로 투여될 때 인간화된 항체 18G7H6A3의 중요한 활성이 관찰된다는 것을 보여주는 선 그래프이다.
- 도 11은 항체 18G7H6A3가 포스포(phospho)-Thr41/Ser45-β-카테닌 면역학적 검정들에 의하여 표시되는 대로 인 비보에서 종양 세포들에서 Wnt 신호전달을 억제할 수 있다는 것을 보여주는 포인트 도표이다.
- 도 12는 가용성 항체 18G7H6A3의 증가하는 농도들이 Wnt3a 플러스 RSP02의 조합에 의하여 TCF/LEF 프로모터 추진된 GFP 발현의 유도에 영향을 미치지 않고, 이는 항-LGR5 항체 18G7H6A3가 RSP0-추진된 TCF/LEF 프로모터 활성화를 차단하지 않는다는 것을 입증한다는 것을 보여주는 막대 차트이다.
- 양성 대조군 항체 C12는 Wnt3a/RSP02 추진된 TCF/LEF 프로모터 활성화를 억제하는 것으로 보여진다.
- 도 13는 R-스폰딘이 LGR5에 항체 18G7H6A3 결합을 차단하지 않는다는 것을 보여주는 선 그래프이다.

도 14는 LGR5에의 항체 18G7H6A3 결합이 삼원 복합체의 형성을 억제한다는 것을 보여주는 막대 차트이다.

도 15는 처리된 샘플들에서 LGR5 발현의 수준들을 묘사한다.

도 16은 처리된 샘플들에서 CTNNB1 발현, 및 p-β-카테닌 발현의 수준들을 묘사한다.

도 17은 여러가지 처리된 샘플들에서 다르게 발현된 전사체들을 묘사한다.

도 18은 18G7H6A3- (BNC101) 처리된 종양들에서 다르게 발현된 유전자들을 묘사한다.

도 19는 FOLFIRI 처리된 종양들에서 다르게 발현된 유전자들을 묘사한다.

도 20은 조합-처리된 종양들에서 다르게 발현된 유전자들을 묘사한다.

도 21은 순환하는 HLA+ 세포들에서 LGR5의 수준을 묘사한다.

도 22A 및 도 22B는 순환하는 HLA+ 세포들에서 LGR5의 수준들을 묘사한다.

도 23은 켈시타빈/아브락산 또는 켈시타빈/아브락산 및 18G7H6A3으로 처리된 마우스들의 동물 생존을 보여주는 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0004] 관련된 출원들

[0005] 이 출원은 2014년 4월 4일 출원된 미국 가출원번호 61/975589 및 2014년 11월 18일 출원된 미국 가출원번호 62/081497의 이익을 주장하며, 그 내용들은 그 전체가 참조로서 여기에 포함된다.

[0006] 서열 목록에 대한 참고

[0007] 본 출원은 전자적 형태인 서열목록과 함께 출원된다. 서열목록은 거의 40 Kb 크기로, 2015년 4월 2일 만들어졌으며 BIONO10WO_SEQLISTING.TXT의 제목이 붙어진 파일로서 제공된다. 서열목록의 전자적 형태의 정보는 그 전체가 참조로서 여기에 포함된다.

[0008] 본 발명의 개요

[0009] 여기에 제공된 조성물, 방법들 및 키트들의 몇몇 예들은 LGR5에 결합하는 인간화된 또는 인간 단일클론 항체를 포함한다. 몇몇 예들에서, 항체는 서열번호:23 또는 그것의 보존적 변형들을 포함하는 중쇄 CDR1을 포함한다. 몇몇 예들에서, 항체는 서열번호:2 또는 그것의 보존적 변형들을 포함하는 무거운 사슬 CDR2을 포함한다. 몇몇 예들에서, 항체는 서열번호:3 또는 그것의 보존적 변형들을 포함하는 무거운 사슬 CDR3을 포함한다. 몇몇 예들에서, 항체는 서열번호:4 또는 그것의 보존적 변형들을 포함하는 가벼운(light) 사슬(chain) CDR1을 포함한다. 몇몇 예들에서, 항체는 아미노산들 LTS 또는 그것의 보존적 변형들을 갖는 가벼운 사슬 CDR2를 포함한다. 몇몇 예들에서, 항체는 서열번호:33 또는 그것의 보존적 변형들을 포함하는 가벼운 사슬 CDR3을 포함한다. 몇몇 예들에서, 항체는 서열번호들:19 또는 48을 포함하는 무거운 사슬 가변(variable) 도메인을 포함한다. 몇몇 예들에서, 항체는 서열번호들: 21 또는 49을 포함하는 가벼운 사슬 가변 도메인을 포함한다. 몇몇 예들에서, 항체는 LGR5 (서열번호:47)의 아미노산들 T175, E176, Q180, R183, S186, A187, Q189, D247, E248, T251, R254, S257, N258, K260 내 에피토프(epitope)에 결합(bind)한다. 몇몇 예들에서, 항체는 LGR5 (서열번호:47)의 류신 풍부 반복들(repeats) 6-9 내 에피토프에 결합한다. 몇몇 예들에서, 항체는 LGR5의 볼록(convex) 표면 상 에피토프에 결합한다. 몇몇 예들에서, 항체는 RSP0-LGR5 결합 부위에 결합하지 않는다. 몇몇 예들에서, 항체는 LGR5-RSP0 결합을 방해하지 않는다. 몇몇 예들에서, 항체는 LGR5-RSP0 신호전달(signaling)을 방해하지 않는다. 몇몇 예들에서, RSP0는 RSP01, RSP02, RSP03, 및 RSP04로 구성되는 군으로부터 선택된다. 몇몇 예들에서, 항체는 LGR5-RSP0-RNF43, LGR5-RSP0-ZNRF3, LGR5-RSP0-LRP6, LGR5-NORRIN-RNF43, LGR5-NORRIN-ZNRF3, LGR5-NORRIN-LRP6과 같은 복합체의 형성을 방해한다. 몇몇 예들에서, 항체는 Wnt/β-카테닌(catenin) 경로를 통하여 LGR5 신호전달을 방해한다. 몇몇 예들에서, 항체는 종양에서 분화 마커들의 발현을 유도한다. 몇몇 예들에서, 항체는 분화하기 위하여 종양에서 세포들을 유도할 수 있다. 몇몇 예들에서, 종양 성장을 억제하는 항체. 몇몇 예들에서, 항체는 종양에서 암 줄기 세포들의 빈도를 감소시킨다.

[0010] 여기에 제공된 조성물들, 방법들 및 키트들의 몇몇 예들은 앞서 말한 항체들 중 임의의 하나를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 분리된 폴리뉴클레오타이드 분자를 포함한다. 여기에 제공된 조성물들, 방법들 및 키트들의 몇몇 예들은 앞서 말한 폴리뉴클레오타이드들 중 임의의 하나를 포함하는 벡터를 포함한다. 여기에 제공

된 조성물들, 방법들 및 키트들의 몇몇 예들은 앞서 말한 벡터들 중 임의의 하나를 포함하는 숙주 세포를 포함한다. 여기에 제공된 조성물들, 방법들 및 키트들의 몇몇 예들은 앞서 말한 숙주 세포들 중 임의의 하나를 배양하는 단계를 포함하는 항체를 생산하는 방법을 포함하여, 항체가 생산된다.

- [0011] 여기에 제공된 조성물들, 방법들 및 키트들의 몇몇 예들은 약학적으로 허용가능한 담체 및 앞서 말한 항체들 중 임의의 하나를 포함하는 약학적 조성물을 포함한다.
- [0012] 여기에 제공된 조성물들, 방법들 및 키트들의 몇몇 예들은 대상에 앞서 말한 항체들 중 임의의 하나를 투여하는 단계를 포함하는 암을 가진 대상을 치료하는 방법을 포함한다. 몇몇 예들은 또한 항체와 조합하여 화학요법 제제를 투여하는 단계를 포함한다. 몇몇 예들에서, 화학요법 제제는 폴린산(folinic acid), 플루오로우라실(fluorouracil), 이리노테칸(irinotecan), 겐시타빈(gemcitabine) 및 아브락산(Abraxane)으로 구성된 군으로부터 선택된다. 몇몇 예들에서, 폴린산, 플루오로우라실, 및 이리노테칸은 대상에 항체와 조합하여 투여된다.
- [0013] 몇몇 예들에서, 치료는 항체로 치료되지 않은 대상의 생존 가능성에 비교하여, 치료 후 적어도 3 달의 기간 동안 대상의 생존 가능성을 증가시킨다. 몇몇 예들에서, 대상의 생존 가능성은 적어도 6 달의 기간 동안 증가된다. 몇몇 예들에서, 대상의 생존 가능성은 적어도 12 달의 기간 동안 증가된다.
- [0014] 몇몇 예들에서, 치료는 항체로 치료되지 않은 대상에서의 암 재발(recurrence) 위험에 비하여 대상에서 암 재발 위험을 감소시킨다.
- [0015] 몇몇 예들에서, 치료는 항체로 치료되지 않은 대상의 말초 혈액 내 종양 세포들의 수준에 비하여 대상의 말초 혈액 내 종양 세포들의 수준을 감소시킨다.
- [0016] 몇몇 예들에서, 암은 결장(colon) 암, 결장직장(colorectal) 암, 췌장(pancreatic) 암, 유방암, 및 폐암으로 구성되는 군으로부터 선택된다. 몇몇 예들에서, 암은 APC 돌연변이를 포함하는 결장(colon) 암, KRAS 돌연변이를 포함하는 결장(colon) 암, 전이성 결장직장(colorectal) 암, 전이성 췌장(pancreatic) 암, 삼중-음성 유방암, 및 소세포 폐암으로 구성되는 군으로부터 선택된다.
- [0017] 몇몇 예들에서, 대상은 포유류다. 몇몇 예들에서 대상은 인간이다.
- [0018] 여기에 제공되는 조성물들, 방법들 및 키트들의 몇몇 예들은 대상에 앞서 말한 항체들 중 임의의 하나를 투여하는 단계를 포함하는 암 성향이 있는 대상에서 암을 발달시키는 위험을 감소시키거나, 암의 재발을 예방하거나 또는 암을 예방하는 방법을 포함한다.
- [0019] 여기에 제공되는 조성물들, 방법들 및 키트들의 몇몇 예들은 대상에 앞서 말한 항체들 중 임의의 하나를 투여하는 단계를 포함하는 암을 갖는 대상의 생존 가능성을 증가시키는 방법을 포함한다. 몇몇 예들에서, 대상의 생존 가능성은 항체로 치료되지 않은 대상의 생존 가능성에 비교하여 치료 후 적어도 3 달의 기간 동안 증가된다. 몇몇 예들에서, 대상의 생존 가능성은 적어도 6 달의 기간 동안 증가된다. 몇몇 예들에서, 대상의 생존 가능성은 적어도 12 달의 기간 동안 증가된다.
- [0020] 여기에 제공되는 조성물들, 방법들 및 키트들의 몇몇 예들은 대상에 앞서 말한 항체들 중 임의의 하나를 투여하는 단계를 포함하는 대상에서 암의 재발 위험을 감소시키는 방법을 포함한다.
- [0021] 여기에 제공되는 조성물들, 방법들 및 키트들의 몇몇 예들은 대상에 앞서 말한 항체들 중 임의의 하나를 투여하는 단계를 포함하는 대상의 말초 혈액에서 암의 종양 세포들의 수준을 감소시키는 방법을 포함한다.
- [0022] 몇몇 예들은 또한 항체와 조합하여 화학요법 제제를 투여하는 단계를 포함한다. 몇몇 예들에서, 화학요법 제제는 폴린산, 플루오로우라실, 이리노테칸, 겐시타빈 및 아브락산으로 구성되는 군으로부터 선택된다. 몇몇 예들에서, 폴린산, 플루오로우라실, 및 이리노테칸은 항체에 항체와 조합하여 투여된다.
- [0023] 몇몇 예들에서, 대상은 예견적(predictive) 임상 시험, 유전적 분석, 또는 가족력 분석에 의하여 암이 있을 성향을 갖는 것으로 결정된다.
- [0024] 몇몇 예들에서, 암은 결장(colon) 암, 결장직장(colorectal) 암, 췌장(pancreatic) 암, 유방암, 및 폐암으로 구성되는 군으로부터 선택된다. 몇몇 예들에서, 암은 APC 돌연변이를 포함하는 결장(colon) 암, KRAS 돌연변이를 포함하는 결장(colon) 암, 전이성 결장직장(colorectal) 암, 전이성 췌장(pancreatic) 암, 삼중-음성 유방암, 및 소세포 폐암으로 구성되는 군으로부터 선택된다.
- [0025] 몇몇 예들에서, 대상은 포유류이다. 몇몇 예들에서, 대상은 인간이다.

[0026] 여기에 제공된 조성물들, 방법들 및 키트들의 몇몇 예들은 하기를 포함하는 대상의 치료법을 선택하는 방법을 포함한다: (a) 대상에게 화학요법 제제를 투여하는 단계; (b) 종양에서 LGR5를 코딩하는 핵산 또는 LGR5 폴리펩타이드의 증가된 수준을 확인하는 단계; 및 (c) 종양에서 LGR5를 코딩하는 핵산 또는 LGR5 폴리펩타이드의 증가된 수준을 갖는 대상에 앞서 말한 항체들 중 임의의 하나를 투여하는 단계. 몇몇 예들에서, 화학요법 제제는 폴린산, 플루오로우라실, 이리노테칸, 젬시타빈 및 아브라칸으로 구성되는 군으로부터 선택된다. 몇몇 예들에서, 종양은 결장(colon) 암 종양, 결장직장(colorectal) 암 종양, 췌장(pancreatic) 암 종양, 유방암 종양, 및 폐암 종양으로 구성되는 군으로부터 선택된다. 몇몇 예들에서, 종양은 APC 돌연변이를 포함하는 결장(colon) 암 종양, KRAS 돌연변이를 포함하는 결장(colon) 암 종양, 전이성 결장직장(colorectal) 암 종양, 전이성 췌장(pancreatic) 암 종양, 삼중-음성 유방암 종양, 및 소세포 폐암 종양으로 구성되는 군으로부터 선택된다.

[0027] 여기에 제공된 조성물들, 방법들 및 키트들의 몇몇 예들은 항체로 치료된 종양에서의 바이오마커의 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 앞서 말한 항체들 중 임의의 하나로 하는 치료의 약효를 평가하는 방법을 포함한다. 몇몇 예들에서, 바이오마커는 핵산 또는 핵산에 의하여 코딩되는 폴리펩타이드이고, 이때 바이오마커는 WNT6, FZD8, FOSL1, WT11, NFATC1, FZD5, FZD2, FRZB, PRICKLE1, FZDB, FZD7, WNT7B, FBXW11, FZD1, DVL1, CSNK2A1, ANGPT2, AKAP12, ADM, CTNNB1, ALDOC, CDH5, ITGA2, DAB1, MIR655, NKX1-2, ZBTB11, ITPKA, PSMC3IP 및 BAK1로 구성되는 군으로부터 선택된다. 몇몇 예들에서, 종양이 치료되지 않은 종양에서의 바이오마커의 수준에 비교한 바이오마커 수준의 감소는 효과적인 치료를 시사한다. 몇몇 예들에서, 바이오마커는 WNT6, FZD8, FOSL1, WT11, NFATC1, FZD5, FZD2, FRZB, PRICKLE1, FZDB, FZD7, WNT7B, FBXW11, FZD1, DVL1, CSNK2A1, ANGPT2, AKAP12, ADM, CTNNB1, ALDOC, CDH5, 및 ITGA2으로 구성되는 군으로부터 선택된다. 몇몇 예들에서, 종양이 치료되지 않은 종양에서의 바이오마커의 수준에 비교한 바이오마커 수준의 증가는 효과적인 치료를 시사한다. 몇몇 예들에서, 바이오마커는 DAB1, MIR655, NKX1-2, ZBTB11, ITPKA, PSMC3IP 및 BAK1로 구성되는 군으로부터 선택된다. 몇몇 예들에서, 종양은 결장(colon) 암 종양, 결장직장(colorectal) 암 종양, 췌장(pancreatic) 암 종양, 유방암 종양, 및 폐암 종양으로 구성되는 군으로부터 선택된다. 몇몇 예들에서, 종양은 APC 돌연변이를 포함하는 결장(colon) 암 종양, KRAS 돌연변이를 포함하는 결장(colon) 암 종양, 전이성 결장직장(colorectal) 암 종양, 전이성 췌장(pancreatic) 암 종양, 삼중-음성 유방암 종양, 및 소세포 폐암 종양으로 구성되는 군으로부터 선택된다.

[0028] **자세한 설명**

[0029] 본 발명의 몇몇 예들은 이러한 항체들로 암 줄기 세포 성장을 억제하는 방법들 및 LGR5에 특이적으로 결합하는 인간화된 항체들에 대한 것이다. 몇몇 예들에서, 항체들은 LGR5에 특이적으로 결합하나, LGR5에 R-Spo이 결합하는 것을 억제하지 않는다. 다른 예들은 LGR5을 통한 R-Spo 신호전달의 억제 없이 LGR5에 결합하는 항체들을 포함한다. 나아가 다른 예들은 LGR5에 결합하지만, LGR5를 통한 신호전달 또는 R-Spo 결합 둘 다를 억제하지 않는 항체들을 포함한다.

[0030] 또다른 예는 LGR5에 결합하고, 또한 Wnt 경로를 통하여 LGR5 신호전달을 억제하는 항체들이다. 몇몇 예들에서, 이들 항체들은 Wnt 경로를 통한 LGR5 신호전달을 억제할 수 있고 RSpO 신호전달에 독립적일 수 있다.

[0031] 다른 예들은 세포 또는 조직에서 LGR5 또는 R-Spo 신호전달을 억제하기 위한 전술한 항체들의 이용 방법들을 포함한다.

[0032] LGR5는 내장(gut)에서 종양-개시(initiating) 세포들 및 정상 줄기 세포들의 매우 특이적 마커로서 계통 추적 연구를 통하여 확인되었다. 이전에 약 150 유전자들은 그 발현이 Wnt 발현의 파기(abrogation) 후 퀸칭(quench)되었다. 움(crypt) 기저부(base)에서 췌기(wedge)-형상의 세포들을 10-14 증식시키는 군에서 선택적으로 발현되기 위한 LGR5에서 발견되는 이들 "Wnt 타겟 유전자들"의 종합적인 특성. 이들 움(crypt)-기저부의(based) 원추(columnar) 세포들은 이전에 후보 줄기 세포 군으로 제안되었다. 유전(heritable) lacZ-LGR5 리포터 유전자로 인 비모(in vivo) 계통 추적을 이용하여, LGR5 장(intestinal) 줄기 세포들이 움 기저부로부터 개시되어 움 모(villus) 끝들(tips)로 확장되는 lacZ+ 자손(progeny) 세포들의 연속된 리본들(ribbons)이 생기게 하는 장(intestinal) 줄기 세포들의 다분화능(multi-potent), 자가재생(self-renewing) 군집이라는 것이 확인되었다.

[0033]

[0034] CSC들(CSCs) 상 LGR5의 특이적 발현은 CSC들을 선택적으로 그리고 효과적으로 타겟팅하는 기회를 제공한다. 정상 조직들에 비하여 LGR5는 CRC, 췌장 및 대부분의 다른 고형 종양들에서 매우 과발현되는데, 이로써 CRC, 췌장, 유방, 난소, 폐, 위 및 간 암에서 CSC들을 타겟팅하기 위한 넓은 치료(therapeutic) 범위(window)를 제공

한다.

[0035] LGR5 그 자체는 LGR5 양성 세포들 상에서 Wnt를 선택적으로 증폭시키고 향상시키기 위하여 분비된 R-스폰딘(spondin) 리간드들에 결합하는 Wnt-Fzd-LRP 수용체 복합체의 임의의(facultative) 요소이다. 또한 Wnt-독립적 방식으로 LGR5이 신호를 보낸다는 증거도 있다. 게다가, 관련된 막관통(transmembrane) RING-타입 E3 유비퀴틴 리가제(ligase) ZNRF3 (징크 및 RING 핑거 3) 또는 RNF43 (RING 핑거 43)는 LGR5+ 줄기 세포들에서 독특하게 발견되며, 구불구불해진(frizzled) 수용체들을 선택적으로 유비퀴틴시킴으로써(ubiquitinating) Wnt 신호들을 감소시키고, 이로써 분해(degradation)를 위하여 이들 Wnt 수용체들을 타겟팅한다. R-스폰딘 리간드들은 막관통 ZNRF3 또는 RNF43과 삼중(ternary) 복합체를 형성하기 위하여 LGR5과 상호작용한다. 이들 삼중 복합체들의 형성은 Wnt-Fzd-LRP 복합체로부터 ZNRF3 또는 RNF43을 격리시키고 기본형(canonical) 및 기본형이 아닌(noncanonical) Wnt 신호전달을 안정화시킨다. 최종적으로 노린(Norrin)은 알려지지 않은 관련된 생명 작용을 갖는 LGR 패밀리를 위한 추가적인 리간드로서 확인되었다.

[0036] CRC에서의 게이트(gate) 키핑(keeping) 돌연변이는 선종성 결장폴립증(adenomatous polyposis coli) (APC)의 상실(loss)이며, 정상적으로는 결장(colon) 움(crypt)에서 줄기 세포 자가재생 및 분화 사이의 균형을 조절하기 위하여 작용하는, Wnt 신호전달의 일탈적인 활성화를 야기한다. 장(intestinal) 줄기 세포들에서 이상조절된(dysregulated) Wnt 신호전달은 악성 CRC에 대한 전구체인 결장(colon)에서의 선종성(adenomatous) 폴립들(polyps)의 형성을 이끈다. 그 LGR5 줄기 세포들이 4 개의 (GFP/YFP/ECFP/RFP) 형광 유전적 마커들 중 하나로 특이적으로 그리고 무작위로 표지되는 마우스들과 유도가능한 APC 유전자 녹아웃 마우스들을 이종교배시키는(cross) 전략을 이용하여, LGR5 줄기 세포들의 이들 마우스 장(intestinal) 종양들의 뿌리 또는 소스로 확인되었다. APC 결실 유도 4 주 후 단일 염색된 종양들 (즉, 모든 GFP 또는 모든 RFP)이 나타난 것은 이들 종양들이 단일 LGR5 줄기 세포로부터 발생되었다는 것을 확인시켜 준다. 게다가 이 모델은 또한 다른 색깔로 폴립(flip) 되기 위하여 LGR5 줄기 세포들에 형광 유전적 태그를 가능하게 하여, 빨간(red) 종양을 만들어 내는 RFP+ LGR5 암 줄기 세포가 ECFP+ LGR5 암 줄기 세포 내로 중간에 형질전환될 수 있어, 여전히 종양을 씨뿌리나(seeding), 전에 모두 빨간 GFP+ 종양 덩어리를 침범하는 파란(blue) 종양 세포들이 생기게 하고 있었다. 이 폴립핑(flipping) 실험은 LGR5 CSC들이 장(intestinal) 종양들을 개시하고 성장을 씨뿌릴 수 있는, 장(intestinal) 종양들의 기원이라는 것을 추가로 확인해줄 뿐 아니라, 그것들은 종양 형성을 연속적으로 유지한다(즉, 장기간의 다시 살게하는(repopulating) 능력을 가졌다)는 것을 확인해준다.

[0037] 암에서 LGR5의 기능적 역할은 리보핵산 간섭(interference) (RNAi) 녹다운 연구들을 통하여 입증되었다. CRC 종양 세포주들의 패널에서 LGR5의 녹다운은 인 비트로(in vitro)에서 연한천 콜로니들의 성장, 그리고 인 비보(in vivo)에서 HCT116 결장(colon) 종양 이종이식들(xenografts)의 성장 또한 상당히 억제하였다. LGR5 RNAi 녹다운은 또한 그 다음에 인 비트로에서 환자-유래된 CRC 종양 세포들로부터의 CSC 콜로니들의 성장을 감소시키는 것으로 보여졌다(데이터 미도시). 마지막으로, 분류된 LGR5+ PATIENT DERIVED XENOGRAFT CRC 종양 세포들은 대조군 LGR5- 세포들에 비하여 인 비보(in vivo)에서 매우 발암성(tumorigenic)으로 발견되었다.

[0038] CSC들은 케어(care) 화학요법의 표준 및 수술로 치료된 많은 암 환자들에서 종양 재발의 높은 발생정도에 원인이 되는 것으로 믿어진다. 예를 들어, 화학요법에 대한 좋지 못한 임상적 반응과 관련 있는 CSC들의 높은 수준들 그리고 화학요법 후 유방암 환자들로부터의 CD44+ CSC들이 풍부하게 발견되었다. 유사하게, 전이성 CRC에서, LGR5 발현이 화학요법 후 손상된 간에서 상향조절되었는데, 이는 화학요법에 응하여 증가된 LGR5 CSC들이 전이성 질환을 개시 및/또는 악화시키는(acerbate) 것을 제안한다. 과연, LGR5 발현은 원발성(primary) CRC 종양들에 비하여 전이성 부위들에서 상당히 더 크다는 것이 발견되어 왔다.

[0039] 항-LGR5 항체들

[0040] 여기에서 사용된 대로, 용어 "항체"는 합성 항체들, 단일클론 항체들, 재조합으로 생산된 항체들, 인트라바디들(intrabodies), (이중특이적(bi-specific) 항체들을 포함하는) 다가특이적(multispecific) 항체들, 인간 항체들, 인간화된 항체들, 키메라 항체들, 합성 항체들, 단일(single)-사슬(chain) Fvs (scFv), Fab 단편들, F(ab') 단편들, (이중특이적(bi-specific) sdFv들을 포함하는) 디설파이드-연결된(linked) Fvs (sdFv), 및 항-이디오타입(idiotypic) (항-Id) 항체들, 및 상기의 것들 중 임의의 것의 에피토프-결합 단편들을 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다. 여기에 제공된 몇몇 예들의 항체들은 단일특이적(monospecific), 이중특이적(bispecific), 삼중특이적(trispecific) 또는 더 큰 다가특이성(multispecificity)의 것일 수 있다. 다가특이적(multispecific) 항체들은 폴리펩타이드의 다른 에피토프들에 특이적일 수 있고, 이종기원(heterologous) 폴리펩타이드 또는 고행 지지 물질과 같은, 이종기원(heterologous) 에피토프와 폴리펩타이드 둘 다에 특이적일

수 있다. 예컨대 PCT publications WO 93/17715; WO 92/08802; WO91/00360; WO 92/05793; Tutt, et al., J. Immunol. 147:60-69 (1991); U.S. Pat. Nos. 4,474,893; 4,714,681; 4,925,648; 5,573,920; 5,601,819; Kostelny et al., J. Immunol. 148:1547-1553 (1992) 참조; 이것들 각각은 여기에 그 전체가 참조로서 포함된다.

- [0041] 여기에서 사용된 대로, LGR5는 NCBI 수납(Accession) 번호 NP_003658.1의 폴리펩타이드를 포함하는 인간 LGR5, 또는 그것의 단편들로 NM_003667.2 내 뉴클레오타이드 서열을 코딩함으로써 코딩되는 것, 또는 그것의 단편들을 포함하나 이에 제한되는 것은 아니다. NCBI 수납(Accession) 번호 NP_003658.1의 전체 등장(entry) 및 아미노산 서열 및 NM_003667.2의 전체 등장(entry) 및 뉴클레오타이드 서열이 그 전체가 참조로서 완전히 포함된다. 여기에서 고려되는 LGR5 단편들의 예들은 LGR5 엑토포도메인(ectodomain), 막관통 도메인, 또는 세포내 도메인 및 그 부분들을 포함한다.
- [0042] 몇몇 예들은 하기 예들에 기재되고 생산된 18G7H6A3 및 18G7H6A1으로 표기된 항-LGR5 항체들을 포함하는, 항-LGR5 항체의 가벼운 사슬 및/또는 무거운 사슬을 생산하는 하이브리도마에 대한 것이다. 한 측면에서, 하이브리도마는 하기 예들에서 기재되고 생산된 18G7H6A3 및 18G7H6A1의 그것과 같은 인간화된 또는 완전히(fully) 인간 단일클론 항체의 가벼운 사슬 및/또는 무거운 사슬을 생산한다.
- [0043] 몇몇 예들은 하기 예들에 기재되고 생산된 18G7H6A3 및 18G7H6A1으로 표기된 항-LGR5 항체들 중 임의의 하나를 포함하는, 항-LGR5 항체의 가벼운 사슬 또는 무거운 사슬을 코딩하는 핵산 분자에 대한 것이다. 몇몇 측면들에서, 핵산 분자는 하기 예들에 기재되고 생산된 항체 18G7H6A3 및 18G7H6A1 와 같은, 인간화된 또는 완전히 인간 단일클론의, 가벼운 사슬 또는 무거운 사슬을 코딩한다.
- [0044] 여러가지 예들은 하기 예들에 기재되고 생산된 18G7H6A3 및 18G7H6A1으로 표기된 항-LGR5 항체들 중 임의의 하나를 포함하는 항-LGR5 항체의 가벼운 사슬 및/또는 무거운 사슬을 코딩하는 핵산 분자 또는 분자들을 포함하는 벡터에 대한 것이다.
- [0045] 여러가지 예들에서, 항체들의 글리코실화는 변형될 수 있다. 예를 들어, 비글리코실화된(aglycosylated) 항체는 만들어질 수 있다(즉, 항체는 글리코실화가 부족하다). 글리코실화는 예를 들어, 타겟 항원을 위한 항체의 친화성(affinity)을 증가시키도록 변화될 수 있다. 이러한 탄수화물 변형들은 예를 들어, 항체 서열 내 글리코실화의 하나 또는 그보다 많은 자리들을 변형시킴으로써, 달성될 수 있다. 예를 들어, 하나 또는 그보다 많은 아미노산이 만들어질 수 있어 하나 또는 그보다 많은 가변적인 영역 프레임워크(framework) 글리코실화 자리들에서 제거를 야기하고, 이로써 그 자리에서 글리코실화를 제거한다. 이러한 비글리코실화(aglycosylation)는 항원을 위한 항체의 친화성(affinity)을 증가시킬 수 있다. 이러한 접근이 미국 특허번호 5,714,350 및 6,350,861에 더 자세히 기재되어 있다; 이것들 각각은 그 전체가 참고로서 여기에 포함된다.
- [0046]
- [0047] 몇몇 예들에서, 항체들은 NCBI 수납(Accession) 번호들. NP_003658.1 (서열번호: 47)의 인간 LGR5 폴리펩타이드 또는 그것들의 단편들과 적어도 60% 동일성(identity), 또는 적어도 70% 동일성, 또는 적어도 80% 동일성, 적어도 85% 동일성, 적어도 90% 동일성, 적어도 95% 동일성, 또는 적어도 적어도 97% 동일성, 또는 적어도 99% 동일성, 또는 100% 동일성을 갖는 LGR5 폴리펩타이드를 포함하는 또는 이로 구성되는 폴리펩타이드에 특이적으로 결합된다. 이러한 단편들은 예를 들어, LGR5 폴리펩타이드의 적어도 약 5, 10, 15, 20, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 또는 900 근접한(contiguous) 또는 근접하지 않은(non-contiguous) 아미노산들, 또는 전술한 길이들 중 임의의 것 사이의 많은 근접한 또는 근접하지 않은 아미노산들일 수 있다.
- [0048] 몇몇 예들에서, 항체는 항체 18G7H6A3이고 서열번호: 11의 DNA 서열 및 서열번호: 13의 무거운 사슬 아미노산 서열을 포함한다. 몇몇 예들에서, 항체는 항체 18G7H6A3이고, 그리고 서열번호: 19을 포함하는 무거운 사슬 가변 도메인을 갖는다. 몇몇 예들에서, 항체는 항체 18G7H6A3이고 서열번호: 14의 가벼운 사슬 서열을 포함한다. 다른 예들에서, 항체는 항체 18G7H6A3이고 그리고 서열번호: 21의 가벼운 사슬 가변 도메인을 포함한다.
- [0049] 몇몇 예들에서, 항체는 상기 서열들의 서열에 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96% 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한(identical) 서열을 포함한다. 몇몇 예들에서, 항체들은 상기 서열들의 무거운 사슬, 가벼운 사슬, 또는 가변 도메인들의 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86,

87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 또는 118 잔기들에 걸쳐 상기 항체 서열들에 100% 동일한 서열을 포함한다.

[0050] 몇몇 예들에서 항체들은 항체 서열들에 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한(identical) 서열을 포함한다. 몇몇 예들에서 항체들은 항체 서열들에 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한(identical) 서열을 포함한다. 몇몇 예들에서 항체들은 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 또는 111 잔기들에 걸쳐 항체 서열들에 100% 동일한 서열을 포함한다.

[0051] 몇몇 예들에서 여기에서 제공되는 항-LGR5 항체는 GYSFTAYW (서열번호:23)을 포함하는 무거운 사슬 CDR1, ILPGSDST (서열번호:2)을 포함하는 무거운 사슬 CDR2, 및 ARSGYYGSSQY (서열번호:3)을 포함하는 무거운 사슬 CDR3을 포함한다. 몇몇 예들에서 여기에 제공되는 항-LGR5 항체는 ESVDYSGNSF (서열번호:4)를 포함하는 가벼운 사슬 CDR1, LTS를 포함하는 사슬 CDR2, 및 QQNAEDPRT (서열번호:33)을 포함하는 사슬 CDR3을 포함한다.

[0052] 몇몇 예들에서 여기에서 제공되는 항-LGR5 항체는 하기를 포함한다: (a) 1, 2, 3, 또는 4 아미노산 치환들을 갖는 상기 서열들의 변종들(variants)을 포함하는 무거운 사슬 CDR1. 항체는 또한 1, 2, 3, 또는 4 아미노산 치환들을 포함하는 변종을 갖는 무거운 사슬 CDR2를 가질 수 있다. 항체는 1, 2, 3, 또는 4 아미노산 치환들을 포함하는 변종을 갖는 무거운 사슬 CDR3을 또한 가질 수 있다. 무거운 사슬의 이들 변형들에 추가하여, 항체는 또한 1, 2, 3, 또는 4 아미노산 치환들을 포함하는 변종을 갖는 가벼운 사슬 CDR1을 가질 수 있다. 항체는 또한 1, 2, 3, 또는 4 아미노산 치환들을 포함하는 변종을 갖는 가벼운 사슬 CDR2를 가질 수 있다. 항체는 또한 1, 2, 3, 또는 4 아미노산 치환들을 갖는 가벼운 사슬 CDR3을 가질 수 있다. 몇몇 예들에서, 아미노산 치환들은 보존적 아미노산 치환들이다.

[0053] 몇몇 예들에서, 여기에서 제공되는 항-LGR5 항체는 첨부된 서열 목록에서 여기에서 기재된 서열들에 적어도 80% 또는 90% 서열 동일성(identity)을 갖는 무거운 사슬 가변 영역을 포함하는 항체를 포함한다. 항체는 또한 여기에 기재된 항체 서열들에 적어도 80% 또는 90% 서열 동일성을 갖는 가벼운 사슬 가변 영역을 가질 수 있다.

[0054] 두 아미노산 서열들 (또는 두 핵산 서열들)의 퍼센트 동일성은, 예를 들어, 최적의 비교 목적들을 위한 서열들을 (예를 들어, 첫 번째 서열의 서열 내로 도입될 수 있는 갭들) 정렬시킴으로써, 결정될 수 있다. 대응하는 자리들에서 아미노산들 또는 뉴클레오타이드들이 그 다음에 비교되고, 두 서열들 사이의 퍼센트 동일성은 서열들에 의하여 공유되는 동일한 자리들의 개수의 함수(function)이다 (즉, % 동일성 = 동일한 자리들의 # / 자리들의 총 # × 100). 두 서열들의 실제 비교는 예를 들어, 수학적 알고리즘을 이용하여, 잘 알려진 방법들에 의하여 달성될 수 있다. 이러한 수학적 알고리즘의 특이적, 제한되지 않은 예는 그 전체가 참조로서 여기에 포함되는 Karlin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:5873-5877 (1993)에 기재되어 있다. 이러한 알고리즘은 그 전체가 참조로서 여기에 포함되는 Schaffer et al., Nucleic Acids Res., 29:2994-3005 (2001)에 기재된 대로 BLASTN 및 BLASTX 프로그램들 내 포함된다. BLAST 및 Gapped BLAST 프로그램들을 이용할 때, 각각의 프로그램들의 디폴트 파라미터들 (예컨대, BLASTN)이 사용될 수 있다. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, as available on Apr. 10, 2002 참조. 한 예에서, 검색된 데이터베이스는 불필요하지 않은(non-redundant) (NR) 데이터베이스이고, 서열 비교를 위한 파라미터들이 세팅될 수 있다: 필터들 없음; 10의 값을 예상; 단어(Word) 크기(Size) 3; 매트릭스는 BLOSUM62; 그리고 갭 코스트들(costs)는 11의 존재(Existence) 및 1의 존재(Existence)를 갖는다.

[0055] 몇몇 예들은 또한 상기 기재된 항체들의 변종들을 포함하는데, 이는 하기 예들에서 생산되고 기재된 18G7H6A3 및 18G7H6A1로 표기된 항-LGR5 항체들 중 임의의 하나를 포함하고, 가변(variable) 가벼운(light) (VL) 도메인 및/또는 가변(variable) 무거운(heavy) (VH) 도메인에 하나 또는 그보다 많은 아미노산 잔기 치환들을 포함한다. 몇몇은 또한 하나 또는 그보다 많은 VL CDR들 및/또는 하나 또는 그보다 많은 VH CDR들에 하나 또는 그보다 많은 추가적인 아미노산 잔기 치환들과 상기 기재된 항체들의 변종들을 포함한다. 상기 기재된 항체들의 VH 도메인, VH CDR들, VL 도메인 및/또는 VL CDR들에 치환들을 도입함으로써 만들어지는 항체는 인 비트로에서 그리고 인 비보에서, 예를 들어, LGR5에 결합하는 그것의 능력 (예컨대, ELISA들 및 BIA코어(core)를 포함하나, 이에 제한되지 않는 면역분석들)이 테스트될 수 있다.

[0056] 여러가지 예들은 LGR5에 특이적으로 결합하는, 하기의 예들에 기재되고 생산된 18G7H6A3 및 18G7H6A1으로 표기

된 항-LGR5 항체들의 임의의 하나와 같은, 항-LGR5 항체들의 VH 도메인들, VH CDR들, VL 도메인들, 또는 VL CDR들의 파생물들(derivatives)을 포함하는 LGR5에 특이적으로 결합하는 항체들을 포함한다. 당업자들에게 알려진 표준 기술들은 예를 들어, 아미노산 치환들을 만들어내기 위하여 일상적으로 사용되는 부위-특이적 돌연변이생성(mutagenesis) 및 PCR-매개 돌연변이 생성을 포함하는, 항체를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열에서, 돌연변이들(예컨대, 삽입들, 결실들, 및/또는 치환들)을 도입하기 위하여 사용될 수 있다. 한 예에서, VH 및/또는 VL CDR들 파생물들은 원래의 VH 및/또는 VL CDR들에 대하여 25 아미노산 치환들 미만(less), 20 아미노산 치환들 미만, 15 아미노산 치환들 미만, 10 아미노산 치환들 미만, 5 아미노산 치환들 미만, 4 아미노산 치환들 미만, 3 아미노산 치환들 미만, 또는 2 아미노산 치환들 미만을 포함한다. 또다른 예에서, VH 및/또는 VL CDR들 파생물들은 하나 또는 그보다 많은 예상되는 비필수 아미노산 잔기들(즉, LGR5에 특이적으로 결합하는 항체에 매우 중요하지 않은 아미노산 잔기들)에서 만들어진(예컨대 앞에) 보존적 아미노산 치환들을 갖는다. 대체하여, 돌연변이들은 포화(saturation) 돌연변이생성에 의하여와 같은, VH 및/또는 VL CDR 코딩 서열의 전체 또는 부분을 따라 무작위로 도입될 수 있고, 그 결과로 생긴 돌연변이들은 활성을 유지하는 돌연변이들을 확인하기 위하여 생물학적 활성에 대하여 스크리닝될 수 있다. 돌연변이생성 후, 코딩된 항체는 발현될 수 있고 항체의 활성은 결정될 수 있다.

[0057] 몇몇 예들은 또한 LGR5 또는 그 단편에 특이적으로 결합하는 항체들을 포함하고, 그 항체들은 하기 예들에 기재되고 생산된 18G7H6A3 및 18G7H6A1로 표기된 그것들을 포함하는 항-LGR5 항체들 중 임의의 하나를 포함하는 여기에 기재된 항체들 중 임의의 것의 가변 무거운 사슬 및/또는 가변 가벼운 사슬의 아미노산 서열에 적어도 45%, 적어도 50%, 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 적어도 99% 동일한 가변 무거운 사슬 및/또는 가변 가벼운 사슬의 아미노산 서열을 포함한다.

[0058] 또다른 예는 하기 예들에 기재되고 생산된 18G7H6A3 및 18G7H6A1로 표기된 항-LGR5 항체들 중 임의의 하나와 같은, 항-LGR5 항체의 임의의 부분에 보존적 아미노산 치환들의 도입을 포함한다. "보존적 아미노산 치환"은 기능적으로-동등한(equivalent) 아미노산들을 치환하는 아미노산 치환들을 가리킨다는 것이 잘 알려져 있다. 보존적 아미노산 변화들은 그 결과인 펩타이드의 아미노산 서열에 침묵(silent) 변화들(changes)을 야기한다. 예를 들어, 유사한 극성의 하나 또는 그보다 많은 아미노산들은 기능적 등가물들(equivalents)로서 작용하고, 펩타이드의 아미노산 서열 내 침묵 변화(alteration)를 야기한다. 잔기를 더 작은 잔기로 대체하고, 전하적 중성인 치환들은 또한, 잔기들이 다른 기들이라도(예컨대, 페닐알라닌을 더 작은 이소류신으로 대체), "보존적 치환들"로 고려될 수 있다. 유사한 측쇄들을 가진 아미노산 잔기들의 패밀리들이 당업계에서 정의되어 왔다. 보존적 아미노산 치환들의 몇몇 패밀리들이 표 1에 보여진다.

표 1

[0059]

패밀리	아미노산들
무극성	Trp, Phe, Met, Leu, Ile, Val, Ala, Pro
비전하(uncharged) 극성	Gly, Ser, Thr, Asn, Gln, Tyr, Cys
산성/음전하의	Asp, Glu
염기성/양전하의	Arg, Lys, His
베타-가지달린	Thr, Val, Ile
사슬 배향(orientation)에 영향을 미치는 잔기들	Gly, Pro
방향족	Trp, Tyr, Phe, His

[0060] 항-LGR5 항체들로 암 줄기 세포 성장의 차단

[0061] 몇몇 예들은 항-LGR5 항체들로 인 비트로에서 그리고 인 비보(in vivo)에서 암 줄기 세포 성장을 차단하는 것에 대한 것이다. 몇몇 예들에서, 암 줄기 세포 성장을 차단하는 방법은 항-LGR5 항체의 효과적인 양을 암 줄기 세포들에 투여하는 단계를 포함하고, 이때 항-LGR5 항체의 효과적인 양은 암 줄기 세포들의 성장을 감소시키기에 충분하다.

[0062] 몇몇 예들에서, 암 줄기 세포 성장을 차단하는 방법은 암 줄기 세포들에 항-LGR5 항체의 효과적인 양을 투여하는 단계를 포함하며, 이때 항-LGR5 항체의 효과적 양은 암 줄기 세포들의 증식을 감소 또는 차단, 또는 성장을 감소 또는 차단시키는데 충분하다.

[0063] 몇몇 예들에서, 항-LGR5 항체의 효과적인 양은 인 비트로에서 암 줄기 세포들에 투여된다. 다른 측면들에서, 항

-LGR5 항체의 효과적인 양은 인 비보(in vivo)에서, 그것의 치료를 필요로하는 환자에서 암 줄기 세포들에 투여된다.

- [0064] 몇몇 예들에서, LGR5에 대항한 항체들은 LGR5에 R-Spo 결합을 억제하는 것 없이 LGR5 신호전달(signaling)을 억제하는 방법들에서 사용된다. 몇몇 예들에서, LGR5에 대항한 항체들은 LGR5을 통한 R-Spo 신호전달을 억제하는 것 없이 LGR5 신호전달을 억제하는 방법들에서 사용된다. 몇몇 예들에서, LGR5에 대항한 항체들은 LGR5을 통한 신호전달 또는 LGR5에 R-Spo 결합을 억제하는 것 없이 LGR5 신호전달을 억제하는 방법들에서 사용된다. 몇몇 예들에서, LGR5에 대항한 항체들은 Wnt를 통한 LGR5 신호전달을 억제하는 방법들에서 사용된다. 몇몇 예들에서, LGR5에 대항한 항체들은 RSpO 신호전달에 독립적인 Wnt를 통한 LGR5 신호전달을 억제하는 방법들에서 사용된다.
- [0065] 여기에서 사용된 대로, 용어 "암 줄기 세포(들)"은 암에서 암 세포들의 큰 부분이 생기게 하고 널리 또는 무기한으로 증식할 수 있는 세포를 가리킨다. 몇몇 측면들에서, 암 세포들의 큰 부분은 정해진 암에서 암 세포들의 대다수를 나타낸다. 설명을 위하여, 암 줄기 세포(들)은 암 덩어리의 대다수를 포함하는 암 세포들의 전구(progenitor) 또는 종양의 시조(founder)일 수 있다. 몇몇 측면들에서, 발암성(carcinogenic) 체제들 또는 외인성(exogenous) 세포 증식-유도의 도입 또는 세포들에 임의의 추가적인 돌연변이의 부재에서, 면역이 약화된 개인들 내로 이식될 때 하나 또는 그보다 많은 종양들을 형성하기 위하여 나뉘는 세포들을 가리킨다. 몇몇 측면들에서, 암 줄기 세포들은 말기의(terminally) 분화된 암 세포들 또는 암 조직과 더불어 추가적인 암 줄기 세포들을 생산하기 위하여 나뉜다.
- [0066] 몇몇 예들에서 암 줄기 세포 성장, 증식, 또는 생존력은 LGR5-RSpO 결합 또는 신호전달로 방해되는 것 없이 차단된다. 몇몇 예들에서 암 줄기 세포 성장, 증식, 또는 생존력은 Wnt를 통한 LGR5 신호전달을 억제 또는 차단하는 것을 통한 신호전달 또는 LGR5-RSpO 결합으로 방해하는 것 없이 차단된다.
- [0067] 암 줄기 세포 성장을 차단하는 것과 관련하여 사용되는 대로, 용어 "효과적인 양"은 임의의 정도에 의하여 암 줄기 세포들의 성장을 감소시키는데 충분한 항-LGR5 항체의 양을 가리킨다. 당업계에서 알려진 임의의 분석이 암 줄기 세포 성장을 측정하기 위하여 사용될 수 있다. 예를 들어, 암 줄기 세포 성장은 세포 군집(population) 또는 콜로니의 콜로니 수, 총 세포 수, 또는 부피/크기에 의하여 측정될 수 있다. 몇몇 예들에서, 암 줄기 세포 성장은 예 1에 하기 기재된 종양 구(sphere) 성장 분석에 의하여 측정될 수 있다.
- [0068] 특정 예들에서, 항-LGR5 항체의 효과적인 양은 암 줄기 세포 군집 또는 종양구(tumorsphere) 성장에서 적어도 5%, 10%, 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 감소에 의하여, 또는 전술한 숫자들 중 임의의 것의 임의의 퍼센트로, 암 줄기 세포 성장을 차단할 수 있다. 몇몇 측면들에서, 항-LGR5 항체는 하기 예들에서 생산되고 기재된 18G7H6A3 및 18G7H6A1로 표기된 대로 항-LGR5 항체들 중 임의의 하나 또는 조합이다.
- [0069] 예를 들어, 몇몇 예들에서, 항-LGR5 항체의 효과적인 양은 암 줄기 세포 군집 또는 종양구(tumorsphere) 성장에서 적어도 약 5%-99%, 5%-80%, 5 내지 40%, 10% 내지 99%, 10 내지 80%, 10-60%, 10%-40%, 20 내지 99%, 20%-80%, 20%-60%, 20%-40%, 50%-98%, 50%-80%, 또는 60%-99%에 의하여 측정되는 대로 암 줄기 세포 성장을 차단할 수 있다. 몇몇 측면들에서, 항-LGR5 항체는 하기 예들에서 생산되고 기재된 18G7H6A3 및 18G7H6A1로 표기된 대로 항-LGR5 항체들 중 임의의 하나 또는 조합이다.
- [0070] 다른 예들에서, 항-LGR5 항체의 효과적인 양은 암 줄기 세포 군집 또는 종양구(tumorsphere) 성장의 적어도 약 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9, 2.0, 2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 2.5, 2.6, 2.7, 2.8, 2.9, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 10, 25, 50, 75, 100, 200, 또는 1000-배(fold) 감소, 또는 전술한 숫자들 중 임의의 것 사이의 임의의 배(fold)-감소에 의하여 측정되는 대로 암 줄기 세포 성장을 차단할 수 있다. 몇몇 측면들에서, 항-LGR5 항체는 하기 예들에서 생산되고 기재된 18G7H6A3 및 18G7H6A1로 표기된 대로 항-LGR5 항체들 중 임의의 하나 또는 조합이다.
- [0071] 몇몇 예들에서, 상기 기재된 임의의 정도에 의하여 암 줄기 세포 성장을 차단하는데 충분한 항-LGR5 항체의 효과적인 양은 약 1 nM, 50 nM, 75 nM, 100 nM, 150 nM, 200 nM, 250 nM, 300 nM, 350 nM, 400 nM, 500 nM, 550 nM, 600 nM, 700 nM, 800 nM, 900 nM, 1 μM, 50 μM, 75 μM, 100 μM, 150 μM, 200 μM, 250 μM, 300 μM, 350 μM, 400 μM, 500 μM, 550 μM, 600 μM, 700 μM, 800 μM, 900 μM, 1 mM, 5 mM, 10 mM, 15 mM, 20 mM, 25 mM, 30 mM, 35 mM, 40 mM, 45 mM, 50 mM, 75 mM, 100 mM, 200 mM, 300 mM, 400 mM, 500 mM, 600 mM, 700 mM, 800 mM, 900 mM, 1000 mM, 1 M, 5 M, 10 M, 15 M, 20 M, 25 M, 30 M, 35 M, 40 M, 45 M, 50 M, 75 M, 100 M의 농도에 있고, 또는 전술한 농도들의 임의의 둘 사이의 임의의 숫자이다. 몇몇 측면들에서, 항-

LGR5 항체 조성물은 하기 예들에 기재되고 생산된 18G7H6A3 및 18G7H6A1로 표기된 항체들 둘 다를 포함할 수 있다.

- [0072] 몇몇 예들에서, 여기에 제공된 항-LGR5 항체는 약 200 nM 미만, 약 100 nM 미만, 약 80 nM 미만, 약 50 nM 미만, 약 20 nM 미만, 약 10 nM 미만, 약 1 nM 미만의, 그리고 앞서 말한 값들 중 임의의 것 사이의 범위의 KD로 인간 LGR5에 결합한다. 몇몇 예들에서, 여기에 제공된 항-LGR5 항체는 약 10 nM, 5 nM, 4 nM, 3 nM, 2 nM, 1 nM 미만의 그리고 앞서 말한 값들 중 임의의 것의 범위 내의 친화성(affinity)으로 LGR5에 결합한다. 몇몇 예들에서, 여기에 제공된 항-LGR5 항체는 약 0.0001 nM, 0.001 nM, 0.01 nM보다 더 큰, 그리고 앞서 말한 값의 임의의 것의 범위 내 친화성(affinity)으로 LGR5에 결합한다.
- [0073] 몇몇 예들에서, 여기에 제공된 항-LGR5 항체는 서열번호: 47의 아미노산들 T175, E176, Q180, R183, S186, A187, Q189, D247, E248, T251, R254, S257, N258, K260 을 포함하는 또는 그것으로 구성되는 또는 그 이내인 에피토프에 결합한다. 몇몇 예들에서, 여기에 제공된 항-LGR5 항체는 류신 풍부 반복들 6-9을 포함하는 또는 그것으로 구성되는 또는 그 이내인 에피토프에 결합한다 (예컨대, Chen et al. Genes Dev. 27(12):1345-50 which is incorporated by reference in its entirety 참조). 몇몇 예들에서, 여기에 제공된 항-LGR5 항체는 LGR5 ecto 도메인의 결합 표면을 포함하는 또는 그것으로 구성되는 또는 그 이내인 에피토프에 결합한다 (예컨대 Chen et al. Genes Dev. 27(12):1345-50 which is incorporated by reference in its entirety 참조).
- [0074] 몇몇 예들에서, 여기에 제공된 항-LGR5 항체는 LGR5에의 R-스폰딘 (RSPO) 단백질들 결합을 크게 방해하지 않는다. 몇몇 예들에서, 여기에 제공된 항-LGR5 항체는 RSPO-LGR5 결합 부위에 결합하지 않는다. 몇몇 예들에서, 여기에 제공된 항-LGR5 항체는 LGR5에의 결합을 위하여 RSPO와 경쟁하지 않는다. 몇몇 예들에서, 여기에 제공된 항-LGR5 항체는 Wnt 신호전달의 RSPO 활성화를 크게 방해하지 않는다. 몇몇 예들에서, 여기에 제공된 항-LGR5 항체는 LGR5-RSPO-RNF43 복합체 형성을 방해할 수 있다. 몇몇 예들에서, 여기에 제공된 항-LGR5 항체는 LGR5-RSPO-ZNRF3 복합체 형성을 방해할 수 있다. 몇몇 예들에서, 여기에 제공된 항-LGR5 항체는 GR5-RSPO-LRP6 복합체 형성을 방해할 수 있다. 몇몇 예들에서, RSPO는 R-스폰딘-1 (RSPO1), R-스폰딘-2 (RSPO2), R-스폰딘-3 (RSPO3), 및 R-스폰딘-4 (RSPO4)을 포함할 수 있다. 몇몇 예들에서, 여기에 제공된 항-LGR5 항체는 LGR5-NORRIN-RNF43 복합체 형성을 방해할 수 있다. 몇몇 예들에서, 여기에 제공된 항-LGR5 항체는 GR5-NORRIN-ZNRF3 복합체 형성을 방해할 수 있다. 몇몇 예들에서, 여기에 제공된 항-LGR5 항체 LGR5-NORRIN-LRP6 복합체 형성을 방해할 수 있다.
- [0075] 몇몇 예들은 세포에서 nt/β -카테닌 신호전달(signaling)을 억제하는 방법들을 포함한다. 더 많은 예들은 세포에서 NF- κ B 신호전달을 억제하는 방법들을 포함한다. 앞서 말한 방법들 중 몇몇은 여기에 제공된 항-LGR5 항체의 효과적인 양과 세포를 접촉시키는 단계를 포함할 수 있다. 몇몇 예들에서, 그 세포는 종양 세포이다. 몇몇 예들에서, 세포는 결장직장(colorectal) 종양 세포, 유방암 세포, 폐암 세포, 또는 췌장 종양 세포를 포함할 수 있다. 몇몇 예들에서, 종양 세포는 LGR5 단백질의 높아진 수준들을 발현시킬 수 있다. 몇몇 예들에서, 여기에서 제공된 항-LGR5 항체는 예를 들어, 암 줄기 세포들의 수 및/또는 빈도를 감소시킴으로써 종양 세포의 성장을 억제시킨다.
- [0076] 몇몇 예들은 그것을 필요로 하는 대상에게 여기에 제공된 항-LGR5 항체의 치료적으로 효과적인 양을 투여하는 단계를 포함하는 암의 치료 방법들을 포함한다. 몇몇 예들에서, 암은 췌장(pancreatic) 암, 결장직장(colorectal) 암, 폐암, 췌장(pancreatic) 암, 및 삼중 음성 유방암과 같은 유방암으로부터 선택된다. 몇몇 예들에서, 결장직장(colorectal) 암은 선종성 결장폴립증 (APC) 유전자에서 돌연변이를 불활성화시키는 것을 포함하며, APC 유전자에서 돌연변이를 불활성화시키는 것을 포함하지 않고, 또는 야생형 APC 유전자를 포함한다. 몇몇 예들에서, 암은 이다. 몇몇 예들에서, 암은 LGR5 단백질의 높아진 수준들을 포함한다. 몇몇 예들에서, 암은 LGR5를 높아진 수준들로 발현시키는 결장(colon) 암이다. 몇몇 예들에서, 암은 LGR5를 높아진 수준들로 발현시키는 췌장 암이다. 몇몇 예들에서, 암은 LGR5를 높아진 수준들로 발현시키는 유방암이다.
- [0077] 몇몇 예들은 대상에서 질환을 치료하는 방법들을 포함하고, 이때 질환은 활성화 of β -카테닌, 및/또는 정도를 벗어난(aberrant) β -카테닌 신호전달과 관련된다. 몇몇 예들은 그것을 필요로 하는 대상에게 여기에서 제공된 항-LGR5 항체의 치료적으로 효과적인 양을 투여하는 단계를 포함한다.
- [0078] 몇몇 예들은 적어도 하나의 additional 치료제와 조합하여 그것을 필요로 하는 대상에게 여기에서 제공되는 항-LGR5 항체의 치료적으로 효과적인 양을 투여하는 단계를 포함하는 질환의 치료 방법들을 포함한다. 몇몇 예들에서, 추가적 치료제는 화학요법 제제를 포함한다. 몇몇 예들에서, 추가적 치료제는 생물학적 제제를 포함한다. 몇몇 예들은 화학요법 제제 및 생물학적 제제와 조합하여 여기에서 제공되는 항-LGR5 항체를 투여하는 단계를

포함한다. 몇몇 예들에서, 화학요법 제제와 조합하여 여기에서 제공되는 항-LGR5 항체를 투여하는 것은 종양과 같은, 암에서 LGR5의 발현 수준을 증가시킬 수 있다. 여기에서 제공되는 방법들의 몇몇 예들은 종양 또는 암에 성 LGR5 단백질 발현의 수준을 결정하는 단계를 포함한다.

[0079] 여기에서 제공되는 방법들의 몇몇 예들은 여기에서 제공되는 항-LGR5 항체로 치료를 위하여 대상을 확인하는 단계를 포함한다. 몇몇 예들은 대상이 정상 조직에서 동일한 LGR5 단백질의 발현에 비교하여 LGR5의 높아진 발현 수준을 포함하는 종양을 갖는지 여부를 결정하는 단계를 포함한다. 몇몇 예들은 종양이 LGR5 발현의 높아진 수준을 갖는다면 치료를 위한 대상을 선택하는 단계를 포함한다. 몇몇 예들은 또한 APC 유전자에서 돌연변이를 불활성화시키는 것을 포함하는 대상이 종양을 갖는지 여부를 결정하는 단계를 포함한다. 몇몇 예들은 또한 종양은 APC 유전자에성 돌연변이를 불활성화시키는 것을 포함하면, 치료를 위한 대상을 선택하는 단계를 포함한다.

[0080] 상기와 관련된 방법들, 조성물들 및 관련 문헌들은, 예를 들어, 그 내용 전체가 참고로서 여기에 포함되는, 2013년 5월 10일 공개된 PCT Publication No. WO 2013/067055에서, 그리고 예를 들어, 그 내용 전체가 참고로서 여기에 포함되는, 2013년 5월 10일 공개된 PCT Publication No. WO 2013/067054에서, 그리고 예를 들어, 그 내용 전체가 참고로서 여기에 포함되는, 2013년 5월 10일 공개된, PCT Publication No. WO 2013/067057에서, 그리고 예를 들어, 그 내용 전체가 참고로서 여기에 포함되는, 2013년 5월 10일 공개된, PCT Publication No. WO 2013/067060에서 제공된다.

[0081] 키트들

[0082] 여기에서 제공된 몇몇 예들은 키트들을 포함한다. 몇몇 예들에서, 키트는 여기에서 제공된 인간화된 항체를 포함할 수 있다. 몇몇 예들에서, 항체는 감압하 동결건조된다(lyophilize). 몇몇 예들에서, 항체는 수용액에 있다. 몇몇 예들에서, 키트는 항체의 투여를 위한 약학적 담체를 포함한다. 몇몇 예들에서, 키트는 또한 화학요법 제제를 포함한다. 몇몇 예들에서, 화학요법 제제는 폴린산, 플루오로우라실, 이리노테칸, 켄시타빈 및 아브락산으로부터 선택된다.

[0083] 본 예들이 명확성 및 이해를 위한 목적으로 좀더 상세히 기재되는 반면, 당업자는 형태 및 상세한 사항에서 여러가지 변화들이 본 발명의 진정한 범위로부터 벗어나지 않고 만들어질 수 있다는 것을 인정할 것이다.

[0084] 실시예들

[0085] LGR5에 대항한 항체들 또는 이러한 항체들을 발현시키는 다른 세포주들, 핵산들 및 이러한 항체들을 코딩하는 핵산들을 포함하는 벡터들, 및 이러한 항체들로 암 줄기 세포 성장을 차단하는 방법들에 대한 예들을 일반적으로 기재하여, 설명만을 위한 목적으로 제공되며 이에 제한되는 것으로 의도되지 않는, 특정한 특이적 예들에 대한 참조로서 얻어질 수 있다.

[0086] 실시예 1-LGR5 항체의 인간화

[0087] 인간 생식계열(germline) 서열들은 쥐(murine) 항체 18G7.1를 인간화하기 위한 수용기(acceptor) 프레임워크들로서 이용되었다. 가장 가까운 생식계열 서열들을 찾기 위하여, 가장 유사한 발현된 가벼운 사슬 및 가장 유사한 무거운 사슬이 NCI IgBLAST (ncbi.nlm.nih.gov/igblast/)에 의하여 생식계열 서열들의 데이터베이스에서 확인되었다. 이 검색에서 18G7.1의 CDR 서열들이 마스킹(mask)되었다. 기본형(canonical) 및 접점(interface) 잔기들의 서열 동일성의 체크에 포함되는 가장 적합한 발현된 서열의 선택, 및 CDR 루프 길이들의 유사도(similarity)의 체크.

[0088] 후보 인간화된 서열 및 부모 쥐 단일클론 항체 18G7.1 사이의 주요(key) 구조적 프레임워크에서의 잠재적 구조적 상충들(conflicts)을 확인하기 위하여, 삼차원 모델이 만들어졌다. 항체 구조체들의 합성물(composite)이 접목된(grafted) 후보 인간화된 서열들로 상동성(homology) 모델을 창조하는데 사용되었고, 뒤이어 분자 에너지 극소화가 이어졌다. 컴퓨터 소프트웨어 Pymol을 이용한 구조적 분석이 잠재적으로 적절한 접힘(folding)에 부정적 영향을 줄 수 있는 잔기들을 확인하는데 사용되었다.

[0089]

[0090] 이 분석으로부터, 6 개의 후보 VH 사슬들이 건설(construct)되었는데, 이는: 1) 접힘에 영향을 미칠 것 같은 분석에 기초한 후보 인간화된 프레임워크(framework) 영역 내에서 선택된 치환들을 포함하는 기능적 인간 프레임워크 및 ii) 부모의 18G7.1 쥐 항체 CDR들 (서열번호들 1, 2, 및 3) 화학적으로 합성된 인간 IgG1 불변 영역에 융합된 인(in)-프레임(frame)을 포함한다.

- [0091] 유사하게, 두 후보 VL 사슬들이 건설되었고 그것은: 1) 접합에 영향을 미칠 것 같은 분석들에 기초한 후보 인간화된 프레임워크 영역 내 선택된 치환들을 포함하는 기능적 인간 프레임워크 및 ii) 부모의 18G7.1 쥐 항체 CDR들 (서열번호들 4, 5, 및 6)을 포함하였다. 인간 IgG1 불변 영역에 인-프레임 융합된 후보 VH 사슬 및 후보 VL 사슬이 화학적으로 합성되었다.
- [0092] 선택된 후보 변종 인간화된 무거운 그리고 가벼운 사슬 조합들은 포유류 세포들 내로 공동(co)-형질주입에 의하여 기능성이 테스트되었다. 상기 기재된 6 개의 후보 인간화된 18G7.1 무거운 사슬들 각각은 HEK 293 세포들 내로 후보 18G7.1 가벼운 사슬들 중 하나와 함께 공동-형질주입되었고, 조건부(conditioned) 배지(media)가 유동세포분석법에 의하여 LGR5 항원 결합 활성에 대하여 분석되었다. 게다가 상기 기재된 세 개의 후보 인간화된 18G7.1 무거운 사슬들은 HEK 293 세포들 내로 두 번째 후보 18G7.1 light 사슬과 공동-형질주입되었고, 조건부 배지가 유동세포분석법에 의하여 LGR5 항원 결합 활성에 대하여 분석되었다. 가장 튼튼한(robust) 결합을 보였고 18G7H6로 알려진 18G7.1 후보 무거운 사슬/가벼운 사슬 조합 (인간화 변종)이 친화성(affinity) 성숙을 위하여 선택되었다.
- [0093] 실시예 2 - 인간화된 LGR5 항체 친화성 성숙
- [0094] 선택된 인간화된 변종 18G7H6의 친화성을 증가시키기 위하여 알라닌 스캐닝(scanning) 돌연변이생성 및 돌연변이생성의 포화의 조합이 이용되었다. 무거운 사슬 CDR1 및 가벼운 사슬 CDR1 및 CDR3의 잔기들이 알라닌으로 돌연변이되었고, HEK 293 세포들 내로 형질주입되었고, 그리고 그 결과인 조건부 배지가 유동세포분석법에 의하여 LGR5 항원 결합 활성에 대하여 분석되었다. 포화 돌연변이생성이 무거운 사슬 CDR3 상에서 수행되었는데, 여기에서 CDR3의 모든 잔기는 그 위치에서 원래 아미노산 동일성을 제외하고, 19 개의 자연적으로 발생하는 아미노산들 중의 각각으로 돌연변이되었다. 돌연변이체들 각각은 HEK 293 세포들 내로 형질주입되었고, 그 결과인 조건부 배지가 유동세포분석법에 의하여 LGR5 항원 결합 활성에 대하여 분석되었다.
- [0095] 이들 돌연변이들은 3 개 구조체들로 점점 더 많은 수가 포함되었다. 이들 세 개 구조체들은 그 다음에 HEK 293 세포들 내로 형질주입되었고, 그리고 그 결과인 조건부 배지가 유동세포분석법에 의하여 LGR5 항원 결합 활성에 대해 분석되었다. 두 구조체들 18G7H6A1 및 18G7H6A3이 추가의 특성화를 위하여 선택되었다. 표 1A 목록들 항체들의 특정 서열들.

[0096] <표 1a>

기재	서열번호 :
18G7.1 무거운 사슬 CDR1 아미노산	1
18G7.1 무거운 사슬 CDR2 아미노산	2
18G7.1 무거운 사슬 CDR3 아미노산	3
18G7.1 가벼운 사슬 CDR1 아미노산	4
18G7.1 가벼운 사슬 CDR2 아미노산	5
18G7.1 가벼운 사슬 CDR3 아미노산	6
18G7H6A1 무거운 사슬 DNA	7
18G7H6A1 가벼운 사슬 DNA	8
18G7H6A1 무거운 사슬 아미노산	9
18G7H6A1 가벼운 사슬 아미노산	10
18G7H6A3 무거운 사슬 DNA	11
18G7H6A3 가벼운 사슬 DNA	12
18G7H6A3 무거운 사슬 아미노산	13
18G7H6A3 가벼운 사슬 아미노산	14
18G7Ch 무거운 사슬 DNA	15
18G7Ch 가벼운 사슬 DNA	16
18G7Ch 무거운 사슬 아미노산	17
18G7ch 가벼운 사슬 아미노산	18
18G7H6A3 무거운 사슬 가변 도메인 아미노산	19
18G7H6A3 무거운 사슬 가변 도메인 DNA	20
18G7H6A3 가벼운 사슬 가변 도메인	21
18G7H6A3 가벼운 사슬 가변 도메인 DNA	22
18G7H6A3 무거운 사슬 CDR1 아미노산	23
18G7H6A3 무거운 사슬 CDR1 DNA	24
18G7H6A3 무거운 사슬 CDR2 아미노산	25
18G7H6A3 무거운 사슬 CDR2 DNA	26
18G7H6A3 무거운 사슬 CDR3 아미노산	27

[0097]

기재	서열번호 :
18G7H6A3 무거운 사슬 CDR3 DNA	28
18G7H6A3 가벼운 사슬 CDR1 아미노산	29
18G7H6A3 가벼운 사슬 CDR1 DNA	30
18G7H6A3 가벼운 사슬 CDR2 아미노산	31
18G7H6A3 가벼운 사슬 CDR2 DNA	32
18G7H6A3 가벼운 사슬 CDR3 아미노산	33
18G7H6A3 가벼운 사슬 CDR3 DNA	34
18G7H6A1 무거운 사슬 CDR1 아미노산	35
18G7H6A1 무거운 사슬 CDR1 DNA	36
18G7H6A1 무거운 사슬 CDR2 아미노산	37
18G7H6A1 무거운 사슬 CDR2 DNA	38
18G7H6A1 무거운 사슬 CDR3 아미노산	39
18G7H6A1 무거운 사슬 CDR3 DNA	40
18G7H6A1 가벼운 사슬 CDR1 아미노산	41
18G7H6A1 가벼운 사슬 CDR1 DNA	42
18G7H6A1 가벼운 사슬 CDR2 아미노산	43
18G7H6A1 가벼운 사슬 CDR2 DNA	44
18G7H6A1 가벼운 사슬 CDR3 아미노산	45
18G7H6A1 가벼운 사슬 CDR3 DNA	46
LGR5 아미노산 서열	47
18G7H6A1 무거운 사슬 가변 아미노산	48
18G7H6A1 가벼운 사슬 가변 아미노산	49

[0098]

[0099]

실시예 3 - 인간화된 LGR5 항체들의 생산

[0100]

18G7Ch로 명칭되는, 18G7H6A1, 18G7H6A3 및 키메라 18G7.1를 위한 GS 단일 유전자 벡터들(인간 IgG1 Fc에 융합된 18G7.1로부터의 쥐 Fab)가 건설되었고, 증폭되었고, 200 ml의 부피에서 발현 평가를 위한 일시적 형질주입(transfection)을 이용하여 중국 햄스터 난소(Ovary) 세포들(CHOK1SV GS-KO) 내로 일시적으로 공동-형질주입되었다. 최종 부피 18G7CH에 대하여 5 리터 및 18G7H6A1 및 18G7H6A3 둘 다에 대해 2.5 리터에서, CHOK1SV GS-KO 세포들의 큰 스케일 일시적 형질주입이 그 다음에 개시되었다. 걸러진(clarified) 배양 상청액이 일-단계 단백질 A 크로마토그래피를 이용하여 정제되었다. SE-HPLC, SDS-PAGE 및 엔도톡신(endotoxin) 측정의 형태로 산물의 질 분석이 대조군 샘플로서 내부(in-house) 인간 항체를 포함하는 1 mg/ml의 농도에서 정제된 물질을 이용하여 수행되었다. 결과들은 회수된 산물의 고순도를 보여주었다 (>95.7%).

[0101]

실시예 4 - 인간화된 LGR5 항체를 위한 세포주의 건설

[0102]

18G7H6A3 항체를 발현시키기 위한 안정적인 GS-CHO 감염체(transfectant) 풀들(pools)이 발현 벡터 p18G7H6A3/DGV로 CHOK1SV GS-KO 숙주 세포들의 형질주입에 의하여 창조되었다. 항체를 코드하는 유전자를 포함하는 DGV가 건설되었고, 형질주입되고 그 결과인 콜론 세포주들이 FACS 방법을 이용한 감염체 풀들의 단일 세포 분류에 의하여 그 다음에 만들어졌다. 클로닝 동안 만들어진 96-웰 플레이트들은 단일 콜로니들의 존재에 대하여 매주 스크리닝되었다. 약 2 주 후, 1000 콜로니들까지로부터의 상청액이 Octet® 시스템 방법을 이용하여 항체 생산을 위하여 스크리닝되었다. 스크리닝된 1000 콜로니들로부터, 항체의 991 생산된 검출가능한 수준들. Octet 데이터들이 랭킹되었고 가장 높은 생산된 콜로니들이 진행으로부터 선택되었다.

[0103]

가장 높게 랭킹된 콜로니들이 CD CHO 배지 내 96-딤(deep) 웰 플레이트들에서 현탁 배양으로 진행되었고, 그 다음에 계대배양(subculture) 배지(medium)로 조정되었다. 선택된 세포주들의 생산성이 가능한한 근접하게 생물반응기 프로세스를 모방한(mimicked) 원료공급(feed) 체계(regime)를 이용하여 수행되었다. 배양물은 12 일에 수확되었고 Octet® 시스템 방법을 이용하여 항체 농도가 분석되었다. <20 mg/L 부터 3000 mg/L까지 범위의 수확에서 항체 농도들. 스무 개 세포주들이 생산성 스크리닝, 이로부터 세포주가 유래된 부모 풀(poo) 및 각각의 세포주가 단일 콜로니로부터 생겨났다는 증거에서 랭크 위치에 기초하여 추가의 평가를 위하여 선택되었다. 20

개의 선택된 세포주들의 배양들이 96 딥 웰 플레이트들로부터 플라스크들을 흔들기(shake) 위하여 순차적인 계대배양(subculture)에 의하여 확장되었다. 진동(shake) - 플라스크 배양들에서 통상적인 계대배양 동안 허용가능한 성장 특성들 및 '축소된(abridged)' 유가식 배치(fed-batch) 현탁 배양 생산성 스크리닝에서 랭크 위치에 기초하여(지속적으로 \geq 통상적인 계대배양(subculture)에서 mL 당 생존들(viable cells)), 두 개의 10 L 실험실-스케일 교반(stirred)-탱크 생물반응기들에서 평가를 위하여 선택된 리드(lead) 세포주. 이 리드(lead) 세포주는 통상적인(routine) 계대배양 동안 지속적인 고성장 및 생존능을 입증하였으며 수확 시 $>2000\text{mg/L}$ 역가들(titers)을 갖는다. 이 세포주는 10 L 실험실-스케일 생물반응기들에서 평가를 위하여 비만(Master) 세포(Cell) 은행(Bank) (MCB)의 창조에 이용되었다.

[0104] 실시예 5 - 인간화된 LGR5 항체가 인간 LGR5에 결합한다

[0105] FACS-기반의 분석이 CHO 세포들의 표면 상에 과발현되는 재조합 인간 LGR5에 대한 정제된 18G7H6A1 및 18G7H6A3의 결합을 측정하기 위하여 이용되었다. CHO 및 CHO-LGR5 세포들이 4 °C에서 18G7H6A1 또는 18G7H6A3의 순차적 회색으로 염색되었고 표면 염색이 PE-콘주게이트된 항-인간 IgG 이차 항체들로 검출되었고 FACS칼리버(calibur) 상에서 분석되었다. 인간 LGR5 결합을 위한 18G7H6A1 및 18G7H6A3의 EC50는 $< 10 \text{ nM}$ 이었다. 항체 대조군(MOPC)이 이 실험에서 음성 대조군으로 LGR5 없는 야생형 CHO와 더불어 사용되었다. 18G7H6A3는 야생형 CHO에 결합이 없다는 것을 보여주었고, 그 이소타입(isotype) 대조군은 인간 LGR5에의 어떠한 측정가능한 결합도 보이지 않았다.

[0106] 18G7H6A3의 치료적 약효 및 안전성을 조사하기 위한 잠재적 동물 모델 종을 확인하기 위하여, 종 상동체(homologues)에 의하여 발현되는 LGR5에 대한 18G7H6A3의 상호(cross)-반응성(reactivity)이 일련의 인 비트로 결합 연구들에서 결정되었다. 도 1 참조. 보여지는대로, 항체 18G7H6A3 (BNC101)가 인간 및 개(cyno) LGR5에 강하게 결합하나, 래트(rat) 또는 마우스 LGR5에는 결합하지 않는 것이 찾아졌다.

[0107] 실시예 6 - 플레이트-결합된 재조합, 인간 LGR5 엑토도메인의 인간화된 LGR5 항체의 결합

[0108] 인간 LGR5에 대한 18G7H6A1 및 18G7H6A3의 결합이 ELISA-기반의 플레이트 결합 분석을 이용하여 인 비트로에서 평가되었다. 그 분석은 서양고추냉이 과산화효소-콘주게이트된 항-인간 IgG-CH1 이차 항체와 LGR5-결합된 항체의 검출로, ELISA 플레이트-결합된(bound) 정제된 재조합, LGR5 엑토도메인(ectodomain)-IgG-Fc 융합에의 항체 결합을 측정하였다. 인간 LGR5-Fc에 대한 18G7H6A3의 EC50은 300 pM로 나타났다.

[0109] 실시예 7 - 종양 세포들 상 인간화된 LGR5 항체의 결합 특성들

[0110] LGR5의 다른 수준들을 발현시키는 인간 암 세포주들에 대한 18G7H6A3의 결합 특성들이 비균질(heterogeneous) 종양 군집들 상 18G7H6A3의 잠재적 타겟팅 물성들을 정의하기 위하여 유동세포분석법에 의해 분석되었다. 복수 개의 종양 세포주들에서 LGR5의 발현 수준들이 유동세포분석법에 의하여 수량화되었다.

[0111] 이들 연구들에서 분석된 인간 종양 세포주들은 결장(colon) 암종(carcinoma) 암 세포주들 (CT1 (Bionomics), CT3 (Bionomics), DLD1 (ATCC), Ls174T (ATCC), LoVo (ATCC), SW48 (ATCC), SW480 (ATCC), SW620 (ATCC) 및 HCT116 (ATCC)), 삼중 음성 유방암 세포주들 (Hs578T (ATCC) 및 MDA-MB-231 (ATCC)), 췌장암 세포주들 (AsPC-1 (ATCC), BxPC3 (ATCC), Capan2 (ATCC), HPAFII (ATCC), SW1990 (ATCC), CFPAC (ATCC), Panc10.05 (ATCC) 및 PANC-1 (ATCC)), 시스플라틴(cisplatin)-민감성 난소 암 세포주들 (OVCAR3 (ATCC) 및 SK-OV-3 (ATCC)), 시스플라틴-내성 난소 암 세포주들 (SK-OV-3/CP, OVCAR8/CP, Igrov1/ CP 및 A2780/CP (TGEN)) 및 폐 선암(adenocarcinoma) 세포주 HOP62 (ATCC)을 포함하였다.

[0112] 합류지점(confluence) 근처에서 성장한 세포들이 TrypLE 세포 분리(dissociation) 버퍼 (Life Technologies)로 들어올려졌고, 수가 세어졌고, 웰당 1×10^5 세포들에서 96-웰 V-바텀(bottom) 플레이트들에 플레이트(plate)되었다. 18G7H6A3는 염색 버퍼 (PBS/0.8% 소 혈청 알부민) 내 순차적 회색들로 100nM의 시작 농도에서 테스트되었다. 샘플들은 30 분 동안 얼음 상에서 배양되었고, 그 다음에 4 °C에서 2 분 동안 1800 rpm에서 원심 분리되었고, 염색 버퍼에서 3 회 세척되었다. 오십 μl 의 1:250 회색에서 이차 항체 염소 항-인간 IgG-PE 콘주게이트 (Southern Biotech)가 염색 버퍼 내 각각 대응되는 웰에 첨가되었다. 샘플들은 추가 15 분 동안 얼음 상에서 배양되었고, 그 다음에 전술한 바와 같이 세척되었고, 죽은 세포 제외를 위하여 프로피디움(propidium) 아이오다이드(iodide) (PI) (Life Technologies)를 포함하는 100 μl 염색 버퍼에서 재현탁되었다. 샘플들은 CellQuest (Becton Dickinson) 및 FlowJo (TreeStar, Inc) 소프트웨어를 이용하여 FACS칼리버(calibur) 유세포 분석기로 분석되었다.

[0113] 여러 종양 세포주들에서 LGR5의 세포 표면 발현이 유동세포분석법에 의하여 수량화되었다. CT1 결장직장

(colorectal) 종양 세포들 및 췌장 암 세포주들 Panc-1, Capan2 및 CFPAC이 가장 높은 LGR5 발현자들 중에 있었다. 췌장 암 세포주들 (AsPC-1, SW1990, HPAFII), 시스플라틴-내성 난소 암 세포주들 (OVCAR8/ CP, A2780/CP 및 Igrov1/CP)과 결장(colon), 유방 및 난소 암 세포주들 (SW48, Hs578T 및 OVCAR3)에서 중간의 발현 정도들이 관찰되었다. LGR5 세포 표면 발현의 낮지만 검출가능한 수준들이 결장(colon) (SW480, LoVo) 및 유방암 세포주들 (MDA-MB-231)에서 관찰되었다. 표 2는 종양 세포주들에 18G7H6A3 FACS 결합을 위한 데이터들을 정리한다.

표 2

[0114]

종양 세포주	18G7H6A3 (18G7.1)	IgG
CRC		
CT1	+	-
CT3	+	-
DLD1	+/-	-
Ls174T	+/-	-
LoVo	+/-	-
SW48	+	-
SW480	+/-	-
SW620	+/-	-
HCT116	+/-	-
Breast		
MDA-MB-231	+/-	-
MDA-MB-231 LM2	+/-	-
Hs578T	+	-
CN34	+/-	-
CN34 LM1	+/-	-
Prostate		
PC-3	+/-	-
PCSD1	+/-	-
Ovarian		
OVCAR-3	+	-
SK-OV-3	+/-	-
SK-OV-3/CP	+/-	-
OVCAR8/CP	+	-
Igrov1/CP	+	-
A2780/CP	+	-
Lung		
HOP-62	+/-	-
Pancreatic		
AsPC-1	+	-
Capan2	++	-
HPAFII	+	-
Sw1990*	+	-
CFPAC	++	-
PANC-1	++	-

[0115]

실시예 8 - 인간화된 Anti-LGR5 항체에 의한 인 비보에서 악액질(cachectic)결장직장 종양 성장의 억제

[0116]

CT1 원발성(primary) CRC 이종이식(xenograft) 모델이 IV 전이성 결장(colon) 암 단계Dm1 환자로부터 유래되었다. 이 종양의 DNA 시퀀싱은 K-Ras, PI3K, PTEN, p53 및 APC를 포함하는 많은 유전자들에서 보통의 결장(colon) 암 돌연변이들을 확인하였다. 무-혈청 조건들 하 배양물 내 유지되는 낮은 관(passage) CT1 종양구들이 0 일에 피하로 Matrigel에서 SCID/Bg 마우스들 내로 주사(inject)되었고, 종양 크기 및 체중에 대하여 일주일에 두 번씩 모니터링되었다. 종양들이 120 mm³에 달할 때, 25 일에 CT1 피하 종양들이 10 마리 마우스들의 그룹들로 임의 추출되었다. 마우스들은 PBS, 항체 대조군 MOPC, 18G7H6A1, 18G7H6A3 또는 인간/쥐 키메라 18G7Ch로 처리되었다. 마우스들은 2.5 주 동안 15 mg/kg으로 BIW 투여되었다 (총 5 투여량(doses)).

[0117]

항체 18G7H6A3는 4 투여량들 코스 (15mg/kg, 매주 이 회) 동안 PBS 및 MOPC 항체 대조군들에 비하여 인 비보에서 중요한 항-종양 활성을 보였다. 항체 18G7H6A1는 항-종양 활성을 보였고, 단일클론 18G7H6A3는 18G7H6A1 및

부모 쥐 키메라 18G7Ch 항체 둘 다에 우수한 활성을 보였다. 표 3은 Lgr5+ Abs의 1-4 투여량들 후 퍼센트 CT1 종양 부피 감소를 보여준다(그룹 대(vs) MOPC).

표 3

[0118]

투여량들의 #:	1	2	3	4
18G7Ch	9.2%	30.6%	19.5%	29.0%
18G7H6A1	17.5%	19.1%	14.2%	19.0%
18G7H6A3	38.8%	42.0%	28.9%	35.4%

[0119]

실시예 9 - 인간화된 Anti-LGR5 항체에 의한 인 비보에서 결장직장 종양 성장의 억제

[0120]

CT3 원발성(primary) CRC 이종이식 모델이 K-Ras, H-Ras, APC, PI3K, PTEN, STK11, RB1, TP53, FGFR2, VANGL2, 및 ISCO에서 돌연변이들과 단계 III mCRC의 환자로부터 유래되었다. 낮은 관(passage) 저온보존된 CT3 원발성(primary) 이종이식 종양 단편들이 5 SCID/Bg 마우스들 내로 이식되었다. 5 마리 CT3 원발성(primary) 이종이식-을 갖는(bearing) SCID 마우스들로부터 모아진 평균 ~1150 mm³의 종양들이 이식 후 41일에 제거되었고, 분리되었고 피하로 Matrigel의 CB.17 SCID 마우스들 내로 재이식되었고, 그리고 종양 크기 및 체중에 대하여 매주 이 회 모니터링되었다. 종양들이 평균 130mm³에 도달할 때, 마우스들은 (이식 34일 후) 임의추출되었다. 마우스들이 PBS, 항체 대조군 MOPC, 18G7H6A3, 18G7H6A1 또는 인간/쥐 키메라 18G7Ch로 처리되었다. 마우스들이 2.5 주 동안 15 mg/kg에서 (5 투여량들) BIW 투여되었고, 34일에 시작되었다. 모든 마우스들은 종료 때까지 전 반적인 건강 및 외형과 더불어, 체중 및 종양 크기에 대해 매주 이 회 모니터링되었다.

[0121]

항체 18G7H6A1이 항-종양 활성을 보이는 반면, 단일클론 18G7H6A3는 4 투여량들 후 (매주 이 회, 15mg/kg) PBS 및 MOPC 항체 대조군들에 비하여 중요한 항-종양 활성을 보였다. 18G7H6A3은 부모 쥐 키메라 18G7Ch 항체에 대한 우수한 활성 및 18G7H6A1에 대한 동등한 활성을 보였다. 표 4는 테스트 Abs의 n 투여량 후 퍼센트 CT3 종양 부피 감소 (그룹 대(vs) MOPC)를 보여 준다.

표 4

[0122]

항체(Ab) 투여량들의 #:	1	2	3	4
18G7Ch	22.6%	8.9%	17.0%	13.8%
18G7H6A1	18.3%	12.6%	28.8%	28.7%
18G7H6A3	34.2%	38.1%	23.4%	28.2%

[0123]

실시예 10 - FOLFIRI과 조합으로 인간화된 항-LGR5 항체에 의한 인 비보에서 결장직장 종양의 억제

[0124]

CB.17 SCID 마우스들이 CSC 조건들 하 성장한 CT3 세포들로 이식(implant)되었다. 이식(implantation) 40일 후, 종양들이 ~160 mm³에 도달했을 때, 마우스들은 i) PBS, ii) 15일 동안 매 5일에 주어진(총 3 투여량들(doses), FolFiri (5FU 30 mg/kg, 류코보린(leucovorin) 90 mg/kg 및 이리노테칸(Irinotecan) 24 mg/kg), 및 iii) (주당 이 회 15 mg/kg) FolFiri (as in ii.) 및 18G7H6A3의 조합을 포함하는 치료 그룹들로 임의추출되었다. 종양 부피의 분석은 18G7H6A3 및 FolFiri의 조합이 FolFiri 요법(regimen)에 비하여 CT3 종양들의 성장을 감소시켰다는 것을 보여주었다. 조합 치료는 61, 65, 68, 71 및 75일에 약 58%, 53%, 45%, 33% 및 37%로 각각 종양 부피를 감소시켰다(도 2).

[0125]

실시예 11 - 인간화된 항-LGR5 항체에 의한 인 비보에서 췌장 암 종양 성장의 억제

[0126]

단일 제제로서, 또는 표준 케어와 조합하여, 18G7H6A3의 약효를 평가하기 위하여, 췌장 암 이종이식 모델이 테스트되었다. CB17.SCID 마우스들은 (1:1 비율로 매트릭셀(matrigel)+RPMI에서) AsPC-1 세포들로 이식(impalnt)되었다. 종양들은 5 개 그룹들로 이식(implantation) 20일 후 임의추출(randomize)되었다: i) PBS, ii) MOPC (주 당 이 회, 복강내(ip), 15 mg/kg), iii) 18G7H6A3 (15 mg/kg, 주 당 이 회, 복강내(ip)), iv) 켈시타빈 (90 mg/kg, 주 당 이 회, 복강 내(ip)) 및 v) 상기 투여량들로 켈시타빈 및 18G7H6A3의 동시 조합.

[0127]

단일 제제로서 18G7H6A3가 식염수(saline) 및/또는 대조군 IgG에 비하여, 이식(implantation) 41일 후 거의 40%까지 종양 성장을 억제하였다는 것이 발견되었다. 게다가 18G7H6A3 및 켈시타빈의 조합은 켈시타빈 단독에 비하여 (이식(implantation) 61일 후 36%까지) AsPC-1 모델에서 종양 성장을 상당히 억제하였다. 단일 제제로서

18G7H6A3은 또한 65일까지 PBS 및 대조군 IgG에 비하여 종양 성장에서 일부 억제를 제공하였다.

- [0128] 실시예 12 - 인간화된 항-LGR5 항체에 의한 인 비보에서 삼중 음성 유방암 종양 성장의 억제
- [0129] 이 인 비보(in vivo) 연구는 낮은 관(passage) 삼중 음성 유방암 세포들 (ER-, PR-, HER2 과발현 없음)을 이용하여 수행되었다. MDA-MB-231-LM3 세포들은 DMEM/ 10% FBS/ 항-항 배지에서 부착(adherent) 배양물에 유지되었다. CB.17 SCID 마우스들은 4 번째 유방의(mammary) 지방체(fat pad) 내로 RPMI:Matrigel (1:1)로 MDA-MB-231-LM3 세포들로 0 일에 주사되었고, 종양 크기 및 체중에 대해 매주 이 회 모니터링되었다. 27일에, MDA-MB-231-LM3 종양들이 종양들이 ~155mm³.에 도달했을 때, 10 마리 마우스들의 4 개 그룹들로 임의추출되었다. 마우스들은 PBS, 항체 대조군 MOPC, 또는 18G7H6A3으로 처리되었다. 마우스들은 3.5 주 동안 15 mg/kg에서 BIW 투여되었다 (7 투여량들). 항체 18G7H6A3은 PBS (60.7% 종양 성장 억제) 또는 MOPC 항체 (49.3% 종양 성장 억제) 대조군들에 비하여 중요한 항-종양 활성을 보였다 (도 3).
- [0130] 실시예 13 - SN38 또는 a PI3K/mTOR 억제제로 처리된 결장직장(colorectal) 암 세포들에서 LGR5의 발현 유도
- [0131] DLD1, HCT116, LS174t, LoVo, SW48, SW480 및 SW620을 포함하는 CRC 세포주들의 패널은 PI3K/mTOR 이중(dual) 억제제(inhibitor) (NVP) 또는 SN38 (이리노테칸(Irinotecan)의 활성 대사산물) 또는 5FU (5 플루오로우라실)을 포함하는 2 개의 다른 세포독성 제제들로 처리되었다. 세포들은 상기 제제들로 1 um에서 처리되었고, 72 시간 후 수확되었다. 세포들은 그 다음에 Alexa Fluor647에 콘쥬게이트된 항-LGR5 Mab으로 염색되었고, 데이터들은 FACS칼리버(calibur)을 이용하여 유동세포분석법에 의하여 분석되었다.
- [0132] CRC 세포주들의 유동세포 분석들은 PI3K/mTOR 억제제로 처리될 때 LoVo, HCT116, LS174t, SW48, SW480 및 SW620 세포들에서 LGR5의 더 큰 발현을 보였다. 추가적으로 SN38 처리는 HCT116, LS174t, SW48, SW480 및 특히 SW620 세포들에서 LGR5 발현을 촉진하였다. 5FU 처리는 그러나, 이들 중 어느 것에서도 LGR5 발현을 유도하지 않았는데, 이는 LGR5 발현을 통제하는 근본적인 메커니즘들이 이들 라인들(lines)과 구별된다는 것을 제안한다. 이들 데이터들은 치료들이 주로 LGR5 음성 비-암 줄기 세포 군집을 타겟으로 하기 때문에 LGR5+ 세포들이 상기 제제들로 하는 처리에 더 내성이라는 것을 가리킨다. 이들 제제들로 하는 처리가 이들 세포들에서 LGR5 발현을 상향조절하는지 여부를 이해하기 위하여 우리는 모든 세포주들에서 유동세포분석법에 의하여 LGR5 세포 표면 발현을 분석하였다. PI3K/mTOR 억제제를 처리하자, LGR5 발현이 LoVo에서 상당히 상향조절되었다. 이들 데이터들은 작은 분자 억제제들 또는 세포독성 제제들로 하는 처리가 LGR5neg 세포들을 타겟으로 하고 이들 세포들에서 LGR5의 증가된 발현을 야기하였다는 것을 가리킨다.
- [0133] 실시예 14 - LGR5 발현은 작은 분자 억제제들 또는 세포독성 제제들로 처리된 췌장 암 세포주들에서 촉진된다
- [0134] 상기 발견들을 더 확장하기 위하여 CRC 세포주들에 추가하여, LGR5의 발현이 납(nab)-파클리탁셀(paclitaxel), 켈시타빈 및 탁솔(taxol) 및 또한 PI3K, MEK 및 GSK3β의 억제제들과 같은 췌장 암의 가장 관련된 경로들을 타겟팅하는 작은 분자 억제제들을 포함하는 관련 표준 치료로 처리된 일련의 췌장 세포주들에서 조사되었다. 테스트된 췌장 세포주들은: AsPc1, HPAFII, PANC1, BxPC3, CFPAC, PANC10.05, Capan2 및 SW1990을 포함한다. 납-파클리탁셀 처리는 유동세포분석법에 의하여 분석된 대로 PANC1, BxPc3 및 PANC10.05에서 LGR5 상향조절을 야기하였다. 켈시타빈 처리는 PANC1에서 LGR5를 상향조절하고 탁솔 처리는 HPAFII에서 증가된 LGR5 발현을 야기한다. PI3K/mTOR 처리는 CFPAC에서 LGR5의 상향조절을 야기하고 MEK 억제제는 HPAFII 및 SW1990에서 LGR5를 상향조절한다.
- [0135] 실시예 15 - LGR5은 FOLFIRI 요법(regimen) (5FU, 류코보린 및 이리노테칸)으로 처리된 결장직장 암 종양들에서 상향조절된다
- [0136] 케모(chemo)가 결장직장(colorectal) 종양들에서 LGR5 발현을 변화시키는지 조사하기 위하여, 마우스들이 매 5 일 마다 5FU (30 mg/kg 복강내(i.p)), 류코보린(leucovorin) (90 mg/kg) 및 2 개의 다른 투여량의 이리노테칸 (24 mg/kg 또는 8 mg/kg)으로 처리되었다. 그 연구들의 결과는 CT3 종양들이 케모 요법(regimen)에 민감한 반면, CT1 종양들은 완전히 퇴행하지 않았다는 것을 보여주며, 요법에의 일부 내성을 보였다는 것을 보여주었다 (도 4). LGR5 발현의 FOLFIRI 처리의 효과를 시험하기 위하여, 총 mRNA가 CT1 및 CT3 환자 유래 종양들로부터 추출되었고, LGR5의 발현이 qRT-PCR 에 의하여 결정되었고 DCT (델타 Ct) 값들을 만들어 내기 위하여 그것이 대응하는 GAPDH 전사체로부터의 각 샘플에서 LGR5의 Ct 값(주기 역치)을 뺀으로써 분석되었다. 데이터들은 DCT의 파워에 2 로 나타내어 진다. LGR5의 풍부(abundance)의 분석은 대응하는 식염수 처리된 종양들에 비하여, CT1 (약 2 배(folds)) 및 CT3 종양들 (거의 3.5 배) 둘 다에서 증가된다는 것을 보여주었다.

- [0137] 실시예 16 - LGR5은 췌스타빈 단독 및 납-파클리탁셀과 조합하여 처리된 췌장 암 종양들에서 상향조절된다.
- [0138] 췌장암을 위한 화학요법 치료의 표준 치료가 췌장 종양들에서 LGR5 발현을 변화시키는지 조사하기 위하여, 마우스들(췌스타빈 및 납-파클리탁셀의 조합(JH109 원발성(primary) 이종이식들에서)으로 주 당 이 회 처리되었다. 최종 분석에서, 종양 cDNA를 이용한 qRT-PCR 데이터들은 대응하는 식염수-treated 종양들에 비하여 화학요법 처리된 종양들에서 LGR5의 발현에서 놀랄만한 증가를 보였는데, 이는 표준 치료의 처리가 종양 세포들에서 LGR5의 상향조절을 야기한다는 것을 가리킨다.
- [0139] 췌장 종양의 환자 유래된 이종이식 모델인 JH109 모델에서의 LGR5 발현. 마우스들은 인 비트로에서 배양 조건에 노출되지 않았던 수혜자(recipient)에서 연속적으로 통과되는(passaged) 종양 덩어리들로 이식되었다(implant). 종양-을 지닌 마우스들을 화학요법 요법(regimen) (췌스타빈 및 납-파클리탁셀의 조합)으로 처리하는 것은 종양 성장에 중요한 역할을 야기하였다. 결장(colon) 암 모델들과 일치하여, JH109 종양들에서 LGR5의 상향조절 (4배보다 많음)을 야기하였는데, 이는 화학요법 치료로 암 줄기 세포 군집이 강화되는 것을 제안한다. 예를 들어 도 5 참조.
- [0140] 실시예 17 - 인간화된 항-LGR5 항체에 의한 인 비보에서 췌장 종양 성장의 억제
- [0141] 18G7H6A3의 약효가 또한 췌장(pancreatic) 암 이종이식 모델에서 조사되었다. CB.17 SCID 마우스들이 PANC1 세포들로(마트리켈+RPMI 1:1 비율로 (1E6/마우스 피하(s.c)) 이식되었고, 이식(implantation) 41일 후 치료 그룹들: i) PBS, ii) IgG 대조군 (15 mg/kg, 주 당 이 회, 복강 내(ip)), iii) 18G7H6A3 (15 mg/kg, 주 당 이 회, 복강 내(ip)), iv) 췌스타빈 (90 mg/kg, 주 당 이 회, 복강 내(ip)) 및 v) 췌스타빈 및 18G7H6A3의 동시 조합 (15 mg/kg, 주 당 이 회, 복강 내(ip)). 로 임의추출되었다. 췌스타빈은 종양 성장을 억제하기 위하여 3 주 동안 할당된 그룹에 투여되었다. 모든 마우스들은 매 주 이 회 체중 및 종양 크기, 그리고 전반적인 건강과 외형이 모니터링되었다.
- [0142] 종양 부피의 분석은 종양 성장을 억제하기 위하여 (이식(implantation) 70일 후에 30%까지) 단일 제제로서 18G7H6A3에 우호적인 트렌드가 있는 반면, 18G7H6A3 및 췌스타빈의 조합은 췌스타빈 단독 그룹에 비하여 이식(implantation) 80일 후에 52%까지) PANC1 종양들의 성장을 상당히 억제하였다는 것을 보여주었다.
- [0143] 이 예에서, 화학요법 (췌스타빈)과의 조합으로 투여될 때 관찰된 18G7H6A3의 중요한 활성은 췌스타빈 치료에 반응한 항원 LGR5을 타겟의 증가된 발현에 공헌할 수 있다.
- [0144] 실시예 18 - 인간화된 항-LGR5 항체에 의한 인 비보에서 전-처리된 췌장 종양 성장의 억제
- [0145] 세포주들에 더하여, 우리는 또한 JH109 원발성(primary) 환자 유래된 췌장 암의 이종이식 모델에서 표준 치료와 조합하여 또는 단일 제제로서 18G7H6A3의 약효를 조사하였다. JH109 이종이식 모델은 5-FU, 췌스타빈, 에르비투스(Erbixux) 및 방사선 치료를 포함하는 4 개의 치료 요법들을 받은 환자로부터의 것이었다. 원래의 환자 종양은 인 비트로 배양의 어떠한 노출도 없이 계속해서 면역-결핍 마우스들에서 통과되었다(passage). JH109 모델에서 18G7H6A3의 약효를 테스트하기 위하여, 종양을 지닌 마우스들 (n=7)이 대조군 IgG (15 mg/kg 복강 내(i.p) 이 회/주), 18G7H6A3 (15 mg/kg 복강 내(i.p) 이 회/주) 단일 제제, 케모 표준 치료 췌스타빈 (50 mg/kg 복강 내(i.p) 주 일 회; 및 납-파클리탁셀 30 mg/kg, 정맥내(i.v) 주 일 회의 조합), 케모 및 대조군 IgG의 조합, 케모 및 18G7H6A3의 조합으로 처리되었다. 단일 18G7H6A3 mAb이 종양 성장에 영향을 미치지 않았던 반면, 18G7H6A3과 납-파클리탁셀의 조합 및 췌스타빈 화학요법은 화학요법 단독에 비하여 상당히 더 큰 정도의 종양 억제를 이끌었다. 화학요법과 조합된 18G7H6A3은 화학요법 단독에 비하여 77% 더 큰 종양 성장 억제를 이끌었다. 18G7H6A3 화학요법 조합으로 처리된 세 마우스들은 그것들의 종양을 완전히 박멸하였다 (검출된 측정 가능한 종양 없음). 18G7H6A3 화학요법 조합 그룹은 치료의 중단 후에도 종양 성장을 계속하여 억제하였으며, 한 마우스는 화학요법의 중단 삼 개월 후 어떠한 측정 가능한 종양들이 전혀 없었다. 이 예에서, 화학요법의 조합 (췌스타빈 플러스 납-파클리탁셀)으로 투여된 때에도 관찰되는 18G7H6A3의 중요한 활성은 췌스타빈 납-파클리탁셀 처리에 반응한 타겟 항원 LGR5의 증가된 발현에 공헌할 수 있으며, 원발성(primary) 종양 큰 덩어리(bulk)를 뿌리뽑기 위한 화학요법 치료 후 인 비보에서 원발성(primary) 종양의 재-성장 또는 재발의 예방의 입증이다.
- [0146] 실시예 19 - 인간화된 LGR5 항체 처리는 암 줄기 세포 군집들을 감소시킨다
- [0147] 유동세포(flow cytometric) 분석을 위하여 5 개 각각의 종양들로부터의 세포들이 줄기 세포 특이적 마커들 CD44, 및 CD166에 대항하여 여러가지 항체들로 염색되었다. 종양들은 분리되었고(dissociate), 마우스 세포들을

위하여 감소되었고(depleted), 그 다음에 생존(viable cells)들의 수가 세어졌다. 분리된 세포들은 유동세포분석법에 의해 세포 표면 줄기 세포 마커 발현 의 분석에 이용되었다.

- [0148] CD166+/ CD44+, LGR5+/ CD166+, 또는 LGR5+/ CD166+/ CD44+ 부분모집단들(subpopulations)에 의하여 정의되는 암 줄기 세포 군집에서 감소가 있었다(도 7).
- [0149] 실시예 20 - 인간화된 LGR5 항체 처리는 결장암 종양 재발 및 암 줄기 세포 빈도를 인 비보에서 감소시킨다
- [0150] FolFiri와 조합인 18G7H6A3의 효과들이 결장(colon) 암 CT3 모델에서 테스트되었다 (실시예 10). 원발성(primary) 종양 약효 연구의 결과들은 3 주기(cycle) FOLFIRI 요법(regiment)과 조합인 18G7H6A3이 종양 성장을 감소시키는데 FolFiri 단독보다 더 효과적이었다는 것을 보여주었다. 18G7H6A3 FOLFIRI 조합 요법(regimen)이 또한 암(cancer) 줄기(stem) 세포(cell) (CSC) 빈도를 감소시키는데 효과적인지 여부를 결정하기 위하여, 78 일부터 종양들이 수확되었고, 분리되었고, 풀(pool)이 되었고, 종양 나이브한(naive) CB17.Scid 마우스들의 새 집단(cohort) 내로 10, 30, 100 세포들/측면(flank)에서 제한된 회석 분석에서 재-이식되었다. 마우스들은 그 다음에 종양 성장을 위해 주 당 2x 모니터링되었고, 그리고 종양들이 추가의 치료 없이 성장하는 것을 가능하게 하였다.
- [0151] FOLFIRI와 조합으로 항-LGR5 항체 18G7H6A3md로 처리된 마우스들로부터 분리된 세포들은 FOLFIRI 단독으로 처리된 마우스들로부터 분리된 세포들과 비교하여 크게 감소된 종양형성(tumorigenicity)을 가졌다 (도 8). 게다가, 18G7H6A3 FOLFIRI 조합으로부터 재-이식된 세포들은 FOLFIRI 단독에 비교하여 진행에 지연된 시간 및 상당히 더 느린 종양 성장 프로파일을 가졌다 (도 9). 마지막으로, 18G7H6A3 처리는 40 일에 6 개 요인에 의하여 선형 회귀 분석에 의해 암 줄기 세포 빈도를 감소시켰다 (FolFiri를 위한 1/138.6 대(vs) 1/856.3 18G7H6A3/FOLFIRI). 이들 데이터들은 FOLFIRI와의 조합으로 18G7H6A3이 종양 개시 또는 암 줄기 세포 군집을 효과적으로 타겟으로 하는 것을 가리킨다. 68 일은 30 세포들/동물 데이터들에 대해 마지막 날이었다. 데이터들은 p=0.0039에서 중요하다.
- [0152] 실시예 21 - 인간화된 LGR5 항체 처리는 췌장 암 종양 재발 및 암 줄기 세포 빈도를 인 비보에서 감소시킨다
- [0153] 췌시타빈과 조합인 18G7H6A3의 효과들이 췌장 암 PANC1 모델에서 테스트되었다. 이 연구는 췌시타빈과 조합인 18G7H6A3이 췌시타빈 단독에 비해 PANC1 모델에서 종양 성장을 상당히 억제했다는 것을 보여주었다. 이들 처리 군들로부터의 종양 세포들이 수득되었고, 분리되었고, 풀(pool)이 되었고, 그리고 CB.17 SCID 마우스들의 새 집단 내로 (500, 1500, 4500 또는 13500 세포들/동물) 제한된 회석 분석에서 재-이식되었고, 그리고 처리 없이 성장하는 것을 가능하게 하였다.
- [0154] 췌시타빈과 조합으로 항-LGR5 항체 18G7H6A3으로 처리된 마우스들로부터 분리된 세포들이 췌시타빈 단독으로 처리된 마우스들로부터 분리된 세포들에 비하여 제한된 회석 분석 재-이식에서 매우 감소된 종양형성(tumorigenicity)을 가졌다. 췌시타빈 및 18G7H6A3의 조합으로 처리된 재-이식된 PANC1 종양들은 4500 세포들로 이식된 마우스들에서 점목(engraftment)의 빈도에서 감소를 보였고(췌시타빈에서 40% vs. 조합으로 20%) 그리고 또한 13500 세포들로 이식된 마우스들 (췌시타빈에서 100% vs. 조합에서 70%). 선형 회귀를 이용하여, 췌시타빈 이식된 종양들에서 암 줄기 세포의 빈도는 조합 그룹에 비하여 췌시타빈에서 약 1.5 배 더 높았다 (14883에서 1 vs. 21336에서 1). 이들 데이터들은 췌시타빈으로 조합에서 18G7H6A3이 효과적으로 종양 개시 또는 암 줄기 세포 군집을 타겟으로 하는 것을 가리킨다.
- [0155] PANC1 종양들에 추가로, 우리는 또한 18G7H6A3과 조합으로 또는 단일 체제로서 췌시타빈으로 처리된 AsPC-1 종양들을 갖는 마우스들에서, 제한된 회석 실험 (500, 1500, 4500 및 13500 세포들을 이용하여)에서 암 줄기 세포 빈도 및 점목(engraftment)의 퍼센트를 분석하였다. 치료 40일 후 종양 부피 측정은 췌시타빈으로 종양을 지닌 마우스들 vs. 4500 또는 13500 세포들로 이식된 마우스들에서 조합의 퍼센트의 감소를 보였다(각각 40% 및 80% vs. 30% 및 50%). 암 줄기 세포들의 빈도는 췌시타빈 vs. 조합 군에서 1.5 배보다 더 많이 더 컸는데, 이는 췌시타빈과 조합인 18G7H6A3이 췌장 암에서 암 줄기 세포 군집을 타겟팅한다는 것을 가리킨다.
- [0156] 실시예 22 - 인간화된 LGR5 항체 치료는 삼중 음성 유방 암 종양 재발 및 암 줄기 세포 빈도를 인 비보에서 감소시킨다
- [0157] 파클리탁셀과의 조합인 18G7H6A3의 효과들이 삼중 음성 유방암 MDA-MB-231-LM3 모델에서 테스트되었다 (실시예 12). 이 연구는 파클리탁셀과의 조합인 18G7H6A3이 파클리탁셀 단독에 비하여 종양 성장에서 최소의 추가적 억제 효과를 가졌다. 이들 종양들이 수확되었고, 분리되었고, 풀(pool)이 되었고, CB.17 SCID 마우스들의 새 집단 내로 10, 30, 100 세포들/측면(flank)에서 제한되는 회석 분석으로 재-이식되고, 그리고 처리 없이 성장하는 것을 가

능하게 하였다.

- [0158] 파클리탁셀과 조합인 항-LGR5 항체 18G7H6A3로 처리된 마우스들로부터 분리된 세포들은 파클리탁셀 단독으로 처리된 마우스들로부터 분리된 세포들에 비해 매우 감소된 종양형성(tumorigenicity)을 가졌다. 게다가, 18G7H6A3 플러스 파클리탁셀 종양들로부터의 재-이식된 세포들은 파클리탁셀 단독에 비해 진행으로의 연장된 시간 및 상당히 더 늦은 종양 성장을 가졌다. 최종적으로, 18G7H6A3 플러스 파클리탁셀 치료는 선형 회귀 분석에 의해 암 줄기 세포 빈도를 감소시켰다. 이들 데이터들은 파클리탁셀과 조합으로 18G7H6A3이 효과적으로 종양 개시 또는 암 줄기 세포 군집을 타겟으로 한다는 것을 가리킨다.
- [0159] 실시예 23 - 인간화된 항-LGR5 항체 및 화학요법으로 예방 치료에 의한 인 비보에서 전이성 결장직장 암 성장의 억제
- [0160] 인 비보 연구는 결장직장(colorectal) 암을 가진 환자의 간 메트(met)로부터 유래된 낮은 관(passage) 결장직장 암 세포들(BMCR086)을 이용하여 수행되었다. 0 일에, BMCR086 세포들이 녹았고, RPMI:매트리젤 (1:1)에 현탁되었고, CB.17 SCID 마우스들의 뒤 측면(flank)으로 피하로 주사되었다. 동물들은 매주 두 번 종양 크기 및 체중 증가 모니터링되었다. 7일에, 마우스들은 18G7H6A3과 조합하여 PBS, 18G7H6A3, FOLFIRI 또는 FOLFIRI으로 처리되었다. 마우스들은 7.5 주 동안 15 mg/kg에서 PBS 및 18G7H6A3, BIW로 투여되었다 (16 투여량들). 마우스들은 4 주 동안 (7, 12, 17, 22, 27 및 32 일에 30 mg/kg 플루오로우라실 및 90 mg/kg 류코보린; 8, 13, 18, 23, 28 및 33 일에 24 mg/kg 이리노테칸) FOLFIRI으로 투여되었다 (6 투여량들). FOLFIRI과 조합으로 18G7H6A3은 FOLFIRI 단독에 비해 중요한 항-종양 활성을 보였다 (도 10).
- [0161] 실시예 24 - 인간화된 LGR5 항체 치료는 Wnt 신호전달 경로를 억제한다
- [0162] 결장(colon) 암 CT1 (실시예 8) 및 CT3 (실시예 9)로부터의 18G7H6A3 처리된 종양들은 인 비보 종양 약효 연구들이 웨스턴 블롯 분석으로 특성화되었다. 각각 처리된 마우스 (그룹 당 n=5 내지 10 마우스들)로부터 종양 샘플들이 희생 후 절제되었고, 즉시 액체 질소 냉각된(cooled) 모르타르에서 냉동되었고, 막자로 갈아 부서지고 (ground-up) (냉각분쇄(cryopulverization)), 액체 질소에서 급속 냉동되고 사용될 때까지 -80 °C에서 저장되었다. 냉각분쇄된 종양들은 얼음에서 30분 동안 (포스파타제 및 프로테아제 억제제들을 포함하는 RIPA 버퍼를 환원시키는) 얼음처럼 차가운 용해(lysis) 버퍼에서 가끔의 볼텍싱과 함께 용해되었다. 종양 용해물 단백질을 포함하는 상층액들이 SDS-PAGE 겔이 되었고, 그리고 다수의 Wnt-신호 단백질들 (및 그것들의 인산화된 형태들)에 대하여 웨스턴 블롯이 뒤따랐다. 처리군들 사이의 다수의 중요한 차이들이 CT1 및 CT3 종양들의 웨스턴 블롯들에서 관찰되었다. 도 11에서, phospho-Thr41/Ser45-β-카테닌 (a Wnt-신호 단백질)은 불활성인 마커이고, 그 다음에 분해되고, 18G7H6A3은 인 비보에서 종양 세포들에서 LGR5 신호전달(signaling)를 억제할 수 있다는 것을 입증하는 단백질의 형태이다.
- [0163] 실시예 25 - 인간화된 LGR5 항체 처리는 인 비트로에서 Wnt-신호전달 경로에서 억제하지 않는다
- [0164] LGR5을 안정적으로 발현시키는 부모의(parental) HEK-293T 세포들 및 HEK-293T 세포는 TCF-LEF 리포터 벡터-포함 렌티바이러스(lentivirus) (GFP Cignal, QIAGEN)로 형질도입되었고, 그리고 리포터의 안정적 발현을 위하여 선택되었다. 부모 및 안정적 리포터 라인(lines)들을 발현시키는 LGR5는 96 웰 플레이트에서 25,000/웰로 플레이트되었고, 밤새 부착되었고, 6시간 동안 비히클(vehicle) 또는 항체들로 처리되고 혈청이 없고(starved), 그 다음에 18 시간 동안 재조합 인간 R-스폰딘들 및 재조합 인간 Wnt3a (3nM) 으로 처리되었다. 각각의 R-스폰딘들 1-3에 대한 두 농도들 및 R-spo4를 위한 하나의 농도가 TCF/LEF 리포터 세포주들의 활성화에서 다른 R-스폰딘들의 활성의 우리의 분석에 기초하여 테스트되었다 (100pM, 300pM, 1nM, 3nM 또는 10nM). 리포터 추진된 GFP 신호가 플레이트 리더 상에서 측정되었다. 보여지는 모든 실험들은 테스트된 각 R-스폰딘에 대하여 삼 회 독립적인 실험들(중복하여(in duplicate) 수행된 각 실험)로부터 풀이 된(pooled) 데이터들이다 (데이터들은 평균 + SD).
- [0165] 도 12에 나타난 바와 같이, 안정적 18G7H6A3의 증가하는 농도들은 Wnt3a 플러스 RSP01, RSP02 또는 RSP03의 조합에 의한 TCF/LEF 프로모터 추진된 GFP 발현의 유도에 영향을 미치지 않았다. RSP0 및 Wnt의 존재 하 LGR4 및 LGR5 둘 다를 통한 신호전달 활성의 유도를 억제하는 것으로 보여진 양성 대조군 항체 76C12이 또한 보여진다. 이 데이터들은 항-LGR5 항체 18G7H6A3가 RSP0-추진된 TCF/LEF 프로모터 활성화를 차단하지 않는다는 것을 입증한다.
- [0166] 실시예 26 - 인간화된 LGR5 항체는 ADCC (항체 의존적 세포 세포독성) 메커니즘을 통한 종양 세포들을 타겟으로 한다
- [0167] CHO-LGR5 세포들은 합류하도록(confluent) 성장되었고, 스펀다운되었고(spun down), PBS에서 재현탁되었고, 수

가 세어졌다. 세포들 (거의 100k)의 부분표본(aliquot)이 100 μ M의 미리-따뜻해진 (37 $^{\circ}$ C) CFSE (카르복시플루오레사인(Carboxyfluorescein) 숙시니미딜(succinimidyl) 에스터(ester))을 포함하는 또다른 튜브에 첨가되었다. 최종 CFSE 농도는 약 1 μ M이었다. 다음에 세포들이 세척되었고 미리-덥혀진 배지에서 재현탁되었고, 또다른 03분 동안 배양기에 놓여졌고 그 후 PBS로 세척되었다. 염색된 세포들이 그 다음에 18G7H6A3 (100 μ M)로 염색되었다. CHO-LGR5 세포들에의 항체의 결합을 보장하기 위하여, 몇몇 연구들에서, 세포들의 부분표본이 또한 이차 염소 염소 항-인간 PE 콘주게이트된 항체로 염색되었고, 실험실에서 칼리버(calibur) 기계로 분석되었다. U937 세포들이 실온에서 실험실 내 빛 보호된 장소에서 그리고 15분 동안 DDAO-SE (DDAO 석시니미딜 에스터; 100K 세포들을 위한 염료 2 μ M)로 염색되었다. 세포들은 그 다음에 1 ml의 FBS (태아 소 혈청)으로, 그 다음에 5 분 동안 빛 보호된 장소에서 배양이 이어졌다. 그 다음에, 세포들은 PBS 보충된 FBS (10%)으로 세척되었고 FBS가 보충된 RPMI에서 재현탁되었다 (2.5%). CHO-LGR5-18G7H6A3 및 U937-DDAO-SE 표지된 세포들 둘다가 5 시간 동안 세포 배양기에서 공동-배양되었고, 실험실에서 칼리버 기계에서 분석되었다. 음성 대조군으로서, CHO-LGR5-CFSE 세포들의 부분표본 (18G7H6A3 염색 없음)이 또한 U937으로 공동-배양되었고, 칼리버 기계로 분석되었다.

[0168] 유동세포분석법 데이터들의 분석은 CFSE 및 18G7H6A3으로 염색된 CHO-LGR5 세포들의 대다수가 독자생존 가능하고 칼리버 기계에서 검출가능하다는 것을 보여주었다. 게다가, U937 (U937 (인간 단핵구 세포주; 효과기 (effector) 세포들) 및 CHO-LGR5 세포들 둘 다 염색되었을 때 검출가능하였고, 개별적으로 수득되었다. 마지막으로, U937-DDAO-SE 및 CHO-LGR5-CFSE-18G7H6A3의 공동-배양은 세포들의 이중 양성 군집을 확인하였고, 그러나, 18G7H6A3이 부족한 U937 및 CHO-LGR5-CFSE의 공동-배양은 이중 양성 군집을 만들어내지 않았다. 이중 양성 군집의 존재는 (Fc 부분을 발현시키는) CHO-LGR5-18G7H6A3에 (FcR을 발현시키는) U937의 교차 결합을 나타내며, 나아가 ADCC가 18G7H6A3의 항-종양 활성의 메커니즘들 중 하나라는 것을 제안한다.

[0169] 실시예 27 - 인간화된 LGR5 항체가 LGR5을 내재화한다

[0170] 18G7H6A3의 내재화(internalization)가 LGR5을 과발현하는 CHO 세포에서 시험되었다. 세포들은 4 $^{\circ}$ C에서 30분-2 시간 동안 100nM 항체로 염색되었고, 과도한 항체(Ab)가 세척되었고, 그리고 염색된 세포들이 4 $^{\circ}$ C 또는 37 $^{\circ}$ C에서 배양되었다. 세포들은 세포 표면-결합된 항체들의 내재화를 모니터링하기 위하여 여러가지 시점들에서 AlexaFluor488-콘주게이트된 이차 항체들로 염색되었다. 37 $^{\circ}$ C에서 배양된 후, 내재화된 속도는 6.703 ± 1.282 분의 표면 부위(localization)에 대해 측정된 t1/2 값을 가졌다. 표면-결합된 항체에서 일부 감소가 관찰되었음에도 불구하고, 내재화는 4 $^{\circ}$ C에서 배양에 의하여 크게 차단되었다.

[0171] 실시예 28 - 인간화된 LGR5 항체는 LGR5에 가용성 RSP0들의 결합을 경쟁적으로 차단하지 않는다

[0172] 인간 R-스폰딘 1/2/3/4 단백질들의 존재에서 hLGR5-Fc로 비오틴-18G7H6A3의 상호작용이 경쟁 ELISA 형식(format)을 이용하여 시험되었다. LGR5-Fc는 2 μ g/mL로 96-웰 고 결합 ELISA 플레이트 상에 코팅되었다. 플레이트는 PBS + 1% BSA으로 차단되었다. 비오틴(biotin)-18G7H6A3이 1 μ g/mL으로 결합 버퍼에서 희석되었다. EC50 농도 상 강한 신호를 주기 위하여 LGR5-Fc 및 비오틴-18G7H6A3 사이에서 전의 직접적 결합 ELISA로부터 선택되었다. 경쟁자(competitor) 단백질들은 변화하는 농도들에서 비오틴-18G7H6A3과 동시에 ELISA 플레이트에 첨가되었다. 스트렙타비딘(streptavidin)-HRP (R&D Systems, cat # 890803)의 1:1,000의 희석이 검출을 위하여 사용되었다. 플레이트는 TMB (Thermo)로 발달되었고, 데이터들이 450nm에서 SpectraMax Plus 384 플레이트 리더 상에 수집되었다. 데이터 분석은 GraphPad Prism 6 프로그램을 이용하여 이루어졌다. ELISA는 경쟁자 농도들 및 비오틴-mAb의 일부 변형들과 삼 회 반복되었다.

[0173] 양성 대조군으로서, LGR5-Fc는 플레이트 상에서 hLGR5-Fc에의 비오틴-18G7H6A3의 결합과 경쟁되었다. R-스폰딘들 1/2/3/4에 대해 플레이트에 코팅된 LGR5-Fc에의 비오틴-18G7H6A3의 결합을 차단하는 능력이 시험되었다. 단백질들은 R&D Systems에서 구입하였고, 포유류 세포들에서 발현되는 전장 구조체들이었다. R-스폰딘 단백질들의 가장 높은 농도에서, LGR5에의 항체 결합의 완전한 차단이 관찰되었다 (도 13).

[0174] 실시예 29 - 인간화된 LGR5 항체는 LGR5에의 가용성 RSP0들의 결합을 경쟁적으로 차단하지 않는다

[0175] LGR5에의 리간드 단독 (RSP0 또는 노린(Norrin))의 결합은 LGR5 신호전달을 유도하는데 충분하지 않다. 대신, LGR5는 신호전달을 추진하기 위하여 복수의 공동(co)-수용체들과 삼중 복합체들을 형성한다. LGR5 삼중 복합체들의 형성에 대한 18G7H6A3의 효과들을 시험하기 위하여, R-스폰딘 1/2/3/4 및 노린의 존재 하 LGR5 to RNF43, ZNRF3, 및 LRP6의 결합이 ELISA 형식을 이용하여 시험되었다. RNF43-Fc, ZNRF3-Fc, 및 LRP6-Fc은 1x PBS에서 4 μ g/mL에서 96-웰 고 결합 플레이트 상에서 코팅되었다. 플레이트가 4 $^{\circ}$ C에서 밤새 배양되었고, PBS + 1% BSA로

차단되었다. LGR5-Fc는 모두, 1 µg/mL의 R-스폰딘 1/2/3/4 또는 0.5 µg/mL의 노린(Norrin)의 존재 또는 부존재 하, 1 µg/mL로 원발성(primary) 버퍼에서 희석되었다. R-스폰딘 1/2/3/4 또는 노린이 ELISA 플레이트로 추가되기 전에, hLGR5-Fc과 함께 전배양되었다. 삼중(Triplicate) 웰들이 각 조건들에 대하여 이용되었고 삼 회 테스트되었다. 1:2,000 항-FLAG mAb (세포 신호전달)이 검출을 위하여 사용된 항-마우스 IgG HRP (JIR)의 결합된 hLGR5-Fc.1:10,000 희석을 검출하기 위하여 사용되었다. 플레이트는 TMB (Thermo)와 발달되었고, 그리고 데이터들이 450nm에서 SpectraMax Plus 384 플레이트 리더 상에서 수집되었다. 데이터 분석은 GraphPad Prism 6 프로그램을 이용하여 이루어졌다. LGR5, 리간드들 RSPO 또는 노린(Norrin), 및 공동-수용체 (RNF43-Fc, ZNRF3-Fc, 및 LRP6-Fc)과의 삼중 복합체의 형성이 관찰되었다.

[0176] 다음에, LGR5-Fc 및 RSPO 또는 노린(Norrin)의 존재 하 ELISA 플레이트에 더하여 18G7H6A3가 추가되었다. 18G7H6A3은 RSPO 및 노린 리간드들 둘다와 더불어 모든 세 개 공동-수용체들 (RNF43, ZNRF3, 및 LRP6)의 형성을 상당히 감소시켰다. 도. 14 참조. 18G7H6A3은 리간드 결합과 직접적으로 또는 경쟁적으로 경쟁하지 않기 때문에, 이 데이터들은 역제의 알로스테릭(allosteric) 모델의 증거이다.

[0177] 실시예 30 - 항-LGR5 항체 18G7H6A3의 에피토프 맵핑

[0178] 항체 18G7H6A3이 결합하는 LGR5의 특정 영역(들)을 더 특성화하기 위하여, 에피토프 맵핑(mapping) 시험이 수소 중수소 교환 질량 분석기를 이용하여 수행되었다. 수소-중수소 교환 실험들을 수행하기 전에, 구아니딘 염산염의 변화하는 농도들의 중수소화되지 않은(undeuterated) 버퍼로 제조된 테스트 소화물들(digests)이 LGR5 단독의 최고의 펩타이드 범위(coverage)를 위한 단백질 가수분해 조건들을 최적화하기 위하여 만들어졌다. DXMS에 대한 펩신 소화를 위하여, 샘플이 5 °C에서 해동되었고, 그 다음에 즉시 0.05% 트리플루오로 아세트산으로 100 µl/분의 유속에서 돼지 펩신 (Sigma)으로 채워진 프로테아제 칼럼 상에서 소화되었다. 펩신(peptic) 단편들이 C18 트랩(trap) 칼럼 상에서 수집되었고 6부터 38%까지의 선형 아세트니트릴 구배로 C18 역상 칼럼 (Vydac)에서 분리되었다. 칼럼 유출물은 LCQ 클래식 (Thermo Finnigan, Inc.) 또는 Q-TOF 질량 분석기 (Micromass) 내로 직접 전기분무되었다. MS/MS 데이터들 세트로부터 펩신-만들어진 펩타이드들의 결정이 SEQUEST (Thermo Finnigan, Inc.)의 이용을 통하여 가능하게 되었다. 펩타이드들의 이 세트는 그 다음에 DXMS Explorer (Sierra Analytics Inc., Modesto, CA)에 의하여 더 확인되었다. GdnHCl의 다른 농도들을 위한 펩타이드 범위(coverage) 지도들(maps)이 비교되었고, 각 개별적인 단백질 또는 단백질 복합체를 위한 최고의 범위 지도의 조건이 그 다음의 중수소 교환 시험들을 위하여 이용되었다. 모든 단계들은 전술한 대로 0 °C에서 수행되었다.

[0179] 교환 시험들은 최종 농도 50% D2O으로 D2O 버퍼와 18G7H6A3과 전배양된 LGR5-Fc 또는 단백질 버퍼에서 LGR5-Fc을 혼합함으로써 개시되었다. 혼합물은 0 °C에서 10, 30, 100, 300, 1,000, 3,000, 또는 10,000 초(s) 동안 배양되었고 그 다음에 교환 반응이 얼음처럼 찬 퀀칭(quench) 용액(0.96% 포름산, 0~0.8 M 구아니딘 염산염)을 첨가함으로써 퀀칭되어, pH 2.5에서 0.58% 포름산 및 0~0.5 M 구아니딘 염산염의 최종 농도들을 갖는 샘플들을 야기하였다. 샘플들은 그 다음에 즉시 드라이아이스 상에 동결되었고 -80 °C에서 저장되었다. DXMS 시험들의 데이터 가공은 전술한 전문화된 소프트웨어(DXMS Explorer, Sierra Analytics Inc.)를 이용하였다.

[0180] 수소/중수소 (H/D)-교환 데이터들은 항원에의 항체의 결합 시 표면 노출되는 잔기들을 다양하게 하는 것 및 18G7H6A3의 결합 때문에 용매 노출에의 변화에 대한 상세한 것들을 제공한다. HD 교환 데이터들 분석은 18G7H6A3이 X-레이 결정분석 연구들에서 확인된 대로 R-스폰딘 결합 부위의 전면의 맞은편 상, 류신 풍부 반복들(repeats) 6-9의 결합 표면 내 서열번호: 47의 아미노산들 T175, E176, Q180, R183, S186, A187, Q189, D247, E248, T251, R254, S257, N258, K260에 결합한다는 것을 가리킨다. (예컨대, 그 전체가 참조로서 포함되는 Chen et al. Genes Dev. 27(12):1345-50 참조). 이들 데이터들은 LGR5의 R-스폰딘들에의 결합에 관여되는 잔기들이 결합 18G7H6A3에 관여되지 않는다는 것을 보여준다. 이들 예비 결과들은 LGR5의 다른 구조적 요소들이 18G7H6A3의 결합 부위에 관여될 수 있다는 사실을 불가능하게 하지 않는다.

[0181] 실시예 31 - 결장(colon) 암으로 고통받는 인간 환자에게 18G7H6A3의 투여

[0182] 결장(colon) 암으로 고통받는 인간 환자들의 군이 화학요법으로 치료되고 종양 부피가 모니터링된다. 평균 종양 부피가 확장되는 것을 멈추고 사실 화학요법의 시작 시 감소되는 것이 관찰된다. 연장된 시간 후, 종양 부피는 안정화되고 결국 증가하기 시작했다.

[0183] 결장(colon) 암으로 고통받는 두 번째 인간 환자 군은 18G7H6A3과 함께 투여되는 화학요법으로 치료되었다. 다시, 평균 종양 부피가 모니터링된다. 종양 부피가 확장되는 것을 멈추고 사실 화학요법의 시작 시 감소되는 것이 관찰된다. 종양 부피가 첫번째 군의 그것보다 상당히 더 낮은 최소 부피로 감소하는 것이 관찰된다. 종양 크

기가 첫 번째 군에 비례하여(relative) 상당히 연장된 시간 동안 낮게 남아있는 것 또한 발견된다.

- [0184] 실시예 32 - 결장(colon) 암으로 고통받는 인간 환자에게 18G7H6A1의 투여
- [0185] 결장(colon) 암으로 고통받는 인간 환자들의 군이 화학요법으로 치료되고 종양 부피가 모니터링된다. 평균 종양 부피가 확장되는 것을 멈추고 사실 화학요법의 시작 시 감소되는 것이 관찰된다. 연장된 시간 후, 종양 부피는 안정화되고 결국 증가하기 시작했다.
- [0186] 결장 암으로 고통받는 두 번째 인간 환자 군은 18G7H6A1과 함께 투여되는 화학요법으로 치료되었다. 다시, 평균 종양 부피가 모니터링된다. 종양 부피가 확장되는 것을 멈추고 사실 화학요법의 시작 시 감소되는 것이 관찰된다. 종양 부피가 첫 번째 군의 그것보다 상당히 더 낮은 최소 부피로 감소하는 것이 관찰된다. 종양 크기가 첫 번째 군에 비례하여 상당히 연장된 시간 동안 낮게 남아있는 것 또한 발견된다.
- [0187] 실시예 33 - 결장 암으로 고통받는 인간 환자에게 18G7H6A3의 투여
- [0188] 결장 암으로 고통받는 인간 환자들의 첫 번째 군에게 화학요법 단독으로 투여되었다. 결장 암으로 고통받는 두 번째 인간 환자 군은 18G7H6A3과 조합인 화학요법으로 투여되었다.
- [0189] 첫 번째 군은 종양 크기 및 성장의 일시적 감소를 입증하고, 그 후 종양 성장이 다시 시작되고 증상이 돌아온다. 화학요법 치료 후 종양 성장은 그 다음의 화학요법 치료들에 저항성(recalcitrant)이다.
- [0190]
- [0191] 두 번째 군은 종양 성장의 중단 및 종양 크기의 기저(basal) 수준으로의 감소를 입증한다. 종양 성장은 치료 요법(regimen)의 완료 시 또는 동안 다시 시작되지 않는다. 요법의 완료 후, 성장은 돌아오지 않고 암의 증상은 두 번째 군에 더 이상 존재하지 않는다.
- [0192] 실시예 34 - 결장 암으로 고통받는 인간 환자에게 18G7H6A1의 투여
- [0193] 결장 암으로 고통받는 인간 환자들의 첫 번째 군에게 화학요법 단독으로 투여되었다. 결장 암으로 고통받는 두 번째 인간 환자 군은 18G7H6A1과 조합인 화학요법으로 투여되었다.
- [0194] 첫 번째 군은 종양 크기 및 성장의 일시적 감소를 입증하고, 그 후 종양 성장이 다시 시작되고 증상이 돌아온다. 화학요법 치료 후 종양 성장은 그 다음의 화학요법 치료들에 저항성이다.
- [0195] 두 번째 군은 종양 성장의 중단 및 종양 크기의 기저 수준으로의 감소를 입증한다. 종양 성장은 치료 요법의 완료 시 또는 동안 다시 시작되지 않는다. 요법의 완료 후, 성장은 돌아오지 않고 암의 증상은 두 번째 군에 더 이상 존재하지 않는다.
- [0196] 실시예 35 - 결장 암으로 고통받는 인간 환자에게 18G7H6A3의 투여는 생존을 증가시킨다
- [0197] 결장 암으로 고통받는 인간 환자들의 첫 번째 군에게 화학요법 단독으로 투여되었다. 결장 암으로 고통받는 두 번째 인간 환자 군은 18G7H6A3과 조합인 화학요법으로 투여되었다.
- [0198] 치료 후 정해진 기간(1년)에 환자 생존이 모니터링된다. 두 번째 군에서 환자 생존이 첫 번째 군에서 환자 생존보다 상당히 더 높은 것이 관찰된다. 즉, 두 번째 군의 상당히 더 높은 비율이 첫 번째 군의 생존율에 비하여 치료 후 첫 일 년이 지나 생존한다.
- [0199] 유사한 관찰들이 뒤의 간격들에서 이루어졌고, 첫 번째 간격에서 생존자들 중에서, 치료 1년 후에 살아있는 첫 번째 군의 일원보다 두 번째 군의 일원들이 두 번째 간격(치료 후 2년)까지 생존할 가능성이 상당히 더 많다는 것이 관찰된다.
- [0200] 실시예 36 - 결장 암으로 고통받는 인간 환자에게 18G7H6A1의 투여는 생존을 증가시킨다
- [0201] 결장 암으로 고통받는 인간 환자들의 첫 번째 군에게 화학요법 단독으로 투여되었다. 결장 암으로 고통받는 두 번째 인간 환자 군은 18G7H6A1과 조합인 화학요법으로 투여되었다.
- [0202] 치료 후 정해진 기간(1년)에 환자 생존이 모니터링된다. 두 번째 군에서 환자 생존이 첫 번째 군에서 환자 생존보다 상당히 더 높은 것이 관찰된다. 즉, 두 번째 군의 상당히 더 높은 비율이 첫 번째 군의 생존율에 비하여 치료 후 첫 일 년이 지나 생존한다.
- [0203] 유사한 관찰들이 뒤의 간격들에서 이루어졌고, 첫 번째 간격에서 생존자들 중에서, 치료 1년 후에 살아있는 첫

번째 군의 일원보다 두 번째 군의 일원들이 두 번째 간격(치료 후 2년)까지 생존할 가능성이 상당히 더 많다는 것이 관찰된다.

- [0204] 실시예 37 - 유방 암으로 고통받는 인간 환자에게 18G7H6A3의 투여
- [0205] 유방암으로 고통받는 인간 환자들의 군이 화학요법으로 치료되고 종양 부피가 모니터링된다. 평균 종양 부피가 확장되는 것을 멈추고 사실 화학요법의 시작 시 감소되는 것이 관찰된다. 연장된 시간 후, 종양 부피는 안정화 되고 결국 증가하기 시작했다.
- [0206] 유방암으로 고통받는 두 번째 인간 환자 군은 18G7H6A3과 함께 투여되는 화학요법으로 치료된다. 다시, 평균 종양 부피가 모니터링된다. 종양 부피가 확장되는 것을 멈추고 사실 화학요법의 시작 시 감소되는 것이 관찰된다. 종양 부피가 첫번째 군의 그것보다 상당히 더 낮은 최소 부피로 감소하는 것이 관찰된다. 종양 크기가 첫 번째 군에 비례하여 상당히 연장된 시간 동안 낮게 남아있는 것 또한 발견된다.
- [0207] 실시예 38 - 유방 암으로 고통받는 인간 환자에게 18G7H6A1의 투여
- [0208] 유방암으로 고통받는 인간 환자들의 군이 화학요법으로 치료되고 종양 부피가 모니터링된다. 평균 종양 부피가 확장되는 것을 멈추고 사실 화학요법의 시작 시 감소되는 것이 관찰된다. 연장된 시간 후, 종양 부피는 안정화 되고 결국 증가하기 시작했다.
- [0209] 유방암으로 고통받는 두 번째 인간 환자 군은 18G7H6A1과 함께 투여되는 화학요법으로 치료된다. 다시, 평균 종양 부피가 모니터링된다. 종양 부피가 확장되는 것을 멈추고 사실 화학요법의 시작 시 감소되는 것이 관찰된다. 종양 부피가 첫번째 군의 그것보다 상당히 더 낮은 최소 부피로 감소하는 것이 관찰된다. 종양 크기가 첫 번째 군에 비례하여 상당히 연장된 시간 동안 낮게 남아있는 것 또한 발견된다.
- [0210] 실시예 39 - 유방 암으로 고통받는 인간 환자에게 18G7H6A3의 투여
- [0211] 유방암으로 고통받는 인간 환자들의 첫 번째 군에게 화학요법 단독으로 투여되었다. 유방암으로 고통받는 두 번째 인간 환자 군은 18G7H6A3과 조합인 화학요법으로 투여되었다.
- [0212] 첫 번째 군은 종양 크기 및 성장의 일시적 감소를 입증하고, 그 후 종양 성장이 다시 시작되고 증상이 돌아온다. 화학요법 치료 후 종양 성장은 그 다음의 화학요법 치료들에 저항성이다.
- [0213] 두 번째 군은 종양 성장의 중단 및 종양 크기의 기저 수준으로의 감소를 입증한다. 종양 성장은 치료 요법의 완료 시 또는 동안 다시 시작되지 않는다. 요법의 완료 후, 성장은 돌아오지 않고 암의 증상은 두 번째 군에 더 이상 존재하지 않는다.
- [0214] 실시예 40 - 유방 암으로 고통받는 인간 환자에게 18G7H6A1의 투여
- [0215] 유방암으로 고통받는 인간 환자들의 첫 번째 군에게 화학요법 단독으로 투여되었다. 유방암으로 고통받는 두 번째 인간 환자 군은 18G7H6A1과 조합인 화학요법으로 투여되었다.
- [0216] 첫 번째 군은 종양 크기 및 성장의 일시적 감소를 입증하고, 그 후 종양 성장이 다시 시작되고 증상이 돌아온다. 화학요법 치료 후 종양 성장은 그 다음의 화학요법 치료들에 저항성이다.
- [0217] 두 번째 군은 종양 성장의 중단 및 종양 크기의 기저 수준으로의 감소를 입증한다. 종양 성장은 치료 요법의 완료 시 또는 동안 다시 시작되지 않는다. 요법의 완료 후, 성장은 돌아오지 않고 암의 증상은 두 번째 군에 더 이상 존재하지 않는다.
- [0218] 실시예 41 - 유방 암으로 고통받는 인간 환자에게 18G7H6A3의 투여는 생존을 증가시킨다
- [0219] 유방암으로 고통받는 인간 환자들의 첫 번째 군에게 화학요법 단독으로 투여되었다. 유방암으로 고통받는 두 번째 인간 환자 군은 18G7H6A3과 조합인 화학요법으로 투여되었다.
- [0220] 치료 후 정해진 기간(1년)에 환자 생존이 모니터링된다. 두 번째 군에서 환자 생존이 첫 번째 군에서 환자 생존보다 상당히 더 높은 것이 관찰된다. 즉, 두 번째 군의 상당히 더 높은 비율이 첫 번째 군의 생존율에 비하여 치료 후 첫 일 년이 지나 생존한다.
- [0221] 유사한 관찰들이 뒤의 간격들에서 이루어졌고, 첫 번째 간격에서 생존자들 중에서, 치료 1년 후(pot)에 살아있는 첫 번째 군의 일원보다 두 번째 군의 일원들이 두 번째 간격(치료 후 2년)까지 생존할 가능성이 상당히 더 많다는 것이 관찰된다.

- [0222] 실시예 42 - 유방 암으로 고통받는 인간 환자에게 18G7H6A1의 투여는 생존을 증가시킨다
- [0223] 유방암으로 고통받는 인간 환자들의 첫 번째 군에게 화학요법 단독으로 투여되었다. 유방암으로 고통받는 두 번째 인간 환자 군은 18G7H6A1과 조합인 화학요법으로 투여되었다.
- [0224] 치료 후 정해진 기간(1년)에 환자 생존이 모니터링된다. 두 번째 군에서 환자 생존이 첫 번째 군에서 환자 생존보다 상당히 더 높은 것이 관찰된다. 즉, 두 번째 군의 상당히 더 높은 비율이 첫 번째 군의 생존율에 비하여 치료 후 첫 일 년이 지나 생존한다.
- [0225] 유사한 관찰들이 뒤의 간격들에서 이루어졌고, 첫 번째 간격에서 생존자들 중에서, 치료 1년 후(pot)에 살아있는 첫 번째 군의 일원보다 두 번째 군의 일원들이 두 번째 간격(치료 후 2년)까지 생존할 가능성이 상당히 더 많다는 것이 관찰된다.
- [0226] 실시예 43 - 결장 암으로 고통받는 인간 환자에게 18G7H6A3의 투여는 부작용들을 감소시킨다
- [0227] 결장암으로 고통받는 인간 환자들의 첫 번째 군에게 LGR5-RSP0 결합 및 신호전달(signaling)을 차단하는 항-LGR5 항체 및 화학요법이 투여되었다. 결장 암으로 고통받는 두 번째 인간 환자 군은 18G7H6A3과 조합인 화학요법으로 투여되었다.
- [0228] 첫 번째 군은 LGR5을 통한 RSP01 신호전달의 방해와 관련된 비-치료적 부작용들을 입증한다. 이들 부작용들은 환자 건강에 해롭다.
- [0229] 화학요법과 조합하여 18G7H6A3이 투여된, 두 번째 군은 LGR5을 통한 RSP01 신호전달의 방해와 관련된 비-치료적 부작용들을 입증하지 않는다.
- [0230] 실시예 44 - 진행(advanced) CRC 종양들에서 LGR5 발현.
- [0231] LGR5 전사체 발현이 LGR5 특이적 프로브들로 RNAscope 기술을 이용하여 조사되었다. LGR5 전사체는 결장, 창자(intestine), 소뇌 및 췌장을 포함하는 조직들에서 검출가능하였다. LGR5 전사체는 또한 CT1 CRC 및 JH109 췌장 종양들을 포함하는, 환자 유래된 이종이식(PDX) 조직들에서 검출가능하였다. LGR5 발현이 초기(Grade-I) vs. 진행(전이성)을 포함하는 종양형성의 다른 단계들에서 분리된 CRC 환자 샘플들에서 조사되었다. LGR5 전사체는 CRC 정도(Grade) I, II 및 II 병변들에서 발현되었고, CRC 전이성 병변들에서 고발현되었다.
- [0232] 실시예 45 - 전이성 췌장 환자 유래 이종이식들에서 LGR54 발현
- [0233] 전이성 췌장 환자 유래된 이종이식들에서 LGR5 발현이 정량적 폴리메라제 사슬 반응(QPCR)을 이용하여 조사되었다. 종양 조직의 샘플이 순간냉동되거나 또는 RNAlater (Qiagen, CA)을 포함하는 저온유리병(cryovial)에 첨가되고, 그리고 몇 시간 동안 4 °C에서 배양 후 -70 °C로 이동되었다. 총 RNA가 Qiagen RNeasy 추출 키트(Qiagen, CA)를 이용하여 추출되었고, 제조업자에 의하여 제공된 프로토콜들 및 SuperScriptIII 키트(Life Technologies, CA)를 이용하여 cDNA가 합성되었다. 인간 LGR5 전사체 풍부함이 인간 특이적 LGR5 및 GAPDH 프라이머들 및 하기 StepOne Thermocycler (Life Technologies, CA)에서 열 조건을 이용하여 측정되었다: 50 °C (2 분); 90 °C (2 분) 및 90 °C (15 초) 및 60 °C (1 분)의 40 주기(cycles) 그리고 녹는(melt) 커브(curve) 평가 (65 °C-95 °C 부터). LGR5 풍부함은 $2^{-\Delta Ct}$ 방정식을 이용하여 수량화되었다.
- [0234] LGR5는 전이성 췌장 환자 유래된 이종이식들에서 높게 발현되었다. 화학요법으로 하는 치료는 췌장 종양들에서 증가된 LGR5 발현을 야기하였다. 인간 특이적 프라이머들을 이용하여, LGR5 전사체가 일련의 췌장 환자 유래된 이종이식들에서 QPCR을 이용하여 측정가능하였다. LGR5가 대부분의 종양들에서 검출가능한 반면, 전이성 종양들에서 증가된 LGR5 발현 추세가 있었는데, 이는 진행되는 종양형성에서 LGR5의 역할을 제안한다.
- [0235] LGR5 발현은 JH109, ASPC1 및 PANC1을 포함하는 일련의 췌장 종양들에서 조사되었다. 표준 치료(standard of care treatment) (SOC)로 하는 치료(ASPC1 및 PANC1에서 겐자르(Gemzar) 단독 및 JH109 에서 아브락산(Abraxane) 및 겐자르(Gemzar))는 앞서 말한 종양들 각각에서 LGR5 발현에서의 유도를 야기하였다 (도 15). 특히, LGR5 발현은 18G7H6A3 및 SOC의 조합으로 처리된 종양들에서 대조군들(식염수 또는 MOPC)에 비교할만한 수준으로 감소되었다. 이들 데이터들은 LGR5 발현이 PANC 종양들에서 조합 치료 (18G7H6A3+SOC)에 대응의 바이오마커로서의 역할을 할 수 있다는 것을 가리킨다.
- [0236] 실시예 46 - CTNNB1은 CRC 및 췌장 종양들에서 18G7H6A3 타겟 유전자들 중 하나이다
- [0237] 18G7H6A3에 대한 Wnt 경로에서 잠재적 타겟들이 조사되었다. Wnt QPCR 플레이트들 (Qiagen, CA)가 96 웰 PCR

플레이트에서 약 80 Wnt 경로 유전자들을 위한 프라이머들과 제조되었다. 18G7H6A3 또는 MOPC (대조군) 처리된 종양들로부터 cDNA이 풀(pool)이 되었고 Wnt 플레이트에서 QPCR이 수행되었다. 각 플레이트에서 데이터들이 대응하는 GAPDH로 정규화되었고(normalize) 각 유전자의 풍부함이 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 방정식을 이용하여 측정되었다. 배 (fold) 차이들을 측정하기 위하여 각 18G7H6A3 처리된 종양에서의 데이터들이 MOPC 처리된 군으로부터의 대응하는 값에 의하여 나뉘었다. 1 초과(above) 또는 1 미만(below)의 값들이 18G7H6A3 처리 군에서 각각 상향조절 또는 하향조절을 나타냈다. 상향- 또는 하향- 조절되는 유전자들의 수의 예비 평가는 종양 모델들 (CT1 및 CT3) 둘 다에서, 상향조절된 유전자들보다 더 많은 하향조절된 유전자들이 존재했다는 것을 보여주었으며, 이는 18G7H6A3이 유전자 발현에 억제 효과를 갖는다는 것을 제안한다. 상세한 분석들은 FZDB, FZD7, WNT7B, FBXW11, FZD1, DVL1, CSNK2A1 및 CTNNB1을 포함하는 몇몇 다르게 발현되는 유전자들을 확인하였다.

[0238] 자궁경부(cervical) 암에서, LGR5 발현 및 CTNNB1 사이의 밀접한 연관성이 있을 수 있다. 다른 연구들에서, LGR5의 (LGR5 재조합 벡터를 이용한) 과발현 또는 (shRNA를 이용한) 하향조절이 각각 CTNNB1의 상향조절 또는 하향조절을 야기하였다 (Chen Q, Cao HZ, Zheng PS. 2014. Oncotarget 5: 9092-105). 추가적으로, 자궁경부암 환자들로부터의 면역조직화학적 슬라이드들은 LGR5 및 CTNNB1 발현 사이의 중요한 연관성을 보여주었다. 이 연구에서, CTNNB1 발현이 (전사체 수준을 측정하기 위하여) QPCR 및 (단백질 발현을 평가하기 위하여) 웨스턴 블롯팅을 이용하여 더 조사되었다. 인간 특이적 프라이머들을 이용하여, CTNNB1 발현이 췌장 및 CRC 종양들에서 조사되었다. 실시예 45에서 설명된 LGR5 발현과 유사하게, SOC로 하는 치료는 CTNNB1 발현을 증가시켰고, 18G7H6A3 및 SOC의 조합은 CTNNB1 발현의 감소를 야기하였다. 게다가, CTNNB1 발현은 18G7H6A3으로 처리된 CT1 종양들에서 약 35% 감소되었다. 이런 식으로 18G7H6A3 치료는 CTNNB1을 억제한다. β -카테닌 및 포스포(phospho)- β -카테닌의 발현(Wnt 경로의 활성 부족을 가리킨다)는 웨스턴 블롯 분석에 의하여 조사되었다. ASPC1 종양들에서 웨스턴 블롯 데이터들은 QPCR 데이터들에서 18G7H6A3이 단일 제제로서 또는 SOC와 조합으로 p β -카테닌을 상향조절했다는 것을 확인했는데, 이는 이들 종양들에서 Wnt 경로 활성의 억제를 제안한다 (도 16).

[0239] p- β -카테닌, GSK-3 β (전체 및 포스포), 및 LRP6를 포함하는 Wnt 경로의 다른 요소들이 일련의 CRC, 췌장 및 유방 종양들에서 조사되었다. 웨스턴 블롯 데이터들의 정량화는 ASPC1 및 PANC1 종양들에서 Wnt 경로 신호전달의 중요한 억제를 보여주었으나, 또한 다른 모델들에서 Wnt 경로 하향조절에 우호적인 몇몇 경향을 드러냈다. 18G7H6A3 처리에 즉각 반응하지 않았던 BMCRC086 종양들은 또한 Wnt 신호전달 경로 요소들 및 LGR5의 발현에 음성이었었는데, 이는 18G7H6A3을 위한 작동 메커니즘이 특이적으로 LGR5을 타겟팅하고 Wnt 신호전달을 억제한다는 것을 지지한다.

[0240] ASPC1, PANC1 및 JH109를 포함하는 췌장 종양들에서 Wnt 경로 유전자들의 발현이 조사되었다. 인 비보 데이터들에 기초하여, PANC1 및 ASPC1 둘 다에서, 18G7H6A3- vs. PBS- 처리된 종양들 사이에서 종양 부피의 차이가 있었다. 대조적으로, JH109 종양들은 18G7H6A3 단일 제제 또는 SOC 케모 조합으로 하는 표준 치료 요법에 반응하지 않았다. 즉각 반응하는 세포들 (PANC1 및 ASPC1) 및 즉각 반응하지 않는 세포들 (JH109)에서 Wnt 유전자 발현의 차이가 조사되었다. 콤보(combo) 처리된 군들에서, Wnt6, FZD8, FOSL1, Wnt11, NFATC 및 FZD5이 ASPC1 및 PANC1 콤보-처리된 종양들 둘 다에서 하향조절되었고, JH109 종양들에서 상향조절되었다. 췌장 및 CRC 데이터들 둘 다에서, WNT11, WNT6, FRZB 및 PRICKEL를 포함하는 유전자들이 PANC1, ASPC1, CT1 및 CT3 세포들에서 하향조절되었으나, JH109 세포들에서는 그렇지 않았다.

[0241] 유전자 트리 분석은 Wnt11, FRAT1, LEF1, GSK3B, FZD8 및 LRP6을 포함한 18G7H6A3로 처리된 췌장 종양들에서 함께(co)-조절된 잠재적 유전자들을 확인하였다. 각 처리에서 다르게 발현된 전사체들의 분석은 췌장 종양들에서 2 배보다 많이 상향/하향 조절된 유전자들을 또한 확인하였다 (도 17). Wnt7A와 같은, 몇몇 유전자들은 18G7H6A3에성 종양들 vs. 대조군 처리된 종양들 사이에 공통됐다.

[0242] 실시예 47 - 18G7H6A3는 CT1 종양들에서 전사를 억제한다.

[0243] 18G7H6A3-타겟된 유전자들의 발현이 초기 대(vs) 늦은 종양형성에서 조사되었다. 마우스들은 CT1으로 이식된 (implanted) 마우스들이었고 종양들은 대조군, 18G7H6A3, FOLFIRI 또는 콤보 군들로부터 3, 10 및 17 일에 수확되었다. 3 일에 각 종양으로부터의 총 RNA가 수확되었고 Illumina 인간 칩들을 이용하여 유전자 어레이 혼성화를 위하여 준비되었다. (1.5 또는 2 배들을 넘는, p<0.05) 다르게 발현된 유전자들의 전체적 분석은 (단일 제제로서 또는 FOLFIRI과 조합으로) 18G7H6A3로 처리된 종양들에서 하향조절된 유전자들이 상향조절된 것들보다 많다는 것을 보여주었다. 이는 18G7H6A3 치료가 전체적인 세포 전사 조직에 더 억제 영향을 가질 수 있다는 것을 제안하였다. PCA (주성분(Principal Component) 분석들(Analyses))은 또한 18G7H6A3 및 대조군 처리된 종양

들에서 전체적 유전자 발현에 가까운 것을 보여주었다. 그러나, 18G7H6A3이 FOLFIRI 에 첨가될 때(즉 콤보 군), 콤보 vs. FOLFIRI사이에 밀접한 분리가 있었고, 이는 LGR5을 타겟팅하는 것이 FOLFIRI-처리된 종양들에서 유전자 발현을 상당히 변화시킬 수 있다는 것을 제안하였다.

- [0244] 18G7H6A3 vs. 비히클에서 다르게 발현된 유전자들의 분석은 18G7H6A3 처리된 종양들에서 하향조절된, ANGPT2, AKAP12 및 ADM과 같은 몇몇 종양 프로모터들 및 또한 18G7H6A3 처리된 종양들에서 상향조절된 DAB1, MIR655, NKX1-2 와 같은 몇몇 종양 억제인자들(suppressors)을 확인하였다(도 18). 정반대로 FOLFIRI 처리는 종양 프로모터들(FBN2, HKDC1, ABCB1, FGF2) 및 TRIB3, ATF3 및 TIMP3 와 같은 몇몇 종양 억제인자들을 상향조절하는 것으로 보인다(도 19). FOLFIRI 및 18G7H6A3의 조합은 ALDOC, CDH5, ITGA2와 같은 더 많은 종양 프로모터들의 하향조절 및 또한 ZBTB11, ITPKA, PSMC3IP 및 BAK1와 같은 더 많은 종양 억제인자들의 상향조절을 야기하였다(도 20).
- [0245] 실시예 48 - 18G7H6A3 치료는 췌장 환자 유래된 이종이식들의 같은자리(orthotopic) 모델들에서 말초 혈액 인간 CTC들을 상당히 감소시킨다
- [0246] 원발성(primary) 종양 성장 및 전이의 억제에서 18G7H6A3의 역할을 조사하기 위하여, LGR5 발현이 일련의 췌장 환자 유래된 이종이식 샘플들, 및 PANC1424 세포들 및 PANC1427 세포들에서 시험되었다.
- [0247] 종양 샘플들이 피하에 NOD/SCID (비만이 아닌(non-obese) 당뇨병의(diabetic) 가혹한(severe) 조합된(combined) 면역결핍(immunodeficient)) 마우스들에 이식되었고 그리고 그 다음에 인 비보 연구들을 위하여 설계된 수혜자들(recipients)에서 체장 내로 이식되었다. 종양 부피는 초음파로 매주 측정되었고, ~100 mm³ 종양들을 갖는 마우스들이 약효 연구에 등록되었고 하기의 것들로 처리되었다: 1- MOPC 이소타입 (15 mg/kg 두 번/주; 복강 내(ip)); 2- 18G7H6A3(15 mg/kg 두 번/주; 복강 내(ip)); 3- SOC (젼자르 50 mg/kg; 복강내(ip) 주당 두 번 그리고 아브락산(Abraxane) 30 mg/kg iv 주당 이 회); 4- 상기 투여량들에서 18G7H6A3 및 SOC의 조합. 연구 마지막에, 각각의 종양을 지닌 마우스로부터의 말초 혈액이 CTC (유동세포분석법을 이용하여) 및 순환하는 DNA 평가들을 위하여 수집되었다. 유동세포분석법을 위하여, 혈액 샘플들이 4 °C에서 30 분 동안 인간 LGR5-AF647 (BD Pharmingen, CA) 및 제조업자 프로토콜을 이용하여 RBC 용해 버퍼 (ACK 버퍼, Life Tech, CA) 로 처리되었다. 세포들이 염색 버퍼 (PBS-FBS3%)로 두 번 세척되었고 실험실에서 FACS 칼리버 기계에서 습득 전 7AAD (7-아미노악티노마이신(aminoactinomycin)) 및 데이터들이 FCS Express 소프트웨어 (De Novo, CA)를 이용하여 분석되었다.
- [0248] LGR5이 여러가지 췌장 환자 유래된 이종이식 샘플들에서 발현되었다. 인간 CTC들이 말초 혈액에서 검출되었다. HLA+ 세포들의 퍼센트가 MOPC vs. 18G7H6A3에서 상당히 변화되지 않은 반면, 순환하는 HLA+LGR5+ 세포들의 퍼센트가 18G7H6A3 처리된 마우스들에서 상당히 감소되었다(도 21).
- [0249] HLA+ 세포들의 퍼센트는 케모 vs. 콤보 처리된 마우스들에서 중요하게 변화하지 않았으나, 그러나 18G7H6A3 및 SOC의 조합은 동시 및 감량(debulk) 세팅들 둘 다 에서 HLA+LGR5+ 세포들을 거의 완전히 제거했다(도 22A, 및 도 22B). (단일 제제로서 또는 SOC와의 조합으로) 18G7H6A3 처리는 췌장 환자 유래 이종이식들의 같은자리(orthotopic) 모델들에서 말초 혈액에서 인간 CTC들을 상당히 감소시킨다.
- [0250] 실시예 49 - 다른 모델들에서 LGR5 발현
- [0251] LGR5 발현은 유동세포분석법 및 RNA스코프(scope)를 이용하여 사이노몰구스(Cynomolgus) 카마크(macaques) (사이노스(Cynos))로부터의 피부 샘플들을 조사하였다. 사이노스(Cynos)로부터의 피부 샘플들이 0, 7, 14 및 21 일에 비히클 또는 여러가지 투여량의 18G7H6A3 (G2:10 mg/kg; G3:50 mg/kg; 및 G4: 150 mg/kg) 으로 처리되었다. 연구 종료에서, 피부 샘플들이 항생제(페니실린 및 스트렙토마이신) 및 항진균 용액(항-항 100X, Life Technologies, CA)으로 보충된 DMEM에 제공되었다. 피부 샘플들이 콜라게나제들 및 서폴리신(thermolysin) (Liberase, Roch Inc, CA)의 각테일을 이용하여 소화되었다. 피부(skin) 전구체들(progenitors) (SP들)은 기계적 붕괴 및 리베라제(Liberase)으로 밤새 배양 후 분리되었다. SP들이 래트 항-인간 LGR5 (AF647, BD Pharmingen, CA)으로 염색되었고 실험실에서 칼리버 기계에서 분석되었다. FCS Express (Denovo Software, CA)을 이용한 데이터 분석들은 LGR5가 Cynos SP들에서 검출가능하였다는 것을 보여주었으나, 그러나 (다른 투여량들에서) 18G7H6A3 vs. 비히클 처리된 군 사이의 LGR5 빈도에 중요한 차이가 없었다. RNA스코프(scope)를 이용하여, LGR5이 피부 상피 세포들에서 훨씬 적은 정도로, 피부 영역들에서 특히 모낭들에서, 검출가능하였다. 비히클 vs. 18G7H6A3 처리된 샘플들에서 LGR5 양성 영역에 중요한 차이가 없었다.
- [0252] 사이노스(Cynos)로부터 분리된 유전자 발현 말초 혈액 단핵구들이 조사되었다. 총 RNA가 Qiagen RNeasy 키트를

이용하여 추출되었고 슈퍼스크립트(Superscript) cDNA 합성 키트 (Life Technologies, CA)를 이용하여 cDNA가 합성되었다. 각각의 치료로부터의 cDNA가 풀(pool)되었고, RT2 Sybergreen qPCR 마스터(master) 믹스(mix) (SABiosciences, MA)에 첨가되었다. 최종적인 혼합물이 케모카인들 또는 염증성 사이토카인들에 대한 Cyno QPCR 프라이머들을 포함하는 96-웰 플레이트의 각각의 웰에 첨가되었다. PCR 열 프로파일은 하기를 포함한다: 10 분 동안 95 °C 및 95 °C 15 초 및 60 °C 1분의 40 주기들(cycles) 뒤이어 녹는(melt) 커브(curve) 단계가 이어졌다. 각 플레이트에서 데이터 (Ct 값들)가 대응하는 GAPDH로부터 빼짐으로서 정규화되었고(normalize), 그리고 각 전사체의 풍부함이 2^{-ΔCT} 방정식을 이용하여 계산되었다. 18G7H6A3 군 vs. 비히클 처리된 군 중 임의의 것 사이의 (2 배보다 크게) 다르게 발현된 전사체들의 수의 분석들은, 유전자 어레이 데이터들과 일치하여, 하향조절된 유전자들이 상향조절된 것보다 훨씬 많이 있다는 것을 보여주었다. 투여량 단계적 확대와 함께, 덜 상향조절된 유전자들 및 더 하향조절된 유전자들이 있었다. 사이노스(Cynos)가 18G7H6A3의 마지막 투여 후 4 주 동안 어떠한 치료도 받지 못한 G4-회수(recovery) (G4R) 군은 상향- 하향- 조절된 유전자들의 거의 유사한 수를 보였다. 상세한 분석은 발현이 반대로 18G7H6A3 투여량, 즉 가장 높게 10 mg/kg에서 그리고 가장 낮게 150 mg/kg에서 관련이 있는, 다르게 발현되는 유전자들 (CCL11, IL3, SPP1, CCL13, CXCL6 및 TNFRSF11b)을 확인하였다.

[0253] 치료들 사이에서 공통적으로 하향조절된 유전자들은 CCL1, IFN γ , CCR8, IL2, IL3 및 IL4를 포함하였으며, 그것들 중 일부는 M1 또는 M2 대식세포들에서 풍부하였다.

[0254] 실시예 50 - 인간화된 항-LGR5 항체에 의한 인 비보에서 소세포 폐암 종양 성장의 억제

[0255] 환자 유래된 소세포 폐암 이종이식 모델. BLG293 종양들로부터의 분리된(dissociated) 종양 세포들이 피하로 매트릭셀(Matrigel)에서 CB.17 SCID 마우스들 내로 이식되었고, 매주 두 번 종양 크기 및 체중이 모니터링되었다. 종양들이 평균 130mm³에 도달할 때, 마우스들이 임의추출되었다. 마우스들은 PBS, 항체 대조군 MOPC, 또는 18G7H6A3으로 처리되었다. 마우스들은 15 mg/kg에서 BIW으로 투여되었다. 모든 마우스들이 종료 때까지, 체중 및 종양 크기와 더불어 전체적 건강 및 외형에 대해 매주 두 번 모니터링되었다.

[0256] 18G7H6A3는 PBS (24.9% 종양 성장 억제) 및 MOPC 항체 (24.7% 종양 성장 억제) 대조군들에 비해 중요한 항-종양 활성을 보였다.

[0257] 실시예 51 - 18G7H6A3는 감량(debulk) 화학요법 치료 후 재발한 췌장 종양들을 갖는 마우스들에서 생존을 증가시킨다

[0258] Panc1427 (UCSD1427) 종양들이 화학요법 (젠타빈/아브락산) 및 18G7H6A3의 처리에 의하여 완전히 감량(회귀)되었다. 종양들이 회귀(regress)되었을 때, 화학요법이 제거되었고 마우스들이 18G7H6A3로 처리되었거나 또는 처리되지 않았다. 18G7H6A3로 처리된 동물들은 대조군 동물들에 비하여 현저히 더 건강했는데, 이때 몇몇 마우스들은 절뚝거리거나 또는 체중 감소와 같은 심각한 건강 관찰들 때문에 안락사시켜야 했다. 150일에, 화학요법 단독으로 처리된 4/8 마우스들에 대조적으로 18G7H6A3 및 화학요법으로 처리된 7/8 마우스들은 살아있었다. 도 23은 결과들을 요약한다.

[0259] 여기에서 사용된 대로 용어 "포함하는(comprising)"은 "포함하는(including)," "함유하는(containing)", 또는 "로 특징되는"과 같은 뜻을 가지며, 포괄적이며(inclusive) 또는 제한을 두지 않고, 추가의, 언급되지 않은 구성요소들 또는 방법 단계들을 배제하지 않는다.

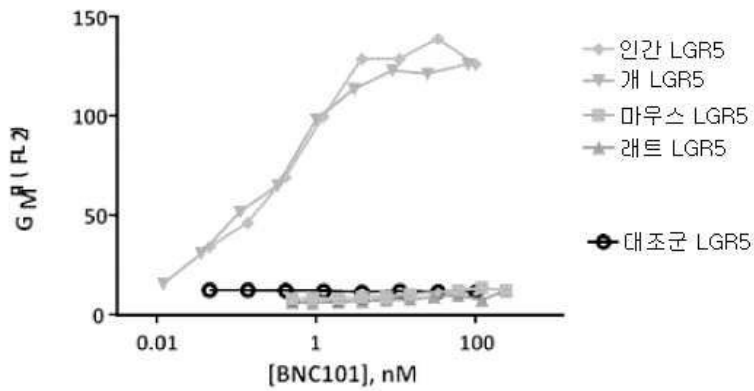
[0260]

[0261] 상기 기재는 본 발명의 몇몇 방법들 및 물질들을 개시한다. 이 발명은 방법들 및 물질들의 변형과 더불어 제작 방법들 및 장비의 변화들을 허용한다. 이러한 변형들은 여기에 개시된 본 발명의 실시 또는 이 공개의 고려사항으로부터 당업자에게 분명할 것이다. 따라서, 본 발명이 여기에 개시된 특정 예들에 제한되어야 하는 것으로 의도되지 않고, 그것은 본 발명의 정수 및 진짜 범위 안에 있는 모든 변형들 및 대체물들을 포함한다.

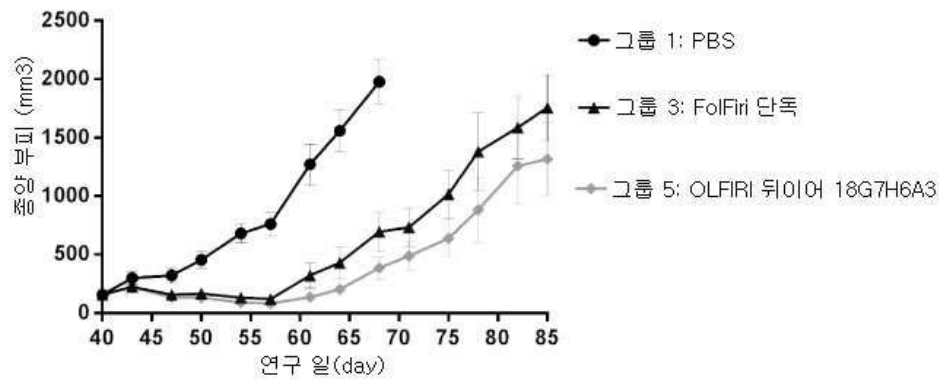
[0262] 공개되고 공개되지 않은 출원들, 특허들 및 인쇄물 참고문헌들을 포함하나 이에 제한되지는 않는, 여기에 언급된 모든 참고문헌들이 그 전체가 참고로서 여기에 포함되며, 이로써 이 명세서의 부분이 된다. 참고로서 포함되는 공개들 및 특허들 또는 특허 출원들이 본 명세서에 포함된 공개를 반박할 때까지, 본 명세서는 어떠한 이러한 모순되는 내용을 대체 및/또는 이보다 우위에 서는 것으로 의도된다.

도면

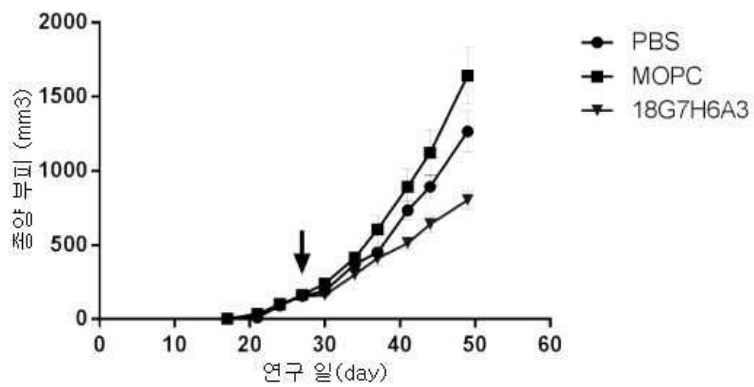
도면1



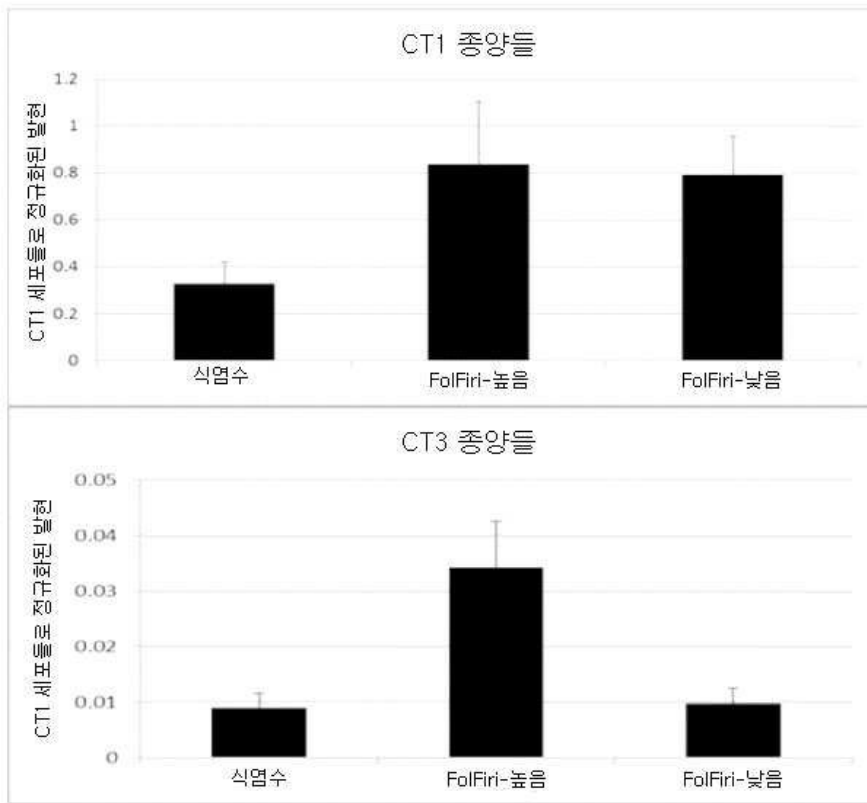
도면2



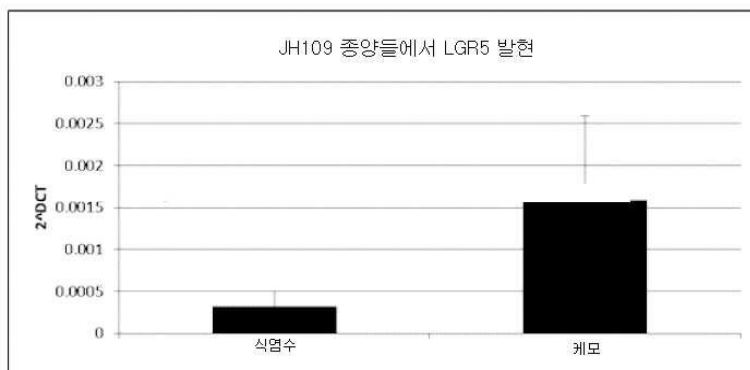
도면3



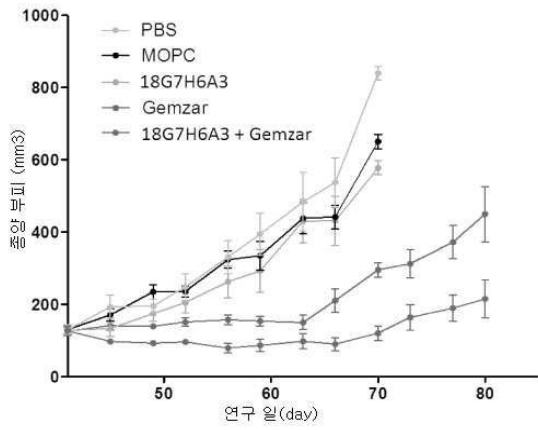
도면4



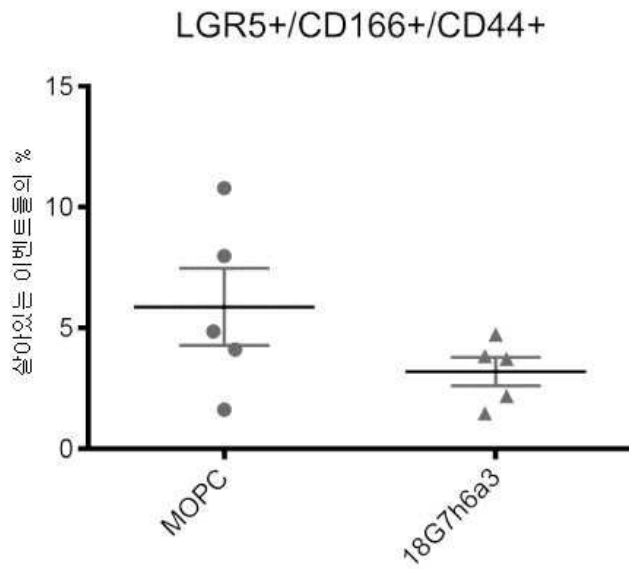
도면5



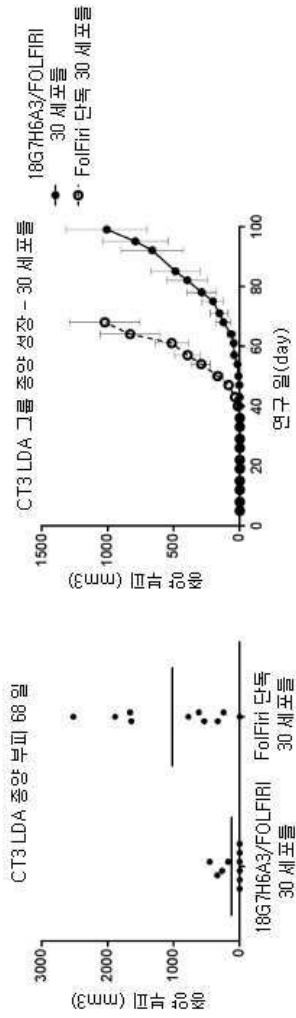
도면6



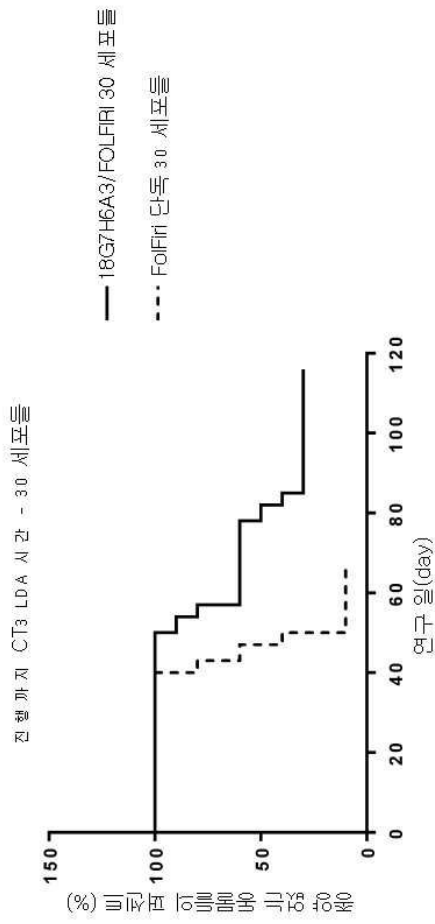
도면7



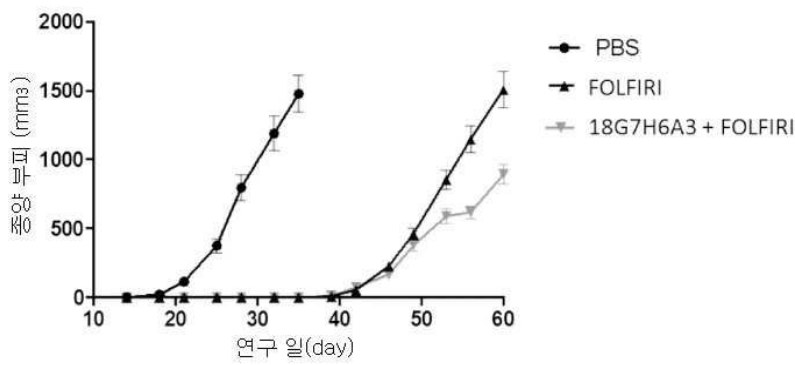
도면8



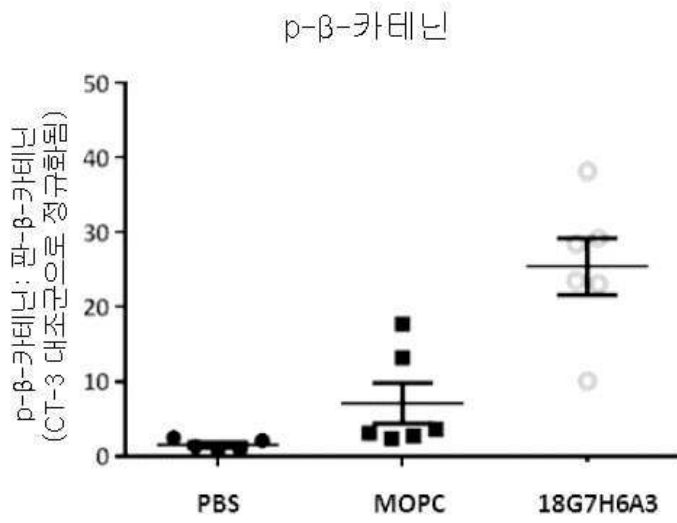
도면9



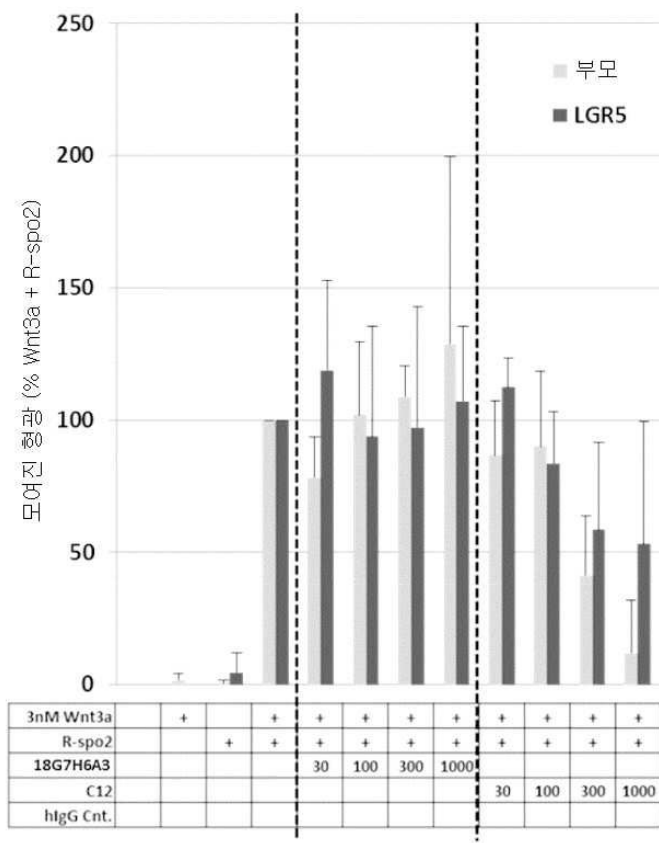
도면10



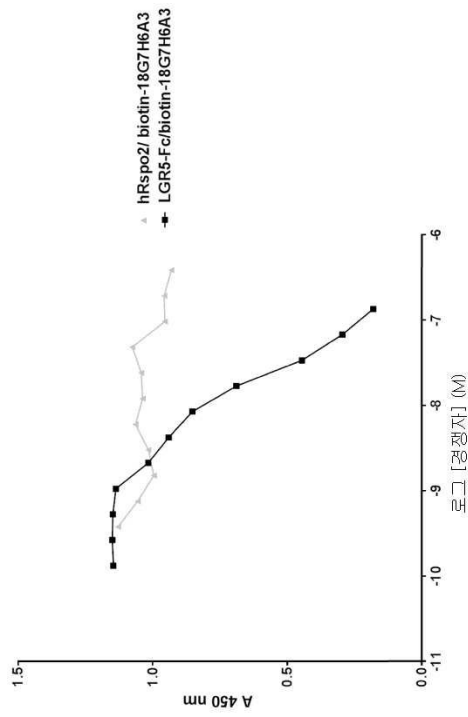
도면11



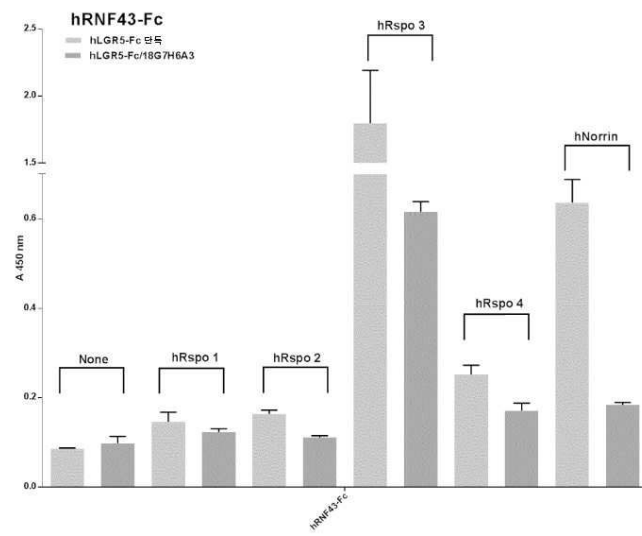
도면12



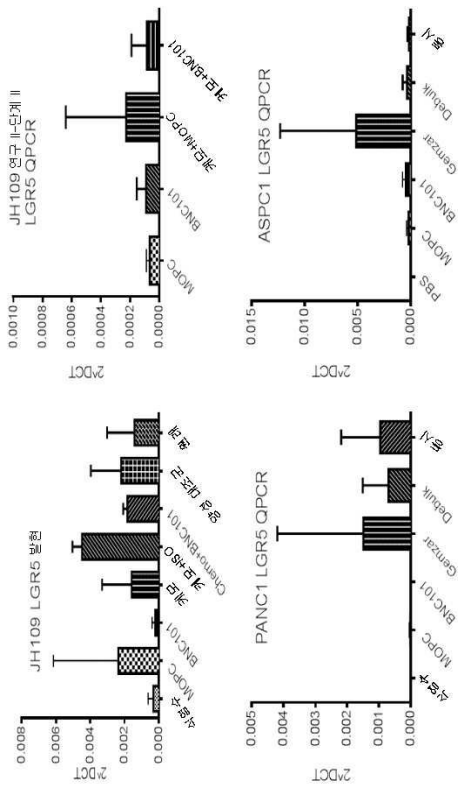
도면13



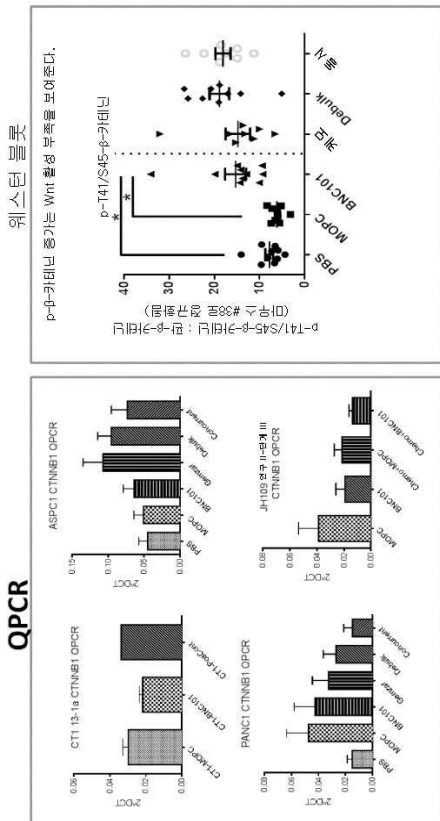
도면14



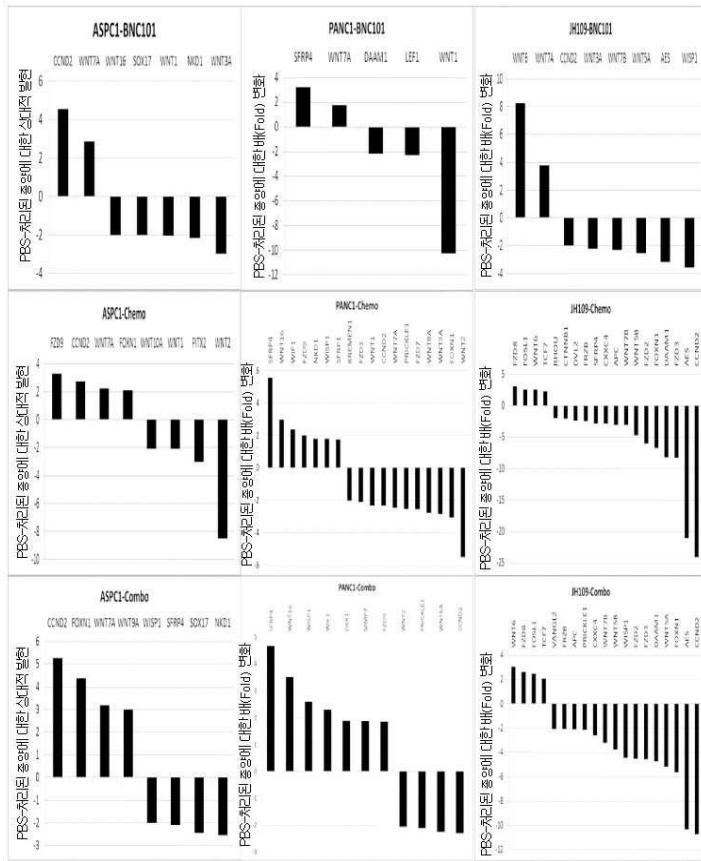
도면15



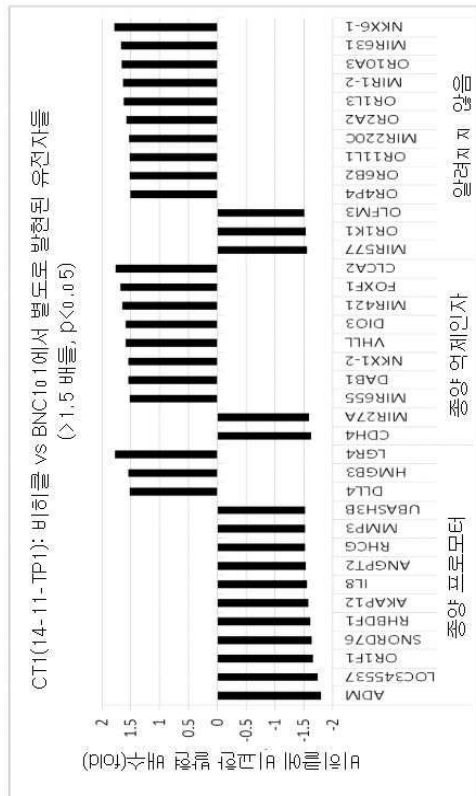
도면16



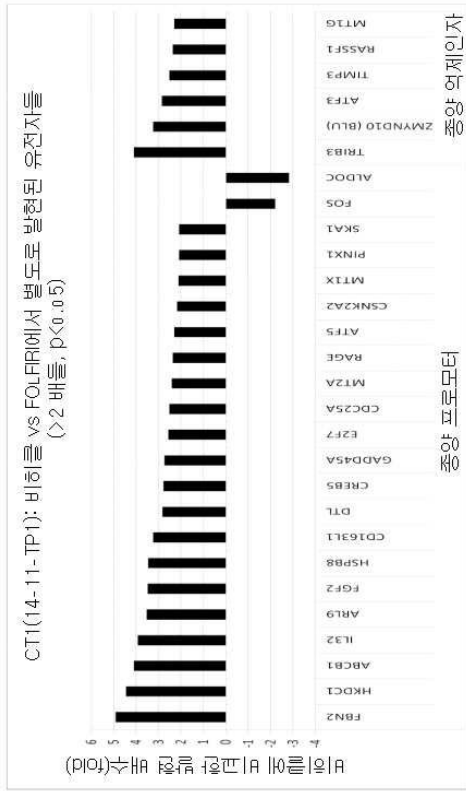
도면17



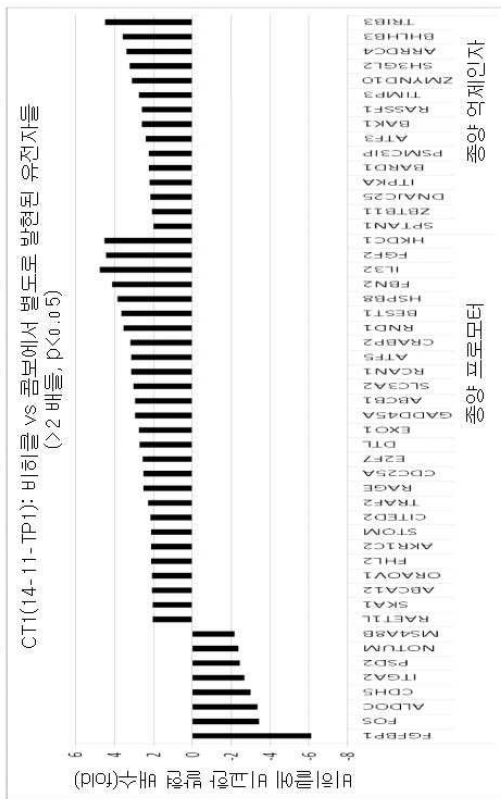
도면18



도면19

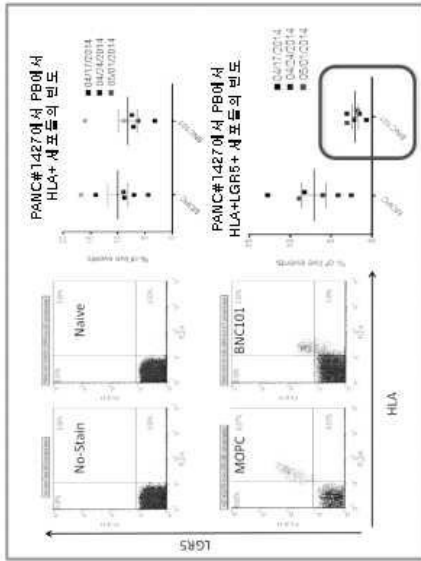


도면20

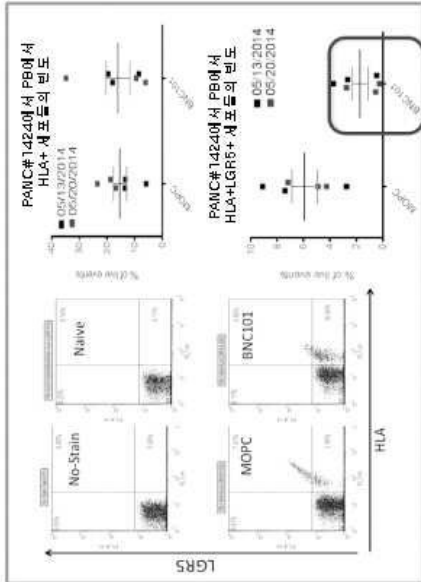


도면21

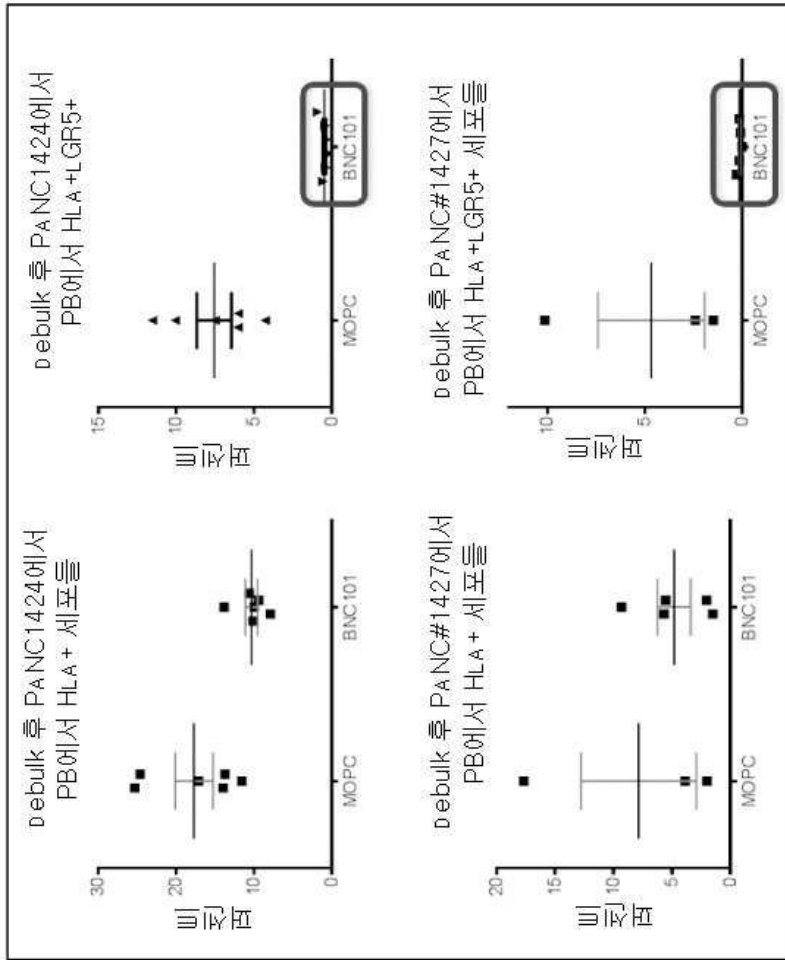
체장 PDX UCSD1427



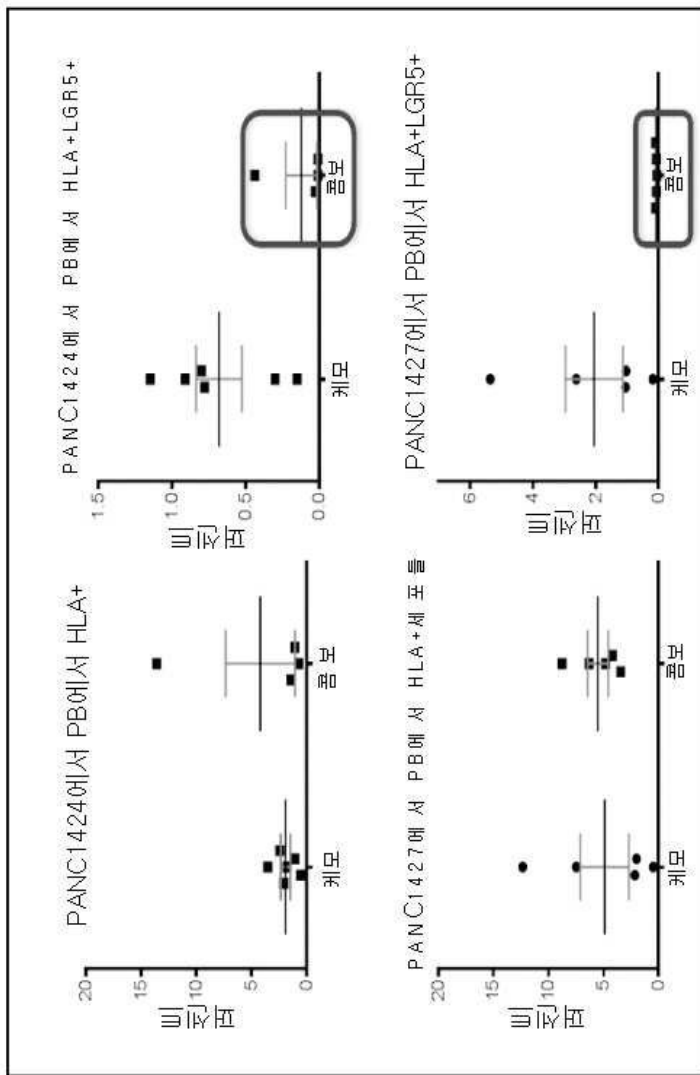
체장 PDX UCSD1424



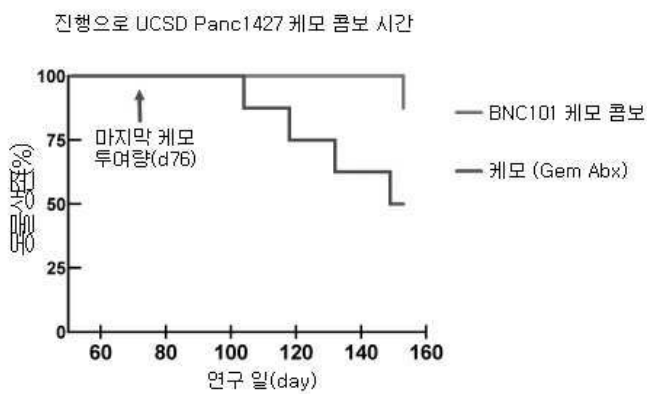
도면22a



도면22b



도면23



서열목록

<110> Bionomics, Inc.
 Reyes, Christopher L.

Chu, Peter
 Smith, Kristen M.
 Campbell, Lioudmila A.
 Shojaei, Farbod
 Norton, John Thomas
 <120> HUMANIZED ANTIBODIES THAT BIND LGR5
 <130> BIONO.010W0
 <150> 61/975589
 <151> 2014-04-04
 <150> 62081497
 <151> 2014-11-18
 <160> 49
 <170> FastSEQ for Windows Version 4.0
 <210> 1
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Mouse
 <220><221> PEPTIDE
 <222> (1)..(8)

 <223> 18G7.1 Heavy Chain CDR1 Amino Acid
 <400> 1
 Gly Tyr Thr Phe Ser Gly Tyr Trp
 1 5
 <210> 2
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Mouse
 <220><221> PEPTIDE
 <222> (1)..(8)
 <223> 18G7.1 Heavy Chain CDR2 Amino Acid
 <400> 2
 Ile Leu Pro Gly Ser Asp Ser Thr
 1 5
 <210> 3
 <211> 11

<212> PRT
 <213> Mouse
 <220><221> PEPTIDE
 <222> (1)..(11)
 <223> 18G7.1 Heavy Chain CDR3 Amino Acid
 <400> 3

Ala Arg Ser Gly Tyr Tyr Gly Ser Ser Gln Tyr

1 5 10
 <210> 4
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Mouse
 <220><221> PEPTIDE
 <222> (1)..(10)
 <223> 18G7.1 Light Chain CDR1 Amino Acid
 <400> 4

Glu Ser Val Asp Ser Tyr Gly Asn Ser Phe

1 5 10
 <210> 5
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Mouse
 <220><221> PEPTIDE
 <222> (1)..(3)
 <223> 18G7.1 Light Chain CDR2 Amino Acid
 <400> 5

Leu Thr Ser

1
 <210> 6
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Mouse
 <220><221> PEPTIDE

<222> (1)..(10)

<223> 18G7.1 Light Chain CDR3 Amino Acid

<400> 6

Met Gln Gln Asn Asn Glu Asp Pro Arg Thr

1 5 10

<210> 7

<211> 354

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 18G7H6A1 Heavy Chain DNA

<400> 7

gaggtgcagc tgggtcagag cggagccgag gtgaagaagc cggcgcgagag cctgaggatc 60

agctgcaagg gcagcggcta cagcttcacc gcgtactgga tcgagtgggt gaggcaggct 120

cccggcaagg gcttggagtg gatcggcgag atcctgcccg gcagcgcagag caccaactac 180

aacgagaagt tcaagggcca cgtgaccatc agcgcgcaca agagcatcag caccgcctac 240

ctgcagtgga gcagcctgaa ggccagcgcac accgccgtgt actactgcgc ccgcagcggc 300

tactacggca gcagccagta ctggggccag ggcacctgg tgacctgag cagc 354

<210> 8

<211> 333

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 18G7H6A1 Light Chain DNA

<400> 8

gacatcgtgc tgaccagag ccccgccagc ctggccgtga gccccggcca gagggccacc 60

atcacctgcc gcgccagcga gagcgtggac agctacggca acagcttcat gcaactggtat 120

cagcagaagc ccggccagcc cccaagctg ctgatctacc tgaccagcaa cctggagtcc 180

ggcgtgcccc acagttcag cggcagcggc agcggcaccg acttcacct gaccatcaac 240

cccgtggagg ccaacgacgc cgccacctac tactgccagc agaacgccga ggaccccagg 300

accttcggcg gcggcaccaa gctggagatc aag 333

<210> 9

<211> 466

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 18G7H6A1 Heavy Chain Amino Acid

<400> 9

Met Glu Trp Ser Trp Val Phe Leu Phe Phe Leu Ser Val Thr Thr Gly
 1 5 10 15
 Val His Ser Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
 20 25 30
 Pro Gly Glu Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe
 35 40 45
 Thr Ala Tyr Trp Ile Glu Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60
 Glu Trp Ile Gly Glu Ile Leu Pro Gly Ser Asp Ser Thr Asn Tyr Asn
 65 70 75 80
 Glu Lys Phe Lys Gly His Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser
 85 90 95
 Thr Ala Tyr Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Val
 100 105 110
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Gly Tyr Tyr Gly Ser Ser Gln Tyr Trp Gly
 115 120 125
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 130 135 140
 Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
 145 150 155 160
 Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 165 170 175
 Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 180 185 190
 Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 195 200 205
 Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
 210 215 220
 Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys

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

 Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 290 295 300
 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 305 310 315 320
 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 325 330 335
 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 340 345 350
 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val

 355 360 365
 Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
 370 375 380
 Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 385 390 395 400
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 405 410 415
 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 420 425 430

 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 435 440 445
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 450 455 460
 Pro Gly
 465
 <210> 10

<211> 238
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 18G7H6A1 Light Chain Amino Acid
 <400> 10
 Met Ser Val Pro Thr Gln Val Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp Leu Thr
 1 5 10 15

 Asp Ala Arg Cys Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala
 20 25 30
 Val Ser Pro Gly Gln Arg Ala Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Ser
 35 40 45
 Val Asp Ser Tyr Gly Asn Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
 50 55 60
 Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Thr Ser Asn Leu Glu Ser
 65 70 75 80
 Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 85 90 95
 Leu Thr Ile Asn Pro Val Glu Ala Asn Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys
 100 105 110
 Gln Gln Asn Ala Glu Asp Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
 115 120 125
 Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
 130 135 140
 Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu
 145 150 155 160

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

210	215	220	
Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys			
225	230	235	
<210>	11		
<211>	1423		
<212>	DNA		
<213>	Artificial Sequence		
<220><223>	18G7H6A3 Heavy Chain DNA		
<400>	11		
aagcttgccg ccaccatgga atggtcctgg gtgttcctgt tcttcctgtc cgtgaccacc			60
ggcgtgcaact ccgaagtgca gctggtgcag tctggcgcg aagtgaagaa gcctggcgag			120
tccctgcgga tctcctgcaa gggctccggc tactccttca ccgctactg gattgagtgg			180
gtgcgacagg ccctggcaa gggcctggaa tggatcggag agatcctgcc cggctccgac			240
tccaccaact acaacgagaa gttcaagggc cacgtgacca tctccgccga caagtccatc			300
tctaccgctt acctgcagtg gtctcctctg aaggcctctg acaccgccgt gtactactgc			360
gccagatccg gcctgtacgg ctctctcag tattggggcc agggcacctc cgtgaccgtg			420
tctctgtcct ctaccaaggc cccaagcgtg ttccccctgg cccccagcag caagagcacc			480
agcggcggca cagccgcctt gggctgcctg gtgaaggact acttccccga gccctgacc			540
gtgtcctgga acagcggagc cctgacctcc ggcgtgcaca ccttccccgc cgtgctgcag			600
agcagcggcc tgiacagcct gagcagcgtg gtgacctgac ccagcagcag cctgggcacc			660
cagacctaca tctgtaacct gaaccacaag cccagcaaca ccaaggtgga caagaaggtg			720
gagcccaaga gctgtgacaa gaccacacc tgccccctt gcccagcccc cgagctgctg			780
ggcggaccca gcgtgttctt gttcccccc aagcccaagg acacctgat gatcagcaga			840
acccccgagg tgacctgtgt ggtggtggac gtgtcccacg aggaccaga ggtgaagttc			900
aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcac aacccaaga ccaagcccag agaggagcag			960
tacaacagca cctacagggt ggtgtccgtg ctgacctgac tgcaccagga ctggctgaac			1020
ggcaaggagt acaagtgtaa ggtgtccaac aaggcctgac cagcccaat cgaagagacc			1080
atcagcaagg ccaagggcca gccaaagag ccccaggtgt acacctgcc acccagcagg			1140
gacgagctga ccaagaacca ggtgtccctg acctgtctgg tgaagggtt ctaccaagc			1200
gacatcgccg tggagtggga gagcaacggc cagcccagaga acaactaaa gaccacccc			1260
ccagtgtcgg acagcagcg cagcttcttc ctgtacagca agctgacctg ggacaagagc			1320

agatggcagc agggcaactg gttcagctgc tccgtgatgc acgaggccct gcacaaccac 1380
 tacaccaga agagcctgag cctgtcccca ggctgatgaa ttc 1423
 <210> 12
 <211> 739
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 18G7H6A3 Light Chain DNA
 <400>
 > 12
 aagcttgccg ccacatgtc cgtgcctacc cagggtgctgg gactgctgct gctgtggctg 60
 accgacgcca gatgcgacat cgtgctgacc cagagccctg cctctctggc tgtgtctcct 120
 ggccagaggg ccacatcac ctgtagagcc tccgagtcgg tggactccta cggcaactcc 180
 ttcattgact ggiatcagca gaagcccggc cagcccccca agctgctgat ctacctgacc 240
 tccaacctgg aatccggcgt gcccgacaga ttctccggct ctggctctgg caccgacttc 300
 acctgacca tcaaccctgt ggaagccaac gacgccgcca cctactactg ccagcagaac 360
 gccgaggacc ccagaacctt tggcggaggc accaagctgg aaatcaagcg tacggaggcc 420

 gctcccagcg tgttcatctt ccccccaagc gacgagcagc tgaagagcgg caccgccagc 480
 gtgggtgtgc tgetgaacaa cttctacccc agggaggcca aggtgcagtg gaaggtggac 540
 aacgccctgc agagcggcaa cagccaggag agcgtcaccg agcaggacag caaggactcc 600
 acctacagcc tgagcagcac cctgacctg agcaaggccg actacgagaa gcacaaggtg 660
 tacgcctgtg aggtgaccca ccaggcctg tccagccccg tgaccaagag cttcaacagg 720
 ggcgagtgtc gatgaattc 739
 <210> 13
 <211> 466
 <212> PRT

 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 18G7H6A3 Heavy Chain Amino Acid
 <400> 13
 Met Glu Trp Ser Trp Val Phe Leu Phe Phe Leu Ser Val Thr Thr Gly
 1 5 10 15
 Val His Ser Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
 20 25 30
 Pro Gly Glu Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 290 295 300
 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 305 310 315 320
 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 325 330 335
 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 340 345 350
 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 355 360 365
 Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
 370 375 380
 Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 385 390 395 400
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 405 410 415
 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 420 425 430
 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 435 440 445
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 450 455 460
 Pro Gly
 465
 <210> 14
 <211> 238
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 18G7H6A3 Light Chain Amino Acid
 <400> 14
 Met Ser Val Pro Thr Gln Val Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp Leu Thr
 1 5 10 15

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

 65 70 75 80
 Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 85 90 95
 Leu Thr Ile Asn Pro Val Glu Ala Asn Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys
 100 105 110
 Gln Gln Asn Ala Glu Asp Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
 115 120 125
 Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
 130 135 140

 Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu
 145 150 155 160
 Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn
 165 170 175
 Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser
 180 185 190
 Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala
 195 200 205
 Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly

 210 215 220
 Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230 235
 <210> 15
 <211> 354
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> 18G7Ch Heavy Chain DNA

<400> 15

caggttcagc tgcagcagtc tggagctgag ctggtgaagc ctggggcctc agtgaagata 60
 tcctgcaagg ctactggcta cacattcagt ggctactgga tagagtgggt aaagcagagg 120
 cctggacatg gccttgagtg gattggagag attttgctg gaagtgatag tactaactac 180

aatgagaagt tcaagggcaa ggccacattc actgcagata catcctcaa cacagtctac 240
 atgcaattca gcagcctgac atctgaggac tctgccgtct attactgtgc aagatcgggt 300
 tactacgcta gtagtcagta ctggggccaa ggcaccactc tcacagtctc ctca 354

<210> 16

<211> 334

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 18G7Ch Light Chain DNA

<400> 16

aacattgtgc tgaccaatc tcctgcttct ttggctgtgt ctctaggca gagggccacc 60
 atatcctgca gagccagtga aagtgtgat agttatggca atagttttat gcaactgtac 120

cagcagaaac caggacagcc acccaaacctc ctcatctate ttacatccaa cctagaatct 180
 ggggtccctg ccaggttcag tggcagtggg tctaggacag acttcaccct caccattgat 240
 cctgtggagg ctgatgatgc tgcaacctat tactgtcagc aaaataatga ggatcctcgg 300
 acgttcggtg gaggcaccaa gctggaaatc aaac 334

<210> 17

<211> 466

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 18G7Ch Heavy Chain Amino Acid

<400> 17

Met Glu Trp Ser Trp Val Phe Leu Phe Phe Leu Ser Val Thr Thr Gly

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

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

35 40 45

Ser Gly Tyr Trp Ile Glu Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu
 50 55 60
 Glu Trp Ile Gly Glu Ile Leu Pro Gly Ser Asp Ser Thr Asn Tyr Asn
 65 70 75 80

 Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn
 85 90 95
 Thr Val Tyr Met Gln Phe Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
 100 105 110
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Gly Tyr Tyr Gly Ser Ser Gln Tyr Trp Gly
 115 120 125
 Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 130 135 140
 Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala

 145 150 155 160
 Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 165 170 175
 Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 180 185 190
 Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 195 200 205
 Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
 210 215 220

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

<400> 19

Met Glu Trp Ser Trp Val Phe Leu Phe Phe Leu Ser Val Thr Thr Gly
 1 5 10 15

Val His Ser Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
 20 25 30

Pro Gly Glu Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe
 35 40 45

Thr Ala Tyr Trp Ile Glu Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60

Glu Trp Ile Gly Glu Ile Leu Pro Gly Ser Asp Ser Thr Asn Tyr Asn
 65 70 75 80

Glu Lys Phe Lys Gly His Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser
 85 90 95

Thr Ala Tyr Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Val
 100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Gly Tyr Tyr Gly Ser Ser Gln Tyr Trp Gly

115 120 125

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

130 135

<210> 20

<211> 411

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 18G7H6A3 Heavy Chain Variable Domain DNA

<400> 20

atggaatggt cctgggtgtt cctgttcttc ctgtccgtga ccaccggcgt gcactccgaa 60

gtgcagctgg tgcagtctgg gcgccgaagtg aagaagcctg gcgagtcct gcgcatctcc 120

tgcaagggt cccgctactc ctccaccgcc tactggattg agtgggtgcg acagggccct 180

ggcaagggcc tggaatggat cggagagatc ctgccggct cccactccac caactacaac 240

gagaagtcca agggccactg gaccatctcc gccgacaagt ccatctctac cgctacctg 300

cagtgtctct cctgaaggc ctctgacacc gccgtgtact actgcgccag atccggcctg 360

tacggctcct ctcagtattg gggccagggc acctcgtga ccgtgtctc t 411

<210> 21
 <211> 131
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 18G7H6A3 Light Chain Variable Domain
 <400> 21
 Met Ser Val Pro Thr Gln Val Leu Gly Leu Leu Leu Trp Leu Thr

1	5	10	15
Asp Ala Arg Cys Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala			
	20	25	30
Val Ser Pro Gly Gln Arg Ala Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Ser			
	35	40	45
Val Asp Ser Tyr Gly Asn Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro			
	50	55	60
Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Thr Ser Asn Leu Glu Ser			
	65	70	75
			80
Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr			
	85	90	95
Leu Thr Ile Asn Pro Val Glu Ala Asn Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys			
	100	105	110
Gln Gln Asn Ala Glu Asp Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu			
	115	120	125
Glu Ile Lys			
	130		

<210> 22
 <211> 393
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 18G7H6A3 Light Chain Variable Domain DNA

<400> 22
 atgtccgtgc ctaccaggt gctgggactg ctgctgctgt ggctgaccga cgccagatgc 60
 gacatcgtgc tgaccagag ccctgcctct ctggctgtgt ctctggcca gagggccacc 120

atcacctgta gagcctccga gtccgtggac tcttacggca actccttcat gcactggtat 180
 cagcagaagc cgggccagcc cccaagctg ctgatctacc tgacctcaa cctggaatcc 240
 ggcggtcccc acagattctc cggtctggc tctggcaccg acttcaccct gaccatcaac 300
 cccgtggaag ccaacgacgc cgccacctac tactgccagc agaacgccga ggaccccaga 360
 acctttggcg gaggaccaa gctggaatc aag 393

<210> 23
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 18G7H6A3 Heavy Chain CDR1 Amino Acid
 <400> 23

Gly Tyr Ser Phe Thr Ala Tyr Trp

1 5
 <210> 24
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 18G7H6A3 Heavy Chain CDR1 DNA
 <400> 24

ggctactcct tcaccgccta ctgg 24

<210> 25
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 18G7H6A3 Heavy Chain CDR2 Amino Acid
 <400> 25

Ile Leu Pro Gly Ser Asp Ser Thr

1 5
 <210> 26
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 18G7H6A3 Heavy Chain CDR2 DNA

<400> 26
atcctgcccc gctccgactc cacc 24

<210> 27
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> 18G7H6A3 Heavy Chain CDR3 Amino Acid
<400> 27
Ala Arg Ser Gly Tyr Tyr Gly Ser Ser Gln Tyr
1 5 10

<210> 28
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> 18G7H6A3 Heavy Chain CDR3 DNA
<400> 28
gccagatccg gctgtacgg ctctctcag tat 33

<210> 29
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> 18G7H6A3 Light Chain CDR1 Amino Acid
<400> 29
Glu Ser Val Asp Ser Tyr Gly Asn Ser Phe
1 5 10

<210> 30
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<
220><223> 18G7H6A3 Light Chain CDR1 DNA
<400> 30
gagtcctgg actctacgg caactccttc 30

<210> 31

<211> 3
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 18G7H6A3 Light Chain CDR2 Amino Acid

<400> 31

Leu Thr Ser

1

<210> 32

<211> 9

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 18G7H6A3 Light Chain CDR2 DNA

<400> 32

ctgacctcc

9

<210> 33

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 18G7H6A3 Light Chain CDR3 Amino Acid

<400> 33

Gln Gln Asn Ala Glu Asp Pro Arg Thr

1

5

<210> 34

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 18G7H6A3 Light Chain CDR3 DNA

<400> 34

cagcagaacg ccgaggaccc cagaacc

27

<210> 35

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 18G7H6A1 Heavy Chain CDR1 Amino Acid

<400> 35

Gly Tyr Ser Phe Thr Ala Tyr Trp

1 5

<210> 36

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 18G7H6A1 Heavy Chain CDR1 DNA

<400> 36

ggctactcct tcaccgccta ctgg 24

<210> 37

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 18G7H6A1 Heavy Chain CDR2 Amino Acid

<400> 37

Ile Leu Pro Gly Ser Asp Ser Thr

1 5

<210> 38

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 18G7H6A1 Heavy Chain CDR2 DNA

<400> 38

atcctgcccc gcagcgacag cacc 24

<210> 39

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 18G7H6A1 Heavy Chain CDR3 Amino Acid

<400> 39

Ala Arg Ser Gly Tyr Tyr Gly Ser Ser Gln Tyr

1 5 10
 <210> 40
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223
 > 18G7H6A1 Heavy Chain CDR3 DNA
 <400> 40
 gcccgcagcg gctactacgg cagcagccag tac 33
 <210> 41
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 18G7H6A1 Light Chain CDR1 Amino Acid
 <400> 41
 Glu Ser Val Asp Ser Tyr Gly Asn Ser Phe
 1 5 10
 <210> 42
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 18G7H6A1 Light Chain CDR1 DNA
 <400> 42
 gagagcgtgg acagctacgg caacagcttc 30
 <210> 43
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 18G7H6A1 Light Chain CDR2 Amino Acid
 <400> 43
 Leu Thr Ser
 1
 <210> 44
 <211> 9

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 18G7H6A1 Light Chain CDR2 DNA
 <400> 44
 ctgaccagc
 <210> 45
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 18G7H6A1 Light Chain CDR3 Amino Acid
 <400> 45

9

Gln Gln Asn Ala Glu Asp Pro Arg Thr

1 5
 <210> 46
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 18G7H6A1 Light Chain CDR3 DNA
 <400> 46

27

cagcagaacg ccgaggaccc caggacc

<210> 47
 <211> 561
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens
 <400> 47

Met Asp Thr Ser Arg Leu Gly Val Leu Leu Ser Leu Pro Val Leu Leu

1 5 10 15
 Gln Leu Ala Thr Gly Gly Ser Ser Pro Arg Ser Gly Val Leu Leu Arg

20 25 30
 Gly Cys Pro Thr His Cys His Cys Glu Pro Asp Gly Arg Met Leu Leu

35 40 45
 Arg Val Asp Cys Ser Asp Leu Gly Leu Ser Glu Leu Pro Ser Asn Leu

50 55 60

<210> 48
 <211> 137
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 18G7H6A1 Heavy Chain Variable Amino acid
 <400> 48

Met Glu Trp Ser Trp Val Phe Leu Phe Phe Leu Ser Val Thr Thr Gly
 1 5 10 15

Val His Ser Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
 20 25 30

Pro Gly Glu Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe
 35 40 45

Thr Ala Tyr Trp Ile Glu Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60

Glu Trp Ile Gly Glu Ile Leu Pro Gly Ser Asp Ser Thr Asn Tyr Asn
 65 70 75 80

Glu Lys Phe Lys Gly His Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser
 85 90 95

Thr Ala Tyr Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Val
 100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Gly Tyr Tyr Gly Ser Ser Gln Tyr Trp Gly
 115 120 125

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 130 135

<210> 49
 <211> 131
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 18G7H6A1 Light Chain Variable Amino acid
 <400> 49

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

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

 65 70 75 80
 Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 85 90 95
 Leu Thr Ile Asn Pro Val Glu Ala Asn Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys
 100 105 110
 Gln Gln Asn Ala Glu Asp Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
 115 120 125
 Glu Ile Lys
 130