



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년07월02일

(11) 등록번호 10-2680924

(24) 등록일자 2024년06월28일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07K 16/28 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)

A61P 25/00 (2006.01) A61P 25/28 (2006.01)

A61P 29/00 (2023.01) A61P 35/00 (2006.01)

A61P 37/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C07K 16/2803 (2013.01)

A61P 25/00 (2018.01)

(21) 출원번호 10-2019-7034009

(22) 출원일자(국제) 2018년05월04일

심사청구일자 2021년04월08일

(85) 번역문제출일자 2019년11월18일

(65) 공개번호 10-2020-0004324

(43) 공개일자 2020년01월13일

(86) 국제출원번호 PCT/US2018/031263

(87) 국제공개번호 WO 2018/204895

국제공개일자 2018년11월08일

(30) 우선권주장

62/501,981 2017년05월05일 미국(US)

(56) 선행기술조사문헌

US20100285036 A1

JP2017502920 A

JP2014530239 A

(73) 특허권자

백시넥스 인코포레이티드

미국 뉴욕 로체스터 마운트 호프 애브뉴 1895 (우: 14620)

(72) 발명자

스미스 어니스트 에스

미국 14586 뉴욕주 웨스트 헨리에타 롱턴 플레이스 67

코넬리슨 엔젤리카

미국 14534 뉴욕주 피츠포드 레인브룩 드라이브 14

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

김진희, 김태홍

전체 청구항 수 : 총 26 항

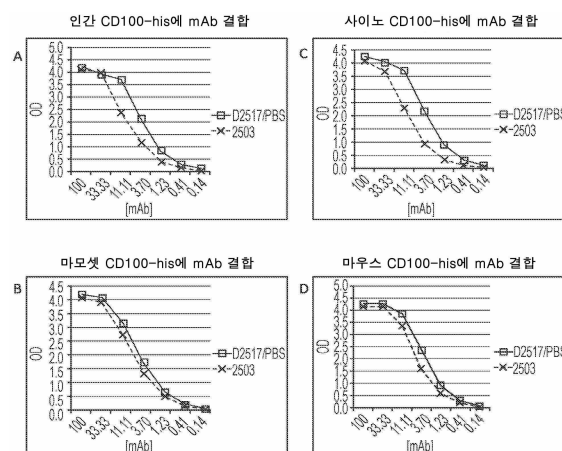
심사관 : 김윤선

(54) 발명의 명칭 인간 항-세마포린 4D 항체

(57) 요약

세마포린-4D(SEMA4D) 병리학과 연관된 질환, 예컨대 자가면역 질환, 염증성 질환, 암, 신경염증성 장애 및 신경 퇴행성 질환을 치료하기 위한 조성물 및 방법이 제공된다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61P 25/28 (2018.01)

A61P 29/00 (2023.02)

A61P 35/00 (2018.01)

A61P 37/00 (2018.01)

A61K 2039/505 (2013.01)

C07K 2317/33 (2013.01)

C07K 2317/73 (2013.01)

C07K 2317/76 (2013.01)

C07K 2317/92 (2013.01)

(72) 발명자

스크리븐스 마리아 쥐 엠

미국 14615 뉴욕주 로체스터 코틀리 씨클 71

패리스 마크

미국 14506 뉴욕주 맨던 보스워스 필드 24

자우더러 모리스

미국 14534 뉴욕주 피츠포드 우드랜드 로드 44

명세서

청구범위

청구항 1

중쇄 가변 영역(VH) 및 경쇄 가변 영역(VL)을 포함하는 세마포린-4D(SEMA4D)에 특이적으로 결합하는 항체 또는 그것의 항원-결합 단편으로서, 상기 VH는 각각 서열번호: 2, 서열번호: 3, 및 서열번호: 4의 아미노산 서열을 포함하는 상보성 결정 영역(HCDRs) HCDR1, HCDR2, 및 HCDR3을 포함하고; 상기 VL은 각각 서열번호: 6, 서열번호: 7, 및 서열번호: 8의 아미노산 서열을 포함하는 상보성 결정 영역(LCDRs) LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 것인 항체 또는 그것의 항원-결합 단편.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 VH가 추가로 프레임워크 영역(HFWs) HFW1, HFW2, HFW3, 및 HFW4을 포함하고, 상기 VL이 추가로 프레임워크 영역(LFWs) LFW1, LFW2, LFW3, 및 LFW4를 포함하는 것인 항체 또는 그것의 항원-결합 단편.

청구항 3

청구항 2에 있어서, 상기 프레임워크 영역이 인간 항체에서 유래된 것인 항체 또는 그것의 항원-결합 단편.

청구항 4

청구항 2에 있어서, 상기 프레임워크 영역이 비-인간 항체에서 유래된 것인 항체 또는 그것의 항원-결합 단편.

청구항 5

청구항 1에 있어서, 상기 VH가 서열번호: 1의 아미노산 서열을 포함하거나; 또는 상기 VL이 서열번호: 5의 아미노산 서열을 포함하거나; 또는 상기 VH가 서열번호: 1의 아미노산 서열을 포함하고 상기 VL이 서열번호: 5의 아미노산 서열을 포함하는 것인 항체 또는 그것의 항원-결합 단편.

청구항 6

청구항 1에 있어서, 중쇄 가변 영역(VH) 및 경쇄 가변 영역(VL)을 포함하는 세마포린-4D(SEMA4D)에 특이적으로 결합하되, 상기 VH가 서열번호: 1과 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나; 또는 상기 VL이 서열번호: 5와 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나; 또는 상기 VH가 서열번호: 1과 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하고 상기 VL이 서열번호: 5와 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 것인 항체 또는 그것의 항원-결합 단편.

청구항 7

청구항 1 또는 6에 있어서, 항체 또는 그것의 항원-결합 단편은 추가로 상기 VH의 C-말단에 융합된 중쇄 불변 영역 또는 그것의 단편을 포함하고, 상기 불변 영역 또는 그것의 단편은 인간 또는 비-인간 중쇄 불변 영역인 것인 항체 또는 그것의 항원-결합 단편.

청구항 8

청구항 7에 있어서, 상기 중쇄 불변 영역 또는 그것의 단편이 인간 IgG4 불변 영역인 것인 항체 또는 그것의 항원-결합 단편.

청구항 9

청구항 7에 있어서, 상기 중쇄 불변 영역 또는 그것의 단편이 쥐과 IgG1 불변 영역인 것인 항체 또는 그것의 항원-결합 단편.

청구항 10

청구항 1 또는 6에 있어서, 항체 또는 그것의 항원-결합 단편은 추가로 상기 VL의 C-말단에 융합된 경쇄 불변 영역 또는 그것의 단편을 포함하고, 상기 불변 영역 또는 그것의 단편은 인간 또는 비-인간 경쇄 불변 영역인 것인 항체 또는 그것의 항원-결합 단편.

청구항 11

청구항 10에 있어서, 상기 경쇄 불변 영역 또는 그것의 단편이 인간 람다 경쇄 불변 영역인 것인 항체 또는 그것의 항원-결합 단편.

청구항 12

청구항 10에 있어서, 상기 경쇄 불변 영역 또는 그것의 단편이 쥐과 람다 경쇄 불변 영역인 것인 항체 또는 그것의 항원-결합 단편.

청구항 13

청구항 1 또는 6에 있어서, Fab 단편, Fab' 단편, F(ab')₂ 단편, Fd 단편, 단일-사슬 Fv 단편(scFv), 또는 디설파이드-연결된 Fv 단편(sdFv)인 항체 또는 그것의 항원-결합 단편.

청구항 14

청구항 1 또는 6에 있어서, 다중특이적인 항체 또는 그것의 항원-결합 단편.

청구항 15

청구항 1 또는 6에 있어서, 인간 SEMA4D, 마우스 SEMA4D, 랫 SEMA4D, 또는 비-인간 영장류 SEMA4D에 특이적으로 결합할 수 있는 항체 또는 그것의 항원-결합 단편.

청구항 16

청구항 1 또는 6에 있어서, SEMA4D가 SEMA4D 수용체에 결합하는 것을 억제할 수 있는 항체 또는 그것의 항원-결합 단편.

청구항 17

청구항 16에 있어서, 상기 SEMA4D 수용체가 플렉신-B1, 플렉신-B2, CD72, 또는 이들의 조합인 것인 항체 또는 그것의 항원-결합 단편.

청구항 18

청구항 1 또는 6의 항체 또는 그것의 항원-결합 단편, 및 담체를 포함하는, 자가면역 질환 또는 장애, 염증성 질환 또는 장애, 암, 신경염증성 질환 또는 장애, 신경퇴행성 질환 또는 장애, 또는 이들의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 질환 또는 장애의 치료를 위한 약제학적 조성물.

청구항 19

청구항 1 또는 6의 항체 또는 그것의 항원-결합 단편, 또는 이것의 서브유닛을 인코딩하는 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는 단리된 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리뉴클레오타이드들의 혼합물.

청구항 20

청구항 19의 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리뉴클레오타이드들의 혼합물, 또는 청구항 19의 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리뉴클레오타이드들의 혼합물을 포함하는 벡터 또는 벡터들을 포함하는 단리된 숙주세포.

청구항 21

청구항 1 또는 6의 항체 또는 그것의 항원-결합 단편을 생산하는 방법으로서, 상기 항체 또는 그것의 항원-결합 단편, 또는 이것의 서브유닛을 인코딩하는 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는 단리된 폴리뉴클레오타이드 또는

폴리뉴클레오타이드들의 혼합물, 또는 상기 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리뉴클레오타이드들의 혼합물을 포함하는 벡터 또는 벡터들을 포함하는 단리된 숙주세포를 배양하는 단계, 및 상기 항체 또는 그것의 항원-결합 단편을 회수하는 단계를 포함하는, 상기 항체 또는 그것의 항원-결합 단편을 생산하는 방법.

청구항 22

청구항 1 또는 6의 항체를 포함하는, 인간 대상체에서 SEMA4D를 중화하기 위한 약제학적 조성물로서, 상기 인간 대상체는 자가면역 질환 또는 장애, 염증성 질환 또는 장애, 암, 신경염증성 질환 또는 장애, 신경퇴행성 질환 또는 장애, 또는 이들의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 질환 또는 장애에 대한 치료를 필요로 하는 것인 약제학적 조성물.

청구항 23

청구항 22에 있어서, 상기 신경염증성 질환 또는 장애가 다발성 경화증인 것인 약제학적 조성물.

청구항 24

청구항 22에 있어서, 상기 질환 또는 장애가 뇌졸중, 알츠하이머병, 파킨슨병, 헌팅턴병, 다운 증후군, 운동실조증, 근위축 측삭 경화증(ALS), 전두측두 치매(FTD), HIV-관련 인지 손상, CNS 낭창, 경도 인지 장애, 또는 이들의 조합인 것인 약제학적 조성물.

청구항 25

청구항 22에 있어서, 상기 자가면역 질환 또는 상기 염증성 질환이 관절염인 것인 약제학적 조성물.

청구항 26

청구항 22에 있어서, 상기 자가면역 질환 또는 상기 염증성 질환이 류마티스성 관절염인 것인 약제학적 조성물.

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

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원에 대한 교차 참조

[0002] 본원은 본 명세서에 참고로 전체가 편입된 미국 특허 가출원 일련 번호 62/501,981(2017년 5월 5일 출원)의 이 점을 주장한다.

배경 기술

[0003] 세마포린 4D(SEMA4D)는 CD 100으로도 알려져 있는데, 세마포린 유전자 계열에 속한 막관통 단백질이다. SEMA4D는 동종이량체로서 세포 표면 상에 발현되나, 세포 활성화 시, SEMA4D는 상기 세포 표면에서 단백질분해 절단을 통해 방출되어, 단백질의 가용성 형태이자, 또한 생물학적으로 활성인 sSEMA4D를 생성할 수 있다. 참고 Suzuki 등, *Nature Rev. Immunol.* 5:159-167 (2003); Kikutani 등, *Nature Immunol.* 9:17-23 (2008).

[0004] SEMA4D는 림프관 기관, 예컨대 비장, 가슴샘, 및 림프절에서, 및 비-림프관 기관, 예컨대 뇌 및 신장에서 높은 수준에서 발현된다. 림프관 기관에서, SEMA4D는 휴지상태 T 세포 상에서 풍부하게 발현되나, 휴지상태 B 세포 및 항원-제시 세포(APCs), 예컨대 수지상 세포(DCs) 상에서는 단지 약하게 발현된다. 그러나, 그것의 발현은 다양한 면역학적 자극에 의한 활성화 이후 이들 세포에서 상향 조절된다. 면역 세포에서 가용성 SEMA4D의 방출은 또한 세포 활성화에 의해 증가된다.

[0005] SEMA4D는 특정 암의 발달에 관련되는 것으로 암시되어 왔고(Ch'ng 등, *Cancer* 770:164-72 (2007); Campos 등, *Oncology Letters* 5:1527-35 (2013); Kato 등, *Cancer Sci.* 102:2029-31 (2011)) 및 여러 보고서는 이와 같은 영향의 한 가지 기전이 종양 혈관신생을 촉진하는 SEMA4D의 역할이라는 점을 시사한다 (Conrotto 등, *Blood* 705:4321-4329 (2005). Basile 등, *J Biol. Chem.* 282: 34888-34895 (2007); Sierra 등 *J. Exp. Med.* 205:1673 (2008); Zhou 등, *Angiogenesis* 15:391-407 (2012)). 종양 성장 및 전이는 내피 세포 및 맥관구조 뿐만 아니라 종양 세포, 기질 및 면역 침윤물 사이에서 혼선의 복합 공정을 수반한다. SEMA4D는 광범위한 종양 유형에서 과발현되고, 또한 종양 미세환경에 동원된 염증 세포에 의해 생산된다. 최근 연구는 SEMA4D가 종양 기질을 구성하는 상이한 세포 유형의 이동, 생존, 분화 및 조직화에 역할을 한다는 점을 시사한다 (Evans 등, *Cancer Immunol. Res.* 5:689-701 (2015)).

[0006] SEMA4D는 신경퇴행성 장애, 자가면역 질환, 탈수초 질환, 및 암에 연루되어 왔다. 중추신경계(CNS)에서, SEMA4D는 예를 들어, 침윤하는 면역 세포 및 회소돌기교세포 전구체 세포 상에서 발현되고, 그것의 수용체는 예를 들어, 뉴런, 회소돌기교세포, 별아교세포, 및 내피 세포 상에서 발현된다(Okuno, T., 등, *J. Immunol.* 184:1499-1506 (2010)). SEMA4D는 축삭돌기 안내 분자로 작용할 수 있고 (Swiercz 등, *Neuron* 55:51-63 (2002)), 및 다른 활성 중에서 GABAergic 및 글루타메이트성 시냅스 발달을 매개할 수 있다(Paradis 등, *Neuron* 53:217-232 (2007)).

[0007] SEMA4D는 또한 뉴런 및 회소돌기교세포 전구체 세포의 이동 및 분화, CNS 염증, 및 신경퇴행에서 역할을 하는 것으로 밝혀진 바 있다. 예를 들어, SEMA4D-결핍 마우스는 실험 자가면역 뇌척수염(EAE)의 발달에 저항하고

(Kumanogoh A 등, *Immunity* 13:621-631 (2000)), SEMA4D의 차단은 EAE에서 미세아교 활성화 및 신경염증을 억제할 수 있다(Okuno, T., 등, *J. Immunol.* 754:1499-1506 (2010)). 이와 유사하게, 내피 세포의 SEMA4D 자극은 친-염증성 사이토카인 IL-8의 생산으로 이어질 수 있다(Yang, YH 등, *PLoS One* 6:e25826 (2011)).

[0008] 최근 출판물들은 항-SEMA4D 결합 분자, 예를 들어, 항체 또는 그것의 항원-결합 단편이 암 및 신경염증성/신경 퇴행성 질환 모두를 치료하는 데 효능이 있음을 실증한 바 있다. 예를 들어, 최근 항-SEMA4D 항체 VX15/2503으로의 단계 I 임상시험이 고형 종양을 치료하는 데 안전성 및 효능을 실증하였다. 참고, 예를 들어, Patnaik, A., 등 *Clin. Cancer Res.* 22:827-836 (2016) and Southwell AL, 등, *Neurobiol. Dis* 76:46-56 (2015). 그러나, 예를 들어, 결합 특성, 면역원성, 및/또는 효력을 비롯한 변형된 및/또는 개선된 프로파일을 갖는 추가의 항-SEMA4D 항체에 대한 요구가 남아 있다.

발명의 내용

[0009] 본 개시내용은 세마포린-4D(SEMA4D) 병리학과 연관된 질환, 예컨대 자가면역 질환, 염증성 질환, 암, 신경염증성 질환 및 신경퇴행성 장애를 치료하기 위한 조성물 및 방법을 제공한다. 본원에 설명된 개시내용의 양태에 따르면, SEMA4D에 특이적으로 결합하는 항체 또는 항원-결합 단편이 제공된다. 본원에 설명된 개시내용의 다른 양태에 따르면, 자가면역 질환, 염증성 질환, 암, 신경염증성 질환, 및 신경퇴행성 장애를 가진 대상체를 치료하는 방법이 제공되며, 상기 방법은 특이적으로 SEMA4D에 결합하고 SEMA4D 활성을 중화하는 항체 또는 항원-결합 단편의 유효량을 상기 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다.

[0010] 특정 양태에서, 특이적으로 SEMA4D에 결합하는 항체 또는 그것의 항원-결합 단편은 중쇄 가변 영역(VH) 및 경쇄 가변 영역(VL)을 포함하되; 상기 VH는 상보성 결정 영역(HCDRs) HCDR1, HCDR2, 및 HCDR3을 포함하는데, 이들은 각각 서열번호: 2, 서열번호: 3, 및 서열번호: 4와 동일하거나, 또는 상기 HCDRs 중 하나, 둘 또는 셋 모두에서 아미노산 치환이 하나, 둘, 셋, 또는 넷인 것을 제외하고 상기 서열번호와 동일한 아미노산 서열을 포함하고; 및 상기 VL은 상보성 결정 영역(LCDRs) LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는데, 이들은 각각 서열번호: 6, 서열번호: 7, 및 서열번호: 8과 동일하거나, 또는 상기 LCDRs 하나, 둘 또는 셋 모두에서 아미노산 치환이 하나, 둘, 셋, 또는 넷인 것을 제외하고 상기 서열번호와 동일한 아미노산 서열을 포함한다.

[0011] 특정 양태에서, 상기 항-SEMA4D 항체 또는 그것의 항원-결합 단편은 각각 서열번호: 2, 서열번호: 3, 및 서열번호: 4와 동일한 아미노산 서열을 포함하는 VH 상보성 결정 영역 HCDR1, HCDR2, 및 HCDR3, 및 각각 서열번호: 6, 서열번호: 7, 및 서열번호: 8과 동일한 아미노산 서열을 포함하는 VL 상보성 결정 영역 LCDR1, LCDR2, 및 LCDR3을 포함한다.

[0012] 특정 양태에서, 상기 항-SEMA4D 항체 또는 그것의 항원-결합 단편은 프레임워크 영역(HFWs) HFW1, HFW2, HFW3, 및 HFW4를 포함하는 VH, 및 프레임워크 영역(LFWs) LFW1, LFW2, LFW3, 및 LFW4를 포함하는 VL을 포함한다. 특정 양태에서, 상기 프레임워크 영역은 인간 항체 또는 비-인간 항체에서 유래될 수 있다.

[0013] 특정 양태에서, 상기 항-SEMA4D 항체 또는 그것의 항원-결합 단편은 서열번호: 1의 아미노산 서열을 포함하는 VH를 포함한다. 특정 양태에서, 상기 항-SEMA4D 항체 또는 그것의 항원-결합 단편은 서열번호: 5의 아미노산 서열을 포함하는 VL을 포함한다. 특정 양태에서, 상기 항-SEMA4D 항체 또는 그것의 항원-결합 단편은 각각 서열번호: 1 및 서열번호: 5의 아미노산 서열을 포함하는 VH 및 VL을 포함한다.

[0014] 특정 양태에서, 본원에 제공된 상기 항-SEMA4D 항체 또는 그것의 항원-결합 단편의 VH는 서열번호: 1과 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 특정 양태에서, 본원에 제공된 상기 항-SEMA4D 항체 또는 그것의 항원-결합 단편의 VL은 서열번호: 5와 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 특정 양태에서, 상기 VH는 서열번호: 1과 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함할 수 있고, 및 상기 VL은 서열번호: 5와 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[0015] 특정 양태에서, 본원에 제공된 상기 항-SEMA4D 항체 또는 그것의 단편은 상기 VH의 C-말단에 융합된 중쇄 불변 영역 또는 그것의 단편을 포함한다. 특정 양태에서, 상기 중쇄 불변 영역 또는 그것의 단편은 인간 중쇄 불변 영역이다. 특정 양태에서, 상기 중쇄 불변 영역 또는 그것의 단편은 인간 IgG4 불변 영역일 수 있다. 특정 양태에서, 상기 중쇄 불변 영역 또는 그것의 단편은 비-인간 불변 영역이다. 특정 양태에서, 상기 중쇄 불변 영역 또는 그것의 단편은 쥐과 IgG1 불변 영역이다. 특정 양태에서, 상기 항-SEMA4D 항체 또는 그것의 단편은 VH 및 VL을 포함하되, 상기 경쇄 불변 영역 또는 그것의 단편은 상기 VL의 C-말단에 융합된다. 특정 양태에서, 본원에 제공된 상기 항-SEMA4D 항체 또는 그것의 단편은 상기 VL의 C-말단에 융합된 경쇄 불변 영역 또는 그것의 단편

을 포함한다. 특정 양태에서, 상기 경쇄 불변 영역은 인간 경쇄 불변 영역, 예를 들어, 인간 램다 또는 인간 카파 경쇄 불변 영역이다. 특정 양태에서, 상기 경쇄 불변 영역은 비-인간 경쇄 불변 영역, 예를 들어, 쥐과 램다 경쇄 불변 영역이다.

- [0016] 특정 양태에서, 본원에 제공된 항-SEMA4D 항체 또는 그것의 단편은 Fab 단편, Fab' 단편, F(ab')₂ 단편, Fd 단편, 단일-사슬 Fv 단편(scFv), 또는 디설파이드-연결된 Fv 단편(sdFv)일 수 있다. 특정 양태에서, 상기 항-SEMA4D 항체 또는 그것의 단편은 다중-특이적, 예를 들어, 이중특이적일 수 있다.
- [0017] 특정 양태에서, 본원에 제공된 항-SEMA4D 항체 또는 그것의 단편은 특이적으로 인간 SEMA4D, 마우스 SEMA4D, 랫트 SEMA4D, 및/또는 비-인간 영장류 SEMA4D, 예를 들어, 사이노몰구스 원숭이 SEMA4D 및/또는 마모셋 SEMA4D에 결합할 수 있다. 특정 양태에서, 본원에 제공된 항-SEMA4D 항체 또는 그것의 단편은 해리 상수 K_D가 500 nM, 100 nM, 50.0 nM, 40.0 nM, 30.0 nM, 20.0 nM, 10.0 nM, 9.0 nM, 8.0 nM, 7.0 nM, 6.0 nM, 5.0 nM, 4.0 nM, 3.0 nM, 2.0 nM, 1.0 nM, 0.50 nM, 0.10 nM, 0.050 nM, 0.01 nM, 0.005 nM, 또는 0.001 nM인 것으로 특징으로 하는 친화도로, SEMA4D, 예를 들어, 인간 SEMA4D, 마우스 SEMA4D, 랫트 SEMA4D, 및/또는 비-인간 영장류 SEMA4D, 예를 들어, 사이노몰구스 원숭이 SEMA4D 및/또는 마모셋 SEMA4D에 결합할 수 있다.
- [0018] 특정 양태에서, 본원에 제공된 항-SEMA4D 항체 또는 그것의 단편은 SEMA4D가 SEMA4D 수용체, 예를 들어, 플렉신-B1, 플렉신-B2, CD72, 또는 이들의 임의의 조합에 결합하는 것을 억제할 수 있다.
- [0019] 특정 양태에서, 상기 항-SEMA4D 항체 또는 그것의 단편은 대상체에게 투여 시 항-항체 면역 반응을 최소로 유도하거나, 또는 전혀 유도하지 않는다.
- [0020] 특정 양태에서, 상기 항-SEMA4D 항체 또는 그것의 단편은 그것에 융합된 또는 접합된 이중성 모이어티를 포함한다. 특정 양태에서, 상기 이중성 모이어티는 예를 들어, 폴리펩타이드, 세포독성 약물, 치료제, 전구약물, 지질, 탄수화물, 핵산, 검출가능한 표지, 폴리머, 또는 이들의 임의의 조합일 수 있다. 특정 양태에서, 상기 이중성 모이어티는 결합 분자, 효소, 사이토카인, 림포카인, 호르몬 펩타이드, 또는 이들의 임의의 조합을 포함할 수 있다. 또 다른 양태에서, 상기 이중성 모이어티는 방사선헌종, 생물학적 독소, 효소 활성 독소, 또는 이들의 임의의 조합을 포함할 수 있다. 또 다른 양태에서, 상기 이중성 모이어티는 효소, 형광 표지, 화학발광 표지, 생물발광 표지, 방사성 표지, 또는 이들의 임의의 조합을 포함할 수 있다.
- [0021] 특정 양태에서, 본 개시내용은 본원에 제공된 항-SEMA4D 항체 또는 그것의 단편, 및 담체를 포함하는 약제학적 조성물을 제공한다.
- [0022] 특정 양태에서, 본 개시내용은 상기 항-SEMA4D 항체 또는 그것의 단편을 인코딩하는 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는 단리된 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리뉴클레오타이드들의 조합을 제공한다. 또 다른 양태에서, 상기 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리뉴클레오타이드들의 조합은 상기 항-SEMA4D 항체 또는 그것의 단편의 VH를 인코딩하는 핵산 서열을 포함한다. 또 다른 양태에서, 상기 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리뉴클레오타이드들의 조합은 상기 항-SEMA4D 항체 또는 그것의 단편의 VL을 인코딩하는 핵산 서열을 포함한다. 또 다른 양태에서, 상기 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리뉴클레오타이드들의 조합은 상기 항-SEMA4D 항체 또는 그것의 단편의 VH 및 VL을 인코딩하는 핵산 서열을 포함한다. 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 상기 항-SEMA4D 항체 또는 그것의 단편을 인코딩하는 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 벡터를 제공한다. 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 상기 벡터를 포함하는 숙주세포를 제공한다. 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 상기 항-SEMA4D 항체 또는 그것의 단편을 생산하는 방법을 제공한다.
- [0023] 상기 제공된 방법의 특정 양태에서, 상기 항-SEMA4D 항체 또는 항원-결합 단편은 인간 대상체에서 SEMA4D를 중화한다.
- [0024] 본원에 설명된 양태에 따르면, 본 개시내용은 자가면역 질환 또는 장애, 염증성 질환 또는 장애, 암, 신경염증성 질환 또는 장애, 신경퇴행성 질환 또는 장애, 또는 이들의 임의의 조합을 가진 대상체를 치료하는 방법을 제공한다. 상기 방법은 특이적으로 SEMA4D에 결합하고 SEMA4D 활성을 중화하는 항체 또는 항원-결합 단편의 유효량을 상기 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다. 특정 양태에서, 상기 신경염증성 질환 또는 장애는 다발성 경화증이다. 특정 양태에서, 상기 신경퇴행성 질환 또는 장애는 뇌졸중, 알츠하이머병, 파킨슨병, 헌팅턴병, 다운 증후군, 운동실조증, 근위축 측삭 경화증(ALS), 전두측두 치매(FTD), HIV-관련된 인지 손상, CNS 낭창, 온건한 인지 손상, 또는 이들의 조합이다. 특정 양태에서, 상기 자가면역 질환 또는 상기 염증성 질환은 관절염이다. 특정 양태에서, 상기 자가면역 질환 또는 상기 염증성 질환은 류마티스성 관절염이다.

도면의 간단한 설명

- [0025] **도 1a**는 ELISA에 의해 측정된 인간 SEMA4D에 MAbD2517 및 MAbVX15/2503(둘 다 PBS에서 제형화됨)의 결합을 비교한다.
- 도 1b**는 ELISA에 의해 측정된 사이노물구스 원숭이 SEMA4D에 MAbD2517 및 MAbVX15/2503(둘 다 PBS에서 제형화됨)의 결합을 비교한다.
- 도 1c**는 ELISA에 의해 측정된 마모셋 SEMA4D에 MAbD2517 및 MAbVX15/2503(둘 다 PBS에서 제형화됨)의 결합을 비교한다.
- 도 1d**는 ELISA에 의해 측정된 마우스 SEMA4D에 MAbD2517 및 MAbVX15/2503(둘 다 PBS에서 제형화됨)의 결합을 비교한다.
- 도 2a**는 MAbVX 15/2503와 비교하여, 인간 SEMA4D가 293PLXNB1 세포에 결합하는 것을 차단하는 MAbD2517의 능력을 도시한다.
- 도 2b**는 MAbVX15/2503과 비교하여, 사이노물구스 원숭이 SEMA4D가 293PLXNB1 세포에 결합하는 것을 차단하는 MAbD2517의 능력을 도시한다.
- 도 2c**는 MAbVX 15/2503과 비교하여, 마우스 SEMA4D가 293PLXNB1 세포에 결합하는 것을 차단하는 MAbD2517의 능력을 도시한다.
- 도 2d**는 MAbVX 15/2503과 비교하여, 랫트 SEMA4D가 293PLXNB1 세포에 결합하는 것을 차단하는 MAbD2517의 능력을 도시한다.
- 도 3a**는 대조군 마우스 IgG1/2B8 또는 키메라 항체 MAbD2585 중 하나로 치료한(10 mg/kg, IP, 매주 X5) Balb/c 마우스에서 종양 부피의 측정을 도시한다.
- 도 3b**는 대조군 마우스 IgG1/2B8 또는 키메라 항체 MAbD2585 중 하나로 치료한 Balb/c 마우스의 생존 시기를 도시한다.
- 도 3c**는 대조군 마우스 IgG1/2B8 또는 키메라 항체 MAbD2585 중 하나로 치료한 Balb/c 마우스에서 종양 퇴화의 빈도를 도시한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0026] 정의
- [0027] 용어 "a" 또는 "an" 독립체는 상기 독립체를 하나 이상 지칭함을 유의해야 한다; 예를 들어, "결합 분자"는 하나 이상의 결합 분자를 나타냄이 이해된다. 이와 같이, 용어들 "a"(또는 "an"), "하나 이상," 및 "적어도 하나"는 본원에서 상호교환하여 사용될 수 있다.
- [0028] 게다가, 본원에 사용된 "및/또는"은 두 가지 명시된 특징 또는 성분 각각의 특이적 개시내용(나머지 하나는 있을 수도, 없을 수도 있음)으로 고려되어야 한다. 따라서, 어구에 사용된 용어 및/또는"은 본원의 "A 및/또는 B"는 "A 및 B," "A 또는 B," "A"(단독), 및 "B"(단독)을 포함하는 것이다. 마찬가지로, 어구에 사용된 용어 "및/또는"은, 예컨대 "A, B, 및/또는 C"는 각각의 하기 구현예: A, B, 및 C; A, B, 또는 C; 또는 C; 또는 B; B 또는 C; 및 C; 및 B; B 및 C;(단독); B(단독); 및 C(단독)를 모두 아우르는 것이다.
- [0029] 달리 정의되지 않는 한, 본원에 사용된 기술 및 과학 용어들은 본 개시내용이 관련된 당해 분야의 숙련가에 의해 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 예를 들어, the Concise Dictionary of Biomedicine and Molecular Biology, Juo, Pei-Show, 2nd ed., 2002, CRC Press; The Dictionary of Cell and Molecular Biology, 3rd ed., 1999, Academic Press; 및 the Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology, Revised, 2000, Oxford University Press는 당해기술의 숙련가에게 본 개시내용에 사용된 많은 용어들의 일반적인 사진을 제공한다.
- [0030] 단위, 접두어 및 기호는 그것의 Systeme International de Unites(SI) 허용된 형태로 표시된다. 수치 범위는 상기 범위를 정의하는 숫자들을 포괄한다. 달리 나타내지 않는 한, 아미노산 서열은 아미노에서 카복시 배향으로 왼쪽에서 오른쪽으로 쓰여진다. 본원에 제공된 제목들은 본 개시내용의 다양한 양태 또는 양태를 제한하는 것이 아니며, 전체적으로 명세서에 참고하여 취해질 수 있다. 따라서, 바로 아래 정의된 용어들은 전체적으로

명세서를 참고하여 좀 더 완전하게 정의된다.

- [0031] 구현예가 언어 "포함하는"으로 기재될 때마다, "~으로 이루어진" 및/또는 "본질적으로 ~으로 이루어진"의 관점에서 기재된 달리 유사한 구현예 또한 제공된다.
- [0032] 아미노산은 본원에서 그것의 통상적으로 알려진 3개의 글자 기호로, 또는 IUPAC-IUB 생화학적 명명법 위원회에 의해 권고된 1-문자 기호로 지칭된다. 뉴클레오타이드도 마찬가지로 그것의 통상적으로 허용된 단일-문자 암호로 지칭된다.
- [0033] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어들 "암" 및 "암성"은 세포의 모집단이 조절되지 않은 세포 성장을 특징으로 하는 것인 포유동물의 생리적 병태를 지칭하거나 또는 묘사한다. 암은 예를 들어, 고형 종양 또는 악성종양, 또는 혈액학적 암 또는 악성종양으로 분류될 수 있다. 두 가지 유형은 전이로서 원격 부위로 이동할 수 있다. 고형 종양은 예를 들어, 육종, 암종, 흑색종, 또는 이들의 전이로 분류될 수 있다.
- [0034] 본 명세서에서 사용된 "종양" 및 "신생물"은 양성(암이 없는)이든 또는 악성(암성)(전-암성 병변 포함)이든, 과도한 세포 성장 또는 증식에서 기인한 임의의 질량의 조직을 지칭한다. 특정 구현예에서, 본원에 기재된 종양은 SEMA4D 수용체, 예를 들어, 플렉신-B1, 플렉신-B2, 및/또는 CD72를 발현하고, 및/또는 SEMA4D를 발현할 수 있다.
- [0035] 본 명세서에서 사용된 용어 "폴리펩타이드"는 단수 "폴리펩타이드" 뿐만 아니라 복수의 "폴리펩타이드"를 아우르고 아미드 결합(펩타이드 결합으로도 알려져 있음)에 의해 선형으로 연결된 단량체(아미노산)으로 구성된 분자를 지칭하는 것으로 의도된다. 용어 "폴리펩타이드"는 둘 이상의 아미노산의 임의의 사슬 또는 사슬들을 지칭하고, 상기 생성물의 특정 길이를 지칭하지는 않는다. 따라서, 둘 이상의 아미노산의 사슬 또는 사슬들을 지칭하기 위해 사용된 펩타이드, 디펩타이드, 트리펩타이드, 올리고펩타이드, "단백질," "아미노산 사슬," 또는 임의의 다른 용어가 "폴리펩타이드"의 정의에 포함되고, 용어 "폴리펩타이드"는 이들 용어들 중 어느 것 대신에 또는 그들과 상호교환하여 사용될 수 있다.
- [0036] 용어 "폴리펩타이드"는 폴리펩타이드의 발현-후 변형(예컨대 비제한적으로 당화, 아세틸화, 인산화, 아미드화, 및 알려진 보호/차단 작용기에 의한 유도체화, 단백질분해 절단, 또는 비-자연 발생 아미노산에 의한 변형)의 생성물을 지칭하는 것이다. 폴리펩타이드는 생물학적 원천에서 유래되거나 또는 재조합 기술에 의해 생산될 수 있지만, 반드시 지정된 핵산 서열에서 번역되지는 않는다. 임의의 방식으로, 예컨대 화학적 합성에 의해 생성될 수 있다.
- [0037] 본 명세서에서 개시된 폴리펩타이드는 크기가 약 3 이상, 5 이상, 10 이상, 20 이상, 25 이상, 50 이상, 75 이상, 100 이상, 200 이상, 500 이상, 1,000 이상, 또는 2,000 이상의 아미노산일 수 있다. 폴리펩타이드는 정의된 3차원 구조를 가질 수 있으나, 반드시 그와 같은 구조를 갖는 것은 아니다. 정의된 3차원 구조를 갖는 폴리펩타이드는 접혀졌다고 칭해지고, 정의된 3차원 구조를 갖지 않는 폴리펩타이드는, 오히려 많은 상이한 형태를 채택할 수 있어서, 접히지 않았다고 칭해진다. 본 명세서에서 사용된 용어 당단백질은 아미노산, 예를 들어, 세린 또는 아스파라긴의 산소-함유 또는 질소-함유 측쇄를 통해 상기 단백질에 부착된 적어도 하나의 탄수화물 모이어티에 커플링된 단백질을 지칭한다.
- [0038] "단리된" 폴리펩타이드 또는 단편, 변이체, 또는 그것의 유도체란 그것의 천연 환경에 존재하지 않는 폴리펩타이드를 의도한다. 특정 수준의 정제가 요구되지 않는다. 예를 들어, 단리된 폴리펩타이드는 그것의 천연 또는 천연 환경에서 제거될 수 있다. 재조합으로 생산된 폴리펩타이드 및 숙주세포에서 발현된 단백질은 본 명세서에서 개시된 바와 같이 단리된 것으로 간주되며, 임의의 적합한 기술에 의해 분리된, 분별된, 또는 부분적으로 또는 실질적으로 정제된 천연 또는 재조합 폴리펩타이드도 마찬가지이다.
- [0039] 본 명세서에서 사용된 용어 "비-자연 발생 폴리펩타이드" 또는 그것의 임의의 문법적 변이체는 판사 또는 행정기관 또는 사법 기관에 의해 "자연 발생"으로 결정 또는 해석되거나 또는 그럴 수 있는 형태의 폴리펩타이드를 명백하게 배제하는(단지 배제하는) 조건적 정의이다.
- [0040] 본원에 개시된 다른 폴리펩타이드는 전술한 폴리펩타이드의 단편, 유도체, 유사체, 또는 변이체, 및 이들의 임의의 조합이다. 본 명세서에서 개시된 용어들 "단편," "변이체," "유도체" 및 "유사체"에는 상응하는 천연 항체 또는 폴리펩타이드의 특성 중 적어도 일부, 예를 들어, 항원에 특이적 결합을 보유한 임의의 폴리펩타이드가 포함된다. 폴리펩타이드의 단편에는 예를 들어, 본원의 다른 곳에서 논의된 특이적 항체와 더불어, 결실 단편 뿐만 아니라 단백질분해 단편이 포함된다. 예를 들어, 폴리펩타이드의 변이체에는 상기에 기재된 단편, 및 또한 아미노산 치환, 결실, 또는 삽입으로 인해 변경된 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드가 포함된다. 특정 양태에

서, 변이체는 비-자연 발생적일 수 있다. 비-자연 발생 변이체는 당해기술에-알려진 돌연변이유발 기술을 사용하여 생산될 수 있다. 변이체 폴리펩타이드는 보존적 또는 비-보존적 아미노산 치환, 결실 또는 첨가를 포함할 수 있다. 유도체는 최초 폴리펩타이드에서 발견되지 않는 추가의 특징을 나타내기 위해 변경된 폴리펩타이드이다. 그 예에는 융합 단백질이 포함된다. 또한 변이체 폴리펩타이드는 본 명세서에서 일명 "폴리펩타이드 유사체"라 불릴 수 있다. 본 명세서에서 사용된 폴리펩타이드의 "유도체"는 또한 기능적 측면 작용기의 반응에 의해 화학적으로 유도된 하나 이상의 아미노산을 갖는 대상체 폴리펩타이드를 지칭할 수 있다. 또한 "유도체"에 포함되는 것은 20개 표준 아미노산의 유도체를 하나 이상 함유한 펩타이드들이다. 예를 들어, 4-하이드록시프롤린이 프롤린 대신 치환될 수 있고; 5- 하이드록실라이신이 라이신 대신 치환될 수 있고; 3-메틸히스티딘이 히스티딘 대신 치환될 수 있고 ; 호모세린이 세린 대신 치환될 수 있고; 및 오르니틴이 라이신 대신 치환될 수 있다.

[0041] "보존적 아미노산 치환"은 하나의 아미노산이 유사한 측쇄를 갖는 또 다른 아미노산으로 대체된 것이다. 유사한 측쇄를 갖는 아미노산의 계열은 당업계에서 정의된 바 있는데, 예컨대 염기성 측쇄(예를 들어, 라이신, 아르기닌, 히스티딘), 산성 측쇄(예를 들어, 아스파르트산, 글루탐산), 무전하 극성 측쇄(예를 들어, 아스파라긴, 글루타민, 세린, 트레오닌, 티로신, 시스테인), 무극성 측쇄(예를 들어, 글리신, 알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 프롤린, 페닐알라닌, 메티오닌, 트립토판), 베타-분지형 측쇄(예를 들어, 트레오닌, 발린, 이소류신) 및 방향족 측쇄(예를 들어, 티로신, 페닐알라닌, 트립토판, 히스티딘)이다. 예를 들어, 티로신 대신 페닐알라닌의 치환은 보존적 치환이다. 특정 구현예에서, 본 개시내용의 폴리펩타이드 및 항체의 서열에서의 보존적 치환은 결합 분자가 결합하는 항원에, 상기 아미노산 서열을 함유하는 폴리펩타이드 또는 항체의 결합을 폐지하지 않는다. 항원-결합을 제거하지 않는 뉴클레오타이드 및 아미노산 보존적 치환을 식별하는 방법은 당업계에서 잘 알려져 있다(참고, 예를 들어, Brummell 등, *Biochem.* 32: 1180-1 187 (1993); Kobayashi 등, *Protein Eng.* 12(10):879-884 (1999); 및 Burks 등, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 412-417 (1997)).

[0042] 용어 "폴리뉴클레오타이드"는 단수 핵산 뿐만 아니라 복수의 핵산을 아우르도록 의도되며, 단리된 핵산 분자 또는 구성체, 예를 들어, 메신저 RNA(mRNA), cDNA, 또는 플라스미드 DNA(pDNA)를 지칭한다. 폴리뉴클레오타이드는 종래의 포스포디에스테르 결합 또는 비-종래의 결합(예를 들어, 예컨대 펩타이드 핵산(PNA)에서 발견되는 아미드 결합)을 포함할 수 있다. 용어들 "핵산" 또는 "핵산 서열"은 임의의 하나 이상의 핵산 분절, 예를 들어, 폴리뉴클레오타이드에 존재하는 DNA 또는 RNA 단편을 지칭한다.

[0043] "단리된" 핵산 또는 폴리뉴클레오타이드란 그것의 천연 환경에서 분리된 핵산 또는 폴리뉴클레오타이드의 임의의 형태를 뜻한다. 예를 들어, 겔-정제된 폴리뉴클레오타이드, 또는 벡터에 함유된 폴리펩타이드를 인코딩하는 재조합 폴리뉴클레오타이드가 "단리된" 것으로 간주되곤 하였다. 또한, 클로닝을 위한 제한 부위를 갖도록 조작된 폴리뉴클레오타이드 분절, 예를 들어, PCR 생성물이 "단리된" 것으로 간주된다. 단리된 폴리뉴클레오타이드의 추가적인 예에는 이종성 숙주세포에 유지된 재조합 폴리뉴클레오타이드 또는 비-자연 용액, 예컨대 완충액 또는 염수 중 정제된(부분적으로 또는 실질적으로) 폴리뉴클레오타이드가 포함된다. 단리된 RNA 분자에는 폴리뉴클레오타이드의 생체내 또는 시험관내 RNA 전사체가 포함되는데, 여기서 상기 전사체는 자연에서 발견되는 것이 아니다. 단리된 폴리뉴클레오타이드 또는 핵산은 추가로, 합성으로 생산된 분자가 포함된다. 또한, 폴리뉴클레오타이드 또는 핵산은 조절 인자, 예컨대 프로모터, 리보솜 결합 부위, 또는 전사 종결자이거나 또는 이들을 포함할 수 있다.

[0044] 본 명세서에서 사용된 용어 "비-자연 발생 폴리뉴클레오타이드" 또는 그것의 임의의 문법적 변이체는 판사 또는 행정 기관 또는 사법 기관에 의해 "자연 발생"으로 결정 또는 해석된, 또는 그럴 될 수 있는 여러 형태의 핵산 또는 폴리뉴클레오타이드를 명백하게 배제(단지 배제)하는 조건적 정의이다.

[0045] 본 명세서에서 사용된 "코딩 영역"은 아미노산으로 번역된 코돈으로 이루어진 핵산의 일부분이다. 비록 "정지 코돈"(TAG, TGA, 또는 TAA)이 아미노산으로 번역되진 않지만, 코딩 영역의 일부로 간주될 수 있고, 반면 임의의 측점 서열, 예를 들어 프로모터, 리보솜 결합 부위, 전사 종결자, 인트론, 및 동종의 것은 코딩 영역의 일부가 아니다. 둘 이상의 코딩 영역이 단일 폴리뉴클레오타이드 구성체, 예를 들어, 단일 벡터 상에, 또는 별개의 폴리뉴클레오타이드 구성체들, 예를 들어, 별개의(상이한) 벡터들 상에 존재할 수 있다. 게다가, 임의의 벡터는 단일 코딩 영역을 함유하거나, 또는 둘 이상의 코딩 영역을 포함할 수 있는데, 예를 들어, 단일 벡터가 별도로 번역글로불린 중쇄 가변 영역 및 번역글로불린 경쇄 가변 영역을 인코딩할 수 있다. 또한, 벡터, 폴리뉴클레오타이드, 또는 핵산에는 또 다른 코딩 영역에 융합되었거나 또는 비융합된 이종성 코딩 영역이 포함될 수 있다. 이종성 코딩 영역에는 비제한적으로, 특화된 요소 또는 모티프, 예컨대 분비성 신호 펩타이드 또는 이종성 기능

적 도메인을 인코딩하는 것들이 포함된다.

- [0046] 특정 구현예에서, 상기 폴리뉴클레오타이드 또는 핵산은 DNA이다. DNA의 경우, 폴리펩타이드를 인코딩하는 핵산을 포함하는 폴리뉴클레오타이드에는 정상적으로 하나 이상의 코딩 영역과 작동 가능하게 회합된 프로모터 및/또는 다른 전사 또는 번역 조절 요소가 포함될 수 있다. 작동 가능한 회합은 유전자 산물, 예를 들어, 폴리펩타이드에 대한 코딩 영역이 하나 이상의 조절 서열과 회합되어 상기 유전자 산물의 발현이 상기 조절 서열(들)의 영향 또는 조절 하에 놓일 때 이루어진다. 2개의 DNA 단편(예컨대 폴리펩타이드 코딩 영역 및 그것과 회합된 프로모터)은 프로모터 기능의 유도가 상기 원하는 유전자 산물을 인코딩하는 mRNA의 전사를 초래하는 경우, 및 상기 2개의 DNA 단편 사그것의 연결의 속성이 발현 조절 서열이 유전자 산물의 발현을 지시하는 능력을 방해하지 않을 경우, 또는 DNA 템플레이트가 전사되는 능력을 방해하지 않는 경우, "작동 가능하게 회합된" 것이다. 따라서, 프로모터 영역은 상기 프로모터가 핵산의 전사를 초래할 수 있는 경우, 폴리펩타이드를 인코딩하는 상기 핵산과 작동가능하게 회합될 것이다. 상기 프로모터는 사전결정된 세포에서 DNA의 실질적인 전사를 지시하는 세포-특이적 프로모터일 수 있다. 프로모터 이외의 다른 전사 조절 요소, 예를 들어 향상제, 오퍼레이터, 억제인자, 및 전사 종료 신호가 상기 폴리뉴클레오타이드와 작동 가능하게 회합되어 세포-특이적 전사를 지시할 수 있다.
- [0047] 다양한 전사 조절 영역이 당해 분야의 숙련가에게 알려져 있다. 이들에는, 비제한적으로, 척추동물 세포에서 기능하는 전사 조절 영역, 예컨대, 비제한적으로, 사이토메갈로바이러스(인트론-A와 공조하는 즉각적인 초기 프로모터), 유인원 바이러스 40(초기 프로모터), 및 레트로바이러스(예컨대 루 욕종 바이러스)에서 유래된 프로모터 및 향상제 분절이 포함된다. 다른 전사 조절 영역에는 척추동물 유전자에서 유래된 것들, 예컨대 진행 세포에서 유전자 발현을 조절할 수 있는 다른 서열 뿐만 아니라, 액틴, 열충격 단백질, 소과 성장 호르몬 및 토끼 B-글로빈이 포함된다. 추가의 적합한 전사 조절 영역에는 림포카인-유도성 프로모터(예를 들어, 인터페론 또는 인터류킨에 의해 유도 가능한 프로모터)뿐만 아니라 조직-특이적 프로모터 및 향상제가 포함된다.
- [0048] 유사하게, 다양한 번역 조절 요소들이 당해 분야의 숙련가에게 알려져 있다. 이들에는, 비제한적으로 리보솜 결합 부위, 번역 개시 및 종료 코돈, 및 피코나(picorna)바이러스(특히 내부 리보솜 유입 부위, 또는 IRES, 또한 일명 CITE 서열)에서 유래된 요소가 포함된다. 다른 구현예에서, 폴리뉴클레오타이드는 예를 들어, 메신저 RNA(mRNA), 전달 RNA, 또는 리보솜 RNA의 형태의 RNA일 수 있다.
- [0049] 폴리뉴클레오타이드 및 핵산 코딩 영역은 분비성 또는 신호 펩타이드를 인코딩하는 추가의 코딩 영역과 회합될 수 있고, 이것은 본 명세서에서 개시된 폴리뉴클레오타이드에 의해 인코딩된 폴리펩타이드의 분비를 지시한다. 신호 가설에 따르면, 포유동물 세포에 의해 분비된 단백질은 울통불통한 내형질 망에 걸쳐 성장 중인 단백질 사슬의 보내기(export)가 일단 개시되면, 상기 성숙한 단백질에서 절단된 신호 펩타이드 또는 분비성 선도 서열을 갖는다. 당해 분야의 숙련가는 척추동물 세포에 의해 분비된 폴리펩타이드가 완전한 또는 "전장" 폴리펩타이드에서 절단된 폴리펩타이드의 N-말단에 융합되어 분비된 또는 "성숙한" 형태의 폴리펩타이드를 생산하는 신호 펩타이드를 갖는다는 것을 인지한다. 특정 구현예에서, 천연 신호 펩타이드, 예를 들어, 면역글로불린 중쇄 또는 경쇄 신호 펩타이드가 사용되거나, 또는 그것과 작동 가능하게 회합된 폴리펩타이드의 분비를 지시하는 능력을 보유한 서열의 기능적 유도체. 대안적으로, 이종성 포유동물 신호 펩타이드, 또는 이것의 기능적 유도체가 사용될 수 있다. 예를 들어, 상기 야생형 선도 서열은 인간 조직 플라스미노겐 활성화제(TPA) 또는 마우스 β -글루쿠로니다제의 선도 서열로 치환될 수 있다.
- [0050] 특정 결합 분자, 또는 항원-결합 단편, 변이체, 또는 그것의 유도체가 본원에 개시된다. 구체적으로 전체-크기의 항체를 지칭하지 않는 한, 용어 "결합 분자"는 전체-크기의 항체 뿐만 아니라 그와 같은 항체의 항원-결합 서브유닛, 단편, 변이체, 유사체, 또는 유도체, 예를 들어, 항체 분자와 유사한 방식으로 항원과 결합하지만, 상이한 스캐폴드를 사용하는 조작된 항체 분자 또는 단편을 아우른다.
- [0051] 본 명세서에서 사용된 용어 "결합 분자"는 그것의 가장 넓은 의미로 수용체, 예를 들어, 에피토프 또는 항원 결정기에 특이적으로 결합하는 분자를 지칭한다. 본원에 추가로 기재된 바에 따르면, 결합 분자는 본원에 기재된 더 많은 "항원 결합 도메인들" 중 하나를 포함할 수 있다. 결합 분자의 비-제한적인 예는 항원-특이적 결합을 보유한 항체 또는 그것의 단편이다.
- [0052] 본 명세서에서 사용된 용어들 "결합 도메인" 또는 "항원 결합 도메인"은 특이적으로 에피토프에 결합하기 위한 필요충분 조건인 결합 분자의 영역을 지칭한다. 예를 들어, "Fv," 예를 들어, 2개의 별개의 폴리펩타이드 서브유닛으로서, 또는 단일 사슬로서 항체의 가변 중쇄 및 가변 경쇄가 "결합 도메인"이 되는 것으로 간주된다. 다른 결합 도메인에는, 비제한적으로, 낙타과 종에서 유래된 항체의 가변 중쇄(VHH), 또는 파이버로백틴 스캐폴드에서 발현된 6개의 면역글로불린 상보성 결정 영역(CDRs)이 포함된다. 본 명세서에서 기재된 "결합 분자

”는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 이상의 “항원 결합 도메인”을 포함할 수 있다

[0053] 용어들 "항체" 및 "면역글로불린"은 본원에서 상호교환되어 사용될 수 있다. 항체(또는 본 명세서에서 개시된 그것의 단편, 변이체, 또는 유도체)에는 적어도 중쇄의 가변 영역(낙타과 종의 경우) 또는 적어도 중쇄 및 경쇄의 가변 영역이 포함된다. 척추동물계에서 기본적인 면역글로불린 구조는 상대적으로 잘 알려져 있다. 참고, 예를 들어, Harlow 등, *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988). 달리 언급되지 않는 한, 용어 “항체”는 항체의 작은 항원-결합 단편에서 전체 크기의 항체, 예를 들어, 완전한 중쇄 2개와 완전한 경쇄 2개를 포함하는 IgG 항체, 완전한 중쇄 4개와 완전한 경쇄 4개를 포함하고 선택적으로 J 사슬 및/또는 분비성 성분을 포함하는 IgA 항체, 또는 완전한 중쇄 10 또는 12개와 완전한 경쇄 10 또는 12개를 포함하고 선택적으로 J 사슬을 포함하는 IgM 항체에 이르는 범위의 모든 것을 아우른다.

[0054] 아래에 더 상세히 논의되는 바와 같이, 용어 “면역글로불린”은 생화학적으로 구별될 수 있는 광범위한 폴리펩타이드들을 포함한다. 당해 분야의 숙련가는 중쇄가 감마, 뮤, 알파, 델타, 또는 엡실론(γ , μ , α , δ , ϵ)으로 분류되고 그들 중에서 일부 하위부류(예를 들어, $\gamma 1 \sim \gamma 4$ 또는 $\alpha 1 \sim \alpha 2$)로 분류됨을 인정할 것이다. 상기 항체의 "부류"를 각각 IgG, IgM, IgA, IgE 또는 IgD로 결정하는 것이 바로 이와 같은 사슬의 속성이다. 면역글로불린 하위부류(아이소타입), 예를 들어, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁, IgA₂ 등은 특성이 잘 규명되어 있고, 기능적 전문성을 제공하는 것으로 알려져 있다. 이들 부류 및 아이소타입 각각의 변형된 버전은 본 개시내용의 관점에서 상기 숙련가에게 쉽게 구별될 수 있고, 따라서 본 개시내용의 범위에 속한다.

[0055] 경쇄는 카파 또는 람다(κ , λ) 중 하나로 분류된다. 각각의 중쇄 부류는 카파 또는 람다 경쇄 중 하나와 결합될 수 있다. 일반적으로, 경쇄와 중쇄는 서로 공유결합되고, 2개의 중쇄의 “꼬리” 부분은, 상기 면역글로불린이 하이브리도마, B 세포 또는 유전자적으로 조작된 숙주세포 중 하나에 의해 생성될 때, 공유 디설파이드 연결기 또는 비-공유 연결기에 의해 서로 결합된다. 상기 중쇄에서, 상기 아미노산 서열은 Y 배치형태의 갈라진(forked) 단부에 있는 N-말단에서 각각의 사슬의 최하부에 있는 C-말단으로 이어진다. 특정 항체, 예를 들어, IgG 항체의 기본 구조는 디설파이드 결합을 통해 공유결합되어 “Y” 구조(본 명세서에서 일명 “H2L2” 구조)를 형성하는 중쇄 서브유닛 2개와 경쇄 서브유닛 2개를 포함한다.

[0056] 경쇄 및 중쇄는 둘 다 구조 및 기능적 상동성의 영역들로 분할된다. 용어들 "불변" 및 "가변"은 기능적으로 사용된다. 이와 관련하여, 가변 경쇄(VL) 및 가변 중쇄(VH) 부분들의 가변 영역이 항원 인식 및 특이성을 결정한다는 점이 인정될 것이다. 반대로, 경쇄(CL) 및 중쇄(CH1, CH2 또는 CH3)의 불변 영역은 생물학적 특성, 예컨대 분비, 경태반 이동도, Fc 수용체 결합, 보체 결합 및 기타 동종의 것을 제공한다. 관례상 상기 불변 영역의 넘버링은 상기 항체의 항원 결합 부위 또는 아미노-말단에서 멀어질수록 크기가 커진다. N-말단부는 가변 영역이고 C-말단부에는 불변 영역이 있으며; CH3(또는 IgM의 경우 CH4) 및 CL 도메인은 실제로 각각 중쇄 및 경쇄의 카복시-말단을 포함한다.

[0057] 상기에서 나타낸 바와 같이, 가변 영역(즉, “결합 도메인”)은 결합 분자가 항원 상의 에피토프를 선택적으로 인식하고 그것에 특이적으로 결합하도록 허용한다. 즉, 결합 분자, 예를 들어, 항체의 VL 영역 및 VH 영역, 또는 상보성 결정 영역(CDRs)의 하위 세트는 조합되어 3차원 항원 결합 부위를 정의하는 가변 영역을 형성한다. 더 구체적으로, 상기 항원 결합 부위는 각각의 VH 및 VL 사슬 상의 세 개 CDRs에 의해 정의된다. 특정 항체는 더 큰 구조를 형성한다. 예를 들어, IgA는 두 개 H2L2 단위, J 사슬 및 분비성 성분(모두 디설파이드 결합을 통해 공유결합됨)을 포함하는 분자를 형성할 수 있고, IgM은 다섯 또는 여섯 개 H2L2 단위 및 선택적으로 J 사슬(디설파이드 결합을 통해 공유결합됨)을 포함하는 오량체 또는 헥사머 분자를 형성할 수 있다.

[0058] 항체 항원-결합 도메인에 존재하는 여섯 개 “상보성 결정 영역”(“CDRs”)은, 상기 항체가 수성 환경에서 그것의 입체적 배치형태를 떠면서, 상기 결합 도메인을 형성하도록 특이적으로 배치된 아미노산의 짧은, 비-인접 서열이다. 상기 결합 도메인 중 아미노산의 나머지는 “프레임워크” 영역이라 칭하는데, 분자간 가변성을 덜 보인다. 상기 프레임워크 영역은 크게 베타-시트 형태를 채택하고 및 상기 CDRs는 연결하는 루프를 형성하고, 일부 경우에, 베타-시트 구조를 형성한다. 따라서, 프레임워크 영역은 사슬간 비-공유 상호작용에 의해 올바른 배향으로 CDRs의 위치를 결정하도록 허용하는 스캐폴드를 형성하는 역할을 한다. 배치된 CDRs에 의해 형성된 결합 도메인은 면역반응 항원 상의 에피토프에 상보적 표면을 정의한다. 이와 같은 상보적 표면은 그것의 동족 에피토프에 상기 항체의 비-공유 결합을 촉진한다. CDRs 및 프레임워크 영역을 구성하는 아미노산은 각각 당해 분야의 숙련가에 의해 임의의 주어진 중쇄 또는 경쇄 가변 영역이 쉽게 확인될 수 있는데, 이들이 다양한 상이한 방식으로 정의된 바 있기 때문이다(참고, "Sequences of Proteins of Immunological Interest," Kabat, E., 등, U.S. Department of Health and Human Services, (1983); 및 Chothia and Lesk, *J. Mol. Biol.*, 796:901-

917 (1987), 그것의 전체가 참고로 본 명세서에 편입됨).

[0059] 당업계에서 사용된 및/또는 허용된 용어의 정의가 둘 이상일 경우, 본 명세서에서 사용된 용어의 정의는 명백하게 달리 언급되지 않는 한, 그와 같은 의미 모두를 포함하는 것이다. 특정 예는 중쇄 및 경쇄 폴리펩타이드의 가변 영역 내에서 발견되는 비인접 항원 결합 부위를 기술하기 위한 용어 “상보성 결정 영역”(“CDR”)의 사용이다. 이들 특정 영역이 예를 들어, Kabat 등, U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequences of Proteins of Immunological Interest" (1983) and by Chothia 등, *J. Mol. Biol.* 796:901-917 (1987)(본 명세서에 참고로 편입됨)에 의해 기재된 바 있다. 상기의 Kabat 및 Chothia 정의에는 서로 비교될 때 아미노산의 중첩 또는 하위세트가 포함된다. 그럼에도 불구하고, 항체 또는 그것의 변이체의 CDR를 지칭하는 정의(또는 당해 분야의 숙련가에 알려진 다른 정의)의 적용은 달리 나타내지 않는 한 본원에 정의된 및 사용된 용어의 범위에 속하는 것으로 의도된다. 각각의 상기 인용된 참조에 의해 정의된 CDRs를 아우르는 적절한 아미노산은 비교로 아래에 표 1에 제시되었다. 특정 CDR를 아우르는 정확한 아미노 산가는 상기 CDR의 서열 및 크기에 따라 달라진다. 당업계의 숙련가들은 일상적으로 항체의 가변 영역 아미노산 서열을 고려하여 어떤 아미노산이 특정 CDR를 포함하는지 결정한다.

표 1. CDR 정의¹

	Kabat	Chothia
VH CDR1	31-35	26-32
VHCDR2	50-65	52-58
VHCDR3	95-102	95-102
VE CDR1	24-34	26-32
VL CDR2	50-56	50-52
VL CDR3	89-97	91-96

[0060]

[0061] ¹표 1에서 모든 CDR 정의의 넘버링은 Kabat 등(아래 참고)에 의해 제시된 넘버링 규약에 따른 것이다.

[0062] 번역글로볼린 가변 영역은 또한 가변 영역 분절, 예컨대 CDRs를 식별하기 위해 **IMGT** 정보 시스템 (www://imgt.cines.fr/)(IMGT®을 사용하여 분석될 수 있다. 참고, 예를 들어, Brochet, X. 등, *Nucl. Acids Res.* 3AW503-508 (2008).

[0063] Kabat 등 은 또한 임의의 항체에 적용가능한 가변 영역 서열에 대한 넘버링 시스템을 정의하였다. 당해 분야의 숙련가는, 서열 자체 이외의 임의의 실험 데이터에 대한 의존 없이, 임의의 가변 영역 서열에 "Kabat 넘버링"의 이와 같은 시스템을 명백하게 지정할 수 있다. 본 명세서에서 사용된 "Kabat 넘버링"은 Kabat 등, U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequence of Proteins of Immunological Interest" (1983)에 의해 제시된 넘버링 시스템을 지칭한다. 그러나, Kabat 넘버링 시스템의 사용이 명백하게 언급되지 않는 한, 연속적인 넘버링이 본 개시내용 중 모든 아미노산 서열을 위해 사용된다.

[0064] 결합 분자, 예를 들어, 항체 또는 그것의 항원-결합 단편, 변이체, 또는 유도체에는 비제한적으로, 다클론성, 단클론성, 인간, 인간화된, 또는 키메라 항체, 단일 사슬 항체, 에피토프-결합 단편, 예를 들어, Fab, Fab' 및 F(ab')₂, Fd, Fvs, 단일-사슬 Fvs(scFv), 단일-사슬 항체, 디설파이드-연결된 Fvs(sdFv), VL 또는 VH 영역 중 하나를 포함하는 단편, Fab 발현 라이브러리에 의해 생산된 단편이 포함된다. ScFv 분자는 당해 기술에 공지되어 있고 예를 들어, 미국 특허 제5,892,019호에 기재되어 있다. 본 개시내용에 의해 포괄된 번역글로볼린 또는 항체 분자는 번역글로볼린 분자의 임의의 유형(예를 들어, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA, 및 IgY), 부류(예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 및 IgA2) 또는 하위부류일 수 있다.

[0065] "특이적으로 결합하는"이란, 일반적으로 결합 분자, 예를 들어, 항체 또는 그것의 단편, 변이체, 또는 유도체가 그것의 항원 결합 도메인을 통해 에피토프에 결합함을 의미하고, 상기 결합이 상기 항원 결합 도메인과 에피토프 사그것의 일부 상보성을 수반함을 의미한다. 이와 같은 정의에 따르면, 결합 분자는 무작위의 관련 없는 에피토프에 결합하는 것보다 더 쉽게, 그것의 항원 결합 도메인을 통해, 특정 에피토프에 결합할 때, 상기 에피토프에 "특이적으로 결합"한다고 이야기된다. 용어 “특이성”은 본원에서 특정 결합 분자가 특정 에피토프에 결합하는 상대 친화도를 제한하기 위해 사용된다. 예를 들어, 결합 분자 "A"는 결합 분자 "B"보다 주어진 에피토프에 대해 더 높은 특이성을 갖는 것으로 간주될 수 있고, 또는 결합 분자 "A"가 관련된 에피토프 "D"에 대해 그것이 갖는 것보다 더 높은 특이성으로 에피토프 "C"에 결합한다고 이야기될 수 있다

- [0066] 결합 분자, 예를 들어, 본원에 개시된 항체 또는 그것의 단편, 변이체, 또는 유도체는 $5 \times 10^{-2} \text{ sec}^{-1}$, 10^{-2} sec^{-1} , $5 \times 10^{-3} \text{ sec}^{-1}$, 10^{-3} sec^{-1} , $5 \times 10^{-4} \text{ sec}^{-1}$, 10^{-4} sec^{-1} , $5 \times 10^{-5} \text{ sec}^{-1}$, 또는 10^{-5} sec^{-1} , $5 \times 10^{-6} \text{ sec}^{-1}$, 10^{-6} sec^{-1} , $5 \times 10^{-7} \text{ sec}^{-1}$, 또는 10^{-7} sec^{-1} 이하의 off 율(k(off))로 표적 항원과 결합한다고 이야기될 수 있다.
- [0067] 결합 분자, 예를 들어, 본원에 개시된 항체 또는 이것의 항원-결합 단편, 변이체, 또는 유도체는 $10^3 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$, $5 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$, $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$, $5 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$, $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$, $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$, $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$, 또는 $5 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$, 또는 $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ 이상의 on 율(k(on))로 표적 항원과 결합한다고 이야기될 수 있다.
- [0068] 결합 분자, 예를 들어, 항체 또는 그것의 단편, 변이체, 또는 유도체는 기준 항체 또는 항원 결합 단편의 에피토프 결합을 어느 정도까지 차단하면서 상기 에피토프에 우선적으로 결합하는 경우, 주어진 에피토프에 기준 항체 또는 항원 결합 단편의 결합을 경쟁적으로 억제한다고 이야기된다. 경쟁적 억제는 당해 분야에 알려진 임의의 방법, 예를 들어, 경쟁 ELISA 검정에 의해 결정될 수 있다. 결합 분자는 주어진 에피토프에 기준 항체 또는 항원 결합 단편의 결합을 적어도 90%, 적어도 80%, 적어도 70%, 적어도 60%, 또는 적어도 50% 경쟁적으로 억제한다고 이야기될 수 있다.
- [0069] 본 명세서에서 사용된 용어 “친화도”는 예를 들어, 면역글로불린 분자의 하나 이상의 결합 도메인과의 결합 강도의 측정치를 지칭한다. 참고, 예를 들어, Harlow 등, Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988) at pages 27-28. 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 “결합능”은 결합 도메인의 모집단과 항원 사그것의 복합체의 전체적인 안정성을 지칭한다. 참고, 예를 들어, Harlow at pages 29-34. 결합능은 모집단 중 개별 결합 도메인의 특이적 에피토프와의 친화도 및 또한 면역글로불린과 항원의 원자가와 관련된 것이다. 예를 들어, 2가 단클론성 항체와, 높은 반복성 에피토프 구조를 갖는 항원, 예컨대 폴리머 사그것의 상호작용은 높은 결합능 중 하나일 것이다. 세포 표면 상에 고정되어 존재하는 수용체와 2가 단클론성 항체 사그것의 상호작용은 또한 높은 결합능일 것이다.
- [0070] 결합 분자, 즉 본 명세서에서 개시된 그것의 항원-결합 단편, 변이체 또는 유도체는 또한 그것의 교차-반응성의 관점에서 기재 또는 명시될 수 있다. 본 명세서에서 사용된 용어 “교차-반응성”은 하나의 항원에 특이적인 결합 분자, 예를 들어, 항체 또는 그것의 단편, 변이체, 또는 유도체가 제2 항원과 반응하는 능력, 즉 2개의 상이한 항원성 물질 사그것의 관련성의 측정치를 지칭한다. 따라서, 결합 분자가 그것의 형성을 유도하는 것이 아닌 다른 에피토프에 결합하는 경우, 교차 반응성이다. 교차-반응성 에피토프는 일반적으로 상기 유도성 에피토프와 동일한 상보적 구조 특징을 더 많이 함유하고, 일부 경우에, 실제로 오리지널보다 더 적합할 수 있다.
- [0071] 결합 분자, 예를 들어, 항체 또는 그것의 단편, 변이체, 또는 유도체는 또한 항원에 대한 그것의 결합 친화도의 관점에서 기재 또는 명시될 수 있다. 예를 들어, 결합 분자는 $5 \times 10^{-2} \text{ M}$, 10^{-2} M , $5 \times 10^{-3} \text{ M}$, 10^{-3} M , $5 \times 10^{-4} \text{ M}$, 10^{-4} M , $5 \times 10^{-5} \text{ M}$, 10^{-5} M , $5 \times 10^{-6} \text{ M}$, 10^{-6} M , $5 \times 10^{-7} \text{ M}$, 10^{-7} M , $5 \times 10^{-8} \text{ M}$, 10^{-8} M , $5 \times 10^{-9} \text{ M}$, 10^{-9} M , $5 \times 10^{-10} \text{ M}$, 10^{-10} M , $5 \times 10^{-11} \text{ M}$, 10^{-11} M , $5 \times 10^{-12} \text{ M}$, 10^{-12} M , $5 \times 10^{-13} \text{ M}$, 10^{-13} M , $5 \times 10^{-14} \text{ M}$, 10^{-14} M , $5 \times 10^{-15} \text{ M}$, 또는 10^{-15} M 이하의 해리 상수 또는 K_D 로 항원에 결합할 수 있다.
- [0072] 단일-사슬 항체 또는 다른 결합 도메인을 비롯한 항체 단편은 단독으로 또는 하기 중 하나 이상과 조합하여 존재할 수 있다: 힌지 영역, CH1, CH2, CH3, 또는 CH4 도메인, J 사슬, 또는 분비성 성분. 또한 힌지 영역, CH1, CH2, CH3, 또는 CH4 도메인, J 사슬, 또는 분비성 성분 중 하나 이상과 가변 영역(들)의 임의의 조합을 포함할 수 있는 항원-결합 단편이 포함된다. 결합 분자, 예를 들어, 항체, 또는 그것의 항원-결합 단편은 새 및 포유동물을 비롯한 임의의 동물 기원에서 유래될 수 있다. 상기 항체는 인간, 쥐과, 당나귀, 토끼, 염소, 기니아피그, 낙타, 야마, 말, 또는 닭 항체일 수 있다. 또 다른 구현예에서, 상기 가변 영역은 애초에 콘드릭토이드일 수 있다(예를 들어, 상어에서 유래). 본원에 사용된 “인간” 항체에는 인간 면역글로불린의 아미노산 서열을 갖는 항체가 포함되고, 인간 면역글로불린 라이브러리에서, 또는 하나 이상의 인간 면역글로불린을 위한 동물 형질전환에서 단리된 항체가 포함되고, 일부 경우에는 아래에 기재된 바와 같이, 예를 들어, Kucherlapati 등에 의한 미국 특허 제5,939,598호에 기재된 바와 같이, 내인성 면역글로불린을 발현하고, 일부는 발현하지 않는다.
- [0073] 본 명세서에서 사용된 용어 “중쇄 서브유닛”은 면역글로불린 중쇄에서 유래된 아미노산 서열을 포함하고, 결합 분자, 예를 들어, 항체 중쇄 서브유닛을 포함하는 항체는 하기 중 적어도 하나를 포함한다: VH 영역, CH1 도메인, 힌지(예를 들어, 상부, 중간 및/또는 하부 힌지 영역) 도메인, CH2 도메인, CH3 도메인, CH4 도메인, 또

는 변이체 또는 그것의 단편. 예를 들어, 결합 분자, 예를 들어, 항체 또는 그것의 단편, 변이체 또는 유도체는, VH 영역과 더불어, CH1 도메인; CH1 도메인, 힌지, 및 CH2 도메인; CH1 도메인 및 CH3 도메인; CH1 도메인, 힌지, 및 CH3 도메인; 또는 CH1 도메인, 힌지 도메인, CH2 도메인, 및 CH3 도메인을 포함할 수 있다. 특정 양태에서 결합 분자, 예를 들어, 항체 또는 그것의 단편, 변이체 또는 유도체는, VH 영역과 더불어, CH3 도메인 및 CH4 도메인; 또는 CH3 도메인, CH4 도메인, 및 J 사슬을 포함할 수 있다. 또한, 본 개시내용에 사용하기 위한 결합 분자는 특정 불변 영역 부분, 예를 들어, CH2 도메인의 모두 또는 일부가 부족할 수 있다. 당해 분야의 숙련가에 의해 이들 도메인(예를 들어, 중쇄 서브유닛)이 최초 면역글로불린 분자에서 유래된 아미노산 서열에서 다양하도록 변형될 수 있음이 이해될 것이다.

[0074] 결합 분자, 예를 들어, 항체 또는 그것의 단편의 중쇄 서브유닛은 상이한 면역글로불린 분자에서 유래된 도메인들을 포함할 수 있다. 예를 들어, 폴리펩타이드의 중쇄 서브유닛은 IgG1 분자에서 유래된 CH1 도메인과 IgG3 분자에서 유래된 힌지 영역을 포함할 수 있다. 또 다른 예에서, 중쇄 서브유닛은 부분적으로, IgG1 분자에서 유래되고, 부분적으로 IgG3 분자에서 유래된 힌지 영역을 포함할 수 있다. 또 다른 예에서, 중쇄 서브유닛은 부분적으로 IgG1 분자에서 유래되고, 부분적으로 IgG4 분자에서 유래된 키메라 힌지를 포함할 수 있다.

[0075] 본 명세서에서 사용된 용어 “경쇄 서브유닛”은 면역글로불린 경쇄에서 유래된 아미노산 서열을 포함한다. 상기 경쇄 서브유닛은 VL 또는 CL(예를 들어, C_K 또는 C_L)도메인 중 적어도 하나를 포함할 수 있다.

[0076] 결합 분자, 예를 들어, 항체 또는 그것의 항원-결합 단편, 변이체, 또는 유도체는 그들이 인식하거나 또는 특이적으로 결합하는 항원의 에피토프(들) 또는 부분(들)의 관점에서 기재 또는 명시될 수 있다. 구체적으로 항체의 항원 결합 도메인과 상호작용하는 표적 항원의 부분이 "에피토프" 또는 "항원 결정기"이다. 표적 항원은 단일 에피토프 또는 적어도 2개의 에피토프를 포함할 수 있고, 항원의 크기, 형태, 및 유형에 따라 임의의 수의 에피토프를 포함할 수 있다.

[0077] 앞서 나타낸 바와 같이, 다양한 면역글로불린 부류의 불변 영역의 서브유닛 구조 및 3차원 배치형태는 잘 알려져 있다. 본 명세서에서 사용된 용어 “VH 영역”은 면역글로불린 중쇄의 아미노 말단 가변 영역을 포함하고, 용어 “CH1 도메인”은 면역글로불린 중쇄의 제1(대부분의 아미노 말단) 불변 영역 도메인을 포함한다. 상기 CH1 도메인은 VH 영역에 인접하고, 전형적인 면역글로불린 중쇄 분자의 힌지 영역에 대한 아미노 말단이다.

[0078] 본 명세서에서 사용된 용어 “CH2 도메인”은 종래의 넘버링 체계(아미노산 244 내지 360, 카밋 넘버링 시스템; 및 아미노산 231-340), EU 넘버링 시스템을 사용하여 예를 들어, IgG 항체의 약 아미노산 244에서 아미노산 360 까지 연장된 중쇄 분자의 일부분을 포함한다; 참조: Kabat EA 등 *op. cit.* CH3 도메인은 CH2 도메인에서 IgG 분자의 C-말단에 이르고, 대략 108개 아미노산을 포함한다. 특정 면역글로불린 부류, 예를 들어, IgM은 추가로 CH4 영역을 포함한다.

[0079] 본 명세서에서 사용된 용어 “힌지 영역”은 CH1 도메인을 CH2 도메인에 결합시키는 중쇄 분자의 일부분을 포함한다. 이와 같은 힌지 영역은 대략 25개 아미노산을 포함하고, 가요성이기 때문에, 상기 두 개의 N-말단 항원 결합 영역이 독립적으로 움직일 수 있도록 허용한다.

[0080] 본 명세서에서 사용된 용어 “디설파이드 결합”은 2개의 황 원자 사이에 형성된 공유결합을 포함한다. 상기 아미노산 시스테인은 제2 티올 작용기와 디설파이드 결합 또는 브릿지를 형성할 수 있는 티올 작용기를 포함한다. 특정 IgG 분자에서, CHI 및 CL 영역은 디설파이드 결합에 의해 연결되고, 상기 두 개의 중쇄는 카밋 넘버링 시스템(위치 226 또는 229, EU 넘버링 시스템)을 사용하는 239 및 242에 상응하는 위치에 있는 두 개의 디설파이드 결합에 의해 연결된다.

[0081] 본 명세서에서 사용된 용어 “키메라 항체”는 면역반응 영역 또는 부위가 제1 종에서 획득 또는 유래되고, 불변 영역(온전한, 부분적인 또는 변형될 수 있음)이 제2 종에서 획득되는 것인 항체를 지칭한다. 일부 구현예에서, 상기 표적 결합 영역 또는 부위는 비-인간 원천(예를 들어 마우스 또는 영장류)에서 유래되고, 상기 불변 영역은 인간 유래될 수 있다.

[0082] 용어들 “다중특이적 항체”, 또는 “이중특이적 항체”는 단일 항체 분자 내에서 둘 이상의 상이한 에피토프에 대한 결합 도메인을 갖는 항체를 지칭한다. 정식 항체 구조와 더불어 다른 결합 분자가 2개의 결합 특이성을 갖도록 구성될 수 있다. 이중특이적 또는 다중특이적 항체에 의한 에피토프 결합은 동시 또는 순차적일 수 있다. 트리오마 및 하이브리드 하이브리도마는 이중특이적 항체를 분비할 수 있는 세포주의 두 가지 예들이다. 이중특이적 항체는 또한 재조합 방법에 의해 구성될 수 있다 (Strohlein and Heiss, *Future Oncol.* 6:1387-94 (2010); Mabry and Snaveley, *IDrugs.* 13:543-9 (2010)). 이중특이적 항체는 또한 디아바디일 수 있다.

- [0083] 본 명세서에서 사용된 용어 “조작된 항체”는 중쇄 및 경쇄 중 하나에서 또는 둘 모두에서 가변 영역이 CDR 또는 프레임워크 영역 중 하나에서의 하나 이상의 아미노산의 적어도 부분적인 치환에 의해 변경된 것인 항체를 지칭한다. 특정 양태에서, 알려진 특이성을 갖는 항체에서 유래된 전체 CDRs는 이중성 항체의 프레임워크 영역에 이식될 수 있다. 비록 상호(alternate) CDRs가 프레임워크 영역이 유래된 항체와 동일한 부류 또는 심지어 동일한 하위부류의 항체에서 유래될 수 있으나, CDRs는 또한 상이한 부류의 항체, 예를 들어, 상이한 종에서 유래된 항체에서 유래될 수 있다. 알려진 특이성을 갖는 비-인간 항체에서 유래된 하나 이상의 “공여체” CDRs가 인간 중쇄 또는 경쇄 프레임워크 영역에 이식된 것인 조작된 항체는 본 명세서에서 “인간화된 항체”로 불린다. 특정 양태에서, 모든 CDRs가 공여체 가변 영역에서 유래된 완전한 CDRs로 대체되지 않으나, 상기 공여체의 항원 결합능이 여전히 수령체 가변 영역으로 이전될 수 있다. 예를 들어, 미국 특허 제5,585,089호, 제5,693,761호, 제5,693,762호 및 제6,180,370호에 제시된 설명을 고려할 때, 기능적으로 조작된 또는 인간화된 항체를 획득하는 것은 일상적인 실험과정을 수행하거나 또는 시행착오 테스트 중 어느 하나에 의해 당해 분야의 숙련가가 할 수 있는 일(능숙도)에 속한다.
- [0084] 본 명세서에서 사용된 용어 “조작된”은 합성 수단(예를 들어 재조합 기술, 시험관내 펩타이드 합성, 펩타이드의 효소적 또는 화학적 커플링, 또는 이들 기술의 일부 조합)에 의한 핵산 또는 폴리펩타이드 분자의 조작을 포함한다.
- [0085] 본 명세서에서 사용된 용어들 “연결된,” “융합된” 또는 “융합” 또는 다른 문법적 등가물은 상호교환적으로 사용될 수 있다. 이들 용어들은 화학적 콘주게이션 또는 재조합 수단을 비롯한 모든 수단에 의한, 둘 이상의 요소 또는 성분의 결합을 지칭한다. “인프레임 융합”은 최초 열린 해독틀(ORFs)의 번역 해독틀을 유지시키는 방식으로, 연속적으로 더 긴 ORF를 형성하기 위해 둘 이상의 폴리뉴클레오타이드 열린 해독틀(ORFs)을 결합하는 것을 지칭한다. 따라서, 재조합 융합 단백질은 최초 ORFs(이것의 분절은 자연에서 정상적으로 그렇게 연결되지 않음)에 의해 인코딩된 폴리펩타이드에 상응하는 둘 이상의 분절을 함유하는 단일 단백질이다. 따라서 비록 상기 해독틀이 상기 융합된 분절 전체에서 연속적이라도 제조된다고 해도, 상기 분절은 예를 들어, 인프레임 링커 서열에 의해 물리적으로 또는 공간적으로 분리될 수 있다. 예를 들어, 번역글로불린 가변 영역의 CDRs를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드가 인프레임으로 융합될 수 있으나, 상기 “융합된” CDRs가 연속적 폴리펩타이드의 일부로 공동-번역되는 한, 적어도 하나의 번역글로불린 프레임워크 영역 또는 추가의 CDR 영역을 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드에 의해 분리될 수 있다.
- [0086] 폴리펩타이드의 맥락에서, “선형적 순서” 또는 “서열”은 상기 서열에서 서로 이웃한 아미노산들이 상기 폴리펩타이드의 일차 구조에서 인접하도록 아미노-카복실 말단 방향으로의 폴리펩타이드 중 아미노산의 순서이다. 폴리펩타이드의 또 다른 부분에 대한 “아미노-말단” 또는 “N-말단”인 폴리펩타이드의 부분은 순차적인 폴리펩타이드 사슬에서 더 일찍 오는 부분이다. 이와 유사하게, 폴리펩타이드의 또 다른 부분에 대한 “카복시-말단” 또는 “C-말단”인 폴리펩타이드의 부분은 상기 순차적인 폴리펩타이드 사슬에서 나중에 오는 부분이다. 예를 들어, 전형적인 항체에서, 가변 영역은 불변 영역에 대해 “N-말단”이고, 상기 불변 영역은 가변 영역에 대해 “C-말단”이다.
- [0087] 본 명세서에서 사용된 용어 “발현”은 유전자가 생화학 물질, 예를 들어, 폴리펩타이드를 생산하는 공정을 지칭한다. 상기 공정에는 일시적 발현 및 안정한 발현 뿐만 아니라, 비제한적으로, 유전자 녹다운을 포함하는 세포 내에 상기 유전자의 기능적 존재의 현시(manifestation)가 포함된다. 여기에는 비제한적으로 메신저 RNA(mRNA)로의 상기 유전자의 전사 및 그와 같은 mRNA의 폴리펩타이드(들)로의 번역이 포함된다. 최종 원하는 생성물이 생화학 물질인 경우, 발현에는 상기 생화학 물질 및 임의의 전구체의 생성이 포함된다. 유전자의 발현은 “유전자 산물”을 생산한다. 본 명세서에서 사용된 유전자 산물은 핵산, 예를 들어, 유전자의 전사에 의해 생산된 메신저 RNA, 또는 전사체에서 번역된 폴리펩타이드 중 하나일 수 있다. 본원에 기재된 유전자 산물은 추가로, 전사-후 변형, 예를 들어, 폴리아데닐화를 갖는 핵산, 또는 번역후 변형, 예를 들어, 메틸화, 당화, 지질 첨가, 다른 단백질 서브유닛과의 회합, 단백질분해 절단, 및 기타 동종의 것을 갖는 폴리펩타이드를 포함한다.
- [0088] 본 명세서에서 사용된 용어 “항-SEMA4D 결합 분자”는 SEMA4D에 특이적으로 결합하는 분자, 예를 들어, 항체 또는 그것의 항원-결합 단편, 변이체, 또는 유도체를 지칭한다. 구체적으로 전체-크기의 항체, 예컨대 자연 발생 항체를 언급하지 않는 한, 용어 “항-SEMA4D 항체”는 항원-결합 단편 뿐만 아니라 전체-크기의 항체, 이와 같은 항체(예를 들어, 자연 발생 항체 또는 번역글로불린 분자 또는 조작된 항체 분자)의 변이체, 유사체 또는 유도체, 또는 항체 분자와 유사한 방식으로 항원과 결합하는 단편을 모두 아우른다.
- [0089] 용어들 예컨대 “치료하는” 또는 “치료” 또는 “치료하기” 또는 “경감하는” 또는 “경감시키기”는 현존하는 진

단된 병리적 병태 또는 장애의 증상을 고치고, 늦추고 줄이고, 및/또는 상기 병태 또는 장애의 진행을 멈추거나 또는 늦추는 치료법을 지칭한다. 용어들 예컨대 “예방하다,” “예방”, “피하다”, “억제(deterrence)” 및 기타 동종의 것은 미진단된 표적화된 병리적 병태 또는 장애의 발달을 방지하는 예방적 또는 방지적 방법들을 지칭한다. 따라서, “치료가 요구되는 개체들”이란 이미 장애를 가진 개체들; 장애를 가질 경향이 있는 개체들; 및 장애가 예방되어야 하는 개체들을 포함할 수 있다. 본 명세서에서 사용된 어구 예컨대 “요법으로 혜택을 볼 대상체” 및 “치료가 요구되는 동물”은 본 명세서에 기재된 요법의 투여로 혜택을 볼 대상체, 예컨대 포유동물 대상체를 포함한다.

[0090] 용어 “치료 유효량”은 대상체 또는 포유동물에서 질환 또는 장애를 “치료”하기에 효과적인 항체, 폴리펩타이드, 폴리뉴클레오타이드, 작은 유기 분자, 또는 다른 약물의 양을 지칭한다.

[0091] “대상체” 또는 “개별” 또는 “동물” 또는 “환자” 또는 “포유동물”이란 진단, 예후, 또는 요법이 요구되는 임의의 대상체, 특히 포유동물 대상체를 의미한다. 포유동물 대상체에는 인간, 가축, 농장 동물, 및 동물원의 동물, 스포츠용 동물, 또는 애완 동물, 예컨대 개, 고양이, 기니아 피그, 토끼, 랫트, 마우스, 말, 돼지, 소, 곰 등이 포함된다.

[0092] 표적 폴리펩타이드 설명 - SEMA4D

[0093] 본 명세서에서 사용된 용어들 “세마포린-4D”, “SEMA4D” 및 “SEMA4D 폴리펩타이드”는, “SEMA4D” 및 “Sema4D”와 마찬가지로, 상호교환적으로 사용된다. 특정 구현예에서, SEMA4D는 세포의 표면에서 발현되거나, 또는 세포에 의해 분비된다. 또 다른 구현예에서, SEMA4D는 막 결합된다. 또 다른 구현예에서, SEMA4D는 예를 들어, sSEMA4D는 가용성이다. 또 다른 구현예에서, SEMA4D는 전체-크기의 SEMA4D 또는 그것의 단편, 또는 SEMA4D 변이체 폴리펩타이드를 포함할 수 있되, 여기서 SEMA4D 또는 SEMA4D 변이체 폴리펩타이드의 단편은 전체-크기의 SEMA4D의 일부 또는 모든 기능적 특성을 보유한다.

[0094] 전체-크기의 인간 SEMA4D 단백질은 150 kDa의 폴리펩타이드 사슬 두 개로 이루어진 동종이량체성 막관통 단백질이다. SEMA4D는 세포 표면 수용체의 세마포린 계열에 속하고, 또한 일명 CD 100이라 불린다. 인간 및 마우스 SEMA4D/Sema4D는 둘 다 그것의 막관통 형태에서 단백질분해에 의해 절단되어 120-kDa 가용성 형태를 생성할 수 있고, 이것은 2개의 Sema4D 동형체를 생산한다(Kumanogoh 등, *J. Cell Science* 116:3464 (2003)). 세마포린은 뉴런과 그것의 적절한 표적 사이에 정확한 연결을 성립시키는 데 중요한 역할을 하는 축삭돌기-안내 인자로 애초에 정의되었던 가용성 및 막-결합 단백질들로 이루어진다. 구조적으로 고려할 때, 부류 IV 세마포린, SEMA4D는 아미노-말단 신호 서열과 이어서 특징적인 'Serna' 도메인으로 이루어지고, 이것은 17개 보존된 시스테인 잔기, Ig-유사 도메인, 라이신-풍부 스트레치(stretch), 소수성 막관통 영역, 및 세포질 꼬리를 함유한다.

[0095] 상기 SEMA4D 폴리펩타이드는 약 13개 아미노산의 신호 서열을 포함하고, 이어서 약 512개 아미노산의 세마포린 도메인, 약 65개 아미노산의 면역글로불린-유사(Ig-like) 도메인, 104개 아미노산의 라이신-풍부 스트레치, 약 19개 아미노산의 소수성 막관통 영역 및 110개 아미노산의 세포질 꼬리를 포함한다. 세포질 꼬리에서 티로신 인산화에 위한 공통 부위는 SEMA4D와 티로신 키나제와의 예상된 회합을 지원한다(Schlossman 등, Eds. (1995) *Leucocyte Typing V* (Oxford University Press, Oxford).

[0096] SEMA4D는 적어도 세 개의 기능적 수용체, 플렉신-B1, 플렉신-B2 및 CD72를 갖는 것으로 알려져 있다. 비-림프양 조직에서 발현되는 플렉신-B1은 SEMA4D에 대한 고친화도(1 nM) 수용체임이 밝혀진 바 있다(Tamagnone 등, *Cell* 99:71-80 (1999)). 플렉신-B1 신호전달의 SEMA4D 자극은 뉴런의 성장 추체 붕괴를 유도하고, 공정 연장 붕괴(collapse) 및 회소돌기교세포의 세포자멸사를 유도하는 것으로 밝혀진 바 있다(Giraudon 등, *J. Immunol.* 172:1246-1255 (2004); Giraudon 등, *NeuroMolecular Med.* 7:207-216 (2005)). SEMA4D에 결합한 후, 플렉신-B1 신호전달은 RhoA의 활성화를 매개함으로써 세포골격의 재구성에 의한 세포 붕괴를 초래할 뿐만 아니라, R-Ras의 불활성화를 매개함으로써 세포의 기질에 대한 인테그린 매개 부착의 감소를 초래한다(Kruger 등, *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 6:789-800 (2005); Pasterkamp, *TRENDS in Cell Biology* 75:61-64 (2005)). 플렉신-B2는 SEMA4D에 대한 중간 친화도를 갖는데, 최근 보고서는 플렉신-B2가 각질형성세포 상에서 발현되어 SEMA4D-양성 $\gamma \delta$ T세포를 활성화하여 상피성 회복에 기여함을 시사한다(Witherden 등, *Immunity* 57:314-25 (2012)).

[0097] 림프양 조직에서, CD72가 저친화도(300 nM) SEMA4D 수용체로서 이용된다(Kumanogoh 등, *Immunity* 73:621-631 (2000)). B 세포 및 항원 제시 세포(APC)가 CD72를 발현하고, 항-CD72 항체는 sSEMA4D와 동일한 효과, 예컨대 CD40-유도된 B 세포 반응의 향상 및 CD23의 B 세포 웨딩 같은 많은 효과를 보인다. CD72는 많은 억제성 수용체와 회합할 수 있는 B 세포 반응의 음성 조절인자(티로신 포스파타제 SHP-1의 모집에 의해) 역할을 하는 것으로

여겨진다. SEMA4D와 CD72의 상호작용은 SHP-1의 해리를 초래하고, 이어서 이와 같은 음성 활성화 신호의 손실로 이어진다. SEMA4D는 *시험관내* T 세포 자극 및 B 세포 응집 및 생존을 촉진하는 것으로 밝혀진 바 있다. SEMA4D-발현 세포 또는 sSEMA4D의 첨가는 *시험관내* CD40-유도 B 세포 증식 및 면역글로불린 생산을 증진시키고, *생체내* 항체 반응을 가속화시킨다(Ishida 등, *Inter. Immunol.* 15:1027- 1034 (2003); Kumanogoh and H. Kukutani, *Trends in Immunol.* 22:670-676 (2001)). sSEMA4D는 DCs의 CD40 유도 성숙, 예컨대 공동자극 분자의 상향조절 및 IL-12의 분비 증가를 증진시킨다. 또한, sSEMA4D는 면역 세포 이동을 억제할 수 있고, 이것은 차단 항-SEMA4D 마우스 항체의 첨가에 의해 역전될 수 있다 (Elhabazi 등, *J. Immunol.* 166:4341-4347 (2001); Delaire 등, *J. Immunol.* 166:4348-4354 (2001)).

[0098] Sema4D는 림프양 기관, 예컨대 비장, 가슴샘, 및 림프절에서, 그리고 비-림프양 기관, 예컨대 뇌, 심장, 및 신장에서 높은 수준으로 발현된다. 림프양 기관에서, Sema4D는 휴지상태 T 세포에서는 풍부하게 발현되나, 휴지상태 B 세포 및 항원-제시 세포(APCs), 예컨대 수지상 세포(DCs)에서는 단지 약하게 발현된다.

[0099] 세포 활성화는 가용성 SEMA4D(sSEMA4D)의 생성 뿐만 아니라 SEMA4D의 표면 발현을 증가시킨다. SEMA4D의 발현 패턴은 면역계에서 병리적일 뿐만 아니라 생리적으로 중요한 역할을 함을 시사한다. SEMA4D는 B 세포 활성화, 응집 및 생존을 촉진하고; CD40-유도 증식 및 항체 생산을 증진시키고; T 세포 의존적 항원에 대한 항체 반응을 증진시키고; T 세포 증식을 증가시키고; 수지상 세포 성숙 및 T 세포 자극 능력을 증진시키고; 및 탈수조화 및 축삭 변성에 직접적으로 연루된 것으로 밝혀진 바 있다 (Shi 등, *Immunity* 13:633-642 (2000); Kumanogoh 등, *J. Immunol.* 169:1175-1181 (2002); 및 Watanabe 등, *J. Immunol.* 167:4321-4328 (2001))

[0100] 인간 항-SEMA4D 항체

[0101] 본 개시내용은 각각 서열번호: 1 및 서열번호: 5의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(VH) 및 경쇄 가변 영역(VL)과 관련된 또는 이와 동일한 VH 및 VL을 갖는 항-SEMA4D 결합 분자, 예를 들어, 항-SEMA4D 결합 분자, 예를 들어, 항체 또는 그것의 항원 결합 단편, 변이체 또는 유도체를 제공한다. 특정 양태에서, 상기 제공된 결합 분자, 예를 들어, 항체 또는 그것의 항원 결합 단편, 변이체, 또는 유도체는 완전 인간 유래이다.

[0102] 특정 양태에서, 상기 항-SEMA4D 결합 분자, 예를 들어, 본원에 제공된 항체 또는 그것의 항원 결합 단편, 변이체, 또는 유도체는 각각 서열번호: 1 및 서열번호: 5의 아미노산 서열을 포함하는 VH 및 VL 영역을 갖는 기준 항-SEMA4D 항체 분자의 VH 및 VL 영역과 적어도 약 80%, 약 85%, 약 88%, 약 89%, 약 90%, 약 91%, 약 92%, 약 93%, 약 94%, 약 95%, 약 96%, 약 97%, 약 98%, 약 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 VH 및 VL 영역을 갖는다.

[0103] 특정 양태에서, 상기 항-SEMA4D 결합 분자, 예를 들어, 항체 또는 그것의 항원 결합 단편, 변이체, 또는 유도체는 그것의 수용체, 예를 들어, 플렉신-B1, 플렉신-B2, 또는 CD72와의 SEMA4D 상호작용을 억제할 수 있다. 특정 양태에서, 상기 항-SEMA4D 결합 분자, 예를 들어, 항체 또는 그것의 항원 결합 단편, 변이체, 또는 유도체는 SEMA4D-매개 플렉신-B1 신호 형질도입을 억제할 수 있다.

[0104] 특정 양태에서, 상기 항-SEMA4D 결합 분자, 예를 들어, 항체 또는 그것의 항원 결합 단편, 변이체, 또는 유도체는 서열번호: 1의 아미노산 서열을 포함하는 가변 중쇄 영역(VH) 및 서열번호: 5의 아미노산 서열을 포함하는 가변성 경쇄 영역(VL)을 포함하는 기준 항체가 SEMA4D에 결합하는 것을 경쟁적으로 억제한다. 특정 양태에서, 상기 항-SEMA4D 결합 분자, 예를 들어, 항체 또는 그것의 항원 결합 단편, 변이체, 또는 유도체는 서열번호: 1의 아미노산 서열을 포함하는 VH 및 서열번호: 5의 아미노산 서열을 포함하는 VL을 포함하는 기준 항체와 동일한 SEMA4D 에피토프에 결합한다. 특정 양태에서, 상기 항-SEMA4D 결합 분자, 예를 들어, 항체 또는 그것의 항원 결합 단편, 변이체, 또는 유도체의 VH는 세 개의 상보성 결정 영역(CDRs) HCDR1, HCDR2, 및 HCDR3을 포함하고, VL은 세 개의 CDRs LCDR1, LCDR2, 및 LCDR3를 포함하되, 상기 CDRs는 CDRs 중 하나 이상에서 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 또는 6개의 단일 보존적 아미노산 치환을 제외하고, 각각 서열번호: 2, 서열번호: 3, 서열번호: 4, 서열번호: 6, 서열번호: 7, 및 서열번호: 8의 아미노산 서열을 포함한다. 특정 양태에서, 상기 CDRs는 각각 서열번호: 2, 서열번호: 3, 서열번호: 4, 서열번호: 6, 서열번호: 7, 및 서열번호: 8의 아미노산 서열을 포함한다.

[0105] 특정 양태에서, 항-SEMA4D 결합 분자, 예를 들어, 항체 또는 그것의 항원 결합 단편, 변이체, 또는 유도체의 VH는 서열번호: 1과 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하고, 상기 항-SEMA4D 결합 분자, 예를 들어, 항체 또는 그것의 항원 결합 단편, 변이체, 또는 유도체의 VL은 서열번호: 5와 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 특정 양태에서, 상기 VH는 서열번호: 1의 아미노산 서열을 포함하고, 상기 VL은 서열번호: 5의 아미노산 서열을 포함한다.

- [0106] 또한 예를 들어, 항-SEMA4D 결합 분자, 예를 들어, 본 명세서에서 제공된 바와 같은 항체 또는 그것의 항원 결합 단편, 변이체, 또는 유도체를 생산할 때 사용하기 위해 본 명세서에서 기재된 항-SEMA4D 항체, 또는 그것의 항원-결합 단편, 변이체, 또는 유도체를 인코딩하는 폴리펩타이드, 이와 같은 폴리펩타이드를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드, 이와 같은 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 벡터, 및 그와 같은 벡터 또는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 숙주세포가 본원에 제공된다.
- [0107] 항-SEMA4D 결합 분자, 예를 들어, 항체 또는 그것의 항원 결합 단편, 변이체, 또는 유도체의 적합한 생물학적 활성 변이체가 본 개시내용에 의해 제공되고, 본원에 제공된 방법에 따라, 또는 당해 분야의 숙련자에게 잘 알려진 방법에 따라 제조 및 사용될 수 있다. 그와 같은 변이체는 본원에 제공된 기준 항-SEMA4D 항체의 특정 원하는 결합 특성을 보유한다. 항체 변이체를 제조하는 방법은 일반적으로 당업계에서 이용 가능하다.
- [0108] 돌연변이유발 및 뉴클레오타이드 서열 변경을 위한 방법이 당해 기술에 공지되어 있다. 참고, 예를 들어, Walker and Gaastra, eds. (1983) *Techniques in Molecular Biology* (MacMillan Publishing Company, New York); Kunkel, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:488-492 (1985); Kunkel 등, *Methods Enzymol.* 154:361-38 (1987); Sambrook 등 (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor, N.Y.); 미국 특허 제4,873,192호; 및 본 명세서에서 인용된 참조문헌; 본원에 참고로 편입됨. 관심대상의 폴리펩타이드의 생물학적 활성에 영향을 주지 않는 적절한 아미노산 치환에 대한 안내를 Dayhoff 등 (1978) in *Atlas of Protein Sequence and Structure* (Natl. Biomed. Res. Found., Washington, D.C.), pp. 345- 352(이것은 전체적으로 참고로 편입됨)의 모델에서 찾을 수 있다. Dayhoff 등 의 모델은 위치(Point) 허용된 돌연변이(PAM) 아미노산 유사성 매트릭스(PAM 250 매트릭스)를 사용하여 적합한 보존적 아미노산 치환을 결정한다. 특정 양태에서, 보존적 치환, 예컨대 하나의 아미노산을 유사한 특성을 갖는 또 다른 것과 교환하는 것이 사용된다. Dayhoff 등 모델의 PAM 250 매트릭스에 의해 교시된 보존적 아미노산 치환의 예에는, 비제한적으로, Gly<->Ala, Val<->Ile<->Leu, Asp<->Glu, Lys<->Arg, Asn<->Gln, 및 Phe<->Trp<->Tyr이 포함된다.
- [0109] 항-SEMA4D 결합 분자, 예를 들어, 항체 또는 그것의 항원-결합 단편, 관심 대상의 폴리펩타이드의 변이체를 구성할 때, 변이체가 원하는 특성, 예를 들어, 본 명세서에서 기재된 바와 같이, SEMA4D, 예를 들어, 인간 SEMA4D, 비-인간 영장류 SEMA4D(예를 들어, 사이노몰구스 원숭이, 마모셋, 및/또는 붉은털원숭이 SEMA4D), 및/또는 설치류 SEMA4D(예를 들어, 마우스 및/또는 랫트 SEMA4D)에 특이적으로 결합할 수 있는 능력, 예를 들어, 세포 표면에서 발현되거나 또는 세포에 의해 분비되는 것(여기서 결합 분자, 예를 들어, 항체 또는 그것의 단편, 변이체, 또는 유도체는 SEMA4D 결합을 가짐), 수용체 차단, 또는 중화하는 활성을 지속적으로 소유하도록 변형이 이루어진다. 특정 양태에서, 상기 변이체 폴리펩타이드를 인코딩하는 DNA에서 이루어진 돌연변이는 상기 핵독들을 유지하고 이차 mRNA 구조를 생산할 수 있는 상보적 영역을 형성하지 않는다. 참고 EP 특허 출원 공개 No. 75,444.
- [0110] 항- SEMA4D 결합 분자, 예를 들어, 항체 또는 그것의 항원-결합 단편, 변이체, 또는 유도체의 결합 특이성 및/또는 활성을 측정하는 방법에는 비제한적으로, 표준 결합 검정, 예컨대 경쟁적 결합 검정, T 세포 또는 B 세포에 의한 면역글로불린 분비를 모니터링하기 위한 검정, T 세포 증식 검정, 세포자멸사 검정, ELISA 검정, 및 기타 동종의 것이 포함된다. 참고, 예를 들어, WO 93/14125; Shi 등, *Immunity* 13:633-642 (2000); Kumanogoh 등, *J. Immunol.* 169:1175-1181 (2002); Watanabe 등, *J. Immunol.* 167:4321-4328 (2001); Wang 등, *Blood* 97:3498-3504 (2001); 및 Giraudon 등, *J. Immunol.* 172:1246-1255 (2004)(이들 모두 본원에 참고로 편입됨)에 개시된 검정.
- [0111] 본원에 개시된 불변 영역, CDRs, VH 영역, 또는 VL 영역을 포함하는 임의의 특정 폴리펩타이드가 또 다른 폴리펩타이드와 적어도 약 65%, 약 70%, 약 75%, 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 91%, 약 92%, 약 93%, 약 94%, 약 95%, 약 96%, 약 97%, 약 98%, 약 99%, 또는 심지어 약 100% 동일한지 여부를 본원에서 논의할 때, % 동일성은 당해 기술에 공지된 방법 및 컴퓨터 프로그램/소프트웨어를 사용하여 결정될 수 있다. 비교를 위한 서열의 최적의 정렬이 예를 들어, 국소 상동성 알고리즘(Smith & Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2:482-489(1981)에 의해, 전반적인 정렬 알고리즘(Needleman & Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:443(1970)에 의해, 유사성 방법을 위한 검색(Pearson & Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85:2444 (1988); Altschul 등, *Nucl. Acids Res.* 25:3389-402 (1997)에 의해, 이들 알고리즘(예를 들어, GAP, BESTFIT, FASTA, and BLAST in the Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis.)의 컴퓨터화된 실행(전형적으로 디폴트 설정을 사용)에 의해, 또는 매뉴얼 정렬 및 육안 검사(참고, 예를 들어, *Current Protocols in Molecular Biology*, Ausubel *et al.* (eds.), 1994)에 의해 수행될 수 있다.

- [0112] 본 개시내용의 목적을 위해, 퍼센트 서열 동일성 갭 오픈 패널티(12) 및 갭 연장 패널티(2), BLOSUM 매트릭스 (62)를 이용한 검색을 사용하는 Smith-Waterman 상동성 검색 알고리즘을 사용하여 결정될 수 있다. 변이체는 예를 들어, 겨우 1 내지 15 아미노산 잔기, 겨우 1 내지 10 아미노산 잔기, 예컨대 6-10, 겨우 5, 겨우 4, 3, 2, 또는 심지어 1 아미노산 잔기가 기준 항-SEMA4D 항체(예를 들어, 본원에 제공된 MAb 2517)와 다를 수 있다.
- [0113] 특정 양태에서, 본 개시내용은 SEMA4D에 특이적으로 결합하는 항체 또는 그것의 항원-결합 단편, 변이체, 또는 유도체를 제공하되, 여기서 상기 항체 또는 그것의 단편은 VH 및 VL을 포함한다. 특정 양태에서, 상기 VH는 상보성 결정 영역(HCDRs) HCDR1, HCDR2, 및 HCDR3을 포함하되, 이들은 각각 서열번호: 2, 서열번호: 3, 및 서열번호: 4와 동일하거나 또는, 상기 HCDRs 중 하나, 둘, 또는 셋 모두에서 아미노산 치환이 하나, 둘, 셋, 넷, 다섯 또는 여섯 개인 것을 제외하고 상기 서열번호들과 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 특정 양태에서, 상기 HCDR1, HCDR2, 및 HCDR3은 각각 서열번호: 2, 서열번호: 3, 및 서열번호: 4와 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 특정 양태에서, 상기 VL은 상보성 결정 영역(LCDRs) LCDR1, LCDR2, 및 LCDR3을 포함하는데, 이들은 각각 서열번호: 6, 서열번호: 7, 및 서열번호: 8과 동일하거나, 또는 상기 LCDRs 중 하나, 둘, 또는 셋 모두에서 아미노산 치환이 하나, 둘, 셋, 넷, 다섯 또는 여섯 개인 것을 제외하고 상기 서열번호들과 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 특정 양태에서, 상기 LCDR1, LCDR2, 및 LCDR3은 각각 서열번호: 6, 서열번호: 7, 및 서열번호: 8과 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 특정 양태에서, 상기 VH는 프레임워크 영역(HFWs) HFW1, HFW2, HFW3, 및 HFW4를 추가로 포함하고, 상기 VL은 프레임워크 영역(LFWs) LFW1, LFW2, LFW3, 및 LFW4를 추가로 포함한다. 특정 양태에서, 상기 프레임워크 영역은 인간 항체에서 유래된다. 특정 양태에서, 예를 들어, 상기 항체가 비-인간 모델 시스템에 사용되어야 할 경우, 상기 프레임워크 영역은 비-인간 항체, 예를 들어, 마우스 항체에서 유래된다. 특정 양태에서, 상기 VH는 서열번호: 1의 아미노산 서열을 포함한다. 특정 양태에서, 상기 VL은 서열번호: 5의 아미노산 서열을 포함한다.
- [0114] 특정 양태에서, 본 개시내용은 세마포린-4D(SEMA4D)에 특이적으로 결합하는 항체, 예를 들어, 완전한-인간 항체, 또는 그것의 항원-결합 단편, 변이체, 또는 유도체(VH 및 VL을 포함함)를 제공한다. 특정 양태에서, 상기 VH는 서열번호: 1과 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 특정 양태에서, 상기 VL은 서열번호: 5와 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 특정 양태에서, 상기 VH는 서열번호: 1과 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하고; 및 상기 VL은 서열번호: 5와 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 특정 양태에서, 상기 VH는 서열번호: 1의 아미노산 서열을 포함하고, 상기 VL은 서열번호: 5의 아미노산 서열을 포함한다. 특정 양태에서, 상기 VH 및 VL은 완전히 인간적이다(human).
- [0115] 특정 양태에서, 본 명세서에서 제공된 항-SEMA4D 항체 또는 그것의 항원-결합 단편, 변이체, 또는 유도체는 인간 SEMA4D, 설치류 SEMA4D, 예를 들어, 마우스 SEMA4D 및/또는 랫트 SEMA4D, 및/또는 비-인간 영장류 SEMA4D, 예를 들어, 사이노몰구스 원숭이 SEMA4D 및/또는 마모셋 SEMA4D에 특이적으로 결합할 수 있다.
- [0116] 특정 양태에서, 상기 항체 또는 그것의 단편, 변이체, 또는 유도체는 VH의 C-말단에 융합된 중쇄 불변 영역 또는 그것의 단편, 변이체, 또는 유도체를 추가로 포함한다. 상기 중쇄 불변 영역 또는 그것의 단편은 임의의 중에서 유래될 수 있으나, 특정 양태에서 상기 중쇄 불변 영역 또는 그것의 단편, 변이체, 또는 유도체는 인간 중쇄 불변 영역, 예를 들어, 인간 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, 또는 IgM 불변 영역이거나 또는 그것에서 유래된다. 특정 양태에서, 상기 중쇄 불변 영역은 인간 IgG4 불변 영역, 또는 그것의 단편, 변이체, 또는 유도체이다. 특정 양태에서, 예를 들어, 제공된 항-SEMA4D 항체 또는 그것의 단편이 비-인간 모델 시스템에서 사용되어야 할 경우, 상기 중쇄 불변 영역 또는 그것의 단편은 비-인간 중쇄 불변 영역, 예를 들어, 쥐와 중쇄 불변 영역 예컨대 쥐와 IgG1 불변 영역일 수 있다.
- [0117] 특정 양태에서, 상기 항체 또는 그것의 단편, 변이체, 또는 유도체는 VL의 C-말단에 융합된 경쇄 불변 영역 또는 그것의 단편, 변이체, 또는 유도체를 추가로 포함한다. 상기 경쇄 불변 영역 또는 그것의 단편은 임의의 중에서 유래될 수 있으나, 특정 양태에서, 상기 경쇄 불변 영역 또는 그것의 단편은 인간 경쇄 불변 영역, 예를 들어, 인간 카파 또는 람다 불변 영역에서 유래된다. 특정 양태에서, 상기 경쇄 불변 영역 또는 그것의 단편, 변이체, 또는 유도체는 인간 람다 경쇄 불변 영역이거나 또는 그것에서 유래된다. 특정 양태에서, 상기 경쇄 불변 영역은 인간 람다 불변 영역이다. 특정 양태에서, 예를 들어, 제공된 항-SEMA4D 항체 또는 그것의 단편이 비-인간 모델 시스템에서 사용되어야 할 경우, 상기 경쇄 불변 영역 또는 그것의 단편은 비-인간 경쇄 불변 영역, 예를 들어, 쥐와 경쇄 불변 영역 예컨대 쥐와 람다 불변 영역일 수 있다.

- [0118] 특정 양태에서, 본 개시내용은 상기에 기재된 바와 같이 VH 및 VL 영역을 포함하는 항-SEMA4D 항체 단편을 제공한다. 특정 양태에서, 상기 단편은 예를 들어, Fab 단편, Fab' 단편, F(ab')₂ 단편, Fd 단편, 단일사슬 Fv 단편(scFv), 또는 디설파이드-연결 Fv 단편(sdFv)일 수 있다.
- [0119] 특정 양태에서, 본 개시내용에 의해 제공된 항-SEMA4D 항체 또는 그것의 단편, 변이체, 또는 유도체는 다중특이적, 예를 들어, 이중특이적일 수 있다. 본 명세서에서 제공된 SEMA4D 항체의 결합 특성과 더불어, 본 명세서에서 제공된 다중특이적 항체 또는 그것의 단편은 추가의 SEMA4D 에피토프에 결합할 수 있고, 또는 다른 관련없는 에피토프에 결합할 수 있다.
- [0120] 특정 양태에서, 본 명세서에서 제공된 항-SEMA4D 항체 또는 그것의 단편은, 해리 상수 K_D 가 500 nM, 100 nM, 50.0 nM, 40.0 nM, 30.0 nM, 20.0 nM, 10.0 nM, 9.0 nM, 8.0 nM, 7.0 nM, 6.0 nM, 5.0 nM, 4.0 nM, 3.0 nM, 2.0 nM, 1.0 nM, 0.50 nM, 0.10 nM, 0.050 nM, 0.01 nM 0.005 nM, 또는 0.001 nM 이하인 것을 특징으로 하는 결합 친화도로, SEMA4D, 예를 들어, 인간 SEMA4D, 마우스 SEMA4D, 사이노몰구스 원숭이 SEMA4D, 마모셋 SEMA4D, 또는 이들의 임의의 조합에 특이적으로 결합할 수 있다. 항체 또는 그것의 단편의 SEMA 4D에 대한 해리 상수(K_D)를 측정하는 방법 및 장치, 예컨대 BIACORE가 당해 분야의 숙련가에게 잘 알려져 있다.
- [0121] 특정 양태에서, 본 개시내용에 의해 제공된 항-SEMA4D 항체 또는 그것의 단편은 SEMA4D가 SEMA4D 수용체, 예를 들어, 플렉신-B1, 플렉신-B2, 및/또는 CD72에 결합하는 것을 억제할 수 있다.
- [0122] 특정 양태에서, 본원에 제공된 항-SEMA4D 항체 또는 그것의 항원-결합 단편, 변이체, 또는 유도체는 완전히 인간적이고, 인간 대상체에 투여 시 항-항체 면역 반응을 최소로 유도하거나 또는 전혀 유도하지 않는다. 대상체에서 항-항체 면역 반응을 측정하는 방법은 당해 기술에 공지되어 있다. 참고, 예를 들어, Darwish, IA, *Int. J. Biomed. Sci.* 2:217-235(2006).
- [0123] 항-SEMA4D 항체의 불변 영역은 돌연변이되어 여러 방식으로 효과기 기능을 바꿀 수 있다. 예를 들어, 참고 미국 특허 제6,737,056 B1 호 및 U.S. 특허 출원 공개 No. 2004/0132101 A1(이들은 Fc 수용체에 대한 항체 결합을 최적화하는 Fc 돌연변이를 개시한다).
- [0124] 본원에 제공된 특정 항-SEMA4D 결합 분자, 예를 들어, 항체 또는 그것의 단편, 변이체 또는 유도체에서, 상기 Fc 부분은 돌연변이되어, 기술 당업계에서 알려진 기술을 사용하여 효과기 기능을 조절, 예를 들어, 증가 또는 감소시킬 수 있다. 예를 들어, 불변 영역 도메인의 결실 또는 불활성화(점 돌연변이 또는 다른 수단을 통해)은 순환하는 변형된 항체의 Fc 수용체 결합을 감소시킴으로써, 종양 편재화를 증가시킬 수 있다. 다른 사례에서, 본 개시내용과 일치하는 불변 영역 변형은 보체 결합을 조절하고, 따라서 혈청 반감기를 증가 또는 감소시킬 수 있다. 그러나, 상기 불변 영역의 다른 변형이 사용되어 증가된 항원 특이성 또는 항체 가요성 때문에 향상된 편재화를 허용하는 디설파이드 연결기 또는 올리고당 모이어티를 변형할 수 있다. 상기 변형의 수득된 생리적 프로파일, 생체이용률 및 다른 생화학적 효과, 예컨대 종양 편재화, 체내분포 및 혈청 반감기는 과도한 실험과정 없이 잘 알려진 면역학적 기술을 사용하여 쉽게 측정 및 정량화될 수 있다.
- [0125] 본원에 제공된 항-SEMA4D 결합 분자, 예를 들어, 항체 또는 그것의 단편에는 예를 들어, 임의의 유형의 분자가 상기 항체에 공유결합 함으로써(공유결합은 상기 항체가 그것의 동족 에피토프에 특이적으로 결합하는 것을 방지하지 않는다) 변형된 유도체가 포함된다. 예를 들어, 제한하기 위한 방법은 아니지만, 상기 항체 유도체에는 예를 들어, 당화, 아세틸화, 페길화, 인산화, 아미드화, 알려진 보호기/차단기에 의한 유도체화, 단백질분해 절단, 세포 리간드 또는 다른 단백질에 연결 등에 의해 변형된 바 있는 항체가 포함된다. 임의의 수많은 화학적 변형이 알려진 기술, 예컨대, 비제한적으로 특이적 화학적 절단, 아세틸화, 포르밀화 등에 의해 수행될 수 있다. 추가로, 상기 유도체는 하나 이상의 비-고전적 아미노산을 함유할 수 있다.
- [0126] "보존적 아미노산 치환"은 아미노산 잔기가 유사한 전하를 갖는 측쇄를 구비한 아미노산 잔기로 대체되는 경우이다. 유사한 전하를 갖는 측쇄를 구비한 아미노산 잔기의 계열이 당업계에서 정의된 바 있다. 이들 계열에는 염기성 측쇄(예를 들어, 라이신, 아르기닌, 히스티딘), 산성 측쇄(예를 들어, 아스파르트산, 글루탐산), 무전하 극성 측쇄(예를 들어, 글리신, 아스파라긴, 글루타민, 세린, 트레오닌, 티로신, 시스테인), 무극성 측쇄(예를 들어, 알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 프롤린, 페닐알라닌, 메티오닌, 트립토판), 베타-분지형 측쇄(예를 들어, 트레오닌, 발린, 이소류신) 및 방향족 측쇄(예를 들어, 티로신, 페닐알라닌, 트립토판, 히스티딘)를 구비한 아미노산이 포함된다. 대안적으로, 돌연변이가 예컨대, 포화 돌연변이유발에 의해, 코딩 서열의 모두 또는 일부와 함께 무작위로 도입될 수 있고, 상기 수득된 돌연변이체는 활성(예를 들어, 항-SEMA4D 폴리펩타이드와 결합하는 능력, SEMA4D와 그것의 수용체의 상호작용을 차단하는 능력, 또는 대상체, 예를 들어, 암 환자에서 전이를

억제, 지연 또는 감소시키는 능력)을 보유한 돌연변이체를 식별하기 위해 생물학적 활성을 대상으로 선별될 수 있다.

[0127] 예를 들어, 항체 분자의 프레임워크 영역에만, 또는 CDR 영역에만 돌연변이를 도입하는 것이 가능하다. 도입된 돌연변이는 침묵의 또는 중성 미스센스 돌연변이일 수 있는데, 즉, 항원과 결합하는 항체의 능력에 전혀 아무런 영향도 미치지 않는다. 돌연변이그것의 유형은 코돈 용법을 최적화하거나 또는 하이브리도마의 항체 생산을 개선하는 데 유용할 수 있다. 대안적으로, 비-중성 미스센스 돌연변이는 항원과 결합하는 항체의 능력을 바꿀 수 있다. 당해 분야의 숙련가라면 원하는 특성, 예컨대 항원 결합 활성의 변경 없음 또는 결합 활성에 변경 있음(예를 들어, 항원 결합 활성의 개선 또는 항체 특이성의 변화)을 가진 돌연변이체 분자를 설계하고 시험할 수 있다. 돌연변이 유발 후, 인코딩된 단백질이 일상적으로 발현될 수 있고, 상기 인코딩된 단백질의 기능적 및/또는 생물학적 활성(예를 들어, SEMA4D 폴리펩타이드의 적어도 하나의 에피토프와 면역특이적으로 결합하는 능력)은 본원에 기재된 기술을 사용하여, 또는 당업계에서 알려진 일상적으로 변형시키는 기술을 사용하여 결정될 수 있다.

[0128] 특정 양태에서, 본원에 제공된 항-SEMA4D 결합 분자, 예를 들어, 항체 또는 그것의 단편은 적어도 하나의 최적화된 상보성-결정 영역(CDR)을 포함할 수 있다. "최적화된 CDR"이란 상기 최적화된 CDR을 포함하는 항-SEMA4D 결합 분자에 전해진 결합 친화도 및/또는 항-SEMA4D 활성을 개선하도록 상기 CDR가 변형 및 최적화된 것을 의도한다. "항-SEMA4D 활성" 또는 "SEMA4D 차단 활성"에는 조절하는 활성이 포함될 수 있다. 예를 들어, 하나 이상의 SEMA4D 활성을 감소시키거나, 제거하거나, 줄이거나 또는 방지한다. 비제한적인 SEMA4D 활성에는 하기가 포함된다: B 세포 활성화, 응집 및 생존; CD40-유도 증식 및 항체 생산; T 세포 의존적 항원에 대한 항체 반응; T 세포 또는 다른 면역 세포 증식; 수지상 세포 성숙; 탈수초화 및 축삭 변성; 만능 신경 전구체 및/또는 희소돌기교세포의 세포자멸사; 내피 세포 이동의 유도; 자발적인 단백질 이동의 억제; 종양 세포 성장 또는 전이; 그것의 촉진, 세포 표면 플렉신-B1 또는 다른 수용체에 결합, 또는 SEMA4D+ 세포의 표면에서 발현되는 가용성 SEMA4D 또는 SEMA4D와의 임의의 다른 활성 회합. 특정 구현예에서, 항-SEMA4D 활성에는 원발성 종양 세포 성장 및 종양 전, 그것의 억제, 지연 또는 감소와 조합되거나, 또는 원발성 종양 세포 성장 및 종양 전이와는 독립적으로, 종양 전이를 억제, 지연 또는 감소시키는 능력이 포함된다. 항-SEMA4D 활성은 또한 SEMA4D 발현과 연관된 질환, 예컨대, 비제한적으로, 특정 유형의 암(고형 종양 및 림프종 포함), 자가면역 질환, 염증성 질환(중추신경계(CNS) 및 말초 신경계(PNS) 염증성 질환 포함), 신경퇴행성 질환, 이식 거부, 및 침습성 혈관신생의 발병을 또는 중증도의 감소에 기인할 수 있다.

[0129] 항-SEMA4D 항체를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드

[0130] 본 개시내용 또한 본 명세서에서 제공된 항-SEMA4D 결합 분자, 예를 들어, 항체 또는 그것의 항원-결합 단편, 변이체, 또는 유도체를 인코딩하는 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는 단리된 폴리뉴클레오타이드, 또는 둘 이상의 폴리뉴클레오타이드를 제공한다.

[0131] 일 양태에서, 본 개시내용은 본 명세서에서 제공된 항-SEMA4D 결합 분자, 예를 들어, 항체 또는 그것의 단편, 변이체, 또는 유도체, 또는 그들의 서브유닛, 예를 들어, 중쇄 서브유닛 또는 그것의 단편 또는 경쇄 서브유닛 또는 그것의 단편을 인코딩하는 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는 단리된 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리뉴클레오타이드들의 조합을 제공한다.

[0132] 특정 양태에서, 본 명세서에서 제공된 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리뉴클레오타이드들의 조합은 항-SEMA4D 결합 분자, 예를 들어, 항체 또는 그것의 단편, 변이체, 또는 유도체의 VH를 인코딩하는 핵산 서열을 포함한다. 특정 양태에서, 본 명세서에서 제공된 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리뉴클레오타이드들의 조합은 항-SEMA4D 결합 분자, 예를 들어, 항체 또는 그것의 단편, 변이체, 또는 유도체의 VL을 인코딩하는 핵산 서열을 포함한다. 특정 양태에서, 본 명세서에서 제공된 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리뉴클레오타이드들의 조합은 항-SEMA4D 결합 분자, 예를 들어, 항체 또는 그것의 단편, 변이체, 또는 유도체의 VH를 인코딩하는 핵산 서열과 VL을 인코딩하는 핵산 서열을 포함한다. 특정 양태에서, 상기 VH-인코딩 핵산 서열 및 상기 VL-인코딩 핵산 서열은 동일한 벡터에 위치한다. 그와 같은 벡터가 본 개시내용에 의해 제공된다. 특정 양태에서, 상기 VH-인코딩 핵산 서열 및 상기 VL-인코딩 핵산 서열은 별개의 벡터에 위치한다. 그와 같은 벡터 또한 본 개시내용에 의해 제공된다. 본 개시내용에 의해 제공된 벡터는 추가로 유전 인자를 포함하여 상기 항체 또는 그것의 단편의 발현을 허용할 수 있다. 그와 같은 유전 인자, 예컨대 프로모터, 폴리-아데닐화 서열, 및 항상제가 본원의 다른 곳에 기재되었다. 상기 개시내용은 추가로 본원에 제공된 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리뉴클레오타이드들의 조합, 및/또는 본원에 제공된 벡터 또는 벡터들을 포함하는 숙주세포를 제공한다.

- [0133] 또한 본 명세서에서 제공된 항-SEMA4D 항체 또는 그것의 단편, 변이체, 또는 유도체를 생산하는 방법이 제공되
되, 상기 방법은 본 명세서에서 제공된 숙주세포를 배양하는 단계 및 상기 항체 또는 그것의 단편을 회수하는
단계를 포함한다.
- [0134] 특정 양태에서, 본 개시내용은 항-SEMA4D 항체 또는 그것의 항원-결합 단편, 변이체, 또는 유도체, 또는 그들의
서브유닛을 인코딩하는 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는 단리된 폴리뉴클레오타이드, 또는 둘 이상의 폴리뉴
클레오타이드를 제공하되, 상기 항체는 VH 및 VL을 포함하고, 상기 VH는 상보성 결정 영역(HCDRs) HCDR1,
HCDR2, 및 HCDR3을 포함하는데, 이들은 각각 서열번호: 2, 서열번호: 3, 및 서열번호: 4와 동일하거나, 또는
HCDRs 중 하나, 둘 또는 셋 모두에서 아미노산 치환이 하나, 둘, 셋, 또는 넷인 것을 제외하고, 상기 서열 번
호와 동일한 아미노산 서열을 포함하고; 및 상기 VL은 상보성 결정 영역(LCDRs) LCDR1, LCDR2, 및 LCDR3을 포함
하는데, 각각 서열번호: 6, 서열번호: 7, 및 서열번호: 8과 동일하거나, 또는 LCDRs 중 하나, 둘, 또는 셋
모두에서 아미노산 치환이 하나, 둘, 셋 또는 넷인 것을 제외하고, 상기 서열번호와 동일한 아미노산 서열을
포함한다.
- [0135] 특정 양태에서, 본 개시내용은 항-SEMA4D 항체 또는 그것의 항원-결합 단편, 변이체, 또는 유도체, 또는 그들
의 서브유닛을 인코딩하는 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는 단리된 폴리뉴클레오타이드, 또는 둘 이상의 폴리
뉴클레오타이드를 제공하는데, 여기서 상기 항체는 VH 및 VL을 포함하되, 상기 VH는 서열번호: 1과 적어도 80%,
85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하고, 상기 VL은 서열번호: 5와 적
어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함한다.
- [0136] 앞서 기재된 임의의 폴리뉴클레오타이드는 추가로, 예를 들어, 본원의 다른 곳에 기재된 중쇄 또는 경쇄 불변
영역 또는 그것의 단편을 인코딩하는 추가의 핵산 서열, 상기 인코딩된 폴리펩타이드의 분비를 지시하는 신호
펩타이드, 또는 본 명세서에서 기재된 다른 이종성 폴리펩타이드를 포함할 수 있다. 또한, 본원의 다른 곳에 더
상세히 기재된 바에 따르면, 본 개시내용에는 앞서 기재된 폴리뉴클레오타이드 중 하나 이상을 포함하는 조성
물이 포함된다.
- [0137] 일 구현예에서, 본 개시내용에는 제1 폴리뉴클레오타이드 및 제2 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 조성물이 포함
되는데, 상기 제1 폴리뉴클레오타이드는 본 명세서에서 기재된 VH를 인코딩하는 핵산 서열을 포함하고, 상기 제
2 폴리뉴클레오타이드는 본 명세서에서 기재된 VL을 인코딩한다.
- [0138] 본 개시내용에는 또한 다른 곳에 기재된 바와 같이, 본원에 제공된 폴리뉴클레오타이드의 단편이 포함된다. 추
가로, 본 명세서에서 기재된 융합 폴리펩타이드, Fab 단편, 및 다른 유도체를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드가
제공된다.
- [0139] 본 개시내용에 의해 제공된 폴리뉴클레오타이드는 당해 분야에 알려진 임의의 방법에 의해 생산 또는 제조될 수
있다. 예를 들어, 상기 항체의 뉴클레오타이드 서열이 알려진 경우, 상기 항체를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이
드는 화학적으로 합성된 올리고뉴클레오타이드(예를 들어, Kutmeier 등, *Bio Techniques* 17:242 (1994)에 기술
된 바와 같이)에서 조립될 수 있는데, 이것은 간단히, 상기 항체를 인코딩하는 서열의 일부분들을 함유하는 중
첩 올리고뉴클레오타이드의 합성, 그와 같은 올리고뉴클레오타이드의 어닐링 및 결합, 및 이어서 PCR에 의한 결
찰된 올리고뉴클레오타이드의 증폭을 수반한다.
- [0140] 대안적으로, 본 명세서에서 제공된 항-SEMA4D 결합 분자, 예를 들어, 항체, 또는 그것의 항원-결합 단편, 변이
체, 또는 유도체를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드는 적합한 원천에서 유래된 핵산 서열에서 생성될 수 있다.
특정 항체를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 함유하는 클론이 이용불가능한 경우, 그러나 상기 항체 분자의
서열이 알려진 경우, 상기 항체를 인코딩하는 핵산은, 상기 서열의 3' 및 5' 단부에 혼성화가능한 합성 프라이
머를 사용하는 PCR 증폭에 의해, 또는 특정한 유전자 서열에 특이적인 올리고뉴클레오타이드 프로브를 사용하는
클로닝에 의해, 적합한 원천(예를 들어, 항체 cDNA 라이브러리, 또는 핵산, 예를 들어, poly A⁺ RNA에서 생성되
거나, 또는 상기 항체 또는 다른 항-SEMA4D 항체를 발현하는 임의의 조직 또는 세포, 예컨대 항체를 발현하도록
선택된 하이브리도마 세포에서 단리된 cDNA 라이브러리)에서 화학적으로 합성 또는 수득되어, 예를 들어, 상기
항체 또는 다른 항-SEMA4D 항체를 인코딩하는 cDNA 라이브러리에서 유래된 cDNA 클론을 식별한다. PCR에 의해
생성된 증폭된 핵산은 이어서 당해 기술에 알려진 임의의 방법을 사용하여 복제가능 클로닝 벡터로 클로닝될 수
있다.
- [0141] 일단 상기 항-SEMA4D 항체, 또는 그것의 항원-결합 단편, 변이체, 또는 유도체의 뉴클레오타이드 서열 및 상응
하는 아미노산 서열이 결정되면, 그것의 뉴클레오타이드 서열은 뉴클레오타이드 서열의 조작을 위해 당해 분야

에서 잘 알려진 방법, 예를 들어, 재조합 DNA 기술, 부위 지향된 돌연변이유발, PCR 등(참고, 예를 들어, Sambrook 등 (1990) Molecular Cloning, A Laboratory Manual (2nd ed.; Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.) and Ausubel 등, eds. (1998) Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley & Sons, NY)(둘 모두는 그 전체가 본 명세서에 참고로 편입됨)에 기재된 기술)을 사용하여 조작되어, 상이한 아미노산 서열을 갖는 항체를 생성하고, 예를 들어 아미노산 치환, 결실, 및/또는 삽입을 형성할 수 있다.

[0142] 항-SEMA4D 결합 분자, 예를 들어, 항체, 또는 그것의 항원-결합 단편, 변이체, 또는 유도체를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리뉴클레오타이드들의 조합은 임의의 폴리리보뉴클레오타이드 또는 폴리데옥시리보뉴클레오타이드로 구성될 수 있고, 이것은 비변형된 RNA 또는 DNA, 또는 변형된 RNA 또는 DNA일 수 있다. 예를 들어, 항-SEMA4D 항체, 또는 그것의 항원-결합 단편, 변이체, 또는 유도체를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리뉴클레오타이드들의 조합은 단일- 및 이중-가닥 DNA, 단일- 및 이중-가닥 영역의 혼합물인 DNA, 단일- 및 이중-가닥 RNA, 및 단일- 및 이중-가닥 영역의 혼합물인 RNA, 단일-가닥 또는, 더욱 전형적으로, 이중-가닥 또는 단일- 및 이중-가닥 영역의 혼합물일 수 있는 DNA 및 RNA를 포함하는 하이브리드 분자로 구성될 수 있다. 또한, 항-SEMA4D 결합 분자, 예를 들어, 항체, 또는 그것의 항원-결합 단편, 변이체, 또는 유도체를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리뉴클레오타이드들의 조합은 RNA 또는 DNA 또는, RNA 및 DNA 둘 모두를 포함하는 삼중-가닥 영역으로 구성될 수 있다.

[0143] 항-SEMA4D 결합 분자, 예를 들어, 항체, 또는 그것의 항원-결합 단편, 변이체, 또는 유도체를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리뉴클레오타이드들의 조합은 또한 변형된 염기, 즉 안정성을 위해 또는 다른 이유 때문에 변형된 DNA 또는 RNA 백본을 하나 이상 함유할 수 있다. "변형된" 염기에는, 예를 들어, 트리틸화된 염기 및 흔히 않은 염기 예컨대 이노신이 포함된다. DNA 및 RNA에 다양한 변형이 이루어질 수 있기 때문에; "폴리뉴클레오타이드"는 화학적으로, 효소적으로, 또는 대사성으로 변형된 형태를 포용한다.

[0144] 면역글로불린(예를 들어, 면역글로불린 중쇄 부분 또는 경쇄 부분)에서 유래된 폴리펩타이드의 비-자연 변이체를 인코딩하는 단리된 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리뉴클레오타이드들의 조합이 하나 이상의 뉴클레오타이드 치환, 첨가 또는 결실을 상기 면역글로불린의 뉴클레오타이드 서열에 도입함으로써 형성되어, 하나 이상의 아미노산 치환, 첨가 또는 결실이 상기 인코딩된 단백질에 도입된다. 돌연변이가 표준 기술, 예컨대 부위 지향적 돌연변이유발 및 PCR-매개 돌연변이유발에 의해 도입될 수 있다. 특정 양태에서, 보존적 아미노산 치환은 하나 이상의 비-필수 아미노산 잔기에서 이루어질 수 있다.

[0145] 융합 단백질 및 항체 콘주게이트

[0146] 본원의 다른 곳에서 더 상세히 논의된 바와 같이, 본 명세서에서 제공된 항-SEMA4D 결합 분자, 예를 들어, 항체 또는 그것의 항원-결합 단편, 변이체, 또는 유도체는 추가로 N- 또는 C-말단에 있는 이중성 폴리펩타이드에 재조합으로 융합되거나, 또는 폴리펩타이드 또는 다른 이중성 모이어티에 화학적으로 접합(공유 및 비-공유 콘주게이션 포함)될 수 있다. 예를 들어, 항-SEMA4D 항체는 검출 검정에 표지로서 유용한 분자, 및 효과기 분자 예컨대 이중성 폴리펩타이드, 약물, 방사선헌종, 또는 독소에 재조합으로 융합 또는 접합될 수 있다. 참고, 예를 들어, PCT 공개 WO 92/08495; WO 91/14438; WO 89/12624; 미국 특허 제5,314,995호; 및 EP 396,387. 특정 양태에서, 상기 이중성 모이어티는 폴리펩타이드, 세포독성 약물, 치료제, 전구약물, 지질, 탄수화물, 핵산, 검출가능한 표지, 폴리머, 또는 이들의 임의의 조합일 수 있다. 예시적인 이중성 폴리펩타이드에는 비제한적으로, 결합 분자, 효소, 사이토카인, 림포카인, 호르몬 펩타이드, 또는 이들의 임의의 조합이 포함된다. 예시적인 세포독성 약물에는 비제한적으로 방사선헌종, 생물학적 독소, 효소 활성 독소, 또는 이들의 임의의 조합이 포함된다. 예시적인 검출가능한 표지에는, 비제한적으로, 효소, 형광 표지, 화학발광 표지, 생물발광 표지, 방사성 표지, 또는 이들의 임의의 조합이 포함된다.

[0147] 본 명세서에서 제공된 항-SEMA4D 결합 분자, 예를 들어, 항체 또는 그것의 항원-결합 단편, 변이체, 또는 유도체는 예를 들어, 상기 항체에 대한 임의의 유형의 모이어티의 공유결합에 의해 변형된 유도체를 포함할 수 있는데, 상기 공유결합은 결합 분자가 SEMA4D에 결합하는 것을 방지하지 않는다. 예를 들어, 제한하기 위한 방법이 아니라, 항체 유도체는 예를 들어, 당화, 아세틸화, 페길화, 인산화, 아미드화, 알려진 보호기/차단기에 의한 유도체화, 단백질분해 절단, 세포 리간드 또는 다른 단백질과 연결 등에 의해 변형될 수 있다. 임의의 수많은 화학적 변형이 알려진 기술, 예컨대, 비제한적으로 특이적 화학적 절단, 아세틸화, 포르밀화 등에 의해 수행될 수 있다. 추가로, 상기 유도체는 하나 이상의 비-고전적 아미노산을 함유할 수 있다.

[0148] 본 명세서에서 제공된 항-SEMA4D 결합 분자, 예를 들어, 항체 또는 그것의 항원-결합 단편, 변이체, 또는 유도체는 펩타이드 결합 또는 변형된 펩타이드 결합, 예를 들어, 펩타이드 등배체에 의해 서로 연결된 아미노산들로

구성될 수 있고, 유전자-인코딩된 아미노산 20개 이외의 아미노산을 함유할 수 있다. 예를 들어, 본 명세서에서 제공된 항-SEMA4D 결합 분자, 예를 들어, 항체 또는 그것의 항원-결합 단편, 변이체, 또는 유도체는 자연적 과정들, 예컨대 번역후 공정에 의해, 또는 당해 기술에 공지된 화학적 변형 기술에 의해 변형될 수 있다. 그와 같은 변형은 아주 큰 연구 문헌에서 뿐만 아니라 기본적인 교과서 및 보다 상세한 모노그래프에 잘 기술되어 있다. 변형은 항-SEMA4D 결합 분자, 예컨대 펩타이드 백본, 아미노산 측쇄 및 아미노 또는 카복실 말단에서, 또는 모이어티 예컨대 탄수화물 상에서 어디든지 일어날 수 있다. 또한, 주어진 항-SEMA4D 결합 분자는 많은 유형의 변형을 함유할 수 있다. 항-SEMA4D 결합 분자는 예를 들어, 유비퀴틴화의 결과로 분지형일 수 있고, 분지화가 있거나 또는 없는 환형일 수 있다. 환형, 분지형, 및 분지형 환형 항-SEMA4D 결합 분자가 번역 후 자연적 과정에서 수득될 수 있고, 또는 합성 방법에 의해 제조될 수 있다. 변형에는 아세틸화, 아실화, ADP-리보실화, 아미드화, 플라빈의 공유결합, 헴 모이어티의 공유결합, 뉴클레오타이드 또는 뉴클레오타이드 유도체의 공유결합, 지질 또는 지질 유도체의 공유결합, 포스포타일리노시톨의 공유결합, 가교결합, 고리화, 디설파이드 결합 형성, 탈메틸화, 공유 가교결합의 형성, 시스템인 형성, 파이로글루타메이트 형성, 포르밀화, 감마-카복실화, 당화, GPI 앵커 형성, 하이드록실화, 요오드화, 메틸화, 미리스토일화, 산화, 폐길화, 단백질분해 공정, 인산화, 프레닐화, 라세미화, 셀레노일화, 황산화, 단백질에 아미노산의 전달-RNA 매개 첨가, 예컨대 아르기닐화, 및 유비퀴틴화가 포함된다. (참고, 예를 들어, 단백질-구조 및 분자 특성, T. E. Creighton, W. H. Freeman and Company, NY; 2nd ed. (1993); Johnson, ed. (1983) Posttranslational Covalent Modification of Proteins (Academic Press, NY), pgs. 1-12; Seifter 등, *Meth. Enzymol.* 182:626-646 (1990); Rattan 등, *Ann. NY Acad. Sci.* 663:48-62 (1992)).

[0149] 본 개시내용은 또한 본 명세서에서 제공된 항-SEMA4D 결합 분자, 예를 들어, 항체 또는 그것의 항원-결합 단편, 변이체, 또는 유도체 및, 이중성 폴리펩타이드를 포함하는 융합 단백질을 제공한다. 상기 항체가 융합된 이중성 폴리펩타이드는 기능 면에서 유용할 수 있고, 또는 항-SEMA4D 폴리펩타이드 발현 세포를 표적화하는 데 유용하다. 본 명세서에서 제공된 항-SEMA4D 결합 분자, 예를 들어, 항체 또는 그것의 항원-결합 단편, 변이체, 또는 유도체는 하나 이상의 이중성 폴리펩타이드 또는 다른 모이어티에 융합 또는 접합되어 폴리펩타이드의 생체내 반감기를 증가시키거나 또는 당해 분야에서 알려진 방법을 사용하는 면역검정에 사용될 수 있다. 예를 들어, 일 구현예에서, PEG 또는 인간 혈청 알부민은 본 명세서에서 제공된 항-SEMA4D 결합 분자에 융합 또는 접합되어 그것의 생체내 반감기를 증가시킬 수 있다. 참고 Leong 등, *Cytokine* 16:106 (2001); *Adv. in Drug Deliv. Rev.* 54:531 (2002); or Weir 등, *Biochem. Soc. Transactions* 30:512 (2002).

[0150] 나아가, 본 명세서에서 제공된 항-SEMA4D 결합 분자, 예를 들어, 항체 또는 그것의 항원-결합 단편, 변이체, 또는 유도체는 하나 이상의 마커 서열, 예컨대 펩타이드에 융합되어 그것의 정제 또는 검출을 촉진할 수 있다. 특정 구현예에서, 상기 마커 아미노산 서열은 헥사-히스티딘 펩타이드, 예컨대 pQE 벡터(QIAGEN, Inc.)에 제공된 태그이고, 그 중에서도, 많은 것들이 상업적으로 입수가능하다. Gentz 등, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:821-824 (1989)에 기술된 바와 같이, 예를 들어, 헥사-히스티딘은 융합 단백질의 편리한 정제를 허용한다. 정제에 유용한 다른 펩타이드 태그에는, 비제한적으로, "HA" 태그(인플루엔자 혈구응집소 단백질에서 유래된 에피토프에 상응함(Wilson 등, *Cell* 37:767 (1984)) 및 "깃발(flag)" 태그가 포함된다.

[0151] 융합 단백질은 당해 분야에서 잘 알려진 방법을 사용하여 제조될 수 있다(참고 예를 들어 미국 특허 제 5,116,964호 및 제 5,225,538호). 상기 융합이 이루어지는 정확한 부위는 실험적으로 선택되어 상기 융합 단백질의 분비 또는 결합 특성을 최적화할 수 있다. 융합 단백질을 인코딩하는 DNA가 이어서 발현을 위한 숙주세포로 형질감염된다.

[0152] 본 명세서에서 제공된 항-SEMA4D 결합 분자, 예를 들어, 항체 또는 그것의 항원-결합 단편, 변이체, 또는 유도체는 비-접합된 형태로 사용되거나 또는 다양한 분자 중 적어도 하나에 접합되어, 예를 들어, 상기 분자의 치료적 특성을 개선하고, 표적 검출을 촉진하고, 또는 환자의 이미징형성 또는 요법을 위할 수 있다. 본 명세서에서 제공된 항-SEMA4D 결합 분자, 예를 들어, 항체 또는 그것의 항원-결합 단편, 변이체, 또는 유도체는 정제 전, 또는 정제 후 또는 정제가 수행될 때, 표지화되거나 접합된다.

[0153] 특히, 본 명세서에서 제공된 항-SEMA4D 결합 분자, 예를 들어, 항체 또는 그것의 항원-결합 단편, 변이체, 또는 유도체는 치료제, 전구약물, 세포독성 약물, 펩타이드, 단백질, 효소, 바이러스, 지질, 생물학적 반응 조절제, 약제학적, 또는 PEG에 접합될 수 있다.

[0154] 당해 분야의 숙련가는 콘주게이트 또한 접합될 선택된 제제에 따라 다양한 기술을 사용하여 조립될 수 있음을 인정한다. 예를 들어, 바이오틴과의 콘주게이트는 예를 들어, 결합 폴리펩타이드를 바이오틴의 활성화된 에스테

르, 예컨대 바이오틴 N-하이드록시석신이미드 에스테르와 반응시킴으로써 제조된다. 이와 유사하게, 형광 마커와의 콘주게이트는 커플링제, 예를 들어, 본원에 열거된 것들의 존재 하에, 또는 이소티오시아네이트, 예를 들어, 플루오레세인-이소티오시아네이트와의 반응에 의해 제조될 수 있다. 본 명세서에서 제공된 항-SEMA4D 결합 분자, 예를 들어, 항체 또는 그것의 항원-결합 단편, 변이체, 또는 유도체의 콘주게이트는 유사한 방식으로 제조될 수 있다.

[0155] 본 개시내용은 추가로 진단 또는 치료제에 접합된 본 명세서에서 제공된 항-SEMA4D 결합 분자, 예를 들어, 항체 또는 그것의 항원-결합 단편, 변이체, 또는 유도체를 아우른다. 그와 같은 항-SEMA4D 결합 분자는 예를 들어, 임상 시험 절차의 일부로서 질환의 전개 또는 진행을 모니터링하고, 예를 들어, 주어진 치료 및/또는 예방 요법의 효능을 판단하기 위해 진단에 사용될 수 있다. 예를 들어, 검출은 상기 항-SEMA4D 결합 분자를 검출가능한 물질에 커플링함으로써 촉진될 수 있다. 검출가능한 물질의 예에는 다양한 효소, 보철 작용기, 형광 물질, 발광성 물질, 생물발광 물질, 방사선험성 물질, 다양한 양전자 방출 단층촬영을 사용하는 양전자 방출 금속, 및 비방사성 상자성 금속 이온이 포함된다. 본 개시내용에 따라 진단으로 사용하기 위해 항체에 접합될 수 있는 금속 이온은 예를 들어, 미국 특허 제 4,741,900호를 참고할 수 있다. 적합한 효소의 예에는 홀스래디쉬 페록시다아제, 알칼리성 포스파타제, [3-갈락토시다아제, 또는 아세틸콜린에스테라제가 포함되고; 적합한 보철 작용기 복합체에는 스트렙타비딘/바이오틴 및 아비딘/바이오틴이 포함되고; 적합한 형광 물질의 예에는 엄벨리페론, 플루오레세인, 플루오레세인 이소티오시아네이트, 로다민, 디클로로트리아지닐아민 플루오레세인, 단일 염화물 또는 파이크오리트린이 포함되고; 발광성 물질의 예에는 루미놀이 포함되고; 생물발광 물질의 예에는 루시페라제, 루시페린, 및 에퀴린이 포함되고; 및 적합한 방사선험성 물질의 예에는 ^{125}I , ^{131}I , ^{111}In , ^{90}Y , 또는 ^{99}Tc 이 포함된다.

[0156] 본 명세서에서 제공된 항-SEMA4D 결합 분자, 예를 들어, 항체, 또는 그것의 항원-결합 단편, 변이체, 또는 유도체는 치료적 모이머티 예컨대 세포독소, 치료제 또는 방사성 금속 이온에 접합될 수 있다. 세포독소 또는 세포독성 약물에는 세포에 해로운 임의의 제제가 포함된다.

[0157] 본 명세서에서 제공된 항-SEMA4D 결합 분자, 예를 들어, 항체, 또는 그것의 항원-결합 단편, 변이체, 또는 유도체는 또한 그것을 화학발광 화합물에 커플링함으로써 검출가능하게 표지화될 수 있다. 화학발광-태깅된 항-SEMA4D 결합 분자의 존재는 이어서 화학적 반응의 과정 중에 발생하는 발광의 존재를 검출함으로써 결정된다. 특히 유용한 화학발광 표지 화합물의 예들은 루미놀, 아이소루미놀, 테로마틱 아크리디니움 에스테르, 이미다졸, 아크리디니움 염 및 옥살레이트 에스테르이다.

[0158] 본 명세서에서 제공된 항-SEMA4D 결합 분자, 예를 들어, 항체 또는 그것의 항원-결합 단편, 변이체, 또는 유도체가 검출가능하게 표지화되는 방법들 중 하나는 by linking 그들을 효소에 연결하고 연결된 생성물을 효소 면역검정(EIA)(Voller, A., "The Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)" Microbiological Associates Quarterly Publication, Walkersville, Md.; Diagnostic Horizons 2:1-7 (1978); Voller 등, *J. Clin. Pathol.* 31:507-520 (1978); Butler, *Meth. Enzymol.* 73:482-523 (1981); Maggio, ed. (1980) Enzyme Immunoassay, CRC Press, Boca Raton, Fla.; Ishikawa 등, eds. (1981) Enzyme Immunoassay (Kagaku Shoin, Tokyo))에 사용하는 것이다. 항-SEMA4D 결합 분자에 결합된 효소는, 예를 들어, 분광광도법적, 형광측정 또는 시각적 수단에 의해 검출될 수 있는 화학적 모이머티를 생산하기 위한 방식으로, 적절한 기질, 예를 들어, 발색 기질과 반응할 것이다. 상기 항체를 검출가능하게 표지하는 데 사용될 수 있는 효소에는 비제한적으로, 말레이트 탈수소효소, 포도당구균 뉴클레아제, 텔타-5-스테로이드 이소머라제, 효모 알코올 탈수소효소, 알파-글리세로포스페이트, 탈수소효소, 트리오스 포스페이트 이소머라제, 홀스래디쉬 페록시다아제, 알칼리성 포스파타제, 아스파라기나제, 글루코스 옥시다제, 베타-갈락토시다아제, 리보뉴클레아제, 우레아, 카탈라제, 글루코스-6-포스페이트 탈수소효소, 글루코아밀라아제 및 아세틸콜린에스테라제가 포함된다. 추가로, 상기 검출은 상기 효소에 대해 발색 기질을 활용하는 비색계 방법에 의해 달성될 수 있다. 검출은 또한 유사하게 제조된 표준과 비교시, 기질의 효소적 반응의 정도의 시각적 비교에 의해 달성될 수 있다.

[0159] 검출은 또한 임의의 다양한 다른 면역검정을 사용하여 달성될 수 있다. 예를 들어, 상기 항-SEMA4D 결합 분자를 방사선험동적으로 표지함으로써, 방사선면역검정(RIA)의 사용을 통해 결합 분자를 검출하는 것이 가능하다. 상기 방사성 동위원소는 비제한적으로, 감마 계수기, 섬광 계수기, 또는 자동 방사선험영을 비롯한 수단들에 의해 검출될 수 있다.

[0160] 본 명세서에서 제공된 항-SEMA4D 결합 분자, 예를 들어, 항체, 또는 그것의 항원-결합 단편, 변이체, 또는 유도체는 또한 형광 방출 금속 예컨대 ^{152}Eu , 또는 란타늄 계열의 다른 것을 사용하여 검출 가능하게 표지화될 수 있다.

다. 이들 금속은 디에틸렌트리아민펜타아세트산(DTPA) 또는 에틸렌디아민테트라아세트산(EDTA)과 같은 금속 킬레이트 작용기를 사용하여 결합 분자에 부착될 수 있다.

[0161] 다양한 모이어티를 본 명세서에서 제공된 항-SEMA4D 결합 분자에 접합하기 위한 기술은 당해 분야의 숙련가에 의해 잘 알려져 있다.

[0162] 항체 폴리펩타이드의 발현

[0163] 본 명세서에서 제공된 항-SEMA4D 결합 분자, 예를 들어, 항체 또는 그것의 항원-결합 단편, 변이체, 또는 유도체의 경쇄 및 중쇄를 인코딩하는 DNA 서열이 잘 알려진 방법에 따라 역전사효소 및 DNA 중합효소를 사용하여 동시에 또는 별도로 제조될 수 있다. PCR는 공개된 중쇄 및 경쇄 DNA 및 아미노산 서열을 토대로 공통 불변 영역 프라이머에 의해 또는 좀 더 특이적인 프라이머에 의해 개시될 수 있다. 상기에 논의된 바와 같이, PCR는 또한 항체 경쇄 및 중쇄를 인코딩하는 DNA 클론을 단리하는 데 사용될 수 있다. 이 경우에 상기 라이브러리는 공통 프라이머 또는 더 큰 상동성 프로브, 예컨대 마우스 불변 영역 프로브에 의해 선별될 수 있다.

[0164] DNA, 전형적으로 플라스미드 DNA는, 예를 들어, 본원의 다른 곳에 제공된 재조합 DNA 기술에 관한 문헌에서 상세히 제시된 표준 공지 기술에 따라 제한 맵핑되고 및 서열분석되는, 당업계에 알려진 기술을 사용하여, 세포에서 단리될 수 있다.

[0165] 본 명세서에서 제공된 항-SEMA4D 결합 분자, 예를 들어, 항체 또는 그것의 항원-결합 단편, 변이체, 또는 유도체를 제공하기 위해 상기 단리된 유전 물질을 조작한 후, 결합 분자를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드가 원하는 양의 항-SEMA4D 결합 분자를 생산하기 위해 사용될 수 있는 하나 이상의 숙주세포에 도입하기 위해 발현 벡터에 삽입될 수 있다.

[0166] 항-SEMA4D 항체, 또는 그것의 단편, 유도체 또는 유사체, 예를 들어, 항체의 중쇄 또는 경쇄의 재조합 발현은 상기 항체를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리뉴클레오타이드들의 조합을 함유하는 하나 이상의 발현 벡터의 구성을 요구한다. 일단 상기 항체 분자 또는 항체의 중쇄 및 경쇄, 또는 그들의 부분(예를 들어, 중쇄 또는 경쇄 가변 영역을 함유)을 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리뉴클레오타이드들의 조합이 수득된 바 있어서, 상기 항체 분자의 생산을 위한 상기 벡터 또는 벡터들은 기술 당해 분야에서 잘 알려진 기술을 사용하는 재조합 DNA 기술에 의해 생산될 수 있다. 따라서, 상기 항체-인코딩 핵산 서열을 함유하는 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리뉴클레오타이드들의 조합을 발현함으로써 단백질을 제조하는 방법이 본 명세서에 기재되어 있다. 당해 분야의 숙련가에게 잘 알려진 방법들이 항체 코딩 서열 및 적절한 전사 및 번역 대조군 신호를 함유한 발현 벡터를 구성하는 데 사용될 수 있다. 이들 방법에는 예를 들어, 시험관내 재조합 DNA 기술, 합성 기술, 및 생체내 유전적 재조합이 포함된다. 본 개시내용은 따라서, 항-SEMA4D 결합 분자, 예를 들어, 본 명세서에서 제공된 항체 또는 그것의 중쇄 또는 경쇄, 또는 프로모터에 작동가능하게 연결된 중쇄 또는 경쇄 가변 영역을 인코딩하는 핵산 서열을 포함하는 복제가능 벡터를 제공한다. 그와 같은 벡터는 항체 중쇄 및/또는 경쇄의 불변 영역을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열(참고, 예를 들어, PCT 공개 WO 86/05807; PCT 공개 WO 89/01036; 및 미국 특허 제5,122,464호)을 포함할 수 있고, 상기 항체의 가변 영역은 전체 중쇄 또는 경쇄의 발현을 위한 그와 같은 벡터에 클로닝될 수 있다.

[0167] 용어 "벡터" 또는 "발현 벡터"는 본 개시내용에 따라 숙주세포에 원하는 유전자를 도입하고 발현하기 위한 비히클로 사용되는 벡터를 의미하기 위해 본원에서 사용된다. 당해 분야의 숙련가에게 알려진 바와 같이, 그와 같은 벡터는, 예를 들어, 플라스미드, 파지, 및 바이러스, 예를 들어, 레트로바이러스에서 쉽게 선택될 수 있다. 일반적으로, 본 개시내용과 양립가능한 벡터는 선택 마커, 원하는 유전자의 클로닝 촉진하는 적절한 제한 부위 및 진핵 또는 원핵 세포에 유입 및/또는 복제되는 능력을 포함한다.

[0168] 수많은 발현 벡터 시스템이 이용될 수 있다. 예를 들어, 벡터의 한 부류는 동물 바이러스 예컨대 소과 유두종 바이러스, 폴리오마 바이러스, 아데노바이러스, 백시니아 바이러스, 배콜로바이러스, 레트로바이러스(RSV, MMTV 또는 MOMLV) 또는 SV40 바이러스에서 유래된 DNA 요소를 활용한다. 다른 것들은 내부 리보솜 결합 부위(IRES)를 갖는 폴리시트론성 시스템의 사용을 수반한다. 추가로, DNA를 그것의 염색체에 통합시킨 세포는 형질감염된 숙주세포의 선택을 허용하는 하나 이상의 마커를 도입함으로써 선택될 수 있다. 상기 마커는 영양요구성 숙주에 대한 원영양, 살생물제 저항(예를 들어, 항생제) 또는 중금속 예컨대 구리에 대한 저항을 허용할 수 있다. 상기 선택가능한 마커 유전자는 공동전환(cotransformation)에 의해 동일한 세포로 발현 또는 도입되는 DNA 서열에 직접적으로 연결될 수 있다. mRNA의 최적의 합성을 위해 추가의 요소가 또한 필요할 수 있다. 이들 요소에는 전사 프로모터, 항상제, 및 종료 신호 뿐만 아니라, 신호 서열, 스플라이스 신호가 포함된다.

- [0169] 특정 양태에서, 상기 클로닝된 가변 영역 핵산 분자는 상기에 논의된 바와 같이 합성된 중쇄 및 경쇄 불변 영역 유전자와 함께 발현 벡터로 삽입될 수 있다. 물론, 진핵 세포에서 발현을 유도할 수 있는 임의의 발현 벡터가 사용될 수 있다. 적합한 벡터의 예에는, 비제한적으로 플라스미드 pcDNA3, pHCMV/Zeo, pCR3.1, pEF 1/His, pIND/GS, pRc/HCMV2, pSV40/Zeo2, pTRACER-HCMV, pUB6/V5-His, pVAX1, 및 pZeoSV2(Invitrogen, San Diego, Calif.에서 입수가능), 및 플라스미드 pCI(Promega, Madison, Wis.에서 입수 가능)가 포함된다. 일반적으로, 면역글로불린 중쇄 및 경쇄가 예를 들어, 로봇 시스템에 의해 수행될 수 있는 일상적인 실험과정인 경우, 적합하게 높은 수준으로 발현하는 것들에 대한 다수의 전환된 세포를 선별한다.
- [0170] 좀 더 일반적으로, 일단 본 명세서에서 제공된 항-SEMA4D 결합 분자, 예를 들어, 항체 또는 그것의 항원-결합 단편, 변이체, 또는 유도체의 단량체성 서브유닛을 인코딩하는 벡터 또는 DNA 서열이 제조된 바 있어서, 상기 발현 벡터는 적절한 숙주세포에 도입될 수 있다. 플라스미드의 숙주세포로의 도입은 당해 분야의 숙련자에게 잘 알려진 다양한 기술에 의해 달성될 수 있다. 이들에는, 비제한적으로, 형질감염(전기영동 및 전기천공 포함), 원형질 융합, 인산칼슘 침전, 외피보유한 DNA와의 세포 융합, 미세주입, 및 온전한 바이러스로의 감염이 포함된다. 참고, Ridgway (1988) "Mammalian Expression Vectors" in Vectors, ed. Rodriguez and Denhardt (Butterworths, Boston, Mass.), Chapter 24.2, pp. 470-472. 전형적으로, 숙주로의 플라스미드 도입은 전기천공을 통한다. 발현 구성체를 품은 숙주세포는 경쇄 및 중쇄의 생산에 적절한 조건 하에서 성장되어 중쇄 및/또는 경쇄 단백질 합성 및 어셈블리에 대해 분석될 수 있다. 예시적인 검정 기술에는 효소-결합 면역흡착 검정(ELISA), 방사선면역검정(RIA), 또는 형광-활성화된 세포 정렬기 분석(FACS), 면역조직화학 및 기타 동종의 것이 포함된다.
- [0171] 발현 벡터는 종래의 기술에 의해 숙주세포에 이전될 수 있고, 형질감염된 세포는 이어서 종래의 기술에 의해 배양되어 본 명세서에서 제공된 항-SEMA4D 결합 분자, 예를 들어, 항체 또는 그것의 항원-결합 단편, 변이체, 또는 유도체를 생산할 수 있다. 따라서, 본 개시내용에는 본 명세서에서 제공된 항체, 또는 프로모터, 예를 들어, 이중성 프로모터에 작동가능하게 연결된 그것의 중쇄 또는 경쇄를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리뉴클레오타이드들의 숙주세포 조합을 함유하는 숙주세포가 포함된다. 이중-사슬 항체의 발현에 대한 특정 구현예에서, 중쇄 및 경쇄 둘 다를 인코딩하는 벡터는 아래 상세히 기술된 바와 같이, 전체 결합 분자의 발현 및 어셈블리를 위한 숙주세포에서 공발현될 수 있다.
- [0172] 본 명세서에서 사용된 "숙주세포"는 재조합 DNA 기술을 사용하여 구성되고 적어도 하나의 이중성 폴리뉴클레오타이드를 인코딩하는 벡터를 품은 세포를 지칭한다. 재조합 숙주에서 항체의 단리를 위한 과정의 설명에서, 용어들 "세포" 및 "세포 배양"은 분명하게 달리 명시되지 않는 한, 항체의 원천을 의미하기 위해 상호교환적으로 사용된다. 환언하면, 상기 "세포"에서 폴리펩타이드의 회수는 스핀 다운된 전체의 세포에서, 또는 배지와 현탁된 세포를 모두 함유한 세포 배양에서 이루어지는 것을 의미할 수 있다.
- [0173] 본 명세서에서 제공된 항-SEMA4D 결합 분자, 예를 들어, 항체 또는 그것의 항원-결합 단편, 변이체, 또는 유도체를 발현하기 위해 다양한 숙주-발현 벡터 시스템이 이용될 수 있다. 그와 같은 숙주-발현 시스템은 관심대상의 코딩 서열이 생산되고, 후속으로 정제되는 비히클을 나타내고, 또한 적절한 뉴클레오타이드 코딩 서열로 전환 또는 형질감염된 경우, 본 명세서에서 제공된 항체 분자를 본래 위치에서 발현하는 세포를 나타낸다. 이들에는 비제한적으로, 미생물 예컨대 재조합 박테리오파아지 DNA로 전환된 박테리아(예를 들어, *E. 콜리*, *B. 서브틸리스*), 항체 코딩 서열을 함유하는 플라스미드 DNA 또는 코스미드 DNA 발현 벡터; 항체 코딩 서열을 함유하는 재조합 효모 발현 벡터로 전환된 효모(예를 들어, *사카로마이세스*, *피치야*); 항체 코딩 서열을 함유하는 재조합 바이러스 발현 벡터(예를 들어, 배큘로바이러스)로 감염된 곤충 세포 시스템; 재조합 바이러스 발현 벡터로 감염된 식물 세포 시스템(예를 들어, 꽃양배추 모자이크 바이러스, CaMV; 담배 모자이크 바이러스, TMV) 또는 항체 코딩 서열을 함유하는 재조합 플라스미드 발현 벡터(예를 들어, Ti 플라스미드)로 전환된 식물 세포 시스템; 또는 포유동물 세포의 계능에서 유래된 프로모터(예를 들어, 메탈로티오네인 프로모터) 또는 포유동물 바이러스에서 유래된 프로모터(예를 들어, 아데노바이러스 후기 프로모터; 백시니아 바이러스 7.5K 프로모터, 또는 인간 사이토메갈로바이러스 즉각적인 초기 프로모터)를 함유한 재조합 발현 구성체를 품은 포유동물 세포 시스템(예를 들어, COS, CHO, BLK, 293, 3T3 세포)이 포함된다. 특정 양태에서, 특히 전체의 재조합 항체 분자의 발현을 위한 박테리아 세포 예컨대 *에스케리치아 콜라이*, 또는 진핵 세포가 재조합 항체 분자의 발현을 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, 포유동물 세포 예컨대 차이니즈 햄스터 난소 세포(CHO)는 벡터와 공조하여 항체를 위한 효과적인 발현 시스템이다(Foecking 등, *Gene* 45:101 (1986); Cockett 등, *Bio/Technology* 8:2 (1990)).
- [0174] 단백질 발현을 위해 사용된 숙주 세포주는 포유동물 기원이다. 예시적인 숙주 세포주에는 비제한적으로, CHO(차이니즈 햄스터 난소), DG44 및 DUXB11(차이니즈 햄스터 난소 세포주, DHFR 마이너스), HeLa(인간 자궁경부

암종), CVI(원숭이 신장 세포주), COS(SV40 T 항원으로의 CVI의 유도체), VERY, BHK(어린 햄스터 신장), MDCK, 293, WI38, R1610(차이니스 햄스터 섬유모세포) BALBC/3T3(마우스 섬유모세포), HAK(햄스터 신장 세포주), SP2/O(마우스 골수종), P3.times.63-Ag3.653(마우스 골수종), BFA-1c1BPT(소과 내피 세포), RAJI(인간 림프구) 및 293(인간 신장)이 포함된다. 숙주 세포주는 상업적 서비스인 American Tissue Culture Collection에서 또는 공개된 문헌에서 전형적으로 이용가능하다.

[0175] 또한, 삽입된 서열의 발현을 조절하거나 또는 원하는 특이적 방식으로 유전자 산물을 변형 및 가공하는 숙주 세포주가 선택될 수 있다. 그와 같은 단백질 생성물의 변형(예를 들어, 당화) 및 가공(예를 들어, 절단)은 상기 단백질의 기능에 중요할 수 있다. 상이한 숙주세포 단백질 및 유전자 산물의 번역 후 공정 및 변형을 위한 특징적인 및 특이적 기전을 갖는다. 발현된 외래 단백질의 올바른 변형 및 가공을 확보하기 위해 적절한 세포주 또는 숙주 시스템이 선택될 수 있다. 이를 위해, 유전자 산물의 일차 전사체, 당화, 및 인산화의 적절한 공정을 위한 세포 기구를 소유하는 진핵생물 숙주 세포가 사용될 수 있다.

[0176] 재조합 단백질의 장기간의 고수율 생산을 위해, 안정한 발현이 사용될 수 있다. 예를 들어, 안정적으로 항체 분자를 발현하는 세포주가 조작될 수 있다. 바이러스 복제의 기원을 함유한 발현 벡터를 사용하기보다, 숙주세포가 적절한 발현 조절 요소(예를 들어, 프로모터, 향상제, 서열, 전사 종결자, 폴리아데닐화 부위, 등), 및 선별 마커에 의해 제어된 DNA로 전환될 수 있다. 외래 DNA의 도입 후, 조작된 세포는 풍부한 배지에서 1~2일 동안 성장하도록 방치될 수 있고, 그리고 나서, 선택적 배지로 교체된다. 재조합 플라스미드에서 선별 마커는 선택에 저항을 제공하고 세포가 안정적으로 플라스미드를 그것의 염색체에 통합하여 세포주로 순차적으로 클로닝 및 팽창될 수 있는 초점(foci)을 형성하도록 성장할 수 있게 한다. 이와 같은 방법은 안정적으로 항체 분자를 발현하는 세포주를 조작하는 데 유익하게 사용될 수 있다.

[0177] 항체 분자의 발현 수준은 벡터 증폭(검토를 위해, Bebbington and Hentschel (1987) "The Use of Vectors Based on Gene Amplification for the Expression of Cloned Genes in Mammalian Cells in DNA Cloning" (Academic Press, NY) Vol. 3 참고)에 의해 증가될 수 있다. 항체를 발현하는 벡터 시스템에서 마커가 증폭되는 경우, 숙주세포의 배양액에 존재하는 억제제의 수준의 증가가 마커 유전자의 복제 개수를 증가시킬 것이다. 증폭된 영역이 항체 유전자와 연관되기 때문에, 상기 항체의 생산이 또한 증가한다(Crouse 등, *Mol. Cell. Biol.* 3:257 (1983)).

[0178] 시험관내 생산은 규모확대를 허용하여 원하는 폴리펩타이드를 다량으로 제공한다. 조직 배양 조건 하에서 포유 동물 세포 배양을 위한 기술이 당해 기술에 공지되어 있고, 여기에는 균질한 현탁 배양, 예를 들어, 이송(airlift) 반응기 또는 연속적 교반기 반응기, 또는 고정된 또는 포획된 세포 배양, 예를 들어, 중공 섬유, 마이크로캡슐, 아가로스 마이크로비드 또는 세라믹 카트리지가 포함된다. 필요하다면, 및/또는 원한다면, 폴리펩타이드 용액은, 예를 들어, 본원에 기재된 합성 힌지 영역 폴리펩타이드의 생합성 후, HIC 크로마토그래피 단계 이전 또는 이후에, 관례적 크로마토그래피 방법, 예를 들어 겔 여과, 이온교환 크로마토그래피, DEAE-셀룰로오스에 대한 크로마토그래피 또는(면역-)친화 크로마토그래피에 의해 정제될 수 있다.

[0179] 본 명세서에서 제공된 항-SEMA4D 결합 분자, 예를 들어, 항체 또는 그것의 항원-결합 단편, 변이체, 또는 유도체를 인코딩하는 핵산 분자는 또한 비-포유동물 세포 예컨대 곤충, 박테리아 또는 효모 또는 식물 세포에서 발현될 수 있다. 쉽게 핵산을 취하는 박테리아는 엔테로박테리아세아에의 구성원, 예컨대 *에스케리치아 콜라이* 또는 *살모넬라*의 균주', 및 바실라세아에, 예컨대 *바실러스 수틸리스(subtilis)*', *페럼균*', *연쇄상균*, 및 *헤모필루스 인플루엔자*를 포함한다. 박테리아에서 발현된 경우, 상기 이중성 폴리펩타이드는 전형적으로 봉입체의 일부가 됨이 추가로 인정될 것이다. 봉입체는 단리되고, 정제된 다음 기능적 분자로 조립될 수 있다. 4가 형태의 항체를 원하는 경우, 서브유닛이 스스로 4가 항체로 조립될 수 있다(WO 02/096948A2).

[0180] 박테리아 시스템에서, 수많은 발현 벡터는 발현된 항체 분자에 대해 의도된 용법에 따라 유익하게 선택될 수 있다. 예를 들어, 많은 양의 그와 같은 단백질이 생산되어야 할 경우, 항체 분자의 약제학적 조성물의 생성을 위해, 쉽게 정제되는 융합 단백질 생성물의 높은 수준의 발현을 지시하는 벡터가 바람직할 수 있다.

[0181] 원핵생물과 더불어, 진핵 미생물 또한 사용될 수 있다. 수많은 균주 예를 들어, *피치아 패스토리스*가 통상적으로 이용 가능하지만, 진핵 미생물들 중 가장 통상적으로 사용되는 것은 제빵사의 효모인 *사카로마이세스 세레비시*이다.

[0182] 곤충 시스템에서, *오토그라파 칼리포르니카* 핵 다각체병 바이러스(AcNPV)가 전형적으로 외부 유전자를 발현하기 위한 벡터로 사용된다. 상기 바이러스는 *스포도프테라 프루지페르다* 세포에서 성장한다. 상기 항체 코딩 서열은

개별적으로 상기 바이러스의 비-필수적인 영역(예를 들어, 폴리헤드린 유전자)으로 클로닝되어, AcNPV 프로모터(예를 들어, 폴리헤드린 프로모터)의 통제 하에 배치될 수 있다.

[0183] 일단 본 명세서에서 제공된 항-SEMA4D 결합 분자, 예를 들어, 항체 또는 그것의 항원-결합 단편, 변이체, 또는 유도체가 재조합으로 발현된 바 있기에, 이것은 면역글로불린 분자의 정제를 위한 당해 분야에 알려진 임의의 방법, 예를 들어, 크로마토그래피(예를 들어, 이온 교환, 친화도, 특히 단백질 A에 대한 친화도 및 사이징 칼럼 크로마토그래피), 원심분리, 차별적인 용해도에 의해, 또는 단백질의 정제를 위한 임의의 다른 표준 기술에 의해 정제될 수 있다. 대안적으로, 본 명세서에서 제공된 항체의 친화도를 증가시키는 방법이 U.S. 특허 출원 공개 No. 2002 0123057 A1에 개시되었다.

[0184] 치료적 항-SEMA4D 항체를 사용한 치료 방법

[0185] 본 개시내용은 SEMA4D 병리학과 연관된 질환 또는 장애를 가진 대상체를 치료하기 위한 본 명세서에서 제공된 항-SEMA4D 결합 분자, 예를 들어, 항체 또는 그것의 항원-결합 단편, 변이체, 또는 유도체의 용도를 위한 방법을 제공한다.

[0186] 하기 논의는 예를 들어, SEMA4D(예를 들어, 인간, 마우스, 또는 인간 및 마우스 SEMA4D)와 특이적으로 결합할 수 있고 SEMA4D-중화 활성을 갖는, 본 명세서에서 제공된 항-SEMA4D 결합 분자, 예를 들어, 항체 또는 그것의 항원-결합 단편, 변이체, 또는 유도체를 사용한 다양한 질환 및 장애의 진단 방법 및 치료를 언급한다.

[0187] 일 양태에서, 본 개시내용은 인간 대상체에서 SEMA4D를 중화하는 방법을 제공하는데, 상기 방법은 본 명세서에서 제공된 항-SEMA4D 결합 분자, 예를 들어, 항체 또는 그것의 항원-결합 단편, 변이체, 또는 유도체를 인간 대상체에 투여하는 단계를 포함한다. 특정 양태에서, 상기 인간 대상체는 자가면역 질환 또는 장애, 염증성 질환 또는 장애, 암, 신경염증성 질환 또는 장애, 신경퇴행성 질환 또는 장애, 또는 이들의 임의의 조합에 대한 치료가 요구된다. 특정 양태에서, 상기 신경염증성 질환 또는 장애는 다발성 경화증이다. 특정 양태에서, 상기 신경퇴행성 질환 또는 장애는 뇌졸중, 알츠하이머병, 파킨슨병, 헌팅턴병, 다운 증후군, 운동실조증, 근위축 측삭 경화증(ALS), 전두측두 치매(FTD), HIV-관련 인지 손상, CNS 낭창, 온건한 인지 손상, 또는 이들의 조합이다. 특정 양태에서, 상기 자가면역 질환 또는 염증성 질환은 관절염, 예를 들어, 류마티스성 관절염, 죽상경화증(참고 예를 들어, PCT 공개 No. WO 2015/054628(전체가 본 명세서에 참고로 편입됨), 또는 골 퇴행성 질환 예컨대 골다공증(참고, 예를 들어, 미국 특허 제9,447,191호(전체가 본 명세서에 참고로 편입됨)이다.

[0188] 일 양태에서, 치료에는 본 명세서에서 제공된 항-SEMA4D 결합 분자, 예를 들어, 항체 또는 그것의 항원-결합 단편, 변이체, 또는 유도체의 대상체 적용 또는 투여, 또는 대상체에서 유래된 단리된 조직 또는 세포주에 적용 또는 투여가 포함된다(상기 대상체가 질환, 질환의 증상, 또는 질환에 대한 소인을 가진 경우). 또 다른 양태에서, 치료에는 또한 본 명세서에서 제공된 항-SEMA4D 결합 분자, 예를 들어, 항체 또는 그것의 항원-결합 단편, 변이체, 또는 유도체를 포함하는 억제학적 조성물의 대상체 또는, 질환, 질환의 증상, 또는 질환에 대한 소인이 있는 환자에서 유래된 단리된 조직 또는 세포주에 적용 또는 투여가 포함된다.

[0189] 일 양태에서, 본 명세서에서 제공된 항-SEMA4D 결합 분자, 예를 들어, 항체 또는 그것의 항원-결합 단편, 변이체, 또는 유도체는 암 치료, 예를 들어, 다양한 악성 및 비-악성 종양의 치료에 유용할 수 있다. "항종양 활성"이란 현존하는 신생물성(종양) 세포 또는 새로 형성된 신생물성 세포의 요법, 및/또는 파괴 중에 일어나는 악성 세포 증식 또는 축적 속도의 감소, 및 그로 인한 현존하는 종양의 성장률 감소 또는 종양의 감소, 및 그로 인한 요법 중에 종양의 전체적인 크기의 감소를 의미한다. 예를 들어, 본 명세서에서 제공된 항-SEMA4D 결합 분자, 예를 들어, 항체 또는 그것의 항원-결합 단편, 변이체, 또는 유도체를 사용한 요법은 생리적 반응, 예를 들어, 혈관신생의 감소 또는 CTL의 종양 미세환경으로의 이동을 유도할 수 있다. 본 명세서에서 제공된 항-SEMA4D 결합 분자, 예를 들어, 항체 또는 그것의 항원-결합 단편, 변이체, 또는 유도체를 사용하여 암을 치료하는 방법은 예를 들어, PCT 공개 No. WO 2014/209802[combo 번역요법](전체가 본 명세서에 참고로 편입됨)에서 찾아볼 수 있다.

[0190] 일 양태에서, 본 개시내용은 특히 암의 치료 또는 예방에 사용하기 위한, 전암성 질환 또는 병변에 사용하기 위한 약제로서 사용하기 위한, 본 명세서에서 제공된 항-SEMA4D 결합 분자, 예를 들어, 항체 또는 그것의 항원-결합 단편, 변이체, 또는 유도체를 제공한다.

[0191] 또 다른 양태에서, 본 명세서에서 제공된 항-SEMA4D 결합 분자, 예를 들어, 항체 또는 그것의 항원-결합 단편, 변이체, 또는 유도체는 자가면역 질환 또는 염증성 질환의 치료에 유용할 수 있다. 또 다른 양태에서, 본 명세서에서 제공된 항-SEMA4D 결합 분자, 예를 들어, 항체 또는 그것의 항원-결합 단편, 변이체, 또는 유도체는 신

경염증성 또는 신경퇴행성 질환의 치료에 유용할 수 있다. 신경염증성 또는 신경퇴행성 질환을 치료하기 위한 방법은 예를 들어, PCT 공개 No. WO 2013/055922 [BBB], PCT 공개 No. WO 2015/061330 [HD], 및 PCT 공개 No. WO 2013/170221 [신경발생/뇌졸중](이들의 내용은 전체가 본원에 참고로 편입됨)에서 찾을 수 있다.

[0192] 본원에 제공된 방법에 따라, 본 명세서에서 제공된 항-SEMA4D 결합 분자, 예를 들어, 항체 또는 그것의 항원-결합 단편, 변이체, 또는 유도체는 악성 인간 세포와 관련하여 양성 치료적 반응을 촉진하기 위해 사용될 수 있다. 암 치료와 관련하여 "양성 치료적 반응"이란 이들 결합 분자, 예를 들어, 항체 또는 그것의 단편의 항종양 활성과 연관된 질환의 개선, 및/또는 상기 질환과 연관된 증상의 개선을 의도한다. 즉, 항-증식성 효과, 추가 종양 결과물의 예방, 종양 크기의 감소, 종양 맥관구조의 축소, 암 세포 개수의 감소, 및/또는 상기 질환과 연관된 하나 이상의 증상의 감소가 관측될 수 있다. 따라서, 예를 들어, 질환의 개선은 완전한 반응으로 특징지을 수 있다. "완전한 반응"이란 임의의 이전에 비정상 방사선사진 연구, 골수, 및 뇌척수액(CSF)의 정규화로 임상적으로 검출가능한 질환의 부재를 의도한다. 대안적으로, 질환의 개선은 부분적인 반응으로 분류된다. "부분적인 반응"이란 신규한 병변의 부재 하에 모든 측정가능한 종양 부담(즉, 대상체에 존재하는 종양 세포의 개수)의 적어도 약 50%의 감소가 적어도 1개월 동안 지속되는 것을 뜻한다. 그와 같은 반응은 측정가능한 종양에만 적용 가능하다.

[0193] 본 명세서에서 제공된 항-SEMA4D 결합 분자, 예를 들어, 항체 또는 그것의 항원-결합 단편, 변이체, 또는 유도체는 또한 염증성 질환 및 면역계의 결핍 또는 장애의 치료에 사용될 수 있다. 염증성 질환은 염증 및 조직 파괴, 또는 이들의 조합을 특징으로 한다. "항-염증성 활성"이란 염증의 감소 또는 예방으로 의도된다. "염증성 질환"에는 면역 반응의 개시 이벤트 또는 표적이 비-자기-항원(들), 예컨대 동종항원, 이종(xeno)항원, 바이러스 항원, 박테리아 항원, 알려지지 않은 항원, 또는 알려지지만 면역-매개 과정이 포함된다. 일 구현예에서, 상기 염증성 질환은 말초 또는 중추신경계의 염증성 장애이다. 또 다른 구현예에서, 상기 염증성 질환은 관절의 염증성 장애이다.

[0194] 또한, 용어 "염증성 질환(들)"에는 "자가면역 질환(들)"이 포함된다. 본 명세서에서 사용된 용어 "자가면역"은 일반적으로 "자기" 항원"을 수반하는 염증성 면역-매개 과정을 아우르는 것으로 이해된다. 자가면역 질환에서, 자기-항원(들)은 숙주 면역 반응을 유발시킨다. 자가면역 질환은 자기-항원(자가항원)에 대항하는 부적절한 면역 반응(자기-내성의 정상적 상태와의 편차임)에서 초래될 수 있다. 일반적으로, 세포독성 분자로 작용하거나 또는 면역 복합체로 작용하는 항체(특히, 비독점적으로, IgG 항체)는 다양한 자가면역 질환(이들 중 많은 경우 쇠약하게 하거나 또는 생명을 위협함)의 주요한 매개체이다.

[0195] 일 구현예에서, 본 명세서에서 제공된 항-SEMA4D 결합 분자, 예를 들어, 항체 또는 그것의 항원-결합 단편, 변이체, 또는 유도체는 다발성 경화증(MS)을 치료하기 위해 사용될 수 있다. 파종성 경화증 또는 뇌척수염 파종성으로도 알려진 MS는 면역계가 중추신경계를 공격하여 탈수초화를 초래하는 자가면역 상태이다. 다발성 경화증은 신경계에 형성되는 흉터(경화증, 또한 일명 플라크 또는 병변)를 지칭한다. MS 병변은 통상적으로 소뇌 심실, 뇌간, 기저핵 및 척수 및 시신경에 인접한 백질 영역을 수반한다. MS는 수초 외피를 형성하고 유지시키는 책임이 있는 세포인 희소돌기교세포의 파괴를 초래한다. MS는 수초의 얇아짐 또는 완전한 소실 및, 질환이 진전되면서, 축삭돌기의 절개를 초래한다.

[0196] 신경적 증상은 MS에 따라 다양할 수 있고, 상기 질환은 종종 물리적 및 인지 장애로 진전된다. MS는 몇 개의 형태를 갖는데, 신규한 증상이 별개의 공격(재발 형태)으로 나타나거나 또는 시간이 경과되면서 느리게 축적된다(진행성 형태). 공격 사이에, 증상이 완전히 사라질 수 있으나, 질환이 진전되면서 영구적 신경적 손상이 종종 초래된다.

[0197] 본 명세서에서 제공된 항-SEMA4D 결합 분자, 예를 들어, 항체 또는 그것의 항원-결합 단편, 변이체, 또는 유도체를 사용한 SEMA4D의 중화가 몇 개의 상이한 기전을 통해 MS의 중증도를 감소시키기 위해 사용될 수 있는데, 예를 들어, 항-SEMA4D 단클론성 항체가 SEMA4D에 의한 면역 성숙 및 활성화를 차단하여 CNS 항원에 대한 이차 면역 반응을 감소시킴으로써 재발율을 소시킬 수 있고, CNS에서 희소돌기교세포의 세포자멸사를 매개하는 가용성 SEMA4D의 효과를 차단할 수 있는 항-SEMA4D 단클론성 항체가 탈수초화를 감소시킴으로써 질환 중증도를 감소시킬 수 있다.

[0198] 일 양태에서, 본 명세서에서 제공된 항-SEMA4D 결합 분자, 예를 들어, 항체 또는 그것의 항원-결합 단편, 변이체, 또는 유도체는 관절염을 치료하기 위해 사용될 수 있다. 관절염은 관절의 염증성 질환으로, 면역계가 관절을 공격하는 자가면역 상태에 의해 야기될 수 있다. 특정 구현예에서, 상기 관절염은 하기에서 선택된다: 골관절염, 통풍 관절염, 강직 척추염, 건선성 관절염, 반응 관절염, 류마티스성 관절염, 유년 발병형 류마티스성 관

절염, 감염성 관절염, 염증성 관절염, 패혈성 관절염, 퇴행성 관절염, 단절성 관절염, 및 라임 관절염으로 이루어진 군. 일 구현예에서, 상기 관절염은 류마티스성 관절염(RA)이다.

[0199] 본 개시내용에는 대상체에게 본 명세서에서 제공된 항-SEMA4D 결합 분자를 투여함으로써 관절염을 치료 또는 예방하는 방법이 포함된다. 본 명세서에서 제공된 방법은 관절염, 예를 들어, 류마티스성 관절염과 연관된 통증, 팽윤, 또는 강성도를 감소시킬 수 있다. 본 개시내용은 또한 관절 성능, 기능, 및 건강을 개선하기 위한 방법에 관한 것이다. 본 개시내용의 일부 구현예에서, 치료는 관절염 중증도 점수의 감소, 관절염 중증도/곡선하 면적의 감소, 관절염(염증, 판누스, 연골 손상, 및 뼈 손상)과 연관된 조직병리 파라미터의 감소, 혈청 아라키돈산 수준의 감소, 또는 항-콜라겐 항체의 감소를 초래한다. 특정 구현예에서, 유익한 또는 원하는 임상 결과에는, 비제한적으로, 관절염과 연관된 증상의 완화; 관절염의 예방; 관절염의 개시의 지연; 모집단에서 관절염의 발병률 감소; 관절염과 연관된 질환의 정도의 약화; 관절염과 연관된 상기 질병, 장애 또는 질환의 상태의 안정화(예를 들어, 악화되지 않음); 관절염과 연관된 질병, 장애 또는 질환의 개시의 지연 또는 둔화; 질병, 장애 또는 질환 상태의 개선, 관절염과 연관된 질병, 장애 또는 질환의 차도(부분적이든 또는 전체적이든)(검출가능한 경우 또는 검출불가능한 경우); 또는 관절염과 연관된 질병 장애 또는 질환의 향상 또는 개선이 포함된다.

[0200] 본원에 제공된 방법은 관절염을 가진 개체 또는 관절염이 생길 위험이 있는 개체를 치료하기 위해 사용될 수 있다. 따라서, 일부 구현예에서 본 개시내용은 정상적 관절, 경계선 관절염 관절, 또는 심한 관절염 관절을 가진 대상체를 치료하는 방법을 제공하되, 상기 방법은 본 명세서에서 제공된 항-SEMA4D 결합 분자를 본 명세서에서 기재된 바와 같이 대상체에 투여하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 본원에 제공된 방법은 상기 대상체의 나머지 삶 동안 만성 관절염을 치료하기 위해 사용될 수 있다.

[0201] 본 명세서에서 제공된 방법에 따르면, 본 명세서에서 제공된 항-SEMA4D 결합 분자, 예를 들어, 항체 또는 그것의 항원-결합 단편, 변이체, 또는 유도체는 자가면역 질환 및/또는 염증성 질환의 치료 또는 예방과 관련하여 양성 치료적 반응을 촉진하기 위해 사용될 수 있다. 자가면역 질환 및/또는 염증성 질환과 관련하여 "양성 치료적 반응"이란 이들 항체의 항-염증성 활성화, 항-혈관신생 활성화, 항-세포자멸사 활성화 등의 회합으로 질환의 개선, 및/또는 상기 질환과 연관된 증상의 개선이 의도된다. 즉, 항-증식성 효과, SEMA4D- 발현 세포의 추가 증식의 예방, 염증 반응의 감소, 예컨대 비제한적으로 염증성 사이토카인, 접착 분자, 프로테아제, 면역글로불린(SEMA4D를 품은 세포가 B 세포인 경우에)의 분비 감소, 이들의 조합, 및 동종의 것, 항-염증성 단백질의 증가된 생산, 자가반응성 세포의 개수의 감소, 면역 관용의 증가, 자가반응성 세포 생존의 억제, 세포자멸사의 감소, 내피 세포 이동의 감소, 자발적인 단핵구 이동의 증가, sSEMA4D 또는 SEMA4D-발현 세포의 자극에 의해 매개된 하나 이상의 증상 감소 및/또는 축소가 관측될 수 있다. 그와 같은 양성 치료적 반응은 투여 경로에 제한되지 않고, 공여체, 공여체 조직(예컨대 예를 들어 장기 관류), 숙주, 이들의 임의의 조합, 및 기타 동종의 것에 투여를 포함할 수 있다.

[0202] 임상 반응은 스크리닝 기술, 예컨대 자기 공명 영상(MRI) 스캔, x-방사선사진 이미지형성, 계산된 토모그래픽(CT) 스캔, 유세포측정 또는 형광-활성화된 세포 정렬기(FACS) 분석, 조직학, 총(gross) 병리학, 및 혈액 화학, 예컨대 비제한적으로 ELISA, RIA, 크로마토그래피, 및 기타 동종의 것에 의해 검출가능한 변화를 사용하여 평가될 수 있다. 이들 양성 치료적 반응과 더불어, 본 명세서에서 제공된 항-SEMA4D 결합 분자, 예를 들어, 항체 또는 그것의 항원-결합 단편, 변이체, 또는 유도체로 의 요법을 받은 대상체는 상기 질환과 연관된 증상의 개선이라는 유익한 효과를 경험할 수 있다.

[0203] 본 명세서에서 제공된 항-SEMA4D 결합 분자, 예를 들어, 항체 또는 그것의 항원-결합 단편, 변이체, 또는 유도체는, 추가의 암 요법이 항-SEMA4D 결합 분자, 예를 들어, 항체 또는 그것의 항원 결합 단편 요법 이전에, 그것과 동시에, 또는 그것 이후에 투여되는 경우, 적어도 다른 하나의 암 요법, 예컨대, 비제한적으로, 수술 또는 수술 과정; 면역 조절 요법, 방사선 요법; 화학요법(선택적으로 자가 골수 이식, 또는 다른 암 요법과 병행하여)과 함께 사용될 수 있다. 따라서, 상기 조합된 요법이 화학요법, 방사선 요법, 다른 항암 항체 요법, 소분자-기반 암 요법, 또는 백신/면역요법-기반 암 요법과 같이, 또 다른 치료제의 투여와 조합하여 본 명세서에서 제공된 항-SEMA4D 결합 분자, 예를 들어, 항체 또는 그것의 항원 결합 단편을 투여하는 것을 포함하는 경우, 본 명세서에서 제공된 방법은 별개의 제형 또는 단일 약제학적 제형, 또는/및 어떤 순서로든 연속적인 투여를 사용하는 공동 투여를 아우른다.

[0204] 본 발명에서 제공된 항-SEMA4D 결합 분자, 예를 들어, 항체 또는 그것의 항원-결합 단편, 변이체, 또는 유도체는, 자가면역 및 염증성 질환을 위한 임의의 알려진 요법, 예컨대 자가면역 및 염증성 질환의 치료에 유용한 것으로 알려지고, 과거부터 지금까지 사용되고 있는 임의의 제제 또는 제제들의 조합과 함께 사용될 수 있다. 따

라서, 상기 조합된 요법이 또 다른 치료제의 투여와 조합하여 항-SEMA4D 결합 분자의 투여를 포함하는 경우, 본원에 제공된 방법은 별개의 제형 또는 단일 약제학적 제형, 및 어떤 순서로든 연속적인 투여를 사용하는 공동 투여를 아우른다. 일부 구현예에서, 본원에 기재된 항-SEMA4D 항체는 면역억제성 약물 또는 항-염증성 약물과 조합하여 투여되되, 상기 항체 및 치료제(들)은 순차적으로, 어떤 순서로든, 또는 동시에(즉, 동반하여 또는 동일한 기간 내에) 투여될 수 있다.

[0205] 특정 양태에서, 본 명세서에서 제공된 항-SEMA4D 결합 분자, 예를 들어, 항체 또는 그것의 항원-결합 단편, 변이체, 또는 그것의 유도체는 류마티스성 관절염을 치료 및/또는 예방하기 위해 단독으로 또는 면역억제성 약물과 조합하여 사용될 수 있다. 상기에 논의된 바와 같이, 치료 유효성은 임의의 수단을 사용하여 평가될 수 있는데, 여기에는 비제한적으로, American College of Rheumatology 기준, European League of Rheumatism 기준, 또는 임의의 다른 기준에 의해 정의된 임상 반응에 의해 측정된 유효성이 포함된다. 예를 들어, Felson 등, *Arthritis. Rheum.* 38:727-35 (1995) and van Gestel 등, *Arthritis Rheum.* 39:34-40 (1996)을 참고할 수 있다.

[0206] 또 특정 다른 양태에서, 본 명세서에서 제공된 항-SEMA4D 결합 분자, 예를 들어, 항체 또는 그것의 항원-결합 단편, 변이체, 또는 유도체는 다발성 경화증을 치료 및/또는 예방하기 위해 단독으로 또는 면역억제성 약물과 조합하여 사용될 수 있다.

[0207] 본 개시내용의 추가 양태는 예를 들어, 주어진 치료 요법의 효능을 측정하기 위해, 임상 시험 절차의 일부로서 조직에서 단백질 수준의 진단 모니터링을 위한, 본 명세서에서 제공된 항-SEMA4D 결합 분자, 예를 들어, 항체 또는 그것의 항원-결합 단편, 변이체, 또는 유도체의 용도이다. 예를 들어, 상기 항체를 검출가능한 물질에 커플링함으로써 검출이 촉진될 수 있다. 검출가능한 물질의 예에는 다양한 효소, 보철 작용기, 형광 물질, 발광성 물질, 생물발광 물질, 및 방사선헌성 물질이 포함된다. 적합한 효소의 예에는 홀스래디쉬 페록시다아제, 알칼리성 포스파타제, [3- 갈락토시다아제, 또는 아세틸콜린에스테라제가 포함되고; 적합한 보철 작용기 복합체의 예에는 스트렙타비딘/바이오틴 및 아비딘/바이오틴이 포함되고; 적합한 형광 물질의 예에는 엠펠리페론, 플루오레세인, 플루오레세인 이소티오시아네이트, 로다민, 디클로로트리아지닐아민 플루오레세인, 단실 염화물 또는 파이코에리트린이 포함되고; 발광성 물질의 예에는 루미놀이 포함되고; 생물발광 물질의 예에는 루시페라제, 루시페린, 및 에퀴린이 포함되고; 및 적합한 방사선헌성 물질의 예에는 ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S , 또는 ^3H 가 포함된다.

[0208] VIII 약제학적 조성물 및 투여 방법

[0209] 본 명세서에서 제공된 항-SEMA4D 결합 분자, 예를 들어, 항체 또는 그것의 항원-결합 단편, 변이체, 또는 유도체를 제조하고, 그것이 필요한 대상체에 투여하는 방법은 당해 분야의 숙련가에게 잘 알려져 있고, 또는 당해 분야의 숙련가에 의해 쉽게 결정된다. 항-SEMA4D 결합 분자의 투여 경로는 예를 들어, 경구, 비경구, 흡입에 의해 또는 국소일 수 있다. 본 명세서에서 사용된 용어 비경구에는 예를 들어, 정맥내, 동맥내, 복강내, 근육내, 피하, 직장, 또는 질 투여가 포함된다. 투여의 모든 제형이 본 개시내용의 범위에 속하는 것으로 고려되는 한편, 투여를 위한 제형의 예에는 주사용, 특히 정맥내 또는 동맥내 주사 또는 적하(drip)용 용액이 포함된다. 일반적으로, 주사에 적합한 약제학적 조성물은 완충액(예를 들어 아세테이트, 포스페이트 또는 시트레이트 완충액), 계면활성제(예를 들어 폴리소르베이트), 선택적으로 안정화제 제제(예를 들어 인간 알부민) 등을 포함할 수 있다. 그러나, 본원의 교시와 양립가능한 다른 방법에서, 본 명세서에서 제공된 항-SEMA4D 결합 분자, 예를 들어, 항체 또는 그것의 항원-결합 단편, 변이체, 또는 유도체는 부정적인 질병, 예를 들어, 고형 종양의 부위에 직접적으로 전달됨으로써, 이환 조직의 치료제 노출을 증가시킨다.

[0210] 본 명세서에서 제공된 항-SEMA4D 결합 분자, 예를 들어, 항체 또는 그것의 항원-결합 단편, 변이체, 또는 유도체는 SEMA4D-매개 질환, 예컨대 암, 자가면역 질환, 염증성 질환(예컨대 중추신경계(CNS) 및 말초 신경계(PNS) 염증성 질환), 신경퇴행성 질환, 및 침습성 혈관신생의 생체내 치료를 위해 약제학적 유효량으로 투여될 수 있다. 이와 관련하여, 개시된 결합 분자가 활성제의 투여를 촉진하고 활성제의 안정성을 촉진하도록 제형화될 수 있음이 인정될 것이다. 특정 양태에서, 본 명세서에서 제공된 약제학적 조성물은 약제학적으로 허용가능한, 무독성, 멸균 담체, 예컨대 생리적 염수, 무독성 완충액, 보존제 및 기타 동종의 것을 포함할 수 있다. 본원의 목적을 위한, 본 명세서에서 제공된 항-SEMA4D 결합 분자, 예를 들어, 항체 또는 그것의 항원-결합 단편, 변이체, 또는 유도체(접합된 또는 비접합된)의 약제학적 유효량은 표적에 효과적인 결합을 달성하고, 이점, 예를 들어, 질환 또는 장애의 증상을 개선하거나 또는 물질 또는 세포를 검출하는 것을 달성하기에 충분한 양을 의미한다.

[0211] 본 개시내용에 사용된 약제학적 조성물은 약제학적으로 허용가능한 담체, 예컨대, 예를 들어, 이온 교환기, 알루미늄, 알루미늄 스테아레이트, 레시틴, 혈청 단백질, 예컨대 인간 혈청 알부민, 완충액 물질 예컨대 포스페이

트, 글리신, 소르브산, 칼륨 소르베이트, 포화된 야채 지방산의 부분적인 글리세라이드 혼합물, 물, 염 또는 전해질, 예컨대 프로타민 설페이트, 디나트륨 수소 포스페이트, 칼륨 수소 포스페이트, 염화나트륨, 아연 염, 콜로이드 실리카, 마그네슘 트리실리케이트, 폴리비닐 피롤리돈, 셀룰로오스계 물질, 폴리에틸렌 글리콜, 나트륨 카복시메틸셀룰로스, 폴리아크릴레이트, 왁스, 폴리에틸렌-폴리옥시프로필렌-블록 중합체, 폴리에틸렌 글리콜, 및 양모 지방을 포함한다.

[0212] 비경구 투여를 위한 제제에는, 비제한적으로, 멸균 수성 또는 비-수용액, 현탁액, 및 에멀션이 포함된다. 비-수성 용매의 예는 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 식물성 오일 예컨대 올리브 오일, 및 주입가능 유기 에스테르, 예컨대 에틸 올레이트이다. 수성 담체에는, 예를 들어, 물, 알코올성/수용액, 에멀션 또는 현탁액, 예컨대 염수 및 완충된 배지가 포함된다. 약제학적으로 허용가능한 담체에는, 비제한적으로, 0.01~0.1M, 예를 들어, 0.05M 인산염 버퍼 또는 0.8% 염수가 포함된다. 다른 일반적인 비경구 비히클에는 인산나트륨 용액, 링거 텍스트로스, 텍스트로스 및 염화나트륨, 락테이트화된 링거, 또는 고정유가 포함된다. 정맥내 비히클에는 유체 및 영양소 보충물, 전해질 보충물, 예컨대 링거 텍스트로스 기반의 것들, 및 기타 동종의 것이 포함된다. 또한 보존제 및 다른 첨가제가 예컨대, 예를 들어, 항미생물제, 산화방지제, 킬레이트제, 및 불활성 가스 및 기타 동종의 것이 존재할 수 있다.

[0213] 특정 양태에서, 주입가능 용도에 적합한 약제학적 조성물에는 멸균 수용액(수용성인 경우), 또는 멸균 주입가능 용액 또는 분산물의 즉석 제조를 위한 분산물 및 멸균 분말이 포함된다. 그와 같은 경우에, 상기 조성물은 멸균이어야 하고, 손쉬운 주사성(syringability)이 존재하도록 유체여야 한다. 제조 및 저장의 조건 하에서 안정적이어야 하고, 미생물, 예컨대 박테리아 및 진균류의 오염 작용에 대항하여 보존될 수 있어야 한다. 상기 담체는 예를 들어, 물, 에탄올, 폴리올(예를 들어, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 및 액체 폴리에틸렌 글리콜, 및 기타 동종의 것), 및 적합한 이들의 혼합물을 함유하는 용매 또는 분산매일 수 있다. 상기 적절한 유체성은, 예를 들어, 예컨대 레시틴과 같은 코팅제의 사용에 의해, 분산물의 경우 요구된 입자 크기의 유지에 의해, 그리고 계면활성제의 사용에 의해, 유지될 수 있다. 본원에 개시된 치료 방법에 사용하기 위한 적합한 제형이 Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Co.) 16th ed. (1980)에 기재되어 있다.

[0214] 미생물의 작용의 예방은 다양한 항균 및 항진균제, 예를 들어, 파라벤, 클로로부탄올, 페놀, 아스코르브산, 티메로살 및 기타 동종의 것에 의해 달성될 수 있다. 특정 양태에서 등장제, 예를 들어, 당, 폴리알코올, 예컨대 만니톨, 소르비톨, 또는 염화나트륨이 상기 조성물에 포함될 수 있다. 주입가능 조성물의 장기적인 흡수는 상기 조성물에 흡수를 지연시키는 제제, 예를 들어, 알루미늄 모노스테아레이트 및 젤라틴을 포함시킴으로써 초래될 수 있다.

[0215] 임의의 경우에, 멸균 주입가능 용액은 본원에 열거된 성분 하나 또는 성분들의 조합과 함께, 적절한 용매에 활성 화합물(예를 들어, 본 명세서에서 제공된 항-SEMA4D 결합 분자, 예를 들어, 항체 또는 그것의 항원-결합 단편, 변이체, 또는 유도체 단독으로, 또는 다른 활성제와 조합하여)의 요구된 양을 통합시키고, 이어서 여과 멸균을 시행함으로써 제조될 수 있다. 일반적으로, 분산물은 멸균 비히클에 상기 활성 화합물을 통합시킴으로써 제조되고, 이것은 염기성 분산매 및 앞서 열거된 것들에서 선택된 요구된 다른 성분을 함유한다. 멸균 주입가능 용액의 제조를 위한 멸균 분말의 경우, 제조 방법에는 진공 건조 및 냉동-건조가 포함될 수 있는데, 이들은 활성 성분과 함께 이전에 멸균-여과된 이것의 용액에서 유래된 임의의 추가의 원하는 성분을 갖는 분말을 생성한다. 주사용 제제는 가공되어 용기, 예컨대 앰플, 백, 병, 주사기 또는 바이알에 채워지고, 당해 분야에서 알려진 방법에 따라 무균성 조건 하에서 밀봉된다. 또한, 상기 제제는 키트의 형태, 예컨대 미국 특허 출원 시리즈 번호 09/259,337에 기재된 것의 형태로 포장 및 판매될 수 있다. 그와 같은 제조 물품은 연관된 조성물이 질환 또는 장애를 앓고 있거나 또는 그것에 취약한 대상체를 치료하는 데 유용함을 나타내는 라벨 또는 포장 삽입물을 가질 수 있다.

[0216] 비경구 제형은 단일 볼러스 용량, 주입 또는 장입 볼러스 용량, 이어서 유지 용량일 수 있다. 이들 조성물은 구체적인 고정 간격 또는 가변성 간격, 예를 들어, 1일 1회, 또는 "필요에 따라" 투여될 수 있다.

[0217] 본 개시내용에 의해 제공된 특정 약제학적 조성물은 허용가능한 투약 형태, 예컨대, 예를 들어, 캡슐, 정제, 수성 현탁액 또는 용액으로 경구 투여될 수 있다. 특정 약제학적 조성물은 또한 비강 에어로졸 또는 흡입에 의해 투여될 수 있다. 그와 같은 조성물은 염수 중 용액으로서, 벤질 알코올 또는 다른 적합한 보존제, 생체이용률을 증진하기 위한 흡수 촉진제, 및/또는 기타 종래의 가용화제 또는 분산제를 활용하여 제조될 수 있다.

[0218] 단일 제형을 생산하기 위해 담체 물질과 조합될 수 있는, 본 명세서에서 제공된 항-SEMA4D 결합 분자, 예를 들어, 항체 또는 그것의 항원-결합 단편, 변이체, 또는 유도체의 양은 치료대상 숙주 및 특정한 투여 방식에 따라

달라질 것이다. 본 조성물은 단일 용량, 다중 용량 또는 주입을 위해 확립된 기간에 걸쳐, 투입될 수 있다. 투약 요법은 또한 최적의 원하는 반응(예를 들어, 치료적 또는 예방적 반응)을 제공하기 위해 조정될 수 있다.

[0219] 본 명세서에서 제공된 항-SEMA4D 결합 분자, 예를 들어, 항체 또는 그것의 항원-결합 단편, 변이체, 또는 유도체는 상기 언급된 치료 방법에 따라 치료적 효과를 생성하기에 충분한 양으로 인간 또는 다른 동물에 투여될 수 있다. 본 명세서에서 제공된 항-SEMA4D 결합 분자, 예를 들어, 항체 또는 그것의 항원-결합 단편, 변이체, 또는 유도체는, 알려진 기술에 따라 상기 항체를 종래의 약제학적으로 허용가능한 담체 또는 희석제와 배합함으로써 제조되는 종래의 투약 형태로, 인간 또는 다른 동물에 투여될 수 있다. 약제학적으로 허용가능한 담체 또는 희석제의 형태 및 특성은 그것이 조합된 활성 성분의 양, 투여 경로 및 기타 잘-알려진 변수에 의해 정해진다는 것이 당해 분야의 숙련가에 의해 인식될 것이다.

[0220] "치료적으로 효과적인 용량 또는 양" 또는 "유효량"은 투여되었을 때, 치료 대상의 질환을 갖고 있는 환자와 관련하여 약 양성 치료적 반응을 초래하는, 본 명세서에서 제공된 항-SEMA4D 결합 분자, 예를 들어, 항체 또는 그것의 항원-결합 단편, 변이체, 또는 유도체의 양을 의도한다.

[0221] SEMA4D-매개 질환 예컨대 암; 자가면역 질환, 예를 들어, 관절염, 다발성 경화증, 염증성 질환(중추신경계(CNS) 및 말초 신경계(PNS) 염증성 질환 포함); 신경퇴행성 질환; 및 침습성 혈관신생의 치료를 위한 본 명세서에서 제공된 조성물의 치료적으로 효과적인 용량은, 많은 상이한 인자, 예컨대 투여 수단, 표적 부위, 생리적 환자의 상태, 환자가 인간인지 동물인지 여부, 다른 약물이 투여되었는지 여부, 및 치료가 예방적 또는 치료적인지 여부에 따라 달라진다. 일반적으로, 환자는 인간이나, 형질전환 포유동물을 비롯한 비-인간 포유동물도 치료될 수 있다. 치료 투약량은 안전성 및 효능을 최적화하기 위해 당해 분야의 숙련가에게 알려진 일상적인 방법을 사용하여 결정될 수 있다.

[0222] 본 명세서에서 제공된 항-SEMA4D 결합 분자, 예를 들어, 항체 또는 그것의 항원-결합 단편, 변이체, 또는 유도체의 투여될 양은 과도한 실험과정 없이 당해 분야의 숙련가에 의해 쉽게 결정된다. 항-SEMA4D 결합 분자의 투여 방식 및 각각의 양에 영향을 미치는 인자에는 비제한적으로, 질환의 중증도, 병력 및 요법을 받는 개체의 연령, 높이, 중량, 건강, 및 신체 조건이 포함된다. 이와 유사하게, 항-SEMA4D 결합 분자의 투여될 양은 투여 방식과 상기 대상체가 상기 제제의 단일 용량 또는 다중 용량을 받을지 여부에 따라 달라진다.

[0223] 본 개시내용은 또한 자가면역 질환 및/또는 염증성 질환, 예컨대, 예를 들어, 관절염, 다발성 경화증, CNS 및 PNS 염증성 질환, 신경퇴행성 질환, 또는 암을 치료하기 위한 약제의 제조 시, 항-SEMA4D 결합 분자, 예를 들어, 항체 또는 그것의 항원-결합 단편, 변이체, 또는 유도체의 사용을 허용한다.

[0224] 본 개시내용은 또한 자가면역 질환 및/또는 염증성 질환, 예컨대, 예를 들어, 관절염, 다발성 경화증, CNS 및 PNS 염증성 질환, 신경퇴행성 질환, 또는 암을 치료하기 위한 약제의 제조 시, 항-SEMA4D 결합 분자, 예를 들어, 본 개시내용의 항체, 또는 그것의 항원-결합 단편, 변이체, 또는 유도체의 사용을 허용하되, 상기 약제는 적어도 하나의 다른 요법으로 사전치료 받은 대상체에 사용된다. "사전 치료된" 또는 "사전 치료"는 상기 대상체가 상기 항-SEMA4D 결합 분자를 포함하는 약제를 투여받기 전에 하나 이상의 다른 요법을 투여 받았음(예를 들어, 적어도 하나의 다른 암 요법으로 치료 받았음)을 의도한다. "사전 치료된" 또는 "사전 치료"에는, 본 명세서에서 제공된 항-SEMA4D 결합 분자, 예를 들어, 항체 또는 그것의 항원-결합 단편, 변이체, 또는 유도체를 포함하는 약제로의 치료 개시 이전에, 2 년 내, 18 개월 이내, 1 년 이내, 6 개월 이내, 2 개월 이내, 6 주 이내, 1 개월 이내, 4 주 이내, 3 주 이내, 2 주 이내, 1 주 이내, 6 일 이내, 5 일 이내, 4 일 이내, 3 일 이내, 2 일 이내, 또는 심지어 1 일 이내에 적어도 하나의 다른 요법으로 치료받았던 대상체가 포함된다. 상기 대상체가 사전 요법 또는 요법들로 사전 치료 받은 반응균일 필요는 없다. 따라서, 상기 항-SEMA4D 결합 분자를 포함하는 약제를 받은 상기 대상체는 사전 요법을 사용한 사전 치료에, 또는 사전 치료가 다중 요법을 포함하는 경우 사전 요법들 중 하나 이상에, 반응 했을 수도 있고, 또는 반응하지 못했을 수도 있다(예를 들어, 상기 암이 난치병이었음). 대상체가 본 명세서에서 제공된 항-SEMA4D 결합 분자, 예를 들어, 항체 또는 그것의 항원-결합 단편, 변이체, 또는 유도체를 포함하는 약제를 받기 전에 받았을 사전 치료에 쓰인 다른 암 요법의 예에는, 비제한적으로, 수술; 방사선 요법; 화학요법(선택적으로 자가 골수 이식과 조합하여); 다른 항암 단클론성 항체 요법; 소분자-기반 암 요법; 백신/면역요법-기반 암 요법; 스테로이드 요법; 다른 암 요법; 또는 이들의 임의의 조합이 포함된다.

[0225] IX. 진단

[0226] 본 개시내용은 추가로 SEMA4D-매개 질환, 예컨대 특정 유형의 암, 자가면역 질환, 염증성 질환 예컨대, 예를 들어

어, 관절염, 다발성 경화증, 중추신경계(CNS) 및 말초 신경계(PNS) 염증성 질환, 신경퇴행성 질환, 및 침습성 혈관신생의 진단 중에 유용한 진단 방법을 제공하는데, 이와 같은 진단 방법은 개체의 조직 또는 다른 세포 또는 체액에서 SEMA4D 단백질 또는 전사체의 발현 수준을 측정하는 단계 및 측정된 발현 수준과 정상 조직 또는 체액에서의 표준 SEMA4D 발현 수준을 비교하는 단계를 수반하고, 그것에 의하여 상기 표준과 비교하여 상기 발현 수준의 증가는 장애를 나타낸다.

[0227] 본 명세서에서 제공된 항-SEMA4D 결합 분자, 예를 들어, 항체 또는 그것의 항원-결합 단편, 변이체, 또는 유도체가 당해 분야의 숙련가에게 알려진 고전적 면역조직학적 방법(예를 들어, Jalkanen, 등, *J. Cell. Biol.* 101:976-985 (1985); Jalkanen 등, *J. Cell Biol.* 105:3087-3096 (1987) 참고)을 사용하여 생물학적 샘플에서 SEMA4D 단백질 수준을 검정하기 위해 사용될 수 있다. SEMA4D 단백질 발현을 검출하는 데 유용한 다른 항체-기반 방법에는 면역검정, 예컨대, 효소-연결 면역흡착 검정(ELISA), 면역침강, 또는 웨스턴 블랏팅이 포함된다. 적합한 검정은 본원의 다른 곳에 더 상세히 기재되어 있다.

[0228] "SEMA4D 폴리펩타이드의 발현수준을 검정"이란 직접적으로(예를 들어, 절대적인 단백질 수준을 측정 또는 추정함으로써) 또는 상대적으로(예를 들어, 제2 생물학적 샘플에서 질환-연관된 폴리펩타이드 수준을 비교함으로써) 제1 생물학적 샘플에서 SEMA4D 폴리펩타이드의 수준을 정성적으로 또는 정량적으로 측정 또는 추정하는 것으로 의도된다. 특정 양태에서, 상기 제1 생물학적 샘플에서의 SEMA4D 폴리펩타이드 발현 수준은 측정 또는 추정될 수 있고, 표준 SEMA4D 폴리펩타이드 수준과 비교될 수 있으며, 상기 표준은 장애를 갖지 않은 개체에서 수득된 제2 생물학적 샘플에서 취하거나 또는 장애를 갖지 않은 개체의 모집단에서 수준을 평균냄으로써 결정된다. 당 업계에서 인정되는 바와 같이, "표준" SEMA4D 폴리펩타이드 수준이 알려지면, 비교를 위한 표준으로 반복적으로 사용될 수 있다.

[0229] "생물학적 샘플"은 개체, 세포주, 조직 배양, 또는 잠재적으로 SEMA4D를 발현하는 세포의 기타 원천에서 수득된 임의의 생물학적 샘플로 의도된다. 포유동물에서 조직 생검 및 체액을 수득하기 위한 방법이 당해 기술에 공지되어 있다.

[0230] X. 면역검정

[0231] 본 명세서에서 제공된 항-SEMA4D 결합 분자, 예를 들어, 항체 또는 그것의 항원-결합 단편, 변이체, 또는 유도체는 당해 분야에 알려진 임의의 방법에 의해 면역특이적 결합에 대해 분석될 수 있다. 사용될 수 있는 면역검정에는, 비제한적으로 기술 예컨대 웨스턴 블랏, 방사선면역검정, ELISA(효소 연결된 면역흡착 검정), "샌드위치" 면역검정, 면역침강 검정, 침강 반응, 겔 확산 침강 반응, 면역확산 검정, 응집 검정, 보체-고착 검정, 면역 방사계수법, 형광 면역검정, 단백질 면역검정 등등을 사용하는 경쟁적 및 비-경쟁적 검정 시스템이 포함된다. 그와 같은 검정은 일상적이고, 당해 분야에서 잘 알려져 있다(참고, 예를 들어, Ausubel 등, eds, (1994) *Current Protocols in Molecular Biology* (John Wiley & Sons, Inc., NY) Vol. 1(본원에 전체적으로 참고로 편집됨). 예시적인 면역검정은 하기에 간단히 기재되었다(그러나, 그것에 국한되지 않는다).

[0232] 본 명세서에서 제공된 항-SEMA4D 결합 분자, 예를 들어, 항체 또는 그것의 항원-결합 단편, 변이체, 또는 유도체는 추가로 SEMA4D 단백질 또는 그것의 보존된 변이체 또는 펩타이드 단편의 원위치 검출을 위해, 면역형광, 면역전자 현미경검사 또는 비-면역학적 검정에서처럼 조직학적으로 이용될 수 있다. 원위치 검출은 환자에게서 조직학적 시료를 채취하고, 그것에 표지화된 항-SEMA4D 항체, 또는 그것의 항원-결합 단편을 도포함으로써, 예를 들어, 상기 표지화된 항체(또는 단편)를 생물학적 샘플에 덮어씌움으로써 달성될 수 있다. 그와 같은 절차의 사용을 통해, SEMA4D 단백질, 또는 보존된 변이체 또는 펩타이드 단편의 존재 뿐만 아니라, 검사된 조직에서 그것의 분포도 측정할 수 있다. 본 개시내용을 사용하여, 통상적인 기술의 숙련가는 그와 같은 원위치 검출을 달성하기 위해 다양한 조직학적 방법들(예컨대 염색 절차) 중 하나가 변형될 수 있음을 쉽게 인식할 것이다.

[0233] 본 명세서에서 제공된 항-SEMA4D 결합 분자, 예를 들어, 항체 또는 그것의 항원-결합 단편, 변이체, 또는 유도체의 주어진 양의 결합 활성은 잘 알려진 방법에 따라 측정될 수 있다. 당해 분야의 숙련가는 일상적인 실험과정을 활용함으로써 각각의 측정을 위한 작동가능한 및 최적의 검정 조건을 결정할 수 있을 것이다.

[0234] 항체-항원 상호작용의 친화도를 측정하기 위해 이용 가능한 다양한 방법이 있으나, 상대적으로 속도 상수를 계산하기 위한 방법은 거의 없다. 대부분의 방법은 표지화 항체 또는 항원에 의존하고, 이것은 필연적으로 일상적인 측정을 복잡하게 만들고, 측정된 양에 불확실성을 초래한다.

[0235] BIACORE®에서 수행된 표면 플라즈몬 공명(SPR)은 항체-항원 상호작용의 친화도를 측정하는 종래의 방법에 비해 수많은 이점을 제공한다:(i) 항체 또는 항원을 표지화하는 데 요건이 없음;(ii) 항체가 우선 정제될 필요가 없

고, 세포 배양 상청액이 직접적으로 사용될 수 있음;(iii) 상이한 단클론성 항체 상호작용의 신속한 반-정량적 비교를 허용하는 실시간 측정이 가능하고, 많은 평가 목적에 충분함;(iv) 생특이성 표면이 재생되어 일련의 상이한 단클론성 항체가 동일한 조건 하에서 쉽게 비교될 수 있음;(v) 분석적 절차가 완전하게 자동화되고, 광범위한 일련의 측정들이 사용자 개입 없이 수행될 수 있음. BIAApplications Handbook, version AB (reprinted 1998), BIACORE® code No. BR-1001-86; BIATechnology Handbook, version AB (reprinted 1998), BIACORE® code No. BR-1001-84. SPR 기반 결합 연구는 결합 쌍 중 하나의 구성원이 센서 표면에 고정될 필요가 있다. 고정된 결합 파트너는 리간드라 불린다. 용액에서 상기 결합 파트너는 피분석물로 불린다. 일부 경우에, 상기 리간드는 또 다른 고정된 분자(이것은 포획(capturing) 분자라 불림)에 결합함으로써 상기 표면에 간접적으로 부착된다. SPR 반응은 피분석물이 결합하거나 또는 해리될 때, 검출기 표면에서 질량 농도의 변화를 반영한다.

[0236] SPR를 기반으로, 실시간 BIACORE® 측정이 상호작용이 발생할 때 상기 상호작용을 직접적으로 모니터링한다. 상기 기술은 동력학 파라미터의 결정에 적합하다. 비교 친화도 순위 매기기는 수행하기 간단하고, 동력학 및 친화도 상수는 센서그램 데이터에서 유래될 수 있다.

[0237] 피분석물이 리간드 표면에 걸쳐 별개의 펄스로 주입된 경우, 수득된 센서그램은 필수적인 세 단계(phases)로 분할될 수 있다:(i) 샘플 주사 중 리간드와 피분석물의 회합;(ii) 샘플 주사 중 평형 또는 정상 상태(여기서 피분석물 결합 속도는 복합체에서의 해리에 의해 균형을 이룬다);(iii) 완충액 흐름 중에 상기 표면에서 피분석물의 해리.

[0238] 회합 및 해리 단계는 피분석물-리간드 상호작용의 동력학에 대한 정보(k_a 및 k_d , 착물 형성 및 해리 속도, $k_d/k_a=K_D$)를 제공한다. 상기 평형 단계는 피분석물-리간드 상호작용의 친화도의 정보(K_D)를 제공한다.

[0239] BIA평가 소프트웨어는 수치 통합 및 전반적인 적합화 알고리즘을 모두 사용하는 곡선 적합(fitting)을 위한 포괄적인 설비를 제공한다. 상기 데이터의 적합한 분석으로, 상호작용에 대한 별개의 속도 및 친화도 상수가 단순한 BIACORE® 조사에서 수득될 수 있다. 이와 같은 기술에 의해 측정가능한 친화도의 범위는 mM에서 pM에 이르는 아주 넓은 범위이다.

[0240] 에피토프 특이성은 단클론성 항체의 중요한 특징이다. 방사선면역검정, ELISA 또는 다른 표면 흡착 방법을 사용하는 종래의 기술과 대조적으로, BIACORE®을 이용한 에피토프 맵핑은 표지화된 또는 정제된 항체가 필요하지 않고, 몇 개의 단클론성 항체의 서열을 사용하는 다중-부위 특이성 테스트를 허용한다. 추가로, 다수의 분석이 자동으로 가공될 수 있다.

[0241] 쌍으로 결합 실험은 두 개의 MAbs가 동일한 항원에 동시에 결합하는 능력을 시험한다. 별개의 에피토프에 대항하는 MAb들은 독립적으로 결합하는 반면, 동일한 또는 밀접하게 관련된 에피토프에 대항하는 MAb들은 서로의 결합을 방해한다. BIACORE®을 이용한 결합 실험은 수행하기에 간단하다.

[0242] 예를 들어, 포획 분자를 사용하여 제1 Mab와 결합하고, 이어서 항원 및 제2 Mab를 순차적으로 첨가할 수 있다. 센서그램은 하기를 알려줄 것이다:(1) 얼마나 많은 양의 항원이 제1 Mab에 결합하는가,(2) 제2 Mab가 어느 정도로 표면-부착된 항원에 결합하는가,(3) 상기 제2 Mab이 결합하지 않는다면, 쌍으로 테스트의 순서를 역행하는 것이 결과를 바꾸는가.

[0243] 펩타이드 억제제는 에피토프 맵핑에 사용되는 또 다른 기술이다. 이와 같은 방법은 쌍으로 항체 결합 연구를 보완할 수 있고, 상기 항원의 일차 서열이 알려져 있는 경우, 기능적 에피토프를 구조 특징에 연계시킬 수 있다. 펩타이드 또는 항원 단편이 고정된 항원에 대한 상이한 MAbs의 결합의 억제에 대해 시험된다. 주어진 Mab의 결합을 방해하는 펩타이드는 상기 Mab에 의해 정의된 에피토프에 구조적으로 관련된 것으로 추정된다.

[0244] 본 개시내용은, 달리 나타내지 않는 한, 당해기술의 범위에 속하는 세포 생물학, 세포 배양, 분자 생물학, 형질 전환 생물학, 미생물학, 재조합 DNA 및 면역학의 종래의 기술을 활용한다. 그와 같은 기술은 문헌에서 완전하게 설명된다. 참고, 예를 들어, Sambrook 등, ed. (1989) Molecular Cloning A Laboratory Manual (2nd ed.; Cold Spring Harbor Laboratory Press); Sambrook 등, ed. (1992) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, (Cold Springs Harbor Laboratory, NY); D. N. Glover ed., (1985) DNA Cloning, Volumes I and II; Gait, ed. (1984) Oligonucleotide Synthesis; Mullis 등 U.S. Pat. No. 4,683,195; Hames and Higgins, eds. (1984) Nucleic Acid Hybridization; Hames and Higgins, eds. (1984) Transcription And Translation; Freshney (1987) Culture Of Animal Cells (Alan R. Liss, Inc.); Immobilized Cells And Enzymes (IRL Press) (1986); Perbal (1984) A Practical Guide To Molecular Cloning; the treatise, Methods In Enzymology (Academic

Press, Inc., N.Y.); Miller and Calos eds. (1987) Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells, (Cold Spring Harbor Laboratory); Wu 등, eds., Methods In Enzymology, Vols. 154 and 155; Mayer and Walker, eds. (1987) Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology (Academic Press, London); Weir and Blackwell, eds., (1986) Handbook Of Experimental Immunology, Volumes I-IV; Manipulating the Mouse Embryo, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., (1986); 및 in Ausubel 등 (1989) Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley and Sons, Baltimore, Md.).

[0245] 항체 조작의 일반적인 원리가 Borrebaeck, ed. (1995) Antibody Engineering (2nd ed.; Oxford Univ. Press)에 제시된다. 단백질 조작의 일반적인 원리가 Rickwood 등, eds. (1995) Protein Engineering, A Practical Approach (IRL Press at Oxford Univ. Press, Oxford, Eng.)에 제시된다. 항체 및 항체-합텐 결합의 일반적인 원리가 Nisonoff (1984) Molecular Immunology (2nd ed.; Sinauer Associates, Sunderland, Mass.); 및 Steward (1984) Antibodies, Their Structure and Function (Chapman and Hall, New York, N.Y.)에 제시된다. 추가로, 당업계에서 알려졌으나 구체적으로 기재되지 않은 면역학에서의 표준 방법은 Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, New York; Stites 등, eds. (1994) Basic and Clinical Immunology (8th ed; Appleton & Lange, Norwalk, Conn.) 및 Mishell and Shiigi (eds) (1980) Selected Methods in Cellular Immunology (W.H. Freeman and Co., NY)에서처럼 준수될 수 있다.

[0246] 면역학의 일반적인 원리를 제시하는 표준 참고서에는 Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, New York; Klein J., Immunology: The Science of Self-Nonself Discrimination (John Wiley & Sons, NY (1982)); Kennett 등, eds. (1980) Monoclonal Antibodies, Hybridoma: A New Dimension in Biological Analyses (Plenum Press, NY); Campbell (1984) "Monoclonal Antibody Technology" in Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, ed. Burden 등, (Elsevier, Amsterdam); Goldsby 등, eds. (2000) Kuby Immunology (4th ed.; W.H. Freeman and Co., NY); Roitt 등 (2001) Immunology (6th ed.; London: Mosby); Abbas 등 (2005) Cellular and Molecular Immunology (5th ed.; Elsevier Health Sciences Division); Kontermann and Dubel (2001) Antibody Engineering (Springer Verlag); Sambrook and Russell (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Press); Lewin (2003) Genes VIII (Prentice Hall, 2003); Harlow and Lane (1988) Antibodies: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Press); Dieffenbach and Dveksler (2003) PCR Primer (Cold Spring Harbor Press)이 포함된다.

[0247] 본원에 인용된 모든 참조 뿐만 아니라 상기에 인용된 모든 참조문헌은 그것의 전체가 본 명세서에 참고로 편입되었다.

[0248] 하기 실시예들은 예시로서 제공되며 이것에 제한되지 않는다.

[0249] 실시예

[0250] 실시예 1: 완전 인간 항-SEMA4D 단클론성 항체 mAb D2517의 생성

[0251] 완전 인간 항-SEMA4D 단클론성 항체 D2517을 하기 방법에 의해 생성하였다. 백시니아 바이러스에서 생성된 완전 인간 항체의 라이브러리를 US 미국 특허 출원 공개 번호 2013-0288927-A1(전체가 본 명세서에 참고로 편입됨)에 기재된 방법에 따라 SEMA4D에 결합에 대해 선별하였다. 총 96개 항체를 경쟁 ELISA에 의해 6개의 상이한 에피토프 그룹에 비닝(bin)하였다. 마우스 항체, mAb76 및 mAb67, 및 마우스 IgG 대조군을 사용하여 저카트(Jurkat) 세포 상에서 인간 SEMA4D의 천연 형태에 인간 항체의 경쟁적 결합을 평가하였다. mAb76 및 mAb67은 인간 SEMA4D의 알려진 에피토프에 결합하고, 둘 중 하나와의 경쟁은 기능성을 시사한다. 저카트(Jurkat) 세포를 100uL 중 5ug/mL인 mAb76, mAb67 또는 마우스 IgG 대조군과 FACS 완충액(1XPBS + 0.05%BSA + 2mM EDTA) 중 200,000개 세포와 함께 얼음에서 30분 동안 사전배양하였다. 이로써 마우스 항체 차단 결합 에피토프의 결합을 포화시킬 수 있었다. 상기 인간 테스트 항체 및 대조군 항체를 이차 시약 염소 항-인간 Fc-Dylight 649 항체(Jackson ImmunoResearch 496-170)와 함께 얼음에서 30분 동안 1ug/mL으로 사전 배양하였다. 마우스 IgG 항체와 저카트 세포의 배양 후, 상기 세포를 세정하고, 테스트 항체/2차 복합 혼합물과 함께 얼음에서 30분 동안 배양하였다. 그리고 나서, 상기 세포를 FACS 완충액 200uL로 2회 세정하고, PBS/1%BSA 250 pL와 PI가 있는 0.5% 파라포름알데하이드의 고정액에 재현탁시켰다. 재현탁 후, FACS CANTO II 상에서 유세포측정에 의해 상기 세포를 분석하였다. PI 음성 모집단을 게이팅(gate)하고 Dylight649 쉬프트를 기록 및 평가하였다. 무관한 마우스 IgG로 사전 배양한 저카트 세포에 인간 항체의 결합과 비교하여, 결합의 퍼센트 억제율을 계산하였다.

[0252] 이전에-특성규명된 컷과 항-SEMA4D 항체 67-2 및 76-1의 크로스블록(crossblock) 능력 때문에 추가적인 특성 규

명을 위해 MAb C2305를 선택하였다. 참고, 예를 들어, 미국 특허 제8,496,938호(그것의 개시내용은 전체적으로 본 명세서에 참고로 편입됨).

[0253] MAb C2305 VH를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 상기 인간 감마-4 중쇄 불변 영역 코딩 서열을 함유한 포유동물 발현 벡터에 클로닝함으로써, 전장 중쇄를 형성하였다. MAb C2305 VL을 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 인간 람다 불변 영역 코딩 서열을 갖는 포유동물 발현 벡터에 클로닝하여, 전장 경쇄를 형성하였다. 상기 중쇄 및 경쇄를 함유하는 발현 벡터를 CHO-S 세포로 공동-형질감염시켰다. 생산된 단클론성 항체는 상기 세포에서 분비되었고, 3~6일 발현 기간 후에 수확하였다. 단백질을 크로마토그래피를 사용하여 상기 수득된 MAb를 정제하고, 특성을 규명하였다. 상기 수득된 완전 인간 MAb(MAb C2305)은 유세포분석 및 ELISA에 의해 SEMA4D에 대해 특이적임을 입증하였고, SEMA4D에 결합에 있어서 컷과 MAb 67-2와 경쟁할 수 있음이 밝혀졌다. 하기 실시예 3의 방법에 따라, MAb C2305의 기능적 활성을 수용체 차단 검정에서 추가로 평가하였다. 수용체 차단을 관측하였으나, 비교기로 사용한 인간화된 MAb 2503(미국 특허 제8,496,938호, 또한 일명 VX15/2503)과 비교하여 더 낮은 수준이었다.

[0254] MAb C2305를 완전하게 서열분석하고, 이어서 친화도 개선을 위해 조작하였다. 중쇄 상보성 결정 영역 3(HCDR3)에 표준 부위 지향적 돌연변이유발 기술을 시행하였고, US 미국 특허 출원 공개 번호 2013-0288927-A1에 기재된 방법에 따라 경쇄 라이브러리에서 신규한 완전 인간 경쇄 가변 영역(VL)을 식별하였다. 이들 변경에서, 개선된 친화도를 갖는 MAb, 즉 MAb D2517을 선두 항체로 선택하였다. MAb D2517를 람다 경쇄가 있는 완전 인간 IgG4 항체로 클로닝하고 조립하여 발현하였다. MAb D2517의 The VH, VL, 및 CDR 서열을 표 2에 제시하였다.

표 2. MAb D2517 서열

서열번호	구조	서열
1	VH	EVOLVESGGGLVOPGGSLRLSCAASGFI FSDYWMVWVROAPG KGLEYVAHMNQDGGARYYAESVGRFTI SRDNAKNSLYLOM NSLRAEDTAVYYCARDPWGVD SWGQGT LVT
2	HCDR1	DYWMV
3	HCDR2	HMNQDGGARYY
4	HCDR3	DPWGY
5	VL	SYELTOPPSVSVSPGOTASITCSGDKLGDKYAVWYOOKPGOSP VLVIYODSKRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTOAMDEADYYC QAWEOEAAWVFVGGGTKL
6	LCDR1	SGDKLGDKYAV
7	LCDR2	QDSKRPS
8	LCDR3	QAWEQEAAWV

[0255]

실시예 2: MAb D2517의 결합 특성규명

[0256]

[0257] MAb D2517의 결합 특성을 아래와 같이 BIACORE 검정에 의해 결정하였다. 비교기 항체 VX15/2503뿐만 아니라 상기 항체 모두 PBS에서 제형화하였고, 저밀도의 염소 항-인간 IgGfC로 센서에서 포착하고, 그런 다음 항원 농도 범위 0~25 nM에서 포착된 항체 위로 마모셋 SEMA4D-His를 흘려 보냈다. 결과를 표 3에 나타내었다. SEMA4D에 대한 MAb D2517의 친화도는 VX15/2503의 친화도와 유사하였다.

표 3. BIACORE 검정 결과

MAb	마모셋 SEMA4D			
	ka(1/MS)	kd(1/S)	KA(1/M)	KD(nM)
MabD2517	7.89E+05	3.20E-03	2.47E+08	4.00
VX15/25 03	2.43E+05	1.18E-03	2.06E+08	4.86
VX15/25 03	3.02E+05	1.26E-03	2.40E+08	4.17

[0258]

[0259] 인간, 마우스, 마모셋, 및 사이노물구스 원숭이 SEMA4D에 결합하는 MAb D2517의 능력을 하기 방법을 사용하여 ELISA에 의해 결정하였다. Nunc maxisorp C-웰 ELISA 플레이트를 1X PBS에 제형화한 CD 100-His 100 pL/웰로 밤새 코팅하였다. 밤새 배양 후, 플레이트를 세정하고, 후속으로 적어도 1 시간 동안 실온에서 PBS + 0.5% BSA + .025% tween 20으로 200uL/웰로 차단하였다. 추가의 세정 후, 100 μl/웰의 희석된 MAbs(100 ng/mL)을 ELISA 플레이트의 각 웰에 첨가하고, 이것을 실온에서 2 시간 동안 배양하고, 그리고 나서 세정하였다. 다음으로, 100 μl/웰의 1:10,000 염소 항-인간 Fc(Jackson cat# 109-035-098 lot 118460)을 각 웰에 첨가하고, 상기 ELISA

플레이트를 실온에서 1시간 동안 배양하였다. 그리고 나서, 상기 플레이트를 세정하고 100uL/웰 TMB 기질로 15분 동안 현상하였다. 100uL/웰 2N 황산을 사용하여 검출 반응을 중단하고, 상기 플레이트를 플레이트 리더로 450-570 nm의 파장에서 판독하였다.

[0260] 결과를 도 1a(인간 SEMA4D), 도 1b(마모셋 SEMA4D), 도 1c(사이노 SEMA4D), 및 도 1d(마우스 SEMA4D)에 나타내었다.

[0261] 실시예 3: SEMA4D가 그것의 수용체에 결합하는 것을 MAb D2517이 차단한다

[0262] 다양한 종에서 유래된 SEMA4D가 그것의 수용체, 플렉신 B1에 결합하는 것을 차단하는 MAbD2517의 능력을 아래와 같이 시험하였다.

[0263] MAbD2517 및 MAbVX 15/2503을 아세테이트 완충액에 제형화하였다. SEMA4D- His 복합체(인간, 사이노몰구스 원숭이, 마우스, 또는 랫트 SEMA4D)가 293PLXNB1 세포에 결합하는 것을 차단하는 능력에 대해, 상기 항체들을 3중 희석 시리즈에서 비교하였다. 모든 항체를 96 웰 플레이트에서 1.5 µg/mL에서 88ng/mL로 희석하였고, 적절한 SEMA4D-His 0.8ug/mL로 1:1로 조합한 뒤, 밤새 4 °C에서 배양하였다.

[0264] 다음 날, 항체/SEMA4D-His 복합체 또는 대조군을 96 웰 플레이트 중 2.5×10^5 293PLXNB1 세포에 첨가하고, 4 °C에서 30분 동안 결합이 발생하도록 허용하였다. 세척 후, 상기 세포를 항-6xHis-APC(30분, 4 °C)로 염색하고, 세척한 후, FACS Canto II 상에서 유세포측정에 의해 분석하였다. 결과를 도 2a~2d에 나타내었다. 곡선에서 EC50 값을 계산하고, 그 값을 표 4에 나타내었다.

표 4. SEMA4D가 그것의 수용체에 결합하는 것을 차단하기 위한 EC50 값(nM)

SEMA4D-his	VX15/250	MAb D2517
인간 SEMA4D	0.3	1.0
Cyno SEMA4D	0.5	1.2
마우스 SEMA4D	0.4	1.2
랫트 SEMA4D	0.6	1.5

[0265] 실시예 4: 종양 모형에서 MAbD2517과 동등한 췌장 키메라의 실험

[0266] MAb D2517의 VH 및 VL 아미노산 서열(서열번호: 1 및 서열번호: 5)을 췌장과 IgG1 및 람다 불변 영역을 발현하는 벡터에 삽입하여 키메라 항체 MAb D2585를 생산하였다. 상기 항체를 CHO-S 세포에서 발현하고, 실시예 1에 설명한 대로 정제하였다.

[0267] 6~8 주령의 Balb/c 암컷 마우스(n=12)에서 30,000 Tubo.A5 유방 종양 세포를 마우스의 유선 지방 패드에 피하로 이식하였다. 대조군 마우스 IgG1/2B8.1E7 또는 항-SEMA4D 키메라 항체 MAbD2585로의 처리를 접종 7일 후 개시하였다(10 mg/kg, IP, 매주 X5). 이식 11일 후에 시작하여 주 2회 종양을 캘리퍼스로 측정하였다. 종양 부피가 800 mm³에 도달하자, 동물을 희생시켰다.

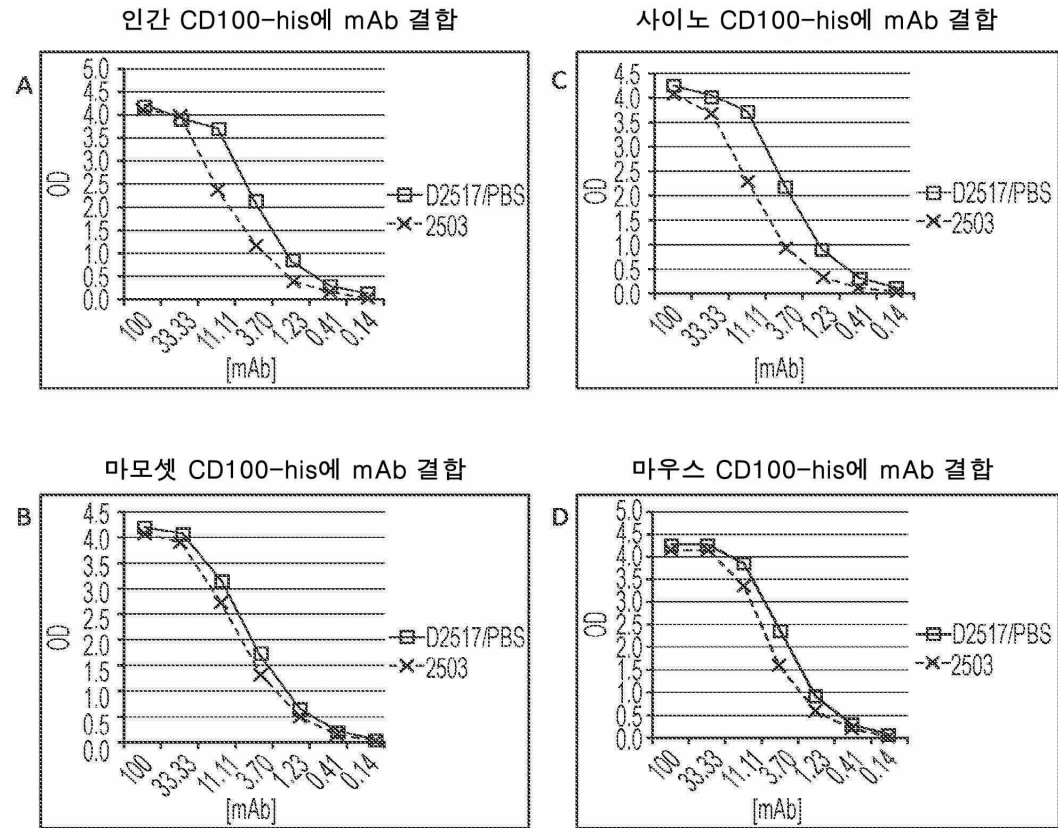
[0268] 캘리퍼스에 의해 종양 성장을 측정하고, 측정값을 사용해 식($w^2 \times l$)/2, (종양의 더 작은 치수인 w = 폭, l = 길이 (mm))을 사용하여 종양 부피를 계산하였다. 평균 종양 부피 및, 종양 부피 = 800 mm³일 경우 종점의 시간으로 정의된 Kaplan Meier 생존 곡선을 도 3a 및 3b에 각각 나타내었다. 평균 종양 부피(p<0.05)를 위해 Two-way Analysis of Variance (ANOVA)를 사용하고, 생존율(p<0.1)을 위해 Log Rank 분석을 사용하여 통계적인 분석을 수행하였는데, 이들은 통계적으로 유의미하였다.

[0269] 또한 Tubo 종양 모형에서 종양 퇴화의 빈도를 측정하고, 도 3c에 나타내었다. 퇴행은 적어도 2개의 연속적인 측정 동안 <50 mm³으로 측정된 종양으로 정의된 측정가능한 종양의 결핍이다. 키메라 항체 MAbD2585로의 처리가 Tubo-함유 마우스에서 퇴행의 개수를 증가시켰다. 키메라 항체 MAbD2585-처리 마우스 그룹에서 퇴행의 개수는, 피서 정확 검정에 의해 측정된 바에 따르면, 대조군 Ig(p =0.01)과 비교하여 통계적으로 유의미하였다.

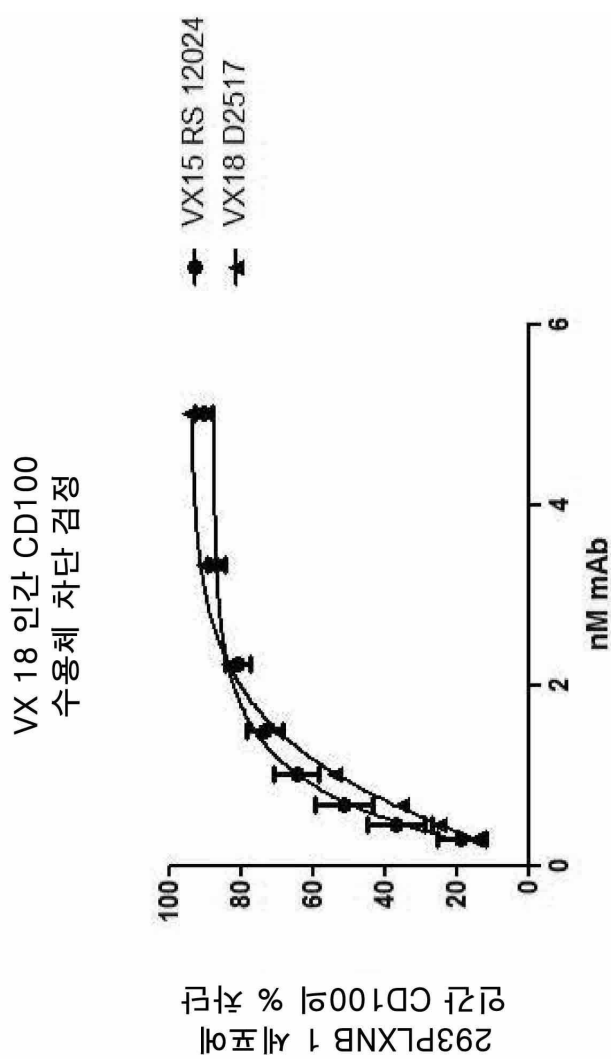
[0270] 본 개시내용의 폭과 범위는 상기-기재된 임의의 예시적인 구현예에 의해 제한되어서는 안 되지만, 하기 청구항 및 그것의 등가물에 따라서만 정의되어야 한다.

도면

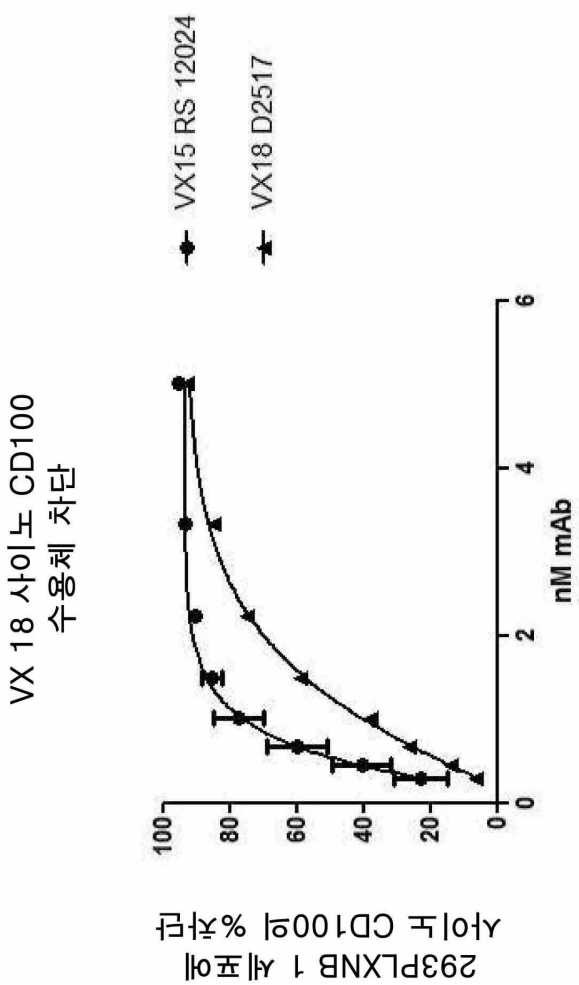
도면1



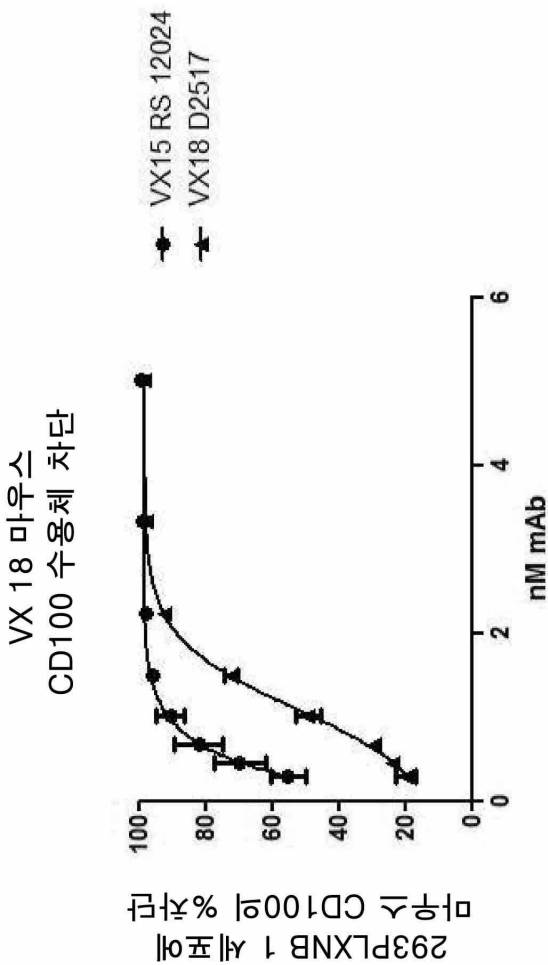
도면2a



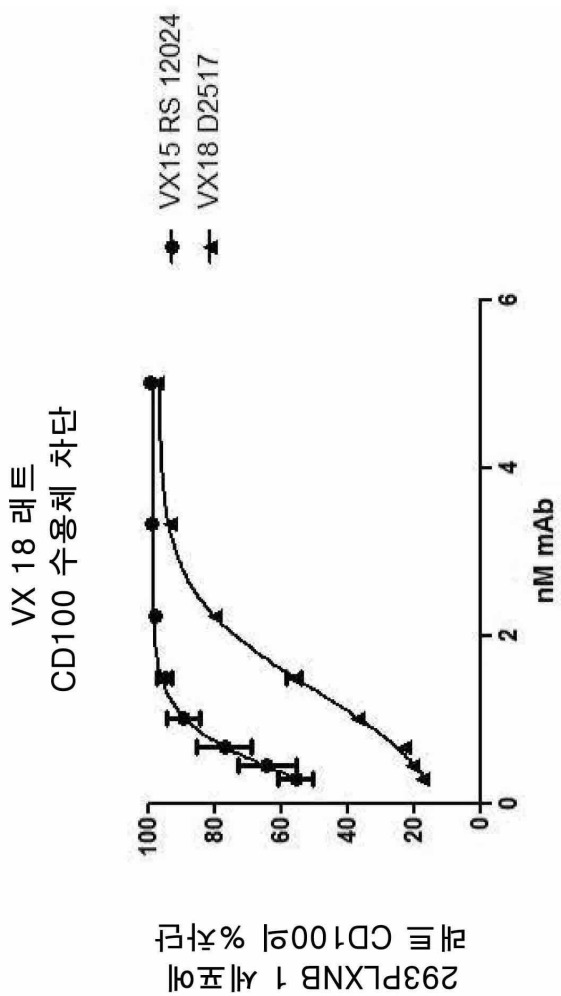
도면2b



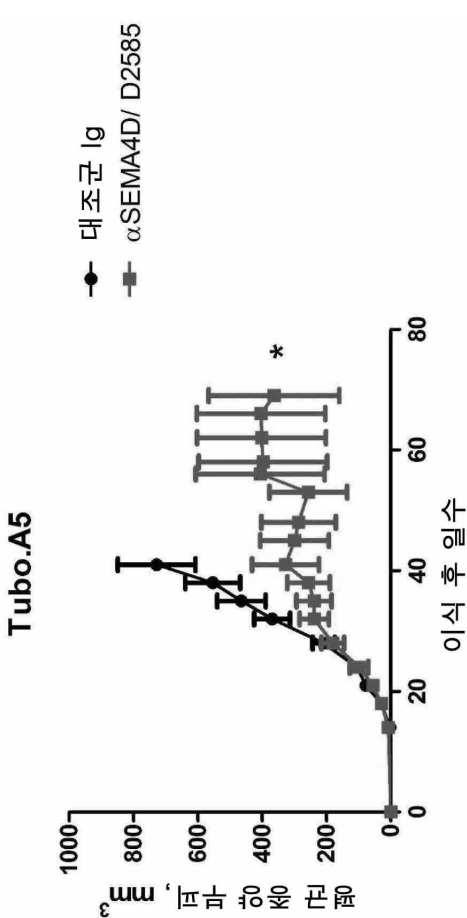
도면2c



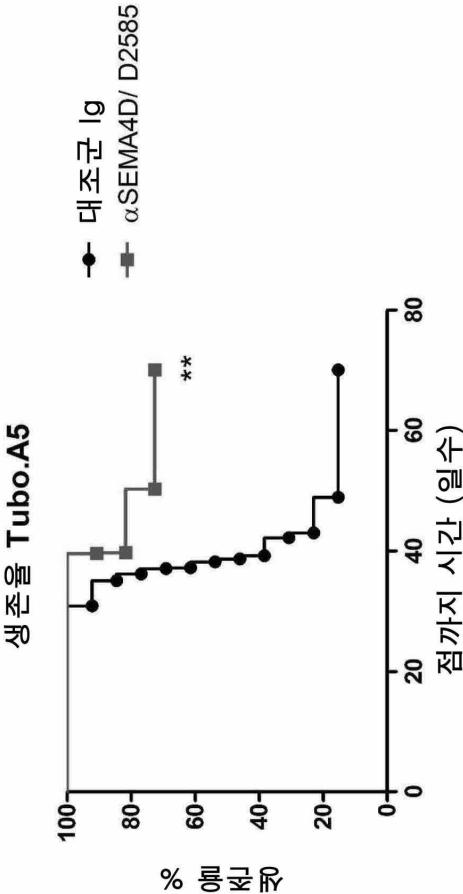
도면2d



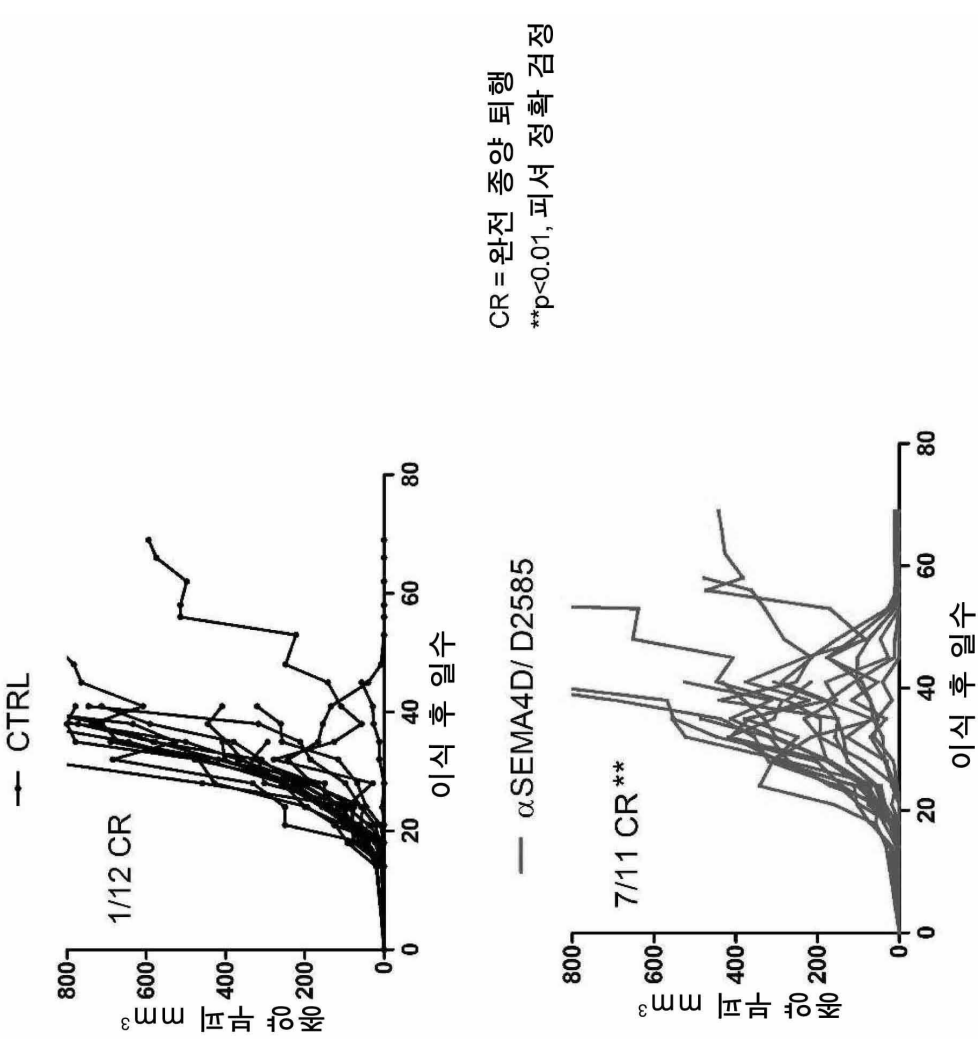
도면3a



도면3b



도면3c



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> VACCINEX, INC.

<120> HUMAN ANTI-SEMAPHORIN 4D ANTIBODY

<130> 009790.014W01

<140> PCT/US2018/031263

<141> 2018-05-04

<150> 62/501,981

<151> 2017-05-05

<160> 9

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 1

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Asp Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Ala His Met Asn Gln Asp Gly Gly Ala Arg Tyr Tyr Ala Glu Ser Val

50 55 60

Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Thr

<210> 2

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 2

Asp Tyr Trp Met Val

1 5

<210> 3

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 3

His Met Asn Gln Asp Gly Gly Ala Arg Tyr Tyr

1 5 10

<210> 4

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 4

Asp Pro Trp Gly Tyr

1 5

<210> 5

<211> 104

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400>

> 5

Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gln Asp Ser Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser

50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met

65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Glu Gln Glu Ala Ala Trp

85

90

95

Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu

100

<210> 6

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 6

Ser Gly Asp Lys Leu Gly Asp Lys Tyr Ala Val

1

5

10

<210> 7

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 7

Gln Asp Ser Lys Arg Pro Ser

1

5

<210> 8

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 8

Gln Ala Trp Glu Gln Glu Ala Ala Trp Val

1

5

10

<210> 9

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

6xHis tag

<400> 9

His His His His His His

1 5