



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년08월26일

(11) 등록번호 10-2698752

(24) 등록일자 2024년08월21일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07K 16/44 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)

A61K 47/68 (2017.01) A61K 51/10 (2006.01)

A61K 9/00 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C07K 16/44 (2013.01)

A61K 47/6801 (2017.08)

(21) 출원번호 10-2019-7030327

(22) 출원일자(국제) 2018년03월19일

심사청구일자 2021년02월19일

(85) 번역문제출일자 2019년10월15일

(65) 공개번호 10-2019-0130604

(43) 공개일자 2019년11월22일

(86) 국제출원번호 PCT/US2018/023123

(87) 국제공개번호 WO 2018/175310

국제공개일자 2018년09월27일

(30) 우선권주장

62/473,554 2017년03월20일 미국(US)

(56) 선행기술조사문헌

KR1020100028575 A*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

캔서 테라퓨틱스 래버러토리즈 인코포레이티드

미국, 캘리포니아 90089, 로스앤젤레스, 에이치엠 알205, 조날 애버뉴 2011

(72) 발명자

웹스타인 알란

미국, 캘리포니아 90089, 로스앤젤레스, 에이치엠 알205, 2011 조날 애버뉴, 캔서 테라퓨틱스 래버러토리즈 인코포레이티드 내

휴 페이생

미국, 캘리포니아 90089, 로스앤젤레스, 에이치엠 알205, 2011 조날 애버뉴, 캔서 테라퓨틱스 래버러토리즈 인코포레이티드 내

(74) 대리인

특허법인한얼

전체 청구항 수 : 총 16 항

심사관 : 이미경

(54) 발명의 명칭 암 치료법에서 피사를 표적화하기 위한 인간화 항-핵 항체

(57) 요약

결합 친화성 및 종양 흡수가 향상된 인간화 모노클로날 항-핵 항체가 제시된다. 특히 바람직한 항체는 비-인간화 비-돌연변이 형태에 비하여 친화성이 최대 약 8배 개선된 H-CDR3의 위치-지정 돌연변이체이다. 추가의 바람직한 양태에서, 이러한 인간화 항체는 면역 조절제, 면역 이펙터 및 다른 치료제 또는 진단제의 종양 피사 표적화된 전달에 사용된다.

대표도 - 도1c

EP/ScFv		
HV	링커	LV
	{GSSSS}	

(52) CPC특허분류

A61K 51/1093 (2020.05)

A61K 9/0019 (2013.01)

A61P 35/00 (2018.01)

A61K 2039/505 (2013.01)

A61K 2039/54 (2013.01)

C07K 2317/24 (2013.01)

C07K 2317/622 (2013.01)

C07K 2317/92 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

상응하는 비-인간화 항체에 비하여 핵 표적에 대해 개선된 결합 친화성을 갖는 인간화 항-핵 항체로서, 상기 항체가 3개의 중쇄 상보성 결정 영역(H-CDR)을 갖는 중쇄(VH) 및 3개의 경쇄 CDR(L-CDR)을 갖는 경쇄(VL)를 포함하고,

여기서 H-CDR1은 서열번호 1이고, H-CDR2는 서열번호 2이고, H-CDR3 서열은 서열번호 3으로부터 돌연변이된 것으로, H-CDR3 돌연변이는 ⁹Phe→Arg, ³Ile→His, ⁴Gly→Arg, ¹¹Tyr→Thr, ⁵Val→Ser, ⁶Arg→Thr, ¹¹Tyr→Arg, 또는 ⁶Arg→Leu이고,

L-CDR1은 서열번호 4이고, L-CDR2는 서열번호 5이고, L-CDR3은 서열번호 6인, 항체.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 핵 표적이 단일 가닥 DNA인 항체.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 인간화 항체가 상응하는 비-인간화 항체보다 적어도 2배 더 높은 결합 친화성을 갖는 항체.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 인간화 항체가 상응하는 비-인간화 항체보다 적어도 4배 더 높은 결합 친화성을 갖는 항체.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 인간화 항체가 상응하는 비-인간화 항체보다 적어도 8배 더 높은 결합 친화성을 갖는 항체.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 인간화 항체가 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTRYWMHWVRQAPGQALEWIGAIYPGNSDTSYNQKFKGKATITADTSTNTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGEEIGVRRWFAYWGQGTILVTVSS(서열번호 7)를 포함하는 VH 서열을 갖되, 단 상기 VH 서열은 서열번호 7의 아미노산 서열에서 ¹⁰⁸Phe→Arg, ¹⁰²Ile→His, ¹⁰³Gly→Arg, ¹¹⁰Tyr→Thr, ¹⁰⁴Val→Ser, ¹⁰⁵Arg→Thr, ¹¹⁰Tyr→Arg, 또는 ¹⁰⁵Arg→Leu의 치환을 갖는 항체.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 인간화 항체가 IVLTQSPATLSLSPGERATLSCRARQISNYLHWYQQKPGQAPRLLIYYASQISGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQSNSWPLTFGQGTKVEIK(서열번호 8)를 포함하는 VL 서열을 갖는 항체.

청구항 8

치료제 및 영상화제(imaging agent) 중 적어도 하나에 커플링된, 제1항 내지 제7항 중 어느 한 항의 항체의 적어도 결합 부분을 포함하는 하이브리드 분자.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 항체의 적어도 결합 부분이 전장 항체, Fab 단편, F(ab')₂ 단편, Fab₂ 단편, 또는 scFv인

하이브리드 분자.

청구항 10

제8항에 있어서, 상기 치료제가 사이토카인 또는 그의 부분, 케모카인 또는 그의 부분, 골수-유래 억제 세포(MDSC)의 저해제, M2 대식구의 저해제, 방사성동위원소, 동시-자극 분자, 톨-유사 수용체(TLR) 효능제 또는 리간드, 상피 중간엽 전이(EMT)를 간섭하는 분자, 및 화학치료 약물 중 적어도 하나를 포함하는 하이브리드 분자.

청구항 11

제8항에 있어서, 상기 영상화제가 방사성동위원소, PET 표지, 및 SPECT 표지 중 적어도 하나를 포함하는 하이브리드 분자.

청구항 12

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항의 항체를 포함하거나, 또는

치료제 및 영상화제 중 적어도 하나에 커플링된, 제1항 내지 제7항 중 어느 한 항의 항체의 적어도 결합 부분을 포함하는 하이브리드 분자를 포함하는,

암을 치료하기 위한 약제학적 조성물.

청구항 13

종양 미세환경에서의 괴사 종양 세포의 표적화 방법으로서,

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항의 항체; 또는 치료제 및 영상화제 중 적어도 하나에 커플링된, 제1항 내지 제7항 중 어느 한 항의 항체의 적어도 결합 부분을 포함하는 하이브리드 분자와 상기 괴사 세포를 시험관 내에서 접촉시키는 단계를 포함하는 방법.

청구항 14

생체 내 종양 미세환경에서의 괴사 종양 세포를 표적화하는 데에 사용하기 위한, 제1항 내지 제7항 중 어느 한 항의 항체.

청구항 15

생체 내 종양 미세환경에서의 괴사 종양 세포를 표적화하는 데에 사용하기 위한, 제8항의 하이브리드 분자.

청구항 16

제8항에 있어서, 상기 항체는 서열번호 7의 VH 서열을 가지되, 단 상기 VH 서열이 서열번호 1의 H-CDR1, 서열번호 2의 H-CDR2, 및 서열번호 3으로부터 돌연변이된 H-CDR3 서열로서, H-CDR3 돌연변이가 서열번호 3의 아미노산 서열에서의 ⁹Phe→Arg, ³Ile→His, ⁴Gly→Arg, ¹¹Tyr→Thr, ⁵Val→Ser, ⁶Arg→Thr, ¹¹Tyr→Arg, 또는 ⁶Arg→Leu인, H-CDR3 서열을 포함하는, 하이브리드 분자.

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원에 관한 상호-참조

[0002] 본 출원은 그 내용이 본원에 참조로 포함되는 2017년 3월 20일자로 출원된 미국 가출원 제US 62/473,554호로부터 우선권의 이익을 주장한다.

[0003] 기술분야

[0004] 본 발명의 분야는 중앙 내의 귀사를 표적화하는 항체, 특히 인간화 항체이다.

배경 기술

- [0005] 배경기술 설명에는 본 발명을 이해하는데 유용할 수 있는 정보가 포함된다. 본원에 제공되는 정보 중 임의의 것이 선행 기술이거나 본원에 청구된 발명과 관련이 있거나 또는 명시적으로 또는 암시적으로 참조된 임의의 공보가 선행 기술인 것을 인정하는 것은 아니다.
- [0006] 본원의 모든 공보 및 특허 출원은 각 개별 공보 또는 특허 출원이 구체적이고 개별적으로 참고문헌으로서 포함되는 것으로 지시된 것과 동일한 정도로 참고문헌으로서 포함된다. 포함된 참고문헌에서의 용어의 정의 또는 사용이 본원에 제공된 용어의 정의와 불일치하거나 상반되는 경우, 본원에 제공된 용어의 정의가 적용되며, 참고문헌에서의 용어의 정의는 적용되지 않는다.
- [0007] 이전에 세포사 후에 접근 가능하게 되는 보편적인 세포내 항원에 대하여 유도된 모노클로날 항체가 고형 종양의 면역요법에 사용되어 왔다(예를 들어, 문헌[Cancer Research, 48:5842-5848,1988]; 문헌[Hybridoma, 12(6):689-698,1993]; 또는 문헌[Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals, 13(4):255-68, 1998] 참조). 유리하게, 이러한 접근법은 모든 종양에 존재하지만, 일반적으로 신체의 정상 조직에서 이용 가능하지 않은 종양의 괴사 영역을 표적으로 한다. 예를 들어, 3가지의 "종양 괴사 표적화"("TNT") 무린 모노클로날 항체가 연구되어 왔으며, 히스톤 H1 및 DNA에 대하여 유도된 muTNT-1, 히스톤 부분 H1 및 H3의 공통 에피토프에 결합하는 muTNT-2, 및 주로 단일 가닥 DNA에 결합하는 muTNT-3을 포함한다. 특히, 종양-보유 마우스에서의 생체분포 분석에 의해, TNT-3이 muTNT-1 및 muTNT-2에 비하여 종양에서 가장 높은 흡수를 보이는 것이 입증되었으며, TNT-3은 고형 종양의 방사면역요법을 위해 제안된 바 있다(예를 들어, 문헌[Cancer Biother Radiopharm 1998 Aug;13(4):255-68] 참조). 대안적인 접근법에서, 키메라 TNT-3 항체/무린 인터페론-감마 융합 단백질을 고형 악성종양의 면역요법을 위하여 구축하였으며(예를 들어, 문헌[Hybrid Hybridomics 2003 Aug;22(4):197-207] 참조), 다양한 바람직한 특징을 나타내었다.
- [0008] 불행히도, 무린 모노클로날 항체는 인간에서 면역원성이며, 이에 따라, 인간 환자에서의 치료 가능성이 크게 제한된다. 면역원성과 관련된 문제를 다루는 것을 돕기 위하여, 분자의 65%에 상당하는 인간 불변 영역 및 무린 가변 영역을 사용하여 키메라 TNT-3 항체를 구축하였다. 그러나, 이러한 키메라 항체가 여전히 약 35%의 무린 잔기를 함유하기 때문에, 항체는 면역원성으로 유지되었다.
- [0009] 키메라 항체의 면역원성을 추가로 감소시키기 위하여, 다양한 접근법이 수행될 수 있다. 가장 간단한 인간화 접근법 중 하나는 6개의 항체 CDR을 간단히 상응하는 인간 프레임워크 영역 내로 이식하는 상보성-결정 영역(CDR) 이식이며, 이는 무린 잔기의 수를 추가로 약 25% 감소시킨다. 불행히도, CDR 이식은 적어도 일부 경우에, 몇몇의 항체의 인간화에 성공적으로 사용된 바 있지만, 이식은 종종 결합 프로파일을 변경시켜, 다른 곳(예를 들어, 문헌[Proc. Natl Acad. Sci. USA,89(10):4285-9, 1992] 참조)에 보고된 바와 같이 수백배까지의 항원에 대한 친화성의 바람직하지 않은 감소를 초래한다(예를 들어, 문헌[J Mol Biol 224:487-499,1992] 참조). 따라서, 대부분의 경우에, CDR 이식은 인간화 항체의 친화성을 회복하는데 잠재적으로 중요한 일부 프레임워크 잔기의 미세한 조정과 조합되어야 한다. 그러나 CDR 구조에 잠재적으로 기여할 수 있는 중요한 프레임워크 잔기의 수는 비교적 크며, 종종 근거 기반의 항체 설계를 불가능하게 한다. 더욱이, 프레임워크 잔기와 하나 이상의 CDR 간의 상호작용은 분석을 더욱 복잡하게 만들어, 미세한 조정 방법을 일반적으로 시간이 걸리게 하고, 예측 불가능하게 만든다.
- [0010] 또 다른 접근법에서, 인간화 항체의 친화성은 CDR의 단계적 돌연변이에 의해 회복되었다(예를 들어, 문헌[Proc. Natl Acad. Sci. USA, 95, 6037-6042,1998] 참조). 또 다른 이들은 VH 쇄의 CDR 영역의 다양성이 대부분의 항체 특이성에 충분하였음을 보고하였으며, 체세포 돌연변이가 놀랍게도 높은 친화성을 가능하게 할 수 있음을 지적하였다. 실제로, 단독의 중쇄 또는 심지어 단일의 VH 도메인이 온전한 항체와 유사한 친화성으로 항원에 결합할 수 있음을 보여주는 이전의 연구에 의해 제안되는 바와 같이, H-CDR3은 항원 결합에서 우세한 역할을 수행하는 것으로 나타났다(예를 들어, 문헌[Nature 341, 544-546,1989]; 및 문헌[J. Immunol. Methods 193, 177-187,1996] 참조). 물론, 선택된 CDR의 변형은 결합 부위의 전반적인 입체형태의 변화를 한번 더 야기하여, 다시 높은 수준의 예측 불가능성을 야기할 수 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0011] 따라서, 종양 미세환경, 특히 괴사 세포의 표적화를 가능하게 하여, 종양에 대한 면역 반응의 위치-특이적 조절

을 허용하는 인간화 항체 조성물 및 방법이 필요하다.

과제의 해결 수단

- [0012] 본 발명의 주제는 개선된 결합 특징을 갖는 인간화 TNT 항체의 조성물 및 이의 생성 및 이용 방법에 관한 것이다.
- [0013] 본 발명의 주제의 일 양태에서, 본 발명자들은 상응하는 비-인간화 항체에 비하여 핵 표적(예를 들어, DNA, 특히 단일 가닥 DNA(ssDNA))에 대하여 개선된 결합 친화성을 갖는 인간화 항-핵 항체를 고려한다. 특히 고려되는 인간화 항체는 상응하는 비-인간화 항체보다 적어도 2배, 더욱 전형적으로 적어도 4배, 가장 전형적으로 적어도 8배 더 높은 결합 친화성을 갖는다. 더욱이, 바람직한 인간화 항체는 상응하는 비-인간화 항체에 비하여 H-CDR3 내에 돌연변이된 아미노산을 갖는다. 예를 들어, H-CDR3 내의 돌연변이된 아미노산은 107Phe→Arg, 101Ile→His, 102Gly→Arg, 109Tyr→Thr, 103Val→Ser, 104Arg→Thr, 109Tyr→Arg 및 104Arg→Leu일 수 있다.
- [0014] 상이한 관점에서 보면, 인간화 항체는 TRYWMH(SEQ ID NO: 1)를 포함하는 H-CDR1 서열, GAIYPGNSDTSYNQKFKG(SEQ ID NO: 2)를 포함하는 H-CDR2 서열, EEIGVRRWFAY(SEQ ID NO: 3)를 포함하는 H-CDR3 서열, RARQISNYLH(SEQ ID NO: 4)를 포함하는 L-CDR1 서열, ASQSI(SEQ ID NO: 5)를 포함하는 L-CDR2 서열 및 QQNSWPLT(SEQ ID NO: 6)를 포함하는 L-CDR3 서열 중 적어도 하나를 가질 수 있다. 따라서, 추가의 고려되는 양태에서, 인간화 항체는 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCAS GYTFTRYWMHWVRQAPGQALEWIGAIYPGNSDTSYNQKFKGKATITADTSTNTAYMELSSLRSEDTAVVYCARGEEIGVRRWFAYWGQGLTVTVSS(SEQ ID NO: 7)를 포함하는 VH 서열 및/또는 IVLTQSPATLSLSPGERATLSCRARQISNYLHWYQQKPGQAPRLLIYASQISISGIPDRFSGSGSGTDFLTISRLEPEDFAVYYCQQNSWPLTFGQGTKVEIK(SEQ ID NO: 8)를 포함하는 VL 서열을 가질 수 있다.
- [0015] 본 발명의 주제의 또 다른 양태에서, 본 발명자들은 또한, 치료제 및/또는 영상화제에 커플링된 본원에 고려되는 인간화 항체의 적어도 결합 부분을 포함하는 하이브리드 분자를 고려한다. 예를 들어, 항체의 적합한 결합 부분은 전장 항체, Fab 단편, F(ab')₂ 단편, Fab₂ 단편 및 scFv를 포함하는 한편, 고려되는 치료제는 사이토카인 또는 그의 부분, 케모카인 또는 그의 부분, 골수-유래 억제 세포(MDSC)의 억제제, M2 대식구의 억제제, 방사성동위원소, 동시-자극 분자, 톨-유사 수용체("TLR") 효능제 또는 리간드, 상피 중간엽 전이("EMT")를 간섭하는 분자 및/또는 화학치료 약물을 포함한다. 고려되는 영상화제는 방사성동위원소, 양전자 방사 단층촬영(PET) 표지 및/또는 단일-광자 방출 전산화 단층촬영(SPECT) 표지를 포함한다. 따라서, 본 발명자들은 또한, 본원에 제시된 바와 같은 항체 또는 하이브리드 분자를 포함하는 약제학적 조성물을 고려한다. 가장 전형적으로, 이러한 약제학적 조성물은 주사용으로 제형화될 것이다.
- [0016] 본 발명의 주제의 또 다른 양태에서, 본 발명자들은 괴사 세포의 표적화 방법을 고려하며, 이러한 방법은 괴사 세포를 본원에 제시된 바와 같은 항체 또는 하이브리드 분자와 접촉시키는 단계를 포함할 것이다. 본 발명의 주제에 제한되지 않지만, 전형적으로, 괴사 세포가 종양 미세환경에서의 괴사 종양 세포이고/이거나, 접촉시키는 단계가 생체 내에서 수행되는 것이 바람직하다.
- [0017] 따라서, 본 발명자들은 또한, 괴사 종양 세포를 함유하는 종양 미세환경으로의 치료제 또는 영상화제의 전달 방법을 고려한다. 이러한 방법에서, 본원에 제시된 바와 같은 항체에 커플링된 치료제 또는 영상화제가 제공된다. 그 다음, 괴사 종양 세포는 항체가 종양 미세환경에서의 괴사 세포 내의 핵 표적에 결합되게 하는 조건 하에서 치료제 또는 영상화제와 미세환경 내에서 접촉된다.
- [0018] 바람직한 양태에서, 치료제는 사이토카인 또는 그의 부분, 케모카인 또는 그의 부분, MDSC의 억제제, M2 대식구의 억제제, 방사성 동위원소, 동시-자극 분자, TLR 효능제 또는 리간드, EMT를 간섭하는 분자 및 화학치료 약물 중 적어도 하나를 포함하는 한편, 영상화제는 방사성 동위원소, PET 표지 및 SPECT 표지 중 적어도 하나를 포함한다. 가장 전형적으로, 종양은 고형 종양이며, 치료제 또는 영상화제의 전달은 혈관구조 투과성 향상제(예를 들어, IL-2)를 사용하여 향상될 수 있다.
- [0019] 본 발명의 주제의 추가의 양태에서, 본 발명자들은 무인 항체로부터의 친화성 최적화된 인간화 항체의 생성 방법을 추가로 고려한다. 가장 전형적으로, 이러한 방법은 무인 항체 서열과 소정의 최소 동일성(예를 들어, CDR을 제외하고 적어도 90% 또는 92% 또는 94% 또는 96%)을 갖는 인간 항체 서열을 동정하는 단계를 포함할 것이다. 또 다른 단계에서, VH 및 VL에 대한 무인 CDR을 동정된 인간 항체 서열의 각각의 VH 및 VL 내로 이식하여, 키메라 VH 및 VL 서열을 수득하며, 키메라 VH 및 VL 서열을 사용하여 scFv-하이브리드를 생성한다. 그

다음, 위치-지정 돌연변이유발을 H-CDR3에서 수행하여, scFv-하이브리드 라이브러리를 생성하며, 친화성 선택 (및/또는 성숙)을 사용하여 scFv-하이브리드 라이브러리로부터 결합체를 동정한다. 또 다른 단계에서, 결합체의 키메라 VH 및 VL 서열을 인간 항체 서열 내로 이식하여, 친화성 최적화된 인간화 항체를 수득한다.

[0020] 가장 전형적으로, scFv-하이브리드는 파지 디스플레이 하이브리드이지만, 또한 RNA 디스플레이 하이브리드일 수도 있다. 더욱이, H-CDR3에서의 위치-지정 돌연변이유발이 H-CDR3의 단일의 아미노산 위치에 대하여 유도되는 것이 일반적으로 바람직하다(그러나 필수적이지는 않다). 마찬가지로, 친화성 선택이 적어도 3회의 연속 선택/농축 사이클에 걸쳐 수행되는 것이 바람직하다(그러나 필수적이지는 않다). 요망되는 경우, 친화성 선택은 H-CDR3 및/또는 프레임워크 영역에서의 추가의 위치-지정 돌연변이유발의 적어도 하나의 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[0021] 본 발명의 주제의 다양한 목적, 특성, 양태 및 이점은 첨부된 도면과 함께 바람직한 실시형태의 하기의 상세한 설명으로부터 보다 명백해질 것이며, 도면에서 유사한 숫자는 유사한 컴포넌트를 나타낸다.

도면의 간단한 설명

[0022] 도 1a, 도 1b 및 도 1c는 인간, 무린 및 인간화 단백질 부분의 VH(도 1a) 및 VL(도 1b) 서열의 예시적인 정렬 및 예시적인 EP/scFv의 일반적인 어셈블리(도 1c)를 보여주는 개략도를 제공한다. 도 1a에서, mTNT-3/HV는 SEQ ID NO: 9이며; EP/HV는 SEQ ID NO: 10이며, HuFd138/HV는 SEQ ID NO: 11이다. 도 1b에서, mTNT/LV는 SEQ ID NO: 12이며, EP/LV는 SEQ ID NO: 13이며, huB-B10/LV는 SEQ ID NO: 14이다.

도 2는 EP/ScFv의 H-CDR3의 돌연변이 및 미정제 DNA에 대한 그의 라이브러리의 패닝을 보여준다. EEIGVRRWFAY(SEQ ID NO: 3) 도메인은 중쇄 CDR3 서열이다. 음영 처리된 "X"는 20가지의 천연 발생 아미노산 중 어느 하나일 수 있다. 프라이머 Pr1 내지 Pr11은 각각 SEQ ID NO: 16 내지 26이다.

도 3은 연속 회차의 패닝에 걸친 결합의 예시적인 증가를 도시한 그래프이다.

도 4는 결합된 파지미드에 대한 클론 결과를 보여주는 플롯이다.

도 5는 예시적인 인간화 IgG 시료가 있는 SDS 겔의 사진이다.

도 6은 EP27, EP7, EP35, EP103, EP54, EP102 및 EP51인 선택된 돌연변이 항체 단백질의 예시적인 상대 친화성을 도시한 그래프이다.

도 7은 본 발명의 주제에 따른 면역염색 선택된 인간화 항체의 다양한 현미경사진을 보여준다.

도 8은 EP2 및 EP51 인간화 항체에 대한 친화성 측정치를 보여주는 그래프이다.

도 9a 내지 도 9d는 본 발명의 주제에 따른 다양한 인간화 항체의 다양한 조직 및 시점에 걸친 생체분포에 대한 예시적인 그래프를 도시한 것이다.

도 10은 혈관 투과 향상 없이 본 발명의 주제에 따른 하나의 인간화 항체의 다양한 조직에 걸친 생체분포에 대한 예시적인 그래프를 도시한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0023] 본 발명자들은 이제 다양한 표적에 대한 항체가 인간화될 수 있을 뿐 아니라, 그들의 항원 친화성에 관하여 개념적으로 단순하고 효율적인 방식으로 개선될 수 있는 것을 발견하였다. 예를 들어, 하기에 더욱 상세히 기재된 바와 같이, 본 발명자들은 무린 항-핵 항체를 실질적으로 개선된 친화성을 갖는 인간화 항체로 전환시켰다.

[0024] 특히, 요망되는 무린 항체(예를 들어, ssDNA에 결합하는 무린 항체)에 기초하여, 가장 높은 아미노산 동일성을 갖는 상응하는 인간 항체 서열을 항체 데이터베이스에서 동정하였다. 가장 전형적으로, 적합한 인간 항체 서열은 CDR을 제외하고, 적어도 90% 또는 적어도 92% 또는 적어도 94% 또는 적어도 96%의 소정의 최소 동일성을 가질 것이다. 일단 동정되면, VH 및 VL에 대한 무린 CDR을 이어서 해당 분야에 널리 알려져 있는 통상적인 방법을 사용하여 인간 서열로 이식함으로써, 키메라 VH 및 VL 서열을 수득한다. 물론, 이러한 이식 단계가 시험관 내에서 또는 가상 환경에서(*in silico*) 행해질 수 있으며, 실제 키메라 서열이 실험을 위해 필요하지 않음을 인식해야 한다. 그 다음, 이식 방식과 관계없이, 필요한 대로 친화성 성숙 또는 다른 개선을 위한 기본 구조로서 키메라 VH 및 VL 서열을 사용하여 scFv-하이브리드를 생성한다. 다시 한번, 해당 분야에 공지된 서열 정보 또는 실제 핵산 부분으로부터 scFv를 제조하는 수많은 방법이 존재하며, 이러한 scFv를 생성하는 모든 방식은 본원에

사용하기에 적합한 것으로 간주된다. 특히 바람직한 양태에서, scFv는 요망되는 친화성 또는 다른 분자 특성을 갖는 변이체의 신속한 동정 및 클론 증폭을 가능하게 하는 선택 시스템에 융합된다. 예를 들어, 본원에 사용하기에 적절한 선택 시스템은 다양한 파지 패닝 시스템(예를 들어, pIII, pVIII, pIX에 기초) 및 RNA 디스플레이 시스템(예를 들어, 푸로마이신 결합에 기초)을 포함하며, 선택된 클론의 모든 알려져 있는 친화성 성숙 및 단리 방식이 본원에 사용하기에 적합한 것으로 간주되는 것을 인식해야 한다. 따라서, 클론 선택 및/또는 친화성 성숙은 CDR 및/또는 프레임워크 영역 중 적어도 하나를 표적화하는 간헐적 위치-지정 돌연변이유발의 하나 이상의 단계를 포함할 수 있다.

[0025] 본 발명의 주제의 추가의 양태에서, 본 발명자들은 친화성 및 심지어 생체 이용 가능성/흡수가 오직 H-CDR3 부분만을 변형시킴으로써 개선될 수 있음을 주목하였다. 특히, 본 발명자들은 단일의 아미노산 스캐닝을 수행하였으며, 선택된 돌연변이체가 하기에 더욱 상세히 나타낸 대로, 실질적으로 증가된 결합을 가졌음을 발견하였다. 유리하게, 이러한 돌연변이유발은 전장 항체(전형적으로 IgG)를 시험하는 것보다는 scFv 포맷을 사용하여 행해질 수 있다. scFv의 친화성 개선된 키메라 VH 및 VL 서열을 이어서 인간 항체 서열로 이식하여, 친화성 최적화된 인간화 항체를 수득할 수 있음을 쉽게 알 수 있을 것이다. 그 다음, 제조된 인간화 및 친화성 개선된 항-핵 항체를 다양한 검정에서 시험하여, 하기에 더욱 상세히 나타낸 대로, 적절한 선택적인 결합을 확인하였다.

[0026] 그에 따라 제조되는 항체의 고려되는 용도에 관하여, 본원에 제시된 항-핵 항체가 피사, 특히 종양 미세환경에서의 피사 세포의 표적화에 특히 유익한 것을 인식해야 한다. 종양 미세환경이 종종 다양한 면역 회피 메커니즘을 촉진시키는 표적화하기 어려운 환경(예를 들어, NK 세포의 활성을 감소시키는 저산소증, EMT를 촉진시키는 영양소 및 산소의 결여 등)이기 때문에, 미세환경으로의 다양한 면역 자극 인자의 특이적인 전달 및 유지의 면역 요법에 특히 유익한 것으로 여겨진다.

[0027] 그와 관련하여, 용어 '아포토시스' 및 '피사'는 본원에 상호교환 가능하게 사용되지 않지만, 2가지의 주요한 별개의 메커니즘 및 경로의 세포사를 지칭하는 것을 인식해야 한다. 아포토시스는 특수 신호전달 사건 및 단계적 세포 췌트-다운(예를 들어, 블레빙(blebbing), 세포 수축, 핵 단편화, 염색질 응축, DNA 단편화, mRNA 붕괴)을 수반하는 널리 정의된 세포 예정사의 과정이지만, 피사는 전형적으로 세포소기관 기능의 소실, 세포 파열 및 환경 내로의 세포 내용물의 방출과 함께 비조직화된 세포사의 과정으로서 입증된다. 또한, 피사는 전형적으로 염증성 세포 반응을 동반한다. 더욱이, 피사는 면역계가 종양을 "발견"하고, 면역학적으로 반응하는 부위임을 인식해야 한다. 피사로의 페이로드의 전달은 면역계가 종양을 인식하고, 이에 반응하는데 도움이 될 것이기 때문에, 이것은 중요하며, 이에 따라, 이들 치료적으로 유효한 페이로드의 바람직한 전달 부위이다.

[0028] 따라서, 본 발명자들은 또한, 종양 미세환경으로 영상화제 및/또는 치료제를 전달하기 위한 항체 및 그의 단편의 용도를 고려한다. 가장 전형적으로, 항체 또는 그의 단편은 핵 표적, 특히 ssDNA에 대하여 특이적인 결합을 가질 것이다(즉, 예를 들어, 표면 플라스몬 공명(SPR) 또는 다른 기법에 의해 결정시 10^{-7} M 미만, 더욱 전형적으로 10^{-8} M 미만의 Kd로 결합한다). 가장 전형적으로(그러나 모든 경우에 반드시 그렇지는 않음), ssDNA로의 결합은 히스톤 및 다른 핵단백질의 존재와 독립적인 것이다.

[0029] 물론, 영상화제 및/또는 치료제가 공유 및 비-공유 결합을 포함하는 수많은 방식으로 항체(또는 그의 단편)에 커플링될 수 있음을 인식해야 한다. 가장 전형적으로, 커플링은 공유적 커플링일 것이며, 이는 통상적인 커플링 화학, 예컨대 아미노기 반응성 시약(예를 들어, N-하이드록시-숙신이미드 에스테르, 다양한 알데히드, 카보디이미드 화합물, 에폭시드, 이미도에스테르 등) 또는 술포하이드릴기 반응성 시약(예를 들어, 다양한 말레이미드, 티올 등)을 사용하여 달성될 수 있거나, 항체(단편)가 관심 제2 단백질에 프레임 내 융합되는 선택적 링커에 프레임 내 융합되는 재조합 클로닝 기법을 통해 구현될 수 있다. 적합한 링커는 요망되는 길이(예를 들어, 요망되는 공간적 거리를 제공), 아미노산 조성(예를 들어, 절단 가능한 링커 또는 유연성 링커를 제공) 등에 의해 선택될 수 있다. 추가로 고려되는 커플링 방식에서, 커플링은 비공유적으로 이루어질 수 있으며, 특히 바람직한 방식에서, 커플링은 공지된 결합 쌍의 요소, 예컨대 비오틴/아비딘, 셀룰로스/셀룰로스 결합 단백질, 니켈-니트릴로트리아세트산(Ni-NTA)/올리고-히스티딘 등에 의해 제공된다.

[0030] 진단제에 관하여, 모든 검출 가능한(바람직하게는 정량적으로 검출 가능한) 작용제가 본원에 사용하기에 적합한 것으로 간주하는 것이 고려된다. 또한, 검출이 해당 분야에 공지된 적합한 방법을 사용하여 생체 외에서(예를 들어, 조직 절편 상에서) 및/또는 생체 내에서 수행될 수 있음을 주목해야 한다. 예를 들어, 시각적으로 검출 가능한 영상화제는 형광단, 발광 기, 촉매 활성 기(예를 들어, 염료를 침전시키고/시키거나 크로모젠(chromogen) 또는 루미노젠(luminogen)을 활성화시키기 위함), 방사선 사진술로 검출 가능한 기(예를 들어,

PET, SPECT, NMR 표지, 방사성 동위원소 등)를 포함한다.

[0031] 마찬가지로, 치료제에 관하여, 모든 치료제가 본원에 사용하기에 적합한 것으로 간주하는 것이 고려된다. 그러나, 본 발명의 주제의 특히 바람직한 양태에서, 치료제는 면역 자극 효과를 가질 것이다. 가장 전형적으로, 이러한 자극제 효과는 종양 미세환경에서의 암 세포의 면역 회피를 야기하는 하나 이상의 메커니즘을 역전시키거나 중화시킬 것이다. 예를 들어, 면역 회피가 M2 대식구 또는 조절 T-세포(Treg)의 동원에 기초하여 이루어지는 경우, 적합한 치료제는 이러한 저해 세포를 특이적으로 불활성화시키거나 파괴하는 것들(예를 들어, 젬시타빈(gemcitabine), RP-182(US9492499호의 SEQ ID NO: 121 참조) 또는 사이클로포스파미드(cyclophosphamide))을 포함할 것이다. 추가로 또는 대안적으로, 면역 회피가 이펙터 및/또는 헬퍼 세포를 사용한 체크포인트 저해에 기초하여 이루어지는 경우, CTLA4 또는 PD1에 대한 결합제 또는 길항제(예를 들어, 이필리무맙(ipilimumab), 펄브롤리주맙(pembrolizumab) 등)가 고려된다.

[0032] 역으로, 치료제가 면역 자극 활성을 갖는 경우 면역 요법은 치료제의 이용에 의해 향상될 수 있음도 또한 인식해야 한다. 이러한 면역 자극 활성은 바람직하게는 하나 이상의 종양(신생)항원의 맥락에서 항체 또는 그의 단편에 커플링된 동시-자극 신호의 이용을 통해 달성될 수 있다. 예를 들어, 동시-자극 신호는 4-1BBL, OX40L, GITRL, TIM3, LFA3, ICAM1, ICOSL 등을 포함한다. 또한, 면역 자극제가 면역 자극 사이토카인, 예컨대 IL-2, IL-12, IL15, IL-15 초효능제(superagonist), TLR 효능제 및 리간드 등도 또한 포함할 것을 인식해야 한다. 또한, 치료제가 추가의 면역 적격 세포(immune competent cell)를 유인할(염증-유발) 케모카인도 또한 포함할 수 있음을 인식해야 한다. 이러한 맥락에서, 치료제가(괴사 세포가 이미 비-생존 가능하기 때문에) 일반적으로 괴사 부위에서 종양 세포를 사멸시키지 않지만, (예를 들어, 항원 확산 및 항원 캐스캐이딩을 이용하거나, 면역 억제 메커니즘의 역전에 의해) 괴사 조직에 근접한 종양 세포에 대한 향상된 면역 반응을 촉진시킬 것을 인식해야 한다.

[0033] 요망되는 경우, 치료제는 또한 IL-8 및 TGF- β 를 포함하는, 종양 미세환경 내의 EMT(상피 중간엽 전이)에 기여하는 인자를 표적화할 작용제를 포함할 수 있다. 따라서, 적합한 치료제는 또한 IL-8 및 TGF- β 에 결합하거나 다르게는 이를 격리시키는 것들을 포함할 것이다.

[0034] 또한, 치료제는 암의 치료에 사용되는 더욱 통상적인 약물도 또한 포함할 수 있다. 예를 들어, 전형적인 항암 약물은 항대사물질, 미세소관 형성 또는 디스어셈블리를 간섭하는 약물, DNA 알킬화제 및 국소이성질화효소 저해제, 세포독성 약물 등을 포함하며, 이들 모두는 종양 미세환경에서 일반적인 조건 하에서 절단 가능할 수 있다. 고려되는 치료제는 또한 방사성 치료제, 예컨대 알파 및 베타 방출체(예를 들어, Bi-213, Pb-212, I-131, Ac-225, Sr-89 등)를 포함한다. 이러한 작용제는 일반적으로 종양 또는 종양 미세환경에서의 비-괴사 종양 세포에 영향을 미칠 것이다.

[0035] 결과적으로, 하기에 더욱 상세히 나타낸 바와 같이, 본 발명자들은 일반적으로 괴사 세포를 핵 표적, 특히 ssDNA에 특이적으로 결합하는 결합제와 접촉시키는 단계를 포함하는 괴사 세포(전형적으로 종양 세포, 가장 전형적으로 종양 미세환경에서의 괴사 종양 세포)의 표적화 방법을 고려한다. 또한, 접촉은 이러한 방법에서 생체 내에서 또는 시험관 내에서 수행될 수 있다. 예를 들어, 단계가 시험관 내에서 수행되는 경우, 상대적으로 적은 양(예를 들어, 0.001 내지 100 μ g 또는 0.01 내지 0.1 μ g 또는 0.001 내지 0.01 μ g)의 항체가 필요할 수 있다. 다른 한편, 단계가 생체 내에서 수행되는 경우, 상대적으로 많은 양(예를 들어, 0.01 내지 100 mg 또는 0.1 내지 10 mg 또는 1 내지 10 mg)의 항체가 필요할 수 있다. 물론, 항체가 영상화제 및/또는 치료제에 커플링되는 경우, 항체의 양은 요망되는 효과를 위해 필요한 영상화제 및/또는 치료제의 유형 및 양에 의해서도 적어도 부분적으로 결정될 것을 인식해야 한다.

[0036] 결과적으로, 본 발명자들은 또한, 괴사 종양 세포를 함유하는 종양 미세환경으로의 치료제 및/또는 영상화제의 전달 방법을 고려한다. 상기 언급된 바와 같이, 이러한 방법은 전형적으로 핵 표적(특히 ssDNA)에 결합하는 항체에 커플링된 치료제 또는 영상화제를 제공하는 단계 및(바람직하게는 생체 내에서) 미세환경에서의 괴사 종양 세포를 항체가 종양 미세환경에서의 괴사 세포 내의 핵 표적에 결합되게 하는 조건 하에서 치료제 또는 영상화제와 접촉시키는 추가의 단계를 포함할 것이다.

[0037] 또한, 본원에 고려되는 방법은 종양 괴사를 증가시킴으로써 종양 내로의 변형된 항체의 흡수를 향상시켜, 치료적 또는 진단적 페이로드의 전달을 최적화시키는 하나 이상의 단계를 추가로 포함할 수 있다. 예를 들어, 적합한 추가의 단계는 방사선요법, 화학요법 또는 면역요법 및 특히 저용량 메트로노믹 화학요법(metronomic chemotherapy) 및 방사선요법을 포함한다.

[0038] **실시예**

[0039] **시약:** 글루타민 신테타제 유전자 증폭 시스템을 갖는 플라스미드 pEE6hCMV-B 및 pEE12를 론자 바이올로지스 (Lonza Biologics)(영국 슬라우 소재)로부터 구입하였다. 제한 엔도뉴클레아제, T4 DNA 리가제 및 다른 분자 생물학 시약을 뉴 잉글랜드 바이오랩스(New England Biolabs)(미국 매사추세츠주 비벌리 소재) 또는 베링거 만하임(Boehringer Mannheim)(미국 인디애나주 인디애나폴리스 소재)으로부터 구입하였다. RPMI-1640 배지, MEM 비-필수 아미노산 용액, 페니실린-스트렙토마이신 용액, 분해된 미정제 DNA, ABTS(2,2'-아조벤젠-2-카복실산)를 시그마 케미컬 컴퍼니(Sigma Chemical Co.)(미국 미주리주 세인트 루이스 소재)로부터 구입하였다. 글루타민 존재 및 부재의 하이브리도마 무혈청 배지(SFM 배지)를 라이프 테크놀로지스, 인코포레이티드(Life Technologies, Inc.)(미국 메릴랜드주 게이터스버그 소재)로부터 구입하고, 투석된 우태아혈청을 하이클론 래보러터리즈, 인코포레이티드(Hyclone Laboratories, Inc.)(미국 유타주 로간 소재)로부터 취득하였다. 요오드-125를 듀폰트(DuPont)/뉴 잉글랜드 뉴클리어(New England Nuclear)(미국 매사추세츠주 노쓰 빌레리카 소재)로부터 0.1N 수산화나트륨 중 요오드화나트륨으로서 취득하였다. 6주령 BALB/c 마우스를 할란-스프라그 다울리(Harlan-Sprague Dawley)(미국 인디애나주 인디애나폴리스 소재)로부터 구입하였다.

[0040] **EP/ScFv의 설계 및 어셈블링:** 인간 항체 데이터베이스를 검색함으로써, 2가지 서열, huFd138 HV 및 hu B-B10 LV는 각각 중쇄 및 경쇄의 원래의 TNT-3 아미노산 서열과 가장 큰 동일성을 가졌다. 이 때문에, 그들을 마스터 주형으로서 사용하여, 각각 EP 가변 중쇄 및 경쇄를 구축하였다. 그 다음, 6개의 CDR을 상응하는 인간 프레임워크 영역 내로 간단히 이식하였다. 6개의 뮤린 TNT-3 CDR 서열을 알려져 있는 인간 항체에서 관찰되는 코돈 사용을 사용하여 상응하는 뉴클레오타이드 서열로 전환시켰다. 가변 중쇄 및 경쇄 서열을 (GSSSS)3 링커와 조합하여, EP/ScFv를 구축하였다. 설계된 DNA 서열을 8개의 중첩 올리고뉴클레오타이드로 나누고 합성하였다.

[0041] 전장 ScFv를 일련의 어셈블링 PCR에 의해 취득하고, 5' 및 3' 말단에서 프라이머의 쌍을 사용하여 증폭시켰다. NotI 및 SpeI으로 분해된 PCR 산물을 pBlueScript SK(-) 내로 클로닝하였다. DNA 시퀀싱에 의해, 정확한 서열을 갖는 하나의 클론을 다음 돌연변이를 위한 표준 주형으로서 선택하였다. EP 항체 후보물질(본원에 EP 또는 huTNT IgG1 또는 항체로도 지칭됨)의 친화성을 회복하고 개선시키기 위하여, 11개의 코돈을 포괄하는 H-CDR3 도메인 상의 위치-특이적 무작위 돌연변이를 수행하였다. 11개의 위치-특이적 돌연변이를 함유하는 프라이머의 세트를 설계하였다. PCR을 사용하여, 11개 아미노 잔기의 무작위 돌연변이를 단계적으로 도입하였다. 11개의 돌연변이 및 인간화된 ScFv를 5' 및 3' 말단에서 프라이머의 쌍을 사용하여 PCR에 의해 증폭시켰다. 그 다음, PCR 산물을 정제하고, NotI 및 SpeI으로 분해하고, 분해된 람다 파지 SurfZAPTM 벡터 내로 삽입하였다. 그 다음, 숙주 세포 XL-1을 감염시킨 패키징된 SurfZAPTM 벡터를 증폭시키고, ExAssistTM 헬프 파지를 사용하여 파지미드 pSurfscripTTM SK(-) 내로 잘라 냈다. 파지미드를 SOLR 세포에서 성장시켜, 헬프 파지를 제거하고, XL-1 세포에서 증폭시켰다. EP/ScFv를 융합 단백질(ScFv/cpIII)로서 발현시키고, VCSM13 헬퍼 파지를 사용하여 재조합 파지미드 입자의 코트 단백질 내로 혼입되게 하였다. 파지미드를 PEG 침전에 의해 증폭된 상층액으로부터 회수하고 농축시켰다.

[0042] 25 ml 플라스크 상으로 코팅된 미정제 DNA에 대한 4회의 바이오패닝을 스트라타진(STRATAGENE) 프로토콜에 따라 행하였다. 약술하면, 각각의 패닝을 위하여 3 ml PBS 중 10^{12} 개 초과 파지미드를 사용하였다. 미결합 파지를 10 PBST 세척으로 제거하고, 결합된 파지를 5 ml 글리신-HCl(pH 2.2)로 용리시켰다. 100 μ l의 감염된 박테리아를 선택 플레이트 상으로 플레이팅하여, 콜로니 형성 단위(c.f.u.)를 계수함으로써 용리된 파지의 역가를 결정하였다. 4차의 패닝으로부터 ScFv 파지를 ELISA 플레이트의 각각의 웰에 코팅된 10 μ g/ml 미정제 DNA 100 μ l를 사용하는 파지-ELISA에 의해 미정제 DNA와의 반응성에 대하여 시험하였다. 결합된 파지를 토끼 항-M13 항체에 이어서 염소 항-토끼 항체 서양고추냉이 과산화효소 컨주게이트로 검출하였다. 기질(ABTS)과의 10분 동안의 인큐베이션 후에 A₄₀₅ 값을 결정하고, ELISA 판독기에 의해 측정하였다.

[0043] **EP IgG의 구축 및 발현:** 온전한 항체 분자를 회복하기 위하여, EP/ScFv를 EP IgG1로 전환시켰다. 이를 달성하기 위하여, EP 중쇄 및 경쇄의 가변 영역을 적절한 제한 엔도뉴클레아제 부위를 도입하도록 설계된 프라이머를 사용하여 클로닝 벡터로부터 PCR-증폭시켰다. 중쇄 가변 영역을 인간 감마 1 불변 영역(CH)이 이전에 클로닝된 발현 벡터 pEE6hCMV-B 내로 도입하였다. 경쇄 가변 영역을 인간 VL 불변 영역 cDNA를 함유하는 발현 벡터 pEE12 내로 삽입하였다. 최종 발현 벡터는 각각 CMV 주요 즉시 초기 프로모터의 제어 하에, 각각 인간 경쇄 및 중쇄에 대한 전사 카세트를 함유하는 pEE6hCMV-B/EP HC 및 pEE12/EP LC였다. pEE12/EP LC는 또한, SV40 초기 프로모터의 제어 하에, 선택 가능한 마커 글루타민 신테타제에 대한 cDNA 서열을 함유한다. 각각의 벡터를 완성한 후에, pEE6hCMV-B/EP HC 및 pEE12/EP LC 벡터를 EP IgG1의 발현을 위하여 숙주 NSO 뮤린 골수종 세포 내로 동시-트랜

스펙션시켰다. 항체 산물을 함유하는 상층액을 처음에는 분해된 미정제 DNA가 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 코팅된 96 웰 마이크로타이터 플레이트를 사용하는 간접 ELISA에 의해 동정하였다. 24시간 생성 속도 검정에 의해 가장 고도로 생성하는 클론을 동정하였다. 제한 회석에 의한 2회의 서브클로닝 후에, 가장 고도로 생성하는 클론을 증량하고, EP IgG1을 단백질 A 친화성 크로마토그래피 및 이온-교환 크로마토그래피에 의해 세포 배양 상층액으로부터 단계적으로 정제하였다. EP 항체의 순도를 SDS-PAGE에 의해 시험하였다.

[0044] ELISA에 의한 미정제 DNA 결합의 결정: EP IgG 후보물질의 DNA 결합 활성을 측정하기 위하여, 96-웰 ELISA 플레이트를 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 미정제 DNA 100 μl 로 코팅하고, 1% BSA-PBS로 블로킹하고, EP IgG 후보물질의 단계 회석물을 웰에 첨가하고, 37°C에서 1시간 동안 인큐베이션시켰다. 정제된 chTNT-3을 표준물질로서 사용하였다. 임의의 미결합 항체를 0.05% PBST로 3회의 세척을 사용하여 제거한 다음, 염소 항 인간 IgG 2차 항체 컨쥬게이트 서양 고추냉이 과산화효소에 이어서 발색 기질을 첨가하였다. OD₄₀₅를 ELISA 판독기에 의해 측정하였다.

[0045] 간접적 면역형광 염색에 의한 Raji 세포에서의 EP 후보물질의 국소화: Raji 세포 내의 이들 EP IgG 후보물질의 국소화를 관찰하기 위하여, 간접적 면역형광 염색을 수행하였다. 약술하면, Raji 세포를 10% 완충 중성 포르말린으로 고정하고, PBS로 세척하였다. 200 μl 의 PBS 중 104개의 Raji 세포를 1.5 ml 튜브 내에서 다양한 EP 항체와 37°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 세포를 PBST로 5회 세척하고, 미결합 항체를 원심분리에 의해 제거하였다. FITC-컨쥬게이트된 염소 항-인간 IgG 항체를 1:30 희석으로 첨가하고, Raji 세포를 마지막으로 20 μl 의 PBS 중에 수집하고, 형광 현미경 하에서의 관찰을 위하여 슬라이드 상으로 스프레딩하였다.

[0046] 요오드-125 표지된 MAb의 제조: 요오드-125 표지된 MAb를 변형된 클로라민-T 방법을 사용하여 제조하였다. 약술하면, 1 mCi의 I¹²⁵ 및 20 μl 의 클로라민-T(2 mg/ml) 수용액을 100 μl 의 PBS 중 100 μg 의 MAb를 함유하는 5 ml 시험관에 첨가하였다. 2분 후에 메타중아황산나트륨 수용액 10 μl 를 사용하여 용액을 퀘칭시켰다. 그 다음, 각각의 반응 혼합물을 전형적으로 90% 내지 95% 회수를 제공하는 세파덱스(Sephadex) G-25 컬럼을 사용하여 정제하였다. 주입을 위하여 방사성 표지된 MAb를 PBS로 희석하고, 4°C에서 보관하고, 표지화 후 2시간 내에 투여하였다.

[0047] 결합 및 생체분포 연구: 방사성 표지된 MAb의 시험관 내 면역반응성을 Raji 세포를 사용하여 통상적인 고정된 세포 방사성면역검정에 의해 평가하였다. 약술하면, 방사성 요오드화 MAb(대략 100,000 cpm/관)를 간헐적으로 혼합하면서 10⁶개의 고정된 Raji 세포와 3별로 1시간 동안 인큐베이션시켰다. 인큐베이션 후에, 세포를 PBS 중 1% BSA로 3회 세척하였다. 감마 계수기에서 세포 펠렛-관련 방사능을 측정함으로써 결합된 MAb를 검출하였다. EP 항체의 결합력 상수(K_a)를 결정하기 위하여, 항원 세포, 고정된 Raji 버킷 림프종 세포를 사용하였다. 다양한 농도(10 내지 110 ng)의 I¹²⁵-표지된 EP 항체를 계속 혼합하면서 실온에서 10⁶개의 고정된 Raji 세포와 인큐베이션시키고, 3회의 PBST의 세척으로 미결합 방사능을 제거한 다음, 결합된 방사능의 양을 감마 계수기에서 계수하고, 이를 사용하여, 스캐차드(Scatchard) 분석에 의해 결합력 상수(K_a)를 계산하였다. 결합력 상수 K_a를 K = -(기울기/2)에 의해 결정하였다.

[0048] EP 항체(들) 및 chTNT-3의 생체분포를 시험하기 위하여, 6주령 암컷 무흉선 누드 마우스에 10⁷개의 LS174T 인간 결장 선암종 세포를 함유하는 접종물 0.2 ml를 좌측 옆구리에 피하 주사하였다. 종양을 대략 1 cm 직경에 도달할 때까지 성장시켰다. 각 군(n=5) 내에서, 개별 마우스에 100 $\mu\text{Ci}/10 \mu\text{g}$ 의 I¹²⁵-표지된 MAb를 함유하는 접종물 0.1 ml를 정맥내 주사하였다. 마우스를 주사 후 다양한 시간에 희생시키고, 기관, 혈액 및 종양을 제거하고, 칭량하였다. 그 다음, 시료에서 방사능을 측정하고, ID/g% 및 종양/기관 비(종양 그램당 cpm/기관 그램당 cpm)로 표현하였다. 윌콕스(Wilcoxon) 순위합 검정을 사용하여 유의성 수준을 결정하였다.

[0049] 인간화 TNT-3/ScFv의 설계 및 구축: V 영역의 인간화 TNT-3 프레임워크를 설계하기 위하여, 본 발명자들은 인간 항체 데이터베이스를 검색하였으며, 2가지 인간 항체, huFd138 HV 및 hu B-B10 LV가 각각 중쇄 및 경쇄의 원래의 TNT-3 아미노산 서열과 가장 큰 동일성을 갖는 것을 발견하였다. huFd138 HV는 mTNT-3 중쇄 서열에 대하여 81% 상동성의 프레임워크 1, 2, 3 및 4를 가졌으며(도 1a 참조); huB-B10 LV는 mTNT-3 경쇄 서열에 대하여 74% 상동성의 프레임워크 1, 2, 3 및 4를 가졌다(도 1b 참조). H-CDR의 입체형태에 대한 프레임워크 대체의 영향을 감소시키기 위하여, 중쇄 프레임워크 상의 CDR 서열에 대한 근접성으로 인해, 또는 중요한 것으로 의심되는 3가지 잔기(I⁴⁸, T⁷⁴ 및 Y⁹⁵)를 유지시켰다. 중쇄 및 경쇄의 6개의 상보성-결정 영역(CDR)의 원래의 서열을 유지하였으며, 모든 다른 서열을 인간 서열로 대체하였다. EP 후보물질의 가변 중쇄 및 경쇄 서열을 (GSSSS)₃ 링커와 조합하여, EP/ScFv를 구축하였다(도 1c 참조). 추가로 도 1a 및 도 1b에 관하여, 무린 TNT-3 및 인간 TNT-3 주형

의 아미노산 서열 정렬이 나타나 있다. 도 1a에는 뮤린 TNT-3(mTNT-3), huFd138 HV 및 EP 중쇄의 정렬이 나타나 있으며; 도 1b에는 mTNT-3, hu B-B10 LV 및 EP 경쇄 주형의 정렬이 나타나 있다. 각각의 인간 주형에 대한 넘버링은 본문에 제공되어 있다. 카바트(Kabat) 정의에 기초하여 경쇄 및 중쇄의 프레임워크 및 CDR 서열을 표지하였다. *는 인간 아미노산으로 대체되는 잔기를 나타내며; #는 유지되는 뮤린 잔기를 지칭한다. 도 1c는 (GSSSS)₃ 링커를 사용하여 EP/ScFv 내로 구축된 HV 및 LV를 개략적으로 보여준다. 특히, 6개의 CDR을 단순히 인간 프레임워크 내로 이식한 EP/ScFv는 파지-ELISA에 의해 미정제 DNA에 대하여 오직 매우 약한 반응만을 보였다. 이는 이러한 프레임워크의 대체가 EP/ScFv 친화성의 큰 감소를 야기하였음을 나타내었다.

[0050] EP/ScFv의 H-CDR3의 돌연변이 및 미정제 DNA에 대한 그의 라이브러리의 패닝: EP/ScFv의 친화성을 개선하기 위하여, H-CDR3 도메인 상의 위치-특이적 무작위 돌연변이를 각각이 도 2에 나타낸 바와 같은 무작위 돌연변이된 코돈을 함유하는 11개의 프라이머로 행하였으며, PCR에 의해 하나씩 중쇄 내로 도입하고, 11개의 돌연변이된 ScFv의 하위-라이브러리를 초래하였다.

[0051] 11개의 하위-라이브러리를 함께 동등하게 혼합하고, 분해된 람다 파지 SurfZAPTM 벡터 내로 삽입하였다. EP ScFv를 SpeI 및 NotI로 분해하고, 람다 파지 SurfZAP 벡터 내로 삽입한 다음, pSurfscript SK(-) 벡터 내로 잘라 냈다. 이는 EP/ScFv가 융합 단백질(ScFv/cpIII)로서 발현되고, 352가지 가변성을 갖는 일반 라이브러리를 구성하게 하였다. 패닝을 위하여, 이러한 라이브러리를 10¹²개의 클론으로 증폭시키고, M13 헬퍼 파지로 구제하였다. 각 회 패닝 후에, 미정제 DNA에 결합하는 라이브러리를 파지 ELISA에 의해 검출하였다. 패닝 시간이 증가함에 따라, 결합의 증가가 관찰되었다(도 3: DNA 코팅된 플라스크로부터의 용리에 의해 파지 디스플레이된 EP를 선택하고, 농축시켰다. 각각의 패닝 시행 후에, 상층액을 DNA가 사전-코팅된 96-웰 ELISA 플레이트에서 인큐베이션시켰다. 세척 후에, HRP-컨쥬게이트된 항-M13 항체를 첨가하고, 405 nm에서 플레이트를 판독하기 전에 ABTS를 기질로서 사용하였다). 3회의 패닝 후의 라이브러리의 결합은 원래의 결합보다 4배 더 컸다. 4회의 패닝 후에 회수된 클론의 90% 초과는 DNA 결합에서 양성이었으며(도 4: 파지미드 입자를 PEG 침전에 의해 클론으로부터 제조하고, 1% Blotto/TBS 블로킹 완충액 중에 재현탁화시켰다. 100 μ l 중 각각의 시료 10⁹ cfu를 미정제 DNA-코팅된 ELISA 플레이트 웰에 첨가하였다. PBST로의 세척에 의해 미결합 파지미드를 제거하였다. 결합된 파지미드를 항-M13 폴리클로날 항체에 이어서 HRP-염소 항-토끼 IgG로 검출하였다. 효소 활성을 기질로서 ABTS를 사용하여 405 nm에서 측정하였다), 이는 고 농축 과정이 행해졌음을 나타낸다.

[0052] EP IgG의 구축, 발현 및 정제: 4회 패닝으로부터의 파지 ELISA의 스크리닝 결과에 기초하여, 가장 높은 OD₄₀₅ 값을 갖는 16개의 클론을 선택하고 시퀀싱하였다. 시퀀싱 분석은 클론이 모두 H-CDR3 내에 8개의 상이한 뉴클레오타이드 및 아미노산 서열을 함유하는 것을 보여주었다. 파지 ELISA에 기초한 클론 결합의 결정은 ScFv 융합 단백질을 함유하는 파지의 정제 및 양에 의해 제한되었다. 2가 IgG보다 8 내지 10배 더 낮은 친화성을 갖는 1가 ScFv는 이러한 단점을 증폭시킬 것이다. 그들의 친화성 간의 차이를 추가로 평가하고, 결합과 H-CDR3 상의 위치 돌연변이 간의 관계를 이해하기 위하여, 그리고 전체 IgG 항체의 능력을 회복하기 위하여, 8개의 돌연변이체의 모든 ScFv를 글루타민 신테타제 유전자 증폭 시스템으로 발현시킨 상응하는 IgG1로 전환시켰다. 수율이 가장 높은 클론을 24시간 ELISA 검정에 의해 선택하였다. 세포주를 1 l 생물반응기에서 증량시키는 경우, 단백질 A 친화성 크로마토그래피에 의해 EP IgG1을 함유하는 그들의 상층액을 단계적으로 수집하고, 정제하였다. 정제 후에 약 10 μ g/ml의 EP IgG1을 수득하였다. SDS-PAGE 검정에 의해, EP IgG1(본원에 EP 또는 huTNT IgG1로 지칭됨)의 8개의 돌연변이체가 적절하게 어셈블된 것이 입증되었다(도 5: 레인(Lane) (a) 낮은 범위 마커(Low Range Markers)(바이오라드(BioRad)); (b) EP2; (c) EP7; (d) EP27.1; e. EP35.2; (f) EP51; g EP54; (h) EP102; (i) EP103; (j) chTNT-3). 2개의 밴드는 각각 EP IgG1 경쇄 및 중쇄의 분자량에 상응하는 대략 25 및 55 kD에서 나타났다.

[0053] EP 돌연변이체의 친화성의 검정 및 돌연변이의 특성화: EP IgG1 후보물질의 결합 활성이 개선되었는지 여부를 측정하기 위하여, 본 발명자들은 ELISA를 사용하여, 미정제 DNA에 대한 그들의 결합 활성을 검출하였다. 도 6에서 용이하게 알 수 있는 바와 같이, 8개의 후보물질은 모두 chTNT-3과 비교하여 유의미한 친화성의 개선을 갖는다(1.45 내지 8배). 여기서, 미정제 DNA에 결합하는 EP 돌연변이체의 상대 친화성을 측정하기 위하여, 다양한 농도의 정제된 EPIgG1을 ELISA에 의해 시험하였다. 용량-의존적 반응의 곡선을 수득하였으며, 0.3 OD에서의 그들의 농도를 최적-핏팅 선 방정식에 의해 결정하였다(정제된 chTNT-3을 표준물질로서 사용하였다). 그들의 상대 친화성을 0.3 OD에서의 EP 농도/chTNT-3 농도의 비로 표현하였다.

[0054] 친화성 및 돌연변이의 조합 분석에 의해, 가장 높은 친화성의 2개의 후보물질, EP/m7 및 EP/27.1이 m7 Ile→His

및 27.1 Gly→Arg의 상응하는 돌연변이로 약 8배 개선을 획득하는 것이 나타났다(표 1 참조). 또 다른 2개의 클론, 즉, EP/35.2 및 EP/m103(여기서, 35.2 Tyr 및 m103 Arg를 각각 Thr 및 Leu으로 변경시켰다)은 친화성의 4배 증가를 얻었다. 나머지 4개의 클론, 즉, m54, m102, m2 및 m51(여기서, 변경은 각각 m54 Arg→Leu, m102 Tyr→Arg, m2 Phe→Arg, m51 Val→Ser이었음)은 또한, 1.46 내지 2.34배 증가의 범위의 친화성의 증가를 보였다.

표 1

돌연변이체	돌연변이	빈도	DNA로의 상대적 결합
2	¹⁰⁷ Phe→Arg	1/16	1.85
7	¹⁰¹ Ile→His	2/16	8.0
27.1	¹⁰² Gly→Arg	3/16	8.25
35.2	¹⁰⁹ Tyr→Thr	6/16	4.0
51	¹⁰³ Val→Ser	1/16	1.46
54	¹⁰⁴ Arg→Thr	1/16	2.34
102	¹⁰⁹ Tyr→Arg	1/16	1.98
103	¹⁰⁴ Arg→Leu	1/16	4.0

[0055]

[0056]

개선된 친화성을 갖는 돌연변이체의 H-CDR3에 대한 아미노산 특성의 분석에 의해, 4개의 돌연변이체에서 양으로 하전된 아미노산, 예컨대 Arg 및 His이 기존의 잔기를 대체하는 한편, 다른 3개의 돌연변이체가 하이드록실기를 함유하는 아미노산으로의 대체를 보이는 것으로 나타났다. 이들 결과는 잔기의 정전기적 또는 수소 결합 능력의 변화가 미정제 DNA로의 항체 결합의 관찰되는 개선에 기여하는 것을 암시하였다. 하나의 예외적인 경우(m103)에, Leu으로의 Arg의 대체는 또한 결합 활성을 4배 증가시켰다.

[0057]

면역형광 현미경 연구: 항원 Raji 세포에 대한 EP IgG 후보물질의 특이성을 관찰하기 위하여, 간접 면역형광 염색을 수행하였다. 도 7에 나타난 바와 같이, EP IgG 후보물질은 모두 고정된 Raji 세포를 염색시켜, 핵 패턴의 염색을 제공하였다. EP2, 7, 27.1, 35.2, 51, 102 및 103은 chTNT-3과 유사한 두드러진 핵 rim-염색을 야기하였으며; EP54만이 균일한 핵 염색 패턴을 야기하였다. 모든 제제에서 세포질 또는 세포 표면 염색이 주목되지 않았다. 동등한 용량을 사용하여, 가장 강한 면역형광 염색의 강도의 순서는 51, 2, chTNT3 > 7, 27.1, 54, 102 > 103 및 35.2였으며, 이는 미정제 DNA로의 그들의 결합의 결과와 상당히 상이하다. ELISA 연구에서 미정제 DNA에 대하여 최적의 친화성을 가졌던 EP7 및 27.1은 고정된 Raji 세포에 대하여 상응하는 반응을 보이지 않았지만, 미정제 DNA에 대하여 상대적으로 낮은 친화성을 가졌던 EP51 및 2는 흥미롭게도 가장 강한 염색 패턴을 생성하였다.

[0058]

RIA에 의한 EP의 결합력 상수(K_a)의 결정: 면역형광 염색의 결과에 기초하여, Raji 세포에 대하여 최적의 친화성을 보였던 2개의 EP IgG 후보물질(EP51 및 EP2)의 결합력 상수(K_a)를 RIA에 의해 결정하였다. EP IgG 후보물질 둘 모두를 ¹²⁵I로 표지하고, 고정된 Raji 세포와 인큐베이션시켰으며, 결합된 방사능을 사용하여, 결합력 상수를 계산하였다(도 8). EP51 및 EP2의 결합력 상수는 각각 $2.8 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ 및 $2.1 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ 이었다. EP51 및 EP2는 결합력 상수 $1.4 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ 을 갖는 chTNT3의 친화성보다 항원 Raji 세포에 대하여 더 강한 친화성을 보였다. EP51 및 EP2의 K_a 값은 미정제 DNA 및 항원 Raji 세포에 대한 반응과 일치하였으며, chTNT-3과 유사하였다.

[0059]

도 9a 및 도 9c는 3일의 생체분포 후의 I-125 표지된 인간화 항체를 사용한 결장 26-보유 마우스에서의 생체분포 연구를 보여준다. 도 9b 및 도 9d는 7일 후의 생체분포를 보여준다. 데이터는 주사된 용량/그램 및 상이한 시점 후의 정상 기관 대 종양 비(n=5 마우스)로서 나타나 있다.

[0060] 제3일, 제5일 및 제7일에 종양에서 특이적이며 안정적인 흡수를 보여주는 LS174T 결장암 보유 누드 마우스(n=5)에서의 EP51 인간화 항체의 생체분포 분석은 도 10에 나타나 있다. 그에 비해, 정상 기관은 혈액 폴로부터의 제거 및 오프-표적 결합 부재를 나타내는, 표지 항체의 흡수의 감소를 보여주었다. 생체분포 분석에 의해, EP51이 표 2에 나타난 바와 같이 chTNT-3과 유사한 생체분포 특징을 가졌음이 추가로 나타났다.

표 2

	결합%	LS174T에서의 종양 흡수%		혈액 흡수%	
		2일	5일	2일	5일
huTNT3/m2 (EP2)	65 35	2.69	1.33	3.45	2.46
huTNT3/m7 (EP7)	28 22	ND			
huTNT3/m27 (EP27)	36 23	4.0	2.14	7.67	4.84
huTNT3/m35 (EP35)	29 18	2.07	1.18	4.10	1.35
huTNT3/m51 (EP51)	70 --	5.90	4.97	10.7	8.5
huTNT3/m54 (EP54)	29 25	3.48	1.26	3.75	3.05
huTNT3/m103 (EP103)	39 29	ND			
chTNT3	85 35	5.62	4.28	11.1	8.28

[0061]

[0062] 제2일 및 제5일까지의 LS174T 모델에서의 EP51의 종양 흡수 백분율은 chTNT3(5.62 및 4.28)과 유사하게 각각 5.90 및 4.97이었다. 혈액 흡수 백분율은 또한 양이 매우 유사하였다. 그러나, EP2의 종양 흡수 백분율은 chTNT-3보다 1.5배 더 높은 Ka에도 불구하고, chTNT-3의 종양 흡수 백분율보다 훨씬 더 낮은 것으로 나타났다. 제2일 및 제5일까지, LS174T 종양 모델에서의 EP2의 종양 흡수 백분율은 각각 2.69 및 1.33이었으며, 이는 chTNT-3의 종양 흡수 백분율보다 훨씬 더 낮은 것이다. EP27.1 및 EP35.2 서브클론에 대하여 도 9에, 그리고 EP51에 대하여 도 10에 나타난 추가의 생체분포 연구에 의해, chTNT-3 및 완전 인간 TNT 항체 NHS76 둘 모두에 비하여 특히 EP51에 대하여 종양에서 향상된 흡수가 나타났다. 인상 깊게, EP51은 제3일 내지 제7일에 오직 최소의 주사된 용량/그램 감소로 가졌으며, 이는 이러한 인간 항체가 종양에 의해 유의미하게 보유되는 한편, 정상 조직에서의 흡수는 음성 결합 및 혈액으로부터의 제거로 인하여 반응성이 소실되었음을 나타낸다.

[0063] 상기 데이터로부터 알 수 있는 바와 같이, 프레임워크 대체에 이어서 6개의 CDR 이식에 의한 초기 인간화 TNT-3 구축물은 각각 mTNT3의 것과 81% 및 74% 동일한 서열을 갖는 HV 및 LV 내의 그들의 인간화 프레임워크에도 불구하고, 오직 미미하게 검출 가능한 친화성만을 보였다. 이러한 발견은 간단한 6개의 CDR 이식을 사용한 인간화가 CDR의 원래의 입체형태를 변경시켰음을 시사한다. 친화성을 회복하기 위하여, H-CDR3의 위치-특이적 무작위 돌연변이를 프라이머의 세트에 의해 도입하였다. 돌연변이된 H-CDR3이 있는 EP ScFv의 라이브러리를 램다 파지 상에 디스플레이하였다. 미정제 DNA에 대한 4회의 선택 후에, 초기 인간화 TNT-3의 미미한 검출 가능한 친화성과 비교하여, 유의미한 높은 친화성을 갖는 8개의 돌연변이체가 효율적으로 농축되었다.

[0064] 미정제 DNA 결합의 ELISA 연구는 8개의 돌연변이체 모두가 모체 항체, chTNT-3의 친화성보다 훨씬 더 큰 친화성 (1.45 내지 8.25배)을 나타내었음을 보여주었다. H-CDR-3 서열의 분석에 의해, 높은 친화성을 갖는 돌연변이의 대부분이 양으로 하전된 아미노산, 예컨대 Arg 및 His, 또는 하이드록실기를 함유하는 아미노산으로 대체되었음이 나타났다. 이들 결과는 잔기의 정전기 또는 수소 결합 가능성의 변화가 미정제 DNA에 대한 항체 결합의 개선에 기여할 수 있음을 시사한다. 흥미롭게도, 최적의 친화성의 2개의 돌연변이체, EP7 및 EP27.1은 EP27.1 Gly→Arg 및 EP7 Ile→His의 상응하는 돌연변이 후에 친화성의 8배 개선을 수득하였다. DNA에 결합하기 위한 아미노산 Arg 및 His의 잠재적 역할은 류린 및 인간 항-DNA 자가 항체 둘 모두에서 강조되었다. Arg는 DNA 결합에서 가장 중요한 다목적 아미노산이다. 그것은 염기-쌍형성된 구아닌, 및 쌍형성되지 않은 및 염기-쌍형성된 시토신과 수소 결합을 형성할 수 있으며, DNA 당-포스페이트 백본과의, 그리고 결합을 용이하게 하는 유연성 측쇄와의 광범위한 상호작용을 통해 주 또는 부 DNA 홈 내로 핏팅될 수 있다. 이는 동일한 Arg로의 대체를 갖는 EP27.1, EP2 및 EP102의 친화성 개선을 부분적으로 설명할 수 있다. 그러나, 하나의 예외적인 경우에, Leu으로의 Arg104의 대체는 또한, 결합 활성을 4배 증가시켰다. 명백하게, 단순한 Arg 대체의 누적은 DNA 결합의 친화성을 증가시키지 않는다. Arg104→Leu의 변형은 그의 DNA와의 상호작용에 더 나은 위치에 Arg105를 위치시킬 수 있다.

[0065] 파지 디스플레이 및 결합 선택으로부터의 EP 돌연변이체의 CDR3 상의 돌연변이 부위의 분석은, H-CDR3 내의 잔기 98 내지 100, 105, 106 및 108이 가장 보존되었으며, 치환이 주로 잔기 101 내지 104, 107 및 109에서 발생하였음을 보여주었다. 대조적으로, 가장 높은 돌연변이의 빈도가 잔기 101, 104, 106 및 109에서 관찰되었다. 완전한 보존적인 잔기는 항원에 직접 접촉하는 역할을 하고, 특이성의 결정에 더 많은 기여를 할 수 있다.

또한, 본 발명자들은 원래의 H-CDR3이 2개의 Arg 잔기(Arg104, Arg105)를 함유하였음을 발견하였으며, 이는 항-dsDNA 자가항체가 H-CDR3에서 적어도 하나, 대부분의 경우에 2 또는 3개의 Arg를 보유하는 것과 일치한다. Arg104는 치환될 수 있으며, Arg105는 보존된다. 보존된 Arg105는 그것이 수소 결합 및 염 가교를 통해 DNA와 효율적으로 상호작용할 수 있는, H-CDR3의 중심에 위치한 자리에 존재하였다. 다른 보존된 잔기와 조합된 보존된 Arg105는 DNA 특이적인 결합의 결정적인 역할을 수행할 수 있었으며, 높은 돌연변이 빈도의 잔기는 항체의 친화성의 조절에 더 많은 기여를 할 수 있다.

[0066] ELISA 및 면역형광 염색에서의 돌연변이체의 반응성 강도의 상이한 순서 및 Raji 세포에서의 이들의 상이한 분포 패턴은 동일한 항원에 대한 일부 돌연변이체의 에피토프가 그들의 H-CDR3의 돌연변이로 인해 변화되거나 이동되었음을 나타냈다. 선택을 위하여 미정제 DNA를 사용하여 이를 시험하였다. 선택을 위하여 미정제 DNA를 사용하는 결정은 Raji 세포 핵으로부터 유래된 chTNT3이 대부분 단일 쇠 DNA에 결합할 수 있었다는 증거에 기초하였다. chTNT-3이 미정제 DNA에 대하여 강한 반응을 보였지만, chTNT-3은 핵에서 복잡한 형태의 DNA에 결합하기에 더 적합할 수 있다. Raji 세포 및 미정제 DNA에 대한 chTNT-3의 친화성의 약 2배를 갖는 EP/m51은 생체 내에서 chTNT-3과 유사한 생체분포 특징을 보였다. 또한, EP/m51의 종양 흡수%는 chTNT-3보다 더 나은 경향이 있었다. 이것은 모두 돌연변이와 조합된 CDR 이식에 의한 mTNT-3의 인간화가 성공적이었으며, 개선된 친화성을 갖는 인간화 EP 항체가 획득되었음을 뒷받침하였다.

[0067] 따라서, (1) H-CDR3 상의 돌연변이는 인간화 항체의 친화성을 개선시키기 위한 효율적인 방법이며; (2) 동일한 특이성 및 더 높은 친화성을 갖는 하나의 인간화 돌연변이체(EP51)가 획득되었으며, 이는 생체 내에서 임상 잠재력에 필요한 우수한 생체분포 프로파일을 보였으며; (3) 결과는 동일한 항원의 상이한 에피토프에 대한 인간화 항체가 동시에 획득될 수 있으며, CDR3의 돌연변이로 인한 인간화 항체의 특이성 변화의 위험이 적합한 항원의 선택에 의해 회피되거나 제어될 수 있음을 나타내며; (4) EP 돌연변이체의 특이성 및 친화성을 연구하여 획득되는 정보는 핵 항원에 결합하는 chTNT3에 관한 지식을 넓히고, EP 친화성 및 특이성을 개선시키는 데 유용하였음을 이해해야 한다. 마지막으로, 종양 보유 마우스에서의 생체분포 연구는 하나의 후보물질, EP35.2가 7일의 연구 후에 우수한 보유와 함께, 종양에서 높고 뛰어난 흡수를 가졌으며, 이러한 실험 종양 모델에서 chTNT-3 또는 완전 인간 NHS76보다 생체 내에서 뛰어난 것으로 나타나는 것을 보여주었다.

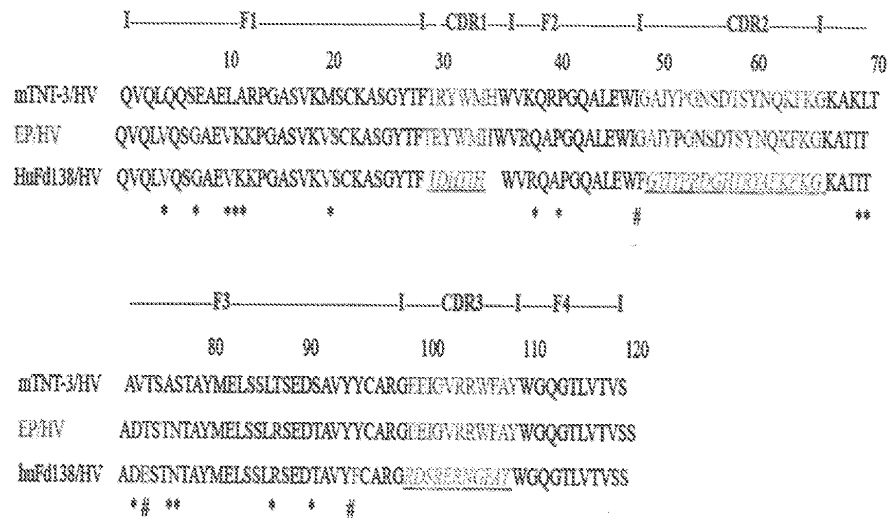
[0068] 일부 실시형태에서, 본 발명의 특정 실시형태를 설명하고 청구하는 데 사용된 성분의 양, 특성, 예컨대 농도, 반응 조건 등을 표현하는 수는 일부 경우에 용어 "약"에 의해 수식되는 것으로 이해해야 한다. 따라서, 일부 실시형태에서, 기재된 설명 및 첨부된 청구범위에 제시된 수적 파라미터는 특정 실시형태에 의해 수득하고자 하는 원하는 특성에 따라 달라질 수 있는 근사치이다. 일부 실시형태에서, 수적 파라미터는 보고된 유효 숫자의 견지에서 통상적인 반올림 기법을 적용하여 해석되어야 한다. 본 발명의 일부 실시형태의 넓은 범위를 설명하는 수치 범위 및 파라미터가 근사치임에도 불구하고, 특정 예에 제시된 수치는 가능한 한 정확하게 보고된다. 본 발명의 일부 실시형태에 제시된 수치는 그들의 각각의 시험 측정에서 발견되는 표준 편차로부터 필연적으로 초래되는 특정 오류를 포함할 수 있다.

[0069] 본원의 설명과 하기 청구범위에 걸쳐 사용된 바와 같이, 문맥에서 달리 명확히 지시하지 않는 한, 단수("a", "an" 및 "the")의 의미는 복수의 참조대상을 포함한다. 또한, 본원의 설명에서 사용된 바와 같이, 문맥에서 달리 명확히 지시하지 않는 한, "~에(in)"의 의미는 "~내(in)" 및 "~상(on)"을 포함한다. 또한, 본원에 사용되는 바와 같이, 문맥에서 달리 지시되지 않는 한, 용어 "~에 커플링된"은 직접적인 커플링(여기서, 서로 커플링된 2개의 요소는 서로 접촉함) 및 간접적인 커플링(여기서, 적어도 하나의 추가의 요소가 2개의 요소 사이에 위치함) 둘 모두를 포함하도록 의도된다. 따라서, 용어 "~에 커플링된" 및 "~과 커플링된"은 동의어로 사용된다.

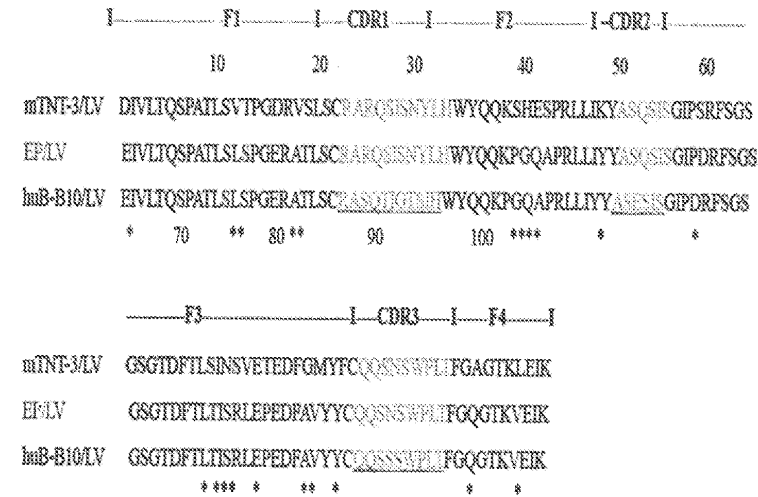
[0070] 이미 기재된 것 이외에 더 많은 변형이 본원의 발명의 개념을 벗어나지 않고 가능하다는 것이 당업자에게 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 주제는 첨부된 청구범위의 범주를 제외하고는 제한되지 않아야 한다. 또한, 명세서 및 청구범위 둘 모두의 해석에 있어서, 모든 용어는 문맥과 일치하는 가장 넓은 가능한 방식으로 해석되어야 한다. 특히, 용어 "포함하다" 및 "포함하는"은 비-배타적인 방식으로 요소, 성분, 또는 단계를 언급하는 것으로 해석되어야 하는데, 이는 언급된 요소, 성분 또는 단계가 명시적으로 언급되지 않은 다른 요소, 성분, 또는 단계와 함께 존재하거나, 이용되거나, 또는 조합될 수 있음을 나타낸다. 명세서 또는 청구범위에서 A, B, C ... 및 N으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것 중 적어도 하나를 지칭하는 경우, 본문은 A 플러스 N, 또는 B 플러스 N, 등이 아니라, 상기 군으로부터 단 하나의 요소만을 요구하는 것으로 해석되어야 한다.

도면

도면1a



도면1b



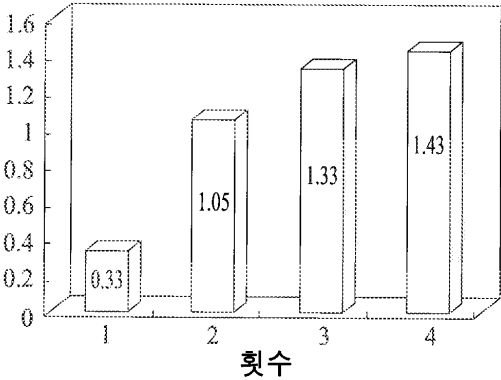
도면1c

EP/ScFv		
HV	링커	LV
	(GSSSS)3	

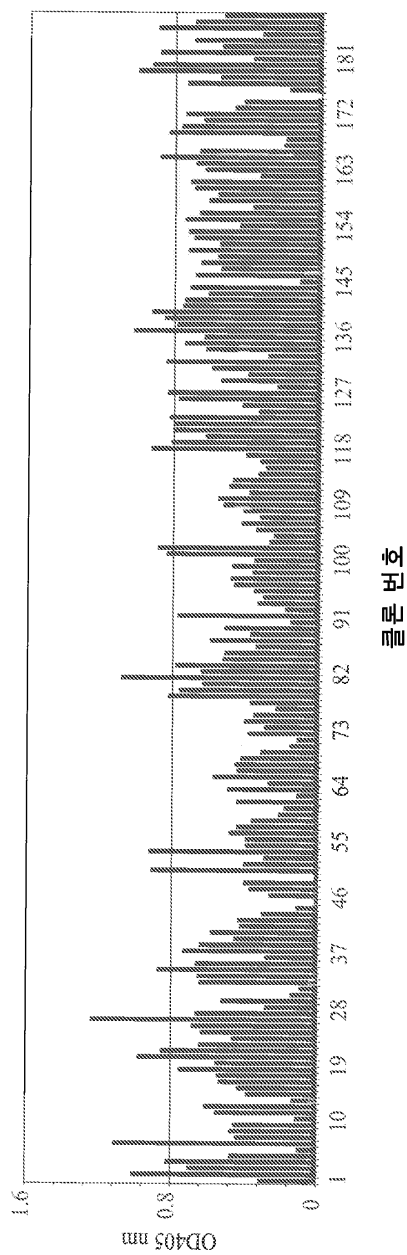
도면2

마스터 주형의 H-CDR3 서열	
EP/ScFv	DTAVYVCARGEEIGVRRWFAYWGQGTSLTVTVSS —— H-CDR3 ——
프라이머	
Pr1	AVYYCARGEEIGVRRWFAYWGQGTSLV
Pr2	AVYYCARGEEIGVRRWFAYWGQGTSLV
Pr3	AVYYCARGEEIGVRRWFAYWGQGTSLV
Pr4	AVYYCARGEEIGVRRWFAYWGQGTSLV
Pr5	AVYYCARGEEIGVRRWFAYWGQGTSLV
Pr6	AVYYCARGEEIGVRRWFAYWGQGTSLV
Pr7	AVYYCARGEEIGVRRWFAYWGQGTSLV
Pr8	AVYYCARGEEIGVRRWFAYWGQGTSLV
Pr9	AVYYCARGEEIGVRRWFAYWGQGTSLV
Pr10	AVYYCARGEEIGVRRWFAYWGQGTSLV
Pr11	AVYYCARGEEIGVRRWFAYWGQGTSLV

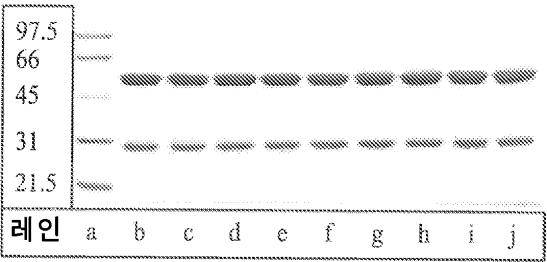
도면3



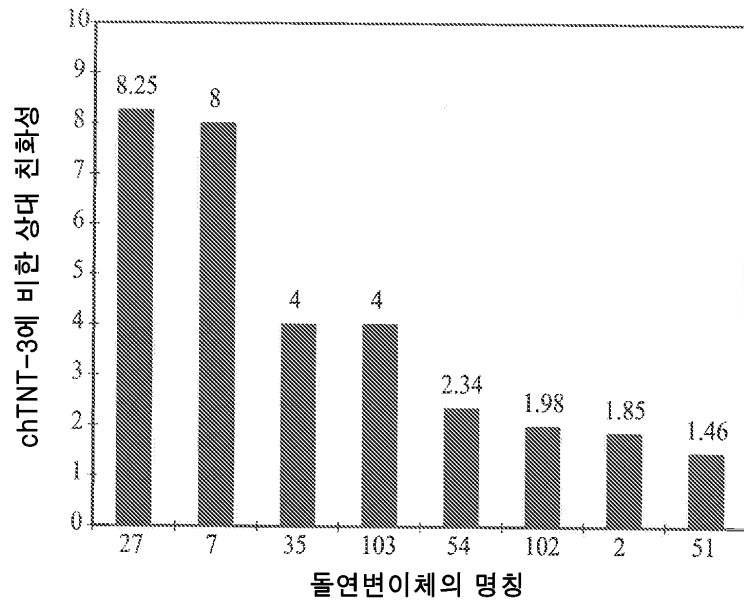
도면4



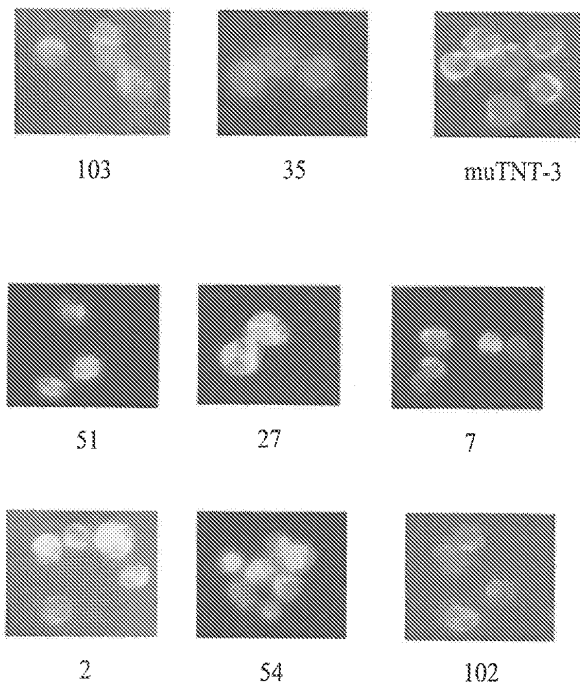
도면5



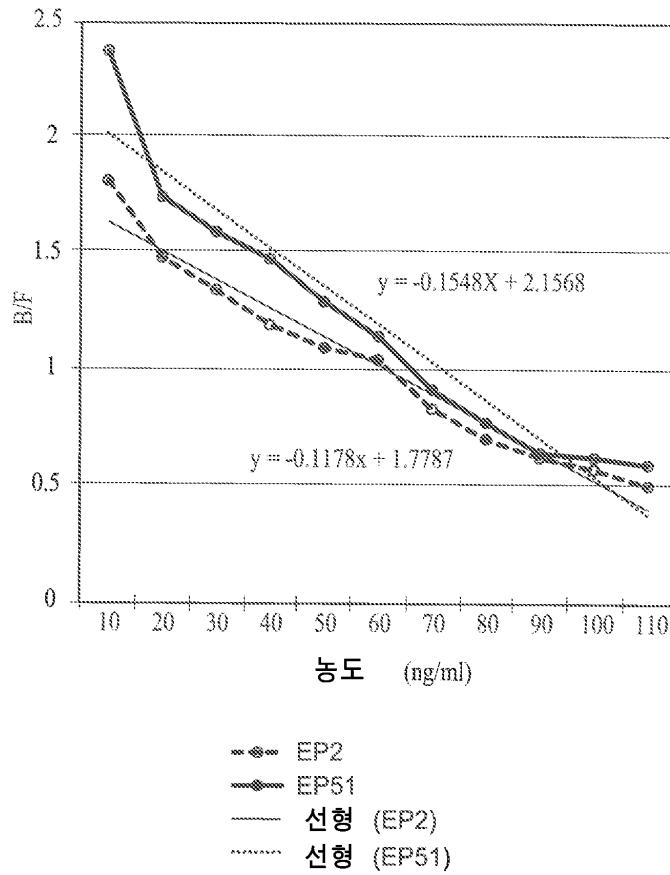
도면6



도면7

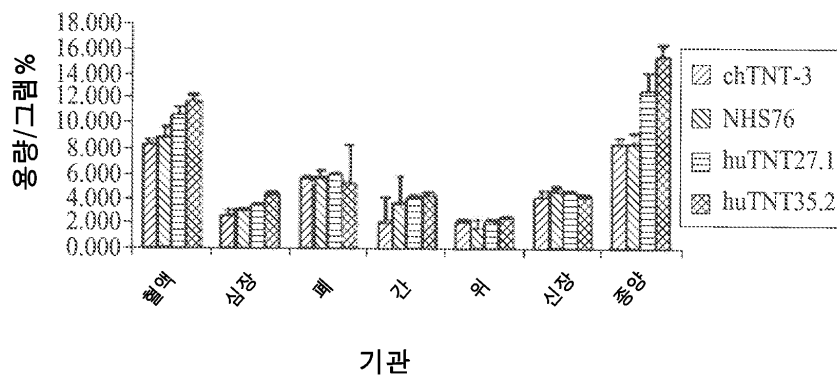


도면8

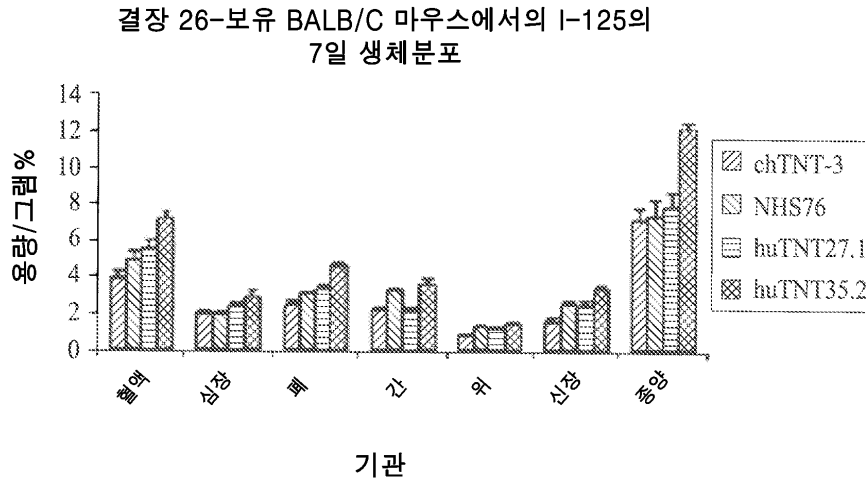


도면9a

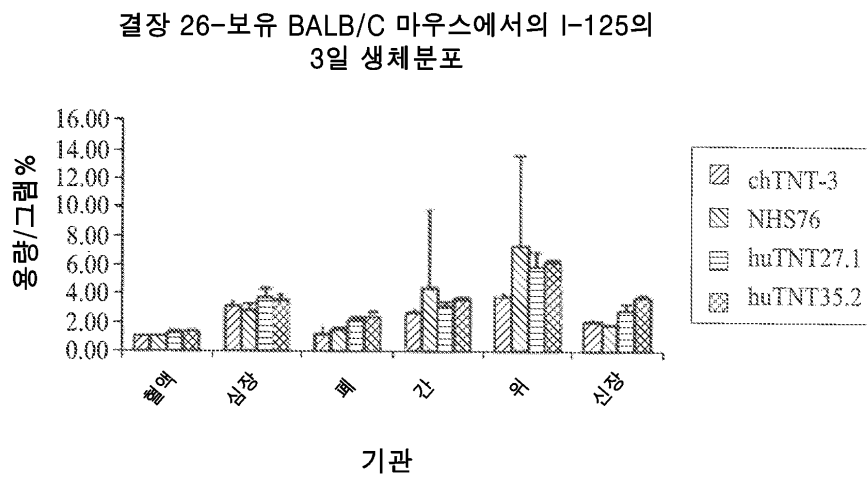
결장 26-보유 BALB/C 마우스에서의 I-125의
3일 생체분포



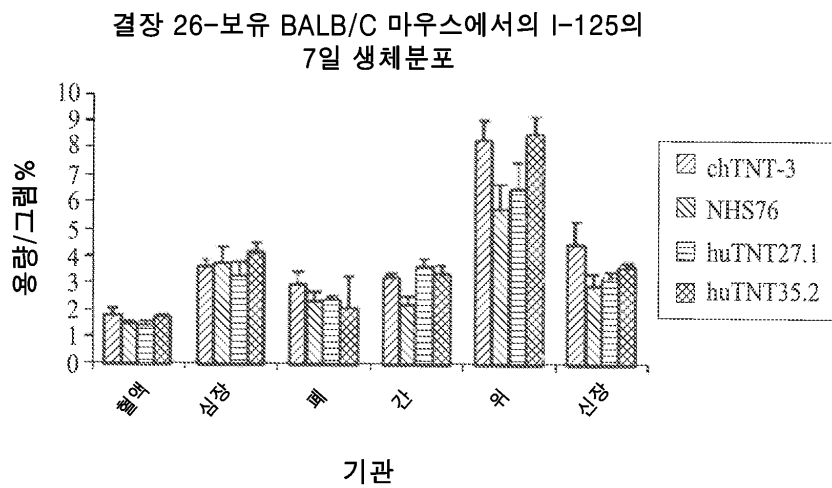
도면9b



도면9c

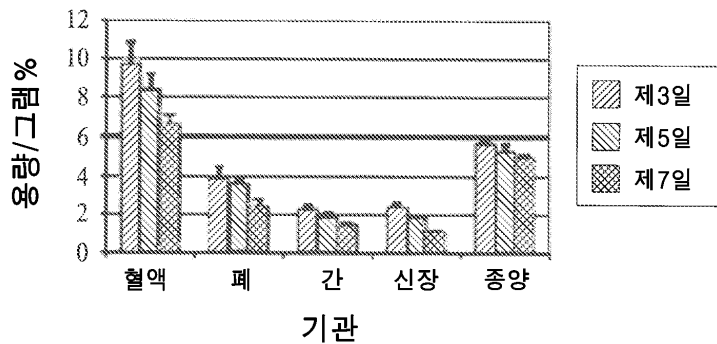


도면9d



도면10

LS174T 보유 누드 마우스에서의 I-125 huEP51
의 생체분포



서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> CANCER THERAPEUTICS LABORATORIES, INC.

<120> HUMANIZED ANTI-NUCLEAR ANTIBODIES FOR TARGETING NECROSIS
IN CANCER THERAPY

<130> IPA191152-US

<150> US 62/473,554

<151> 2017-03-20

<160> 26

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 6

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Thr Arg Tyr Trp Met His

1 5

<210> 2

<211> 18

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

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

1 5 10 15

Lys Gly

<210> 3

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Glu Glu Ile Gly Val Arg Arg Trp Phe Ala Tyr

1 5 10

<210> 4

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Arg Ala Arg Gln Ser Ile Ser Asn Tyr Leu His

1 5 10

<210> 5

<211> 6

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Ala Ser Gln Ser Ile Ser

1 5

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Gln Gln Ser Asn Ser Trp Pro Leu Thr

1 5

<210> 7

<211> 121

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asn Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Gly Glu Glu Ile Gly Val Arg Arg Trp Phe Ala Tyr Trp Gly

100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 8

<211> 106

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

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

1 5 10 15

Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Arg Gln Ser Ile Ser Asn Tyr Leu

20 25 30

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

35 40 45

Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser

50 55 60

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

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

<210> 9

<211> 120

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

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

50 55 60
 Lys Gly Lys Ala Lys Leu Thr Ala Val Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Glu Glu Ile Gly Val Arg Arg Trp Phe Ala Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 115 120

<210> 10

<211> 121

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

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

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

 50 55 60
 Lys Gly Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Glu Glu Ile Gly Val Arg Arg Trp Phe Ala Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 11

<211> 121

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 11

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

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

Ala Arg Gly Arg Asp Ser Arg Glu Arg Asn Gly Phe Ala Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 12

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 12

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

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

Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser His Glu Ser Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45

Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn Ser Val Glu Thr
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Gly Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Asn Ser Trp Pro Leu
 85 90 95

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

<210> 13

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 13

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

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Arg Gln Ser Ile Ser Asn Tyr
 20 25 30

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

Tyr Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Ser Trp Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 14

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 14

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

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Thr Ile Gly Thr Ser

20 25 30

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

35 40 45

Tyr Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Ser Ser Trp Pro Leu

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 15

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Linker

<400> 15

Gly Ser Ser Ser Ser

1 5

<210> 16

<211> 26

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> H-CDR3 mutation Primer1

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (19)..(19)

<223> random mutated codon

<400> 16

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Glu Glu Ile Gly Val Arg Arg Trp

1 5 10 15

Phe Ala Xaa Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val

20 25

<210> 17

<211> 26

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> H-CDR3 mutation primer 2

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (18)..(18)

<223> random mutated codon

<400> 17

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Glu Glu Ile Gly Val Arg Arg Trp

1 5 10 15

Phe Xaa Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val

20 25

<210> 18

<211> 26

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> H-CDR3 mutation primer 3

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (17)..(17)

<223> random mutated codon

<400> 18

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Glu Glu Ile Gly Val Arg Arg Trp

1 5 10 15

Xaa Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val

20 25

<210> 19

<211> 26

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> H-CDR3 mutation primer 4

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (16)..(16)

<223> random mutated codon

<400> 19

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Glu Glu Ile Gly Val Arg Arg Xaa

1 5 10 15

Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val

20 25

<210> 20

<211> 26

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> H-CDR3 mutation primer 5

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (15)..(15)

<223> random mutated codon

<220><221> misc_feature

<222> (16)..(16)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 20

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Glu Glu Ile Gly Val Arg Arg Xaa

1 5 10 15

Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val

20 25

<210> 21

<211> 26

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> H-CDR3 mutation primer 6

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (14)..(14)

<223> random mutated codon

<400> 21

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Glu Glu Ile Gly Val Xaa Arg Trp

1 5 10 15

Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val

20 25

<210> 22

<211> 26

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> H-CDR3 mutation primer 7

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (13)..(13)

<223> random mutated codon

<400> 22

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Glu Glu Ile Gly Xaa Arg Arg Trp

1 5 10 15

Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val

20 25

<210> 23

<211> 26

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> H-CDR3 mutation primer8

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (12)..(12)

<223> random mutated codon

<400> 23

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Glu Glu Ile Xaa Val Arg Arg Trp

1 5 10 15

Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val

 20 25

<210> 24

<211>

26

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> H-CDR3 mutation primer 9

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (11)..(11)

<223> random mutated codon

<400> 24

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Glu Glu Xaa Gly Val Arg Arg Trp

1 5 10 15

Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val

 20 25

<210> 25

<211> 26

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> H-CDR3 mutation primer 10

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (10)..(10)

<223> random mutated codon

<400> 25

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Glu Xaa Ile Gly Val Arg Arg Trp

1 5 10 15

Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val

20 25

<210> 26

<211> 26

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> H-CDR3 mutation primer 11

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (9)..(9)

<223> random mutated codon

<400> 26

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Xaa Glu Ile Gly Val Arg Arg Trp

1 5 10 15

Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val

20 25