



(19) 대한민국특허청(KR)
 (12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0088381
 (43) 공개일자 2018년08월03일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/30 (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)
A61K 47/68 (2017.01) *G01N 33/574* (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C07K 16/3092 (2013.01)
A61K 47/6803 (2017.08)
- (21) 출원번호 10-2018-7013532
- (22) 출원일자(국제) 2016년11월10일
 심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2018년05월11일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2016/061427
- (87) 국제공개번호 WO 2017/083582
 국제공개일자 2017년05월18일
- (30) 우선권주장
 62/254,278 2015년11월12일 미국(US)
 (뒷면에 계속)

- (71) 출원인
 시아맙 쎄라퓨틱스, 인코포레이티드
 미국 매사추세츠주 02458 뉴턴 스위트 100 브리지
 스트리트 90
- (72) 발명자
 에아바론 데이비드 에이.
 미국 매사추세츠주 02171 노스 퀸시 웨스트 스퀘
 텁 스트리트 95 에이피티. 1118
 프렌더캐스트 질리안 엠.
 미국 매사추세츠주 01754 메이忸드 파크 스트리트
 18
 (뒷면에 계속)
- (74) 대리인
 장훈

전체 청구항 수 : 총 70 항

(54) 발명의 명칭 글리칸-상호작용 화합물 및 사용방법

(57) 요약

본 발명은 글리칸-상호작용 항체 및 암을 비롯한 인간 질환의 치료 및 예방에 유용한 글리칸-상호작용 항체를 제조하는 방법을 제공한다. 이러한 글리칸-상호작용 항체는 인간화 항체, 이의 유도체 및 단편 뿐만 아니라 관련 조성물과 키트를 포함한다. 치료 및 진단을 위해 글리칸-상호작용 항체를 사용하는 방법이 포함된다.

(52) CPC특허분류

A61K 47/6851 (2017.08)

G01N 33/574 (2013.01)

A61K 2039/505 (2013.01)

C07K 2317/24 (2013.01)

C07K 2317/33 (2013.01)

C07K 2317/56 (2013.01)

C07K 2317/92 (2013.01)

G01N 2333/4725 (2013.01)

(72) 발명자

베렌스 제프리

미국 매사추세츠주 02468 뉴턴 와일드 로드 48

루고포스코이 알렉세이 알렉산드로비히

미국 매사추세츠주 01801 워번 센터 스트리트 24

드랜스필드 다니엘 티.

미국 매사추세츠주 02341 핸손 조지 스트리트 14

(30) 우선권주장

62/274,572 2016년01월04일 미국(US)

62/287,666 2016년01월27일 미국(US)

62/293,989 2016년02월11일 미국(US)

62/345,515 2016년06월03일 미국(US)

62/382,835 2016년09월02일 미국(US)

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 115, 114, 116-120, 140 및 141로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노 서열과 적어도 50%의 아미노산 서열 동일성을 갖는 CDR-H3 상보성 결정 영역을 가지는 중쇄 가변 도메인(VH)을 포함하는 항체.

청구항 2

제1항에 있어서, VH가

서열번호 105, 106 및 136으로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열과 적어도 50%의 서열 동일성을 갖는 CDR-H1; 및

서열번호 107-113 및 137-139로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열과 적어도 60%의 서열 동일성을 갖는 CDR-H2를 포함하는 항체.

청구항 3

서열번호 89, 91, 93, 95-98, 101-103, 133-135 및 148로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노 서열과 적어도 50%의 아미노산 서열 동일성을 갖는 CDR-L3을 가지는 경쇄 가변 도메인(VL)을 포함하는 항체.

청구항 4

제3항에 있어서, VL이

서열번호 121-129 및 142-146으로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열과 적어도 50%의 서열 동일성을 갖는 CDR-L1; 및

서열번호 77, 79-81, 83-86, 88, 130-132 및 147로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열과 적어도 50%의 서열 동일성을 갖는 CDR-L2를 포함하는 항체.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중의 어느 한 항에 있어서, 서열번호 206-216으로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열과 적어도 70%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 가지는 적어도 하나의 인간 프레임워크 영역(framework region)을 포함하는 항체.

청구항 6

서열번호 220-224, 230-234, 237-241, 249-253 및 256-260으로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열과 적어도 70%의 서열 동일성을 갖는 VH를 포함하는 항체.

청구항 7

서열번호 217-219, 225-229, 235, 236, 242-248, 254 및 255로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열과 적어도 70%의 서열 동일성을 갖는 VL을 포함하는 항체.

청구항 8

제6항 또는 제7항에 있어서,

서열번호 220-224로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열과 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 VH; 및

서열번호 217-219로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열과 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 VL을 포함하는 항체.

청구항 9

제6항 또는 제7항에 있어서,

서열번호 237-241로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열과 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 VH; 및 서열번호 235 및 236으로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열과 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 VL을 포함하는 항체.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중의 어느 한 항에 있어서, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG2c, IgG3 및 IgG4로 이루어진 군으로부터 선택된 동종형(isotype)을 포함하는 항체.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중의 어느 한 항에 있어서, 인간 또는 인간화 항체인 항체.

청구항 12

제1항 내지 제10항 중의 어느 한 항에 있어서, 인간 IgG1 항체인 항체.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중의 어느 한 항의 항체를 암호화하는 작제물.

청구항 14

제13항의 작제물을 포함하는 세포.

청구항 15

제13항의 작제물을 포함하는 벡터.

청구항 16

제14항의 세포에 의해 생산되는 항체.

청구항 17

제1항 내지 제12항 중의 어느 한 항에 있어서, 약 0.01nM 내지 약 30nM의 반수 최대 유효 농도(EC50)로 세포-관련 STn에 결합하는 항체.

청구항 18

제1항 내지 제12항 중의 어느 한 항에 있어서, 치료제에 접합되는 항체.

청구항 19

제18항에 있어서, 상기 치료제가 세포독성제인, 항체.

청구항 20

제19항에 있어서, 상기 세포독성제가 모노메틸 오리스타틴 E(MMAE) 및 모노메틸 오리스타틴 F(MMAF)로 이루어진 군으로부터 선택되는 항체.

청구항 21

제20항에 있어서, 상기 세포독성제가 MMAE이고, 상기 항체가 약 0.1nM 내지 약 20nM의 반수-최대 억제 농도 (IC50)로 STn-관련 세포를 사멸시킬 수 있는 것인, 항체.

청구항 22

제1항 내지 제12항 및 제17항 내지 제21항 중의 어느 한 항의 항체를 투여하는 단계를 포함하는 암의 치료 방법.

청구항 23

제22항에 있어서, 상기 암이 적어도 하나의 종양을 포함하는 것인, 방법.

청구항 24

제23항에 있어서, 상기 적어도 하나의 종양의 체적이 감소되는 것인, 방법.

청구항 25

제24항에 있어서, 상기 적어도 하나의 종양의 체적이 적어도 20%까지 감소되는 것인, 방법.

청구항 26

제23항 내지 제25항 중의 어느 한 항에 있어서, 상기 적어도 하나의 종양이 적어도 하나의 종양-관련 탄수화물 항원(TACA)을 포함하는 적어도 하나의 종양 세포를 포함하는 것인, 방법.

청구항 27

제26항에 있어서, 상기 적어도 하나의 TACA가 시알릴(α 2,6)N-아세틸갈락토사민(STn)을 포함하는 것인, 방법.

청구항 28

제22항 내지 제27항 중의 어느 한 항에 있어서, 상기 암이 유방암, 결장암, 췌장암, 폐암, 자궁경부암, 난소암, 위암, 전립선암 및 간암 중의 하나 이상을 포함하는 것인, 방법.

청구항 29

제22항 내지 제28항 중의 어느 한 항에 있어서, 항체가 화학요법제 및/또는 치료 항체와 병용 투여되는 것인, 방법.

청구항 30

제29항에 있어서, 상기 화학요법제가 플루오로피리미딘, 옥살리플라틴 및 이리노테칸 중의 적어도 하나로부터 선택되는 것인, 방법.

청구항 31

제28항 또는 제29항에 있어서, 상기 치료 항체가 베바시주맙 및 항-표피 성장 인자 수용체(EGFR) 항체 중의 적어도 하나로부터 선택되는 것인, 방법.

청구항 32

제22항 내지 제31항 중의 어느 한 항에 있어서, 상기 항체가 약 0.1mg/kg 내지 약 30mg/kg의 용량으로 투여되는 것인, 방법.

청구항 33

제32항에 있어서, 상기 항체가 약 2.5mg/kg 내지 약 5mg/kg의 용량으로 투여되는 것인, 방법.

청구항 34

제32항 또는 제33항에 있어서, 상기 항체가 치료 약 1일 후 내지 치료 약 1개월 후 수득된 적어도 하나의 대상체 샘플에서 검출 가능한 것인, 방법.

청구항 35

제34항에 있어서, 상기 항체가 MMAE와 접합되고, 상기 항체에 대한 상기 MMAE의 항체에 대한 약물의 비율(Drug to Antibody Ratio, DAR)이 상기 적어도 하나의 대상체 샘플에서 50% 미만까지 변하는 것인, 방법.

청구항 36

세포 또는 샘플을 제1항 내지 제12항 중의 어느 한 항의 항체와 접촉시키는 단계를 포함하는, 적어도 하나의 TACA의 존재에 대해 세포 또는 샘플을 스크리닝하는 방법.

청구항 37

제36항에 있어서, 상기 적어도 하나의 TACA가 STn을 포함하는 것인, 방법.

청구항 38

제36항 또는 제37항에 있어서, 상기 샘플이 대상체로부터 수득된 생물학적 샘플인 것인, 방법.

청구항 39

제38항에 있어서, 상기 대상체가 암에 걸렸거나 암에 걸린 것으로 의심되는 것인, 방법.

청구항 40

제38항 또는 제39항에 있어서, 상기 생물학적 샘플이 세포, 조직, 조직 절편 및 체액 중의 하나 이상을 포함하는 것인, 방법.

청구항 41

제36항 내지 제40항 중의 어느 한 항에 있어서, 상기 항체가 검출 가능한 표지를 포함하는 것인, 방법.

청구항 42

제36항 내지 제40항 중의 어느 한 항에 있어서, 상기 항체가 검출제(detection agent)를 사용하여 검출되는 것인, 방법.

청구항 43

제42항에 있어서, 상기 검출제가 이차 항체인 것인, 방법.

청구항 44

제43항에 있어서, 상기 이차 항체가 검출 가능한 표지를 포함하는 것인, 방법.

청구항 45

제38항 내지 제44항 중의 어느 한 항의 방법에 따라 샘플을 스크리닝하는 단계를 포함하는, 대상체에서 암을 진단하는 방법.

청구항 46

제45항에 있어서, 상기 방법이 동반 진단(companion diagnostic)의 일부인 것인, 방법.

청구항 47

제46항에 있어서, 상기 동반 진단이 암 중증도를 계층화하고, 암 위험을 계층화하며, 임상 시험을 위해 대상체를 선택하고, 치료 섭생(therapeutic regimen)을 개발하고, 치료 섭생을 조절하고, 치료 안전성을 증가시키고, 치료 효능을 조절하는 것 중의 하나 이상을 위해 사용되는 것인, 방법.

청구항 48

제36항 내지 제40항 중의 어느 한 항에 있어서, 상기 샘플이 단백질 어레이를 포함하는 것인, 방법.

청구항 49

제48항에 있어서, 상기 단백질 어레이가 하나 이상의 단백질에 결합하도록 구성된 하나 이상의 항체를 포함하고, 여기서 상기 하나 이상의 단백질 중의 적어도 하나가 상기 샘플에 존재하는 것인, 방법.

청구항 50

제1항 내지 제12항 중의 어느 한 항의 항체를 포함하는, 제36항 내지 제49항 중의 어느 한 항의 방법을 실시하기 위한 키트.

청구항 51

제50항에 있어서, 이차 항체를 포함하는 키트.

청구항 52

제51항에 있어서, 상기 이차 항체가 검출 가능한 표지를 포함하는 것인, 키트.

청구항 53

제1항 내지 제12항 및 제17항 내지 제21항 중의 어느 한 항의 항체 중의 하나 이상을 포함하는 조성물.

청구항 54

제53항에 있어서, 적어도 하나의 부형체를 포함하는 조성물.

청구항 55

제54항에 있어서, 상기 적어도 하나의 부형체가 약제학적으로 혼용되는 부형체를 포함하는 것인, 조성물.

청구항 56

제53항에 있어서, 항체-코팅제(antibody-coated agent)를 포함하는 조성물.

청구항 57

제56항에 있어서, 상기 항체-코팅제가 입자, 나노입자, 단백질, 융합-단백질, 지질, 리포솜 및 세포 중의 하나 이상을 포함하는 것인, 조성물.

청구항 58

제56항 또는 제57항에 있어서, 상기 항체가 항체 단편인 것인, 조성물.

청구항 59

제58항에 있어서, 상기 항체 단편이 Fab 단편 및 단일쇄 Fv 중의 하나 이상으로부터 선택되는 것인, 조성물.

청구항 60

세포의 STn 수준을 조절하는 인자를 암호화하는 합성 작제물을 포함하는 변형된 세포.

청구항 61

제60항에 있어서, 상기 인자가 STn 합성에 관여하는 적어도 하나의 인자를 포함하는 것인, 변형된 세포.

청구항 62

제61항에 있어서, 상기 적어도 하나의 인자가 (알파-N-아세틸-뉴라미닐-2,3-베타-갈락토실-1,3)-N-아세틸갈락토사미니드, 알파-2,6-시알릴트랜스페라제 I(ST6GalNAc I), T-신타제 및 코어 1 베타3-갈락토실트랜스페라제-특이적 분자 샤프론(COSMC) 중의 적어도 하나로부터 선택되는 것인, 변형된 세포.

청구항 63

제60항 내지 제62항 중의 어느 한 항에 있어서, 적어도 하나의 비변형 세포와 비교하여 증가된 STn 수준을 포함하는 변형된 세포.

청구항 64

제60항에 있어서, 상기 인자가 ST6GalNAc의 발현을 감소시키는 것인, 변형된 세포.

청구항 65

제64항에 있어서, 상기 인자가 억제성 리보핵산(RNA) 분자인 것인, 변형된 세포.

청구항 66

제60항 내지 제65항 중의 어느 한 항에 있어서, 변형된 난소 종양 세포인 변형된 세포.

청구항 67

제66항에 있어서, 상기 변형된 난소 종양 세포가 SKOV3 세포, OVCAR3 세포, OVCAR4 세포, BRCA1 돌연변이 종양 세포 및 비-BRCA1 돌연변이 종양 세포 중의 하나 이상으로부터 선택되는 것인, 변형된 세포.

청구항 68

다수의 글리칸을 포함하는 글리칸 어레이를 항체와 접촉시키는 단계를 포함하는, 항체의 결합을 특성화하는 방법.

청구항 69

제68항에 있어서, 상기 글리칸 어레이가, 하기 중 각각 하나 이상으로 이루어지는 글리칸의 패널을 포함하는 것인, 방법:

Neu5Ac α 6GalNAc α 0(CH₂)2CH₂NH₂;

Neu5Gc α 6GalNAc α 0(CH₂)2CH₂NH₂;

Neu5Ac α 6Gal β 4GlcNAc β 0(CH₂)2CH₂NH₂;

Neu5Gc α 6Gal β 4GlcNAc β 0(CH₂)2CH₂NH₂;

Neu5Ac α 6Gal β 4Glc β 0(CH₂)2CH₂NH₂;

Neu5Gc α 6Gal β 4Glc β 0(CH₂)2CH₂NH₂;

Neu5Ac α 6Gal β 0(CH₂)2CH₂NH₂;

Neu5Gc α 6Gal β 0(CH₂)2CH₂NH₂;

GalNAc α 0(CH₂)2CH₂NH₂;

Gal β 3GalNAc β 0(CH₂)2CH₂NH₂;

Ga13 β GalNAc α 0(CH₂)2CH₂NH₂;

Neu5Ac α 3Gal β 1-3GalNAc α 0(CH₂)2CH₂NH₂; 및

Neu5Gc α 3Gal β 1-3GalNAc α 0(CH₂)2CH₂NH₂.

청구항 70

제68항 또는 제69항에 있어서, 상기 복수의 글리칸 각각이 네오당지질(neoglycolipid) 프로브의 일부인 것인, 방법.

발명의 설명**기술 분야****[0001] 관련 출원에 대한 상호참조**

본 출원은 글리칸-상호작용 화합물 및 사용방법이라는 명칭으로 2015년 11월 12일자로 출원된 미국 가특허원 제62/254,278호, 글리칸-상호작용 화합물 및 사용방법이라는 명칭으로 2016년 1월 4일자로 출원된 미국 가특허원 제62/274,572호, 글리칸-상호작용 화합물 및 사용방법이라는 명칭으로 2016년 1월 27일자로 출원된 미국 가특허원 제62/287,666호, 글리칸-상호작용 화합물 및 사용방법이라는 명칭으로 2016년 2월 11일자로 출원된 미국 가특허원 제62/293,989호, 글리칸-상호작용 화합물 및 사용방법이라는 명칭으로 2016년 6월 3일자로 출원된 미국 가특허원 제62/345,515호 및 글리칸-상호작용 화합물 및 사용방법이라는 명칭으로 2016년 9월 2일자로 출원된 미국 가특허원 제62/382,835호에 대한 우선권을 주장하며, 이들 각각의 내용은 전문이 본원에 참고로 포함된다.

[0003] 서열 목록

[0004] 본 출원은 ASCII 포맷으로 전자 제출된 서열 목록을 담고 있으며 이의 전문이 본원에 참고로 포함된다. 2016년 11월 10일자로 작성된 상기 ASCII 사본의 명칭은 2033_1021PCT_SL.txt이고 크기는 159,457 바이트이다.

[0005] 발명의 분야 표

[0006] 본 발명은 항체와 같은 글리칸-상호작용 화합물 및 유기체로부터 당화 물질의 검출 및/또는 제거를 위한 상기 화합물 및 관련 조성물의 개발 방법에 관한 것이다. 본 발명은 또한 본원에 나타낸 글리칸-상호작용 화합물 및 조성물로 암과 같은 비정상적인 당화와 관련된 질환을 치료하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0007] 비정상적인 당화는 암종에서 흔히 관찰되는 다른 돌연변이 중의 일부를 동반한다. 모든 암종의 약 80%가 말단절단된 글리칸(truncated glycan), Tn 항원 및 시알릴화 형태인 시알릴 Tn(STn)을 발현하는 것으로 추정되어 왔다. 거의 예외없이, Tn 및 STn은 정상의, 건강한 조직에서는 발현되지 않는다. 더욱이, 비-인간 면역원성 시알산, N-글리콜릴뉴라민산(Neu5Gc)은 Neu5Gc-STn(GcSTn)의 형태로 유방암과 같은 암종에서 별도로 발현되는 것으로 보인다.

[0008] 다중 비정상적인 당화 형태가 인간 암에서 기술되었으며, 특정 글리칸을 특정 종양 표적화에 적합한 세포 표면 분자의 일종이라고 밝혔다(Cheever, M.A. et al., Clin Cancer Res. 2009 Sep 1;15(17):5323-37). 예를 들면, 다양한 인간 암 유형(예를 들면, 그중에서도 방광, 유방, 자궁경부, 결장, 폐 및 난소 암)이 STn 항원의 높은 발현을 보이는데, 이것은 정상적인 인간 조직에서는 드물다(Karlen, P. et al., Gastroenterology. 1998 Dec;115(6):1395-404; Ohno, S. et al., Anticancer Res. 2006 Nov-Dec;26(6A):4047-53). 또한, 종양-관련 유신에서의 STn의 존재는 예후가 나쁜 암과 관련되며 이와 함께 암 검출 및 표적화 요법을 위한 매력적인 애피토프로 간주된다(Cao, Y. et al., Virchows Arch. 1997 Sep;431(3):159-66; Julien, S. et al., Br J Cancer. 2009 Jun;100(11):1746-54; Itzkowitz, S.H. et al., Cancer. 1990 Nov 1;66(9):1960-6; Motoo, Y. et al., Oncology. 1991;48(4):321-6; Kobayashi, H. et al., J Clin Oncol. 1992 Jan;10(1):95-101). Tn 및 STn 형성은 활성화 T-신타제의 형성에 필요한 문자 샤프론을 암호화하는 유전자 Cosmc에서의 체세포 돌연변이와 관련된다(Ju, T. et al., Nature. 2005 Oct 27;437(7063):1252; Ju, T. et al., Cancer Res. 2008 Mar 15;68(6):1636-46). 이것은 또한 시알릴 트랜스퍼라제인 ST6GalNAc-I의 증가된 발현으로부터 야기될 수 있다(Ikehara, Y. et al., Glycobiology. 1999 Nov;9(11):1213-24; Brockhausen, I. et al., Biol Chem. 2001 Feb;382(2):219-32). STn의 데-노보(De-novo) 발현은 암종 세포를 변조하고, 악성 표현형을 변화시키고, 보다 공격적인 세포 행동을 초래할 수 있다(Pinho, S. et al., Cancer Lett. 2007 May 8;249(2):157-70). STn은 악성 조직에서 크게 발현되지만, 건강한 인간 세포에서도 낮은 수준이 발견된다(Jass, J.R. et al., J Pathol. 1995 Jun;176(2):143-9; Kirkeby, S. et al., Arch Oral Biol. 2010 Nov;55(11):830-41). STn 단독은 암 검출 및 치료법을 위한 표적으로서 이목을 끌었다(Cheever, M.A. et al., Clin Cancer Res. 2009 Sep 1;15(17):5323-37). STn은 또한 암 줄기 세포와 관련된 유신에 존재하며(Engelmann et al., Cancer research, 2008, 68, 2419-2426) STn은 면역 억제에 연관된다(Carrascal, M.A., et al., Molecular Oncology. 2014, 8(3): 753-65).

[0009] STn의 존재에 더하여, 다른 당화 변화들이 암에서 기재된 바 있다. 이들 중의 하나는 Neu5Gc를 수반한다. N-아세틸뉴라민산(Neu5Ac) 및 Neu5Gc는 포유류 세포 표면 상의 두 가지 주요 시알산이다. Neu5Ac 및 Neu5Gc는 Neu5Gc가 탄소 5에 부착된 화학 그룹과 결합된 추가의 산소원자를 포함한다는 점에서만 다르다. 기능적 유전자의 손실로 인해, 인간은 Neu5Gc가 아니라 Neu5Ac 형태로만 시알산을 합성할 수 있다. 그러나 Neu5Gc는 붉은 고기와 같은 동물-유래 식이 원료로부터 인간에게 대사적으로 도입될 수 있다(Tangvoranuntakul, P. et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 Oct 14; 100(21):12045-50; Nguyen, D.H. et al., J Immunol. 2005 Jul 1; 175(1):228-36; US7,682,794, US8,084,219, US2012/0142903, WO2010030666 및 WO2010030666). Neu5Gc는 인간 종양들 사이에 상당히 풍부하고(Higashi, H. et al., Cancer Res. 1985 Aug; 45(8):3796-802; Miyoshi I. et al., Mol Immunol. 1986. 23: 631-638; Hirabayashi, Y. et al., Jpn J Cancer Res. 1987. 78: 614-620; Kawachi, S. et al., Int Arch Allergy Appl Immunol. 1988. 85: 381-383; Devine, P.L. et al., Cancer Res. 1991. 51: 5826-5836; Malykh, Y.N. et al., Biochimie. 2001. 83: 623-634 and Inoue, S. et al., 2010. Glycobiology. 20(6): 752-762) 정상적인 인간 조직에서는 현저히 낮은데, 이것이 수십 년 동안 간과되어 왔다(Diaz, S.L. et al., PLoS One. 2009. 4: e4241; Tangvoranuntakul, P. et al., Proc Natl Acad Sci U S A.

2003. 100: 12045-12050; Varki, A. et al., Glycoconj J. 2009. 26: 231-245). 건강한 인간 조직에 비해 암 조직에서의 식이-유래 Neu5Gc의 증가된 대사적 축적은 적어도 세 가지 요인에 의해 설명될 것 같다: 경쟁 내인성 Neu5Ac의 빠른 성장과 생산부족, 성장 인자에 의해 유도된 향상된 대음세포작용(macropinocytosis)(Dharmawardhane, S. et al., Mol Biol Cell. 2000 Oct;11(10):3341-52; Simonsen, A. et al., Curr Opin Cell Biol. 2001 Aug;13(4):485-92; Johannes, L. et al., Traffic. 2002 Jul;3(7):443-51; Amyere, M. et al., Int J Med Microbiol. 2002 Feb;291(6-7):487-94) 및 저산소증에 의한 리소좀 시알산 전달체 유전자 시알린의 유전자 발현의 상향조절(Yin, J. et al., Cancer Res. 2006 Mar 15;66(6):2937-45). 또한, 지금까지 시험된 모든 인간은 비-인간 Neu5Gc에 대한 다클론 항체 저장소를 포함하며, 이것이 제노-자가항원의 첫 사례를 만든다(Padler-Karavani, V. et al., Glycobiology. 2008 Oct;18(10):818-30; Varki, N.M. et al., Annu Rev Pathol. 2011;6:365-93). 항-Neu5Gc 반응에도 불구하고 악성 종양에서의 식이 Neu5Gc의 축적은 저급 만성 염증을 유도함으로써 종양 진행을 촉진시키는 것으로 나타났다(Hedlund, M. et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 2008 Dec 2;105(48):18936-41). 따라서, 인간 종양 상의 Neu5Gc 함유 글리칸 에피토프는 약물 표적화를 위한 귀중한 가능성을 나타낸다. 최근 연구는 암 환자에서 Neu5Ac-STn(AcSTn)에 대해서가 아니라 Neu5Gc-함유 STn(GcSTn)에 대한 항체의 존재를 시사하며 암 검출을 위한 특이적 생물지표로서의 이들의 가능성을 탐구한다(Padler-Karavani, V. et al., Cancer Res. 2011 May 1;71(9):3352-63).

[0010] 질병 및 질병에 걸린 세포 및 조직과 관련된 글리칸을 포함한 글리칸에 결합할 수 있는 치료 항체가 당업계에서 계속 요구되고 있다. 또한, 이러한 항체를 개발하는 보다 나은 방법 및 질병에 걸린 세포 및 조직을 표적화하기 위해 이들 항체를 사용하는 방법이 계속 요구되고 있다. 본 발명은 관련 화합물 및 방법을 제공함으로써 이러한 요구를 충족시킨다.

발명의 내용

발명의 개요

[0011] 일부 실시양태에서, 본 발명은 서열번호 114-120, 140 및 141로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노 서열과 적어도 50%의 아미노산 서열 동일성을 갖는 CDR-H3 상보성 결정 영역을 지닌 중쇄 가변 도메인(VH)을 갖는 항체를 제공한다. VH는 서열번호 105, 106 및 136으로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열과 적어도 50%의 서열 동일성을 갖는 CDR-H1 및 서열번호 107-113 및 137-139로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열과 적어도 60%의 서열 동일성을 갖는 CDR-H2를 포함할 수 있다.

[0012] 일부 실시양태에서, 항체는 서열번호 89, 91, 93, 95-98, 101-103, 133-135 및 148로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노 서열과 적어도 50%의 아미노산 서열 동일성을 갖는 CDR-L3을 지닌 경쇄 가변 도메인(VL)을 포함한다. VL은 서열번호 121-129 및 142-146으로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열과 적어도 50%의 서열 동일성을 갖는 CDR-L1 및 서열번호 77, 79-81, 83-86, 88, 130-132 및 147로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열과 적어도 50%의 서열 동일성을 갖는 CDR-L2를 포함할 수 있다. 항체는 서열번호 206-216으로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열과 적어도 70%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 갖는 적어도 하나의 인간 프레임워크 영역(framework region)을 포함할 수 있다.

[0013] 일부 실시양태에서, 항체는 서열번호 220-224, 230-234, 237-241, 249-253 및 256-260으로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열과 적어도 70%의 서열 동일성을 갖는 VH를 포함한다. 항체는 서열번호 217-219, 225-229, 235, 236, 242-248, 254 및 255로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열과 적어도 70%의 서열 동일성을 갖는 VL을 포함할 수 있다. VH는 서열번호 220-224로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열과 적어도 95%의 서열 동일성을 가질 수 있고 VL은 서열번호 217-219로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열과 적어도 95%의 서열 동일성을 가질 수 있다. VH는 서열번호 237-241로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열과 적어도 95%의 서열 동일성을 가질 수 있고 VL은 서열번호 235 및 236으로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열과 적어도 95%의 서열 동일성을 가질 수 있다. 항체는 IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG2c, IgG3 및 IgG4로 이루어진 군으로부터 선택된 동종형(isotype)일 수 있다. 항체는 인간 또는 인간화 항체일 수 있다. 항체는 인간 IgG1 항체일 수 있다.

[0014] 일부 실시양태에서, 본 발명은 기재된 항체를 암호화할 수 있는 작제물을 제공한다. 또한, 작제물을 포함할 수 있는 세포가 제공된다. 작제물은 벡터에 포함될 수 있다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 항체를 암호화하는 작제물을 포함하는 세포로부터 생산된 항체가 제공된다.

[0015] 일부 실시양태에서, 약 0.01nM 내지 약 30nM의 반수 최대 유효 농도(EC50)로 세포-관련 STn에 결합하는 항체가

제공된다.

[0017] 일부 실시양태에서, 항체는 치료제에 접합될 수 있다. 치료제는 모노메틸 오리스타틴 E(MMAE) 및 모노메틸 오리스타틴 F(MMAF)로 이루어진 군으로부터 선택된 세포독성제일 수 있다. 항체는 약 0.1nM 내지 약 20nM의 반수-최대 억제 농도(IC50)로 STn-관련 세포를 사멸할 수 있다.

[0018] 일부 실시양태에서, 개시된 항체를 투여함을 포함하여 암을 치료하는 방법이 제공된다. 암은 적어도 하나의 종양을 포함할 수 있다. 종양의 체적은 치료에 의해 감소될 수 있다. 종양 크기의 감소는 적어도 20%일 수 있다. 종양은 적어도 하나의 종양 세포를 포함할 수 있으며, 종양 세포는 적어도 하나의 종양-관련 탄수화물 항원(TACA)을 포함할 수 있다. TACA는 시알릴(α 2,6)N-아세틸갈락토사민(STn)을 포함할 수 있다. 암은 유방암, 결장암, 췌장암, 폐암, 자궁경부암, 난소암, 위암, 전립선암 및 간암 중의 하나 이상을 포함할 수 있다. 항체는 화학요법제 및/또는 치료 항체와 조합하여 투여될 수 있다. 화학요법제는 플루오로파미딘, 옥살리플라틴 및 이리노테칸 중의 적어도 하나로부터 선택될 수 있다. 치료 항체는 베바시주맙 및 항-표피 성장 인자 수용체(EGFR) 항체 중의 적어도 하나로부터 선택될 수 있다. 항체는 약 0.1mg/kg 내지 약 30mg/kg의 용량으로 투여될 수 있다. 용량은 약 2.5mg/kg 내지 약 5mg/kg일 수 있다. 항체는 치료한지 약 1일 후 내지 치료한지 약 1개월 후 수득된 적어도 하나의 대상체 샘플에서 검출 가능할 수 있다. 항체는 MMAE와 접합될 수 있다. 샘플에서 항체에 대한 MMAE의 항체에 대한 약물의 비율(DAR)은 적어도 하나의 대상체 샘플에서 50% 미만까지 변할 수 있다.

[0019] 일부 실시양태에서, 세포 또는 샘플을 개시된 항체와 접촉시킴을 포함하여 적어도 하나의 TACA의 존재에 대해 세포 또는 샘플을 스크리닝하는 방법이 제공된다. 적어도 하나의 TACA는 STn을 포함할 수 있다. 샘플은 생물학적 샘플일 수 있다. 상기 생물학적 샘플은 대상체로부터 수득될 수 있다. 대상체는 암을 가질 수 있거나 암을 갖는 것으로 의심될 수 있다. 생물학적 샘플은 세포, 조직, 조직 부분 및 체액 중의 하나 이상을 포함할 수 있다. 항체는 검출 가능한 표지를 포함할 수 있다. 항체는 검출제(detection agent)를 사용하여 검출될 수 있다. 검출제는 이차 항체일 수 있다. 이차 항체는 검출 가능한 표지를 포함할 수 있다. 방법은 대상체에서 암을 진단하기 위해 사용될 수 있다. 방법은 동반 진단(companion diagnostic)의 일부일 수 있다. 동반 진단은 암 중증도를 계층화하고, 암 위험을 계층화하며, 임상 시험을 위해 대상체를 선택하고, 치료 섭생을 개발하고, 치료 섭생을 조절하고, 치료 안전성을 증가시키고, 치료 효능을 조절하는 것 중의 하나 이상을 위해 사용될 수 있다. 방법은 단백질 어레이의 사용을 포함할 수 있다. 단백질 어레이는 샘플에 존재하는 하나 이상의 단백질에 결합하도록 구성된 하나 이상의 항체를 포함할 수 있다.

[0020] 일부 실시양태에서, 본 발명은 기재된 방법들을 수행하기 위한 키트를 제공한다. 키트는 기재된 항체를 포함할 수 있다. 키트는 이차 항체를 포함할 수 있다. 이차 항체는 검출 가능한 표지를 포함할 수 있다.

[0021] 일부 실시양태에서, 본 발명은 기재된 항체들 중의 하나 이상을 포함하는 조성물을 제공한다. 조성물은 적어도 하나의 부형제를 포함할 수 있다. 조성물은 약제학적으로 허용되는 부형제를 포함할 수 있다. 조성물은 항체-코팅제(antibody-coated agent)를 포함할 수 있다. 항체-코팅제는 입자, 나노입자, 단백질, 융합-단백질, 지질, 리포솜 및 세포 중의 하나 이상을 포함한다. 항체는 항체 단편일 수 있다. 항체 단편은 Fab 단편 및 단일쇄 Fv 중의 하나 이상으로부터 선택될 수 있다.

[0022] 일부 실시양태에서, 본 발명은 합성 작제물을 갖는 변형된 세포를 제공한다. 합성 작제물은 세포의 STn 수준을 조절하는 인자를 암호화할 수 있다. 인자는 STn 합성에 관여하는 적어도 하나의 인자를 포함할 수 있다. 인자는 (알파-N-아세틸-뉴라미닐-2,3-베타-갈락토실-1,3)-N-아세틸갈락토사미니드, 알파-2,6-시알릴트랜스페라제 I(ST6GalNAc I), T-신타제 및 코어 1 베타3-갈락토실트랜스페라제-특이적 분자 샤프론(COSMC) 중의 적어도 하나로부터 선택될 수 있다. 변형된 세포는 적어도 하나의 비변형 세포와 비교하는 경우 증가된 STn 수준을 포함할 수 있다. 인자는 ST6GalNAc의 발현을 감소시킬 수 있다. 인자는 억제성 리보핵산(RNA) 분자일 수 있다. 변형된 세포는 변형된 난소 종양 세포일 수 있다. 변형된 난소 종양 세포는 SKOV3 세포, OVCAR3 세포, OVCAR4 세포, BRCA1 돌연변이 종양 세포 및 비-BRCA1 돌연변이 종양 세포 중의 하나 이상으로부터 선택될 수 있다.

[0023] 일부 실시양태에서, 항체 결합을 특성화하는 방법이 제공된다. 방법은 글리칸 어레이를 항체와 접촉시킴을 포함할 수 있다. 글리칸 어레이는 다수의 글리칸을 포함할 수 있다. 다수의 글리칸은 각각의 Neu5Ac α 6GalNAc α O(CH₂)2CH₂NH₂; Neu5Gc α 6GalNAc α O(CH₂)2CH₂NH₂; Neu5Ac α 6Gal β 4GalNAc β O(CH₂)2CH₂NH₂; Neu5Gc α 6Gal β 4GalNAc β O(CH₂)2CH₂NH₂; Neu5Ac α 6Gal β 4GalNAc β O(CH₂)2CH₂NH₂; Neu5Gc α 3Gal β 1-3GalNAc α O(CH₂)2CH₂NH₂; 및 Neu5Gc α 3Gal β 1-3GalNAc α O(CH₂)2CH₂NH₂ 중의 하나 이상으로 이루어진 글리칸의 패널을 포함할 수 있다. 다수의 글리칸 각각은 네오당지

질 프로브(neoglycolipid probe)의 일부일 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0024] 상기 및 기타 목적들, 특징들 및 이점들은 첨부된 도면에 예시된 바와 같이 발명의 특정 양태들의 하기 설명으로 자명해질 것이며, 도면에서 비슷한 참조 특성은 다른 관점 전반에 걸쳐 동일한 부분을 나타낸다. 도면은 반드시 일정한 비율로 작성되지는 않으며, 대신 발명의 다양한 양태의 원리를 예시하는데 중점을 둔다.

도 1A-1D는 α 2,6-시알릴화 N-아세틸갈락토사민(STn)을 도시하고 항-STn 항체 결합에 관여하는 추정 에피토프(putative epitope)를 나타내는 도표이다. 각 도표에서 가장 큰 타원은 4개의 항원 그룹 각각에 의해 표적화된 STn의 특정 영역을 나타낸다. 이를 그룹은 그룹 1 항체(도 1A에 나타낸 큰 타원형 영역에 결합함), 그룹 2 항체(도 1B에 나타낸 큰 타원형 영역에 결합함), 그룹 3 항체(도 1C에 나타낸 큰 타원형 영역에 결합함) 및 그룹 4 항체(도 1D에 나타낸 큰 타원형 영역에 결합함)를 포함한다.

도 2는 가변 도메인의 개략도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

서론

[0025] 본 발명에 따르면 본원에서 글리칸이라고 하는 탄수화물 그룹을 포함하는 에피토프에 특이적이거나 에피토프와 상호작용하는 항체이다. 본원에 기재된 몇가지 글리칸-상호작용 항체는 바이오치료제(biotherapeutics)로서 사용될 수 있다. 또 다른 양태는 이러한 글리칸-상호작용 항체를 생성하는 방법을 제공한다.

[0026] 자연에서, STn은 N-아세틸뉴라민산(Neu5Ac) 또는 N-글리콜릴뉴라민산(Neu5Gc)으로 시알릴화될 수 있다. 본 발명에 따르는 글리칸-상호작용 항체는 임의의 STn을 갖는 글리칸(pan-STn 항체), Neu5Ac를 특이적으로 포함하는 STn(AcSTn)을 갖는 글리칸 또는 Neu5Gc를 특이적으로 포함하는 STn(GcSTn)을 갖는 글리칸에 지시될 수 있다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 글리칸-상호작용 항체는 α 2,6-시알릴화 N-아세틸갈락토사민(STn)과 같은 암-관련 글리칸 항원을 표적화한다.

[0027] 일부 실시양태에서, 본 발명은 글리칸-상호작용 항체를 생산하는 방법을 제공한다. 이러한 방법은 STn(예컨대 AcSTn 및/또는 GcSTn)을 포함한 하나 이상의 항원에 대한 면역 반응을 생성하기 위한 마우스의 사용을 포함할 수 있다. 본원에 기재된 바와 같이, 마우스 면역화를 통해 생산된 항체를 조절하기 위해 다수의 방법이 사용될 수 있다. 이러한 방법은 면역화되는 마우스의 품종 및/또는 성별을 변화시키는 것, 사용되는 항원을 변화시키는 것, 항원 투여에 포함되는 아주반트의 유형 및 용량과 하이브리도마 융합의 개시 전 면역화의 시간 과정을 변화시키는 것을 포함할 수 있다.

[0028] 일부 실시양태에서, 본 발명은 글리칸-상호작용 항체를 사용하여 암 줄기 세포를 제거하는 방법을 제공한다. 또 다른 양태에서, 본 발명은 글리칸-상호작용 항체를 사용하여 암 줄기 세포를 제거함으로써 대상체에서 암을 치료하는 방법을 제공한다. 몇몇 측면에서, 글리칸-상호작용 항체는 단독으로 사용될 수 있다. 또 다른 측면에서, 글리칸-상호작용 항체는 화학요법제와 병용된다.

[0029] 본원에 개시된 글리칸-상호작용 항체의 최적화된, 인간화된 및 접합된 형태가 추가로 제공된다. 게다가, 본 발명의 항체 및/또는 방법을 포함하는 키트, 검정 및 시약이 나타내어져 있다.

정의

[0030] 인접한: 본원에서 사용되는 용어 "인접한"은 주어진 실체의 부근이거나, 이웃하거나, 바로 옆에 있는 어떤 것을 가리킨다. 일부 실시양태에서, "인접한 잔기"는 서로에 연결된 글리칸 쇄 내의 당 잔기이다. 일부 실시양태에서, "인접한 글리칸"은 직접 접촉하여 또는 아주 근접하여 및 둘 사이에 다른 글리칸 없이 서로에 대해 바로 옆에 있는 글리칸 쇄이다.

[0031] 병용 투여되는: 본원에서 사용되는 용어 "병용 투여되는" 또는 "병용된 투여"는 대상체가 어떠한 지점에서 제시간에 제제 둘 다에 동시에 노출되도록 및/또는 환자에 대한 각 제제의 효과가 겹칠 수 있도록 대상체가 동시에 또는 시간 간격 내에 투여된 둘 이상의 제제에 동시에 노출됨을 의미한다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 제제의 적어도 하나의 용량은 하나 이상의 다른 제제의 적어도 하나의 용량의 약 24시간, 12시간, 6시간, 3시간, 1시간, 30분, 15분, 10분, 5분, 또는 1분 내에 투여된다. 일부 실시양태에서, 투여는 중복 투여량 섭생으로 일어난다. 본원에 사용되는 용어 "투여량 섭생"은 시간상 간격을 두고 떨어져 있는 다수의 용량을 가리킨다.

다. 이러한 용량은 규칙적인 간격으로 발생할 수 있거나 투여에 있어 한 번 이상의 중단을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 바와 같이 하나 이상의 글리칸-상호작용 항체의 개별 용량의 투여는 조합(예컨대, 상승) 효과가 달성되도록 함께 충분히 가깝게 간격을 둔다.

[0034] **아미노산:** 본원에서 사용되는 용어 "아미노산" 및 "아미노산들"은 모든 자연 발생적 L-알파-아미노산 뿐만 아니라 비-자연 발생적 아미노산을 가리킨다. 아미노산은 1-글자 또는 3-글자 명칭으로 다음과 같이 확인된다: 아스파르트산 (Asp:D), 이소류신 (Ile:I), 트레오닌 (Thr:T), 류신 (Leu:L), 세린 (Ser:S), 티로신 (Tyr:Y), 글루탐산 (Glu:E), 페닐알라닌 (Phe:F), 프롤린 (Pro:P), 히스티딘 (His:H), 글리신 (Gly:G), 리신 (Lys:K), 알라닌 (Ala:A), 아르기닌 (Arg:R), 시스테인 (Cys:C), 트립토판 (Trp:W), 발린(Val:V), 글루타민 (Gln:Q) 메티오닌 (Met:M), 아스파라긴 (Asn:N), 여기서는 아미노산이 먼저 열거되고 뒤에 삽입구로서 각각 3글자 및 1글자 코드가 열거된다.

[0035] **동물:** 본원에서 사용되는 용어 "동물"은 동물계의 임의의 구성원을 가리킨다. 일부 실시양태에서, "동물"은 임의의 발달 단계의 인간을 가리킨다. 일부 실시양태에서, "동물"은 임의의 발달 단계의 비-인간 동물을 가리킨다. 특정 양태에서, 비-인간 동물은 포유동물(예컨대, 설치류, 마우스, 랙트, 토끼, 원숭이, 개, 고양이, 양, 소, 영장류, 또는 돼지)이다. 일부 실시양태에서, 동물은 포유류, 조류, 파충류, 양서류, 어류 및 벌레를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 일부 실시양태에서, 동물은 유전자이식 동물, 유전자-조작 동물, 또는 클론이다.

[0036] **항체:** 본원에서 사용되는 용어 "항체"는 광범위한 의미로 사용되며 구체적으로 단클론 항체, 다클론 항체, 다중 특이적 항체(예컨대 적어도 두 개의 무순상 항체로부터 형성된 이중특이적 항체) 및 디아바디와 같은 항체 단편을 포함하지만 이에 제한되지 않는 다양한 양태들을, 이들이 목적하는 생물학적 활성을 나타내는 한, 포함한다. 항체는 주로 아미노산 기반 분자이지만, 당 모이어티를 갖는 것과 같은 하나 이상의 변형을 또한 포함할 수 있다.

[0037] **항체 단편:** 본원에서 사용되는 용어 "항체 단편"은 바람직하게는 항체의 항원 결합 영역을 포함한, 무순상 항체의 일부를 가리킨다. 항체 단편의 예는 Fab, Fab', F(ab')₂ 및 Fv 단편; 디아바디; 선형 항체; 단일쇄 항체 분자; 및 항체 단편으로부터 형성된 다중특이적 항체를 포함한다. 항체의 파파인 소화는 "Fab" 단편이라고 불리는 두 개의 동일한 항원-결합 단편을 생산하며, 이들 각각은 단일 항원-결합 부위를 갖는다. 잔류성 "Fc" 단편이 또한 생산되는데, 이의 명칭은 신속하게 결정화하는 능력을 반영한다. 웨신 처리는 두 개의 항원-결합 부위를 갖고 여전히 항원을 가교결합할 수 있는 F(ab')₂ 단편을 생성한다. 글리칸-상호작용 항체는 이러한 단편들 중의 하나 이상을 포함할 수 있다. 본원의 목적을 위해, 항체는 중쇄 및 경쇄 가변 도메인 뿐만 아니라 Fc 영역을 포함할 수 있다.

[0038] **항원-결합 영역:** 본원에서 사용되는 용어 "항원-결합 영역"은 표적 분자 또는 에피토프와 직접 상호작용하는 항체의 일부, 항체 단편, 또는 관련 분자를 가리킨다. 항원-결합 영역은 전형적으로 항체의 Fab 영역에서와 같이 또는 scFv에 함께 결합된 바와 같이 가변 도메인 쌍을 포함한다.

[0039] **대략:** 본원에서 사용되는 용어 "대략" 또는 "약"은, 하나 이상의 관심 값에 적용되는 바와 같이, 제시된 기준 값과 유사한 값을 가리킨다. 특정 양태에서, 용어 "대략" 또는 "약"은 달리 제시되지 않거나 달리 문맥으로부터 자명하지 않은 한(이러한 숫자가 가능한 값의 100%를 초과하는 경우를 제외하고) 제시된 기준 값의 어느 방향으로(초과 또는 미만) 25%, 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 또는 그 미만 내에 드는 범위의 값을 가리킨다.

[0040] **~와 연합된:** 본원에서 사용되는 용어 "와 연합된", "접합된", "결합된", "부착된" 및 "테더링된"은, 둘 이상의 모이어티와 관련하여 사용되는 경우, 모이어티가 직접 또는 결합제로서 작용하는 하나 이상의 추가의 모이어티를 통해 서로 물리적으로 연합되거나 접속되어, 모이어티가 그 구조가 사용되는 조건, 예컨대, 생리학적 조건하에서 계속해서 물리적으로 연합되도록 하기에 충분히 안정한 구조를 형성함을 의미한다. "연합"은 엄격히 직접적인 공유 화학 결합을 통해 이루어질 필요는 없다. 이것은 "연합된" 실체가 계속해서 물리적으로 연합되도록 하기에 충분히 안정한 이온 결합 또는 수소 결합 또는 혼성화 기반 연결을 또한 시사할 수 있다.

[0041] **이작용성:** 본원에서 사용되는 용어 "이작용성"은 적어도 두 개의 작용기를 유지할 수 있는 임의의 물질, 분자 또는 모이어티를 가리킨다. 작용기는 동일한 결과 또는 상이한 결과에 영향을 미칠 수 있다. 작용기를 생성하는 구조는 동일하거나 상이할 수 있다.

- [0042] **생체분자:** 본원에서 사용되는 용어 "생체분자"는 아미노산-기반, 핵산-기반, 탄수화물-기반 또는 지질-기반 등의 임의의 천연 분자이다.
- [0043] **이중특이적 항체:** 본원에서 사용되는 용어 "이중특이적 항체"는 두 개의 상이한 항원에 결합할 수 있는 항체를 가리킨다. 이러한 항체는 전형적으로 적어도 두 개의 상이한 항체로부터의 영역을 포함한다. 이중특이적 항체는 문헌[참조; Riethmuller, G. 2012. Cancer Immunity. 12:12-18, Marvin, J.S. et al., 2005. Acta Pharmacologica Sinica. 26(6):649-58 and Schaefer, W. et al., 2011. PNAS. 108(27):11187-92]에 기재된 것들 중의 어느 것을 포함할 수 있으며, 상기 문헌 각각의 내용은 전문이 본원에 참고로 포함된다.
- [0044] **분지:** 본원에서 사용되는 용어 "분지(branch)"는 주요 실체 또는 공급원으로부터 연결되거나 연장된 실체, 모이어티 또는 부속물을 가리킨다. 일부 실시양태에서, "분지 쇄" 또는 "분지화 쇄"는 모 쇄(parent chain)로부터 연장된 하나 이상의 잔기(당 잔기를 포함하지만, 이에 제한되지 않음)를 포함한다. 본원에서 사용되는 바와 같이, "모 쇄"는 분지화 쇄가 연결되는 잔기(당 잔기를 포함하지만, 이에 제한되지 않음)의 쇄를 가리키는데 사용된다. 다수의 분지를 갖는 글리칸의 경우에, 모 쇄는 이러한 모든 분지가 직접 또는 간접적으로 부착되는 공급원 쇄를 가리킬 수도 있다. 핵소오스 잔기의 쇄를 갖는 다당류의 경우에, 모 쇄 결합은 전형적으로 인접 잔기의 탄소 1 및 4 사이에서 일어나는 반면 분지화 쇄는 분지화 잔기의 탄소 1과 분지가 연장되는 모 잔기의 탄소 3 사이의 결합을 통해 모 쇄에 부착된다. 본원에서 사용되는 용어 "분지화 잔기"는 분지화 쇄에서 모 쇄에 부착되는 잔기를 가리킨다.
- [0045] **암 줄기 세포:** 본원에서 사용되는 바와 같이, 암 줄기 세포(CSC)는 자기-재생 능력을 갖는 종양 세포의 하위세트를 가리킨다. CSC는 다양한 세포 유형을 재생할 수 있다. 일부 경우에, 이들 세포는 종양의 수술적 또는 화학적 치료를 통해 제거하기 어렵거나 불가능하다.
- [0046] **화합물:** 본원에서 사용되는 용어 "화합물"은 분명한 화학적 실체를 가리킨다. 일부 실시양태에서, 특정 화합물은 하나 이상의 이성체 또는 동위원소 형태(입체이성체, 기하이성체 및 동위원소를 포함하지만, 이에 제한되지 않음)로 존재할 수 있다. 일부 실시양태에서, 화합물은 오로지 이러한 단일 형태로 제공되거나 사용된다. 일부 실시양태에서, 화합물은 둘 이상의 이러한 형태의 혼합물(입체이성체의 라세미 혼합물을 포함하지만, 이에 제한되지 않음)로서 제공되거나 사용된다. 당업계의 숙련가들은 일부 화합물들은 이러한 상이한 형태로 존재하고, 상이한 특성 및/또는 활성(생물학적 활성을 포함하지만, 이에 제한되지 않음)을 보인다는 것을 인지한다. 이러한 경우에, 본 발명에 따라 사용하기 위해 특정 형태의 화합물을 선택하거나 피하는 것은 당업계의 통상의 숙련자의 재량 내에 있다. 예를 들면, 비대칭 치환된 탄소원자를 함유하는 화합물은 광학 활성 또는 라세미 형태로 분리될 수 있다. 광학 활성 출발 물질로부터 광학 활성 형태를 제조하는 방법은 라세미 혼합물의 분해에 의해 또는 입체선택적 합성에 의해서와 같이 당업계에 공지되어 있다.
- [0047] **사이클릭 또는 폐환된:** 본원에서 사용되는 용어 "사이클릭"은 연속 고리(continuous loop)의 존재를 가리킨다. 사이클릭 분자는 원형일 필요는 없으며, 단지 결합하여 서브유닛의 끊어지지 않은 쇄를 형성한다.
- [0048] **시티딘 모노포스페이트-N-아세틸뉴라민산 하이드록실라제:** 본원에서 사용되는 용어 "시티딘 모노포스페이트-N-아세틸뉴라민산 하이드록실라제" 또는 "CMAH"는 인간에서는 부재하지만 대부분의 다른 포유류(마우스, 돼지 및 침팬지를 포함하지만, 이에 제한되지 않음)에는 존재하여, N-아세틸뉴라민산으로부터의 N-글리콜릴뉴라민산의 형성을 촉매하는 효소를 가리킨다. 인간에서 상기 효소의 부재는 CMAH 전사체의 조기 종결 및 비-작용성 단백질의 생산을 야기하는 틀이동 돌연변이(frameshift mutation)로 인한 것이다.
- [0049] **세포독성:** 본원에서 사용되는 용어 "세포독성"은 세포(예컨대, 포유류 세포(예컨대, 인간 세포)), 박테리아, 바이러스, 진균류, 원생동물, 기생충, 프리온, 또는 이의 조합에 대한 해로운, 독성의, 또는 치명적인 효과를 사멸하거나 유발하는 제제를 가리키는데 사용된다.
- [0050] **전달:** 본원에서 사용되는 바와 같이, "전달"은 화합물, 물질, 실체, 모이어티, 카고(cargo) 또는 페이로드를 의도된 목적지로 운반하는 작용 또는 방식을 가리킨다.
- [0051] **전달제:** 본원에서 사용되는 바와 같이, "전달제"는 화합물, 물질, 실체, 모이어티, 카고 또는 페이로드의 생체내 전달을, 적어도 부분적으로, 촉진시키는 임의의 물질을 가리킨다.
- [0052] **검출 가능한 표지:** 본원에서 사용되는 바와 같이, "검출 가능한 표지"는 마커, 신호, 또는 모이어티가 방사선촬영, 형광, 화학발광, 효소 활성, 흡광도 등을 포함하여 당업계에 공지된 방법들에 의해 용이하게 검출되는, 또 다른 실체와 부착, 삽입 또는 연결되는 하나 이상의 마커, 신호, 또는 모이어티를 가리킨다. 검출 가능한 표지

는 방사성 동위원소, 형광단, 발색단, 효소, 엔도, 금속 이온, 리간드, 예를 들면, 비오틴, 아비딘, 스트렙타비딘 및 합텐, 양자점 등을 포함한다. 검출 가능한 표지는 이들이 부착, 삽입 또는 연결되는 실체의 임의의 위치에 위치할 수 있다. 예를 들면, 펩타이드 또는 단백질에 부착, 삽입 또는 연결되는 경우, 이들은 아미노산, 펩타이드, 또는 단백질 내에 있을 수 있거나, N- 또는 C-말단에 위치할 수 있다.

[0053] **디스플레이 라이브러리:** 본원에서 사용되는 용어 "디스플레이 라이브러리"는 생체분자 상호작용을 확인하기 위한 과학적 발견에 사용되는 도구를 가리킨다. 박테리오파지, 효모 및 리보솜의 사용을 포함한 디스플레이 라이브러리의 상이한 변화들이 존재한다. 각 경우에, 주어진 라이브러리 내의 단백질(본원에서는 "라이브러리 멤버"라고도 함)은 단백질을 암호화하는 핵산에 (물리적으로 또는 숙주와의 연합을 통해) 결합된다. 표적 분자가 디스플레이 라이브러리의 멤버와 함께 배양되는 경우, 표적에 결합하는 임의의 라이브러리 멤버를 단리할 수 있으며 결합된 단백질을 암호화하는 서열을 결합된 핵산의 분석을 통해 알아낼 수 있다. 일부 실시양태에서, 디스플레이 라이브러리는 "파지 디스플레이 라이브러리"이며, 여기서 디스플레이 라이브러리는 도입되었던 핵산에 의해 암호화된 단백질에 융합되는 바이러스 코트 단백질의 생산을 야기하는 파지 계놈에 핵산이 삽입되는 박테리오파지 바이러스 입자(본원에서는 "파지 입자"라고도 함)로 구성된다. 이러한 융합된 단백질은 조립된 파지 입자의 외부 표면 상에서 "표시"되며, 여기서 이들은 주어진 표적과 상호작용할 수 있다.

[0054] **원위:** 본원에서 사용되는 용어 "원위"는 중심으로부터 떨어져서 또는 관심 지점 또는 영역으로부터 떨어져서 위치함을 의미한다.

[0055] **조작된:** 본원에서 사용되는 바와 같이, 본 발명의 양태들은 출발점, 야생형 또는 네이티브 분자부터 다른, 구조적이든 또는 화학적이든, 특징 또는 특성을 갖도록 설계되는 경우 "조작된다". 따라서, 조작된 제제 또는 실체는 이의 설계 및/또는 생산이 사람의 손의 작용을 포함하는 것이다.

[0056] **에피토프:** 본원에서 사용되는 바와 같이, "에피토프"는 항체를 포함하지만 이에 제한되지 않는 면역계의 성분과 상호작용할 수 있는 문자 상의 표면 또는 영역을 가리킨다. 일부 실시양태에서, 에피토프는 표적 부위를 포함할 수 있다. 에피토프는 상응하는 항체에 의해 특이적으로 인식되고 결합되는 항원 상에 또는 둘 이상의 항원 간의 영역을 포함할 수 있다. 몇몇 에피토프는 하나 이상의 글리칸을 따라 하나 이상의 당 잔기를 포함할 수 있다. 이러한 에피토프는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 적어도 10개의 당 잔기를 포함할 수 있다. 에피토프는 또한 실체 간의 하나 이상의 상호작용 영역을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 에피토프는 두 개의 당 잔기 사이에, 분지화 쇄와 모 쇄 사이에 또는 글리칸과 단백질 사이에 접합부를 포함할 수 있다.

[0057] **에테르 결합:** 본원에서 사용되는 바와 같이, "에테르 결합"은 두 개의 탄소원자 사이에 결합된 산소를 포함하는 화학 결합을 가리킨다. 일부 실시양태에서, 에테르 결합은 글리칸 쇄를 형성하기 위해 당 잔기를 다른 당 잔기를 포함하지만 이에 제한되지 않는 다른 실체에 연결한다. 이러한 결합을 "글리코시드 결합" 또는 "글리코시드 연결"이라고도 한다. 적어도 하나의 당 잔기의 맥락에서, 용어 "연결하다" 및/또는 "연결"은 또한 글리코시드 연결을 언급하는 경우에 본원에서 사용된다. 일부 실시양태에서, 연결은 글리칸을 단백질, 지질, 인지질 및 스크립고지질을 포함하지만 이에 제한되지 않는 다른 실체에 연결할 수 있다. 일부 실시양태에서, 당 잔기는 단백질에 연결되어, 전형적으로 당 잔기와 아미노산 잔기 간의 연결을 형성할 수 있다. 이러한 아미노산 잔기는 세린 및 트레오닌을 포함한다. 일부 실시양태에서, 에테르 결합은 결합 형성에 참여하는 탄수화물 링커를 통해 글리칸을 글리칸 어레이에 연결한다. 글리코시드 연결은 이들의 입체화학적 특성에 있어서 상이할 수 있다. 일부 실시양태에서, 알파 배향된 글리코시드 연결("알파 연결"이라고도 함)은 에테르 결합의 결합된 산소와 당 잔기의 사이클로헥산 환 간의 축 배향을 초래한다. 일부 실시양태에서, 베타 배향된 글리코시드 연결(본원에서는 "베타 연결"이라고도 함)은 에테르 결합의 결합된 산소와 당 잔기의 사이클로헥산 환 간의 적도 배향을 초래한다.

[0058] **발현:** 본원에서 사용되는 바와 같이, 핵산 서열의 "발현"은 다음의 이벤트 중의 하나 이상을 가리킨다: (1) (예컨대, 전사에 의한) DNA 서열로부터의 RNA 주형의 생산; (2) (예컨대, 스플라이싱, 편집, 5' 캡 형성 및/또는 3' 말단 프로세싱에 의한) RNA 전사체의 프로세싱; (3) 폴리펩타이드 또는 단백질로의 RNA의 번역; (4) 폴리펩타이드 또는 단백질의 접합; 및 (5) 폴리펩타이드 또는 단백질의 번역후 변형.

[0059] **특징:** 본원에서 사용되는 바와 같이, "특징"은 특징, 특성, 또는 독특한 요소를 가리킨다.

[0060] **제제:** 본원에서 사용되는 바와 같이, "제제"는 화학식에 따라 제조되고 적어도 하나의 항체, 화합물, 물질, 실체, 모이어티, 카고 또는 페이로드 및 전달제, 담체 또는 부형제를 포함할 수 있는 재료 또는 혼합물을 가리킨다.

[0061] **작용성:** 본원에서 사용되는 바와 같이, "작용성" 생물학적 분자는 이들을 특징지우는 특성 및/또는 활성을 나타

내는 구조 및 형태를 갖는 생물학적 실체이다. 본원에서 사용되는 바와 같이, "작용기" 또는 "화학 그룹"은 보다 큰 분자의 일부인 원자 또는 화학 결합의 특징적인 기를 가리킨다. 일부 실시양태에서, 작용기는 다른 분자와 연합될 수 있지만, 이들이 일부인 분자에 관계없이 유사한 화학 반응에 참여할 수 있다. 통상의 작용기는 카복실기(-COOH), 아세틸기(-COH), 아미노기(-NH₂), 메틸기(-CH₃), 설페이트기(-SO₃H) 및 아실기를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 일부 실시양태에서, 분자에의 하나 이상의 작용기의 첨가는 작용기의 명칭을 끝에 "-화된"으로 수식하는 용어, 예컨대, 아세틸화된, 메틸화된 및 황산화된을 사용하여 전달될 수 있다.

[0062] 글리칸: 본원에서 사용되는 용어 "글리칸", "올리고당" 및 "다당류"는 상호교환 가능하게 사용되며 전형적으로 본원에서는 연결이라고도 하는 글리코시드 결합에 의해 결합된 당 단량체로 이루어진 중합체를 가리킨다. 일부 실시양태에서, 용어 "글리칸", "올리고당" 및 "다당류"는 당접합체(예컨대, 당단백질, 당지질, 또는 프로테오글리칸)의 탄수화물 부분을 가리키는데 사용될 수 있다.

[0063] 글리칸 쇄: 본원에서 사용되는 용어 "글리칸 쇄"는 둘 이상의 당을 포함하는 당 중합체를 가리킨다. 일부 실시양태에서, 글리칸 쇄는 단백질 상의 세린 또는 트레오닌 잔기를 통해 단백질에 공유 결합된다.

[0064] 글리칸-풍부 조성물: 본원에서 사용되는 용어 "글리칸-풍부 조성물"은 글리칸을 큰 비율로 포함하는 혼합물을 가리킨다. 일부 실시양태에서, 글리칸-풍부 조성물 내의 글리칸은 조성물의 총 중량의 약 1% 내지 약 10%, 약 5% 내지 약 15%, 약 20% 내지 약 40%, 약 30% 내지 약 50%, 약 60% 내지 약 80%, 약 70% 내지 약 90% 또는 적어도 100%를 구성할 수 있다.

[0065] 글리코시드 결합: 본원에서 사용되는 용어 "글리코시드 결합"은 탄수화물과 다른 화학기 간에 형성된 공유 결합을 가리킨다. 일부 실시양태에서, 글리코시드 결합은 하나의 당 분자의 환원 말단과 제2 당 분자 또는 다당류 쇄의 비-환원 말단 사이에 형성된다. 이러한 글리코시드 결합은 결합된 당들 간의 산소(또는 에테르 결합)로 인해 0-글리코시드 결합으로도 알려져 있다. 일부 실시양태에서, 두 개의 당 간의 또는 당과 링커 간의 글리코시드 결합을 "연결"이라고도 할 수 있다.

[0066] 시험관내: 본원에서 사용되는 용어 "시험관내"는 유기체(예컨대, 동물, 식물, 또는 미생물) 내라기 보다는 인공 환경에서, 예컨대, 시험관 또는 반응 용기에서, 세포 배양물에서, 페트리 디쉬 등에서 발생하는 이벤트를 가리킨다.

[0067] 생체내: 본원에서 사용되는 용어 "생체내"는 유기체(예컨대, 동물, 식물, 또는 미생물 또는 이의 세포 또는 조직) 내에서 발생하는 이벤트를 가리킨다.

[0068] 단리된: 본원에서 사용되는 용어 "단리된(isolated)"은 "분리된(separated)"과 동의어이지만, 분리는 사람의 손으로 수행된다는 추론을 동반한다. 한 실시양태에서, 단리된 물질 또는 실체는 이것이 (자연에서든 또는 실험 환경에서든) 이전에 연결된 성분들 중의 적어도 일부로부터 분리된 것이다. 단리된 물질은 이들이 연결된 물질과 관련하여 다양한 정도의 순도를 가질 수 있다. 단리된 물질 및/또는 실체는 이들이 초기에 연결된 다른 성분들 중의 적어도 약 10%, 약 20%, 약 30%, 약 40%, 약 50%, 약 60%, 약 70%, 약 80%, 약 90%, 또는 그 이상으로부터 분리될 수 있다. 일부 실시양태에서, 단리된 제제는 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 91%, 약 92%, 약 93%, 약 94%, 약 95%, 약 96%, 약 97%, 약 98%, 약 99% 이상, 또는 약 99% 이상의 순도이다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 물질은, 다른 성분들을 실질적으로 함유하지 않는다면, "순수하다".

[0069] 키트: 본원에서 사용되는 용어 "키트"는 공동의 목적에 맞는 하나 이상의 성분 및 이의 사용을 위한 지침서를 포함하는 세트를 가리킨다.

[0070] 녹아웃: 본원에서 사용되는 용어 "녹아웃"은 전형적으로 사람의 손을 수반하는 과정을 통해 현준 유전자가 불활성화된 유기체를 가리킨다. 녹아웃 유기체에서, 불활성화된 유전자를 "녹아웃"되었다고 한다. 일부 실시양태에서, 녹아웃된 유전자는 유전자로의 뉴클레오티드 서열의 삽입을 통해 또는 전체적으로 유전자의 교체를 통해 불활성화될 수 있다.

[0071] 링커: 본원에서 사용되는 바와 같이, "링커"는 둘 이상의 도메인, 모이어티 또는 실체를 연결하는 모이어티를 가리킨다. 한 실시양태에서, 링커는 10, 11, 12, 13, 14, 15개 또는 그 이상의 원자를 포함할 수 있다. 추가의 양태에서, 링커는 원자의 그룹, 예컨대, 10-1,000개의 원자를 포함할 수 있다. 이러한 원자 또는 이의 그룹은 탄소, 아미노, 알킬아미노, 산소, 황, 설포사이드, 설포닐, 카보닐 및 이민을 포함할 수 있지만, 이에 제한되지 않는다. 일부 실시양태에서, 링커는 아미노산, 웨타이드, 폴리웨타이드, 또는 단백질을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 링커에 의해 결합된 모이어티는 원자, 화학기, 뉴클레오티드, 뉴클레오사이드, 핵염기, 당, 핵산,

아미노산, 웹타이드, 폴리웹타이드, 단백질, 단백질 복합체, 페이로드(예컨대, 치료제) 또는 마커(화학적, 형광성, 방사성 또는 생물발광 마커를 포함하지만, 이에 제한되지 않음)를 포함할 수 있지만, 이에 제한되지 않는다. 링커는 다합체 또는 접합체를 형성하는 것, 뿐만 아니라 본원에 기재된 바와 같이 페이로드를 투여하는 것과 같은 임의의 유용한 목적을 위해 사용될 수 있다. 링커에 삽입될 수 있는 화학기의 예는 알킬, 알케닐, 알키닐, 아미도, 아미노, 에테르, 티오에테르, 에스테르, 알킬렌, 헤테로알킬렌, 아릴, 또는 헤테로사이클릴을 포함하지만, 이에 제한되지 않으며, 이를 각각은 본원에 기재된 바와 같이 임의로 치환될 수 있다. 링커의 예는 불포화 알칸, 폴리에틸렌 글리콜(예컨대, 에틸렌 또는 프로필렌 글리콜 단량체 단위, 예컨대, 디에틸렌 글리콜, 디프로필렌 글리콜, 트리에틸렌 글리콜, 트리프로필렌 글리콜, 테트라에틸렌 글리콜, 또는 테트라에틸렌 글리콜) 및 텍스트란 중합체를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 또 다른 예는 링커 내의 절단 가능한 모이어티, 예를 들면, 디설파이드 결합(-S-S-) 또는 아조 결합(-N=N-)을 포함하지만, 이에 제한되지 않으며, 이것은 환원제 또는 광분해를 사용하여 절단될 수 있다. 선택적으로 절단 가능한 결합의 비제한적인 예는 예를 들면 트리스(2-카복시에틸)포스핀(TCEP), 또는 다른 환원제 및/또는 광분해의 사용에 의해 절단될 수 있는 아미도 결합, 뿐만 아니라 예를 들면 산성 또는 염기성 가수분해에 의해 절단될 수 있는 에스테르 결합을 포함한다. 일부 실시양태에서, 링커는 글리칸 어레이에서와 같이 글리칸을 기질에 연결하는데 사용되는 탄수화물이다. 이러한 탄수화물 링커는 $-O(CH_2)_2CH_2HN_2$ 및 $-O(CH_2)_3NHCOCH_2(OCH_2CH_2)_6NH_2$ 를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

- [0072] **mRNA:** 본원에서 사용되는 용어 "mRNA"는 유전자 전사 및 생성된 전사체의 프로세싱의 결과로서 생산된 메신저 RNA를 가리킨다. 일부 실시양태에서, 세포의 핵을 떠난 mRNA는 세포 또는 세포의 세트로부터 추출할 수 있으며 어떠한 유전자가 주어진 시간에 또는 주어진 환경 세트하에 전사를 겪는지를 알아보기 위해 분석할 수 있다.
- [0073] **뮤신:** 본원에서 사용되는 용어 "뮤신"은 매우 글리코실화된 단백질 계열을 가리킨다. 일부 실시양태에서 뮤신은 하악선에 의해 생산되며 타액 및 점액에서 발견된다.
- [0074] **음성 선택:** 본원에서 사용되는 용어 "음성 선택(negative selection)"은 표적 항원을 포함하지 않는 조성물의 실체 및/또는 성분에 결합할 수 있는 능력에 기초한 디스플레이 라이브러리로부터의 라이브러리 멤버의 선택을 가리킨다. 일부 실시양태에서, 음성 선택은 표적에 비특이적으로 결합할 수 있는 요소를 제거하기 위해 양성 선택 전에 사용된다.
- [0075] **오프-타겟:** 본원에서 사용되는 바와 같이, "오프 타겟(off target)"은 표적, 유전자, 또는 세포 전사체 중의 하나 이상에 대한 임의의 의도하지 않은 효과를 가리킨다.
- [0076] **환자:** 본원에서 사용되는 바와 같이, "환자"는 치료를 구하거나 필요로 할 수 있거나, 치료를 요구하거나, 치료를 받고 있거나, 치료를 받을 예정인 대상체, 또는 특정 질환 또는 병태에 대해 훈련된(예컨대, 허가받은) 전문가에 의한 관리하에 있는 대상체를 가리킨다.
- [0077] **웹타이드:** 본원에서 사용되는 바와 같이, "웹타이드"는 50개 이하의 아미노산 길이, 예컨대, 약 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 또는 50개 아미노산 길이의 단백질 또는 폴리웹타이드이다.
- [0078] **약제학적으로 허용되는:** 어구 "약제학적으로 허용되는"은, 온전한 의학적 판단 범위내에서, 과도한 독성, 자극, 알레르기 반응, 또는 다른 문제 또는 합병증 없이 사람 및 동물의 조직과 접촉하여 사용하기에 적합하고, 합리적인 이익/위험 비율 갖는 화합물, 물질, 조성물 및/또는 투여형을 가리키기 위해 본원에서 사용된다.
- [0079] **약제학적으로 허용되는 부형제:** 어구 "약제학적으로 허용되는 부형제"는, 본원에서 사용되는 바와 같이, 약제학적 조성물에 존재하고 환자에서 실질적으로 비독성이고 비염증성인 특성을 갖는, 활성제(예컨대, 본원에 기재된 바와 같음) 이외의 임의의 성분을 가리킨다. 일부 실시양태에서, 약제학적으로 허용되는 부형제는 활성제를 혼탁 또는 용해시킬 수 있는 비히클이다. 부형제는, 예를 들면: 접착방지제, 산화방지제, 결합제, 코팅, 압축 조제, 봉해제, 염료(칼라), 완화제, 유화제, 충전제(희석제), 필름 형성제 또는 코팅, 방향제, 향, 활주제(유동 증진제), 유행제, 방부제, 인쇄 잉크, 흡착제, 혼탁제 또는 분산제, 감미제 및 수화용수를 포함할 수 있다. 예시적인 부형제는 다음을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다: 부틸화 하이드록시톨루엔(BHT), 탄산칼슘, 인산칼슘(이염기성), 스테아르산칼슘, 크로스카멜로스, 가교결합된 폴리비닐 피롤리돈, 시트르산, 크로스포비돈, 시스테인, 에틸셀룰로스, 젤라틴, 하이드록시프로필 셀룰로스, 하이드록시프로필 메틸셀룰로스, 락토스, 스테아르산마그네슘, 말티톨, 만니톨, 메티오닌, 메틸셀룰로스, 메틸 파라벤, 미세결정성 셀룰로스, 폴리에틸렌 글리콜, 폴리비닐 피롤리돈, 포비돈, 예비젤라틴화 전분, 프로필 파라벤, 레티닐 팔미테이트, 셀락, 이산화규소, 나트륨 카복시메틸 셀룰로스, 시트르산나트륨, 나트륨 전분 글리콜레이트, 소르비톨, 전분(옥수수), 스테아르산, 수크로스, 활석, 이산화티탄, 비타민 A, 비타민 E, 비타민 C 및 크실리톨.

[0080]

약제학적으로 허용되는 염: 본원에 기재된 화합물의 약제학적으로 허용되는 염은 산 또는 염기 모이어티가 (예컨대, 유리 염기기를 적합한 유기 산과 반응시킴으로써 생성되는 바와 같은) 이의 염 형태인 개시된 화합물의 형태이다. 약제학적으로 허용되는 염의 예는 아민과 같은 염기성 잔기의 무기 또는 유기 산 염; 카복실산과 같은 산성 잔기의 알칼리 또는 유기 염; 등을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 대표적인 산 부가염은 아세테이트, 아디페이트, 알기네이트, 아스코르베이트, 아스파르테이트, 벤젠설포네이트, 벤조에이트, 비설페이트, 보레이트, 부티레이트, 캄포레이트, 캄포르설포네이트, 시트레이트, 사이클로펜탄프로파오네이트, 디글루코네이트, 도데실설페이트, 에탄설포네이트, 푸마레이트, 글루코헵토네이트, 글리세로포스페이트, 헤미설페이트, 햅토네이트, 헥사노에이트, 하이드로브로마이드, 하이드로클로라이드, 하이드로요오다이드, 2-하이드록시-에탄설포네이트, 락토비오네이트, 락테이트, 라우레이트, 라우릴설페이트, 말레이트, 말로네이트, 메탄설포네이트, 2-나프탈렌설포네이트, 니코터네이트, 니트레이트, 올레아이트, 옥살레이트, 팔미테이트, 파모아이트, 펙티네이트, 퍼설페이트, 3-페닐프로파오네이트, 포스페이트, 피크레이트, 피발레이트, 프로파오네이트, 스테아레이트, 석시네이트, 설페이트, 타르트레이트, 티오시아네이트, 툴루엔설포네이트, 운데카노에이트, 발레레이트 염 등을 포함한다. 대표적인 알칼리 금속염 또는 알칼리 토금속염은 나트륨, 리튬, 칼륨, 칼슘, 마그네슘 등, 뿐만 아니라 비독성 암모늄, 4급 암모늄 및 암모늄, 테트라메틸암모늄, 테트라에틸암모늄, 메틸아민, 디메틸아민, 트리메틸아민, 트리에틸아민, 에틸아민 등을 포함하지만, 이에 제한되지 않는 아민 양이온을 포함한다. 약제학적으로 허용되는 염은, 예를 들면, 비독성 무기 또는 유기 산으로부터의 통상의 비독성 염을 포함한다. 일부 실시양태에서 약제학적으로 허용되는 염은 통상의 화학적 방법에 의해 염기성 또는 산성 모이어티를 함유하는 모 화합물로부터 제조된다. 일반적으로, 이러한 염은 이들 화합물의 유리 산 또는 염기 형태를 물 중에서 또는 유기 용매 중에서, 또는 둘의 혼합물 중에서 화학양론적 양의 적합한 염기 또는 산과 반응시킴으로써 제조될 수 있으며; 일반적으로, 에테르, 에틸 아세테이트, 에탄올, 이소프로판을, 또는 아세토니트릴과 같은 비수성 매질이 바람직하다. 적합한 염의 목록은 문헌[참조; *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 17th ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1985, p. 1418, *Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use*, P.H. Stahl and C.G. Wermuth (eds.), Wiley-VCH, 2008, and Berge et al., *Journal of Pharmaceutical Science*, 66, 1-19 (1977)]에서 발견되며, 이들 각각은 전문이 본원에 참고로 포함된다.

[0081]

약제학적으로 허용되는 용매화물: 용어 "약제학적으로 허용되는 용매화물"은, 본원에서 사용되는 바와 같이, 적합한 용매의 분자가 결정 격자에 삽입되어 있는 화합물의 결정질 형태를 가리킨다. 예를 들면, 용매화물은 유기 용매, 물, 또는 이의 혼합물을 포함하는 용액으로부터 결정화, 재결정화, 또는 침전에 의해 제조될 수 있다. 적합한 용매의 예는 에탄올, 물(예를 들면, 일-, 이- 및 삼-수화물), N-메틸피롤리디논(NMP), 디메틸설포사이드(DMSO), N,N'-디메틸포름아미드(DMF), N,N'-디메틸아세트아미드(DMAC), 1,3-디메틸-2-이미다졸리디논(DMEU), 1,3-디메틸-3,4,5,6-테트라하이드로-2-(1H)-피리미디논(DMPU), 아세토니트릴(ACN), 프로필렌 글리콜, 에틸 아세테이트, 벤질 알콜, 2-피롤리돈, 벤질 벤조에이트 등이다. 물이 용매인 경우, 용매화물을 "수화물"이라고 한다. 일부 실시양태에서, 용매화물에 혼입된 용매는 용매화물이 (예컨대, 약제학적 조성물의 단위 투여형으로) 투여되는 유기체에 생리학적으로 허용되는 유형 또는 수준의 것이다.

[0082]

약동학: 본원에서 사용되는 바와 같이, "약동학"은 살아있는 유기체에 투여된 물질의 운명의 결정과 관련된 바와 같은 분자 또는 화합물의 임의의 하나 이상의 특성을 가리킨다. 약동학은 흡수, 분포, 대사 및 배설의 정도 및 속도를 포함하여 몇 가지 분야로 나뉜다. 이것을 흔히 ADME라고 하며, 여기서: (A) 흡수는 혈액 순환으로 들어가는 물질의 과정이고; (D) 분포는 신체의 체액 및 조직 전반에 걸친 물질의 분산 또는 보급이며; (M) 대사(또는 생체내변환)은 딸 대사산물로의 부모 화합물의 비가역적인 변환이고; (E) 배설(또는 제거)은 신체로부터의 물질의 제거를 가리킨다. 드물게, 일부 약물은 비가역적으로 신체 조직에 축적된다.

[0083]

물리화학적: 본원에서 사용되는 바와 같이, "물리화학적"은 물리적 및/또는 화학적 특성을 의미하거나 이와 관련된다.

[0084]

양성 선택: 본원에서 사용되는 용어 "양성 선택"은 독특한 실체의 그룹으로부터의 소정의 실체의 선택을 가리킨다. 이러한 실체 및 이의 그룹은, 예를 들면 항체일 수 있다. 일부 경우에 이들은 항체 단편일 수 있거나 발현된 항체 단편은 이러한 단편을 발현할 수 있는 제제(예컨대 디스플레이 라이브러리로부터의 라이브러리 멤버)와 연관된다. 선택은 선택된 실체가 목적하는 표적 또는 에피토프에 결합할 수 있는 능력에 기초할 수 있다. 일부 실시양태에서, 양성 선택은 목적하는 표적에 결합하는 scFv를 발현하는 파지 입자를 확인하기 위해 파지 디스플레이 라이브러리와 함께 사용될 수 있다. 또 다른 양태에서, 양성 선택은 항원의 혼주(pool)로부터의 항체 후보 물질의 선택을 가리킬 수 있다. 또 다른 경우에, 실체는 하이브리도마 선택 동안의 클론의 선택에서와 같이 세포, 세포주 또는 클론일 수 있다. 이러한 경우에, 양성 선택은 이러한 클론에 의해 생산된 항체의 하나 이상의

특징들(예컨대 하나 이상의 목적하는 에피토프에 대한 특이성)에 기초한 클론 선택을 가리킬 수 있다. 일부 경우에, 양성 선택법에서 목적하는 에피토프는 STn(예컨대 AcSTn 및/또는 GcSTn)를 포함할 수 있다.

[0085] 반대로, "음성 선택"은, 본원에서 사용되는 바와 같이, 양성 선택에 대해 기술된 동일한 원리와 예를 포함하지만, 이것은 독특한 실체의 그룹으로부터 바람직하지 않은 실체의 제거를 위해 사용된다는 것을 구별되는 특징으로 한다.

[0086] 예방하는: 본원에서 사용되는 용어 "예방하는"은 감염, 질환, 장애 및/또는 병태의 개시를 부분적으로 또는 완전히 지연시키고; 특정 감염, 질환, 장애 및/또는 병태의 하나 이상의 증상, 특징, 또는 임상 소견의 개시를 부분적으로 또는 완전히 지연시키고; 특정 감염, 질환, 장애 및/또는 병태의 하나 이상의 증상, 특징, 또는 소견의 개시를 부분적으로 또는 완전히 지연시키고; 감염, 특정 질환, 장애 및/또는 병태로부터의 진행을 부분적으로 또는 완전히 지연시키고/시키거나; 감염, 질환, 장애 및/또는 병태와 관련된 병리를 발병할 위험을 감소시킴을 가리킨다.

[0087] 전구약물: 본 발명은 또한 본원에 기재된 화합물의 전구약물을 포함한다. 본원에 사용되는 바와 같이, "전구약물"은 그 물질, 분자 또는 실체가 화학적 또는 물리적 변화시 치료제로서 작용한다는데 입각한 형태의 임의의 물질, 분자 또는 실체를 가리킨다. 전구약물은 어떠한 방식으로든 공유적으로 결합되거나 봉쇄될 수 있으며 포유류 대상체에 투여하기 전, 투여시 또는 투여한 후 활성 약물 모이어티로 전환되거나 방출된다. 전구약물은 변형이, 일상적인 조작으로 또는 생체내에서, 모 화합물로 절단되도록 하는 방식으로 화합물에 존재하는 작용기를 변형시킴으로써 제조될 수 있다. 전구약물은 하이드록실, 아미노, 설프하이드릴, 또는 카복실기이, 포유류 대상체에 투여시 절단되어 각각 유리 하이드록실, 아미노, 설프하이드릴, 또는 카복실기를 형성하는 임의의 기에 결합되어 있는 화합물을 포함한다. 전구약물의 제조 및 사용은 문헌[T. Higuchi and V. Stella, "Pro-drugs as Novel Delivery Systems," Vol. 14 of the A.C.S. Symposium Series, and in *Bioreversible Carriers in Drug Design*, ed. Edward B. Roche, American Pharmaceutical Association and Pergamon Press, 1987]에 논의되어 있으며, 이들 둘 다는 전문이 본원에 참고로 포함된다.

[0088] 근위: 본원에서 사용되는 용어 "근위"는 중심에 또는 관심 지점 또는 영역에 더욱 가까이 위치함을 의미한다.

[0089] 상호작용의 영역: 본원에서 사용되는 용어 "상호작용의 영역"은 둘 이상의 실체가 상호작용하거나 중첩되는, 이러한 실체들 중의 어느 것을 따라 있는 영역을 가리킨다. 일부 실시양태에서, 상호작용의 영역은 제2 글리칸 쇄와 접촉하는 글리칸 쇄를 따라 하나 이상의 당 잔기를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 글리칸 쇄는 동일한 모 쇄로부터의 분지화 쇄이다. 일부 실시양태에서, 상호작용의 영역은 두 개의 글리칸 쇄 사이에서 발생할 수 있으며, 여기서 하나의 쇄는 분지화 쇄이고 두 번째 쇄는 모 쇄이다. 글리칸 쇄의 경우에, 상호작용의 영역은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 적어도 10개의 당 잔기를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 상호작용의 영역은 또한 글리칸과 단백질 사이에서 또는 글리칸과 지질 사이에서 발생할 수 있다.

[0090] 잔기: 본원에서 사용되는 용어 "잔기"는 중합체와 결합되거나 결합될 수 있는 단량체를 가리킨다. 일부 실시양태에서, 잔기는 글루코스, 갈락토스, N-아세틸글루코사민, N-아세틸갈락토사민, 시알산을 포함하지만 이에 제한되지 않는 당 분자를 포함한다. 일부 실시양태에서, 잔기는 아미노산을 포함한다.

[0091] 샘플: 본원에서 사용되는 용어 "샘플"은 공급원으로부터 채취되고/되거나 분석 또는 가공을 위해 제공되는 부분 표본(aliquot) 또는 부분을 가리킨다. 일부 실시양태에서, 샘플은 조직, 세포 또는 구성 요소(예컨대 혈액, 혈장, 혈청, 점액, 림프액, 활액, 뇌척수액, 타액, 양수, 제대혈, 뇨, 질액 및 정액을 포함하지만, 이에 제한되지 않는 체액)과 같은 생물학적 공급원(본원에서 "생물학적 샘플"이라고도 함)으로부터 유래한다. 일부 실시양태에서, 샘플은, 예를 들면, 혈장, 혈청, 척수액, 림프액, 피부, 호흡기, 장관 및 비뇨생식관의 외부 구획, 눈물, 타액, 젖, 혈구, 종양, 장기를 포함하지만 이에 제한되지 않는 전체 유기체 또는 이의 조직, 세포 또는 구성요소의 하위세트, 또는 이의 분획 또는 부분으로부터 제조된 균질물, 용해물 또는 추출물일 수 있거나 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 샘플은 영양 브로스 또는 젤과 같은 배지를 포함하며, 이것은 단백질 또는 핵산 분자와 같은 세포 성분을 함유할 수 있다. 일부 실시양태에서, "일차" 샘플은 공급원의 부분표본이다. 일부 양태에서, 일차 샘플은 분석 또는 다른 사용을 위한 샘플을 제조하기 위해 하나 이상의 프로세싱(예컨대, 분리, 정제 등) 단계에 적용된다.

[0092] 시알릴: 본원에서 사용되는 바와 같이, 접두사 "시알릴" 뿐만 아니라 용어 "시알릴화"는 시알산을 포함하는 화합물을 기술한다.

[0093] 단일 단위 용량: 본원에서 사용되는 바와 같이, "단일 단위 용량"은 일회 용량/한번에/단일 경로/단일 접촉점,

즉, 단일 투여 이벤트로 투여되는 임의의 치료제의 용량이다. 일부 실시양태에서, 단일 단위 용량은 이산 투여형(예컨대, 정제, 캡슐제, 패치, 충전된 시린지, 바이알 등)으로서 제공된다.

[0094] **분할 용량:** 본원에서 사용되는 바와 같이, "분할 용량"은 둘 이상의 용량으로의 단일 단위 용량 또는 전체 1일 용량의 분배이다.

[0095] **안정한:** 본원에서 사용되는 바와 같이 "안정한"은 반응 혼합물로부터 유용한 정도의 순도로의 분리에 견딜 수 있는 정도로 충분히 로버스트하고, 바람직하게는 효과있는 치료제로의 제제화가 가능한 화합물 또는 실체를 가리킨다.

[0096] **안정화된:** 본원에서 사용되는 용어 "안정화하다", "안정화된", "안정화된 영역"은 안정하게 하거나 안정하게 되는 것을 의미한다. 일부 실시양태에서, 안정성은 절대값을 기준으로 측정된다. 일부 실시양태에서, 안정성은 기준 화합물 또는 실체를 기준으로 측정된다.

[0097] **대상체:** 본원에서 사용되는 용어 "대상체" 또는 "환자"는 본 발명에 따르는 조성물이, 예컨대, 실험적, 진단적, 예방적 및/또는 치료적 목적으로 투여될 수 있는 임의의 유기체를 가리킨다. 전형적인 대상체는 동물(예컨대, 마우스, 랙트, 토끼, 비-인간 영장류 및 인간과 같은 포유동물) 및/또는 식물을 포함한다.

[0098] **하악선:** 본원에서 사용되는 용어 "하악선" 또는 "악하선"은 입 바닥 아래에 위치한 점액 생산 분비선(gland)을 가리킨다. 이러한 분비선은 뮤신을 생산할 수 있으며 일부 실시양태에서, 뮤신의 공급원으로서 포유동물로부터 추출될 수 있다.

[0099] **~로 고통받는:** 질환, 장애 및/또는 병태"로 고통받는" 개체는 질환, 장애 및/또는 병태로 진단되거나 이의 하나 이상의 증상을 나타낸다.

[0100] **~에 걸리기 쉬운:** 질환, 장애 및/또는 병태"에 걸리기 쉬운" 개체는 질환, 장애 및/또는 병태로 진단되지 않고/않거나 이의 증상들을 나타내지 않을 수 있지만, 질환 또는 이의 증상을 발병하는 성향을 지닌다. 일부 실시양태에서, 질환, 장애 및/또는 병태(예를 들면, 암)에 걸리기 쉬운 개체는 다음 중의 하나 이상을 특징으로 할 수 있다: (1) 질환, 장애 및/또는 병태의 발병과 관련된 유전적 돌연변이; (2) 질환, 장애 및/또는 병태의 발병과 관련된 유전적 다형성; (3) 질환, 장애 및/또는 병태와 관련된 단백질 및/또는 핵산의 증가된 및/또는 감소된 발현 및/또는 활성; (4) 질환, 장애 및/또는 병태의 발병과 관련된 습관 및/또는 생활양식; (5) 질환, 장애 및/또는 병태의 가족력; 및 (6) 질환, 장애 및/또는 병태의 발병과 관련된 미생물에의 노출 및/또는 감염. 일부 실시양태에서, 질환, 장애 및/또는 병태에 걸리기 쉬운 개체는 질환, 장애 및/또는 병태를 발병할 것이다. 일부 실시양태에서, 질환, 장애 및/또는 병태에 걸리기 쉬운 개체는 질환, 장애 및/또는 병태를 발병하지 않을 것이다.

[0101] **합성:** 용어 "합성"은 인간의 손에 의해 생산, 작성 및/또는 제조됨을 의미한다. 본 발명의 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩타이드 또는 기타 분자의 합성은 화학적 또는 효소적일 수 있다.

[0102] **표적:** 본원에서 사용되는 용어 "표적"은 작용에 의해 영향을 받게 되는 물체 또는 실체를 가리킨다. 일부 실시양태에서, 표적은 항원에 특이적으로 결합하는 항체의 개발에 사용되는 항원을 가리킨다.

[0103] **표적 스크리닝:** 본원에서 사용되는 용어 "표적 스크리닝"은 표적 물질에 대한 결합 파트너를 확인하기 위한 그 물질의 사용을 가리킨다.

[0104] **표적 부위:** 본원에서 사용되는 용어 "표적 부위"는 결합체 또는 효과기 분자(예컨대, 항체)에 의해 인지되는 세포, 세포외 공간, 조직, 장기 및/또는 유기체 상의 또는 내의 하나 이상의 글리칸, 당단백질, 생체분자 및/또는 생체구조 상의 또는 내의 영역을 가리킨다. 일부 실시양태에서, 글리칸 표적 부위는 오로지 하나의 당 잔기에 있을 수 있거나, 둘 이상의 잔기에 의해 형성될 수 있거나, 글리칸 및 비-글리칸 성분 둘 다를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 표적 부위는 둘 이상의 글리칸 또는 당단백질 사이에 형성된다. 일부 실시양태에서, 표적 부위는 동일한 글리칸의 분지화 쇄들 사이에 또는 하나 이상의 분지화 쇄와 모 쇄 사이에 형성된다.

[0105] **표적화된 세포:** 본원에서 사용되는 바와 같이, "표적화된 세포"는 관심 대상인 임의의 하나 이상의 세포를 가리킨다. 세포는 시험관내, 생체내, 원 위치에 또는 유기체의 조직 또는 장기에서 발견될 수 있다. 유기체는 동물, 바람직하게는 포유동물, 보다 바람직하게는 인간, 가장 바람직하게는 환자일 수 있다.

[0106] **말단 잔기:** 본원에서 사용되는 용어 "말단 잔기"는 중합체 쇄의 마지막 잔기를 가리킨다. 일부 실시양태에서, 말단 잔기는 다당류 쇄의 비-환원 말단에 위치한 당 잔기이다.

- [0107] **치료제:** 용어 "치료제"는, 대상체에 투여되는 경우, 치료적, 진단적 및/또는 예방적 효과를 갖고/갖거나 목적하는 생물학적 및/또는 약리학적 효과를 발휘하는 임의의 제제를 가리킨다.
- [0108] **치료학적 유효량:** 본원에서 사용되는 용어 "치료학적 유효량"은, 감염, 질환, 장애 및/또는 병태로 고통받거나 걸리기 쉬운 대상체에 투여되는 경우, 감염, 질환, 장애 및/또는 병태를 치료하고, 증상을 개선시키고, 진단하고, 예방하고/하거나 개시를 지연시키기에 충분한, 전달되는 제제(예컨대, 핵산, 약물, 치료제, 진단제, 예방제 등)의 양을 의미한다. 일부 실시양태에서, 치료학적 유효량은 단일 용량으로 제공된다. 일부 실시양태에서, 치료학적 유효량은 다수의 용량을 포함하는 투여량 섭생으로 투여된다. 당업계의 숙련가들은 일부 실시양태에서, 단위 투여형이 이러한 투여량 섭생의 일부로서 투여되는 경우 효과적인 양을 포함한다면 특정 제제 또는 실체의 치료학적 유효량을 포함하는 것으로 간주될 수 있음을 인지할 것이다.
- [0109] **치료학적 유효 성과:** 본원에서 사용되는 용어 "치료학적 유효 성과"는 감염, 질환, 장애 및/또는 병태로 고통받거나 걸리기 쉬운 대상체에서, 감염, 질환, 장애 및/또는 병태를 치료하고, 증상을 개선시키고, 진단하고, 예방하고/하거나 개시를 지연시키기에 충분한 성과를 의미한다.
- [0110] **총 1일 용량:** 본원에서 사용되는 바와 같이, "총 1일 용량"은 24시간에 주어지거나 처방된 양이다. 이것은 단일 단위 용량으로서 투여될 수 있다.
- [0111] **유전자이식:** 본원에서 사용되는 용어 "유전자이식"은 유기체에서 자연적으로 발견되는 유기체 계놈 내에 삽입된 하나 이상의 유전자를 포함하는 유기체를 가리킨다.
- [0112] **치료하는:** 본원에서 사용되는 용어 "치료하는"은 특정 감염, 질환, 장애 및/또는 병태의 하나 이상의 증상 또는 특징을 부분적으로 또는 완전히 완화하고, 개량시키고, 개선시키고, 경감시키며, 개시를 지연시키고, 진행을 억제하고, 중증도를 감소시키고/시키거나 발병률을 감소시키는 것을 가리킨다. 예를 들면, 암을 "치료하는"은 종양의 생존, 성장 및/또는 확산을 억제함을 가리킬 수 있다. 치료는 질환, 장애 및/또는 병태와 관련된 병리를 발생할 위험을 감소시킬 목적으로 질환, 장애 및/또는 병태의 징후를 나타내지 않는 대상체에 및/또는 질환, 장애 및/또는 병태의 초기 징후만을 나타내는 대상체에 투여될 수 있다.
- [0113] **가변 영역:** 본원에서 사용되는 용어 "가변 영역" 또는 "가변 도메인"은 오로지 항체들 간의 서열에 있어서만 상이하고 이의 특정 항원에 대한 각각의 특정 항체의 결합 및 특이성에 사용되는 특이적 항체 도메인을 가리킨다.
- [0114] **전체 IgG:** 본원에서 사용되는 용어 "전체 IgG"는 완전 IgG 분자를 가리킨다. 일부 실시양태에서, 전체 IgG 분자는 둘 이상의 다른 유기체에서 자연적으로 발견되는 영역을 포함한다.
- [0115] **야생형:** 본원에서 사용되는 용어 "야생형"은 (다른 유기체로부터 유도된 유전자를 함유하지 않는) 자연 계놈을 포함하는 유기체를 가리킨다.
- [0116] *I. 본 발명의 조성물*
- [0117] 일부 실시양태에서, 본 발명은 적어도 하나의 글리칸-상호작용 항체를 포함하는 화합물 및 조성물을 포함한다. 글리칸 내에서, 단당류 단량체는 모두 동일할 수 있거나 이들은 상이할 수 있다. 공통의 단량체는 트리오스, 테트로스, 펜토스, 글루코스, 프럭토스, 갈락토스, 크실로스, 아라비노스, 릭소스, 알로스, 알트로스, 만노스, 굴로스, 이오도스, 리보스, 만노헵톨로스, 세도헵톨로스 및 탈로스를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 아미노당이 또한 글리칸 내의 단량체일 수 있다. 이러한 당을 포함하는 글리칸을 본원에서는 아미노글리칸이라고 한다. 아미노당은, 본원에서 사용되는 바와 같이, 하이드록실기 대신에 아민기를 포함하는 당 분자, 또는 양태에서, 이러한 당으로부터 유도된 당이다. 아미노당의 예는 글루코사민, 갈락토사민, N-아세틸글루코사민, N-아세틸갈락토사민, 시알산(N-아세틸뉴라민산 및 N-글리콜릴뉴라민산을 포함하지만, 이에 제한되지 않음) 및 L-다우노사민을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.
- [0118] 본원에서 사용되는 용어 "글리칸-상호작용 항체"는 글리칸 모이어티와 상호작용할 수 있는 항체를 가리킨다. 이러한 항체는 글리칸 모이어티 단독에, 다중 글리칸 모이어티에, 또는 글리칸 및 비-글리칸 성분 둘 다를 포함하는 에피토프에 결합할 수 있다. 비-글리칸 성분은 단백질, 단백질-결합된 모이어티(번역후 변형), 세포 및 세포-결합된 분자/구조를 포함할 수 있지만, 이에 제한되지 않는다. 글리칸-호작용 항체는 글리칸 또는 글리칸-결합된 분자 또는 실체에 결합하고, 변화시키고, 활성화시키고, 억제하고, 안정화시키고, 분해하고/하거나 조절하도록 기능할 수 있다. 그렇게 해서, 글리칸-상호작용 항체는 치료제, 일시적인 처방이든간에, 예방제로서 또는 진행중인 치료 조성물로서 기능할 수 있다. 일부 실시양태에서, 글리칸-상호작용 항체는 다른 분자와의 접합체 또는 조합물을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 글리칸-상호작용 항체는 하나 이상의 아미노당을 갖는 글리-

칸을 향해 지시된다. 추가의 양태에서, 하나 이상의 아미노 당은 시알산이다. 추가의 양태에서, 하나 이상의 시알산은 N-아세틸뉴라민산 및/또는 N-글리콜릴뉴라민산이다.

[0119] 항체

[0120] 글리칸-상호작용 항체는 전체 항체 또는 이의 단편을 포함할 수 있다. 본원에서 사용되는 용어 "항체"는 가장 넓은 의미로 사용되며 단클론 항체, 다클론 항체, 다중특이적 항체(예컨대, 적어도 두 개의 무순상 항체로부터 형성된 이중특이적 항체), 항체 접합체(항체-약물 접합체를 포함하지만, 이에 제한되지 않음), 항체 변이체[항체 모방체, 키메라 항체(예컨대 하나 이상의 종으로부터 유도된 아미노산 서열을 갖는 항체) 및 합성 변이체를 포함하지만, 이에 제한되지 않음] 및 항체 단편을 포함하지만 이에 제한되지 않는 다양한 포맷을, 이들이 목적하는 생물학적 활성(예컨대, 하나 이상의 표적을 결합시키고, 활성화시키고, 억제하고, 안정화시키고, 분해하고/하거나 조절함)을 나타내는 한, 포함한다. 항체는 주로 아미노산 기반 분자이지만 하나 이상의 번역 후 또는 합성 변형을 포함할 수 있다. 번역 후 변형은 글리코실화를 포함할 수 있다.

[0121] 본원에서 사용되는 용어 "항체 단편"은, 일부 경우에 적어도 하나의 항원 결합 영역을 포함하는 무순상 항체의 일부 또는 이의 융합-단백질을 가리킨다. 항체 단편의 예는 Fab, Fab', F(ab')₂, Fv 단편, 단일쇄 가변 단편(scFvs); 디아바디; 트리(아)바디; 선형 항체; 단일쇄 항체 분자; 및 항체 단편으로부터 형성된 다중특이적 항체를 포함한다. 항체의 파파인 소화는 "Fab" 단편이라고 불리는 두 개의 동일한 항원-결합 단편을 생산하며, 이들 각각은 단일 항원-결합 부위를 갖는다. 잔류성 "Fc" 단편이 또한 생산되는데, 이의 명칭은 신속하게 결정화하는 능력을 반영한다. 펩신 처리는 두 개의 항원-결합 부위를 갖고 여전히 항원을 가교결합할 수 있는 F(ab')₂ 단편을 생성한다. 글리칸-상호작용 항체는 이러한 단편들 중의 하나 이상을 포함할 수 있고, 예를 들면, 전체 항체의 효소적 소화를 통해 또는 재조합 발현을 통해 생성될 수 있다.

[0122] "네이티브(native) 항체"는 통상적으로, 두 개의 동일한 경쇄(L) 및 두 개의 동일한 중쇄(H)로 구성된, 약 150,000 돌턴의 이합사량체성(heterotetrameric) 당단백질이다. 항체 중쇄 및 경쇄를 암호화하는 유전자는 알려져 있으며 각각을 구성하는 세그먼트는 잘 특성화되고 기술되었다(Matsuda, F. et al., 1998. *The Journal of Experimental Medicine*. 188(11): 2151-62 and Li, A. et al., 2004. *Blood*. 103(12): 4602-9, 이들 각각의 내용은 전문이 본원에 참고로 포함됨). 각각의 경쇄는 하나의 공유 디설파이드 결합에 의해 중쇄에 연결되지만, 디설파이드 결합의 수는 상이한 면역글로불린 동종형의 중쇄에 따라 다르다. 각각의 중쇄 및 경쇄는 또한 쇄간 디설파이드 브릿지로 규칙적인 간격을 두고 떨어져 있다. 각각의 중쇄는 하나의 말단에 가변 도메인(V_H)에 이어 다수의 불변 도메인을 갖는다. 각각의 경쇄는 하나의 말단에 가변 도메인(V_L)을 갖고 다른 말단에 불변 도메인을 가지며; 경쇄의 불변 도메인은 중쇄의 제1 불변 도메인과 정렬되고, 경쇄 가변 도메인은 중쇄의 가변 도메인과 정렬된다.

[0123] 본원에서 사용되는 용어 "가변 도메인"은 오로지 항체들 사이의 서열에 있어서 상이하고 이의 특정 항원에 대한 각각의 특정 항체의 결합 및 특이성에서 사용되는, 항체 중쇄 및 경쇄 둘 다에서 발견되는 특이적 항체를 가리킨다. 가변 도메인은 초가변 영역을 포함한다. 본원에서 사용되는 용어 "초가변 영역"은 항원 결합을 책임지는 아미노산 잔기를 포함하는 가변 도메인 내의 영역을 가리킨다. 초가변 영역 내에 존재하는 아미노산이 항체의 항원-결합 부위의 일부로 되는 상보성 결정 영역(CDR)의 구조를 결정한다. 본원에서 사용되는 용어 "CDR"은 이의 표적 항원 또는 에피토프에 상보적인 구조를 포함하는 항체의 영역을 가리킨다. 항원과 상호작용하지 않는 가변 도메인의 또 다른 부분을 프레임워크(FW) 영역이라고 한다. 항원-결합 부위(항원 조합 부위 또는 파라토프라고도 알려져 있음)는 특정 항원과 상호작용하는데 필요한 아미노산 잔기를 포함한다. 항원-결합 부위를 구성하는 정확한 잔기는 전형적으로 결합된 항원과의 공동-결정학에 의해 규명되지만, 계산 평가가 또한 다른 항체와의 비교에 기초하여 사용될 수 있다(Strohl, W.R. Therapeutic Antibody Engineering. Woodhead Publishing, Philadelphia PA. 2012. Ch. 3, p47-54, 이의 내용은 전문이 본원에 참고로 포함됨). CDR을 구성하는 잔기를 결정하는 것은 카바트(Kabat) [Wu, T.T. et al., 1970, JEM, 132(2):211-50 및 Johnson, G. et al., 2000, Nucleic Acids Res. 28(1): 214-8, 이의 내용은 전문이 본원에 참고로 포함됨], 초티아(Chothia) [Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196, 901 (1987), Chothia et al., Nature 342, 877 (1989) 및 Al-Lazikani, B. et al., 1997, J. Mol. Biol. 273(4):927-48, 이의 내용은 전문이 본원에 참고로 포함됨], Lefranc(Lefranc, M.P. et al., 2005, Immunome Res. 1:3) 및 호네거(Honegger) (Honegger, A. and Pluckthun, A. 2001. J. Mol. Biol. 309(3):657-70, 이들의 내용은 전문이 본원에 참고로 포함됨)에 의해 교시된 것들을 포함하지만 이에 제한되지 않는 번호부여 방식의 사용을 포함할 수 있다.

- [0124] VH 및 VL 도메인은 각각 세 개의 CDR을 갖는다. VL CDR은 가변 도메인 폴리펩타이드를 따라 N-말단에서 C-말단으로 이동하는 경우 발생 순서로 본원에서 CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3이라고 한다. VH CDR은 가변 도메인 폴리펩타이드를 따라 N-말단에서 C-말단으로 이동하는 경우 발생 순서로 본원에서 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3이라고 한다. 각각의 CDR은 항원-결합 도메인에서 다양한 삼차원 구조를 야기하는 항체들 간에 서열 및 길이에 있어서 매우 가변적일 수 있는 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H3을 제외하고는 유리한 정준 구조(canonical structure)를 갖는다(Nikoloudis, D. et al., 2014. PeerJ. 2:e456). 일부 경우에, CDR-H3은 항체 다양성을 평가하기 위해 관련 항체들의 패널들 간에 분석될 수 있다. CDR 서열을 결정하는 다양한 방법들이 당업계에 공지되어 있으며 공지된 항체 서열에 적용될 수 있다(Strohl, W.R. Therapeutic Antibody Engineering. Woodhead Publishing, Philadelphia PA. 2012. Ch. 3, p47-54, 이들의 내용은 전문이 본원에 참고로 포함됨).
- [0125] 본원에서 사용되는 용어 "Fv"는 완전 항원-결합 부위를 형성하는데 필요한 항체 상의 최소 단편을 포함하는 항체 단편을 가리킨다. 이러한 영역은 단단한, 비-공유 결합으로의 하나의 중쇄 및 하나의 경쇄 가변 도메인의 이합체로 이루어진다. Fv 단편은 단백질분해적 분할에 의해 생성될 수 있지만, 대체로 불안정하다. 전형적으로 경쇄 가변 도메인과 중쇄 가변 도메인 간의 가요성 링커의 삽입을 통해[단일쇄 Fv(scFv)를 형성하기 위해] 또는 중쇄 및 경쇄 가변 도메인 간의 디설파이드 브릿지의 도입을 통해 안정한 Fv 단편을 생성하기 위한 재조합 방법이 당업계에 공지되어 있다(Strohl, W.R. Therapeutic Antibody Engineering. Woodhead Publishing, Philadelphia PA. 2012. Ch. 3, p46-47, 이들의 내용은 전문이 본원에 참고로 포함됨).
- [0126] 임의의 척추동물 종으로부터의 항체 "경쇄"는 이들의 불변 도메인의 아미노산 서열에 기초하여 카파(kappa) 및 람다(lambda)라고 불리는 두 개의 명백히 별개의 유형 중의 하나에 할당될 수 있다. 항체의 중쇄의 불변 도메인의 아미노산 서열에 따라, 항체는 상이한 부류에 할당될 수 있다. 무손상 항체의 주요 부류는 다섯 가지이다: IgA, IgD, IgE, IgG 및 IgM, 이들 중의 몇 가지는 하위부류(동종형), 예컨대, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG2c, IgG3, IgG4, IgA 및 IgA2로 더욱 나뉠 수 있다.
- [0127] 본원에서 사용되는 용어 "단일쇄 Fv" 또는 "scFv"는 VH 및 VL 항체 도메인의 융합 단백질을 가리키며, 여기서 이들 도메인은 가요성 펩타이드 링커에 의해 단일 폴리펩타이드 쇄로 함께 결합된다. 일부 실시양태에서, Fv 폴리펩타이드 링커는 scFv가 항원 결합을 위한 목적하는 구조를 형성하게 할 수 있다. 일부 실시양태에서, scFv는 파지 디스플레이, 효모 디스플레이 또는 기타의 디스플레이 방법과 함께 사용되며, 여기서 이들은 표면 멤버(예컨대 파지 코트 단백질)와 연합하여 발현될 수 있으며 주어진 항원에 대한 고 친화도 펩타이드의 확인에 사용될 수 있다.
- [0128] 용어 "디아바디"는 두 개의 항원-결합 부위를 갖는 작은 항체 단편을 가리키며, 이러한 단편은 동일한 폴리펩타이드 쇄에서 경쇄 가변 도메인 V_L에 결합된 중쇄 가변 도메인 V_H을 포함한다. 동일한 쇄 상의 두 개의 도메인 사이에 쌍형성(pairing)을 가능케 하기에는 너무 짧은 링커를 사용함으로써, 도메인은 다른 쇄의 상보적 도메인과 쌍을 이루게 되고 두 개의 항원-결합 부위를 생성한다. 디아바디는, 예를 들면, 제EP 404,097호; 제WO 93/11161호; 및 문헌[Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993)]에 보다 충분히 기재되어 있으며, 이들 각각의 내용은 전문이 본원에 참고로 포함된다.
- [0129] 용어 "인트라바디"는 이것을 생산하는 세포로부터 분비되지 않고, 대신에 하나 이상의 세포내 단백질을 표적으로 하는 항체의 한 형태를 가리킨다. 인트라바디는 세포내 트래픽킹(intracellular trafficking), 전사, 번역, 대사 과정, 증식성 신호전달 및 세포 분열을 포함하지만 이에 제한되지 않는 다수의 세포 과정에 영향을 미치는데 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 방법은 인트라바디-기반 치료법을 포함할 수 있다. 이러한 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 가변 도메인 서열 및/또는 CDR 서열은 인트라바디-기반 치료법을 위한 하나 이상의 작제물에 삽입될 수 있다. 일부 경우에, 본 발명의 인트라바디는 하나 이상의 당화 세포내 단백질을 표적화할 수 있으며 하나 이상의 당화된 세포내 단백질과 또 다른 단백질 사이의 상호작용을 조절할 수 있다.
- [0130] 용어 "키메라 항원 수용체" 또는 "CAR"은, 본원에서 사용되는 바와 같이, 인공 수용체에 높은 친화도로 결합하는 실체를 발현하는 세포에의 면역 효과기 세포의 특이적 표적화를 야기하는 이러한 면역 효과기 세포의 표면 상에 발현되도록 조작되는 인공 수용체를 가리킨다. CAR은 이러한 CAR이 면역 효과기 세포 상에 발현되는 경우, 면역 효과기 세포가 CAR의 항체 부분에 의해 인지되는 임의의 세포에 결합하여 이를 소거하도록 항체, 항체 가변 도메인 및/또는 항체 CDR의 하나 이상의 세그먼트를 포함하도록 설계될 수 있다. 일부 경우에, CAR은 암 세포에 특이적으로 결합하여, 암 세포의 면역-조절된 소거(immune-regulated clearance)를 야기하도록 설계된다.
- [0131] 본원에서 사용되는 용어 "단클론 항체"는 실질적으로 균일한 세포(또는 클론)의 집단으로부터 수득되는 항체를

가리키며, 즉, 집단을 구성하는 개별 항체들은 단클론 항체의 생산 동안 야기될 수 있는 가능한 변이체를 제외하고는 동일하고/하거나 및/또는 동일한 에피토프에 결합하며, 상기한 변이체는 일반적으로 소량으로 존재한다. 전형적으로 상이한 결정인자(에피토프)에 대해 지시된 상이한 항체를 포함하는 다클론 항체와는 달리, 각각의 단클론 항체는 항원 상의 단일 결정인자에 대해 지시된다.

[0132] 수식어 "단클론성"은 항체의 실질적으로 균일한 집단으로부터 수득된다고 하는 항체의 특성을 나타내며, 특정 방법에 의한 항체의 생산을 필요로 하는 것으로 해석되어서는 안된다. 단클론 항체는 본원에서 중쇄 및/또는 경쇄의 일부는 특정 종으로부터 유도되거나 특정 항체 부류 또는 하위부류에 속하는 항체에서 상응하는 서열과 동일하거나 상동성이 반면 쇄(들)의 나머지는 특정 종으로부터 유도되거나 다른 항체 부류 또는 하위부류에 속하는 항체에서 상응하는 서열과 동일하거나 상동성인 "키메라" 항체(면역글로불린), 뿐만 아니라 이러한 항체의 단편을 포함한다.

[0133] 비-인간(예컨대, 뮤린) 항체의 "인간화된" 형태는 비-인간 면역글로불린으로부터 유도된 최소 서열을 함유하는 키메라 항체이다. 대개, 인간화 항체는 수용자의 항체로부터의 초가변 영역으로부터의 잔기가 목적하는 특이성, 친화도 및 성능을 갖는 마우스, 랫트, 토끼, 또는 비인간 영장류와 같은 비-인간 종(공여자 항체)의 항체로부터의 초가변 영역으로부터의 잔기로 대체된 인간 면역글로불린(수용자 항체)이다. 인간화 항체는 공여자 항체에서 발견되는 아미노산로의 하나 이상의 아미노산의 복귀를 포함하는 하나 이상의 복귀-돌연변이를 포함할 수 있다. 반대로, 인간화 항체에 포함된 공여자 항체로부터의 잔기는 인간 수용자 항체에 존재하는 잔기에 매칭되도록 돌연변이될 수 있다.

[0134] 일부 실시양태에서, 본 발명의 글리칸-상호작용 항체는 항체 모방체일 수 있다. 용어 "항체 모방체"는 항체의 기능 또는 효과를 모방하고 이들의 분자 표적에 특이적으로 및 높은 친화도로 결합하는 임의의 분자를 가리킨다. 일부 실시양태에서, 항체 모방체는 단백질 스캐폴드로서 피브로넥틴 타입 III 도메인(Fn3)을 포함하도록 설계된 모노바디일 수 있다(제US 6,673,901호; 제US 6,348,584호). 일부 실시양태에서, 항체 모방체는 애피바디 분자, 애필린, 애피틴, 안티칼린, 아비머, DARPins, Fynomers 및 Kunitz 및 도메인 웨타이드를 포함하지만 이에 제한되지 않는 당업계에 공지된 것들일 수 있다. 또 다른 양태에서, 항체 모방체는 하나 이상의 비-웹타이드 영역을 포함할 수 있다.

[0135] 본원에서 사용되는 용어 "항체 변이체"는 구조, 서열 및/또는 기능에 있어서는 항체와 닮았지만 또 다른 항체 또는 네이티브 항체와 비교하여 이들의 아미노산 서열, 조성 또는 구조에 있어서는 약간의 차이를 포함하는 생체분자를 가리킨다.

항체 개발

[0136] 본 발명의 글리칸-상호작용 항체는 본원에 기재된 것들과 같이 항원에 결합하도록 개발된다. 본원에서 사용되는 바와 같이, "항원"은 유기체에서 면역 반응을 유도하거나 유발하는 실체이다. 면역 반응은 외래 개체(foreign entity)의 존재에 대한 유기체의 세포, 조직 및/또는 장기의 반응에 의해 특징지워진다. 이러한 면역 반응은 전형적으로 외래 개체, 예컨대, 항원 또는 항원의 일부에 대한 하나 이상의 항체의 유기체에 의한 생산을 초래한다. 일부 경우에, 면역화 방법은 하나 이상의 목적하는 면역화 성과에 기초하여 변경될 수 있다. 여기서 사용되는 바와 같이, 용어 "면역화 성과"는 하나 이상의 목적하는 면역화 효과를 가리킨다. 예는 관심 표적에 대한 높은 항체 역가 및/또는 증가된 항체 특이성을 포함한다.

[0137] 본 발명의 항원은 글리칸, 당접합체(당단백질 및 당지질을 포함하지만, 이에 제한되지 않음), 웨타이드, 폴리웨타이드, 융합 단백질, 또는 상기한 것들 중의 어느 것을 포함할 수 있으며 하나 이상의 별도의 아주반트 또는 이종 단백질에 접합되거나 착화될 수 있다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 방법에 따라 사용되는 항원은 STn과 같은 시알릴화 글리칸을 포함할 수 있다. STn을 갖는 항원은 뮤신을 포함할 수 있다. 뮤신은 매우 글리코실화된 단백질 계열이다. 이들은 상피 세포로부터 기원하는 여러 종양의 성분이다(Ishida, A. et al., 2008. Proteomics. 8: 3342-9, 이들의 내용은 전문이 본원에 참고로 포함됨). 이들은 하악선에 의해 고도로 발현되며 타액 및 점액에서 높은 수준으로 발견될 수 있다. 동물-유도된 하악선 뮤신이 항원으로서 사용되어 면역원성 숙주에서 항-STn 항체를 생성할 수 있다. 상이한 종으로부터의 하악선 뮤신은 AcSTn 대 GcSTn 형태에 대해 이들의 STn 함량에 있어서 상이하다. 돼지 하악선 뮤신(PSM)은 GcSTn이 특히 풍부하며, 이것이 전체 STn의 약 90%를 구성한다. 소 하악선 뮤신(BSM)으로부터의 STn은 대략 같은 비율의 GcSTn과 AcSTn을 포함한다. 양 하악선 뮤신(OSM)은 AcSTn이 특히 풍부하며, 이것이 전체 STn의 약 90%를 구성한다. 일부 경우에, 면역화를 위해 제조된 용액은 이러한 면역화로부터 야기되는 항체의 목적하는 표적에 따라 PSM, BSM 및 OSM 중의 하나 이상을 포함하도록 변형될 수 있다. PSM은 GcSTn에 대해 더욱 특이적일 것 같은 면역원성 숙주에서 항체를 생성하기 위해 면역

화에서 사용될 수 있다. PSM은 GcSTn으로 장식된 Neu5Gc-함유 뮤신-타입, 당단백질이 풍부하다. 현재 알려져 있는 높은 Neu5Gc 함량의 공급원 중에는 붉은 고기가 있다; 특히 하악선은 CMAH 효소의 높은 발현으로 인해 Neu5Gc의 풍부한 공급원으로서 이미 기재되어 있으며, 상기 효소는 Neu5Gc 전구체, CMP-Neu5Ac를 생산하는 반응을 촉매한다. 일부 경우에, PSM은 pan-항-Neu5Gc 반응을 방지하고 GcSTn에 대해 보다 특이적인 면역 반응을 유도하는데 사용될 수 있다. OSM은 AcSTn에 대해 더욱 특이적일 것 같은 면역원성 숙주에서 항체를 생성하기 위해 면역화에서 사용될 수 있다.

[0139] 한 실시양태에서, 본 발명은 GcSTn-특이적인 글리칸-상호작용 항체를 제공한다. 항체는 Neu5Ac-STn 또는 Tn에 대한 교차-반응성을 거의 갖지 않는다. 항체는 GcSTn에 결합할 수 있지만 AcSTn에 대해서는 감소된 친화도를 갖는다.

[0140] 일부 실시양태에서, 항원은 면역원성 숙주에서 생성된 면역 반응을 조절하기 위해 면역화 이전에 효소 소화에 적용될 수 있다. 하나의 예에서, 하악선 뮤신은 면역화 이전에 트립신 또는 프로테이나제 K 효소로 처리될 수 있다. 이러한 효소의 활성은 비-STn 에피토프를 절단하고 이에 의해 이의 비율과 가변성을 감소시키는데 도움을 줄 수 있다. 글리칸 모이어티는 이들이 효소적 단백질분해로부터 부착되는 웨타이드의 영역을 차폐할 수 있고 이에 의해 손상되지 않고 남을 수 있다. 면역화로부터 야기된 항체 역가는 이러한 면역화에서 사용된 항원의 유형 및 양에 따라 상이한 항체 수준을 가질 수 있다. 일부 경우에, 특정 항원은 예상되는 역가에 기초하여 면역화에 사용하기 위해 선택될 수 있다.

[0141] 본원에서 사용되는 바와 같이, "아주반트"는 다른 제제의 효과를 변화시키는 약리학적 또는 면역학적 제제이다. 본 발명에 따르는 아주반트는 화학적 조성물, 생체분자, 치료제 및/또는 치료 섭생을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 아주반트는 프로인트 아주반트(Freund's adjuvant)(완전 및/또는 불완전), 면역자극 올리고뉴클레오티드[예컨대 CpG 올리고데옥시뉴클레오티드(ODN)], 광물-함유 조성물, 박테리아성 ADP-리보실화 독소, 생체접착제, 점막접착제, 미세입자, 지질, 리포솜, 무라밀 웨타이드, N-산화된 폴리에틸렌-피페라진 유도체, 사포닌 및/또는 면역 자극 복합체(ISCO)를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 아주반트는 수중유 에멀젼(예컨대 마이크론-이하의 수중유 에멀젼)을 포함할 수 있다. 본 발명에 따르는 아주반트는 또한 미국 특허 공개 제US20120027813호 및/또는 미국 특허 제US8506966호에 기재된 것들 중의 어느 것을 포함할 수 있으며, 상기 특허의 내용은 전문이 본원에 참고로 포함된다.

[0142] 본 발명의 항체는 다클론성 또는 단클론성 또는 재조합성일 수 있으며, 당업계에 공지된 방법으로 또는 본원에 기재된 바와 같이 제조된다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 항체는 당업계의 숙련가에 의해 공지된 검출 가능한 표지로 검출 목적으로 표지화될 수 있다. 표지는 방사성 동위 원소, 형광 화합물, 화학발광 화합물, 효소, 또는 효소 보조-인자, 또는 당업계에 공지된 임의의 다른 표지일 수 있다. 일부 측면에서, 목적하는 항원에 결합하는 항체는 표지되지 않지만, 일차 항체에 특이적으로 결합하는 표지화된 이차 항체의 결합에 의해 검출될 수 있다.

[0143] 본 발명의 항체(예컨대, 글리칸-상호작용 항체)는 다클론성, 단클론성, 다중특이성, 인간, 인간화 또는 키메라 항체, 단일쇄 항체, Fab 단편, F(ab') 단편, Fab 발현 라이브러리에 의해 생산된 단편, 항-이디오타입(항-Id) 항체(예컨대, 본 발명의 항체에 대한 항-Id 항체 포함), 세포내에서 만들어진 항체(즉, 인트라바디) 및 상기한 것들 중의 어느 것의 에피토프-결합 단편을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 본 발명의 항체(예컨대, 글리칸-상호작용 항체)는 조류 및 포유류를 포함한 임의의 동물 기원으로부터의 것일 수 있다. 바람직하게는, 이러한 항체는 인간, 뮤린(예컨대, 마우스 및 팫트), 당나귀, 양, 토끼, 염소, 기니 피그, 낙타, 말, 또는 닭 기원의 것이다. 본 발명의 항체는 단일특이성 또는 다중특이성(예컨대, 이중특이성, 삼중특이성, 또는 그 이상의 다중 특이성)일 수 있다. 다중특이적 항체는 본 발명의 표적 항원의 상이한 에피토프에 대해 특이적일 수 있거나, 본 발명의 표적 항원 및 이종 에피토프, 예를 들면, 이종 글리칸, 웨타이드 또는 고체 지지체 물질 둘 다에 대해 특이적일 수 있다. (참조; 예컨대, WO 93/17715; WO 92/08802; WO 91/00360; WO 92/05793; Tutt, A. et al., *Trispecific F(ab')3 derivatives that use cooperative signaling via the TCR/CD3 complex and CD2 to activate and redirect resting cytotoxic T cells*. J Immunol. 1991 Jul 1;147(1):60-9; 미국 특허 4,474,893; 4,714,681; 4,925,648; 5,573,920; 5,601,819; 및 Kostelny, S.A. et al., *Formation of a bispecific antibody by the use of leucine zippers*. J Immunol. 1992 Mar 1;148(5):1547-53).

[0144] 본 발명의 글리칸-상호작용 항체는 단클론 항체를 개발하기 위해 당업계에 공지된 널리-화립된 방법을 사용하여 제조될 수 있다. 한 실시양태에서, 단클론 항체는 하이브리도마 기술을 사용하여 제조된다(Kohler, G. et al., *Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity*. Nature. 1975 Aug 7;256(5517):495-7). 하이브리도마 형성을 위해, 먼저, 마우스, 햄스터, 또는 다른 적합한 숙주 동물을 전형적

으로 면역제(예컨대, 본 발명의 표적 항원)로 면역화하여, 면역제에 특이적으로 결합하는 항체를 생산하거나 생산할 수 있는 램프구를 유발시킨다. 대안적으로, 램프구는 시험관내에서 면역화시킬 수 있다. 그 후, 램프구를 폴리에틸렌 글리콜과 같은 적합한 응제를 사용하여 불멸성 세포주와 융합시켜, 하이브리도마 세포를 형성한다 (Goding, J.W., *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*. Academic Press. 1986; 59-1031). 불멸성 세포주는 통상적으로 형질전환된 포유동물 세포, 특히 설치류, 토끼, 소 및 인간 기원의 골수종 세포이다. 통상적으로, 랫트 또는 마우스 골수종 세포주가 사용된다. 하이브리도마 세포는 융합되지 않은, 불멸성 세포의 성장 또는 생존을 억제하는 하나 이상의 물질을 바람직하게는 함유하는 적합한 배양 배지에서 배양될 수 있다. 예를 들면, 부모 세포가 효소 하이포크산틴 구아닌 포스포리보실 트랜스퍼라제(HGPRT 또는 HPRT)가 결핍된다면, 하이브리도마를 위한 배양 배지는 전형적으로 하이포크산틴, 아미노프테린 및 티미딘("HAT 배지")을 포함할 것이며, 이것은 HGPRT-결핍 세포의 성장을 막는다.

[0145] 바람직한 불멸성 세포주는 효율적으로 융합하고, 선택된 항체-생산 세포에 의한 항체의 안정한 높은 수준의 발현을 지지하며, HAT 배지와 같은 배지에 민감한 것이다. 보다 바람직한 불멸성 세포주는 뮤린 골수종 세포주이며, 이것은, 예를 들면, 캘리포니아주 샌디에고에 소재하는 솔크 인스티튜트 셀 디스트리뷰션 센터(Salk Institute Cell Distribution Center) 및 버지니아주 매너서스에 소재하는 미국표준균주은행(American Type Culture Collection)으로부터 수득될 수 있다. 인간 골수종 및 마우스-인간 이종골수종 세포주가 또한 인간 단클론 항체의 생산을 위해 기술된 바 있다(Kozbor, D. et al., *A human hybrid myeloma for production of human monoclonal antibodies*. J Immunol. 1984 Dec;133(6):3001-5; Brodeur, B. et al., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*. Marcel Dekker, Inc., New York. 1987; 33:51-63).

[0146] 일부 실시양태에서, 골수종 세포가 유전자 조작에 적용될 수 있다. 이러한 조작은 본원에 기재된 바와 같이 아연-집게 뉴클레아제(ZFN) 돌연변이유발을 사용하여 수행될 수 있다. 대안적으로, 당업계에 공지된 형질감염 방법이 사용될 수 있다. NS0 골수종 세포주 또는 다른 마우스 골수종 세포주가 사용될 수 있다. 예를 들면, Sp2/0-Ag14가 하이브리도마 개발을 위한 대안적인 세포주일 수 있다.

[0147] 전사 활성인자-유사 효과기 뉴클레아제(TALEN)-유도된 유전자 편집이 대안적인 유전자 녹 아웃 방법을 제공한다. TALEN은 TAL 효과기 DNA 결합 도메인을 DNA 절단 도메인에 융합시킴으로써 생성된 인공적인 제한 효소이다. ZFN과 유사하게, TALEN은 오류-유발 NHEJ에 의해 수선되어 절단 부위에서 삽입/결실을 야기할 수 있는 목적하는 유전자좌에 이중-가닥 절단을 유도한다(Wood, A.J. et al., *Targeted genome editing across species using ZFNs and TALENs*. Science. 2011 Jul 15;333(6040):307). 매사추세츠 캠브리지 소재의 셀렉티스 바이오리서치(Cellectis Bioresearch)는 TALEN 설계 및 플라스미드 작제를 위한 서비스를 제공한다. 그후, 하이브리도마 세포가 배양되는 배양 배지를 단클론 항체의 존재에 대해 검정할 수 있다. 바람직하게는, 하이브리도마 세포에 의해 생산된 단클론 항체의 결합 특이성(즉, 특이적 면역반응성)은 면역침강에 의해 또는 시험관내 결합 검정, 예를 들면, 방사면역검정(RIA) 또는 효소-결합 면역흡착 검정(ELISA)에 의해 결정된다. 이러한 기술 및 검정은 당업계의 숙련가들에 의해 공지되어 있다. 단클론 항체의 결합 특이성은, 예를 들면, 스캐차드(Scatchard) 분석에 의해 결정될 수 있다(Munson, P.J. et al., *Ligand: a versatile computerized approach for characterization of ligand-binding systems*. Anal Biochem. 1980 Sep 1;107(1):220-39). 일부 경우에, 주어진 항원의 영역에 대한 항체 특이성은 항원 결합에 대해 검정하기 전에 항원을 화학적으로 변형시킴으로써 특징지워질 수 있다. 하나의 예에서, 시알산의 C6 측쇄를 파괴하기 위해 폐리오데이터 처리가 사용될 수 있다. 검정은 비처리된 샘플에서의 결합이 시알산-특이적인지 아닌지를 밝히기 위해 폐리오데이터 처리의 존재 및 부재하에서 수행될 수 있다. 일부 경우에, 9-0-아세틸화 시알산을 갖는 항원을 (예컨대, 0.1M NaOH를 사용함) 가벼운 염기 처리에 적용하여 9-0-아세틸기를 파괴할 수 있다. 검정은 비처리된 샘플에서의 결합이 시알산의 9-0-아세틸화에 의존하는지 그렇지 않은지를 밝히기 위해 가벼운 염기 처리의 존재 및 부재하에서 수행될 수 있다.

[0148] 목적하는 하이브리도마 세포가 동정된 후, 클론을 한계 희석 과정에 의해 서브클로닝시키고 표준 방법으로 성장 시킬 수 있다. 이러한 목적을 위한 적합한 배양 배지는, 예를 들면, 둘째코 개질된 이글 배지 또는 RPMI-1640 배지를 포함한다. 대안적으로, 하이브리도마 세포는 포유동물에서 복수(ascite)로서 생체내에서 성장할 수 있다.

[0149] 하이브리도마를 클로닝하는 대안적인 방법은 하이브리도마 클론의 선택 및 성장을 뒷받침하기 위해 메틸셀룰로스-기반 반고체 배지 및 기타 배지 및 시약을 함유하는, 캐나다 밴쿠버 소재의 STEMCELL 테크놀로지스(Technologies)의 키트, 예컨대 ClonaCell™-HY 키트에 의해 제공되는 것들을 포함할 수 있다. 그러나, 이 키트 내의 배지는 FCS를 함유하며, 이것이 Neu5Gc 혼입을 위한 외인성 공급원을 제공한다. 내인성 Neu5Gc 합성을 위

한 기구가 *Cmah*^{-/-} 하이브리도마에서 파괴되지만, 배양 배지로부터 혼입된 Neu5Gc가 또한 일부 경우에 문제를 일으킬 수 있다(Bardor, M. et al., Mechanism of uptake and incorporation of the non-human sialic acid N-glycolylneuraminic acid into human cells. J Biol Chem. 2005. 280: 4228-4237). 이러한 경우, 대사적 경쟁에 의한 Neu5Gc 혼입을 없애기 위해 배양 배지를 Neu5Ac로 보충할 수 있다(Ghaderi, D. et al., Implications of the presence of N-glycolylneuraminic acid in recombinant therapeutic glycoproteins. Nat Biotechnol. 2010. 28: 863-867).

[0150] 서브클론에 의해 분비된 단클론 항체는, 예를 들면, 단백질 A-세파로스, 하이드록실아파타이트 크로마토그래피, 겔 전기영동, 투석, 또는 친화도 크로마토그래피와 같은 통상의 면역글로불린 정제 과정에 의해 배양 배지 또는 복수액로부터 단리 또는 정제될 수 있다.

[0151] 또 다른 양태에서, 본 발명의 단클론 항체는 또한 전문이 본원에 참고로 포함된 미국 특허 제4,816,567호에 기재된 것과 같은 재조합 DNA 방법에 의해 제조될 수 있다. 본 발명의 단클론 항체를 암호화하는 DNA는 통상의 과정을 사용하여(예컨대, 뮤린 항체의 중쇄 및 경쇄를 암호화하는 유전자에 특이적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오티드 프로브를 사용함으로써) 용이하게 단리되고 서열화될 수 있다. 본 발명의 하이브리도마 세포는 DNA의 바람직한 공급원으로서 기능한다. 일단 단리되면, DNA는 발현 벡터 내에 배치될 수 있으며, 이것은 그후 숙주 세포 내로 형질감염된다. 숙주 세포는 재조합 숙주 세포에서 단클론 항체의 합성을 수득하는 HEK293 세포, HEK293T 세포, 시미안 COS 세포, 중국 햄스터 난소(CHO) 세포 및 달리 면역글로불린 단백질을 생산하지 않는 골수종 세포를 포함할 수 있지만, 이에 제한되지 않는다. DNA는 또한, 예를 들면, 인간 중쇄 및 경쇄 불변 도메인에 대한 암호화 서열을 상동성 뮤린 서열 대신으로 치환함으로써(미국 특허 제4,816,567호) 또는 비-면역글로불린 폴리펩타이드에 대한 암호화 서열의 전부 또는 일부를 면역글로불린 암호화 서열에 공유 결합함으로써 변형될 수 있다. 이러한 비-면역글로불린 폴리펩타이드가 본 발명의 항체의 불변 도메인으로 치환되거나, 본 발명의 항체의 하나의 항원-결합부의 가변 도메인으로 치환되어 키메라 이가 항체를 생성할 수 있다.

[0152] 일부 실시양태에서, 본 발명의 항체(예컨대, 글리칸-상호작용 항체)는 당업계의 숙련가들에 의해 공지된 다양한 과정에 의해 생산될 수 있다. 생체내 다클론 항체의 생산을 위해, 토끼, 랙트, 마우스, 암소, 말, 당나귀, 닭, 원숭이, 양 또는 염소와 같은 숙주 동물을, 예를 들면, 복강내 및/또는 피내 주사에 의해 유리 또는 운반체-결합된 항원으로 면역화한다. 일부 실시양태에서, 주사재는 약 100 μg의 항원 또는 운반 단백질을 함유하는 애멸전일 수 있다. 일부 실시양태에서, 주사재는 용액 중의 비-인간 포유류 하악선 뮤신과 같은 글리칸-풍부 조성물을 포함할 수 있다. 다양한 아주반트가 또한 숙주 종에 따라 면역 반응을 증가시키는데 사용될 수 있다. 아주반트는 프로인트(완전 및 불완전), 광물 겔, 예를 들면, 수산화알루미늄, 표면 활성 물질, 예를 들면, 리소레시틴, 플루로닉 폴리올, 다음이온, 웨პ타이드, 오일 애멸전, TiterMax® (CytRx Corp, Los Angeles, CA), 키홀 림펫 해모시아닌, 디니트로페놀 및 잠재적으로 유용한 인간 아주반트, 예를 들면, BCG(바실리 칼메트-궤린, Bacille Calmette-Guerin) 및 코리네박테리움 파르븀(corynebacterium parvum)을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 이러한 아주반트는 또한 당업계에 널리 공지되어 있다. 수 회의 보강 접종이, 예를 들면, 고체 표면에 흡착된 글리칸 및/또는 유리 웨პ타이드를 사용한 ELISA 검정에 의해 검출될 수 있는 항체의 유용한 역할을 제공하기 위해, 예를 들면, 대략 2주 간격으로 요구될 수 있다. 면역화된 동물로부터의 혈청에서 항체의 역가는 항체의 선택에 의해, 예컨대, 고체 지지체 상의 항체의 흡착 및 당업계에 널리 공지된 방법에 따르는 선택된 항체의 용출에 의해 증가될 수 있다.

[0153] 글리칸-상호작용 항체, 이의 변이체 및 단편은 고속 대량 발견 방법(high throughput methods of discovery)을 사용하여 선택되고 생산될 수 있다. 한 실시양태에서, 합성 항체, 이의 변이체 및 단편을 포함하는 글리칸-상호작용 항체는 디스플레이 라이브러리의 사용을 통해 생산된다. 본원에서 사용되는 용어 "디스플레이"는 주어진 숙주의 표면 상의 단백질 또는 웨პ타이드의 발현 또는 "디스플레이"를 가리킨다. 본원에서 사용되는 용어 "라이브러리"는 독특한 cDNA 서열 및/또는 이들에 의해 암호화되는 단백질의 집합을 가리킨다. 라이브러리는 두 개 정도로 적은 독특한 cDNA 내지 수천억 개의 독특한 cDNA를 함유할 수 있다. 일부 실시양태에서, 합성 항체인 글리칸-상호작용 항체는 항체 디스플레이 라이브러리 또는 항체 단편 디스플레이 라이브러리를 사용하여 생산된다. 본원에서 사용되는 용어 "항체 단편 디스플레이 라이브러리"는 각각의 구성원이 항체의 적어도 하나의 가변 영역을 함유하는 항체 단편을 암호화하는 디스플레이 라이브러리를 가리킨다. 이러한 항체 단편은 바람직하게는 Fab 단편이지만, 단일쇄 가변 단편(scFv)과 같은 다른 항체 단편도 고려된다. Fab 항체 단편 라이브러리에서, 암호화된 각각의 Fab는 Fab 단편의 상보성 결정 영역(CDR)의 가변 루프 내에 함유된 아미노산 서열을 제외하고는 동일할 수 있다. 대안적인 또는 추가의 양태에서, 개별 V_H 및/또는 V_L 영역 내의 아미노산 서열도 상

이할 수 있다.

[0154] 디스플레이 라이브러리는 효모, 박테리오파지, 박테리아 및 레트로바이러스를 포함하지만 이에 제한되지 않는 다수의 가능한 숙주에서 발현될 수 있다. 사용될 수 있는 추가의 디스플레이 기법은 리보솜-디스플레이, 마이크로비드-디스플레이 및 단백질-DNA 결합 기법을 포함한다. 바람직한 양태에서, Fab 디스플레이 라이브러리는 효모에서 또는 박테리오파지(본원에서는 "파지" 또는 "파지 입자"라고도 함)에서 발현된다. 발현되는 경우, Fab는 파지 또는 효모의 표면을 장식하며, 여기서 이들은 소정의 항원과 상호작용할 수 있다. 글리칸을 포함하는 항원 또는 목적하는 표적으로부터의 다른 항원이 그 항원에 대해 높은 친화도로 항체 단편을 발현하는 파지 입자 또는 효모 세포를 선택하는데 사용될 수 있다. 결합된 항체 단편의 CDR을 암호화하는 DNA 서열은 그후 결합된 입자 또는 세포를 사용하여 서열화를 통해 결정될 수 있다. 한 실시양태에서, 양성 선택이 항체의 개발에 사용된다. 일부 실시양태에서, 음성 선택이 항체의 개발에 사용된다. 일부 실시양태에서, 양성 및 음성 선택 방법 둘 다는 디스플레이 라이브러리를 사용한 항체의 개발에서 수 차례의 선택 동안 이용된다.

[0155] 효모 디스플레이에서, 상이한 항체 단편을 암호화하는 cDNA가 효모 세포에 도입되고, 여기서 이들이 발현되며 항체 단편이 Chao 등에 의해 기재된 바와 같이 세포 표면 상에 "디스플레이"된다(Chao, G. et al., *Isolating and engineering human antibodies using yeast surface display*. Nat Protoc. 2006;1(2):755-68). 효모 표면 디스플레이에서, 발현된 항체 단편은 효모 응집소 단백질, Aga2p를 포함하는 추가의 도메인을 함유할 수 있다. 이 도메인은 항체 단편 융합 단백질이 표면-발현된 Aga1p와 디설파이드 결합의 형성을 통해 효모 세포의 외부 표면에 부착되도록 한다. 결과는 특정 항체 단편에 코팅된 효모 세포이다. 이러한 항체 단편을 암호화하는 cDNA의 디스플레이 라이브러리가 초기에 사용되며, 여기서 항체 단편 각각은 독특한 서열을 갖는다. 이러한 융합 단백질은 수백만 개의 효모 세포의 세포 표면 상에 발현되며, 여기서 이들은 세포와 배양된 목적하는 항원성 표적 항원과 상호작용할 수 있다. 표적 항원은 화학적 또는 자기성 그룹과 공유적으로 또는 달리 변형될 수 있어, 적합한 항체 단편과의 성공적인 결합이 일어난 후 효율적인 세포 분리(cell sorting)를 가능하게 한다. 회수는 자기-활성화 세포 분리(MACS), 형광-활성화 세포 분리(FACS) 또는 당업계에 공지된 기타의 세포 분리 방법에 의해서 이루어질 수 있다. 일단 효모 세포의 아집단이 선택되면, 상응하는 플라스미드를 분석하여 CDR 서열을 결정할 수 있다.

[0156] 박테리오파지 디스플레이 기법은 전형적으로 fd, F1 및 M13 비리온을 포함하지만 이에 제한되지 않는 사상 파지를 사용한다. 이러한 균주는 비-용해성(non-lytic)이어서, 숙주의 지속적인 증식 및 바이러스 역가 증가를 가능케 한다. 본 발명의 항체를 제조하는데 사용될 수 있는 파지 디스플레이 방법의 예는 미에르쉬(Miersch) 등(Miersch, S. et al., *Synthetic antibodies: Concepts, potential and practical considerations*. Methods. 2012 Aug; 57(4):486-98), 브래드베리(Bradbury) 등(Bradbury, A.R. et al., *Beyond natural antibodies: the power of in vitro display technologies*. Nat Biotechnol. 2011 Mar;29(3):245-54), 브링크만(Brinkman) 등(Brinkmann, U. et al., *Phage display of disulfide-stabilized Fv fragments*. J Immunol Methods. 1995 May 11; 182(1):41-50); 에임스(Ames) 등(Ames, R.S. et al., *Conversion of murine Fabs isolated from a combinatorial phage display library to full length immunoglobulins*. J Immunol Methods. 1995 Aug 18;184(2):177-86); 케틀보로(Kettleborough) 등(Kettleborough, C.A. et al., *Isolation of tumor cell-specific single-chain Fv from immunized mice using phage-antibody libraries and the re-construction of whole antibodies from these antibody fragments*. Eur J Immunol. 1994 Apr; 24(4):952-8); 페르식(Persic) 등(Persic, L. et al., *An integrated vector system for the eukaryotic expression of antibodies or their fragments after selection from phage display libraries*. Gene. 1997 Mar 10; 187(1):9-18); PCT 공보 제PCT/GB91/01134호; PCT 공보 제WO 90/02809호; 제WO 91/10737호; 제WO 92/01047호; 제WO 92/18619호; 제WO 93/11236호; 제WO 95/15982호; 제WO 95/20401호; 및 미국 특허 제5,698,426호; 제5,223,409호; 제5,403,484호; 제5,580,717호; 제5,427,908호; 제5,750,753호; 제5,821,047호; 제5,571,698호; 제5,427,908호; 제5,516,637호; 제5,780,225호; 제5,658,727호; 제5,733,743호 및 제5,969,108호에 기재된 것들을 포함하며, 이를 각각은 전문이 본원에 참고로 포함된다. 박테리오파지 상의 항체 단편 발현은 단편을 암호화하는 cDNA를 바이러스 외피 단백질을 발현하는 유전자에 삽입함으로써 수행될 수 있다. 사상 박테리오파지의 바이러스 외피는 단일-가닥 게놈에 의해 암호화되는 5개의 외피 단백질로 이루어진다. 외피 단백질 pIII은 전형적으로 N-말단에서 항체 단편 발현을 위한 바람직한 단백질이다. 항체 단편 발현이 pIII의 기능을 손상시키는 경우, 야생형 pIII의 공동발현을 통해 바이러스 기능이 회복될 수 있지만, 이러한 발현은 바이러스 외피 상에서 발현되는 항체 단편의 수를 감소시킬 것이며 표적 항원에 의한 항체 단편에의 접근을 증진시킬 수 있다. 바이러스 뿐만 아니라 항체 단편 단백질의 발현은 대안적으로 다수의 플라스미드 상에서 암호화될 수 있다. 이 방법은 감염성 플

라스미드의 전체 크기를 감소시키고 형질전환 효율을 증진시키는데 사용될 수 있다.

[0157] 상기한 바와 같이, 고 친화성 항체 또는 항체 단편, (예컨대, 글리칸-상호작용 항체)을 발현하는 숙주의 선택 후, 항체 또는 항체 단편으로부터의 암호화 영역을 단리하고 인간 항체, 또는 임의의 다른 목적하는 항원 결합 단편을 포함한 전체 항체를 생성하는데 사용할 수 있으며, 포유류 세포, 곤충 세포, 식물 세포, 효모 및 박테리아, 예컨대, 아래에 상세하게 기재된 바와 같은 것을 포함하는 임의의 목적하는 숙주에서 발현시킬 수 있다.

[0158] 고 친화성 항체를 암호화하는 DNA 서열은 친화성 성숙으로 알려진 과정에서 추가의 수 차례의 선택을 위해 돌연변이될 수 있다. 본원에서 사용되는 용어 "친화성 성숙"은 항체가 연속적인 수 차례의 돌연변이 및 항체- 또는 항체 단편-암호화 cDNA 서열의 선택을 통해 소정의 항원에 대해 증가된 친화도로 생산되는 방법을 가리킨다. 일부 경우에, 이러한 과정은 시험관내에서 수행된다. 이를 완수하기 위해, CDR 암호화 서열의 증폭을 오류-유발(error-prone) PCR을 사용하여 수행하여 점 돌연변이, 영역 돌연변이(regional mutation), 삽입 돌연변이 및 결실 돌연변이를 포함하지만 이에 제한되지 않는 돌연변이를 함유하는 수백만 개의 복제물을 생산할 수 있다. 본원에서 사용되는 용어 "점 돌연변이"는 뉴클레오티드 서열 내의 하나의 뉴클레오티드가 다른 뉴클레오티드로 변하는 핵산 돌연변이를 가리킨다. 본원에 사용되는 용어 "영역 돌연변이"는 둘 이상의 연속 뉴클레오티드가 다른 뉴클레오티드로 변하는 핵산 돌연변이를 가리킨다. 본원에서 사용되는 용어 "삽입 돌연변이"는 하나 이상의 뉴클레오티드가 뉴클레오티드 서열에 삽입되는 핵산 돌연변이를 가리킨다. 본원에서 사용되는 용어 "결실 돌연변이"는 하나 이상의 뉴클레오티드가 뉴클레오티드 서열로부터 제거되는 핵산 돌연변이를 가리킨다. 삽입 또는 결실 돌연변이는 출발 코돈의 하나 또는 두 개의 뉴클레오티드를 바꿈으로써 전체 코돈의 완전 교체 또는 하나의 코돈의 다른 코돈으로의 변화를 포함할 수 있다.

[0159] 돌연변이유발은 CDR 중쇄 및 경쇄 영역에 단일의 돌연변이를 갖는 수백만 개의 돌연변이체를 생성하기 위해 CDR-암호화 cDNA 서열 상에서 수행될 수 있다. 또 다른 접근법에서, 무작위 돌연변이가 오직 CDR 잔기에 도입되어 아마도 친화도를 개선시킨다. 이러한 새로 생성된 돌연변이원성 라이브러리를 사용하여 표적 항원에 대해 훨씬 더 높은 친화도로 항체 단편을 암호화하는 클론을 스크리닝하기 위한 과정을 반복할 수 있다. 계속된 수 차례의 돌연변이 및 선택은 보다 큰 친화도를 갖는 클론의 합성을 촉진시킨다(Chao, G. et al., *Isolating and engineering human antibodies using yeast surface display*. Nat Protoc. 2006;1(2):755-68).

[0160] 항체 및 항체 단편, 예를 들면 Fab 및 scFv를 생산하는데 사용될 수 있는 기법의 예는 미국 특허 제4,946,778호 및 제5,258,498호; 미에르쉬(Miersch) 등(Miersch, S. et al., *Synthetic antibodies: Concepts, potential and practical considerations*. Methods. 2012 Aug;57(4):486-98), 카오(Chao) 등(Chao, G. et al., *Isolating and engineering human antibodies using yeast surface display*. Nat Protoc. 2006;1(2):755-68), 휴斯顿(Huston) 등(Huston, J.S. et al., *Protein engineering of single-chain Fv analogs and fusion proteins*. Methods Enzymol. 1991;203:46-88); 슈(Shu) 등(Shu, L. et al., *Secretion of a single-gene-encoded immunoglobulin from myeloma cells*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1993 Sep 1;90(17):7995-9); 및 스케라(Skerra) 등(Skerra, A. et al., *Assembly of a functional immunoglobulin Fv fragment in Escherichia coli*. Science. 1988 May 20;240(4855):1038-41)에 기재된 것들을 포함하며, 이를 각각은 전문이 본원에 참고로 포함된다.

[0161] 인간에서의 항체(예컨대, 글리칸-상호작용 항체)의 생체내 사용 및 시험관내 검출 검정을 포함한 몇몇 용도를 위해, 키메라, 인간화, 또는 인간 항체를 사용하는 것이 바람직할 수 있다. 키메라 항체는 항체의 다른 부분이 다른 동물 종으로부터 유도되는 분자, 예를 들면, 뮤린 단클론성 면역글로불린으로부터 유도된 가변 영역 및 인간 면역글로불린 불변 영역을 갖는 항체이다. 키메라 항체를 제조하는 방법은 당업계에 공지되어 있다. (Morrison, S.L., *Transfectedomas provide novel chimeric antibodies*. Science. 1985 Sep 20;239(4719):1202-7; Gillies, S.D. et al., *High-level expression of chimeric antibodies using adapted cDNA variable region cassettes*. J Immunol Methods. 1989 Dec 20;125(1-2):191-202.; 및 미국 특허 제5,807,715호; 제4,816,567호; 및 제4,816,397호, 이것은 전문이 본원에 참고로 포함된다).

[0162] 인간화 항체는 목적하는 항원에 결합하고 비인간 종으로부터의 하나 이상의 상보성 결정 영역(CDR) 및 인간 면역글로불린 분자로부터의 프레임워크 영역을 갖는 비인간 종으로부터의 항체 분자이다. 종종, 인간 프레임워크 영역에서의 프레임워크 잔기가 공여자 항체의 CDR 및 프레임워크 영역으로부터의 상응하는 잔기로 치환되어 항원 결합을 변화, 바람직하게는 개선시킨다. 이러한 프레임워크 치환은 당업계에 널리 공지된 방법에 의해, 예컨대, 항원 결합에 중요한 프레임워크 잔기를 확인하기 위해 CDR과 프레임워크 잔기의 상호작용을 모델링함으로써 및 특정 위치에 특이한 프레임워크 잔기를 확인하기 위한 서열 비교에 의해 확인된다(미국 특허 제5,693,762호

및 제5,585, 089호; Riechmann, L. et al., *Reshaping human antibodies for therapy*. Nature. 1988 Mar 24;332(6162):323-7, 이것은 전문이 본원에 참고로 포함된다). 항체는, 예를 들면, CDR-그라프팅(EP 제239,400호; PCT 공보 제WO 91/09967호; 미국 특허 제5,225,539호; 제5,530,101호; 및 제5,585,089호); 베니어링(veneering) 또는 리서페이싱(resurfacing)(EP 제592,106호; EP 제519,596호; Padlan, E.A., *A possible procedure for reducing the immunogenicity of antibody variable domains while preserving their ligand-binding properties*. Mol Immunol. 1991 Apr-May;28(4-5):489-98; Studnicka, G.M. et al., *Human-engineered monoclonal antibodies retain full specific binding activity by preserving non-CDR complementarity-modulating residues*. Protein Eng. 1994 Jun;7(6):805-14; Roguska, M.A. et al., *Humanization of murine monoclonal antibodies through variable domain resurfacing*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1994 Feb 1;91(3):969-73); 및 쇄 셔틀링(미국 특허 제5,565,332호)을 포함하여 당업계에 공지된 다양한 기술들을 사용하여 인간화될 수 있으며; 이들 각각은 전문이 본원에 참고로 포함된다. 본 발명의 인간화 항체는 목적하는 결합 특이성, 보체-의존 세포독성 및 항체-의존 세포-매개된 세포독성 등을 위해 개발될 수 있다.

[0163] 일부 경우에, 인간 프레임워크는 최고 수준의 상동성을 갖는 인간 프레임워크 후보물질을 찾기 위해 공여자 항체 서열과 인간 프레임워크 서열의 정렬에 의해 선택된다. 일부 경우에, 프레임워크 영역은 하나 이상의 인간 프레임워크 후보물질로부터 선택될 수 있다(예컨대, 프레임워크 영역 1-3은 하나의 후보물질로부터 선택될 수 있고 프레임워크 영역 4는 또 다른 후보물질로부터 선택될 수 있다). 일부 경우에, 프레임워크 영역은 체세포 돌연변이에 의해 생성된 면역원성 에피토프를 포함할 위험을 피하기 위해 인간 컨센서스 서열로부터 선택될 수 있다. 컨센서스 서열은 여러 서열을 비교하여 가장 흔하게 발생하는 잔기를 각 위치에 채택함으로써 형성되는 서열이다. 일부 경우에, 인간 프레임워크는 인간 생식계열 서열로부터 선택될 수 있다. 이들은 데이터베이스 검색(예컨대, NCBI 단백질 데이터베이스 또는 기타 데이터베이스를 사용하여)을 통해 확인될 수 있다.

[0164] 경쇄 및 중쇄 인간 프레임워크는 동일하거나 상이한 클론으로부터 선택될 수 있다. 동일한 클론으로부터 유도된 경쇄 및 중쇄는 기능성인 결합 부위를 형성하기 위해 연결될 가능성이 더 크다; 그러나, 중쇄와 경쇄 사이의 계면이 전형적으로 보존 성질이 다른 클론으로부터의 경쇄 및 중쇄를 연결시키고 기능성으로 되게 한다. 인간 경쇄 및 중쇄 프레임워크 간의 쌍형성 빈도는, 예를 들면, 문헌[Tiller et al., 2013. MAbs. 5(3): 445-70, 이들의 내용은 전문이 본원에 참고로 포함됨]에서 검토될 수 있다.

[0165] 인간화 항체 서열의 잔기들은 인간화 동안 소실된 항체 친화성을 개선시키거나 회복하기 위해 "복귀-돌연변이"에 대해 고려될 수 있다. 복귀-돌연변이는 인간화 동안 바뀐 잔기를 원래의 비-인간 항체 서열에 존재하는 것으로 다시 변화시킴을 포함한다. 복귀-돌연변이를 위한 후보물질인 잔기는, 예를 들면, 정준 항체(canonical antibody) 구조에서 발견되는 표준 형태와의 비교에 의해 확인될 수 있다(참조; Al-Lazikani, et al., 1997. J. Mol. Biol. 273: 927-48, 이들의 내용은 전문이 본원에 참고로 포함됨). 특이한 정준 잔기가 확인되고 복귀-돌연변이에 대해 표적화될 수 있다. 일부 경우에, 복귀-돌연변이를 위한 후보물질인 잔기는 "베니어 잔기(Vernier residue)"일 수 있으며, 이 용어는 CDR과 접촉하는 잔기를 가리키는데 사용된다. 이러한 잔기는 CDR 위치결정 및 형태 및 이에 따라 항체 친화성 및/또는 특이성에 영향을 미칠 가능성이 더 높다(Strohl, W.R. Therapeutic Antibody Engineering. Woodhead Publishing, Philadelphia PA. 2012. Ch. 6, p117). 일부 경우에, 경험적 방법을 통해 결합을 유지하면서 인간 프레임워크 영역은 불변하게 유지되고 공여자 항체로부터의 CDR은 인간 CDR 영역에 맞게 복귀-돌연변이된다.

[0166] 완전 인간 항체(예컨대, 글리칸-상호작용 항체)가 외래 단백질에 대한 면역 반응을 피하거나 완화시키도록 하여 인간 환자의 치료학적 치료에 특히 바람직하다. 인간 항체는 인간 면역글로불린 서열로부터 유도된 항체 라이브러리를 사용하는 상기한 항체 디스플레이 방법을 포함하여 당업계에 공지된 다양한 방법으로 제조될 수 있다. 또한, 미국 특허 제4,444,887호 및 제4,716,111호; 및 PCT 공보 제WO 98/46645호, 제WO 98/50433호, 제WO 98/24893호, 제WO 98/16654호, 제WO 96/34096호, 제WO 96/33735호 및 제WO 91/10741호를 참조하며; 이들 각각은 전문이 본원에 참고로 포함된다.

[0167] 인간 항체(예컨대, 글리칸-상호작용 항체)는 또한 기능성의 내인성 면역글로불린을 발현할 수는 없지만, 인간 면역글로불린 폴리뉴클레오티드는 발현할 수 있는 유전자이식 마우스(transgenic mice)를 사용하여 제조될 수 있다. 예를 들면, 인간 중쇄 및 경쇄 면역글로불린 폴리뉴클레오티드 복합체가 무작위적으로, 또는 상동 재조합에 의해, 마우스 배아 줄기 세포에 도입될 수 있다. 대안적으로, 인간 가변 영역, 불변 영역 및 다양성 영역이 인간 중쇄 및 경쇄 폴리뉴클레오티드에 더하여 마우스 배아 줄기 세포에 도입될 수 있다. 마우스 중쇄 및 경쇄 면역글로불린 폴리뉴클레오티드는 상동 재조합에 의한 인간 면역글로불린 유전자좌의 도입과 별도로 또는 동시

에 비기능성으로 될 수 있다. 특히, J_H 영역의 동형접합성 결실은 내인성 항체 생산을 막는다. 변형된 배아 줄기 세포를 확장시키고 배반포에 미량주사하여 키메라 마우스를 생산한다. 그후 키메라 마우스를 사육하여 인간 항체를 발현하는 동형접합성 자손을 생산한다. 유전자이식 마우스를 통상의 방식으로 선택된 항원, 예컨대, 본 발명의 글리칸, 당접합체 및/또는 폴리펩타이드의 전부 또는 일부로 면역화한다.

[0168] 따라서, 이러한 기법을 사용하여, 유용한 인간 IgG, IgA, IgM, IgD 및 IgE 항체를 생산할 수 있다. 인간 항체를 생산하기 위한 기법의 개요에 대해서는, 문헌[Lonberg and Huszar (Lonberg, N. et al., *Human antibodies from transgenic mice*. Int Rev Immunol. 1995;13(1):65-93)]을 참조한다. 인간 항체 및 인간 단클론 항체를 생산하기 위한 기술 및 이러한 항체를 생산하기 위한 프로토콜의 상세한 논의에 대해서는, 예를 들면, PCT 공보 제WO 98/24893호; 제WO 92/01047호; 제WO 96/34096호; 제WO 96/33735호; 미국 특허 제5,413,923호; 제5,625,126호; 제5,633,425호; 제5,569,825호; 제5,661,016호; 제5,545,806호; 제5,814,318호; 제5,885,793호; 제5,916,771호; 제5,939,598호; 제6,075,181호; 및 제6,114,598호를 참조하며, 이를 각각은 전문이 본원에 참고로 포함된다. 또한, 앱제닉스 인코포레이티드(Abgenix, Inc., 캘리포니아주 프리몬트 소재), 프로테인 디자인 랩스 인코포레이티드(Protein Design Labs, Inc., 캘리포니아주 마운틴 뷰 소재) 및 젠팜(Genpharm, 캘리포니아주 산호세 소재)과 같은 회사가 상기한 기술과 유사한 기술을 사용하여 선택된 항원에 대해 지시된 인간 항체를 제공하는데 참여하고 있다.

[0169] 일단 본 발명의 항체 분자가 동물, 세포주에 의해 생산되거나, 화학적으로 합성되거나, 재조합적으로 발현되면, 이를 면역글로불린 또는 폴리펩타이드 분자의 정제를 위해 당업계에 공지된 방법에 의해, 예를 들면, 크로마토그래피(예컨대, 이온 교환, 친화도, 특히 특이적 항원에 대한 친화도에 의해, 단백질 A 및 크기 컬럼 크로마토그래피), 원심분리, 차동 용해도, 또는 단백질의 정제를 위한 임의의 다른 표준 기술에 의해 정제(즉, 단리)할 수 있다. 또한, 본 발명의 항체 또는 이의 단편을 본원에 기재되거나 달리 당업계에 공지된 이종 폴리펩타이드 서열에 융합시켜 정제를 촉진시킬 수 있다.

[0170] 항체와 표적 또는 리간드(예를 들면, 소정의 항체를 생성하는데 사용되는 항원) 간의 친화도는 본원에 기재된 바와 같은 하나 이상의 결합 검정을 사용하여 K_D의 측면에서 측정될 수 있다. 소정의 항체에 대한 목적하는 용도에 따라, 다양한 K_D 값이 바람직할 수 있다. 고친화성 항체는 전형적으로 약 10⁻⁵ M 이하, 예컨대 약 10⁻⁶ M 이하, 약 10⁻⁷ M 이하, 약 10⁻⁸ M 이하, 약 10⁻⁹ M 이하, 약 10⁻¹⁰ M 이하, 약 10⁻¹¹ M 이하, 또는 약 10⁻¹² M 이하의 K_D로 리간드 결합을 형성한다.

[0171] 일부 실시양태에서, 본 발명의 항체는 이들의 반수 최대 유효 또는 억제 농도(각각 EC₅₀ 또는 IC₅₀)에 따라 특성화될 수 있다. 일부 경우에, 이 값은 항체의 최고 농도에서 관찰되는 최대 억제의 절반과 같은 수준으로 STn(예컨대 사멸시키고, 증식을 감소시키고/시키거나 하나 이상의 세포 기능을 감소시킴)을 발현하는 세포를 억제하는데 필요한 항체의 농도를 나타낼 수 있다. 이러한 IC₅₀ 값은 약 0.001nM 내지 약 0.01nM, 약 0.005nM 내지 약 0.05nM, 약 0.01nM 내지 약 1nM, 약 0.05nM 내지 약 5nM, 약 0.1nM 내지 약 10nM, 약 0.5nM 내지 약 25nM, 약 1nM 내지 약 50nM, 약 5nM 내지 약 75nM, 약 10nM 내지 약 100nM, 약 25nM 내지 약 250nM, 약 200nM 내지 약 1000 nM 또는 1000nM 초과일 수 있다.

[0172] 일부 실시양태에서, 본 개시내용에 교시된 항체는 환자-유래 암 세포 및/또는 암 줄기 세포(CSC)를 표적화하는 이들의 능력에 대해 시험될 수 있다. 이러한 양태에 따르면, 환자-유래 암 세포를 시험관내에서 배양할 수 있으며 본 발명의 항체를 사용하여 이러한 세포를 표적화할 수 있다.

[0173] 또 다른 양태에서, 환자-유래 세포를 사용하여 환자-유래 이종이식(PDX) 종양을 생성할 수 있다. 일부 경우에, 조직 구조로서 유지된 원발성 또는 전이성 고형 종양의 조각을 수술 또는 생검 절차에 의해 수집할 수 있다. 일부 경우에, 악성 복수 또는 흉막 삼출로부터 배출된 체액이 사용될 수 있다. 종양은 단독으로 또는 다른 연구들에서는 MATRIGEL®(뉴욕주 코닝 소재의 코닝 라이프 사이언시즈(Corning Life Sciences))로 코팅되거나 인간 섬유아세포 또는 간엽 줄기 세포와 혼합되어 조각 또는 단일 세포 혼탁액으로서 이식될 수 있다. 이식 부위는 마우스의 등 부위(피하 이식)를 포함할 수 있지만, 원래 종양과 동일한 장기에의 이식이 선택사항일 수 있다(정위 이식, 즉, 훼장, 구강, 난소, 유방 지방체, 뇌 등). 또한, 종양 기원과는 무관하게, 일부 접근법은 접종(engraftment) 성공률을 증가시키려는 노력으로 신피막에 원발성 종양을 이식시킴을 포함할 수 있다. 상이한 정도의 면역억제를 갖는 다양한 마우스 품종이 이러한 연구에 사용될 수 있다. 호르몬 민감성 종양의 경우, 일부 연구들은 접종률을 증가시키려는 의도로 호르몬 보충을 사용할 수 있다. 일부 실시양태에서, PDX 종양은 비-비

만 당뇨성/중증 복합 면역결핍증(NOD/SCID) 마우스에서 생성될 수 있다. 항체를 PDX 종양을 갖는 마우스에 투여 할 수 있으며 종양 체적에 대한 효과를 분석할 수 있다. 일부 경우에, PDX 종양을 절개하고, 세포 분해에 적용하고, 생성된 세포를 배양액에서 성장시킬 수 있다. 본 발명의 항체가 이러한 세포를 표적화하는 능력을 시험관내에서 평가할 수 있다.

- [0174] 항체의 제조는, 단클론성이든 다클론성이든, 당업계에 공지되어 있다. 항체의 제조를 위한 기술은 당업계에 널리 공지되어 있으며, 예를 들어, 문헌[Harlow and Lane "Antibodies, A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988 and Harlow and Lane "Using Antibodies: A Laboratory Manual" Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999]에 기재되어 있다.

[0175] 표적

- [0176] 본 발명의 글리칸-상호작용 항체는 하나 이상의 글리칸 또는 글리칸-결합된 또는 글리칸-관련된 표적에의 (가역적 또는 비가역적) 결합을 통해 이들의 효과를 발휘할 수 있다. 일부 실시양태에서, 글리칸-상호작용 항체는 본원에 교시된 표적의 임의의 영역으로부터 제조될 수 있다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 표적은 글리칸을 포함한다. 항체를 생성하는데 사용되는 글리칸은 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4, 적어도 5, 적어도 6, 적어도 7, 적어도 8, 적어도 9, 적어도 10, 적어도 11, 적어도 12, 적어도 13, 적어도 14, 적어도 15, 적어도 16, 적어도 17, 적어도 18, 적어도 19 또는 적어도 20개 잔기를 갖는 당 사슬을 포함할 수 있다. 항체를 생성하는데 사용되는 몇몇 글리칸은 약 2개 잔기 내지 약 5개 잔기를 포함할 수 있다.

- [0177] 일부 실시양태에서, 글리칸-상호작용 항체 표적 항원은 시알산을 포함한다. N-아세틸뉴라민산(Neu5Ac) 및 N-글리콜릴뉴라민산(Neu5Gc)이 포유동물 세포 표면 상의 주요 시알산이다. 이들 중에서, Neu5Ac가 인간에서 자연적으로 생산된다. Neu5Gc는 CMP-Neu5Ac로부터의 CMP-Neu5Gc 생산을 책임지는 시티딘 모노포스페이트(CMP)-N-아세틸뉴라민산 하이드록실라제(CMAH) 유전자의 돌연변이로 인해 인간을 제외한 대부분의 포유동물에서 자연적으로 생산된다. 인간에서 Neu5Gc는 사실상 항-Neu5Gc 항체를 발현하는 거의 모든 인간에서 면역원성이다. 생산 부족에도 불구하고, 대부분의 인체는 식이 섭취로 인해 어느 정도 수준의 Neu5Gc를 포함한다. 이러한 외래 산물은 후속적으로 인간 당단백질에 혼입된다. 이러한 당단백질이 본 발명의 표적으로 고려된다. 본 발명의 글리칸 표적 항원은 하기 표에 열거된 것들을 포함할 수 있지만, 이에 제한되지 않는다.

표 1

글리칸 표적 항원

글리칸
GalNAc α -R
Gal α 1,3Gal β 1,4GlcNAc β -R
Gal β 1,3GalNAc β -R
Gal β 1,3GlcNAc α -R
Gal β 1,3GlcNAc β 1,3Gal β 1,4Glc β -R
Gal β 1,3GlcNAc β -R
Gal β 1,4GlcNAc6S β -R
Gal β 1,4GlcNAc β -R
Gal β 1,4Glc β -R
KDN α 2,8Neu α 2,3Gal β 1,4Glc β -R
KDN α 2,8Neu α 2,3Gal β 1,4Glc β -R
Neu α 5,9Ac α 2,3Gal β 1,3GalNAc α -R
Neu α 5,9Ac α 2,3Gal β 1,3GalNAc β -R
Neu α 5,9Ac α 2,3Gal β 1,4GlcNAc β -R
Neu α 5,9Ac α 2,3Gal β 1,4Glc β -R
Neu α 5,9Ac α 2,3Gal β -R
Neu α 5,9Ac α 2,6GalNAc α -R
Neu α 5,9Ac α 2,6Gal β 1,4GlcNAc β -R
Neu α 5,9Ac α 2,6Gal β 1,4Glc β -R
Neu α 5,9Ac α 2,3Gal β 1,3GalNAc α -R
Neu α 5,9Ac α 2,3Gal β 1,3GalNAc β -R
Neu α 5,9Ac α 2,3Gal β 1,3Gal β 1,4Glc β -R
Neu α 5,9Ac α 2,3Gal β 1,3GlcNAc β -R
Neu α 5,9Ac α 2,3Gal β 1,4(Fuc α 1,3)GlcNAc6S β -R
Neu α 5,9Ac α 2,3Gal β 1,4(Fuc α 1,3)GlcNAc β -R
Neu α 5,9Ac α 2,3Gal β 1,4GlcNAc6S β -R
Neu α 5,9Ac α 2,3Gal β 1,4GlcNAc β -R
Neu α 5,9Ac α 2,3Gal β -R
Neu α 5,9Ac α 2,6(KDN α 2,3)Gal β 1,4Glc β -R
Neu α 5,9Ac α 2,6(Neu α 5Ac α 2,3)Gal β 1,4Glc β -R

[0178]

Neu5Aca2,6(Neu5Gca2,3)Galβ1,4Glcβ-R
Neu5Aca2,6GalNAca-R
Neu5Aca2,6Galβ1,4GlcNAcβ-R
Neu5Aca2,6Galβ1,4Glcβ-R
Neu5Aca2,6Galβ-R
Neu5Aca2,8KDN02,6Galβ1,4Glcβ-R
Neu5Aca2,8Neu5Aca2,3Galβ1,4Glcβ-R
Neu5Aca2,8Neu5Aca2,3Galβ1,4Glcβ-R
Neu5Aca2,8Neu5Aca2,6Galβ1,4Glcβ-R
Neu5Aca2,8Neu5Aca2,8Neu5Aca2,3Galβ1,4Glcβ-R
Neu5Aca2,8Neu5Aca2,8Neu5Aca2,3Galβ1,4Glcβ-R
Neu5Aca2,8Neu5Gca2,3Galβ1,4Glcβ-R
Neu5Aca2,8Neu5Gca2,6Galβ1,4Glcβ-R
Neu5Gc9Aca2,3Galβ1,4Glcβ-R
Neu5Gc9Aca2,6Galβ1,4Glcβ-R
Neu5Gc9Aca2,3Galβ1,3GalNAca-R
Neu5Gc9Aca2,3Galβ1,3GalNAcβ-R
Neu5Gc9Aca2,3Galβ1,3GlcNAcβ-R
Neu5Gc9Aca2,3Galβ1,4GlcNAcβ-R
Neu5Gc9Aca2,3Galβ-R
Neu5Gc9Aca2,6GalNAca-R
Neu5Gc9Aca2,6Galβ1,4GlcNAcβ-R
Neu5Gc9Aca2,6Galβ-R
Neu5GcOMe2,8Neu5Aca2,3Galβ1,4Glcβ-R
Neu5Gca2,3Galβ1,3GalNAca-R
Neu5Gca2,3Galβ1,3GalNAcβ-R
Neu5Gca2,3Galβ1,3GlcNAcβ1,3Galβ1,4Glcβ-R
Neu5Gca2,3Galβ1,3GlcNAcβ-R
Neu5Gca2,3Galβ1,4(Fucα1,3)GlcNAc6Sβ-R
Neu5Gca2,3Galβ1,4(Fucα1,3)GlcNAcβ-R
Neu5Gca2,3Galβ1,4GlcNAc6Sβ-R
Neu5Gca2,3Galβ1,4GlcNAcβ-R
Neu5Gca2,3Galβ1,4Glcβ-R
Neu5Gca2,3Galβ-R
Neu5Gca2,6GalNAca-R
Neu5Gca2,6Galβ1,4GlcNAcβ-R
Neu5Gca2,6Galβ1,4Glcβ-R
Neu5Gca2,6Galβ-R
Neu5Gca2,8Neu5Aca2,3Galβ1,4Glcβ-R
Neu5Gca2,8Neu5Gca2,3Galβ1,4Glcβ-R

[0179]

[0180]

하기의 약어들이 본원에서 사용된다: Glc - 글루코스, Gal - 갈락토스, GlcNAc - N-아세틸글루코사민, GalNAc - N-아세틸갈락토사민, GlcNAc6S - 6-설포-N-아세틸글루코사민, KDN - 2-케토-3-데옥시-D-글리세로-D-갈락토노논산, Neu5,9Ac2 - N-아세틸-9-O-아세틸뉴라민산, Fuc - 푸코스 및 Neu5GcOMe - 2-O-메틸-N-글리콜릴뉴라민산. O-글리코시드 결합이 결합에 의해 연결된 두 개의 잔기 사이의 상대적 화학양론을 나타내는 α 및 β로 열거된 글리칸의 각 잔기 사이에 존재하며, 여기서 α는 축방향 배향을 나타내고 β는 적도 배향을 나타낸다. 포멧 X, X'에서 α 및/또는 β 다음에 오는 숫자는 결합 형성에 참여하는 인접한 잔기를 각각으로부터의 각 탄소의 탄소수를 나타낸다. 상기 표에 열거된 글리칸은 고려되는 개별 글리칸 표적 항원을 나타내지만, 본 발명은 또한 상기 나타낸 글리칸이 나타낸 것과는 상이한 조합의 α 및 β-배향된 O-글리코시드 결합을 포함하는 양태를 포함한다. 또한 상기 표에서, R은 글리칸이 커플링될 수 있는 실체를 나타낸다. 일부 양태에서, R은 글리칸이 전형적으로 세린 또는 트레오닌 잔기에 결합된 단백질이다. 일부 실시양태에서, R은 글리칸 어레이에서와 같이 글리칸을 기질에 결합시키는데 사용되는 링커 문자이다. 일부 실시양태에서, R은 화학식 -(CH₂)₂CH₂NH₂ 또는

$-(\text{CH}_2)_3\text{NHCOC}\text{H}_2(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_6\text{NH}_2$ 를 갖는 링커일 수 있다. 일부 실시양태에서, R은 비오틴, 알부민, ProNH₂, -CH-, -OH, -OCH₃, -OCH₂CH₃, -H, 하이드록시, 알콕실, 산소, 탄소, 황, 질소, 폴리아크릴아미드, 인, NH₂, ProNH₂=O(CH₂)₂CH₂NH₂, (OCH₂CH₂)₆NH₂, O(CH₂)₃NHCOC $\text{H}_2(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_6\text{NH}_2$, 형광 표지 2-아미노벤즈아미드(AB) 및/또는 2-아미노벤조이드 산(AA), 알킬 아민을 함유하는 2-아미노벤즈아미드 유사체(AEAB), 아미노옥시-기, 메틸아미노옥시기, 하이드라지드기, 아미노 지질 1,2-디헥사데실-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민(DHPE), 아미노옥시(AO) 관능화된 DHPE 및 글리코실포스파티딜이노시톨(GPI)일 수 있다. R의 공급원 또는 성질을 제한하려는 것은 아니지만, 이것은 글리칸 잔기의 물리적 간격(physical spacing)에 영향을 미치는 구조를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, R기는 여기에 나타낸 R기의 조합, 예컨대 비오틴화 폴리아크릴아미드를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, R기는 아래에 있는 기질과 함께 글리칸 잔기 간격을 초래한다.

[0181]

본 발명의 글리칸 표적은 항체 인식의 하나 이상의 영역을 포함할 수 있다. 본원에서 사용되는 용어 "항체 인식의 영역"은 문자의 임의의 부분, 부착된 그룹 상에 위치하거나 글리칸과 다른 글리칸, 단백질, 막, 세포 표면 구조, 또는 세포외 기질 성분을 포함하지만 이에 제한되지 않는 다른 문자 간의 상호작용의 영역 상에 위치하는 부분을 가리킨다. 일부 실시양태에서, 항체 인식의 영역은 쇄간 표적 부위에 위치하며, 여기서 용어 "쇄간(interchain)"은 존재하는 중합체 쇄 내를 의미한다. 쇄간 표적 부위는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 적어도 10개 잔기, 잔기 간의 결합 또는 잔기와 결합의 조합을 갖는 항체 인식의 영역을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 항체 인식의 영역은 하나 이상의 글리칸 쇄 사이의 상호작용의 영역에 위치한다. 이러한 영역은 2, 3, 4 또는 적어도 5개의 글리칸 쇄 사이에 있을 수 있다.

[0182]

일부 실시양태에서, 항체 인식의 영역은 공통의 모 쇄에 연결된 글리칸 분지 쇄 사이의 상호작용의 영역에 위치한다. 일부 실시양태에서, 항체 인식의 영역은 글리칸 분지 쇄와 모 쇄 사이의 상호작용의 영역에 위치한다. 일부 실시양태에서, 항체 인식의 영역은 글리칸과 단백질 사이의 상호작용의 영역에 위치한다. 이러한 상호작용의 영역은 공유 결합, 이온 결합, 정수학적 결합(hydrostatic bond), 소수성 결합 및 수소 결합을 포함하지만 이에 제한되지 않는 글리칸과 단백질 간의 화학적 결합을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 항체 인식의 영역은 글리칸과 지질 및 핵산을 포함하지만 이에 제한되지 않는 다른 생체분자 사이의 상호작용의 영역에 위치한다. 이러한 상호작용의 영역은 공유 결합, 이온 결합, 정수학적 결합, 소수성 결합 및 수소 결합을 포함하지만 이에 제한되지 않는 글리칸과 생체분자 간의 화학적 결합을 포함할 수 있다.

[0183]

일부 실시양태에서, 본 발명의 글리칸 표적은 당접합체의 성분이다. 본원에서 사용되는 용어 "당접합체"는 글리칸 모이어티와 결합된 임의의 실체를 가리킨다. 일부 양태에서, 당접합체는 당지질이다. 본원에서 사용되는 용어 "당지질"은 탄수화물 모이어티가 공유적으로 부착된 지질의 일종을 가리킨다. 일부 실시양태에서, 당지질 상에 존재하는 탄수화물 모이어티는 글리칸일 수 있다. 일부 실시양태에서, 당지질의 지질 성분은 세라마이드 모이어티를 포함한다. 본 발명의 표적으로서 고려되는 당지질의 예는 글리세로글리코리피드(갈락토리피드 및 설포리피드를 포함하지만, 이에 제한되지 않음), 글리코스핑고리피드(세레브로시드(예컨대, 갈락토세레브로시드, 글루코세레브로시드 및 설파티드), 강글리오시드, 글로보시드 및 글리코포스포스핑고리피드를 포함하지만, 이에 제한되지 않음) 및 글리코실포스파티딜이노시톨을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 세포 막 내에 위치하는 경우, 당지질의 글리칸 모이어티는 막의 세포외면에 위치하며, 여기서 이들은 다른 세포들 뿐만 아니라 세포 신호전달 리간드와 상호작용할 수 있다(Maccioni, H.J. et al., *Organization of the synthesis of glycolipid oligosaccharides in the Golgi complex*. FEBS Lett. 2011 Jun 6;585(11):1691-8).

[0184]

일부 실시양태에서, 본 발명의 당접합체 표적은 당단백질 및/또는 프로테오글리칸이다. 당단백질은 글리칸과 공유 결합된 임의의 단백질을 가리킨다. 프로테오글리칸은 종종 음전하를 지니는 글리칸으로 매우 글리코실화된 단백질의 일종이다. 이러한 특성은 이들을 매우 친수성이고 결합 조직의 중요한 성분으로 만든다.

[0185]

암-관련 표적

[0186]

일부 실시양태에서, 본 발명의 표적은 암-관련 항원 또는 에피토프이다. 본원에서 사용되는 용어 "암-관련"은 암, 암성 세포 및/또는 암성 조직과 어떠한 방식으로 연합될 수 있는 실체를 기술하는데 사용된다. 종양 세포와 상호관련하여 발현되는 글리칸을 포함하는 다수의 암-관련 항원 또는 에피토프가 확인된 바 있다(Heimburg-Molinaro, J. et al., *Cancer vaccines and carbohydrate epitopes*. Vaccine. 2011 Nov 8;29(48):8802-26). 이것을 본원에서는 "종양-관련 탄수화물 항원(tumor-associated carbohydrate antigen)" 또는 "TACA"라고 한다. TACA는 뮤신-관련 항원[Tn, 시알릴 Tn(STn) 및 톰젠-프리덴라이히 항원(Thomsen-Friedenreich antigen)을 포함하지만, 이에 제한되지 않음], 혈액형 루이스 관련 항원[Lewis^Y(Le^Y), Lewis^X(Le^X), 시알릴 Lewis^X(SLe^X)

및 시알릴 Lewis^A(SLe^A)를 포함하지만, 이에 제한되지 않음], 글리코스핑고리피드-관련 항원[Globo H, 발생 단계-특히 배아성 항원-3(SSEA-3) 및 시알산을 포함하는 글리코스핑고리피드를 포함하지만, 이에 제한되지 않음], 강글리오시드-관련 항원[강글리오시드 GD2, GD3, GM2, 푸코실 GM1 및 Neu5GcGM3을 포함하지만, 이에 제한되지 않음] 및 폴리시알산-관련 항원을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 이러한 항원 중의 다수가 국제 공개 제 WO2015054600호에 기재되어 있으며, 이들의 내용은 전문이 본원에 참고로 포함된다.

[0187] 일부 실시양태에서, 본 발명의 TACA 표적은 루이스 혈액형 항원을 포함한다. 루이스 혈액형 항원은 α 1-3 결합 또는 α 1-4 결합에 의해 GlcNAc에 결합된 푸코스 잔기를 포함한다. 이들은 당지질 및 당단백질 둘 다에서 발견될 수 있다. 루이스 혈액형 항원은 이러한 항원의 분비자인 개체의 체액에서 발견될 수 있다. 적혈구에의 이들의 출현은 적혈구에 의한 혈청으로부터의 루이스 항원의 흡수로 인한 것이다.

[0188] 일부 실시양태에서, 본 발명의 TACA 표적은 Le^Y를 포함한다. Le^Y(CD174로도 알려짐)는 α 1,2- 뿐만 아니라 α 1,3-결합된 푸코스 잔기를 갖는 Galβ1,4GlcNAc로 구성되어 Fucα(1,2)Galβ(1,4)Fucα(1,3)GlcNAc 에피토프를 생성한다. 이것은 α 1,3 푸코스를 모 쇄의 GlcNAc 잔기에 부착하는 α 1,3 푸코실트랜스퍼라제에 의해 H 항원으로부터 합성된다. Le^Y는 난소, 유방, 전립선, 결장, 폐 및 상피를 포함하지만 이에 제한되지 않는 각종 암에서 발현될 수 있다. 정상 조직에서의 낮은 발현 수준 및 다수의 암에서의 증가된 발현 수준으로 인해, Le^Y 항원은 치료 항체에 대한 매력적인 표적이다.

[0189] 일부 실시양태에서, 본 발명의 TACA 표적은 Le^X를 포함한다. Le^X는 에피토프 Galβ1-4(Fucα1-3)GlcNAcβ-R을 포함한다. 이것은 CD15 및 발육 단계-특이적 배아성 항원-1(SSEA-1)으로도 알려져 있다. 이 항원은 F9 기형암종 세포로 면역화에 적용된 마우스로부터 채취된 혈청과 면역반응성이 것으로 처음으로 인지되었다. Le^X는 또한 특정 단계에서의 배아 발생과 상관성이 있는 것으로 밝혀졌다. 이것은 또한 암의 존재 및 부재 둘 다 하에 다양한 조직에서 발현되지만, 유방암 및 난소암에서도 발견될 수 있는데, 여기서 이것은 단지 암성 세포에 의해 발현된다.

[0190] 일부 실시양태에서, 본 발명의 TACA 표적은 SLe^A 및/또는 SLe^X를 포함한다. SLe^A 및 SLe^X는 각각 구조 Neu5Acα 2-3Galβ1-3(Fucα1-4)GlcNAcβ-R 및 Neu5Acα 2-3Galβ1-4(Fucα1-3)GlcNAcβ-R로 구성된다. 이들의 발현은 암 세포에서 상향조절된다. 혈청에서의 이러한 항원의 존재는 악성 종양 및 나쁜 예후와 상관성이 있다. SLe^X는 주로 뮤신 말단 에피토프로서 발견된다. 이것은 유방, 난소, 흑색종, 결장, 간, 폐 및 전립선을 포함한 여러 상이한 암에서 발현된다. 본 발명의 일부 실시양태에서, SLe^A 및 SLe^X 표적은 Neu5Gc(본원에서는 각각 GcSLe^A 및 GcSLe^X라고 함)를 포함한다.

[0191] 일부 경우에, 본 발명의 암-관련 표적은 뮤신을 포함할 수 있다. 이시다(Ishida) 등은 MUC2와 수지상 세포(항-종양 활성)의 상호작용이 수지상 세포 아폽토시스를 야기함을 입증하였다(Ishida, A. et al., 2008. Proteomics. 8: 3342-9, 이들의 내용은 전문이 본원에 참고로 포함됨). 몇몇 측면에서, 본 발명은 수지상 세포 아폽토시스를 방지하고 항-종양 활성을 지지하는 항-뮤신 항체를 제공하였다.

[0192] 일부 실시양태에서, 본 발명의 TACA 표적은 글리코스핑고리피드를 포함하지만 이에 제한되지 않는 당지질 및/또는 당지질 상에 존재하는 에피토프를 포함한다. 글리코스핑고리피드 세라마이드 하이드록실기에 의해 글리칸에 연결된 지질 세라마이드를 포함한다. 세포 막에서, 글리코스핑고리피드는 "지질 뗏목(lipid raft)"이라고 하는 클러스터를 형성한다.

[0193] 일부 실시양태에서, 본 발명의 TACA 표적은 Globo H를 포함한다. Globo H는 유방암 세포에서 처음 확인된 암-관련 글리코스핑고리피드이다. Globo H의 글리칸 부분은 Fucα(1-2)Galβ(1-3)GalNAcβ(1-3)Galα(1-4)Galβ(1-4)Glcβ(1)을 포함한다. Globo H는 다수의 정상적인 상피 조직에서 발견되었지만, 소세포 폐, 유방, 전립선, 폐, 췌장, 위, 난소 및 자궁내막 종양을 포함하지만 이에 제한되지 않는 다수의 종양 조직과 관련하여 확인되었다.

[0194] 일부 실시양태에서, 본 발명의 암-관련 글리코스핑고리피드 표적은 강글리오시드를 포함한다. 강글리오시드는 하나 이상의 시알산을 갖는 글리코스핑고리피드이다. 강글리오시드 명명법에 따르면, G는 강글리오시드에 대한 약어로서 사용된다. 이러한 약어 뒤에는 부착된 시알산 잔기의 수(각각 1, 2 또는 3)를 가리키는 문자 M, D 및 T가 뒤따른다. 마지막으로 숫자 1, 2 또는 3은 박층 크로마토그래피로 분석하는 경우 각각이 이동하는 거리의

순서를 가리키는데 사용된다(여기서 3이 가장 먼 거리를 가고, 그 다음이 2이고, 그 다음이 1이다). 강글리오시드는 암-관련 성장 및 전이에 관여하는 것으로 알려져 있으며 종양 세포의 세포 표면 상에서 발현될 수 있다. 종양 세포 상에서 발현되는 강글리오시드는 GD2, GD3, GM2 및 푸코실 GM1(본원에서 Fuc-GM1이라고도 함)을 포함할 수 있지만, 이에 제한되지 않는다. 본 발명의 일부 실시양태에서, 글리칸-상호작용 항체는 GD3에 대해 지시된다. GD3은 세포 성장의 조절인자이다. 일부 실시양태에서, GD3-지시된 항체는 세포 성장 및/또는 혈관형성을 조절하는데 사용된다. 일부 실시양태에서, GD3-지시된 항체는 세포 부착을 조절하는데 사용된다. 몇몇 종양 세포와 관련된 GD3은 9-O-아세틸화 시알산 잔기를 포함할 수 있다(Mukherjee, K. et al., 2008. J Cell Biochem. 105: 724-34 및 Mukherjee, K. et al., 2009. Biol Chem. 390: 325-35, 이의 내용은 전문이 본원에 참고로 포함됨). 일부 경우에, 본 발명의 항체는 9-O-아세틸화 시알산 잔기에 대해 선택적이다. 일부 항체는 9-O-아세틸화 GD3에 특이적일 수 있다. 이러한 항체는 9-O-아세틸화 GD3을 발현하는 종양 세포를 표적화하는데 사용될 수 있다. 본 발명의 일부 실시양태에서, 글리칸 상호작용 항체는 GM2에 대해 지시된다. 일부 실시양태에서, GM2-지시된 항체는 세포 대 세포 접촉을 조절하는데 사용된다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 강글리오시드 표적은 Neu5Gc를 포함한다. 일부 실시양태에서, 이러한 표적은 Neu5Gc를 갖는 GM3 변이체(본원에서는 GcGM3이라고 함)를 포함할 수 있다. GcGM3의 글리칸 성분은 Neu5Gc α2-3Gal β1-4Glc이다. GcGM3은 종양 세포의 알려진 성분이다(Casadesus, A.V. et al., 2013. Glycoconj J. 30(7):687-99, 이들의 내용은 전문이 본원에 참고로 포함됨).

[0195] 일부 실시양태에서, 본 기재내용의 TACA는 적어도 하나의 Neu5Gc 잔기를 포함한다.

제조합 항체

[0197] 본 발명의 제조합 항체(예컨대, 글리칸-상호작용 항체)는 당업계에 공지된 표준 기법들을 사용하여 생성될 수 있다. 일부 실시양태에서, 제조합 항체는 항-글리칸 항체일 수 있다. 추가의 항체는 항-STn 항체(예컨대 항-GcSTn 또는 항-AcSTn 항체)일 수 있다. 본 발명의 제조합 항체는 본원에 기재된 방법에 따라 생산된 하이브리도마 세포-유도된 항체로부터 수득된 가변 도메인을 사용하여 제조될 수 있다. 항체의 중쇄 및 경쇄 가변 영역 cDNA 서열은 표준 생화학 기법을 사용하여 결정될 수 있다. 총 RNA는 항체-생산 하이브리도마 세포로부터 추출되고 역전사 효소(RT) 폴리머라제 연쇄 반응(PCR)에 의해 cDNA로 전환될 수 있다. PCR 증폭을 생성된 cDNA 상에서 수행하여 가변 영역 유전자를 증폭시킬 수 있다. 이러한 증폭은 중쇄 및 경쇄 서열의 증폭에 특이적인 프라이머의 사용을 포함할 수 있다. 또 다른 양태에서, 제조합 항체는 다른 공급원으로부터 수득된 가변 도메인을 사용하여 생산될 수 있다. 이것은 항원 패닝(antigen panning)에 사용되는 scFv 라이브러리와 같은 하나 이상의 항체 단편 라이브러리로부터 선택된 가변 도메인의 사용을 포함한다. 그후, 생성된 PCR 산물을 서열 분석을 위해 플라스미드로 서브클로닝시킬 수 있다. 일단 서열화되면, 항체 암호화 서열을 발현 벡터에 배치할 수 있다. 인간화를 위해, 인간 중쇄 및 경쇄 불변 도메인에 대한 암호화 서열을 사용하여 상동성 뮤린 서열을 치환할 수 있다. 그후, 생성된 작제물을 대규모 번역을 위해 포유동물 세포로 형질감염시킬 수 있다.

항-Tn 항체

[0199] 일부 실시양태에서, 본 발명의 제조합 항체(예컨대, 글리칸-상호작용 항체)는 항-Tn 항체일 수 있다. 이 항체는 Tn을 갖는 표적에 결합할 수 있다. 항-Tn 항체는 Tn에 특이적일 수 있거나 추가의 탄수화물 잔기를 포함하지만 이에 제한되지 않는 다른 모이어티에 결합된 Tn과 같은 Tn의 다른 변형된 형태에 결합할 수 있다. 일부 경우에 항-Tn 항체는 항-시알릴-Tn 항체일 수 있다. 이 항체는 Neu5Ac을 포함하는 시알릴화 Tn 및/또는 Neu5Gc를 포함하는 시알릴화 Tn에 결합할 수 있다. 몇몇 항-Tn 항체는 Tn 항원의 클러스터에 특이적으로 결합할 수 있다.

항-STn 항체

[0201] 일부 실시양태에서, 본 발명의 항체(예컨대, 글리칸-상호작용 항체)는 STn에 특이적으로 결합할 수 있다. 본 발명의 항-STn 항체는 STn 항원의 특정 부분에의 이들의 결합에 의해 및/또는 AcSTn 대 GcSTn에 대한 이들의 특이성에 의해 분류될 수 있다. 일부 경우에, 본 발명의 항-STn 항체는 그룹 1 항체이다. 본 발명에 따르는 "그룹 1" 항체는 AcSTn 및 GcSTn에 결합할 수 있는 항체이다. 이러한 항체는 보다 광범위한 STn 구조와 결합하는 이들의 능력으로 인해 본원에서 범-STn 항체라고도 할 수 있다. 일부 실시양태에서, 그룹 1 항체는 도 1A에서 큰 타원형으로 나타낸 STn의 부분과 결합할 수 있다. 일부 경우에, 본 발명의 항-STn 항체는 그룹 2 항체이다. "그룹 2" 항체는, 본 발명에 따르면, STn 뿐만 아니라 세린 또는 트레오닌에의 O-결합을 포함하는 몇몇 관련 구조에 결합할 수 있는 항체이다. 일부 실시양태에서, 그룹 2 항체는 시알릴화 갈락토스 잔기를 포함하는 글리칸과 결합할 수 있다. 일부 경우에, 그룹 2 항체는 도 1B에서 큰 타원형으로 나타낸 STn의 부분과 결합할 수 있다. 몇몇 그룹 2 항체는 바람직하게는 GcSTn을 갖는 구조 위에 AcSTn을 갖는 구조에 결합한다. 추가의 항-STn 항체는 그룹 3 항체일 수 있다. 본원에서 언급되는 바와 같이, "그룹 3" 항체는 STn에 결합할 수 있는 항체이지만, 또

한 보다 광범위한 관련 구조에 결합할 수 있다. 그룹 2 항체와는 달리, 그룹 3 항체는 이러한 구조가 세린 또는 트레오닌에의 O-결합을 갖는 것을 필요로 하지 않는다. 일부 실시양태에서, 그룹 3 항체는 도 1C에서 큰 타원형으로 나타낸 STn의 부분과 결합할 수 있다. 마지막으로, 본 발명의 일부 항-STn 항체는 그룹 4 항체일 수 있다. 본원에서 언급되는 바와 같이, "그룹 4" 항체는 AcSTn 및 GcSTn 둘 다 뿐만 아니라 비-시알릴화 Tn 항원에도 결합할 수 있으며, 따라서 보다 광범위한 특이성을 갖는다. 일부 실시양태에서, 그룹 4 항체는 도 1D에서 큰 타원형으로 나타낸 STn의 부분과 결합할 수 있다.

[0202] 일부 경우에, 본 발명의 항-STn 항체는 특정 항원 또는 세포 표면 상의 STn의 클러스터에 특이적으로 결합할 수 있다. 이러한 몇몇 항체는 이웃하는 STn 구조 사이의 접촉 부위를 포함하는 에피토프를 포함하여 STn의 클러스터화에 의해 형성된 에피토프를 인식할 수 있다. 이러한 에피토프는 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 또는 그 이상의 STn 구조의 클러스터화에 의해 형성될 수 있다.

[0203] 일부 실시양태에서, 본 기재내용의 항-STn 항체는 STn을 운반하는 세포 단백질에 결합하는데 사용될 수 있다. 이러한 항체는 STn 발현에 의해 비-암성 세포에서 유사한 단백질과 구별할 수 있는 암 세포와 관련된 세포 단백질을 표적화하는데 유용할 수 있다. 일부 경우에, 이러한 단백질은 세포 표면 단백질을 포함할 수 있다. STn을 지니는 암 세포 표면 단백질은 암 치료 및/또는 진단 동안 항-STn 항체에 의해 표적화될 수 있다. STn을 운반하는 세포 표면 단백질은 질량 분광분석법을 사용하여 및/또는 면역학적 방법(예컨대, FACS 분석, 면역침강, 면역 블롯팅, ELISA, etc.)을 사용하여 동정될 수 있다. 일부 경우에, STn을 운반하는 세포 단백질은 암 세포 마커, 암 줄기 세포 마커 및/또는 암 줄기 세포 신호전달 단백질을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, STn을 운반하는 세포 단백질은 CD44, CD133, CD117, 인테그린, 노치(Notch) 및 해지호그(Hedgehog)를 포함할 수 있지만, 이에 제한되지 않는다.

항체 성분

[0204] 일부 경우에, 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 본원에 제공된 가변 도메인 및/또는 CDR 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 일부 항체 또는 항원 결합 단편은 이러한 서열의 상이한 조합을 포함할 수 있다. 일부 경우에, 본 발명의 항체 또는 항원 결합 단편은 아래 표에 열거된 가변 도메인 서열 중의 하나 이상을 포함할 수 있다. "X"로 나타낸 잔기는 부재하거나, 다른 아미노산 잔기로부터 선택될 수 있다. 표에 나타낸 경쇄 가변 도메인은 C-말단 아르기닌 잔기를 갖거나 갖지 않고서 발현될 수 있다. 이 잔기는 전형적으로 경쇄 가변 도메인을 경쇄 불변 도메인과 연결시키며 경쇄 가변 도메인 대신에 경쇄 불변 도메인의 일부로서 발현될 수 있다. 일부 경우에, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 아래 표에 열거된 가변 도메인 서열 중의 하나 이상과 약 50% 내지 약 99.9%의 서열 동일성(예컨대 약 50% 내지 약 60%, 약 55% 내지 약 65%, 약 60% 내지 약 70%, 약 65% 내지 약 75%, 약 70% 내지 약 80%, 약 75% 내지 약 85%, 약 80% 내지 약 90%, 약 85% 내지 약 95%, 약 90% 내지 약 99.9%, 약 95% 내지 약 99.9%, 약 97%, 약 97.5%, 약 98%, 약 98.5%, 약 99%, 약 99.5%, 약 99.6%, 약 99.7% 또는 약 99.8%)을 갖는 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 일부 경우에, 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 아래 표에 열거된 서열 중의 어느 것의 하나 이상의 단편을 갖는 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

표 2

가변 도메인 서열

항체 ID 번호	가변 도메인	서열	서열 번호
7D3-2C10	중쇄	QVQLLQYDAELVKPGGSVKISCKASGYTFTDHAIHWV KQKPEQGLEWIGYFSPGNDDIKYSEKFKGKATLTADKS SSTAYMQLNSLTSEDSAVFCKRSITTPYWGQGTLVTV SA	1
7D3-2C10	경쇄	DIQMNQSPSSLSASLGDTITITCHASQNINVWLSWYQQK PGNIPKLIIYKVSNLHTGVPSRFSGSGSGTGFTLTISLQ PEDIATYCCQDOSYPYTFGGGTKLKK	2
A5-2G12	중쇄	QVQLQQSDAELVKPGASVKISCKASGYTFTDHAIHWV KQKPEQGLEWIGYFSPGNDDIKYNEKFKGKATLTADKS SSTAYMQLNSLTSEDSAVFCKRSITTSYWGQGTLVTV SA	3
A5-2G12	경쇄	NIVMTQSPKSMSSMSVGERVTLCKASENVVIYVSWYQ QKPEQSPKLLIYGAASNRYTGVPDFRTGSGSATDFLTIS VQAEDLADYHCQGQYSYPYTFGGGTKLEIKR	4
1A5-2C9	중쇄	QVQLQQSDAELVKPGASVKISCKASGYTFTDHAIHWV KQKPEQGLEWIGYFSPGNDDIKYSEKFKGKATLTADK SSTAYMQLNSLTSEDSAVFCKRSIGDYWGQGTTLV VSS	5
1A5-2C9	경쇄	DIVMTQSQKFMSSSVGDRVTITCKASQNVGTAVAWYQ QKPGOSPKFLIASNRNTGVPDRFTGSGSGTDFTLTIS NMQSEDLADYFCQQYSSYRLTFGGGTKLEIKR	6
4D9-2C11	중쇄	QVQLQQSDAELVKPGASVKISCKASGYTFTDHAIHWV KQKPEQGLEWIGYFSPGNDDIKYSEKFKGKATLTADKS SSTAYMQLNSLTSEDSAVFCKRSIGGDHWQGTTLV VSS	7
4D9-2C11	경쇄	DIQMNQSPSSLSASLGDTITITCHASQNINVWLNWYQQ KPGNIPKLIIYKASNLHTGVPSRFSGSGSGTGFTLTIGSL QPEDIAFYCCQQQSYRPTFGGGTKLEIKR	8
2F4-1E2	중쇄	QVQLQQSDAELVKPGASVKISCKASGYTFTDHAIHWV KQKPEQGLEWIGYFSPGNDDIKYNEKFKGKATLTADKS SSTAYMQLNSLTSEDSAVFCKRSIGDYWGQGTTLV VSS	9
2F4-1E2	경쇄	DVVMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHSYGNTYL HWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVPDFRGSGSGTD TLKISRVEAEDLGVYFCSONTHVPTFGGGTKLEIKR	10
2F4-1H8	중쇄	QVQLQQSDAELVKPGASVKISCKASGYTFTDHAIHWV KQKPEQGLEWIGYFSPGNDDIKYNEKFKGKATLTADKS SSTAYMQLNSLTSEDSAVFCKRSIGDYWGQGTTLV VSS	9
2F4-1H8	경쇄	DVVMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHSYGNTYL HWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVPDFRGSGSGTD TLKISRVEAEDLGVYFCSONTHVPTFGGGTKLEIKR	10
2C6-2F11	중쇄	QVQLQQSDAELGKPGASVKISCKASGYTFSDHAIHWV KQKPEQGLEWIGYFSPGNDDIKYNEKFKGKATLTADKS SSTAYMQLNSLTSEDSAVFCKRSIGDVYWGQGTLV	11

[0206]

		VSA	
2C6-2F11	경 쇄	DVVMTQTPLSLTVSLGDQASISCRFSQLVQSNGNTYL QWYLOKPGQSPKLLIYKVSNRFCGVPDFRGSGSGSGTDF TLKISRVEAEDLGVYFCQSTHAPLTGAGTKLELK	12
2B2-2A7	중 쇄	QVQLQQSDAELVKPGASVKISCKTSGYTFTDHAIHWVK QKPEQGLEWIGYISPNGDIKYNEKFKGKATLTADKS STAYMQLSSLTPEDSAVYFCKISYYGIWGQGQGTLTVSS	13
2B2-2A7	경 쇄	DIQMTQSPASLSVVGESVTITCRLEDIYSNLAWFQQR PGKSPOLLVYKATNLADGVPSRFSGSGSGTQYSLKINSL QSEDFGTYYCQHFWGTPFTFGSGTKEIK	14
5G2-1B3	중 쇄	QVOLQQSDAELVKPGASVKISCKASGYTFTDHAIHWV KQKPEQGLEWIGYFSPGNDDIKYNEKFKGKATLTADKS STAYMQLSLTSEDSAVYFCRSYYGDWGQGQGTLTV SS	15
5G2-1B3	경 쇄	DIQMTQSPASLSVVGESVTITCRASENIYSHLAWSYQQ KQKSPOLLVYGAATNLADGVPSRFSGSGSGTQFSLKIH SLQSEDFGSYYCQHFWGAPFTFGSGTKEIK	16
7A6-2A2	중 쇄	QIQLQQSDAELVKPGTSVKMSCKASGYTFTDHAIHWV KQKPEQGLEWIGYFSPGNDDIKYNEKFKGKATLTADKS SSSTAYMQLNSLTSEDSAVYFCSVGYALDYWGLGTT TVSS	17
7A6-2A2	경 쇄	NIVMTQSPKSMMSMSVGERVTLTCKASENVVTVSWYQ QKPEQSPKLLIYGASNRVTGVPDRFTGSGSATDFTLTSS VQAEDLADYHCGQGYSYPYTFGGGTKEIKR	18
10C9-2G7	중 쇄	QVQLQQSDAELVKPGITVKISCKASGYTFTDHAIHWV KEKPEQGLEWIGYISPNGDIKYSEKFKGKATLTADKS STAYMQLNSLTSEDSAVYFCRSLSTPYWGQGTLTV SA	19
10C9-2G7	경 쇄	알려지지 않음	
1C11-2G9	중 쇄	알려지지 않음	
1C11-2G9	경 쇄	DIVMTQSPSLLTVTAGEKVTMSCRSSQSLNNSGNQKNY LTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDFRTGSGSGTD FTLISSVQAEDLAVYYCQNDYSYPYTFGGGTKEIKR	20
1F6-1B7 (또 한 1F6- 1C10 의 서열)	중 쇄	QVQLQQSDAELVKPGASVKISCKASGYTFTDHAIHWV MQMPEQGLEWIGYISPNGDVKYSERFKGRATLTADKS SSSSAYMQLNSLTSEDSAVYFCRSLSTPYWGQGTLVT VS	21
1F6-1B7 (또 한 1F6- 1C10 의 서열)	경 쇄	DIVMTQSPSLLTVTAGERVTMSCRSSQSLNNSGNQKSY LTWYQQKPGQPPKLLIISWASTRDSGVPDFRTGSGSGTD FTLISSVQAEDLAVYYCQSDYSYPYTFGGGTKEIKR	22
2G12-2B2	중 쇄	QVQLQQSDXELVKPGASVKISCKASGYTFTDHAIHWV KQKPEQGLEWIGYFSPGNDDIKYNEKFKGKATLTADKS STAYMQLNSLSSDDSAYFCRSLSTPYWGQGTLXTV SA	23
2G12-2B2	경 쇄	DIVMTQSPSLLTVTAGEKVTMSCRSSQSLNNGRNHKNY LTWYRKPKGLPPKLLIYWASTRESGVPDFRTGSGSGTD FTLISSVQAEDLAVYYCQNDYTYPYTFGGGTKEIKR	24
5E6-2E7	중 쇄	QVQLQQSDAELVKPGASMKISCKASGYTFTDHAIHWV KQKPEQGLEWIGYISPNGDIKYNEKFKGKATLTADKS STAYMQLNSLTSEDSAVYFCRSLSTPYWGQGTLTV SA	25
5E6-2E7	경 쇄	DIVMTQSPSLLTVTAGEKVTMSCRSSQSLNNGKTKNY LTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDFRTGSGSGTD FTLISSVQAEDLAVYYCQNDYSYPYTFGGGTKEIKR	26
9E5-1A8	중 쇄	QVQLQQSDAELVKPGASVKISCKTSGYTFTDHAIHWVK	27

[0207]

		QKPEQGLEWIGYISPGNDDIKYTEFKGKVTLTADKSSS TAYMQLNSLTSEDAVYFCRSITTPYWGQGTLVTVA	
9E5-1A8	경쇄	알려지지 않음	
9F11-1F7	중쇄	QVOLQQSDAELVKPGASMKISCKASGYFTDHAIHWV KQKPEQGLEWIGYISPGNGDIKYNEFKVKATLTADKS SSTAYMQLNSLTSEDAVYFCRSITTPYWGQGTLVTVA	25
9F11-1F7	경쇄	DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLNSGKTNY LTWYQQKPGOPPKLLIYWA STRESGVPDFRTGSGSGTD FTLTISSVQAEDLAVYYCKNDYSYPYTFGGGTKEIKR	26
10F4-2F2	중쇄	QVOLQQSDAELVKPGASVKISCKASGYFTDHAIHWV KQKPEQGLEWIGYISPGNGDIKYDEFKFGKATLTADKS SSTAYMQLNSLTSEDAVYFCRSITTSYWGQGTLVTVA	28
10F4-2F2	경쇄	NIVMTQSPKSMSSMSVGERVLTCKASENVVTTVSWYQ QKPEQSPKLLIYGA S NRYTGVPD RFTGSGSATDFTLT ISS VQAEDLADYHCGQGYS PYTFGGGTKEIKR	18
2B8-2F10	중쇄	QVOLQQSDAELVKPGASVKISCKASGYFTDHAIHWV KQKPEQGLEWIGYISPGNGDIKYNEFKFGKATLTADKS SSTAYMQLNSLTSEDAVYFCRSITTSYWGQGTLVTVA	29
2B8-2F10	경쇄	알려지지 않음	
4G8-1E3	중쇄	QVQLQQSDAELVKPGASVKISCKASGYIFTDHAIHWV KQKPEQGLEWIGYISPGNGDIKYNEFKFGKATLTADKS S TAYMHLNSLTSEDAVYFCRSITTSYWGQGTLVTVA	30
4G8-1E3	경쇄	DIQMNPQSPSSLASLGDTITITCHASQHINFWSWYQQK PGNIPKLLIYKA S NLHTVG P RSFSGSG GTGFTL T ISS EDVATYYCQ DQS Y PYMF GGGT KLEIKR	31
6B11-2E3	중쇄	QVQLQQSDAELVKPGASVKISCKASGYIFTDHAIHWV KQKPEQGLEWIGYISPGNGDIKYNEFKFGKATLTADKS S TAYMLLN S LTSEDAVYFCRSITTSYWGQGTLVTVA	32
6B11-2E3	경쇄	NIVMTQSPKSMSSMSVGERVLTCKASENVVTTVSWYQ QKPEQSPKLLIYGA S NRYTGVPD RFTGSGSATDFTLT ISS VQAEDLADYHCGQGYS PYTFGGGTKEIKR	18
8C2-2D6	중쇄	QVQLQQSDAELVKPGASVKISCKASGYIFTDHAIHWV KQKPEQGLEWIGYISPGNGDIKYNEFKFGKATLTADTS S TAYMQLNSLTSEDAVYFCRSITTSYWGQGTLVTVA	33
8C2-2D6	경쇄	NIVMTQSPKSMSSMSVGERVLTCKASENVVTTVSWYQ QKPEQSPKLLIYGA S NRYTGVPD RFTGSGSATDFTLT ISS VQAEDLADYHCGQGYS PYTFGGGTKEIKR	18
8C2-2D6	경쇄 (V2)	DIQMNPQSPSSLASLGDTITITCHASQHIN VWLSWYQQK PGNIPKLLIYKA S NLTYTG V P RSFSGSG GTGFTL T ISS PEDVATYYCQ H DQS Y PYTF GGGT KLEIK	34
7D4-2A2-2F2	중쇄	QVQLQQSDAELVKPGASVKISCKASGYIFTDHAIHWV KQKPEQGLEWIGYISPGNGDIKYIEKFRGKATLTADKSS S TAYMQLNSLTSEDAVYFCRSL ST PYWGQGTLVTVA	35
7D4-2A2-2F2	경쇄	NIILMTQSPKSMSSMSVGERVLTCKASENVVNNYVSWYQ QKPEQSPKLLIIFGA S NRYSGV P DRFTGSGSATDFTLT ISS VQAEDLADYHCGSKW IT S PYTF GGGT KLEIKR	36
7D4-1H12-2B3	중쇄	QVQLQQSDAELVKPGASVKISCKASGYIFTDHAIHWV KQKPEQGLEWIGYISPGNGDIKYIEKFRGKATLTADKSS S TAYMQLNSLTSEDAVYFCRSL ST PYWGQGTLVTVA	35

7D4-1H12-2B3	경쇄	NIILMTQSPKSMSSMSVGERVLTCKASENVVNNYVSWYQ QKPEQSPKLLIYGA S NRYSGV P DRFTGSGSATDFTLT ISS VQAEDLADYHCGARV T S PYTF GGGT KLEIKR	37
2C2-2C5	중쇄	QVQLQQSDAELVKPGT SVK ICR ASGY FTD HAIHWV K QKPEQGLEWIGYISPGNGDIKYNEFKFGKATLTADKS S TAYMQLNSLTSEDAVYFCRSIT TPYWGQGTL T VS	38
2C2-2C5	경쇄	SFVMTQTPKF L LLV SAGDR V T TCK A QS SV NN V AW Y Q QKPGOSPK Q LI Y Y A S N R Y T G V P D R F T G S G Y G T D F T F T Y TV Q A E D L A V Y F C Q Q G Y S S P W T F G G T K L K	39
10F4-2A9	중쇄	QVQLQQSDAELVKPGASVKISCKASGYIFTDHAIHWV KQKPEQGLEWIGYISPGNGDIKYDEKFGKATLTADKS S TAYMQLNSLTSEDAVYFCRSIT TSYWGQGTL V T V A	28
3F1	중쇄	QVQLQQSDAELVKPGASVKISCKASGYIFTDHAIHWV KQKPEQGLD W I G Y I S P G N G D I K Y N E F K D K V T L T A D K S S T A C M H L N S L T S E D A V Y F C R S L L A L D Y W G Q G T T L T V S S	40
3F1	경쇄	DIVMTQSHKFM S T V G D R V S I T C K A S Q D V G T N I A W Y Q QKPG R S P K V L I Y S A S T R H T G V P D R F T G S G S G T D F T L T I S N V Q S E D L T D Y F C Q Q Y S S P L T F G V G T K L E L K	41
3F1	중쇄 (C80S 돌연변이 를 가짐)	QVQLQQSDAELVKPGASVKISCKASGYIFTDHAIHWV KQKPEQGLD W I G Y I S P G N G D I K Y N E F K D K V T L T A D K S S T A S M H L N S L T S E D A V Y F C R S L L A L D Y W G Q G T T L T V S S	42

[0208]

일부 경우에, 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 아래 표에 열거된 CDR 아미노산 서열 중의 하나 이상을 포함할 수 있다. "X"로 나타낸 잔기는 부재하거나, 다른 아미노산 잔기로부터 선택될 수 있다. 일부 경우에, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 아래 표에 열거된 CDR 서열 중의 하나 이상과 약 50% 내지 약 99.9%의 서열

[0209]

[0210]

동일성(예컨대 약 50% 내지 약 60%, 약 55% 내지 약 65%, 약 60% 내지 약 70%, 약 65% 내지 약 75%, 약 70% 내지 약 80%, 약 75% 내지 약 85%, 약 80% 내지 약 90%, 약 85% 내지 약 95%, 약 90% 내지 약 99.9%, 약 95% 내지 약 99.9%, 약 97%, 약 97.5%, 약 98%, 약 98.5%, 약 99%, 약 99.5%, 약 99.6%, 약 99.7% 또는 약 99.8%)을 갖는 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 일부 경우에, 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 아래 표에 열거된 서열 중의 어느 것의 하나 이상의 단편을 갖는 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

표 3

CDR 서열

항체 ID 번호	CDR	서열	서열 번호
7A6-2A2	CDR-H1	GYTFTDHAIHWV	43
2B2-2A7	CDR-H1	GYTFTDHAIHWV	43
5G2-1B3	CDR-H1	GYTFTDHAIHWV	43
4D9-2C11	CDR-H1	GYTFTDHAIHWV	43
2F4-1E2	CDR-H1	GYTFTDHAIHWV	43
2F4-1H8	CDR-H1	GYTFTDHAIHWV	43
1A5-2C9	CDR-H1	GYTFTDHAIHWV	43
1F6-1B7 (또한 1F6-1C10 의 서열)	CDR-H1	GYTFTDHAIHWV	43
2C2-2C5	CDR-H1	GYTFTDHAIHWV	43
2G12-2B2	CDR-H1	GYTFTDHAIHWV	43
10C9-2G7	CDR-H1	GYTFTDHAIHWV	43
2C6-2F11	CDR-H1	GYTFSDHAIHWV	44
7D4-2A2-2F2	CDR-H1	GYIFTDHAIHWV	45
7D4-1H12-2B3	CDR-H1	GYIFTDHAIHWV	45
7D3-2C10	CDR-H1	GYTFTDHAIHWV	43
8C2-2D6	CDR-H1	GYTFTDHAIHWV	43
9E5-1A8	CDR-H1	GYTFTDHAIHWV	43
5E6-2E7	CDR-H1	GYTFTDHAIHWV	43
9F11-1F7	CDR-H1	GYTFTDHAIHWV	43
4G8-1E3	CDR-H1	GYIFTDHAIHWV	45

[0211]

10F4-2F2	CDR-H1	GYTFTDHAIHWV	43
10F4-2A9	CDR-H1	GYTFTDHAIHWV	43
6B11-2E3	CDR-H1	GYTFTDHAIHWV	43
2B8-2F10	CDR-H1	GYTFTDHAIHWV	43
7A5-2G12	CDR-H1	GYTFTDHAIHWV	43
7A6-2A2	CDR-H2	FSPGNDDIKY	46
2B2-2A7	CDR-H2	ISPGNGDIKY	47
5G2-1B3	CDR-H2	FSPGNDDIKY	46
4D9-2C11	CDR-H2	LSPGNDDIKY	48
2F4-1E2	CDR-H2	ISPGNGDIKY	47
2F4-1H8	CDR-H2	ISPGNGDIKY	47
1A5-2C9	CDR-H2	VSPGNNGDIKY	49
1F6-1B7 (또한 1F6-1C10 의 서열)	CDR-H2	ISPGNGDVKY	50
2C2-2C5	CDR-H2	ISPGNGDIKY	47
2G12-2B2	CDR-H2	FSPGNDDIKY	46
10C9-2G7	CDR-H2	ISPGNDDIKY	51
2C6-2F11	CDR-H2	ISPGNDDIKY	51
7D4-2A2-2F2	CDR-H2	ISPGNGDIKY	47
7D4-1H12-2B3	CDR-H2	ISPGNGDIKY	47
7D3-2C10	CDR-H2	FSPGNDDIKY	46
8C2-2D6	CDR-H2	ISPGNGDIKY	47
9E5-1A8	CDR-H2	ISPGNDDIKY	51
5E6-2E7	CDR-H2	ISPGNGDIKY	47
9F11-1F7	CDR-H2	ISPGNGDIKY	47
4G8-1E3	CDR-H2	ISPGNGDIKY	47
10F4-2F2	CDR-H2	ISPGNGDIKY	47
10F4-2A9	CDR-H2	ISPGNGDIKY	47
6B11-2E3	CDR-H2	ISPGNDDIKY	51
2B8-2F10	CDR-H2	ISPGNDDIKY	51
7A5-2G12	CDR-H2	ISPGNDDIKY	51
7A6-2A2	CDR-H3	SVGYALDY	52
2B2-2A7	CDR-H3	KJSYYGI	53
5G2-1B3	CDR-H3	KRSYYGD	54
4D9-2C11	CDR-H3	KRSIGGDH	55
2F4-1E2	CDR-H3	QRQLGQGY	56
2F4-1H8	CDR-H3	QRQLGQGY	56
1A5-2C9	CDR-H3	KRSLIGDY	57
1F6-1B7 (또한 1F6-1C10 의 서열)	CDR-H3	KRSLSTPY	58
2C2-2C5	CDR-H3	KRSITTPY	59
2G12-2B2	CDR-H3	KRSLSTPY	58
10C9-2G7	CDR-H3	KRSLSTPY	58
2C6-2F11	CDR-H3	ERSMIGVY	60
7D4-2A2-2F2	CDR-H3	KRSLSTPY	58
7D4-1H12-2B3	CDR-H3	KRSLSTPY	58
7D3-2C10	CDR-H3	KRSITTPY	59
8C2-2D6	CDR-H3	KRSITTSY	61
9E5-1A8	CDR-H3	KRSITTPY	59
5E6-2E7	CDR-H3	KRSITTPY	59
9F11-1F7	CDR-H3	KRSITTPY	59
4G8-1E3	CDR-H3	KRSITTSY	61
10F4-2F2	CDR-H3	KRSITTSY	61

[0212]

10F4-2A9	CDR-H3	KRSITTSY	61
6B11-2E3	CDR-H3	KRSITTSY	61
2B8-2F10	CDR-H3	KRSITTSY	61
7A5-2G12	CDR-H3	KRSITTSY	61
7A6-2A2	CDR-L1	ENVVTY	62
2B2-2A7	CDR-L1	EDIYSN	63
5G2-1B3	CDR-L1	ENIYSH	64
4D9-2C11	CDR-L1	QNINVW	65
2F4-1E2	CDR-L1	QSLVHSYGN TY	66
2F4-1H8	CDR-L1	QSLVHSYGN TY	66
1A5-2C9	CDR-L1	QNVGTA	67
1F6-1B7 (또한 1F6-1C10 의 서열)	CDR-L1	QSLLNSGNQKSY	68
2C2-2C5	CDR-L1	QSVNNN	69
2G12-2B2	CDR-L1	QSLLNRGNHKNY	70
2C6-2F11	CDR-L1	QSLVQSNGNTY	71
7D4-2A2-2F2	CDR-L1	ENVVNY	72
7D4-1H12-2B3	CDR-L1	ENVVNY	72
7D3-2C10	CDR-L1	QNINVW	65
8C2-2D6	CDR-L1	ENVVTY	62
5E6-2E7	CDR-L1	QSLLNSGKTKNY	73
9F11-1F7	CDR-L1	QSLLNSGKTKNY	73
4G8-1E3	CDR-L1	QHINFW	74
10F4-2F2	CDR-L1	ENVVTY	62
10F4-2A9	CDR-L1	ENVVTY	62
6B11-2E3	CDR-L1	ENVVTY	62
7A5-2G12	CDR-L1	ENVVIY	75
1C11-2G9	CDR-L1	QSLLNSGNQKN Y	76
7A6-2A2	CDR-L2	GASNRYT	77
2B2-2A7	CDR-L2	KATNLAD	78
5G2-1B3	CDR-L2	GATNLAD	79
4D9-2C11	CDR-L2	KASNLHT	80
2F4-1E2	CDR-L2	KVSNRFS	81
2F4-1H8	CDR-L2	KVSNRFS	81
1A5-2C9	CDR-L2	SASNRYT	82
1F6-1B7 (또한 1F6-1C10 의 서열)	CDR-L2	WASTRDS	83
2C2-2C5	CDR-L2	YASNRYT	84
2G12-2B2	CDR-L2	WASTRES	85
2C6-2F11	CDR-L2	KVSNRFC	86
7D4-2A2-2F2	CDR-L2	GASNRYS	87
7D4-1H12-2B3	CDR-L2	GASNRYS	87
7D3-2C10	CDR-L2	KVSNLHT	88
8C2-2D6	CDR-L2	GASNRYT	77
5E6-2E7	CDR-L2	WASTRES	85
9F11-1F7	CDR-L2	WASTRES	85
4G8-1E3	CDR-L2	KASNLHT	80
10F4-2F2	CDR-L2	GASNRYT	77
10F4-2A9	CDR-L2	GASNRYT	77
6B11-2E3	CDR-L2	GASNRYT	77
7A5-2G12	CDR-L2	GASNRYT	77
1C11-2G9	CDR-L2	WASTRES	85
7A6-2A2	CDR-L3	GQGYSYPYT	89

[0213]

2B2-2A7	CDR-L3	QHFWGTPFT	90
5G2-1B3	CDR-L3	QHFWGAPFT	91
4D9-2C11	CDR-L3	QQGQSYPFT	92
2F4-1E2	CDR-L3	SQNTHVPYT	93
2F4-1H8	CDR-L3	SQNTHVPYT	93
1A5-2C9	CDR-L3	QQYSSYRLT	94
1F6-1B7 (또한 1F6-1C10 의 서열)	CDR-L3	QSDYSYPYT	95
2C2-2C5	CDR-L3	QQGYSSPWT	96
2G12-2B2	CDR-L3	QNDYTYPYT	97
2C6-2F11	CDR-L3	SQSTHAPLT	98
7D4-2A2-2F2	CDR-L3	GSKWITSYPYT	99
7D4-1H12-2B3	CDR-L3	GARVTSYPYT	100
7D3-2C10	CDR-L3	QQDQSYPYT	101
8C2-2D6	CDR-L3	GQGYSYPYT	89
5E6-2E7	CDR-L3	KNDYSYPYT	102
9F11-1F7	CDR-L3	KNDYSYPYT	102
4G8-1E3	CDR-L3	QQDQSYPYM	103
10F4-2F2	CDR-L3	GQGYSYPYT	89
10F4-2A9	CDR-L3	GQGYSYPYT	89
6B11-2E3	CDR-L3	GQGYSYPYT	89
7A5-2G12	CDR-L3	GQGYSYPYT	89
1C11-2G9	CDR-L3	QNDYSYPYT	104

[0214]

[0215]

일부 경우에, 본 기재내용의 항체는 아래 표에 열거된 CDR 서열 그룹으로부터의 하나 이상의 CDR 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 도메인을 포함할 수 있다. "X"로 나타낸 잔기는 부재하거나, 다른 아미노산 잔기로부터 선택될 수 있다. 일부 경우에, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 아래 표에 열거된 CDR 서열 중의 하나 이상과 약 50% 내지 약 99.9%의 서열 동일성(예컨대 약 50% 내지 약 60%, 약 55% 내지 약 65%, 약 60% 내지 약 70%, 약 65% 내지 약 75%, 약 70% 내지 약 80%, 약 75% 내지 약 85%, 약 80% 내지 약 90%, 약 85% 내지 약 95%, 약 90% 내지 약 99.9%, 약 95% 내지 약 99.9%, 약 97%, 약 97.5%, 약 98%, 약 98.5%, 약 99%, 약 99.5%, 약 99.6%, 약 99.7% 또는 약 99.8%)을 갖는 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 일부 경우에, 항체는 아래 표에 열거된 서열 중의 어느 것의 하나 이상의 단편을 갖는 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

표 4

VH CDR 서열 그룹

클론 ID	CDR-H1	서열 번호	CDR-H2	서열 번호	CDR-H3	서열 번호
8C2-2D6	GYTFTDHAIH	105	YISPGNGDIKYNEKFKG	107	SITTSY	114
4G8-1E3	GYIFTDHAIH	106	YISPGNGDIKYNEKFKG	107	SITTSY	114
2G12-2B2	GYTFTDHAIH	105	YFSPGNDDIKYNEKFGR	108	SLSTPY	115
5G2-1B3	GYTFTDHAIH	105	YFSPGNDDIKYNEKFKV	109	SYYGD	116
5E6-2E7	GYTFTDHAIH	105	YISPGNGDIKYNEKFKV	110	SITTPY	117
2C2-2C5	GYTFTDHAIH	105	YISPGNGDIKYNEKFKG	107	SITTPY	117
9F11-1F7	GYTFTDHAIH	105	YISPGNGDIKYNEKFKV	110	SITTPY	117
1F6-1C10	GYTFTDHAIH	105	YISPGNGDVKYSERFKG	137	SLSTPY	115
7D3-2C10	GYTFTDHAIH	105	YFSPGNDDIKYSEKFKG	138	SITTPY	117
7A5-2G12	GYTFTDHAIH	105	YISPGNDDIKYNEKFKG	113	SITTSY	114
10F4-2A9	GYTFTDHAIH	105	YISPGNGDIKYDEKFKG	139	SITTSY	114
2F4-1E2	GYTFTDHAIH	105	YISPGNGDIKYNEKFKG	107	QLGQGY	140
2C6-2F11	GYTFSDHAIH	136	YISPGNDDIKYNEKFKG	113	SMIGVY	141
6B11-2E3	GYTFTDHAIH	105	YISPGNDDIKYNEKFKG	113	SITTSY	114
3F1	GYTFTDHAIH	105	YISPGNGDIKYNEKFKD	111	SLLALDY	118
CC49	GYTFTDHAIH	105	YFSPGNDDFKYNEKFKG	112	SLNMAY	119
B72.3	GYTFTDHAIH	105	YISPGNDDIKYNEKFKG	113	SYYGH	120
컨센서스	GYTFTDHAIH	105	YISPGNGDIKYNEKFKG	107	SITTSY	114

[0216]

[0217]

일부 경우에, 본 기재내용의 항체는 아래 표에 열거된 CDR 서열 그룹으로부터의 하나 이상의 CDR 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 도메인을 포함할 수 있다. "X"로 나타낸 잔기는 부재하거나, 다른 아미노산 잔기로부터 선택될 수 있다. 일부 경우에, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 아래 표에 열거된 CDR 서열 중의 하나 이상과 약 50% 내지 약 99.9%의 서열 동일성(예컨대 약 50% 내지 약 60%, 약 55% 내지 약 65%, 약 60% 내지 약 70%, 약

65% 내지 약 75%, 약 70% 내지 약 80%, 약 75% 내지 약 85%, 약 80% 내지 약 90%, 약 85% 내지 약 95%, 약 90% 내지 약 99.9%, 약 95% 내지 약 99.9%, 약 97%, 약 97.5%, 약 98%, 약 98.5%, 약 99%, 약 99.5%, 약 99.6%, 약 99.7% 또는 약 99.8%)을 갖는 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 일부 경우에, 항체는 아래 표에 열거된 서열 중의 어느 것의 하나 이상의 단편을 갖는 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

표 5

VL CDR 서열 그룹

클론 ID	CDR-L1	서열 번호	CDR-L2	서열 번호	CDR-L3	서열 번호
8C2-2D6	KASENVVVTYVS	121	GASNRYT	77	GQGYSYPYTT	89
8C2-2D6(V2)	HASQNINVWLS	142	KASNLYT	147	QHDQSYPTY	148
4G8-1E3	HASQHINFWLS	122	KASNLHT	80	QQDQSYPYPM	103
2G12-2B2	KSSQSLLNNGKTNKYLT	123	WASTRES	85	QNNDYTYPYTT	97
5G2-1B3	RASENIYSHLA	124	GATNLAD	79	QHFWGAPFT	91
5E6-2E7	KSSQSLLNNSGKTKNYLT	125	WASTRES	85	KNDYSYPYTT	102
2C2-2C5	KASQSVNNNVA	126	YASNRYT	84	QQGYSSPWT	96
1F6-1C10	KSSQSLLNNSGNQKSYLT	143	WASTRDS	83	QSDYSYPYTT	95
7D3-2C10	HASQNINVWLS	142	KVSNLHT	88	QQDQSYPYTT	101
7A5-2G12	KASENVVIYVS	144	GASNRYT	77	GQGYSYPYTT	89
10F4-2A9	KASENVVVTYVS	121	GASNRYT	77	GQGYSYPYTT	89
2F4-1E2	RSSQSLVHSYGNNTYLH	145	KVSNRFS	81	SQNTHVPYT	93
2C6-2F11	RFSQSLVQSNNGNTYQL	146	KVSNRFC	86	SQSTHAPLT	98
6B11-2E3	KASENVVVTYVS	121	GASNRYT	77	GQGYSYPYTT	89
3F1	KASQDVGTNIA	127	SASTRHT	130	QQYSSFPLT	133
CC49	KSSQSLLYSGNQKNYLA	128	WASARES	131	QQYYSYPLT	134
B72.3	RASENIYSNLA	129	AATNLAD	132	QHFWGTPYT	135

[0218]

일부 경우에, 본 발명의 항체 또는 항원 결합 단편은 아래 표에 열거된 가변 도메인 서열 중의 하나 이상을 포함하는 뉴클레오티드 서열에 의해 암호화될 수 있다. "N"으로 표기된 잔기는 부재하거나 뉴클레오티드 A, C, G 또는 T로부터 선택될 수 있다. 일부 경우에, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 아래 표에 열거된 가변 도메인 서열 중의 하나 이상과 약 50% 내지 약 99.9%의 서열 동일성(예컨대 약 50% 내지 약 60%, 약 55% 내지 약 65%, 약 60% 내지 약 70%, 약 65% 내지 약 75%, 약 70% 내지 약 80%, 약 75% 내지 약 85%, 약 80% 내지 약 90%, 약 85% 내지 약 95%, 약 90% 내지 약 99.9%, 약 95% 내지 약 99.9%, 약 97%, 약 97.5%, 약 98%, 약 98.5%, 약 99%, 약 99.5%, 약 99.6%, 약 99.7% 또는 약 99.8%)을 갖는 서열을 포함하는 뉴클레오티드 서열에 의해 암호화될 수 있다. 일부 경우에, 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 아래 표에 열거된 서열 중의 어느 것의 하나 이상의 단편을 포함하는 뉴클레오티드 서열에 의해 암호화될 수 있다.

표 6

가변 도메인 뉴클레오티드 서열

항체 ID 번호	가변 쇄	서열	서열 번호
7D3-2C10	중쇄	CAGGTTCAGTTGCTGCAGTATGACGCTGAGTTGGTG AAACCTGGGGGGTCAGTGAAGATATCGTGCAAGGC CTCTGGCTACACCTCACTGACCATGCTATTCACTGG GTGAAGCAGAACGCTGAACAGGGCTGGATGGAT TGGATAATTTCTCCCGGAAATGATGATATTAAGTA CACTGAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACACTGACTG CAGACAAGTCCCTCAGCACTGCCTACATGCAGCTCA ACAGCCTGACATCTGAGGATTCTGCAGTGTTATTCT GTAAAAGATCCATTACTACGCCCTACTGGGGCAAG GGACTCTGGTCACTGTCTGCA	149
7D3-2C10	경쇄	GACATCCAGATGAACCAGTCTCCATCCAGTCTGTCT GCATCCCTGGAGACACAATTACCATCACTGCCAT GCCAGTCAGAACATTAAATGTTGGTTAACGCTGGTAC CAGCAGAAACCAAGGAAATATTCTAAACTATTGATC TATAAGGTTCCAACTTGCACACAGGCGTCCCATCA AGGTTTAGTGGCAGTGGATCTGGAACAGGTTTCACA TTAACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGACATTGCC ACTTACTACTGTCAACAGGATCAAAGTTATCCGTAC ACGTTGGAGGGGGACCAAGCTGAAAAAAA	150

[0220]

7A5-2G12	중성	CAGGTTCAGCTGCAGCAGTCTGACGCTGAGTTGGTG AAACCTGGGCTTCAGTGAAGATATCCTGCAAGGCC TCTGGCTACACCTCACTGACCAGTGTATTCACTGG GTGAAGCAGAACGCTGAACAGGGCCTGGAATGGAT TGGATATATTCTCCCGAAATGATGATATTAAGTA CAATGAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACACTGACTG CAGACAAATCCCTCAGCACTGCCTACATGCAGCTCA ACAGCCTGACATCTGAGGATTCTGCAGTGTATTCT GTAAAAGATCCATTACTACAGTCTACTGGGCCAAG GGACTCTGGTCACTGTCTGCA	151
7A5-2G12	경성	AACATTGTAATGACCCAATCTCCAAATCCATGTCC ATGTCAGTAGGGAGAGAGGGTCACCTTGACCTGCAA GGCCAGTGAGAATGTGGTTATTATGTTCTGGTA TCAACAGAAACAGAGCAGTCTCCTAAACTGCTGAT ATACGGGGCATCCAACCGGTACACTGGGGTCCCCGA TCGCTTCACAGGCAGTGGATCTGCAACAGATTTCAC TCGACCATCAGCAGTGTGCAAGGCTGAAGACCTTGC AGATTATCACTGTGGACAGGGTACAGCTATCCGTA CACGTTGGAGGGGGACCAAGCTGGAAATAAACAC G	152
1A5-2C9	중성	CAGGTTCAGTTGCAGCAGTCTGACGCTGAGTTGGTG AAACCTGGGCTTCAGTGAAGATATCCTGCAAGGCC TCIIGGCTACACCTCACTGACCAGTGCCTATTG GTGAAGCAGAACGCTGAACAGGGCCTGGAATGGAT TGGATATTTCTCCCGAAATGGTATATTAAGTA CAATGAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACACTGACTG CAGACAAATCCCTCAGCACTGCCTACATGCAGCTCA ACAGCCTGACATCTGAGGATTCTGCAGTGTATTCT GTAAAAGATCTTAATTGGAGACTATTGGGCCAAG GCACCACTCTCACAGTCTCCTCA	153
1A5-2C9	경성	GACATTGTGATGACCCAGTCTCAAAATTCTATGTCC TCATCAGTAGGGAGACAGGGTCACCATCACCTGCAAG GCCAGTCAGAATGTGGGTACTGCTGTAGCCTGGTAT CAACAGAAACCCAGGACAATCTCTAAATTCTGATT TACTCGGCATCCAATCGGTACACTGGAGTCCCTGAT CGCTTCACAGGCAGTGGATCTGGACAGATTTCACT CTCACGATCAGCAATATGCACTGTGAACAGACCTGGCA GATTATTCTGCCAGCAATATAGCAGCTATCGTCTG ACGTTGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAAC	154
4D9-2C11	중성	CAGGTTCAGCTGCAGCAGTCTGACGCTGAGTTGGTG AAACCTGGGCTTCAGTGAAGATATCCTGCAAGGCC TCTGGCTACACCTCACTGACCAGTGTATTCACTGG GTGAAGCAGAACGCTGAACAGGGCCTGGAATGGAT TGGATATTTCTCCCGAAATGGTATATTAAGTA CAATGAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACACTGACTG CAGACAAATCCCTCAGCACTGCCTACATGCAGCTCA ACAGCCTGACATCTGAGGATTCTGCAGTGTATTCT GTAAAAGATCCATAGGGGGGACCAACTGGGCCAAG GGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA	155
4D9-2C11	경성	GACATCCAGATGAAACCACTGCTCCATCCAGTCTGTCT GCATCCCTGGAGACACAATTACCATCACCTGCCAT GCCAGTCAGAACATTAATGTTGGTAAACTGGTAC CAGCAGAAACCCAGGAAATATCCTAAACTATTGATC TATAAGGGCTTCAACTTGCACACAGGGCTCCCATCA AGGTTAGTGGCAGTGGATCTGGAACAGGTTTCACA TTAACCATCGGCAGCCTGCAAGCTGAAGACATTGCC ACTTACTACTGTCAACAGGGCAAAGTATCCGTTC ACGTTGGAGGGGGACCAAGCTGGAAATAAACCG	156

2F4-1E2	종 쇄	CAGGTTCAGCTGCAGCAGTCTGACGCTGAGTTGGTG AAACCTGGGCTTCAGTGAAGATATCCTGCAAGGCT TCTGGCTACACCTTCACTGACCATGCTATTCACTGG GTGAAACAGAACGCTGAACAGGGCCTGGAATGGAT TGGATATATTCCTCCCGAAATGGTATTAAGTA TAATGAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACACTGACTG CAGACAAATCCTCCAGCACTGCCTACATGCAGCTCA ACAGCCTGACATCTGAGGATCTGCAGTGTATTCT GTCAAAGACAACGGACAGGCTACTGGGCCAA GGCACCAACTCTCACAGTCTCCTCA	157
2F4-1E2	경 쇄	GATGTTGATGACCCAACTCCACTCTCCCTGCCT GTCAGTCTGGAGATCAAGCCTCCATCTTGCAGA TCTAGTCAGAGCCTGTACACAGTTATGGAAACACC TATTACATTGGTACCTGCAGAACGCCAGGCCAGTCT CCAAAGCTCCTGATTACAAAGTTCCAACCGATT TCTGGGTCCCAGACAGGTCAGTGGCAGTGGATCA GGGACAGATTTCACACTCAAGATCAGCAGAGTGG GGCTGAGGATCTGGAGTTATTCTGCTCTCAAAA TACACATGTTCCGTACACGTTGGAGGGGGACCAA GCTGGAATAAACG	158
2F4-1H8	종 쇄	CAGGTTCAGCTGCAGCAGTCTGACGCTGAGTTGGTG AAACCTGGGCTTCAGTGAAGATATCCTGCAAGGCT TCTGGCTACACCTTCACTGACCATGCTATTCACTGG GTGAAACAGAACGCTGAACAGGGCCTGGAATGGAT TGGATATATTCCTCCCGAAATGGTATTAAGTA TAATGAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACACTGACTG CAGACAAATCCTCCAGCACTGCCTACATGCAGCTCA ACAGCCTGACATCTGAGGATCTGCAGTGTATTCT GTCAAAGACAACGGACAGGCTACTGGGCCAA GGCACCAACTCTCACAGTCTCCTCA	157
2F4-1H8	경 쇄	GATGTTGATGACCCAACTCCACTCTCCCTGCCT GTCAGTCTGGAGATCAAGCCTCCATCTTGCAGA TCTAGTCAGAGCCTGTACACAGTTATGGAAACACC TATTACATTGGTACCTGCAGAACGCCAGGCCAGTCT CCAAAGCTCCTGATTACAAAGTTCCAACCGATT TCTGGGTCCCAGACAGGTCAGTGGCAGTGGATCA GGGACAGATTTCACACTCAAGATCAGCAGAGTGG GGCTGAGGATCTGGAGTTATTCTGCTCTCAAAA TACACATGTTCCGTACACGTTGGAGGGGGACCAA GCTGGAATAAACG	158
2C6-2F11	종 쇄	CAGGTTCAGCTGCAGCAGTCTGACGCTGAGTTGGGG AAACCTGGGCTTCAGTGAAGATATCCTGCAAGGCT TCTGGCTACACCTTCACTGACCATGCTATTCACTGG GTGAAGCAGAACGCCATGACAGGGCCTGGAATGGAT TGGATATATTCCTCCCGAAACGATGATTAAGTA CAATGAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACACTGACTG CAGACAAATCCTCCAGCACTGCCTACATGCAGCTCA ACAGCCTGACATCTGAGGATCTGCAGTGTATTCT GTGAAAGATCGATGATTGGGGTTACTGGGGCAAG GGACTCTGGTACTGTCTGCA	159
2C6-2F11	경 쇄	GATGTTGATGACCCAACTCCACTCTCCCTGACT GTCAGTCTGGCGATCAAGCCTCCATCTTGCAGA TTTAGTCAGAGCCTGTACAAAGTAATGGAAATACC TATTACAGTGGTATCTGCAGAACGCCAGGCCAGTCT CCAAAGCTCCTGATTACAAAGTCTCCAACCGATT TGTGGGGTCCCAGACAGGTCAGTGGCAGTGGATCA GGGACAGATTTCACACTCAAGATCAGCAGAGTGG GGCTGAGGATCTGGAGTTATTCTGCTCTCAAAG	160

		TACACATGCTCGCTCACGTTGGTGGGACCAA GCTGGAGCTGAAAC	
2B2-2A7	중쇄	CAGGTTCAGCTGCAGCAGTCTGACGCTGAGTTGGTG AAACCTGGGGCTTCAGTGAAGATATCCTGCAAGACT TCTGGCTACACCTTCACTGACCATGCAATTCACTGG GTGAAGCAGAACGCCCTGAACAGGGCCTGGAATGGAT TGATATATTCTCCCGAAATGGTATTAAGTA CAATGAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACCCCTGACTG CAGACAAATCCTCAGCACTGCCTATATGCACTCA GCAGCCTGACACCTGAGGATTCTGCAGTGTATTCT GTAAAATATCTTACTACGTATTGGGCAAGGCA CCACTCTCACAGTCTCCCA	161
2B2-2A7	경쇄	GACATCCAGATGACTCAGTCTCCAGCCTCCATCT GTATCTGTGGAGAGTCTGTCACCATCACATGTCGA CTAAGTGAAGATATTCAGTAATTAGCATGGTT CAGCAGAGACCGGGAAATCTCCTCAGCTCCGGTT TATAAAGCAACAAACTTAGCAGACGGTGTGCCATCA AGGTCAGTGGCAGTGGATCAGGCACACAGTATTCC CTCAAGATCAACAGCCTGCAGTCTGAAGATTGGG ACTTATTACTGTCAACATTGGGGTACTCCATTCA CGTCGGCTCGGGGACCAAGGTGAAATAAAC	162
5G2-1B3	중쇄	CAGGTTCAGCTGCAGCAGTCTGACGCTGAGTTGGTG AAACCTGGGGCTTCAGTGAAGATATCCTGCAAGGCT TCTGGCTACACCTTCACTGACCATGCTATTCACTGG GTGAAGCAGAACGCCCTGAACAGGGCCTGGAATGGAT TGATATTTCTCCCGAAATGATGATTAAGTA TAATGAGAAGTTCAAGGTCAAGGCCACACTGACTGC AGACAAATCCTCAGCACTGCCTACATGCAACTCAC CAGCCTGACATCTGAAGATTCTGCAGTGTATTCTG TAAAAGATCTTACTACGGTATTGGGCAAGGCAC CACTCTCACAGTCTCCCA	163
5G2-1B3	경쇄	GACATCCAGATGACTCAGTCTCCAGCCTCCATCT GTTCCTGTGGAGAAACTGTCACCATCACATGTCGA GCAAGTGAAGATATTCAGTCATTAGCATGGTAT CAACAGAAACAGGGAAATCTCCTCAACTCCTGGTC TATGGTGCACACTAACCTAGCAGATGGTGTGCCATCA AGGTCAGTGGCAGTGGATCAGGCACACAGTTTCC CTCAAGATCCACAGCCTGCAGTCTGAAGATTGGG AGITATTACTGTCAACATTGGGGTGTCCATTCA CGTCGGCTCGGGGACAAAGTGGAAATAAAC	164
7A6-2A2	중쇄	CAAATTCAAGCTGCAGCAGTCTGACGCTGAGTTGGTG AAACCTGGGACTTCAGTGAAGATGTCTGCAAGGCT TCTGGCTACACCTTCACTGACCATGCTATTCACTGG GTGAAGCAGAACGCCCTGAACAGGGCCTGGAATGGAT TGATATTTCTCCCGAAATGATGATTAAGTA TAATGTGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACACTGACTGC AGACAAATCCTCAGCACTGCCTACATGCACTCAA CAGCCTGACATCTGAAGATTCTGCAGTGTATTCTG TTCGGTGGGATACGCCCTTGACTACTGGGCTAGG CACCACCTCACAGTCTCCCA	165
7A6-2A2	경쇄	AACATTGTAAATGACCCAATCTCCCAAATCCATGTCC ATGTCAGTAGGAGAGAGGGTCACCTTGACCTGCAA GGCCAGTGAGAATGTGGTTACTTATGTTCTGGTA TCAACAGAAACCAGAGCAGTCTCCTAAACTGCTGAT ATACGGGGCATCCAACCGGTACACTGGGTCGGCGA TCGCTTCACAGGCAGTGGATCTGCAACAGATTTCAC TCTGACCATCAGCAGTGTGCAGGCTGAAGACCTTGC AGATTACTACTGTGGACAGGGTACAGCTATCCGTA	166

		CACGTTCGGAGGGGGACCAAGCTGAAATAAAC G	
10C9-2G7	중쇄	CAGGTTCACTGCAACAGTCTGACGCTGAGTTGGTG AAACCTGGACTACAGTGAAGATATCCTGCAAGGCT TCTGGCTACACTTCACTGACCAGTGTATTCACTGGG TGAAGGAGAAGCCTGAACAGGGCCTGGAATGGATC GGATATATTCTCCCGAAATGATGATATTAAGTAC AGTGAGAAGTCAAGGGCAAGGCCACACTGACTGC AGACAAATCCTCCAGCACTGCTTACATGCAGCTCAA CAGCCTGACATCTGATGATCTGCAGTGTATTCTGT AAAAGATCGCTTAGTACGCCCTACTGGGGCAAGGG ACTCTGGTCACTGTCTCTGCA	167
10C9-2G7	경쇄	TTTTAATACGACTCCCTATAGGGCAAGCAGTGGTA TCAATGCAGATTACAAGGGGAAAGGCATCAGACC AGCATGGGCATCAAGGTGGAATCACAGACTCTGGTC TTCATATCCATACTGTTGGTTATATGGAGCTGATG GGAACACATTAATGACCCAATCTCCCACATCCATGT ACATGTCAGTAGGGAGAGAGGGTCACCTGACTTGCA AGGCCAGTGAAGAATGAGATTAATTATGTTCCCTGGT ATCAACAGAACCCAGAGCAGTCTCTAAACTGTTGA TATACGGGGCATCAACCCGTAICTCTGGGTCCCCG ATCGCTTCACAGGCACTGCAACAGATTICA CTCTGACCATCAGCAGTGTGCAGGCTGAAGACCTTG CAGATTATCCCTGTGGAGCAAGGGATTAACTAGCTA TCCGTACACGTTGGAGGGGGACCAAGCTGGAAA TAAAACGGGC	168
1C11-2G9	중쇄	알려지지 않음	
1C11-2G9	경쇄	GACATTGTGATGACACAGTCTCCATCCTCCCTGACT GTGACAGCAGGAGAGAAGGTCACTATGAGCTGCAG GTCCAGTCAGAGTCTGTTAACAGTGGAAATCAAAA GAACACTTGAACCTGGTACCCAGCAGAAACCAGGGC AGCCTCCTAAACTGTTGATCTACTGGGCATCCACTA GGGAATCTGGGGTCCCTGATCGCTTACAGGCAGTG GATCTGGAACAGATTCACTCTCACCATCAGCAGTG TGCAGGCTGAAGACCTGGCAGTTATTACTGTCAGA ATGATTATAGTTATCCGTACACGTTGGAGGGGGGA CCAAGCTGGAAATAAAACG	169
1F6-1B7 (또한 1F6- 1C10 의 서열)	중쇄	CAGGTTCACTGCAACAGTCTGACGCTGAGTTGGTG AAACCTGGGGCTCACTGAAAGATATCCTGCAAGGCT TCTGGCTACACCTCACTGACCAGTGTATTCACTGG GTGATGCAAGTGCCTGAACAGGGCCTGGAATGGATT GGATATATTCTCCCGAAATGGTGTGTTAAGTAC AGTGAGAGGTTCAAGGGCAGGGCCACACTGACTGC AGACAAATCCTCCAGCTGCTTACATGCAGCTCAA CAGCCTGACATCTGAGGATTCTGCAGTTATTCTGT AAAAGATCGCTTAGTACGCCCTACTGGGGCAAGGG ACTCTGGTCACTGTCTCTG	170
1F6-1B7 (또한 1F6- 1C10 의 서열)	경쇄	GACATTGTGATGACACAGTCTCCATCCTCCCTGACT GTGACAGCAGGAGAGAGGGTCACTATGAGCTGCAA GTCCAGTCAGAGTCTGTTAACAGTGGAAATCAAAA GAGCTACTTGAACCTGGTACCCAGCAGAAACCAGGGC AGCCTCCTAAACTGTTGATCTCCTGGGCATCCACTA GGGATTCTGGGGTCCCTGATCGCTTACAGGCAGTG GATCTGGAACAGATTCACTCTCACCATCAGCAGTG TGCAGGCTGAAGACCTGGCAGTTATTACTGTCAGA GTGATTATAGTTATCCGTACACGTTGGAGGGGGGA CCAAGCTGGAAATAAAACG	171

2G12-2B2	중 쇄	CAGGTTCAGCTGCAGCAGTCTGACGNTGAGTTGGTG AAACCGGGGGCTTCAGTGAAGATATCCTGTAAGGCT TCTGGCTACACCTCACTGACCAGTCTATTCACTGG GTGAAGCAGAAGCCTGAACAGGGCCTGGAATGGAT TGGATATTTCTCCCGAAATGATGATATTAAAGTA CAATGAGAAGTTAGGGCAAGGCCACACTGACTG CAGACAATCTCCAGCACTGCCTACATGCAGCTCA ACAGCCTGTCACTGATGATTCTGCAGTGTATTCTG TAAAAGATGCCCTAGTACGCCCTACTGGGGCAAGG GACTCTGGNCACTGTCTCTGCA	172
2G12-2B2	경 쇄	GACATTGTGATGACACAGTCTCCATCCTCCCTGACT GTGACAGCAGGAGAGAAAGTCACTATGAGCTGCAA GTCCAGTCAGAGTCTGTTAACCGTGGAAATCATAA GAACTACTTGCACCTGGTACCGGCAGAAACCAGGGCT GCCTCTAAACTGTGATTACTGGGCATCCACTAG GGAATCTGGGTCCCTGATCGCTTACAGGCAGTGG ATCTGGAACAGATTTCGCTCTCACCATCAGCAGTGT TCAGGCTGAAGACCTGGCAGTTATTACTGTCAAGAA TGATTATACTTATCCGTACACGTTGGAGGGGGGAC CAAGCTGGAGATAAAACG	173
5E6-2E7	중 쇄	CAGGTTCAGCTGCAGCAGTCTGACGCTGAGTTGGTG AAACCTGGGGCTTCAGTGAAGATTTCTGCAAGGCT TCTGGCTACACCTCACTGACCAGTCTATTCACTGG GTGAAGCAGAAGCCTGAACAGGGCCTGGAATGGAT TGGATATTTCTCCCGAAATGGTGTATTAAAGTA CAATGAGAAGTCAAGGTCAAGGCCACACTGACTG CAGACAATCTCCAGCACTGCCTACATGCAGCTCA ACAGCCTGACATCTGAGGATTCTGCAGTGTATTCT GTAAAAGATCGATTACTACGCCCTACTGGGGCAAG GGAACCTGGTCACTGTCTCTGCA	174
5E6-2E7	경 쇄	GACATTGTGATGACACAGTCTCCATCCTCCCTGACT GTGACAGCAGGAGAGAAAGTCACTATGAGCTGCAA GTCCAGTCAGAGTCTGTTAACAGTGGAAAAACAA AGAACTACTTGCACGTGGTACCGAGCAGAAACCAGGG CAGCCTCTAAACTGTGATTACTGGGCATCCACT AGGAATCTGGGTCCCTGATCGCTTACAGGCAGT GGATCTGGAACAGATTTCCTCTCACCATCAGCAGT GTGAGGCTGAAGACCTGGCAGTTATTACTGTCAAG AATGATTATACTGTTATCCGTACACGTTGGAGGGGG ACCAAGCTGGAAATAAAACG	175
9E5-1A8	중 쇄	CAGGTTCAGCTGCAGCAGTCTGACGCTGAAATTGGTG AAACCTGGGGCTTCAGTGAAGATATCCTGCAAGACT TCTGGCTACACCTCACTGACCAGTCTATTCACTGG GTGAAGCAGAAGCCTGAACAGGGCCTGGAATGGAT TGGATATATCTCCCGAAATGATGATATTAAAGTA CACTGAGAAGTCAAGGGCAAGGTACACTGACTG CAGACAATCTCCAGCACTGCCTACATGCAGCTCA ACAGCCTGACATCTGAGGATTCTGCAGTGTATTCT GTAAAAGATCGATTACTACGCCCTACTGGGGCAAG GGAACCTGGTCACTGTCTCTGCA	176
9E5-1A8	경 쇄	TITTTATAACGCCACTTTCTAATACGCCCTACTATAGG GCAAGCAGTGGTATCAACGCAGATTACAAGGGGA AAGGAATCAGACCGACTCGCGCATCAAGATGGAAT CACAGACTCTGGTCTCATATCCAGTACCGCTGGGG ACTATGGAGNGGAACAGTACATTITAATGACCCAAT GTCCCAAGGCAAGAACATGTCAGTAGGGAGAGAGG GTCACTCAGAGTGCAGGCCAGGAGAAATCAAAC ACTTATGTTCCGGTATCAACAGAAACCAGAGCAN	177

		NCTNTAAAATGNNGATTACGGGGCATCCAACCGGG AATCTGGGTCNCCGATCGCTCACAGGCAGTGGAT CTGGAACAGATTCACTCTACCACATCAGCAGTGTGC AGGCTGAAGACCNNGCAGTNNTCACTGTGGACAGG GNTACAGTTATCCGTACACGTTGGAGGGGGACCA AGCTGAAAAAAACGGGC	
9F11-1F7	중쇄	CAGGTTAGCTGAGCAGTCTGACGCTGAGTTGGTG AAACCTGGGGCTTCATGAAGATTTCTGCAAGGCT TCTGGCTACACCTTCACTGACCATGCTATTCACTGG GTGAAGCAGAACGCTGAACAGGGCCTGGAAATGGAT TGGATATATTCTCCCGAAATGGTGTATTAAGTA CAATGAGAAGTTCAAGGTCAGGCCACACTGACTG CAGACAAATCCTCCAGCACTGCCTACATGCAGCTCA ACAGCCTGACATCTGAGGATTCTGCAGTGTATTCT GTAAAAGATCGATTACTACGCCTTACTGGGGCCAAG GGACTCTGGTCACTGTCTTGCA	174
9F11-1F7	경쇄	GACATTGTGATGACACAGTCTCCATCCTCCCTGACT GTGACAGCAGGAGAGAAGGTCACTATGAGCTGCAA GTCAGTCAGAGTCTGTTAACAGTGGAAAAACAA AGAAACTACTTGACGTGGTACAGCAGAACACCAGGG CAGCCTCTAAACTGTTGATCTACTGGGCATCCACT AGGGAAATCTGGGTCCTGATCGCTTACAGGCAGT GGATCTGAAACAGATTCACTTCACCATCAGCAGT GTGCAGGCTGAAGACCTGGCAGTTTACTGTAAAG AATGATTATAAGTTATCCGTACACGTTGGAGGGGG ACCAAGCTGAAATAAACG	175
10F4-2F2	중쇄	CAGGTTAGCTGAGCAGTCTGACGCTGAGTTGGTG AAACCTGGGGCTTCAGTGAAGATATCCTGCAAGGCT TCTGGCTACACCTTCACTGACCATGCTATTCACTGG GTGAAGCAGAACGCTGAACAGGGCCTGGAAATGGAT TGGATATATTCTCCCGAAATGGTGTATTAAGTA CGATGAGAAGTTAAGGCAAGGCCACACTGACTG CAGACAAATCCTCCACTGCCTACATGCAGCTCA ACAGCCTGACATCTGAGGATTCTGCAGTGTATTCT GTAAAAGATCGATTACTACCTTACTGGGGCCAAG GGACTCTGGTCACTGTCTTGCA	178
10F4-2F2	경쇄	AACATTGTAAATGACCCAATCTCCAAATCCATGTCC ATGTCAGTAGGGAGAGAGGGTCACCTTGACCTGCAA GCCAGTGAGAATGTGGTTACTTATGTTCTCTGTA TCAACAGAAACCAGAGCAGTCTCTAAACTGCTGAT ATACGGGGCATCCAACCGGTACACTGGGGTCCCCGA TCGCTTACAGGCAGTGGATCTGCAACAGATTICAC TCTGACCATCAGCAGTGTGAGGCTGAAGACCTTGC AGATTATCACTGTGGACAGGGTACAGCTATCCGTA CACGTTGGAGGGGGACCAAGCTGAAATAAAC G	166
2B8-2F10	중쇄	CAGGTTAGCTGAGCAGTCTGACGCTGAGTTGGTG AAACCTGGGGCTTCAGTGAAGATATCCTGCAAGGCT TCTGGCTACACCTTCACTGACCATGCTATTCACTGG GTGAAGCAGAACGCTGAACAGGGCCTGGAAATGGAT TGGATATATTCTCCCGAAATGGTGTATTAAGTA CAATGAGAAGTTCAAGGCAAGGCCACACTGACTG CAGACAAAGTCTCCAGCACTGCCTACATGCAGCTCA ACAGCCTGACATCTGAGGATTCTGCAGTGTATTCT GTAAAAGATCGATTACTACCTTACTGGGGCCAAG GGACTCTGGTCACTGTCTTGCA	179
2B8-2F10	경쇄	TTNATAGGACTCAATATAAGGCAAGCAGTGGTATTA ACGCCGAGTACATGGGAGGGCAAGGGCAGAAAGT	180

		CACTTTCAGTGAGGATAACCCATCAGCATGAGGGTC CTTGTGAGCTCTGGGGGGCTGGTNTGCTTT TAGGTGTGAGATGTGACATCCAGATGAACCAGTCTC CATCCAGTCTGNTGCATCCTTGGAGACACAATT CCATCATTGCCATTCCAGTCAGAACATTAATGTTG GTTAAGATGGTACCGAGAAACAGGAAATATT CTAAAATATTGATATATAAGGGTCCAATTGTACA CAGGCGTCCCACATCAAGGTTAGTGGCAGTGGATTG GAACAGGTTACATTAACCACAGCAGCGTGCAGC GGGAAGACATGCCACTTAACAGTCAACAGGATC AAAGTTATCCGTACAGCTCGGAGGGGGACCAAG CTGAAATAAACGGGC	
4G8-1E3	중 쇄	CAGGTTCAGCTGCAGCAGTCTGACGCCAGTTGGT AAACCTGGGGCTTCAGTGAAGATATCCTGCAAGGCT TCTGGCTACATCTCACTGACCATGCTATTCACTGG TGAAAGCAGAACGCTGAACAGGGCCTGGAATGGATT GGATATATTCTCCCGGAAATGGTGAATTAAAGTAC AATGAGAAGTCAAGGGCAAGGCCACACTGACTGC AGACAAATCTCCAGCACTGCCTACATGCATCTCAA CAGCCTGACATCTGAGGATTCTGCAGTGTATTCTG TAAAAGATCGATTACTACCTTACTGGGGCCAAGG GACTCTGGTCACTGTCCTGCA	181
4G8-1E3	경 쇄	GACATCCAGATGAACCACTCCCCATCCAGTCTGCT GCATCCCTGGAGACACAAATTACCATCACTGCCAT GCCAGTCAGCACATTAATTGGITAAGCTGGTAC CAGCAGAAACCAGGAAATATTCTAAACTCTGATC TATAAGGCTTCAACTTGACACAGGGCTCCATCA AGGTTAGTGGCAGTGGATCTGGAACAGGTTTCACA TTAACCATCAGCAGCTGCTGCTGAAGACGTTGCC ACTTACTACTGCAACAGGATCAAAAGTTATCCGTAT ATGTTGGAGGGGGACCAAGCTGGAAATAAACG	182
6B11-2E3	중 쇄	CAGGTTCAGCTGCAGCAGTCTGACGCTGAGTTGGT AAACCTGGGGCTTCAGTGAAGATATCCTGCAAGGCT TCTGGCTACACCTTCACTGACCATGCTATTCACTGG TGAAAGCAGAACGCTGAACAGGGCCTGGAATGGAT TGATATATTCTCCCGGAAATGGTGAATTAAAGTA CAATGAGAAGTTAAGGGCAAGGCCACACTGACTG CAGACAAATCTCCAGCACTGCCTACATGCTGCTCA ACAGCCTGACATCTGAGGATTCTGCAGTGTATTCT GTAAAAGATCGATTACTACCTTACTGGGGCCAAG GGACTCTGGTCACTGTCCTGCA	183
6B11-2E3	경 쇄	AACATTGTAATGACCCAACTCTCCAAATCCATGTCC ATGTCAGTAGGAGAGAGGGTCACCTTGACCTGCAA GGCCAGTGAGAATGTGGTTACTTATGTTCTGGTA TCAACAGAAACCAGAGCAGTCTCTAAACTGCTGAT ATACGGGGCATCCAACCGGTACACTGGGTCCCCGA TCGCTTCACAGGCAGTGGATCTGCAACAGATTTCAC TTGACCATCAGCAGTGTGCAGGCTGAAGACCTTGC AGATTATCACTGTGGACAGGGTACAGCTATCGTA CACGTTGGAGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAC G	184
8C2-2D6	중 쇄	CAGGTTCAACTGCAGCAGTCTGACGCTGAGTTGGT AAACCTGGGGCTTCAGTGAAGATATCCTGCAAGGCT TCTGGCTACACCTTCACTGACCATGCTATTCACTGG TGAAAGCAGAACGCTGAACAGGGCCTGGAATGGAT TGATATATTCTCCCGGAAATGGTGAATTAAAGTA CAATGAGAAGTTCAAGGGTAAGGCCACACTGACTG CAGACACTTCCACCACACTGCCTACATGCAGCTCA	185

		ACAGCCTGACATCTGAGGATTCTGCAATGTATTCT GTAAAAGATCCATTACTACGTCTACTGGGCCAAG GGACTCTGGTCACTGTCTGCA	
8C2-2D6	경쇄	AACATTGTAATGACCCAATCTCCCAAATCCATGTCC ATGTCAGTAGGAGAGAGGGTCACCTTGACCTGCAA GGCAGTGAAGAATGTGGTTACTTATGTTCTGGTA TCAACAGAAACCAGAGCAGTCTCTAAACTGCTGAT ATACGGGGCATCCAACCGTACACTGGGGTCCCCGA TCGCTTCACAGGCAGTGGATCTGCAACAGATTTCAC TCGACCACAGCAGTGTGCAGGCTGAAGACCTTGC AGATTATCACTGTGGACAGGGTTACAGCTATCCGTA CACGTTGGAGGGGGGACCAAGCTGAAATAAAAC G	152
8C2-2D6	경쇄 (V2)	GACATCCAGATGAACCAGTCTCCATCCAGTCTGTCT GCATCCCTGGAGACACAATTACCATCACTTGCCAT GCCAGTCAGAACATTAATGTTGGTAAGCTGGTAC CAGCAGAAACCAGGAATATTCTAAACTATTGATC TATAAGGCTTCCAATTGTATACAGGCGTCCCACATCA AGGTTAGTGGCAGTGGATCTGGAACAGGTTTACA TTAACCATCAGCAGCCTGAGCCTGAAGACGTTGCC ACGTACTACTGTCAACACGATCAAAGTTATCCGTAC ACGTTGGAGGGGGACCAAGCTGAAATAAAAC	186
7D4-2A2- 2F2	중쇄	CAGGITCAGCTGCAGCAGTCTGACGCTGAGTTGGTG AAACCTGGGGCTTCAGTGAAGATATCCTGCAAGGCT TCTGGCTACATCTCACTGACCATGCAATTCACTGG GTGAAGCAGAACGCTGAACAGGGCTGGAATGGAT TGGATATATTCTCCGGAAATGGTGAATTAAAGTA CATTGAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACACTGACTG CAGACAAATCCTCCAGCAGTGCCTACATGCAGCTCA ACAGCCTGACATCTGAGGATTCTGCACTGTATTCT GTAAAAGATCGCTTAGTACGCCTACTGGGGCCAAG GGACTCTGGTCACTGTCTGCA	187
7D4-2A2- 2F2	경쇄	AACATTITAATGACCCAATCTCCCAAATCCATGTCC ATGTCAGTAGGAGAGAGGGTCACCTTGACCTGCAA GGCAGTGAAGAATGTGGTTAATTATGTTCTGGTA TCAACAGAAACCAGAGCAGTCTCTAAACTGCTGAT ATTCGGGGCATCCAACCGTACTCTGGGGTCCCCGA TCGCTTCACAGGCAGTGGATCTGCAACAGATTTCAC TCGACCACAGCAGTGTGCAGGCTGAAGACCTTGC AGATTATCACTGTGGACAGCAAGTGGATTACTAGCTA TCCGTACACGTTGGAGGGGGACCAAGCTGAAA TAAAACG	188
7D4-1H12- 2B3	중쇄	CAGGITCAGCTGCAGCAGTCTGACGCTGAGTTGGTG AAACCTGGGGCTTCAGTGAAGATATCCTGCAAGGCT TCTGGCTACATCTCACTGACCATGCAATTCACTGG GTGAAGCAGAACGCTGAACAGGGCTGGAATGGAT TGGATATATTCTCCGGAAATGGTGAATTAAAGTA CATTGAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACACTGACTG CAGACAAATCCTCCAGCAGTGCCTACATGCAGCTCA ACAGCCTGACATCTGAGGATTCTGCACTGTATTCT GTAAAAGATCGCTTAGTACGCCTACTGGGGCCAAG GGACTCTGGTCACTGTCTGCA	187
7D4-1H12- 2B3	경쇄	AACATTITAATGACCCAATCTCCCAAATCCATGTCC ATGTCAGTAGGAGAGAGGGTCACCTTGACCTGCAA GGCAGTGAAGAATGTGGTTAATTATGTTCTGGTA TCAACAGAAACCAGAGCAGTCTCTAAACTGCTGAT ATACGGGGCATCCAACCGTACTCTGGGGTCCCCGA TCGCTTCACAGGCAGTGGATCTGCAACAGATTTCAC	189

		TCTGACCACAGCAGTGTGCAGGCTGAAGACCTTGC AGATTATCACTGTGGAGCAAGGGTTACTAGCTATCC GTACACGTCGGAGGGGGACCAAGCTGGAAATAA AACG	
2C2-2C5	중쇄	CAGGTTCACTGCAGCAGTCTGACGCTGAGTTGGTG AAACCTGGGACTTCAGTGAAGATATCCTGCAGGGCT TCTGGCTACACCTCACTGACCATGCTATTCACTGG GTGAAGCAGAAGCCTGAACAGGGCCTGGAATGGAT TGATATATTCTCCCGGAAATGGTGTATTAAGTA CAATGAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACACTGACTG CAGACAAATCCTCCAGCAGTGCCTACATGCAGCTCA ACAGCCTGACATCTGACGATTCTGCAGTGTATTCT GTAAAAGATCCATTACTACGCCCTACTGGGGCCAAG GCACCACTCTCACAGTCTCCTCA	190
2C2-2C5	경쇄	AGTTTGTGATGACCCAGACTCCAAATTCCCTGCTT GTGTCAAGCAGGAGACAGGGTACCTAACCTGCAA GGCCAGTCAGAGTGTGAATAATGTAGCTTGGTA CCAACAGAAGCCAGGGCAGTCTCTAAACAGCTGA TATACTATGCATCCAATCGCTACACTGGAGTCCCTG ATCGCTTCACTGGCAGTGGATATGGGACGGATTCTCA CTTTACCACATCTACACTGTGCAGGCTGAAGACCTGG CAGTTTATTCTGTCAGCAGGGTTATAAGCTCTCGTG GACGTTCGGTGGAGGACCAAGCTGAAA	191
10F4-2A9	중쇄	CAGGTTCACTGCAGCAGTCTGACGCTGAGTTGGTG AAACCTGGGCTTCAGTGAAGATATCCTGCAAGGCT TCTGGCTACACCTCACTGACCATGCTATTCACTGG GTGAAGCAGAAGCCTGAACAGGGCCTGGAATGGAT TGATATATTCTCCCGGAAATGGTGTATTAAGTA CGATGAGAAGTTAAGGGCAAGGCCACACTGACTG CAGACAAATCCTCTCCACTGCCTACATGCAGCTCA ACAGCCTGACATCTGAAAGATTCTGCAGTGTATTCT GTAAAAGATCGATTACTACCTTACTGGGGCCAAG GGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA	178
10F4-2A9	경쇄	AACATTGTAATGACCCAAATCTCCAAATCCATGTCC ATGTCAGTAGGGAGAGGGTCACTTGACCTGCAA GGCCAGTGAGAATGTGGTACTTATGTTCTGGTA TCAACAGAAACCAGAGCAGTCCTAAACTGCTGAT ATACGGGGCATCCAACCGGTACACTGGGTCGGGA TCGCTTCACAGGCAGTGGATCTGCAACAGATTTCAC TCTGACCATCAGCAGTGTGCAGGCTGAAGACCTTG AGATTACTGTCAGGACAGGGTACAGCTATCCGTA CACGTTGGAGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAC G	152

[0229]

[0230]

일부 경우에, 본 발명의 항체 또는 항원 결합 단편은 아래 표에 나타낸 IgG 프레임워크 영역 중의 어느 것을 포함할 수 있다. 일부 경우에, 항체 또는 이의 단편은 아래 표에 열거된 불변 도메인 서열 중의 하나 이상과 약 50% 내지 약 99.9%의 서열 동일성(예컨대 약 50% 내지 약 60%, 약 55% 내지 약 65%, 약 60% 내지 약 70%, 약 65% 내지 약 75%, 약 70% 내지 약 80%, 약 75% 내지 약 85%, 약 80% 내지 약 90%, 약 85% 내지 약 95%, 약 90% 내지 약 99.9%, 약 95% 내지 약 99.9%, 약 97%, 약 97.5%, 약 98%, 약 98.5%, 약 99%, 약 99.5%, 약 99.6%, 약 99.7% 또는 약 99.8%)을 갖는 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 일부 경우에, 본 발명의 항체 또는 이의 단편은 아래 표에 열거된 서열 중의 어느 것의 하나 이상의 단편을 갖는 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

표 7

IgG 불변 도메인 서열

도메인	서열	서열 번호
뮤린 IgG2a 중쇄 불변 도메인 영역	AKTTAPS VYPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLT WNSGSLSSGVHTFPALQSDLYTLSSSVTVTSSTWPSQSIT CNVAHPASSTKVDKKIEPRGPTIKCPPCKCPAPNLLGGPS VFIFPPKIKDVLMLISPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWFVN NVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMSGKEF KCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPPEEEMT KKQVTLTCMVTDMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVVL DSDGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHH TTKSFSRTPGK	192
뮤린 IgG2a 카파 경쇄 불변 영역	RADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKW KIDGSERQNGVLNSWTQDSKDSTYSMSSTLTLTKDEYER HNSYTCEATHKTSTSPIVKSFRNRNEC	193
인간 IgG1 중쇄 불변 영역	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPALQSSGLYSSLSSVTPVSSSLGTQT YICNVNHKPNTKVDDKVEPKSCDKTHTCPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKD TLMSRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK	194
인간 IgG1 경쇄 불변 영역	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTL SKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFRNRGE C	195

[0231]

[0232] 일부 경우에, 항체는 하기 표의 아미노산 서열 중의 하나 또는 둘 다를 포함하고/하거나 하기 표에 나타낸 뉴클레오티드 서열 또는 이의 최적화된 버전 중의 하나 또는 둘 다에 의해 암호화될 수 있다.

표 8

3F1 항체 서열

항체	도메인	서열	서열 번호
3F1	중쇄 전장 아미노산	QVQLQQSDAELVKPGASVKISCKASGYTF TDHAIHW VKQKPEQGLDWIGYI SPGNGDIKYNEKF KDKVTLTA DKSSSTACMHLNSL TSED SAVYFCRSSL ALD YWG QGTTLT VSSAKTTAPS VYPLAPVCGDTTGSSVT LGCL VKGYFPEPVTL TWNSGSLSSGVHTFPALQSDLYTL SSSVTV TSSTWPSQSITCNVAHPASSTKVDKKIEPRGP TIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVIFPPKIKDVLMLISPLPI VTCVVVDVSEDDPDVQISWFVNNEVHTAQTQTHR EDYNSTLRVVSALPIQHQDWMSGKEFKCKVNNKDL PAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPPEEEMT KKQVTL TCMVTDMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVVL DGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNH HTKSF SRTPGK	196
3F1	중쇄 전장, 뉴클레오티드	ATGGAGACCGACACCCCTGCTGCTCTGGGTGCTGCT GCTCTGGGTGCCGGCTCACCGGACAGGTTCA GC TGCAGCAGCTGACGCTGAGTTGGT GAAACCTGG	197

[0233]

		GGCTTCAGTGAAGATATCCTGCAAGGCTCTGGCT ACACCTTCACTGACCAGTCTATTCACTGGGTGAAG CAAAAGCCTGAACAGGGCCTGGACTGGGATTGGAT ATATTTCTCCCGAAATGGTGATATAAGTACAAT GAGAAGTCAAGGACAAGGTACACTGACTGCAG ACAAAATCCTCCAGCACTGCCTGCATGCACCTCAAC AGCCTGACATCTGAGGATTCTGCAGTGTATTTCTG CAAAAGATCCCTACTAGCTCTGACTACTGGGCC AAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCAGCTAAAACA ACAGCCCCATCGGCTCATCCACTGGCCCCCTGTGTG TGGAGATACAACCTGGCTCTCGGTGACTCTAGGAT GCCTGTCAGGGTTATTCCTGAGCCAGTGACC TTGACCTGGAACTCTGGTCCCTGTCCAGTGGTGT GCACACCTTCCAGCTGTCCCTGCAGTCTGACCTCT ACACCCCTCAGCTCAAGCTGACTGTAACCAGCTCG ACCTGGCCCAGCAGTCCATCACCTGCAATGTGGC CCACCCGGCAAGCAGCACCAAGGTGGACAAGAAA ATTGAGCCCAGAGGGCCCACAATCAAGCCCTGTC CTCCATGCAAATGCCAACCTCTGGGT GGACCATCGCTTCATCTCCCTCAAAGATCAA GGATGTAECTCATGATCTCCCTGACCCCCATAGTCA CATGTGAGTCGTTGATGTGAGCGAGGATGACCCA GATGTCAGATCAGCTGGTTGTAACAACGTGGA AGTGCACACTGCTCAGACACAGACGATAGAGAG GATTACAACAGTACTCTCCGGGTTGTCACTGCCCT CCCCATCCAGCACCAAGGACTGGATGAGTGGCAAG GAGITCAAATGCAAGGTCAACAACAAAGACCTCC CAGCCCCCATCGAGAGAACCATCTCAAACACCAA AGGGTCAGTAAGAGCTCCACAGGTATATGTCCTGC CTCCACAGAACAGGAGATGACTAAGAACAGGT CACTCTGACCTGCATGGTCACAGACTTCACTGCCCTG AAGACATTACGTGGAGTGGACCAACAACGGGAA AACAGAGCTAAACTACAAGAACACTGAACCAAGCTC CTGGACTCTGATGGTCTTACTCATGTCAGCAA GCTGAGAGTGGAGAAGAAGAACTGGGTGGAGAG AAATAGCTACTCTGTGAGTGGTCCACGAGGGTC TGCAACATCACCAACAGACTAAGAGCTTCTCCGG ACTCCGGGTAATAG	
3F1	정쇄 전장 아미노산	DIVMTQSHKFMSTSVDRVSITCKASQDVGTNIAWY QQPKGRSPKVLIYSASTRHTGVPDFRTGSGSTDFTL TISNVQSEDLTDYFCQQYSSPLTFVGVTKLELKRAD AAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFNNFYPKDINVK WKIDGSERQNGVNLNSWTDQDSKDSTYSMSSTLTLT KDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNNEC	198
3F1	정쇄 전장, 뉴클레오티드	ATGGAGACCGACACCCCTGCTGCTCTGGGTGCTGCT GCTCTGGGTGCCCCGGCTCCACCGAGAGACATGTGA TGACCCAGTCTCACAAAATTCTATGTCACATCAGTA GGAGACAGGGTCACCATCACCTGCAAGGCCAGTC AGGAATGTGGGCACTAATAATAGCCCTGGTATCAACA GAAACCCAGGGCGATCTCTAAAGTAGCTGATTACT CGGCATCCACCCGGCACACTGGAGTCCCTGATCGC TTCACAGGCGATGGGATCTGGGACAGATTTCACTCT CACCATAGCAATGTGCAAGTCTGAAGACTTGAACAG ATTATTCGTCAAGCAATATAGCAGCTTCCCTCTCA CGITCCGGTGTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAACCG GGCAGATGCTGCACCAACTGTATCCATCTCCAC CATCCAGTGAGCAGTAAACATCTGGAGGTGCTCTA GTCGTGTGCTCTTGAACAAACTCTACCCCAAAGA CATCAATGTCAGTGGAAAGATTGATGGCAGTGAA CGACAAAATGGCTCTGAACAGTGGACTGATC AGGACAGCAAAGACAGCACCTACAGCATGAGCAG CACCTTCACGTGACCAAGGACGAGTATGAACCGA CATAACAGCTATACTGTGAGGCCACTCACAAGA CATCAACTCACCCATTGTCAAGAGCTTCAACAGG AATGAGTGTGA	199

[0234]

일부 경우에, 항체 또는 이의 단편은 상기 표에 나타낸 아미노산 서열 중의 하나 이상과 약 50% 내지 약 99.9%의 서열 동일성(예컨대, 약 50% 내지 약 60%, 약 55% 내지 약 65%, 약 60% 내지 약 70%, 약 65% 내지 약 75%, 약 70% 내지 약 80%, 약 75% 내지 약 85%, 약 80% 내지 약 90%, 약 85% 내지 약 95%, 약 90% 내지 약 99.9%, 약 95% 내지 약 99.9%, 약 97%, 약 97.5%, 약 98%, 약 98.5%, 약 99%, 약 99.5%, 약 99.6%, 약 99.7% 또는 약 99.8%)을 갖는 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 일부 경우에, 항체 또는 이의 단편은 상기 표에 나타낸 뉴클레오티드 서열 중의 하나 이상과 약 50% 내지 약 99.9%의 서열 동일성(예컨대 약 50% 내지 약 60%, 약 55% 내지 약 65%, 약 60% 내지 약 70%, 약 65% 내지 약 75%, 약 70% 내지 약 80%, 약 75% 내지 약 85%, 약 80% 내지 약 90%, 약 85% 내지 약 95%, 약 90% 내지 약 99.9%, 약 95% 내지 약 99.9%, 약 97%, 약 97.5%, 약 98%, 약 98.5%, 약 99%, 약 99.5%, 약 99.6%, 약 99.7% 또는 약 99.8%)을 갖는 뉴클레오티드 서열에 의해 암호화될 수 있다.

[0236]

일부 실시양태에서, 본 발명은 상기한 하나 이상의 항체 서열 또는 관련 변이체를 사용하여 생산된 항체 단편을 포함한다. 이러한 항체 단편은 scFv, Fab 단편, 또는 본원에 기재된 것들 중의 어느 것을 포함하는 임의의 다른

항체 단편을 포함할 수 있다.

[0237] 인간화 항체

비-인간(예컨대, 뮤린) 항체의 "인간화" 형태는 비-인간 면역글로불린으로부터 유도된 최소 서열을 함유하는 키메라 항체이다. 대개, 인간화 항체는 수용자의 항체로부터의 초가변 영역으로부터의 잔기가 목적하는 특이성, 친화성 및 수용성을 갖는 마우스, 랫트, 토끼 또는 비인간 영장류와 같은 비-인간 종의 항체(공여자 항체)로부터의 초가변 영역으로부터의 잔기로 대체된 인간 면역글로불린(수용자 항체)이다.

[0239] 일부 실시양태에서, 완전 인간화 중쇄 및 경쇄는 본원에 나타낸 항체 서열로부터 및/또는 CDR로 설계될 수 있다. 항체 가변 영역의 단백질 모델은 현존 항체 구조를 주형으로서 사용하여 생성될 수 있다. 출발 중쇄 및 경쇄 가변 영역 아미노산 서열의 세그먼트를 인간 서열과 비교하여, 유사한 서열을 갖는 인간 생식계열 항체를 동정할 수 있다. 일련의 인간화 중쇄 및 경쇄 가변 영역은 T 세포 에피토프를 피하려는 목적으로 인간 가변 도메인 프레임워크 영역 서열을 사용하여 설계될 수 있다. 그후, 인실리코(*in silico*) 기술에 의해 측정되는 바와 같은 잠재적 T 세포 에피토프의 상당한 발생도를 갖는 변이체 인간 서열 세그먼트는 버릴 수 있다. 일부 경우에, 생성된 가변 도메인 중의 아미노산 잔기의 일부는 원래의 마우스 가변 도메인에 존재하는 아미노산으로 복귀 돌연변이될 수 있다. 일부 경우에, 생성된 가변 도메인 중의 마우스 잔기의 일부는 인간 생식계열 서열에 존재하는 잔기에 매칭되도록 돌연변이될 수 있다.

[0240] 인간화 중쇄 및 경쇄 가변 영역 유전자는 리가제 연쇄 반응(LCR)을 사용하여 전장 유전자로 조립되는 중첩 올리고뉴클레오티드로부터 작제될 수 있다. LCR 산물을 증폭시킬 수 있으며 발현 백터로의 클로닝을 위해 적합한 제한 부위를 부가할 수 있다. PCR 산물을 중간 백터로 클로닝하고 서열화에 의해 확인할 수 있다.

[0241] 인간 불변 영역을 갖는 완전 인간화 항체를 암호화하는 발현 플라스미드의 작제를 위해, 항체 가변 영역을 암호화하는 DNA 서열을 업스트림 프로모터/인핸서, 예를 들면, 사이토메갈로바이러스 즉시/초기 프로모터/인핸서(CMV IE), + 면역글로불린 신호 서열 및 다운스트림 면역글로불린 불변 영역 유전자 사이의 발현 백터(예컨대, 포유동물 발현 백터)에 삽입할 수 있다. 그후 포유동물 세포로의 형질감염을 위해 DNA 샘플을 제조할 수 있다.

[0242] 세포주의 생성 및 완전 인간화 항체의 선택을 위해, 중쇄 및 경쇄 플라스미드 DNA 쌍을 발현을 위해 세포에 형질감염시킬 수 있다. 일부 실시양태에서, 포유동물 NSO 세포가 사용될 수 있다. 인간화 항체를 생산하는 세포주를 세포 배양 배지로부터 수확 및 정제될 수 있는 발현 항체를 위해 확장시킬 수 있다.

[0243] 일부 실시양태에서, 본 기재내용의 항체는 당업계에 공지된 인간화 방법에 따라 제조될 수 있다. 이러한 방법은 CDR 그라프팅, 리서페이싱, 초인간화 및 인간 스트링 콘텐트 최적화(human string content optimization)를 포함할 수 있지만, 이에 제한되지 않는다(참조; 예를 들면, Almagro, et al., 2008. *Front. Biosci.* 13:1619-33). 일부 실시양태에서, 경험적 방법이 사용된다. 이러한 방법은 거대 조합 라이브러리의 생성 및 과지 디스플레이, 효모 디스플레이, 리보솜 디스플레이, 또는 다른 고속 대량 스크리닝 기법과 같은 풍부화 기술에 의한 목적하는 변이체 선택을 포함할 수 있다. 이러한 방법은 단독으로 또는 프레임워크 라이브러리, 지침 선택(guided selection), 프레임워크 셀렉팅 및 휴머니어링(humaneering)과 함께 사용될 수 있다.

[0244] 일부 실시양태에서, 인간화 항체는 하기 표에 나타낸 인간 가변 도메인 중의 하나 이상을 사용하여 제조될 수 있다. 이러한 항체는 인간 가변 도메인에 존재하는 CDR 서열을 치환하는 본원에 제시된 하나 이상의 CDR 서열 또는 이의 단편 또는 변이체 중의 어느 것을 포함할 수 있다. 일부 경우에, 인간 가변 도메인 서열의 변이체가 사용되며, 여기서 이러한 변이체는 아래 표에 나타낸 인간 가변 도메인 서열 중의 어느 것과 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 적어도 99.9%의 서열 동일성을 갖는다.

표 9

인간 가변 도메인

가변 도메인	카바트 생식계열	서열	서열 번호
VH	IGHV1-18*01, 뉴클레오티드	CAGGTTCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTG AAGAAGCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGC AAGGCCTCTGGTTACACCTTACCAAGCTATGGTA TCAGCTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGC TTGAGTGGATGGGATGGATCAGCGCTTACAATG GTAACACAAACTATGCACAGAACAGCTCCAGGGCA GAGTCACCATGACCACAGACACATCCACAGAGCA CAGCCTACATGGAGCTGAGGAGCCTGAGATCTG ACGACACGGCCGTATTACTGTGCGAGAGA	200
VL	IGKV1-39*01, 뉴클레오티드	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGT CTGCATCTGAGGAGACAGAGTCACCATCACTT GCCGGGCAAGTCAGAGCATTAGCAGCTATTTAA ATTGGTATCAGCAGAAACCAAGGGAAAGCCCCTA AGCTCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTGCAAAG TGGGGTCCCCTCAAGGTTCAAGTGGCAGTGATC TGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTG CAACCTGAAGATTTCGAACTTACTACTGTCAAC AGAGTTACAGTACCCCTC	201
VL	IGKV4-1*01, 뉴클레오티드	GACATCGTGATGACCCAGTCTCCAGACTCCCTGG CTGTGTCTCTGGCGAGAGGGCCACCATCAACT GCAAGTCCAGCCAGAGTGTTTATAACAGCTCCA ACAATAAAGAACTACTTAAGCTTGGTACCAAGCAGA AACCAAGGACAGCCTCTAAAGCTGCTCATTACTG GGCATCTACCCGGGAATCCGGGGTCCCTGACCG ATTCAAGTGGCAGGGGTCTGGGACAGATTTCAC TCTCACCATCAGCAGCTGCAGGCTGAAGATGT GGCAGTTTATTACTGTCAAGCAATATTATAGTACT CCTCC	202
VH	IGHV1-18*01, 아미노산	QVQLVQSGAEVKPGAVSVKVSCKASGYTFTSYGIS WVRQAPGQGLEWMGWIAYNGNTYAQKLQGR VTMTIDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCAR	203
VL	IGKV1-39*01, 아미노산	DIQMTQSPSSLSAVGDRTITCRASQSISSYLNWY QQKPGKAPKLLIYASSLQSGVPSPSGSGSTDFT LTISSLQPEDFATYYCQQSYSTP	204
VL	IGKV4-1*01, 아미노산	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNK NYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGPDRFSG SGSGTDFLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSTPC	205

[0245]

[0246]

일부 실시양태에서, 본 기재내용의 인간화 항체는 하기 표에 나타낸 인간 프레임워크 영역 중의 하나 이상을 포함할 수 있다. 몇몇 항체는 아래 표에 나타낸 프레임워크 영역 중의 어느 것과 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 적어도 98%의 서열 동일성을 갖는 프레임워크 영역을 포함할 수 있다.

표 10

인간 프레임워크 영역

프레임워크 영역, 가변 도메인	카바트 생식계열	아미노산 서열	서열 번호
FR1, VH	IGHV1-18*01	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDHAIH	206
FR1, VL	IGKV1-39*01	IQMTCSPSSLSASVGDRVTITC	207
FR1, VL	IGKV4-1*01	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC	208
FR2, VH	IGHV1-18*01	WVRQAPGQGLEWMG	209
FR2, VL	IGKV1-39*01	WYQQKPGKAPKLLIY	210
FR2, VL	IGKV4-1*01	WYQQKPGQPPKLLIY	211
FR3, VH	IGHV1-18*01	RVTMTTDSTSTAYMELRSLRSDDTAVY YCAR	212
FR3, VL	IGKV1-39*01	GVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATY YC	213
FR3, VL	IGKV4-1*01	GVPDRFSGSGSGTDFLTISLQAEDVAV YYC	214
FR4, VH	인간 컨센서스 서열 1	WGQGTLVTVSS	215
FR4, VL	인간 컨센서스 서열 1	FGQGTKVEIK	216

[0247]

[0248] 일부 실시양태에서, 인간화 항체의 하나 이상의 잔기를 역-교배(back-cross)하여 항체 결합 또는 다른 특성들을 개선시킬 수 있다.

[0249] 일부 실시양태에서, 본 기재내용의 항체에 존재하는 인간화 가변 도메인은 하기 표에 나타낸 가변 도메인 중의 어느 것을 포함할 수 있다. 일부 경우에, 항체는 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 적어도 99.5%의 서열 동일성을 갖는 이들 가변 도메인의 하나 이상의 변이체를 포함한다.

표 11

인간화 가변 도메인

mAb	쇄	서열	서열 번호
5G2-1B3	VL0	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASENIYSHLAWYQ QKPGKAPKLLIYGATNLADGVPSRFSGSQSGTDFLT ISSLQPEDFATYYCQHFWGAPFTFGQGQTKVEIK	217
5G2-1B3	VL1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASENIYSHLAWYQ QKPGKAPKLLVYVGATNLASGVPSRFSGSQSGTQFTL TISSLQPEDFATYYCQHFWGAPFTFGQGQTKVEIK	218
5G2-1B3	VL2	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASENIYSHLAWYQ QKPGKAPKLLVYVGATNLADGVPSRFSGSQSGTQFTL TISSLQPEDFATYYCQHFWGAPFTFGQGQTKVEIK	219
5G2-1B3	VH0	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDHAIH WVRQAPGQGLEWMGYFSPGNDDIKYNEKFKVRVT MTTDSTSTAYMELRSLRSDDTAVYFCKRSYGGDW GQGTLVTVSS	220
5G2-1B3	VH1	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDHAIH WVRQAPGQGLEWMGYFSPGNDDIKYNEKFKVRVT MTADKSSSTAYMELRSLRSDDTAVYFCKRSYGGDW GQGTLVTVSS	221
5G2-1B3	VH2	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDHAIH VRQAPGQGLEWIGYFSPGNDDIKYNEKFKVRATLTA DKSSSTAYMELRSLRSDDTAVYFCKRSYGGDWGQG TLVTVSS	222
5G2-1B3	VH3	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDHAIH WVRQAPGQGLEWMGYFSPGNDDIKYNEKFKVRVT	223

[0250]

		MTADKSSSTAYMELRSLSRSDDTAVYFCKRSYYGDW GQGTLVTSS	
5G2-1B3	VH4	EVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYIFTDHAIIHW VRQAPGQGLEWIGYFSPGNDDIKYNEKFKVRATLTA DKSSSTAYMELRSLSRSDDTAVYFCKRSYYGDWGQG TLVTSS	224
4G8-1E3	VL0	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQHINFWLWY QQKPGKAPKLLIYKASNLHTGVPSRFSGSGBTFTL TISSLQPEDFATYYCQQDQSYPYMFQGQGTKEIK	225
4G8-1E3	VL1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQHINFWLWY QQKPGKIPKLLIYKASNLHTGVPSRFSGSGBTFTL TISSLQPEDFATYYCQQDQSYPYMFQGQGTKEIK	226
4G8-1E3	VL2	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQHINFWLWYQ QKPGKIPKLLIYKASNLHTGVPSRFSGSGBTFTL TISSLQPEDFATYYCQQDQSYPYMFQGQGTKEIK	227
4G8-1E3	VL3	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQHINFWLWY QQKPGKIPKLLIYKASNLHTGVPSRFSGSGBTFTL TISSLQPEDFATYYCQQDQSYPYFFGQGTKEIK	228
4G8-1E3	VL4	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQHINFWLWYQ QKPGKIPKLLIYKASNLHTGVPSRFSGSGBTFTL TISSLQPEDFATYYCQQDQSYPYFFGQGTKEIK	229
4G8-1E3	VH0	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYIFTDHAIIH WVRQAPGQGLEWMGYISPNGDIKYNEKFGRVT MTTDTSTSTAYMELRSLSRSDDTAVYYCARSITTSY WQGTLVTSS	230
4G8-1E3	VH1	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYIFTDHAIIH WVRQAPGQGLEWMGYISPNGDIKYNEKFGRVT MTADKSSSTAYMELRSLSRSDDTAVYFCKRSITTSY WQGTLVTSS	231
4G8-1E3	VH2	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYIFTDHAIIH VRQAPGQGLEWIGYISPNGDIKYNEKFGRATLTA DKSSSTAYMHLRSLSRSDDTAVYFCKRSITTSYWGQ TLVTSS	232
4G8-1E3	VH3	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYIFTDHAIIHW VRQAPGQGLEWMGYISPNGDIKYNEKFGRVTMT ADKSSSTAYMELRSLSRSDDTAVYFCKRSITTSYWGQ TLVTSS	233
4G8-1E3	VH4	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYIFTDHAIIHW VRQAPGQGLEWIGYISPNGDIKYNEKFGRATLTA DKSSSTAYMHLRSLSRSDDTAVYFCKRSITTSYWGQ TLVTSS	234
2G12-2B2	VL0	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLNRGNHK NYLTWYQQKPGOPPKLLIYWA STRESGVPDFRGSG SGTDFLTISLQAEDVA YYCQNDYTYPYTFGQGT KVEIK	235
2G12-2B2	VL2	DIVMTQSPDSLAVSLGERVTMSCKSSQSLNRGNHK NYLTWYQQKPGOPPKLLIYWA STRESGVPDFRGSG SGTDFLTISLQAEDVA YYCQNDYTYPYTFGQGT KVEIK	236
2G12-2B2	VH0	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYIFTDHAIIH WVRQAPGQGLEWMGYISPNGDIKYNEKFGRVT MTTDTSTSTAYMELRSLSRSDDTAVYYCARSLSTPY WQGTLVTSS	237
2G12-2B2	VH1	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYIFTDHAIIH WVRQAPGQGLEWMGYISPNGDIKYNEKFGRVT MTADKSSSTAYMELRSLSRSDDTAVYFCKRSLSTPY WQGTLVTSS	238

[0251]

2G12-2B2	VH2	QVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYTFTDHAIHW VRQAPGQGLEWIGYFSPGNDDIKYNEKFGRVTLTA DKSSSTAYMELRSLRSDDTAVYFCKRSLSPTYWGQQ TLTVSS	239
2G12-2B2	VH3	EVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYTFTDHAIHW WVRQAPGQGLEWIGYFSPGNDDIKYNEKFGRVTLTA MTADKSSTAYMELRSLRSDDTAVYFCKRSLSPTYW GQQTLTVSS	240
2G12-2B2	VH4	EVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYTFTDHAIHW VRQAPGQGLEWIGYFSPGNDDIKYNEKFGRVTLTA DKSSSTAYMELRSLRSDDTAVYFCKRSLSPTYWGQQ TLTVSS	241
8C2-2D6	VL0	DIQMTQSPSSLASVGDRVTITCKASENVVTVWSWY QQKPGKAPKLLIYGASNRYTGVPSRSGSGSTDFTL TISSLQPEDFATYYCGQQGSYSPYTFGQQGTKEIK	242
8C2-2D6	VL1	NIQMTQSPSSLASVGDRVTITCKASENVVTVWSWY QQKPGKAPKLLIYGASNRYTGVPSRSGSGSATDFTL TISSLQPEDFATYYCGQQGSYSPYTFGQQGTKEIK	243
8C2-2D6	VL2	NIVMTQSPSSMSMSVGDRVTITCKASENVVTVWSWY YQQKPGKSPKLLIYGASNRYTGVPSRSGSGSATDFLT LTISSVQPEDLATYHCQGQGSYSPYTFGQQGTKEIK	244
8C2-2D6(V2)	VL0	DIQMTQSPSSLASVGDRVTITCHASQNINVWLSWY QQKPGKAPKLLIYKASNLYTGVPSSRSGSGSTDFTL TISSLQPEDFATYYCQHDQSYPYTFGQQGTKEIK	245
8C2-2D6(V2)	VL1	DIQMTQSPSSLASVGDRVTITCHASQNINVWLSWY YQQKPGKPKLLIYKASNLYTGVPSSRSGSGSTDFTL TISSLQPEDFATYYCQHDQSYPYTFGQQGTKEIK	246
8C2-2D6(V2)	VL2	DIQMTQSPSSLASVGDRVTITCHASQNINVWLSWYQ QKPGKIPKLLIYKASNLYTGVPSSRSGSGSTDFTL TSSLQPEDFATYYCQHDQSYPYTFGQQGTKEIK	247
8C2-2D6(V2)	VL3	DIQMNQSPSSLASVGDRVTITCHASQNINVWLSWYQ QKPGKIPKLLIYKASNLYTGVPSSRSGSGSTDFTL TSSLQPEDFATYYCQHDQSYPYTFGQQGTKEIK	248
8C2-2D6	VH0	QVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYTFTDHAIHW WVRQAPGQGLEWIGYFSPGNDDIKYNEKFGRVT MTTDTSTAYMELRSLRSDDTAVYFCRSITTSYW GQQTLTVSS	249
8C2-2D6	VH1	QVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYTFTDHAIHW WVRQAPGQGLEWIGYFSPGNDDIKYNEKFGRVT MTTADKSSTAYMELRSLRSDDTAVYFCRSITTSYW GQQTLTVSS	250
8C2-2D6	VH2	QVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYTFTDHAIHW VRQAPGQGLEWIGYFSPGNDDIKYNEKFGRVTLTA DKSSSTAYMELRSLRSDDTAMYFCRSITTSYW GQQTLTVSS	251
8C2-2D6	VH3	EVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYTFTDHAIHW WVRQAPGQGLEWIGYFSPGNDDIKYNEKFGRVTM TADKSSTAYMELRSLRSDDTAVYFCRSITTSYW GQQTLTVSS	252
8C2-2D6	VH4	EVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYTFTDHAIHW VRQAPGQGLEWIGYFSPGNDDIKYNEKFGRVTLTA DKSSSTAYMELRSLRSDDTAMYFCRSITTSYW GQQTLTVSS	253
3F1	VL0	DIQMTQSPSSLASVGDRVTITCKASQDVGTNIAWY QQKPGKAPKLLIYSASTRHTGVPSRSGSGSTDFTL TISSLQPEDFATYYCQYSSPLTFGQQGTKEIK	254
3F1	VL1	DIQMTQSPSSLASVGDRVTITCKASQDVGTNIAWY	255

		QQKPGKAPKVLIIYSASTRHTGVPSRSGSGSTDFTL TISSLQPEDFATYYCQYSSPLTFGQQGTKEIK	
3F1	VH0	QVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYTFTDHAIHW WVRQAPGQGLEWIGYFSPGNDDIKYNEKFGRVT MTTDTSTAYMELRSLRSDDTAVYFCRSITTSYW GQQTLTVSS	256
3F1	VH1	QVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYTFTDHAIHW WVRQAPGQGLEWIGYFSPGNDDIKYNEKFGRVT MTTADKSSTAYMELRSLRSDDTAVYFCRSITTSYW GQQGTKEIK	257
3F1	VH2	QVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYTFTDHAIHW WVRQAPGQGLEWIGYFSPGNDDIKYNEKFGRVTM TADKSSTAYMELRSLRSDDTAVYFCRSITTSYW GQQGTKEIK	258
3F1	VH3	EVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYTFTDHAIHW WVRQAPGQGLEWIGYFSPGNDDIKYNEKFGRVTM TADKSSTAYMELRSLRSDDTAVYFCRSITTSYW GQQGTKEIK	259
3F1	VH4	EVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYTFTDHAIHW WVRQAPGQGLEWIGYFSPGNDDIKYNEKFGRVTM TADKSSTAYMELRSLRSDDTAVYFCRSITTSYW GQQGTKEIK	260

[0252]

[0253]

[0254]

항체 서열 죄적화

[0255]

가변 도메인 서열은 항체 기능, 별현, 안정성 및/또는 면역원성에 영향을 미칠 수 있는 서열 특징들에 대해 분석될 수 있다. 일부 경우에, 이러한 특징은 NG 잔기 쌍을 포함할 수 있다. NG 잔기 쌍은 아스파라긴 탈아미드화 되기 쉬울 수 있으며, 시간 경과에 따라 3:1 비의 글루타메이트 및 피로글루타메이트로 전환될 수 있다. 이러한

잔기 쌍을, 예를 들면, SG 또는 QG 쌍으로 돌연변이시켜 이러한 부위에서 탈아미드화를 방지할 수 있다. 대안적으로, 이러한 항체는 탈아미드화를 감소시키도록 제제화할 수 있다.

[0256] 일부 실시양태에서, 아스파르테이트 이성질화 부위를 동정하고 변경할 수 있다. 아스파르테이트 이성질화 부위는 DG 아미노산 잔기 쌍을 포함한다. 이러한 부위에서 아스파르트산은 시간 경과에 따라 3:1 비의 글루타메이트 및 피로글루타메이트로 전환될 수 있다. DG 잔기 쌍을 SG 또는 QG 잔기 쌍으로 돌연변이시켜 이러한 부위에서 이성질화를 방지할 수 있다. 대안적으로, 이러한 항체는 탈아미드화를 감소시키도록 제제화할 수 있다.

[0257] 일부 실시양태에서, N-말단 글루타민 잔기를 N-말단 글루타메이트 잔기로 전환시킬 수 있다. 이것은 N-말단 열분해(pyrolization)를 방지할 수 있다.

[0258] 일부 실시양태에서, 아미노산 잔기의 하나 이상의 응집-경향(aggregation-prone) 패치를 돌연변이시킬 수 있다. 이들은 별기한 측쇄를 갖는 아미노산, 예를 들면, 히스티딘, 페닐알라닌 및 트립토판을 갖는 패치를 포함할 수 있다.

[0259] 일부 실시양태에서, 하나 이상의 시스테인 잔기를 돌연변이시켜 쌍을 이루지 않은(unpaired) 시스테인의 존재를 방지할 수 있다. 쌍을 이루지 않은 시스테인은, 예를 들면, 항체의 일부로서 용매에 접근 가능한 경우 반응성일 수 있다. 일부 경우에, 쌍을 이루지 않은 시스테인 잔기는 세린으로 돌연변이될 수 있다.

[0260] 일부 실시양태에서, 항체 생산, 안정성, 결합 및/또는 활성을 개선시키기 위해 하나 이상의 당화 부위(예컨대, N-결합된 NXS/T 부위), 산 절단 부위 및 아미노산 산화 부위를 돌연변이시킨다.

IgG 합성

[0262] 본원에 제시된 하나 이상의 가변 도메인 및/또는 CDR 아미노산 서열을 포함하는 IgG 항체(예컨대 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4)(또는 이의 단편 또는 변이체)는 추가의 시험 및/또는 제품 개발을 위해 합성할 수 있다. 이러한 항체는 목적하는 아미노산 서열을 암호화하는 cDNA의 하나 이상의 세그먼트를 IgG 생산에 적합한 발현 벡터에 삽입함으로써 제조될 수 있다. 발현 벡터는 포유류 세포에서의 IgG 발현에 적합한 포유류 발현 벡터를 포함할 수 있다. IgG의 포유류 발현은 생산된 항체가 포유류 단백질에 특유한 변형(예컨대 당화)를 포함하는 것을 보장하고/하거나 항체 제제에 내독소 및/또는 박테리아 발현 시스템으로부터 단백질 제제에 존재할 수 있는 기타의 오염물이 결핍되는 것을 보장하도록 수행될 수 있다.

면역원성 숙주

[0264] 일부 실시양태에서, 본 발명의 글리칸-상호작용 항체는 본원에서 "면역원성 숙주"라고 하는 면역화를 위한 숙주로서 비-인간 동물의 사용을 통해 개발될 수 있다. 일부 실시양태에서, 면역원성 숙주는 포유동물이다. 일부 실시양태에서, 면역원성 숙주는 유전자이식 녹아웃 마우스이다. 글리칸-상호작용 항체의 표적 부위 및/또는 에피토프 표적을 갖는 항원이, 도입된 항원 상에 존재하는 표적 부위 및/또는 에피토프 표적에 특이적으로 결합하는 면역원성 숙주에서 면역 반응을 자극하고 항체를 생산하기 위해 면역원성 숙주와 접촉하는데 사용될 수 있다.

[0265] 본 발명의 몇 가지 방법에 따르면, 항-STn 항체의 개발은 *Cmah* 유전자가 교란되었던 마우스를 면역화함을 포함할 수 있다. 이러한 돌연변이는 이러한 마우스에서는 시알산의 면역원성 비-인간 형태인 Neu5Gc가 더 이상 생산되지 않는다는 점에서 더욱 인간-같은 생리학을 초래할 수 있다. 회수 가능한 항-GcSTn의 양을 감소시킴으로써 또는 항체가 다시 하이브리도마에 결합함으로 인해 하이브리도마가 죽기 시작하여, GcSTn 단클론 항체의 생산을 위한, Neu5Gc 발현이 없는 하이브리도마를 생산하기 위한 *Cmah*^{-/-} 골수종 세포가 또한 제공된다. 또 다른 유전자가 *Cmah*^{-/-} 골수종 세포의 백그라운드에서 녹아웃될 수 있다. 예를 들면, 인간에 매우 면역원성인 에피토프의 형성에 중요한 효소를 암호화하는 알파1,3-갈락토실트랜스퍼라제 유전자(Chung, C.H. et al., Cetuximab-induced anaphylaxis and IgE specific for galactose-alpha-1,3-galactose. N Engl J Med. 2008 Mar 13;358(11):1109-17)가 *Cmah*^{-/-} 골수종 세포의 백그라운드에서 녹아웃될 수 있다.

[0266] 본 발명의 또 다른 방법에 따르면, 야생형 마우스가 면역화에 사용될 수 있다. 이러한 방법은 때때로 AcSTn 또는 pan-STn 에피토프와 상호작용하는 항체의 생산에 유리할 수 있다. 일부 경우에, 야생형 마우스에서 면역 반응이 더 왕성할 수 있다.

[0267] 면역화를 통해 생산된 항체를 면역원성 숙주의 혈청으로부터 단리할 수 있다. 면역원성 숙주로부터의 항체 생산 세포를 또한 사용하여 목적하는 항체를 생산하는 세포주를 생성할 수 있다. 일부 실시양태에서, 면역원성 숙주로부터의 항체 및/또는 항체 생산 세포의 스크리닝은 효소-결합 면역흡착 검정(ELISA) 및/또는 글리칸 어레이의

사용을 통해 수행될 수 있다.

[0268] 아주반트

본원에 기재된 항원으로의 면역원성 숙주의 면역화는 하나 이상의 아주반트의 사용을 포함할 수 있다. 아주반트는 이러한 면역원성 숙주에서 더욱 높은 면역 반응을 유도하는데 사용될 수 있다. 이와 같이, 본 발명에 따라 사용되는 아주반트는 항체 역가에 영향을 미치는 이들의 능력에 기초하여 선택될 수 있다.

일부 실시양태에서, 유중수 에멀젼이 아주반트로서 유용할 수 있다. 유중수 에멀젼은 이동성 항원 데포를 형성하고, 항원 서방출을 촉진시키고 면역 성분에 대한 항원 제시를 증진시킴으로써 작용할 수 있다. 프로인트 아주반트는 건조 및 불활성화된 마이코박테리아 입자를 포함하는 완전 프로인트 아주반트(CFA)로서, 또는 이러한 입자가 결핍된 불완전 프로인트 아주반트(IFA)로서 사용될 수 있다. 기타의 유중수-기반 아주반트는 EMULSIGEN® (MVP Technologies, Omaha, NE)을 포함할 수 있다. EMULSIGEN®은 동물계 성분을 함유하지 않는 마이크론 크기의 유적을 포함한다. 이것은 단독으로 또는 수산화알루미늄 및 CARBİGEN™(MVP Technologies, Omaha, NE)을 포함하지만 이에 제한되지 않는 다른 아주반트와 조합하여 사용될 수 있다.

일부 실시양태에서, TITERMAX® 아주반트가 사용될 수 있다. TITERMAX®는 스쿠알렌 뿐만 아니라 소르비탄 모노올레이트 80(유화제로서) 및 기타 성분을 포함하는 또 다른 유중수 에멀젼이다. 일부 경우에, TITERMAX®은 보다 높은 면역 반응을 제공하지만, 면역원성 숙주에 대해서는 감소된 독성을 갖는다.

면역자극성 올리고뉴클레오티드가 또한 아주반트로서 사용될 수 있다. 이러한 아주반트는 CpG 올리고데옥시뉴클레오티드(ODN)를 포함할 수 있다. CpG ODN이 Toll-유사 수용체 9(TLR9)에 의해 인식되어 강력한 면역자극 효과를 야기한다. 타입 C CpG ODN은 형질세포양 수지상 세포(pDC)로부터의 강력한 IFN- α 생산 및 B 세포 자극 뿐만 아니라 T-도움(T_H) 세포로부터의 IFN- γ 생산을 유도한다. CpG ODN 아주반트는 마우스에서 폐렴구균 다당류(19F 및 타입 6B)-특이적 IgG2a 및 IgG3을 상당히 증진시키는 것으로 나타났다. CpG ODN은 또한 단백질 운반체 CRM197, 특히 CRM197-특이적 IgG2a 및 IgG3에 대한 항체 반응을 증진시켰다(Chu et al., Infection Immunity 2000, vol 68(3):1450-6). 게다가, 늙은 마우스를 CpG-ODN과 조합된 폐렴구균 피막 다당류 혈청형 14(PPS14)로 면역화하였더니 IgG 항-PPS14 반응이 젊은 성인 수준으로 회복되었다(Sen et al., Infection Immunity, 2006, 74(3):2177-86). 본 발명에 따라 사용되는 CpG ODN은 클래스 A, B 또는 C ODN을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, ODN은 ODN-1585, ODN-1668, ODN-1826, ODN-2006, ODN-2007, ODN-2216, ODN-2336, ODN-2395 및/또는 ODN-M362와 같은 상업적으로 이용 가능한 것들 중의 어느 것을 포함할 수 있으며, 이들 각각은, 예를 들면, 캘리포니아주 샌디에고 소재의 인비보젠(InvivoGen)으로부터 구입할 수 있다. 일부 경우에, ODN-2395가 사용될 수 있다. ODN-2395는 인간 뿐만 아니라 마우스 TLR9를 특이적으로 자극하는 클래스 C CpG ODN이다. 이러한 ODN은 포스포로티오에이트 주쇄 및 CpG 회문 모티프(palindromic motif)를 포함한다.

일부 실시양태에서, 면역 자극 복합체(ISCOM)가 아주반트로서 사용될 수 있다. ISCOM은 특정한 화학양론 하에서 콜레스테롤, 인지질 및 Quillaia 사포닌을 함께 혼합하는 경우 자발적으로 형성되는 구형의 개방 케이지형 구조(직경 전형적으로 40nm)이다. ISCOM 기술은 엡스타인-바 바이러스(Epstein-Barr virus)(80% 탄수화물로 이루어진 340 kDa 항원)로부터의 gp340과 같은 거대 당단백질로부터 운반체-접합된 합성 웹타이드 및 비오텐과 같은 작은 합텐에 이르기까지 굉장히 다양한 항원에 대해 입증된다. 일부 ISCOM은 T_{H1} 및 T_{H2} 특징 둘 다를 갖는 균형 잡힌 면역 반응을 발생시킬 수 있다. ISCOM에 대한 면역 반응은 배수 림프절에서 개시되지만, 비장으로 효율적으로 이동되어, 단클론 항체를 생성하는데 비장이 특히 적합하도록 만든다. 일부 실시양태에서, ISCOM 아주반트 AbISCO-100(이스코노바(Isconova), 스웨덴 옵살라 소재)이 사용될 수 있다. AbISCO-100은 다른 사포닌에 민감할 수 있는 마우스와 같은 면역원성 숙주에서 사용하기 위해 특수하게 개발된 사포닌계 아주반트이다.

본 발명의 양태에 따르면, 면역화 용액의 아주반트 성분은 목적하는 결과를 달성하기 위해 달라질 수 있다. 이러한 결과는 면역원성 숙주에서 면역 반응의 전체적인 수준 및/또는 독성의 수준을 조절함을 포함할 수 있다.

[0275] 항체 서열 및 구조 분석 및 최적화

일부 실시양태에서, 본 발명의 항체는 서열 분석 및/또는 구조 분석에 적용될 수 있으며, 여기서 이들은 항체 화학, 친화성, 특이성, 단백질 접힘, 안정성, 제조, 발현 및/또는 면역원성(즉, 이러한 항체로 처리된 대상체에서의 면역 반응)에 영향을 미칠 수 있는 특성들에 대해 분석된다. 이러한 분석은 동일하거나 유사한 에피토프에 결합하는 항체들 간의 비교를 포함할 수 있다.

동일한 에피토프에 결합하는 항체의 항체 서열을 경쇄 및/또는 중쇄 서열에 있어서의 변화에 대해 분석할 수 있

다. 이러한 분석은 생식계열 서열 및/또는 CDR 서열을 포함할 수 있다. 이러한 분석으로부터 수득된 정보는 보존된 아미노산 잔기; 아미노산의 보존된 세그먼트; 보존된 측쇄 특징을 갖는 아미노산 위치; 보존된 CDR 길이; 및 동일한 에피토프에 결합하는 항체들 사이에 보존된 다른 특징들을 확인(및 임의로 변형, 결실, 대체 또는 복구)하는데 사용될 수 있다. 이러한 정보는 항체 친화성, 특이성, 단백질 접힘, 안정성, 제조, 발현 및/또는 면역원성을 개선시키기 위해 변이체를 설계하거나 항체 최적화 과정을 통지하는데 사용될 수 있다.

[0278] 서열 분석은 유사성을 확인하기 위해 동일하거나 유사한 에피토프에 결합하는 둘 이상의 항체를 정렬함을 포함할 수 있다. 이러한 분석은 항체 영역(예컨대, CDR, 가변 도메인, 생식계열 세그먼트)의 서열 및/또는 길이를 비교할 수 있다. 아미노산 삽입, 아미노산 결실 및 치환을 확인하고 평가할 수 있다. 서열 차이를 항체 친화성 및/또는 특이성에 대해 비교할 수 있다.

[0279] 일부 경우에, 서열 분석은 하나 이상의 쌍을 이루지 않은 시스테인 또는 불규칙적인 디설파이드; 당화 부위(예컨대, N-결합된 NXS/T 부위); 산 절단 부위, 아미노산 산화 부위, 마우스 생식계열 서열과의 정합(conformity); 아스파라긴 탈아미드화 부위; 아스파르테이트 이성질화 부위; N-말단 피로글루타메이트 형성 부위; 및 CDR에서의 응집-경향 패치를 확인(및 임의로 변형, 결실, 대체 또는 복구)하기 위해 수행된다.

[0280] 일부 경우에, 본 발명은 본원에 제시된 항체의 서열 분석-통지된 변이체를 제공한다. 본원에서 사용되는 용어 "서열 분석-통지된 변이체"는 항체 서열 분석으로부터 유래된 하나 이상의 결론에 기초하여 변형된 항체 변이체를 가리킨다. 일부 경우에, 본 발명의 항체는 항체 친화성, 특이성, 단백질 접힘, 안정성, 제조, 발현 및/또는 면역원성 중의 하나 이상에 대한 변형을 포함하는 항체 변이체를 생산하도록 변형될 수 있다.

[0281] 몇몇 서열 분석-통지된 변이체는 하나 이상의 CDR 길이 변형을 포함한다. CDR 길이 변형된 항체는 원래의 항체 서열에 비해 하나 이상의 CDR에 하나 이상의 부가되거나 결실된 아미노산을 포함할 수 있다. 일부 경우에, 서열 분석-통지된 변이체는 다른 항체(예컨대, 동일하거나 유사한 에피토프에 결합하는 항체)로부터 유도된 하나 이상의 CDR로의 하나 이상의 CDR의 치환을 포함할 수 있다. 일부 경우에, 서열 분석-통지된 변이체는 다른 항체(예컨대, 동일하거나 유사한 에피토프에 결합하는 항체)로부터의 중쇄 또는 경쇄 가변 도메인의 치환을 포함할 수 있다. 서열 분석-통지된 변이체는 항체가 발현되는 하나 이상의 생식계열 유전자에의 변형을 포함할 수 있다. 이러한 변형은 점 돌연변이, 영역 돌연변이, 삽입 돌연변이 또는 결실 돌연변이를 포함할 수 있다. 일부 경우에, 생식계열 유전자 변형은 CDR을 하나의 공지된 생식계열 유전자로부터 다른 공지된 생식계열 유전자로 이동하도록 수행된다. 서열 분석-통지된 변이체는 scFv, 모노바디, 디아바디, 인트라바디, CAR, 항체 모방체 등을 포함하지만 이에 제한되지 않는 본원에 기재된 기타의 변이체를 포함할 수 있다.

[0282] 일부 실시양태에서, 서열 및/또는 구조 분석은 항체 단편 디스플레이 라이브러리(scFv 라이브러리, 파지 디스플레이 라이브러리 및 효모 디스플레이 라이브러리를 포함하지만, 이에 제한되지 않음)의 작제를 통지하는데 사용될 수 있다. 하나의 예에서, 서열 정렬은 공통 항원 또는 에피토프를 갖는 둘 이상의 항체를 정렬하기 위해 수행될 수 있으며 정렬된 항체 사이에서 보존된 또는 정렬된 항체 사이에서 가변성인 아미노산 잔기가 확인될 수 있다. 이러한 경우에, 항체 단편 디스플레이 라이브러리는 라이브러리 구성원 간의 가변성이 서열 분석에서 확인된 가변 아미노산에 주로 제한되도록 작제될 수 있다. 일부 경우에, 이러한 라이브러리는 표적 항원(예컨대, STn) 또는 표적 항원의 특정 에피토프(예컨대, 아래 실시예 1에 기재된 바와 같은 그룹 1, 2, 3 및 4 항체에 의해 인식된 에피토프)에 대한 변경된 친화성 및/또는 특이성을 갖는 변이체를 확인하는데 사용될 수 있다.

[0283] 일부 실시양태에서, 본 발명의 항체는 하나 이상의 쌍을 이루지 않은 시스테인 잔기를 제거, 대체 또는 달리 없애기 위해 변형될 수 있다. 일부 경우에, 쌍을 이루지 않은 시스테인 잔기는 반응성일 수 있으며 일부 경우에 항체 친화성 및/또는 특이성에 영향을 미칠 수 있다. 따라서, 본 발명의 몇몇 항체는 쌍을 이루지 않은 시스테인 잔기를 없애도록 변형되었다. 일부 경우에, 이러한 변이체는 변형된 에피토프 특이성 및/또는 친화성을 가질 수 있다. 일부 경우에, 쌍을 이루지 않은 시스테인 잔기의 변형은 항체 접힘을 변화시킬 수 있다. 일부 경우에, 이러한 변이체는 하나 이상의 시스테인 잔기의 치환 또는 결실을 포함한다. 일부 경우에, 이러한 변이체는 쌍을 이루지 않은 시스테인 잔기로부터의 바람직하지 않은 효과를 방지하거나 감소시키기 위해 하나 이상의 추가의 아미노산 잔기(하나 이상의 시스테인 잔기의 부가를 포함하지만, 이에 제한되지 않음)를 포함한다. 일부 경우에, 시스테인 잔기는 소수성 측쇄(예컨대, 티로신, 알라닌, 발린, 이소류신, 류신, 메티오닌, 페닐알라닌 또는 트립토판)를 갖는 아미노산으로 대체된다.

항체 시험 및 특성화

[0284] 본원에 기재된 항체는 다양한 방법을 사용하여 시험하고/하거나 특성화될 수 있다. 이러한 방법은 항체 친화성;

특이성; 및 활성(예컨대, 세포 신호전달 경로 또는 기타의 세포성 또는 생물학적 활성의 활성화 또는 억제)을 포함할 수 있지만, 이에 제한되지 않는 다양한 특징을 결정하는데 사용될 수 있다. 항체 시험은 독성, 치료 효과, 약력학, 약동학, 흡수, 용착, 대사 및 배설 중의 하나 이상에 대한 생체내 시험(예컨대, 동물 및/또는 인간 연구에서)을 추가로 포함할 수 있다. 동물에서의 시험은 마우스, 랫트, 토끼, 기니 피크, 돼지, 영장류(예컨대, 시노몰구스 원숭이), 양, 염소, 말 및 소에서의 시험을 포함할 수 있지만, 이에 제한되지 않는다.

[0286] 세포-기반 검정

[0287] 일부 실시양태에서, 본 발명의 항체는 하나 이상의 세포-기반 검정의 사용을 통해 시험되거나 특성화될 수 있다. 이러한 세포-기반 검정은 배양물 중의 세포로 시험판내에서 수행될 수 있다. 일부 경우에, 세포-기반 검정은 생체내에서 수행될 수 있다. 세포-기반 생체내 검정의 예는 종양 세포가 숙주에 주사되거나 달리 도입되는 종양 모델을 포함한다.

[0288] 일부 경우에, 세포-기반 검정에서 사용되는 세포는 본 발명의 하나 이상의 항체에 의해 인식되는 하나 이상의 표적 글리칸을 발현할 수 있다. 이러한 글리칸은 이러한 세포에 의해 자연적으로 발현될 수 있거나, 또는 대안적으로, 세포는 특정의 검정의 목적을 위해 필요한 하나 이상의 글리칸을 발현하도록 유도될 수 있다. 유도된 발현은 당화된 단백질 또는 당화를 조절하는 효소의 발현을 상향조절하는 하나 이상의 처리를 통해 이루어질 수 있다. 또 다른 경우에, 유도된 발현은 형질감염, 형질도입, 또는 당화의 조절에 관여하는 효소 또는 하나 이상의 당화된 단백질의 내인성 발현을 위한 하나 이상의 유전자 또는 전사체의 도입의 또 다른 형태를 포함할 수 있다.

[0289] 일부 경우에, 본원에서 사용되는 세포-기반 검정은 암 세포의 사용을 포함할 수 있다. 다수의 암 세포주가 본 발명의 항체를 시험하기 위한 실험에 이용 가능하다. 이러한 세포는 표적 글리칸을 발현할 수 있거나 표적 글리칸을 발현하도록 유도할 수 있다. 게다가, 암 세포주가 본 발명의 항체를 시험하는데 사용될 수 있으며, 여기서 암 세포주가 암 줄기 세포를 대표한다. 암 줄기 세포(CSC) 세포주는 (예컨대, 암 줄기 세포에 특이적인 마커를 기반으로 한 분류를 통해) 배양물에서 성장된 암 세포로부터 단리되거나 분화될 수 있다. 세포-기반 검정에서 사용되는 세포주는 유방, 결장, 난소, 림프구, 골수 및 피부 세포주를 포함할 수 있지만, 이에 제한되지 않는다. 구체적인 세포주는 SNU-16 세포, LS-174T 세포, MC38 세포, TOV-112D 세포, TOV-21G 세포, Jurkate E6.1 세포, K-562 세포, B16-F0 세포, B16-F10 세포, LS180 세포, COLO205 세포, TB4 세포, HT29 세포, Panc1 세포, HPAC 세포, HPAFII 세포, RKO 세포, SW480 세포 및 SNU-C2A 세포를 포함할 수 있지만, 이에 제한되지 않는다.

[0290] 일부 실시양태에서, 난소암 세포주가 사용될 수 있다. 이러한 세포주는 SKOV3, OVCAR3, OV90 및 A2870 세포주를 포함할 수 있지만, 이에 제한되지 않는다. 일부 경우에, CSC 세포는 CD44 및/또는 CD133 세포 마커를 발현하는 세포를 단리함으로써 이러한 세포주로부터 단리될 수 있다.

[0291] OVCAR3 세포는 진행성 난소 선암종을 앓고 있는 환자로부터 수득된 악성 복수를 사용하여 처음 확립되었다 (Hamilton, T.C. et al., 1983. Cancer Res. 43: 5379-89). 암 줄기 세포군은 CD44(세포 부착 및 이동에 관여함), CD133 및 CD117과 같은 특이적 세포 표면 마커에 기초한 선택을 통해 OVCAR3 세포 배양물로부터 단리될 수 있다(Liang, D. et al., 2012. BMC Cancer. 12: 201, 이들의 내용은 전문이 본원에 참고로 포함됨). OV90 세포는 인간 복수로부터 유사하게 유도되었던 상피 난소암 세포이다(미국 특허 제5,710,038호 참조). OV-90 세포가 활성화되는 경우 또한 CD44를 발현할 수 있다(Meunier, L. et al., 2010. Transl Oncol. 3(4): 230-8).

[0292] 일부 실시양태에서, 위암으로부터 유도된 세포주가 사용될 수 있다. 이러한 세포주는 SNU-16 세포[문헌(Park J.G. et al., 1990. Cancer Res. 50: 2773-80)]의 기술내용 참조, 이들의 내용은 전문이 본원에 참고로 포함됨)를 포함할 수 있지만, 이에 제한되지 않는다. SNU-16 세포는 STn을 자연적으로, 그러나 낮은 수준으로 발현한다.

[0293] 일부 실시양태에서, 본 기재내용의 방법은 결장직장 세포를 글리칸-상호작용 항체와 접촉시키고 세포에의 항체 결합, 세포에의 항체 내재화 및/또는 세포의 항체 사멸을 평가함으로써 글리칸-상호작용 항체를 특성화하는 방법을 포함한다. 이러한 몇몇 방법에 따르면, 결장직장 세포는 시험판내 성장된(예컨대, 세포 배양물을 통해 번식된) 결장직장 세포주로부터 유도될 수 있다. 일부 경우에, 결장직장 세포주는 종양으로부터 유도된다. 또 다른 양태에서, 결장직장 세포주는 이종이식 동물 모델(예컨대, 이종이식 마우스 모델)을 사용하여 형성된 종양으로부터 유도될 수 있다. 글리칸-상호작용 항체를 특성화하는데 사용되는 결장직장 세포는 환자(예컨대, 환자 종양)로부터의 것일 수 있다. 글리칸-상호작용 항체를 특성화하는 방법은 하나 이상의 결장직장 세포를 갖는 것을

포함한 조직 마이크로 어레이의 사용을 포함할 수 있다.

[0294] 글리칸-상호작용 항체를 결장직장 세포로 특성화하는 것은 결장직장 세포에 대한 글리칸-상호작용 항체의 결합의 EC₅₀을 측정함으로써 이러한 항체와 세포 간의 결합을 평가함을 포함할 수 있다. EC₅₀은 유동 세포계측 분석 및 ELISA 분석 중의 하나 이상을 사용함으로써 측정될 수 있다. 일부 실시양태에서, 글리칸-상호작용 항체를 결장직장 세포로 특성화하는 것은 글리칸-상호작용 항체에 의한 이러한 세포의 사멸을 평가함을 포함할 수 있다. 이것은 결장직장 세포를 글리칸-상호작용 항체로 처리하고 세포 생존율 검정을 사용하여 처리에 의해 사멸된 세포의 퍼센트를 구함으로써 수행할 수 있다. 일부 경우에, 글리칸-상호작용 항체에 의한 결장직장 세포의 사멸을 평가하는 것은 결장직장 세포의 글리칸-상호작용 항체 사멸에 대한 IC₅₀을 측정함을 포함한다. 일부 경우에, 항체는 세포독성제(예컨대, MMAE 또는 MMAF)와 접합될 수 있다.

글리칸 어레이

[0295] 일부 실시양태에서, 본 발명의 글리칸-상호작용 항체는 글리칸 어레이의 사용을 통해 개발할 수 있다. 본원에서 사용되는 용어 "글리칸 어레이"는 어레이 기재에 결합된 다수의 상이한 글리칸 중의 어느 것과 상호작용하는 제제를 확인하는데 사용되는 도구를 가리킨다. 일부 실시양태에서, 글리칸 어레이는 본원에서 "글리칸 프로브(glycan probe)"라고 하는 다수의 화학적으로 합성된 글리칸을 포함한다. 일부 실시양태에서, 글리칸 어레이는 적어도 2, 적어도 5, 적어도 10, 적어도 20, 적어도 30, 적어도 40, 적어도 50, 적어도 60, 적어도 70, 적어도 80, 적어도 90, 적어도 100, 적어도 150, 적어도 350, 적어도 1000 또는 적어도 1500개의 글리칸 프로브를 포함한다. 일부 실시양태에서, 글리칸 어레이는 목적하는 글리칸 프로브 세트를 나타내도록 맞춰질 수 있다. 일부 실시양태에서, 글리칸 프로브는 링커 분자에 의해 어레이 기재에 부착될 수 있다. 이러한 링커는 -O(CH₂)₂CH₂)NH₂ 및 O(CH₂)₃NHCOCH₂(OCH₂CH₂)₆NH₂를 포함하지만 이에 제한되지 않는 분자를 포함할 수 있다.

[0296] 일부 실시양태에서, 글리칸 어레이는 70개 이상의 화학적으로 합성된 글리칸을 가지며, 이의 대부분은 Neu5Ac 및 Neu5Gc-함유 글리칸 쌍으로서 존재한다. 글리칸 프로브의 몇 가지 예는 다음을 포함할 수 있다: Neu5Ac-α-2-6-GalNAc (AcSTn); Neu5Gc-α-2-6-GalNAc (GcSTn); Neu5,9Ac₂-α-2,6-GalNAc; Neu9Ac5Gc-α-2,6-GalNAc 및 Ga1NAc (Tn). AcSTn 대 GcSTn에 대한 항체 결합 특이성은 어레이를 사용하여 또는 당업계에 공지된 다른 특이성 결정방법을 사용하여 결정될 수 있다. 또한, O-아세틸화 STn에 대한 항체의 결합 프로파일이 결정될 수 있다. 암-관련 발현은 항체에 의한 STn 인식 증가와 상관성이 있기 때문에 STn의 O-아세틸화의 손실은 암과 관계있다 (Ogata, S. et al., Tumor-associated sialylated antigens are constitutively expressed in normal human colonic mucosa. Cancer Res. 1995 May 1;55(9):1869-74) 일부 경우에, 글리칸 어레이는 STn vs. Tn의 인식을 결정하는데 사용될 수 있다.

항체 단편 디스플레이 라이브러리 스크리닝 기술

[0297] 일부 실시양태에서, 본 발명의 항체는 고속 대량 발견 방법을 사용하여 생산 및/또는 최적화될 수 있다. 이러한 방법은 국제 특허 출원 제W02014074532호에 개시된 디스플레이 기술(예컨대 디스플레이 라이브러리 스크리닝 기술) 중의 어느 것을 포함할 수 있으며, 상기 특허의 내용은 전문이 본원에 참고로 포함된다. 일부 실시양태에서, 합성 항체는 디스플레이 기술(예컨대 파지 디스플레이 기술)을 사용하여 표적 항원을 스크리닝함으로써 설계, 선택 또는 최적화될 수 있다. 파지 디스플레이 라이브러리는 수백만 개 내지 수십억만 개의 파지 입자를 포함할 수 있으며, 입자 각각은 이들의 바이러스 코트 상에 독특한 항체 단편을 발현한다. 이러한 라이브러리는 하나 이상의 관심 항원에 대해 다양한 수준의 친화성을 갖는 잠재적으로 수백개의 항체 단편을 선택하는데 사용될 수 있는 풍부하게 다양한 자원을 제공할 수 있다(McCafferty, et al., 1990. Nature. 348:552-4; Edwards, B.M. et al., 2003. JMB. 334: 103-18; Schofield, D. et al., 2007. Genome Biol. 8, R254 and Pershad, K. et al., 2010. Protein Engineering Design and Selection. 23:279-88; 이의 내용은 전문이 본원에 참고로 포함됨). 종종, 이러한 라이브러리에 존재하는 항체 단편은 가요성 링커에 의해 연결된 V_H 및 V_L 항체 도메인의 융합 단백질을 포함하는 scFv 항체 단편을 포함한다. 일부 경우에, scFv는 상보성 결정 영역(CDR)의 가변 루프를 암호화하는 독특한 서열을 제외하고는 동일한 서열을 함유할 수 있다. 일부 경우에, scFv는 바이러스 코트 단백질(예컨대 바이러스 pIII 코트 단백질의 N-말단)에 연결된 융합 단백질로서 발현된다. V_L 쇄는 바이러스 코트로의 복합체 삽입 이전에 주변 세포질에서 V_H 쇄와 조립을 위해 별도로 발현될 수 있다. 침강된 라이브러리 구성원은 목적하는 scFv를 암호화하는 cDNA를 수득하기 위해 결합된 파지로부터 서열화될 수 있다. 이러한 서열은 재조합 항체 생산을 위해 항체 서열에 직접 삽입될 수 있거나, 시험관내 친화성 성숙을 통한 추가의

최적화를 위해 돌연변이되고 사용될 수 있다.

[0300] 세포독성 항체의 개발

일부 실시양태에서, 본 발명의 항체는 항체-의존성 세포-매개 세포독성(ADCC) 및/또는 항체-의존성 세포 죽세포 작용(ADCP)을 유도할 수 있다. ADCC는 세포가 면역 세포 공격의 결과로서 용해되는 면역 메카니즘이다. 이러한 면역 세포는 CD56+ 세포, CD3-자연 살해(NK) 세포, 단핵구 및 호중구를 포함할 수 있다(Strohl, W.R. Therapeutic Antibody Engineering. Woodhead Publishing, Philadelphia PA. 2012. Ch. 8, p186, 이들의 내용은 전문이 본원에 참고로 포함됨).

일부 경우에, 본 발명의 항체는 ADCC 또는 ADCP가 항체 결합시 필요한지 아닌지에 따라 소정의 동종형을 포함하도록 조작될 수 있다. 이러한 항체는, 예를 들면, 문현(Alderson, K.L. et al., J Biomed Biotechnol. 2011. 2011:379123)에 개시된 방법 중의 어느 것에 따라 조작될 수 있다. 마우스 항체의 경우에, 상이한 동종형의 항체가 ADCC를 촉진시키는데 더욱 효과적이다. 예를 들면, IgG2a가 IgG2b보다 ADCC를 유도하는데 있어서 더욱 효과적이다. 마우스 IgG2b 항체를 포함하는 본 발명의 몇몇 항체는 IgG2a 항체로 되도록 재조작될 수 있다. 이러한 재조작된 항체는 세포-관련 항원에 결합시 ADCC를 유도하는데 더욱 효과적일 수 있다. 일부 실시양태에서, 항체는 ADCC 및/또는 CDC 생물학적 활성을 개선시키기 위해 변형시키거나 하나 이상의 번역후 변형을 도입함으로써 재조작된다.

일부 실시양태에서, 본 발명의 방법에 따라 개발된 항체의 가변 영역을 암호화하는 유전자는 인간 Fc 영역을 암호화하는 포유동물 발현 벡터로 클로닝될 수 있다. 이러한 Fc 영역은 인간 IgG1 κ로부터의 Fc 영역일 수 있다. IgG1 κ Fc 영역은 Fc-수용체 결합 및 항체-의존적 세포-매개 세포독성(ADCC)을 증진시키는 것으로 알려진 아미노산 돌연변이를 포함할 수 있다.

일부 실시양태에서, 본 발명의 항체는 항체-약물 접합체(ADC) 치료 용도를 위해 개발될 수 있다. ADC는 하나 이상의 카고(예컨대, 치료제)가 [예컨대 직접적으로 또는 링커(예컨대 절단 가능한 링커 또는 비-절단 가능한 링커)를 통해] 부착된 항체이다. ADC는 하나 이상의 표적 세포 또는 조직으로의 치료제(예컨대, 약물 또는 세포독성제)의 전달에 유용하다(Panowski, S. et al., 2014. mAbs 6:1, 34-45). 일부 경우에, ADC는 표적화된 세포상의 표면 항원에 결합하도록 설계될 수 있다. 결합시, 전체 항체-항원 복합체가 내재화되어 세포 리소좀에 자시될 수 있다. 그후, ADC가 분해되어, 결합된 카고를 방출할 수 있다. 카고가 세포독성제인 경우, 표적 세포는 사멸되거나 달리 무력해질 것이다. 세포독성제는 세포골격 억제제[예컨대 메이탄신 또는 오리스타틴(예컨대 모노메틸 오리스타틴 E [MMAE] 및 모노메틸 오리스타틴 F [MMAF])과 같은 튜불린 중합 억제제] 및 DNA 손상화제(예컨대 칼케아미신 및 듀오카마이신과 같은 DNA 중합 억제제)를 포함할 수 있지만, 이에 제한되지 않는다.

일부 실시양태에서, 본 발명의 항체는 ADC로서 개발되는 경우 세포사를 촉진시키는 이들의 능력에 대해 시험될 수 있다. 세포 생존율 검정은 이차 항체-약물 접합체의 존재 및 부재하에서 수행될 수 있다. 그후 강력한 세포성장 억제를 갖는 항체를 직접적인 항체-약물 접합체(ADC)를 설계하는데 사용할 수 있다. 세포-기반 세포독성 검정에서 이러한 이차 항체-약물 접합체의 사용은 다수의 ADC 후보물질의 신속한 사전-스크리닝을 가능하게 할 수 있다. 이러한 검정에 기초하여, 비접합된 항체 후보물질이 하나 이상의 세포독성제에 접합된 이차 항체의 존재하에서 세포에 직접 부가된다(본원에서 2^o ADC라고 함). 고밀도의 표적화된 항원을 발현하는 세포로의 항체/2^o ADC 복합체의 내재화는 세포내 용량-의존적 약물 방출을 달성할 수 있어, 세포(예컨대, 종양 세포)를 사멸시키는 세포독성 효과를 야기할 수 있는 반면, 저밀도의 표적화된 항원을 발현하는 세포는 영향을 받지 않는다(예컨대, 정상 세포).

본 발명의 ADC는 암 세포를 표적화하도록 설계될 수 있다. 이러한 ADC는 하나 이상의 종양-관련 탄수화물 항원(TACA)에 지시된 항체를 포함할 수 있다. 일부 경우에, 본 발명의 ADC는 항-STn 항체이다.

[0307] 키메라 항원 수용체의 개발

일부 실시양태에서, 본 발명의 항체 서열은 키메라 항원 수용체(CAR)를 개발하는데 사용될 수 있다. CAR은 표적 세포(예컨대 종양 세포)의 인식 및 사멸을 촉진시키는 면역 세포 상에서 발현되는 막관통 수용체이다. CAR은 전형적으로 세 개의 기본 부분을 포함한다. 이들은 엑토도메인(인식 도메인으로도 알려져 있음), 막관통 도메인 및 세포내 (신호전달) 도메인을 포함한다. 엑토도메인은 표적 세포 상의 세포 항원에의 결합을 촉진시키는 반면, 세포내 도메인은 전형적으로 결합된 표적 세포의 사멸을 촉진시키는 세포 신호전달 기능을 포함한다. 또한, 이들은 본원에 기재된 하나 이상의 항체 가변 도메인 또는 이의 단편을 갖는 세포외 도메인을 가질 수 있다. 본 발명의 CAR은 또한 막관통 도메인 및 세포질 꼬리를 포함한다. CAR은 이러한 CAR이 면역 효과기 세포

상에서 발현되는 경우, 면역 효과기 세포가 CAR의 항체 부분에 의해 인식되는 임의의 세포에 결합하여 이를 제거하도록 항체의 하나 이상이 세그먼트, 항체 가변 도메인 및/또는 항체 CDR을 포함하도록 설계될 수 있다.

[0309] CAR의 특징은 단클론 항체의 항원-결합성을 이용하여 비-MHC-제한된 방식으로 선택된 표적에 대해 T-세포 특이성 및 반응성을 재지시하는 능력을 포함한다. 비-MHC-제한된 항원 인식은 CAR를 발현하는 T 세포에게 항원 처리와 무관하게 항원을 인식하는 능력을 제공함으로써, 종양 탈출의 주요 메카니즘을 우회한다. 더욱이, T-세포에서 발현되는 경우, CAR은 유리하게는 내인성 T 세포 수용체(TCR) 알파 및 베타 쇄와 이랑화하지 않는다.

[0310] 표적 종양에 대해 조작된 CAR은 하나 이상의 종양 관련 탄수화물 항원(TACA)에 대해 특이성을 가질 수 있다. 일부 실시양태에서, 이러한 CAR의 엑토도메인은 하나 이상의 항체 가변 도메인 또는 이의 단편을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, CAR은 T 세포에서 발현되며, 이를 "CAR-조작된 T 세포" 또는 "CAR-T"라고 할 수 있다. CAR-T는 하나 이상의 항체 가변 도메인을 갖는 CAR 엑토도메인으로 조작될 수 있다.

키메라 항원 수용체의 구조적 특징

[0312] 유전자-도입(gene-transfer) 기술로, T 세포를 이들의 표면 상에 항체를 안정적으로 발현하도록 조작하여, 목적하는 항원 특이성을 부여할 수 있다. 키메라 항원 수용체(CAR)는 특이적 항체의 항원-인식 도메인을 단일 키메라 융합 단백질로의 T 세포 활성화 특성을 갖는 CD3-제타 쇄 또는 Fc γ RI 단백질의 세포내 도메인과 조합한다. CAR 기술은 T 세포에 의한 표적 세포의 MHC-비제한된 인식을 제공한다. T 세포의 MHC 제한의 제거는 임의의 환자에서 및 또한, 통상적으로 각각 MHC 클래스 I 또는 II 애피토프에 제한된 CD8 $^{+}$ 및 CD4 $^{+}$ T 세포 둘 다에서 이들 분자의 사용을 촉진시킨다. Ab-결합 영역의 사용은 T 세포가 단백질에 의해서 뿐만 아니라 탄수화물 및 지질에 의해 형성된 애피토프에 반응하게 한다. 이러한 키메라 수용체 방안은 암의 면역요법에 특히 잘 맞아서, MHC 하향조절, 공동자극 분자의 발현의 부족, CTL 내성 및 T 세포 억제의 유도와 같은 종양이 면역인식을 피하는 메카니즘의 대부분을 우회할 수 있고, 여기서 CD8 $^{+}$ CTL 및 CD4 $^{+}$ T 세포 둘 다의 사용이 최적의 항종양 효능을 위해 최상으로 조합된다. 이러한 방안은 HIV와 같은 바이러스 이외에 광범위한 종양 항원에도 적용 가능한 것으로 입증되었다(Finney, et al., *J. Immunology*, 2004, 172:104-113).

[0313] 키메라 항원 수용체가 내인성 T-세포 수용체와 유사한 방식으로 T-세포 활성화를 촉발하지만, 실제로, CAR 기술의 임상적 응용은 키메라 항원 수용체 T 세포의 불충분한 생체내 확장에 의해 저해되었다. 예를 들면, 1세대 CAR은 이들의 신호전달 도메인으로서 CD3 ζ 또는 Fc 수용체 γ 쇄의 세포질 영역을 포함하였다. 이러한 1세대 CAR을 난소암, 신장암, 림프종 및 신경아세포종을 가진 환자에서 I상 임상 연구에서 시험하였으며, T 세포 세포 독성을 효과적으로 재지시하지만 반복된 항원 노출시 T 세포 증식 및 생존을 가능하게 하지는 못하는 크지 않은 반응을 유도하는 것으로 밝혀졌다. 2세대 CAR에 대한 원형(prototype)은 CD28 및 CD3 ζ 둘 다를 포함하는 수용체를 포함하였으며, 2세대 CAR은 B 세포 약성종양 및 기타의 암의 치료를 위해 시험되었다(Sadelain, et al., (2009) *Current Opinion in Immunology*, 21(2):215-223). 따라서, CAR은 상이한 기능적 특성을 갖는 수용체의 다양한 어레이로 신속하게 확장되었다.

[0314] 보다 최근에, CAR-매개된 T-세포 반응이 공동자극 도메인의 부가로 항상될 수 있는 것으로 밝혀졌다. 전임상 모델에서, CD137(4-1BB) 신호전달 도메인의 포함은 CD3-제타 쇄 단독의 포함과 비교하여 항종양 활성 및 키메라 항원 수용체의 생체내 지속성을 상당히 증가시키는 것으로 밝혀졌다(Porter, et al., *N. Engl. J. Med.* 2011, 365:725-733).

[0315] 따라서, 본 기재내용의 일부 실시양태에서, 본 발명의 항체 서열은 키메라 항원 수용체(CAR)를 개발하는데 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, CAR은 표적 세포(예컨대 종양 세포)의 인식 및 사멸을 촉진시키는 면역 세포 상에서 발현되는 막판통 수용체이다.

[0316] 다수의 암에서, 표적화하기 위한 종양-특이적 항원은 정의되지 않았지만, B-세포 신생물에서는, CD19가 매력적인 표적이다. CD19의 발현은 정상 및 악성 B 세포 및 B-세포 전구체에 제한된다. 항-CD19 키메라 항원 수용체(CART19)를 발현하는 자가조직 T 세포로의 처리의 시범 임상 시험(pilot clinical trial)을 진행성 p53-결핍 만성 림프성 백혈병(CLL)을 가진 환자에서 수행하였다. 골수에서의 CD19-특이적 면역 반응의 생성은 키메라 항원 수용체 T 세포의 최대 침윤과 동시에 일어나는 사이토kin의 일시적 방출 및 백혈병 세포의 절제(ablation)에 의해 입증되었다. (Porter, et al., *N. Engl. J. Med.* 2011, 365:725-733).

[0317] CAR의 추가의 구조적 특징은 시티 오브 호프(City of Hope)에 양도되고 마이클 젠슨(Michael Jensen)을 공동 발명자로 갖는 몇가지 PCT 공보에 개시된 것들 중의 어느 것을 포함할 수 있다. 예를 들면, PCT 공개 제WO

00/23573호는 CD20에 특이적인 수용체를 포함하는 세포외 도메인, 세포내 신호전달 도메인 및 막관통 도메인을 갖는 세포 표면 단백질을 발현하는 유전자 조작된, CD20-특이적 재지시된 T 세포를 기술한다. CD20⁺ 악성 종양의 세포 면역요법을 위한 및 임의의 유해한 B 세포 기능을 없애기 위한 이러한 세포의 용도. 한 실시양태에서, 세포 표면 단백질은 단일쇄 FvFc: ζ 수용체이며, 여기서 Fv는 웨პ타이드에 의해 연결된 CD20에 대한 단일쇄 단클론 항체의 VH 및 VL 쇄를 나타내고, Fc는 인간 IgG1의 힌지-CH2-CH3 영역을 나타내며, ζ 는 인간 CD3의 제타 쇄의 세포내 신호전달 도메인을 나타낸다. 수용체를 암호화하는 네이키드 DNA를 사용하는 전기천공에 의해 키메라 T 세포 수용체를 발현하는 재지시된 T 세포를 제조하는 방법. 유사하게, PCT 공개 제WO 02/077029호는 CD19에 대해 특이적인 수용체를 포함하는 세포외 도메인, 세포내 신호전달 도메인 및 막관통 도메인을 갖는 세포 표면 단백질을 발현하는 유전자 조작된, CD19-특이적 재지시된 면역 세포를 기술한다. CD19⁺ 악성 종양의 세포 면역요법을 위한 및 임의의 유해한 B 세포 기능을 없애기 위한 이러한 세포의 용도. 한 실시양태에서, 면역 세포는 T 세포이고 세포 표면 단백질은 단일쇄 svFvFc: ζ 수용체이며, 여기서 scFc는 CD19에 대한 단일쇄 단클론 항체의 VH 및 VL 쇄를 나타내고, Fc는 IgG1의 불변 영역의 적어도 일부를 나타내며, 제타는 T 세포 항원 수용체 복합체 제타 쇄(인간 CD3의 제타 쇄)의 세포내 신호전달 도메인을 나타낸다. 세포외 도메인 scFvFc 및 세포내 도메인 제타는 CD4의 막관통 도메인과 같은 막관통 도메인에 의해 연결된다. 수용체를 암호화하는 네이키드 DNA를 사용한 전기천공에 의해 키메라 T 세포 수용체를 발현하는 재지시된 T 세포를 제조하는 방법. 이러한 키메라 항원 수용체는, T 세포에서 발현되는 경우, 단클론 항체의 특이성에 기초하여 항원 인식을 재지시하는 능력을 갖는다. 종양 세포-표면 에피토프에 대해 표적 특이성을 갖는 scFvFc: 수용체의 설계는 이것이 기준의 항-종양 면역력에 의존하지 않기 때문에 입양 요법(adoptive therapy)을 위한 항종양 면역 효과기 세포를 생성하기 위한 개념적으로 매력적인 전략이다. 이러한 수용체는 MHC 비의존적 방식으로 항원에 결합한다는 점에서 "보편적(universal)"이며, 따라서 하나의 수용체 작제물을 사용하여 항원 양성 종양을 갖는 환자군을 치료할 수 있다. City of Hope PCT 공보 제WO 02/088334호, 제WO 2007/059298호 및 제WO 2010/065818호는 세포외 도메인을 세포 표면에 테더링할 수 있는 지지 영역에 연결된 가용성 수용체 리간드를 포함하는 세포외 도메인, 막관통 영역 및 세포내 신호전달 도메인으로 구성된 "제타카인(zetakine)"을 기술한다. 제타카인은, T 림프구의 표면 상에서 발현되는 경우, 가용성 수용체 리간드에 특이적인 수용체를 발현하는 이러한 특이적 세포에 T 세포 활성을 자시한다.

[0318]

CAR의 추가의 특징은 텍사스 대학(University of Texas)에 양도되고 로렌스 쿠퍼(Lawrence Cooper)를 공동 발명자로 갖는 두 개의 PCT 공보에 개시된 것들 중의 어느 것을 포함할 수 있다. PCT 공개 제WO 2009/091826호는 세포내 신호전달 도메인, 막관통 도메인 및 인간 CD 19 결합 영역을 포함하는 세포외 도메인을 포함하는 인간 CD19-특이적 키메라 T 세포 수용체(또는 키메라 항원 수용체, CAR) 폴리웨პ타이드(hCD19CAR라고 명명됨)를 포함하는 조성물을 기술한다. 또 다른 측면에서, CD 19 결합 영역은 F(ab')2, Fab', Fab, Fv 또는 scFv이다. 세포내 도메인은 인간 CD3 ζ 의 세포내 신호전달 도메인을 포함할 수 있으며 인간 CD28 세포내 세그먼트를 추가로 포함할 수 있다. 특정 측면에서 막관통 도메인은 CD28 막관통 도메인이다. PCT 공개 제WO 2013/074916호는 T 세포 수용체 및/또는 HLA의 발현을 없애도록 유전자 변형된 CAR⁺ T 세포를 사용하는 면역요법을 위한 방법 및 조성물을 기술한다. 특정 양태에서, T 세포 수용체-음성 및/또는 HLA-음성 T 세포는, 예를 들면, 아연-집게 뉴클레아제를 사용하여 생성된다. 동종이계의 건강한 공여자로부터의 CAR⁺ T 세포는 이식편 대 숙주 질환(GVHD)을 야기하지 않으면서 임의의 환자에게 투여되어, 암, 자가면역 및 감염과 같은 의학적 병태의 규격 치료(off-the-shelf treatment)를 위한 보편적인 시약으로서 작용할 수 있다.

[0319]

U.S. 보건 사회 복지부(Department of Health and Human Services)에 양도된 PCT 공개 제WO 2011/041093호는 KDR-1121 또는 DC101 항체의 항원 결합 도메인, 세포외 힌지 도메인, T 세포 수용체 막관통 도메인 및 세포내 T 세포 수용체 신호전달 도메인을 포함하는 항-혈관 내피 성장 인자 수용체-2 키메라 항원 수용체 및 암 치료에 있어서의 이들의 용도를 기술한다.

[0320]

PCT 공개 제WO 2012/079000호 및 제WO 2013/040557호(이의 내용은 전문이 본원에 참고로 포함됨)는 펜실베이니아 대학(University of Pennsylvania)에 양도되고 공동 발명자 칼 에이치. 준(Carl H. June)을 공유한다; 이들 공보는 항원 결합 도메인, 막관통 도메인, 공동자극 신호전달 영역 및 CD3 제타 신호전달 도메인을 포함하는 CAR 및 RNA 키메라 항원 수용체 (CAR) 형질감염된 T 세포를 생성하는 방법을 각각 기술한다.

[0321]

펜실베이니아 대학에 양도되고 공동 발명자 칼 에이치. 준(Carl H. June)을 공유하는 PCT 공개 WO2013/126712호는 또한 외인성 사이토kin 또는 배양보조 세포의 부가와 무관한 독립적인 리간드인, 배양물 중에서 연장된 지수 확장을 나타내는 T 세포의 지속적인 집단을 생성하기 위한 조성물 및 방법을 기술하며, 이것은 암의 치료에 유

용하다. 일부 실시양태에서, 항원 결합 도메인은 항-cMet 결합 도메인이다. 일부 실시양태에서, 항원 결합 도메인은 항-메소텔린 결합 도메인이다. 일부 실시양태에서, 항원 결합 도메인은 항-CD 19 결합 도메인이다. 힌지 도메인은 IgG4이고, 막관통 도메인은 CD28 막관통 도메인이다. 일부 실시양태에서, 공동자극 신호전달 영역은 CD28 신호전달 영역이다. 키메라 항원 수용체(CAR)를 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 벡터가 또한 제공되며, 여기서 CAR은 항원 결합 도메인, 힌지 도메인, 막관통 도메인, 공동자극 신호전달 영역 및 CD3 제타 신호전달 도메인을 포함한다.

[0322] 펜실베이니아 대학에 양도된 PCT 공개 제WO 2014/039513호는 세포의 세포용해 활성을 증진시키기 위해 세포에서 하나 이상의 디아실글리세롤 키나제(DGK) 동종형을 억제하는 조성물 및 방법을 기술한다. 세포는 입양 T 세포 전달에 사용될 수 있으며, 여기서 세포는 키메라 항원 수용체(CAR)를 발현하도록 변형된다. 입양 T 세포 전달에 사용되는 T 세포에서의 DGK의 억제는 T 세포의 세포용해 활성을 증가시키며, 따라서 암, 감염 및 면역 장애를 포함한 각종 병태의 치료에 사용될 수 있다.

[0323] 펜실베이니아 대학에 양도된 PCT 공개 제WO 2014/055771호는 난소암을 치료하기 위한 조성물 및 방법을 기술한다. 구체적으로, 상기 발명은 알파-엽산 수용체(FR-알파) 결합 도메인 및 CD27 공동자극 도메인을 갖는 유전자 변형된 T 세포를 투여하여 난소암을 치료하는 것에 관한 것이다. 한 실시양태에서, FR-알파 결합 도메인은 완전 인간형이어서, 숙주 면역 반응을 방지한다고 한다.

[0324] 일부 실시양태에서, 본 발명의 CAR은 종양을 표적화하도록 조작될 수 있다. 이러한 CAR은 하나 이상의 TACA에 대해 특이성을 가질 수 있다. 일부 경우에, 이러한 CAR의 엑토도메인은 본원에 제시된 하나 이상의 항체 가변 도메인 또는 이의 단편을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 CAR은 본원에서 "CAR-조작된 T 세포" 또는 "CAR-T"라고 하는 T 세포에서 발현된다. CAR-T는 본원에 제시된 하나 이상의 항체 가변 도메인을 갖는 CAR 엑토도메인으로 조작될 수 있다.

다중특이적 항체

[0325] 일부 실시양태에서, 본 발명의 항체는 하나 이상의 에피토프에 결합할 수 있다. 본원에서 사용되는 용어 "멀티 바디" 또는 "다중특이적 항체"는 둘 이상의 가변 영역이 상이한 에피토프에 결합하는 항체를 가리킨다. 에피토프는 동일하거나 상이한 표적 상에 있을 수 있다. 특정 양태에서, 다중-특이적 항체는 동일하거나 상이한 항원 상의 두 개의 상이한 에피토프를 인식하는 "이중특이적 항체"이다.

이중특이적 항체

[0326] 이중특이적 항체는 두 개의 상이한 항원에 결합할 수 있다. 이러한 항체는 전형적으로 적어도 두 개의 상이한 항체로부터의 항원-결합 영역을 포함한다. 예를 들면, 이중특이적 단클론 항체(BsMAB, BsAb)는 두 개의 상이한 단클론 항체의 단편으로 이루어진 인공 단백질이며, 따라서 BsAb가 두 가지 상이한 타입의 항원에 결합되게 한다. 이러한 기술의 한 가지 공통 용도는 암 면역요법에서의 용도이며, 여기서 BsMAB는 (CD3과 같은 수용체를 사용하여) 세포독성 세포 및 파괴하고자 하는 종양 세포와 같은 표적에 동시에 결합하도록 조작된다.

[0327] 이중특이적 항체는 문헌(Riethmuller, G., 2012. *Cancer Immunity*. 12:12-18; Marvin, J.S. et al., 2005. *Acta Pharmacologica Sinica*. 26(6):649-58; and Schaefer, W. et al., 2011. *PNAS*. 108(27):11187-92, 이의 내용은 전문이 본원에 참고로 포함됨)에 기재된 것들 중의 어느 것을 포함할 수 있다.

[0328] "삼작용성 이중특이" 항체라 불리는 신세대 BsMAB가 개발되었다. 이들은 각각 두 개의 항체로부터의 두 개의 중쇄 및 두 개의 경쇄로 구성되며, 여기서 두 개의 Fab 영역(팔)은 두 개의 항원에 대해 지시되고, Fc 영역(발)은 두 개의 중쇄를 포함하고 제3 결합 부위를 형성한다.

[0329] 이중특이적 항체의 가변 도메인의 상부를 형성하는 두 개의 파라토프 중에서, 하나는 표적 항원에 대해 지시될 수 있고 다른 하나는 CD3과 같은 T-림프구 항원에 대해 지시될 수 있다. 삼작용성 항체의 경우에, Fc 영역은 대식세포, 자연 살해(NK) 세포 또는 수지상 세포와 같은, Fc 수용체를 발현하는 세포에 추가로 결합할 수 있다. 요약하면, 표적화된 세포는 면역계의 하나 또는 두 개의 세포에 연결되며, 이것이 후속적으로 이를 파괴시킨다.

[0330] 또 다른 타입의 이중특이적 항체는 짧은 반감기, 면역원성 및 사이토kin 유리(cytokine liberation)에 의해 야기되는 부작용과 같은 특정 문제들을 극복하도록 설계되었다. 이들은 Fab 영역만으로 이루어진 화학적으로 연결된 Fab 및 다양한 타입의 2가 및 3가 단일쇄 가변 단편(scFvs), 두 개의 항체의 가변 도메인을 모방하는 융합 단백질을 포함한다. 이러한 보다 새로운 포맷 중의 가장 발달된 것은 이중-특이적 T-세포 인게이저(bi-specific T-cell engager; BiTE) 및 mAb2's, Fc 불변 영역 대신에 Fcаб 항원-결합 단편을 함유하도록 조작된 항체이다.

[0333] 이중특이적 단일쇄 항체 Fv 단편(Bs-scFv)이 암 세포를 사멸시키는데 성공적으로 사용되었다. 몇몇 인간 암은 야생형 p53로의 유전자 요법에 의해 회복되는 p53에 있어서의 기능적 결합에 의해 유발된다. Weisbart 등은 살아있는 결장암 세포에 침투하여, 세포내 p53에 결합하고, 이의 야생형 기능을 표적화 및 회복시키는 이중특이적 단일쇄 항체의 작제 및 발현을 기술한다(Weisbart, et al., *Int. J. Oncol.* 2004 Oct;25(4):1113-8; 및 Weisbart, et al., *Int. J. Oncol.* 2004 Dec;25(6):1867-73). 이러한 연구에서, 이중특이적 단일쇄 항체 Fv 단편(Bs-scFv)은 (i) 살아있는 세포에 침투하고 핵에 국한되는 mAb 3E10의 단일쇄 Fv 단편 및 (ii) 비-침투성 항체, p53의 C-말단에 결합하는 mAb PAb421의 단일쇄 Fv 단편으로부터 작제되었다. PAb421 결합은 SW480 인간 결장암 세포의 것을 포함한 일부 p53 돌연변이체의 야생형 기능을 회복한다. Bs-scFv는 SW480 세포에 침투하고 세포독성이었으며, 이것은 돌연변이성 p53에 대한 활성을 회복하는 능력을 시시한다. COS-7 세포(야생형 p53을 갖는 원숭이 신장 세포)는 이들이 p53에의 PAb421의 결합을 억제하는 SV40 거대 T 항원의 존재로 인해 PAb421에 무반응성이기 때문에 대조군으로서 역할을 하였다. Bs-scFv는 COS-7 세포에 침투하지만 세포독성은 아니었으며, 이에 의해 p53 결합에 관련없는 Bs-scFv의 비특이적 독성을 제거한다. Fv 단편 단독은 세포독성이 아니었으며, 이것은 사멸이 p53의 형질도입으로 인한 것이었음을 나타낸다. PAb421 VH의 CDR1에 있어서의 단일 돌연변이는 p53에의 Bs-scFv의 결합을 없애고 세포 침투를 변화시키지 않으면서 SW480 세포에 대한 세포독성을 제거하였으며, 이것은 세포독성을 위한 p53에의 PAb421 결합의 필요성을 더욱 뒷받침한다(Weisbart, et al., *Int. J. Oncol.* 2004 Oct;25(4):1113-8; 및 Weisbart, et al., *Int. J. Oncol.* 2004 Dec;25(6):1867-73).

[0334] 일부 실시양태에서, 본 발명의 항체는 디아바디일 수 있다. 디아바디는 기능성 이중특이적 단일쇄 항체(bscAb)이다. 이러한 2가 항원-결합 분자는 scFv의 비-공유 이량체로 이루어지며, 재조합 방법을 사용하여 포유동물 세포에서 생산될 수 있다. (문헌; 예컨대, Mack et al, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 92: 7021-7025, 1995). 많지 않은 디아바디가 임상 개발에 접어들었다. 항-CEA 키메라 항체 cT84.66의 요오드-123-표지된 디아바디 버전이 시티 오브 호프(the City of Hope)의 베크만 연구소(Beckman Research Institute)에 의해 후원된 연구에서 결장 직장 암의 수술전 면역영상(immunoscintigraphic) 검출을 위해 평가되었다(Clinicaltrials.gov NCT00647153)(Nelson, A. L., *Mabs*. 2010. Jan-Feb; 2(1):77-83).

[0335] 분자 유전학을 사용하여, 두 개의 scFv를 "텐덤 scFv"(tascFv)라고 불리는, 링커 도메인에 의해 분리된 단일 폴리펩타이드로 동시에 조작할 수 있다. TascFv는 가용성이 불량하거나 박테리아에서 생산되는 경우 재접힘(refolding)을 필요로 하는 것으로 밝혀졌으며, 또는 이들은 포유동물 세포 배양 시스템에서 제조될 수 있으며, 이것은 재접힘 필요를 모면하지만 불량한 수율을 초래할 수 있다. 두 개의 상이한 scFv에 대한 유전자를 갖는 tascFv의 작제는 "이중특이적 단일쇄 가변 단편"(bis-scFv)을 야기한다. 단지 두 개의 tascFv 만이 영리 회사에 의해 임상적으로 개발되었다; 둘 다는 종양학적 징후에 대한 마이크로메트(Micromet)에 의해 활성 초기 단계 개발 중인 이중특이적 제제이며, "이중특이적 T-세포 인게이저(BiTE)"로 묘사된다. 블리나투모맙(blinatumomab)은 2상에서 B-세포 비-호지킨 림프종에 대한 T-세포 반응을 강화시키는 항-CD19/항-CD3 이중특이적 tascFv이다. MT110은 1상에서 고형 종양에 대한 T-세포 반응을 강화시키는 항-EP-CAM/항-CD3 이중특이적 tascFv이다. 이중특이적 4가 "TandAbs"가 또한 어피메드(Affimed)에 의해 연구중이다(Nelson, A. L., *Mabs*. 2010. Jan-Feb; 2(1):77-83).

[0336] 맥시바디(maxibody)(IgG의 Fc(CH2-CH3 도메인)의 아미노 말단에 융합된 2가 scFV)가 또한 포함된다.

[0337] 이중특이적 T-세포-인게이저(BiTE) 항체는 선택된 표적 세포의 용해를 위해 세포독성 T-세포와 일시적으로 맞물리도록 설계된다. 이들은 전형적으로 두 개의 scFv(하나는 T 세포 상의 CD3에 결합하고 다른 하나는 파괴를 위해 표적화된 세포의 표면 상의 표적 항원에 결합함)를 포함한다. 일부 실시양태에서, 두 개의 scFv는 링커에 의해 연결된다. 또 다른 양태에서, 두 개의 scFv는 항체 상의 상이한 영역이다. BiTE 항체의 임상적 활성은 종양 조직으로부터 유도되거나, 특이적 T-세포 수용체로 형질감염된 세포와 확장된, 자가조직 T-세포가 고형 종양의 치료에 있어서 치료 가능성을 나타내었다는 조사결과를 확증한다. 이러한 개별 접근법들이 T-세포 단독이 심지어 말기 암에서도 상당한 치료 활성을 가질 수 있음을 입증하지만, 이들은 광범위한 기준에서 수행하기가 번거롭다. 이것은 종양-특이적 T-세포 클론의 생성을 촉진시키는 세포독성 T-림프구 항원 4(CTLA-4) 항체 및 또한 암 세포 용해를 위해 환자의 T-세포의 큰 집단과 직접적으로 맞물리는 이중- 및 삼중-특이적 항체에 따라 다르다. T-세포-인게이징 항체에 의한 인간 암 치료법을 위한 글로벌한 T-세포 인게이지먼트 요법(engagement therapy)의 가능성이 활발히 연구중에 있다(Baeuerle PA, et al., *Current Opinion in Molecular Therapeutics*. 2009, 11(1):22-30 and Baeuerle PA and Reinhardt C, *Cancer Res.* 2009, 69(12): 4941-4, 이의 내용은 전문이 본원에 참고로 포함됨).

[0338] 3세대 분자는 "소형화(miniaturized)" 항체를 포함한다. mAb 소형화의 가장 좋은 예 중에는 트루비온 파마슈티

컬스(Trubion Pharmaceuticals)로부터의 SMIP(소형 모듈 면역의약품, small modular immunopharmaceuticals)가 있다. 1가 또는 2가일 수 있는 이러한 분자는 하나의 V_L , 하나의 V_H 항원-결합 도메인 및 하나 또는 두 개의 불변 "효과기" 도메인을 함유하며, 이들 모두가 링커 도메인에 의해 연결되어 있는 재조합 단일체 분자이다. 아마도, 이러한 분자는 불변 도메인에 의해 부여된 면역 효과기 기능을 유지하면서 단편들에 의해 요구된 증가된 조직 또는 종양 침투의 이점을 제공할지도 모른다. 적어도 세 개의 "소형화" SMIP가 임상 개발에 접어들었다. 와이어스(Wyeth)와 제휴하여 개발된 항-CD20 SMIP인 TRU-015가 최첨단의 프로젝트이며, 류마티스 관절염(RA)의 경우 2상까지 진행되었다. 전신 홍반성 낭창(SLE) 및 B 세포 림프종에서의 초기 시도들은 결국 중단되었다. 트루비온 및 포싯 바이오테크놀로지(Facet Biotechnology)가 2상에 도달한 프로젝트인, CLL 및 다른 림프성 종양의 치료를 위한 TRU-016, 항-CD37 SMIP의 개발에 협력하고 있다. 와이어스가 RA, SLE 및 가능하게는 다발성 경화증을 포함한 자가면역 질환의 치료를 위한 항-CD20 SMIP SBI-087을 허가받았지만, 이러한 프로젝트는 여전히 임상 시험의 가장 초기 단계에 있다. (Nelson, A. L., *Mabs*.2010. Jan-Feb; 2(1):77-83).

[0339]

젠맙(genmab)은 헌지 영역이 IgG4 분자로부터 제거된 "유니바디(Unibody)" 기술의 연구 응용이다. IgG4 분자가 불안정하고 경쇄-중쇄 이형이량체를 서로 교환할 수 있지만, 헌지 영역의 결실이 중쇄-중쇄 쌍형성을 완전히 막아서, 안정성 및 연장된 생체내 반감기를 보장하도록 Fc 영역을 유지하면서 매우 특이적인 1가 경쇄/중쇄 이형 이량체를 남긴다. 이러한 배열은, IgG4가 FcR과 불량하게 상호작용하고 1가 유니바디가 세포내 신호전달 복합체 형성을 촉진시키지 못하기 때문에, 면역 활성화 또는 종양원성 성장의 위험을 최소화시킬 수 있다. 그러나, 이러한 주장은 주로 임상적 증거보다는 실험실 증거에 의해 뒷받침된다. 바이오테크놀(Biotecnol)이 또한 "소형화" mAb, CAB051을 개발하고 있는데, 이것은 전임상 연구 중인 "압축된(compacted)" 100 kDa 항-HER2 항체이다(Nelson, A. L., *Mabs*.2010. Jan-Feb; 2(1):77-83).

[0340]

단일 항원-결합 도메인으로 구성된 재조합 치료제가 또한 개발되었지만, 이들은 현재 임상 파이프라인의 4% 만을 차지한다. 이러한 분자는 극히 작으며, 분자량이 실물 크기 mAb에 대해 관찰된 것의 대략 1/10이다. 아라나(Arana) 및 도만티스(Domantis)가 인간 면역글로불린 경쇄 또는 중쇄의 항원-결합 도메인으로 구성된 분자를 분자를 설계하였지만, 아라나만이 ART-621, 2상 연구 중인 건선 및 류마티스 관절염의 치료를 위한 항-TNF α 분자를 임상 시험에서 후보로 두고 있다. 애블링스(Ablynx)는 경쇄가 결여된, 낙타 및 라마에서 발견되는 중쇄 항체의 항원-결합 가변 중쇄 영역(V_{Hc})으로부터 유도된 "나노바디"를 생산한다. 급성 관동맥 증후군을 위한 경피 관상동맥 중재술을 받고 있는 환자에서 혈전증을 예방하기 위한 정맥내 치료법으로서 2상 개발중인 ALX-0081 및 급성 관동맥 증후군 및 혈전성 혈소판감소성 자반을 갖는 환자 둘 다에 대해 의도된 피하 투여를 위한 1상 분자인 ALX-0681를 포함한 두 개의 애블링스 항-폰 빌레브란트 인자 나노바디가 임상 개발에 진출하였다(Nelson, A. L., *Mabs*.2010. Jan-Feb; 2(1):77-83).

[0341]

다중특이적 항체의 개발

[0342]

일부 실시양태에서, 본 발명의 항체 서열은 다중특이적 항체(예컨대, 이중특이적 삼중특이, 또는 보다 큰 다중 특이성)를 개발하는데 사용될 수 있다. 다중특이적 항체는 본 발명의 표적 항원의 상이한 에피토프에 대해 특이 적일 수 있거나, 본 발명의 표적 항원 및 이종 글리칸, 펩타이드 또는 고체 지지체 물질과 같은 이종 에피토프 둘 다에 대해 특이적일 수 있다. (참조; 예컨대, WO 93/17715; WO 92/08802; WO 91/00360; WO 92/05793; Tutt, A. et al., *Trispecific F(ab')3 derivatives that use cooperative signaling via the TCR/CD3 complex and CD2 to activate and redirect resting cytotoxic T cells*. *J. Immunol.* 1991 Jul 1;147(1):60-9; 미국 특허 4,474,893호; 4,714,681호; 4,925,648호; 5,573,920호; 5,601,819호; 및 Kostelny, S.A. et al., *Formation of a bispecific antibody by the use of leucine zippers*. *J. Immunol.* 1992 Mar 1;148(5):1547-53); 미국 특허 5,932,448호).

[0343]

메모리얼 슬론 케터링 암 센터(Memorial Sloan-Kettering Cancer Center)의 PCT 공개 제W02014144573호에는 이량체화의 능력 없이도 다중특이적 결합제를 능가하는 개선된 특성을 갖는 이량체성 다중특이적 결합제(예컨대, 항체 성분을 포함하는 융합 단백질)를 제조하기 위한 다량체화 기술이 개시되고 청구되어 있다.

[0344]

머크 페이튼트 게엠베하(Merck Patent GMBH)의 PCT 공개 제W02014144357호에는 4가 이중특이적 항체(TetBiAb) 및 암 또는 면역 장애를 진단 및 치료하기 위해 TetBiAb를 제조하는 방법 및 사용하는 방법이 개시되고 청구되어 있다. TetBiAb는 항체의 C-말단에 부착된 제2 항원 특이성을 갖는 Fab 단편의 제2 쌍을 특징으로 하며, 따라서 두 개의 항원 특이성의 각각에 대해 2가인 분자를 제공한다. 4가 항체는 유전 공학 방법에 의해, 항체 중쇄를 Fab 경쇄에 공유적으로 결합함으로써 생산되며, 상기 경쇄는 이의 동족, 공동-발현된 Fab 중쇄와 연결된다.

- [0345] IBC 파마슈티칼스, 인코포레이티드(IBC Pharmaceuticals, Inc.)의 PCT 공개 제WO2014028560호에는 질환의 치료를 위한, T-세포 항원에 대한 적어도 하나의 결합 부위 및 병에 걸린 세포 또는 병원체 상의 항원에 대한 적어도 하나의 결합 부위를 갖는 T 세포 재지시 이중특이적 항체(bsAb)가 개시되고 청구되어 있다. 바람직하게는, 이러한 bsAb는 항-CD3 x 항-CD19 이중특이적 항체이지만, 다른 T-세포 항원 및/또는 질환-관련 항원에 대한 항체가 사용될 수도 있다. 복합체는 효과기 T 세포를 표적화하여 암, 자가면역 질환 또는 전염병과 같은 질환과 관련된 세포의 T-세포-매개된 세포독성을 유도할 수 있다. 세포독성 면역 반응은 인터페론- α , 인터페론-bgr; 인터페론- λ 1, 인터페론- λ 2 또는 인터페론- λ 3를 포함하는 인터폰-기반 제제의 공동-투여에 의해 증진된다.
- [0346] 신이뮨 게엠베하(Synimmune GMBH)의 PCT 공개 제WO2013092001호에는 이중특이적 항체 분자, 뿐만 아니라 이의 제조방법, 이의 용도 및 이중특이적 항체 분자를 암호화하는 핵산 분자가 개시되고 청구되어 있다. 특히 면역 세포의 표적 세포 제한된 활성화를 매개할 수 있는 항체 분자가 제공된다.
- [0347] PCT 공개 제WO2012007167호에는 종양 세포의 표면 상의 적어도 글리코에피토프 및 erbB 부류의 수용체에 특이적으로 결합하여, 글리코에피토프 및 수용체와 가교결합하는 다중특이적 모듈 항체가 개시되고 청구되어 있으며, 이러한 항체는 NK 세포와 무관하게 세포용해를 수행하는 세포사멸 활성을 갖는다.
- [0348] PCT 공보 제WO2012048332호 및 제WO2013055404호에는 메디토프, 메디토프-결합 항체, 메디토프 전달 시스템, 뿐만 아니라 메디토프를 위한 단클론 항체 프레임워크 결합 계면 및 이의 사용방법이 개시되고 청구되어 있다. 구체적으로, 두 개의 항체 결합 펩타이드, C-QFDLSTRRLK-C("cQFD"; 여기서는 서열 식별 번호 1; 서열번호 261) 및 C-QYNLSSRALK-C("cQYN"; 여기서는 서열 식별 번호 2; 서열번호 262)가 신규한 mAb 결합 특성을 갖는 것으로 나타났다. 또한, "메디토프"로 불리는 cQFD 및 cQYN은 항-EGFR mAb 세특시맙의 Fab 프레임워크의 영역에는 결합하지만 항원에 결합하는 상보성 결정 영역(CDR)에는 결합하지 않는 것으로 나타났다. Fab 프레임워크 상의 결합 영역은 초항원 스타필로코커스(*Staphylococcal*) 단백질 A(SpA)(Graillie et al., 2000) 및 웨토스트렙토코커스 매그너스(*Peptostreptococcus magnus*) 단백질 L(PpL)(Graillie et al., 2001)과 같은 다른 프레임워크-결합 항원과는 별개이다. 따라서, 개시된 하나의 양태는 사이클릭 메디토프에 결합하는 독특한 뮤린-인간 항체 또는 이의 기능적 단편의 프레임워크 영역을 포함하는 프레임워크 결합 계면이다.
- [0349] 관심을 끄는 예시적인 특허 및 특허 공보는 미국 특허 제5,585,089호; 제5,693,761호; 및 제5,693,762호(이들 모두는 1995년 6월 7일자로 출원됨) 및 미국 특허 제6,180,370호이며, 이들 모두는 프로테인 디자인 랩스, 인코포레이티드에 양도되며, 하나 이상의 상보성 결정 영역(CDR) 및 공여자 면역글로불린으로부터의 가능한 추가의 아미노산 및 수용 인간으로부터의 프레임워크 영역을 갖는 인간화 면역글로불린을 제조하는 방법 및 이의 조성물을 기술한다. 각각의 인간화 면역글로불린 쇄는, CDR 이외에, 예를 들면, CDR과 상호작용하여 결합 친화성을 야기할 수 있는 공여자 면역글로불린 프레임워크로부터의 아미노산, 예를 들면, 공여자 면역글로불린에서 CDR에 바로 인접한 하나 이상의 아미노산 또는 분자 모델링에 의해 예측되는 바와 같이 약 3Å 이내에 있는 것들을 통상적으로 포함한다고 한다. 중쇄 및 경쇄는 각각 다양한 위치 기준 중의 어느 하나 또는 모두를 사용하여 설계될 수 있다. 무손상 항체로 조합되는 경우, 본 발명의 인간화 면역글로불린은 인간에서 실질적으로 비-면역원성이며 단백질 또는 에피토프를 함유하는 다른 화합물과 같은 항원에 대한 공여자 면역글로불린과 실질적으로 동일한 친화성을 보유한다고 한다.
- [0350] 루뱅 가톨릭 대학(Universite Catholique De Louvain) 및 바이오 트랜즈플랜트, 인코포레이티드(Bio Transplant, Inc.)에 양도된 미국 특허 제5,951,983호는 T-림프구에 대한 인간화 항체를 기술한다. HUM5400(EMBL 수탁 X55400)로 명명된 인간 V 카파 유전자로부터 및 인간 항체 클론 Amu 5-3(GenBank 수탁 번호 U00562)로부터의 프레임워크 영역이 그 안에 제시되어 있다.
- [0351] 크리에이티브 바이오모래큘스, 인코포레이티드(Creative Biomolecules, Inc.)의 미국 특허 제5,091,513호는 예비선택된 항원에 대해 친화성을 갖는 합성 단백질 계열을 기술한다. 단백질은 생합성 항체 결합 부위(BABS)로서 행동하는 영역을 구성하는 아미노산의 하나 이상의 서열을 특징으로 한다. 상기 부위는 1) 비-공유 결합되거나 디설파이드 결합된 합성 V_H 및 V_L 이량체, 2) V_H-V_L 또는 V_L-V_H 단일 쇄(여기서, V_H 및 V_L 은 폴리펩타이드 링커에 의해 부착된다), 또는 3) 개별 V_H 또는 V_L 도메인을 포함한다. 결합 도메인은 결합된 CDR 및 FR 영역을 포함하며, 이것은 별도의 면역글로불린으로부터 유도될 수 있다. 단백질은 또한, 예컨대, 효소, 독소, 결합 부위, 또는 부동화 배지 또는 방사성 원자에의 부착 부위로서 기능하는 다른 폴리펩타이드 서열을 포함할 수 있다. 단백질을 제조하기 위한, 항체의 생체내 생성에 의해 유발될 수 있는 임의의 특이성을 갖는 BABS를 설계하기 위한 및 이의 유사체를 제조하기 위한 방법이 개시된다.

- [0352] ESBATech, 알콘 바이오메디칼 리서치 유닛, 엘엘씨(Alcon Biomedical Research Unit, LLC,)의 미국 특허 제 8,399,625호는 항체 수용체 프레임워크 및 특히 매우 적합한 항체 수용체 프레임워크를 사용하여 비-인간 항체, 예컨대, 토끼 항체를 이식하기 위한 방법을 기술한다.
- [0353] 인트라바디
- [0354] 일부 실시양태에서, 본 발명의 항체는 인트라바디일 수 있다. 인트라바디는 이를 생산하는 세포로부터 분비되지 않지만 하나 이상의 세포내 단백질을 표적화하는 항체의 한 형태이다. 인트라바디는 세포내에서 발현되고 기능하며, 세포내 이동(intracellular trafficking), 전사, 번역, 대사 과정, 증식성 신호전달 및 세포 분열을 포함하지만 이에 제한되지 않는 다수의 세포 과정에 영향을 미치는데 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 방법은 인트라바디-기반 치료법을 포함한다. 이러한 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 가변 도메인 서열 및/또는 CDR 서열은 인트라바디-기반 치료법을 위한 하나 이상의 작제물에 삽입된다. 예를 들면, 인트라바디는 하나 이상의 당화된 세포내 단백질을 표적화할 수 있거나 하나 이상의 당화된 세포내 단백질과 또 다른 단백질 간의 상호작용을 조절할 수 있다.
- [0355] 20년도 더 전에, 세포내 표적에 대한 세포내 항체가 처음 기술되었다(Biocca, Neuberger and Cattaneo *EMBO J.* 9: 101-108, 1990). 포유동물 세포의 상이한 구획에서의 인트라바디의 세포내 발현은 내인성 분자의 기능의 차단 또는 조절을 가능하게 한다(Biocca, et al., *EMBO J.* 9: 101-108, 1990; Colby et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101 : 17616-21 , 2004). 인트라바디는 단백질 접힘, 단백질-단백질, 단백질-DNA, 단백질-RNA 상호작용 및 단백질 변형을 변화시킬 수 있다. 이들은 표현형 녹아웃을 유도할 수 있으며, 표적 항원에 직접 결합함으로써, 이의 세포내 트래픽을 변환시킴으로써 또는 결합 파트너와의 결합을 억제함으로써 중화제로서 작용할 수 있다. 이들은 주로 연구 도구로서 사용되어 왔으며 바이러스 병리학, 암 및 미스폴딩(misfolding) 질환과 같은 인간 질환의 치료를 위한 치료 분자로서 떠오르고 있다. 재조합 항체의 급성장하는 바이오-마켓은 치료법에서의 이들의 사용을 위한, 보다 낮은 면역원성과 함께, 향상된 결합 특이성, 안정성 및 가용성을 갖는 인트라바디를 제공한다(Biocca, abstract in *Antibody Expression and Production Cell Engineering Volume 7*, 2011, pp. 179-195).
- [0356] 일부 실시양태에서, 인트라바디는 간접 RNA(iRNA)를 능가하는 이점을 가지며; 예를 들면, iRNA는 다중 비-특이적 효과를 발휘하는 것으로 나타난 반면, 인트라바디는 표적 항원에 대한 높은 특이성 및 친화성을 갖는 것으로 나타났다. 게다가, 단백질로서, 인트라바디는 iRNA보다 훨씬 더 긴 활성 반감기를 갖는다. 따라서, 세포내 표적 분자의 활성 반감기가 긴 경우, iRNA를 통한 유전자 침묵은 효과를 내기에는 느릴 수 있는 반면, 인트라바디 발현의 효과는 거의 즉각적일 수 있다. 마지막으로, 다른 것은 남겨두더라도, 인트라바디를 특정 표적 분자의 특정 결합 상호작용을 차단하도록 설계하는 것이 가능하다.
- [0357] 인트라바디의 개발
- [0358] 인트라바디는 혼히 재조합 핵산 분자로부터 발현되고 세포내 보유되도록(예컨대, 세포질, 소포체, 또는 주변세포질에 보유되도록) 조작된 단일쇄 가변 단편(scFv)이다. 인트라바디는, 예를 들면, 인트라바디가 결합하는 단백질의 기능을 없애는데 사용될 수 있다. 인트라바디의 발현은 또한 인트라바디를 포함하는 핵산 발현 벡터에서 유도성 프로모터의 사용을 통해 조절될 수 있다. 인트라바디는 다음 문헌에 개시되고 검토된 것들과 같은 당업계의 공지된 방법을 사용하여 생산될 수 있다: (Marasco et al., 1993 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 7889-7893; Chen et al., 1994, *Hum. Gene Ther.* 5:595-601; Chen et al., 1994, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91: 5932-5936; Maciejewski et al., 1995, *Nature Med.*, 1: 667-673; Marasco, 1995, *Immunotech*, 1: 1-19; Mhashilkar, et al., 1995, *EMBO J.* 14: 1542-51; Chen et al., 1996, *Hum. Gene Therap.*, 7: 1515-1525; Marasco, *Gene Ther.* 4:11-15, 1997; Rondon and Marasco, 1997, *Annu. Rev. Microbiol.* 51:257-283; Cohen, et al., 1998, *Oncogene* 17:2445-56; Proba et al., 1998, *J. Mol. Biol.* 275:245-253; Cohen et al., 1998, *Oncogene* 17:2445-2456; Hassanzadeh, et al., 1998, *FEBS Lett.* 437:81-6; Richardson et al., 1998, *Gene Ther.* 5:635-44; Ohage and Steipe, 1999, *J. Mol. Biol.* 291:1119-1128; Ohage et al., 1999, *J. Mol. Biol.* 291:1129-1134; Wirtz and Steipe, 1999, *Protein Sci.* 8:2245-2250; Zhu et al., 1999, *J. Immunol. Methods* 231:207-222; Arafat et al., 2000, *Cancer Gene Ther.* 7:1250-6; der Maur et al., 2002, *J. Biol. Chem.* 277:45075-85; Mhashilkar et al., 2002, *Gene Ther.* 9:307-19; 및 Wheeler et al., 2003, *FASEB J.* 17: 1733-5; 및 본원에 인용된 참고문헌). 특히, CCR5 인트라바디는 슈타인베르거(Steinberger) 등에 의해 생산되었다(Steinberger et al., 2000, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:805-810). 일반적으로는 문헌[Marasco, WA, 1998, "Intrabodies: Basic Research and Clinical Gene Therapy Applications" Springer:New York]을 참조하

고; scFv의 검토를 위해서는, [Pluckthun in "The Pharmacology of Monoclonal Antibodies," 1994, vol. 113, Rosenberg and Moore eds. Springer-Verlag, New York, pp. 269-315]을 참조한다.

[0359] 일부 실시양태에서, 항체 서열은 인트라바디를 개발하는데 사용된다. 인트라바디는 흔히 단리된 VH 및 VL 도메인과 같은 단일 도메인 단편으로서 또는 세포 내에 단일쇄 가변 단편(scFv) 항체로서 재조합적으로 발현된다. 예를 들면, 인트라바디는 종종 단일 폴리펩타이드로서 발현되어, 가요성 링커 폴리펩타이드에 의해 결합된 중쇄 및 경쇄의 가변 도메인을 포함하는 단일쇄 항체를 형성한다. 인트라바디는 전형적으로 디설파이드 결합이 결핍되며 이들의 특이적 결합 활성을 통해 표적 유전자의 발현 또는 활성을 조절할 수 있다. 단일쇄 항체는 또한 경쇄 불변 영역에 결합된 단일쇄 가변 영역 단편으로서 발현될 수 있다.

[0360] 당업계에 공지된 바와 같이, 인트라바디는 재조합 폴리뉴클레오티드 벡터로 조작되어 이의 N 또는 C 말단에 세포이하 트래픽킹 신호를 암호화하여 표적 단백질이 위치한 세포이하 구획에 높은 농도로 발현되게 할 수 있다. 예를 들면, 소포체(ER)에 표적화된 인트라바디는 선도 웨პ타이드 및, 임의로, C-말단 ER 영역 신호, 예를 들면, KDEL 아미노산 모티프를 삽입하도록 조작된다. 핵에서 활성을 발휘하도록 의도된 인트라바디는 핵 국소화 신호를 포함하도록 조작된다. 인트라바디를 원형질 막의 시토졸 쪽에 테더링하기 위해 지질 모이어티가 인트라바디에 결합된다. 인트라바디는 또한 시토졸에서 기능을 발휘하도록 표적화될 수 있다. 예를 들면, 시토졸성 인트라바디는 시토졸 내에 인자들을 봉쇄하는데 사용되어, 이들이 이들의 자연적 세포 목적지로 수송되지 못하게 막는다.

[0361] 인트라바디 발현에는 특정의 기술적 문제가 있다. 특히, 세포 내의 새로-합성된 인트라바디의 단백질 형태 접힘 및 구조적 안정성은 세포내 환경의 환원 조건에 의해 영향을 받는다. 인간 임상 요법에서는, 세포 내에 인트라바디 발현을 달성하는데 사용되는 형질감염된 재조합 DNA의 적용을 둘러싼 안전성 우려가 있다. 유전자 조작에서 흔히 사용되는 다양한 바이러스-기반 벡터가 특히 우려된다. 따라서, 이러한 문제들을 회피하는 한 가지 방법은 단백질 형질도입 도메인(PTD)을 scFv 항체에 융합시켜 '세포-침투성' 항체 또는 '트랜스바디'를 생성하는 것이다. 트랜스바디는 단백질 형질도입 도메인(PTD)이 단일쇄 가변 단편(scFv) 항체와 융합되어 있는 세포-침투성 항체이다(Heng and Cao, 2005, *Med Hypotheses*. 64:1105-8).

[0362] 표적 유전자와 상호작용시, 인트라바디는 표적 단백질 분해를 가속화시키고 비-생리학적 세포이하 구획에 표적을 봉쇄하는 것과 같은 메카니즘에 의해 표적 단백질 기능을 조절하고/하거나 표현형/기능적 녹아웃을 달성한다. 표적 단백질 상의 촉매 부위에 또는 단백질-단백질, 단백질-DNA, 또는 단백질-RNA 상호작용에 관여하는 에피토프에의 결합과 같은 인트라바디-매개된 유전자 불활성화의 다른 메카니즘은 인트라바디가 지시되는 에피토프에 따라 좌우될 수 있다.

[0363] 한 실시양태에서, 인트라바디는 표적을 핵에 포획시키는데 사용됨으로써, 핵 내에서의 이의 활성을 방지한다. 목적하는 표적화를 달성하기 위해 핵 표적화 신호가 이러한 인트라바디로 조작된다. 이러한 인트라바디는 특정의 표적 도메인에 특이적으로 결합하도록 설계된다. 또 다른 양태에서, 표적 단백질에 특이적으로 결합하는 시토졸성 인트라바디는 표적이 핵에 접근하지 못하게 막는데 사용됨으로써, 이것이 핵 내에서 임의의 생물학적 활성을 발휘하지 못하게 막는다(예컨대, 표적이 다른 인자들과 전사 복합체를 형성하는 것을 막는다).

[0364] 이러한 인트라바디의 발현을 특정 세포에 대해 특이적으로 지시하기 위해, 인트라바디의 전사를 적합한 종양-특이적 프로모터 및/또는 인핸서의 조절적 제어하에 둔다. 인트라바디 발현을 특이적으로 전립선에 표적화하기 위해, 예를 들면, PSA 프로모터 및/또는 프로모터/인핸서가 사용될 수 있다(예를 들면, 1999년 7월 6일자로 허여된 미국 특허 제5,919,652호 참조).

[0365] 단백질 형질도입 도메인(PTD)은 단백질이 세포 막을 가로질러 전위하고 비정형적인 분비 및 내재화 경로를 통해 시토졸 내에 내재화될 수 있게 하는 짧은 웨პ타이드 서열이다. '트랜스바디'가 세포 내에서 발현되는 종래의 인트라바디를 능가하여 가지는 여러 분명한 잇점들이 있다. 우선, '정확한' 형태 접힘 및 디설파이드 결합 형성이 표적 세포로의 도입 전에 일어날 수 있다. 더욱 중요하게도, 세포-침투성 항체 또는 '트랜스바디'의 사용이 세포내 인트라바디 발현에 필요한, 인간 임상 치료법에서의 재조합 DNA 기술의 직접적인 적용을 둘러싼 압도적인 안전성 및 윤리적 우려를 방지할 것이다. 세포에 도입된 '트랜스바디'는 어떠한 영구적인 유전적 변화도 초래하지 않으면서 단지 제한된 활성 반감기를 가질 것이다. 이것은 인간 임상 치료법에서의 이들의 적용과 관련한 안전성 우려를 누그러뜨릴 것이다(Heng and Cao 2005, *Med Hypotheses*. 64:1105-8).

[0366] 인트라바디는 병리학적 동종형을 포함한 상이한 형태의 단백질을 특이적으로 인식하는 이들의 사실상 무제한적인 능력 때문에, 그리고 이들이 잠재적 응집 부위(세포내 및 세포외 부위 둘 다)에 표적화될 수 있기 때문에,

알츠하이머병, 파킨슨병, 헌팅تون병 및 프리온병을 포함한 미스풀딩 질환의 치료를 위한 유망한 치료제이다. 이들 분자는 응집을 방지함으로써 아밀로이드형성 단백질에 대한 중화제로서 및/또는 잠재적 응집 부위로부터 단백질을 경로 재설정함으로써 세포내 트래픽의 분자 션터(molecular shunter)로서 작동할 수 있다(Cardinale, and Biocca, *Curr. Mol. Med.* 2008, 8:2-11).

- [0367] 세포내 항체 또는 인트라바디를 기술하는 예시적인 특허 공보들이 아래에 제시되어 있으며, 이들 각각은 전문이 참고로 포함된다.
- [0368] 카타네오(Cattaneo) 등에게 등록된 PCT 공개 제W003014960호 및 미국 특허 제7,608,453호는 다음의 단계를 포함하여, 세포내 항체에 대한 적어도 하나의 컨센서스 서열(ICS)을 확인하는 세포내 항체 포획 기술 방법을 기술한다: 유효 세포내 항체의 서열을 포함하는 데이터데이스(VIDA 데이터베이스)를 생성하고 카바트에 따라 유효 세포내 항체의 서열을 정렬하는 단계; 정렬된 항체의 각각의 위치에서 특정 아미노산이 발생하는 빈도를 결정하는 단계; 빈도 역치 값(LP 또는 컨센서스 역치)을 70% 내지 100% 범위로 선택하는 단계; 특정 아미노산의 빈도가 LP 값 이상인 정렬 위치를 확인하는 단계; 및 상기 정렬의 위치에서 가장 빈번한 아미노산을 확인하는 단계.
- [0369] PCT 공보 제W00054057호; 제W003077945호; 제W02004046185호; 제W02004046186호; 제W02004046187호; 제W02004046188호; 제W02004046189호; 미국 특허 출원 공보 제US2005272107호; 제US2005276800호; 제US2005288492호; 제US2010143939호; 등록된 미국 특허 제7,569,390호 및 제7,897,347호 및 등록된 유럽 특허 제EP1560853호; 및 제EP1166121호는 모두 메디칼 리서치 카운실(Medical Research Council)에 양도되고 카타네오 등을 발명자로 포함하며, 세포내 세포내 단일 도메인 면역글로불린 및 면역글로불린 단일 도메인이 세포내 환경에서 표적에 결합하는 능력을 결정하는 방법, 뿐만 아니라 세포내 항체를 생성하는 방법을 기술한다.
- [0370] 카테네오(Cattaneo)를 발명자로 하고 S.I.S.A. 이탈리아 국제과학대학원(Scuola Internazionale Superiore)에게 양도된 PCT 공개 제W00235237호; 미국 특허 출원 공보 제2003235850호 및 등록된 유럽 특허 제EP1328814호는 세포내 항원의 에피토프의 생체내 동정을 위한 방법을 기술한다.
- [0371] 레이 라인 지노믹스(Lay Line Genomics) SPA에게 양도되고 카테네오를 발명자로 하는 PCT 공개 제W02004046192호 및 유럽 특허 제EP1565558호는 세포 내부에서 단백질 리간드 x 및 단백질 리간드 y 간의 상호작용을 방해하고 중화시키는 세포내 항체를 단리하는 방법을 기술한다. x와 y 간의 상호작용을 가능케 하는 세포내 항체를 사용하여 공지된 y 리간드에 결합할 수 있는 단백질 리간드 x를 동정하는 방법; 및 주어진 세포(상호작용체)의 단백질-단백질 상호작용의 상당 부분에 대해 또는 세포내 경로 또는 망상구조를 구성하는 단백질 상호작용에 대해 항체 단편의 세트를 단리하기 위한 방법이 또한 개시된다.
- [0372] 발명의 명칭이 "면역 반응의 인트라바디-매개된 조절"이고 다나 파버 캔서 인스티튜트 인코포레이티드(Dana Farber Cancer Institute Inc.)에게 양도되며 발명자 이름이 마라스코(Marasco) 및 마希尔카르(Mhashilkar)인 미국 특허 출원 공보 제2006034834호 및 PCT 공개 제W09914353호는, 예컨대, 세포를 면역조절 수용체 분자(IRM)에 대해 세포내 발현되는 항체, 또는 인트라바디로 형질도입함을 포함하여 세포 상의 개별 면역조절 수용체 분자(IRM) 또는 부류를 선택적으로 표적화함으로써 면역계의 조절을 변화시키는 방법에 관한 것이다. 바람직한 양태에서 인트라바디는 IRM에 대한 단일쇄 항체, 예컨대, MHC-1 분자를 포함한다.
- [0373] 다나 파버 캔서 인스티튜트 인코포레이티드 및 화이트헤드 바이오메디칼 인스티튜트(Whitehead Biomedical Institute)에게 양도되고 발명자 이름이 브래드너(Bradner), 랄(Rahl) 및 영(Young)인 PCT 공개 제W02013033420호는 브로모도메인 단백질 및 면역글로불린(Ig) 조절 요소 간의 상호작용을 억제하고 Ig 유전자좌로 전위된 종양유전자의 발현을 하향조절하는데, 뿐만 아니라 Ig 유전자좌로 전위되는 종양유전자의 증가된 발현을 특징으로 하는 암(예컨대, 혈액성 악성 종양)을 치료하는데 유용한 방법 및 조성물을 기술한다. 인트라바디가 일반적으로 기술된다.
- [0374] 발명의 명칭이 "진핵 세포에서 인트라바디를 생산하거나 동정하는 방법"이고 로체스터 의과대학(University of Rochester Medical Center)에 양도되며 발명자 이름이 자우더러 웨이(Zauderer, Wei) 및 스미스(Smith)인 PCT 공개 제W002086096호 및 미국 특허 출원 공보 제2003104402호는 삼분자 재조합 방법을 사용하여 진핵 세포에서 세포내 면역글로불린 분자 및 세포내 면역글로불린 라이브러리를 발현하는 고효율 방법을 기술한다. 세포내 면역글로불린 분자 및 이의 단편을 선택하고 스크리닝하는 방법 및 세포내 면역글로불린 분자를 생산, 스크리닝 및 선택하기 위한 키트, 뿐만 아니라 이러한 방법을 사용하여 생산된 세포내 면역글로불린 분자 및 단편이 추가로 제공된다.
- [0375] 어페니티 바이오사이언시즈(Affinity Biosciences) PTY LTD에게 양도되고 발명자 이름이 비슬리(Beasley), 나

이번(Niven) 및 키펠(Kiebel)인 PCT 공개 제WO2013023251호는 폴리펩타이드, 예를 들면, 항체 분자 및 이러한 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드 및 이의 라이브러리를 기술하며, 여기서 발현된 폴리펩타이드는 높은 안정성 및 가용성을 입증한다. 특히, 환원 또는 세포내 환경에서 가용성 발현 및 접힘을 입증하는 쌍을 이룬 VL 및 VH 도메인을 포함하는 폴리펩타이드가 기술되며, 여기서 인간 scFv 라이브러리를 스크리닝하여, 인간 생식계열 서열에 대해 동일한 프레임워크 영역을 가질 뿐만 아니라 현저한 열안정성 및 scFv 스캐폴드로의 CDR3 이식의 내성을 갖는 가용성 scFv 유전자를 단리한다.

[0376] 에스바테크(Esbatech) AG 및 취리히 대학(University of Zuerich)에게 양도되고 발명자 명칭이 에버트(Ewert), 후버(Huber), 호네거(Honneger) 및 플루엑툰(Plueckthun)인 유럽 특허 출원 제EP2314622호 및 PCT 공보 제WO03008451호와 제WO03097697호는 인간 가변 도메인의 변형을 기술하며 매우 안정한 가용성 단일쇄 Fv 항체 단편의 생성을 위한 프레임워크로서 유용한 조성물을 제공한다. 이러한 프레임워크는 세포내 성능을 위해 선택되었으며, 따라서 세포의 환원 환경에서와 같이 안정성 및 가용성이 항체 단편의 성능에 대한 제한 인자인 용도를 위한 scFv 항체 단편 또는 scFv 항체 라이브러리의 생성에 이상적으로 적합하다. 이러한 프레임워크는 또한 향상된 가용성 및 안정성을 입증하는 고도로 보존된 잔기 및 컨센서스 서열을 동정하는데 사용될 수 있다.

[0377] 발명의 명칭이 "인트라바디 표적화된 전달 및 치료제의 재부하를 위한 시스템 장치 및 방법"인 PCT 공개 제WO02067849호 및 미국 특허 출원 공보 제2004047891호는 분자의 인트라바디 표적화된 전달을 위한 시스템, 장치 및 방법을 기술한다. 보다 구체적으로, 몇몇 양태는 치료제를 국소화된 시기적절한 방식으로 대상체의 조직 영역에 표적 전달할 수 있는 재부하 가능한 약물 전달 시스템에 관한 것이다.

[0378] 암젠 인코포레이티드(Amgen Inc.)에게 양도되고 발명자 이름이 주우(Zhou), 쉐ن(Shen) 및 마틴(Martin)인 PCT 공개 제WO2005063817호 및 미국 특허 제7,884,054호는 인트라바디를 포함한 기능성 항체를 동정하기 위한 방법을 기술한다. 특히, 단독이량체성 인트라바디가 기술되며, 여기서 단독이량체의 각각의 폴리펩타이드 쇄는 Fc 영역, scFv 및 세포내 국소화 서열을 포함한다. 세포내 국소화 서열은 인트라바디가 ER 또는 골지(Golgi)에 국소화되게 할 수 있다. 임의로, 각각의 폴리펩타이드 쇄는 한 개 이하의 scFv를 포함한다.

[0379] 페르메온 바이올로직스 인코포레이티드(Permeon Biologics Inc.)에 양도된 보간(Vogan) 등의 PCT 공개 제WO2013138795호는 세포내 항체 및 항체-유사 모이어티의 전달을 위한 세포 침투 조성물 및 이들(본원에서는 "AAM 모이어티들" 또는 "AAM 모이어티"라고 함)을 세포내로 전달하는 방법을 기술한다. 이론에 구속시키고자 하는 것은 아니지만, 본 발명은, 적어도 부분적으로, AAM 모이어티를 표면 양전하를 갖는 세포 침투 폴리펩타이드(본원에서는 "Surf+ 침투 폴리펩타이드"라고 함)와 착화시킴으로써 AAM 모이어티가 세포내로 전달될 수 있다는 발견에 기초한다. 인트라필린(intraphilin) 기술의 몇 가지 응용의 예가 제공되어 있다.

[0380] 파스퇴르 인스티튜트(Pasteur Institute)에게 양도된 PCT 공개 제WO2010004432호는 낙타과(낙타, 단봉낙타, 라마 및 알파카)로부터의 면역글로불린을 기술하며, 이의 약 50%는 경쇄가 없는 항체이다. 이러한 중쇄 항체는 VHH(들), VHH 도메인(들) 또는 VHH 항체(들)라고 하는 단지 하나의 단일 가변 도메인에 의해 항원과 상호작용한다. 경쇄의 부재에도 불구하고, 이러한 단독이량체성 항체는 이들의 초가변 영역을 확대함으로써 광범위한 항원-결합 레퍼토리를 나타내며, VHH 도메인이 세포내 표적에 대해 지시되는 경우 시험관내 뿐만 아니라 생체내에서 트랜스바디 및/또는 인트라바디로서 작용할 수 있다.

[0381] PCT 공개 제WO2014106639호는 세포 표현형을 변형시킬 수 있는 인트라바디를 확인하고 인트라바디의 직접 또는 간접 세포 표적을 확인함으로써 세포 표현형에 관련되는 세포 표적을 확인하는 방법을 기술한다. 특히, 인트라바디 3H2-1, 3H2-VH 및 5H4는 알레르기 반응에 의해 촉발된 비만 세포에서의 탈과립 반응을 억제시킬 수 있으며; 더욱이, 인트라바디 3H2-1 및 5H4는 각각 ABCF1 계열 및 C120RF4 계열의 단백질을 직접 또는 간접적으로 표적화하였다. 이러한 ABCF1 및 C120RF4 억제제는 치료법, 특히 알레르기성 및/또는 염증성 병태를 치료하는데 유용하다고 한다.

[0382] 우로제네시스 인코포레이티드(Urogenesis Inc.)에게 양도된 PCT 공개 제WO0140276호는 일반적으로 세포내 항체(인트라바디)를 사용한 STEAP(전립선의 6개의 막관통 상피 항원, Six Transmembrane Epithelial Antigen of the Prostate) 단백질의 억제 가능성을 기술한다.

[0383] 맨체스터 대학(University of Manchester)에게 양도된 PCT 공개 제WO2086505호 및 발명자 이름이 사이몬(Simon) 및 벤턴(Benton)인 미국 특허 출원 공보 제US2004115740호는 표적 분자의 세포내 분석을 위한 방법을 기술하며, 여기서는 인트라바디가 바람직하다고 한다. 한 실시양태에서, CFP에 결합된 항-MUC1 인트라바디를 발현할 수 있는 벡터(pScFv-ECFP로 명명됨)가 기술된다.

- [0384] 진 쎄라피 시스템즈 인코포레이티드(Gene Therapy Systems Inc.)에게 양도된 PCT 공개 제WO03095641호 및 제WO0143778호는 세포내 단백질 전달을 위한 조성물 및 방법을 기술하며, 인트라바디가 일반적으로 기술된다.
- [0385] 셀렉티브 제네틱스 인코포레이티드(Selective Genetics Inc.)에게 양도된 PCT 공개 제WO03086276호는 세포내 감염의 치료를 위한 플랫폼 기술을 기재한다. 본원에 기재된 조성물 및 방법은 감염과 관련된 세포 표면 수용체 /모이어티를 통해 결합하고 내재화하는 결합된 리간드를 통해 감염성 세포를 표적화하는 비-표적 특이적 벡터를 포함한다. 벡터는 표적 세포로의 내재화시 발현되는 외인성 핵산 서열을 포함한다. 벡터 관련 리간드 및 핵산 분자는 상이한 감염원을 표적화하도록 변형될 수 있다. 또한, 본 발명은 벡터의 내재화를 지시할 수 있고 바이러스 진입을 차단할 수 있는 에피토프 및 리간드를 동정하는 방법을 제공한다.
- [0386] 에라스무스 대학(Erasmus University)에게 양도된 PCT 공개 제WO03062415호는 이종항원 갈락토스 알파 1,3 갈락토스의 생산의 촉매작용을 방해하는 세포내 항체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드 작제물 및/또는 PERV 입자 단백질과 같은 레트로바이러스 단백질에 특이적으로 결합하는 세포내 항체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드 작제물을 포함하는 유전자이식 유기체를 기술한다. 유전자이식 유기체의 세포, 조직 및 기관이 이종이식에 사용될 수 있다.
- [0387] 발명의 명칭이 "단백질 형태를 검출하기 위한 수단 및 이의 용도"인 PCT 공개 제WO2004099775호는 형태학적 단백질 상태를 특이적으로 검출하기 위한 입체형태-특이적 항체로서의 scFv 단편의 용도를 기술하며, 이것은 살아 있는 세포에서, 세포내 발현시, 내인성 단백질의 거동을 따르기 위한 센서로서 적용된다고 한다.
- [0388] 임클론 시스템즈 인코포레이티드(Imclone Systems Inc.)에게 양도된 PCT 공개 제WO2008070363호는 세포내 단백질에 또는 비-수용성 티로신 키나제의 Tec 계열의 구성원인 Etk, 내피 및 상피 티로신 키나제와 같은 세포내 단백질의 세포내 도메인에 결합하는 단일 도메인 인트라바디를 기술한다. 인트라바디 또는 인트라바디를 발현하는 핵산을 투여함으로써 환자에서 세포내 효소를 억제하고, 종양을 치료하는 방법이 또한 제공된다.
- [0389] 코넬 리서치 파운데이션 인코포레이티드(Cornell Research Foundation Inc.)에게 양도된 PCT 공개 제WO2009018438호는 표적 분자에 결합하는 단백질을 암호화하는 DNA 분자를 포함하는 작제물에 스톨 서열(stall sequence)에 결합되는 DNA 분자를 제공함으로써 표적 분자에 결합하고 세포내 기능성을 갖는 단백질을 동정하는 방법을 기술한다. 숙주 세포를 작제물로 형질전환시킨 다음 형성에 효과적인 조건하에서 배양하여, 숙주 세포내에, 번역이 스톤링된 단백질, 단백질을 암호화하는 mRNA 및 리보솜의 복합체를 형성한다. 복합체에서 단백질은 적절히 접혀있는 활성 형태이며 복합체는 세포로부터 회수된다. 이 방법은 숙주 세포 대신에 리보솜을 함유하는 세포-비함유 추출물 제제로 수행할 수 있다. 본 발명은 또한 표적 분자에 결합하는 단백질을 암호화하는 DNA 분자 및 RNA 분자에 결합된 SecM 스톤링 서열을 포함하는 작제물에 관한 것이다. DNA 분자 및 SecM 스톤링 서열은 이들 사이에 충분한 거리를 두고 결합되어, 이들의 암호화된 단백질을, 세포 내에, 적절하게 접힌 활성 형태로 발현되도록 한다. 인트라바디의 용도가 일반적으로 기술된다.
- [0390] 목암생명공학연구소(Mogam Biotech Research Institute)에게 양도된 PCT 공개 제WO2014030780호는 표적 단백질 및 항생제-내성 단백질이 Tat 신호 신호에 연결된 유전자 작제물을 제조한 다음 이것을 대장균(*E. coli*) 내에서 발현시킴으로써, 보다 높은 가용성 및 탁월한 열안정성을 갖는 표적 단백질, 특히, 인간 생식 세포로부터 유도되는 면역글로불린 가변 도메인(VH 또는 VL)을 스크리닝하기 위한 Tat-결합 단백질 공학(Tat-associated protein engineering; TAPE)이라고 명명된 방법을 기술한다. 또한, TAPE 방법에 의해 스크리닝되는, 가용성 및 탁월한 열안정성을 갖는 인간 또는 조작된 VH 및 VL 도메인 항체 및 인간 또는 조작된 VH 및 VL 도메인 항체 스캐폴드가 개시된다. 또한, TAPE 방법에 의해 스크리닝되는 인간 또는 조작된 VH 또는 VL 도메인 항체 스캐폴드에 랜덤 CDR 서열을 포함하는 라이브러리, 이의 제조방법, 라이브러리를 사용함으로써 스크리닝된 표적 단백질에의 결합 능력을 갖는 VH 또는 VL 도메인 항체 및 도메인 항체를 포함하는 약제학적 조성물이 제공된다.
- [0391] 유럽 특허 출원 제 EP2422811호는 세포내 에피토프에 결합하는 항체를 기술하며; 이러한 인트라바디는 항원에 특이적으로 결합할 수 있고 바람직하게는 이의 분비를 위한 작동 가능한 서열 코딩을 함유하지 않아서 계속 세포 내에 있는 항체의 적어도 일부를 포함한다. 한 실시양태에서, 인트라바디는 scFv를 포함한다. scFv 폴리펩타이드는 scFv가 항원 결합을 위한 바람직한 구조를 형성할 수 있게 하는 VH와 VL 도메인 사이에 폴리펩타이드 링 커를 추가로 포함한다. 또한, 인트라바디가 Eph 수용체의 세포질 도메인에 결합하여 이의 신호전달(예컨대, 자가인산화)을 방지하는 특정 양태가 기술된다. 또 다른 특정 양태에서, 인트라바디는 B-타입 에프린(Ephrin)(예컨대, 에프린B1, 에프린B2 또는 에프린B3)의 세포질 도메인에 결합한다.
- [0392] PCT 공개 제WO2011003896호 및 유럽 특허 출원 제EP2275442호는 증식 세포 핵 항원(PCNA)에 특이적으로 결합하

MANVQLNESGGGL VQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSIVVRQAPGKGLEWVSDISPAGVAKYSDSVKGRFTISRDNAKNRLLQMNSTPEDITGEYFCTKVQ
SPRTRIPAPSSQGTQTVSS(서열번호 263) 봇

MANVQLNESSGGVLVOPPGSRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPKGLEWVSEISPSGAVKAYSDSVKGRFTI SRDNAKNRLYLOMNSLTPEDTGEYFCTKVQ

SPRTRIPAPSSQGTQTVVSS(서열번호 264)를 포함한다. 실시예에서, PCNA의 결합에 관여하는 프레임워크 영역만

아니라 CDR 영역이 결정되었다.

유입국에 출원 세부2703485호는 영설 세포 또는 영설아세포를 선택하기 위한 뜨거운 표적 항원 특이적 항체를 생산하는

하기 위한 방법 및 신규한 단을논 양체를 기울한다. 한 설시상태에서, 세포내 면역글로불린을 발현하는 세포가 동정되었다.

항체-코팅제

일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항체 또는 항체 단편은 항체-코팅제를 포함하는 조성물을 제조하는데 사용될 수 있다. 본원에서 사용되는 용어 "항체-코팅제"는 하나 이상의 표면-관련 항체 또는 항체 단편을 포함하는 임의의 입자, 나노입자, 분자, 단백질, 융합-단백질, 지질, 리포솜, 세포 막, 세포, 또는 기타의 구조를 가리킨다. 항체-코팅제는 코팅에 사용되는 항체 또는 항체 단편의 특이성에 기초하여 하나 이상의 글리칸, 단백질, 세포, 조직 및/또는 기관을 표적화할 수 있다.

항체-코팅제는 관련된, 둘러싸인, 또는 매립된 카고를 포함할 수 있다. 카고는 검출 가능한 표지일 수 있다. 일부 카고는 하나 이상의 치료제를 포함할 수 있다. 이러한 치료제는 약물, 화학요법제 및 세포독성제를 포함할 수 있지만, 이에 제한되지 않는다. 세포독성제는 세포를 사멸시키거나 달리 무력화하는데 사용될 수 있다. 세포독성제는 세포골격 억제제[예컨대 튜불린 중합 억제제, 예를 들면, 메이탄신 또는 오리스타틴(예컨대 모노메틸 오리스타틴 E [MMAE] 및 모노메틸 오리스타틴 F [MMAT])] 및 DNA 손상화제(예컨대 DNA 중합 억제제, 예를 들면, 칼케아미신 및 듀오카마이신)를 포함할 수 있지만, 이에 제한되지 않는다.

일부 실시양태에서, 항체-코팅제는 본원에 기재된 하나 이상의 항체 또는 항체 단편으로 코팅된 나노입자를 포함할 수 있다. 이러한 항체-코팅제는 세포-관련 글리칸을 포함하지만 이에 제한되지 않는 하나 이상의 글리칸을 표적화할 수 있다. 이러한 일부 항체-코팅제는 하나 이상의 세포독성제를 포함한다.

단백질 및 변이체

본 발명의 글리칸-상호작용 항체는 전체 폴리펩타이드, 다수의 폴리펩타이드 또는 폴리펩타이드의 단편으로서 존재할 수 있으며, 이것은 독립적으로 하나 이상의 핵산, 다수의 핵산, 핵산의 단편 또는 상기한 것들 중의 어느 것의 변이체에 의해 암호화될 수 있다. 본원에서 사용되는 바와 같이, "폴리펩타이드"는 웨بت아이드 결합에 의해 가장 자주 함께 결합되는 아미노산 잔기(천연 또는 비천연)의 중합체를 의미한다. 용어는, 본원에서 사용되는 바와 같이, 임의의 크기, 구조, 또는 기능의 단백질, 폴리펩타이드 및 웨بت아이드를 가리킨다. 일부 경우에 암호화되는 폴리펩타이드는 약 50개 아미노산보다 작으며, 이때 폴리펩타이드를 웨بت아이드라고 부른다. 폴리펩타이드가 웨بت아이드인 경우, 이것은 적어도 약 2, 3, 4, 또는 적어도 5개 아미노산 잔기 길이일 것이다. 따라서, 폴리펩타이드는 유전자 산물, 자연 발생 폴리펩타이드, 합성 폴리펩타이드, 동족체, 오르소로그, 파라로그, 단편 및 기타 등가물, 상기의 변이체 및 유사체를 포함한다. 폴리펩타이드는 단일 분자일 수 있거나 이량체, 삼량체 또는 사량체와 같은 다중-분자 복합체일 수 있다. 이들은 또한 단일쇄 또는 다중쇄 폴리펩타이드를 포함할 수 있으며 연결되거나 결합될 수 있다. 용어 폴리펩타이드는 또한 하나 이상의 아미노산 잔기가 상응하는 자연 발생 아미노산의 인공 화학적 유사체인 아미노산 중합체에 적용될 수 있다.

용어 "폴리펩타이드 변이체"는 네이티브 또는 참조 서열로부터의 아미노산 서열에 있어서 상이한 문자를 가리킨다. 아미노산 서열 변이체는 네이티브 또는 참조 서열과 비교하여 아미노산 서열 내의 특정 위치에 치환, 결실 및/또는 삽입을 가질 수 있다. 통상적으로, 변이체는 네이티브 또는 참조 서열과 적어도 약 50% 동일성(상동성)을 가질 것이며, 바람직하게는, 이들은 네이티브 또는 참조 서열과 적어도 약 80%, 보다 바람직하게는 적어도 약 90% 동일(상동성)할 것이다.

일부 실시양태에서 "변이체 모방체"가 제공된다. 본원에서 사용되는 용어 "변이체 모방체"는 활성화된 서열을 모방하는 하나 이상의 아미노산을 함유하는 것이다. 예를 들면, 글루타메이트는 포스포로-트레오닌 및/또는 포스포로-세린에 대한 모방체로서 작용할 수 있다. 대안적으로, 변이체 모방체는 불활성화를 야기하거나 모방체를

함유하는 불활성화된 산물을 야기할 수 있으며, 예컨대, 페닐알라닌은 티로신에 대한 불활성화 치환물로서 작용 할 수 있거나; 알라닌은 세린에 대한 불활성화 치환물로서 작용할 수 있다. 본 발명의 글리칸-상호작용 항체의 아미노산 서열은 자연 발생 아미노산을 포함할 수 있으며 이와 같이 단백질, 웹타이드, 폴리웹타이드, 또는 이의 단편으로 간주될 수 있다. 대안적으로, 글리칸-상호작용 항체는 자연 발생 및 비-자연 발생 아미노산 둘 다를 포함할 수 있다.

[0402] 용어 "아미노산 서열 변이체"는 네이티브 또는 출발 서열과 비교하여 이들의 아미노산 서열에 있어 약간의 차이를 갖는 분자를 가리킨다. 아미노산 서열 변이체는 아미노산 서열 내의 특정 위치에 치환, 결실 및/또는 삽입을 가질 수 있다. "네이티브" 또는 "출발" 서열을 야생형 서열과 혼동해서는 안된다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 네이티브 또는 출발 서열은 비교가 이루어질 수 있는 원래의 분자를 가리키는 상대어이다. "네이티브" 또는 "출발" 서열 또는 분자는 야생형(자연에서 발견되는 서열)을 나타낼 수 있지만 야생형 서열일 필요는 없다.

[0403] 통상적으로, 변이체는 네이티브 서열과 비교하여 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5% 적어도 99.8%, 또는 적어도 99.9%의 서열 동일성을 가질 것이다. 아미노산 서열 또는 뉴클레오티드 서열에 적용되는 바와 같은 "서열 동일성"은 서열을 정렬하고 캡과 단편을, 필요에 따라, 고려하여 최대 서열 동일성 퍼센트를 달성한 후 제2 서열에 의 잔기와 동일한 후보 서열에서의 잔기의 백분율로서 정의된다. 두 개의 중합체 서열의 동일성 퍼센트의 계산은, 예를 들면, 최적의 비교 목적을 위해 두 개의 서열을 정렬함으로써 수행될 수 있다(예컨대, 캡은 최적 정렬을 위해 제1 및 제2 중합체성 서열 중의 하나 또는 둘 다에 도입될 수 있고 비-동일 서열은 비교 목적을 위해 무시될 수 있다). 특정 양태에서, 비교 목적으로 정렬된 서열의 길이는 참조 서열의 길이의 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 100%이다. 그후, 상응하는 위치의 잔기를 비교한다. 제1 서열에서의 위치가 제2 서열에서의 상응하는 위치와 동일한 잔기로 점유되는 경우, 분자는 그 위치에서 동일하다. 두 개의 서열 간의 동일성 퍼센트는 캡의 수 및 각 캡의 길이를 고려하여, 서열에 의해 공유되는 동일한 위치의 수의 함수이며, 여기서 캡은 두 개의 서열의 최적 정렬을 위해 도입될 필요가 있다. 두 개의 서열 간의 서열의 비교 및 동일성 퍼센트의 결정은 수학적 알고리즘을 사용하여 달성될 수 있다. 예를 들면, 두 개의 뉴클레오티드 서열 간의 동일성 퍼센트는 문헌[Computational Molecular Biology, Lesk, A. M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D. W., ed., Academic Press, New York, 1993; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; Computer Analysis of Sequence Data, Part I, Griffin, A. M., and Griffin, H. G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; 및 Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M Stockton Press, New York, 1991; 이들 각각은 본원에 참고로 포함됨]에 기재된 것들과 같은 방법들을 사용하여 결정될 수 있다. 예를 들면, 두 개의 뉴클레오티드 서열 간의 동일성 퍼센트는 마이어스 및 밀러의 알고리즘(CABIOS, 1989, 4:11-17)을 사용하여 결정될 수 있으며, 이것은 PAM120 중량 잔기 표, 12의 캡 길이 패널티 및 4의 캡 패널티를 사용하여 ALIGN 프로그램(버전 2.0)에 통합되었다. 두 개의 뉴클레오티드 서열 간의 동일성 퍼센트는, 대안적으로, NWSgapdna.CMP 행렬을 사용하는 GCG 소프트웨어 패키지의 GAP 프로그램을 사용하여 결정될 수 있다. 서열 간의 동일성 퍼센트를 결정하는데 흔히 사용되는 방법은 문헌[Carillo, H., and Lipman, D., SIAM J Applied Math., 48:1073 (1988); 본원에 참고로 포함됨]에 개시된 것들을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 동일성을 결정하기 위한 기법들은 공공 이용 가능한 컴퓨터 프로그램에 성문화되어 있다. 두 개의 서열 간의 상동성을 결정하는 예시적인 컴퓨터 소프트웨어는 GCG 프로그램 패키지 (Devereux, J., et al., Nucleic Acids Research, 12(1), 387 (1984)), BLASTP, BLASTN 및 FASTA (Altschul, S. F. et al., J. Molec. Biol., 215, 403 (1990))를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0404] 아미노산 서열에 적용되는 바와 같은 "동족체"란 제2 종의 제2 서열과 상당한 동일성을 갖는 다른 종의 상응하는 서열을 의미한다. "유사체"는 모 폴리웹타이드의 특성을 여전히 유지하는, 아미노산 잔기의 하나 이상의 아미노산 변형, 예컨대, 치환, 부가 또는 결실에 의해 상이한 폴리웹타이드 변이체를 포함하는 것을 의미한다.

[0405] 본 발명은 변이체 및 유도체를 포함한 아미노산 기반의 몇 가지 유형의 글리칸-상호작용 항체를 고려한다. 이들은 치환, 삽입, 결실 및 공유 변이체 및 유도체를 포함한다. 이와 같이, 치환, 삽입 및/또는 부가, 결실 및 공유 변형을 함유하는 글리칸-상호작용 항체 분자가 본 발명의 범위내에 포함된다. 예를 들면, 서열 태그 또는 아미노산, 예를 들면, 하나 이상의 리신이 (예컨대, N-말단 및 C-말단에서) 본 발명의 웹타이드 서열에 부가될 수 있다. 서열 태그는 웹타이드 정체 또는 국소화에 사용될 수 있다. 리신은 웹타이드 가용성을 증가시키거나 비오티닐화를 가능케 하는데 사용될 수 있다. 대안적으로, 웹타이드 또는 단백질의 아미노산 서열의 카복시 및 아미노 말단 영역에 위치한 아미노산 잔기는 임의로 결실되어 말단절단된 서열을 제공할 수 있다. 특정 아미노산(예

컨대, C-말단 또는 N-말단 잔기)은 대안적으로, 예를 들면, 가용성이거나 고체 지지체에 결합된 보다 큰 서열의 일부로서의 서열의 발현으로서, 서열의 사용에 따라 결실될 수 있다.

[0406] 단백질에 대해 언급되는 경우 "치환 변이체"는 네이티브 또는 출발 서열에 적어도 하나의 아미노산 잔기가 제거되고 다른 아미노산이 동일한 위치에서 그 자리에 삽입된 것이다. 치환은 단일 치환일 수 있으며, 여기서는 문자 중의 한자 하나의 아미노산이 치환되거나, 치환은 다중 치환일 수 있으며, 여기서는 둘 이상의 아미노산이 동일한 문자에서 치환된다.

[0407] 본원에서 사용되는 용어 "보존적 아미노산 치환"은 동일한 크기, 전하, 또는 극성의 상이한 아미노산으로의 서열에 정상적으로 존재하는 아미노산의 치환을 가리킨다. 보존적 치환의 예는 다른 비극성 잔기를 이소류신, 발린 및 류신과 같은 비극성(소수성) 잔기로 치환을 포함한다. 또한, 보존적 치환의 예는 아르기닌과 리신 사이, 글루타민과 아스파라긴 사이 및 글리신과 세린 사이와 같이 다른 잔기를 하나의 극성(친수성) 잔기로 치환을 포함한다. 더욱이, 다른 잔기를 리신, 아르기닌 또는 히스티딘과 같은 염기성 잔기로 치환, 또는 다른 산성 잔기를 아스파르트산 또는 글루탐산과 같은 산성 잔기로 치환이 보존적 치환의 추가의 예이다. 비-보존적 치환의 예는 시스테인, 글루타민, 글루탐산 또는 리신과 같은 극성(친수성) 잔기를 이소류신, 발린, 류신, 알라닌, 메티오닌과 같은 비극성(소수성) 아미노산 잔기로 치환 및/또는 비극성 잔기를 극성 잔기로 치환을 포함한다.

[0408] 단백질에 대해 언급되는 경우 "삽입 변이체"는 하나 이상의 아미노산이 네이티브 또는 출발 서열에 특정 위치에서 아미노산에 바로 인접하여 삽입된 것이다. 아미노산에 "바로 인접한"은 아미노산의 알파-카복시 또는 알파-아미노 작용기에 연결됨을 의미한다.

[0409] 단백질에 대해 언급되는 경우 "결실 변이체"는 네이티브 또는 출발 아미노산 서열에 하나 이상의 아미노산이 제거된 것이다. 통상적으로, 결실 변이체는 문자의 특정 영역에서 하나 이상의 아미노산이 결실될 것이다.

[0410] 본원에서 사용되는 용어 "유도체"는 용어 "변이체"와 동의어로 사용되며 참조 문자 또는 출발 문자에 비해 어떠한 방식으로 변형되거나 변화된 문자를 가리킨다. 일부 실시양태에서, 유도체는 유기 단백질성 또는 비-단백질성 유도체화제 및 번역후 변형으로 변형된 네이티브 또는 출발 단백질을 포함한다. 공유 변형은 전통적으로, 단백질의 표적화된 아미노산 잔기를 선택된 측쇄 또는 말단 잔기와 반응할 수 있는 유기 유도체화제와 반응시킴으로써, 또는 선택된 재조합 숙주 세포에서 기능하는 번역후 변형의 메카니즘을 이용함으로써 도입된다. 생성된 공유 유도체는 생물학적 활성에 중요한 잔기를 확인하는데 지시된 프로그램에서, 면역검정을 위해, 또는 재조합 당단백질의 면역친화성 정제를 위한 항-단백질 항체의 제조를 위해 유용하다. 이러한 변형은 당업계의 통상의 기술내에 있으며 과도한 실험 없이 수행된다.

[0411] 특정의 번역후 변형은 발현된 폴리펩타이드에 대한 재조합 숙주의 작용의 결과이다. 글루타미닐 및 아스파라기닐 잔기는 흔히 상응하는 글루타밀 및 아스파르틸 잔기로 번역후 탈아미드화된다. 대안적으로, 이러한 잔기는 약한 산성 조건하에서 탈아미드화된다. 이러한 잔기 중의 어느 하나의 형태가 본 발명에 따라 사용되는 단백질에 존재할 수 있다.

[0412] 다른 번역후 변형은 프롤린 및 리신의 하이드록실화, 세릴 또는 트레오닐 잔기의 하이드록실기의 포스포릴화, 리신, 아르기닌 및 히스티딘 측쇄의 알파-아미노기의 메틸화를 포함한다(T. E. Creighton, Proteins: Structure and Molecular Properties, W.H. Freeman & Co., San Francisco, pp. 79-86 (1983)).

[0413] 공유 유도체는 특별히 본 발명의 단백질이 비-단백질성 중합체에 공유 결합되어 있는 융합 분자를 포함한다. 비-단백질성 중합체는 보통 친수성 합성 중합체, 즉 자연에서 달리 발견되지 않는 중합체이다. 그러나, 자연에 존재하고 재조합 또는 시험관내 방법에 의해 제조되는 중합체가, 자연으로부터 단리된 중합체가 그러한 바와 같이 유용하다. 친수성 폴리비닐 중합체, 예컨대 폴리비닐알콜 및 폴리비닐피롤리돈이 본 발명의 범위내에 든다. 특히 유용한 것은 폴리비닐알킬렌 에테르, 예를 들면, 폴리에틸렌 글리콜, 폴리프로필렌 글리콜이다. 단백질은 미국 특허 제4,640,835호; 제4,496,689호; 제4,301,144호; 제4,670,417호; 제4,791,192호 또는 제4,179,337호에 제시된 방식으로 다양한 비-단백질성 중합체, 예를 들면, 폴리에틸렌 글리콜, 폴리프로필렌 글리콜 또는 폴리옥시알킬렌에 연결될 수 있다.

[0414] 단백질에 대해 언급되는 경우 "특징(feature)"은 문자의 뚜렷이 다른 아미노산 서열-기반 성분으로서 정의된다. 본 발명의 단백질의 특징은 표면 발현(surface manifestation), 국소 배좌 형태(local conformational shape), 접힘, 루프, 반-루프, 도메인, 반-도메인, 부위, 말단 또는 이의 임의의 조합을 포함한다.

[0415] 본원에서 사용되는 바와 같이 단백질에 대해 언급되는 경우 용어 "표면 발현"은 최외각 표면 상에 나타나는 단

백질의 폴리펩타이드 기반 성분을 가리킨다.

- [0416] 본원에서 사용되는 바와 같이 단백질에 대해 언급되는 경우 용어 "국소 배좌 형태"는 단백질의 한정할 수 있는 공간 내에 위치한 단백질의 폴리펩타이드 기반 구조적 발현을 의미한다.
- [0417] 본원에서 사용되는 바와 같이 단백질에 대해 언급되는 경우 용어 "접힘"은 에너지 최소화시 아미노산 서열의 야기되는 형태를 의미한다. 접힘은 2차 또는 3차 수준의 접합 공정에서 발생할 수 있다. 2차 수준의 접힘의 예는 베타 시트 및 알파 나선을 포함한다. 3차 접힘의 예는 활동적인 힘의 접합 또는 분리로 인해 형성된 도메인 및 영역을 포함한다. 이러한 방식으로 형성된 영역은 소수성 및 친수성 포켓 등을 포함한다.
- [0418] 본원에서 사용되는 용어 "선회(turn)"는, 단백질 형태와 관련되는 바와 같이, 웨타이드 또는 폴리펩타이드의 주체의 방향을 변화시키는 굴곡을 의미하며, 한 개, 두 개, 세 개 또는 그 이상의 아미노산 잔기를 포함할 수 있다.
- [0419] 본원에서 사용되는 바와 같이 단백질에 대해 언급되는 경우 용어 "루프"는 웨타이드 또는 폴리펩타이드의 주체의 방향을 역전시키고 네 개 이상의 아미노산 잔기를 포함하는 웨타이드 또는 폴리펩타이드의 구조적 특징을 가리킨다. 올리비아(Oliva) 등은 적어도 5개 부류의 단백질 루프를 확인하였다(J. Mol Biol 266 (4): 814-830; 1997).
- [0420] 본원에서 사용되는 바와 같이 단백질에 대해 언급되는 경우 용어 "반-루프"는 이것이 유도되는 루프의 적어도 절반의 아미노산 잔기의 수를 갖는 확인된 루프의 부분을 가리킨다. 루프가 항상 짹수 개의 아미노산 잔기를 함유하지 않을 수 있는 것으로 이해된다. 따라서, 루프가 홀수 개의 아미노산을 함유하거나 포함하는 것으로 확인된 경우에, 홀수 개 루프의 반-루프는 루프의 정수 부분 또는 정수 부분 다음을 포함할 것이다(루프의 아미노산의 수/2+-0.5 아미노산). 예를 들면, 7개 아미노산 루프로 확인된 루프는 3개 아미노산 또는 4개 아미노산의 반-루프를 생산할 수 있다($7/2=3.5+-0.5$ 는 3 또는 4이다).
- [0421] 본원에서 사용되는 바와 같이 단백질에 대해 언급되는 경우 용어 "도메인"은 하나 이상의 확인 가능한 구조적 또는 기능적 특징 또는 특성(예컨대, 결합 성능, 단백질-단백질 상호작용을 위한 부위로서의 작용)을 갖는 폴리펩타이드의 모티프를 가리킨다.
- [0422] 본원에서 사용되는 바와 같이 단백질에 대해 언급되는 경우 용어 "반-도메인"은 이것이 유도되는 도메인의 적어도 절반의 아미노산 잔기의 수를 갖는 확인된 도메인의 부분을 가리킨다. 도메인이 항상 짹수 개의 아미노산 잔기를 함유하지 않을 수 있는 것으로 이해된다. 따라서, 도메인이 홀수 개의 아미노산을 함유하거나 포함하는 것으로 확인된 경우에, 홀수 개 도메인의 반-도메인은 도메인의 정수 부분 또는 정수 부분 다음을 포함할 것이다(도메인의 아미노산의 수/2+-0.5 아미노산). 예를 들면, 7개 아미노산 도메인으로 확인된 도메인은 3개 아미노산 또는 4개 아미노산의 반-도메인을 생산할 수 있다($7/2=3.5+-0.5$ 는 3 또는 4이다). 또한, 하위-도메인(sub-domain)이 도메인 또는 반-도메인 내에서 확인될 수 있으며, 이러한 하위도메인은 이들이 유도되는 도메인 또는 반 도메인에서 확인되는 구조적 또는 기능적 특성을 전부보다는 적게 갖는 것으로 이해된다. 또한, 본원의 도메인 유형 중의 어느 것의 아미노산이 폴리펩타이드의 주체를 따라 인접할 필요가 없는 것으로 이해된다(즉, 비인접 아미노산이 구조적으로 접혀서 도메인, 반-도메인 또는 하위도메인을 생산할 수 있다).
- [0423] 본원에서 사용되는 바와 같이 단백질에 대해 언급되는 경우 용어 "부위"는, 아미노산 기반 양태에 속하는 바와 같이 "아미노산 잔기" 및 "아미노산 측쇄"와 동의어로 사용된다. 부위는 본 발명의 폴리펩타이드 기반 문자 내에서 변형, 조작, 변화, 유도체화 또는 달라질 수 있는 웨타이드 또는 폴리펩타이드 내의 위치를 나타낸다.
- [0424] 본원에서 사용되는 바와 같이 용어 "말단들(termini) 또는 말단(terminus)"은 단백질에 대해 언급되는 경우, 웨타이드 또는 폴리펩타이드의 맨 끝을 가리킨다. 이러한 맨 끝은 단지 웨타이드 또는 폴리펩타이드의 처음 또는 마지막 부위에 제한되는 것이 아니라 말단 영역에 추가의 아미노산을 포함할 수 있다. 본 발명의 폴리펩타이드 기반 문자는 N-말단(유리 아미노기(NH₂)를 갖는 아미노산에 의해 말단화됨) 및 C-말단(유리 카복실기(COOH)를 갖는 아미노산에 의해 말단화됨) 둘 다를 가짐을 특징으로 할 수 있다. 본 발명의 단백질은 일부 경우에 디설파이드 결합에 의해 또는 비-공유결합 힘에 의해 합쳐진 다중 폴리펩타이드 쇄로 구성된다(다량체, 올리고머). 이러한 종류의 단백질은 다수의 N- 및 C-말단을 가질 것이다. 대안적으로, 폴리펩타이드의 말단은 이들이, 경우에 따라, 유기 접합체와 같은 비-폴리펩타이드 기반 모이어티로 시작되거나 끝나도록 변형될 수 있다.
- [0425] 일단 특징들 중의 어느 것이 본 발명의 문자의 성분으로서 확인되거나 정의되면, 이러한 특징들의 몇몇 조작 및 /또는 변형을 이동, 스위핑, 인버팅, 결실, 무작위화 또는 중복에 의해 수행할 수 있다. 또한, 특징의 조작은 본 발명의 문자의 변형과 동일한 결과를 초래할 수 있는 것으로 이해된다. 예를 들면, 도메인을 결실시킴을 포

함하는 조작은 핵산의 변형처럼 분자의 길이의 변화를 초래하여 전장보다 짧은 분자를 암호화한다.

[0426] 변형 및 조작은 부위 지정 돌연변이유발(site directed mutagenesis)와 같이 당업계에 공지된 방법으로 달성될 수 있다. 그후, 생성되는 변형된 분자를 본원에 기재된 것들과 같은 시험관내 또는 생체내 검정 또는 당업계에 공지된 임의의 다른 적합한 스크리닝 검정을 사용하여 활성에 대해 시험할 수 있다.

동위원소 변형

[0428] 본 발명의 글리칸-상호작용 항체는 동위원소인 하나 이상의 원자를 함유할 수 있다. 본원에서 사용되는 용어 "동위원소"는 하나 이상의 추가의 중성자를 갖는 화학 원소를 가리킨다. 한 실시양태에서, 본 발명의 화합물은 중수소화될 수 있다. 본원에서 사용되는 용어 "중수소화된"은 하나 이상의 수소원자가 중수소 동위원소로 대체된 물질을 가리킨다. 중수소 동위원소는 수소의 동위원소이다. 수소의 핵은 하나의 양성자를 함유하는 반면 중수소 핵은 양성자와 중성자 둘 다를 함유한다. 글리칸-상호작용 항체는 안정성과 같은 화합물의 물리적 특성을 변화시키기 위해 또는 화합물이 진단적 및 실험적 용도에 사용되도록 하기 위해 중수소화될 수 있다.

접합체 및 조합물

[0430] 본 발명의 글리칸-상호작용 항체는 하나 이상의 상동 또는 이종 분자와 착화, 접합 또는 조합될 수 있는 것으로 본 발명에 의해 고려된다. 본원에서 사용되는 바와 같이, "상동 분자"는 출발 분자와 관련하여 구조 또는 기능 중의 적어도 하나에 있어서 유사한 분자를 의미하는 반면 "이종 분자"는 출발 분자와 관련하여 구조 또는 기능 중의 적어도 하나에 있어서 상이한 분자이다. 따라서 구조적 동족체는 실질적으로 구조적으로 유사한 분자이다. 이들은 동일할 수 있다. 기능적 동족체는 실질적으로 기능적으로 유사한 분자이다. 이들은 동일할 수 있다.

[0431] 본 발명의 글리칸-상호작용 항체는 접합체를 포함할 수 있다. 본 발명의 이러한 접합체는 단백질(예컨대, 인간 혈청 알부민(HSA), 저밀도 지단백질(LDL), 고밀도 지단백질(HDL), 또는 글로불린); 탄수화물(예컨대, 텍스트란, 폴루란, 키틴, 키토산, 이눌린, 사이클로텍스트란 또는 히알루론산); 또는 지질과 같은 자연 발생 성분 또는 리간드를 포함할 수 있다. 리간드는 또한 재조합 또는 합성 분자, 예를 들면, 합성 중합체, 예컨대, 합성 폴리아미노산, 올리고뉴클레오티드(예컨대 압타머)일 수 있다. 폴리아미노산의 예는 다음을 포함하며 폴리아미노산 폴리리신(PLL), 폴리 L-아스파르트산, 폴리 L-글루탐산, 스티렌-말레산 무수물 공중합체, 폴리(L-락ти드-코-글리콜리드) 공중합체, 디비닐 에테르-말레산 무수물 공중합체, N-(2-하이드록시프로필)메타크릴아미드 공중합체 (HMPA), 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 폴리비닐 알콜(PVA), 폴리우레탄, 폴리(2-에틸아크릴산), N-이소프로필아크릴아미드 중합체, 또는 폴리포스파진이다. 폴리아민의 예는 다음을 포함한다: 폴리에틸레이민, 폴리리신(PLL), 스페르민, 스페르미딘, 폴리아민, 슈도펩타이드-폴리아민, 웨პ타이드모방체 폴리아민, 텐드리미 폴리아민, 아르기닌, 아미딘, 프로타민, 양이온성 지질, 양이온성 포르피린, 폴리아민의 4급 염, 또는 알파 나선형 웨პ타이드.

[0432] 접합체는 또한 표적화 그룹, 예컨대, 세포 또는 조직 표적화 제제 또는 그룹, 예컨대, 텍틴, 당단백질, 지질 또는 단백질, 예컨대, 신장 세포와 같은 지정된 세포 유형에 결합하는 항체를 포함할 수 있다. 표적화 그룹은 갑상선 자극 호르몬, 멜라노트로핀, 렉틴, 당단백질, 계면활성제 단백질 A, 뮤신 탄수화물, 다가 락토스, 다가 갈락토스, N-아세틸-갈락토사민, N-아세틸-글루코사민, 다가 만노스, 다가 푸코스, 글리코실화 폴리아미노산, 다가 갈락토스, 트랜스페린, 비스포스포네이트, 폴리글루타메이트, 폴리아스파르테이트, 지질, 콜레스테롤, 스테로이드, 담즙산, 엽산염, 비타민 B12, 비오틴, RGD 웨პ타이드, RGD 웨პ타이드 모방체 또는 압타머일 수 있다.

[0433] 표적화 그룹은 단백질, 예컨대, 당단백질, 또는 웨პ타이드, 예컨대, 공동-리간드에 대해 특이적 친화성을 갖는 분자, 또는 항체 예컨대, 암 세포, 내피 세포, 또는 골 세포와 같은 지정된 세포 유형에 결합하는 항체일 수 있다. 표적화 그룹은 또한 호르몬 및 호르몬 수용체를 포함할 수 있다. 이들은 또한 비-웨პ타이드성 종, 예를 들면, 지질, 렉틴, 탄수화물, 비타민, 다가 락토스, 다가 갈락토스, N-아세틸-갈락토사민, N-아세틸-글루코사민, 다가 만노스, 다가 푸코스, 또는 압타머를 포함할 수 있다.

[0434] 표적화 그룹은 특정 수용체를 표적화할 수 있는 임의의 리간드일 수 있다. 이러한 예로는, 제한함이 없이, 엽산염, GalNAc, 갈락토스, 만노스, 만노스-6P, 압타머, 인테그린 수용체 리간드, 케모카인 수용체 리간드, 트랜스페린, 비오틴, 세로토닌 수용체 리간드, PSMA, 엔도텔린, GCPII, 소마토스타틴, LDL 및 HDL 리간드를 포함한다. 특정 양태에서, 표적화 그룹은 압타머이다. 압타머는 비변형될 수 있거나 본원에 개시된 변형의 임의의 조합을 가질 수 있다.

[0435] 여전히 다른 양태에서, 글리칸-상호작용 항체는 세포 침투 폴리웨პ타이드에 공액 접합된다. 세포-침투 웨პ타이드는 또한 신호 서열을 포함할 수 있다. 본 발명의 접합체는 증가된 안정성; 증가된 세포 형질감염; 및/또는 변화

된 생체분포(예컨대, 특정 조직 또는 세포 유형에 표적화됨)를 갖도록 설계될 수 있다.

[0436] 접합 모이어티는 이들이 제거를 위해 표적을 표지화 또는 플래깅(flagging)을 가능하게 하도록 글리칸-상호작용 항체에 부가될 수 있다. 이러한 태깅/플래깅 분자는 유비퀴틴, 형광 분자, 인간 인플루엔자 해마글루터닌(HA), c-myc[서열 EQKLISEEDL(서열번호 265)을 갖는 인간 원암유전자 myc의 10개 아미노산 세그먼트], 히스티딘(His), 플래그[서열 DYKDDDDK(서열번호 266)의 짧은 웨타이드], 글루타티온 S-트랜스퍼라제(GST), V5(시미안 바이러스 5 에피토프의 파라미소바이러), 비오틴, 아비딘, 스트렙타비딘, 호스 래디쉬 퍼옥시다제(HRP) 및 디곡시게닌을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0437] 일부 실시양태에서, 글리칸-상호작용 항체는 질환 또는 병태의 치료에 있어서 서로 또는 다른 분자와 조합될 수 있다.

핵산

[0439] 본 발명은 핵산 분자를 포함한다. 일부 실시양태에서, 핵산은 본 발명의 항체(항체, 항체 단편, 인트라바디 및 키메라 수용체 항원을 포함하지만, 이에 제한되지 않음)를 암호화한다. 이러한 핵산 분자는, 제한함이 없이, DNA 분자, RNA 분자, 폴리뉴클레오티드, 올리고뉴클레오티드, mRNA 분자, 백터, 플라스미드 및 기타 작제물을 포함한다. 본원에서 사용되는 용어 "작제물"은 플라스미드, 코스미드, 자율 복제 폴리뉴클레오티드 분자 또는 선형 또는 원형 단일-가닥 또는 이중-가닥 DNA 또는 RNA 폴리뉴클레오티드 분자를 포함하지만 이에 제한되지 않는 임의의 재조합 핵산 분자를 가리킨다. 본 발명은 또한 글리칸-상호작용 항체를 암호화하는 핵산 분자를 발현하도록 프로그래밍되거나 생성된 세포를 포함한다. 이러한 세포는 형질감염, 전기천공, 바이러스 전달 등의 사용을 통해 생성될 수 있다. 본 발명의 작제물로 조직된 바이러스는 렌티바이러스, 아데노바이러스, 아데노-관련 바이러스 및 과지를 포함할 수 있지만, 이에 제한되지 않는다. 일부 경우에, 본 발명의 핵산은 코돈-최적화된 핵산을 포함한다. 코돈-최적화된 핵산을 생성하는 방법은 당업계에 공지되어 있으며 미국 특허 제5,786,464호 및 제6,114,148호에 기재된 것들을 포함할 수 있지만, 이에 제한되지 않으며, 상기 특허의 내용은 전문이 본원에 참고로 포함된다. 일부 실시양태에서, 핵산 서열은 단백질 발현을 개선시키거나 은성 스플라이스 부위(cryptic splice site)를 제거하기 위해 코돈 최적화된다.

II. 방법 및 사용

[0441] 본 기재내용의 방법은 치료, 진단, 정량, 생물가공, 실험 및/또는 조사 목적을 위해 하나 이상의 글리칸-상호작용 항체를 사용하는 방법을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 이러한 글리칸-상호작용 항체는 항-STn 항체를 포함할 수 있다.

치료제

암-관련 용도

[0444] 비정상적인 당화는 암 세포 형질전환의 특징이다. 다수의 비정상적인 당화 형태가 특이적 종양 표적화에 적합한 세포 표면 분자의 한 부류로서 특이적 종양-관련 탄수화물 항원(TACA)을 확인하여 인간 암에서 기술되었다 (Cheever, M.A. et al., Clin Cancer Res. 2009 Sep 1;15(17):5323-37). TACA 항원 발현은 유방, 결장, 폐, 방광, 자궁경부, 난소, 위, 전립선 및 암을 포함하지만 이에 제한되지 않는 상피 암에서 발견되었다. TACA 항원 발현은 난황낭 종양 및 정상피종을 포함하지만 이에 제한되지 않는 배아 암에서 발견되었다. 또한, TACA 항원 발현은 다수의 흑색종, 암종 및 다양한 조직의 백혈병에서 발견되었다(Heimburg-Molinaro et al., Vaccine. 2011 Nov 8; 29(48):8802-8826). 하나 이상의 TACA를 표적화하는 본 발명의 항체를 본원에서는 "항-TACA 항체"라고 한다.

[0445] MUC1은 정상적으로 광범위하게 당화되지만 종양 세포에서 하위당화(underglycosylate)되는 주요 세포 표면 당단 백질이다. MUC1의 희박한 당화는 면역원성 항원의 노출을 야기한다. 이들은 MUC1 코어 웨타이드 서열을 따라 또는 코어 탄수화물 잔기를 따라 존재할 수 있다. 이러한 TACA는 N-아세틸갈락토사민(Tn), 시알릴(α 2,6)N-아세틸 갈락토사민(STn) 및 갈락토스(β 1-3)N-아세틸갈락토사민(톰젠-프리텐라이히 항원 또는 TF로도 알려짐)을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 모든 암종의 약 80%는 MUC1의 코어 탄수화물을 따라 Tn을 발현하며 STn가 인간 암 종 세포 상에서 강하게 발현되고 암 진행 및 전이와 관련되는 것으로 추정되었다. 거의 예외 없이, Tn 및 STn은 정상적인 건강한 조직에서는 발현되지 않는다. 시알산은 STn 상에 현저한 에피토프를 형성한다. 본 발명은 이상 Neu5Gc-STn(GcSTn) 글리칸 발현이 각종 암종에 매우 특이적인 것으로 보인다는 사실을 이용한다.

[0446] MUC1의 경우에, STn으로의 Neu5Gc 삽입이 종양-특이적 표적, 종양 조직을 치료하기 위한 항체-기반 치료법을 위

한 매력적인 표적인 부위를 생성한다. 본 발명의 일부 실시양태에서, 글리칸-상호작용 항체는 Neu5Gc를 포함하는 MUC1 발현 암 세포를 표적화한다. 지금까지, Neu5Gc는 결장암, 망막암 종 조직, 흑색종, 유방암 및 난황낭 종양 조직을 포함하지만 이에 제한되지 않는 다수의 인간 암 조직으로부터의 당접합체에서 검출되었다. 본 발명의 일부 실시양태에서, 이러한 형태의 암 뿐만 아니라 여기에 구체적으로 열거되어 있지 않지만 Neu5Gc를 포함하는 암 세포의 존재를 특징으로 하는 다른 형태의 암의 글리칸-상호작용 항체 치료를 위한 방법이 고려된다.

[0447] 암과 상호관련하여 발현되는 글리칸을 포함하는 추가의 항원이 동정되었다(Heimburg-Molinaro, J. et al., Cancer vaccines and carbohydrate epitopes. Vaccine. 2011 Nov 8;29(48):8802-26). 이러한 종양-관련 탄수화물 항원은 혈액형 루이스 관련 항원[Lewis^Y(Le^Y), Lewis^X(Le^X), 시알릴 Lewis^X(SLe^X) 및 시알릴 Lewis^A(SLe^A)을 포함하지만, 이에 제한되지 않음], 글리코스핑고리피드-관련 항원[Globo H, 발육 단계-특이적 배아성 항원-3(SSEA-3) 및 시알산을 포함하는 글리코스핑고리피드를 포함하지만, 이에 제한되지 않음], 강글리오시드-관련 항원[강글리오시드 GD2, GD3, GM2, 푸코실 GM1 및 Neu5GcGM3을 포함하지만, 이에 제한되지 않음] 및 폴리시알산-관련 항원을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0448] 일부 실시양태에서, 본 발명의 치료제는 루이스 혈액형 항원에 대해 지시될 수 있다. 루이스 혈액형 항원은 α 1-3 결합 또는 α 1-4 결합에 의해 GlcNAc에 결합된 푸코스 잔기를 포함한다. 이들은 당지질과 당단백질 둘 다에서 발견될 수 있다. 루이스 혈액형 항원은 이러한 항원의 분비자인 개체의 체액에서 발견될 수 있다. 적혈구에서의 이들의 출현은 적혈구에 의한 혈청으로부터의 루이스 항원의 흡수로 인한 것이다.

[0449] 일부 실시양태에서, 본 발명의 치료제는 Le^Y에 대해 지시될 수 있다. Le^Y(CD174로도 알려짐)는 Gal β 1,4GlcNAc로 구성되며 α 1,2- 뿐만 아니라 α 1,3-결합된 푸코스 잔기를 포함하여 Fuc α (1,2)Gal β (1,4)Fuc α (1,3)GlcNAc 에피토프를 생성한다. 이것은 α 1,3 푸코스를 모 쇄의 GlcNAc 잔기에 부착하는 α 1,3 푸코실트랜스퍼라제에 의해 H 항원으로부터 합성된다. Le^Y는 난소, 유방, 전립선, 결장, 폐 및 상피를 포함하지만 이에 제한되지 않는 각종 암에서 발현될 수 있다. 정상 조직에서의 낮은 발현 수준 및 여러 암에서의 증가된 발현 수준으로 인해, Le^Y 항원은 치료 항체를 위한 매력적인 표적이다.

[0450] 일부 실시양태에서, 본 발명의 치료제는 Le^X에 대해 지시될 수 있다. Le^X는 에피토프 Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β -R을 포함한다. 이것은 CD15 및 발육 단계-특이적 배아성 항원-1(SSEA-1)로도 알려져 있다. 이 항원은 F9 기형암종 세포로 면역화에 적용된 마우스로부터 채취된 혈청과 면역반응성이 것으로 처음으로 인지되었다. Le^X는 또한 특정 단계에서 배아 발생과 상관성이 있는 것으로 밝혀졌다. 이것은 또한 암의 존재 및 부재 둘 다 하에서 다양한 조직에서 발현되지만, 유방암 및 난소암에서도 발견될 수 있는데, 여기서 이것은 단지 암성 세포에 의해 발현된다.

[0451] 일부 실시양태에서, 본 발명의 치료제는 SLe^A 및/또는 SLe^X에 대해 지시될 수 있다. SLe^A 및 SLe^X는 각각 구조 Neu5Ac α 2-3Gal β 1-3(Fuc α 1-4)GlcNAc β -R 및 Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β -R을 포함한다. 이들의 발현은 암 세포에서 상향조절된다. 혈청 중의 이들 원의 존재는 악성 종양 및 나쁜 예후와 상관성이 있다. SLe^X는 주로 뮤신 말단 에피토프로서 발견된다. 이것은 유방, 난소, 흑색종, 결장, 간, 폐 및 전립선을 포함한 다수의 상이한 암에서 발현된다. 본 발명의 일부 실시양태에서, SLe^A 및 SLe^X 표적은 Neu5Gc를 포함한다(본원에서 각각 GcSLe^A 및 GcSLe^X라고 함).

[0452] 일부 실시양태에서, 본 발명의 치료제는 글리코스핑고리피드를 포함하지만 이에 제한되지 않는 당지질 및/또는 당지질에 존재하는 에피토프에 대해 지시될 수 있다. 글리코스핑고리피드는 세라마이드 하이드록실기에 의해 글리칸에 결합된 지질 세라마이드를 포함한다. 세포 막에서, 글리코스핑고리피드는 "지질 뗏목"이라고 하는 클러스터를 형성한다.

[0453] 일부 실시양태에서, 본 발명의 치료제는 Globo H에 대해 지시될 수 있다. Globo H는 유방암 세포에서 처음 확인된 암-관련 글리코스핑고리피드이다. Globo H의 글리칸 부분은 Fuc α (1-2)Gal β (1-3)GalNAc β (1-3)Gal α (1-4)Gal β (1-4)Glc β (1)을 포함한다. Globo H는 다수의 정상적인 상피 조직에서 발견되었지만, 소세포 폐, 유방, 전립선, 폐, 췌장, 위, 난소 및 자궁내막 종양을 포함하지만 이에 제한되지 않는 다수의 종양 조직과 관련하여 확인되었다.

[0454] 일부 실시양태에서, 본 발명의 치료제는 강글리오시드에 대해 지시될 수 있다. 강글리오시드는 하나 이상의 시

알산을 갖는 글리코스펩고리피드이다. 강글리오시드 명명법에 따르면, G는 강글리오시드에 대한 약어로서 사용된다. 이러한 약어 뒤에는 부착된 시알산 잔기의 수(각각 1, 2 또는 3)를 가리키는 문자 M, D 및 T가 뒤따른다. 마지막으로 숫자 1, 2 또는 3은 박층 크로마토그래피로 분석하는 경우 각각이 이동하는 거리의 순서를 가리키는데 사용된다(여기서 3이 가장 먼 거리를 가고, 그 다음이 2이고, 그 다음이 1이다). 강글리오시드는 암-관련 성장 및 전이에 관여하는 것으로 알려져 있으며 종양 세포의 세포 표면 상에서 발현될 수 있다. 종양 세포 상에서 발현되는 강글리오시드는 GD2, GD3, GM2 및 푸코실 GM1(본원에서 Fuc-GM1이라고도 함)을 포함할 수 있지만, 이에 제한되지 않는다. 본 발명의 일부 실시양태에서, 글리칸-상호작용 항체는 GD3에 대해 지시된다. GD3은 세포 성장의 조절인자이다. 일부 실시양태에서, GD3-지시된 항체는 세포 성장 및/또는 혈관형성을 조절하는데 사용된다. 일부 실시양태에서, GD3-지시된 항체는 세포 부착을 조절하는데 사용된다. 본 발명의 일부 실시양태에서, 글리칸 상호작용 항체는 GM2에 대해 지시된다. 일부 실시양태에서, GM2-지시된 항체는 세포 대 세포 접촉을 조절하는데 사용된다. 일부 양태에서, 본 발명의 강글리오시드 표적은 하나 이상의 Neu5Gc 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 이러한 표적은 Neu5Gc를 갖는 GM3 변이체(본원에서는 GcGM3이라고 함)를 포함할 수 있다. GcGM3의 글리칸 성분은 Neu5Gc α 2-3Gal β 1-4Glc이다. GcGM3은 종양 세포의 공지된 성분이다.

- [0455] 일부 실시양태에서, 본 발명의 항-TACA 항체에 의해 표적화되는 TACA는 US 공개 제US2013/0236486A1호, 제US2013/0108624A1호, 제US2010/0178292A1호, 제US2010/0104572A1호, 제US2012/0039984A1호, 제US2009/0196916A1호 및 제US2009/0041836A1호에 열거된 것들 중의 어느 것을 포함할 수 있지만, 이에 제한되지 않으며, 이들의 내용은 전문이 본원에 참고로 포함된다.
- [0456] 일부 실시양태에서, 본 발명은 본원에 교시된 항-글리칸 항체의 투여 또는 이러한 항체의 조성물(예컨대, 적어도 하나의 부형제를 갖는 항-글리칸 항체의 조성물)의 투여를 포함하는 암 치료방법을 제공한다.
- [0457] 일부 실시양태에서, 본 기재내용의 방법은 하나 이상의 글리칸-상호작용 항체의 투여를 통해 종양 세포를 완전히 퇴치하여 오래가는 초기 차도(initial remission)를 유도함을 포함한다. 다른 방법은 일정 기간 동안, 일부 경우에 과도한 독성 없이 종양 재출현(tumor resurgence)의 억제를 포함한다. 이러한 기간은 약 1개월 내지 약 18개월, 약 1년 내지 약 5년, 약 2년 내지 약 10년, 또는 10년 초과일 수 있다.
- [0458] 암에서의 STn
- [0459] 면역계는 선천 및 적응 면역 활성 둘 다를 포함하는 항-종양 세포 면역 활성을 촉진시키기 위한 다중 메카니즘을 갖는다. 본원에서 사용되는 용어 "항-종양 세포 면역 활성"은 종양 세포를 사멸시키거나 이의 성장 및/또는 증식을 방지하는 면역계의 활성을 가리킨다. 일부 경우에, 항-종양 면역 활성은 자연 살해(NK) 세포에 의한 인식 및 종양 세포 사멸 및 대식세포에 의한 죽음세포 작용을 포함한다. 적응 항-종양 면역 반응은 수지상 세포(DC)와 같은 항원 제시 세포(APC)에 의한 종양 항원 흡수 및 제시를 포함하여, T 세포 항-종양 활성의 조절 및/또는 B 세포의 확장과 종양-특이적 항체의 분비를 야기한다. 종양에의 종양-특이적 항체의 결합은 종양 세포사의 항체-의존적 세포성 세포독성(ADCC) 및 보체-의존적 세포독성(CDC) 메카니즘을 야기할 수 있다.
- [0460] 본원에서 사용되는 용어 "면역-내성 종양 세포"는 항-종양 세포 면역 활성을 감소시키거나 피하는 종양 세포를 가리킨다. 몇몇 연구들은 종양 세포 표면 상의 또는 종양 세포 미세환경으로 분비된 STn(공지된 TACA)의 발현이 항-종양 면역 활성의 종양 세포 기피를 촉진시킬 수 있음을 나타낸다. 본원에서 사용되는 용어 "종양 세포 미세환경"은 종양 세포에 인접하거나 이를 둘러싼 임의의 구역을 가리킨다. 이러한 구역은 종양 세포 사이, 종양 및 비-종양 세포 사이, 세포와 기질의 주변 체액 및 주변 성분 사이의 구역을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.
- [0461] STn을 갖는 시알릴화 뮤신은 오가타(Ogata) 등에 의해 종양 세포의 NK 세포 표적화를 감소시키는 것으로 입증되었다(Ogata, S. et al., 1992. Canc. Res. 52:4741-6, 이들의 내용은 전문이 본원에 참고로 포함됨). 이 연구에서는 양, 소 및 돼지의 하악선 뮤신(각각 OSM, BSM 및 PSM)의 존재가 세포독성의 거의 백 퍼센트 억제를 야기하는 것으로 밝혀졌다(오가타 등의 표 2 참조). 잔두스(Jandus) 등에 의한 추가의 연구는 일부 종양 세포가 NK 세포 siglec 수용체와 상호작용하여 NK 억제를 야기할 수 있는 시알로글리칸 리간드의 발현으로 인해 NK 파괴를 피할 수 있음을 입증한다(Jandus, C. et al., 2014, JCI. pii: 65899, 이들의 내용은 전문이 본원에 참고로 포함됨).
- [0462] 토다(Toda) 등에 의한 연구는 STn이 B 세포 상의 CD22 수용체에 결합하여 감소된 신호 형질도입 및 감소된 B 세포 활성화를 야기할 수 있음을 입증한다(Toda, M. et al., 2008. Biochem Biophys Res Commun. 372(1):45-50, 이들의 내용은 전문이 본원에 참고로 포함됨). 수지상 세포(DC)는 T 세포 활성을 조절함으로써 적응 면역 활성에 영향을 미칠 수 있다. 카라스칼(Carrascal) 등에 의한 연구는 방광암 세포에 의한 STn 발현이 DC에서 내성을

유도하여 T 세포에서 항-종양 세포 면역 활성을 유도하는 이들의 능력을 감소시킴을 밝혀내었다(Carrascal, MA et al., 2014. Mol Oncol. pii: S1574-7891(14)00047-7, 이들의 내용은 전문이 본원에 참고로 포함됨). 이러한 연구들에서는 STn-양성 방광암 세포와 접촉하게 되는 DC가 CD80, CD86, IL-12 및 TNF- α 의 낮은 발현을 갖는 톨로리제닉(tolorigenic) 발현 프로파일을 나타내는 것으로 드러났다. 게다가, DC는 T 세포가 IFN γ 의 낮은 발현 및 FoxP3의 높은 발현을 갖도록 조절성 T 세포를 조정하는 것으로 밝혀졌다. 반 블리에트(van Vliet) 등에 의한 다른 연구들은 대식세포 갈락토스-타입 렉틴(MGL)의 DC 표면 발현이 이들 세포가 종양 조직을 표적화하도록 할 수 있음을 나타낸다(van Vliet, SJ., 2007. Amsterdam: Vrije Universiteit. p1-232 and van Vliet, SJ. et al., 2008. J Immunol. 181(5):3148-55, Nollau, P. et al., 2013. J Histochem Cytochem. 61(3):199-205, 이의 내용은 전문이 본원에 참고로 포함됨). MGL 상호작용으로 인해 조직에 도착한 DC는 세 가지 방법 중의 하나로 T 도움(Th) 세포에 영향을 미칠 수 있다. DC는 T 세포 내성, T 세포 면역 활성 또는 효과기 T 세포의 하향조절을 유도할 수 있다. MGL은 AcSTn 및 GcSTn 둘 다에 결합하는 것으로 나타났으며 친화도가 심층적으로 분석되었다(Mortezaei, N. et al., 2013. Glycobiology. 23(7):844-52, 이들의 내용은 전문이 본원에 참고로 포함됨). 흥미롭게도, 종양 상의 MUC1 발현이 T 세포 내성을 야기하여, 면역 근절(immune eradication)로부터 종양 세포를 보호하는 것으로 나타났다.

[0463] 일부 실시양태에서, 본 발명의 글리칸-상호작용 항체(항-STn 항체를 포함하지만, 이에 제한되지 않음)는 하나 이상의 TACA를 발현하는 하나 이상의 종양 세포를 갖는 대상체를 치료하는데 사용될 수 있다. 일부 경우에, 본 발명의 글리칸-상호작용 항체(항-STn 항체를 포함하지만, 이에 제한되지 않음)는 STn을 발현하는 종양 세포에 대한 항-종양 세포 면역 활성을 증가시키는데 사용될 수 있다. 이러한 항체는 면역-내성 종양 세포에 대한 적응 면역 반응 및/또는 선천 면역 반응을 증가시킬 수 있다. 몇몇 글리칸-상호작용 항체는 NK 항-종양 세포 활성을 증가시키는데 사용될 수 있다. 이러한 글리칸-상호작용 항체는, 일부 경우에, 암 세포에서 또는 주변 조직에서 STn 글리칸과 NK 세포 상에서 발현되는 글리칸 수용체 간의 상호작용을 차단할 수 있다.

[0464] 일부 실시양태에서, 본 발명의 글리칸-상호작용 항체(항-STn 항체를 포함하지만, 이에 제한되지 않음)는 B 세포 항-종양 세포 활성을 증가시키는데 사용될 수 있다. 이러한 항체는 세포에서 또는 주변 조직에서 STn 글리칸과 B 세포 상의 CD22 수용체 간의 상호작용을 감소시킬 수 있다. 스요르베르(Sjoberg) 등의 연구는 당단백질 상의 α 2,6-결합된 시알산의 9-O-아세틸화가 또한 B 세포 CD22 수용체와 이러한 당단백질 간의 상호작용을 감소시켰음을 입증한다(Sjoberg, E.R. et al. 1994. JCB. 126(2): 549-562). 쉬(Shi) 등의 또 다른 연구에서는 뮤린 적백혈병 세포 상의 보다 높은 수준의 9-O-아세틸화 시알산 잔기가 이러한 세포가 보체-매개된 용해에 더욱 민감하게 만드는 것으로 드러났다(Shi, W-X. et al., 1996. J of Biol Chem. 271(49): 31526-32, 이들의 내용은 전문이 본원에 참고로 포함됨). 일부 실시양태에서, 본 발명의 항-STn 항체는 비-9-O-아세틸화된 STn에 선택적으로 결합하여, 전체적인 STn 결합을 감소시키고, 종양 세포 성장 및/또는 증식을 감소시킬 수 있다(예컨대 증가된 B 세포 항-종양 활성 및 증가된 보체-매개된 종양 세포 파괴를 통해). 일부 실시양태에서, 본 발명의 글리칸-상호작용 항체(항-STn 항체를 포함하지만, 이에 제한되지 않음)는 DC 항-종양 활성을 증가시키는데 사용될 수 있다. 이러한 항체는 종양 세포에 대한 DC 내성을 감소시키는데 사용될 수 있다. 감소된 DC 내성은 CD80, CD86, IL-12 및/또는 TNF- α 의 DC 발현 증가를 포함할 수 있다. 일부 경우에, DC 항-종양 세포 활성은 T 세포 항-종양 세포 활성의 촉진을 포함할 수 있다. 이러한 항체는 암 세포 상에서 또는 주위에서 발현되는 글리칸 및 DC MGL 간의 결합을 방지할 수 있다.

[0465] 이브라힘(Ibrahim) 등의 연구는 내분비 요법과 함께 높은 수준의 항-STn 항체가 전이성 유방암을 가진 여성에서 전체 생존율 및 진행되기까지 걸리는 시간(time to progression; TTP)을 증가시킬 수 있음을 시사한다(Ibrahim, N.K. et al., 2013. 4(7): 577-584, 이들의 내용은 전문이 본원에 참고로 포함됨). 이 연구에서, 항-STn 항체 수준은 키홀-립펫 혜모시아닌(KLH)에 결합된 STn으로 백신접종 후 상승하였다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 항-STn 항체는 내분비 요법(예컨대 타목시펜 및/또는 아로마타제 억제제)과 조합하여 사용될 수 있다.

[0466] 일부 실시양태에서, 본 발명의 글리칸-상호작용 항체는 암성 세포 및/또는 STn을 발현하는 세포를 감소시키거나 없애는데 사용될 수 있다. 이러한 세포는 종양의 일부일 수 있는 세포를 포함한다.

[0467] 일부 경우에, 본 발명은 본 발명의 항-글리칸 항체를 하나 이상의 종양을 갖는 대상체에 투여함으로써 종양 체적을 감소시키는 방법을 제공한다. 종양 체적의 감소는 치료 전 및 후 대상체에서 종양 체적을 비교함으로써 또는 항-글리칸 항체-치료된 대상체와 대조군 치료된 대상체 간의 종양 체적을 비교함으로써 결정될 수 있다.

[0468] 일부 경우에, 본 발명의 항-글리칸 항체는 대상체에서 종양 체적의 목적하는 감소 퍼센트를 달성하도록 투여될 수 있다. 이것은 항-글리칸 항체로 치료 전 및 후에 대상체에서 하나 이상의 종양의 체적을 (예컨대, 캘리퍼 또

는 CT 스캔 같은 영상화 기법의 사용을 통해) 결정한 다음 두 개의 값으로부터 종양 체적의 감소 퍼센트를 계산함으로써 평가될 수 있다. 일부 실시양태에서, 항-글리칸 항체로 치료된 대상체에서 종양 체적은 약 0.1% 내지 약 2%, 약 1% 내지 약 5%, 약 3% 내지 약 12%, 약 10% 내지 약 30%, 약 20% 내지 약 50%, 약 40% 내지 약 60%, 약 50% 내지 약 75%, 약 60% 내지 약 85%, 또는 약 80% 내지 약 99%까지 감소될 수 있다. 일부 경우에, 항-글리칸 항체로 치료된 대상체에서 종양 체적은 적어도 1%까지, 적어도 5%까지, 적어도 10%까지, 적어도 20%까지, 적어도 40%까지, 적어도 50%까지, 적어도 60%까지, 적어도 80%까지, 적어도 85%까지, 적어도 90%까지, 적어도 95%까지, 적어도 98%까지, 적어도 99%까지, 또는 100%까지 감소될 수 있다.

[0469] 일부 경우에, 본 발명의 항-글리칸 항체는 목적하는 종양 성장 억제 퍼센트(%T/C)를 달성하도록 투여될 수 있다. %T/C는 치료된 대상체에서 종양 체적을 결정하고 이들을 비-치료된 또는 위약-치료된 대상체에서의 종양 체적과 비교함으로써 계산된다. 일부 실시양태에서, 본 발명은 항-글리칸 항체를 투여함으로써 대상체에서 종양 체적을 감소시키는 방법을 제공하며, 여기서 %T/C는 약 0.1% 내지 약 1%, 약 0.5% 내지 약 5%, 약 2% 내지 약 20%, 약 3% 내지 약 16%, 약 10% 내지 약 30%, 약 20% 내지 약 60%, 또는 약 40% 내지 약 80%이다. 일부 경우에 %T/C는 적어도 80%이다. 일부 경우에 %T/C는 0.1% 미만이다.

[0470] 일부 실시양태에서, 대상체에서 종양 체적을 감소시키는데 사용되는 항체는 세포 표면 글리칸(예컨대, STn)에 결합하는 이들의 능력 및/또는 암성 세포를 사멸시키는 이들의 능력에 기초하여 선택될 수 있다. 일부 경우에, 항체는 세포 표면 STn을 갖는 세포에 결합하기 위해 이들의 반-최대 유효 농도(EC₅₀)에 기초하여 선택될 수 있다. 이러한 항체에 대한 EC₅₀ 값은, 예컨대, 세포 표면 STn을 갖는 세포로 유동 세포계측 분석을 통해 결정될 수 있다. 이러한 항체는 약 0.1nM 내지 약 2nM, 약 0.5nM 내지 약 5nM, 약 1nM 내지 약 10nM, 약 5nM 내지 약 20nM, 또는 약 10nM 내지 약 30nM의 EC₅₀ 값을 가질 수 있다.

[0471] 일부 실시양태에서, 본 발명은 본원에 제시된 하나 이상의 항체를 투여함으로써, 종양 세포와 같은 암 세포를 사멸시키는 방법을 제공한다.

[0472] 일부 실시양태에서, 본 기재내용은 암 세포(암 줄기 세포를 포함하지만, 이에 제한되지 않음)를 단리하고/하거나 생검 재료를 수득하고 STn 발현에 대해 암 세포 및/또는 생검 재료를 스크리닝함으로써 항-STn 항체 치료를 필요로 하는 대상체를 확인하는 방법을 제공한다. 이러한 방법에 따르면, STn을 발현하는 암 세포 및/또는 생검 재료를 갖는 대상체는 항-STn 항체 치료로부터 이득을 보거나 항-STn 항체 치료(예컨대, 본원에 기재된 하나 이상의 항체로의 치료)를 필요하는 것으로 여겨진다. 일부 경우에, 본원에 기재된 항체는 암 세포 및/또는 생검 재료를 스크리닝하는데 사용될 수 있다. 암 세포는, 암 세포를 배양하고 표준 면역학적 검정(예컨대, ELISA, 웨스턴 블롯, 또는 다른 표준 면역학적 검정)을 사용하여 STn 발현을 검출함으로써 시험관내에서 스크리닝될 수 있다. 일부 경우에, 암 세포는 유동 세포계측 기법을 사용하여 STn 발현에 대해 스크리닝될 수 있다. 또 다른 양태에서, 암 세포를 배양액에서 성장시키고 항체-약물 접합체(ADC)인 항-STn 항체로 치료후 생존율에 대해 시험할 수 있다. 이러한 ADC는 본원에 기재된 것들을 포함하지만 이에 제한되지 않는 세포독성제를 포함할 수 있다. 세포독성제는 MMAE를 포함할 수 있다. 항-STn 항체는 본원에 기재된 것들을 포함하지만 이에 제한되지 않는 인간화 항체를 포함할 수 있다. 또 다른 양태에서, 암 세포는 암 세포를 사용하여 마우스(예컨대, NOD/SCID 마우스)에서 종양을 형성함으로써 스크리닝될 수 있다. 마우스에서 발생된 종양은, 이러한 종양으로부터 조직 부분을 제조하고 조직 부분을 본원에 기재된 항-STn 항체를 포함하지만 이에 제한되지 않는 항-STn 항체를 사용한 면역조직화학 분석에 적용함으로써 스크리닝될 수 있다. 일부 경우에, 마우스에서 형성된 종양은 마우스를 본원에 기재된 항-STn 항체를 포함하지만 이에 제한되지 않는 항-STn 항체로 처리한 후 종양 체적의 변화에 대해 평가될 수 있다. 이러한 항-STn 항체는 ADC를 포함할 수 있다. ADC는 본원에 기재된 것들 중의 어느 것을 포함하지만 이에 제한되지 않는 하나 이상의 세포독성제(예컨대, MMAE)를 포함할 수 있다. 스크리닝 후 STn 발현이 입증된 암 세포를 갖는 대상체는 항-STn 항체 치료를 필요로 하는 것으로 결정될 수 있다.

[0473] 일부 실시양태에서, 본 기재내용은 대상체로부터 암 세포(암 줄기 세포를 포함하지만, 이에 제한되지 않음)를 단리하고, 암 세포를 STn 발현에 대해 스크리닝하고, STn-발현 암 세포를 STn에 대해 특이적인 하나 이상의 후보 항체와 접촉시켜 하나 이상의 후보 항체 중의 어느 것이 암 세포에 결합할 수 있는지를 결정함으로써 암을 치료하는데 적합한 항체를 확인하는 방법을 제공한다. 본원에서 사용되는 용어 "후보 항체"는 하나 이상의 목적을 위해 평가되는 항체 또는 항체의 그룹 중의 하나를 가리킨다. 대상체 암 세포는 암 세포를 배양하고 표준 면역학적 검정(예컨대, ELISA, 웨스턴 블롯, 또는 다른 표준 면역학적 검정)으로 STn-검출 항체를 사용하여 또는 유동 세포계측 기법을 사용하여 STn 발현을 검출함으로써 시험관내에서 스크리닝될 수 있다. 본원에서 사용되는 용어 "STn-검출 항체"는 STn에 결합하고 삽입된 검출 가능한 표지의 존재를 통해 또는 검출 가능한 표지를 갖는

이차 항체의 사용을 통해 각 결합의 관찰을 가능케 하는 항체를 가리킨다. 또 다른 양태에서, 암 세포를 스크리닝하는 것은 이를 사용하여 마우스(예컨대, NOD/SCID 마우스)에서 종양을 형성함을 포함할 수 있다. 스크리닝은 ADC를 포함하지만 이에 제한되지 않는 항-STn 항체의 투여 후 STn의 발현에 대해 또는 체적의 감소에 대해 마우스 종양을 평가함으로써 수행될 수 있다.

[0474] 일부 실시양태에서, 본 발명은 대상체로부터 암 세포를 수득하고, 암 세포를 사용하여 마우스(예컨대, NOD/SCID 마우스)에서 종양을 형성하고, 항-STn 항체를 마우스에 투여하고, 마우스에서 종양 체적의 변화를 측정함으로써 대상체에서 암을 치료하기 위한 항체의 적합성을 평가하는 방법을 포함하며, 여기서, 마우스에서 종양 체적이 감소되면, 항-STn 항체는 대상체에서 암을 치료하는데 적합한 것으로 결정된다. 일부 경우에, 항-STn 항체는 다수회 투여된다. 이러한 양태에 따르면, 항체는 매 시간, 매일, 매주, 매달 및/또는 매년 투여될 수 있다. 일부 경우에, 항체는 약 2 내지 약 12주의 기간 동안 매주 투여된다. 일부 경우에, 항체는 적어도 12주의 기간 동안 매주 투여된다.

[0475] STn 발현은 암 세포의 전이 가능성에 기여하는데 연관된다. 본 발명의 몇몇 방법에 따르면, 글리칸-상호작용 항체는 전이를 감소시키는데 사용될 수 있다. 이러한 방법은 약 1% 내지 약 15%, 약 5% 내지 약 25%, 약 10% 내지 약 50%, 약 20% 내지 약 60%, 약 30% 내지 약 70%, 약 40% 내지 약 80%, 약 50% 내지 약 90%, 약 75% 내지 약 95%, 또는 적어도 95%까지의 전이 감소를 포함할 수 있다.

치료법 표적으로서의 암 줄기 세포

[0477] 암 줄기 세포 또는 CSC(종양 개시 세포라고도 불림)는 원발성 및 전이성 종양의 개시, 성장, 전파 및 재발을 구동하는 이종 종양군 내의 암 세포의 하위세트이며(Karsten and Goletz, SpringerPlus, 2013, 2, 301), 이것은 종양 타입에 따라 전체 종양군의 다양한 비율에서 발생할 수 있다. CSC는 자기-재생 능력에 의해 말단 분화된 세포와 구별되며 비-CSC, 분화된 자손을 야기한다(Gupta et al., Nature medicine, 2009, 15, 1010-1012). 이러한 특성은 정상 줄기 세포의 특성과 유사하다. 정상 줄기 세포와 CSC 사이의 이러한 차이는 치료에 대해 중요한 영향을 미친다.

[0478] CSC를 이들의 비-CSC 대응물과 구별하려는 취지의 점점 더 많은 수의 세포-표면 바이어마커가 확인되었다 (Medema et al., Nature cell biology, 2013, 15, 338-344; Zoller, Cancer, 2011, 11, 254-267). 이들은 CD44, CD133, CD117 및 알데히드 데하이드로제나제 동종형 1(ALDH1)을 포함할 수 있지만, 이에 제한되지 않는다. 이들 중의 일부는 마우스 종양 및 인간 세포주의 연구로부터 나온 것이지만, 다른 것은 원발성 인간 종양 샘플을 사용하여 검증되었다. 이들 중의 하나, 다양한 종양 타입의 널리 공지된 구성분인 막-신장 CD44 단백질, 또는 히알루로난 수용체가 또한 보다 최근에 인간 암에서 진짜 CSC 마커로서 받아 들여졌으며, 사실상 가장 빈번하게 관찰된 것이다(Lobo et al., 2007, 23, 675-699).

[0479] CD44는 전장 CD44 유전자의 20개 엑손과 19개 인트론 사이에서 발생하는 대안적 스플라이싱 이벤트에 의해 생성되는 몇몇 변이체 동종형으로 존재한다(Williams et al, Experimental biology and medicine, 2013, 238, 324-338). 커지는 실험적 증거가, 부분적으로 세포내 신호 형질도입 경로의 조절로 인해(Williams et al, Experimental biology and medicine, 2013, 238, 324-338), CSC의 선천적 전이성 및 약물 내성 표현형에 기여하는데 있어서의 CD44 및 이의 변이체의 지지적 역할을 지적한다(Negi et al., Journal of drug targeting, 2012, 20, 561-573). 게다가, 몇 가지 다른 암 유형과 함께, 높은 수준의 CD44 세포를 나타내는 삼중 음성 유방암을 가진 환자는 나쁜 예후 및 보다 높은 사망율을 갖는 것으로 알려져 있다(Negi et al., Journal of drug targeting, 2012, 20, 561-573). 이러한 조사결과는 CD44를 표적화하는 것이 성숙 암 세포 이외에 CSC의 억제 또는 제거를 통해 암을 치료하는 수단을 제공한다는 개념을 뒷받침한다. 사실상, CD44를 표적화하는 수 많은 접근법들이 다양한 성공 정도로 실험적으로 시도되어 왔다. 이들은 접합 및 비접합 항체, 나노-운반체 약물 시스템 및 히알루로난-접합 약물의 사용을 포함한 광범위한 기술을 포함한다(Negi et al., Journal of drug targeting, 2012, 20, 561-573). 그러나, 몇 가지 예에서, 독성 효과가 생체내 연구에서 관찰되었으며; 이러한 뜻밖의 부작용은 표적화된 CSC 및 성숙 종양 세포의 표면 상에서의 이의 존재 이외에 대부분의 척추동물 세포의 막에서의 CD44 및 변이체의 광범위한 발생에 기인할 수 있다(Naor et al., Seminars in cancer biology, 2008, 18, 260-267). 정상적인 인간 줄기 세포의 구성분(Williams et al, Experimental biology and medicine, 2013, 238, 324-338)인 CD44 단백질을 표적화하는 것은 또한 정상적인 줄기 세포 기능을 해칠 수 있다(Leth-Larsen et al., Molecular medicine, 2012, 18, 1109-1121). 대규모의 연구가 CSC 뿐만 아니라 성숙 종양 세포에 대한 표적화 CD44 단백질의 만족도를 지적하지만, 이러한 접근법이 갖는 본질적인 문제는 정상 조직 뿐만 아니라 정상 줄기 세포를 할애하는 억제제를 설계하는데 있어서 여전히 어려운 것으로 남아 있다.

- [0480] CSC 생물학에 영향을 미치는 또 다른 널리 공지된 종양 항원은 대다수의 선암에서는 높은 수준으로 별도로 발현되지만 정상 상피 세포에서는 낮은 수준으로 발현되거나 전혀 발현되지 않는 막 테더링된 당단백질인 상피 뮤신 MUC1이다. MUC1은 최근에 유방암(Engelmann et al., Cancer research, 2008, 68, 2419-2426) 및 췌장암을 포함한 각종 종양형성에 대한 CSC 바이오마커로서 확인되었으며, 여기서 이의 발현은 높은 전이 및 나쁜 예후와 상관성이 있다. CSC의 구성분으로서, MUC1은 세포 부착, 증식, 생존 및 신호전달에서 기능을 하는 것으로 나타났으며(Engelmann et al., Cancer research, 2008, 68, 2419-2426) 또한 CD44와 공동-발현될 수 있다(Leth-Larsen et al., Molecular medicine, 2012, 18, 1109-1121). 암에서 MUC1을 표적화하기 위한 면역치료 접근법은 백신 뿐만 아니라 다른 방법을 사용하되 주로 성숙 암 세포 요법의 맥락에서 추구되고 있다(Julien et al., Biomolecules, 2012, 2, 435-466; Acres et al., Expert review of vaccines, 2005, 4, 493-502).
- [0481] 암 줄기 세포는 상피-중간엽(EMT) 이행(epithelial-to-mesenchymal transition)(Gupta et al., Nature medicine, 2009, 15, 1010-1012) 및/또는 역으로 전이 부위에서 발생하는 중간엽-상피(MET) 이행(Leth-Larsen et al., Molecular medicine, 2012, 18, 1109-1121)(CSC 가소성이라고도 불리며, 여기서는 비-CSC가 CSC를 야기할 수 있음)을 통해 생성되는 것으로 가정되었다. 이러한 발견은 종양군에서 CSC 및 비-CSC 둘 다를 제거할 필요성을 더욱 강조한다.
- [0482] 풍부화된 CSC 집단에 대한 최근 연구에서는 이러한 세포는, 종양의 대부분과는 달리, 비교적 정지성(quiescent)이며 화학요법 및 방사선을 포함한 현재의 여러 유형의 치료법에 대해 우선적으로 내성인 것으로 드러났다(Leth-Larsen et al., Molecular medicine, 2012, 18, 1109-1121). 따라서 현재의 치료 전략은 종양의 비-CSC 성분을 표적으로 하므로, CSC는 대체로 영향을 받지 않아서 적절한 치료 후 재출현하여 처음 부위에 재발성 원발성 종양을 재형성하거나 별개의 부위에 전파되고, 콜로니화하여 암 사망률의 주 원인인 전이성 질환을 야기한다.
- [0483] 암 줄기 세포의 특성에 대한 현재의 이해는 현 관행대로, 종양에 존재하는 세포의 대부분을 표적화할 뿐만 아니라 잠재적으로 완치를 야기하기 위해 CSC 구획도 표적화할 필요성을 분명히 강조하였다.
- [0484] 앞서 논의된 바와 같이, (CSC를 포함한) 종양 관련 바이오마커에 기초하여 개발된 전략들은 대부분의 암 바이오마커가 정상 줄기 세포를 포함한 정상 세포에도 존재한다는 도전에 직면하다. CSC를 제거하기 위해 단백질 바이오마커를 표적으로 하는 치료법은 정상 줄기 세포를 또한 표적화할 수 있어, 정상 세포의 제거를 초래할 수 있다.
- [0485] **CSC에서의 종양-특이적 글리칸**
- [0486] 톰젠-누보(Thomsen-nouveau)(Tn) 항원(GalNAc-0-Ser/Thr)의 출현을 포함한 당화의 이상 형태가 다수의 인간 암에서 기술되었으며, 글리칸을 특이적 종양 표적화에 적합한 신규한 부류의 종양-관련 탄수화물 항원이라고 밝혔다(Rabu et al., Future oncology, 2012, 8, 943-960). Tn의 시알릴 유도체(STn)의 형성은 Tn 항원에의 α2,6 결합에 시알산을 부가하는 시알릴 트랜스퍼라제 ST6GalNAc-I에 의해 매개된다. STn의 시알릴화는 추가의 당 부가를 방지하며, 이에 따라 추가의 글리칸 연장을 절단한다(Schultz et al., Cancer metastasis reviews, 2012, 31, 501-518).
- [0487] 정상적인 성인 인간 조직에서 STn의 존재는 드물지만, STn은 다른 것들 중에서도 난소, 방광, 유방, 자궁경부, 결장 및 폐 암을 포함한 다양한 인간 암에서 발생한다(Ferreira et al., Molecular oncology, 2013, 7, 719-731; Kinney et al., Cancer, 1997, 80, 2240-2249). 게다가, 종양에서의 STn의 존재는 전이성 질환, 나쁜 예후 및 감소된 전체 생존율과 연관된다(Ferreira et al., Molecular oncology, 2013, 7, 719-731; Kinney et al., Cancer, 1997, 80, 2240-2249); 따라서, STn은 암 검출 및 치료법을 위한 매우 매력적인 표적으로 간주된다. STn의 말단 위치에 위치한 두 개의 별개의 형태의 시알산이 있다 - Neu5Ac 및 Neu5Gc. Neu5Ac-시알릴화된 형태가 인간에서 두드러지는데, 그 이유는 인간은 불활성 CMP-Neu5Ac 하이드록실라제(CMAH) 유전자로 인해 Neu5Gc를 합성할 수 없기 때문이다. 그러나, Neu5Gc-풍부 식품의 소비가 인간 세포에, 특히 암종에 외래 Neu5Gc 흡입을 야기한다. 선행 연구들에서는 고형 종양이 시알산의 Neu5Gc 형태를 받아들여 발현시키는 것으로 나타났다(Inoue et al., Glycobiology, 2010, 20, 752-762; Malykh et al., Biochimie, 2001, 83, 623-634; Padler-Karavani et al., Cancer research, 2011, 71, 3352-3363). mAb는 잠재적인 암 표적인 STn의 글리코-동종형 둘다에 결합한다: Neu5Ac-STn(AcSTn) 및 Neu5Gc-STn(GcSTn)(즉, pan-STn 항체로서 명명됨).
- [0488] STn 축적은 고형 종양에서 반복하여 관찰되는 특이적 체세포 돌연변이 및 활성 T-신타제의 형성을 위해 필요한 분자적 샤프론 코어 1 베타3-갈اكتоз일트랜스퍼라제-특이적 분자 샤프론(COSMC)를 암호화하는 유전자의 불활성화

와 연관된다(Ju et al., *Nature*, 2005, 437, 125). T-신타제는 GalNAc 기질에 대해 ST6GalNAc-I과 경쟁하며 따라서 돌연변이에 의해 불활성화되는 경우 증가된 STn 합성을 초래한다. 게다가, STn 축적은 또한 ST6GalNAc-I의 증가된 발현으로부터 야기될 수 있는데, 이것은 종종 관찰된다(Brockhausen et al., *Biological chemistry*, 2001, 382, 219-232; Ikebara et al., *Glycobiology*, 1999, 9, 1213-1224). STn의 데 노보 발현은 암종 세포를 조절하고, 악성 표현형을 변화시키고, 보다 공격적인 세포 거동을 야기할 수 있다(Pinho et al., *Cancer letters*, 2007, 249, 157-170). 이와 같이, STn은 흥미로운 암 바이오마커이자 치료 표적일 뿐만 아니라 STn 기능을 방해하는 것은 상당한 기능성, 항-전이성 치료 이익을 가질 매우 흥미로운 잠재성을 제공한다.

[0489] 세포 당단백질의 당화가 암에서 변한다는 것이 널리 알려져 있지만, 비정상적인 당화는 해당 당단백질 및 글리칸 둘 다에 대해 선택적인 것으로 보인다. 사실상, 인간 종양 CSC에서 CD44 및 MUC1 만이 STn 항원의 주요 운반체이며(Cazet et al., *Breast cancer research : BCR*, 2010, 12, 204; Julien et al., *Glycobiology*, 2006, 16, 54-64), 이는 즉시, 성숙 종양 세포 뿐만 아니라 CSC를 표적화하기 위한 선택적인 방안을 시사한다. MUC1은 장벽 기능을 제공하는 일부 상피 세포의 정상적인 표면 구성분인 반면, 종양-관련 MUC1은 성숙 암 세포에서 관찰되는 바와 동일한 방식으로 CSC에 대한 당화저하(hypoglycosylation) 및 증가된 시알릴화를 특징으로 하며, STn은 CSC 및 성숙 종양 세포 둘 다에 대한 특이적 마커로 보인다(Curry et al., *Journal of surgical oncology*, 2013, 107, 713-722). MUC1의 비정상적인 올리고당 프로파일은 시알릴-Le³(CA19-9 시험에서 사용됨), 시알릴-Le^x 및 시알릴-Tn(TAG-72), 뿐만 아니라 암 세포(예컨대, CSC)에서의 Tn과 같은 은성 에피토프와 같은 네오마커의 발현을 야기한다. 또한, 당화감소(underglycosylation) 때문에, 뮤신의 웨타이드 코어는 코어 내의 에피토프(정상 조직-유래 MUC1 내에서는 접근 가능하지 않음)가 잠재적인 항원으로서 작용할 수 있도록 노출된다.

[0490] 따라서, STn을 표적화하는 임상 방법들은 STn 백신만으로 이루어졌다. 가장 진보된 임상 후보물질은 키홀 림펫 혜모시아닌에 커플링된 STn으로 이루어진 치료 백신인 테라토프(Theratope)이다. 생체내 마우스 연구에서 테라토프 면역화는 강력한 항체 반응을 유도하여, 주사된 STn-발현 유방 암종 세포의 성장 지연을 매개하는 것으로 나타났다(Julien et al., *British journal of cancer*, 2009, 100, 1746-1751). 그러나, 테라토프는 전이성 유방암에서 III상 임상 시험에서 이의 1차 종점은 충족시키지 못했다. 테라토프 시험이 일차 종점에 이르지 못한 이유에 대한 주요 가설은 환자 집단을 등록 전에 STn 발현에 대해 평가하지 않았다는 것이다. 유방암에서의 STn 발현은 연구 및 검출 방법에 따라 25%-80% 범위로 환자들 간에 매우 이종성이기 때문에, STn 발현을 반응과 상관지울 수 있는 능력의 부족이 테라토프로부터의 어떠한 이익을 차폐시킬 수 있다. 중요하게도, 호르몬 요법을 받고 있는 환자의 아집단은 호르몬 요법 단독과 비교하여 테라토프로 치료된 경우 전체 생존율 중간값에 있어서 상당한 7.5개월 증가를 나타내었으며(Ibrahim et al., *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 2004, 22, 2547; 및 Miles et al., *The oncologist*, 2011, 16, 1092-1100), 이는 특정 환자 집단에서 STn 표적화의 치료적 가능성을 입증하였다. 추가로, 면역 반응은 종종 백신화된 환자들 간에 상이하게 다르기 때문에, 백신 방법은 항체 역가를 제어하거나 조절할 수 있는 능력이 부족하여, 환자들 간에 광범위한 치료 항체 노출을 초래한다. 그럼에도 불구하고, 테라토프는 최소의 독성으로 잘 받아들여졌으며, 이는 암 치료법을 위한 표적화 STn의 안전성을 입증한다.

[0491] 암 세포에서 STn 발현의 분자 기초의 커가는 이해는 임의의 세포 표면 단백질 상에서 STn을 발현하는 세포가 또한 다수의 (전부는 아니지만) 다른 O-글리코실화된 세포 표면 단백질 상에서 STn을 발현하여, 광범위하게 분포된 탁월한 암-관련 치료 표적으로 되게 함을 강력하게 시사한다. 따라서, STn 양성 암 세포군은 CSC가 풍부할 수 있다. 또한, 최근 데이터는 STn 발현의 폐기가 암이 덜 공격적이게 하고 전이성 거동에 있어서 상당한 감소를 초래함을 입증한다(Gill et al., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2013, 110, E3152-3161).

암 치료로서의 항-STn 항체 표적화 CSC

[0493] 몇몇 항-STn 항체가 당 분야에 기재되어 있지만, 일부는 STn 항원 또는 시알릴화 동종형에 대해 낮은 특이성을 입증한다. 예를 들면, 상업적 B72.3 항-STn 항체는 STn에 뿐만 아니라 Tn 항원에도 결합하는 것으로 나타났다(Bapat, S. A. (2010) *Human ovarian cancer stem cells*. *Reproduction* 140, 33-41). 항체-의존적 세포성 세포독성(ADCC) 및/또는 보체-의존적 세포독성(CDC)을 유도하도록 조작되거나, 세포독성 페이로드[예컨대 항체 약물 접합체(ADC)]와 접합된, STn을 표적화하는 단클론 항체(mAb)의 이용 가능성은 STn-발현 종양을 갖는 암 환자에 대해 상당한 치료 이익의 가능성을 제공한다. 또한, 이러한 항체는 치료법에 가장 반응할 것 같은 환자를 미리 선택할 수 있는 동반 진단제(companion diagnostic)의 개발을 또한 가능케 할 것이다.

[0494] STn은 종종 하나 이상의 CSC 표면 항원 상에 존재하며, 함께 이들은 CSC와 연관된 줄기세포능 및 화학내성 특성

을 촉진시키는 작용을 한다. 따라서, 항-STn 항체는 직접적인 맞물림 및/또는 ADCC를 통해 CSC를 직접 사멸시킬 수 있는 가능성을 갖는 CSC-관련 암 표적화제를 제공할 뿐만 아니라 다수의 세포-표면 단백질에 결합하고 CSC 생존력, 자기-재생 및 복제에 필수적인 이들의 관련 기능을 방해하는 독특한 기회를 제공한다.

[0495] 본원에 논의된 바와 같이, CSC에 대해 STn을 표적화하는 이유 및 이점은 다음을 포함할 수 있다: (1) 다수의 종양-특이적 말단절단된 당단백질은 암에서 STn을 운반하고; (2) STn은 CSC 및 성숙 종양 세포 둘 다 상에서, 증식 상태와 무관하게 CD44, MUC1 및 잠재적으로 다른 중요한 세포-표면 마커 상에서 우선적으로 발현되는 독특한 글리칸 표적이어서, 단일 치료제에 의한 이러한 종양 성분 둘 다의 표적화를 가능하게 하고; (3) STn은 또한 난소암 및 기타의 바이오마커인 CA-125의 성분이고; (4) STn은 난소 CSC 마커 CD44의 성분이다. 따라서, Tn에 결합된 시알산의 Neu5Ac 및 Neu5Gc 형태 둘 다를 포함하는 에피토프를 표적화하는 pan-STn 뮤린 mAb의 사용은, CSC 및, 공통의 에피토프 덕분에, 비-CSC 종양 세포에 결합하여 이의 기능을 사멸 또는 손상시킬 것이다.

[0496] 일부 실시양태에서, 본 발명은 인간 CSC 뿐만 아니라 성숙 종양 세포의 특이적인 제거를 위한 신규한 항-pan STn mAb(들)를 제공한다. 본 발명의 하나의 측면에서, 항-STn 항체는 입증된 STn 글리칸 자체-특정한 당펩타이드 또는 운반 단백질이 아니라-를 표적화할 것이며, 이것은 CSC 및 비-CSC 종양군 둘 다 상에서 CD44, MUC1, 또는 다른 STn-글리코실화된 마커에 결합할 폭넓은 가능성을 제공할 것이다. 일부 실시양태에서, 본 기재내용의 글리칸-상호작용 항체는 하나 이상의 관련 글리칸을 갖는 줄기 세포-관련 단백질을 표적화하는데 사용될 수 있다. 본원에서 사용되는 용어 "줄기 세포-관련 단백질"은 하나 이상의 줄기 세포와 연관되는 임의의 단백질을 가리킨다. 이러한 단백질은 줄기 세포 생존, 성장, 복제 및/또는 유지에 영향을 주는 세포 표면 단백질, 마커, 세포내 단백질, 전사 인자 및 세포 신호전달에 관여하는 단백질을 포함할 수 있지만, 이에 제한되지 않는다. 일부 경우에, 이러한 글리칸은 STn을 포함한다. 줄기 세포-관련 단백질은 노치, 헤지호그, CD44, CD117, CD133 및 인테그린을 포함할 수 있지만, 이에 제한되지 않는다.

[0497] 종양-관련 STn을 표적화하는데 있어서의 예외적인 특이성을 고려해 볼 때, 본 발명은 정상 성인 줄기 세포를 포함한 정상 조직을 할애함으로써 탁월한 치료 창을 가능케 할 수 있다.

[0498] 본 발명에 따르면, 종양 구획 내에 함유된 CSC 및 성숙 암 세포 둘 다를 제거함으로써 인간 종양형성을 퇴치하는 것을 목표로 한 독특한 면역치료 해법이 본원에 제공된다. 본 발명은 종양을 특이적으로 표적화하는 치료법 및 방법을 제공하며, 이것은 본 발명에 이르러 CSC를 표적화하고, 따라서 이러한 잠재적 표적의 관련 종양-특이적 탄수화물 모이어티를 표적화함으로써 치료 창을 확장시킴을 포함한다. 제거는 암 줄기 세포를 포함한 암 조직에 독특하게 존재하는 종양 관련 세포-표면 시알릴화 Tn 항원(STn) 구조를 표적화함을 통해 특이적으로 부여된다.

[0499] 난소 CSC

[0500] 난소암은 미국에서 여성에 야기되는 주요 부인과 암이다. 2013년 동안, 22,240명의 여성이 이 질환으로 진단되고 14,030명이 이 질환으로 사망할 것으로 추정되어, 이것은 미국에서 여성-관련 암 사망의 다섯 번째로 주요한 원인이며 가장 치명적인 부인과 악성종양일 것이다(Siegel et al., Cancer statistics, 2013. CA: a cancer journal for clinicians 63, 11-30). 이러한 높은 사망률은 증상을 보이지 않는 개시, 말기에 처음 진단, 이러한 유형의 암의 공격성 및 치료상으로 표적화할 수 있는 유전학적 변화의 일반적인 부족에 기인할 수 있다. 현재의 치료 기준은 종양 용적축소(tumor debulking)에 이은 턱산 및 백금 기반 화학요법이다. 이러한 초기 치료로 환자의 ~70%가 초기 완전한 임상 반응을 달성하게 되지만, 이들 환자의 대부분에서는 불행하게도 화학내성 질환이 재발할 것이다(Foster et al., Cancer letters, 2013, 338, 147-157; 및 McCann et al., PLoS one, 2011, 6, e28077). 부분적으로, 재발성 질환은, 다른 암 유형에서처럼, 전체 종양군 내의 CSC의 존재에 기인할 수 있다. 실제로, 난소 CSC가 화학요법 및 방사선요법에 내성인 것으로 확인되었고 나타났다(Burgos-Ojeda et al., Cancer letters, 2012, 322, 1-7). 따라서, 다시금 다른 형태의 암에서처럼, 종양군에서 성숙 세포와 함께 CSC를 제거하는 것은 재발성 질환을 관리하고 이상적으로 치료를 실시할 수 있다는 낙관을 제공한다.

[0501] 본 발명의 일부 실시양태에서, 난소 CSC가 난소암 치료를 위해 표적화될 수 있다. CD133이 가장 널리 연구된 추정상의 난소 CSC 마커이지만, 앞서 논의된 바와 같이 STn의 공지된 운반체인 CD44가 난소암과 연관되며 난소 CSC를 확인하는 마커 세트에 포함되는 것으로 인지된다(Zhang et al., Cancer research, 2008, 68, 4311-4320; Foster et al., Cancer letters, 2013, 338, 147-157; 및 Zoller, Cancer, 2011, 11, 254-267). 또한, STn은 널리 공지된 난소암 바이오마커 CA-125(MUC16) 상에서 뿐만 아니라 MUC1 상에서 발현되며, 여기서 혈청 중의 이들 STn-관련 뮤신의 수준이 암성 대 양성 난소 질환의 추가의 식별인자(differentiator)로서 최근에 사용되었다. STn의 증가된 혈청 수준은 난소암 환자의 ~50%에서 발생하며 보다 낮은 5년 생존율과 상관성이 있

다(Kobayashi et al., Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology, 1991, 9, 983-987; Kobayashi et al., Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology, 1992, 10, 95-101; and Chen et al., Journal of proteome research, 2013, 12, 1408-1418). 마지막으로, 바티파디에칼(Vathipadiekal) 등은 인간 원발성 난소 암종 CSC 및 비-CSC 집단 간의 차등 유전자 발현의 연구에서 STn-생성 시알릴 트랜스퍼라제 ST6GalNAc-I의 발현이 두 구획으로부터의 세포들 간에 상이하지 않았음을 밝혀내었다.

[0502] 일부 실시양태에서, 본 발명은 CSC와 관련된 암의 조절 또는 치료를 막는 CSC를 표적화하기 위한 항체를 제공한다. 이러한 항체는 국제 출원 제PCT/US14/60079호에 기재된(또는 기재된 것들 중의 어느 것으로부터 유도된) 것들 중의 어느 것을 포함하지만 이에 제한되지 않는 항-STn 항체를 포함할 수 있으며, 이의 내용은 전문이 본원에 참고로 포함된다. 또한, 항-STn 항체는 3F1 및/또는 인간화된 유도체로부터의 CDR을 갖는 재조합 항체를 포함하여, 항체 3F1(SBH Sciences, Natick, MA) 또는 이의 유도체를 포함할 수 있다.

[0503] 일부 실시양태에서, 본 발명의 항체는 다른 형태의 치료에 내성이 있는 난소암 줄기 세포를 표적화하는데 사용될 수 있다. 이러한 치료는 화학요법을 포함할 수 있다. 화학요법 치료는 본원에 기재된 것들 중의 어느 것을 포함할 수 있으며 카보플라틴 및/또는 파클리탁셀로의 치료를 포함할 수 있지만, 이에 제한되지 않는다. 화학요법-내성 난소암 줄기 세포를 표적화하는 방법은 화학요법 치료 후 발생하는 난소암 줄기 세포 표면 글리칸 발현의 변화를 이용할 수 있다. 일부 경우에, 화학요법-내성 난소암 줄기 세포는 화학요법 치료 전 및/또는 후에 STn을 발현한다. 화학요법 치료 후, 몇몇 화학요법-내성 난소암 줄기 세포가 증식하여, 이를 세포를 주변 세포와 구별하는 하나 이상의 세포 표면 글리칸(예컨대, STn)을 발현하는 종양 세포의 집단은 야기할 수 있다. 본원에 기재된 것들을 포함하지만 이에 제한되지 않는 항-글리칸 항체는 이러한 구별되는 글리칸을 표적화함으로써 난소암 줄기 세포의 이러한 집단을 사멸시키는데 사용될 수 있다. 일부 경우에, 항-STn 항체가 제공될 수 있다. 이러한 항체는 본원에 기재된 항체 중의 어느 것을 포함할 수 있지만, 이에 제한되지 않는다. 일부 경우에, 이러한 항체는 인간 또는 인간화된 적어도 하나의 가변 도메인을 가질 수 있다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 화학요법-내성 난소암 줄기 세포를 갖는 대상체는 카보플라틴 및/또는 파클리탁셀로 치료 후 본 발명의 항-STn 항체로 치료될 수 있다.

[0504] 결장직장암

[0505] 결장직장 암(CRC)은 4번째로 가장 큰 발병률을 가지며, 현재 US에서 암-관련 사망의 3번째로 주요한 원인이다. 현재, 환자의 20%는 전이성 질환으로 진단되며 CRC를 갖는 환자의 대략 50%는 결국 전이를 발병할 것이다. 전이성 질환으로 진단된 경우, 5년 생존율은 13.1%이다. 전이성 결장암(mCRC)을 갖는 환자에서, 항-표피 성장 인자 수용체(EGFR) 단클론 항체 및 항-VEGF 단클론 항체와 같은 치료 항체(예컨대, 단클론 항체)의 사용에 대한 선례가 있다.

[0506] 일부 실시양태에서, 본 기재내용의 글리칸-상호작용 항체가 CRC 및/또는 mCRC를 치료하는데 사용될 수 있다. 일부 경우에, 이러한 글리칸-상호작용 항체는 본원에 기재된 것들 중의 어느 것을 포함하지만 이에 제한되지 않는 항-STn 항체이다. CRC 및/또는 mCRC를 치료하는데 사용되는 글리칸-상호작용 항체는 세포독성제(예컨대, MMAE 및 MMAF)와 접합될 수 있다. 글리칸-상호작용 항체는 화학요법제(예컨대, 플루오로피리미딘, 옥살리플라틴 및/또는 이리노테칸) 및/또는 치료 항체(예컨대, 베바시주맙 및/또는 항-EGFR)로의 치료법과 같은 다른 치료법과 병용될 수 있다.

[0507] 몇몇 양태에 따르면, 결장직장암을 치료하는데 사용되는 글리칸-상호작용 항체는 약 0.5mg/kg 내지 약 20mg/kg의 용량으로 투여될 수 있다. 예를 들면, 항체는 약 0.5mg/kg 내지 약 2mg/kg, 약 1mg/kg 내지 약 5mg/kg, 약 2.5mg/kg 내지 약 10mg/kg, 또는 약 5mg/kg 내지 약 20mg/kg의 용량으로 투여될 수 있다.

[0508] 병용 암 요법

[0509] 일부 실시양태에서, 본 발명의 화합물 및 조성물은 하나 이상의 추가의 형태의 암 치료와 조합될 수 있다. 일부 경우에, 이러한 추가의 형태는 화학요법적 치료를 포함할 수 있다. 따라서, 본 발명의 몇몇 방법은 적어도 하나의 화학요법제를 암을 갖는 대상체에 투여하고 글리칸-상호작용 항체를 투여함으로써 암을 치료하는 방법을 포함한다. 이러한 항체는 본원에 기재된 항-STn 항체를 포함할 수 있다.

[0510] 본원에서 사용되는 용어, "화학요법"은 화학 물질을 사용한 치료의 한 형태를 가리킨다. 이러한 화학 물질을 본원에서는 "화학요법제"라고 한다. 암의 치료에서, 화학요법제는 암 세포의 증식을 느리게 하거나 억제하는 제제이다.

- [0511] 일부 실시양태에서, 본 발명의 화학요법제는 핵산 길항제일 수 있다. 이러한 제제는 주로 암 세포와 같은 증식 세포에 영향을 미치며, 전형적으로 DNA 복구 및/또는 합성을 방해함으로써 기능한다. 일부 경우에, 핵산 길항제는 알킬화제(예컨대, 이작용성 알킬화제 또는 일작용성 알킬화제)이다. 알킬화제는 분열하는 세포에서 DNA 합성을 방해하는데 사용될 수 있는 반응성 화합물이다. 본 발명의 알킬화제는 사이클로포스파미드, 메클로레타민, 클로람부실, 멜팔란, 데카르바진, 니트로소우레아 및 테모졸로미드를 포함할 수 있지만, 이에 제한되지 않는다.
- [0512] 또 다른 양태에서, 본 발명의 핵산 길항제는 안트라사이클린을 포함할 수 있다. 안트라사이클린은 핵산 합성을 방해하는 박테리아 유래 화합물이다. 본 발명의 안트라사이클린은 다우노루비신, 독소루비신, 에피루비신, 이다루비신, 미톡산트론 및 발루비신을 포함할 수 있지만, 이에 제한되지 않는다. 일부 실시양태에서, 안트라사이클린은 리포솜적으로 캡슐화될 수 있다.
- [0513] 추가의 양태에서, 핵산 길항제는 히스톤 데아세틸라제 억제제 및/또는 토포이소머라제 억제제일 수 있다. 이들 억제제는 DNA 합성 및 복구에 필요한 DNA 수퍼코일링(supercoiling)에서의 변화를 방지한다. 토포이소머라제 I의 억제제는 이리노테칸 및 토포테칸을 포함할 수 있지만, 이에 제한되지 않는다. 토포이소머라제 II의 억제제는 에토포시드, 테니포시드 및 타플루포시드를 포함할 수 있지만, 이에 제한되지 않는다. 히스톤 데아세틸라제 억제제는 보리노스타트 및 로미뎁신을 포함할 수 있지만, 이에 제한되지 않는다.
- [0514] 일부 실시양태에서, 본 발명의 핵산 길항제는 뉴클레오티드 유사체 및/또는 뉴클레오티드 전구체 유사체를 포함할 수 있다. 증식 세포는 생성되는 딸 세포에서 핵산에의 삽입을 위해 뉴클레오티드를 필요로 한다. 뉴클레오티드 유사체는 이러한 핵산의 형성을 방해하거나 이들이 비작용성으로 되게 할 수 있다. 본 발명의 뉴클레오티드 유사체는 아자시티딘, 아자티오프린, 카페시타빈, 독시플루리딘, 폴루오로우라실, 겹시타빈, 하이드록시우레아, 머캅토푸린, 메토트렉세이트 및 티오구아닌을 포함할 수 있지만, 이에 제한되지 않는다. 일부 실시양태에서, 류코보린이 이들의 효과를 증진시키고/시키거나 해로운 부작용을 감소시키기 위해 뉴클레오티드 유사체와 함께 투여된다.
- [0515] 일부 실시양태에서, 본 발명의 핵산 길항제는 백금계 제제이다. 이러한 제제는 핵산을 가교결합시킴으로써 핵산을 분열시킨다. 본 발명의 백금계 제제는 옥살리플라틴, 시스플라틴 및 카보플라틴을 포함할 수 있지만, 이에 제한되지 않는다.
- [0516] 일부 경우에, 본 발명의 화학요법제는 세포골격 분열작용제(disrupting agent)를 포함한다. 활발히 분열하는 세포는 이러한 화합물에 의해 방해될 수 있는 주요 세포골격 변화를 겪는다. 본 발명의 세포골격 분열작용제는 빈카 알칼로이드, 에포테린, 파클리탁셀, Abraxane®(주사 가능한 혼탁액을 위한 파클리탁셀 단백질-결합된 입자) 및 도세탁셀을 포함할 수 있지만, 이에 제한되지 않는다.
- [0517] 화학요법제는 증식하는 암 세포를 표적화하는 데에는 효과적이지만, 종종 일부 비-암성 세포에도 영향을 미친다. 이 때문에, 이들의 투여는 전형적으로 용량, 치료 기간, 또는 치료 면적에 의해 제한된다. 또한, 화학요법제가 주로 증식 세포에 영향을 미치기 때문에, 비-증식 암 줄기 세포는 치료 후에도 여전히 생존할 수 있으며 암성 세포를 재형성할 수 있다. 따라서, 일부 실시양태에서, 본 발명의 방법은 적어도 하나의 화학요법제가 암을 가진 대상체에 먼저 투여된 다음 글리칸-상호작용 항체가 투여되는 암 치료방법을 제공한다. 일부 경우에, 글리칸-상호작용 항체는 화학요법-내성 세포와 관련된 특이적 세포 표면 글리칸을 표적화하도록 선택된다. 본원에서 사용되는 용어 "화학요법-내성"은 화학요법 치료에 의해 영향을 받지 않거나 이에 대해 제한된 민감성을 갖는 세포를 가리키는데 사용된다.
- [0518] 화학요법-내성 세포(예컨대, 화학요법-내성 암 줄기 세포)를 표적화하는 방법은 화학요법 치료 후 발생하는 이러한 세포에서의 STn 발현의 변화를 이용할 수 있다. 일부 경우에, 화학요법-내성 세포는 화학요법 치료 전 및/또는 후에 STn을 발현한다. 일부 경우에, 화학내성 세포에서의 세포 표면 STn 발현은 화학요법 치료 후 증가될 수 있다[예컨대, STn 합성에 관여하는 인자(예컨대, STnGalNAc I, T-신타제, 또는 Cosmc)의 변화된 발현, 감소된 퇴화, 또는 증가된 세포 표면 STn 발현을 야기하는 기타의 메카니즘으로 인해]. 화학요법 치료 후, 세포 표면 STn을 발현하는 일부 화학요법-내성 세포가 증식하여 화학요법-내성인 STn-발현 종양 세포군을 야기할 수 있다. 일부 실시양태에서, 항-STn 항체는 화학요법-내성 세포를 표적화하는데 사용될 수 있다. 일부 경우에, 이들 세포는 암 줄기 세포이다. 따라서, 본 발명의 방법은 항-STn 항체를 투여하여 하나 이상의 화학요법제의 투여 후 존재하는 STn-발현 화학요법-내성 세포를 표적화하는 방법을 포함할 수 있다.
- [0519] 화학요법-내성 세포 상에서의 세포 표면 글리칸의 동정은 이를 세포를 주변 세포와 구별하는 세포 표면 글리칸의 정체에 대해 화학요법 치료 후 화학요법-내성 세포를 분석함으로써 수행할 수 있다. 일부 실시양태에서, 이

러한 세포 표면 글리칸은 뮤신-관련 항원(Tn, STn 및 톰젠-프리텐라이히 항원을 포함하지만, 이에 제한되지 않음), 혈액형 루이스 관련 항원[Lewis^Y(Le^Y), Lewis^X(Le^X), 시알릴 Lewis^X(SLe^X) 및 시알릴 Lewis^A(SLe^A)를 포함하지만, 이에 제한되지 않음], 글리코스핑고리피드-관련 항원[Globo H, 발생 단계-특히 배아성 항원-3(SSEA-3) 및 시알산을 포함하는 글리코스핑고리피드를 포함하지만, 이에 제한되지 않음], 강글리오시드-관련 항원[강글리오시드 GD2, GD3, GM2, 푸코실 GM1 및 Neu5GcGM3을 포함하지만, 이에 제한되지 않음] 및 폴리시알산-관련 항원을 포함할 수 있지만, 이에 제한되지 않는다. 이러한 항원들 중의 다수가 국제 공보 제WO2015054600호에 기재되어 있으며, 이의 내용은 전문이 본원에 참고로 포함된다. 화학요법 후 남아 있는 암 줄기 세포 상에서 발현되는 세포 표면 글리칸을 동정하기 위해 수행되는 분석은 당업계에 공지된 임의의 방법들에 따라 수행할 수 있다. 일부 경우에, 이러한 분석은 조직 샘플을 수득하고 하나 이상의 면역학적 검정(예컨대, 면역조직화학적 분석, ELISA 분석, 유동 세포계측 분석, 항체 어레이, 또는 질량 분광법)을 사용하여 조직 샘플에서 세포 표면 글리칸의 발현을 평가함으로써 수행된다.

[0520] 일부 실시양태에서, 화학요법-내성 세포를 분석하여 세포 표면 STn의 발현 수준을 평가한다. 이것은 조직 샘플을 수득하고 [예를 들면, 하나 이상의 면역학적 검정(예컨대, 면역조직화학적 분석, ELISA 분석, 유동 세포계측 분석, 항체 어레이, 또는 질량 분광법)을 사용하여] 세포 표면 STn의 발현에 대해 샘플을 분석함으로써 수행될 수 있다. 화학요법-내성 세포가 STn을 발현하는 경우, 항-STn 항체가 화학요법제의 투여 후 대상체에 투여될 수 있다.

[0521] 일부 실시양태에서, 하나 이상의 종양은 종양을 적어도 하나의 화학요법제와 접촉시킴으로써 하나 이상의 글리칸-상호작용 항체로의 치료에 대해 프라이밍된다. 이러한 양태에 따르면, 글리칸-상호작용 항체 치료에 대해 종양을 프라이밍함(priming)은 종양에서 종식 세포를 감소시켜 하나 이상의 화학요법-내성 종양 세포를 남겨 두는 것을 가리킨다. 이러한 방법에 따르면, 글리칸-상호작용 항체는 하나 이상의 화학요법제로의 치료 후에 남아 있는 화학요법-내성 세포를 제거함으로써 종양 체적을 더욱 감소시키는데 사용될 수 있다.

[0522] 하나 이상의 화학요법제 투여 후의 글리칸-상호작용 항체의 투여는 하나 이상의 화학요법제로 투여한지 약 1일 내지 약 1년 후에 수행될 수 있다(예컨대, 약 1일 내지 약 10일, 1주 내지 약 4주, 약 2주 내지 약 10주, 약 1개월 내지 약 3개월, 약 2개월 내지 약 6개월, 또는 약 3개월 내지 약 12개월). 일부 경우에, 글리칸-상호작용 항체의 투여는 하나 이상의 화학요법제로 치료한지 적어도 1년 후에 수행될 수 있다.

[0523] 일부 실시양태에서, 하나 이상의 화학요법제를 여러 차례 투여한 다음 글리칸-상호작용 항체를 투여할 수 있다(예컨대, 2차례, 3차례, 4차례, 5차례, 6차례, 7차례, 8차례, 9차례, 10차례, 또는 적어도 10차례). 일부 경우에, 조직 분석으로 암성 세포 및/또는 화학요법-내성 세포가 감소되거나 제거된 것으로 드러날 때까지 수 차례의 치료를 반복한다.

[0524] 화학요법제의 용량은 치료를 받는 대상체의 체격에 기초하여 조절될 수 있다. 일부 실시양태에서, 용량은 2014년 Calvo 등에 의해 기재된 것들을 포함한다(Calvo, E. et al., 2014. Chemotherapeutic agents and their uses, dosages, and toxicities. Cancer Network. p1-12). 일부 경우에, 용량은 치료되는 대상체의 표면적에 기초하여 조절된다[전형적으로 제곱 미터(m^2)로 측정됨]. 본 발명의 화학요법제는 약 $0.01mg/m^2$ 내지 약 $1mg/m^2$, 약 $0.1mg/m^2$ 내지 약 $5mg/m^2$, 약 $1mg/m^2$ 내지 약 $20mg/m^2$, 약 $10mg/m^2$ 내지 약 $100mg/m^2$, 약 $50mg/m^2$ 내지 약 $500mg/m^2$, 약 $200mg/m^2$ 내지 약 $2000mg/m^2$, 또는 약 $1000mg/m^2$ 내지 약 $10000mg/m^2$ 의 용량으로 투여될 수 있다.

일부 경우에, 본 발명의 화학요법제는 적어도 $10000mg/m^2$ 의 용량으로 투여된다. 몇몇 방법에 따르면, 화학요법제는 정맥내 투여된다.

[0525] 일부 실시양태에서, 화학요법제의 투여는 카보플라틴의 투여를 포함한다. 몇몇 양태에 따르면, 카보플라틴은 약 $200mg/m^2$ 내지 약 $400mg/m^2$ 의 용량으로 투여된다. 일부 실시양태에서, 화학요법제의 투여는 파클리탁셀의 투여를 포함한다. 몇몇 양태에 따르면, 파클리탁셀은 약 $20mg/m^2$ 내지 약 $300mg/m^2$ 의 용량으로 투여된다.

[0526] 일부 실시양태에서, 본 기재내용의 글리칸-상호작용 항체는 항-혈관형성 치료법(예컨대, 베바시주맙)과 병용하여 투여된다. 몇몇 양태에 따르면, 암 치료를 필요로 하는 대상체를 확인하는 단계(여기서, 대상체는 적어도 하나의 폴리-ADP-리보스 폴리미라제 억제제로의 치료에 완전히 반응성이 아닌 암을 갖는다) 및 대상체에 항-STn 항체를 투여하는 단계를 포함하여 암을 치료하는 방법이 제공된다. 이러한 항-STn 항체는 당업계에 공지되거나 본원에 기재된 것들 중의 어느 것을 포함할 수 있다.

[0527] 면역-관련 표적

일부 실시양태에서, 본 발명의 글리칸-상호작용 항체는 면역조절 항체일 수 있다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 면역조절 항체는 하나 이상의 면역 기능 또는 경로를 증진시키거나 억제하는 항체이다.

다수의 박테리아성 글리칸이 시알산을 포함하는 것으로 알려져 있다. 일부 경우에, 이러한 글리칸은 박테리아가 인간을 포함하지만 이에 제한되지 않는 숙주의 선천성 면역계를 피할 수 있게 한다. 하나의 예에서, 박테리아성 글리칸은 인자 H 인식을 통해 대체 보체 경로 활성화를 억제시킨다. 또 다른 예에서, 박테리아성 글리칸은 항원 성일 수 있는 기본 잔기를 차폐시킨다. 몇몇 박테리아성 글리칸은 특정 시알릴화 모이어티를 포함한 실체에의 면역 반응을 약화시키는 억제성 시알산 결합 Ig-유사 렉틴(Siglecs)의 활성화를 통해 세포 신호전달 이벤트에 참여한다(Chen, X. et al., Advances in the biology and chemistry of sialic acids. ACS Chem Biol. 2010 Feb 19;5(2):163-76). 일부 실시양태에서, 본 발명의 글리칸-상호작용 항체는 박테리아성 글리칸과 관련된 면역 합병증을 치료하는데 사용될 수 있다.

[0530] 본원에 기재된 바와 같은 Neu5Gc의 외래 특성으로 인해, 몇몇 Neu5Gc 글리칸은 면역원성이어서, 이들 글리칸이 발현될 수 있는 세포 및 다른 실체의 면역 관련 파괴를 초래한다. 이러한 자가면역 파괴는 병원성일 수 있다. 일부 실시양태에서, 글리칸-상호작용 항체는 Neu5Gc 글리칸과 관련된 자가면역 장애를 앓는 환자를 치료하는데 사용될 수 있다.

[0531] 일부 실시양태에서, 본 발명의 면역조절 항체는 T 세포-매개된 면역력을 촉진시키거나 억제하는데 사용될 수 있다. 이러한 항체는 T 세포, T 세포-관련 단백질 및/또는 T 세포와 상호작용하는 하나 이상의 다른 세포 유형 상에 존재하는 하나 이상의 글리칸과 상호작용할 수 있다. T 세포 매개된 면역력을 증진시키는 면역조절 항체는 암 세포의 T 세포 매개된 표적화를 자극하는데 사용될 수 있다.

[0532] 몇몇 종양에서, 종양-관련 대식세포(TAM)에 의한 침윤이 종양 세포 생존 및 성장을 촉진시키는 면역억제를 야기 할 수 있다. 이것은 TAM 상에 존재하는 콜수성 C-타입 수용체(CLR) 및 종양-관련 뮤신 간의 상호작용을 통해 발생하는 면역억제 세포 신호전달로 인한 것으로 생각된다(Allavena, P. et al., Clin Dev Immunol. 2010;2010:547179). 일부 실시양태에서, 하나 이상의 종양-관련 뮤신 또는 TACA에의 본 발명의 면역조절 항체의 결합은 TAM에서 면역억제 세포 신호전달을 방지한다.

항-바이러스 용도

[0534] 일부 실시양태에서, 본 발명의 글리칸-상호작용 항체는 바이러스를 표적화할 수 있다. 바이러스 코트 단백질 및 바이러스 외피는 종종 글리칸을 포함하며, 이를 본원에서는 바이러스 표면 글리칸이라고 한다. 이러한 글리칸이 글리칸-상호작용 항체의 표적일 수 있다. 일부 실시양태에서, 바이러스 표면 글리칸은 시알릴-STn을 포함한다. 추가의 양태에서, 바이러스 표면 글리칸은 GcSTn을 포함할 수 있다. 글리칸-상호작용 항체에 의해 표적화될 수 있는 바이러스는 HIV, 인플루엔자, 리노바이러스, 대상포진, 로타바이러스, 헤르페스(예컨대 타입 1 및 2), 간염(예컨대 타입 A, B, C, D 및 E), 황열병 및 인간 유두종 바이러스를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

다른 치료 용도

[0536] 일부 실시양태에서, 본 발명의 글리칸-상호작용 항체는 단백질분해 이벤트를 변화시키거나 제어하는 작용을 할 수 있다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 글리칸-상호작용 항체는 표적에 결합하기 전에 세포에 내재화될 수 있다.

수의과 용도

[0538] 본 발명의 글리칸-상호작용 항체는 비-인간 척추동물의 치유 및 치료를 포함한 수의과적 관리 영역에서 유용성을 발견할 것으로 고려된다. 본원에 기재된 바와 같이, 용어 "비-인간 척추동물"은 야생 및 사육 종, 예를 들면, 반려 동물 및 가축을 포함하여 호모 사피엔스를 제외한 모든 척추동물을 포함한다. 비-인간 척추동물은 알파카, 들소(banteng), 들소(bison), 낙타, 고양이, 소, 사슴, 개, 당나귀, 가양, 염소, 기니 피그, 말, 라마, 노새, 돼지, 토끼, 순록, 양, 물소 및 야크와 같은 포유동물을 포함한다. 가축은 식량, 노동 및 유래 제품, 예를 들면, 섬유 및 화학물질과 같은 재료를 생산하기 위해 농업 환경에서 자라는 사육 동물을 포함한다. 일반적으로, 가축은 잡재적인 농업상의 중요성을 갖는 모든 포유동물, 조류 및 어류를 포함한다. 특히, 네 발 달린 도축 동물은 거세한 수소, 암송아지, 젖소, 송아지, 황소, 소, 돼지 및 양을 포함한다.

생물가공

- [0540] 일부 실시양태에서 본 발명은 세포를 유전자 발현을 조절하거나, 생산되는 글리칸의 수준 및/또는 유형을 변화시킬 수 있는 하나 이상의 글리칸-상호작용 항체(예를 들면 항체 또는 융합 단백질)와 접촉시킴(여기서, 이러한 조절 또는 변화는 생물학적 산물의 생산을 증진시킨다)으로써 숙주 세포에서 생물학적 산물을 생산하는 방법이다. 본 발명에 따르면, 생물가공 방법은 본 발명의 글리칸-상호작용 항체 중의 하나 이상을 사용하여 개선될 수 있다. 이들은 또한 하나 이상의 글리칸-상호작용 항체를 보충, 대체 또는 부가함으로써 개선될 수 있다.
- [0541] 진단제
- [0542] 일부 실시양태에서, 본 발명의 화합물 및 조성물은 진단제로서 사용될 수 있다. 일부 경우에, 본 발명의 항체는 표적 항원을 발현하는 세포, 조직, 기관 등을 확인하거나 표지하거나 염색하는데 사용될 수 있다. 추가의 양태에서, 본 발명의 항체는 암성 세포를 갖는 것으로 알려지거나 의심되는 조직을 포함한 조직 부분(즉, 조직학적 조직 부분)에 존재하는 STn을 확인하는데 사용될 수 있다. 본 발명의 항체를 사용하는 이러한 방법은 일부 경우에 조직 부분에서 암성 세포 또는 종양을 확인하는데 사용될 수 있다. 조직 부분은 유방, 결장, 췌장, 난소, 뇌, 간, 신장, 폐, 피부, 위, 창자, 식도, 또는 뼈를 포함하지만 이에 제한되지 않는 임의의 조직 또는 기관으로부터의 것일 수 있다.
- [0543] 일부 실시양태에서, 본 발명의 진단 방법은 면역조직화학적 기법을 사용한 하나 이상의 세포 또는 조직의 분석을 포함할 수 있다. 이러한 방법은 본원에 기재된 하나 이상의 글리칸-상호작용 항체 중의 어느 것의 사용을 포함할 수 있다. 본 발명의 면역조직화학적 방법은 조직 부분을 염색하여 하나 이상의 글리코실화된 단백질 또는 기타 마커의 존재 및/또는 수준을 결정함을 포함할 수 있다. 조직 부분은 대상체 종양(예컨대, 환자 종양 및 동물 종양, 예를 들면, 동물 모델 종양)으로부터 유도될 수 있다. 조직 부분은 포르말린-고정되거나 고정되지 않은 신선한 동결 조직으로부터 비롯될 수 있다. 일부 경우에, 조직 부분은 포르말린-고정되고 파라핀-매립된(FFPE) 조직으로부터 비롯된다. 본원에 기재된 글리칸-상호작용 항체가 일차 항체로서 사용될 수 있다. 일차 항체는 조직 부분과 직접 접촉하여 표적 애피토프에 결합하는데 사용된다. 일차 항체는 검출 가능한 표지와 직접 접합될 수 있거나 이차 항체와 같은 검출제의 사용을 통해 검출될 수 있다. 일부 실시양태에서, 일차 항체 또는 검출제는 기질과 반응하여 가시적인 산물(예컨대, 침전물)을 생성하는데 사용될 수 있는 효소를 포함한다. 이러한 효소는 호스 래디쉬 퍼옥시다제, 알칼리성 포스파타제, 베타-갈락토시다제 및 카탈라제를 포함할 수 있지만, 이에 제한되지 않는다.
- [0544] 본원에 기재된 항-STn 항체는 조직 또는 세포에서 STn-글리코실화된 단백질을 검출하기 위해 본 발명의 면역조직화학적 방법에 따라 사용될 수 있다. 일부 경우에, 이들 항체는 종양 조직에서 STn의 수준을 검출 및/또는 결정하는데 사용된다. 이러한 종양 조직은 종양 마이크로어레이에 포함된 종양 조직을 포함할 수 있다. 적합한 종양 유형은 유방, 결장, 난소, 췌장, 피부, 장, 폐 및 뇌 종양을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 면역조직화학적 염색 기법에서 사용되는 항-STn 항체의 수준은 가시적인 염색을 증가시키거나 염색의 배경 수준을 감소시키기 위해 변할 수 있다. 일부 실시양태에서, 약 0.01 μ g/ml 내지 약 50 μ g/ml의 항체 농도가 사용된다. 예를 들면, 약 0.01 μ g/ml 내지 약 1 μ g/ml, 약 0.05 μ g/ml 내지 약 5 μ g/ml, 약 0.1 μ g/ml 내지 약 3 μ g/ml, 약 1 μ g/ml 내지 약 10 μ g/ml, 약 2 μ g/ml 내지 약 20 μ g/ml, 약 3 μ g/ml 내지 약 25 μ g/ml, 약 4 μ g/ml 내지 약 30 μ g/ml, 또는 약 5 μ g/ml 내지 약 50 μ g/ml의 항체 농도가 사용될 수 있다.
- [0545] 일부 실시양태에서, 본 발명의 진단 방법은 STN-결합된 당단백질 프로파일을 생성하는 방법을 포함한다. 본원에서 사용되는 용어 "STN-결합된 당단백질 프로파일"은 샘플 또는 대상체에서 STN-결합된 당단백질의 수준 및/또는 정체를 나타내는 정보 세트를 가리킨다. STN-결합된 당단백질 프로파일을 생성하는 방법은 대상체로부터 수득된 샘플에서 수행될 수 있다. 이러한 샘플은 본원에 기재된 것들 중의 어느 것을 포함하지만 이에 제한되지 않는 생물학적 샘플일 수 있다. 생물학적 샘플은 세포 샘플일 수 있다. 일부 경우에, 세포 샘플은 적어도 하나의 종양 세포를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 종양 세포 샘플은 BRCA1 돌연변이 또는 비-BRCA1 돌연변이 종양 세포를 포함할 수 있다.
- [0546] STN-결합된 당단백질 프로파일에 포함된 당단백질은 암 세포 마커, 줄기 세포 마커, 암 줄기 세포 마커 및 줄기 세포-관련 단백질을 포함할 수 있지만, 이에 제한되지 않는다. 일부 실시양태에서, STN-결합된 당단백질 프로파일의 일부로서 확인되고/되거나 정량된 당단백질은 CD44, CD133, CD117, 인테그린, 노치 및 헤지호그를 포함할 수 있지만, 이에 제한되지 않는다.
- [0547] STN-결합된 당단백질 프로파일에서 STN-결합된 당단백질의 수준 및/또는 정체는 단백질을 확인하고/하거나 단백질 수준을 정량하기 위해 당업계에 공지된 임의의 방법들에 따라 결정될 수 있다. 일부 실시양태에서, 이러한 방법은 질량 분광법, 어레이 분석(예컨대, 항체 어레이 또는 단백질 어레이), 웨스턴 블로팅, 유동 세포계측,

면역침강 및 ELISA를 포함할 수 있지만, 이에 제한되지 않는다. STn-결합된 당단백질은 일부 경우에 분석 전에 샘플로부터 면역침강될 수 있다. 이러한 면역침강은 항-STn 항체를 사용하여 수행될 수 있다. STN-결합된 당단백질의 면역침강을 위해 사용되는 항-STn 항체는 당업계에 공지되거나 본원에 기재된 것들 중의 어느 것을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, STn-당단백질은 항-STn 항체를 사용하여 생물학적 샘플로부터 면역침강시킨 다음 질량 분광법을 사용하여 확인 및/또는 정량한다.

[0548] 일부 실시양태에서, 암 치료는 STN-결합된 당단백질 프로파일 정보에 의해 통지된다. 따라서, 본 기재내용은 암 치료를 필요로 하는 대상체로부터 샘플을 수득하는 단계, 샘플로부터 STN-결합된 당단백질 프로파일을 생성하는 단계, STN-결합된 당단백질 프로파일로부터 STn-글리코실화된 단백질에 결합하는 글리칸-상호작용 항체를 선택하는 단계 및 글리칸-상호작용 항체를 대상체에 투여하는 단계를 포함하는 암 치료방법을 제공한다. 이러한 방법에 따라 투여된 글리칸-상호작용 항체는 본원에 교시된 하나 이상의 CDR 또는 가변 도메인을 포함할 수 있다.

[0549] 일부 실시양태에서, 본 기재내용의 방법은 동반 진단으로서 사용될 수 있다. 본원에 사용되는 용어 "동반 진단"은 결과가 대상체의 진단 또는 치료를 돋는 검정을 가리킨다. 동반 진단제는 비용을 감소시키고, 임상 시험의 지속시간을 단축시키고, 안전성을 증가시키고/시키거나 효과를 증가시키기 위해 치료 섭생 및 용량을 조절할 수 있도록 환자 질환, 장애 또는 병태 중증도 수준을 계층화하는데 유용할 수 있다. 동반 진단제는 질환, 장애 또는 병태의 발달을 예측하고 예방적 치료법의 처방을 돋는데 사용될 수 있다. 몇몇 동반 진단제는 하나 이상의 임상 시험을 위해 대상체를 선택하는데 사용될 수 있다. 일부 경우에, 동반 진단 검정은 치료 최적화를 촉진시키기 위해 특정 치료와 병행될 수 있다.

[0550] 일부 실시양태에서, 본 기재내용의 방법은 암과 관련된 질환, 장애 및/또는 병태를 위한 동반 치료제로서 유용할 수 있다. 본 발명의 몇몇 동반 진단제는 하나 이상의 형태의 암의 중증도를 예측 및/또는 결정하는데 유용할 수 있다. 본 발명의 몇몇 동반 진단제는 하나 이상의 형태의 암을 발병할 위험에 의해 대상체를 계층화하는데 사용될 수 있다. 본 발명의 몇몇 동반 진단제는 암 치료법을 위한 약물 개발을 촉진 및 용이하게 하는데 사용될 수 있다.

[0551] STn 발현-변형된 세포

[0552] 일부 실시양태에서, 본 기재내용은 변화된 STn 수준을 갖는 변형된 세포를 제공한다. 이러한 세포는 다양한 목적(예컨대, 실험, 치료, 항체 시험 등)으로 사용될 수 있다. 일부 경우에, 본 기재내용의 방법은 하나 이상의 세포 또는 조직에서 ST6GalNAc I의 발현을 증진시키는 방법을 포함한다. 이것은 세포의 STn(예컨대, 표면-발현된 STn)의 증가된 발현을 갖는 하나 이상의 세포의 생성을 초래할 수 있다. ST6GalNAc I의 발현은, 예를 들면, ST6GalNAc I 발현 작제물을 운반하는 하나 이상의 벡터를 도입함으로써 증진될 수 있다. 이러한 발현 작제물은 천연 ST6GalNAc I 프로모터 또는 유전자 발현을 증진시키는 프로모터로 설계될 수 있다. 유전자 발현의 증진을 위해 구성된 프로모터는 구성적 또는 과도한 활성 프로모터 성분을 가질 수 있다. 일부 경우에, 프로모터는 유도성 유전자 발현을 위해 구성될 수 있다. 이러한 프로모터는 프로모터의 유도성 성분을 활성화시키는 인자와 접촉되는 경우 활성화되거나 증가된 활성을 가질 수 있다. STn 발현 작제물은 문헌[Julien, S. et al., 2001. Glycoconj J, 18: 883-93, 이들의 내용은 전문이 본원에 참고로 포함됨]에 기재된 바와 같은 hST6GalNAc I pRc-CMV를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 발현 작제물은 STn 합성 및/또는 발현에 관여하는 다른 인자들을 암호화할 수 있다. 이러한 인자는 T-신타제 및 코어 1 베타3-갈락토실트랜스퍼라제-특이적 분자 샤프론(COSMC)을 포함할 수 있지만, 이에 제한되지 않는다. 일부 실시양태에서, 최소 STn 발현을 갖는 세포가 STn-발현 세포로 전환된다. 이러한 세포는 SKOV3 세포, BRCA1 돌연변이 세포 및 비-돌연변이 BRCA1 세포를 포함할 수 있지만, 이에 제한되지 않는다.

[0553] 또한, 비변형 세포에 비해 감소된 STn 발현을 갖는 변형된 세포가 제공된다. 따라서, 본 기재내용의 방법은 STn 발현을 억제하는 방법을 포함한다. 이러한 방법은 ST6GalNAc I 발현을 감소시킴을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 이러한 방법은 ST6GalNAc I 발현을 억제하는 하나 이상의 핵산 분자의 투여를 포함할 수 있다. 이러한 핵산 분자는 억제성 RNA(예컨대, RNAi 또는 침묵 siRNA)를 포함할 수 있지만, 이에 제한되지 않는다. 일부 실시양태에서, STn 합성 및/또는 발현에 관여하는 다른 인자들은 감소될 수 있다. 이러한 인자들은 T-신타제 및 COSMC를 포함할 수 있지만, 이에 제한되지 않는다. 일부 실시양태에서, STn를 자연적으로 발현하는 세포가 STn-결핍 세포로 전환된다. 이러한 세포는 OVCAR3 세포 및 OVCAR4 세포를 포함할 수 있지만, 이에 제한되지 않는다.

[0554] III. 약제학적 조성물

[0555] 일부 실시양태에서, 본 기재내용은 약제학적 조성물을 포함한다. 이러한 약제학적 조성물은 본 발명의 항체 및/

또는 이러한 항체로부터 유도된 단편, 펩타이드, 또는 단백질을 포함할 수 있다. 약제학적 조성물은 생체이용효율, 치료 창 및/또는 분포 용적 중의 하나 이상에 의해 특징지워질 수 있다.

[0556] 생체이용효율

글리칸-상호작용 항체는, 본원에 기재된 바와 같은 전달/제제화 제제 또는 비히클과 함께 조성물로 제제화되는 경우, 본원에 기재된 바와 같은 전달제가 결핍된 조성물에 비해 생체이용효율의 증가를 나타낼 수 있다. 본원에서 사용되는 용어 "생체이용효율"은 포유동물에게 투여된 소정량의 글리칸-상호작용 항체의 전신 이용율을 가리킨다. 생체이용효율은 포유동물에게 화합물을 투여한 후 변하지 않은 형태의 화합물의 곡선하 면적(AUC) 또는 최대 혈청 또는 혈장 농도(C_{max})를 측정함으로써 평가될 수 있다. AUC는 가로좌표(X축)를 따라 시간에 대해 세포좌표(Y축)를 따라 화합물의 혈청 또는 혈장 농도를 플롯팅한 곡선하 면적의 결정이다. 일반적으로, 특정 화합물에 대한 AUC는 당업계의 통상의 숙련가들에게 공지된 방법을 사용하여 그리고 문헌[G. S. Bunker, Modern Pharmaceutics, Drugs and the Pharmaceutical Sciences, v. 72, Marcel Dekker, New York, Inc., 1996, 본원에 참고로 포함됨]에 기재된 바와 같이 계산할 수 있다.

C_{max} 값은 포유동물에 화합물을 투여한 후 포유동물의 혈청 또는 혈장에서 달성된 화합물의 최대 농도이다. 특정 화합물의 C_{max} 값은 당업계의 통상의 숙련가들에게 공지된 방법을 사용하여 측정될 수 있다. 본원에서 사용되는 어구 "생체이용효율 증가" 또는 "약동학 개선"은 포유동물에서 AUC, C_{max} , 또는 C_{min} 로 측정하여 글리칸-상호작용 항체의 전신 이용율이, 본원에 기재된 바와 같은 전달제와 공동-투여되는 경우, 공동-투여가 일어나지 않는 경우보다 더 크다는 것을 의미한다. 일부 실시양태에서, 글리칸-상호작용 항체의 생체이용효율은 적어도 약 2%, 적어도 약 5%, 적어도 약 10%, 적어도 약 15%, 적어도 약 20%, 적어도 약 25%, 적어도 약 30%, 적어도 약 35%, 적어도 약 40%, 적어도 약 45%, 적어도 약 50%, 적어도 약 55%, 적어도 약 60%, 적어도 약 65%, 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 또는 약 100%까지 증가할 수 있다.

[0559] 치료 범위

글리칸-상호작용 항체는, 본원에 기재된 바와 같은 전달제와 함께 조성물로 제제화되는 경우, 본원에 기재된 바와 같은 전달제가 결핍된 투여된 글리칸-상호작용 항체 조성물의 치료 범위에 비해 투여된 글리칸-상호작용 항체 조성물의 치료 창에 있어서 증가를 나타낼 수 있다. 본원에서 사용되는 "치료 범위"는 치료 효과를 유발할 가능성이 높은, 작용 부위에서의 치료학적 활성 물질의 혈장 농도 범위 또는 수준 범위를 가리킨다. 일부 실시양태에서, 글리칸-상호작용 항체의 치료 창은 본원에 기재된 바와 같은 전달제와 공동-투여되는 경우 적어도 약 2%, 적어도 약 5%, 적어도 약 10%, 적어도 약 15%, 적어도 약 20%, 적어도 약 25%, 적어도 약 30%, 적어도 약 35%, 적어도 약 40%, 적어도 약 45%, 적어도 약 50%, 적어도 약 55%, 적어도 약 60%, 적어도 약 65%, 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 또는 약 100%까지 증가할 수 있다.

일부 실시양태에서, 글리칸-상호작용 항체는 투여 후 적어도 1일, 적어도 2일, 적어도 5일, 적어도 10일, 적어도 14일, 적어도 1개월, 적어도 2개월, 적어도 6개월, 또는 적어도 1년 동안 대상체 샘플에서 검출 가능하다. 항체가 세포독성제(예컨대, MMAE)와 접합된 경우, 약물 대 항체 비(DAR)는 여전히 안정할 수 있다. 일부 경우에, DAR은 주어진 기간(예컨대, 항체 수준이 대상체 샘플에서 검출될 수 있는 기간)에 걸쳐 1% 미만, 5% 미만, 10% 미만, 20% 미만, 30% 미만, 40% 미만, 50% 미만, 60% 미만, 또는 75% 미만까지 변할 수 있다.

[0562] 분포 용적

글리칸-상호작용 항체는, 본원에 기재된 바와 같은 전달제와 함께 조성물로 제제화되는 경우, 본원에 기재된 바와 같은 전달제가 결핍된 조성물에 비해 개선된, 예컨대, 감소되거나 표적화된 분포 용적(V_{dist})을 나타낼 수 있다. 분포 용적(V_{dist})은 체내 약물의 양을 혈액 또는 혈장 중의 약물의 농도에 관련시킨다. 본원에서 사용되는 용어 "분포 용적"은 혈액 또는 혈장에서와 동일한 농도로 체내 약물의 총량을 신체에 함유하는데 필요한 체액 용적을 가리키며: V_{dist} 는 체내 약물의 양/혈액 또는 혈장 중의 약물의 농도와 같다. 예를 들면, 10mg 용량 및 10mg/L의 혈장 농도에 대해, 분포 용적은 1리터일 것이다. 분포 용적은 약물이 혈관외 조직에 존재하는 정도를 반영한다. 큰 분포 용적은 혈장 단백질 결합에 비해 조직 성분에 결합하는 화합물의 경향을 반영한다. 임상 환경에서, V_{dist} 는 정상 상태(steady state) 농도를 달성하기 위한 부하 용량을 결정하는데 사용될 수 있다. 일부

실시양태에서, 글리칸-상호작용 항체의 분포 용적은, 본원에 기재된 바와 같은 전달제와 공동-투여되는 경우, 적어도 약 2%, 적어도 약 5%, 적어도 약 10%, 적어도 약 15%, 적어도 약 20%, 적어도 약 25%, 적어도 약 30%, 적어도 약 35%, 적어도 약 40%, 적어도 약 45%, 적어도 약 50%, 적어도 약 55%, 적어도 약 60%, 적어도 약 65%, 적어도 약 70% 감소할 수 있다.

[0564] 일부 실시양태에서, 글리칸-상호작용 항체는 하나 이상의 약제학적으로 허용되는 부형제와 조성물 및/또는 복합체에 포함된다. 약제학적 조성물은 임의로 하나 이상의 추가의 활성 물질, 예컨대 치료적 및/또는 예방적 활성 물질을 포함할 수 있다. 약제학적 제제의 제제화 및/또는 제조에 있어서의 일반적인 고려사항은, 예를 들면, 문헌[*Remington: The Science and Practice of Pharmacy* 21st ed., Lippincott Williams & Wilkins, 2005(본원에 참고로 포함됨)]에서 찾아볼 수 있다.

[0565] 일부 실시양태에서, 조성물은 인간, 인간 환자 또는 대상체에 투여된다. 본 기재내용의 목적을 위해, 어구 "활성 성분"은 일반적으로 본원에 기재된 바와 같이 전달되는 글리칸-상호작용 항체를 가리킨다.

[0566] 본원에 제공된 약제학적 조성물의 설명이 주로 인간에게 투여하기에 적합한 약제학적 조성물에 대한 것이지만, 이러한 조성물은 일반적으로 기타의 다른 동물, 예컨대, 비-인간 동물, 예컨대 비-인간 포유동물에게 투여하기에 적합한 것으로 숙련가들은 이해할 것이다. 조성물이 다양한 동물에서 투여하기에 적합하도록 하기 위해 인간에게 투여하기에 적합한 약제학적 조성물의 변형은 잘 이해되며, 통상의 숙련된 수의과 약리학자는 단지 보통의, 있다면, 실험으로 이러한 변형을 설계 및/또는 수행할 수 있다. 약제학적 조성물의 투여가 고려되는 대상체는 인간 및/또는 다른 영장류; 소, 돼지, 말, 양, 고양이, 개, 마우스 및/또는 랫트와 같은 상업적으로 관련된 포유류를 포함한 포유류; 및/또는 가금류, 닭, 오리, 거위 및/또는 칠면조와 같은 상업적으로 관련된 조류를 포함한 조류를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0567] 본원에 기재된 약제학적 조성물의 제제는 약리학 분야에서 공지되거나 이후에 개발되는 임의의 방법으로 제조될 수 있다. 일반적으로, 이러한 제조방법은 활성 성분을 부형제 및/또는 하나 이상의 다른 보조 성분과 함께 조합한 다음, 필요에 따라 및/또는 경우에 따라, 생성물을 목적하는 단일- 또는 다중-용량 단위로 분할, 성형 및/또는 포장하는 단계를 포함한다.

[0568] 본 발명에 따르는 약제학적 조성물은 대량으로, 단일 단위 용량으로서 및/또는 다수의 단일 단위 용량으로서 제조, 포장 및/또는 판매될 수 있다. 본원에서 사용되는 바와 같이, "단위 용량"은 예비결정된 양의 활성 성분을 포함하는 약제학적 조성물의 이산량이다. 활성 성분의 양은 일반적으로 대상체에 투여되는 활성 성분의 투여량 및/또는 이러한 투여량의 통상의 부분, 예를 들면, 이러한 투여량의 1/2 또는 1/3과 같다.

[0569] 본 발명에 따르는 약제학적 조성물 중의 활성 성분, 약제학적으로 허용되는 부형제 및/또는 임의의 추가 성분의 상대적인 양은 치료되는 대상체의 신원, 체격 및/또는 상태에 따라 및 추가로 조성물이 투여되는 경로에 따라 변할 것이다. 예를 들자면, 조성물은 0.1% 내지 100%, 예컨대, .5 내지 50%, 1-30%, 5-80%, 또는 적어도 80% (w/w) 활성 성분을 포함할 것이다. 한 실시양태에서, 활성 성분은 암 세포에 대해 지시된 항체이다.

제제

[0571] 본 발명의 글리칸-상호작용 항체는 (1) 안정성을 증가시키고; (2) 세포 투과성을 증가시키고; (3) 서방출 또는 지연 방출(예컨대, 글리칸-상호작용 항체의 제제로부터)을 가능하게 하고/하거나; (4) 생체분포(예컨대, 글리칸-상호작용 항체를 특이적 조직 또는 세포 유형에 표적화)를 변화시키기 위해 하나 이상의 부형제를 사용하여 제제화될 수 있다. 임의의 및 모든 용매, 분산 매질, 희석제, 또는 다른 액체 비히클, 분산 또는 혼탁 보조제, 표면 활성제, 등장화제, 중점 또는 유화 제제, 방부제와 같은 통상의 부형제 이외에, 본 발명의 제제는, 제한함이 없이, 리포솜, 지질 나노입자, 중합체, 리포플렉스, 코어-쉘 나노입자, 웹타이드, 단백질, 글리칸-상호작용 항체(예컨대, 대상체에의 이식을 위해)로 형질감염된 세포 및 이의 조합을 포함할 수 있다.

부형제

[0573] 본원에서 사용되는 용어 "부형제"는 사용 전에 본 발명의 화합물 및/또는 조성물과 조합되는 임의의 물질을 가리킨다. 일부 실시양태에서, 부형제는 불활성이며 본 발명의 화합물 및/또는 조성물을 위한 담체, 희석제 또는 부형제로서 주로 사용된다. 약제학적 조성물을 제제화하기 위한 다양한 부형제 및 조성물을 제조하기 위한 기법들은 당업계에 공지되어 있다(참조; *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, 21st Edition, A. R. Gennaro, Lippincott, Williams & Wilkins, Baltimore, MD, 2006; 본원에 참고로 포함됨).

- [0574] 통상의 부형제 매질의 사용은 임의의 통상의 부형제 매질이, 예를 들면, 바람직하지 않은 생물학적 효과를 야기하거나 달리 약제학적 조성물의 다른 성분(들)과 유해한 방식으로 상호작용함으로써 물질 또는 이의 유도체와 비상용성일 수 있는 한을 제외하고는 본 기재내용의 범위내로 고려된다.
- [0575] 본원에 기재된 약제학적 조성물의 제제는 약리학의 분야에서 공지되거나 이후에 개발되는 임의의 방법에 의해 제조될 수 있다. 일반적으로, 이러한 제조방법은 활성 성분을 부형제 및/또는 하나 이상의 다른 보조 성분과 조합하는 단계를 포함한다.
- [0576] 본 기재내용에 따르는 약제학적 조성물은 대량으로, 단일 단위 용량으로서 및/또는 다수의 단일 단위 용량으로서 제조, 포장 및/또는 판매될 수 있다.
- [0577] 본 발명에 따르는 약제학적 조성물 중의 활성 성분, 약제학적으로 허용되는 부형제 및/또는 임의의 추가 성분의 상대적인 양은 치료되는 대상체의 신원, 체격 및/또는 상태에 따라 및 추가로 조성물이 투여되는 경로에 따라 달라질 수 있다.
- [0578] 일부 실시양태에서, 약제학적으로 허용되는 부형제는 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100% 순수하다. 일부 실시양태에서, 부형제는 인간에서 사용하기 위해 및 수의과 사용을 위해 승인된다. 일부 실시양태에서, 부형제는 미국 식품 의약국에 의해 승인된다. 일부 실시양태에서, 부형제는 약제학적 등급이다. 일부 실시양태에서, 부형제는 미국 약전(USP), 유럽 약전(EP), 영국 약전 및/또는 국제 약전의 표준을 충족시킨다.
- [0579] 약제학적 조성물의 제조에 사용되는 약제학적으로 허용되는 부형제는 불활성 희석제, 분산 및/또는 과립화제제, 표면 활성제 및/또는 유화제, 봉해제, 결합제, 방부제, 완충제, 윤활제 및/또는 오일을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 이러한 부형제는 임의로 약제학적 조성물에 포함될 수 있다.
- [0580] 예시적인 희석제는 탄산칼슘, 탄산나트륨, 인산칼슘, 인산이칼슘, 황산칼슘, 인산수소칼슘, 인산나트륨 락토스, 수크로스, 셀룰로스, 미세결정성 셀룰로스, 카올린, 만니톨, 소르비톨, 이노시톨, 염화나트륨, 건조 전분, 옥수수전분, 분말 당 등 및/또는 이들의 조합을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.
- [0581] 예시적인 과립화 및/또는 분산 제제는 감자 전분, 옥수수 전분, 타피오카 전분, 나트륨 전분 글리콜레이트, 점토, 알긴산, 구아 검, 감귤 펄프, 한천, 벤토나이트, 셀룰로스 및 목제품, 해면 스펜지, 양이온-교환 수지, 탄산칼슘, 실리케이트, 탄산나트륨, 가교결합된 폴리(비닐-피롤리돈)(크로스포비돈), 나트륨 카복시메틸 전분(나트륨 전분 글리콜레이트), 카복시메틸 셀룰로스, 가교결합된 나트륨 카복시메틸 셀룰로스(크로스카멜로스), 메틸셀룰로스, 예비겔라틴화 전분(전분 1500), 미세결정성 전분, 수불용성 전분, 칼슘 카복시메틸 셀룰로스, 규산알루미늄마그네슘(VEEGUM[®]), 나트륨 라우릴 설페이트, 4급 암모늄 화합물 등 및/또는 이들의 조합을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.
- [0582] 예시적인 표면 활성제 및/또는 유화제는 천연 유화제(예컨대 아카시아, 한천, 알긴산, 알긴산나트륨, 트라카칸트, 콘드록스, 콜레스테롤, 크산탄, 페틴, 젤라틴, 난황, 카제인, 라놀린, 콜레스테롤, 왁스 및 레시틴), 콜로이드성 점토(예컨대 벤토나이트[규산알루미늄] 및 VEEGUM[®][규산알루미늄마그네슘]), 장쇄 아미노산 유도체, 고분자량 알콜(예컨대 스테아릴 알콜, 세틸 알콜, 올레일 알콜, 트리아세틴 모노스테아레이트, 에틸렌 글리콜 디스테아레이트, 글리세릴 모노스테아레이트 및 프로필렌 글리콜 모노스테아레이트, 폴리비닐 알콜), 카보머(예컨대 카복시 폴리메틸렌, 폴리아크릴산, 아크릴산 중합체 및 카복시비닐 중합체), 카라기난, 셀룰로스성 유도체(예컨대 카복시메틸셀룰로스 나트륨, 분말상 셀룰로스, 하이드록시메틸 셀룰로스, 하이드록시프로필 셀룰로스, 하이드록시프로필 메틸셀룰로스, 메틸셀룰로스), 소르비탄 지방산 에스테르(예컨대 폴리옥시에틸렌 소르비탄 모노올레아이트[TWEEN[®] 20], 폴리옥시에틸렌 소르비탄[TWEEN[®] 60], 폴리옥시에틸렌 소르비탄 모노올레아이트[TWEEN[®] 80], 소르비탄 모노팔미테이트[SPAN[®] 40], 소르비탄 모노스테아레이트[Span[®] 60], 소르비탄 트리스테아레이트[Span[®] 65], 글리세릴 모노올레아이트, 소르비탄 모노올레아이트[SPAN[®] 80]), 폴리옥시에틸렌 에스테르(예컨대 폴리옥시에틸렌 모노스테아레이트[MYRJ[®] 45], 폴리옥시에틸렌 수소화 피마자유, 폴리에톡실화 피마자유, 폴리옥시메틸렌 스테아레이트 및 SOLUTOL[®]), 수크로스 지방산 에스테르, 폴리에틸렌 글리콜 지방산 에스테르(예컨대 CREMOPHOR[®]), 폴리옥시에틸렌 에테르, (예컨대 폴리옥시에틸렌 라우릴 에테르[BRIJ[®] 30]), 폴리(비닐-피롤리돈), 디에틸렌 글리콜 모노라우레이트, 트리에탄올아민 올레아이트, 올레산나트륨, 올레산칼륨, 에틸 올레아이트

트, 올레산, 에틸 라우레이트, 나트륨 라우릴 설페이트, PLUORINC[®]F 68, POLOXAMER[®] 188, 세트리모늄 브로마이드, 세틸피리디늄 클로라이드, 벤즈알코늄 클로라이드, 도쿠세이트 나트륨 등 및/또는 이들의 조합을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0583] 예시적인 결합제는 전분(예컨대 옥수수전분 및 전분 페이스트); 젤라틴; 당(예컨대 수크로스, 글루코스, 텍스트로스, 텍스트린, 당밀, 락토스, 락ти톨, 만니톨,); 천연 및 합성 검(예컨대 아카시아, 나트륨 알기네이트, 아일랜드 이끼(Irish moss)의 추출물, 판워 검(panwar gum), 가티 검(ghatti gum), 이사폴 허스크의 점액질(mucilage of isapol husk), 카복시메틸셀룰로스, 메틸셀룰로스, 에틸셀룰로스, 하이드록시에틸셀룰로스, 하이드록시프로필 셀룰로스, 하이드록시프로필 메틸셀룰로스, 미세결정성 셀룰로스, 셀룰로스 아세테이트, 폴리(비닐-피롤리돈), 규산알루미늄마그네슘(Veegum[®]) 및 낙엽송 아라보갈락탄); 알기네이트; 폴리에틸렌 옥사이드; 폴리에틸렌 글리콜; 무기 칼슘 염; 규산; 폴리메타크릴레이트; 왁스; 물; 알콜; 등 ; 및 이의 조합을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0584] 예시적인 방부제는 산화방지제, 퀼레이트화제, 항균성 방부제, 항진균성 방부제, 알콜 방부제, 산성 방부제 및/또는 기타의 방부제를 포함할 수 있지만, 이에 제한되지 않는다. 예시적인 산화방지제는 알파 토코페롤, 아스코르브산, 아코르빌 팔미테이트, 부틸화 하이드록시아니솔, 부틸화 하이드록시톨루엔, 모노티오글리세롤, 메타중아황산칼륨, 프로피온산, 프로필 갈레이트, 아스코르브산나트륨, 중아황산나트륨, 메타중아황산나트륨 및/또는 아황산나트륨을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 예시적인 퀼레이트화제는 에틸렌디아민테트라아세트산(EDTA), 시트르산 일수화물, 에데트산이나트륨, 에데트산이칼륨, 에데트산, 푸마르산, 말산, 인산, 에데트산나트륨, 타르타르산 및/또는 에데트산삼나트륨을 포함한다. 예시적인 항균성 방부제는 벤즈알코늄 클로라이드, 벤즈에토늄 클로라이드, 벤질 알콜, 브로노풀, 세트리미드, 세틸피리디늄 클로라이드, 클로르헥시딘, 클로로부탄올, 클로로크로스솔, 클로르옥실레놀, 크레솔, 에틸 알콜, 글리세린, 헥세티딘, 이미두레아, 페놀, 페녹시에탄올, 페닐에틸 알콜, 질산페닐수은, 프로필렌 글리콜 및/또는 티메로살을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 예시적인 항진균 방부제는 부틸 파라벤, 메틸 파라벤, 에틸 파라벤, 프로필 파라벤, 벤조산, 하이드록시벤조산, 벤조산칼륨, 소르브산칼륨, 벤조산나트륨, 프로피온산나트륨 및/또는 소르브산을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 예시적인 알콜 방부제는 에탄올, 폴리에틸렌 글리콜, 페놀, 페놀성 화합물, 비스페놀, 클로로부탄올, 하이드록시벤조에이트 및/또는 페닐에틸 알콜을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 예시적인 산성 방부제는 비타민 A, 비타민 C, 비타민 E, 베타-캐로틴, 시트르산, 아세트산, 데하이드로아세트산, 아스코르브산, 소르브산 및/또는 피틴산을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 기타 방부제는 토코페롤, 토코페롤 아세테이트, 데테록심메실레이트, 세트리미드, 부틸화 하이드록시아니솔(BHA), 부틸화 하이드록시톨루엔(BHT), 에틸렌디아민, 나트륨라우릴 설페이트(SLS), 나트륨 라우릴 에테르 설페이트(SLES), 중아황산나트륨, 메타중아황산나트륨, 아황산칼륨, 메타중아황산칼륨, GLYDANT PLUS[®], PHENONIP[®], 메틸파라벤, GERMALL[®] 115, GERMABEN[®] II, NEOLONETM, KATHONTM 및/또는 EUXYL[®]을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0585] 예시적인 완충제는 시트레이트 완충 용액, 아세테이트 완충 용액, 포스페이트 완충 용액, 염화암모늄, 탄산칼슘, 염화칼슘, 시트르산칼슘, 칼슘 글루비오네이트, 칼슘 글루셉테이트, 글루콘산칼슘, d-글루콘산, 칼슘글리세로포스페이트, 락트산칼슘, 프로판산, 레볼린산칼슘, 펜탄산, 이염기성 인산칼슘, 인산, 삼염기성 인산칼슘, 인산수산화칼슘, 아세트산칼륨, 염화칼륨, 글루콘산칼륨, 칼륨 혼합물, 이염기성 인산칼륨, 일염기성 인산칼륨, 인산칼륨 혼합물, 아세트산나트륨, 중탄산나트륨, 염화나트륨, 시트르산나트륨, 락트산나트륨, 이염기성 인산나트륨, 일염기성 인산나트륨, 인산나트륨 혼합물, 트로메타민, 수산화마그네슘, 수산화알루미늄, 알긴산, 피로겐-비함유 수, 등장성 염수, 링거액, 에틸 알콜 등 및/또는 이들의 조합을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0586] 예시적인 윤활제는 스테아르산마그네슘, 스테아르산칼슘, 스테아르산, 실리카, 활석, 맥아, 글리세릴 베헤네이트, 수소화 식물유, 폴리에틸렌 글리콜, 벤조산나트륨, 아세트산나트륨, 염화나트륨, 류신, 마그네슘 라우릴 설페이트, 나트륨 라우릴 설페이트 등 및 이들의 조합을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0587] 예시적인 오일은 아몬드, 행인, 아보카도, 바바수, 베르가못, 블랙 커런트 시드(black current seed), 보리지(borage), 케이드(cade), 캐모마일, 캐놀라, 캐러웨이, 카나우바, 피마자, 계피, 코코아 버터, 코코넛, 대구간, 커피, 옥수수, 면설, 에뮤, 유칼립투스, 달맞이꽃, 어류, 아마씨, 계라니올, 박(gourd), 포도씨, 헤이즐넛, 히솝, 이소프로필 미리스테이트, 호호바, 쿠쿠이 너트(kukui nut), 라반딘, 라벤더, 레몬, 리트시 쿠베바(litsea cubeba), 마카다미아 너트, 아욱, 망고씨, 메도우폼 시드(meadowfoam seed), 링크, 육두구, 올리브,

오렌지, 오렌지 러피, 야자, 야자핵, 도핵, 땅콩, 양귀비씨, 호박씨, 평지씨, 쌀겨, 로즈메리, 잇꽃, 백단, 사스콰나(sasquana), 세이버리(savoury), 산자나무, 참깨, 시어 버터, 실리콘, 대두, 해바라기, 티 트리, 영경퀴, 동백, 베티베르, 호두 및 밀 배아 오일을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 예시적인 오일은 부틸 스테아레이트, 카프릴산 트리글리세라이드, 카프로산 트리글리세라이드, 사이클로메티콘, 디에틸 세바케이트, 디메티콘 360, 이소프로필 미리스테이트, 광우, 옥틸도데칸올, 올레일 알콜, 실리콘유 및/또는 이들의 조합을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0588] 코코아 버터 및 쪽약 왁스, 착색제, 피복제, 감미제, 방향제 및/또는 향미제와 같은 부형제가 제제업자의 판단에 따라 조성물에 존재할 수 있다.

[0589] 일부 실시양태에서, 본 발명의 항-글리칸 항체는 시트레이트 및/또는 NaCl을 포함하는 부형제로 제제화된다. 이러한 조성물은 약 1mM 내지 약 10mM, 약 2mM 내지 약 20mM, 약 5mM 내지 약 50mM, 약 10mM 내지 약 100mM, 약 50mM 내지 약 200mM, 또는 약 100mM 내지 약 1,000mM 시트레이트를 포함할 수 있다. 추가로 조성물은 약 1mM 내지 약 10mM, 약 5mM 내지 약 20mM, 약 15mM 내지 약 50mM, 약 30mM 내지 약 60mM, 약 50mM 내지 약 200mM, 약 100mM 내지 약 300mM, 또는 약 250mM 내지 약 1000mM NaCl을 포함할 수 있다.

[0590] 비하icles

[0591] 리포솜, 리포플렉스 및 지질 나노입자

[0592] 본 발명의 글리칸-상호작용 항체는 하나 이상의 리포솜, 리포플렉스, 또는 지질 나노입자를 사용하여 제제화될 수 있다. 한 실시양태에서, 글리칸-상호작용 항체를 포함하는 약제학적 조성물은 리포솜을 추가로 포함한다. 리포솜은 하나 이상의 지질 이중층을 포함할 수 있고 영양소 및 약제학적 제제의 투여를 위한 전달 비하icles로서 사용될 수 있는 인공적으로 제조된 소포이다. 리포솜은 직경이 수백 나노미터일 수 있고 좁은 수성 구획에 의해 분리된 일련의 동심성 이중층을 함유할 수 있는 다중층 소포(MLV), 직경이 50nm보다 작을 수 있는 소형 단세포 소포(SUV) 및 직경이 50 내지 500nm일 수 있는 대형 단일층 소포(LUV)와 같지만 이에 제한되지 않는 상이한 크기일 수 있다. 리포솜 설계는 건강하지 못한 조직에의 리포솜의 부착을 개선시키거나 세포내섭취(endocytosis)와 같지만 이에 제한되지 않는 이벤트를 활성화시키기 위해 읍소닌 또는 리간드를 포함할 수 있지만, 이에 제한되지 않는다. 리포솜은 약제학적 제제의 전달을 개선시키기 위해 낮은 또는 높은 pH를 가질 수 있다.

[0593] 리포솜의 형성은 포획된 약제학적 제제 및 리포솜 성분, 지질 소포가 분산되는 매질의 성질, 포획된 물질의 유효 농도 및 이의 잠재적 독성, 소포의 적용 및/또는 전달 동안 관여되는 임의의 부가적인 공정들, 최적화 크기, 의도된 용도를 위한 소포의 다분산성 및 저장-수명 및 안전하고 효율적인 리포솜 산물의 대규모 생산의 가능성 및 배치간 재현성과 같지만 이에 제한되지 않는 물리화학적 특징에 따라 좌우될 수 있다.

[0594] 한 실시양태에서 이러한 제제는 또한 이들이 수동적으로 또는 능동적으로 생체내 다른 세포 유형에 지시되도록 제작되거나 조성이 변할 수 있다.

[0595] 제제는 또한 엽산염, 트랜스페린, N-아세틸갈락토사민(GalNAc) 및 항체 표적화 접근법으로 예시되지만 이에 제한되지 않는 이들의 표면 상의 상이한 리간드의 발현을 통해 선택적으로 표적화될 수 있다.

[0596] 리포솜, 리포플렉스, 또는 지질 나노입자는 이를 제제가 글리칸-상호작용 항체로의 세포 형질감염을 증가시킬 수 있기 때문에 글리칸-상호작용 항체 작용의 효능을 개선시키는데 사용될 수 있다. 리포솜, 리포플렉스, 또는 지질 나노입자는 또한 글리칸-상호작용 항체의 안정성을 증가시키는데 사용될 수 있다.

[0597] 항체 카고를 위해 특수하게 제제화된 리포솜은 에프스태인(Eppstein) 등(Eppstein, D.A. et al., *Biological activity of liposome-encapsulated murine interferon gamma is mediated by a cell membrane receptor*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1985 Jun;82(11):3688-92); 황 등(Hwang, K.J. et al., *Hepatic uptake and degradation of unilamellar sphingomyelin/cholesterol liposomes: a kinetic study*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1980 Jul;77(7):4030-4); US 제4,485,045호 및 US 제4,544,545호에 의해 기재된 바와 같이 당업계에 공지된 기술에 따라 제조된다. 지속 순환 시간을 갖는 리포솜의 제조가 또한 US 제5,013,556호에 기재되어 있다.

[0598] 본 발명의 글리칸-상호작용 항체를 포함하는 리포솜은 지질, 예를 들면, 포스파티딜콜린, 콜레스테롤 뿐만 아니라 폴리에틸렌 글리콜-유도체화된 포스파티딜에탄올아민을 이용하는 역상 증발을 사용하여 생성될 수 있다. 정의된 기공 크기를 갖는 충전제가 목적하는 직경의 리포솜을 압출하는데 사용된다. 또 다른 양태에서, 본 발명의 글리칸-상호작용 항체는 마틴 등에 기재된 바와 같이 디설파이드 교환 반응에 의해 리포솜의 외부 표면에 접합될 수 있다(Martin, F.J. et al., *Irreversible coupling of immunoglobulin fragments to preformed*

vesicles. An improved method for liposome targeting. J Biol Chem. 1982 Jan 10;257(1):286-8.

[0599] 중합체 및 나노입자

본 발명의 글리칸-상호작용 항체는 천연 및/또는 합성 중합체를 사용하여 제제화될 수 있다. 전달을 위해 사용될 수 있는 중합체의 비제한적인 예는 DMRI/DOPE, 폴록사미, 키토산, 사이클로덱스트린 및 폴리(락트산-코-글리콜산)(PLGA) 중합체를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 이들은 생분해성일 수 있다.

중합체 제제는 글리칸-상호작용 항체의 서방출 또는 지연 방출(예컨대, 근육내 또는 피하 주사 후)을 가능하게 할 수 있다. 글리칸-상호작용 항체에 대한 변화된 프로파일은, 예를 들면, 연장된 시간에 걸쳐 글리칸-상호작용 항체의 방출을 초래할 수 있다. 중합체 제제는 또한 글리칸-상호작용 항체의 안정성을 증가시키는데 사용될 수 있다.

중합체 제제는 또한 엽산염, 트랜스페린 및 N-아세틸갈اكت오사민(GalNAc)에 의해 예시되지만 이에 제한되지 않는 상이한 리간드의 발현을 통해 선택적으로 표적화될 수 있다(Benoit et al., Biomacromolecules. 2011 12:2708-2714; Rozema et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 2007 104:12982-12887; Davis, Mol Pharm. 2009 6:659-668; Davis, Nature 2010 464:1067-1070; 전문이 본원에 참고로 포함됨).

본 발명의 글리칸-상호작용 항체는 또한 중합체, 지질 및/또는 인산칼슘과 같지만 이에 제한되지 않는 다른 생분해성 제제의 조합물을 사용하여 나노입자로서 제제화될 수 있다. 성분들을 코어-쉘, 혼성물 및/또는 층상 구조(layer-by-layer architecture)로 조합하여, 글리칸-상호작용 항체의 전달이 증진될 수 있도록 나노입자의 미세-조정을 가능하게 할 수 있다. 글리칸-상호작용 항체의 경우, 폴리(2-(메타크릴로일옥시)에틸 포스포릴콜린)-블럭-(2-(디이소프로필아미노)에틸 메타크릴레이트), (PMPC-PDPA), 생리학적 pH에서 자가-조립하여 나노미터 크기의 소포를 형성하는, 폴리머솜(polymersome)이라고도 알려져 있는 pH 민감성 이블력 공중합체를 기본으로 하는 시스템이 사용될 수 있다. 이러한 폴리머솜은 살아있는 세포 내에서 비교적 높은 항체 페이로드를 성공적으로 전달하는 것으로 나타났다(Massignani, et al., Cellular delivery of antibodies: effective targeted subcellular imaging and new therapeutic tool. Nature Proceedings, May, 2010).

한 실시양태에서, PEG-전하-변환 중합체(Pitella et al., Biomaterials. 2011 32:3106-3114)가 본 발명의 글리칸-상호작용 항체를 전달하기 위해 나노입자를 형성하는데 사용될 수 있다. PEG-전하-변환 중합체는 산성 pH에서 다양이온으로 절단되어 엔도솜 탈출을 증진시킴으로써 PEG-다음이온 블럭 공중합체를 개선시킬 수 있다.

코어-쉘 나노입자의 사용은 추가로 양이온성 가교결합된 나노겔 코어 및 다양한 쉘을 합성하기 위해 고속-처리 방법에 중점을 두었다(Siegwart et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 2011 108:12996-13001). 중합체성 나노입자의 착물화, 전달 및 내재화는 나노입자의 코어 및 쉘 성분 둘 다에서 화학 조성을 변경함으로써 정확하게 조절될 수 있다.

한 실시양태에서, 폴리(에틸렌-코-비닐 아세테이트)의 매트릭스가 본 발명의 글리칸-상호작용 항체를 전달하는데 사용된다. 이러한 매트릭스는 문헌[Nature Biotechnology 10, 1446 - 1449 (1992)]에 기재되어 있다.

[0607] 항체 제제

본 발명의 글리칸-상호작용 항체는 정맥내 투여 또는 혈관외 투여를 위해 제제화될 수 있다(Daugherty, et al., *Formulation and delivery issues for monoclonal antibody therapeutics.* Adv Drug Deliv Rev. 2006 Aug 7;58(5-6):686-706, 미국 특허 공보 제2011/0135570호, 이들 모두는 전문이 본원에 포함됨). 혈관외 투여 경로는 피하 투여, 복강내 투여, 뇌내 투여, 안내 투여, 병변내 투여, 국소 투여 및 근육내 투여를 포함할 수 있지만, 이에 제한되지 않는다.

항체 구조는 치료제로서의 이들의 효능을 개선시키기 위해 변형될 수 있다. 개선은 개선된 열역학적 안정성, 감소된 Fc 인자 결합 특성 및 개선된 접힘 효율을 포함할 수 있지만, 이에 제한되지 않는다. 변형은 아미노산 치환, 글리코실화, 팔미토일화 및 단백질 접합을 포함할 수 있지만, 이에 제한되지 않는다.

글리칸-상호작용 항체는 항체 산화를 감소시키기 위해 산화방지제로 제제화될 수 있다. 글리칸-상호작용 항체는 또한 단백질 응집을 감소시키기 위한 참가제로 제제화될 수 있다. 이러한 참가제는 알부민, 아미노산, 당, 우레아, 구아니디늄 클로라이드, 폴리알콜, 중합체(예를 들면, 폴리에틸렌 글리콜 및 텍스트란), 계면활성제(폴리소르베이트 20 및 폴리소르베이트 80을 포함하지만, 이에 제한되지 않음) 또는 심지어 다른 항체를 포함할 수 있지만, 이에 제한되지 않는다.

- [0611] 본 발명의 글리칸-상호작용 항체는 항체 구조 및 기능에 대한 물의 영향을 감소시키도록 제제화될 수 있다. 이러한 제제에서의 항체 제제는 동결건조될 수 있다. 동결건조에 적용되는 제제는 항체 구조를 보호하고 안정화하기 위해 탄수화물 또는 폴리올 화합물을 포함할 수 있다. 이러한 화합물은 수크로스, 트레할로스 및 만니톨을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.
- [0612] 본 발명의 글리칸-상호작용 항체는 중합체로 제제화될 수 있다. 한 실시양태에서, 중합체 제제는 소수성 중합체를 함유할 수 있다. 이러한 중합체는 수중유중고체 캡슐화 방법(solid-in-oil-in-water encapsulation method)을 통해 폴리락티드-코-글리콜리드로 제제화된 미소구체일 수 있다. 에틸렌-비닐 아세테이트 공중합체를 포함하는 미소구체가 또한 항체 전달을 위해 고려되며 전달 부위에서 항체 방출의 시간 경과를 연장하는데 사용될 수 있다. 또 다른 양태에서, 중합체는 수성 겔일 수 있다. 이러한 겔은, 예를 들면, 카복시메틸셀룰로스를 포함할 수 있다. 수성 겔은 또한 히알루론산 하이드로겔을 포함할 수 있다. 항체는 중추 신경계의 조직을 포함하지만 이에 제한되지 않는 조직에서 지속 전달(sustained delivery)을 가능하게 하는 하이드라존 결합을 통해 이러한 겔에 공유 결합될 수 있다.
- [0613] 웨타이드 및 단백질 제제
- [0614] 본 발명의 글리칸-상호작용 항체는 웨타이드 및/또는 단백질로 제제화될 수 있다. 한 실시양태에서, 세포 침투성 웨타이드 및 단백질 및 세포내 전달을 가능하게 하는 웨타이드와 같지만 이에 제한되지 않는 웨타이드가 약제학적 제제를 전달하는데 사용될 수 있다. 본 발명의 약제학적 제제에 사용될 수 있는 세포 침투성 웨타이드의 비제한적인 예는 세포내 공간으로의 전달을 촉진시키는 다양이온에 부착된 세포-침투성 웨타이드 서열, 예컨대, HIV-유도된 TAT 웨타이드, 폐네트라틴, 트랜스포르탄, 또는 hCT 유도된 세포-침투성 웨타이드를 포함한다(참조; 예컨대, Caron et al., Mol. Ther. 3(3):310-8 (2001); Langel, Cell-Penetrating Peptides: Processes and Applications (CRC Press, Boca Raton FL, 2002); El-Andaloussi et al., Curr. Pharm. Des. 11(28):3597-611 (2003); 및 Deshayes et al., Cell. Mol. Life Sci. 62(16):1839-49 (2005), 이들 모두는 본원에 참고로 포함됨). 조성물은 또한 세포내 공간으로의 조성물의 전달을 증진시키는 세포 침투제, 예컨대, 리포솜을 포함하도록 제제화될 수 있다. 본 발명의 글리칸-상호작용 항체는 세포내 전달을 가능하게 하기 위해 에일레론 쎄라퓨틱스(Aileron Therapeutics, 미국 매사추세츠주 캠브리지 소재) 및 페르메온 바이올로직스(미국 매사추세츠주 캠브리지 소재)로부터의 웨타이드 및/또는 단백질과 같지만 이에 제한되지 않는 웨타이드 및/또는 단백질에 착화될 수 있다(Cronican et al., ACS Chem. Biol. 2010 5:747-752; McNaughton et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2009 106:6111-6116; Sawyer, Chem Biol Drug Des. 2009 73:3-6; Verdine and Hilinski, Methods Enzymol. 2012;503:3-33; 이들 모두는 전문이 본원에 참고로 포함됨).
- [0615] 한 실시양태에서, 세포-침투성 폴리웨타이드는 제1 도메인 및 제2 도메인을 포함할 수 있다. 제1 도메인은 과하전된(supercharged) 폴리웨타이드를 포함할 수 있다. 제2 도메인은 단백질-결합 파트너를 포함할 수 있다. 본원에서 사용되는 바와 같이, "단백질-결합 파트너"는 항체 및 이의 기능성 단편, 스캐폴드 단백질, 또는 웨타이드를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 세포-침투성 폴리웨타이드는 단백질-결합 파트너를 위한 세포내 결합 파트너를 추가로 포함할 수 있다. 세포-침투성 폴리웨타이드는 글리칸-상호작용 항체가 도입될 수 있는 세포로부터 분비될 수 있다.
- [0616] 본 발명의 제제에서, 웨타이드 또는 단백질은 글리칸-상호작용 항체에 의한 세포 형질감염을 증가시키거나 글리칸-상호작용 항체의 생체분포를 변화(예컨대, 특정 조직 또는 세포 유형을 표적화함으로써)시키기 위해 삽입될 수 있다.
- [0617] 세포 제제
- [0618] 본 발명의 글리칸-상호작용 항체 조성물의 세포-기반 제제는 세포 형질감염을 보장하거나(예컨대, 세포 운반체에서) 조성물의 생체분포를 변화시키는데(예컨대, 세포 운반체를 특정 조직 또는 세포 유형에 표적화함으로써) 사용될 수 있다.
- [0619] 세포 전달 방법
- [0620] 바이러스 및 비-바이러스 매개된 기법들을 포함한 다양한 방법들이 당업계에 공지되어 있으며 핵산 또는 단백질, 예를 들면, 글리칸-상호작용 항체를 세포에 도입하는데 적합하다. 전형적인 비-바이러스 매개된 기법의 예는 전기천공, 인산칼슘 매개된 이입, 뉴클레오펙션(nucleofection), 초음파천공, 열 충격, 자기주입(magnetofection), 리포솜 매개된 이입, 미량주사, 미세투사물 매개된 이입(나노입자), 양이온성 중합체 매개된 이입(DEAE-텍스트란, 폴리에틸렌이민, 폴리에틸렌 글리콜(PEG) 등) 또는 세포 융합을 포함하지만, 이에 제한되

지 않는다.

[0621] 초음파천공, 또는 세포 초음파처리의 기법은 세포 원형질 막의 투과성을 변형시키기 위해 소리(예컨대, 초음파 주파수)를 사용하는 것이다. 초음파천공법은 당업계의 사람들에게 공지되어 있으며 생체내 혁산을 전달하는데 사용된다(Yoon and Park, Expert Opin Drug Deliv. 2010 7:321-330; Postema and Gilja, Curr Pharm Biotechnol. 2007 8:355-361; Newman and Bettinger, Gene Ther. 2007 14:465-475; 모두 전문이 본원에 참고로 포함됨). 초음파천공법은 당업계에 공지되어 있으며 또한, 예를 들면, 박테리아에 관련됨에 따라 미국 특히 공보 제20100196983호에 및 다른 세포 타입에 관련됨에 따라, 예를 들면, 미국 특히 공보 제20100009424호에 교시되어 있으며, 이들 각각은 전문이 본원에 참고로 포함된다.

[0622] 전기천공 기법 또한 당업계에 널리 공지되어 있으며 생체내에서 임상적으로 혁산을 전달하는데 사용된다(Andre et al., Curr Gene Ther. 2010 10:267-280; Chiarella et al., Curr Gene Ther. 2010 10:281-286; Hojman, Curr Gene Ther. 2010 10:128-138; 모두 전문이 본원에 참고로 포함됨). 한 실시양태에서, 글리칸-상호작용 항체는 전기천공에 의해 전달될 수 있다.

[0623] 투여 및 전달

[0624] 본 발명의 조성물은 당업계에 공지된 표준 방법 또는 경로 중의 어느 것에 의해 투여될 수 있다.

[0625] 본 발명의 글리칸-상호작용 항체는 치료학적으로 유효한 결과를 초래하는 임의의 경로에 의해 투여될 수 있다. 이들은 장관, 위장, 경막외, 경구, 경피, 경막외(경막주위), 뇌내(대뇌 안으로), 뇌실내(뇌실 안으로), 피부외(피부에 적용), 피내(피부 자체 안으로), 피하(피부 아래), 비내 투여(코를 통해), 정맥내(정맥 안으로), 동맥내(동맥 안으로), 근육내(근육 안으로), 심장내(심장 안으로), 골내 주입(골수 안으로), 경막내(척추관 안으로), 복강내(복막 안으로 주입 또는 주사), 방광내 주입, 유리체내(눈을 통해), 해면내 주사(음경의 기저 안으로), 질내 투여, 자궁내, 양막외 투여, 경피(전신 분포를 위해 무손상 피부를 통해 확산), 근육내(점막을 통해 확산), 통기(코흡입), 설하, 입술밑, 관장, 점안액(결막에), 또는 점이액을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 특정 양태에서, 조성물은 이들이 혈액-뇌 장벽, 혈관 장벽, 또는 다른 상피 장벽을 건너갈 수 있도록 하는 방식으로 투여될 수 있다. 본 발명의 글리칸-상호작용 항체에 대한 비제한적인 투여 경로가 아래에 기재되어 있다.

[0626] 비경구 및 주사성 투여

[0627] 경구 및 비경구 투여를 위한 액체 투여형은 약제학적으로 허용되는 에멀젼, 마이크로에멀젼, 용액, 혼탁액, 시럽 및/또는 엘리서를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 활성 성분 이외에, 액체 투여형은, 예를 들면, 물 또는 다른 용매와 같은 당업계에서 통상적으로 사용되는 불활성 희석제, 가용화제 및 유화제, 예를 들면, 에틸 알콜, 이소프로필 알콜, 에틸 카보네이트, 에틸 아세테이트, 벤질 알콜, 벤질 벤조에이트, 프로필렌 글리콜, 1,3-부틸렌 글리콜, 디메틸포름아미드, 오일(특히, 면실유, 낙화생유, 옥수수유, 배아유, 올리브유, 피마자유 및 호마유), 글리세롤, 테트라하이드로푸르푸릴 알콜, 폴리에틸렌 글리콜 및 소르비탄의 지방산 에스테르 및 이들의 혼합물을 포함할 수 있다. 불활성 희석제 이외에, 경구 조성물은 습윤제, 유화 및 혼탁 제제, 감미제, 방향제 및/또는 향미제와 같은 아주반트를 포함할 수 있다. 비경구 투여를 위한 특정 양태에서, 조성물은 CREMOPHOR[®], 알콜, 오일, 변성유, 글리콜, 폴리소르베이트, 사이클로덱스트린, 중합체 및/또는 이들의 조합과 같은 가용화제와 혼합된다. 또 다른 양태에서, 하이드록시프로필셀룰로스와 같은 계면활성화제가 포함된다.

[0628] 주사 가능한 제제, 예를 들면, 멸균 주사 가능한 수성 또는 유성 혼탁액은 적합한 분산제, 습윤제 및/또는 혼탁제를 사용하여 공지된 기술에 따라 제제화될 수 있다. 멸균 주사 가능한 제제는 비독성의 비경구적으로 허용되는 희석제 및/또는 용매 중의 용액, 혼탁액 및/또는 에멀젼, 예를 들면, 1,3-부탄디올 중의 용액일 수 있다. 사용될 수 있는 허용 가능한 비히클 및 용매에는 물, 링거액, U.S.P. 및 등장성 염화나트륨 용액이 있다. 멸균 고정유가 통상적으로 용매 또는 혼탁 매질로서 사용된다. 이러한 목적을 위해 합성 모노- 또는 디글리세라이드를 포함한 임의의 완하성 고정유가 사용될 수 있다. 올레산과 같은 지방산이 주사제의 제조에 사용될 수 있다.

[0629] 주사 가능한 제제는, 예를 들면, 박테리아-보유 필터를 통한 여과에 의해 및/또는 사용 전에 멸균수 또는 다른 멸균 주사성 매질에 용해되거나 분산될 수 있는 멸균 고체 조성물의 형태로 멸균제를 혼입함으로써 멸균될 수 있다.

[0630] 활성 성분의 효과를 연장하기 위해, 피하 또는 근육내 주사로부터 활성 성분의 흡수를 느리게 하는 것이 종종 바람직할 수 있다. 이것은 불량한 수용해도를 갖는 결정질 또는 무정질 물질의 액체 혼탁액의 사용에 의해 달성될 수 있다. 이때 약물의 흡수 속도는 이의 용해 속도에 따라 좌우되며, 용해 속도는 결국 결정 크기 및 결정질

형태에 따라 좌우될 수 있다. 대안적으로, 비경구 투여된 약물 형태의 지연 흡수는 약물을 오일 비히클에 용해 또는 혼탁시킴으로써 달성된다. 주사 가능한 데포 형태는 폴리락티드-폴리글리콜리드와 같은 생분해성 중합체에 약물의 미세캡슐 매트릭스를 형성함으로써 제조된다. 약물 대 중합체의 비 및 사용되는 특정 중합체의 성질에 따라, 약물 방출 속도가 조절될 수 있다. 다른 생분해성 중합체의 예는 폴리(오르토에스테르) 및 폴리(안하이드라이드)를 포함한다. 데포 주사 가능한 제제는 체 조직과 상용성인 리포솜 또는 마이크로에멀젼에 약물을 포획함으로써 제조된다.

[0631] 직장 및 질 투여

직장 또는 질 투여를 위한 조성물은 전형적으로, 조성물을 코코아 버터, 폴리에틸렌 글리콜 또는 좌약 와스와 같은 주위 온도에서는 고체이지만 체온에서는 액체이어서 직장 또는 질강에서 용융되어 활성 성분을 방출하는 적합한 비자극 부형제와 혼합함으로써 제조될 수 있는 좌제이다.

[0633] 경구 투여

경구 투여를 위한 고체 투여형은 캡슐제, 정제, 환제, 산제 및 과립제를 포함한다. 이러한 고체 투여형에서, 활성 성분은 적어도 하나의 불활성의 약제학적으로 허용되는 부형제, 예를 들면, 시트르산나트륨 또는 인산이칼슘 및/또는 충전제 또는 증량제(예컨대 전분, 락토스, 수크로스, 글루코스, 만니톨 및 규산), 결합제(예컨대 카복시메틸셀룰로스, 알기네이트, 젤라틴, 폴리비닐파리디논, 수크로스 및 아카시아), 보습제(예컨대 글리세롤), 붕해제(예컨대 한천, 탄산칼슘, 감자 또는 타피오카 전분, 알긴산, 특정 실리케이트 및 탄산나트륨), 용해 지연제(예컨대 파라핀), 흡수 촉진제(예컨대 4급 암모늄 화합물), 습윤제(예컨대 세틸 알콜 및 글리세롤 모노스테아레이트), 흡착제(예컨대 카올린 및 벤토나이트 점토) 및 윤활제(예컨대 활석, 스테아르산칼슘, 스테아르산마그네슘, 고체 폴리에틸렌 글리콜, 나트륨 라우릴 설페이트) 및 이들의 혼합물과 혼합된다. 캡슐제, 정제 및 환제의 경우, 투여형은 완충제를 포함할 수 있다.

[0635] 국소 또는 경피 투여

본원에 기재된 바와 같이, 본 발명의 글리칸-상호작용 항체를 함유하는 조성물은 국소 투여용으로 제제화될 수 있다. 피부는 쉽게 접근 가능하기 때문에 전달을 위한 이상적인 표적 부위일 수 있다. 유전자 발현은 피부에 제한되어 잠재적으로 비특이적 독성을 피할 뿐만 아니라 피부 내의 특정 층 및 세포 유형에 제한될 수 있다.

[0637] 전달된 조성물의 피부 발현의 부위는 핵산 전달의 경로에 따라 좌우될 것이다. 세 가지 경로가 글리칸-상호작용 항체를 피부에 전달하는데 흔히 고려된다: (i) 국소 적용(예컨대 국소/국부 치료 및/또는 향장학적 적용의 경우); (ii) 피내 주사(예컨대 국소/국부 치료 및/또는 향장학적 적용의 경우); 및 (iii) 전신 전달(예컨대 피부 및 피부외 영역 둘 다에 영향을 미치는 피부 질환의 치료의 경우). 글리칸-상호작용 항체는 당업계에 공지된 몇 가지 상이한 방법에 의해 피부에 전달될 수 있다.

[0638] 한 실시양태에서, 본 발명은 본 발명의 방법을 편리하게 및/또는 효과적으로 수행하기 위한 각종 드레싱(예컨대, 상처 드레싱) 또는 붕대(예컨대, 접착 붕대)를 제공한다. 드레싱 또는 붕대는 사용자가 대상체(들)의 다중 치료를 수행하도록 하기 위해 본원에 기재된 충분량의 약제학적 조성을 및/또는 글리칸-상호작용 항체를 포함할 수 있다.

[0639] 한 실시양태에서, 본 발명은 1회 이상의 주사로 전달하고자 하는 글리칸-상호작용 항체를 포함하는 조성물을 제공한다.

[0640] 조성물의 국소 및/또는 경피 투여를 위한 투여형은 연고, 페이스트, 크림, 로션, 젤, 분말, 용액, 스프레이, 흡입제 및/또는 패치를 포함할 수 있다. 일반적으로, 활성 성분은 멸균 조건하에서 약제학적으로 허용되는 부형제 및/또는 임의의 필요한 방부제 및/또는 필요할 수 있는 완충제와 혼합된다.

[0641] 게다가, 본 발명은 경피 패치의 사용을 고려하며, 이것은 종종 신체로의 화합물의 제어 전달을 제공하는 추가의 이점을 갖는다. 이러한 투여형은, 예를 들면, 화합물을 적절한 매질에 용해 및/또는 분배함으로써 제조될 수 있다. 대안적으로 또는 추가로, 속도는 속도 조절 막을 제공하고/하거나 화합물을 중합체 매트릭스 및/또는 젤에 분산시킴으로써 조절될 수 있다.

[0642] 국소 투여에 적합한 제제는 액체 및/또는 반 액체 제제, 예를 들면, 도찰제(liniment), 로션, 수중유 및/또는 유중수 에멀젼, 예를 들면, 크림, 연고 및/또는 페이스트 및/또는 용액 및/또는 혼탁액을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

- [0643] 국소-투여 가능한 제제는, 예를 들면, 약 1% 내지 약 10% (w/w) 활성 성분을 포함할 수 있지만, 활성 성분의 농도는 용매 중의 활성 성분의 용해도 한계만큼 높을 수 있다. 국소 투여를 위한 제제는 본원에 기재된 하나 이상의 부가 성분을 추가로 포함할 수 있다.
- [0644] 데포 투여
- [0645] 본원에 기재된 바와 같이, 일부 실시양태에서, 본 발명의 조성물은 연장 방출을 위해 데포로 제제화된다. 일반적으로, 특정 기관 또는 조직("표적 조직")이 투여를 위해 표적화된다.
- [0646] 본 발명의 몇몇 측면에서, 글리칸-상호작용 항체는 표적 조직 내에 또는 근위에 공간적으로 보유된다. (하나 이상의 표적 세포를 포함한) 하나 이상의 표적 조직을 조성물, 특히 조성물의 글리칸-상호작용 항체 성분(들)이 표적 조직에 실질적으로 보유되도록 하는 조건(이것은 적어도 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99, 99.9, 99.99 또는 99.99% 이상의 조성물이 표적 조직에 보유됨을 의미한다)하에서 조성물과 접촉시킴으로써 포유동물 대상체의 하나 이상의 표적 조직에 조성물을 제공하는 방법이 제공된다. 유리하게는, 보유는 표적 조직 및/또는 세포로 들어가는 조성물에 존재하는 글리칸-상호작용 항체의 수준을 측정함으로써 결정된다. 예를 들면, 대상체에 투여되는 글리칸-상호작용 항체의 적어도 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99, 99.9, 99.99 또는 99.99% 이상이 투여 후 일정 기간에 세포내에 존재한다. 예를 들면, 포유동물 대상체에의 근육내 주사는 하나 이상의 글리칸-상호작용 항체 및 형질감염 시약을 포함하는 수성 조성물을 사용하여 수행될 수 있으며, 조성물의 보유는 근육 세포에 존재하는 글리칸-상호작용 항체의 수준을 측정함으로써 결정될 수 있다.
- [0647] 본 발명의 특정 측면은 (하나 이상의 표적 세포를 포함한) 표적 조직을 조성물이 표적 조직에 실질적으로 보유되도록 하는 조건하에서 조성물과 접촉시킴으로써 포유동물 대상체의 표적 조직에 조성물을 제공하는 방법에 관한 것이다. 조성물은 관심을 끄는 효과가 적어도 하나의 표적 세포에서 야기되도록 유효량의 글리칸-상호작용 항체를 함유한다. 조성물은 일반적으로 세포 침투제 및 약제학적으로 허용되는 담체를 함유하지만, "네이키드" 글리칸-상호작용 항체(예를 들면, 세포 침투제 또는 다른 제제가 없는 글리칸-상호작용 항체)도 고려된다.
- [0648] 일부 실시양태에서, 조성물은 다수의 상이한 글리칸-상호작용 항체를 포함하며, 여기서 글리칸-상호작용 항체 중의 하나 또는 하나 이상은 관심 글리칸을 표적화한다. 임의로, 조성물은 또한 조성물의 세포내 전달을 돋기 위해 세포 침투제를 함유한다. 예비결정된 용적의 표적 조직 내에 함유된 세포의 상당 비율로 관심 글리칸을 표적화하는데 필요한 조성물 용량을 결정한다(일반적으로, 예비결정된 용적에 인접한, 또는 표적 조직의 원위에 있는 조직에 글리칸을 표적화하지 않으면서). 이러한 결정 이후에, 결정된 용량을 포유동물 대상체의 조직에 직접 도입할 수 있다.
- [0649] 한 실시양태에서, 본 발명은 1회 이상의 주사로 또는 분할 용량 주사에 의해 전달되는 글리칸-상호작용 항체를 제공한다.
- [0650] 폐 투여
- [0651] 약제학적 조성물은 구강을 통한 폐 투여에 적합한 제제로 제조, 포장 및/또는 판매될 수 있다. 이러한 제제는 활성 성분을 추가로 포함하고 약 0.5nM 내지 7nm 또는 약 1nm 내지 약 6nm 범위의 직경을 갖는 건조 입자를 포함할 수 있다. 이러한 조성물은 적절하게는, 추진제의 스트림이 분말을 분산시키도록 지시될 수 있는 건조 분말 저장소를 포함하는 장치를 사용하여 및/또는 밀봉된 용기에서 저비점 추진제에 용해 및/또는 혼탁된 활성 성분을 포함하는 장치와 같은 자가-추진 용매/분말 분배 용기를 사용하여 투여하기 위한 건조 분말 형태일 수 있다. 이러한 분말은 입자의 중량의 적어도 98%가 0.5nm 초과의 직경을 갖고 입자의 수의 적어도 95%가 7nm 미만의 직경을 갖는 입자를 포함할 수 있다. 대안적으로, 입자의 중량의 적어도 95%가 1nm 초과의 직경을 갖고 입자의 수의 적어도 90%가 6nm 미만의 직경을 갖는다. 건조 분말 조성물은 당과 같은 고체 미세 분말 희석제를 포함할 수 있으며 통상적으로 단위 용량 형태로 제공된다.
- [0652] 저비점 추진제는 일반적으로 대기압에서 65°F 아래의 비점을 갖는 액체 추진제를 포함한다. 일반적으로 추진제가 조성물의 50% 내지 99.9% (w/w)를 구성할 수 있으며 활성 성분이 조성물의 0.1% 내지 20% (w/w)를 구성할 수 있다. 추진제는 추가의 성분, 예를 들면, 액체 비-이온성 및/또는 고체 음이온성 계면활성제 및/또는 고체 희석제(활성 성분을 포함하는 입자와 동위의 입자 크기를 가질 수 있음)를 추가로 포함할 수 있다.
- [0653] 폐 전달을 위해 제제화된 약제학적 조성물은 용액 및/또는 혼탁액의 액적의 형태로 활성 성분을 제공할 수 있다. 이러한 제제는 활성 성분을 포함하고 임의로 멸균성인 수성 및/또는 희석 알콜성 용액 및/또는 혼탁액으

로서 제조, 포장 및/또는 판매될 수 있고, 통상적으로 임의의 분무화 및/또는 미립자화 장치를 사용하여 투여될 수 있다. 이러한 제제는 방향제, 예를 들면, 사카린 나트륨, 휘발성 오일, 완충제, 표면 활성제 및/또는 방부제, 예를 들면, 메틸하이드록시벤조에이트를 포함하지만 이에 제한되지 않는 하나 이상의 부가 성분을 추가로 포함할 수 있다. 이러한 투여 경로에 의해 제공된 액적은 약 0.1nm 내지 약 200nm 범위의 평균 직경을 가질 수 있다.

[0654] 비내, 비강 및 구강 투여

폐 전달에 유용한 것으로 본원에 기재된 제제는 약제학적 조성물의 비내 투여에 유용하다. 비내 투여에 적합한 또 다른 제제는 활성 성분을 포함하고 약 0.2 μm 내지 500 μm 의 평균 입자를 갖는 거친 분말이다. 이러한 제제는 코로 들어쉬는 방식으로, 즉, 코 가까이에 유지된 분말의 용기로부터 비강을 통한 신속한 흡입에 의해 투여된다.

비강 투여에 적합한 제제는, 예를 들면, 작게는 약 0.1% (w/w)에서 많게는 100% (w/w)의 활성 성분을 포함할 수 있으며 본원에 기재된 하나 이상의 부가 성분들을 포함할 수 있다. 약제학적 조성물은 구강 투여에 적합한 제제로 제조, 포장 및/또는 판매될 수 있다. 이러한 제제는, 예를 들면, 통상의 방법을 사용하여 제조되는 정제 및/또는 로젠지 형태일 수 있으며, 예를 들면, 0.1% 내지 20% (w/w) 활성 성분을 포함할 수 있고, 나머지는 경구 용해 가능한 및/또는 분해 가능한 조성물 및, 임의로, 본원에 기재된 하나 이상의 부가 성분을 포함한다. 대안적으로, 구강 투여에 적합한 제제는 활성 성분을 포함하는 분말 및/또는 에어로졸화 및/또는 분무화 용액 및/또는 혼탁액을 포함할 수 있다. 이러한 분말화, 에어로졸화 및/또는 분무화된 제제는, 분산되는 경우, 약 0.1nm 내지 약 200nm 범위의 평균 입자 및/또는 액적 크기를 가질 수 있고, 본원에 기재된 하나 이상의 부가 성분을 추가로 포함할 수 있다.

[0657] 눈 또는 귀 투여

약제학적 조성물은 눈 또는 귀 투여에 적합한 제제로 제조, 포장 및/또는 판매될 수 있다. 이러한 제제는, 예를 들면, 수성 또는 유성 액체 부형제 중의 활성 성분의 0.1/1.0% (w/w) 용액 및/또는 혼탁액을 포함한 점안액 또는 점이액 형태일 수 있다. 이러한 점적제는 완충제, 염 및/또는 본원에 기재된 하나 이상의 기타 임의의 부가 성분을 추가로 포함할 수 있다. 유용한 기타의 안과적으로-투여 가능한 제제는 미세결정성 형태로 및/또는 리포솜 제제로 활성 성분을 포함하는 것들을 포함한다. 망막하 인서트가 또한 투여의 한 형태로서 사용될 수 있다.

[0659] 페이로드(payload) 투여

본원에 기재된 글리칸-상호작용 항체는 생물학적 표적으로의 물질("페이로드")의 전달이 요구되는 다수의 상이한 시나리오, 예를 들면 표적의 검출을 위한 검출 가능한 물질의 전달, 또는 치료제 또는 진단제의 전달에서 사용될 수 있다. 검출 방법은 시험관내 이미징 및 생체내 이미징 방법 둘 다, 예컨대, 면역조직화학, 생물발광 이미징(BLI), 자기 공명 이미징(MRI), 양전자 방사 단층촬영(PET), 전자 현미경법, X선 컴퓨터 단층촬영, 라マン 이미징, 광 간섭 단층촬영, 흡수 이미징, 열 이미징, 형광 반사 이미징, 형광 현미경법, 형광 분자 단층촬영 이미징, 핵 자기 공명 이미징, X선 이미징, 초음파 이미징, 광음향 이미징, 실험실 분석(lab assay), 또는 태그화/염색/이미징이 요구되는 임의의 상황을 포함할 수 있지만, 이에 제한되지 않는다.

글리칸-상호작용 항체는 임의의 유용한 배향으로 링커 및 페이로드 둘 다를 포함하도록 설계될 수 있다. 예를 들면, 두 개의 말단을 갖는 링커는 하나의 말단을 페이로드에 부착시키고 다른 말단을 글리칸-상호작용 항체에 부착시키는데 사용된다. 본 발명의 글리칸-상호작용 항체는 하나 이상의 페이로드 뿐만 아니라 절단 가능한 링커를 포함할 수 있다. 또 다른 예에서, 링커를 통해 글리칸-상호작용 항체에 부착될 수 있고 형광 표지화될 수 있는 약물이 생체내에서, 예컨대 세포내에서 약물을 추적하는데 사용될 수 있다.

또 다른 예는 세포로의 가역적 약물 전달에 있어서의 글리칸-상호작용 항체의 사용을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

본원에 기재된 글리칸-상호작용 항체는 특정 소기관으로의 페이로드, 예컨대, 검출 가능한 제제 또는 치료제의 세포내 표적화에 사용될 수 있다. 또한, 본원에 기재된 글리칸-상호작용 항체는, 예컨대, 살아있는 동물에서 치료제를 세포 또는 조직에 전달하는데 사용될 수 있다. 예를 들면, 본원에 기재된 글리칸-상호작용 항체는 암 세포를 사멸시키기 위해 화학요법제를 전달하는데 사용될 수 있다. 링커를 통해 치료제에 부착된 글리칸-상호작용 항체는 막 침투를 촉진시켜 치료제가 세포로 이동하여 세포내 표적에 도달하도록 할 수 있다.

일부 실시양태에서, 페이로드는 세포독소, 방사성 이온, 화학요법제, 또는 기타의 치료제와 같은 치료제일 수

있다. 세포독소 또는 세포독성제는 세포에 해로울 수 있는 임의의 제제를 포함한다. 예는 탁솔, 사이토칼라신 B, 그라미시딘 D, 브롬화에티듐, 애메틴, 미토마이신, 에토포시드, 테니포시드, 빙크리스틴, 빈블라스틴, 콜히친, 독소루비신, 다우노루비신, 디하이드록시안트라신디온, 미토크산트론, 미트라마이신, 약티노마이신 D, 1-데하이드로테스토스테론, 글루코코르티코이드, 프로카인, 테트라카인, 리도카인, 프로프라놀롤, 푸로마이신, 메이탄시노이드, 예컨대, 메이탄시놀(본원에 전문이 참고로 포함된 미국 특허 제5,208,020호 참조), 라첼마이신(CC-1065, 미국 특허 제5,475,092호, 제5,585,499호 및 제5,846,545호 참조, 이들 모두는 본원에 참고로 포함됨) 및 이의 유사체 또는 동족체를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 방사성 이온은 요오드(예컨대, 요오드 125 또는 요오드 131), 스트론튬 89, 인, 팔라듐, 세슘, 이리듐, 인산염, 코발트, 이트륨 90, 사마륨 153 및 프라세오디뮴을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 기타의 치료제는 항대사산물(예컨대, 메토트렉세이트, 6-머캅토퓨린, 6-티오구아닌, 시타라빈, 5-플루오로우라실 데카르바진), 알킬화제(예컨대, 메클로레타민, 티오테파 클로람부실, 라첼마이신(CC-1065), 멜팔란, 카르무스틴(BSNU), 로무스틴(CCNU), 사이클로포스파미드, 부설판, 디브로모만니톨, 스트렙토조토신, 미토마이신 C 및 시스-디클로로디아민 백금(II)(DDP) 시스플라틴), 안트라사이클린(예컨대, 다우노루비신(이전에는 다우노마이신) 및 독소루비신), 항생제(예컨대, 닥티노마이신(이전에는 약티노마이신), 블레오마이신, 미트라마이신 및 안트라마이신(AMC)) 및 항-유사분열제(예컨대, 빙크리스틴, 빈블라스틴, 탁솔 및 메이탄시노이드)를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 본 발명의 항-STn 항체의 경우에, 종양 사멸은 독소를 이러한 항-STn 항체에 접합시킴으로써 촉진될 수 있다.

[0665]

일부 실시양태에서, 페이로드는 다양한 유기 소분자, 무기 화합물, 나노입자, 효소 또는 효소 기질, 형광 물질, 발광 물질(예컨대, 루미놀), 생물발광 물질(예컨대, 루시페라제, 루시페린 및 에퀴린), 화학발광 물질, 방사성 물질(예컨대, ¹⁸F, ⁶⁷Ga, ^{81m}Kr, ⁸²Rb, ¹¹¹In, ¹²³I, ¹³³Xe, ²⁰¹Tl, ¹²⁵I, ³⁵S, ¹⁴C, ³H, 또는 ^{99m}Tc(예컨대, 퍼테크네이트(테크네이트(VII), TcO₄⁻)로서) 및 콘트라스트제(예컨대, 금(예컨대, 금 나노입자), 가돌리늄(예컨대, 킬레이트화 Gd), 산화철(예컨대, 초상자성 산화철(SPIO), 단결정성 산화철 나노입자(MION) 및 초소형 초상자성 산화철(USPIO)), 망간 키레이트(예컨대, Mn-DPPD), 황산바륨, 요오드화 조영제(이오헥솔), 미세기포, 또는 파볼화탄소)와 같은 검출 가능한 제제일 수 있다. 이러한 광학-검출 가능한 표지는, 예를 들면, 제한함이 없이, 4-아세트아미도-4'-이소티오시아네이토스틸벤-2,2'디설폰산; 아크리딘 및 유도체(예컨대, 아크리딘 및 아크리딘 이소티오시아네이트); 5-(2'-아미노에틸)아미노나프탈렌-1-설폰산(EDANS); 4-아미노-N-[3-비닐설포닐]페닐]나프탈이미드-3,5 디설포네이트; N-(4-아닐리노-1-나프틸)말레이미드; 안트라닐아미드; BODIPY; 브릴리언트 엘로(Brilliant Yellow); 쿠마린 및 유도체(예컨대, 쿠마린, 7-아미노-4-메틸쿠마린(AMC, 쿠마린 120) 및 7-아미노-4-트리플루오로메틸쿠마린(ку마린 151)); 시아닌 염료; 시아노신; 4',6-디아미니디노-2-페닐인돌(DAPI); 5'5"-디브로모페로갈룰-설포나프탈레인(Bromopyrogallol Red); 7-디에틸아미노-3-(4'-이소티오시아네이토페닐)-4-메틸쿠마린; 디에틸렌트리아민 웬타아세테이트; 4,4'-디이소티오시아네이토디하이드로-스틸벤-2,2'-디설폰산; 4,4'-디이소티오시아네이토스틸벤-2,2'-디설폰산; 5-[디메틸아미노]-나프탈렌-1-설포닐 클로라이드(DNS, 단실클로라이드); 4-디메틸아미노페닐아조페닐-4'-이소티오시아네이트(DABITC); 에오신 및 유도체(예컨대, 에오신 및 에오신 이소티오시아네이트); 에리트로신 및 유도체(예컨대, 에리트로신 B 및 에리트로신 이소티오시아네이트); 에티듐; 플루오레세인 및 유도체(예컨대, 5-카복시플루오레세인(FAM), 5-(4,6-디클로로트리아진-2-일)아미노플루오레세인(DTAF), 2',7'-디메톡시-4'5'-디클로로-6-카복시플루오레세인, 플루오레세인, 플루오레세인 이소티오시아네이트, X-로다민-5-(및-6)-이소티오시아네이트(QFITC 또는 XRITC) 및 플루오레사민); 2-[2-[3-[[1,3-디하이드로-1,1-디메틸-3-(3-설포프로필)-2H-벤즈[e]인돌-2-일리덴]에틸리덴]-2-[4-(에톡시카보닐)-1-페라지닐]-1-사이클로펜텐-1-일]-1,1-디메틸-3-(3-설포르프로필)-1H-벤즈[e]인돌륨 하이드록사이드, 분자 내염, n,n-디에틸에탄아민(1:1)을 갖는 화합물(IR144); 5-클로로-2-[2-[3-[(5-클로로-3-에틸-2(3H)-벤조티아졸-일리덴)에틸리덴]-2-(디페닐아미노)-1-사이클로펜텐-1-일]에테닐]-3-에틸 벤조티아졸륨 피클로레이트(IR140); 말라카이트 그린(Malachite Green) 이소티오시아네이트; 4-메틸룹밸리페론 오르토크레솔프탈레인; 니트로티로신; 파라로사닐린; 폐놀 레드; B-피코에리트린; o-프탈디알데히드; 피렌 및 유도체(예컨대, 피렌, 피렌 부티레이트 및 석신이미딜 1-피렌); 부티레이트 양자점; 리액티브 레드(Reactive Red) 4(CIBACRON™ Brilliant Red 3B-A); 로다민 및 유도체(예컨대, 6-카복시-X-로다민(ROX), 6-카복시로다민(R6G), 리사민 로다민 B 설포닐 클로라이드 로다닌(Rhod), 로다민 B, 로다민 123, 로다민 X 이소티오시아네이트, 설포로다민 B, 설포로다민 101, 설포로다민 101의 설포닐 클로라이드 유도체(Texas Red), N,N,N',N' 테트라메틸-6-카복시로다민(TAMRA) 테트라메틸 로다민 및 테트라메틸 로다민 이소티오시아네이트(TRITC)); 리보플라빈; 로졸산; 테르븀 키레이트 유도체; 시아닌-3(Cy3); 시아닌-5(Cy5); 시아닌-5.5(Cy5.5), 시아닌-7(Cy7); IRD 700; IRD 800; Alexa 647; 라 졸타 블루(La Jolta Blue); 프탈로 시아닌; 및 나프탈로 시아닌을 포함한다.

- [0666] 일부 실시양태에서, 검출 가능한 제제는 활성화시 검출 가능해지는 비-검출 가능한 전구체일 수 있다(예컨대, 형광원성 테트라진-형광단 작제물(예컨대, 테트라진-BODIPY FL, 테트라진-Oregon Green 488, 또는 테트라진-BODIPY TMR-X) 또는 효소 활성화 가능한 형광원성 제제(예컨대, PROSENSE® (VisEn Medical))). 효소 표지된 조성물이 사용될 수 있는 시험관내 검정은 효소 결합 면역흡착법(ELISA), 면역침강 검정, 면역형광법, 효소 면역검정(EIA), 방사면역검정(RIA) 및 웨스턴 블로트 분석을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.
- [0667] 병용
- [0668] 글리칸-상호작용 항체는 하나 이상의 다른 치료적, 예방적, 진단적, 또는 이미징 제제와 조합하여 사용될 수 있다. "병용하여(in combination with)"란, 제제들이 함께 전달을 위해 동시에 투여되고/되거나 제제화되어야 함을 의미하는 것은 아니지만, 이러한 전달방법은 본 기재내용의 범위내에 있다. 조성물은 하나 이상의 다른 목적하는 치료 또는 의료 절차와 동시에, 이전에, 또는 이후에 투여될 수 있다. 일반적으로, 각 제제는 그 제제에 대해 결정된 용량 및/또는 시간 스케줄로 투여될 것이다. 일부 실시양태에서, 본 기재내용은 약제학적, 예방적, 진단적 및/또는 이미징 조성물을 이들의 생체이용효율을 개선시키고, 이들의 대사를 감소 및/또는 변화시키고, 이들의 배설을 억제하고/하거나 및/또는 이들의 체내 분포를 변화시킬 수 있는 제제와 조합하여 전달함을 포함한다.
- [0669] 투여량
- [0670] 본 기재내용은 약물 전달 과학에서 진보할 것으로 간주되는 임의의 적합한 경로에 의한 치료, 약제, 진단 또는 이미징을 위한 글리칸-상호작용 항체의 전달을 포함한다. 전달은 네이키드 또는 제제화될 수 있다.
- [0671] 네이키드 전달
- [0672] 본 발명의 글리칸-상호작용 항체는 "네이키드" 형태로 세포, 조직, 기관 또는 유기체에 전달될 수 있다. 본원에서 사용되는 용어 "네이키드"는 형질감염 또는 투과성을 촉진시키는 제제 또는 변형 없이 전달되는 글리칸-상호작용 항체를 가리킨다. 네이키드 글리칸-상호작용 항체는 당업계에 공지되고 본원에 기재된 투여 경로를 사용하여 세포, 조직, 기관 및/또는 유기체에 전달될 수 있다. 네이키드 전달은 염수 또는 PBS와 같은 단순 완충액 중의 제제를 포함할 수 있다.
- [0673] 제제화된 전달
- [0674] 본 발명의 글리칸-상호작용 항체는 본원에 기재된 방법을 사용하여 제제화될 수 있다. 제제는 변형 및/또는 비변형될 수 있는 글리칸-상호작용 항체를 포함할 수 있다. 제제는 추가로 세포 침투제, 약제학적으로 허용되는 담체, 전달제, 생분해성 또는 생체적합성 중합체, 용매 및 서방출 전달 데포를 포함할 수 있지만, 이에 제한되지 않는다. 제제화된 글리칸-상호작용 항체는 당업계에 공지되고 본원에 기재된 투여 경로를 사용하여 전달될 수 있다.
- [0675] 조성물은 또한 직접 침지 또는 배싱(bathing), 카테터를 통해, 젤, 분말, 연고, 크림, 젤, 로션 및/또는 점적제에 의해, 조성물로 피복되거나 합침된 직물 또는 생분해성 물질과 같은 기재를 사용함으로써 당업계의 몇 가지 방법 중의 어느 것으로 기관 또는 조직에 직접 전달을 위해 제제화될 수 있다.
- [0676] 복용
- [0677] 일부 실시양태에서, 본 기재내용은 본 발명에 따르는 하나 이상의 글리칸-상호작용 항체를 이를 필요로 하는 대상체에 투여함을 포함하는 방법을 제공한다. 글리칸-상호작용 항체를 암호화하는 핵산, 글리칸-상호작용 항체를 포함하는 단백질 또는 복합체, 또는 이의 약제학적, 이미징, 진단적, 또는 예방적 조성물이 질환, 장애 및/또는 병태를 예방, 치료, 진단, 또는 이미지화하는데 효과적인 임의의 양 및 투여 경로를 사용하여 대상체에 투여될 수 있다. 요구되는 정확한 양은 대상체의 종, 연령 및 일반적인 상태, 질환의 중증도, 특정 조성물, 이의 투여 모드, 이의 활성 모드 등에 따라 대상체마다 다를 것이다. 본 발명에 따르는 조성물은 투여 용이성 및 투여량 균일성을 위해 투여 단위 형태로 제제화된다. 그러나, 본 발명의 조성물의 총 1일 사용량은 온전한 의학적 판단 범위내에서 담당의에 의해 결정되는 것으로 이해될 것이다. 임의의 특정 환자를 위한 구체적인 치료학적으로 유효한, 예방학적으로 유효한, 또는 적합한 이미징 용량 수준은 치료되는 장애 및 장애의 중증도; 사용되는 특정 화합물의 활성; 사용되는 특정 조성물; 환자의 연령, 체중, 일반적인 건강, 성별 및 식이; 사용되는 특정 화합물의 투여 시간, 투여 경로 및 배설 속도; 치료의 지속시간; 사용되는 특정 화합물과 병용되거나 일치하는 약물; 및 의료 분야에 널리 공지된 유사 인자들을 포함한 다양한 인자에 따라 좌우될 것이다.
- [0678] 특정 양태에서, 본 발명에 따르는 조성물은 치료적, 진단적, 예방적, 또는 이미징 효과를 수득하기 위해, 1일 1

회 이상, 1일당 대상체 체중의 약 0.0001mg/kg 내지 약 100mg/kg, 약 0.01mg/kg 내지 약 50mg/kg, 약 0.1mg/kg 내지 약 40mg/kg, 약 0.5mg/kg 내지 약 20mg/kg, 0.5mg/kg 내지 약 30mg/kg, 약 0.01mg/kg 내지 약 10mg/kg, 약 0.1mg/kg 내지 약 10mg/kg, 약 2.5mg/kg 내지 약 5.0mg/kg, 또는 약 1mg/kg 내지 약 25mg/kg을 전달하기에 충분한 투여량 수준으로 투여될 수 있다. 목적하는 투여량은 1일 3회, 1일 2회, 1일 1회, 2일마다, 3일마다, 매주, 2주마다, 3주마다, 또는 4주마다 전달될 수 있다. 특정 양태에서, 목적하는 투여량은 다수회 투여(예컨대, 2회, 3회, 4회, 5회, 6회, 7회, 8회, 9회, 10회, 11회, 12회, 13회, 14회, 또는 그 이상의 투여)를 사용하여 전달될 수 있다.

[0679] 본 발명에 따르면, 글리칸-상호작용 항체는 분할-용량 섭생으로 투여될 수 있다. 본원에서 사용되는 바와 같이, "분할 용량"은 단일 단위 용량 또는 총 1일 용량을 둘 이상의 용량으로 나눈 것, 예컨대, 단일 단위 용량의 2회 이상의 투여이다. 본원에서 사용되는 바와 같이, "단일 단위 용량"은 1회 용량으로/한번에/단일 경로/단일 접촉 점, 즉, 단일 투여 이벤트로 투여되는 임의의 치료제의 용량이다. 본원에 사용되는 바와 같이, "총 1일 용량"은 24 시간 내에 제공되거나 처방되는 양이다. 이것은 단일 단위 용량으로서 투여될 수 있다. 한 실시양태에서, 본 발명의 글리칸-상호작용 항체는 분할 용량으로 대상체에 투여된다. 글리칸-상호작용 항체는 완충액 단독으로 또는 본원에 기재된 제제로 제제화될 수 있다. 본원에 기재된 바와 같은 글리칸-상호작용 항체를 포함하는 약제학적 조성물은 국소, 비내, 기관내, 또는 주사 가능한 투여형(예컨대, 정맥내, 안내, 유리체내, 근육내, 심장내, 복강내 또는 피하)과 같은 본원에 기재된 투여형으로 제제화될 수 있다. 약제학적 제제의 제제화 및/또는 제조에 있어서의 일반적인 고려사항은, 예를 들면, 문헌[Remington: The Science and Practice of Pharmacy 21st ed., Lippincott Williams & Wilkins, 2005 (본원에 참고로 포함됨)]에서 찾아볼 수 있다.

[0680] 일부 실시양태에서, 글리칸-상호작용 항체의 투여량은 방관자 효과(bystander effect)를 감소시키도록 조절될 수 있다. 본원에서 사용되는 바와 같이 "방관자 효과"는 표적 세포에 이웃한 비-표적 세포 또는 세포들(본원에서는 방관자 세포라고도 함)에 대한 부정적인 효과를 가리킨다. 이러한 방법에 따르면, 항체 용량 또는 접합체 유형은 방관자 효과를 감소시키도록 조절될 수 있다. 이러한 조절은 95% 이상, 90% 이상, 85% 이상, 80% 이상, 75% 이상, 70% 이상, 65% 이상, 60% 이상, 55% 이상, 50% 이상, 45% 이상, 40% 이상, 35% 이상, 30% 이상, 또는 25% 이상의 방관자 세포가 계속 생존하도록 하는 치료를 야기할 수 있다.

코팅 또는 쉘

[0682] 정제, 당의정, 캡슐제, 환제 및 과립제의 고체 투여형은 장용 제피 및 약제학적 제제화 분야에서 널리 공지된 기타의 코팅과 같은 코팅 및 쉘로 제조될 수 있다. 이들은 임의로 불투명화제를 포함할 수 있으며 이들이 활성 성분(들) 만을, 또는 우선적으로, 장관의 특정 부분에서, 임의로, 지연된 방식으로 방출하는 조성의 것일 수 있다. 사용될 수 있는 매봉 조성물의 예는 중합체성 물질 및 왁스를 포함한다. 유사한 유형의 고체 조성물이 락토스 또는 유당과 같은 부형제 뿐만 아니라 고분자량 폴리에틸렌 글리콜 등을 사용하여 연질 및 경질-충전된 젤라틴 캡슐에서 충전제로서 사용될 수 있다.

IV. 키트 및 장치

키트

[0685] 본원에 기재된 조성물 중의 어느 것은 키트에 포함될 수 있다. 비제한적인 예에서, 항원 분자를 포함하는, 글리칸-상호작용 항체를 생성하기 위한 시약이 키트에 포함된다. 키트는 글리칸-상호작용 항체를 생성 또는 합성하기 위한 시약 또는 지침서를 추가로 포함할 수 있다. 이것은 또한 하나 이상의 완충제를 포함할 수 있다. 본 발명의 또 다른 키트는 글리칸-상호작용 항체 단백질 또는 핵산 어레이 또는 라이브러리를 제조하기 위한 성분을 포함할 수 있으며, 따라서, 예를 들면, 고체 지지체를 포함할 수 있다.

[0686] 일부 실시양태에서, 본 기재내용은 하나 이상의 글리칸-상호작용 항체를 포함하는, 대상체의 스크리닝, 모니터링 및/또는 진단을 위한 키트를 포함한다. 이러한 키트는 단독으로 또는 스크리닝, 모니터링 및/또는 진단(예컨대, 동반 진단으로서)의 하나 이상의 다른 방법들과 조합하여 사용될 수 있다. 일부 키트는 완충제, 생물학적 표준, 이차 항체, 검출 시약 및 샘플 전처리용 조성물(예컨대, 항원 회복, 차단 등을 위한) 중의 하나 이상을 포함한다.

[0687] 키트의 성분들은 수성 매질로 또는 동결건조된 형태로 포장될 수 있다. 키트의 용기 수단은 일반적으로 성분이 배치될 수 있고, 바람직하게는 적절하게 분취될 수 있는 적어도 하나의 바이알, 시험관, 플라스크, 병, 시린지 또는 다른 용기 수단을 포함할 것이다. 키트에 하나 이상의 성분이 있는 경우(표지화 시약 및 표지가 함께 포장될 수 있다), 키트는 또한 일반적으로 추가의 성분이 별도로 배치될 수 있는 제2, 제3 또는 기타의 추가 용기를

함유할 것이다. 키트는 또한 멸균성의 약제학적으로 허용되는 완충제 및/또는 기타 희석제를 함유하는 제2 용기 수단을 포함할 수 있다. 그러나, 성분들의 다양한 조합이 바이알에 포함될 수 있다. 본 발명의 키트는 또한 전형적으로 상업적 판매를 위해 좁게 가두워진 글리칸-상호작용 항체, 예컨대, 단백질, 핵산 및 임의의 다른 시약 용기를 담기 위한 수단을 포함할 것이다. 이러한 용기는 목적하는 바이알이 보유된 사출성형되거나 취입성형된 플라스틱 용기를 포함할 수 있다.

[0688] 키트의 성분들이 하나의 및/또는 그 이상의 액체 용액에 제공되는 경우, 액체 용액은 수용액이며, 멸균 수용액이 특히 바람직하다. 그러나, 키트의 성분들은 건조된 분말(들)로서 제공될 수 있다. 시약 및/또는 성분이 건조 분말로서 제공되는 경우, 분말은 적합한 용매의 첨가에 의해 재구성될 수 있다. 용매는 또한 다른 용기 수단에 제공될 수 있는 것으로 생각된다. 일부 실시양태에서, 표지화 염료가 건조된 분말로서 제공된다. 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 마이크로그램 또는 적어도 1000 마이크로그램 또는 최대 10g의 건조된 염료가 본 발명에 키트에 제공되는 것으로 고려된다. 그후 염료는 DMSO와 같은 임의의 적합한 용매에 재현탁될 수 있다.

[0689] 키트는 키트 성분의 사용 및 키트에 포함되지 않은 임의의 다른 시약의 사용에 대한 지침서를 포함할 수 있다. 지침서는 실행될 수 있는 변화들을 포함할 수 있다.

[0690] 장치

[0691] 본원에 기재된 조성물 중의 어느 것은 장치와 조합되거나 이에 코팅되거나 이에 매봉될 수 있다. 장치는 치아 임플란트, 스텐트, 뼈 대체물, 인공 관절, 판막, 심박 조율기 또는 기타의 이식 가능한 치료 장치를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0692] V. 등가물 및 범위

[0693] 당업계의 숙련가들은 단지 일상적인 실험을 사용하여, 본원에 기재된 발명에 따르는 특정 양태들에 대한 다수의 등가물을 인지하거나 알아낼 수 있을 것이다. 본 발명의 범위는 상기 설명에 제한되는 것으로 의도되지 않으며, 오히려 첨부된 청구항에 제시된 바와 같다.

[0694] 청구항에서, "a", "an" 및 "the"와 같은 관사는, 반대로 나타내거나 달리 문맥으로부터 자명하지 않은 한, 하나 또는 하나 이상을 의미할 수 있다. 그룹의 하나 이상의 구성원 사이에 "또는(or)"을 포함하는 청구항 또는 설명은 그룹 구성원 중의 하나, 하나 이상, 또는 전부가, 반대로 나타내거나 달리 문맥으로부터 자명하지 않은 한, 주어진 생성물 또는 공정에 존재하거나 사용되거나 또는 달리 이에 관련된다면 충족된 것으로 간주된다. 본 발명은 그룹의 정확히 하나의 구성원이 주어진 생성물 또는 공정에 존재하거나 사용되거나 또는 달리 이에 관련되는 양태들을 포함한다. 본 발명은 하나 이상의, 또는 전체 그룹 구성원이 주어진 생성물 또는 공정에 존재하거나 사용되거나 또는 달리 이에 관련되는 양태들을 포함한다.

[0695] 용어 "포함하는(comprising)"은 개방적인 것으로 의도되며 추가의 요소들 또는 단계들의 포함을 허용하지만 필요로 하지 않는 것으로 또한 주지된다. 용어 "포함하는"이 본원에서 사용되는 경우, 용어 "로 이루어진 (consisting of)"이 또한 포함되고 기술된다.

[0696] 범위가 주어지는 경우, 종점이 포함된다. 게다가, 달리 나타내거나 그렇지 않으면 문맥 및 당업계의 통상의 숙련가의 합의로부터 자명하지 않은 한, 범위로서 표현된 값들은 본 발명의 상이한 양태들에서 명시된 범위 내의 임의의 특정 값 또는 하위범위를, 문맥이 달리 명백히 나타내지 않는 한, 범위의 하한치의 단위의 1/10까지 추정할 수 있는 것으로 이해된다.

[0697] 또한, 선행 기술 내에 포함되는 본 발명의 임의의 특정 양태는 청구항 중의 어느 하나 이상으로부터 명백히 배제될 수 있는 것으로 이해된다. 이러한 양태들은 당업계의 통상의 숙련가에게 공지된 것으로 간주되기 때문에, 이들은 배제가 본원에 명백히 제시되어 있지 않더라도 배제될 수 있다. 본 발명의 조성물의 특정 양태(예컨대, 임의의 핵산 또는 이에 의해 암호화된 단백질; 임의의 생산방법; 임의의 사용방법 등)는 선행 기술의 존재와 관련되건 그렇지 않건 간에, 어떤 이유로든, 하나 이상의 청구항으로부터 배제될 수 있다.

[0698] 모든 인용된 자료, 예를 들면, 참고문헌, 간행물, 데이터베이스, 데이터베이스 엔트리 및 본원에 명시된 기술은, 인용문에 명백히 명시되지 않더라도, 본원에 참고로 포함된다. 인용 자료 및 본 출원의 상반되는 진술의 경우, 본 출원의 진술이 우선되어야 한다.

[0699] 부문 제목 및 표제는 제한하는 것으로 의도되지 않는다.

[0700]

실시예

[0701]

실시예 1. 글리칸 어레이 분석

[0702]

최적화된 글리칸 어레이를 사용하여 단일 실험에서 다중 글리칸에 대한 항체 친화성 및 특이성을 시험한다. 글리칸 어레이는 71개의 화학적으로 합성되고 잘 정의된 글리칸을 포함하며, 이들 대부분은 Neu5Ac 및 Neu5Gc 글리칸 쌍이다. 어레이 슬라이드는 상업적으로 입수하며(캘리포니아주 써니베일 소재의 어레이잇 코포레이션(ArrayIt Corp)) 아래 표에 열거된 글리칸을 포함한다.

표 12

어레이 글리칸

글리칸 ID 번호	글리칸
1	Neu5,9Ac2α2,3Galβ1,4GlcNAcβO(CH2)2CH2NH2
2	Neu5Gc9Acα2,3Galβ1,4GlcNAcβO(CH2)2CH2NH2
3	Neu5,9Ac2α2,6Galβ1,4GlcNAcβO(CH2)2CH2NH2
4	Neu5Gc9Acα2,6Galβ1,4GlcNAcβO(CH2)2CH2NH2
5	Neu5Acα2,6GalNAcαO(CH2)2CH2NH2
6	Neu5Gca2,6GalNAcαO(CH2)2CH2NH2
7	Neu5,9Ac2α2,3Galβ1,3GlcNAcβO(CH2)2CH2NH2
8	Neu5Gc9Acα2,3Galβ1,3GlcNAcβO(CH2)2CH2NH2
9	Neu5,9Ac2α2,3Galβ1,3GalNAcαO(CH2)2CH2NH2
10	Neu5Gc9Acα2,3Galβ1,3GalNAcαO(CH2)2CH2NH2
11	Neu5Acα2,3Galβ1,4GlcNAcβO(CH2)2CH2NH2
12	Neu5Gca2,3Galβ1,4GlcNAcβO(CH2)2CH2NH2
13	Neu5Acα2,3Galβ1,3GlcNAcβO(CH2)2CH2NH2
14	Neu5Gca2,3Galβ1,3GlcNAcβO(CH2)2CH2NH2
15	Neu5Acα2,3Galβ1,3GalNAcαO(CH2)2CH2NH2
16	Neu5Gca2,3Galβ1,3GalNAcαO(CH2)2CH2NH2
17	Neu5Acα2,6Galβ1,4GlcNAcβO(CH2)2CH2NH2
18	Neu5Gca2,6Galβ1,4GlcNAcβO(CH2)2CH2NH2
19	Neu5Acα2,6Galβ1,4GlcβO(CH2)2CH2NH2
20	Neu5Gca2,6Galβ1,4GlcβO(CH2)2CH2NH2
21	Neu5Acα2,3Galβ1,4GlcβO(CH2)2CH2NH2
22	Neu5Gca2,3Galβ1,4GlcβO(CH2)2CH2NH2
23	Neu5,9Ac2α2,6GalNAcαO(CH2)2CH2NH2
24	Neu5Gc9Acα2,6GalNAcαO(CH2)2CH2NH2
25	Neu5Acα2,3GalβO(CH2)2CH2NH2

[0703]

26	Neu5Gca2,3Gal β O(CH2)2CH2NH2
27	Neu5Aca2,6Gal β O(CH2)2CH2NH2
28	Neu5Gca2,6Gal β O(CH2)2CH2NH2
29	Neu5,9Ac2a2,3Gal β O(CH2)2CH2NH2
30	Neu5Gc9Aca2,3Gal β O(CH2)2CH2NH2
31	Neu5,9Ac2a2,6Gal β O(CH2)2CH2NH2
32	Neu5Gc9Aca2,6Gal β O(CH2)2CH2NH2
33	Neu5Aca2,3Gal β 1,3GalNAc β O(CH2)2CH2NH2
34	Neu5Gca2,3Gal β 1,3GalNAc β O(CH2)2CH2NH2
35	Neu5,9Ac2a2,3Gal β 1,3GalNAc β O(CH2)2CH2NH2
36	Neu5Gc9Aca2,3Gal β 1,3GalNAc β O(CH2)2CH2NH2
37	Neu5,9Ac2a2,6Gal β 1,4Glc β O(CH2)2CH2NH2
38	Neu5Gc9Aca2,6Gal β 1,4Glc β O(CH2)2CH2NH2
39	Neu5,9Ac2a2,3Gal β 1,4Glc β O(CH2)2CH2NH2
40	Neu5Gc9Aca2,3Gal β 1,4Glc β O(CH2)2CH2NH2
41	Neu5Aca2,8Neu5Aca2,3Gal β 1,4Glc β O(CH2)2CH2NH2
42	Neu5Aca2,8Neu5Aca2,8Neu5Aca2,3Gal β 1,4Glc β O(CH2)2CH2NH2
43	Gal β 1,4Glc β O(CH2)2CH2NH2
45	Gal β 1,4GlcNAc β O(CH2)2CH2NH2
47	GalNAcO(CH2)2CH2NH2
51	Gal β 1,3GalNAc β O(CH2)2CH2NH2
52	Gal β 1,3GlcNAc α O(CH2)2CH2NH2
53	Gal β 1,3GlcNAc β O(CH2)2CH2NH2
54	Gal β 1,4GlcNAc6S β O(CH2)2CH2NH2
55	Neu5Aca2,3Gal β 1,4(Fuc α 1,3)GlcNAc β O(CH2)2CH2NH2
56	Neu5Gca2,3Gal β 1,4(Fuc α 1,3)GlcNAc β O(CH2)2CH2NH2
57	Neu5Aca2,3Gal β 1,4(Fuc α 1,3)GlcNAc6S β O(CH2)2CH2NH2
58	Neu5Gca2,3Gal β 1,4(Fuc α 1,3)GlcNAc6S β O(CH2)2CH2NH2
59	Gal β 1,3GlcNAc β 1,3Gal β 1,4Glc β O(CH2)2CH2NH2
60	Neu5Aca2,3Gal β 1,3GlcNAc β 1,3Gal β 1,4Glc β O(CH2)2CH2NH2
61	Neu5Gca2,3Gal β 1,3GlcNAc β 1,3Gal β 1,4Glc β O(CH2)2CH2NH2
62	Neu5Aca2,3Gal β 1,4GlcNAc6S β O(CH2)2CH2NH2
63	Neu5Gca2,3Gal β 1,4GlcNAc6S β O(CH2)2CH2NH2
64	Neu5Aca2,8Neu5Aca2,3Gal β 1,4Glc β O(CH2)3NHCOCH2(OCH2)6NH2
65	Neu5Aca2,8Neu5Aca2,8Neu5Aca2,3Gal β 1,4Glc β O(CH2)3NHC OCH2(OCH2CH2)6NH2
66	Neu5Aca2,6(Neu5Gca2,3)Gal β 1,4Glc β O(CH2)2CH2NH2
67	Neu5Aca2,6(Neu5Gca2,3)Gal β 1,4Glc β O(CH2)2CH2NH2
68	Neu5Aca2,6(KDN α 2,3)Gal β 1,4Glc β O(CH2)2CH2NH2
69	Neu5Gca2,8Neu5Aca2,3Gal β 1,4Glc β O(CH2)2CH2NH2
70	KDN α 2,8Neu5Aca2,3Gal β 1,4Glc β O(CH2)2CH2NH2
71	Neu5Aca2,8Kdn α 2,6Gal β 1,4Glc β O(CH2)2CH2NH2
72	Neu5Aca2,8Neu5Gca2,3Gal β 1,4Glc β O(CH2)2CH2NH2
73	Neu5Aca2,8Neu5Gca2,6Gal β 1,4Glc β O(CH2)2CH2NH2
74	KDN α 2,8Neu5Gca2,3Gal β 1,4Glc β O(CH2)2CH2NH2
75	Neu5Gca2,8Neu5Gca2,3Gal β 1,4Glc β O(CH2)2CH2NH2
76	Neu5Aca2,8Neu5Aca2,6Gal β 1,4Glc β O(CH2)2CH2NH2

[0704]

[0705]

300m1의 에폭시 블로킹 완충액은 15m1의 2M Tris 완충액(pH 8)을 0.9m1의 16.6M 에탄올아민 및 284.1m1의 중류수와 배합함으로써 제조한다. 용액을 HCl을 사용하여 9.0의 최종 pH로 되게 한다. 용액을 0.2 μ M 닉트로셀룰로스 막을 사용하여 여과한다. 에폭시 완충 용액 뿐만 아니라 1L의 중류수를 50°C로 예비-가온시킨다. 유리 슬라이드를 슬라이드 홀더에 정렬하고 가온된 에폭시 블로킹 완충액을 갖는 염색 통에 신속하게 침지시킨다. 슬라이드를 50°C에서 1시간 동안 에폭시 블로킹 완충액 중에서 주기적으로 진탕시키면서 항온처리하여 에폭시 결합 부위를 불활성화시킨다. 그후, 슬라이드를 세정하고 1% OVA를 갖는 PBS로 25°C에서 1시간 동안 차단하였다. 다클론 항체(1:1000) 또는 정제된 단클론 항체(1ug/mL)를 갖는 혈청 샘플을 1% OVA를 갖는 PBS에서 희석시키고 25°C에서 1시간 동안 글리칸 어레이에 가한다. 광범위하게 세척한 후, 글리칸 마이크로어레이 슬라이드를 Cy3-접합된 항-마우스 IgG(Jackson Immunoresearch, West Grove, PA)와 1시간 동안 항온처리함으로써 항체의 결합을 검출한다. 그후, 슬라이드를 광범위하게 세척하고, 건조시키고 Genepix 4000B 스캐너(레이저 100%로; 350에서 획득; 10 μ m 픽셀)로 스캐닝한다. 스캐닝한 이미지로부터의 미가공 데이터를 Genepix 소프트웨어를 사용하여 추출하고 미가공 데이터의 분석을 실시한다. 항체는, 이들이 AcSTn 및 GcSTn 분자 둘 다에는 결합하지만 Tn 또는 어레이 상의 임의의 다른 글리칸에는 결합하지 않는 것을 입증한다면, AcSTn 및 GcSTn에 매우 특이적인 것으로 간주된다.

[0706]

어레이 분석에 기초하여, 항체를 어레이 글리칸 결합 프로파일에 따라 분류한다. 항체가 글리칸 5, 6, 23 및 24에 결합한다면, AcSTn 및 GcSTn에 결합할 수 있는 "그룹 1" 항체로 분류된다. 이러한 항체는 도 1A에 큰 타원형으로 나타낸 STn의 부분 및 광범위한 STn 구조와 관련되는 이들의 능력으로 인해 Pan-STn 항체라고 한다. 항체가 글리칸 5, 6, 23, 24, 27 및 31에 결합한다면, STn 뿐만 아니라 세린 또는 트레오닌에의 O-결합을 포함하는

몇몇 관련 구조에 결합할 수 있는 "그룹 2" 항체로 분류된다. 이러한 항체는 도 1B에 큰 타원형으로 나타낸 STn의 부분과 관련되는 것으로 생각된다. 몇몇 그룹 2 항체는 바람직하게는 GcSTn을 갖는 구조를 능가하여 AcSTn을 갖는 구조에 결합한다. 항체가 글리칸 5, 6, 23, 24, 17, 3, 19, 37, 27 및 31에 결합한다면, "그룹 3" 항체(STn에 결합할 수 있지만, 또한 보다 광범위한 관련 구조에도 결합할 수 있음)로서 분류된다. 그룹 2 항체와는 달리, 그룹 3 항체는 이러한 구조가 세린 또는 트레오닌에의 0-결합을 갖는 것을 필요로 하지 않는다. 그룹 3 항체는 도 1C에 큰 타원형으로 나타낸 STn의 부분과 관련되는 것으로 생각된다. 마지막으로, 항체가 글리칸 5, 6, 23, 24 및 47에 결합한다면, AcSTn 및 GcSTn 둘 다 뿐만 아니라 비-시알릴화 Tn 항원에 결합할 수 있는(따라서 보다 광범위한 특이성을 갖는) "그룹 4" 항체이다. 그룹 4 항체는 도 1D에 큰 타원형으로 나타낸 STn의 부분과 관련되는 것으로 생각된다.

[0707] 실시예 2. 항체 결합의 유동 세포계측-기반 분석

[0708] 유동 세포계측-기반 분석은 세포 표면 항원에의 항체의 결합에 대한 용량-반응 곡선을 규명하기 위해 수행된다. 이러한 분석을 위해, 다양한 세포주가 사용된다.

[0709] MDA-MB-231 세포는 인간 유방암 세포이다. 이들은 10% 태아 송아지 혈청(FCS), 100 μ g/ml 폐니실린, 100 UI/ml 스트렙토마이신 및 45 μ g/ml 젠타마이신으로 보충된 이를 최소 필수 배지에서 성장된다. MCF-7 세포 또한 인간 유방암 세포이며 MDA-MB-231 세포와 동일한 조건하에서 성장된다. (알파-N-아세틸-뉴라미닐-2,3-베타-갈락토실-1,3)-N-아세틸갈락토사마이드 알파-2,6-시알릴트랜스퍼라제 I(GalNAc α 2,6-시알릴트랜스퍼라제 I 또는 ST6GalNAc I)을 과발현시키는 MDA-MB-231(MDA-MB-231-STn, 클론 TAH3.P10) 및 MCF-7 세포(MCF-7 세포에 대해 클론 A12.1)의 안정하게 형질감염된 버전을 또한 이식유전자를 발현하는 세포를 지지하기 위해 1mg/ml의 G418을 부가하는 것을 제외하고는 동일한 조건하에서 배양한다. ST6GalNAc I은 GalNAc를 시알릴화 할 수 있는 효소이다. 과발현의 결과로서, 형질감염된 세포는 높은 수준의 Neu5Ac-STn을 발현한다(참조; Julien, S. et al., Glycoconjugate journal. 2001. 18, 883-93; 이들의 내용은 전문이 본원에 참고로 포함됨).

[0710] E3 세포는 뮤린 유방암 세포이다. 이들을 10% FCS를 갖는 둘베코 E4 배지에서 배양한다. 높은 수준의 Neu5Gc-STn(E3-STn)을 발현하는 E3 세포의 안정적으로 형질감염된 버전을 600 μ g/ml의 G418 및 200 μ g/ml의 히그로마이신과 배양한다. 실험 세포의 성장 및 유지 동안, 트립신을 세포 계대배양(cell passaging)을 위해 사용하지 않는다.

[0711] OV90 및 OVCAR3 세포가 또한 사용된다. 이들은 이전에 기재된 인간 난소암 세포주이다.

[0712] SNU-16 세포가 또한 사용된다. 이들은 낮은 수준의 STn을 발현하는 위암 세포주이다.

[0713] 분석을 위해, 세포를 StemPro Accutase (미국 캘리포니아주 칼스바드 소재의 라이프 테크놀로지스(Life Technologies))를 사용하여 수확하고 광 원심분리에 의한 펠렛화 이전에 5% FBS를 포함하는 PBS로 세척한다. 세포 수 및 생존력을 트립판 블루 염료 배제 분석에 의해 결정하고 세포 농도를 5% FBS를 갖는 PBS 중에서 5 x 10⁶개 세포/ml로 조절한다. 50 μ l의 세포를 검정 플레이트의 각 웰에 가한다. 세포를 분석되는 항체 또는 대조 항체의 용액 50 μ l와 합하여 4°C에서 1시간 동안 항온처리한다. 세포를 알로피코시아닌(APC)에 접합된 항-마우스 IgG (알라바마주 베밍햄 소재의 서던 바이오텍(Southern Biotech))의 1:1,500 회석물을 포함하는 5% FBS를 갖는 PBS 100 μ l로 처리하기 전에 5% FBS를 갖는 PBS로 2회 세척하고 펠렛화한다. 세포를 5% FBS를 갖는 PBS 중에서 1:1000로 회석된 요오드화프로파碇(PI) 200 μ l에 세척 및 재현탁시키기 전에 4°C에서 30분 동안 항온처리한다. 그후, 처리된 세포를 유동 세포계측 분석에 적용하고 각 샘플에 대해 10,000회 이벤트를 획득한다.

[0714] 실시예 3. 항체 인간화

[0715] 완전 인간화 중쇄 및 경쇄를 본원에 나타낸 CDR로 설계한다. 현존 항체 구조를 주형으로 사용하여 가변 영역의 단백질 모델을 생성한다. 출발 중쇄 및 경쇄 가변 영역 아미노산 서열의 세그먼트를 완전 인간화 서열에의 포함 가능성을 위해 인간 서열과 비교한다. 일련의 인간화 중쇄 및 경쇄 가변 영역은 T 세포 에피토프를 피하는 것을 목적으로 인간 가변 영역 서열의 세그먼트로부터 전적으로 설계된다. 인실리코 기술에 의해 결정되는 바와 같이 잠재적인 T 세포 에피토프의 발생도가 상당한 변이체 인간 서열 세그먼트는 폐기한다.

[0716] 인간화 중쇄 및 경쇄 가변 영역 유전자는 리가아제 연쇄 반응(LCR)을 사용하여 전장 유전자로 조립된 중복 올리고뉴클레오티드로부터 작제된다. LCR 산물을 중폭시키고 발현 벡터로의 클로닝을 위해 적합한 제한 부위를 가한다. PCR 산물을 중간 벡터로 클로닝하고 서열화에 의해 확인한다.

[0717] 인간 불변 영역을 갖는 완전 인간화 항체를 암호화하는 발현 플라스미드의 적체를 위해, 각 가변 영역에 대한

DNA 서열을 업스트림 시토메갈로바이러스 증식/초기 프로모터/인핸서(CMV IE) + 면역글로불린 신호 서열 및 다운스트림 면역글로불린 불변 영역 유전자 사이의 포유동물 발현 벡터에 삽입한다. 포유동물 세포로의 형질감염을 위해 DNA 샘플을 제조한다.

[0718] 세포주의 생성 및 선도 완전 인간화 항체의 선택을 위해, 중쇄 및 경쇄 플라스미드 DNA 쌍을 포유동물 세포(NS0)로 형질감염시킨다. 인간화 항체를 생산하는 세포주를 확장시키고 항체 샘플을 정제한다. 항체를 일차 및 이차 결합 검정에서 시험하여 선도 항체 후보물질을 결정한다. 3개의 선도 후보물질이 추가의 분석을 위해 사용된다.

실시예 4. 면역원성 시험

[0720] 선도 항체를 건강한 자발적 기증자로부터의 최소 20개 혈액 샘플을 사용하여 EpiScreen (아리조나주 파라다이스 밸리 소재의 안티토프(Antitope)) 전 항체 인간 T 세포 검정에 적용한다. 선도 항체의 면역원성을 출발 항체 가변 영역 및 매치된 인간 불변 영역을 갖는 대조 키메라 항체와 비교한다. 데이터를 임상-단계 생물제제에 대한 EpiScreen 전 단백질 데이터에 대해 벤치마킹한다.

실시예 5. 항체 서열 분석

[0722] 항-글리칸 항체 가변 도메인 서열을 서열 유사성에 대해서 뿐만 아니라 항체 기능, 발현, 안정성 또는 면역원성에 영향을 미칠 수 있는 특징에 대해 분석하였다. 사용되는 항체는 상업적으로 이용 가능하거나 미국 공개 제US2016/0264684호 및 제US2016/0130356호에 기재된 바와 같이 이전에 개발되었으며, 상기 특허의 내용은 전문이 본원에 참고로 포함된다. 분석에서는 중쇄 가변 도메인에 비해 경쇄 가변 도메인에서 더 큰 변동성이 드러났다. 게다가, 항-글리칸 항체의 중쇄 가변 도메인은 하나의 생식계열 유전자, muIGHV1S53으로부터 기원하며, 이 생식계열 유전자는 당업계에 공지된 항-STn 항체와 공유되는 것으로 밝혀졌다: 항체 3F1(SBH Sciences, Natick, MA), 항체 B72.3(참조; Colcher, D. et al., 1981. PNAS. 78(5): 3199-203) 및 항체 CC49(참조; Muraro, R. et al., 1988. Cancer Res. 48: 4588-96). 분석에 기초한 중쇄 CDR 서열의 비교 판점이 아래 표에 나타내어져 있다.

표 13

CDR 서열 중쇄 비교

클론 ID	CDR-H1	서열 번호	CDR-H2	서열 번호	CDR-H3	서열 번호
8C2-2D6	GYTFTDHAIH	105	YISPGNGDIKYNEFKKG	107	SITTSY	114
4G8-1E3	GYIIFTDHAIH	106	YISPGNGDIKYNEFKKG	107	SITTSY	114
2G12-2B2	GYTFTDHAIH	105	YFSPGNDDIKYNEKFGRG	108	SLSTPY	115
5G2-1B3	GYTFTDHAIH	105	YFSPGNDDIKYNEFKV	109	SYGGD	116
5E6-2E7	GYTFTDHAIH	105	YISPGNGDIKYNEFKV	110	SITTPY	117
2C2-2C5	GYTFTDHAIH	105	YISPGNGDIKYNEFKKG	107	SITTPY	117
9F11-1F7	GYTFTDHAIH	105	YISPGNGDIKYNEFKV	110	SITTPY	117
1F6-1C10	GYTFTDHAIH	105	YISPGNGDVKYSERFKKG	137	SLSTPY	115
7D3-2C10	GYTFTDHAIH	105	YFSPGNDDIKYSEKFKKG	138	SITTPY	117
7A5-2G12	GYTFTDHAIH	105	YISPGNDDIKYNEKFKG	113	SITTSY	114
10F4-2A9	GYTFTDHAIH	105	YISPGNGDIKYDEKFKG	139	SITTSY	114
2F4-1E2	GYTFTDHAIH	105	YISPGNGDIKYNEKFKG	107	QLQQGY	140
2C6-2F11	GYTFSDHAIH	136	YISPGNDDIKYNEKFKG	113	SMIGVY	141
6B11-2E3	GYTFTDHAIH	105	YISPGNDDIKYNEKFKG	113	SITTSY	114
3F1	GYTFTDHAIH	105	YISPGNGDIKYNEFKFD	111	SLLALDY	118
CC49	GYTFTDHAIH	105	YFSPGNDDFKYNEKFKG	112	SLNMAY	119
B72.3	GYTFTDHAIH	105	YISPGNDDIKYNEKFKG	113	SYYGH	120
컨센서스	GYTFTDHAIH	105	YISPGNGDIKYNEKFKG	107	SITTSY	114

[0723]

[0724] CDR-H3 서열은 중간 길이(median length)에 비해 + - 1개의 아미노산까지 다르다.

[0725] 흥미롭게도, 표적-특이적 경쇄는 5개의 경쇄 생식계열 패밀리로부터 유도되는 것으로 밝혀졌다: IGKV6, IGKV15, IGKV8, IGKV1 및 IGKV12. 이들 중, 전부는 동일한 CDR-L2 및 CDR-L3 서열 길이를 가졌다. CDR-L1 서열 중의 두 가지 부류가 지속되는 것으로 밝혀졌으며[긴(IGKV8 및 IGKV1) 및 짧은(IGKV6, IGKV15 및 IGKV12)], 이것은 잠재적으로 각 경우에 통일된 위상기하학을 나타낸다.

[0726]

경쇄 CDR 서열의 비교가 하기 표에 나타내어져 있다.

표 14

CDR 서열 경쇄 비교

클론 ID	CDR-L1	서열 번호	CDR-L2	서열 번호	CDR-L3	서열 번호
8C2-2D6	KASENVVTYVS	121	GASNRYT	77	QGQYSYPYT	89
8C2-2D6(V2)	HASQNINVWLS	142	KASNLYT	147	QHDQSYPTY	148
4G8-1E3	HASQHINFWLS	122	KASNLIHT	80	QQDQSYPPYM	103
2G12-2B2	KSSQSLLNRGNHKNYLT	123	WASTRES	85	QNDYTYPPYT	97
5G2-1B3	RASENIYSHLA	124	GATNLAD	79	QHFWGAPFT	91
5E6-2E7	KSSQSLLNSGKTKNYLT	125	WASTRES	85	KNDYSYPPYT	102
2C2-2C5	KASQSVNNNVA	126	YASNRYT	84	QQGYSSPWT	96
1F6-1C10	KSSQSLLNSGNQKSYLT	143	WASTRDS	83	QSDYSYPPYT	95
7D3-2C10	HASQNINVWLS	142	KVSNLHT	88	QQDQSYPPYT	101
7A5-2G12	KASENVVIYVS	144	GASNRYT	77	GGQGYSYPYT	89
10F4-2A9	KASENVVTYVS	121	GASNRYT	77	GGQGYSYPYT	89
2F4-1E2	RSSQLVHSYGNNTYLH	145	KVSNRFS	81	SQNTHVPYT	93
2C6-2F11	RFSQSLVQSNGNNTYLQ	146	KVSNRFC	86	SQSTHAPLT	98
6B11-2E3	KASENVVTYVS	121	GASNRYT	77	GGQGYSYPYT	89
3F1	KASQDVGTNIA	127	SASTRHT	130	QQYSSFPLT	133
CC49	KSSQSLLYSGNQKNYLA	128	WASARES	131	QQYYSYPLT	134
B72.3	RASENIYSNLA	129	AATNLAD	132	QHFWGTPYT	135

[0727]

[0728]

종합하면, 서열 분석은 특이적 경쇄 생식계열 쌍형성과 상응하는 CDR-H3 다양성의 뚜렷한 패턴을 시사한다. 세 개의 서열 그룹[그룹 A(하위그룹 A1 및 A2를 가짐), 그룹 B(하위 B1 및 B2를 가짐) 및 그룹 C]이 이러한 쌍형성에 기초하여 확인되었다. 각 그룹에 속하는 항체의 목록이 하기 표에 나타내어져 있다.

표 15

항체 서열 그룹

클론 ID	경쇄 뮤린 생식계열	서열 그룹
8C2-2D6	IGKV6-20	그룹 A1
7A5-2G12	IGKV6-20	그룹 A1
10F4-2A9	IGKV6-20	그룹 A1
6B11-2E3	IGKV6-20	그룹 A1
2C2-2C5	IGKV6-32	그룹 A1
3F1	IGKV6-32	그룹 A1
4G8-1E3	IGKV15-103	그룹 A2
7D3-2C10	IGKV15-103	그룹 A2
8C2-2D6(V2)	IGKV15-103	그룹 A2
2G12-2B2	IGKV8-19	그룹 B1
5E6-2E7	IGKV8-19	그룹 B1
1F6-1C10	IGKV8-19	그룹 B1
CC49	IGKV8-30	그룹 B1
2F4-1E2	IGKV1-110	그룹 B2
2C6-2F11	IGKV1-110	그룹 B2
5G2-1B3	IGKV12-46	그룹 C
B72.3	IGKV12-46	그룹 C

[0729]

[0730]

그룹 A는 항체 8C2-2D6, 4G8-1E3 및 3F1을 포함한다. 이들 항체는 CDR-H3 길이의 측면에서 모든 다른 항체와는 별개인 3F1(추가의 아미노산을 가져서, 더 긴 루프를 생성함)을 제외하고는 유사한 CDR-H3 서열을 갖는다. 그룹 A 항체는 또한, 특히 CDR 잔기 길이에 있어서 유사성을 갖는 경쇄 CDR을 갖는다.

[0731]

그룹 B는 항체 2G12-2B2 및 CC49를 포함한다. 중쇄 서열의 유사성 중에서, 이들 항체는 CDR-H2에 보존된 F 및 D

잔기를 갖고 CDR-H3에 보존된 L 잔기를 갖는다. 추가로, 그룹 B 항체는 매우 유사한 경쇄 서열을 갖는다.

[0732] 그룹 C 항체는 5G2-1B3 및 B72.3을 포함한다. 이들 중쇄 서열 간의 유사성 중에서, 이들 항체는 이들의 CDR-H2 서열에 보존된 D 잔기를 가질 뿐만 아니라 이들의 CDR-H3 서열에 YYG 모티프를 갖는다. 그룹 C 항체는 또한 매우 유사한 경쇄 서열을 갖는다.

[0733] 제한된 수의 확인된 그룹은 항-STn 결합을 위해 필요한 비교적 드문 서열 특이성을 강조한다. 항체 그룹화는 에피토프 결합에 대한 관련 그룹내 서열-기반 기여의 확인을 촉진시킨다. 특히, 그룹 A 내에서, 3F1은 독특하게도, 새로운 결합 프로파일에 기여할 수 있는 연장된 CDR-H3 루프를 함유한다. 흥미롭게도, 면역조직화학 데이터는 3F1이 내피 세포에의 바람직하지 않은 결합을 포함한 보다 광범위한 표적에 결합할 수 있음을 나타낸다.

실시예 6. 항체 변이체

[0735] 본 발명의 항-글리칸 항체에 대한 가변 도메인 서열을 항체 기능, 발현, 안정성 및/또는 면역원성에 영향을 미칠 수 있는 서열 특징에 대해 분석하였다.

[0736] 분석된 항체 중의 다수는 NG 잔기 쌍을 함유하는 CDR-H2 서열을 가져서, 이들이 아스파라긴 탈아미드화에 민감하게 되며, 가능하게는 시간 경과에 따라 3:1 비의 글루타메이트 및 피로글루타메이트로 전환될 수 있다. 이러한 서열은 돌연변이에 적용되어 NG 잔기 쌍을 SG 또는 QG 쌍으로 전환시켜 이 부위에서 탈아미드화를 방지할 수 있다. 대안적으로, 이러한 항체는 탈아미드화를 감소시키도록 제제화될 수 있다.

[0737] 항체 2B2-2A7 및 5G2-1B3은 이들의 경쇄 가변 도메인에 아스파르테이트 이성질화 부위(DG 아미노산 잔기 쌍에 의해 확인됨)를 가졌다. 이 부위에서의 아스파르트산은 시간 경과에 따라 글루타메이트 및 피로글루타메이트 3:1 비로 전환될 수 있다. 이를 서열은 돌연변이에 적용되어 DG 잔기 쌍을 SG 또는 QG로 전환시켜 이 부위에서 이성질화를 방지할 수 있다. 대안적으로, 이러한 항체는 이성질화를 감소시키도록 제제화될 수 있다.

[0738] 항체 중의 다수는 N-말단 글루타민 잔기를 지닌 중쇄를 갖는다. 이들 서열은 돌연변이에 적용되어 N-말단 글루타민 잔기를 글루타메이트 잔기로 전환시킬 수 있다.

[0739] 응집-경향(aggregation-prone) 패치에 대한 서열 분석으로 5G2-1B3의 CDR-L3에 HFW 세그먼트가 드러났으며, 이것은 항체 응집을 증가시킬 약간의 위험을 지닌다. 이러한 모티프의 변이체로 응집 안정성 연구를 수행하여 응집-경향이 덜한 항체를 확인할 수 있다.

실시예 7. 항체 인간화

[0741] 선도 항체의 인간화 버전을 서열 및 구조 분석을 사용하여 개발하였다. 먼저, 마우스 생식계열 항체 서열을 각 항체에 대해 확인하였다(하기 표 참조).

표 16

항체 마우스 생식계열 서열

항체	VH 마우스 생식계열	VL 마우스 생식계열
4G8-1E3	muIGHV1S53	muIGKV15-103
5G2-1B3	muIGHV1S53	muIGKV12-46
2G12-2B2	muIGHV1S53	muIGKV8-19
8C2-2D6	muIGHV1S53	muIGKV6-20
3F1	muIGHV1S53	muIGKV6-23

[0743] 그후, 항체 가변 도메인 서열을 인간 프레임워크 서열과 비교하여 상동성에 의해 CDR 이식에 적합한 인간 프레임워크 서열을 확인하였다. 가변 도메인의 도식이 도 2에 나타내어져 있으며, 이는 CDR에 관하여 항체 가변 도메인 프레임워크 영역[프레임워크 영역 1 (FR1), 프레임워크 영역 2 (FR2), 프레임워크 영역 3 (FR3) 및 프레임워크 영역 4 (FR4)]의 레이아웃을 입증한다. 하기 표는 항체 4G8-1E3, 5G2-1B3, 2G12-2B2, 8C2-2D6 및 3F1의 상응하는 프레임워크 영역을 대체하도록 선택된 인간 프레임워크 또는 인간 컨센서스 서열을 나타낸다. 인간 컨센서스 1 중쇄의 FR4는 아미노산 서열 WGQGTLTVSS(서열번호 215)에 상응하고 인간 컨센서스 1 경쇄의 FR4는 아미노산 서열 FGQGTTKVEIK(서열번호 216)에 상응한다.

표 17

선택된 인간 프레임워크 영역

mAb	쇄	FR1	CDR1 (서열번호)	FR2	CDR2 (서열번호)	FR3	CDR3 (서열번호)	FR4
4G8-1E3	VH	IGHV1 -18*01	106	IGHV1 -18*01	107	IGHV1 -18*01	114	인간 컨센서스 1, 중쇄
4G8-1E3	VL	IGKV1 -39*01	122	IGKV1 -39*01	80	IGKV1 -39*01	103	인간 컨센서스 1, 경쇄
5G2-1B3	VH	IGHV1 -18*01	105	IGHV1 -18*01	109	IGHV1 -18*01	116	인간 컨센서스 1, 중쇄
5G2-1B3	VL	IGKV1 -39*01	124	IGKV1 -39*01	79	IGKV1 -39*01	91	인간 컨센서스 1, 경쇄
2G12-2B2	VH	IGHV1 -18*01	105	IGHV1 -18*01	108	IGHV1 -18*01	115	인간 컨센서스 1, 중쇄
2G12-2B2	VL	IGKV4 -1*01	123	IGKV4 -1*01	85	IGKV4 -1*01	97	인간 컨센서스 1, 경쇄
8C2-2D6	VH	IGHV1 -18*01	105	IGHV1 -18*01	107	IGHV1 -18*01	114	인간 컨센서스 1, 중쇄
8C2-2D6	VL	IGKV1 -39*01	121	IGKV1 -39*01	77	IGKV1 -39*01	89	인간 컨센서스 1, 경쇄
8C2-2D6	VL (V2)	IGKV1 -39*01	142	IGKV1 -39*01	147	IGKV1 -39*01	148	인간 컨센서스 1, 경쇄
3F1	VH	IGHV1 -18*01	105	IGHV1 -18*01	111	IGHV1 -18*01	118	인간 컨센서스 1, 중쇄
3F1	VL	IGKV1 -39*01	127	IGKV1 -39*01	130	IGKV1 -39*01	133	인간 컨센서스 1, 경쇄

[0744]

[0745]

역-교배하여 항체 결합 또는 기타의 특성들을 개선시킬 수 있는 잔기를 확인하기 위해 추가의 분석을 수행하였다. 이러한 분석에 기초하여, 몇 가지 인간화 VL 및 VH 서열을 합성 및 시험을 위해 설계하였다. 이들은 하기 표에 나타낸 가변 도메인 서열을 포함한다. 표에는, VH 또는 VL 도메인이 나타내어져 있고, 그 다음의 숫자는 변이체 수(variant number)를 나타낸다. 숫자 "0"을 갖는 도메인은 어떠한 복귀-돌연변이도 없는 인간화 서열을 나타낸다.

표 18

인간화 가변 도메인

mAb	체	서열	서열 번호
5G2-1B3	VL0	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASENIYSHLAWYQ QKPGKAPKLLIYGAATNLADGVPSRFSGSGBTDFTLT ISSLQPEDFATYYCQHFWGAPFTFGQQGTKEIK	217
5G2-1B3	VL1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASENIYSHLAWYQ QKPGKAPKLLVYGAATNLASGVPSRFSGSGBTDFTL TISSLQPEDFATYYCQHFWGAPFTFGQQGTKEIK	218
5G2-1B3	VL2	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASENIYSHLAWYQ QKPGKAPKLLVYGAATNLADGVPSRFSGSGBTDFTL TISSLQPEDFATYYCQHFWGAPFTFGQQGTKEIK	219
5G2-1B3	VH0	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDHAIH WVRQAPGQGLEWMGYFSPGNDDIKYNEKFKVVRT MTTDTSTSTAYMELRSLSRSDDTAVYYCARSYYGDW GQGTLVTVSS	220
5G2-1B3	VH1	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDHAIH WVRQAPGQGLEWMGYFSPGNDDIKYNEKFKVVRT MTADKSSSTAYMELRSLSRSDDTAVYFCKRSYYGDW GQGTLVTVSS	221
5G2-1B3	VH2	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDHAIH VRQAPGQGLEWIGYFSPGNDDIKYNEKFKVRLTAA DKSSSTAYMELRSLSRSDDTAVYFCKRSYYGDWGQG TLVTVSS	222
5G2-1B3	VH3	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDHAIH WVRQAPGQGLEWMGYFSPGNDDIKYNEKFKVVRT MTADKSSSTAYMELRSLSRSDDTAVYFCKRSYYGDW GQGTLVTVSS	223
5G2-1B3	VH4	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDHAIH VRQAPGQGLEWIGYFSPGNDDIKYNEKFKVRLTAA DKSSSTAYMELRSLSRSDDTAVYFCKRSYYGDWGQG TLVTVSS	224
4G8-1E3	VL0	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQHINFWSWY QKPGKAPKLLIYKASNLHTGVPSRFSGSGBTDFTL TISSLQPEDFATYYCQCDQSYPYMFQGQGTKEIK	225
4G8-1E3	VL1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQHINFWSWY QKPGKIPKLLIYKASNLHTGVPSRFSGSGBTDFTL TISSLQPEDFATYYCQCDQSYPYMFQGQGTKEIK	226
4G8-1E3	VL2	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQHINFWSWYQ QKPGKIPKLLIYKASNLHTGVPSRFSGSGBTDFTL SSLQPEDVATYYCQCDQSYPYMFQGQGTKEIK	227
4G8-1E3	VL3	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQHINFWSWY QKPGKIPKLLIYKASNLHTGVPSRFSGSGBTDFTL TISSLQPEDFATYYCQCDQSYPYFFGQQGTKEIK	228
4G8-1E3	VL4	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQHINFWSWYQ QKPGKIPKLLIYKASNLHTGVPSRFSGSGBTDFTL SSLQPEDVATYYCQCDQSYPYFFGQQGTKEIK	229
4G8-1E3	VH0	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDHAIH WVRQAPGQGLEWMGYFSPGNDDIKYNEKFGRVT MTTDTSTSTAYMELRSLSRSDDTAVYYCARSITTSYW GQGTLVTVSS	230

[0746]

4G8-1E3	VH1	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYIFTDHAIH WVRQAPQGLEWMGYISPNGNDIKYNEKFGRVT MTADKSSSTAYMELRSLSRSDDTAVYFCKRSITTSYW GQGTLTVSS	231
4G8-1E3	VH2	QVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYIFTDHAIH VROAPGQGLEWIGYISPNGNDIKYNEKFGRATLTA DKSSSTAYMHLRSLSRSDDTAVYFCKRSITTSYWQG TLTVSS	232
4G8-1E3	VH3	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYIFTDHAIH VRQAPGQGLEWMGYISPNGNDIKYNEKFGRVTM ADKSSSTAYMELRSLSRSDDTAVYFCKRSITTSYWQG GTLTVSS	233
4G8-1E3	VH4	EVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYIFTDHAIH VRQAPGQGLEWIGYISPNGNDIKYNEKFGRATLTA DKSSSTAYMHLRSLSRSDDTAVYFCKRSITTSYWQG TLTVSS	234
2G12-2B2	VL0	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNRGNHK NYLTWYQQKPGQPKLLIYWA STRESGVPDFRGSGSG SGTDFLTISLQAEDVA VYYCQN DYTYPYTFQQGT KVEIK	235
2G12-2B2	VL2	DIVMTQSPDSLAVSLGERAVTMSCKSSQSLLNRGNHK NYLTWYQQKPGQPKLLIYWA STRESGVPDFRGSGSG SGTDFLTISLQAEDVA VYYCQN DYTYPYTFQQGT KVEIK	236
2G12-2B2	VH0	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYFTDHAIH WVRQAPQGLEWMGYFSPGNDIKYNEKFGRVT MTTDSTSTAYMELRSLSRSDDTAVYFCRSLSTPYW GQGTLTVSS	237
2G12-2B2	VH1	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYFTDHAIH WVRQAPQGLEWMGYFSPGNDIKYNEKFGRVT MTADKSSSTAYMELRSLSRSDDTAVYFCRSLSTPYW GQGTLTVSS	238
2G12-2B2	VH2	QVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYFTDHAIH VRQAPGQGLEWIGYFSPGNDIKYNEKFGRVT DKSSSTAYMELRSLSRSDDTAVYFCKRSLSTPYW GQGTLTVSS	239
2G12-2B2	VH3	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYFTDHAIH WVRQAPGQGLEWMGYFSPGNDIKYNEKFGRVT MTADKSSSTAYMELRSLSRSDDTAVYFCKRSLSTPYW GQGTLTVSS	240
2G12-2B2	VH4	EVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYFTDHAIH VRQAPGQGLEWIGYFSPGNDIKYNEKFGRVT DKSSSTAYMELRSLSRSDDTAVYFCKRSLSTPYW GQGTLTVSS	241
8C2-2D6	VL0	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTTCKASENVVTVWSY QQKPGKAPKLLIYGANRRTGVPSRFSGSGSGTDFL TISSLQPEDFATYYCGQGYSPYTFGQGTKEIK	242
8C2-2D6	VL1	NIQMTQSPSSLSASVGDRVTTCKASENVVTVWSY QQKPGKAPKLLIYGANRRTGVPSRFSGSGSATDFL TISSLQPEDFATYYCGQGYSPYTFGQGTKEIK	243
8C2-2D6	VL2	NIVMTQSPSSMSMSVGDRVTTCKASENVVTVWSY YQQKPGKSPKLLIYGANRRTGVPSRFSGSGSATDFL TISSVQPEDLATYHCGQGYSPYTFGQGTKEIK	244
8C2- 2D6(V2)	VL0	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTTCHASQNINVWLSWY QQKPGKAPKLLIYKASNLYTGVP SRFSFGSGSATDFL TISSLQPEDFATYYCQHDQSYPYTFGQGTKEIK	245
8C2-	VL1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTTCHASQNINVWLSWY	246

[0747]

2D6(V2)		QQKPGKIPKLLIYKASNLYTGVPSRSGSGSGTGFTL TISSLOPEDFATYYCQHDQSYPYTFGQGTKEIK	
8C2- 2D6(V2)	VL2	DIQMTQSPSSLASAVGDRITITCHASQNINVWLSWYQ QKPGKIPKLLIYKASNLYTGVPSRSGSGSGTGFTLTI SSLQPEDFATYYCQHDQSYPYTFGQGTKEIK	247
8C2- 2D6(V2)	VL3	DIQMNQSPSSLASAVGDRITITCHASQNINVWLSWYQ QKPGKIPKLLIYKASNLYTGVPSRSGSGSGTGFTLTI SSLQPEDFATYYCQHDQSYPYTFGQGTKEIK	248
8C2-2D6	VH0	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKCASGYTFTDHAIH WVRQAPGQGLEWMGYISPGNGDIKYNEKFGRVT MTTDTSTSTAYMELRSLSRSDDTAVYYCARSITTSYW GQGTIVTVSS	249
8C2-2D6	VH1	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKCASGYTFTDHAIH WVRQAPGQGLEWMGYISPGNGDIKYNEKFGRVT MTADKSSTTAYMELRSLSRSDDTAVYFCKRSITTSYW GQGTIVTVSS	250
8C2-2D6	VH2	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKCASGYTFTDHAIHW VRQAPGQGLEWMGYISPGNGDIKYNEKFGRATLTA DKSSTTAYMELRSLSRSDDTAMYFCKRSITTSYWQGQ TLTVSS	251
8C2-2D6	VH3	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKCASGYTFTDHAIH WVRQAPGQGLEWMGYISPGNGDIKYNEKFGRVTM TADKSSTTAYMELRSLSRSDDTAVYFCKRSITTSYW QGTIVTVSS	252
8C2-2D6	VH4	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKCASGYTFTDHAIHW VRQAPGQGLEWMGYISPGNGDIKYNEKFGRATLTA DKSSTTAYMELRSLSRSDDTAMYFCKRSITTSYWQGQ TLTVSS	253

[0748]

[0749] 전 항체의 초기 발현 및 시험을 위해 가변 도메인 쌍을 선택하였다. 5G2-1B3에 대해 선택된 쌍 중에는 VL0과 VH0(복귀-돌연변이 없음); VL1과 VH1; VL1과 VH2; VL2와 VH1; VL2와 VH2; 및 VL1과 VH3이 있다. 4G8-1E3에 대해 선택된 쌍 중에는 VL0과 VH0(복귀-돌연변이 없음); VL1과 VH1; VL1과 VH2; VL2와 VH1; VL2와 VH2; VL1과 VH3; VL3과 VH1; 및 VL3과 VH3이 있다. 2G12-2B2에 대해 선택된 쌍 중에는 VL0과 VH0(복귀-돌연변이 없음); VL0과 VH1; VL0과 VH2; VL2와 VH1; VL2와 VH2; 및 VL0과 VH3이 있다. 8C2-2D6에 대해 선택된 쌍 중에는 VL0과 VH0(복귀-돌연변이 없음); VL1과 VH1; VL1과 VH2; VL2와 VH1; VL2와 VH2; 및 VL1과 VH3이 있다. 8C2-2D6(V2)에 대해 선택된 쌍 중에는 VL0과 VH0(복귀-돌연변이 없음); VL1과 VH1; VL1과 VH2; VL2와 VH1; VL2와 VH2; VL3과 VH2; 및 VL1과 VH3이 있다.

[0750]

3F1 전장 중쇄 아미노산 서열(서열번호 40)을 쌍을 이루지 않은 시스테인 잔기의 존재에 대해 평가하였다. 중쇄의 잔기 80은 IgG의 일부인 경우 쌍을 이루어지 않은 시스테인으로서 확인되었다. 시스테인은 용액 중에 있는 경우 용매에 접근 가능하며 따라서 반응성인 것으로 밝혀졌다. 뮤린 3F1 VH 변이체는 이 잔기(서열번호 40의 잔기 80)를 세린 친기 (QVQLQQSDAELVKPGASVKISKASGYTFTDHAIHWVKQKPEQGLDWIGYISPGNGDIKYNEKFKDKVLTADKSSTASMHLNSLTSEDSAVYFCKRSLL ALDYWGQGTIVTVSS; 서열번호 42)로 치환하도록 설계되었다.

[0751]

인간화 3F1 항체 가변 도메인을 또한 설계하였으며 하기 표에 나타내어져 있다. 표에는, VH 또는 VL 도메인이 나타내어져 있으며, 그 다음의 숫자는 변이체 수를 나타낸다. 숫자 "0"을 갖는 도메인은 어떠한 복귀-돌연변이도 없는 인간화 서열을 나타낸다. 나타낸 모든 VH 변이체는 쌍을 이루지 않은 시스테인 잔기(서열번호 40의 잔기 80)를 세린 잔기 또는 소수성 측쇄를 갖는 아미노산(예컨대, 티로신)으로 치환하도록 설계되었다.

표 19

3F1 변이체 가변 도메인

mAb	쇄	서열	서열 번호
3F1	VL0	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVGTNIAWYQQKPG KAPKLLIYSASTRHTGVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFA TYYCQQYSSFPLTFGQGTKVEIK	254
3F1	VL1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVGTNIAWYQQKPG KAPKVLIVYSASTRHTGVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFA TYFCQQYSSFPLTFGQGTKVEIK	255
3F1	VH0	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYFTTDHAIHWVRQ APGQGLEWMGYISPGNGDIKYNEKFKDRVTMTTDTSTSTA YMELRSLSRSDDTAVYYCARSLLALDYWGQGTLVTVSS	256
3F1	VH1	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYFTTDHAIHWVRQ APGQGLEWMGYISPGNGDIKYNEKFKDRVTMTADKSSSTA YMQLRSLSRSDDTAVYFCKRSLLALDYWGQGTLVTVSS	257
3F1	VH2	QVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYFTTDHAIHWVRQA PGQGLEWIGYISPGNGDIKYNEKFKDRVTLTADKSSSTASM HLRSLRSRSDDTAVYFCKRSLLALDYWGQGTLVTVSS	258
3F1	VH3	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYFTTDHAIHWVRQ APGQGLEWMGYISPGSGDIKYNEKFKDRVTMTADKSSSTA YMQLRSLSRSDDTAVYFCKRSLLALDYWGQGTLVTVSS	259
3F1	VH4	EVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYFTTDHAIHWVRQA PGQGLEWIGYISPGSGDIKYNEKFKDRVTLTADKSSSTASM HLRSLRSRSDDTAVYFCKRSLLALDYWGQGTLVTVSS	260

[0752]

[0753] 전 항체의 초기 발현 및 시험을 위해 가변 도메인 쌍을 선택하였다. 3F1에 대해 선택된 쌍 중에는 VL0과 VH0, VL1과 VH1, VL1과 VH2, VL1과 VH3, VL1과 VH4, VL0과 VH3이 있다.

실시예 8. 인간화 항체의 특성화

[0755]

이전 실시예에 기재된 바와 같이 가변 도메인을 갖는 인간화 IgG1 항체를 발현시키고 MDA-MB-231-STn 세포로의 유동 세포계측-기반 결합 분석; BSM ELISA에 의한 결합 분석; 및 글리칸 어레이 분석을 포함하는 특성화 분석에 적용하였다.

[0756]

유동 세포계측-기반 결합 연구에서, 항체를 형질감염-유도된 STn 발현을 갖거나 갖지 않는 MDA-MB-231 세포에 대한 결합과 비교하여 0 내지 300nM의 농도 범위에 스크리닝하였다. 결합은 항-인간 APC 접합된 이차 항체를 사용하여 결정하였으며 살아있는 세포만이 고려되었다(요오드화프로피odium 음성 케이팅에 기초하여). 샘플당 평균 5,000개 이벤트를 수집하였다. 데이터를 FlowJo 소프트웨어(오레곤주 소재의 애쉬랜드(Ashland))를 사용하여 분석하고, 이에 따라 APC 평균 및 % APC를 수득하였다. 이러한 데이터를 로그 변환시킨 다음 비선형 회귀 모델에 피팅하여 용량 반응 곡선 및 EC₅₀ 결합 정보를 수득하였다. 인간 동종형 IgG1 항체가 동종형 음성 대조군으로서 사용되었다. 표피 성장 인자 수용체(LA22, 매사추세츠주 빌레리카 소재의 EMD 밀리포어(Millipore))가 양성 대조군으로서 사용되었다.

[0757]

BSM ELISA 분석을 위해, 항체를 소 하악선 뮤신(BSM) 코팅된 웰 상에서 0 내지 100nM의 농도 범위에 걸쳐 스크리닝하였다. 웰의 하위세트를 항체 결합 전에 페리오데이터 용액으로 처리하여 말단 시알산 잔기 상에 측쇄를 제거하였다(STn 항원을 파괴). 페리오데이터 및 비-페리오데이터-처리된 웰의 광학 밀도를 구하여 로그 변환한 다음 비선형 회귀 모델에 피팅하여 용량 반응 곡선을 수득하였다. 페리오데이터-처리된 웰로부터 수득된 광학 밀도 값을 비-페리오데이터 처리된 웰로부터 공제하여 페리오데이터-민감성 STn 결합 곡선 및 상응하는 EC₅₀ 값을 수득하였다.

[0758]

글리칸 어레이 분석은 이전에 기재된 바와 같이 수행하였으며 항체를 본원에 기재된 파라미터에 따라 어레이 글리칸 결합 프로파일에 할당하였다.

[0759]

유동 세포계측, ELISA 및 글리칸 어레이 분석으로부터의 결과가 하기 표에 나타내어져 있다.

표 20

항체 특성화 결과

클론 ID	인간화 가변 도메인 쌍	MDA-MB-231-STn 세포 결합 [EC ₅₀ (nM)]	BSM ELISA [EC ₅₀ (nM)]	어레이 글리칸 결합 프로파일
3F1	VL1,VH1	0.3	1.8	그룹 1
3F1	VL1,VH2	0.7	1.4	그룹 1
3F1	VL1,VH4	9.8	6.5	그룹 1
3F1	VL1,VH3	20.1	12.2	그룹 1
2G12-2B2	VL0,VH3	2.0	4.2	그룹 1
2G12-2B2	VL2,VH2	0.6	2.9	그룹 1
2G12-2B2	VL0,VH2	0.8	1.8	그룹 1
2G12-2B2	VL2,VH1	1.4	4.4	그룹 1
2G12-2B2	VL0,VH1	2.1	4.5	그룹 1
5G2-1B3	VL1,VH2	0.1	측정되지 않음	그룹 4
5G2-1B3	VL1,VH3	0.2	측정되지 않음	그룹 4
5G2-1B3	VL2,VH2	0.2	측정되지 않음	그룹 4
5G2-1B3	VL2,VH1	0.3	측정되지 않음	그룹 4
5G2-1B3	VL1,VH1	0.1	측정되지 않음	그룹 4

[0760]

[0761] 시험된 모든 항체는 세포- 및 BSM-관련된 STn에의 결합을 입증하였다. 인간 IgG1 동종형 대조군에서는 결합이 관찰되지 않았다(알라바마주 버밍햄 소재의 서던 바이오테크). 인간화 5G2-1B3 결합은 ELISA 검정에서 페리오데이트 민감성이 아니어서, BSM ELISA에 의해 신뢰할 수 있는 EC₅₀을 구할 수 없었다.

[0762]

특성화 실험의 결과에 기초하여, 각 클론 그룹의 두 개의 항체를 1리터 발현을 위해 선택하였으며 생성된 항체를 동일한 과정에 따라 다시 시험하였다(하기 표에 나타낸 결과 참조).

표 21

1 리터 생산 후 항체 특성화 결과

클론 ID	인간화 가변 도메인 쌍	MDA-MB-231-STn 세포 결합 [EC ₅₀ (nM)]	BSM ELISA [EC ₅₀ (nM)]
3F1	VL1,VH1	0.48	0.86
3F1	VL1,VH2	0.67	0.57
2G12-2B2	VL0,VH3	1.20	0.80
2G12-2B2	VL2,VH2	0.45	1.82
5G2-1B3	VL1,VH2	0.34	측정되지 않음
5G2-1B3	VL1,VH3	1.57	측정되지 않음

[0763]

[0764] 발현된 모든 항체는 세포-관련 및 BSM-관련 STn 결합 둘 다에 대해 2nM 미만의 EC₅₀을 입증하였다.

실시예 9. 항체-약물 접합체로의 인간화 항체의 분석

[0766]

이전 실시예에 기재된 인간화 항체의 항체-약물 접합체(ADC) 버전을 모노메틸 오리스타틴 E(MMAE)와의 접합에 의해 개발하였다. 이것은 항체를 말레이미도카프로일-발린-시트룰린-p-아미노벤질옥시카보닐-모노메틸 오리스타틴 E(MC-g c-PAB-MMAE, 본원엣허는 CL-MMAE라고 함)와 접촉시킴으로써 수행하였다. 생성된 접합물은 말레이미드-시스테인 기반이며, 여기서 항체 쇄간 디설파이드 결합은 TCEP로 환원된 다음 약물의 말레이미드 모이어티에 결합된다.

[0767]

접합된 항체를 Sephadex G50 컬럼 상에서 탈염시켜 잔류 미반응 독소를 제거한 다음 150mM NaCl를 갖는 30mM HEPES pH 7.7 중에서 투석시켰다.

[0768]

그후, ADC 항체를 (부모 또는 STn의 증진된 발현을 위해 형질감염된) MDA-MB-231 세포를 사용하여 ADC 세포독성 검정으로 평가하였다. 부모 세포를 10% FBS, 1x Pen/Strep 및 45µg/ml 젠타마이신으로 보충된 이글 최소 필수 배지(EMEM)에서 성장시켰다. STn 양성 세포는 항생제 선택을 위해 1mg/mL G418을 추가하는 것을 제외하고는 동일한 배지에서 성장시켰다. 세포를 상기한 적당한 배지를 사용하여 96 웰 플레이트에서 별도로 시딩하였다(부모 세포의 경우 4,000개 세포/웰 또는 STn 양성 세포의 경우 2,000/웰). 세포를 밤새 성장시켰다. 16-20시간 후,

세포를 72시간 동안 다양한 농도의 시험 항체로 삼중으로(50nM 내지 0.012nM) 처리하였다. 그후, 세포를 ADC CELLTITER-GLO® 발광성 세포 생존력 검정 키트(위스콘신주 매디슨 소재의 프로메가(Promega))를 사용하여 분석하여, 대사 활성 세포의 지표인 존재하는 ATP의 양을 구하였다. 검정은 혈청-보충된 배지에서 배양된 세포에 직접 첨가되는 단일 시약을 사용한다. 시약은 세포를 용해시키며 존재하는 ATP의 양에 비례하는 발광 신호를 생성한다. 발광 신호를 분석하고, STn 양성 세포를 사멸시키는 이들의 능력에 기초하여 사용된 각 항체에 대한 IC₅₀ 값을 계산하는데 사용하였다(하기 표 참조).

표 22

인간화 ADC 항체에 대한 IC₅₀ 값

인간화 항체	IC ₅₀ (nM)
3F1, VL1,VH1	1.30
3F1, VL1,VH2	1.04
5G12-1B3, VL1,VH2	2.58
5G12-1B3, VL1,VH3	7.89
2G12-2B2, VL0,VH3	7.55
2G12-2B2, VL2,VH2	5.17

[0769]

[0770] 시험된 모든 항체는 STn 발현 세포를 사멸시키는 각각에 대한 강력한 능력을 나타내는 단일 나노몰 범위의 IC₅₀ 값을 입증하였다.

실시예 10. MDA-MB-231 이종이식 모델 연구

[0772] 이종이식 모델 연구는 생체내 인간화 ADC 항체를 시험하기 위해 수행한다. 암성 세포의 피하 주사를 통해 마우스에서 종양을 유도한다. 주사에 사용되는 암성 세포는 다음으로부터 선택된다: (1) STn의 발현을 유도하도록 형질감염된 세포(MDA-MB-231 STn+ 세포), (2) 표면 상에 STn을 자연적으로 발현하는 암 세포주 및 (3) 원발성 인간 환자 종양으로부터 채취된, 환자-유도된 종양 세포.

[0773] 환자 종양 세포를 사용한 모델은 다른 모델보다 인간 종양 생물학을 보다 충실히 복제하고 약물 반응을 보다 양호하게 예측할 수 있다. 몇몇 실험에서, 환자 종양 세포는 결장직장 암 환자로부터 유도된다. 몇몇 실험에서, 환자 종양 세포는 RNA 서열 데이터베이스를 검색한 후 선택되어 ST6GalNAc I을 발현하는 세포를 확인한다. 몇몇 실험에서, 환자 종양 세포는 항-STn 항체를 사용한 면역염색 또는 유동 세포계측 분석에 의해 평가되는 바와 같이 STn의 발현에 기초하여 선택된다.

[0774] 일단 종양 세포가 연구용 마우스에 주사되면, 목적하는 종양 체적(전형적으로 약 175mm³ 내지 약 225mm³)에 도달 할 때까지 종양이 발달되도록 한다. 이 시점에서, 마우스를 처리군으로 분리한다. 그후, 마우스를 인간화 MMAE-접합된 항체, 비관련 대조 항체 또는 네이키드(비-접합된) 항체 대조군을 포함하는 조성물로 처리한다. 용량은 마우스 체중 킬로그램당 약 1 내지 약 20mg의 항체를 전달하기에 충분하다. 마우스는 단일 용량 또는 다중 용량(예컨대, 3주 동안 매주 한번)를 제공받는다. 처리 동안, 마우스를 체중 및 종양 체적의 변화에 대해 모니터링 한다. 인간화 ADC 항체로 치료된 마우스에서의 종양 체적은 약 20 내지 100%까지 감소된다.

실시예 11. 조직 연구

[0776] 인간화 항체를 비오틴으로 직접 표지화하거나 항-인간 IgG 비오틴 표지된 이차 항체와 예비-착화시킨다. 포르말린-포정되고 파라핀 매립된 조직 마이크로어레이 조직 부분을 탈-파라핀화하고, 재수화시키고, 비오틴화 항체 또는 항체 복합체로 처리하기 전에 항원 회복에 적용한다. 조직에의 항체 결합을 VECTASTAIN™ ABC 키트(캘리포니아주 벌링 게임 소재의 벡터 래버토리스(Vector Laboratories))를 사용하여 검출하여 시각 침전물을 생성한다. 헤마톡실린으로 대조염색한 후, 슬라이드를 염색 강도, 빈도 및 국소화에 대해 맹검 방식(blinded fashion)으로 현미경으로 스코어링한다. 각각의 후보 항체에 대해, 60개 샘플(30개의 기관 또는 기관의 하위영역에 대해 각각 2명의 인간 공여자)을 함유하는 정상 조직 마이크로어레이(AC1, 대한민국 서울 소재의 수퍼 바이오 칩스(Super Bio Chips))를 사용하여 정상 조직 결합을 평가한다. 118개 공여자 종양 샘플을 함유하는 인간 암 조직 마이크로어레이(MA2 및 MA4, 대한민국 서울 소재의 수퍼 바이오 칩스)를 암성 조직에 대한 항체 결합을 평가하기 위해 시험한다. 총 13개의 여러 공통 종양 타입을 전체적으로 시험하며, 각 종양 타입에 대해 다수의 하위 분류 주석을 캡처한다. 인간화 항체는 정상 조직 부분에서는 세포에 최소로 결합하거나 전혀 결합하지 않으면서

인간 암 조직 부분에서는 (췌장 및 결장직장 암 세포를 포함한) 암성 세포에 결합한다.

[0777] 실시예 12. 시험관내 생존력 검정

[0778] 실험은 본질적으로 STn을 발현하는 암 세포주(예컨대, 췌장 및 결장직장 세포주)를 확인하기 위해 실시한다. 시험된 세포주에는 결장직장 암 세포주[예컨대, LS180 (CL-187), COLO205 (CL-222), TB4 (CCL-248), HT29 (HTB-38), RKO (CRL-2577), SW480 (CCL-228) 및 SNU-C2A (CCL-250.1) 세포주] 및 췌장 세포주[예컨대, Panc-1 (CRL-1469), CFPAC1 (CRL-1918), HPAC (CRL-2119), ASPC1 (CRL-1682), BXPC3 (CRL-1687), CPAN1 (HTB-79) 및 HPAFII (CRL-1997) 세포주]가 있다.

[0779] 유동 세포계측을 사용하여 STn 발현을 평가한다. 항-STn 항체를 시험되는 세포주로부터의 세포와 합한다. 결합은 APC 접합된 이차 항체를 사용하여 결정하며 살아있는 세포만이 간주된다(즉은 세포는 요오드화프로피дум 음성 게이트를 사용하여 여과 제거함). 샘플당 평균 5,000개 이벤트가 수집된다. 데이터를 FlowJo 소프트웨어(오래온 주 소재의 애쉬랜드)를 사용하여 분석하고 이에 따라 APC 평균 및 % APC를 수득한다. 정상 IgG1 항체를 동종형 대조군으로서 사용한다. STn을 발현하는 세포주를 확인한다. 유동 세포계측을 STn을 발현하는 것으로 밝혀진 세포주를 사용하여 인간화 항체로 반복한다. 인간화 항체는 STn-발현 암 세포주에 결합하는 것으로 발견된다.

[0780] 세포 생존력 연구는 확인된 STn-발현 암 세포주로 수행한다. 인간화 항체를 사용하여 MMAE와 접합된 ADC 항체를 형성한다. 세포를 인간화 ADC 항체로 처리하고 각 세포주에 대해 IC₅₀ 값을 계산한다. 시험된 인간화 ADC 항체는 시험된 STn-발현 암 세포주를 사멸시키는데 효과적이다.

[0781] 실시예 13. 조직 교차-반응성 연구

[0782] 조직 교차-반응성(TCR) 연구는 비임상 안전성 시험에 사용되는 인간 및 관련 종에 대한 항체의 결합 프로파일(온- 및 잠재적인 오프-표적 결합 둘 다)을 평가하기 위해 수행된다. 초기 특성화 및 최적화를 위해, 예비 TCR 연구를 수행하여 인간 조직(정상 대 암성)에서 인간화 선도 ADC 항체의 염색 패턴을 평가한다. 선도 후보물질은 특정 암 세포는 염색되고 정상 세포는 전혀 염색되지 않거나 최소로 염색되는 최적의 염색 프로파일을 입증한다.

[0783] 인간, 마우스, 랫트 및 시노몰구스 원숭이 정상 조직 패널(예컨대, 뇌, 결장, 심장, 간, 폐, 췌장, 소장, 비장 및 위)의 동결절단부분(Cryosection)을 항-STn 항체 결합에 대해 프로빙한다. 인간 췌장 종양 내의 암종 세포가 양성 대조 조직으로서 사용되고 동일 조직 내의 간질 세포가 음성 대조군으로서 사용된다. 검출은 간접 면역파옥시다제 기술에 이어 ABC 삼원 시스템을 사용하며, 여기서 항-STn 인간화 항체를 조직 항원처리 전에 비오틴화 이차 항체와 예비-착화시킨다. 전체 조직 패널을 염색하기 전에 적당한 항체 농도 및 조건을 결정하기 위해 조직의 제한된 패널로 유효 염색 시험에 착수한다.

[0784] 실시예 14. 독성학 및 약동학 연구

[0785] 독성학 연구는 독성 효과를 갖는 항체를 확인하고 각 항체에 대해 부작용이 관찰되지 않는 수준(no-observed-adverse-effect-level)(NOAEL)을 결정하기 위해 인간화 ADC 항체를 사용하여 랫트에서 수행된다. 마우스는 ADC 항체의 세포독성 성분인 오리스타틴에 내성이기 때문에, 랫트가 적합한 모델이다. 단일 용량 및 다중 용량 연구 둘 다를 1mg/kg, 2.5mg/kg, 또는 5mg/kg 용량을 사용하여 착수한다. 다수의 랫트가 각 처리군에 포함된다. 단일 용량 연구의 경우, 동물 건강 및 체중을 모니터링하고 랫트를 복강내 (IP) 항체 투여후 처리후 72시간 및 처리 후 2주를 포함한 상이한 시점에서 희생시킨다. 다중 용량 연구의 경우, 랫트는 0일, 2주 및 4주째에 IP 항체 주사를 제공받는다. 이러한 연구에서, 랫트 건강 및 체중을 모니터링하고 랫트를 투여 후에 마지막 용량 후 24시간 및 마지막 용량 후 2주를 포함한 상이한 시점에서 희생시킨다.

[0786] 희생시킨 후, 장기(부신, 뇌, 결장, 장, 심장, 신장, 폐, 하악 타액선, 췌장, 비장, 위 및 갑상선)를 수거하고, 혜마톡실린 및 에오신(H&E) 염색 및 병리학적 평가를 위해 포르말린-고정시키고 파라핀-매봉시킨다.

[0787] 시험된 인간화 ADC 항체의 단일 및 다중 용량 투여에 적용된 랫트는 체중 감량 또는 건강상의 부작용의 어떠한 징후도 나타내지 않는다. 장기는 또한 시험된 모든 시점에서 정상으로 보인다.

[0788] 약동학 분석을 위해 사용된 랫트에서, 연구 항체의 혈청 농도 수준을 정량하고 약동학적 모델링을 수행하기 위해 연구 기간 이전에 및 연구 기간 전반에 걸쳐 혈액 샘플을 입수한다. 혈액은 단일 용량 결과 및 다중 용량 연구 설계에 기초하여 투여하기 적어도 24시간 전, 투여후 1일째(투여후 대략 1, 4 및 8시간), 2일째(투여후 대략 24시간), 3일째(투여후 대략 48시간), 4일째(투여후 대략 72시간) 및 투여후 다양한 시간에서 입수한다.

[0789] 혈액 샘플을 응고되도록 하고 원심분리에 의해 혈청을 분리한다. 생성된 샘플을 임상 병리학적 평가(임상 화학, 혈액학 및 응고)에 적용한다. 임상 화학 평가는 나트륨 크레아티닌, 총 단백질, 칼륨, 알칼리성 포스파타제, 트리글리세라이드, 클로라이드, 알라닌 아미노트랜스퍼라제, 총 빌리루빈, 칼슘 아스파르테이트 아미노트랜스퍼라제, 알부민, 무기 인, 글루코스, 글로불린, 우레아, 질소, 콜레스테롤 및 알부민/글로불린 비의 분석을 포함한다. 혈액학 평가는 헤마토크리트, 평균 혈구 혜모글로빈 농도, 혜모글로빈, 망상 적혈구 수(절대 및 상대), 혈소판 수, 적혈구 수, 평균 혈소판 용적, 총 백혈구 수, 평균 혈구 혜모글로빈, 차동 백혈구 수(절대 & 상대), 평균 혈구 용적 및 적혈구 분포 폭의 평가를 포함한다. 응고 분석의 경우, 프로트롬빈 시간 및 활성화 부분 트롬보플라스틴 시간을 결정한다. 임상 병리학적 평가는 인간화 ADC 항체로의 처리로부터 어떠한 부작용도 나타내지 않는다.

실시예 15. 환자-유도된 종양 세포의 평가

[0790] [0791] 실험은 환자-유도된 이종이식(PDX) 세포의 STn 발현 프로파일을 특성화하기 위해 수행된다. 환자-유도된 암 세포를 사용하여, 이전에 기재된 바와 같이 NOD/SCID 마우스에서 종양을 생성한다. 생성된 PDX 종양으로부터의 세포를 제거하고, 해리시키고, STn 발현에 대해 스크리닝한다. 스크리닝은 초기에 면역조직화학(IHC)에 의해 수행한 다음 유동 세포계측 분석에 의해 확인한다. STn의 최상의 발현을 갖는 PDX 종양으로부터의 세포를 연속되는 연구를 위해 선택한다.

[0792] 하나의 연속되는 연구에서, 선택된 PDX 종양으로부터의 세포를 시험관내 배양한다. 일부 배양물을 세포독성제, MMAE와 접합된 본원에 기재된 인간화 항-STn 항체로 처리하여, 항체-약물 접합체(ADC)를 형성한다. 이러한 ADC가 배양된 세포를 사멸시키는 능력을 세포 생존력 검정을 사용하여 결정한다. 연구는 화학요법제의 존재 또는 부재하에서의 이들 배양물의 처리를 비교하기 위해 수행된다. 인간화 항-STn ADC는 STn을 발현하는 PDX 종양으로부터의 세포를 사멸할 수 있다. 세포가 화학요법제로 먼저 처리된 경우, 인간화 항-STn ADC가 이들 세포를 사멸시키는 능력이 향상된다.

[0793] 또 다른 연속되는 연구에서, 선택된 PDX 종양으로부터의 세포를 시험관내 배양하고 화학요법제의 존재 또는 부재하에 처리한다. 화학요법제 처리 전 및 후의 STn 발현을 평가한다. 평가된 세포에서의 STn 발현은 화학요법제 처리 후 증가된다.

실시예 16. OVCAR3 이종이식 모델을 사용하여 항체 시험

[0794] [0795] 생체내 종양 모델에서 암 세포를 감소시키는 인간화 항-STn 항체의 효능을 평가한다. NOD/SCID 마우스에게 Matrigel®(뉴욕주 코닝 소재의 코닝 라이프 사이언시즈) 혼탁액 중의 5×10^5 개 OVCAR3 세포를 주사하여 OVCAR3 종양 형성을 유도한다. 일단 마우스가 175–225mm³ 범위의 종양 체적을 나타내면, 이들을 필수적으로 등 가의 그룹 평균 종양 체적을 갖는 그룹들로 무작위화한다. MMAE 접합체, 동종형 대조 항체, 또는 비히클 대조군 [20mM 시트레이트(pH 5.5) 및 150mM NaCl]을 갖는 인간화 항-STn 항체를 2.5mg/kg의 용량으로 투여하고 마우스를 처리 후 4주간(또는 종양 크기가 $\geq 1000\text{mm}^3$ 의 종점 체적에 도달할 때까지) 매주 2회 종양 체적 및 체중의 변화를 모니터링한다. 그후, 종양을 추출하고 생존 가능한 종양 세포의 존재 및 STn 발현에 대해 평가한다. 종양 체적을 억제 또는 감소시키고; 암 세포 수 및/또는 종양에서의 STn 발현을 감소시킬 수 있는 항체를 확인하고 추가의 연구에 사용한다.

실시예 17. 단일 항체 처리 후 PDX 샘플의 평가

[0796] [0797] 실험은 상이한 항체 용량에서 항-STn 항체 요법에 대해 상이한 특징을 갖는 PDX 모델의 반응성을 비교하기 위해 실시된다. 계대배양된 난소 암종 PDX 종양으로부터의 완만 동결된 조직을 NOD/SCID 마우스에 이식하여 16주에 걸쳐 이러한 마우스에서 PDX 종양을 생성한다. 종양을 수거하고 25마리 NOD/SCID 마우스에 재주사하여 12주에 걸쳐 PDX 종양을 생성한다. 생성된 종양을 다시 수거하고 52마리 NOD/SCID 마우스에 재주사하여 12주 동안 종양이 형성되도록 한다. 그후, 이러한 마우스를 2.5mg/kg 또는 5mg/kg 용량의 (MMAE와 접합된) 인간화 항-STn 항체; 동종형 대조 항체; 또는 비히클 대조군[20mM 시트레이트(pH 5.5) 및 150mM NaCl]의 복강내 주사로 처리한다. 마우스 체중 및 종양 체적의 변화를 처리 후(또는 종양 크기가 $\geq 1000\text{mm}^3$ 의 종점 체적에 도달할 때까지) 매주 2회 모니터링한다. 그후, 종양을 추출하고 종양 세포 생존력 및 STn 발현에 대해 유동 세포계측을 사용하여 평가한다. 항-STn 항체 처리에 반응성인 PDX 종양을 확인한다.

실시예 18. PDX 종양의 다중-용량 처리

[0799] 인간화 항-STn 처리에 대해 입증된 반응성을 갖는 PDX 종양으로부터의 세포를 다중-용량 항체 처리 연구에서 사용하기 위해 선택한다. 계대배양된 난소 암종 PDX 종양으로부터의 완만 동결된 조직을 NOD/SCID 마우스에 이식하여 16주에 걸쳐 이러한 마우스에서 PDX 종양을 생성한다. 종양을 수거하고 25마리 NOD/SCID 마우스에 재주사하여 12주에 걸쳐 PDX 종양을 생성한다. 생성된 종양을 다시 수거하고 52마리 NOD/SCID 마우스에 재주사하여 12주 동안 종양이 형성되도록 한다. 그후, 이러한 마우스를 5mg/kg 용량의 (MMAE와 접합된) 인간화 항-STn 항체; 동종형 대조 항체; 또는 비히클 대조군[20mM 시트레이트(pH 5.5) 및 150mM NaCl]의 복강내 주사로 4주 동안 매주 처리한다. 마우스 체중 및 종양 체적의 변화를 처리 후(또는 종양 크기가 $\geq 1000\text{mm}^3$ 의 종점 체적에 도달할 때까지) 매주 2회 모니터링한다. 그 후, 종양을 추출하고 종양 세포 생존력 및 STn 발현에 대해 유동 세포계측을 사용하여 평가한다. 항-STn 항체 처리에 반응성인 PDX 종양을 확인한다. MMAE-접합된 인간화 항-STn 항체가 종양 체적을 감소시키는데 가장 효과적이다.

실시예 19. 교차-반응성, 독성학

[0800] 교차-반응성 연구는 조직 패널을 사용한 면역조직화학적 염색에 의해 인간, 시노 및 랫트 대상체 간의 인간화 항-STn 항체의 교차-반응성을 알아보기 위해 실시된다. 인간화 항-STn 항체는 시노 및 랫트 대상체 둘 다와 교차 반응하는 것으로 밝혀진다. 추가의 독성학적 연구는 인간화 항-STn 항체의 독성을 평가하기 위해 랫트에서 실시된다. 평가는 사망률/발병률, 임상적 관찰, 체중, 식량 소비, 체온, 국소 자극 및 안과학(ophthalmology)과 같은 수명 예측을 포함한다. 인간화 항-STn 항체는 10mg/kg 이하의 용량에서 독성이 아닌 것으로 밝혀진다.

실시예 20. 약동학적 연구

[0803] MMAE와 접합된 인간화 항-STn 항체를 2.5mg/kg 또는 5mg/kg의 용량으로 설치류(예컨대, 랫트) 또는 영장류 연구 모델에 투여하여 항체 반감기 및 임상 병리학(예컨대, 임상 화학, 혈액학 및 응고)을 평가한다. 평가는 72시간, 2주 및 4주 시점에서 이루어진다.

[0804] 반감기 분석을 위해, 항체 체액 농도를 항체 투여한지 1시간 후, 4시간 후, 8시간 후, 24시간 후, 48시간 후 및 72시간 후에 구한다.

[0805] 임상 병리학을 위해, 혈액 샘플을 투여(예비시험) 전에 및 투여 후 다수의 시점에서 연구 대상체로부터 수집한다. 임상 화학의 경우, 나트륨 크레아틴, 총 단백질, 칼륨, 알칼리성 포스파타제, 트리글리세라이드, 클로라이드, 알라닌 아미노트랜스퍼라제, 총 빌리루빈, 칼슘 아스파르테이트 아미노트랜스퍼라제, 알부민, 무기 인, 글루코스, 글로불린, 우레아, 질소, 콜레스테롤 및 알부민/글로불린 비를 측정한다. 혈액학의 경우, 헤마토크리트, 평균 혈구 혜모글로빈 농도, 혜모글로빈, 망상 적혈구 수(절대 및 상대), 혈소판 수, 적혈구 수, 평균 혈소판 용적, 총 백혈구 수, 평균 혈구 혜모글로빈, 차동 백혈구 수(절대 & 상대), 평균 혈구 용적 및 적혈구 분포 폭을 구한다. 응고의 경우, 프로트롬빈 시간 및 활성화 부분 트롬보플라스틴 시간을 평가한다.

[0806] 마지막으로, 연구 동물을 안락사시키고 장기(부신, 뇌, 결장, 장, 심장, 신장, 폐, 하악 타액선, 췌장, 비장, 위 및 갑상선)를 수거하고, H&E 염색 및 면허가 있는 병리학자에 의한 병리학적 평가를 위해 포르말린-고정시키고 파라핀-매봉시킨다. 시험된 인간화 항체에 대해 어떠한 부작용도 관찰되지 않는다.

실시예 21. 인간화 항-STn 항체를 생산하는 안정한 세포주

[0808] 생산을 위한 GMP 시설로의 전이에 적합한 안정한 세포주를 생성하여 인간화 항-STn 항체를 생산한다. FREEDOM® pCHO 1.0 벡터(매사추세츠주 월트햄 소재의 씨모 피셔 사이언티픽(Thermo Fisher Scientific))를 사용하여 본원에 나타낸 하나 이상의 가변 도메인을 갖는 인간화 항체를 발현하는 작제물을 생성한다. Gibco FREEDOM® CHO-S® 키트(매사추세츠주 월트햄 소재의 씨모 피셔 사이언티픽)를 사용한 중국 햄스터 난소(CHO) 혼탁 세포로의 형질감염에 의해 작제물을 도입하고 키트 지침서에 따라 세포를 배양하여, 삽입된 작제물의 안정한 발현을 나타내는 퓨로마이신-내성 세포를 선택한다. 생성된 안정한 세포주를 항체 생산 및 저장을 위해 성장시킨다.

실시예 22. 항상된 ST6GalNAc I 발현을 갖는 SKOV3 세포주의 생성

[0810] SKOV3 세포를 ST6GalNAc I 발현 작제물(hST6GalNAc I_pRc-CMV)을 전달하는 렌티바이러스 벡터로 형질도입하였다. 안정한 세포 혼주물을 생성하고 ST6GalNAc I의 다양한 발현을 갖는 6개의 클론[정량적 중합 효소 연쇄 반응(qPCR) 분석으로 측정한 바와 같음]을 선택하였다(하기 표 참조).

표 23

선택된 클론에서 ST6GalNAc I의 발현 수준

클론 ID	ST6GalNAc mRNA 발현 수준 (대조군에 대한 배수 발현 수준)
클론 7	165
클론 8	105
클론 10	15
클론 13	125
클론 15	20
클론 16	30

[0811]

[0812] 클론 7, 8 및 13은 비-형질도입된 세포주에서의 수준과 비교하는 경우 가장 높은 수준의 ST6GalNAc I mRNA를 입증하였다.

실시예 23. 다양한 STn 발현 수준을 갖는 세포를 사용한 이종이식 종양 모델 연구

[0814] 실험은 다양한 수준의 STn 발현을 갖는 이종이식 종양의 반응성을 인간화 항-STn 항체 처리와 비교하기 위해 실시된다. 다양한 수준의 STn 발현을 갖는 종양 세포(즉, STn 발현이 없는 세포, 낮은 수준의 STn 발현을 갖는 세포, 중간 수준의 STn 발현을 갖는 세포 및 높은 수준의 STn 발현을 갖는 세포)가 수득된다. 이들은 ST6GAINAC I 을 과발현하도록 변형된 세포; ST6GalNAc I 발현의 녹다운을 갖는 세포; 및 무 STn 발현, 낮은 발현 수준, 중간 발현 수준, 또는 높은 발현 수준을 갖는 비-변형된 세포를 포함한다. 종양 세포를 NOD/SCID 마우스에 이식하여 종양을 생성한다.

[0815] 그후, 마우스를 인간화 항-STn 항체(접합된 MMAE를 갖거나 갖지 않음); 동종형 대조 항체; 또는 비히클 대조군 [20mM 시트레이트(pH 5.5) 및 150mM NaCl]의 복강내 주사로 8주간 처리한다. 마우스 체중 및 종양 체적의 변화를 처리 후 매주 2회 모니터링한다. 8주 후, 항-STn 항체 치료를 받은 마우스를 무작위화하여 8주 이상 동안 초기 치료법을 계속하거나 8주 동안 비히클 대조군으로 처리한다. 16주 시기의 말기에, 혈청 샘플을 입수하고 종양 세포 생존력 및 STn 발현에 대해 유동 세포계측을 사용하여 평가하기 위해 종양을 추출한다.

[0816] MMAE와 접합된 항-STn 항체는 최고 수준의 항-종양 활성을 야기한다. 무작위화시 항-STn-MMAE 처리의 중단은 종양 재발을 촉진시키는 반면 항-STn-MMAE 항체로의 연장된 치료는 종양 재발을 방지한다.

실시예 24. STn의 발현에 대한 세포주의 스크리닝

[0818] 유방, 결장, 난소, 림프구, 콜수, 위, 췌장, 결장직장, 피부 세포 및 기타 종양 정후 세포주를 STn 발현에 대해 스크리닝한다. 시험되는 세포주는 SNU-16 세포, LS-174T 세포, MC38 세포, COLO205, RKO, HT29, Panc1, HPAC, HPAFII, TOV-112D 세포, TOV-21G 세포, Jurkate E6.1 세포, K-562 세포, B16-F0 세포 및 B16-F10 세포를 포함한다.

[0819] 결장직장 세포주[예를 들면, LS180 (CL-187), COLO205 (CL-222), TB4 (CCL-248), HT29 (HTB-38), RKO (CRL-2577), SW480 (CCL-228) 및 SNU-C2A (CCL-250.1)]가 ST6GalNAcI 발현 및 목적하는 특징(예컨대, 배종 시간, 종양형성성, 화학-내성 및 항원 발현)에 기초하여 스크리닝을 위해 선택된다. 표면 및 효소 발현은 발달 및 분화 세포 성장 조건에 기초하여 상이할 수 있음을 고려하여, STn 발현은 시험관내 및 생체내 성장된 세포 둘 다에 대해 시험한다.

[0820] 세포주를 유동 세포계측에 의해 STn 분석에 적용한다. 인간화 항-STn 항체를 사용하여 STn 발현에 대해 프로빙 하며 인간 동종형 대조군을 음성 대조군으로서 사용한다.

[0821] 각 세포주를 배양물 중에서 증식시키고 상이한 성장 포맷 중에 분포시킨다. 생체내 포맷의 경우, 세포를 MATRIGEL™(뉴욕주 코닝 소재의 코닝 라이프 사이언시즈) 혼탁액[MATRIGEL™과 1:1 (v/v)의 비로 5×10^6 개 세포]으로 NOD/SCID 마우스에 주사하여 이종이식 모델을 생성한다. 200mm^3 , 400mm^3 , 600mm^3 , 또는 1000mm^3 의 평균 종양 체적을 갖는 마우스를 희생시키고 종양을 유동 세포계측에 의한 STn 발현 분석을 위해 및 면역조직화학적

분석을 위한 포르말린-고정 파라핀 매봉을 위해 추출한다.

- [0822] STn 발현을 입증하는 세포가 항-STn 항체의 선택, 특성화 및 시험을 포함하는 추가의 연구를 위해 사용된다. 낮은 STn 발현을 갖거나 STn 발현을 전혀 갖지 않음을 입증하는 일부 세포는 추가의 연구(예컨대, 항-STn 항체의 선택, 특성화 및 시험)에서 사용하기 전에 STn을 발현하도록 형질감염시킨다.

실시예 25. STn-발현 결장직장 세포주에서의 인간화 항-STn 항체 시험

- [0824] 인간화 항-STn 항체를 STn-발현 결장직장 세포주에 내재화하기 위한 이들의 능력에 대해 평가한다. 항-CEA 항체를 양성 대조군으로서 사용한다. CEA는 여러 유형의 결장암 세포의 표면 상에서 발현되는 것으로 알려져 있으며 CEA를 발현하는 다른 세포 유형과 함께 결장직장 세포에 내재화될 수 있다. 항-STn 항체 및 대조군을 제조자의 지침에 따라 ALEXA FLUOR™ 488(매사추세츠주 월트햄 소재의 씨모 피셔 사이언티픽)로 공유적으로 표지화한다. 유동 세포계측을 통해 내재화를 평가하기 전에 항-ALEXA FLUOR™ 488 항체를 사용하여 표면 결합된 항체 신호를 차단한다. 결과는 항-STn 항체가 STn-발현 결장직장 세포주에 의해 내재화됨을 나타낸다.

실시예 26. 방관자 사멸 검정

- [0826] STn-양성 세포를 트랜스웰에 시팅하고, 여기서 STn-저 또는 -음성 발현자가 플레이트의 바닥에 시팅된다. 오직 STn-양성 또는 오직 STn-음성 세포를 갖는 웰이 대조군으로서 포함된다. MMAE 접합체를 갖는 0 내지 300nM 용량의 항-STn 항체를 배양액(뿐만 아니라 독성 대조군으로서 몇몇 웰에 유리 MMAE)에 가하고 STn-저 또는 -음성 발현 세포의 생존력을 프로메가(위스콘신주 매디슨 소재) ADC CELLTITER-GLO® 발광성 세포 생존력 검정 키트를 사용하여 결정하며, 상기 키트는 대사 활성 세포의 지표로서 존재하는 ATP의 양을 결정한다.

- [0827] 결과는 STn 발현 세포가 항-STn MMAE-접합 항체를 내재화함을 나타낸다. 죽어가는 세포가 분해된 유리 MMAE를 방출하고, 이것이 트랜스웰 막을 가로질러 이동하며 비/저-STn 발현 세포에서 독성에 의해 방관자 사멸은 거의 내지는 전혀 관찰되지 않는다

실시예 27. 혈장 안정성 연구

- [0829] 인간화 항-STn 항체의 혈장 안정성을 인간, 시노몰구스 원숭이, 랫트 및 마우스 혈장에서 평가한다. 항체를 시험관내에서 인간, 시노몰구스 원숭이, 랫트 및 마우스 혈장에 찔러 넣은 다음 37°C에서 14일까지 항온처리한다. 혈장 샘플 중의 총 인간화 항체, 인간화 항체 MMAE 접합체 및 유리 MMAE의 농도를 면역검정 및 LC-MS-기반 방법을 사용하여 상이한 날짜에 정량한다. 약물 항체 비(DAR)를 또한 동일한 샘플에서 평가한다. 항체는 혈장에서 비교적 안정하게 남아 있으며 DAR은 연구 과정에 걸쳐 거의 변동없음을 입증한다.

실시예 28. 항체 마이크로어레이를 사용한 STn 함유 단백질의 확인

- [0831] STn 발현을 유도하는 형질감염을 갖거나 갖지 않는 암 세포(MDA MB 231)를 사용하여 STn 클리코실화를 지닌 단백질을 확인하였다. MDA-MB-231 STn+/-로부터의 조악한 세포 용해물을 인쇄된 항체 마이크로어레이(Rho et. Al, 2013)로 프로빙하였다. 각 어레이에는 N-하이드록시설헬신이미드(NHS)-에스테르 반응성 3-D 박막 표면 슬라이드(Nexterion H slide, Schott)를 통해 공유적으로 고정화된 대략 2100개의 독특한 단백질을, 삼중으로, 표적화하는 대략 3500개의 인간-단백질 특이적 항체를 함유한다. 인쇄된 항체의 표적을 암과 관련된 단백질, 신호전달 단백질 및 이전에 확인된 혈장 암 단백질로부터 선택하였다.

- [0832] 동결된 마이크로어레이 슬라이드를 30분간 실온으로 평형화시키고 인산염 완충 염수(PBS) 중의 0.5% Tween20에서 수화시킨 다음 증류수/탈이온수(dd H₂O)로 세척하였다. 그후, 슬라이드를 50mM 봉산나트륨, pH 8 중의 0.3% (v/v) 에탄올아민과 30분 동안에 이어 PBS 중의 1% BSA (w/v), 0.5% Tween 20과 30분 동안 항온처리에 의해 차단하였다. 그후, 어레이를 PBS 중의 0.5% Tween 20에 이어 dd H₂O로 세척하였다. 그후, 어레이를 슬라이드 랙 홀더를 갖는 진동하 물통 회전자(Sorvall Legend RT)에서 500rpm에서 8분 동안 원심분리에 의해 건조시켰다. 어레이의 항체-인쇄된 면적을 커버슬립(mSeries Lifter Slips, 22 X 25 X 1 mm, 씨모 피셔 사이언티픽)으로 덮었다.

- [0833] STn 함유 단백질의 존재를 검출하기 위해, STn+/- 세포를 배양하고 조악한 세포 용해물을 3개의 생물학적 복제물에서 수집하여 샘플을 수득하였다(STn+의 경우 N=3 및 STn-의 경우 N=3). 용해물을 마이크로어레이/커버슬립 접합부에서 슬라이드 상에 페랫팅하고 실온에서 60분 동안 항온처리하였다. 그후, 슬라이드를 PBS 중의 0.5% Tween 20으로 5분 동안 2회 세척하였다. 형광성 시아닌5 염료에 접합된 Siamab의 STn 항체(Hu3F1,L1H1; Hu2G12-2B2,L2H2; Hu5G2-1B3,L1H2 및 Hu3F1,L1H1)와 항온처리 후 STn 함유 당단백질을 검출하였다. 어레이를 PBS 중의 0.5% Tween 20으로 5분 동안 2회 세척한 다음 PBS로 2회(각 5 min) 및 dd H₂O로 1회 세척하고, 이어서

원심분리에 의해 견조시켰다. 신호의 배경 수준을 결정하기 위해, 어레이를 바로 STn 항체(세포 용해물 첨가하지 않음)와 항온처리하고 생성된 신호를 배경 제거(background subtraction)를 위해 사용하였다. 그후, 슬라이드 GenePix 4200A 마이크로어레이 스캐너(Axon Instruments) 상에서 스캐닝하여 적색 (Cy5) 이미지를 생성한다. 스캐닝된 어레이 이미지의 점 형광 강도를 Genepix Pro 6.0 이미지 분석 소프트웨어를 사용하여 입수하였다.

[0834] STn + 및 STn- 조건 사이의 형광 강도(FI)의 차이를 3가지 통계적 방법으로 분석하였다: (1) 효과 크기((평균 FI STn+ 세포 - 평균 FI STn- 세포)/STn- 세포의 표준 편차). >3의 효과 크기가 당해 검정에서 바람직한 것으로 간주된다. (2) p-값. <0.25의 p 값이 당해 검정에서 바람직하다. (3) 비($2^{(\text{Log 평균 FI STn+ 세포}) - \text{Log 평균 FI STn- 세포})}$). > 1.2의 비는 단백질이 STn+ 세포에서 증가됨을 나타내고 <0.8의 비는 단백질이 STn+ 세포에서 감소됨을 시사한다.

[0835] 각 항체는 상이한 결합 특성을 갖는 것으로 보였지만, 상이한 항체들 간의 특정 단백질 결합의 확인이 암에서 시알릴 Tn 함량의 전반적인 상향조절의 강력한 증거였다. 게다가, 공지된 STn 운반체 MUC16 및 MUC1이 당해 검정에서 검출되었다. 상부 35개 히트는 원형질 막(7), 세포외 공간(8), 핵(6) 및 세포질(17)에 위치한 단백질로 구성되었다. 전반적으로, Hu3F1, L1H1이 가장 광범위한 특이성을 가졌으며, 검출된 총 86개 단백질 중 63개에서 상향조절을 검출하였다. 당해 검정에서 Hu3F1, L1H1, Hu2G12-2B2, L2H2, Hu5G2-1B3, L1H2를 사용하여 검출된 STn 글리코실화를 갖는 몇몇 단백질의 예가 아래 표에 열거되어 있다.

표 24

증가된 STn 글리코실화를 갖는 단백질

유전자	세포 위치	Hu3F1 L1H1 p 값	Hu3F1 L1H1 효과 크기	Hu2G12-2B2 L2H2 p 값	Hu2G12-2B2 L2H2 효과 크기	Hu5G2-1B3 L1H2 p 값	Hu5G2-1B3 L1H2 효과 크기
IL10	세포외 공간	0.01	4.11	0.01	6.90	0.00	2.23
SPP1	세포외 공간	0.03	13.76	0.10	2.78	N/D	N/D
LY6D	원형질 막	0.32	2.63	0.24	1.96	0.02	13.19
MUC16	세포막, 분비됨	0.04	2.64	N/D	N/D	0.07	79.10
F5	분비됨, 원형질 막	0.02	5.69	0.04	2.89	0.20	1.59
PDPK1	세포막-말초 세포막 단백질, 세포질	0.08	12.38	0.40	1.36	0.03	7.05
Ihh	세포외 공간	0.15	24.84	0.54	0.93	0.83	0.07
IHH	세포외 공간	0.35	1.32	0.05	3.95	N/D	N/D
IHH	세포외 공간	N/D	N/D	N/D	N/D	0.05	12.07
SMS	세포질	0.10	3.11	0.13	30.82	0.03	7.22
MAPK3	세포질	0.01	6.73	0.11	3.07	0.04	11.96
OAS1	세포질	0.01	4.69	0.05	32.20	0.89	0.28
CRADD	세포질	0.13	1.26	0.17	1.68	0.06	28.19
GRB2	세포질	0.01	5.38	0.14	6.83	0.07	7.23
PRDX6	세포질	0.06	2.48	0.25	9.99	0.19	2.35
PCNA	핵	0.05	2.95	0.19	2.79	0.11	21.73
CUX1	핵	0.06	2.35	0.00	6.74	N/D	N/D

[0836]

[0837] 열거된 모든 단백질들은 적어도 하나의 STn 항체에 대해 친화성을 나타내었으며, 이는 STn 글리코실화의 존재를 시사한다. IHH는 3개의 별도의 엔트리로서 목록에 나타나 있다. 이들은 세 개의 독특한 항체에 의해 IHH에 포획된다. 다음의 단백질들은 두 개의 상이한 항체 클론과 결합을 나타내었다: IL10, SPP1, LY6D, MUC16, F5, PDPK1, SMS, MAPK3, OAS1, CRADD, GRB2, PRDX6, PCNA 및 CUX1, 이것은 이들의 STn 글리코실화를 강력하게 입증한다.

[0838]

이들 중에서 IL10, SPP1, LY6D 및 MUC16은 세포외 또는 세포 막에 편재하며 암 바이오마커로서 미리 연관되었다.

[0839]

IL10: 인터류킨-10은 활성화된 대식세포에 의해 및 도움 T-세포에 의해 생산된 IFN-감마, IL-2, IL-3, TNF 및 GM-CSF를 포함한 다수의 사이토kin의 합성을 억제한다.

[0840]

SPP1: 오스테오폰틴은 리간드, 시알산에 의해 활성화되며, I형 면역력을 위해 필수적이다. 이것은 CD44와 상호

작용할 수 있다. SPP1은 사이토킨으로서 작용하고 인터페론-감마 및 인터류킨-12의 생산을 향상시키고 인터류킨-10의 생산을 감소시킨다.

[0841] MUC16: 뮤신-16 또는 CA-125는 난소암에 대한 알려진 암 바이오마커이다.

[0842] LY6D: 림프구 항원 6D는 B- 및 T-세포 발달 사이의 림프구의 특정화 단계에서 B 세포 특정화 마커(specification marker)로서 작용한다.

[0843] 스크린에 의해 확인된 단백질 중의 일부는 단지 하나의 STn 항체 클론에만 독특하였다. Hu3F1,L1H1과 글리코실화를 나타내는 단백질이 아래 표에 나타내어져 있다.

표 25

Hu3F1,L1H1에 의해 인식된 단백질

유전자	위치	Hu3F1 L1H1 p 값	Hu3F1 L1H1 효과 크기
TLN1	원형질막/ 세포질 측면	0.06	25.27
MUC1	원형질막	0.03	9.00
LIMK2	세포질	0.02	8.78
MAPRE1	세포질	0.03	7.91

[0844]

[0845] TLN1: 탈린-1은 세포골격 구조와 원형질 막 사이의 연결부의 일부이다. TLN1은 암에서의 인과적 역할을 시사하는 마우스 삽입 돌연변이유발 실험에서 이미 확인되었다. TLN1 발현은 암 세포의 침입 및 이동과 상관성이 있다.

[0846] MUC1: 뮤신-1의 베타 하위단위는 포스포릴화 및 단백질-단백질 상호작용을 통해 세포 신호전달에 관여하는 C-말단 도메인을 함유하며, 상기 상호작용을 통해 이것은 중앙 성장을 촉진시킨다. B 세포에서, Muc1은 ERK, SRC 및 NF-카파-B 신호전달 경로를 조절한다. 활성화된 T-세포에 있는 동안, 이것은 Ras/MAPK 경로를 조절한다.

[0847] Hu2G12-2B2,L2H2과 글리코실화를 나타내는 단백질이 아래 표에 나타내어져 있다.

표 26

2G12-2B2,L2H2에 의해 인식된 단백질

유전자	위치	Hu2G12-2B2,L2H2 p 값	Hu2G12-2B2,L2H2 효과 크기
ALDH1A1	세포질	0.01	12.70
ANO1	원형질막	0.02	6.67

[0848]

[0849] ALDH1A1: 망막 데하이드로게나제는 암 줄기 세포 마커이다. 이것은 또한 화학내성에 연관된다.

[0850] ANO1: 아녹타민-1은 상피 통과 음이온 수송에서 역할을 하는 칼슘-활성화된 클로라이드 채널이다. ANO1은 유방 암 세포주 및 원발성 종양에서 증폭되고 고도로 발현된다.

[0851] Hu5G2-1B3,L1H2와 글리코실화를 나타내는 단백질이 아래 표에 나타내어져 있다.

표 27

Hu5G2-1B3,L1H2에 의해 인식된 단백질

유전자	위치	Hu5G2-1B3,L1H2 p 값	Hu5G2-1B3,L1H2 효과 크기
GPC3	원형 질막	0.026	8.69
HAPLN1	세포외 공간	0.003	5.53

[0852]

[0853] GPC3: 글리피칸-3은 헤파란 설레이트를 지닌 세포 표면 프로테오글리칸이다. 이것은 대부분 중배엽 조직 및 장기에서 성장 억제에 관여한다. 항-GPC3 단클론 항체는 마우스에서 항암 활성을 갖는 것으로 나타났다.

[0854]

Hu3F1,L1H1 항체와 STn 글리코실화를 나타내는 단백질을 Mu3F1을 사용한 글리코실화를 나타내는 단백질과 비교하였다. 결과가 아래 표에 나타내어져 있다.

표 28

3F1 항체 비교

유전자	위치	Hu3F1,L1H1 p 값	Hu3F1,L1H1 효과 크기	비율 Mu3F1
COL4A3	세포외 공간	0.062	22.63	1.09
CCR5	원형 질막	0.104	20.55	1.17
SLC30A8	세포질 소포 및 세포막 단백질	0.006	8.26	1.03
CNN1	세포골격	0.015	6.42	1.06
ITSN1	세포내막계	0.007	5.74	1.04
PKM2	세포질, 원형 질막, 및 세포외 공간	0.348	6.59	1.06
LAMB3	세포외 공간	0.116	5.28	1.12
F5	분비된 원형 질막	0.022	5.69	1.14
MUC1	원형 질막	0.028	9.00	1.00
TK1	세포질	0.032	7.59	1.07
SMS	세포질	0.098	3.11	1.04
PRDX6	세포질	0.060	2.48	1.05
CUX1	핵	0.057	2.35	1.07
MEF2C	핵	0.015	8.92	1.04
CCNE2	핵	0.001	10.30	1.05
PCNA	핵	0.050	2.95	1.03

[0855]

실시예 29. 대안적 글리칸 어레이를 사용한 인간화 항체 시험

[0856]

열거된 모든 단백질들은 STn 항체 둘 다에 대해 친화성을 나타내었으며, 이는 STn 글리코실화의 존재를 나타낸다. 이들 중에서 COL4A3, CCR5 및 MUC1은 세포외 또는 세포 막에 편재하며 암 바이오마커로서 미리 연관되었다.

[0857]

COL4A3: 콜라겐 알파-3(IV) 쇄. IV형 콜라겐은 라미닌, 프로테오글리칸 및 엔탁틴/니도겐과 함께 '육각형 철망 구조(chicken-wire)' 그물세공을 형성하는 사구체 기저막(GBM)의 주요 구조 성분이다. 콜라겐 알파 3(IV) NC1 도메인에 상응하는 절단 단편인 톰스타틴은 항-혈관형성 및 항-종양 세포 활성을 갖는다.

[0858]

CCR5: C-C 케모카인 수용체 타입 5는 다수의 염증성 CC-케모카인을 위한 수용체이다. CCR5는 인간 결장직장 암에서 혈액에서 종양 부위로의 T-조절 세포(Treg)의 모집에 관여되었다. 종양 성장은 CCR5/- 마우스에서 지연되며 감소된 종양 Treg 침윤과 연관된다.

[0859]

13개의 화학적으로 합성되고 잘 정의된 글리칸을 갖는 대안적인 글리칸 어레이가 또한 단일 실험에서 다중 글리칸에 대한 항체 친화성 및 특이성을 시험하기 위해 사용되었다. 대안적인 글리칸 어레이는 아래 표에 열거된 Neu5Ac 및 Neu5Gc 글리칸 쌍을 포함한다.

표 29

대안적인 어레이에서의 어레이 글리칸

글리칸 ID 번호	글리칸
1	Neu5Aca6GalNAcaO(CH2)2CH2NH2
2	Neu5Gca6GalNAcaO(CH2)2CH2NH2
3	Neu5Aca6Galβ4GlcNAcβO(CH2)2CH2NH2
4	Neu5Gca6Galβ4GlcNAcβO(CH2)2CH2NH2
5	Neu5Aca6Galβ4GlcβO(CH2)2CH2NH2
6	Neu5Gca6Galβ4GlcβO(CH2)2CH2NH2
7	Neu5Aca6GalβO(CH2)2CH2NH2
8	Neu5Gca6GalβO(CH2)2CH2NH2
9	GalNAcaO(CH2)2CH2NH2
10	Galβ3GalNAcβO(CH2)2CH2NH2
11	Gal3βGalNAcO(CH2)2CH2NH2
12	Neu5Aca3Galβ1-3GalNAcaO(CH2)2CH2NH2
13	Neu5Gca3Galβ1-3GalNAcaO(CH2)2CH2NH2

[0861]

[0862] 폴리아크릴아미드(PAA) 접합된, 인간 혈청 알부민(HAS)-접합된 또는 아민 접합된 당접합체를 글리칸 프로브 제조에 사용하였다. 당접합체를 문헌[Yu, H. et al., 2007. Org Biomol Chem. 5:2458-63, 이들의 내용은 전문이 본원에 참고로 포함됨]에 기재된 방법에 따라 화학효소적으로 합성하였다. 시알로글리칸을 Yu 등에 의해 기재된 바와 같이 "하나의 포트 세 개의 효소(one-pot three-enzyme)" 방법을 사용하여 합성하였다(Yu, H. et al., Nat Protoc. 2006. 1(5): 2485-92, Yu, H. et al., J Am Chem Soc. 2005. 127:17618-9 and Yu, H. et al., 2006. Angew Chem Int Ed Engl. 45:3938-44, 이의 내용은 전문이 본원에 참고로 포함됨). 화합물 구조는 HRMS (ESI) 질량 분광법으로 확인하였다. 각각의 합성된 글리칸의 순도를 HPLC 분석에 의해 평가하고 95% 이상의 순도를 갖는 글리칸 제제만을 사용하였다.

[0863]

어레이를 각 슬라이드에 16개의 서브-어레이 블럭을 갖는 946MP3 마이크로어레이 인쇄 펀(캘리포니아주 써니베일 소재의 어레이잇 코포레이션)이 장착된 NanoPrint LM-60 마이크로어레이어로 에폭사이드-유도체화된 슬라이드(뉴욕주 코닝 소재의 코닝 라이프 사이언시즈) 상에 인쇄하였다. 글리칸 프로브를 샘플당 4개의 복제 웰 및 웰당 8 μ L를 사용하여 384-웰 공급원 플레이트에 분포시켰다. 글리칸 프로브를 인쇄 완충액(300mM 인산염 완충액, pH 8.4) 중에서 글리칸 당 100 μ M의 농도로 제조하였다. 게다가, 링커(O(CH2)2CH2NH2) 단독 및 완충액 단독(300mM 인산염 완충액, pH 8.4)을 네 개의 복제물로 어레이 상에 인쇄하였다. 인쇄 품질을 모니터링하기 위해, 뮤린 IgG 및 인간 IgG를 또한 각 슬라이드(10% 글리세롤을 함유하는 PBS 중의 40 및 20ng/uL, 팬실베니아주 웨스트그로브 소재의 잭슨 이뮤노리서치 래버래토리스(Jackson ImmunoResearch Laboratories)) 상에 인쇄하였다. 어레이를 네 개의 946MP3 펀(5mm 텁, 0.25uL 샘플 채널, 대략 100mm 점 직경, 어레이잇 코포레이션)으로 인쇄하였다. 각 블럭(서브-어레이)은 10개의 행, 8개의 열을 가지며, 점 대 점 간격은 275 μ m이었다. 어레이 챔버의 습도 수준은 인쇄 동안 약 70%로 유지하였다. 인쇄된 슬라이드를 밤새 어레이어 테크 상에 두어, 습도를 주위 수준(40-45%)으로 떨어뜨렸다. 그 후, 슬라이드를 충전하고, 진공을 밀봉하여 실온에서 저장하였다.

[0864]

글리칸 어레이는 다음을 사용하여 검정하였다: Hu2G12-2B2,L0H2, Hu8C2-2D6,L1H1, Hu5G2-1B3,L1H2, Mu2G12-2B2 및 Mu3F1.

[0865]

추가로, 대조 항체 및 렉틴을 또한 어레이에서 글리칸이 공지된 글리칸 결합제에 의해 인식될 수 있는지를 알아보기 위해 어레이 상에서 시험하였다. 이들은 다음을 포함하였다: (a) Gc 함유 글리칸, Neu5Gc α 6GalNAc α O(CH2)2CH2NH2(GcSTn)(글리칸 ID No.2), Neu5Gc α 6Gal β 4GlcNAc β O(CH2)2CH2NH2(글리칸 ID No. 4), Neu5Gc α 6Gal β 4Glc β O(CH2)2CH2NH2(글리칸 ID No. 6), Neu5Gc α 6Gal β O(CH2)2CH2NH2(글리칸 ID No. 8) 및 Neu5Gc α 3Gal β 1-3GalNAc α O(CH2)2CH2NH2(글리칸 ID No. 12) 및 Neu5Gc α 3Gal β 1-3GalNAc α O(CH2)2CH2NH2(글리칸 ID No.13)과 같은 글리칸 함유 (2,3)-결합된 시알산에 결합하는 MAL-II(다辱나무 렉틴 II); (b) Neu5Ac α 3Gal β 1-3GalNAc α O(CH2)2CH2NH2(글리칸 ID No.3), Neu5Gc α 6Gal β 4GlcNAc β O(CH2)2CH2NH2(글리칸 ID No.4), Neu5Ac α 6Gal β 4Glc β O(CH2)2CH2NH2(글리칸 ID No.5) 및 Neu5Gc α 6Gal β 4Glc β O(CH2)2CH2NH2(글리칸 ID No. 6)와 같은 말단 갈락토스에 결합된 글리칸 함유 (2, 6) 시알산에 우선적으로 결합하는 SNA(삼버커스 니그라 렉틴); 및 (d) 동종형

음성 대조군 및 예상대로 결합된 글리칸과 링커/완충액이 없는 인쇄 대조군으로서의 팔리비주아맙.

[0866]

에폭시 차단 완충액(300mL)은 15mL의 2M Tris 완충액(pH 8)을 0.9mL의 16.6M 에탄올아민 및 284.1mL의 중류수와 배합함으로써 제조하였다. 용액을 0.2 μ M 니트로셀룰로스 막을 사용하여 여과하였다. 에폭시 완충 용액 뿐만 아니라 1L의 중류수를 50°C로 예비-가온시켰다. 유리 슬라이드를 슬라이드 홀더에 정렬시키고 가온된 에폭시 차단 완충액이 담긴 염색 통에 신속하게 침지시켰다. 슬라이드를 주기적으로 진탕시키면서 에폭시 차단 완충액 중에서 50°C에서 1시간 동안 항온처리하여 에폭시 결합 부위를 불활성화시켰다. 그후, 슬라이드를 중류수로 세정하고, ProPlate 슬라이드 홀더(Grace Bio-Labs # 204862 16 정사각형 7x7mm 챔버)에 배치한 다음 25°C에서 1시간 동안 1% OVA를 갖는 PBS로 차단시켰다. 시험 항체 및 동종형 대조 항체는 1 및 2.5ug/mL에서 시험하였다. 대조 항체 항-Gc는 0.5ug/mL 및 1ug/mL에서 시험하였다. 대조 비오틴 태그된 렉틴은 MALII의 경우 40ug/mL에서 및 SNA의 경우 20ug/mL에서 시험하였다. 모든 항체/렉틴을 차단 완충액(1% OVA/PBS)에 희석시키고 25°C에서 1시간 동안 글리칸 어레이와 항온처리하였다. 광범위한 세척 후, 글리칸 마이크로어레이 슬라이드를 Cy3-접합된 항-SA, 항-마우스 IgG 또는 항인간 IgG(팬실베니아주 웨스트그로브 소재의 잭슨 이뮤노리서치 래버래토리스)와 1시간 동안 항온처리함으로써 다클론 혈청 항체의 결합을 검출하였다. 그후, 슬라이드를 광범위하게 세척하고, 건조시키고 Genepix 4000B 스캐너(100% 레이저; 350에서 획득; 10 μ m 픽셀)로 스캐닝하였다. 스캐닝한 이미지로부터의 미가공 형광 강도 데이터를 Genepix 소프트웨어를 사용하여 추출하고 미가공 데이터의 분석을 실시하였다. 항체는, 이들이 AcSTn 및 GcSTn 문자 둘 다에는 결합하지만 Tn 또는 어레이 상의 임의의 다른 글리칸에는 결합하지 않는 것을 입증한다면, AcSTn 및 GcSTn에 매우 특이적인 것으로 간주되었다.

[0867]

항체 Hu2G12-2B2, L0H2, Hu8C2-2D6, L1H1, Hu5G2-1B3, L1H2, Mu2G12-2B2 및 Mu3F1은 AcSTn 및 GcSTn(글리칸 ID No 1 및 2)에는 결합하지만 어레이의 다른 글리칸에는 결합하지 않음을 입증하였으며, 이는 이들 항체가 STn 글리칸에 대해서만 특이적으로 친화성을 가짐을 입증한다. 예상대로, Gc를 함유하는 어레이의 모든 글리칸에 결합된 항-Gc 항체, (2,3)-결합된 시알산을 함유하는 어레이의 글리칸에 결합된 MALII, 말단 갈락토스에 결합된 (2,6) 시알산을 함유하는 어레이의 글리칸에 결합된 SNA 및 팔리비주아맙 대조군은 글리칸에 결합하지 않는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 글리칸 어레이가 인쇄된 글리칸에 특이적인 항체 및 단백질에 의해 인식될 수 있는 글리칸을 함유함을 입증하였다.

[0868]

실시예 30: 네오당지질 어레이 분석

[0869]

네오당지질 프로브는 아래 표에 기재된 화학적으로 합성된 글리칸으로부터 제조된다.

표 30

글리칸의 목록

글리칸 ID 번호	글리칸
1	Neu5Ac α 6GalNAc α O(CH2)2CH2NH2 (AcSTn)
2	Neu5Gc α 6GalNAc α O(CH2)2CH2NH2 (GcSTn)
3	Neu5Ac α 6Gal β 4GlcNAc β O(CH2)2CH2NH2
4	Neu5Gc α 6Gal β 4GlcNAc β O(CH2)2CH2NH2
5	Neu5Ac α 6Gal β 4Glc β O(CH2)2CH2NH2
6	Neu5Gc α 6Gal β 4Glc β O(CH2)2CH2NH2
7	Neu5Ac α 6Gal β O(CH2)2CH2NH2
8	Neu5Gc α 6Gal β O(CH2)2CH2NH2
9	GalNAc α O(CH2)2CH2NH2
10	Gal β 3GalNAc β O(CH2)2CH2NH2
11	Gal3 β GalNAc α O(CH2)2CH2NH2
12	Neu5Ac α 3Gal β 1-3GalNAc α O(CH2)2CH2NH2
13	Neu5Gc α 3Gal β 1-3GalNAc α O(CH2)2CH2NH2

[0870]

[0871]

네오당지질은 글리칸을 아미노 인지질 N-아미노아세틸-N-(9-안트라세닐 메틸)-1,2-디헥사데실-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민(ADHP)에 접합시켜 형광 프로브를 생성하거나 L-1,2-디헥사데실-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민(DHPE)으로 환원적 아민화에 의해 또는 N-아미노옥시아세틸-1,2-디헥사데실-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민(AOPE)으로 옥심 결찰에 의해 비 형광성 표지를 생성함으로써 제조된다. 접합 반응은 NGL가 고체 매트릭스 상에 고정화되도록 한다. 당단백질로부터 환원적으로 방출된 글리칸을 접합 전에 약한 폐리오데이트 반응에

적용한다. 접합 후, NGL 생성물을 정제하여 과량의 지질 및 염을 제거하고, 질량 분광법으로 분석하고, 밀도계 측에 의해 고성능 박막 크로마토그래피 상에서 정량한다.

[0872] 네오당지질 어레이는 네오당지질 프로브를 리포솜 제제에서 니트로셀룰로스-코팅된 유리 슬라이드 상에 로봇에 의해 분배함으로써 생산된다. 프로브를 다중 농도 및 밀도에서 인쇄하여 최적의 혼성화 조건을 결정한다.

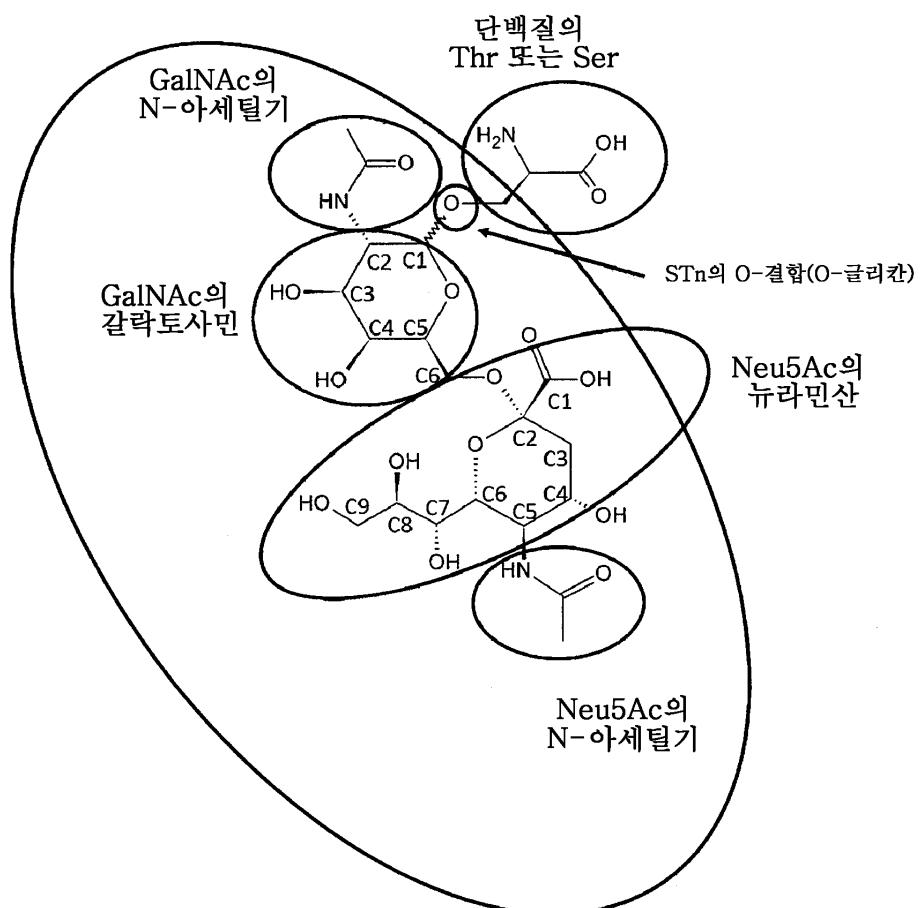
[0873] 슬라이드를 정제된 항-STn 항체 용액 또는 항-STn 항체를 함유하는 다클론 혈청으로 프로빙한다. 항체 결합은 비오틴화 이차 항체에 이어 형광 표지된 스트렙타비딘을 사용하여 검출한다. 슬라이드를 ProScanArray(퍼킨 엘머 라이프 사이언시즈(Perkin Elmer Life Sciences))를 사용하여 스캐닝하고, 형광 결합 신호를 ScanArray Express 소프트웨어(퍼킨 엘머 라이프 사이언시즈)를 사용하여 정량한다. 정제된 항체 또는 혈청은, 이들이 분자 둘 다에는 결합하지만 Tn 또는 어레이 상의 임의의 다른 글리칸에는 결합하지 않는 것을 입증한다면, AcSTn 및 GcSTn에 매우 특이적인 것으로 간주된다.

도면

도면 1a

도 1A

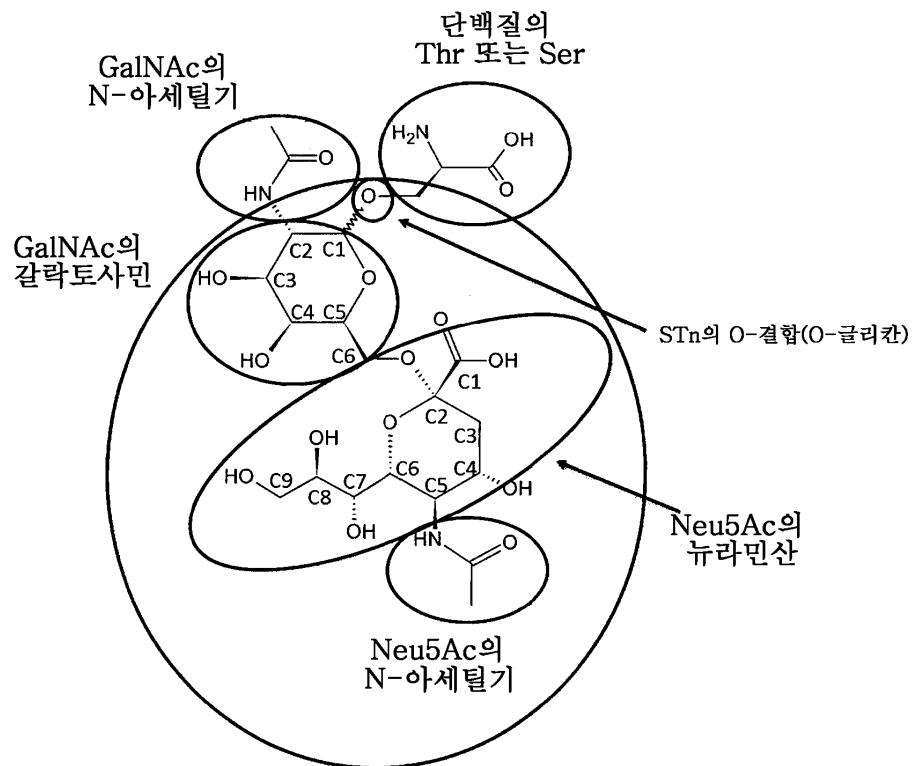
STn 결합 특이성
(그룹 1)
검출된 에피토프(가장 큰 타원형)



도면1b

도 1B

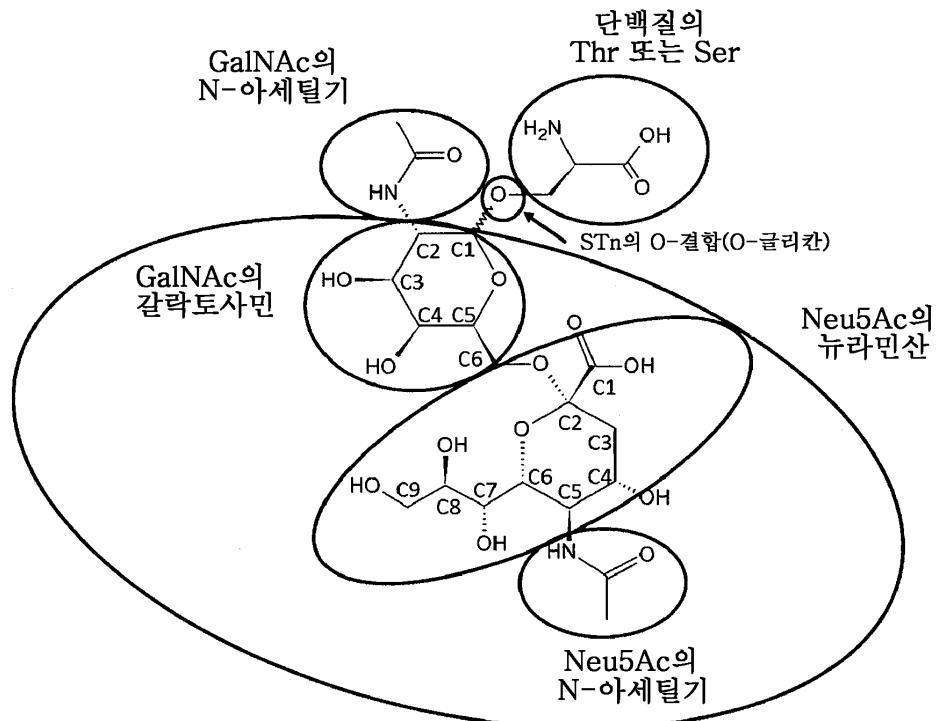
STn 결합 특이성
(그룹 2)
검출된 에피토프(가장 큰 타원형)



도면1c

도 1C

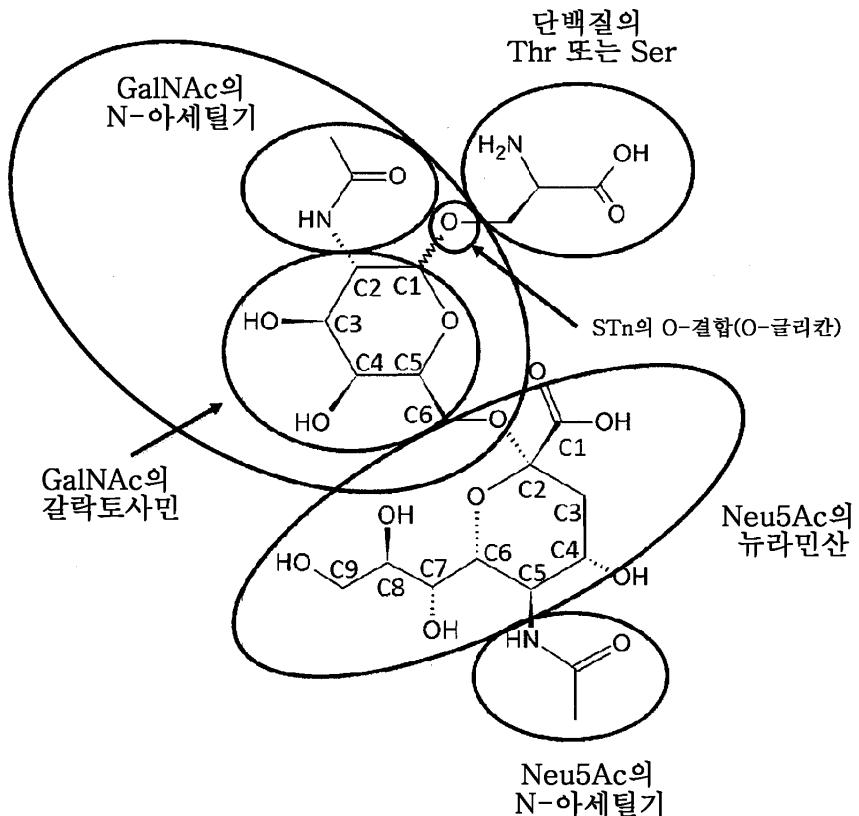
STn 결합 특이성
(그룹 3)
검출된 에피토프(가장 큰 타원형)



도면1d

도 1D

STn 결합 특이성
(그룹 4)
검출된 에피토프(가장 큰 타원형)



도면2

가변 도메인

FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
-----	------	-----	------	-----	------	-----

FR = 프레임워크 영역
CDR = 상보성 결정 영역

서 열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> SIAMAB THERAPEUTICS, INC.

<120> GLYCAN-INTERACTING COMPOUNDS AND METHODS OF USE

<130> 2033.1021PCT

<140> PCT/US2016/xxxxxx

<141> 2016-11-10

<150> 62/382,835

<151> 2016-09-02

<150> 62/345,515

<151> 2016-06-03

<150> 62/293,989

<151> 2016-02-11

<150> 62/287,666

<151> 2016-01-27

<150> 62/274,572

<151> 2016-01-04

<150> 62/254,278

<151> 2015-11-12

<160> 266

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 115

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 1

Gln Val Gln Leu Leu Gln Tyr Asp Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Gly

1	5	10	15
---	---	----	----

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp His

20	25	30
----	----	----

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

35	40	45
----	----	----

Gly Tyr Phe Ser Pro Gly Asn Asp Asp Ile Lys Tyr Ser Glu Lys Phe

50	55	60
----	----	----

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

65	70	75	80
----	----	----	----

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

85 90 95
 Lys Arg Ser Ile Thr Thr Pro Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110

Val Ser Ala

115

<210> 2

<211> 106

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 2

Asp Ile Gln Met Asn Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly

1 5 10 15

Asp Thr Ile Thr Ile Thr Cys His Ala Ser Gln Asn Ile Asn Val Trp
 20 25 30

Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Asn Ile Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Lys Val Ser Asn Leu His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Gly Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

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

Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Lys Lys

100 105

<210> 3

<211> 115

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 3

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

1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp His

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

85	90	95
Lys Arg Ser Ile Thr Thr Ser Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr		
100	105	110
Val Ser Ala		

115

<210> 4

<211> 108

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 4

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

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

35 40 45

Tyr Gly Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Ala Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala

65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Asp Tyr His Cys Gly Gln Gly Tyr Ser Tyr Pro Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg

100 105

<210> 5

<211> 115

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 5

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

1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp His

20 25 30

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

35 40 45

Gly Tyr Val Ser Pro Gly Asn Gly Asp Ile Lys Tyr Asn Glu Lys Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Lys Arg Ser Leu Ile Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr

100 105 110

Val Ser Ser

115

<210> 6

<211> 107

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 6

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln Lys Phe Met Ser Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Ala

20 25 30

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

35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly

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

<210> 7

<211> 115

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 7

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

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

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

115

<210> 8

<211> 108

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 8

Asp Ile Gln Met Asn Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly

1 5 10 15

Asp Thr Ile Thr Ile Thr Cys His Ala Ser Gln Asn Ile Asn Val Trp

20 25 30

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

35 40 45

Tyr Lys Ala Ser Asn Leu His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Gly Phe Thr Leu Thr Ile Gly Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Gln Ser Tyr Pro Phe

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg

100 105

<210> 9

<211> 115

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 9

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

1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp His

20 25 30

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

35 40 45

Gly Tyr Ile Ser Pro Gly Asn Gly Asp Ile Lys Tyr Asn Glu Lys Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85	90	95
----	----	----

Gln Arg Gln Leu Gly Gln Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr

100	105	110
-----	-----	-----

Val Ser Ser

115		
-----	--	--

<210> 10

<211> 113

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 10

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

1	5	10	15
---	---	----	----

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser

20	25	30
----	----	----

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

35	40	45
----	----	----

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro

50	55	60
----	----	----

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

65	70	75	80
----	----	----	----

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Asn

85	90	95
----	----	----

Thr His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100	105	110
-----	-----	-----

Arg

<210> 11

<211> 115

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 11

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

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

20 25 30

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

35	40	45
----	----	----

Gly	Tyr	Ile	Ser	Pro	Gly	Asn	Asp	Asp	Ile	Lys	Tyr	Asn	Glu	Lys	Phe
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

50	55	60
----	----	----

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

65	70	75	80
----	----	----	----

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

85	90	95
----	----	----

Glu	Arg	Ser	Met	Ile	Gly	Val	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

100	105	110
-----	-----	-----

Val Ser Ala

115

<210> 12

<211> 112

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 12

Asp	Val	Val	Met	Thr	Gln	Thr	Pro	Leu	Ser	Leu	Thr	Val	Ser	Leu	Gly
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

1	5	10	15
---	---	----	----

Asp	Gln	Ala	Ser	Ile	Ser	Cys	Arg	Phe	Ser	Gln	Ser	Leu	Val	Gln	Ser
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

20	25	30
----	----	----

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

35	40	45
----	----	----

Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Lys	Val	Ser	Asn	Arg	Phe	Cys	Gly	Val	Pro
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

50	55	60
----	----	----

Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Lys	Ile
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

65	70	75	80
----	----	----	----

Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Leu	Gly	Val	Tyr	Phe	Cys	Ser	Gln	Ser
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

85	90	95
----	----	----

Thr His Ala Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys

100 105 110

<210> 13

<211> 114

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 13

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

1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp His

20 25 30

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

35 40 45

Gly Tyr Ile Ser Pro Gly Asn Gly Asp Ile Lys Tyr Asn Glu Lys Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Pro Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys

85 90 95

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

100 105 110

Ser Ser

<210> 14

<211> 107

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 14

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

1 5 10 15

Glu Ser Val Thr Ile Thr Cys Arg Leu Ser Glu Asp Ile Tyr Ser Asn

20 25 30

Leu Ala Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Val

35 40 45

Tyr Lys Ala Thr Asn Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Ser

65 70 75 80

Glu Asp Phe Gly Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Gly Thr Pro Phe

85 90 95

Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 15

<211> 114

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 15

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

1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp His

20 25 30

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

35 40 45

Gly Tyr Phe Ser Pro Gly Asn Asp Asp Ile Lys Tyr Asn Glu Lys Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Lys Arg Ser Tyr Tyr Gly Asp Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val

100 105 110

Ser Ser

<210> 16

<211> 107

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 16

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

1 5 10 15

Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser His

20 25 30

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

35 40 45

Tyr Gly Ala Thr Asn Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Ser Leu Lys Ile His Ser Leu Gln Ser

65 70 75 80

Glu Asp Phe Gly Ser Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Gly Ala Pro Phe

85 90 95

Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 17

<211> 115

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 17

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

1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp His

20 25 30

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

35 40 45

Gly Tyr Phe Ser Pro Gly Asn Asp Asp Ile Lys Tyr Asn Val Lys Phe

50 55 60

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

65	70	75	80
Met Gln Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys			
85	90	95	
Ser Val Gly Tyr Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Leu Gly Thr Thr Leu Thr			
100	105	110	
 Val Ser Ser			
115			
<210> 18			
<211> 108			
<212> PRT			
<213> Mus sp.			
<400> 18			
Asn Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Lys Ser Met Ser Met Ser Val Gly			
1	5	10	15
Glu Arg Val Thr Leu Thr Cys Lys Ala Ser Glu Asn Val Val Thr Tyr			
20	25	30	
Val Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Gln Ser Pro Lys Leu Ile			
35	40	45	
Tyr Gly Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly			
50	55	60	
Ser Gly Ser Ala Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala			
65	70	75	80
Glu Asp Leu Ala Asp Tyr His Cys Gly Gln Gly Tyr Ser Tyr Pro Tyr			
85	90	95	
Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg			
100	105		
<210> 19			
<211> 115			
<212> PRT			
<213> Mus sp.			
<400> 19			
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Asp Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Thr			

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

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

<210> 20

<211> 114

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 20

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

Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser			
20	25	30	

Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln			
35	40	45	

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

Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr			
65	70	75	80

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

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

<210> 21

<211> 114

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 21

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Asp Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp His

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

85 90 95
 Lys Arg Ser Leu Ser Thr Pro Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110
 Val Ser

<210> 22

<211> 114

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 22

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Lys Arg

<210> 23

<211> 115

<212> PRT

<213> Mus sp.

<220><221> MOD_RES

<222> (9)..(9)

<223> Any amino acid

<220><221> MOD_RES

<222> (111)..(111)

<223> Any amino acid

<400> 23

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

1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp His

20 25 30

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

35 40 45

Gly Tyr Phe Ser Pro Gly Asn Asp Asp Ile Lys Tyr Asn Glu Lys Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

Met Gln Leu Asn Ser Leu Ser Ser Asp Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys

85 90 95

Lys Arg Ser Leu Ser Thr Pro Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Xaa Thr

100 105 110

Val Ser Ala

115

<210> 24

<211> 114

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 24

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Lys Arg

<210> 25

<211> 115

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 25

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

1 5 10 15

Ser Met Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp His

20 25 30

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

35 40 45

Gly Tyr Ile Ser Pro Gly Asn Gly Asp Ile Lys Tyr Asn Glu Lys Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Val Ser Ala

115

<210> 26

<211> 114

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 26

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

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

<210> 27

<211> 115

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 27

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

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

<210> 28

<211> 115

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 28

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

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

<210> 29

<211> 115

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 29

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

Met Gln Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Phe Phe Cys

85 90 95

Lys Arg Ser Ile Thr Thr Ser Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr

100 105 110

Val Ser Ala

115

<210> 30

<211> 115

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 30

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

1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ile Phe Thr Asp His

20 25 30

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

35 40 45

Gly Tyr Ile Ser Pro Gly Asn Gly Asp Ile Lys Tyr Asn Glu Lys Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

Met His Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys

85 90 95

Lys Arg Ser Ile Thr Thr Ser Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr

100 105 110

Val Ser Ala

115

<210> 31

<211> 108

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 31

Asp Ile Gln Met Asn Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly

1 5 10 15
Asp Thr Ile Thr Ile Thr Cys His Ala Ser Gln His Ile Asn Phe Trp

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

85 90 95
Met Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 32

<211> 115

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 32

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

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

100	105	110
Val Ser Ala		
115		
<210> 33		
<211> 115		
<212> PRT		
<213> Mus sp.		
<400> 33		
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Asp Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala		
1	5	10
Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp His		
20	25	30
Ala Ile His Trp Val Lys Gln Lys Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile		
35	40	45
Gly Tyr Ile Ser Pro Gly Asn Gly Asp Ile Lys Tyr Asn Glu Lys Phe		
50	55	60
Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Thr Ser Ser Thr Thr Ala Tyr		
65	70	75
Met Gln Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Met Tyr Phe Cys		
85	90	95
Lys Arg Ser Ile Thr Thr Ser Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr		
100	105	110
Val Ser Ala		
115		
<210> 34		
<211> 107		
<212> PRT		
<213> Mus sp.		
<400> 34		
Asp Ile Gln Met Asn Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly		
1	5	10
Asp Thr Ile Thr Ile Thr Cys His Ala Ser Gln Asn Ile Asn Val Trp		
20	25	30

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

35 40 45

Tyr Lys Ala Ser Asn Leu Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Gly Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Asp Gln Ser Tyr Pro Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 35

<211> 115

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 35

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

1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ile Phe Thr Asp His

20 25 30

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

35 40 45

Gly Tyr Ile Ser Pro Gly Asn Gly Asp Ile Lys Tyr Ile Glu Lys Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Lys Arg Ser Leu Ser Thr Pro Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr

100 105 110

Val Ser Ala

115

<210> 36

<211> 110

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 36

Asn Ile Leu Met Thr Gln Ser Pro Lys Ser Met Ser Met Val Gly

1 5 10 15

Glu Arg Val Thr Leu Thr Cys Lys Ala Ser Glu Asn Val Val Asn Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Phe Gly Ala Ser Asn Arg Tyr Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Ala Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala

65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Asp Tyr His Cys Gly Ser Lys Trp Ile Thr Ser Tyr

85 90 95

Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg

100 105 110

<210> 37

<211> 109

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 37

Asn Ile Leu Met Thr Gln Ser Pro Lys Ser Met Ser Met Val Gly

1 5 10 15

Glu Arg Val Thr Leu Thr Cys Lys Ala Ser Glu Asn Val Val Asn Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Tyr Gly Ala Ser Asn Arg Tyr Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Ala Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala

65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Asp Tyr His Cys Gly Ala Arg Val Thr Ser Tyr Pro

85 90 95

Tyr Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg

100 105

<210> 38

<211> 115

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 38

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

1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp His

20 25 30

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

35 40 45

Gly Tyr Ile Ser Pro Gly Asn Gly Asp Ile Lys Tyr Asn Glu Lys Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

Met Gln Leu Asn Ser Leu Thr Ser Asp Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys

85 90 95

Lys Arg Ser Ile Thr Thr Pro Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr

100 105 110

Val Ser Ser

115

<210> 39

<211> 105

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 39

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

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

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

<210> 40

<211> 116

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 40

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

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

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

Thr Val Ser Ser

115

<210> 41

<211> 107

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 41

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly

1	5	10	15
---	---	----	----

Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Gly Thr Asn

20	25	30
----	----	----

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

35	40	45
----	----	----

Tyr Ser Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly

50	55	60
----	----	----

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Ser

65	70	75	80
----	----	----	----

Glu Asp Leu Thr Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Ser Ser Phe Pro Leu

85	90	95
----	----	----

Thr Phe Gly Val Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys

100	105
-----	-----

<210> 42

<211> 116

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 42

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

1	5	10	15
---	---	----	----

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp His

20	25	30
----	----	----

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

35	40	45
----	----	----

Gly Tyr Ile Ser Pro Gly Asn Gly Asp Ile Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

Lys Asp Lys Val Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Ser
 65 70 75 80

Met His Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95

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

Thr Val Ser Ser
 115

<210> 43

<211> 12

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 43

Gly Tyr Thr Phe Thr Asp His Ala Ile His Trp Val

1 5 10

<210> 44

<211> 12

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 44

Gly Tyr Thr Phe Ser Asp His Ala Ile His Trp Val

1 5 10

<210> 45

<211> 12

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 45

Gly Tyr Ile Phe Thr Asp His Ala Ile His Trp Val

1 5 10

<210> 46

<211> 10

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 46

Phe Ser Pro Gly Asn Asp Asp Ile Lys Tyr

1	5	10
---	---	----

<210> 47

<211> 10

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 47

Ile Ser Pro Gly Asn Gly Asp Ile Lys Tyr

1	5	10
---	---	----

<210> 48

<211> 10

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 48

Leu Ser Pro Gly Asn Asp Asp Ile Lys Tyr

1	5	10
---	---	----

<210> 49

<211> 10

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 49

Val Ser Pro Gly Asn Gly Asp Ile Lys Tyr

1	5	10
---	---	----

<210> 50

<211> 10

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 50

Ile Ser Pro Gly Asn Gly Asp Val Lys Tyr

1	5	10
---	---	----

<210> 51

<211> 10

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 51

Ile Ser Pro Gly Asn Asp Asp Ile Lys Tyr

1 5 10

<210> 52

<211> 8

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 52

Ser Val Gly Tyr Ala Leu Asp Tyr

1 5

<210> 53

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 53

Lys Ile Ser Tyr Tyr Gly Ile

1 5

<210> 54

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 54

Lys Arg Ser Tyr Tyr Gly Asp

1 5

<210> 55

<211> 8

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 55

Lys Arg Ser Ile Gly Gly Asp His

1 5

<210> 56

<211> 8

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 56

Gln Arg Gln Leu Gly Gln Gly Tyr

1 5

<210> 57

<211> 8

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 57

Lys Arg Ser Leu Ile Gly Asp Tyr

1 5

<210> 58

<211> 8

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 58

Lys Arg Ser Leu Ser Thr Pro Tyr

1 5

<210> 59

<211> 8

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 59

Lys Arg Ser Ile Thr Thr Pro Tyr

1 5

<210> 60

<211> 8

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 60

Glu Arg Ser Met Ile Gly Val Tyr

1 5

<210> 61

<211> 8

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 61

Lys Arg Ser Ile Thr Thr Ser Tyr

1 5

<210> 62

<211> 6

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 62

Glu Asn Val Val Thr Tyr

1 5

<210> 63

<211> 6

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 63

Glu Asp Ile Tyr Ser Asn

1 5

<210> 64

<211> 6

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 64

Glu Asn Ile Tyr Ser His

1 5

<210> 65

<211> 6

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 65

Gln Asn Ile Asn Val Trp

1 5

<210> 66

<211> 11

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 66

Gln Ser Leu Val His Ser Tyr Gly Asn Thr Tyr

1 5 10

<210> 67

<211> 6

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 67

Gln Asn Val Gly Thr Ala

1 5

<210> 68

<211> 12

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 68

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

1 5 10

<210> 69

<211> 6

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 69

Gln Ser Val Asn Asn Asn

1 5

<210> 70

<211> 12

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 70

Gln Ser Leu Leu Asn Arg Gly Asn His Lys Asn Tyr

1 5 10

<210> 71

<211> 11

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 71

Gln Ser Leu Val Gln Ser Asn Gly Asn Thr Tyr

1 5 10

<210> 72

<211> 6

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 72

Glu Asn Val Val Asn Tyr

1 5

<210> 73

<211> 12

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 73

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

1 5 10

<210> 74

<211> 6

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 74

Gln His Ile Asn Phe Trp

1 5

<210> 75

<211> 6

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 75

Glu Asn Val Val Ile Tyr

1 5

<210> 76

<211> 12

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 76

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

1 5 10

<210> 77

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 77

Gly Ala Ser Asn Arg Tyr Thr

1 5

<210> 78

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 78

Lys Ala Thr Asn Leu Ala Asp

1 5

<210> 79

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 79

Gly Ala Thr Asn Leu Ala Asp

1 5

<210> 80

<211> 7

<212> PRT

<213>

Mus sp.

<400> 80

Lys Ala Ser Asn Leu His Thr

1 5

<210> 81

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 81

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser

1 5

<210> 82

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 82

Ser Ala Ser Asn Arg Tyr Thr

1 5

<210> 83

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 83

Trp Ala Ser Thr Arg Asp Ser

1 5

<210> 84

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 84

Tyr Ala Ser Asn Arg Tyr Thr

1 5

<210> 85

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 85

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser

1 5

<210> 86

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 86

Lys Val Ser Asn Arg Phe Cys

1 5

<210> 87

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 87

Gly Ala Ser Asn Arg Tyr Ser

1 5

<210> 88

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 88

Lys Val Ser Asn Leu His Thr

1 5

<210> 89

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 89

Gly Gln Gly Tyr Ser Tyr Pro Tyr Thr

1 5

<210> 90

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 90

Gln His Phe Trp Gly Thr Pro Phe Thr

1 5

<210> 91

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 91

Gln His Phe Trp Gly Ala Pro Phe Thr

1 5

<210> 92

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 92

Gln Gln Gly Gln Ser Tyr Pro Phe Thr

1 5

<210> 93

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 93

Ser Gln Asn Thr His Val Pro Tyr Thr

1 5

<210> 94

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 94

Gln Gln Tyr Ser Ser Tyr Arg Leu Thr

1 5

<210> 95

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 95

Gln Ser Asp Tyr Ser Tyr Pro Tyr Thr

1 5

<210> 96

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 96

Gln Gln Gly Tyr Ser Ser Pro Trp Thr

1 5

<210> 97

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 97

Gln Asn Asp Tyr Thr Tyr Pro Tyr Thr

1 5

<210> 98

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 98

Ser Gln Ser Thr His Ala Pro Leu Thr

1 5

<210> 99

<211> 11

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 99

Gly Ser Lys Trp Ile Thr Ser Tyr Pro Tyr Thr

1 5 10

<210> 100

<211> 10

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 100

Gly Ala Arg Val Thr Ser Tyr Pro Tyr Thr

1 5 10

<210> 101

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 101

Gln Gln Asp Gln Ser Tyr Pro Tyr Thr

1 5

<210> 102

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 102

Lys Asn Asp Tyr Ser Tyr Pro Tyr Thr

1 5

<210> 103

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 103

Gln Gln Asp Gln Ser Tyr Pro Tyr Met

1 5

<210> 104

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400

> 104

Gln Asn Asp Tyr Ser Tyr Pro Tyr Thr

1 5

<210> 105

<211> 10

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 105

Gly Tyr Thr Phe Thr Asp His Ala Ile His

1 5 10

<210> 106

<211> 10

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 106

Gly Tyr Ile Phe Thr Asp His Ala Ile His

1 5 10

<210> 107

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 107

Tyr Ile Ser Pro Gly Asn Gly Asp Ile Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 108

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 108

Tyr Phe Ser Pro Gly Asn Asp Asp Ile Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Arg

1 5 10 15

Gly

<210> 109

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 109

Tyr Phe Ser Pro Gly Asn Asp Asp Ile Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys

1 5 10 15

Val

<210> 110

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 110

Tyr Ile Ser Pro Gly Asn Gly Asp Ile Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys

1 5 10 15

Val

<210> 111

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 111

Tyr Ile Ser Pro Gly Asn Gly Asp Ile Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys

1 5 10 15

Asp

<210> 112

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 112

Tyr Phe Ser Pro Gly Asn Asp Asp Phe Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys

1	5	10	15
---	---	----	----

Gly

<210> 113

<211>

> 17

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 113

Tyr Ile Ser Pro Gly Asn Asp Asp Ile Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys

1	5	10	15
---	---	----	----

Gly

<210> 114

<211> 6

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 114

Ser Ile Thr Thr Ser Tyr

1	5		
---	---	--	--

<210> 115

<211> 6

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 115

Ser Leu Ser Thr Pro Tyr

1	5		
---	---	--	--

<210> 116

<211> 5

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 116

Ser Tyr Tyr Gly Asp

1 5

<210> 117

<211> 6

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 117

Ser Ile Thr Thr Pro Tyr

1 5

<210> 118

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 118

Ser Leu Leu Ala Leu Asp Tyr

1 5

<210> 119

<211> 6

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 119

Ser Leu Asn Met Ala Tyr

1 5

<210> 120

<211> 5

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 120

Ser Tyr Tyr Gly His

1 5

<210> 121

<211> 11

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400>

> 121

Lys Ala Ser Glu Asn Val Val Thr Tyr Val Ser

1 5 10

<210> 122

<211> 11

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 122

His Ala Ser Gln His Ile Asn Phe Trp Leu Ser

1 5 10

<210> 123

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 123

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Arg Gly Asn His Lys Asn Tyr Leu

1 5 10 15

Thr

<210> 124

<211> 11

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 124

Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser His Leu Ala

1 5 10

<210> 125

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 125

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

1 5 10 15

Thr

<210> 126

<211> 11

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 126

Lys Ala Ser Gln Ser Val Asn Asn Asn Val Ala

1 5 10

<210> 127

<211> 11

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 127

Lys Ala Ser Gln Asp Val Gly Thr Asn Ile Ala

1 5 10

<210> 128

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 128

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

1 5 10 15

Ala

<210> 129

<211> 11

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 129

Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Asn Leu Ala

1 5 10

<210> 130

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 130

Ser Ala Ser Thr Arg His Thr

1 5

<210> 131

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 131

Trp Ala Ser Ala Arg Glu Ser

1 5

<210> 132

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 132

Ala Ala Thr Asn Leu Ala Asp

1 5

<210> 133

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 133

Gln Gln Tyr Ser Ser Phe Pro Leu Thr

1 5

<210> 134

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400>

134

Gln Gln Tyr Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr

1 5

<210> 135

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 135

Gln His Phe Trp Gly Thr Pro Tyr Thr

1 5

<210> 136

<211> 10

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 136

Gly Tyr Thr Phe Ser Asp His Ala Ile His

1 5 10

<210> 137

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 137

Tyr Ile Ser Pro Gly Asn Gly Asp Val Lys Tyr Ser Glu Arg Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 138

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 138

Tyr Phe Ser Pro Gly Asn Asp Asp Ile Lys Tyr Ser Glu Lys Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 139

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 139

Tyr Ile Ser Pro Gly Asn Gly Asp Ile Lys Tyr Asp Glu Lys Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 140

<211> 6

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 140

Gln Leu Gly Gln Gly Tyr

1 5

<210> 141

<211> 6

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 141

Ser Met Ile Gly Val Tyr

1 5

<210> 142

<211> 11

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 142

His Ala Ser Gln Asn Ile Asn Val Trp Leu Ser

1 5 10

<210> 143

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 143

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

1 5 10 15

Thr

<210> 144

<211> 11

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 144

Lys Ala Ser Glu Asn Val Val Ile Tyr Val Ser

1 5 10

<210> 145

<211> 16

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 145

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Tyr Gly Asn Thr Tyr Leu His

1 5 10 15

<210> 146

<211> 16

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 146

Arg Phe Ser Gln Ser Leu Val Gln Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Gln

1 5 10 15

<210> 147

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 147

Lys Ala Ser Asn Leu Tyr Thr

1 5

<210> 148

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 148

Gln His Asp Gln Ser Tyr Pro Thr Tyr

1 5

<210> 149

<211> 345

<212> DNA

<213> Mus sp.

<400> 149

cagggtcagt tgctgcagta tgacgctgag ttggtaaaac ctgggggtc agtgaagata	60
tctgtcaagg cctctggcta caccttact gaccatgcta ttcaactgggt gaagcagaag	120
cctgaacagg gcctggaatg gattggatat ttttctcccg gaaatgatga tattaagtac	180

agtgagaagt tcaaggcca ggccacactg actgcagaca agtcctccag cactgcctac	240
atgcagctca acagcctgac atctgaggat tctgcagtg atttctgtaa aagatccatt	300
actacgcctt actggggcca agggactctg gtcactgtct ctgca	345

<210> 150

<211> 319

<212> DNA

<213> Mus sp.

<400> 150

gacatccaga tgaaccagtc tccatccagt ctgtctgcat cccttggaga cacaattacc	60
atcacttgcc atgccagtca gaacattaaat gtttggtaa gctggcacca gcagaaacca	120
ggaaatattt ctaaactatt gatctataag gtttccaact tgcacacagg cgtcccatca	180

aggtagtg gcagtggatc tggaacaggt ttcacattaa ccatcagcag cctgcagect	240
gaagacattt ccacttacta ctgtcaacag gatcaaagtt atccgtacac gttcgaggg	300
gggaccaagc tgaaaaaaa	319

<210> 151

<211> 345

<212> DNA

<213> Mus sp.

<400> 151

cagggtcagc tgcagcagtc tgacgctgag ttggtaaaac ctggggcttc agtgaagata	60
---	----

tcctgcaagg cctctggcta caccttcaact gaccatgcta ttcaactgggt gaagcagaag	120
cctgaacagg gcctggaatg gattggatat atttctcccg gaaatgatga tattaagtac	180
aatgagaagt tcaagggcaa ggcccacactg actgcagaca aatcctccag cactgcctac	240
atgcagctca acagcctgac atctgaggat tctgcagttt atttctgtaa aagatccatt	300
actacgtctt actggggcca agggactctg gtcactgtct ctgca	345
<210> 152	
<211> 323	
<212> DNA	
<213> Mus sp.	
<400> 152	
aacattgtaa tgacccaatc tccaaatcc atgtccatgt cagtaggaga gagggtcacc	60
ttgacctgca aggccagtga gaatgtggtt atttatgttt cctggtatca acagaaacca	120
gagcagtctc ctaaactgct gatatacggg gcatccaacc ggtacactgg ggtccccat	180
cgcttcacag gcagtggatc tgcaacagat ttcaactctga ccatcagcag tgtgcaggct	240
gaagacattg cagattatca ctgtggacag gttacagct atccgtacac gttcggaggg	300
gggaccaagg tggaaataaa acg	323
<210> 153	
<211> 345	
<212> DNA	
<213> Mus sp.	
<400> 153	
caggttcagt tgacgcagtc tgacgcttag ttggtaaac ctggggcttc agtgaagata	60
tcctgcaagg cttctggcta caccttcaact gaccatgcca ttcaattgggt gaagcagaag	120
cctgaacagg gcctggaatg gattggatat gtttctcccg gaaatggtga tattaagtac	180
aatgagaagt tcaagggcaa ggcccacactg actgcagaca aatcctccag cactgcctac	240
atgcagctca acagcctgac atcgaggat tctgcagttt atttctgtaa aagatctta	300
attggagact attggggcca aggcaccact ctcacagttt cctca	345
<210> 154	
<211> 322	
<212> DNA	
<213> Mus sp.	
<400> 154	

gacattgtga tgacctagtc taaaaattc atgtctcat cagtaggaga cagggtacc	60
atcacctgca aggcagtca gaatgtgggt actgctgtag cctggtatca acagaaacca	120
ggacaatctc ctaaatttct gatttactcg gcatccaatc ggtacactgg agtccctgat	180
cgcttcacag gcagtggatc tggacagat ttactctca cgatcagcaa tatgcagtct	240
gaagacctgg cagattattt ctgccagcaa tatagcagct atcgctgac gttcggtgga	300
ggcaccaagc tggaaatcaa ac	322
<210> 155	
<211> 345	
<212> DNA	
<213> Mus sp.	
<400> 155	
caggttcagc tgacgcagtc tgacgctgaa ttggtaaac ctggggcttc agtgaagata	60
tcctgcaagg ctctggcta caccttact gaccatgcta ttactgggt gaagcagaag	120
cctgaacagg gcctggaatg gattggatat ctttctcccg gaaatgatga tattaagtac	180
agtgagaagt tcaaggacaa ggccacactg actgcagaca aatcctccag cactgcctac	240
atgcagctca acagcctgac atctgaggat tctgcagtg atttctgtaa aagatccata	300
gggggggacc actggggcca aggaccact ctcacagtct cctca	345
<210> 156	
<211> 323	
<212> DNA	
<213> Mus sp.	
<400> 156	
gacatccaga tgaaccagtc tccatccagt ctgtctgcat ccctggaga cacaattacc	60
atcaacttgcc atgccagtca gaacattaat gtttgttaa actggtacca gcagaaacca	120
ggaaatattc ctaaactatt gatctataag gcttccaact tgcacacagg cgtcccatca	180
aggtagtg gcagtggatc tggAACAGGT ttCACATTAA CCACTGGCAG CCTGCAGCCT	240
gaagacattg ccacttacta ctgtcaacag ggtCAAAGTT ATCCGTTAC GTTCGGAGGG	300
ggcaccaagc tggaaataaa acg	323
<210> 157	
<211> 345	
<212> DNA	
<213> Mus sp.	

<400> 157

cagggtcagc tgacgcagtc tgacgcttag ttggtaaac ctgggcttc agtgaagata	60
tcctgcaagg ctctggcta caccttact gaccatgcta ttcaactgggt gaaacagaag	120
cctgaacagg gcctggaatg gattggatat atttctccg gaaatggtga tattaagtat	180

aatgagaagt tcaaggcaaa ggccacactg actgcagaca aatcctccag cactgcctac	240
atgcagctca acagcctgac atctgaggat tctgcagtgt atttctgtca aagacaactg	300
ggacaaggct actggggcca aggcaccact ctcacagtct cctca	345

<210> 158

<211> 338

<212> DNA

<213> Mus sp.

<400> 158

gatgttgtga tgacccaaac tccactctcc ctgcctgtca gtcttgaga tcaaggctcc	60
atctcttgca gatctagtca gaggcttgta cacagttatg gaaacaccta tttacattgg	120
tacctgcaga agccaggcca gtctccaaag ctccgttatt acaaaggttc caaccgattt	180

tctgggtcc cagacagggtt cagtgccagt ggatcaggga cagattcac actcaagatc	240
agcagagtgg aggctgagga tctggaggtt tatttctgtct ctaaaaatac acatgttccg	300
tacacgttcg gaggggggac caagctggaa ataaaacg	338

<210> 159

<211> 345

<212> DNA

<213> Mus sp.

<400> 159

cagggtcagc tgacgcagtc tgacgcttag ttggtaaac ctgggcttc agtgaagata	60
tcctgcaagg ctctggcta caccttact gaccatgcta ttcaactgggt gaaggcagaag	120
cctgaacagg gcctggaatg gattggatat atctctccg gaaacgtatga tattaagtac	180

aatgagaagt tcaaggcaaa ggccacactg actgcagaca aatcctccag cactgcctac	240
atgcagctca acagcctgac atctgaggat tctgcagtgt atttctgtga aagatcgatg	300
attgggtttt actggggcca agggactctg gtcactgtct ctgca	345

<210> 160

<211> 337

<212> DNA

<213> Mus sp.

<400> 160

gatgttgtga tgacccaaac tccactctcc ctgactgtca gtcttggcga tcaaggctcc	60
atctcttgca gatttagtca gagccttgta caaagtaatg gaaataccta ttacagtgg	120
tatctgcaga agccaggcca gtctccaaag ctccctgattt acaaagtctc caaccgattt	180

tgtgggtcc cagacaggtt cagttggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaagatc	240
agcagagtgg aggctgagga tctgggagtt tatttctgct ctcaaagtac acatgctccg	300
ctcacgttcg gtgctggac caagctggag ctgaaac	337

<210> 161

<211> 342

<212> DNA

<213> Mus sp.

<400> 161

cagggttcagc tgacgcagtc tgacgctgag ttggtaaaac ctggggcttc agtgaagata	60
tcctgcaaga ctctggcta caccttact gaccatgcaaa ttcaactgggt gaaggcagaag	120
cctgaacagg gcctggaatg gattggatat atttctcccg gaaatggta tattaaatgtac	180

aatgagaagt tcaaggcata gcccacccctg actgcagaca aatcctccag cactgcctat	240
atgcagctca gcagcctgac acctgaggat tctgcagttt atttctgtaa aatatcttac	300
tacgttattt gggccaagg caccacttc acagtctc ca	342

<210> 162

<211> 322

<212> DNA

<213> Mus sp.

<400> 162

gacatccaga tgactcagtc tccagcctcc ctatctgtat ctgtgggaga gtctgtcacc	60
atcacatgtc gactaagtga agatatttac agtaattttcatggtttca gcagagacgg	120
ggaaaatctc ctcagctctt ggtttataaa gcaacaaact tagcagacgg tgtgccatca	180

aggttcagtg gcagtggatc aggcacacag tattccctca agatcaacag cctgcagttt	240
gaagattttggacttatta ctgtcaacat ttttgggta ctccattcac gttcggtcg	300
gggaccaagg tgaaataaa ac	322

<210> 163

<211> 342

<212> DNA

<213> Mus sp.

<400> 163

caggcagtc tgacgcgatc tgacgttag ttggtaaaac ctggggcttc agtgaagata	60
tcctgcaagg cttctggcta cacccact gaccatgcta ttcaactgggt gaaggcagaag	120
cctgaacagg gccttggatg gattggatat ttttctcccg gaaatgtatg tattaaatgtat	180

aatgagaagt tcaaggtaa ggccacactg actgcagaca aatcctccag cactgcctac	240
atgcaactca ccagcctgac atctgaagat tctgcagtgt atttctgtaa aagatcttac	300
tacggtgatt gggccaagg caccacttc acagtctc ca	342

<210> 164

<211> 322

<212> DNA

<213> Mus sp.

<400> 164

gacatccaga tgactcagtc tccagcctcc ctatctgttt ctgtgggaga aactgtcacc	60
atcacatgtc gagcaagtga gaatatttac agtcatttag catggatca acagaaacag	120
ggaaaaatctc ctcaactcct ggtctatggt gcaactaact tagcagatgg tgtccatca	180

aggttcagtg gcagtggatc aggacacacag tttccctca agatccacag cctgcagtct	240
gaagattttggagtttata ctgtcaacat ttttgggtt ctccattcac gttggctcg	300
gggacaaagt tgaaaataaa ac	322

<210> 165

<211> 345

<212> DNA

<213> Mus sp.

<400> 165

caaattcagc tgacgcgatc tgacgttag ttggtaaaac ctggggacttc agtgaagatg	60
tcctgcaagg cttctggcta cacccact gaccatgcta ttcaactgggt gaaggcagaag	120
cctgaacagg gccttggatg gattggatat ttttctcccg gaaatgtatg tattaaatgtat	180

aatgtgaagt tcaaggcaaa ggccacactg actgcagaca aatcctccag cactgcctac	240
atgcagctca acagcctgac atctgaagat tctgcagtgt atttctgttc ggtggatac	300
gcccttgact actggggctt aggcaccact ctcacagtc cctca	345

<210> 166

<211> 323

<212> DNA

<213> Mus sp.

<400> 166

aacattgtaa tgacccaatc tcccaaatcc atgtccatgt cagtaggaga gagggtcacc	60
ttgacctgca aggccagtga gaatgtggtt acttatgtt cctggtatca acagaaaacca	120
gagcagtctc ctaaactgct gatatacggg gcatccaacc ggtacactgg ggtccccat	180

cgcttcacag gcagtggatc tgcaacagat ttcaacttga ccatcagcag tgtgcaggct	240
gaagaccctg cagattatca ctgtggacag ggtaacagct atccgtacac gttcgagggg	300
gggaccaagc tggaaataaa acg	323

<210> 167

<211> 345

<212> DNA

<213> Mus sp.

<400> 167

cagggtcagc tgcaacagtc tgacgctgag ttggtaaac ctgggactac agtgaagata	60
tcctgcaagg ctctggcta cacttcaact gaccatgcta ttcaactgggt gaaggagaag	120
cctgaacagg gcctggaatg gatcgatat atttctccg gaaatgatga tattaagtac	180

agtgagaagt tcaaggcaaa gcccacactg actgcagaca aatcctccag cactgcttac	240
atgcagctca acagcctgac atctgatgtat tctgcagttt atttctgtaa aagatcgctt	300
agtacgcctt actggggcca agggactctg gtcactgtct ctgca	345

<210> 168

<211> 477

<212> DNA

<213> Mus sp.

<400> 168

ttttaatac gactccatat agggcaagca gtggtatcaa tgcagattac aaggggaaaa	60
ggcatcagac cagcatggc atcaaggtgg aatcacagac tctggcttc atatccatac	120
tgttgggtt atatggagct gatggaaaca cataatgac ccaatctccc acatccatgt	180

acatgtcagt aggagagagg gtcacattga cttgcaaggc cagtgagaat gagattaatt	240
atgttctg gtatcaacag aaaccagagc agtctctaa actgttgata tacggggcat	300
ccaaaccgta ctctgggtc cccgatcgct tcacaggcag tggatctgca acagattca	360

ctctgaccat cagcagtgt caggctgaag accttcaga ttatccctgt ggagcaaggg	420
attaactgc tatccgtaca cggtcgagg ggggaccaag ctggaaataa aacggc	477
<210> 169	
<211> 341	
<212> DNA	
<213> Mus sp.	
<400> 169	
gacattgtga tgacacagtc tccatcctcc ctgactgtga cagcaggaga gaaggtaact	60
atgagctgca ggtccagtca gagtctgtta aacagtggaa atcaaagaa ctacttgacc	120
tggtaccagg agaaaccagg gcagcctct aaactgttga tctactggc atccactagg	180
gaatctgggg tcctgtatcg cttcacaggc agtggatctg gaacagattt cacttcacc	240
atcagcagtgc tgccaggctga agacctggca gtttattact gtcagaatga ttatagttat	300
ccgtacacgt tcggaggggg gaccaagctg gaaataaaac g	341
<210> 170	
<211> 343	
<212> DNA	
<213> Mus sp.	
<400> 170	
caggttcagc tgccaggctgc tgacgcttag ttggtaaac ctggggcttc agtgaagata	60
tcctgcaagg ctctggcta cacttcaact gaccatgcta ttactgggt gatgcagatg	120
cctgaacagg gcctggaatg gattggatat atttctcccg gaaatggtga tgttaagtac	180
agtggaggt tcaagggcag gcccacactg actgcagaca aatcctccag ctctgcctac	240
atgcagctca acagcctgac atctgaggat tctgcagttt atttctgtaa aagatcgctt	300
agtacgcctt actggggcca agggactctg gtcactgtct ctg	343
<210> 171	
<211> 341	
<212> DNA	
<213> Mus sp.	
<400> 171	
gacattgtga tgacacagtc tccatcctcc ctgactgtga cagcaggaga gagggtaact	60
atgagctgca agtccagtca gagtctgtta aacagtggaa atcaaagag ctacttgacc	120
tggtaccagg agaaaccagg gcagcctct aaactgttga tctcctggc atccactagg	180

gattctgggg tccctgatcg cttcacaggc agtggatctg gaacagattt cacttcacc 240
 atcagcagt tgccaggctga agacctggca gtttattact gtcagagtga ttatagttat 300
 ccgtacacgt tcggaggggg gaccaagctg gaaataaaac g 341
 <210> 172
 <211> 345
 <212> DNA
 <213> Mus sp.
 <220><221> modified_base
 <222> (26)..(26)
 <223> a, c, t, g, unknown or other

<220><221> modified_base
 <222> (332)..(332)
 <223> a, c, t, g, unknown or other
 <400> 172
 cagggtcagc tgcagcagtc tgacgntgag ttggtgaaac cgggggcttc agtgaagata 60
 tcctgttaagg ctctggcta caccttcaact gaccatgcta ttcaactgggt gaagcagaag 120
 cctgaacagg gcctggaatg gattggatat ttttctcccg gaaatgatga tattaagtac 180
 aatgagaagt ttagggcaa ggccacactg actgcagaca aatcctccag cactgcctac 240
 atgcagctca acagcctgtc atctgatgt tctgcagtgt atttctgtaa aagatcgctt 300
 agtacgcctt actggggcca agggactctg gncactgtct ctgca 345

<210> 173
 <211> 341
 <212> DNA
 <213> Mus sp.
 <400> 173
 gacattgtga tgacacagtc tccatcctcc ctgactgtga cagcaggaga gaaagtca 60
 atgagctgca agtccagtca gagtctgtta aaccgtggaa atcataagaa ctacttgacc 120
 tggtaacctggc agaaaccagg gctgcctcct aaactgttgat tttactggc atccactagg 180
 gaatctgggg tccctgatcg cttcacaggc agtggatctg gaacagattt cgctctcacc 240
 atcagcagt tgccaggctga agacctggca gtttattact gtcagaatga ttatacttat 300
 ccgtacacgt tcggaggggg gaccaagctg gagataaaac g 341

<210> 174

<211> 345

<212> DNA

<213> Mus sp.

<400> 174

cagggtcagc tgacgcagtc tgacgcttag ttggtaaac ctgggcttc aatgaagatt	60
tcctgcaagg cttctggcta caccttcaact gaccatgcta ttcaactgggt gaagcagaag	120
cctgaacagg gcctggaatg gattggatat atttctcccg gaaatggtga tattaagtac	180
aatgagaagt tcaaggtaa ggccacactg actgcagaca aatcctccag cactgcctac	240
atgcagctca acagcctgac atctgaggat tctgcagtgt atttctgtaa aagatcgatt	300
actacgcctt actggggcca agggactctg gtcactgtct ctgca	345

<210> 175

<211> 341

<212> DNA

<213> Mus sp.

<400> 175

gacattgtga tgacacagtc tccatcctcc ctgactgtga cagcaggaga gaaggtcact	60
atgagctgca agtccagtca gagtctgtta aacagtggaa aaacaaagaa ctacttgacg	120
tgttaccagg agaaaccagg gcagcctcct aaactgttga tctactggc atccactagg	180
gaatctgggg tccctgatcg cttcacaggc agtggatctg gaacagattt cactctacc	240
atcagcagtg tgcaggctga agacctggca gtttattact gtaagaatga ttatagttat	300
ccgtacacgt tcggaggggg gaccaagctg gaaataaaac g	341

<210> 176

<211> 345

<212> DNA

<213> Mus sp.

<400> 176

cagggtcagc tgacgcagtc tgacgctgaa ttggtaaagc ctgggcttc agtgaagata	60
tcctgcaaga cttctggcta caccttcaact gaccatgcta ttcaactgggt gaagcagaag	120
cctgaacagg gcctggaatg gattggatat atctctcccg gaaatgtatga tattaagtac	180
aatgagaagt tcaaggccaa ggtcacactg actgcagaca aatcctccag cactgcctac	240
atgcagctca acagcctgac atctgaggat tctgcagtct atttctgtaa aagatcgatt	300
actacgcctt actggggcca agggactctg gtcactgtct ctgca	345

<210> 177
<211> 480
<212> DNA
<213> Mus sp.
<220><221> modified_base
<222> (153)..(153)
<223> a, c, t, g, unknown or other
<220><221> modified_base
<222> (285)..(286)
<223> a, c, t, g, unknown or other
<220><221> modified_base
<222> (289)..(289)
<223> a, c, t, g, unknown or other
<220><221> modified_base
<222> (297)..(298)
<223> a, c, t, g, unknown or other
<220><221> modified_base
<222> (332)..(332)
<223> a, c, t, g, unknown or other
<220><221> modified_base
<222> (405)..(405)

<223> a, c, t, g, unknown or other
<220><221> modified_base
<222> (412)..(412)
<223> a, c, t, g, unknown or other
<220><221> modified_base
<222> (429)..(429)
<223> a, c, t, g, unknown or other

<400> 177
tttttatacg ccacttctca atacgcctca ctataggcca agcagtggta tcaacgcaga 60
ttacaaaggg gaaaggaatc agaccgactc gcgcataaag atgaaatcac agactctgg 120
cttcataatcc agtacgctcg gggactatgg agnggaacag tacatttaa tgacccaatg 180
tcccaaaggc aagaacatgt cagtaggaga gagggtcact cagagtgcaa ggccaggaga 240

aatcaaaaca cttatgttccctggtatcaa cagaaaccaggcancntntaaaatgnnga	300
ttacgggca tccaaccggg aatctgggt cnccgatcgcttcacaggca gtggatctgg	360
aacagatttc actctcacca tcagcagtgcaggctgaa gaccngcag tnttcactgt	420
ggacaggnt acagttatcc gtacacgttc ggagggggca ccaagctgaa aaaaacggc	480
<210> 178	
<211> 345	
<212> DNA	
<213> Mus sp.	
<400> 178	
cagggtcagc tgacgcagtc tgacgcttagtttgtgaaacctgggcttc agtgaagata	60
tcctgcaagg ctctggcta caccttcaact gaccatgcta ttcaactggtaa gaagcagaag	120
cctgaacagg gcctggaatg gattggatat atttctccggaaatggtgatgatgatgat	180
gatgagaagt ttaaggcggca gcccacactg actgcagaca aatccctctc cactgcctac	240
atgcagctca acagcctgac atctgaagat tctgcagtgttattctgtaa aagatcgatt	300
actacctttaactggggccaaaggactctggtcactgtctctgca	345
<210> 179	
<211> 345	
<212> DNA	
<213> Mus sp.	
<400> 179	
cagggtcagc tgacgcagtc tgacgcttagtttgtgaaacctgggcttc agtgaagata	60
tcctgcaagg ctctggcta caccttcaact gaccatgcta ttcaactggtaa gaagcagaag	120
cctgaacagg gcctggaatg gattggatat atttctccggaaatggtgatgatgatgat	180
aatgagaagt tcaaggcggca gcccacactg actgcagaca agtcctccag cactgcctac	240
atgcagctca acagcctgac atctgaggat tctgcagtgttttctgtaa aagatcgatt	300
actacctttaactggggccaaaggactctggtcactgtctctgca	345
<210> 180	
<211> 483	
<212> DNA	
<213> Mus sp.	
<220><221> modified_base	
<222> (3)..(3)	
<223> a, c, t, g, unknown or other	

<220><221> modified_base

<222> (137)..(137)

<223> a, c, t, g, unknown or other

<220><221> modified_base

<222> (193)..(193)

<223> a, c, t, g, unknown or other

<400> 180

ttnataggac tcaatatagg gcaagcagt gtttacgc cgagtacatg gggagggcaa	60
ggcgagaag tcacttcag tgaggataca ccatcagcat gagggccctt gttgagctcc	120
tggggggct ggtgtntgc ttttaggtg tgagatgtga catccagatg aaccagtctc	180
catccagtct gtntgcatcc ttggagaca caattaccat catggccat tccagtcaga	240
acattaatgt ttggtaaga tggtaaccagg agaaaccagg aaatattcct aaaatattga	300
tatataaggg ttccaacttg tacacaggcg tcccatcaag gtttagtggc agtgatttg	360

gaacaggtt cacattaacc atcagcagcg tgcageggaa agacattgcc acttactact	420
gtcaacagga tcaaagttt ccgtacacgt tcggaggggg gaccaagctg aaataaaacg	480
ggc	483

<210> 181

<211> 345

<212> DNA

<213> Mus sp.

<400> 181

caggttcagc tgcccgagc tgacgcccgg ttggtaaac ctggggcttc agtgaagata	60
tcctgcaagg ctctggcta catttcaact gaccatgcta ttcaactgggt gaagcagaag	120
cctgaacagg gcctggaatg gattggat atttctcccg gaaatggtga tattaaagtac	180

aatgagaagt tcaagggcaa ggcccacactg actgcagaca aatcctccag cactgcctac	240
atgcatctca acagcctgac atctgaggat tctgcgtgtt atttctgtaa aagatcgatt	300
actacctttt actggggcca agggactctg gtcactgtct ctgca	345

<210> 182

<211> 323

<212> DNA

<213> Mus sp.

<400> 182

gacatccaga tgaaccagtc cccatccagt ctgtctgcat ccctggaga cacaattacc	60
atcacttgcc atgccagtca gcacattaat ttttggtaa gctggcacca gcagaaacca	120
ggaaatattc ctaaactctt gatctataag gcttccaact tgcacacagg cgtcccatca	180
aggttagtg gcagtggatc tggaacaggt ttcacattaa ccatcagcag cctgctgcct	240
gaagacgttg ccacttacta ctgtcaacag gatcaaagtt atccgtatat gttcgaggg	300
gggaccaagc tgaaaataaa acg	323
<210> 183	
<211> 345	
<212> DNA	
<213> Mus sp.	
<400> 183	
caggttcagc tgacgcagtc tgacgctgag ttggtaaac ctgggcttc agtgaagata	60
tcctgcaagg ctctggcta caccttact gaccatgcta ttcaactgggt gaagcagaag	120
cctgaacagg gcctggaatg gattggatat atttctcccg gaaatgatga tattaagtac	180
aatgagaagt ttaaggcaaa ggccacactg actgcagaca aatcctccag cactgcctac	240
atgctgtca acagcctgac atctgaggat tctgcagttt atttctgtaa aagatcgatt	300
actaccttt actggggcca agggactctg gtcaactgtct ctgca	345
<210> 184	
<211> 323	
<212> DNA	
<213> Mus sp.	
<400> 184	
aacattgtaa tgaccaatc tccaaatcc atgtccatgt cagtaggaga gagggtcacc	60
ttgacctgca aggccagtga gaatgtggtt acttatgttt cctggatca acagaaacca	120
gagcagtctc ctaaactgct gatatacggg gcatccaacc ggtacactgg ggtccccat	180
cgcttcacag gcagtggatc tgcaacagat ttcacttga ccatcagcag tgtgcaggct	240
gaagacgttg cagattatca ctgtggacag gttacagct atccgtacac gttcgaggg	300
gggaccaagc tgaaaataaa acg	323
<210> 185	
<211> 345	
<212> DNA	
<213> Mus sp.	

<400> 185

cagggtcaac tgacgagtc tgacgcttag ttggtaaac ctgggcttc agtgaagata	60
tcctgcagg ctctggcta cacttcaact gaccatgcta ttcaactgggt gaagcagaag	120
cctgaacagg gcctggaaatg gattggat atttctcccg gaaatggtga tattaagtac	180

aatgagaagt tcaaggtaa ggccacactg actgcagaca cttcctccac cactgcctac	240
atgcagctca acagcctgac atctgaggat tctgcaatgt atttctgtaa aagatccatt	300
actacgttt actggggcca agggactctg gtcactgtct ctgca	345

<210> 186

<211> 321

<212> DNA

<213> Mus sp.

<400> 186

gacatccaga tgaaccagtc tccatccagt ctgtctgcat cccttgaga cacaattacc	60
atcaacttgcc atgccagtcgaa acatattat gtttggtaa gctggatcca gcagaaacca	120
ggaaatattc ctaaactatt gatctataag gcttccaaatt tgtatacagg cgtcccatca	180

aggtagtgt gcagtggatc tggaacagg ttcacattaa ccatcagcag cctgcagcct	240
gaagacgttg ccacgtacta ctgtcaacac gatcaaagtt atccgtacac gttcgagg	300
gggaccaagc tggaaataaa a	321

<210> 187

<211> 345

<212> DNA

<213> Mus sp.

<400> 187

cagggtcagc tgacgagtc tgacgcttag ttggtaaac ctgggcttc agtgaagata	60
tcctgcagg ctctggcta catttcaact gaccatgcaa ttcaactgggt gaagcagaag	120
cctgaacagg gcctggaaatg gattggat atttctcccg gaaatggtga tattaagtac	180

attgagaagt tcagggcaa ggccacactg actgcagaca aatcctccag cactgcctac	240
atgcagctca acagcctgac atctgaggat tctgcgtgt atttctgtaa aagatcgctt	300
agtacgcctt actggggcca agggactctg gtcactgtct ctgca	345

<210> 188

<211> 329

<212> DNA

<213> Mus sp.

<400> 188

aacatttaa tgaccaatc tccaaatcc atgtccatgt cagtaggaga gagggtcacc	60
ttgacctgca aggccagtga gaatgtggtt aattatgtt cctggtatca acagaaacca	120
gagcagtctc ctaaactgct gatattcggg gcatccaacc ggtactctgg ggtccccat	180

cgcttcacag gcagtggatc tgcaacagat ttcaactctga ccatcagcag tgtgcaggct	240
gaagaccttg cagattatca ctgtggaagc aagtggatata ctagctatcc gtacacgttc	300
ggagggggga ccaagctgga aataaaaacg	329

<210> 189

<211> 326

<212> DNA

<213> Mus sp.

<400> 189

aacatttaa tgaccaatc tccaaatcc atgtccatgt cagtaggaga gagggtcacc	60
ttgacctgca aggccagtga gaatgtggtt aattatgtt cctggtatca acagaaacca	120
gagcagtctc ctaaactgct gatatacggg gcatccaacc ggtactctgg ggtccccat	180

cgcttcacag gcagtggatc tgcaacagat ttcaactctga ccatcagcag tgtgcaggct	240
gaagaccttg cagattatca ctgtgagca agggttacta gctatccgt aacgttcgga	300
ggggggacca agctggaaat aaaacg	326

<210> 190

<211> 345

<212> DNA

<213> Mus sp.

<400> 190

cagggtcagc tgacgcagtc tgacgcttag ttggtaaac ctggacttc agtgaagata	60
tcctgcaggg cttctggcta cacttcaact gaccatgcta ttcaactgggt gaagcagaag	120
cctgaacagg gcctggaatg gattggatat atttctcccg gaaatggta tattaagtac	180

aatgagaagt tcaaggcaa ggccacactg actgcagaca aatcctccag cactgcctac	240
atgcagctca acagcctgac atctgacat tctgcagtgt atttctgtaa aagatccatt	300
actacgcctt actggggcca aggcaccact ctcacagct cctca	345

<210> 191

<211> 315

<212> DNA

<213> Mus sp.

<400> 191

agttttgtga tgacccagac tcccaaattc ctgctgtgt cagcaggaga cagggttacc	60
ataaacctgca aggccagtca gagtgtgaat aataatgttag ctggtagcca acagaagcca	120
ggcgagtctc ctaaacagct gatatactat gcatccaatc gtacactgg agtccctgat	180

cgcttcactg gcagtggata tgggacggat ttcaacttca ccatctacac tgtgcaggt	240
gaagacctgg cagtttattt ctgtcagcag gtttatagct ctccgtggac gttcggtgga	300
ggcaccaaggc tgaaa	315

<210> 192

<211> 330

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 192

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Ser Ser Ser Val Thr Val Thr Ser Ser Thr Trp Pro Ser Gln Ser Ile

65 70 75 80

Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys

85 90 95

Ile Glu Pro Arg Gly Pro Thr Ile Lys Pro Cys Pro Pro Cys Lys Cys

100 105 110

Pro Ala Pro Asn Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro

115 120 125

Lys Ile Lys Asp Val Leu Met Ile Ser Leu Ser Pro Ile Val Thr Cys

130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp
 145 150 155 160

Phe Val Asn Asn Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg
 165 170 175

Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Leu Arg Val Val Ser Ala Leu Pro Ile Gln
 180 185 190

His Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn
 195 200 205

Lys Asp Leu Pro Ala Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Pro Lys Gly
 210 215 220

Ser Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro Pro Pro Glu Glu
 225 230 235 240

Met Thr Lys Lys Gln Val Thr Leu Thr Cys Met Val Thr Asp Phe Met
 245 250 255

Pro Glu Asp Ile Tyr Val Glu Trp Thr Asn Asn Gly Lys Thr Glu Leu
 260 265 270

Asn Tyr Lys Asn Thr Glu Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe
 275 280 285

Met Tyr Ser Lys Leu Arg Val Glu Lys Lys Asn Trp Val Glu Arg Asn
 290 295 300

Ser Tyr Ser Cys Ser Val Val His Glu Gly Leu His Asn His His Thr
 305 310 315 320

Thr Lys Ser Phe Ser Arg Thr Pro Gly Lys
 325 330

<210> 193

<211> 107

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 193

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg

35 40 45

Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser

50 55 60

Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu

65 70 75 80

Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser

85 90 95

Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys

100 105

<210> 194

<211> 330

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 194

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys

85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys

100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro

115	120	125
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys		
130	135	140
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp		
145	150	155
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu		
165	170	175
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu		
180	185	190
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn		
195	200	205
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly		
210	215	220
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu		
225	230	235
Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr		
245	250	255
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn		
260	265	270
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe		
275	280	285
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn		
290	295	300
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr		
305	310	315
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
325	330	
<210> 195		
<211> 107		
<212> PRT		
<213> Homo sapiens		
<400> 195		

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

1	5	10	15
---	---	----	----

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

20	25	30
----	----	----

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

35	40	45
----	----	----

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

50	55	60
----	----	----

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

65	70	75	80
----	----	----	----

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

85	90	95
----	----	----

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

100	105
-----	-----

<210> 196

<211> 446

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

hybrid polypeptide

<400> 196

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

1	5	10	15
---	---	----	----

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp His

20	25	30
----	----	----

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

35	40	45
----	----	----

Gly Tyr Ile Ser Pro Gly Asn Gly Asp Ile Lys Tyr Asn Glu Lys Phe

50	55	60
----	----	----

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

65	70	75	80
----	----	----	----

Met His Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys

85 90 95

Lys Arg Ser Leu Leu Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu

100 105 110

Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Ala Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala

115 120 125

Pro Val Cys Gly Asp Thr Thr Gly Ser Ser Val Thr Leu Gly Cys Leu

130 135 140

Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Leu Thr Trp Asn Ser Gly

145 150 155 160

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

165 170 175

Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Val Thr Val Thr Ser Ser Thr Trp Pro

180 185 190

Ser Gln Ser Ile Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr Lys

195 200 205

Val Asp Lys Lys Ile Glu Pro Arg Gly Pro Thr Ile Lys Pro Cys Pro

210 215 220

Pro Cys Lys Cys Pro Ala Pro Asn Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe

225 230 235 240

Ile Phe Pro Pro Lys Ile Lys Asp Val Leu Met Ile Ser Leu Ser Pro

245 250 255

Ile Val Thr Cys Val Val Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val

260 265 270

Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr

275 280 285

Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Leu Arg Val Val Ser Ala

290 295 300

Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys

305 310 315 320

Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro Ala Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser

325	330	335
-----	-----	-----

Lys Pro Lys Gly Ser Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro Pro

340	345	350
-----	-----	-----

Pro Glu Glu Glu Met Thr Lys Lys Gln Val Thr Leu Thr Cys Met Val

355	360	365
-----	-----	-----

Thr Asp Phe Met Pro Glu Asp Ile Tyr Val Glu Trp Thr Asn Asn Gly

370	375	380
-----	-----	-----

Lys Thr Glu Leu Asn Tyr Lys Asn Thr Glu Pro Val Leu Asp Ser Asp

385	390	395	400
-----	-----	-----	-----

Gly Ser Tyr Phe Met Tyr Ser Lys Leu Arg Val Glu Lys Lys Asn Trp

405	410	415
-----	-----	-----

Val Glu Arg Asn Ser Tyr Ser Cys Ser Val Val His Glu Gly Leu His

420	425	430
-----	-----	-----

Asn His His Thr Thr Lys Ser Phe Ser Arg Thr Pro Gly Lys

435	440	445
-----	-----	-----

<210> 197

<211> 1401

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

hybrid polynucleotide

<400> 197

atggagaccg acaccctgct gctctgggtg ctgcgtctct gggtgcccg ctccacccga	60
cagggttcagc tgcaagcagtc tgacgctgag ttggtaaaac ctggggcttc agtgaagata	120
tcctgcaagg cttctggcta caccttact gaccatgcta ttcactgggt gaagcaaag	180
cctgaacagg gcctggactg gattggatat atttctcccg gaaatggta tattaagtac	240
aatgagaagt tcaaggacaa ggtcacactg actgcagaca aatcctccag cactgcctgc	300
atgcacacta acagcctgac atctgaggat tctgcgtgt atttctgcaa aagatcccta	360
ctagctttg actactgggg ccaaggcacc actctcacag tctcctcagc taaaacaaca	420

gcccccattcg tctatccact ggcccctgtg tgtggagata caactggctc ctcggtgact	480
cttagatgcc tggtaaaggg ttatccct gagccagtga cttgacactg gaactctgg	540

tccctgtcca	gtggtgtca	cacccccc	gctgtcgc	agtctgacct	ctacaccctc	600
agctcaagcg	tgactgtaac	cagctcgacc	tggccagcc	agtccatcac	ctgcaatgt	660
gcccacccgg	caaggcagcac	caaggtggac	aagaaaattg	agcccagagg	gcccacaatc	720
aagccctgtc	ctccatgcaa	atgcccagca	cctaaccctt	tgggtggacc	atccgtttc	780
atctccctc	caaagatcaa	ggatgtactc	atgatctccc	tgagccccat	agtcatatgt	840

gtagtcgttg	atgtgagcga	ggatgaccca	gatgtccaga	ttagctggtt	tgtgaacaac	900
gtggaagtgc	acactgctca	gacacagacg	catagagagg	attacaacag	tactctccgg	960
gttgcgttg	ccctccccat	ccagcaccag	gactggatga	gtggcaagga	gttcaaattgc	1020
aaggtaaca	acaaagacct	cccagcggcc	atcgagagaa	ccatctcaa	acccaaaggg	1080
ttagtaagag	ctccacaggt	atatgtcttg	cctccaccag	aagaggagat	gactaagaaa	1140
caggtaactc	tgacactgcat	ggtcacagac	ttcatgcctg	aagacattt	cgtggagtgg	1200
accaacaacg	ggaaaacaga	gctaaactac	aagaacactg	aaccagtctt	ggactctgat	1260

ggttcttact	tcatgtacag	caagctgaga	gtggagaaga	agaactgggt	ggagagaaat	1320
agctactct	gttcgttgt	ccacgagggt	ctgcacaatc	accacacgac	taagagcttc	1380
tccggactc	cggtaataata	g				1401

<210> 198

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

hybrid polypeptide

<400> 198

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Gly Thr Asn

20 25 30

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

35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Ser

65	70	75	80
----	----	----	----

Glu Asp Leu Thr Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Ser Ser Phe Pro Leu

85	90	95
----	----	----

Thr Phe Gly Val Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Ala Asp Ala Ala

100	105	110
-----	-----	-----

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

115	120	125
-----	-----	-----

Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp Ile

130	135	140
-----	-----	-----

Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val Leu

145	150	155	160
-----	-----	-----	-----

Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser

165	170	175
-----	-----	-----

Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser Tyr

180	185	190
-----	-----	-----

Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys Ser

195	200	205
-----	-----	-----

Phe Asn Arg Asn Glu Cys

210

<210> 199

<211> 705

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

hybrid polynucleotide

<400> 199

atggagacgg acaccctgct gctctgggtg ctgctgctct gggtgcccggt ctccaccggaa	60
---	----

gacatttgtga tgacctagtc tcacaaattc atgtccacat cagtaggaga cagggtcagc	120
--	-----

atcacctgca aggccagtca ggatgtgggc actaatatag cctggtatca acagaaaacca	180
--	-----

ggccgatctc ctaaagtact gat�actcg gcatccaccc ggcacactgg agtccctgat	240
--	-----

cgcttcacag gcagtggatc tgggacagat ttcaactctca ccattagcaa tgtgcagtct	300
--	-----

gaagacttga cagattattt ctgtcagcaa tatagcagct ttcctctcac gttcggttt	360
gggaccaagg tggagctgaa acgggcagat gctgcaccaa ctgtatccat cttccacca	420
tccagtggc agttaacatc tggaggtgcc tcagtcgtgt gcttcttcaa caacttctac	480
cccaaagaca tcaatgtcaa gtggaagatt gatggcagt aacgacaaaa tggcgccctg	540
aacagttgga ctgatcagga cagcaaagac agcacctaca gcatgagcag caccctcagc	600
ttgaccaagg acgagtatga acgacataac agctataacct gtgaggccac tcacaagaca	660
tcaacttcac ccattgtcaa gagcttcaac aggaatgagt gttga	705
<210> 200	
<211> 296	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 200	
caggttcagc tggtgcagtc tggagctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggc	60
tcctgcaagg ctctggta caccttacc agctatggta tcagctgggt gcgcacaggcc	120
cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg atcagcgctt acaatggtaa cacaaactat	180
gcacagaagc tccagggcag agtcaccatg accacagaca catccacgag cacagcctac	240
atggagctga ggagcctgag atctgacgac acggccgtgt attactgtgc gagaga	296
<210> 201	
<211> 286	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 201	
gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtacc	60
atcaacttgcc gggcaagtca gagcatttagc agctattaa attggatca gcagaaacca	120
gggaaagccc ctaagctcct gatctatgtt gcatccagg ttcaaagtgg ggtccatca	180
aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcaactctca ccatcagcag tctgcaacct	240
gaagattttcaacttacta ctgtcaacag agttacagta cccctc	286
<210> 202	
<211> 305	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400>	
> 202	

gacatcgta tgaccagtc tccagactcc ctggctgtt ctctggcga gagggccacc 60
 atcaactgca agtccagcca gagtgttta tacagctcca acaataagaa ctacttagct 120
 tggtaccagg agaaaccagg acgcctctt aagctgctca ttactggc atctaccgg 180
 gaatccggg tccctgaccg attcagtggc agcggcttg ggacagattt cactctacc 240
 atcagcagcc tgcaggctga agatgtggca gtttattact gtcagcaata ttatagtact 300
 cctcc
 <210> 203
 <211> 98
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 203
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Trp Ile Ser Ala Tyr Asn Gly Asn Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Leu
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg

<210> 204
 <211> 95
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 204
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro

85 90 95

<210> 205

<211> 102

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 205

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Tyr Tyr Ser Thr Pro Cys

100

<210> 206

<211> 25

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400>

206

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

20 25

<210> 207

<211> 22

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 207

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

1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Thr Cys

20

<210> 208

<211> 23

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 208

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

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys

20

<210> 209

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 209

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

1 5 10

<210> 210

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 210

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

1 5 10 15

<210> 211

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 211

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

1 5 10 15

<210> 212

<211> 32

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 212

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 213

<211> 32

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 213

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

1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys

20 25 30

<210> 214

<211> 32

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 214

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

1	5	10	15
---	---	----	----

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

20	25	30
----	----	----

<210> 215

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 215

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

1	5	10
---	---	----

<210> 216

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 216

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

1	5	10
---	---	----

<210> 217

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

hybrid polypeptide

<400> 217

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

1	5	10	15
---	---	----	----

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser His

20	25	30
----	----	----

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

35 40 45

Tyr Gly Ala Thr Asn Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Gly Ala Pro Phe

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 218

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

hybrid polypeptide

<400> 218

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser His

20 25 30

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

35 40 45

Tyr Gly Ala Thr Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Gly Ala Pro Phe

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 219

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

hybrid polypeptide

<400> 219

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser His

20 25 30

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

35 40 45

Tyr Gly Ala Thr Asn Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Gly Ala Pro Phe

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 220

<211> 114

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

hybrid polypeptide

<400> 220

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

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

35 40 45

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

Ser Ser

<210> 221

<211> 114

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 221

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

35 40 45

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

100 105 110

Ser Ser

<210> 222

<211> 114

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 222

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

1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp His

20 25 30

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

35 40 45

Gly Tyr Phe Ser Pro Gly Asn Asp Asp Ile Lys Tyr Asn Glu Lys Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Lys Arg Ser Tyr Tyr Gly Asp Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val

100 105 110

Ser Ser

<210> 223

<211> 114

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 223

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

<210> 224
 <211> 114
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 hybrid polypeptide
 <400> 224

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Lys Arg Ser Tyr Tyr Gly Asp Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val

100 105 110

Ser Ser

<210> 225

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

hybrid polypeptide

<400> 225

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys His Ala Ser Gln His Ile Asn Phe Trp

20 25 30

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

35 40 45

Tyr Lys Ala Ser Asn Leu His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asp Gln Ser Tyr Pro Tyr

85 90 95

Met Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 226

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 226

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

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

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

<210> 227

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

hybrid polypeptide

<400> 227

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Gly Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asp Gln Ser Tyr Pro Tyr

85 90 95

Met Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 228

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 228

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys His Ala Ser Gln His Ile Asn Phe Trp
20 25 30

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

Tyr Lys Ala Ser Asn Leu His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Gly Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asp Gln Ser Tyr Pro Tyr

85 90 95

Phe Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 229

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

hybrid polypeptide

<400> 229

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

1 5 10 15

Asp Arg Ile Thr Ile Thr Cys His Ala Ser Gln His Ile Asn Phe Trp

20 25 30

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

35 40 45

Tyr Lys Ala Ser Asn Leu His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Gly Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asp Gln Ser Tyr Pro Tyr

85 90 95

Phe Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 230

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

hybrid polypeptide

<400> 230

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 Ile Phe Thr Asp His

20 25 30

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

35 40 45

Gly Tyr Ile Ser Pro Gly Asn Gly Asp Ile Lys Tyr Asn Glu Lys Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Ser Ile Thr Thr Ser Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr

100 105 110

Val Ser Ser

115

<210> 231

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

hybrid polypeptide

<400

> 231

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 Ile Phe Thr Asp His

20 25 30

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

35 40 45

Gly Tyr Ile Ser Pro Gly Asn Gly Asp Ile Lys Tyr Asn Glu Lys Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Lys Arg Ser Ile Thr Thr Ser Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr

100 105 110

Val Ser Ser

115

<210> 232

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

hybrid polypeptide

<400> 232

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

1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ile Phe Thr Asp His

20 25 30

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

35 40 45

Gly Tyr Ile Ser Pro Gly Asn Gly Asp Ile Lys Tyr Asn Glu Lys Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

Met His Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys

85 90 95

Lys Arg Ser Ile Thr Thr Ser Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr

100 105 110

Val Ser Ser

115

<210> 233

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

hybrid polypeptide

<400> 233

Glu 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 Ile Phe Thr Asp His

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

<210> 234
<211> 115
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

hybrid polypeptide

<400> 234	1	5
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala		
10	15	
Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ile Phe Thr Asp His		
20	25	30
Ala Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile		
35	40	45
Gly Tyr Ile Ser Pro Gly Ser Gly Asp Ile Lys Tyr Asn Glu Lys Phe		
50	55	60

Lys Gly Arg Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr		
65	70	75
Met His Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys		
85	90	95

Lys Arg Ser Ile Thr Thr Ser Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110
 Val Ser Ser
 115

<210> 235

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

hybrid polypeptide

<400> 235

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Asp Tyr Thr Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile

100 105 110

Lys

<210> 236

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

hybrid polypeptide

<400> 236

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

1	5	10	15
---	---	----	----

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

20	25	30
----	----	----

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

35	40	45
----	----	----

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

50	55	60
----	----	----

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

65	70	75	80
----	----	----	----

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

85	90	95
----	----	----

Asp Tyr Thr Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile

100	105	110
-----	-----	-----

Lys

<210> 237

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

hybrid polypeptide

<400> 237

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
----	----	----

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

35	40	45
----	----	----

Gly Tyr Phe Ser Pro Gly Asn Asp Asp Ile Lys Tyr Asn Glu Lys Phe

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

<210> 238

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

hybrid polypeptide

<400> 238

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

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

35 40 45

Gly Tyr Phe Ser Pro Gly Asn Asp Asp Ile Lys Tyr Asn Glu Lys Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Lys Arg Ser Leu Ser Thr Pro Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr

100 105 110

Val Ser Ser

115

<210> 239

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

hybrid polypeptide

<400> 239

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

1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp His

20 25 30

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

35 40 45

Gly Tyr Phe Ser Pro Gly Asn Asp Asp Ile Lys Tyr Asn Glu Lys Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Lys Arg Ser Leu Ser Thr Pro Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr

100 105 110

Val Ser Ser

115

<210> 240

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

hybrid polypeptide

<400> 240

Glu 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

Ala Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Tyr Phe Ser Pro Gly Asn Asp Asp Ile Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

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

Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95

Lys Arg Ser Leu Ser Thr Pro Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110

Val Ser Ser

115

<210> 241

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

hybrid polypeptide

<400> 241

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

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

Ala Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Tyr Phe Ser Pro Gly Asn Asp Asp Ile Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

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

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

85 90 95
 Lys Arg Ser Leu Ser Thr Pro Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110
 Val Ser Ser

115
 <210> 242
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

hybrid polypeptide

<400> 242
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Glu Asn Val Val Thr Tyr
 20 25 30
 Val Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Gly Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

<210> 243
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 hybrid polypeptide
 <400>

> 243

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

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

<210> 244

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

hybrid polypeptide

<400

> 244

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

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

Glu Asp Leu Ala Thr Tyr His Cys Gly Gln Gly Tyr Ser Tyr Pro Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 245

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

hybrid polypeptide

<400

> 245

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys His Ala Ser Gln Asn Ile Asn Val Trp

20 25 30

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

35 40 45

Tyr Lys Ala Ser Asn Leu Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Asp Gln Ser Tyr Pro Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 246

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

hybrid polypeptide

<400

> 246

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

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

<210> 247

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400>

> 247

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

Ser Gly Ser Gly Thr Gly Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Asp Gln Ser Tyr Pro Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 248

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400>

> 248

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

1	5	10	15
---	---	----	----

Asp Arg Ile Thr Ile Thr Cys His Ala Ser Gln Asn Ile Asn Val Trp

20	25	30
----	----	----

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

35	40	45
----	----	----

Tyr Lys Ala Ser Asn Leu Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50	55	60
----	----	----

Ser Gly Ser Gly Thr Gly Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65	70	75	80
----	----	----	----

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Asp Gln Ser Tyr Pro Tyr

85	90	95
----	----	----

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 249

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400>

> 249

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

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

115

<210> 250

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

hybrid polypeptide

<400> 250

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

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

35 40 45

Gly Tyr Ile Ser Pro Gly Asn Gly Asp Ile Lys Tyr Asn Glu Lys Phe

50 55 60

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

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

85 90 95

Lys Arg Ser Ile Thr Thr Ser Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr

100 105 110

Val Ser Ser

115

<210> 251

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

hybrid polypeptide

<400> 251

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

1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp His

20 25 30

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

35 40 45

Gly Tyr Ile Ser Pro Gly Asn Gly Asp Ile Lys Tyr Asn Glu Lys Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Lys Arg Ser Ile Thr Thr Ser Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr

100 105 110

Val Ser Ser

115

<210> 252

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

hybrid polypeptide

<400> 252

Glu 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

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

35 40 45

Gly Tyr Ile Ser Pro Gly Ser Gly Asp Ile Lys Tyr Asn Glu Lys Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Lys Arg Ser Ile Thr Thr Ser Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr

100 105 110

Val Ser Ser

115

<210> 253

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

hybrid polypeptide

<400> 253

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

1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp His

20 25 30

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

35 40 45

Gly Tyr Ile Ser Pro Gly Ser Gly Asp Ile Lys Tyr Asn Glu Lys Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Lys Arg Ser Ile Thr Thr Ser Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr

100 105 110

Val Ser Ser

115

<210> 254

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

hybrid polypeptide

<400> 254

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Gly Thr Asn

20 25 30

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

35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Ser Phe Pro Leu

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 255

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400

> 255

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

1 5 10 15

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 256

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

hybrid polypeptide

<400

> 256

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

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

35 40 45

Gly Tyr Ile Ser Pro Gly Asn Gly Asp Ile Lys Tyr Asn Glu Lys Phe

50 55 60

Lys Asp Arg Val Thr Met Thr Asp Thr Ser Thr Ser Ala Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Thr Val Ser Ser

115

<210> 257

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

hybrid polypeptide

<400> 257

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

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

35 40 45

Gly Tyr Ile Ser Pro Gly Asn Gly Asp Ile Lys Tyr Asn Glu Lys Phe

50 55 60

Lys Asp Arg Val Thr Met Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Met Gln Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys

85 90 95

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

100 105 110

Thr Val Ser Ser

115

<210> 258

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

hybrid polypeptide

<400> 258

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

1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp His

20 25 30

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

35 40 45

Gly Tyr Ile Ser Pro Gly Asn Gly Asp Ile Lys Tyr Asn Glu Lys Phe

50 55 60

Lys Asp Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Ser

65 70 75 80

Met His Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys

85 90 95

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

100 105 110

Thr Val Ser Ser

115

<210> 259

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

hybrid polypeptide

<400> 259

Glu 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

Ala Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Tyr Ile Ser Pro Gly Ser Gly Asp Ile Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

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

Met Gln Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95

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

Thr Val Ser Ser
 115

<210> 260

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

hybrid polypeptide

<400> 260

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

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

Ala Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Tyr Ile Ser Pro Gly Ser Gly Asp Ile Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

Lys Asp Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Ser

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

<210> 261

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 261

Cys Gln Phe Asp Leu Ser Thr Arg Arg Leu Lys Cys

1 5 10

<210> 262

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 262

Cys Gln Tyr Asn Leu Ser Ser Arg Ala Leu Lys Cys

1 5 10

<210> 263

<211> 122

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

polypeptide

<400> 263

Met Ala Asn Val Gln Leu Asn Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro

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

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

<210> 264

<211> 122

<212>

PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 264

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

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

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Thr Pro Glu Asp Thr Gly Glu Tyr

85 90 95

Phe Cys Thr Lys Val Gln Ser Pro Arg Thr Arg Ile Pro Ala Pro Ser

100 105 110

Ser Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 265

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 265

Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu

1 5 10

<210> 266

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 266

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Lys

1 5