(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0135653
(43) 공개일자 2024년09월11일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/40 (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)
A61K 47/68 (2017.01) *A61P 35/00* (2006.01)
C07K 14/725 (2006.01) *C07K 16/28* (2006.01)
C12N 5/0783 (2010.01)
(52) CPC특허분류
C07K 16/40 (2013.01)
A61K 39/4611 (2023.05)
(21) 출원번호 10-2024-7027390
(22) 출원일자(국제) 2023년01월24일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2024년08월14일
(86) 국제출원번호 PCT/US2023/061136
(87) 국제공개번호 WO 2023/147292
국제공개일자 2023년08월03일
(30) 우선권주장
63/302,639 2022년01월25일 미국(US)

(71) 출원인
더 칠드런스 호스피탈 오브 필라델피아
미국 펜실베니아 필라델피아 시빅 센터 블러바드 3401 (우: 19104)
유니버시티 오브 피츠버그 - 오브 더 커먼웰쓰 시스템 오브 하이어 에듀케이션
미국 펜실베니아 15260, 피츠버그, 130 새커리 애비뉴, 퍼스트 플로어 가드너 스틸 컨퍼런스 센터
(72) 발명자
디미트로브 디미터
미국, 펜실베니아 15220, 피츠버그, 1040 그린론 드라이브
첸 추안
미국, 펜실베니아 15213, 피츠버그, 3267 케넷 스퀘어
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인한얼

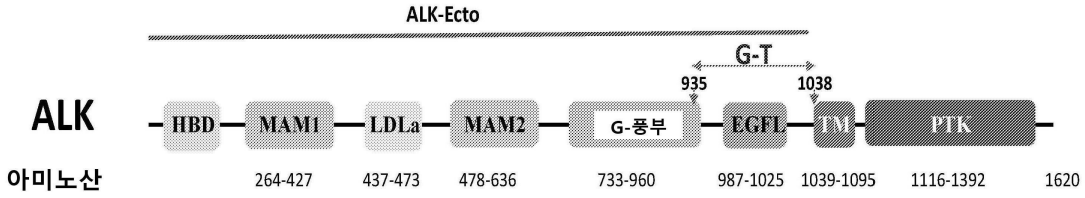
전체 청구항 수 : 총 16 항

(54) 발명의 명칭 **역형성 림프종 키나아제 항체 및 이의 사용 방법**

(57) 요 약

항-ALK 항체 및 이의 항원 결합 단편이 이의 사용 방법과 함께 제공된다.

대 표 도



(52) CPC특허분류
A61K 39/4631 (2023.05)
A61K 39/4633 (2023.05)
A61K 39/464429 (2023.05)
A61K 39/464462 (2023.05)
A61K 47/6803 (2023.08)
A61P 35/00 (2018.01)
C07K 14/7051 (2013.01)
C07K 16/2896 (2013.01)
C12N 5/0636 (2023.05)
(72) 발명자
순 제후아
미국, 펜실베니아 15237, 피츠버그, 123 포인트 뷰 드라이브
모세 야엘
미국, 펜실베니아 19072, 펜 밸리, 712 콘쇼호켄 스테이트 로드

명 세 서

청구범위

청구항 1

역형성 림프종 키나아제(anaplastic lymphoma kinase; ALK)에 대하여 면역학적으로 특이적인 단리된 항체(isolated antibody) 또는 이의 항원 결합 단편으로서, 상기 항체 또는 이의 단편이 ALK의 아미노산 733-960 또는 아미노산 935-1038과 특이적으로 결합하는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편이 VH20 또는 VH78로부터의 적어도 하나의 상보성 결정 영역(complementarity determining region)을 포함하는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편이 VH20 또는 VH78로부터의 3개 모두의 상보성 결정 영역을 포함하는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편이 GFTFSSYA(서열 번호: 3), IWYDGSNQ(서열 번호: 4), 및 AKSSYYDSSGYYFPYGY(서열 번호: 5)를 포함하는 중쇄를 포함하는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편이 GFTFSSYA(서열 번호: 3), IYPGDSDT(서열 번호: 7), 및 ARERGWQDAFDI(서열 번호: 8)를 포함하는 중쇄를 포함하는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편이 EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAAI WYDGSNQYYADSVKGRFTISRDDSTNTLYLQMNSLRAEDTALYYCAKSSYY DSSGYYFPYGYWGQGTLVTVSS (서열 번호: 2)를 포함하는 중쇄를 포함하는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편이 EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWMGII YPGDSDTRYSPSFQGHVTISRDDSTNTLYLQMNSLRAEDTATYYCARERGWQ DAFDIWGQGTLVTVSS (서열 번호: 6)를 포함하는 중쇄를 포함하는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항의, 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는, 면역접합체(immunoconjugate).

청구항 9

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항의, 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는, 항체-약물 접합체(antibody-drug conjugate; ADC).

청구항 10

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항의, 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는, 키메라 항원 수용체(chimeric antigen receptor; CAR).

청구항 11

제10항에 있어서, CAR을 포함하는, CAR T-세포.

청구항 12

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항의, 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는, 이특이적 T-세포 인게이저(bispecific T-cell engager).

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항의 화합물, 및 적어도 하나의 약제학적으로 허용되는 담체(carrier)를 포함하는 항-ALK 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 조성물을 투여하는 단계를 포함하여, 대상체(subject)에서 암을 치료, 억제, 및/또는 예방하기 위한 방법.

청구항 14

제13항에 있어서, 상기 암(cancer)은 이의 표면에 ALK를 발현하는, 방법.

청구항 15

제13항에 있어서, 상기 암은 신경모세포종(neuroblastoma)인, 방법.

청구항 16

제13항에 있어서, ALK 억제제 및/또는 화학요법제(chemotherapeutic agent)를 추가로 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 출원은 2022년 1월 25일자로 출원된 미국 가특허원 제63/302,639호의 우선권을 주장한다. 상기 출원은 본원에 참조로 혼입된다.

배 경 기 술

[0002] 본 발명은 국립보건원이 부여한 수여 번호 CA140198 하에 정부 지원으로 이루어졌다. 정부는 본 발명에 대한 특정 권리를 가진다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0003] 본 발명은 종양학 분야에 관한 것이다. 더 자세하게는, 본 발명은 신경모세포종(neuroblastoma)와 같은 암(cancer)의 치료를 위한 역형성 림프종 키나아제(anaplastic lymphoma kinase; ALK) 항체를 포함하는 조성물 및 방법을 제공한다.

과제의 해결 수단

[0004] 몇몇 간행물 및 특허 문서는 본 발명이 관련된 기술의 상태를 기술하기 위해 명세서 전체에 인용된다. 이러한

인용 문헌 각각은 전문에 제시된 상태로 본원에 참조로 혼입한다.

[0005] 신경모세포종(NB)은 소아암 이환율(morbidity) 및 사망률(mortality)의 주요 원인으로 남아있다. 유전성 활성화 돌연변이(Heritable activating mutation)가 역형성 림프종 키나아제(ALK) 종양 유전자에 존재하고 이의 동일한 돌연변이를 고위험 NB 종양형성(high-risk NB tumorigenesis) 동안 빈번하게 신체적으로(somatically) 획득한다. ALK는 NB에서 추적 가능한 분자 표적으로 확립되었으며 ALK 억제 요법의 임상학적 개발을 위한 근거를 제공한다. 실제로, ALK가 정상 조직 상에는 크게 발현되지 않는 반면, NB 및 다른 소아 악성종양(pediatric malignancy)의 많은 대다수의 세포 표면 상에는 풍부하게 발현된다. 특히, ALK 돌연변이 활성화의 대부분은 크리조티닙(crizotinib)과 같은 1세대 약물에 대해 민감하지 않다. 하지만, 화학요법은 ALK 돌연변이체 NB가 크리조티닙에 민감하게 만들 수 있다. 추가로, 로라티닙(lorlatinib)은 모든 활성화 돌연변이에 대해 효과적인 유일한 ALK 억제제이다. 분자로 표적화된 제제(agent)(예를 들어, ALK-유도된 NB를 갖는 환자에 대해 세리티닙 및 리보시클립)의 조합이 시너지 효과를 나타내었다. 하지만, ALK를 발현하는 암의 치료를 위한 새로운 치료제가 여전히 필요하다.

[0006] **발명의 요약**

[0007] 본 발명에 따라, 항-역형성 림프종 키나아제(ALK) 항체 및 이의 단편(예를 들어, 항원 결합 단편)이 제공된다. 특정 실시양태에서, 항-ALK 항체 또는 이의 단편은 ALK의 아미노산 733-960 또는 아미노산 935-1038에 결합한다. 특정 실시양태에서, 항체 및 이의 단편은 VH20 또는 VH78로부터의 적어도 하나의 상보성 결정 영역(complementarity determining region)을 포함한다. 특정 실시양태에서, 항체 또는 이의 단편은 VH20 또는 VH78로부터의 3개 모두의 상보성 결정 영역을 포함한다. 특정 실시양태에서, 항체 또는 이의 단편은 VH20 또는 VH78을 포함한다.

[0008] 본 발명의 또 다른 양태에 따라, 항-ALK 항체 또는 이의 단편(예를 들어, 항원 결합 단편)을 포함하는 면역접합체(immunoconjugate)가 제공된다. 특정 실시양태에서, 면역접합체는 항-ALK 항체 또는 이의 단편을 포함하는 항체-약물 접합체(antibody-drug conjugate; ADC)이다. 항-ALK 항체 또는 이의 단편(예를 들어, 항체 결합 단편)을 포함하는 이특이적 T-세포 인게이저(bispecific T-cell engager; BiTE)가 제공된다. 또한 항-ALK 항체 또는 이의 단편(예를 들어, 항원 결합 단편)을 포함하는 키메라 항원 수용체(CAR) 및 CAR-T 세포가 제공된다.

[0009] 본 발명의 또 다른 양태에 따라, 대상체(subject) 또는 환자에서 암을 치료, 억제, 및/또는 예방(예를 들어, 발병 억제)하기 위한 방법이 제공된다. 특정 실시양태에서, 방법은 항-ALK 항체 또는 이의 단편(예를 들어, 항원 결합 단편), 또는 항-ALK 항체 또는 이의 단편(예를 들어, 항원 결합 단편)을 포함하는 화합물 또는 세포를 대상체 또는 환자에 투여하는 단계를 포함한다. 특정 실시양태에서, 암은 특히 이의 표면에서, ALK를 발현한다. 특정 실시양태에서, 암은 신경모세포종이다. 특정 실시양태에서, 방법은 화학요법제(chemotherapeutic agent), 방사선요법(radiotherapy), 및/또는 ALK 억제제를 대상체에 투여하는 단계를 추가로 포함한다.

도면의 간단한 설명

[0010] 도 1a는 역형성 림프종 키나아제(ALK) 단백질의 계략도이다. 도 1b는 VH20 또는 VH9와 293T 세포 또는 G-풍부 도메인(G-rich domain)을 발현하는 293T 세포(293T-ALK)의 결합의 그래프를 제공한다. 도 1c는 VH78 또는 VH5와 293T 세포 또는 G-T 도메인을 발현하는 293T 세포(293T-ALK)의 결합의 그래프를 제공한다.

도 2a 내지 2d는 동적 광 산란(dynamic light scattering; DLS)에 의해 결정된 인산염 완충 식염수(PBS)에서 VH20(도 2a), VH9(도 2b), VH5(도 2c), 및 VH78(도 2d)의 응집을 도시하는 그래프를 제공한다. 도 2a는 (위에서 아래로) 0일, 1일, 4일, 7일, 및 14일에서 샘플의 그래프를 제공하며; 도 2b는 (위에서 아래로) 0일 및 1일에서 샘플의 그래프를 제공하며; 도 2c는 (위에서 아래로) 0일, 1일, 4일, 및 7일에서 샘플의 그래프를 제공하며; 도 2d는 (위에서 아래로) 0일, 1일, 및 4일에서 샘플의 그래프를 제공한다.

도 3a 내지 3d는 VH의 특성을 제공한다. 도 3a는 ALK 세포외 도메인 융합ekxtracellular domain fusion)과 인간 IgG1 Fc의 융합인, ALK-Fc 및 VH(●)로 표시된 ELISA 검정(assay) 그래프를 제공한다. 또한 항체가 없는 대조군(▲)이 제공된다. 도 3b는 VH20의 크기 배제 크로마토그래피(size exclusion chromatography; SEC) 검정의 그래프를 제공한다. 도 3c는 ALK, VH20, 및 KTN0239-IgG의 결합 그래프를 제공한다. 도 3d는 SK-N-AS, IMR32, 또는 SY5Y-D3 세포에 결합하는, VH20 또는 대조군 항체의 유세포 분석(flow cytometry) 결과의 그래프를 제공한다.

도 4는 VH9(왼쪽), VH20(왼쪽), VH5(오른쪽), 또는 VH78(오른쪽)을 갖는 CAR-T세포와, 293T 세포 또는 ALK를

발현하는 293T 세포의 세포독성 그래프를 제공한다.

도 5a는 VH20 이특이적인 T-세포 인게이저(VH20-OKT3-Fc BiTE)의 계략도 및 베타-머캅토에탄올의 존재 또는 부재에서 VH20-OKT3-FcBiTE의 SDS-PAGE 분석 이미지를 제공한다. 도 5b는 VH20-OKT3-Fc BiTE의 크기 배제 크로마토그래피(SEC) 검정 그래프를 제공한다. 도 5c는 표시된 세포에 대한 VH20-OKT3-Fc BiTE 또는 대조군(Iso)의 시험관 내(*in vitro*) 세포독성 검정 그래프를 제공한다.

도 6a는 표지된 VH20이 다양한 농도에서 293T 세포 또는 293T-ALK 세포와 함께 배양될때의 내재화 그래프를 제공한다. 도 6b는 293T 세포 또는 293T-ALK 세포와 함께 배양된, 모노메틸 오리스타틴 E (monomethyl auristatin E; MMAE) 또는 항체-약물 접합체 VH20-Fc-MMAE의 세포독성 그래프를 제공한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0011] 인간 ALK 단백질은 인슐린 수용체 슈퍼패밀리(insulin receptor superfamily)의 220 kDa 세포 표면 수용체 티로신 키나아제이다. 도 1a는 ALK의 도메인의 계략도를 제공한다. ALK는 아미노산 264-427 및 478-636에서 2개의 MAM 도메인(meprin/A5-단백질/PTPmu), 아미노산 437-473에서 저-밀도 당단백질 분류 A(LDLa) 모티프(motif), 아미노산 733-960에서 글리신-풍부 영역(G-풍부), 아미노산 1039-1059에서 막관통 도메인(transmembrane domain), 및 아미노산 1116-1392에서 PTK(단백질 티로신 키나아제) 도메인을 포함한다. 또한 ALK는 N-말단 근처(예를 들어, 신호 펩타이드 후 아미노산 19에서 시작하는) 헤파린-결합 단백질(HBD) 및 아미노산 987-1025로부터의 EGFL 도메인을 포함한다. 또한 ALK는 G-풍부 영역과 결합할 수 있는 TNFL 모듈을 포함하여 TNFL-GR 슈프라도메인(supradomain)을 형성한다. ALK의 세포외 도메인은 ALK N-말단에서 TM 도메인(예를 들어 아미노산 1-1038 또는 아미노산 19-1038)으로의 영역이다. ALK 아미노산 및 뉴클레오타이드 서열이 예를 들어, GenBank Gene ID: 238; 및 GenBank Accession Nos. NM_004304.5 및 NP_004295.2.에서 제공된다. 특정 실시양태에서, ALK의 아미노산 서열은 (서열 번호: 1)을 포함한다:

```
MGAIGLLWLLPLLLSTAAVGSGMGTGQRAGSPAAGPPLQPREPLSYSRLQ   50
RKSLAVDFVVPSLFRVYARDLLLPPSSSELKAGRPEARGSLALDCAPLLR  100
LLGPAPGVSWTAGSPAPAEARTLSRVLKGGSVRKLRRAKQLVLELGEEAI  150
LEGCVGPPGEAAVGLLQFNLSELFSWWIRQGEGRLRIRLMPEKKASEVGR  200
EGRLSAAIRASQPRLLFQIFGTGHSSLESPTNMPSPSPDYFTWNLTWIMK  250
DSFPFLSHRSRYGLECSFDFPCELEYSPPLHDLRNQSWSWRRIPSEEASQ  300
MDLLDGPGAERSKEMPRGSFLLLNTSADSKHTILSPWMRSSSEHCTLAVS  350
VHRHLQPSGRYIAQLLPHNEAAREILLMPTPGKHGWTVLQGRIGRPDNPF  400
RVALEYISSGNRSLSAVDFFALKNCSEGTSPGSKMALQSSFTCWNGTVLQ  450
LGQACDFHQDCAQGEDESQMCRKLPVGFYCNFEDGFCGWTQGTLSPHTPQ  500
WQVRTLKDARFQDHQDHALLLSTTDVPASESATVTSATFPAPIKSSPCEL  550
RMSWLIRGVLRGNVSLVLVENKTGKEQGRMVWHVAAYEGLSLWQWMVLPL  600
LDVSDRFWLQMVAWWGQGSRAIVAFDNISISLDCYLTISGEDKILQNTAP  650
KSRNLFERNPNKELKPGENSPRQTPIFDPTVHWLFTTCGASGPHGPTQAQ  700
CNNAYQNSNLSVEVGSEGPLKGIQIWKVPATDTYSISGYGAAGGKGGKNT  750
MMRSHGVSVLGIFNLEKDDMLYILVGQQGEDACPSTNQLIQKVCIGENNV  800
IEEEIRVNRSVHEWAGGGGGGGGATYVFKMKDGVPVPLIIAAGGGGRAYG  850
AKTDTFHPERLENNSSVLGLNGNSGAAGGGGGWNDNTSLLWAGKSLQEGA  900
TGGHSCPQAMKKWGWETRGGFGGGGGGCSSGGGGGGYIGGNAASNNDPEM  950
DGEDGVSFISPLGILYTPALKVMEGHGEVNIKHYLNCSHCEVDECHMDPE 1000
SHKVICFCDHGTVLAEDGVSCIVSPTPEPHLPLSLILSVVTSALVAALVL 1050
AFSGIMIVYRRKHQELQAMQMELQSPEYKLSKLRTSTIMTDYNPNYCFAG 1100
KTSSISDLKEVPRKNITLIRGLGHGAFGEVYEGQVSGMPNDPSPLQVAVK 1150
TLPEVCSEQDELDFLMEALIISKFNHQNIVRCIGVSLQSLPRFILLELMA 1200
GGDLKSFLRETRPRPSQPSSLAMLDLLHVARDIACGCQYLEENHFIHRDI 1250
AARNCLLTCPGPGRVAKIGDFGMARDIYRASYYRKGGCAMLPVKWMPPEA 1300
FMEGIFTSKTDTWSFGVLLWEIFSLGYMPYPSKSNQEVLEFVTSGGRMDP 1350
PKNCPGPVYRIMTQCWQHQPEDRPNFAIILERIEYCTQDPDVINTALPIE 1400
YGPLVEEEEKVPVRPKDPEGVPPLLVSQQAKREEERSPAAPPPLPTTSSG 1450
KAAKKPTAAEISVRVPRGPAVEGGHVNMAFSQSNPPSELHKVHGSRNKPT 1500
SLWNPTYGSWFTEKPTKKNNPIAKKEPHDRGNLGLEGSCTVPPNVATGRL 1550
PGASLLLEPSSLTANMKEVPLFRLRHFPCGNVNYGYQQQGLPLEAATAPG 1600
AGHYEDTILKSKNSMNQPGP                                 1620
```

[0012]

[0013] 본 발명의 하나의 양태에 따라, 항-ALK 항체 및 이의 단편(예를 들어, 항체-결합 단편)이 제공된다. 항-ALK 항체는 모노클로날(monoclonal) 또는 폴리클로날 일 수 있다. 항-ALK 항체는 이특이적일 수 있다. 특정 실시양태에서, 항체 또는 이의 단편은 인간 ALK에 대하여 면역학적으로 특이적이다. 항-ALK 항체 또는 이의 단편은 선형 에피토프(linear epitope) 또는 입체형태적 에피토프(conformational epitope)를 인식할 수 있다. 특정 실시양태에서, 항-ALK 항체 또는 이의 단편은 ALLK의 G-풍부 도메인(예를 들어, 아미노산 733-960)에 결합한다. 특정 실시양태에서, 항-ALK 항체 또는 이의 단편은 ALK의 G-T 도메인(예를 들어, 아미노산 935-1038)에 결합한다. 특정 실시양태에서, 항-ALK 항체 또는 이의 단편은 ALK의 아미노산 733-960을 포함하는 폴리펩타이드(예를 들어, 서열 번호: 1)에 대해 면역학적으로 특이적이다. 특정 실시양태에서, 항-ALK 항체 또는 이의 단편은 ALK의 아미노산 935-1038을 포함하는 폴리펩타이드(예를 들어, 서열 번호: 1)에 대해 면역학적으로 특이적이다. 상기 에피토프는 상기 식별된 서열보다 서열의 N-말단 및/또는 C-말단에서, 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 또는 그 이상의 아미노산, 특히 1, 2, 3, 4, 5개의 아미노산만큼 더 길거나 짧을 수 있다. 특정 실시양태에서, 상기 에피토프는 서열 번호:1과 적어도 90%, 95%, 97%, 99%, 또는 100% 상동성(homology) 또는 동일성(identity)을 가진다. 또한 본원에 제공된 항체로서 동일한 에피토프에 결합한 항체가 본 발명에 의해 포함된다.

[0014] 특정 실시양태에서, 항-ALK 항체 또는 이의 단편은 ALK의 아미노산 733-960에 대하여 면역학적으로 특이적이다. 특정 실시양태에서, 항-ALK 항체는 VH20 또는 이의 단편을 포함한다. 특정 실시양태에서, 항-ALK 항체는 다음을 포함하는 중쇄(예를 들어, VH 도메인)를 포함한다:

EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAA
IWYDGSNQYYADSVKGRFTISRDDSTNTLYLQMNSLRAEDTALYYCAKSS
YYDSSGYYFPYGYWGQGTLVTVSS (서열번호: 2),

[0015]

[0016] 여기서 밑줄된 서열은 상보성 결정 영역(CDR)이다. 특정 실시양태에서, 항-ALK 항체 또는 이의 단편은 (예를 들어, IMGT, Chothia, Kabat, Martin(예를 들어, 강화된 Chothia) 또는 AHo 넘버링 설계(numbering scheme)에 의해 결정된) VH20의 1개, 2개, 또는 3개 모두의 CDR를 포함한다. 특정 실시양태에서, 항-ALK 항체 또는 이의 단편은 서열 번호: 2의 1개, 2개, 또는 3개 모두의 CDR을 포함한다. 특정 실시양태에서, 항-ALK 항체 또는 이의 단편은 서열 번호: 2의 1개, 2개, 또는 3개 모두의 CDR을 포함하는 중쇄(예를 들어, VH 도메인)를 포함한다. 특정 실시양태에서, 항-ALK 항체 또는 이의 단편은 GFTFSSYA(서열 번호: 3), IWYDGSNQ (서열 번호: 4), 및 AKSSYYDSSGYYFPYGY (서열 번호: 5)의 1개, 2개, 또는 3개 모두를 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 항-ALK 항체 또는 이의 단편은 상기 제공된 서열의 임의의 것(예를 들어, 서열 번호 2 내지 5 중 임의의 것)과 적어도 90%, 95%, 97%, 99%, 또는 100% 상동성 또는 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.

[0017] 특정 실시양태에서, 항-ALK 항체 또는 이의 단편은 ALK의 아미노산 935-1038에 대하여 면역학적으로 특이적이다. 특정 실시양태에서, 항-ALK 항체는 VH78 또는 이의 단편을 포함한다. 특정 실시양태에서, 항-ALK 항체는 하기를 포함하는 중쇄(예를 들어, VH 도메인)을 포함한다:

EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWMGI
IYPGDSDTRYSPSFQGHVTISRDDSTNTLYLQMNSLRAEDTATYYCARER
GWQDAFDIWGQGTLVTVSS (서열번호: 6),

[0018]

[0019] 여기서, 밑줄된 서열이 상보성 결정 영역(CDR)이다. 특정 실시양태에서, 항-ALK 항체 또는 이의 단편은 (예를 들어, IMGT, Chothia, Kabat, Martin(예를 들어, 강화된 Chothia) 또는 AHo 넘버링 설계에 의해 결정된) VH78의 1개, 2개, 또는 3개 모두의 CDR를 포함한다. 특정 실시양태에서, 항-ALK 항체 또는 이의 단편은 서열 번호: 6의 1개, 2개, 또는 3개 모두의 CDR을 포함한다. 특정 실시양태에서, 항-ALK 항체 또는 이의 단편은 서열 번호: 6의 1개, 2개, 또는 3개 모두의 CDR을 포함하는 중쇄(예를 들어, VH 도메인)을 포함한다. 특정 실시양태에서, 항-ALK 항체 또는 이의 단편은 GFTFSSYA (서열 번호: 3), IYPGDSDT (서열 번호: 7), 및 ARERGWQDAFDI (서열 번호: 8)의 1개, 2개, 또는 3개 모두를 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 항-ALK 항체 또는 이의 단편은 제공된 서열의 임의의 것(예를 들어, 서열 번호 3, 6 내지 8 중 임의의 것)과 적어도 90%, 95%, 97%, 99%, 또는 100% 상동성 또는 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.

[0020] 또한 본 발명의 항-ALK 항체 또는 이의 단편, 및 약제학적으로 허용되는 담체(carrier)와 같은 담체를 포함하는 조성물이 본원에 포함된다. 특정 실시양태에서, 조성물은 적어도 하나의 항-ALK 항체 또는 항체 단편, 및 적어도 하나의 담체(예를 들어, 약제학적으로 허용되는 담체)를 포함한다.

[0021] 또한 본 발명의 항-ALK 항체 또는 이의 단편을 인코딩(encoding)하는 핵산 분자가 본원에 포함된다. 특정 실시양태에서, 항-ALK 항체 또는 이의 단편을 인코딩하는 핵산 분자는 상기 제공된 임의의 아미노산 서열을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 특정 실시양태에서, 본 발명의 핵산 분자를 벡터(vector), 특히 발현 벡터 내에 포함한다. 또한 본 발명은 본 발명의 핵산 분자를 포함하고, 임의로, 발현하는 세포(예를 들어, 항-ALK 항체를 분비하는 세포)를 포함한다.

[0022] 항체는 합성 또는 변형된 항체(예를 들어, 재조합으로 생성된 항체; 키메라 항체; 이특이적 항체; 인간화된 항체; 낙타과 항체; 등)일 수 있다. 본 발명의 특정 실시양태에서, 항체는 이특이적 항체이다.

[0023] 본 발명의 항체는 항체 단편일 수 있다. 특정 실시양태에서, 항체 단편은 항체의 항원 결합 단편이다. 항체 단편은 단일 도메인(Dab; 예를 들어, 단일 가변 경쇄 또는 중쇄 도메인), Fab, Fab', $F(ab')_2$, 및 F(v)을 포함하지만 이에 제한되지 않는 면역글로불린 단편; 및 scFv, $scFv_2$, scFv-Fc, 미니바디(minibody), 디아바디, 트리아바디, 및 테트라바디를 포함하지만 이에 제한되지 않는 이들의 면역글로불린 단편의 융합체(fusion)(예를 들어, 링커(linker)를 통해)을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 또한 항체는 적어도 하나의 항체 또는 항체 단편을 포함하는 단백질(예를 들어, 융합 단백질)일 수 있다. 특정 실시양태에서, 항체 단편은 단일 도메인 항체(예를

들어, VH 도메인)이다.

[0024] 본 발명의 항체는 추가로 변형될 수 있다. 예를 들어, 항체는 인간화될 수 있다. 특정 실시양태에서, 항체는(또는 이의 부분은) 항체 또는 항체 단편 작제물(construct) (예를 들어, 항체 프레임워크(framework)), 특히 인간 작제물/프레임워크의 골격(backbone)에 삽입된다. 예를 들어, 본 발명의 항체의 가변 경 도메인 및/또는 가변 중 도메인, 또는 이에 포함된 CDR은 또 다른 항체 작제물 또는 프레임워크, 특히 인간에 삽입될 수 있다. 항체를 재조합적으로 생산하기 위한 방법은 당해 분야에 잘 알려져 있다. 항체 또는 항체 단편 작제물을 위한 상업용 벡터가 이용가능하다.

[0025] 또한 본 발명의 항체가 다른 성분에 접합/결합될 수 있다. 본 발명의 항-ALK 항체 또는 이의 단편을 포함하는 면역접합체가 본원에 포함된다. 예를 들어, 항체 또는 이의 단편은 적어도 하나의 검출가능한 제제(예를 들어, 방사선 원자(예를 들어, 방사선 접합체)), 이미징 제제(imaging agent), 조영제, 또는 치료제 또는 약물(예를 들어, 항체-약물 접합체)에 작동가능하게 연결(예를 들어, 링커를 통해 임의로 공유결합)될 수 있다. 특정 실시양태에서, 항-ALK 항체 또는 이의 단편은 예를 들어, 제한 없이, 양전자 방출 동위원소 및 알파-, 베타-, 감마-, 오거-(Auger-) 및 저에너지 전자-방출체(low energy electron-emitter)에 접합된다. 또한 본 발명의 항체는 적어도 하나의 정제 태그(예를 들어, His-tag)를 포함할 수 있다.

[0026] 본 발명에 따라, 항체-약물 접합체(ADC)가 제공된다. ADC는 당해 분야(예를 들어, Polakis (2016) Pharmacol. Rev., 68:3-19)에 잘 알려져 있다. ADC는 항체의 표적화 능력으로 인해 정확하게 운반되어, 다른 조직 또는 기관에서 약물 농도를 크게 낮추는 동안 표적 세포에서 국소 약물 농도를 효과적으로 증가시킴으로써, 감소 독성을 감소시킬 수 있다. 본원에서, ADC는 본 발명의 항-ALK 항체 또는 이의 단편, 및 약물 또는 치료제, 특히 세포독성제를 포함한다. 약물 및, 항체 또는 이의 단편은 직접적으로 접합되거나 링커를 통해 접합될 수 있다.

[0027] 일반적으로, 약물 또는 세포독성제는 저분자이다. 본원에 사용된, "세포독성제"는 세포의 기능을 억제 또는 예방하고/하거나 세포의 파괴 및/또는 죽음을 야기하는 물질이다. 세포독성제의 예는 항대사제, 알킬화제(alkylating agent), DNA 마이너 홈 결합제(DNA minor groove binder), DNA 인터칼레이터(DNA intercalator), DNA 가교결합제(DNA crosslinker), 히스톤 탈아세틸화 효소 억제제, 핵 수송 억제제, 프로테아좀 억제제, 열 충격 단백질 억제제, 티로신 키나제 억제제, 항-유사분열제, 안트라사이클린, 세포 골격 파괴 물질, 탁산, 에포틸론, 독소(toxin)(예를 들어, 디프테리아, 외독소, 리친(ricin) (예를 들어, 리친 A), 아브린, 슈도모나스 외독소, 사포린 등), 토포이소머라제 I 억제제, 토포이소머라제 II 억제제, 뉴클레오타이드 유사체, 뉴클레오타이드 전구체 유사체, 항생제(예를 들어, 펩타이드 항생제), 백금 기반제, 메이탄시노이드(예를 들어, 마이탄신), 오리스타틴(예를 들어, 모노메틸 오리스타틴 E(MMAE)), 독소루비신, 듀오카마이신(예를 들어, 티에노인돌(thienoindole)), 이리노테칸, 및 피롤로벤조디아제핀(PDB) 또는 피롤로벤조디아제핀 이량체를 포함하지만 이에 제한되지 않는다(문헌: 예를 들어, Carlson (2012) Biotechnol. Healthc., 9(4): 28-31; WO 2005/040170 참고).

[0028] 특정 실시양태에서, 세포독성제는 티에노인돌이다. 티에노인돌(예를 들어, NMS-P528)은 강력한 수용성 듀오카마이신 유사체(duocarmycin analog)로, 항체 페이로드(antibody payload)의 역할을 하기에 매우 적합한 DNA 마이너 홈 알킬화제이다(Valsasina, et al. (2014) Cancer Res., 74:822; Caruso, et al. (2018) Cancer Res. 78(13 Suppl): Abstract nr 734).

[0029] 특정 실시양태에서, 세포독성제는 피롤로벤조디아제핀(PBD) 이량체이다. 특정 실시양태에서, PBD 이량체는 CH2 도메인의 글리칸을 통해 항체 또는 이의 단편에 접합된다. PBD 이량체는 소아암 모델에서 효능과 효과가 입증된 강력한 세포독성 DNA 마이너 홈 가닥 간 가교결합제(crosslinking agent)이다 (Bosse, et al. (2012) Cancer Res., 72(8):2068-78; Wood, et al. (2013) Pediatr. Blood Cancer 60(11):1860-7).

[0030] ADC의 링커는 임의의 화학적으로 실현가능한 위치에서 항체 또는 이의 단편을 접합할 수 있고, 바람직하게는 항체 또는 이의 단편의 활성(예를 들어, 표적 결합) 및 약물의 활성(예를 들어, 세포의 사멸)이 크게 부정적인 영향을 받지 않는다. 예를 들어, 약물은 (예를 들어, 항체 힌지(hinge) 또는 고정 영역 또는 CDR이 아닌 다른 영역에서) 리신 잔기 또는 시스테인 잔기를 통해 항체 또는 이의 단편에 접합될 수 있다. 또한 글리칸을 통한 부위-특이적 접합(site-specific conjugation)은 항체의 결합 및 다른 특성에는 영향을 주지 않는다(Zhu, et al. (2014) MAbs 6(5):1190-200; Bosse, et al. (2017) Cancer Cell 32(3):295-309; Seaman, et al. (2017) Cancer Cell 31(4):501-15). C2-아지드-갈락토스(C2-Azide-Galactose)는 Fc-글리칸 변형을 위한 기질로 사용될 수 있다. DBCO-PEG4-VA-약물 (예를 들어, PDB)은 클릭 화학-기반 접근(click chemistry-based approach)(Baskin, et al. (2007) Proc. Natl. Acad. Sci., 104(43):16793-7)에 따른 접합을 위한 페이로드로

서 이용될 수 있다.

[0031] ADC의 링커는 절단가능한 링커일 수 있다(예를 들어, 세포 내에서 접합된 약물을 방출하기 위함) (Kellogg, et al. (2011) Bioconjug. Chem., 22(4):717-27; Polson, et al. (2011) Expert Opin. Investig. Drugs 20(1):75-85). 예를 들어, 산-불안정성 링커(acid-labile linker)(예를 들어, 히드라존 링커(hydrazone linker)), 리소좀 또는 펩티다아제-민감성 링커(예를 들어, Val-Cit, Val-Lys, Val-Ala, Lys-Lys, 또는 Ala-Val와 같은 디펩타이드를 전형적으로 포함하는 짧은 펩티딜 링커), 또는 디설파이드-함유 링커가 이용될 수 있다. 특정 실시양태에서, 항체는 펩타이드 절단가능한 약물 링커 및 자가-용해성 스페이서(self-immolative spacer)와 함께 약물에 접합되어, 시스테인 잔기의 부분적인 감소를 통해, 활성화 전에 2개의 화학 결합의 분해가 필요한 보호 모이어티(protective moiety)를 허용함으로써, 바람직한 약물-항체 비(DAR)(예를 들어, of~2. 7)을 생산한다. 펩타이드 링커의 한 가지 이점은 세포독성 페이로드의 방출을 위해 리소좀 프로테아제에 의해 세포내 효소 절단이 필요하다는 것이다.

[0032] 이작용성 커플링제(bifunctional coupling agent) 또는 가교결합제는 항체 또는 이의 단편에 약물을 접합하는데 이용될 수 있다. 가교결합제는 하나 이상의 카르복실-투-아민(carboxyl-to-amine) 반응성 그룹(예를 들어, 카르보디이미드), 아민-반응성 그룹(예를 들어, NHS 에스테르, 이미도에스테르), 설프하이드릴-반응성 그룹(예를 들어, 말레이미드, 할로아세틸, 피리딜디설파이드), 알데하이드-반응성 그룹(예를 들어, 하이드라자이드, 알콕시아민), 및 하이드록실-반응성 그룹(예를 들어, 이소시아네이트)을 포함할 수 있지만 이에 제한되지 않는다.

[0033] 본 발명에 따라, 이특이적 T-세포 인게이저(BiTE)가 제공된다. 도 5a는 BiTE의 예의 계략도를 제공한다. 일반적으로, BiTE는 2개의 항원-결합 도메인을 갖고, 이 중 하나는 T-세포 항원에 결합하고 이 중 두번째는 표적의 표면에 존재하는 항원에 결합한다 (문헌: 예를 들어, WO 05/061547; Baeuerle et al. (2008) Drugs of the Future 33:137-147; Bargou et al. (2008) Science 321:974-977) 참고). 본 발명의 BiTE는 2개의 결합 부위를 가질 수 있으며, 첫번째 결합 부위는 본원에 기재된 항-ALK 항체 또는 이의 단편을 포함하고 두번째 결합 부위는 T 세포(예를 들어, CD3와 같은 세포 표면 표적)에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 단편을 포함한다. 특정 실시양태에서, BiTE는 단일 폴리펩타이드 쇄 분자이다. 특정 실시양태에서, BiTE는 Fc 영역을 포함한다. 특정 실시양태에서, T 세포에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 단편은 항-CD3 항체 또는 이의 단편이다. 특정 실시양태에서, 항-CD3 항체 또는 이의 단편은 scFv이다. 특정 실시양태에서, 항-CD3 항체 또는 이의 단편은 OKT3이다.

[0034] 또한 본 발명은 키메라 항원 수용체의 제조에서의 본원에 기재된 항-ALK 항체 또는 이의 단편의 서열(예를 들어, CDR 또는 VH 서열)의 용도를 포함하며 이는 CAR-T 기술에 사용될 수 있다. 본원에서 사용된, "키메라 항원 수용체" 또는 "CAR"는 세포 신호전달 및/또는 세포 활성화 도메인에 연결되는 항원-결합 도메인(예를 들어, 항체의 항원-결합 부분)을 포함하는 하이브리드 폴리펩타이드를 지칭한다. 특정 실시양태에서, 본 발명의 키메라 항원 수용체는 엑토도메인(ectodomain)(세포외 도메인), 막관통 도메인, 및 엔도도메인(endodomain)(세포질 또는 세포내 도메인)을 포함한다. 본 발명의 키메라 항원 수용체의 엑토도메인은 항-ALK 항체 또는 이의 단편을 포함한다. 특정 실시양태에서, 항체 또는 이의 단편은 Fab 또는 ScFv를 포함한다. 상기 항체 또는 엑토도메인의 항원-결합 단편은 아미노산 링커/스페이서(예를 들어, 약 1 내지 약 100개의 아미노산)를 통해 막관통 도메인에 연결될 수 있다. 또한 엑토도메인은 신호 펩타이드(예를 들어, 소포체 신호 펩타이드)를 포함할 수 있다.

[0035] 본 발명의 키메라 항원 수용체의 막관통 도메인은 임의의 막관통 도메인일 수 있다. 특정 실시양태에서, 막관통 도메인은 세포 막을 연장하는 소수성 알파 나선(hydrophobic alpha helix)이다. 전형적으로, 막관통 도메인은 엔도도메인으로서 동일한 단백질로부터 존재한다. 막관통 도메인의 예는 T-세포 수용체 (TCR), CD28, CD3, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, 또는 CD154로부터의 막관통 도메인을 포함하나 이에 제한되지 않는다. 특정 실시양태에서, 막관통 도메인은 CD3-ζ 또는 CD28로부터 유래한다.

[0036] 본 발명의 키메라 항원 수용체의 엔도도메인은 적어도 하나의 신호전달(signaling) 또는 활성화 도메인(예를 들어, 하나 이상의 면역수용체 티로신-기반 활성화 모티프(ITAM)를 포함하는 신호전달 도메인)을 포함한다. 신호전달 또는 활성화 도메인은 엑토도메인에 결합하는 항원에 의해 활성화되고 T 세포의 활성화를 유도한다. 신호전달 또는 활성화 도메인은 CD3, LIGHT, 림프구 기능-연관 항원 1(LFA-1), CD2, CD28, ICOS, CD30, CD7, NKG2C, CD40, PD-1, OX40, CD18, CD27, B7-H3, 4-1BB (CD137), OX40, CD40, 및 NKG2C로부터의 신호전달 또는 활성화 도메인(예를 들어, 엔도도메인/세포질 도메인 또는 이의 단편)을 포함하나 이에 제한되지 않는다. 특정 실시양태에서, 엔도도메인은 CD3-ε, CD3-γ, 또는 CD3-ζ 쇄의 세포질 도메인 또는 이의 단편을 포함한다. 특

정 실시양태에서, 엔도도메인은 CD3-ζ, CD28, 4-1BB, 및/또는 OX40의 신호전달 도메인을 포함한다. 특정 실시양태에서, 엔도도메인은 CD3-ζ, CD28, 및 OX40의 신호전달 도메인을 포함한다. 특정 실시양태에서, 엔도도메인은 CD3-ζ, CD28, 및 4-1BB의 신호전달 도메인을 포함한다. 특정 실시양태에서, 엔도도메인은 4-1BB 신호전달 도메인을 포함한다.

[0037] 본 발명의 CAR을 인코딩하는 핵산 분자(예를 들어, 벡터)는 임의의 물리적, 화학적, 또는 생물학적 수단에 의해 원하는 표적 세포(예를 들어, T 세포)로 이동될 수 있다.

[0038] 본 발명의 방법은 CAR을 인코딩하는 핵산(DNA 또는 RNA)을 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다. 특정 실시양태에서, 방법은 CAR을 인코딩하는 핵산을 포함하는 T 세포(예를 들어, T 세포, 세포독성 T 세포, 및/또는 자연 킬러(natural killer))를 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다. T 세포는 자가성(autologous)일 수 있다. 예를 들어, 방법은 본 발명의 키메라 항원 수용체를 암호화하는 핵산(예를 들어, 키메라 항원 수용체의 발현을 위한 통합 또는 비-통합 벡터)으로 T 세포 생체 외(*ex vivo*) 형질도입을 포함하는 단계를 포함할 수 있다. 본 발명의 방법은 대상체로부터 T 세포를 획득하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[0039] 본 발명의 항체 분자는 당해 분야에서 알려진 다양한 방법을 이용해 제조될 수 있다. 폴리클로날 및 모노클로날 항체는 문헌[Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel et al. eds]의 기술에 따라 제조될 수 있다. 항체는 화학적 가교결합, 하이브리드 하이브리도마 기술에 의해 제조될 수 있고 숙주 세포, 예를 들어 박테리아 또는 효모 세포에서 발현되는 재조합 항체 단편의 발현에 의해 제조될 수 있다. 본 발명의 하나의 실시양태에서, 항체 분자는 숙주 세포의 재조합 항체 또는 항체 단편의 발현에 의해 생산된다. 항체를 인코딩하는 핵산 분자는 발현 벡터로 삽입될 수 있고 숙주 세포로 도입될 수 있다. 이어서, 제조된 항체 분자는 발현 시스템으로부터 단리되고 정제된다. 항체는 항체가 정제될 수 있는 정제 태그(purification tag)를 임의로 포함한다.

[0040] 본 발명의 항체 분자의 순도는 당해 분야의 숙련가에게 알려진 표준 방법, 예를 들어 ELISA, 면역조직화학(immunohistochmistry), 이온-교환 크로마토그래피, 친화성 크로마토그래피, 고정 금속 친화성 크로마토그래피(IMAC), 크기 배제 크로마토그래피, 폴리아크릴아미드 젤 전기영동(PAGE), 웨스턴 블로팅(western blotting), 표면 플라즈몬 공명 및 질량 분석법을 포함하지만 이에 제한되지 않는 방법을 이용해 평가될 수 있다.

[0041] 본 발명의 또 다른 양태에 따라, 암의 억제, 치료, 및/또는 예방을 위한 방법이 제공된다. 특정 실시양태에서, 암은 ALK 발현 암이다. 특정 실시양태에서, 암은 횡문근육종(rhabdmyosarcoma), 수모세포종(medulloblastoma), 신경교종(glioma), 유잉 육종(Ewing sarcoma), 또는 신경모세포종이다. 특정 실시양태에서, 암은 신경모세포종이다. 방법은 본 발명의 항-ALK 항체 또는 이의 단편을 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다. 항-ALK 항체는 약제학적으로 허용되는 담체를 추가로 포함하는 조성물로 투여될 수 있다. 항-ALK 항체 또는 이의 단편은 면역접합체로서 투여될 수 있다. 항-ALK 항체 또는 이의 단편은 ADC로서 투여될 수 있다. 항-ALK 항체 또는 이의 단편은 BiTE로서 투여될 수 있다. 항-ALK 항체 또는 이의 단편은 CAR로서 투여될 수 있다. 항-ALK 항체 또는 이의 단편은 CAR-T 세포로서 투여될 수 있다.

[0042] 특정 실시양태에서, 암은 특히 ALK의 증가된 활성(예를 들어, 증가된 키나아제 활성) 및/또는 보통 인간 세포와 비교해 증가된 ALK 복제 수를 유도하는, ALK의 적어도 하나의 돌연변이를 특징으로 한다. 특정 실시양태에서, ALK는 위치 P36, P157, V198, G640, L684, G718, D993, L1204, I1170, A1200, L1204, F1245, G1128, R1192, R1275, D1091, M1166, I1171, F1174, F1245, 또는 I1250에서 적어도 하나의 돌연변이를 포함한다. 특정 실시양태에서, ALK는 위치 G1128, R1192, R1275, D1091, M1166, I1171, F1174, F1245, 또는 I1250에서 적어도 하나의 돌연변이를 포함한다. 특정 실시양태에서, ALK는 위치 G1128, R1192, 및 R1275에서 적어도 하나의 돌연변이를 포함한다. 특정 실시양태에서, ALK는 P36S, P157S, V198M, G640R, L684M, G718F, G718S, D993G, L1204F, I1170S, A1200V, L1204F, F1245I, G1128A, R1192P, R1275Q, D1091N, M1166R, I1171N, F1174I, F1174L, F1245C, F1245V, I1250T, T1151M, I1170S, F1174C, L1196M, F1245I, R259H, M770I, E1407K, E1433del, R1464G, G1494R, 및 A1553P로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 적어도 하나의 돌연변이를 포함한다. 특정 실시양태에서, ALK는 G1128A, R1192P, R1275Q, D1091N, M1166R, I1171N, F1174I, F1174L, F1245C, F1245V, 및 I1250T로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 적어도 하나의 돌연변이를 포함한다. 특정 실시양태에서, ALK는 아미노산 R1275 및/또는 F1174, 특히 적어도 하나의 R1275Q, F1174I, 및 F1174L의 적어도 하나의 돌연변이를 포함한다. 특정 실시양태에서, 암은 ALK 억제제(예를 들어, 크리조티닙)에 내성이 있을 수 있다.

[0043] 조성물은 암에 대한 적어도 하나의 다른 치료제를 추가로 포함할 수 있다. 특정 실시양태에서, 다른 치료제는 화학요법제 및/또는 ALK 억제제(예를 들어, ALK siRNA 및/또는 안티센스 분자, 크리조티닙, TAE684(노바티스),

CEP-14083(세팔론), 로라티닙, 세리티닙, 또는 리보시클립)이다. 대안적으로, 다른 치료제를 적어도 하나의 약제학적으로 허용되는 담체와 함께 별도의 조성물(들) 내에서 얻을 수 있다. 별도의 조성물을 ALK 항체 또는 이의 단편을 포함하는 조성물로서 동일한 시간에(예를 들어, 동시에) 및/또는 상이한 시간에(예를 들어, 순차적으로) 투여할 수 있다. 예를 들어, 다른 치료제(들)를 (항-ALK 항체 또는 이의 단편 전에, 후에, 또는 동일한 시간에) 별도로 또는 동일한 조성물에서 투여할 수 있다. 특정 실시양태에서, 항-ALK 항체 또는 이의 단편은 동일한 시간에(예를 들어, 동시에) 및/또는 상이한 시간에(예를 들어, 순차적으로) 방사선요법과 함께 투여될 수 있다. 적어도 하나의 항-ALK 항체를 포함하는 조성물(들) 및/또는 적어도 하나의 다른 치료제를 포함하는 조성물(들)을 키트(kit) 내에 포함할 수 있다.

[0044] 본 발명의 조성물을 임의의 적합한 경로(route), 예를 들어, (예를 들어, 국소 또는 전신 투여를 위한) 주사, 비경구, 피하, 경구(예를 들어, 액체 또는 알약/캡슐/정제 형태), 국소, 폐, 정맥 내, 복강 내, 척추강 내, 경막 외, 근육 내, 피 내, 비강, 또는 다른 투여 방식에 의해 투여할 수 있다. 특정 실시양태에서, 조성물을 주사에 의해 (예를 들어, 비경구, 피하, 또는 혈액(예를 들어, 정맥 내로) 투여할 수 있다. 조성물을 암의 위치로 직접적으로 투여할 수 있다. 조성물을 정맥 내 또는 경구로 투여할 수 있다. 본 발명의 항체를 포함하는 조성물은 허용가능한 배지 예컨대, 물, 완충 식염수, 에탄올, 폴리올(예를 들어, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 액상 폴리에틸렌 글리콜 등), 디메틸 설폭사이드(DMSO), 오일, 세제, 현탁제 또는 이들의 적합한 혼합물과 함께 투여를 위해 편리하게 제형화할 수 있다. 적합한 약제학적 제조의 선택은 선택된 투여 방법에 달려있다. 선택된 배지에서 항체의 농도는 다양할 수 있고 배지를 약제학적 제제의 투여의 원하는 경로에 기반하여 선택할 수 있다. 임의의 기존의 배지 또는 제제가 투여되는 제제와 호환되지 않는 경우를 제외하면, 약제학적 제제에서 이의 사용이 고려된다. 본 발명의 약제학적 조성물을, 예를 들어, 액체 형태로 제조할 수 있거나, 건조된 파우더 형태(예를 들어, 동결 건조된) 일 수 있다.

[0045] 약제학적 담체와 밀접한 혼합물에서 활성 성분으로서 본 발명의 제제를 포함하는 약제학적 조성물은 기존의 약제학적 조제(compounding) 기술에 따라 제조될 수 있다. 담체는 투여를 위해 원하는 제제의 형태에 따라 다양한 형태로 취해질 수 있다. 경구 투여 형태로 항체의 제조에서, 경구 액체 제제(예컨데, 예를 들어, 현탁제, 엘릭서 및 수용액)의 경우 임의의 유용한 약제학적 배지, 예를 들어, 물, 글리콜, 오일, 알코올, 향료, 보존제, 착색제 등이 사용될 수 있고; 경구 고형 제제(예컨대, 예를 들어, 파우더, 캡슐 및 정제)의 경우 담체 예컨대 전분, 당류, 희석제, 과립제, 윤활제, 결합제, 붕해제 등이 사용될 수 있다.

[0046] 본 발명의 약제학적 제제를 투여량(dosage)의 균일성 및 투여(administration)의 용이성을 위해 투여 단위 형태(dosage unit form)로 제형화할 수 있다. 본원에서 사용된 투여 단위 형태는 치료를 받는 환자에게 위해 적합한 약제학적 제제의 물리적으로 분리된 단위를 지칭한다. 각각의 투여는 계산된 활성 물질의 양을 함유하여 선택된 약제학적 담체와 함께 조합되어 원하는 효과를 생산한다. 적합한 투여 단위를 결정하기 위한 과정은 당해 분야의 숙련가들에게 잘 알려져있다. 투여 단위는 환자의 체중에 기반하여 비례하여 증가되거나 감소될 수 있다. 특정 병리학적 상태의 완화를 위해 적합한 농도는 당해 분야에 알려진대로, 투여 농도 커브 계산에 의해 결정할 수 있다.

[0047] 본 발명에 따른 특정 환자에게 투여하기에 적합한 항체의 용량(dose) 및 투여 섭생은 환자의 나이, 성별, 체중, 일반적 의료 상태, 및 상기 제제를 투여하기 위한 특정 상태, 및 심각성을 고려해 의사에 의해 결정할 수 있다. 또한 의사는 항체의 투여 경로, 항체와 혼합될 수 있는 약제학적 담체, 및 항체의 생물학적 활성을 고려할 수 있다. 본 발명의 제제의 투여를 위한 적합한 투여 단위를 동물 모델에서 제제의 독성을 평가함으로써 결정할 수 있다. 또한 적합한 투여 단위를 다른 표준 약물들과 함께 혼합된 제제의 효과를 평가함으로써 결정할 수 있다.

[0048] 본 발명의 제제를 포함하는 조성물은 적합한 간격, 예를 들어, 병적 증상이 감소 또는 완화될 때까지 적어도 1일 1회 이상 투여할 수 있으며, 그 이후에는 투여량을 유지 수준으로 감소시킬 수 있다. 특정 경우에 적합한 투여 간격은 일반적으로 환자의 상태에 따라 다르다.

[0049] 정의

[0050] 하기 정의는 본 발명의 이해를 촉진하기 위해 제공된다:

[0051] 본원에서 명확하게 지시되지 않는 한, 단수 형태 "하나"("a", "an") 및 "그것"("the")은 복수 지시 대상을 포함한다.

[0052] "약제학적으로 허용되는"은 연방 또는 주 정부의 규제 기관에 의한 승인 또는 동물, 또는 더 특히 인간에게 사용하기 위해 미국 약전 또는 기타 일반적으로 인정되는 약전에 등재되어 있음을 의미한다.

[0053] "담체"는 본 발명의 활성제와 함께 예를 들어, 희석제, 아쥬반트(adjuvant), 부형제(excipient), 보조제 또는 비히클(vehicle)을 투여하는 것을 지칭한다. 약제학적으로 허용되는 담체는 멸균 액체, 예컨대 물 및 오일, 예를 들어 석유, 동물, 식물 또는 합성 기원의 오일, 예를 들어 땅콩 오일, 대두 오일, 미네랄 오일, 참깨 오일 등일 수 있다. 물 또는 수성 식염수 용액 및 수성 덱스트로즈 및 글리세롤 용액은 바람직하게는 담체로서 이용된다. 적합한 약제학적 담체가, 예를 들어, 문헌["Remington's Pharmaceutical Sciences" by E.W. Martin]에 기술되어 있다.

[0054] "항체" 또는 "항체 분자"는 특정 항원에 결합하는 항체 및 이의 단편을 포함하는 임의의 면역글로불린이다. 본원에 사용된, 항체 또는 항체 분자는 온전한(intact) 면역글로불린 분자, 면역글로불린 분자의 면역학적 활성화 부위(예를 들어, 항원-결합 단편), 및 면역글로불린 분자의 면역학적 활성화 부위의 융합을 고려한다.

[0055] 본원에서 사용된, 용어 "면역학적으로 특정한"은 단백질 또는 목적 화합물의 하나 이상의 에피토프(epitope)에 결합하지만 이는 연속적으로 인식되지 않고 항원성 생물학적 분자의 혼합된 집단(population)을 포함하는 샘플에서 다른 분자와 결합하지 않는 단백질/폴리펩타이드, 특히 항체를 지칭한다.

[0056] 본원에서 사용된, 용어 "대상체"는 동물, 특히 포유류, 특히 인간을 지칭한다.

[0057] "약제학적 유효량"의 화합물 또는 약제학적 조성물은 특정 장애 또는 질병의 증상을 예방, 억제, 치료, 또는 감소시키기 위한 효과적인 양을 지칭한다. 본원의 질병 또는 장애의 치료는 질병 또는 장애, 이의 증상(들), 이에 대한 소인(predisposition)을 치유, 완화, 및/또는 예방하는 것을 지칭할 수 있다.

[0058] 본원에서 사용된, 용어 "치료제"는 화학적 화합물 또는 생물학적 분자, 예를 들어 상태, 질병, 또는 장애의 증상을 감소시키거나 상태, 질병, 또는 장애를 치료하기 위해 사용될 수 있는 핵산, 펩타이드, 단백질, 및 항체를 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0059] 용어 "단리된"은 화합물의 생산 동안 또는 이의 자연 환경으로부터 존재하는 다른 요소로부터 화합물의 분리를 지칭한다. "단리된"은 다른 화합물 또는 재료와 함께 인공적 또는 합성적 혼합물, 또는 기초적인 활성을 실질적으로 방해하지 않는 불순물의 존재을 배제하지 않고, 이는 예를 들어, 불완전한 정제, 또는 안정제의 추가 때문에 존재할 수 있다.

[0060] 본원에서 사용된, 용어 "저분자"는 상대적으로 낮은 분자량(예를 들어, 2,000 이하)를 갖는 물질 또는 화합물을 지칭한다. 전형적으로, 저분자는 유기물이지만 단백질, 폴리펩타이드, 또는 핵산은 아니다.

[0061] 화학요법제는 항암 활성을 나타내고/내거나 세포에 해로움(예를 들어, 독소)을 나타내는 화합물이다. 적합한 화학요법제는 독소(예를 들어, 사포린, 리친, 아브린, 에티듐 브로마이드, 디프테리아 독소, 및 슈도모나스 외독소); 탁산; 알킬화제(예를 들어, 테모졸로마이드, 질소 머스타드(nitrogen mustard) 예컨대 클로람부실, 사이클로포스파마이드, 이소파마이드, 메클로레타민, 멜팔란 및 우라실 머스타드; 아지리딘 예컨대 티오테파; 메탄설폰산 에스테르 예컨대 부설판; 니트로소 우레아(nitroso urea) 예컨대 카르무스틴, 로무스틴 및 스트렙토조신; 백금 착물(예를 들어, 시스플라틴, 카르보플라틴, 테트라플라틴, 오르마플라틴, 티오플라틴, 사트라플라틴, 네다플라틴, 옥살리플라틴, 헵타플라틴, 이프로플라틴, 트랜스플라틴, 및 로바플라틴); 생물환원성 알킬화제 예컨대 미토마이신, 프로카르바진, 다카르바진 및 알트레타민); DNA 가닥-절단제(예를 들어, 블레오마이신); 토포이소머라제 II 억제제(예를 들어, 암사크린, 메노가릴, 아모나파이드, 닥티노마이신, 다우노루비신, N,N-디벤질 다우노마이신, 엘립티신, 다우노마이신, 피라졸로아크리딘, 이다루비신, 미톡산트론, m-AMSA, 비산트렌, 독소루비신(아드리아마이신), 데옥시독소루비신, 에토포사이드(VP-16), 에토포사이드 인산, 옥산트라졸, 루비다존, 에피루비신, 블레오마이신, 및 테니포사이드); DNA 마이너 홈 결합제(예를 들어, 플리카미딘); 항대사제(예를 들어, 엽산 길항제 예컨대 메토트렉세이트 및 트리메트렉세이트); 피리미딘 길항제 예컨대 플루오로우라실, 플루오로디옥시우리딘, CB3717, 아자시티딘, 시타라빈 및 플록스우리딘; 퓨린 길항제 예컨대 머캅토퓨린, 6-티오구아닌, 플루다라빈, 펜토스타틴; 아스파라기나아제; 및 리보뉴클레오타이드 환원효소 억제제 예컨대 하이드록시우레아); 안트라사이클린; 및 튜불린 상호작용제(예를 들어, 빈크리스틴, 빈블라스틴, 및 파클리탁셀(Taxol®))을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0062] 하기 실시예는 본 발명의 특정 실시양태를 설명하기 위해 제공된다. 이는 어떠한 방식으로 본 발명을 제한하려는 의도는 아니다.

[0063] **실시예**

[0064] 최근의 포괄적인 게놈 분석은 치료가능한 재발성 체세포 돌연변이가 소아암에서 드물다는 심각한 결론을 도출했

으며, 정밀하게 개발된 요법을 사용하여 결과를 실질적으로 개선하기 위해서 돌연변이 키나아제를 표적화(targeting)하는 저분자를 넘어서는 것이 필요하다는 전망을 제기한다. 신경모세포종 및 다른 ALK-발현 소아 종양에 치료적 접근으로서 ALK-표적 항체에 대한 긴급한 요구가 있다. 중요하게는, ALK는 일반 조직이 아닌, 신경모세포종 세포의 표면에 발현된다 (Carpenter, et al. (2012) Oncogene 31(46):4859-67). 특히, ALK는 또한 횡문근육종, 수모세포종, 신경교종 , 및 유잉 육종의 서브세트(subset)에서도 높은 수준으로 차별적으로 발현된다 (Mosse, Y.P. (2016) Clin. Cancer Res., 22(3):546-52; Corao (2009) Pediatric Dev. Pathol., 12(4):275-83; Pillay, et al. (2002) Histopathology 41(5):461-7; Yoshida et al. (2013) Mod. Pathol., 26(6):772-81). 이는 또한 ALK가 면역요법의 표적임을 나타낸다. 예를 들어, ALK 세포외 영역에 대한 항체-약물 접합체(ADC)는 ALK의 면역치료적 표적화에 이용될 수 있다. ADC는 강력한 세포독성 약물의 항암 효과(Teicher, et al. (2011) Clin. Cancer Res., 17(20):6389-97)와 함께 종양 세포-표면 단백질(Sliwkowski, et al. (2013) Science 341(6151):1192-8)에 특이적인 항체(예를 들어, 모노클로날 항체)의 표적화 특성을 조합하는 빠르게 성장하는 항암 약물 분류(class)이다.

[0065] 도 1a는 ALK의 계략도를 제공한다. MAM1, LDLa, MAM2, G-풍부, G-T 도메인 및 전장 ALK 세포외 도메인(full-length ALK extracellular domain) (ALK-Ecto)이 파지 패닝(phage panning)을 위해 별도로 발현된다. 간단하게는, 293T 및 293T-ALK 세포를 얼음에서 30분 동안 200mL PBS에서 1μM의 농도로 상이한 VH 항체와 함께 염색했다. 세포를 1mL PBS로 3회 세척하였고 얼음에서 30분 동안 항-FLAG-PE 항체(1:200, BioLegend)로 인큐베이션(incubation)하였다. FLAG 태그는 서열: DYKDDDDK (서열 번호: 9)를 포함한다. 이후 염색된 세포를 1mL PBS로 3회 세척하였다. 항체 결합을 BD™ LSR II (BD Biosciences, San Jose, CA)에서 검출하였다. 형광 활성화 세포 분류(Fluorescence activated cell sorting; FACS) 데이터 분석을 FlowJo_V10_CL를 사용해 수행하였다.

[0066] 도 1b 및 1c는 293T 세포(293T-ALK)의 세포 표면에 발현된 ALK 세포외 도메인에 결합하는 다양한 VH와 함께 유세포분석 결과를 도시한다. VH5 및 VH78이 G-T 도메인 항원과 함께 식별되는 반면, VH9 및 VH20은 G-풍부 도메인 항원과 함께 식별된다. 모든 4개의 VH는 293T-ALK 세포와 준수한 결합을 보이는 반면 293T 세포와는 상당한 비-특이적 결합을 보이지 않는다.

[0067] 4개의 VH를 동적 광 산란(DLS)에 의해 연구했다. 간단하게는, VH 항체를 PBS로 완충액(buffer)을 교체하고 0.22 μM 필터로 여과하였다. 항체 농도는 5 mg/mL로 조절하였다. 500 μL 샘플을 DLS에 대해 37℃에서 인큐베이션하였다. 샘플을 0일, 1일, 4일, 7일, 및 14일에 Zetasizer Nano-ZS ZEN 3600 (Malvern Instruments Limited; Malvern, UK)에서 측정하여 단백질 입자의 크기 분포를 결정하였다. 도 2a 내지 2d에서 볼 수 있듯이, VH20 및 VH5는 VH9 및 VH78보다 더 낮은 응집을 보였다.

[0068] VH를 추가로 특성화하였다. 먼저, VH의 결합 친화성을 인간 IgG1 Fc(ALK-Fc)에 융합된 ALK 세포외 도메인을 포함하는 융합 단백질을 사용하는 ELISA 검정으로 연구했다. ELISA 플레이트 (Corning 3690; Tewksbury, MA)를 4℃에서 밤새 50 μl 항원 (1x PBS로 희석된 5 μg/ml)로 코팅(coating)하였다. 다음날, 차단을 2시간 동안 실온에서 150 μL 5% 밀크-PBS (Bio-RAD; Hercules, CA)로 수행하였다. 이어서, 플레이트를 0.05% PBST로 3회 세척하였다. (5% PBS-Milk에서) 3배 연속 희석된 VH 항체를 각각의 웰(well)에 첨가하였고 1시간 동안 실온에서 접종한 다음 PBST로 4회 세척하였다. 다음으로, 50 μL 항-Flag-HRP (5% PBS-밀크 내 1:1000 희석, Thermo; Waltham, MA)를 각각의 웰에 첨가하였고 1시간 동안 실온에서 인큐베이션 한 다음 PBST로 5회 세척하였다. 50 μL 3,3',5,5'-테트라메틸벤지딘(TMB) 기질(Sigma; St. Louis, MO)을 각각의 웰에 첨가하였고 1 내지 2분 동안 색이 발현되도록 한 다음 50 μL H_2SO_4 (1M, Sigma)로 중단하였다. 플레이트를 450 nm 흡광도에서 판독하였다.

ELISA 결과를 GraphPad Prism 9.0.2를 사용하여 분석하였다. 도 3a에서 볼 수 있듯이, VH20는 약 0.4 nM의 ALK에 대한 EC_{50}, VH5는 약 0.32 nM의 ALK에 대한 EC_{50}, 및 VH78는 약 1.32 nM의 ALK에 대한 EC_{50}을 나타내었다.

[0069] 또한 VH20을 크기 배재 크로마토그래피(SEC)에 의해 연구하였다. 200μL (1 μg/mL) 여과된 샘플을 분석에 사용하였다. Superdex® 200 Increase 10/300 GL 컬럼(GE Healthcare, Cat. No. 28990944)을 SEC를 위해 사용하였다. 컬럼을 페리틴(440 kDa), 알돌라제(158 kDa), 코날부민(75 kDa), 오발부민(44 kDa), 탄산탈수효소(29 kDa), 및 리보뉴클레아제 A(13.7 kDa)의 단백질 분자량 표준으로 보정하였다. 단백질을 0.5 mL/분의 유동 속도(flow rate)으로 둘베코의 인산 완충된 식염수(DPBS) 완충액으로 용출하였다. 도 3b에 볼 수 있듯이, VH20을 SEC에 의해 이량체(dimer)로 결정하였다.

[0070] 또한 KTN0239와 경쟁하는 VH20의 능력에 대해서도 연구하였다. KTN0239는 KTN0125의 인간화된 변이체이고(Sano et al. (2016) Cancer Res., 76(14 Suppl):Abstract2690) ALK의 G 풍부 도메인에 결합할 수 있다. 단백질 A 바

이오센서(Protein A biosensor)(18-5010, BLItz® system, ForteBio; Freemont, CA)를 KTN0239-IgG 부동화(immobilization)에 이용하였다. DPBS (pH = 7.4)를 기준선을 위해 사용하고 해리를 결정하였다. 사용된 검출 조건은 (I) 기준선 30초; (II) 120초 동안 KTN0239-IgG 로딩; (III) 기준선 30초; (IV) ALK와 120초 동안 결합(association); 및 (V) VH20과 120초 동안 결합이다. 도 3c에서 볼 수 있듯이, VH20은 KTN0239-IgG와 경쟁적이지 않다.

[0071] VH20이 ALK 발현 세포에 결합하는 능력 또한 FACS에 의해 연구하였다. SK-N-AS (음성 세포주), IMR32 (양성 세포주), SY5Y-D3 (양성 세포주) 세포를 얼음에서 30분 동안 200 μL에서 1 μM 의 농도로 VH20을 염색하였다. 세포를 1mL PBS로 3회 세척하였고 얼음에서 30분 동안 항-Flag-PE 항체(1:200, BioLegend)로 인큐베이션하였다. 세포를 다시 1 mL PBS로 3회 세척하였다. 항체 결합을 BD™ LSR II (San Jose, CA) 상에서 검출하였다. FACS 데이터 분석을 FlowJo_V10_CL을 사용하여 수행하였다. 도 3d에서 볼 수 있듯이, VH20는 IMR32 및 SY5Y-D3 세포 상의 세포 표면 ALK에 결합이 가능했지만, 음성 대조군 SK-N-AS 세포에는 가능하지 않았다.

[0072] 또한 293T 및 293T-ALK 세포에 대한 항-ALK CAR-T 세포의 세포독성을 연구하였다. 항-ALK CAR-T 세포 (효과기 세포(effector cells))를 효과기에서 293T 및 293T-ALK 세포와 인큐베이션하였다: 96-웰 세포 배양 플레이트(Corning)에서 48시간 동안 1.25:1, 2.5:1, 5:1, 10:1 및 20:1의 표적 비율. 293T 세포와 CAR-T 세포의 공동 배양을 음성 대조군으로 이용하였다. 세포독성을 제조업자의 설명서에 따라 세포독성 LDH 검출 키트(Promega)로 표적 세포로부터 배지로 방출되는 특정 젖산 탈수효소(lactate dehydrogenase; LDH)를 검출함으로써 결정하였다. 세포독성 퍼센트를 하기 공식으로 계산하였다: 세포독성(%) = (실험적 용해 - 효과기 자발적 용해 - 표적 자발적 용해)/(표적 최대 용해 - 표적 자발적 용해) X 100%. 항-ALK CAR-T 세포를 음성 대조군으로서 293T와 함께 공동 배양하였다. 도 4에서 볼 수 있듯이, 더 큰 세포독성을 VH5 및 VH78으로 검출하였다.

[0073] 또한 VH20 이특이적 T-cell 인게이저(VH20-OKT3-Fc BiTE)를 합성하고 특성화 하였다. 도 5a는 인간 VH20-OKT3-Fc BiTE의 계략도를 제공한다. VH20, OKT3-7 scFV 및 IgG1 Fc를 융합하여 BiTE를 생성했다. 또한 도 5a는 베타-머캅토엔탄올과 (감소하면서) 함께 또는 베타-머캅토엔탄올 없이 SDS-PAGE에서 BiTE의 크기를 제공한다. (C-말단에서 His 태그 (6x His)를 포함하는) 단백질을 Expi293™ 발현 시스템 (Thermo)에서 발현하였고 Ni-NTA 컬럼 (Thermo)으로 정제하였다. 단백질 농도를 NanoDrop™ Lite spectrophotometer (Thermo)로 측정하였고 단백질 순도는 SDS-PAGE로 >95%으로 추정되었다.

[0074] 또한 크기 배제 크로마토그래피(SEC)가 VH20-OKT3-Fc BiTE를 특성화하기 위해 수행되었다. 간단하게는, 200 μL (1 μg/mL) 여과된 샘플 분석을 위해 사용하였다. Superdex® 200 Increase 10/300 GL 컬럼 (GE Healthcare, Cat. No. 28990944)를 사용하였다. 컬럼은 단백질 분자량 표준인 페리틴(440 kDa), 알돌라제(158 kDa), 코날부민(75 kDa), 오발부민(44 kDa), 탄산탈수효소(29 kDa), 및 리보뉴클레아제 A(13.7 kDa)로 보정하였다. 단백질을 0.5 mL/분의 유동 속도로 DPBS 버퍼로 용출하였다. 도 5b에서 볼 수 있듯이, VH20-OKT3-Fc는 단량체(monomer)이다.

[0075] 또한 ALK 양성 세포를 사멸시키는 VH20-OKT3-Fc BiTE의 능력을 시험하였다. BiTE 매개된 세포 독성 검정을 96개의 웰 세포 배양 플레이트에서 BiTE의 3배 연속 희석을 배양 배지로 첨가함으로써 수행하였다. 활성화된 Pan-T 세포(효과기 세포), 및 표적 세포(293T, 293T-ALK, SK-N-AS, IMR32, SY5Y) 혼합물을 E:T 비율 = 4 (10,000 표적 세포/웰)로 각각의 웰에 첨가하였다. Iso 유형 BiTE를 음성 대조군으로 사용하였다. 인큐베이션 24시간 후, 세포독성을 세포독성 LDH 검출 키트(Promega)로 표적 세포로부터 배지로 방출된 특정 젖산 탈수소효소를 검출함으로써 결정하였다. 세포독성 퍼센트를 하기 수학식으로 계산하였다: 세포독성(%) = (실험적 용해 - 효과기 자발적 용해 - 표적 자발적 용해)/(표적 최대 용해 - 표적 자발적 용해) X 100%. 도 5c에서 볼 수 있듯이, BiTE는 ALK 양성 종양 세포(293T-ALK, SY5Y, IMR32)에 세포독성을 매개한다. BiTE는 SK-N-AS 세포(음성 대조군)에 대해 세포독성이 아니였다. 따라서, VH20-OKT3-Fc BiTE는 상이한 종양 세포(293T-ALK, SY5Y, IMR32 세포, E:T = 4:1)에 대해 높은 효능(IC_{50}가 293T-ALK에 대해 0.01 nM; SY5Y에 대해 0.15 nM; 및 IMR32에 대해 0.1 nM인)으로 세포독성이었다.

[0076] 또한 VH20 내재화를 특성화하였다. 내재화 연구를 위해, VH20을 pHrodo™ 딥 레드 항체 라벨링 키트 (Thermo)를 사용하여 pHrodo™ 딥 레드 염료(Deep Red dye)로 접합하였다. 접합된 VH20를 상이한 농도에서 24시간 동안 293T 및 293T-ALK 세포로 인큐베이션하였다. VH20 내재화를 유세포분석에 의해 측정하였다. 도 6a에서 볼 수 있

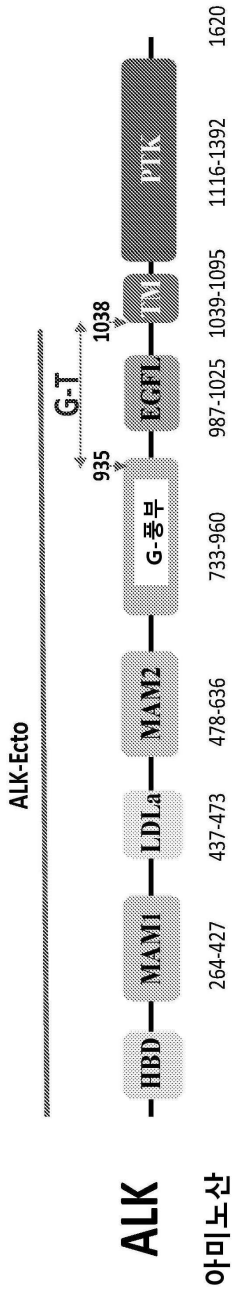
듯이, VH20를 293T-ALK 세포로 효과적으로 내재화한 동안, 293T 세포에서 다른 비특이적 내재화는 측정되지 않았다.

[0077] 또한 VH20을 포함하는 항체-약물 접합체(ADC)의 세포독성을 연구하였다. 구체적으로는, VH20-Fc-모노메틸 오리스타틴 E(MMAE) 작제물을 합성하였다. VH20-ADC를 96개의 웰에서 세포 배양 배지에 3배 연속 희석하였다. 배양 4일 후, 293T 및 293T-ALK 세포를 각각의 웰(2000 cells/well)에 첨가하였다. 이어서, 세포 생존성(Cell viability)을 CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay (Promega)으로 결정하였다. 도 6b에서 볼 수 있듯이, VH20-Fc-MMAE는 293T-ALK 세포에 대해 강력한 세포독성(IC_{50} = 4.528 nM)을 나타내었다.

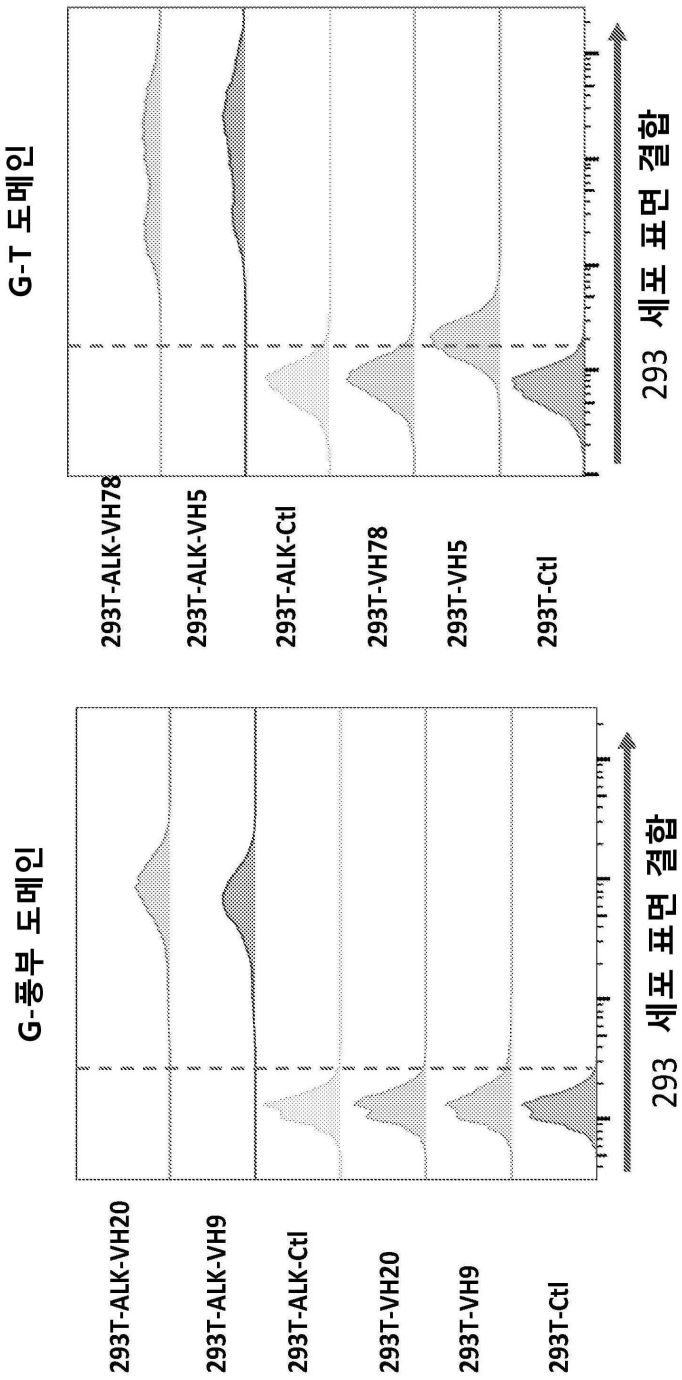
[0078] 본 발명의 바람직한 실시양태의 일부가 상기에 기재되고 구체적으로 예시되었지만, 본 발명이 이러한 실시양태에 제한된다는 것을 의도하지 않는다. 하기 청구범위에 제시된 것과 같은, 본 발명의 범위와 사상을 벗어나지 않고 다양한 변형이 이루어질 수 있다.

도면

도면1a



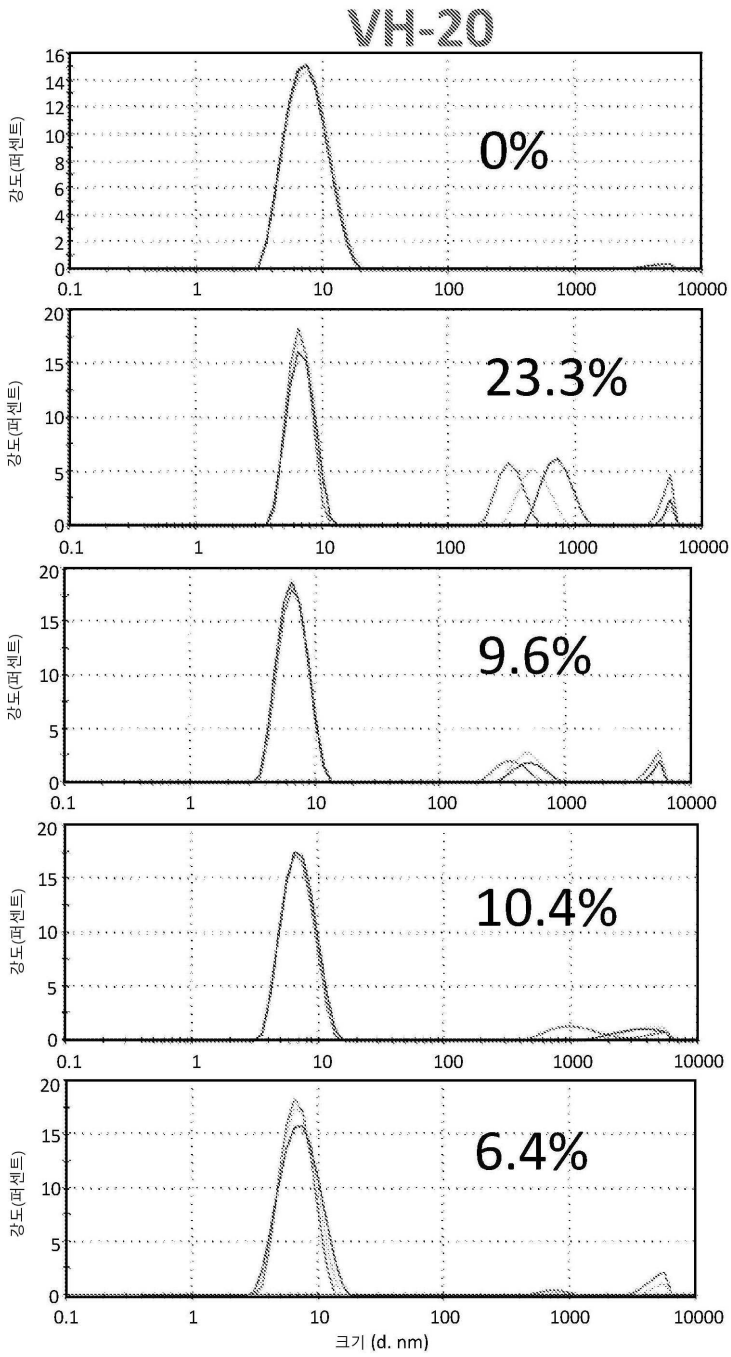
도면1bc



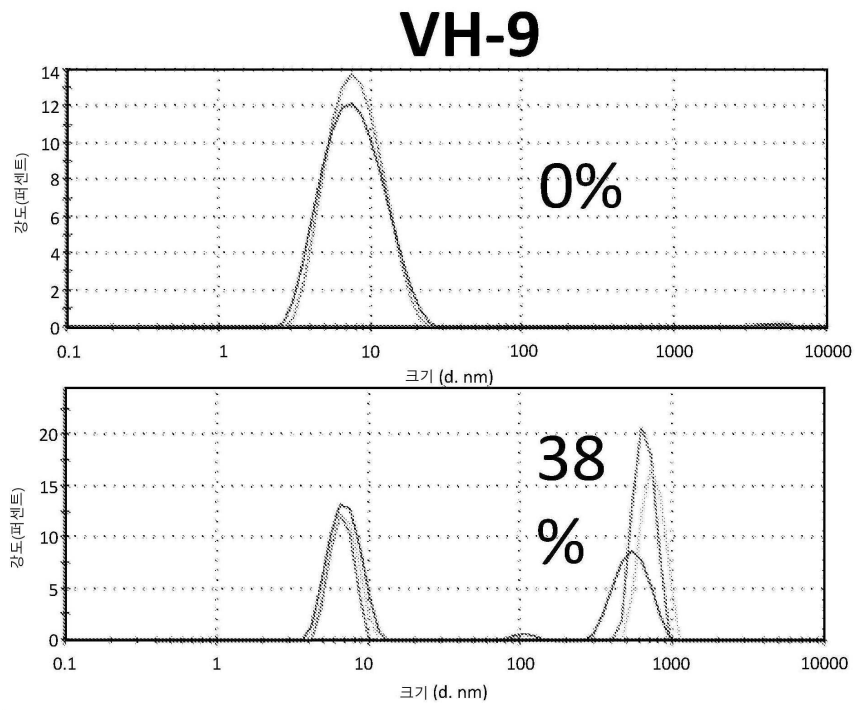
도 1b

도 1c

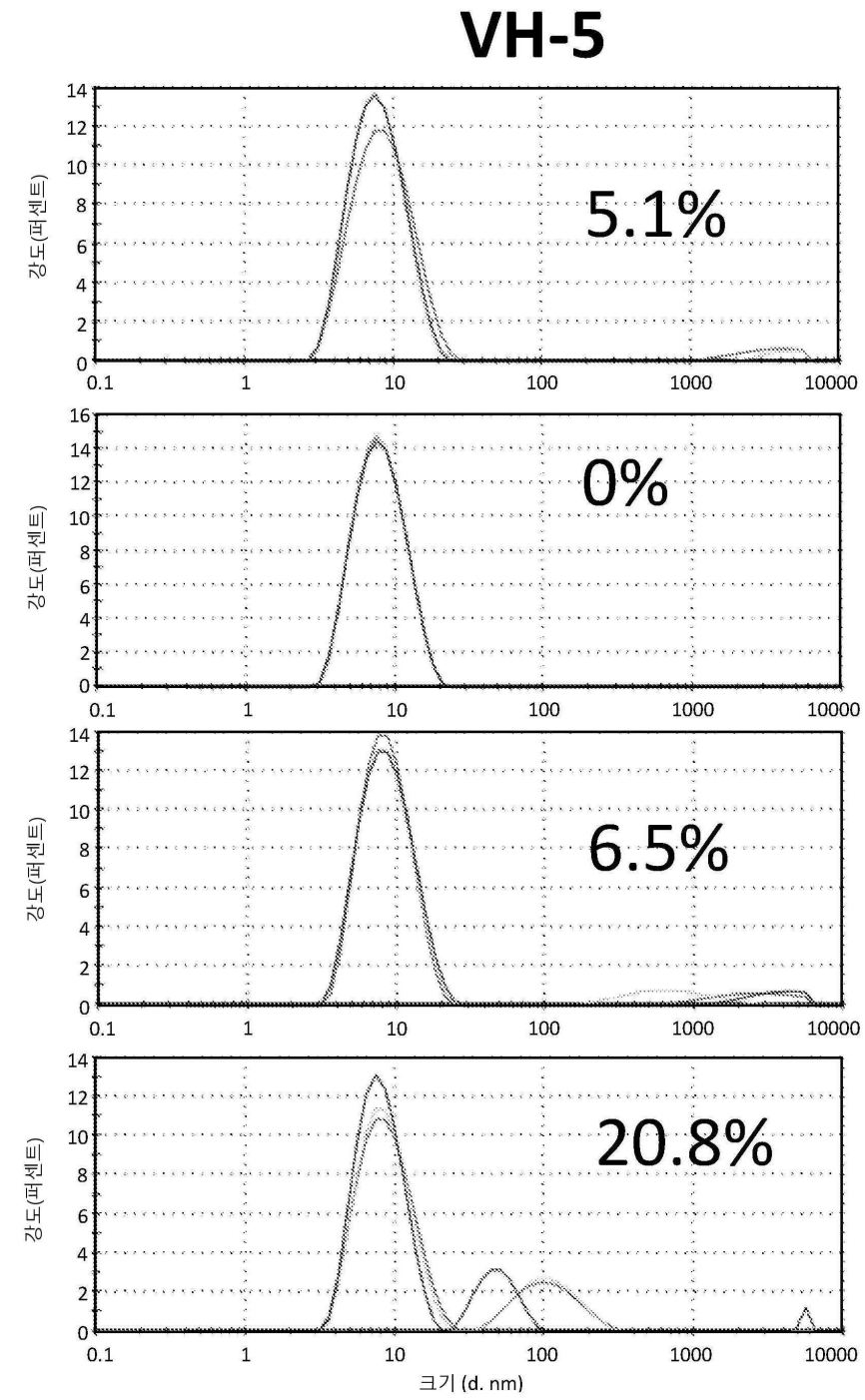
도면2a



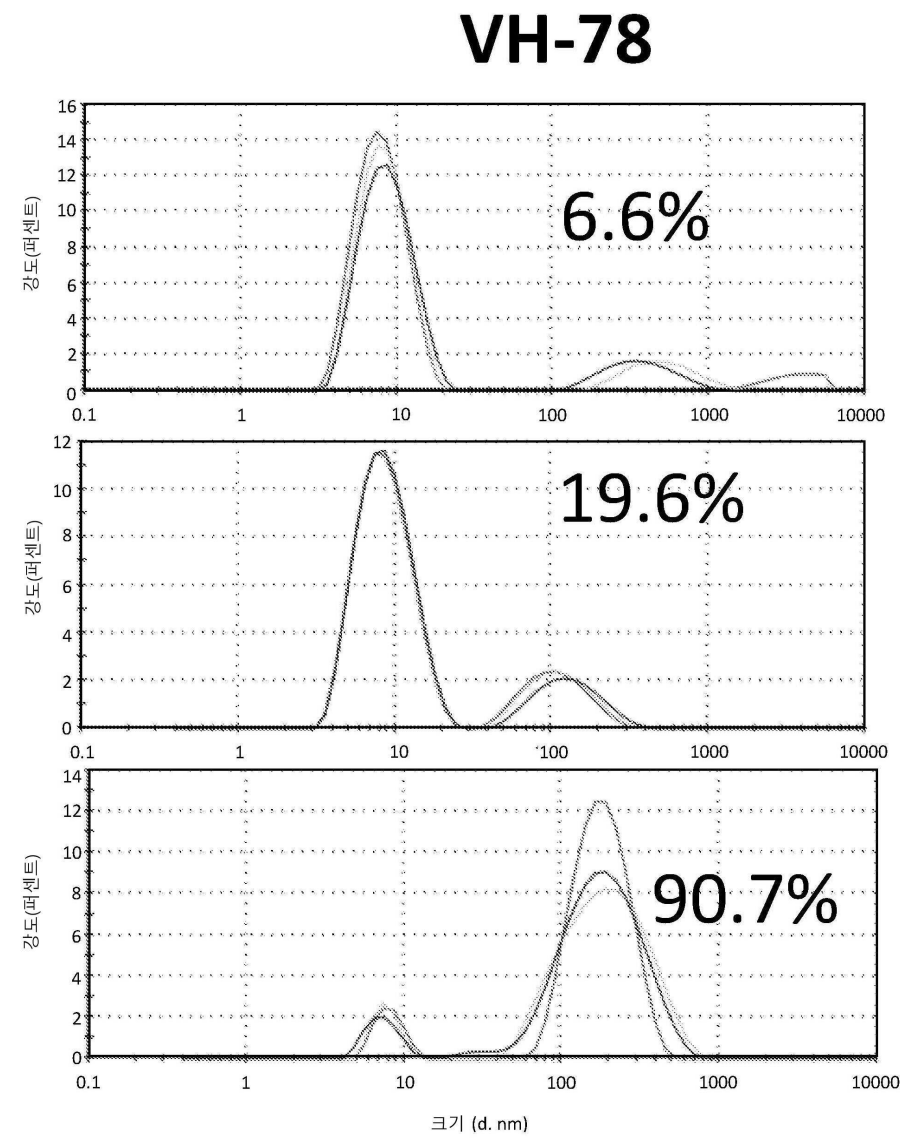
도면2b



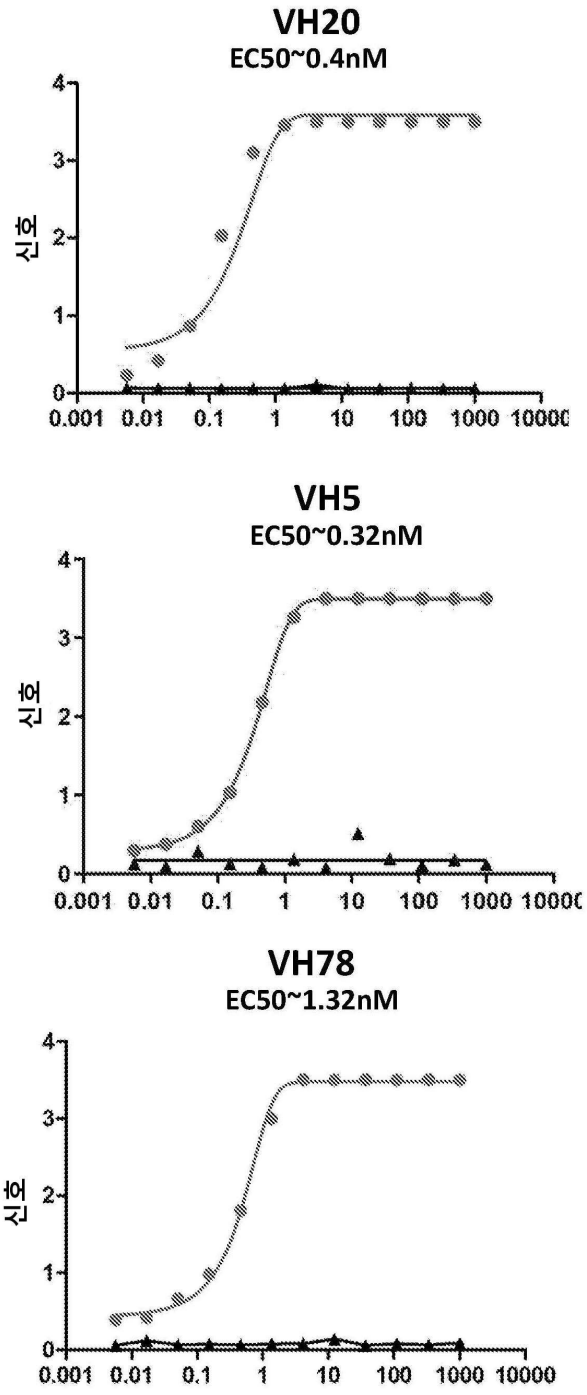
도면2c



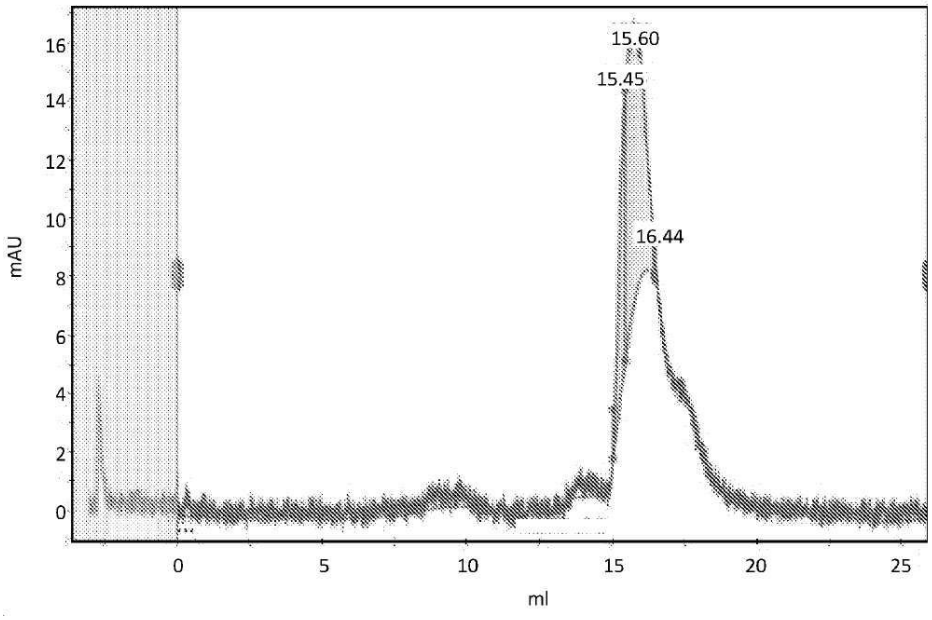
도면2d



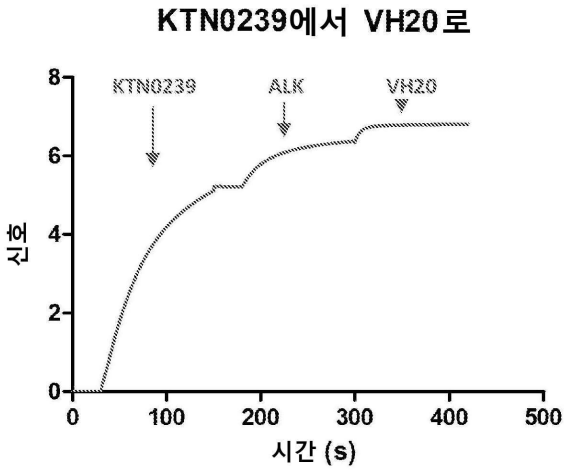
도면3a


VH20
EC50~0.4nM
신호
0
1
2
3
4
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
10000
VH5
EC50~0.32nM
신호
0
1
2
3
4
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
10000
VH78
EC50~1.32nM
신호
0
1
2
3
4
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
10000

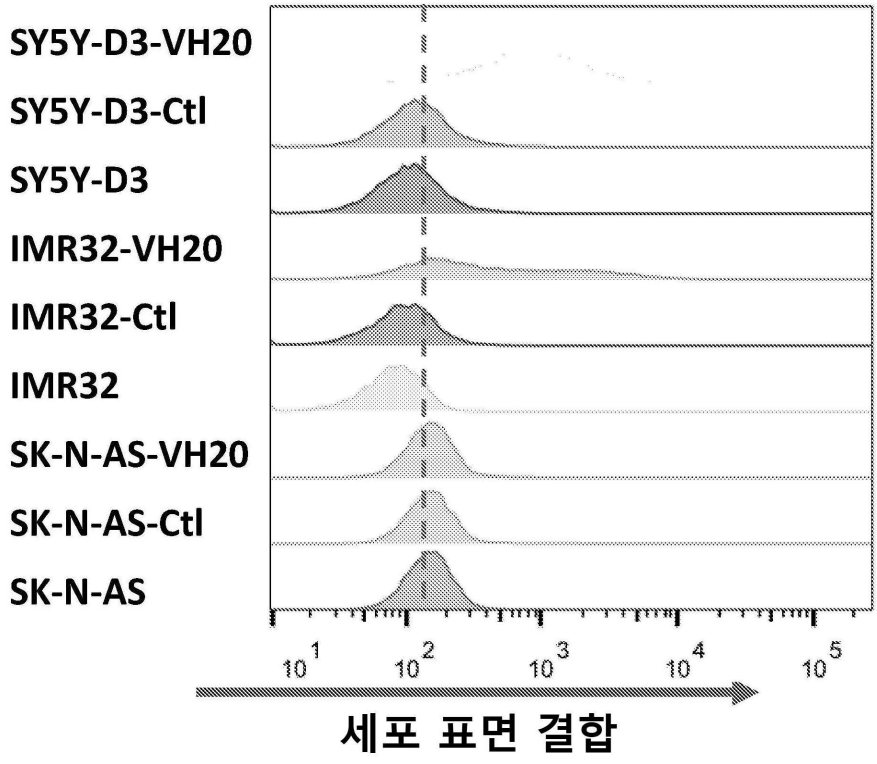
도면3b



도면3cd

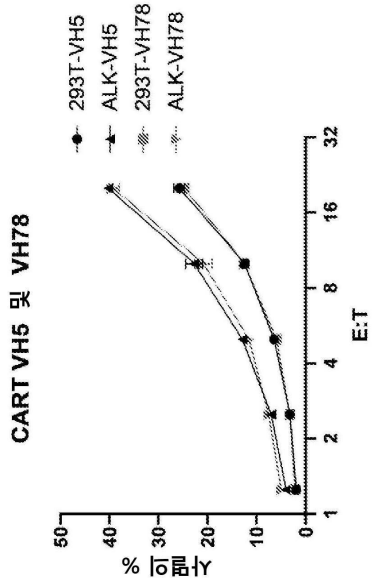


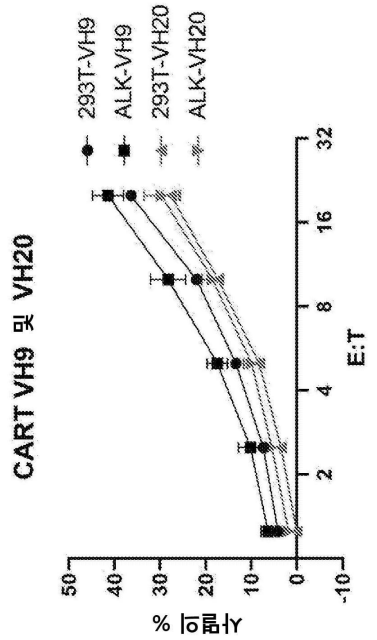
도 3c



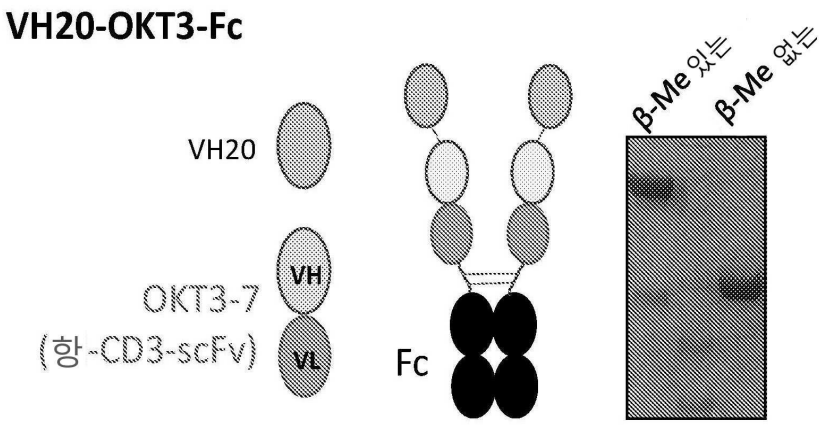
도 3d

도면4

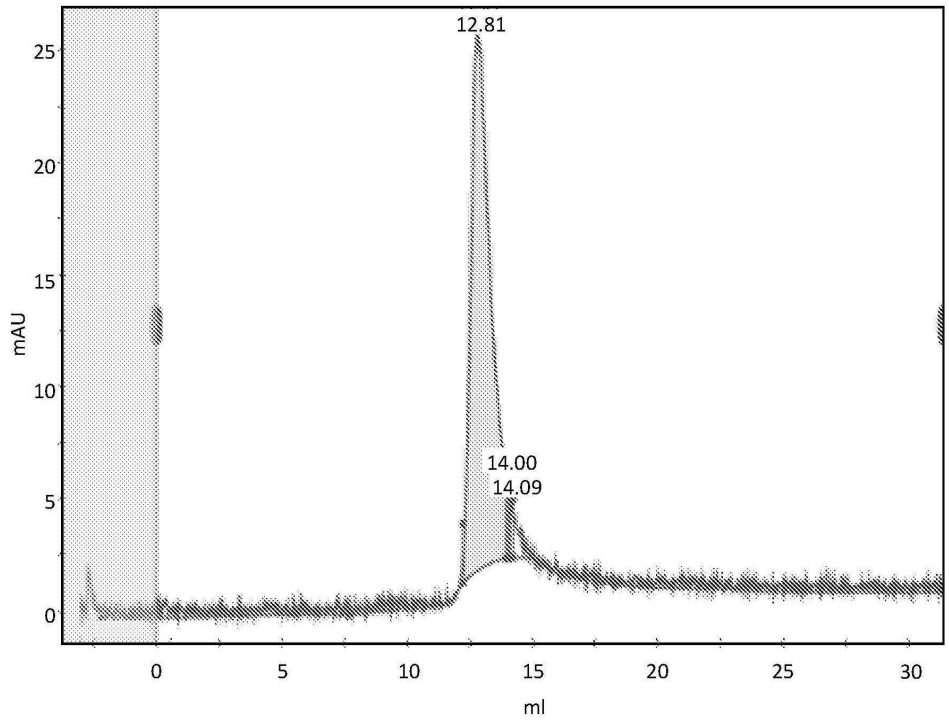

CART VH5 및 VH78
293T-VH5
ALK-VH5
293T-VH78
ALK-VH78
사멸의 %
E:T
0
10
20
30
40
50
1
2
4
8
16
32


CART VH9 및 VH20
293T-VH9
ALK-VH9
293T-VH20
ALK-VH20
사멸의 %
E:T
-10
0
10
20
30
40
50
2
4
8
16
32

도면5ab

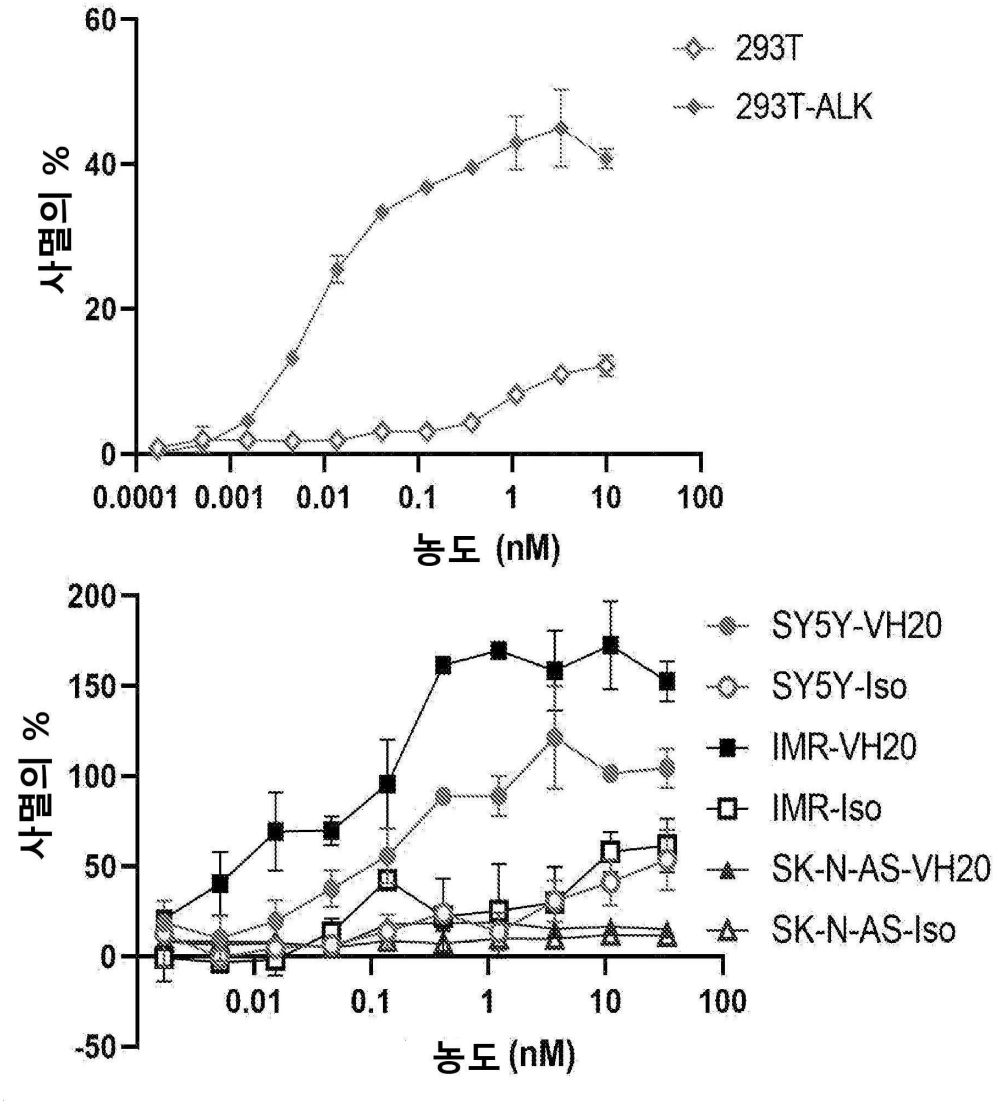


도 5a

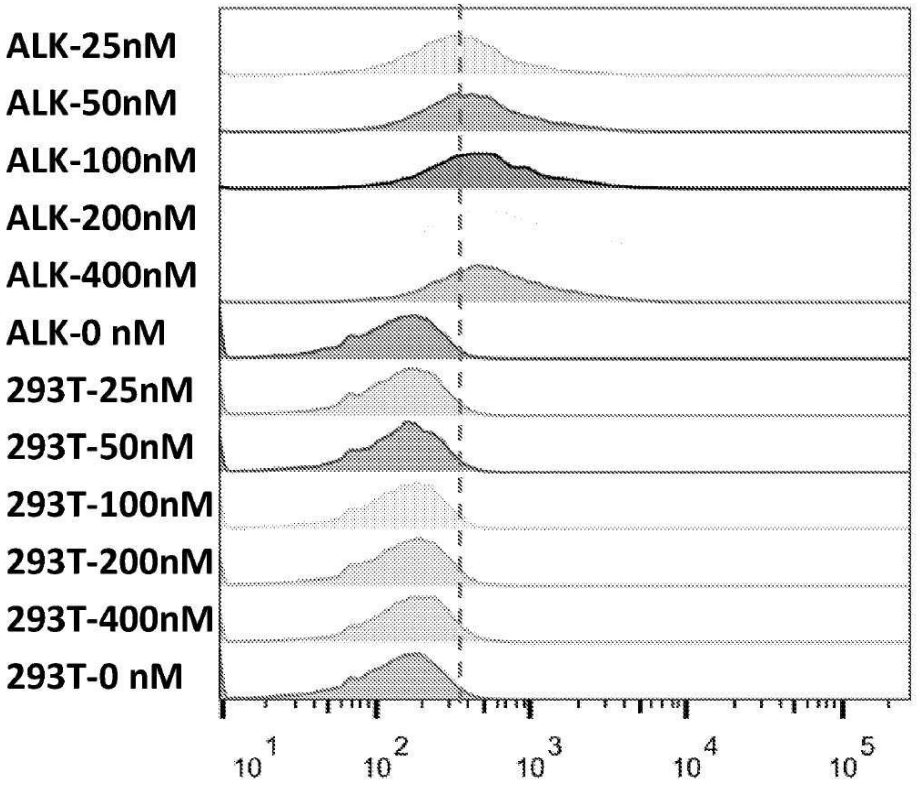


도 5b

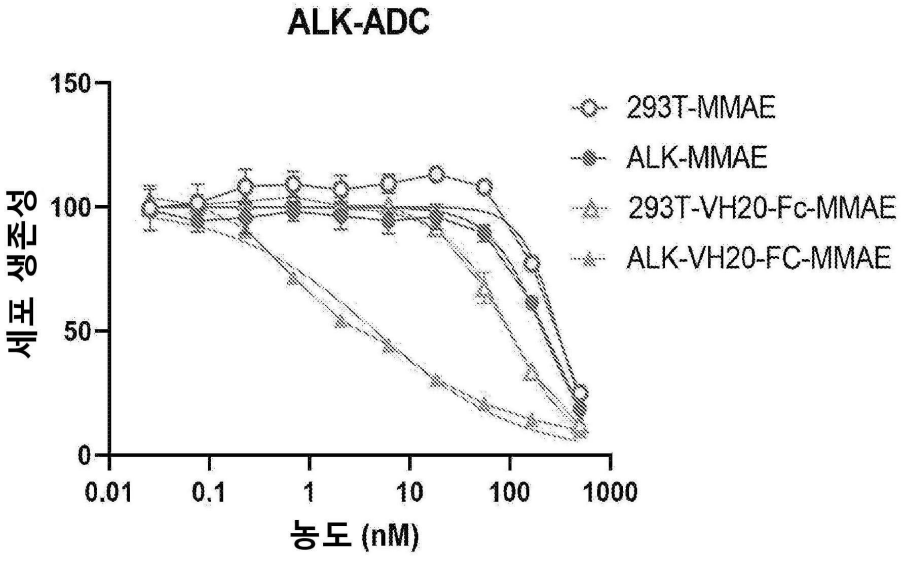
도면5c


60
40
20
0
사멸의 %
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
100
농도 (nM)
293T
293T-ALK
200
150
100
50
0
-50
사멸의 %
0.01
0.1
1
10
100
농도 (nM)
SY5Y-VH20
SY5Y-Iso
IMR-VH20
IMR-Iso
SK-N-AS-VH20
SK-N-AS-Iso

도면6a


ALK-25nM
ALK-50nM
ALK-100nM
ALK-200nM
ALK-400nM
ALK-0 nM
293T-25nM
293T-50nM
293T-100nM
293T-200nM
293T-400nM
293T-0 nM
10^1
10^2
10^3
10^4
10^5

도면6b


ALK-ADC
293T-MMAE
ALK-MMAE
293T-VH20-Fc-MMAE
ALK-VH20-FC-MMAE
세포 생존율
150
100
50
0
0.01
0.1
1
10
100
1000
농도 (nM)

서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.