(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0155419
(43) 공개일자 2023년11월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 39/00 (2006.01) *A61P 31/04* (2006.01)
A61P 31/12 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
A61P 37/04 (2006.01) *C07K 16/30* (2006.01)
G01N 33/574 (2006.01) *G01N 33/92* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 39/001171 (2023.05)
A61P 31/04 (2018.01)
(21) 출원번호 10-2023-7014431
(22) 출원일자(국제) 2021년10월05일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2023년04월27일
(86) 국제출원번호 PCT/US2021/053503
(87) 국제공개번호 WO 2022/076364
국제공개일자 2022년04월14일
(30) 우선권주장
63/087,427 2020년10월05일 미국(US)

(71) 출원인
에이오에이 디엑스
미국 콜로라도 80302 볼더 캐니언 비엘브이디 1495 익스팬시브 볼더 오피스 #105
(72) 발명자
사라고비, 호라시오 유리
캐나다 큐씨 에이치4에이3엘8 몬트리올 말로우 애비뉴 3421
(74) 대리인
특허법인 광장리앤고

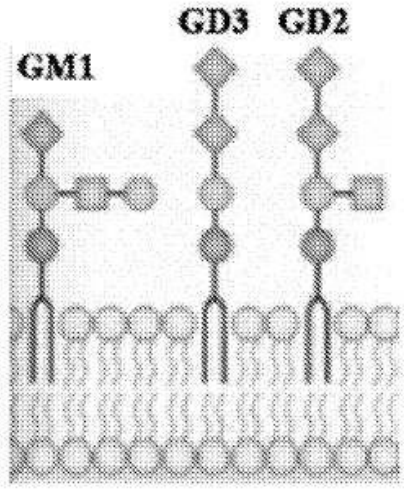
전체 청구항 수 : 총 110 항

(54) 발명의 명칭 **암 진단을 위한 조성물 및 방법**

(57) 요 약

본원은 강글리오시드(예를 들어, GD2 또는 GD3)에 특이적으로 결합하는 단클론성 항체 및 이의 항원 결합 단편뿐만 아니라 이를 포함하는 조성물 및 진단 및 예측 목적을 위해 이를 사용하는 방법을 제공한다. 또한, 본원은 다양한 강글리오시드 및 이들의 지질 길이를 검출하기 위한 질량 분석-기반 방법을 제공하며, 이들의 변화는 본원에 기재된 암 진단 및 예측 방법에 유용하다. 본원은 강글리오시드의 변형 버전을 포함하는 화합물을 추가로 제공한다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61P 31/12 (2018.01)
A61P 35/00 (2018.01)
A61P 37/04 (2018.01)
C07K 16/3084 (2013.01)
G01N 33/57492 (2013.01)
G01N 33/92 (2013.01)
C07K 2317/56 (2013.01)
C07K 2317/565 (2013.01)
G01N 2405/10 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

하기 구조를 갖는 강글리오시드를 포함하는 조성물:

(A)x-[(P)y-(L)z]-(M)b;

상기 구조에서,

A는 강글리오시드, 또는 이의 임의의 부분이고; x는 1 내지 32의 정수이고; P는 헤테로아릴이고; y는 1이고; L은 링커이고; z는 0 내지 8의 정수이고; M은 코어이고; b는 0 또는 1이고;

P는 (1) 수소; (2) C_{1-7} 아실; (3) C_{1-20} 알킬; (4) 아미노; (5) C_{3-10} 아릴; (6) 하이드록시; (7) 니트로; (8) C_{1-20} 알킬-아미노; 및 (9) $-(CH_2)_qCONR^B$로부터 독립적으로 선택되는 1, 2, 3, 4 또는 5개의 치환기로 선택적으로 치환되고, 여기서 q는 0 내지 4의 정수이고, R^B는 (a) 수소, (b) C_{1-6} 알킬, (c) C_{3-10} 아릴 및 (d) C_{1-6} 알크-C_{6-10} 아릴로 이루어진 군으로부터 선택된다.

청구항 2

제1항에 있어서,

헤테로아릴이 트리아진 또는 트리아졸인, 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서,

a) 트리아진이 1, 3, 5 트리아진이거나;

b) 트리아졸이 1, 2, 3 트리아졸 또는 1, 2, 4 트리아졸인, 조성물.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

P는 (1) 수소; (2) C_{1-20} 알킬-아미노; 및 (3) $-(CH_2)_qCONR^B$로부터 독립적으로 선택되는 1, 2, 3, 4 또는 5개의 치환기로 치환되고, 여기서 q는 0 내지 4의 정수이고, R^B는 (a) 수소, (b) C_{1-6} 알킬, (c) C_{3-10} 아릴 및 (d) C_{1-6} 알크-C_{6-10} 아릴로 이루어진 군으로부터 선택되는, 조성물.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서,

M이 (1) 아민 또는 (2) 폴리아미도아민(PAMAM)인, 조성물.

청구항 6

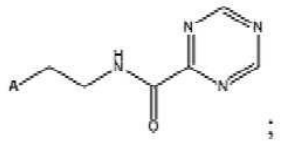
제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서,

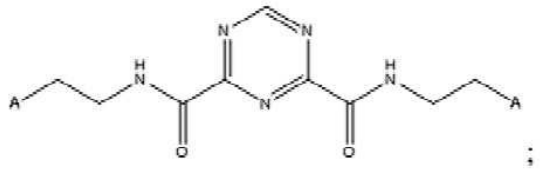
x가 1, 2, 3, 4, 6 또는 8인, 조성물.

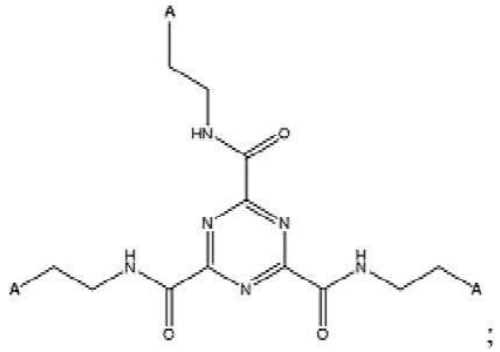
청구항 7

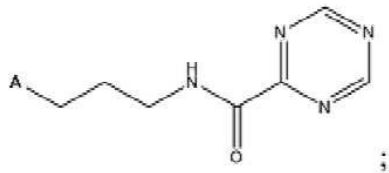
제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서,

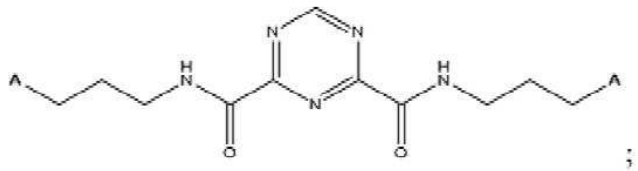
구조가

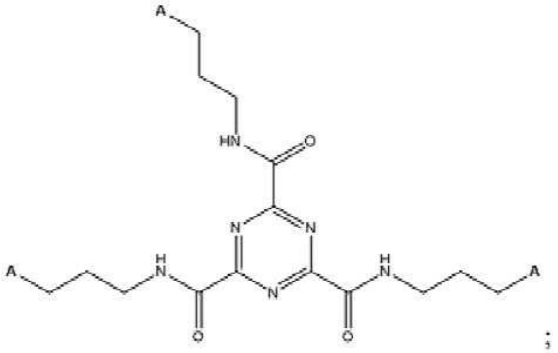

;


;

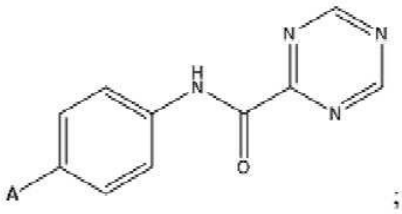

;


;

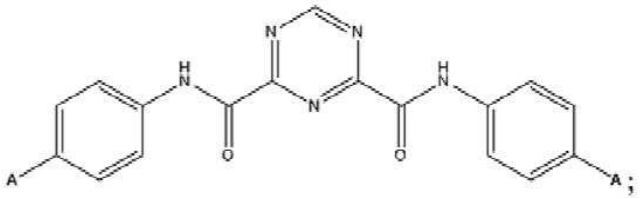

;



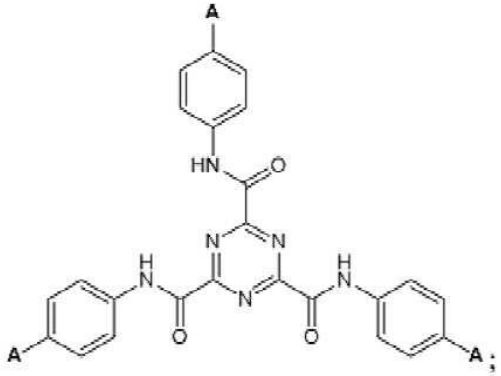
;



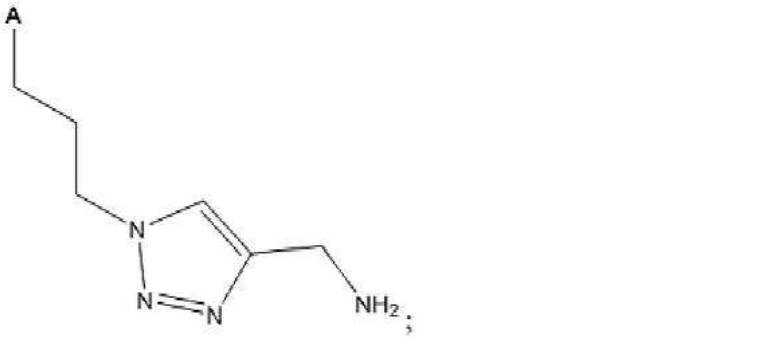
;

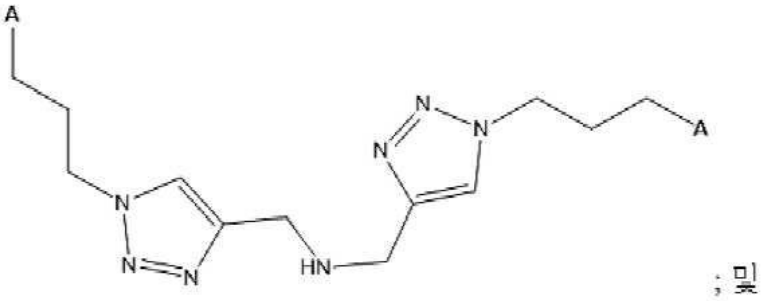


;

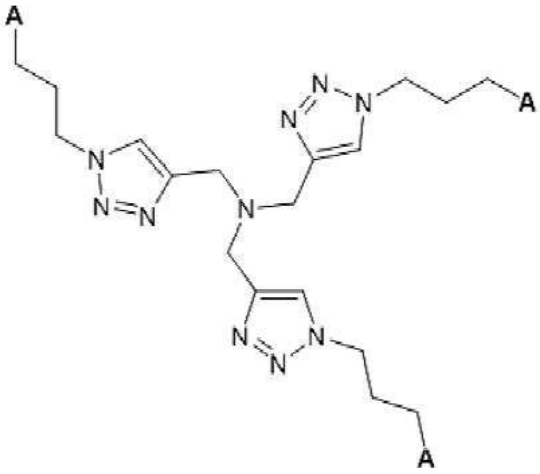


;





;



로부터 선택되고, 여기서 A가 강글리오시드인, 조성물.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서,

강글리오시드가 GD2, GD3, GD1b, GT1b, 푸코실-GM1, GloboH, 폴리시알산(PSA), GM2, GM3, 시알릴-루이스(sialyl-Lewis)^{X}, 시알릴-루이스^{Y}, 시알릴-루이스^{A}, 시알릴-루이스^{B} 및 루이스^{Y}로부터 선택되고, 선택적으로 강글리오시드가 GD2, GD3, GT1b 및 GM2인, 조성물.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서,

강글리오시드가 검출가능하게 표지되고, 선택적으로 강글리오시드가 효소, 보결 분자단(prosthetic group)(예를 들어, 스트렙타비딘/비오틴), 형광단, 발광성 태그, 생발광성 태그 및/또는 방사성동위원소로 표지되는, 조성물.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서,

약학 조성물인, 조성물.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항의 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 대상체에서 강글리오시드에 대한 면역 반응을 유도하는 방법.

청구항 12

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항의 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 치료를 필요로 하는 대상체를 치료하는 방법.

청구항 13

제11항 또는 제12항에 있어서,

대상체가 암을 앓거나, 감염(예를 들어, 바이러스 또는 박테리아 감염)된 것인, 방법.

청구항 14

(a) 선택적으로 아쥬반트(adjuvant)를 추가로 포함하는, 제1항 내지 제10항 중 어느 한 항의 조성물로 포유동물을 면역화시키는 단계; 및

(b) 포유동물 유래의 강글리오시드, 포유동물 유래의 세포, 또는 포유동물 유래의 세포를 사용하여 제조된 하이브리도마에 결합하는 항체를 단리하는 단계

를 포함하는, 포유동물에서 항체를 제조하는 방법.

청구항 15

제14항에 있어서,

포유동물이 토끼, 마우스, 염소, 낙타, 개, 양 또는 래트로부터 선택되는 것인, 방법.

청구항 16

강글리오시드의 탄수화물 부분에 특이적으로 결합하는, 단클론성 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 17

제16항에 있어서,

강글리오시드는 (a) GD2, (b) GD3 또는 (c) GD2 및 GD3인, 단클론성 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 18

제16항 또는 제17항에 있어서,

a) 표 1에 기재된 바와 같은 중쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3의 조합, 또는 단지 1개 또는 2개의 아미노산이 상이하거나, 적어도 또는 약 85%의 서열 동일성을 갖는 이의 변이체 서열; 및/또는

b) 표 1에 기재된 바와 같은 경쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3의 조합, 또는 단지 1개 또는 2개의 아미노산이 상이하거나, 적어도 또는 약 85%의 서열 동일성을 갖는 이의 변이체 서열

을 포함하는, 단클론성 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 19

제16항 또는 제17항에 있어서,

a) 표 2에 기재된 바와 같은 VH 서열, 또는 단지 1개 또는 2개의 아미노산이 상이하거나, 적어도 또는 약 85%의 서열 동일성을 갖는 이의 변이체 서열; 및/또는

b) 표 2에 기재된 바와 같은 VL 서열, 또는 단지 1개 또는 2개의 아미노산이 상이하거나, 적어도 또는 약 85%의

서열 동일성을 갖는 이의 변이체 서열

을 포함하는, 단클론성 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 20

제16항 또는 제17항에 있어서,

a) 서열번호: 2, 4, 6, 8, 10 및 12(클론 4), 또는 단지 1개 또는 2개의 아미노산이 상이하거나, 적어도 또는 약 85%의 서열 동일성을 갖는 이의 변이체 서열;

b) 서열번호: 14, 16, 18, 20, 22 및 24(클론 6), 또는 단지 1개 또는 2개의 아미노산이 상이하거나, 적어도 또는 약 85%의 서열 동일성을 갖는 이의 변이체 서열;

c) 서열번호: 26, 28, 30, 32, 34 및 36(클론 7), 또는 단지 1개 또는 2개의 아미노산이 상이하거나, 적어도 또는 약 85%의 서열 동일성을 갖는 이의 변이체 서열;

d) 서열번호: 38, 40, 42, 44, 46 및 48(클론 8), 또는 단지 1개 또는 2개의 아미노산이 상이하거나, 적어도 또는 약 85%의 서열 동일성을 갖는 이의 변이체 서열;

e) 서열번호: 50, 52, 54, 56, 58 및 60(클론 9), 또는 단지 1개 또는 2개의 아미노산이 상이하거나, 적어도 또는 약 85%의 서열 동일성을 갖는 이의 변이체 서열;

f) 서열번호: 62, 64, 66, 68, 70 및 72(클론 10), 또는 단지 1개 또는 2개의 아미노산이 상이하거나, 적어도 또는 약 85%의 서열 동일성을 갖는 이의 변이체 서열;

g) 서열번호: 74, 76, 78, 80, 82 및 84(클론 13), 또는 단지 1개 또는 2개의 아미노산이 상이하거나, 적어도 또는 약 85%의 서열 동일성을 갖는 이의 변이체 서열;

h) 서열번호: 86, 88, 90, 92, 94 및 96(클론 14), 또는 단지 1개 또는 2개의 아미노산이 상이하거나, 적어도 또는 약 85%의 서열 동일성을 갖는 이의 변이체 서열;

i) 서열번호: 98, 100, 102, 104, 106 및 108(클론 15), 또는 단지 1개 또는 2개의 아미노산이 상이하거나, 적어도 또는 약 85%의 서열 동일성을 갖는 이의 변이체 서열;

j) 서열번호: 110, 112, 114, 116, 118 및 120(클론 17), 또는 단지 1개 또는 2개의 아미노산이 상이하거나, 적어도 또는 약 85%의 서열 동일성을 갖는 이의 변이체 서열;

k) 서열번호: 122, 124, 126, 128, 130 및 132(클론 18), 또는 단지 1개 또는 2개의 아미노산이 상이하거나, 적어도 또는 약 85%의 서열 동일성을 갖는 이의 변이체 서열; 및

l) 서열번호: 134, 136, 138, 140, 142 및 144(클론 19), 또는 단지 1개 또는 2개의 아미노산이 상이하거나, 적어도 또는 약 85%의 서열 동일성을 갖는 이의 변이체 서열

로부터 선택되는 6개의 CDR 아미노산 서열을 포함하는, 단클론성 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 21

제16항 또는 제17항에 있어서,

a) 서열번호: 146 및 148 또는 단지 1개 또는 2개의 아미노산이 상이하거나, 적어도 또는 약 85%의 서열 동일성을 갖는 이의 변이체 서열;

b) 서열번호: 150 및 152 또는 단지 1개 또는 2개의 아미노산이 상이하거나, 적어도 또는 약 85%의 서열 동일성을 갖는 이의 변이체 서열;

c) 서열번호: 154 및 156 또는 단지 1개 또는 2개의 아미노산이 상이하거나, 적어도 또는 약 85%의 서열 동일성을 갖는 이의 변이체 서열;

d) 서열번호: 158 및 160 또는 단지 1개 또는 2개의 아미노산이 상이하거나, 적어도 또는 약 85%의 서열 동일성을 갖는 이의 변이체 서열;

e) 서열번호: 162 및 164 또는 단지 1개 또는 2개의 아미노산이 상이하거나, 적어도 또는 약 85%의 서열 동일성

을 갖는 이의 변이체 서열;

f) 서열번호: 166 및 168 또는 단지 1개 또는 2개의 아미노산이 상이하거나, 적어도 또는 약 85%의 서열 동일성을 갖는 이의 변이체 서열;

g) 서열번호: 170 및 172 또는 단지 1개 또는 2개의 아미노산이 상이하거나, 적어도 또는 약 85%의 서열 동일성을 갖는 이의 변이체 서열;

h) 서열번호: 174 및 176 또는 단지 1개 또는 2개의 아미노산이 상이하거나, 적어도 또는 약 85%의 서열 동일성을 갖는 이의 변이체 서열;

i) 서열번호: 178 및 180 또는 단지 1개 또는 2개의 아미노산이 상이하거나, 적어도 또는 약 85%의 서열 동일성을 갖는 이의 변이체 서열;

j) 서열번호: 182 및 184 또는 단지 1개 또는 2개의 아미노산이 상이하거나, 적어도 또는 약 85%의 서열 동일성을 갖는 이의 변이체 서열;

k) 서열번호: 186 및 188 또는 단지 1개 또는 2개의 아미노산이 상이하거나, 적어도 또는 약 85%의 서열 동일성을 갖는 이의 변이체 서열; 및

l) 서열번호: 190 및 192 또는 단지 1개 또는 2개의 아미노산이 상이하거나, 적어도 또는 약 85%의 서열 동일성을 갖는 이의 변이체 서열

로부터 선택되는 VH 및 VL 아미노산 서열을 포함하는, 단클론성 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 22

제16항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서,

a) 단클론성 항체 또는 이의 항원 결합 단편이 키메라, 인간화, 복합, 뮤린 또는 인간이고/이거나;

b) 단클론성 항체 또는 이의 항원 결합 단편이 IgG, IgG1, IgG2, IgG2A, IgG2B, IgG3, IgG4, IgA, IgM, IgD 및 IgE 불변 도메인으로 이루어진 군으로부터 선택되는 면역글로불린 중쇄 불변 도메인을 포함하는, 단클론성 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 23

제16항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서,

단클론성 항체 또는 이의 항원 결합 단편이 검출가능하게 표지되거나 접합(conjugated)되고/되거나, 이펙터 도메인을 포함하고/하거나, Fc 도메인을 포함하고/하거나, Fv, F(ab')2, Fab', dsFv, scFv, sc(Fv)2 및 디아바디 단편으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 단클론성 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 24

표 2에 나열된 면역글로불린 중쇄 및 경쇄 서열로부터 선택되는 면역글로불린 중쇄 및/또는 경쇄.

청구항 25

a) 표 1 및/또는 표 2에 나열된 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드;

b) 표 1 및/또는 표 2에 나열된 아미노산 서열에 대해 적어도 또는 약 85% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드; 및/또는

c) 제16항 내지 제23항 중 어느 한 항의 단클론성 항체 또는 이의 항원 결합 단편

을 인코딩하는, 단리된 핵산 분자.

청구항 26

제25항의 단리된 핵산을 포함하는, 벡터.

청구항 27

(a) 제25항의 단리된 핵산을 포함하고/하거나, (b) 제26항의 벡터를 포함하고/하거나, (c) 제16항 내지 제23항 중 어느 한 항의 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 발현하는, 숙주 세포.

청구항 28

(i) 제16항 내지 제23항 중 어느 한 항에 따른 적어도 하나의 단클론성 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 인코딩하는 서열을 포함하는 핵산을 포함하는 숙주 세포를, 상기 단클론성 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 발현을 가능하게 하기에 적합한 조건 하에 배양하는 단계; 및

(ii) 발현된 단클론성 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 회수하는 단계

를 포함하는, 제16항 내지 제23항 중 어느 한 항에 따른 적어도 하나의 단클론성 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제조하는 방법.

청구항 29

제16항 내지 제23항 중 어느 한 항에 따른 단클론성 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 적어도 하나 포함하는 장치 또는 키트.

청구항 30

제29항에 있어서,

(a) 적어도 하나의 단클론성 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 검출하기 위한 표지;

(b) 1차 항체의 검출을 위한 2차 항체; 및/또는

(c) 선택적으로 강글리오시드인, 적어도 하나의 기준 항원

을 추가로 포함하는, 장치 또는 키트.

청구항 31

제30항에 있어서,

기준 항원이 GD2, GD3 및 GD2 또는 GD3의 변형 버전으로부터 선택되는, 장치 또는 키트.

청구항 32

제30항 또는 제31항에 있어서,

기준 항원이 제1항 내지 제9항 중 어느 한 항의 강글리오시드; 티오페닐 GD2, 티오페닐 GD3, GD2-O-아릴-NH_2, GD3-O-아릴-NH_2, p-아미노 페닐 에테르 GD2(AP-GD2), p-아미노 페닐 에테르 GD3(AP-GD3), 트리아진 GD2(예를 들어, 1, 3, 5-트리아진-GD2, 예를 들어, 2-아미노-4,6-디클로로-1,3,5-트리아진-GD2), 트리아진 GD3(예를 들어, 1, 3, 5-트리아진-GD3, 예를 들어, 2-아미노-4,6-디클로로-1,3,5-트리아진-GD3), 다량체 GD2(예를 들어, PAMAM-GD2) 및 다량체 GD3(PAMAM-GD3)으로부터 선택되는, 장치 또는 키트.

청구항 33

(a) 샘플을 수득하는 단계;

(b) (i) 약 1:2:1, (ii) 약 4:8:3 또는 (iii) 약 2:4:1로부터 선택되는 비율로 $CHCl_3$:메탄올:물을 포함하는 약 2 내지 5배 부피의 유기 용매를 샘플에 첨가하는 단계;

(c) (b)의 조합된 혼합물을 진탕하는 단계; 및

(d) 유기 용매로부터 샘플을 분리함으로써, 샘플로부터 지질을 추출하는 단계

를 포함하는, 샘플로부터 지질을 추출하는 방법.

청구항 34

(a) 샘플을 수득하는 단계;

(b) (i) 약 1:2:1, (ii) 약 4:8:3 또는 (iii) 약 2:4:1로부터 선택되는 비율로 $CHCl_3$:메탄올:물을 포함하는 약 2 내지 5배 부피의 유기 용매를 샘플에 첨가하는 단계;

(c) (b)의 조합된 혼합물을 진탕하는 단계; 및

(d) 유기 용매로부터 샘플을 분리함으로써, 샘플로부터 지질을 추출하는 단계

를 포함하는, 샘플로부터 강글리오시드를 정제하는 방법.

청구항 35

제33항 또는 제34항에 있어서,

(i) 유기 용매로 추출하기 전에 샘플이 원심분리에 의해 정화되고/되거나;

(ii) 샘플이 포유동물, 선택적으로 인간으로부터 유래하고/하거나;

(iii) 샘플이 원심분리에 의해 유기 용매로부터 분리되고/되거나;

(iv) 샘플이 암을 앓는 대상체 또는 암이 없는 대상체로부터 유래하고/하거나;

(v) 샘플이 세포, 혈청, 혈액, 종양 부근 조직 및/또는 종양내 조직을 포함하고/하거나;

(vi) (b)-(d) 단계를 적어도 1, 2, 3, 4 또는 5회 반복하는 단계를 추가로 포함하고/하거나;

(vii) 선택적으로 진공(예를 들어, 고속 진공) 하에서 용액을 원심분리함으로써, (d)의 추출된 샘플로부터 잔류 유기 용매를 증발시키는 단계를 추가로 포함하는,

방법.

청구항 36

적어도 하나의 강글리오시드(예를 들어, GD2 및/또는 GD3)의 존재 또는 수준을 검출하는 방법으로서,

상기 방법이 제16항 내지 제23항 중 어느 한 항에 따른 적어도 하나의 단클론성 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 사용하여 샘플에서 상기 강글리오시드를 검출하는 단계를 포함하고,

선택적으로 샘플이 암을 앓는 대상체 또는 암이 없는 대상체로부터 유래한 것인, 방법.

청구항 37

제36항에 있어서,

적어도 하나의 단클론성 항체 또는 이의 항원 결합 단편이 강글리오시드(예를 들어, GD2 또는 GD3)와 복합체를 형성하고, 복합체가 효소 결합 면역흡착 검정(ELISA), 방사성면역 검정(RIA), 면역화학적으로(예를 들어, 면역조직화학) 또는 유세포 분석에서 검출되는 것인, 방법.

청구항 38

제37항에 있어서,

복합체가 효소 결합 면역흡착 검정(ELISA)에서 검출되는 것인, 방법.

청구항 39

제37항 또는 제38항에 있어서,

복합체가 샌드위치 ELISA에서 검출되는 것인, 방법.

청구항 40

제39항에 있어서,

복합체가 제16항 내지 제23항 중 어느 한 항의, 임의의 2개의 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 사용하여 샌드위치 ELISA에서 검출되는 것인, 방법.

청구항 41

제37항 또는 제38항에 있어서,

복합체가 경쟁 ELISA에서 검출되는 것인, 방법.

청구항 42

제41항에 있어서,

경쟁 ELISA가 GD2, GD3 또는 GD2 또는 GD3의 변형 버전으로부터 선택되는 기준 항원을 포함하는 것인, 방법.

청구항 43

제42항에 있어서,

기준 항원이 제1항 내지 제9항 중 어느 한 항의 강글리오시드, 티오페닐 GD2, 티오페닐 GD3, GD2-O-아릴-NH_2, GD3-O-아릴-NH_2, p-아미노 페닐 에테르 GD2(AP-GD2), p-아미노 페닐 에테르 GD3(AP-GD3), 트리아진 GD2(예를 들어, 1, 3, 5-트리아진-GD2, 예를 들어, 2-아미노-4,6-디클로로-1,3,5-트리아진-GD2), 트리아진 GD3(예를 들어, 1, 3, 5-트리아진-GD3, 예를 들어, 2-아미노-4,6-디클로로-1,3,5-트리아진-GD3), 다량체 GD2(예를 들어, PAMAM-GD2) 및 다량체 GD3(PAMAM-GD3)로부터 선택되는 것인, 방법.

청구항 44

제37항에 있어서,

복합체가 면역조직화학(IHC)에서 검출되는 것인, 방법.

청구항 45

적어도 하나의 강글리오시드의 존재, 수준 또는 지질 길이를 검출하는 방법으로서,

상기 방법이 질량 분석법(예를 들어, LC/MS 또는 LC/MS/MS)를 사용하여 샘플에서 상기 강글리오시드를 검출하는 단계를 포함하고,

선택적으로 샘플이 암을 앓는 대상체 또는 암이 없는 대상체로부터 유래한 것인, 방법.

청구항 46

제36항 내지 제45항 중 어느 한 항에 있어서,

샘플이 제33항 내지 제35항 중 어느 한 항의 방법에 따라 제조되는 것인, 방법.

청구항 47

대상체에서 암을 진단하는 방법으로서,

상기 방법이

a) 적어도 하나의 단클론성 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 사용하여 대상체 샘플에서 적어도 하나의 강글리오시드의 수준을 결정하는 단계로서, 선택적으로 적어도 하나의 단클론성 항체 또는 이의 항원 결합 단편이 제16항 내지 제23항 중 어느 한 항에 따른 것인, 단계; 및

b) 상기 적어도 하나의 강글리오시드의 수준을 대조군 샘플의 것과 비교하는 단계

를 포함하고,

대조군 샘플에서의 수준과 비교하여 대상체 샘플에서 적어도 하나의 강글리오시드의 유의미하게 더 높은 수준은 대상체가 암을 갖는 것을 나타내는 것인, 방법.

청구항 48

암을 갖는 대상체를 식별하는 방법으로서,

상기 방법이

a) 적어도 하나의 단클론성 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 사용하여 대상체 샘플에서 적어도 하나의 강글리오시드의 수준을 결정하는 단계로서, 선택적으로 적어도 하나의 단클론성 항체 또는 이의 항원 결합 단편이 제16항 내지 제23항 중 어느 한 항에 따른 것인, 단계; 및

b) 상기 적어도 하나의 강글리오시드의 수준을 대조군 샘플의 것과 비교하는 단계

를 포함하고,

대조군 샘플에서의 수준과 비교하여 대상체 샘플에서 적어도 하나의 강글리오시드의 유의미하게 더 높은 수준은 대상체를 암을 갖는 것으로 식별하는 것인, 방법.

청구항 49

암의 등급을 결정하는 방법으로서,

상기 방법이

a) 적어도 하나의 단클론성 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 사용하여 대상체 샘플에서 적어도 하나의 강글리오시드의 수준을 결정하는 단계로서, 선택적으로 적어도 하나의 단클론성 항체 또는 이의 항원 결합 단편이 제16항 내지 제23항 중 어느 한 항에 따른 것인, 단계; 및

b) 상기 적어도 하나의 강글리오시드의 수준을 대조군 샘플의 것과 비교하는 단계

를 포함하고,

대조군 샘플에서의 수준과 비교하여 대상체 샘플에서 적어도 하나의 강글리오시드의 수준의 적어도 100% 및 200% 이하의 증가는 대상체가 낮은 등급의 암을 갖는 것을 나타내고/내거나;

대조군 샘플에서의 수준과 비교하여 대상체 샘플에서 적어도 하나의 강글리오시드의 수준의 적어도 200%의 증가는 대상체가 높은 등급의 암을 갖는 것을 나타내는 것인, 방법.

청구항 50

암의 종양 부담을 결정하는 방법으로서,

상기 방법이

a) 적어도 하나의 단클론성 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 사용하여 대상체 샘플에서 적어도 하나의 강글리오시드의 수준을 결정하는 단계로서, 선택적으로 적어도 하나의 단클론성 항체 또는 이의 항원 결합 단편이 제16항 내지 제23항 중 어느 한 항에 따른 것인, 단계; 및

b) 상기 적어도 하나의 강글리오시드의 수준을 대조군 샘플의 것과 비교하는 단계

를 포함하고,

대조군 샘플에서의 수준과 비교하여 대상체 샘플에서 적어도 하나의 강글리오시드의 수준의 적어도 100% 및 200% 이하의 증가는 대상체가 낮은 종양 부담을 갖는 것을 나타내고/내거나;

대조군 샘플에서의 수준과 비교하여 대상체 샘플에서 적어도 하나의 강글리오시드의 수준의 적어도 200%의 증가는 대상체가 높은 종양 부담을 갖는 것을 나타내는 것인, 방법.

청구항 51

대상체에서 암의 재발을 검출하는 방법으로서,

상기 방법이

a) 암 치료를 받은 후 암이 퇴행했던 대상체로부터 샘플을 수득하거나 준비하는 단계;

b) 적어도 하나의 단클론성 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 사용하여 대상체 샘플에서 적어도 하나의 강글리오시드의 수준을 결정하는 단계로서, 선택적으로 적어도 하나의 단클론성 항체 또는 이의 항원 결합 단편이 제16항 내지 제23항 중 어느 한 항에 따른 것인, 단계; 및

c) 상기 적어도 하나의 강글리오시드의 수준을 대조군 샘플의 것과 비교하는 단계

를 포함하고,

대조군 샘플에서의 수준과 비교하여 대상체 샘플에서 적어도 하나의 강글리오시드의 유의미하게 더 높은 수준은 대상체에서 암의 재발을 나타내는 것인, 방법.

청구항 52

대상체에서 최소 잔존 질병(minimal residual disease)을 검출하는 방법으로서,

상기 방법이

a) 관해 중인 대상체로부터 샘플을 수득하거나 준비하는 단계;

b) 적어도 하나의 단클론성 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 사용하여 대상체 샘플에서 적어도 하나의 강글리오시드의 수준을 결정하는 단계로서, 선택적으로 적어도 하나의 단클론성 항체 또는 이의 항원 결합 단편이 제16항 내지 제23항 중 어느 한 항에 따른 것인, 단계; 및

c) 상기 적어도 하나의 강글리오시드의 수준을 대조군 샘플의 것과 비교하는 단계

를 포함하고,

대조군 샘플에서의 수준과 비교하여 대상체 샘플에서 적어도 하나의 강글리오시드의 유의미하게 더 높은 수준은 대상체가 최소 잔존 질병을 갖는 것을 나타내는 것인, 방법.

청구항 53

암 치료로부터의 이익에 따라 암을 앓고 있는 대상체를 계층화하는 방법으로서,

상기 방법이

a) 적어도 하나의 단클론성 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 사용하여 대상체 샘플에서 적어도 하나의 강글리오시드의 수준을 결정하는 단계로서, 선택적으로 적어도 하나의 단클론성 항체 또는 이의 항원 결합 단편이 제16항 내지 제23항 중 어느 한 항에 따른 것인, 단계;

b) 대조군에서 적어도 하나의 강글리오시드의 수준을 결정하는 단계; 및

c) 단계 a) 및 b)에서 검출된 적어도 하나의 강글리오시드의 수준을 비교하는 단계

를 포함하고,

대조군에서의 수준과 비교하여 대상체 샘플에서 적어도 하나의 강글리오시드 수준의 감소 또는 유의미한 변화가 없다는 것은 암을 앓고 있는 대상체가 암 치료로부터 이익을 얻을 것이라는 징후인 것인, 방법.

청구항 54

암을 앓고 있는 대상체가 암 치료에 반응 할 가능성이 있을지 여부를 결정하는 방법으로서,

상기 방법이

a) 적어도 하나의 단클론성 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 사용하여 대상체 샘플에서 적어도 하나의 강글리오시드의 수준을 결정하는 단계로서, 선택적으로 적어도 하나의 단클론성 항체 또는 이의 항원 결합 단편이 제16항 내지 제23항 중 어느 한 항에 따른 것인, 단계;

b) 대조군에서 적어도 하나의 강글리오시드의 수준을 결정하는 단계; 및

c) 단계 a) 및 b)에서 검출된 적어도 하나의 강글리오시드의 수준을 비교하는 단계

를 포함하고,

대조군에서의 수준과 비교하여 대상체 샘플에서 적어도 하나의 강글리오시드의 유의미하게 더 높은 수준은 암을 앓고 있는 대상체가 암 치료에 반응하지 않을 것이라는 징후이고/이거나;

대조군에서의 수준과 비교하여 대상체 샘플에서 적어도 하나의 강글리오시드의 수준의 감소 또는 유의미한 변화

가 없다는 것은 암을 앓고 있는 대상체가 암 치료에 반응 할 것이라는 징후인 것인, 방법.

청구항 55

암을 앓고 있는 대상체의 임상 결과를 예측하는 방법으로서,

상기 방법이

a) 적어도 하나의 단클론성 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 사용하여 대상체 샘플에서 적어도 하나의 강글리오시드의 수준을 결정하는 단계로서, 선택적으로 적어도 하나의 단클론성 항체 또는 이의 항원 결합 단편이 제16항 내지 제23항 중 어느 한 항에 따른 것인, 단계;

b) 대조군에서 적어도 하나의 강글리오시드의 수준을 결정하는 단계; 및

c) 단계 a) 및 b)에서 결정된 적어도 하나의 강글리오시드의 수준을 비교하는 단계

를 포함하고,

대조군에서의 수준과 비교하여 대상체 샘플에서 적어도 하나의 강글리오시드의 유의미하게 더 높은 수준은 대상체가 불량한 임상 결과를 갖는 징후인 것인, 방법.

청구항 56

대상체의 암의 진행을 모니터링하는 방법으로서,

상기 방법이

a) 적어도 하나의 단클론성 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 사용하여 적어도 하나의 강글리오시드의 수준을 제1 시점에 대상체의 샘플에서 검출하는 단계로서, 선택적으로 적어도 하나의 단클론성 항체 또는 이의 항원 결합 단편이 제16항 내지 제23항 중 어느 한 항에 따른 것인, 단계;

b) 후속 시점에서 단계 a)를 반복하는 단계; 및

c) 단계 a) 및 b)에서 검출된 적어도 하나의 강글리오시드의 수준을 비교하여 대상체에서 암의 진행을 모니터링하는 단계로서, 선택적으로 대상체가 암 발병의 위험이 있는, 단계

를 포함하는, 방법.

청구항 57

제56항에 있어서,

제1 시점 및 후속 시점 사이에, 대상체가 암 치료를 받았던 것인, 방법.

청구항 58

대상체에서 암 치료의 효능을 평가하는 방법으로서,

상기 방법이

a) 적어도 하나의 단클론성 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 사용하여 적어도 하나의 강글리오시드의 수준을 대상체로부터 수득된 제1 샘플에서 결정하는 단계로서, 선택적으로 적어도 하나의 단클론성 항체 또는 이의 항원 결합 단편이 제16항 내지 제23항 중 어느 한 항에 따른 것인, 단계;

b) 암 치료의 투여 후 적어도 하나의 후속 시점 동안 단계 a)를 반복하는 단계; 및

c) 단계 a) 및 b)에서 검출된 적어도 하나의 강글리오시드의 수준을 비교하는 단계

를 포함하고,

제1 샘플에 비해 적어도 하나의 후속 샘플에서 적어도 하나의 강글리오시드의 유의미하게 더 낮은 수준은 치료가 대상체에서 암을 치료하는 데 효과적이라는 징후인 것인, 방법.

청구항 59

제56항 내지 제58항 중 어느 한 항에 있어서,

제1 및/또는 적어도 하나의 후속 샘플이 대상체로부터 수득된 합동 샘플(pooled sample) 또는 단일 샘플의 일부인, 방법.

청구항 60

제47항 내지 제59항 중 어느 한 항에 있어서,

적어도 하나의 단클론성 항체 또는 이의 항원 결합 단편이 강글리오시드(예를 들어, GD2 또는 GD3)와 복합체를 형성하고, 복합체가 효소 결합 면역흡착 검정(ELISA), 방사성면역 검정(RIA), 면역화학적으로(예를 들어, 면역조직화학) 또는 유세포 분석에서 검출되는 것인, 방법.

청구항 61

제60항에 있어서,

복합체가 효소 결합 면역흡착 검정(ELISA)에서 검출되는 것인, 방법.

청구항 62

제60항 또는 제61항에 있어서,

복합체가 샌드위치 ELISA에서 검출되는 것인, 방법.

청구항 63

제62항에 있어서,

복합체가 제16항 내지 제23항 중 어느 한 항의, 임의의 2개의 항체를 사용하여 샌드위치 ELISA에서 검출되는 것인, 방법.

청구항 64

제60항 또는 제61항에 있어서,

복합체가 경쟁 ELISA에서 검출되는 것인, 방법.

청구항 65

제64항에 있어서,

경쟁 ELISA가 GD2, GD3 또는 GD2 또는 GD3의 변형 버전으로부터 선택되는 기준 항원을 포함하는 것인, 방법.

청구항 66

제66항 내지 제67항에 있어서,

기준 항원이 제1항 내지 제9항 중 어느 한 항의 강글리오시드, 티오페닐 GD2, 티오페닐 GD3, GD2-O-아릴-NH_2, GD3-O-아릴-NH_2, p-아미노 페닐 에테르 GD2(AP-GD2), p-아미노 페닐 에테르 GD3(AP-GD3), 트리아진 GD2(예를 들어, 1, 3, 5-트리아진-GD2, 예를 들어, 2-아미노-4,6-디클로로-1,3,5-트리아진-GD2), 트리아진 GD3(예를 들어, 1, 3, 5-트리아진-GD3, 예를 들어, 2-아미노-4,6-디클로로-1,3,5-트리아진-GD3), 다량체 GD2(예를 들어, PAMAM-GD2) 및 다량체 GD3(PAMAM-GD3)로부터 선택되는 것인, 방법.

청구항 67

제60항에 있어서,

복합체가 면역조직화학(IHC)에서 검출되는 것인, 방법.

청구항 68

제47항 내지 제66항 중 어느 한 항에 있어서,

샘플이 제33항 내지 제35항 중 어느 한 항의 방법에 따라 제조되는 것인, 방법.

청구항 69

대상체에서 암을 진단하는 방법으로서,

상기 방법이

a) 제45항 또는 제46항에 따른 질량 분석법을 사용하여 대상체 샘플에서 적어도 하나의 강글리오시드의 수준을 결정하는 단계; 및

b) 상기 적어도 하나의 강글리오시드의 수준을 대조군 샘플의 것과 비교하는 단계

를 포함하고,

대조군 샘플과 비교하여 대상체 샘플에서 적어도 하나의 강글리오시드의 유의미하게 더 높은 수준은 대상체가 암을 갖는 것을 나타내는 것인, 방법.

청구항 70

암을 갖는 대상체를 식별하는 방법으로서,

상기 방법이

a) 제45항 또는 제46항에 따른 질량 분석법을 사용하여 대상체 샘플에서 적어도 하나의 강글리오시드의 수준을 결정하는 단계; 및

b) 상기 적어도 하나의 강글리오시드의 수준을 대조군 샘플의 것과 비교하는 단계

를 포함하고,

대조군 샘플과 비교하여 대상체 샘플에서 적어도 하나의 강글리오시드의 유의미하게 더 높은 수준은 대상체를 암을 갖는 것으로 식별하는 것인, 방법.

청구항 71

암의 등급을 결정하는 방법으로서,

상기 방법이

a) 제45항 또는 제46항에 따른 질량 분석법을 사용하여 대상체 샘플에서 적어도 하나의 강글리오시드의 수준을 결정하는 단계; 및

b) 상기 적어도 하나의 강글리오시드의 수준을 대조군 샘플의 것과 비교하는 단계

대조군 샘플에서의 수준과 비교하여 대상체 샘플에서 적어도 하나의 강글리오시드의 수준의 적어도 100% 및 200% 이하의 증가는 대상체가 낮은 등급의 암을 갖는 것을 나타내고/내거나;

대조군 샘플에서의 수준과 비교하여 대상체 샘플에서 적어도 하나의 강글리오시드의 수준의 적어도 200%의 증가는 대상체가 높은 등급의 암을 갖는 것을 나타내는 것인, 방법.

청구항 72

암의 종양 부담을 결정하는 방법으로서,

상기 방법이

a) 제45항 또는 제46항에 따른 질량 분석법을 사용하여 대상체 샘플에서 적어도 하나의 강글리오시드의 수준을 결정하는 단계; 및

b) 상기 적어도 하나의 강글리오시드의 수준을 대조군 샘플의 것과 비교하는 단계

를 포함하고,

대조군 샘플에서의 수준과 비교하여 대상체 샘플에서 적어도 하나의 강글리오시드의 수준의 적어도 100% 및

200% 이하의 증가는 대상체가 낮은 종양 부담을 갖는 것을 나타내고/내거나;

대조군 샘플에서의 수준과 비교하여 대상체 샘플에서 적어도 하나의 강글리오시드의 수준의 적어도 200%의 증가는 대상체가 높은 종양 부담을 갖는 것을 나타내는 것인, 방법.

청구항 73

대상체에서 암의 재발을 검출하는 방법으로서,

상기 방법이

a) 암 치료를 받은 후 암이 퇴행했던 대상체로부터 샘플을 수득하거나 준비하는 단계;

b) 제45항 또는 제46항에 따른 질량 분석법을 사용하여 대상체 샘플에서 적어도 하나의 강글리오시드의 수준을 결정하는 단계; 및

c) 상기 적어도 하나의 강글리오시드의 수준을 대조군 샘플의 것과 비교하는 단계

를 포함하고,

대조군 샘플에서의 수준과 비교하여 대상체 샘플에서 적어도 하나의 강글리오시드의 유의미하게 더 높은 수준은 대상체에서 암의 재발을 나타내는 것인, 방법.

청구항 74

대상체에서 최소 잔존 질병을 검출하는 방법으로서,

상기 방법이

a) 관해 중인 대상체로부터 샘플을 수득하거나 준비하는 단계;

b) 제45항 또는 제46항에 따른 질량 분석법을 사용하여 대상체 샘플에서 적어도 하나의 강글리오시드의 수준을 결정하는 단계; 및

c) 상기 적어도 하나의 강글리오시드의 수준을 대조군 샘플의 것과 비교하는 단계

를 포함하고,

대조군 샘플에서의 수준과 비교하여 대상체 샘플에서 적어도 하나의 강글리오시드의 유의미하게 더 높은 수준은 대상체가 최소 잔존 질병을 갖는 것을 나타내는 것인, 방법.

청구항 75

암 치료로부터의 이익에 따라 암을 앓고 있는 대상체를 계층화하는 방법으로서,

상기 방법이

a) 제45항 또는 제46항에 따른 질량 분석법을 사용하여 대상체 샘플에서 적어도 하나의 강글리오시드의 수준을 결정하는 단계;

b) 대조군에서 적어도 하나의 강글리오시드의 수준을 결정하는 단계; 및

c) 단계 a) 및 b)에서 검출된 적어도 하나의 강글리오시드의 수준을 비교하는 단계

를 포함하고,

대조군에서의 수준과 비교하여 대상체 샘플에서 적어도 하나의 강글리오시드 수준의 감소 또는 유의미한 변화가 없다는 것은 암을 앓고 있는 대상체가 암 치료로부터 이익을 얻을 것이라는 징후인 것인, 방법.

청구항 76

암을 앓고 있는 대상체가 암 치료에 반응 할 가능성이 있을지 여부를 결정하는 방법으로서,

상기 방법이

a) 제45항 또는 제46항에 따른 질량 분석법을 사용하여 대상체 샘플에서 적어도 하나의 강글리오시드의 수준을

결정하는 단계;

b) 대조군에서 적어도 하나의 강글리오시드의 수준을 결정하는 단계; 및

c) 단계 a) 및 b)에서 검출된 적어도 하나의 강글리오시드의 수준을 비교하는 단계

를 포함하고,

대조군에서의 수준과 비교하여 대상체 샘플에서 적어도 하나의 강글리오시드의 유의미하게 더 높은 수준은 암을 앓고 있는 대상체가 암 치료에 반응하지 않을 것이라는 징후이고/이거나;

대조군에서의 수준과 비교하여 대상체 샘플에서 적어도 하나의 강글리오시드 수준의 감소 또는 유의미한 변화가 없다는 것은 암을 앓고 있는 대상체가 암 치료에 반응 할 것이라는 징후인 것인, 방법.

청구항 77

암을 앓고 있는 대상체의 임상 결과를 예측하는 방법으로서,

상기 방법이

a) 제45항 또는 제46항에 따른 질량 분석법을 사용하여 대상체 샘플에서 적어도 하나의 강글리오시드의 수준을 결정하는 단계;

b) 대조군에서 적어도 하나의 강글리오시드의 수준을 결정하는 단계; 및

c) 단계 a) 및 b)에서 검출된 적어도 하나의 강글리오시드의 수준을 비교하는 단계

를 포함하고,

대조군에서의 수준과 비교하여 대상체 샘플에서 적어도 하나의 강글리오시드의 유의미하게 더 높은 수준은 대상체가 불량한 임상 결과를 갖는 징후인 것인, 방법,

청구항 78

대상체에서 암의 진행을 모니터링하는 방법으로서,

상기 방법이

a) 제45항 또는 제46항에 따른 질량 분석법을 사용하여 적어도 하나의 강글리오시드의 수준을 제1 시점에 대상체의 샘플에서 검출하는 단계;

b) 후속 시점에서 단계 a)를 반복하는 단계; 및

c) 단계 a) 및 b)에서 검출된 적어도 하나의 강글리오시드의 수준을 비교하여 대상체에서 암의 진행을 모니터링하는 단계로서, 선택적으로 대상체가 암 발병의 위험이 있는, 단계

를 포함하는, 방법.

청구항 79

제78항에 있어서,

제1 시점 및 후속 시점 사이에, 대상체가 암 치료를 받았던 것인, 방법.

청구항 80

대상체에서 암 치료의 효능을 평가하는 방법으로서,

상기 방법이

a) 제45항 또는 제46항에 따른 질량 분석법을 사용하여 적어도 하나의 강글리오시드의 수준을 대상체로부터 수득된 제1 샘플에서 결정하는 단계;

b) 암 치료의 투여 후 적어도 하나의 후속 시점 동안 단계 a)를 반복하는 단계; 및

c) 단계 a) 및 b)에서 검출된 적어도 하나의 강글리오시드의 수준을 비교하는 단계

를 포함하고,

제1 샘플에 비해 적어도 하나의 후속 샘플에서 적어도 하나의 강글리오시드의 유의미하게 더 낮은 수준은 치료가 대상체에서 암을 치료하는 데 효과적이라는 징후인 것인, 방법.

청구항 81

제78항 내지 제80항 중 어느 한 항에 있어서,

제1 및/또는 적어도 하나의 후속 샘플이 대상체로부터 수득된 합동 샘플 또는 단일 샘플의 일부인, 방법.

청구항 82

대상체에서 암을 진단하는 방법으로서,

상기 방법이

a) 제45항 또는 제46항에 따른 질량 분석법을 사용하여 대상체 샘플에서 적어도 하나의 강글리오시드의 지질 길이를 결정하는 단계; 및

b) 상기 적어도 하나의 강글리오시드의 지질 길이를 대조군 샘플의 것과 비교하는 단계

를 포함하고,

대조군 샘플과 비교하여 대상체 샘플에서 적어도 하나의 강글리오시드의 지질 길이의 이질성(heterogeneity)의 유의미한 변화는 대상체가 암을 갖는 것을 나타내는 것인, 방법.

청구항 83

암을 갖는 대상체를 식별하는 방법으로서,

상기 방법이

a) 제45항 또는 제46항에 따른 질량 분석법을 사용하여 대상체 샘플에서 적어도 하나의 강글리오시드의 지질 길이를 결정하는 단계; 및

b) 상기 적어도 하나의 강글리오시드의 지질 길이를 대조군 샘플의 것과 비교하는 단계

를 포함하고,

대조군 샘플과 비교하여 대상체 샘플에서 적어도 하나의 강글리오시드의 지질 길이의 이질성의 유의미한 변화는 대상체를 암을 갖는 것으로 식별하는 것인, 방법.

청구항 84

암의 등급을 결정하는 방법으로서,

상기 방법이

a) 제45항 또는 제46항에 따른 질량 분석법을 사용하여 대상체 샘플에서 적어도 하나의 강글리오시드의 지질 길이를 결정하는 단계; 및

b) 상기 적어도 하나의 강글리오시드의 지질 길이를 대조군 샘플의 것과 비교하는 단계

를 포함하고,

대조군 샘플에서의 것과 비교하여 대상체 샘플에서 적어도 하나의 강글리오시드의 지질 길이의 이질성의 적어도 100% 및 200% 이하의 변화(예를 들어, 증가 또는 감소)는 대상체가 낮은 등급의 암을 갖는 것을 나타내고/내거나;

대조군 샘플에서의 것과 비교하여 대상체 샘플에서 적어도 하나의 강글리오시드의 지질 길이의 이질성의 적어도 200% 변화(예를 들어, 증가 또는 감소)는 대상체가 높은 등급의 암을 갖는 것을 나타내는 것인, 방법.

청구항 85

암의 종양 부담을 결정하는 방법으로서,

상기 방법이

a) 제45항 또는 제46항에 따른 질량 분석법을 사용하여 대상체 샘플에서 적어도 하나의 강글리오시드의 지질 길이를 결정하는 단계; 및

b) 상기 적어도 하나의 강글리오시드의 지질 길이를 대조군 샘플의 것과 비교하는 단계

를 포함하고,

대조군 샘플에서의 것과 비교하여 대상체 샘플에서 적어도 하나의 강글리오시드의 지질 길이의 이질성의 적어도 100% 및 200% 이하의 변화(예를 들어, 증가 또는 감소)는 대상체가 낮은 종양 부담을 갖는 것을 나타내고/내거나;

대조군 샘플에서의 것과 비교하여 대상체 샘플에서 적어도 하나의 강글리오시드의 지질 길이의 이질성의 적어도 200%의 변화(예를 들어, 증가 또는 감소)는 대상체가 높은 종양 부담을 갖는 것을 나타내는 것인, 방법.

청구항 86

대상체에서 암의 재발을 검출하는 방법으로서,

상기 방법이

a) 암 치료를 받은 후 암이 퇴행했던 대상체로부터 샘플을 수득하거나 준비하는 단계;

b) 제45항 또는 제46항에 따른 질량 분석법을 사용하여 대상체 샘플에서 적어도 하나의 강글리오시드의 지질 길이를 결정하는 단계; 및

c) 상기 적어도 하나의 강글리오시드의 지질 길이를 대조군 샘플의 것과 비교하는 단계

를 포함하고,

대조군 샘플에서의 것과 비교하여 대상체 샘플에서 적어도 하나의 강글리오시드의 지질 길이의 이질성의 유의미한 변화는 대상체에서 암의 재발을 나타내는 것인, 방법.

청구항 87

대상체에서 최소 잔존 질병을 검출하는 방법으로서,

상기 방법이

a) 관해 중인 대상체로부터 샘플을 수득하거나 준비하는 단계;

b) 제45항 또는 제46항에 따른 질량 분석법을 사용하여 대상체 샘플에서 적어도 하나의 강글리오시드의 지질 길이를 결정하는 단계; 및

c) 상기 적어도 하나의 강글리오시드의 지질 길이를 대조군 샘플의 것과 비교하는 단계

를 포함하고,

대조군 샘플에서의 것과 비교하여 대상체 샘플에서 적어도 하나의 강글리오시드의 지질 길이의 이질성의 유의미한 변화는 대상체가 최소 잔존 질병을 갖는 것을 나타내는 것인, 방법.

청구항 88

암 치료(예를 들어, 면역치료)로부터의 이익에 따라 암을 앓고 있는 대상체를 계층화하는 방법으로서,

상기 방법이

a) 제45항 또는 제46항에 따른 질량 분석법을 사용하여 대상체 샘플에서 적어도 하나의 강글리오시드의 지질 길이를 결정하는 단계;

b) 대조군에서 적어도 하나의 강글리오시드의 지질 길이를 결정하는 단계; 및

c) 단계 a) 및 b)에서 검출된 적어도 하나의 강글리오시드의 지질 길이를 비교하는 단계

를 포함하고,

대조군에서의 것과 비교하여 대상체 샘플에서 적어도 하나의 강글리오시드의 지질 길이의 이질성의 유의미한 변화가 없다는 것은 암을 앓고 있는 대상체가 암 치료로부터 이익을 얻을 것이라는 징후인 것인, 방법.

청구항 89

암을 앓고 있는 대상체가 암 치료(예를 들어, 면역치료)에 반응 할 가능성이 있을지 여부를 결정하는 방법으로서,

상기 방법이

a) 제45항 또는 제46항에 따른 질량 분석법을 사용하여 대상체 샘플에서 적어도 하나의 강글리오시드의 지질 길이를 결정하는 단계;

b) 대조군에서 적어도 하나의 강글리오시드의 지질 길이를 결정하는 단계; 및

c) 단계 a) 및 b)에서 검출된 적어도 하나의 강글리오시드의 지질 길이를 비교하는 단계

를 포함하고,

대조군에서의 것과 비교하여 대상체 샘플에서 적어도 하나의 강글리오시드의 지질 길이의 이질성의 유의미한 변화는 암을 앓고 있는 대상체가 암 치료에 반응하지 않을 것이라는 징후이고/이거나;

대조군에서의 것과 비교하여 대상체 샘플에서 적어도 하나의 강글리오시드의 지질 길이의 이질성의 유의미한 변화가 없다는 것은 암을 앓고 있는 대상체가 암 치료에 반응 할 것이라는 징후인 것인, 방법.

청구항 90

암을 앓고 있는 대상체의 임상 결과를 예측하는 방법으로서,

상기 방법이

a) 제45항 또는 제46항에 따른 질량 분석법을 사용하여 대상체 샘플에서 적어도 하나의 강글리오시드의 지질 길이를 결정하는 단계;

b) 대조군에서 적어도 하나의 강글리오시드의 지질 길이를 결정하는 단계; 및

c) 단계 a) 및 b)에서 결정된 적어도 하나의 강글리오시드의 지질 길이를 비교하는 단계

를 포함하고,

대조군 샘플과 비교하여 대상체 샘플에서 적어도 하나의 강글리오시드의 지질 길이의 이질성의 유의미한 변화는 대상체가 불량한 임상 결과를 갖는 징후인 것인, 방법.

청구항 91

대상체의 암의 진행을 모니터링하는 방법으로서,

상기 방법이

a) 제45항 또는 제46항에 따른 질량 분석법을 사용하여 적어도 하나의 강글리오시드의 지질 길이를 제1 시점에 대상체 샘플에서 검출하는 단계;

b) 후속 시점에서 단계 a)를 반복하는 단계; 및

c) 단계 a) 및 b)에서 검출된 적어도 하나의 강글리오시드의 지질 길이의 이질성을 비교하여 대상체에서 암의 진행을 모니터링하는 단계로서, 선택적으로 대상체가 암 발병의 위험이 있는, 단계

를 포함하는, 방법.

청구항 92

제91항에 있어서,

제1 시점 및 후속 시점 사이에, 대상체가 암 치료를 받았던 것인, 방법.

청구항 93

대상체에서 암 치료의 효능을 평가하는 방법으로서,

상기 방법이

a) 제45항 또는 제46항에 따른 질량 분석법을 사용하여 적어도 하나의 강글리오시드의 지질 길이를 대상체로부터 수득된 제1 샘플에서 결정하는 단계; 및

b) 암 치료의 투여 후 적어도 하나의 후속 시점 동안 단계 a)를 반복하는 단계

를 포함하고,

제1 샘플에 비해 제2 샘플에서 적어도 하나의 강글리오시드의 지질 길이의 이질성의 유의미한 변화는 치료가 대상체에서 암을 치료하는 데 효과적이라는 징후인 것인, 방법.

청구항 94

제91항 내지 제93항 중 어느 한 항에 있어서,

제1 및/또는 적어도 하나의 후속 샘플이 대상체로부터 수득된 합동 샘플 또는 단일 샘플의 일부인, 방법.

청구항 95

제53항, 제54항, 제57항, 제58항, 제75항, 제76항, 제79항, 제80항, 제88항, 제89항, 제92항 및 제93항 중 어느 한 항에 있어서,

암 치료가 수술, 화학치료, 암 백신, 키메라 항원 수용체, 방사선 치료, 면역치료, 면역 관문 억제 단백질 또는 리간드의 발현 조절제 또는 이들의 임의의 조합인, 방법.

청구항 96

제95항에 있어서,

면역 치료가 면역 관문 억제 치료인, 방법.

청구항 97

제53항, 제54항, 제57항, 제58항, 제75항, 제76항, 제79항, 제80항, 제88항, 제89항, 제92항, 제93항, 제95항 및 제96항 중 어느 한 항에 있어서,

암 치료가 아벨루맙, 두르발루맙, 아테졸리주맙, BRAF/MEK 억제제, 펨브롤리주맙, 니볼루맙, 이필리무맙 또는 이의 조합인, 방법.

청구항 98

제47항 내지 제97항 중 어느 한 항에 있어서,

강글리오시드가 종양-관련 강글리오시드인, 방법.

청구항 99

제98항에 있어서,

종양-관련 강글리오시드가 GD2, GD3, GD1b, GT1b, 푸코실-GM1, GloboH, 폴리시알산(PSA), GM2, GM3, 시알릴-루이스^{X}, 시알릴-루이스^{Y}, 시알릴-루이스^{A}, 시알릴-루이스^{B}, 루이스^{Y}, 이들의 임의의 일부로부터 선택되고; 선택적으로 종양-관련 강글리오시드가 GD1, GD2, GD3, GT1b 및 GM2로부터 선택되는 것인, 방법.

청구항 100

제13항 및 제35항 내지 제99항 중 어느 한 항에 있어서,

암 또는 종양이 신경모세포종, 림프종, 백혈병, 흑색종, 신경교종, 소세포 폐암, 유방 암종, 난소암, 연조직 육종, 골육종, 유잉 육종, 결합조직형성 원형 세포 종양, 횡문근육종, 망막모세포종, 비-소세포 폐암, 신장세포암, 윌름스 종양, 전립선암, 위암, 자궁내막암, 췌장암 및 결장암으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 방법.

청구항 101

제100항에 있어서,

암 또는 종양이 신경모세포종, 림프종, 백혈병, 흑색종, 신경교종, 소세포 폐암, 유방 암종, 난소암, 연조직 육종, 골육종, 유잉 육종, 결합조직형성 원형 세포 종양, 횡문근육종, 망막모세포종으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 방법.

청구항 102

제33항 내지 제101항 중 어느 한 항에 있어서,

샘플이 대상체로부터 수득된 세포, 혈청, 혈액, 종양 부근 조직 및/또는 종양내 조직을 포함하는 것인, 방법.

청구항 103

제47항 내지 제102항 중 어느 한 항에 있어서,

적어도 하나의 강글리오시드의 유의미하게 더 높은 수준이 적어도 하나의 강글리오시드의 수준의 적어도 20 퍼센트 증가를 포함하는 것인, 방법.

청구항 104

제47항 내지 제102항 중 어느 한 항에 있어서,

적어도 하나의 강글리오시드의 유의미하게 더 낮은 수준이 적어도 하나의 강글리오시드의 수준의 적어도 20 퍼센트 감소를 포함하는 것인, 방법.

청구항 105

제82항 내지 제102항 중 어느 한 항에 있어서,

지질 길이의 이질성의 유의미한 변화가 대조군 샘플에 비해 대상체 샘플에서 적어도 20 퍼센트 변화(예를 들어, 증가 또는 감소)를 포함하는 것인, 방법.

청구항 106

제47항 내지 제105항 중 어느 한 항에 있어서,

대조군 샘플이 암이 없는 대상체로부터의 샘플인, 방법.

청구항 107

제47항 내지 제106항 중 어느 한 항에 있어서,

암 치료를 대상체에게 권고, 처방 및/또는 투여하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 108

제11항 내지 제13항 및 제31항 내지 제113항 중 어느 한 항에 있어서,

대상체가 포유동물인, 방법.

청구항 109

제11항 내지 제13항 및 제31항 내지 제114항 중 어느 한 항에 있어서,

대상체가 암의 동물 모델 또는 인간인, 방법.

청구항 110

제11항 내지 제13항 및 제31항 내지 제115항 중 어느 한 항에 있어서,

대상체가 인간인, 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] **관련 출원에 대한 교차 참조**

[0002] 본 출원은 2020년 10월 5일자로 출원된 미국 가특허 출원 번호 63/087,427의 이익을 주장하고, 상기 출원의 전체 내용은 그 전문이 본원에 포함된다.

배 경 기 술

[0003] **발명의 배경기술**

[0004] 암은 신체의 다른 부분으로 침범하거나 퍼질 가능성을 가진 비정상적인 세포 성장을 수반한다. 수십 년의 암 연구에도 불구하고, 암은 조기 및/또는 정확한 검출을 위한 수단의 부족으로 인해 계속해서 상당한 수의 사망(2020년 미국에서 하루에 ~1,600명 사망)을 초래하고 있다. 예를 들어, 난소암은 가장 치명적인 부인과 암이며, 여성의 세 번째 사망 원인이다. 장액성 난소암은 난소암 중 가장 공격적인 아형이며, 대부분의 환자가 진행된 단계에서 진단되기 때문에 통상적으로 "침묵의 살인자"라는 꼬리표가 붙었다. 증상은 모호하고 다른 병태와 쉽게 혼동된다. 현재, CA-125는 치료 효능을 스크리닝하고 모니터링하는 데 둘 다 사용되는 혈액 마커이다. CA-125 수준은 상피 종양의 80%에서 상승하지만, 대부분의 이러한 종양은 진행 단계에 있다. 혈청 CA-125는 단계 I 난소암의 <50%에서 수준이 상승하고, 제한된 특이성을 갖기 때문에 조기 진단에 대한 낮은 검출률을 갖는다. 따라서, 암 환자의 생존을 향상시킬 암의 초기 단계를 검출하기 위해, 예를 들어 암 조직 및 혈액에 새로운 바이오마커에 대한 필요성이 크다.

발명의 내용

[0005] **발명의 개요**

[0006] 강글리오시드는, (i) 이름으로 구체적으로 정의하는 탄수화물 구조 및 (ii) 탄소 쇄 길이가 다를 수 있는 지질 미부(tail)를 포함하는 당지질이다. 본 발명은 적어도 부분적으로는 강글리오시드(예를 들어, GD2, GD3, GM2 및/또는 GD1)가 암 진단 및 예상, 특히 암의 조기 검출에 유용한 바이오마커라는 발견에 기초한다. 본원은 암 진단 및 예상을 위한 조성물 및 방법을 제공한다. 예를 들어, 본원은, 강글리오시드(예를 들어, GD2 또는 GD3)에 특이적으로 결합하는 단클론성 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 조성물 및 강글리오시드의 양을 검출하고 측정하기 위해 조성물을 사용하는 것뿐만 아니라 액체 생검(예를 들어, 혈액, 혈청) 또는 고체 조직 생검을 사용하여 암을 진단하는 방법을 제공한다. 본원은 강글리오시드(예를 들어, GD2, GD3, GM2 및/또는 GD1)의 존재, 수준 및/또는 지질 길이를 검출하기 위한 신규한 질량 분석-기반 방법을 추가로 제공한다. 검출된 강글리오시드의 종류의 이질성 및/또는 동질성(homogeneity)뿐만 아니라 암 환자 또는 시간 경과에 따라 환자에서 종방향으로 지질 길이의 이질성 및/또는 동질성 또는 이의 변화는 암 진단 및 예상을 위한 신규한 바이오마커를 이에 따라 제공할 수 있다.

[0007] 특정 양태에서, 본원은 변형된 강글리오시드를 포함하는 조성물을 제공한다. 예를 들어, 본원은 하기 구조를 갖는 강글리오시드를 포함하는 조성물을 제공한다:

[0008] (A)x-[(P)y-(L)z]-(M)b;

[0009] 상기 식에서, A는 강글리오시드, 또는 이의 임의의 부분이고; x는 1 내지 32의 정수이고; P는 헤테로아릴이고; y는 1이고; L은 링커이고; z는 0 내지 8의 정수이고; M은 코어이고; b는 0 또는 1이고;

[0010] P는 (1) 수소; (2) C_{1-7} 아실; (3) C_{1-20} 알킬; (4) 아미노; (5) C_{3-10} 아릴; (6) 하이드록시; (7) 니트로; (8) C_{1-20} 알킬-아미노; 및 (9) $-(CH_2)_qCONR^B$로부터 독립적으로 선택되는 1, 2, 3, 4 또는 5개의 치환기로 선택적으로

치환되고, 여기서 q는 0 내지 4의 정수이고, R^B는 (a) 수소, (b) C_{1-6} 알킬, (c) C_{3-10} 아릴 및 (d) C_{1-6} 알크-C_{6-10} 아릴로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0011] 강글리오시드는 트리아진을 포함한다. 다른 실시양태에서, 변형된 강글리오시드는 트리아졸을 포함한다.

[0012] 일부 실시양태에서, 본원의 강글리오시드는 검출가능하게 표지된다. 일부 실시양태에서, 본원의 강글리오시드를 포함하는 조성물은 약학 조성물이다.

[0013] 또한, 본원은 본원의 강글리오시드를 포함하는 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 대상체에서 강글리오시드에 대한 면역 반응을 유도하는 방법을 제공한다.

[0014] 본원은 치료를 필요로 하는 대상체에서 대상체를 치료하는 방법을 추가로 제공하고, 상기 방법은 본원의 강글리오시드를 포함하는 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 대상체는 암을 앓거나, 감염(예를 들어, 바이러스(예를 들어, HIV, 헤파티티스 C 바이러스(HCV) 또는 엡스테인-바르 바이러스) 또는 박테리아 감염)을 갖는다. 예를 들어, 본원의 조성물은 대상체에서 암을 예방하거나 치료하는 데 사용될 수 있다.

[0015] 본원은 포유동물에서 항체를 제조하는 방법을 제공하고, 상기 방법은 (a) 선택적으로 아쥬반트를 추가로 포함하는, 본원의 강글리오시드를 포함하는 조성물로 포유동물을 면역화시키는 단계; 및 (b) 포유동물 유래의 강글리오시드, 포유동물 유래의 세포, 또는 포유동물 유래의 세포를 사용하여 제조된 하이브리도마에 결합하는 항체를 단리하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 포유동물은 토끼, 마우스, 염소, 낙타, 개, 양 또는 래트로부터 선택된다.

[0016] 특정 양태에서, 본원은 단클론성 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공하고, 단클론성 항체는 강글리오시드의 탄수화물 부분에 특이적으로 결합한다. 일부 실시양태에서, 강글리오시드는 (a) GD2, (b) GD3 또는 (c) GD2 및 GD3이다.

[0017] 특정 양태에서, 본원은, 본원에 기재된, a) 표 1 및/또는 표 2에 나열된 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드; b) 표 1 및/또는 표 2에 나열된 아미노산 서열과 적어도 또는 약 85% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드; 및/또는 c) 단클론성 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 인코딩하는 단리된 핵산 분자를 제공한다.

[0018] 특정 양태에서, 본원에 기재된 단리된 핵산을 포함하는 벡터가 제공된다.

[0019] 특정 양태에서, 본원에 기재된 단리된 핵산을 포함하고, 본원에 기재된 벡터를 포함하고, 본원에 기재된 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 발현하는 숙주 세포가 제공된다.

[0020] 특정 양태에서, 본원의 적어도 하나의 단클론성 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제조하는 방법은, (i) 본원의 적어도 하나의 단클론성 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 인코딩하는 서열을 포함하는 핵산을 포함하는 숙주 세포를, 상기 단클론성 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 발현을 가능하게 하기에 적합한 조건 하에 배양하는 단계; 및 (ii) 발현된 단클론성 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 회수하는 단계를 포함한다.

[0021] 특정 양태에서, 본원에 기재된 단클론성 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 적어도 하나 포함하는 장치 또는 키트.

[0022] 일부 실시양태에서, 장치 또는 키트는, (a) 적어도 하나의 단클론성 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 검출하기 위한 표지; (b) 1차 항체의 검출을 위한 2차 항체; 및/또는 (c) 선택적으로 강글리오시드인, 적어도 하나의 기준 항원을 추가로 포함한다.

[0023] 일부 실시양태에서, 장치 또는 키트의 기준 항원은 GD2, GD3 및 GD2 또는 GD3의 변형 버전으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 기준 항원은 본원에 기재된 강글리오시드(예를 들어, (A)x-[(P)y-(L)z]-(M)b의 구조를 갖는 것), 티오페닐 GD2, 티오페닐 GD3, GD2-O-아릴-NH2, GD3-O-아릴-NH2, p-아미노 페닐 에테르 GD2(AP-GD2), p-아미노 페닐 에테르 GD3(AP-GD3), 트리아진 GD2(예를 들어, 1, 3, 5-트리아진-GD2, 예를 들어, 2-아미노-4,6-디클로로-1,3,5-트리아진-GD2), 트리아진 GD3(예를 들어, 1, 3, 5-트리아진-GD3, 예를 들어, 2-아미노-4,6-디클로로-1,3,5-트리아진-GD3), 다량체 GD2(예를 들어, PAMAM(폴리아미도아민)-GD2) 및 다량체 GD3(PAMAM-GD3) 중 어느 하나로부터 선택된다.

[0024] 특정 양태에서, (a) 샘플을 수득하는 단계; (b) (i) 약 1:2:1, (ii) 약 4:8:3 또는 (iii) 약 2:4:1로부터 선택되는 비율로 $CHCl_3$:메탄올:물을 포함하는 약 1, 2, 3, 4 또는 5배(또는 2 내지 5배) 부피의 유기 용매를 샘플에 첨가하는 단계; (c) (b)의 조합된 혼합물을 진탕하는 단계; 및 (d) 유기 용매로부터 샘플을 분리함으로써, 샘플

로부터 지질을 추출하는 단계를 포함하는, 샘플로부터 지질을 추출하는 방법.

[0025] 특정 양태에서, (a) 샘플을 수득하는 단계; (b) (i) 약 1:2:1, (ii) 약 4:8:3 또는 (iii) 약 2:4:1로부터 선택되는 비율로 $CHCl_3$:메탄올:물을 포함하는 약 1, 2, 3, 4 또는 5배(또는 2 내지 5배) 부피의 유기 용매를 샘플에 첨가하는 단계; (c) (b)의 조합된 혼합물을 진탕하는 단계; 및 (d) 유기 용매로부터 샘플을 분리함으로써, 샘플로부터 지질을 추출하는 단계를 포함하는 샘플로부터 강글리오시드를 정제하는 방법.

[0026] 지질을 추출하는 방법 또는 강글리오시드를 정제하는 방법의 실시양태에서, (i) 샘플이 유기 용매로 추출하기 전에 원심분리에 의해 정화되고/되거나; (ii) 샘플이 포유동물, 선택적으로 인간으로부터 유래하고/하거나; (iii) 샘플이 원심분리에 의해 유기 용매로부터 분리되고/되거나; (iv) 샘플이 암을 앓는 대상체 또는 암이 없는 대상체로부터 유래하고/하거나; (v) 샘플이 세포, 혈청, 혈액, 종양 부근 조직 및/또는 종양내 조직을 포함하고/하거나; (vi) 방법이 (b)-(d) 단계를 적어도 1, 2, 3, 4 또는 5회 반복하는 단계를 추가로 포함하고/하거나; (vii) 방법이 선택적으로 진공(예를 들어, 고속 진공) 하에서 용액을 원심분리함으로써, (d)의 추출된 샘플로부터 잔류 유기 용매를 증발시키는 단계를 추가로 포함한다.

[0027] 세포 및/또는 조직(즉, 비-액체)을 포함하는 샘플의 경우, 당업자는 상기 샘플이 추출 효율을 증가시키기 위해 충분히 균질화되어야 함을 인식한다. 따라서, 일부 실시양태에서, 세포 및/또는 조직은 추출 전에 균질화된다.

[0028] 특정 양태에서, 적어도 하나의 강글리오시드(예를 들어, GD2 및/또는 GD3)의 존재 또는 수준을 검출하는 방법으로서, 이는 본원에 기재된 적어도 하나의 단클론성 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 사용하여 샘플에서 상기 강글리오시드를 검출하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 샘플은 암을 앓는 대상체 또는 암이 없는 대상체로부터 유래한다.

[0029] 본원에 기재된 바와 같이, 특정 실시양태는 본원에 기재된 임의의 방법에 적용가능하다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 단클론성 항체 또는 이의 항원 결합 단편은, 강글리오시드(예를 들어, GD2 또는 GD3)와 복합체를 형성하고, 복합체가 효소 결합 면역흡착 검정(ELISA), 방사성면역 검정(RIA)의 형태, 면역화학적으로(예를 들어, 면역조직화학(IHC)) 또는 유세포 분석을 사용하여 검출된다. 일부 실시양태에서, 복합체는 효소 결합 면역흡착 검정(ELISA)에서 검출된다. 바람직한 실시양태에서, 복합체는 샌드위치 ELISA 또는 경쟁 ELISA에서 검출된다. 일부 실시양태에서, 복합체는 면역조직화학(IHC)에 의해 검출된다.

[0030] 바람직한 실시양태에서, 복합체는 샌드위치 ELISA에서 검출된다. 일부 실시양태에서, 복합체는 본원의 임의의 2개의 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 사용하여 샌드위치 ELISA에서 검출된다. 다른 실시양태에서, 복합체는 본원의 임의의 하나의 항체 및 당업계에 알려진 항체(예를 들어, 강글리오시드를 검출할 수 있는 항체, 예를 들어 강글리오시드의 지질 미부 모이어티 또는 세라마이드로 지시되는 항체)의 조합을 사용하여 샌드위치 ELISA에서 검출된다. 또 다른 실시양태에서, 복합체는 당업계에 알려진 2개의 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 사용하여 샌드위치 ELISA에서 검출된다.

[0031] 또 다른 바람직한 실시양태에서, 복합체는 경쟁 ELISA에서 검출된다.

[0032] 일부 실시양태에서, 경쟁 ELISA는 GD2, GD3 또는 GD2 또는 GD3의 변형 버전으로부터 선택되는 기준 항원을 포함한다. 일부 실시양태에서, 기준 항원은 본원에 기재된 강글리오시드(예를 들어, (A)x-[(P)y-(L)z]-(M)b의 구조를 갖는 것), 티오페닐 GD2, 티오페닐 GD3, GD2-O-아릴-NH2, GD3-O-아릴-NH2, p-아미노 페닐 에테르 GD2(AP-GD2), p-아미노 페닐 에테르 GD3(AP-GD3), 트리아진 GD2(예를 들어, 1, 3, 5-트리아진-GD2, 예를 들어, 2-아미노-4,6-디클로로-1,3,5-트리아진-GD2), 트리아진 GD3(예를 들어, 1, 3, 5-트리아진-GD3, 예를 들어, 2-아미노-4,6-디클로로-1,3,5-트리아진-GD3), 다량체 GD2(예를 들어, PAMAM-GD2) 및 다량체 GD3(PAMAM-GD3) 중 임의의 것으로부터 선택된다.

[0033] 본원은 적어도 하나의 강글리오시드를 검출하는 질량 분석-기반 방법을 추가로 제공한다. 예를 들어, 본원은 질량 분석법(예를 들어, LC/MS 또는 LC/MS/MS)을 사용하여 샘플에서 상기 강글리오시드를 검출하는 단계를 포함하는 적어도 하나의 강글리오시드의 존재, 수준 또는 지질 길이를 검출하는 방법을 제공한다.

[0034] 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 강글리오시드의 지질 길이의 상대적 이질성 또는 대안적으로 이의 상대적 동질성은 상기 방법을 사용하여 검출되고/되거나, 정량화된다. 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 강글리오시드의 지질 길이의 상대적 이질성 또는 상대적 동질성에 대해 환자에서 발생하는 종단적 변화(주어진 환자에 대한 시간 경과에 따라 만들어지는 변화)는 상기 방법을 사용하여 검출되고/되거나 정량화된다.

[0035] 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 강글리오시드의 존재, 수준 또는 지질 길이를 검출(예를 들어, 질량 분석법

또는 항체를 사용하는 검출)하기 위한 샘플은 본원에 기재된 방법(예를 들어, 지질 추출)에 따라 제조된 샘플을 포함한다.

[0036] 특정 양태에서, 본원은 본원의 상세한 설명에 기재된 진단 및 예측 방법을 제공한다.

도면의 간단한 설명

[0037] **도면의 간단한 설명**

도 1은 GD2 및 GD3 강글리오시드의 개략도를 보여준다. 각각 기하학적 형태는 당의 종류이다. 노출된 글리칸 트리는 세라마이드에 연결되며, 이는 두 개의 지질 미부에 연결된다. 정상 GM1과 종양 GD3의 당 헤드는 2개의 당이 다르고, GD2와 GD3은 1개의 당이 서로 다르다. GD2는 GD3의 생합성 산물이므로, GD2와 GD3은 종종(항상은 아님) 동일한 세포에서 검출될 수 있다.

도 2는 GD2 및 GD3 mAb의 특이성을 보여준다. 유세포 분석에서 항-GD2 mAb 9A3 및 14C3의 예로서, 이는 GD2를 발현하는 세포에 특이적으로 결합하지만, GD2가 결여되어 GD3을 발현하는 세포에는 결합하지 않는다. 빨간색 히스토그램은 mAb 음성 대조군이다.

도 3은 ELISA 검정이 난소암 환자의 혈청에서 GD2 또는 GD3의 양을 정량화하는 것을 보여준다(다중 분석을 대표함). ELISA 플레이트에 고정된 피분석물은 GD2 또는 GD3에 대한 mAb로 검정된다. 대조군 = 10 ng의 정제된 천연 GD2 또는 GD3. BG = 백그라운드 웰, 1차 없음. 모든 암 샘플(OV)은 하나의 진단된 경계선을 제외하고 GD2 또는 GD3에 대해 양성이다. 모든 일반 샘플(N)은 음성이며, 백그라운드와 동일하다. 각각의 샘플에 대한 OD는 3회 반복 ± sd의 평균이며, 각각의 ELISA는 GD2 또는 GD3에 대해 각각 2개의 상이한 mAb 및 적어도 2회 독립적으로 모사되었다. 컷오프로서 통계적으로 유의미한 2배 더 높은 값이 사용되었으며, 모든 건강한 대조군 또는 백그라운드의 평균으로부터 적어도 2x sd가 사용되었다. OD는 표준 곡선으로 정규화된다.

도 4는 인간 난소 조직에 대한 GD2 및 GD3 면역-염색을 보여준다. GD2 및 GD3 염색은 경계선 및 높은 등급 생검의 종양 세포에서 특이적으로 검출되었다. 암 조직만 종양 막의 강력한 표지화를 갖는 GD2+ 또는 GD3+였으며, 주변 정상 조직은 음성이었다. 음성 대조군은 인접 섹션에서 테스트된 무관한 mAb와 일치하는 동형이다.

도 5는 인간 난소 조직 상의 GD2 및 GD3 IHC가 질병 단계와 상관관계가 있음을 보여준다. GD3 및/또는 GD2 염색은 종양 조직에서 검출되었으며, 이는 질병 단계와 상관관계가 있다(아형에 의한 추가 구분 없이, 낮은 등급과 높은 등급을 비교한 p=0.026 및 p=0.015). 높은 등급은 GD2 및 GD3 모두를 발현하며, GD2 및/또는 GD3 발현에서 높은 점수를 받았다. 낮은 등급은 GD2가 GD3보다 약간 강하게 염색되었지만, GD2 및 GD3 발현 모두에 대해 낮은 점수를 받았다.

도 6은 난소암 조직 생검에서 GD2 및 GD3의 면역염색을 보여준다. 경계선(초기 단계) 및 높은 등급(말기 단계) 생검 모두는 IHC에서 GD2 및 GD3에 대해 양성이다. 액체 생검 데이터는 동일한 환자 유래의 샘플이 2가지 기술을 사용하여 연구될 경우에 IHC와 상관관계가 있다.

도 7은 흑색종 조직 생검에서 GD2 및 GD3의 면역염색을 보여준다. 흑색종 조직 생검의 거의 100%가 IHC에서 GD2 및 GD3에 대해 양성이다.

도 8은 문헌 [National Comprehensive 암 Networks Clinical Practice Guidelines in Ovarian Cancer, v3.2019]로부터 조정된 개략도를 보여준다. 모니터링 및 위험 평가에 대한 현재 지침은 조기 검출 또는 모니터링에 적합하지 않다. 본원의 GD2/GD3 테스트(노란색 박스)를 추가하면 CA-125 진료 표준 액체 생검에 의해 많은 것을 놓친 초기 및 말기 단계 난소암을 검출할 것이다.

도 9a-도 9b는 난소암 생검에서 종양 마커 강글리오시드(TMG)의 면역조직화학적 검출을 보여준다. 이미지는 항-GD2(도 9a) 및 항-GD3(도 9b) 항체 염색의 대표적인 사진을 보여주며, "0"(염색 없음), "1"(약한 염색), "2"(중등도 염색) 및 "3"(강한 염색)로 채점되었다. 점수 "0"과 "1"은 음성으로 간주되었고, 점수 "2"와 "3"은 양성으로 간주되었다. 각 컬럼에 대한 오른쪽 패널은 검은색 사각형 내의 영역의 더 높은 배율이다.

도 10a-도 10d는 종양 마커 강글리오시드(TMG)가 난소암 환자에서 고도로 발현됨을 보여준다. 정상, 경계선 및 난소 조직 생검에서 GD2(도 10a) 및 GD3(도 10b) 면역조직화학을 보여주는 대표적인 이미지. 하단 패널은 검은색 사각형 내에서 상단 패널 영역의 더 높은 배율을 보여준다. GD2 및 GD3은 종양 세포를 특이적으로 염색하였지만, 주변 정상 조직을 염색하지 않았다. 염색은 주로 세포질 막과 세포질에 국한되었다. GD2(도 10c) 및 GD3(도 10d)에 대해 음성(점수 "0" 및 "1") 또는 양성(점수 "2" 및 "3")인 정상, 경계선 및 난소 환자의 백분율.

TMG의 발현은 정상(n = 9 정상; n = 16 경계선; n = 151 난소), p< 0.0001(카이-제곱)과 비교하여 경계선 및 난소 환자에서 유의미하게 더 높다.

도 11a-도 11d는 종양 마커 강글리오시드(TMG)가 상이한 난소암 아형에서 고도로 발현됨을 보여준다. 투명 세포 및 자궁내막암 조직 생검; 및 높은 등급 장액성 암(HGSC) 환자 유래의 용적축소후 수술(post-debulking surgery, PDS) 암 조직 생검에서 GD2(도 11a) 및 GD3(도 11b) 면역조직화학을 보여주는 대표적인 이미지. 하단 패널은 검은색 사각형 내에서 상단 패널 영역의 더 높은 배율을 보여준다. GD2(도 11c) 및 GD3(도 11d)에 대해 음성(점수 "0" 및 "1) 또는 양성(점수 "2" 및 "3")인 난소암 아형 환자의 백분율. GD2 염색에 대해 작은 통계적 차이가 있지만(p=0.035, 카이-제곱), GD2 및 GD3 발현 수준은 상이한 난소암 아형 간에 유사하다. GD3에 대한 통계적 차이는 관찰되지 않았다(n = 27 투명 세포; n = 17 자궁내막; n = 55 HGSC(PDS)).

도 12a-도 12c는 종양 마커 강글리오시드(TMG) 발현이 신보강 화학치료(NACT)로 치료된 HGSC 환자에서 감소됨을 보여준다. HGSC(PDS) 또는 HGSC(NACT)에서 GD2(도 12a) 및 GD3(도 12b) 면역조직화학을 보여주는 대표적인 이미지. 양성 및 음성 환자의 정량화(백분율)는 GD2 및 GD3 발현이 NACT를 겪은 환자 대 PDS를 겪은 환자(n = 52 NACT, n = 55 PDS)에서 유의미하게 감소됨을 보여주었다. GD2의 경우 p = 0.017, GD3의 경우 p = 0.007, (카이 제곱).

도 13a-도 13f는 종양 마커 강글리오시드(TMG) 염색(IHC)에서 더 높은 점수가 더욱 공격적인 난소암 아형과 연관되어 있음을 보여준다. 정상 환자 대 경계선 및 난소암 환자(도 13a, 도 13b); 난소암 아형(도 13c, 도 13d) 및 HGSC (PDS 대 NACT)(도 13e, 도 13f)에서 GD2 및 GD3 점수의 정량화(백분율). 난소암 환자는 경계선 및 정상과 비교하여 유의미하게 더 높은 GD2 및 GD3 염색 점수를 보여주었다(도 13a, 도 13b). GD2 및 GD3 점수는 HGSC(PDS) 환자 대 투명 세포 또는 자궁내막암 아형(도 13c, 도 13d) 또는 대 HGCS(NACT) 환자(도 13e, 도 13f)에서 유의미하게 더 높았다. (n = 9 정상, n = 16 경계선; n = 151 난소; n = 151 난소, n = 27 투명 세포; n = 17 자궁내막; n = 55 HGSC(PDS) 및 n = 52 HGSC(NACT). p < 0.001(카이제곱).

도 14a-도 14f는 종양 마커 강글리오시드(TMG)가 임상에서 사용되는 CA-125 난소암 마커와 비교하여 유사한 백분율의 양성 암 환자를 검출하였음을 보여준다. TMG는 IHC를 사용하여 검출되었고, CA-125는 액체 생검에서 검출되었다. CA-125 수준은 정상 환자 대 경계선 및 난소암 환자(도 14a); 난소암 아형(도 14c) 및 HGSC(PDS 대 NACT)(도 14e)에서 나타난다. CA-125 수준은 도 14a, 도 14c 및 도 14e에서 통계적으로 상이하지만(p < 0.001, 카이-제곱), 질병의 침해력 및 검출된 CA-125 값 사이에 직접적인 상관관계는 없었다. GD2+, GD3+, GD2+GD3+, CA-125+ 또는 경계선 대 난소암 환자(도 14b); 난소암 아형(도 14d) 및 HGSC(PDS 대 NACT) (도 14f)에서 함께 모든 마커에 대해 양성인 양성 환자의 정량화(백분율). 개별적으로 또는 조합된 모든 마커는 양성 난소암 환자의 검출의 유사한 수준을 달성하였다. 여성은 평균 연령(정상의 경우 62±6세; 경계선의 경우 57±15세; 모든 난소의 경우 61±12세; 투명 세포의 경우 55±12세; 자궁내막의 경우 63 ± 10세; HGSC(PDS)의 경우 63 ± 12세 및 HGSC(NACT)의 경우 63 ± 10세)에 기초하여 폐경 후로 분류되었다. 투명 세포 그룹 대 HGSC(PDS) 환자를 제외하고는 그룹 간에 유의미한 연령 차이가 발견되지 않았다(p < 0.01 , 다중 비교를 위한 본페로니(Bonferroni) 보정을 이용한 일원 분산분석(One-Way ANOVA))(n = 9 정상; n = 16 경계선; n = 151 난소; n = 151 난소, n = 27 투명 세포; n = 17 자궁내막; n = 55 HGSC(PDS) 및 n = 52 HGSC(NACT).

도 15a-도 15d는 종양 마커 강글리오시드(TMG)가 난소암의 진행 단계에서 더욱 고도로 발현되는 것을 보여준다. 질병의 상이한 단계에서 양성 및 음성 GD2(도 15a), CA-125(도 15b) 또는 GD3(도 15c)의 정량화(백분율). TMG는 IHC를 사용하여 검출되었고, CA-125는 액체 생검에서 검출되었다. 총 환자 수(100%)는 각 개별 단계(I 또는 II 또는 III 또는 IV)에서 검출된 총 환자의 합계에 해당한다. 모든 마커는 난소암의 더 진행된 단계에서 유의미하게 고도로 발현되었다(p < 0.001, 카이-제곱). (도 15d) 각 마커에 의해 검출된 양성 환자의 백분율 비교. 유의미한 차이가 관찰되지 않았다(n= 162명의 환자).

도 16a-도 16b는 5년 전체 생존(5YOS)을 보여준다. (도 16a) 난소 환자 및 (도 16b) HGSC(PDS)에서 종양 마커 강글리오시드(TMG) 및 5YOS 사이의 상관관계. TMG는 IHC를 사용하여 검출되었다. 데이터는 GD2+ 및 GD2- 또는 GD3+ 및 GD3- 또는 GD2-GD3- 및 GD2+GD3+에서 생존 백분율로 도시된다. 일반적으로 GD2+, GD3+ 및 GD2+GD3+ 환자는 GD2-, GD3- 및 GD2-GD3- 환자와 비교하여 약간 감소된 생존을 갖는 경향이 있지만, 통계적 차이는 보고되지 않았다(도 16a에서 n = 151 난소; 도 16b에서 n= 55 HGSC(PDS)).

도 17a-도 17d는 ELISA에 의한 액체 생검에서 GD2의 검출이 CA-125보다 더욱 민감한 난소 마커임을 보여준다. TMG는 IHC를 사용하여 검출되었고(도 17a-도 17b), 이의 수준은 ELISA를 사용하여 액체 생검에서 측정된 TMG의 수준과 일치되었다(도 17c). 또한, CA-125(도 17d)는 ELISA를 사용한 액체 생검에서 검출되었다. 정상, 경계선

및 난소암 환자의 조직 생검에서 음성 또는 양성 GD2(도 17a) 또는 GD3(도 17b)의 정량화(백분율). TMG의 발현은 정상과 비교하여 경계선 및 난소 환자에서 유의미하게 더 높다(n=9 정상; n=7 경계선; n=33 난소), p< 0.0001(카이-제곱). (도 17a)에 나타낸 동일한 경계선 및 난소 환자로부터의 액체 생검에서 분석된 (도 17c) GD2 수준. GD2는 정상 환자와 비교하여 난소암 및 경계선 암 환자에서 유의미하게 상승하였다(n=19 정상; n=7 경계선; n=33 난소) (p< 0.0001, 카이-제곱). (도 17a) 및 (도 17c)에서 분석된 동일한 환자에서 (도 17d) CA-125 수준. CA-125 수준은 정상과 비교하여 난소 환자에서 유의미하게 더 높았지만(n=8 정상, n=7 경계선, n=33 난소)(p< 0.0001, 카이-제곱), 경계선 대비는 그렇지 않았다. 경계선 환자의 약 40% 및 난소암 환자의 8%가 CA-125에 대해 음성이었지만, ELISA에 의해 GD2 양성이었으며, 이는 GD2가 주로 질병의 초기 단계에 대해 상당히 우수한 마커임을 시사한다.

도 18a-도 18d는 상이한 암 단계에서 난소 마커의 비교 검출을 보여준다. ELISA(도 18b)에 의한 IHC(도 18a)에 의해 검출된 GD2 또는 CA-125(도 18c)에 대한 양성 또는 음성 환자의 백분율. GD2 및 CA-125 양성 환자의 백분율은 음성 환자에 비해 유의미하게 더 높았다(도 18a의 경우 p = 0.04, 도 18b의 경우 p = 0.02 및 C의 경우 p < 0.0001, 카이-제곱). (도18d) 각 기술에 의해 검출된 양성 환자의 백분율 비교. 총 환자 수(100%)는 모든 단계(I+II+III+IV)에서 검출된 환자의 합계에 해당한다. 유미의한 차이가 관찰되지 않았다(n= 41명의 환자).

도 19a-19d는 트리아진-트리GD2 및 트리아진-트리GD3 모두 각각 항-GD2 또는 항-GD3 mAb에 의해 인식되었음을 입증하는 직접 ELISA 실험의 결과를 보여준다. 도 19a는 항-GD2 항체의 결합을 보여준다. 도 19b는 GD2 항원에 대한 백신접종된 마우스로부터의 혈청의 결합을 보여준다. 도 19c는 항-GD3 항체와의 결합을 보여준다. 도 19d는 GD3 항원에 대한 백신접종된 마우스로부터의 혈청의 결합을 보여준다.

도 20a 및 20b는 트리아진-트리GD2 및 트리아진-트리GD3 둘 모두 항-GD2 또는 항-GD3 mAb에 의해 각각 인식되어, 플레이트 상에 고정된 GD2 또는 GD3에 결합하는 mAb의 경쟁을 초래하는 것을 입증한 경쟁 ELISA 실험의 결과를 보여준다. 도 20a는 트리아진-GD2에 대한 단클론성 항체의 결합을 보여준다. 도 20b는 트리아진-GD3에 대한 단클론성 항체의 결합을 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0038] **발명의 상세한 설명**

[0039] 강글리오시드는 >40개의 상이한 시알산 함유 글리코스핑고지질 계열이다. 각각의 글리칸 트리는 구조적으로 고유하며 이름으로 각각의 강글리오시드를 정의한다. GM1과 같은 일부 강글리오시드가 보통이며, 아주 흔하다. GD2 및 GD3와 같은 다른 강글리오시드는 종양-마커이다(표 3). 이들은 정상 세포에서 낮거나 없고 암에서 높은 수준으로 발현된다. 따라서 GD2 및 GD3은 병인적 바이오마커(즉, 암에 필수적인 기능을 가진 것)이며, 이는 암이 마커의 발현을 쉽게 하향 조절하지 않기 때문에 선호된다.

[0040] GD2 및 GD3은 막 유동성, 래프트(raft) 크기 및 기능을 조절하고, 종양에 성장/전이, 면역 회피 및 차단에 있어서 이점을 제공한다. 지질 미부는 세포막의 외부 리플릿(leaflet)에 내장되어 있으며 길이가 가변적이다. 가변 지질 길이의 생물학적 관련성은 알려져 있지 않다.

[0041] GD2 또는 GD3은 안정하고, 불변하며, 비-돌연변이 표적을 제공하고, 발현은 포유류 종에 걸쳐 보존되며(글리칸 트리는 동일함), 발현은 세포주 및 원발성 종양에서 균질하고 균일하며, 발현 밀도는 화학치료 후 생존한 종양 세포에서 하향조절되지 않는다. 종양 세포 표면에 존재하는 것 외에도, GD2 및 GD3은 세포외 환경으로 탈락될 수 있다.

[0042] 그러나, 조직 또는 순환계에서의 GD2 및 GD3의 발현의 연구는 몇몇 환자 샘플만을 보고하였다. 조직 또는 혈청에서 발현될 수 있는 GD2 또는 GD3을 검출하기 위한 검정은 정량적이거나 표준화되지 않는다. 연구는 추정치만 얻는 지질-관련 시알산(LASA) 또는 박층 크로마토그래피(TLC)를 이용하고, 모순된 결론을 내렸다. GD2 또는 GD3을 연구하기 위한 도구가 부족하다. 40년의 연구 후에도 검정을 설계할 수 있는 GD2 또는 GD3에 대한 mAb는 매우 소수이며, 대부분은 특이적이지 않고, 대부분 차선책이며, 강글리오시드 구조의 작은 차이를 고려할 때 교차-반응한다(도 1). GD2 및 GD3은 당지질이고, 산물이 다중 생합성 경로 및 효소를 통해 생성될 수 있기 때문에, 돌연변이 또는 mRNA 발현을 모니터링하는 것은 실현 가능하지 않다. GD2 및 GD3은 임의의 암의 진단을 위해 미개발된 상태로 있다.

[0043] 따라서, 본원은 강글리오시드(예를 들어, GD2 또는 GD3)에 특이적으로 결합하는 단클론성 항체 및 이의 항원 결합 단편뿐만 아니라 이의 면역글로불린, 폴리펩티드, 핵산, 및 이러한 항체를 진단 및 예측 목적으로 사용하는

방법을 제공한다. 본원은 강글리오시드(예를 들어, GD2, GD3, GM2 및/또는 GD1)의 존재, 수준 및/또는 지질 길이를 검출하기 위한 신규한 질량 분석-기반 방법을 추가로 제공한다. 암 환자에서 강글리오시드의 지질 길이의 이질성이 변한다는 본원에 제시된 발견은 암 진단 및 예상을 위한 신규한 바이오마커 및 이러한 바이오마커의 유용성을 제공한다.

[0044] 정의

[0045] 관사 "a" 및 "an"은 본원에서 관사의 문법적 대상 중 하나 또는 하나 초과(즉, 적어도 하나)을 지칭하는 데 사용된다. 예를 들어, "요소"는 하나의 요소 또는 하나 초과의 요소를 의미한다.

[0046] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "복합 항체"는 2개 이상의 관련 없는 가변 영역으로부터 생식 계통 또는 비-생식 계통 면역글로불린 서열을 포함하는 가변 영역을 갖는 항체를 지칭한다. 추가로, 용어 "복합 인간 항체"는 2개 이상의 관련 없는 인간 가변 영역으로부터의 인간 생식 계통 또는 비-생식 계통 서열을 포함하는 가변 영역 및 인간 생식 계통 또는 비-생식 계통 면역글로불린 서열로부터 유래된 불변 영역을 갖는 항체를 지칭한다.

[0047] 기질로부터 해리되는 상당 부분의 분자 없이 기질이 유체(*예를 들어*, 표준 식염수 시트레이트, pH 7.4)로 헹구어질 수 있도록, 분자가 기질과 공유 또는 비-공유 연합된 경우, 분자는 기질에 "고정" 또는 "부착"된다.

[0048] 용어 "CDR" 및 이의 복수형 "CDR들"은 상보성 결정 영역(CDR)을 지칭하고, 이들 중 3개가 경쇄 가변 영역의 결합 특성(CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3)을 구성하고, 3개가 중쇄 가변 영역의 결합 특성(CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3)을 구성한다. CDR은 항체 분자의 기능적 활성에 기여하며, 스캐폴딩 또는 프레임워크 영역을 포함하는 아미노산 서열에 의해 분리된다. 정확한 정의로서 CDR 경계 및 길이는 상이한 분류 및 번호 지정 시스템의 영향을 받는다. 따라서, CDR은 카밧(Kabat), 코티아(Chothia), 컨택트 또는 임의의 다른 경계 정의에 의해 지칭될 수 있다. 상이한 경계에도 불구하고, 이러한 각각의 시스템은 가변 서열 내에서 소위 "초가변 영역"을 구성하는 곳에서 어느 정도의 중복을 갖는다. 따라서, 이러한 시스템에 따른 CDR 정의는 인접한 프레임워크 영역에 대해 길이 및 경계 영역이 상이할 수 있다. 예를 들어 문헌 [Kabat, Chothia, and/or MacCallum *et al.*,]을 참조하라 (Kabat *et al.*, in "Sequences of Proteins of Immunological Interest," 5th Edition, U.S. Department of Health and Human Services, 1992; Chothia *et al.* (1987) J. Mol. Biol. 196, 901; and MacCallum *et al.*, J. Mol. Biol. (1996) 262, 732, 이들 각각은 그 전문이 참조로 포함됨).

[0049] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "Fc 영역"은 천연-서열 Fc 영역 및 변이체 Fc 영역을 포함하는 면역글로불린 중쇄의 C-말단 영역을 설명하기 위해 사용된다. 면역글로불린 중쇄의 Fc 영역의 경계가 다양할 수 있지만, 인간 IgG 중쇄 Fc 영역은 일반적으로 Pro230 또는 Cys226 위치의 아미노산 잔기로부터 이의 카복실 말단까지 늘어진 것으로 정의된다. 본 발명의 항체에 사용하기에 적합한 천연-서열 Fc 영역은 인간 IgG1, IgG2(IgG2A, IgG2B), IgG3 및 IgG4를 포함한다.

[0050] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "K_D"는 특정 항체-항원 상호작용의 해리 평형 상수를 지칭하도록 의도된다. 개시된 발명의 항체의 결합 친화도는, 표준 항체-항원 검정, 예를 들어 경쟁 검정, 포화 검정, 또는 면역 검정, 예컨대 ELISA 또는 RIA에 의해 측정되거나 결정될 수 있다.

[0051] 지질 길이는 진단에 중요한 강글리오시드의 지질 미부의 길이를 지칭한다. 지질 미부는 세포막의 외부 리플릿에 내장된다. 지질은 길이가 가변적일 수 있다. 특히, 이러한 차이는 단일 강글리오시드 내에서 뿐 아니라 강글리오시드 사이에서 비교할 때 발생한다. 따라서, 지질 이질성 및 이의 변화는 본원에 기재된 진단 및 방법에 중요하다.

[0052] 용어 "최소 잔존 질병"은 당업계에서 인식되고 있으며, 환자가 관해 중일 때, 암 치료 중 또는 암 치료 후 신체의 적은 수의 암 세포를 설명하기 위해 사용된다. 남아있는 세포의 수가 너무 적을 수 있어, 이들은 임의의 물리적 징후나 증상을 유발하지 않을 수 있으며, 종종 전통적인 방법을 통해서는 검출조차 될 수 없다. 이는 암 재발의 주요 원인이다.

[0053] 용어 "신보강 치료"는 1차 치료 전에 제공되는 치료를 지칭한다. 신보강 치료의 예는 화학치료, 방사선 치료 및 호르몬 치료를 포함할 수 있다.

[0054] 핵산은 또 다른 핵산 서열과 기능적 관계에 있을 때 "작동가능하게 연결"된다. 예를 들어, 프로모터 또는 인핸서는 서열의 전사에 영향을 미치는 경우 코딩 서열에 작동가능하게 연결된다. 전사 조절 서열과 관련하여, 작동가능하게 연결된다는 것은 연결되는 DNA 서열이 연속적이며, 필요한 경우 2개의 단백질 코딩 영역을 연결하도록 연속적이고 판독 프레임 내에 있음을 의미한다. 스위치 서열의 경우, 작동가능하게 연결된다는 것은 서열이 스

위치 재조합에 영향을 미칠 수 있음을 나타낸다.

[0055] 용어 "예방"은 당업계에서 인식되며, 바이러스/박테리아 감염과 같은 병태 또는 암과 같은 질병과 관련하여 사용되는 경우, 당업계에 잘 이해되며, 치료를 받지 않은 대상체에 비해 대상체의 의학적 병태의 증상의 빈도를 감소시키거나, 이의 발병을 지연시키는, 치료, 예를 들어 조성물의 투여를 포함한다. 따라서, 암의 예방은, 예를 들어, 통계적으로 및/또는 임상적으로 상당한 양으로, 치료되지 않은 대조군 개체군에 비해 예방적 치료를 받는 환자의 개체군에서 검출가능한 암 성장의 수를 감소시키는 것 및/또는 치료되지 않은 대조군 개체군에 비해 치료된 개체군에서 검출가능한 암 성장의 출현을 지연시키는 것을 포함한다.

[0056] 용어 "관해"는 당업계에서 인식되며, 암의 징후 및 증상이 감소된 상태를 지칭한다.

[0057] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "대상체"는 임의의 건강한 동물, 포유동물 또는 인간, 또는 암에 걸린 임의의 동물, 포유동물 또는 인간을 지칭한다. 용어 "대상체"는 "환자"와 상호교환 가능하다. 용어 "비-인간 동물"은 모든 척추동물, *예를 들어* 포유동물 및 비-포유동물, 예컨대 비-인간 영장류, 양, 개, 소, 닭, 양서류, 파충류 등을 포함한다.

[0058] 화합물의 "치료적 유효량"은, 예를 들어, 바람직하게는 인간 또는 비-인간 포유동물에서 허용가능한 이익 : 위험 비율로, 강글리오시드에 대한 면역 반응을 유도하거나, 종양 부담을 감소시키거나, 종양 세포의 성장을 감소시키거나, 암과 관련된 임의의 증상을 완화시키는, 치료된 환자에서 의학적으로 바람직한 결과를 생성할 수 있는 양이다.

[0059] 용어 "치료"는 예방적 및/또는 치료적 치료를 포함한다. 용어 "예방적 또는 치료적" 치료는 당업계에 인식되고, 숙주에게 대상 조성물 중 하나 이상의 투여를 포함한다. 원치 않는 병태(*예를 들어*, 숙주 동물의 질병 또는 다른 원치 않는 병태)의 임상적 징후 이전에 투여되는 경우, 치료는 예방적이고(*즉*, 원치 않는 병태 발생에 대해 숙주를 보호함); 반면에, 원치 않는 병태의 징후 후에 투여되는 경우, 치료는 치료적이다(*즉*, 기존의 원치 않는 병태 또는 이의 부작용을 감소, 개선 또는 안정화하도록 의도됨).

[0060] 항원-결합 단백질

[0061] 본원은 강글리오시드(예를 들어, GD2 또는 GD3)에 결합하는 항원-결합 단백질을 제공한다. 다양한 실시양태에서, 항원 결합 단백질은 강글리오시드(예를 들어, GD2 또는 GD3)의 탄수화물 부분에 결합한다. 본원의 항원-결합 단백질은 당업계에 알려진 많은 형태의 항원-결합 단백질 중 임의의 하나를 취할 수 있다. 다양한 실시양태에서, 본원의 항원-결합 단백질은 항체, 또는 항원-결합 항체 단편, 또는 항체 단백질 산물의 형태를 취한다.

[0062] 본원의 다양한 실시양태에서, 항원-결합 단백질은 항체를 포함하거나, 이것으로 본질적으로 구성되거나, 이것으로 구성된다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "항체"는 중쇄 및 경쇄를 포함하고, 가변 및 불변 영역을 포함하는 통상적인 면역글로불린 형식을 갖는 단백질을 지칭한다. 예를 들어, 항체는 두 개의 동일한 폴리펩티드 쇄 쌍의 "Y자형" 구조인 IgG일 수 있으며, 각각의 쌍은 하나의 "경쇄"(전형적으로 약 25 kDa의 분자량을 가짐) 및 하나의 "중쇄"(전형적으로 약 50-70 kDa의 분자량을 가짐)를 갖는다. 항체는 가변 영역과 불변 영역을 갖는다. IgG 형식에서, 가변 영역은 일반적으로 약 100-110개 이상의 아미노산이고, 3개의 상보성 결정 영역(CDR)을 포함하고, 주로 항원 인식을 담당하고, 상이한 항원에 결합하는 다른 항체 중에서 실질적으로 다양하다. 불변 영역은 항체가 면역 시스템의 세포 및 분자를 동원할 수 있게 한다. 가변 영역은 각각의 경쇄 및 중쇄의 N-말단 영역으로 구성되는 반면, 불변 영역은 각각의 중쇄 및 경쇄의 C-말단 부분으로 구성된다. (Janeway et al., "Structure of the Antibody Molecule and the Immunoglobulin Genes", Immunobiology: The Immune System in Health and Disease, 4th ed. Elsevier Science Ltd./Garland Publishing, (1999)).

[0063] 본원 내에서 달리 명시되지 않는 한, 항체 또는 항체들은 항체의 자연-발생 형태(*예를 들어*, IgG, IgA, IgM, IgE) 및 재조합 항체, 예컨대 단일쇄 항체, 키메라 및 인간화 항체, 다중-특이적 항체뿐만 아니라 전술한 것들 모두의 단편 및 유도체를 광범위하게 포함하고, 여기서 단편 및 유도체는 적어도 항원 결합 부위를 갖는다. 항체 유도체는 항체에 접합된 단백질 또는 화학적 모이어티를 포함할 수 있다. 항체는 디설파이드 결합 또는 이의 항원 결합 부분에 의해 상호 연결된 적어도 2개의 중쇄(H) 및 2개의 경쇄(L)를 포함하는 당단백질을 지칭한다. 각각의 중쇄는 중쇄 가변 영역(본원에서는 V_H로 약칭함) 및 중쇄 불변 영역으로 구성된다. 중쇄 불변 영역은 CH1, CH2 및 CH3의 3개의 도메인으로 구성된다. 각각의 경쇄는 경쇄 가변 영역(본원에서는 V_L로 약칭함) 및 경쇄 불변 영역으로 구성된다. 경쇄 불변 영역은 1개의 도메인인 CL로 구성된다. V_H 및 V_L 영역은 상보성 결정 영

역(CDR)이라고 하는 초가변 영역으로 추가로 세분될 수 있으며, 이는 프레임워크 영역(FR)이라고 하는 보다 보존된 영역에 산재된다. 각각의 V_H 및 V_L은 아미노-말단에서 카복실-말단까지 다음과 같은 순서로 배열된 3개의 CDR 및 4개의 FR로 구성된다: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. 프레임워크 또는 FR 잔기는 본원에 나타낸 바와 같은 초가변성 잔기 이외의 가변-도메인 잔기이다. 중쇄 및 경쇄의 가변 영역은 항원과 상호작용하는 결합 도메인을 함유한다.

[0064] 항체의 CDR의 일반적인 구조 및 특성은 당업계에 기재되어 있다. 간략하게는, 항체 스캐폴드에서, CDR은 주로 항원 결합 및 인식을 담당하는 영역을 구성하는 중쇄 및 경쇄 가변 영역에서 프레임워크 내에 내장된다. 가변 영역은 전형적으로 프레임워크 영역(문헌 [Kabat et al., 1991]에 의해 지정된 프레임워크 영역 1-4, FR1, FR2, FR3 및 FR4; 또한 앞선 문헌 [Chothia and Lesk, 1987] 참조) 내에서, 적어도 3개의 중쇄 또는 경쇄 CDR을 포함한다(문헌 [Kabat et al., 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, Public Health Service N.I.H., Bethesda, Md.]; 또한 문헌 [Chothia and Lesk, 1987, J. Mol. Biol. 196:901-917]; [Chothia et al., 1989, Nature 342: 877-883] 참조). 관련 실시양태에서, 프레임워크의 잔기가 변경된다. 변경될 수 있는 중쇄 프레임워크 영역은 H-FR1, H-FR2, H-FR3 및 H-FR4 지정된 영역 내에 있으며, 이들은 중쇄 CDR 잔기를 둘러싸고, 변경될 수 있는 경쇄 프레임워크 영역의 잔기는 L-FR1, L-FR2, L-FR3 및 L-FR4 지정된 영역 내에 있고, 이들은 경쇄 CDR 잔기를 둘러싼다. 프레임워크 영역 내의 아미노산은, 예를 들어 인간 프레임워크 또는 인간 컨센서스 프레임워크(consensus framework)에서 확인된 임의의 적합한 아미노산으로 대체될 수 있다.

[0065] 항체는 당업계에 알려진 임의의 불변 영역을 포함할 수 있다. 인간 경쇄는 카파 및 람다 경쇄로 분류된다. 중쇄는 뮤, 델타, 감마, 알파 또는 엡실론으로 분류되며, 항체의 동형을 각각 IgM, IgD, IgG, IgA 및 IgE로 정의한다. IgG는 비제한적으로 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4를 포함하여, 몇몇 하위 클래스를 갖는다. IgM은 비제한적으로 IgM1 및 IgM2를 포함하는 하위 클래스를 갖는다. 본원의 실시양태는 항체의 이러한 모든 클래스 또는 동형을 포함한다. 경쇄 불변 영역은, 예를 들어 카파- 또는 람다-형 경쇄 불변 영역, 예를 들어 인간 카파- 또는 람다-형 경쇄 불변 영역일 수 있다. 중쇄 불변 영역은, 예를 들어 알파-, 델타-, 엡실론-, 감마- 또는 뮤-형 중쇄 불변 영역, 예를 들어 인간 알파-, 델타-, 엡실론-, 감마- 또는 뮤-형 중쇄 불변 영역일 수 있다. 따라서, 다양한 실시양태에서, 항체는 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 중 어느 하나를 포함하여, 동형 IgA, IgD, IgE, IgG 또는 IgM의 항체이다. 다양한 양태에서, 항체는 반감기/안정성을 개선하거나, 항체를 발현/생산성에 대해 보다 적합하게 하기 위해 자연-발생 대응물에 비해, 하나 이상의 아미노산 변형을 포함하는 불변 영역을 포함한다. 다양한 예에서, 항체는 자연-발생 대응물에 존재하는 C-말단 Lys 잔기가 제거되거나, 절단된 불변 영역을 포함한다.

[0066] 항체는 단클론성 항체일 수 있다. 일부 실시양태에서, 항체는 포유동물, 예를 들어 마우스, 토끼, 염소, 말, 닭, 햄스터, 인간 등에 의해 생성된 자연-발생 항체와 실질적으로 유사한 서열을 포함한다. 이와 관련하여, 항체는 포유류 항체, 예를 들어 마우스 항체, 토끼 항체, 염소 항체, 말 항체, 닭 항체, 햄스터 항체, 인간 항체 등으로 간주될 수 있다. 특정 양태에서, 항원-결합 단백질은 인간 항체와 같은 항체이다. 특정 양태에서, 항원-결합 단백질은 키메라 항체 또는 인간화 항체이다. 용어 "키메라 항체"는 2개 이상의 상이한 항체로부터 도메인을 함유하는 항체를 지칭한다. 키메라 항체는, 예를 들어 1종으로부터의 불변 도메인 및 두 번째의 가변 도메인을 함유할 수 있거나, 보다 일반적으로는, 적어도 2종 유래의 아미노산 서열의 스트레치를 함유할 수 있다. 키메라 항체는 또한 동일한 종 내에서 2개 이상의 상이한 항체의 도메인을 함유할 수 있다. 항체와 관련하여 사용될 때 용어 "인간화"는 본래의 원천 항체보다 실제 인간 항체와 더 유사한 구조 및 면역학적 기능을 갖도록 조작된 비-인간 원천 유래의 적어도 CDR 영역을 갖는 항체를 지칭한다. 예를 들어, 인간화는 마우스 항체와 같은 비-인간 항체 유래의 CDR을 인간 항체에 이식하는 것을 포함할 수 있다. 인간화는 또한 비-인간 서열을 인간 서열과 더 유사하게 만들기 위해 선택적인 아미노산 치환을 포함할 수 있다. 인간 항체 중쇄 및 경쇄 불변 영역에 대한 서열 정보를 포함한 정보는 유니포트(Uniprot) 데이터베이스뿐만 아니라 항체 조작 및 제조 분야의 당업자에게 잘 알려진 다른 데이터베이스를 통해 공개적으로 이용가능하다. 예를 들어, IgG2 불변 영역은 유니포트 데이터베이스로부터 유니포트 번호 P01859로 이용가능하며, 이는 본원에 참조로 포함된다.

[0067] 본원에서 사용된 바와 같은 항체는 또한 항체의 항원-결합 부분을 포함한다. 항원 결합 부분은 항원(*예를 들어*, 강글리오시드)에 특이적으로 결합하는 능력을 보유하는 항체의 하나 이상의 단편을 지칭한다. 항체의 항원-결합 기능은 전장 항체의 단편에 의해 수행될 수 있음이 밝혀졌다. 항체의 항원-결합 부분 내에 포함되는 결합 단편의 예는, (i) VL, VH, CL 및 CH1 도메인으로 구성된 1가 단편인 Fab 단편; (ii) 힌지 영역에서 디설파이드 브릿지에 의해 연결된 2개의 Fab 단편을 포함하는 2가 단편인 $F(ab')_2$ 단편; (iii) VH 및 CH1 도메인으로 구성된 Fd 단편; (iv) 항체의 단일 암(arm)의 VL 및 VH 도메인으로 구성된 Fv 단편; (v) VH 도메인으로 구성된 dAb 단편

(Ward *et al.*, (1989) *Nature* 341:544-546); 및 (vi) 단리된 상보성 결정 영역(CDR)을 포함한다. 또한, Fv 단편의 두 도메인인 VL과 VH는, 별도의 유전자에 의해 코딩되지만, 이들은 1가 폴리펩티드를 형성하기 위해 VL 및 VH 영역이 쌍을 이루는 단일 단백질 쇄로서 제조되는 것을 가능하게 하는 합성 링커에 의해, 재조합 방법을 사용하여, 연결될 수 있다(단일쇄 Fv(scFv)로 알려짐; 예를 들어, 문헌 [Bird *et al.* (1988) *Science* 242:423-426]; 및 [Huston *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883]; 및 [Osbourn et al. 1998, Nature Biotechnology 16: 778] 참조). 이러한 단일쇄 항체는 또한 항체의 항원-결합 부분 내에 포함되도록 의도된다.

[0068] 항체는, 예를 들어 파파인 및 펩신과 같은 효소에 의해 단편으로 절단될 수 있다. 파파인은 항체를 절단하여 2개의 Fab 단편 및 단일 Fc 단편을 생성한다. 펩신은 항체를 절단하여 F(ab')2 단편 및 pFc' 단편을 생성한다. 본원의 다양한 양태에서, 본원의 항원-결합 단백질은 항체의 항원-결합 단편(일명, 항원-결합 항체 단편, 항원-결합 단편, 항원-결합 부분)이다. 다양한 예에서, 항원-결합 항체 단편은 Fab 단편 또는 F(ab')2 단편이다.

[0069] 항체의 아키텍처는, 적어도 또는 약 12-150 kDa의 분자량 범위에 걸쳐 있고, 단량체(n = 1)에서, 이량체(n = 2), 삼량체(n = 3), 사량체(n = 4)까지, 그리고 잠재적으로는 더 높은 원자가(n) 범위를 갖는, 증가하는 다양한 대안적인 항체 형식을 생성하기 위해 이용되어 왔고; 이러한 대안적인 항체 형식은 본원에서 "항체 단백질 산물"로서 지칭된다. 항체 단백질 산물은 완전 항체 구조에 기초한 것 및 완전 항원-결합 능력을 보유한 항체 단편을 모방한 것, 예를 들어 scFv, Fab 및 VHH/VH(하기 논의됨)를 포함한다. 완전 항원 결합 부위를 보유하는 가장 작은 항원-결합 단편은 Fv 단편이며, 이는 가변(V) 영역으로 전적으로 구성된다. 가용성인, 가요성 아미노산 펩티드 링커는 분자의 안정화를 위해 V 영역을 scFv(단일쇄 단편 가변) 단편에 연결하는 데 사용되거나, 불변(C) 도메인이 V 영역에 추가되어 Fab 단편[단편, 항원 결합]을 생성한다. scFv 및 Fab 단편 모두는 숙주 세포, 예를 들어 원핵 숙주 세포에서 쉽게 제조될 수 있다. 다른 항체 단백질 산물은 디설파이드-결합 안정화된 scFv(ds-scFv), 단일쇄 Fab(scFab)뿐만 아니라 올리고머화 도메인에 연결된 scFv로 구성된 상이한 형식을 포함하는 디아-, 트리아-, 테트라-바디 또는 미니바디(miniAb)와 같은 이량체 및 다량체 항체 형식을 포함한다. 가장 작은 단편은 단일 도메인 Ab(sdAb)뿐만 아니라 카멜리드(camelid) 중쇄 Ab의 VHH/VH이다. 신규한 항체 형식을 생성하는 데 가장 자주 사용되는 빌딩 블록은 단일-쇄 가변(V)-도메인 항체 단편(scFv)이며, 이는 ~15 아미노산 잔기의 펩티드 링커에 의해 연결된 중쇄 및 경쇄 유래의 V 도메인(VH 및 VL 도메인)을 포함한다. 펩티바디 또는 펩티드-Fc 융합은 또 다른 항체 단백질 산물이다. 펩티바디의 구조는 Fc 도메인에 이식된 생물학적으로 활성인 펩티드로 구성된다. 펩티바디는 당업계에 잘 설명되어 있다. 예를 들어, 문헌 [Shimamoto et al., mAb 4(5): 586-591(2012)]를 참조하라.

[0070] 다른 항체 단백질 산물은 단일쇄 항체(SCA); 디아바디; 트리아바디; 테트라바디; 이중특이적 또는 삼중특이적 항체 등을 포함한다. 이중특이적 항체는 BsIgG, 첨부된 IgG, 이중특이적 항체(BsAb) 단편, 이중특이적 융합 단백질 및 BsAb 접합체의 5가지 주요 클래스로 나눌 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Spiess et al., Molecular Immunology 67(2) Part A: 97-106(2015)]를 참조하라.

[0071] 다양한 양태에서, 본원의 항원-결합 단백질은 이들 항체 단백질 산물 중 어느 하나를 포함하거나, 이들로 본질적으로 구성되거나, 이들로 구성된다. 다양한 양태에서, 본원의 항원-결합 단백질은 Fab VHH/VH, Fv 단편, ds-scFv, scFab, Fv, F(ab')2, Fab', dsFv, scFv, sc(Fv)2, 이량체 항체, 다량체 항체(예를 들어, 디아바디, 트리아바디, 테트라바디), 미니Ab, 카멜리드 중쇄 항체의 펩티바디 VHH/VH, sdAb, 디아바디; 트리아바디; 및 테트라바디 중 어느 하나를 포함하거나, 이들로 본질적으로 구성되거나, 이들로 구성된다.

[0072] 다양한 예에서, 본원의 항원-결합 단백질은 단량체 형태, 또는 중합체, 올리고머 또는 다량체 형태의 항체 단백질 산물이다.

[0073] 특정 양태에서, 본원은 단클론성 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공하고, 단클론성 항체는 강글리오시드의 탄수화물 부분에 특이적으로 결합한다. 일부 실시양태에서, 강글리오시드는 (a) GD2, (b) GD3, 또는 (c) GD2 및 GD3이다.

[0074] 다양한 실시양태에서, (GD2 또는 GD3에 대한) 항-강글리오시드 항체 또는 이의 항체 변이체는 인간 항체, 인간화 항체, 키메라 항체, 단클론성 항체, 재조합 항체, 항원-결합 항체 단편, 단일쇄 항체, 단량체 항체, 디아바디, 트리아바디, 테트라바디, Fv, F(ab')2, Fab', dsFv, scFv, sc(Fv)2, IgG1 항체, IgG2 항체, IgG3 항체 및 IgG4 항체로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0075] 특정 양태에서, 본원은 단클론성 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공하고, 단클론성 항체는 a) 표 1에 나열

된 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 중쇄 CDR 서열과 적어도 또는 약 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.1%, 99.2%, 99.3%, 99.4%, 99.5%, 99.6%, 99.7%, 99.8%, 99.9% 또는 100% 동일성을 갖는 중쇄 상보성 결정 영역(CDR) 서열; 및/또는 b) 표 1에 나열된 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 경쇄 CDR 서열과 적어도 또는 약 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.1%, 99.2%, 99.3%, 99.4%, 99.5%, 99.6%, 99.7%, 99.8%, 99.9% 또는 100% 동일성을 갖는 경쇄 CDR 서열을 포함한다.

[0076] 특정 양태에서, 단클론성 항체 또는 이의 항원 결합 단편으로서, 여기서 단클론성 항체가 a) 표 2에 나열된 VH 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 VH 서열과 적어도 또는 약 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.1%, 99.2%, 99.3%, 99.4%, 99.5%, 99.6%, 99.7%, 99.8%, 99.9% 또는 100% 동일성을 갖는 중쇄 가변 도메인(VH); 및/또는 b) 표 2에 나열된 VL 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 VL 서열과 적어도 또는 약 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.1%, 99.2%, 99.3%, 99.4%, 99.5%, 99.6%, 99.7%, 99.8%, 99.9% 또는 100% 동일성을 갖는 경쇄 가변 도메인(VL) 서열을 포함하는 것인, 단클론성 항체 또는 이의 항원 결합 단편이 제공된다.

[0077] 특정 양태에서, 단클론성 항체 또는 이의 항원 결합 단편으로서, 여기서 단클론성 항체 또는 이의 항원 결합 단편이, a) 표 1에 기재된 바와 같은 중쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3의 조합, 또는 단지 1개 또는 2개의 아미노산이 다르거나, 적어도 또는 약 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.1%, 99.2%, 99.3%, 99.4%, 99.5%, 99.6%, 99.7%, 99.8%, 99.9% 또는 100% 서열 동일성을 갖는 이의 변이체 서열; 및/또는 b) 표 1에 기재된 경쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3의 조합, 또는 단지 1개 또는 2개의 아미노산이 다르거나, 적어도 또는 약 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.1%, 99.2%, 99.3%, 99.4%, 99.5%, 99.6%, 99.7%, 99.8%, 99.9% 또는 100% 서열 동일성을 갖는, 이의 변이체 서열을 포함하는 것인, 단클론성 항체 또는 이의 항원 결합 단편이 제공된다.

[0078] 특정 양태에서, 본원은 단클론성 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공하고, 단클론성 항체 또는 이의 항원 결합 단편은, a) 표 2에 기재된 바와 같은 VH 서열, 또는 단지 1개 또는 2개의 아미노산이 다르거나, 적어도 또는 약 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.1%, 99.2%, 99.3%, 99.4%, 99.5%, 99.6%, 99.7%, 99.8%, 99.9% 또는 100% 서열 동일성을 갖는 이의 변이체 서열; 및/또는 b) 표 2에 기재된 VL 서열, 또는 단지 1개 또는 2개의 아미노산이 다르거나, 적어도 또는 약 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.1%, 99.2%, 99.3%, 99.4%, 99.5%, 99.6%, 99.7%, 99.8%, 99.9% 또는 100% 서열 동일성을 갖는, 이의 변이체 서열을 포함한다.

[0079] 일부 실시양태에서, 단클론성 항체 또는 이의 항원 결합 단편으로서, 여기서 단클론성 항체가 a) 표 2에 나열된 VH 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 VH 서열; 및/또는 b) 표 2에 나열된 VL 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 VL서열을 포함하는 것인, 단클론성 항체 또는 이의 항원 결합 단편이 제공된다.

[0080] 일부 실시양태에서, 단클론성 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 하기로부터 선택되는 6개의 CDR 아미노산 서열을 포함한다: a) 서열번호: 2, 4, 6, 8, 10 및 12(클론 4), 또는 단지 1개 또는 2개의 아미노산이 다르거나, 적

어도 또는 약 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.1%, 99.2%, 99.3%, 99.4%, 99.5%, 99.6%, 99.7%, 99.8%, 99.9% 또는 100% 서열 동일성을 갖는 이의 변이체 서열; b) 서열번호: 14, 16, 18, 20, 22 및 24(클론 6), 또는 단지 1개 또는 2개의 아미노산이 다르거나, 적어도 또는 약 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.1%, 99.2%, 99.3%, 99.4%, 99.5%, 99.6%, 99.7%, 99.8%, 99.9% 또는 100% 서열 동일성을 갖는 이의 변이체 서열; c) 서열번호: 26, 28, 30, 32, 34 및 36(클론 7), 또는 단지 1개 또는 2개의 아미노산이 다르거나, 적어도 또는 약 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.1%, 99.2%, 99.3%, 99.4%, 99.5%, 99.6%, 99.7%, 99.8%, 99.9% 또는 100% 서열 동일성을 갖는 이의 변이체 서열; d) 서열번호: 38, 40, 42, 44, 46 및 48(클론 8), 또는 단지 1개 또는 2개의 아미노산이 다르거나, 적어도 또는 약 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.1%, 99.2%, 99.3%, 99.4%, 99.5%, 99.6%, 99.7%, 99.8%, 99.9% 또는 100% 서열 동일성을 갖는 이의 변이체 서열; e) 서열번호: 50, 52, 54, 56, 58 및 60(클론 9), 또는 단지 1개 또는 2개의 아미노산이 다르거나, 적어도 또는 약 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.1%, 99.2%, 99.3%, 99.4%, 99.5%, 99.6%, 99.7%, 99.8%, 99.9% 또는 100% 서열 동일성을 갖는 이의 변이체 서열; f) 서열번호: 62, 64, 66, 68, 70 및 72(클론 10), 또는 단지 1개 또는 2개의 아미노산이 다르거나,적어도 또는 약 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.1%, 99.2%, 99.3%, 99.4%, 99.5%, 99.6%, 99.7%, 99.8%, 99.9% 또는 100% 서열 동일성을 갖는 이의 변이체 서열; g) 서열번호: 74, 76, 78, 80, 82 및 84(클론 13), 또는 단지 1개 또는 2개의 아미노산이 다르거나, 적어도 또는 약 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.1%, 99.2%, 99.3%, 99.4%, 99.5%, 99.6%, 99.7%, 99.8%, 99.9% 또는 100% 서열 동일성을 갖는 이의 변이체 서열; h) 서열번호: 86, 88, 90, 92, 94 및 96(클론 14), 또는 단지 1개 또는 2개의 아미노산이 다르거나, 적어도 또는 약 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.1%, 99.2%, 99.3%, 99.4%, 99.5%, 99.6%, 99.7%, 99.8%, 99.9% 또는 100% 서열 동일성을 갖는 이의 변이체 서열; i) 서열번호: 98, 100, 102, 104, 106 및 108(클론 15), 또는 단지 1개 또는 2개의 아미노산이 다르거나, 적어도 또는 약 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.1%, 99.2%, 99.3%, 99.4%, 99.5%, 99.6%, 99.7%, 99.8%, 99.9% 또는 100% 서열 동일성을 갖는 이의 변이체 서열; j) 서열번호: 110, 112, 114, 116, 118 및 120(클론 17), 또는 단지 1개 또는 2개의 아미노산이 다르거나, 적어도 또는 약 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.1%, 99.2%, 99.3%, 99.4%, 99.5%, 99.6%, 99.7%, 99.8%, 99.9% 또는 100% 서열 동일성을 갖는 이의 변이체 서열; k) 서열번호: 122, 124, 126, 128, 130 및 132(클론 18), 또는 단지 1개 또는 2개의 아미노산이 다르거나, 적어도 또는 약 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%,

96%, 97%, 98%, 99%, 99.1%, 99.2%, 99.3%, 99.4%, 99.5%, 99.6%, 99.7%, 99.8%, 99.9% 또는 100% 서열 동일성을 갖는 이의 변이체 서열; 및 l) 서열번호: 134, 136, 138, 140, 142 및 144(클론 19) 또는 단지 1개 또는 2개의 아미노산이 상이하거나, 적어도 또는 약 85%의 서열 동일성을 갖는 이의 변이체 서열.

[0081] 일부 실시양태에서, 단클론성 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 하기로부터 선택되는 VH 및 VL 아미노산 서열을 포함한다: a) 서열번호: 146 및 148, 단지 1개 또는 2개의 아미노산이 다르거나, 적어도 또는 약 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.1%, 99.2%, 99.3%, 99.4%, 99.5%, 99.6%, 99.7%, 99.8%, 99.9% 또는 100% 서열 동일성을 갖는 이의 변이체 서열; b) 서열번호: 150 및 152, 또는 단지 1개 또는 2개의 아미노산이 다르거나, 적어도 또는 약 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.1%, 99.2%, 99.3%, 99.4%, 99.5%, 99.6%, 99.7%, 99.8%, 99.9% 또는 100% 서열 동일성을 갖는 이의 변이체 서열; c) 서열번호: 154 및 156, 또는 단지 1개 또는 2개의 아미노산이 다르거나, 적어도 또는 약 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.1%, 99.2%, 99.3%, 99.4%, 99.5%, 99.6%, 99.7%, 99.8%, 99.9% 또는 100% 서열 동일성을 갖는 이의 변이체 서열; d) 서열번호: 158 및 160, 또는 단지 1개 또는 2개의 아미노산이 다르거나, 적어도 또는 약 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.1%, 99.2%, 99.3%, 99.4%, 99.5%, 99.6%, 99.7%, 99.8%, 99.9% 또는 100% 서열 동일성을 갖는 이의 변이체 서열; e) 서열번호: 162 및 164, 또는 단지 1개 또는 2개의 아미노산이 다르거나, 적어도 또는 약 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.1%, 99.2%, 99.3%, 99.4%, 99.5%, 99.6%, 99.7%, 99.8%, 99.9% 또는 100% 서열 동일성을 갖는 이의 변이체 서열; f) 서열번호: 166 및 168, 또는 단지 1개 또는 2개의 아미노산이 다르거나, 적어도 또는 약 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.1%, 99.2%, 99.3%, 99.4%, 99.5%, 99.6%, 99.7%, 99.8%, 99.9% 또는 100% 서열 동일성을 갖는 이의 변이체 서열; g) 서열번호: 170 및 172, 또는 단지 1개 또는 2개의 아미노산이 다르거나, 적어도 또는 약 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.1%, 99.2%, 99.3%, 99.4%, 99.5%, 99.6%, 99.7%, 99.8%, 99.9% 또는 100% 서열 동일성을 갖는 이의 변이체 서열; h) 서열번호: 174 및 176, 또는 단지 1개 또는 2개의 아미노산이 다르거나, 적어도 또는 약 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.1%, 99.2%, 99.3%, 99.4%, 99.5%, 99.6%, 99.7%, 99.8%, 99.9% 또는 100% 서열 동일성을 갖는 이의 변이체 서열; i) 서열번호: 178 및 180, 또는 단지 1개 또는 2개의 아미노산이 다르거나, 적어도 또는 약 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.1%, 99.2%, 99.3%, 99.4%, 99.5%, 99.6%, 99.7%, 99.8%, 99.9% 또는 100% 서열 동일성을 갖는 이의 변이체 서열; j) 서열번호: 182 및 184, 또는 단지 1개 또는 2개의 아미노산이 다르거나, 적어도 또는 약 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.1%, 99.2%, 99.3%, 99.4%, 99.5%, 99.6%, 99.7%, 99.8%, 99.9% 또는 100% 서열 동일성을 갖는 이의 변이체

서열; k) 서열번호: 186 및 188, 또는 단지 1개 또는 2개의 아미노산이 다르거나, 적어도 또는 약 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.1%, 99.2%, 99.3%, 99.4%, 99.5%, 99.6%, 99.7%, 99.8%, 99.9% 또는 100% 서열 동일성을 갖는 이의 변이체 서열; 및 l) 서열번호: 190 및 192, 또는 단지 1개 또는 2개의 아미노산이 다르거나, 적어도 또는 약 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.1%, 99.2%, 99.3%, 99.4%, 99.5%, 99.6%, 99.7%, 99.8%, 99.9% 또는 100% 서열 동일성을 갖는 이의 변이체 서열.

[0082] 본원에 기재된 본 발명의 임의의 양태에 적용될 수 있는 다수의 실시양태가 추가로 제공된다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 단클론성 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 키메라, 인간화, 복합, 뮤린 또는 인간이다. 일부 실시양태에서, 단클론성 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 IgG, IgG1, IgG2, IgG2A, IgG2B, IgG3, IgG4, IgA, IgM, IgD 및 IgE 불변 도메인으로 이루어진 군으로부터 선택된 면역글로불린 중쇄 불변 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 단클론성 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 검출가능하게 표지되고/되거나, 이펙터 도메인을 포함하고/하거나, Fc 도메인을 포함하고/하거나, Fv, F(ab')2, Fab', dsFv, scFv, sc(Fv)2 단편, 디아바디, 2가, 다가, 및 2작용성 조작된 구성물로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 단클론성 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 하이브리도마로부터 얻을 수 있다. 일부 실시양태에서, 단클론성 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 강글리오시드(예를 들어, GD2 또는 GD3)에 특이적으로 결합한다. 일부 실시양태에서, 단클론성 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 강글리오시드(예를 들어, GD2 또는 GD3)의 탄수화물 부분에 특이적으로 결합한다.

[0083] 특정 양태에서, 본원에 기재된 단클론성 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 접합체가 제공된다. 일부 실시양태에서, 접합체는 검출가능한 모이어티(예를 들어, 형광단, 효소, 방사성동위원소 등)를 포함한다.

[0084] 특정 양태에서, 표 2에 나열된 면역글로불린 중쇄 및 경쇄 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 면역글로불린 중쇄 및/또는 경쇄가 제공된다.

[0085] 서열 동질성 / 상동성

[0086] 기능-보존적 변이체는 단백질 또는 효소의 주어진 아미노산 잔기가, 비제한적으로 아미노산을 유사한 특성(예를 들어, 극성, 수소 결합 포텐셜, 산성, 염기성, 소수성, 방향족 등)을 갖는 것으로 대체하는 것을 포함하여, 폴리펩티드의 전체적인 형태 및 기능을 변경하지 않고 변화되어 있는 것이다. 보존된 것으로 나타낸 것 이외의 아미노산은 단백질에서 다를 수 있어, 유사한 기능의 임의의 두 단백질 사이의 퍼센트 단백질 또는 아미노산 서열 유사성이 다를 수 있고, 클러스터 방법과 같은 정렬 체계(alignment scheme)에 따라 결정된 바와 같이, 예를 들어 70% 내지 99%일 수 있으며, 여기서 유사성은 MEGALIGN 알고리즘을 기반으로 한다. 기능-보존적 변이체는 또한 BLAST 또는 FASTA 알고리즘에 의해 결정된 바와 같이 적어도 60%, 바람직하게는 적어도 75%, 더욱 바람직하게는 적어도 85%, 더욱 더 바람직하게는 적어도 90%, 훨씬 더 바람직하게는 적어도 95%의 아미노산 동일성을 갖고, 비교되는 천연 또는 모 단백질과 동일하거나 실질적으로 유사한 특성 또는 기능을 갖는 폴리펩티드를 포함한다.

[0087] 두 서열 사이의 퍼센트 동일성은 두 서열의 최적 정렬을 위해 도입될 필요가 있는 갭의 수 및 각 갭의 길이를 고려하여, 서열에 의해 공유되는 동일한 위치의 개수의 함수(즉, % 동일성 = 동일한 위치의 # / 위치들의 전체 # x 100)이다. 두 서열 사이의 퍼센트 동일성의 결정 및 서열의 비교는 하기 비-제한적 실시예에 기재된 바와 같이, 수학적 알고리즘을 이용하여 달성될 수 있다.

[0088] NWS갭디엔에이(NWSgapdna)를 사용하는 GCG 소프트웨어 패키지(GCG 회사 웹사이트의 월드 와이드 웹에서 이용가능) 내의 GAP 프로그램을 사용하여 2개의 뉴클레오티드 서열 사이의 퍼센트 동일성이 결정될 수 있다. CMP 매트릭스 및 40, 50, 60, 70 또는 80의 갭 가중치 및 1, 2, 3, 4, 5 또는 6의 길이 가중치. PAM120 가중 잔기 테이블, 12의 갭 길이 페널티 및 4의 갭 페널티를 이용해, ALIGN 프로그램(버전 2.0)에 통합된 문헌 [E. Meyers and W. Miller(CABIOS, 4:11 17(1989))]의 알고리즘을 사용하여 2개의 뉴클레오티드 또는 아미노산 서열 사이의 퍼센트 동일성이 결정될 수 있다. 또한, 블로섬(Blosum) 62 매트릭스 또는 PAM250 매트릭스 및 16, 14, 12, 10, 8, 6 또는 4의 갭 가중치 및 1, 2, 3, 4, 5 또는 6의 길이 가중치를 이용하여, GCG 소프트웨어 패키지(GCG 회사 웹사이트의 월드 와이드 웹에서 이용가능) 내의 GAP 프로그램에 통합된 문헌 [Needleman and Wunsch(J. Mol.

Biol.(48):444 453(1970))]의 알고리즘을 사용하여 2개의 아미노산 서열 사이의 퍼센트 동일성이 결정될 수 있다.

[0089] 본 발명의 핵산 및 단백질 서열은 예를 들어 관련 서열을 식별하기 위해 공개 데이터베이스에 대한 검색을 수행하기 위한 "질의 서열"로서 추가로 사용될 수 있다. 이러한 검색은 문헌 [Altschul, *et al.*(1990) J. Mol. Biol. 215:403 10]의 NBLAST 및 XBLAST 프로그램(버전 2.0)을 사용하여 수행될 수 있다. BLAST 뉴클레오티드 검색을 NBLAST 프로그램, 스코어=100, 단어 길이=12로 수행하여 본 발명의 핵산 분자에 대해 상동인 뉴클레오티드 서열을 얻을 수 있다. BLAST 단백질 검색을 XBLAST 프로그램, 스코어=50, 단어 길이=3으로 수행하여 본 발명의 단백질 분자와 상동인 아미노산 서열을 얻을 수 있다. 비교 목적을 위한 갭 정렬을 얻기 위해, 문헌 [Altschul *et al.*, (1997) Nucleic Acids Res. 25(17):3389 3402]에 기재된 바와 같이 갭 처리(Gapped) BLAST가 활용될 수 있다. BLAST 및 갭 처리 BLAST 프로그램을 활용할 때, 각각의 프로그램(예를 들어, XBLAST 및 NBLAST)의 기본 매개변수가 사용될 수 있다(NCBI 웹 사이트의 월드 와이드 웹에서 이용가능).

[0090] 서열

[0091] 본원에 사용된 바와 같이, 코딩 영역은 아미노산 잔기로 번역되는 코돈을 포함하는 뉴클레오티드 서열의 영역을 지칭하는 반면, 비코딩 영역은 아미노산으로 번역되지 않는 뉴클레오티드 서열의 영역을 지칭한다(*예를 들어*, 5' 및 3' 비번역 영역).

[0092] [~에 대한] 상보 또는 상보성은 두 핵산 가닥의 영역 사이, 또는 동일한 핵산 가닥의 두 영역 사이의 서열 상보성의 넓은 개념을 지칭한다. 제1 핵산 영역의 아데닌 잔기는 잔기가 티민 또는 우라실인 경우 제1 영역과 역평행인 제2 핵산 영역의 잔기와 특정 수소 결합(염기 쌍 형성)을 형성할 수 있는 것으로 알려져 있다. 유사하게는, 제1 핵산 가닥의 시토신 잔기는 잔기가 구아닌인 경우 제1 가닥과 역평행인 제2 핵산 가닥의 잔기와 염기 쌍을 형성할 수 있는 것으로 알려져 있다. 핵산의 제1 영역은 두 영역이 역평행 방식으로 배열되었을 때, 제1 영역의 적어도 하나의 뉴클레오티드 잔기가 제2 영역의 잔기와 염기 쌍을 형성할 수 있는 경우, 동일하거나 상이한 핵산의 제2 영역에 대해 상보성이다. 일부 실시양태에서, 제1 영역은 제1 부분을 포함하고 제2 영역은 제2 부분을 포함하며, 이에 따라 제1 부분 및 제2 부분이 역평행 방식으로 배열될 때 적어도 또는 약 50%, 바람직하게는 적어도 또는 약 75%, 적어도 또는 약 90%, 또는 적어도 또는 약 95%의 제1 부분의 뉴클레오티드 잔기는 제2 부분의 뉴클레오티드 잔기와 염기 쌍을 형성할 수 있다. 다른 실시양태에서, 제1 부분의 모든 뉴클레오티드 잔기는 제2 부분의 뉴클레오티드 잔기와 염기 쌍을 형성할 수 있다.

[0093] 핵산은 또 다른 핵산 서열과 기능적 관계에 있을 때 "작동가능하게 연결"된다. 예를 들어, 프로모터 또는 인핸서는 서열의 전사에 영향을 미치는 경우 코딩 서열에 작동가능하게 연결된다. 전사 조절 서열과 관련하여, 작동가능하게 연결된다는 것은 연결되는 DNA 서열이 연속적이며, 필요한 경우 2개의 단백질 코딩 영역을 연결하도록 연속적이고 판독 프레임 내에 있음을 의미한다. 스위치 서열의 경우, 작동가능하게 연결된다는 것은 서열이 스위치 재조합에 영향을 미칠 수 있음을 나타낸다.

[0094] 유전자 코드(하기 참조)에 의해 정의된 바와 같이, 특정 단백질의 아미노산 서열 및 단백질을 코딩할 수 있는 뉴클레오티드 서열 사이에는 알려진 명확한 대응 관계가 있다. 마찬가지로, 유전자 코드에 의해 정의된 바와 같이, 특정 핵산의 뉴클레오티드 서열 및 해당 핵산에 의해 인코딩된 아미노산 서열 사이에는 알려진 명확한 대응 관계가 있다.

[0095] 유전자 코드

알라닌(Ala, A)	GCA, GCC, GCG, GCT
아르기닌(Arg, R)	AGA, ACG, CGA, CGC, CGG, CGT
아스파라긴(Asn, N)	AAC, AAT
아스파르트 산(Asp, D)	GAC, GAT
시스테인(Cys, C)	TGC, TGT
글루탐산(Glu, E)	GAA, GAG
글루타민(Gln, Q)	CAA, CAG
글리신(Gly, G)	GGA, GGC, GGG, GGT
히스티딘(His, H)	CAC, CAT
이소류신(Ile, I)	ATA, ATC, ATT
류신(Leu, L)	CTA, CTC, CTG, CTT, TTA, TTG
라이신(Lys, K)	AAA, AAG
메티오닌(Met, M)	ATG
페닐알라닌(Phe, F)	TTC, TTT
프롤린(Pro, P)	CCA, CCC, CCG, CCT
세린(Ser, S)	AGC, AGT, TCA, TCC, TCG, TCT
트레오닌(Thr, T)	ACA, ACC, ACG, ACT
트립토판(Trp, W)	TGG
티로신(Tyr, Y)	TAC, TAT
발린(Val, V)	GTA, GTC, GTG, GTT
종료 신호(end)	TAA, TAG, TGA

[0096]

[0097] 유전자 코드의 중요하고 잘 알려진 특징은 중복성(redundancy)이며, 이에 따라 단백질을 만드는 데 사용되는 대부분의 아미노산의 경우, 하나 초과의 코딩 뉴클레오티드 삼중자(nucleotide triplet)가 사용될 수 있다(상기 설명됨). 따라서, 다수의 상이한 뉴클레오티드 서열이 주어진 아미노산 서열을 코딩할 수 있다. 이러한 뉴클레오티드 서열은 (특정 유기체가 일부 서열을 다른 것들보다 더 효율적으로 번역할 수 있기는 하지만) 모든 유기체에서 동일한 아미노산 서열의 제조를 초래하기 때문에 기능적으로 동등하게 간주된다. 더욱이, 때때로, 푸린 또는 피리미딘의 메틸화된 변이체가 주어진 뉴클레오티드 서열에서 발견될 수 있다. 이러한 메틸화는 트리뉴클레오티드 코돈과 해당하는 아미노산 사이의 코딩 관계에 영향을 미치지 않는다.

[0098] 폴리펩티드의 아미노 서열에 변화를 주는데 있어서, 아미노산의 소수친수 지표(hydropathic index)가 고려될 수 있다. 단백질에 대한 상호작용적 생물학적 기능을 부여함에 있어서 소수친수 아미노산 지표의 중요성은 일반적으로 당업계에서 이해되고 있다. 아미노산의 상대적인 소수친수 특성이 생성 단백질의 2차 구조에 기여하는 것으로 받아들여지며, 이는 단백질과 다른 분자, 예를 들어 효소, 기질, 수용체, DNA, 항체, 항원 등과의 상호작용을 차례로 정의한다. 각각의 아미노산은 이들의 소수성 및 전하 특성에 기초한 소수친수 지표가 다음과 같이 할당되어 있다: 이소류신(+4.5); 발린(+4.2); 류신(+3.8); 페닐알라닌(+2.8); 시스테인/시스틴(+2.5); 메티오닌(+1.9); 알라닌(+1.8); 글리신(-0.4); 트레오닌(-0.7); 세린(-0.8); 트립토판(-0.9); 티로신(-1.3); 프롤린(-1.6); 히스티딘(-3.2); 글루타메이트(-3.5); 글루타민(-3.5); 아스파르테이트(<RTI 3.5); 아스파라긴(-3.5); 라이신(-3.9); 및 아르기닌(-4.5).

[0099] 특정 아미노산이 유사한 소수친수 지표 또는 점수를 갖는 다른 아미노산에 의해 치환될 수 있고, 여전히 유사한 생물학적 활성을 갖는 단백질을 생성할 수 있다는 것, 즉, 여전히 생물학적 기능적으로 동등한 단백질을 수득할 수 있다는 것은 당업계에 알려져 있다.

[0100] 따라서, 위에서 약술한 바와 같이, 아미노산 치환은 일반적으로 아미노산 측쇄 치환의 상대적인 유사성, 예를 들어 이들의 소수성, 친수성, 전하, 크기 등에 기초한다. 전술한 다양한 특성을 고려한 예시적인 치환은 당업자

에게 잘 알려져 있으며 다음을 포함한다: 아르기닌 및 라이신; 글루타메이트 및 아스파르테이트; 세린 및 트레오닌; 글루타민 및 아스파라긴; 및 발린, 류신 및 이소류신.

[0101] 전술한 관점에서, DNA 또는 RNA의 뉴클레오티드 서열은 DNA 또는 RNA를 아미노산 서열로 번역하기 위한 유전자 코드를 사용하여, 폴리펩티드 아미노산 서열을 유래시키기 위해 사용될 수 있다. 마찬가지로, 폴리펩티드 아미노산 서열의 경우, 폴리펩티드를 인코딩할 수 있는 해당하는 뉴클레오티드 서열은 유전자 코드(이는, 이의 중복성 때문에, 임의의 주어진 아미노산 서열에 대해 다중 핵산 서열을 생성할 것임)로부터 도출될 수 있다. 따라서, 본원에서 폴리펩티드를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열의 설명 및/또는 개시는 뉴클레오티드 서열에 의해 인코딩되는 아미노산 서열의 설명 및/또는 개시도 포함하는 것으로 간주되어야 한다. 유사하게는, 본원에서 폴리펩티드 아미노산 서열의 설명 및/또는 개시는 아미노산 서열을 인코딩할 수 있는 모든 가능한 뉴클레오티드 서열의 설명 및/또는 개시도 포함하는 것으로 간주되어야 한다.

[0102] **표 1: 항-강글리오시드 단클론성 항체의 CDR의 예시적인 서열**

클론 번호	결합:	CDR 번호	cDNA 서열	아미노산 서열
4 마우스 mAb	GD2/GD3	HC-CDR1	GGCTACACATTTACCAGGTACTGG (서열번호: 1)	GYTFTRYW (서열번호: 2)
		HC-CDR2	ATTTATCCTGGAAATAGTGATACT (서열번호: 3)	IYPGNSDT (서열번호: 4)
		HC-CDR3	GCAAGATCCGATGGTCCTATGGACTAC (서열번호: 5)	ARSDGPMDY (서열번호: 6)
		LC-CDR1	GAAAGTGTTGATAATTATGGCATCAGTTTT (서열번호: 7)	ESVDNYGISF (서열번호: 8)
		LC-CDR2	GCTGCATCC (서열번호: 9)	AAS (서열번호: 10)
		LC-CDR3	CAGCAAAGTAAGGAGGTTCCGTTCACG (서열번호: 11)	QQSKEVPFT (서열번호: 12)
6 마우스 IgG 카파	GD3	HC-CDR1	ACCTATGGAATGAGC (서열번호: 13)	TYGMS (서열번호: 14)
		HC-CDR2	TGGATAAACACATATACTGGAGTGCCAACATATGGTGATGACTTCAAGGGA (서열번호: 15)	WINTYTGVPTYGDDFKG (서열번호: 16)
		HC-CDR3	TGGTTACGCCACCATGCTATGGACTAC (서열번호: 17)	WLRHHAMDY (서열번호: 18)
		LC-CDR1	AAGGCCAGTGAGAATGTGGTTACTTATGTTTCC (서열번호: 19)	KASENVVTYVS (서열번호: 20)
		LC-CDR2	GGGGCATCCAACCGGTACACT (서열번호: 21)	GASNRYT (서열번호: 22)
		LC-CDR3	GGACAGGGTTACAGCTATCCGTACACG (서열번호: 23)	GQGYSYPYT (서열번호: 24)
7	GD2/GD3	HC-CDR1	GGATTCACTTTTAGTGACGCCTGG (서열번호: 25)	GFTFSDAW (서열번호: 26)

[0103]

[0104]

클론 번호	결합:	CDR 번호	cDNA 서열	아미노산 서열
마우스 mAb		HC-CDR 2	ATTAGAAACAAAGCTAATAATCATGCGACA (서열번호: 27)	IRNKANNHAT (서열번호: 28)
		HC-CDR 3	ACCAGGCGACATGATTCCTACTTTGACTAC (서열번호: 29)	TRRHDSYFDY (서열번호: 30)
		LC-CDR 1	CAGGATGTGGATACTGCT (서열번호: 31)	QDVDTA (서열번호: 32)
		LC-CDR 2	TGGGCATCC (서열번호: 33)	WAS (서열번호: 34)
		LC-CDR 3	CAGCAATATCGCAGCTATCCTCTCACG (서열번호: 35)	QQYRSYPLT (서열번호: 36)
8 마우스 mAb	GD2/GD3	HC-CDR 1	GGCTACACATTTACCAGTTACTGG (서열번호: 37)	GYTFTSYW (서열번호: 38)
		HC-CDR 2	ATTTATCCTGGAAAAAGTGGTACT (서열번호: 39)	IYPGKSGT (서열번호: 40)
		HC-CDR 3	ACAAGATCCGATGGTCCTATGGACTAC (서열번호: 41)	TRSDGPMDY (서열번호: 42)
		LC-CDR 1	GAGAGTGTTGATAATTATGACATTAGTTTT (서열번호: 43)	ESVDNYDISF (서열번호: 44)
		LC-CDR 2	GCTGCATCC (서열번호: 45)	AAS (서열번호: 46)
		LC-CDR 3	CAGCAAAGTAAGGAGGTTCCGTACACG (서열번호: 47)	QQSKEVPYT (서열번호: 48)
9 마우스 IgG 카파	GD2/GD3	HC-CDR 1	GACTACAACATGGAC (서열번호: 49)	DYNMD (서열번호: 50)
		HC-CDR 2	GATATTAATCCTAACAATGGTGGTACTATCTACAACCAGAAGTTCAAGGGC (서열번호: 51)	DINPNNGGTIYNQKFKG (서열번호: 52)
		HC-CDR 3	TCGGGGATCTACTATGATTACGCCTGGTTTCCTTAC (서열번호: 53)	SGIYYDYAWFPY (서열번호: 54)

[0105]

클론 번호	결합:	CDR 번호	cDNA 서열	아미노산 서열
		LC-CDR 1	AGTGCAAGTCAGGGCATTAGCAATTATTTAAAC (서열번호: 55)	SASQGISNYLN (서열번호: 56)
		LC-CDR 2	TACACATCAAGTTTACACTCA (서열번호: 57)	YTSSLHS (서열번호: 58)
		LC-CDR 3	CAGCAGTATAGTAAGCTTCCTCCTACG (서열번호: 59)	QQYSKLPPT (서열번호: 60)
10 마우스 IgM 카파	GD2/GD3	HC-CDR 1	GACTACAACATGGAC (서열번호: 61)	DYNMD (서열번호: 62)
		HC-CDR 2	GATATTAATCCTAACAATGGTGGTACTATCTACAACCAGAAGTTCAAGGGC (서열번호: 63)	DINPNNGGTIYNQKFKG (서열번호: 64)
		HC-CDR 3	TCGGGGATCTACTATGATTACGCCTGGTTTCCTTAC (서열번호: 65)	SGIYYDYAWFPY (서열번호: 66)
		LC-CDR 1	AGTGCAAGTCAGGGCATTAGCAATTATTTAAAC (서열번호: 67)	SASQGISNYLN (서열번호: 68)
		LC-CDR 2	TACACATCAAGTTTACACTCA (서열번호: 69)	YTSSLHS (서열번호: 70)
		LC-CDR 3	CAGCAGTATAGTAAGCTTCCTCCTACG (서열번호: 71)	QQYSKLPPT (서열번호: 72)
13 마우스 IgM 카파	GD2/GD3	HC-CDR 1	GACTATGAAATGCAC (서열번호: 73)	DYEMH (서열번호: 74)
		HC-CDR 2	GCTATTGATCCTGAAACTGGTGGTACTGCCTACAATCAGAAGTTCAAGGGC (서열번호: 75)	AIDPETGGTAYNQKFKG (서열번호: 76)
		HC-CDR 3	AGCTGGGACGGAGACTAC (서열번호: 77)	SWDGDY (서열번호: 78)
		LC-CDR 1	AAGGCCAGTCAGAATGTGGGTACTAATGTAGCC (서열번호: 79)	KASQNVGTNVA (서열번호: 80)

[0106]

클론 번호	결합:	CDR 번호	cDNA 서열	아미노산 서열
		LC-CDR 2	TCGGCATCCTACCGGTACAGT (서열번호: 81)	SASYRYS (서열번호: 82)
		LC-CDR 3	CAGCAATATAACAGCTATCCATTCACG (서열번호: 83)	QQYNSYPFT (서열번호: 84)
14 마우스 IgM 카파	GD2/GD3	HC-CDR 1	GACTACAACATGGAC (서열번호: 85)	DYNMD (서열번호: 86)
		HC-CDR 2	GATATTAATCCTAACAATGGTGGTACTATCTACAACCAGAAGTTCAAGGGC (서열번호: 87)	DINPNNGGTIYNQKFKG (서열번호: 88)
		HC-CDR 3	TCGGGGATCTACTATGATTACGCCTGGTTTCCTTAC (서열번호: 89)	SGIYYDYAWFPY (서열번호: 90)
		LC-CDR 1	AGTGCAAGTCAGGGCATTAGCAATTATTTAAAC (서열번호: 91)	SASQGISNYLN (서열번호: 92)
		LC-CDR 2	TACACATCAAGTTTACACTCA (서열번호: 93)	YTSSLHS (서열번호: 94)
		LC-CDR 3	CAGCAGTATAGTAAGCTTCCTCCTACG (서열번호: 95)	QQYSKLPPT (서열번호: 96)
15 마우스 mAb	GD2/GD3	HC-CDR 1	GGATTCACTTTTAGTGACGCCTGG (서열번호: 97)	GFTFSDAW (서열번호: 98)
		HC-CDR 2	ATTAGAAACAAAGCTAATAATCATGCGACA (서열번호: 99)	IRNKANNHAT (서열번호: 100)
		HC-CDR 3	ACCGGGCGACATGATTCCTACTTTGACTAC (서열번호: 101)	TGRHDSYFDY (서열번호: 102)
		LC-CDR 1	CAGGGCATTAGCAATTAT (서열번호: 103)	QGISNY (서열번호: 104)
		LC-CDR 2	TACACATCA (서열번호: 105)	YTS (서열번호: 106)
		LC-CDR 3	CAGCAGTATAGTAAGCTTCCTCCTACG (서열번호: 107)	QQYSKLPPT (서열번호: 108)

[0107]

클론 번호	결합:	CDR 번호	cDNA 서열	아미노산 서열
17 마우스 mAb	GD2/GD3	HC-CDR1	GGCTACACCTTCACCAGCTACTGG (서열번호: 109)	GYTFTSYW (서열번호: 110)
		HC-CDR2	ATTTATCCTGGTAGTGGTAGTACT (서열번호: 111)	IYPGSGST (서열번호: 112)
		HC-CDR3	GCAAGCCACCGATTTGATTACTACGGTAGTAGCTACTATGCTATGGACTAC (서열번호: 113)	ASHRFDYYGSSYYAMDY (서열번호: 114)
		LC-CDR1	CAGGACATTTGCAATTAT (서열번호: 115)	QDICNY (서열번호: 116)
		LC-CDR2	TACACATCA (서열번호: 117)	YTS (서열번호: 118)
		LC-CDR3	CAACAGGGTAATACGCTTCCGCTCACG (서열번호: 119)	QQGNTLPLT (서열번호: 120)
18 마우스 mAb	GD2/GD3	HC-CDR1	GGATACACGTTCACTGACTTCCAC (서열번호: 121)	GYTFTDFH (서열번호: 122)
		HC-CDR2	ATTAATCCTAACAATGGTGGTACT (서열번호: 123)	INPNNGGT (서열번호: 124)
		HC-CDR3	GTAAGAGAAATCTACTTTGGCTTTGACTAC (서열번호: 125)	VREIYFGFDY (서열번호: 126)
		LC-CDR1	CAGGACATTTGCAATTAT (서열번호: 127)	QDICNY (서열번호: 128)
		LC-CDR2	TACACATCA (서열번호: 129)	YTS (서열번호: 130)
		LC-CDR3	CAACAGGGTAATACGCTTCCGCTCACG (서열번호: 131)	QQGNTLPLT (서열번호: 132)
19 마우스	GD2	HC-CDR1	GGATACACATTCACTAAATACACC (서열번호: 133)	GYTFTKYT (서열번호: 134)
		HC-CDR2	ATTAATCCTAACAATGGTGGTACT (서열번호: 135)	INPNNGGT (서열번호: 136)

[0108]

클론 번호	결합:	CDR 번호	cDNA 서열	아미노산 서열
mAb		HC-CDR3	ACAAGCAAGTCCTTTGACTAC (서열번호: 137)	TSKSFDY (서열번호: 138)
		LC-CDR1	TCAAGTGTAAGTAAC (서열번호: 139)	SSVSN (서열번호: 140)
		LC-CDR2	AGCACATCC (서열번호: 141)	STS (서열번호: 142)
		LC-CDR3	CAACAAAGGAGTGGTTACCCATTCACG (서열번호: 143)	QQRSGYPFT (서열번호: 144)

[0109] 표 2: 항-강글리오시드 단클론성 항체의 가변 영역 및 선도의 예시적인 서열

[0110] 서열번호: 145클론 4 중쇄 가변(vH) cDNA 서열

[0111]
```
CAAGTACAGCTGGAGGAGTCTGGGACTGTGCTGGCAAGGCCTGGGGCTTCAGTGAAGATGTCCTGCAAGACTT
CTGGCTACACATTTACCAGGTACTGGATGCACTGGGTAAAACAGAGGCCTGGACAGGGTCTGGAATGGATAGG
GGCTATTTATCCTGGAAATAGTGATACTACCTACAACCAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCAAACTGACTGCAGTC
ACATCCGCCACCAATGCCTACATGGAAGTAAGCAGCCTGACAAATGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTGCAA
GATCCGATGGTCCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA
```

[0112] 서열번호: 146클론 4 중쇄 가변(vH) 아미노산 서열

[0113]
```
QVQLEESGTVLARPGASVKMSCKTSGYTFTRYWMHWVKQRPGQGLEWIGAIYPGNSDTTYNQKFKGKAKLTAV
TSATNAYMEVSSLTNEDSAVYYCARSDGPMDYWGQGTSVTVSS
```

[0114] 서열번호: 147클론 4 경쇄(카파) 가변(vL) cDNA 서열

[0115]
GACATTGTACTGACCCAATCTCCAGCTTCTTTGGCTGTGTCTCTAGGGCAGAGGGCCACCATTTCCTGCAGAG
CCAGCGAAAGTGTTGATAATTATGGCATCAGTTTTATGAACTGGTTCCAACAGAAACCAGGACAGCCACCCAA

[0116]
ACTCCTCATCTATGCTGCATCCAATCAAGGATCCGGGGTCCCTGCCAGGTTTAGTGGCAGTGGGTCTGGGACA
GACTTCAGTCTCAACATCCATCCTATGGAGGAGGATGATACTGCAATGTATTTCTGTCAGCAAAGTAAGGAGG
TTCCGTTCACGTTCGGAGGGGGGACCAAGCTGGA

[0117] 서열번호: 148클론 4 경쇄(카파) 가변(vL) 아미노산 서열

[0118]
DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVDNYGISFMNWFQQKPGQPPKLLIYAASNQGSGVPARFSGSGSGT
DFSLNIHPMEEDDTAMYFCQQSKEVPFTFGGGTKL

[0119] 서열번호: 149클론 6 중쇄 가변(vH) cDNA 서열

[0120]
CAGATCCAGTTGGTACAATCTGGACCTGAGCTGAAGAAGCCTGGAGAGACAGTCAAGATCTCCTGCAAGGCTT
CTGGATATTCCTTCACAACCTATGGAATGAGCTGGGTGAAACAGGCTCCAGGAAAGGGTTTAAAGTGGATGGG
CTGGATAAACACATATACTGGAGTGCCAACATATGGTGATGACTTCAAGGGACGGTTTGCCTTCTCTTTGGAA
ACCTCTACCAGCACTGCCTATTTGCAGATCAACAACCTCAAAAATGACGACACGGCTTCATATTTCTGTGCAA
GATGGTTACGCCACCATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA

[0121] 서열번호: 150클론 6 중쇄 가변(vH) 아미노산 서열

[0122]
QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYSFTTYGMSWVKQAPGKGLKWM
GWINTYTGVPTYGDDFKGRFAFSLETSTSTAYLQINNLKNDDTASYFCARWLRHHAMDYWGQGTSVTVSS

[0123] 서열번호: 151클론 6 경쇄(카파) 가변(vL) cDNA 서열

[0124]
AACATTGTAATGACCCAATCTCCCAAATCCATGTCCATGTCAGTAGGAGAGAGGGTCACCTTGACCTGCAAGG
CCAGTGAGAATGTGGTTACTTATGTTTCCTGGTATCAACAGAAACCAGAGCAGTCTCCTAAACTGCTGATATA
CGGGGCATCCAACCGGTACACTGGGGTCCCCGATCGCTTCACAGGCAGTGGATCTGCAACAGATTTCACTCTG
ACCATCAGCAGTGTGCAGGCTGAAGACCTTGCAGATTATCACTGTGGACAGGGTTACAGCTATCCGTACACGT
TCGGAGGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAA

[0125] 서열번호: 152클론 6 경쇄(카파) 가변(vL) 아미노산 서열

[0126]
NIVMTQSPKSMSMSVGERVTLTCKASENVVTYVSWYQQKPEQSPKLLIYGASNRYTGVPDRFTGSGSATDFTL
TISSVQAEDLADYHCGQGYSYPYTFGGGTKLEIK

[0127] 서열번호: 153클론 7 중쇄 가변(vH) cDNA 서열

[0128]
CAGGTTCAGCTGGAGCAGTCTGGAGGAGCCTTGGTGCAACCTGGAGGATCCATGAAACTCTCTTGTGCTGCCT
CTGGATTCACTTTTAGTGACGCCTGGATGGACTGGGTCCGCCAGTCTCCAGAAAAGGGGCTTGAGTGGGTTGC
TGAAATTAGAAACAAAGCTAATAATCATGCGACATACTATGCTGAGTCTGTGAAAGGGAGGTTCACCATCTCA
AGAGATGATTCCAAAAATAGTGTCTACCTGCAAATGAACAACTTAAGAGCTGAAGACACTGGCATTTATTATT
GTACCAGGCGACATGATTCCTACTTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA

[0129] 서열번호: 154클론 7 중쇄 가변(vH) 아미노산 서열

[0130]
QVQLEQSGGALVQPGGSMKLSCAASGFTFSDAWMDWVRQSPEKGLEWVAEIRNKANNHATYYAESVKGRFTIS
RDDSKNSVYLQMNNLRAEDTGIYYCTRRHDSYFDYWGQGTTLTVSS

[0131] 서열번호: 155클론 7 경쇄(카파) 가변(vL) cDNA 서열

[0132]
GACATTGTGATGACCCAGTCTCACAAATTCATGTCCACATCAGTAGGAGACAGGGTCAGCATCACCTACAAGG
CCAGTCAGGATGTGGATACTGCTGTAGCCTGGTATCAACAGAAACCAGGGCAATCTCCTAAACTACTGATTTA
CTGGGCATCCACCCGGCACACTGGAGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTC
ACCATTAACAATGTGCAGTCTGAAGACTTGGCAGATTATTTCTGTCAGCAATATCGCAGCTATCCTCTCACGT
TCGGTGCTGGGACCAAGCTGGAACTGAAACGG

[0133] 서열번호: 156클론 7 경쇄(카파) 가변(vL) 아미노산 서열

[0134]
DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITYKASQDVDTAVAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRHTGVPDRFTGSGSGTDFTL
TINNVQSEDLADYFCQQYRSYPLTFGAGTKLELKR

[0135] 서열번호: 157클론 8 중쇄 가변(vH) cDNA 서열

GAAGTAAAGCTGCAGGAGTCTGGGACTGAGCTGGCAAGGCCTGGGGCTTCAGTGAAGATGTCCTGCAAGACTT
CTGGCTACACATTTACCAGTTACTGGATGCACTGGGTAAAACAGAGGCCTGGACAGGGTCTGGAATGGATAGG
GGCTATTTATCCTGGAAAAAGTGGTACTACCTACAACCAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCAAACTGACTGCAGTC
ACATCCGCCAGCACTGCCTACATGGAACTCAGCAGCCTGACAAATGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTACAA
[0136] GATCCGATGGTCCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA

[0137] 서열번호: 158클론 8 중쇄 가변(vH) 아미노산 서열

EVKLQESGTELARPGASVKMSCKTSGYTFTSYWMHWVKQRPGQGLEWIGAIYPGKSGTTYNQKFKGKAKLTAV
[0138] TSASTAYMELSSLTNEDSAVYYCTRSDGPMDYWGQGTSVTVSS

[0139] 서열번호: 159클론 8 경쇄(카파) 가변(vL) cDNA 서열

GACATTGTGCTGACCCAATCTCCAGCTTCTTTGGCTGTGTCTCTAGGGCAGAGGGCCACCATCTCCTGCAGAG
CCAGCGAGAGTGTTGATAATTATGACATTAGTTTTATGAACTGGTTCCAACAGAAACCAGGACAGCCACCCAA
ACTCCTCATCTATGCTGCATCCAACCAAGGATCCGGGGTCCCTGCCAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACA
GACTTCAGTCTCAACATCCATCCTATGGAGGAGGATGATACTGCAATGTATTTCTGTCAGCAAAGTAAGGAGG
[0140] TTCCGTACACGTTCGGAGGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAACGG

[0141] 서열번호: 160클론 8 경쇄(카파) 가변(vL) 아미노산 서열

DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVDNYDISFMNWFQQKPGQPPKLLIYAASNQGSGVPARFSGSGSGT
[0142] DFSLNIHPMEEDDTAMYFCQQSKEVPYTFGGGTKLEIKR

[0143] 서열번호: 161클론 9 중쇄 가변(vH) cDNA 서열

GAGGTCCAGCTGCAACAGTCTGGACCTGAGCTGGTGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGATACCCTGCAAGGCTT
CTGGATACACATTCACTGACTACAACATGGACTGGGTGAAACAGAGCCATGGAAAGAGCCTTGAGTGGATTGG
AGATATTAATCCTAACAATGGTGGTACTATCTACAACCAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACATTGACTGTAGAC
AAGTCCTCCAGCACAGCCTACATGGAGCTCCGCAGCCTGACATCTGAGGACACTGCAGTCTATTACTGTGCAA
[0144] GATCGGGGATCTACTATGATTACGCCTGGTTTCCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA

[0145] 서열번호: 162클론 9 중쇄 가변(vH) 아미노산 서열

EVQLQQSGPELVKPGASVKIPCKASGYTFTDYNMDWVKQSHGKSLEWIGDINPNNGGTIYNQKFKGKATLTVD
[0146] KSSSTAYMELRSLTSEDTAVYYCARSGIYYDYAWFPYWGQGTLVTVSA

[0147] 서열번호: 163클론 9 경쇄(카파) 가변(vL) cDNA 서열

GATATCCAGATGACACAGACTACATCCTCCCTGTCTGCCTCTCTGGGAGACAGAGTCACCATCAGTTGCAGTG
CAAGTCAGGGCATTAGCAATTATTTAAACTGGTATCAGCAGAAACCAGATGGAACTGTTAAACTCCTGATCTA
TTACACATCAAGTTTACACTCAGGAGTCCCATCAAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGATTATTCTCTC
ACCATCAGCAACCTGGAACCTGAAGATATTGCCACTTACTATTGTCAGCAGTATAGTAAGCTTCCTCCTACGT
[0148] TCGGTGCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAA

[0149] 서열번호: 164클론 9 경쇄(카파) 가변(vL) 아미노산 서열

DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCSASQGISNYLNWYQQKPDGTVKLLIYYTSSLHSGVPSRFSGSGSGTDYSL
[0150] TISNLEPEDIATYYCQQYSKLPPTFGAGTKLELK

[0151] 서열번호: 165클론 10 중쇄 가변(vH) cDNA 서열

GAGGTCCAGCTGCAACAGTCTGGACCTGAGCTGGTGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGATACCCTGCAAGGCTT
CTGGATACACATTCACTGACTACAACATGGACTGGGTGAAACAGAGCCATGGAAAGAGCCTTGAGTGGATTGG
AGATATTAATCCTAACAATGGTGGTACTATCTACAACCAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACATTGACTGTAGAC
AAGTCCTCCAGCACAGCCTACATGGAGCTCCGCAGCCTGACATCTGAGGACACTGCAGTCTATTACTGTGCAA
[0152] GATCGGGGATCTACTATGATTACGCCTGGTTTCCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCAG

[0153] 서열번호: 166클론 10 중쇄 가변(vH) 아미노산 서열

EVQLQQSGPELVKPGASVKIPCKASGYTFTDYNMDWVKQSHGKSLEWIGDINPNNGGTIYNQKFKGKATLTVD
[0154] KSSSTAYMELRSLTSEDTAVYYCARSGIYYDYAWFPYWGQGTLVTVSA

[0155] 서열번호: 167클론 10 경쇄(카파) 가변(vL) cDNA 서열

GATATCCAGATGACACAGACTACATCCTCCCTGTCTGCCTCTCTGGGAGACAGAGTCACCATCAGTTGCAGTG
CAAGTCAGGGCATTAGCAATTATTTAAACTGGTATCAGCAGAAACCAGATGGAACTGTTAAACTCCTGATCTA
TTACACATCAAGTTTACACTCAGGAGTCCCATCAAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGATTATTCTCTC
ACCATCAGCAACCTGGAACCTGAAGATATTGCCACTTACTATTGTCAGCAGTATAGTAAGCTTCCTCCTACGT
[0156] TCGGTGCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAAC

[0157] 서열번호: 168클론 10 경쇄(카파) 가변(vL) 아미노산 서열

[0158]
DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCSASQGISNYLNWYQQKPDGTVKLLIYYTSSLHSGVPSRFSGSGSGTDYSL
TISNLEPEDIATYYCQQYSKLPPTFGAGTKLELK

[0159] 서열번호: 169클론 13 중쇄 가변(vH) cDNA 서열

[0160]
CAGGTTCAACTGCAGCAGTCTGGGGCTGAGCTGGTGAGGCCTGGGGCTTCAGTGACGCTGTCCTGCAAGGCTT
CGGGCTACACATTTACTGACTATGAAATGCACTGGGTGAAGCAGACACCTGTGCATGGCCTGGAATGGATTGG
AGCTATTGATCCTGAAACTGGTGGTACTGCCTACAATCAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCATACTGACTGCAGAC
AAATCCTCCAGCACAGCCTACATGGAGCTCCGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCCGTCTATTACTGTACAA
GAAGCTGGGACGGAGACTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA

[0161] 서열번호: 170클론 13 중쇄 가변(vH) 아미노산 서열

[0162]
QVQLQQSGAELVRPGASVTLSCKASGYTFTDYEMHWVKQTPVHGLEWIGAIDPETGGTAYNQKFKGKAILTAD
KSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCTRSWDGDYWGQGTTLTVSS

[0163] 서열번호: 171클론 13 경쇄(카파) 가변(vL) cDNA 서열

[0164]
GACATTGTGATGACCCAGTCTCAAAAATTCATGTCCACATCAGTAGGAGACAGGGTCAGCGTCACCTGCAAGG
CCAGTCAGAATGTGGGTACTAATGTAGCCTGGTATCAACAGAAACCAGGGCAATCTCCTAAAGCACTGATTTA
CTCGGCATCCTACCGGTACAGTGGAGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTC
ACCATCAGCAATGTGCAGTCTGAAGACTTGGCAGAGTATTTCTGTCAGCAATATAACAGCTATCCATTCACGT
TCGGCTCGGGGACAAAGTTGGAAATAAAA

[0165] 서열번호: 172클론 13 경쇄(카파) 가변(vL) 아미노산 서열

[0166]
DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTNVAWYQQKPGQSPKALIYSASYRYSGVPDRFTGSGSGTDFTL
TISNVQSEDLAEYFCQQYNSYPFTFGSGTKLEIK

[0167] 서열번호: 173클론 14 중쇄 가변(vH) cDNA 서열

[0168]
GAGGTCCAGCTGCAACAGTCTGGACCTGAGCTGGTGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGATACCCTGCAAGGCTT
CTGGATACACATTCACTGACTACAACATGGACTGGGTGAAACAGAGCCATGGAAAGAGCCTTGAGTGGATTGG
AGATATTAATCCTAACAATGGTGGTACTATCTACAACCAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACATTGACTGTAGAC
AAGTCCTCCAGCACAGCCTACATGGAGCTCCGCAGCCTGACATCTGAGGACACTGCAGTCTATTACTGTGCAA
GATCGGGGATCTACTATGATTACGCCTGGTTTCCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCAG

[0169] 서열번호: 174클론 14 중쇄 가변(vH) 아미노산 서열

[0170]
EVQLQQSGPELVKPGASVKIPCKASGYTFTDYNMDWVKQSHGKSLEWIGDINPNNGGTIYNQKFKGKATLTVD
KSSSTAYMELRSLTSEDTAVYYCARSGIYYDYAWFPYWGQGTLVTVSA

[0171] 서열번호: 175클론 14 경쇄(카파) 가변(vL) cDNA 서열

[0172]
GATATCCAGATGACACAGACTACATCCTCCCTGTCTGCCTCTCTGGGAGACAGAGTCACCATCAGTTGCAGTG
CAAGTCAGGGCATTAGCAATTATTTAAACTGGTATCAGCAGAAACCAGATGGAACTGTTAAACTCCTGATCTA
TTACACATCAAGTTTACACTCAGGAGTCCCATCAAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGATTATTCTCTC
ACCATCAGCAACCTGGAACCTGAAGATATTGCCACTTACTATTGTCAGCAGTATAGTAAGCTTCCTCCTACGT
TCGGTGCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAAC

[0173] 서열번호: 176클론 14 경쇄(카파) 가변(vL) 아미노산 서열

[0174]
DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCSASQGISNYLNWYQQKPDGTVKLLIYYTSSLHSGVPSRFSGSGSGTDYSL
TISNLEPEDIATYYCQQYSKLPPTFGAGTKLELK

[0175] 서열번호: 177클론 15 중쇄 가변(vH) cDNA 서열

[0176]
CAAGTTCAGCTGCAGGAGTCTGGAGGAGCCTTGGTGCAACCTGGAGGATCCATGAAACTCTCTTGTGCTGCCT
CTGGATTCACTTTTAGTGACGCCTGGATGGACTGGGTCCGCCAGTCTCCAGAAAAGGGGCTTGAGTGGGTTGC
TGAAATTAGAAACAAAGCTAATAATCATGCGACATACTATGCTGAGTCTGTGAAAGGGAGGTTCACCATCTCA
AGAGATGATTCCAAAAATAGTGTCTACCTGCAAATGAACAACTTAAGAGCTGAGGACACTGGCATTTATTACT
GTACCGGGGCGACATGATTCCTACTTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA

[0177] 서열번호: 178클론 15 중쇄 가변(vH) 아미노산 서열

[0178]
QVQLQESGGALVQPGGSMKLSCAASGFTFSDAWMDWVRQSPEKGLEWVAEIRNKANNHATYYAESVKGRFTIS
RDDSKNSVYLQMNNLRAEDTGIYYCTGRHDSYFDYWGQGTTLTVSS

[0179] 서열번호: 179클론 15 경쇄(카파) 가변(vL) cDNA 서열

GATATCCAGATGACACAGACTACATCCTCCCTGTCTGCCTCTCTGGGAGACAGAGTCACCATCAGTTGCAGTG
CAAGTCAGGGCATTAGCAATTATTTAAACTGGTATCAGCAGAAACCAGATGGAACTGTTAAACTCCTGATCTA
TTACACATCAAGTTTACACTCAGGAGTCCCATCAAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGATTATTCTCTC
ACCATCAGCAACCTGGAACCTGAAGATATTGCCACTTACTATTGTCAGCAGTATAGTAAGCTTCCTCCTACGT
[0180] TCGGTGCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAACGG

[0181] 서열번호: 180클론 15 경쇄(카파) 가변(vL) 아미노산 서열

DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCSASQGISNYLNWYQQKPDGTVKLLIYYTSSLHSGVPSRFSGSGSGTDYSL
[0182] TISNLEPEDIATYYCQQYSKLPPTFGAGTKLELKR

[0183] 서열번호: 181클론 17 중쇄 가변(vH) cDNA 서열

GAGGTCCAGCTGGAGGAGTCTGGGGCTGAGCTTGTGAAGCCTGGGGCTTCGGTGAAGATGTCCTGTAAGGCTT
CTGGCTACACCTTCACCAGCTACTGGATAACCTGGGTGAAGCAGAGGCCTGGACAAGGCCTTGAGTGGATTGG
AGATATTTATCCTGGTAGTGGTAGTACTAACTACAATGAGAAGTTCAAGAGCAAGGCCACACTGACTGTAGAC
ACATCCTCCAGCACAACCTACATGCAGCTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTGCAA
GCCACCGATTTGATTACTACGGTAGTAGCTACTATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGT
[0184] CTCCTCA

[0185] 서열번호: 182클론 17 중쇄 가변(vH) 아미노산 서열

EVQLEESGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYWITWVKQRPGQGLEWIGDIYPGSGSTNYNEKFKSKATLTVD
[0186] TSSSTTYMQLSSLTSEDSAVYYCASHRFDYYGSSYYAMDYWGQGTSVTVSS

[0187] 서열번호: 183클론 17 경쇄(카파) 가변(vL) cDNA 서열

GATATCCAGATGACACAGACTACATCCTCCCTGTCTGCCTCTCTGGGAGACAGAGTCACCATCAGTTGCAGGG
CAAGTCAGGACATTTGCAATTATTTAAACTGGTATCAGCAGAAACCAGATGGACCTTTTAAACTCCTGATCTT
CTACACATCAAGATTACACTCAGGAGTCCCATCAAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGAACAGATTATTCTCTC
ACCATTAGCAACCTGGAGCAAGAAGATATTGCCACTTACTTTTGCCAACAGGGTAATACGCTTCCGCTCACGT
[0188] TCGGTGCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAACGG

[0189] 서열번호: 184클론 17 경쇄(카파) 가변(vL) 아미노산 서열

DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDICNYLNWYQQKPDGPFKLLIFYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSL
[0190] TISNLEQEDIATYFCQQGNTLPLTFGAGTKLELKR

[0191] 서열번호: 185클론 18 중쇄 가변(vH) cDNA 서열

GAAGTACAGCTGGAGGAGTCTGGACCTGAGCTGGTGAAGCCTGGGACTTCAGTGAAGATATCCTGTAAGGCTT
CTGGATACACGTTCACTGACTTCCACATTAACTGGGTGAAACAGAGCCATGGAAAGAACCTTGAGTGGATTGG
AGATATTAATCCTAACAATGGTGGTACTAACTACAACCAGAAATTCAAGGGCAAGGCCACATTGATTGTTGAC
AAGTCTTCCAGCGCAGCCTACATGGAGCTCCGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCAGTCTATTATTGTGTAA
[0192] GAGAAATCTACTTTGGCTTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA

[0193] 서열번호: 186클론 18 중쇄 가변(vH) 아미노산 서열

EVQLEESGPELVKPGTSVKISCKASGYTFTDFHINWVKQSHGKNLEWIGDINPNNGGTNYNQKFKGKATLIVD
[0194] KSSSAAYMELRSLTSEDSAVYYCVREIYFGFDYWGQGTTLTVSS

[0195] 서열번호: 187클론 18 경쇄(카파) 가변(vL) cDNA 서열

GATATCCAGATGACACAGACTACATCCTCCCTGTCTGCCTCTCTGGGAGACAGAGTCACCATCAGTTGCAGGG
CAAGTCAGGACATTTGCAATTATTTAAACTGGTATCAGCAGAAACCAGATGGACCTTTTAAACTCCTGATCTT
CTACACATCAAGATTACACTCAGGAGTCCCATCAAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGAACAGATTATTCTCTC
ACCATTAGCAACCTGGAGCAAGAAGATATTGCCACTTACTTTTGCCAACAGGGTAATACGCTTCCGCTCACGT
[0196] TCGGTGCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAACGG

[0197] 서열번호: 188클론 18 경쇄(카파) 가변(vL) 아미노산 서열

DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDICNYLNWYQQKPDGPFKLLIFYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSL
[0198] TISNLEQEDIATYFCQQGNTLPLTFGAGTKLELKR

[0199] 서열번호: 189클론 19 중쇄 가변(vH) cDNA 서열

GAAGTGAAGCTGGAGGAGTCTGGACCTGAGCTGGTGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGATATCCTGCAAGACTT
CTGGATACACATTCACTAAATACACCATGCACTGGGTGAAGCAGAGCCATGGAAAGAGCCTTGAGTGGATTGG
AGATATTAATCCTAACAATGGTGGTACTAACTACAACCAGAAGTTCAAGGGCACGGCCACATTGACTGTACAC
AAGTCCTCCACCACAGCCTACATGGAGCTCCGCAGCCTGACATCTGAGGATTCTGCAGTCTATTACTGTACAA
[0200] GCAAGTCCTTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA

[0201] 서열번호: 190클론 19 중쇄 가변(vH) 아미노산 서열

EVKLEESGPELVKPGASVKISCKTSGYTFTKYTMHWVKQSHGKSLEWIGDINPNNGGTNYNQKFKGTATLTVH
[0202] KSSTTAYMELRSLTSEDSAVYYCTSKSFDYWGQGTTLTVSS

[0203] 서열번호: 191클론 19 경쇄(카파) 가변(vL) cDNA 서열

CAAATTGTTCTCACCCAGTCTCCAGCAATCATGTCTGCATCTCCAGGGGAGAAGGTCACCATAACCTGCAGTG
CCAGCTCAAGTGTAAGTAACATACACTGGTTCCAGCAGAAGCCAGGCACTTTTCCCAAACTCTGGATTTATAG
CACATCCACCCTGGCTTCTGGAGTCCCTGGTCGCTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACCTCTTACTCTCTCACA
ATCAGCCGAATGGGGGCTGAAGATGCTGCCACTTATTACTGCCAACAAAGGAGTGGTTACCCATTCACGTTCG
[0204] GCTCGGGGACAAAGTTGGAAATAAAACGG

[0205] 서열번호: 192클론 19 경쇄(카파) 가변(vL) 아미노산 서열

QIVLTQSPAIMSASPGEKVTITCSASSSVSNIHWFQQKPGTFPKLWIY
[0206] STSTLASGVPGRFSGSGSGTSYSLTISRMGAEDAATYYCQQRSGYPFTFGSGTKLEIKR

[0207] * 표 1 및 2에는 RNA 핵산 분자(*예를 들어*, 우리딘으로 대체된 티미딘), 인코딩된 단백질의 오르토로그를 인코딩하는 핵산 분자뿐만 아니라 표 1 및 2에 나열된 임의의 서열번호의 핵산 서열 또는 이의 일부를 갖는 이들의 전장에 걸쳐서 적어도 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.5% 또는 그 초과의 동일성을 갖는 핵산 서열을 포함하는 DNA 또는 RNA 핵산 서열이 포함된다. 이러한 핵산 분자는 본원에서 추가로 기재되는 바와 같이 전장 핵산의 기능을 가질 수 있다.

[0208] *표 1 및 2에 제시된 항체는 강글리오시드 GD2 및 GD3의 탄수화물 도메인에 결합한다.

[0209] 핵산, 벡터 및 재조합 숙주 세포

[0210] 본 발명의 추가 목적은 본 발명의 단클론성 항체 및 이의 단편, 면역글로불린 및 폴리펩티드를 인코딩하는 핵산 서열에 관한 것이다.

[0211] 예를 들어, 특정 실시양태에서, 본 발명은 부분적으로 본원의 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 vH 도메인 또는 vL 도메인을 인코딩하는 핵산 서열에 관한 것이다.

[0212] 전형적으로, 상기 핵산은 임의의 적합한 벡터, 예컨대 플라스미드, 코스미드, 에피솜, 인공 염색체, 파지 또는 바이러스 벡터에 포함될 수 있는 DNA 또는 RNA 분자이다.

[0213] 용어 "벡터", "클로닝 벡터" 및 "발현 벡터"는 DNA 또는 RNA 서열(*예를 들어*, 외래 유전자)을 숙주 세포에 도입하여 숙주를 형질전환하고 도입된 서열의 발현(*예를 들어*, 전사 및 번역)을 촉진할 수 있는 비히클을 의미한다. 따라서, 본 발명의 추가적인 목적은 본 발명의 핵산을 포함하는 벡터에 관한 것이다.

[0214] 이러한 벡터는 조절 요소, 예컨대 프로모터, 인핸서, 터미네이터 등을 포함하여 대상체에게 투여 시 상기 폴리펩티드의 발현을 야기하거나 지시할 수 있다. 동물 세포용 발현 벡터에 사용되는 프로모터 및 인핸서의 예는, SV40의 초기 프로모터 및 인핸서(Mizukami T. et al. 1987), 몰로니(Moloney) 마우스 백혈병 바이러스의 LTR 프로모터 및 인핸서(Kuwana Y et al. 1987), 면역글로불린 H 쇄의 프로모터(Mason J O et al. 1985) 및 인핸서(Gillies S D et al. 1983) 등을 포함한다.

[0215] 임의의 동물 세포용 발현 벡터가 사용될 수 있다. 적합한 벡터의 예는 pAGE107(Miyaji H et al. 1990), pAGE103(Mizukami T et al. 1987), pHSG274(Brady G et al. 1984), pKCR(O'Hare K et al. 1981), pSG1 베타 d2-4-(Miyaji H et al. 1990) 등을 포함한다. 플라스미드의 다른 대표적인 예는, 예를 들어 pUC, pcDNA, pBR 등과 같은 통합 플라스미드 또는 복제 기점을 포함하는 복제 플라스미드를 포함한다. 바이러스 벡터의 대표적인 예는 아데노바이러스, 레트로바이러스, 헤르페스 바이러스 및 AAV 벡터를 포함한다. 이러한 재조합 바이러스는 패키징 세포를 형질감염시키거나 헬퍼 플라스미드 또는 바이러스로 일시적 형질감염시키는 것과 같은 당업계에 알려진 기술에 의해 제조될 수 있다. 바이러스 패키징 세포의 전형적인 예는 PA317 세포, PsiCRIP 세포, GPenv-양성 세포, 293 세포 등을 포함한다. 이러한 복제-결함 재조합 바이러스를 제조하기 위한 상세한 프로토콜은 예

를 들어 WO 95/14785, WO 96/22378, 미국 특허 번호 5,882,877, 미국 특허 번호 6,013,516, 미국 특허 번호 4,861,719, 미국 특허 번호 5,278,056 및 WO 94/19478에서 확인할 수 있다.

[0216] 본 발명의 추가 목적은 본 발명에 따른 핵산 및/또는 벡터에 의해 형질감염, 감염 또는 형질전환되어 있는 세포에 관한 것이다. 용어 "형질전환"은, 숙주 세포가 도입된 유전자 또는 서열을 발현하여 원하는 물질, 전형적으로 도입된 유전자 또는 서열에 의해 코딩된 단백질 또는 효소를 제조하도록, "외래"(즉, 외인성 또는 세포외) 유전자, DNA 또는 RNA 서열을 숙주 세포에 도입하는 것을 의미한다. 도입된 DNA 또는 RNA를 수용하고 발현하는 숙주 세포는 "형질전환"되었다.

[0217] 본 발명의 핵산은 적합한 발현 시스템에서 본 발명의 재조합 폴리펩티드를 제조하기 위해 사용될 수 있다. 용어 "발현 시스템"은, 예를 들어 벡터에 의해 운반되고 숙주 세포에 도입되는 외래 DNA에 대해 코딩된 단백질의 발현을 위한 적합한 조건에서의 숙주 세포 및 양립가능한 벡터를 의미한다.

[0218] 통상적인 발현 시스템은 *대장균(E. coli)* 숙주 세포 및 플라스미드 벡터, 곤충 숙주 세포 및 배큘로바이러스 벡터 및 포유류 숙주 세포 및 벡터를 포함한다. 숙주 세포의 다른 예는, 비제한적으로 원핵 세포(예컨대, 박테리아) 및 진핵 세포(예컨대, 효모 세포, 포유류 세포, 곤충 세포, 식물 세포 등)를 포함한다. 구체적인 예는 *대장균*, *클루이베로미세스(Kluyveromyces)* 또는 *사카로미세스(Saccharomyces)* 효모, 포유류 세포주(예를 들어, 베로 세포, CHO 세포, 3T3 세포, COS 세포 등)뿐만 아니라 초기 또는 주화 포유류 세포 배양물(예를 들어, 림프모세포, 섬유아세포, 배아 세포, 상피 세포, 신경 세포, 지방 세포 등으로부터 제조됨)을 포함한다. 예는 또한 마우스 SP2/0-Ag14 세포(ATCC CRL1581), 마우스 P3X63-Ag8.653 세포(ATCC CRL1580), 디하이드로폴레이트 환원효소 유전자(이하 "DHFR 유전자"로 지칭됨)가 결함인 CHO 세포(Urlaub G et al; 1980), 래트 YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20 세포(ATCC CRL 1662, 이하 "YB2/0 세포"로 지칭됨) 등을 포함한다. 키메라 또는 인간화 항체의 ADCC 활성이 이러한 세포에서 발현될 때 강화되기 때문에 YB2/0 세포가 바람직하다.

[0219] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 본 발명의 항체 또는 폴리펩티드를 발현하는 재조합 숙주 세포를 제조하는 방법에 관한 것이며, 상기 방법은 (i) 본원에 기재된 바와 같은 재조합 핵산 또는 벡터를 컴피턴트(competent) 숙주 세포 내로 *시험관내* 또는 *생체외* 도입하는 단계, (ii) 수득한 재조합 숙주 세포를 *시험관내* 또는 *생체외* 배양하는 단계, 및 (iii) 선택적으로, 상기 항체 또는 폴리펩티드를 발현 및/또는 분비하는 세포를 선택하는 단계를 포함한다. 이러한 재조합 숙주 세포는 본 발명의 항체 및 폴리펩티드의 제조를 위해 사용될 수 있다.

[0220] 또 다른 양태에서, 본 발명은 선택적 혼성화 조건 하에서 본원에 개시된 폴리뉴클레오티드에 혼성화하는 단리된 핵산을 제공한다. 따라서, 본 실시양태의 폴리뉴클레오티드는 이러한 폴리뉴클레오티드를 포함하는 핵산을 단리, 검출 및/또는 정량화하기 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 기탁된 라이브러리에서 부분 또는 전장 클론을 식별, 단리 또는 증폭하기 위해 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드는 인간 또는 포유류 핵산 라이브러리로부터 cDNA로 단리되거나, 그렇지 않으면 이에 대해 상보적인 게놈 또는 cDNA 서열이다. 바람직하게는, cDNA 라이브러리는 적어도 80%의 전장 서열, 바람직하게는 적어도 85% 또는 90%의 전장 서열, 바람직하게는 적어도 95% 전장 서열을 포함한다. cDNA 라이브러리는 정규화되어 희귀 서열의 표현을 증가시킬 수 있다. 낮거나 중간 정도의 엄격성 혼성화 조건은 전형적이지만 배타적이지 않게 상보적 서열에 비해 감소된 서열 동일성을 갖는 서열과 함께 사용된다. 중간 정도 및 높은 엄격성 조건은 더 큰 동일성의 서열에 대해 선택적으로 사용될 수 있다. 낮은 엄격성 조건은 약 70%의 서열 동일성을 갖는 서열의 선택적 혼성화를 가능하게 하고, 오르토로그 또는 파라로그 서열을 식별하기 위해 사용될 수 있다. 선택적으로, 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 본원에 기재된 폴리뉴클레오티드에 의해 인코딩되는 항체의 적어도 일부를 인코딩할 것이다. 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 본 발명의 항체를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드에 대한 선택적 혼성화를 위해 사용될 수 있는 핵산 서열을 포괄한다. *예를 들어*, 앞선 문헌 [Ausubel]; [Colligan]을 참조하고, 각각 전체적으로 본원에 참조로 포함된다.

[0221] 항체를 제조하는 방법

[0222] 본 발명의 항체 및 이의 단편, 면역글로불린 및 폴리펩티드는, 비제한적으로, 임의의 화학적, 생물학적, 유전적 또는 효소적 기술과 같은 임의의 기술 단독, 또는 이들 조합에 의해 제조될 수 있다.

[0223] 원하는 서열의 아미노산 서열을 알고 있으면, 당업자는 폴리펩티드 제조를 위한 표준 기술에 의해, 상기 항체 또는 폴리펩티드를 쉽게 제조할 수 있다. 예를 들어, 잘 알려진 고체상 방법, 바람직하게는 상업적으로 입수가능한 펩티드 합성 장치(예컨대, 캘리포니아, 포스터 시티 소재의 어플라이드 바이오시스템즈(Applied Biosystems)에 의해 제조된 것)를 사용하고, 제조업체의 지침에 따라 이들이 합성될 수 있다. 대안적으로, 본

발명의 항체 및 다른 폴리펩티드는 당업계에 잘 알려진 재조합 DNA 기술에 의해 합성될 수 있다. 예를 들어, 이들 단편은 원하는 (폴리)펩티드를 인코딩하는 DNA 서열을 발현 벡터에 혼입하고, 이러한 벡터를 잘 알려진 기술을 사용하여 추후 단리될 수 있는 원하는 폴리펩티드를 발현할 적합한 진핵 또는 원핵 숙주에 도입한 후 DNA 발현 산물로서 수득될 수 있다.

[0224] 특히, 본 발명은 추가로 본 발명의 항체 또는 폴리펩티드를 제조하는 방법에 관한 것이며, 방법은 (i) 상기 항체 또는 폴리펩티드의 발현을 가능하게 하기에 적합한 조건 하에서 본 발명에 따른 형질전환된 숙주 세포를 배양하는 단계; 및 (ii) 발현된 항체 또는 폴리펩티드를 회수하는 단계를 포함한다.

[0225] 본 발명의 항체 및 다른 폴리펩티드는, 예를 들어 단백질 A-세파로스, 하이드록실아파타이트 크로마토그래피, 겔 전기영동, 투석, 친화도 크로마토그래피, 암모늄 설페이트 또는 에탄올 침전, 산 추출, 음이온 또는 양이온 교환 크로마토그래피, 포스포셀룰로오스 크로마토그래피, 소수성 상호작용 크로마토그래피, 하이드록실아파타이트 크로마토그래피 및 렉틴 크로마토그래피와 같은 통상적인 면역글로불린 정제 절차에 의해 배양 배지로부터 적합하게 분리된다. 고성능 액체 크로마토그래피("HPLC") 또한 정제를 위해 사용될 수 있다. *예를 들어*, 문헌 [Colligan, Current Protocols in Immunology, or Current Protocols in Protein Science, John Wiley & Sons, NY, N.Y., (1997-2001)]의, 예를 들어 챕터 1, 4, 6, 8, 9, 10를 참조하고, 각각 전체적으로 본원에 참조로 포함된다.

[0226] 본 발명의 키메라 항체(*예를 들어*, 마우스-인간 키메라 또는 비-설치류-인간 키메라)는, 이전에 기재된 바와 같이 VL 및 VH 도메인을 인코딩하는 핵산 서열을 수득하고, 인간 항체 CH 및 인간 항체 CL을 인코딩하는 유전자를 갖는 동물 세포용 발현 벡터에 이들을 삽입함으로써 인간 키메라 항체 발현 벡터를 구성하고, 발현 벡터를 동물 세포에 도입하여 코딩 서열을 발현시킴으로써 제조될 수 있다. 인간 키메라 항체의 CH 도메인은 IgG 클래스 또는 이의 하위 클래스, 예컨대 IgG2, IgG3 및 IgG4와 같은 인간 면역글로불린에 속하는 임의의 영역일 수 있다. 유사하게는, 인간 키메라 항체의 CL은 카파 클래스 또는 람다 클래스와 같은 Ig에 속하는 임의의 영역일 수 있다. 표준 재조합 DNA 기술을 사용하여 제조될 수 있는 인간 및 비-인간 부분을 모두 포함하는 키메라 및 인간화 단클론성 항체는 본 발명의 범위 내에 있다. 상기 키메라 및 인간화 단클론성 항체는, 예를 들어, Robinson *et al.*의 국제 특허 공개 PCT/US86/02269; Akira *et al.*의 유럽 특허 출원 184,187; Taniguchi, M.의 유럽 특허 출원 171,496; Morrison *et al.*의 유럽 특허 출원 173,494; Neuberger *et al.*의 PCT 출원 WO 86/01533; Cabilly *et al.*의 미국 특허 번호 4,816,567; Cabilly *et al.*의 유럽 특허 출원 125,023; 문헌 [Better *et al.*(1988) *Science* 240:1041-1043]; [Liu *et al.*(1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:3439-3443]; [Liu *et al.*(1987) *J. Immunol.* 139:3521-3526; Sun *et al.*(1987) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84:214-218]; [Nishimura *et al.*(1987) *cancer Res.* 47:999-1005]; [Wood *et al.*(1985) *Nature* 314:446-449]; [Shaw *et al.*(1988) *J. Natl. cancer Inst.* 80:1553-1559)]; [Morrison, S. L.(1985) *Science* 229:1202-1207]; [Oi *et al.*(1986) *Biotechniques* 4:214]; Winter의 미국 특허 5,225,539; [Jones *et al.*(1986) *Nature* 321:552-525]; [Verhoeyan *et al.*(1988) *Science* 239:1534]; 및 [Beidler *et al.*(1988) *J. Immunol.* 141:4053-4060]에 기재된 방법을 사용하여, 당업계에 알려진 재조합 DNA 기술에 의해 제조될 수 있다.

[0227] 또한, 인간화 항체는 미국 특허 5,565,332에 개시된 것과 같은 표준 프로토콜에 따라 제조될 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 항체 쇄 또는 특이적 결합 쌍 구성원은, 특이적 결합 쌍 구성원의 폴리펩티드 쇄 및 복제가능한 제네릭 디스플레이 패키지(generic display package)의 구성요소의 융합을 인코딩하는 핵산 분자를 포함하는 벡터, 및 *예를 들어*, 미국 특허 5,565,332, 5,871,907 또는 5,733,743에 기재된 바와 같이, 당업계에 알려진 기술을 사용하여 단일 결합 쌍 구성원의 제2 폴리펩티드 쇄를 인코딩하는 핵산 분자를 함유하는 벡터 사이의 재조합에 의해 제조될 수 있다. 본 발명의 인간화 항체는, 이전에 기재된 바와 같이, CDR 도메인을 인코딩하는 핵산 서열을 수득하고, (i) 인간 항체의 것과 동일한 중쇄 불변 영역 및 (ii) 인간 항체의 것과 동일한 경쇄 불변 영역을 인코딩하는 유전자를 갖는 동물 세포용 발현 벡터에 이들을 삽입하고, 발현 벡터를 동물 세포에 도입하여 유전자를 발현시킴으로써 제조될 수 있다. 인간화 항체 발현 벡터는 항체 중쇄를 인코딩하는 유전자 및 항체 경쇄를 인코딩하는 유전자가 별도의 벡터에 존재하는 종류의 것 또는, 두 유전자가 동일한 벡터에 존재하는 종류(탠덤 종류)의 것일 수 있다.

[0228] 통상적인 재조합 DNA 및 유전자 형질감염 기술에 기초한 인간화 항체를 제조하기 위한 방법은 당업계에 잘 알려져 있다(*예를 들어*, 문헌 [Riechmann L. et al. 1988; Neuberger M S. et al. 1985] 참조). 항체는, 예를 들어 CDR-이식(EP 239,400; PCT 공개 WO91/09967; 미국 특허 번호 5,225,539; 5,530,101; 및 5,585,089), 베니어링(veneering) 또는 리서페이싱(resurfacing)(EP 592,106; EP 519,596; 문헌 [Padlan EA(1991)]; [Studnicka G M et al.(1994)]; [Roguska M A. et al.(1994)]) 및 체인 셔플링(chain shuffling)(미국 특허 번호 5,565,33

2)를 포함하여 당업계에 알려진 다양한 기술을 사용하여 인간화될 수 있다. 이러한 항체를 제조하기 위한 일반적인 재조합 DNA 기술도 알려져 있다(유럽 특허 출원 EP 125023 및 국제 특허 출원 WO 96/02576 참조).

[0229] 또한, 항체 단편을 제조하기 위한 방법은 잘 알려져 있다. 예를 들어, 본 발명의 Fab 단편은 파파인과 같은 프로테아제로 강글리오시드와 특이적으로 반응하는 항체를 처리함으로써 수득될 수 있다. 또한, Fab는 항체의 Fab를 인코딩하는 DNA를 원핵 발현 시스템 또는 진핵 발현 시스템용 벡터에 삽입하고, 벡터를 원핵생물 또는 진핵생물에 (적절하게) 도입하여 Fab를 발현시킴으로써 제조될 수 있다.

[0230] 유사하게는, 본 발명의 F(ab')2 단편은 프로테아제인 펩신으로 강글리오시드와 특이적으로 반응하는 항체를 처리하여 수득될 수 있다. 또한, F(ab')2 단편은 후술하는 Fab'를 티오에테르 결합 또는 디설파이드 결합을 통해 결합시킴으로써 제조될 수 있다.

[0231] 본 발명의 Fab' 단편은 환원제인 디티오트레이톨로 강글리오시드와 특이적으로 반응하는 F(ab')2를 처리하여 수득될 수 있다. 또한, Fab' 단편은 항체의 Fab' 단편을 인코딩하는 DNA를 원핵생물용 발현 벡터 또는 진핵생물용 발현 벡터에 삽입하고, 벡터를 원핵생물 또는 진핵생물에 (적절하게) 도입하여 이의 발현을 수행함으로써 제조될 수 있다.

[0232] 또한, 본 발명의 scFv는 이전에 기재된 바와 같이 VH 및 VL 도메인을 인코딩하는 cDNA를 수득하고, scFv를 인코딩하는 DNA를 구성하고, DNA를 원핵생물용 발현 벡터 또는 진핵생물용 발현 벡터에 삽입한 후, 발현 벡터를 원핵생물 또는 진핵생물에 (적절하게) 도입하여 scFv를 발현시킴으로써 제조될 수 있다. 인간화 scFv 단편을 생성하기 위해서, CDR 이식이라는 잘 알려진 기술이 사용될 수 있으며, 이는 기증자 scFv 단편 유래의 상보성 결정 영역(CDR)을 선택하고, 이를 알려진 3차원 구조의 인간 scFv 단편 프레임워크에 이식하는 것을 포함한다(*예를 들어*, WO98/45322; WO 87/02671; 미국 특허 번호 5,859,205; 미국 특허 번호 5,585,089; 미국 특허 번호 4,816,567; EP0173494 참조).

[0233] 항체, 면역글로불린 및 폴리펩티드의 변형

[0234] 본원에 기재된 항체의 아미노산 서열 변형(들)이 고려된다. 예를 들어, 항체의 결합 친화도 및/또는 다른 생물학적 특성을 개선하는 것이 바람직할 수 있다. 인간 항체의 VH와 VL의 FR에 단순히 비-인간 동물로부터 유래된 항체의 VH와 VL의 CDR만을 이식함으로써, 인간화 항체가 제조될 경우, 항원 결합 활성이 비-인간 동물로부터 유래된 본래의 항체의 것과 비교하여 감소되는 것으로 알려져 있다. 비-인간 항체의 VH 및 VL의 여러 아미노산 잔기는, CDR뿐만 아니라 FR에서도, 항원 결합 활성과 직간접적으로 관련되어 있는 것으로 여겨진다. 따라서, 이들 아미노산 잔기를 인간 항체의 VH 및 VL의 FR로부터 유래된 상이한 아미노산 잔기로 치환하면 결합 활성이 감소할 것이며, 아미노산을 비-인간 동물로부터 유래된 본래의 항체의 아미노산 잔기로 대체함으로써 수정될 수 있다.

[0235] 본 발명의 항체의 구조 및 이들을 인코딩하는 DNA 서열에서 변형 및 변화가 이루어질 수 있으며, 여전히 바람직한 특성을 갖는 항체 및 폴리펩티드를 인코딩하는 기능적 분자를 수득할 수 있다. 예를 들어, 특정 아미노산은 감지가능한 활성 손실 없이 단백질 구조에서 다른 아미노산으로 치환될 수 있다. 단백질의 상호작용 능력 및 본질이 단백질의 생물학적 기능적 활성을 정의하기 때문에, 특정 아미노산 치환은, 단백질 서열은 물론 DNA 인코딩 서열에서 이루어질 수 있는 한편, 그럼에도 불구하고, 유사한 특성을 갖는 단백질을 수득할 수 있다. 따라서, 본 발명의 항체 서열 또는 상기 폴리펩티드를 인코딩하는 해당하는 DNA 서열에서, 이들의 생물학적 활성의 감지가능한 손실 없이 다양한 변화가 이루어질 수 있음이 고려된다.

[0236] 하나의 실시양태에서, 아미노산 변화는 유전자 코드의 보존에 기초한 보존적 치환을 인코딩하기 위해 DNA 서열에서 코돈을 변화시킴으로써 달성될 수 있다. 구체적으로, 유전자 코드(하기 참조)에 의해 정의된 바와 같이, 단백질을 코딩할 수 있는 뉴클레오티드 서열 및 특정 단백질의 아미노산 서열 사이에는 알려진 명확한 대응 관계가 있다. 마찬가지로, 유전자 코드(상기 유전자 코드 차트 참조)에 의해 정의된 바와 같이, 해당 핵산에 의해 인코딩된 아미노산 서열 및 특정 핵산의 뉴클레오티드 서열 사이에는 알려진 명확한 대응 관계가 있다.

[0237] 상기한 바와 같이, 유전자 코드의 중요하고 잘 알려진 특징은 중복성이며, 이에 따라 단백질을 만드는 데 사용되는 대부분의 아미노산의 경우, 하나 초과의 코딩 뉴클레오티드 삼중자가 사용될 수 있다(상기 설명됨). 따라서, 다수의 상이한 뉴클레오티드 서열이 주어진 아미노산 서열을 코딩할 수 있다. 이러한 뉴클레오티드 서열은 (특정 유기체가 일부 서열을 다른 것들보다 더 효율적으로 번역할 수 있기는 하지만) 모든 유기체에서 동일한 아미노산 서열의 제조를 초래하기 때문에 기능적으로 동등하게 간주된다. 더욱이, 때때로, 푸린 또는 피리미딘의 메틸화된 변이체가 주어진 뉴클레오티드 서열에서 발견될 수 있다. 이러한 메틸화는 트리뉴클레오티드 코돈

과 해당하는 아미노산 사이의 코딩 관계에 영향을 미치지 않는다.

[0238] 폴리펩티드의 아미노 서열에 변화를 주는데 있어서, 아미노산의 소수친수 지표가 고려될 수 있다. 단백질에 대한 상호작용적 생물학적 기능을 부여함에 있어서 소수친수 아미노산 지표의 중요성은 일반적으로 당업계에서 이해되고 있다. 아미노산의 상대적인 소수친수 특성이 생성 단백질의 2차 구조에 기여하는 것으로 받아들여지며, 이는 단백질과 다른 분자, 예를 들어 효소, 기질, 수용체, DNA, 항체, 항원 등과의 상호작용을 차례로 정의한다. 각각의 아미노산은 이들의 소수성 및 전하 특성에 기초한 소수친수 지표가 다음과 같이 할당되어 있다: 이소류신(+4.5); 발린(+4.2); 류신(+3.8); 페닐알라닌(+2.8); 시스테인/시스틴(+2.5); 메티오닌(+1.9); 알라닌(+1.8); 글리신(-0.4); 트레오닌(-0.7); 세린(-0.8); 트립토판(-0.9); 티로신(-1.3); 프롤린(-1.6); 히스티딘(-3.2); 글루타메이트(-3.5); 글루타민(-3.5); 아스파르테이트(<RTI 3.5); 아스파라긴(-3.5); 라이신(-3.9); 및 아르기닌(-4.5).

[0239] 특정 아미노산이 유사한 소수친수 지표 또는 점수를 갖는 다른 아미노산에 의해 치환될 수 있고, 여전히 유사한 생물학적 활성을 갖는 단백질을 생성할 수 있다는 것, 즉, 여전히 생물학적 기능적으로 동등한 단백질을 수득할 수 있다는 것은 당업계에 알려져 있다.

[0240] 위에서 약술한 바와 같이, 따라서 아미노산 치환은 일반적으로 아미노산 측쇄 치환의 상대적인 유사성, 예를 들어 이들의 소수성, 친수성, 전하, 크기 등에 기초한다. 전술한 다양한 특성을 고려한 예시적인 치환은 당업자에게 잘 알려져 있으며 다음을 포함한다: 아르기닌 및 라이신; 글루타메이트 및 아스파르테이트; 세린 및 트레오닌; 글루타민 및 아스파라긴; 및 발린, 류신 및 이소류신.

[0241] 본 발명의 항체의 또 다른 종류의 아미노산 변형은, 예를 들어 안정성을 증가시키기 위해 항체의 본래 글리코실화 패턴을 변경하는 데 유용할 수 있다. "변경"이란 항체에서 발견되는 하나 이상의 탄수화물 모이어티를 삭제하고/하거나, 항체에 존재하지 않는 하나 이상의 글리코실화 부위를 부가하는 것을 의미한다. 항체의 글리코실화는 전형적으로 N-연결된다. "N-연결"은 아스파라긴 잔기의 측쇄에 대한 탄수화물 모이어티의 부착을 지칭한다. 트리펩티드 서열 아스파라긴-X-세린 및 아스파라긴-X-트레오닌은, 아스파라긴 측쇄에 대한 탄수화물 모이어티의 효소적 부착을 위한 인식 서열이며, 여기서 X는 프롤린을 제외한 임의의 아미노산이다. 따라서, 폴리펩티드에서 이러한 트리펩티드 서열들 중 어느 하나의 존재는 잠재적인 글리코실화 부위를 생성한다. 항체에 대한 글리코실화 부위의 부가는 아미노산 서열을 변경함으로써 편리하게 달성되어, (N-연결된 글리코실화 부위에 대해) 상기 트리펩티드 서열을 하나 이상 함유하도록 한다. 또 다른 종류의 공유 변형은 글리코시드를 항체에 화학적으로 또는 효소적으로 커플링하는 것을 포함한다. 이러한 절차는 N- 또는 O-연결 글리코실화를 위한 글리코실화 능력을 갖는 숙주 세포에서 항체의 제조를 필요로 하지 않는다는 점에서 이점이 있다. 사용된 커플링 방식에 따라, 당(들)은, (a) 아르기닌 및 히스티딘, (b) 유리 카복실 기, (c) 시스테인의 것과 같은 유리 설프하이드릴 기, (d) 세린, 트레오닌 또는 하이드록시프롤린의 것과 같은 유리 하이드록실 기, (e) 페닐알라닌, 티로신, 트립토판의 것과 같은 방향족 잔기, 또는 (f) 글루타민의 아미드 기에 부착될 수 있다. 예를 들어, 상기 방법은 WO87/05330에 기재되어 있다.

[0242] 유사하게는, 항체 상에 존재하는 임의의 탄수화물 모이어티의 제거는 화학적 또는 효소적으로 달성될 수 있다. 화학적 탈글리코실화는 화합물 트리플루오로메탄설폰산 또는 등가 화합물에 대한 항체의 노출을 필요로 한다. 이러한 처리는 연결 당(N-아세틸글루코사민 또는 N-아세틸갈락토사민)을 제외한 대부분 또는 모든 당의 절단을 초래하는 반면, 항체는 그대로 둔다. 화학적 탈글리코실화는 문헌 [Sojahr H. et al.(1987)] 및 [Edge, A S. et al.(1981)]에 의해 기재된다. 항체 상의 탄수화물 모이어티의 효소 절단은 문헌 [Thotakura, N R. et al.(1987)]에 의해 기재된 바와 같이, 다양한 엔도- 또는 엑소-글리코시다제의 사용에 의해 달성될 수 있다.

[0243] 다른 변형은 면역접합체의 형성을 포함할 수 있다. 예를 들어, 공유 변형의 하나의 종류에서, 항체 또는 단백질은, 다양한 비 단백성 중합체, *예를 들어* 폴리에틸렌 글리콜, 폴리프로필렌 글리콜 또는 폴리옥시알킬렌 중 하나에, 미국 특허 번호 4,640,835; 4,496,689; 4,301,144; 4,670,417; 4,791,192 또는 4,179,337에 기재된 방식으로, 공유 연결된다.

[0244] 본 발명의 항체 또는 다른 단백질과 이종 작용제의 접합은, 비제한적으로, N-석신이미딜(2-피리딜디티오) 프로피오네이트(SPDP), 석신이미딜(N-말레이미도메틸)사이클로헥산-1-카복실레이트, 이미노티올레인(IT), 이미도에스테르의 2작용성 유도체(예컨대, 디메틸 아디피미데이트 HCL), 활성 에스테르(예컨대 디석신이미딜 수베레이트), 알데하이드(예컨대, 글루타르알데하이드), 비스-아지도 화합물(예컨대, 비스(p-아지도벤조일) 헥산디아민), 비스-디아조늄 유도체(예컨대, 비스-(p-디아조늄벤조일)-에틸렌디아민), 디이소시아네이트(예컨대, 톨루엔 2,6 디이소시아네이트) 및 비스-활성 플루오린 화합물(예컨대, 1,5-디플루오로-2,4-디니트로벤젠)을 포

함하는 다양한 2작용성 단백질 커플링제를 사용하여 이루어질 수 있다. 예를 들어, 탄소 표지된 1-이소티오시아네이토벤질 메틸디에틸렌 트리아민펜타아세트산(MX-DTPA)은 방사성뉴클레오티드를 항체에 접합시키기 위한 예시적인 킬레이트제이다(WO 94/11026).

[0245] 또 다른 양태에서, 본 발명은 검출을 가능하게 하는 모이어티에 접합된 강글리오시드(예를 들어, GD2 또는 GD3)에 특이적으로 결합하는 항체를 특징으로 한다. 접합된 항-강글리오시드 항체를 진단적으로 또는 예측적으로 사용하여, 임상 테스트 절차의 일부로서 혈액 또는 조직에서 강글리오시드 수준(예를 들어, GD2 또는 GD3)을 모니터링할 수 있고, *예를 들어* 환자가 암을 갖는지 여부를 진단하거나, 암의 상이한 단계를 결정하거나, 암의 진행을 모니터링하거나, 주어진 치료 요법의 효능을 결정하거나, 암 치료(예를 들어, 면역치료)에 반응 할 가능성이 가장 높은 환자를 선택할 수 있다. 검출가능한 모이어티의 예는 다양한 효소, 보결 분자단, 형광 물질, 발광 물질, 생물발광 물질 및 방사성 물질을 포함한다. 적합한 효소의 예는 홀스래디쉬(horseradish) 퍼옥시다제, 알칼리 포스파타제, β-갈락토시다제 또는 아세틸콜린에스테라제를 포함하고; 적합한 보결 분자단 복합체의 예는 스트렙타비딘/비오틴 및 아비딘/비오틴을 포함하고; 적합한 형광 물질의 예는 움벨리페론, 플루오레세인, 플루오레세인 이소티오시아네이트(FITC), 로다민, 디클로로트리아지닐아민 플루오레세인, 단실 클로라이드 또는 피코에리트린(PE)을 포함하고; 발광 물질의 예는 루미놀을 포함하고; 생물발광 물질의 예는 루시퍼라제, 루시페린 및 에쿠오린을 포함하고; 적합한 방사성 물질의 예는 ^{125}I, ^{131}I, ^{35}S 또는 ^{3}H를 포함한다. 본원에 사용된 바와 같이, 항체와 관련하여 용어 "표지된"은 검출가능한 물질, 예컨대 방사성 작용제 또는 형광단(*예를 들어*, 플루오레세인 이소티오시아네이트(FITC) 또는 피코에리트린(PE) 또는 인도시아닌(Cy5))을 항체에 커플링(*즉*, 물리적 연결)시킴으로써 항체를 직접 표지화하는 것뿐만 아니라 검출가능한 물질과의 반응성에 의해 항체를 간접적으로 표지화하는 것을 포함하도록 의도된다. 예를 들어, 항체는, 발현이 이후에 검출되고 측정될 수 있도록, 증폭 및 검출될 수 있는 핵산 서열, 또는 특정 유전자의 발현을 감소시키기 위한 안티센스 올리고뉴클레오티드로 표지될 수 있다.

[0246] 항체에 이러한 치료적 모이어티를 접합하기 위한 기술이 잘 알려져 있고, 예를 들어, 문헌 [Arnon *et al.*, "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", in Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeld *et al.* (eds.), pp. 243 56 (Alan R. Liss, Inc. 1985)]; [Hellstrom *et al.*, "Antibodies For Drug Delivery", in Controlled Drug Delivery (2nd Ed.), Robinson *et al.* (eds.), pp. 623 53 (Marcel Dekker, Inc. 1987)]; [Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", in Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, Pinchera *et al.* (eds.), pp. 475 506 (1985)]; ["Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", in Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy, Baldwin *et al.* (eds.), pp. 303 16 (Academic Press 1985), and Thorpe *et al.*, "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", Immunol. Rev., 62:119 58 (1982)]을 참조하라.

[0247] 강글리오시드

[0248] 강글리오시드는 하나 이상의 시알산을 포함하는 글리코스핑고지질이다. 글리코스핑고지질은 소수성 세라마이드 또는 스핑고이드 지질 미부를 함유하며, 이는 일반적으로 원형질막의 외부 리플릿에 고정된다. 이들은 또한 올리고당 모이어티를 함유하고, 이러한 탄수화물 구조에 따라 분류된다(강글리오, 이소강글리오, 락토 등). 강글리오시드는 리포올리고당 모이어티에 연결된 음전하를 띠는 시알산(N-아세틸뉴라민산 또는 N-글리콜릴뉴라민산)을 함유하기 때문에 글리코스핑고지질의 중요한 하위 클래스이다. 강글리오시드는 내부 당 모이어티에 부착된 시알산 잔기의 수(1개의 경우 M, 2개의 경우 D, 3개의 경우 T, 4개의 경우 Q) 및 이의 크로마토그래피 이동성에 따라 명명되고 분류된다. 강글리오시드의 번호 지정(5-x)은 스퍼너홀름(Svennerholm)의 원래 실험 분류에 따라 내부 당 모이어티(글루코스, 갈락토스 또는 GalNAc)의 개수(x)에 기초한다. 따라서, x가 4이면, 강글리오시드는 GM1, GD1, GT1이고, GM2, GD2, GT2의 경우 x = 3이고, GM3, GD3 및 GT3의 경우 x = 2이다.

[0249] 본원에 제시된 바와 같이, 강글리오시드는 종양 바이오마커이다(예를 들어, 표 3 참조). 일부 실시양태에서, 종양-관련 강글리오시드는 GD2, GD3, GD1b, GT1b, 푸코실-GM1, GloboH, 폴리시알산(PSA), GM2, GM3, 시알릴-루이스^{X}, 시알릴-루이스^{Y}, 시알릴-루이스^{A}, 시알릴-루이스^{B}, 루이스^{Y}, 이의 임의의 일부 및 이의 변형 버전으로부터 선택된다. 바람직한 실시양태에서, 강글리오시드는 GD2, GD3, GM2 또는 GT1b이다.

[0250] 일부 실시양태에서, 강글리오시드가 변형된다. 변형된 강글리오시드는 당업계에 잘 알려져 있다. 예시적인 변형된 강글리오시드는, 예를 들어 특허 공개 번호 WO 2015/081438 및 WO 2018/112669에 개시되어 있으며, 이들의 전체 내용은 본원에 참조로 포함된다. 강글리오시드는 단량체일 수 있다. 대안적으로, 특허 공개 번호 WO

2015/081438 및 WO 2018/112669에 예시된 바와 같이, 2개 이상의 강글리오시드가 공통 코어에 공유적으로 부착되어 다량체를 형성할 수 있다. 일부 실시양태에서, 다량체는 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20개의 강글리오시드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 다량체는 2개의 강글리오시드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 다량체는 4개의 강글리오시드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 공통 코어는 폴리아미도아민(PAMAM)을 포함한다.

[0251] 따라서, 본원에 사용된 바와 같이, 용어 강글리오시드는 강글리오시드, 종양-관련 강글리오시드, 이의 일부, 이의 변형된 버전, 단량체 또는 다량체를 지칭할 수 있다.

[0252] 일부 실시양태에서, 강글리오시드는 [(A)-(P)y-(L)z]x-M 구조를 가지며, 여기서 A는 강글리오시드 또는 이의 임의의 부분이고; P는 고리이고; y는 0 또는 1이고; L은 링커이고; z는 0 또는 1이고; x는 1 내지 32의 정수이고; M은 코어이다.

[0253] 일부 실시양태에서, 강글리오시드는 구조 (A)x-[(P)y-(L)z]-(M)b를 가지며, 여기서 A는 강글리오시드 또는 이의 임의의 부분이고; x는 1 내지 32의 정수이고; P는 고리이고; y는 0 또는 1이고; L은 링커이고; z는 0 내지 8의 정수이고; M은 코어이고; b는 0 또는 1이다.

[0254] 일부 실시양태에서, 고리, P는 사이클로알킬, 헤테로사이클릴, 아릴 또는 헤테로아릴 기이다.

[0255] 일부 실시양태에서, 고리, P는 사이클로알킬 기이고, 여기서 용어 "사이클로알킬"은, 달리 명시되지 않는 한, 3 내지 8개의, 임의의 1가 포화 또는 불포화 비-방향족 사이클릭 탄화수소 기를 포함하고, 사이클로프로필, 사이클로부틸, 사이클로펜틸, 사이클로헥실, 사이클로헵틸, 비사이클 헵틸 등으로 예시된다. 사이클로알킬 기가 하나의 탄소-탄소 이중 결합 또는 하나의 탄소-탄소 삼중 결합을 포함하는 경우, 사이클로알킬 기는 각각 "사이클로알케닐" 또는 "사이클로알키닐" 기로 지칭될 수 있다. 예시적인 사이클로알케닐 및 사이클로알키닐 기는, 사이클로펜텔, 사이도헥세닐, 사이도헥시닐 등을 포함한다. 본 발명의 사이클로알킬 기는 다음으로 선택적으로 치환될 수 있다: (1) C_{1-7} 아실(예를 들어, 카복시알데하이드); (2) C_{1-20} 알킬(예를 들어, C_{1-6} 알킬, C_{1-6} 알콕시-C_{1-6} 알킬, C_{1-6} 알킬설피닐-C_{1-6} 알킬, 아미노-C_{1-6} 알킬, 아지도-C_{1-6} 알킬, (카복시알데하이드)-C_{1-6} 알킬, 할로-C_{1-6} 알킬(예를 들어, 퍼플루오로알킬), 하이드록시-C_{1-6} 알킬, 니트로-C_{1-6} 알킬 또는 C_{1-6} 티오알콕시-C_{1-6} 알킬); (3) C_{1-20} 알콕시(예를 들어, C_{1-6} 알콕시, 예컨대 퍼플루오로알콕시); (4) C_{1-6} 알킬설피닐; (5) C_{6-10} 아릴; (6) 아미노; (7) C_{1-6} 알크-C_{6-10} 아릴; (8) 아지도; (9) C_{3-8} 사이클로알킬; (10) C_{1-6} 알크-C_{3-8} 사이클로알킬; (11) 할로; (12) C_{1-12} 헤테로사이클릴(예를 들어, C_{1-12} 헤테로아릴); (13) (C_{1-12} 헤테로사이클릴)옥시; (14) 하이드록시; (15) 니트로; (16) C_{1-20} 티오알콕시(예를 들어, C_{1-6} 티오알콕시); (17) $-(CH_2)_qCO_2R^A$, 여기서 q가 0 내지 4의 정수이고, R^A가 (a) 알킬, (b) C_{6-10} 아릴, (c) 수소 및 (d) 알크-C_{6-10} 아릴로 이루어진 군으로부터 선택됨; (18) $-(CH_2)_qCONR^B R^c$, 여기서 q가 0 내지 4의 정수이고, R^B 및 R^c가 (a) 수소, (b) C_{6-10} 알킬, (c) C_{6-10} 아릴 및 (d) C_{1-6} 알크-C_{6-10} 아릴로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택됨; (19) $-(CH_2)_qSO_2R^D$, 여기서 q가 0 내지 4의 정수이고, R^D가 (a) C_{6-10} 알킬, (b) C_{6-10} 아릴 및 (c) C_{1-6} 알크-C_{6-10} 아릴로 이루어진 군으로부터 선택됨; (20) $-(CH_2)_qSO_2NR^E R^F$, 여기서 q가 0 내지 4의 정수이고, R^E 및 R^F 각각이 (a) 수소, (b) C_{6-10} 알킬, (c) C_{6-10} 아릴 및 (d) C_{1-6} 알크-C_{6-10} 아릴로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택됨; (21) 티올; (22) C_{6-10} 아릴옥시; (23) C_{3-8} 사이클로알콕시; (24) C_{6-10} 아릴-C_{1-6} 알콕시; (25) C_{1-6} 알크-C_{1-12} 헤테로사이클릴(예를 들어, C_{1-6} 알크-C_{1-12} 헤테로아릴); (26) 옥소; (27) C_{2-20} 알케닐; 및 (28) C_{2-20} 알키닐. 일부 실시양태에서, 이들 기 각각은 본원에 기재된 바와 같이 추가로 치환될 수 있다. 예를 들어, C_1-알크아릴 또는 C_1-알크헤테로 사이클릴의 알킬렌 기는 옥소 기으로 추가로 치환되어 각각의 아릴로일 및 (헤테로사이클릴)오일 치환 기를 제공할 수 있다.

[0256] 일부 실시양태에서, 고리, P는 헤테로사이클릴 기이고, 여기서 용어 "헤테로사이클릴"은, 달리 명시되지 않는 한, 5-, 6- 또는 7-원 고리를 포함하고, 이는 질소, 산소 및 황으로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되는 1, 2, 3 또는 4개의 헤테로원자를 함유한다. 5-원 고리는 0 내지 2개의 이중 결합을 갖고, 6-원 및 7-원 고리는 0 내지 3개의 이중 결합을 갖는다. 예시적인 비치환 헤테로사이클릴 기는 1 내지 12개(예를 들어, 1 내지 11개, 1 내지 10개, 1 내지 9개, 2 내지 12개, 2 내지 11개, 2 내지 10개, 또는 2 내지 9개)의 탄소의 것이다. 용어

"헤테로사이클릴"은 또한 하나 이상의 탄소 및/또는 헤테로원자가 모노사이클릭 고리의 2개의 비-인접 구성원을 다리 결합한 다리 결합된 다중사이클릭 구조, 예를 들어 퀴누클리디닐 기를 갖는 헤테로사이클릭 화합물을 나타낸다. 용어 "헤테로사이클릴"은 비사이클릭, 트리사이클릭 및 테트라사이클릭 기를 포함하고, 여기서 상기 헤테로사이클릭 고리 중 임의의 것은 1개, 2개 또는 3개의 카보사이클릭 고리, 예를 들어 아릴 고리, 사이클로헥산 고리, 사이클로헥센 고리, 사이클로펜탄 고리, 사이클로펜텐 고리, 또는 또 다른 모노사이클릭 헤테로사이클릭 고리, 예컨대 인돌릴, 퀴놀릴, 이소퀴놀릴, 테트라하이드로퀴놀릴, 벤조푸릴, 벤조티에닐 등에 융합된다. 융합된 헤테로사이클릴의 예는, 트로판 및 1,2,3,5,8,8a-헥사하이드로인돌리진을 포함한다. 헤테로사이클릭은 피롤릴, 피롤리닐, 피롤리디닐, 피라졸릴, 피라졸리닐, 피라졸리디닐, 이미다졸릴, 이미다졸리닐, 이미다졸리디닐, 피리딜, 피페리디닐, 호모피페리디닐, 피라지닐, 피페라지닐, 피리미디닐, 피리다지닐, 옥사졸릴, 옥사졸리디닐, 이소옥사졸릴, 이소옥사졸리디닐, 모르폴리닐, 티오모르폴리닐, 티아졸릴, 티아졸리디닐, 이소티아졸릴, 이소티아졸리디닐, 인돌릴, 인다졸릴, 퀴놀릴, 이소퀴놀릴, 퀴녹살리닐, 디하이드로퀴녹살리닐, 퀴나졸리닐, 신놀리닐, 프탈라지닐, 벤즈이미다졸릴, 벤조티아졸릴, 벤즈옥사졸릴, 벤조티아디아졸릴, 푸릴, 티에닐, 티아졸리디닐, 이소티아졸릴, 트리아졸릴, 테트라졸릴, 옥사디아졸릴(예를 들어, 1,2,3-옥사디아졸릴), 퓨리닐, 티아디아졸릴(예를 들어, 1,2,3-티아디아졸릴), 테트라하이드로푸라닐, 디하이드로푸라닐, 테트라하이드로티에닐, 디하이드로티에닐, 디하이드로인돌릴, 디하이드로퀴놀릴, 테트라하이드로퀴놀릴, 테트라하이드로이소퀴놀릴, 디하이드로이소퀴놀릴, 피라닐, 디하이드로피라닐, 디티아졸릴, 벤조푸라닐, 이소벤조푸라닐, 벤조티에닐 등을 포함하고, 이는 이의 디하이드로 및 테트라하이드로 형태를 포함하고, 여기서 하나 이상의 이중 결합은 수소로 대체되고 환원된다. 또 다른 예시적인 헤테로사이클릴은 다음을 포함한다: 2,3,4,5-테트라하이드로-2-옥소-옥사졸릴; 2,3-디하이드로-2-옥소-1H-이미다졸릴; 2,3,4,5-테트라하이드로-5-옥소-1H-피라졸릴(예를 들어, 2,3,4,5-테트라하이드로-2-페닐-5-옥소-1H-피라졸릴); 2,3,4,5-테트라하이드로-2,4-디옥소-1H-이미다졸릴(예를 들어, 2,3,4,5-테트라하이드로-2,4-디옥소-5-메틸-5-페닐-1H-이미다졸릴); 2,3-디하이드로-2-티오옥소-1,3,4-옥사디아졸릴(예를 들어, 2,3-디하이드로-2-티오옥소-5-페닐-1,3,4-옥사디아졸릴); 4,5-디하이드로-5-옥소-1H-트리아졸릴(예를 들어, 4,5-디하이드로-3-메틸-4-아미노 5-옥소-1H-트리아졸릴); 1,2,3,4-테트라하이드로-2,4-디옥소피리디닐(예를 들어, 1,2,3,4-테트라하이드로-2,4-디옥소-3,3-디에틸피리디닐); 2,6-디옥소-피페리디닐(예를 들어, 2,6-디옥소-3-에틸-3-페닐피페리디닐); 1,6-디하이드로-6-옥소피리디미닐; 1,6-디하이드로-4-옥소피리미디닐(예를 들어, 2-(메틸티오)-1,6-디하이드로-4-옥소-5-메틸피리미딘-1-일); 1,2,3,4-테트라하이드로-2,4-디옥소피리미디닐(예를 들어, 1,2,3,4-테트라하이드로-2,4-디옥소-3-에틸피리미디닐); 1,6-디하이드로-6-옥소-피리다지닐(예를 들어, 1,6-디하이드로-6-옥소-3-에틸피리다지닐); 1,6-디하이드로-6-옥소-1,2,4-트리아지닐(예를 들어, 1,6-디하이드로-5-이소프로필-6-옥소-1,2,4-트리아지닐); 2,3-디하이드로-2-옥소-1H-인돌릴(예를 들어, 3,3-디메틸-2,3-디하이드로-2-옥소-1H-인돌릴 및 2,3-디하이드로-2-옥소-3,3'-스피로프로판-1H-인돌-1-일); 1,3-디하이드로-1-옥소-2H-이소-인돌릴; 1,3-디하이드로-1,3-디옥소-2H-이소-인돌릴; 1H-벤조피라졸릴(예를 들어, 1-(에톡시카보닐)-1H-벤조피라졸릴); 2,3-디하이드로-2-옥소-1H-벤즈이미다졸릴(예를 들어, 3-에틸-2,3-디하이드로-2-옥소-1H-벤즈이미다졸릴); 2,3-디하이드로-2-옥소-벤즈옥사졸릴(예를 들어, 5-클로로-2,3-디하이드로-2-옥소-벤즈옥사졸릴); 2-옥소-2H-벤조피라닐; 1,4-벤조디옥사닐; 1,3-벤조디옥사닐; 2,3-디하이드로-3-옥소,4H-1,3-벤조티아지닐; 3,4-디하이드로-4-옥소-3H-퀴나졸리닐(예를 들어, 2-메틸-3,4-디하이드로-4-옥소-3H-퀴나졸리닐); 1,2,3,4-테트라하이드로-2,4-디옥소-3H-퀴나졸릴(예를 들어, 1-에틸-1,2,3,4-테트라하이드로-2,4-디옥소-3H-퀴나졸릴); 1,2,3,6-테트라하이드로-2,6-디옥소-7H-퓨리닐(예를 들어, 1,2,3,6-테트라하이드로-1,3-디메틸-2,6-디옥소-7H-퓨리닐); 1,2,3,6-테트라하이드로-2,6-디옥소-1H-퓨리닐(예를 들어, 1,2,3,6-테트라하이드로-3,7-디메틸-2,6-디옥소-1H-퓨리닐); 2-옥소벤즈[c,d]인돌릴; 1,1-디옥소-2H-나프트[1,8-c,d]이소티아졸릴; 및 1,8-나프틸렌디카복사미도. 추가적인 헤테로사이클릭은 3,3a,4,5,6,6a-헥사하이드로-피롤로[3,4-b]피롤-(2H)-일 및 2,5-디아자비사이클로[2.2.1]헵탄-2-일, 호모피페라지닐(또는 디아제파닐), 테트라하이드로피라닐, 디티아졸릴, 벤조푸라닐, 벤조티에닐, 옥세파닐, 티에파닐, 아조카닐, 옥세카닐 및 티오카닐을 포함한다. 본원에 언급된 헤테로사이클릴 기의 임의의 것은 다음으로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되는 1, 2, 3, 4 또는 5개의 치환기로 선택적으로 치환될 수 있다: (1) C_{1-7} 아실(예를 들어, 카복시알데하이드); (2) C_{1-20} 알킬(예를 들어, C_{1-6} 알킬, C_{1-6} 알콕시-C_{1-6} 알킬, C_{1-6} 알킬설피닐-C_{1-6} 알킬, 아미노-C_{1-6} 알킬, 아지도-C_{1-6} 알킬, (카복시알데하이드)-C_{1-6} 알킬, 할로-C_{1-6} 알킬(예를 들어, 퍼플루오로알킬), 하이드록시-C_{1-6} 알킬, 니트로-C_{1-6} 알킬 또는 C_{1-6} 티오알콕시-C_{1-6} 알킬); (3) C_{1-20} 알콕시(예를 들어, C_{1-6} 알콕시, 예컨대 퍼플루오로알콕시); (4) C_{1-6} 알킬설피닐; (5) C_{6-10} 아릴; (6) 아미노; (7) C_{1-6} 알크-C_{6-10} 아릴; (8) 아지도; (9) C_{3-8} 사이클로알킬; (10) C_{1-6} 알크-C_{3-8} 사이클로알킬; (11) 할로; (12) C_{1-12} 헤테로사이클릴(예를 들어, C_{1-12} 헤테로

아릴); (13) (C_{1-12} 헤테로사이클릴)옥시; (14) 하이드록시; (15) 니트로; (16) C_{1-20} 티오알콕시(예를 들어, C_{1-6} 티오알콕시); (17) $-(CH_2)_qCO_2R^A$, 여기서 q가 0 내지 4의 정수이고, R^A가 (a) C_{1-6} 알킬, (b) C_{6-10} 아릴, (c) 수소 및 (d) C_{1-6} 알크-C_{6-10} 아릴로 이루어진 군으로부터 선택됨; (18) $-(CH_2)_qCONR^{B'}R^{c'}$, 여기서 q가 0 내지 4의 정수이고, $R^{B'}$ 및 $R^{c'}$가 (a) 수소, (b) C_{1-6} 알킬, (c) C_{3-10} 아릴 및 (d) C_{1-6} 알크-C_{6-10} 아릴로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택됨; (19) $-(CH_2)_qSO_2R^D$, 여기서 q가 0 내지 4의 정수이고, R^D가 (a) 알킬, (b) C_{6-10} 아릴 및 (c) 알크-C_{6-10} 아릴로 이루어진 군으로부터 선택됨; (20) $-(CH_2)_qSO_2NR^{E'}R^{F'}$, 여기서 q가 0 내지 4의 정수이고, $R^{E'}$ 및 $R^{F'}$의 각각이 (a) 수소, (b) C_{1-6} 알킬, (c) C_{6-10} 아릴 및 (d) C_{1-6} 알크-C_{6-10} 아릴로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택됨; (21) 티올; (22) C_{6-10} 아릴옥시; (23) C_{3-8} 사이클로알콕시; (24) 아릴알콕시; (25) C_{1-6} 알크-C_{1-12} 헤테로사이클릴(예를 들어, C_{1-6} 알크-C_{1-12} 헤테로아릴); (26) 옥소; (27) (C_{1-12} 헤테로사이클릴)이미노; (28) C_{2-20} 알케닐; (29) C_{2-20} 알키닐; 및 (30) $-(CH_2)_qCONR^B$, 여기서 q가 0 내지 4의 정수이고, R^B가 (a) 수소, (b) C_{1-6} 알킬, (c) C_{3-10} 아릴 및 (d) C_{1-6} 알크-C_{6-10} 아릴로 이루어진 군으로부터 선택됨. 일부 실시양태에서, 이들 기 각각은 본원에 기재된 바와 같이 추가로 치환될 수 있다. 예를 들어, C_1-알크아릴 또는 C_1-알크헤테로 사이클릴의 알킬렌 기는 옥소 기로 추가로 치환되어 각각의 아릴로일 및 (헤테로사이클릴)오일 치환 기를 제공할 수 있다.

[0257] 일부 실시양태에서, 고리, P는 아릴 기이다. 용어 "아릴"은 1 또는 2개의 방향족 고리를 갖는 모노-, 비사이클릭 또는 다중사이클릭 카보사이클릭 고리 시스템을 포함하고, 페닐, 나프틸, 1,2-디하이드로나프틸, 1,2,3,4-테트라하이드로나프틸, 안트라세닐, 페난트레닐, 플루오레닐, 인다닐, 인데닐 등에 의해 예시되고, 1, 2, 3, 4 또는 5개의 치환기로 선택적으로 치환될 수 있다. 일부 실시양태에서, 1, 2, 3, 4 또는 5개의 치환기는 다음으로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택된다: (1) C_{1-7} 아실(예를 들어, 카복시알데하이드); (2) C_{1-20} 알킬(예를 들어, C_{1-6} 알킬, C_{1-6} 알콕시-C_{1-6} 알킬, C_{1-6} 알킬설피닐-C_{1-6} 알킬, 아미노-C_{1-6} 알킬, 아지도-C_{1-6} 알킬, (카복시알데하이드)-C_{1-6} 알킬, 할로-C_{1-6} 알킬(예를 들어, 퍼플루오로알킬), 하이드록시-C_{1-6} 알킬, 니트로-C_{1-6} 알킬 또는 C_{1-6} 티오알콕시-C_{1-6} 알킬); (3) C_{1-20} 알콕시(예를 들어, C_{1-6} 알콕시, 예컨대 퍼플루오로알콕시); (4) C_{1-6} 알킬설피닐; (5) C_{6-10} 아릴; (6) 아미노; (7) C_{1-6} 알크-C_{6-10} 아릴; (8) 아지도; (9) $C_{3.8}$ 사이클로알킬; (10) C_{1-6} 알크-C_{3-8} 사이클로알킬; (11) 할로; (12) C_{1-12} 헤테로사이클릴(예를 들어, C_{1-12} 헤테로아릴); (13) (C_{1-12} 헤테로사이클릴)옥시; (14) 하이드록시; (15) 니트로; (16) C_{1-20} 티오알콕시(예를 들어, C_{1-6} 티오알콕시); (17) $-(CH_2)_qCO_2R^A$, 여기서 q가 0 내지 4의 정수이고, R^A가 (a) C_{1-6} 알킬, (b) C_{6-10} 아릴, (c) 수소 및 (d) C_{1-6} 알크-C_{6-10} 아릴로 이루어진 군으로부터 선택됨; (18) $-(CH_2)_qCONR^{B'}R^{c'}$, 여기서 q가 0 내지 4의 정수이고, $R^{B'}$ 및 $R^{c'}$가 (a) 수소, (b) C_{1-6} 알킬, (c) C_{3-10} 아릴 및 (d) C_{1-6} 알크-C_{6-10} 아릴로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택됨; (19) $-(CH_2)_qSO_2R^D$, 여기서 q가 0 내지 4의 정수이고, R^D가 (a) 알킬, (b) C_{6-10} 아릴 및 (c) 알크-C_{6-10} 아릴로 이루어진 군으로부터 선택됨; (20) $-(CH_2)_qSO_2NR^{E'}R^{F'}$, 여기서 q가 0 내지 4의 정수이고, $R^{E'}$ 및 $R^{F'}$의 각각이 (a) 수소, (b) C_{1-6} 알킬, (c) C_{6-10} 아릴 및 (d) C_{1-6} 알크-C_{6-10} 아릴로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택됨; (21) 티올; (22) C_{6-10} 아릴옥시; (23) C_{3-8} 사이클로알콕시; (24) C_{6-10} 아릴-C_{1-6} 알콕시; (25) C_{1-6} 알크-C_{1-12} 헤테로사이클릴(예를 들어, C_{1-6} 알크-$C_{1\ -12}$ 헤테로아릴); (26) $C_{2.20}$ 알케닐; (27) $C_{2.20}$ 알키닐; 및 (28) $-(CH_2)_qCONR^B$, 여기서 q가 0 내지 4의 정수이고, R^B가 (a) 수소, (b) C_{1-6} 알킬, (c) C_{3-10} 아릴 및 (d) C_{1-6} 알크-C_{6-10} 아릴로 이루어진 군으로부터 선택됨. 일부 실시양태에서, 이들 기 각각은 본원에 기재된 바와 같이 추가로 치환될 수 있다. 예를 들어, C_1-알크아릴 또는 C_1 알크헤테로 사이클릴의 알킬렌 기는 옥소 기로 추가로 치환되어 각각의 아릴로일 및 (헤테로사이클릴)오일 치환 기를 제공할 수 있다.

[0258] 일부 실시양태에서, 아릴은 헤테로아릴 기이고, 여기서 "헤테로아릴"은 본원에 정의된 바와 같이 방향족인 헤테로사이클릴의 서브세트를 포함하고, 즉, 이들은 모노- 또는 다중사이클릭 고리 시스템 내에 4n+2 파이 전자를 함유한다. 예시적인 비치환된 헤테로아릴 기는 1 내지 12개(예를 들어, 1 내지 11개, 1 내지 10개, 1 내지 9개, 2 내지 12개, 2 내지 11개, 2 내지 10개 또는 2 내지 9개)의 탄소의 것이다. 일부 실시양태에서, 헤테로아릴은 헤테로사이클릴 기에 대해 정의된 바와 같은 1, 2, 3 또는 4개의 치환기로 치환된다.

[0259] 일부 실시양태에서, 아릴은 C_3-C_{10} 아릴 기이다.

[0260] 일부 실시양태에서, 아릴은 C_6-C_{10} 아릴 기, 예컨대 페닐 또는 아미노페닐(예를 들어, p-아미노페닐)이다.

[0261] 일부 실시양태에서, 아릴은 페닐, 히드록실-나프틸, 나프탈렌-2,6-디아민, 5-아미노나프탈렌-1-올, 나프탈렌-1,5-디올, 나프탈렌-1,5-디아민, (3-아미노메틸)사이클로펜틸아민, 사이클로펜탄-1,3-디일디메탄아민, 3-(아미노메틸)사이클로펜탄아민, 퀴놀린-3,7-디아민, 4-아미노퀴놀린-8-올, 퀴놀린-4,8-디올, 퀴놀린-4,8-디아민, 이소퀴놀린-4,8-디아민, 피리딘-2,6-디카복실산, 트리아진, 트리아졸, 이미다졸, 모르폴리노, 또는 4-(아미노메틸)피페리딘으로 이루어진 군으로부터 선택되고, 이들 중 임의의 것은 헤테로사이클릴 기에 대해 정의된 바와 같이 선택적으로 치환될 수 있다.

[0262] 일부 실시양태에서, 링커 L은 2개의 요소 사이(예를 들어, 탄수화물 항원과 코어 사이, 또는 고리와 코어 사이) 링키지(linkage)이다. 링커는 공유 결합(예를 들어, 아미드, 에스테르, 에테르, 아지드, 이소티오시아네이트 또는 디설파이드 결합과 같은 화학적 접합에 의해 생성된 임의의 결합) 또는 두 요소를 연결하고, 두 요소 사이에 공간 및/또는 가요성을 제공하는 스페이서(예를 들어, 모이어티 또는 아미노산 서열)일 수 있다. 일부 실시양태에서, 링커는 탄화수소 링커(예를 들어, C_2-C_{20} 알킬, C_2-C_{20} 알케닐 또는 C_2-C_{20} 알키닐), 폴리아민 링커(예를 들어, 에틸렌 디아민, 푸트레신, 카다베린, 스페르미딘 또는 스페르민), 펩티드 링커(예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개의 아미노산 서열), 또는 합성 중합체(예를 들어, 폴리에틸렌 글리콜과 같은 폴리에테르)이다.

[0263] 일부 실시양태에서, 코어, M은 탄수화물 항원에 (예를 들어, 직접적으로 또는 링커 및/또는 고리를 통해 간접적으로) 연결될 수 있는 하나 이상의 부위를 함유하는 모이어티이고, 여기서 링키지는 (예를 들어, 공유 결합에 의한) 공유 링키지 또는 (예를 들어, 친화도 결합 쌍을 통한) 비-공유 링키지일 수 있다. 코어는, 예를 들어 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 16, 20, 24, 28, 32개 또는 그 초과의 링키지 부위를 가질 수 있다.

[0264] 일부 실시양태에서, 코어는 아민이다. 일부 실시양태에서, 코어는 분지형 중합체(예를 들어, 별-모양 중합체, 빗형 중합체, 브러시 중합체, 초분지형 중합체(hyperbranched polymer) 및 덴드리머(예를 들어, 폴리(아미도아민)(PAMAM) 덴드리머)); 핵산(예를 들어, 올리고뉴클레오티드 또는 더 긴 핵산 분자); 폴리아민(예를 들어, 에틸렌 디아민 또는 2,4,6-트리피리딜-S-트리아진); 폴리펩티드(예를 들어, 스트렙타비딘 및 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 또는 담체 단백질(예를 들어, KLH)); 다당류(예를 들어, 박테리아성 다당류 또는 식물 다당류) 및 미셀로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0265] 일부 실시양태에서, 코어, M은 덴드리머, 예컨대 폴리(아미도아민)(PAMAM) 덴드리머이다. 일부 실시양태에서, 코어는 PAMAM 덴드리머이고, "x"는 4 이상(예를 들어, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30 또는 32 이상)이다.

[0266] 일부 실시양태에서, 코어는 담체 단백질, 예컨대 키홀 림펫 헤모시아닌(keyhole limpet hemocyanin)(KLH)이다.

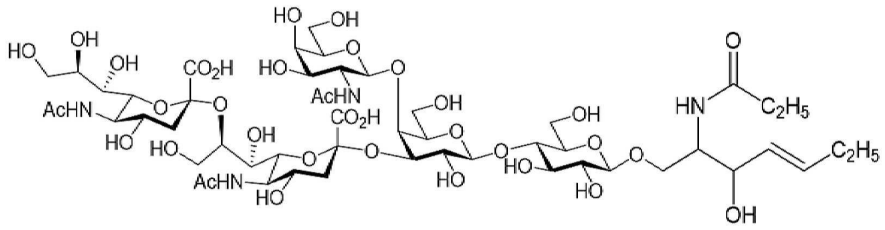
[0267] 일부 실시양태에서, 코어는 에틸렌 디아민이고, "x"는 2이다.

[0268] 일부 실시양태에서, 코어는 아민이고, "x"는 3이다.

[0269] 일부 실시양태에서, 코어는 2,4,6-트리피리딜-S-트리아진이고, "x"는 3이다.

[0270] 일부 실시양태에서, "x"는 1 내지 32의 정수(예를 들어, 1 , 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 , 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31 또는 32)이다. 바람직한 실시양태에서, "x"는 2, 3, 4, 8 또는 16이다.

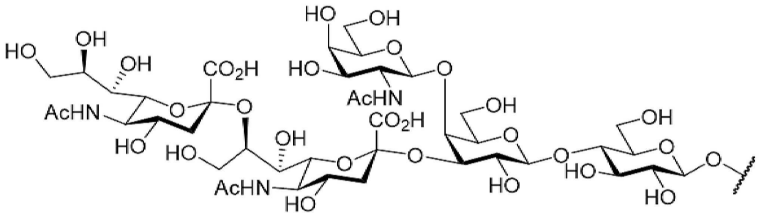
[0271] 예를 들어, 일부 실시양태에서, GD2는 하기 구조 또는 이의 변형 버전을 갖는 강글리오시드를 지칭한다:



강글리오시드 **GD2**

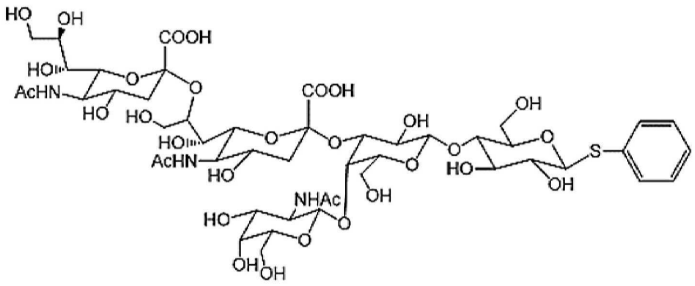
[0272]

[0273] 일부 실시양태에서, GD2는 하기 구조를 포함한다:



[0274] .

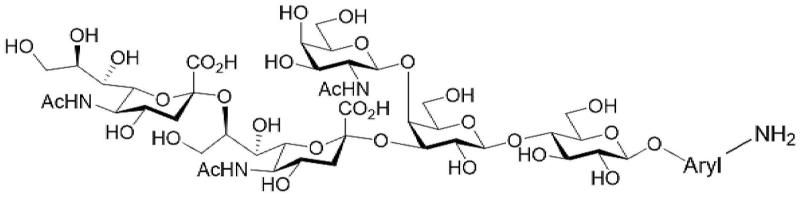
[0275] 일부 실시양태에서, GD2는 티오페닐 기(예를 들어, 하기 도시된 바와 같은 티오페닐 GD2)를 포함한다.



[0276]

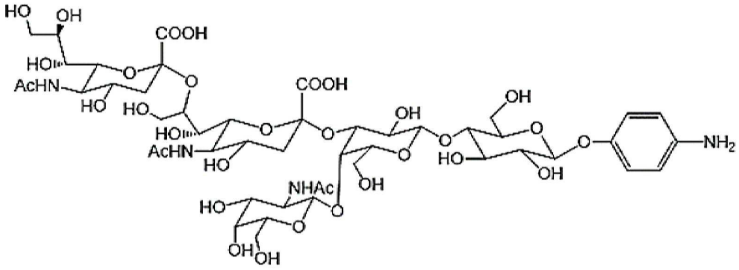
[0277] 일부 실시양태에서, GD2는 아릴 기를 포함한다.

[0278] 일부 실시양태에서, GD2는 하기 구조를 갖는 GD2-O-아릴-NH_2를 포함한다:



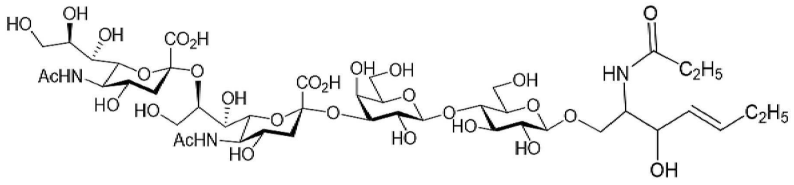
[0279]

[0280] 일부 실시양태에서, GD2는 p-아미노 페닐 에테르 기(예를 들어, 하기 도시된 바와 같은 AP-GD2)를 포함한다.



[0281]

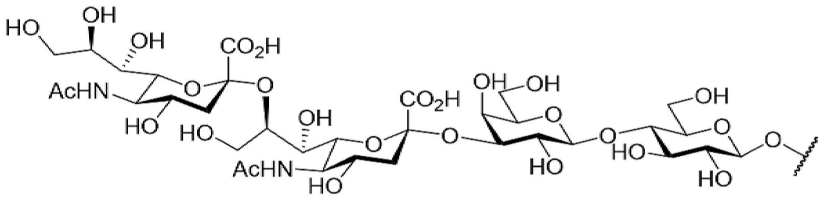
[0282] 유사하게는, 일부 실시양태에서, GD3은 하기 구조 또는 이의 변형 버전을 갖는 강글리오시드를 지칭한다:



강글리오시드 **GD3**

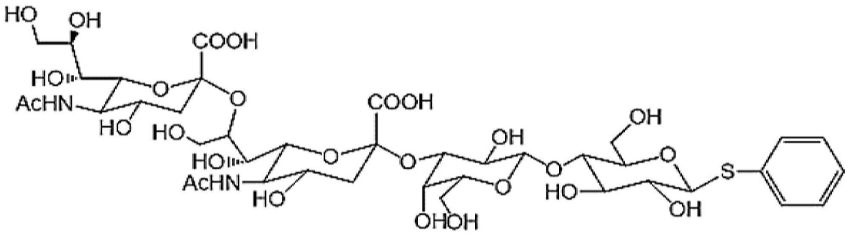
[0283]

[0284] 일부 실시양태에서, GD3은 하기 구조를 포함한다:



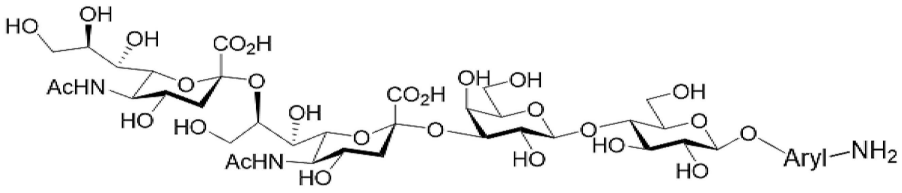
[0285]

[0286] 일부 실시양태에서, GD3은 티오페닐 GD3이다. 일부 실시양태에서, 티오페닐 GD3은 하기 구조를 갖는다:



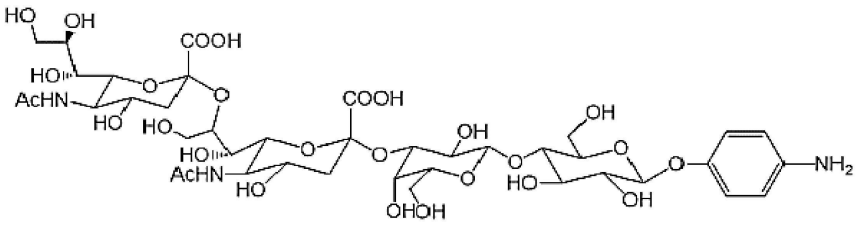
[0287]

[0288] 일부 실시양태에서, GD3은 하기 구조를 갖는 GD3-O-아릴-NH_2이다:



[0289]

[0290] 일부 실시양태에서, GD3은 p-아미노 페닐 에테르 GD3(AP-GD3)이다.



[0291]

[0292] 일부 실시양태에서, 아릴은 트리아진이다. 일부 실시양태에서, 트리아진은 1, 3, 5-트리아진이다. 일부 실시양태에서, 트리아진은 선택적으로 치환된다. 일부 실시양태에서, 트리아진은 2-아미노-4,6-디클로로-1,3,5-트리아진이다.

[0293] 따라서, 본원은 헤테로아릴, 예를 들어, 트리아진 또는 트리아졸을 포함하는 강글리오시드를 제공한다. 일부 실시양태에서, 헤테로아릴을 포함하는 강글리오시드는 단량체이다. 다른 실시양태에서, 헤테로아릴을 포함하는 강글리오시드는 다량체(예를 들어, 삼량체)이다.

[0294] 따라서, 특정 양태에서, 본원은 구조:(A)x-[(P)y-(L)z]-(M)b를 갖는 강글리오시드를 포함하는 조성물을 제공하고; 상기 식에서 A는 강글리오시드, 또는 이의 임의의 부분이고; x는 1 내지 32의 정수이고; P는 헤테로아릴이고; y는 1이고; L은 링커이고; z는 0 내지 8의 정수이고; M은 코어이고; b는 0 또는1이고; P는 (1) 수소; (2)

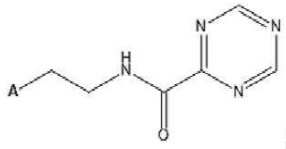
C_{1-7} 아실; (3) C_{1-20} 알킬; (4) 아미노; (5) C_{3-10} 아릴; (6) 하이드록시; (7) 니트로; (8) C_{1-20} 알킬-아미노; 및 (9) $-(CH_2)_qCONR^B$로부터 독립적으로 선택되는 1, 2, 3, 4 또는 5개의 치환기로 선택적으로 치환되고, 여기서 q는 0 내지 4의 정수이고, R^B는 (a) 수소, (b) C_{1-6} 알킬, (c) C_{3-10} 아릴 및 (d) C_{1-6} 알크-C_{6-10} 아릴로 이루어진 군으로부터 선택된다.

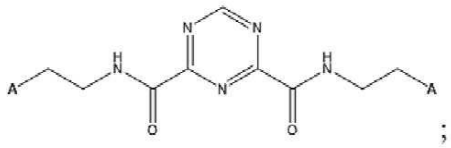
[0295] 일부 실시양태에서, 헤테테로아릴은 트리아진 또는 트리아졸이다. 일부 실시양태에서, a) 트리아진이 1, 3, 5 트리아진이거나; b) 트리아졸이 1, 2, 3 트리아졸 또는 1, 2, 4 트리아졸이다.

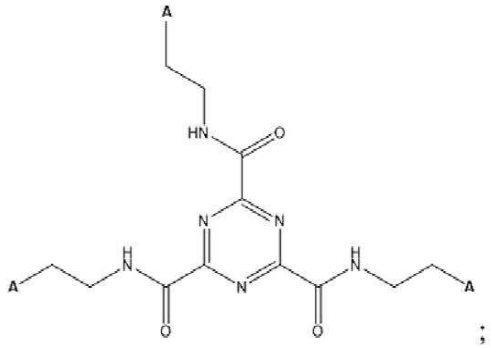
[0296] 일부 실시양태에서, P는 (1) 수소; (2) C_{1-20} 알킬-아미노; 및 (3) $-(CH_2)_qCONR^B$로부터 독립적으로 선택되는 1, 2, 3, 4 또는 5개의 치환기로 치환되고, 여기서 q는 0 내지 4의 정수이고, R^B는 (a) 수소, (b) C_{1-6} 알킬, (c) C_{3-10} 아릴 및 (d) C_{1-6} 알크-C_{6-10} 아릴로 이루어진 군으로부터 선택된다.

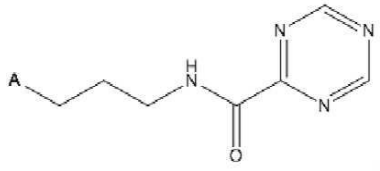
[0297] 일부 실시양태에서, M은 (1) 아민 또는(2) 폴리아미도아민(PAMAM)이다. 일부 실시양태에서, x는 1, 2, 3, 4, 6 또는 8이다.

[0298] 예시적인 구조는

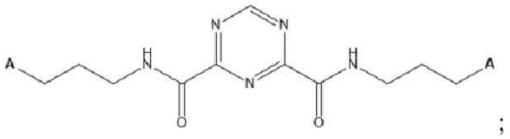

;

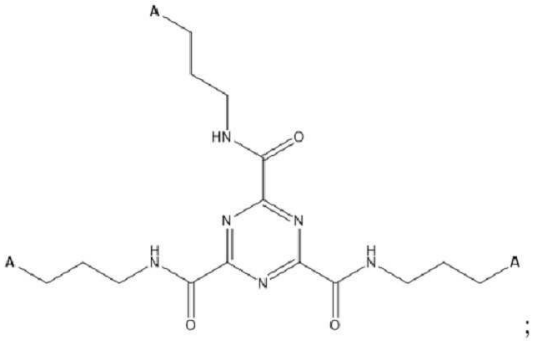

;


;

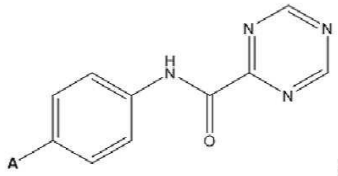

;

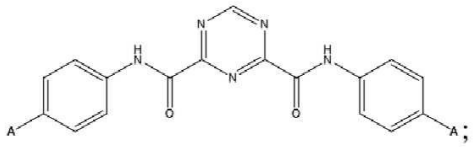
[0299]

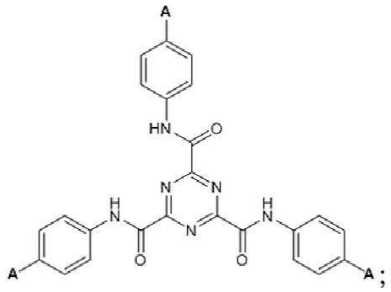

;


;

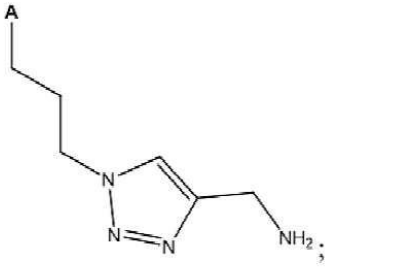
[0300]

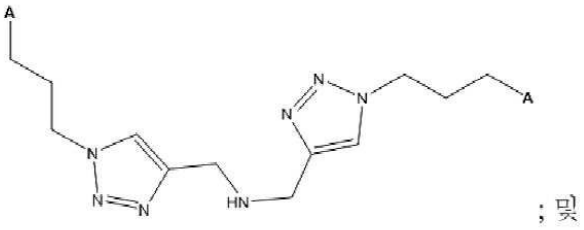

;


;

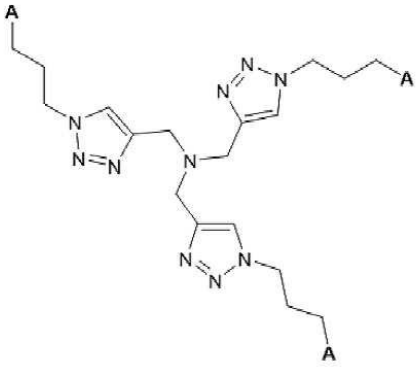

;

[0301]





; 및



[0302] 를 포함하고,

[0303] 여기서 A는 강글리오시드이다.

[0304] 일부 실시양태에서, 강글리오시드는 GD2, GD3, GD1b, GT1b, 푸코실-GM1, GloboH, 폴리시알산(PSA), GM2, GM3, 시알릴-루이스^{X}, 시알릴-루이스^{Y}, 시알릴-루이스^{A}, 시알릴-루이스^{B} 및 루이스^{Y}로부터 선택되고, 선택적으로 강글리오시드는 GD2, GD3, GT1b 및 GM2이다.

[0305] 일부 실시양태에서, 강글리오시드는 검출가능하게 표지되고, 선택적으로 강글리오시드는 효소, 보결 분자단(예를 들어, 스트렙타비딘/비오틴), 형광단, 발광성 태그, 생발광성 태그 및/또는 방사성동위원소로 표지된다.

[0306] 본원에서 입증된 바와 같이, 본원의 강글리오시드(천연 또는 변형)는 검출을 가능하게 하는 모이어티로 표지될 수 있다. 표지된 강글리오시드는 임상 테스트 절차의 일부로서 혈액 또는 조직에서 항-강글리오시드 항체의 수준을 모니터링하기 위해 진단 또는 예측적으로 사용될 수 있는 항원으로서 사용될 수 있다. 표지된 강글리오시드는 또한 다양한 검정(예를 들어, ELISA 검정, 경쟁 ELISA 검정 등)에서 사용될 수 있다. 검출가능한 모이어티의 예는 다양한 효소, 보결 분자단, 형광 물질, 발광 물질, 생물발광 물질 및 방사성 물질을 포함한다. 적합한 효소의 예는 홀스래디쉬 퍼옥시다제, 알칼리 포스파타제, β-갈락토시다제 또는 아세틸콜린에스테라제를 포함하고; 적합한 보결 분자단 복합체의 예는 스트렙타비딘/비오틴 및 아비딘/비오틴을 포함하고; 적합한 형광 물질의 예는 움벨리페론, 플루오레세인, 플루오레세인 이소티오시아네이트(FITC), 로다민, 디클로로트리아지닐아민 플루오레세인, 단실 클로라이드 또는 피코에리트린(PE)을 포함하고; 발광 물질의 예는 루미놀을 포함하고; 생물발광 물질의 예는 루시퍼라제, 루시페린 및 에쿠오린을 포함하고; 적합한 방사성 물질의 예는 ^{125}I, ^{131}I, ^{35}S 또는 ^{3}H를 포함한다. 본원에 사용된 바와 같이, 항체와 관련하여 용어 "표지된"은 검출가능한 물질, 예컨대 방사성 작용제 또는 형광단(*예를 들어*, 플루오레세인 이소티오시아네이트(FITC) 또는 피코에리트린(PE) 또는 인도시아닌(Cy5))을 강글리오시드에 커플링(즉, 물리적 연결)시킴으로써 강글리오시드를 직접 표지화하는 것뿐만 아니라 검출가능한 물질과의 반응성에 의해 강글리오시드를 간접 표지화하는 것을 포함하도록 의도된다. 예를 들어, 강글리오시드는 증폭 및 검출될 수 있는 핵산 서열로 표지될 수 있다.

[0307] 일부 실시양태에서, 본원의 강글리오시드를 포함하는 조성물은 약학 조성물이다.

[0308] 약학 조성물

[0309] 강글리오시드에 대한 면역 반응을 유도하는 화합물은 대상체에게 투여하기에 적합한 약학 조성물에 혼입될 수 있다. 이러한 조성물은 전형적으로 화합물(예를 들어, 강글리오시드의 변형된 형태) 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함한다. 본원에 사용된 바와 같이, 약학적으로 허용가능한 담체는 약학적 투여와 양립가능한, 임의의 모든 용매, 분산 매질, 코팅, 항박테리아 및 항진균제, 등장화제 및 흡수 지연제 등을 포함하도록 의도된다. 약학적으로 활성인 물질에 대한 이러한 매질 및 작용제의 용도는 당업계에 잘 알려져 있다. 임의의 통상적인 매질 또는 작용제가 활성 화합물과 양립할 수 없는 경우를 제외하고, 조성물에서의 이의 사용이 고려된다. 보충적인 활성 화합물도 조성물에 혼입될 수 있다.

[0310] 본 발명의 약학 조성물은 의도된 투여 경로와 양립가능하도록 제형화된다. 투여 경로의 예는 비경구, *예를 들어* 정맥내, 피내, 피하, 경구(예를 들어, 흡입), 경피(국소), 경점막 및 직장 투여를 포함한다. 비경구, 피내 또는 피하 적용에 사용되는 용액 또는 현탁액은 다음과 같은 구성성분을 포함할 수 있다: 멸균 희석액, 예컨대 주사용수, 식염수, 고정유, 폴리에틸렌 글리콜, 글리세린, 프로필렌 글리콜 또는 다른 합성 용매; 항박테리아제, 예컨대 벤질 알코올 또는 메틸 파라벤; 항산화제, 예컨대 아스코르브산 또는 중황산나트륨; 킬레이트제, 예컨대 에틸렌디아민테트라아세트산; 완충제, 예컨대 아세테이트, 시트레이트 또는 포스페이트; 및 긴장 조절을 위한 작용제, 예컨대 염화나트륨 또는 덱스트로스. pH는 염산 또는 수산화나트륨과 같은 산 또는 염기로 조절될 수 있다. 비경구 제제는 앰플, 일회용 주사기, 또는 유리 또는 플라스틱으로 제조된 다회 용량 바이알에 동봉될 수 있다.

[0311] 주사용에 적합한 약학 조성물은 멸균 수용액(수용성인 경우) 또는 분산액 및 멸균 주사용 용액 또는 분산액의 즉석 제조를 위한 멸균 분말을 포함한다. 정맥내 투여의 경우, 적합한 담체는 생리식염수, 정균수, 크레모포르 EL™(뉴저지 파스패니 소재의 BASF) 또는 포스페이트 완충 식염수(PBS)를 포함한다. 모든 경우에, 조성물은 멸균이어야 하고, 쉬운 주사 가용성이 존재할 정도로 유동적이어야 한다. 제조 및 보관 조건에서 안정적이어야 하며, 박테리아 및 진균과 같은 미생물의 오염 작용에 대해 보호되어야 한다. 담체는, 예를 들어 물, 에탄올, 폴리올(예를 들어, 글리세롤, 프로필렌 글리콜 및 액체 폴리에틸렌 글리콜 등) 및 이들의 적합한 혼합물을 함유하는 용매 또는 분산 매질일 수 있다. 적절한 유동성은, 예를 들어 레시틴과 같은 코팅의 사용, 분산의 경우 필요한 입자 크기의 유지 및 계면활성제의 사용에 의해 유지될 수 있다. 미생물 작용의 억제는 다양한 항박테리아 및 항진균제, 예를 들어 파라벤, 클로로부탄올, 페놀, 아스코르브산, 티메로살 등에 의해 달성될 수 있다. 많은 경우에, 등장화제, 예를 들어 당, 다가알코올, 예컨대 만니톨, 소르비톨, 염화나트륨을 조성물에 포함시키는 것이 바람직하다. 주사용 조성물의 연장된 흡수는 흡수를 지연시키는 작용제, 예를 들어 알루미늄 모노스테아레이트 및 젤라틴을 조성물에 포함시킴으로써 야기될 수 있다.

[0312] 멸균 주사 용액은 필요에 따라 상기 열거된 성분 중 하나 또는 조합과 함께 적절한 용매에 활성 화합물을 필요한 양으로 혼입한 후, 멸균 여과함으로써 제조될 수 있다. 일반적으로, 분산액은 활성 화합물을 기본 분산 매질 및 상기 열거된 것들로부터의 필요한 다른 성분을 함유하는 멸균 비히클에 혼입시킴으로써 제조된다. 멸균 주사용 용액의 제조를 위한 멸균 분말의 경우, 바람직한 제조 방법은 진공 건조 및 이전에 멸균 여과된 이의 용액으로부터 활성 성분의 분말 및 임의의 원하는 추가 성분을 수득하는 동결 건조이다.

[0313] 경구 조성물은 일반적으로 불활성 희석제 또는 식용 담체를 포함한다. 이들은 젤라틴 캡슐에 동봉되거나 정제로 압축될 수 있다. 경구 치료 투여의 목적을 위해, 활성 화합물은 부형제와 함께 혼입되고, 정제, 트로키 또는 캡슐의 형태로 사용될 수 있다. 경구 조성물은 또한 구강 세척제로서 사용하기 위한 유체 담체를 사용하여 제조될 수 있으며, 여기서 유체 담체 내의 화합물은 경구로 적용되고, 스위시(swish)되고 뱉어지거나 삼켜진다. 약학적으로 양립가능한 결합제 및/또는 아쥬반트 물질이 조성물의 일부로서 포함될 수 있다. 정제, 알약, 캡슐, 트로키 등은 다음과 같은 성분 중 임의의 것 또는 유사한 성질의 화합물을 함유할 수 있다: 결합제, 예컨대 미세결정질 셀룰로오스, 트라가칸트 검 또는 젤라틴; 부형제, 예컨대 전분 또는 락토스, 붕해제, 예컨대 알긴산, 프리모겔 또는 옥수수 전분; 윤활제, 예컨대 마그네슘 스테아레이트 또는 스테로테스(Sterotes); 활택제, 예컨대 콜로이드성 이산화규소; 감미제, 예컨대 스쿠로스 또는 사카린; 또는 향미제, 예컨대 페퍼민트, 메틸 살리실레이트 또는 오렌지 향료.

[0314] 전신 투여는 또한 경점막 또는 경피 수단에 의한 것일 수 있다. 경점막 또는 경피 투여의 경우, 침투될 장벽에 적합한 침투제가 제형에 사용된다. 이러한 침투제는 일반적으로 당업계에 알려져 있고, 예를 들어 경점막 투여의 경우, 세제, 담즙산염 및 푸시딘산 유도체를 포함한다. 경점막 투여는 비강 스프레이 또는 좌약의 사용을 통해 달성될 수 있다. 경피 투여의 경우, 활성 화합물은 당업계에 일반적으로 알려진 바와 같이, 연고, 납고

(salve), 겔 또는 크림으로 제형화된다.

[0315] 일부 실시양태에서, 본원의 화합물은 이식물 및 마이크로캡슐화된 전달 시스템을 포함하여, 제어 방출 제형과 같이 신체로부터의 신속한 제거에 대해 화합물을 보호할 담체와 함께 제조된다. 에틸렌 비닐 아세테이트, 폴리무수물, 폴리글리콜산, 콜라겐, 폴리오르토에스테르 및 폴리락트산과 같은 생분해성, 생체적합성 중합체가 사용될 수 있다. 이러한 제형의 제조 방법은 당업자에게 자명해야 한다. 물질은 또한 알자 코포레이션(Alza Corporation) 및 노바 파마슈티컬즈 주식회사(Nova Pharmaceuticals, Inc.)로부터 상업적으로 입수될 수 있다. 리포솜 현탁액(바이러스 항원에 대한 단클론성 항체로 감염된 세포를 표적으로 하는 리포솜 포함)은 또한 약학적으로 허용가능한 담체로서 사용될 수 있다. 이들은, 예를 들어 미국 특허 번호 4,522,811에 기재된 바와 같이, 당업자에게 알려진 방법에 따라 제조될 수 있다.

[0316] 투여의 용이성 및 투여량의 균일성을 위해 투여 단위 형태로 경구 또는 비경구 조성물을 제형화하는 것이 특히 유리하다. 본원에 사용된 바와 같은 투여 단위 형태는 치료될 대상체에 대한 일원화된 투여량으로서 적합한 물리적으로 분리된 단위; 필요한 약학적 담체와 관련하여 원하는 치료 효과를 생성하도록 계산된 활성 화합물의 사전결정된 양을 함유하는 각각의 단위를 지칭한다. 본 발명의 투여 단위 형태에 대한 사양은 활성 화합물의 고유한 특성, 달성하고자 하는 특정 치료 효과 및 개체의 치료를 위한 이러한 활성 화합물을 배합하는 기술에 내재된 한계에 의해 좌우되고, 이들에 직접적으로 의존한다.

[0317] 강글리오시드 분석/검출

[0318] 강글리오시드 바이오마커는 본원에 기재된 방법 및 당업계에 알려진 다른 적합한 기술에 따라 분석될 수 있다. 강글리오시드(예를 들어, GD1, GD2, GD3, GM2)의 존재, 수준 또는 지질 길이는, 비제한적으로 면역확산, 면역전기영동, 면역형광 검정, 효소 면역검정, 면역침강 검정, 화학발광검정, 면역조직화학적 검정, 도트 블롯 검정 또는 슬롯 블롯 검정을 포함하는 방법을 사용하여 검출될 수 있다. 위에서 언급된 다양한 면역검정을 수행하는 데 사용될 일반 기술 및 다른 기술 변형, 예컨대 *인 시투(in situ)* 근접 결찰 검정(PLA), 형광 편광 면역검정(FPIA), 형광 면역검정(FIA), 효소 면역검정(EIA), 혼탁 억제 면역검정(NIA), 효소 결합 면역흡착 검정(ELISA), 방사성면역검정(RIA), 샌드위치 ELISA, 경쟁 ELISA, 응집, 보체 검정, 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC), 박층 크로마토그래피(TLC), 초확산 크로마토그래피 등(*예를 들어*, Basic and Clinical Immunology, Sites and Terr, eds., Appleton and Lange, Norwalk, Conn. pp 217-262, 1991, 이는 참조로 포함됨)은, 단독 또는 조합, 또는 대안적으로 NMR, MALDI-TOF, LC-MS/MS와 함께 당업자에게 알려져 있다.

[0319] 이러한 시약은 또한 세포 또는 조직에서 강글리오시드 수준을 모니터링하기 위해 사용될 수 있다. 항체를 검출가능한 물질에 커플링(*예를 들어*, 물리적 연결)함으로써 검출이 촉진될 수 있다. 검출가능한 물질의 예는 다양한 효소, 보결 분자단, 형광 물질, 발광 물질, 생물발광 물질 및 방사성 물질을 포함한다. 적합한 효소의 예는 홀스래디쉬 퍼옥시다제, 알칼리 포스파타제, β-갈락토시다제 또는 아세틸콜린에스테라제를 포함하고; 적합한 보결 분자단 복합체의 예는 스트렙타비딘/비오틴 및 아비딘/비오틴을 포함하고; 적합한 형광 물질의 예는 움벨리페론, 플루오레세인, 플루오레세인 이소티오시아네이트, 로다민, 디클로로트리아지닐아민 플루오레세인, 단실 클로라이드 또는 피코에리트린을 포함하고; 발광 물질의 예는 루미놀을 포함하고; 생물발광 물질의 예는 루시퍼라제, 루시페린 및 에쿠오린을 포함하고, 적합한 방사성 물질의 예는 ^{125}I, ^{131}I, ^{35}S 또는 ^{3}H를 포함한다.

[0320] 일부 실시양태에서, ELISA 및 RIA 절차를 수행하여, 원하는 바이오마커 단백질 표준이 (방사성동위원소, 예컨대 ^{125}I 또는 ^{35}S, 또는 검정가능한 효소, 예컨대 홀스래디쉬 퍼옥시다제 또는 알칼리 포스파타제로) 표지되게 하고, 표지되지 않은 샘플과 함께, 해당하는 항체와 접촉하게 되며, 제2 항체를 사용하여 제1 항체에 결합시키고, 방사능 또는 고정된 효소를 검정할 수 있다(경쟁적 분석). 대안적으로, 샘플 내의 바이오마커 단백질은 해당하는 고정된 항체와 반응하도록 허용되고, 방사성동위원소- 또는 효소-표지된 항-바이오마커 단백질 항체는 시스템과 반응하도록 허용되며, 방사능 또는 효소가 검정된다. 다른 통상적인 방법도 적절하게 사용될 수 있다.

[0321] 일부 실시양태에서, 샌드위치 ELISA는 강글리오시드 수준을 검출하고 측정하기 위해 사용된다. 샌드위치 ELISA는 항체의 두 층(즉, 포획 및 검출 항체) 사이의 항원을 정량화한다. 적어도 2개의 항체가 샌드위치에서 작용하기 때문에, 측정될 항원은 항체에 결합할 수 있는 적어도 2개의 항원 에피토프를 함유해야 한다. 단클론성 또는 다클론성 항체는 샌드위치 ELISA 시스템에서 포획 및 검출 항체로서 사용될 수 있다. 단클론성 항체는 항원에서 작은 차이를 정밀하게 검출하고 정량화할 수 있게 하는 단일 에피토프를 인식한다. 다클론성은 종종 가능한 한 많은 항원을 허물기 위한 포획 항체로서 사용된다. 샌드위치 ELISA의 이점은 분석 전에 샘플을 정제할 필요가 없으며 검정이 매우 민감할 수 있다는 것이다(직접 또는 간접 ELISA보다 최대 2 내지 5배 더 민감함).

[0322] 일부 실시양태에서, 샌드위치 ELISA는 본원의 하나 이상의 항체(예를 들어, 항-GD2 또는 항-GD3 항체)의 사용을 포함한다. 일부 실시양태에서, 샌드위치 ELISA는 당업계에 잘 알려진 하나 이상의 항체(예를 들어, 상업적으로 입수가능한 항-GD2 또는 항-GD3 항체)의 사용을 포함한다. 일부 실시양태에서, 샌드위치 ELISA는 본원의 항체 및 당업계에 알려진 항체(예를 들어, 상업적으로 입수가능한 항체)의 조합의 사용을 포함한다.

[0323] 본원의 검정(예를 들어, 샌드위치 ELISA)에 적합한 다수의 항-GD2 또는 항-GD3 항체가 당업계에 알려져 있고/있거나 상업적으로 입수가능하다.

[0324] 항-GD2 항체의 비제한적인 예는 뮤린 m3F8 항체, 뮤린 14G2a 항체, 디누툭시맙, Ch14.18/CHO(디누툭시맙-베타), 인간 3F8 항체, 낙시타맙 및 Hu14.18-K322A (문헌 [(Sait and Modak(2017) *Expert Rev Anticancer Ther.* 17:889-904]; [Voeller and Sondel(2020) *J Pediatr Hematol Oncol* 41:163-169]; [Mora *et al*(2020) *J of Clin Oncol* 38:15)]; [Ca.t No. BE0318(BioXCell, Lebanon, NH)] 참조); 카탈로그 번호 ab68456, ab82717(매사추세츠 월섬 소재의 아브캄(Abcam)); 카탈로그 번호 AGM-039YJ, AGM-143YJ, AGM-144YJ, AGM-145YJ, AGM-146YJ(뉴욕 셜리 소재의 크리에이티브 바이오랩스(Creative Biolabs))를 포함한다.

[0325] 항-GD3 항체의 비제한적인 예는 카탈로그 번호 ab11779(매사추세츠 월섬 소재의 아브캄); 카탈로그 번호 14-9754-82(매사추세츠 월섬 소재의 서모피셔 사이언티픽(ThermoFisher Scientific)); 카탈로그 번호 917701(캘리포니아 샌디에고 소재의 바이오레전드(BioLegend)); 카탈로그 번호 MABC1112(매사추세츠 벌링턴 소재의 밀리포어 시그마(Millipore Sigma)); 카탈로그 번호 sc-33685(텍사스 댈러스 산타 크루즈 바이오테크놀로지(Santa Cruz Biotechnology)); 문헌 [Hedberg *et al.*(2000) *Glycoconjugate Journal* 17:717-726]에 의해 제공된 항체를 포함한다.

[0326] 일부 실시양태에서, 강글리오시드 수준을 검출하고 측정하기 위해 경쟁 ELISA가 사용된다. 경쟁 ELISA(억제 ELISA 또는 경쟁 면역검정으로도 알려짐)는 신호 간섭의 검출에 의해 항원의 농도를 측정한다. 샘플 항원은 특정 양의 표지된 항체에 결합하기 위해 기준 항원과 경쟁한다. 기준 항원은 본원의 임의의 하나 이상의 항원일 수 있다. 대안적으로, 기준 항원은 당업계에 알려진 임의의 강글리오시드 또는 이의 변형 버전일 수 있다.

[0327] 일부 실시양태에서, 기준 항원은 다중-웰 플레이트 상에 사전 코팅된다. 샘플은 표지된 항체(예를 들어, 항-GD2 또는 항-GD3 항체, 예를 들어, 본원의 항체)와 함께 사전 항온처리되고, 웰에 첨가된다. 샘플에 있는 항원의 양에 따라, 더 많거나 적은 유리 항체가 기준 항원에 결합하는 데 이용가능할 것이다. 이는 샘플에 더 많은 항원이 있을수록 더 적은 기준 항원이 검출될 것이며, 신호가 더 약하다는 것을 의미한다. 일부 경쟁 ELISA 방법은 표지된 항체 대신 표지된 항원을 사용한다. 표지된 항원과 샘플 항원(표지되지 않음)은 1차 항체에 결합하기 위해 경쟁한다. 샘플에 있는 항원의 양이 적을수록, 웰에서 더 많은 표지된 항원으로 인해 신호가 더 강하다. 또한, 다른 통상적인 변형이 적절하게 사용될 수 있다.

[0328] 다른 실시양태에서, 경쟁 ELISA 검정은 다중-웰 플레이트 상에 1차 항체(예를 들어, 항-GD2 또는 항-GD3 항체, 예를 들어, 본원의 항체)를 코팅하는 것을 포함한다. 여기서, 검출가능/표지된 기준 항원(예를 들어, FITC-표지된 강글리오시드) 및 샘플은 웰에서 공동-항온처리되고, 표지된 기준 항원은 1차 항체에 결합하기 위해 천연 항원과 경쟁한다. 샘플에 있는 항원의 양이 적을수록, 웰에서 더 많은 표지된 항원으로 인해 신호가 더 강하다.

[0329] 또 다른 실시양태에서, 경쟁 ELISA 검정은 1차 항체(예를 들어, 항-GD2 또는 항-GD3 항체, 예를 들어 본원의 항체)를 다중-웰 플레이트에 코팅되는 항-종 2차 항체를 통해 다중-웰 플레이트에 고정시키는 것을 포함한다. 예를 들어, 마우스에서 생성된 1차 항체를 고정하기 위해, 항-마우스 2차 항체가 사용된다. 그 후, 검출가능/표지된 기준 항원(예를 들어, FITC-표지된 강글리오시드) 및 샘플이 웰에서 공동-항온처리되고, 표지된 기준 항원은 1차 항체에 결합하기 위해 천연 항원과 경쟁한다. 샘플에 있는 항원의 양이 적을수록, 웰에서 더 많은 표지된 항원으로 인해 신호가 더 강하다.

[0330] 일부 실시양태에서, 바이오마커 강글리오시드 수준을 측정하는 방법은 생물학적 시료(예를 들어, 액체 생검(예를 들어, 혈액, 혈청))을 바이오마커 강글리오시드에 선택적으로 결합하는 항체 또는 이의 변이체(예를 들어, 단편)와 접촉시키는 단계, 및 상기 항체 또는 이의 변이체가 상기 샘플에 결합하는지 여부를 검출함으로써 바이오마커 강글리오시드의 수준을 측정하는 단계를 포함한다.

[0331] 면역조직화학은, *예를 들어* 생검 샘플에서 바이오마커 강글리오시드의 존재 또는 수준을 검출하기 위해 사용될 수 있다. 적합한 항체는, 예를 들어 세포의 얇은 층과 접촉하게 되고, 세척된 후, 두 번째로 표지된 항체와 접촉된다. 표지화는 형광 마커, 효소, 예컨대 퍼옥시다제, 아비딘 또는 방사성표지화에 의한 것일 수 있다. 검정은 현미경을 사용하여 시각적으로 채점된다.

[0332] 항-강글리오시드 항체는 또한 영상화 목적, 예를 들어 대상체의 세포 및 조직 상의 바이오마커 강글리오시드의 존재를 검출하기 위해 사용될 수 있다. 적합한 표지는 방사성동위원소, 아이오딘(^{125}I, ^{121}I), 탄소(^{14}C), 황(^{35}S), 삼중수소(^{3}H), 인듐(^{112}In) 및 테크네튬(^{99}mTc), 형광 표지, 예컨대 플루오레세인 및 로다민 및 비오틴을 포함한다.

[0333] 사용될 수 있는 항체 및 이의 유도체는 다클론성 또는 단클론성 항체, 키메라, 인간, 인간화, 영장류화(CDR-이식), 베니어드(veneered) 또는 단일쇄 항체뿐만 아니라 항체의 기능적 단편, 즉 바이오마커 단백질 결합 단편을 포함한다. 예를 들어, 비제한적으로 Fv, Fab, Fab' 및 F(ab')2 단편을 포함하여, 바이오마커 단백질 또는 이의 일부에 결합할 수 있는 항체 단편이 사용될 수 있다.

[0334] 일부 실시양태에서, 질량 분석법(예를 들어, MALDI-TOF, LC/MS/MS, LC/MS 또는 당업계에 알려진 다른 것들)은, 액체 생검(예를 들어, 혈액, 타액, 혈청, 샘플 섹션 참조)과 같은 생물학적 시료에서, 강글리오시드(예를 들어, GD1, GD2, GD3 및/또는 GM2)의 존재, 수준 또는 지질 길이를 검출하기 위해 사용된다. 질량 분석-기반 방법은 본원의 신규한 바이오마커인 강글리오시드의 지질 길이의 이질성을 결정하는 데 특히 유용하다.

[0335] 바이오마커의 양이 양을 평가하기 위해 사용된 검정의 표준 오차보다 더 큰 양만큼 대조군에서의 수준보다 각각 더 크거나 작은 경우, 대상체에서 바이오마커(예를 들어, 강글리오시드)의 "수준" 또는 "양"은, 대조군에서 바이오마커의 수준보다 "유의미하게" 더 높거나 낮다.

[0336] 일부 실시양태에서, 대상체에서 바이오마커의 양 또는 수준은, 양이 바이오마커의 정상 및/또는 대조군 양보다, 각각, 적어도 또는 약 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100%, 110%, 120%, 130%, 140%, 150%, 160%, 170%, 180%, 190%, 200%, 250%, 300%, 350%, 400%, 450%, 500%, 550%, 600%, 650%, 700%, 750%, 800%, 850%, 900%, 950%, 1000%, 1500%, 2000%, 2500%, 3000%, 또는 그 초과 또는 이들 사이의 임의의 범위, 예컨대 5%-100%, 더 높거나 낮은 경우 정상 및/또는 대조군 양보다 "유의미하게" 더 높거나 낮은 것으로 간주될 수 있다. 상기 유의미한 조절 값은 강글리오시드의 수준 또는 강글리오시드의 지질 길이의 이질성의 변화 등과 같이, 본원에 기재된 임의의 측정치(metric)에 적용될 수 있다.

[0337] 용어 적어도 하나의 강글리오시드의 "지질 길이의 이질성"은 주어진 샘플에서 적어도 하나의 강글리오시드의 지질 길이의 수준 또는 분포 패턴을 포함한다.

[0338] 일부 실시양태에서, 대상 샘플에서 적어도 하나의 강글리오시드의 지질 길이의 수준 또는 분포가, 정상 및/또는 대조군 샘플에서의 것보다, 적어도 또는 약 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100%, 110%, 120%, 130%, 140%, 150%, 160%, 170%, 180%, 190%, 200%, 250%, 300%, 350%, 400%, 450%, 500%, 550%, 600%, 650%, 700%, 750%, 800%, 850%, 900%, 950%, 1000%, 1500%, 2000%, 2500%, 3000%, 또는 그 초과 또는 이들 사이의 임의의 범위, 예컨대 5%-100% 더 높거나 낮은 경우, 지질 길이의 이질성의 변화(예를 들어, 증가 또는 감소) 또는 유의미한 변화가 있다.

[0339] 유사하게는, 용어 강글리오시드의 "지질 길이의 이질성"은 짧은 지질 길이 대 긴 지질 길이를 갖는 강글리오시드의 분포 패턴을 포함한다(실시예 6 참조). 강글리오시드는 2개의 지질 미부: 스핑고신 및 아실을 갖는다. 본원에 사용된 바와 같이, 2개의 지질 미부는 구별되지 않는다. 따라서, 본원에 사용된 바와 같은 용어 "지질 길이의 이질성"은 강글리오시드의 양쪽 지질 미부의 평균 길이를 지칭한다. 일부 실시양태에서, 대상체 샘플에서 짧은 지질 길이(14-34 탄소)를 갖는 강글리오시드의 양 또는 수준이, 정상 및/또는 대조군 샘플에서의 것보다, 적어도 또는 약 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100%, 110%, 120%, 130%, 140%, 150%, 160%, 170%, 180%, 190%, 200%, 250%, 300%, 350%, 400%, 450%, 500%, 550%, 600%, 650%, 700%, 750%, 800%, 850%, 900%, 950%, 1000%, 1500%, 2000%, 2500%, 3000%, 또는 그 초과 또는 이들 사이의 임의의 범위, 예컨대 5%-100% 더 높거나 낮은 경우, 강글리오시드의 지질 길이의 이질성의 변화 또는 유의미한 변화가 있다.

[0340] 일부 실시양태에서, 대상체 샘플에서 긴 지질 길이(36-48 탄소)를 갖는 강글리오시드의 양 또는 수준이, 정상 및/또는 대조군 샘플에서의 것보다, 적어도 또는 약 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100%, 110%, 120%, 130%, 140%, 150%, 160%, 170%, 180%, 190%, 200%, 250%, 300%, 350%, 400%, 450%, 500%, 550%, 600%, 650%, 700%, 750%, 800%, 850%, 900%, 950%, 1000%, 1500%, 2000%, 2500%, 3000%, 또는 그 초과 또는 이들 사이의 임의의 범위, 예컨대 5%-100% 더 높거나 낮은 경

우, 강글리오시드의 지질 길이의 이질성의 변화 또는 유의미한 변화가 있다.

[0341] 일부 실시양태에서, 대상체 샘플에서 짧은 지질 길이(14-34 탄소) 및 긴 지질 길이(36-48 탄소)를 갖는 강글리오시드의 양 또는 수준이, 정상 및/또는 대조군 샘플에서의 것보다, 적어도 또는 약 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100%, 110%, 120%, 130%, 140%, 150%, 160%, 170%, 180%, 190%, 200%, 250%, 300%, 350%, 400%, 450%, 500%, 550%, 600%, 650%, 700%, 750%, 800%, 850%, 900%, 950%, 1000%, 1500%, 2000%, 2500%, 3000%, 또는 그 초과 또는 이들 사이의 임의의 범위, 예컨대 5%-100% 더 높거나 낮은 경우, 강글리오시드의 지질 길이의 이질성의 변화 또는 유의미한 변화가 있다.

[0342] 대조군

[0343] 대조군은 임의의 적절한 참조 표준, 예컨대 정상 환자, 정상 환자와 같은 대상체로부터 단리된 배양된 일차 세포/조직, 환자의 동일한 장기 또는 신체 위치로부터 수득된 인접한 정상 세포/조직, 정상 대상체로부터 단리된 조직 또는 세포 샘플, 또는 보관소로부터 수득된 일차 세포/조직을 지칭한다. 다른 실시양태에서, 대조군은 정상 또는 건강한 대상체와 같은 대상체의 강글리오시드의 발현 수준(예를 들어, 강글리오시드의 수준) 및/또는 지질 미부 길이를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 대조군은 테스트 작용제(예를 들어, 항-강글리오시드 항체)가 결핍된 샘플을 지칭한다.

[0344] 대조군은 또한 테스트 샘플의 발현 산물에 대한 비교를 제공하기에 적합한 임의의 참조 표준을 지칭한다. 특정 실시양태에서, 대조군은 강글리오시드의 수준 또는 지질 길이가 검출되고 테스트 샘플로부터의 것과 비교되는 대조군 샘플을 수득하는 것을 포함한다. 이러한 대조군 샘플은, 비제한적으로 알려진 결과를 갖는 대조군 암 환자로부터의 샘플(보관된 샘플 또는 이전 샘플 측정일 수 있음); 정상 환자 또는 암 환자와 같은 대상체로부터 단리된 정상 조직 또는 세포, 정상 대상체 또는 암 환자와 같은 대상체로부터 단리된 배양된 일차 세포/조직, 암 환자의 동일한 장기 또는 신체 위치로부터 수득된 인접한 정상 세포/조직, 정상 대상체로부터 단리된 조직 또는 세포 샘플, 또는 보관소로부터 수득된 일차 세포/조직을 포함하여, 임의의 적합한 샘플을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 대조군은, 비제한적으로 정상 조직(또는 다른 이전에 분석된 대조군 샘플)으로부터의 발현 산물 수준 범위, 특정 결과(예를 들어, 1, 2, 3, 4 년 등 생존)를 갖거나, 치료(예를 들어 암 치료 진료 표준)을 받은 환자의 세트 또는 환자의 그룹 유래의 테스트 샘플 내에서 이전에 결정된 발현 산물 수준 범위를 포함하여, 임의의 적합한 원천으로부터의 참조 표준 발현 산물(예를 들어, 강글리오시드) 수준을 포함할 수 있다. 이러한 대조군 샘플 및 참조 표준 발현 산물 수준이 본 발명의 방법에서 대조군으로서 조합으로 사용될 수 있음이 당업자에 의해 이해될 것이다.

[0345] 일부 실시양태에서, 단백질 또는 핵산의 양은 동일한 샘플 내의 또 다른 유전자의 단백질 또는 핵산의 양에 대해 상대적으로 또는 비율로서 샘플 내에서 결정될 수 있다. 일부 실시양태에서, 대조군은, 비제한적으로 테스트 샘플에서 강글리오시드의 짧은 지질 길이 대 긴 지질 길이의 비율 또는 2개의 강글리오시드의 산물 수준의 비율을 결정하고, 참조 표준 내의 것의 임의의 적절한 비율과 이를 비교하는 하는 것; 테스트 샘플 내의 2개 이상의 유전자의 산물 수준을 결정하고, 임의의 적절한 대조군 내의 산물 수준의 차이를 결정하는 것; 및 테스트 샘플 내의 2개 이상의 강글리오시드의 산물 수준을 결정하고, 테스트 샘플 내의 하우스키핑 유전자 산물의 수준에 대해 이들의 수준을 정규화하고, 임의의 적절한 대조군과 비교하는 것을 포함하여, 발현 산물 수준의 비율 변환을 포함한다. 바람직한 실시양태에서, 대조군은 테스트 샘플과 동일한 계통 및/또는 종류의 것인 대조군 샘플을 포함한다. 다른 실시양태에서, 대조군은 모든 암을 갖는 환자와 같은 환자 샘플의 세트 내에서 또는 이를 기반으로 백분위수로 그룹화된 산물 수준을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 예를 들어, 특정 백분위수에 비해 더 높거나 더 낮은 산물의 수준이 결과를 예측하기 위한 기준으로 사용되는 대조군 산물 수준이 확립된다. 다른 바람직한 실시양태에서, 대조군 산물 수준은 알려진 결과를 갖는 암 대조군 환자로부터의 산물 수준을 사용하여 확립되고, 테스트 샘플로부터의 산물 수준은 결과를 예측하기 위한 기준으로서 대조군 산물 수준과 비교된다. 본원에서 제공되는 데이터에 의해 입증된 바와 같이, 본 발명의 방법은 테스트 샘플의 산물의 수준을 대조군과 비교하여 특정 컷-포인트를 사용하는 것으로 한정되지 않는다.

[0346] 일부 실시양태에서, 사전-결정된 마커 양 및/또는 활성 측정(들)은 임의의 적합한 표준일 수 있다. 예를 들어, 사전-결정된 마커 양 및/또는 활성 측정(들)은 환자 선택이 평가되고 있는 동일하거나 다른 인간으로부터 수득될 수 있다. 일부 실시양태에서, 사전-결정된 마커 양 및/또는 활성 측정(들)은 동일한 환자의 이전 평가로부터 수득될 수 있다. 이러한 방식으로, 시간 경과에 따라 환자 선택의 진행이 모니터링될 수 있다. 또한, 대상체가 인간인 경우, 대조군은 또 다른 인간 또는 복수의 인간, *예를 들어* 선택된 인간 그룹의 평가로부터 수득될 수 있다. 상기 방식으로, 선택이 평가되고 있는 인간의 선택 정도는, 적합한 다른 인간, *예를 들어* 동일한 인종 그

룹, 및/또는 유사하거나 동일한 병태(들)을 앓고 있는 인간과 같이, 관심 있는 인간과 유사한 상황에 있는 다른 인간과 비교될 수 있다.

[0347] 진단 검정

[0348] 본 발명은 부분적으로 생물학적 샘플이 강글리오시드를 포함하는지 여부 및/또는 강글리오시드의 수준이 조절(예를 들어, 상향 조절 또는 하향 조절)되는지 여부를 정확하게 분류함으로써 암과 같은 관심 장애의 상태를 나타내기 위한 방법, 시스템 및 코드를 제공한다. 일부 실시양태에서, 본 발명은, 통계적 알고리즘 및/또는 경험적 데이터(*예를 들어*, 강글리오시드의 존재, 부재, 수준 또는 지질 길이)를 사용하여, 강글리오시드에 의해 매개된 암 또는 이의 아형에 대한 위험이 있거나 이와 관련된 샘플(대상체 유래)을 분류하는 데 유용하다.

[0349] 강글리오시드의 수준을 검출하여, 샘플이 암 또는 이의 임상적 아형 또는 암의 다른 단계와 관련되어 있는지 여부를 분류하는 데 유용한 예시적인 방법은, 테스트 대상체로부터 생물학적 샘플을 수득하고, 강글리오시드의 수준이 생물학적 샘플에서 검출되도록, 강글리오시드를 검출할 수 있는 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합 단편과 생물학적 샘플을 접촉시키는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 적어도 1개의 항체 또는 이의 항원 결합 단편이 사용되고, 여기서 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 또는 그 초과의 항체 또는 항체 단편은 조합(*예를 들어*, 샌드위치 ELISA) 또는 연속하여 사용될 수 있다. 특정 예에서, 통계 알고리즘은 단일 학습 통계 분류기 시스템이다. 예를 들어, 단일 학습 통계 분류기 시스템은 예측 또는 확률 값 및 강글리오시드의 존재 또는 수준에 기초하여 샘플을 암 샘플로 분류하는 데 사용될 수 있다. 단일 학습 통계 분류기 시스템의 사용은 전형적으로 민감도, 특이성, 양성 예측 값, 음성 예측 값 및/또는 적어도 또는 약 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 전체 정확도로 샘플을 암 샘플로 분류한다.

[0350] 다른 적합한 통계 알고리즘은 당업자에게 잘 알려져 있다. 예를 들어, 학습 통계 분류기 시스템은 복잡한 데이터 세트(*예를 들어*, 관심 마커 패널)에 적응하고 이러한 데이터 세트를 기반으로 결정을 내릴 수 있는 기계 학습 알고리즘 기술을 포함한다. 일부 실시양태에서, 분류 트리(예를 들어, 랜덤 포레스트(random forest))와 같은 단일 학습 통계 분류기 시스템이 사용된다. 다른 실시양태에서, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 또는 그 초과의 학습 통계 분류기 시스템의 조합이 바람직하게는 협력하여 사용된다. 학습 통계 분류기 시스템의 예는, 비제한적으로 귀납적 학습(예를 들어, 결정/분류 트리, 예컨대 랜덤 포레스트, 분류 및 회귀 트리(C&RT), 부스트된 트리 등), 아마도 대략적으로 올바른(Probably Approximately Correct, PAC) 학습, 연결주의 학습(connectionist learning)(예를 들어, 신경 네트워크(NN), 인공 신경 네트워크(ANN), 신경 퍼지 네트워크(NFN), 네트워크 구조, 퍼셉트론(perceptron), 예컨대 다층 퍼셉트론, 다층 피드-포워드 네트워크, 신경 네트워크의 응용, 신뢰 네트워크(belief network) 내 베이지안(Bayesian) 등), 강화 학습(예를 들어, 알려진 환경에서의 수동 학습, 예컨대 나이브 학습(naive learning), 적응형 동적 학습 및 시간차 학습(temporal difference learning), 알려지지 않은 환경에서의 수동 학습, 알려지지 않은 환경에서의 능동 학습, 행동 가치 함수 학습, 강화 학습의 응용 등), 유전자 알고리즘 및 진화 프로그래밍을 사용하는 것들을 포함한다. 다른 학습 통계 분류기 시스템은 지원 벡터 머신(예를 들어, 커널 방법(Kernel method)), 다변량 적응형 회귀 스플라인(MARS), 레벤버그-마크워트(Levenberg-Marquardt) 알고리즘, 가우스-뉴턴(Gauss-Newton) 알고리즘, 가우시안(Gaussian) 혼합, 경사 하강 알고리즘 및 학습 벡터 양자화(LVQ)를 포함한다. 특정 실시양태에서, 본 발명의 방법은 샘플 분류 결과를 임상의(비-전문가, 예를 들어, 주치의 및/또는 전문가, 예를 들어, 조직병리학자 또는 종양학자)에게 보내는 것을 추가로 포함한다.

[0351] 일부 실시양태에서, 본 발명의 방법은 개체가 암을 가질 가능성의 형태로 진단을 추가로 제공한다. 예를 들어, 개체는 암을 가질 가능성을 약 0%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 그 초과로 가질 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 방법은 개체에서 암의 예상을 추가로 제공한다. 일부 예에서, 샘플을 암 샘플로 분류하는 방법은 샘플이 수득되는 개체의 증상(*예를 들어*, 임상적 요인)에 추가로 기초할 수 있다. 증상 또는 증상의 그룹은, 예를 들어 림프구 수, 백혈구 수, 적혈구 침강 속도, 설사, 복통, 팽만감, 골반 통증, 하부 요통, 경련, 발열, 빈혈, 체중 감소, 불안, 우울증, 및 이들의 조합일 수 있다. 일부 예에서, 샘플을 암 샘플로 분류하는 방법은 추가로, 증상에 관계없이 암에 대한 소인 및/또는 유전적 돌연변이를 기반으로 할 수 있다. 일부 실시양태에서, 암을 갖는 것으로 개체를 진단한 후 개체에게 치료적 유효량의 암 치료(*예를 들어*, 화학치료제)를 투여한다.

[0352] 강글리오시드의 존재 또는 부재를 검출하기 위한 예시적인 방법은 강글리오시드에 결합할 수 있는 본원의 항체 또는 이의 단편, 바람직하게는 검출가능한 표지를 갖는 항체를 사용하는 것을 포함한다. 항체는 다클론성, 또는

보다 바람직하게는 단클론성일 수 있다. 이러한 작용제는 표지될 수 있다. 항체와 관련하여 용어 "표지된"은 검출가능한 물질을 프로브 또는 항체에 커플링(즉, 물리적 연결)함으로써 프로브 또는 항체의 직접적인 표지화 뿐만 아니라 직접적으로 표지된 또 다른 시약과의 반응성에 의한 프로브 또는 항체의 간접적인 표지화를 포함하도록 의도된다. 간접 표지의 예는 형광 표지된 2차 항체를 사용한 1차 항체의 검출을 포함한다. 용어 "생물학적 샘플"은 대상체 내에 존재하는 조직, 세포 및 체액뿐만 아니라 혈청, 혈액과 같이, 대상체로부터 단리된 조직, 세포 및 생물학적 체액을 포함하도록 의도된다. 즉, 본원의 검출 방법은 *생체내*뿐만 아니라 *시험관내*, *생체외* 생물학적 샘플에서 강글리오시드를 검출하는 데 사용될 수 있다. 강글리오시드의 검출을 위한 *시험관내* 기술은 효소 결합 면역흡착 검정(ELISA), 면역침강, 면역조직화학(IHC), 유세포 분석 및 관련 기술, 면역형광법을 포함한다. 또한, 강글리오시드의 검출을 위한 *생체내* 기술은 표지된 항-강글리오시드 항체를 대상체에게 도입하는 것을 포함한다. 예를 들어, 항체는 방사성, 발광성, 형광성 또는 표준 영상화 기술에 의해 단독으로 또는 세포 종류의 마커(예를 들어, CD8+ T 세포 마커)와 같은 다른 분자에 대한 영상화와 조합하여 대상체에서 존재 및 위치가 검출될 수 있는 다른 유사한 마커로 표지될 수 있다.

[0353] 강글리오시드의 존재, 수준 또는 지질 길이를 검출하기 위한 또 다른 예시적인 방법은 바람직하게는 HPLC와 커플링된 질량 분석법을 사용하는 것이다.

[0354] 일부 실시양태에서, 방법은 대조군 생물학적 샘플(*예를 들어*, 암을 갖지 않은 대상체로부터의 생물학적 샘플), 관해 중 또는 암이 발병하기 전에 대상체로부터의 생물학적 샘플, 또는 암의 발병에 대해 치료 중인 대상체로부터 생물학적 샘플을 수득하는 것을 추가로 포함한다.

[0355] 일부 실시양태에서, 방법은 강글리오시드의 존재 및/또는 수준이 생물학적 샘플에서 검출되도록 강글리오시드를 검출할 수 있는 화합물 또는 작용제와 대조군 샘플을 접촉시키는 것, 및 테스트 샘플에서 강글리오시드의 존재 또는 수준과 대조 샘플에서 강글리오시드의 존재 또는 수준을 비교하는 것을 포함한다.

[0356] 바람직한 생물학적 샘플은 혈청, 혈액, 타액, 종양 미세환경, 종양 부근 또는 종양내이며, 이는 대상체로부터 통상적인 수단에 의해 단리된다.

[0357] 또 다른 실시양태에서, 항체는 ELISA 또는 RIA에서 항체를 사용하기 위한 구성요소 또는 장치와 관련될 수 있다. 비-제한적 예는 이들 검정에서 사용하기 위해 고체 표면 상에 고정된 항체를 포함한다(*예를 들어*, 상기한 바와 같이 광 또는 방사선 방출에 기초한 검출가능한 표지에 연결 및/또는 접합됨). 다른 실시양태에서, 항체는 면역크로마토그래피 또는 면역화학적 검정, 예컨대 "샌드위치" 또는 경쟁 검정, 면역조직화학, 면역형광 현미경 등을 사용하여 강글리오시드를 검출하기 위한 장치 또는 스트립과 연합된다. 이러한 장치 또는 스트립의 추가 예는 가정 테스트 또는 신속 현장 검사 테스트용으로 디자인된 것들이다. 추가적인 예는 단일 샘플에서 복수의 피분석물의 동시 분석을 위해 디자인된 것들을 포함한다. 예를 들어, 본 발명의 표지되지 않은 항체는 생물학적 샘플에서 강글리오시드를 "포획"하기 위해 적용될 수 있고, 포획된(또는 고정된) 강글리오시드는 검출을 위해 본원의 항-강글리오시드 항체의 표지된 형태에 결합될 수 있다. 면역검정의 다른 실시양태는, 예를 들어 면역확산, 면역전기영동, 면역조직병리학, 면역조직화학 및 조직병리학에 기초한 검정을 포함하여, 당업자에게 잘 알려져 있다.

[0358] 본원의 조성물 및 방법에 의해 결정된 바와 같이, 적어도 하나의 강글리오시드의 지질 길이의 수준 및/또는 이질성은 암의 상이한 등급과 상관관계가 있다. 따라서, 일부 실시양태에서, 본원의 조성물 및 방법은 본원에 기재된 바와 같이 결정된 적어도 하나의 강글리오시드의 지질 길이의 수준 및/또는 이질성에 기초하여, 암의 등급을 결정하는 데 사용될 수 있다. 암의 등급은 건강한 세포와 비교할 때 현미경에서 암 세포 및 조직이 얼마나 비정상적으로 보이는지를 설명한다. 거의 건강한 세포 및 조직처럼 보이고 조직화된 암 세포는 낮은 등급의 종양이다. 의사들은 이러한 암이 잘 분화된 것으로 설명한다. 더 낮은 등급의 암은 전형적으로 덜 공격적이며 예후가 더 좋다. 세포가 비정상적으로 보이고 이들끼리 조직화될수록, 암의 등급이 높아진다. 높은 등급을 갖는 암 세포는 더 공격적인 경향이 있다. 이들은 불량한 분화 또는 미분화라고 지칭한다. 일부 암은 종양 등급을 위한 이들의 자체의 체계를 갖는다. 다른 많은 이들이 표준 1-4 등급 척도를 사용한다.

[0359] • 1 등급: 종양 세포와 조직이 거의 건강한 세포와 조직처럼 보인다. 이를 잘 분화된 종양이라고 하며 낮은 등급으로 간주된다.

[0360] • 2 등급: 세포와 조직이 다소 비정상적이며 중등도 분화라고 한다. 이들은 중급 종양이다.

[0361] • 3 등급: 암 세포와 조직이 매우 비정상적으로 보인다. 이러한 암은 더 이상 구조적 구조나 패턴을 갖지 않기 때문에 불량하게 분화된 것으로 간주된다. 3 등급 종양은 높은 등급으로 간주된다.

[0362] • 4 등급: 이러한 미분화 암은 가장 비정상적으로 보이는 세포를 갖는다. 이들은 가장 높은 등급이며 전형적으로 낮은 등급의 종양보다 빠르게 성장하고 퍼진다.

[0363] 본원에 사용된 바와 같이, 낮은 등급 암은 등급 I 암을 지칭하고; 높은 등급 암은 2-4 등급의 암을 지칭한다.

[0364] 유사하게는, 본원의 조성물 및 방법에 의해 결정된 바와 같이 적어도 하나의 강글리오시드의 지질 길이의 수준 및/또는 이질성은 암의 상이한 단계와 상관관계가 있다. 따라서, 일부 실시양태에서, 본원의 조성물 및 방법은 본원에 기재된 바와 같이 결정된 적어도 하나의 강글리오시드의 지질 길이의 수준 및/또는 이질성을 기초로 하여, 암의 등급을 결정하는 데 사용될 수 있다.

[0365] 암의 단계는 원발성 종양이 얼마나 크고, 암이 환자의 몸에 얼마나 퍼졌는지를 설명한다. 여러 상이한 단계화 체계가 있다. 이들 중 다수는 특정 종류의 암을 위해 만들어졌다. 다른 것들은 여러 종류의 암을 설명하기 위해 사용될 수 있다. 많은 사람들이 알고 있는 하나의 통상적인 체계는 암을 0에서 IV까지의 척도로 두는 것이다.

[0366] • 단계 0은 퍼지지 않았고 암으로 간주되지 않지만, 향후 암이 될 수 있는 비정상 세포에 대한 것이다. 이러한 단계를 "인-시투"라고도 한다.

[0367] • 단계 I에서 단계 III까지는 원발성 종양 부위를 넘어서 퍼지지 않았거나 인근 조직으로만 퍼져 있는 암에 대한 것이다. 단계 번호가 높을수록, 종양이 더 크고 더 많이 퍼져 있다.

[0368] • 단계 IV 암은 신체의 먼 영역까지 퍼져 있다. 본원에 사용된 바와 같이, 초기/낮은 단계 암은 단계 I 암을 지칭하고; 말기/높은/진행 단계의 암은 단계 II 내지 단계 IV의 암을 포함한다.

[0369] 마찬가지로, 본원의 조성물 및 방법에 의해 결정된 바와 같이, 적어도 하나의 강글리오시드의 지질 길이의 수준 및/또는 이질성은 종양 부담과 상관관계가 있다. 따라서, 일부 실시양태에서, 본원의 조성물 및 방법은 본원에 기재된 바와 같이 결정된 적어도 하나의 강글리오시드의 지질 길이의 수준 및/또는 이질성을 기초로 하여, 대상체의 종양 부담을 결정하는 데 사용될 수 있다. 종양 부담(또는 종양 부하)는, 골수를 포함하여 환자의 신체에 분포된 종양의 총량(세포/질량)으로 정의된다. 고형 종양의 반응 평가 기준(Response Evaluation Criteria in Solid Tumor, RECIST) 분석에서, 종양 부담은 모든 측정 가능한 병변의 가장 긴 직경의 합으로 간주된다. 대상체에서 종양 부담을 결정하기 위해 다양한 방법이 사용될 수 있다. 예를 들어, 컴퓨터 단층 촬영(CT) 및 자기 공명(MR) 영상화는, 특히 RECIST를 사용함으로써 형태학적(크기, 위치) 기준에 기초하여 종양 반응을 평가하기 위해 사용되었다. RECIST 분류는 병변의 크기를 설명하고, 치료 반응의 4가지 종류인 - 안정 질환(SD), 부분 반응(PR), 완전 반응(CR) 또는 진행성 질환(PD)을 구분한다.

[0370] 예측 검정

[0371] 용어 "예측"은 암의 가능한 과정 및 결과 또는 질병으로부터의 회복 가능성에 대한 예상을 포함한다. 일부 실시양태에서, 통계적 알고리즘의 사용은 개체에서 암의 예상을 제공한다. 예를 들어, 예상은 수술, 암의 임상적 아형(*예를 들어*, 고형 종양, 예컨대 폐암, 흑색종 및 신장세포 암종)의 발달, 하나 이상의 임상 요인의 발달, 장암의 발달 또는 질병으로부터의 회복일 수 있다.

[0372] 본원에 기재된 검정, 예컨대 전술한 진단 검정 또는 하기 검정은, 대상체가 암을 치료하기 위해 작용제(*예를 들어*, 아고니스트, 길항제, 펩티드모방체, 폴리펩티드, 펩티드, 핵산, 소분자, 면역치료, 면역 관문 억제 치료 또는 다른 약물 후보)를 투여 받을 수 있는지 여부를 결정하는 데 활용될 수 있다. 예를 들어, 이러한 방법은 대상체가 하나 또는 작용제의 조합으로 효과적으로 치료될 수 있는지 여부를 결정하는 데 사용될 수 있다. 따라서, 본원은 테스트 샘플이 수득되고 강글리오시드가 검출되는, 하나 이상의 암 치료용 작용제로 대상체가 효과적으로 치료될 수 있는지 여부를 결정하기 위한 방법을 제공한다.

[0373] 본원에 기재된 방법은, *예를 들어* 임상 환경에서 암의 증상 또는 가족력을 나타내는 환자를 진단하기 위해 편리하게 사용될 수 있는 본원에 기재된 적어도 하나의 항체 시약을 포함하는 사전 패키징된 진단 키트를 활용함으로써 수행될 수 있다.

[0374] 본원의 다른 양태는 암을 갖는 개체로부터의 생물학적 샘플에서 강글리오시드가 분석되고, 정보가, 바람직하게는 유사한 연령 및 인종의 대조군(*예를 들어*, 암을 갖지 않은 개체; 대조군은 "건강한" 또는 "정상적인" 개체, 또는 주어진 시간 경과 연구에서 초기 시점에 지칭될 수도 있음)의 것과 비교되는 연관성 및/또는 계층화 분석을 위한 본원에 기재된 조성물 및 방법의 용도를 포함한다. 환자와 대조군의 적절한 선택은 연관성 및/또는 계층화 연구의 성공에 중요하다. 따라서, 잘 특징화된 표현형을 가진 개체 풀(pool)이 매우 바람직하다. 암 진단 기준, 암 소인 스크리닝, 임상 결과 예측, 암 예상, 약물 반응성 결정(약물유전체학), 약물 독성 스크리닝 등이

본원에 기재된다.

[0375] 유전적 연관성 및/또는 계층화 연구를 위해 상이한 연구 디자인이 사용될 수 있다(문헌 [Modern Epidemiology, Lippincott Williams & Wilkins(1998), 609-622]). 환자의 반응이 방해받지 않는 관찰 연구가 가장 자주 수행된다. 관찰 연구의 첫 번째 종류는 질병의 의심되는 원인이 존재하는 사람의 샘플 및 의심되는 원인이 없는 사람의 또 다른 샘플을 식별한 후, 두 샘플에서 질병의 발병 빈도를 비교한다. 이러한 샘플 개체군을 코호트라고 하며, 연구는 전향적 연구이다. 관찰 연구의 다른 종류는 사례-대조군 또는 후향적 연구이다. 전형적인 사례-대조군 연구에서, 샘플은 질병의 특정 징후와 같은 관심 표현형(사례)을 갖는 개체 및 결론을 도출할 개체군(표적 개체군)의 표현형(대조군)이 없는 개체로부터 수집된다. 그 후, 질병의 가능한 원인이 후향적으로 조사된다. 사례-대조군 연구에서 샘플을 수집하는 시간과 비용은 전향적 연구를 위한 것보다 상당히 적은 바, 사례-대조군 연구는 적어도 탐구 및 발견 단계 도중 유전자 연관성 연구에서 보다 통상적으로 사용되는 연구 디자인이다.

[0376] 모든 관련 표현형 및/또는 유전자형 정보를 수득한 후, 개체의 표현형 특성과 대립형질 또는 유전자형의 존재 사이에 임의의 유의미한 상관관계가 있는지 결정하기 위해 통계 분석이 수행된다. 바람직하게는, 유전적 연관성에 대한 통계적 테스트를 수행하기 전에 데이터 검사 및 점검(cleaning)이 먼저 수행된다. 샘플의 유행병학 및 임상 데이터는 당업계에 잘 알려진 표 및 그래프로 기술 통계에 의해 요약될 수 있다. 데이터 검증은, 바람직하게는, 데이터 완성, 일관되지 않은 항목 및 아웃라이어(outlier)에 대한 확인을 위해 수행된다. 카이 제곱 테스트 및 t 테스트(분포가 정상이 아닌 경우 윌콕손 순위-합 테스트)는 이산 및 연속 변수 각각에 대한 사례와 대조군 간의 유의미한 차이를 확인하기 위해 사용될 수 있다.

[0377] 유전적 연관성 테스트의 수행에서 중요한 결정은 테스트의 p-값이 해당 수준에 도달했을 때 유의미한 연관성을 단언할 수 있는 유의 수준의 결정이다. 후속 확인 테스트에서 긍정적인 적중이 이어질 탐구적 분석에서, 조정되지 않은 p-값 <0.2(관대한 측면의 유의 수준)는, 예를 들어 암의 특정 표현형 특정을 갖는 강글리오시드의 유의미한 연관성에 대한 가설을 생성하기 위해 사용될 수 있다. 수준이 암과의 연관성을 갖는 것으로 간주되기 위해서는, p-값 <0.05(당업계에서 전통적으로 사용되는 유의 수준)가 달성되는 것이 바람직하다. 동일한 원천의 더 많은 샘플 또는 다른 원천으로부터의 다른 샘플에서의 확인 분석에서 적중이 이어지는 경우, 실험별 오류율을 0.05로 유지하면서 과도한 적중 수를 회피하기 위해 다중 테스트에 대한 조정이 수행될 것이다. 상이한 종류의 오류율을 제어하기 위해 다중 테스트를 조정하는 상이한 방법이 있는 반면, 통상적으로 사용되지만 다소 보수적인 방법은 실험-별 또는 패밀리-별 오류율을 제어하기 위한 본페로니 보정이다(다중 비교 및 다중 테스트, 문헌 [Westfall et al, SAS Institute(1999)]). 오류 발견율(false discovery rate)인 FDR을 제어하기 위한 순열 테스트는 더 강력할 수 있다(문헌 [Benjamini and Hochberg, Journal of the Royal Statistical Society, Series B 57, 1289-1300, 1995, Resampling-based Multiple Testing, Westfall and Young, Wiley(1993)]). 다중도를 제어하는 이러한 방법은 테스트가 종속적이고 오류 발견율을 제어하는 것이 실험-별 오류율을 제어하는 것과는 대조적으로 충분할 때 선호될 것이다.

[0378] 질병에 대한 소인에 대해 유전적 또는 비-유전적 개체 위험 요인이 발견되었으면, 분류/예측 체계는, 이의 표현형 및/또는 유전자형 및 다른 비-유전적 위험 요인에 따라 개체가 속할 범주(예를 들어, 질병 또는 질병 없음)를 예측하기 위해, 설정될 수 있다. 개별 특성에 대한 로지스틱 회귀 및 연속 특성에 대한 선형 회귀는 이러한 작업에 대한 표준 기술이다(문헌 [Applied Regression Analysis, Draper 및 Smith, Wiley(1998)]). 더욱이, 분류를 설정하는 데 다른 기술이 사용될 수도 있다. 이러한 기술은, 비제한적으로 MART, CART, 신경 네트워크 및 상이한 방법의 성능을 비교하는 데 사용하기에 적합한 판별 분석을 포함한다(문헌 [The Elements of Statistical Learning, Hastie, Tibshirani & Friedman, Springer(2002)]).

[0379] 진단 및 예측 방법의 예시적인 실시양태

[0380] 특정 양태에서, 본원은 진단 및 예측 방법을 제공한다. 예를 들어, 특정 양태에서, 본원은 대상체에서 암을 진단하는 방법을 제공하고, 상기 방법은, a) 대상체 샘플에서 적어도 하나의 강글리오시드의 수준을 결정하는 단계; 및 b) 상기 적어도 하나의 강글리오시드의 수준을 대조군 샘플의 것과 비교하는 단계를 포함하고, 여기서 대조군 샘플에서의 수준과 비교하여 대상체 샘플에서 적어도 하나의 강글리오시드의 유의미하게 더 높은 수준은 대상체가 암을 갖는 것을 나타낸다.

[0381] 특정 양태에서, 본원은 암을 갖는 대상체를 식별하는 방법을 제공하고, 상기 방법은 a) 대상체 샘플에서 적어도 하나의 강글리오시드의 수준을 결정하는 단계; 및 b) 상기 적어도 하나의 강글리오시드의 수준을 대조군 샘플의 것과 비교하는 단계를 포함하고, 여기서 대조군 샘플에서의 수준과 비교하여 대상체 샘플에서 적어도 하나의 강글리오시드의 유의미하게 더 높은 수준은 대상체를 암을 갖는 것으로 식별한다.

[0382] 특정 양태에서, 본원은 암의 단계를 결정하는 방법을 제공하고, 상기 방법은, a) 대상체 샘플에서 적어도 하나의 강글리오시드의 수준을 결정하는 단계; 및 b) 상기 적어도 하나의 강글리오시드의 수준을 대조군 샘플의 것과 비교하는 단계를 포함하고, 여기서 대조군에서의 수준과 비교하여 대상체 샘플에서 적어도 하나의 강글리오시드의 수준에 있어서, 적어도 또는 약 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 110%, 120%, 130%, 140%, 150%, 160%, 170%, 180%, 190%, 200%, 210%, 220%, 230%, 240%, 250%, 260%, 270%, 280%, 290%, 300%, 310%, 320%, 330%, 340%, 350%, 360%, 370%, 380%, 390%, 400%, 410%, 420%, 430%, 440%, 450%, 460%, 470%, 480%, 490%, 500%, 510%, 520%, 530%, 540%, 550%, 560%, 570%, 580%, 590%, 600%, 610%, 620%, 630%, 640%, 650%, 660%, 670%, 680%, 690%, 700%, 710%, 720%, 730%, 740%, 750%, 760%, 770%, 780%, 790%, 800%, 810%, 820%, 830%, 840%, 850%, 860%, 870%, 880%, 890%, 900%, 910%, 920%, 930%, 940%, 950%, 960%, 970%, 980%, 990%, 1000%, 또는 이들 값 이하의 증가는 대상체가 초기 암을 갖는 것을 나타내고/나타내거나; 대조군에서의 수준과 비교하여 대상체 샘플에서 적어도 하나의 강글리오시드의 수준에 있어서, 적어도 또는 약 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 110%, 120%, 130%, 140%, 150%, 160%, 170%, 180%, 190%, 200%, 210%, 220%, 230%, 240%, 250%, 260%, 270%, 280%, 290%, 300%, 310%, 320%, 330%, 340%, 350%, 360%, 370%, 380%, 390%, 400%, 410%, 420%, 430%, 440%, 450%, 460%, 470%, 480%, 490%, 500%, 510%, 520%, 530%, 540%, 550%, 560%, 570%, 580%, 590%, 600%, 610%, 620%, 630%, 640%, 650%, 660%, 670%, 680%, 690%, 700%, 710%, 720%, 730%, 740%, 750%, 760%, 770%, 780%, 790%, 800%, 810%, 820%, 830%, 840%, 850%, 860%, 870%, 880%, 890%, 900%, 910%, 920%, 930%, 940%, 950%, 960%, 970%, 980%, 990%, 1000%, 또는 이들 값 이하의 증가는 대상체가 말기 암을 갖는 것을 나타낸다.

[0383] 일부 실시양태에서, 대조군 샘플에서의 수준과 비교하여 대상체 샘플에서 적어도 하나의 강글리오시드의 수준의 적어도 100% 및 200% 이하의 증가는 대상체가 초기 암을 갖는 것을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 대조군 샘플에서의 수준과 비교하여 대상체 샘플에서 적어도 하나의 강글리오시드의 수준의 적어도 200%의 증가는 대상체가 말기 암을 갖는 것을 나타낸다.

[0384] 특정 양태에서, 본원은 암의 등급을 결정하는 방법을 제공하고, 상기 방법은 a) 대상체 샘플에서 적어도 하나의 강글리오시드의 수준을 결정하는 단계; 및 b) 상기 적어도 하나의 강글리오시드의 수준을 대조군 샘플의 것과 비교하는 단계를 포함하고, 여기서, 대조군에서의 수준과 비교하여 대상체 샘플에서 적어도 하나의 강글리오시드의 수준에 있어서, 적어도 또는 약 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 110%, 120%, 130%, 140%, 150%, 160%, 170%, 180%, 190%, 200%, 210%, 220%, 230%, 240%, 250%, 260%, 270%, 280%, 290%, 300%, 310%, 320%, 330%, 340%, 350%, 360%, 370%, 380%, 390%, 400%, 410%, 420%, 430%, 440%, 450%, 460%, 470%, 480%, 490%, 500%, 510%, 520%, 530%, 540%, 550%, 560%, 570%, 580%, 590%, 600%, 610%, 620%, 630%, 640%, 650%, 660%, 670%, 680%, 690%, 700%, 710%, 720%, 730%, 740%, 750%, 760%, 770%, 780%, 790%, 800%, 810%, 820%, 830%, 840%, 850%, 860%, 870%, 880%, 890%, 900%, 910%, 920%, 930%, 940%, 950%, 960%, 970%, 980%, 990%, 1000%, 또는 이들 값 이하의 증가는 대상체가 I 등급 암을 갖는 것을 나타내고/내거나; 대조군에서의 수준과 비교하여 대상체 샘플에서 적어도 하나의 강글리오시드의 수준에 있어서, 적어도 또는 약 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 110%, 120%, 130%, 140%, 150%, 160%, 170%, 180%, 190%, 200%, 210%, 220%, 230%, 240%, 250%, 260%, 270%, 280%, 290%, 300%, 310%, 320%, 330%, 340%, 350%, 360%, 370%, 380%, 390%, 400%, 410%, 420%, 430%, 440%, 450%, 460%, 470%, 480%, 490%, 500%, 510%, 520%, 530%, 540%, 550%, 560%, 570%, 580%, 590%, 600%, 610%, 620%, 630%, 640%, 650%, 660%, 670%, 680%, 690%, 700%, 710%, 720%, 730%, 740%, 750%, 760%, 770%, 780%, 790%, 800%, 810%, 820%, 830%, 840%, 850%, 860%, 870%, 880%, 890%, 900%, 910%, 920%, 930%, 940%, 950%, 960%, 970%, 980%, 990%, 1000%, 또는 이들 값 이하의 증가는 대상체가 II 등급 암을 갖는 것을 나타내고/내거나; 대조군에서의 수준과 비교하여 대상체 샘플에서 적어도 하나의 강글리오시드의 수준에 있어서, 적어도 또는 약 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 110%, 120%, 130%, 140%, 150%, 160%, 170%, 180%, 190%, 200%, 210%, 220%, 230%, 240%, 250%, 260%, 270%, 280%, 290%, 300%, 310%, 320%, 330%, 340%, 350%, 360%, 370%, 380%, 390%, 400%, 410%, 420%, 430%, 440%, 450%, 460%, 470%, 480%, 490%, 500%, 510%, 520%, 530%, 540%, 550%, 560%, 570%, 580%, 590%, 600%, 610%, 620%, 630%, 640%, 650%, 660%, 670%, 680%, 690%, 700%, 710%, 720%, 730%, 740%, 750%, 760%, 770%, 780%, 790%, 800%, 810%, 820%, 830%, 840%, 850%, 860%, 870%, 880%, 890%, 900%, 910%, 920%, 930%, 940%, 950%, 960%, 970%, 980%, 990%, 1000%, 또는 이들 값 이하의 증가는 대상체가 III 등급 암을 갖는 것을 나타내고/내거나; 대조군에서의 수준과 비교하여 대상체 샘플에서 적어도 하나의 강글리오시드의 수준에 있어서, 적어도 또는 약 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 110%, 120%, 130%, 140%, 150%, 160%, 170%, 180%, 190%, 200%, 210%, 220%, 230%, 240%, 250%, 260%, 270%, 280%, 290%, 300%, 310%, 320%, 330%, 340%, 350%, 360%,

370%, 380%, 390%, 400%, 410%, 420%, 430%, 440%, 450%, 460%, 470%, 480%, 490%, 500%, 510%, 520%, 530%, 540%, 550%, 560%, 570%, 580%, 590%, 600%, 610%, 620%, 630%, 640%, 650%, 660%, 670%, 680%, 690%, 700%, 710%, 720%, 730%, 740%, 750%, 760%, 770%, 780%, 790%, 800%, 810%, 820%, 830%, 840%, 850%, 860%, 870%, 880%, 890%, 900%, 910%, 920%, 930%, 940%, 950%, 960%, 970%, 980%, 990%, 1000%, 또는 이들 값 이하의 증가는 대상체가 IV 등급 암을 갖는 것을 나타낸다.

[0385] 일부 실시양태에서, 대조군에서의 수준과 비교하여 대상체 샘플에서 적어도 하나의 강글리오시드의 수준에 있어서, 적어도 또는 약 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 110%, 120%, 130%, 140%, 150%, 160%, 170%, 180%, 190%, 200%, 210%, 220%, 230%, 240%, 250%, 260%, 270%, 280%, 290%, 300%, 310%, 320%, 330%, 340%, 350%, 360%, 370%, 380%, 390%, 400%, 410%, 420%, 430%, 440%, 450%, 460%, 470%, 480%, 490%, 500%, 510%, 520%, 530%, 540%, 550%, 560%, 570%, 580%, 590%, 600%, 610%, 620%, 630%, 640%, 650%, 660%, 670%, 680%, 690%, 700%, 710%, 720%, 730%, 740%, 750%, 760%, 770%, 780%, 790%, 800%, 810%, 820%, 830%, 840%, 850%, 860%, 870%, 880%, 890%, 900%, 910%, 920%, 930%, 940%, 950%, 960%, 970%, 980%, 990%, 1000%, 또는 이들 값 이하의 증가는 대상체가 낮은 등급의 암(예를 들어, I 등급)을 갖는 것을 나타낸다.

[0386] 일부 실시양태에서, 대조군에서의 수준과 비교하여 대상체 샘플에서 적어도 하나의 강글리오시드의 수준에 있어서, 적어도 또는 약 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 110%, 120%, 130%, 140%, 150%, 160%, 170%, 180%, 190%, 200%, 210%, 220%, 230%, 240%, 250%, 260%, 270%, 280%, 290%, 300%, 310%, 320%, 330%, 340%, 350%, 360%, 370%, 380%, 390%, 400%, 410%, 420%, 430%, 440%, 450%, 460%, 470%, 480%, 490%, 500%, 510%, 520%, 530%, 540%, 550%, 560%, 570%, 580%, 590%, 600%, 610%, 620%, 630%, 640%, 650%, 660%, 670%, 680%, 690%, 700%, 710%, 720%, 730%, 740%, 750%, 760%, 770%, 780%, 790%, 800%, 810%, 820%, 830%, 840%, 850%, 860%, 870%, 880%, 890%, 900%, 910%, 920%, 930%, 940%, 950%, 960%, 970%, 980%, 990%, 1000%, 또는 이들 값 이하의 증가는 대상체가 높은 등급의 암(예를 들어, II, III 또는 IV 등급)을 갖는 것을 나타낸다.

[0387] 일부 실시양태에서, 대조군 샘플에서의 수준과 비교하여 대상체 샘플에서 적어도 하나의 강글리오시드의 수준의 적어도 100% 및 200% 이하의 증가는 대상체가 낮은 등급 암(예를 들어, I 등급)을 갖는 것을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 대조군 샘플에서의 수준과 비교하여 대상체 샘플에서 적어도 하나의 강글리오시드의 수준의 적어도 200%의 증가는 대상체가 높은 등급 암(예를 들어, II, III 또는 IV 등급)을 갖는 것을 나타낸다.

[0388] 특정 양태에서, 본원은 암의 종양 부담을 결정하는 방법을 제공하고, 상기 방법은 a) 대상체 샘플에서 적어도 하나의 강글리오시드의 수준을 결정하는 단계; 및 b) 상기 적어도 하나의 강글리오시드의 수준을 대조군 샘플의 것과 비교하는 단계를 포함하고, 여기서 대조군에서의 수준과 비교하여 대상체 샘플에서 적어도 하나의 강글리오시드의 수준에 있어서, 적어도 또는 약 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 110%, 120%, 130%, 140%, 150%, 160%, 170%, 180%, 190%, 200%, 210%, 220%, 230%, 240%, 250%, 260%, 270%, 280%, 290%, 300%, 310%, 320%, 330%, 340%, 350%, 360%, 370%, 380%, 390%, 400%, 410%, 420%, 430%, 440%, 450%, 460%, 470%, 480%, 490%, 500%, 510%, 520%, 530%, 540%, 550%, 560%, 570%, 580%, 590%, 600%, 610%, 620%, 630%, 640%, 650%, 660%, 670%, 680%, 690%, 700%, 710%, 720%, 730%, 740%, 750%, 760%, 770%, 780%, 790%, 800%, 810%, 820%, 830%, 840%, 850%, 860%, 870%, 880%, 890%, 900%, 910%, 920%, 930%, 940%, 950%, 960%, 970%, 980%, 990%, 1000%, 또는 이들 값 이하의 증가는 대상체가 낮은 종양 부담을 갖는 것을 나타내고/내거나; 대조군에서의 수준과 비교하여 대상체 샘플에서 적어도 하나의 강글리오시드의 수준에 있어서, 적어도 또는 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 110%, 120%, 130%, 140%, 150%, 160%, 170%, 180%, 190%, 200%, 210%, 220%, 230%, 240%, 250%, 260%, 270%, 280%, 290%, 300%, 310%, 320%, 330%, 340%, 350%, 360%, 370%, 380%, 390%, 400%, 410%, 420%, 430%, 440%, 450%, 460%, 470%, 480%, 490%, 500%, 510%, 520%, 530%, 540%, 550%, 560%, 570%, 580%, 590%, 600%, 610%, 620%, 630%, 640%, 650%, 660%, 670%, 680%, 690%, 700%, 710%, 720%, 730%, 740%, 750%, 760%, 770%, 780%, 790%, 800%, 810%, 820%, 830%, 840%, 850%, 860%, 870%, 880%, 890%, 900%, 910%, 920%, 930%, 940%, 950%, 960%, 970%, 980%, 990%, 1000%, 또는 이들 값 이하의 증가는 대상체가 높은 종양 부담을 갖는 것을 나타낸다.

[0389] 일부 실시양태에서, 대조군 샘플에서의 수준과 비교하여 대상체 샘플에서 적어도 하나의 강글리오시드의 수준의 적어도 100% 및 200% 이하의 증가는 대상체가 낮은 종양 부담을 갖는 것을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 대조군 샘플에서의 수준과 비교하여 대상체 샘플에서 적어도 하나의 강글리오시드의 수준의 적어도 200%의 증가는 대상체가 높은 종양 부담을 갖는 것을 나타낸다.

[0390] 특정 양태에서, 본원은 대상체에서 암의 재발을 검출하는 방법을 제공하고, 상기 방법은 a) 암 치료를 받은 후 암이 퇴행했던 대상체로부터 샘플을 수득하거나 준비하는 단계; b) 대상체 샘플에서 적어도 하나의 강글리오시드의 수준을 결정하는 단계; 및 c) 상기 적어도 하나의 강글리오시드의 수준을 대조군 샘플의 것과 비교하는 단계를 포함하고, 여기서 대조군 샘플에서의 수준과 비교하여 대상체 샘플에서 적어도 하나의 강글리오시드의 유의미하게 더 높은 수준은 대상체에서 암의 재발을 나타낸다.

[0391] 특정 양태에서, 본원은 대상체에서 최소 잔존 질병을 검출하는 방법을 제공하고, 상기 방법은 a) 관해 중인 대상체로부터 샘플을 수득하거나 준비하는 단계; b) 대상체 샘플에서 적어도 하나의 강글리오시드의 수준을 결정하는 단계; 및 c) 상기 적어도 하나의 강글리오시드의 수준을 대조군 샘플의 것과 비교하는 단계를 포함하고, 대조군 샘플에서의 수준과 비교하여 대상체 샘플에서 적어도 하나의 강글리오시드의 유의미하게 더 높은 수준은 대상체가 최소 잔존 질병을 갖는 것을 나타낸다.

[0392] 특정 양태에서, 본원은 암 치료(예를 들어, 면역치료)로부터의 이익에 따라 암을 앓고 있는 대상체를 계층화하는 방법을 제공하고, 상기 방법은 a) 대상체 샘플에서 적어도 하나의 강글리오시드의 수준을 결정하는 단계; b) 대조군에서 적어도 하나의 강글리오시드의 수준을 결정하는 단계; 및 c) 단계 a) 및 b)에서 검출된 적어도 하나의 강글리오시드의 수준을 비교하는 단계를 포함하고, 대조군에서의 수준과 비교하여 대상체 샘플에서 적어도 하나의 강글리오시드 수준의 감소 또는 유의미한 변화가 없다는 것은 암을 앓고 있는 대상체가 암 치료로부터 이익을 얻을 것이라는 징후이다.

[0393] 특정 양태에서, 암을 앓고 있는 대상체가 암 치료(예를 들어, 면역치료)에 반응 할 가능성이 있을지 또는 대안적으로 가능성이 없을지 여부를 결정하는 방법을 제공하고, 상기 방법은 a) 대상체 샘플에서 적어도 하나의 강글리오시드의 수준을 결정하는 단계; b) 대조군에서 적어도 하나의 강글리오시드의 수준을 결정하는 단계; 및 c) 단계 a) 및 b)에서 검출된 적어도 하나의 강글리오시드의 수준을 비교하는 단계를 포함하고, 여기서 대조군에서의 수준과 비교하여 대상체 샘플에서 적어도 하나의 강글리오시드의 유의미하게 더 높은 수준은 암을 앓고 있는 대상체가 암 치료에 반응하지 않을 것이라는 징후이고/이거나; 대조군에서의 수준과 비교하여 대상체 샘플에서 적어도 하나의 강글리오시드의 수준의 감소 또는 유의미한 변화가 없다는 것은 암을 앓고 있는 대상체가 암 치료에 반응 할 것이라는 징후이다.

[0394] 특정 양태에서, 본원은 암을 앓고 있는 대상체의 임상 결과를 예측하는 방법을 제공하고, 상기 방법은 a) 대상체 샘플에서 적어도 하나의 강글리오시드의 수준을 결정하는 단계; b) 대조군에서 적어도 하나의 강글리오시드의 수준을 결정하는 단계; 및 c) 단계 a) 및 b)에서 결정된 적어도 하나의 강글리오시드의 수준을 비교하는 단계를 포함하고, 대조군에서의 수준과 비교하여 대상체 샘플에서 적어도 하나의 강글리오시드의 유의미하게 더 높은 수준은 대상체가 불량한 임상 결과를 갖는 징후이다.

[0395] 특정 양태에서, 본원은 대상체의 암의 진행을 모니터링하는 방법을 제공하고, 상기 방법은 a) 적어도 하나의 강글리오시드의 수준을 제1 시점에 대상체 샘플에서 검출하는 단계; b) 후속 시점에서 단계 a)를 반복하는 단계; 및 c) 단계 a) 및 b)에서 검출된 적어도 하나의 강글리오시드의 수준을 비교하여 대상체에서 암의 진행을 모니터링하는 단계를 포함한다.

[0396] 일부 실시양태에서, 방법은 제1 시점 및 후속 시점 사이에 암 치료를 받았던 대상체에서 암의 진행을 모니터링한다. 일부 실시양태에서, 대상체는 암 발병에 대한 위험이 있다.

[0397] 특정 양태에서, 본원은 대상체에서 암 치료의 효능을 평가하는 방법을 제공하고, 상기 방법은 a) 적어도 하나의 강글리오시드의 수준을 대상체로부터 수득된 제1 샘플에서 결정하는 단계; b) 암 치료의 투여 후 적어도 하나의 후속 시점 동안 단계 a)를 반복하는 단계; 및 c) 단계 a) 및 b)에서 검출된 적어도 하나의 강글리오시드의 수준을 비교하는 단계를 포함하고, 제1 샘플에 비해 적어도 하나의 후속 샘플에서 적어도 하나의 강글리오시드의 유의미하게 더 낮은 수준은 치료가 대상체에서 암을 치료하는 데 효과적이라는 징후이다.

[0398] 일부 실시양태에서, 제1 및/또는 적어도 하나의 후속 샘플은 대상체로부터 수득된 합동 샘플 또는 단일 샘플의 일부이다.

[0399] 일부 실시양태에서, 암 치료는 수술, 화학치료, 암 백신, 키메라 항원 수용체, 방사선 치료, 면역치료, 면역 관문 억제 단백질 또는 리간드의 발현 조절제 또는 이들의 임의의 조합이다. 일부 실시양태에서, 면역치료는 면역 관문 억제 치료이다. 일부 실시양태에서, 암 치료는 아벨루맙, 두르발루맙, 아테졸리주맙, BRAF/MEK 억제제, 티로신 키나제 억제제, 펨브롤리주맙, 니볼루맙, 이필리무맙 또는 이들의 조합이다.

[0400] 본원에 기재된 본 발명의 임의의 양태에 적용될 수 있는 다수의 실시양태가 추가로 제공된다.

[0401] 예를 들어, 본원에 기재된 진단 및 예측 방법은 적어도 하나의 강글리오시드의 수준을 검출하고 결정하기 위해 당업계에 알려진 임의의 방법을 사용할 수 있다. 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 단클론성 항체 또는 이의 항원 결합 단편에 의해 적어도 하나의 강글리오시드가 검출되고 이의 수준이 결정된다. 바람직한 실시양태에서, 본원에 기재된 예시적인 방법 또는 당업계에 알려진 방법(예를 들어, ELISA, 샌드위치 ELISA, 경쟁 ELISA) 중 어느 하나를 사용하여, 본원에 기재된, 적어도 하나의 단클론성 항체 또는 이의 항원 결합 단편에 의해 적어도 하나의 강글리오시드가 검출되고, 이의 수준이 결정된다.

[0402] 또 다른 바람직한 실시양태에서, 질량 분석법(예를 들어, LC/MS, LC/MS/MS 또는 당업계에 알려진 임의의 다른 질량 분석법)에 의해 적어도 하나의 강글리오시드가 검출되고, 이의 수준이 결정된다.

[0403] 일부 실시양태에서, 적어도 또는 약 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 110%, 120%, 130%, 140%, 150%, 160%, 170%, 180%, 190%, 200%, 210%, 220%, 230%, 240%, 250%, 260%, 270%, 280%, 290%, 300%, 310%, 320%, 330%, 340%, 350%, 360%, 370%, 380%, 390%, 400%, 410%, 420%, 430%, 440%, 450%, 460%, 470%, 480%, 490%, 500%, 510%, 520%, 530%, 540%, 550%, 560%, 570%, 580%, 590%, 600%, 610%, 620%, 630%, 640%, 650%, 660%, 670%, 680%, 690%, 700%, 710%, 720%, 730%, 740%, 750%, 760%, 770%, 780%, 790%, 800%, 810%, 820%, 830%, 840%, 850%, 860%, 870%, 880%, 890%, 900%, 910%, 920%, 930%, 940%, 950%, 960%, 970%, 980%, 990%, 1000%, 또는 이들 값 이하로 더 높은 수준의 강글리오시드는 유의미하게 더 높은 수준을 나타낸다.

[0404] 일부 실시양태에서, 적어도 또는 약 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 110%, 120%, 130%, 140%, 150%, 160%, 170%, 180%, 190%, 200%, 210%, 220%, 230%, 240%, 250%, 260%, 270%, 280%, 290%, 300%, 310%, 320%, 330%, 340%, 350%, 360%, 370%, 380%, 390%, 400%, 410%, 420%, 430%, 440%, 450%, 460%, 470%, 480%, 490%, 500%, 510%, 520%, 530%, 540%, 550%, 560%, 570%, 580%, 590%, 600%, 610%, 620%, 630%, 640%, 650%, 660%, 670%, 680%, 690%, 700%, 710%, 720%, 730%, 740%, 750%, 760%, 770%, 780%, 790%, 800%, 810%, 820%, 830%, 840%, 850%, 860%, 870%, 880%, 890%, 900%, 910%, 920%, 930%, 940%, 950%, 960%, 970%, 980%, 990%, 1000%, 또는 이들 값 이하로 더 낮은 수준의 강글리오시드는 유의미하게 더 낮은 수준을 나타낸다.

[0405] 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 강글리오시드의 수준에 있어서 적어도 또는 약 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 110%, 120%, 130%, 140%, 150%, 160%, 170%, 180%, 190%, 200%, 210%, 220%, 230%, 240%, 250%, 260%, 270%, 280%, 290%, 300%, 310%, 320%, 330%, 340%, 350%, 360%, 370%, 380%, 390%, 400%, 410%, 420%, 430%, 440%, 450%, 460%, 470%, 480%, 490%, 500%, 510%, 520%, 530%, 540%, 550%, 560%, 570%, 580%, 590%, 600%, 610%, 620%, 630%, 640%, 650%, 660%, 670%, 680%, 690%, 700%, 710%, 720%, 730%, 740%, 750%, 760%, 770%, 780%, 790%, 800%, 810%, 820%, 830%, 840%, 850%, 860%, 870%, 880%, 890%, 900%, 910%, 920%, 930%, 940%, 950%, 960%, 970%, 980%, 990%, 1000%, 또는 이들 값 이하의 증가 또는 감소는 적어도 하나의 강글리오시드의 수준의 유의미한 변화가 없음을 나타낸다.

[0406] 본원은 적어도 하나의 강글리오시드의 지질 길이의 이질성 또는 동질성(예를 들어, 질량 분석법을 사용하여 결정됨)을 사용하는 진단 및 예측 방법을 추가로 제공한다. 일부 실시양태에서, 대조군 샘플과 비교하여 대상체 샘플에서의 적어도 하나의 강글리오시드의 지질 길이의 이질성의 유의미한 변화는 대상체가 암을 갖는 것을 나타낸다. 유사하게는, 일부 실시양태에서, 대조군 샘플과 비교하여 대상체 샘플에서의 적어도 하나의 강글리오시드의 지질 길이의 이질성의 유의미한 변화는 대상체를 암을 갖는 것으로 식별한다.

[0407] 특정 양태에서, 본원은 암의 단계를 결정하는 방법을 제공하고, 상기 방법은, a) 질량 분석법을 사용하여 대상체 샘플에서 적어도 하나의 강글리오시드의 지질 길이를 결정하는 단계; 및 b) 상기 적어도 하나의 강글리오시드의 지질 길이를 대조군 샘플의 것과 비교하는 단계를 포함하고, 여기서 대조군 샘플에서의 것과 비교하여 대상체 샘플에서 적어도 하나의 강글리오시드의 지질 길이의 이질성에 있어서 적어도 또는 약 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 110%, 120%, 130%, 140%, 150%, 160%, 170%, 180%, 190%, 200%, 210%, 220%, 230%, 240%, 250%, 260%, 270%, 280%, 290%, 300%, 310%, 320%, 330%, 340%, 350%, 360%, 370%, 380%, 390%, 400%, 410%, 420%, 430%, 440%, 450%, 460%, 470%, 480%, 490%, 500%, 510%, 520%, 530%, 540%, 550%, 560%, 570%, 580%, 590%, 600%, 610%, 620%, 630%, 640%, 650%, 660%, 670%, 680%, 690%, 700%, 710%, 720%, 730%, 740%, 750%, 760%, 770%, 780%, 790%, 800%, 810%, 820%, 830%, 840%, 850%, 860%, 870%, 880%, 890%, 900%, 910%, 920%, 930%, 940%, 950%, 960%, 970%, 980%, 990%, 1000%, 또는 이들 값 이하의 변화는 대상체가 초기 암을 갖는 것을 나타내고/나타내거나; 대조군 샘플에서의 것과 비교하여 대상체 샘플에서 적어도 하나의 강글리오시드의 지질 길이의 이질성에 있어서 적어도 또는 약 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%,

100%, 110%, 120%, 130%, 140%, 150%, 160%, 170%, 180%, 190%, 200%, 210%, 220%, 230%, 240%, 250%, 260%, 270%, 280%, 290%, 300%, 310%, 320%, 330%, 340%, 350%, 360%, 370%, 380%, 390%, 400%, 410%, 420%, 430%, 440%, 450%, 460%, 470%, 480%, 490%, 500%, 510%, 520%, 530%, 540%, 550%, 560%, 570%, 580%, 590%, 600%, 610%, 620%, 630%, 640%, 650%, 660%, 670%, 680%, 690%, 700%, 710%, 720%, 730%, 740%, 750%, 760%, 770%, 780%, 790%, 800%, 810%, 820%, 830%, 840%, 850%, 860%, 870%, 880%, 890%, 900%, 910%, 920%, 930%, 940%, 950%, 960%, 970%, 980%, 990%, 1000%, 또는 이들 값 이하의 변화는 대상체가 말기 암을 갖는 것을 나타낸다.

[0408] 일부 실시양태에서, 대조군 샘플에서의 것과 비교하여 대상체 샘플에서 적어도 하나의 강글리오시드의 지질 길이의 이질성의 적어도 100% 및 200% 이하의 변화(예를 들어, 증가 또는 감소)는 대상체가 초기 암을 갖는 것을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 대조군 샘플에서의 것과 비교하여 대상체 샘플에서 적어도 하나의 강글리오시드의 지질 길이의 이질성의 적어도 200%의 변화(예를 들어, 증가 또는 감소)는 대상체가 말기 암을 갖는 것을 나타낸다.

[0409] 일부 실시양태에서, (a) 긴 지질 길이를 갖는 강글리오시드의 수준에 대하여 짧은 지질 길이를 갖는 강글리오시드의 수준; 또는 (b) 짧은 지질 길이를 갖는 강글리오시드의 수준에 대하여 긴 지질 길이를 갖는 강글리오시드의 수준에 있어서, 적어도 또는 약 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 110%, 120%, 130%, 140%, 150%, 160%, 170%, 180%, 190%, 200%, 210%, 220%, 230%, 240%, 250%, 260%, 270%, 280%, 290%, 300%, 310%, 320%, 330%, 340%, 350%, 360%, 370%, 380%, 390%, 400%, 410%, 420%, 430%, 440%, 450%, 460%, 470%, 480%, 490%, 500%, 510%, 520%, 530%, 540%, 550%, 560%, 570%, 580%, 590%, 600%, 610%, 620%, 630%, 640%, 650%, 660%, 670%, 680%, 690%, 700%, 710%, 720%, 730%, 740%, 750%, 760%, 770%, 780%, 790%, 800%, 810%, 820%, 830%, 840%, 850%, 860%, 870%, 880%, 890%, 900%, 910%, 920%, 930%, 940%, 950%, 960%, 970%, 980%, 990%, 1000%, 또는 이들 값 이하의 증가 또는 감소는 대상체가 초기 또는 말기 암을 갖는 것을 나타낸다.

[0410] 특정 양태에서, 본원은 암의 등급을 결정하는 방법을 제공하고, 상기 방법은 a) 질량 분석법을 사용하여 대상체 샘플에서 적어도 하나의 강글리오시드의 지질 길이를 결정하는 단계; 및 b) 상기 적어도 하나의 강글리오시드의 지질 길이를 대조군 샘플의 것과 비교하는 단계를 포함하고, 여기서 대조군 샘플에서의 것과 비교하여 대상체 샘플에서 적어도 하나의 강글리오시드의 지질 길이의 이질성에 있어서, 적어도 또는 약 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 110%, 120%, 130%, 140%, 150%, 160%, 170%, 180%, 190%, 200%, 210%, 220%, 230%, 240%, 250%, 260%, 270%, 280%, 290%, 300%, 310%, 320%, 330%, 340%, 350%, 360%, 370%, 380%, 390%, 400%, 410%, 420%, 430%, 440%, 450%, 460%, 470%, 480%, 490%, 500%, 510%, 520%, 530%, 540%, 550%, 560%, 570%, 580%, 590%, 600%, 610%, 620%, 630%, 640%, 650%, 660%, 670%, 680%, 690%, 700%, 710%, 720%, 730%, 740%, 750%, 760%, 770%, 780%, 790%, 800%, 810%, 820%, 830%, 840%, 850%, 860%, 870%, 880%, 890%, 900%, 910%, 920%, 930%, 940%, 950%, 960%, 970%, 980%, 990%, 1000%, 또는 이들 값 이하의 변화(예를 들어, 증가 또는 감소)는 대상체가 I 등급, II 등급, II 등급 또는 IV 등급 암을 갖는 것을 나타낸다.

[0411] 일부 실시양태에서, 대조군 샘플에서의 것과 비교하여 대상체 샘플에서 적어도 하나의 강글리오시드의 지질 길이의 이질성에 있어서, 적어도 또는 약 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 110%, 120%, 130%, 140%, 150%, 160%, 170%, 180%, 190%, 200%, 210%, 220%, 230%, 240%, 250%, 260%, 270%, 280%, 290%, 300%, 310%, 320%, 330%, 340%, 350%, 360%, 370%, 380%, 390%, 400%, 410%, 420%, 430%, 440%, 450%, 460%, 470%, 480%, 490%, 500%, 510%, 520%, 530%, 540%, 550%, 560%, 570%, 580%, 590%, 600%, 610%, 620%, 630%, 640%, 650%, 660%, 670%, 680%, 690%, 700%, 710%, 720%, 730%, 740%, 750%, 760%, 770%, 780%, 790%, 800%, 810%, 820%, 830%, 840%, 850%, 860%, 870%, 880%, 890%, 900%, 910%, 920%, 930%, 940%, 950%, 960%, 970%, 980%, 990%, 1000%, 또는 이들 값 이하의 변화(예를 들어, 증가 또는 감소)는 대상체가 낮은 등급 암 또는 높은 등급 암을 갖는 것을 나타낸다.

[0412] 일부 실시양태에서, 대조군 샘플에서의 것과 비교하여 대상체 샘플에서 적어도 하나의 강글리오시드의 지질 길이의 이질성의 적어도 100% 및 200% 이하의 변화(예를 들어, 증가 또는 감소)는 대상체가 낮은 등급 암을 갖는 것을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 대조군 샘플에서의 것과 비교하여 대상체 샘플에서 적어도 하나의 강글리오시드의 지질 길이의 이질성의 적어도 200%의 변화(예를 들어, 증가 또는 감소)는 대상체가 높은 등급 암을 갖는 것을 나타낸다.

[0413] 일부 실시양태에서, (a) 긴 지질 길이를 갖는 강글리오시드의 수준에 대하여 짧은 지질 길이를 갖는 강글리오시드의 수준; 또는 (b) 짧은 지질 길이를 갖는 강글리오시드의 수준에 대하여 긴 지질 길이를 갖는 강글리오시드의 수준에 있어서, 적어도 또는 약 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 110%, 120%, 130%,

140%, 150%, 160%, 170%, 180%, 190%, 200%, 210%, 220%, 230%, 240%, 250%, 260%, 270%, 280%, 290%, 300%, 310%, 320%, 330%, 340%, 350%, 360%, 370%, 380%, 390%, 400%, 410%, 420%, 430%, 440%, 450%, 460%, 470%, 480%, 490%, 500%, 510%, 520%, 530%, 540%, 550%, 560%, 570%, 580%, 590%, 600%, 610%, 620%, 630%, 640%, 650%, 660%, 670%, 680%, 690%, 700%, 710%, 720%, 730%, 740%, 750%, 760%, 770%, 780%, 790%, 800%, 810%, 820%, 830%, 840%, 850%, 860%, 870%, 880%, 890%, 900%, 910%, 920%, 930%, 940%, 950%, 960%, 970%, 980%, 990%, 1000%, 또는 이들 값 이하의 증가 또는 감소는 대상체가 낮은 등급 또는 높은 등급 암을 갖는 것을 나타낸다.

[0414] 특정 양태에서, 본원은 암의 종양 부담을 결정하는 방법을 제공하고, 상기 방법은 a) 질량 분석법을 사용하여 대상체 샘플에서 적어도 하나의 강글리오시드의 지질 길이를 결정하는 단계; 및 b) 상기 적어도 하나의 강글리오시드의 지질 길이를 대조군 샘플의 것과 비교하는 단계를 포함하고, 여기서 대조군 샘플에서의 것과 비교하여 대상체 샘플에서 적어도 하나의 강글리오시드의 지질 길이의 이질성에 있어서, 적어도 또는 약 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 110%, 120%, 130%, 140%, 150%, 160%, 170%, 180%, 190%, 200%, 210%, 220%, 230%, 240%, 250%, 260%, 270%, 280%, 290%, 300%, 310%, 320%, 330%, 340%, 350%, 360%, 370%, 380%, 390%, 400%, 410%, 420%, 430%, 440%, 450%, 460%, 470%, 480%, 490%, 500%, 510%, 520%, 530%, 540%, 550%, 560%, 570%, 580%, 590%, 600%, 610%, 620%, 630%, 640%, 650%, 660%, 670%, 680%, 690%, 700%, 710%, 720%, 730%, 740%, 750%, 760%, 770%, 780%, 790%, 800%, 810%, 820%, 830%, 840%, 850%, 860%, 870%, 880%, 890%, 900%, 910%, 920%, 930%, 940%, 950%, 960%, 970%, 980%, 990%, 1000%, 또는 이들 값 이하의 변화는, 대상체가 낮은 종양 부담을 갖는 것을 나타내고/내거나; 대조군 샘플에서의 것과 비교하여 대상체 샘플에서 적어도 하나의 강글리오시드의 지질 길이의 이질성에 있어서, 적어도 또는 약 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 110%, 120%, 130%, 140%, 150%, 160%, 170%, 180%, 190%, 200%, 210%, 220%, 230%, 240%, 250%, 260%, 270%, 280%, 290%, 300%, 310%, 320%, 330%, 340%, 350%, 360%, 370%, 380%, 390%, 400%, 410%, 420%, 430%, 440%, 450%, 460%, 470%, 480%, 490%, 500%, 510%, 520%, 530%, 540%, 550%, 560%, 570%, 580%, 590%, 600%, 610%, 620%, 630%, 640%, 650%, 660%, 670%, 680%, 690%, 700%, 710%, 720%, 730%, 740%, 750%, 760%, 770%, 780%, 790%, 800%, 810%, 820%, 830%, 840%, 850%, 860%, 870%, 880%, 890%, 900%, 910%, 920%, 930%, 940%, 950%, 960%, 970%, 980%, 990%, 1000%, 또는 이들 값 이하의 변화는, 대상체가 높은 종양 부담을 갖는 것을 나타낸다.

[0415] 일부 실시양태에서, 대조군 샘플에서의 것과 비교하여 대상체 샘플에서 적어도 하나의 강글리오시드의 지질 길이의 이질성의 적어도 100% 및 200% 이하의 변화(예를 들어, 증가 또는 감소)는 대상체가 낮은 종양 부담을 갖는 것을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 대조군 샘플에서의 것과 비교하여 대상체 샘플에서 적어도 하나의 강글리오시드의 지질 길이의 이질성의 적어도 200%의 변화(예를 들어, 증가 또는 감소)는 대상체가 높은 종양 부담을 갖는 것을 나타낸다.

[0416] 일부 실시양태에서, (a) 긴 지질 길이를 갖는 강글리오시드의 수준에 대하여 짧은 지질 길이를 갖는 강글리오시드의 수준; 또는 (b) 짧은 지질 길이를 갖는 강글리오시드의 수준에 대하여 긴 지질 길이를 갖는 강글리오시드의 수준에 있어서, 적어도 또는 약10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 110%, 120%, 130%, 140%, 150%, 160%, 170%, 180%, 190%, 200%, 210%, 220%, 230%, 240%, 250%, 260%, 270%, 280%, 290%, 300%, 310%, 320%, 330%, 340%, 350%, 360%, 370%, 380%, 390%, 400%, 410%, 420%, 430%, 440%, 450%, 460%, 470%, 480%, 490%, 500%, 510%, 520%, 530%, 540%, 550%, 560%, 570%, 580%, 590%, 600%, 610%, 620%, 630%, 640%, 650%, 660%, 670%, 680%, 690%, 700%, 710%, 720%, 730%, 740%, 750%, 760%, 770%, 780%, 790%, 800%, 810%, 820%, 830%, 840%, 850%, 860%, 870%, 880%, 890%, 900%, 910%, 920%, 930%, 940%, 950%, 960%, 970%, 980%, 990%, 1000%, 또는 이들 값 이하의 증가 또는 감소는 대상체가 낮은 종양 부담 또는 높은 종양 부담을 갖는 것을 나타낸다.

[0417] 특정 양태에서, 본원은 대상체에서 암의 재발을 검출하는 방법을 제공하고, 상기 방법은 a) 암 치료를 받은 후 암이 퇴행했던 대상체로부터 샘플을 수득하거나 준비하는 단계; b) 질량 분석법을 사용하여 대상체 샘플에서 적어도 하나의 강글리오시드의 지질 길이를 결정하는 단계; 및 c) 상기 적어도 하나의 강글리오시드의 지질 길이를 대조군 샘플의 것과 비교하는 단계를 포함하고, 여기서 대조군 샘플에서의 것과 비교하여 대상체 샘플에서 적어도 하나의 강글리오시드의 지질 길이의 이질성의 유의미한 변화는 대상체에서 암의 재발을 나타낸다.

[0418] 특정 양태에서, 본원은 대상체에서 최소 잔존 질병을 검출하는 방법을 제공하고, 상기 방법은 a) 관해 중인 대상체로부터 샘플을 수득하거나 준비하는 단계; b) 질량 분석법을 사용하여 대상체 샘플에서 적어도 하나의 강글리오시드의 지질 길이를 결정하는 단계; 및 c) 상기 적어도 하나의 강글리오시드의 지질 길이를 대조군 샘플의

것과 비교하는 단계를 포함하고, 여기서 대조군 샘플에서의 것과 비교하여 대상체 샘플에서 적어도 하나의 강글리오시드의 지질 길이의 이질성의 유의미한 변화는 대상체가 최소 잔존 질병을 갖는 것을 나타낸다.

[0419] 특정 양태에서, 본원은 암 치료(예를 들어, 면역치료)로부터의 이익에 따라 암을 앓고 있는 대상체를 계층화하는 방법을 제공하고, 상기 방법은 a) 질량 분석법을 사용하여 대상체 샘플에서 적어도 하나의 강글리오시드의 지질 길이를 결정하는 단계; b) 대조군에서 적어도 하나의 강글리오시드의 지질 길이를 결정하는 단계; 및 c) 단계 a) 및 b)에서 검출된 적어도 하나의 강글리오시드의 지질 길이를 비교하는 단계를 포함하고, 여기서 대조군 샘플에서의 것과 비교하여 대상체 샘플에서 적어도 하나의 강글리오시드의 지질 길이의 이질성의 유의미한 변화가 없다는 것은 암을 앓고 있는 대상체가 암 치료로부터 이익을 얻을 것이라는 징후이다.

[0420] 특정 양태에서, 암을 앓고 있는 대상체가 암 치료에 반응 할 가능성이 있을지 여부를 결정하는 방법을 제공하고, 상기 방법은 a) 질량 분석법을 사용하여 대상체 샘플에서 적어도 하나의 강글리오시드의 지질 길이를 결정하는 단계; b) 대조군에서 적어도 하나의 강글리오시드의 지질 길이를 결정하는 단계; 및 c) 단계 a) 및 b)에서 검출된 적어도 하나의 강글리오시드의 지질 길이를 비교하는 단계를 포함하고, 여기서 대조군에서의 것과 비교하여 대상체 샘플에서 적어도 하나의 강글리오시드의 지질 길이의 이질성의 유의미한 변화는 암을 앓고 있는 대상체가 암 치료에 반응하지 않을 것이라는 징후이고/이거나; 대조군에서의 것과 비교하여 대상체 샘플에서 적어도 하나의 강글리오시드의 지질 길이의 이질성의 유의미한 변화가 없다는 것은 암을 앓고 있는 대상체가 암 치료에 반응 할 것이라는 징후이다.

[0421] 특정 양태에서, 본원은 암을 앓고 있는 대상체의 임상 결과를 예측하는 방법을 제공하고, 상기 방법은, a) 질량 분석법을 사용하여 대상체 샘플에서 적어도 하나의 강글리오시드의 지질 길이를 결정하는 단계; b) 대조군에서 적어도 하나의 강글리오시드의 지질 길이를 결정하는 단계; 및 c) 단계 a) 및 b)에서 결정된 적어도 하나의 강글리오시드의 지질 길이를 비교하는 단계를 포함하고, 여기서 대조군 샘플과 비교하여 대상체 샘플에서 적어도 하나의 강글리오시드의 지질 길이의 이질성의 유의미한 변화는 대상체가 불량한 임상 결과를 갖는다는 징후이다.

[0422] 특정 양태에서, 본원은 대상체에서 암의 진행을 모니터링하는 방법을 제공하고, 상기 방법은 a) 질량 분석법을 사용하여 적어도 하나의 강글리오시드의 지질 길이를 제1 시점에 대상체 샘플에서 검출하는 단계; b) 후속 시점에 단계 a)를 반복하는 단계; c) 단계 a) 및 b)에서 검출된 적어도 하나의 강글리오시드의 지질 길이의 이질성을 비교하여 대상체에서 암의 진행을 모니터링하는 단계를 포함하고, 여기서 선택적으로 대상체는 암 발병의 위험이 있다.

[0423] 일부 실시양태에서, 제1 시점과 후속 시점 사이에 대상체는 암 치료를 받았다.

[0424] 특정 양태에서, 본원은 대상체에서 암 치료의 효능을 평가하는 방법을 제공하고, 상기 방법은 a) 질량 분석법을 사용하여 적어도 하나의 강글리오시드의 지질 길이를 대상체로부터 수득된 제1 샘플에서 결정하는 단계; b) 암 치료의 투여 후 적어도 하나의 후속 시점 동안 단계 a)를 반복하는 단계; 및 c) 단계 a) 및 b)에서 검출된 적어도 하나의 강글리오시드의 수준을 비교하는 단계를 포함하고, 여기서 제1 샘플에 비해 제2 샘플에서 적어도 하나의 강글리오시드의 지질 길이의 이질성의 유의미한 변화는 치료가 대상체에서 암을 치료하는 데 효과적이라는 징후이다.

[0425] 일부 실시양태에서, 제1 및/또는 적어도 하나의 후속 샘플은 대상체로부터 수득된 합동 샘플 또는 단일 샘플의 일부이다.

[0426] 본원에 기재된 진단 및 예측 방법은 적어도 하나의 강글리오시드의 지질 길이의 이질성을 검출하고 결정하기 위해 당업계에 알려진 임의의 방법을 사용할 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 질량 분석법(예를 들어, LC/MS, LC/MS/MS 또는 당업계에 알려진 임의의 다른 질량 분석법)에 의해 적어도 하나의 강글리오시드의 지질 길이의 이질성이 검출된다.

[0427] 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 강글리오시드의 지질 길이의 이질성 또는 동질성에 있어서, 적어도 또는 약 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 110%, 120%, 130%, 140%, 150%, 160%, 170%, 180%, 190%, 200%, 210%, 220%, 230%, 240%, 250%, 260%, 270%, 280%, 290%, 300%, 310%, 320%, 330%, 340%, 350%, 360%, 370%, 380%, 390%, 400%, 410%, 420%, 430%, 440%, 450%, 460%, 470%, 480%, 490%, 500%, 510%, 520%, 530%, 540%, 550%, 560%, 570%, 580%, 590%, 600%, 610%, 620%, 630%, 640%, 650%, 660%, 670%, 680%, 690%, 700%, 710%, 720%, 730%, 740%, 750%, 760%, 770%, 780%, 790%, 800%, 810%, 820%, 830%, 840%, 850%, 860%, 870%, 880%, 890%, 900%, 910%, 920%, 930%, 940%, 950%, 960%, 970%, 980%, 990%, 1000%, 또는 이들 값 이하

의 변화는 이질성 또는 동질성의 유의미한 변화를 나타낸다.

[0428] 일부 실시양태에서, (a) 긴 지질 길이를 갖는 강글리오시드의 수준에 대하여 짧은 지질 길이를 갖는 강글리오시드의 수준; 또는 (b) 짧은 지질 길이를 갖는 강글리오시드의 수준에 대하여 긴 지질 길이를 갖는 강글리오시드의 수준에 있어서, 적어도 또는 약 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 110%, 120%, 130%, 140%, 150%, 160%, 170%, 180%, 190%, 200%, 210%, 220%, 230%, 240%, 250%, 260%, 270%, 280%, 290%, 300%, 310%, 320%, 330%, 340%, 350%, 360%, 370%, 380%, 390%, 400%, 410%, 420%, 430%, 440%, 450%, 460%, 470%, 480%, 490%, 500%, 510%, 520%, 530%, 540%, 550%, 560%, 570%, 580%, 590%, 600%, 610%, 620%, 630%, 640%, 650%, 660%, 670%, 680%, 690%, 700%, 710%, 720%, 730%, 740%, 750%, 760%, 770%, 780%, 790%, 800%, 810%, 820%, 830%, 840%, 850%, 860%, 870%, 880%, 890%, 900%, 910%, 920%, 930%, 940%, 950%, 960%, 970%, 980%, 990%, 1000%, 또는 이들 값 이하의 증가 또는 감소는 지질 길이의 이질성 또는 동질성의 유의미한 변화를 나타낸다.

[0429] 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 강글리오시드의 지질 길이의 이질성 또는 동질성에 있어서, 적어도 또는 약 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 110%, 120%, 130%, 140%, 150%, 160%, 170%, 180%, 190%, 200%, 210%, 220%, 230%, 240%, 250%, 260%, 270%, 280%, 290%, 300%, 310%, 320%, 330%, 340%, 350%, 360%, 370%, 380%, 390%, 400%, 410%, 420%, 430%, 440%, 450%, 460%, 470%, 480%, 490%, 500%, 510%, 520%, 530%, 540%, 550%, 560%, 570%, 580%, 590%, 600%, 610%, 620%, 630%, 640%, 650%, 660%, 670%, 680%, 690%, 700%, 710%, 720%, 730%, 740%, 750%, 760%, 770%, 780%, 790%, 800%, 810%, 820%, 830%, 840%, 850%, 860%, 870%, 880%, 890%, 900%, 910%, 920%, 930%, 940%, 950%, 960%, 970%, 980%, 990%, 1000%, 또는 이들 값 이하의 변화는 이질성 또는 동질성의 유의미한 변화가 없음을 나타낸다.

[0430] 일부 실시양태에서, (a) 긴 지질 길이를 갖는 강글리오시드의 수준에 대하여 짧은 지질 길이를 갖는 강글리오시드의 수준; 또는 (b) 짧은 지질 길이를 갖는 강글리오시드의 수준에 대하여 긴 지질 길이를 갖는 강글리오시드의 수준에 있어서, 적어도 또는 약 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 110%, 120%, 130%, 140%, 150%, 160%, 170%, 180%, 190%, 200%, 210%, 220%, 230%, 240%, 250%, 260%, 270%, 280%, 290%, 300%, 310%, 320%, 330%, 340%, 350%, 360%, 370%, 380%, 390%, 400%, 410%, 420%, 430%, 440%, 450%, 460%, 470%, 480%, 490%, 500%, 510%, 520%, 530%, 540%, 550%, 560%, 570%, 580%, 590%, 600%, 610%, 620%, 630%, 640%, 650%, 660%, 670%, 680%, 690%, 700%, 710%, 720%, 730%, 740%, 750%, 760%, 770%, 780%, 790%, 800%, 810%, 820%, 830%, 840%, 850%, 860%, 870%, 880%, 890%, 900%, 910%, 920%, 930%, 940%, 950%, 960%, 970%, 980%, 990%, 1000%, 또는 이들 값 이하의 증가 또는 감소는 지질 길이의 이질성 또는 동질성의 유의미한 변화가 없음을 나타낸다.

[0431] 본원에 기재된 본 발명의 임의의 양태에 적용될 수 있는 다수의 실시양태가 추가로 제공된다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 암 치료는 수술, 화학치료, 암 백신, 키메라 항원 수용체, 방사선 치료, 면역치료, 면역 관문 억제 단백질 또는 리간드의 발현 조절제 또는 이들의 임의의 조합이다. 일부 실시양태에서, 면역치료는 면역 관문 억제 치료이다. 일부 실시양태에서, 암 치료는 아벨루맙, 두르발루맙, 아테졸리주맙, BRAF/MEK 억제제, 티로신 키나제 억제제, 펨브롤리주맙, 니볼루맙, 이필리무맙 또는 이의 조합이다.

[0432] 일부 실시양태에서, 강글리오시드는 종양-관련 강글리오시드이다. 일부 실시양태에서, 종양-관련 강글리오시드는 GD2, GD3, GD1b, GT1b, 푸코실-GM1, GloboH, 폴리시알산(PSA), GM2, GM3, 시알릴-루이스^{X}, 시알릴-루이스^{Y}, 시알릴-루이스^{A}, 시알릴-루이스^{B}, 루이스^{Y}, 이들의 임의의 일부로부터 선택되고; 선택적으로 종양-관련 강글리오시드는 GD1, GD2, GD3, GT1b 및 GM2로부터 선택된다.

[0433] 일부 실시양태에서, 암은 신경모세포종, 림프종, 백혈병, 흑색종, 신경교종, 소세포 폐암, 유방 암종, 난소암, 연조직 육종, 골육종, 유잉 육종, 결합조직형성 원형 세포 종양, 횡문근육종, 망막모세포종, 비-소세포 폐암, 신장세포암, 윌름스 종양, 전립선암, 위암, 자궁내막암, 췌장암 및 결장암으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0434] 일부 실시양태에서, 암은 신경모세포종, 림프종, 백혈병, 흑색종, 신경교종, 소세포 폐암, 유방 암종, 난소암, 연조직 육종, 골육종, 유잉 육종, 결합조직형성 원형 세포 종양, 횡문근육종, 망막모세포종으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0435] 일부 실시양태에서, 샘플은 대상체으로부터 수득된 세포, 혈청, 혈액, 종양 부근 조직 및/또는 종양내 조직을 포함한다(예를 들어, 생검). 바람직한 실시양태에서, 샘플은 액체 생검(액체 포함)을 포함한다.

[0436] 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 강글리오시드의 유의미하게 더 높은 수준은 적어도 하나의 강글리오시드의 수준의 적어도 20 퍼센트의 증가를 포함한다.

[0437] 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 강글리오시드의 유의미하게 더 낮은 수준은 적어도 하나의 강글리오시드의 수준의 적어도 20 퍼센트의 감소를 포함한다.

[0438] 바람직한 실시양태에서, 적어도 하나의 강글리오시드의 유의미하게 더 높거나 낮은 수준은 대조군(예를 들어, 비-암성 샘플)의 수준보다 적어도 또는 약 50% 더 높거나 더 낮은 수준이다. 다른 실시양태에서, 적어도 하나의 강글리오시드의 유의미하게 더 높거나 낮은 수준은 종단 연구에서 대상체의 이전 판독의 수준보다 적어도 또는 약 25% 더 높거나 더 낮은 수준이다. 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 강글리오시드의 지질 길이의 이질성의 유의미한 변화는 대조군 샘플에 비해 대상체 샘플에서 적어도 20 퍼센트 변화(예를 들어, 증가 또는 감소)를 포함한다.

[0439] 일부 실시양태에서, 대조군 샘플은 암이 없는 대상체로부터의 샘플이다.

[0440] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 진단 및/또는 예측 방법은 암 치료(예를 들어, 면역 관문 억제 치료)를 대상체에게 권고, 처방 및/또는 투여하는 단계를 추가로 포함한다.

[0441] 일부 실시양태에서, 대상체는 포유동물이다. 강글리오시드(예를 들어, GD2)의 탄수화물 모이어티는 모든 포유동물에서 고도로 보존되므로(즉, 동일), 모든 포유동물(예를 들어, 인간, 애완동물, 가축)에서 암을 진단하는 데 사용될 수 있다.

[0442] 일부 실시양태에서, 대상체는 암의 동물 모델 또는 인간이다.

[0443] 바람직한 실시양태에서, 대상체는 인간이다.

[0444] 임상 시험 동안 효과의 모니터링

[0445] 강글리오시드 수준에 대한 작용제(예를 들어, 화합물, 약물 또는 소분자)의 영향을 모니터링하는 것은 기본 약물 스크리닝뿐만 아니라 임상 시험에도 적용될 수 있다. 예를 들어, 강글리오시드의 수준을 감소시키기 위해 본원에 기재된 바와 같은 스크리닝 검정에 의해 결정된 작용제의 유효성은 본원에 기재된 항-강글리오시드 항체 또는 단편 또는 질량 분석-기반 분석에 의해 검출가능한, 대상체의 임상 시험에서 모니터링될 수 있다. 이러한 임상 시험에서, 강글리오시드 및/또는 증상 또는 암의 다른 마커의 수준은 특정 세포, 조직 또는 시스템의 표현형의 "판독" 또는 마커로 사용될 수 있다.

[0446] 바람직한 실시양태에서, 본원은 작용제(*예를 들어*, 아고니스트, 길항제, 펩티드모방체, 폴리펩티드, 펩티드, 핵산, 소분자, 면역치료, 면역 관문 억제 치료 또는 다른 약물 후보)를 이용한 대상체의 치료의 유효성을 모니터링하기 위한 방법을 제공하고, 상기 방법은 (i) 작용제의 투여 전에 대상체로부터 투여 전 샘플을 수득하는 단계; (ii) 투여 전 샘플에서 적어도 하나의 강글리오시드의 수준을 검출하는 단계; (iii) 대상체로부터 하나 이상의 투여 후 샘플을 수득하는 단계; (iv) 투여 후 샘플에서 적어도 하나의 강글리오시드의 수준을 검출하는 단계; (v) 투여 전 샘플에서의 적어도 하나의 강글리오시드의 수준을, 투여 후 샘플 또는 샘플들에서의 적어도 하나의 강글리오시드와 비교하는 단계 및 (vi) 이에 따라 대상체에 대한 작용제의 투여를 변경하는 단계를 포함한다. 예를 들어, 작용제의 증가된 투여는 검출된 것보다 더 낮은 수준으로 강글리오시드의 수준을 감소시키기 위해, 즉 작용제의 효과를 증가시키기 위해 바람직할 수 있다. 이러한 실시양태에 따르면, 강글리오시드는 관찰가능한 표현형 반응이 부재하더라도, 작용제의 유효성의 지표로 사용될 수 있다. 유사하게는, 예컨대 면역조직화학(IHC) 또는 질량 분석-기반 방법에 의한 강글리오시드 분석은 또한 암 치료(예를 들어, 면역치료, 면역 관문 억제 치료)를 받을 환자를 선택하는 데 사용될 수 있다.

[0447] 샘플

[0448] 생물학적 샘플은 체액 샘플, 세포 샘플 또는 조직 샘플을 포함하여 대상체 유래의 다양한 원천으로부터 수집될 수 있다. 체액은 신체로부터 배설되거나 분비되는 체액뿐만 아니라 보통의 경우에 배설되거나 분비되지 않는 체액(*예를 들어*, 양수, 수양액, 담즙, 혈액 및 혈장, 뇌척수액, 귀지 및 이구, 쿠퍼액 또는 사전-사정액, 유미액, 유미즙, 대변, 여성 사정액, 간질액, 세포내액, 림프액, 월경, 모유, 점액, 흉수, 고름, 타액, 피지, 정액, 혈청, 땀, 관절 낭액, 눈물, 소변, 질액, 유리액, 토사물)을 지칭한다. 일부 실시양태에서, 대상체 및/또는 대조군 샘플은 세포, 세포주, 전혈, 혈청, 혈장, 협측 스크랩, 타액, 뇌척수액 및 골수로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 샘플은 살아있는 세포/조직, 신선한 냉동 세포, 신선한 조직, 생검, 고정 세포/조직,

파라핀, 조직학적 슬라이드와 같은 매체에 내장된 세포/조직, 또는 이들의 임의의 조합일 수 있다.

[0449] 샘플은 종적 기간에 걸쳐 반복적으로 개체로부터 수집될 수 있다(*예를 들어*, 대략 일, 주, 월, 연간, 반년 등에 1회 이상).

[0450] 샘플 준비 및 분리는 수집된 샘플의 종류 및/또는 바이오마커 측정(들)의 분석에 따라 임의의 절차를 포함할 수 있다. 상기 절차는 단지 예로서 농축, 희석, pH 조정, 높은 존재도의 폴리펩티드(*예를 들어*, 알부민, 감마 글로불린 및 트랜스페린 등)의 제거, 방부제 및 보정물(calibrant)의 첨가, 프로테아제 억제제의 첨가, 변성제의 첨가, 샘플의 탈염, 샘플 단백질의 농축, 지질의 추출 및 정제를 포함한다. 일부 실시양태에서, 특정 세포 종류는 세포 표면에 존재하는 적어도 하나의 마커에 기초하여 정제된다.

[0451] 샘플은 고정된 분자를 포함할 수 있다. 기질로부터 해리되는 상당 부분의 분자 없이 기질이 유체(예를 들어, 표준 식염수 시트레이트, pH 7.4)로 헹구어질 수 있도록, 분자가 기질과 공유 또는 비공유 연합된 경우, 분자는 기질에 "고정" 또는 "부착"된다.

[0452] 본원에 기재된 바와 같이, 일부 실시양태에서, 대상체로부터의 샘플에서 적어도 하나의 강글리오시드 측정(들)의 수준은 대조군 생물학적 샘플(예를 들어, 암을 갖지 않는 대상체로부터의 생물학적 샘플), 관해 도중 또는 암 발병 이전에 대상체로부터의 대조군 생물학적 샘플 또는 암 발병에 대한 치료 도중 대상체로부터의 대조군 생물학적 샘플과 비교된다. 일부 실시양태에서, 대조군 생물학적 샘플은 특정 치료로 치료하기 전의 대상체 유래의 것이다. 일부 실시양태에서, 대상체가 하나 이상의 치료의 다중 라운드로 치료되는 경우, 대조군 생물학적 샘플은 이러한 치료 동안 대상체 샘플에 대해 더 이른 시점 또는 더 늦은 시점으로부터의 것일 수 있다. 예를 들어, 3차 라운드의 치료 후 대상체 샘플은 1차 라운드의 치료 후 대조군 대상체 샘플과 비교될 수 있다.

[0453] 일부 실시양태에서, 대상체로부터의 샘플에서 적어도 하나의 강글리오시드 측정(들)의 수준은 사전결정된 대조군(표준) 샘플과 비교된다. 대상체로부터의 샘플은 전형적으로 암 세포 또는 조직과 같은 질병에 걸린 조직 유래의 것이다. 대조군 샘플은 동일한 대상체 또는 상이한 대상체 유래의 것일 수 있다. 대조군 샘플은 전형적으로 질병이 없는 정상 샘플이다. 그러나, 질병의 단계화 또는 치료 효능 평가와 같은 일부 실시양태에서, 대조군 샘플은 질병에 걸린 조직 유래의 것일 수 있다. 대조군 샘플은 여러 상이한 대상체로부터의 샘플의 조합일 수 있다. 일부 실시양태에서, 대상체로부터의 바이오마커 양 및/또는 활성 측정(들)은 사전 결정된 수준과 비교된다. 이러한 사전 결정된 수준은 전형적으로 정상 샘플로부터 수득된다.

[0454] 본원에 기재된 바와 같이, "사전-결정된" 바이오마커 양 측정(들)은 단지 예로서 치료를 위해 선택될 수 있는 대상체를 평가하고/하거나, 암 치료에 대한 반응을 평가하고/하거나, 항암 치료의 조합에 대한 반응을 평가하기 위해 사용되는 바이오마커 양 측정(들)일 수 있다. 사전-결정된 바이오마커 양 및/또는 활성 측정(들)은 암이 있거나 없는 환자의 개체군에서 결정될 수 있다. 사전-결정된 바이오마커 양 측정(들)은 모든 환자에게 동등하게 적용가능한 단일 숫자일 수 있거나, 사전-결정된 바이오마커 양 측정(들)은 환자의 특정 하위 개체군에 따라 달라질 수 있다. 대상체의 연령, 체중, 키 및 다른 요인은 개체의 사전-결정된 바이오마커 양 측정(들)에 영향을 미칠 수 있다. 또한, 사전-결정된 바이오마커 양은 각각의 대상체 대해 개별적으로 결정될 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 방법에서 결정 및/또는 비교되는 양은 절대 측정치를 기반으로 한다.

[0455] 일부 실시양태에서, 대상체로부터의 샘플에서 적어도 하나의 강글리오시드 측정(들)의 존재 또는 수준은 강글리오시드를 검출하는 작용제가 없는 샘플과 비교된다. 예를 들어, 대상체 샘플에서 강글리오시드의 수준을 검출하기 위해 항체 또는 이의 항원 결합 단편이 사용되는 경우, 비교를 위한 대조군 샘플은 항체 또는 이의 항원 결합 단편이 생략된 동일한 대상체 샘플, 즉, "백그라운드 신호"일 수 있다. 이러한 백그라운드 신호 대조군은 본원에 제시된 실험 데이터에서 사용된다.

[0456] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 방법에서 결정 및/또는 비교되는 양은 상대적 측정, 예컨대 비율(*예를 들어*, 치료 전 대 치료 후의 바이오마커 수준, 스파이크 또는 인공 대조군에 대한 이러한 바이오 마커 측정, 하우스키핑 유전자의 발현에 대한 이러한 바이오마커 측정 등)에 기반한다. 예를 들어, 상대 분석은 치료 후 바이오마커 측정과 비교하여 치료 전 바이오마커 측정의 비율을 기반으로 할 수 있다. 치료 전 바이오마커 측정은 항암 치료를 시작하기 전에 언제든지 이루어질 수 있다. 치료 후 바이오마커 측정은 항암 치료를 시작한 후 언제든지 이루어질 수 있다. 일부 실시양태에서, 치료 후 바이오마커 측정은 항암 치료의 시작 후 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 주 이상 이루어지고, 지속적인 모니터링을 위해 무기한으로 훨씬 길게 이루어진다. 치료는 하나 이상의 항암 치료, 예를 들어 면역관문 억제제를 포함할 수 있다.

[0457] 일부 실시양태에서, 사전-결정된 바이오마커 양 측정(들)은 임의의 적합한 표준일 수 있다. 예를 들어, 사전-결

정된 바이오마커 양 측정(들)은 환자 선택이 평가되고 있는 동일하거나 다른 인간으로부터 수득될 수 있다. 일부 실시양태에서, 사전-결정된 바이오마커 양 측정(들)은 동일한 환자의 이전 평가로부터 수득될 수 있다. 이러한 방식으로, 시간 경과에 따라 환자 선택의 진행이 모니터링될 수 있다. 또한, 대상체가 인간인 경우 대조군은 또 다른 인간 또는 복수의 인간, *예를 들어* 선택된 인간 그룹의 평가로부터 수득될 수 있다. 이러한 방식으로, 선택이 평가되고 있는 인간의 선택 정도는, 적합한 다른 인간, 예를 들어 동일한 인종 그룹, 및/또는 유사하거나 동일한 병태(들)을 앓고 있는 인간과 같이, 관심 있는 인간과 유사한 상황에 있는 다른 인간과 비교될 수 있다.

[0458] 본원의 일부 실시양태에서, 사전-결정된 수준으로부터의 바이오마커 양 측정(들)의 변화는 약 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5 또는 5.0배 이상, 또는 이들 사이 값을 포함하여 이들 사이의 임의의 범위이다. 이러한 컷오프 값은 측정이 치료 후 바이오마커 측정과 비교하여 치료 전 바이오마커 측정의 비율에 기초한 것과 같은 상대적인 변화를 기반으로 할 경우 동일하게 적용된다.

[0459] 암

[0460] 암, 종양 또는 과증식성 장애는 제어되지 않는 증식, 불멸성, 전이 가능성, 빠른 성장 및 증식 속도, 특정 특징적인 형태학적 특징과 같은, 암-유발 세포의 전형적인 특징을 가진 세포의 존재를 지칭한다. 암 세포는 종종 종양의 형태이지만, 이러한 세포는 동물 내에 단독으로 존재할 수 있거나, 백혈병 세포와 같은 비-종양형성 암 세포일 수 있다. 암은 비제한적으로 B 세포 암, 예를 들어, 다발성 골수종, 발덴스트롬 마크로글로불린혈증, 중쇄 질병, 예컨대, 알파 쇄 질병, 감마 쇄 질병 및 뮤 쇄 질병, 양성 단클론성 감마글로불린병증 및 면역세포성(immunocytic) 유전분증, 흑색종, 유방암, 폐암, 기관지암, 결장암, 전립선암, 췌장암, 위암, 난소암, 비뇨기 방광암, 뇌 또는 중추신경계 암, 말초신경계 암, 식도암, 자궁경부암, 자궁 또는 자궁내막암, 구강 또는 인두의 암, 간암, 신장암, 고환암, 담도암, 소장 또는 맹장암, 침샘암, 갑상선암, 부신암, 골육종, 연골육종, 혈액학적 조직의 암 등을 포함한다. 본 발명에 포함되는 방법에 적용가능한 암의 종류의 다른 비-제한적인 예는 인간 육종 및 암종, 예를 들어, 섬유육종, 점액육종, 지방육종, 연골육종, 골육종, 성대종양(chordoma), 혈관육종, 내피육종(endotheliosarcoma), 림프관육종, 림프관내피육종(lymphangioendotheliosarcoma), 활막종, 중피종, 유잉 종양, 평활근육종, 횡문근육종, 결장 암종, 결장암, 췌장암, 유방암, 난소암, 전립선암, 편평세포 암종, 기저세포 암종, 선암, 한선 암종, 피지샘 암종, 유두 암종, 유두 선암, 낭샘암종, 수질 암종, 기관지 암종, 신장 세포 암종, 간세포암, 담관 암종, 간암, 융모막암종, 정상피종, 배아 암종, 윌름스 종양, 자궁경부암, 골암, 뇌 종양, 고환암, 폐 암종, 소세포 폐 암종(SCLC), 방광 암종, 상피 암종, 신경교종, 성상세포종, 수모세포종, 두개인두종, 뇌실막종, 송과체종(pinealoma), 혈관모세포종, 속귀신경집종(acoustic neuroma), 희소돌기교종, 수막종 신경모세포종, 망막모세포종; 백혈병, 예를 들어, 급성 림프성 백혈병 및 급성 골수성 백혈병(골수모구, 전골수성, 골수단핵구, 단핵구 및 적백혈병); 만성 백혈병(만성 골수성(과립구성) 백혈병 및 만성 림프성 백혈병); 및 진성다혈구증, 림프종(호지킨병 및 비-호지킨병), 다발성 골수종, 발덴스트롬 마크로글로불린혈증 및 중쇄 질병을 포함한다. 일부 실시양태에서, 암은 사실상 상피성이고, 비제한적으로 방광암, 유방암, 자궁경부암, 결장암, 부인과 암, 신장암, 후두암, 폐암, 구강암, 두경부암, 난소암, 췌장암, 전립선암 또는 피부암을 포함한다. 다른 실시양태에서, 암은 유방암, 전립선암, 폐 암 또는 결장암이다. 또 다른 실시양태에서, 상피 암은 비-소세포 폐암, 비유두형 신장세포 암종, 자궁 암종, 난소 암종(예를 들어, 장액성 난소 암종) 또는 유방 암종이다. 상피 암은, 비제한적으로 장액성, 자궁내막모양, 점액, 투명 세포, 브레너(Brenner) 또는 미분화를 포함하는 다양한 다른 방식으로 특성화될 수 있다.

[0461] 본 발명의 조성물 및 방법은 난소암, 소세포 폐암(SCLC) 또는 흑색종을 검출하기 위해 사용될 수 있다.

[0462] 암 치료

[0463] 본 발명의 치료제는 단독으로 사용될 수 있거나, *예를 들어* 화학치료제, 호르몬, 항혈관형성제, 방사성 표지된 화합물, 또는 수술, 동결요법, 면역치료, 암 백신, 면역 세포 조작(예를 들어, CAR-T) 및/또는 방사선 요법과 조합 치료로 투여될 수 있다. 전술한 치료 방법은 종래 치료의 다른 형태(*예를 들어*, 당업자에게 잘 알려진 암에 대한 치료 기준 치료)와 함께, 종래 요법 전 또는 후에 연속적으로 투여될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 작용제는 치료적 유효 투여량의 화학치료제와 함께 투여될 수 있다. 다른 실시양태에서, 본 발명의 작용제는 화학치료제의 활성 및 효능을 향상시키기 위해 화학치료와 함께 투여된다. 문헌 [Physicians' Desk Reference(PDR)]은 다양한 암 치료에 사용되었던 화학치료제의 투여량을 개시한다. 치료적으로 효과적인 이러한 전술의 화학치료 약물의 투여 요법 및 투여량은 치료되는 특정 암, 질병의 정도 및 당업계의 의사에게 친숙한 다른 요인에 따라 달라질 것이며, 의사에 의해 결정될 수 있다.

[0464] 면역치료는, 예를 들어 암 백신 및/또는 감작화된 항원 제시 세포의 사용을 포함할 수 있는 표적화된 요법이다. 예를 들어, 종양용해(oncolytic) 바이러스는 암 세포를 감염시키고 용해시킬 수 있는 반면, 정상 세포를 해롭지 않게 두고, 암 치료에서 이들을 잠재적으로 유용하게 하는 바이러스이다. 종양용해 바이러스의 복제는 종양 세포 파괴를 촉진하고 또한 종양 부위에서 용량 증폭을 생성한다. 이들은 또한 항암 유전자에 대한 벡터로서 작용할 수 있어, 이들을 종양 부위로 특이적으로 전달될 수 있게 한다. 면역치료는 암 항원 또는 질병 항원에 대해 지시된 사전 형성된 항체의 투여(*예를 들어*, 선택적으로, 화학치료제 또는 독소에 연결된 단클론성 항체를 종양 항원에 투여하는 것)에 의해 달성되는 숙주의 단기간 보호를 위한 수동 면역성을 수반한다. 예를 들어, 항-VEGF는 신장세포 암종을 치료하는 데 효과적인 것으로 알려져 있다. 면역치료는 또한 암 세포주의 세포독성 림프구-인식 에피토프를 사용하는 데 중점을 둘 수 있다. 대안적으로, 안티센스 폴리뉴클레오티드, 리보자임, RNA 간섭 분자, 삼중 나선 폴리뉴클레오티드 등은 종양 또는 암의 개시, 진행 및/또는 병리와 관련된 생체분자를 선택적으로 조절하기 위해 사용될 수 있다.

[0465] 면역치료는 또한 면역 관문 조절제를 포함한다. 면역 관문은 항-종양 면역 반응을 하향 조절하거나 억제함으로써 면역 반응을 미세 조정하는 CD4+ 및/또는 CD8+ T 세포의 세포 표면 상의 분자의 그룹이다. 면역 관문 단백질은 당업계에 잘 알려져 있으며, 비제한적으로 CTLA-4, PD-1, VISTA, B7-H2, B7-H3, PD-L1, B7-H4, B7-H6, 2B4, ICOS, HVEM, PD-L2, CD160, gp49B, PIR-B, KIR 계열 수용체, TIM-1, TIM-3, TIM-4, LAG-3, BTLA, SIRP알파(CD47), CD48, 2B4(CD244), B7.1, B7.2, ILT-2, ILT-4, TIGIT, HHLA2, TMIDG2, KIR3DL3 및 A2aR을 포함한다(예를 들어 WO 2012/177624 참조). 하나 이상의 면역 관문 억제제의 억제는 암을 보다 효과적으로 치료하기 위해 억제 신호를 차단하거나 그렇지 않으면 중화함으로써 면역 반응을 상향 조절할 수 있다. 일부 실시양태에서, 암 백신은 PD1, PD-L1 및/또는 CD47 억제제와 같은 면역 관문의 하나 이상의 억제제(면역 관문 억제 치료)와 조합하여 투여된다.

[0466] 입양 세포 기반 면역치료는 본 발명의 치료와 조합될 수 있다. 비제한적으로 조사된 자가 또는 동종이계 종양 세포, 종양 용해물 또는 세포사멸 종양 세포, 항원-제시 세포 기반 면역치료, 수지상 세포-기반 면역치료, 입양 T 세포 전달, 입양 CAR T 세포 치료, 자가 면역 강화 치료(AIET), 암 백신 및/또는 항원-제시 세포를 포함하여, 입양 세포-기반 면역치료 양상이 잘 알려져 있다. 이러한 세포-기반 면역치료는 추가로 변형되어서 하나 이상의 유전자 산물을 발현하여 면역 반응을 추가로 조절하는 것, 예컨대 GM-CSF과 같은 사이토카인을 발현하고/하거나, 종양-관련 항원(TAA) 항원, 예컨대 Mage-1, gp-100 등을 발현할 수 있다.

[0467] 용어 "키메라 항원 수용체" 또는 "CAR"은 원하는 항원 특이성을 갖는 조작된 T 세포 수용체(TCR)를 지칭한다. T 림프구는 주요 조직적합성 복합체(MHC) 클래스 I 또는 II 분자에 의해 제시된 짧은 펩티드와 T 세포 수용체(TCR)의 상호작용을 통해 특정 항원을 인식한다. 초기 활성화 및 클론 확장을 위해, 실험 전 T 세포(naive T cell)는 추가 공동 자극 신호를 제공하는 전문 항원-제시 세포(APC)에 의존한다. 공동 자극 부재 시 TCR 활성화는 무반응 및 클론성 아너지(anergy)를 초래할 수 있다. 면역화를 우회하기 위해, 이식된 인식 특이성을 가진 세포독성 이펙터 세포의 유도를 위한 상이한 접근법이 개발되었다. TCR-관련 CD3 복합체의 세포-표면 구성요소에 대해 특이적인 천연 리간드 또는 항체로부터 유래된 결합 도메인으로 구성된 CAR이 구성되어 있다. 항원 결합 시, 이러한 키메라 항원 수용체는 이펙터 세포의 내인성 신호전달 경로에 연결되고 TCR 복합체에 의해 개시된 신호와 유사한 활성화 신호를 생성한다. 키메라 항원 수용체에 대한 첫 번째 보고 이후, 이러한 개념은 꾸준히 개선되었고, 키메라 수용체의 분자 디자인은 최적화되었으며, 많은 잘 알려진 결합 도메인, 예컨대 cFV 및 본원에 기재된 또 다른 단백질 결합 단편을 일상적으로 사용한다.

[0468] 다른 실시양태에서, 면역치료는 비-세포 기반 면역치료를 포함한다. 일부 실시양태에서, 백신-강화 아쥬반트와 함께 또는 이것 없이 항원을 포함하는 조성물이 사용된다. 이러한 조성물은 펩티드 조성물, 종양용해 바이러스, 융합 단백질을 포함하는 재조합 항원 등과 같이 많이 잘 알려진 형태로 존재한다. 일부 실시양태에서, 인터페론, G-CSF, 이미퀴모드, TNF알파 등과 같은 면역조절 사이토카인뿐만 아니라 이의 조절제(*예를 들어*, 차단 항체 또는 보다 강력하거나 보다 오래 지속되는 형태)가 사용된다. 일부 실시양태에서, 면역조절 인터루킨, 예컨대 IL-2, IL-6, IL-7, IL-12, IL-17, IL-23 등뿐 아니라 이의 조절제(*예를 들어*, 차단 항체 또는 보다 강력하거나 보다 오래 지속되는 형태)가 사용된다. 일부 실시양태에서, CCL3, CCL26 및 CXCL7 등과 같은 면역조절 케모카인뿐만 아니라 이의 조절제(*예를 들어*, 차단 항체 또는 보다 강력하거나 보다 오래 지속되는 형태)가 사용된다. 일부 실시양태에서, STAT3 신호전달 조절제, NF카파B 신호전달 조절제 및 면역 관문 조절제와 같은 면역억제를 표적화하는 면역조절 분자가 사용된다.

[0469] 또 다른 실시양태에서, 면역조절 약물, 예컨대 면역세포증식억제(immunocytostatic) 약물, 글루코코르티코이드, 세포증식억제제, 면역필린 및 이의 조절제(*예를 들어*, 라파마이신, 칼시뉴린 억제제, 타크로리무스, 시클로스포

린(사이클로스포린), 피메크로리무스, 아베티무스, 구스페리무스, 리다포롤리무스, 에베롤리무스, 템시롤리무스, 조타롤리무스 등), 하이드로코르티손(코티솔), 코르티손 아세테이트, 프레드니손, 프레드니솔론, 메틸프레드니솔론, 덱사메타손, 베타메타손,트리암시놀론, 베클로메타손, 플루드로코르티손 아세테이트, 데옥시코르티코스테론 아세테이트(도카) 알도스테론, 비-글루코코르티코이드 스테로이드, 피리미딘 합성 억제제, 레플루노미드, 테리플루노미드, 엽산 유사체, 메토트렉세이트, 항-흉선 세포 글로불린, 항-림프구 글로불린, 탈리도미드, 레날리도미드, 펜톡시필린, 부프로피온, 커큐민, 카테킨, 오피오이드, IMPDH 억제제, 마이코페놀산, 마이리오신, 핀골리모드, NF-xB 억제제, 랄록시펜, 드로트레코진 알파, 데노수맙, NF-xB 신호전달 캐스케이드 억제제, 디설피람, 올메사르탄, 디티오카바메이트, 프로테아좀 억제제, 보르테조밉, MG132, 프롤, NPI-0052, 커큐민, 제니스테인, 레스베라트롤, 파르테놀리드, 탈리도미드, 레날리도미드, 플라보피리돌, 비-스테로이드성 항염증 약물(NSAID), 삼산화비소, 데하이드록시메틸에폭시퀴노마이신(DHMEQ), I3C(인돌-3-카비놀)/DIM(디-인돌메탄)(13C/DIM), Bay 11-7082, 루테올린, 세포 투과성 펩티드 SN-50, IKBa.-수퍼 리프레서 과발현, NFKB 디코이 올리고데옥시뉴클레오티드(ODN), 또는 이들의 임의의 유도체 또는 유사체가 사용된다. 또 다른 실시양태에서, 면역조절 항체 또는 단백질이 사용된다. 예를 들어, CD40, 톨-유사 수용체(TLR), OX40, GITR, CD27, 또는 4-1BB에 결합하는 항체, T-세포 이중특이적 항체, 항-IL-2 수용체 항체, 항-CD3 항체, OKT3(무로모나브), 오텔릭시주맙, 테플리주맙, 비실리주맙, 항CD4 항체, 클레놀릭시맙, 켈릭시맙, 자놀리무맙, 항-CD11a 항체, 에팔리주맙, 항-CD18 항체, 에를리주맙, 로벨리주맙, 항-CD20 항체, 아푸투주맙, 오크렐리주맙, 오파투무맙, 파스콜리주맙, 리툭시맙, 항-CD23 항체, 루밀릭시맙, 항-CD40 항체, 테넬릭시맙, 토랄리주맙, 항-CD40L 항체, 루플리주맙, 항-CD62L 항체, 아셀리주맙, 항-CD80 항체, 갈릭시맙, 항-CD147 항체, 가빌리모맙, B-림프구 자극제(BLyS) 억제 항체, 벨리무맙, CTLA4-Ig 융합 단백질, 아바타셉트, 벨라타셉트, 항-CTLA4 항체, 이필리무맙, 트레멜리무맙, 항-에오탁신 1 항체, 베르틸리무맙, 항-a4-인테그린 항체, 니탈리주맙, 항-IL-6R 항체, 토실리주맙, 항-LFA-1 항체, 오둘리모맙, 항-CD25 항체, 바실릭시맙, 다클리주맙, 이놀리모맙, 항-CD5 항체, 졸리모맙, 항-CD2 항체, 시플리주맙, 네렐리모맙, 파랄리모맙, 아틀리주맙, 아토롤리무맙, 세델리주맙, 도르리모맙 아리톡스, 도르릭시주맙, 폰톨리주맙, 간테네루맙, 고밀릭시맙, 레브릴리주맙, 마슬리모맙, 모롤리무맙, 펙셀리주맙, 레슬리주맙, 로벨리주맙, 틸리주맙, 텔리모맙 아리톡스, 바팔릭시맙, 베팔리모맙, 애플리버셉트, 알레파셉트, 릴로나셉트, IL-1 수용체 길항제, 아나킨라, 항-IL-5 항체, 메폴리주맙, IgE 억제제, 오말리주맙, 탈리주맙, IL12 억제제, IL23 억제제, 우스테키누맙 등.

[0470] 비타민 A, 비타민 E, 비타민 C 등과 같은 면역 반응을 향상시키는 영양 보충제는 당업계에 잘 알려져 있고(예를 들어, 미국 특허 번호 4,981,844 및 5,230,902 및 PCT 공개 번호 WO 2004/004483 참조) 본원에 기재된 방법에서 사용될 수 있다.

[0471] 유사하게는, 다양한 작용제 또는 이의 조합은 암을 치료하는 데 사용될 수 있다. 예를 들어, 화학치료, 방사선, 후생적 변형제(예를 들어, 히스톤 데아세틸라제(HDAC) 변형제, 메틸화 변형제, 인산화 변형제 등), 표적 요법 등은 당업계에 잘 알려져 있다.

[0472] 일부 실시양태에서, 화학치료가 사용된다. 화학치료는 화학치료제의 투여를 포함한다. 이러한 화학치료제는, 비제한적으로 다음과 같은 화합물의 군으로부터 선택된 것일 수 있다: 백금 화합물, 세포독성 항생제, 항대사물질, 항-유사분열제(anti-mitotic agent), 알킬화제, 비소 화합물, DNA 토포이소머라제 억제제, 탁산, 뉴클레오시드 유사체, 식물 알칼로이드 및 독소; 및 이들의 합성 유도체. 예시적인 화합물은, 비제한적으로 알킬화제: 시스플라틴, 트레오설판 및 트로포스파미드; 식물 알칼로이드: 빈블라스틴, 파클리탁셀, 도세탁솔; DNA 토포이소머라제 억제제: 테니포시드, 크리스나톨 및 미토마이신; 항-엽산제: 메토트렉세이트, 마이코페놀산 및 하이드록시우레아; 피리미딘 유사체: 5-플루오로우라실, 독시플루리딘 및 시토신 아라비노시드; 푸린 유사체: 머캅토푸린 및 티오구아닌; DNA 항대사물질: 2'-데옥시-5-플루오로우리딘, 아피디콜린 글리시네이트 및 피라졸로이미다졸; 및 항유사분열제: 할리콘드린, 콜히친 및 리족신을 포함한다. 하나 이상의 화학치료제(예를 들어, FLAG, CHOP)를 포함하는 조성물이 또한 사용될 수 있다. FLAG는 플루다라빈, 시토신 아라비노시드(Ara-C) 및 G-CSF를 포함한다. CHOP는 사이클로포스파미드, 빈크리스틴, 독소루비신 및 프레드니손을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, PARP(예를 들어, PARP-1 및/또는 PARP-2) 억제제가 사용되며, 이러한 억제제는 당업계에 잘 알려져 있다(예를 들어, 올라파립(Olaparib), ABT-888, BSI-201, BGP-15(엔-진 리서치 래버러토리스 주식회사(N- Gene Research Laboratories, Inc.)), INO-1001(이노텍 파마슈티컬즈 인 주식회사(Inotek Pharmaceuticals Inc.)), PJ34(문헌 [Soriano *et al.*, 2001; Pacher *et al.*, 2002b]), 3-아미노벤즈아미드(트레비겐(Trevigen)), 4-아미노-1,8-나프탈이미드(트레비겐), 6(5H)-페난트리디논(트레비겐); 벤즈아미드(미국 특허 Re. 36,397) 및 NU1025(문헌 [Bowman *et al.*]). 작용 메커니즘은 일반적으로 PARP에 결합하여 이의 활성을 감소시키는 PARP 억제제의 능력과 관련이 있다. PARP는 .베타.-니코틴아미드 아데닌 디뉴클레오티드(NAD+)를 니코틴아미드 및 폴리-ADP-리

보오스(PAR)로 전환하는 것을 촉매작용한다. 폴리(ADP-리보오스) 및 PARP 둘 모두는 전사, 세포 증식, 게놈 안정성 및 발암성의 조절과 관련되어 있다(문헌 [Bouchard V. J. et.al. Experimental Hematology, Volume 31, Number 6, June 2003, pp. 446-454(9); Herceg Z.]; [Wang Z.-Q. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, Volume 477, Number 1, 2 Jun. 2001, pp. 97-110(14)]). 폴리(ADP-리보오스) 폴리머라제 1(PARP1)은 DNA 단일 가닥 파단(SSB)의 보수에 있어서 핵심 분자이다(문헌 [de Murcia J. *et al.* 1997. Proc Natl Acad Sci USA 94:7303-7307; Schreiber V, Dantzer F, Ame J C, de Murcia G(2006) Nat Rev Mol Cell Biol 7:517-528; Wang Z Q, *et al.*(1997) Genes Dev 11:2347-2358]). PARP1 기능의 억제에 의한 SSB 보수의 녹아웃은 결함이 있는 상동성-지시된 DSB 보수를 갖는 암 세포에서 합성 치명율을 유발할 수 있는 DNA 이중 가닥 파단(DSB)을 유도한다(문헌 [Bryant H E, *et al.*(2005) Nature 434:913-917]; [Farmer H, *et al.*(2005)]). 화학치료제의 전술한 예는 예시적이며 한정하도록 의도되지 않는다.

[0473] 다른 실시양태에서, 방사선 치료가 사용된다. 방사선 치료에 사용되는 방사선은 이온화 방사선일 수 있다. 또한, 방사선 치료는 감마선, X선 또는 양성자 빔일 수 있다. 방사선 치료의 예는, 비제한적으로 외부 빔 방사선 치료, 방사성 동위원소(I-125, 팔라듐, 이리듐)의 간질 착상, 방사성동위원소, 예컨대 스트론튬-89, 흉부 방사선 치료, 복강내 P-32 방사선 치료 및/또는 전체 복부 및 골반 방사선 치료를 포함한다. 방사선 치료의 일반적인 개요의 경우, 문헌 [Hellman, Chapter 16: Principles of Cancer Management: Radiation Therapy, 6th edition, 2001, DeVita *et al.*, eds., J. B. Lippencott Company, Philadelphia]를 참조하라. 방사선 치료는 외부 빔 방사선 또는 원격치료로서 시행될 수 있고, 여기서 방사선이 원격 원천으로부터 지향된다. 방사선 치료는 또한 내부 치료 또는 근접치료(brachytherapy)로서 시행될 수 있고, 여기서 방사성 원천은 암 세포 또는 종양 덩어리에 가까운 신체 내부에 배치된다. 또한 광감제, 예컨대 헤마토포르피린 및 이의 유도체, 베르토포르핀(BPD-MA), 프탈로시아닌, 광감제 Pc4, 데메톡시-하이포크렐린 A; 및 2BA-2-DMHA의 투여를 포함하는 광역학적 치료의 사용이 포함된다.

[0474] 다른 실시양태에서, 호르몬 치료가 사용된다. 호르몬 치료적 치료는, 예를 들어 호르몬 아고니스트, 호르몬 길항제(예를 들어, 플루타미드, 비칼루타미드, 타목시펜, 랄록시펜, 류프로리드 아세테이트(LUPRON), LH-RH 길항제), 호르몬 생합성 및 처리의 억제제, 및 스테로이드(예를 들어, 덱사메타손, 레티노이드, 델토이드, 베타메타손, 코르티솔, 코르티손, 프레드니손, 데하이드로테스토스테론, 글루코코르티코이드, 미네랄로코르티코이드, 에스트로겐, 테스토스테론, 프로게스틴), 비타민 A 유도체(예를 들어, 전체-트랜스 레티노산(ATRA)); 비타민 D3 유사체; 항게스타겐(예를 들어, 미페프리스톤, 오나프리스톤) 또는 항안드로겐(예를 들어, 사이프로테론 아세테이트)를 포함할 수 있다.

[0475] 다른 실시양태에서, 광역학 치료(PDT, 광방사선 치료, 광치료 또는 광화학치료로도 지칭됨)는 일부 종류의 암 치료에 사용된다. 이는 유기체가 특정 종류의 광에 노출될 때 감광제로 알려진 특정 화학 물질이 단세포 유기체를 사멸시킬 수 있다는 발견에 기초한다.

[0476] 또 다른 실시양태에서, 레이저 치료는 암 세포를 파괴하기 위해 고-강도 광을 활용하는 데 사용된다. 이러한 기술은 특히 암이 다른 치료법으로 치유될 수 없을 때 출혈이나 폐색과 같은 암 증상을 완화하는 데 종종 사용된다. 또한 종양을 축소하거나 파괴하여 암을 치료하는 데 사용될 수 있다.

[0477] 치료에 대한 반응 / 임상 효능

[0478] 임상 효능은 당업계에 알려진 임의의 방법에 의해 측정될 수 있다. 예를 들어, 치료에 대한 반응은 치료에 대한 암, *예를 들어* 종양의 임의의 반응, 바람직하게는 신보강 또는 보강 화학치료의 개시 후 종양 질량 및/또는 부피의 변화에 관한 것이다. 종양 반응은 신보강 또는 보강 상황 시 평가될 수 있으며, 여기서 전신 개입 후 종양의 크기는, CT, PET, 유방조영술, 초음파 또는 촉진법에 의해 측정된 바와 같은 초기 크기 및 치수와 비교될 수 있고, 종양의 세포질은 조직학적으로 추정되고, 치료 개시 전 채취된 종양 생검의 세포질과 비교될 수 있다. 반응은 또한 생검 또는 외과적 절제 후 종양의 캘리퍼 측정 또는 병리학적 검사에 의해 평가될 수 있다. 반응은 종양 부피 또는 세포질의 백분율 변화와 같은 정량적 방식으로, 또는 반-정량적 채점 시스템, 예컨대 잔류 암 부담(문헌 [Symmans *et al.*, *J. Clin. Oncol.*(2007) 25:4414-4422]) 또는 밀러-파인 채점(Miller-Payne score)(문헌 [Ogston *et al.*, (2003) *Breast*(Edinburgh, Scotland) 12:320-327])을 사용하여, "병리학적 완전 반응"(pCR), "임상적 완전 관해"(cCR), "임상적 부분 관해"(cPR), "임상적 안정 질병"(cSD), "임상 진행성 질병"(cPD)과 같은 정성적 방식 또는 다른 정성적 기준으로 기록될 수 있다. 종양 반응의 평가는 신보강 또는 보강 치료의 개시 후 초기에, 예를 들어 몇 시간, 며칠, 몇 주 후 또는 바람직하게는 몇 달 후에 수행될 수 있다. 반응 평가를 위한 전형적인 종점은 신보강 화학치료 종료 시 또는 잔류 종양 세포 및/또는 종양 베드(bed)

의 외과적 제거 시이다.

[0479] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 치료적 치료의 임상 효능은 임상적 이익률(CBR)을 측정함으로써 결정될 수 있다. 임상적 이익률은 치료 종료로부터 적어도 6개월의 시점에서, 완전관해(CR)에 있는 환자의 백분율, 부분관해(PR)에 있는 환자의 수 및 안정 질병(SD)을 갖는 환자의 수의 합을 결정함으로써 측정된다. 이러한 공식의 축약은 6개월 동안 CBR=CR+PR+SD이다. 일부 실시양태에서, 특정 항-면역 관문 치료 요법에 대한 CBR은 적어도 적어도 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85% 이상이다.

[0480] 암 치료에 대한 반응을 평가하기 위한 추가 기준은 "생존"과 관련되며, 이는 다음을 모두 포함한다: 전체 생존으로도 알려진 사망까지의 생존(여기서 상기 사망은 원인에 관계없거나 종양과 관련될 수 있음); "재발-없는 생존"(여기서 용어 재발은 국소 및 먼 재발을 모두 포함해야함); 전이 없는 생존; 질병 없는 생존(여기서 용어 질병은 암 및 이와 관련된 질병을 포함해야함). 상기 생존 길이는 정의된 시작점(예를 들어, 진단 시간 또는 치료 시작) 및 종점(예를 들어, 사망, 재발 또는 전이)을 참조함으로써 계산될 수 있다. 또한 치료의 효능에 대한 기준은 확장하여 생존 확률, 주어진 기간 내 전이 확률 및 종양 재발 확률을 포함하도록 확장될 수 있다.

[0481] 예를 들어, 적절한 역치 값을 결정하기 위해 특정 항-암 치료 요법이 대상체의 개체군에 투여될 수 있고, 결과는 임의의 암 치료의 투여 전에 결정된 바이오마커 측정과 상관관계가 있을 수 있다. 결과 측정은 신보강 환경에서 제공된 치료에 대한 병리학적 반응일 수 있다. 대안적으로, 전체 생존 및 질병 없는 생존과 같은 결과 척도는 바이오마커 측정 값이 알려진 암 치료 후 대상체에 대해 일정 기간 동안 모니터링될 수 있다. 특정 실시양태에서, 동일한 투여량의 항-암제가 각각의 대상체에게 투여된다. 관련 실시양태에서, 투여되는 투여량은 항-암제에 대해 당업계에 알려진 표준 투여량이다. 대상체가 모니터링되는 기간은 다를 수 있다. 예를 들어, 대상체는 적어도 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 또는 60개월 동안 모니터링될 수 있다. 암 치료의 결과와 상관관계가 있는 바이오마커 측정 역치 값은 실시예 섹션에 기재된 것과 같은 방법을 사용하여 결정될 수 있다.

[0482] 키트

[0483] 본 발명은 또한 생물학적 샘플에서 강글리오시드의 존재 또는 수준을 검출하기 위한 키트를 포함한다. 예를 들어, 키트는 생물학적 샘플에서 강글리오시드를 검출할 수 있는 표지된 화합물 또는 작용제; 샘플에서 강글리오시드의 양을 측정하기 위한 수단; 및 샘플에서 강글리오시드의 양을 표준과 비교하기 위한 수단을 포함할 수 있다. 화합물 또는 작용제는 적합한 용기 내에 패키징될 수 있다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 본 발명은 본원에 기재된 적어도 하나의 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 키트를 제공한다. 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 함유하는 키트는 예를 들어 진단 또는 예측 검정에서 강글리오시드를 검출하는 데 사용된다. 본 발명의 키트는 고체 지지체, 예를 들어, 조직 배양 플레이트 또는 비드(예를 들어, 세파로스 비드)에 커플링된 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 함유할 수 있다.

[0484] 키트는 키트가 디자인된 특정 용례를 용이하게 하는 추가 구성요소를 포함할 수 있다. 예를 들어, *시험관내 또는 생체외, 예를 들어* ELISA 또는 웨스턴 블롯에서 강글리오시드의 검출 및 정량화를 위한 항체를 함유하는 키트가 제공될 수 있다. 키트가 함유할 수 있는 추가, 예시적인 작용제는 표지를 검출하는 수단(예를 들어, 효소 표지를 위한 효소 기질, 형광 표지를 검출하기 위한 필터 세트, 양 항-마우스-HRP 등과 같은 적절한 2차 표지) 및 대조군에 필요한 시약(예를 들어, 대조군 생물학적 샘플 또는 강글리오시드 표준)을 포함한다. 키트는 개시된 발명의 방법에 사용하기 위해 인식된 완충제 및 다른 시약을 추가로 포함할 수 있다. 비-제한적 예는 담체 단백질 또는 세제와 같은 비-특이적 결합을 감소시키는 작용제를 포함한다. 또한, 본 발명의 키트는 본원에 제공된 바와 같이 개시된 본원의 방법에서 개시된 본원의 키트 또는 항체의 사용을 개시하거나 기재한 교육용 자료를 포함할 수 있다.

[0485] 본 발명은 한정하는 것으로 해석되어서는 안되는 하기 실시예에 의해 추가로 예시된다. 도면뿐만 아니라 본 출원 전반에 걸쳐 인용된 모든 참조, 특허 및 공개된 특허 출원의 내용은 본원에 참조로 포함된다.

[0486] **실시예**

[0487] **실시예 1: 물질 및 방법**

[0488] *마우스*

[0489] 사용된 동물 프로토콜을 레이디 데이비스 인스티튜트(Lady Davis Institute) 동물 관리 위원회에서 검토 및 승인 받았으며 동물 실험을 캐나다 동물 관리 위원회의 지침에 따라 수행하였다. 건강한 야생형 암컷 C57/B16 마

우스(10-12주령, 19-20 g)를 할란(Harlan)(캐나다 퀘벡 소재의 라친(Lachine))에서 구입하였고, PAMAM-GD2 및 PAMAM-GD3로 면역화하여 항체를 생성하는 데 사용하였다. 케이지당 최대 5마리의 마우스를 자유식의 음식 및 물과 함께 12시간 암-광 주기로 유지하였다.

[0490] *면역화*

[0491] PAMAM-GD2 및 PAMAM-GD3을 약 5-7일 간격으로 마우스에 각각 2회 복강내(PBS 중 50 ug) 주사하였다. 첫 번째 면역화에는 10%(v/v) 게르부(gerbu)(아쥬반트)가 있었으나, 두 번째 면역화는 아쥬반트가 없었다. 면역화된 마우스로부터 비장 세포를 수확하고, 골수종 주(myeloma line)와 융합시켜 하이브리도마를 생성하였다(문헌 [Haskard and Archer, J. Immunol. Methods, 74(2), 361-67(1984), Roder et al., Methods Enzymol., 121, 140-67(1986) 및 Huse et al., Science, 246, 1275-81(1989)]). PAMAM-GD2, PAMAM-GD3 또는 천연 강글리오시드에 결합하는 항체의 능력을 유세포 분석 및 ELISA에 의해 분석하였다.

[0492] *면역조직화학(IHC)*

[0493] 파라핀-내장된 4-μm 두께의 조직 섹션을 탈파라핀화하고, 포스페이트 완충 식염수(PBS)로 세척하였다. 내인성 수소 퍼옥시다제 및 비오틴을 각각 0.3%(v/v) H_2O_2 및 아비딘/비오틴 차단 키트(벡터 래버러토리스(Vector Laboratories), SP-2001)로 차단하였다. 비특이적 백그라운드를 차단 시약으로 차단한 후, 항-GD2 항체 또는 항-GD3 항체와 밤새 항온처리하였다. 섹션을 항-비오티닐화된 마우스 IgG 홀스 래빗 퍼옥시다제(HRP)와 함께 항온처리한 후, DAB 반응을 수행하고, 헤마톡실린/에오신으로 대조염색하였다. 1차 항체가 없는 섹션을 음성 대조군으로 사용하였다. 광학 현미경 스캐너를 사용하여 이미지를 촬영하였다.

[0494] *채점*

[0495] GD2 및 GD3의 면역반응성을 병리학자가 반-정량적 방법을 사용하여 검토 및 채점하였다(문헌 [Ziebarth et al, 2012 : Uterine leiomyosarcoma diffusely express disialoganglioside GD2 and bind the therapeutic immunocytokine 14.18-IL2: Implications for immunotherapy)] 및 [Orsi et al, 2017 : GD2 expression in breast cancer]). 면역염색을 맹검 방식으로 그리고 임상병리학적 데이터로부터 독립적으로 평가하였다. 샘플을 이들의 강도에 따라 상이한 범주로 분류하였다. 면역반응 없음(0), 1+(약한 염색), 2+(중등도 염색), 3+(강한 염색). 점수 0 또는 1+ 염색을 가진 샘플을 음성으로 간주하였고, 점수 2+ 및 3+는 양성으로 간주하였다. 최종 GD2 또는 GD3 점수는 총 난소 샘플 또는 암 난소 아형의 백분율(%)로 나타내었다.

[0496] *ELISA*

[0497] 강글리오시드를 유기 용매 추출 방법(예를 들어, 실시예 10 참조)을 사용하여, 각각의 기증자로부터의 동일 부피의 혈청으로부터 단리하였다. 혈청-동일 부피의 피분석물을 ELISA 플레이트에 고정하고, GD2 또는 GD3에 대한 mAb로 검정하였다. 2차 항체와 함께 항온처리한 후, 광학 밀도(OD)를 450 nm에서 판독하였다. 음성 값을 광학 밀도(OD) < 0.15에서 설정하고; 0.15-0.5 사이의 OD에서 낮은 양성 GD2 값 및 OD > 0.5에서 높은 양성 GD2 값을 설정하였다. 대조군 정제 천연 GD2 또는 GD3(10 ng/웰)을 표준 양성 대조군으로 사용하였다. 1차가 없는 웰을 백그라운드로 사용하였다. 각각의 샘플을 3중으로 검정하고, 각각의 ELISA를 적어도 2-3회 독립적으로 반복하였다.

[0498] *유세포 분석*

[0499] 2×10^5 세포의 EL4-GD2+, EL4-GD3+ 및 저캇(Jurkat) 세포를, 2 mL 마우스 항혈청(1:50 희석) 또는 양성 대조군 항-GD2 mAb(13 nM, 14G2a; 산타 크루즈 바이오테크놀로지) 또는 양성 대조군 항-GD3 mAb(13 nM, R24; 아브캄)에 이어서, FITC-접합된 항-마우스 IgG 2차(1.8 nM, 시그마)와 얼음 위에서 20분 동안 항온처리하였다. 유세포 분석기(벡톤-디킨슨(Becton-Dickinson))에서 즉시 세포를 연구하고, 셀퀘스트(CellQuest) 소프트웨어를 사용하여 데이터를 분석하였다. 사전-채혈 혈청 및 정상 마우스 혈청을 음성 대조군으로 사용하였다. 저캇 세포(GD2 및 GD3에 대해 음성)를 음성 대조군 세포로 사용하였다.

[0500] *환자*

[0501] 환자 샘플(TMA 및 액체 생검)을 윤리적 승인 하에 LDI/JHG 바이오뱅크로부터 입수하였다. 임상 병력의 후향적 연구를 이용하여 TMG와 CA-125 수준, 암 질병 단계 및 생존 및 폐경 단계 사이의 상관관계를 평가하였다. 총 176명의 환자를 연구하였다(n = 9 정상; n = 16 경계선, n = 151 난소). 이들로부터, 액체 생검에서 GD2의 수준을 ELISA에 의해 분석하고, 동일한 환자에서 CA-125 값과 비교하였다(n=40 난소 환자, n=7 경계선, n=33 난소).

[0502] **실시예 2: GD2 및 GD3에 대한 항체의 생성을 위한 덴드리머 생성물 및 탄수화물 유사체의 디자인 및 합성**

[0503] 본원에 기재된 바와 같이, 강글리오시드의 상향조절은 종양에서 일반적이다.

[0504] 표 3: 상향조절된 종양 마커 강글리오시드를 갖는 암의 매트릭스

적응증	GD2	GD3	푸코실-GM1	GM2	GM3	폴리 Sia	시알릴 루이스 X	시알릴 루이스 A
신경모세포종	X	X	X	X	X	X		
림프종	X	X	X	X	X			
백혈병	X	X						
흑색종	X	X						
신경교종	X	X		X	X	X		
소세포 폐암	X	X	X	X				
유방 암종	X	X		X	X	X	X	X
난소암	X	X	X	X	X			
연조직 육종	X	X						
골육종	X	X						
유잉 육종	X	X			X			
결합조직형성 원형 세포 종양	X	X						
횡문근육종	X	X						
망막모세포종	X				X			
비-소세포 폐암			X	X	X	X	X	X
신장세포암			X	X	X		X	X
윌름스 종양(신장모세포종)					X	X		
갑상선수질암						X		
전립선암				X				
위암				X		X	X	X
자궁내막암				X		X		
췌장암				X		X	X	X
결장암				X			X	X
식도암							X	X
두경부							X	X

[0505]

[0506] 정상 강글리오시드와 TMG의 탄수화물은 공통 구조를 공유한다. 예를 들어, GD2와 GD3은 당 하나가 서로 상이하며, 편재하여 발현되는 GM1은 GD2와 2개의 당 단위가 다르다. 따라서 항-강글리오시드 면역성을 안전하게 높이는 것은 매우 어렵다. 이질성 및 교차-반응의 위험을 줄이기 위해 가변 지질 미부가 없고, 천연 GD2 및 GD3 탄수화물과 구조적으로 동일한 강글리오시드 모방체가 본원에서 제조된다. 합성 유사체 p-아미노 페닐 에테르-GD2(AP-GD2) 및 p-아미노 페닐 에테르-GD3(AP-GD3)를 생성하였고, 이에 따라 이들의 아민 기를 순응성 스캐폴드에 대한 접합에 이용할 수 있다. AP-GD2 및 AP-GD3에서, 페닐 에테르에 연결된 글루코스의 아노머 중심은 b-배열에 있으며, 이는 천연 강글리오시드에서 당과 세라마이드 사이에서 발견되는 천연 연결이다. 이러한 입체 화학은 천연 구조를 보존하기 위한 핵심이며, a- 및 b-배열의 혼합을 초래하는 일부 화학에만 기반한 합성 방법과 대조된다. 고성능 액체크로마토그래피 정제 후, 액체크로마토그래피-질량 분석법에 의해 AP-GD2의 동일성을 확인하고, 1H 핵자기공명(NMR) 분광법에 의해 배열을 확인하였다. AP-GD3도 유사하게 특징화하였다.

[0507] AP-GD2 및 AP-GD3 글리코미메틱(glycomimetic) 전구체를 사용하여, 항체의 생성을 위한 마우스를 면역화하기 위해 지질이 없는 수용성 올리고머 생성물을 합성하였다. 정제된 AP-GD2 및 AP-GD3을 상응하는 이소티오시아네이트로 전환시키고, PAMAM G0 수지상 코어의 유리 아민에 커플링시켜 상응하는 티오우레아, PAMAM-GD2 및 PAMAM-GD3을 수득하였다. 반응하지 않은 전구체 및 과량의 시약으로부터 분리한 후, PAMAM-GD2 및 PAMAM-GD3을 박층크로마토그래피, NMR 분광법 및 정량화를 사용하여 특징화하였다. 합성에 관한 추가 세부 사항은 이하에 제공된다.

[0508] *AP-GD2 및 AP-GD3의 합성*

[0509] p-아미노페닐에테르-b-D-락토피라노시드(토론토 리서치 케미컬즈(Toronto Research Chemicals), AP-Lac)를 사용하여 수용성(>20 mg/ml) AP-GD2 및 AP-GD3 중간체 탄수화물을 효소적으로 합성하였다. AP-GD2의 합성은 215

mmol의 AP-GD3(4 mM), 295 mmol의 UDP-GalNAc(5.4 mM) 및 10.5 단위의 CgtA(구성물 CJL-30), 10 mM $MnCl_2$ 및 24 mM Hepes pH 7.0을, 55 ml의 최종 부피로 포함하였다. 반응 혼합물을 37℃에서 6.5시간 동안 항온처리하였다. 불용성 물질을 27,000 g으로 15분 동안 원심분리에 의해 제거하고, 효소를 10 kDa 멤브레인 컷오프를 이용하여 한외여과에 의해 제거하였다. 여액을 셉팍(SepPak) C18 5 g 컬럼(워터스 코포레이션(waters Corp))에 로딩하고, 미확인 오염물이 컬럼에 남아 있는 동안 생성물을 물로 용리시켰다. 생성물을 0 내지 0.3 M NH_4HCO_3의 구배를 사용하는 하이트랩큐(HiTrapQ)(지이 헬스케어(GE Healthcare)) 상의 음이온 교환 크로마토그래피 및 수퍼덱스 펩티드(Superdex Peptide) 10/300 GL 컬럼(지이 헬스케어) 상의 크기 배제 크로마토그래피에 의해 추가로 정제하였다. AP-GD2(1,218 g/mol) 및 AP-GD3(927 g/mol)의 측정된 분자량은 예상 값에 대응한다. 구조를 1D 및 2D NMR 분광법 및 질량 분석법(EI-MS)에 의해 확인하였다. AP-GD2 및 AP-GD3 중간체를 덴드리머 스캐폴드에 대한 접합에 의한 백신의 합성에 이들을 적용하기 전에 크기 배제 크로마토그래피(수퍼덱스 30 16 mm X 85 cm 컬럼, 지이 헬스케어)에 의해 >99% 순도로 정제하였다.

[0510] *PAMAM-GD2 및 PAMAM-GD3 덴드리머의 합성*

[0511] 80% 에탄올(300 ml) 중 AP-GD2(2 mg)의 교반 용액에 티오포스겐(2 ml)을 첨가하였다. 실온에서 3시간 후, 박층 크로마토그래피(에틸 아세테이트:메탄올:물:아세트산 4:2:1:0.1 v/v)는 단일 산물을 형성하였음을 보여주었다. 거의 건조할 때까지 농축하여 고체를 수득하였고, 이를 물로 처리하고 여과하였다. 필터 케이크를 물로 세척하고, 합한 여액 및 세척액을 동결 건조하여 백색 분말로서 이소티오시아네이토페닐 GD2를 수득하였다(1.8 mg, 90% 수율). 별도의 플라스크에서, 폴리아미도아민(덴드리테크 주식회사(Dendritech, Inc), PAMAM G0)의 메탄올 용액으로부터의 휘발 물질을 감압하에 증발시키고, 생성된 잔류물을 디메틸포름아미드(DMF)에 용해시켰다. DMF(110 ml) 중 이소티오시아네이토페닐 GD2(1.8 mg)를 N,N-디이소프로필에틸아민(0.5 ml) 및 PAMAM G0(85.4 mg/ml의 2 ml)의 교반된 DMF 용액(100 ml)에 적가하였다. TLC에 의해 출발 물질이 검출되지 않을 때까지 반응물을 실온에서 20시간 동안 교반하였다. 혼합물을 물로 희석하고, 물에 대해 투석하였다(스펙트럼 래버러토리스 주식회사(Spectrum Laboratories Inc.), MW 컷오프 2 kDa). 생성된 용액을 동결 건조하여 1D 및 2D NMR 분광법에 의해 추가로 특징화된 백색 분말로서 PAMAM-GD2 생성물의 1.34 mg(80% 수율)을 수득하였다. PAMAM-GD3을 유사한 공정을 사용하여 AP-GD3 전구체 및 PAMAM으로부터 합성하였다. PAMAM-GD2 및 PAMAM-GD3의 합성을 TLC 및 NMR에 의해 결정된 바와 같이 각각 적어도 3회 재현하여 동일한 산물을 수득하였다.

[0512] 산물은, 완전히 접합된 사량체(예를 들어, 1H NMR의 방향족 영역(6 ppm 이상) 참조)를 포함하고 0-4 범위의 PAMAM에 접합된 상이한 양의 GD2 모이어티의 불균일 혼합물이다. 따라서, 산물의 구성요소의 추가 조사를 수행하였다. PAMAM-GD2의 HPLC는, 분리되고(피크 1 및 피크 2) NMR 분석된 2개의 주요 피크를 나타내었다. 피크 1은 PAMAM-락토스 사량체이며, 이는 GalNAc 및 시알산 잔기를 상실하고, GD2 에피토프를 함유하지 않는다. 피크 2는 이의 모든 구성요소를 갖는 PAMAM-GD2의 혼합물이며, 사량체를 포함하는 GD2 에피토프를 함유한다. 선택적 항-GD2 mAb(산타 크루즈 바이오테크놀로지, 클론 14G2a)를 사용함으로써 PAMAM-GD2에서 항원(AP-GD2) 양의 정량화를 수행하였다. GD2-반응성 에피토프의 양(w/w)을 PAMAM-GD2 혼합물의 상이한 구성요소의 각각에서 정량화하였다. 피크 1에서 시알산 및 GalNAc 잔기의 상실은 GD2 에피토프의 검출을 초래하지 않는다. PAMAM-GD2 혼합물로부터 단리된 다른 모든 분획물은 14G2a(산타 크루즈 바이오테크놀로지)에 결합하고, 이는 해당 분획물이 GD2 함량을 갖는 것을 시사한다. 용량-반응 곡선으로부터의 정량화는 49 ± 12%(w/w)가 PAMAM-GD2 혼합물 중 AP-GD2 함량임을 나타낸다.

[0513] **실시예 3: 강글리오시드의 변형 버전의 디자인 및 합성**

[0514] 헤테로아릴(예를 들어, 트리아진)을 다양한 형태의 GD2 또는 GD3(예를 들어, 아미노-페닐 GD, 아미노-프로필 GD, 아미노에틸 GD, 아미노부틸 GD 등)과 커플링함으로써 변형된 강글리오시드의 예시적인 종을 제조하였다. 자세한 합성 방법은 이하에 제공된다.

[0515] *트리아진-GD2 접합체(트리아-트리-GD2)의 합성*

[0516] 2-아미노-4,6-디클로로-1,3,5-트리아진(1 mg, 0.007 mmol)을 무수 DMF의 1 mL에 용해시켰다. 해당 용액에 분말화된 1,1-티오카보닐디이미다졸(2.5 mg, 0.014 mmol)을 첨가하고, 반응 혼합물을 3시간 동안 교반하였다. 반응의 진행을 HPLC에 의해 모니터링하였다(사용된 용리 구배 용매 시스템은 물 중 0 내지 100% 아세토니트릴이었다). 머무름 시간이 3.54분인 피크(2-아미노-4,6-디클로로-1,3,5-트리아진, 출발 물질 및 제한 반응물)가 사라지고, 머무름 시간이 2.29분인 새로운 피크가 생성되었다. 2.29분의 머무름 시간에서 피크를 단리하고, 동결건조하였다. 산물을 임의의 추가 정제 또는 특징화 없이 다음 단계에 사용하였다.

[0517] 1 mL DMF 중 산물(0.1 mg, 0.533 μmol)에 아미노페닐GD2(3.2 μmol, 4 mg)를 첨가하고, 20 μL의 1 N NaOH를 반응 혼합물에 첨가하였다. 그 후, 반응 혼합물을 12시간 동안 교반하고, 반응의 진행을 동일한 구배 용매 시스템(물 중 0 내지 100% 아세토니트릴)을 사용하여 HPLC에 의해 모니터링하였다. 2.29분에서 피크가 사라지고, 1.89분에 새로운 주요 피크가 나타났다.

[0518] 이 피크를 단리하고, 동결건조하고, 활성 검정에 사용하였다(ELISA 참조).

[0519] *트리아진-GD3 접합체(트리아-트리-GD3)의 합성*

[0520] 2-아미노-4,6-디클로로-1,3,5-트리아진(1 mg, 0.007 mmol)을 무수 DMF의 1 mL에 용해시켰다. 해당 용액에 분말화된 1,1-티오카보닐디이미다졸(2.5 mg, 0.014 mmol)을 첨가하고, 반응 혼합물을 3시간 동안 교반하였다. 반응의 진행을 HPLC에 의해 모니터링하였다(사용된 용리 구배 용매 시스템은 물 중 0 내지 100% 아세토니트릴이었다). 머무름 시간이 3.54분인 피크(2-아미노-4,6-디클로로-1,3,5-트리아진, 출발 물질 및 제한 반응물)가 사라지고, 머무름 시간이 2.29분인 새로운 피크가 생성되었다. 2.29분의 머무름 시간에서 피크를 단리하고, 동결건조하였다. 산물을 임의의 추가 정제 또는 특징화 없이 다음 단계에 사용하였다.

[0521] 1 mL DMF 중 산물(0.1 mg, 0.533 μmol)에 아미노페닐GD3(3.2 μmol, 3.2 mg)를 첨가하고, 20 μL의 1 N NaOH를 반응 혼합물에 첨가하였다. 그 후, 반응 혼합물을 12시간 동안 교반하고, 반응의 진행을 동일한 구배 용매 시스템(물 중 0 내지 100% 아세토니트릴)을 사용하여 HPLC에 의해 모니터링하였다. 2.29분에서 피크가 사라지고 2.34분에 새로운 주요 피크가 나타났다.

[0522] 이 피크를 단리하고, 동결건조하고, 활성 검정에 사용하였다(ELISA 참조).

[0523] *x=2 화학양론(트리아-디-GD2)을 갖는 트리아진-GD2의 유사체의 합성*

[0524] 2-아미노-4,6-디클로로-1,3,5-트리아진(1 mg, 0.007 mmol)을 무수 DMF의 1 mL에 용해시켰다. 여기에 고체 탄산나트륨 10 mg을 첨가하였다. 해당 용액에 분말화된 Boc-무수물(3 mg, 0.014 mmol)을 첨가하고, 반응 혼합물을 12시간 동안 교반하였다. 반응의 진행을 HPLC에 의해 모니터링하였다(사용된 용리 구배 용매 시스템은 물 중 0 내지 100% 아세토니트릴이었다). 머무름 시간이 3.54분인 피크(2-아미노-4,6-디클로로-1,3,5-트리아진, 출발 물질 및 제한 반응물)가 사라지고, 새로운 피크가 생성되었다. 피크를 단리하고, 동결건조하였다. 생성물을 임의의 추가 정제 또는 특징화 없이 다음 단계에 사용하였다.

[0525] 1 mL DMF 중 산물(0.1 mg)에 아미노페닐-GD2(3.2 μmol, 4 mg)를 첨가하고 20 μL의 1 N NaOH를 반응 혼합물에 첨가하였다.그 후, 반응 혼합물을 12시간 동안 교반하고, 반응의 진행을 동일한 구배 용매 시스템(물 중 0 내지 100% 아세토니트릴)을 사용하여 HPLC에 의해 모니터링하였다. 2.29분에 피크가 사라지고, 1.89분에 새로운 주요 피크가 나타났다.

[0526] BOC 보호 기의 제거는 선택적이며, 만약 상기 기가 제거되면 탈보호화된 부위는 상업적으로 입수가능한 시약을 사용하여, 형광 색소(예를 들어, FITC 또는 Cy7) 또는 태그, 예컨대 비오틴으로 유도될 수 있다.

[0527] *트리아진-디-GD3의 합성*

[0528] 2-아미노-4,6-디클로로-1,3,5-트리아진(1 mg, 0.007 mmol)을 무수 DMF의 1 mL에 용해시켰다. 해당 용액에 분말화된 1,1-티오카보닐디이미다졸(2.5 mg, 0.014 mmol)을 첨가하고, 반응 혼합물을 3시간 동안 교반하였다. 반응의 진행을 HPLC에 의해 모니터링하였다(사용된 용리 구배 용매 시스템은 물 중 0 내지 100% 아세토니트릴이었다). 머무름 시간이 3.54분인 피크(2-아미노-4,6-디클로로-1,3,5-트리아진, 출발 물질 및 제한 반응물)가 사라지고, 머무름시간이 2.29분인 새로운 피크가 생성되었다. 2.29분의 머무름 시간에 피크를 단리하고, 동결건조하였다. 산물을 임의의 추가 정제 또는 특징화 없이 다음 단계에 사용하였다.

[0529] 1 mL DMF 중 산물(0.1 mg, 0.533 umol)에 아미노페닐GD3(3.2 umol, 3.2 mg)를 첨가하고, 20 μL의 1 N NaOH를 반응 혼합물에 첨가하였다.그 후, 반응 혼합물을 12시간 동안 교반하고, 반응의 진행을 동일한 구배 용매 시스템(물 중 0 내지 100% 아세토니트릴)을 사용하여 HPLC에 의해 모니터링하였다. 2.29분에 피크가 사라지고, 2.34분에 새로운 주요 피크가 나타났다.

[0530] 이 피크를 단리하고, 동결건조하였다. BOC 보호 기의 제거는 선택적이며, 만약 상기 기가 제거되면 탈보호화된 부위는 상업적으로 입수가능한 시약을 사용하여, 형광 색소(예를 들어, FITC 또는 Cy7) 또는 태그, 예컨대 비오틴으로 유도될 수 있다.

[0531] *FITC 표지된 트리아진-디-GD2의 합성*

[0532] 물 중 boc-보호된 트리아진-디GD2에 아세트산 20%(v/v)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 1시간 동안 교반하였다. 반응의 진행을 HPLC에 의해 모니터링하였다(사용된 용리 구배 용매 시스템은 물 중 0 내지 100% 아세토니트릴이었다). 생성물을 임의의 추가 정제 없이 다음 단계에 사용하였다.

[0533] DMF 중 산물에 플루오레세인 이소티오시아네이트(FITC)를 첨가하고, 반응을 12시간 동안 수행하였다. 반응의 진행을 HPLC에 의해 모니터링하였다(사용된 용리 구배 용매 시스템은 물 중 0 내지 100% 아세토니트릴이었다).

[0534] *FITC 표지된 트리아진-디-GD3의 합성*

[0535] 물(1 mL) 중 boc-보호된 트리아진-디GD3(1 mg) 용액에 20%(v/v) 아세트산을 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 1시간 동안 교반하였다. 반응의 진행을 HPLC에 의해 모니터링하였다(사용된 용리 구배 용매 시스템은 물 중 0 내지 100% 아세토니트릴이었다). boc-보호된 트리아진-디GD3 머무름 시간을 갖는 피크가 사라지고 새로운 피크가 생성되었고, 이를 단리하고, 동결건조하였다. 산물을 임의의 추가 정제 또는 특징화 없이 다음 단계에 사용하였다.

[0536] DMF 중의 산물에 3몰 과량의 플루오레세인 이소티오시아네이트를 첨가하고 반응을 12시간 동안 수행하였다. 반응의 진행을 HPLC(사용된 용리 구배 용매 시스템은 물 중 0 내지 100% 아세토니트릴임)로 모니터링하고, 새로운 피크를 생성하고, 단리하고, 동결건조하였다.

[0537] 그 후 순수한 생성물을 활성 및 결합 연구에 사용하였다.

[0538] **항-인간 GD2 및 GD3 항체의 생성**

[0539] 본원은, PAMAM-GD2 및 PAMAM-GD3을 이용한 마우스의 면역화로부터, 선택적 항-GD2 또는 항-GD3 mAb를 분비하는 12개의 고유한 하이브리도마를 생성하였다. 전 세계적으로 선택적인 mAb가 단지 몇 개에 불과하기 때문에 이것은 중요한 업적이다. 이는, 탄수화물이 불량한 면역원성을 갖는 바, GD2 및 GD3와 같은 강글리오시드의 탄수화물 부분은 고사하고, 탄수화물에 특이적으로 결합하는 항체를 생성하기 어렵기 때문이다. 본원에 제시된 mAb는 GD2 또는 GD3의 고유한 탄수화물 부분에 결합하고, 고도로 선택적이다. 유세포 분석 검정에서, 각각의 mAb는 GD2를 발현하거나 GD3을 발현하는 세포주(마우스 랫트 또는 인간)의 세포 표면에만 결합하지만, GD2 또는 GD3에 대해 음성인 것으로 알려진 세포에 대한 결합은 없다. 12개의 mAb의 결합 및 선택성을 유세포 분석에 의해 특징화하였다. IHC 및 ELISA의 경우, 12개의 별개의 mAb 중 4개(표 1 및 2에 개시된 클론)를 심층적으로 특징화하였으며, 이는 이들 mAb가 또한 종양에 대한 세포독성이면서 *생체내* 암 면역치료에 유용하기 때문이다.

[0540] **실시예 4: ELISA에 의한 인간 액체 생검에서 GD2 및 GD3의 정량화**

[0541] GD2 및 GD3가 암 세포로부터 탈락되는 것을 알고, 강글리오시드에 대해 개발된 ELISA 방법을 적용하고, 50명의 난소암 환자 혈액 샘플에서 GD2 또는 GD3의 존재를 평가하였다(n=37 높은 등급 진단됨 및 n=13 초기 단계 진단됨 또는 경계선). 맹검화 ELISA 연구에서 48/50(96%) 및 46/50(92%)이 GD2 또는 GD3에 대해 양성이었다. 전체 비율은 49/50(98%)이었다. 건강하고, 비-암이 환자로부터의 모든 액체 생검은 음성이었고, 백그라운드와 동일한 값을 가졌다(n=23 개체 비-암 여성; 및 건강한 기증자 30명의 1개의 합동 샘플).

[0542] *액체 생검의 종단 평가는 반응 또는 재발을 모니터링한다*

[0543] 혈액 샘플에서 GD2 및 GD3의 종단 평가는 검출을 종양 부담 및 치료에 대한 반응과 관련시켰다. 혈청을 치료 전(진단 시) 및 치료(수술 및 보강 화학치료) 완료 후 ~2주에 수집하였다. 종양 부피를 PET 영상화에 의해 정량화하였다(데이터는 전신의 누적 종양 부피를 보여준다; 표 4).

[0544] 표 4: 표준 치료 전후에 수집된 흑색종 환자의 액체 생검

[0545]

	환자 1(반응)		환자 2(비-반응)	
분석	치료 경험 없음 초기 310 cm^3	치료 후 잔여 3.1 cm^3	치료 경험 없음 초기 183 cm^3	치료 후 잔여 103 cm^3
GD3	22	2	20	13
GD2	2	1	2	2
PS 대조군	15	29	7	26

[0546] * 혈액 GD2 또는 GD3은 흑색종 종양을 갖는 환자에서 발견된다.

[0547] * 혈액 중 GD2 또는 GD3 수준은 종양 부피와 상관관계가 있다.

[0548] * 감소된 종양 부피(치료 후)는 혈액 중 GD2 또는 GD3 수준의 감소로 이어진다.

[0549] 2명의 환자를 예로서 나타낸다. ***환자 1***: 진단 시 종양 부담은 310 cm^3이었고, GD2/GD3 수준은 정상보다 10배 높아졌다. 환자는 치료에 잘 반응하였다. 치료 후 잔여 종양은 3.0 cm^3이었고, GD2/GD3 수준은 유의미하게 감소했으며, 정상과 구별할 수 없었다. ***환자 2:*** 진단 시 종양 부담은 183 cm^3이었고, GD2/GD3 수준은 정상보다 6배 높아졌다. 환자는 치료에 저조하게 반응하였다. 치료 후 잔여 종양은 103 cm^3이었고, GD2/GD3 수준은 높게 유지되었고, GD3 수준이 30% 약간 감소하였다.

[0550] 상기 결과는 ELISA가 치료 반응 또는 암 재발을 모니터링하는 데 유용하다는 것을 입증하였다. 특히, 정량적 검출의 한계(limit of quantitative detection, LOQD)는 대사 PET에 의해 검출가능한 최소 잔존 질병과 동등하고, 이는 이러한 테스트를 암 재발의 모니터링을 위해 가치있게 만들 것이다. 당지질을 1 ml의 혈청으로부터 유기 용매에서 추출한다. 각각의 샘플을 3중으로 검정하고, 각각의 ELISA를 GD2 또는 GD3 각각에 대해 2개의 독립적인 mAb를 사용하여, 적어도 2-3회 독립적으로 반복한다. 샘플을 테스트하고 다른 방법으로 교차 검증하는 데 단지 1 ml의 혈청이면 충분하다. 나머지 표준 혈액 수집 튜브(5 ml)를 다른 마커 평가; 및 기록 목적으로 사용할 수 있다. 정제된 천연 GD2 또는 GD3의 표준 곡선을 내부 양성 대조군으로 사용하고, 정상 강글리오시드 GM1을 음성 대조군(10 ng/웰)으로 사용하고, 다양한 mAb 농도(225 nM, 75 nM, 25 nM)를 사용한다. 백그라운드 웰은 모든 시약을 갖지만, 1차 mAb를 갖지 않는다. 컷오프로서, 모든 대조군의 평균으로부터 통계적으로 유의미한 2배 더 높은 값을, 대조군으로부터 적어도 2x 표sd와 함께 사용한다.

[0551] **실시예 5: IHC에 의한 난소암 조직 생검 내 GD2 및 GD3의 검출**

[0552] 항-GD2 및 항-GD3 mAb를 113개의 난소암 조직 생검(75개의 진행 단계 및 38개의 낮은 단계)의 IHC에서 평가하였다. 본원에 사용된 바와 같이, 초기/낮은 단계에서 암은 단계 I 암에 해당하고; 말기/높은/진행 단계에서 암은 단계 II 내지 단계 IV의 암을 포함한다. 전체적으로 109/113(96%)이 GD2 및 GD3에 대해 양성이었고; 진행 단계에서는 73/75 및 초기 단계에서는 36/38이 양성이었다. 염색은 유의미하였고, 균질하였으며, 종양 조직에 국한되었고, 정상적인 주변 조직에는 없었다(도 4). IHC에 의해 연구된 조직이 ELISA에서 혈액이 사용된 동일한 50명의 환자를 포함한다는 점에 주목하는 것이 핵심이다(실시예 5 참조). 데이터는 100% 상관관계가 있었다. 혈액-매개 GD2가 GD2-양성 종양으로부터만 발생할 수 있기 때문에 이것은 교차 검증이다.

[0553] 표준 CA-125 마커(~60% 초기 및 ~85% 말기에서 검출 가능하고 조기 재발을 모니터링하는 데 유용하지 않음)와의 비교는 GD2/GD3가 상당히 우수한 마커임을 보여주었다. *초기 단계 환자*의 경우 25/38이 CA-125(244 ± 106 U/l)의 비정상적인 수준을 가졌고, 25명 중 24명은 GD2에 대해 양성이었다. 다른 13/38명의 초기 환자는 정상 CA-125 수준을 가졌고, 이들의 13명 중 12명은 GD2+ive였다. 따라서 ELISA는 달리 감지되지 않을 12/13 초기 단계의 환자를 검출했을 것이다. 전반적으로 초기 환자는 36/38 GD2+ive였다. *말기 단계 환자*의 경우 66/75가 CA-125의 비정상적인 수준(966 ± 527 U/l)를 가졌고, 이들 중 65명은 GD2+ive였다. 나머지 9/75는 정상적인 CA-125 수준을 가졌고, 이들의 9명 중 8명은 GD2+ive였다. 따라서 ELISA는 달리 감지되지 않을 8/9 말기 단계 환자를 검출했을 것이다. 전반적으로 진행 단계 환자는 73/75 GD2-양성이었다.

[0554] 초기 단계 진단을 위한 데이터는 상대적인 염색 강도에 의해 추가로 강조된다. GD3(p=0.026) 및 GD2(p=0.015)에 대한 단일 염색 강도와 암 단계의 유의미한 직접적인 상관관계가 있다(도 5). 이러한 데이터는 개인화된 치료 결정을 추진하는 데 도움이 될 수 있는 백금 화학치료에 대한 반응 부족과의 상관관계를 나타낸다.

[0555] 이들은 승인된 윤리 프로토콜에 따라 병리학자에 의해 채점된 이중 맹검 후향적 연구이다. 표준 DAB 염색 절차와 함께 종양 마이크로어레이(TMA)도 사용하였다. 또한, 분자 병리학 서비스(Molecular Pathology Service)(디스커버리 엑스오토메이티드 IHC(Discovery XTautomated IHC) 플랫폼, 벤타나(Ventana), 로슈(ROCHE))에서의 자동 및 수동 방법 모두를 사용하였다.

[0556] 이러한 데이터는 GD2 및 GD3 마커의 진단적 사용을 지원한다. 현재 진단 병리학 지침은 난소 형태 전이성 결장 직장암을 구별하기 위한 CK20, ER, PAX8, P53 및 CK7에 대한 염색을 포함한다. 목록에 GD2 및 GD3을 추가하면 더 나은 진단 병리학 및 반응의 예측에 대한 요구를 처리할 것이다.

[0557] **실시예 6: 액체 생검에서 LC/MS 검정 - 강글리오시드의 수준**

[0558] nLC-ESI-MS/MS(LC/MS)를 사용하여, 6명의 암 환자(흑색종 2명, 신장암 2명, SCLC 새로 진단됨-치료 경험 없음 2명) 및 3명의 비-암 대조군(개별적으로 연구한 기증자 2명, 30명의 기증자로부터 합해진 혈장 1개)으로부터의

액체 생검을 분석하였다(표 5 및 6). LC/MS 방법을 개발하여, 한 번에 모든 종양 강글리오시드를 연구하였다(예를 들어, 적어도 5,000개의 피분석물 내에서 20개의 종양 강글리오시드를 포함하는 암 강글리오좀 매트릭스(Cancer Gangliosome Matrix)).

[0559] 암 환자는 각각의 암에 특이적인 상승된 종양 강글리오시드를 보여주었다. LC-MS에 의해 평가되고, 비-암 샘플과 비교하여, 흑색종 샘플은 GM2, GD3 및 GD1b의 수준의 유의미한 증가를 나타내었고; 신장암 샘플은 GD3 및 GD2 수준의 유의미한 증가를 나타내었고; 폐암 샘플은 GD3 및 GM2의 수준의 유의미한 증가를 나타내었다. 특히 GD3을 평가하기 위해 수행된 난소암 샘플 연구에서, 12/13 난소암 샘플은 2개의 비-암 대조군 샘플과 비교하여 GD3의 유의미한 증가를 입증하였다. 대조군 비-암 샘플은 매우 낮거나 검출 역치 미만인 수준을 나타내었다(표 5). 내부 표준은 모든 샘플에서 높은 수준으로 존재하는 콜레스테롤(표시되지 않음) 및 포스파티딜콜린(표시되지 않음)을 포함하였다. 일반 스트레스(암, 염증, 당뇨병, 감염, 패혈증, 세포사멸)의 비-특이적 양성 마커인, 포스파티딜세린(PS)은 모든 암 샘플에서 비-암 샘플에 비해 상승하였다.

[0560] 표 5: 암의 진단으로서 강글리오시드의 LC-MS-MS 검출.

종양 강글리오시드	흑색종	신장암	폐암	비-암		난소암	비-암
GM2	1,350	60	140	14			
GD3	430	200	100	10		213	33
GD2	45	155	20	15			
GD1b	80	0	0	0			
PS	60,000	26,000	18,000	4,000			

[0561]

[0562] 왼쪽 패널은 상대적 정량화를 갖는 사례당 1명의 환자이다. 정량화 가능한 검출(LOQD)의 한계는 ~1-20 단위였다. 오른쪽 패널은 절대 정량화(pmol/ml)이다. 진단 시점에 채취된 혈청에서 측정된 당지질은, 2개의 비-암 샘플 평균에 대해 13개의 난소암 샘플(초기 단계 4개 및 말기 단계 9개)의 평균을 비교하였다.

[0563] **실시예 7: 액체 생검에서 LC/MS 검정 - 지질 미부 길이**

[0564] 암 환자가 상승된 수준의 종양 강글리오시드를 갖는 것을 LC/MS에 의해 입증한 것 외에도, 본원은, 종양 강글리오시드가 각각의 암에 특이적인 지질 미부 이질성 패턴을 갖는다는 놀랍고도 예상치 못한 발견을 처음으로 제공한다.

[0565] 흑색종에서, 단쇄 형태(지질 미부)를 갖는 GM2가 우세하였고, 정상보다 10배 증가한 반면, 장쇄 형태는 정상에서의 감지 불가능한 단위로부터 90 단위까지 암에서 증가하였다. GD3의 경우, 단쇄 형태가 정상보다 40배 증가하였다. GD1의 경우, 단쇄 형태가 정상에서의 감지 불가능한 단위로부터 70 단위까지 증가하였다. 신장암은 GD3 및 GD2(특히 단쇄 지질 형태)에서 유의미한 증가를 가졌다. 폐암은 GD3(특히 장쇄 지질 형태)에서 유의미한 증가 또는 이동, 및 GM2에서 단쇄 지질 형태로 이동을 가졌다(표 6). 모든 대조군 샘플은 매우 낮거나 역치 미만의 시그니처(signature)를 가졌으나, GM1과 같은 정상 강글리오시드가 검출되었다.

[0566] 본원에서 처음으로 입증된 바와 같이, LC/MS를 사용하여, 본원은 강글리오시드의 지질 가변 길이를 검출하고 정량화하였고, 지질 미부 길이와 암 진단의 연관성을 확립하였다. 또한, 본원에서 추가로 입증된 바와 같이, LC/MS 방법은 현재 ELISA에서 정량화될 수 없는 GM2 및 GD1과 같은 다른 강글리오시드 종양 마커를 검출하였다. 많은 종양 강글리오시드(예를 들어, 암 강글리오좀 매트릭스)에 대한 특이적 시그니처의 검출은 확장된 응용 및 종양의 검출/진단/예상에 가치가 있을 것이다.

[0567] 표 6: 인간 암의 진단학으로서 강글리오시드의 LC-MS-MS 검출

피분석물	흑색종		신장암		폐암		비-암 대조군	
	짧은 지질	긴 지질	짧은 지질	긴 지질	짧은 지질	긴 지질	짧은 지질	긴 지질
GM2	**1260**	**90**	0	**60**	20	**120**	140	0
GD3	**380**	50	**110**	**90**	30	**70**	10	10
GD2	30	15	**155**	**0**	15	5	15	60
GD1	**70**	10	0	0	0	0	0	0

[0568]

[0569] 진단 시점에 혈청의 당지질 및 지질을 연구하였다. 정상 대조군과 비교한 관련 데이터만 상대 단위로 표시된다. 단순화를 위해, 지질 미부는 짧음(14-34개의 탄소) 또는 긺(36-48개의 탄소)으로 구분된다. 표시된 예는 광범위한 전이성 질병을 갖는 흑색종; 신장암 및 비-소세포 폐암을 포함한다. 환자를 비-암 기증자의 평균과 비교하였다. ~5,000개의 피분석물로부터의 데이터의 예(유의미한 변화 대 굵게 표시된 정상). 다른 강글리오시드는 미변화 또는 감지 불가로 남는다. 현재 추정되는 정량화 가능한 검출 한계(LOQD)는 ~40 단위 또는 0.010-0.24 pmol/mL이다.

[0570] LC/MS 방법은 ELISA에 사용된 코호트의 동일한 액체 생검 샘플을 사용하여 ELISA를 교차 검증하는 데 유용하다. 전반적으로 혈액에 대한 ELISA 및 LC/MS 및 조직의 IHC는 견고한 데이터 교차 검증을 제공한다. 그러나, LC/MS 방법은 IHC 및 ELISA가 측정하지 않는 GD2 및 GD3 시그니처의 많은 고유한 특징을 측정하기 때문에 이의 자신의 본질적 가치를 갖는다.

[0571] **실시예 8: GD2/GD3의 수준은 암 치료에 대한 반응성을 나타낸다**

[0572] 상이한 암 치료(표 7), 예를 들어 면역 관문 억제 치료 및/또는 화학치료로 치료된 흑색종 암 환자의 혈액 샘플에서 GD2 또는 GD3의 존재를 ELISA를 사용하여 검출하였다. GD2/GD3의 수준은 PET 영상화에 의해 결정된 바와 같이 다양한 암 치료에 대한 반응성과 상관관계가 있었다. GD2 또는 GD3의 낮은 수준 또는 감지 불가능한 수준은 다양한 암 치료를 사용한 치료에 대한 더 나은 반응과 상관관계가 있었다.

[0573] 표 7: 암 치료에 대한 반응성

[0574]

사례	GD2	GD3	치료	1-년 반응(PET)
1	-	-	아벨루맙(PDL-1) + BRAF/MEK	거의 완전(치료에 대해 90% 반응)
2	+++	+	펨브롤리주맙(PD-1)	진행-사망(치료에 대한 반응 0%)
3	++	++	니볼루맙(PD-1) + 이필리무맙(CTLA-4)	부분적(치료에 대한 60% 반응)
4	++	-	니볼루맙(PD-1) + BRAF/MEK	부분적(치료에 대한 50% 반응)
5	-	-	펨브롤리주맙(PD-1)	완전(치료에 대한 100% 반응)

[0575] **실시예 9: 직접 결합 ELISA**

[0576] 천연 강글리오시드(GD2 또는 GD3, 대조군), 트리아-트리-GD2, 트리아-트리-GD3, PAMAM-GD2, PAMAM-GD3 또는 단량체 전구체 AP-GD2 또는 AP-GD3을 폴리스티렌 코닝 스트립 웰(Corning Strip Well) 96-웰 플레이트 위에 고정시켰다(10 ng/웰). 모든 웰을 알부민(BSA)으로 차단한 후, 항-GD2 또는 항-GD2 mAb(최종 7 nM) 또는 PAMAM-GD2(1:75 희석)로 백신 접종된 마우스로부터의 혈청과의 결합에 대해 웰을 반응시켰다. 사용된 2차 항체는 홀스래디쉬 퍼옥시다제(HRP)-접합된 항-마우스 IgG(시그마)였다. BG= 백그라운드 대조군.

[0577] 표 8 및 도 19a-19d를 참조하면, 트리아진-트리GD2 및 트리아진-트리GD3 둘 모두는 각각 항-GD2 또는 항-GD3 mAb에 의해 인식되고 결합되었다. 또한, PAMAM-GD2 또는 PAMAM-GD3에 대해 증가된 항혈청은 트리아진-트리GD2 또는 트리아진-트리GD3과 교차 반응하고 직접 결합하였고, 이는 예를 들어 탄수화물 모이어티가 PAMAM-GD2 및 트리아진-트리GD2에서 동일한 면역원임을 나타낸다.

[0578] 표 8: 직접 결합 ELISA 데이터

항-GD2 항체를 갖는 GD2 버전

	OD(450 nm)			평균	StDev	SEM	카운트
대조군	1.174	1.069	1.072	1.105	0.059774577	0.034510868	3
트리아진GD2	0.506	0.478	0.39	0.458	0.060530984	0.03494758	3
PAMAMGD2	0.541	0.533	0.485	0.51966667	0.030287511	0.017486503	3
AP-GD2	0.483	0.558	0.568	0.53633333	0.046457866	0.026822462	3
BG	0.08	0.078	0.069	0.07566667	0.005859465	0.003382964	3

백신 접종된 마우스 혈청을 갖는 GD2 버전

	OD(450nm)			평균	StDev	SEM	카운트
GD2	1.319	1.23	1.128	1.22566667	0.095573706	0.055179505	3
트리아진GD2	0.537	0.442	0.559	0.51266667	0.062179847	0.035899551	3
PAMAMGD2	0.703	0.547	0.628	0.626	0.078019228	0.045044423	3
AP-GD2	0.694	0.587	0.635	0.63866667	0.053594154	0.030942599	3
BG	0.08	0.078	0.069	0.07566667	0.005859465	0.003382964	3

항-GD3 항체를 갖는 GD3 버전

	OD(450 nm)			평균	StDev	SEM	카운트
GD3	0.602	0.465	0.493	0.52	0.072380937	0.041789153	3
트리아진GD3	0.44	0.422	0.502	0.45466667	0.041968242	0.024230376	3
PAMAMGD3	0.541	0.533	0.485	0.51966667	0.030287511	0.017486503	3
AP-GD3	0.483	0.558	0.568	0.53633333	0.046457866	0.026822462	3
BG	0.08	0.078	0.069	0.07566667	0.005859465	0.003382964	3

백신 접종된 마우스 혈청을 갖는 GD3 버전

	OD(450 nm)			평균	StDev	SEM	카운트
GD3	0.646	0.534	0.555	0.57833333	0.059534304	0.034372146	3
트리아진GD3	0.675	0.548	0.539	0.58733333	0.076054805	0.043910262	3
PAMAMGD3	0.541	0.533	0.485	0.51966667	0.030287511	0.017486503	3
AP-GD3	0.483	0.558	0.568	0.53633333	0.046457866	0.026822462	3
BG	0.08	0.078	0.069	0.07566667	0.005859465	0.003382964	3

[0579]

[0580] *BG: 백그라운드

[0581] **실시예 10: 경쟁 ELISA**

[0582] 천연 강글리오시드 GD2 또는 GD3(어드밴스드 이뮤노케미칼 주식회사(Advanced Immunochemical Inc.))를 폴리스티렌 코닝 스트립 웰 96-웰 플레이트 위에 고정시키고(10 ng/웰), 항-GD2 또는 항-GD3 mAb의 결합에 대해 테스트하였다. 사용된 2차 항체는 홀스래디쉬 퍼옥시다제(HRP)-접합된 항-마우스 IgG(시그마)였다. ELISA 동안 경쟁 리간드로서 트리아진-트리-GD2 또는 트리아진-트리-GD3을 첨가하여 경쟁을 수행하였다.

[0583] 표 9 및 도 20a 및 도 20b를 참조하면, 트리아진-트리GD2 및 트리아진-트리GD3은 각각 항-GD2 또는 항-GD3 mAb에 의해 인식되었고; 플레이트 위에 고정된 GD2 또는 GD3에 결합하는 mAb의 경쟁을 초래하였다.

[0584] 표 9:

트리아진-트리GD2

	OD(450 nm)			평균	StDev	SEM	카운트
대조군	0.597	0.68	0.541	0.606	0.069935685	0.040377386	3
10x 트리아진GD2	0.573	0.569	0.519	0.53366667	0.030088758	0.017371752	3
10x 트리아진GD2	0.541	0.533	0.485	0.51966667	0.030287511	0.017486503	3
100x 트리아진GD2	0.483	0.558	0.568	0.53633333	0.046457866	0.026822462	3

트리아진-트리GD3

	OD(450nm)			평균	StDev	SEM	카운트
대조군	0.726	0.719	0.716	0.72033333	0.005131601	0.002962731	3
10x 트리아진GD3	0.723	0.732	0.693	0.716	0.020420578	0.011789826	3
20x 트리아진GD3	0.703	0.547	0.628	0.626	0.078019228	0.045044423	3
100x 트리아진GD3	0.694	0.587	0.635	0.63866667	0.053594154	0.030942599	3

[0585]

[0586] 실시예 11: 샌드위치 ELISA

[0587] 1. 항-GD2/GD3 포획 항체를 코팅 완충액(10 mM 포스페이트)에 희석(1:1000 - 1:5000 희석)함으로써 코팅용액을 제조한다.

[0588] 2. 마이크로타이터 플레이트의 웰당 100 μL의 코팅 항체 용액을 첨가한다.

[0589] 3. 플레이트를 냉장 조건(2-8℃)에서 밤새 항온처리(최대 18시간) 동안 유지한다.

[0590] 4. 다음날 용액을 흡인하고, 200 μL의 세척 완충액(0.05% 트윈(Tween)-20을 갖는 PBS 또는 트리스(Tris))으로

플레이트를 1회 세척한다. 마이크로타이터 플레이트를 뒤집고 흡착 타월로 두드려 임의의 과도한 액체를 제거한다.

[0591] 5. 웰당 200 μL 차단 완충액(0.1% BSA 또는 5% 무지방 탈지유 또는 1% 카제인을 갖는 PBS)을 첨가하고, 플레이트를 실온에서 1시간 동안 항온처리한다.

[0592] 6. 용액을 흡인하고, 마이크로타이터 플레이트를 뒤집고, 흡착 타월로 두드려 임의의 과도한 액체를 제거한다.

[0593] 7. 다양한 양의 GD2/GD3을 갖는 샘플 및 표준을 차단 완충액에서 제조하고, 탄수화물 또는 지질 모이어티가 항체에 결합되어 플레이트 상의 포획 항체에 결합하도록 이중으로(웰당 100 μL) 첨가한다.

[0594] 8. 플레이트를 부드럽게 흔들면서(~300-500 rpm) 실온에서 2시간 동안 항온처리한다. 이러한 항온처리 동안, 강글리오시드를 포함하는 미셀은 항체에 의해 포획된다.

[0595] 9. 항온처리 후 용액을 흡인하고, 마이크로타이터 플레이트를 뒤집고, 흡착 타월로 두드려 임의의 과도한 액체를 제거한다.

[0596] 10. 플레이트를 200 μL의 세척 완충액(0.05% 트윈-20을 갖는 PBS 또는 트리스)으로 3-4회 세척한다.

[0597] 11. 각각의 세척 후, 마이크로타이터 플레이트를 뒤집고, 흡착 타월로 두드려 임의의 과도한 액체를 제거한다.

[0598] 12. 홀스 래디시 퍼옥시다제(HRP)로 표지된 항-GD2/GD3 검출 항체를 차단 완충액 중 적절한 희석을 이용해 제조한다.

[0599] 13. 웰당 100 μL의 검출 항체를 첨가하고, 플레이트를 부드럽게 흔들면서(~300-500 rpm) 실온에서 3시간 동안 항온처리한다.

[0600] 14.항온처리 후 용액을 흡인하고, 마이크로타이터 플레이트를 뒤집고, 흡착 타월로 두드려 임의의 과도한 액체를 제거한다.

[0601] 15. 플레이트를 200 μL의 세척 완충액(0.05% 트윈-20을 갖는 PBS 또는 트리스)으로 3-4회 세척한다.

[0602] 16. 각각의 세척 후, 마이크로타이터 플레이트를 뒤집고, 흡착 타월로 두드려 임의의 과도한 액체를 제거한다.

[0603] 17. 스트렙타비딘-HRP 작업 용액(1:5000 희석)을 차단 완충액에서 제조한다.

[0604] 18. 100 μL의 스트렙타비딘-HRP 용액을 웰당 첨가하고, 플레이트를 부드럽게 흔들면서(~300-500 rpm) 실온에서 45분 동안 항온처리한다.

[0605] 19. 항온처리 후, 용액을 흡인하고, 200 μL의 세척 완충액(0.05% 트윈-20을 갖는 PBS 또는 트리스)으로 3-4회 세척한다.

[0606] 20. 각각의 세척 후, 마이크로타이터 플레이트를 뒤집고, 흡착 타월로 두드려 임의의 과도한 액체를 제거한다.

[0607] 21. 웰당 100 μL의 TMB 기질을 첨가하고, 플레이트를 실온에서 30분 동안 항온처리한다.

[0608] 22. 100 μL의 정지 용액을 각각의 웰에 첨가하고, 정지 용액 첨가 30분 이내에 450 nm에서 흡광도를 측정한다.

[0609] 23. GD2/GD3의 알려진 양을 사용하여 표준 곡선을 준비하고, OD와 함께 이들의 상관관계를 관찰한다. 샘플에 대한 농도를 이들의 관찰된 OD 및 표준 곡선 맞춤을 사용하여 계산한다.

[0610] **실시예 12: ELISA 연구를 위한 혈청으로부터 추출된 샘플의 제조 - $CHCl_3$:MEOH:H_2O를 사용한 지질 추출**

[0611] 100 μL의 혈청 부피로부터 당지질을 추출하기 위해, 샘플을 3000 x g으로 10분 동안 원심분리하고, 상청액을 펠릿 없이 수집하였다. 그 후, 5 부피의 $CHCl_3$:MeOH:H_2O[클로로포름:메탄올:물, 예를 들어 1:2:1 또는 4:8:3 또는 2:4:1 범위의 비율]를, 예를 들어, 원하는 피분석물의 추출 및/또는 농축을 위해 수집된 상청액에 첨가하였다. 혼합물을 3000 x g으로 10분 동안 원심분리하고, 상청액을 간기(interphase)를 피하여 회수하였다. 회수된 상청액에 26 μL의 증류수를 첨가한 후, 추출 단계를 1회 반복하고, 2차 추출 후 상청액을 회수하였다. 유기 용매가 회수되면, 유기상을 (예를 들어, 스피드-백(Speed-Vac)에서) 증발시켰다. 추출된 샘플("ELISA 샘플")을 본원에 기재된 바와 같이 ELISA에 사용하였다.

[0612] **실시예 13: $CHCl_3$:MEOH:H_2O를 사용해 추출된 지질의 ELISA**

[0613] 1. ELISA 샘플을 상기와 같이 제조하였다. ELISA 샘플 또는 순수 강글리오시드(표준 양성 대조군으로 사용)를 95% 에탄올과 1:2로 혼합하였다. 그 후, ELISA 플레이트를 실온 또는 30℃ 상자 내에서 ~5분 동안 웰에 첨가된 물질을 건조시킴으로써, ELISA 샘플, 또는 표준 곡선의 양성 대조군 천연 강글리오시드로 코팅하였다. 96-웰 ELISA 플레이트가 본원에 예시되었지만 다른 형식도 가능하다.

[0614] 2. 모든 웰에 새로 만든 PBS-BSA 0.1% 차단 완충액을 첨가하고 30-45분 동안 항온처리하여 웰 내 비-특이적 결합을 차단하였다.

[0615] 3. 차단 완충액을 제거한 후, 50 ul의 1차 항체, 예를 들어 본원의 항-GD2 또는 항-GD3 항체를 첨가하였다. 1차 mAb의 농도는 1 ug/ml 내지 0.005 ug/ml의 범위였다.

[0616] 4. 1차 항체를 30-60분 동안 항온처리하였다.

[0617] 5. 웰을 200 ul/웰의 차단 완충액으로 3회 세척하였다.

[0618] 6. 차단 완충액을 제거한 후, 효소-접합 또는 형광-표지된 희석된 50 ul의 2차 항체를 첨가하고, 30-60분 동안 항온처리하였다.

[0619] 7. 웰을 200 ul/웰의 PBS로 3회 세척하였다.

[0620] 8. 그 후, 2차 항체의 태그에 대한 표준 검출 시스템을 사용한다. 홀스래디쉬 퍼옥시다제로 태깅된 2차 항체의 경우, 웰당 50 ul의 TMB 시약을 첨가하였다(TMB-ELISA 서모피셔 사이언티픽 [카탈로그 # 34028].).

[0621] 9. 플레이트를 ~3~5분 동안 항온처리하거나, 양성 대조군(표준 곡선 생성용)을 함유하는 웰이 밝은 파란색에 도달할 때까지 항온처리하였다.

[0622] 10. 50 ul의 0.5 N H_2SO_4를 첨가하여 반응을 정지시켰다.

[0623] 11. 450 nm의 흡광도에서 분광광도계로 반응을 판독하였다.

[0624] 표 10: 고정화 샘플에 대한 예시적인 맵

[0625]

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12
B	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12
C	Bkg	Bkg	Bkg	Bkg	Bkg	Bkg	Bkg	Bkg	Bkg	Bkg	Bkg	Bkg
D	Bkg	Bkg	Bkg	Bkg	Bkg	Bkg	Bkg	Bkg	Bkg	Bkg	Bkg	Bkg
E	S13	S14	S15	S16	S17	S18	S19	S20	- Ctl	+ Ctl	N1Ctl	N2Ctl
F	S13	S14	S15	S16	S17	S18	S19	S20	- Ctl	+ Ctl	N1Ctl	N2Ctl
G	Bkg	Bkg	Bkg	Bkg	Bkg	Bkg	Bkg	Bkg	Bkg	Bkg	Bkg	Bkg
H	Bkg	Bkg	Bkg	Bkg	Bkg	Bkg	Bkg	Bkg	Bkg	Bkg	Bkg	Bkg

[0626] *표 10에 대한 부호:*

[0627] • S(1-20): 지질 추출 유래의 샘플

[0628] • - Ctl: 음성 대조군

[0629] • + Ctl: 양성 대조군

[0630] • N(1-2) Ctl: 정상 환자 유래의 음성 대조군 샘플

[0631] • Bkg: 2차 항체만을 이용한 백그라운드

[0632] **참조로서 포함**

[0633] 본원에 언급된 모든 간행물, 특허 및 특허 출원은, 각각의 개별 간행물, 특허 또는 특허 출원이 구체적이고 개별적으로 참조로 포함되는 것으로 나타낸 것과 같이 이들의 전문이 참조로 본원에 포함된다. 상충하는 경우, 본원의 임의의 정의를 포함하여 본 출원이 우선한다.

[0634] 또한, [tigr.org]의 월드 와이드 웹 상의 미국 게놈 연구소(The Institute for Genomic Research, TIGR) 및/또는 [ncbi.nlm.nih.gov]의 월드 와이드 웹 상의 미국 국립생물공학정보센터 (National Center for

Biotechnology Information, NCBI)에 의해 유지되는 것과 같은 공개 데이터베이스의 항목과 관련된 수탁 번호를 참조하는 임의의 폴리뉴클레오티드 및 아미노산 서열은 그 전체가 참조로 포함된다.

[0635] **등가물**

[0636] 당업자는 본원에 기재된 본 발명의 특정 실시양태에 대한 많은 등가물을 단지 일상적인 실험을 사용하여 알아내거나 인식할 수 있을 것이다. 상기 등가물은 이하의 청구범위에 포함되도록 의도된다.

[0637] **참조문헌**

1. Howlader N. et al. Lifetime Risk (Percent) of Being Diagnosed with Cancer by Site and Race/Ethnicity; Males, 18 SEER Areas, 2012-2014SEER Cancer Statistics Review, 1975-2014, National Cancer Institute. Bethesda, MD, https://seer.cancer.gov/csr/1975_2014/, based on November 2016 SEER data submission, posted to the SEER web site, April 2017.

2. Cancer Stat Facts: Ovarian Cancer. Accessed 15 January 2020. <World Wide Web at seer.cancer.gov/statfacts/html/ovary.html>

3. American Cancer Society. *Cancer Facts and Figures 2018*. Atlanta, GA: American Cancer Society; 2018.

4. van Nagell JR Jr, Hoff JT. Transvaginal ultrasonography in ovarian cancer screening: current perspectives. *Int J Womens Health*. 2013;6:25–33. Published 2013 Dec 20.

5. ACOG Statement on FDA Safety Communication on Ovarian Cancer Screening Tests. 8 September 2016. < World Wide Web at acog.org/About-ACOG/News-Room/Statements/2016/ACOG-Statement-on-FDA-Safety-Communication-on-Ovarian-Cancer-Screening-Tests?IsMobileSet=false>

6. Ovarian Cancer Canada 2019. 15 January 2020. < World Wide Web at ovariancanada.org/About-Ovarian-Cancer/Detection>Esselen KM, Cronin AM, Bixel K, et al. Use of CA-125 Tests and Computed Tomographic Scans for Surveillance in Ovarian Cancer. *JAMA Oncol*. 2016;2(11):1427–1433.

7. Pepin K. et al. CA 125 and Epithelial Ovarian Cancer: Role in Screening, Diagnosis, and Surveillance.

[0638]

8. Dochez V, Caillon H, Vaucel E, Dimet J, Winer N, Ducarme G. Biomarkers and algorithms for diagnosis of ovarian cancer: CA125, HE4, RMI and ROMA, a review. *J Ovarian Res.* 2019;12(1):28. Published 2019 Mar 27.

9. Risk of Malignancy Index (RMI) for Ovarian Cancer. 15 January 2020. <World Wide Web at mdcalc.com/risk-malignancy-index-rmi-ovarian-cancer>

10. Ovarian Cancer Testing: HE4, Ovarian Cancer Monitoring. 15 January 2020. <World Wide Web at questdiagnostics.com/home/patients/health-test-info/cancer/ovarian-cancer/he4-monitoring/>Monk B. Monitoring and Managing Patients With Ovarian Cancer. 28 February 2018. <World Wide Web at targetedonc.com/case-based-peer-perspectives/gynecologic-cancer/monk-recurrentovarian-cancer/monitoring-and-managing-patients-with-ovarian-cancer>

11. Herzog TJ. Patient education: Treatment of ovarian cancer (Beyond the Basics). 28 January 2020. <World Wide Web at uptodate.com/contents/treatment-of-ovarian-cancer-beyond-the-basics>

12. Women & Infants Hospital. "FDA clears biomarker test for ovarian cancer." ScienceDaily, 6 September 2011. <World Wide Web at sciencedaily.com/releases/2011/09/110906144034.htm>.

13. k081754- 510(k) SUBSTANTIAL EQUIVALENCE DETERMINATION DECISION SUMMARY. 15 January 2020. <World Wide Web at accessdata.fda.gov/cdrh_docs/reviews/K081754.pdf>

[0639]

14. Moore RG, McMeekin DS, Brown AK, et al. A novel multiple marker bioassay utilizing HE4 and CA125 for the prediction of ovarian cancer in patients with a pelvic mass. Gynecol Oncol. 2009;112:40–6.

15. Dunton, G. et al. (2019) Multivariate Index Assay Outperforms CA125 in Detection of Ovarian Malignancy in African American Women. *Biomarkers in Cancer* 11:1-4

16. Esselen KM, Cronin AM, Bixel K, et al. Use of CA-125 Tests and Computed Tomographic Scans for Surveillance in Ovarian Cancer. *JAMA Oncol.* 2016;2(11):1427–1433. 1842 Vermillion Reports Fourth Quarter and Year-End 2018 Financial Results. 15 January 2020. <World Wide Web at globenewswire.com/news release/2019/03/28/1783632/0/en/Vermillion-Reports-Fourth-Quarter-and-Year-End-2018-Financial-Results.html>

[0640]

17. Nolen BM, Lokshin AE. Biomarker testing for ovarian cancer: clinical utility of multiplex assays. *Mol Diagn Ther*. 2013;17(3):139–146. doi:10.1007/s40291-013-0027-6

18. Bercow AS, Chen L, Chatterjee S, et al. Cost of Care for the Initial Management of Ovarian Cancer. *Obstet Gynecol*. 2017;130(6):1269–1275.

19. How much does treating ovarian cancer cost? 15 January 2020. <World Wide Web at herwaroncancer.com/common-types-of-cancer/ovarian-cancer/treatment-cost/>

20. Jacobs et al., I et al. (2015) Ovarian cancer screening and mortality in the UK Collaborative Trial of Ovarian Cancer Screening (UKTOCS): a randomised controlled trial. *The Lancet*. 10222:945-956

21. Buys, S et al., (2011) Effect of screening on ovarian cancer mortality: the Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian (PLCO) Cancer Screening Randomized Controlled Trial. *JAMA*. (22):2295-303

22. World Wide Web at nccn.org/professionals/physician_gls/default.aspx

23. Cannistra, S. A. Cancer of the ovary. *N Engl J Med* 351, 2519-2529, (2004).

24. Daly, M. B. & Ozols, R. F. Symptoms of ovarian cancer--where to set the bar? *JAMA* 291, 2755-2756, (2004).

25. Vaughan, S. *et al.* Rethinking ovarian cancer: recommendations for improving outcomes. *Nat Rev Cancer* 11, 719-725, doi:10.1038/nrc3144 (2011).

26. Averette, H. E. *et al.* National survey of ovarian carcinoma. I. A patient care evaluation study of the American College of Surgeons. *Cancer* 71, 1629-1638 (1993).

27. Felder, M. *et al.* MUC16 (CA125): tumor biomarker to cancer therapy, a work in progress. *Mol Cancer* 13, 129, doi:10.1186/1476-4598-13-129 (2014).

[0641]

28. Santin, A. D. *et al.* Increased levels of gangliosides in the plasma and ascitic fluid of patients with advanced ovarian cancer. *BJOG* 111, 613-618, (2004).

29. Shenoy, G. N. *et al.* Sialic Acid-Dependent Inhibition of T Cells by Exosomal Ganglioside GD3 in Ovarian Tumor Microenvironments. *J Immunol*, (2018).

30. Tiper, I. V. *et al.* VEGF Potentiates GD3-Mediated Immunosuppression by Human Ovarian Cancer Cells. *Clin Cancer Res* 22, 4249-4258, (2016).

31. Cancer Genome Atlas Research, N. Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma. *Nature* 474, 609-615, (2011).

32. Gagnon, M. & Saragovi, H. U. Gangliosides: therapeutic agents or therapeutic targets? *Expert Opinion on Therapeutic Patents* 12, 1215-1223, (2002).

[0642]

33. Daniotti, J. L., Lardone, R. D. & Vilcaes, A. A. Dysregulated Expression of Glycolipids in Tumor Cells: From Negative Modulator of Anti-tumor Immunity to Promising Targets for Developing Therapeutic Agents. *Front Oncol* 5, 300, (2016).
34. Zhang, X. & Kiechle, F. L. Review: Glycosphingolipids in health and disease. *Ann Clin Lab Sci* 34, 3-13 (2004).
35. Regina Todeschini, A. & Hakomori, S. I. Functional role of glycosphingolipids and gangliosides in control of cell adhesion, motility, and growth, through glycosynaptic microdomains. *Biochimica et Biophysica Acta* 1780, 421-433, (2008).
36. Navid, F., Santana, V. M. & Barfield, R. C. Anti-GD2 antibody therapy for GD2-expressing tumors. *Current Cancer Drug Dargets* 10, 200-209 (2010).
37. Cheever, M. A. *et al.* The prioritization of cancer antigens: a national cancer institute pilot project for the acceleration of translational research. *Clin Cancer Res* 15, 5323-5337, (2009).
38. Yang, R. K. & Sondel, P. M. Anti-GD2 Strategy in the Treatment of Neuroblastoma. *Drugs Future* 35, 665 (2010).
39. Chiantia, S., Kahya, N. & Schwille, P. Raft domain reorganization driven by short- and longchain ceramide: a combined AFM and FCS study. *Langmuir* 23, 7659-7665, (2007).
40. Grey, M. *et al.* Acceleration of alpha-synuclein aggregation by exosomes. *J Biol Chem* 290, 2969-2982, (2015).
41. Yu, R. K., Tsai, Y. T., Ariga, T. & Yanagisawa, M. Structures, biosynthesis, and functions of gangliosides--an overview. *J Oleo Sci* 60, 537-544 (2011).

[0643]

42. Chen, Y. X. *et al.* Effect of tumor gangliosides on tyrosine phosphorylation of p125FAK in platelet adhesion to collagen. *Oncol Rep* 29, 343-348, (2013).
43. Shibuya, H. *et al.* Enhancement of malignant properties of human osteosarcoma cells with disialyl gangliosides GD2/GD3. *Cancer Sci* 103, 1656-1664, (2012).
44. Furukawa, K., Hamamura, K., Ohkawa, Y., Ohmi, Y. & Furukawa, K. Disialyl gangliosides enhance tumor phenotypes with differential modalities. *Glycoconj J* 29, 579-584, (2012).
45. Hamamura, K. *et al.* Functional activation of Src family kinase yes protein is essential for the enhanced malignant properties of human melanoma cells expressing ganglioside GD3. *J Biol Chem* 286, 18526-18537 (2011).

[0644]

46. Mitsuzuka, K., Handa, K., Satoh, M., Arai, Y. & Hakomori, S. A specific microdomain

("glycosynapse 3") controls phenotypic conversion and reversion of bladder cancer cells through GM3-mediated interaction of alpha3beta1 integrin with CD9. *J. Biol. Chem.* 280, 35545-35553, (2005).

47. Yoshida, S. *et al.* Ganglioside G(D2) in small cell lung cancer cell lines: enhancement of cell
proliferation and mediation of apoptosis. *Cancer Research* 61, 4244-4252 (2001).

48. Daniotti, J. L., Crespo, P. M. & Yamashita, T. In vivo modulation of epidermal growth factor receptor phosphorylation in mice expressing different gangliosides. *Journal of Cellular Biochemistry* 99, 1442-1451 (2006).

49. Ohkawa, Y. *et al.* Ganglioside GD3 Enhances Invasiveness of Gliomas by Forming a Complex with Platelet-derived Growth Factor Receptor alpha and Yes Kinase. *J Biol Chem* 290, 16043-16058, (2015).

50. Rampersaud, A. A., Oblinger, J. L., Ponnappan, R. K., Burry, R. W. & Yates, A. J. Gangliosides and growth factor receptor regulation. *Biochem Soc Trans* 27, 415-422 (1999).

51. Tong, W. *et al.* Small-molecule ligands of GD2 ganglioside, designed from NMR studies, exhibit induced-fit binding and bioactivity. *Chem Biol* 17, 183-194 (2010).

52. Tong, W., Maira, M., Gagnon, M. & Saragovi, H. U. Ligands Binding to Cell Surface Ganglioside GD2 Cause Src-Dependent Activation of N-Methyl-D-Aspartate Receptor Signaling and Changes in Cellular Morphology. *PLoS One* 10, e0134255, (2015).

53. Sorice, M. *et al.* Role of GM3-enriched microdomains in signal transduction regulation in T lymphocytes. *Glycoconjugate Journal* 20, 63-70, (2004).

[0645]

54. Kasahara, K., Watanabe, Y., Yamamoto, T. & Sanai, Y. Association of Src family tyrosine kinase Lyn with ganglioside GD3 in rat brain. Possible regulation of Lyn by glycosphingolipid in caveolae-like domains. *J Biol Chem* 272, 29947-29953 (1997).

55. Yates, A. J. & Rampersaud, A. Sphingolipids as receptor modulators. An overview. *Ann N Y Acad Sci* 845, 57-71 (1998).

56. Liu, Y., McCarthy, J. & Ladisch, S. Membrane ganglioside enrichment lowers the threshold for vascular endothelial cell angiogenic signaling. *Cancer Research* 66, 10408-10414, (2006).

57. Ziche, M., Morbidelli, L., Alessandri, G. & Gullino, P. M. Angiogenesis can be stimulated or repressed in vivo by a change in GM3:GD3 ganglioside ratio. *Laboratory Investigation* 67, 711-715 (1992).

[0646]

58. Iwabuchi, K. *et al.* Reconstitution of membranes simulating "glycosignaling domain" and their susceptibility to lyso-GM3. *J. Biol. Chem.* 275, 15174-15181 (2000).
59. Todeschini, A. R., Dos Santos, J. N., Handa, K. & Hakomori, S. I. Ganglioside GM2-tetraspanin CD82 complex inhibits met and its cross-talk with integrins, providing a basis for control of cell motility through glycosynapse. *J. Biol. Chem.* 282, 8123-8133, (2007).
60. Nakashima, H. *et al.* Overexpression of caveolin-1 in a human melanoma cell line results in dispersion of ganglioside GD3 from lipid rafts and alteration of leading edges, leading to attenuation of malignant properties. *Cancer Science* 98, 512-520 (2007).
61. Aixinjueluo, W. *et al.* Mechanisms for the apoptosis of small cell lung cancer cells induced by anti-GD2 monoclonal antibodies: roles of anoikis. *J. Biol. Chem.* 280, 29828-29836 (2005).
62. Yoshida, S., Kawaguchi, H., Sato, S., Ueda, R. & Furukawa, K. An anti-GD2 monoclonal antibody enhances apoptotic effects of anti-cancer drugs against small cell lung cancer cells via JNK (c-Jun terminal kinase) activation. *Japanese Journal of Cancer Research* 93, 816-824 (2002).
63. Furukawa, K., Hamamura, K., Aixinjueluo, W. & Furukawa, K. Biosignals modulated by tumorassociated carbohydrate antigens: novel targets for cancer therapy. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1086, 185-198 (2006).
64. Caldwell, S. *et al.* Mechanisms of ganglioside inhibition of APC function. *Journal of Immunology* 171, 1676-1683 (2003).
65. Shurin, G. V. *et al.* Neuroblastoma-derived gangliosides inhibit dendritic cell generation and function. *Cancer Research* 61, 363-369 (2001).

[0647]

66. Grayson, G. & Ladisch, S. Immunosuppression by human gangliosides. II. Carbohydrate structure and inhibition of human NK activity. *Cellular Immunology* 139, 18-29 (1992).
67. Dube, D. H. & Bertozzi, C. R. Glycans in cancer and inflammation--potential for therapeutics and diagnostics. *Nat Rev Drug Discov* 4, 477-488 (2005).
68. RodrIguez, E., Schetters, S. T. T. & van Kooyk, Y. The tumour glyco-code as a novel immune checkpoint for immunotherapy. *Nat Rev Immunol* 18, 204-211, (2018).
69. Astronomo, R. D. & Burton, D. R. Carbohydrate vaccines: developing sweet solutions to sticky situations? *Nat Rev Drug Discov* 9, 308-324 (2010).
70. Webb, T. J. *et al.* Molecular identification of GD3 as a suppressor of the innate immune response in ovarian cancer. *Cancer Res* 72, 3744-3752, (2012).

[0648]

71. Heimburg-Molinaro, J. *et al.* Cancer vaccines and carbohydrate epitopes. *Vaccine* 29, 8802-8826, (2011).
72. Doronin, II *et al.* Ganglioside GD2 in reception and transduction of cell death signal in tumor cells. *BMC Cancer* 14, 295, doi:10.1186/1471-2407-14-295 (2014).
73. Kramer, G., Suss, W., Kohler, H., Schneider, B. & Hopf, H. C. [Ganglioside therapy in uremic polyneuropathy]. *Med Klin (Munich)* 83, 7-11, 40 (1988).
74. Brignole, C. *et al.* Immune cell-mediated antitumor activities of GD2-targeted liposomal c-myb antisense oligonucleotides containing CpG motifs. *Journal of the National Cancer Institute* 96, 1171-1180, (2004).
75. Zhang, S. *et al.* Selection of tumor antigens as targets for immune attack using immunohistochemistry: I. Focus on gangliosides. *International Journal of Cancer* 73, 42-49 (1997).
76. Poon, V. I. *et al.* Ganglioside GD2 expression is maintained upon recurrence in patients with osteosarcoma. *Clin Sarcoma Res* 5, 4, doi:10.1186/s13569-014-0020-9 (2015).
77. Kong, Y., Li, R. & Ladisch, S. Natural forms of shed tumor gangliosides. *Biochim Biophys Acta* 1394, 43-56 (1998).
78. Ladisch, S., Li, R. & Olson, E. Ceramide structure predicts tumor ganglioside immunosuppressive activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 1974-1978 (1994).

[0649]

79. Irani, D. N., Lin, K. I. & Griffin, D. E. Brain-derived gangliosides regulate the cytokine production and proliferation of activated T cells. *J Immunol* 157, 4333-4340 (1996).
80. Wu, A. M. *et al.* Glycomic mapping of pseudomucinous human ovarian cyst glycoproteins: identification of Lewis and sialyl Lewis glycotopes. *Proteomics* 7, 3699-3717, (2007).
81. Ladisch, S. & Wu, Z. L. Detection of a tumour-associated ganglioside in plasma of patients with neuroblastoma. *Lancet* 1, 136-138 (1985).
82. Bernhard, H., Meyer zum Buschenfelde, K. H. & Dippold, W. G. Ganglioside GD3 shedding by human malignant melanoma cells. *Int J Cancer* 44, 155-160 (1989).
83. Merritt, W. D., Der-Minassian, V. & Reaman, G. H. Increased GD3 ganglioside in plasma of children with T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 8, 816-822 (1994).
84. Valentino, L. *et al.* Shed tumor gangliosides and progression of human neuroblastoma. *Blood* 75, 1564-1567 (1990).
85. Tai, T. *et al.* Immunogenicity of melanoma-associated gangliosides in cancer patients. *International Journal of Cancer* 35, 607-612 (1985).

[0650]

86. Tsuchida, T., Ravindranath, M. H., Saxton, R. E. & Irie, R. F. Gangliosides of human melanoma: altered expression in vivo and in vitro. *Cancer Res* 47, 1278-1281 (1987).
87. Tsuchida, T., Saxton, R. E., Morton, D. L. & Irie, R. F. Gangliosides of human melanoma. *Journal of the National Cancer Institute* 78, 45-54 (1987).
88. Tsuchida, T., Saxton, R. E., Morton, D. L. & Irie, R. F. Gangliosides of human melanoma. *J Natl Cancer Inst* 78, 45-54, doi:10.1093/jnci/78.1.45 (1987).
89. Tsuchida, Y., Fukui, M., Sakaguchi, H. & Ishiguro, T. Analysis of lectin affinity immunoelectrophoretic profiles of serum alpha-fetoprotein from patients with yolk sac tumors and carcinomas of the gastrointestinal tract: correlations with molecular structures. *Tumour Biol* 10, 289-296, doi:10.1159/000217628 (1989).
90. Cheresh, D. A., Pierschbacher, M. D., Herzig, M. A. & Mujoo, K. Disialogangliosides GD2 and GD3 are involved in the attachment of human melanoma and neuroblastoma cells to extracellular matrix proteins. *J. Cell Biol.* 102, 688-696, doi:10.1083/jcb.102.3.688 (1986).
91. Pukel, C. S. *et al.* GD3, a prominent ganglioside of human melanoma. Detection and characterisation by mouse monoclonal antibody. *J Exp Med* 155, 1133-1147 (1982).
92. Cheung, N.-K. V. *et al.* Monoclonal Antibodies to a Glycolipid Antigen on Human Neuroblastoma Cells. *Cancer Research* 45, 2642-2649 (1985).
93. Rabu, C., McIntosh, R., Jurasova, Z. & Durrant, L. Glycans as targets for therapeutic antitumor antibodies. *Future Oncol* 8, 943-960, doi:10.2217/fon.12.88 (2012).

[0651]

94. Rashidijahanabad, Z. & Huang, X. Recent advances in tumor associated carbohydrate antigen based chimeric antigen receptor T cells and bispecific antibodies for anti-cancer immunotherapy. *Semin Immunol*, 101390, (2020).
95. Cheung, N. K. *et al.* Single-chain Fv-streptavidin substantially improved therapeutic index in multistep targeting directed at disialoganglioside GD2. *Journal of Nuclear Medicine* 45, 867-877 (2004).
96. Daniotti, J. L., Vilcaes, A. A., Torres Demichelis, V., Ruggiero, F. M. & Rodriguez-Walker, M. Glycosylation of Glycolipids in Cancer: Basis for Development of Novel Therapeutic Approaches. *Front Oncol* 3, 306, (2013).
97. Tong, W. *et al.* Vaccination with Tumor-Ganglioside Glycomimetics Activates a Selective Immunity that Affords Cancer Therapy. *Cell Chem Biol* 26, 1013-1026 e1014, (2019).

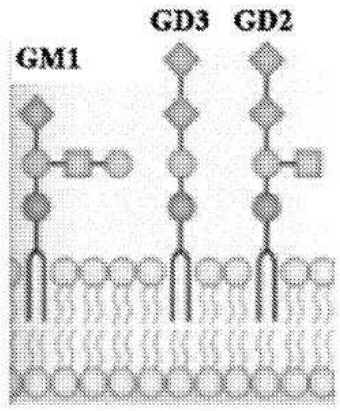
[0652]

98. Moffett, S. *et al.* Preparation and characterization of new anti-PSMA monoclonal antibodies with potential clinical use. *Hybridoma* 26, 363-372, (2007).
99. Bai, Y. *et al.* An agonistic TrkB mAb causes sustained TrkB activation, delays RGC death, and protects the retinal structure in optic nerve axotomy and in glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 51, 4722-4731, (2010).
100. Saragovi, H. U. *et al.* A TrkA-selective, fast internalizing nerve growth factor-antibody complex induces trophic but not neuritogenic signals. *J Biol Chem* 273, 34933-34940, (1998).
101. Saragovi, H. U. *et al.* Functional and physical association of a cell surface phospholipid and interleukin-2 receptor p55(alpha) subunits. *Biochim Biophys Acta* 1414, 51-64 (1998).
102. Cohen, J. D. *et al.* Detection and localization of surgically resectable cancers with a multi-analyte blood test. *Science* 359, 926-930, (2018).
103. Killock, D. Diagnosis: CancerSEEK and destroy - a blood test for early cancer detection. *Nat Rev Clin Oncol* 15, 133, (2018).
104. Aravanis, A. M., Lee, M. & Klausner, R. D. Next-Generation Sequencing of Circulating Tumor DNA for Early Cancer Detection. *Cell* 168, 571-574, (2017).
105. Lin, J. *et al.* Exosomes: novel biomarkers for clinical diagnosis. *ScientificWorldJournal* (2015).

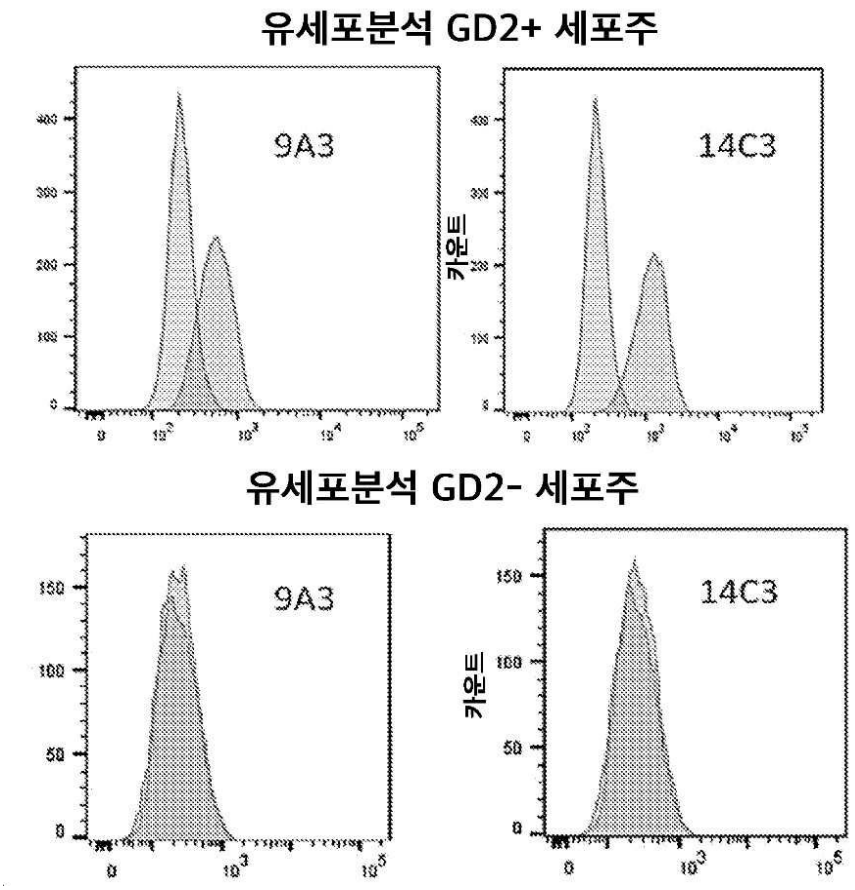
[0653]

도면

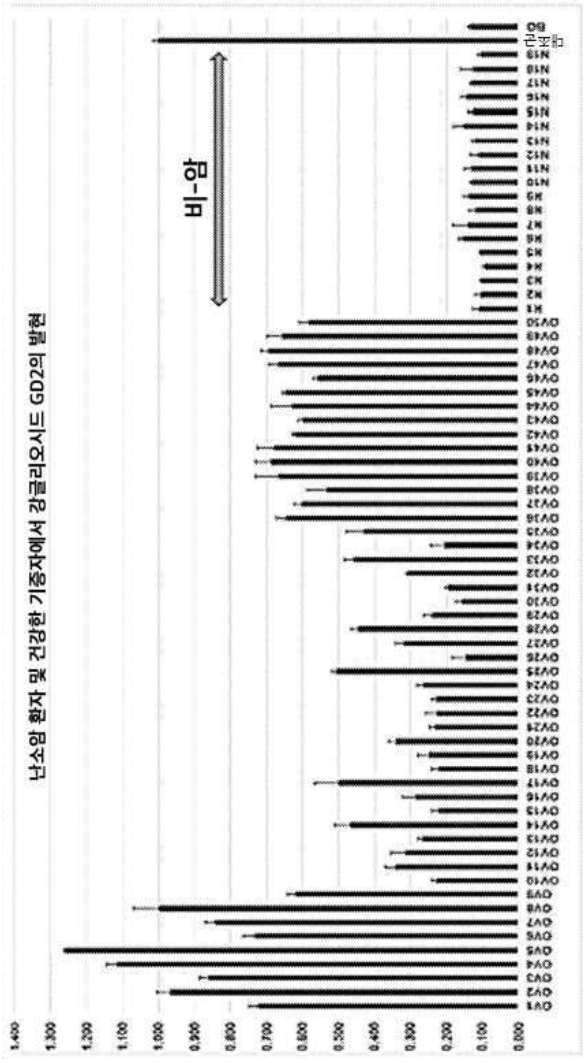
도면1



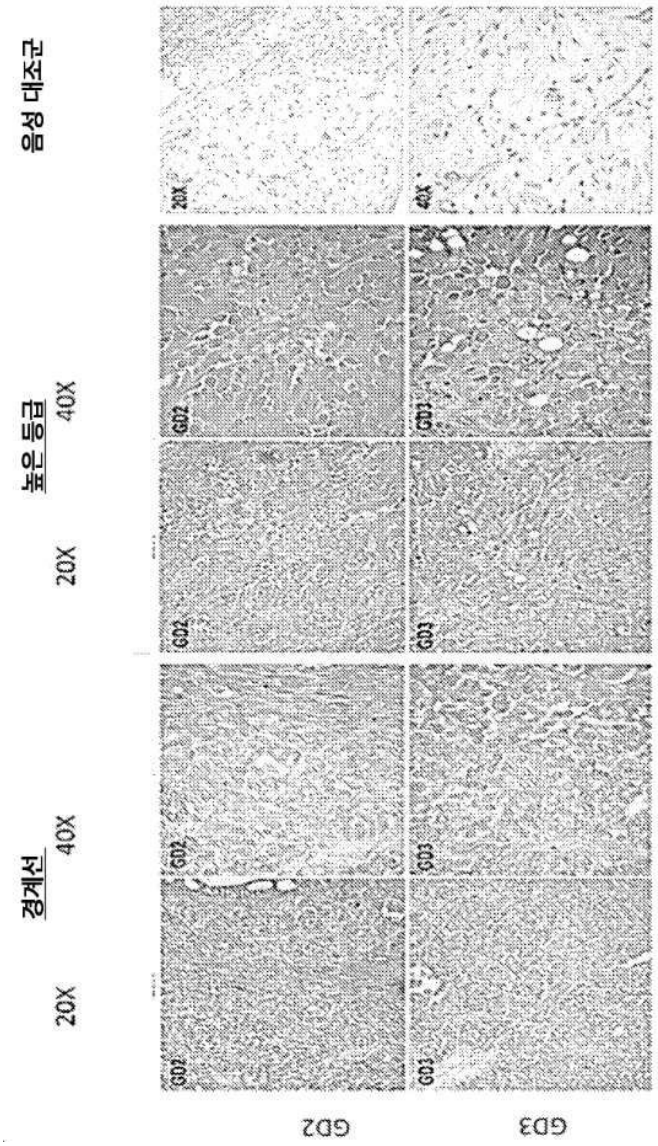
도면2



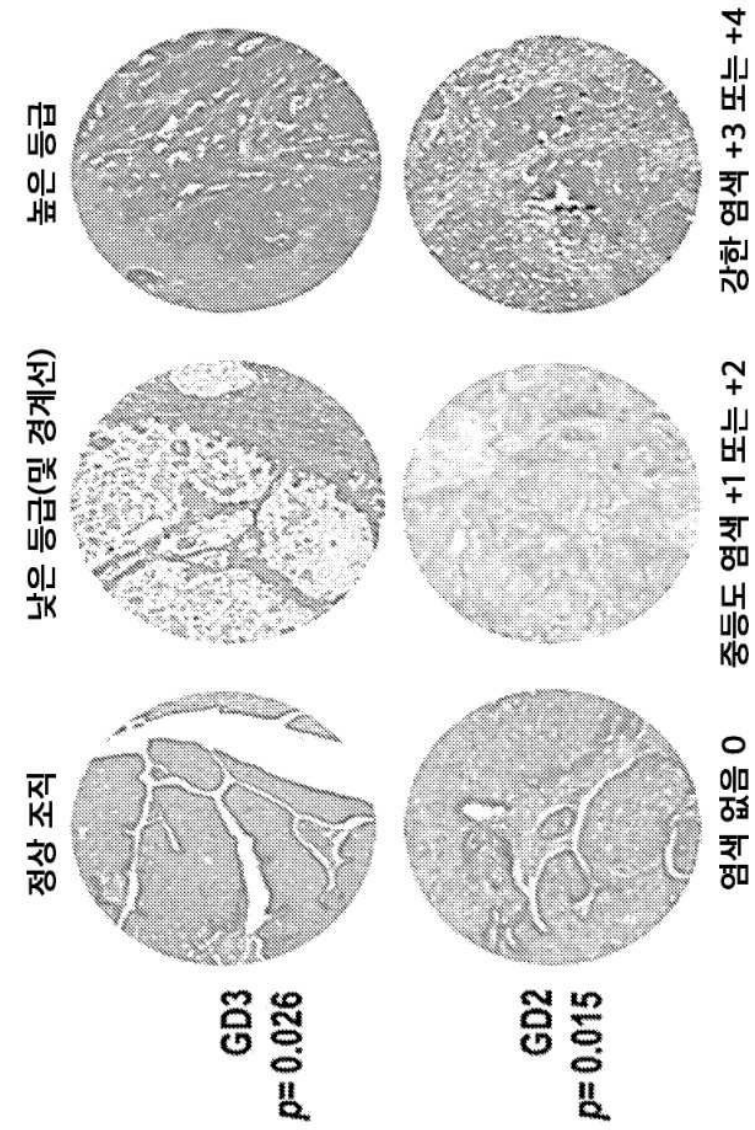
도면3



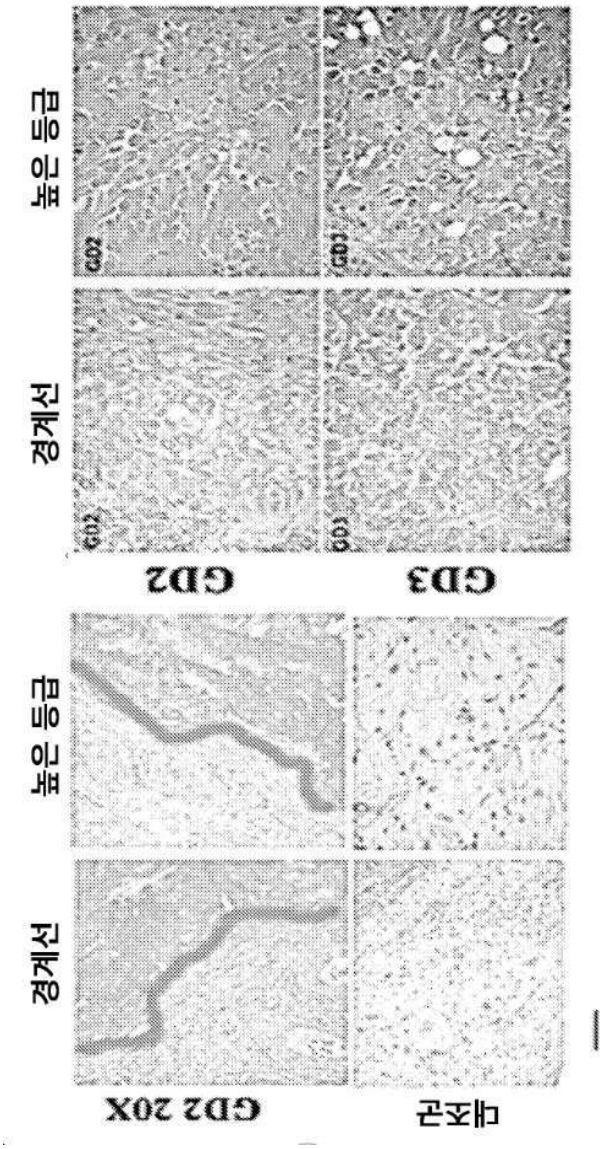
도면4



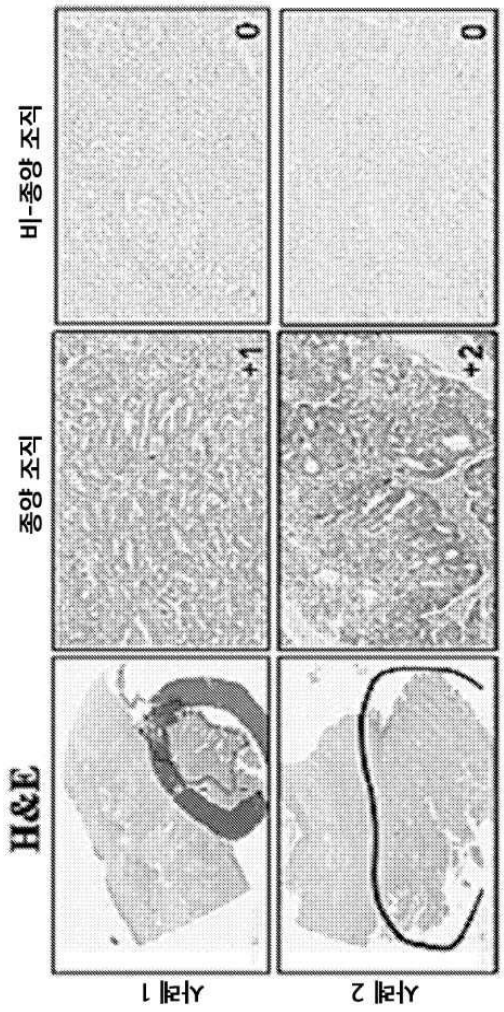
도면5


높은 등급
낮은 등급(및 경계선)
정상 조직
강한 염색 +3 또는 +4
중등도 염색 +1 또는 +2
염색 없음 0
GD2
p= 0.015
GD3
p= 0.026

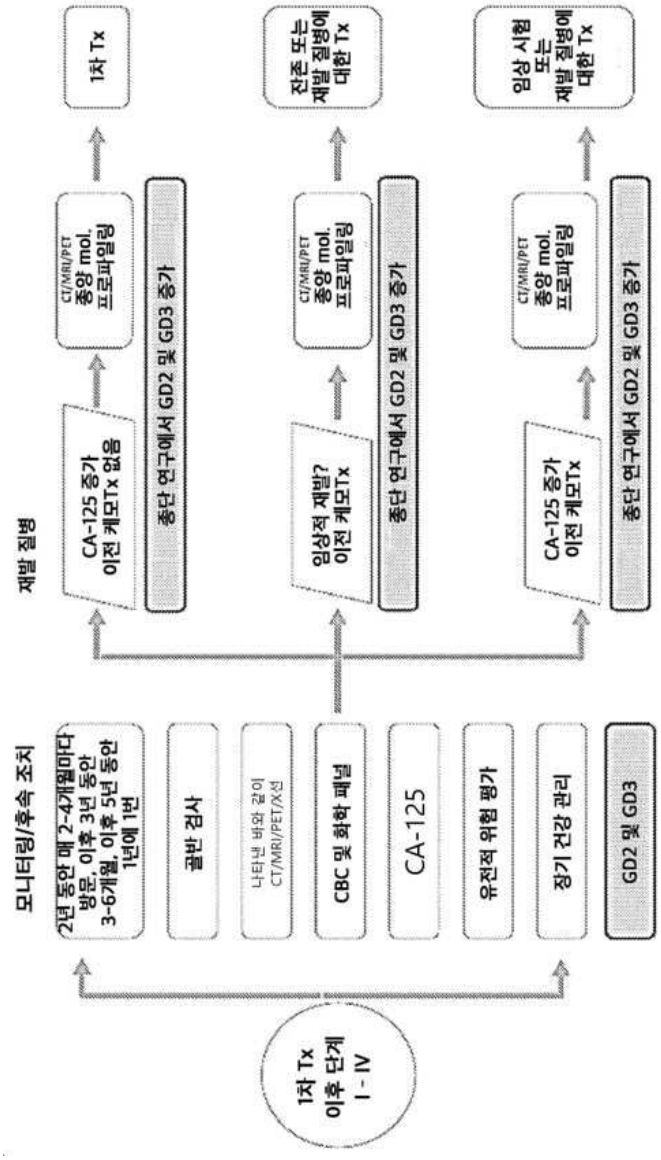
도면6



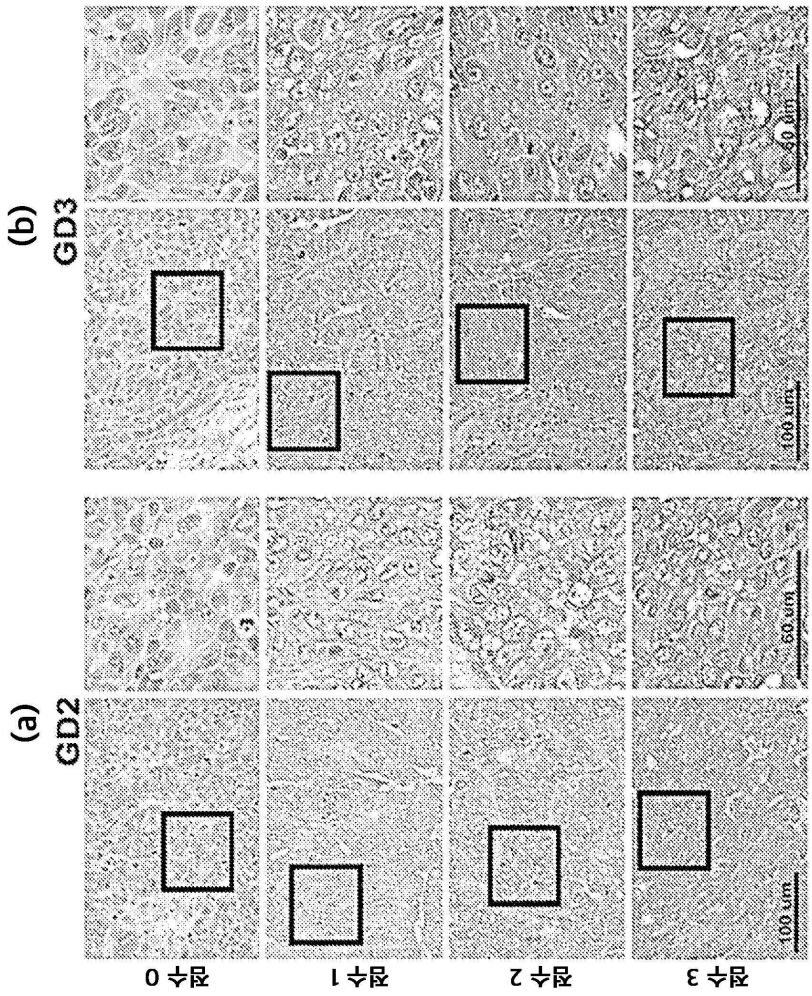
도면7



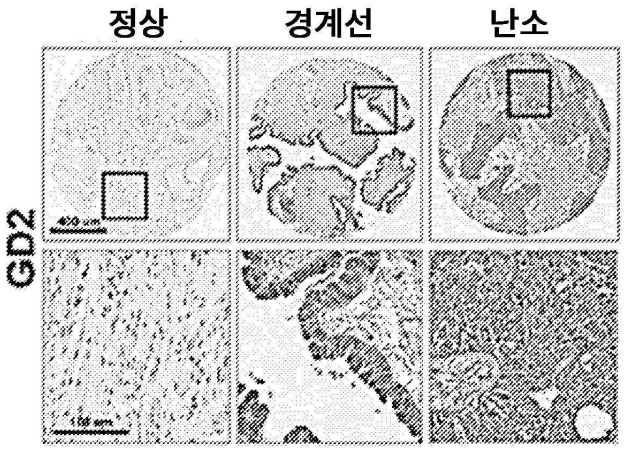
도면8


모니터링/후속 조치
재발 질병
2년 동안 매 2-4개월마다 방문, 이후 3년 동안 3-6개월, 이후 5년 동안 1년에 1번
골반 검사
나타난 바와 같이 CT/MRI/PET/X선
CBC 및 화학 패널
CA-125
유전적 위험 평가
장기 건강 관리
GD2 및 GD3
1차 Tx 이후 단계 I - IV
CA-125 증가 이전 케모Tx 없음
종단 연구에서 GD2 및 GD3 증가
CT/MRI/PET 종양 mol. 프로파일링
1차 Tx
임상적 재발? 이전 케모Tx
종단 연구에서 GD2 및 GD3 증가
CT/MRI/PET 종양 mol. 프로파일링
잔존 또는 재발 질병에 대한 Tx
CA-125 증가 이전 케모Tx
종단 연구에서 GD2 및 GD3 증가
CT/MRI/PET 종양 mol. 프로파일링
임상 시험 또는 재발 질병에 대한 Tx

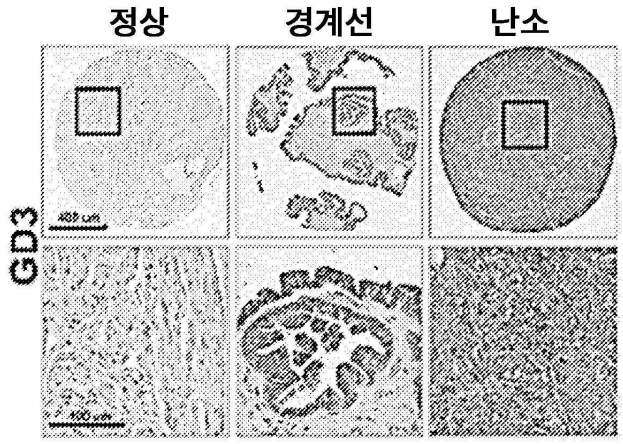
도면9



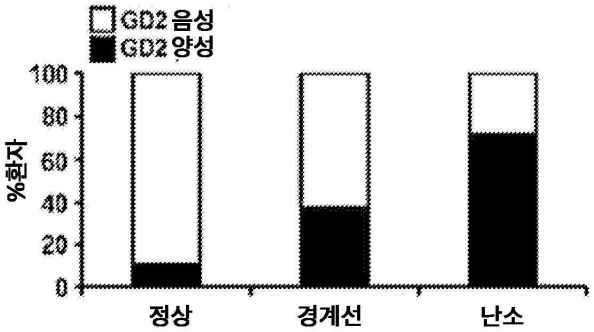
도면10a



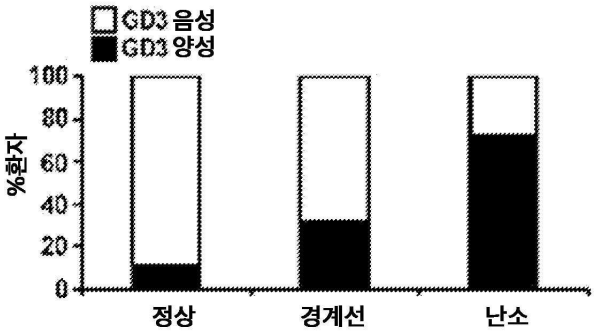
도면10b



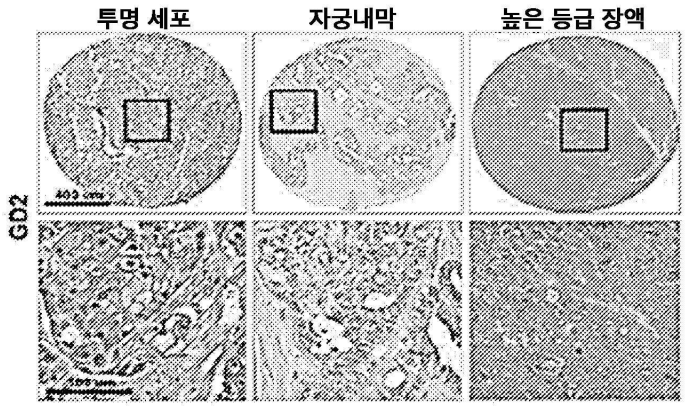
도면10c



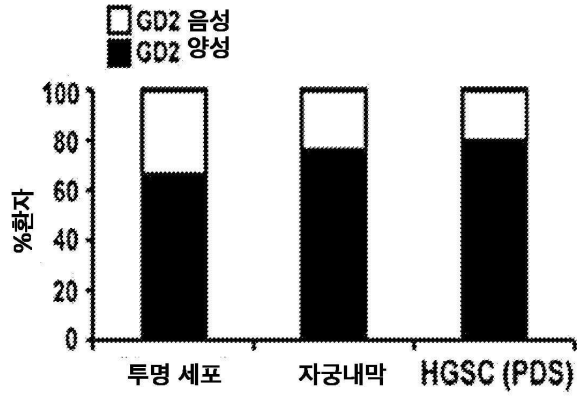
도면10d



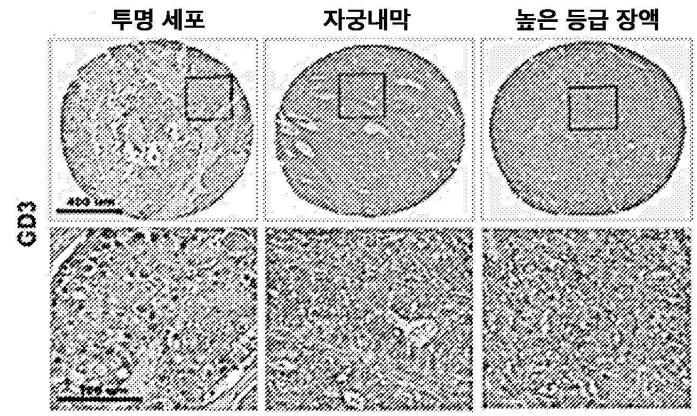
도면11a



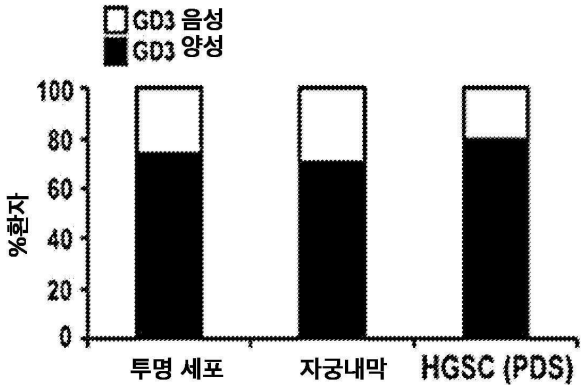
도면11b



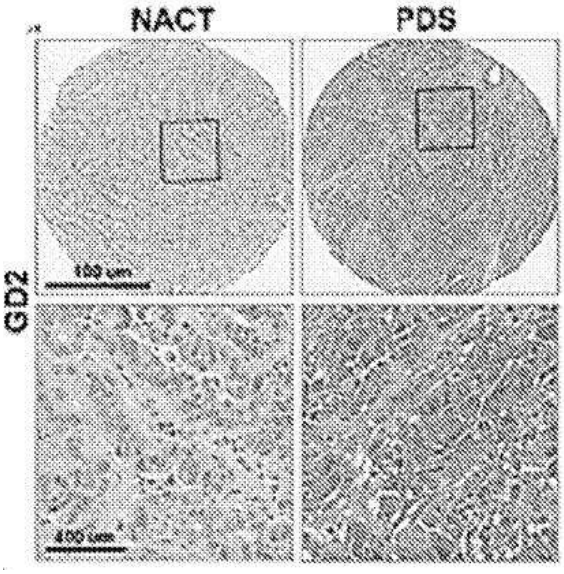
도면11c



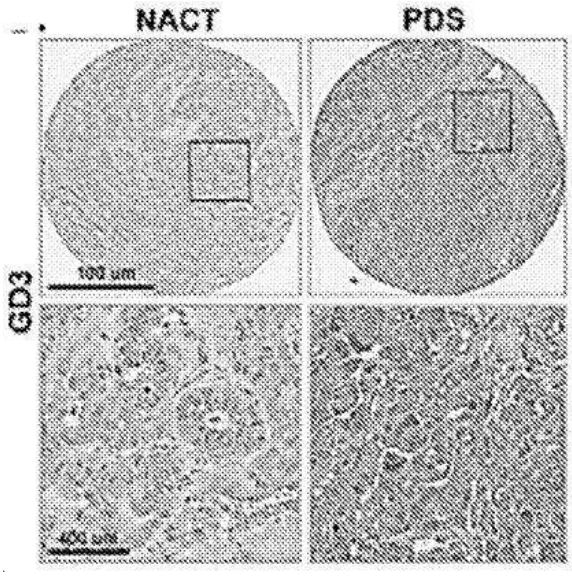
도면11d



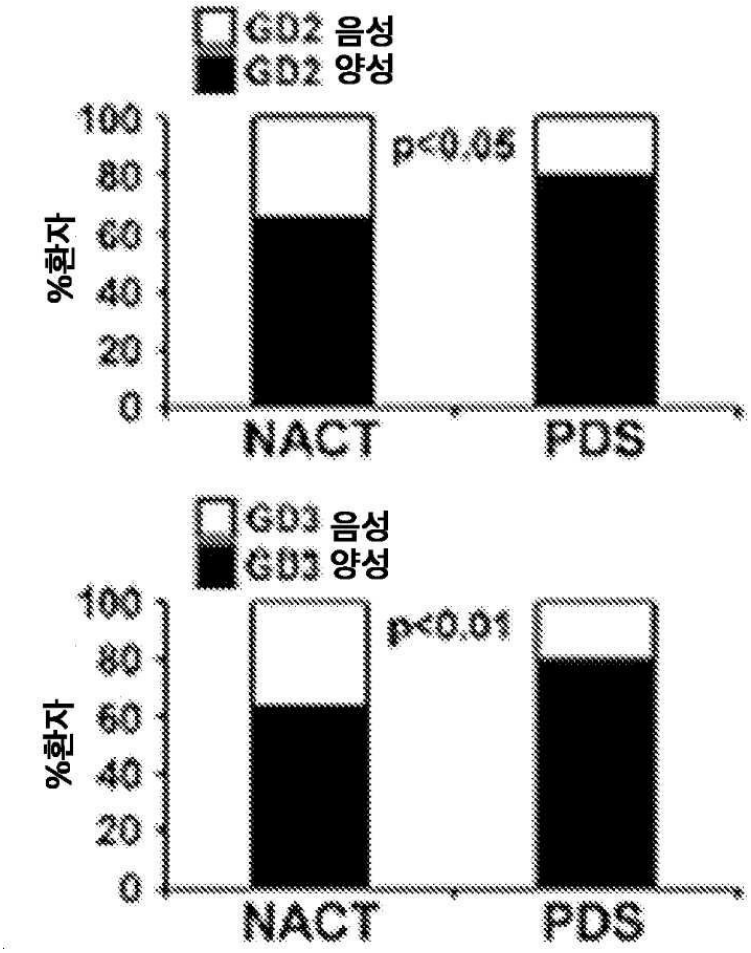
도면12a



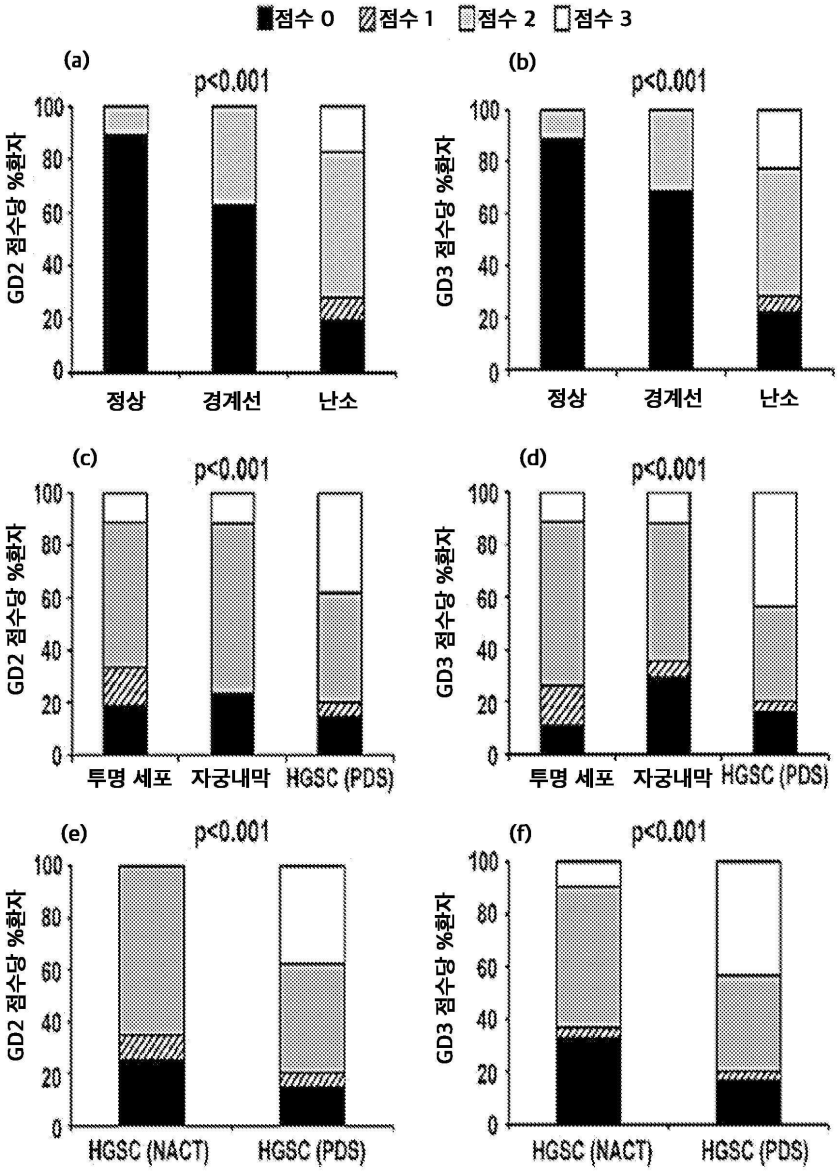
도면12b



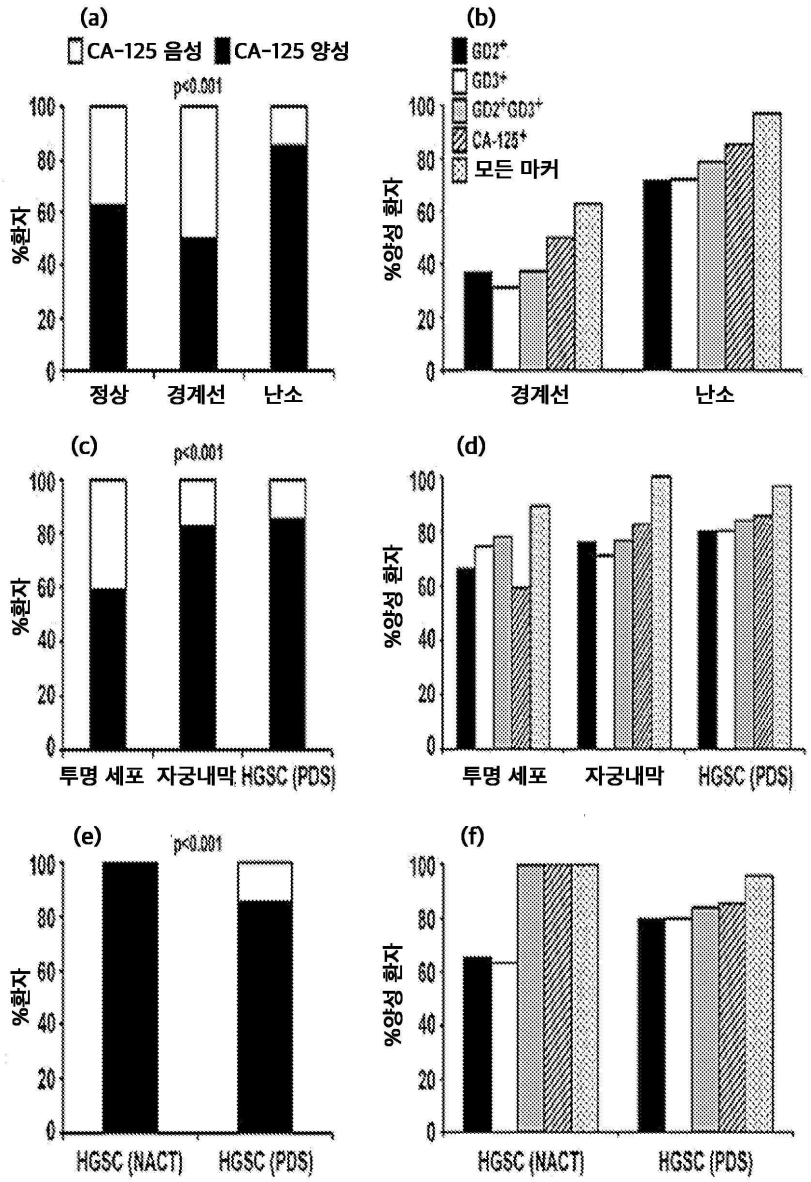
도면12c


GD2 음성
GD2 양성
100
80
60
40
20
0
%환자
p<0.05
NACT
PDS
GD3 음성
GD3 양성
100
80
60
40
20
0
%환자
p<0.01
NACT
PDS

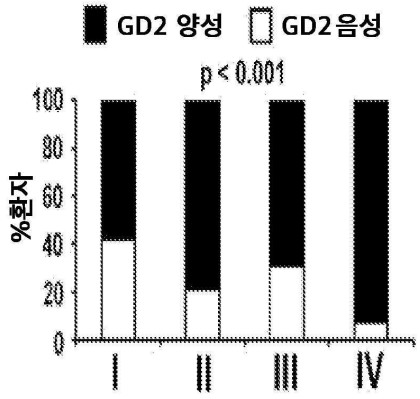
도면13


점수 0
점수 1
점수 2
점수 3
(a)
p<0.001
GD2 점수당 %환자
정상
경계선
난소
(b)
p<0.001
GD3 점수당 %환자
정상
경계선
난소
(c)
p<0.001
GD2 점수당 %환자
투명 세포
자궁내막
HGSC (PDS)
(d)
p<0.001
GD3 점수당 %환자
투명 세포
자궁내막
HGSC (PDS)
(e)
p<0.001
GD2 점수당 %환자
HGSC (NACT)
HGSC (PDS)
(f)
p<0.001
GD3 점수당 %환자
HGSC (NACT)
HGSC (PDS)

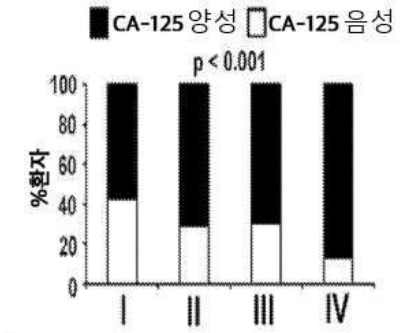
도면14


(a)
CA-125 음성
CA-125 양성
p<0.001
%환자
정상
경계선
난소
(b)
GD2+
GD3+
GD2+GD3+
CA-125+
모든 마커
%양성 환자
경계선
난소
(c)
p<0.001
%환자
투명 세포
자궁내막
HGSC (PDS)
(d)
%양성 환자
투명 세포
자궁내막
HGSC (PDS)
(e)
p<0.001
%환자
HGSC (NACT)
HGSC (PDS)
(f)
%양성 환자
HGSC (NACT)
HGSC (PDS)

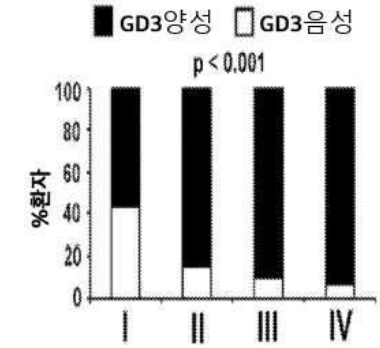
도면15a


GD2 양성
GD2 음성
p < 0.001
%환자
I
II
III
IV

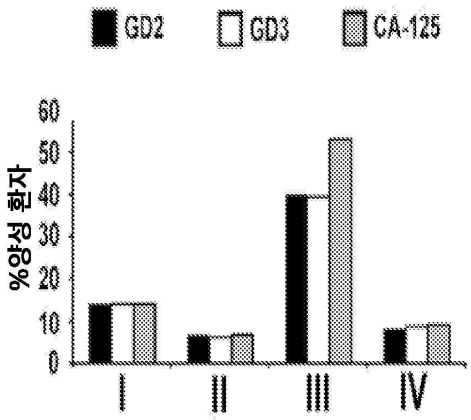
도면15b



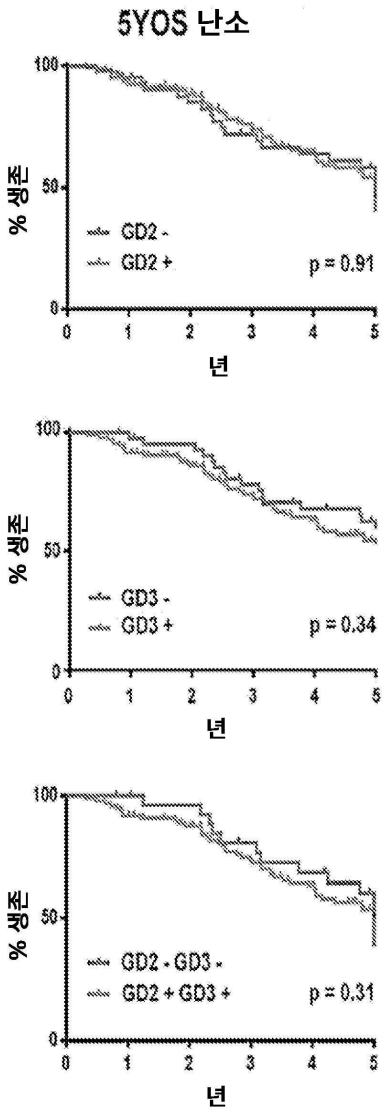
도면15c



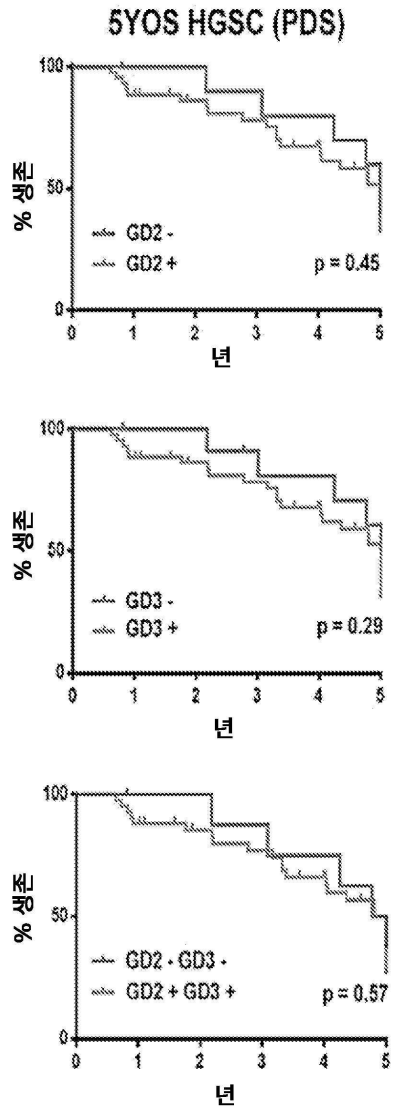
도면15d



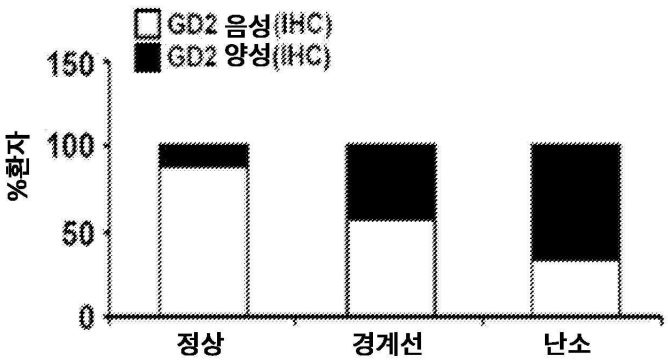
도면16a


5YOS 난소
% 생존
100
50
0
GD2 -
GD2 +
p = 0.91
0 1 2 3 4 5
년
% 생존
100
50
0
GD3 -
GD3 +
p = 0.34
0 1 2 3 4 5
년
% 생존
100
50
0
GD2 - GD3 -
GD2 + GD3 +
p = 0.31
0 1 2 3 4 5
년

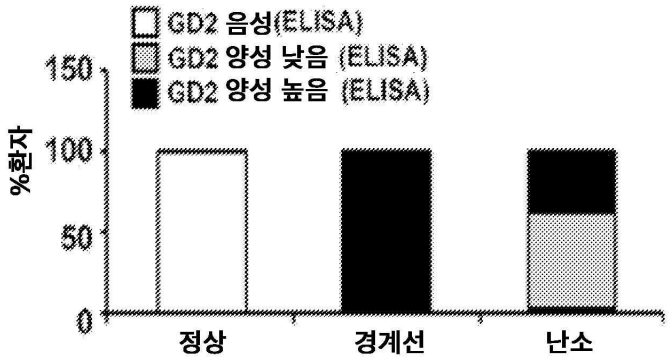
도면16b


5YOS HGSC (PDS)
% 생존
100
50
0
GD2 -
GD2 +
p = 0.45
0 1 2 3 4 5
년
% 생존
100
50
0
GD3 -
GD3 +
p = 0.29
0 1 2 3 4 5
년
% 생존
100
50
0
GD2 - GD3 -
GD2 + GD3 +
p = 0.57
0 1 2 3 4 5
년

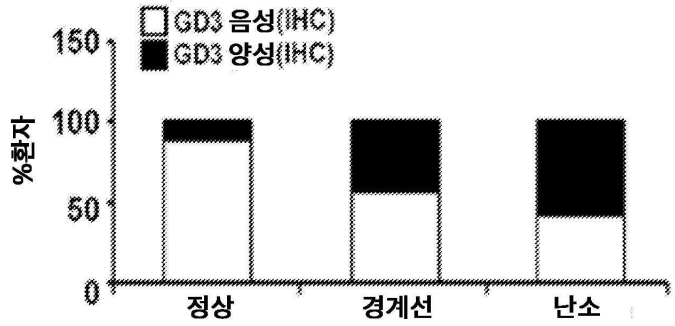
도면17a


GD2 음성(IHC)
GD2 양성(IHC)
%환자
150
100
50
0
정상
경계선
난소

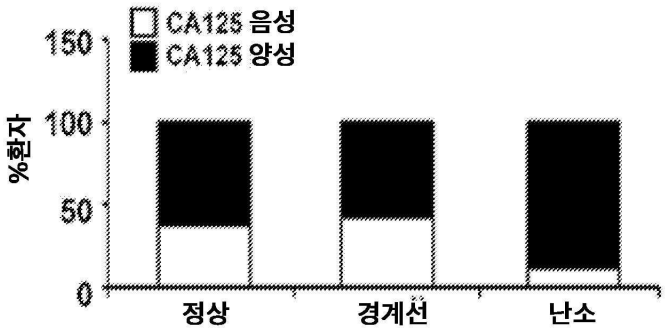
도면17b



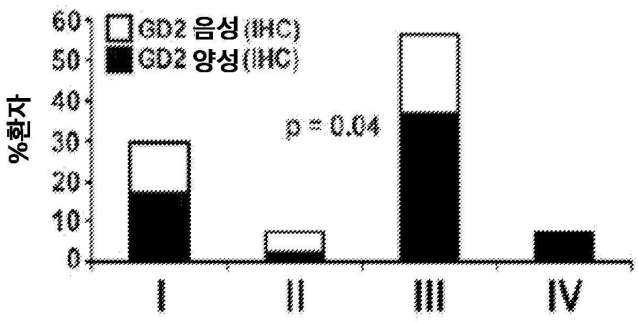
도면17c



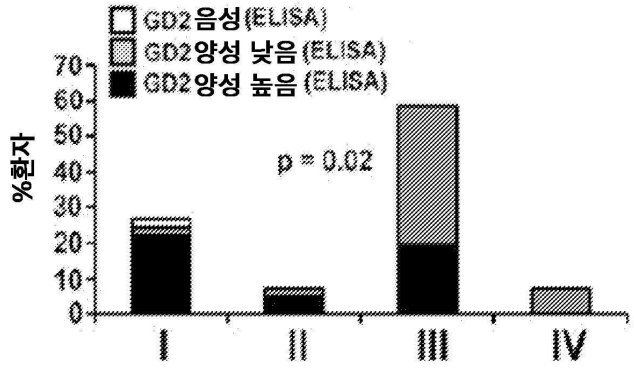
도면17d



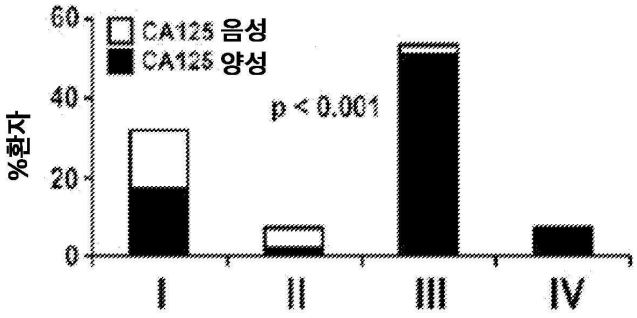
도면18a



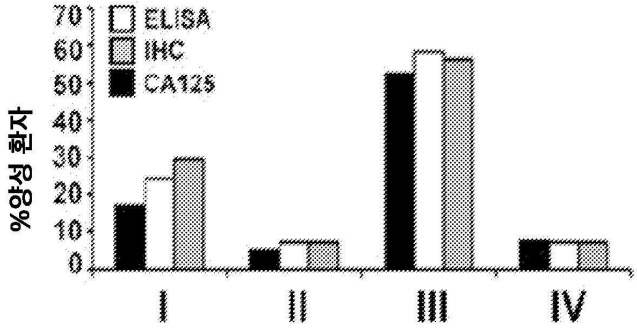
도면18b



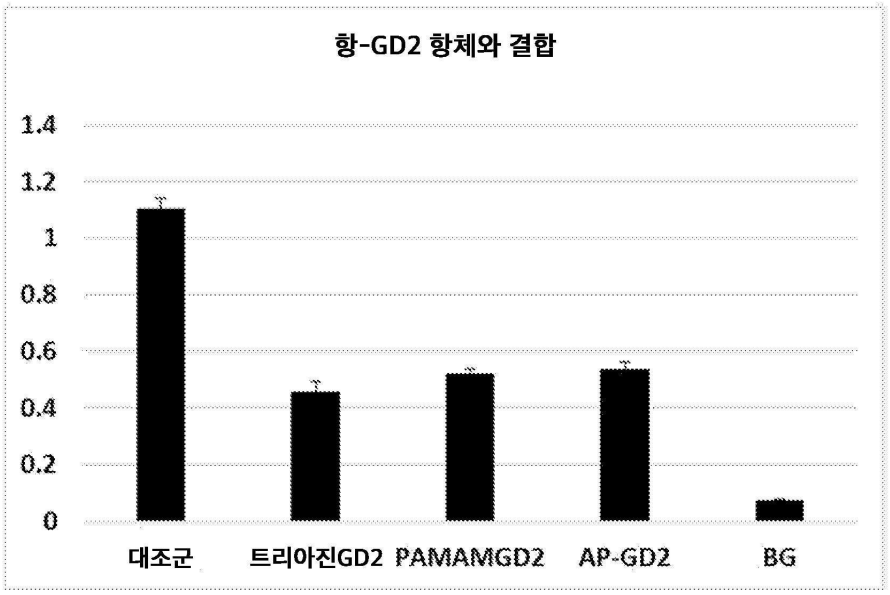
도면18c



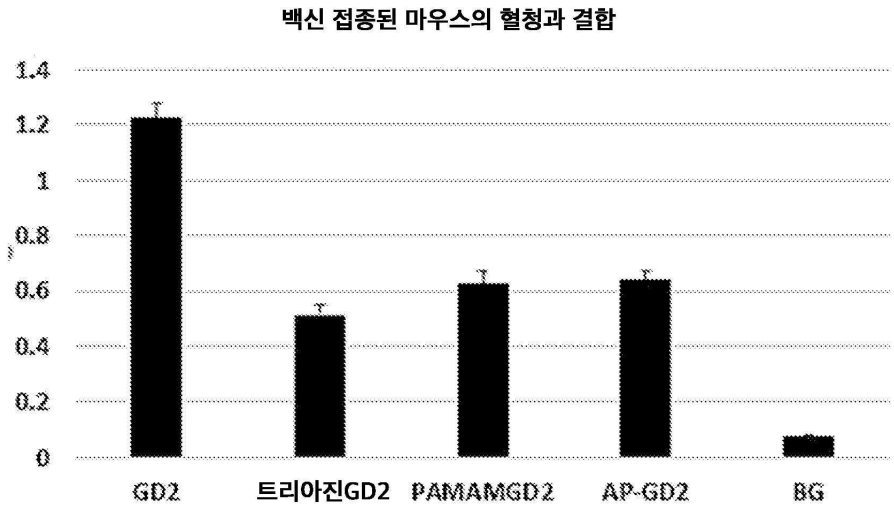
도면18d



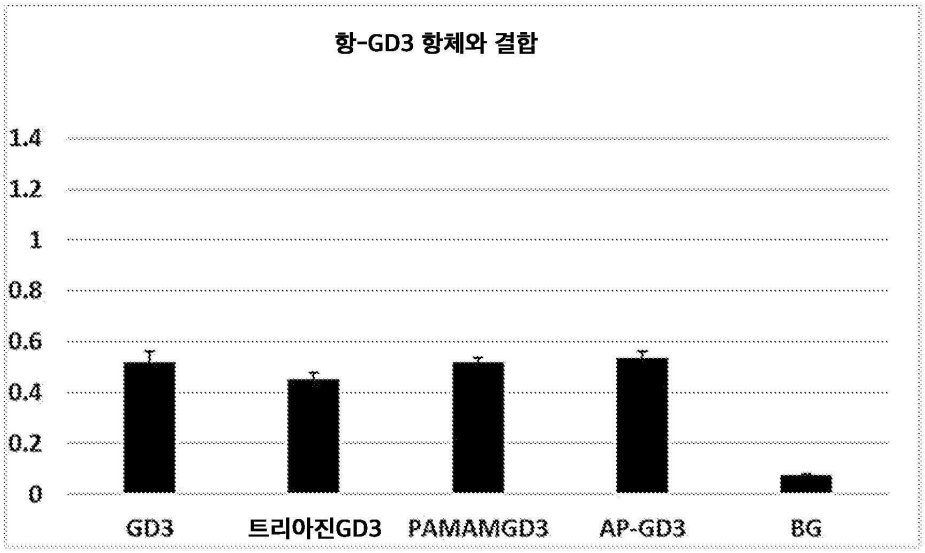
도면19a


항-GD2 항체와 결합
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
대조군
트리아진GD2
PAMAMGD2
AP-GD2
BG

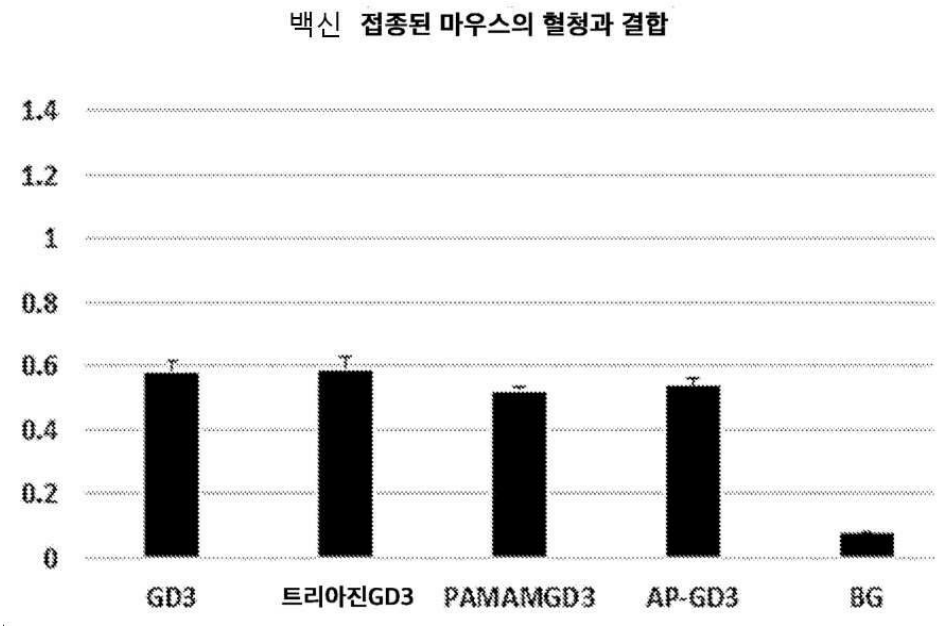
도면19b


백신 접종된 마우스의 혈청과 결합
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
GD2
트리아진GD2
PAMAMGD2
AP-GD2
BG

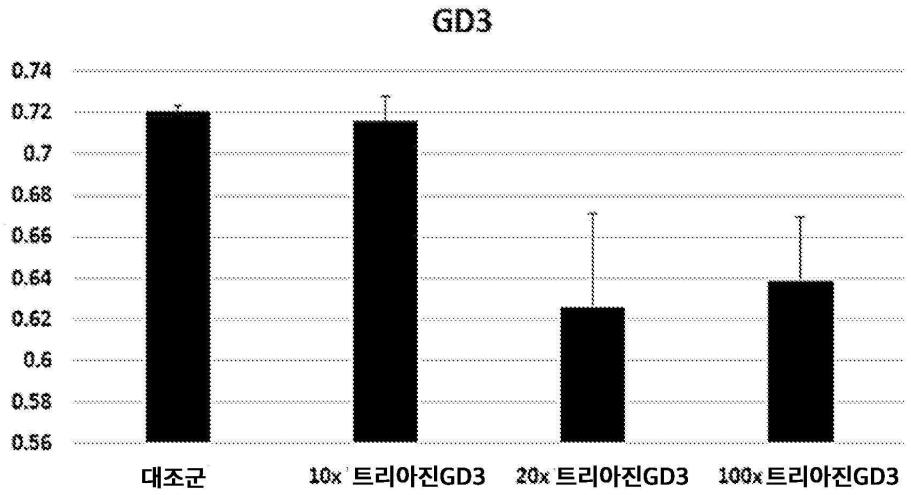
도면19c


항-GD3 항체와 결합
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
GD3
트리아진GD3
PAMAMGD3
AP-GD3
BG

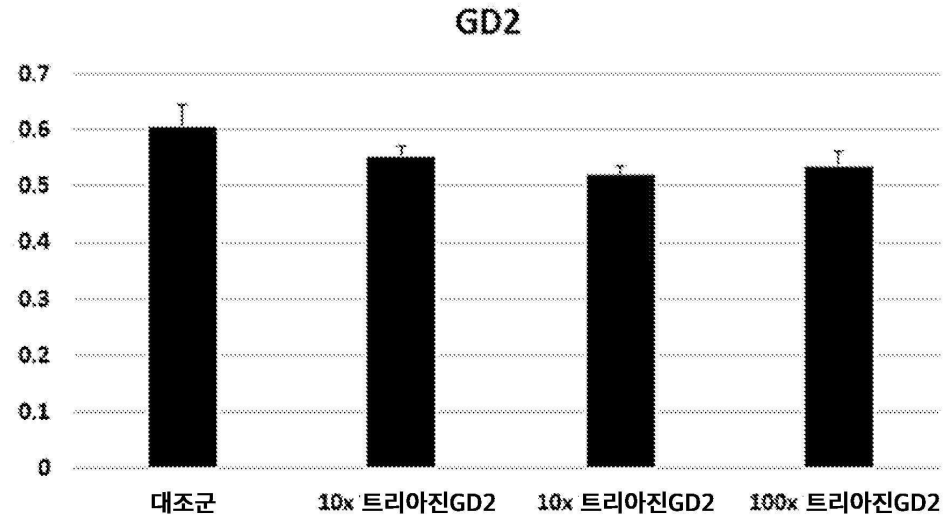
도면19d


백신 접종된 마우스의 혈청과 결합
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
GD3
트리아진GD3
PAMAMGD3
AP-GD3
BG

도면20a



도면20b



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> AOA DX

<120> COMPOSITIONS AND METHODS FOR CANCER DIAGNOSIS

<130> AOS-00125

<140> PCT/US2021/053503

<141> 2021-10-05

<150> 63/087,427

<151> 2020-10-05

<160> 192

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 1

ggctacacat ttaccaggta ctgg 24

<210> 2

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 2

Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr Trp
1 5

<210> 3

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 3

atttatcctg gaaatagtga tact 24

<210> 4

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 4

Ile Tyr Pro Gly Asn Ser Asp Thr

1 5

<210> 5

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 5

gcaagatccg atggtcctat ggactac 27

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 6

Ala Arg Ser Asp Gly Pro Met Asp Tyr

1 5

<210> 7

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 7

gaaagtgttg ataattatgg catcagtttt 30

<210> 8

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 8

Glu Ser Val Asp Asn Tyr Gly Ile Ser Phe

1 5 10

<210> 9

<211> 9

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 9

gctgcatcc 9

<210> 10

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 10

Ala Ala Ser

1

<210> 11

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 11

cagcaaagta aggaggttcc gttcacg 27

<210> 12

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 12

Gln Gln Ser Lys Glu Val Pro Phe Thr

1 5

<210> 13

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 13

acctatggaa tgagc 15

<210> 14

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 14

Thr Tyr Gly Met Ser

1 5

<210> 15

<211> 51

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 15

tggataaaca catatactgg agtgccaaca tatggtgatg acttcaaggg a 51

<210> 16

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 16

Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Val Pro Thr Tyr Gly Asp Asp Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 17

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 17

tggttacgcc accatgctat ggactac 27

<210> 18

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 18

Trp Leu Arg His His Ala Met Asp Tyr

1 5

<210> 19

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 19

aaggccagtg agaatgtggt tacttatgtt tcc 33

<210> 20

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 20

Lys Ala Ser Glu Asn Val Val Thr Tyr Val Ser

1 5 10

<210> 21

<211> 21

<212> DNA

<213>

Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 21

ggggcatcca accggtacac t 21

<210> 22

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 22

Gly Ala Ser Asn Arg Tyr Thr

1 5

<210> 23

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 23

ggacagggtt acagctatcc gtacacg 27

<210> 24

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 24

Gly Gln Gly Tyr Ser Tyr Pro Tyr Thr
1 5

<210> 25

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 25

ggattcactt ttagtgacgc ctgg 24

<210> 26

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 26

Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ala Trp
1 5

<210> 27

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 27

attagaaaca aagctaataa tcatgcgaca 30

<210> 28

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220

><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 28

Ile Arg Asn Lys Ala Asn Asn His Ala Thr

1 5 10

<210> 29

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 29

accaggcgac atgattccta ctttgactac 30

<210> 30

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 30

Thr Arg Arg His Asp Ser Tyr Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 31

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 31

caggatgtgg atactgct 18

<210> 32

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 32

Gln Asp Val Asp Thr Ala

1 5

<210> 33

<211> 9

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 33

tgggcatcc 9

<210> 34

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 34

Trp Ala Ser

1

<210> 35

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 35

cagcaatatc gcagctatcc tctcacg 27

<210> 36

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 36

Gln Gln Tyr Arg Ser Tyr Pro Leu Thr
1 5

<210> 37

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 37

ggctacacat ttaccagtta ctgg 24

<210> 38

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 38

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp
1 5

<210> 39

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 39

atttatcctg gaaaaagtgg tact 24

<210> 40

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220

><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 40

Ile Tyr Pro Gly Lys Ser Gly Thr

1 5

<210> 41

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 41

acaagatccg atggtcctat ggactac 27

<210> 42

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 42

Thr Arg Ser Asp Gly Pro Met Asp Tyr

1 5

<210> 43

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 43

gagagtgttg ataattatga cattagtttt 30

<210> 44

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 44

Glu Ser Val Asp Asn Tyr Asp Ile Ser Phe

1 5 10

<210> 45

<211> 9

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 45

gctgcatcc 9

<210> 46

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 46

Ala Ala Ser

1

<210> 47

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 47

cagcaaagta aggaggttcc gtacacg 27

<210> 48

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 48

Gln Gln Ser Lys Glu Val Pro Tyr Thr
1 5

<210> 49

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 49

gactacaaca tggac 15

<210> 50

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 50

Asp Tyr Asn Met Asp
1 5

<210> 51

<211> 51

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 51

gatattaatc ctaacaatgg tggtactatc tacaaccaga agttcaaggg c 51

<210> 52

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 52

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

1 5 10 15

Gly

<210> 53

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 53

tcggggatct actatgatta cgcctggttt ccttac 36

<210> 54

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 54

Ser Gly Ile Tyr Tyr Asp Tyr Ala Trp Phe Pro Tyr

1 5 10

<210> 55

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 55

agtgcaagtc agggcattag caattattta aac 33

<210> 56

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 56

Ser Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Tyr Leu Asn

1 5 10

<210> 57

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 57

tacacatcaa gtttacactc a 21

<210> 58

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 58

Tyr Thr Ser Ser Leu His Ser

1 5

<210> 59

<211> 27

<212
> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 59

cagcagtata gtaagcttcc tcctacg 27

<210> 60

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 60

Gln Gln Tyr Ser Lys Leu Pro Pro Thr
1 5

<210> 61

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 61

gactacaaca tggac 15

<210> 62

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 62

Asp Tyr Asn Met Asp
1 5

<210> 63

<211> 51

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 63

gatattaatc ctaacaatgg tggtactatc tacaaccaga agttcaaggg c 51

<210> 64

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 64

Asp Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Ile Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
1 5 10 15
Gly

<210> 65

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 65

tcggggatct actatgatta cgcctggttt ccttac 36

<210> 66

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 66

Ser Gly Ile Tyr Tyr Asp Tyr Ala Trp Phe Pro Tyr
1 5 10

<210> 67

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 67

agtgcaagtc agggcattag caattattta aac 33

<210> 68

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 68

Ser Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Tyr Leu Asn

1 5 10

<210> 69

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 69

tacacatcaa gtttacactc a 21

<210> 70

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 70

Tyr Thr Ser Ser Leu His Ser

1 5

<210> 71

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 71

cagcagtata gtaagcttcc tcctacg 27

<210> 72

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 72

Gln Gln Tyr Ser Lys Leu Pro Pro Thr

1 5

<210> 73

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 73

gactatgaaa tgcac 15

<210> 74

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 74

Asp Tyr Glu Met His

1 5

<210> 75

<211> 51

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 75

gctattgatc ctgaaactgg tggtactgcc tacaatcaga agttcaaggg c 51

<210> 76

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 76

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

1 5 10 15

Gly

<210> 77

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 77

agctgggacg gagactac 18

<210> 78

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 78

Ser Trp Asp Gly Asp Tyr

1 5

<210> 79

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 79

aaggccagtc agaatgtggg tactaatgta gcc 33

<210> 80

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 80

Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn Val Ala

1 5 10

<210> 81

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 81

tcggcatcct accggtacag t 21

<210> 82

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 82

Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser
1 5

<210> 83

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 83

cagcaatata acagctatcc attcacg 27

<210> 84

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 84

Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Phe Thr
1 5

<210> 85

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 85

gactacaaca tggac 15

<210> 86

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 86

Asp Tyr Asn Met Asp
1 5

<210> 87

<211> 51

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 87

gatattaatc ctaacaatgg tggtactatc tacaaccaga agttcaaggg c 51

<210> 88

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 88

Asp Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Ile Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 89

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 89

tcggggatct actatgatta cgcctggttt ccttac 36

<210> 90

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 90

Ser Gly Ile Tyr Tyr Asp Tyr Ala Trp Phe Pro Tyr
1 5 10

<210> 91

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 91

agtgcaagtc agggcattag caattattta aac 33

<210> 92

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 92

Ser Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Tyr Leu Asn
1 5 10

<210> 93

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 93

tacacatcaa gtttacactc a 21

<210> 94

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 94

Tyr Thr Ser Ser Leu His Ser
1 5

<210> 95

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 95

cagcagtata gtaagcttcc tcctacg 27

<210> 96

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 96

Gln Gln Tyr Ser Lys Leu Pro Pro Thr
1 5

<210> 97

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 97

ggattcactt ttagtgacgc ctgg 24

<210> 98

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 98

Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ala Trp

1 5

<210> 99

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 99

attagaaaca aagctaataa tcatgcgaca 30

<210> 100

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 100

Ile Arg Asn Lys Ala Asn Asn His Ala Thr

1 5 10

<210> 101

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 101

accgggcgac atgattccta ctttgactac 30

<210> 102

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 102

Thr Gly Arg His Asp Ser Tyr Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 103

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 103

cagggcatta gcaattat 18

<210> 104

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 104

Gln Gly Ile Ser Asn Tyr

1 5

<210> 105

<211> 9

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 105

tacacatca 9

<210> 106

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 106

Tyr Thr Ser

1

<210> 107

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 107

cagcagtata gtaagcttcc tcctacg 27

<210> 108

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 108

Gln Gln Tyr Ser Lys Leu Pro Pro Thr

1 5

<210> 109

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 109

ggctacacct tcaccagcta ctgg 24

<210> 110

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 110

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp

1 5

<210> 111

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 111

atttatcctg gtagtggtag tact 24

<210> 112

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 112

Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Ser Thr

1 5

<210> 113

<211> 51

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 113

gcaagccacc gatttgatta ctacggtagt agctactatg ctatggacta c 51

<210> 114

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 114

Ala Ser His Arg Phe Asp Tyr Tyr Gly Ser Ser Tyr Tyr Ala Met Asp

1 5 10 15

Tyr

<210> 115

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 115

caggacattt gcaattat 18

<210> 116

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 116

Gln Asp Ile Cys Asn Tyr

1 5

<210> 117

<211> 9

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 117

tacacatca 9

<210> 118

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 118

Tyr Thr Ser
1

<210> 119

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 119

caacagggta atacgcttcc gctcacg 27

<210> 120

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 120

Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Leu Thr
1 5

<210> 121

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 121

ggatacacgt tcactgactt ccac 24

<210> 122

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 122

Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Phe His

1 5

<210> 123

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 123

attaatccta acaatggtgg tact 24

<210> 124

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 124

Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr

1 5

<210> 125

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 125

gtaagagaaa tctactttgg ctttgactac 30

<210> 126

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 126

Val Arg Glu Ile Tyr Phe Gly Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 127

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 127

caggacattt gcaattat 18

<210> 128

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 128

Gln Asp Ile Cys Asn Tyr

1 5

<210> 129

<211> 9

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 129

tacacatca 9

<210> 130

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 130

Tyr Thr Ser

1

<210> 131

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 131

caacagggta atacgcttcc gctcacg 27

<210> 132

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 132

Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Leu Thr

1 5

<210> 133

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 133

ggatacacat tcactaaata cacc 24

<210> 134

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 134

Gly Tyr Thr Phe Thr Lys Tyr Thr

1 5

<210> 135

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 135

attaatccta acaatggtgg tact 24

<210> 136

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 136

Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr

1 5

<210> 137

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 137

acaagcaagt cctttgacta c 21

<210> 138

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 138

Thr Ser Lys Ser Phe Asp Tyr

1 5

<210> 139

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 139

tcaagtgtaa gtaac 15

<210> 140

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 140

Ser Ser Val Ser Asn

1 5

<210> 141

<211> 9

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 141

agcacatcc 9

<210> 142

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 142

Ser Thr Ser

1

<210> 143

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 143

caacaaagga gtggttaccc attcacg 27

<210> 144

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 144

Gln Gln Arg Ser Gly Tyr Pro Phe Thr

1 5

<210> 145

<211> 348

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

polynucleotide

<400> 145

caagtacagc tggaggagtc tgggactgtg ctggcaaggc ctggggcttc agtgaagatg 60

tcctgcaaga cttctggcta cacatttacc aggtactgga tgcactgggt aaaacagagg 120

cctggacagg gtctggaatg gataggggct atttatcctg gaaatagtga tactacctac 180

aaccagaagt tcaagggcaa ggccaaactg actgcagtca catccgccac caatgcctac 240

atggaagtaa gcagcctgac aaatgaggac tctgcggtct attactgtgc aagatccgat 300

ggtcctatgg actactgggg tcaaggaacc tcagtcaccg tctcctca 348

<210> 146

<211

> 116

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

polypeptide

<400> 146

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Lys Gly Lys Ala Lys Leu Thr Ala Val Thr Ser Ala Thr Asn Ala Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Thr Val Ser Ser

115

<210> 147

<211> 326

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 147

gacattgtac tgacccaatc tccagcttct ttggctgtgt ctctagggca gagggccacc 60

atttcctgca gagccagcga aagtgttgat aattatggca tcagttttat gaactggttc 120

caacagaaac caggacagcc acccaaactc ctcatctatg ctgcatccaa tcaaggatcc 180

ggggtccctg ccaggtttag tggcagtggg tctgggacag acttcagtct caacatccat 240

cctatggagg aggatgatac tgcaatgtat ttctgtcagc aaagtaagga ggttccgttc 300

acgttcggag gggggaccaa gctgga 326

<210> 148

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 148

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

1 5 10 15

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr

20 25 30

Gly Ile Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro

35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Gln Gly Ser Gly Val Pro Ala

50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser Leu Asn Ile His

65 70 75 80

Pro Met Glu Glu Asp Asp Thr Ala Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Lys

85 90 95

Glu Val Pro Phe Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu

100 105

<210> 149

<211> 354

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 149

cagatccagt tggtacaatc tggacctgag ctgaagaagc ctggagagac agtcaagatc 60

tcctgcaagg cttctggata ttccttcaca acctatggaa tgagctgggt gaaacaggct 120

ccaggaaagg gtttaaagtg gatgggctgg ataaacacat atactggagt gccaacatat 180

ggtgatgact tcaagggacg gtttgccttc tctttggaaa cctctaccag cactgcctat 240

ttgcagatca acaacctcaa aaatgacgac acggcttcat atttctgtgc aagatggtta 300

cgccaccatg ctatggacta ctggggtcaa ggaacctcag tcaccgtctc ctca 354

<210> 150

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 150

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met
35 40 45
Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Val Pro Thr Tyr Gly Asp Asp Phe
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Asn Asp Asp Thr Ala Ser Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Arg Trp Leu Arg His His Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110
Ser Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 151
<211> 321
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide
<400> 151
aacattgtaa tgacccaatc tcccaaatcc atgtccatgt cagtaggaga gagggtcacc 60
ttgacctgca aggccagtga gaatgtggtt acttatgttt cctggtatca acagaaacca 120
gagcagtctc ctaaactgct gatatacggg gcatccaacc ggtacactgg ggtccccgat 180

cgcttcacag gcagtggatc tgcaacagat ttcactctga ccatcagcag tgtgcaggct 240
gaagaccttg cagattatca ctgtggacag ggttacagct atccgtacac gttcggaggg 300
gggaccaagc tggaaataaa a 321
<210> 152
<211> 107
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 152

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 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 Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 153

<211> 357

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 153

caggttcagc tggagcagtc tggaggagcc ttggtgcaac ctggaggatc catgaaactc 60

tcttgtgctg cctctggatt cacttttagt gacgcctgga tggactgggt ccgccagtct 120

ccagaaaagg ggcttgagtg ggttgctgaa attagaaaca aagctaataa tcatgcgaca 180

tactatgctg agtctgtgaa agggaggttc accatctcaa gagatgattc caaaaatagt 240

gtctacctgc aaatgaacaa cttaagagct gaagacactg gcatttatta ttgtaccagg 300

cgacatgatt cctactttga ctactggggc caaggcacca ctctcacagt ctcctca 357

<210> 154

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

polypeptide

<400> 154

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

1 5 10 15

Ser Met Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ala

20 25 30

Trp Met Asp Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ala Glu Ile Arg Asn Lys Ala Asn Asn His Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu

50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser

65 70 75 80

Val Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Arg Ala Glu Asp Thr Gly Ile Tyr

85 90 95

Tyr Cys Thr Arg Arg His Asp Ser Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser

115

<210> 155

<211> 324

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

polynucleotide

<400> 155

gacattgtga tgacccagtc tcacaaattc atgtccacat cagtaggaga cagggtcagc 60

atcacctaca aggccagtca ggatgtggat actgctgtag cctggtatca acagaaacca 120

gggcaatctc ctaaactact gatttactgg gcatccaccc ggcacactgg agtccctgat 180

cgcttcacag gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccattaacaa tgtgcagtct 240

gaagacttgg cagattattt ctgtcagcaa tatcgcagct atcctctcac gttcggtgct 300

gggaccaagc tggaactgaa acgg 324

<210> 156

<211

> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

polypeptide

<400> 156

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 Tyr Lys Ala Ser Gln Asp Val Asp Thr Ala

20 25 30

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

35 40 45

Tyr Trp 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 Asn Asn Val Gln Ser

65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Arg Ser Tyr Pro Leu

85 90 95

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg

100 105

<210> 157

<

211> 348

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

polynucleotide

<400> 157

gaagtaaagc tgcaggagtc tgggactgag ctggcaaggc ctggggcttc agtgaagatg 60

tcctgcaaga cttctggcta cacatttacc agttactgga tgcactgggt aaaacagagg 120

cctggacagg gtctggaatg gataggggct atttatcctg gaaaaagtgg tactacctac 180

aaccagaagt tcaagggcaa ggccaaactg actgcagtca catccgccag cactgcctac 240

atggaactca gcagcctgac aaatgaggac tctgcggtct attactgtac aagatccgat 300

ggtcctatgg actactgggg tcaaggaacc tcagtcaccg tctcctca 348

<210> 158

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 158

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

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Lys Ser Gly Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Lys Leu Thr Ala Val Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Asn Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Thr Arg Ser Asp Gly Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 159

<211> 336

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 159

gacattgtgc tgacccaatc tccagcttct ttggctgtgt ctctagggca gagggccacc 60

atctcctgca gagccagcga gagtgttgat aattatgaca ttagttttat gaactggttc 120

caacagaaac caggacagcc acccaaactc ctcatctatg ctgcatccaa ccaaggatcc 180

ggggtccctg ccaggttcag tggcagtggg tctgggacag acttcagtct caacatccat 240

cctatggagg aggatgatac tgcaatgtat ttctgtcagc aaagtaagga ggttccgtac 300

acgttcggag gggggaccaa gctggaaata aaacgg 336

<210> 160

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 160

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

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

Asp Ile Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Gln Gly Ser Gly Val Pro Ala
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser Leu Asn Ile His
65 70 75 80

Pro Met Glu Glu Asp Asp Thr Ala Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Lys
85 90 95

Glu Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105 110

<210> 161

<211> 363

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

polynucleotide

<400> 161

gaggtccagc tgcaacagtc tggacctgag ctggtgaagc ctggggcttc agtgaagata 60

ccctgcaagg cttctggata cacattcact gactacaaca tggactgggt gaaacagagc 120

catggaaaga gccttgagtg gattggagat attaatccta acaatggtgg tactatctac 180

aaccagaagt tcaagggcaa ggccacattg actgtagaca agtcctccag cacagcctac 240

atggagctcc gcagcctgac atctgaggac actgcagtct attactgtgc aagatcgggg 300

atctactatg attacgcctg gtttccttac tggggccaag ggactctggt cactgtctct 360

gca 363

<210> 162

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

polypeptide

<400> 162

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Asn Met Asp Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala

115 120

<210> 163

<211> 321

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

polynucleotide

<400> 163

gatatccaga tgacacagac tacatcctcc ctgtctgcct ctctgggaga cagagtcacc 60

atcagttgca gtgcaagtca gggcattagc aattatttaa actggtatca gcagaaacca 120

gatggaactg ttaaactcct gatctattac acatcaagtt tacactcagg agtcccatca 180

aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagat tattctctca ccatcagcaa cctggaacct 240

gaagatattg ccacttacta ttgtcagcag tatagtaagc ttcctcctac gttcggtgct 300

gggaccaagc tggagctgaa a 321

<210> 164

<211

> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

polypeptide

<400> 164

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Tyr

20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Tyr Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Pro

65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Lys Leu Pro Pro

85 90 95

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

<210> 165

<211> 364

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 165

gaggtccagc tgcaacagtc tggacctgag ctggtgaagc ctggggcttc agtgaagata 60

ccctgcaagg cttctggata cacattcact gactacaaca tggactgggt gaaacagagc 120

catggaaaga gccttgagtg gattggagat attaatccta acaatggtgg tactatctac 180

aaccagaagt tcaagggcaa ggccacattg actgtagaca agtcctccag cacagcctac 240

atggagctcc gcagcctgac atctgaggac actgcagtct attactgtgc aagatcgggg 300

atctactatg attacgcctg gtttccttac tggggccaag ggactctggt cactgtctct 360

gcag 364

<210> 166

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 166

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

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

Asn Met Asp Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Asp Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Ile Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala

115 120

<210> 167

<211> 322

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 167

gatatccaga tgacacagac tacatcctcc ctgtctgcct ctctgggaga cagagtcacc 60

atcagttgca gtgcaagtca gggcattagc aattatttaa actggtatca gcagaaacca 120

gatggaactg ttaaactcct gatctattac acatcaagtt tacactcagg agtcccatca 180

aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagat tattctctca ccatcagcaa cctggaacct 240

gaagatattg ccacttacta ttgtcagcag tatagtaagc ttcctcctac gttcggtgct 300

gggaccaagc tggagctgaa ac 322

<210> 168

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 168

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Tyr

20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Tyr Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Pro

65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Lys Leu Pro Pro

85 90 95

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys

100 105

<210> 169

<211> 345

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 169

caggttcaac tgcagcagtc tggggctgag ctggtgaggc ctggggcttc agtgacgctg 60

tcctgcaagg cttcgggcta cacatttact gactatgaaa tgcactgggt gaagcagaca 120

cctgtgcatg gcctggaatg gattggagct attgatcctg aaactggtgg tactgcctac 180

aatcagaagt tcaagggcaa ggccatactg actgcagaca aatcctccag cacagcctac 240

atggagctcc gcagcctgac atctgaggac tctgccgtct attactgtac aagaagctgg 300

gacggagact actggggcca aggcaccact ctcacagtct cctca 345

<210> 170

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 170

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

1 5 10 15

Ser Val Thr Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr

20 25 30

Glu Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Val His Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Arg Ser Trp Asp Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr

100 105 110

Val Ser Ser

115

<210> 171

<211> 321

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

polynucleotide

<400> 171

gacattgtga tgacccagtc tcaaaaattc atgtccacat cagtaggaga cagggtcagc 60

gtcacctgca aggccagtca gaatgtgggt actaatgtag cctggtatca acagaaacca 120

gggcaatctc ctaaagcact gatttactcg gcatcctacc ggtacagtgg agtccctgat 180

cgcttcacag gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcaa tgtgcagtct 240

gaagacttgg cagagtattt ctgtcagcaa tataacagct atccattcac gttcggctcg 300

gggacaaagt tggaaataaa a 321

<210> 172

<211

> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

polypeptide

<400> 172

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

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser 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 Ala Glu Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Phe
85 90 95
Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 173

<211> 364

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 173

gaggtccagc tgcaacagtc tggacctgag ctggtgaagc ctggggcttc agtgaagata 60
ccctgcaagg cttctggata cacattcact gactacaaca tggactgggt gaaacagagc 120
catggaaaga gccttgagtg gattggagat attaatccta acaatggtgg tactatctac 180
aaccagaagt tcaagggcaa ggccacattg actgtagaca agtcctccag cacagcctac 240
atggagctcc gcagcctgac atctgaggac actgcagtct attactgtgc aagatcgggg 300

atctactatg attacgcctg gtttccttac tggggccaag ggactctggt cactgtctct 360
gcag 364

<210> 174

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 174

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

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

Asn Met Asp Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Asp Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Ile Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Ser Gly Ile Tyr Tyr Asp Tyr Ala Trp Phe Pro Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
115 120

<210> 175

<211> 322

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 175

gatatccaga tgacacagac tacatcctcc ctgtctgcct ctctgggaga cagagtcacc 60

atcagttgca gtgcaagtca gggcattagc aattatttaa actggtatca gcagaaacca 120

gatggaactg ttaaactcct gatctattac acatcaagtt tacactcagg agtcccatca 180

aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagat tattctctca ccatcagcaa cctggaacct 240

gaagatattg ccacttacta ttgtcagcag tatagtaagc ttcctcctac gttcggtgct 300

gggaccaagc tggagctgaa ac 322

<210> 176

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 176

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Tyr

20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Tyr Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Pro

65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Lys Leu Pro Pro

85 90 95

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys

100 105

<210> 177

<211> 357

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 177

caagttcagc tgcaggagtc tggaggagcc ttggtgcaac ctggaggatc catgaaactc 60

tcttgtgctg cctctggatt cacttttagt gacgcctgga tggactgggt ccgccagtct 120

ccagaaaagg ggcttgagtg ggttgctgaa attagaaaca aagctaataa tcatgcgaca 180

tactatgctg agtctgtgaa agggaggttc accatctcaa gagatgattc caaaaatagt 240

gtctacctgc aaatgaacaa cttaagagct gaggacactg gcatttatta ctgtaccggg 300

cgacatgatt cctactttga ctactggggc caaggcacca ctctcacagt ctcctca 357

<210> 178

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 178

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Ala Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Met Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ala
20 25 30

Trp Met Asp Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Glu Ile Arg Asn Lys Ala Asn Asn His Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu
50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser
65 70 75 80

Val Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Arg Ala Glu Asp Thr Gly Ile Tyr
85 90 95

Tyr Cys Thr Gly Arg His Asp Ser Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
115

<210> 179

<211> 324

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 179

gatatccaga tgacacagac tacatcctcc ctgtctgcct ctctgggaga cagagtcacc 60

atcagttgca gtgcaagtca gggcattagc aattatttaa actggtatca gcagaaacca 120

gatggaactg ttaaactcct gatctattac acatcaagtt tacactcagg agtcccatca 180

aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagat tattctctca ccatcagcaa cctggaacct 240

gaagatattg ccacttacta ttgtcagcag tatagtaagc ttcctcctac gttcggtgct 300

gggaccaagc tggagctgaa acgg 324

<210> 180

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 180

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

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

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile
35 40 45

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

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

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

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

<210> 181

<

211> 372

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 181

gaggtccagc tggaggagtc tggggctgag cttgtgaagc ctggggcttc ggtgaagatg 60

tcctgtaagg cttctggcta caccttcacc agctactgga taacctgggt gaagcagagg 120

cctggacaag gccttgagtg gattggagat atttatcctg gtagtggtag tactaactac 180

aatgagaagt tcaagagcaa ggccacactg actgtagaca catcctccag cacaacctac 240

atgcagctca gcagcctgac atctgaggac tctgcggtct attactgtgc aagccaccga 300

tttgattact acggtagtag ctactatgct atggactact ggggtcaagg aacctcagtc 360

accgtctcct ca 372

<210> 182

<211> 124

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 182

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

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

Trp Ile Thr Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Asp Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Ser Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Ser Ser Thr Thr Tyr
65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ser His Arg Phe Asp Tyr Tyr Gly Ser Ser Tyr Tyr Ala Met Asp
100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 183

<211> 324

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 183

gatatccaga tgacacagac tacatcctcc ctgtctgcct ctctgggaga cagagtcacc 60

atcagttgca gggcaagtca ggacatttgc aattatttaa actggtatca gcagaaacca 120

gatggacctt ttaaactcct gatcttctac acatcaagat tacactcagg agtcccatca 180

aggttcagtg gcagtgggtc tggaacagat tattctctca ccattagcaa cctggagcaa 240

gaagatattg ccacttactt ttgccaacag ggtaatacgc ttccgctcac gttcggtgct 300

gggaccaagc tggagctgaa acgg 324

<210> 184

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 184

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Cys Asn Tyr

20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Pro Phe Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Phe Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln

65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Leu

85 90 95

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg

100 105

<210> 185

<211> 351

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 185

gaagtacagc tggaggagtc tggacctgag ctggtgaagc ctgggacttc agtgaagata 60

tcctgtaagg cttctggata cacgttcact gacttccaca ttaactgggt gaaacagagc 120

catggaaaga accttgagtg gattggagat attaatccta acaatggtgg tactaactac 180

aaccagaaat tcaagggcaa ggccacattg attgttgaca agtcttccag cgcagcctac 240

atggagctcc gcagcctgac atctgaggac tctgcagtct attattgtgt aagagaaatc 300

tactttggct ttgactactg gggccaaggc accactctca cagtctcctc a 351

<210> 186

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 186

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

1 5 10 15

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

20 25 30

His Ile Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Asn Leu Glu Trp Ile

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Val Arg Glu Ile Tyr Phe Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr

100 105 110

Leu Thr Val Ser Ser

115

<210> 187

<211> 324

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide

<400> 187

gatatccaga tgacacagac tacatcctcc ctgtctgcct ctctgggaga cagagtcacc 60

atcagttgca gggcaagtca ggacatttgc aattatttaa actggtatca gcagaaacca 120

gatggacctt ttaaactcct gatcttctac acatcaagat tacactcagg agtcccatca 180

aggttcagtg gcagtgggtc tggaacagat tattctctca ccattagcaa cctggagcaa 240

gaagatattg ccacttactt ttgccaacag ggtaatacgc ttccgctcac gttcggtgct 300

gggaccaagc tggagctgaa acgg 324

<210> 188

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 188

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Cys Asn Tyr

20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Pro Phe Lys Leu Leu Ile

35 40 45

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

<210> 189

<

211> 342

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 189

gaagtgaagc tggaggagtc tggacctgag ctggtgaagc ctggggcttc agtgaagata 60
tcctgcaaga cttctggata cacattcact aaatacacca tgcactgggt gaagcagagc 120
catggaaaga gccttgagtg gattggagat attaatccta acaatggtgg tactaactac 180
aaccagaagt tcaagggcac ggccacattg actgtacaca agtcctccac cacagcctac 240
atggagctcc gcagcctgac atctgaggat tctgcagtct attactgtac aagcaagtcc 300

tttgactact ggggccaagg caccactctc acagtctcct ca 342

<210> 190

<211> 114

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 190

Glu Val Lys Leu Glu Glu Ser Gly Pro 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 Lys Tyr

20 25 30

Thr Met His Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile

35 40 45

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

50 55 60

Lys Gly Thr Ala Thr Leu Thr Val His Lys Ser Ser Thr Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Ser Lys Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val

100 105 110

Ser Ser

<210> 191

<211> 321

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 191

caaattgttc tcacccagtc tccagcaatc atgtctgcat ctccagggga gaaggtcacc 60

ataacctgca gtgccagctc aagtgtaagt aacatacact ggttccagca gaagccaggc 120

acttttccca aactctggat ttatagcaca tccaccctgg cttctggagt ccctggtcgc 180

ttcagtggca gtggatctgg gacctcttac tctctcacaa tcagccgaat gggggctgaa 240

gatgctgcca cttattactg ccaacaaagg agtggttacc cattcacgtt cggctcgggg 300

acaaagttgg aaataaaacg g 321

<210> 192

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 192

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

His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Thr Phe Pro Lys Leu Trp Ile Tyr
        35                  40                  45
Ser Thr Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Gly Arg Phe Ser Gly Ser
    50                  55                  60
Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Met Gly Ala Glu
65                  70                  75                  80
Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Gly Tyr Pro Phe Thr
                85                  90                  95

Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
            100                 105
```