(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0075604
(43) 공개일자 2025년05월28일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 16/2827 (2013.01)
A61P 35/00 (2018.01)
(21) 출원번호 10-2025-7012354
(22) 출원일자(국제) 2023년09월21일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2025년04월15일
(86) 국제출원번호 PCT/CN2023/120292
(87) 국제공개번호 WO 2024/061306
국제공개일자 2024년03월28일
(30) 우선권주장
PCT/CN2022/120415 2022년09월22일 중국(CN)

(71) 출원인
상하이 헨리우스 바이오테크, 인크.
중국 201210 상하이 푸둥 디스트릭트 차이나 (상하이) 파일럿 프리 트레이드 존 캉난 로드 넘버 222 콤플렉스 빌딩 룸 330
상하이 헨리우스 바이올로직스 컴퍼니 리미티드
중국 201616 상하이 송지앙 디스트릭트 딩유안 로드 래인 618 넘버 1 빌딩 29 룸 617
상하이 헨리우스 바이오파마슈티칼 컴퍼니 리미티드
중국 200233 상하이 쉬후이 디스트릭트 이산 로드 넘버 1289 빌딩 1 (빌딩 디)
(72) 발명자
창, 젠-콴
중국 상하이 201210 푸동 뉴 에리아 차이나 (상하이) 파일럿 프리 트레이드 존 강난 로드 넘버 222 컴플렉스 빌딩 룸 330
수, 웬펑
중국 상하이 201210 푸동 뉴 에리아 차이나 (상하이) 파일럿 프리 트레이드 존 강난 로드 넘버 222 컴플렉스 빌딩 룸 330
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
공병욱

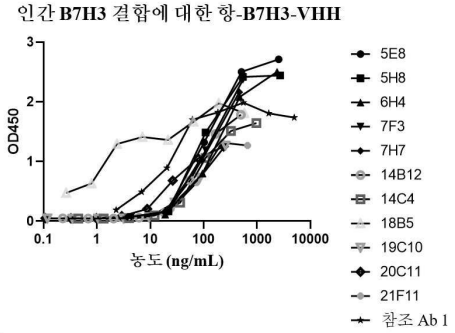
전체 청구항 수 : 총 86 항

(54) 발명의 명칭 **항-B7H3 항체 및 사용 방법**

(57) 요 약

본 개시는 B7H3(CD276로도 알려짐)에 결합하는 항체 및 항체 유도체 및 이를 사용하는 방법에 관한 것이다. 특정 실시양태에서, 본원에서 개시되는 항체 또는 항체 유도체는 B7H3에 결합하는 단일 도메인 항체를 포함한다.

대 표 도



(52) CPC특허분류
A61K 2039/505 (2013.01)
C07K 2317/31 (2013.01)
C07K 2317/33 (2013.01)
C07K 2317/41 (2013.01)
C07K 2317/52 (2013.01)
C07K 2317/567 (2013.01)
C07K 2317/569 (2013.01)
C07K 2317/734 (2013.01)
C07K 2317/92 (2013.01)

(72) 발명자
지앙, 웨이-동
중국 상하이 201210 푸동 뉴 에리아 차이나 (상하이) 파일럿 프리 트레이드 존 강난 로드 넘버 222 컴플렉스 빌딩 룸 330
이사프라스, 하산
중국 상하이 201210 푸동 뉴 에리아 차이나 (상하이) 파일럿 프리 트레이드 존 강난 로드 넘버 222 컴플렉스 빌딩 룸 330
수, 지에
중국 상하이 201210 푸동 뉴 에리아 차이나 (상하이) 파일럿 프리 트레이드 존 강난 로드 넘버 222 컴플렉스 빌딩 룸 330
린, 페이-후와
중국 상하이 201210 푸동 뉴 에리아 차이나 (상하이) 파일럿 프리 트레이드 존 강난 로드 넘버 222 컴플렉스 빌딩 룸 330

명 세 서

청구범위

청구항 1

1×10^{-7} M 이하의 KD로 B7H3에 결합하는 단일 도메인 항체를 포함하는, B7H3에 결합하는 항체.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 단일 도메인 항체는 5×10^{-8} M 이하의 KD로 B7H3에 결합하는, 항체.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 단일 도메인 항체는 1×10^{-8} M 이하의 KD로 B7H3에 결합하는, 항체.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단일 도메인 항체는 약 1×10^{-10}M과 약 5×10^{-8} M 사이의 KD로 B7H3에 결합하는, 항체.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단일 도메인 항체는 VHH를 포함하는, 항체.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단일 도메인 항체 또는 상기 VHH는 중쇄 가변 영역(VH)을 포함하는, 항체.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단일 도메인 항체는 B7H3에 결합하기 위해 다음을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하는 참조 항-B7H3 단일 도메인 항체와 교차 경쟁하는, 항체:

a) 서열 번호: 1에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1, 서열 번호: 2에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2 및 서열 번호: 3에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3,

b) 서열 번호: 5에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1, 서열 번호: 6에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2 및 서열 번호: 7에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3,

c) 서열 번호: 9에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1, 서열 번호: 10에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2 및 서열 번호: 11에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3,

d) 서열 번호: 13에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1, 서열 번호: 14에 제시

된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2 및 서열 번호: 15에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3,

e) 서열 번호: 17에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1, 서열 번호: 18에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2 및 서열 번호: 19에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3,

f) 서열 번호: 21에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1, 서열 번호: 22에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2 및 서열 번호: 23에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3,

g) 서열 번호: 25에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1, 서열 번호: 26에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2 및 서열 번호: 27에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3,

h) 서열 번호: 29에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1, 서열 번호: 30에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2 및 서열 번호: 31에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3,

i) 서열 번호: 33에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1, 서열 번호: 34에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2 및 서열 번호: 35에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3,

j) 서열 번호: 37에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1, 서열 번호: 38에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2 및 서열 번호: 39에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3,

k) 서열 번호: 41에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1, 서열 번호: 42에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2 및 서열 번호: 43에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3,

l) 서열 번호: 56에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1, 서열 번호: 57에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2 및 서열 번호: 58에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단일 도메인 항체는 다음을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하는, 항체:

a) 서열 번호: 1, 5, 9, 13, 17, 21, 25, 29, 33, 37, 41 및 56 중 임의의 하나의 아미노산 서열 또는 최대 약 3개의 아미노산 치환을 포함하는 이의 변이체를 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1;

b) 서열 번호: 2, 6, 10, 14, 18, 22, 26, 30, 34, 38, 42 및 57 중 임의의 하나의 아미노산 서열 또는 최대 약 3개의 아미노산 치환을 포함하는 이의 변이체를 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2; 및

c) 서열 번호: 3, 7, 11, 15, 19, 23, 27, 31, 35, 39, 43 및 58 중 임의의 하나의 아미노산 서열 또는 최대 약 3개의 아미노산 치환을 포함하는 이의 변이체를 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단일 도메인 항체는 CDR1 도메인, CDR2 도메인 및 CDR3 도메인을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하며, 상기 CDR1 도메인, 상기 CDR2 도메인 및 상기 CDR3 도메인은 각각 서열 번호: 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40, 44, 48, 52 및 59로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 참조 중쇄 가변 영역에 포함되는 CDR1 도메인, CDR2 도메인 및 CDR3 도메인을 포함하는, 항체.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단일 도메인 항체는 서열 번호: 1에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1, 서열 번호: 2에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2 및 서열 번호: 3에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3을 포함하는, 항체.

청구항 11

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단일 도메인 항체는 서열 번호: 5에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1, 서열 번호: 6에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2 및 서열 번호: 7에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3을 포함하는, 항체.

청구항 12

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단일 도메인 항체는 서열 번호: 9에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1, 서열 번호: 10에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2 및 서열 번호: 11에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3을 포함하는, 항체.

청구항 13

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단일 도메인 항체는 서열 번호: 13에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1, 서열 번호: 14에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2 및 서열 번호: 15에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3을 포함하는, 항체.

청구항 14

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단일 도메인 항체는 서열 번호: 17에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1, 서열 번호: 18에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2 및 서열 번호: 19에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3을 포함하는, 항체.

청구항 15

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단일 도메인 항체는 서열 번호: 21에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1, 서열 번호: 22에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2 및 서열 번호: 23에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3을 포함하는, 항체.

청구항 16

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단일 도메인 항체는 서열 번호: 25에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1, 서열 번호: 26에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2 및 서열 번호: 27에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3을 포함하는, 항체.

청구항 17

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단일 도메인 항체는 서열 번호: 29에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1, 서열 번호: 30에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영

역 CDR2 및 서열 번호: 31에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3을 포함하는, 항체.

청구항 18

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단일 도메인 항체는 서열 번호: 33에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1, 서열 번호: 34에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2 및 서열 번호: 35에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3을 포함하는, 항체.

청구항 19

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단일 도메인 항체는 서열 번호: 37에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1, 서열 번호: 38에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2 및 서열 번호: 39에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3을 포함하는, 항체.

청구항 20

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단일 도메인 항체는 서열 번호: 41에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1, 서열 번호: 42에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2 및 서열 번호: 43에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3을 포함하는, 항체.

청구항 21

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단일 도메인 항체는 서열 번호: 56에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1, 서열 번호: 57에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2 및 서열 번호: 58에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3을 포함하는, 항체.

청구항 22

제1항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단일 도메인 항체는 서열 번호: 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40, 44, 48, 52 및 59로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산과 적어도 약 90% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하는, 항체.

청구항 23

제1항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단일 도메인 항체는 서열 번호: 4에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하는, 항체.

청구항 24

제1항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단일 도메인 항체는 서열 번호: 8에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하는, 항체.

청구항 25

제1항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단일 도메인 항체는 서열 번호: 12에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하는, 항체.

청구항 26

제1항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단일 도메인 항체는 서열 번호: 16에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하는, 항체.

청구항 27

제1항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단일 도메인 항체는 서열 번호: 20에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하는, 항체.

청구항 28

제1항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단일 도메인 항체는 서열 번호: 24에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하는, 항체.

청구항 29

제1항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단일 도메인 항체는 서열 번호: 28에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하는, 항체.

청구항 30

제1항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단일 도메인 항체는 서열 번호: 32에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하는, 항체.

청구항 31

제1항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단일 도메인 항체는 서열 번호: 36에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하는, 항체.

청구항 32

제1항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단일 도메인 항체는 서열 번호: 40에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하는, 항체.

청구항 33

제1항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단일 도메인 항체는 서열 번호: 44에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하는, 항체.

청구항 34

제1항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단일 도메인 항체는 서열 번호: 48에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하는, 항체.

청구항 35

제1항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단일 도메인 항체는 서열 번호: 52에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하는, 항체.

청구항 36

제1항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단일 도메인 항체는 서열 번호: 59에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하는, 항체.

청구항 37

제1항 내지 제36항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단일 도메인 항체는 인간화 프레임워크를 포함하는, 항체.

청구항 38

제1항 내지 제37항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 Fc 영역은 인간 Fc 영역을 포함하는, 항체.

청구항 39

제1항 내지 제38항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 Fc 영역은 IgG, IgA, IgD, IgE 및 IgM의 Fc 영역으로 이루어진 군으로부터 선택되는 Fc 영역을 포함하는, 항체.

청구항 40

제1항 내지 제39항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 Fc 영역은 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4의 Fc 영역으로 이루어진 군으로부터 선택되는 Fc 영역을 포함하는, 항체.

청구항 41

제1항 내지 제40항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 Fc 영역은 IgG1 Fc 영역을 포함하는, 항체.

청구항 42

제41항에 있어서, 상기 IgG1 Fc 영역은 항체 의존성 세포 매개 세포독성(ADCC)을 향상시키는 하나 이상의 돌연변이 또는 변형을 포함하는, 항체.

청구항 43

제41항에 있어서, 상기 IgG1 Fc 영역은 비푸코실화 당 사슬을 포함하는, 항체.

청구항 44

제41항 또는 제42항에 있어서, 상기 IgG1 Fc 영역은 L235V, F243L, R292P 및 Y300L의 돌연변이,와 S239D,

A330L 및 I332E의 돌연변이 또는 L235V, F243L, R292P, Y300L 및 P396L의 돌연변이를 포함하는, 항체.

청구항 45

제41항 또는 제42항에 있어서, 상기 IgG1 Fc 영역은 L235V, F243L, R292P 및 Y300L의 돌연변이를 포함하는, 항체.

청구항 46

제41항 또는 제42항에 있어서, 상기 IgG1 Fc 영역은 S239D, A330L 및 I332E의 돌연변이를 포함하는, 항체.

청구항 47

제41항 또는 제42항에 있어서, 상기 IgG1 Fc 영역은 L235V, F243L, R292P, Y300L 및 P396L의 돌연변이를 포함하는, 항체.

청구항 48

제1항 내지 제47항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 중쇄 가변 영역은 펩티드 링커를 통해 Fc 영역에 연결되는, 항체.

청구항 49

제48항에 있어서, 상기 펩티드 링커는 약 4개 내지 약 30개의 아미노산을 포함하는, 항체.

청구항 50

제48항 또는 제49항에 있어서, 상기 펩티드 링커는 서열 번호: 61~82로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는, 항체.

청구항 51

제1항 내지 제50항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 전장 면역글로불린, 단쇄 Fv(scFv) 단편, Fab 단편, Fab' 단편, F(ab')2, Fv 단편, 이황화 안정화 Fv 단편(dsFv), (dsFv)2, VHH, VHH-Fc 융합체, Fv-Fc 융합체, scFv-Fc 융합체, scFv-Fv 융합체, 디아바디, 트리바디, 테트라바디 또는 이들의 임의의 조합을 포함하는, 항체.

청구항 52

제1항 내지 제51항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 다중특이적 항체, 예를 들어, 이중특이적 항체에 포함되며, 상기 다중특이적 항체는 제2 항원에 특이적으로 결합하는 제2 항체 모이어티를 포함하는, 항체.

청구항 53

제52항에 있어서, 상기 제2 항원은 종양 연관 항원인, 항체.

청구항 54

제53항에 있어서, 상기 종양 연관 항원은 Her-2, EGFR, PDL1, c-Met, B 세포 성숙 항원(BCMA), 탄산 무수화효소 IX(CA1X), 암종배아 항원(CEA), CD5, CD7, CD10, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD34, CD38, CD41, CD44, CD49f, CD56, CD74, CD123, CD133, CD138, CD276(B7H3), 상피 당단백질(EGP2), 세포영약막 세포-표면 항원 2(TROP-2), 상피 당단백질-40(EGP-40), 상피 세포 부착 분자(EpCAM), 수용체 티로신-단백질 키나아제 erb-B2,3,4, 엽산-결합 단백질(FBP), 태아 아세티콜린 수용체(AChR), 엽산 수용체-a, 강글리오사이드 G2(GD2), 강글리오사이드 G3(GD3), 인간 텔로머레이스 역전사효소(hTERT), 키나아제 삽입 도메인 수용체(KDR), 루이스 A(CA 1.9.9), 루이스 Y(LeY), 글리피칸-3(GPC3), L1 세포 부착 분자(L1CAM), 뮤신 16(Muc-16), 뮤신 1(Muc-1), NG2D 리간드, 종양태아성 항원(h5T4), 전립선 줄기 세포 항원(PSCA), 전립선 특이적 막 항원(PSMA), 종양 연관 당단백질 72(TAG-72), Claudin18.2(CLDN18.2), 혈관 상피 성장 인자 R2(VEGF- R2), 윌름스 종양 단백질(WT-1), 1형 티로신-단백질 키나아제 막관통 수용체(ROR1), PVR, PVRL2 및 이들의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 항체.

청구항 55

제54항에 있어서, 상기 제2 항원은 면역 관문 조절제인, 항체.

청구항 56

제55항에 있어서, 상기 면역 관문 조절제는 TIGIT, PD1, CTLA4, LAG-3, 2B4, BTLA 및 이들의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 항체.

청구항 57

제1항 내지 제56항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 치료제 또는 표지에 접합되는, 항체.

청구항 58

제57항에 있어서, 상기 표지는 방사성 동위원소, 형광 염료 및 효소로 이루어진 군으로부터 선택되는, 항체.

청구항 59

치료제 또는 표지에 연결되는, 제1항 내지 제58항 중 어느 한 항에 따른 항체를 포함하는 면역접합체.

청구항 60

제59항에 있어서, 상기 치료제는 세포독소인, 면역접합체.

청구항 61

제59항에 있어서, 상기 치료제는 방사성 동위원소인, 면역접합체.

청구항 62

제1항 내지 제58항 중 어느 한 항에 따른 항체를 포함하는 세포외 항원 결합 도메인을 포함하는, 키메라 항원

수용체(CAR).

청구항 63

제62항에 있어서, 상기 항체는 VHH인, CAR.

청구항 64

제62항 또는 제63항에 따른 CAR을 포함하는, 면역반응 세포.

청구항 65

제64항에 있어서, 상기 면역반응 세포는 T 세포, 자연 살해(NK) 세포, 세포독성 T 림프구(CTL), 조절 T 세포, 자연 살해 T(NKT) 세포 및 골수성 세포로 이루어진 군으로부터 선택되는, 면역반응 세포.

청구항 66

제64항에 있어서, 상기 면역반응 세포는 T 세포인, 면역반응 세포.

청구항 67

a) 제1항 내지 제58항 중 어느 한 항에 따른 항체, 제59항 내지 제61항 중 어느 한 항에 따른 면역접합체, 제64항 내지 제66항 중 어느 한 항에 따른 면역반응 세포 및 b) 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는, 약학적 조성물.

청구항 68

제1항 내지 제58항 중 어느 한 항에 따른 항체를 코딩하는, 핵산.

청구항 69

제68항에 따른 핵산을 포함하는, 벡터.

청구항 70

제68항에 따른 핵산 또는 제69항에 따른 벡터를 포함하는, 숙주 세포.

청구항 71

제1항 내지 제58항 중 어느 한 항에 따른 항체를 제조하기 위한 방법으로서, 제70항에 따른 숙주 세포에서 항체를 발현시키는 단계 및 상기 항체를 상기 숙주 세포로부터 단리하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 72

대상체의 종양 부담을 감소시키는 방법으로서, 상기 방법은 상기 대상체에게 유효량의 제1항 내지 제58항 중 어

느 한 항에 따른 항체, 제59항 내지 제61항 중 어느 한 항에 따른 면역접합체 또는 제67항에 따른 약학적 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 73

제72항에 있어서, 상기 방법은 종양 세포의 수를 감소시키는, 방법.

청구항 74

제72항 또는 제73항에 있어서, 상기 방법은 종양 크기를 감소시키는, 방법.

청구항 75

제72항 내지 제73항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법은 상기 대상체의 상기 종양을 근절하는, 방법.

청구항 76

제72항 내지 제74항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 종양은 중피종, 폐암, 췌장암, 난소암, 유방암, 결장암, 흉막 종양, 교모세포종, 식도암, 위암, 활막 육종, 흉선암종, 자궁내막암종, 위종양, 담관암종, 두경부암, 혈액암 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 방법.

청구항 77

신생물을 치료 및/또는 예방하는 방법으로서, 상기 방법은 상기 대상체에게 유효량의 제1항 내지 제58항 중 어느 한 항에 따른 항체, 제59항 내지 제61항 중 어느 한 항에 따른 면역접합체 또는 제67항에 따른 약학적 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 78

신생물을 갖는 대상체의 생존 기간을 연장시키는 방법으로서, 상기 방법은 상기 대상체에게 유효량의 제1항 내지 제58항 중 어느 한 항에 따른 항체, 제59항 내지 제61항 중 어느 한 항에 따른 면역접합체 또는 제67항에 따른 약학적 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 79

제77항 또는 제78항에 있어서, 상기 신생물은 중피종, 폐암, 췌장암, 난소암, 유방암, 결장암, 흉막 종양, 교모세포종, 식도암, 위암, 활막 육종, 흉선암종, 자궁내막암종, 위종양, 담관암종, 두경부암, 혈액암 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 방법.

청구항 80

약제로서 사용하기 위한, 제1항 내지 제58항 중 어느 한 항에 따른 항체.

청구항 81

암을 치료하는 데 사용하기 위한, 제1항 내지 제58항 중 어느 한 항에 따른 항체.

청구항 82

약제로서 사용하기 위한, 제67항에 따른 약학적 조성물.

청구항 83

암을 치료하는 데 사용하기 위한, 제67항에 따른 약학적 조성물.

청구항 84

제81항에 따른 항체 또는 제82항에 따른 약학적 조성물로서, 상기 암은 중피종, 폐암, 췌장암, 난소암, 유방암, 결장암, 흉막 종양, 교모세포종, 식도암, 위암, 활막 육종, 흉선암종, 자궁내막암종, 위종양, 담관암종, 두경부암, 혈액암 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 항체 또는 약학적 조성물.

청구항 85

키트로서, 제1항 내지 제58항 중 어느 한 항에 따른 항체, 제59항 내지 제61항 중 어느 한 항에 따른 면역접합체, 제67항에 따른 약학적 조성물, 제68항에 따른 핵산, 제69항에 따른 벡터 또는 제70항에 따른 숙주 세포를 포함하는, 키트.

청구항 86

제85항에 있어서, 상기 키트는 신생물을 치료 및/또는 예방하기 위한 서면 지침을 추가로 포함하는, 키트.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 관련 출원에 대한 상호 참조

[0002] 본 출원은 2022년 9월 22일자로 출원된 국제 특허 출원 제PCT/CN2022/120415호에 대한 우선권을 주장하며, 이의 내용은 전문이 참조에 의해 인용되며, 이의 우선권이 주장된다. 본 개시는 B7H3(CD276로도 알려짐)에 결합하는 항체 및 항체 유도체 및 이를 사용하는 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] B7H3(CD276으로도 알려짐)은 B7 및 CD28 계열의 면역 관문 분자이며, 이는 T 세포 면역 반응 조절에 관여한다. B7H3은 다양한 유형의 종양 조직에서 과발현되며 인간 환자의 경우 부정적인 예후와 종종 관련이 있다. B7H3의 수용체는 아직 특성규명이 되지 않았으나, B7H3 신호 경로를 억제하면 면역 세포의 강력한 항암 활성을 매개할 수 있다. 최근 연구는 B7-H3가 면역 조절 역할을 넘어 암 진행에 영향을 미칠 수 있다는 점을 나타낸다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0004] 면역 관문 조절에 있어서 B7H3의 유의한 역할을 감안하면, 면역 요법 및 암 치료를 위해 B7H3 매개 면역 세포 조절을 제어하는 치료 분자 및 방법의 개발에 대한 필요성이 당업계에서 존재한다.

과제의 해결 수단

[0005] 본 개시는 B7H3 및 하나 이상의 추가 표적에 결합하는 단일특이적 항-B7H3 항체 및 다중특이적 항체를 포함하는 고친화성으로 B7H3에 특이적으로 결합하는 단리된 모노클로날 항체 및 항체 유도체를 제공한다. 특정 실시양태에서, 본원에서 개시되는 항체 또는 항체 유도체는 B7H3에 결합하는 단일 도메인 항체를 포함한다. 본 개시는 예를 들어, 질환 및 장애, 예를 들어 암을 치료하기 위해 본원에서 개시되는 항체 및 항체 유도체 및 이를 포함하는 약학적 조성물을 제조하고 사용하는 방법을 추가로 제공한다. 본 발명은, 부분적으로, 종양 세포를 표적화하고/하거나 종양 세포에 대한 면역 반응을 증가시켜 개선된 항종양 효능을 제공할 수 있는 B7H3에 결합하는 신규 단일 도메인 항체의 발견을 기반으로 한다.

[0006] 본 개시는 B7H3에 결합하는 항체를 제공하며, 이는 1×10^{-7}M 이하의 KD로 B7H3에 결합하는 단일 도메인 항체를 포함한다. 특정 실시양태에서, 상기 단일 도메인 항체는 5×10^{-8}M 이하의 KD로 B7H3에 결합한다. 특정 실시양태에서, 상기 단일 도메인 항체는 1×10^{-8}M 이하의 KD로 B7H3에 결합한다. 특정 실시양태에서, 상기 단일 도메인 항체는 약 1×10^{-10}M 내지 약 5×10^{-8}M의 KD로 B7H3에 결합한다. 특정 실시양태에서, 단일 도메인 항체는 VHH를 포함한다. 특정 실시양태에서, 상기 단일 도메인 항체 또는 VHH는 중쇄 가변 영역(VH)을 포함한다. 특정 실시양태에서, 상기 단일 도메인 항체는 a) 서열 번호: 1에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1, 서열 번호: 2에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2 및 서열 번호: 3에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3, b) 서열 번호: 5에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1, 서열 번호: 6에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2 및 서열 번호: 7에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3, c) 서열 번호: 9에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1, 서열 번호: 10에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2 및 서열 번호: 11에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3, d) 서열 번호: 13에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1, 서열 번호: 14에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2 및 서열 번호: 15에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3, e) 서열 번호: 17에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1, 서열 번호: 18에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2 및 서열 번호: 19에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3, f) 서열 번호: 21에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1, 서열 번호: 22에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2 및 서열 번호: 23에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3, g) 서열 번호: 25에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1, 서열 번호: 26에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2 및 서열 번호: 27에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3, h) 서열 번호: 29에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1, 서열 번호: 30에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2 및 서열 번호: 31에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3, i) 서열 번호: 33에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1, 서열 번호: 34에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2 및 서열 번호: 35에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3, j) 서열 번호: 37에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1, 서열 번호: 38에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2 및 서열 번호: 39에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3, k) 서열 번호: 41에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1, 서열 번호: 42에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2 및 서열 번호: 43에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3 및 l) 서열 번호: 56에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1, 서열 번호: 57에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2 및 서열 번호: 58에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하는 참조 항-B7H3 단일 도메인 항체와 B7H3에 대한 결합에 대하여 교차 경쟁한다.

[0007] 특정 실시양태에서, 상기 단일 도메인 항체는 a) 서열 번호: 1, 5, 9, 13, 17, 21, 25, 29, 33, 37, 41 및 56 중 임의의 하나의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1 또는 최대 약 3개의 아미노산 치환을 포함하는 이의 변이체; b) 서열 번호: 2, 6, 10, 14, 18, 22, 26, 30, 34, 38, 42 및 57 중 임의의 하나의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2 또는 최대 약 3개의 아미노산 치환을 포함하는 이의 변이체; 및 c) 서열 번호: 3, 7, 11, 15, 19, 23, 27, 31, 35, 39, 43 및 58 중 임의의 하나의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3 또는 최대 약 3개의 아미노산 치환을 포함하는 이의 변이체를 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함한

다. 특정 실시양태에서, 상기 단일 도메인 항체는 CDR1 도메인, CDR2 도메인 및 CDR3 도메인을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하며, 상기 CDR1 도메인, 상기 CDR2 도메인 및 상기 CDR3 도메인은 각각 서열 번호: 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40, 44, 48, 52 및 59로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 참조 중쇄 가변 영역에 포함되는 CDR1 도메인, CDR2 도메인 및 CDR3 도메인을 포함한다.

[0008] 특정 실시양태에서, 상기 단일 도메인 항체는 서열 번호: 1에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1, 서열 번호: 2에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2 및 서열 번호: 3에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3을 포함한다. 특정 실시양태에서, 상기 단일 도메인 항체는 서열 번호: 5에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1, 서열 번호: 6에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2 및 서열 번호: 7에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3을 포함한다. 특정 실시양태에서, 상기 단일 도메인 항체는 서열 번호: 9에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1, 서열 번호: 10에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2 및 서열 번호: 11에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3을 포함한다. 특정 실시양태에서, 상기 단일 도메인 항체는 서열 번호: 13에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1, 서열 번호: 14에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2 및 서열 번호: 15에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3을 포함한다. 특정 실시양태에서, 상기 단일 도메인 항체는 서열 번호: 17에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1, 서열 번호: 18에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2 및 서열 번호: 19에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3을 포함한다. 특정 실시양태에서, 상기 단일 도메인 항체는 서열 번호: 21에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1, 서열 번호: 22에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2 및 서열 번호: 23에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3을 포함한다. 특정 실시양태에서, 상기 단일 도메인 항체는 서열 번호: 25에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1, 서열 번호: 26에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2 및 서열 번호: 27에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3을 포함한다. 특정 실시양태에서, 상기 단일 도메인 항체는 서열 번호: 29에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1, 서열 번호: 30에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2 및 서열 번호: 31에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3을 포함한다. 특정 실시양태에서, 상기 단일 도메인 항체는 서열 번호: 33에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1, 서열 번호: 34에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2 및 서열 번호: 35에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3을 포함한다. 특정 실시양태에서, 상기 단일 도메인 항체는 서열 번호: 37에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1, 서열 번호: 38에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2 및 서열 번호: 39에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3을 포함한다. 특정 실시양태에서, 상기 단일 도메인 항체는 서열 번호: 41에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1, 서열 번호: 42에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2 및 서열 번호: 43에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3을 포함한다. 특정 실시양태에서, 상기 단일 도메인 항체는 서열 번호: 56에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1, 서열 번호: 57에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2 및 서열 번호: 58에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3을 포함한다.

[0009] 특정 실시양태에서, 상기 단일 도메인 항체는 서열 번호: 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40, 44, 48, 52 및 59로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 약 90% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함한다. 특정 실시양태에서, 상기 단일 도메인 항체는 서열 번호: 4에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함한다. 특정 실시양태에서, 상기 단일 도메인 항체는 서열 번호: 8에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함한다. 특정 실시양태에서, 상기 단일 도메인 항체는 서열 번호: 12에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함한다. 특정 실시양태에서, 상기 단일 도메인 항체는 서열 번호: 16에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함한다. 특정 실시양태에서, 상기 단일 도메인 항체는 서열 번호: 20에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함한다. 특정 실시양태에서, 상기 단일 도메인 항체는 서열 번호: 24에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함한다. 특정 실시양태에서, 상기 단일 도메인 항체는 서열 번호: 28에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함한다. 특정 실시양태에서, 상기 단일 도메인 항체는 서열 번호: 32에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함한다. 특정 실시양태에서, 상기 단일 도메인 항체는 서열 번호: 36에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함한다. 특정 실시양태에서, 상기 단일 도메인 항체는 서열

번호: 40에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함한다. 특정 실시양태에서, 상기 단일 도메인 항체는 서열 번호: 44에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함한다. 특정 실시양태에서, 상기 단일 도메인 항체는 서열 번호: 48에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함한다. 특정 실시양태에서, 상기 단일 도메인 항체는 서열 번호: 52에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함한다. 특정 실시양태에서, 상기 단일 도메인 항체는 서열 번호: 59에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함한다.

[0010] 특정 실시양태에서, 상기 단일 도메인 항체는 인간화 프레임워크를 포함한다.

[0011] 특정 실시양태에서, 상기 항-B7H3 항체는 Fc 영역을 추가로 포함한다. 특정 실시양태에서, 상기 Fc 영역은 인간 Fc 영역을 포함한다. 특정 실시양태에서, 상기 Fc 영역은 IgG, IgA, IgD, IgE 및 IgM의 Fc 영역으로 이루어진 군으로부터 선택되는 Fc 영역을 포함한다. 특정 실시양태에서, 상기 Fc 영역은 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4의 Fc 영역으로 이루어진 군으로부터 선택되는 Fc 영역을 포함한다. 특정 실시양태에서, 상기 Fc 영역은 IgG1 Fc 영역을 포함한다. 특정 실시양태에서, 상기 IgG1 Fc 영역은 항체 의존성 세포 매개 세포독성(ADCC)을 향상시키는 하나 이상의 돌연변이 또는 변형을 포함한다. 특정 실시양태에서, 상기 IgG1 Fc 영역은 비-푸코실화된 당 사슬을 포함한다. 특정 실시양태에서, 상기 IgG1 Fc 영역은 L235V, F243L, R292P 및 Y300L의 돌연변이, S239D, A330L 및 I332E의 돌연변이 또는 L235V, F243L, R292P, Y300L 및 P396L의 돌연변이를 포함한다. 특정 실시양태에서, 상기 IgG1 Fc 영역은 L235V, F243L, R292P 및 Y300L의 돌연변이를 포함한다. 특정 실시양태에서, 상기 IgG1 Fc 영역은 L235V, F243L, R292P, Y300L 및 P396L의 돌연변이를 포함한다. 특정 실시양태에서, 상기 IgG1 Fc 영역은 S239D, A330L 및 I332E의 돌연변이를 포함한다.

[0012] 특정 실시양태에서, 상기 중쇄 가변 영역은 링커를 통해 Fc 영역에 연결된다. 특정 실시양태에서, 상기 링커는 펩티드 링커이다. 특정 실시양태에서, 상기 펩티드 링커는 약 4개 내지 약 30개의 아미노산을 포함한다. 특정 실시양태에서, 상기 펩티드 링커는 약 4개 내지 약 15개의 아미노산을 포함한다. 특정 실시양태에서, 상기 펩티드 링커는 서열 번호: 61 내지 82로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함한다.

[0013] 특정 실시양태에서, 상기 항-B7H3 항체는 전장 면역글로불린, 단쇄 Fv(scFv) 단편, Fab 단편, Fab' 단편, F(ab')2, Fv 단편, 이황화 안정화 Fv 단편(dsFv), (dsFv)2, VHH, Fv-Fc 융합체, scFv-Fc 융합체, scFv-Fv 융합체, 디아바디, 트리바디, 테트라바디 또는 이들의 임의의 조합을 포함한다.

[0014] 특정 실시양태에서, 상기 항-B7H3 항체는 다중특이적 항체, 예를 들어, 이중특이적 항체에 포함되며, 이는 제2 항원에 특이적으로 결합하는 제2 항체 모이어티를 포함한다. 특정 실시양태에서, 상기 제2 항원은 종양 연관 항원이다. 특정 실시양태에서, 상기 종양 연관 항원은 Her-2, EGFR, PD-L1, c-Met, B 세포 성숙 항원(BCMA), 탄산 무수화효소 IX(CA1X), 암종배아 항원(CEA), CD5, CD7, CD10, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD34, CD38, CD41, CD44, CD49f, CD56, CD74, CD123, CD133, CD138, CD276(B7H3), 상피 당단백질(EGP2), 세포영약막 세포-표면 항원 2(TROP-2), 상피 당단백질- 40(EGP-40), 상피 세포 부착 분자(EpCAM), 수용체 티로신-단백질 키나아제 erb-B2,3,4, 엽산-결합 단백질(FBP), 태아 아세티콜린 수용체(AChR), 엽산 수용체-a, 강글리오사이드 G2(GD2), 강글리오사이드 G3(GD3), 인간 텔로머레이스 역전사효소(hTERT), 키나아제 삽입 도메인 수용체(KDR), 루이스 A(CA 1.9.9), 루이스 Y(LeY), 글리피칸-3(GPC3), L1 세포 부착 분자(L1CAM), 뮤신 16(Muc-16), 뮤신 1(Muc-1), NG2D 리간드, 종양태아성 항원(h5T4), 전립선 줄기 세포 항원(PSCA), 전립선 특이적 막 항원(PSMA), 종양 연관 당단백질 72(TAG-72), Claudin18.2(CLDN18.2), 혈관 상피 성장 인자 R2(VEGF- R2), 윌름스 종양 단백질(WT-1), 1형 티로신-단백질 키나아제 막관통 수용체(ROR1) 및 이들의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 특정 실시양태에서, 상기 제2 항원은 면역 관문 조절제이다. 특정 실시양태에서, 상기 면역 관문 조절제는 TIGIT, PD1, CTLA4, LAG-3, 2B4, BTLA 및 이들의 임의의 조합으로 구성된다.

[0015] 특정 실시양태에서, 상기 항-B7H3 항체는 치료제 또는 표지에 접합된다. 특정 실시양태에서, 상기 표지는 방사성 동위원소, 형광 염료 및 효소로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0016] 본 개시는 치료제에 결합하는, 본원에 개시된 임의의 항체를 포함하는 면역접합체를 추가로 제공한다. 특정 실시양태에서, 상기 치료제는 세포독소이다. 특정 실시양태에서, 상기 치료제는 방사성 동위원소이다.

[0017] 본 개시는 본원에서 개시되는 임의의 항체를 포함하는 세포외 항원 결합 도메인을 포함하는 키메라 항원 수용체(CAR)를 추가로 제공한다. 특정 실시양태에서, 상기 항체는 VHH이다.

[0018] 본 개시는 본원에서 개시되는 임의의 CAR을 포함하는 면역반응 세포를 추가로 제공한다. 특정 실시양태에서, 상기 면역반응 세포는 T 세포, 자연 살해(NK) 세포, 세포독성 T 림프구(CTL), 조절 T 세포, 자연 살해 T(NKT) 세

포 및 골수성 세포로 이루어진 군으로부터 선택된다. 특정 실시양태에서, 상기 면역반응 세포는 T 세포이다.

[0019] 본 개시는 약학적 조성물을 추가로 제공한다. 특정 실시양태에서, 상기 약제학적 조성물은 a) 본원에서 개시되는 항체, 면역접합체 또는 면역반응 세포 및 b) 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함한다.

[0020] 본 개시는 본원에서 개시되는 임의의 항체를 코딩하는 핵산을 추가로 제공한다. 본 개시는 본원에서 개시되는 임의의 핵산을 포함하는 벡터를 추가로 제공한다. 본 개시는 본원에서 개시되는 핵산 또는 벡터를 포함하는 숙주 세포를 추가로 제공한다.

[0021] 본 개시는 본원에서 개시되는 항체를 제조하는 방법을 추가로 제공한다. 특정 실시양태에서, 상기 방법은 본원에서 개시되는 숙주 세포에서 항체를 발현시키는 단계 및 숙주 세포로부터 항체를 단리하는 단계를 포함한다.

[0022] 본 개시는 대상체에서 종양 부담을 감소시키는 방법을 추가로 제공한다. 특정 실시양태에서, 상기 방법은 대상체에게 본원에서 개시되는 유효량의 항체, 면역접합체 또는 약학적 조성물을 투여하는 단계를 포함한다.

[0023] 특정 실시양태에서, 상기 방법은 종양 세포의 수를 감소시킨다. 특정 실시양태에서, 상기 방법은 종양 크기를 감소시킨다. 특정 실시양태에서, 상기 방법은 대상체에서 종양을 근절한다. 특정 실시양태에서, 상기 종양은 중피종, 폐암, 췌장암, 난소암, 유방암, 결장암, 흉막 종양, 교모세포종, 식도암, 위암, 활막 육종, 흉선암종, 자궁내막암종, 위종양, 담관암종, 두경부암, 혈액암 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0024] 본 개시는 대상체에서 신생물을 치료하고/하거나 예방하는 방법을 추가로 제공한다. 특정 실시양태에서, 상기 방법은 대상체에게 본원에서 개시되는 유효량의 항체, 면역접합체 또는 약학적 조성물을 투여하는 단계를 포함한다.

[0025] 본 개시는 신생물이 있는 대상체의 생존 기간을 연장시키는 방법을 추가로 제공한다. 특정 실시양태에서, 상기 방법은 대상체에게 본원에서 개시되는 유효량의 항체, 면역접합체 또는 약학적 조성물을 투여하는 단계를 포함한다.

[0026] 특정 실시양태에서, 상기 신생물은 중피종, 폐암, 췌장암, 난소암, 유방암, 결장암, 흉막 종양, 교모세포종, 식도암, 위암, 활막 육종, 흉선암종, 자궁내막암종, 위종양, 담관암종, 두경부암, 혈액암 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0027] 본 개시는 약제로서 사용하기 위해 본원에서 개시되는 임의의 항체를 추가로 제공한다. 본 개시는 암을 치료하는 데 사용하기 위한 본원에서 개시되는 임의의 항체를 추가로 제공한다. 본 개시는 약제로서 사용하기 위해 본원에서 개시되는 약학적 조성물을 추가로 제공한다. 본 개시는 암을 치료하는 데 사용하기 위한 본원에서 개시되는 약학적 조성물을 추가로 제공한다. 특정 실시양태에서, 상기 암은 중피종, 폐암, 췌장암, 난소암, 유방암, 결장암, 흉막 종양, 교모세포종, 식도암, 위암, 활막 육종, 흉선암종, 자궁내막암종, 위종양, 담관암종, 두경부암, 혈액암 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0028] 본 개시는 본원에서 개시되는 항체, 면역접합체, 약학적 조성물, 핵산, 벡터 또는 숙주 세포를 포함하는 키트를 추가로 제공한다. 특정 실시양태에서, 상기 키트는 신생물을 치료하고/하거나 예방하기 위한 서면 지침을 포함한다.

도면의 간단한 설명

[0029] 도 1a~도 1b는 인간 또는 사이노몰구스 B7H3에 대한 항-B7H3 VHH 항체의 ELISA 결합을 도시한다. 도 1a는 인간 B7H3에 대한 항-B7H3 VHH 항체의 ELISA 결합을 도시한다. 도 1b는 사이노몰구스 B7H3에 대한 항-B7H3 VHH 항체의 ELISA 결합을 도시한다.

도 2a~도 2f는 유세포 분석을 통해 평가한 인간 B7H3+ 세포에 대한 항-B7H3 VHH 항체의 전체 세포 결합을 도시한다. 도 2a는 인간 B7H3+ A498 세포에 대한 항-B7H3 VHH 항체의 전체 세포 결합을 도시한다. 도 2b는 인간 B7H3+ A498 세포에 대한 19c10 변이체의 전체 세포 결합을 도시한다. 도 2c는 인간 B7H3+ A498 세포에 대한 19c10-V3 및 19c10-V4의 전체 세포 결합의 비교를 도시한다. 도 2d는 인간 B7H3+ A498 세포에 대한 19c10-V4 및 참조 항-B7H3 항체의 전체 세포 결합의 비교를 도시한다. 도 2e는 B7H3를 발현하지 않는 Jurkat 세포에 대한 항-B7H3 VHH 항체의 전체 세포 결합을 도시한다. 도 2f는 B7H3를 발현하지 않는 Raji 세포에 대한 19c10-V4 및 참조 항-B7H3 항체의 전체 세포 결합을 도시한다.

도 3a~도 3b는 항-B7H3 VHH 항체의 ADCC 효과를 도시한다. 도 3a는 참조 Ab 1과 비교한 다양한 항-B7H3 VHH 항

체의 ADCC 효과를 도시한다. 도 3b는 참조 Ab 1 및 참조 Ab 2와 비교한 19c10-V4 항체의 ADCC 효과를 도시한다.

도 4a~도 4b는 항-B7H3 VHH 항체의 체내 항암 효과를 도시한다. 도 4a는 음성 대조(PBS), 19c10-V4 항체, 참조 Ab 1(MGA-271, 에노블리투주맙 유사체) 및 참조 Ab 2(h1702 유사체)로 치료한 마우스에서의 체내 종양 성장 곡선을 도시한다. 도 4b는 치료 동안의 마우스의 체중 변화를 도시한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0030] 본 개시는 B7H3 및 하나 이상의 추가 표적에 결합하는 단일특이적 항-B7H3 항체 및 다중특이적 항체를 포함하는 고친화성으로 B7H3에 특이적으로 결합하는 단리된 모노클로날 항체 및 항체 유도체를 제공한다. 특정 실시양태에서, 본원에서 개시되는 항체 또는 항체 유도체는 B7H3에 결합하는 단일 도메인 항체를 포함한다. 본 개시는 예를 들어, 질환 및 장애, 예를 들어 암을 치료하기 위해 본원에서 개시되는 항체 및 항체 유도체 및 이를 포함하는 약학적 조성물을 제조하고 사용하는 방법을 추가로 제공한다. 본 발명은, 부분적으로, 종양 세포를 표적화하고/하거나 종양 세포에 대한 면역 반응을 증가시켜 개선된 항종양 효능을 제공할 수 있는 B7H3에 결합하는 신규 단일 도메인 항체의 발견을 기반으로 한다.

[0031] 명확성을 위해 그리고 제한 없이 현재 개시되는 특허 대상의 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용은 다음 하위 섹션으로 구분된다:

[0032] 1. 정의;

[0033] 2. 항체 및 항체 유도체;

[0034] 3. 사용 방법;

[0035] 4. 약학적 제제; 및

[0036] 5. 제조 품목.

[0037] 1. 정의

[0038] 본원에서 지칭되는 용어 "항체"는 전장 항체 및 이의 임의의 항원 결합 단편(즉, 항체 단편)을 포함한다. "항체"는 독립형 분자 또는 항체 유도체의 일부일 수 있다. 예시적인 항체 유도체는 다중특이적 항체(예를 들어, 이중특이적 항체), 항원 인식 수용체(예를 들어, 키메라 항원 수용체), 추가의 단백질성 또는 비단백질성 모이어티(예를 들어, 항체-약물 접합체 또는 중합체 코팅 항체) 및 항체를 포함하는 다른 다기능 분자를 포함한다.

[0039] "전장 항체", "온전한 항체" 및 "전체 항체"는 천연 항체 구조와 유사하거나 본원에서 정의되는 Fc 영역을 함유하는 중쇄를 갖는 항체를 지칭한다. 특정 실시양태에서, 전장 항체는 두 개의 중쇄 및 두 개의 경쇄를 포함한다. 특정 실시양태에서, 경쇄 및 중쇄의 가변 영역은 항원 결합을 담당한다. 중쇄 및 경쇄의 가변 영역은 각각 "VH" 및 "VL"로 지칭될 수 있다. 두 사슬 모두에 있는 가변 영역은 일반적으로 상보성 결정 영역(CDR)(LC-CDR1, LC-CDR2 및 LC-CDR3을 포함하는 경쇄(LC) CDR, HC-CDR1, HC-CDR2 및 HC-CDR3을 포함하는 중쇄(HC) CDR)로 지칭되는 3개의 고도로 가변적인 루프를 함유한다. 본원에서 개시되는 항체 및 항원 결합 단편에 대한 CDR 경계는 널리 알려진 관례, 예를 들어, 아래에서 기재되는 Kabat, Chothia, MacCallum, IMGT 및 AHo의 관례에 의해 정의될 수 있거나 식별될 수 있다. 중쇄 또는 경쇄의 3개 CDR은 프레임워크 영역(FR)으로 알려진 측접 스트레치 사이에 삽입되며, 이는 CDR보다 더 보존되어 초가변 루프를 지원하는 스캐폴드를 형성한다. 중쇄와 경쇄의 불변 영역은 항원 결합에 관여하지 않으나 다양한 이펙터 기능을 나타낸다. 항체는 중쇄의 불변 영역의 아미노산 서열을 기준으로 분류된다. 상기 항체의 5가지 주요 부류 또는 아이소타입은 IgA, IgD, IgE, IgG 및 IgM이며, 이는 각각 α, δ, ε, γ 및 μ 중쇄의 존재를 특징으로 한다. 여러 주요 항체 부류는 IgG1(γ1 중쇄), IgG2(γ2 중쇄), IgG3(γ3 중쇄), IgG4(γ4 중쇄), IgA1(α1 중쇄) 또는 IgA2(α2 중쇄)와 같은 하위 부류로 구분된다. 특정 실시양태에서, 전장 항체는 글라이코실화된다. 특정 실시양태에서, 전장 항체는 이의 Fc 영역에 연결된 글리칸을 포함한다. 특정 실시양태에서, 전장 항체는 분지형 글리칸을 포함한다.

[0040] 본원에서 사용되는 "항원 결합 부분", "항체 단편" 및 "항체 부분"은 항원에 특이적으로 결합하는 능력을 보유하는 전장 항체의 하나 이상의 단편을 지칭한다. 전장 항체의 항원 결합 기능이 전장 항체의 단편에 의해 수행될 수 있는 것으로 나타났다. 항체 단편의 예는 Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')2, 디아바디, 선형 항체, 단쇄 항체 분자(예를 들어, scFv 및 scFv-Fc), 단일 도메인 항체, VHH, VHH-Fc, 나노바디, 도메인 항체, 이가 도메인 항체 또는 항원에 결합하는 항체의 임의의 다른 단편 또는 이의 조합을 포함하나 이에 한정되지 않는다. "VHH"

는 낙타과 동물로부터 단리된 단일 도메인 항체를 지칭한다. 특정 실시양태에서, VHH는 낙타과 중쇄 항체의 중쇄의 가변 영역을 포함한다. 특정 실시양태에서, VHH는 크기가 약 25kDa 이하이다. 특정 실시양태에서, VHH는 크기가 약 20 kDa 이하이다. 특정 실시양태에서, VHH는 크기가 약 15 kDa 이하이다.

[0041] 참조 항체와 "결합을 위해 교차 경쟁하는 항체"는 경쟁 분석에서 참조 항체의 항원에 대한 결합을 50% 이상 차단하고 반대로 참조 항체는 경쟁 분석에서 항체의 항원에 대한 결합을 50% 이상 차단하는 항체를 지칭한다. 예시적인 경쟁 분석은 Antibodies, Harlow 및 Lane(Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY)에서 기재되어 있다.

[0042] "Fv"는 완전한 항원 인식 및 결합 부위를 함유하는 최소 항체 단편이다. 이러한 단편은 긴밀한 비공유 결합으로 하나의 중쇄 가변 영역과 하나의 경쇄 가변 영역의 이량체로 구성된다. 이러한 두 도메인의 접힘(folding)으로부터 아미노산 잔기를 항원 결합에 기여하고 결합 특이성을 항체에 항원 부여하는 6개의 초가변 루프(중쇄 및 경쇄 각각에서 3개의 루프)가 방출된다. 그러나, 단일 가변 도메인(또는 항원에 특이적인 3개의 CDR만 포함하는 Fv의 절반)조차도 때때로 전체 결합 부위보다 친화성이 낮음에도 불구하고 항원을 인식할 수 있고 이에 결합할 수 있다.

[0043] "sFv" 또는 "scFv"로 또한 약칭되는 "단쇄 Fv"는 단일 폴리펩티드 사슬로 연결되는 V_H 및 V_L 항체 도메인을 포함하는 항체 단편이다. 일부 실시양태에서, scFv 폴리펩티드는 V_H 도메인과 V_L 도메인 사이에 폴리펩티드 링커를 더 포함하며, 이는 scFv가 항원 결합을 위해 원하는 구조를 형성할 수 있게 한다. scFv의 검토를 위하여, Pluckthun in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenburg 및 Moore 편집, Springer-Verlag, New York, pp. 269-315(1994) 참조.

[0044] 본원의 목적을 위한 "수용체 인간 프레임워크" 또는 "인간 프레임워크"는 인간 면역글로불린 프레임워크 또는 인간 컨센서스 프레임워크로부터 유래한 경쇄 가변 도메인(VL) 프레임워크 또는 중쇄 가변 도메인(VH) 프레임워크의 아미노산 서열을 포함하는 프레임워크이다. 인간 면역글로불린 프레임워크 또는 인간 컨센서스 프레임워크로부터 "유래한" 수용체 인간 프레임워크는 이의 동일한 아미노산 서열을 포함할 수 있거나 아미노산 서열 변화를 포함할 수 있다. 특정 실시양태에서, 아미노산 변화의 수는 10개 이하, 9개 이하, 8개 이하, 7개 이하, 6개 이하, 5개 이하, 4개 이하, 3개 이하 또는 2개 이하이다. 특정 실시양태에서, 상기 VL 수용체 인간 프레임워크는 상기 VL 인간 면역글로불린 프레임워크 서열 또는 인간 컨센서스 프레임워크 서열과 서열이 동일하다.

[0045] "친화성"은 분자(예를 들어, 항체)의 단일 결합 부위와 이의 결합 파트너(예를 들어, 항원) 사이의 모든 비공유 상호작용 총합의 강도를 지칭한다. 달리 지시하지 않는 한, 본원에서 사용되는 바와 같이 "결합 친화성"은 결합 쌍의 구성원(예를 들어, 항체 및 항원) 사이의 1:1 상호작용을 반영하는 고유 결합 친화성을 지칭한다. 파트너 Y에 대한 분자 X의 친화성은 일반적으로 해리 상수(KD)로 나타낼 수 있다. 친화성은 본원에서 기재되는 것을 포함하여 당업계에서 알려진 일반적인 방법에 의해 측정될 수 있다. 결합 친화성을 측정하기 위한 구체적 예시적인 및 예시적인 실시양태는 다음에서 기재된다.

[0046] "친화성 성숙" 항체는 이러한 변경을 보유하지 않은 모 항체와 비교하여, 하나 이상의 CDR 또는 초가변 영역(HVR)에서 하나 이상의 변경을 갖는 항체를 지칭하며, 이러한 변경은 항원에 대한 항체의 개선된 친화성을 제공한다.

[0047] 본원에서 사용되는 바와 같은 "B7H3", "B7H3 단백질" 또는 "B7H3 폴리펩티드"는 영장류(예를 들어, 인간 및 사이노몰구스 원숭이)와 같은 포유동물을 포함하는 임의의 척추동물 공급원으로부터 유래한 임의의 B7H3 폴리펩티드 또는 이의 임의의 단편을 지칭하며 선택적으로 최대 1개, 최대 2개, 최대 3개, 최대 4개, 최대 5개, 최대 6개, 최대 7개, 최대 8개, 최대 9개 또는 최대 10개의 아미노산 치환, 첨가 및/또는 결실을 포함할 수 있다. 해당 용어는 전체 길이의 처리되지 않은 B7H3 및 세포 내 처리로 인해 발생하는 임의의 형태의 B7H3을 포괄한다. 해당 용어는 또한 B7H3의 자연 발생 변이체, 예를 들어, 스플라이스 변이체 또는 대립유전자 변이체를 포함한다. 특정 실시양태에서, B7H3 폴리펩티드는 NCBI 참조 번호: NP_001316557.1, NP_001316558.1, NP_079516.1 또는 NP_001019907.1을 갖는 서열과 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99% 또는 적어도 약 100% 상동성이거나 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 갖는다(본원에서 상동성은 BLAST 또는 FASTA와 같은 표준 소프트웨어를 사용하여 결정될 수 있다). 특정 실시양태에서, 상기 B7H3 폴리펩티드는 서열 번호: 83의 전체 또는 연속적 부분인 아미노산 서열을 포함하거나 갖는다.

[0048] 용어 "B7H3의 ECD"는 B7H3의 세포외 도메인을 지칭한다. 특정 실시양태에서, 예시적인 B7H3 폴리펩티드의 ECD는

서열 번호: 84에 제시된 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[0049] 용어 "항-B7H3 항체" 및 "B7H3에 결합하는 항체"는 B7H3을 표적화하기 위한 진단제 및/또는 치료제로서 유용할 만큼 충분한 친화성으로 B7H3에 결합할 수 있는 항체를 지칭한다. 일 실시양태에서, 비관련 비B7H3 단백질에 대한 항-B7H3 항체의 결합의 정도는, 예를 들어, BIACORE® 표면 플라즈몬 공명 분석에 의해, 측정된 바와 같이 B7H3 단백질에 대한 그 항체의 결합의 약 10% 미만이다. 특정 실시양태에서, B7H3에 결합하는 항체는 해리 상수(KD)가 < 약 1 μM, < 약 100nM, < 약 10nM, < 약 1nM, < 약 0.1nM, < 약 0.01nM 또는 < 약 0.001nM(예를 들어, 10^{-8}M 이하, 예를 들어, 10^{-8}M 내지 10^{-12}M, 예를 들어, 10^{-9}M 내지 10^{-10}M)이다. 특정 실시양태에서, 항-B7H3 항체는 상이한 종으로부터 유래한 B7H3 사이에 보존되는 B7H3의 에피토프에 결합한다. 특정 실시양태에서, 항-B7H3 항체는 단백질의 ECD에 있는 B7H3 상의 에피토프에 결합한다.

[0050] 용어 "키메라" 항체는 중쇄 및/또는 경쇄의 일부가 특정 공급원 또는 종으로부터 유래하고 중쇄 및/또는 경쇄의 나머지가 상이한 공급원 또는 종으로부터 유래한 항체를 지칭한다. 특정 실시양태에서, 본원에서 개시되는 키메라 항체는 낙타과 중쇄 가변 영역 및 인간 Fc 영역을 포함한다.

[0051] 본원에서 사용되는 바와 같이 용어 "CDR" 또는 "상보성 결정 영역"은 중쇄 및/또는 경쇄의 가변 영역 내에 있는 비인접 항원 조합 부위를 의미하는 것으로 의도된다. 이러한 특정 영역은 Kabat 등, J. Biol. Chem. 252:6609-6616(1977); Kabat 등, U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequences of proteins of immunological interest"(1991); Chothia 등, J. Mol. Biol. 196:901-917(1987); Al-Lazikani B. 등, J. Mol. Biol., 273: 927-948(1997); MacCallum 등, J. Mol. Biol. 262:732-745(1996); Abhinandan 및 Martin, Mol. Immunol., 45: 3832-3839(2008); Lefranc M.P. 등, Dev. Comp. Immunol., 27: 55-77(2003); 및 Honegger 및 Pluckthun, J. Mol. Biol., 309:657-670(2001)에서 기재된 바 있으며, 여기서 정의는 서로 비교되는 경우 아미노산 잔기의 중첩 또는 부분집합을 포함한다. 그럼에도 불구하고, 항체 또는 이식된 항체 또는 이의 변이체의 CDR을 지칭하는 정의 중 임의의 하나의 적용은 본원에서 정의되고 사용되는 용어의 범위 내에 있는 것으로 의도된다. 위에서 인용되는 참고문헌 각각에 의해 정의되는 CDR을 포괄하는 아미노산 잔기는 비교로서 아래 표 1에 제시되어 있다. CDR 예측 알고리즘 및 인터페이스는 예를 들어, Abhinandan 및 Martin, Mol. Immunol., 45: 3832-3839(2008); Ehrenmann F. 등, Nucleic Acids Res., 38: D301-D307(2010); 및 Adolf-Bryfogle J. 등, Nucleic Acids Res., 43: D432-D438(2015)을 포함하여 당업계에서 알려져 있다. 본 단락에서 인용되는 참고문헌의 내용은 본 출원에서 사용하기 위해 그리고 본원의 하나 이상의 청구항에 포함될 수 있도록 전문이 참조에 의해 본원에 인용된다.

표 1

[0052] CDR 정의

	Kabat[1]	Chothia[2]	MacCallum[3]	IMGT[4]	AHo[5]
V_H CDR1	31-35	26-32	30-35	27-38	25-40
V_H CDR2	50-65	53-55	47-58	56-65	58-77
V_H CDR3	95-102	96-101	93-101	105-117	109-137
V_L CDR1	24-34	26-32	30-36	27-38	25-40
V_L CDR2	50-56	50-52	46-55	56-65	58-77
V_L CDR3	89-97	91-96	89-96	105-117	109-137

[0053] [1]잔기 넘버링은 상기 Kabat 등의 명명법을 따름.

[0054] [2]잔기 넘버링은 상기 Chothia 등의 명명법을 따름.

[0055] [3]잔기 넘버링은 상기 MacCallum 등의 명명법을 따름.

[0056] [4]잔기 넘버링은 상기 Lefranc 등의 명명법을 따름.

[0057] [5]잔기 넘버링은 상기 Honegger 및 Pluckthun의 명명법을 따름.

[0058] 표현 "Kabat에서와 같은 가변 도메인 잔기 넘버링" 또는 "Kabat에서와 같은 아미노산 위치 넘버링" 및 이의 변

형은 상기 Kabat 등에서 항체의 편집(compilation)의 중쇄 가변 도메인 또는 경쇄 가변 도메인에 사용되는 넘버링 시스템을 지칭한다. 이러한 넘버링 시스템을 사용하면 실제 선형 아미노산 서열은 가변 도메인의 FR 또는 CDR의 단축 또는 삽입에 해당하는 더 적은 또는 추가 아미노산을 함유할 수 있다. 예를 들어, 중쇄 가변 도메인은 H2의 잔기 52 다음에 단일 아미노산 삽입(Kabat에 따른 잔기 52a) 및 중쇄 FR 잔기 82 다음에 삽입된 잔기(예를 들어, Kabat에 따른 잔기 82a, 82b 및 82c 등)를 포함할 수 있다. 잔기의 Kabat 넘버링은 항체의 서열의 상동성의 영역을 "표준" Kabat 넘버링된 서열과 정렬하여 주어진 항체에 대해 결정될 수 있다.

[0059] 특정 실시양태에서, 단일 도메인 항체(예를 들어, 본원에서 개시되는 단일 도메인 항-B7H3 항체)의 CDR을 포괄하는 아미노산 잔기는 상기 Lefranc 등의 IMGT 명명법에 따라 정의된다. 특정 실시양태에서, 전장 항체의 CDR을 포괄하는 아미노산 잔기는 상기 Kabat 등의 Kabat 명명법에 따라 정의된다. 특정 실시양태에서, 면역글로불린 중쇄, 예를 들어 Fc 영역에 있는 잔기의 넘버링은 상기 Kabat 등에서와 같은 EU 지수의 넘버링이다. "Kabat에서와 같은 EU 지수"는 인간 IgG1 EU 항체의 잔기 넘버링을 지칭한다.

[0060] "프레임워크" 또는 "FR"은 잔기가 본원에 정의되는 바와 같은 CDR 잔기 이외의 가변 도메인 잔기를 지칭한다.

[0061] "인간화" 항체는 비인간 CDR/HVR로부터 유래한 아미노산 잔기 및 인간 FR로부터 유래한 아미노산 잔기를 포함하는 키메라 항체를 지칭한다. 특정 실시양태에서, 인간화 항체는 적어도 1개 그리고 전형적으로 2개의 가변 도메인의 실질적으로 전부를 포함할 것이며, 여기서 HVR/CDR의 전부 또는 실질적으로 전부는 비인간 항체의 HVR/CDR에 상응하며, FR의 전부 또는 실질적으로 전부는 인간 항체의 FR에 상응한다. 인간화 항체는 인간 항체로부터 유래한 항체 불변 영역의 적어도 일부를 선택적으로 포함할 수 있다. 항체, 예를 들어, 비인간 항체의 "인간화 형태"는 인간화를 거친 항체를 지칭한다.

[0062] "인간 항체"는 인간에 의해 생성되는 항체의 아미노산 서열에 상응하는 아미노산 서열을 보유하고/하거나 본원에서 개시되는 인간 항체를 제조하기 위한 임의의 기법을 사용하여 제조된 항체이다. 인간 항체의 이러한 정의는 비인간 항원 결합 잔기를 포함하는 인간화 항체를 구체적으로 배제한다. 인간 항체는 파지-디스플레이 라이브러리를 포함하여 당업계에서 알려진 다양한 기법을 사용하여 생성될 수 있다. Hoogenboom 및 Winter, J. Mol. Biol., 227:381(1991); Marks 등, J. Mol. Biol., 222:581(1991). 또한, 인간 모노클로날 항체의 제조에 이용 가능한 방법은 Cole 등, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, p. 77(1985); Boerner 등, J. Immunol., 147(1):86-95(1991)에서 기재되는 방법이다. 또한, van Dijk 및 van de Winkel, Curr. Opin. Pharmacol., 5: 368-74(2001) 참조. 인간 항체는 항원성 공격에 반응하여 이러한 항체를 생성하도록 변형되었으나 내인성 유전자좌가 비활성화된 유전자이식 동물, 예를 들어, 면역화 제노믹스(예를 들어, XENOMOUSE™ 기술에 관한 미국 특허 제6,075,181호 및 제6,150,584호 참조)에 항원을 투여하여 제조할 수 있다. 또한, 예를 들어, 인간 B 세포 하이브리도마 기술을 통해 생성된 인간 항체에 관한 Li 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103:3557-3562(2006) 참조.

[0063] 본원에서 식별되는 폴리펩티드 및 항체 서열에 관한 "아미노산 서열 동일성 백분율(%)" 또는 "상동성"은 서열 동일성의 일부로서 임의의 보존적 치환을 고려하여 서열을 정렬한 후, 비교되는 폴리펩티드에 있는 아미노산 잔기와 동일한 후보 서열에 있는 아미노산 잔기의 백분율로서 정의된다. 아미노산 서열 동일성 백분율을 결정하기 위한 목적을 위한 정렬은, 예를 들어, 공개적으로 이용 가능한 컴퓨터 소프트웨어, 예컨대, BLAST, BLAST-2, ALIGN, Megalign(DNASTAR) 또는 MUSCLE 소프트웨어를 사용하여, 당업계의 기술 내에 있는 다양한 방식으로 달성될 수 있다. 당업자는 비교되는 서열의 전체 길이에 걸쳐 최대 정렬을 달성하는 데 필요한 임의의 알고리즘을 포함하여 정렬을 측정하기 위한 적절한 매개변수를 결정할 수 있다. 그러나, 본원의 목적을 위해, 아미노산 서열 동일성 % 값은 서열 비교 컴퓨터 프로그램 MUSCLE(Edgar, R.C., Nucleic Acids Research 32(5):1792-1797, 2004; Edgar, R.C., BMC Bioinformatics 5(1):113, 2004)을 사용하여 생성된다.

[0064] "상동성"은 2개의 폴리펩티드 사이 또는 2개의 핵산 분자 사이의 서열 유사성 또는 서열 동일성을 지칭한다. 2개의 비교된 서열 둘 모두의 위치가 동일한 염기 또는 아미노산 단량체 서브유닛에 의해 점유되는 경우, 예를 들어 두 DNA 분자 각각의 위치가 아데닌에 의해 점유되는 경우, 분자는 해당 위치에서 상동성이다. 두 서열 사이의 상동성의 백분율은 두 서열이 공유하는 일치하거나 상동성인 위치의 수를 비교된 위치의 수로 나눈 값에 100을 곱한 함수이다. 예를 들어, 두 서열의 위치 10개 중 6개가 일치하거나 상동성인 경우 두 서열은 60% 상동성이다. 예를 들어, DNA 서열 ATTGCC와 TATGGC는 50% 상동성을 공유한다. 일반적으로, 두 서열이 최대 상동성을 제공하도록 정렬되면 비교가 이루어진다.

[0065] 용어 "불변 도메인"은 항원 결합 부위를 함유하는 가변 도메인인 면역글로불린의 다른 부분에 비해 더 보존된 아미노산 서열을 갖는 면역글로불린 분자의 부분을 지칭한다. 불변 도메인은 중쇄의 C_H1, C_H2 및 C_H3 도메인(집

합적으로, C_H) 및 경쇄의 C_L 도메인을 함유한다.

[0066] 임의의 포유동물 종으로부터 유래한 항체(예를 들어, 면역글로불린)의 "경쇄"는 이들의 불변 도메인의 아미노산 서열을 기준으로 카파("κ") 및 람다("λ")라고 지칭되는 2개의 명확하게 구별되는 유형 중 하나에 할당될 수 있다.

[0067] "CH1 도메인"("H1" 도메인의 "C1"로도 지칭됨)은 일반적으로 약 아미노산 118로부터 약 아미노산 215(EU 넘버링 시스템)까지 연장된다.

[0068] "힌지 영역"은 일반적으로 인간 IgG1의 Glu216 내지 Pro230에 상응하는 IgG에 있는 영역으로 정의된다(Burton, Molec. Immunol.22:161-206(1985)). 다른 IgG 아이소타입의 힌지 영역은 중쇄간 S-S 결합을 형성하는 첫 번째 및 마지막 시스테인 잔기를 동일한 위치에 배치하여 IgG1 서열과 정렬될 수 있다.

[0069] 인간 IgG Fc 영역의 "CH2 도메인"("C2" 도메인으로도 지칭됨)은 일반적으로 약 아미노산 231로부터 약 아미노산 340까지 연장된다. CH2 도메인은 다른 도메인과 밀접하게 쌍을 이루지 않는다는 점에서 독특하다. 오히려, 2개의 N-연결 분지형 탄수화물 사슬이 온전한 천연 IgG 분자의 2개의 CH2 도메인 사이에 삽입된다. 탄수화물은 도메인-도메인 쌍의 대체물을 제공할 수 있고 CH2 도메인을 안정화하는 데 도움이 될 수 있다고 추측되었다. Burton, Molec Immunol. 22:161-206(1985).

[0070] "CH3 도메인"("C2" 도메인으로도 지칭됨)은 CH2 도메인과 Fc 영역의 C-말단 사이(즉, 항체 서열의 아미노산 잔기 341에서 C-말단 단부까지, 전형적으로 IgG의 아미노산 잔기 446 또는 447까지)의 잔기를 포함한다.

[0071] 본원에서 용어 "Fc 영역" 또는 "단편 결정화 가능 영역"은 천연-서열 Fc 영역 및 변이체 Fc 영역을 포함하는 면역글로불린 중쇄의 C-말단 영역을 정의하는 데 사용된다. 면역글로불린 중쇄의 Fc 영역의 경계는 다를 수 있지만, 인간 IgG 중쇄 Fc 영역은 일반적으로 Cys226 위치의 아미노산 잔기 또는 Pro230으로부터 이의 카복실 말단까지 연장되어 있는 것으로 정의된다. Fc 영역의 C-말단 라이신(EU 넘버링 시스템에 따른 잔기 447)은 예를 들어, 항체의 생성 또는 정제 동안 또는 항체의 중쇄를 코딩하는 핵산을 재조합적으로 조작하여 제거될 수 있다. 따라서, 온전한 항체의 조성물은 모든 K447 잔기가 제거된 항체 집단, K447 잔기가 제거되지 않은 항체 집단 및 K447 잔기가 있거나 없는 항체의 혼합물을 갖는 항체 집단을 포함할 수 있다. 본원에서 기재되는 항체에 사용하기에 적합한 천연 서열 Fc 영역은 인간 IgG1, IgG2(IgG2A, IgG2B), IgG3 및 IgG4를 포함한다.

[0072] "Fc 수용체" 또는 "FcR"은 항체의 Fc 영역에 결합하는 수용체를 설명한다. 바람직한 FcR은 천연 인간 FcR이다. 또한, 바람직한 FcR은 IgG 항체(감마 수용체)에 결합하고 대립형질 변이체 및 대안적으로 스플라이싱된 형태의 이러한 수용체를 포함하는 FcγRI, FcγRII 및 FcγRIII 하위부류의 수용체를 포함하는 것이며, FcγRII 수용체는 이의 세포질 도메인에서 주로 상이한 유사한 아미노산 서열을 갖는 FcγRIIA("활성화 수용체")와 FcγRIIB("억제 수용체")를 포함한다. 활성화 수용체 FcγRIIA는 이의 세포질 도메인에 면역수용체 티로신 기반 활성화 모티프(ITAM)를 함유한다. 억제 수용체 FcγRIIB는 이의 세포질 도메인에 면역수용체 티로신 기반 억제 모티프(ITIM)를 함유한다. (M. Daeron, Annu. Rev. Immunol. 15:203-234(1997) 참조). FcR은 Ravetch 및 Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9: 457-92(1991); Capel 등, Immunomethods 4: 25-34(1994); 및 de Haas 등, J. Lab. Clin. Med. 126: 330-41(1995)에서 검토되어 있다. 향후 식별될 FcR을 포함한 다른 FcR은 본원에서 용어 "FcR"에 의해 포괄된다.

[0073] 본원에서 사용되는 용어 "에피토프"는 항체 또는 항체 유도체가 결합하는 항원상의 특정 원자 또는 아미노산 그룹을 지칭한다. 2개의 항체 또는 항원 결합 모이어티는 항원에 대해 경쟁적 결합을 나타내는 경우 항원 내의 동일한 에피토프에 결합할 수 있다.

[0074] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "특이적으로 결합", "특이적으로 인식" 및 "특이적인"은 생물학적 분자를 포함하는 분자의 이종성 집단의 존재 하에서 표적의 존재를 결정하는 표적과 항체 또는 항체 모이어티 사이의 결합과 같은 측정 가능하고 재현 가능한 상호작용을 지칭한다. 예를 들어, 표적(이는 에피토프일 수 있음)을 특이적으로 인식하는 항체 또는 항체 모이어티는 다른 표적에 대한 이의 결합보다 더 큰 친화성, 더 큰 결합력, 더 큰 준비도 및/또는 더 큰 지속시간으로 이러한 표적에 결합하는 항체 또는 항체 모이어티이다. 일부 실시양태에서, 관련되지 않은 표적에 대한 항체의 결합 정도는, 예를 들어, 방사성 면역 분석(RIA)에 의해 측정된 바와 같이 표적에 대한 항체의 결합의 약 10% 미만이다. 일부 실시양태에서, 표적에 특이적으로 결합하는 항체는 $\leq 10^{-5}$ M, $\leq 10^{-6}$ M, $\leq 10^{-7}$ M, $\leq 10^{-8}$ M, $\leq 10^{-9}$ M, $\leq 10^{-10}$ M, $\leq 10^{-11}$ M 또는 $\leq 10^{-12}$ M의 해리 상수(K_D)를 갖는다. 일부 실시양태에서, 항체는 상이 종의 단백질 중에서 보존된 단백질의 에피토프에 특이적으로 결합한다. 일부 실시양

태에서, 특정 결합은 배타적 결합을 포함할 수 있지만 반드시 필요한 것은 아니다. 상기 항체 또는 항원 결합 도메인의 결합 특이성은 당업계에서 알려진 방법에 의해 실험적으로 결정될 수 있다. 이러한 방법은 웨스턴 블롯, ELISA-, RIA-, ECL-, IRMA-, EIA-, BIACORE™ -시험 및 펩티드 스캔을 포함하나 이에 한정되지 않는다.

[0075] "단리된" 항체(또는 작제물)는 이의 생성 환경의 구성요소(예를 들어, 천연 또는 재조합)로부터 식별되고/되거나 분리되고/되거나 회수된 항체이다. 특정 실시양태에서, 단리된 폴리펩티드는 이의 생성 환경으로부터 유래한 다른 모든 성분과의 결합이 없거나 실질적으로 없다.

[0076] 본원에서 기재되는 작제물, 항체, 또는 이의 항원 결합 단편을 코딩하는 "단리된" 핵산 분자는 생성된 환경에서 통상적으로 연관되는 적어도 하나의 오염 핵산 분자로부터 식별되고 분리되는 핵산 분자이다. 특정 실시양태에서, 단리된 핵산은 생성 환경과 연관되는 모든 성분과 연관되지 않거나 실질적으로 연관되지 않는다. 본원에서 기재되는 폴리펩티드 및 항체를 코딩하는 단리된 핵산 분자는 자연에서 발견되는 형태 또는 환경과 다른 형태로 존재한다. 따라서 단리된 핵산 분자는 세포에서 자연적으로 존재하는 본원에서 기재되는 폴리펩티드 및 항체를 코딩하는 핵산과 구별된다. 단리된 핵산은 일반적으로 핵산 분자를 함유하나 해당 핵산 분자는 염색체외로 또는 천연 염색체 위치와 상이한 염색체 위치에 존재하는 세포에 함유된 핵산 분자를 포함한다.

[0077] 용어 "조절 서열"은 특정 숙주 유기체에서 작동 가능하게 연결된 코딩 서열의 발현에 필요한 DNA 서열을 지칭한다. 원핵생물에 적합한 제어 서열은 예를 들어, 프로모터, 선택적으로 오퍼레이터 서열 및 리보솜 결합 부위를 포함한다. 진핵 세포는 프로모터, 폴리아데닐화 신호 및 인핸서를 활용하는 것으로 알려져 있다.

[0078] 핵산은 다른 핵산 서열과 기능적 관계에 놓일 때 "작동 가능하게 연결"된다. 예를 들어, 전서열 또는 분비 리더를 위한 DNA는 폴리펩티드의 분비에 참여하는 전단백질로서 발현되는 경우 폴리펩티드를 위한 DNA에 작동 가능하게 연결되거나; 프로모터 또는 인핸서는 서열의 전사에 영향을 미치는 경우 코딩 서열에 작동 가능하게 연결되거나; 리보솜 결합 부위는 번역을 용이하게 하도록 위치되는 경우 코딩 서열에 작동 가능하게 연결된다. 일반적으로, "작동 가능하게 연결"은 연결되는 DNA 서열이 인접하고, 분비 리더의 경우, 인접하고 판독 프레임에 있음을 의미한다. 그러나, 인핸서가 인접할 필요는 없다. 연결은 편리한 제한 부위에서 결찰에 의해 달성된다. 이러한 부위가 존재하지 않는 경우, 합성 올리고뉴클레오티드 어댑터 또는 링커가 종래의 관행에 따라 사용된다.

[0079] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "벡터"는 연결된 다른 핵산을 증식시킬 수 있는 핵산 분자를 지칭한다. 해당 용어는 자가 복제 핵산 구조로서의 벡터 및 도입된 숙주 세포에 도입되었을 때 숙주 세포의 게놈에 혼입되는 벡터를 포함한다. 특정 벡터는 작동 가능하게 연결된 핵산의 발현을 지시할 수 있다. 이러한 벡터는 본원에서 "발현 벡터"라고 지칭한다.

[0080] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "형질감염" 또는 "형질전환" 또는 "형질도입"은 외인성 핵산이 숙주 세포 내로 전달되거나 도입되는 과정을 지칭한다. "형질감염" 또는 "형질전환" 또는 "형질도입" 세포는 외인성 핵산으로 형질감염, 형질전환 또는 형질도입된 세포이며, 이 세포는 1차 대상체 세포 및 이의 자손을 포함한다.

[0081] 용어 "숙주 세포", "숙주 세포주" 및 "숙주 세포 배양물"은 상호교환적으로 사용될 수 있으며, 외인성 핵산이 도입된 세포를 지칭하며, 이러한 세포의 자손을 포함한다. 숙주 세포는 "형질전환체" 및 "형질전환 세포"를 포함하며, 이는 계대 수에 관계없이 1차 형질전환 세포 및 이로부터 유래한 자손을 포함한다. 자손은 핵산 함량이 모 세포와 완전히 동일하지 않을 수 있으며 돌연변이를 포함할 수 있다. 원래 형질전환된 세포에서 스크리닝되거나 선택된 것과 동일한 기능 또는 생물학적 활성을 갖는 돌연변이 자손이 본원에 포함된다.

[0082] 용어 "대상체", "개체" 및 "환자"는 인간, 소, 말, 고양이, 개, 설치류 또는 영장류를 포함하나 이에 한정되지 않는 포유동물을 지칭하기 위해 본원에서 상호교환적으로 사용된다. 일부 실시양태에서, 상기 대상체는 인간이다.

[0083] 제제의 "유효량"은 원하는 치료적 또는 예방적 결과를 달성하기 위해 필요한 투여량으로 그리고 기간 동안 효과적인 양을 지칭한다. 특정 용량은 선택된 특정 제제, 후속될 투약 요법, 다른 화합물과 조합하여 투여되는지 여부, 투여 시점, 영상화될 조직 및 운반되는 물리적 전달 시스템 중 하나 이상에 따라 달라질 수 있다.

[0084] 본 출원의 물질/분자, 작용제 또는 길항제의 "치료적 유효량"은 개체의 질환 상태, 연령, 성별 및 체중 및 개체에서 원하는 반응을 유도하는 물질/분자, 작용제 또는 길항제의 능력과 같은 인자에 따라 달라질 수 있다. 치료적 유효량은 또한 물질/분자, 작용제 또는 길항제의 임의의 독성 또는 유해한 효과가 치료적 유익한 효과에 의해 초과되는 것이다. 치료적 유효량은 하나 이상의 투여로 전달될 수 있다.

[0085] "예방적 유효량"은 원하는 예방적 결과를 달성하기 위해 필요한 투여량으로 그리고 기간 동안 효과적인 양을 지

칭한다. 반드시 그런 것은 아니지만 전형적으로, 예방적 용량이 질환의 이전 또는 초기 단계에서 대상체에게 사용되기 때문에, 예방적 유효량은 치료적 유효량보다 적을 것이다.

[0086] 본원에서 사용되는 바와 같이, "치료" 또는 "치료하는"은 임상 결과를 포함하여 유익하거나 원하는 결과를 수득하기 위한 접근법이다. 본 출원의 목적을 위해, 유익하거나 원하는 임상 결과는 다음 중 하나 이상을 포함하나 이에 한정되지 않는다: 질환으로부터 기인하는 하나 이상의 증상 완화, 질환의 정도 감소, 질환 안정화(예를 들어, 질환의 악화를 예방 또는 지연), 질환의 확산(예를 들어, 전이) 예방 또는 지연, 질환의 재발 예방 또는 지연, 질환의 진행 지연 또는 둔화, 질환 상태 완화, 질환의 관해(부분 또는 전체) 제공, 질환을 치료하기 위해 필요한 하나 이상의 다른 약제의 용량 감소, 질환의 진행 지연, 삶의 질 증가 또는 개선, 체중 증가 및/또는 생존 연장. 또한 "치료"에는 암의 병리학적 결과(예를 들어 종양 부피)의 감소도 포괄된다. 본 출원의 방법은 치료의 이러한 양태 중 임의의 하나 이상을 고려한다. "치료"는 치료 중인 병태가 반드시 치료된다는 의미는 아니다.

[0087] 본원에서 기재되는 출원의 실시양태는 "구성되는" 및/또는 "본질적으로 이루어진" 실시양태를 포함하는 것으로 이해된다.

[0088] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "약" 또는 "대략"은 당업자에 의해 결정되는 특정 값에 대해 허용 가능한 오차 범위 내를 의미하며, 이는 값이 측정되거나 결정되는 방법, 즉, 측정 시스템의 한계에 따라 부분적으로 달라질 것이다. 특정 실시양태에서, "약"은 당업계의 관행에 따라 3 또는 3 초과의 표준 편차 이내를 의미할 수 있다. 특정 실시양태에서, "약"은 주어진 값의 최대 20%, 예를 들어 최대 10%, 최대 5% 또는 최대 1%의 범위를 의미할 수 있다. 특정 실시양태에서, 특히 생물학적 시스템 또는 과정과 관련하여, 해당 용어는 값의 예를 들어 5배 이내 또는 2배 이내의 한 자릿수 이내를 의미할 수 있다.

[0089] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "조절하다"는 긍정적으로 또는 부정적으로 변경됨을 의미한다. 예시적인 조절은 약 1%, 약 2%, 약 5%, 약 10%, 약 25%, 약 50%, 약 75% 또는 약 100% 변화를 포함한다.

[0090] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "증가"는 적어도 약 5%만큼 양으로 변경됨을 의미한다. 변경은 약 5%, 약 10%, 약 25%, 약 30%, 약 50%, 약 75%, 약 100% 이상만큼일 수 있다.

[0091] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "감소"는 적어도 약 5%만큼 음으로 변경됨을 의미한다. 변경은 약 5%, 약 10%, 약 25%, 약 30%, 약 50%, 약 75%, 또는 심지어 약 100%만큼일 수 있다.

[0092] 본원에서 사용되는 용어 "약 X 내지 Y"는 "약 X 내지 약 Y"와 동일한 의미를 갖는다.

[0093] 본원에서 그리고 첨부되는 청구범위에서 사용되는 바와 같이, 단수형 지시대상은 문맥상 명백하게 달리 지시하지 않는 한 복수형 지시대상을 포함한다.

[0094] "이펙터 기능"은 항체 아이소타입에 따라 달라지는 항체의 Fc 영역에 기인하는 생물학적 활성을 지칭한다. 항체 이펙터 기능의 예는 C1q 결합 및 보체 의존성 세포독성(CDC), Fc 수용체 결합, 항체 의존성 세포 매개 세포독성(ADCC), 식세포작용, 세포 표면 수용체(예를 들어, B 세포 수용체) 하향 조절 및 B 세포 활성화를 포함한다.

[0095] "면역접합체"는 세포독성제를 포함하나 이에 한정되지 않는 하나 이상의 이종성 분자에 접합된 항체를 지칭한다.

[0096] 용어 "약학적 제제"는 함유된 활성 성분의 생물학적 활성이 효과적일 수 있도록 하는 형태이고 제제가 투여될 대상체에게 허용할 수 없을 정도로 독성이 있는 추가의 성분을 함유하지 않는 제제를 지칭한다.

[0097] 본원에서 사용되는 바와 같이, "약학적으로 허용 가능한 담체"는 대상체에게 무독성인, 활성 성분 이외의, 약학적 제제에 있는 성분을 지칭한다. 약학적으로 허용 가능한 담체는 완충제, 부형제, 안정화제 또는 방부제를 포함하나 이에 한정되지 않는다.

[0098] 용어 "가변 영역" 또는 "가변 도메인"은 항체를 항원에 결합시키는 데 관여하는 항체 중쇄 또는 경쇄의 도메인을 지칭한다. 특정 실시양태에서, 천연 항체의 중쇄 및 경쇄의 가변 도메인(각각 VH 및 VL)은 일반적으로 유사한 구조를 가지며, 각각의 도메인은 4개의 보존된 프레임워크 영역(FR) 및 3개의 CDR을 포함한다. (예를 들어, Kindt 등, Kuby Immunology, 61ed., W.H. Freeman and Co., page 91(2007) 참조.) 단일 VH 또는 VL 도메인만으로도 항원 결합 특이성을 부여하기에 충분할 수 있다. 또한, 특정 항원에 결합하는 항체는 각각 상보적 VL 또는 VH 도메인의 라이브러리를 스크리닝하기 위해 항원에 결합하는 항체로부터 VH 또는 VL 도메인을 사용하여 단리될 수 있다. 예를 들어, Portolano 등, J. Immunol. 150:880-887(1993); Clarkson 등, Nature 352:624-

628(1991) 참조.

[0099] 본원에서 사용되는 바와 같은 "항원 인식 수용체"는 항원과의 결합에 반응하여 면역반응 세포(예를 들어, T 세포)를 활성화할 수 있는 수용체를 지칭한다. 항원 인식 수용체의 비제한적인 예는 천연 및 변형 T 세포 수용체("TCR") 및 키메라 항원 수용체("CAR")를 포함한다.

[0100] 본원에서 사용되는 바와 같은 용어 "키메라 항원 수용체" 또는 "CAR"은 면역반응 세포를 활성화하거나 자극할 수 있는 세포내 신호전달 도메인에 융합된 세포외 항원 결합 도메인 및 막횡단 도메인을 포함하는 분자를 지칭한다. 특정 실시양태에서, CAR의 세포외 항원 결합 도메인은 항체 또는 항체 단편, 예를 들어, VHH 또는 scFv를 포함한다. 특정 실시양태에서, 상기 항체(예를 들어, VHH 또는 scFv)는 세포내 신호전달 도메인에 융합되는 막횡단 도메인에 융합된다. 특정 실시양태에서, 상기 CAR은 항원에 대한 높은 결합 친화성 또는 결합력을 갖도록 선택된다.

[0101] "면역반응 세포"는 면역 반응에서 기능하는 세포 또는 이의 전구세포 또는 자손을 의미한다.

[0102] 2. 항체 및 항체 유도체

[0103] 본 개시는 항체 및 항체 유도체를 제공한다. 특정 실시양태에서, 본 개시는 항체가 종양 세포를 선택적으로 표적화하고/하거나 B7H3에 의해 매개되는 신호 경로를 억제하여 종양 세포에 대해 유익한 항종양 효과를 유도하는 항종양 치료제에 사용될 수 있는 B7H3에 결합하는 단일 도메인 항체의 발견에 부분적으로 기반한다. 특정 실시양태에서, 본원에서 개시되는 항체는 B7H3를 발현하는 종양 세포 및/또는 면역 세포에 결합한다. 특정 실시양태에서, 본원에서 개시되는 항체는 B7H3 기능을 억제하는 길항제 항체이다. 특정 실시양태에서, 항-B7H3 항체는 B7H3와 이의 수용체 사이의 상호 작용을 억제한다. 특정 실시양태에서, 항-B7H3 항체는 B7H3 단백질에 의해 야기되는 면역 억제 신호를 차단하거나 감소시킨다. 특정 실시양태에서, 항-B7H3 항체는 단일 도메인 항체, 예를 들어, 낙타과 항체 또는 VHH 항체를 포함한다. 특정 실시양태에서, 항-B7H3 항체는 IgG, Fab 및/또는 scFv 형태의 전통적인 항체와 비교하여 더 작은 크기로 인해 개선된 조직 침투 능력을 갖는다.

[0104] 특정 실시양태에서, 본 개시의 항체는 키메라, 인간화 또는 인간 항체를 포함하는 모노클로날 항체이거나 이를 포함할 수 있다. 특정 실시양태에서, 본원에서 개시되는 항체는 인간화 항체를 포함한다. 특정 실시양태에서, 상기 항체는 수용체 인간 프레임워크, 예를 들어, 인간 면역글로불린 프레임워크 또는 인간 컨센서스 프레임워크를 포함한다.

[0105] 특정 실시양태에서, 본 개시의 항체는 항체 단편, 예를 들어, Fv, Fab, Fab', scFv, 디아바디 또는 F(ab')2 단편일 수 있다. 특정 실시양태에서, 상기 항체는 전장 항체, 예를 들어 온전한 IgG 1 항체 또는 본원에서 정의되는 다른 항체 부류 또는 아이소타입이다. 특정 실시양태에서, 본 개시의 항체 또는 항체 유도체는 본 출원, 예를 들어 본원에 상세히 설명된 2.1 내지 2.12 섹션에서 기재되는 바와 같은 임의의 특징을 단독으로 또는 조합하여 혼입할 수 있다.

[0106] 본 개시의 항체 및 항체 유도체는 예를 들어, 신생물 또는 암의 진단 또는 치료에 유용하다. 특정 실시양태에서, 본 개시의 항체를 사용하여 성장이 억제될 수 있는 상기 신생물 및 암은 전형적으로 면역요법에 반응하는 신생물 및 암을 포함한다. 특정 실시양태에서, 상기 신생물 및 암은 유방암(예를 들어, 유방 세포 암종), 난소암(예를 들어, 난소 세포 암종) 및 신세포 암종(RCC)을 포함한다. 본 개시의 방법을 사용하여 치료될 수 있는 다른 암의 예는 흑색종(예를 들어, 전이성 악성 흑색종), 전립선암, 결장암, 폐암, 골암, 췌장암, 피부암, 뇌 종양, 급성 골수성 백혈병, 만성 골수성 백혈병, 급성 림프구성 백혈병, 만성 림프구성 백혈병을 포함하는 만성 또는 급성 백혈병, 림프종(예를 들어, 호지킨 및 비호지킨 림프종, 림프구성 림프종, 원발성 CNS 림프종, T 세포 림프종), 비인두암종, 두암 또는 경부암, 피부 또는 안구내 악성 흑색종, 자궁암, 직장암, 항문부암, 위암, 고환암, 자궁암, 나팔관암종, 자궁내막암종, 자궁경부암종, 질암종, 음문암종, 식도암, 소장암, 내분비계암, 갑상샘암, 부갑상샘암, 유방선암, 연조직 육종, 요도암, 음경암, 소아 고형 종양, 방광암, 신장암 또는 요관암, 유방골반암종, 중추신경계(CNS)의 신생물, 종양 혈관신생증, 척추 종양, 뇌간 신경교종, 뇌하수체 선종, 카포시 육종, 표피모양암, 편평세포암, 석면에 의해 유도된 암을 포함하는 환경적으로 유도된 암, 예를 들어, 중피종 및 상기 암의 조합을 포함한다.

[0107] 2.1 예시적인 단일특이적 항체 및 다중특이적 항체

[0108] 2.1.1 예시적인 항-B7H3 항체

[0109] 본 개시는 B7H3 단백질에 결합하는 단리된 항체를 제공한다. 특정 실시양태에서, 본 개시의 항-B7H3 항체는

B7H3의 ECD에 결합한다. 특정 실시양태에서, 항-B7H3 항체는 서열 번호: 84에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 B7H3의 ECD에 결합한다. 특정 실시양태에서, 상기 항-B7H3 항체는 본원에서 기재되는 항-B7H3 항체, 예를 들어 19C10, 19C10-V3 또는 19C10-V4와 동일한 에피토프에 결합한다.

[0110] 특정 실시양태에서, 본원에서 개시되는 항-B7H3 항체는 B7H3 기반 신호 경로의 길항제로서 기능할 수 있다. 특정 실시양태에서, 상기 항-B7H3 항체는 B7H3 단백질과 이의 수용체 사이의 상호작용을 차단하거나 감소시킬 수 있다. 특정 실시양태에서, 상기 항-B7H3 항체는 B7H3 단백질과 이의 수용체 사이의 상호작용을 적어도 약 10%, 약 20%, 약 30%, 약 40%, 약 50%, 약 60%, 약 70%, 약 80%, 약 90%, 약 99% 또는 약 99.9% 감소시킬 수 있다. 특정 실시양태에서, 상기 항-B7H3 항체는 B7H3 단백질 또는 이의 수용체의 다운스트림 면역 억제 신호를 차단할 수 있다. 특정 실시양태에서, 상기 항-B7H3 항체를 사용하는 치료는 대상체에서 항종양 효능을 나타내며, 이로써 종양 성장을 감소시키고/시키거나 대상체의 생존 기간을 연장시킨다. 특정 실시양태에서, 상기 항-B7H3 항체는 면역 세포, 예를 들어, T 세포 및/또는 NK 세포의 면역 반응 및/또는 항암 효과를 증가시킨다. 특정 실시양태에서, 단일 도메인 항체(예를 들어, VHH)를 포함하는 상기 항-B7H3 항체는 전장 항체의 Fab 도메인과 비교하여 단일 도메인 항체의 더 작은 크기로 인해 전장 항체와 비교하여 작은 분자 크기를 가지며, 이는 전장 항체와 비교하여, 예를 들어, 종양 부위에서, 우수한 조직 침윤을 초래할 수 있다. 특정 실시양태에서, 상기 항-B7H3 항체를 사용하는 치료는 전장 항-B7H3 항체, 예를 들어 MGA-271 유사체(에노블리투주맙으로도 알려짐) 및/또는 h1702를 사용한 치료에 비해 더 우수한 항종양 효능을 나타내는데, 이 서열은 각각 US 8,802,091 및 US 20200031934 A1에서 개시되어 있다.

[0111] 특정 실시양태에서, 상기 항-B7H3 항체는 B7H3에 결합하는 단일 도메인 항체를 포함한다. 특정 실시양태에서, 상기 단일 도메인 항체는 VHH를 포함한다. 특정 실시양태에서, 상기 단일 도메인 항체는 중쇄 가변 영역(VH)을 포함한다. 특정 실시양태에서, 상기 단일 도메인 항체는 Fc 영역에 연결된다. 특정 실시양태에서, 상기 단일 도메인 항체는 Fc 영역에 연결되지 않는다.

[0112] 특정 실시양태에서, 상기 단일 도메인 항체는 약 1×10^{-7}M 이하의 KD로 B7H3에 결합한다. 특정 실시양태에서, 상기 단일 도메인 항체는 약 1×10^{-8}M 이하의 KD로 B7H3에 결합한다. 특정 실시양태에서, 상기 단일 도메인 항체는 약 5×10^{-9}M 이하의 KD로 B7H3에 결합한다. 특정 실시양태에서, 상기 단일 도메인 항체는 약 1×10^{-9}M 이하의 KD로 B7H3에 결합한다. 특정 실시양태에서, 상기 단일 도메인 항체는 약 1×10^{-10}M 이하의 KD로 B7H3에 결합한다. 특정 실시양태에서, 상기 단일 도메인 항체는 약 1×10^{-11}M 내지 약 1×10^{-7}M의 KD로 B7H3에 결합한다. 특정 실시양태에서, 상기 단일 도메인 항체는 약 1×10^{-10}M 내지 약 1×10^{-7}M의 KD로 B7H3에 결합한다. 특정 실시양태에서, 상기 단일 도메인 항체는 약 1×10^{-10}M 내지 약 1×10^{-8}M의 KD로 B7H3에 결합한다. 특정 실시양태에서, 상기 단일 도메인 항체는 약 1×10^{-11}M 내지 약 1×10^{-9}M의 KD로 B7H3에 결합한다. 특정 실시양태에서, 상기 단일 도메인 항체는 약 2×10^{-10}M 내지 약 5×10^{-9}M의 KD로 B7H3에 결합한다. 특정 실시양태에서, 상기 단일 도메인 항체는 약 1×10^{-9}M 내지 약 5×10^{-8}M의 KD로 B7H3에 결합한다. 특정 실시양태에서, 상기 단일 도메인 항체는 약 1×10^{-10}M 내지 약 1×10^{-9}M의 KD로 B7H3에 결합한다.

[0113] 특정 실시양태에서, 상기 단일 도메인 항체는 서열 번호: 1에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1, 서열 번호: 2에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2 및 서열 번호: 3에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3을 포함하는 참조 항-B7H3 단일 도메인 항체와 B7H3에 대한 결합에 대하여 교차 경쟁한다. 특정 실시양태에서, 상기 단일 도메인 항체는 서열 번호: 5에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1, 서열 번호: 6에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2 및 서열 번호: 7에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3을 포함하는 참조 항-B7H3 단일 도메인 항체와 B7H3에 대한 결합에 대하여 교차 경쟁한다. 특정 실시양태에서, 상기 단일 도메인 항체는 서열 번호: 9에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1, 서열 번호: 10에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2 및 서열 번호: 11에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3을 포함하는 참조 항-B7H3 단일 도메인 항체와 B7H3에 대한 결합에 대하여 교차 경쟁한다. 특정 실시양태에서, 상기 단일 도메인 항체는 서열 번호: 13에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1, 서열 번호: 14에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2 및 서열 번호: 15에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3을 포함하는 참

조 항-B7H3 단일 도메인 항체와 B7H3에 대한 결합에 대하여 교차 경쟁한다. 특정 실시양태에서, 상기 단일 도메인 항체는 서열 번호: 17에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1, 서열 번호: 18에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2 및 서열 번호: 19에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3을 포함하는 참조 항-B7H3 단일 도메인 항체와 B7H3에 대한 결합에 대하여 교차 경쟁한다. 특정 실시양태에서, 상기 단일 도메인 항체는 서열 번호: 21에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1, 서열 번호: 22에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2 및 서열 번호: 23에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3을 포함하는 참조 항-B7H3 단일 도메인 항체와 B7H3에 대한 결합에 대하여 교차 경쟁한다. 특정 실시양태에서, 상기 단일 도메인 항체는 서열 번호: 25에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1, 서열 번호: 26에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2 및 서열 번호: 27에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3을 포함하는 참조 항-B7H3 단일 도메인 항체와 B7H3에 대한 결합에 대하여 교차 경쟁한다. 특정 실시양태에서, 상기 단일 도메인 항체는 서열 번호: 29에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1, 서열 번호: 30에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2 및 서열 번호: 31에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3을 포함하는 참조 항-B7H3 단일 도메인 항체와 B7H3에 대한 결합에 대하여 교차 경쟁한다. 특정 실시양태에서, 상기 단일 도메인 항체는 서열 번호: 33에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1, 서열 번호: 34에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2 및 서열 번호: 35에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3을 포함하는 참조 항-B7H3 단일 도메인 항체와 B7H3에 대한 결합에 대하여 교차 경쟁한다. 특정 실시양태에서, 상기 단일 도메인 항체는 서열 번호: 37에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1, 서열 번호: 38에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2 및 서열 번호: 39에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3을 포함하는 참조 항-B7H3 단일 도메인 항체와 B7H3에 대한 결합에 대하여 교차 경쟁한다. 특정 실시양태에서, 상기 단일 도메인 항체는 서열 번호: 41에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1, 서열 번호: 42에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2 및 서열 번호: 43에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3을 포함하는 참조 항-B7H3 단일 도메인 항체와 B7H3에 대한 결합에 대하여 교차 경쟁한다. 특정 실시양태에서, 상기 단일 도메인 항체는 서열 번호: 56에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1, 서열 번호: 57에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2 및 서열 번호: 58에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3을 포함하는 참조 항-B7H3 단일 도메인 항체와 B7H3에 대한 결합에 대하여 교차 경쟁한다.

[0114] 특정 실시양태에서, 상기 단일 도메인 항체는 a) 서열 번호: 1, 5, 9, 13, 17, 21, 25, 29. 33, 37, 41 및 56 중 임의의 하나의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1 또는 최대 약 3개의 아미노산 치환을 포함하는 이의 변이체; b) 서열 번호: 2, 6, 10, 14, 18, 22, 26, 30, 34, 38, 42 및 57 중 임의의 하나의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2 또는 최대 약 3개의 아미노산 치환을 포함하는 이의 변이체; 및 c) 서열 번호: 3, 7, 11, 15, 19, 23, 27, 31, 35, 39, 43 및 58 중 임의의 하나의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3 또는 약 최대 3개의 아미노산 치환을 포함하는 이의 변이체를 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함한다.

[0115] 특정 실시양태에서, 상기 단일 도메인 항체는 CDR1 도메인, CDR2 도메인 및 CDR3 도메인을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하며, 상기 CDR1 도메인, 상기 CDR2 도메인 및 상기 CDR3 도메인은 각각 서열 번호: 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40, 44, 48, 52 및 59로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 참조 중쇄 가변 영역에 포함되는 CDR1 도메인, CDR2 도메인 및 CDR3 도메인을 포함한다.

[0116] 특정 실시양태에서, 상기 단일 도메인 항체는 서열 번호: 1에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1, 서열 번호: 2에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2 및 서열 번호: 3에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3을 포함한다. 특정 실시양태에서, 상기 단일 도메인 항체는 서열 번호: 5에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1, 서열 번호: 6에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2 및 서열 번호: 7에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3을 포함한다. 특정 실시양태에서, 상기 단일 도메인 항체는 서열 번호: 9에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1, 서열 번호: 10에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2 및 서열 번호: 11에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3을 포함한다. 특정 실시양태에서, 상기 단일 도메인 항체는 서열 번호: 13에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1, 서열 번호: 14에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역

CDR2 및 서열 번호: 15에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3을 포함한다. 특정 실시양태에서, 상기 단일 도메인 항체는 서열 번호: 17에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1, 서열 번호: 18에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2 및 서열 번호: 19에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3을 포함한다. 특정 실시양태에서, 상기 단일 도메인 항체는 서열 번호: 21에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1, 서열 번호: 22에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2 및 서열 번호: 23에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3을 포함한다. 특정 실시양태에서, 상기 단일 도메인 항체는 서열 번호: 25에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1, 서열 번호: 26에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2 및 서열 번호: 27에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3을 포함한다. 특정 실시양태에서, 상기 단일 도메인 항체는 서열 번호: 29에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1, 서열 번호: 30에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2 및 서열 번호: 31에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3을 포함한다. 특정 실시양태에서, 상기 단일 도메인 항체는 서열 번호: 33에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1, 서열 번호: 34에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2 및 서열 번호: 35에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3을 포함한다. 특정 실시양태에서, 상기 단일 도메인 항체는 서열 번호: 37에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1, 서열 번호: 38에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2 및 서열 번호: 39에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3을 포함한다. 특정 실시양태에서, 상기 단일 도메인 항체는 서열 번호: 41에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1, 서열 번호: 42에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2 및 서열 번호: 43에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3을 포함한다. 특정 실시양태에서, 상기 단일 도메인 항체는 서열 번호: 56에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1, 서열 번호: 57에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2 및 서열 번호: 58에 제시된 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3을 포함한다.

[0117] 특정 실시양태에서, 상기 단일 도메인 항체는 서열 번호: 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40, 44, 48, 52 및 59로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 약 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함한다. 특정 실시양태에서, 상기 단일 도메인 항체는 서열 번호: 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40, 44, 48, 52 및 59로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함한다.

[0118] 특정 실시양태에서, 상기 단일 도메인 항체는 서열 번호: 4에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함한다. 특정 실시양태에서, 상기 단일 도메인 항체는 서열 번호: 8에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함한다. 특정 실시양태에서, 상기 단일 도메인 항체는 서열 번호: 12에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함한다. 특정 실시양태에서, 상기 단일 도메인 항체는 서열 번호: 16에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함한다. 특정 실시양태에서, 상기 단일 도메인 항체는 서열 번호: 20에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함한다. 특정 실시양태에서, 상기 단일 도메인 항체는 서열 번호: 24에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함한다. 특정 실시양태에서, 상기 단일 도메인 항체는 서열 번호: 28에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함한다. 특정 실시양태에서, 상기 단일 도메인 항체는 서열 번호: 32에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함한다. 특정 실시양태에서, 상기 단일 도메인 항체는 서열 번호: 36에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함한다. 특정 실시양태에서, 상기 단일 도메인 항체는 서열 번호: 40에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함한다. 특정 실시양태에서, 상기 단일 도메인 항체는 서열 번호: 44에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함한다. 특정 실시양태에서, 상기 단일 도메인 항체는 서열 번호: 48에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함한다. 특정 실시양태에서, 상기 단일 도메인 항체는 서열 번호: 52에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함한다. 특정 실시양태에서, 상기 단일 도메인 항체는 서열 번호: 59에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함한다.

[0119] 특정 실시양태에서, 상기 중쇄 가변 영역에 포함된 아미노산 서열 중 임의의 하나는 최대 약 1개, 약 2개, 약 3개, 약 4개, 약 5개, 약 6개, 약 7개, 약 8개, 약 9개 또는 약 10개의 아미노산 치환, 결실 및/또는 첨가를 포함할 수 있다. 특정 실시양태에서, 상기 아미노산 치환은 보존적 치환이다.

[0120] 특정 실시양태에서, 상기 단일 도메인 항체는 인간화 프레임워크를 포함한다. 특정 실시양태에서, 상기 인간화 프레임워크는 서열 번호: 48, 52 및 59로 이루어진 군으로부터 선택되는 중쇄 가변 영역 서열의 프레임워크 서

열을 포함한다. 특정 실시양태에서, 상기 인간화 프레임워크는 서열 번호: 48의 프레임워크 서열을 포함한다. 특정 실시양태에서, 상기 인간화 프레임워크는 서열 번호: 52의 프레임워크 서열을 포함한다. 특정 실시양태에서, 상기 인간화 프레임워크는 서열 번호: 59의 프레임워크 서열을 포함한다.

[0121] 특정 실시양태에서, 상기 항-B7H3 항체는 Fc 영역을 포함하지 않는다. 특정 실시양태에서, 상기 항-B7H3 항체는 Fc 영역을 추가로 포함한다. 특정 실시양태에서, 상기 Fc 영역은 인간 Fc 영역을 포함한다. 특정 실시양태에서, 상기 Fc 영역은 IgG, IgA, IgD, IgE 및 IgM의 Fc 영역으로 이루어진 군으로부터 선택되는 Fc 영역을 포함한다. 특정 실시양태에서, 상기 Fc 영역은 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4의 Fc 영역으로 이루어진 군으로부터 선택되는 Fc 영역을 포함한다. 특정 실시양태에서, 상기 Fc 영역은 IgG1 Fc 영역을 포함한다. 특정 실시양태에서, 상기 IgG1 Fc 영역은 항체 의존성 세포 매개 세포독성(ADCC)을 변형하는 하나 이상의 돌연변이 또는 변형을 포함한다. 특정 실시양태에서, 상기 IgG1 Fc 영역은 항체 의존성 세포 매개 세포독성(ADCC)을 감소시키는 하나 이상의 돌연변이 또는 변형을 포함한다. 특정 실시양태에서, 상기 IgG1 Fc 영역은 항체 의존성 세포 매개 세포독성(ADCC)을 향상시키는 하나 이상의 돌연변이 또는 변형을 포함한다. 특정 실시양태에서, 상기 IgG1 Fc 영역은 비-푸코실화된 당 사슬을 포함한다. 특정 실시양태에서, 상기 IgG1 Fc 영역은 L235V, F243L, R292P, Y300L 및 P396L의 돌연변이를 포함한다. 특정 실시양태에서, 상기 IgG1 Fc 영역은 L235V, F243L, R292P 및 Y300L의 돌연변이를 포함한다. 특정 실시양태에서, 상기 IgG1 Fc 영역은 S239D, A330L 및 I332E의 돌연변이를 포함한다. 특정 실시양태에서, 상기 항-B7H3 항체는 서열 번호: 53에 제시된 아미노산 서열을 포함한다. 특정 실시양태에서, 상기 항-B7H3 항체는 서열 번호: 54에 제시된 아미노산 서열을 포함한다. 특정 실시양태에서, 상기 항-B7H3 항체는 서열 번호: 55에 제시된 아미노산 서열을 포함한다. 특정 실시양태에서, 상기 항-B7H3 항체는 서열 번호: 60에 제시된 아미노산 서열을 포함한다.

[0122] 특정 실시양태에서, 상기 중쇄 가변 영역은 링커를 통해 Fc 영역에 연결된다. 특정 실시양태에서, 상기 링커는 펩티드 링커이다. 특정 실시양태에서, 상기 펩티드 링커는 약 4개 내지 약 30개의 아미노산을 포함한다. 특정 실시양태에서, 상기 펩티드 링커는 약 4개 내지 약 15개의 아미노산을 포함한다. 특정 실시양태에서, 상기 펩티드 링커는 서열 번호: 61 내지 82로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함한다.

[0123] 특정 실시양태에서, 상기 항-B7H3 항체는 전장 면역글로불린, 단쇄 Fv(scFv) 단편, Fab 단편, Fab' 단편, F(ab')2, Fv 단편, 이황화 안정화 Fv 단편(dsFv), (dsFv)2, VHH, Fv-Fc 융합체, scFv-Fc 융합체, VHH-Fv 융합체, 디아바디, 트리바디, 테트라바디 또는 이들의 임의의 조합을 포함한다.

[0124] 특정 실시양태에서, 상기 항체는 항체 유도체인 더 큰 분자에 포함된다. 특정 실시양태에서, 상기 항체 유도체는 다중특이적 항체, 예를 들어, 이중특이적 항체이며, 다중특이적 항체는 제2 항원에 특이적으로 결합하는 제2 항체 모이어티를 포함한다. 특정 실시양태에서, 상기 제2 항원은 종양 연관 항원이다. 특정 실시양태에서, 상기 종양 연관 항원은 Her-2, EGFR, PD-L1, c-Met, B 세포 성숙 항원(BCMA), 탄산 무수화효소 IX(CA1X), 암종배아 항원(CEA), CD5, CD7, CD10, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD34, CD38, CD41, CD44, CD49f, CD56, CD74, CD123, CD133, CD138, CD276(B7H3), 상피 당단백질(EGP2), 세포영약막 세포-표면 항원 2(TROP-2), 상피 당단백질- 40(EGP-40), 상피 세포 부착 분자(EpCAM), 수용체 티로신-단백질 키나아제 erb-B2,3,4, 엽산-결합 단백질(FBP), 태아 아세티콜린 수용체(AChR), 엽산 수용체-a, 강글리오사이드 G2(GD2), 강글리오사이드 G3(GD3), 인간 텔로머레이스 역전사효소(hTERT), 키나아제 삽입 도메인 수용체(KDR), 루이스 A(CA 1.9.9), 루이스 Y(LeY), 글리피칸-3(GPC3), L1 세포 부착 분자(L1CAM), 뮤신 16(Muc-16), 뮤신 1(Muc-1), NG2D 리간드, 종양태아성 항원(h5T4), 전립선 줄기 세포 항원(PSCA), 전립선 특이적 막 항원(PSMA), 종양 연관 당단백질 72(TAG-72), Claudin18.2(CLDN18.2), 혈관 상피 성장 인자 R2(VEGF- R2), 윌름스 종양 단백질(WT-1), 1형 티로신-단백질 키나아제 막관통 수용체(ROR1), PVR, PVRL2 및 이들의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 특정 실시양태에서, 상기 제2 항원은 면역 관문 조절제이다. 특정 실시양태에서, 상기 면역 관문 조절제는 TIGIT, PD1, CTLA4, LAG-3, 2B4, BTLA 및 이들의 임의의 조합으로 구성된다.

[0125] 특정 실시양태에서, 상기 항-B7H3 항체는 치료제 또는 표지에 접합된다. 특정 실시양태에서, 상기 표지는 방사성 동위원소, 형광 염료 및 효소로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0126] 2.2 항체 친화성

[0127] 특정 실시양태에서, 본원에서 개시되는 항체 또는 항체 유도체는 이의 표적 항원에 대해 높은 결합 친화성을 갖는다. 특정 실시양태에서, 상기 항체 또는 항체 유도체는 약 1×10^{-7}M 이하의 KD로 표적에 결합한다. 특정 실시양태에서, 상기 항체 또는 항체 유도체는 약 1×10^{-8}M 이하의 KD로 표적에 결합한다. 특정 실시양태에서, 상기

항체 또는 항체 유도체는 약 5×10^{-9}M 이하의 KD로 표적에 결합한다. 특정 실시양태에서, 상기 항체 또는 항체 유도체는 약 1×10^{-9}M 이하의 KD로 표적에 결합한다. 특정 실시양태에서, 상기 항체 또는 항체 유도체는 약 1×10^{-10}M 이하의 KD로 표적에 결합한다.

[0128] 특정 실시양태에서, 상기 항체 또는 항체 유도체는 약 1×10^{-11}M 내지 약 1×10^{-7}M의 KD로 표적에 결합한다. 특정 실시양태에서, 항체 또는 항체 유도체는 약 1×10^{-10}M 내지 약 1×10^{-7}M의 KD로 표적에 결합한다. 특정 실시양태에서, 항체 또는 항체 유도체는 약 1×10^{-10}M 내지 약 1×10^{-8}M의 KD로 표적에 결합한다. 특정 실시양태에서, 항체 또는 항체 유도체는 약 1×10^{-11}M 내지 약 1×10^{-9}M의 KD로 표적에 결합한다. 특정 실시양태에서, 항체 또는 항체 유도체는 약 2×10^{-10}M 내지 약 5×10^{-9}M의 KD로 표적에 결합한다. 특정 실시양태에서, 항체 또는 항체 유도체는 약 1×10^{-9}M 내지 약 5×10^{-8}M의 KD로 표적에 결합한다. 특정 실시양태에서, 항체 또는 항체 유도체는 약 1×10^{-10}M 내지 약 1×10^{-9}M의 KD로 표적에 결합한다.

[0129] 상기 항체 또는 항체 유도체의 KD는 당업계에서 알려진 방법에 의해 결정될 수 있다. 이러한 방법은 웨스턴 블롯, ELISA-, RIA-, ECL-, IRMA-, EIA-, Octet- BIACORE®-시험 및 펩티드 스캔을 포함하나 이에 한정되지 않는다.

[0130] 특정 실시양태에서, KD는 BIACORE® 표면 플라스몬 공명 분석을 사용하여 측정될 수 있다. 예를 들어, 그리고 제한 없이, BIACORE®-2000 또는 BIACORE® 3000(Biacore, Inc., Piscataway, NJ)을 사용하는 분석은 약 10 반응 단위(RU)의 고정된 항원 CMS 칩을 사용하여 25℃에서 수행된다. 특정 실시양태에서, 카르복시메틸화 덱스트란 바이오센서 칩(CMS, Biacore, Inc.)은 공급자의 지시에 따라 N-에틸-N'-(3-디메틸아미노프로필)-카보디이미드 염산염(EDC) 및 N-히드록시숙신이미드(NHS)로 활성화된다. 결합된 단백질의 대략 10 반응 단위(RU)를 달성하기 위해 5㎕/분의 유속으로 주사하기 전에 항원을 10mM 아세트산 나트륨(pH 4.8)으로 5㎍/ml(약 0.2㎛M)로 희석한다. 항원 주사 후, 1M 에탄올아민을 주사하여 미반응 기를 차단한다. 동역학 측정을 위해, Fab(0.78nM 내지 500nM)의 2배 연속 희석액을 0.05% 폴리소르베이트 20(TWEEN-20TM) 계면활성제(PBST)가 있는 PBS에 25℃에서 대략 25㎕/분의 유속으로 주사한다. 결합 속도(k_{on}) 및 해리 속도(k_{off})는 결합 및 해리 센서그램을 동시에 피팅하여 간단한 일대일 Langmuir 결합 모델(BIACORE® Evaluation Software version 3.2)을 사용하여 계산된다. 평형 해리 상수(KD)는 koff/kon 비율로 계산할 수 있다. 예를 들어, Chen 등, J. Mol. Biol. 293:865-881(1999) 참조. 위의 표면 플라즈몬 공명 분석에 의해 on 속도가 $10^{6}M^{-1}$ s^{-1}을 초과하는 경우, 교반된 큐벳을 갖는 정지-유동 장착 분광광도계(Aviv Instruments) 또는 8000-시리즈 SLM-AMINCO™ 분광광도계(ThermoSpectronic)와 같은 분광계에서 측정된 바와 같이 증가하는 농도의 항원의 존재 하에, PBS, pH 7.2 중의 20nM 항항원 항체(Fab 형태)의 25℃에서의 형광 방출 강도(여기 = 295nm; 방출 = 340nm, 16nm 밴드 패스)의 증가 또는 감소를 측정하는 형광 켄칭 기법을 사용하여 on 속도를 결정할 수 있다.

[0131] 2.3 항체 단편

[0132] 특정 실시양태에서, 본 개시의 항체는 항원 결합 단편 또는 항체 단편을 포함한다. 항체 단편은 Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')2, VHH, Fv 및 scFv 단편 및 본원에서 기재되는 다른 단편을 포함하나 이에 한정되지 않는다. 특정 항체 단편에 대한 검토를 위하여, Hudson 등, Nat. Med. 9: 129-134(2003) 참조. scFv 단편의 검토를 위하여, 예를 들어, Pluckthtin, in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, 제113권, Rosenburg and Moore 편집, (Springer- Verlag, New York), pp. 269-315(1994) 참조; 또한 WO 93/16185; 및 미국 특허 제5,571,894호 및 제5,587,458호 참조. 회수 수용체 결합 에피토프 잔기를 포함하고 체내 반감기가 증가된 Fab 및 $F(ab)_2$ 단편에 대한 논의를 위하여, 미국 특허 제5,869,046호 참조.

[0133] 특정 실시양태에서, 본 개시의 항체는 디아바디일 수 있다. 디아바디는 2가 또는 이중특이적일 수 있는 2개의 항원 결합 부위를 가진 항체 단편이다. 예를 들어, EP 404,097; WO 1993/01 161; Hudson 등, Nat. Med. 9:129-134(2003); 및 Hollinger 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448(1993) 참조. 트리바디 및 테트라바디는 또한 Hudson 등, Nat. Med. 9: 129-134(2003) 참조.

[0134] 특정 실시양태에서, 본 개시의 항체는 단일 도메인 항체를 포함할 수 있다. 단일 도메인 항체는 항체의 중쇄 가변 도메인의 전부 또는 일부 또는 경쇄 가변 도메인의 전부 또는 일부를 포함하는 항체 단편이다. 특정 실시양

태에서, 상기 단일 도메인 항체는 인간 단일 도메인 항체이다(Domantis, Inc., Waltham, MA; 예를 들어, 미국 특허 제 6,248,516 B1호 참조). 특정 실시양태에서, 상기 단일 도메인 항체는 낙타과 단일 도메인 항체이다. 특정 실시양태에서, 상기 단일 도메인 항체는 VHH이다. 특정 실시양태에서, 상기 단일 도메인 항체는 인간화된다.

[0135] 항체 단편은 본원에서 기재되는 바와 같이 온전한 항체의 단백질분해 소화뿐만 아니라 재조합 숙주 세포(예를 들어, 대장균(E. coli) 또는 파지)에 의한 생성을 포함하나 이에 한정되지 않는 다양한 기법에 의해 제조될 수 있다.

[0136] 2.4 키메라 및 인간화 항체

[0137] 특정 실시양태에서, 본 개시의 항체는 키메라 항체이다. 특정 키메라 항체는 예를 들어, 미국 특허 제4,816,567호; 및 Morrison 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855(1984)에서 기재되어 있다. 특정 실시양태에서, 키메라 항체는 비인간 가변 영역(예를 들어, 마우스로부터 유래한 가변 영역) 및 인간 불변 영역을 포함한다. 특정 실시양태에서, 키메라 항체는 부류 또는 하위부류가 모 항체의 부류 또는 하위부류로부터 변경된 "부류 전환" 항체이다. 키메라 항체는 이의 항원 결합 단편을 포함한다.

[0138] 특정 실시양태에서, 본 개시의 항체는 인간화 항체일 수 있다. 전형적으로, 비인간 항체는 인간화되어 인간에 대한 면역원성을 감소시키면서 모 비인간 항체의 특이성과 친화성은 유지한다. 일반적으로, 인간화 항체는 HVR, 예를 들어, CDR(또는 이의 부분)이 비인간 항체로부터 유래하고 하나 이상의 프레임워크(FR)(또는 이의 임의의 부분)가 인간 항체 서열로부터 유래한 하나 이상의 가변 도메인을 포함한다. 인간화 항체는 또한 선택적으로 인간 불변 영역의 적어도 일부를 포함할 수 있다. 특정 실시양태에서, 인간화 항체의 특정 FR 잔기는 예를 들어, 항체 특이성 또는 친화성을 복원하거나 개선하기 위해 비인간 항체(예를 들어, HVR 잔기가 유래된 항체)로부터 유래한 상응하는 잔기로 치환된다.

[0139] 인간화 항체 및 이를 제조하는 방법은 예를 들어, Almagro 및 Fransson, Front. Biosci. 13:1619-1633(2008)에서 기재되어 있으며 예를 들어, Riechmann 등, Nature 332:323-329(1988); Queen 등, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 86:10029-10033(1989); 미국 특허 제5,821,337호, 제7,527,791호, 제6,982,321호 및 제7,087,409호; Kashmiri 등, Methods 36:25-34(2005) (SDR(a-CDR) 이식 기재); Padlan, Mol. Immunol. 28:489-498(1991) ("재표면화(resurfacing)" 기재); Dall'Acqua 등, Methods 36:43-60(2005) ("FR 셔플링" 기재); 및 Osbourn 등, Methods 36:61-68(2005) 및 Klimka 등, Br. J. Cancer, 83:252-260(2000) (FR 셔플링에 대한 "가이드된 선택" 접근법 기재)에서 더 기재되어 있다.

[0140] 인간화에 사용될 수 있는 인간 프레임워크 영역은 "최적 적합" 방법을 사용하여 선택된 프레임워크 영역(예를 들어, Sims 등, J. Immunol. 151:2296(1993) 참조); 경쇄 또는 중쇄 가변 영역의 특정 하위군의 인간 항체의 공통 서열로부터 유래한 프레임워크 영역(예를 들어, Carter 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285(1992); 및 Presta 등, J. Immunol., 151:2623(1993) 참조); 인간 성숙(체세포적으로 돌연변이된) 프레임워크 영역 또는 인간 생식계열 프레임워크 영역(예를 들어, Almagro 및 Fransson, Front. Biosci. 13:1619-1633(2008) 참조); 및 스크리닝 FR 라이브러리로부터 유래한 프레임워크 영역(예를 들어, Baca 등, J. Biol. Chem. 272:10678-10684(1997) 및 Rosok 등, J. Biol. Chem. 271:22611-22618(1996) 참조)을 포함하나 이에 한정되지 않는다.

[0141] 2.5 인간 항체

[0142] 특정 실시양태에서, 본 개시의 항체는 인간 항체(예를 들어, 인간 도메인 항체 또는 인간 DAb)일 수 있다. 인간 항체는 당업계에서 알려진 다양한 기법을 사용하여 생성될 수 있다. 인간 항체는 일반적으로 van Dijk 및 van de Winkel, Curr. Opin. Pharmacol. 5: 368-74(2001), Lonberg, Curr. Opin. Immunol. 20:450-459(2008) 및 Chen, Mol. Immunol. 47(4):912-21(2010)에서 기재되어 있다. 완전한 인간 단일 도메인 항체(또는 DAb)를 생성할 수 있는 유전자이식 마우스 또는 래트는 당업계에서 알려져 있다. 예를 들어, US20090307787A1, 미국 특허 제8,754,287호, US20150289489A1, US20100122358A1 및 WO2004049794 참조.

[0143] 인간 항체(예를 들어, 인간 DAb)는 항원성 공격에 반응하여 온전한 인간 항체 또는 인간 가변 영역을 갖는 온전한 항체를 생성하도록 변형된 유전자이식 동물에 면역원을 투여하여 제조될 수 있다. 이러한 동물은 전형적으로 내인성 면역글로불린 유전자좌를 대체하거나 염색체외에 존재하거나 동물의 염색체에 무작위로 통합되는 인간 면역글로불린 유전자좌의 전부 또는 일부를 함유한다. 이러한 유전자이식 마우스에서, 상기 내인성 면역글로불린 유전자좌가 일반적으로 비활성화되었다. 유전자이식 동물로부터 인간 항체를 수득하는 방법의 검토를 위하여, Lonberg, Nat. Biotech. 23:1117-1125(2005) 참조. 또한 예를 들어, XENOMOUSE™ 기술을 기재하는 미국

특허 제6,075,181호 및 제6,150,584호; HuMab® 기술을 기재하는 미국 특허 제5,770,429호; K-M MOUSE® 기술을 기재하는 미국 특허 제7,041,870호 및 VelociMouse® 기술을 기재하는 미국 특허 출원 공개 제US 2007/0061900호 참조. 이러한 동물에 의해 생성된 온전한 항체로부터 유래한 인간 가변 영역은 예를 들어, 다른 인간 불변 영역과 조합하여 더 변형될 수 있다.

[0144] 인간 항체(예를 들어, 인간 DAb)는 또한 하이브리도마 기반 방법에 의해 제조될 수 있다. 인간 모노클로날 항체의 생성을 위한 인간 골수종 및 마우스-인간 이종골수종 세포주가 기재되어 있다(예를 들어, Kozbor J. Immunol., 133: 3001(1984); Brodeur 등, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987); 및 Boerner 등, J. Immunol., 147: 86(1991) 참조). 인간 B 세포 하이브리도마 기술을 통해 생성된 인간 항체는 또한 Li 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103:3557-3562(2006)에서 기재되어 있다. 추가 방법은 예를 들어, 미국 특허 제7,189,826호(하이브리도마 세포주로부터 유래한 모노클로날 인간 IgM 항체의 생성을 기술함) 및 Ni, Xiandai Mianyixue, 26(4):265-268(2006)(인간-인간 하이브리도마를 기재함)에서 기재되는 방법을 포함한다. 인간 하이브리도마 기술(Trioma 기술)은 또한 Vollmers 및 Brandlein, Histology and Histopathology, 20(3):927-937(2005) 및 Vollmers 및 Brandlein, Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology, 27(3):185-91(2005)에서 기재되어 있다.

[0145] 인간 항체(예를 들어, 인간 DAb)는 또한 인간 유래 파지 디스플레이 라이브러리로부터 선택되는 Fv 클론 가변 도메인 서열을 단리하여 생성될 수 있다. 이후, 이러한 가변 도메인 서열은 원하는 인간 불변 도메인과 결합될 수 있다. 항체 라이브러리로부터 인간 항체를 선택하는 기법은 아래에 기재되어 있다.

[0146] 2.6 라이브러리 유래 항체

[0147] 본 개시의 항체는 원하는 활성을 갖는 항체에 대한 조합 라이브러리를 스크리닝하여 단리될 수 있다. 예를 들어, 파지 디스플레이 라이브러리를 생성하고 원하는 결합 특성을 보유하는 항체에 대해 이러한 라이브러리를 스크리닝하기 위한 다양한 방법이 당업계에서 알려져 있다. 이러한 방법은 예를 들어, Hoogenboom 등 in Methods in Molecular Biology 178:1-37(O'Brien 등 편집, Human Press, Totowa, NJ, 2001)에서 기재되어 있으며 McCafferty 등, Nature 348:552-554; Clackson 등, Nature 352: 624-628(1991); Marks 등, J. Mol. Biol. 222: 581-597(1992); Marks 및 Bradbury, in Methods in Molecular Biology 248:161-175(Lo 편집, Human Press, Totowa, NJ, 2003); Sidhu 등, J. Mol. Biol. 338(2): 299-310(2004); Lee 등, J. Mol. Biol. 340(5): 1073-1093(2004); Fellouse, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101(34): 12467-12472(2004); 및 Lee 등, J. Immunol. Methods 284(1-2): 119-132(2004)에서 더 기재되어 있다. 단일 도메인 항체 라이브러리를 구축하는 방법이 기재되어 있으며, 예를 들어, 미국 특허 제 7371849호 참조.

[0148] 특정 파지 디스플레이 방법에서, V_H 및 V_L 유전자의 레퍼토리는 중합효소 연쇄 반응(PCR)에 의해 개별적으로 클로닝되고 파지 라이브러리에서 무작위로 재조합되며, 이는 이후 Winter 등, Ann. Rev. Immunol., 12: 433-455(1994)에서 기재되는 바와 같이 항원 결합 파지에 대해 스크리닝될 수 있다. 파지는 전형적으로 scFv 단편으로서 또는 Fab 단편으로서 항체 단편을 표시한다. 면역화된 공급원으로부터 유래한 라이브러리는 하이브리도마를 구성할 필요 없이 면역원에 대한 고친화성 항체를 제공한다. 대안적으로, 나이브 레퍼토리는 Griffiths 등, EMBO J, 12: 725-734(1993)에 의해 기재되는 바와 같이 임의의 면역화 없이 광범위한 비자기 및 또한 자기 항원에 대한 항체의 단일 공급원을 제공하도록(예를 들어, 인간으로부터) 클로닝될 수 있다. 마지막으로, 나이브 라이브러리는 줄기 세포로부터 재배열되지 않은 V-유전자 세그먼트을 클로닝하고 무작위 서열을 함유하는 PCR 프라이머를 사용하여 고도로 가변적인 CDR3 영역을 코딩하고 체외에서 재배열을 달성함으로써 합성적으로 제조될 수도 있으며, 이는 Hoogenboom 및 Winter, J. Mol. Biol., 227: 381-388(1992)에서 기재되는 바와 같다. 인간 항체 파지 라이브러리를 기재하는 특허 간행물은 예를 들어, 다음을 포함한다: 미국 특허 제5,750,373호 및 미국 특허 공개 제2005/0079574호, 제2005/0119455호, 제2005/0266000호, 제2007/0117126호, 제2007/0160598호, 제2007/0237764호, 제2007/0292936호 및 제2009/0002360호.

[0149] 인간 항체 라이브러리로부터 단리된 항체 또는 항체 단편은 본원에서 인간 항체 또는 인간 항체 단편으로 간주된다.

[0150] 2.7 항체 변이체

[0151] 본 개시는 개시된 항체의 아미노산 서열 변이체를 추가로 제공한다. 예를 들어, 항체의 결합 친화성 및/또는 다른 생물학적 특성을 개선하는 것이 바람직할 수 있다. 항체의 아미노산 서열의 변이체는 항체를 코딩하는 뉴클

레오티드 서열에 적절한 변형을 도입하여 또는 펩티드 합성으로 제조할 수 있다. 이러한 변형은 항체의 아미노산 서열 내의 잔기로부터의 결실 및/또는 잔기로의 삽입 및/또는 잔기의 치환을 포함하나 이에 한정되지 않는다. 최종 항체, 즉 변형된 항체가 원하는 특성, 예를 들어, 항원 결합을 보유하는 경우, 결실, 삽입 및 치환의 임의의 조합을 통해 최종 작제물에 도달할 수 있다.

[0152] 2.7.1 치환, 삽입 및 결실 변이체

[0153] 특정 실시양태에서, 하나 이상의 아미노산 치환을 갖는 항체 변이체가 제공된다. 치환적 돌연변이생성에 대한 관심 부위는 HVR(또는 CDR) 및 FR을 포함한다. 보존적 치환은 표 2의 "바람직한 치환"의 제목 하에 나타나 있다. 보다 실질적인 변화는 표 2의 "예시적 치환"이라는 제목 하에 제공되며, 이는 아미노산 측쇄 부류와 관련하여 아래에 더 설명된다. 아미노산 치환은 관심 항체에 도입될 수 있으며 생성물은 원하는 활성, 예를 들어, 유지된/개선된 항원 결합, 감소된 면역원성 또는 개선된 ADCC 또는 CDC에 대해 스크리닝될 수 있다.

표 2

[0154] 아미노산 치환

원래 잔기	예시적 치환	바람직한 치환
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; Norleucine	Leu
Leu (L)	Norleucine; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Norleucine	Leu

[0155] 아미노산은 공통적인 측쇄의 성질에 따라 분류될 수 있다: (1) 소수성: 노르류신, Met, Ala, Val, Leu, Ile; (2) 중성 친수성: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln; (3) 산성: Asp, Glu; (4) 염기성: His, Lys, Arg; (5) 사슬 배향에 영향을 미치는 잔기: Gly, Pro; 및 (6) 방향족: Trp, Tyr, Phe. 특정 실시양태에서, 비보존적 치환은 이들 부류 중 하나의 구성원을 다른 부류로 교환하는 것을 수반할 것이다.

[0156] 특정 실시양태에서, 치환 변이체의 유형은 모 항체(예를 들어, 인간화 또는 인간 항체)의 하나 이상의 초가변 영역 잔기를 치환하는 것을 수반한다. 일반적으로, 추가 연구를 위해 선택된 생성된 변이체는 모 항체에 비해 특정 생물학적 특성(예를 들어, 증가된 친화성, 감소된 면역원성)에서 변형(예를 들어, 개선)을 가질 것이고/이거나 모 항체의 특정 생물학적 특성을 실질적으로 유지할 것이다. 예시적인 치환 변이체는 친화성 성숙 항체이며, 이는 예를 들어, 본원에서 기재되는 바와 같은 파지 디스플레이 기반 친화성 성숙 기법을 사용하여 편리하게 생성될 수 있다. 간단히 말하면, 하나 이상의 HVR(또는 CDR) 잔기가 돌연변이되고 변이체 항체가 파지 상에 표시되며 특정 생물학적 활성(예를 들어, 결합 친화성)에 대해 스크리닝된다.

[0157] 예를 들어, 항체 친화성을 개선하기 위해 HVR(또는 CDR)에서 변경(예를 들어, 치환)이 이루어질 수 있다. 이러한 변경은 HVR(또는 CDR) "핫스팟", 즉, 체세포 성숙 과정 동안 높은 빈도로 돌연변이를 겪는 코돈에 의해 암호화된 잔기(예를 들어, Chowdhury, Methods Mol. Biol. 207:179-196(2008) 참조) 및/또는 SDR(a-CDR)에서 이루어질 수 있으며, 생성된 변이체 VH 또는 VL은 결합 친화성에 대해 시험된다. 2차 라이브러리로부터 구축 및 재

선택에 의한 친화성 성숙은, 예를 들어 Hoogenboom 등, in Methods in Molecular Biology 178:1-37(O'Brien 등 편집, Human Press, Totowa, NJ, (2001))에서 기재되어 있다. 친화성 성숙의 특정 실시양태에서, 임의의 다양한 방법(예를 들어, 오류 발생 가능성이 있는 PCR, 사슬 셔플링 또는 올리고뉴클레오티드 지정 돌연변이생성)에 의해 성숙을 위해 선택된 가변 유전자에 다양성이 도입된다. 이후, 2차 라이브러리가 생성된다. 이후, 라이브러리를 스크리닝하여 원하는 친화성을 갖는 임의의 항체 변이체를 식별한다. 다양성을 도입하는 다른 방법은 여러 HVR(또는 CDR) 잔기(예를 들어 1회에 4 내지 6개 잔기)를 무작위화하는 HVR(또는 CDR) 지정 접근법을 포함한다. 항원 결합에 관여하는 HVR(또는 CDR) 잔기는 예를 들어, 알라닌 스캐닝 돌연변이생성 또는 모델링을 사용하여 구체적으로 식별될 수 있다. 특히, CDR-H3 및 CDR-L3이 표적화되는 경우가 많다.

[0158] 특정 실시양태에서, 이러한 변경이 항원에 결합하는 항체의 능력을 실질적으로 감소시키지 않는 한, 치환, 삽입 또는 결실은 하나 이상의 HVR(또는 CDR) 내에서 발생할 수 있다. 예를 들어, 결합 친화성을 실질적으로 감소시키지 않는 보존적 변경(예를 들어, 본원에서 제공되는 보존적 치환)은 HVR(또는 CDR)에서 이루어질 수 있다. 이러한 변경은 HVR(또는 CDR) "핫스팟" 또는 CDR 외부에 있을 수 있다. 위에서 제공되는 변이체 VHH 서열의 특정 실시양태에서, 각각의 HVR(또는 CDR)은 변경되지 않거나 1개, 2개 또는 3개 이하의 아미노산 치환을 함유한다.

[0159] 돌연변이생성을 위해 표적화될 수 있는 항체의 잔기 또는 영역을 식별하기 위한 유용한 방법은 Cunningham and Wells(1989) Science, 244:1081-1085에 의해 기재된 바와 같이 "알라닌 스캐닝 돌연변이생성"으로 지칭된다. 이러한 방법에서, 항체와 항원의 상호작용이 영향을 받는지 여부를 결정하기 위해, 표적 잔기의 잔기 또는 기(예를 들어, 하전된 잔기, 예컨대, Arg, Asp, His, Lys 및 Glu)가 식별되고 중성 또는 음전하를 띤 아미노산(예를 들어, 알라닌 또는 폴리알라닌)에 의해 대체된다. 추가 치환은 초기 치환에 대한 기능적 민감성을 나타내는 아미노산 위치에 도입될 수 있다. 대안적으로 또는 추가적으로, 항체와 항원 사이의 접촉점을 식별하기 위한 항원-항체 복합체의 결정 구조. 이러한 접촉 잔기 및 인접 잔기는 치환을 위한 후보로서 표적화되거나 제거될 수 있다. 변이체는 이들이 원하는 성질을 함유하는지 여부를 결정하기 위해 스크리닝될 수 있다.

[0160] 아미노산 서열 삽입은 하나의 잔기에서 백 개 이상의 잔기를 함유하는 폴리펩티드까지의 길이 범위의 아미노-및/또는 카르복실-말단 융합뿐만 아니라 단일 또는 다수 아미노산 잔기의 서열내 삽입을 포함한다. 말단 삽입의 예는 N-말단 메티오닐 잔기를 갖는 항체를 포함한다. 항체 분자의 다른 삽입 변이체는 항체의 N-말단 또는 C-말단에 효소(예를 들어, ADEPT의 경우) 또는 항체의 혈청 반감기를 증가시키는 폴리펩티드와의 융합을 포함한다.

[0161] 2.7.2 글리코실화 변이체

[0162] 특정 실시양태에서, 항체는 작제물이 글리코실화되는 정도를 증가시키거나 감소시키기 위해 변경된다. 항체에 대한 글리코실화 부위의 첨가 또는 결실이 하나 이상의 글리코실화 부위가 생성되거나 제거되도록 아미노산 서열을 변경하여 편리하게 달성될 수 있다.

[0163] 항체가 Fc 영역(예를 들어, scFv-Fc)을 포함하는 경우, 이에 부착된 탄수화물이 변경될 수 있다. 포유동물 세포에 의해 생성되는 천연 항체는 전형적으로 Fc 영역의 C_H2 도메인의 Asn297에 N-결합에 의해 일반적으로 부착되는 분지형 바이안테나리 올리고당을 포함한다. 예를 들어, Wright 등, TIBTECH 15:26-32(1997) 참조. 올리고당은 만노스, N-아세틸 글루코사민(GlcNAc), 갈락토스, 시알산과 같은 다양한 탄수화물뿐만 아니라 바이안테나리 올리고당 구조의 "줄기(stem)"에서 GlcNAc에 부착된 푸코스를 포함할 수 있다. 특정 실시양태에서, 상기 항체에 있는 올리고당의 변형은 특정 개선된 성질을 갖는 항체 변이체를 생성하기 위해 이루어질 수 있다.

[0164] 특정 실시양태에서, 상기 항체는 Fc 영역에 (직접적으로 또는 간접적으로) 부착된 푸코스가 결여된 탄수화물 구조를 가질 수 있다. 예를 들어, 이러한 항체 중 푸코스의 양은 1% 내지 80%, 1% 내지 65%, 5% 내지 65% 또는 20% 내지 40%일 수 있다. 푸코스의 양은, 예를 들어, WO 2008/077546에 기재된 바와 같이, MALDI-TOF 질량 분석법에 의해 측정된 바와 같이 Asn 297에 부착된 모든 당구조(예를 들어, 복합, 하이브리드 및 고 만노스 구조)의 합에 대해, Asn297에서 당 사슬 내의 푸코스의 평균 양을 계산하여 결정된다. Asn297은 Fc 영역의 약 위치 297(Fc 영역 잔기의 EU 넘버링)에 위치한 아스파라긴 잔기를 지칭하나; Asn297은 또한 항체의 사소한 서열 변이로 인해 위치 297의 업스트림 또는 다운스트림, 즉, 위치 294와 300 사이에 약 ±3개 아미노산에 위치할 수 있다. 이러한 푸코실화 변이체는 개선된 ADCC 기능을 가질 수 있다. 예를 들어, 미국 특허 공개 제US 2003/0157108호(Presta, L.); 제US 2004/0093621호(Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd) 참조. "비푸코실화", "탈푸코실화" 또는 "푸코스 결핍" 항체 변이체와 관련된 간행물의 예는 다음을 포함한다: US 2003/0157108; WO 2000/61739; WO 2001/29246; US 2003/0115614; US 2002/0164328; US 2004/0093621; US 2004/0132140; US 2004/0110704; US 2004/0110282; US 2004/0109865; WO 2003/085119; WO 2003/084570; WO 2005/035586; WO 2005/035778; WO2005/053742; WO2002/031140; Okazaki 등, J. Mol. Biol. 336:1239-1249(2004); Yamane-

Ohnuki 등, Biotech. Bioeng. 87: 614(2004). 탈푸코실화 항체를 생성할 수 있는 세포주의 예는 단백질 푸코실화가 결핍된 Lec13 CHO 세포(Ripka 등, Arch. Biochem. Biophys. 249:533-545(1986); 미국 특허 출원 제US 2003/0157108 A1호, Presta, L; 및 WO 2004/056312 A1, Adams 등) 및 녹아웃 세포주, 예컨대, 알파-1,6-푸코실전달효소 유전자, FUT8, 녹아웃 CHO 세포(예를 들어, Yamane-Ohnuki 등, Biotech. Bioeng. 87: 614(2004); Kanda, Y. 등, Biotechnol. Bioeng., 94(4):680-688(2006); 및 WO2003/085107 참조)를 포함한다.

[0165] 특정 실시양태에서, 상기 항체는 양분된 올리고당을 가지며, 예를 들어, 여기서 항체의 Fc 영역에 부착된 바이안테나리 올리고당은 GlcNAc에 의해 양분된다. 이러한 항체 변이체는 감소된 푸코실화 및/또는 개선된 ADCC 기능을 가질 수 있다. 이러한 항체 변이체의 예는, 예를 들어, WO 2003/011878(Jean-Mairet 등); 미국 특허 제6,602,684호(Umana 등); 및 US 2005/0123546(Umana 등)에 기재되어 있다. Fc 영역에 부착된 올리고당에 적어도 하나의 갈락토스 잔기를 갖는 항체 변이체가 또한 제공된다. 이러한 항체 변이체는 개선된 CDC 기능을 가질 수 있다. 이러한 항체 변이체는 WO 1997/30087(Patel 등); WO 1998/58964(Raju, S.); 및 WO 1999/22764(Raju, S.)에 기재되어 있다.

[0166] 2.7.3 Fc 영역 변이체

[0167] 특정 실시양태에서, 현재 개시되는 항체 또는 항체 유도체의 Fc 영역은 하나 이상의 아미노산 위치에서 아미노산 변형(예를 들어 치환)을 포함하는 인간 Fc 영역 서열(예를 들어, 인간 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 Fc 영역)을 포함할 수 있다. 특정 실시양태에서, 하나 이상의 아미노산 변형이 항체 모이어티(예를 들어, scFv-Fc 또는 VHH-Fc)의 Fc 영역 내로 도입되어 Fc 영역 변이체를 생성할 수 있다.

[0168] 특정 실시양태에서, 상기 Fc 영역은 모든 이펙터 기능이 아닌 일부 이펙터 기능을 보유하며, 이는 체내에서 항체의 반감기가 중요하지만 특정 이펙터 기능(예컨대 보체 및 ADCC)이 불필요하거나 유해한 일부 적용에 대해 이상적인 후보가 되게 한다. 체외 및/또는 체내 세포독성 분석이 CDC 및/또는 ADCC 활성의 감소/고갈을 확인하기 위해 수행될 수 있다. 예를 들어, Fc 수용체(FcR) 결합 분석은 항체가 FcγR 결합이 결여되어 있으나(따라서 ADCC 활성이 결여되어 있을 가능성이 있음) FcRn 결합 능력을 유지하는 것을 보장하기 위해 수행될 수 있다. ADCC를 매개하는 일차 세포인 NK 세포는 FcγRIII만을 발현하는 반면, 단핵구는 FcγRI, FcγRII 및 FcγRIII을 발현한다. 조혈 세포 상에서의 FcR 발현은 Ravetch 및 Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9:457-492 (1991)의 페이지 464 표 2에서 요약되어 있다. 관심 분자의 ADCC 활성을 평가하기 위한 체외 분석의 비제한적인 예는 미국 특허 제5,500,362호(예를 들어. Hellstrom, I. 등, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 83:7059-7063(1986) 참조) 및 Hellstrom, I 등, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 82:1499-1502(1985); 5,821,337(Bruggemann, M. 등, J. Exp. Med. 166:1351-1361(1987) 참조)에 기재되어 있다. 대안적으로, 비방사성 분석 방법이 사용될 수 있다(예를 들어, 유세포 분석을 위한 ACTI™ 비방사성 세포독성 분석(CellTechnology, Inc. Mountain View, CA); 및 CytoTox 96® 비방사성 세포독성 분석(Promega, Madison, WI) 참조). 이러한 분석을 위한 유용한 이펙터 세포는 말초 혈액 단핵 세포(PBMC) 및 자연 살해(NK) 세포를 포함한다. 대안적으로 또는 추가적으로, 관심 분자의 ADCC 활성은 체내에서, 예를 들어, Clynes 등, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 95:652-656(1998)에 개시되는 것과 같은 동물 모델에서 평가될 수 있다. C1q 결합 분석은 항체가 C1q에 결합할 수 없기에 CDC 활성이 결여되어 있음을 확인하기 위해 또한 수행될 수 있다. 예를 들어, WO 2006/029879 및 WO 2005/100402에서 C1q 및 C3c 결합 ELISA를 참조. 보체 활성화를 평가하기 위해, CDC 분석이 수행될 수 있다(예를 들어, Gazzano-Santoro 등, J. Immunol. Methods 202:163(1996); Cragg, M.S. 등, Blood 101:1045-1052(2003); 및 Cragg, M.S. 및 M.J. Glennie, Blood 103:2738-2743(2004) 참조). FcRn 결합 및 체내 제거율/반감기 결정은 또한 당업계에서 알려진 방법을 사용하여 수행될 수 있다(예를 들어, Petkova, S.B. 등, Int'l. Immunol. 18(12):1759-1769(2006) 참조).

[0169] 감소된 이펙터 기능을 갖는 항체는 Fc 영역 잔기 238, 265, 269, 270, 297, 327 및 329 중 하나 이상의 치환을 갖는 항체를 포함한다(미국 특허 제6,737,056호). 이러한 Fc 돌연변이체는 아미노산 위치 265, 269, 270, 297 및 327 중 두 개 이상 위치에 있는 치환을 갖는 Fc 돌연변이체를 포함하며, 이는 잔기 265 및 297이 알라닌으로 치환되는 소위 "DANA" Fc 돌연변이체를 포함한다(미국 특허 제7,332,581호).

[0170] FcR에 대한 결합이 개선되거나 감소된 특정 항체 변이체가 기재되어 있다. (예를 들어, 미국 특허 제6,737,056호; WO 2004/056312 및 Shields 등, J. Biol. Chem. 9(2): 6591-6604(2001) 참조)

[0171] 특정 실시양태에서, 상기 Fc 영역은 잔기의 EU 넘버링에 따른 하나 이상의 돌연변이를 포함한다. 특정 실시양태에서, 상기 Fc 영역은 IgG1 Fc 영역이다. 특정 실시양태에서, 상기 IgG1 Fc 영역은 L234A 돌연변이 및/또는 L235A 돌연변이를 포함한다. 특정 실시양태에서, 상기 Fc 영역은 IgG2 또는 IgG4 Fc 영역이다. 특정 실시양태에

서, 상기 Fc 영역은 F234A 및/또는 L235A 돌연변이를 포함하는 IgG4 Fc 영역이다.

[0172] 특정 실시양태에서, 상기 Fc 영역은 IgG1 Fc 영역이다. 특정 실시양태에서, 상기 IgG1 Fc 영역은 항체 의존성 세포 매개 세포독성(ADCC)을 변형하는 하나 이상의 돌연변이를 포함한다. 특정 실시양태에서, 상기 IgG1 Fc 영역은 항체 의존성 세포 매개 세포독성(ADCC)을 감소시키는 하나 이상의 돌연변이를 포함한다. 특정 실시양태에서, 상기 IgG1 Fc 영역은 항체 의존성 세포 매개 세포독성(ADCC)을 향상시키는 하나 이상의 돌연변이를 포함한다. 특정 실시양태에서, 상기 IgG1 Fc 영역은 L235V, F243L, R292P, Y300L 및 P396L의 돌연변이를 포함한다. 특정 실시양태에서, 상기 IgG1 Fc 영역은 S239D, A330L 및 I332E의 돌연변이를 포함한다. 특정 실시양태에서, 상기 IgG1 Fc 영역은 L235V, F243L, R292P 및 Y300L의 돌연변이를 포함한다. 특정 실시양태에서, 상기 IgG1 Fc 영역은 Fc 영역의 위치 298, 333 및/또는 334에서 치환을 포함한다.

[0173] 특정 실시양태에서, 상기 Fc 영역은 IgG4 Fc 영역을 포함한다. 특정 실시양태에서, 상기 IgG4 Fc 영역은 S228P 돌연변이를 포함한다.

[0174] 특정 실시양태에서, C1q 결합 및/또는 보체 의존성 세포독성(CDC)을 변경(즉, 개선 또는 감소)시키는 변경이 상기 Fc 영역에서 이루어지며, 이는 예를 들어 미국 특허 제6,194,551호, WO 99/51642 및 Idusogie 등, J. Immunol. 164: 4178-4184(2000)에 기재된 바와 같다.

[0175] 특정 실시양태에서, 상기 항체(예를 들어, scFv-Fc 또는 VHH-Fc) 변이체는 반감기를 변경하고/하거나 신생아 Fc 수용체(FcRn)에 대한 결합을 변경하는 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하는 변이체 Fc 영역을 포함한다. 태아에게 모체의 IgG를 전달하는 역할을 하는 신생아 Fc 수용체(FcRn)에 대한 결합이 개선되고 반감기가 증가된 항체(Guyer 등, J. Immunol. 117:587(1976) 및 Kim 등, J. Immunol. 24:249(1994))가 US2005/0014934A1(Hinton 등)에 기재되어 있다. 이러한 항체는 FcRn에 대한 Fc 영역의 결합을 변경하는 하나 이상의 치환을 갖는 Fc 영역을 포함한다. 이러한 Fc 변이체는 Fc 영역 잔기 중 하나 이상에 치환, 예를 들어, Fc 영역 잔기 434의 치환이 있는 Fc 변이체를 포함한다(미국 특허 제7,371,826호).

[0176] Fc 영역 변이체의 다른 예에 관한 Duncan & Winter, Nature 322:738-40(1988); 미국 특허 제5,648,260호; 미국 특허 제5,624,821호; 및 WO 94/29351 또한 참조.

[0177] 2.7.4 시스테인 조작 항체 변이체

[0178] 특정 실시양태에서, 항체의 하나 이상의 잔기가 시스테인 잔기로 치환된 시스테인 조작된 항체 모이어티, 예를 들어, "thioMAb"를 생성하는 것이 바람직할 수 있다. 특정 실시양태에서, 상기 치환된 잔기는 항체의 접근 가능한 부위에서 발생한다. 이러한 잔기를 시스테인으로 치환하여, 반응성 티올기는 항체의 접근 가능한 부위에 위치하게 되며 본원에서 추가로 기재된 바와 같이 항체를 약물 모이어티 또는 링커-약물 모이어티와 같은 다른 모이어티에 접합시켜 면역접합체를 생성하는 데 사용될 수 있다. 특정 실시양태에서, 다음 잔기 중 임의의 하나 이상이 시스테인으로 치환될 수 있다: 중쇄의 A118(EU 넘버링); 및 중쇄 Fc 영역의 S400(EU 넘버링). 시스테인 조작된 항체 모이어티는 예를 들어, 미국 특허 제7,521,541호에서 기재된 바와 같이 생성될 수 있다.

[0179] 2.8 항체 유도체

[0180] 특정 실시양태에서, 본원에서 기재되는 항체는 당업계에서 알려져 있고 용이하게 이용 가능한 추가적인 단백질성 또는 비단백질성 모이어티를 포함하는 항체 유도체가 되도록 추가로 변형될 수 있다. 항체의 유도체화에 적합한 비단백질성 모이어티는 수용성 중합체를 포함하나 이에 한정되지 않는다. 수용성 중합체의 비제한적인 예는 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 에틸렌 글리콜/프로필렌 글리콜의 공중합체, 카르복시메틸셀룰로스, 덱스트란, 폴리비닐 알코올, 폴리비닐 피롤리돈, 폴리-1,3-디옥솔레인, 폴리-1,3,6-트리옥세인, 에틸렌/말레산 무수물 공중합체, 폴리아미노산(동종중합체 또는 무작위 공중합체) 및 덱스트란 또는 폴리(n-비닐 피롤리돈)폴리에틸렌 글리콜, 프로프로필렌 글리콜 동종중합체, 프로리프로필렌 옥사이드/에틸렌 옥사이드 공중합체, 폴리옥시에틸화 폴리올(예를 들어, 글리세롤), 폴리비닐 알코올 및 이들의 혼합물을 포함하나 이에 한정되지 않는다. 폴리에틸렌 글리콜 프로피온알데히드는 물에 대한 안정성으로 인해 제조 시 우세를 가질 수 있다. 중합체는 임의의 분자량을 가질 수 있고, 분지되거나 분지되지 않을 수 있다. 항체에 부착된 중합체의 수는 다양할 수 있고, 하나 이상의 중합체가 부착된 경우, 이들은 동일하거나 상이한 분자일 수 있다. 일반적으로, 유도체화에 사용되는 중합체의 수 및/또는 유형은 개선될 항체의 특정 성질 또는 기능, 항체 유도체가 한정된 조건 하에 진단에 사용될 것인지 여부 등을 포함하나 이에 한정되지 않는 고려사항을 기반으로 결정될 수 있다.

[0181] 특정 실시양태에서, 항체는 하나 이상의 생물학적 활성 단백질, 폴리펩티드 또는 이의 단편을 포함하는 항체 유도체가 되도록 추가로 변형될 수 있다. 본원에서 상호교환적으로 사용 가능한 바와 같이, "생체 활성" 또는 "생

물학적 활성"은 특정 기능을 수행하기 위해 신체에서 생물학적 활성을 나타내는 것을 의미한다. 예를 들어, 단백질, DNA 등과 같은 특정 생체분자와 조합하여 이러한 생체분자의 활성을 촉진 또는 억제하는 것을 의미할 수 있다. 특정 실시양태에서, 생체 활성 단백질 또는 이의 단편은 질환 또는 병태의 예방 또는 치료를 위한 활성 약물 물질로서 환자에게 투여되는 단백질 및 폴리펩티드에, 진단 시험 또는 체외 분석에서 사용되는 효소와 같은 진단 목적으로 사용되는 단백질 및 폴리펩티드뿐만 아니라 백신과 같은 질환을 예방하기 위해 환자에게 투여되는 단백질 및 폴리펩티드를 포함한다.

[0182] 2.9 생성 방법

[0183] 본원에서 개시되는 항체 및 항체 유도체는 당업계에서 이용 가능하거나 알려진 임의의 기법을 사용하여 생성될 수 있다. 예를 들어, 제한은 아니나, 항체 및 항체 유도체는 예를 들어, 미국 특허 제4,816,567호에서 기재된 바와 같이 재조합 방법 및 조성물을 사용하여 생성될 수 있다. 항체 및 항체 유도체를 생성하는 상세한 절차는 아래 실시예에서 기재되어 있다.

[0184] 본 개시되는 특허 대상은 본원에서 개시되는 항체 또는 항체 유도체를 코딩하는 단리된 핵산을 추가로 제공한다. 예를 들어, 상기 단리된 핵산은 항체의 VL을 포함하는 아미노산 서열 및/또는 VH를 포함하는 아미노산 서열, 예를 들어 항체의 경쇄 및/또는 중쇄를 코딩할 수 있다.

[0185] 특정 실시양태에서, 핵산은 하나 이상의 벡터, 예를 들어, 발현 벡터에 존재할 수 있다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "벡터"는 그 핵산 분자가 연결된 다른 핵산을 수송할 수 있는 핵산 분자를 지칭한다. 벡터의 한 유형은 추가 DNA 세그먼트가 결찰될 수 있는 환형 이중 가닥 DNA 루프를 지칭하는 "플라스미드"이다. 다른 유형의 벡터는 추가 DNA 세그먼트가 바이러스 게놈 내로 결찰될 수 있는 바이러스 벡터이다. 특정 벡터는 도입되는 숙주 세포에서 자가 복제가 가능하다(예를 들어, 박테리아 복제 기점을 갖는 박테리아 벡터 및 에피솜 포유동물 벡터). 다른 벡터(예를 들어, 비에피솜 포유동물 벡터)는 숙주 세포 내로 도입 시 숙주 세포의 게놈에 통합되어 숙주 게놈과 함께 복제된다. 또한, 특정 벡터, 즉 발현 벡터는 작동 가능하게 연결된 유전자의 발현을 안내할 수 있다. 일반적으로, 재조합 DNA 기법에 유용한 발현 벡터는 종종 플라스미드(벡터) 형태이다. 그러나 개시되는 특허 대상은 동등한 기능을 수행하는 바이러스 벡터(예를 들어, 복제 결함 레트로바이러스, 아데노바이러스 및 아데노 연관 바이러스)와 같은 다른 형태의 발현 벡터를 포함하도록 의도된다.

[0186] 본원에서 개시되는 항체 또는 항체 유도체의 상이한 부분은 단일, 멀티시스트론 발현 카세트, 단일 벡터의 다수의 발현 카세트 또는 다수의 벡터로 구축될 수 있다. 폴리시스트론 발현 카세트를 만드는 요소의 예는 다양한 바이러스 및 비바이러스 내부 리보솜 진입 부위(IRES, 예를 들어, FGF-1 IRES, FGF-2 IRES, VEGF IRES, IGF-II IRES, NF-kB IRES, RUNX1 IRES, p53 IRES, A형 간염 IRES, C형 간염 IRES, 페스티바이러스 IRES, 아프토바이러스 IRES, 피코르나바이러스 IRES, 폴리오바이러스 IRES 및 뇌심근염 바이러스 IRES) 및 절단 가능한 링커(예를 들어, 2A 펩티드, 예를 들어, P2A, T2A, E2A 및 F2A 펩티드)를 포함하나 이에 한정되지 않는다. 레트로바이러스 벡터와 적절한 포장 라인의 조합도 적합하며, 여기서 캡시드 단백질이 인간 세포를 감염시키는 데 기능할 수 있다. 다양한 양쪽성 바이러스-생성 세포주(amphotropic virus- producing cell line)가 알려져 있으며, 이는 PA12(Miller, 등 (1985) Mol. Cell. Biol. 5:431-437); PA317(Miller, 등 (1986) Mol. Cell. Biol. 6:2895-2902); 및 CRIP(Danos, 등 (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:6460-6464)를 포함하나 이에 한정되지 않는다. 비양쪽성 입자는 예를 들어, VSVG, RD114 또는 GALV 외피로 위형화되거나 당업계에서 알려진 임의의 다른 입자도 적합하다.

[0187] 특정 실시양태에서, 본 개시의 항체 또는 항체 유도체를 코딩하는 핵산 및/또는 상기 핵산을 포함하는 하나 이상의 벡터는 숙주 세포 내로 도입될 수 있다. 특정 실시양태에서, 세포 내로 핵산을 도입하는 것은 형질감염, 전기천공, 미세주사, 핵산 서열을 함유하는 바이러스 또는 박테리오파지 벡터를 이용한 감염, 세포 융합, 염색체-매개 유전자 전달, 미세세포-매개 유전자 전달, 스페로플라스트 융합 등을 포함하나 이에 한정되지 않는 당업계에서 알려진 임의의 방법에 의해 수행될 수 있다. 특정 실시양태에서, 숙주 세포는 예를 들어, 단일 도메인 항체 및/또는 단일 도메인 항체의 VH를 포함하는 아미노산 서열을 코딩하는 핵산을 포함하는 벡터로 형질전환된 것을 포함할 수 있다. 특정 실시양태에서, 숙주 세포는 예를 들어, (1) 항체의 VL을 포함하는 아미노산 서열 및 항체의 VH를 포함하는 아미노산 서열을 코딩하는 핵산을 포함하는 벡터 또는 (2) 항체의 VL을 포함하는 아미노산 서열을 코딩하는 핵산을 포함하는 제1 벡터 및 항체의 VH를 포함하는 아미노산 서열을 코딩하는 핵산을 포함하는 제2 벡터로 형질전환된 것을 포함할 수 있다. 특정 실시양태에서, 상기 숙주 세포는 진핵 세포, 예를 들어 중국 햄스터 난소(CHO) 세포 또는 림프 세포(예를 들어 YO, NSO, Sp20 세포)이다.

[0188] 특정 실시양태에서, 본원에서 개시되는 항체 또는 항체 유도체를 만드는 방법은 항체 또는 항체 유도체의 발현

에 적합한 조건 하에, 항체 또는 항체 유도체를 코딩하는 핵산이 도입된 숙주 세포를 배양하는 단계 및 선택적으로 숙주 세포 및/또는 숙주 세포 배양 배지로부터 항체 또는 항체 유도체를 회수하는 단계를 포함할 수 있다. 특정 실시양태에서, 상기 항체 또는 항체 유도체는 크로마토그래피 기법을 통해 숙주 세포로부터 회수된다.

[0189] 본 개시의 항체 또는 항체 유도체의 재조합 생성을 위해, 예를 들어, 위에 기재된 바와 같은 항체 또는 항체 유도체를 코딩하는 핵산이 단리될 수 있으며 숙주 세포에서의 추가 클로닝 및/또는 발현을 위해 하나 이상의 벡터 내로 삽입될 수 있다. 이러한 핵산은 일반적인 절차를 사용하여 (예를 들어, 항체 또는 항체 유도체의 중쇄 및 경쇄를 코딩하는 유전자에 특이적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오티드 프로브를 사용하여) 용이하게 단리되고 시퀀싱될 수 있다. 항체 코딩 벡터의 클로닝 또는 발현에 적합한 숙주 세포는 본원에서 기재되는 원핵 세포 또는 진핵 세포를 포함한다. 예를 들어, 항체 또는 항체 유도체는 특히 글리코실화 및 Fc 이펙터 기능이 필요하지 않은 경우 박테리아에서 생성될 수 있다. 박테리아에서의 항체 단편 및 폴리펩티드 발현에 대해서는, 예를 들어, 미국 특허 제5,648,237호, 제5,789,199호 및 제5,840,523호 참조. (또한, 대장균(E. coli.)에서의 항체 단편의 발현을 기재하는 Charlton, Methods in Molecular Biology, Vol. 248(B.K.C. Lo 편집, Humana Press, Totowa, NJ, 2003), pp. 245-254 참조) 발현 후, 상기 항체 또는 항체 유도체를 가용성 분획의 박테리아 세포 페이스트로부터 단리할 수 있으며 추가로 정제할 수 있다.

[0190] 원핵 생물에 더하여, 사상균 또는 효모와 같은 진핵 생물 미생물은 글리코실화 경로가 "인간화"되어 부분적으로 또는 완전히 인간 글리코실화 패턴을 갖는 항체 또는 항체 유도체의 생성을 초래하는 진균 및 효모 균주를 포함하는 항체 코딩 벡터에 적합한 클로닝 또는 발현 숙주이다. Gemgross, Nat. Biotech. 22:1409-1414(2004) 및 Li 등, Nat. Biotech. 24:21 0-215(2006) 참조. 글리코실화 항체의 발현에 적합한 숙주 세포는 또한 다세포 유기체(무척추동물 및 척추동물)로부터 유래될 수 있다. 무척추동물 세포의 예는 식물 세포 및 곤충 세포를 포함한다. 특히, 열대거세미나방(Spodoptera frugiperda) 세포의 형질감염을 위해 곤충 세포와 함께 사용될 수 있는 수많은 바큘로바이러스 균주가 식별되었다. 특정 실시양태에서, 식물 세포 배양물은 숙주 세포로서 활용될 수 있다. 예를 들어, 미국 특허 제5,959,177호, 제6,040,498호, 제6,420,548호, 제7,125,978호 및 제6,417,429호 (유전자이식 식물에서 항체를 생성하기 위한 PLANTIBODIES™ 기술을 기재함)를 참조.

[0191] 특정 실시양태에서, 척추동물 세포도 숙주로서 사용될 수 있다. 예를 들어, 제한 없이 현탁액에서 성장하도록 적응된 포유동물 세포주가 유용할 수 있다. 유용한 포유동물 숙주 세포주의 비제한적 예는 SY40에 의해 형질전환된 원숭이 신장 CV1 세포주(COS-7); 인간 배아 신장 세포주(293 또는 293 세포, 예를 들어, Graham 등, J Gen Viral. 36:59(1977)에 기재된 바와 같음); 새끼 햄스터 신장 세포(BHK); 마우스 세르톨리 세포(TM4 세포, 예를 들어, Mather, Biol. Reprod. 23:243-251(1980)에 기재된 바와 같음); 원숭이 신장 세포(CV 1); 아프리카 녹색 원숭이 신장 세포(VERO-76); 인간 자궁경부암종 세포(HELA); 개 신장 세포(MDCK); 버팔로 래트 간 세포(BRL 3A); 인간 폐 세포(W138); 인간 간 세포(Hep 02); 마우스 유방 종양(MMT 060562); TRI 세포(예를 들어, Mather 등, Annals N. Y. Acad. Sci. 383:44-68(1982)에 기재된 바와 같음); MRC 5 세포; 및 FS4 세포이다. 다른 유용한 포유동물 숙주 세포주는 DHFK CHO 세포를 포함하는 중국 햄스터 난소(CHO) 세포(Urlaub 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:42 I6(1980)); 및 YO, NSO 및 Sp2/0과 같은 골수종 세포주를 포함한다. 항체 또는 항체 유도체 생성에 적합한 특정 포유동물 숙주 세포주의 검토에 대해서는, 예를 들어, Yazaki 및 Wu, Methods in Molecular Biology, Vol. 248 (B.K.C. Lo 편집, Humana Press, Totowa, NJ), pp. 255-268(2003) 참조.

[0192] 특정 실시양태에서, 이중특이적 및/또는 다중특이적 항체를 만들기 위한 기법은 동일한 특이성을 갖는 두 개의 면역글로불린 중쇄-경쇄 쌍의 재조합 발현(여기서 중쇄 또는 경쇄 중 하나 또는 둘 모두가 상이한 특이성을 갖는 항원 결합 모이어티(예를 들어, 단일 도메인 항체, 예를 들어, VHH)에 융합됨), 상이한 특이성을 갖는 두 개의 면역글로불린 중쇄-경쇄 쌍의 재조합 공동발현(Milstein 및 Cuello, Nature 305: 537(1983), PCT 특허 출원 제WO 93/08829호 및 Traunecker 등, EMBO J 10: 3655(1991) 참조) 및 "노브-인-홀" 공정(예를 들어, 미국 특허 제5,731,168호 참조)을 포함하나 이에 한정되지 않는다. 이중특이적 항체는 또한 항체 Fc-이종이량체 분자를 만들기 위한 정전기적 조종 효과를 조작하고(WO 2009/089004A 1); 두 개 이상의 항체 또는 단편을 가교결합시키고(예를 들어, 미국 특허 제4,676,980호 및 Brennan 등, Science , 229: 81(1985) 참조); 이중특이적 항체를 생성하기 위해 류신 지퍼를 사용하고(예를 들어, Kostelny 등, J Immunol. , 148(5): 1547-1553(1992) 참조); 이중특이적 항체 단편을 만들기 위한 "디아바디" 기술을 사용하고(예를 들어, Hollinger 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448(1993) 참조); 단쇄 Fv(sFv) 이량체를 사용하고(예를 들어, Gruber 등, J. Immunol. , 152:5368(1994) 참조); Tutt 등, J Immunol. 147: 60(1991)에 기재된 바와 같이 삼중특이적 항체를 제조하여 제조될 수 있다.

[0193] 본 개시의 이중특이적 및 다중특이적 분자는 또한 화학적 기법(예를 들어, Kranz(1981) Proc. Natl. Acad.

Sci. USA 78:5807), "폴리도마" 기법(예를 들어, 미국 특허 4,474,893 참조) 또는 재조합 DNA 기법을 사용하여 제조될 수 있다. 본원에서 개시되는 특허 대상의 이중특이적 및 다중특이적 분자는 또한 당업계에서 알려지고 본원에서 기재되는 바와 같은 방법을 사용하여 구성 결합 특이성, 예를 들어, 제1 에피토프 및 제2 에피토프 결합 특이성을 접합시켜 제조될 수 있다. 예를 들어, 제한 없이, 이중특이적 및 다중특이적 분자의 각각의 결합 특이성은 재조합 융합 단백질 기법에 의해 함께 생성될 수 있거나 별도로 생성된 후 서로 접합될 수 있다. 결합 특이성이 단백질이나 펩티드인 경우, 공유결합 접합을 위해 다양한 커플링제나 가교결합제를 사용할 수 있다. 가교결합제의 비제한적인 예는 단백질 A, 카보디이미드, N 숙신이미딜-S-아세틸-티오아세테이트(SATA), N-숙신이미딜-3-(2-피리딜디티오)프로피오네이트(SPDP) 및 설포숙신이미딜 4-(N-말레이미도메틸) 시클로헥세인-1-카르복실레이트(설포-SMCC)를 포함한다(예를 들어, Karpovsky(1984) J. Exp. Med. 160:1686; Liu(1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:8648 참조). 다른 방법은 Paulus(Behring Ins. Mitt. (1985) No. 78, 1 18-132; Brennan(1985) Science 229:81-83), Glennie(1987) J Immunol. 139: 2367-2375)에 의해 기재되는 방법을 포함한다. 결합 특이성이 항체(예를 들어, 두 개의 인간화 항체)인 경우, 이들은 두 개의 중쇄의 C-말단 힌지 영역의 설프히드릴 결합을 통해 접합될 수 있다. 특정 실시양태에서, 힌지 영역은 접합 전 홀수, 예를 들어 하나의 설프히드릴 잔기를 함유하도록 변형될 수 있다.

[0194] 특정 실시양태에서, 이중특이적 항체의 결합 특이성은 모두 동일한 벡터에서 코딩될 수 있고 동일한 숙주 세포에서 발현 및 조립될 수 있다. 이러한 방법은 이중특이적 및 다중특이적 분자가 MAb×MAb, MAb×Fab, Fab×F(ab')2 또는 리간드×Fab 융합 단백질인 경우에 특히 유용하다. 특정 실시양태에서, 본 개시의 이중특이적 항체는 단쇄 분자, 예컨대, 단쇄 이중특이적 항체, 하나의 단쇄 항체 및 결합 결정자를 포함하는 단쇄 이중특이적 분자 또는 두 개의 결합 결정자를 포함하는 단쇄 이중특이적 분자일 수 있다. 이중특이적 및 다중특이적 분자는 또한 단쇄 분자일 수 있거나 적어도 두 개의 단쇄 분자를 포함할 수 있다. 이중특이적 및 다중특이적 분자를 제조하기 위한 방법은 예를 들어, 미국 특허 제5,260,203호; 미국 특허 제5,455,030호; 미국 특허 제4,881,175호; 미국 특허 제5,132,405호; 미국 특허 제5,091,513호; 미국 특허 제5,476,786호; 미국 특허 제5,013,653호; 미국 특허 제5,258,498호; 및 미국 특허 제5,482,858호에서 기재되어 있다. "문어 항체"를 포함하는 세 개 이상의 기능성 항원 결합 부위(예를 들어, 에피토프 결합 부위)를 갖는 조작된 항체도 본원에 포함된다(예를 들어, US 2006/0025576A1 참조).

[0195] 특정 실시양태에서, 동물 시스템을 사용하여 본 개시의 항체 또는 항체 유도체를 생성할 수 있다. 하이브리도마를 제조하기 위한 한 가지 동물 시스템은 뮤린 시스템이다.

[0196] 마우스에서의 하이브리도마 생성은 매우 잘 확립된 절차이다. 융합을 위한 면역화된 비장세포의 단리를 위한 면역화 프로토콜 및 기법은 당업계에서 알려져 있다. 융합 파트너(예를 들어, 뮤린 골수종 세포) 및 융합 절차도 알려져 있다(예를 들어, Harlow 및 Lane(1988), Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor New York 참조).

[0197] 2.10 분석

[0198] 본원에서 제공되는 본 개시의 항체 및 항체 유도체는 당업계에서 알려지고 본원에서 제공되는 다양한 분석에 의해 물리적/화학적 특성 및/또는 생물학적 활성에 근거하여 식별되거나, 스크리닝되거나 또는 특성화될 수 있다.

[0199] 특정 실시양태에서, 본 개시의 항체 또는 항체 유도체는 효소 결합 면역흡착 분석(ELISA), 방사성 면역 분석(RIA) 또는 웨스턴 블롯 분석과 같은 알려진 방법에 의해 이의 항원 결합 활성에 대해 시험될 수 있다. 각각의 이러한 분석은 일반적으로 관심 복합체에 특이적인 표지된 시약(예를 들어 항체)을 사용하여 유난히 관심있는 단백질-항체 복합체의 존재를 검출한다. 예를 들어, 상기 항체 또는 항체 유도체는 예를 들어, 항체 또는 항체 유도체를 인식하고 특이적으로 결합하는 효소 결합 항체 또는 항체 단편을 사용하여 검출될 수 있다. 대안적으로, 상기 항체 또는 항체 유도체는 임의의 다양한 기타 면역분석을 사용하여 검출될 수 있다. 예를 들어, 상기 항체 또는 항체 유도체는 방사성 표지되어 방사성 면역 분석(RIA)에서 사용될 수 있다(예를 들어 Weintraub, B., Principles of Radioimmunoassays, Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques, The Endocrine Society, March 1986 참조, 이는 인용방식을 통해 본원에 포함됨). 방사성 동위원소는 가이거 계수기 또는 섬광 계수기의 사용 또는 자가방사선촬영에 의해 검출될 수 있다.

[0200] 특정 실시양태에서, 경쟁 분석을 사용하여 본 개시의 항체와 경쟁적으로 B7H3에 결합하는 항체 또는 항체 유도체를 식별할 수 있다. 특정 실시양태에서, 이러한 경쟁하는 항체는 본원에서 개시되는 항체에 의해 결합되는 동일한 에피토프(예를 들어, 선형 또는 구조적 에피토프)에 결합한다. 항체가 결합하는 에피토프를 맵핑하기 위한 상세한 예시적인 방법이 Morris(1996) "Epitope Mapping Protocols," in Methods in Molecular Biology Vol.

66(Humana Press, Totowa, NJ)에서 제공된다.

[0201] 경쟁 분석의 비제한적인 예에서, 고정된 B7H3은 B7H3에 결합하는 표지된 제1 항체 또는 항체 유도체 및 제1 항체와 경쟁적으로 B7H3에 결합하는 능력에 대해 시험되는 표지되지 않은 제2 항체를 포함하는 용액에서 인큐베이션될 수 있다. 상기 제2 항체는 하이브리도마 상청액에 존재할 수 있다. 대조로서, 고정된 B7H3은 표지된 제1 항체를 포함하나 표지되지 않은 제2 항체를 포함하지 않는 용액에서 인큐베이션된다. B7H3에 대한 제1 항체의 결합을 허용하는 조건 하에서 인큐베이션한 후, 과량의 결합되지 않은 항체를 제거하고, 고정된 B7H3과 연관된 표지의 양을 측정한다. 고정된 B7H3과 연관된 표지의 양이 대조 샘플에 비해 시험 샘플에서 실질적으로 감소하면, 이는 제2 항체가 제1 항체와 경쟁적으로 B7H3에 결합하고 있음을 나타낸다. Harlow 및 Lane(1988) Antibodies: A Laboratory Manual ch.14 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY) 참조.

[0202] 본 개시는 생물학적 활성을 갖는 항-B7H3 항체 또는 이의 항체 유도체를 식별하기 위한 분석을 제공한다. 생물학적 활성은 예를 들어, 면역 세포 또는 면역 활성화 리포터, 예를 들어, NFAT 리포터 또는 NF-κB 리포터를 활성화하는 것을 포함할 수 있다. 체내 및/또는 체외에서 이러한 생물학적 활성을 갖는 항체도 제공된다.

[0203] 2.11 면역접합체

[0204] 본원에서 개시되는 특허 대상은 하나 이상의 검출 프로브 및/또는 화학요법제 혹은 약물, 성장 억제제, 독소(예를 들어, 단백질 독소, 박테리아, 진균, 식물 또는 동물 기원의 효소적 활성 독소 또는 이들의 단편)와 같은 세포독서제 또는 방사성 동위원소에 접합된 본원에서 개시되는 항체 또는 항체 유도체를 포함하는 면역접합체를 추가로 제공한다. 예를 들어, 개시되는 특허 대상의 항체 또는 항원 결합 부분은 다른 항체, 항체 단편, 펩티드 또는 결합 모방체와 같은 하나 이상의 다른 결합 분자에 (예를 들어, 화학적 결합, 유전적 융합, 비공유 결합 또는 다른 방식에 의해) 기능적으로 연결될 수 있다.

[0205] 특정 실시양태에서, 면역접합체는 항체가 메이탄시노이드(미국 특허 제5,208,020호, 제5,416,064호 및 유럽 특허 EP 0 425 235 참조); 예컨대, 모노메틸아우리스타틴 약물 모이어티 DE 및 DF(MMAE 및 MMAF)와 같은 아우리스타틴(예를 들어, 미국 특허 제5,635,483호 및 제5,780,588호 및 제7,498,298호 참조); 돌라스타틴; 칼리체아미신 또는 이의 유도체(예를 들어, 미국 특허 제5,712,374호, 제5,714,586호, 제5,739,116호, 제5,767,285호, 제5,770,701호, 제5,770,710호, 제5,773,001호 및 제5,877,296호; Hinman 등, Cancer Res. 53:3336-3342(1993); 및 Lode 등, Cancer Res. 58:2925-2928(1998) 참조); 다우노마이신 또는 독소루비신과 같은 안트라시클린(Kratz 등, Current Med Chem. 13:477-523(2006); Jeffrey 등, Bioorganic & Med. Chem. Letters 16:358-362(2006); Torgov 등, Bioconj. Chem. 16:717-721(2005); Nagy 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:829-834(2000); Dubowchik 등, Bioorg. & Med. Chem. Letters 12:1529-1532(2002); King 등, J Med. Chem. 45:4336-4343(2002); 및 미국 특허 제6,630,579호 참조); 메토트렉세이트; 빈데신; 도세탁셀, 파클리탁셀, 라로탁셀, 테세탁셀, 오르타탁셀과 같은 탁세인; 트리코테센; 및 CC1065를 포함하나 이에 한정되지 않는 하나 이상의 약물에 접합된 항체-약물 접합체(ADC)이다.

[0206] 특정 실시양태에서, 면역접합체는 디프테리아 A 사슬, 디프테리아 독소의 비결합 활성 단편, (녹농균(Pseudomonas aeruginosa)으로부터의) 외독소 A 사슬, 리신 A 사슬, 아브린 A 사슬, 모데신 A 사슬, 알파-사르신, 알류리츠 포디 단백질, 디안틴 단백질, 피톨라카 아메리카나 단백질(PAPI, PAPII 및 PAP-S), 모모디카 카란티아 억제제, 커신, 크로틴, 사파오나리아 오피시날리스 억제제, 겔로닌, 미토겔린, 레스트리토신, 페노마이신, 에노마이신 및 트리코테센을 포함하나 이에 한정되지 않는, 효소 활성 독소 또는 이의 단편에 접합된 본원에서 기재되는 바와 같은 항체를 포함한다.

[0207] 특정 실시양태에서, 면역접합체는 방사성 접합체를 형성하기 위해 방사성 원자에 접합된 본원에서 기재되는 항체를 포함한다. 다양한 방사성 동위원소가 방사성 접합체의 생성을 위해 이용 가능하다. 비제한적 예는 At^{211}, I^{131}, I^{125}, Y^{90}, Re^{186}, Re^{188}, Sm^{153}, Bi^{212}, P^{32}, Pb^{212} 및 Lu의 방사성 동위원소를 포함한다. 방사성 접합체가 검출에 사용되는 경우, 이는 신티그래픽 연구를 위한 방사성 원자, 예를 들어 tc99m 또는 1123, 또는 요오드-123, 요오드-131, 인듐-11, 불소-19, 탄소-13, 질소-15, 산소-17, 가돌리늄 망가니즈 또는 철과 같은 핵자기공명(NMR) 이미징(자기공명 이미징, MRI로도 알려짐)을 위한 스핀 표지를 포함할 수 있다.

[0208] 항체 및 세포독성제의 접합체는 다양한 이중 기능성 단백질 커플링제, 예컨대, N-숙신이미딜-3-(2-피리딜디티오) 프로피오네이트(SPDP), 숙신이미딜-4-(N-말레이미도메틸) 시클로헥세인-1-카르복실레이트(SMCC), 이미노티올란(IT), 이미도에스터의 이중 기능성 유도체(예컨대, 디메틸 아디피미데이트 HCl), 활성 에스터(예컨대, 디숙신이미딜 수베레이트), 알데히드(예컨대 글루타르알데히드), 비스-아지도 화합

물(예컨대, 비스(p-아지도벤조일) 헥세인디아민), 비스-디아조늄 유도체(예컨대, 비스-(p-디아조늄벤조일)-에틸렌디아민), 디아이소시아네이트(예컨대, 톨루엔 2,6-디아이소시아네이트), 및 이중 활성 플루오린 화합물(예컨대, 1,5-디플루오로-2,4-디니트로벤젠)을 사용하여 제조될 수 있다. 예를 들어, 리신 면역독소는 Vitetta 등, Science 238: 1098(1987)에 기재된 바와 같이 제조될 수 있다. 탄소-4-표지된 1-아이소티오시아나토벤질-3-메틸디에틸렌 트리아민펜타아세트산(MX-DTPA)은 항체에 방사성 뉴크레오티드를 접합하기 위한 예시적인 킬레이트제이다. WO94/11026 참조. 링커는 세포에서 세포독성 약물의 방출을 촉진하는 "절단 가능한 링커"일 수 있다. 예를 들어, 산 불안정 링커, 펩티드분해효소 민감성 링커, 광불안정 링커, 디메틸 링커 또는 이황화물 함유 링커(Chari 등, Cancer Res. 52:127-1 31(1992); 미국 특허 제5,208,020호)가 사용될 수 있다.

[0209] 본원의 면역접합체 또는 ADC는 (예를 들어, Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., U.S.A로부터) 상업적으로 이용 가능한 BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, 설포-EMCS, 설포-GMBS, 설포-KMUS, 설포-MBS, 설포-SIAB, 설포-SMCC 및 설포-SMPB 및 SVSB(숙신이미딜-(4-비닐설폰)벤조에이트)를 포함하나 이에 한정되지 않는 가교결합제 시약으로 제조되는 접합체를 명시적으로 고려하나 이에 한정되지 않는다.

[0210] 2.12 항원 인식 수용체

[0211] 본 개시되는 특허 대상은 본원에서 개시되는 항체 또는 항체 단편을 포함하는 항원 인식 수용체를 추가로 제공한다. 항원 인식 수용체는 항원과의 결합에 반응하여 면역반응 세포(예를 들어, T 세포)를 활성화하거나, 자극하거나 또는 억제할 수 있는 수용체이다. 항원 인식 수용체의 비제한적 예는 천연 및 재조합 T 세포 수용체(TCR), 키메라 공동자극 수용체(CCR), 키메라 항원 수용체(CAR) 또는 억제 CAR(iCAR)을 포함한다. 항원 인식 수용체 설계 및 사용 방법은 당업계에서 널리 알려져 있으며, 문헌, 예를 들어, 국제 공개 WO 2018/027155, WO 2019/099483, WO 2019/157454, WO 2019/133969, WO 2019/099993, WO 2015/142314, WO 2018/027197 및 WO 2014055668에서 기재되어 있다.

[0212] 특정 실시양태에서, 본 개시되는 특허 대상은 본원에서 개시되는 항체 또는 항체 단편을 포함하는 키메라 항원 수용체(CAR)를 제공한다. CAR은 면역 이펙터 세포에 관심 특이성을 이식하거나 부여할 수 있는 조작된 수용체이다. 특정 실시양태에서, CAR은 모노클로날 항체의 특이성을 T 세포상에 이식하기 위해 사용될 수 있으며; 코딩 서열의 전달이 벡터에 의해 촉진된다. 특정 실시양태에서, 상기 CAR은 전형적으로 세포질/세포내 신호전달 도메인에 융합된 막관통 도메인에 융합된 세포외 항원 결합 도메인(예를 들어, scFv 또는 VHH)으로 구성되는 "1세대" CAR이다. "1세대" CAR은 새로운 항원 인식을 제공하고 HLA-매개 항원 제시와 상관없이 단일 융합 분자에서 CD3z 사슬 신호전달 도메인을 통해 면역반응 세포, 예를 들어, CD4+ 및 CD8+ T 세포의 활성화를 유발할 수 있다. 특정 실시양태에서, 상기 CAR은 다양한 공동 자극 분자(예를 들어, CD28, 4-1BB, ICOS, OX40, CD27, CD40/My88 및 NKGD2)로부터 CAR의 세포질 꼬리까지의 세포내 신호전달 도메인을 추가로 포함하여 면역반응 세포에 추가 신호를 제공하는 "2세대" CAR이고, 이에 의해 "2세대" CAR은 공동 자극(예를 들어, CD28 또는 4-1BB) 및 활성화(CD3z) 둘 모두를 제공하는 것을 포함한다. 특정 실시양태에서, 상기 CAR은 다수의 공동자극 도메인(예를 들어, CD28 및 4-1BB) 및 활성화 (CD3z)를 포함하는 "3세대" CAR이다. 특정 실시양태에서, 상기 CAR은 2세대 CAR이다. 특정 실시양태에서, 상기 CAR은 항원에 결합하는 세포외 항원 결합 도메인, 막관통 도메인 및 세포내 신호전달 도메인을 포함하며, 여기서 세포내 신호전달 도메인은 공동자극 신호전달 도메인을 포함한다. 특정 실시양태에서, 상기 CAR은 세포외 항원 결합 도메인과 막관통 도메인 사이에 힌지/스페이서 영역을 추가로 포함한다. 특정 실시양태에서, 상기 세포외 항원 결합 도메인은 본원에서 개시되는 항체 또는 항체 단편을 포함한다. 특정 실시양태에서, 상기 항체 또는 항체 단편은 VHH 또는 scFv를 포함한다.

[0213] 특정 실시양태에서, 본 개시되는 특허 대상은 본원에서 개시되는 항체 또는 항체 단편을 포함하는 재조합 TCR을 제공한다. 천연 TCR은 CD3 사슬 분자와의 복합체의 일부로서 발현되는 두 개의 가변 사슬로 구성되는 이황화 결합에 의해 연결되는 이종이량체 단백질을 포함하는 단백질 복합체이다. 천연 TCR은 T 세포 표면상에서 발견되며 항원을 주요 조직적합성 복합체(MHC) 분자에 결합된 펩티드로 인식하는 역할을 한다. 특정 실시양태에서, 천연 TCR은 알파 사슬 및 베타 사슬(각각 *TRA* 및 *TRB* 유전자에 의해 코딩됨)를 포함한다. 특정 실시양태에서, TCR은 감마 사슬 및 델타 사슬(각각 *TRG* 및 *TRD* 유전자에 의해 코딩됨)을 포함한다. 상기 알파 사슬, 베타 사슬, 감마 사슬 및 델타 사슬 각각은 두 개의 세포외 도메인, 즉 가변(V) 영역과 불변(C) 영역을 포함한다. 상기 불변 영역은 세포막에 인접해 있고, 이어서 막관통 영역 및 짧은 세포질 꼬리가 따른다. 상기 가변 영역은 펩티드/MHC 복합체에 결합한다. 각 가변 영역은 세 개의 상보성 결정 영역(CDR)을 갖는다. 특정 실시양태에서, TCR은 CD3δ, CD3γ, CD3ε 및 CD3ζ와의 수용체 복합체를 포함한다. TCR 복합체가 이의 항원 및 MHC(펩티드/MHC)와

결합하는 경우, TCR 복합체를 발현하는 T 세포가 활성화된다.

[0214] 특정 실시양태에서, 재조합 TCR은 비천연 발생 TCR이다. 특정 실시양태에서, 상기 재조합 TCR은 재조합 알파 사슬 및/또는 재조합 b 사슬을 포함하며, 여기서 재조합 알파 사슬 및/또는 재조합 b 사슬의 일부 또는 전부 가변 영역은 본원에서 개시되는 항체 또는 항체 단편에 의해 대체된다. 특정 실시양태에서, 상기 항체 또는 항체 단편은 VHH, VH, VL 또는 scFv를 포함한다. 특정 실시양태에서, 상기 항체 또는 항체 단편은 VHH를 포함한다. 특정 실시양태에서, 상기 재조합 TCR은 비 MHC/HLA-의존적 방식으로 관심 항원에 결합한다. 특정 비제한적 실시양태에서, 항원의 결합은 재조합 TCR을 포함하는 면역반응 세포를 활성화할 수 있다.

[0215] 본 개시되는 특허 대상은 (a) 본원에서 개시되는 항원 인식 수용체(예를 들어, CAR 또는 TCR)를 포함하는 면역반응 세포를 제공한다. 특정 실시양태에서, 상기 항원 인식 수용체는 면역반응 세포를 활성화할 수 있다. 본 개시되는 특허 대상의 면역반응 세포는 림프 계통의 세포일 수 있다. B, T 및 자연 살해(NK) 세포를 포함하는 림프 계통은 항체 생성, 세포 면역계 조절, 혈액 내 이물질 검출, 숙주에 외래적인 세포 검출 등을 제공한다. 림프구 계통의 면역반응 세포의 비제한적인 예는 T 세포, 자연 살해(NK) 세포, 배아 줄기 세포 및 다능성 줄기 세포(예를 들어, 림프 세포로 분화될 수 있는 세포)를 포함한다. T 세포는 흉선에서 성숙되는 림프구일 수 있으며 주로 세포 매개 면역의 역할을 하고 있다. T 세포는 적응성 면역계에 관여한다. 본 개시되는 특허 대상의 T 세포는 보조 T 세포, 세포독성 T 세포, 기억 T 세포(중심 기억 T 세포, 줄기 세포 유사 기억 T 세포(또는 줄기 유사 기억 T 세포) 포함) 및 두 가지 유형의 이펙터 기억 T 세포: 예를 들어, TEM 세포 및 TEMRA 세포, 조절 T 세포(억제 T 세포로도 알려짐), 자연 살해 T 세포, 점막 연관 불변 T 세포 및 gd T 세포를 포함하나 이에 한정되지 않는 임의의 유형의 T 세포일 수 있다. 세포독성 T 세포(CTL 또는 살해 T 세포)는 감염된 체세포 또는 종양 세포의 사멸을 유도할 수 있는 T 림프구의 서브세트이다. 환자 자신의 T 세포는 항원 인식 수용체(예를 들어, CAR 또는 TCR)의 도입을 통해 특정 항원을 표적으로 하도록 유전적으로 변형될 수 있다. 특정 실시양태에서, 상기 면역반응 세포는 T 세포이다. 상기 T 세포는 CD4+ T 세포 또는 CD8+ T 세포일 수 있다. 특정 실시양태에서, 상기 T 세포는 CD4+ T 세포이다. 특정 실시양태에서, 상기 T 세포는 CD8+ T 세포이다. 자연 살해(NK) 세포는 세포 매개 면역의 일부이며 선천성 면역 반응 기간에 작용하는 림프구일 수 있다. NK 세포는 표적 세포에 대한 세포독성 효과를 발휘하기 위해 사전 활성화가 필요하지 않다. 본 개시되는 특허 대상의 인간 림프구의 유형은 말초 공여체 림프구, 예를 들어, Sadelain, M., 등, 2003 Nat Rev Cancer 3:35-45(CAR을 발현하도록 유전적으로 변형된 말초 공여체 림프구를 개시함), Morgan, R.A., 등, 2006 Science 314: 126-129(a 및 b 이종이량체를 포함하는 전장 종양 항원 인식 T 세포 수용체 복합체를 발현하도록 유전적으로 변형된 말초 공여체 림프구를 개시함), Panelli, M.C., 등, 2000 J Immunol 164:495-504; Panelli, M.C., 등, 2000 J Immunol 164:4382-4392(종양 생검의 종양 침윤 림프구(TIL)로부터 유래한 림프구 배양물을 개시함) 및 Dupont, J., 등, 2005 Cancer Res 65:5417-5427; Papanicolaou, G.A., 등, 2003 Blood 102:2498-2505(인공 항원 제시 세포(AAPC) 또는 펄스 수지상 세포를 사용하여 선택적으로 체외 확장된 항원 특이적 말초 혈액 백혈구를 개시함)에서 개시되는 것을 포함하나 이에 한정되지 않는다. 특정 실시양태에서, 상기 면역반응 세포(예를 들어, T 세포)는 자가 유래, 비자가 유래(예를 들어, 동종이계)이거나 조작된 전구 세포 또는 줄기 세포로부터 체외에서 유래될 수 있다.

[0216] 3. 사용 방법

[0217] 본 개시되는 특허 대상은 개시된 항체 및 항체 유도체를 사용하는 방법을 추가로 제공한다. 특정 실시양태에서, 상기 방법은 본 개시되는 항체 또는 항체 유도체의 치료 용도를 위한 것이다. 특정 실시양태에서, 상기 방법은 본 개시되는 항체 또는 항체 유도체의 진단 용도를 위한 것이다.

[0218] 3.1 치료 방법

[0219] 본 개시는 질환 및 장애의 치료 또는 면역 반응의 증가를 위한 방법 및 본원에서 개시되는 항체 또는 항체 유도체의 사용을 제공한다. 특정 실시양태에서, 본원에서 개시되는 항체, 항체 유도체 또는 이를 포함하는 약학적 조성물은 질환 및 장애를 치료하거나 면역 반응을 증가시키기 위해 대상체(예를 들어, 인간과 같은 포유동물)에게 투여될 수 있다. 특정 실시양태에서, 상기 질환 및 장애는 면역 관문 억제 및/또는 비정상적인 B7H3 활성에 관한다. 특정 실시양태에서, 본원에서 개시되는 항체 또는 항체 유도체에 의해 치료될 수 있는 질환 및 장애는 신생물, 예를 들어, 암을 포함하나 이에 한정되지 않는다.

[0220] 특정 실시양태에서, 본 개시는 약제의 제조에 사용하기 위한 본원에서 기재되는 항체 또는 항체 유도체(또는 이의 단편)를 제공한다. 특정 실시양태에서, 본 개시는 암을 치료하기 위한 약제의 제조에 사용하기 위한 본원에서 기재되는 항체 또는 항체 유도체(또는 이의 단편)를 제공한다. 특정 실시양태에서, 본 개시는 대상체의 암을 치료하는 데 사용하기 위한 본원에서 기재되는 항체 또는 항체 유도체(또는 이의 단편)를 제공한다. 특정 실시

양태에서, 본 개시는 대상체의 암을 치료하는 데 사용하기 위한 본원에서 제공되는 항체 또는 항체 유도체(또는 이의 단편)를 포함하는 약학적 조성물을 제공한다. 특정 실시양태에서, 상기 암은 혈액암(예를 들어, 백혈병, 림프종, 및 골수종), 난소암, 유방암, 방광암, 뇌암, 결장암, 장암, 간암, 폐암, 췌장암, 전립선암, 피부암, 위암, 교모세포종, 인후암, 흑색종, 신경모세포종, 선암종, 신경교종, 연조직 육종, 및 다양한 암종(전립선 및 소세포 폐암 포함)일 수 있다. 적합한 암종은 성상세포종, 섬유육종, 점액육종, 지방육종, 희소돌기아교종, 뇌실세포종, 수모세포종, 원시신경외배엽 종양(PNET), 연골육종, 골원성 육종, 췌장 관 선암종, 소세포 및 대세포 폐 선암종, 척삭종, 혈관육종, 내피육종, 편평세포암종, 기관지폐암종, 상피 선암종, 및 이들의 간 전이, 림프관육종, 림프관내피육종, 간 종양, 담관암종, 윤활막종, 중피종, 유잉 종양, 횡문근육종, 결장암종, 기저세포암종, 땀샘암종, 유두상암종, 피지선암종, 유두상 선암종, 낭선암종, 수질암종, 기관지원성암종, 신세포암종, 담관암종, 융모암종, 정상피종, 배아암종, 윌름스종양, 고환종양, 수모세포종, 두개인두종, 뇌실막종, 송과체종, 혈관모세포종, 청신경종, 희소돌기아교종, 수막종, 신경모세포종, 망막모세포종, 백혈병, 다발성 골수종, 발덴스트롬 마크로글로불린혈증, 관상 및 소엽 선암종과 같은 유방 종양, 자궁 자궁경부의 편평 및 선암종, 자궁 및 난소 상피암종, 전립선 선암종, 방광의 이행 편평세포암종, B 및 T 세포 림프종(결절성 및 미만성) 형질세포종, 급성 및 만성 백혈병, 악성 흑색종, 연조직육종 및 평활근육종을 포함하나 이에 한정되지 않는 종양학 분야에서 임의의 알려진 암종을 포함한다.

[0221] 특정 실시양태에서, 상기 암은 흑색종, NSCLC, 두경부암, 요로상피암, 유방암(예를 들어, 삼중 음성 유방암, TNBC), 위암, 담관암종, 고전적인 호지킨 림프종(cHL), 비호지킨 림프종 원발성 종격동 B 세포 림프종(NHL PMBCL), 중피종, 난소암, 폐암(예를 들어, 소세포 폐암), 식도암, 비인두암종(NPC), 담도암, 결장직장암, 자궁경부암 또는 갑상선암일 수 있다.

[0222] 특정 실시양태에서, 상기 치료될 대상체는 포유동물(예를 들어, 인간, 비인간 영장류, 래트, 마우스, 소, 말, 돼지, 양, 염소, 개, 고양이 등)이다. 특정 실시양태에서, 상기 대상체는 인간이다. 특정 실시양태에서, 상기 대상체는 암이 있거나 암이 있을 위험이 있는 것으로 의심되거나 암 또는 비정상적인 B7H3 발현 또는 활성을 갖는 임의의 다른 질환으로 진단될 것으로 의심된다.

[0223] 암 또는 비정상적인 B7H3 활성을 나타내는 임의의 다른 질환에 대한 많은 진단 방법 및 이러한 질환의 임상적 설명이 당업계에서 알려져 있다. 이러한 방법은 예를 들어, 면역조직화학, PCR, 형광 제위치 부합법(FISH)을 포함하나 이에 한정되지 않는다. 비정상적인 B7H3 활성 또는 발현에 대한 진단 방법에 관한 추가 세부사항은 예를 들어, Gupta 등, (2009) Mod Pathol. 22(1): 128-133; Lopez-Rios 등 (2013) J Clin Pathol. 66(5): 381-385; Ellison 등 (2013) J Clin Pathol 66(2): 79-89; 및 Guha 등 (2013) PLoS ONE 8(6): e67782에 기재되어 있다.

[0224] 투여는 예를 들어 정맥내, 근육내 또는 피하를 포함하는 임의의 적합한 경로에 의해 이루어질 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원에서 제공되는 항체 또는 항체 유도체(또는 이의 단편) 및/또는 조성물은 비정상적인 B7H3 활성에 관한 질환 또는 장애를 치료하기 위해 제2 제제, 제3 제제 또는 제4 제제(예를 들어, 항종양제, 성장 억제제, 세포독성제 또는 화학치료제를 포함함)와 조합하여 투여된다. 이러한 제제는 예를 들어, 도세탁셀, 게피티닙, FOLFIRI(이리노테칸, 5-플루오로우라실 및 류코보린), 이리노테칸, 시스플라틴, 카르보플라틴, 파클리탁셀, 베바시주맙(항-VEGF 항체), FOLFOX-4, 주입용 플루오로우라실, 류코보린 및 옥살리플라틴, 아파티닙, 젬시타빈, 카페시타빈, 페메트렉시드, 티반티닙, 에베로리무스, CpG-ODN, 라파마이신, 레날리도마이드, 베무라페닙, 엔도스타틴, 라파티닙, PX-866, 임프라임 PGG 및 엘로티닙을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 항체 유도체(또는 이의 단편)는 추가 제제에 접합된다.

[0225] 특정 실시양태에서, 본원에서 제공되는 항체 또는 항체 유도체(또는 이의 단편) 및/또는 조성물은 방사선 요법, 수술, 화학요법 및/또는 표적 요법과 같은 하나 이상의 추가 요법과 조합하여 투여된다. 특정 실시양태에서, 본원에서 제공되는 항체, 항체 유도체(또는 이의 단편) 및/또는 조성물은 방사선 요법과 조합하여 투여된다. 특정 실시양태에서, 본원에서 제공되는 항체, 항체 유도체(또는 이의 단편) 및/또는 조성물과 방사선 요법의 조합은 본원에서 개시되는 신생물 또는 암을 치료하기 위해 사용된다.

[0226] 치료할 적응증 및 당업계의 숙련된 의사가 친숙하게 알고 있는 투약량과 관련된 요소에 따라, 본원에서 제공되는 항체 또는 항체 유도체는 독성 및 부작용을 최소화하면서도 해당 적응증의 치료에 효과적인 투여량으로 투여될 것이다. 암 치료를 위하여, 전형적인 용량은 예를 들어 0.001 내지 1000㎍의 범위일 수 있으나, 이러한 예시적인 범위 미만 또는 초과의 투여량은 본 발명의 범위 내에 있다. 일일 용량은 총 체중의 약 0.1㎍/kg 내지 약 100mg/kg, 총 체중의 약 0.1㎍/kg 내지 약 100㎍/kg 또는 총 체중의 약 1㎍/kg 내지 약 100㎍/kg일 수 있다. 위에서 언급한 바와 같이, 치료 또는 예방 효능은 치료한 환자의 주기적인 평가를 통해 모니터링할 수 있

다. 며칠 이상 반복 투여하는 경우, 병태에 따라 원하는 질환 증상 억제가 나타날 때까지 치료를 반복한다. 그러나, 다른 투여 요법이 유용할 수 있으며 이는 본 발명의 범위 내에 있다. 원하는 투여량은 조성물의 단회 볼루스 투여, 조성물의 다회 볼루스 투여 또는 조성물의 연속 주입 투여에 의해 전달될 수 있다.

[0227] 본원에서 개시되는 항체 또는 항체 유도체를 포함하는 약학적 조성물은 1일에 1회, 2회, 3회 또는 4회 투여될 수 있다. 상기 조성물은 또한 1일 1회보다 덜 빈번하게, 예를 들어, 주 6회, 주 5회, 주 4회, 주 3회, 주 2회, 주 1회, 2주에 1회, 3주에 1회, 월 1회, 2개월에 1회, 3개월에 1회, 또는 6개월에 1회 투여될 수 있다. 상기 조성물은 또한 일정 기간에 걸쳐 사용을 위해 조성물을 점차적으로 방출하는 임플란트와 같은 서방성 제형으로 투여될 수 있으며, 이는 조성물이 덜 빈번하게, 예컨대 월 1회, 2~6개월에 1회, 연 1회 또는 심지어 단일 투여로 투여되도록 한다. 서방성 장치(예컨대, 펠렛, 나노입자, 마이크로입자, 나노구, 마이크로구 등)는 주사에 의해 투여되거나 다양한 위치에 외과적으로 이식될 수 있다.

[0228] 암 치료는 예를 들어, 종양 퇴행, 종양 중량 또는 크기 수축, 진행 시간, 생존 기간, 무진행 생존 기간, 전체 반응률, 반응 기간, 삶의 질, 단백질 발현 및/또는 활성에 의해 평가될 수 있으나 이에 한정되지 않는다. 예를 들어, 방사선 이미징을 통한 반응 측정을 포함하여, 요법의 효능을 결정하기 위한 접근법이 사용될 수 있다.

[0229] 특정 실시양태에서, 치료의 효능은 방정식 100-(T/C×100)을 사용하여 계산된 종양 성장 억제 백분율(% TGI)에 의해 측정되고, 여기서 T는 치료된 종양의 평균 상대 종양 부피이고, C는 치료되지 않은 종양의 평균 상대 종양 부피이다. 특정 실시양태에서, 상기 %TGI는 약 10%, 약 20%, 약 30%, 약 40%, 약 50%, 약 60%, 약 70%, 약 80%, 약 90%, 약 91%, 약 92%, 약 93%, 약 94%, 약 95%, 또는 95% 초과이다.

[0230] 3.2 진단 및 이미징 방법

[0231] 표지된 항체 또는 항체 유도체는 B7H3의 발현, 이상 발현 및/또는 활성과 연관된 질환 및/또는 장애를 검출, 진단 또는 모니터링하기 위한 진단 목적으로 사용될 수 있다. 예를 들어, 본원에서 제공되는 항체 및 항체 유도체는 제위치(in situ), 체내(in vivo), 생체외(ex vivo) 및 체외(in vitro) 진단 분석 또는 이미징 분석에서 사용될 수 있다. B7H3 폴리펩티드의 발현을 검출하는 방법은 (a) 하나 이상의 항체 또는 항체 유도체를 사용하여 개체의 세포(예를 들어, 조직) 또는 체액에서 폴리펩티드의 발현을 분석하는 단계; 및 (b) 유전자 발현 수준을 표준 유전자 발현 수준과 비교하는 단계를 포함하며, 이에 의해 표준 발현 수준과 비교하여 분석된 유전자 발현 수준의 증가 또는 감소가 이상 발현을 나타낸다.

[0232] 본원에서 제공되는 추가 실시양태는 동물(예를 들어, 인간과 같은 포유동물)에서 B7H3의 발현 또는 비정상적인 발현과 연관되는 질환 또는 장애를 진단하는 방법을 포함한다. 상기 방법은 포유동물에서 B7H3 분자를 검출하는 단계를 포함한다. 특정 실시양태에서, 진단은 (a) 유효량의 표지된 항체 또는 항체 유도체를 포유동물에 투여하는 단계 (b) 표지된 항체 또는 항체 유도체가 대상체에서 B7H3 분자가 발현되는 부위로 우선적으로 집중되도록 하기 위해(그리고 비결합된 표지된 분자가 배경 수준으로 제거되도록 하기 위해) 투여한 후 일정 시간 동안 대기하는 단계; (c) 배경 수준을 결정하는 단계; 및 (d) 대상체에서 표지된 분자를 검출함으로써, 표지된 분자가 배경 수준을 초과한 것으로 검출할 때 대상체가 B7H3의 발현 또는 이상 발현과 연관된 특정 질환 또는 장애를 가지고 있음을 나타내도록 하는 단계를 포함한다. 배경 수준은 검출된 표지된 분자의 양을 특정 시스템에 대해 이전에 결정된 표준 값과 비교하는 것을 포함하는 다양한 방법에 의해 결정될 수 있다.

[0233] 본원에서 제공되는 항체 및 항체 유도체는 당업자에게 알려진 전형적인 면역조직학적 방법을 사용하여 생물학적 샘플에서 단백질 수준을 분석하기 위해 사용될 수 있다(예를 들어, Jalkanen, 등, J. Cell. Biol. 101:976-985(1985); Jalkanen, 등, J. Cell. Biol. 105:3087-3096(1987) 참조). 단백질 유전자 발현을 검출하는 데 유용한 다른 항체 기반 방법은 효소 결합 면역흡착 분석(ELISA) 및 방사성 면역 분석(RIA)과 같은 면역분석을 포함한다. 적합한 항체 분석 표지는 당업계에서 알려져 있으며 효소 표지, 예컨대, 글루코스 산화효소; 방사성 동위원소, 예컨대, 요오드(131I, 125I, 123I, 121I), 탄소(14C), 황(35S), 삼중수소(3H), 인듐(115mIn, 113mIn, 112In, 111In) 및 테크네튬(99Tc, 99mTc), 탈륨(201Ti), 갈륨(68Ga, 67Ga), 팔라듐(103Pd), 몰리브데넘(99Mo), 크세논(133Xe), 불소(18F), 153Sm, 177Lu, 159Gd, 149Pm, 140La, 175Yb, 166Ho, 90Y, 47Sc, 186Re, 188Re, 142Pr, 105Rh, 97Ru; 루미놀; 및 형광 표지, 예컨대, 플루오레세인 및 로다민 및 비오틴을 포함한다.

[0234] 당업계에서 알려진 기법은 본원에서 제공되는 표지된 항체(또는 이의 단편)에 적용될 수 있다. 이러한 기법은 이중 기능성 접합제의 사용을 포함하나 이에 한정되지 않는다(예를 들어. 미국 특허 제5,756,065호; 제5,714,631호; 제5,696,239호; 제5,652,361호; 제5,505,931호; 제5,489,425호; 제5,435,990호; 제5,428,139호; 제5,342,604호; 제5,274,119호; 제4,994,560호; 및 제5,808,003호 참조).

[0235] 대안적으로 또는 추가적으로, 예를 들어, EGFR 코딩 핵산 또는 이의 보체에 상응하는 핵산 기반 프로브를 사용하는 형광 제위치 부합법; (FISH; 1998년 10월 공개된 WO98/45479 참조) 서던 블롯팅, 노던 블롯팅, 또는 중합효소 연쇄 반응(PCR) 기법, 예컨대, 실시간 정량적 PCR(RT-PCR)을 통해, 세포 내 B7H3 폴리펩티드 코딩 핵산 또는 mRNA의 수준을 측정할 수 있다. 예를 들어, 항체 기반 분석을 사용하여 혈청과 같은 생물학적 체액에서 유리 항원(shed antigen)을 측정하여 B7H3 과발현을 연구할 수도 있다(또한, 예를 들어, 미국 특허 제4,933,294호(1990년 6월 12일 발행); WO91/05264(1991년 4월 18일 발행); 미국 특허 제5,401,638호(1995년 3월 28일 발행); 및 Sias 등, J. Immunol. Methods 132:73-80(1990) 참조). 위의 분석 외에도, 당업자는 다양한 체내 및 생체외 분석을 사용할 수 있다. 예를 들어, 포유동물의 신체 내의 세포를 검출 가능한 표지, 예를 들어 방사성 동위원소로 선택적으로 표지된 항체에 노출시킬 수 있고, 신체 세포에 대한 항체의 결합은, 예를 들어, 방사능 외부 스캐닝에 의해 또는 이전에 항체에 노출된 포유동물로부터 취해진 샘플(예를 들어, 생검 또는 다른 생물학적 샘플)을 분석하여 평가될 수 있다.

[0236] 4. 약학적 제제

[0237] 본 개시되는 특허 대상은 약학적으로 허용 가능한 담체와 함께 본원에서 개시되는 항체 또는 항체 유도체를 함유하는 약학적 제제를 추가로 제공한다. 특정 실시양태에서, 약학적 조성물은 본 개시되는 특허 대상의 다수(예를 들어, 두 개 이상) 항체 및/또는 항체 유도체의 조합을 포함할 수 있다.

[0238] 특정 실시양태에서, 개시되는 약학적 제제는 원하는 순도의 항체 또는 항체 유도체를 동결건조된 제형 또는 수용액의 형태로 존재하는 하나 이상의 선택적인 약학적으로 허용 가능한 담체(Remington's Pharmaceutical Sciences 제16판, Osol, A. 편집, (1980))와 조합하여 제조될 수 있다. 예를 들어, 제한은 아니나, 동결건조된 항체 제제는 미국 특허 제6,267,958호에서 기재되어 있다. 특정 실시양태에서, 수성 항체 제제는 미국 특허 제6,171,586호 및 WO2006/044908에서 기재되는 수성 항체 제제를 포함할 수 있으며, 후자 제제는 히스티딘-아세테이트 완충제를 포함한다. 특정 실시양태에서, 상기 항체 또는 항체 유도체는 약 80% 초과, 약 90% 초과, 약 91% 초과, 약 92% 초과, 약 93% 초과, 약 94% 초과, 약 95% 초과, 약 96% 초과, 약 97% 초과, 약 98% 초과, 약 99% 초과, 약 99.1% 초과, 약 99.2% 초과, 약 99.3% 초과, 약 99.4% 초과, 약 99.5% 초과, 약 99.6% 초과, 약 99.7% 초과, 약 99.8% 초과 또는 약 99.9% 초과의 순도일 수 있다.

[0239] 약학적으로 허용 가능한 담체는 일반적으로 사용되는 투여량 및 농도에서 수용체에게 무독성이며 포스페이트, 시트레이트 및 다른 유기산과 같은 완충제, 아스코르브산 및 메티오닌을 포함하는 항산화제, 방부제(예컨대, 옥타데실디메틸벤질 암모늄 클로라이드, 헥사메토늄 클로라이드, 벤즈알코늄 클로라이드, 벤즈에토늄 클로라이드, 페놀, 부틸 또는 벤질 알코올, 메틸 파라벤 또는 프로필 파라벤과 같은 알킬 파라벤, 카테콜, 레조르시놀, 시클로헥산올, 3-펜탄올 및 m-크레졸), 저분자량(약 10 잔기 미만) 폴리펩티드, 혈청 알부민, 젤라틴 또는 면역글로불린과 같은 단백질, 폴리비닐피롤리돈과 같은 친수성 중합체, 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 히스티딘, 아르기닌 또는 라이신과 같은 아미노산, 단당류, 이당류 및 글루코스, 만노스, 또는 덱스트린을 포함하는 다른 탄수화물, EDTA와 같은 킬레이트제, 수크로스, 만니톨, 트레할로스 또는 소르비톨과 같은 당, 나트륨과 같은 염 형성 반대 이온, 금속 착물(예를 들어, Zn-단백질 착물) 및/또는 폴리에틸렌 글리콜(PEG)과 같은 비이온성 계면활성제를 포함하나 이에 한정되지 않는다. 본원의 예시적인 약학적으로 허용 가능한 담체는 가용성 중성 활성 하이알루론산분해효소 당단백질(sHASEGP), 예를 들어 인간 가용성 PH-20 하이알루론산분해효소 당단백질, 예컨대, rHuPH20(HYLENEX®, Baxter International, Inc.)과 같은 간질성 약물 분산제를 추가로 포함한다. rHuPH20을 포함하는 특정 예시적 sHASEGP 및 사용 방법은 미국 특허 공개 제2005/0260186호 및 제2006/0104968호에서 기재되어 있다. 특정 실시양태에서, sHASEGP는 콘드로이틴분해효소와 같은 하나 이상의 추가 글라이코사미노글리칸 분해효소(glycosaminoglycanase)와 조합된다.

[0240] 담체는 정맥내, 근육내, 피하, 비경구, 척추내 또는 표피 투여(예를 들어, 주사 또는 주입)에 적합하다. 투여 경로에 따라, 활성 화합물, 예를 들어 항-B7H3 항체는 화합물을 비활성화할 수 있는 산 및 기타 자연 조건의 작용으로부터 화합물을 보호하는 물질 내로 코팅될 수 있다.

[0241] 본 개시의 약학적 조성물은 또한 조합 요법으로, 즉, 다른 제제와 조합하여 투여될 수 있다. 특정 실시양태에서, 본원에서 개시되는 약학적 조성물은 또한 치료되는 특정 적응증에 필요한 하나를 넘은 활성 성분, 예를 들어, 서로 악영향을 미치지 않는 보완적 활성을 갖는 활성 성분을 함유할 수 있다. 특정 실시양태에서, 약학적 제제는 제1 치료제에 의해 치료되는 동일한 질환을 치료하기 위한 제2 활성 성분을 포함할 수 있다. 이러한 활성 성분은 의도된 목적에 효과적인 양으로 적합하게 조합되어 존재한다. 예를 들어, 제한 없이, 본 개시의 제제는 또한 치료되는 특정 적응증에 필요한 두 개 이상의 활성 성분, 바람직하게는, 서로 악영향을

미치지 않는 보완적 활성을 갖는 활성 성분을 함유할 수 있다. 예를 들어, 동일한 질환의 치료에 유용한 제2 치료제를 추가로 제공하는 것이 바람직할 수 있다. 이러한 활성 성분은 의도된 목적에 효과적인 양으로 적합하게 조합되어 존재한다.

[0242] 본 개시의 조성물은 당업계에서 알려진 다양한 방법으로 투여될 수 있다. 투여 경로 및/또는 방식은 원하는 결과에 따라 달라진다. 활성 화합물은 신속한 방출을 방지하기 위해 화합물을 보호하는 담체, 예컨대, 임플란트, 경피 패치 및 미세캡슐화 전달 시스템을 포함하는 제어 방출 제제로 제조될 수 있다. 생분해성, 생체적합성 중합체, 예컨대 에틸렌 비닐 아세테이트, 폴리무수물, 폴리글리콜산, 콜라겐, 폴리오르토에스터 및 폴리락트산이 사용될 수 있다. 이러한 제제를 제조하기 위한 많은 방법은 예를 들어, Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson 편집, Marcel Dekker, Inc., New York, 1978에 의해 기재되어 있다. 특정 실시양태에서, 상기 약학적 조성물은 미국 식품의약품안전처의 GMP(Good Manufacturing Practice) 조건하에서 제조된다.

[0243] 본원에서 개시되는 항체 또는 항체 유도체를 함유하는 서방형 제제를 또한 제조할 수 있다. 서방형 제제의 적합한 예는 항체 또는 항체 유도체를 함유하는 고체 소수성 중합체의 반투과성 매트릭스를 포함하며, 이들 매트릭스는 성형된 품목, 예를 들어 필름 또는 마이크로캡슐의 형태이다. 특정 실시양태에서, 활성 성분은 콜로이드성 약물 전달 시스템(예를 들어, 리포좀, 알부민 마이크로스피어, 마이크로에멀젼, 나노입자 및 나노캡슐) 또는 매크로에멀젼에서 각각, 예를 들어, 코아세르베이션 기법 또는 계면 중합에 의해 제조된 마이크로캡슐, 예를 들어, 히드록시메틸셀룰로스 또는 젤라틴 마이크로캡슐 및 폴리-(메틸메타실레이트) 마이크로캡슐에 포접될 수 있다. 이러한 기법은 Remington's Pharmaceutical Sciences 제16판, Osol, A. 편집, (1980)에서 개시되어 있다.

[0244] 특정 투여 경로에 의해 본 개시의 항체 또는 항체 유도체를 투여하기 위해, 화합물을 이의 비활성화를 방지하기 위한 물질로 코팅하거나 그 화합물과 공동 투여할 필요가 있을 수 있다. 예를 들어, 화합물은 적절한 담체, 예를 들어 리포좀, 또는 희석제로 대상체에게 투여될 수 있다. 약학적으로 허용 가능한 희석제는 식염수 및 수성 완충 용액을 포함한다. 리포좀은 수중유중수형 CGF 에멀젼뿐만 아니라 일반적인 리포좀을 포함한다(Strejan 등 (1984) J Neuroimmunol. 7:27).

[0245] 약학적으로 허용 가능한 담체는 멸균 주사용 용액 또는 분산액의 즉석 제조를 위한 멸균 수용액 또는 분산액 및 멸균 분말을 포함한다. 이러한 약학적 활성 물질에 대한 배지 및 제제의 사용은 당업계에서 알려져 있다.

[0246] 모든 일반적인 배지 또는 제제가 활성 화합물과 양립할 수 없는 경우를 제외하면, 본 발명의 약학적 조성물에서 이의 사용이 고려된다. 보조 활성 화합물은 또한 조성물에 혼입될 수 있다.

[0247] 치료적 조성물은 전형적으로 멸균, 실질적으로 등장성이어야 하고, 제조 및 보관 조건 하에 안정해야 한다. 상기 조성물은 용액, 마이크로에멀젼, 리포좀, 또는 높은 약물 농도에 적합한 다른 규칙적 구조로서 제형화될 수 있다. 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 코팅을 사용하고, 분산의 경우 필요한 입자 크기를 유지하고, 또한 계면활성제를 사용함으로써 유지될 수 있다. 많은 경우, 등장화제, 예를 들어, 당, 만니톨, 소르비톨과 같은 폴리알코올 또는 염화나트륨을 조성물에 포함시키는 것이 바람직하다. 주사용 조성물의 장기간 흡수는 흡수를 지연시키는 제제, 예를 들어 모노스테아레이트 염 및 젤라틴을 조성물에 포함시킴으로써 이루어질 수 있다.

[0248] 멸균 주사용 용액은 적절한 용매 중에서 필요한 양으로 본원에서 개시되는 하나 이상의 항체 또는 항체 유도체를 필요에 따라 위에서 열거된 성분 중 하나 또는 이들의 조합과 혼입한 후, 멸균 미세여과, 예를 들어 멸균 여과막을 통한 여과에 의해 제조될 수 있다. 일반적으로, 분산액은 염기성 분산 매질 및 위에서 열거된 것으로부터 유래한 다른 필요한 성분을 함유하는 멸균 비하이클 내에 활성 화합물을 혼입하여 제조된다. 멸균 주사용 용액의 제조를 위한 멸균 분말의 경우, 바람직한 제조 방법은 활성 성분에 임의의 추가의 원하는 성분의 분말을 이의 전에 멸균 여과된 용액으로부터 생산하는 진공 건조 및 동결- 건조(동결건조) 방법이다.

[0249] 치료적 조성물은 또한 당업계에서 알려진 의학 장치를 사용해서 투여할 수 있다. 예를 들어, 본 개시의 치료적 조성물은 예를 들어, 미국 특허 제5,399,163호, 제5,383,851호, 제5,312,335호, 제5,064,413호, 제4,941,880호, 제4,790,824호 또는 제4,596,556호에서 개시되는 장치와 같은 무바늘 피하 주사 장치로 투여될 수 있다. 본 개시에서 유용한 임플란트 및 모듈의 예는 다음을 포함한다: 제어된 속도로 약물을 분배하기 위한 이식 가능한 마이크로 주입 펌프를 개시한 미국 특허 제4,487,603호; 피부를 통해 약물을 투여하기 위한 치료

장치를 개시한 미국 특허 제4,486,194호; 정밀한 주입 속도로 약물을 전달하기 위한 약물 주입 펌프를 개시한 미국 특허 제4,447,233호; 연속 약물 전달을 위한 가변 유동 이식 가능한 주입 장치를 개시한 미국 특허 제4,447,224호; 다중 챔버 구획을 갖는 삼투성 약물 전달 시스템을 개시한 미국 특허 제4,439,196호; 및 삼투성 약물 전달 시스템을 개시하고 있는 미국 특허 제4,475,196호. 많은 다른 이러한 임플란트, 전달 시스템 및 모듈이 알려져 있다.

[0250] 치료 조성물의 경우, 본 개시의 제제는 경구, 비강, 국소(협측 및 설하 포함), 직장, 질 및/또는 비경구 투여에 적합한 것을 포함한다. 상기 제제는 단위 투여 제형으로 편리하게 존재할 수 있으며 약학 분야에서 알려진 임의의 방법에 의해 제조될 수 있다. 단일 투여 제형을 생성하기 위해 담체 물질과 조합될 수 있는 항체 또는 항체 유도체의 양은 치료되는 대상체 및 특정 투여 방식에 따라 달라진다. 단일 투여 제형을 생성하기 위해 담체 물질과 조합될 수 있는 항체 또는 항체 유도체의 양은 일반적으로 치료 효과를 생성하는 조성물의 양이다. 일반적으로, 100% 중에서, 이러한 양은 활성 성분의 약 0.01% 내지 약 99%, 약 0.1% 내지 약 70%, 또는 약 1% 내지 약 30%의 범위이다.

[0251] 본 개시의 조성물의 국소 또는 경피 투여를 위한 투여 제형은 분말, 분무, 연고, 페이스트, 크림, 로션, 겔, 용액, 패치 및 흡입제를 포함한다. 활성 화합물은 멸균 조건 하에 약학적으로 허용 가능한 담체 및 필요할 수 있는 임의의 방부제, 완충제 또는 추진제와 혼합될 수 있다.

[0252] 문구 "비경구 투여" 및 "비경구적으로 투여되는"은, 일반적으로 주사에 의한 투여 방식(장내 및 국소 투여 제외)을 의미하며 정맥내, 근육내, 동맥내, 척수강내, 피막내, 안와내, 심장내, 피부내, 복강내, 기관내, 피하, 표피하, 관절내, 피막하, 지주막하, 척수내, 경막외 및 흉골내 주사 및 주입을 포함하나 이에 한정되지 않는다.

[0253] 이러한 약학적 조성물은 또한 방부제, 습윤제, 유화제 및 분산제와 같은 보조제를 함유할 수 있다. 미생물의 존재를 방지하는 것이 위의 멸균 절차와 다양한 항균 및 항진균제, 예를 들어, 파라벤, 클로로부탄올, 페놀 소르브산 등의 첨가에 의해 보장될 수 있다. 등장화제, 예컨대 당, 염화나트륨 등을 조성물 내에 포함시키는 것이 또한 바람직할 수 있다. 또한, 주사용 약학적 형태의 장기간 흡수는 알루미늄 모노스테아레이트 및 젤라틴과 같은 흡수를 지연시키는 제제의 첨가에 의해 이루어질 수 있다.

[0254] 특정 실시양태에서, 본 개시의 항체 또는 항체 유도체가 약제로서 인간 및 동물에 투여되는 경우, 이들은 단독으로 또는 예를 들어 약학적으로 허용 가능한 담체와 조합된, 약 0.01% 내지 약 99.5%(또는 약 0.1% 내지 약 90%)의 항체 또는 항체 유도체를 함유하는 약학적 조성물로서 투여될 수 있다.

[0255] 5. 제조 품목

[0256] 본 개시되는 특허 대상은 위에서 기재되는 장애의 치료, 예방 및/또는 진단에 유용한 물질을 함유하는 제조 품목을 추가로 제공한다.

[0257] 특정 실시양태에서, 상기 제조 품목은 용기 및 용기 상에 있거나 용기와 연관되는 표지 또는 의약품 설명서를 포함한다. 적합한 용기의 비제한적 예는 병, 바이알, 주사기, IV 용액 백 등을 포함한다. 상기 용기는 유리 또는 플라스틱과 같은 다양한 물질로 형성될 수 있다. 상기 용기는 단독으로 존재하거나 또는 병태의 치료, 예방 및/또는 진단에 효과적인 다른 조성물과 조합된 조성물을 보유할 수 있으며 멸균 접근 포트를 가질 수 있다(예를 들어, 용기는 정맥내 용액 백 또는 피하 주사 바늘에 의해 관통 가능한 스토퍼를 갖는 바이알일 수 있음).

[0258] 특정 실시양태에서, 상기 조성물 중 적어도 하나의 활성제는 본 개시의 항체 또는 항체 유도체이다. 표지 또는 의약품 설명서는 조성물이 선택한 병태를 치료하는 데 사용된다는 내용을 나타낼 수 있다.

[0259] 특정 실시양태에서, 상기 제조 품목은 (a) 본 개시의 항체 또는 항체 유도체를 포함하는 조성물이 그 내부에 함유된 제1 용기; 및 (b) 추가 세포독성제 또는 다른 치료제를 포함하는 조성물이 그 내부에 함유된 제2 용기를 포함한다. 특정 실시양태에서, 상기 제조 품목은 조성물이 특정 병태를 치료하는 데 사용될 수 있음을 나타내는 의약품 설명서를 추가로 포함할 수 있다.

[0260] 대안적으로 또는 추가적으로, 상기 제조 품목은 추가 용기, 예를 들어, 제2 또는 제3 용기를 추가로 포함할 수 있으며, 이는 예를 들어, 정균 주사용수(BWFI), 인산염 완충 식염수, 링거 용액 및 덱스트로스 용액과 같으나 이에 한정되지 않는 약학적으로 허용 가능한 완충제를 포함한다. 상기 제조 품목은 다른 완충제, 희석제, 필터, 바늘 및 주사기를 포함하여 상업적 및 사용자 관점에서 바람직한 다른 재료를 포함할 수 있다.

[0261] 다음 실시예는 현재 개시되는 특허 대상을 단지 예시하는 것일 뿐 임의의 방식으로 제한하는 것으로 간주되어서

는 안 된다.

[0262] [서열 표]

서열 번호	유전자 명칭	아미노산 서열
1.	5H8 CDR1	GRTFSSDS
2.	5H8 CDR2	VSRSAGST
3.	5H8 CDR3	AATDIATMPWLMVSSRYDY
4.	5H8 VHH	QVKLEESGGGQVQAGDSRTLSCVASGRTFSSDSMAWF REAPGKARGFVAVVSRSAGSTWYEDSVKGRFTISRDN AKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAATDIATMPWLMVS SRYDYWGQGTQVTVSS
5.	6H4 CDR1	GGSFSSDS
6.	6H4 CDR2	VTSAGST
7.	6H4 CDR3	AATTIATMPWLMVSSRYAY
8.	6H4 VHH	QVQLQESGGDLVQPGGSLTLSCAASGGSFSSDSMGWF RQAPRKARGFVGAVTSAGSTWYEDSVKGRFTISRDNA KNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAATTIATMPWLMVSS RYAYWGQGTQVTVSS
9.	7F3 CDR1	GRPFNSWS
10.	7F3 CDR2	VTSAGST
11.	7F3 CDR3	AATTIATMPWLMVSSRYAY
12.	7F3 VHH	QVQLVDSGGGLVQAGDSLRLSCAASGRPFNSWSMGW FRQAPRKARGFVGAVTSAGSTWYEDSVKGRFTISRDN AKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAATTIATMPWLMVS SRYAYWGQGTQVTVSS
13.	7H7 CDR1	GSTFSKYA
14.	7H7 CDR2	VTSAGST
15.	7H7 CDR3	AATTIATMPWLMVSSRYAY
16.	7H7 VHH	QVKLEESGGGLVQAGGSLRLSCAASGSTFSKYAMGWF RQAPRKARGFVGAVTSAGSTWYEDSVKGRFTISRDNA KNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAATTIATMPWLMVSS RYAYWGQGTQVTVSS
17.	14B12 CDR1	GRTFRNFG
18.	14B12 CDR2	VTSAGST
19.	14B12 CDR3	AATTIATMPWLMVSSRYAY
20.	14B12 VHH	QVQLVESGGGVVQAGGSLRLSCAASGRTFRNFGMGW FRQAPRKARGFVGAVTSAGSTWYEDSVKGRFTISRDN AKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAATTIATMPWLMVS SRYAYWGQGTQVTVSS
21.	14C4 CDR1	GRTFSSYG
22.	14C4 CDR2	VTSAGST
23.	14C4 CDR3	AATTIATMPWLMVSSRYAY
24.	14C4 VHH	QVQLVESGGGVVQAGGSLRLSCAASGRTFSSYGMGW FRQAPRKARGFVGAVTSAGSTWYEDSVKGRFTISRDN

[0263]

		AKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAATTIATMPWLMVS SRYAYWGQGTQVTVSS
25.	18B5 CDR1	GITFSSDS
26.	18B5 CDR2	VSRSAGST
27.	18B5 CDR3	AATDIATMPWLMVSSRYDY
28.	18B5 VHH	QVQLQESGGGLVQAGGSLTLSCTASGITFSSDSMAWF REAPGKARGFVAVVSRSAGSTWYEDSVKGRFTISRDN AKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAATDIATMPWLMVS SRYDYWGQGTQVTVSS
29.	20C11 CDR1	ELTLDYN
30.	20C11 CDR2	VTSAGST
31.	20C11 CDR3	AATTIATMPWLMVSSRYAY
32.	20C11 VHH	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASELTLDYNIGWFR QAPRKARGFVGAVTSAGSTWYEDSVKGRFTISRDNAK NTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAATTIATMPWLMVSSR YAYWGQGTQVTVSS
33.	21F11 CDR1	GDDFFTINAIDA
34.	21F11 CDR2	VTSAGST
35.	21F11 CDR3	AATTIATMPWLMVSSRYAY
36.	21F11 VHH	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGDDFFTINAIDAI GWFRQAPRKARGFVGAVTSAGSTWYEDSVKGRFTISR DNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAATTIATMPWLM VSSRYAYWGQGTQVTVSS
37.	5E8 CDR1	GRTFSSDS
38.	5E8 CDR2	VSRSAGST
39.	5E8 CDR3	AATDIATMPWLMVSSRYDY
40.	5E8 VHH	QVKLEESGGGLVQAGGSLKLSCAASGRTFSSDSMAWF REAPGKARGFVAVVSRSAGSTWYEDSVKGRFTISRDN AKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAATDIATMPWLMVS SRYDYWGQGTQVTVSS
41.	19C10 CDR1	GSTFSKYA
42.	19C10 CDR2	VTSAGST
43.	19C10 CDR3	AATTIATMPWLMVSSRYAY
44.	19C10 VHH	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGSTFSKYAMGW FRQAPRKARGFVGAVTSAGSTWYEDSVKGRFTISRDN AKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAATTIATMPWLMVS SRYAYWGQGTQVTVSS
45.	19C10-V2 CDR1	GSTFSKYA
46.	19C10-V2 CDR2	VTSAGST
47.	19C10-V2 CDR3	AATTIATMPWLMVSSRYAY
48.	19C10-V2 VHH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSTFSKYAMGWF RQAPRKARGFVGAVTSAGSTWYADSVKGRFTISRDNS KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAATTIATMPWLMVSS RYAYWGQGTLVTVSS

[0264]

		RYAYWGQGTLVTVSSEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
61.	예시적인 링커	GSGGSGGSGGSG
62.	예시적인 링커	GGGGSGGGGSGGGGS
63.	예시적인 링커	GGGSG
64.	예시적인 링커	GGGSGGGGSG
65.	예시적인 링커	GGSGGGSG
66.	예시적인 링커	GGSGGGSGGGSG
67.	예시적인 링커	GSGGSG
68.	예시적인 링커	GSGGSGGSG
69.	예시적인 링커	GSGSGSG
70.	예시적인 링커	GGGGSGGGGSGGGGSGGG
71.	예시적인 링커	PAPAP
72.	예시적인 링커	IKRTVAA
73.	예시적인 링커	VSSASTK
74.	예시적인 링커	ASTK
75.	예시적인 링커	ASTKSGGSGGSG
76.	예시적인 링커	AEAAAKA
77.	예시적인 링커	AEAAAKEAAAKA
78.	예시적인 링커	GRPGS GRPGS
79.	예시적인 링커	GRGGS GRGGS
80.	예시적인 링커	GKPGS GKPGS
81.	예시적인 링커	GEPGS GEPGS
82.	예시적인 링커	GDPGS GDPGS
83.	인간 B7H3 폴리펩티드	MLRRRGSPGMGVHVGAALGALWFCLTGALEVQVPED PVVALVGTDATLCCSFSPEPGFSLAQLNLIWQLTDTKQ LVHSFAEGQDQGSAYANRTALFPDLLAQGNASLRLQR VRVADEGSFTCFVSIRDFGSAAVSLQVAAPYSKPSMTL EPNKDLRPGDTVTITCSSYQGYPEAEVFWQDGQGVPL TGNVTTSQMANEQGLFDVHSILRVVLGANGTYSCLVR NPVLQQDAHSSVTITPQRSPTGAVEVQVPEDPVVALVG TDATLRCSFSPEPGFSLAQLNLIWQLTDTKQLVHSFTE GRDQGSAYANRTALFPDLLAQGNASLRLQRVRVADE GSFTCFVSIRDFGSAAVSLQVAAPYSKPSMTLEPNKDL RPGDTVTITCSSYRGYPEAEVFWQDGQGVPLTGNVTT SQMANEQGLFDVHSVLRVVLGANGTYSCLVRNPVLQ

[0265]

		QDAHGSVTITGQPMTFPPEALWVTVGLSVCLIALLVAL AFVCWRKIKQSCEEENAGAEDQDGEGEGSKTALQPLK HSDSKEDDGQEIA
84.	인간 B7H3 폴리펩티드의 ECD	MLRRRGSPGMGVHVGAALGALWFCLTGALEVQVPED PVVALVGTDATLCCSFSPEPGFSLAQLNLIWQLTDTKQ LVHSFAEGQDQGSAYANRTALFPDLLAQGNASLRLQR VRVADEGSFTCFVSIRDFGSAAVSLQVAAPYSKPSMTL EPNKDLRPGDTVTITCSSYQGYPEAEVFWQDGQGVPL TGNVTTSQMANEQGLFDVHSILRVVLGANGTYSCLVR NPVLQQDAHSSVTITPQRSPTGAVEVQVPEDPVVALVG TDATLRCSFSPEPGFSLAQLNLIWQLTDTKQLVHSFTE GRDQGSAYANRTALFPDLLAQGNASLRLQRVRVADE GSFTCFVSIRDFGSAAVSLQVAAPYSKPSMTLEPNKDL RPGDTVTITCSSYRGYPEAEVFWQDGQGVPLTGNVTT SQMANEQGLFDVHSVLRVVLGANGTYSCLVRNPVLQ QDAHGSVTITGQPMT

[0266]

[0267] **실시예**

[0268] **실시예 1. 항-B7H3 VHH 항체 생성**

[0269] 재조합 인간 B7H3 세포외 도메인(ECD) 단백질의 항원은 C-말단 폴리-히스티딘 태그 또는 Fc 태그로 구축되었으며 사내에서 정제되었다. B7H3 ECD-Fc를 이용한 라마 면역화는 표준 프로토콜을 사용하여 수행되었다. 혈청 항체의 역가는 ELISA 분석을 통해 측정되었다. 3회의 면역화 후 높은 역가(1:30,000)가 관찰되었다. 이후, 전혈을 수집하고 PBMC를 단리하였다. 이후, RNA를 PBMC로부터 단리하였다.

[0270] VHH 항체 유전자를 표준 프로토콜을 사용하여 PCR로 증폭시키고, DNA 아가로스 겔로 정제하고, 파지미드 벡터 pADL-23c(Antibody Design Labs) 내로 구축하고 TG1 전기적격 세포(Lucigen로부터 유래함)에 형질전환시켰다. 형질전환 TG1 세포를 Y2T 배지에서 배양하였다. 표적 VHH가 표시된 파지는 보조 파지를 첨가하고 밤새 공동 배양하여 생성되었다. 세포 배양 상청액의 파지를 원심분리하여 채취하였고, 인간-B7H3(h-B7H3) 항원에 대한 결합제의 패닝을 비오티닐화 h-B7H3로 코팅된 스트렙타비딘-결합 Dynabeads를 사용하여 수행하였다. 1회의 패닝 후, h-B7H3 결합제가 용출되었으며, 이는 SS320 세포를 감염시키는 데 사용되었다. SS320 세포의 콜로니를 선택하여 Y2T 배지에서 배양한 후, IPTG를 VHH 항체 분비를 위해 첨가하였다. VHH 항체를 갖는 상청액은 h-B7H3 ECD 코팅 플레이트를 사용하여 ELISA 분석을 통해 스크리닝되었다. 양성 h-B7H3 결합제가 시퀀싱을 위해 선택되었다. 상이한 서열을 갖는 44개의 클론이 선택되었다. 사이노몰구스 B7H3에 대한 VHH 항체의 결합 능력을 ELISA를 통해 또한 검사하였다. 미국 특허 제8,802,091호에 개시된 서열을 기반으로 사내에서 합성된 에노블리투주맙 유사체인 참조 Ab1을 대조로 사용하였다.

[0271] 도 1a 및 도 1b는 상위 11개 클론이 각각 인간 및 사이노몰구스 B7H3에 결합되었음을 나타낸다. 상위 클론의 서열을 식별하여 불변 중쇄 2(CH2) 및 불변 중쇄 3(CH3) 도메인을 포함하는 인간 IgG1 Fc 영역을 첨가하여 2가 VHH-Fc 항체를 만들기 위해 사용하였다. VHH-Fc 항체는 ExpiCHO 세포에서 발현되었고, 상청액의 단백질은 채취되어 단백질 A로 정제되었다.

[0272] 상위 11개 결합제 및 이들의 CDR 및 VH가 서열 표(서열 번호: 1~44)에 나타나 있다. VHH-Fc 형태의 상위 클론의 결합 동역학은 옥텟 결합 분석을 통해 평가되었으며, 데이터는 표 3에 나타나 있다. 결과에 따르면 상위 11개 항체 클론이 에노블리투주맙 유사체와 유사하게 높은 친화성으로 B7H3에 결합한 것으로 나타났다.

표 3

[0273] 결합 동역학

클론 명칭	KD(M)	kon(1/Ms)	koff(1/s)
5e8	5.21E-10	5.82E+05	3.03E-04
5h8	6.17E-10	4.88E+05	3.01E-04
6h4	8.95E-10	4.90E+05	4.38E-04
7f3	1.48E-09	4.02E+05	5.94E-04
7h7	1.43E-09	4.85E+05	6.93E-04
14b12	2.06E-09	4.10E+05	8.47E-04
14c4	6.64E-10	4.31E+05	2.86E-04
18b5	5.80E-10	4.90E+05	2.84E-04

19c10	1.05E-09	4.57E+05	4.79E-04
20c11	1.01E-09	4.46E+05	4.51E-04
21f11	1.23E-09	4.21E+05	5.19E-04
Ref Ab 1	7.39E-10	2.69E+05	1.99E-04

[0274] 한 가지 대표적인 클론 19c10이 이의 프레임워크의 인간화를 위해 선택되었다. 간단히 말하면, 클론의 서열을 사용하여 Igblast를 수행하고, 인간 생식계열 유전자의 데이터베이스를 검색하였다. 이상적인 생식계열 서열이 선택되었고 프레임워크 서열의 돌연변이가 이루어져 프레임워크 서열이 라마에서 인간으로 변경되었다. 두 개의 인간화 클론, 19c10-V2 및 19c10-V3이 만들었으며, 여기서 19c10-V2는 인간화 FR1, FR3 및 FR4를 함유하였고, 19c10-V3은 19c10-V2를 기반으로 FR2를 추가로 함유하였다. 다른 인간화 클론인 19c10-V4는 역 돌연변이를 도입하고 CDR2 영역 주변의 라이신 잔기 수를 감소시켜 제조되었다. 작제물은 발현 벡터 내로 클로닝되었고 항체 단백질은 ExpiCHO의 일시적 형질감염을 통해 생성되었으며 단백질 A로 정제되었다.

[0275] **실시예 2. 항-B7H3 VHH 항체의 전체 세포 결합**

[0276] B7H3 양성 종양 세포에 대한 항-B7H3 항체의 결합 친화성을 결정하기 위해, 전체 세포 결합 분석은 B7H3 양성 인간 종양 세포를 사용하여 수행되었다. B7H3 양성 세포인 A498(인간 신장암종 세포) 또는 음성 대조 세포인 Jurkat(인간 백혈병 세포) 및 Raji 세포를 동일한 양(1*10^4개 세포/웰, 웰당 100ul)으로 FACS 완충액(1.5% FBS가 있는 PBS)이 있는 96웰 플레이트에 접종하였다. 항-B7H3 항체와 참조 항체를 웰에 첨가하고 37℃에서 15분 동안 인큐베이션하였다. 혼합물을 원심분리기로 채취하고 상청액은 폐기하였다. 세척 후, 2차 항체(Alexa Fluor 488 AffiniPure Goat Anti-Human IgG, Jackson Immuno Research, #109-545-008, 1:500 희석)를 혼합물과 함께 37℃ 인큐베이터에서 15분 동안 인큐베이션하였다. 세척 후, 항체-종양 혼합물은 FACS 분석을 수행하였다. 평균 형광 강도는 항체-종양 세포 혼합물 집단을 게이팅하여 CytoFlex 벤치탑 유세포 분석기(Beckman Coulter life science)로 측정하였다. 결합 친화성은 GraphPad PRISM을 사용하여 계산되고 플로팅되었다.

[0277] 도 2a에 나타난 바와 같이, 상위 11개의 항-B7H3 항체 클론은 참조 Ab 1(에노블리투주맙 유사체)과 비교하여 B7H3 양성 A498 세포에 대해 더 높은 결합 친화성(더 낮은 EC50)을 나타냈다. 도 2b에 나타난 바와 같이, 인간화 항-B7H3 항체 클론도 모 클론 및 참조 Ab 1과 필적한 결합 친화성을 나타내었다. 참조 Ab 4는 B7H3에 결합하지 않는 음성 대조이다. 도 2c는 19c10-V4가 19c10-V3과 비교하여 B7H3 양성 A498 세포에 대해 더 높은 결합 친화성(더 낮은 EC50)을 가짐을 나타낸다. 도 2d에 나타난 바와 같이, 19c10-V4는 참조 Ab 1(에노블리투주맙 유사체) 및 참조 Ab 2(h1702 유사체) 모두와 비교하여 B7H3 양성 A498 세포에 대해 더 높은 결합 친화성(더 낮은 EC50)을 나타내었다. 도 2e는 항-B7H3 항체가 B7H3 음성 Jurkat 세포에 결합되지 않음을 나타내었다. 마찬가지로, 도 2f는 19c10-V4, 참조 Ab 1 또는 참조 Ab 2 중 아무 것도 B7H3 음성 Raji 세포에 결합되지 않은 것으로 나타내었으나, 항-CD47 항체는 양성 대조로 사용되었다. 결과는 상위 11개의 항-B7H3 항체 클론뿐만 아니라 인간화 19c10 클론은 B7H3 양성 종양 세포에 특이적으로 높은 결합 친화성을 가지고 있었지만 B7H3 음성 세포에는 그렇지 않았으며 상위 항-B7H3 항체 클론 및 19c10-V4는 참조 항체와 비교하여 더 높은 결합 친화성을 가짐을 나타내었다.

[0278] **실시예 3. 항-B7H3 VHH 항체의 항체 의존성 세포 독성(ADCC)**

[0279] 항체 의존성 세포 독성(ADCC)은 세포 매개 면역 방어의 면역 메커니즘으로, 면역 이펙터 세포가 이를 통해 항체에 의해 결합된 표적 세포를 인식하고 분해한다. 항-B7H3 항체의 ADCC 유도 능력을 평가하였다.

[0280] 상위 11개 항-B7H3 VHH 항체 클론 중 5개(5H8, 6H4, 14C4, 18B5 및 19C10)가 ADCC 평가를 위해 선택되었다. 에노블리투주맙의 ADCC 기능은 이의 항종양 효능의 주요 메커니즘 중 하나라고 보고되었다. 따라서, 에노블리투주맙 유사체인 참조 Ab 1을 ADCC 평가를 위한 양성 대조로 사용하였다. 에노블리투주맙 유사체와 항원 결합 영역 간의 정확한 비교를 확보하기 위해, VHH 항체의 Fc 영역을 에노블리투주맙의 Fc 영역으로 대체하여 Fc 영역 차이로 인해 야기되는 임의의 상이한 효과를 배제하였다.

[0281] B7H3 양성 A498 인간 신장암종 세포를 96웰 플레이트에 접종하고 세포 배양 배지(Eagle's Minimum Essential Medium, ATCC 30-2003, 10% FBS, 1% 페니실린/스트렙토마이신 및 1% L-글루타민 함유)에서 밤새 인큐베이션한다. 이후, 항-B7H3 항체를 A498 배양 배지로 희석하고 37℃ 인큐베이터에서 세포와 함께 30분 동안 인큐베이션하였다. 1차 인간 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)를 항체-A498 혼합물에 첨가하여 밤새 인큐베이션하였다. 이후, 세포 생존율은 6시간 동안 VICTOR X3 다중표지 플레이트 리더(PerkinElmer)를 사용하여 한 시간마다 검출하였고

GraphPad PRISM을 사용하여 계산하였다.

[0282] 도 3a에 나타난 바와 같이, 모든 항-B7H3 항체는 ADCC를 통해 종양 세포의 용해를 유도하였고, 선택된 5개의 VHH 항체 클론 중 4개가 참조 Ab 1(에노블리투주맙 유사체)과 비교하여 우수한 ADCC 기능을 나타내었다.

[0283] 또한, 유사한 ADCC 분석을 19c10-V4 및 참조 항체를 사용하여 수행하였다. 도 3b에 나타난 바와 같이, 모든 항-B7H3 항체는 ADCC를 통해 종양 세포의 용해를 유도하였고, 19c10-V4는 참조 Ab 1(에노블리투주맙 유사체) 및 참조 Ab 2(h1702 유사체)와 비교하여 우수한 ADCC 기능을 나타내었다. 이러한 결과는 항-B7H3 VHH 항체가 종양 근절에 필수적인 효과적인 ADCC 기능을 나타냄을 입증하였다.

[0284] **실시예 4. 항-B7H3 VHH 항체의 체내 항종양 효과**

[0285] 항-B7H3 항체의 항종양 효과는 A549 이종이식 마우스 모델을 사용하여 체내에서 추가로 평가되었다. A549는 ATCC로부터 구입한 인간 폐암 세포주이다. A549 세포는 37℃, 공기 중 5% CO_2 분위기 하 10% 열 비활성화된 소 태아 혈청이 보충된 F-12K 배지에서 단층 배양으로 체외에서 유지되었다. 세포는 0.25% 트립신-EDTA 소화를 통해 주 3회 정기적으로 계대 배양되었다. 3번의 계대배양 후, 500만개의 A549 세포를 각 마우스 내에 피하 접종하였다. 동물은 무작위로 배정되었고 평균 종양 부피가 약 100mm^3에 도달하면 치료를 시작하였다(1일차). 치료는 3주 동안 주 2회 수행하였다(표 4).

표 4

[0286] 군별 및 치료

군	*N	처리	투여 수준(mg/kg)	**투여량(μL/g)	투여 경로	투여 일정
1	8	비하이클(DPBS)	--	10	*i.p.*	BIW×3
2	8	19c10 V4	4.4	10	*i.p.*	BIW×3
3	8	HL702	8.4	10	*i.p.*	BIW×3
4	8	MGA-271	8.4	10	*i.p.*	BIW×3

[0287] 비고:

[0288] *: 동물 수

[0289] **투여량: 체중 10μl/g을 기준으로 투여량 조절. 체중 감량이 15%를 초과하면 투여 요법도 이에 맞게 조정되었음.

[0290] 종양 크기는 캘리퍼를 사용하여 2차원에서 주 3회 측정하여고, 부피는 다음 공식을 사용하여 mm^3로 표현하였다: $V = 0.5\ a \times b^2$, 여기서 *a* 및 *b*는 각각 종양의 긴 직경 및 짧은 직경이다. 이후, 종양 크기를 사용하여 종양 성장 억제율(TGI)(%) 및 상대 종양 증식률(T/C)(%)을 계산하였다. $TGI(\%)=[1-(V_{treat-t}-V_{treat-0})/(V_{control-t}-V_{control-0})]$는 항종양 효과를 나타내며, 여기서 $V_{treat-0}$ 및 $V_{control-0}$은 군 배정 당일의 처리군 및 대조군의 평균 부피이며, $V_{treat-t}$ 및 $V_{control-t}$는 주어진 일차의 처리군 및 대조군의 평균 부피이다. T/C % = TRTV / CRTV × 100 %(TRTV: 처리군 RTV; CRTV: 대조군 RTV). 이후, 상기 종양 크기는 다음 공식을 사용하여 RTV(상대 종양 부피) 값을 계산하는 데 사용되었다: RTV = Vt / V0, 여기서 V0 및 Vt는 군 배정 당일의 처리군 및 대조군의 평균 부피이며, TRTV 및 CRTV는 주어진 일차의 처리군 및 대조군의 RTV이다. 결과를 수집하여 GraphPad PRISM을 통해 플롯팅하였다.

[0291] 도 4a 및 표 5에 나타난 바와 같이, 항-B7H3 항체로 처리한 마우스는 대조 마우스와 비교하여 더 양호한 종양 성장 억제율(TGI)을 나타내었다. 19c10V4는 45일차에 h1702 유사체(21.19%) 및 에노블리투주맙 유사체인 MGA-271(27.14%)을 포함한 참조 항체보다 더 양호한 TGI(38.46%)를 나타내었다. 어느 군에서도 유의한 체중 감소는 관찰되지 않았다(도 4b). 실험 결과는 19c10V4 항체가 A549 이종이식 모델에서 h1702 유사체 및 에노블리투주맙 유사체와 비교하여 우수한 항종양 효능을 가짐을 입증하였다.

표 5

[0292] A549 이종이식을 보유한 암컷 BALB/c 누드 마우스에 대한 시험 품목의 항종양 효능(45일차 데이터 기준)

군	종양 부피(mm^3)[a] (45일차)	T/C[b] (%)	TGI[b] (%)
비하이클 i.p. BIW	2289.96±325.37	--	--
19c10 V4, 4.4mg/kg i.p. BIW	1447.51±395.79	63.73	38.46
HL702, 8.4mg/kg i.p. BIW	1825.71±232.98	79.27	21.19
MGA-271, 8.4 mg/kg i.p. BIW	1695.68±146.70	71.17	27.14

[0293] a. Mean ± SEM.

[0294] b. 종양 성장의 억제는 T/C 및 TGI(TGI(%) = [1-(T_{45}-T_0)/ (V_{45}-V_0)] ×100)로부터 계산되었음.

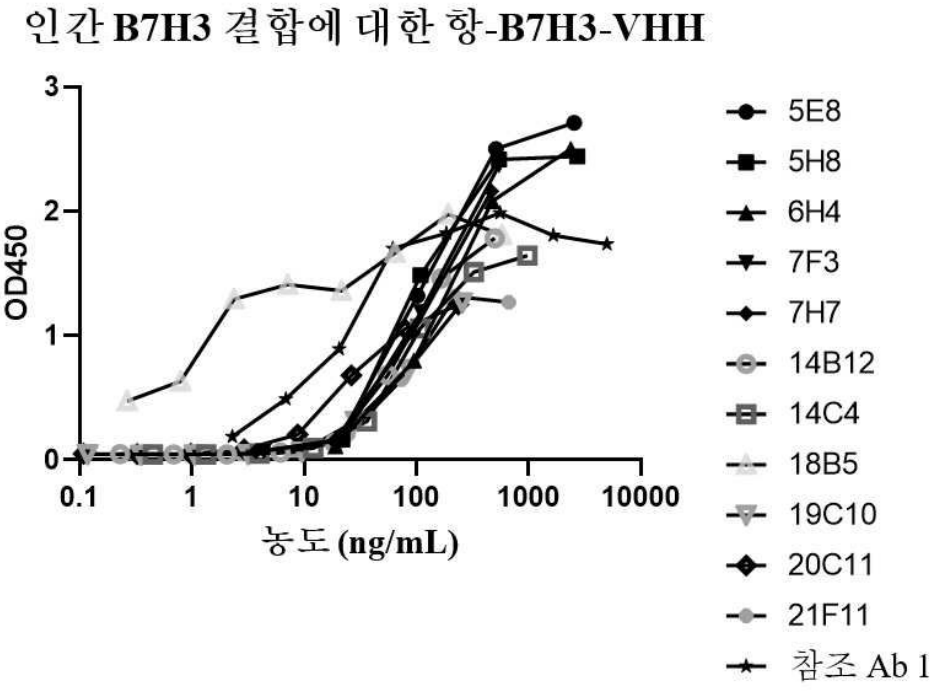
[0295] 도시되고 청구되는 다양한 실시양태에 더하여, 개시되는 특허 대상은 또한 본원에서 개시되고 청구되는 특징의 다른 조합을 갖는 다른 실시양태에 관한 것이다. 이와 같이, 본원에 제시된 특정 특징은 개시되는 특허 대상이 본원에서 개시되는 특징의 임의의 적합한 조합을 포함하도록 개시되는 특허 대상의 범위 내에서 다른 방식으로 서로 조합될 수 있다. 개시되는 특허 대상의 특정 실시양태에 대한 전술한 설명은 예시 및 설명의 목적으로 제시되었다. 이는 개시되는 특허 대상을 개시되는 실시양태로 총망라하거나 제한하려는 의도가 아니다.

[0296] 개시되는 특허 대상의 사상 또는 범위를 벗어나지 않고 개시되는 특허 대상의 구성 및 방법에 다양한 수정 및 변화가 이루어질 수 있음이 당업자에게 명백할 것이다. 따라서, 개시되는 특허 대상은 첨부되는 청구범위 및 이의 균등물의 범위 내에 있는 수정 및 변형을 포함하도록 의도된다.

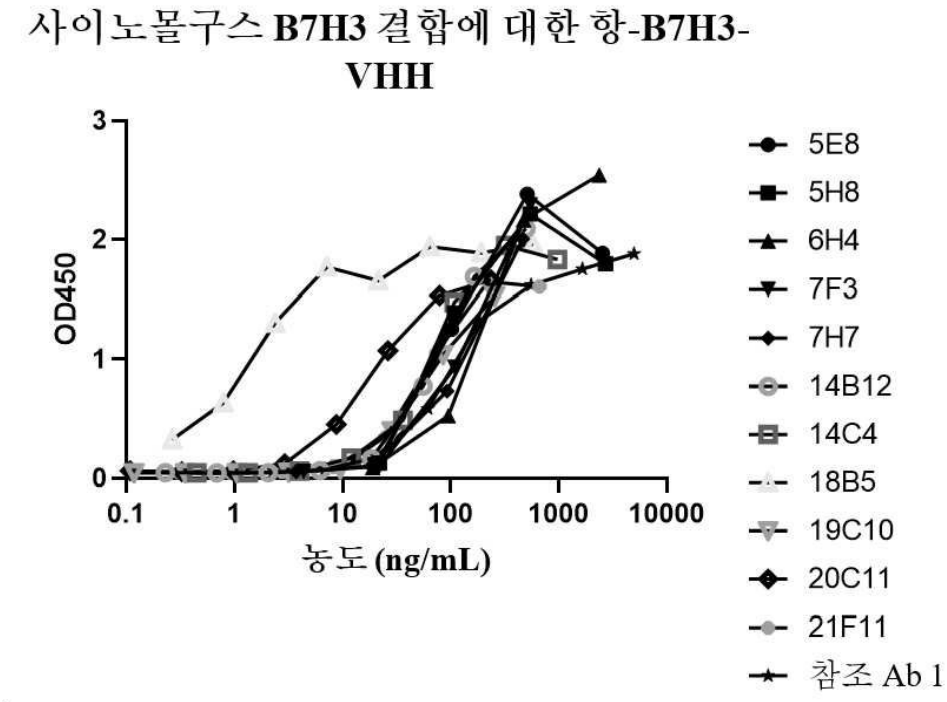
[0297] 다양한 간행물, 특허 및 특허 출원이 본원에서 인용되어 있으며, 이들의 전체 내용이 인용방식을 통해 본원에 포함된다.

도면

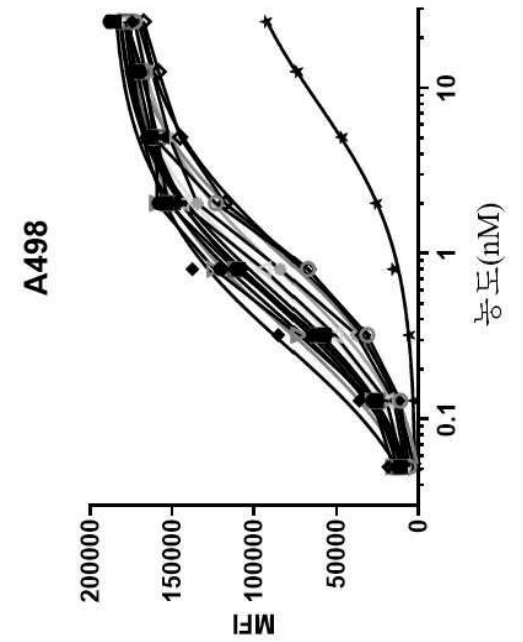
도면1a



도면1b

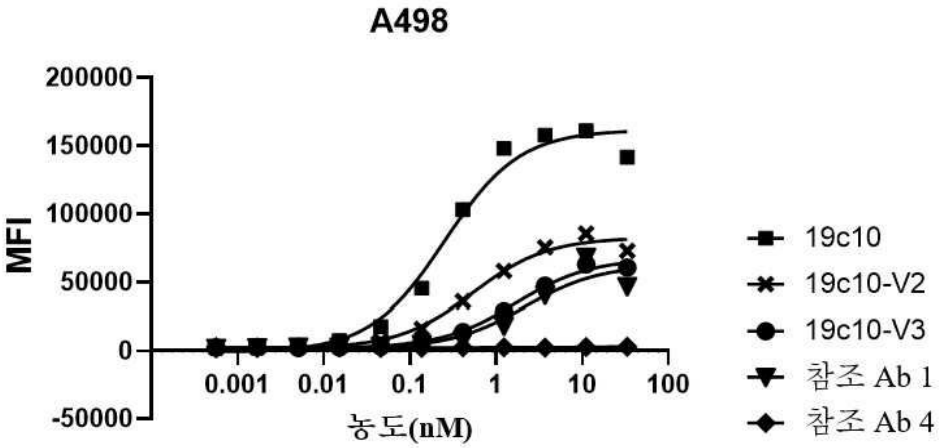

사이노몰구스 B7H3 결합에 대한 항-B7H3-VHH
OD450
3
2
1
0
0.1
1
10
100
1000
10000
농도 (ng/mL)
5E8
5H8
6H4
7F3
7H7
14B12
14C4
18B5
19C10
20C11
21F11
참조 Ab 1

도면2a



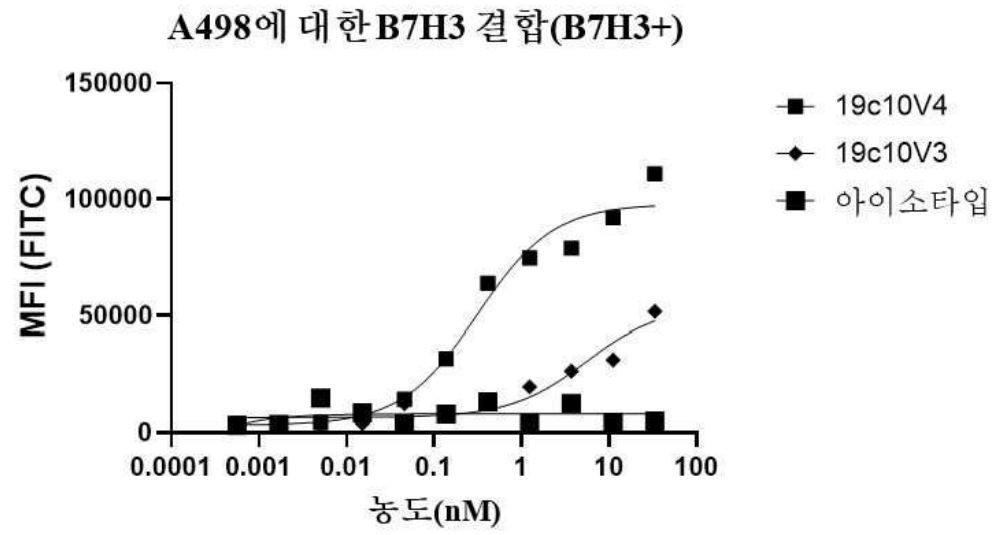
	5e8	5h8	6h4	7f3	7h7	14b12	14c4	18b5	19c10	20c11	21f11	참조 Ab 1
EC50	0.4508	0.5369	0.5016	0.5985	0.2720	1.085	0.4732	0.6795	0.3565	1.089	0.7789	7.939

도면2b

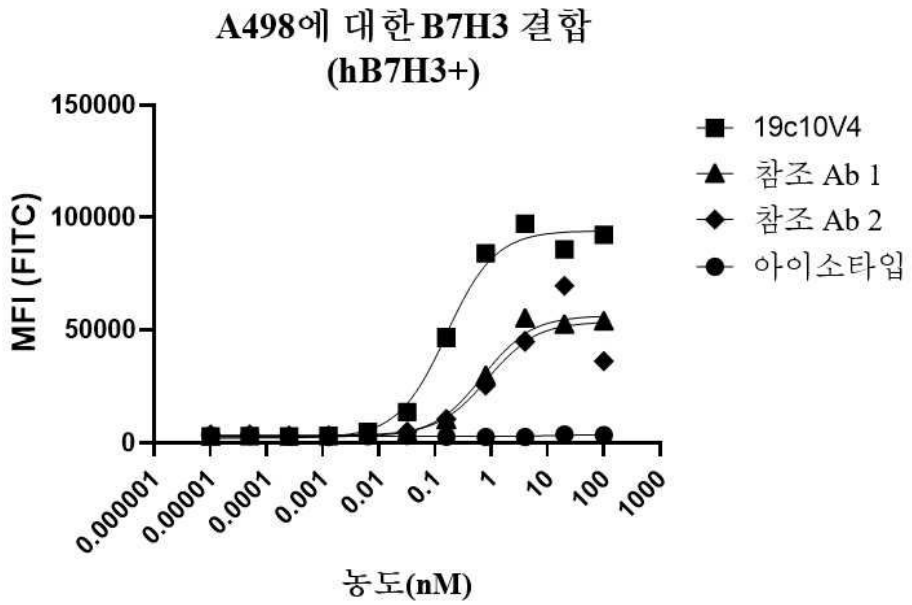


	19c10	19c10-V2	19c10-V3	참조 Ab 1	참조 Ab 4
EC50	0.2539	0.5372	1.690	2.177	40.26

도면2c

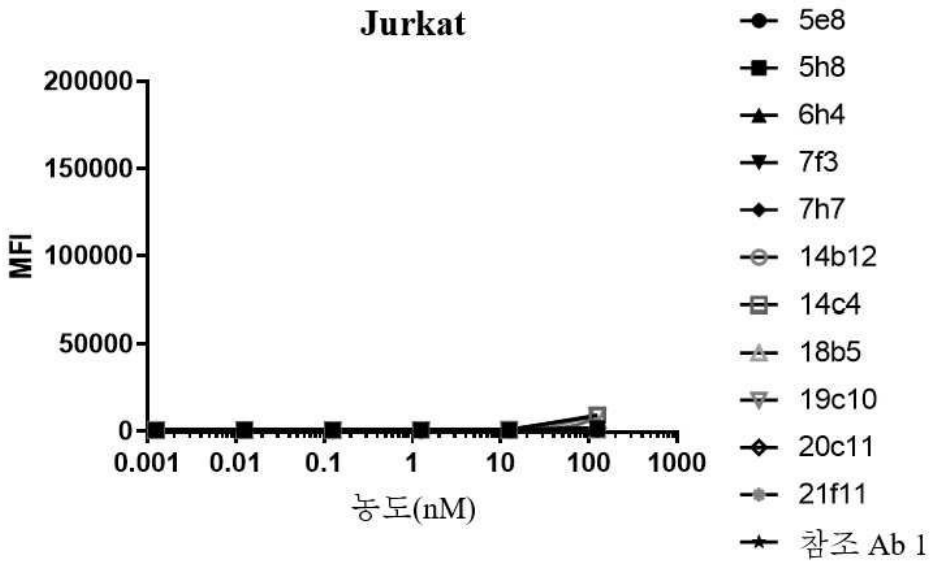


도면2d

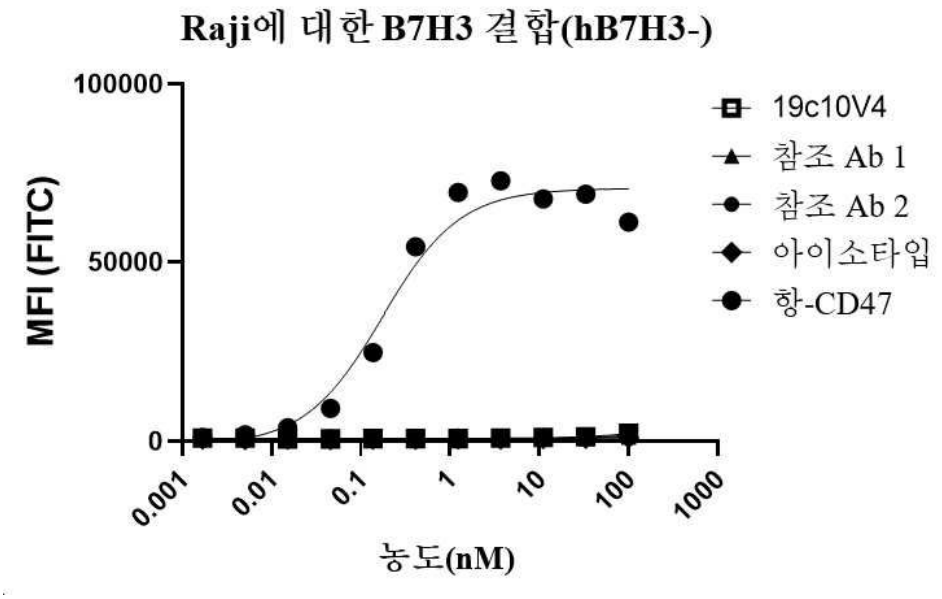


	19c10V4	참조 Ab 1	참조 Ab 2
EC50	0.1603	0.6972	0.8502

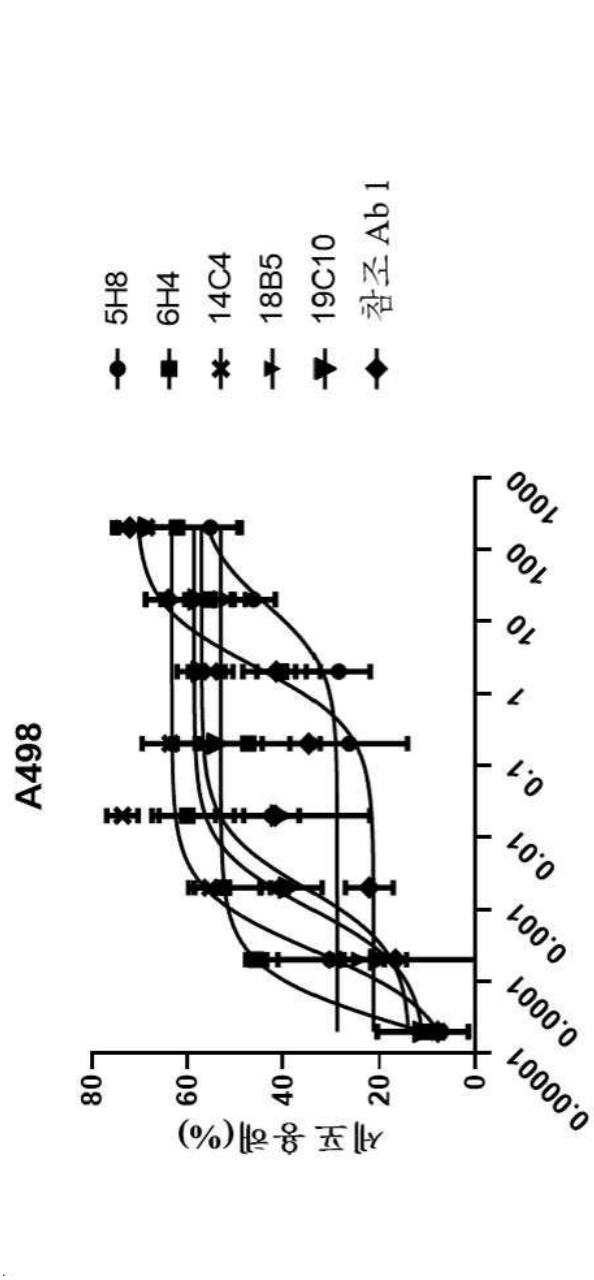
도면2e



도면2f

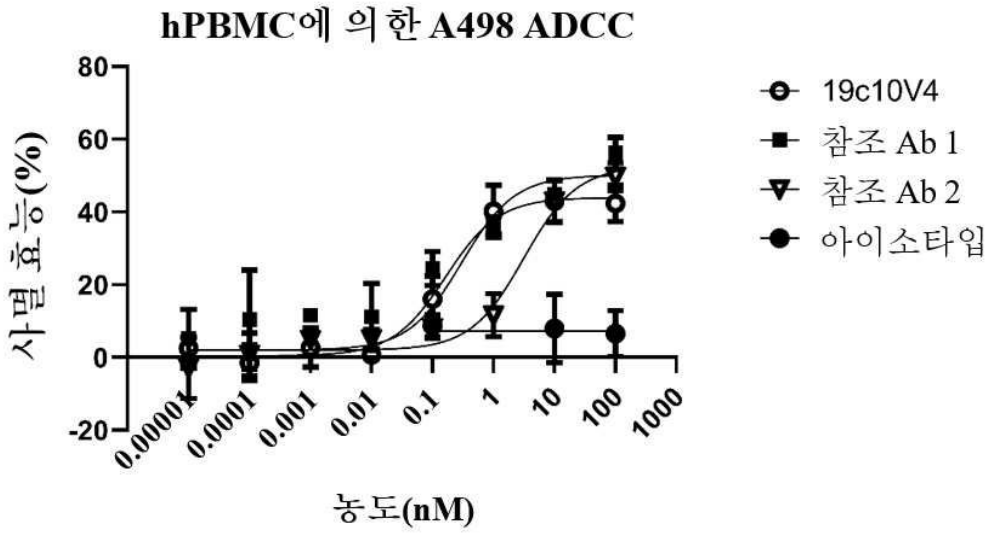

Raji에 대한 B7H3 결합(hB7H3-)
MFI (FITC)
100000
50000
0
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
농도(nM)
19c10V4
참조 Ab 1
참조 Ab 2
아이소타입
항-CD47

도면3a



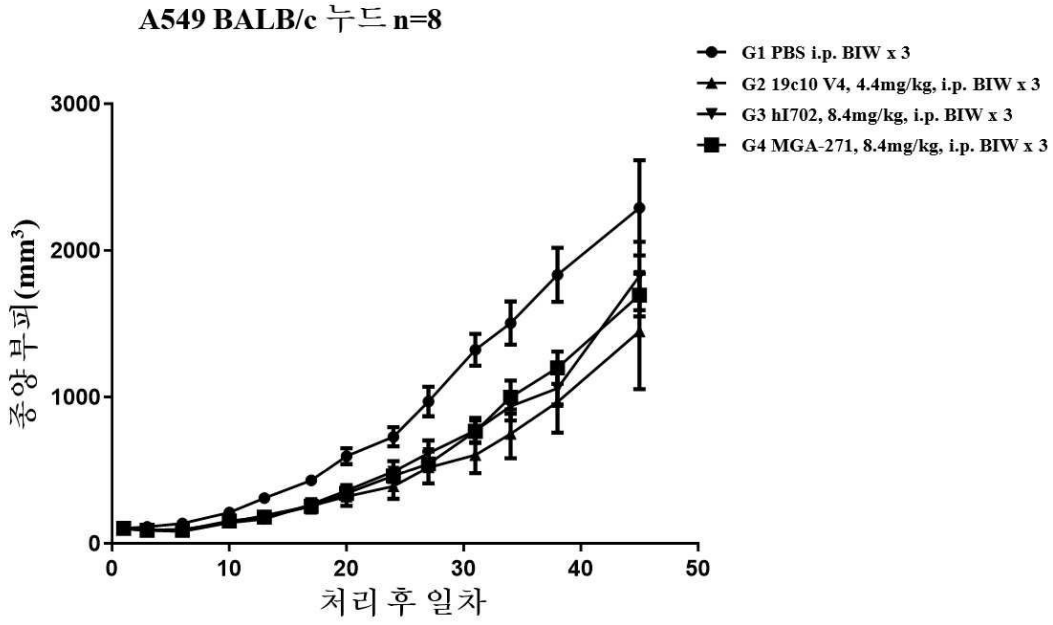
	5H8	6H4	14C4	18B5	19C10	참조 Ab 1
EC50	16.83	1.801e-005	0.0002609	0.001026	0.001942	2.369

도면3b

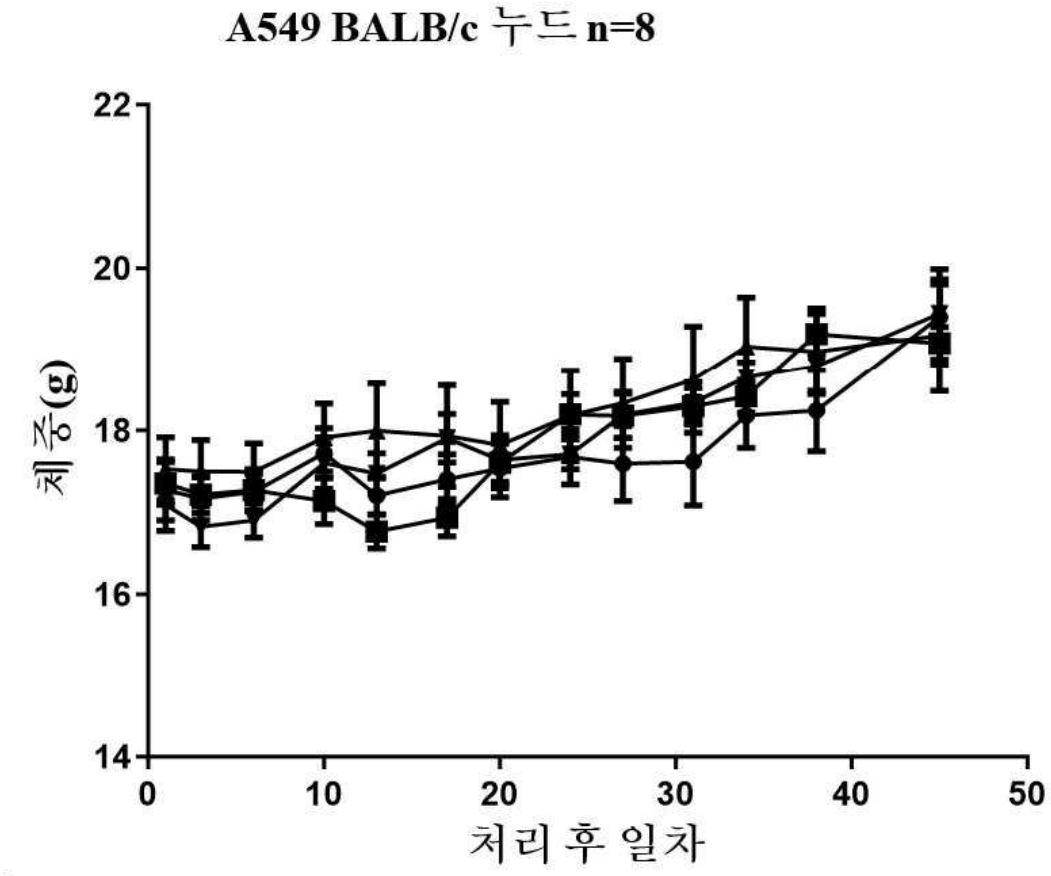


	19c10V4	참조 Ab 1	참조 Ab 2
EC50	0.1650	0.3021	3.152

도면4a



도면4b



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

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