



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2025년06월17일

(11) 등록번호 10-2821413

(24) 등록일자 2025년06월12일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07K 16/18 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)  
A61K 39/395 (2006.01) A61K 39/42 (2006.01)  
A61P 35/00 (2006.01) C07K 16/28 (2006.01)  
C07K 16/32 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C07K 16/18 (2013.01)  
A61K 39/3955 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2023-7006450(분할)

(22) 출원일자(국제) 2015년05월27일

심사청구일자 2023년02월23일

(85) 번역문제출일자 2023년02월23일

(65) 공개번호 10-2023-0033737

(43) 공개일자 2023년03월08일

(62) 원출원 특허 10-2016-7036488

원출원일자(국제) 2015년05월27일

심사청구일자 2020년05월12일

(86) 국제출원번호 PCT/US2015/032745

(87) 국제공개번호 WO 2015/184009

국제공개일자 2015년12월03일

(30) 우선권주장

62/003,136 2014년05월27일 미국(US)

(뒷면에 계속)

(56) 선행기술조사문헌

US20110263828 A1\*

KR1020130139884 A

JP2005521635 A

US20120258126 A1

\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

아카데미아 시니카

대만 11529 타이페이 난강 섹션 2 아카데미아 로드 128

(72) 발명자

우, 충-이

대만 뉴 타이페이 시티 221 시-즈 디스트릭트 동시 스트리트 넘버 78-1

마, 체

중화민국 11529 타이페이 난강 섹션 2 아카데미아 로드 128 아카데미아 시니카 내

왕, 치-휴이

미국 캘리포니아 92067 란초 산타페 피.오.박스 8154

(74) 대리인

이충한, 김해중

전체 청구항 수 : 총 8 항

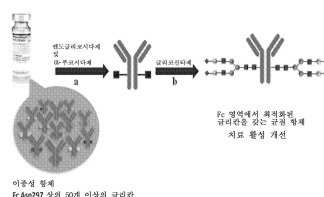
심사관 : 문영준

(54) 발명의 명칭 증진된 항체 효능을 위한 범용 당형태에 관한 조성물 및 방법

## (57) 요약

본 발명은 당가공된 Fc 영역을 포함하는 당단백질, 특히 모노클로날 항체에 관한 것이고, 여기서, 상기 Fc 영역은 Sia<sub>2</sub>(α2-6)Gal<sub>2</sub>GlcNAc<sub>2</sub>Man<sub>3</sub>GlcNAc<sub>2</sub>의 구조를 갖는 최적화된 N-글리칸을 포함한다. 상기 당가공된 Fc 영역은 야생형 Fc 영역을 포함하는 비교가능한 모노클로날 항체에 상대적으로 보다 높은 친화성으로 FcγRIIA 또는 Fcγ (뒷면에 계속)

## 대표도



RIIIa에 결합한다. 본 발명의 모노클로날 항체는 특히 FcγR에 의해 매개되는 이펙터 세포 기능(예를 들어, ADCC)의 증진된 효능이 요구되는 질환, 장애 또는 감염과 관련된 하나 이상의 증상, 예를 들어, 암, 자가면역, 감염성 질환을 예방하거나, 치료하거나 완화시키는데 유용하고, 효과가 ADCC에 의해 매개되는 치료학적 항체의 치료학적 효능을 증진시키는데 유용하다.

(52) CPC특허분류

**A61K 39/42** (2013.01)  
**A61P 35/00** (2018.01)  
**C07K 16/2887** (2013.01)  
**C07K 16/32** (2013.01)  
**A61K 2039/505** (2013.01)  
**C07K 2317/24** (2013.01)  
**C07K 2317/41** (2013.01)  
**C07K 2317/72** (2013.01)  
**C07K 2317/732** (2013.01)

(30) 우선권주장

|            |             |        |
|------------|-------------|--------|
| 62/003,104 | 2014년05월27일 | 미국(US) |
| 62/003,908 | 2014년05월28일 | 미국(US) |
| 62/020,199 | 2014년07월02일 | 미국(US) |
| 62/110,338 | 2015년01월30일 | 미국(US) |

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

당조작된 모노클로날 항체 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는, 암을 치료, 예방 또는 완화시키기 위한 약제학적 조성물로서,

여기서, 모노클로날 항체가 리투시맙(rituximab)의 경쇄 서열 및 중쇄 서열을 포함하고,

약제학적 조성물이 항체-의존성 세포 독성(ADCC) 활성을 당조작되지 않은 야생형 항체에 비해서 증가시키고;

당조작된 모노클로날 항체가 Fc 영역 내의 각각의 Asn-297 위치에서 N-글리칸 Sia<sub>2</sub>(α2-6)Gal<sub>2</sub>GlcNAc<sub>2</sub>Man<sub>3</sub>GlcNAc<sub>2</sub>-를 갖는 동족성인 집단의 모노클로날 항체를 포함하는, 약제학적 조성물.

#### 청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 당조작된 모노클로날 항체가 이종성으로 당화된 집단의 상응하는 모노클로날 항체에 상대적으로 FcγRIIA 또는 FcγRIIIA에 대해 증가된 결합 친화성을 나타내는, 약제학적 조성물.

#### 청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 약제학적 조성물이 시험관내 제조되는, 약제학적 조성물.

#### 청구항 4

제1 항에 있어서, 암이 뇌암, 폐암, 유방암, 경구암, 식도암, 위암, 간암, 담관암, 췌장암, 결장암, 신장암, 자궁암, 난소암 및 전립선암으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 약제학적 조성물.

#### 청구항 5

삭제

#### 청구항 6

삭제

#### 청구항 7

제 1항에 있어서, 동족성인 집단이 2% 미만의 전구체 N-글리칸을 갖는, 약제학적 조성물.

#### 청구항 8

제 1항에 있어서, 동족성인 집단이 Fc 영역 내의 각각의 Asn-297 위치에서 N-글리칸 Sia<sub>2</sub>(α2-6)Gal<sub>2</sub>GlcNAc<sub>2</sub>Man<sub>3</sub>GlcNAc<sub>2</sub>-를 갖는 적어도 90 중량%의 당조작된 모노클로날 항체를 포함하는, 약제학적 조성물.

#### 청구항 9

제 1항에 있어서, 상기 모노클로날 항체가 리투시맙이고, 암이 리투시맙에 의한 치료에 내성이거나 불응성인, 약제학적 조성물.

#### 청구항 10

제 1항에 있어서, 암이 난소암, B 세포 림프종, NHL, 전구체 B 세포 림프아구 백혈병/림프종 및 성숙한 B 세포 신생물, B 세포 만성 림프구 백혈병 (CLL)/소형 림프구 림프종 (SLL), B 세포 전림프구 백혈병, 림프형질세포성 림프종, 맨틀 세포 림프종(MCL), 여포성 림프종(FL), 저등급, 중간등급 및 고등급(FL), 피부 여포 중심 림프종, 대역 B 세포 림프종, MALT 유형 대역 B 세포 림프종, 결절 대역 B 세포 림프종, 비장 유형 대역 B 세포 림프종, 모발 세포 백혈병, 확산 대형 B 세포 림프종, 버킷 림프종, 형질세포종, 혈장 세포 골수종, 이식 후 림프구증식

장애, 발덴스트롬 거대글로불린혈증, 및 성형술 대형-세포 림프종(ALCL)으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 약제학적 조성물.

## 발명의 설명

### 기술 분야

[0001] 관련 출원

[0002] 본 출원은 2014년 5월 27일자로 출원된 미국 가출원 US 일련 번호 (USSN) 제62/003,136호, 2014년 5월 27일자로 출원된 USSN 제62/003,104호, 2014년 5월 28일자로 출원된 USSN 제62/003,908호, 2014년 7월 2일자로 출원된 USSN 제62/020,199호 및 2015년 1월 30일자로 출원된 USSN 제62/110,338호의 우선권을 주장한다. 이들 각각의 내용은 이의 전문이 본원에 참조로 인용된다.

### 배경 기술

[0003] 발명의 배경

[0004] 항체-기반 치료요법은 염증 장애, 암, 감염성 질환 및 고형 기관 이식 거부를 포함하는 많은 질환에 대해 입증된 효능 기록을 갖는다. 현재 40개 초과 치료학적 모노클로날 항체(mAb)는 USA, EU 및 여러 다른 국가에서 임상적 용도를 위해 승인되었다. 이들 대부분은 암 및 면역 질환의 치료요법을 위한 것이다. 항-종양 활성을 갖는 치료학적 항체의 예는 항-CD20, 항-Her2, 항-EGFR, 항-CD40, 항-CTLA-4, 및 항-PD-1 항체를 포함한다.

[0005] 치료학적 항체의 대부분은 모노클로날이고 유전자전이 인간화된 마우스가 상이한 종으로부터 유래되는 목적하지 않은 면역학적 반응을 회피하기 위해 쥐/인간 키메라 또는 인간화된 항체를 발현하도록 도입된 하이브리도마 기술에 의해 제조된다. 최근에, 완전한 인간 항체의 개발은 주요 트렌드가 되었고 이의 임상적 진행은 파아지 디스플레이된 항체 라이브러리 또는 단일 B 세포의 활용으로부터 이롭다.

[0006] 많은 다른 포유동물 단백질과 같이, 항체는 이중성으로 당화되어 있고 Fc 영역에서 당화는 글리칸이 Fc 수용체와의 상호작용을 통해 항체의 활성에 상당한 영향을 미칠 수 있기 때문에 효과적이고 안전한 치료학적 모노클로날 항체의 개발에서 중요한 핵심이 되었다. 결과적으로, 이들 상호작용을 이해하고 약물 치료에서 안전성 및 효능을 개선시키기 위해 잘-한정된 Fc-글리칸을 갖는 균일한 모노클로날 항체를 개발할 필요가 있다. 상기 목표를 향하여 코어 푸코스 잔기의 제거가 Fc-글리칸과 인간 Fc $\gamma$ RIIIa 수용체 간의 증가된 상호작용으로 인해 IgG의 항체-의존성 세포 독성(ADCC) 활성을 증진시키는 것으로 보고되었다. 2개의 FDA 승인된 당가공된 항체인 모가물리주맙 (POTELLIGENT<sup>®</sup>) 및 오비누투주맙(GA101)은 탈푸코실화된 항체이고 여기서, POTELLIGENT<sup>®</sup>은 FUT8 녹아웃 CHO 세포주에 의해 생산되었고 GA101은 GnT-III 과발현 시스템으로부터 기원하였다. 추가로, 보다 많은 Fc $\gamma$ RIIIa가 장기(long-term) RA의 단핵구상에서 발현되었고 보다 많은 푸코실화의 경향은 또한 RA 환자의 IgG 중쇄에서 발견되었고, 이는 염증 촉진 사이토킨을 중화시킬 뿐만 아니라 Fc $\gamma$ RIIIa에 대해 자가 조직의 자가 항체와 경쟁하는 탈푸코실화된 약제학적 항체를 사용한 RA 치료 및 차도의 가능성을 의미한다.

[0007] 따라서, 최적화된 Fc 당형태를 갖는 치료학적 모노클로날 항체를 제조하는 것이 큰 관심 대상이다.

### 발명의 내용

#### 해결하려는 과제

[0008] 발명의 요약

[0009] 본원의 개시내용은 모노클로날 항체, 구체적으로 모노클로날 항체("당항체")의 동종성 집단에 대해 당-최적화된 Fc의 발견을 기초로 한다. 상기 최적화된 당형태는 이펙터 세포 기능(예를 들어, ADCC)의 증진된 효능을 나타낸다.

[0010] 용어 "당항체"는 발명자 키-웨이 웡 박사(Dr. Chi-Huey Wong)에 의해 Fc 상에 단일의 균일한 N-글리칸을 갖는 모노클로날 항체(바람직하게, 치료학적 모노클로날 항체)의 동종성 집단을 언급하기 위해 만들어졌다. 동종성 집단을 포함하는 개별 당항체는 실질적으로 동일하고 동일한 에피토프에 결합하며 잘-한정된 글리칸 구조 및 서열과 함께 동일한 Fc 글리칸을 함유한다.

[0011] "실질적으로 동일한"은 비교되는 대상이 통상의 기술자에 의해 이해되는 바와 같이 근본적으로 동일한 것으로서



밀접한 유사성을 가짐을 의미한다. "실질적으로 동일한"은 "동일함"을 포괄한다.

- [0012] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "당항체"("GAb")는 Fc 상에 동일한 N-글리칸을 갖는 IgG 분자의 동종성 집단을 언급한다. 상기 용어 "당항체" ("GAb")는 당항체에서 개별 IgG 분자를 언급한다.
- [0013] 따라서, 본원의 개시내용의 한 측면은 Fc 상에 단일의 균일한 N-글리칸을 포함하는 모노클로날 항체의 동종성 집단의 조성물에 관한 것이고, 여기서, 상기 구조는 이펙터 세포 기능의 효능을 증진시키기 위해 최적화된 N-글리칸 구조이다.
- [0014] 바람직한 양태에서, 상기 N-글리칸은 Fc 영역의 Asn-297에 부착되어 있다.
- [0015] 바람직한 양태에서, 상기 N-글리칸은 Sia<sub>2</sub>(α2-6)Gal<sub>2</sub>GlcNAc<sub>2</sub>Man<sub>3</sub>GlcNAc<sub>2</sub>의 구조로 이루어진다.
- [0016] 본원에 기재된 당항체는 시험관내 제조될 수 있다. 당항체는 Fc 당가공에 의해 생성될 수 있다. 특정 양태에서, 상기 당항체는 포유동물 세포 배양에 의해 수득된 모노클로날 항체로부터 효소적으로 또는 화학효소적으로 가공된다.
- [0017] 일부 양태에서, 본원에 기재된 당항체의 Fc 영역은 상응하는 모노클로날 항체에서 야생형 Fc 영역과 상대적으로 FcγRIIA 또는 FcγRIIIA에 대해 증가된 결합 친화성을 나타낸다.
- [0018] 일부 양태에서, 본원에 기재된 당항체는 야생형 면역글로불린에 상대적으로 증진된 항체-의존성 세포 매개된 세포독성(ADCC) 활성을 나타낸다.
- [0019] 일부 양태에서, 당항체는 인간 IgG1, IgG2, IgG3, 및 IgG4로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.
- [0020] 상기 모노클로날 항체는 인간화된, 인간 또는 키메라일 수 있다.
- [0021] 본원에 기재된 당항체는 암, 자가면역 장애, 염증 장애 또는 감염성 질환과 관련된 항원에 결합할 수 있다.
- [0022] 일부 양태에서, 본원에 기재된 당항체는 당조작된 항-CD20이다. 일부 예에서, 본원에 기재된 당항체는 당가공된 리투시맵(Rituxan®)이다.
- [0023] 일부 양태에서, 본원에 기재된 당항체는 당가공된 항-HER2이다. 일부 예에서, 본원에 기재된 당항체는 당가공된 트라스투주맵(Herceptin®)이다.
- [0024] 일부 양태에서, 본원에 기재된 당항체는 당가공된 항-TNFα이다. 일부 예에서, 본원에 기재된 당항체는 당가공된 아달리루맵(Humira®)이다.
- [0025] 일부 양태에서, 본원에 기재된 당항체는 당가공된 F16 항체이다.

### 파제의 해결 수단

- [0027] 본원의 개시내용의 또 다른 측면은 본원에 기재된 당항체의 조성물 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제학적 조성물을 특징으로 한다. 상기 약제학적 조성물은 암, 자가면역 장애, 염증성 장애 및 감염성 질환과 같은 치료제에 사용될 수 있다.
- [0028] 일부 양태에서, 상기 약제학적 조성물은 FcγR에 의해 매개되는 이펙터 세포 기능(예를 들어, ADCC)의 증진된 효능이 요망되는 질환, 장애 또는 감염과 관련된 하나 이상의 증상, 예를 들어, 암, 자가면역, 감염성 질환을 예방하거나, 치료하거나 개선시키기 위해 사용되고, 이의 효과가 ADCC에 의해 매개되는 치료학적 항체의 치료학적 효능을 증진시키는데 사용된다.
- [0029] 본원의 기재 내용은 또한 항체-의존성 세포 매개된 세포독성(ADCC) 활성을 증진시키기 위한 방법을 포함하고, 상기 방법은 대상체에게 본원에 기재된 당항체의 양을 투여함을 포함한다.
- [0030] 추가로, 본원에 기재된 것은 질환, 장애 또는 감염과 관련된 하나 이상의 증상을 예방하거나, 치료하거나 개선시키기 위한 방법을 포함하고, 상기 방법은 본원에 기재된 치료학적 유효량의 약제학적 조성물을 이를 필요로 하는 대상체에게 투여함을 포함한다. 상기 질환, 장애 또는 감염은 암, 자가면역 장애, 염증성 장애 및 감염성 감염으로 이루어진 그룹으로부터 선택될 수 있다.
- [0031] 본원의 개시내용의 또 다른 측면은 (a) NK 세포의 억제 수용체를 차단시키는 제1 화합물을 대상체에게 투여하고, (b) 본원에 기재된 약제학적 조성물의 치료학적 유효량을 대상체에게 투여함을 포함하는, 이를 필요

로 하는 인간 대상체에서 바이러스 질환을 치료하기 위한 방법을 특징으로 한다.

[0032] 본원에 기재된 상기 치료 방법에서, 당항체의 약제학적 조성물은 단독으로 투여되거나 제2 항체, 화학치료제 또는 면역 억제제와 같은 제2 치료제와 연계하여 투여될 수 있다.

[0033] 본 출원은 다양한 공개된 특허, 공개된 특허 출원, 저널 기사 및 다른 공보물을 언급하고 이들 모두는 본원에 참조로 인용된다.

[0034] 본 발명의 하나 이상의 양태의 세부 사항은 하기에 기재되어 있다. 본 발명의 다른 특징 또는 이점은 하기의 도면, 여러 양태의 상세한 설명 및 또한 첨부된 특허청구범위로부터 자명할 것이다.

### 발명의 효과

[0035] 본원은 질환, 장애 또는 감염과 관련된 하나 이상의 증상을 예방하거나, 치료하거나 개선시키기 위한 방법을 포함한다.

[0036] 본원은 인간 대상체에서 바이러스 질환을 치료하기 위한 방법에 효과적이다.

### 도면의 간단한 설명

[0037] 도 1은 IgG1의 Fc 영역(b) 상의 글리칸 구조의 리모델링을 통해 동종성 항체를 제조하기 위한 (a) 일반적인 전략을 보여준다.

도 2는 다양한 당가공된 리톡시맙의 항체 의존성 B-세포 고갈 활성을 보여준다. 인간 B 세포의 고갈은 새롭게 제조된 인간 PBMC 세포를 사용하여 수행되었고 CD19+ CD2- B 세포를 기준으로 FACS 상에서 분석하였다. (A) 일련의 상이한 당가공된 리톡시맙과 비교하여, 2,6-NSCT 리톡시맙은 보다 높은 고갈 활성을 나타냈다. (B) 10명의 전혈 B 세포 고갈 활성에서, 2,6-시알릴화된 리톡시맙은 0.0016의 p 값을 갖는 비처리된 리톡시맙 보다 훨씬 활성인 반면, 모노-GlcNAc 리톡시맙은 최저 활성을 보여주었다. (C) Ramos 및 Raji의 제조된 리톡시맙-내성 세포는 세포 표면에 보다 낮은 수준의 CD20을 발현한다. (D, E) 2,6-NSCT 리톡시맙은 정상 및 내성 세포 둘다에 대해 현저한 ADCC 효능을 나타낸 반면, 비-처리된 항체는 내성 균주에 대한 이의 활성을 급격히 상실한다.

도 3은 V158 Fc  $\gamma$ RIIIa에서 당가공된 헤르셉틴의 EC50이 ADCC 리포터 생검정을 매개하였음을 보여준다. 실험은 표적 세포로서 SKBR3과 이펙터 세포로서 V158 Fc  $\gamma$ RIIIa 가공된 유르캣(Jurkat)을 사용하여 6 대 1의 E/T 비율 하에 수행하였다. 동일한 그래프에 보여지는 모든 데이터는 이펙터 세포의 동일한 마이크로플레이트 및 동일한 배치에서 수행된 실험이었고; 95% 신뢰 구간의 막대를 플롯팅하였다. (A) 탈푸코실화된(afucosylated) 헤르셉틴 G8 및 시판되는 헤르셉틴은 유사한 ADCC 효과를 보여주었고 이는 항-Fc  $\gamma$ RIIIa의 탈푸코실화된 이점이 탈푸코실화된 헤르셉틴 G8에서 상실됨을 설명한다. (B) 양분되고 이의 비-양분된 유사체 헤르셉틴인 G9 및 G4는 유사한 EC50 값을 보여주었고, 이는 보다 우수하게 양분된 글리칸 매개된 ADCC 기능이 상기 검정에서 관찰되지 않음을 지적한다. (C) 2개의 갈락토스 말단을 갖는 당가공된 헤르셉틴 G1과 비교하여, 2,6-시알화된 항체에서 어떠한 상당한 EC50 변화가 관찰되지 않은 반면, 겔보기 EC50 증가는 2,3-시알화된 헤르셉틴에서 나타났다. 상기 결과는 Fc 상에 2,3-시알화가 이펙터 세포 활성화를 저하시키지만 2,6-연결된 것은 그렇지 않음을 지적했다. 배수 유도의 곡선은 유도된 발광을 어떠한 항체 대조군이 없는 유도로 나눈 결과이다. (D) 그래프 (A) 내지 (C)에서 최저 EC50을 갖는 샘플을 선택하고 시판되는 헤르셉틴과 비교하였다. 모든 샘플은 상기 ADCC 리포터 생검정에서 보다 우수한 활성을 입증하였다.

도 4는 이의 Fc Asn297 (FI6m)에 부착된 변형된 동종성 SCT 글리칸을 갖는 항-인플루엔자 항체 FI6이 이의 ADCC 활성의 상당한 증진을 나타내고 치사량의 H1N1 바이러스 챌린지로부터 마우스를 예방학적으로 보호함을 보여준다. (a) 세포독성은 PBMC(이펙터 세포)와 다양한 농도의 항체로 항온처리되는 경우 인플루엔자 H1 헤마글루티닌(HA) (A/캘리포니아/07/09)와 함께 발현되는 용해된 HEK293T 세포(표적 세포)의 %로서 나타낸다. (b) ADCC 활성은 활성화된 T 세포 경로의 ADCC 신호 핵 인자가 활성화되는 경우 신호를 제공하는 루시퍼라제 검정으로부터 생발광의 배수 증가로 나타내었다. HA 발현된 HEK293T 세포(표적 세포)는 상기 루시퍼라제 리포터(이펙터 세포) 및 다양한 양의 항-인플루엔자 항체 FI6 및 FI6m과 함께 NK 세포와 항온처리하였다. 곡선 피팅은 4PL 비선형 회귀에서 소프트웨어 그래프패드 프리즘으로 수행하였다. (c) 마우스의 생존은 인플루엔자 바이러스 A/캘리포니아/07/09 (H1N1)의 치사량 (10 MLD50) 감염시 모니터링하였다. 감염 2시간 전에, 마우스의 각각의 그룹(N=9)은 각각 복강내에 2.5 mg/kg의 FI6, FI6m 또는 PBS를 투여하였다. FI6 및 FI6m 그룹은 유의적인 생존 차이를 가졌다(p<0.01).

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

- [0038] **정의**
- [0039] 본 발명의 수행은 달리 지적되지 않는 경우 당업계 기술 범위내에 있는 분자 생물학, 미생물학, 재조합 DNA 및 면역학의 통상적인 기술을 사용한다. 상기 기술은 문헌에서 완전하게 설명되어 있다. 예를 들어, 문헌 [Molecular Cloning A Laboratory Manual, 2nd Ed., ed. by Sambrook, Fritsch and Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989); DNA Cloning, Volumes I and II (D. N. Glover ed., 1985); Culture Of Animal Cells (R. I. Freshney, Alan R. Liss, Inc., 1987); Immobilized Cells And Enzymes (IRL Press, 1986); B. Perbal, A Practical Guide To Molecular Cloning (1984); the treatise, Methods In Enzymology (Academic Press, Inc., N.Y.); Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells (J. H. Miller and M. P. Calos eds., 1987, Cold Spring Harbor Laboratory); Methods In Enzymology, Vols. 154 and 155 (Wu et al. eds.), Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology (Mayer and Walker, eds., Academic Press, London, 1987); Antibodies: A Laboratory Manual, by Harlow and Lane s (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988); and Handbook Of Experimental Immunology, Volumes I-IV (D. M. Weir and C. C. Blackwell, eds., 1986)]을 참조한다.
- [0040] 용어 "당향체"는 본원 발명자 키-웨이 웅 박사에 의해 Fc 영역에 결합된 단일의 균일한 당형태를 갖는 모노클로날 항체(바람직하게, 치료학적 모노클로날 항체)의 동종성 집단을 언급하기 위해 만들어졌다. 필수적으로 동종성 집단을 포함하는 개별 당향체는 동일하고 동일한 에피토프에 결합하고 잘 한정된 글리칸 구조 및 서열과 함께 동일한 Fc 글리칸을 함유한다.
- [0041] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "항-CD20 당향체" ("항-CD20 GAb")는 Fc 상에 동일한 당형태를 갖는 항-CD20 IgG 분자의 동종성 집단을 언급한다.
- [0042] 상기 용어 "항-CD20 당향체" ("항-CD20 GAb")는 항-CD20 당향체에서 개별 IgG 분자를 언급한다. 본원에 사용된 바와 같은 용어 "분자"는 또한 항체 결합 단편을 언급할 수 있다.
- [0043] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "글리칸"은 폴리사카라이드, 올리고사카라이드 또는 모노사카라이드를 언급한다. 글리칸은 슈가 잔기의 단량체 또는 중합체일 수 있고 직쇄이거나 측쇄일 수 있다. 글리칸은 천연 슈가 잔기 (예를 들어, 글루코스, N-아세틸글루코사민, N-아세틸 뉴라민산, 갈락토스, 만노스, 푸코스, 헥소스, 아라비노스, 리보스, 크실로스, 등) 및/또는 변형된 슈가(예를 들어, 2'-플루오로리보스, 2'-데옥시리보스, 포스포만노스, 6' 설프 N-아세틸글루코사민 등)을 포함할 수 있다. 글리칸은 또한 당단백질, 당지질, 당펩타이드, 당프로테옴, 펩티도글리칸, 리포폴리사카라이드 또는 프로테오글리칸과 같은 당접합체의 탄수화물 부분을 언급하기 위해 사용된다. 글리칸은 일반적으로 모노사카라이드 사이에 O-글리코시딕 연결체로만 이루어진다. 예를 들어, 셀룰로스는  $\beta$ -1,4-연결된 D-글루코스로 구성된 글리칸(또는 보다 구체적으로 글루칸)이고 키틴은  $\beta$ -1,4-연결된 N-아세틸-D-글루코사민으로 구성된 글리칸이다. 글리칸은 모노사카라이드 잔기들의 동종 또는 이종중합체일 수 있고 직쇄 또는 측쇄일 수 있다. 글리칸은 당단백질 및 프로테오글리칸에서와 같이 단백질에 부착되어 있는 것으로 밝혀질 수 있다. 이들은 일반적으로 세포의 외부 표면상에서 발견된다. O- 및 N-연결된 글리칸은 진핵 세포에서 매우 흔하지만 또한 덜 통상적일지라도 원핵 세포에서 발견될 수 있다. N-연결된 글리칸은 세쿠온에서 아스파라긴의 R-그룹 질소(N)에 부착되어 있는 것으로 밝혀졌다. 상기 세쿠온은 Asn-X-Ser 또는 Asn-X-Thr 서열이고 여기서, X는 프탈린을 제외한 임의의 아미노산이다.
- [0044] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "푸코스", "코어 푸코스" 및 "코어 푸코스 잔기"는 상호교환적으로 사용되고  $\alpha$  1,6-위치에서 N-아세틸글루코사민에 연결된 푸코스를 언급한다.
- [0045] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "N-글리칸", "N-연결된 글리칸", "N-연결된 당화", "Fc 글리칸" 및 "Fc 당화"는 상호교환적으로 사용되고 Fc 함유 폴리펩타이드내 아스파라긴 잔기의 아미드 질소에 연결된 N-아세틸글루코사민 (GlcNAc)에 의해 부착되어 있는 N-연결된 올리고사카라이드를 언급한다. 용어 "Fc-함유 폴리펩타이드"는 Fc 영역을 포함하는 항체와 같은 폴리펩타이드를 언급한다.
- [0046] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "당화 패턴" 및 "당화 프로파일"은 상호교환적으로 사용되고 효소적으로 또는 화학적으로 당단백질 또는 항체로부터 방출되고 이어서 예를 들어, LC-HPLC 또는 MALDI-TOF MS 등을 사용하여 이들의 탄수화물 구조에 대해 분석한 N-글리칸 종의 특징적 "펄크프린트"를 언급한다. 예를 들어, 문헌[the review in Current Analytical Chemistry, Vol. 1, No. 1 (2005), pp. 28-57]을 참조하고; 이의 전문이 본원에 참조로

인용된다.

- [0047] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "당가공된 Fc"는 효소적으로 또는 화학적으로 변형되거나 가공되었다. 본원에 사용된 바와 같은 용어 "Fc 당가공"은 당가공된 Fc를 제조하기 위해 사용되는 효소적 또는 화학적 공정을 언급한다. 예시적인 가공 방법은 예를 들어, 문헌[참조: Wong et al. *USN12/959,351*]에 기재되어 있고, 이의 내용은 참조로 인용된다.
- [0048] Fc 영역의 당화 프로필과 관련하여 용어 "동종성", "균일한", "균일하게" 및 "동종"은 상호교환적으로 사용되고 전구체 N-글리칸이 거의 없는 하나의 목적하는 N-글리칸 중에 의해 나타나는 단일 당화 패턴을 의미하는 것으로 의도된다. 특정 양태에서, 전구체 N-글리칸의 극미량은 약 2% 미만이다.
- [0049] "필수적으로 순수한" 단백질은 조성물의 총 중량을 기준으로 예를 들어, 적어도 약 91중량%, 적어도 약 92중량%, 적어도 약 93중량%, 적어도 약 94중량%, 적어도 약 95중량%, 적어도 약 96중량%, 적어도 약 97중량%, 적어도 약 98중량%, 또는 적어도 약 99중량%를 포함하는, 단백질의 적어도 약 90중량%를 포함하는 조성물을 의미한다.
- [0050] "필수적으로 동종성" 단백질은 조성물의 총중량을 기준으로 예를 들어, 적어도 약 98.5중량%, 적어도 약 99중량%를 포함하는 단백질의 적어도 약 98중량%를 포함하는 조성물을 의미한다. 특정 양태에서, 상기 단백질은 항체, 구조적 변이체 및/또는 이의 항원 결합 단편이다.
- [0051] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "IgG", "IgG 분자", "모노클로날 항체", "면역글로불린", 및 "면역글로불린 분자"는 상호교환적으로 사용된다. 본원에 사용된 바와 같은 "분자"는 또한 항원 결합 단편을 언급할 수 있다.
- [0052] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "Fc 수용체" 또는 "FcR"은 항체의 Fc 영역에 결합하는 수용체를 기재한다. 바람직한 FcR은 본래의 서열의 인간 FcR이다. 더욱이, 바람직한 FcR은 IgG 항체에 결합하는 수용체(감마 수용체)이고 대립 형질 변이체 및 이들 수용체의 다르게 스플라이싱된 형태를 포함하는 Fc $\gamma$ RI (CD64), Fc $\gamma$ RII (CD32), 및 Fc $\gamma$ RIII (CD16) 아부류의 수용체를 포함한다. Fc $\gamma$ RII 수용체는 세포질 도메인에서 주로 상이한, 유사한 아미노산 서열을 갖는 Fc $\gamma$ RIIA ("활성화 수용체") 및 Fc $\gamma$ RIIB ("억제 수용체")를 포함한다. 활성화 수용체 Fc $\gamma$ RIIA는 이의 세포질 도메인에서 면역수용체 티로신-기반 활성화 모티프(ITAM)를 함유한다. 억제 수용체 Fc $\gamma$ RIIB는 세포질 도메인에서 면역수용체 티로신 기반 억제 모티프(ITIM)를 함유한다(문헌참조: review M. in Daeron, *Annu. Rev. Immunol.* 15:203-234 (1997)). FcR은 문헌(Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-92 (1991); Capel et al., *Immunomethods* 4:25-34 (1994); and de Haas et al., *J. Lab. Clin. Med.* 126:330-41 (1995))에 리뷰되어 있다. 향후 동정될 것들을 포함하는 다른 FcR은 본원의 용어 "FcR"에 의해 포괄된다. 상기 용어는 또한 모계 IgG의 태아로의 전달에 관여하는 신생아 수용체인 FcRn을 포함한다(문헌참조: Guyer et al., *J. Immunol.* 117:587 (1976) and Kim et al., *J. Immunol.* 24:249 (1994)).
- [0053] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "이펙터 기능"은 Fc 수용체 또는 리간드와 항체 Fc 영역의 상호작용으로부터 비롯되는 생화학적 반응을 언급한다. 예시적인 "이펙터 기능"은 C1q 결합; 보체 의존성 세포독성; Fc 수용체 결합; 항체-의존성 세포 매개된 세포독성(ADCC); 식세포작용; 세포 표면 수용체(예를 들어, B 세포 수용체; BCR)의 하향 조절 등을 포함한다. 상기 이펙터 기능은 당업계에 공지된 다양한 검정을 사용하여 평가될 수 있다.
- [0054] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "항체-의존성 세포-매개된 세포독성" 또는 "ADCC"는 특정 세포독성 세포(예를 들어, 천연 킬러(NK) 세포, 호중구 및 마크로파지) 상에 존재하는 Fc 수용체(FcR)상에 결합된 분비된 Ig가 이들 세포독성 이펙터 세포가 항원-함유 표적 세포에 특이적으로 결합하도록 하여 후속적으로 세포독소로 표적 세포를 사멸시킬 수 있도록 하는 세포독성 형태를 언급한다. 상기 항체는 세포독성 세포를 "무장"시키고 상기 사멸을 위해 절대적으로 요구된다. ADCC를 매개하기 위한 1차 세포인 NK 세포는 단지 Fc $\gamma$ RIII를 발현하는 반면, 단핵구는 Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RII 및 Fc $\gamma$ RIII를 발현한다. 조혈 세포상의 FcR 발현은 문헌[참조: Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-92 (1991)]의 제464면상의 표 3에 요약되어 있다. 목적하는 분자의 ADCC 활성을 평가하기 위해, 문헌[미국 특허 제5,500,362호 또는 미국 특허 제5,821,337호]에 기재된 것과 같은 시험관내 ADCC 검정을 수행할 수 있다. 상기 검정을 위해 유용한 이펙터 세포는 말초 혈액 단핵 세포(PBMC) 및 천연 킬러(NK) 세포를 포함한다. 대안적으로, 또는 추가로, 목적하는 분자의 ADCC 활성은 예를 들어, 문헌[참조: Clynes et al. *PNAS (USA)* 95:652-656 (1998)]에 기재된 것과 같은 동물 모델에서 생체내 평가될 수 있다.
- [0055] 사용된 바와 같은 용어 "보체 의존성 세포독성" 또는 "CDC"는 보체의 존재하에 표적 세포의 용해를 언급한다. 전형적 보체 경로의 활성화는 보체 시스템의 제1 성분(C1q)의 이들의 동족 항원에 결합된 항체(적당한 아부류)로의 결합에 의해 개시된다. 보체 활성화를 평가하기 위해, 예를 들어, 문헌[참조: Gazzano-Santoro



et al., *J. Immunol. Methods* 202:163 (1996)]에 기재된 바와 같은 CDC 검정을 수행할 수 있다.

- [0056] "키메라" 항체 (면역글로불린)는 특정 종으로부터 유래되거나 특정 항체 부류 또는 아부류에 속하는 항체에서 상응하는 서열과 동일하거나 상동성인 중쇄 및/또는 경쇄 부분을 갖고 쇠(들)의 나머지는 또 다른 종으로부터 유래되거나 또 다른 항체 부류 또는 아부류에 속하는 항체, 및 단편들이 목적하는 생물학적 활성을 갖는 한 상기 항체의 단편들에서 상응하는 서열과 동일하거나 상동성이다(문헌참조: 미국 특허 제4,816,567호; 및 Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6851-6855 (1984)). 본원에 사용된 바와 같은 인간화된 항체는 키메라 항체의 서브세트이다.
- [0057] "인간화된" 형태의 비-인간 (예를 들어, 쥐) 항체는 비-인간 면역글로불린으로부터 유래된 최소 서열을 함유하는 키메라 항체이다. 대부분에 대해, 인간화된 항체는 인간 면역글로불린 (수용자 또는 수용체 항체)이고, 여기서, 수용자의 추가변 영역 잔기는 마우스, 래트, 토끼 또는 비인간 영장류와 같은 비-인간 종(공여자 항체) 기원의 목적하는 특이성, 친화성 및 능력을 갖는 추가변 영역에 의해 대체된다. 일부 경우에, 인간 면역글로불린의 Fv 골격 영역(FR) 잔기들은 상응하는 비-인간 잔기들로 대체된다. 추가로, 인간화된 항체는 수용자 항체 또는 공여자 항체에서 발견되지 않는 잔기들을 포함할 수 있다. 이들 변형은 결합 친화성과 같은 항체 수행능을 추가로 개선하기 위해 수행된다. 일반적으로, 인간화된 항체는 실질적으로 모든 적어도 하나 및 전형적으로 2개의 가변 도메인을 포함하고, 여기서, 모든 또는 실질적으로 모든 추가변 루프는 비-인간 면역글로불린의 것들에 상응하고 모든 또는 실질적으로 모든 FR 영역은 인간 면역글로불린 서열의 것들이지만 상기 FR 영역은 결합 친화성을 개선시키는 하나 이상의 아미노산 치환을 포함할 수 있다. FR에서 이들 아미노산 치환 수는 전형적으로 H 쇠에서 6개 이하이고 L 쇠에서는 3개 이하이다. 인간화된 항체는 또한 임의로 면역글로불린 불변 영역(Fc)의 적어도 일부, 전형적으로 인간 면역글로불린의 일부를 포함한다. 추가의 세부사항에 대해, 문헌[Jones et al., *Nature* 321:522-525 (1986); Reichmann et al., *Nature* 332:323-329 (1988); and Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992)]을 참조한다. 또한 본원에 인용된 검토 논문 및 여기에 인용된 문헌[Vaswani and Hamilton, *Ann. Allergy, Asthma & Immunol.* 1:105-115 (1998); Harris, *Biochem. Soc. Transactions* 23:1035-1038 (1995); Hurle and Gross, *Curr. Op. Biotech.* 5:428-433 (1994)]을 참조한다.
- [0058] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "항원"은 면역 반응을 유발할 수 있는 임의의 물질로서 정의된다. 본원에 사용된 바와 같은 용어 "항원 특이적"은 특정 항원 또는 상기 항원의 공급이 특이적 세포 증식을 유도하도록 세포 집단의 성질을 언급한다.
- [0059] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "면역원성"은 면역 반응을 자극하는 면역원, 항원 또는 백신의 능력을 언급한다.
- [0060] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "에피토프"는 항체 또는 T 세포 수용체의 항원 결합 부위를 접촉시키는 항원 분자 부분으로서 정의된다.
- [0061] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "특이적으로 결합하는"은 결합 쌍(예를 들어, 항체 및 항원)간의 상호작용을 언급한다. 다양한 경우에, 특이적으로 결합하는은 약 10<sup>-6</sup> 몰/리터, 약 10<sup>-7</sup> 몰/리터, 또는 약 10<sup>-8</sup> 몰/리터, 또는 그 이하의 친화성 상수에 의해 구현될 수 있다.
- [0062] "분리된" 항체는 이의 천연 환경의 성분으로부터 동정되고 분리되고/되거나 회수된 것이다. 이의 천연 환경의 오염 성분은 항체에 대한 연구, 진단적 또는 치료학적 용도를 방해하는 물질이고 효소, 호르몬 및 다른 단백질 또는 비-단백질성 용질을 포함할 수 있다.
- [0063] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "실질적으로 유사한", "실질적으로 동일한", "동등한", 또는 "실질적으로 동등한"은 2개의 수치값 (예를 들어, 분자와 관련된 하나 및 참조/비교 분자와 관련된 다른 하나) 간의 충분한 고도의 유사성을 지칭하여, 당업자는 2개의 값 간의 차이를 상기 값(예를 들어, Kd 값, 항-바이러스 효과 등)에 의해 측정된 생물학적 특징 내 거의 생물학적 및/또는 통계학적 유의성이 없는 것으로 고려한다. 상기 2개의 값 간의 차이는 예를 들어, 참조/비교 분자에 대한 값의 함수로서 약 50% 미만, 약 40% 미만, 약 30% 미만, 약 20% 미만, 및/또는 약 10% 미만이다.
- [0064] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "실질적으로 감소된" 또는 "실질적으로 상이한"은 2개의 수치 값(일반적으로 분자와 관련된 하나 및 참조/비교 분자와 관련된 하나) 간의 충분한 고도의 차이를 지칭하여 당업자는 2개의 값 간의 차이를 상기 값(예를 들어, Kd 값)에 의해 측정된 생물학적 특징 내에서 통계학적으로 유의적인 것으로 고려한다. 상기 2개의 값 간의 차이는 예를 들어, 참조/비교 분자의 함수로서 약 10% 초과, 약 20% 초과, 약 30% 초과, 약 40% 초과 및/또는 약 50% 초과이다.
- [0065] "결합 친화성"은 일반적으로 분자(예를 들어, 항체)의 단일 결합 부위와 이의 결합 파트너(예를 들어, 항원) 간

의 비공유 상호작용의 총합의 강도를 언급한다. 달리 지적되지 않는 경우, 본원에 사용된 바와 같은 "결합 친화성"은 결합 쌍(예를 들어, 항체 및 항원)의 구성원 간의 1:1 상호작용을 반영하는 고유 결합 친화성을 언급한다. 분자 X와 이의 파트너 Y의 친화성은 일반적으로 해리 상수(Kd)에 의해 나타낼 수 있다. 친화성은 본원에 기재된 것들을 포함하는, 당업계에 공지된 통상의 방법에 의해 측정될 수 있다. 저-친화성 항체는 일반적으로 느리게 항원에 결합하고 신속하게 해리되는 경향이 있는 반면 고친화성 항체는 일반적으로 보다 신속하게 항원에 결합하고 보다 오랫동안 결합된 상태로 유지되는 경향이 있다. 결합 친화성을 측정하는 다양한 방법은 당업계에 공지되어 있고 이의 임의의 방법은 본 발명의 목적을 위해 사용될 수 있다. 특정 예시적 양태는 하기에 기재되어 있다.

[0066] 항체의 "가변 영역" 또는 "가변 도메인"은 항체의 중쇄 또는 경쇄의 아미노-말단 도메인을 언급한다. 이들 도메인은 일반적으로 항체의 가장 가변적 부분이고 항원-결합 부위를 함유한다.

[0067] 용어 "가변"은 가변 도메인의 특정 부분이 항체 중의 서열이 매우 상이하고 각각의 특정 항체의 이의 특정 항원에 대한 결합 및 특이성에 사용된다는 사실을 언급한다. 그러나, 가변성은 항체의 가변 도메인 전반에 걸쳐 고르게 분포되어 있지 않다. 이것은 경쇄 및 중쇄 가변 도메인 둘다에서 상보성 결정 영역(CDR) 또는 초가변 영역으로 불리우는 3개의 분절에 집중되어 있다. 가변 도메인 중 보다 고도로 보존된 부분을 골격(FR)으로 불리운다. 고유 중쇄 및 경쇄의 가변 도메인은 각각 4개의 FR 영역을 포함하고 대부분 루프 연결을 형성하는 3개의 CDR에 의해 연결된 베타-쉬트 형태를 취하고 일부 경우에 베타-쉬트 구조의 일부를 형성한다. 각각의 쇠에서 CDR은 FR 영역에 의해 인접하게 함께 유지되고 다른 쇠 기원의 CDR과 함께 항체의 항원-결합 부위의 형성에 기여한다(문헌참조: Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, National Institute of Health, Bethesda, Md. (1991)). 상기 불변 도메인은 항체가 항원에 결합하는데 직접 관여하지 않지만 항체-의존성 세포 독성에 항체의 관여와 같은 다양한 이펙터 기능을 나타낸다.

[0068] 항체의 파파인 분해는 "Fab" 단편으로 불리우는 2개의 동일한 항원-결합 단편을 생성시키고, 각각은 단일-항원 부위 및 잔여 "Fc" 단편을 갖고 이의 명칭은 용이하게 결정화하는 능력을 반영한다. 펩신 처리는 2개의 항원 연결 부위를 갖고 여전히 항원을 상호 연결시킬 수 있는 F(ab')<sub>2</sub> 단편을 생성시킨다.

[0069] "Fv"는 완전한 항원-인지 및 -결합 부위를 함유하는 최소 항체 단편이다. 2개의 쇠 Fv 중에서, 상기 영역은 단단하게 비공유적으로 연합된 하나의 중쇄 및 하나의 경쇄 가변 도메인으로 이루어진다. 단일-쇄 Fv 중에서, 하나의 중쇄 및 하나의 경쇄 가변 도메인은 유연한 펩타이드 링커에 의해 공유적으로 연결되어 상기 경쇄 및 중쇄는 2개의 쇠 Fv 중에서의 것과 유사한 "이량체" 구조로 연합할 수 있다. 각각의 가변 도메인의 3개의 CDR이 상호작용하여 VH-VL 이량체의 표면에 항원-결합 부위를 한정하도록 하는 형태로 있다. 총체적으로, 6개의 CDR은 항체에 항원 결합 특이성을 부여한다. 그러나, 심지어 단일 가변 도메인 (또는 항원에 특이적인 단지 3개의 CDR을 포함하는 Fv의 절반)은 항원을 인지하고 이에 결합하는 능력을 갖지만 전체 결합 부위 보다는 낮은 친화성이다.

[0070] 상기 Fab 단편은 또한 경쇄의 불변 도메인 및 중쇄의 제1 불변 도메인 (CH1)을 함유한다. Fab' 단편은 항체 힌지 영역으로부터의 하나 이상의 시스테인을 포함하는 중쇄 CH1 도메인의 카복시 말단에서 몇개의 잔기가 첨가됨에 의해 Fab 단편과 상이하다. Fab'-SH는 본원에서 불변 도메인의 시스테인 잔기(들)이 유리된 티올 그룹을 함유하는 Fab'를 지칭한다. F(ab')<sub>2</sub> 항체 단편은 본래에 이들 간에 힌지 시스테인을 갖는 Fab' 단편의 쌍으로서 제조되었다. 항체 단편들의 다른 화학적 커플링은 또한 공지되어 있다.

[0071] 임의의 척추동물 중 기원의 항체(면역글로불린)의 "경쇄"는 이들의 불변 도메인의 아미노산 서열을 기준으로 카파( $\kappa$ ) 및 람다( $\lambda$ )로 불리우는 2개의 명백히 구분된 유형 중 하나에 할당될 수 있다.

[0072] 이들의 중쇄의 불변 도메인의 아미노산 서열에 따라, 항체(면역글로불린)은 상이한 부류로 할당될 수 있다. 5개의 주요 면역글로불린 부류가 있고: IgA, IgD, IgE, IgG 및 IgM, 이들 중 여러 개는 아부류 (이소형), 예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, 및 IgA2로 분류될 수 있다. 상이한 부류의 면역글로불린에 상응하는 중쇄 불변 도메인은 각각  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$ ,  $\mu$ 로 불리운다. 상이한 부류의 면역글로불린의 서브유닛 구조 및 3차원 형태는 널리 공지되어 있고 예를 들어, 일반적으로 문헌[참조: Abbas et al. Cellular and Mol. Immunology, 4th ed. (2000)]에 기재되어 있다. 항체는 항체와 하나 이상의 다른 단백질 또는 펩타이드의 공유 또는 비-공유 연합에 의해 형성되는 보다 큰 융합 분자의 일부일 수 있다.

[0073] 용어 "전장 항체", "온전한 항체", 및 "전체 항체"는 하기 정의된 바와 같은 항체 단편이 아닌 이의 실질적으로 온전한 형태의 항체를 언급하기 위해 상호교환적으로 사용된다. 상기 용어는 특히 Fc 영역을 함유하는 중쇄를

갖는 항체를 언급한다.

[0074] "항체 단편"은 온전한 항체의 단지 일부를 포함하고, 여기서 상기 일부는 온전한 항체에 존재하는 경우 상기 일부와 정상적으로 연합된 기능의 적어도 하나 및 대부분의 많은 기능 또는 모든 기능을 보유한다. 하나의 양태에서, 항체 단편은 온전한 항체의 항원 결합 부위를 포함하고 따라서 항원에 결합할 능력을 보유한다. 또 다른 양태에서, 항체 단편, 예를 들어, Fc 영역을 포함하는 단편은 온전한 항체에 존재하는 경우, FcRn 결합, 항체 반감기 조절, ADCC 기능 및 보체 결합과 같은 Fc 영역과 정상적으로 연관된 생물학적 기능 중 적어도 하나를 보유한다. 하나의 양태에서, 항체 단편은 온전한 항체와 실질적으로 유사한 생체내 반감기를 갖는 1가 항체이다. 예를 들어, 상기 항체 단편은 생체내 안전성을 단편에 부여할 수 있는 Fc 서열에 연결된 항원 결합 아암을 포함할 수 있다.

[0075] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "모노클로날 항체"는 실질적으로 동종성 항체 집단으로부터 수득된 항체, 즉 집단 중의 개별 항체들은 소량으로 존재할 수 있는 가능한 천연 돌연변이를 제외하고는 동일하다. 따라서, 변형 어구 "모노클로날"은 구분된 항체의 혼합물이 아닌 것으로서의 항체의 특징을 지적한다. 상기 모노클로날 항체는 전형적으로 표적에 결합하는 폴리펩타이드 서열을 포함하는 항체를 포함하고, 여기서, 상기 표적 결합 폴리펩타이드 서열은 다수의 폴리펩타이드 서열로부터 단일표적 결합 폴리펩타이드 서열의 선택을 포함하는 공정에 의해 수득하였다. 예를 들어, 선택 공정은 하이브리도마 클론, 파아지 클론 또는 재조합 DNA 클론의 풀과 같은 다수의 클론으로부터의 독특한 클론의 선택일 수 있다. 선택된 표적 결합 서열은 예를 들어, 표적에 대한 친화성을 개선시키기 위해, 표적 결합 서열을 인간화시키기 위해, 세포 배양에서 이의 생산을 개선시키기 위해, 생체내 이의 면역원성을 감소시키기 위해, 다중특이적 항체를 제조하기 위한 것 등을 위해 변형시킬 수 있고 상기 변형된 표적 결합 서열을 포함하는 항체는 또한 본 발명의 모노클로날 항체인 것으로 이해되어야만 한다. 전형적으로 상이한 결정인자(에피토프)에 대해 지시된 상이한 항체를 전형적으로 포함하는 폴리클로날 항체 집단과는 대조적으로, 모노클로날 항체 제제의 각각의 모노클로날 항체는 항원 상의 단일 결정인자에 대해 지시된다. 이들의 특이성 뿐만 아니라, 모노클로날 항체 제제는 이들이 전형적으로 다른 면역글로불린에 의해 오염되어 있지 않다는 점에 유리하다. 변형 어구 "모노클로날"은 실질적으로 균질의 항체 집단으로부터 수득된 것으로서의 항체의 특징을 지적하고 임의의 특정 방법에 의한 항체의 생산을 요구하는 것으로 해석되지 말아야 한다. 예를 들어, 본 발명에 따라 사용될 모노클로날 항체는 예를 들어, 하이브리도마 방법(문헌참조: 예를 들어, Kohler et al., Nature, 256: 495 (1975); Harlow et al., Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988); Hammerling et al., in: Monoclonal Antibodies and T-Cell hybridomas 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981)), 재조합 DNA 방법(문헌참조: 예를 들어, 미국 특허 제4,816,567호), 파아지 디스플레이 기술(문헌참조: 예를 들어, Clackson et al., Nature, 352: 624-628 (1991); Marks et al., J. Mol. Biol. 222: 581-597 (1992); Sidhu et al., J. Mol. Biol. 338(2): 299-310 (2004); Lee et al., J. Mol. Biol. 340(5): 1073-1093 (2004); Fellouse, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101(34): 12467-12472 (2004); and Lee et al., J. Immunol. Methods 284(1-2): 119-132 (2004)), 및 인간 면역글로불린 서열을 암호화하는 인간 면역글로불린 유전자좌 또는 유전자들의 일부 또는 모두를 갖는 동물에서 인간 또는 인간형 항체를 제조하기 위한 기술(문헌참조: 예를 들어, WO98/24893; WO96/34096; WO96/33735; WO91/10741; Jakobovits et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 2551 (1993); Jakobovits et al., Nature 362: 255-258 (1993); Bruggemann et al., Year in Immunol. 7:33 (1993); 미국 특허 제5,545,807호; 제5,545,806호; 제5,569,825호; 제5,625,126호; 제5,633,425호; 제5,661,016호; Marks et al., Bio. Technology 10: 779-783 (1992); Lonberg et al., Nature 368: 856-859 (1994); Morrison, Nature 368: 812-813 (1994); Fishwild et al., Nature Biotechnol. 14: 845-851 (1996); Neuberger, Nature Biotechnol. 14: 826 (1996) and Lonberg and Huszar, Intern. Rev. Immunol. 13: 65-93 (1995))을 포함하는, 다양한 기술에 의해 제조될 수 있다.

[0076] 본원에서 모노클로날 항체는 구체적으로 중쇄 및/또는 경쇄의 일부가 특정 종으로부터 유래되거나 특정 항체 부류 또는 아부류에 속하는 항체에서 상응하는 서열과 동일하거나 이에 상동성인 "키메라" 항체를 포함하고,쇄(들)의 나머지는 이들이 목적하는 생물학적 활성을 나타내는 한, 상기 항체의 단편 뿐만 아니라, 또 다른 종으로부터 유래되거나 또 다른 항체 부류 또는 아부류에 속하는 항체에서 상응하는 서열과 동일하거나 상동성이다(문헌참조: 미국 특허 제4,816,567호; 및 Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855 (1984)).

[0077] 또한 본원에 인용된 하기의 검토 잡지 및 문헌을 참조한다: Vaswani and Hamilton, Ann. Allergy, Asthma & Immunol. 1:105-115 (1998); Harris, Biochem. Soc. Transactions 23:1035-1038 (1995); Hurlle and Gross, Curr. Op. Biotech. 5:428-433 (1994).

- [0078] 본원에 사용되는 경우 용어 "초가변 영역", "HVR", 또는 "HV"는 서열에서 초가변성이고/이거나 구조적으로 한정된 루프를 형성하는 항체 가변 도메인 영역들을 언급한다. 일반적으로, 항체는 6개의 초가변 영역; VH에서 3개(H1, H2, H3), 및 VL에서 3개(L1, L2, L3)를 포함한다. 다수의 초가변 영역 기술이 사용 중에 있고 본원에 포함된다. 캐뱃(Kabat) 상보성 결정 영역(CDR)은 서열 가변성을 기준으로 하고 가장 흔하게 사용된다(문헌참조: Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)). 초티아(Chothia)는 대신 구조적 루프의 위치를 언급한다(Chothia and Lesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)). AbM 초가변 영역은 캐뱃 CDR과 초티아 구조적 루프 간의 절충을 나타내고, 소프트웨어(Oxford Molecular's AbM antibody modeling software)에 의해 사용된다. "접촉" 초가변 영역은 가용한 복합 결정 구조의 분석을 기초로 한다. 이들 초가변 영역 각각으로부터의 잔기들은 하기에 주지된다.
- [0079] 루프 캐뱃 AbM 초티아 접촉
- [0080] L1 L24-L34 L24-L34 L26-L32 L30-L36
- [0081] L2 L50-L56 L50-L56 L50-L52 L46-L55
- [0082] L3 L89-L97 L89-L97 L91-L96 L89-L96
- [0083] H1 H31-H35B H26-H35B H26-H32 H30-H35B
- [0084] (캐뱃 넘버링)
- [0085] H1 H31-H35 H26-H35 H26-H32 H30-H35
- [0086] (초티아 넘버링)
- [0087] H2 H50-H65 H50-H58 H53-H55 H47-H58
- [0088] H3 H95-H102 H95-H102 H96-H101 H93-H101
- [0089] 초가변 영역은 다음과 같이 "연장된 초가변 영역"을 포함할 수 있다: VL에서 24-36 또는 24-34 (L1), 46-56 또는 50-56 또는 49-56 (L2) 및 89-97 또는 89-96 (L3) 및 VH에서 26-35 (H1), 50-65 또는 49-65 (H2) 및 93-102, 94-102, 또는 95-102 (H3). 가변 도메인 잔기들은 이들 정의 각각에 대해 상기 참조된 캐뱃 등에 따라 넘버링한다.
- [0090] "골격" 또는 "FR" 잔기들은 본원에 정의된 바와 같은 초가변 영역 잔기들 외의 다른 가변 도메인 잔기들이다.
- [0091] 용어 "캐뱃에서와 같은 가변 도메인 잔기" 또는 "캐뱃에서와 같은 아미노산위치 넘버링" 및 이의 변형어구는 문헌[참조: Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)]에서 컴파일링된 항체의 중쇄 가변 도메인 또는 경쇄 가변 도메인을 위해 사용되는 넘버링 시스템을 언급한다. 상기 넘버링 시스템을 사용하여, 실제 선형 아미노산 서열은 가변 도메인의 FR 또는 HVR의 단축 또는 여기로의 삽입에 상응하는 보다 적거나 추가적인 아미노산을 함유할 수 있다. 예를 들어, 중쇄 가변 도메인은 중쇄 FR 잔기 82번 후 H2 및 삽입된 잔기(예를 들어, 캐뱃에 따르면 잔기 82a, 82b, 및 82c 등)의 잔기 52번 후 단일 아미노산 삽입체(캐뱃에 따른 잔기 52a)를 포함할 수 있다. 잔기의 캐뱃 넘버링은 "표준" 캐뱃 넘버링된 서열을 갖는 항체 서열의 상동성 영역에서 정렬에 의해 소정의 항체에 대해 결정할 수 있다.
- [0092] "단일쇄 Fv" 또는 "scFv" 항체 단편은 항체의 VH 및 VL 도메인을 포함하고, 여기서, 이들 도메인은 단일 폴리펩타이드 쇠에 존재한다. 일반적으로, scFv 폴리펩타이드는 scFv가 항원 결합을 위해 목적하는 구조를 형성할 수 있게 하는, VH와VL 사이에 폴리펩타이드 링커를 추가로 포함한다. scFv의 검토투를 위해, 문헌[Pluckthun, in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994)]을 참조한다.
- [0093] 용어 "디아바디"는 2개의 항원-결합 부위를 갖는 소형 항체 단편을 언급하고, 상기 단편은 동일한 폴리펩타이드 쇠(VH-VL)에서 경쇄 가변 도메인(VL)에 연결된 중쇄 가변 도메인(VH)을 포함한다. 너무 짧아서 동일한 쇠 상에서 2개의 도메인 사이에 쌍을 형성하지 못하는 링커를 사용함에 의해, 상기 도메인은 또 다른 쇠의 상보적 도메인과 쌍을 형성하여 2개의 항원 결합 부위가 생성되도록 한다. 디아바디는 예를 들어, 문헌[참조: EP 404,097; WO93/1161; 및 Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448 (1993)]에 보다 완전하게 기재되



어 있다.

- [0094] "인간 항체"는 인간에 의해 생성된 항체의 서열에 상응하는 아미노산 서열을 갖는 항체이고 본원에 기재된 바와 같은 인간 항체를 제조하기 위한 임의의 기술을 사용하여 제조되었다. 인간 항체에 대한 상기 정의는 구체적으로 비-인간 항원 결합 잔기를 포함하는 인간화된 항체를 배제한다.
- [0095] "친화성 성숙된" 항체는 이들 변형(들)을 갖지 않는 모 항체와 비교하여, 항원에 대한 항체의 친화성을 개선시키는 하나 이상의 HVR에서 하나 이상의 변형을 갖는 항체이다. 하나의 양태에서, 친화성 성숙화된 항체는 표적 항원에 대해 나노몰 또는 심지어 피코몰 친화성을 갖는다. 친화성 성숙화된 항체는 당업계에서 공지된 과정에 의해 생성된다. 문헌[참조: Marks et al. Bio/Technology 10:779-783 (1992)]은 VH 및 VL 도메인 서플링에 의한 친화성 성숙화를 기재하고 있다. CDR 및/또는 골격 잔기들의 무작위 돌연변이유발은 문헌[참조: Barbas et al. Proc Nat. Acad. Sci. USA 91:3809-3813 (1994); Schier et al. Gene 169:147-155 (1995); Yelton et al. J. Immunol. 155:1994-2004 (1995); Jackson et al., J. Immunol. 154(7):3310-9 (1995); and Hawkins et al, J. Mol. Biol. 226:889-896 (1992)]에 의해 기재되어 있다.
- [0096] "차단하는" 항체 또는 "길항제" 항체는 이것이 결합하는 항원의 생물학적 활성을 억제하거나 감소시키는 항체이다. 특정 차단하는 항체 또는 길항제 항체는 실질적으로 또는 완전하게 항원의 생물학적 활성을 억제한다.
- [0097] 본원에 사용된 바와 같은 "효능제 항체"는 목적하는 폴리펩타이드의 기능성 활성 중 하나 이상을 모사하는 항체이다.
- [0098] "장애"는 본 발명의 항체를 사용한 치료가 이득이 되는 임의의 병태이다. 이것은 포유동물이 미지의 장애에 대한 성향을 나타나게 하는 병리학적 병태를 포함하는 만성 및 급성 장애 또는 질환을 포함한다. 본원에 치료될 장애의 비제한적인 예는 암을 포함한다.
- [0099] 용어 "세포 증식 장애" 및 "증식 장애"는 비정상적 세포 증식과 어느 정도 연관된 장애를 언급한다. 하나의 양태에서, 세포 증식 장애는 암이다.
- [0100] 본원에 사용된 바와 같은 "종양"은 악성이든 양성이든 상관 없이 모든 신생물 세포 성장 및 증식, 및 모든 전암성 및 암성 세포 및 조직을 언급한다. 용어 "암", "암성", "세포 증식 장애", "증식 장애" 및 "종양"은 본원에 언급된 바와 같이 상호 배타적이지 않다.
- [0101] 용어 "암" 및 "암성"은 일반적으로, 전형적으로 비조절된 세포 성장/증식을 특징으로 하는 포유동물에서 생리학적 병태를 언급하거나 기재한다. 암의 예는 암종, 림프종 (예를 들어, 호지킨 및 비-호지킨 림프종), 모세포종, 육종 및 백혈병을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 상기 암의 보다 특정 예는 편평 세포 암, 소세포 폐암, 비-소세포 폐암, 폐의 선암종, 폐의 편평 암종, 배막의 암, 간세포 암, 위장암, 췌장암, 교모세포종, 자궁암, 난소암, 간암, 방광암, 간암종, 유방암, 결장암, 결장직장암, 자궁내막 암종 또는 자궁 암종, 침샘 암종, 신장암, 간암, 전립선암, 음문암, 갑상선암, 간암종(hepatic carcinoma), 백혈병 및 다른 림프증식성 장애, 및 다양한 유형의 경부암을 포함한다.
- [0102] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "항원"은 면역 반응을 유발할 수 있는 임의의 물질로서 정의된다.
- [0103] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "항원 특이적"은 특정 항원 또는 항원 단편의 공급이 특정 세포를 증식시키도록 하는 세포 집단의 성질을 언급한다.
- [0104] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "CD20 발현 암"은 암 세포가 CD20 항원의 발현을 보여주는 모든 암을 언급한다. 바람직하게 본원에 사용된 바와 같은 CD20 발현 암은 림프종(바람직하게, B 세포 비-호지킨 림프종(NHL)) 및 림프구성 백혈병을 언급한다. 상기 림프종 및 림프구성 백혈병은 예를 들어, a) 여포성 림프종, b) 소형 비-절단 세포 림프종/버킷 림프종(풍토성 버킷 림프종, 산발성 버킷 림프종 및 비-버킷 림프종을 포함하는), c) 대역 림프종(marginal zone lymphomas) (결절외 대역 B 세포 림프종(점막-관련 림프성 조직 림프종, MALT), 결절 대역 B 세포 림프종 및 비장성 대역 림프종을 포함하는), d) 맨틀 세포 림프종(MCL), e) 대형 세포 림프종(B 세포 확산 대형 세포 림프종(DLCL), 확산 혼합 세포 림프종, 면역아세포 림프종, 1차 종격동 B 세포 림프종, 주위혈관(Angiocentric) 림프종-폐 B-세포 림프종을 포함하는) f) 모발 세포 백혈병, g) 림프구성 림프종, 발덴스트롬 거대글로불린혈증, h) 급성 림프구성 백혈병(ALL), 만성 림프구성 백혈병(CLL)/소형 림프구 림프종(SLL), B-세포 프로림프구성 백혈병, i) 혈장 세포 신생물, 혈장 세포 골수종, 다발성 골수종, 형질세포종 j) 호지킨 질환을 포함한다. 보다 바람직하게 CD20 발현 암은 B-세포 비-호지킨 림프종 (NHL)이다. 특히, CD20 발현 암은 맨틀 세포 림프종(MCL), 급성 림프구성 백혈병(ALL), 만성 림프구성 백혈병(CLL), B-세포 확산 대형 세포 림프종

(DLCL), 버킷 림프종, 모발 세포 백혈병, 여포성 림프종, 다발성 골수종, 대역 림프종, 이식 후 림프증식성 장애(PTLD), HIV 관련 림프종, 발덴스트롬 거대글로불린혈증, 또는 1차 CNS 림프종이다.

[0105] 본원에 사용된 바와 같은 "치료"는 치료되는 개체 또는 세포의 본래의 과정을 변형시키고자 하는 시도에서의 임상적 중재를 언급하고 임상적 병리의 예방을 위해 또는 병리 과정 동안에 수행될 수 있다. 목적하는 치료 효과는 질환의 발병 또는 재발을 예방하거나, 증상의 완화, 질환의 임의의 직간접적인 병리학적 결과의 감소, 염증 및/또는 조직/기관 손상을 예방하거나 감소시키거나, 질환 진행을 감소시키거나, 질환 상태의 개선 또는 완화 및 차도 또는 개선된 예후를 포함한다. 일부 양태에서, 본 발명의 항체는 질환 또는 장애의 발병을 지연하기 위해 사용된다.

[0106] "개체" 또는 "대상체"는 척추동물이다. 특정 양태에서, 상기 척추동물은 포유동물이다. 포유동물은 농장 동물(예를 들어, 소), 스포츠 동물, 애완동물(예를 들어, 고양이, 개 및 말), 영장류, 마우스 및 래트를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 특정 양태에서, 척추동물은 인간이다.

[0107] 치료 목적을 위한 "포유동물"은 인간, 가정용 및 농장 동물, 및 동물원, 스포츠 또는 애완동물, 예를 들어, 개, 말, 고양이, 소 등을 포함하는 포유동물로서 분류되는 임의의 동물을 언급한다. 특정 양태에서, 상기 포유동물은 인간이다.

[0108] "유효량"은 목적하는 치료학적 또는 예방학적 결과를 성취하기에 필요한 시기 동안 및 투여에서 효과적인 양을 언급한다.

[0109] 본 발명의 "치료학적 유효량"의 물질/분자는 개체의 질환 상태, 연령, 성별 및 체중 및 개체에서 목적하는 반응을 유발하는 물질/분자의 능력과 같은 인자에 따라 다양할 수 있다. 치료학적 유효량은 또한 물질/분자의 임의의 독성 또는 해로운 효과가 치료학적으로 이로운 효과에 의해 능가되는 양이다. "예방학적 유효량"은 목적하는 예방학적 결과를 성취하기에 필요한 시기 및 투여에서 효과적인 양을 언급한다. 예방학적 용량은 질환 발병 전 또는 질환의 초기 단계에서 대상체에 사용되기 때문에 예방학적 유효량은 치료학적 유효량 미만인 것이 전형적이지만 필수적인 것은 아니다.

[0110] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "세포독성제"는 세포의 기능을 억제하거나 예방하고/하거나 세포의 파괴를 유발하는 물질을 언급한다. 상기 용어는 방사능활성 동위원소(예를 들어, At211, I131, I125, Y90, Re186, Re188, Sm153, Bi212, P32, Pb212 및 Lu의 방사능 동위원소), 화학치료학적 제제(예를 들어, 메토트렉세이트, 아드리아미신, 빈카 알칼로이드(빈크리스틴, 빈블라스틴, 에토포사이드), 독소루비신, 멜팔란, 미토마이신 C, 클로로람부실, 다우노루비신 또는 다른 삽입 제제, 효소 및 이의 단편, 예를 들어, 핵융효소, 항생제 및 독소, 예를 들어, 이의 단편 및/또는 변이체를 포함하는 세균, 진균류, 식물 또는 동물 기원의 소분자 독소 또는 효소적 활성 독소, 및 하기된 다양한 항종양제 또는 항암제를 포함하는 것으로 의도된다. 다른 세포독성제는 하기된다. 종양살생제는 종양 세포의 파괴를 유발한다.

[0111] "화학치료제"는 암의 치료에 유용한 화학적 화합물이다. 화학치료제의 예는 알킬화제, 예를 들어, 티오테파 및 CYTOXAN® 사이클로포스파미드; 알킬 설포네이트, 예를 들어, 부설판, 임프로설판 및 피포설판; 아지리딘, 예를 들어, 벤조도파, 카보쿠온, 메투레도파, 및 우레도파; 에틸렌이민, 및 알트레타민, 트리에틸렌멜라민, 트리에틸렌포스포르아미드, 트리에틸렌티오포스포르아미드 및 트리메틸로멜라민을 포함하는 메틸아멜라민; 아세토게닌(특히 블라타신 및 블라타시논); 델타-9-테트라하이드로카나비놀(드로나비놀, MARINOL®); 베타-라파콘; 라파콜; 콜키신; 베틀린산; 캄프토테신(합성 유사체 토포테칸(HYCANTIN®), CPT-11(이리노테칸, CAMPTOSAR®), 아세틸캄프토테신, 스코폴렉틴, 및 9-아미노캄프토테신을 포함하는); 브리오스타틴; 칼리스타틴; CC-1065(이의 아도젤레신, 카르젤레신 및 비젤레신 합성 유사체를 포함하는); 포도필로톡신; 포도필린산; 테니포사이드; 크립토포신(특히 크립토포신 1 및 크립토포신 8); 둘라스타틴; 두오카마이신(합성 유사체, KW-2189 및 CB1-TM1을 포함하는); 엘레우테로빈; 판크라티스타틴; 사코디틴; 스폰지스타틴; 질소 머스타드, 예를 들어, 클로람부실, 클로마파진, 콜로포스파미드, 에스트라무스틴, 이포스파미드, 메클로레타민, 메클로레타민 옥사이드 하이드로클로라이드, 멜팔란, 노벤비킨, 페네스테린, 프레드니무스틴, 트로포스파미드, 우라실 머스타드; 니트로우레아. 예를 들어, 카무스틴, 클로로조토신, 포테무스틴, 로무스틴, 니무스틴, 및 라니무스틴; 항생제, 예를 들어, 에네디인 항생제(예를 들어, 칼리케아미신, 특히 칼리케아미신 감마 1I 및 칼리케아미신 오메가1I(문헌참조: 예를 들어, Agnew, Chem. Intl. Ed. Engl., 33: 183-186 (1994))); 디네미신 A를 포함하는 디네미신; 에스페라미신; 및 네오카지노스타틴, 발색단 및 관련 발색단백질 에네디인 항생제 발색단, 아클라시노마이신, 악티노마이신, 오프라마이신, 아자세린, 블레오마이신, 캅티노마이신, 카라비신, 카미노마이신, 카르지노필린, 크로모마이시니스, 다크티노마이신, 다우노루비신, 데토루비신, 6-디아조-5-옥소-L-노르류신, ADRIAMYCIN® 독소루비신(모르

폴리노-독소루비신, 시아노모르폴리노-독소루비신, 2-피롤리노-독소루비신 및 테옥시독소루비신을 포함하는), 에피루비신, 예소루비신, 이다루비신, 마르셀로마이신, 미토마이신, 예를 들어, 미토마이신 C, 마이코페놀산, 노갈라마이신, 올리보마이신, 페플로마이신, 포트필마이신, 푸로마이신, 쿠엘라마이신, 로도루비신, 스트렙토니그린, 스트렙토조신, 투버시딘, 우베니멕스, 지노스타틴, 조루비신; 항-대사물, 예를 들어, 메토타렉세이트 및 5-플루오로우라실 (5-FU); 폴산 유사체, 예를 들어, 데노프테린, 메토타렉세이트, 프테로프테린, 트리메트렉세이트; 퓨린 유사체, 예를 들어, 플루다라빈, 6-머캅토피린, 티아미프린, 티오구아닌; 피리미딘 유사체, 예를 들어, 안시타빈, 아자시티딘, 6-아자우리딘, 카모푸르, 시타라빈, 디데옥시우리딘, 독시플루리딘, 에녹시타빈, 플록스우리딘; 안드로겐, 예를 들어, 칼루스테론, 드로모스타놀론 프로피오네이트, 에피티오스타놀, 메피티오스탄, 테스토라톤; 항-아드레날, 예를 들어, 아미노글루테트이미드, 미토탄, 트릴로스탄; 폴산 리플레니셔, 예를 들어, 프롤린산(frolic acid); 아세글라톤; 알도포스파미드 글리코시드; 아미노레불린산; 에닐우라실; 암사크린; 베스트라부실; 비산트렌; 에다트락세이트; 데포프아민; 데메콜신; 디아지쿠온; 엘포르미틴; 엘립티니움 아세테이트; 에포틸론; 에토글루시드; 갈륨 니트레이트; 하이드록시우레아; 렌티난; 로니다이닌; 마이탄시노이드, 예를 들어, 마이탄신 및 안사미토신; 미토구아존; 미톡산트론; 모피단물; 니트라에린; 펜토스타틴; 페나메트; 피라루비신; 로속산트론; 2-에틸하이드라지드; 프로카바진; PSK® 폴리사카라이드 복합체 (JHS Natural Products, Eugene, Oreg.); 라족산; 리족신; 시조푸란; 스피로게르마늄; 테누아존산; 트리아지쿠온; 2,2',2''-트리클로로트리에틸아민; 트리코테센(특히, T-2 독소, 베라쿠린 A, 로리딘 A 및 안구이딘); 우레탄; 빈데신 (ELDISINE®, FILDENIN®); 다카바진; 마노무스틴; 미토브로니톨; 미톨락톨; 피포브로만; 가시토신; 아라비노사이드("Ara-C"); 티오테파; 탁소이드, 예를 들어, TAXOL® 파클리탁셀 (Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.), ABRAXANE™ 크레모포르-부제, 파클리탁셀의 알부민-가공된 나노입자 제형 (American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Ill.), 및 TAXOTERE® 독세탁셀 (Rhone-Poulenc Rorer, Antony, France); 클로란부실; 겐시타빈 (GEMZAR®); 6-티오구아닌; 머캅토피린; 메토타렉세이트; 플라티늄 유사체, 예를 들어, 시스플라틴 및 카보플라틴; 빈블라스틴 (VELBAN®); 플라티늄; 에토포사이드 (VP-16); 이포스파미드; 미톡산트론; 빈크리스틴 (ONCOVIN®); 옥살리플라틴; 류코보빈; 비노렐빈 (NAVELBINE®); 노반트론; 에다트렉세이트; 다우노마이신; 아미노프테린; 이반드로네이트; 토포이소머라제 억제제 RFS 2000; 디플루오로메틸 오르니틴 (DMFO); 레티노이드, 예를 들어, 레티노산; 카페시타빈 (XELODA®); 약제학적으로 허용되는 염, 산 또는 상기 임의의 유도체; 및 사이클로포스파미드, 독소루비신, 빈크리스틴 및 프레드니솔론의 조합 치료요법에 대한 약어인 CHOP 및 5-FU 및 류코보빈과 조합된 옥살리플라틴 (ELOXATIN™)을 사용한 치료 용법에 대한 약어인 FOLFOX와 같은 상기 중 2개의 이상의 조합을 포함한다.

- [0112] 본원에 사용된 바와 같은 "치료"는 치료중인 개체 또는 세포의 본래의 과정을 변화시키거나 하는 시도에서의 임상적 중재를 언급하고 임상적 병리의 예방 또는 병리 과정 동안에 수행될 수 있다. 목적하는 치료 효과는 질환의 발병 또는 재발, 증상의 완화, 질환의 임의의 직접적이거나 간접적인 병리학적 결과의 감소, 염증 및/또는 조직/기관 손상의 예방 또는 감소, 질환 진행 속도의 감소, 질환 상태의 개선 또는 완화 및 차도 또는 개선된 예후를 포함한다. 일부 양태에서, 본 발명의 항체는 질환 또는 장애의 발병을 지연시키기 위해 사용된다.
- [0113] "개체" 또는 "대상체"는 척추동물이다. 특정 양태에서, 상기 척추동물은 포유동물이다. 포유동물은 농장 동물(예를 들어, 소), 스포츠 동물, 애완동물(예를 들어, 고양이, 개 및 말), 영장류, 마우스 및 래트를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 특정 양태에서, 척추동물은 인간이다.
- [0114] 치료 목적을 위한 "포유동물"은 인간, 가정용 및 농장 동물, 및 동물원, 스포츠 또는 애완동물, 예를 들어, 개, 말, 고양이, 소 등을 포함하는 포유동물로서 분류되는 임의의 동물을 언급한다. 특정 양태에서, 상기 포유동물은 인간이다.
- [0115] "유효량"은 목적하는 치료학적 또는 예방학적 결과를 성취하기에 필요한 시기 동안 및 투여에서 효과적인 양을 언급한다.
- [0116] 본 발명의 "치료학적 유효량"의 물질/분자는 개체의 질환 상태, 연령, 성별 및 체중 및 개체에서 목적하는 반응을 유발하는 물질/분자의 능력과 같은 인자에 따라 다양할 수 있다. 치료학적 유효량은 또한 물질/분자의 임의의 독성 또는 해로운 효과가 치료학적으로 이로운 효과에 의해 능가되는 양이다. "예방학적 유효량"은 목적하는 예방학적 결과를 성취하기에 필요한 시기 및 투여에서 효과적인 양을 언급한다. 예방학적 용량은 질환 발병 전 또는 질환의 초기 단계에서 대상체에 사용되기 때문에 예방학적 유효량은 치료학적 유효량 미만인 것이 전형적이지만 필수적인 것은 아니다.
- [0117] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "세포독성제"는 세포의 기능을 억제하거나 예방하고/하거나 세포의 파괴를 유발

하는 물질을 언급한다. 상기 용어는 방사능활성 동위원소(예를 들어, At211, I131, I125, Y90, Re186, Re188, Sm153, Bi212, P32, Pb212 및 Lu의 방사능 동위원소), 화학치료학적 제제(예를 들어, 메토크세이트, 아드리아미신, 빈카 알칼로이드(빈크리스틴, 빈블라스틴, 에토포사이드), 독소루비신, 멜팔란, 미토마이신 C, 클로로람부실, 다우노루비신 또는 다른 삽입 제제, 효소 및 이의 단편, 예를 들어, 핵융해효소, 항생제 및 독소, 예를 들어, 이의 단편 및/또는 변이체를 포함하는 세균, 진균류, 식물 또는 동물 기원의 소분자 독소 또는 효소적 활성 독소, 및 하기된 다양한 항종양제 또는 항암제를 포함하는 것으로 의도된다. 다른 세포독성제는 하기된다. 종양살생제는 종양 세포의 파괴를 유발한다.

[0118] "치료하는" 또는 "치료" 또는 "완화"는 치료학적 및 예방학적 대책 둘다를 언급하고; 여기서, 상기 목적은 표적화된 병리학적 병태 또는 장애를 예방하거나 서행(줄이는)시키는 것이다. 치료를 필요로 하는 자들은 장애를 이미 갖고 있는 자들, 장애를 가질 성향이 있는 자들 또는 장애가 예방되어야만 하는 자들을 포함한다. 대상체 또는 포유동물은 본 발명의 방법에 따른 치료학적 유효량의 항체를 투여 받은 후 상기 환자가 하기 하나 이상의 부재하에 관찰가능하고/하거나 측정가능한 감소를 보여주는 경우 감염에 대해 성공적으로 "치료"된다: 감염된 세포 수의 감소 또는 감염된 세포의 부재; 감염된 총 세포 %의 감소; 및/또는 일부 정도도의 경감, 특이적 감염과 관련된 증상들 중 하나 이상; 감소된 이환율 및 사망율, 및 생활의 질 문제 개선. 질환에서 성공적인 치료 및 개선을 평가하기 위한 상기 파라미터는 담당의에 의해 친숙한 통상의 과정들에 의해 용이하게 측정가능하다.

[0119] 용어 "치료학적 유효량"은 대상체 또는 포유동물에서 질환 또는 장애를 "치료"하기 위해 효과적인 항체 또는 약물의 양을 언급한다. "치료하는"의 이전의 정의를 참조한다.

[0120] 하나 이상의 추가의 치료학적 제제와 "조합된" 투여는 동시(동시 발생) 및 연속 투여(임의의 순서로)를 포함한다.

[0121] 본원에 사용된 바와 같은 "담체"는 사용되는 사용되는 투여 용량 및 농도에서 노출된 세포 또는 포유동물에 비독성인 약제학적으로 허용되는 담체, 부형제 또는 안정화제를 포함한다. 흔히, 생리학적으로 허용되는 담체는 수성 pH 완충 용액이다. 생리학적으로 허용되는 담체의 예는 포스페이트, 시트레이트 및 다른 유기산과 같은 완충제; 아스코르브산을 포함하는 항산화제; 저분자량(약 10개 잔기 미만)의 폴리펩타이드; 단백질, 예를 들어, 혈청 알부민, 겔라틴, 또는 면역글로불린; 친수성 중합체, 예를 들어, 폴리비닐피롤리돈; 아미노산, 예를 들어, 글라이신, 글루타민, 아스파라긴, 아르기닌 또는 라이신; 모노사카라이드, 디사카라이드, 및 글루코스, 만노스 또는 텍스트린을 포함하는 다른 탄수화물; 킬레이팅제, 예를 들어, EDTA; 당 알콜, 예를 들어, 만니톨 또는 소르비톨; 염-형성 반대이온, 예를 들어, 나트륨; 및/또는 비이온성 계면활성제, 예를 들어, TWEEN™ 폴리에틸렌 글리콜 (PEG), 및 PLURONICS™을 포함한다.

## [0122] 당항체

[0123] 배양 중 포유동물 세포로부터 생산되는 재조합 단백질의 당화는 치료학적 항체의 효과적인 용도를 보장하는데 있어서 중요한 과정이다(문헌참조: Goochee et al., 1991; Jenkins and Curling, 1994). 포유동물 세포 배양은 모두 동일한 성질을 갖지 않는 당화 패턴을 갖는 이종성 혼합물을 전달한다. 치료학적 단백질의 안전성, 효능 및 혈청 반감기와 같은 성질들은 이들 당화 패턴에 의해 영향받을 수 있다. 본원 발명자는 "당항체"로 불리우는 신규 부류의 모노클로날 항체의 개발에 의해 당형태의 이종성 문제점을 성공적으로 해결하였다.

[0124] 용어 "당항체"는 치-후웨이 왕 박사에 의해 Fc 상의 단일의 균일화된 당형태를 갖는 모노클로날 항체(바람직하게, 치료학적 모노클로날 항체)의 동종성 집단을 언급하기 위해 만들어졌다. 동종성 집단을 포함하는 개별 당항체는 동일하고 동일한 에피토프에 결합하고 잘-한정된 글리칸 구조 및 서열을 갖는 동일한 Fc 글리칸을 함유한다.

[0125] 당항체는 시판중이거나 개발중인 모노클로날 항체(바람직하게, 치료학적 모노클로날 항체)로부터 제조될 수 있다. 치료학적 용도를 위한 모노클로날 항체는 인간화된, 인간 또는 키메라일 수 있다.

[0126] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "모 항체"는 당항체를 제조하기 위해 사용되는 모노클로날 항체를 언급한다. 모 항체는 포유동물 세포 배양, 피키아 파스토리스(*Pichia pastoris*) 또는 곤충 세포주 배양에 의해 수득될 수 있다. 바람직하게, 모 항체는 포유동물 세포 배양에서 제조된다. 모 항체는 FDA 승인되거나 개발 중인 것일 수 있다.

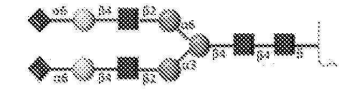
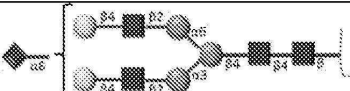
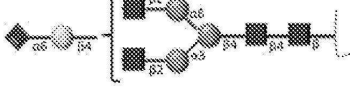
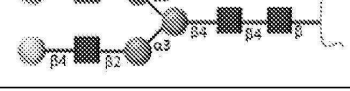
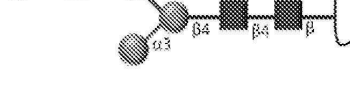
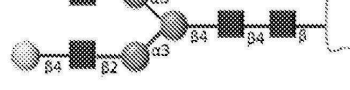
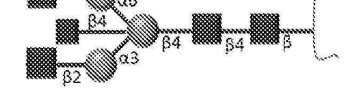
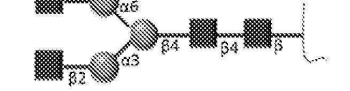
[0127] 모노클로날 항체는 하이브리도마, 재조합 및 파아지 디스플레이 기술 또는 이의 조합의 용도를 포함하는 당업계에서 공지된 광범위한 기술을 사용하여 제조될 수 있다. 예를 들어, 모노클로날 항체는 당업계에 공지되고 예를



들어, 문헌[참조: Harlow et al., Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988); Hammerling, et al., in: Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981); 이의 각각은 전문이 본원에 참조로 인용된다]에 교시된 것들을 포함하는 하이브리도마 기술을 사용하여 제조될 수 있다. 본원에 사용된 바와 같은 용어 "모노클로날 항체" ("mAb"로서 약칭됨)는 하이브리도마 기술을 통해 제조된 항체에 제한되지 않는다. 상기 용어 "모노클로날 항체"는 이것이 제조되는 방법이 아니라 임의의 진핵, 원핵 또는 파아지 클론을 포함하는 단일 클론으로부터 유래된 항체를 언급한다. "모노클로날 항체"는 2개의 단백질, 즉, 중쇄 및 경쇄를 포함할 수 있거나 대안적으로 이들로 이루어진다.

- [0128] 본원에 기재된 것은 Fc 당가공에 의해 치료학적 모노클로날 항체로부터 유래된 기능적 활성 당항체이다. 최적화된 당형태를 갖는 당항체는 치료학적 모노클로날 항체와 비교하여 보다 강력한 생물학적 활성을 나타낸다. 최적화된 당형태를 갖는 당항체는 치료학적 용도를 위한 대안을 제공할 수 있는 것으로 고려된다.
- [0129] 본 발명의 당항체는 Fc 상에 단일의 균일화된 당형태(N-글리칸)로 이루어진다. 일부 양태에서, N-글리칸은 Fc 영역의 Asn-297에 부착되어 있다.
- [0130] 본 발명에 따른 N-글리칸은 또한 "트리만노스 코어" 또는 "펜타사카라이드 코어"로서 언급되는  $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ 의 통상의 펜타사카라이드 코어를 갖고, 여기서, "Man"은 만노스를 언급하고, "Glc"는 글루코스를 언급하고, "NAc"는 N-아세틸을 언급하고, GlcNAc는 N-아세틸글루코사민을 언급한다.
- [0131] 일부 양태에서, N-글리칸은 2개 안테나 구조를 갖는다.
- [0132] 본원에 기재된 N-글리칸은 "2등분" GlcNAc를 포함하는 쇠내 치환을 가질 수 있다. 글리칸이 트리만노스 코어 상에 2등분 GlcNAc를 포함하는 경우, 상기 구조는  $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_3$ 로서 나타낸다. 글리칸이 트리만노스 코어에 부착된 코어 푸코스를 포함하는 경우, 상기 구조는  $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2(\text{F})$ 로서 나타낸다. N-글리칸은 하나 이상의 말단 시알산(예를 들어, N-아세틸뉴라민산)을 포함할 수 있다. "Sia"로서 나타난 구조는 말단 시알산을 언급한다. 시알화는 2개 안테나 구조의  $\alpha 1-3$  또는  $\alpha 1-6$  아암 상에 존재할 수 있다.
- [0133] 일부 양태에서, 본원 기재된 N-글리칸은 적어도 하나의  $\alpha 2-6$  말단 시알산을 포함한다. 특정 양태에서, N-글리칸은 하나의  $\alpha 2-6$  말단 시알산을 포함한다. 바람직한 양태에서, N-글리칸은 2개의  $\alpha 2-6$  말단 시알산을 포함한다.
- [0134] 일부 양태에서, 본원에 기재된 N-글리칸은 적어도 하나의  $\alpha 2-3$  말단 시알산을 포함한다. 특정 양태에서, N-글리칸은 하나의  $\alpha 2-3$  말단 시알산을 포함한다. 바람직한 양태에서, N-글리칸은 2개의  $\alpha 2-3$  말단 시알산을 포함한다.
- [0135] 일부 양태에서, 본원에 기재된 N-글리칸은 적어도 하나의 갈락토스를 포함한다. 특정 양태에서, N-글리칸은 하나의 갈락토스를 포함한다. 바람직한 양태에서, N-글리칸은 2개의 갈락토스를 포함한다.
- [0136] 바람직하게, 본원의 개시내용에 따른 N-글리칸은 코어 푸코스가 없다.
- [0137] 표 1은 당항체에서 예시적 N-글리칸을 열거한다.

[0138] [ 표 1 ]

| GAb   | 글리칸 구조  | 글리칸 서열   |
|-------|---|--|
| 1-101 |    | Sia <sub>2</sub> (α2-6)Gal <sub>2</sub> GlcNAc <sub>2</sub> Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub> |
| 1-102 |    | Sia(α2-6)Gal <sub>2</sub> GlcNAc <sub>2</sub> Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>               |
| 1-103 |    | Sia(α2-6)GalGlcNAc <sub>2</sub> Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>                             |
| 1-104 |    | Gal <sub>2</sub> GlcNAc <sub>2</sub> Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>                        |
| 1-105 |    | GalGlcNAcMan <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>  |
| 1-106 |   | GalGlcNAc <sub>2</sub> Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>                                      |
| 1-107 |  | GlcNAc <sub>3</sub> Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>   |
| 1-108 |  | GlcNAc <sub>2</sub> Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>   |

[0139]

|       |  |   |
|-------|--|---|
| 1-109 |  | GlcNAcMan <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>  |
| 1-110 |  | GlcNAcMan <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>  |
| 1-111 |  | Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>  |
| 1-112 |  | Sia <sub>2</sub> ( $\alpha$ 2-6)Gal <sub>2</sub> GlcNAc <sub>3</sub> Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub> |
| 1-113 |  | Sia( $\alpha$ 2-6)Gal <sub>2</sub> GlcNAc <sub>3</sub> Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>               |
| 1-114 |  | Sia( $\alpha$ 2-6)GalGlcNAc <sub>3</sub> Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>                             |
| 1-115 |  | Gal <sub>2</sub> GlcNAc <sub>3</sub> Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>                                 |
| 1-116 |  | GalGlcNAc <sub>3</sub> Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>   |
| 1-117 |  | Sia <sub>2</sub> ( $\alpha$ 2-3)Gal <sub>2</sub> GlcNAc <sub>2</sub> Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub> |
| 1-118 |  | Sia( $\alpha$ 2-3)Gal <sub>2</sub> GlcNAc <sub>2</sub> Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>               |

[0140]

|       |  |   |
|-------|--|---|
| 1-119 |  | $\text{Sia}_2(\alpha 2-3)\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_3\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$            |
| 1-120 |  | $\text{Sia}(\alpha 2-3)\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_3\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$              |
| 1-121 |  | $\text{Sia}_2(\alpha 2-3/\alpha 2-6)\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ |
| 1-122 |  | $\text{Sia}_2(\alpha 2-6/\alpha 2-3)\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ |
| 1-123 |  | $\text{Sia}_2(\alpha 2-3/\alpha 2-6)\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_3\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ |
| 1-124 |  | $\text{Sia}_2(\alpha 2-6/\alpha 2-3)\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_3\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ |
| 1-125 |  | $\text{Sia}(\alpha 2-3)\text{GalGlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$                       |
| 1-126 |  | $\text{Sia}(\alpha 2-3)\text{GalGlcNAc}_3\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$                       |

[0141]

[0142] Fc 상의 당화는 ADCC, CDC 및 순환 반감기를 포함하는 다양한 면역글로불린 이펙터-매개된 기능에 영향을 미칠 수 있다. ADCC 증진은 치료학적 항체 약물 효능을 개선시키기 위한 주요 전략이다. 보다 낮은 약물 비용의 이득을 위해 유효 약물 용량을 저하시키는 잠재력을 갖는다. 본원에 기재된 당향체는 기능적 성질을 특징으로 할 수 있다.

#### [0143] (I) 암에 대한 당향체

[0144] 본원에 기재된 당향체는 암을 치료하기 위해 유용할 수 있다. FDA는 암 치료요법에 대한 다수의 치료학적 모노클로날 항체를 승인하였고 단독으로 또는 다른 치료와 연계된 임상 시험에서 보다 많이 연구되었다. 이들 모노클로날 항체("모 항체")는 당향체를 제조하기 위해 사용될 수 있다.

[0145] 암에 대한 예시적 모노클로날 항체는 Ado-트라스투주맙 엠탄신 (Kadcyla), 알렘투주맙 (캄파트(Campath)), 벨리무맙 (벤리스트(Benlysta)), 베바시주맙 (아바스티(Avastin)), 브렌톡시맙 베도틴(어드세트리스(Adcetris)), 카보잔티니브(코메트리크(Cometriq)), 카나키누맙(Canakinumab) (이라리스(Ilaris)), 세톡시맙(에르비투스(Erbitux)), 데노수맙 (크게바(Xgeva)), 이브리투모맙 티옥세탄 (제발린(Zevalin)), 이필리무맙 (에르보이(Yervoy)), 니볼루맙(Nivolumab) (오프디보(Opdivo)), 오비누투주맙 (가지바(Gazyva)), 오파투무맙 (아르제라



(Arzerra), HuMax-CD20), 파니투무맙 (베크티빅스(Vectibix)), 캄브롤리주맙 (키트루다(Keytruda)), 퍼투주맙 (페리에타(Perjeta)), 라무시루맙 (시람자(Cyramza)), 리툽시맙 (리툽산(Rituxan), 마브테라(Mabthera)), 실툽시맙(실반트(Sylvant)), 토실리주맙, 토시투모맙(벡스사르(Bexsar)) 및 트라스투주맙(헤르셉틴)을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0146] **항-CD20 당항체(항-CD20 GAb)**

[0147] "CD20" 항원은 대략 35kD의 분자량을 갖는 비-당화된 막관통 인단백질이고 이는 말초 혈액 또는 림프 기관으로부터의 90% 초과와 B 세포의 표면상에서 발견된다. CD20은 조기 사전-B 세포 발육 동안에 발현되고 혈장 세포 분화때까지 유지되고; 이것은 인간 줄기 세포, 림프성 선조 세포 또는 정상 혈장 세포상에서 발견되지 않는다. CD20은 악성 B 세포 뿐만 아니라 정상 B 세포 둘다에 존재한다. 문헌에서 CD20에 대한 명칭은 "B-림프구-제한된 분화 항원" 및 "Bp35"를 포함한다. CD20 항원은 예를 들어, 문헌[참조: Clark and Ledbetter, *Adv. Can Res.* 52:81-149 (1989) and Valentine et al. *J. Biol. Chem.* 264(19):11282-11287 (1989)]에 기재되어 있다.

[0148] 본원의 개시내용은 "항-CD20 당항체" ("항-CD20 GAb")로 호칭되는 신규 부류의 항-CD20 항체를 특징으로 한다. 항-CD20 당항체는 Fc 당가공에 의해 항-CD20 모노클로날 항체로부터 생성될 수 있다. 동중성 집단을 포함하는 개별 항-CD20 당항체는 동일하고 잘-한정된 글리칸 구조 및 서열과 함께 동일한 Fc 글리칸을 함유한다. 본 발명에 따른 항-CD20 GAb는 이의 모 항체로서 세포 막상의 인간 CD20 항원의 동일한 에피토프에 특이적으로 결합한다.

[0149] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "모 항체"는 항-CD20 당항체를 생산하기 위해 사용되는 항-CD20 모노클로날 항체를 언급한다.

[0150] 모 항체는 포유동물 세포 배양, 피키아 파스토리스 또는 곤충 세포주 배양과 같은 세포 배양에 의해 수득될 수 있다. 바람직하게, 모 항체는 포유동물 세포 배양에서 제조된다. 모 항체는 FDA 승인되거나 개발 중일 수 있다. 예시적 모 항체는 리툽시맙, 오파투무맙, 토시투모맙, 오크렐리주맙, 11B8 또는 7D8 (WO2004/035607에 기재된), C6과 같은 WO 2005/103081에 기재된 항-CD20 항체, IMMU-106 (제조원: Immunomedics)과 같은 WO2003/68821에 기재된 항-CD 항체, AME-133 (제조원: Applied Molecular Evolution/Lilly)과 같은 WO2004/103404에 기재된 항-CD20 항체, TRU-015 (제조원: Trubion Pharmaceuticals Inc)과 같은 US 2003/0118592에 기재된 항-CD20 항체, "Y2B8" (ZEVALIN®) (제조원: Biogen-Idec, Inc.)로 지정된 90Y-표지된 2B8 쥐 항체(예를 들어, 미국 특허 제 5,736,137호, Anderson et al.; ATCC 기탁번호 HB11388); 쥐 및 키메라 2H7 항체(예를 들어, 미국 특허 제 5,677,180호, Robinson et al.); rhuMab2H7과 같은 인간화된 2H7 항체 및 다른 버전(Genentech, Inc.) (예를 들어, WO 2004/056312, Adams et al., 및 하기된 다른 참조문헌); CD20 (GenMab A/S/Medarex, Inc.)에 대한 인간 모노클로날 항체 (예를 들어, WO 2004/035607 및 WO 2005/103081, Teeling et al.); CD20의 세포외 에피토프에 결합하는 키메라화되거나 인간화된 모노클로날 항체(Biomedics Inc.) (예를 들어, WO 2006/106959, Numazaki et al.); 인간화된 LL2 및 유사 항체(Immunomedics, Inc.) (예를 들어, 미국 특허 제 7,151,164호 및 미국 제 2005/0106108호, Hansen); A20 항체 (Immunomedics, Inc.), 예를 들어, 키메라 A20 (cA20) 또는 인간화된 A20 항체 (hA20, IMMUN-106T, 벨투주맙) (예를 들어, US 2003/0219433, Hansen et al.); CD20에 대한 완전한 인간 항체(Amgen/AstraZeneca) (예를 들어, WO 2006/130458, Gazit et al.); CD20에 대한 항체(Avestha Gengraime Technologies Pvt Ltd.) (예를 들어, WO 2006/126069, Morawala); 및 GA101 (예를 들어, WO 2005/044859; US 2005/0123546; US 2004/0072290; 및 US 2003/0175884, Umana et al.)와 같은 CD20 (Roche/GlycArt Biotechnology AG)에 대한 키메라 또는 인간화된 B-Ly1 항체를 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0151] 일부 양태에서, 본원에 기재된 예시적 항-CD20 GAb는 서열번호 1에 제시된 아미노산 서열을 갖는 중쇄 및 서열번호 2에 제시된 아미노산 서열을 갖는 경쇄를 포함한다. 바람직한 양태에서, 항-CD20 GAb는 리툽시맙의 경쇄 서열 및 중쇄 서열을 포함한다.

[0152] 하기 표 2는 리툽시맙의 중쇄 및 경쇄 서열을 보여준다.

[0153] [표 2]

| 표 2   |
|---|
| <p>리톡시맵</p> <p>승인 번호 : DB00073</p> <p>Source: <a href="http://www.drugbank.ca/drugs/DB00073">http://www.drugbank.ca/drugs/DB00073</a></p>   |
| <p>&gt; 리톡시맵 중쇄</p> <p>QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGRGLEWIGAIYPGNGDTSY<br/> NQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYGGDWYFNVWGAGTTVTVS<br/> AASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS<br/> SGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHPKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG<br/> GPSVFLFPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY<br/> NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD<br/> ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR<br/> WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK<br/> (서열번호 2)</p> <p>&gt; 리톡시맵 경쇄</p> <p>QIVLSQSPAILLSASPGEKVTMTCRASSSVSYIHWFQQKPGSSPKPWIYATSNLASGVPVR<br/> FSGSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWTSNPPTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPS<br/> DEQLKSGTASVVCCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYLSSTLTLL<br/> SKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC<br/> (서열번호 1)</p> |

[0154]

[0155] 일부 양태에서, N-글리칸은 Fc 영역의 Asn-297에 부착된다.

[0156] 본 발명에 따른 N-글리칸은 또한 "트리만노스 코어" 또는 "펜타사카라이드 코어"로서 언급되는  $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ 의 통상의 펜타사카라이드 코어를 갖고, 여기서, "Man"은 만노스를 언급하고, "Glc"는 글루코스를 언급하고, "NAc"는 N-아세틸을 언급하고, GlcNAc는 N-아세틸글루코사민을 언급한다.

[0157] 일부 양태에서, N-글리칸은 2개 안테나 구조를 갖는다.

[0158] 본원에 기재된 N-글리칸은 "2등분" GlcNAc를 포함하는 채내 치환을 가질 수 있다. 글리칸이 트리만노스 코어 상에 2등분 GlcNAc를 포함하는 경우, 상기 구조는  $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_3$ 로서 나타낸다. 글리칸이 트리만노스 코어에 부착된 코어 푸코스를 포함하는 경우, 상기 구조는  $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2(\text{F})$ 로서 나타낸다. N-글리칸은 하나 이상의 말단 시알산(예를 들어, N-아세틸뉴라민산)을 포함할 수 있다. "Sia"로서 나타난 구조는 말단 시알산을 언급한다. 시알화는 2개 안테나 구조의  $\alpha 1-3$  또는  $\alpha 1-6$  아암 상에 존재할 수 있다.

[0159] 일부 양태에서, 본원에 기재된 N-글리칸은 적어도 하나의  $\alpha 2-6$  말단 시알산을 포함한다. 특정 양태에서, N-글리칸은 하나의  $\alpha 2-6$  말단 시알산을 포함한다. 바람직한 양태에서, N-글리칸은 2개의  $\alpha 2-6$  말단 시알산을 포함한다.

[0160] 일부 양태에서, 본원에 기재된 N-글리칸은 적어도 하나의  $\alpha 2-3$  말단 시알산을 포함한다. 특정 양태에서, N-글리칸은 하나의  $\alpha 2-3$  말단 시알산을 포함한다. 바람직한 양태에서, N-글리칸은 2개의  $\alpha 2-3$  말단 시알산을 포함한다.

[0161] 일부 양태에서, 본원에 기재된 N-글리칸은 적어도 하나의 갈락토스를 포함한다. 특정 양태에서, N-글리칸은 하나의 갈락토스를 포함한다. 바람직한 양태에서, 상기 N-글리칸은 2개의 갈락토스를 포함한다.

[0162] 바람직하게, 본원의 개시내용에 따른 N-글리칸은 코어 푸코스가 없다.

[0163] 표 3은 항-CD20 당항체에서 예시적인 N-글리칸을 열거한다. 본원 개시내용의 양태는 본원에 열거된 임의의 N-글리칸을 포함할 수 있거나 배제할 수 있다.

[0164] [표 3]

| GAb   | 글리칸 구조 | 글리칸 서열   |
|-------|--------|--|
| 2-101 |        | Sia <sub>2</sub> (α2-6)Gal <sub>2</sub> GlcNAc <sub>2</sub> Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub> |
| 2-102 |        | Sia(α2-6)Gal <sub>2</sub> GlcNAc <sub>2</sub> Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>               |
| 2-103 |        | Sia(α2-6)GalGlcNAc <sub>2</sub> Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>                             |
| 2-104 |        | Gal <sub>2</sub> GlcNAc <sub>2</sub> Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>                        |
| 2-105 |        | GalGlcNAcMan <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>  |
| 2-106 |        | GalGlcNAc <sub>2</sub> Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>                                      |

[0165]

|       |  |   |
|-------|--|---|
| 2-107 |  | GlcNAc <sub>3</sub> Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>  |
| 2-108 |  | GlcNAc <sub>2</sub> Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>  |
| 2-109 |  | GlcNAcMan <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>  |
| 2-110 |  | GlcNAcMan <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>  |
| 2-111 |  | Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>  |
| 2-112 |  | Sia <sub>2</sub> ( $\alpha$ 2-6)Gal <sub>2</sub> GlcNAc <sub>3</sub> Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub> |
| 2-113 |  | Sia( $\alpha$ 2-6)Gal <sub>2</sub> GlcNAc <sub>3</sub> Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>               |
| 2-114 |  | Sia( $\alpha$ 2-6)GalGlcNAc <sub>3</sub> Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>                             |
| 2-115 |  | Gal <sub>2</sub> GlcNAc <sub>3</sub> Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>                                 |
| 2-116 |  | GalGlcNAc <sub>3</sub> Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>   |

[0166]

|       |  |   |
|-------|--|---|
| 2-117 |  | $\text{Sia}_2(\alpha 2-3)\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$            |
| 2-118 |  | $\text{Sia}(\alpha 2-3)\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$              |
| 2-119 |  | $\text{Sia}_2(\alpha 2-3)\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_3\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$            |
| 2-120 |  | $\text{Sia}(\alpha 2-3)\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_3\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$              |
| 2-121 |  | $\text{Sia}_2(\alpha 2-3/\alpha 2-6)\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ |
| 2-122 |  | $\text{Sia}_2(\alpha 2-6/\alpha 2-3)\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ |
| 2-123 |  | $\text{Sia}_2(\alpha 2-3/\alpha 2-6)\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_3\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ |
| 2-124 |  | $\text{Sia}_2(\alpha 2-6/\alpha 2-3)\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_3\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ |
| 2-125 |  | $\text{Sia}(\alpha 2-3)\text{GalGlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$                       |

[0167]

|       |  |   |
|-------|--|---|
| 2-126 |  | $\text{Sia}(\alpha 2-3)\text{GalGlcNAc}_3\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ |
|-------|--|---|

[0168]

[0169]

#### 항-CD20 당항체의 생물학적 특성

[0170]

Fc 상의 당화는 ADCC, CDC 및 순환 반감기를 포함하는 다양한 면역글로불린 이펙터-매개된 기능에 영향을 미칠 수 있다. ADCC 증진은 치료학적 항체 약물 효능을 개선시키기 위한 주요 전략이다. 보다 낮은 약물 비용의 이득을 위해 유효 약물 용량을 저하시키는 잠재력을 갖는다. 본원에 기재된 당항체는 기능적 성질을 특징으로 할 수 있다. 본원에 기재된 항-CD20 당항체는 기능성 성질을 특징으로 할 수 있다. 항-CD20 GAb는 인간 CD20 발현 세포에 대한 아포토시스를 포함하는 세포 성장 억제 활성을 갖는다. 일부 양태에서, 항-CD20 GAb는 이의 모 항체와 비교하여 보다 강력한 세포 성장 억제 활성을 나타낸다.

[0171] 항-CD20 당항체의 ADCC 활성

[0172] 본 발명에 따른 당항체의 증가된 ADCC 활성은 모 항체의 ADCC 활성과 비교하여 적어도 약 5배이고 적어도 약 6배, 약 7배, 약 8배, 약 9배, 약 10배, 약 15배, 약 20배, 약 25배, 약 30배, 약 35배, 약 40배, 약 50배, 약 60배, 및 약 80배 또는 본원에 열거된 임의의 2개의 수치 사이의 범위에서 적어도 대략적인 값을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0173] 표 4는 리툽시맙과 비교하여 항-CD20 GAb의 예시적인 증진된 ADCC 활성을 열거한다. 예시적인 검정은 실시예에 기재한다.

[0174] [표 4]

| 항-CD20<br>ADCC<br>(배수) | 리툽시맙 | GAb101 | GAb104 | GAb105 | GAb107 | GAb108 | GAb111 |
|------------------------|------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
|                        | 1    | >50    | >50    | 30~50  | >50    | 10~30  | 5~10   |

[0175]

[0176] 본원에 기재된 다수의 항-CD20 GAb, 특히, GAb101, 및 GAb104는 이의 모 항체인 리툽시맙과 비교하여 증진된 ADCC 활성을 나타낸다. 본 발명의 당항체가 B 세포 매개된 악성 종양 및 면역학적 질환에 대한 치료학적 제제로서 보다 우수한 효과를 나타낼 수 있는 것으로 고려되고, 여기서, B 세포 또는 B 세포에 의해 생산되는 항체가 관여되고 본 발명의 목적은 치료학적 제제를 개발하는데 항-CD20 GAb를 사용하는 것이다.

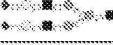









[0177] 항-CD20 당항체의 ADCC 활성

[0178] 본원에 기재된 당항체는 놀랍게도 CDC에 영향을 주는 것 없이 개선된 ADCC를 제공할 수 있다. 예시적인 CDC 검정은 실시예에 기재되어 있다. 예시적인 양태에서, 당항체의 ADCC는 증가되지만 보체 의존성 세포독성(CDC)와 같은 다른 면역글로불린형 이펙터 기능은 유사하게 남아있거나 유의적으로 영향을 받지 않는다.

[0179] FcγRIIIa와 항-CD20 당항체 간의 결합

[0180] 표 5는 항-CD20 GAb 및 리툽시맙의 예시적인 FcγRIIIa를 열거한다. FcγRIIIa 결합은 당업계에 공지된 검정을 사용하여 측정될 수 있다. 예시적인 검정은 실시예에 기재되어 있다. Fc 수용체 결합은 항-CD20 GAb 대 리툽시맙의 상대적 비율로서 결정될 수 있다. 예시적인 양태에서 Fc 수용체 결합은 적어도 1.2-배, 2-배, 3-배, 4-배, 5-배, 6-배, 7-배, 8-배, 9-배, 10-배, 15-배 또는 20-배, 30-배, 40-배, 50-배, 100-배 이상까지 증가된다.

[0181] [표 5]

| SPR에 의한 가변 당항체에 대한 FcRIIIA의 결합 상수   |        |         |           |    | 비고  |
|---|--------|---------|-----------|----|---|
|   | 곡선     | KD (nM) | Rmax (RU) | 배수 |   |
|   | 리툽산    | 100~300 | 49.29     |    | 카테고리 A:<br>증가 >30X<br><br>카테고리 B:<br>증가 15~30X<br><br>카테고리 C:<br>증가 5~10X |
|  | GAb101 | 1~25    | 90.48     | A  |   |
|  | GAb104 | 1~25    | 93.4      | A  |   |
|  | GAb111 | 40~130  | 56.28     | C  |   |
|  | GAb108 | 40~130  | 67.01     | C  |   |
|  | GAb107 | 7~30    | 76.02     | B  |   |
|  | GAb109 | 40~130  | 51.03     | C  |   |
|  | GAb110 | 40~130  | 38.43     | C  |   |
|  | GAb105 | 1~25    | 72.12     | A  |   |
|  | GAb106 | 7~30    | 70.8      | B  |   |
|  | GAb102 | 1~25    | 67.52     | A  |   |
|   |        |         |           |    |   |
|   |        |         |           |    |   |
|   |        |         |           |    |   |

[0182]

[0183] 리툽시맙과 비교하여, 결합 데이터는 항-CD20 GAb, 특히, GAb101 및 GAb104가 표적 분자 CD20에 대해 보다 강한



결합 친화성을 나타냄을 보여주었다.

- [0184] 이를 종합하면, 항-CD20 Gab는 리톡시맙과 비교하여 증진된 ADCC 활성 및 보다 강한 FcγRIIIa 결합 친화성을 나타낸다. 본 발명의 당항체는 단독으로 또는 2개의 이상의 항체를 포함하는 조성물에서 및 임의로 화학치료요법과 같은 다른 치료와 조합하여 보다 우수한 임상적 반응을 제공할 수 있다. ADCC-증진된 항-CD20 당항체는 B 세포 림프종 및 다른 질환에 대한 대안적 치료제를 제공할 수 있는 것으로 고려된다. 본 발명의 당항체는 유리하게 현재 투여 경로 및 현재 치료학적 용법을 변화시키기 위해 사용될 수 있는데 이들의 증가된 이펙터 기능은 이들이 보다 적은 농도로 및 덜한 빈도로 투여되어 항체 독성에 대한 잠재력 및/또는 항체 관용성의 발달을 감소시킬 수 있음을 의미한다. 추가로, 개선된 이펙터 기능은 재조합 숙주 시스템에서 생산된 상응하는 항-CD20 모노클로날 항체를 사용한 치료에 대해 이전에 내성이었거나 난치성이었던 임상적 징후를 치료할 새로운 방법을 수득케 한다.
- [0185] **항-CD20 Gab의 제조**
- [0186] 본 발명의 항-CD20 당항체는 시판되거나 임상전 또는 임상 개발 중에 있는 항-CD20 모노클로날 항체("모 항체")로부터 Fc 당가공에 의해 제조될 수 있다. 바람직하게, 모노클로날 항체는 치료학적 모노클로날 항체이다. Fc 당가공은 효소적으로 또는 화학효소적으로 수행될 수 있다. 바람직한 양태에서, 모 항체는 리톡시맙이다.
- [0187] 본 발명의 당항체에서 N-글리칸은 바람직하게 탈푸코실화된다.
- [0188] N-글리칸의 탈푸코실화는 Fc 도메인의 N-글리칸에서 코어 푸코스를 제거하기 위한 과정이다. 탈푸코실화는 효소적으로 사용될 수 있다. N-글리칸은 2개의 Fc 도메인 사이에 매립되어 있기 때문에, 효소적 탈코실화 효율은 입체적 장애로 인해 훨씬 낮고, 즉, 푸코시다제의 푸코스 잔기로의 접근은 Fc 도메인 부분에 의해 차단된다.
- [0189] 많은 α-푸코시다제는 당업계에 공지되어 있다. 이의 예는 터보 코르누투스(*Turbo cornutus*), 카로니아 람파스(*Charonia lampas*), 바실러스 풀미난스(*Bacillus fulminans*), 아스퍼질러스 나이거(*Aspergillus niger*), 클로스트리디움 퍼프린젠스(*Clostridium perfringens*), 소 신장(Glyko), 닭 간(문헌참조: Tyagarajan et al., 1996, Glycobiology 6:83-93) 기원의 α-푸코시다제 및 크산토모나스 마니호티스(*Xanthomonas manihotis*) (Glyko, PROzyme) 기원의 α-푸코시다제 II를 포함한다. 많은 다양한 푸코시다제는 또한 시판되고 있다(특히 Glyko, Novato, Calif.; PROzyme, San Leandro, Calif.; Calbiochem-Novabiochem Corp., San Diego, Calif.). 그러나, α-푸코시다제의 어떠한 것도 N-연결된 글리칸으로부터 코어 푸코스를 효율적으로 제거하는 것으로 공지되어 있지 않다.
- [0190] WO 2013/12066은 소 신장 기원의 α-푸코시다제에 의한 (Fuc α 1,6)GlcNAc-리톡시맙의 탈푸코실화를 보고하였다. WO 2013/12066에 기재된 바와 같이, (Fuc α 1, 6)GlcNAc-리톡시맙의 반응 혼합물은 (Fuc α 1,6)GlcNAc-리톡시맙에서 푸코스를 완전히 제거하기 위해 37℃에서 20일 동안 소 신장 (Prozyme으로부터 시판되는) 기원의 α-푸코시다제로 항온처리하였다.
- [0191] 면역글로불린의 열 불안정성이 보고되었다(문헌참조: Vermeer et al., Biophys J. Jan 78: 394-404 (2000)). Fab 단편은 열 처리에 가장 민감한 반면 Fc 단편은 감소된 pH에 가장 민감하다. 항체의 열 안정성 및 기능적 활성을 조사하기 위해, 본원 발명자는 WO 2013/12066에 기재된 바와 동일한 실험을 수행하였고, 상기 항체가 37℃에서 3일동안 열 처리 후 CD20에 대해 약 10%의 결합 친화성이 상실됨을 밝혔다. 추가로, 본원 발명자는 상기 항체가 37℃에서 7일 동안 열 처리 후 CD20에 대해 약 20%의 결합 친화성이 상실됨을 밝혔다. 상기 항체는 WO 2013/12066에 기재된 바와 같이 20일 동안 37℃에서와 같은 장기 열 처리 후 CD20에 대한 결합 친화성이 상당히 상실되는 것으로 고려된다.
- [0192] 개선된 치료학적 가치를 갖는 당항체를 합성할 시도로, 본원 발명자는 예상치 않게 박테로이데스 프라길리스(*Bacteroides fragilis*) α-푸코시다제(GenBank accession no. YP\_212855.1)가 N-연결된 글리칸으로부터 푸코스 잔기를 효율적으로 제거할 수 있음을 발견하였다. 효율적인 탈푸코실화는 특이적 효소를 사용하여 성공적으로 성취되었다. 중요하게, 본 발명의 당항체를 제조하는 효율은 도 1에 도시된 바와 같이 N-글리칸의 용이한 탈푸코실화를 생성시키는 특이적 α-푸코시다제의 사용으로 가치있게 개선되었다.
- [0193] 따라서, 본 발명은 α-푸코시다제의 조성물 및 상기 α-푸코시다제를 사용하여 N-글리칸의 코어 푸코스를 제거하기 위한 개선된 방법을 제공한다. α-푸코시다제는 서열번호 5의 서열과 적어도 80%, 85% 90%, 95%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드 또는 이의 변이체를 포함한다. 탈푸코실화의 개선된 방법은 항체를 α-푸코시다제와 접촉시킴을 포함하고, 여기서, α-푸코시다제는 서열번호 5의 서열과 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 98% 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드, 변이체 또는 이의 단편을

포함한다.

[0194] 본원에 기재된 것은 항-CD20 당항체를 제조하기 위한 개선된 방법을 포함하고, 상기 방법은 (a) 항-CD20 모노클로날 항체를  $\alpha$ -푸코시다제 및 적어도 하나의 엔도글리코시다제와 접촉시켜 단일 N-아세틸글루코사민(GlcNAc)를 갖는 탈푸코실화된 항체를 수득하는 단계 및 (b) 탄수화물 잔기를 적합한 조건하에서 GlcNAc에 첨가하는 단계를 포함한다.

[0195] 일부 양태에서, 본 발명의 방법에 따른 항-CD20 모노클로날 항체는 리톡시맙이다.

[0196] 엔도글리코시다제는 N-글리칸에서 올리고사카라이드의 가변 부분을 제단하기 위해 사용된다. 본원에 사용된 엔도글리코시다제의 예는 EndoA, EndoF, EndoF1, EndoF2, EndoF3, EndoH, EndoM, EndoS, EndoS2 및 이의 변이체를 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0197] 본 발명의 방법에 따른  $\alpha$ -푸코시다제는 서열번호 5의 서열과 적어도 85% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드, 이의 기능성 단편을 포함한다.

[0198] 일부 양태에서,  $\alpha$ -푸코시다제는 서열번호 5의 서열과 적어도 90% 또는 95% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드, 이의 변이체 또는 단편을 포함한다.

[0199] 특정 양태에서,  $\alpha$ -푸코시다제는 재조합 박테로이드  $\alpha$ -푸코시다제이다.

[0200] [표 6]

| 표 6  |
|--|
| <p>QQKYQPTEANLKARSEFQDNKFGIFLHWGLYAMLATGEWT<br/> MTNNNLNYKEYAKLAGGFYPSKFDADKWVAAIKASGAKYICFTTRHHEGFMSMFDTKYSDY<br/> NIVKATPFRDVKELADACAKHGKLFYSHIDWYREDAPQGRTRGRTPGNPKGDWK<br/> SYYQFMNNQLTELLTNYGPIGAIWFDGWWDQDINPDFDWELPEQYALIHRLQPACLVGNN<br/> HHQTPFAGEDIQIFERDLPAGENTAGLSGQSVSHLPLETCETMNGMWGYKITDQNYKSTKT<br/> LIHYLVKAAGKDANLLMNIGPQPDGELPEVAVQRLKEVGEWMSKYGETIYGTRGGLVAPH<br/> DWGVTQKGNKLYVHILNLQDKALFLPIVDKKVKKAVVFADKTPVRETKNKEGIVLELAK<br/> VPTDVDYVVELTID<br/> ( 서열번호 5 )</p> |

[0201]

[0202] 본 발명의 방법에서 단계 (a)는 단일 N-아세틸글루코사민 (GlcNAc)을 갖는 탈푸코실화된 항체를 유도한다. 트랜스글리코실라제를 사용하는 후속적 효소 매개된 당화는 지정된 탄수화물 모이어티를 GlcNAc에 부가하고 슈가 쇄를 연장하기 위해 수행된다. 따라서 당항체의 동종성 집단이 제조될 수 있다. 본원에 기재된 트랜스글리코실라제의 예는 EndoA, EndoF, EndoF1, EndoF2, Endo F3, EndoH, EndoM, EndoS, Endo S2 및 이의 변이체를 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0203] 일부 양태에서, 본 발명의 방법에 따른 탄수화물 모이어티는  $\text{Sia}_2(\alpha 2-6)\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ ,  $\text{Sia}_2(\alpha 2-6)\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_3\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ ,  $\text{Sia}_2(\alpha 2-3)\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ ,  $\text{Sia}_2(\alpha 2-3)\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_3\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ ,  $\text{Sia}_2(\alpha 2-3/\alpha 2-6)\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ ,  $\text{Sia}_2(\alpha 2-6/\alpha 2-3)\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ ,  $\text{Sia}_2(\alpha 2-3/\alpha 2-6)\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_3\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ ,  $\text{Sia}_2(\alpha 2-6/\alpha 2-3)\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_3\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ ,  $\text{Sia}(\alpha 2-6)\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ ,  $\text{Sia}(\alpha 2-3)\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ ,  $\text{Sia}(\alpha 2-6)\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_3\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ ,  $\text{Sia}(\alpha 2-3)\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_3\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ ,  $\text{Sia}(\alpha 2-6)\text{GalGlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ ,  $\text{Sia}(\alpha 2-3)\text{GalGlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ ,  $\text{Sia}(\alpha 2-6)\text{GalGlcNAc}_3\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ ,  $\text{Sia}(\alpha 2-3)\text{GalGlcNAc}_3\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ ,  $\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ ,  $\text{GalGlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ ,  $\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_3\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ ,  $\text{GalGlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ ,  $\text{GalGlcNAc}_3\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ ,  $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ ,  $\text{GlcNAc}_3\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ ,  $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ ,  $\text{GlcNAc}_3\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$  및  $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ 로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.

[0204] 바람직한 양태에서, 상기 탄수화물 모이어티는  $\text{Sia}_2(\alpha 2-6)\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ ,  $\text{Sia}_2(\alpha 2-6)\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_3\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ ,  $\text{Sia}_2(\alpha 2-3)\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ ,  $\text{Sia}_2(\alpha 2-3)\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_3\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ ,  $\text{Sia}_2(\alpha 2-3/\alpha 2-6)\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ ,  $\text{Sia}_2(\alpha 2-6/\alpha 2-3)\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ ,  $\text{Sia}_2(\alpha 2-3/\alpha 2-6)\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_3\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ ,  $\text{Sia}_2(\alpha 2-6/\alpha 2-3)\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_3\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ ,  $\text{Sia}(\alpha 2-6)\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ ,  $\text{Sia}(\alpha 2-3)\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ ,  $\text{Sia}(\alpha 2-6)\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_3\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ ,  $\text{Sia}(\alpha 2-3)\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_3\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ ,  $\text{Sia}(\alpha 2-6)\text{GalGlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ ,  $\text{Sia}(\alpha 2-3)\text{GalGlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ ,  $\text{Sia}(\alpha 2-6)\text{GalGlcNAc}_3\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ ,  $\text{Sia}(\alpha 2-3)\text{GalGlcNAc}_3\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ ,  $\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ ,  $\text{GalGlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ ,  $\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_3\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ ,  $\text{GalGlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ ,  $\text{GalGlcNAc}_3\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ ,  $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ ,  $\text{GlcNAc}_3\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ ,  $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$  및  $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ 로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.



6)Gal<sub>2</sub>GlcNAc<sub>3</sub>Man<sub>3</sub>GlcNAc<sub>2</sub>, Sia<sub>2</sub>( α 2-6/ α 2-3)Gal<sub>2</sub>GlcNAc<sub>3</sub>Man<sub>3</sub>GlcNAc<sub>2</sub>, Sia( α 2-6)Gal<sub>2</sub>GlcNAc<sub>2</sub>Man<sub>3</sub>GlcNAc<sub>2</sub>, Sia( α 2-3)Gal<sub>2</sub>GlcNAc<sub>2</sub>Man<sub>3</sub>GlcNAc<sub>2</sub>, Sia( α 2-6)Gal<sub>2</sub>GlcNAc<sub>3</sub>Man<sub>3</sub>GlcNAc<sub>2</sub>, Sia( α 2-3)Gal<sub>2</sub>GlcNAc<sub>3</sub>Man<sub>3</sub>GlcNAc<sub>2</sub>, Sia( α 2-6)GalGlcNAc<sub>2</sub>Man<sub>3</sub>GlcNAc<sub>2</sub>, Sia( α 2-3)GalGlcNAc<sub>2</sub>Man<sub>3</sub>GlcNAc<sub>2</sub>, Sia( α 2-6)GalGlcNAc<sub>3</sub>Man<sub>3</sub>GlcNAc<sub>2</sub>, Sia( α 2-3)GalGlcNAc<sub>3</sub>Man<sub>3</sub>GlcNAc<sub>2</sub>, Gal<sub>2</sub>GlcNAc<sub>2</sub>Man<sub>3</sub>GlcNAc<sub>2</sub>, GalGlcNAcMan<sub>3</sub>GlcNAc<sub>2</sub> 및 Gal<sub>2</sub>GlcNAc<sub>3</sub>Man<sub>3</sub>GlcNAc<sub>2</sub>로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.

[0205] 본 발명의 방법에서 단계 (b)는 슈가쇄 연장을 유도한다. 슈가쇄 연장을 위한 한가지 방법은 효소 촉매된 당화 반응을 통해서이다. 효소 촉매된 당화 반응 중에서 슈가 공여자로서의 슈가 옥사졸린을 사용하는 당화가 올리고사카라이드를 합성하기 위해 유용한 것으로 널리 공지되어 있는데 이는 당화 반응이 첨가 반응이고 임의의 동반 산, 물 등의 제거 없이 진행하기 때문이다(문헌참조: Fujita, et al., *Biochim. Biophys. Acta* 2001, 1528, 9-14).

[0206] 일부 양태에서, 탄수화물 잔기는 슈가 옥사졸린이다.

[0207] 적합한 조건은 또한 적어도 20분, 30분, 40분, 50분, 60분, 70분, 80분, 90분 또는 100분, 바람직하게는 60분 미만 동안 반응 혼합물의 항온처리를 포함한다. 항온처리는 바람직하게 실온에서, 보다 바람직하게 대략적으로 20℃, 25℃, 30℃, 35℃, 40℃ 또는 45℃, 및 가장 바람직하게 대략 37℃에서 수행한다.

[0208] 본 발명의 α-푸코시다제의 폴리펩타이드는 이들의 단리 또는 정제와 함께 보조를 위해 유도체화되거나 변형될 수 있다. 따라서, 본 발명의 하나의 양태에서, 본 발명에 사용하기 위한 폴리펩타이드는 분리 수단에 직접적으로 및 특이적으로 결합할 수 있는 리간드의 첨가에 의해 유도체화되거나 변형된다. 대안적으로, 폴리펩타이드는 결합 쌍 중 하나의 구성원의 첨가에 의해 유도체화되거나 변형되고 분리 수단은 결합 쌍의 다른 구성원의 첨가에 의해 유도체화되거나 변형된 시약을 포함한다. 임의의 적합한 결합 쌍이 사용될 수 있다. 본 발명에 사용하기 위한 폴리펩타이드가 결합 쌍의 하나의 구성원의 첨가에 의해 유도체화되거나 변형된 바람직한 양태에서, 상기 폴리펩타이드는 바람직하게 히스티딘 태그되거나 비오틴 태그된다. 전형적으로, 히스티딘 또는 비오틴 태그의 아미노산 암호화 서열은 유전자 수준에서 포함되고 단백질은 이. 콜라이에서 재조합적으로 발현된다. 상기 히스티딘 또는 비오틴 태그는 전형적으로 폴리펩타이드의 하나의 말단, N-말단 또는 C-말단에 존재한다. 상기 히스티딘 태그는 전형적으로 6개의 히스티딘 잔기로 이루어지지만 이는 이보다 더 길 수 있고, 전형적으로 7, 8, 9, 10 또는 20개의 아미노산 또는 보다 짧은 예를 들어, 5, 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산일 수 있다. 추가로, 히스티딘 태그는 하나 이상의 아미노산 치환, 바람직하게는 상기 정의된 바와 같은 보존성 치환을 함유할 수 있다.

[0209] 본원에 기재된 바와 같은 변이체 폴리펩타이드는 아미노산 서열이 서열번호 5의 서열과는 상이하지만 서열번호 5의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드를 포함하는 효소와 동일한 또는 유사한 기능을 나타내는 폴리펩타이드이다.

[0210] 서열과 관련하여 본원에 사용된 바와 같은 퍼센트(%) 서열 동일성은 서열을 정렬하고 필요하다면 최대 % 서열 동일성을 성취하기 위해 갭을 도입한 후 참조 폴리펩타이드 서열내 아미노산 잔기와 동일한 후보 폴리펩타이드 서열 중 아미노산 잔기의 %로서 정의된다. % 서열 동일성을 결정하기 위한 정렬은 예를 들어, 대중에게 가용한 컴퓨터 소프트웨어, 예를 들어, BLAST, ALIGN 또는 Megalign (DNASTAR) 소프트웨어를 사용하여 당업계 기술에서 다양한 방식으로 성취될 수 있다. 당업자는 비교되는 서열의 전장 상에 최대 정렬을 성취하기 위해 요구되는 임의의 알고리즘을 포함하는, 정렬을 측정하기 위해 적당한 파라미터를 결정할 수 있다.

[0211] 본 발명의 일부 바람직한 양태는 실시예에서 입증된다.

[0212] 비-인간 항체를 인간화하기 위한 방법은 당업계에 널리 공지되어 있다. 일반적으로, 인간화된 항체는 비-인간인 공급원으로부터 여기에 도입된 하나 이상의 아미노산 잔기들을 갖는다. 이들 비-인간 아미노산 잔기들은 전형적으로 "임포트" 가변 도메인으로부터 취해진 "임포트" 잔기들을 언급한다. 인간화는 필수적으로 설치류 CDR 또는 CDR 서열을 인간 항체의 상응하는 서열로 치환함에 의해 문헌(참조: 윈터 및 공동 연구자(Winter and co-workers) (Jones et al., *Nature*, 321:522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature*, 332:323-327 (1988); Verhoeyen et al., *Science*, 239:1534-1536 (1988))의 방법 후 수행될 수 있다. 따라서, 상기 "인간화된" 항체는 키메라 항체(미국 특허 제4,816,567호)이고, 여기서, 온전한 인간 가변 도메인 보다 실질적으로 적은 부분이 비-인간 중 기원의 상응하는 서열에 의해 치환된다. 실제로, 인간화된 항체는 전형적으로 인간 항체이고, 여기서, 일부 CDR 잔기들 및 능히 일부 FR 잔기들은 설치류 항체에서 유사 부위 기원의 잔기로 치환되어 있다.

[0213] 인간화된 항체를 제조하는데 사용되는 경쇄 및 중쇄 둘다의 인간 가변 도메인의 선택은 항원성을 감소시키기 위

해 매우 중요하다. 소위 "최상의-피트" 방법에 따라, 설치류 항체의 가변 도메인의 서열은 공지된 인간 가변-도메인 서열의 전체 라이브러리에 대하여 스크리닝한다. 설치류의 서열과 가장 유사한 인간 서열은 이어서 인간화된 항체에 대한 인간 골격(FR)으로서 수용된다(문헌참조: Sims et al., J. Immunol., 151:2296 (1993); Chothia et al., J. Mol. Biol., 196:901 (1987)). 또 다른 방법은 경쇄 또는 중쇄의 특정 서브그룹의 모든 인간 항체의 컨센서스 서열로부터 유래된 특정 골격을 사용한다. 동일한 골격은 여러 상이한 인간화된 항체를 위해 사용될 수 있다(문헌참조: Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285 (1992); Presta et al., J. Immunol., 151:2623 (1993)).

[0214] 추가로 항체는 항원에 대한 고친화성 및 다른 선호하는 생물학적 성질을 갖도록 인간화되는 것이 중요하다. 바람직한 방법에 따라 상기 목적을 성취하기 위해, 인간화된 항체는 모 서열 및 인간화된 서열의 3차원 모델을 사용하여 모 서열 및 다양한 개념적 인간화된 생성물의 분석 과정에 의해 제조된다. 3차원 면역글로불린 모델인 통상적으로 가용하고 당업자에게 친숙하다. 선택된 후보 면역글로불린 서열의 가능한 3차원 형태적 구조를 도시하고 디스플레이하는 컴퓨터 프로그램이 가용하다. 이들 디스플레이의 조사는 후보 면역글로불린 서열의 기능에서 잔기의 가능한 역할에 대한 분석, 즉 후보 면역글로불린이 이의 항원에 결합할 능력에 영향을 주는 잔기들의 분석을 가능하게 한다. 상기 방식으로, FR 잔기들은 수용자 및 임포트 서열로부터 선택되고 조합되어 표적 항원(들)에 대해 증가된 친화성과 같은 목적하는 항체 특징이 성취되도록 할 수 있다. 일반적으로, CDR 잔기들은 직접적으로 및 가장 실질적으로 항원 결합에 영향을 주는데 관여한다.

[0215] 또한, 현재 면역화시 내인성 면역글로불린 생산 부재하에 인간 항체의 완전한 레퍼토리를 생성할 수 있는 유전자원이 동물(예를 들어, 마우스)을 제조할 수 있다. 예를 들어, 키메라 및 생식선 돌연변이체 마우스에서 항체 중쇄 연결 영역(JH) 유전자의 결실은 내인성 항체 생산을 완전히 억제한다. 상기 생식선 돌연변이체 마우스에서 인간 생식선 면역글로불린 유전자 어레이의 전달은 항원 챌린지시 인간 항체를 생성시킨다. 예를 들어, 문헌 [Jakobovits et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:2551 (1993); Jakobovits et al., Nature, 362:255-258 (1993); Bruggermann et al., Year in Immunol., 7:33 (1993). Human antibodies can also be derived from phage-display libraries (Hoogenboom et al., J. Mol. Biol., 227:381 (1991); Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991))]을 참조한다.

[0216] **항-HER2 당항체(항-HER2 GAb)**

[0217] HER2 유전자는 유방암의 대략 30%에서 과발현되거나 증폭된다. HER2 과발현 또는 증폭을 갖는 유방암 환자는 질 환-부재 및 전체 생존을 단축시켰다. HER2 단백질은 HER2 유전자를 과발현하는 암의 항체의 치료요법에 대해 고 유하고 유용한 표적인 것으로 사료된다. 모노클로날 항체 항-HER2, 트라스투주맵 (Herceptin®)은 HER2 과발현 유방암의 치료를 위해 1998년에 FDA에 의해 승인된, 상기 표적에 관한 악성 암에 대한 치료요법에 성공적으로 사용되어 왔다. 제한된 유방암을 포함하지만 이에 제한되지 않는, HER2를 발현하는 세포가 관여하는 범위의 질환을 예방하고/하거나 치료하는데 보다 효과적인 HER2에 대해 개선된 치료학적 항체가 여전히 요구된다.

[0218] 본원의 개시내용은 "항-HER2 당항체" ("항-HER2 GAb")로 호칭되는 신규 부류의 항-HER2 항체를 특징으로 한다. 항-HER2 당항체는 Fc 당가공에 의해 항-HER2 모노클로날 항체로부터 생성될 수 있다. 동종성 집단을 포함하는 개별 항-HER2 당항체는 동일하고 잘-한정된 글리칸 구조 및 서열을 갖는 동일한 Fc 글리칸을 함유한다. 본 발명에 따른 항-HER2 GAb는 이의 모 항체와 동일한 인간 HER2 항원의 에피토프에 특이적으로 결합한다.

[0219] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "모 항체"는 항-HER2 당항체를 제조하기 위해 사용되는 항-HER2 모노클로날 항체를 언급한다.

[0220] 모 항체는 포유동물 세포 배양, 피키아 파스토리스(*Pichia pastoris*) 또는 곤충 세포주와 같은 세포 배양에 의해 수득될 수 있다. 바람직하게, 상기 모 항체는 포유동물 세포 배양에서 제조된다. 모 항체는 FDA 승인되거나 개발 중에 있는 것일 수 있다. FDA 승인된 항-HER2 치료학적 항체는 트라스투주맵(헤르셉틴), 라파티니브(티케르브), 페르투주맵(페리엠타), 아도-트라스투주맵 엠탄신(카드실라, Genentech)을 포함한다.

[0221] 일부 양태에서, 본원에 기재된 항-HER2 GAb는 서열번호 3에 제시된 아미노산 서열을 갖는 중쇄 및 서열번호 4에 제시된 아미노산 서열을 갖는 경쇄를 포함한다. 바람직한 양태에서, 항-HER2 GAb는 트라스투주맵의 경쇄 서열 및 중쇄 서열을 포함한다.

[0222] 하기 표 7은 트라스투주맵의 중쇄 및 경쇄 서열을 보여준다.

[0223] [표 7]

| 표 7   |
|---|
| <p>트라스투주맵</p> <p>승인 번호 : DB00072</p> <p>Source: <a href="http://www.drugbank.ca/drugs/DB00072">http://www.drugbank.ca/drugs/DB00072</a></p>   |
| <p>&gt; 트라스투주맵 경쇄에 대한 아미노산 서열</p> <p>DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPK<br/>         LLIYSASFLYSGVPSRFSGRSGTDFTLTISSLOPEDEATYYCQQ<br/>         HYTTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL<br/>         LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLT<br/>         LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</p> <p>(서열번호 12)</p> <p>&gt; 트라스투주맵 중쇄에 대한 아미노산 서열</p> <p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTNIDYIHWVRQAPGKGL<br/>         EWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAED<br/>         TAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSS<br/>         KSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS<br/>         GLYSLSSSVTVPPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDK<br/>         THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDS<br/>         HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD<br/>         WLNKGKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE<br/>         EMTKNQVSLTCLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDG<br/>         SFFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSFCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p> <p>(서열번호 11)</p> |

[0224]

[0225] Fc 상의 당화는 ADCC, CDC 및 순환 반감기를 포함하는, 다양한 면역글로불린 이펙터 매개된 기능에 영향을 미칠 수 있다. ADCC 증진은 치료학적 항체 약물 효능을 개선시키기 위한 주요 전략이다. 보다 낮은 약물 비용의 이득을 위해 효과적인 약물 용량을 저하시키는 잠재력을 갖는다. 본원에 기재된 항-HER2 당항체는 기능적 성질에 의해 특징 분석될 수 있다. 항-HER2 GAb는 인간 HER2 발현 세포에 대한 아포토시스를 포함하는 세포 성장 억제 활성을 갖는다. 일부 양태에서, 항-HER2 GAb는 이의 모 항체와 비교하여 보다 강력한 세포 성장 억제 활성을 나타낸다.

[0226] 본 발명에 따른 당항체의 ADCC 활성은 모 항체의 ADCC 활성과 비교하여 적어도 3배 증가된, 바람직하게 적어도 9배 증가된, 보다 바람직하게 적어도 10배 증가된 ADCC 활성, 바람직하게 적어도 12배 증가된 ADCC 활성, 바람직하게 적어도 20배 증가된 ADCC 활성, 가장 바람직하게는 적어도 30배 증가된 ADCC 활성이다.

[0227] 본 발명의 당항체의 ADCC 용해 활성은 표적 암 세포주, 예를 들어, SKBR5, SKBR3, LoVo, MCF7, OVCAR3 및/또는 Kato III를 사용하여, 모 항체와 대비하여 측정될 수 있다.

[0228] 표 8은 트라스투주맵과 비교하여 항-HER2 GAb의 예시적 증진된 ADCC 활성을 열거한다. 예시적인 검정은 실시예에 기재되어 있다.

[0229] [표 8]

| 항-HER2       | 트라스투주맵 | GAb101 | GAb104 | GAb105 | GAb107 | GAb108 | GAb111 |
|--------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| ADCC<br>(배수) | 1      | >30    | >30    | 20~30  | >10    | 5~10   | 1~5    |

[0230]

[0231] 본원에 기재된 다수의 항-HER2 GAb, 특히, GAb101 및 GAb104는 이의 모 항체, 리툭시맵과 비교하여 증진된 ADCC 활성을 나타낸다. 본 발명의 당항체가 HER2-양성 질환에 대한 치료학적 제제로서 우수한 효과를 나타낼 수 있는 것으로 고려되고 본 발명의 목적은 치료학적 제제의 개발에서 항-HER2 GAb를 사용하는 것이다.

[0232] 본원에 기재된 당항체는 놀랍게도 CDC에 영향을 주는 것 없이 개선된 ADCC를 제공할 수 있다. 예시적 CDC 검정은 실시예에 기재되어 있다. 예시적 양태에서, 당항체의 ADCC는 증가되지만 보체-의존성 세포독성(CDC)과 같은 다른 면역글로불린형 이펙터 기능은 유사하게 유지되거나 유의적으로 영향받지 않는다.

[0233] 표 9는 항-HER2 GAb 및 헤르셉틴의 예시적 Fc  $\gamma$ RIIIa 결합을 열거한다.

[0234] [표 9]

| 샘플   | KD (M) | Rmax (RU) | 배수   |
|------|--------|-----------|------|
| 헤르셉틴 | 80~200 | 30.01     | 1-배  |
| 101  | 1~25   | 44.98     | >10X |
| 104  | 1~25   | 55.68     | >10X |
| 111  | 35~100 | 41.54     | 1~5X |
| 108  | 25~100 | 53.98     | 1~5X |

[0235]

|     |        |       |       |
|-----|--------|-------|-------|
| 107 | 20~90  | 39.88 | 3~10X |
| 109 | 25~80  | 48.19 | 2~10X |
| 110 | 70~150 | 18.15 | 1~5X  |
| 106 | 25~80  | 52.82 | 1~10X |
| 103 | 15~70  | 59.89 | 4~10X |
| 117 | 1~50   | 26.95 | 1~5X  |

[0236]

[0237] Fc  $\gamma$ RIIIa 결합은 당업계에서 공지된 검정을 사용하여 측정될 수 있다. 예시적 검정은 실시예에서 기재되어 있다. Fc 수용체 결합은 항-HER2 GAb 대 트라스투주맙의 상대적 비율로서 결정될 수 있다. 예시적 양태에서 Fc 수용체 결합은 적어도 2.5-배, 3-배, 4-배, 5-배, 6-배, 7-배, 8-배, 9-배, 10-배, 15-배 또는 20-배, 30-배, 40-배, 50-배 이상 증가된다.

[0238] 트라스투주맙과 비교하여, 상기 결합 데이터는 항-HER2 GAb, 특히 GAb101 및 GAb104가 표적 분자 HER2에 대해 보다 강한 결합 친화성을 나타냄을 보여주었다.

[0239] 종합해 보면, 항-HER2 GAb, 특히 GAb101 및 GAb104는 트라스투주맙과 비교하여 증진된 ADCC 활성 및 보다 강한 Fc  $\gamma$ RIIIa 결합 친화성을 나타낸다. 본 발명의 당향체가 단독으로 또는 2개 이상의 상기 항체를 포함하는 조성물에서 및 임의로 화학치료요법과 같은 다른 치료와 조합되어 우수한 임상적 반응을 제공할 수 있는 것으로 고려된다. ADCC-증진된 항-HER2 당향체가 HER2 양성 질환에 대한 대안적 치료제를 제공할 수 있는 것으로 고려된다. 본 발명의 당향체는 현재 투여 경로 및 현재 치료학적 용법을 변형시키기 위해 사용될 수 있고 이들의 증가된 이펙터 기능은 이들이 보다 낮은 농도 및 덜한 빈도로 투여되어 항체 독성 및/또는 항체 관용성의 발달에 대한 잠재력을 감소시킬 수 있음을 의미한다. 추가로, 이들의 개선된 이펙터 기능은 제조합 숙주 시스템에서 제조된 상응하는 항-HER2 모노클로날 항체를 사용한 치료에 내성이거나 불응성인 임상적 징후를 치료하기 위한 새로운 방법을 수득케 한다.

[0240] 본 발명의 항-HER2 당향체는 시판되거나 임상전 또는 임상적 개발 중에 있는 항-HER2 모노클로날 항체("모향체")로부터 Fc 당가공에 의해 제조될 수 있다. 바람직하게, 모노클로날 항체는 치료학적 모노클로날 항체이다. Fc 당가공은 효소적으로 또는 화학효소적으로 수행될 수 있다 바람직한 양태에서, 모향체는 트라스



투주맙이다.

[0241] 본 발명의 당항체에서 N-글리칸은 바람직하게 탈푸코실화된다.

[0242] 항-HER2 당항체를 제조하기 위한 방법은 항-CD20 당항체를 제조하기 위해 본원에 기재된 방법과 유사하다. 간략하게, 상기 방법은 (a) 항-HER2 모노클로날 항체를 α-푸코시다제 및 적어도 하나의 엔도글리코시다제와 접촉시켜 단일 N-아세틸글루코사민 (GlcNAc)을 갖는 탈푸코실화된 항체를 수득하는 단계 및 (b) 목적하는 탄수화물 모이어티를 적합한 조건하에서 GlcNAc로 첨가하는 단계를 포함한다.

[0243] 바람직한 양태에서, 탄수화물 모이어티는  $\text{Sia}_2(\alpha 2-6)\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}$ 이다.

[0244] **(II) 자가면역 및/또는 염증에 대한 당항체**

[0245] 본원에 기재된 당항체는 자가면역 및/또는 염증을 치료하기 위해 유용할 수 있다. 자가면역 및 염증을 위해 예시적인 모노클로날 항체는 나탈리주맙(티사브리; Biogen Idec/Elan), 베돌리주맙(MLN2; Millennium Pharmaceuticals/Takeda), 벨리루맙(벤리스타(Benlysta); Human Genome Sciences/ GlaxoSmithKline), 아타시셉트 (TACI-Ig; Merck/Serono), 알레파셉트 (아메비베(Amevive); Astellas), 오텔릭시주맙(TRX4; Tolerx/GlaxoSmithKline), 테플리주맙(MGA031; MacroGenics/Eli Lilly), 리툽시맙 (리툽산/마브테라(Rituxan/Mabthera); Genentech/Roche/Biogen Idec), 오파투무맙(아제라(Arzerra); Genmab/GlaxoSmithKline), 오크렐리주맙(2H7; Genentech/Roche/Biogen Idec), 에프라투주맙(hLL2; Immunomedics/UCB), 알렘투주맙(Campath/MabCampath; Genzyme/Bayer), 아바타셉트(오렌시아(Orencia); Bristol-Myers Squibb), 에쿨리주맙(솔리리스(Soliris); Alexion pharmaceuticals), 오말리주맙 (솔라이르; Genentech/Roche/Novartis), 카나키누맙(일라리스(Ilaris); Novartis), 메폴리주맙(Bosatria; GlaxoSmithKline), 레슬리주맙 (SCH55700; Ception Therapeutics), 토실리주맙(악템라/로악템라(Actemra/RoActemra); Chugai/Roche), 우스테키누맙(Ustekinumab) (스텔라라(Stelara); 쉐نت코르(Centocor)), 브리아키누맙(Briakinumab) (ABT-874; Abbott), 에타너셉트(Enbrel; Amgen/Pfizer), 인플릭시맙(레미카데(Remicade); Centocor/Merck), 아달리루맙(Adalimumab)(휴미라/트루텍사(Humira/Trudexa); Abbott), 세르톨리주맙 페골(Certolizumab pegol) (심지아(Cimzia); UCB), 및 콜리루맙 (심포니(Simponi); 쉐نت코르(Centocor))을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0246] **항-TNF α 당항체(항-TNF α Gab)**

[0247] 단핵구 및 마크로파아지는 내독소 또는 다른 자극에 응답하여 종양 괴사 인자-α (TNF α) 및 종양 괴사 인자-β (TNF β)로서 공지된 사이토킨을 분비한다. TNF α는 17kD 단백질 서브유니트의 가용성 동중삼량체이다(문헌참조: Smith, et al., J. Biol. Chem. 262:6951-6954 (1987)). TNF의 막 결합된 26 kD 전구체 형태가 또한 존재한다(문헌참조: Kriegler, et al., Cell 53:45-53 (1988)). TNF-α는 순수 면역력의 주요 조절인자인, 염증 반응의 강력한 유도인자이고 세포내 세균 및 특정 바이러스 감염에 대해 Th1 면역 반응의 조절에 중요한 역할을 수행한다. 그러나, 탈조절된 TNF는 또한 수많은 병리학적 상황에 기여할 수 있다. 이들은 류마티스 관절염, 크론 질환, 건선 관절염, 강직성 척추염, 궤양성 대장염 및 중증 만성 플라크 건선을 포함하는 면역 매개된 염증 질환(IMID)을 포함한다.

[0248] 본원의 개시내용은 "항-TNF α 당항체" ("항-TNF α Gab")로 호칭되는 신규 부류의 항-TNF α 모노클로날 항체를 특징으로 한다. 항-TNF α 당항체는 Fc 당가공에 의해 항-TNF α 모노클로날 항체("모 항체")로부터 제조될 수 있다. 본원에 사용된 바와 같은 용어 "모 항체"는 항-TNF α 당항체를 제조하기 위해 사용되는 항-TNF α 모노클로날 항체를 언급한다. 동중성 집단을 포함하는 개별 항-TNF α 당항체는 동일하고 잘-한정된 글리칸 구조 및 서열을 갖는 동일한 Fc 글리칸을 함유한다. 본 발명의 항-TNF α 당항체는 이의 모 항체가 결합하는 인간 TNF α 항원의 동일한 에피토프에 결합할 수 있다.

[0249] 모 항체는 포유동물 세포, 피키아 파스토리스 또는 곤충 세포와 같은 세포에서 생산될 수 있다. 바람직하게, 모 항체는 포유동물 세포에서 생산된다. 모 항체는 FDA 승인되거나 개발 중인 것일 수 있다. 승인되거나 개발 중인 항-TNF α 모노클로날 항체는 인플릭시맙, 아달리루맙, 콜리루맙, CDP870 (세르톨리주맙), TNF-TeAb 및 CDP571을 포함한다.

[0250] 본 발명의 항-TNF α 당항체는 서열번호 1에 제시된 아미노산 서열을 갖는 중쇄 및 서열번호 2에 제시된 아미노산 서열을 갖는 경쇄를 포함할 수 있다. 본 발명의 항-TNF α 당항체는 아달리루맙 Adalimumab (Humira®)의 경쇄 서열 및 중쇄 서열을 포함할 수 있다.

[0251] 하기 표 10은 아달리루맙의 중쇄 서열 및 경쇄 서열을 보여준다.

[0252] [표 10]

| 표 10   |
|--|
| <p>아달리무맙<br/>                 승인 번호 : DB00051<br/>                 Source: <a href="http://www.drugbank.ca/drugs/DB00051">http://www.drugbank.ca/drugs/DB00051</a></p>   |
| <p>&gt; 경쇄 :<br/>                 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAASLTQSGVPS<br/>                 RFGSGSGTDFTLTISSLPEDVATYYCQRYNRAPYTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPP<br/>                 SDEQLKSGTASVVCLLNFFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTLSSTLT<br/>                 LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC<br/>                 KSFNRGEC<br/>                 (서열번호 22)</p> <p>&gt; 중쇄 :<br/>                 EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSAITWNSGHIDY<br/>                 ADSVEGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVSYLSTASSLDYWGQGLTVTS<br/>                 SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS<br/>                 SGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC<br/>                 (서열번호 21)</p> |

[0253]

[0254] 본 발명의 항-TNF α 당항체는 항-TNF α 모노클로날 항체("모 항체")로부터 Fc 당가공에 의해 제조될 수 있다. 일부 양태에서, 모 항체는 아달리무맙(Humira®)이다.

[0255] 항-TNF α 당항체를 제조하는 방법은 항-CD20 당항체를 제조하기 위해 본원에 기재된 방법과 유사하다. 간략하게, (a) 항-TNF α 모노클로날 항체를 α-푸코시다제 및 하나 이상의 엔도글리코시다제와 접촉시켜 단일 N-아세틸글루코사민 (GlcNAc)을 갖는 탈푸코실화된 항체를 수득하는 단계 및 (b) 목적하는 탄수화물 모이어티를 적합한 조건하에서 GlcNAc에 첨가하는 단계를 포함한다.

[0256] 바람직한 양태에서, 상기 탄수화물 모이어티는 Sia<sub>2</sub>(α2-6)Gal<sub>2</sub>GlcNAc<sub>2</sub>Man<sub>3</sub>GlcNAc이다.

### [0257] (III) 감염성 질환에 대한 당항체

[0258] 일부 양태에서, 본원에 기재된 당항체는 감염성 질환을 치료하기 위해 유용하다.

[0259] 감염성 질환에 대한 예시적인 모노클로날 항체는 항-에볼라 항체, 예를 들어, MB-003 (c13C6, h13F6 및 c6D8), ZMab (m1H3, m2G4 및 m4G7) 및 ZMapp (c13C6, c2G4, c4G7), 항-HIV 항체, 예를 들어, VRC01, VRC02, VRC03, VRC06, b12, HJ16, 8ANC131, 8ANC134, CH103, NIH45, NIH46, NIH45G54W, NIH46G54W, 3BNC117, 3BNC60, VRC-PG04, 1NC9, 12A12, 12A21, VRC23, PG9, PGT145, PGDM1400, PG16, 2G12, PGT121, PGT128, PGT135, 4E10, 10E8, Z13 및 2F5, 및 항-인플루엔자 항체, 예를 들어, C179, CR6261, F10, FI6, CR8020, CH65, C05, TCN-032, D005, CR9114 및 S139/1을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

### [0260] 항-바이러스 당항체

[0261] 일부 양태에서, 본원의 개시내용은 신규 부류의 당가공된 FI6 모노클로날 항체를 특징으로 한다. FI6 모노클로날 항체는 항-인플루엔자 A 바이러스 항체를 중화시킨다. 상기 중화 항체는 인플루엔자 A 바이러스에 응답한다. 항체의 중쇄 및 경쇄의 아미노산 서열은 PCT 공보 WO 2013011347에 기재된 것들과 같다.

[0262] FI6 당항체를 제조하기 위한 방법은 항-CD20 당항체를 제조하기 위해 본원에 기재된 방법과 유사하다. 간략하게, 상기 방법은 (a) FI6 모노클로날 항체를 α-푸코시다제 및 적어도 하나의 엔도글리코시다제와 접촉시켜 단일의 N-아세틸글루코사민(GlcNAc)을 갖는 탈푸코실화된 항체를 수득하는 단계 및 (b) 목적하는 탄수화물 잔기를 적합한 조건하에서 GlcNAc에 첨가하는 단계를 포함한다.

[0263] 바람직한 양태에서, 탄수화물 잔기는 Sia<sub>2</sub>(α2-6)Gal<sub>2</sub>GlcNAc<sub>2</sub>Man<sub>3</sub>GlcNAc이다.

### [0264] 약제학적 조성물

[0265] 본원의 개시내용에 따른 약제학적 조성물은 치료제에 사용될 수 있다. 예를 들어, 약제학적 조성물은 질환, 장

에 또는 감염과 관련된 하나 이상의 증상(여기서,  $Fc\gamma R$ 에 의해 매개된 이펙터 세포 기능(예를 들어, ADCC)의 증진된 효능이 요망된다), 예를 들어, 암, 자가면역, 및 감염성 질환을 예방하거나, 치료하거나 완화시키기 위해 및 이의 효과가 ADCC에 의해 매개되는 치료학적 항체의 치료학적 효능을 증진시키는데 사용될 수 있다.

[0266] 본원에 기재된 바와 같은 항체의 제조 후, "동결건조 전 제형"이 제조될 수 있다. 제형을 제조하기 위한 항체는 바람직하게 필수적으로 순수하고 바람직하게 필수적으로 균질하다(즉 오염 단백질 등이 없다). "필수적으로 순수한" 단백질은 조성물의 총 중량을 기준으로 적어도 약 90중량%의 단백질, 바람직하게 적어도 약 95중량%를 포함하는 조성물을 의미한다. "필수적으로 동중성" 단백질은 조성물의 총 중량을 기준으로 적어도 약 99중량%의 단백질을 포함하는 조성물을 의미한다. 특정 양태에서, 상기 단백질은 항체이다.

[0267] 동결건조 전 제형에서 항체의 양은 목적하는 투여 용량, 투여 방식 등을 고려하여 결정된다. 선택된 단백질이 온전한 항체(전장 항체)인 경우, 약 2 mg/mL 내지 약 50 mg/mL, 바람직하게 약 5 mg/mL 내지 약 40 mg/mL 및 가장 바람직하게 약 20-30 mg/mL은 예시적 출발 단백질 농도이다. 상기 단백질은 일반적으로 용액 중에 존재한다. 예를 들어, 상기 단백질은 약 4 내지 8의 pH 및 바람직하게 약 5 내지 7의 pH에서 pH-완충된 용액 중에 존재할 수 있다. 예시적인 완충액은 히스티딘, 포스페이트, 트리스, 시트레이트, 숙시네이트 및 다른 유기산을 포함한다. 완충제 농도는 예를 들어, 제형(예를 들어, 재구성된 제형의)의 완충제 및 목적하는 등장성에 의존하여 약 1 mM 내지 약 20 mM, 또는 약 3 mM 내지 약 15 mM일 수 있다. 바람직한 완충제는 하기 입증된 바와 같이, 이것은 동결보호 성질을 가질 수 있다는 점에서 히스티딘이다. 숙시네이트는 또 다른 유용한 것으로 나타났다.

[0268] 동결보호제는 동결건조 전 제형에 첨가한다. 바람직한 양태에서, 동결보호제는 슈크로스 또는 트레할로스와 같은 비-환원 슈가이다. 동결건조 전 제형 중에 동결보호제의 양은 일반적으로 재구성시 수득한 제형이 등장성이라도록 하는 것이다. 그러나, 고장성의 재구성된 제형이 또한 적합할 수 있다. 추가로, 동결보호제의 양은 허용되지 않은 양의 단백질의 분해/응집이 동결건조시 일어나도록 너무 낮지 말아야 한다. 동결보호제가 슈가(예를 들어, 슈크로스 또는 트레할로스)이고 상기 단백질이 항체인 경우, 동결건조 전 제형 중에 예시적 동결보호제 농도는 약 10 mM 내지 약 400 mM, 및 바람직하게 약 30 mM 내지 약 300 mM, 및 가장 바람직하게 약 50 mM 내지 약 100 mM이다.

[0269] 단백질 대 동결보호제의 비율은 각각의 단백질 및 동결보호제 조합을 위해 선택된다. 항체가 선택된 단백질이고 슈가(예를 들어, 슈크로스 또는 트레할로스)가 높은 단백질 농도를 갖는 등장성 재구성된 제형을 생성하기 위해 동결보호제인 경우, 동결보호제 대 항체의 몰비는 약 100 내지 약 1500몰의 동결보호제 대 1몰 항체 및 바람직하게, 약 200 내지 약 1000몰의 동결보호제 대 1몰 항체, 예를 들어, 약 200 내지 약 600몰의 동결보호제 대 1몰 항체일 수 있다.

[0270] 본 발명의 바람직한 양태에서, 동결건조 전 제형에 계면활성제를 첨가하는 것이 요망되는 것으로 밝혀졌다. 대안적으로, 또는 추가로, 상기 계면활성제는 동결건조된 제형 및/또는 재구성된 제형에 첨가될 수 있다. 예시적인 계면활성제는 폴리스อร์베이트(예를 들어, 폴리스อร์베이트 20 또는 80); 폴록사머(예를 들어, 폴록사머 188); 트리톤; 나트륨 도데실 설페이트 (SDS); 나트륨 라우릴 설페이트; 나트륨 옥틸 글리코시드; 라우릴-, 미리스틸-, 리놀레일-, 또는 스테아릴-설포베타인; 라우릴-, 미리스틸-, 리놀레일- 또는 스테아릴-사르코신; 리놀레일-, 미리스틸-, 또는 세틸-베타인; 라우로아미도프로필-, 코카미도프로필-, 리놀레아미도프로필-, 미리스트아미도프로필-, 팔니도프로필-, 또는 이소스테아르아미도프로필-베타인(예를 들어, 라우로아미도프로필); 미리스트아미도프로필-, 팔미도프로필-, 또는 이소스테아르아미도프로필-디메틸아민; 나트륨 메틸 코코일-, 또는 이나트륨 메틸 올레일-타우레이트; 및 MONAQUATTM 계열(Mona Industries, Inc., Paterson, N.J.), 폴리에틸 글리콜, 폴리프로필 글리콜 및 에틸렌 및 프로필렌 글리콜의 공중합체(예를 들어, Pluronic, PF68 등)와 같은 비이온성 계면활성제를 포함한다. 첨가되는 계면활성제의 양은 이것이 재구성된 단백질의 응집을 감소시키고 재구성 후 미립자의 형성을 최소화하도록 하는 것이다. 예를 들어, 상기 계면활성제는 약 0.001-0.5%, 및 바람직하게 약 0.005-0.05%의 양으로 동결건조 전 제형 중에 존재할 수 있다.

[0271] 본 발명의 특정 양태에서 동결보호제(예를 들어, 슈크로스 또는 트레할로스) 및 벌크제(예를 들어, 만니톨 또는 글라이신)의 혼합물은 동결건조 전 제형 제제에 사용된다. 상기 벌크제는 과도한 포켓이 없는 균일한 동결건조된 케이크의 제조를 가능하게 한다.

[0272] 문헌[참조: Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)]에 기재된 것들과 같은 다른 약제학적으로 허용되는 담체, 부형제 또는 안정화제는 이들이 제형의 목적하는 특징에 안 좋은 영향을 미치지 않는 경우 동결건조 전 제형(및/또는 동결건조된 제형 및/또는 재구성된 제형)에 포함될 수 있다. 허용되는 담체, 부형제 또는 안정화제는 사용되는 투여 용량 및 농도에서 수용자에게 비독성이고 다음을 포함한다: 추

가의 완충제; 보존제; 조용매; 아스코르브산 및 메티오닌을 포함하는 항산화제; 킬레이팅제, 예를 들어, EDTA; 금속 복합체(예를 들어, Zn-단백질 복합체); 생분해가능한 중합체, 예를 들어, 폴리에스테르; 및/또는 염-형성 반대이온, 예를 들어, 나트륨을 포함한다.

[0273] 본원에 기재된 약제학적 조성물 및 제형은 바람직하게 안정하다. "안정한" 제형/조성물은 여기에 항체가 저장시 이의 물리적 및 화학적 안정성 및 통합성을 필수적으로 보유하는 조성물이다. 단백질 안정성을 측정하기 위한 다양한 분석적 기술은 당업계에서 가용하고 문헌[참조: Peptide and Protein Drug Delivery, 247-301, Vincent Lee Ed., Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., Pubs. (1991) and Jones, A. Adv. Drug Delivery Rev. 10: 29-90 (1993)]에서 검토된다. 안정성은 선택된 시기 동안 선택된 온도에서 측정될 수 있다.

[0274] 생체내 투여를 위해 사용될 제형은 멸균된 것이어야 한다. 이것은 동결건조 및 재구성 전 또는 후에 멸균 여과막을 통한 여과에 의해 용이하게 성취된다. 대안적으로, 전체 혼합물의 멸균성은, 예를 들어, 약 30분 동안 약 120℃에서 단백질을 제외하고는 성분들을 오토클레이빙함에 의해 성취될 수 있다.

[0275] 단백질, 동결보호제 및 다른 임의의 성분들을 함께 혼합한 후, 상기 제형은 동결건조시킨다. Hull150® (Hull, USA) 또는 GT20® (Leybold-Heraeus, Germany) 동결 건조제와 같은 많은 상이한 동결 건조제는 상기 목적을 위해 가용하다. 동결 건조는 제형을 동결시키고 이어서 주요 건조를 위해 적합한 온도에서 동결된 내용물로부터 얼음을 승화시킴에 의해 성취된다. 상기 조건하에서, 상기 생성물 온도는 제형의 공융점 미만 또는 붕괴 온도 미만이다. 전형적으로, 주요 건조를 위한 선반 온도는 전형적으로 약 50 내지 250 mTorr 범위의 적합한 압력에서 약 -30 내지 25℃ 범위이다(단, 생성물은 주요 건조 동안에 동결된 상태로 유지된다). 샘플을 보유하는 컨테이너 (예를 들어, 유리 바이알)의 제형, 크기 및 유형 및 액체 용적은 주로 수시간 내지 몇일 (예를 들어, 40 내지 60시간)의 범위일 수 있는 건조를 위해 요구되는 시간을 지정한다. 2차 건조 단계는 주로 컨테이너의 유형 및 크기 및 사용되는 단백질의 유형에 의존하여 약 0 내지 40℃에서 수행될 수 있다. 그러나, 본원에서 2차 건조 단계는 불필요한 것으로 밝혀졌다. 예를 들어, 동결건조의 전체 물 제거 상에 걸친 선반 온도는 약 15-30℃ (예를 들어, 약 20℃)일 수 있다. 2차 건조를 위해 요구되는 시간 및 압력은 예를 들어, 온도 및 다른 파라미터에 의존하여 적합한 동결건조된 케이크를 생성시키는 것이다. 2차 건조 시간은 생성물에서 목적하는 잔류수분 수준에 의해 지정되고 전형적으로 적어도 약 5시간 (예를 들어, 10 내지 15시간) 걸린다. 상기 압력은 1차 건조 단계 동안에 사용되는 것과 동일할 수 있다. 동결 건조 조건은 제형 및 바이알 크기에 따라 다양할 수 있다.

[0276] 일부 경우에, 컨테이너에 단백질 제형을 동결건조시키는 것이 바람직할 수 있고 여기서, 상기 단백질의 재구성은 전달 단계를 피하기 위해 수행되어야만 한다. 상기 경우에 컨테이너는 예를 들어, 3, 5, 10, 20, 50 또는 100 cc 바이알일 수 있다. 일반적인 문제점으로서, 동결건조는 수분 함량이 약 5% 미만 및 바람직하게 약 3% 미만인 동결건조된 제형을 유발한다.

[0277] 요구되는 단계에서, 전형적으로 단백질을 환자에게 투여할 시간인 경우, 동결건조된 제형은 재구성된 제형에서 단백질 농도가 적어도 50 mg/mL, 예를 들어, 약 50 mg/mL 내지 약 400 mg/mL, 보다 바람직하게 약 80 mg/mL 내지 약 300 mg/mL, 및 가장 바람직하게 약 90 mg/mL 내지 약 150 mg/mL이도록 희석제와 재구성될 수 있다. 재구성된 제형에서 상기 높은 단백질 농도는 재구성된 제형의 피하 전달이 의도된 경우 특히 유용한 것으로 고려된다. 그러나, 다른 투여 경로, 예를 들어, 정맥내 투여를 위해, 재구성된 제형 중에 보다 낮은 농도의 단백질이 요구될 수 있다(예를 들어, 재구성된 제형에서 약 5-50 mg/mL, 또는 약 10-40 mg/mL 단백질). 특정 양태에서, 재구성된 제형에서 단백질 농도는 동결건조전 제형에서 보다 상당히 높다. 예를 들어, 재구성된 제형에서 단백질 농도는 동결 건조전 제형의 약 2 내지 40배, 바람직하게 3 내지 10배 및 가장 바람직하게 3 내지 6배(예를 들어, 적어도 3배 또는 적어도 4배)일 수 있다.

[0278] 재구성은 일반적으로 약 25℃의 온도에서 수행하여 완전한 수화를 보장하지만, 다른 온도가 필요하다면 사용될 수 있다. 재구성을 위해 요구되는 시간은 예를 들어, 희석제의 유형, 부형제(들) 및 단백질의 양에 의존한다. 예시적인 희석제는 멸균수, 세균억제 주사용수(BWFI), pH 완충 용액(예를 들어, 포스페이트 완충 식염수), 멸균 식염 용액, 링거 용액 또는 텍스트로스 용액을 포함한다. 상기 희석제는 임의로 보존제를 함유한다. 예시적 보존제는 상기된 바와 같고, 벤질 또는 페놀 알콜과 같은 방향족 알콜이 바람직한 보존제이다. 사용되는 보존제의 양은 단백질 및 보존제 효능 시험과 함께 양립성을 위해 상이한 보존제 농도를 평가함에 의해 결정된다. 예를 들어, 보존제가 방향족 알콜(예를 들어, 벤질 알콜)인 경우, 이것은 약 0.1-2.0%의 양 및 바람직하게 약 0.5-1.5%의 양, 그러나 가장 바람직하게는 약 1.0-1.2%의 양으로 존재할 수 있다. 바람직하게, 상기 재구성된 제형은 크기가 >10 $\mu$ m인 바이알당 6000개 미만의 입자를 갖는다.



[0279] **치료학적 적용**

[0280] 본원에 개시된 것은 질환, 장애 또는 감염과 관련된 하나 이상의 증상을 예방하거나, 치료하거나, 완화시키기 위한 방법을 포함하고, 상기 방법은 본원에 개시된 치료학적 유효량의 약제학적 조성물을 이를 필요로 하는 대상체에게 투여함을 포함한다. 상기 질환, 장애 또는 감염은 암, 자가면역 장애, 염증 장애 및 감염성 감염을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0281] **(I) 암의 치료**

[0282] 기재내용에 따른 약제학적 조성물은 암에 사용될 수 있다. 본원에 기재된 것은 환자에서 암의 치료를 위한 방법을 포함하고, 상기 방법은 본원에 기재된 유효량의 약제학적 조성물을 환자에게 투여함을 포함한다.

[0283] 암의 예는 청신경종, 선암종, 부신암, 항문암, 혈관육종(예를 들어, 림프관육종, 림프관내피육종, 혈관육종), 충수암, 양성 모노클로날 글로불린혈증, 담관계암(예를 들어, 담관암), 방광암, 유방암(예를 들어, 유방의 선암종, 유방의 유두암종, 유선암, 유방의 수질암종), 뇌암(예를 들어, 뇌수막종; 신경교종, 예를 들어, 성상세포종, 핍지교종; 수모세포종), 기관지암, 카르시노이드 종양, 자궁경부암(예를 들어, 자궁경부 선암종), 용모암, 척삭종, 두개인두종, 결장직장암(예를 들어, 결장암, 직장암, 결장직장 선암종), 상피 암종, 상의세포종, 내피 육종(예를 들어, 카포시 육종, 다발성 특발성 출혈성 육종), 자궁내막암(예를 들어, 자궁암, 자궁 육종), 식도암(예를 들어, 식도의 선암종, 바레트 선암종), 어빙 육종, 안암(예를 들어, 안내 흑색종, 망막아세포종), 친숙한 과다호산구증가증, 담즙 방광암, 위암(예를 들어, 위 선암종), 위장 기질 종양(GIST), 두경부암(예를 들어, 두경부 편평 세포 암종, 경구암(예를 들어, 경구 편평 세포 암종(OSCC), 인후암(예를 들어, 후두암, 인두암, 비인두암, 구인두암)), 조혈암(예를 들어, 백혈병, 예를 들어, 급성 림프구 백혈병(ALL)(예를 들어, B-세포 ALL, T-세포 ALL), 급성 골수구 백혈병(AML)(예를 들어, B-세포 AML, T-세포 AML), 만성 골수구 백혈병(CML)(예를 들어, B-세포 CML, T-세포 CML), 및 만성 골수구 백혈병(CLL)(예를 들어, B-세포 CLL, T-세포 CLL); 림프종, 예를 들어, 호지킨 림프종(HL)(예를 들어, B-세포 HL, T-세포 HL) 및 비-호지킨 림프종(NHL)(예를 들어, B-세포 NHL, 예를 들어, 확산 대형 세포 림프종(DLCL)(예를 들어, 확산 대형 B-세포 림프종(DLBCL)), 여포성 림프종, 만성 림프구 백혈병/소형 림프구 림프종(CLL/SLL), 맨틀 세포 림프종(MCL), 대역 B-세포 림프종(예를 들어, 점막 관련 림프성 조직(MALT) 림프종, 결절 대역 B-세포 림프종, 비장 대역 B-세포 림프종), 1차 종격동 B-세포 림프종, 버킷 림프종, 림프구형질세포의 림프종(즉, "발덴스트롬의 거대글로불린혈증"), 모발 세포 백혈구(HCL), 면역모세포 대형 세포 림프종, 전구체 B-림프아구 림프종 및 1차 중추신경계(CNS) 림프종; 및 T-세포 NHL, 예를 들어, 전구체 T-림프아구 림프종/백혈병, 말초 T-세포 림프종(PTCL)(예를 들어, 피부 T-세포 림프종(CTCL)(예를 들어, 진균증, 세자리 증후군), 혈관면역아세포 T-세포 림프종, 결절외 천연 킬러 T-세포 림프종, 장병증 유형 T-세포 림프종, 피하 지방층염형 T-세포 림프종, 성형술 대형 세포 림프종); 상기된 바와 같은 하나 이상의 백혈병/림프종; 및 다발성 골수종(MM)), 중쇄 질환(예를 들어, 알파 쇄 질환, 감마쇄 질환, mu 쇄 질환), 혈관모세포종, 염증성 근섬유아세포 종양, 면역세포 아밀로이드증, 신장암(예를 들어, 신경모세포종 a.k.a. 빌름스 종양, 신장 세포 암종), 간암(예를 들어, 간세포 암(HCC), 악성 간종), 폐암(예를 들어, 기관지 암종, 소세포 폐암(SCLC), 비-소세포 폐암(NSCLC), 폐의 선암종), 평활근육종(LMS), 비만세포증(예를 들어, 전신 비만세포증), 골수형이상증후군(MDS), 중피종, 골수증식성 장애(MPD)(예를 들어, 진성적혈구 증가증(PV), 본태성 혈소판 증가증(ET), 원인불명 골수섬유증(AMM), a.k.a. 골수섬유증(MF), 만성 특발성 골수섬유증, 만성 골수세포 백혈병(CML), 만성 호중구 백혈병(CNL), 호산구증가 증후군(HES)), 신경아세포종, 신경섬유종(예를 들어, 신경섬유종증(NF) 1형 또는 2형, 신경초종증), 신경내분비암(예를 들어, 위장췌장 신경내분비 종양(GEP-NET), 카르시노이드 종양), 골육종, 난소암(예를 들어, 난선암종, 난소 배아 암종, 난소 선암종), 유도선암종, 췌장암(예를 들어, 췌장 선암종, 관내 유두 무친종양(IPMN), 섬 세포 종양), 음경암(예를 들어, 음경 및 음낭의 파제트 질환), 송과체종, 원시 신경외배엽 종양(PNT), 전립선암(예를 들어, 전립선 선암종), 직장암, 횡문근육종, 침샘암, 피부암(예를 들어, 편평세포 암종(SCC), 각질극 세포종(KA), 흑색종, 기저 세포 암종(BCC)), 소장암(예를 들어, 충수 암), 연질 조직 육종(예를 들어, 악성 섬유 조직구종(MFH), 지방육종, 악성 말초 신경초 종양(MPNST), 연골육종, 섬유육종, 점액 육종), 피지선암종, 땀샘 암종, 활막종, 고환암(예를 들어, 정상피종, 고환 배아 암종), 갑상선암(예를 들어, 갑상선의 유두 암종, 유두 갑상선 암종(PTC), 갑상선수질암), 요도암, 질암 및 외음부암(예를 들어, 외음부의 파제트 질환)을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0284] 일부 양태에서, 제공된 당향체는 폐암을 치료하는데 유용하다. 일부 양태에서, 제공된 화합물은 소형 폐암을 치료하는데 유용하다. 일부 양태에서, 제공된 화합물은 비-소형 폐암을 치료하는데 유용하다. 일부 양태에서, 제공된 화합물은 대장암을 치료하는데 유용하다. 일부 양태에서, 제공된 화합물은 췌장암을 치료하는데 유용하다.

일부 양태에서, 제공된 화합물은 담관암 또는 자궁내막암을 치료하는데 유용하다.

[0285] **항-CD20 당항체를 사용한 치료**

[0286] 일부 양태에서, 본원의 개시내용은 치료학적 유효량의 항-CD20 당항체 및 약제학적으로 허용되는 담체를 대상체에게 투여함을 포함하는, 이를 필요로 하는 인간 대상체에서 암을 치료하기 위한 방법을 특징으로 한다.

[0287] 암의 예는 B 세포 림프종, NHL, 전구체 B 세포 림프아구 백혈병/림프종 및 성숙한 B 세포 신생물, B 세포 만성 림프구 백혈병 (CLL)/소형 림프구 림프종 (SLL), B 세포 전림프구 백혈병, 림프혈정세포성 림프종, 맨틀 세포 림프종(MCL), 여포성 림프종(FL), 저등급, 중간등급 및 고등급(FL), 피부 여포 중심 림프종, 대역 B 세포 림프종, MALT 유형 대역 B 세포 림프종, 결절 대역 B 세포 림프종, 비장 유형 대역 B 세포 림프종, 모발 세포 백혈병, 확산 대형 B 세포 림프종, 버킷 림프종, 형질세포종, 혈장 세포 골수종, 이식 후 림프구증식 장애, 발덴스트롬 거대글로불린혈증, 및 성형술 대형-세포 림프종(ALCL)을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0288] 특정 양태에서, 암은 비-호지킨 림프종과 같은 B 세포 림프종이다.

[0289] **항-HER2 당항체를 사용한 치료**

[0290] 일부 양태에서, 본원의 개시내용은 치료학적 유효량의 항-HER2 당항체 및 약제학적으로 허용되는 담체를 대상체에게 투여함을 포함하는, 이를 필요로 하는 인간 대상체에서 암을 치료하기 위한 방법을 특징으로 한다.

[0291] 암의 예는 유방암, 폐암, 경구암, 식도암, 위암, 간암, 담관암, 췌장암, 결장암, 신장암, 자궁암, 난소암 및 전립선암을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 일부 양태에서, 암은 뇌암, 폐암, 유방암, 난소암, 전립선암, 결장암 또는 췌장암이다.

[0292] 본원에 기재된 이들 치료 방법에서, 당항체의 약제학적 조성물은 단독으로 또는 제2 항체와 같은 제2 치료학적 제제, 또는 화학치료제 또는 면역억제제와 연계하여 투여될 수 있다.

[0293] 특정 양태에서, 제2 치료학적 제제는 항암제이다. 항암제는 생물치료학적 항암제 및 화학치료학적 제제를 포괄한다. 예시적인 생물치료학적 항암제는 인터페론, 사이토킨 (예를 들어, 종양 괴사 인자, 인터페론 α, 인터페론 γ), 백신, 조혈 성장 인자, 모노클로날 혈청치료요법, 면역자극제 및/또는 면역조절제(예를 들어, IL-1, 2, 4, 6, 또는 12), 면역 세포 성장 인자 (예를 들어, GM-CSF) 및 항체(예를 들어, 헤르셉틴 (트라스투주맵), T-DM1, AVASTIN (베바시주맵), ERBITUX (세툽시맵), 벡티빅스 (파니투무맵), 리툭산 (리툽시맵), 백사르 (토시투모맵))을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 예시적인 화학치료학적 제제는 항-에스트로겐 (예를 들어, 타목시펜, 탈록시펜 및 메게스트롤), LHRH 효능제 (예를 들어, 고스크르클린 및 류프롤리드), 항-안드로겐 (예를 들어, 플루타미드 및 바이칼루타미드), 광동력학적 치료요법(예를 들어, 베르토포르핀(BPD-MA), 프탈로시아닌, 광감각제 Pc4, 및테메톡시-하이포크렐린 A (2BA-2-DMHA)), 질소 무스타드(예를 들어, 사이클로포스파미드, 이포스파미드, 트로포스파미드, 클로람부실, 에스트라무스틴, 및 멜팔란), 니트로소우레아(예를 들어, 카르무스틴 (BCNU) 및 로무스틴 (CCNU)), 알킬설포네이트 (예를 들어, 부설판 및 트레오설판), 트리아젠 (예를 들어, 다카바진, 테모졸로미드), 백금 함유 화합물(예를 들어, 시스플라틴, 카보플라틴, 옥살리플라틴), 빈카 알칼로이드 (예를 들어, 빈크리스틴, 빈블라스틴, 빈데신, 및 비노렐빈), 탁소이드(예를 들어, 파클리탁셀 또는 파클리탁셀 등가물, 예를 들어, 나노입자 알부민-결합된 파클리탁셀(아브라칸), 도코사헥산산 결합된-파클리탁셀(DHA-파클리탁셀, 탁소트렉신), 폴리글루타메이트 결합된-파클리탁셀 (PG-파클리탁셀, 파클리탁셀 폴리글루텍스, CT-2103, XYOTAX), 종양 활성화된 프로드럭 (TAP) ANG1005 (파클리탁셀의 3개 분자에 결합된 안지오펙트-2), 파클리탁셀-EC-1 (erbB2-인지 캡타이드 EC-1에 결합된 파클리탁셀), 및 글루코스-결합된 파클리탁셀, 예를 들어, 2'-파클리탁셀 메틸 2-글루코피라노실 숙시네이트; 도세탁셀, 탁술), 에피도도필린(예를 들어, 에토포사이드, 에토포사이드 포스페이트, 테니포사이드, 토포테칸, 9-아미노캄포테신, 캄토이리노테칸, 이리노테칸, 크리스나톨, 마이토마이신 C), 항-대사물, DHFR 억제제(예를 들어, 메토포렉세이트, 디클로로메토포렉세이트, 트리메트렉세이트, 에다트렉세이트), IMP 데하이드로게나제 억제제(예를 들어, 마이코페놀산, 티아조푸린, 라바비린, 및 EICAR), 리보뉴클레오타이드 리덕타제 억제제(예를 들어, 하이드록시우레아 및 데페록사민), 우라실 유사체(예를 들어, 5-플루오로우라실 (5-FU), 플록스우리딘, 독시플루리딘, 라티트렉세드, 테가푸르-우라실, 카페시타빈), 사이토신 유사체 (예를 들어, 사이타라빈 (ara C), 사이토신 아라비노사이드, 및 플루다라빈), 퓨린 유사체(예를 들어, 머캅토포린 및 티오구아닌), 비타민 D3 유사체 (예를 들어, EB 1089, CB 1093, 및 KH 1060), 이소프레닐화 억제제(예를 들어, 로바스타틴), 도파민성 신경독소(예를 들어, 1-메틸-4-페닐피리디늄 이온), 세포 주기 억제제(예를 들어, 스타우로스포린), 악티노마이신(예를 들어, 악티노마이신 D, 닥티노마이신), 블레오마이신 (예를 들어, 블레오마이신 A2, 블레오마이신 B2, 펄페로마이신), 안트라사이클린 (예를 들어, 다우노루비신, 독소

루비신, 폐결화된 리포좀 독소루비신, 이다루비신, 에피루비신, 피라루비신, 조루비신, 미톡산트론), MDR 억제제 (예를 들어, 베라파밀),  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase 억제제 (예를 들어, 타프시가르긴), 이마티니브, 탈리도미드, 레날리도미드, 타이로신 키나제 억제제 (예를 들어, 악시티니브 (AG013736), 보수티니브 (SKI-606), 세디라니브 (RECENTIN<sup>TM</sup>, AZD2171), 다사티니브 (SPRYCEL<sup>®</sup>, BMS-354825), 예를로티니브 (TARCEVA<sup>®</sup>), 게피티니브 (IRESSA<sup>®</sup>), 이마티니브 (Gleevec<sup>®</sup>, CGP57148B, STI-571), 라파티니브 (TYKERB<sup>®</sup>, TYVERB<sup>®</sup>), 레스타우르티니브 (CEP-701), 네라티니브 (HKI-272), 닐로티니브 (TASIGNA<sup>®</sup>), 세막사니브 (세막사티니브, SU5416), 수니티니브 (SUTENT<sup>®</sup>, SU11248), 토세라니브 (PALLADIA<sup>®</sup>), 반테타니브 (ZACTIMA<sup>®</sup>, ZD6474), 바탈라니브 (PTK787, PTK/ZK), 트라스투주맵 (HERCEPTIN<sup>®</sup>), 베바시주맵 (AVASTIN<sup>®</sup>), 리툽시맵 (RITUXAN<sup>®</sup>), 세툽시맵 (ERBITUX<sup>®</sup>), 파니투무맵 (VECTIBIX<sup>®</sup>), 라니비주맵 (Lucentis<sup>®</sup>), 닐로티니브 (TASIGNA<sup>®</sup>), 소라페니브 (NEXAVAR<sup>®</sup>), 에베롤리무스 (AFINITOR<sup>®</sup>), 알렘투주맵 (CAMPATH<sup>®</sup>), 겐투주맵 오조가미신 (MYLOTARG<sup>®</sup>), 템시롤리무스 (TORISEL<sup>®</sup>), ENMD-2076, PCI-32765, AC220, 도비티니브 락테이트 (TKI258, CHIR-258), BIBW 2992 (TOVOK<sup>TM</sup>), SGX523, PF-04217903, PF-02341066, PF-299804, BMS-777607, ABT-869, MP470, BIBF 1120 (VARGATEF<sup>®</sup>), AP24534, JNJ-26483327, MGCD265, DCC-2036, BMS-690154, CEP-11981, 티보자니브 (AV-951), OSI-930, MM-121, XL-184, XL-647, 및/또는 XL228), 프로테오솜 억제제 (예를 들어, 보르테조미브 (벨카데)), mTOR 억제제 (예를 들어, 라파마이신, 템시롤리무스 (CCI-779), 에베롤리무스 (RAD-001), 리다포롤리무스, AP23573 (Ariad), AZD8055 (아스트라제네카), BEZ235 (노바티스 (Novartis)), BGT226 (노바티스 (Novartis)), XL765 (Sanofi Aventis), PF-4691502 (Pfizer), GDC0980 (Genetech), SF1126 (Semafoe) 및 OSI-027 (OSI)), 오블리머센, 겐시타빈, 카르미노마이신, 류코보린, 페메트렉세드, 사이클로포스파미드, 다카바진, 프로카비진, 프레드니솔론, 텍사메타손, 캄파테신, 플리카마이신, 아스파라기나제, 아미노프테린, 메토프테린, 포르피로마이신, 멜팔란, 류로신, 클로람부실, 트라벡테딘, 프로카바진, 디스코데르몰리드, 카미노마이신, 아미노프테린, 및 헥사메틸 멜라민을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

## [0294] (II) 자가면역 및/또는 염증 질환의 치료

[0295] 일부 양태에서, 본원에 기재된 당향체는 자가면역 및/또는 염증 질환을 치료하기 위해 유용하다.

### [0296] 항-CD20 당향체를 사용한 치료

[0297] 일부 양태에서, 본원의 개시내용은 치료학적 유효량의 항-CD20 당향체 및 약제학적으로 허용되는 담체를 대상체에게 투여함을 포함하는, 이를 필요로 하는 인간 대상체에서 자가면역 또는 염증 질환을 치료하기 위한 방법을 특징으로 한다.

[0298] 자가면역 또는 염증 질환의 예는 류마티스 관절염, 소아 류마티스 관절염, 전신 홍반성 낭창(SLE), 베게너 질환, 염증 장 질환, 특발성 혈소판감소성자반병(ITP), 혈전증의 혈소판감소성자반병(TTP), 자가면역 혈소판감소증, 다발성 경화증, 건선, IgA 신증, IgM 다발성신경병증, 중증 근무력증, 혈관염, 진성 당뇨병, 레이노드 증후군, 크론 질환, 궤양성 장염, 위염, 하시모토 갑상선염, 강직성 척추염, 간염 C-관련 냉각글로불린 혈관염, 만성 초점 뇌염, 유전포창, 혈우병 A, 막증식성 사구체신염, 성인 및 소아 피부근염, 성인 다발성근염, 만성 두드러기, 1차 담즙성 간경변증, 시속신경수염, 그레이브 갑상선 질환, 유전포창, 막증식성 사구체신염, 처그-스트라우스 증후군, 천식, 건선 관절염, 피부염, 호흡 곤란 증후군, 뇌수막염, 뇌염, 포도막염, 습진, 죽상동맥경화증, 백혈구 접착 결핍, 소아 개시 당뇨병, 라이터 질환(Reiter's disease), 베체트 질환(Behcet's disease), 용혈성 빈혈, 아토피 피부염, 베게너 육아종증(Wegener's granulomatosis), 오펜 증후군(Omenn's syndrome), 만성 신부전증, 급성 감염성 단핵증, HIV 및 헤르페스-관련 질환, 전신성 경화증, 쇼그렌 증후군(Sjorgen's syndrome) 및 사구체신염, 피부근염, ANCA, 재생불량성 빈혈, 자가면역 용혈성 빈혈(AIHA), 인자 VIII 결핍증, 혈우병 A, 자가면역 백혈구 감소증, 캐슬먼 증후군(Castleman's syndrome), 굿파스처 증후군(Goodpasture's syndrome), 고체 기관 이식 거부, 이식 대 숙주 질환 (GVHD), 자가면역 간염, 림프구 간질 폐렴 (HIV), 폐쇄세기관지기질화폐렴(비-이식제), 길라인-바르 증후군(Guillain-Barre Syndrome), 대형 혈관 혈관염, 거대 세포(타카야수) 동맥염, 중간 혈관 혈관염, 가와사키 질환, 및 다발동맥염 결절을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 특정 양태에서, 자가면역 또는 염증 질환은 류마티스 관절염이다.

### [0299] 항-TNF $\alpha$ 당향체를 사용한 치료

- [0300] 일부 양태에서, 본원의 개시내용은 치료학적 유효량의 항-TNF  $\alpha$  당항체 및 억제학적으로 허용되는 담체를 대상체에게 투여함을 포함하는, 이를 필요로 하는 인간 대상체에서 자가면역 또는 염증 질환을 치료하기 위한 방법을 특징으로 한다.
- [0301] **(III) 감염 질환의 치료**
- [0302] 일부 양태에서, 본원에 기재된 당항체는 세균 또는 바이러스 감염에 의해 유발되는 감염 질환을 치료하기 위해 유용하다.
- [0303] 감염 질환의 예는 인간 면역결핍 바이러스 (HIV), 호흡 신시알 바이러스 (RSV), 사이토메갈로바이러스 (CMV), 에볼라 바이러스, A형 간염 바이러스, B형 간염 바이러스, C형 간염 바이러스(HCV), 엡스타인-바르 바이러스 (Epstein-Barr virus), 바리셀라 조스터 바이러스(varicella zoster virus) (VZV), 한탄 바이러스(Hantaan virus), 인플루엔자 바이러스, 헤르페스 심플렉스 바이러스 (HSV), 인간 헤르페스 바이러스 6 (HHV-6), 인간 헤르페스 바이러스 8 (HHV-8), 인간 파필로마 바이러스, 또는 파르보바이러스, SARS 바이러스, 홍역 바이러스; 볼거리 바이러스; 루벨라 바이러스; 광견병 바이러스; 파필로마바이러스; 백시니아 바이러스; 바리셀라-조스터 바이러스; 바리올라 바이러스; 폴리오 바이러스; 리노 바이러스; 호흡 신시알 바이러스; 피. 팔시파룸(*P. falciparum*); 피. 비박스(*P. vivax*); 피. 말라리아(*P. malariae*); 피. 보알레(*P. ovale*); 코리넨박테리움 디프테리아(*Corynebacterium diphtheriae*); 클로스트리디움 테타니(*Clostridium tetani*); 클로스트리디움 보툴리눔(*Clostridium botulinum*); 보르데텔라 페르투스시스(*Bordetella pertussis*); 해모필러스 인플루엔자(*Haemophilus influenzae*); 나이세리아 메닝기티디스(*Neisseria meningitidis*), 혈청형 A, B, C, W135 및/또는 Y; 스트렙토코커스 뉴모니아(*Streptococcus pneumoniae*); 스트렙토코커스 아갈락티아(*Streptococcus agalactiae*); 스트렙토코커스 피오게네스(*Streptococcus pyogenes*); 스타필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*); 바실러스 안트라시스(*Bacillus anthracis*); 모락셀라 카타르할리스(*Moraxella catarrhalis*); 클라미디아 트라코마티스(*Chlamydia trachomatis*); 클라미디아 뉴모니아(*Chlamydia pneumoniae*); 예르시니아 페스티스(*Yersinia pestis*); 프란시셀라 툴라렌시스(*Francisella tularensis*); 살모넬라 종(*Salmonella species*); 비브리오 콜레라(*Vibrio cholerae*); 독성 이. 콜라이(*E.coli*); 인간 내인성 레트로바이러스; 다른 미생물 병원체; 다른 미생물 독소, 알레르겐, 종양 항원, 자가항원 및 동종항원, 화학물질 또는 독소를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 특정 양태에서, 감염 질환은 HIV, HCV 또는 이의 조합에 의해 유발된다.
- [0304] **F16 당항체를 사용한 치료**
- [0305] 일부 양태에서, 본원의 개시내용은 치료학적 유효량의 F16 당항체 및 억제학적으로 허용되는 담체를 대상체에게 투여함을 포함하는, 이를 필요로 하는 인간 대상체에게 바이러스 질환을 치료하기 위한 방법을 특징으로 한다.
- [0306] 바이러스 질환은 HIV (인간 면역결핍 바이러스), RSV (호흡 신시알 바이러스), CMV (사이토메갈로바이러스), 에볼라 바이러스, A형 간염 바이러스, B형 간염 바이러스, C형 간염 바이러스, 엡스타인-바르 바이러스, 바리셀라 조스터 바이러스(VZV), 한탄 바이러스, 인플루엔자 바이러스, 헤르페스 심플렉스 바이러스(HSV), 인간 헤르페스 바이러스 6 (HHV-6), 인간 헤르페스 바이러스 8 (HHV-8), 인간 파필로마 바이러스, 또는 파르보바이러스에 의해 유발될 수 있다. 별도의 측정 양태에서, 바이러스 질환은 HIV에 의해 또는 C형 간염 바이러스에 의해 유발된다.
- [0307] 일부 양태에서, 본원의 개시내용은 NK 세포의 억제 수용체를 차단하는 제1 화합물을 대상체에게 투여하고 (b) 본원에 기재된 치료학적 유효량의 억제학적 조성물을 대상체에게 투여함을 포함하는, 이를 필요로 하는 인간 대상체에서 바이러스 질환을 치료하기 위한 방법을 특징으로 한다.
- [0308] "치료하는" 또는 "치료" 또는 "완화"는 치료학적 치료 및 예방학적 또는 예방적 대책 둘다를 언급하고, 여기서, 상기 목적은 표적화된 병리학적 병태 또는 장애를 예방하거나 서행(감소)시키기 위한 것이다. 치료를 필요로 하는 자들은 장애를 이미 갖는 자들 및 상기 장애를 갖기 쉬운 자들 또는 장애가 예방되어야 하는 자들을 포함한다. 대상체 또는 포유동물은 본원 발명의 방법에 따른 치료학적 유효량을 투여받은 후 상기 환자가 하기 중 하나 이상에서 관찰가능하고/하거나 측정가능한 감소를 보여주거나 부재인 경우 감염에 대해 성공적으로 "치료되었다": 감염 세포 수의 감소 또는 감염 세포 부재; 감염된 총 세포의 %의 감소; 및/또는 특정 감염과 관련된 증상들 중 하나 이상의 어느 정도 경감; 감소된 이환율 및 사망율, 및 생활의 질 문제의 개선을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 질환에서 성공적인 치료 및 개선을 평가하기 위한 상기 파라미터는 담당의에게 친숙한 통상적 과정에 의해 용이하게 측정가능하다.
- [0309] 용어 "치료학적 유효량"은 대상체 또는 포유동물에서 질환 또는 장애를 "치료"하기 위해 효과적인 항체 또는 약물의 양을 언급한다. "치료하는"의 이전의 정의를 참조한다.



- [0310] 하나 이상의 추가의 치료학적 제제와 "조합된" 투여는 동시(동시다발), 및 임의의 순서의 연속 투여를 포함한다.
- [0311] 본원에 사용된 바와 같은 "담체"는 사용되는 투여 용량 및 농도에 노출된 세포 또는 포유동물에 비독성인 약제학적으로 허용되는 담체, 부형제 또는 안정화제를 포함한다. 흔히, 생리학적으로 허용되는 담체는 수성 pH 완충 용액이다. 생리학적으로 허용되는 담체의 예는 포스페이트, 시트레이트 및 다른 유기산과 같은 완충제; 아스코르브산을 포함하는 항산화제; 저분자량 (약 10개 잔기 미만)의 폴리펩타이드; 단백질, 예를 들어, 혈청 알부민, 겔라틴 또는 면역글로불린; 친수성 중합체, 예를 들어, 폴리비닐피롤리돈; 아미노산, 예를 들어, 글라이신, 글루타민, 아스파라긴, 아르기닌 또는 라이신; 모노사카라이드, 디사카라이드 및 글루코스, 만노스 또는 텍스트린을 포함하는 다른 탄수화물; 킬레이팅제, 예를 들어, EDTA; 슈가 알콜, 예를 들어, 만니톨 또는 소르비톨; 염 형성 반대이온, 예를 들어, 나트륨; 및/또는 비이온성 계면활성제, 예를 들어, TWEEN™ 폴리에틸렌 글리콜 (PEG), 및 PLURONICS™ 을 포함한다.
- [0312] 하기의 실시예는 본 발명의 바람직한 양태를 입증하기 위해 포함된다. 당업자는 후속 실시예에 기재된 기술이 본 발명의 수행에 잘 기능하는 것으로 본 발명자에 의해 발견된 기술을 대표하고 따라서 이의 수행에 대한 바람직한 양상을 구성하는 것으로 고려될 수 있는 것으로 이해해야만 한다. 그러나, 당업자는 본원의 개시내용에 비추어 기재된 특정 양태에서 많은 변화가 기재된 특정 양태에서 만들어질 수 있고 본 발명의 취지 및 범위로부터 벗어나는 것 없이 동일하거나 유사한 결과를 수득하는 것으로 인지한다.
- [0313] **실시예**
- [0314] 예시적 일반 과정
- [0315] **방법 A: 티오-글리칸 공여자에 의한 당화**
- [0316] 당화용 분자체 MS-4A를 활성화시키기 위해, 진공 시스템에 연결하였고 1시간 동안 가열하였다. 활성화된 분자체가 실온으로 냉각된 후, 이를 공여자 (하나의 위치 당화에 대해 1.5~2.0 eq.) 및 수용자 (1.0 eq.)를 함유하는 플라스크에 첨가하였다. 디클로로메탄은 상기 혼합물에 첨가하고 이어서 용액은 3시간 동안 실온에서 교반하였다. N-요오도숙신이미드(NIS, 1.7~2.2 eq.) 및 트리메틸실릴 트리플루오로메탄설포네이트(TMSOTf, 0.1 eq.)을 -78℃ 상에서 용액에 첨가하고 이어서 상기 용액을 -20℃에서 교반하였다. 반응은 박층 크로마토그래피 (TLC) 분석에 의해 모니터링하였고, 상기 분석은 유리 지지된 실리카 겔 플레이트(Merck DC Kieselgel 60F<sub>254</sub>)상에서 수행하였고 UV 광(254 nm) 및 산성 세력 암모늄 폴리브레이트에 의해 가시화하였다. 수용체가 완전히 소모된 후 상기 반응은 포화 NaHCO<sub>3(aq)</sub> 및 20% Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>으로 퀀칭시키고 이어서 혼합물은 셀라이트 패드를 통해 여과하였다. 수성 층을 2개 부분의 디클로로메탄으로 추출한 후, 조합된 유기 층들은 염수로 세척하고 MgSO<sub>4</sub> 상에서 건조시키고 농축시켰다. 상기 조추출물은 실리카 겔 칼럼 크로마토그래피(용출 시스템으로서 톨루엔/에틸 아세테이트)에 의해 정제하여 생성물을 수득(상기 생성은 도식 상에서 나타냈다)하였다.
- [0317] **방법 B: 플루오라이드-글리칸 공여자에 의한 당화**
- [0318] 무수 톨루엔 중에 실버 트리플레이트(5eq.), 비스(사이클로펜타디에닐) 하프늄 디클로라이드(3.5 eq.) 및 4A 활성화된 분자체의 혼합물은 1시간 동안 실온에서 교반하였다. 이어서 반응 혼합물은 -50℃로 냉각시키고 톨루엔 중에 수용자(1.0 eq.) 및 공여자(1.2~1.5 eq.)의 용액을 첨가하였다. 상기 혼합물은 2 내지 8시간 동안 -10℃에서 교반하였다. TLC가 수용자의 완전한 소모를 지정한 후, 반응은 Et<sub>3</sub>N로 퀀칭시키고 EtOAc로 희석하고 셀라이트를 통해 여과하였다. 여과물은 수성 NaHCO<sub>3</sub> 및 염수 용액으로 세척하였다. 유기층은 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 상에서 건조시키고 진공 농축시켰다. 조추출물은 실리카 겔 칼럼 크로마토그래피로 정제하여 (용출 시스템으로서 톨루엔/에틸 아세테이트) 생성물을 수득(상기 생성은 반응식 상에 나타냈다)한다.
- [0319] **방법 C: O-아세틸의 탈보호**
- [0320] NaOMe(0.25 eq.)은 THF/메탄올(2/3) 중에 출발 물질(1.0 eq.) 용액에 첨가하였다. 반응물은 실온에서 교반하고 TLC 분석에 의해 모니터링하였다. 아세틸 그룹을 완전히 탈보호한 후, 용액은 IR-120으로 중화시키고, 여과하고, 농축시켰다. 조추출물은 실리카 겔 크로마토그래피(용출 시스템으로서 헥산/에틸 아세테이트)로 정제하여 생성물을 수득(상기 생성은 반응식 상에 나타냈다)하였다.
- [0321] **방법 D: O-Troc의 탈보호**



[0322] Zn 분말(20 eq.) 및 아세트산(0.2 eq.)을 THF 중 출발 물질(1.0 eq.) 용액에 첨가하였다. 반응물은 실온에서 교반하고 박층 크로마토그래피(TLC) 분석에 의해 모니터링하였다. Troc 그룹을 완전히 탈보호한 후, 용액을 여과시키고 농축시켰다. 조추출물은 실리카 겔 칼럼 크로마토그래피로 정제하여 (용출 시스템으로서 헥산/에틸 아세테이트) 생성물을 수득(상기 생성은 반응식 상에 나타냈다)하였다.

[0323] **방법 E: 벤질리덴의 탈보호**

[0324] *p*-톨루엔설폰산(*pTSA*, 1.5 eq.)은 ACN/MeOH(2/1) 중의 출발 물질(1.0 eq.) 용액에 첨가하였다. 반응물은 실온에서 교반하고 박층 크로마토그래피(TLC) 분석에 의해 모니터링하였다. 벤질리덴 그룹을 완전히 제거한 후, 반응은 트리메틸아민으로 켄칭시키고 농축시켰다. 조추출물은 실리카 겔 칼럼 크로마토그래피로 정제하여 (용출 시스템으로서 헥산/에틸 아세테이트) 생성물을 수득(상기 생성은 반응식 상에 나타냈다)하였다.

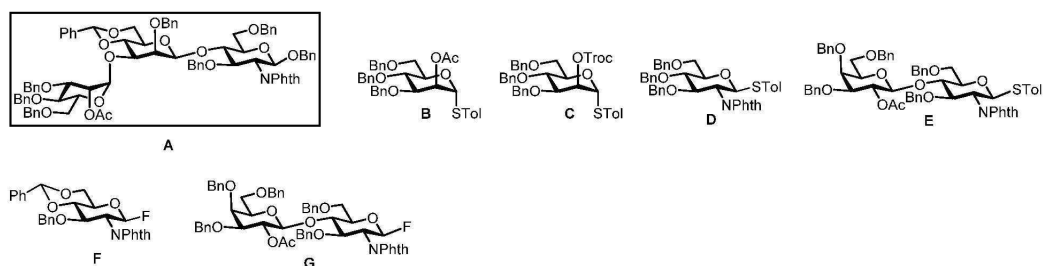
[0325] **방법 F: 글로벌 탈보호**

[0326] 보호된 올리고사카라이드(50mmol), 및 에틸렌 디아민:*n*BuOH(1/4)의 10mL의 혼합물은 밤새 90℃에서 교반하였다. 휘발물을 증발시키고 조추출물은 밤새 10 mL Ac<sub>2</sub>O/피리딘(1/2)과 반응시켰다. 상기 용매는 높은 진공하에 제거하고 생성물은 섬광 칼럼 크로마토그래피로 정제(용출 시스템으로서 아세톤/톨루엔)하였다. 상기 생성물은 밤새 MeOH(10mL) 중의 나트륨 메톡사이드를 사용하여 탈아세틸화하였다. 반응은 IR-120을 사용함에 의해 중화시키고, 이어서 여과하고 진공 농축시켰다. 잔사는 섬광 칼럼 크로마토그래피로 정제(용출 시스템으로서 아세테이트/톨루엔)하였다. 상기 생성물은 10 mL MeOH:H<sub>2</sub>O:HCOOH(6/3/1) 중에 용해시키고, Pd(OH)<sub>2</sub> (50중량%)를 첨가하고 반응물은 밤새 수소화시켰다. 상기 반응 혼합물은 셀라이트를 통해 여과하고 진공 농축시켰다. 상기 잔사는 용출제로서 물을 사용하는 G-15 겔 칼럼 크로마토그래피로 정제하였다. 상기 생성물은 동결건조시켜 백색 분말을 수득(상기 생성은 반응식 상에 나타냈다)하였다.

[0327] **방법 G: 효소적 (2,6)-시알화**

[0328] 출발 물질(5 μmol), CTP(1 μmol), Neu5Ac(9.5 μmol), PEP(10 μmol), 2,6-시알킬트랜스퍼라제(200 μL, 2mg/L의 평가된 농도), CMK(80 유닛), PK(40 유닛), 및 PPA(40 유닛)는 1% BSA(130 μL)를 함유하는 50 μmol 나트륨 카코딜레이트(pH 7.4) 중에 용해시켰다. 상기 반응은 2d 동안 약간의 교반과 함께 37℃에서 항온처리하였다. 상기 생성물은 G-15 겔 크로마토그래피(용출제 H<sub>2</sub>O)를 사용하여 정제하여 동결건조 후 백색 고체로서 목적하는 생성물을 수득하였다.

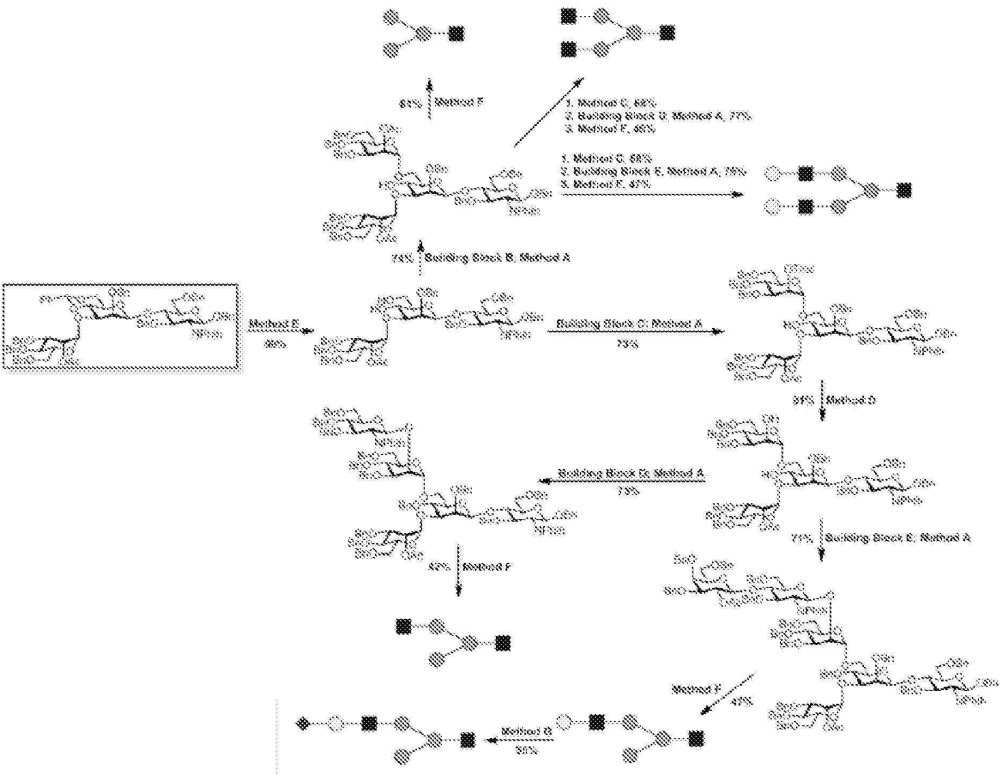
[0329] **빌딩 블록**



[0330]

[0331] **비대칭 N-글리칸을 합성하기 위한 실험적 과정**

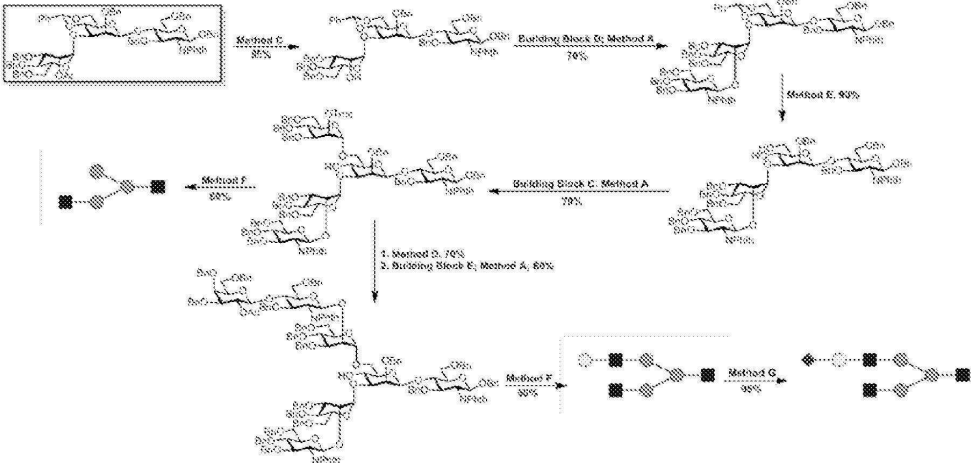
[0332] [반응식 1]



[0333]

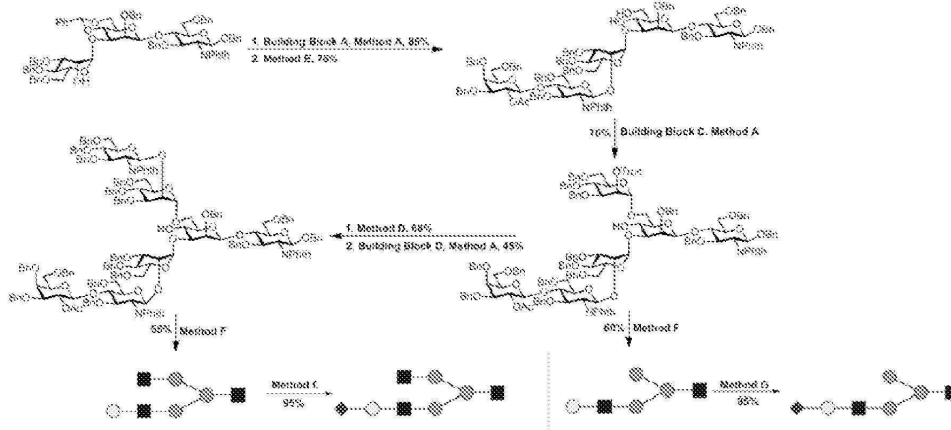
[0334] 비대칭 N-글리칸을 합성하기 위한 실험적 과정

[0335] [반응식 2]



[0336]

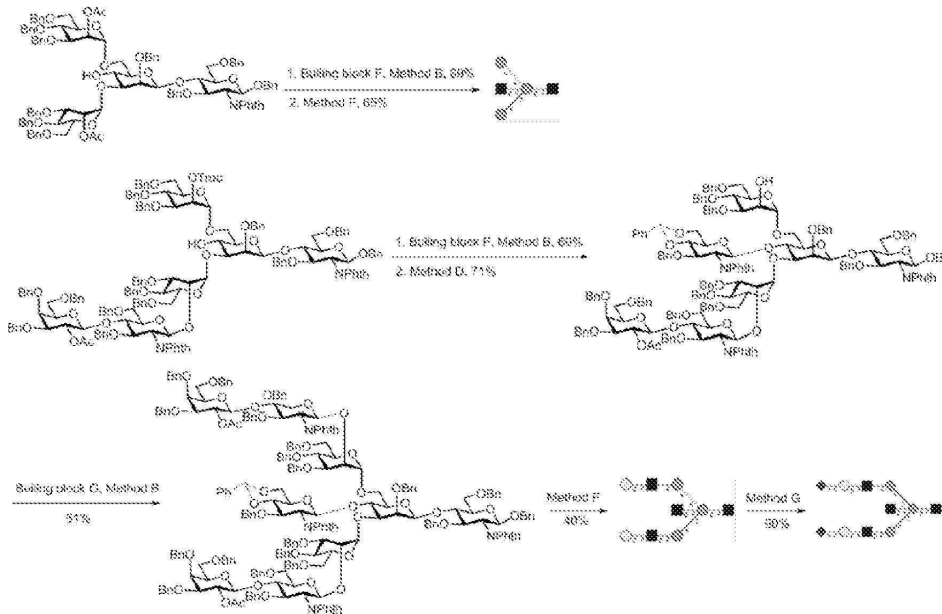
[0337] [반응식 3]



[0338]

[0339] 2등분 GlcNAc N-글리칸을 합성하기 위한 실험적 과정

[0340] [반응식 4]



[0341]

[0342] **실시예 1: IgG1 항체의 당가공**

[0343] 상기 연구의 목표는 항암 및 소염 기능 둘 다에 최적화된 활성을 갖는 동중성 항체를 제조하는 것이다. 따라서, 시판되는 리톡시맵 IgG1은 이것이 암 및 자가면역 질환 둘다의 치료를 위해 사용되어 왔기 때문에 모델로서 선택된다. 당단백질 리모델링의 전략을 사용하여 Fc 영역에서 모노-GlcNAc를 갖는 동중성 항체를 먼저 수득하고 이어서 순수한 합성 글리칸은 모노-GlcNAc 항체와 연결하여 활성 검정을 위해 동중성 항체를 수득하는 것이다 (도 1a). 이. 콜라이로부터 푸코시다제 BfFucH는 엔도글리코시다제, 단독의 스트렙토코커스 피로게네 (*Streptococcus pyogenes*)로부터 EndoS 또는 Endo F1/F3 또는 Endo F1/S의 혼합물과 조합하여 사용하여 하루 이내에 원-팟에서 동중성 모노-GlcNAc 당화된 항체를 제조하는 것이다. 이러한 푸코시다제는 항온처리 20일을 요구하는 소 신장으로부터의 푸코시다제 보다 효율적이었다(23). 1주일 동안 37℃에서 항온처리는 리톡시맵 구조를 악화시키고 이의 항원에 대한 결합 친화성을 약 15% 상실시키는 것으로 밝혀졌다(지지 정보). 이어서, EndoS 돌연변이체를 사용함에 의해(23), 일련의 합성 글리칸 옥사줄린은 모노-GlcNAc 리톡시맵으로 성공적으로 전달되어 후속적 결합 및 기능성 검정을 위해 Fc 영역에서 상이한 글리칸을 갖는 동중성 리톡시맵을 형성하는 것이다.

[0344] **실시예 2: 2, 3- 및 2, 6-시알화된 리톡시맵 사이의 특징**

[0345] 라베츠(Ravetch) 그룹은 2,6-시알화된 IVIG가 2,3-시알화된 IVIG와 비교하여 소염 활성에 관여하는 주요 구조인

것으로 보고하였지만, 상이한 Fc  $\gamma$  Rs와의 세부적인 상호작용은 연구되지 않았다(11). 더욱이, 라우 연구는 항체 내 고수준의 시알화가 ADCC를 약화시킴을 보여주었지만 (12), 2,6- 및 2,3-시알화된 항체 둘다가 세포독성에 대해 유사한 효과를 갖는지가 명백하지 않았다. 이들 시알화 연결체의 차이를 연구하기 위해, 본원 발명자는 모노-GlcNAc 리톡시맵으로부터 2,6- 및 2,3-시알화된 항체(2,6NSCT-리톡시맵 및 2,3NSCT-리톡시맵으로서 지칭되는)를 제조하였다. 비-변형된 리톡시맵과 비교하여, 모노-GlcNAc 리톡시맵은 Fc  $\gamma$  RIIb에 대한 것을 제외하고는 Fc  $\gamma$  RIIa, Fc  $\gamma$  RIIa, Fc  $\gamma$  RI 및 C1q에 대한 결합 친화성을 완전히 상실시키거나 실질적으로 감소시킴을 보여주었다. 그러나, 2,6-NSCT-리톡시맵의 구조를 형성하기 위해 글리칸의 연장 후, Fc  $\gamma$  RIIa, Fc  $\gamma$  RIIb 및 특히 Fc  $\gamma$  RIIa에 대한 이의 결합 친화성은 증가하였지만 어떠한 상당한 변화가 C1q에 대해 관찰되지 않았다(표 11A). 상이하계, 2,3-NSCT-리톡시맵에 대해, Fc  $\gamma$  RIIa와의 상호작용만이 부분적으로 증가하였지만 Fc  $\gamma$  RIIb 및 Fc  $\gamma$  RIIa에 대한 이의 인지는 변화되지 않거나 심지어 감소하였다(표 11A). C1q의 리톡시맵 및 2,6-NSCT-리톡시맵으로의 비교가능한 결합 친화성에 상응하여, FACS 결과는 항체 둘다가 CDC에서 병행적 경향을 나타냄을 보여주었다(표 11B). 그러나, 2,3-NSCT-리톡시맵의 세포독성은 절반 최대 효과적인 농도 (EC50)의 보다 높은 값으로 나타난 바와 같이 2,6-NSCT-리톡시맵의 것 보다 낮았다(표 11B).

[0346] CDC에 추가로, ADCC는 또한 항체와 관련된 세포독성을 고려하는데 주요 문제점이다. IgG1의 탈푸코실화는 탈푸코실화된(afucosylated) Fc-글리칸과 Fc  $\gamma$  RIIa 간의 상호작용을 증가시킴을 통해 ADCC 효과를 효과적으로 상승시키는 것으로 보고되었다(5, 33). 본원 발명자는 3개의 상이한 CFSE-표지된 B 림프종 세포인, Raji, Ramos 및 SKW6.4를 사용하는 유동 세포측정기상에서 비처리된 리톡시맵 및 처리된 mAb인 2,3-NSCT- 및 2,6-NSCT-리톡시맵에 의해 유도된 PBMC 매개된 ADCC 검정에서 PI 염색된 죽은 세포를 모니터링하였다. 실제로, 시판되는 리톡시맵과 비교하여, 2,6-NSCT- 및 2,3-NSCT-리톡시맵 둘다는 Fc  $\gamma$  RIIa와 보다 강한 상호작용을 보여주었고 ADCC에서 EC50은 보다 작았다(표 11A 및 11C). 흥미롭게도, 2,6-시알릴 연결체는 Fc  $\gamma$  RIIa 및 ADCC에 대해 우수한 친화성 및 효과를 보여주는 반면, 2,3-연결체는 보다 약한 활성을 가졌다. 동일한 항체의 ADCC 결과는 Raji, Ramos 및 SKW6.4를 포함하는 상이한 표적 세포 중에서 비교할만 하다(표 11C).

#### [0347] 실시예 3: 다양한 탈푸코실화된 리톡시맵의 결합 친화성 및 B 세포 고갈 활성

[0348] 세포독성이 2,6-시알화에 의해 영향받는지 연구하기 위해, 본원 발명자는 2등분된 변형, 3'-아아에서 모노-시알화, 트리-만노스 코어, 말단 GlcNAc 엔딩, 갈락토스 테일을 갖는 글리칸 및 다른 비대칭 글리칸을 함유하는 것들을 포함하는 다른 동종성 탈푸코실화된 리톡시맵을 제조하였다. 표면 플라스마 공명 분석에서, 변형된 탈푸코실화된 리톡시맵의 어떠한 것도 2,6-NSCT-리톡시맵 보다 Fc  $\gamma$  RII에 대해 보다 강한 결합 친화성을 나타내지 않았지만, 상이한 당형태 중에서 일부 Kd 변화가 관찰되었다(표 12). 이어서, 본원 발명자는 유동 세포측정 상에서 CD19<sup>+</sup> CD3<sup>-</sup> B 세포를 분석함에 의해 인간 B 세포의 PBMC 매개된 고갈에서 가공된 항체의 세포독성 유도 연구를 수행하였다. SPR 데이터에 상응하는, 2,6-NSCT-리톡시맵의 B 세포 고갈 효능은 항체 농도가 10 ng/mL 이상인 경우 최고였다(도 2a). 더욱이, 2,6-NSCT-리톡시맵의 활성은 또한 10개 공여자의 전혈 B 세포 고갈 시험에서 비-변형된 리톡시맵 보다 훨씬 높았고 p값은 0.0016인 반면, 모노-GlcNAc 리톡시맵은 최저 활성을 보여준다(도 2b). 이들 데이터는 면역글로불린 G1 상의 2,3- 및 2,6-시알화가 이의 기능에 대해 상이한 활성을 가졌고 2,6-NSCT가 B 세포 고갈에 대해 리톡시맵에 이로운 지지를 하였다. 상기 결과는 많은 샘플이, 2,3-시알화를 함유하지만 2,6-연결체가 거의 없는 다양한 글리칸을 갖는 단백질을 발현하는 CHO 세포로부터 기원했기 때문에 이전의 연구에서 확인되지 않았다(34).

#### [0349] 실시예 4: 내성 세포주에 대한 2,6-NSCT 리톡시맵의 ADCC 효능

[0350] 많은 약제 처럼, 리톡시맵은 고용량 및 장기 약물 처리로 인한 내성을 접하게 되었다(35, 36). 2,6-NSCT-리톡시맵이 약물 내성 세포에 대해 효과적인지를 이해하기 위해, 본원 발명자는 Ramos 및 Raji의 리톡시맵-내성 세포주를 제조하여 2,6-NSCT 변형된 리톡시맵의 상이한 농도하에 이들의 PBMC 매개 ADCC를 평가하였다(도 2c-e). 장기간동안 리톡시맵과 함께 배양된 후, Ramos 및 Raji B 세포는 표면에 CD20 발현이 덜한 것들로 진화하였다(도 2c). 결과로서, 비변형된 리톡시맵이 내성 군주에 대한 이의 활성을 급격히 상실한다는 것은 놀라운 것이 아니다(도 2d 및 2e). 그러나, 2,6-NSCT 리톡시맵은 비-내성 및 내성 세포 둘 다에 대해 최고 ADCC 활성을 보여주었다.

#### [0351] 실시예 5: 다양한 탈푸코실화된 헤르셉틴의 Fc $\gamma$ RIIa 결합 친화성

[0352] 2,6-NSCT 글리칸 약물치료로부터 유래되어 나타나는 세포독성이 다른 항체에 적용될 수 있는지를 추가로 평가하기 위해, 또 다른 항체인 헤르셉틴은 상이한 글리칸 구조를 갖도록 변형되었고 평가되었다.



- [0353] 당가공된 헤르셉틴과 Fc $\gamma$ RIIIa의 역학적 결합 분석은 표 3에 열거한다. ELISA 분석에서 2,3- 및 2,6-NSCT-리톡시맙의 친화성 차이와 유사하게, 2,6-NSCT-헤르셉틴은 Fc $\gamma$ RIIIa과 보다 강한 상호작용을 보여주었고 반면 해로운 효과는 2,3-NSCT-헤르셉틴에서 관찰되었다. 한편, Fc 탈푸코실화 효과는 2,6- 또는 2,3- 연결체 둘다를 갖는 시알화의 효과 보다 더 유의적이었다. 더욱이, 모든 당가공된 헤르셉틴의 상응하는 Kd는 리톡시맙에서의 경우와 유사한 경향을 보여주었다(표 13). G1, G2, 및 2,6-NSCT와 같은 항체는 G3, G4, G5, G6, G7, G9 및 2,3-NSCT와 같은 다른 것들과 비교하여 Fc $\gamma$ RIIIa에 대한 친화성에서 9배 초과 증가를 가졌다. 특히, 리톡시맙 및 헤르셉틴 둘다의 경우에, 탈푸코실화된 당가공된 G8은 ADCC 활성에 대한 이의 탈푸코실화 이점을 거의 상실시켰다. 2등분된 글리칸을 갖는 항체인 G9은 이것이 2등분되지 않은 유사체 G4와 비교하는 경우 리톡시맙 및 헤르셉틴 둘다에서 Fc $\gamma$ RIIIa에 대한 친화성에서 약간 증가하였지만 유의적 증가를 보여주지 않았다. 전체적으로, 2,6-NSCT-헤르셉틴은 실제로 또한 SPR 분석에서 이들 탈푸코실화된 유사체 중에서 최고의 Fc $\gamma$ RIIIa 결합 친화성을 보여주었다.
- [0354] 헤르셉틴의 Fc $\gamma$ RIIIa 매개된 ADCC에 대한 Fc 당화 효과를 추가로 이해하기 위해, 본원 발명자는 V158 Fc $\gamma$ RIIIa 가공된 주르켓 이펙터 세포의 활성화된 T-세포(NFAT) 경로의 시그널 전달 핵 인자를 사용하고 E/T 비율이 6인 표적 세포로서 SKBR3을 취한 ADCC 리포터 생검정을 수행하였다. 역학적 데이터와 일치하여, 탈푸코실화된 G8 헤르셉틴의 EC50은 Fc $\gamma$ RIIIa 활성의 상실을 보여주었고 푸코실화된 헤르셉틴과 유사한 ADCC 효과를 나타냈다(도 3a). 흥미롭게도, 이전의 연구는 증가된 수준의  $\beta(1,4)$ -N 아세틸글루코사미닐트랜스퍼라제 III에 의해 유발된 항체상에서 보다 2등분된 글리칸이 이의 보다 강한 ADCC와 서로 관련이 있음을 보여주었다(37). 반대로, 본원 발명의 연구는 어떠한 유의적인 Kd 차이가 헤르셉틴 및 리톡시맙, G9 및 G4의 2등분되고 비-2등분된 항체간에 관찰되지 않았고, 헤르셉틴 당형태의 EC50 값은 Fc $\gamma$ RIIIa 세포-매개된 검정에서 유사한 세포독성 프로필을 보여주었다(도 3b). 따라서, 본원 발명자는 2등분된 IgG1이 ADCC를 지배하는 Fc $\gamma$ RIIIa에서 보다 우수하게 수행하지 않은 것으로 결론지었다.
- [0355] 추가로, 비-시알화된 G1-헤르셉틴과 비교하여, 2,3-시알화된 헤르셉틴의 ADCC는 명백히 감소한 반면 2,6-NSCT 헤르셉틴은 여전히 이의 활성을 유지하였고(도 3c), 이는 시알화 매개된 ADCC 감소가 2,3-연결체에 의해 유발됨을 지적한다. 항체 약물 치료에서 2,6-NSCT의 잠재적인 활용을 탐구하기 위해, 본원 발명자는 추가의 활성 연구에 대한 각각의 플레이트에서 최저 EC50을 갖는 당가공된 탈푸코실화된 샘플을 선택하였고(도 3d), 모든 샘플은 우수한 세포독성을 나타냈고 낮은 농도하에서 암 세포의 절반을 사멸시킬 수 있음을 밝혔다.
- [0356] **실시예 6: 항-바이러스 항체에서 2,6-NSCT 글리칸의 ADCC 효과**
- [0357] Fc 약물 치료에서 2,6-NSCT 글리칸의 활용을 탐구하기 위해, 본원 발명자는 항체의 동종성 2,6-NSCT 글리칸 변형이 바이러스 감염된 세포를 제거하는 항-바이러스 항체의 ADCC 효과를 증가시킬 수 있는지를 평가하였다. 본원 발명자는 다양한 아유형의 인플루엔자의 헤마글루티닌(HA)의 줄기 영역에 결합하는 공지된 광범위하게 항-인플루엔자 중화 항체, FI6를 제조하였고, 이의 중화 활성은 ADCC에 연관되었다(38). FI6 항체의 Fc 글리칸은 동종성 2,6-NSCT 글리칸으로 변형되었고 인플루엔자 감염된 세포를 모방하도록 세포 표면에 HA를 발현하는 인간 HEK293T 세포와 혼합하고; 이어서, ADCC 효과는 표적 세포에서 PBMC-매개된 사멸과 이펙터 세포의 활성화된 T-세포 경로의 ADCC 시그널 전달 핵 인자(NFAT)의 활성화 둘다에 의해 측정하였다. 세포독성 결과는 동종성 2,6-NSCT 글리칸 변형된 FI6(FI6m)은 실제로 통상의 변형되지 않은 FI6 항체 보다 상당히 높은(2- 내지 3-배 증가) ADCC 활성을 나타냄을 보여주었다(도 4a). 추가로, 이펙터 NK 세포의 ADCC 시그널 전달 NFAT 경로의 활성화는 또한 동종성 FI6m이 사용되는 경우 2배 증진과 함께 관찰되었다(도 4b). 본원 발명의 관찰은 항-바이러스 항체의 동종성 2,6-NSCT 글리칸 변형은 바이러스 감염된 세포에 대한 ADCC의 이펙터 기능을 증진시키기 위한 일반적인 전략일 수 있음을 지적했다.
- [0358] 이어서, 본원 발명자는 FI6의 동종성 2,6-NSCT 변형에 의한 시험관내 ADCC 증진이 인플루엔자 H1N1의 치사량으로 감염된 마우스 모델에서 보호로 해독될 수 있는지를 시험하였다. FI6 모노클로날의 수동적 전달은 이전에 H1N1 감염을 보호하는 것으로 나타났다(39). 실제로, 동종성 2,6-NSCT 글리칸 변형과 함께, FI6m은 마우스가 A/캘리포니아/07/2009 H1N1 바이러스로 챌린지되는 경우 상당히 우수한 보호를 사용한다(도 4c). 생존율은 FI6m에 대해 66%였고 복합체 유형의 글리칸의 혼합물을 갖는 통상의 FI6에 대해서는 11%였다. 결론적으로, 본원 발명자는 인플루엔자 바이러스 감염 마우스 모델에서, 항체의 동종성 2,6-NSCT 글리칸 변형에 의한 시험관내 ADCC 증진이 바이러스 감염으로부터 생체내 보호와 일치함을 입증하였다.
- [0359] 표 11. 시판되는 리톡시맙과 당가공된 2,3-NSCT- 및 2,6-NSCT-리톡시맙의 Fc $\gamma$ Rs 결합 특징 및 기능성 검정.
- [0360] (A) Fc $\gamma$ Rs 및 C1q에 대한 모노-GlcNAc, 2,3-NSCT- 및 2,6-NSCT-리톡시맙의 결합 실험은 ELISA에서 수행하였



다. 탈당화는 모노-GlcNAc 리톡시맵이 Fc $\gamma$ RIIIa—Fc $\gamma$ RI 및 C1q에 대한 이의 결합 친화성이 상실되도록 하는 반면 2,3- 및 2,6-시알화된 항체는 이들의 친화성을 복구하였고 2,6-시알화된 리톡시맵은 Fc $\gamma$ RIIa, Fc $\gamma$ RIIb 및 Fc $\gamma$ RIIIa와 증진된 상호작용을 보여주었다. (B) CDC 검정은 FACS에서 수행하였다. 상기 2,6-NSCT-리톡시맵은 비-처리된 항체와 유사한 CDC 활성을 보여주었지만 2,3-NSCT-리톡시맵의 결과는 높은 EC50 값과 함께 감소된 CDC 활성을 보여주었다. (C) 새로운 PBMC는 ADCC 검정을 매개하였다. 검정 실험은 3개의 상이한 B 세포, Raji, Ramos 및 SKW6.4와 함께 수행하였다. 상기 결과는 EC50 값에 의해 측정된 활성이 비변형된 리톡시맵에서 당가공된 탈푸코실화된 2,3-NSCT-리톡시맵으로 상당히 증가하였음을 보여주었고 2,6-NSCT-리톡시맵이 최고였다.

[0361] 표 12. 표면 혈장 공명 분석에 의해 측정된 Fc $\gamma$ RIIIa에 대한 당가공된 리톡시맵 IgG1의 결합 친화성.

[0362] 분석된 항체는 인간 Fab 포획 키트를 수단으로 포획하였고 단일 주기 역학적 방법으로 검출하였다.

[0363] 표 13. 표면 혈장 공명 분석을 사용한 Fc $\gamma$ RIIIa에 대한 당가공된 헤르셉틴 IgG1의 결합 친화성.

[0364] 분석된 항체는 염소 항-인간 F(ab')<sub>2</sub>의 F(ab')<sub>2</sub> 단편에 의해 포획되었고 이중 참조와 함께 단일 주기 역학적 방법에 의해 검출하였다. 나타낸 데이터는 2개의 레플리케이트를 대표한다.

[0365] [표 11]

(A)

| EC50 (nM)         | Roche- 리톡시맵 | 2,6-NSCT- 리톡시맵  | 2,3-NSCT- 리톡시맵 | N- 리톡시맵 |
|-------------------|-------------|-----------------|----------------|---------|
| Fc $\gamma$ RIIIa | 6.2~9.0     | 0.24~0.27 (30x) | 1.2            | 36.3    |
| Fc $\gamma$ RIIa  | 5.4         | 3.0 (2.1x)      | 16.5           | >110    |
| Fc $\gamma$ RI    | 0.19        | 0.23            |                | 0.85    |
| Fc $\gamma$ RIIb  | 0.51        | 0.28 (1.8x)     | 0.53           | 0.32    |
| C1q               | 6.5         | 8.0             |                | >>50    |

(B)

| EC <sub>50</sub> (ug/ml) | Ramos         |
|--------------------------|---------------|
| 리톡시맵 (Roche)             | 0.033         |
| 2,3-NSCT- 리톡시맵           | 0.086 (0.45X) |
| 2,6-NSCT- 리톡시맵           | 0.039         |

(C)

| EC <sub>50</sub> (ug/ml) | Raji         | Ramos        | SKW6.4      |
|--------------------------|--------------|--------------|-------------|
| 리톡시맵 (Roche)             | 0.319        | 4.379        | 2.074       |
| 2,3-NSCT- 리톡시맵           | 0.086(3.7X)  | 1.45(3.02X)  | 1.218(1.7X) |
| 2,6-NSCT- 리톡시맵           | 0.022(14.5X) | 0.377(11.6X) | 0.276(7.5X) |

[0366]

[0367] [표 12]

| 시 샘플     | ka (1/Ms) | kd (1/s) | KD (M)   | Rmax (RU) | 배수      |
|----------|-----------|----------|----------|-----------|---------|
| 리톡시맵     | 2.07E+05  | 0.03344  | 1.62E-07 | 49.29     | 1- 배    |
| 2,6-NSCT | 6.86E+05  | 0.005681 | 8.28E-09 | 90.48     | 19.6- 배 |
| G1       | 6.55E+05  | 0.006116 | 9.33E-09 | 93.4      | 17.4- 배 |
| G7       | 2.22E+05  | 0.01391  | 6.27E-08 | 56.28     | 2.6- 배  |
| G4       | 3.56E+05  | 0.01338  | 3.75E-08 | 67.01     | 4.3- 배  |
| G9       | 2.67E+05  | 0.006993 | 2.62E-08 | 76.02     | 6.2- 배  |
| G3       | 2.39E+05  | 0.01996  | 8.36E-08 | 51.03     | 1.9- 배  |
| G8       | 4.44E+05  | 0.05322  | 1.20E-07 | 38.43     | 1.4- 배  |
| G2       | 3.25E+05  | 0.004263 | 1.31E-08 | 72.12     | 12.4- 배 |
| G6       | 3.67E+05  | 0.01     | 2.72E-08 | 70.8      | 6.0- 배  |
| G5       | 3.33E+05  | 0.006284 | 1.89E-08 | 67.52     | 8.6- 배  |

[0368]

[0369] \* 상기 배수 수치는 시판되는 리톡시맵의  $K_D$  값을 당가공된 리톡시맵의  $K_D$  값으로 나누어 계산하였다.

[0370] [표 13]

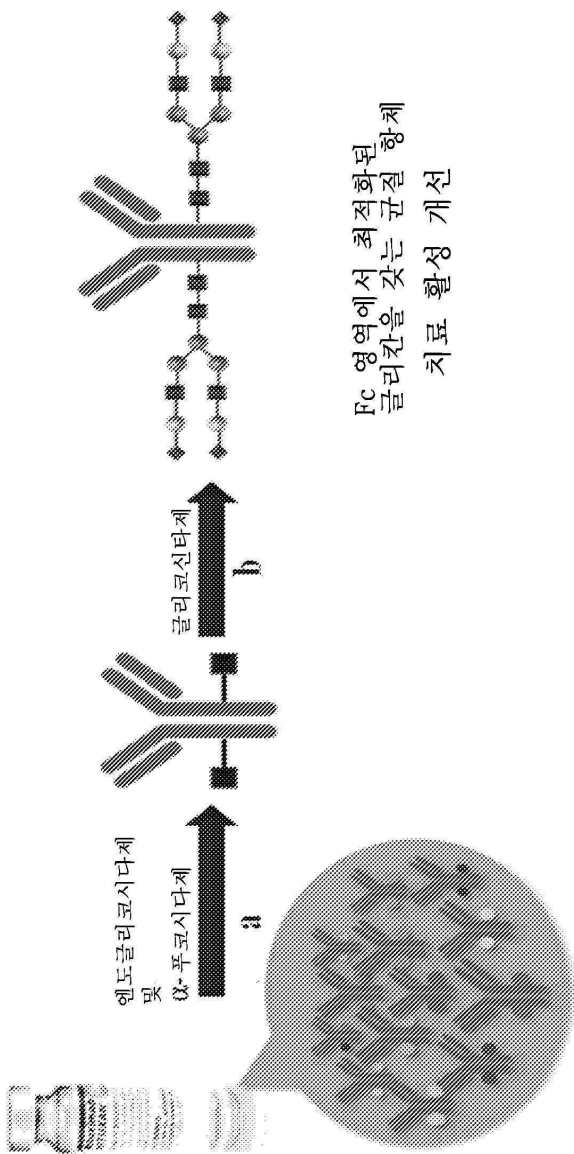
| 샘플       | ka (1/Ms) | kd (1/s) | KD (M)   | Rmax (RU) | 배수     |
|----------|-----------|----------|----------|-----------|--------|
| 헤르셉틴     | 1.45E+05  | 0.0131   | 9.09E-08 | 30.01     | 1- 배   |
| 2,6-NSCT | 2.14E+05  | 0.00209  | 9.76E-09 | 44.98     | 9.3- 배 |
| G1       | 2.04E+05  | 0.00192  | 9.37E-09 | 55.68     | 9.7- 배 |
| G7       | 1.68E+05  | 0.0071   | 4.22E-08 | 41.54     | 2.2- 배 |
| G4       | 1.59E+05  | 0.00447  | 2.81E-08 | 53.98     | 3.2- 배 |
| G9       | 1.74E+05  | 0.00406  | 2.33E-08 | 39.88     | 3.9- 배 |
| G3       | 1.61E+05  | 0.00498  | 3.08E-08 | 48.19     | 3.0- 배 |
| G8       | 2.03E+05  | 0.0156   | 7.68E-08 | 18.15     | 1.2- 배 |
| G2       | 2.15E+05  | 0.00207  | 9.61E-09 | 70.48     | 9.5- 배 |
| G6       | 1.23E+05  | 0.00465  | 2.72E-08 | 52.82     | 2.4- 배 |
| G5       | 1.67E+05  | 0.00318  | 1.89E-08 | 59.89     | 4.8- 배 |
| 2,3-NSCT | 1.83E+05  | 0.00473  | 2.58E-09 | 26.95     | 3.5- 배 |

[0371]

[0372] \* 상기 배수 수치는 시판되는 헤르셉틴의  $K_D$  값을 당가공된 헤르셉틴의  $K_D$  값으로 나누어 계산하였다.

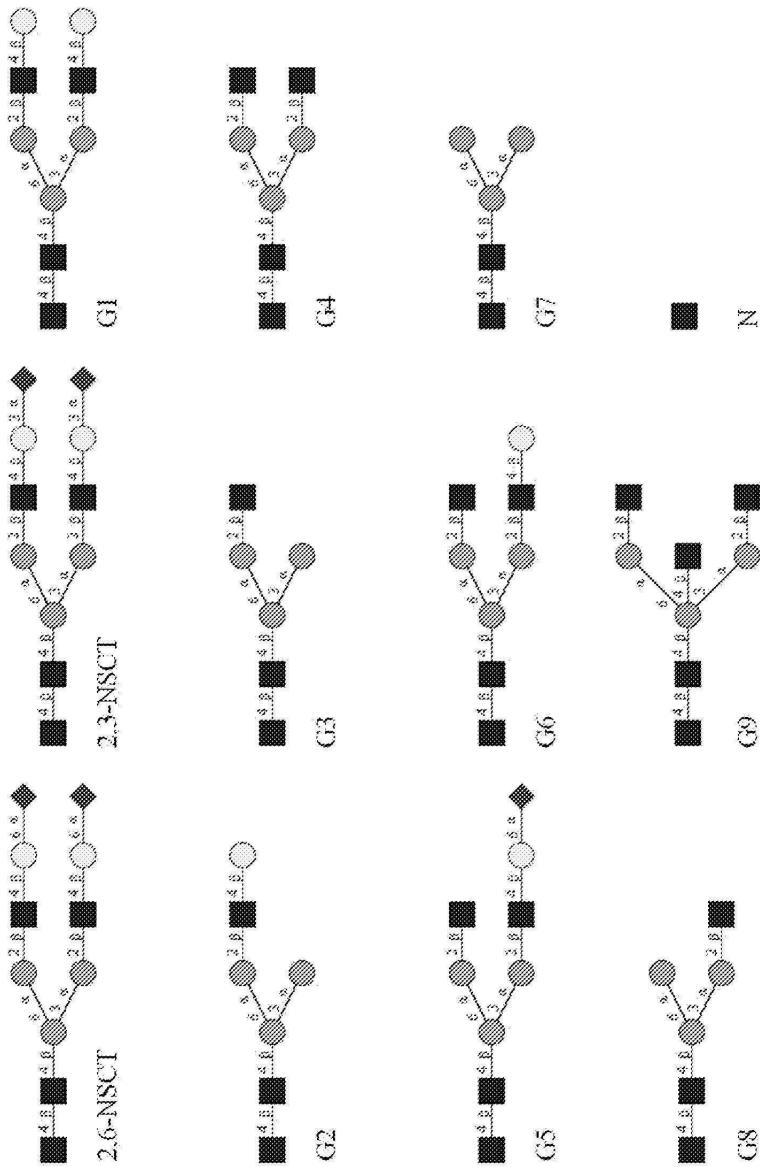
도면

도면1a

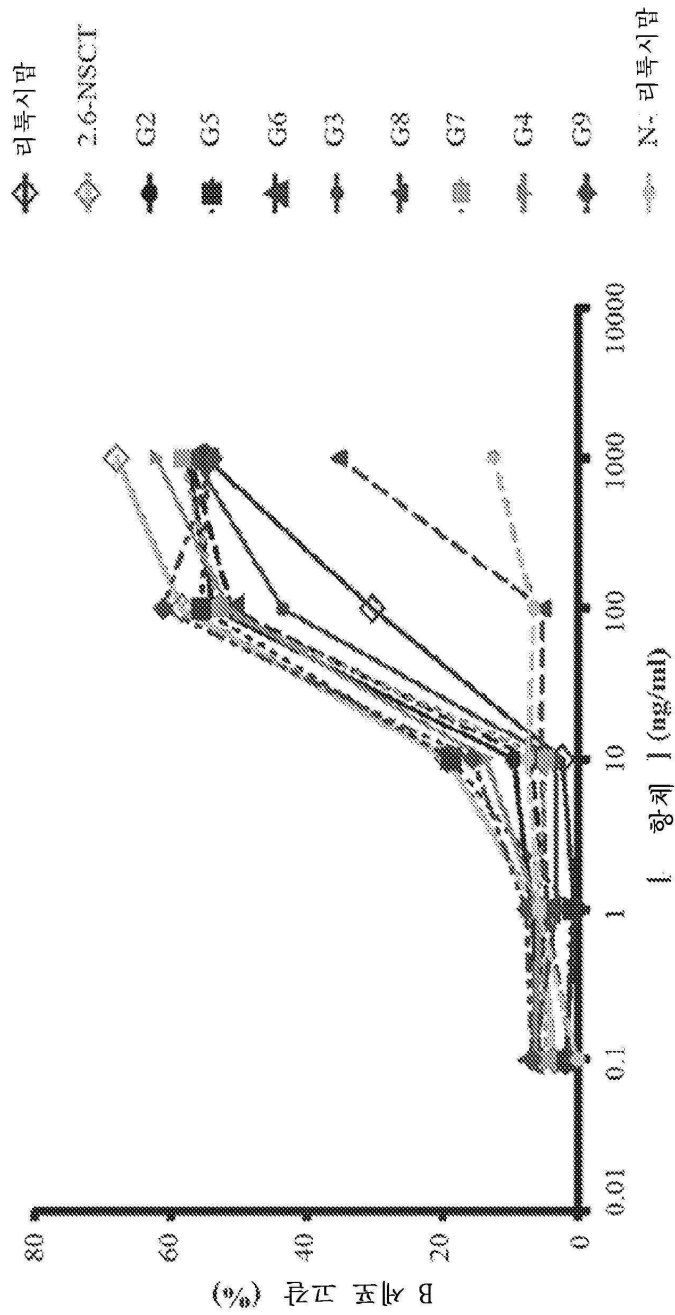


이증성 항체  
Fc Asn297 상의 50개 이상의 글리칸

도면1b



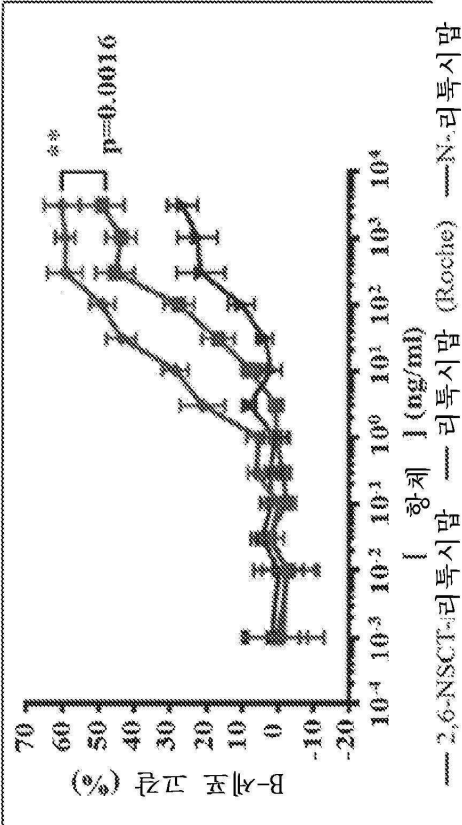
도면2a





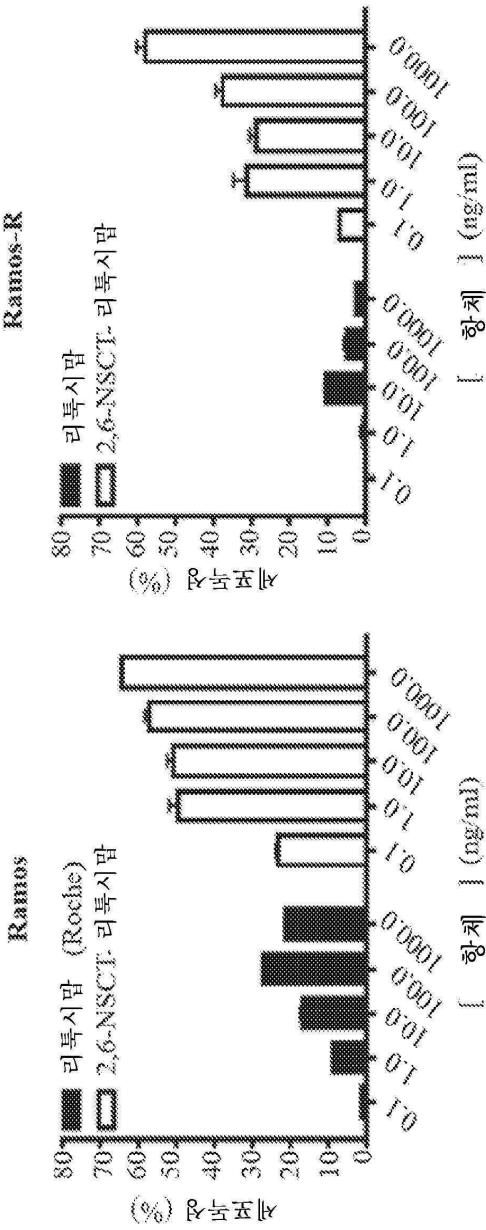
도면2b

| 전혈 B-세포 고갈               |                |  |
|--------------------------|----------------|--|
| EC <sub>50</sub> (ng/ml) | 인간 전혈 (n=10)   |  |
| 리톡시맙 (Roche)             | 0.0529         |  |
| 2,6-NSCT-리톡시맙            | 0.00932 (5.7X) |  |
| N-리톡시맙                   | 0.1301         |  |

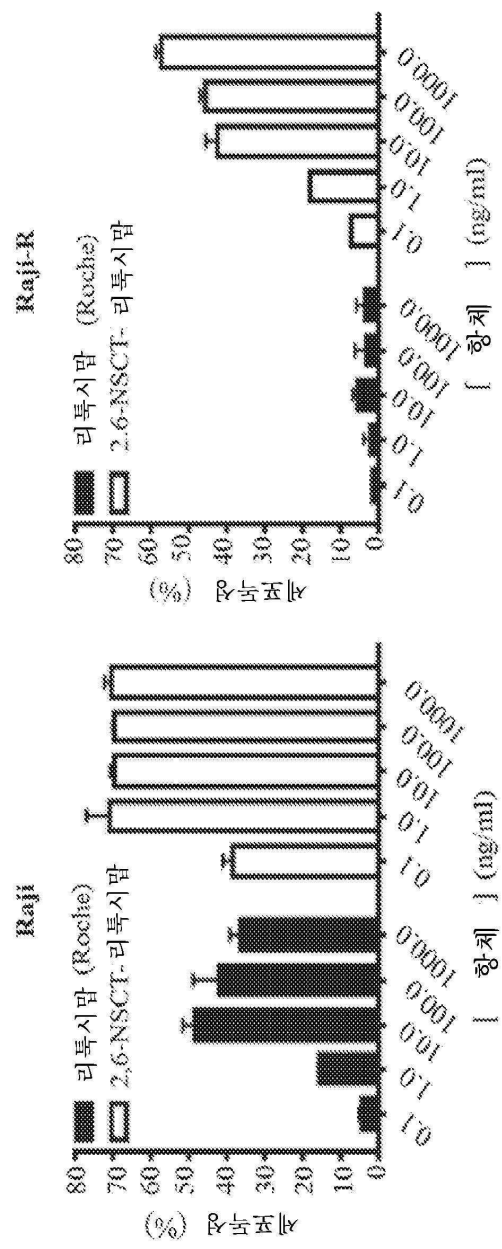




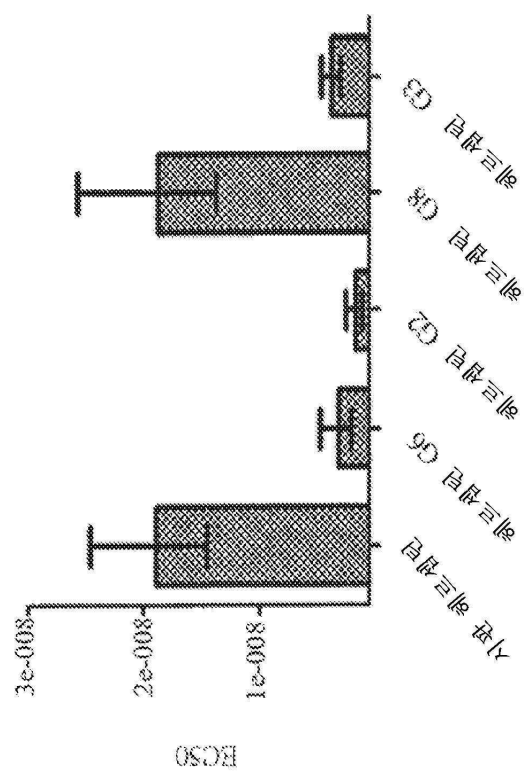
도면2d



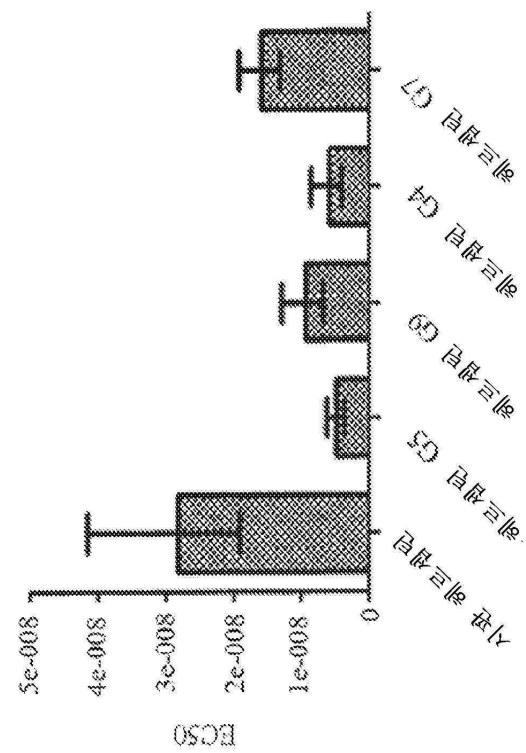
도면2e



도면3a

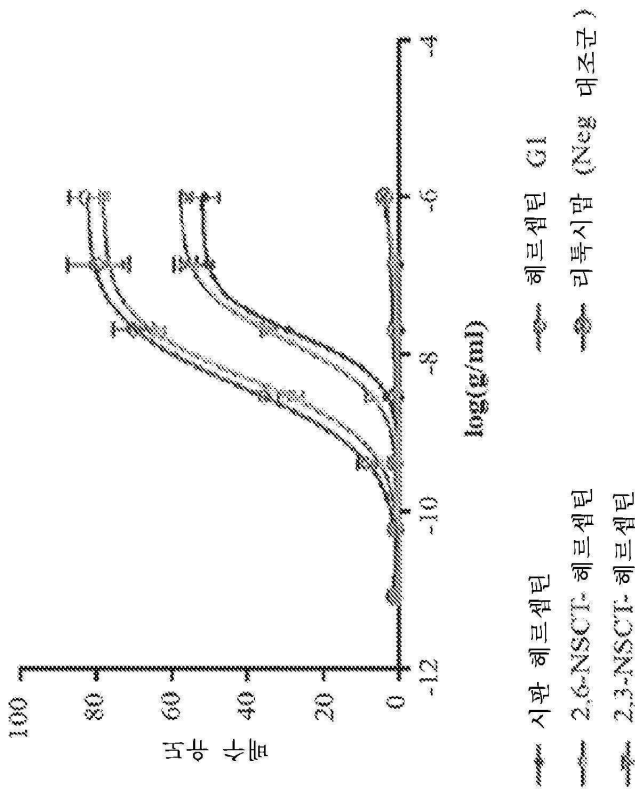


도면3b

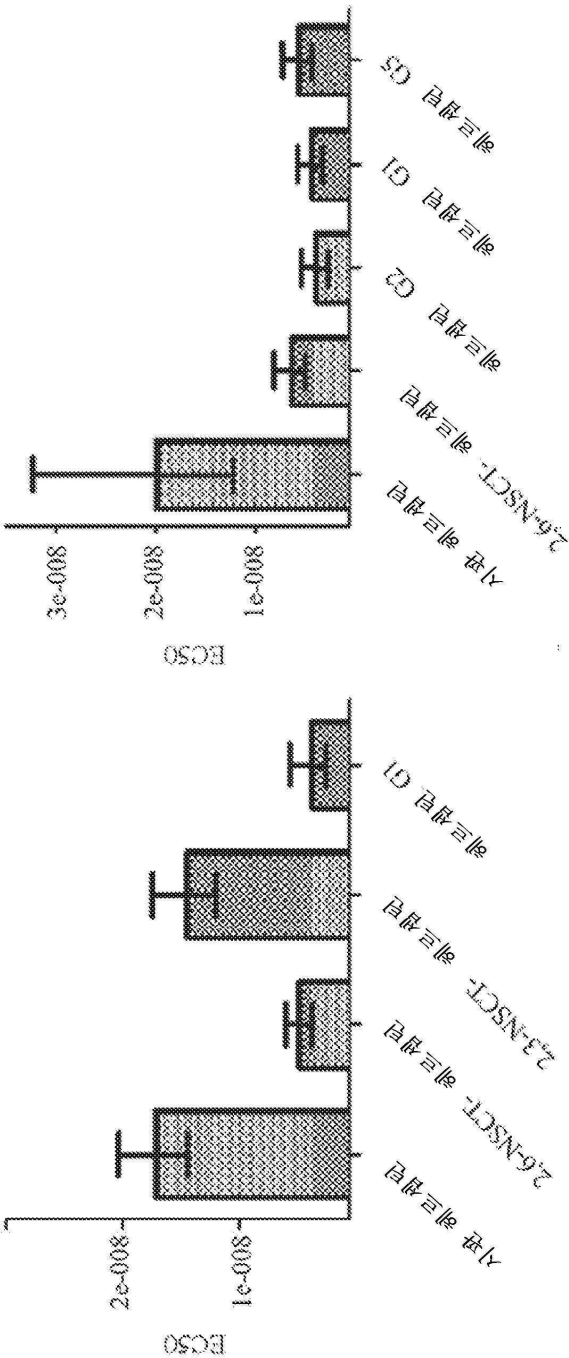




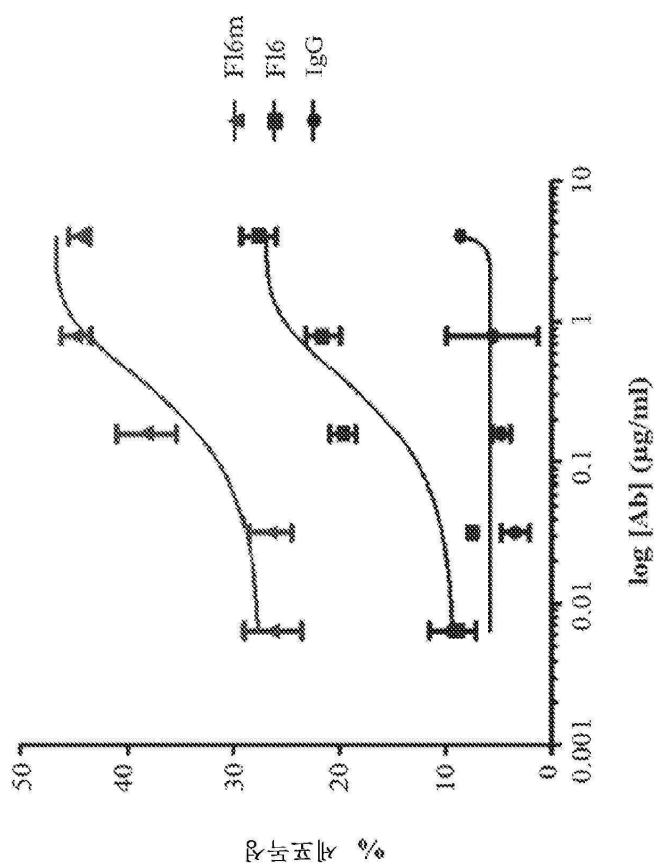
도면3c



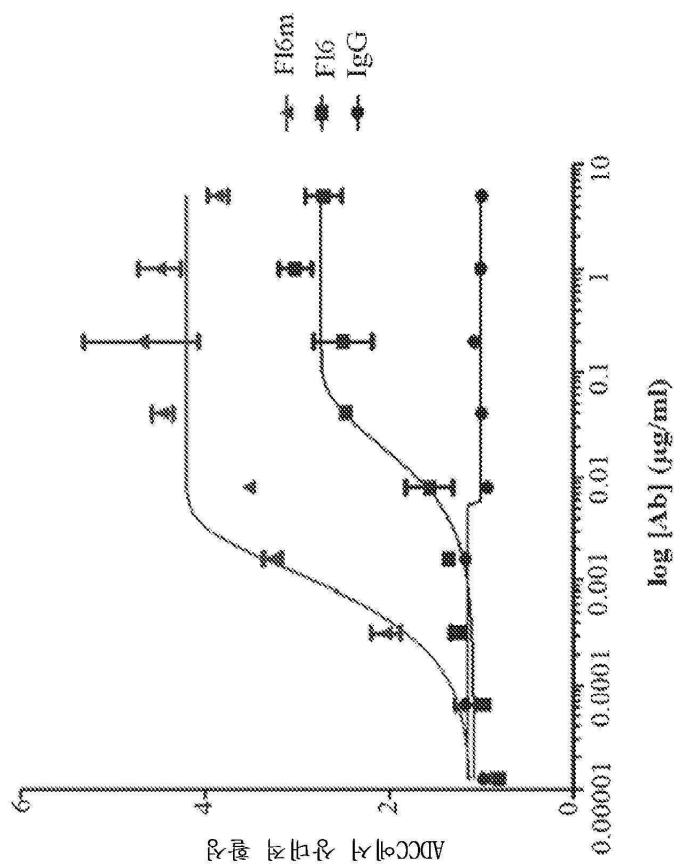
도면3d



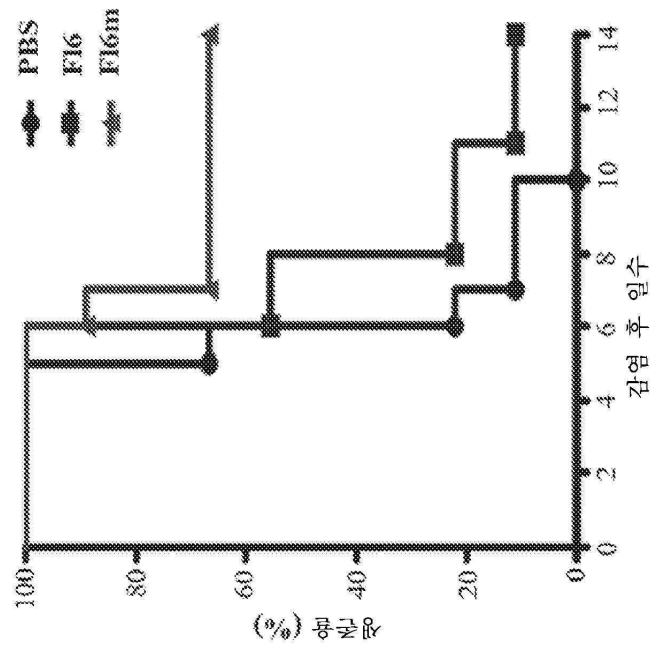
도면4a



도면4b



도면4c



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> WONG, CHI-HUEY

WU, CHUNG-YI

<120> COMPOSITIONS AND METHODS RELATING TO UNIVERSAL GLYCOFORMS FOR  
ENHANCED ANTIBODY EFFICACY

<130> G2112-02201

<140> 14/723,297

<141> 2015-05-27

<150> 62/110,338

<151> 2015-01-30

<150> 62/020,199

<151> 2014-07-02

<150> 62/003,908

<151> 2014-05-28

<150> 62/003,104

<151> 2014-05-27

<150> 62/003,136

<151> 2014-05-27

<160> 23

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 213

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
polypeptide

<400> 1

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

1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Ile

20 25 30

His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr

35 40 45



Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Val Arg Phe Ser Gly Ser

50

55

60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu

65

70

75

80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Thr Ser Asn Pro Pro Thr

85

90

95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro

100

105

110

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr

115

120

125

Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys

130

135

140

Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu

145

150

155

160

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser

165

170

175

Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala

180

185

190

Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe

195

200

205

Asn Arg Gly Glu Cys

210

<210> 2

<211> 451

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 2

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

1

5

10

15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr  
 20 25 30  
 Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45  
 Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe  
 50 55 60  
 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
  
 Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Ser Thr Tyr Tyr Gly Gly Asp Trp Tyr Phe Asn Val Trp Gly  
 100 105 110  
 Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ala Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser  
 115 120 125  
 Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala  
 130 135 140  
  
 Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val  
 145 150 155 160  
 Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala  
 165 170 175  
 Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val  
 180 185 190  
 Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His  
 195 200 205  
  
 Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys  
 210 215 220  
 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly  
 225 230 235 240  
 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met  
 245 250 255  
 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His

260                                      265                                      270  
 Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val  
 275                                      280                                      285  
 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr  
 290                                      295                                      300  
 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly  
 305                                      310                                      315                                      320  
 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile  
 325                                      330                                      335  
  
 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val  
 340                                      345                                      350  
 Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser  
 355                                      360                                      365  
 Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu  
 370                                      375                                      380  
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro  
 385                                      390                                      395                                      400  
  
 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val  
 405                                      410                                      415  
 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met  
 420                                      425                                      430  
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser  
 435                                      440                                      445  
 Pro Gly Lys  
 450  
 <210> 3  
 <400> 3  
 000  
 <210> 4  
 <400> 4  
 000  
 <210> 5

<211> 414

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 5

Gln Gln Lys Tyr Gln Pro Thr Glu Ala Asn Leu Lys Ala Arg Ser Glu

1 5 10 15

Phe Gln Asp Asn Lys Phe Gly Ile Phe Leu His Trp Gly Leu Tyr Ala

20 25 30

Met Leu Ala Thr Gly Glu Trp Thr Met Thr Asn Asn Asn Leu Asn Tyr

35 40 45

Lys Glu Tyr Ala Lys Leu Ala Gly Gly Phe Tyr Pro Ser Lys Phe Asp

50 55 60

Ala Asp Lys Trp Val Ala Ala Ile Lys Ala Ser Gly Ala Lys Tyr Ile

65 70 75 80

Cys Phe Thr Thr Arg His His Glu Gly Phe Ser Met Phe Asp Thr Lys

85 90 95

Tyr Ser Asp Tyr Asn Ile Val Lys Ala Thr Pro Phe Lys Arg Asp Val

100 105 110

Val Lys Glu Leu Ala Asp Ala Cys Ala Lys His Gly Ile Lys Leu His

115 120 125

Phe Tyr Tyr Ser His Ile Asp Trp Tyr Arg Glu Asp Ala Pro Gln Gly

130 135 140

Arg Thr Gly Arg Arg Thr Gly Arg Pro Asn Pro Lys Gly Asp Trp Lys

145 150 155 160

Ser Tyr Tyr Gln Phe Met Asn Asn Gln Leu Thr Glu Leu Leu Thr Asn

165 170 175

Tyr Gly Pro Ile Gly Ala Ile Trp Phe Asp Gly Trp Trp Asp Gln Asp

180 185 190

Ile Asn Pro Asp Phe Asp Trp Glu Leu Pro Glu Gln Tyr Ala Leu Ile

|   |     |     |     |
|---|-----|-----|-----|
| 195   | 200 | 205 |     |
| His Arg Leu Gln Pro Ala Cys Leu Val Gly Asn Asn His His Gln Thr |     |     |     |
| 210   | 215 | 220 |     |
| Pro Phe Ala Gly Glu Asp Ile Gln Ile Phe Glu Arg Asp Leu Pro Gly |     |     |     |
| 225   | 230 | 235 | 240 |
|   |     |     |     |
| Glu Asn Thr Ala Gly Leu Ser Gly Gln Ser Val Ser His Leu Pro Leu |     |     |     |
| 245   | 250 | 255 |     |
| Glu Thr Cys Glu Thr Met Asn Gly Met Trp Gly Tyr Lys Ile Thr Asp |     |     |     |
| 260   | 265 | 270 |     |
| Gln Asn Tyr Lys Ser Thr Lys Thr Leu Ile His Tyr Leu Val Lys Ala |     |     |     |
| 275   | 280 | 285 |     |
| Ala Gly Lys Asp Ala Asn Leu Leu Met Asn Ile Gly Pro Gln Pro Asp |     |     |     |
| 290   | 295 | 300 |     |
|   |     |     |     |
| Gly Glu Leu Pro Glu Val Ala Val Gln Arg Leu Lys Glu Val Gly Glu |     |     |     |
| 305   | 310 | 315 | 320 |
| Trp Met Ser Lys Tyr Gly Glu Thr Ile Tyr Gly Thr Arg Gly Gly Leu |     |     |     |
| 325   | 330 | 335 |     |
| Val Ala Pro His Asp Trp Gly Val Thr Thr Gln Lys Gly Asn Lys Leu |     |     |     |
| 340   | 345 | 350 |     |
| Tyr Val His Ile Leu Asn Leu Gln Asp Lys Ala Leu Phe Leu Pro Ile |     |     |     |
| 355   | 360 | 365 |     |
|   |     |     |     |
| Val Asp Lys Lys Val Lys Lys Ala Val Val Phe Ala Asp Lys Thr Pro |     |     |     |
| 370   | 375 | 380 |     |
| Val Arg Phe Thr Lys Asn Lys Glu Gly Ile Val Leu Glu Leu Ala Lys |     |     |     |
| 385   | 390 | 395 | 400 |
| Val Pro Thr Asp Val Asp Tyr Val Val Glu Leu Thr Ile Asp         |     |     |     |
| 405   | 410 |     |     |
|   |     |     |     |
| <210> 6   |     |     |     |
| <400> 6   |     |     |     |
| 000   |     |     |     |
| <210> 7   |     |     |     |
| <400> 7   |     |     |     |



000

<210> 8

<400> 8

000

<210> 9

<400> 9

000

<210> 10

<400> 10

000

<210> 11

<211> 450

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 11

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val

|   |     |     |     |
|---|-----|-----|-----|
| 115   | 120 | 125 |     |
| Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala |     |     |     |
| 130   | 135 | 140 |     |
| Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser |     |     |     |
| 145   | 150 | 155 | 160 |
| Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val |     |     |     |
| 165   | 170 | 175 |     |
| Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro |     |     |     |
| 180   | 185 | 190 |     |
| Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys |     |     |     |
| 195   | 200 | 205 |     |
| Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp |     |     |     |
| 210   | 215 | 220 |     |
| Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly |     |     |     |
| 225   | 230 | 235 | 240 |
| Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile |     |     |     |
| 245   | 250 | 255 |     |
| Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu |     |     |     |
| 260   | 265 | 270 |     |
| Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His |     |     |     |
| 275   | 280 | 285 |     |
| Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg |     |     |     |
| 290   | 295 | 300 |     |
| Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys |     |     |     |
| 305   | 310 | 315 | 320 |
| Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu |     |     |     |
| 325   | 330 | 335 |     |
| Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr |     |     |     |
| 340   | 345 | 350 |     |
| Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu |     |     |     |
| 355   | 360 | 365 |     |

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp  
 370 375 380  
 Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val  
 385 390 395 400  
 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp  
 405 410 415  
 Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His  
 420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro  
 435 440 445

Gly Lys

450

<210> 12

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 polypeptide

<400> 12

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

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45  
 Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60  
 Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80  
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro  
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala

100 105 110  
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly  
115 120 125  
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala  
130 135 140  
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln  
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser  
165 170 175  
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr  
180 185 190  
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser  
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

<210> 13

<400> 13

000

<210> 14

<400> 14

000

<210>

15

<400> 15

000

<210> 16

<400> 16

000

<210> 17

<400> 17

000

<210> 18

<400> 18

000

<210> 19

<400> 19

000

<210> 20

<400> 20

000

<210> 21

<211> 224

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 21

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Ser Ala Ile Thr Trp Asn Ser Gly His Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala

130 135 140

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val



145                      150                      155                      160  
 Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala  
                          165                      170                      175  
 Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val  
                          180                      185                      190  
 Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His  
                          195                      200                      205  
 Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys

210                      215                      220  
 <210> 22  
 <211> 248  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
                          polypeptide

<400> 22  
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1                      5                      10                      15  
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Tyr  
                          20                      25                      30  
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35                      40                      45  
 Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
                          50                      55                      60  
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65                      70                      75                      80  
 Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Arg Tyr Asn Arg Ala Pro Tyr  
                          85                      90                      95  
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala

100                      105                      110  
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly  
                          115                      120                      125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala  
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln  
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser

165 170 175  
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr  
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser  
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys  
210 215 220

Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr

225 230 235 240  
Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

245

<210> 23

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

6xHis tag

<220>

<223> See specification as filed for detailed description of  
substitutions and preferred embodiments

<400> 23

His His His His His His

1

5