(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2022년12월26일
(11) 등록번호 10-2480815
(24) 등록일자 2022년12월20일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)
A61K 47/68 (2017.01) *A61K 51/10* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) *G01N 33/574* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 16/2896 (2013.01)
A61K 47/6803 (2017.08)
(21) 출원번호 10-2020-7035837
(22) 출원일자(국제) 2019년05월30일
심사청구일자 2022년05월30일
(85) 번역문제출일자 2020년12월11일
(65) 공개번호 10-2021-0031428
(43) 공개일자 2021년03월19일
(86) 국제출원번호 PCT/US2019/034708
(87) 국제공개번호 WO 2019/232246
국제공개일자 2019년12월05일
(30) 우선권주장
62/678,890 2018년05월31일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
WO2002092126 A1*
Glycoconjugate Journal. 1987, Vol. 4(4), pp. 399-406
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
글라이코넥스 인코포레이티드
대만, 221, 뉴 타이페이 시티, 시치 디스트릭트, 신타이 5 로드, 섹션 1, 넘버 97, 8에프
(72) 발명자
창 통-수안
대만, 221, 뉴 타이페이 시티, 시치 디스트릭트, 신타이 5 로드, 섹션 1, 넘버 97, 8에프, 씨/오 글라이코넥스 인코포레이티드
양 메이-천
대만, 221, 뉴 타이페이 시티, 시치 디스트릭트, 신타이 5 로드, 섹션 1, 넘버 97, 8에프, 씨/오 글라이코넥스 인코포레이티드
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인한얼

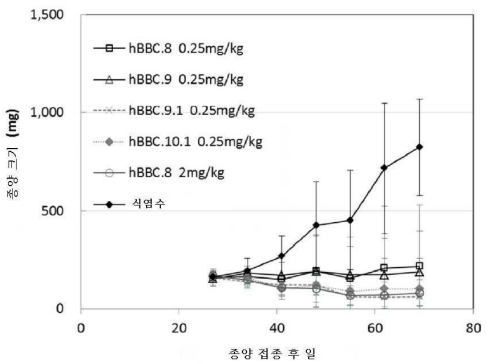
전체 청구항 수 : 총 26 항 심사관 : 김종호

(54) 발명의 명칭 **바이안테나리 루이스 B 및 루이스 Y 항원에 결합하는 치료 항체**

(57) 요 약

특정 바이안테나리 루이스 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 인간화 항체, 이의 항원-결합 단편, 및 항체 접합체가 본원에 개시되며, 이 항원은 다양한 암에서 발현된다. 현재 개시된 항체는 다양한 암을 포함하는 질환의 치료 또는 검출을 위한 항원-발현 세포를 표적화하는데 유용하다. 또한, 개시된 항체 및 이의 항원-결합 단편을 제조하기 위한 폴리뉴클레오티드, 벡터 및 숙주 세포가 제공된다. 약제학적 조성물, 치료 및 검출 방법, 및 항체, 항원-결합 단편, 항체 접합체 및 조성물의 용도도 또한 제공된다.

대 표 도 - 도20c



(52) CPC특허분류
A61K 51/1048 (2020.05)
A61P 35/00 (2018.01)
G01N 33/57407 (2013.01)
G01N 33/57419 (2013.01)
G01N 33/57446 (2019.01)
C07K 2317/33 (2013.01)
C07K 2317/41 (2013.01)
C07K 2317/565 (2013.01)
C07K 2317/73 (2013.01)

(72) 발명자
리우 리앙-인
대만, 221, 뉴 타이페이 시티, 시치 디스트릭트, 신타이 5 로드, 섹션 1, 넘버 97, 8에프, 씨/오 글라이코넥스 인코포레이티드
팅 제리
대만, 221, 뉴 타이페이 시티, 시치 디스트릭트, 신타이 5 로드, 섹션 1, 넘버 97, 8에프, 씨/오 글라이코넥스 인코포레이티드
창 슈-옌
대만, 221, 뉴 타이페이 시티, 시치 디스트릭트, 신타이 5 로드, 섹션 1, 넘버 97, 8에프, 씨/오 글라이코넥스 인코포레이티드
첸 옌-잉
대만, 221, 뉴 타이페이 시티, 시치 디스트릭트, 신타이 5 로드, 섹션 1, 넘버 97, 8에프, 씨/오 글라이코넥스 인코포레이티드
린 유-유
대만, 221, 뉴 타이페이 시티, 시치 디스트릭트, 신타이 5 로드, 섹션 1, 넘버 97, 8에프, 씨/오 글라이코넥스 인코포레이티드
탕 슈-런
대만, 221, 뉴 타이페이 시티, 시치 디스트릭트, 신타이 5 로드, 섹션 1, 넘버 97, 8에프, 씨/오 글라이코넥스 인코포레이티드

명 세 서

청구범위

청구항 1

(a) 서열번호 2에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 상보성 결정 영역 1(VH CDR1); 서열번호 3에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 상보성 결정 영역 2(VH CDR2); 서열번호 4에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 상보성 결정 영역 3(VH CDR3)를 포함하는 면역글로불린 중쇄 가변 영역; 및 (b) 서열번호 6에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 상보성 결정 영역 1(VL CDR1); 서열번호 7에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 상보성 결정 영역 2(VL CDR2); 및 서열번호 8에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 상보성 결정 영역 3(VL CDR3)를 포함하는 면역글로불린 경쇄 가변 영역을 포함하는 단리된 항체 또는 이의 항원-결합 단편으로서, 항체 또는 이의 항원-결합 단편은

$Fuc_4(Gal\beta1\rightarrow3GlcNAc)_2$**[I]** 또는 $[Fuc\alpha1\text{-}2Gal\beta1\text{-}3(Fuc\alpha1\text{-}4)GlcNAc]_2$**[II]**를 포함하는 바이안테나리(biantennary) Le^B/Le^B 항원,

$Fuc_4(Gal\beta1\rightarrow4GlcNAc)_2$**[III]** 또는 $[Fuc\alpha1\text{-}2Gal\beta1\text{-}4(Fuc\alpha1\text{-}3)\ GlcNAc]_2$**[IV]**를 포함하는 바이안테나리 Le^Y/Le^Y 항원,

$Fuc_2(Gal\beta1\rightarrow3GlcNAc)[Fuc_2(Gal\beta1\rightarrow4GlcNAc)]$**[V]**, 또는 $[Fuc\alpha1\text{-}2Gal\beta1\text{-}3(Fuc\alpha1\text{-}4)GlcNAc][Fuc\alpha1\text{-}2Gal\beta1\text{-}4(Fuc\alpha1\text{-}3)GlcNAc]$**[VI]**를 포함하는 바이안테나리 Le^B/Le^Y 항원, 및

$Fuc_2(Gal\beta1\text{-}4GlcNAc)[Fuc_2(Gal\beta1\text{-}3GlcNAc)]$**[VII]** 또는 $[Fuc\alpha1\text{-}2Gal\beta1\text{-}4(Fuc\alpha1\text{-}3)GlcNAc][Fuc\alpha1\text{-}2Gal\beta1\text{-}3(Fuc\alpha1\text{-}4)GlcNAc]$**[VIII]**를 포함하는 바이안테나리 Le^Y/Le^B 항원에 특이적으로 결합할 수 있고,

항체 또는 이의 항원-결합 단편은 $Gal\beta1\rightarrow4(Fuc\alpha1\rightarrow3)GlcNAc$**[IX]**를 포함하는 모노안테나리(monoantennary) Le^X 항원, 또는 $[Gal\beta1\rightarrow4(Fuc\alpha1\rightarrow3)GlcNAc]_2$**[X]**를 포함하는 바이안테나리 Le^X 항원, 또는 $Gal\beta1\text{-}3(Fuc\alpha1\text{-}4)GlcNAc$**[XI]**를 포함하는 모노안테나리 Le^A 항원, 또는 $Fuc\alpha1\text{-}2Gal\beta1\text{-}4GlcNAc$**[XII]**를 포함하는 모노안테나리 H 항원 타입 2, 또는 $(Fuc\alpha1\text{-}2Gal\beta1\text{-}4GlcNAc)_2$**[XIII]**를 포함하는 바이안테나리 H 항원 타입 2 또는 $Fuc\alpha1\text{-}2Gal\beta1\text{-}3GlcNAc$**[XIV]**를 포함하는 모노안테나리 H 항원 타입 1에 특이적으로 결합하지 않는 단리된 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

청구항 2

서열번호 35에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 면역글로불린 중쇄 가변 영역; 및 서열번호 5에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 면역글로불린 경쇄 가변 영역을 포함하는 단리된 항체 또는 이의 항원-결합 단편으로서, 항체 또는 이의 항원-결합 단편은

$Fuc_4(Gal\beta1\rightarrow3GlcNAc)_2$**[I]** 또는 $[Fuc\alpha1\text{-}2Gal\beta1\text{-}3(Fuc\alpha1\text{-}4)GlcNAc]_2$**[II]**를 포함하는 바이안테나리 Le^B/Le^B 항원,

$Fuc_4(Gal\beta1\rightarrow4GlcNAc)_2$**[III]** 또는 $[Fuc\alpha1\text{-}2Gal\beta1\text{-}4(Fuc\alpha1\text{-}3)\ GlcNAc]_2$**[IV]**를 포함하는 바이안테나리 Le^Y/Le^Y 항원,

$Fuc_2(Gal\beta1\rightarrow3GlcNAc)[Fuc_2(Gal\beta1\rightarrow4GlcNAc)]$**[V]**, 또는 $[Fuc\alpha1\text{-}2Gal\beta1\text{-}3(Fuc\alpha1\text{-}4)GlcNAc][Fuc\alpha1\text{-}2Gal\beta1\text{-}4(Fuc\alpha1\text{-}3)GlcNAc]$**[VI]**를 포함하는 바이안테나리 Le^B/Le^Y 항원, 및

$Fuc_2(Gal\beta1\text{-}4GlcNAc)[Fuc_2(Gal\beta1\text{-}3GlcNAc)]$**[VII]** 또는 $[Fuc\alpha1\text{-}2Gal\beta1\text{-}4(Fuc\alpha1\text{-}3)GlcNAc][Fuc\alpha1\text{-}2Gal\beta1\text{-}$

3(Fucα1-4)GlcNAc]**[VIII]**를 포함하는 바이안테나리 Le^Y/Le^B 항원에 특이적으로 결합할 수 있고,

항체 또는 이의 항원-결합 단편은 Galβ1→4(Fucα1→3)GlcNAc**[IX]**를 포함하는 모노안테나리 Le^X 항원, 또는 [Galβ1→4(Fucα1→3)GlcNAc]$_2$**[X]**를 포함하는 바이안테나리 Le^X 항원, 또는 Galβ1-3(Fucα1-4)GlcNAc**[XI]**를 포함하는 모노안테나리 Le^A 항원, 또는 Fucα1-2Galβ1-4GlcNAc**[XII]**를 포함하는 모노안테나리 H 항원 타입 2, 또는 (Fucα1-2Galβ1-4GlcNAc)$_2$**[XIII]**를 포함하는 바이안테나리 H 항원 타입 2 또는 Fucα1-2Galβ1-3GlcNAc**[XIV]**를 포함하는 모노안테나리 H 항원 타입 1에 특이적으로 결합하지 않는, 단리된 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

청구항 3

서열번호 10에 제시된 아미노산 서열을 갖는 면역글로불린 중쇄 및 서열번호 11에 제시된 아미노산 서열을 갖는 면역글로불린 경쇄를 포함하는 단리된 항체.

청구항 4

서열번호 35에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 또는 99% 동일성을 보유하는 아미노산 서열을 포함하는 면역글로불린 중쇄 가변 영역; 및 서열번호 5에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 또는 99% 동일성을 보유하는 아미노산 서열을 포함하는 면역글로불린 경쇄 가변 영역을 포함하는 단리된 항체 또는 이의 항원-결합 단편으로서, 항체 또는 이의 항원-결합 단편은

Fuc_4(Galβ1→3GlcNAc)$_2$**[I]** 또는 [Fucα1-2Galβ1-3(Fucα1-4)GlcNAc]$_2$**[II]**를 포함하는 바이안테나리 Le^B/Le^B 항원,

Fuc_4(Galβ1→4GlcNAc)$_2$**[III]** 또는 [Fucα1-2Galβ1-4(Fucα1-3) GlcNAc]$_2$**[IV]**를 포함하는 바이안테나리 Le^Y/Le^Y 항원,

Fuc_2(Galβ1→3GlcNAc)[Fuc_2(Galβ1→4GlcNAc)]**[V]**, 또는 [Fucα1-2Galβ1-3(Fucα1-4)GlcNAc][Fucα1-2Galβ1-4(Fucα1-3)GlcNAc]**[VI]**를 포함하는 바이안테나리 Le^B/Le^Y 항원, 및

Fuc_2(Galβ1-4GlcNAc)[Fuc_2(Galβ1-3GlcNAc)]**[VII]** 또는 [Fucα1-2Galβ1-4(Fucα1-3)GlcNAc][Fucα1-2Galβ1-3(Fucα1-4)GlcNAc]**[VIII]**를 포함하는 바이안테나리 Le^Y/Le^B 항원에 특이적으로 결합할 수 있고,

항체 또는 이의 항원-결합 단편은 Galβ1→4(Fucα1→3)GlcNAc**[IX]**를 포함하는 모노안테나리 Le^X 항원, 또는 [Galβ1→4(Fucα1→3)GlcNAc]$_2$**[X]**를 포함하는 바이안테나리 Le^X 항원, 또는 Galβ1-3(Fucα1-4)GlcNAc**[XI]**를 포함하는 모노안테나리 Le^A 항원, 또는 Fucα1-2Galβ1-4GlcNAc**[XII]**를 포함하는 모노안테나리 H 항원 타입 2, 또는 (Fucα1-2Galβ1-4GlcNAc)$_2$**[XIII]**를 포함하는 바이안테나리 H 항원 타입 2 또는 Fucα1-2Galβ1-3GlcNAc**[XIV]**를 포함하는 모노안테나리 H 항원 타입 1에 특이적으로 결합하지 않고,

항체 또는 이의 항원-결합 단편은 제1항에 정의된 VH CDR1, VH CDR2, VH CDR3, VL CDR1, VL CDR2, 및 VL CDR3을 포함하는, 단리된 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

청구항 5

(i) 서열번호 2에 제시된 아미노산 서열 또는 이의 변이체를 포함하는 VH CDR1으로서, 상기 변이체는 서열번호 35의 위치 33에서의 Y→A 치환으로 이루어지는, VH CDR1;

(ii) 서열번호 3에 제시된 아미노산 서열 또는 이의 변이체를 포함하는 VH CDR2로서, 상기 변이체는 서열번호 35의 위치 55에서의 T→S 치환으로 이루어지는, VH CDR2;

(iii) 서열번호 4에 제시된 아미노산 서열 또는 이의 변이체를 포함하는 VH CDR3로서, 상기 변이체는 서열번호

35의 위치 104에서의 Y→A 치환, 서열번호 35의 위치 106에서의 A→H 치환, 또는 이둘 모두로 이루어지는, VH CDR3;

(iv) 서열번호 6에 제시된 아미노산 서열 또는 이의 변이체를 포함하는 VL CDR1으로서, 상기 변이체는 서열번호 5의 위치 30에서의 Y→A 치환으로 이루어지는, VL CDR1;

(v) 서열번호 7에 제시된 아미노산 서열 또는 이의 변이체를 포함하는 VL CDR2로서, 상기 변이체는 서열번호 5의 위치 50에서의 G→A 치환으로 이루어지는, VL CDR2; 및

(vi) 서열번호 8에 제시된 아미노산 서열 또는 이의 변이체를 포함하는 VL CDR3로서, 상기 변이체는 서열번호 5의 위치 93에서의 T→S 치환으로 이루어지는, VL CDR3을 포함하는 단리된 항체 또는 이의 항원-결합 단편으로서,

항체 또는 이의 항원-결합 단편은

$Fuc_4(Gal\beta1\rightarrow3GlcNAc)_2$**[I]** 또는 $[Fuc\alpha1\text{-}2Gal\beta1\text{-}3(Fuc\alpha1\text{-}4)GlcNAc]_2$**[II]**를 포함하는 바이안테나리(biantennary) Le^B/Le^B 항원,

$Fuc_4(Gal\beta1\rightarrow4GlcNAc)_2$**[III]** 또는 $[Fuc\alpha1\text{-}2Gal\beta1\text{-}4(Fuc\alpha1\text{-}3)\ GlcNAc]_2$**[IV]**를 포함하는 바이안테나리 Le^Y/Le^Y 항원,

$Fuc_2(Gal\beta1\rightarrow3GlcNAc)[Fuc_2(Gal\beta1\rightarrow4GlcNAc)]$**[V]**, 또는 $[Fuc\alpha1\text{-}2Gal\beta1\text{-}3(Fuc\alpha1\text{-}4)GlcNAc][Fuc\alpha1\text{-}2Gal\beta1\text{-}4(Fuc\alpha1\text{-}3)GlcNAc]$**[VI]**를 포함하는 바이안테나리 Le^B/Le^Y 항원, 및

$Fuc_2(Gal\beta1\text{-}4GlcNAc)[Fuc_2(Gal\beta1\text{-}3GlcNAc)]$**[VII]** 또는 $[Fuc\alpha1\text{-}2Gal\beta1\text{-}4(Fuc\alpha1\text{-}3)GlcNAc][Fuc\alpha1\text{-}2Gal\beta1\text{-}3(Fuc\alpha1\text{-}4)GlcNAc]$**[VIII]**를 포함하는 바이안테나리 Le^Y/Le^B 항원에 특이적으로 결합할 수 있고,

항체 또는 이의 항원-결합 단편은 $Gal\beta1\rightarrow4(Fuc\alpha1\rightarrow3)GlcNAc$**[IX]**를 포함하는 모노안테나리(monoantennary) Le^X 항원, 또는 $[Gal\beta1\rightarrow4(Fuc\alpha1\rightarrow3)GlcNAc]_2$**[X]**를 포함하는 바이안테나리 Le^X 항원, 또는 $Gal\beta1\text{-}3(Fuc\alpha1\text{-}4)GlcNAc$**[XI]**를 포함하는 모노안테나리 Le^A 항원, 또는 $Fuc\alpha1\text{-}2Gal\beta1\text{-}4GlcNAc$**[XII]**를 포함하는 모노안테나리 H 항원 타입 2, 또는 $(Fuc\alpha1\text{-}2Gal\beta1\text{-}4GlcNAc)_2$**[XIII]**를 포함하는 바이안테나리 H 항원 타입 2 또는 $Fuc\alpha1\text{-}2Gal\beta1\text{-}3GlcNAc$**[XIV]**를 포함하는 모노안테나리 H 항원 타입 1에 특이적으로 결합하지 않는, 단리된 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

청구항 6

제5항에 있어서, 중쇄 가변 영역은 서열번호 35에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 90% 동일성을 보유하는 아미노산 서열을 포함하고, 면역글로불린 경쇄 가변 영역은 서열번호 5에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 90% 동일성을 보유하는 아미노산 서열을 포함하고,

항체 또는 이의 항원-결합 단편은 제5항에 정의된 VH CDR1, VH CDR2, VH CDR3, VL CDR1, VL CDR2, 및 VL CDR3을 포함하는, 단리된 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

청구항 7

제5항에 있어서, 중쇄 가변 영역은 서열번호 35에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 92% 동일성을 보유하는 아미노산 서열을 포함하고, 면역글로불린 경쇄 가변 영역은 서열번호 5에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 92% 동일성을 보유하는 아미노산 서열을 포함하고,

항체 또는 이의 항원-결합 단편은 제5항에 정의된 VH CDR1, VH CDR2, VH CDR3, VL CDR1, VL CDR2, 및 VL CDR3을 포함하는, 단리된 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

청구항 8

제5항에 있어서, 중쇄 가변 영역은 서열번호 35에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 95% 동일성을 보유하는 아미노산 서열을 포함하고, 면역글로불린 경쇄 가변 영역은 서열번호 5에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도

95% 동일성을 보유하는 아미노산 서열을 포함하고,

항체 또는 이의 항원-결합 단편은 제5항에 정의된 VH CDR1, VH CDR2, VH CDR3, VL CDR1, VL CDR2, 및 VL CDR3을 포함하는, 단리된 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

청구항 9

제5항에 있어서, 중쇄 가변 영역은 서열번호 35에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 97% 동일성을 보유하는 아미노산 서열을 포함하고, 면역글로불린 경쇄 가변 영역은 서열번호 5에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 97% 동일성을 보유하는 아미노산 서열을 포함하고,

항체 또는 이의 항원-결합 단편은 제5항에 정의된 VH CDR1, VH CDR2, VH CDR3, VL CDR1, VL CDR2, 및 VL CDR3을 포함하는, 단리된 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

청구항 10

제5항에 있어서, 중쇄 가변 영역은 서열번호 35에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 99% 동일성을 보유하는 아미노산 서열을 포함하고, 면역글로불린 경쇄 가변 영역은 서열번호 5에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 99% 동일성을 보유하는 아미노산 서열을 포함하고,

항체 또는 이의 항원-결합 단편은 제5항에 정의된 VH CDR1, VH CDR2, VH CDR3, VL CDR1, VL CDR2, 및 VL CDR3을 포함하는, 단리된 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 항체는 모노클로날인, 단리된 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

청구항 12

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 항체는 인간화 항체인, 단리된 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

청구항 13

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 항원-결합 단편은 Fab 단편, F(ab')2 단편, Fv 단편, 단일 쇄 Fv(ScFv) 항체, 및 디아바디로부터 선택되는, 단리된 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

청구항 14

바이안테나리 Le^B/Le^B, 바이안테나리 Le^Y/Le^Y, 바이안테나리 Le^B/Le^Y, 및 바이안테나리 Le^Y/Le^B으로 이루어지는 군으로부터 선택된 하나 이상의 바이안테나리 루이스 항원을 발현하는 암의 치료를 위한 약제학적 조성물로서, 제1항 내지 제10항 중 어느 한 항의 단리된 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 포함하는, 약제학적 조성물.

청구항 15

바이안테나리 Le^B/Le^B, 바이안테나리 Le^Y/Le^Y, 바이안테나리 Le^B/Le^Y, 및 바이안테나리 Le^Y/Le^B으로 이루어지는 군으로부터 선택된 하나 이상의 바이안테나리 루이스 항원을 발현하는 결장직장 선암종(colorectal adenocarcinoma)의 치료를 위한 약제학적 조성물로서, 제1항 내지 제10항 중 어느 한 항의 단리된 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 포함하는, 약제학적 조성물.

청구항 16

바이안테나리 Le^B/Le^B, 바이안테나리 Le^Y/Le^Y, 바이안테나리 Le^B/Le^Y, 및 바이안테나리 Le^Y/Le^B으로 이루어지는 군으로부터 선택된 하나 이상의 바이안테나리 루이스 항원을 발현하는 위 선암종(stomach adenocarcinoma)의 치료를 위한 약제학적 조성물로서, 제1항 내지 제10항 중 어느 한 항의 단리된 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 포함하는, 약제학적 조성물.

청구항 17

바이안테나리 Le^B/Le^B, 바이안테나리 Le^Y/Le^Y, 바이안테나리 Le^B/Le^Y, 및 바이안테나리 Le^Y/Le^B으로 이루어지는 군

으로부터 선택된 하나 이상의 바이안테나리 루이스 항원을 발현하는 폐암(lung cancer)의 치료를 위한 약제학적 조성물로서, 제1항 내지 제10항 중 어느 한 항의 단리된 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 포함하는, 약제학적 조성물.

청구항 18

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항의 단리된 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 인코딩하는 단리된 폴리뉴클레오티드.

청구항 19

제18항의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터.

청구항 20

제19항의 재조합 벡터를 포함하는 숙주 세포.

청구항 21

제20항의 숙주 세포를, 숙주 세포가 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 발현하기 위한 충분한 시간 동안 및 조건 하에 배양하여 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 포함하는 배양물을 수득하는 단계; 및

상기 배양물로부터 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 회수하는 단계를 포함하는, 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 생산 방법으로서,

항체 또는 이의 항원-결합 단편은

$Fuc_4(Gal\beta1\rightarrow3GlcNAc)_2$**[I]** 또는 $[Fuc\alpha1\text{-}2Gal\beta1\text{-}3(Fuc\alpha1\text{-}4)GlcNAc]_2$**[II]**를 포함하는 바이안테나리(biantennary) Le^B/Le^B 항원,

$Fuc_4(Gal\beta1\rightarrow4GlcNAc)_2$**[III]** 또는 $[Fuc\alpha1\text{-}2Gal\beta1\text{-}4(Fuc\alpha1\text{-}3)\ GlcNAc]_2$**[IV]**를 포함하는 바이안테나리 Le^Y/Le^Y 항원,

$Fuc_2(Gal\beta1\rightarrow3GlcNAc)[Fuc_2(Gal\beta1\rightarrow4GlcNAc)]$**[V]**, 또는 $[Fuc\alpha1\text{-}2Gal\beta1\text{-}3(Fuc\alpha1\text{-}4)GlcNAc][Fuc\alpha1\text{-}2Gal\beta1\text{-}4(Fuc\alpha1\text{-}3)GlcNAc]$**[VI]**를 포함하는 바이안테나리 Le^B/Le^Y 항원, 및

$Fuc_2(Gal\beta1\text{-}4GlcNAc)[Fuc_2(Gal\beta1\text{-}3GlcNAc)]$**[VII]** 또는 $[Fuc\alpha1\text{-}2Gal\beta1\text{-}4(Fuc\alpha1\text{-}3)GlcNAc][Fuc\alpha1\text{-}2Gal\beta1\text{-}3(Fuc\alpha1\text{-}4)GlcNAc]$**[VIII]**를 포함하는 바이안테나리 Le^Y/Le^B 항원에 특이적으로 결합할 수 있고,

항체 또는 이의 항원-결합 단편은 $Gal\beta1\rightarrow4(Fuc\alpha1\rightarrow3)GlcNAc$**[IX]**를 포함하는 모노안테나리(monoantennary) Le^X 항원, 또는 $[Gal\beta1\rightarrow4(Fuc\alpha1\rightarrow3)GlcNAc]_2$**[X]**를 포함하는 바이안테나리 Le^X 항원, 또는 $Gal\beta1\text{-}3(Fuc\alpha1\text{-}4)GlcNAc$**[XI]**를 포함하는 모노안테나리 Le^A 항원, 또는 $Fuc\alpha1\text{-}2Gal\beta1\text{-}4GlcNAc$**[XII]**를 포함하는 모노안테나리 H 항원 타입 2, 또는 $(Fuc\alpha1\text{-}2Gal\beta1\text{-}4GlcNAc)_2$**[XIII]**를 포함하는 바이안테나리 H 항원 타입 2 또는 $Fuc\alpha1\text{-}2Gal\beta1\text{-}3GlcNAc$**[XIV]**를 포함하는 모노안테나리 H 항원 타입 1에 특이적으로 결합하지 않는, 방법.

청구항 22

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항의 단리된 항체 또는 이의 항원-결합 단편; 및 이에 연결된 페이로드(payload) 분자를 포함하는, 항체 접합체.

청구항 23

제22항에 있어서, 상기 페이로드 분자는 링커에 의해 항체 또는 이의 항원-결합 단편에 공유 결합된, 항체 접합체.

청구항 24

제23항에 있어서, 상기 링커는 절단성 링커 및 비절단성 링커로부터 선택되고, 여기서 절단성 링커는 프로테아제-민감성 링커, pH-민감성 링커, 또는 글루타티온-민감성 링커인, 항체 접합체.

청구항 25

제22항에 있어서, 상기 페이로드 분자는 (i) 튜불린-표적화 항유사분열제, 펩티드-기반 독소, 피롤로벤조디아제핀(PBD) 이량체, 항생제, 피리미딘 합성 억제제, 항대사물질, DNA 알킬화제 및 토포아이소머라제 억제제로부터 선택되는 치료제; 및 (ii) 방사성 핵종, 염료, 방사성 금속, 형광 모이어티, MRI 조영제, 마이크로버블, 탄소 나노튜브, 금 입자, 플루오로데옥시글루코스, 효소, 발색단, 및 방사선 불투명 마커로부터 선택되는 검출가능한 지시제로부터 선택되는, 항체 접합체.

청구항 26

바이안테나리 Le^{B}/Le^{B}, 바이안테나리 Le^{Y}/Le^{Y}, 바이안테나리 Le^{B}/Le^{Y}, 및 바이안테나리 Le^{Y}/Le^{B}으로 이루어지는 군으로부터 선택된 하나 이상의 바이안테나리 루이스 항원을 발현하는 암을 검출하기 위한 조성물로서, 상기 조성물은 제22항의 항체 접합체를 포함하고, 페이로드 분자가 검출가능한 지시제인, 조성물.

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 관련 출원에 대한 상호 참조

[0002] 본 출원은 2018년 5월 31일자로 출원된 미국 가출원 제62/678,890호에 대한 35 U.S.C. § 119(e)하의 이익을 주장하며, 이 출원은 그 전문이 본원에 참고로 인용된다.

[0003] 서열 목록(SEQUENCE LISTING)에 관한 설명

[0004] 본 출원과 관련된 서열 목록은 종이 사본 대신에 텍스트 포맷으로 제공되고, 본 명세서에 참고로 인용된다. 서열 목록을 함유하는 텍스트 파일의 명칭은 400100_401WO_SEQUENCE_LISTING.txt이다. 텍스트 파일은 43.3 KB이고, 2019년 5월 30일에 생성되었고, EFS-웹을 통해 전자적으로 제출되고 있다.

[0005] 본 발명의 구현예는 일반적으로 특정 루이스 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 항체 및 이의 항원-결합 단편, 및 이의 제조 및 사용 방법에 관한 것이다. 또한, 본원에 개시된 항체 및 항원-결합 단편과 관련된 조성물, 폴리뉴클레오티드, 벡터, 융합 단백질 및 숙주 세포가 제공된다. 특정 구현예에서, 현재 개시된 항체 및 이의 항원-결합 단편은 바이안테나리 Le^B/Le^B, Le^Y/Le^Y, Le^B/Le^Y 및 Le^Y/Le^B 항원에 특이적으로 결합할 수 있고, 이러한 항원의 발현을 특징으로 하는 질환, 예를 들어, 암을 치료 또는 검출하는 데 유용하다.

배 경 기 술

[0006] 면역요법은 다양한 암을 포함하는 다양한 질환을 치료하기 위한 새로운 방식이다. 예를 들어, 항종양 활성을 갖는 모노클로날 항체(mAb)의 임상적 효능은 1990년대 후반부터 입증되었고(참조: Topalian et al., J. Clin. Oncol. 29(36):4828-4836 (2011)), 몇몇 블록부르스터 암 약물은 mAb(예: 리툭시맙, 트라스투주맙, 및 베바시주맙)이다.

[0007] 항체-기반 요법은 종양 세포와 같은 항원-발현 세포를 특이적으로 표적화할 수 있고, 예를 들어, 항체-의존 세포 세포독성(ADCC), 보체-매개 세포독성(CDC), 및 T-세포 매개 세포독성을 유도하는 것을 포함하는 다수의 수단을 통해 세포독성 활성에 영향을 미칠 수 있다. 다른 접근법은 담체 비히클로서 항체를 사용하여 표적 세포를 사멸시키고/시키거나 이러한 세포의 성장 및 전이성 확산을 억제하는 세포독성제 또는 항증식제를 선택적으로 전달하는 것을 포함한다.

[0008] 모노클로날 항체 요법에 대한 관련 기준은, 예를 들어, 건강한 세포 상에서 발현되는 하나 이상의 다른 잠재적 에피토프, 예를 들어, 단백질 또는 글리칸에 무절제하게 결합하는 것이 아니라, 목적하는 항원을 특이적으로 인식하고 이에 결합하는 항체의 능력을 포함한다. 또한, 항체는 환자에게 면역원성이 아니어야 한다. 이와 관련하여, 인간 질환 항원에 특이적인 항체는 종종 마우스 및 토끼와 같은 비-인간 숙주에서 생성되며, 예를 들어, 인간 환자에서 면역원성일 수 있는 숙주-종 아미노산 서열 및/또는 탄수화물 모티프를 포함할 수 있다.

따라서, 요법에 사용하기 위한 바람직한 항체는 잠재적으로 최소한의 면역원성 특성이 갖거나 부족하다. 표적 항원의 특징도 또한 고려되어야 한다. 바람직하게는, 항원은 특정 질환 상태(예: 암)에서 선택적으로 발현되거나 고도로 과발현되어, 항체-매개 요법이 건강한 조직에 대해 원하지 않는 해로운 "표적(on-target), 비종양(off-tumor)" 효과를 갖지 않도록 한다.

[0009] 비정상적 글리코실화(예: 당단백질 및 당지질의 과발현 또는 오발현)는 수많은 암에 공통적인 특징이다(참조: 예를 들어, Blanas et al., Front. Oncol. 8:39 (2018)). 이론에 결부시키고자 하는 것은 아니지만, 비정상적 글리코실화는 암 진행 및 전이(예: 세포 성장 및 대사, 혈관형성, 세포-매트릭스 상호작용, 및 세포-세포 부착)를 유도하는 다수의 세포 과정에 영향을 미칠 수 있다. 암에서 비정상적으로 발현되는 예시적인 탄수화물 항원은 루이스 항원 시스템의 말단(비환원 말단에서) 푸코실화 탄수화물 에피토프인 타입 I 및 타입 II 루이스 항원을 포함한다. 타입 I 및 타입 II 루이스 항원은 구조적으로 관련된 H1, H2, 및 루이스 A, B, X 및 Y 항원을 포함하고, 이들 모두는 3개의 단당류 단위: a(환원성) 말단 아세틸글루코사민(GlcNac); 갈락토스(Gal); 및 푸코스(Fuc)를 공유한다. 타입 I 루이스 항원은 락토사민 코어 쇄(Galβ1 → 3GlcNac: 타입 I; Galβ1 → 4GlcNac: 타입 II)에서 글리코시드 결합의 성질에 의해 타입 II와 다르고, 다양한 구조(예: 항원 모티프를 포함하는 1개, 2개, 또는 그 이상의 안테나를 갖는 선형 또는 분지형)로 존재한다. 루이스 항원은 건강한 성인 조직(예: 소화 및 생식 상피)에서 중간 수준의 발현 수준을 갖지만, 예를 들어, 폐, 유방, 간, 신장, 방광, 췌장 및 전립선의 암을 포함하는 다수의 고형 암에서 세포 표면 상에서 과발현되며, 또한 급성 골수성 백혈병(acute myeloid leukemia), 급성 림프구성 백혈병(acute lymphoblastic leukemia) 및 비호지킨 림프종(Non-Hodgkin's lymphoma)과 관련된다.

[0010] 담체 분자로서 BR96 모노클로날 항체(참조: Hellstrom et al., Cancer Res. 50(7):2183-2190 (1990))를 사용하여 독소루비신을 Le^Y 항원-발현 종양 세포에 전달하는, 중단된 시애틀 제네틱스/브리스톨 마이어스 스키브(Seattle Genetics)/Bristol Meyers Squibb) 항체-약물 접합체 "cBR96-Dox"를 포함하는, 암을 치료하기 위한 루이스 항원을 표적화하는 일부 요법이 공지되어 있다. 명백하게, 종양 관련 항원 또는 종양 특이적 항원으로서 루이스 항원을 발현하는 암과 같은 암을 치료하기 위한 추가 요법이 당업계에 필요하다. 현재 개시된 구현예들은 이러한 필요성을 다루고 다른 관련된 이점들을 제공한다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 현재 개시된 특정 구현예에 따르면, 서열번호 10에 제시된 아미노산 서열을 갖는 면역글로불린 중쇄 및 서열번호 11에 제시된 아미노산 서열을 갖는 면역글로불린 경쇄를 포함하는 단리된 항체가 제공된다.

과제의 해결 수단

[0012] 특정 구현예에서, 서열번호 35에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 면역글로불린 중쇄 가변 영역; 및 서열번호 5에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 면역글로불린 경쇄 가변 영역을 포함하는 단리된 항체 또는 이의 항원-결합 단편이 제공되며, 여기서 상기 항체 또는 이의 항원-결합 단편은

[0013] $Fuc_4(Gal\beta1\rightarrow3GlcNAc)_2$[I] 또는 [Fucα1-2Galβ1-3(Fucα1-4)GlcNAc]$_2$[II]를 포함하는 바이안테나리 Le^B/Le^B 항원,

[0014] $Fuc_4(Gal\beta1\rightarrow4GlcNAc)_2$[III] 또는 [Fucα1-2Galβ1-4(Fucα1-3) GlcNAc]$_2$[IV]를 포함하는 바이안테나리 Le^Y/Le^Y 항원,

[0015] $Fuc_2(Gal\beta1\rightarrow3GlcNAc)[Fuc_2(Gal\beta1\rightarrow4GlcNAc)]$[V], 또는 [Fucα1-2Galβ1-3(Fucα1-4)GlcNAc][Fucα1-2Galβ1-4(Fucα1-3)GlcNAc][VI]를 포함하는 바이안테나리 Le^B/Le^Y 항원, 및

[0016] $Fuc_2(Gal\beta1-4GlcNAc)[Fuc_2(Gal\beta1-3GlcNAc)]$[VII] 또는 [Fucα1-2Galβ1-4(Fucα1-3)GlcNAc][Fucα1-2Galβ1-3(Fucα1-4)GlcNAc][VIII]를 포함하는 바이안테나리 Le^Y/Le^B 항원에 특이적으로 결합할 수 있고,

[0017] 상기 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 Galβ1→4(Fucα1→3)GlcNAc[IX]를 포함하는 모노안테나리 Le^X 항원, 또

는 [Galβ1→4(Fucα1→3)GlcNAc]$_2$[X]를 포함하는 바이안테나리 Le^X 항원, 또는 Galβ1-3(Fucα1-4)GlcNAc[XI]를 포함하는 모노안테나리 Le^A 항원, 또는 Fucα1-2Galβ1-4GlcNAc[XII]를 포함하는 모노안테나리 H 항원 타입 2, 또는 (Fucα1-2Galβ1-4GlcNAc)$_2$[XIII]를 포함하는 바이안테나리 H 항원 타입 2 또는 Fucα1-2Galβ1-3GlcNAc[XIV]를 포함하는 모노안테나리 H 항원 타입 1에 특이적으로 결합하지 않는다.

[0018] 특정 구현예에서, (a) 서열번호 2에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 상보성 결정 영역 1(VH CDR1); 서열번호 3에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 상보성 결정 영역 2(VH CDR2); 서열번호 4에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 상보성 결정 영역 3(VH CDR3)을 포함하는 면역글로불린 중쇄 가변 영역; 및 (b) 서열번호 6에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 상보성 결정 영역 1(VL CDR1); 서열번호 7에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 상보성 결정 영역 2(VL CDR2); 및 서열번호 8에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 상보성 결정 영역 3(VL CDR3)을 포함하는 면역글로불린 경쇄 가변 영역을 포함하는 단리된 항체 또는 이의 항원 결합 단편이 제공되며, 여기서 상기 항체 또는 이의 항원-결합 단편은

[0019] Fuc_4(Galβ1→3GlcNAc)$_2$[I] 또는 [Fucα1-2Galβ1-3(Fucα1-4)GlcNAc]$_2$[II]를 포함하는 바이안테나리 Le^B/Le^B 항원,

[0020] Fuc_4(Galβ1→4GlcNAc)$_2$[III] 또는 [Fucα1-2Galβ1-4(Fucα1-3) GlcNAc]$_2$[IV]를 포함하는 바이안테나리 Le^Y/Le^Y 항원,

[0021] Fuc_2(Galβ1→3GlcNAc)[Fuc_2(Galβ1→4GlcNAc)][V], 또는 [Fucα1-2Galβ1-3(Fucα1-4)GlcNAc][Fucα1-2Galβ1-4(Fucα1-3)GlcNAc][VI]를 포함하는 바이안테나리 Le^B/Le^Y 항원, 및

[0022] Fuc2(Galβ1-4GlcNAc)[Fuc_2(Galβ1-3GlcNAc)][VII] 또는 [Fucα1-2Galβ1-4(Fucα1-3)GlcNAc][Fucα1-2Galβ1-3(Fucα1-4)GlcNAc][VIII]를 포함하는 바이안테나리 Le^Y/Le^B 항원에 특이적으로 결합할 수 있고,

[0023] 상기 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 Galβ1→4(Fucα1→3)GlcNAc[IX]를 포함하는 모노안테나리 Le^X 항원, 또는 [Galβ1→4(Fucα1→3)GlcNAc]$_2$[X]를 포함하는 바이안테나리 Le^X 항원, 또는 Galβ1-3(Fucα1-4)GlcNAc[XI]를 포함하는 모노안테나리 Le^A 항원, 또는 Fucα1-2Galβ1-4GlcNAc[XII]를 포함하는 모노안테나리 H 항원 타입 2, 또는 (Fucα1-2Galβ1-4GlcNAc)$_2$[XIII]를 포함하는 바이안테나리 H 항원 타입 2 또는 Fucα1-2Galβ1-3GlcNAc[XIV]를 포함하는 모노안테나리 H 항원 타입 1에 특이적으로 결합하지 않는다.

[0024] 본원에 기재된 특정 구현예에서, 단리된 항체는 모노클로날 항체일 수 있다. 특정 구현예에서, 단리된 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 인간화 항체이다. 특정 구현예에서, 단리된 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 Fab 단편, F(ab')2 단편, Fv 단편, 단일 쇄 Fv(scFv) 항체, 및 디아바디로부터 선택된다.

[0025] 또한, 단리된 항체 또는 이의 항원-결합 단편이 서열번호 35에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 또는 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 면역글로불린 중쇄 가변 영역; 및 서열번호 5에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 또는 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 면역글로불린 경쇄 가변 영역을 포함하는 구현예가 본원에 제공되며, 여기서 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편은

[0026] Fuc_4(Galβ1→3GlcNAc)$_2$[I] 또는 [Fucα1-2Galβ1-3(Fucα1-4)GlcNAc]$_2$[II]를 포함하는 바이안테나리 Le^B/Le^B 항원,

[0027] Fuc_4(Galβ1→4GlcNAc)$_2$[III] 또는 [Fucα1-2Galβ1-4(Fucα1-3) GlcNAc]$_2$[IV]를 포함하는 바이안테나리 Le^Y/Le^Y 항원,

[0028] Fuc_2(Galβ1→3GlcNAc)[Fuc_2(Galβ1→4GlcNAc)][V], 또는 [Fucα1-2Galβ1-3(Fucα1-4)GlcNAc][Fucα1-2Galβ1-4(Fucα1-3)GlcNAc][VI]를 포함하는 바이안테나리 Le^B/Le^Y 항원, 및

[0029] $Fuc_2(Gal\beta1\text{-}4GlcNAc)[Fuc_2(Gal\beta1\text{-}3GlcNAc)]$[VII] 또는 [Fucα1-2Galβ1-4(Fucα1-3)GlcNAc][Fucα1-2Galβ1-3(Fucα1-4)GlcNAc][VIII]를 포함하는 바이안테나리 Le^Y/Le^B 항원에 특이적으로 결합할 수 있고,

[0030] 상기 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 Galβ1→4(Fucα1→3)GlcNAc[IX]를 포함하는 모노안테나리 Le^X 항원, 또는 $[Gal\beta1\rightarrow4(Fuc\alpha1\rightarrow3)GlcNAc]_2$[X]를 포함하는 바이안테나리 Le^X 항원, 또는 Galβ1-3(Fucα1-4)GlcNAc[XI]를 포함하는 모노안테나리 Le^A 항원, 또는 Fucα1-2Galβ1-4GlcNAc[XII]를 포함하는 모노안테나리 H 항원 타입 2, 또는 $(Fuc\alpha1\text{-}2Gal\beta1\text{-}4GlcNAc)_2$[XIII]를 포함하는 바이안테나리 H 항원 타입 2 또는 Fucα1-2Galβ1-3GlcNAc[XIV]를 포함하는 모노안테나리 H 항원 타입 1에 특이적으로 결합하지 않는다.

[0031] 특정 구현예에서, 본 발명은 (a) 서열번호 2에 제시된 아미노산 서열 또는 서열번호 2에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 또는 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 상보성 결정 영역 1(VH CDR1); 서열번호 3에 제시된 아미노산 서열 또는 서열번호 3에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 또는 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 상보성 결정 영역 2(VH CDR2); 서열번호 4에 제시된 아미노산 서열 또는 서열번호 4에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 또는 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 상보성 결정 영역 3(VH CDR3)을 포함하는 면역글로불린 중쇄 가변 영역; 및 (b) 서열번호 6에 제시된 아미노산 서열 또는 서열번호 6에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 또는 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 상보성 결정 영역 1(VL CDR1); 서열번호 7에 제시된 아미노산 서열 또는 서열번호 7에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 또는 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 상보성 결정 영역 2(VL CDR2); 서열번호 8에 제시된 아미노산 서열 또는 서열번호 8에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 또는 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 상보성 결정 영역 3(VL CDR3)을 포함하는 면역글로불린 경쇄 가변 영역을 포함하는 단리된 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공한다.

[0032] 특정의 추가 구현예에서, 다음과 같은 (i), (ii), (iii), (iv), (v), 또는 (vi) 또는 이들의 임의의 조합을 포함하는 본 발명에 따르는 단리된 항체 또는 이의 항원 결합 단편이 제공된다: (i) 서열번호 2에 제시된 아미노산 서열의 변이체를 포함하는 VH CDR1로서, 상기 변이가 카바트 넘버링(Kabat numbering)에 따라 위치 33에서의 Y→A 치환으로 이루어지는 VH CDR1; (ii) 서열번호 4에 제시된 아미노산 서열의 변이체를 포함하는 VH CDR3로서, 상기 변이가 카바트 넘버링에 따라 위치 104에서의 Y→A 치환으로 이루어지는 VH CDR3; (iii) 서열번호 4에 제시된 아미노산 서열의 변이체를 포함하는 VH CDR3로서, 상기 변이가 카바트 넘버링에 따라 위치 106에서의 H→A 치환으로 이루어지는 VH CDR3; (iv) 서열번호 6에 제시된 아미노산 서열의 변이체를 포함하는 VL CDR1로서, 상기 변이가 카바트 넘버링에 따라 위치 30에서의 Y→A 치환으로 이루어지는 VL CDR1; (v) 서열번호 7에 제시된 아미노산 서열의 변이체를 포함하는 VL CDR2로서, 상기 변이가 카바트 넘버링에 따라 위치 50에서의 G→A 치환으로 이루어지는 VL CDR2; 또는 (vi) 서열번호 8에 제시된 아미노산 서열의 변이체를 포함하는 VL CDR3로서, 상기 변이가 카바트 넘버링에 따라 위치 93에서의 T→S 치환으로 이루어지는 VL CDR3.

[0033] 특정의 추가 구현예에서, 본원에 기재된 상보성 결정 영역(CDR)(즉, 본원에 기재된 아미노산 치환을 갖는 CDR 변이체를 포함하여, 각각 서열번호 2, 3, 4, 6, 7 및 8에 대해 적어도 90% 동일성을 갖는 CDR)을 포함하고, 서열번호 35에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 또는 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이들로 구성되는 면역글로불린 중쇄 가변 영역, 및 서열번호 5에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 또는 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이들로 구성되는 면역글로불린 경쇄 가변 영역을 포함하는 단리된 항체 또는 항원-결합 단편이 제공된다.

[0034] 본원에 기재된 임의의 구현예에서, 단리된 항체 또는 이의 항원-결합 단편, 또는 본 발명의 항체 또는 항원-결합 단편을 포함하는 항체-약물 접합체는 본원에 개시된 바와 같이 서열번호 27에 제시된 아미노산 서열을 갖는 VL 도메인 및 서열번호 28에 제시된 아미노산 서열을 갖는 VH 도메인을 포함하는 "BBC" 항체와 비교하여 모노안테나리 루이스 B 또는 모노안테나리 루이스 Y 항원에 대한 감소된(예를 들어, 당업계 허용 방법론을 사용하여 결정되는 바와 같은 통계적으로 유의한 방식으로 감소된) 결합(특정 구현예에서, 어떠한 결합도 포함하지 않는)을 나타낼 수 있다. 1가 루이스 B는 정상 인간 조직에서 발현되는 혈액 그룹 항원이고; 따라서, 현재 개시된 항체, 항원-결합 단편, 및 항체 약물 접합체는, BBC 항체와 비교하여, 암 항원에 대한 개선된 특이성 및 정상 인간 조직에서 발현되는 모노안테나리 루이스 B 항원에 대해 감소된 결합을 갖는다. 특정 구현예에서, 본원

에 개시된 항체, 항원-결합 단편, 또는 항체 약물 접합체는 모노안테나리 루이스 B 항원에 대한 결합과 비교하여 본원에서 임의의 하나 이상의 화학식 [I] 내지 [VIII]에 따르는 세포 표면 발현 항원에 대한 결합을 1배, 2배, 3배, 5배, 6배, 7배, 8배 이상 증가시킨다.

[0035] 특정 구현예에서, 항체, 항원-결합 단편, 또는 항체 약물 접합체는, 예를 들어, ELISA 결합 검정에서 측정된 바와 같이, BR96의 친화도의 1/10, 1/9, 1/8, 1/7, 1/6, 1/5, 1/4, 1/3, 또는 1/2로 모노안테나리 루이스 B 항원에 결합한다.

[0036] 본원에 기재된 임의의 구현예에서, 단리된 항체 또는 이의 항원-결합 단편, 또는 본 발명의 항체 또는 항원-결합 단편을 포함하는 항체-약물 접합체는, 항체 BR96에 의해 인식되는 모노안테나리 Le^Y 항원과 구별되는 항원을 결합하고, 비-제한적인 이론에 따라 BR96과 비교하여 치료적 적용에서 암 세포의 보다 안전하고 보다 특이적인 표적화를 가능하게 할 수 있다. 본원에 기재된 임의의 구현예에서, 단리된 항체 또는 항원-결합 단편, 또는 본 발명의 항체 또는 항원-결합 단편을 포함하는 항체-약물 접합체는 항원-발현 암 세포에 결합하여, 이러한 세포의 리소좀으로 효율적이고 안정하게 내재화되고, 비-인간 영장류 모델에서 치료 용량으로 안전하게 허용될 수 있다.

[0037] 다른 측면에서, 본 발명은 본원에 개시된 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 인코딩하는 단리된 폴리뉴클레오티드를 제공한다. 특정 구현예에서, 폴리뉴클레오티드는 숙주 세포에서의 발현을 위해 코돈-최적화된다. 특정의 관련된 구현예에서, 본원에 개시된 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터가 제공된다. 특정 구현예에서, 재조합 벡터는 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드에 작동가능하게 연결된 발현 조절 서열을 포함한다. 특정 구현예에서, 재조합 벡터는 발현 조절 서열이 프로모터를 포함하는 발현 벡터이다.

[0038] 다른 구현예에서, 본 발명의 재조합 및/또는 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포가 제공된다. 특정의 다른 구현예에서,

[0039] $Fuc_4(Gal\beta1\rightarrow3GlcNAc)_2$[I] 또는 $[Fuc\alpha1\text{-}2Gal\beta1\text{-}3(Fuc\alpha1\text{-}4)GlcNAc]_2$[II]를 포함하는 바이안테나리 Le^B/Le^B 항원,

[0040] $Fuc_4(Gal\beta1\rightarrow4GlcNAc)_2$[III] 또는 $[Fuc\alpha1\text{-}2Gal\beta1\text{-}4(Fuc\alpha1\text{-}3)\ GlcNAc]_2$[IV]를 포함하는 바이안테나리 Le^Y/Le^Y 항원,

[0041] $Fuc_2(Gal\beta1\rightarrow3GlcNAc)[Fuc_2(Gal\beta1\rightarrow4GlcNAc)]$[V], 또는 $[Fuc\alpha1\text{-}2Gal\beta1\text{-}3(Fuc\alpha1\text{-}4)GlcNAc][Fuc\alpha1\text{-}2Gal\beta1\text{-}4(Fuc\alpha1\text{-}3)GlcNAc]$[VI]를 포함하는 바이안테나리 Le^B/Le^Y 항원, 및

[0042] $Fuc_2(Gal\beta1\text{-}4GlcNAc)[Fuc_2(Gal\beta1\text{-}3GlcNAc)]$[VII] 또는 $[Fuc\alpha1\text{-}2Gal\beta1\text{-}4(Fuc\alpha1\text{-}3)GlcNAc][Fuc\alpha1\text{-}2Gal\beta1\text{-}3(Fuc\alpha1\text{-}4)GlcNAc]$[VIII]를 포함하는 바이안테나리 Le^Y/Le^B 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 본원에 개시된 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 제조하는 관련 방법이 제공되고,

[0043] 여기서, 상기 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 $Gal\beta1\rightarrow4(Fuc\alpha1\rightarrow3)GlcNAc$[IX]를 포함하는 모노안테나리 Le^X 항원, 또는 $[Gal\beta1\rightarrow4(Fuc\alpha1\rightarrow3)GlcNAc]_2$[X]를 포함하는 바이안테나리 Le^X 항원, 또는 $Gal\beta1\text{-}3(Fuc\alpha1\text{-}4)GlcNAc$[XI]를 포함하는 모노안테나리 Le^A 항원, 또는 $Fuc\alpha1\text{-}2Gal\beta1\text{-}4GlcNAc$[XII]를 포함하는 모노안테나리 H 항원 타입 2, 또는 $(Fuc\alpha1\text{-}2Gal\beta1\text{-}4GlcNAc)_2$[XIII]를 포함하는 바이안테나리 H 항원 타입 2 또는 $Fuc\alpha1\text{-}2Gal\beta1\text{-}3GlcNAc$[XIV]를 포함하는 모노안테나리 H 항원 타입 1에 특이적으로 결합하지 않고,

[0044] 상기 방법은 상기 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드의 숙주 세포에 의한 발현에 충분한 조건하 및 시간 동안 본원에 기재된 바와 같은 숙주 세포를 배양하여 상기 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 포함하는 배양물을 수득하는 단계; 및 상기 배양물로부터 상기 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 회수하는 단계를 포함한다.

[0045] 다른 구현예에서, 본 발명의 단리된 항체 또는 이의 항원-결합 단편; 및 이에 연결된 페이로드 분자를 포함하는 항체 접합체가 제공된다. 특정 구현예에서, 페이로드 분자는 링커에 의해 항체 또는 이의 항원-결합 단편에 공유적으로 연결된다. 특정 구현예에서, 링커는 절단성 링커 및 비절단성 링커로부터 선택된다. 특정 구현예에

서, 절단성 링커는 프로테아제-민감성 링커, pH-민감성 링커, 또는 글루타티온-민감성 링커이다. 특정 구현예에서, 절단성 링커는 발린-시트룰린 디펩티드를 포함하는 프로테아제-민감성 링커이다. 일부 구현예에서, 링커는 말레이미드 그룹을 포함한다. 특정 구현예에서, 본원에 개시된 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 힌지 영역에서 감소된 이황화 가교를 포함하고, 감소된 이황화 가교는 말레이미드 그룹에 커플링된다. 또한, 링커가, 예를 들어, 파라-아미노 벤질 알콜(PABC)과 같은 자가-파괴 그룹을 추가로 포함하는 구현예가 본원에 제공된다. 특정 구현예에서, 항체 접합체는 본원에 개시된 항체 또는 항원-결합 단편 및 치료제 및 검출가능한 지시제로부터 선택되는 페이로드 분자를 포함한다. 특정 구현예에서, 페이로드 분자는 튜불린-표적화 항유사분열제, 펩티드 기반 독소, 피롤로벤조디아제핀(PBD) 이량체, 항생제, 피리미딘 합성 억제제, 항대사물질, DNA 알킬화제 및 토포아이소머라제 억제제로부터 선택되는 치료제이다. 특정 구현예에서, 페이로드 분자는 마인탄시노이드, 아우리스타틴, 독소루비신, 칼리케아미신, PBD 이량체, 모노메틸아우리스타틴 E(MMAE), 및 모노메틸아우리스타틴 F(MMAF)로부터 선택된다. 특정의 다른 구현예에서, 페이로드 분자는 검출가능한 지시제이다. 특정의 추가의 구현예에서, 검출가능한 지시제는 방사성 핵종, 염료, 방사성 금속, 형광 모이어티, MRI 조영제, 마이크로버블, 탄소 나노튜브, 금 입자, 플루오로데옥시글루코스, 효소, 발색단, 및 방사선 불투명 마커로부터 선택된다. 특정 구현예에서, 검출가능한 지시제는 ^{68}Ga, ^{64}Cu, ^{86}Y, ^{89}Zr, ^{124}I, ^{99m}Tc, ^{123}I, ^{111}In, ^{177}Lu, ^{131}I, ^{76}Br, ^{78}Zr, ^{18}F 및 ^{124}T로부터 선택된 방사성 핵종이다. 특정 구현예에서, 항체 접합체는 말레이미드-표지된 DOTA, N-하이드록시석신이미드-DOTA, 및 데스페리옥사민(DFO)으 로부터 선택된 방사성 핵종 킬레이터를 포함한다.

[0046] 약제학적 조성물이 또한 본원에 제공되며, 일부 구현예에서, 단리된 본원에 개시된 항체, 항원-결합 단편, 또는 항체 접합체; 및 약제학적 담체를 포함한다.

[0047] 본 발명은 또한 특정 구현예에서 현재 개시된 항체, 항원-결합 단편, 및/또는 항체 접합체의 사용을 포함하는 치료 또는 검출 방법을 제공한다. 일부 구현예에서, 암을 치료하거나 검출하는 방법이 제공되며, 여기서 상기 방법은 본원에 개시된 바와 같은 약제학적 조성물을 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다. 특정 구현예에서, 대상체는 위암(gastric cancer), 결장암(colon cancer), 유방암(breast cancer), 폐암(lung cancer), 림프암(lymphatic cancer), 간암(liver cancer), 난소암(ovarian cancer), 췌장 전립선암(pancreatic prostate cancer), 자궁암(uterine cancer), 및 편평 세포 암종(squamous cell carcinoma)으로부터 선택된 암을 갖거나 암을 갖는 것으로 의심된다. 특정 구현예에서, 암은 위장 선암종(stomach adenocarcinoma), 점액성 위 선암종(mucinous stomach adenocarcinoma), 미분화 위 선암종(undifferentiated stomach adenocarcinoma), 인환 세포 위 암종(signet-ring cell stomach carcinoma), 결장 선암종(colon adenocarcinoma), 침습성 유방관암종(invasive breast ductal carcinoma), 간세포 암종(hepatocellular carcinoma), 폐 선암종(lung adenocarcinoma), 편평 세포 암종(squamous cell carcinoma), 전이성 림프절 선암종(metastatic lymph node adenocarcinoma), 점액성 난소 선암종(mucinous ovarian adenocarcinoma), 췌장 관 선암종(pancreatic ductal adenocarcinoma), 췌장 유두 선암종(pancreatic papillary adenocarcinoma), 전립선 선암종(prostate adenocarcinoma), 및 자궁내막 암종(endometrioid carcinoma)으로부터 선택된다. 특정 구현예에서, 정맥내, 비경구, 위내, 흉막내, 폐내, 직장내, 피내, 복강내, 종양내, 피하, 경구, 국소, 경피, 갑골내, 척수강내, 비강내 및 근육내로부터 선택된 경로로 현재 개시된 조성물(예를 들어, 본원에 개시된 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는)을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 방법이 제공된다. 암을 검출하거나 치료하는 현재 개시된 방법의 특정의 추가 구현예에서, 상기 대상체는 (a) 면역억제 요법; (b) 자극성 면역 체크포인트 분자; (c) 방사선 요법; (d) 화학요법; (e) 세포 면역요법; 또는 (f) (a) 내지 (e)의 임의의 조합을 투여받고 있거나 이미 투여 받았다.

[0048] 본 발명의 이들 및 기타 측면 및 구현예는 하기 상세한 설명 및 첨부된 도면을 참조하면 명백해질 것이다. 본원에 개시된 모든 참고문헌은 각각이 개별적으로 혼입되는 것처럼 그 전문이 참고로 인용된다.

도면의 간단한 설명

[0049] 도 1은 선택된 후보 인간 수용체 아미노산 서열(1-8; 각각 서열번호 44-51에 상응함)에 대한 현재 개시된 "BBC" 항체 중쇄 가변 영역(서열번호 28)의 다중 아미노산 서열 정렬을 나타낸다. 열 3(파선으로 박스화됨)은 CDR 그래프팅용으로 선택된 인간 수용체 서열을 나타낸다. 도의 중간 부분에서, 단일 박스형 아미노산(V/I/M)은 인간 수용체 서열에서 희귀한 메티오닌이고; 이 잔기는 인간화 동안 더 일반적인 이소류신으로 치환되었다.

도 2a는 IMH2/BBC 항체(서열번호 27) 및 인간화 변이체: hBBC.8 (서열번호 31); hBBC.9 및 hBBC.9.1 (서열번호 33); 및 hBBC.10, hBBC.10.1, 및 hBBC.10.1FQ (서열번호 5)의 경쇄(LC) 가변 영역 서열의 아미노산 서열

정렬을 도시한다. hBBC CDR 서열은 박스(파선)로 제시되어 있고, 인간 수용체 CDR 서열은 밑줄친 것이다. 도의 바닥 부분에서, 2개의 단일 박스화 아미노산 잔기(R/G 및 Y/F)는 프레임워크 영역 서열에서 차이를 나타낸다. 도 2b는 AGC 세포 결합 검정에서 BBC, hBBC.8, R66G 치환 돌연변이를 갖는 hBBC.8, hBBC.9 및 hBBC.10 항체의 상대적 활성을 도시한다. F71Y 돌연변이를 갖는 hBBC-LC는 hBBC.9를 나타낸다. F71Y 및 R66G 돌연변이를 갖는 hBBC-LC는 hBBC.10을 나타낸다. 도 2c 내지 2e는 AGS 세포에 대한 추가 생성된 변이체 항체(2c) 및 합성 모노안테나리 LeB 항원과 비교된 AGS 세포에 대한 추가 생성된 변이체 항체(2d, 2e)의 결합 특이성을 도시한다.

도 3은 중쇄 프레임워크 3 영역 내의 hBBC.10.1 항체(서열번호 38), hBBC.10.1FQ 항체(서열번호 39) 및 두 개의 FDA 승인된 인간화 치료 항체(기준 1 및 기준 2)(각각 서열번호 40 및 41)의 서열 정렬을 제공한다.

도 4a 및 4b는 결합되지 않은 분획(4a) 및 BBC-결합(용출) 분획(4b)에서 m/Z 2521에서 COLO 205 GSL 세포의 $Fuc_4(LacNAc)_3Lac$의 MALDI-MSMS 서열분석을 도시한다. 도 4a-7b에서, 글리칸은 다음과 같이 묘사된다: 개방 원 = Gal; 충전된 원 = Glc; 충전된 사각형 = GlcNac; 폐쇄된 삼각형 = Fuc. 동일한 관례가 충전된 원 = Man이라는 차이와 함께 도 8a-8b에서 사용된다.

도 5a 및 5b는 각각 (a) NCI-N87 및 (b) SW1116 GSL 세포의 BBC-결합(바닥) 및 비-결합(상부) 글리칸의 MALDI-MS 프로파일을 도시한다.

도 6a 및 도 6b는 BBC-결합(용출) 분획에서 m/z 2521에서 NCI-N87(6a) 및 SW1116 GSL 세포(6b)의 $Fuc_4(LacNAc)_3Lac$의 MALDI-MSMS 서열분석을 도시한다.

도 7a 및 도 7b는 BBC-결합(용출) 분획에서 m/z 2970(7a) 및 m/z 3767(7b)에서 NCI-N87 GSL 세포의 $Fuc_4(LacNAc)_3Lac$ 및 $Fuc_6(LacNAc)_5Lac$의 MALDI-MSMS 서열분석을 제공한다.

도 8a 및 8b는 BBC-풍부 AGS N-글리칸의 MALDI-Q/TOF MS/MS 서열분석을 도시한다.

도 9a 및 9b는 각각 hBBC.10.1 항체를 갖는 글리칸 항원 (a) Le^Y-펜타오스 및 (b) Le^B-펜타오스의 ITC 적정 그래프를 도시한다.

도 10a 내지 10c는 hBBC.10.1 항체를 갖는 추가의 글리칸 항원의 ITC 적정 그래프를 도시한다: (a) Le^Y/Le^Y-ASGA; (b) Le^Y/Le^Y-I 항원; (c) Le^Y/Le^B-I 항원.

도 11a 내지 11f는 hBBC.10.1 항체를 갖는 다른 글리칸 항원의 ITC 적정 그래프를 도시한다: (a) Le^X-테트라오스; (b) Le^A-테트라오스; (c) H-항원 타입 I; (d) H-항원 타입 II; (e) H-ASGP; (f) Le^X/Le^X-ASGP.

도 12a 내지 12c는 기준 항체 "BR96"을 갖는 글리칸 항원의 ITC 적정 그래프를 제공한다: (a) Le^Y-펜타오스; (b) Le^Y/Le^Y-I 항원, 및 (c) Le^Y/Le^Y-ASGP.

도 13a 및 13b는 지시된 글리칸 항원: (a) Le^Y-gal 및 Le^Y/Le^Y-ASGA; (b) Le^B-gal 및 Le^B/Le^B-ASGA에 대한 hBBC.10.1 및 BR96의 표면 플라즈몬 공명(SPR) 센서그램을 도시한다.

도 14a 및 14b는 지시된 농도에서 코팅된 루이스 항원에 결합하는 hBBC.10.1 의 간접적 ELISA로부터의 결과를 도시한다: (a) Le^Y/Le^Y-ASGA-비오틴; (b) Le^Y-Gal-비오틴.

도 15는 지시된 농도에서 코팅된 루이스 항원(Le^B/Le^B-ASGA 대 Le^Y/Le^Y-ASGA 및 Le^B-Gal)에 결합하는 hBBC.10.1 의 간접적 ELISA로부터의 결과를 도시한다.

도 16a는 Le^Y-Gal-sp3-비오틴(Le^Y-Gal), Le^B-Gal-LC-비오틴(Le^B-Gal), Le^Y/Le^Y-ASGA-비오틴(Le^Y/Le^Y-ASGA), Le^B/Le^B-ASGA-비오틴(Le^B/Le^B-ASGA), 3-Le^Y/6 -Le^B-ASGA-비오틴(Le^Y/Le^B-ASGA), 및 3-Le^B/6-Le^Y-ASGA-비오틴(Le^B/Le^Y-ASGA)을 포함하는 글리칸 항원에 대한 hBBC.10.1의 항원-결합 ELISA로부터의 결과를 도시한다. 모든 항원의 코팅량은 동일하였다(1.87 pmole). 도 16b 및 16c는 각각 항원에 대한 (16b) BBC 항체 및 (16c) hBBC.10.1 항체의 친화도 및 선택도를 비교하는 항원-결합 ELISA 실험으로부터의 결과를 도시한다.

도 17은 AGS 위암 세포에 의한 hBBC.10.1의 세포내 섭취를 나타내는 형광 현미경 이미지를 제공한다. 좌측 패널: Alexa488-접합된 항-인간 IgG(녹색 채널)에 의해 염색된 hBBC.10.1. 우측 패널: 팔로이딘 로다민(적색 채널)으로 표지된 F-액틴 염색을 갖는 오버레이. 플루오레세인 및 로다민이 공동-분포된 영역은 현미경하에서 황색으로 나타나고, 병합된 이미지에서 공동-국소화된 형광 신호로서 나타난다.

도 18은 AGS 위암 세포에서 hBBC.10.1의 리소좀 국소화를 보여주는 형광 현미경 이미지를 제공한다. 좌측 패널: Alexa488-접합된 항-인간 IgG(녹색 채널)에 의해 염색된 hBBC.10.1. 중간 패널: 항-Lamp-1 항체에 이어, 항-토끼 IgG(적색 채널)로 표지된 리소좀. 우측 패널: 병합.

도 19a 및 19b는 면역결핍 SCID 마우스에게 (a) 인간 DLD-1 또는 (b) COLO 205 종양 세포가 투여된 후, 종양이 발생되면 항체가 투여된 생체내 이종이식 실험에서 hBBC.10.1의 항종양 활성을 도시한다.

도 20a 및 20b는 각각 면역결핍 SCID 마우스에게 인간 AGS 위암 선암종 세포가 투여된 후, 종양이 발생되면 항체가 투여된 생체내 이종이식 실험에서 다양한 농도의 (a) hBBC.10.1 및 (b) BR96의 항종양 활성을 도시한다. 도 20c 및 20d는 생체내 이종이식 실험에서 본 발명의 hBBC 항체의 항종양 활성을 도시한다.

도 21은 다양한 농도의 항체에서 hBBC.10.1("hBBC") 및 BR96에 의한 AGS 종양 세포의 직접적인 사멸을 도시한다. 사멸은 요오드화프로피움(PI)으로 염색된 표적 세포의 백분율로서 측정되었다.

도 22는 면역결핍 SCID 마우스에게 인간 TSGH 9201 위 암종 세포가 투여된 후, 종양이 발생되면 항체가 투여된 생체내 이종이식 실험에서 hBBC.10.1("hBBC") 및 BR96의 항종양 활성을 도시한다.

도 23은 면역결핍 SCID 마우스에게 인간 COLO 201 결장직장 선암종 세포가 투여된 후, 종양이 발생되면 항체가 투여된 생체내 이종이식 실험에서 다양한 농도의 hBBC.10.1("hBBC")의 항종양 활성을 도시한다.

도 24a 및 24b는 면역결핍 SCID 마우스에게 인간 COLO 201 결장직장 선암종 세포가 투여된 후, 종양이 발생되면 항체가 투여된 생체내 이종이식 실험에서 (a) hBBC.10.1("hBBC") 및 (b) BR96의 항종양 활성을 도시한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0050] 서열의 간단한 설명

[0051] 서열번호 1은 항체 hBBC.10.1FQ의 중쇄 가변(VH) 도메인의 아미노산 서열이다:

[0052] QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGYSITSGYTWHWIRQHPGKGLEWLGYIHYTGNTKYSPSLKSRLSISRDTSKNTFYLQMNSLTTEDTAVYYCGREALRGYDAGFWFTYWGQGTLVTV.

[0053] 서열번호 2는 항체 IMH2/BBC, 항체 hBBC.8, 항체 hBBC.9, 항체 hBBC.9.1, 항체 hBBC.10, 항체 hBBC.10.1, 및 항체 hBBC.10.1FQ의 중쇄 상보성 결정 영역 1(VH CDR1)의 아미노산 서열이다:

[0054] SGYTWH.

[0055] 서열번호 3은 항체 hBBC.9.1, 항체 hBBC.10.1 및 항체 hBBC.10.1FQ의 VH CDR2의 아미노산 서열이다:

[0056] YIHYTGNTKYSPSLKS.

[0057] 서열번호 4는 항체 hBBC.10.1 및 항체 hBBC.10.1FQ의 VH CDR3의 아미노산 서열이다:

[0058] EALRGYDAGFWFTY.

[0059] 서열번호 5는 항체 hBBC.10, 항체 hBBC.10.1 및 항체 hBBC.10.1FQ의 경쇄 가변(VL) 도메인의 아미노산 서열이다:

[0060] DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCTASEDIYNRLTWYQQKPGKVPRLLISGATSLDTGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDVATYYCQQYWTTPWTFGQGTKLEIK.

[0061] 서열번호 6은 항체 IMH2/BBC, 항체 hBBC.8, 항체 hBBC.9, 항체 hBBC.9.1, 항체 hBBC.10, 항체 hBBC.10.1, 및 항체 hBBC.10.1FQ의 경쇄 상보성 결정 영역 1(VL CDR1)의 아미노산 서열이다:

[0062] TASEDIYNRLT.

[0063] 서열번호 7은 항체 IMH2/BBC, 항체 hBBC.8, 항체 hBBC.9, 항체 hBBC.9.1, 항체 hBBC.10, 항체 hBBC.10.1, 및 항체 hBBC.10.1FQ의 VL CDR2의 아미노산 서열이다:

[0064] GATSLDT.

[0065] 서열번호 8은 항체 IMH2/BBC, 항체 hBBC.8, 항체 hBBC.9, 항체 hBBC.9.1, 항체 hBBC.10, 항체 hBBC.10.1, 및 항체 hBBC.10.1FQ의 VL CDR3의 아미노산 서열이다:

[0066] QQYWTTPWT.

[0067] 서열번호 9는 [VL-VH] 배향에서 항체 hBBC.10.1로부터 유도된 단일 쇄 단편 변수(scFv)의 아미노산 서열이다:

[0068] DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCTASEDIYNRLTWYQQKPGKVPRLLISGATSLDTGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDVATYYCQQYWTTPWTFGQGTKLEIK(GGGGS)$_x$ QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGYSITSGY

[0069] TWHWIRQHPGKGLEWLGYIHYTGNTKYSPSLKSRLSISRDTSKNQFFLKLSSVTTEDTAVYYCGREALRGYDAGFWFTYWGQGTLVTV, 여기서 "x"는 괄호에 제시된 서열 GGGGS의 1, 또는 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 또는 그 이상의 반복체일 수 있다.

[0070] 서열번호 10은 항체 hBBC.10.1의 전장 중쇄(HC)의 아미노산 서열이다:

[0071] QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGYSITSGYTWHWIRQHPGKGLEWLGYIHYTGNTKYSPSLKSRLSISRDTSKNQFFLKLSSVTTEDTAVYYCGREALRGYDAGFWFTYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK.

[0072] 서열번호 11은 항체 hBBC.10, 항체 hBBC.10.1 및 항체 hBBC.10.1FQ의 전장 경쇄(LC)의 아미노산 서열이다:

[0073] DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCTASEDIYNRLTWYQQKPGKVPRLLISGATSLDTGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDVATYYCQQYWTTPWTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC.

[0074] 서열번호 12는 항체 hBBC.10.1의 중쇄 가변(VH) 도메인을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열이다:

[0075] Caggtgcagctgcaggaaagcggcccgggcctggtgaaaccgagccagaccctgagcctgacctgcaccgtgagcggctatagcattaccagcggctatacctggcattggattcgccagcatccgggcaaaggcctggaatggctgggctatattcattataccggcaacaccaaatatagcccgagcctgaaaagccgcctgagcattagccgcgataccagcaaaaaccagttcttcctgaaactgagcagcgtgaccaccgaagataccgcggtgtattattgcggccgcgaagcgctgcgcggctatgatgctggcttctggtttacctattggggccaaggcaccctggtgaccgtg.

[0076] 서열번호 13은 항체 IMH2/BBC, 항체 hBBC.8, 항체 hBBC.9, 항체 hBBC.9.1, 항체 hBBC.10, hBBC.10.1, 및 항체 hBBC.10.1FQ의 중쇄 상보성 결정 영역 1(VH CDR1)을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열이다:

[0077] agcggctatacctggcat.

[0078] 서열번호 14는 항체 hBBC.9.1, 항체 hBBC.10, 및 항체 hBBC.10.1FQ의 VH CDR2를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열이다:

[0079] tatattcattataccggcaacaccaaatatagcccgagcctgaaaagc.

[0080] 서열번호 15는 항체 hBBC.10.1 및 항체 hBBC.10.1FQ의 VH CDR3을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열이다:

[0081] gaagcgctgcgcggctatgatgctggcttctggtttacctat.

[0082] 서열번호 16은 항체 hBBC.10, 항체 hBBC.10.1, 및 항체 hBBC.10.1FQ의 경쇄 가변(VL) 도메인을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열이다:

[0083] gatattcagatgacccagagcccgagcagcctgagcgcgagcgtgggcgatcgcgtgaccattacctgcaccgcgagcgaagatatttataaccgcctgacctggtatcagcagaaaccgggcaaagtgccgcgtctgctgatttctggcgcgaccagcctggataccggcgtgccgagccgctttagcggcagcggcagcggcaccgattacaccctgaccattagcagcctgcagccggaagatgtggcgacctattattgccagcagtattggaccaccccgtggacctttggccagggcaccaaactggaaattaaa.

[0084] 서열번호 17은 항체 IMH2/BBC, 항체 hBBC.8, 항체 hBBC.9, 항체 hBBC.9.1, 항체 hBBC.10, 항체 hBBC.10.1, 및 항체 항체 hBBC.10.1FQ의 경쇄 상보성 결정 영역 1(VL CDR1)을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열이다:

[0085] accgcgagcgaagatatttataaccgcctgacc.

[0086] 서열번호 18은 항체 IMH2/BBC, 항체 hBBC.8, 항체 hBBC.9, 항체 hBBC.9.1, 항체 hBBC.10, 항체 hBBC.10.1, 및 항체 hBBC.10.1FQ의 VL CDR2를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열이다:

[0087] ggcgcgaccagcctggatacc.

[0088] 서열번호 19는 항체 항체 IMH2/BBC, 항체 hBBC.8, 항체 hBBC.9, 항체 hBBC.9.1, 항체 hBBC.10, 항체 hBBC.10.1, 및 항체 hBBC.10.1FQ의 VL CDR3을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열이다:

[0089] cagcagtattggaccaccccgtggacc.

[0090] 서열번호 20은 항체 hBBC.10.1로부터 유도된 [VL-(L)-VH] 배향에서 단일 쇄 단편 변수(scFv)를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열이다:

[0091] gatattcagatgacccagagcccgagcagcctgagcgcgagcgtgggcgatcgcgtgaccattacctgcaccgcgagcgaagatatttataaccgcctgacc
tggtatcagcagaaaccgggcaaagtgccgcgtctgctgatttctggcgcgaccagcctggataccggcgtgccgagccgctttagcggcagcggcagcggc
accgattacaccctgaccattagcagcctgcagccggaagatgtggcgacctattattgccagcagtattggaccaccccgtggacctttggccagggcacc
aaactggaaattaaa(ggtggaggcggttct)$_x$

caggtgcagctgcaggaaagcggcccgggcctggtgaaaccgagccagaccctgagcctgacctgcaccgtgagcggctatagcattaccagcggctatacc
tggcattggattcgccagcatccgggcaaaggcctggaatggctgggctatattcattataccggcaacaccaaatatagcccgagcctgaaaagccgcctg
agcattagccgcgataccagcaaaaaccagttcttcctgaaactgagcagcgtgaccaccgaagataccgcggtgtattattgcggccgcgaagcgctgcgc
ggctatgatgctggcttctggtttacctattggggccaaggcaccctggtgaccgtg,

[0092] 여기서, "x"는 괄호에 제시된 서열 ggtggaggcggttct의 1, 또는 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 또는 그 이상의 반복체일 수 있다.

[0093] 서열번호 21은 항체 hBBC.10.1의 전장 중쇄(HC)를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열이다:

[0094] caggtgcagctgcaggaaagcggcccgggcctggtgaaaccgagccagaccctgagcctgacctgcaccgtgagcggctatagcattaccagcggctatacc
tggcattggattcgccagcatccgggcaaaggcctggaatggctgggctatattcattataccggcaacaccaaatatagcccgagcctgaaaagccgcctg
agcattagccgcgataccagcaaaaaccagttcttcctgaaactgagcagcgtgaccaccgaagataccgcggtgtattattgcggccgcgaagcgctgcgc
ggctatgatgctggcttctggtttacctattggggccaaggcaccctggtgaccgtgtcgagcgcttccaccaagggcccatcggtcttcccctggcaccc
tcctccaagagcacctctgggggcacagcggccctgggctgcctggtcaaggactacttccccgaaccggtgacggtgtcgtggaactcaggcgccctgacc
agcggcgtgcacaccttcccggctgtcctacagtcctcaggactctactccctcagcagcgtggtgaccgtgccctccagcagcttgggcacccagacctac
atctgcaacgtgaatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagaaagttgagcccaaatcttgtgacaaaactcacacatgcccaccgtgcccagcacct
gaactcctgggggggaccgtcagtcttcctcttcccccaaaacccaaggacaccctcatgatctcccggacccctgaggtcacatgcgtggtggtggacgtg
agccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgcgggaggagcagtacaacagcacgtac
cgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcaaggtctccaacaaagccctcccagcccccatcgagaaa
accatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacaccctgcccccatcccgggatgagctgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctg
gtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgctggactccgacggc
tccttcttcctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactac
acgcagaagagcctctccctgtctccgggtaaatga.

[0095] 서열번호 22는 항체 hBBC.10.1 및 항체 hBBC.10.1FQ의 전장 경쇄(LC)를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열이다:

[0096] gatattcagatgacccagagcccgagcagcctgagcgcgagcgtgggcgatcgcgtgaccattacctgcaccgcgagcgaagatatttataaccgcctgacc
tggtatcagcagaaaccgggcaaagtgccgcgtctgctgatttctggcgcgaccagcctggataccggcgtgccgagccgctttagcggcagcggcagcggc
accgattacaccctgaccattagcagcctgcagccggaagatgtggcgacctattattgccagcagtattggaccaccccgtggacctttggccagggcacc
aaactggaaattaaacgtacggtggctgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgtgcctgctg
aataacttctatcccagaggccaaagtacagtggaaggtggataacgccctccaatcgggtaactcccaggagagtgtcacagagcaggacagcaaggac
agcacctacagcctcagcagcaccctgacgctgagcaaagcagactacgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggcctgagctcgccc
gtcacaaagagcttcaacaggggagagtgttaa.

[0097] 서열번호 23은 예시적인 스페이서 아미노산 서열 EGKSSGSGSESKVD이다.

[0098] 서열번호 24는 예시적인 스페이서 아미노산 서열 KESGSVSSEQLAQFRSLD이다.

[0099] 서열번호 25는 가요성 폴리링커 아미노산 서열 GGGGS이다.

[0100] 서열번호 26은 가요성 폴리링커 아미노산 서열 GGGGSGGGGSGGGGS이다.

[0101] 서열번호 27은 항체 IMH2/BBC의 VL 도메인의 아미노산 서열이다:

[0102] DIQMTQSSSSFSVSLGDRVTITCTASEDIYNRLTWYQQKPGNVPRLLISGATSLDTGVPSRFSGSRSGKDYALSITSLQTEDVATYYCQQYWTTPWTFGGGT
RLEIK.

[0103] 서열번호 28은 항체 IMH2/BBC의 VH 도메인의 아미노산 서열이다:

[0104] DVQLQESGPDLVKPSQSLSLTCTVTGYSITSGYTWHWIRQFPGNTLEWLGYIHYSGNTKYSPSLKSRLSVTRDTSKNQFFLQLNSVTTEDTATYYCGREALR
GYDHGFWFTYWGQGTLVTV.

[0105] 서열번호 29는 인간 수용체 프레임워크 AAS01771.1의 VL 도메인의 아미노산 서열이다:

[0106] DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNYLAWYQQKPGKVPKLLIYAASTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCQKYNSAPYTFGQGT
KLEIK.

[0107] 서열번호 30은 인간 수용체 프레임워크 CAD89404.1의 VH 도메인의 아미노산 서열이다:

[0108] QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSISSGAYYWSWIRQHPGKGLEWIGYIYYSGTTYYNPSLKSRLSMSRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGPY
YDSPRPFDPWGQGTLVTV.

[0109] 서열번호 31은 항체 hBBC.8의 VL 도메인의 아미노산 서열이다:

[0110] DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCTASEDIYNRLTWYQQKPGKVPRLLISGATSLDTGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCQQYWTTPWTFGQGT
KLEIK.

[0111] 서열번호 32는 항체 hBBC.8, 항체 hBBC.9, 및 항체 hBBC.10의 VH 도메인의 아미노산 서열이다:

[0112] QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGYSITSGYTWHWIRQHPGKGLEWLGYIHYSGNTKYSPSLKSRLSISRDTSKNQFFLKLSSVTTEDTAVYYCGREALR
GYDHGFWFTYWGQGTLVTV.

[0113] 서열번호 33은 항체 hBBC.9 및 항체 hBBC.9.1의 VL 도메인의 아미노산 서열이다:

[0114] DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCTASEDIYNRLTWYQQKPGKVPRLLISGATSLDTGVPSRFSGSRSGTDYTLTISSLQPEDVATYYCQQYWTTPWTFGQGT
KLEIK.

[0115] 서열번호 34는 항체 hBBC.9.1의 VH 도메인의 아미노산 서열이다:

[0116] QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGYSITSGYTWHWIRQHPGKGLEWLGYIHYTGNTKYSPSLKSRLSISRDTSKNQFFLKLSSVTTEDTAVYYCGREALR
GADHGFWFTYWGQGTLVTV.

[0117] 서열번호 35는 항체 hBBC.10.1의 VH 도메인의 아미노산 서열이다:

[0118] QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGYSITSGYTWHWIRQHPGKGLEWLGYIHYTGNTKYSPSLKSRLSISRDTSKNQFFLKLSSVTTEDTAVYYCGREALR
GYDAGFWFTYWGQGTLVTV.

[0119] 서열번호 36은 [VH-VL] 배향에서 항체 hBBC.10.1로부터 유도된 단일 쇄 단편 변수(scFv)의 아미노산 서열이다:

[0120] QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGYSITSGYTWHWIRQHPGKGLEWLGYIHYTGNTKYSPSLKSRLSISRDTSKNQFFLKLSSVTTEDTAVYYCGREA

[0121] LRGYDAGFWFTYWGQGTLVTV $(GGGGS)_x$DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC

[0122] TASEDIYNRLTWYQQKPGKVPRLLISGATSLDTGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSL

[0123] QPEDVATYYCQQYWTTPWTFGQGTKLEIK, 여기서 "x"는 괄호에 제시된 서열 GGGGS의 1, 또는 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 또는 그 이상의 반복체일 수 있다.

[0124] 서열번호 37은 항체 hBBC.10.1로부터 유도된 [VH-(L)-VL] 배향에서 단일 쇄 단편 변수(scFv)를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열이다:

[0125] caggtgcagctgcaggaaagcggcccgggcctggtgaaaccgagccagaccctgagcctgacctgcaccgtgagcggctatagcattaccagcggctatacc
tggcattggattcgccagcatccgggcaaaggcctggaatggctgggctatattcattataccggcaacaccaaatatagcccgagcctgaaaagccgcctg
agcattagccgcgataccagcaaaaaccagttcttcctgaaactgagcagcgtgaccaccgaagataccgcggtgtattattgcggccgcgaagcgctgcgc
ggctatgatgctggcttctggtttacctattggggccaaggcaccctggtgaccgtg(ggtggaggcggttct)$_x$gatattcagatgacccagagcccgagc

agcctgagcgcgagcgtgggcgatcgcgtgaccattacctgcaccgcgagcgaagatatttataaccgcctgacctggtatcagcagaaaccgggcaaagtg
ccgcgtctgctgatttctggcgcgaccagcctggataccggcgtgccgagccgctttagcggcagcggcagcggcaccgattacaccctgaccattagcagc
ctgcagccggaagatgtggcgacctattattgccagcagtattggaccaccccgtggacctttggccagggcaccaaactggaaattaaa,

[0126] 여기서, "x"는 괄호에 제시된 서열 ggtggaggcggttct의 1, 또는 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 또는 그 이상의 반복체일 수 있다.

[0127] 이들 서열 및 다른 서열은 첨부된 서열 목록에 제공된다.

[0128] 상세한 설명

[0129] 본 발명은 다양한 암에서 발현된 특정 루이스 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 인간화 항체 및 이의 항원-결합 단편에 관한 것이다. 보다 구체적으로, 처음으로 본원에 기재되고 이하 보다 상세하게 제시된 바와 같이, 본 키메라, 인간화 항체는 예기치 않게 암 세포 상에서 발현되고 생체내에서 강력한 항종양 활성을 갖는 특정 바이안테나리 루이스$^{B/Y}$ 항원에 대해 정교한 특이성으로 결합한다. 또한, 현재 개시된 항체는 유리하게는 서열번호 27에 제시된 아미노산 서열을 갖는 VL 도메인 및 서열번호 28에 제시된 아미노산 서열을 갖는 VH 도메인을 포함하는 BBC 항체와 비교하여 모노안테나리 루이스 B 항원(이는 건강한 조직에서 발현된다)에 대해 놀랍게도 감소된(예를 들어, 통계적으로 유의한 방식으로 감소된) 결합을 갖는다. 본원에 개시된 항체는 항체 BR96에 의해 인식되는 모노안테나리 Le^{Y} 항원과 구별되는 항원에 결합하고, 이론에 결부시키고자 하는 것은 아니지만, 본 항체는 BR96 과 비교하여 치료적 적용에서 암 세포의 보다 안전하고 보다 특이적인 표적화를 가능하게 할 수 있다. 또한, 본 발명의 항체 및 항원-결합 단편은 또한 항원-발현 암 세포에 결합되어, 이러한 세포의 리소좀으로 효율적이고 안정하게 내재화되고, 비-인간 영장류 모델에서 치료 용량으로 안전하게 허용된다.

[0130] 특정의 바람직한 구현예에 따라, 그리고 추가로 비-제한적인 이론에 따르면, 현재 개시된 항체 및 이의 항원-결합 단편의 유익한 사용은, 예를 들어, 다양한 위암, 난소암, 폐암, 전립선암, 췌장암 및 다른 암과 같은 암을 진단 및/또는 치료하는 방법에 관한 것이다. 이들 및 관련된 구현예가 본원에서 보다 상세하게 개시된다.

[0131] 폴리펩티드 및 단백질

[0132] 용어 "폴리펩티드", "단백질" 및 "펩티드" 및 "당단백질"은 상호교환가능하게 사용되며, 임의의 특정 길이로 제한되지 않는 아미노산의 중합체를 지칭한다. 상기 용어는 신호 서열의 미리스틸화, 황산화, 글리코실화, 인산화 및 첨가 또는 결실과 같은 변형을 배제하지 않는다. 용어 "폴리펩티드" 또는 "단백질"은 아미노산의 하나 이상의 쇄를 의미할 수 있으며, 여기서 각각의 쇄는 펩티드 결합에 의해 공유적으로 연결된 아미노산을 포함하고, 상기 폴리펩티드 또는 단백질은 천연 단백질, 즉 자연 발생 및 구체적으로 비-재조합 세포, 또는 유전자 조작된 또는 재조합 세포에 의해 생성된 단백질의 서열을 갖는, 펩티드 결합에 의해 함께 비공유적으로 및/또는 공유적으로 연결된 다수의 쇄를 포함할 수 있고, 천연 단백질의 아미노산 서열을 갖는 분자, 또는 천연 서열의 하나 이상의 아미노산으로부터의 결실, 아미노산으로의 첨가 및/또는 이의 치환을 갖는 분자를 포함할 수 있다. 따라서, "폴리펩티드" 또는 "단백질"은 하나("단량체"라 칭명됨) 또는 복수("다량체"라 칭명됨)의 아미노산 쇄를 포함할 수 있다. 용어 "펩티드", "폴리펩티드" 및 "단백질"은 구체적으로 본 발명의 항체 및 항원-결합 단편, 또는 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 하나 이상의 아미노산으로부터의 결실, 이에의 첨가 및/또는 이의 치환을 갖는 서열을 포함한다.

[0133] 본원에 사용된 바와 같이, "아미노산"은 자연 발생 및 합성 아미노산 뿐만 아니라 자연 발생 아미노산과 유사한 방식으로 기능하는 아미노산 유사체 및 아미노산 모방체를 지칭한다. 자연 발생 아미노산은 유전자 코드에 의해 인코딩된 것들뿐만 아니라 나중에 변형된 아미노산, 예를 들어, 하이드록시프롤린, γ-카복시글루타메이트, 및 O-포스포세린이다. 아미노산 유사체는 자연 발생 아미노산과 동일한 기본적인 화학 구조, 즉 수소, 카복실 그룹, 아미노 그룹 및 R 그룹에 결합된 α-탄소를 갖는 화합물, 예를 들어, 호모세린, 노르류신, 메티오닌 설폭사이드, 메티오닌 메틸 설포늄을 지칭한다. 이러한 유사체는 변형된 R 그룹(예: 노르류신) 또는 변형된 펩티드 백본을 갖지만, 자연 발생 아미노산과 동일한 기본적인 화학 구조를 보유한다. 아미노산 모방체는 아미노산의 일반적인 화학 구조와 상이한 구조를 갖지만 자연 발생 아미노산과 유사한 방식으로 기능하는 화학적 화합물을 지칭한다.

[0134] 본원에 사용된 바와 같이, "돌연변이"는 각각 기준 또는 야생형 핵산 분자 또는 폴리펩티드 분자와 비교하여 핵산 분자 또는 폴리펩티드 분자의 서열 변화를 지칭한다. 돌연변이는 뉴클레오티드(들) 또는 아미노산(들)의 치환, 삽입 또는 결실을 포함하는 여러 가지 상이한 유형의 서열 변화를 초래할 수 있다.

[0135] 용어 "폴리펩티드 단편"은 아미노-말단 결실, 카복실-말단 결실, 및/또는 자연 발생 또는 재조합적으로 생성된 폴리펩티드의 내부 결실 또는 치환을 갖는 폴리펩티드(단량체성 또는 다량체성일 수 있음)를 지칭한다. 본원에 사용된 바와 같이, "인접 아미노산"은 개시된 아미노산 서열의 중단되지 않은 선형 부분에 상응하는 공유적으로 연결된 아미노산을 지칭한다. 특정 구현예에서, 폴리펩티드 단편은 적어도 5 내지 약 500개의 아미노산 길이를 갖는 아미노산 쇄를 포함할 수 있다. 특정 구현예에서, 단편은 적어도 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 또는 450개 아미노산 길이이다는 것이 인식될 것이다.

[0136] 본원에서 지칭되는 용어 "단리된 단백질" 및 "단리된 폴리펩티드"는 대상 단백질 또는 폴리펩티드가 (1) 전형적으로 자연에서 발견될 수 있는 적어도 일부 다른 단백질 또는 폴리펩티드가 없고, (2) 본질적으로 동일한 공급원으로부터, 예를 들어, 동일한 종으로부터의 다른 단백질 또는 폴리펩티드가 없고, (3) 상이한 종으로부터 세포에 의해 발현되고, (4) 적어도 약 50%의 폴리뉴클레오티드, 지질, 탄수화물, 또는 자연에서 관련되는 다른 물질로부터 분리되었고, (5) "단리된 단백질" 또는 "단리된 폴리펩티드"가 자연에서 관련될 수 있는 단백질 또는 폴리펩티드의 일부와 (공유 또는 비공유 상호작용에 의해) 관련되지 않고, (6) 자연에서 관련되지 않는 폴리펩티드와 (공유 또는 비공유 상호작용에 의해) 작동가능하게 관련되고, 또는 (7) 자연에서 발생하지 않는다는 것을 의미한다. 이러한 단리된 단백질 또는 폴리펩티드는 게놈 DNA, cDNA, mRNA 또는 다른 RNA에 의해 인코딩될 수 있거나, 인공 펩티드 및 단백질 합성을 위한 임의의 다수의 익히 공지된 화학, 또는 이들의 임의의 조합에 따르는 합성 기원일 수 있다. 특정 구현예에서, 단리된 단백질 또는 폴리펩티드는 이의 사용(치료적, 진단적, 예방적, 연구 또는 기타)을 방해하는 자연 환경에서 발견되는 단백질 또는 폴리펩티드 또는 다른 오염물을 실질적으로 함유하지 않는다.

[0137] 폴리펩티드는 단백질의 N-말단 말단에서 신호 (또는 리더) 서열을 포함할 수 있으며, 이는 단백질의 전달을 공동번역적으로 또는 번역 후 지시한다. 폴리펩티드는 또한 폴리펩티드(예: 폴리-His)의 합성, 정제 또는 동정을 용이하게 하기 위해 또는 고체 지지체에 대한 폴리펩티드의 결합을 향상시키기 위해 인-프레임으로 융합되거나 링커 또는 다른 서열에 접합될 수 있다. 본원에 사용된 바와 같이, "융합 단백질" 또는 "융합 폴리펩티드"는 단일 쇄에서 적어도 2개의 별개의 도메인을 갖는 단백질을 지칭하며, 여기서 도메인은 단백질에서 자연적으로 함께 발견되지 않는다. 융합 단백질을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드는 PCR을 사용하여 작제되고, 재조합적으로 조작되거나 등등일 수 있거나, 이러한 융합 단백질은 합성될 수 있다. 융합 단백질은 다른 성분, 예를 들어, 태그, 링커, 또는 형질도입 마커를 추가로 함유할 수 있다. 융합 도메인 폴리펩티드는 N-말단 및/또는 C-말단에서 폴리펩티드에 결합될 수 있고, 비-제한적인 예로서, 당업자에게 친숙한 바와 같이, 면역글로불린 유도 서열, 예를 들어, Ig 불변 영역 서열 또는 이의 일부, 친화도 태그, 예를 들어, His 태그(예: 헥사히스티딘 또는 다른 폴리히스티딘), FLAG™ 또는 myc 또는 다른 펩티드 친화도 태그, 검출 가능한 폴리펩티드 잔기, 예를 들어, 녹색 형광 단백질(GFP) 또는 이의 변이체(예: 황색 형광 단백질(YFP), 청색 형광 단백질(BFP), 다른 에쿼린 또는 이의 유도체 등) 또는 다른 검출가능한 폴리펩티드 융합 도메인, 효소 또는 이의 일부, 예를 들어, 글루타티온-S-트랜스퍼라제(GST) 또는 다른 공지된 효소 검출 및/또는 리포터 융합 도메인 등을 포함할 수 있다. 추가의 검출가능한 잔기가 본원에서 논의된다.

[0138] 시스테인-함유 펩티드는 본 발명의 항체 또는 이의 항원-결합 단편과 같은 폴리펩티드의 N- 및/또는 C-말단에 결합될 수 있는 융합 펩티드로서 사용되어 확립된 방법론에 따라 이러한 폴리펩티드를 디설파이드-가교결합된 이량체, 삼량체, 사량체 또는 고급 다량체로 쉽게 조립할 수 있도록 할 수 있다. 예를 들어, 쇄간 디설퍼이드 브릿지를 형성할 수 있는 시스테인 잔기를 포함하는 면역글로불린 유전자 슈퍼패밀리 구성원 유도 서열을 함유하는 융합 폴리펩티드는 익히 공지되어 있고, S-S 연결된 다량체를 조작하기 위한 다른 전략도 마찬가지이다(예를 들어, Reiter et al., 1994 *Prot. Eng.* 7:697; Zhu et al., 1997 *Prot. Sci.* 6:781; Mabry et al., 2010 *Mabs* 2:20; Gao et al., 1999 *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 96:6025; Lim et al., 2010 *Biotechnol. Bioeng.* 106:27). 본원에 기재된 항체 및 항원-결합 단편(예를 들어, Fan et al, 2008 FASEB J. 22:3795)과 같은 목적하는 폴리펩티드 상에 융합 도메인으로서 다량체 조립을 촉진하는 펩티드 서열을 그래프팅하기 위한 대안적인 접근법도 또한 고려된다.

[0139] 폴리펩티드 변형은 광범위하게 다양한 익히 공지된 방법론에 따라 생합성적으로 및/또는 화학적으로 수행될 수 있고, 또한 담체 단백질(예: 키홀 림펫 헤모시아닌(KLH), 소 혈청 알부민(BSA), 난백알부민(OVA) 또는 다른 분자)에 대한 접합, 및 고체 지지체 상의 공유 또는 비공유 고정화를 포함할 수 있다. 특정 구현예에 따라, 본원에 기재된 항체 또는 이의 항원-결합 단편에 대해 다가인 접합체의 생성을 위해 담체에 대한 화학적 또는 생합

성적 접합이 고려된다.

[0140] 또한, 형광단(예: FITC, TRITC, Texas Red 등)과 같은 검출가능한 지시제 잔기(때때로 리포터 잔기로서 지칭됨)를 사용하는 검출가능한 표지화도 고려된다. 특정 목적을 위해 선택될 수 있는 넓은 범위의 검출가능한 지시제(비색 지시제를 포함함)의 예는 문헌[참조: Haugland, 2005 The *Handbook: A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies- Tenth Ed.*, Invitrogen Corp./ Molecular Probes쩨, Eugene, OR; in Mohr, 1999 *J. Mater. Chem.*, 9: 2259-2264; in Suslick *et al.*, 2004 *Tetrahedron* 60:11133-11138]; 및 미국 특허 제6,323,039호에 기재되어 있다(참조: 예를 들어, Fluka Laboratory Products Catalog, 2001 Fluka, Milwaukee, WI; and Sigma Life Sciences Research Catalog, 2000, Sigma, St Louis, MO). 검출가능한 지시제는 형광 지시제, 발광 지시제, 인광 지시제, 방사성 지시제, 염료, 효소, 효소의 기질, 에너지 전달 분자 또는 친화도 표지일 수 있다.

[0141] 본원에서 고려되는 특정 구현예에서 사용하기 위한 다른 검출가능한 지시제는 친화도 시약, 예를 들어, 항체, 렉틴, 면역글로불린 Fc 수용체 단백질(예: 스타필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*) 단백질 A, 단백질 G 또는 다른 Fc 수용체), 아비딘, 비오틴, 다른 리간드, 수용체 또는 반대수용체 또는 그들의 유사체 또는 모방체 등을 포함한다. 이러한 친화도 방법론에 대해, 예를 들어, 방사성 핵종(예: ^{76}Br, ^{78}Zr, ^{18}FI), 형광단, 친화도 태그, 비오틴 또는 비오틴 모방체 서열로 표지된 것들 또는 항체-효소 접합체로서 제조된 것들을 포함하여 적절하게 표지된 항체 또는 렉틴과 같은 면역계측 측정을 위한 시약이 제조될 수 있다(참조: 예를 들어, Weir, D.M., *Handbook of Experimental Immunology*, 1986, Blackwell Scientific, Boston; Scouten, W.H., 1987 *Methods in Enzymology 135*:30-65; Harlow and Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual,* 1988 Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY; Haugland, *Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies- Tenth Ed.*, 2005 Invitrogen Corp. /Molecular Probes쩨, Eugene, OR; Scopes, R.K., *Protein Purification: Principles and Practice*, 1987, Springer-Verlag, NY; Hermanson, G.T. *et al.*, *Immobilized Affinity Ligand Techniques*, 1992, Academic Press, Inc., NY; Luo *et al.*, 1998 *J. Biotechnol.* 65:225 및 그 안에 인용된 참조문헌).

[0142] 펩티드 링커/스페이서 서열은 또한, 목적하는 경우, 각각의 폴리펩티드가 그의 2차 및/또는 3차 구조로 폴딩되는 것을 보장하기에 충분한 거리만큼 다수의 폴리펩티드 성분을 분리하기 위해 사용될 수 있다. 이러한 펩티드 링커 서열은 당업계에 익히 공지된 표준 기술을 사용하여 융합 폴리펩티드에 혼입될 수 있다.

[0143] 특정 펩티드 스페이서 서열은, 예를 들어, (1) 가요성 연장 형태를 채택하는 능력; (2) 제1 및 제2 폴리펩티드 상의 기능적 에피토프와 상호작용할 수 있는 2 차 구조를 채택할 수 없는 능력; 및/또는 (3) 폴리펩티드 기능적 에피토프와 반응할 수 있는 소수성 또는 하전된 잔기의 결핍에 기초하여 선택될 수 있다. 특정 구현예에서, 펩티드 스페이서 서열은, 예를 들어, Gly, Asn 및 Ser 잔기를 함유한다. 기타 거의 중성 아미노산, 예를 들어, Thr 및 Ala가 또한 스페이서 서열에 포함될 수 있다. 스페이서로서 유용하게 사용될 수 있는 다른 아미노산 서열은 문헌[참조: Maratea *et al.*, *Gene 40*:39 46 (1985); Murphy *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83*:8258 8262 (1986); 미국 특허 제4,935,233호, 및 미국 특허 제4,751,180호]에 개시된 것들을 포함한다. 스페이서의 다른 예시적이고 비제한적인 예는, 예를 들어, Glu-Gly-Lys-Ser-Ser-Gly-Ser-Gly-Ser-Glu-Ser-Lys-Val-Asp(서열번호 23)(참조: Chaudhary *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:1066-1070 (1990)) 및 Lys-Glu-Ser-Gly-Ser-Val-Ser-Ser-Glu-Gln-Leu-Ala-Gln-Phe-Arg-Ser-Leu-Asp(서열번호 24)(참조: Bird *et al.*, *Science* 242:423-426 (1988))를 포함할 수 있다.

[0144] 일부 구현예에서, 스페이서 서열은 제1 및 제2 폴리펩티드가 기능적 도메인을 분리하고 입체적 간섭을 방지하기 위해 사용될 수 있는 비-필수 N-말단 아미노산 영역을 가질 경우 필요하지 않다. 2개의 코딩 서열은 임의의 스페이서 없이 직접 융합될 수 있거나, 예를 들어, 단일 반복으로 존재하거나 1 내지 5회 이상, 또는 그 이상 반복될 때, 예를 들어, 5량체 Gly-Gly-Gly-Ser(서열번호 25)로 구성된 가요성 폴리링커를 사용하여 융합될 수 있고; 예를 들어, 서열번호 26을 참조한다. 특정의 예시적이고 비제한적 구현예에서, 펩티드 스페이서는 1 내지 5개의 아미노산, 5 내지 10개의 아미노산, 5 내지 25개의 아미노산, 5 내지 50개의 아미노산, 10 내지 25개의 아미노산, 10 내지 50개의 아미노산, 10 내지 100개의 아미노산, 또는 임의의 개입 범위의 아미노산일 수 있다. 다른 예시적인 구현예에서, 펩티드 스페이서는 길이 약 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50개 또는 그 이상의 아미노산을 포함한다.

[0145] 본원에 기재된 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 아미노산 서열 변형(들)이 또한 특정 구현예에 따라 고려된다. 변형은, 예를 들어, 보존적 및 비-보존적 아미노산 치환을 포함한다. "보존적 치환"은 특정 단백질의 특별한

특성(예: 특이적 결합 활성과 같은 결합 활성)에 유의하게 영향을 미치지 않거나 변경하지 않는 아미노산 치환을 지칭한다. 일반적으로, 보존적 치환은 치환된 아미노산 잔기가 유사한 측쇄를 갖는 아미노산 잔기로 대체된 것이다. 보존적 치환은 다음 그룹 중의 하나에서 발견되는 치환을 포함한다: 그룹 1: 알라닌(Ala 또는 A), 글리신(Gly 또는 G), 세린(Ser 또는 S), 트레오닌(Thr 또는 T); 그룹 2: 아스파르트산(Asp 또는 D), 글루탐산(Glu 또는 Z); 그룹 3: 아스파라긴(Asn 또는 N), 글루타민(Gln 또는 Q); 그룹 4: 아르기닌(Arg 또는 R), 리신(Lys 또는 K), 히스티딘(His 또는 H); 그룹 5: 이소류신(Ile 또는 I), 류신(Leu 또는 L), 메티오닌(Met 또는 M), 발린(Val 또는 V); 및 그룹 6: 페닐알라닌(Phe 또는 F), 티로신(Tyr 또는 Y), 트립토판(Trp 또는 W). 추가로 또는 대안적으로, 아미노산은 유사한 기능, 화학적 구조, 또는 조성(예: 산성, 염기성, 지방족, 방향족 또는 황-함유)에 의해 보존적 치환 그룹으로 그룹화될 수 있다. 예를 들어, 지방족 그룹화는 치환 목적으로 Gly, Ala, Val, Leu 및 Ile를 포함할 수 있다. 다른 보존적 치환 그룹은 다음을 포함한다: 황-함유: Met 및 시스테인(Cys 또는 C); 산성: Asp, Glu, Asn 및 Gin; 작은 지방족, 비극성 또는 약간 극성 잔기: Ala, Ser, Thr, Pro 및 Gly; 극성, 음으로 하전된 잔기 및 그들의 아미드: Asp, Asn, Glu 및 Gln; 극성, 양으로 하전된 잔기: His, Arg 및 Lys; 큰 지방족, 비극성 잔기: Met, Leu, lie, Val 및 Cys; 및 큰 방향족 잔기: Phe, Tyr 및 Trp. 추가의 정보는 문헌[참조: Creighton (1984) Proteins, W.H. Freeman and Company]에서 발견될 수 있다.

[0146] 예를 들어, 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 결합 친화도 및/또는 다른 생물학적 특성을 개선시키는 것이 바람직할 수 있다. 아미노산 서열 변이체는, 예를 들어, 적절한 뉴클레오티드 변화를 이를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드에 도입함으로써 또는 펩티드 합성에 의해 제조될 수 있다. 이러한 변형은, 예를 들어, 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 아미노산 서열 내의 잔기의 결실 및/또는 잔기로의 삽입 및/또는 이의 치환을 포함한다. 결실, 삽입 및 치환의 임의의 조합을 최종 항체 또는 항원-결합 단편 변이체에 도달하도록 이루어질 수 있으며, 단 최종 작제물은 목적하는 특성을 갖는다(예를 들어, 본원에 기재된 바와 같이, 바이안테나리 루이스 항원에 대한 특이적인 결합을 유지하지만, 본원의 다른 곳에서 기재된 바와 같이 모노안테나리 Le^X 또는 Le^A 또는 H 항원에 대해 검출가능하게 결합되지 않거나, 또는 통계적으로 유의하게 감소된 결합을 나타낸다). 상기 아미노산 변화는 또한 글리코실화 부위의 수 또는 위치를 변화시키는 것과 같은 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 번역후 과정을 변경할 수 있다.

[0147] 대표적인 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 3차원 구조의 결정은, 그렇게 유도된 구조적 변이체가 현재 개시된 종의 공간-충전 특성을 보유하는지 여부를 결정할 목적으로 선택된 천연 또는 비-천연 아미노산을 갖는 하나 이상의 아미노산의 치환, 부가, 결실 또는 삽입이 사실상 모델링될 수 있도록 통상적인 방법을 통해 이루어질 수 있다. 예를 들어, 문헌[Donate et al., 1994 *Prot. Sci.* 3:2378; Bradley et al., *Science* 309: 1868-1871 (2005); Schueler-Furman et al., *Science* 310:638 (2005); Dietz et al., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 103:1244 (2006); Dodson et al., *Nature* 450:176 (2007); Qian et al., *Nature* 450:259 (2007); Raman *et al.* Science 327:1014-1018 (2010); Marcos et al., 2017 *Science* 355:201, 및 그 안에 인용된 참조문헌]을 참조한다. 본원에 제공된 바와 같은 항체 및 항원-결합 단편의 합리적인 설계를 위한 것과 같은, 이들 및 관련 구현예에 사용될 수 있는 컴퓨터 알고리즘의 일부 추가의 비제한적인 예는 VMD를 포함하며, 이는 디스플레이, 애니메이션 및 3-D 그래픽과 빌트-인 스크립팅(built-in scripting)을 사용하는 대형 생체분자 시스템을 분석하기 위한 분자 시각화 프로그램이다(참조: ks.uiuc.edu/Research/vmd/의 어바나-샴페인 소재 일리노이 대학교의 이론 및 전산 생물물리학 그룹의 웹사이트).

[0148] 많은 다른 컴퓨터 프로그램이 당업계에 공지되어 있으며, 당업자에게 이용가능하며, 이는 다음 에너지-최소화 형태의 공간-충전 모델(반 데르 바알스 반경)로부터 원자 치수를 결정할 수 있게 한다; 상이한 화학적 그룹에 대한 높은 친화도 영역을 결정하여 결합을 향상시키는 GRID, 수학적 정렬을 계산하는 몬테 카를로(Monte Carlo) 검색, 및 력장 계산을 평가하는 CHARMM(참조: Brooks et al. (1983) J. Comput. Chem. 4:187-217) 및 AMBER(참조: Weiner et al (1981) J. Comput. Chem. 106: 765), 및 분석(참조: Eisenfield et al. (1991) Am. J. Physiol. 261:C376-386; Lybrand (1991) J. Pharm. Belg. 46:49-54; Froimowitz (1990) Biotechniques 8:640-644; Burbam et al. (1990) Proteins 7:99-111; Pedersen (1985) Environ. Health Perspect. 61:185-190; and Kini et al. (1991) J. Biomol. Struct. Dyn. 9:475-488). 다양한 적절한 계산 컴퓨터 프로그램들이 또한, 예를 들어, 슈뢰딩거(Schrodinger)(독일 뮌헨)로부터 시판되고 있다.

[0149] 항체

[0150] 본 발명의 특정의 바람직한 구현예는

[0151] $Fuc_4(Gal\beta1\rightarrow3GlcNAc)_2$[I] 또는 [Fuc α1-2Gal β1-3(Fuc α1-4)GlcNAc]$_2$[II]를 포함하는 바이안테나리 Le^b/Le^b 항원,

[0152] $Fuc_4(Gal\beta1\rightarrow4GlcNAc)_2$[III] 또는 [Fuc α1-2Gal β1-4(Fuc α1-3) GlcNAc]$_2$[IV]를 포함하는 바이안테나리 Le^Y/Le^Y 항원,

[0153] $Fuc_2(Gal\beta1\rightarrow3GlcNAc)[Fuc_2(Gal\beta1\rightarrow4GlcNAc)]$[V], 또는 [Fuc α1-2Gal β1-3(Fuc α1-4)GlcNAc][Fuc α1-2Gal β1-4(Fuc α1-3)GlcNAc][VI]를 포함하는 바이안테나리 Le^B/Le^Y 항원, 및

[0154] $Fuc_2(Gal\beta1-4GlcNAc)[Fuc_2(Gal\beta1-3GlcNAc)]$[VII] 또는 [Fuc α1-2Gal β1-4(Fuc α1-3)GlcNAc][Fuc α1-2Gal β1-3(Fuc α1-4)GlcNAc][VIII]를 포함하는 바이안테나리 Le^Y/Le^B 항원에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편으로서,

[0155] 여기서, 상기 항체 또는 이의 항원-결합 단편이 Gal β1→4(Fuc α1→3)GlcNAc[IX]를 포함하는 모노안테나리 Le^X 항원, 또는 [Gal β1→4(Fuc α1→3)GlcNAc]$_2$[X]를 포함하는 바이안테나리 Le^X 항원, 또는 Gal β1-3(Fuc α1-4)GlcNAc[XI]를 포함하는 모노안테나리 Le^A 항원, 또는 Fuc α1-2Gal β1-4GlcNAc[XII]를 포함하는 모노안테나리 H 항원 타입 2, 또는 (Fuc α1-2Gal β1-4GlcNAc)$_2$[XIII]를 포함하는 바이안테나리 H 항원 타입 2 또는 Fuc α1-2Gal β1-3GlcNAc[XIV]를 포함하는 모노안테나리 H 항원 타입 1에 특이적으로 결합하지 않고,

[0156] 특정의 추가의 특히 바람직한 구현예에서, 본원에 기재된 바와 같이, 다른 바이안테나리 또는 모노안테나리 루이스 항원에 특이적으로 결합하지 않는 항체 또는 이의 항원 결합 단편에 관한 것이다.

[0157] 본원에 사용된 용어 "항체"(Ab)는 목적하는 생물학적 특성을 나타내는 한, 예를 들어, 현재 개시된 바이안테나리 루이스 항원에 특이적으로 결합하는 능력을 유지하는 한, 모노클로날 항체, 폴리클로날 항체, 다중특이적 항체(예: 이중특이적 또는 삼중특이적 항체), 인간화 항체, 키메라 항체, 이종접합 항체, 및 항체 단편을 포함한다. 용어 "면역글로불린"(Ig)은 본원에서 "항체"와 상호교환가능하게 사용된다.

[0158] 기본적인 항체 단위는 2개의 동일한 경(L)쇄 및 2개의 동일한 중(H)쇄로 구성된 헤테로테트라머 당단백질이다. 각각의 L 쇄는 적어도 하나 (및 전형적으로 하나)의 공유 디설파이드 결합에 의해 H 쇄에 연결되는 반면, 2개의 H 쇄는 H 쇄 이소형에 따라 하나 이상의 디설파이드 결합에 의해 서로 연결된다. 각각의 H 및 L 쇄는 또한 규칙적으로 이격된 쇄내 이황화 가교를 갖는다. 각 H 쇄는 N-말단에 가변 도메인(V_H), 이어서 각각의 α 및 γ 쇄에 대한 3개의 불변 도메인(C_H) 및 μ 및 ε 이소형에 대한 4개의 C_H 도메인을 갖는다. 각 L 쇄는 N-말단에 가변 도메인(VL)에 이어서 그의 다른 말단에 불변 도메인(C_L)을 갖는다. V_L은 V_H와 정렬되고, C_L은 중쇄의 제1 불변 도메인(C_H1)과 정렬된다. 특정 아미노산 잔기는 경쇄 및 중쇄 가변 도메인 사이에 계면을 형성하는 것으로 생각된다. V_H 및 V_L의 짝짓기는 함께 단일 항원-결합 부위를 형성한다.

[0159] 임의의 척추동물 종으로부터의 L 쇄는 그들의 불변 도메인(C_L)의 아미노산 서열에 기초하여, 카파(κ) 및 람다(λ)로 불리는 2개의 명확하게 구별되는 유형 중 하나에 할당될 수 있다. 이들의 중쇄의 불변 도메인(C_H)의 아미노산 서열에 따라, 면역글로블린은 상이한 부류 또는 이소형으로 할당될 수 있다. 각각 알파(α), 델타(δ), 엡실론(ε), 감마(γ) 및 뮤(μ)로 지정된 중쇄를 갖는 5개 부류의 면역글로불린: IgA, IgD, IgE, IgG 및 IgM이 있다. γ 및 α 부류는 CH 서열 및 기능의 비교적 최소의 차이에 기초하여 하위부류로 추가로 분할되고, 예를 들어, 인간은 다음과 같은 하위부류를 발현한다: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, 및 IgA2. 다수의 Ig 이소형을 인코딩하는 포유동물이 이소형 부류 전환을 겪을 수 있다는 것이 이해될 것이다.

[0160] IgM 항체는 J 쇄로 불리는 추가의 폴리펩티드와 함께 5개의 염기성 헤테로테트라머 단위들로 구성되고, 따라서 10개의 항원 결합 부위를 함유하는 반면, 분비된 IgA 항체는 중합하여 J 쇄과 함께 2 내지 5개의 기본적인 4-쇄 단위를 포함하는 다가 어셈블리를 형성할 수 있다. IgG의 경우, 4-쇄 단위는 일반적으로 약 150,000 달톤의 분자량을 갖는다. 상이한 부류의 항체의 구조 및 특성에 대해, 예를 들어, 문헌(Basic and Clinical Immunology, 8th edition, Daniel P. Stites, Abba I. Terr and Tristram G. Parslow (eds.), Appleton & Lange, Norwalk, Conn., 1994, page 71, and Chapter 6)을 참조한다.

[0161] 가변(V) 도메인은 항원 결합을 매개하고, 그의 특정 항원에 대한 특정 항체의 특이성을 정의한다. V_H 도메인을 인코딩하는 유전자 서열은 가변성(V), 다양성(D), 및 결합(J) 세그먼트의 다중 카피를 갖는다. V_L 도메인을 인코딩하는 유전자 서열은 V 및 J 세그먼트의 다중 카피를 함유한다. V_H 및 V_L 영역은 항체에서 다양한 항원 특이성을 개발하기 위해 유전자 재배열(즉, 체세포 재조합)을 겪는다. 용어 "가변성"은 V 도메인의 특정 세그먼트가 항체 중 서열에서 광범위하게 상이하다는 사실을 지칭한다.

[0162] 그러나, 가변성은 가변 도메인의 110-아미노산 범위에 걸쳐 균일하게 분포되지 않는다. 대신에, V 영역은 "초가변 영역"으로 불리는 극도의 가변성(extreme variability)의 짧은 영역에 의해 분리된 15 내지 30개의 아미노산의 프레임워크 영역(FR)이라 불리는 비교적 불변 스트레치(stretch)로 구성된다. 이들 초가변 영역은 친화도 성숙화 과정 동안 체세포 과돌연변이의 결과이고, 그들은 전형적으로 각각 9 내지 18개의 아미노산 길이이다. 그러나, 그들은 특정 에피토프에 따라 길이가 4 내지 28개 아미노산 범위인 것으로 밝혀졌다. 예를 들어, 길이가 최대 적어도 22개 또는 23개 아미노산인 CDR3 영역이 기재되었다. 예를 들어, 문헌(참조: Morea V, et al., J Mol Biol. 275(2):269-94 (1998) and Kabat, E.A., et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition. NIH Publication No. 91-3242 (1991))을 참조한다. 항체 아미노산 위치(예: CDR 서열)는 카바트(Kabat), 초티아(Chothia), IMGT, 및/또는 EU 넘버링 방식(numbering scheme)과 같은 공지된 넘버링 방식에 따라 결정될 수 있다.

[0163] 천연 중쇄 및 경쇄의 가변 도메인은 각각 3개의 초가변 영역(또한 상보성 결정 영역(CDR)으로도 공지되고, 이하 추가로 규정됨)에 의해 연결된, β-시트 형태를 주로 채택하는 4개의 프레임워크 영역(FR)을 포함하고, 이는 루프를 형성하여 β-시트 구조를 연결하고 일부 경우에 이의 일부를 형성한다. 각 쇄의 초가변 영역은 FR에 의해 매우 근접하게 함께 유지시키고, 일부 경우에는 다른 쇄의 초가변 영역과 함께 유지시켜 항체의 항원 결합 부위의 형성에 기여한다(참조: Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)). 불변 도메인은 항체 대 항원의 결합에 직접 관여하지 않지만. 항체 의존성 세포 세포독성(ADCC) 또는 불변 영역 도메인과 세포 표면 Fc 수용체(FcR)의 상호작용을 포함할 수 있는 다른 메커니즘에 항체가 참여하는 것과 같은 다양한 이펙터 기능을 나타낸다.

[0164] 본원에서 사용될 때 용어 "초가변 영역"은 항원 결합을 담당하는 항체의 아미노산 잔기를 지칭한다. 초가변 영역은 일반적으로 "상보성 결정 영역" 또는 "CDR"로부터의 아미노산 잔기(예: V_L에서 약 잔기 24-34(L1), 50-56(L2) 및 89-97(L3) 주위 및 V_H에서 약 28-36(H1), 50-65(H2) 및 95-102(H3) 주위에서 카바트 넘버링에 따라서, 문헌[참조: Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)]; 및/또는, 예를 들어, 문헌[Martin, "Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable Domains", In Antibody Engineering, R. Kontermann and S. Dubel, 2001, Springer-Verlag, Berlin, Germany, pages 422-438]에 기재된 것들과 같은, 카바트에 의해 규정된 CDR을 동정하기 위해 당업계에 공지된 방법론에 따라 결정될 수 있음) 및/또는 "초가변 루프"로부터의 아미노산 잔기들(예: V_L에서 잔기 26-32 (L1), 50-52 (L2) 및 91-96 (L3), 및 V_H에서 26-32 (H1), 53-55 (H2) 및 96-101 (H3); Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917(1987))를 포함한다.

[0165] "단리된 항체"는 이의 자연 환경의 성분으로부터 분리되고/되거나 회수된 것이다. 자연 환경의 오염 성분은 항체의 진단 또는 치료 용도를 방해하는 물질이고, 효소, 호르몬 및 다른 단백질성 및 비단백질성 용질을 포함할 수 있다. 바람직한 구현예에서, 항체는 (1) 브래드포드 방법(Bradfore method)에 의해 결정된 항체의 95중량% 초과, 가장 바람직하게는 99중량%% 이상으로; (2) 스피닝 컵 서열분석기의 사용으로 N-말단 또는 내부 아미노산 서열의 적어도 15개 잔기를 수득하기에 충분한 정도로; 또는 (3) 쿠마쉬 블루(Coomassie blue) 또는 은 염색(silver stain)을 사용하여 환원 또는 비환원 조건하에 SDS-PAGE에 의한 균질성까지 정제된다. 단리된 항체는 항체의 자연 환경의 적어도 하나의 성분이 존재하지 않을 것이기 때문에 재조합 세포 내에서 원위치에 항체를 포함한다. 그러나, 일반적으로 단리된 항체는 적어도 하나의 정제 단계에 의해 제조된다.

[0166] "온전한" 항체는 C_L 및 적어도 중쇄 불변 도메인, C_H 1, C_H 2 및 C_H 3뿐만 아니라 항원 결합 부위를 포함하는 것이다. 불변 도메인은 천연 서열 불변 도메인(예: 인간 천연 서열 불변 도메인) 또는 이의 아미노산 서열 변이체일 수 있다. 바람직하게는, 온전한 항체는 하나 이상의 이펙터 기능을 갖는다.

[0167] "항체 단편"은 온전한 항체의 일부, 바람직하게는 온전한 항체의 항원 결합 또는 가변 영역을 포함하거나 이들

로 이루어진 폴리펩티드이다. 항체 단편의 예로는 Fab, Fab', $F(ab')_2$, 및 Fv 단편; 디아바디; 선형 항체(참조: 미국 특허 제5,641,870호; Zapata et al, Protein Eng. 8(10): 1057-1062[1995]); 단일 쇄 항체 분자; 및 항체 단편으로부터 형성된 다중특이적 항체를 포함한다.

[0168] 항체의 파파인 분해는 "Fab" 단편이라 칭명되는 2개의 동일한 항원-결합 단편, 및 쉽게 결정화하는 능력을 반영하는 명칭인 잔류성 "Fc" 단편을 생성한다. Fab 단편은 H 쇄의 가변 영역 도메인(V_H) 및 하나의 중쇄의 제1 불변 도메인(C_H1)과 함께 전체 L 쇄로 구성된다. 각 Fab 단편은 항원 결합에 대해 1가이다, 즉 단일 항원-결합 부위를 갖는다. 항체의 펩신 처리는 2가 항원-결합 활성을 갖는 2개의 디설파이드 결합 Fab 단편에 거의 상응하고 여전히 항원을 교차 결합할 수 있는 거대한 단일 $F(ab')_2$ 단편을 생성한다. Fab 및 $F(ab')_2$는 모두 "항원-결합 단편"의 예이다. Fab' 단편은 항체 힌지 영역으로부터 하나 이상의 시스테인을 포함하는 C_H1 도메인의 카복시 말단에 추가적인 소수의 잔기를 가짐으로써 Fab 단편과 상이하다. Fab'-SH는 불변 도메인의 시스테인 잔기(들)가 유리 티올 그룹을 갖는 Fab'에 대한 본원에서의 명칭이다. $F(ab')_2$ 항체 단편은 본래 그들 사이에 힌지 시스테인을 갖는 Fab' 단편의 쌍으로서 생성되었다. 항체 단편의 다른 화학적 커플링도 또한 공지되어 있다.

[0169] "Fc" 단편은 디설파이드에 의해 함께 유지된 두 H 쇄의 카복시 말단 부분(즉, IgG의 CH2 및 CH3 도메인)을 포함한다. 항체의 이펙터 기능은 Fc 영역의 서열에 의해 결정된다. Fc 도메인은 FcR과 같은 세포 수용체에 의해 인식되고, 보체-활성화 단백질 C1q가 결합하는 항체의 부분이다. 본원에서 논의된 바와 같이, 변형(예: 아미노산 치환)은 Fc-함유 폴리펩티드(예: 본 발명의 항체)의 하나 이상의 작용기를 변형(예: 개선, 감소 또는 제거)하기 위해 Fc 도메인에서 이루어질 수 있다.

[0170] "Fv"는 완전한 항원-인식 및 항원-결합 부위를 함유하는 최소 항체 단편이다. 이 단편은 긴밀한 비공유 결합으로 하나의 중쇄 가변 영역 도메인과 하나의 경쇄 가변 영역 도메인의 이량체로 구성된다. 이들 2개의 도메인의 폴딩으로부터 항원 결합을 위한 아미노산 잔기에 기여하고, 항체에 항원 결합 특이성을 부여하는 6개의 초가변 루프(H 및 L 쇄로부터 각각 3개의 루프)를 방출한다. 그러나, 단일 가변 도메인(또는 항원에 특이적인 3개의 CDR만을 포함하는 Fv의 절반)조차도 전형적으로 전체 결합 부위보다 낮은 친화도에 있지만 항원을 인식하고 결합하는 능력을 갖는다.

[0171] "sFv" 또는 "scFv"로 약칭되기도 하는 "단일 쇄 Fv"는 단일 폴리펩티드 쇄에 연결된 V_H 및 V_L 항체 도메인을 포함하는 항체 단편이다. 바람직하게는, sFv 폴리펩티드는 sFv가 항원 결합을 위한 목적하는 구조를 형성할 수 있게 하는 V_H 및 V_L 도메인 사이에 폴리펩티드 링커를 추가로 포함한다. sFv의 검토를 위해, 문헌(Pluckthun in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenburg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994); Borrebaeck 1995, *infra*)을 참조한다.

[0172] 용어 "디아바디"는 V 도메인의 쇄내(intra-chain)가 아닌 쇄간 짝짓기가 달성되어 2가 단편, 즉 2개의 항원-결합 부위를 갖는 단편이 생성되도록 V_H 및 V_L 도메인 사이에 짧은 링커(약 5 내지 10개의 잔기)를 갖는 sFv 단편(선행 단락 참조)을 작제함으로써 제조된 작은 항체 단편을 지칭한다. 이중특이적 디아바디는, 2개의 항체의 V_H 및 V_L 도메인이 상이한 폴리펩티드 쇄에 존재하는 2개의 "교차" sFv 단편의 이종이량체이다. 디아바디는, 예를 들어, 문헌[참조: EP 404,097; WO 93/11161; 및 Hollinger *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993)]에 더욱 완전하게 기재되어 있다. 다른 항체 단편 및 이를 포함하는 분자는, 예를 들어, 선형 항체, 탠덤 scFv, scFv-Fc, 탠덤 scFv-Fc, scFv 이량체, scFv-지퍼, 디아바디-Fc, 디아바디-CH3, sc디아바디, sc디아바디-Fc, sc디아바디-CH3, 나노바디, TandAb, 미니바디, 미니항체, 트리아바디, 테트라바디, scFab, Fab-scFv, Fab-scFv-Fc, scFv-CH-CL-scFv, 및 F(ab')2-scFv2를 포함하며, 이들 모두는 또한 본원에서 고려된다.

[0173] 특정 구현예에서, 본 발명의 항체 또는 항원-결합 단편은 다중특이적 항체, 예를 들어, 이중특이적 또는 삼중특이적 항체이다. 이중특이적 항체에 대한 포맷은, 예를 들어, 문헌[참조: Spiess *et al.*, Mol. Immunol. *67*(2):95 (2015), 및 Brinkmann and Kontermann, *mAbs 9*(2):182-212 (2017)]에 개시되어 있고, 이 이중특이적 포맷 및 이의 제조 방법은 본원에 참조로 인용되고, 예를 들어, 이중특이적 T 세포 결합기(BiTE), DART, 노브-인투-홀(Knob-Into-Holes)(KIH) 어셈블리, scFv-CH3-KIH 어셈블리, KIH 공통 경쇄 항체, TandAb, 삼중 바디, TriBi 미니바디, Fab-scFv, scFv-CH-CL-scFv, F(ab')2-scFv2, 4가 HCab, 인트라바디, 크로스맵스(CrossMab), 이중 작용 Fab(DAF)(투-인-원 또는 포-인-원), DutaMab, DT-IgG, 전하 쌍, Fab-암 교환, SEED바디, 트리오맵,

LUZ-Y 어셈블리, Fcab, κλ-바디, 직교 Fab, DVD-IgG, IgG(H)-scFv, scFv-(H)IgG, IgG(L)-scFv, scFv-(L)IgG, IgG(L,H)-Fv, IgG(H)-V, V(H)-IgG, IgG(L)-V, V(L)-IgG, KIH IgG-scFab, 2scFv-IgG, IgG-2scFv, scFv4-Ig, 자이바디, 및 DVI-IgG(포-인-원)를 포함한다.

[0174] 본원에 사용된 용어 "폴리클로날 항체"는 특정 항원의 하나 이상의 에피토프를 인식하는 항원-특이적 항체의 집단으로부터 수득된 항체를 의미한다. "항원" 또는 "면역원"은 적응성 면역 시스템에 의해 인식되는 펩티드, 지질, 다당류 또는 폴리뉴클레오티드를 지칭한다. 항원은 자가 또는 비-자가 분자일 수 있다. 항원의 예는 박테리아 세포 벽 성분, 꽃가루 및 rh 인자를 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 특이적 항체에 의해 특이적으로 인식되는 항원의 영역은 "에피토프" 또는 "항원성 결정인자"이다. 단일 항원은 다수의 에피토프를 가질 수 있다.

[0175] 본원에 사용된 용어 "모노클로날 항체"(mAb)는 실질적으로 균질한 항체의 집단으로부터 수득된 항체를 지칭하며, 즉, 집단을 포함하는 개별 항체는 소량으로 존재할 수 있는 가능한 자연 발생 돌연변이를 제외하고는 동일하다. 모노클로날 항체는 단일 항원성 부위에 대해 지시된 매우 특이적이다. 또한, 상이한 에피토프에 대해 지시된 상이한 항체를 포함하는 폴리클로날 항체 제제와 대조적으로, 각각의 모노클로날 항체는 항원의 단일 에피토프에 대해 지시된다. 그들의 특이성 이외에, 모노클로날 항체는 그들이 다른 항체에 의해 오염되지 않게 합성될 수 있다는 점에서 유리하다. 변형제 "모노클로날"은 임의의 특정 방법에 의한 항체의 생산을 요구하는 것으로 해석되어서는 안된다. 예를 들어, 본 발명에 유용한 모노클로날 항체는 먼저 문헌[참조: Kohler *et al.*, Nature, 256:495 (1975)]에 기재된 하이브리도마 방법론에 의해 제조될 수 있거나, 박테리아, 진핵 동물 또는 식물 세포에서 재조합 DNA 방법을 사용하여 제조될 수 있다(참조: 예를 들어, 미국 특허 제4,816,567호). "모노클로날 항체"는 또한, 예를 들어, 문헌[참조: Clackson *et al.*, *Nature*, 352:624-628 (1991) and Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991)]에 기재된 기술을 사용하여 파지 항체 라이브러리로부터 단리될 수 있다.

[0176] 본원의 모노클로날 항체는 중쇄 및/또는 경쇄의 일부가 특정 종으로부터 유도된 또는 특정 항체 부류 또는 하위부류에 속하는 항체의 상응하는 서열과 동일하거나 상동성인 반면, 쇄(들)의 나머지가 다른 종으로부터 유도된 또는 다른 항체 부류 또는 하위부류에 속하는 항체의 상응하는 서열과 동일하거나 상동성인 "키메라 항체"뿐만 아니라, 그들이 목적하는 생물학적 활성을 나타내는 한, 이러한 항체의 단편을 포함한다(참조: 미국 특허 제4,816,567호; 제5,530,101호 및 제7,498,415호; 및 Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6851-6855(1984)). 예를 들어, 키메라 항체는 인간 및 비-인간 잔기를 포함할 수 있다. 또한, 키메라 항체는 수용자 항체 또는 공여자 항체에서 발견되지 않는 잔기를 포함할 수 있다. 이러한 변형은 항체 성능을 더욱 개선시키기 위해 이루어진다. 추가의 상세함을 위해, 문헌[Jones et al., Nature 321:522-525 (1986); Riechmann et al., Nature 332:323-329 (1988); and Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596 (1992)]을 참조한다. 키메라 항체는 또한 영장류화 및 인간화 항체를 포함한다.

[0177] "인간화 항체"는 일반적으로 비-인간인 공급원으로부터 도입된 하나 이상의 아미노산 잔기를 갖는 인간 항체인 것으로 간주된다. 이들 비-인간 아미노산 잔기는 전형적으로 가변 도메인으로부터 취해진다. 인간화는 인간 항체의 상응하는 서열을 비인간 가변 서열로 치환함으로써 전통적으로 동절기 및 동료의 방법에 따라 수행된다(참조: Jones *et al.*, *Nature*, 321:522-525 (1986); Reichmann *et al.*, *Nature*, 332:323-327 (1988); Verhoeyen *et al.*, *Science*, 239:1534-1536 (1988)). 따라서, 이러한 "인간화" 항체는 키메라 항체이고(미국 특허 제4,816,567호; 제5,530,101호 및 제7,498,415호), 여기서 실질적으로 온전한 인간 가변 도메인보다 적게 비-인간 종으로부터의 상응하는 서열에 의해 치환되었다. 일부 예에서, "인간화" 항체는 비-인간 세포 또는 동물에 의해 생성되고 인간 서열, 예를 들어, H_c 도메인을 포함하는 것이다.

[0178] "인간 항체"는 인간에 의해 자연적으로 생성된 항체에 존재하는 서열만을 함유하는 항체이다. 그러나, 본원에 사용된 바와 같이, 인간 항체는 본원에 기재된 변형 및 변이체 서열을 포함하는 자연 발생 인간 항체에서 발견되지 않는 잔기 또는 변형을 포함할 수 있다. 이들은 전형적으로 항체 성능을 더욱 개선시키거나 향상시키기 위해 제조된다. 일부 예에서, 인간 항체는 유전자 도입 동물에 의해 생성된다. 예를 들어, 미국 특허 제5,770,429호; 제6,596,541호 및 제7,049,426호를 참조한다.

[0179] 항체 "이펙터 기능"은 항체의 Fc 영역(천연 서열 Fc 영역 또는 아미노산 서열 변이체 Fc 영역)에 기인하는 생물학적 활성을 지칭하며, 항체 이소형에 따라 변한다. 항체 이펙터 기능의 예는 다음을 포함한다: C1q 결합 및 보체 의존성 세포독성; Fc 수용체 결합; 항체-의존성 세포-매개된 세포독성(ADCC); 식작용; 세포 표면 수용체(예: B 세포 수용체)의 하향 조절; 및 B 세포 활성화. Fc 작용성을 변형(예: 개선, 감소 또는 제거)하기 위한 아미노산 변형(예: 치환)은, 예를 들어, T250Q/M428L, M252Y/S254T/T256E, H433K/N434F, M428L/N434S,

E233P/L234V/L235A/G236 + A327g/A330S/P331S, E333A, S239D/A330L/I332E, P257I/Q311, K326W/E333S, S239D/I332E/G236A, N297Q, K322A, S228P, L235E + E318A/K320/K322A, L234A/L235A, 및 L234A/L235A/P329G 돌연변이를 포함하며, 이 돌연변이는 문헌[참조: InvivoGen(2011)]에 의해 공표된 "조작된 Fc 영역"에서 요약되고 주석이 달리고, www. invivogen.com/PDF/review/review-Engineered-Fc-Regions-invivogen.pdf?utm_source=review&utm_medium=pdf&utm_ campaign=review&utm_content=Engineered-Fc-Regions에서 온라인으로 이용가능하고 본원에 참고로 인용된다.

[0180] 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 "기능적 단편 또는 유사체"란 어구는 전장 항체 또는 이의 항원-결합 단편과 공동으로 정성적인 생물학적 활성을 갖는 화합물이다.

[0181] 지정된 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 "생물학적 특성"을 갖는 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 다른 항체 또는 항체-유도 결합 단편으로부터 이를 구별하는 그 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 생물학적 특성 중 하나 이상을 포함하는 것이다. 예를 들어, 특정 구현예에서, 지정된 항체의 생물학적 특성을 갖는 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 지정된 항체에 의해 결합된 것과 동일한 에피토프에 결합할 것이고/이거나 지정된 항체와 동일한 이펙터 기능을 가질 것이다.

[0182] 본원에서 사용된 바와 같이, 항체는 항원과 검출가능한 수준에서, 바람직하게는 약 10^4M^{-1} 이상, 또는 약 10^5M^{-1} 이상, 약 10^6M^{-1} 이상, 약 10^7M^{-1} 이상, 또는 10^8M^{-1} 이상의 친화도 상수, K_a로 반응하는 경우 항원에 "면역특이적", "특이적"이거나 이에 "특이적으로 결합하는" 것으로 언급된다. 그의 동족 항원에 대한 항체의 친화도는 또한 일반적으로 해리 상수 K_D로서 표현되고, 특정 구현예에서 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 $10^{-4}M$ 이하, 약 $10^{-5}M$ 이하, 약 $10^{-6}M$ 이하, $10^{-7}M$ 이하, 또는 $10^{-8}M$ 이하의 K_D로 결합한다면 본 발명의 루이스 항원에 특이적으로 결합한다. 항체 및 항원-결합 단편의 친화도는 통상적인 기술, 예를 들어, 문헌[Scatchard *et al.* (*Ann. N.Y. Acad. Sci. USA* 51:660 (1949))]에 기재된 것들을 사용하거나, 표면 플라스몬 공명(SPR)(예를 들어, Hearty et al, 2012 Meths. Mol. Biol. 907:411)에 의해, 등온 적정 열량 측정법(ITC)(예를 들어, Dam et al, 2008 J.Biol. Chem. 283:31366)에 의해, 효소-결합 면역흡착 검정(ELISA)(예를 들어, Bobrovnik, 2003 J. Blochem. Blophys. Meths. 75(3): 213)에 의해, 또는 당업자에게 친숙한 다른 방법론에 의해 쉽게 결정될 수 있다.

[0183] 항체의 이의 항원, 세포 또는 조직에 대한 결합 특성은 일반적으로, 예를 들어, 면역형광-기반 검정, 예를 들어, 면역조직화학(IHC) 및/또는 형광-활성화 세포 분류(FACS)를 포함하는 면역검출 방법을 사용하여 결정되고 평가될 수 있다. 항원에 대한 항체의 결합을 결정하는 다른 방법은, 예를 들어, 효소-결합 면역흡착 검정(ELISA), 등온 적정 열량 측정법(ITC), 및 표면 플라스몬 공명(SPR) 기술을 포함한다.

[0184] 본원에 사용된 바와 같은 "담체"는 사용되는 투여량 및 농도에서 이에 노출되는 세포 또는 포유동물에 무독성인 약제학적으로 허용되는 담체, 부형제, 또는 안정화제를 포함한다. 종종 생리학적으로 허용되는 담체는 pH 완충 수용액이다. 생리학적으로 허용되는 담체의 예로는 완충액, 예를 들어, 포스페이트, 시트레이트 및 다른 유기산; 아스코르브산을 포함하는 산화방지제; 저분자량(약 10개 미만 잔기) 폴리펩티드; 단백질, 예를 들어, 혈청 알부민, 젤라틴 또는 면역글로불린; 친수성 중합체, 예를 들어, 폴리비닐피롤리돈; 아미노산, 예를 들어, 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 아르기닌 또는 리신; 단당류, 이당류, 및 글루코스, 만노스 또는 덱스트린을 포함하는 다른 탄수화물; 킬레이트제, 예를 들어, EDTA; 당 알콜, 예를 들어, 만니톨 또는 소르비톨; 염 형성 반대이온, 예를 들어, 나트륨; 및/또는 비이온성 계면활성제, 예를 들어, 폴리소르베이트 20(TWEEN™) 폴리에틸렌 글리콜(PEG) 및 폴록사머(PLURONICS™) 등을 포함한다.

[0185] 폴리뉴클레오티드, 벡터 및 숙주 세포

[0186] 추가의 측면에서, 본 발명은 특정 구현예에서 본원에 기재된 바와 같은 항체 및 이의 항원-결합 단편을 인코딩하는 단리된 폴리뉴클레오티드를 제공하며, 또한 이를 포함하는 벡터를 제공한다. 폴리뉴클레오티드를 포함하는 핵산은 DNA 또는 RNA를 포함할 수 있고, 전체적으로 또는 부분적으로 합성적일 수 있다.

[0187] 본원에서 언급되는 용어 "폴리뉴클레오티드"는 단일 가닥 또는 이중 가닥 핵산 중합체를 의미하며, 구체적으로는 DNA의 단일 가닥 및 이중 가닥 형태를 포함한다. 폴리뉴클레오티드는, 예를 들어, 폴리머라제 연쇄 반응(PCR) 또는 시험관내 번역에 의해 생성될 수 있고, 단편은 임의의 결찰, 절단, 엔도뉴클레아제 작용, 또는 엑소뉴클레아제 작용에 의해 생성된다. 특정 구현예에서, 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 PCR에 의해 생성된다. 폴

리뉴클레오티드는 자연 발생 뉴클레오티드(예: 데옥시리보뉴클레오티드 및 리보뉴클레오티드), 자연 발생 뉴클레오티드의 유사체(예: 자연 발생 뉴클레오티드의 α-거울상이성체 형태), 또는 이들의 조합인 단량체로 구성될 수 있다. 추가의 구현예에서, 폴리뉴클레오티드를 포함하는 뉴클레오티드는 리보뉴클레오티드 또는 데옥시리보뉴클레오티드 또는 두 유형의 뉴클레오티드의 변형된 형태일 수 있다.

[0188] 용어 "자연 발생 뉴클레오티드"는 데옥시리보뉴클레오티드 및 리보뉴클레오티드를 포함한다. 용어 "변형된 뉴클레오티드"는 변형된 또는 치환된 당 그룹 등을 갖는(예: 브로모우리딘, 아라비노사이드, 또는 2'3'-디데옥시리보스로 변형된) 뉴클레오티드를 포함한다. 용어 "올리고뉴클레오티드 결합"은 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트, 포스포로셀레노에이트, 포스포로디셀레노에이트, 포스포로아닐로티오에이트, 포스포라닐라데이트, 포스포로아미데이트 등과 같은 올리고뉴클레오티드 결합을 포함한다. 예를 들어, 개시내용이 임의의 목적을 위해 참고로 인용된 문헌(참조: LaPlanche *et al.*, 1986, *Nucl. Acids Res.*, *14*:9081; Stec *et al.*, 1984, *J. Am. Chem. Soc.*, *106*:6077; Stein *et al.*, 1988, *Nucl. Acids Res.*, 16:3209; Zon *et al.*, 1991, *Anti-Cancer Drug Design*, *6*:539; Zon *et al.*, 1991, OLIGONUCLEOTIDES AND ANALOGUES: A PRACTICAL APPROACH, pp. 87-108 (F. Eckstein, Ed.), Oxford University Press, Oxford England; Stec et al., 미국 트특허 제5,151,510호; Uhlmann and Peyman, 1990, *Chemical Reviews*, *90*:543)을 참조한다. 올리고뉴클레오티드는 올리고뉴클레오티드의 검출 또는 이의 하이브리드화를 가능하게 하는 검출가능한 표지를 포함할 수 있다.

[0189] 본원에 사용된 용어 "단리된 폴리뉴클레오티드"는 게놈, cDNA, 또는 합성 기원의 폴리뉴클레오티드 또는 이들의 일부 조합을 의미하며, 단리된 폴리뉴클레오티드는 이의 기원에 의해 (1) 단리된 폴리뉴클레오티드가 자연에서 발견되는 폴리뉴클레오티드의 전부 또는 일부와 연관되지 않고, (2) 자연에서 연결되지 않은 폴리뉴클레오티드에 연결되거나, (3) 더 큰 서열의 일부로서 자연에서 발생하지 않는다.

[0190] 본원에 제시된 뉴클레오티드 서열에 대한 언급은 특정 서열을 갖는 DNA 분자를 포함하며, 문맥상 달리 요구되지 않는 한, U가 T로 치환된 특정 서열을 갖는 RNA 분자를 포함한다.

[0191] 용어 "작동가능하게 연결된"은 용어가 적용되는 성분이 적절한 조건하에서 그들 고유의 기능을 수행할 수 있게 하는 관계에 있음을 의미한다. 예를 들어, 단백질 코딩 서열에 "작동가능하게 연결된" 전사 조절 서열이 이에 결찰되어 단백질 코딩 서열의 발현이 조절 서열의 전사 활성과 양립할 수 있는 조건하에서 달성되도록 한다.

[0192] 본원에 사용된 용어 "조절 서열"은 그들이 결찰되거나 작동가능하게 연결된 코딩 서열의 발현, 처리 또는 세포내 국소화에 영향을 미칠 수 있는 폴리뉴클레오티드 서열을 지칭한다. 이러한 조절 서열의 성질은 숙주 유기체에 따라 달라질 수 있다. 특정 구현예에서, 원핵생물에 대한 전사 조절 서열은 프로모터, 리보솜 결합 부위 및 전사 종결 서열을 포함할 수 있다. 다른 특정 구현예에서, 진핵생물에 대한 전사 조절 서열은 전사 인자, 전사 인핸서 서열, 전사 종결 서열 및 폴리아데닐화 서열에 대한 하나 또는 복수의 인식 부위를 포함하는 프로모터를 포함할 수 있다. 특정 구현예에서, "조절 서열"은 리더 서열 및/또는 융합 파트너 서열을 포함할 수 있다. 발현 조절 서열은 적절한 전사 개시, 종결, 프로모터 및 인핸서 서열; 스플라이싱 및 폴리아데닐화 신호와 같은 효율적인 RNA 처리 신호; 세포질 mRNA를 안정화시키는 서열; 번역 효율을 향상시키는 서열(즉, 코작(Kozak) 컨센서스 서열); 단백질 안정성을 향상시키는 서열; 및 단백질 분비를 향상시키는 가능한 서열을 포함할 수 있다. 발현 조절 서열은 그들이 관심있는 유전자 및 트랜스로 또는 관심있는 유전자를 조절하기 위한 거리에서 작용하는 발현 조절 서열과 인접하는 경우 작동가능하게 연결될 수 있다.

[0193] 발현은, 인트론이 존재하는 경우, 전사, 번역 및 RNA 스플라이싱과 같은 과정을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0194] 당업자에 의해 이해되는 바와 같이, 폴리뉴클레오티드는 게놈 서열, 엑스트라-게놈 및 플라스미드-인코딩 서열 및 발현되는 더 작은 조작된 유전자 단편을 포함할 수 있거나, 단백질, 폴리펩티드, 펩티드 등을 발현하도록 적응될 수 있다. 이러한 세그먼트는 자연적으로 단리되거나, 또는 당업자에 의해 합성적으로 변형될 수 있다.

[0195] 당업자에 의해 인식되는 바와 같이, 폴리뉴클레오티드는 단일-가닥(코딩 또는 안티센스) 또는 이중-가닥일 수 있고, DNA(게놈, cDNA 또는 합성) 또는 RNA 분자일 수 있다. RNA 분자는 인트론을 함유하고, 1 대 1(one-to-one) 방식으로 DNA 분자에 상응하는 HnRNA 분자, 및 인트론을 함유하지 않는 mRNA 분자를 포함할 수 있다. 추가의 코딩 또는 비-코딩 서열은 본 발명에 따르는 폴리뉴클레오티드 내에 존재할 수 있지만, 반드시 그럴 필요는 없으며, 폴리뉴클레오티드는 다른 분자 및/또는 지지체 물질에 연결될 수 있지만, 반드시 그럴 필요는 없다. 폴리뉴클레오티드는 천연 서열을 포함할 수 있거나, 이러한 서열의 변이체 또는 유도체를 인코딩하는 서열을 포

함할 수 있다.

[0196] 따라서, 이들 및 관련된 구현예에 따라, 본 발명은 또한 본원에 기재된 바와 같은 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다.

[0197] 다른 관련 구현예에서, 폴리뉴클레오티드 변이체는 본원에 기재된 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열에 대해 실질적인 동일성을 가질 수 있다. 예를 들어, 폴리뉴클레오티드는 본원에 기재된 방법(예: 이하 기재되는 바와 같이, 표준 파라미터를 사용하는 BLAST 분석)을 사용하여 본원에 기재된 항원 또는 이의 항원 결합 단편을 인코딩하는 서열과 같은 기준 폴리뉴클레오티드 서열과 비교하여 적어도 70%의 서열 동일성, 바람직하게는 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 또는 그 이상의 서열 동일성을 포함하는 폴리뉴클레오티드일 수 있다. 당업자는 이들 값이 코돈 축퇴성, 아미노산 유사성, 판독 프레임 위치 등을 고려함으로써 2개의 뉴클레오티드 서열에 의해 인코딩되는 단백질의 상응하는 동일성을 결정하도록 적절하게 조절될 수 있다는 것을 인식할 것이다.

[0198] 전형적으로, 폴리뉴클레오티드 변이체는 하나 이상의 치환, 부가, 결실 및/또는 삽입을 함유하여 바람직하게는 변이체 폴리뉴클레오티드에 의해 인코딩되는 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 결합 친화도가 본원에 구체적으로 제시된 폴리뉴클레오티드 서열에 의해 인코딩되는 항체 또는 이의 항원 결합 단편에 비해(예: 서열번호 10에 제시되는 아미노산 서열을 갖는 면역글로불린 중쇄 및 서열번호 11에 제시되는 아미노산 서열을 갖는 면역글로불린 경쇄를 포함하는, 본원에서 hBBC.10.1로 지칭되는 항체에 비해) 실질적으로 감소되지 않도록 할 것이다.

[0199] 특정의 다른 관련 구현예에서, 폴리뉴클레오티드 단편은 본원에 기재된 바와 같은 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 인코딩하는 서열과 동일하거나 이에 상보적인 서열의 다양한 길이의 연속 스트레치를 포함하거나 본질적으로 이들로 구성될 수 있다. 예를 들어, 본원에 개시된 항체 또는 이의 항원 결합 단편 또는 이의 변이체를 인코딩하는 서열의 적어도 약 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 200, 300, 400, 500 또는 1000개 또는 그 이상의 연속 뉴클레오티드뿐만 아니라 그 사이에 존재하는 모든 중간체 길이를 포함하거나 이들로 본질적으로 이루어지는 폴리뉴클레오티드가 제공된다. 이러한 맥락에서, "중간체 길이"는 200 내지 500; 500 내지 1,000까지의 모든 정수 등을 포함하여 인용된 값 사이의 임의의 길이, 예를 들어, 50, 51, 52, 53 등; 100, 101, 102, 103 등; 150, 151, 152, 153 등을 의미한다는 것이 쉽게 이해될 것이다. 본원에 기재된 바와 같은 폴리뉴클레오티드 서열은 천연 서열에서 발견되지 않은 추가의 뉴클레오티드에 의해 한쪽 또는 양쪽 말단에서 연장될 수 있다. 이러한 추가 서열은 본원에 기재된 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드의 어느 한 말단에서 또는 본원에 기재된 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드의 양 말단에서 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20개의 뉴클레오티드로 구성될 수 있다.

[0200] 또 다른 구현예에서, 본원에 제공된 항체 또는 이의 항원-결합 단편, 또는 이의 변이체, 또는 이의 단편, 또는 이의 상보적 서열을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열로 중간 내지 높은 엄격성 조건하에서 하이브리드화할 수 있는 폴리뉴클레오티드가 제공된다. 하이브리드화 기술은 분자 생물학 분야에 익히 공지되어 있다. 예시 목적으로, 다른 폴리뉴클레오티드로 본원에 제공된 폴리뉴클레오티드의 하이브리드화를 시험하기 위한 적절한 적당히 엄격한 조건은 5 X SSC, 0.5% SDS, 1.0 mM EDTA(pH 8.0)의 용액 중에서 예비세척하는 단계; 50℃ 내지 60℃, 5 X SSC 에서 밤새 하이브리드화하는 단계; 이어서, 65℃에서 각각 0.1% SDS를 함유하는 2X, 0.5X 및 0.2X SSC로 20분 동안 2회 세척하는 단계를 포함한다. 당업자는 하이브리드화의 엄격성이, 예를 들어, 하이브리드화 용액의 염 함량 및/또는 하이브리드화가 수행되는 온도를 변화시킴으로써 용이하게 조작될 수 있음을 이해할 것이다. 예를 들어, 다른 구현예에서, 적합한 고도로 엄격한 하이브리드화 조건은 하이브리드화의 온도가, 예를 들어, 60℃ 내지 65℃ 또는 65℃ 내지 70℃로 증가되는 것을 제외하고는 상기 기재된 것들을 포함한다.

[0201] 특정 구현예에서, 상기 기재된 폴리뉴클레오티드, 예를 들어, 폴리뉴클레오티드 변이체, 단편 및 하이브리드화 서열은 본원에 기재된 바와 같은 바이안테나리 루이스 항원에 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 인코딩한다. 다른 구현예에서, 이러한 폴리뉴클레오티드는 현재 개시된 루이스 항원에 적어도 약 50%, 적어도 70%, 특정 구현예에서 적어도 약 90% 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 또는 이의 변이체뿐만 아니라 본원에 구체적으로 제시된 항체 또는 이의 항원결합 단편(예: 항체 hBBC.10.1)을 인코딩한다. 추가의 구현예에서, 이러한 폴리뉴클레오티드는 본원에 구체적으로 제시된 항체 또는 이의 항원-결합 단편뿐만 아니라, 예를 들어, 적어도 약 105%, 106%, 107%, 108%, 109%, 또는 110%를 정량적으로 결합하는 본원에 구체적으로 제시된 항체 또는

이의 항원-결합 단편보다 더 큰 친화도로 현재 개시된 루이스 항원에 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 또는 이의 변이체를 인코딩한다.

[0202] 본원의 다른 곳에 기재된 바와 같이, 현재 개시된 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 3차원 구조의 결정은, 선택된 천연 또는 비-천연 아미노산에 의한 하나 이상의 아미노산의 치환, 부가, 결실 또는 삽입이 그렇게 유도된 구조적 변이체가 현재 개시된 종의 공간-충전 특성을 보유하는지의 여부를 결정할 목적으로 실질적으로 모델링될 수 있도록 통상적인 방법론을 통해 이루어질 수 있다. 예를 들어, 친화도가 유지되거나 더 나은 친화도가 달성되도록 항체 또는 이의 항원-결합 단편 내에서 적절한 아미노산 치환 (또는 아미노산 서열을 인코딩하는 적절한 폴리뉴클레오티드)을 결정하기 위한 다양한 컴퓨터 프로그램이 당업자에게 공지되어 있다. 예를 들어, 문헌[Donate et al., 1994 *Prot. Sci.* 3:2378; Bradley et al., *Science* 309: 1868-1871 (2005); Schueler-Furman et al., *Science* 310:638 (2005); Dietz et al., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 103:1244 (2006); Dodson et al., *Nature* 450:176 (2007); Qian et al., *Nature* 450:259 (2007); Raman *et al.* Science 327:1014-1018 (2010); Marcos et al., 2017 *Science* 355:201, 및 그 안에 인용된 참고문헌]을 참조한다.

[0203] 코딩 서열 자체의 길이에 관계없이, 본원에 기재된 폴리뉴클레오티드 또는 이의 단편은 프로모터, 폴리아데닐화 신호, 추가의 제한 효소 부위, 다중 클로닝 부위, 다른 코딩 세그먼트 등과 같은 다른 DNA 서열과 조합될 수 있어 이들의 전체 길이는 상당히 가변적일 수 있다. 따라서, 거의 모든 길이의 핵산 단편이 사용될 수 있으며, 전체 길이는 바람직하게는 의도된 재조합 DNA 프로토콜에서의 제조 및 사용 용이성에 의해 제한된다는 것이 예상된다. 예를 들어, 총 길이가 약 10,000, 약 5000, 약 3000, 약 2,000, 약 1,000, 약 500, 약 200, 약 100, 약 50개 염기 쌍 길이 등(모든 중간체 길이를 포함함)인 예시적인 폴리뉴클레오티드 세그먼트가 유용한 것으로 고려된다.

[0204] 폴리뉴클레오티드 서열을 비교할 때, 두 서열 내의 뉴클레오티드의 서열이 이하 기재된 바와 같이 최대 상응성을 위해 정렬될 때 동일한 경우, 두 서열은 "동일한" 것으로 언급된다. 두 서열 사이의 비교는 전형적으로 서열 유사성의 국소 영역을 식별하고 비교하기 위한 비교 윈도우에 걸쳐 서열을 비교함으로써 수행된다. 본원에 사용된 바와 같은 "비교 윈도우"는 적어도 약 20개의 연속 위치, 일반적으로 30 내지 약 75개, 40 내지 약 50개의 세그먼트를 지칭하며, 여기서 서열은 2개의 서열이 최적으로 정렬된 후 동일한 수의 연속 위치의 기준 서열과 비교될 수 있다.

[0205] 비교용 서열의 최적 정렬은 디폴트 파라미터를 사용하여 생물정보학 소프트웨어(DNASTAR, Inc, Madison, Wl)의 DNASTAR® Lasergene suite의 Meglign 프로그램을 사용하여 수행될 수 있다. 이 프로그램은 다음 참고문헌에 기재된 여러 정렬 방식을 구현한다: Dayhoff, M.O. (1978) A model of evolutionary change in proteins - Matrices for detecting distant relationships. In Dayhoff, M.O. (ed.) *Atlas of Protein Sequence and Structure*, National Biomedical Research Foundation, Washington DC Vol. 5, Suppl. 3, pp. 345-358; Hein J., *Unified Approach to Alignment and Phylogenes*, pp. 626-645 (1990); *Methods in Enzymology* vol. 183, Academic Press, Inc., San Diego, CA; Higgins, D.G. and Sharp, P.M., *CABIOS 5*:151-153 (1989); Myers, E.W. and Muller W., *CABIOS 4*:11-17 (1988); Robinson, E.D., *Comb. Theor 11*:105 (1971); Santou, N. Nes, M., *Mol. Biol. Evol. 4*:406-425 (1987); Sneath, P.H.A. and Sokal, R.R., *Numerical Taxonomy - the Principles and Practice of Numerical Taxonomy*, Freeman Press, San Francisco, CA (1973); Wilbur, W.J. and Lipman, D.J., *Proc. Natl. Acad., Sci. USA 80*:726-730 (1983).

[0206] 대안적으로, 비교용 서열의 최적 정렬은 문헌[참조: Smith and Waterman, *Add. APL. Math* 2:482 (1981)]의 국소 동일성 알고리즘, 문헌[참조: Needleman and Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:443 (1970)]의 동일성 정렬 알고리즘, 문헌[참조: Pearson and Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 2444 (1988)]의 유사성 방법의 검색, 이들 알고리즘의 컴퓨터화 구현(위스콘신 유전자 소프트웨어 패키지의 GAP, BESTFIT, BLAST, FASTA, 및 TFASTA, Genetics Computer Group (GCG), 575 Science Dr., Madison, WI), 또는 검사에 의해 수행될 수 있다.

[0207] 서열 동일성 및 서열 유사성 퍼센트를 결정하는데 적합한 알고리즘의 하나의 바람직한 예는 BLAST 및 BLAST 2.0 알고리즘이고, 이는 각각 문헌[참조: Altschul *et al.*, *Nucl. Acids Res.* 25:3389-3402 (1977)], 및 문헌[참조: Altschul *et al.*, *J. Mol. Biol.* 215:403-410 (1990)]에 기재되어 있다. BLAST 및 BLAST 2.0은, 예를 들어, 본원에 기재된 파라미터와 함께 사용되어 2개 이상의 폴리뉴클레오티드 사이의 서열 동일성 퍼센트를 결정할 수 있다. BLAST 분석을 수행하기 위한 소프트웨어는 국립 생명공학 정보 센터를 통해 공개적으로 이용가능하다. 하나의 예시적인 예에서, 누적 점수는 뉴클레오티드 서열에 대해 파라미터 M(한 쌍의 매칭 잔기에 대한 보상 점수; 항상 > 0) 및 N(부정합 잔기에 대한 페널티 점수; 항상 < 0)를 사용하여 계산될 수 있다. 각각

의 방향에서 단어 히트의 연장은 누적 정렬 스코어가 최대 달성된 값으로부터 양 X에 의해 떨어질 때; 누적 스코어가 하나 이상의 네거티브 스코어링 잔기 정렬의 축적에 기인하여 0 또는 그 이하로 될 때; 또는 어느 한 서열의 말단에 도달될 때 중지된다. BLAST 알고리즘 파라미터 W, T 및 X는 정렬의 감도 및 속도를 결정한다. BLASTN 프로그램(뉴클레오티드 서열의 경우)은 디폴트로서 단어 길이(W) 11, 기대값(E) 10, 및 BLOSUM62 스코어링 매트릭스(참조: Henikoff and Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915 (1989)) 정렬, (B) 50, 기대값(E) 10, M = 5, N = -4 및 두 가닥의 비교를 사용한다.

[0208] 특정 구현예에서, "서열 동일성의 퍼센트"는 적어도 20개 위치의 비교 윈도우에 걸쳐 2개의 최적으로 정렬된 서열을 비교함으로써 결정되고, 여기서 비교 윈도우 내의 폴리뉴클레오티드 서열의 일부는 2개의 서열의 최적의 정렬을 위해 기준 서열(첨가 또는 결실을 포함하지 않음)과 비교하여 20% 이하, 일반적으로 5 내지 15%, 또는 10 내지 12%의 첨가 또는 결실(즉, 갭)을 포함할 수 있다. 백분율은 동일한 핵산 염기가 두 서열에서 발생하는 위치의 수를 결정하여 매칭된 위치의 수를 산출하고, 매칭된 위치의 수를 기준 서열 내의 위치의 총 수(즉, 윈도우 크기)로 나누고, 결과에 100을 곱하여 서열 동일성의 백분율을 산출함으로써 계산된다.

[0209] 유전자 코드의 축퇴 결과로서, 본원에 기재된 바와 같은 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 인코딩하는 많은 뉴클레오티드 서열이 존재한다는 것이 당업자에 의해 인식될 것이다. 일부 이러한 폴리뉴클레오티드는 본원에 기재된 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 인코딩하는 천연 또는 원래의 폴리뉴클레오티드 서열의 뉴클레오티드 서열에 대한 최소 서열 동일성을 갖는다. 그럼에도 불구하고, 코돈 사용량의 차이로 인해 변하는 폴리뉴클레오티드는 본 발명에 의해 명백히 고려된다. 특정 구현예에서, 포유동물 발현에 대해 코돈 최적화된 서열이 구체적으로 고려된다. 코돈 최적화는 공지된 기술 및 도구를 사용하여, 예를 들어, GenScript® OptimiumGene™ 도구를 사용하여 수행될 수 있다. 코돈-최적화 서열은 부분적으로 코돈-최적화된 서열(즉, 적어도 하나의 코돈은 숙주 세포에서의 발현을 위해 최적화된다) 및 완전히 코돈-최적화된 서열을 포함한다.

[0210] 따라서, 다른 구현예에서, 부위 특이적 돌연변이유발과 같은 돌연변이유발 접근법이 본원에 기재된 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 변이체 및/또는 유도체의 제조를 위해 사용될 수 있다. 이러한 접근법에 의해, 폴리펩티드 서열의 특정 변형은 그들을 인코딩하는 기본적인 폴리뉴클레오티드의 돌연변이유발을 통해 이루어질 수 있다. 이들 기술은 하나 이상의 뉴클레오티드 서열 변화를 폴리뉴클레오티드에 도입함으로써, 예를 들어, 하나 이상의 상기 고려사항을 포함하는 서열 변이체를 제조하고 시험하기 위한 간단한 접근법을 제공한다.

[0211] 부위 특이적 돌연변이유발은 목적하는 돌연변이의 DNA 서열을 인코딩하는 특이적 올리고뉴클레오티드 서열 뿐만 아니라 충분한 수의 인접 뉴클레오티드의 사용을 통해 돌연변이체의 생산을 가능하게 하여 횡단되는 결실 접합부의 양 측면에 안정한 이중체를 형성하는데 충분한 크기 및 서열 복잡성의 프라이머 서열을 제공한다. 돌연변이는 폴리뉴클레오티드 자체의 특성을 개선, 변경, 감소, 변형, 또는 달리 변화시키기 위해 및/또는 인코딩된 폴리펩티드의 특성, 활성, 조성, 안정성, 또는 1차 서열을 변경하기 위해 선택된 폴리뉴클레오티드 서열에 사용될 수 있다.

[0212] 특정 구현예에서, 본 발명자들은 본원에 개시된 항체 또는 이의 항원-결합 단편, 또는 이의 변이체를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열의 돌연변이유발을 고려함으로써, 본 발명에 따르는 루이스 항원에 대한 결합 친화도와 같은 인코딩된 폴리펩티드의 하나 이상의 특성을 변경한다. 부위 특이적 돌연변이유발의 기술은 당업계에 익히 공지되어 있으며, 폴리펩티드 및 폴리뉴클레오티드의 변이체를 생성하는데 널리 사용된다. 예를 들어, 부위 특이적 돌연변이유발은 종종 DNA 분자의 특정 부분을 변경하는데 사용된다. 이러한 구현예에서, 전형적으로 약 14 내지 약 25개의 뉴클레오티드 또는 그 길이를 포함하는 프라이머가 사용되며, 상기 서열의 접합부의 양 측면 상의 약 5 내지 약 10개의 잔기가 변경된다.

[0213] 당업자에 의해 이해되는 바와 같이, 부위 특이적 돌연변이유발 기술은 종종 단일 가닥 및 이중 가닥 형태로 존재하는 파지 벡터를 사용하였다. 부위-지시된 돌연변이유발에 유용한 전형적인 벡터는 M13 파지와 같은 벡터를 포함한다. 이들 파지는 쉽게 시판되고 있다. 이중 가닥 플라스미드는 또한 플라스미드로부터 파지로 관심있는 유전자를 전달하는 단계를 제거하는 부위-지시된 돌연변이유발에 통상적으로 사용된다.

[0214] 일반적으로, 본 발명에 따르는 부위-지시된 돌연변이유발은 먼저 단일 가닥 벡터를 수득하거나 목적하는 펩티드를 인코딩하는 DNA 서열을 이의 서열 내에 포함하는 이중 가닥 벡터의 2개의 가닥을 별도로 용융시킴으로써 수행된다. 목적하는 돌연변이된 서열을 포함하는 올리고뉴클레오티드 프라이머는 일반적으로 합성적으로 제조된다. 이어서, 이 프라이머는 단일-가닥 벡터로 어닐링되고, 돌연변이-함유 가닥의 합성을 완료하기 위해 이. 콜리(*E.coli*) 폴리머라제 I Klenow 단편과 같은 DNA 중합 효소에 적용한다. 따라서, 하나의 가닥이 원래의 비-돌연변이된 서열을 인코딩하고, 제2 가닥이 목적하는 돌연변이를 포함하는 헤테로듀플렉스가 형성된다. 이어서,

이 헤테로듀플렉스 벡터를 사용하여 이. 콜리 세포와 같은 적절한 세포를 형질전환시키고, 돌연변이된 서열 배열을 갖는 재조합 벡터를 포함하는 클론이 선택된다.

[0215] 부위-지시된 돌연변이유발을 사용하여 선택된 펩티드-인코딩 DNA 세그먼트의 서열 변이체의 제조는 잠재적으로 유용한 종을 생산하는 수단을 제공하며, 펩티드의 서열 변이체 및 그들을 인코딩하는 DNA 서열이 수득될 수 있는 다른 방법이 있기 때문에 제한하는 것을 의미하지 않는다. 예를 들어, 목적하는 펩티드 서열을 인코딩하는 재조합 벡터는 서열 변이체를 수득하기 위해 하이드록실아민과 같은 돌연변이원으로 처리될 수 있다. 이들 방법 및 프로토콜에 관한 구체적인 세부사항은 그 목적을 위해 본원에 각각 참고로 인용된 문헌[참조: Maloy et al., 1994; Segal, 1976; Prokop and Bajpai, 1991; Kuby, 1994; and Maniatis et al., 1982]의 교시에서 발견된다.

[0216] 본원에 사용된 용어 "올리고뉴클레오티드 지시된 돌연변이유발 절차"는 초기 농도에 비해 특정 핵산 분자의 농도를 증가시키거나 증폭과 같은 검출가능한 신호의 농도를 증가시키는 주형-의존 과정 및 벡터-매개 증식을 지칭한다. 본원에 사용된 용어 "올리고뉴클레오티드 지시된 돌연변이유발 절차"는 프라이머 분자의 주형-의존 연장을 포함하는 과정을 지칭하도록 의도된다. 용어 주형 의존 과정은 RNA 또는 DNA 분자의 핵산 합성을 지칭하며, 여기서 핵산의 새로 합성된 가닥의 서열은 상보적인 염기 짝짓기의 익히 공지된 규칙에 의해 지시된다(예를 들어, Watson, 1987 참조). 전형적으로, 벡터 매개 방법론은 핵산 단편을 DNA 또는 RNA 벡터 내로 도입, 벡터의 클론 증폭, 및 증폭된 핵산 단편의 회수를 포함한다. 이러한 방법론의 예는 구체적으로 전문이 참조로 본원에 인용된 미국 특허 제4, 237,224호에 의해 제공된다.

[0217] 폴리펩티드 변이체를 생산하기 위한 또 다른 접근법에서, 미국 특허 제5,837,458호에 기재된 바와 같이, 재귀적 서열 재조합이 사용될 수 있다. 이러한 접근법에서, 예를 들어, 증가된 결합 친화도를 갖는 개별적 폴리뉴클레오티드 변이체를 "진화"시키기 위해 재조합 및 스크리닝 또는 선택의 반복적 사이클이 수행된다. 특정 구현예는 또한 본원에 기재된 바와 같은 적어도 하나의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 플라스미드, 벡터, 전사 또는 발현 카세트의 형태로 작제물을 제공한다.

[0218] 용어 "벡터"는 코딩 정보를 숙주 세포에 전달하는데 사용되는 임의의 분자(예: 핵산, 플라스미드, 또는 바이러스)를 지칭하기 위해 사용된다. 용어 "발현 벡터"는 숙주 세포의 형질전환에 적합하고 삽입된 이종 핵산 서열의 발현을 지시하고/하거나 조절하는 핵산 서열을 함유하는 벡터를 지칭한다. 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 인코딩하는 발현 벡터는 바이러스 벡터, 예를 들어, 렌티바이러스 벡터 또는 γ-레트로바이러스 벡터를 포함한다. 바이러스 벡터는 레트로바이러스, 아데노바이러스, 파보바이러스(예: 아데노-관련 바이러스), 코로나바이러스, 네거티브 가닥 RNA 바이러스, 예를 들어, 오르토-믹소바이러스(예: 인플루엔자 바이러스), 랍도바이러스(예: 광견병 및 소포성 구내염 바이러스), 파라믹소바이러스(예: 홍역(measles) 및 센다이(Sendai)), 포지티브 가닥 RNA 바이러스, 예를 들어, 피코르나바이러스 및 알파바이러스, 및 아데노바이러스, 헤르페스바이러스(예: 단순 헤르페스 바이러스 타입 1 및 2, 엡슈타인-바르(Epstein-Barr) 바이러스, 사이토메갈로바이러스) 및 폭스바이러스(예: 백시니아, 계두(fowlpox) 및 카나리폭스)를 포함하는 이중 가닥 DNA 바이러스를 포함한다. 다른 바이러스는, 예를 들어, 노르워크 바이러스, 토가바이러스, 플라비바이러스, 리오바이러스, 파포바바이러스, 헤파드나바이러스 및 간염 바이러스를 포함한다. 레트로바이러스의 예는 조류 백혈병-육종, 포유동물 C-형, B-형 바이러스, D형 바이러스, HTLV-BLV 그룹, 렌티바이러스, 스푸마바이러스(Coffin, J. M., Retroviridae: The viruses and their replication, In Fundamental Virology, Third Edition, B. N. Fields et al., Eds., Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 1996)를 포함한다.

[0219] 본원에 사용된 바와 같이, "렌티바이러스 벡터"는 통합적 또는 비-통합적일 수 있고, 비교적 큰 패키징 용량을 가지며, 다양한 상이한 세포 유형을 형질도입할 수 있는, 유전자 전달을 위한 HIV-기반 렌티바이러스 벡터를 의미한다. 렌티바이러스 벡터는 일반적으로 3개(패키징, 외피 및 전달) 이상의 플라스미드를 생산자 세포로 일시적으로 형질감염 후 생성된다. HIV와 같이, 렌티바이러스 벡터는 세포 표면 상의 수용체와 바이러스 표면 당단백질의 상호작용을 통해 표적 세포에 들어간다. 진입시, 바이러스 RNA는 바이러스 역전사효소 복합체에 의해 매개되는 역전사를 겪는다. 역전사 생성물은 감염된 세포의 DNA에 바이러스를 통합하기 위한 기질인 이중 가닥 선형 바이러스 DNA이다.

[0220] 특정의 관련된 구현예에 따르면, 본원에 기재된 바와 같은 하나 이상의 작제물을 포함하는 재조합 숙주 세포; 항체 또는 이의 항원-결합 단편 또는 이의 변이체를 인코딩하는 핵산; 및 상기 인코딩된 생성물의 생산 방법이 제공되며, 이 방법은 이를 인코딩하는 핵산의 발현을 포함한다. 발현은 적절한 조건하에서 핵산을 함유하는 재조합 숙주 세포(예를 들어, 본 발명의 벡터에서)를 배양함으로써 편리하게 달성될 수 있다. 발현에 의한 생산

후, 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 임의의 적합한 기술을 사용하여 단리 및/또는 정제될 수 있고, 이어서 목적하는 바와 같이 사용될 수 있다.

[0221] 다양한 상이한 숙주 세포에서 폴리펩티드의 클로닝 및 발현을 위한 시스템은 익히 공지되어 있다. 적합한 숙주 세포는 박테리아, 포유동물 세포, 효모 및 바큘로바이러스 시스템을 포함한다. 이종 폴리펩티드의 발현용으로 당업계에서 이용가능한 포유동물 세포주는 중국 해스터 난소 세포, HeLa 세포, 아기 햄스터 신장 세포(예: HEK293-c18 세포와 같은 HEK 세포), NSO 마우스 흑색종 세포 및 많은 다른 세포를 포함한다. 일반적인 바람직한 박테리아 숙주는 이. 콜리이다.

[0222] 이. 콜리와 같은 원핵 세포에서 펩티드의 발현은 당업계에서 잘 확립되어 있다. 검토를 위해, 예를 들어, 문헌[Pluckthun, A. *Bio/Technology 9*: 545-551 (1991)]을 참조한다. 배양물에서 진핵 세포에서의 발현은 또한 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 생산을 위한 옵션으로서 당업자에게 이용가능하며, 최근 검토, 예를 들어, 문헌[Ref, M. E. (1993) *Curr. Opinion Biotech. 4*: 573-576; Trill J. J. *et al.* (1995) *Curr. Opinion Biotech 6*: 553-560]을 참조한다.

[0223] 적합한 벡터는 프로모터 서열, 터미네이터 서열, 폴리아데닐화 서열, 인핸서 서열, 마커 유전자 및 기타 적절한 서열을 포함하는 적절한 조절 서열을 함유하여 선택되거나 작제될 수 있다. 벡터는 플라스미드, 바이러스, 예를 들어, 파지, 또는 적절한 경우 파지미드일 수 있다. 추가의 상세함을 위해, 예를 들어, 문헌[Molecular Cloning: a Laboratory Manual: 2nd edition, Sambrook et al., 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press]을 참조한다. 예를 들어, 핵산 작제물의 제조, 돌연변이유발, 서열분석, DNA의 세포로의 도입 및 유전자 발현, 및 단백질의 분석에서 핵산의 조작을 위한 많은 공지된 기술 및 프로토콜은 문헌[참조: Current Protocols in Molecular Biology, Second Edition, Ausubel et al. eds., John Wiley & Sons, 1992] 또는 이의 후속적 업데이트에 상세히 기재되어 있다.

[0224] 용어 "숙주 세포"는 본원에 기재된 항체 및 이의 항원-결합 단편 중 하나 이상을 인코딩하는 핵산 서열이 도입되었거나 도입될 수 있고, 본원에 기재된 임의의 항체 또는 항원-결합 단편을 인코딩하는 유전자와 같은 관심있는 선택된 유전자를 추가로 발현하거나 발현할 수 있는 세포를 지칭하기 위해 사용된다. 상기 용어는 선택된 유전자가 존재하는 한, 자손이 원래의 부모와 형태 또는 유전적 구성이 동일한지의 여부에 관계없이 부모 세포의 자손을 포함한다. 따라서, 이러한 핵산을 숙주 세포에 도입하는 단계를 포함하는 방법이 또한 고려된다. 도입은 임의의 이용가능한 기술을 사용할 수 있다. 진핵 세포의 경우, 적합한 기술은 인산칼슘 형질감염, DEAE-덱스트란, 전기천공, 레트로바이러스 또는 다른 바이러스, 예를 들어, 백시니아, 또는 곤충 세포의 경우 바큘로바이러스를 사용하는 리포좀-매개 형질감염 및 형질도입을 포함할 수 있다. 박테리아 세포의 경우, 적합한 기술은 염화칼슘 형질전환, 전기천공 및 박테리오파지를 사용하는 형질감염을 포함할 수 있다. 도입은, 예를 들어, 유전자 발현을 위한 조건하에서 숙주 세포를 배양함으로써, 핵산으로부터 발현을 야기하거나 허용함으로써 수행될 수 있다. 하나의 구현예에서, 핵산은 숙주 세포의 게놈(예: 염색체)에 통합된다. 통합은 표준 기술에 따라 게놈과의 재조합을 촉진시키는 서열을 포함시킴으로써 촉진될 수 있다.

[0225] 본 발명은 또한 특정 구현예에서 본원에 기재된 바와 같은 항체 또는 이의 항원-결합 단편과 같은 특정 폴리펩티드를 발현시키기 위해 발현 시스템에서 상기 언급된 바와 같은 작제물을 사용하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다. 용어 "형질도입"은 일반적으로 파지에 의해 하나의 박테리아에서 다른 박테리아로 유전자의 전달을 지칭하기 위해 사용된다. "형질도입"은 또한 레트로바이러스에 의한 진핵 세포 서열의 획득 및 전달을 지칭한다. 용어 "형질감염"은 세포에 의한 외래 또는 외인성 DNA의 흡수를 지칭하기 위해 사용되며, 외인성 DNA가 세포막 내부에 도입될 때 세포는 "형질감염되었다". 다수의 형질감염 기술이 당업계에 익히 공지되어 있으며, 본원에 개시되어 있다. 예를 들어, 문헌[Graham et al., 1973, Virology 52:456; Sambrook et al., 2001, MOLECULAR CLONING, A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Laboratories; Davis et al., 1986, BASIC METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, Elsevier; and Chu et al., 1981, Gene 13:197]을 참조한다. 이러한 기술은 하나 이상의 외인성 DNA 잔기를 적합한 숙주 세포에 도입하는데 사용될 수 있다.

[0226] 본원에 사용된 용어 "형질전환"은 세포의 유전적 특성의 변화를 지칭하고, 세포는 새로운 DNA를 함유하도록 변형될 때 형질전환되었다. 예를 들어, 세포는 이의 천연 상태로부터 유전적으로 변형되는 경우 형질전환된다. 형질감염 또는 형질도입 후, 형질전환성 DNA는 세포의 염색체 내로 물리적으로 통합함으로써 세포의 DNA와 재조합할 수 있거나, 복제되지 않고 에피솜 요소로서 일시적으로 유지될 수 있거나, 플라스미드로서 독립적으로 복제할 수 있다. 세포는 DNA가 세포의 분열과 함께 복제되는 경우 안정하게 형질전환된 것으로 간주된다. 용어 "자연 발생" 또는 "천연"은 핵산 분자, 폴리펩티드, 숙주 세포 등과 같은 생물학적 물질과 관련하여 사용될 때,

자연에서 발견되고 사람에 의해 조작되지 않는 물질을 지칭한다. 유사하게, 본원에서 사용된 "비-자연 발생" 또는 "비-천연"은 자연에서 발견되지 않거나 인간에 의해 구조적으로 변형되거나 합성된 물질을 지칭한다.

[0227] 본 발명의 몇몇 구현예의 실시는, 특별히 반대로 지시되지 않는 한, 당해 분야의 기술 내의 바이러스학, 면역학, 미생물학, 분자 생물학 및 재조합 DNA 기술에서 통상적인 방법을 사용할 것이며, 이들 중 다수는 예시의 목적으로 하기에 기재되어 있다. 이러한 기술은 문헌에 충분히 설명되어 있다. 예를 들어, 문헌[*Current Protocols in Molecular Biology* or *Current Protocols in Immunology*, John Wiley & Sons, New York, N.Y.(2009); Ausubel *et al.*, *Short Protocols in Molecular Biology*, 3rd ed., Wiley & Sons, 1995; Sambrook and Russell, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3rd Edition, 2001); Maniatis *et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (1982); *DNA Cloning: A Practical Approach*, vol. I & II (D. Glover, ed.); *Oligonucleotide Synthesis* (N. Gait, ed., 1984); *Nucleic Acid Hybridization* (B. Hames & S. Higgins, eds., 1985); *Transcription and Translation* (B. Hames & S. Higgins, eds., 1984); *Animal Cell Culture* (R. Freshney, ed., 1986); Perbal, *A Practical Guide to Molecular Cloning* (1984)] 및 다른 유사 참조문헌을 참조한다.

[0228] 현재 개시된 특정 구현예는 탄수화물-규정된 항원성 구조를 향해 지시되는 특이적 면역학적 결합 활성(예: 항체 결합 활성)의 검출 및 특성화에 관한 것이다. 당업자는 동족체 탄수화물 항원의 미세한 구조적 특성화를 포함하여 탄수화물-특이적 면역학적 시약을 생성하고 시험하는 다양한 방법론이 있다는 것을 이해할 것이다. 이러한 기술의 비제한적인 예는 문헌[Haji-Ghassemi et al., 2015 *Glybiol.* 25:920; Dingjan et al., 2015 *Mol. Immunol.* 67(2 Pt A):75-88; Soliman et al., 2017 *Curr. Opin. Struct. Biol.* 44:1-8; and Hakomori, 2001 *Adv. Exp. Med. Biol.* 491:369-402; 및 그 안에 인용된 참고문헌]에 기재되어 있다. 거기와 다른 곳에서도 또한 탄수화물-규정 항원의 공급원 및 그들의 제조, 단리 및 구조적 특성화 방법에 대한 설명을 찾을 수 있다. 이러한 접근법의 예시적이고 비제한적인 적용이 본원에 개시되어 있고, 본 발명은 그렇게 제한되는 것으로 의도되지 않고, 또한 당업계에 공지된 생합성 효소의 정교한 특이성을 글리코실트랜스퍼라제로 이용하는 것을 포함하여 구조적으로 규정된 탄수화물 항원의 합성적 제조를 고려한다. 예를 들어, 문헌[Wu et al., Universal phosphatase-coupled glycosyltransferase assay, *Glycobiology* 21(6): 727-733, 2011; Becker et al., Fucose: biosynthesis and biological function in mammals, *Glycobiology* 13(7): 41R-53R, 2003; de Vries et al., Fucosyltransferases: structure/function studies, *Glycobiology* 11(10): 119R-128R, 2001]을 참조한다.

[0229] 재조합 DNA, 올리고뉴클레오티드 합성 및 조직 배양 및 형질전환(예: 전기천공, 리포펙션)을 위해 표준 기술이 사용될 수 있다. 효소 반응 및 정제 기술은 제조자의 사양에 따라 또는 당업계에서 일반적으로 달성된 바와 같이 또는 본원에 기재된 바와 같이 수행될 수 있다.

[0230] 이들 및 관련 기술 및 절차는 일반적으로 당업계에 익히 공지된 통상적인 방법에 따라 그리고 본 명세서 전반에 걸쳐 인용되고 논의된 다양한 일반적이고 보다 구체적인 참고문헌에 기재된 바와 같이 수행될 수 있다. 구체적인 정의가 제공되지 않는 한, 본원에 기재된 분자 생물학, 분석 화학, 합성 유기 화학, 및 의약 및 약제학적 화학의 실험실 절차 및 기술과 관련하여 사용된 명명법은 당업계에서 익히 공지되어 있고 일반적으로 사용되는 것들이다. 재조합 기술, 분자 생물학적, 미생물학적, 화학적 합성, 화학적 분석, 약제학적 제조, 제형화 및 전달, 및 본원에 추가로 기재된 환자의 치료를 위해 표준 기술이 사용될 수 있다.

[0231] 조성물

[0232] 특정 측면에서, 본 발명은 항체 및 이의 항원-결합 단편뿐만 아니라 이의 변이체, 및 이를 포함하는 조성물을 제공한다. 특정 구현예에서, 서열번호 10에 제시된 아미노산 서열을 갖는 면역글로불린 중쇄 및 서열번호 11에 제시된 아미노산 서열을 갖는 면역글로불린 경쇄를 포함하는 단리된 항체가 제공된다.

[0233] 특정 구현예에서, 서열번호 35에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 면역글로불린 중쇄 가변 영역; 및 서열번호 5에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 면역글로불린 경쇄 가변 영역을 포함하는 단리된 항체 또는 이의 항원-결합 단편이 제공되며, 여기서 상기 항체 또는 이의 항원-결합 단편은

[0234] $Fuc_4(Gal\beta1\rightarrow3GlcNAc)_2$[I] 또는 [Fuc α1-2Gal β1-3(Fuc α1-4)GlcNAc]$_2$[II]를 포함하는 바이안테나리 Le^B/Le^B 항원,

[0235] $Fuc_4(Gal\beta1\rightarrow4GlcNAc)_2$[III] 또는 [Fuc α1-2Gal β1-4(Fuc α1-3) GlcNAc]$_2$[IV]를 포함하는 바이안테나리 Le^Y/Le^Y 항원,

[0236] $Fuc_2(Gal\beta1\rightarrow3GlcNAc)[Fuc_2(Gal\beta1\rightarrow4GlcNAc)]$[V], 또는 [Fuc α1-2Gal β1-3(Fuc α1-4)GlcNAc][Fuc α1-2Gal β1-4(Fuc α1-3)GlcNAc][VI]를 포함하는 바이안테나리 Le^B/Le^Y 항원, 및

[0237] $Fuc_2(Gal\beta1-4GlcNAc)[Fuc_2(Gal\beta1-3GlcNAc)]$[VII] 또는 [Fuc α1-2Gal β1-4(Fuc α1-3)GlcNAc][Fuc α1-2Gal β1-3(Fuc α1-4)GlcNAc][VIII]를 포함하는 바이안테나리 Le^Y/Le^B 항원에 특이적으로 결합할 수 있고,

[0238] 상기 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 Gal β1→4(Fuc α1→3)GlcNAc[IX]를 포함하는 모노안테나리 Le^X 항원, 또는 [Gal β1→4(Fuc α1→3)GlcNAc]$_2$[X]를 포함하는 바이안테나리 Le^X 항원, 또는 Gal β1-3(Fuc α1-4)GlcNAc[XI]를 포함하는 모노안테나리 Le^A 항원, 또는 Fuc α1-2Gal β1-4GlcNAc[XII]를 포함하는 모노안테나리 H 항원 타입 2, 또는 (Fuc α1-2Gal β1-4GlcNAc)$_2$[XIII]를 포함하는 바이안테나리 H 항원 타입 2 또는 Fuc α1-2Gal β1-3GlcNAc[XIV]를 포함하는 모노안테나리 H 항원 타입 1에 특이적으로 결합하지 않는다.

[0239] 다른 구현예에서, 단리된 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 (a) 서열번호 2에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 상보성 결정 영역 1(VH CDR1); 서열번호 3에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 상보성 결정 영역 2(VH CDR2); 서열번호 4에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 상보성 결정 영역 3(VH CDR3)을 포함하는 면역글로불린 중쇄 가변 영역; 및 (b) 서열번호 6에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 상보성 결정 영역 1(VL CDR1); 서열번호 7에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 상보성 결정 영역 2(VL CDR2); 및 서열번호 8에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 상보성 결정 영역 3(VL CDR3)을 포함하는 면역글로불린 경쇄 가변 영역을 포함하고, 여기서 상기 항체 또는 이의 항원-결합 단편은

[0240] $Fuc_4(Gal\beta1\rightarrow3GlcNAc)_2$[I] 또는 [Fuc α1-2Gal β1-3(Fuc α1-4)GlcNAc]$_2$[II]를 포함하는 바이안테나리 Le^B/Le^B 항원,

[0241] $Fuc_4(Gal\beta1\rightarrow4GlcNAc)_2$[III] 또는 [Fuc α1-2Gal β1-4(Fuc α1-3) GlcNAc]$_2$[IV]를 포함하는 바이안테나리 Le^Y/Le^Y 항원,

[0242] $Fuc_2(Gal\beta1\rightarrow3GlcNAc)[Fuc_2(Gal\beta1\rightarrow4GlcNAc)]$[V], 또는 [Fuc α1-2Gal β1-3(Fuc α1-4)GlcNAc][Fuc α1-2Gal β1-4(Fuc α1-3)GlcNAc][VI]를 포함하는 바이안테나리 Le^B/Le^Y 항원, 및

[0243] $Fuc_2(Gal\beta1-4GlcNAc)[Fuc_2(Gal\beta1-3GlcNAc)]$[VII] 또는 [Fuc α1-2Gal β1-4(Fuc α1-3)GlcNAc][Fuc α1-2Gal β1-3(Fuc α1-4)GlcNAc][VIII]를 포함하는 바이안테나리 Le^Y/Le^B 항원에 특이적으로 결합할 수 있고,

[0244] 상기 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 Gal β1→4(Fuc α1→3)GlcNAc[IX]를 포함하는 모노안테나리 Le^X 항원, 또는 [Gal β1→4(Fuc α1→3)GlcNAc]$_2$[X]를 포함하는 바이안테나리 Le^X 항원, 또는 Gal β1-3(Fuc α1-4)GlcNAc[XI]를 포함하는 모노안테나리 Le^A 항원, 또는 Fuc α1-2Gal β1-4GlcNAc[XII]를 포함하는 모노안테나리 H 항원 타입 2, 또는 (Fuc α1-2Gal β1-4GlcNAc)$_2$[XIII]를 포함하는 바이안테나리 H 항원 타입 2 또는 Fuc α1-2Gal β1-3GlcNAc[XIV]를 포함하는 모노안테나리 H 항원 타입 1에 특이적으로 결합하지 않는다.

[0245] 현재 개시된 특정 구현예에서, 단리된 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 모노클로날이다.

[0246] 현재 개시된 특정 구현예에서, 단리된 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 인간화된다.

[0247] 특정 구현예에서, 단리된 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 Fab 단편, F(ab')2 단편, Fv 단편, 단일 쇄 Fv(scFv) 항체, 및 디아바디로부터 선택된다.

[0248] 특정의 여전히 다른 구현예에서, 서열번호 35에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 또는 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 면역글로불린 중쇄 가변 영역; 및 서열번호 5에

제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 또는 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 면역글로불린 경쇄 가변 영역을 포함하는 단리된 항체 또는 이의 항원 결합 단편이 제공되며, 여기서 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편은

[0249] $Fuc_4(Gal\beta1\rightarrow3GlcNAc)_2$[I] 또는 [Fuc α1-2Galβ1-3(Fuc α1-4)GlcNAc]$_2$[II]를 포함하는 바이안테나리 Le^B/Le^B 항원,

[0250] $Fuc_4(Gal\beta1\rightarrow4GlcNAc)_2$[III] 또는 [Fuc α1-2Galβ1-4(Fuc α1-3) GlcNAc]$_2$[IV]를 포함하는 바이안테나리 Le^Y/Le^Y 항원,

[0251] $Fuc_2(Gal\beta1\rightarrow3GlcNAc)[Fuc_2(Gal\beta1\rightarrow4GlcNAc)]$[V], 또는 [Fuc α1-2Galβ1-3(Fuc α1-4)GlcNAc][Fuc α1-2Galβ1-4(Fuc α1-3)GlcNAc][VI]를 포함하는 바이안테나리 Le^B/Le^Y 항원, 및

[0252] $Fuc_2(Gal\beta1-4GlcNAc)[Fuc_2(Gal\beta1-3GlcNAc)]$[VII] 또는 [Fuc α1-2Galβ1-4(Fuc α1-3)GlcNAc][Fuc α1-2Galβ1-3(Fuc α1-4)GlcNAc][VIII]를 포함하는 바이안테나리 Le^Y/Le^B 항원에 특이적으로 결합할 수 있고,

[0253] 상기 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 Galβ1→4(Fuc α1→3)GlcNAc[IX]를 포함하는 모노안테나리 Le^X 항원, 또는 [Galβ1→4(Fuc α1→3)GlcNAc]$_2$[X]를 포함하는 바이안테나리 Le^X 항원, 또는 Galβ1-3(Fuc α1-4)GlcNAc[XI]를 포함하는 모노안테나리 Le^A 항원, 또는 Fuc α1-2Galβ1-4GlcNAc[XII]를 포함하는 모노안테나리 H 항원 타입 2, 또는 (Fuc α1-2Galβ1-4GlcNAc)$_2$[XIII]를 포함하는 바이안테나리 H 항원 타입 2 또는 Fuc α1-2Galβ1-3GlcNAc[XIV]를 포함하는 모노안테나리 H 항원 타입 1에 특이적으로 결합하지 않는다.

[0254] 특정 구현예에서, 단리된 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 (a) 서열번호 2에 제시된 아미노산 서열 또는 서열번호 2에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 또는 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 상보성 결정 영역 1(VH CDR1); 서열번호 3에 제시된 아미노산 서열 또는 서열번호 3에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 또는 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 상보성 결정 영역 2(VH CDR2); 서열번호 4에 제시된 아미노산 서열 또는 서열번호 4에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 또는 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 상보성 결정 영역 3(VH CDR3)을 포함하는 면역글로불린 중쇄 가변 영역; 및 (b) 서열번호 6에 제시된 아미노산 서열 또는 서열번호 6에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 또는 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 상보성 결정 영역 1(VL CDR1); 서열번호 7에 제시된 아미노산 서열 또는 서열번호 7에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 또는 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 상보성 결정 영역 2(VL CDR2); 서열번호 8에 제시된 아미노산 서열 또는 서열번호 8에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 또는 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 상보성 결정 영역 3(VL CDR3)을 포함하는 면역글로불린 경쇄 가변 영역을 포함한다.

[0255] 다른 구현예에서, 단리된 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 다음과 같은 (i), (ii), (iii), (iv), (v), 또는 (vi) 또는 이들의 임의의 조합을 포함한다: (i) 서열번호 2에 제시된 아미노산 서열의 변이체를 포함하는 VH CDR1로서, 상기 변이가 카바트 넘버링에 따라 위치 33에서의 Y→A 치환으로 이루어지는 VH CDR1; (ii) 서열번호 4에 제시된 아미노산 서열의 변이체를 포함하는 VH CDR3로서, 상기 변이가 카바트 넘버링에 따라 위치 104에서의 Y→A 치환으로 이루어지는 VH CDR3; (iii) 서열번호 4에 제시된 아미노산 서열의 변이체를 포함하는 VH CDR3로서, 상기 변이가 카바트 넘버링에 따라 위치 106에서의 H→A 치환으로 이루어지는 VH CDR3; (iv) 서열번호 6에 제시된 아미노산 서열의 변이체를 포함하는 VL CDR1로서, 상기 변이가 카바트 넘버링에 따라 위치 30에서의 Y→A 치환으로 이루어지는 VL CDR1; (v) 서열번호 7에 제시된 아미노산 서열의 변이체를 포함하는 VL CDR2로서, 상기 변이가 카바트 넘버링에 따라 위치 50에서의 G→A 치환으로 이루어지는 VL CDR2; 또는 (vi) 서열번호 8에 제시된 아미노산 서열의 변이체를 포함하는 VL CDR3로서, 상기 변이가 카바트 넘버링에 따라 위치 93에서의 T→S 치환으로 이루어지는 VL CDR3.

[0256] 본원에 기재된 임의의 구현예에서, 단리된 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호 27에 제시된 아미노산 서열을 갖는 VL 도메인 및 서열번호 28에 제시된 아미노산 서열을 갖는 VH 도메인을 포함하는 BBC 항체와 비교하

여 모노안테나리 루이스 B 항원 또는 모노안테나리 루이스 Y에 대한 결합이 감소(예를 들어, 통계적으로 유의한 방식으로 감소)될 수 있다.

[0257] 특정의 추가 구현예에서, 본원에 기재된 CDR(즉, 본원에 기재된 아미노산 치환을 갖는 CDR 변이체를 포함하여, 각각 서열번호 2, 3, 4, 6, 7 및 8에 대해 적어도 90% 동일성을 갖는 CDR)을 포함하고, 서열번호 35에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 또는 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이들로 구성되는 면역글로불린 중쇄 가변 영역, 및 서열번호 5에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 또는 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이들로 구성되는 면역글로불린 경쇄 가변 영역을 포함하는 단리된 항체 또는 항원-결합 단편이 제공된다.

[0258] scFv를 포함하지만 이에 제한되지 않는 본원에 기재된 것들과 같은 항체 또는 이의 항원-결합 단편은, 특정 구현예에서, 본원에 기재된 바와 같은 루이스 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 융합 단백질에 포함될 수 있다. 일부 구현예에서, 융합 단백질은 숙주 세포, 예를 들어, T 세포, NK 세포, 또는 NK-T 세포의 표면에서 발현할 수 있고, 본원에 개시된 바와 같은 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 포함하는 세포외 성분, 및 적절한 신호(예: CD27, CD28, 4-1BB(CD137), OX40(CD134) CD3ε, CD3δ. CD3ζ, CD25, CD27, CD28, CD79A, CD79B, CARD11, DAP10, FcRα, FcRβ, FcRγ, Fyn, HVEM, ICOS, Lck, LAG3, LAT, LRP, NKG2D, NOTCH1, NOTCH2, NOTCH3, NOTCH4, Wnt, ROR2, Ryk, SLAMF1, Slp76, pTα, TCRα, TCRβ, TRIM, Zap70, PTCH2, 또는 이들의 임의의 조합으로부터의 이펙터 도메인)를 수신할 때 세포(예: 면역계 세포, 예를 들어, T 세포)에서 면역학적 반응을 직접적으로 또는 간접적으로 촉진시킬 수 있는 이펙터 도메인을 포함하는 세포내 성분을 포함하고, 여기서 상기 세포외 성분 및 세포내 성분은 막관통 도메인(예: CD8 막관통 도메인, CD4 막관통 도메인, CD27 막관통 도메인, 또는 CD28 막관통 도메인)에 의해 연결되고, 상기 세포내 성분은 임의로 CD27, CD28, 4-1BB(CD137), OX40(CD134), 또는 이들의 조합으로부터 선택된 공동자극 도메인 또는 이의 일부를 포함한다. 특정 구현예에서, 본 발명의 항체 또는 항원-결합 단편을 포함하는 융합 단백질의 세포외 성분은 면역글로불린 단백질, 예를 들어, IgG4 힌지-CH2-CH3으로부터 유도된 폴리펩티드를 포함한다.

[0259] 이들 및 관련된 구현예에서, 항원-결합 단편은 scFv와 같은 본원에 기재된 항원-결합 단편을 포함할 수 있고, 세포외 성분은 힌지를 포함하는 커넥터 영역을 추가로 포함할 수 있고; 예를 들어, 키메라 항원 수용체 분자(CAR)에서, 이는 세포 면역요법에 사용하기 위한 숙주 세포, 예를 들어, T 세포, NK 세포, NK-T 세포의 세포 표면 상에서 발현될 수 있다. CAR 분자 및 설계 원리는, 예를 들어, 문헌[Sadelain *et al.*, *Cancer Discov.*, *3*(4):388 (2013); Harris and Kranz, *Trends Pharmacol. Sci.*, *37*(3):220 (2016); Stone *et al.*, *Cancer Immunol. Immunother.*, *63*(11):1163 (2014); Xu et al., 2018 *Oncotarget* 9:13991; Androulla et al., 2018 *Curr. Pharm. Biotechnol.* Volume 19 (April 2018); Wu et al., 2016 *Expert Opin. Biol. Ther.* 16:1469; Ren et al., 2017 *Protein Cell* 8:634]에 기재되어 있고; 이 CAR 분자, CAR 설계, 및 CAR 설계 원리는 본원에 그 전문이 참고로 인용된다.

[0260] 또한, 본 발명의 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 포함하는 항체 접합체; 및 이에 연결된 페이로드 분자가 본원에 제공된다. 배경으로, 항원을 특이적으로 표적화하는 모노클로날 항체는 치료적 또는 검출가능한 페이로드 분자를 항원 발현 부위, 예를 들어, 항원을 발현하는 종양 세포로 전달하기 위한 담체 분자로서 사용될 수 있다. 항원에 대한 항체 접합체에 의한 결합은, 예를 들어, 질환, 예를 들어, 암의 치료 또는 검출, 이미징 또는 모니터링을 위해 병든 세포 또는 조직에 세포독성 페이로드 또는 검출가능한 잔기의 표적화 전달을 허용할 수 있다. 특정 구현예에서, 항체 접합체는 항체 접합체에 의한 결합 후 또는 결합시 항원을 발현하는 표적 세포에 의해 내재화된다. 세포질 또는 표적 세포의 리소좀 구획으로의 내재화는, 예를 들어, 표적 세포에 세포독성 손상을 일으키는 페이로드 분자의 선택적 방출을 허용할 수 있다.

[0261] 다양한 기술이 페이로드 분자를 항체 또는 이의 항원-결합 단편에 결합시켜 본 발명의 항체 접합체를 형성하는 데 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 항체 접합체는 링커에 의해 항체 또는 이의 항원-결합 단편에 공유적으로 연결되는 페이로드 분자를 포함한다. 세포독성 또는 항-증식제(예: 항체 약물 접합체)를 포함하는 항체 접합체에 사용된 링커는 전형적으로 페이로드 분자가 담체 분자로부터 방출되는 메카니즘에 따라 조직된 2개의 그룹 중 하나에 속하는 유기 화합물이다. 절단성 링커는 표적 세포의 고유 특성에 따라 선택적으로 분해되거나 절단되도록 설계되고: 3가지 유형의 절단성 링커는 프로테아제-민감성 링커(종양 세포 리소좀에 존재하는 프로테아제에 의한 링커, 예를 들어, 발린-시트룰린 또는 페닐알라닌-리신 디펩티드 또는 테트라펩티드(예: GFLG 또는 ALAL)를 포함하는 링커의 절단으로 페이로드 분자를 방출한다); 세포질 pH에 비해 엔도솜 및 리소좀 구획의 낮은 pH에 의해 선택적으로 가수분해되는 산 불안정성 그룹을 함유하는 pH-민감성 링커; 및 세포내 글루타티온에 의해 감소되는 이황화 가교를 포함하는 글루타티온-민감성 링커이다. 비절단성 링커는 페이로드 분자를 방

출하기 위해 항체 접합체의 비특이적 분해에 의존한다.

[0262] 특정 링커, 페이로드, 링커 화학, 및 관련 메카니즘 및 방법은 문헌[Nareshkumar et al., Pharm. Res. 32:3526-3540 (2015)]에 개시되어 있고, 이 조성물, 방법 및 기술은 그 전체가 본원에 참고로 인용된다. 특정 구현예에서, 항체 접합체는 절단성 링커 및 비절단성 링커로부터 선택되는 링커를 포함한다. 추가의 구현예에서, 링커는 프로테아제-민감성 링커, pH-민감성 링커, 또는 글루타티온-민감성 링커로부터 선택된 절단성 링커이다. 특정 구현예에서, 절단성 링커는 발린-시트룰린 디펩티드를 포함하는 프로테아제-민감성 링커이다.

[0263] 링커는 임의의 적절한 기술 또는 메카니즘을 사용하여 항체 또는 이의 항원-결합 단편에 연결되거나 결합될 수 있다. 일부 구현예에서, 링커는 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 힌지 영역에서 감소된 이황화 가교와 반응할 수 있는 말레이미드 그룹(임의로 PEG화됨)을 포함한다. 링커에의 접합에 적합한 담체 분자(즉, 항체 또는 이의 항원-결합 단편) 상의 다른 부위는 부위 특이적 접합을 위해 시스테인 잔기 또는 비천연 아미노산을 도입하는 것과 같은 재조합 기술을 사용하여 도입되거나 조작될 수 있다. 이러한 변형을 도입하는 방법은, 예를 들어, PCT 공개 번호 제WO 2012/032181호의 실시예 6.3-7에 기재된 방법을 포함한다.

[0264] 일부 구현예에서, 링커는 선택적 절단 반응을 돕기 위해 자가-희생 그룹 또는 자가 희생 스페이서로서 지칭되기도 하는 자가-파괴 그룹을 추가로 포함한다. 특정 구현예에서, 자가-파괴 그룹은 파라-아미노 벤질 알콜(PABC)이다.

[0265] 항체 접합체를 생성하는데 유용한 클릭 화학은 문헌[Meyer et al., Bioconjug. Chem. 27(12):2791-2807 (2016)]에 기재되어 있는 것들을 포함하고, 그 전체가 본원에 참고로 인용된다.

[0266] 본원에 기재된 임의의 항체 접합체에서, 페이로드 분자는 치료제 및 검출가능한 지시제로부터 선택될 수 있다. 암 요법에 적합한 치료제는 문헌[Parslow et al., Biomedickines 4:14(2016)]에 개시된 것들을 포함하며, 이 페이로드 및 ADC 설계 원리는 여기에 참고로 인용된다. 특정 구현예에서, 페이로드 분자는 튜불린-표적화 항유사분열제, 펩티드 기반 독소, 피롤로벤조디아제핀(PBD) 이량체, 항생제(예: 칼리케아마이신), 피리미딘 합성 억제제(예: 5-플루오로우라실), 항대사물질(예: 메토트렉세이트), DNA 알킬화제, 및 토포아이소머라제 억제제(예: 독소루비신)로부터 선택된 치료제이다. 추가의 구현예에서, 페이로드 분자는 마인탄시노이드, 아우리스타틴, 모노메틸아우리스타틴 E(MMAE), 및 모노메틸아우리스타틴 F(MMAF)로부터 선택된다.

[0267] 다른 구현예에서, 페이로드 분자는 검출가능한 지시제이다. 항체 접합체뿐만 아니라 관련 표지화 전략 및 이미징 기술(예: PET, MRI, NIR)에 사용하기에 적합한 검출가능한 지시제는 문헌[참조: Friese and Wu, *Mol. Immunol. 67*(200):142-152 (2015) and Moek *et al.*, *J. Nucl. Med. 58*:83S-90S (2017)]에 개시된 것들을 포함하고, 이들 모두는 참고로 인용된다. 특정 구현예에서, 검출가능한 지시제는 방사성 핵종, 염료, 방사성 금속, 형광 모이어티, MRI 조영제, 마이크로버블, 탄소 나노튜브, 금 입자, 플루오로데옥시글루코스, 효소, 발색단, 및 방사선 불투명 마커로부터 선택된다. 특정 구현예에서, 검출가능한 지시제는 ^{68}Ga, ^{64}Cu, ^{86}Y, ^{89}Zr, ^{124}I, ^{99m}Tc, ^{123}I, ^{111}In, ^{177}Lu, ^{131}I, ^{76}Br, ^{78}Zr, ^{18}F 및 ^{124}T로부터 선택된 방사성 핵종이다. 특정의 이러한 구현예에서, 항체 접합체는 말레이미드-표지된 DOTA, N-하이드록시석신이미드-DOTA, 및 데스페리옥사민(DFO)으로부터 선택된 방사성 핵종 킬레이터를 추가로 포함한다.

[0268] 본 발명의 항체, 이의 항원-결합 단편, 또는 항체 접합체; 및 약제학적 담체를 포함하는 약제학적 조성물이 또한 본원에 제공된다.

[0269] 또 다른 측면에서, 본 발명은 본원에 기재된 바와 같은 항체 또는 항원-결합 단편을 인코딩하는 단리된 폴리뉴클레오티드를 제공하고, 이 폴리뉴클레오티드는 본원에 개시된 특정 뉴클레오티드 서열과 비교하여 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 서열 변이체를 포함한다. 특정 구현예에서, 본 발명의 항체 또는 항원-결합 단편(예: scFv, Fab, F(ab'2) 단편, Fv 단편, 또는 디아바디를 포함)을 인코딩하거나 항체 또는 항원 결합 단편의 일부(예: 중쇄, 경쇄, VH, VL, 또는 CDR)를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드는 서열번호 12-22 또는 37 중 어느 하나와 비교하여 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는다. 특정 구현예에서, 폴리뉴클레오티드는 숙주 세포, 예를 들어, 포유동물 세포에서 발현을 위해 코돈-최적화된다. 임의의 상기 구현예에서, 폴리뉴클레오티드는 재조합 벡터에 제공될 수 있다. 특정 구현예에서, 벡터는 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드에 작동가능하게 연결된 발현 조절 서열을 포함한다. 특정의 이러한 구현예에서, 벡터(예: 재조합 벡터)는 발현 조절 서열

이 프로모터를 포함하는 발현 벡터이다.

[0270] 다른 측면에서, 본원에 기재된 재조합 벡터 또는 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포가 제공된다. 관련된 측면에서,

[0271] $Fuc_4(Gal\beta1\rightarrow3GlcNAc)_2$[I] 또는 [Fuc α1-2Galβ1-3(Fuc α1-4)GlcNAc]$_2$[II]를 포함하는 바이안테나리 Le^B/Le^B 항원,

[0272] $Fuc_4(Gal\beta1\rightarrow4GlcNAc)_2$[III] 또는 [Fuc α1-2Galβ1-4(Fuc α1-3) GlcNAc]$_2$[IV]를 포함하는 바이안테나리 Le^Y/Le^Y 항원,

[0273] $Fuc_2(Gal\beta1\rightarrow3GlcNAc)[Fuc_2(Gal\beta1\rightarrow4GlcNAc)]$[V], 또는 [Fuc α1-2Galβ1-3(Fuc α1-4)GlcNAc][Fuc α1-2Galβ1-4(Fuc α1-3)GlcNAc][VI]를 포함하는 바이안테나리 Le^B/Le^Y 항원, 및

[0274] $Fuc_2(Gal\beta1-4GlcNAc)[Fuc_2(Gal\beta1-3GlcNAc)]$[VII] 또는 [Fuc α1-2Galβ1-4(Fuc α1-3)GlcNAc][Fuc α1-2Galβ1-3(Fuc α1-4)GlcNAc][VIII]를 포함하는 바이안테나리 Le^Y/Le^B 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 생성하는 방법이 제공되고,

[0275] 여기서, 상기 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 Galβ1→4(Fuc α1→3)GlcNAc[IX]를 포함하는 모노안테나리 Le^X 항원, 또는 [Galβ1→4(Fuc α1→3)GlcNAc]$_2$[X]를 포함하는 바이안테나리 Le^X 항원, 또는 Galβ1-3(Fuc α1-4)GlcNAc[XI]를 포함하는 모노안테나리 Le^A 항원, 또는 Fuc α1-2Galβ1-4GlcNAc[XII]를 포함하는 모노안테나리 H 항원 타입 2, 또는 (Fuc α1-2Galβ1-4GlcNAc)$_2$[XIII]를 포함하는 바이안테나리 H 항원 타입 2 또는 Fuc α1-2Galβ1-3GlcNAc[XIV]를 포함하는 모노안테나리 H 항원 타입 1에 특이적으로 결합하지 않고,

[0276] 상기 방법은 본 발명의 숙주 세포를 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드의 숙주 세포에 의해 발현시키기 위한 조건하 및 충분한 시간 동안 배양하여 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 배양물을 수득하는 단계; 및 상기 배양물로부터 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 회수하는 단계를 포함한다.

[0277] 질환을 검출하고 치료하기 위한 방법 및 용도

[0278] 특정 구현예에서, 현재 개시된 항체, 이의 항원-결합 단편, 및 항체 접합체는 본원에 기재된 루이스 항원의 발현(예: 과발현)에 의해 특성화되는 질환을 검출하거나 치료하는 방법에 유용하다.

[0279] 의료 분야의 숙련가에 의해 이해되는 바와 같이, 용어 "치료하다" 및 "치료"는 대상체(즉, 인간 또는 비인간 동물일 수 있는 환자, 숙주)(참조: 예를 들어, Stedman's Medical Dictionary)의 질환, 장애 또는 상태의 의학적 관리를 지칭한다. 일반적으로, 적절한 용량 및 치료 섭생은 하나 이상의 항체, 이의 항원-결합 단편, 또는 항체 접합체를 치료적 또는 예방적 이점을 제공하기에 충분한 양으로 제공한다. 치료적 치료 또는 예방적 또는 예방적 방법에 기인하는 치료적 또는 예방적 이점은, 예를 들어, 개선된 임상 결과를 포함하며, 여기서 상기 목적은 바람직하지 않은 생리학적 변화 또는 장애를 예방 또는 지연 또는 달리 감소(예를 들어, 미처리된 대조군에 비해 통계학적으로 유의한 방식으로 감소)시키거나, 이러한 질환 또는 장애의 팽창 또는 중증도를 예방, 지연 또는 그렇지 않으면 감소시키는 것이다. 대상체를 치료함으로써 생성되는 이로운 또는 바람직한 임상 결과는 치료될 질환 또는 장애로 인한 또는 그와 관련된 증상의 경감, 감소, 또는 완화; 증상 발생의 감소; 삶의 질의 향상; 더 긴 질환 부재 상태(즉, 대상체가 질환 진단이 이루어지는 것에 기초하여 증상을 나타낼 가능성 또는 성향을 감소시키는 것); 질환의 정도 감소; 안정화된(즉, 악화되지 않은) 질환 상태; 질환 진행의 지연 또는 늦춤; 질환 상태의 개선 또는 완화; 및 관해 (부분적이든 전체적이든), 검출가능하든 검출가능하지 않든; 또는 전반적인 생존을 포함한다.

[0280] "치료"는 또한 대상체가 치료를 받지 않은 경우 예상 생존과 비교할 때 생존 연장을 의미할 수 있다. 본원에 기재된 방법 및 조성물을 필요로 하는 대상체는 이미 질환 또는 장애를 갖는 대상체뿐만 아니라 질환 또는 장애가 발병하기 쉽거나 발병할 위험이 있는 대상체를 포함한다. 질환 또는 장애의 발생 또는 재발 가능성을 감소시키기 위한 치료를 필요로 하거나, 예방적 치료를 필요로 하는 대상체는 질환, 상태 또는 장애가 중증도가 감소되거나 부분적으로 또는 완전히 회피되거나 불완전하게 또는 완전히 예방될(예를 들어, 절대적인 예방을 포함

할 수 있지만 반드시 필요로 하지는 않는 질환 또는 장애의 발생 또는 재발 가능성을 감소시키는) 대상체를 포함할 수 있다. 본원에 기재된 조성물 (및 조성물을 포함하는 제제) 및 방법에 의해 제공되는 임상적 이점은, 실시예에 기재된 바와 같이, 조성물의 투여가 이로운 것으로 의도되는 대상체에서 시험관내 검정, 전임상 연구, 및 임상 연구의 설계 및 실행에 의해 평가될 수 있다.

[0281] 예를 들어, 특정 구현예에서, 암(즉, 본원에 기재된 바와 같은 루이스 항원을 발현하는 암)을 치료 또는 검출하기 위한 방법이 제공되며, 여기서 상기 방법은 본 발명의 약제학적 조성물을 이를 필요로 하는 대상체에 투여하는 단계를 포함한다. 본원에 사용된 바와 같이, "암"은 병든 세포의 비정상적 또는 제어되지 않은 증식(예: 과증식)을 특징으로 하는 상태를 지칭하며, 이는 제1 조직 또는 부위로부터 신체 내의 인접한 또는 먼 조직 또는 조직들 또는 부위들로의 악성 확산을 특징으로 할 수 있다.

[0282] 본 발명의 방법의 특정 구현예에서, 대상체는 위암, 결장암, 유방암, 폐암, 림프암, 간암, 난소암, 췌장 전립선암, 자궁암 및 편평 세포 암종으로부터 선택된 암을 갖거나 암을 갖는 것으로 의심된다. 추가의 구현예에서, 암은 위 선암종, 점액성 위 선암종, 미분화 위 선암종, 인환 세포 위 암종, 결장 선암종, 침습성 유방 관암종, 간세포 암종, 폐 선암종, 편평 세포 암종, 전이성 림프절 선암종, 점액성 난소 선암종, 췌장 관 선암종, 췌장 유두 선암종, 전립선 선암종, 및 자궁내막 암종으로부터 선택된다. 본원에 기재된 항체, 항원 결합 단편, 또는 항체 접합체의 순수한 형태 또는 적합한 약제학적 조성물로의 투여는 유사한 효용을 제공하기 위한 제제의 임의의 허용되는 투여 방식을 통해 수행될 수 있다. 약제학적 조성물은 항체, 항원 결합 단편 또는 항체 접합체를 적합한 생리학적으로 허용되는 담체, 희석제 또는 부형제와 조합함으로써 제조될 수 있고, 고체, 반고체, 액체 또는 미세입자-(예: 미세방울) 함유 기체 형태의 제제, 예를 들어, 정제, 캡슐, 분말, 과립, 연고, 용액, 좌제, 주사제, 흡입제, 겔, 미소구 및 에어로졸로 제형화될 수 있다. 또한, 다른 약제학적 활성 성분(본원의 다른 곳에 기재된 바와 같은 다른 면역억제제를 포함함) 및/또는 적합한 부형제, 예를 들어, 염, 완충액 및 안정화제가 조성물 내에 존재할 수 있지만, 반드시 존재할 필요는 없다.

[0283] 치료의 정확한 투여량 및 지속기간은 치료될 상태 또는 질환의 함수일 수 있고, 공지된 시험 프로토콜을 사용하여 또는 당업계에 공지된 모델 시스템에서 조성물을 시험하고 이로부터 추론함으로써 경험적으로 결정될 수 있다. 제어된 임상 시험이 또한 수행될 수 있다. 투여량은 또한 완화될 상태의 심각성에 따라 변할 수 있다. 약제학적 조성물은 일반적으로 바람직하지 않은 부작용을 최소화하면서 치료적으로 유용한 효과를 발휘하도록 제형화되고 투여된다. 조성물은 1회 투여될 수 있거나, 또는 일정 시간 간격으로 투여되는 다수의 더 작은 용량으로 분할될 수 있다. 임의의 특정 대상체에 대해, 특정 투여 섭생은 개별적인 필요에 따라 경시적으로 조정될 수 있다.

[0284] 조성물의 "유효량"은, 본원에 기재된 바와 같이, 투여량에서 및 필요한 기간 동안, 목적하는 임상 결과 또는 유익한 치료를 달성하기에 충분한 양을 지칭한다. 유효량은 하나 이상의 투여로 전달될 수 있다. 질환 또는 질환-상태를 갖는 것으로 이미 공지되거나 확인된 대상체에게 투여된다면, 용어 "치료적 양"은 치료와 관련하여 사용될 수 있는 반면, "예방적 유효량"은 질환 또는 질환-상태의 발병 가능성 및/또는 중증도를 감소시키는(예: 미처리된 상태에 비해 통계적으로 유의한 방식으로) 유리하고/하거나 보호 과정으로서 질환 또는 질환 상태(예: 재발)에 민감하거나 발병할 위험이 있는 대상체에게 유효량의 투여를 설명하기 위해 사용될 수 있다.

[0285] 다양한 구현예에서, 본 발명의 항체 접합체는 본원에 기재된 바와 같은 검출가능한 페이로드를 포함하며, 생체내, 시험관내 또는 생체외에서 암과 같은 질환을 검출하는데 사용될 수 있다. 특정의 이들 및 다른 구현예에서, 본원에 기재된 항체(즉, 하나 이상의 항체) 또는 이의 항원-결합 단편은 직접적으로 또는 간접적으로 검출될 수 있는 검출가능한 표지에 접합된다(예를 들어, 공유적으로). 본 발명에서, 임의의 개시된 모노클로날 항체, 이의 항원-결합 단편, 및 항체 접합체는 검출가능한 표지(예: 항체 접합체의 검출가능한 또는 치료적 페이로드 분자 이외에)에 연결될 수 있다. "직접 검출"에서, 단지 하나의 검출가능한 항체, 즉 1차 검출가능한 항체가 사용된다. 따라서, 직접 검출은 검출가능한 표지에 접합된 항체가 제2 항체(2차 항체)를 첨가할 필요 없이, 그 자체로 검출될 수 있음을 의미한다.

[0286] "검출가능한 표지"는 샘플 내의 표지의 존재 및/또는 농도를 나타내는 검출가능한(예를 들어, 시각적으로, 전자적으로 또는 달리) 신호를 생성할 수 있는 분자 또는 물질이다. 펩티드에 접합될 때, 검출가능한 표지는 특정 펩티드가 결합되는 표적을 위치시키고/시키거나 정량하는데 사용될 수 있다. 이에 의해, 샘플 중 표적의 존재 및/또는 농도는 검출가능한 표지에 의해 생성된 신호를 검출함으로써 검출될 수 있다. 검출가능한 표지는 직접적으로 또는 간접적으로 검출될 수 있고, 상이한 특이적-항체에 접합된 몇몇 상이한 검출가능한 표지는 하나 이상의 표적을 검출하기 위해 조합하여 사용될 수 있다.

[0287] 직접 검출될 수 있는 검출가능한 표지의 예는 형광 염료 및 방사성 물질 및 금속 입자를 포함한다. 대조적으로, 간접 검출은 1차 항체의 적용 후 하나 이상의 추가의 항체, 즉 2차 항체의 적용을 필요로 한다. 따라서, 검출은 1차 검출가능한 항체에 대한 2차 항체 또는 결합제의 결합의 검출로 수행된다. 2차 결합제 또는 항체의 첨가를 필요로 하는 1차 검출가능한 결합제 또는 항체의 예는 효소 검출가능한 결합제 및 합텐 검출가능한 결합제 또는 항체를 포함한다.

[0288] 일부 구현예에서, 검출가능한 표지는 (예를 들어, ISH, WISH 또는 FISH 공정에서) 제1 결합제를 포함하는 핵산 중합체에 접합된다. 다른 구현예에서, 검출가능한 표지는 (예를 들어, IHC 공정에서) 제1 결합제를 포함하는 항체에 접합된다.

[0289] 본 발명의 방법에 사용되는 항체, 항원-결합 단편, 및 항체 접합체에 접합될 수 있는 검출가능한 표지의 예는 형광 표지, 효소 표지, 방사성 동위원소, 화학발광 표지, 전기화학발광 표지, 생물발광 표지, 중합체, 중합체 입자, 금속 입자, 합텐 및 염료를 포함한다.

[0290] 형광 표지의 예는 5- (및 6)-카복시플루오레세인, 5- 또는 6-카복시플루오레세인, 6-(플루오레세인)-5- (및 6)-카복스아미도 헥산산, 플루오레세인 이소티오시아네이트, 로다민, 테트라메틸로다민, 및 염료, 예를 들어, Cy2, Cy3 및 Cy5, AMCA를 포함하는 임의로 치환된 쿠마린, PerCP, R-피코에리트린(RPE) 및 알로피코에리트린(APC)을 포함하는 피코빌리단백질, 텍사스 레드(Texas Red), 프린스턴 레드(Princeton Red), 그린 형광 단백질(GFP) 및 이의 유사체, 및 R-피코에리트린 또는 알로피코에리트린의 접합체, 무기 형광 표지, 예를 들어, 코팅된 CdSe 나노결정과 같은 반도체 물질에 기초한 입자를 포함한다.

[0291] 중합체 입자 표지의 예는 형광 염료로 매립될 수 있는 폴리스티렌, PMMA 또는 실리카의 미세입자 또는 라텍스 입자, 또는 염료, 효소 또는 기질을 함유하는 중합체 미셀 또는 캡슐을 포함한다.

[0292] 금속 입자 라벨의 예는 금 입자 및 코팅된 금 입자를 포함하며, 이는 은 얼룩에 의해 전환될 수 있다. 합텐의 예는 DNP, 플루오레세인 이소티오시아네이트(FITC), 비오틴 및 디곡시게닌을 포함한다. 효소 라벨의 예는 서양고추냉이 퍼옥시다제(HRP), 알칼리성 포스파타제(ALP 또는 AP), β-갈락토시다제(GAL), 글루코스-6-포스페이트 데하이드로게나제, β-N-아세틸글루코사미미다제, β-글루쿠로니다제, 인버타제, 크산틴 옥시다제, 반딧불이 루시페라제 및 글루코스 옥시다제(GO)를 포함한다.

[0293] 서양고추냉이 퍼옥시다제에 일반적으로 사용되는 기질의 예는 3,3'-디아미노벤지딘(DAB), 니켈 강화된 디아미노벤지딘, 3-아미노-9-에틸카바졸(AEC), 벤지딘 디히드로클로라이드(BDHC), 한커-예이츠 시약(Hanker-Yates reagent; HYR), 인도판 블루(IB), 테트라메틸벤지딘(TMB), 4-클로로-1-나프톨(CN), .알파.-나프톨 피로닌(.알파.-NP), o-디아니시딘(OD), 5-브로모-4-클로로-3-인돌릴포스페이트(BCIP), 니트로 블루 테트라졸륨(NBT), 2-(p-요오도페닐)-3-p-니트로페닐-5-페닐 테트라졸륨 클로라이드(INT), 테트라니트로 블루 테트라졸륨(TNBT), 5-브로모-4-클로로-3-인돌릴-β-D-갈락토사이드/페로-페리시아나이드(BCIG/FF)를 포함한다.

[0294] 알칼리성 포스파타제를 위한 통상적으로 사용되는 기질의 예는 나프톨-AS-B 1-포스페이트/패스트 레드 TR(NABP/FR), 나프톨-AS-MX-포스페이트/패스트 레드 TR(NAMP/FR), 나프톨-AS-B1-포스페이트/-패스트 레드 TR(NABP/FR), 나프톨-AS-MX-포스페이트/패스트 레드 TR(NAMP/FR), 나프톨-AS-B1-포스페이트/새로운 푸쉰(NABP/NF), 브로모클로로인돌릴 포스페이트/니트로블루 테트라졸륨(BCIP/NBT), 5-브로모-4-클로로-3-인돌릴-b-d-갈락토피라노시드(BCIG)를 포함한다.

[0295] 발광 표지의 예는 루미놀, 이소루미놀, 아크리디늄 에스테르, 1,2-디옥세탄 및 피리도피리다진을 포함한다. 전기화학발광 표지의 예는 루테늄 유도체를 포함한다. 방사성 표지의 예는 요오디드, 코발트, 셀레늄, 삼중수소, 탄소, 황 및 인의 방사성 동위원소를 포함한다.

[0296] 검출가능한 표지는 본원에 기재된 항체, 항원-결합 단편, 및 항체 접합체 또는 관심있는 생물학적 마커, 예를 들어, 항체, 핵산 프로브, 또는 중합체에 특이적으로 결합하는 임의의 다른 분자에 연결될 수 있다. 또한, 당업자는 검출가능한 표지가 또한 제2, 및/또는 제3 및/또는 제4, 및/또는 제5 결합제 또는 항체 등에 접합될 수 있음을 이해할 것이다. 또한, 당업자는 관심있는 생물학적 마커를 특성화하는데 사용되는 각각의 추가의 결합제 또는 항체가 신호 증폭 단계로서 작용할 수 있다는 것을 이해할 것이다. 생물학적 마커는, 예를 들어, 광현미경, 형광 현미경, 전자 현미경을 사용하여 시각적으로 검출될 수 있고, 여기서 검출 가능한 물질은, 예를 들어, 염료, 콜로이드성 금 입자, 발광 시약이다. 생물학적 마커에 결합된 시각적으로 검출가능한 물질은 또한 분광광도계를 사용하여 검출될 수 있다. 검출가능한 물질이 방사성 동위원소인 경우, 검출은 자동 방사선 촬영에 의해 가시적일 수 있거나 섬광 계수기를 사용하여 비가시적일 수 있다. 예를 들어, 문헌[Larsson, 1988,

Immunocytochemistry: Theory and Practice, (CRC Press, Boca Raton, Fla.); Methods in Molecular Biology, vol. 80 1998, John D. Pound (ed.) (Humana Press, Totowa, N.J.)]을 참조한다.

[0297] 특정 구현예에서, 본 발명의 항체, 항원-결합 단편, 또는 항체 접합체는 본원에 기재된 바와 같은 루이스 항원의 발현과 관련된 질환을 검출 또는 진단하는 방법에 사용되며, 상기 방법은 상기 항체, 항원-결합 단편, 또는 항체 접합체를, 상기 질환을 갖는 것으로 의심되거나 가질 위험이 있는 대상체로부터의 샘플과 접촉시키는 단계 및 항체:항원 복합체의 형성을 검출하는 단계 및/또는 상기 샘플에서 항체, 항원-결합 단편, 또는 항체 접합체의 특이적 결합을 검출하는 단계를 포함한다. 특정 구현예에서, 샘플은 혈액(예: 말초 혈액), 조직, 종양, 또는 이들의 임의의 조합을 포함한다. 특정 구현예에서, 진단 또는 검출 방법은 생체외 또는 시험관내에서 수행된다.

[0298] 검출가능한 페이로드 또는 검출가능한 표지를 갖는 항체 접합체의 생체내 검출 방법은 모두 참고로 인용된 문헌[Friese and Wu, Mol. Immunol. 67(200):142-152 (2015) and Moek *et al.*, J. Nucl. Med. 58:83S-90S (2017)]에 개시된 것들을 포함한다. 특정 구현예에서, 항체, 항원-결합 단편, 또는 항체 접합체를 검출하는 단계는 양전자 방출 단층촬영(PET), 자기 공명 이미징(MRI), 근적외선 이미징(NRI), x-선 컴퓨터 단층촬영(CT), 단일 광자 방출 컴퓨터 단층촬영(SPECT), 광학 이미징, 초음파 검사, 또는 이들의 임의의 조합을 수행하는 단계를 포함한다.

[0299] 바람직한 투여 방식은 특정 구현예에서 유해한 또는 임상적으로 바람직하지 않은 상태를 지칭하는 치료될 상태의 성질에 따라 좌우되며, 이의 정도, 심각성, 발생 가능성 및/또는 지속 기간은 본원에 제공된 특정 방법에 따라 감소될 수 있다(예를 들어, 미처리 대조군과 같은 적절한 제어 상황에 비해 통계적으로 유의한 방식으로 감소될 수 있다). 투여 후, 종양 부담의 부분적 또는 완전한 감소 또는 전이성 확산의 부분적 또는 완전한 감소와 같은 이러한 상태를 검출가능하게 감소시키거나, 억제하거나, 적어도 부분적으로 예방하거나 중증도 또는 발생 가능성을 감소시키거나, 지연시키는 양이 효과적인 것으로 간주된다. 당업자는 본원에 기재된 조성물의 투여의 임상적 적절성을 나타내거나 이에 적용될 수 있는 임의의 수의 진단, 수술 및 기타 임상적 기준에 친숙할 것이다. 예를 들어, 문헌[Hanahan and Weinberg, 2011 *Cell* 144:646; Hanahan and Weinberg 2000 *Cell* 100:57; Cavallo et al., 2011 *Canc. Immunol. Immunother*. 60:319; Kyrigideis et al., 2010 *J. Carcinog*. 9:3; Park et al. 2009 *Molec. Therap.* 17:219; Cheever et al., 2009 *Clin Cancer Res* 15 (17):5323- 5337; Lu et al., 2013 *Curr. Pharm. Biotechnol.* 14:714-22; Layke et al., 2004 *Am. Fam. Physician* 69:1133049; Bunn, 2012 *Arch. Pathol. Lab. Med.* 136:1478-81; Manne et al., 2005 *Drug Discov. Today* 10:965; Schmoll et al. (Eds.), 2009 *ESMO Handbook of Cancer Diagnosis and Treatment Evaluation*, CRC Press, Boca Raton, FL; Faix, 2013 *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 50(1):23-36 ("Biomarkers of Sepsis"); Wiersinga et al., 2014 *Virulence* 5(1):36-44 ("Host innate immune responses to sepsis"); Hotchkiss et al., 2013 *Nat. Rev. Immunol.* 13:862; Aziz et al., 2013 *J. Leukoc. Biol.* 93(3):329; Beyrau et al., 2012 *Open Biol.* 2:120134; Fry, 2012 *Amer. Surg*. 78:1; Kellum et al., 2007 *Arch. Intern. Med.* 167(15):1655; Remick, 2007 *Am. J. Pathol.* 170(5):1435; Hotchkiss et al., 2003 *New Engl. J. Med.* 348:138-150; Humar et al., Atlas of Organ Transplantation, 2006, Springer; Kuo et al., Comprehensive Atlas of Transplantation, 2004 Lippincott, Williams & Wilkins; Gruessner et al., Living Donor Organ Transplantation, 2007 McGraw-Hill Professional; Antin et al., Manual of Stem Cell and Bone Marrow Transplantation, 2009 Cambridge University Press; Wingard et al. (Ed.), Hematopoietic Stem Cell Transplantation: A Handbook for Clinicians, 2009 American Association of Blood Banks; 및 그 안에 인용된 참조문헌]을 참조한다.

[0300] 따라서, 이들 및 관련 약제학적 조성물을 투여하는 전형적인 경로는, 제한 없이, 경구, 국소, 경피, 흡입, 비경구, 설하, 협측, 직장, 질 및 비강내를 포함한다. 본원에서 사용되는 용어 비경구는 피하 주사, 정맥내, 근육내, 흉골내 주사 또는 주입 기술을 포함한다. 본 발명의 특정 구현예에 따르는 약제학적 조성물은 환자에게 조성물을 투여시 그 안에 함유된 활성 성분이 생체이용할 수 있도록 제형화된다. 대상체 또는 환자에게 투여되는 조성물은 하나 이상의 투여 단위의 형태를 취할 수 있으며, 여기서, 예를 들어, 정제는 단일 투여 단위일 수 있고, 본원에 기재된 항체, 이의 항원-결합 단편 또는 에어로졸 형태의 항체 접합체의 용기는 복수의 투여 단위를 보유할 수 있다. 이러한 투여 형태를 제조하는 실제 방법은 당업자에게 공지되어 있거나, 명백할 것이고; 예를 들어, 문헌[*Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, 20th Edition (Philadelphia College of Pharmacy and Science, 2000]을 참조한다. 투여될 조성물은, 임의의 경우에, 본원의 교시에 따라 관심 있는 질환 또는 상태의 치료를 위해, 본 발명의 항체, 이의 항원-결합 단편, 또는 항체 접합체의 치료적 유효량을 함유할 것이다. 특정 구현예에서, 투여는 정맥내, 비경구, 위내, 흉막내, 폐내, 직장내, 피내, 복강내, 종양내, 피

하, 경구, 국소, 경피, 낭내, 척수강내, 비강내 및 근육내로부터 선택된 경로로 투여함을 포함한다.

[0301] 약제학적 조성물은 고체 또는 액체 형태일 수 있다. 하나의 구현예에서, 담체(들)는 미립자여서 조성물은, 예를 들어, 정제 또는 분말 형태이다. 담체(들)는 액체일 수 있으며, 조성물은, 예를 들어, 경구 오일, 주사가능한 액체 또는 에어로졸이며, 이는, 예를 들어, 흡입 투여에 유용하다. 경구 투여용으로 의도된 경우, 약제학적 조성물은 바람직하게는 고체 또는 액체 형태이고, 여기서 반-고체, 반-액체, 현탁액 및 겔 형태는 고체 또는 액체로서 본원에서 고려되는 형태 내에 포함된다

[0302] 경구 투여용 고체 조성물로서, 약제학적 조성물은 분말, 과립, 압축 정제, 환제, 캡슐, 츄잉검, 웨이퍼 등으로 제형화될 수 있다. 이러한 고체 조성물은 전형적으로 하나 이상의 불활성 희석제 또는 식용 담체를 함유할 것이다. 또한, 다음 중 하나 이상이 존재할 수 있다: 결합제, 예를 들어, 카복시메틸셀룰로스, 에틸 셀룰로스, 미세결정성 셀룰로스, 검 트라가칸트 또는 젤라틴; 부형제, 예를 들어, 전분, 락토스 또는 덱스트린, 붕해제, 예를 들어, 알긴산, 나트륨 알기네이트, 프리모겔, 옥수수 전분 등; 윤활제, 예를 들어, 마그네슘 스테아레이트 또는 스테로텍스; 활탁제, 예를 들어, 콜로이드성 이산화규소; 감미제, 예를 들어, 수크로스 또는 사카린; 향미제, 예를 들어, 페퍼민트, 메틸 살리실레이트 또는 오렌지 향미제; 및 착색제. 약제학적 조성물이 캡슐, 예를 들어, 젤라틴 캡슐의 형태일 때, 그것은 상기 유형의 물질 이외에, 폴리에틸렌 글리콜 또는 오일과 같은 액체 담체를 함유할 수 있다.

[0303] 약제학적 조성물은 액체, 예를 들어, 엘릭시르, 시럽, 용액, 에멀젼 또는 현탁액의 형태일 수 있다. 액체는 2가지 예로서 경구 투여용 또는 주사에 의한 전달용일 수 있다. 경구 투여용으로 의도된 경우, 바람직한 조성물은 본 화합물 이외에, 하나 이상의 감미제, 방부제, 염료/착색제 및 향미 증진제을 함유한다. 주사로 투여되도록 의도된 조성물에 하나 이상의 계면활성제, 방부제, 습윤제, 분산제, 현탁화제, 완충액, 안정화제 및 등장화제가 포함될 수 있다.

[0304] 액체 약제학적 조성물은, 용액, 현탁액 또는 기타 유사 형태이든지 간에, 하나 이상의 다음 보조제를 포함할 수 있다: 멸균 희석제, 예를 들어, 주사용수, 식염수, 바람직하게는 생리 식염수, 링거 용액, 등장성 염화나트륨, 불휘발성 오일, 예를 들어, 용매 또는 현탁 매질, 폴리에틸렌 글리콜, 글리세린, 프로필렌 글리콜 또는 기타 용매로서 역할을 할 수 있는 합성 모노 또는 디글리세라이드; 항균제, 예를 들어, 벤질 알콜 또는 메틸 파라벤; 산화방지제, 예를 들어, 아스코르브산 또는 중아황산나트륨; 킬레이트제, 예를 들어, 에틸렌디아민테트라아세트산; 완충액, 예를 들어, 아세테이트, 시트레이트 또는 포스페이트 및 긴장성 조절 제제, 예를 들어, 염화나트륨 또는 덱스트로스. 비경구 제제는 앰플, 일회용 주사기 또는 유리 또는 플라스틱으로 제조된 다중 용량 바이알에 포함될 수 있다. 생리 식염수가 바람직한 보조제이다. 주사가능한 약제학적 조성물은 바람직하게는 멸균성이다.

[0305] 비경구 또는 경구 투여용으로 의도된 액체 약제학적 조성물은 적합한 투여량이 수득될 수 있도록 본원에 개시된 바와 같은 항체, 이의 항원-결합 단편, 또는 항체 접합체의 양을 함유해야 한다. 전형적으로, 이 양은 조성물 중 항체 또는 항원-결합 단편의 적어도 0.01%이다. 경구 투여용으로 의도된 경우, 이 양은 조성물의 0.1 내지 약 70중량%가 되도록 변화될 수 있다. 특정의 경구 약제학적 조성물은 약 4% 내지 약 75%의 항체, 이의 항원-결합 단편, 또는 항체 접합체를 함유한다. 특정 구현예에서, 본 발명에 따르는 약제학적 조성물 및 제제는 비경구 투여 단위가 희석 전에 항체, 이의 항원 결합 단편, 또는 항체 접합체를 0.01 내지 10중량% 함유하도록 제조된다.

[0306] 약제학적 조성물은 국소 투여용으로 의도될 수 있으며, 이 경우 담체는 적합하게는 용액, 에멀젼, 연고 또는 겔 기제를 포함할 수 있다. 기제는, 예를 들어, 다음 중 하나 이상을 포함할 수 있다: 바셀린, 라놀린, 폴리에틸렌 글리콜, 밀랍 왁스, 광유, 희석제, 예를 들어, 물 및 알콜, 및 유화제 및 안정화제. 증점제는 국소 투여용 약제학적 조성물에 존재할 수 있다. 경피 투여용으로 의도된 경우, 조성물은 경피 패치 또는 이온토포레시스 장치를 포함할 수 있다. 약제학적 조성물은 직장 투여용으로, 예를 들어, 직장 내에서 용융되어 약물을 방출하는 좌제의 형태로 의도될 수 있다. 직장 투여용 조성물은 적합한 비자극성 부형제로서 유성 기제를 함유할 수 있다. 이러한 기제는 제한 없이 라놀린, 코코아 버터 및 폴리에틸렌 글리콜을 포함한다.

[0307] 약제학적 조성물은 고체 또는 액체 투여 단위의 물리적 형태를 변형시키는 다양한 물질을 포함할 수 있다. 예를 들어, 조성물은 활성 성분 주위에 코팅 쉘을 형성하는 물질을 포함할 수 있다. 코팅 쉘을 형성하는 물질은 전형적으로 불활성이며, 예를 들어, 당, 쉘락 및 다른 장용 코팅제로부터 선택될 수 있다. 대안적으로, 활성 성분은 젤라틴 캡슐에 매입될 수 있다. 고체 또는 액체 형태의 약제학적 조성물은 본 발명의 항체, 이의 항원-결합 단편, 또는 항체 접합체에 결합하는 제제를 포함할 수 있고, 이로써 화합물의 전달을 돕는다. 이러한 능

력으로 작용할 수 있는 적합한 제제는 모노클로날 또는 폴리클로날 항체, 하나 이상의 단백질 또는 리포좀을 포함한다. 약제학적 조성물은 에어로졸로서 투여될 수 있는 투여 단위로 본질적으로 구성될 수 있다. 용어 에어로졸은 콜로이드 성질의 것들로부터 가압 패키지로 구성된 시스템에 이르는 다양한 시스템을 나타내기 위해 사용된다. 전달은 액화 또는 압축 가스에 의해 또는 활성 성분을 분배하는 적절한 펌프 시스템에 의해 이루어질 수 있다. 에어로졸은 활성 성분(들)을 전달하기 위해 단일 상, 2상 또는 3상 시스템으로 전달될 수 있다. 에어로졸의 전달은 함께 키트를 형성할 수 있는 필요한 용기, 활성화제, 밸브, 하위용기 등을 포함한다. 당업자는 과도한 실험없이 바람직한 에어로졸을 결정할 수 있다.

[0308] 약제학적 조성물은 제약 분야에 익히 공지된 방법론에 의해 제조될 수 있다. 예를 들어, 주사에 의해 투여되도록 의도된 약제학적 조성물은 본원에 기재된 바와 같은 항체, 이의 항원-결합 단편, 또는 항체 접합체, 및 임의로, 하나 이상의 염, 완충액 및/또는 안정화제를 포함하는 조성물을 멸균성 증류수와 조합하여 용액을 형성함으로써 제조될 수 있다. 균질한 용액 또는 현탁액의 형성을 용이하게 하기 위해 계면활성제를 첨가할 수 있다. 계면활성제는 펩티드 조성물과 비공유적으로 상호작용하여 수성 전달 시스템에서 항체, 이의 항원-결합 단편, 또는 항체 접합체의 용해 또는 균질한 현탁을 용이하게 하는 화합물이다.

[0309] 상기 조성물은 사용되는 특정 화합물의 활성; 화합물의 대사 안정성 및 작용 길이; 환자의 연령, 체중, 일반적인 건강, 성별 및 식이; 투여 방식 및 시간; 배설 속도; 약물 조합; 특정 장애 또는 상태의 중증도; 및 요법을 받고 있는 대상체를 포함하는 다양한 인자에 따라 변하는 치료적 유효량으로 투여된다. 일반적으로, 치료적으로 유효한 1일 투여량은 (70kg 포유동물의 경우) 약 0.001mg/kg(즉, 0.07mg) 내지 약 100mg/kg(즉, 7.0g)이고; 바람직하게는 치료적 유효량은 (70kg 포유동물의 경우) 약 0.01mg/kg(즉, 0.7mg) 내지 약 50mg/kg(즉, 3.5g)이고; 더욱 바람직하게는 치료적 유효량은 (70kg 포유동물의 경우) 약 1mg/kg(즉, 70mg) 내지 약 25mg/kg(즉, 1.75g)이다.

[0310] 본 발명의 항체, 이의 항원-결합 단편, 또는 항체 접합체를 포함하는 조성물은 또한 하나 이상의 다른 치료제의 투여와 동시에, 투여 전에 또는 후에 투여될 수 있다. 이러한 병용 요법은 본 발명의 화합물 및 하나 이상의 추가의 활성제를 함유하는 단일 약제학적 투여 제형의 투여뿐만 아니라 본 발명의 항체, 이의 항원-결합 단편, 또는 항체 접합체 및 그 자체의 별개의 약제학적 투여 제형으로 각각의 활성제를 포함하는 조성물의 투여를 포함할 수 있다. 예를 들어, 본원에 기재된 바와 같은 항체, 이의 항원-결합 단편, 또는 항체 접합체 및 다른 활성제는 정제 또는 캡슐과 같은 단일 경구 투여 조성물로 환자에게 함께 투여될 수 있거나, 각각의 제제는 별도의 경구 투여 제형으로 투여될 수 있다. 유사하게, 본원에 기재된 바와 같은 항체, 이의 항원-결합 단편, 또는 항체 결합체 및 다른 활성제는 식염수 또는 다른 생리학적으로 허용되는 용액과 같은 단일 비경구 투여 조성물로 함께 환자에게 투여될 수 있거나, 각각의 제제는 별도의 비경구 투여 제형으로 투여될 수 있다. 별도의 투여 제형이 사용되는 경우, 항체 및 하나 이상의 추가의 활성제를 포함하는 조성물은 본질적으로 동일한 시간에, 즉 동시에, 또는 개별적으로 시차를 두고, 즉 순차적으로 및 임의의 순서로 투여될 수 있고; 병용 요법은 이들 모든 섭생을 포함하는 것으로 이해된다.

[0311] 따라서, 특정 구현예에서, 또한 하나 이상의 다른 치료제와 조합된 본 발명의 항체, 이의 항원-결합 단편, 또는 항체 접합체의 투여가 고려된다. 이러한 치료제는 암과 같은 본원에 기재된 바와 같은 특정 질환의 표준 치료로서 당업계에서 허용될 수 있다. 고려되는 예시적인 치료제는 사이토카인, 성장 인자, 스테로이드, NSAID, DMARD, 소염제, 화학요법제, 면역 체크포인트 억제제, 간섭성 RNA, 자극성 면역 체크포인트 분자의 작용제, 암을 표적으로 하는 다른 항체, 항원-결합 단편, 또는 항체 접합체, 또는 다른 활성 및 보조제를 포함한다.

[0312] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "면역 억제제" 또는 "면역억제제"는 면역 반응을 조절하거나 억제하는 것을 돕는 억제 신호를 제공하는 하나 이상의 세포, 단백질, 분자, 화합물 또는 복합체를 지칭한다. 예를 들어, 면역억제제는 면역 자극을 부분적으로 또는 전체적으로 차단하고; 면역 활성화를 감소, 예방 또는 지연시키거나; 면역 억제를 증가, 활성화 또는 상향 조절하는 분자를 포함한다. (예를 들어, 면역 체크포인트 억제제를 사용하여) 표적화하는 예시적인 면역억제제는 PD-1, PD-L1, PD-L2, LAG3, CTLA4, B7-H3, B7-H4, CD244/2B4, HVEM, BTLA, CD160, TIM3, GAL9, KIR, PVR1G(CD112R), PVRL2, 아데노신, A2aR, 면역억제성 사이토카인(예: IL-10, IL-4, IL-1RA, IL-35), IDO, 아르기나아제, VISTA, TIGIT, LAIR1, CEACAM-1, CEACAM-3, CEACAM-5, Treg 세포, 또는 이들의 임의의 조합을 포함한다.

[0313] 면역 억제제 억제제(또한, 면역 체크포인트 억제제로서 지칭됨)는 화합물, 항체, 항체 단편 또는 융합 폴리펩티드(예: Fc 융합, 예를 들어, CTLA4-Fc 또는 LAG3-Fc), 안티센스 분자, 리보자임 또는 RNAi 분자, 또는 저분자량 유기 분자일 수 있다. 본원에 개시된 임의의 구현예에서, 방법은 본 발명의 항체, 항원-결합 단편, 또는 항체

접합체를 단독으로 또는 임의의 조합으로 하기 면역 억제 성분 중 어느 하나의 하나 이상의 억제제와 함께 투여하는 단계를 포함할 수 있다.

[0314] 특정 구현예에서, 본 발명의 항체, 항원-결합 단편, 또는 항체 접합체는 PD-1 억제제, 예를 들어, PD-1-특이적 항체, 예를 들어, 피딜리주맙, 니볼루맙, 펨브롤리주맙, MEDI0680(이전에 AMP-514), AMP-224, BMS-936558, 또는 이의 항원-결합 단편, 또는 이들의 임의의 조합과 결합하여 사용된다. 추가의 구현예에서, 본 발명의 항체, 항원-결합 단편, 또는 항체 접합체는 PD-L1 특이적 항체, 예를 들어, BMS-936559, 두르발루맙(MEDI4736), 아테졸리주맙(RG7446), 아벨루맙(MSB0010718C), MPDL3280A, 또는 이들의 항원-결합 단편, 또는 이들의 임의의 조합과 결합하여 사용된다.

[0315] 특정 구현예에서, 본 발명의 항체, 항원-결합 단편, 또는 항체 접합체는 LAG3 억제제, 예를 들어, LAG525, IMP321, IMP701, 9H12, BMS-986016, 또는 이들의 임의의 조합과 결합하여 사용된다.

[0316] 특정 구현예에서, 본 발명의 항체, 항원-결합 단편, 또는 항체 접합체는 CTLA4의 억제제와 결합하여 사용된다. 특정 구현예에서, 본 발명의 항체, 항원-결합 단편, 또는 항체 접합체는 CTLA4 특이적 항체 또는 이의 결합 단편, 예를 들어, 이필리무맙, 트레멜리무맙, CTLA4-Ig 융합 단백질(예: 아바타셉트, 벨라타셉트), 또는 이들의 임의의 조합과 결합하여 사용된다.

[0317] 특정 구현예에서, 본 발명의 항체, 항원-결합 단편, 또는 항체 접합체는 B7-H3 특이적 항체 또는 이의 항원-결합 단편, 예를 들어, 에노블리투주맙(MGA271), 376.96, 또는 둘 다와 결합하여 사용된다. B7-H4 항체 결합 단편은, 예를 들어, 문헌[참조: Dangaj *et al., Cancer Res*. 73:4820, 2013]에 기재된 scFv 또는 이의 융합 단백질뿐만 아니라 미국 특허 제9,574,000호 및 PCT 특허 공보 제WO 2016/40724A1호 및 제WO 2013/025779A1호에 기재된 것들일 수 있다.

[0318] 특정 구현예에서, 본 발명의 항체, 항원-결합 단편, 또는 항체 접합체는 CD244의 억제제와 결합하여 사용된다. 특정 구현예에서, 본 발명의 항체, 항원-결합 단편, 또는 항체 접합체는 BLTA, HVEM, CD160 또는 이들의 임의의 조합의 억제제와 결합하여 사용된다. 항-CD160 항체는, 예를 들어, PCT 공보 제WO 2010/084158호에 기재되어 있다.

[0319] 특정 구현예에서, 본 발명의 항체, 항원-결합 단편, 또는 항체 접합체는 TIM3의 억제제와 결합하여 사용된다. 특정 구현예에서, 본 발명의 항체, 항원-결합 단편, 또는 항체 접합체는 Gal9의 억제제와 결합하여 사용된다.

[0320] 특정 구현예에서, 본 발명의 항체, 항원-결합 단편, 또는 항체 접합체는 아데노신 신호전달 억제제, 예를 들어, 데코이 아데노신 수용체와 결합하여 사용된다. 특정 구현예에서, 본 발명의 항체, 항원-결합 단편, 또는 항체 접합체는 A2aR 의 억제제와 결합하여 사용된다.

[0321] 특정 구현예에서, 본 발명의 항체, 항원-결합 단편, 또는 항체 접합체는 KIR의 억제제, 예를 들어, 리릴루맙(BMS-986015)과 결합하여 사용된다. 특정 구현예에서, 본 발명의 항체, 항원-결합 단편, 또는 항체 접합체는 억제성 사이토카인(전형적으로, TGFβ 이외의 사이토카인) 또는 Treg 개발 또는 활성의 억제제와 결합하여 사용된다.

[0322] 특정 구현예에서, 본 발명의 항체, 항원-결합 단편, 또는 항체 접합체는 IDO 억제제, 예를 들어, 레보-1-메틸 트립토판, 에파카도스타트(INCB024360; Liu et Al, Blood 115:3520-30, 2010), 엡셀렌(Tertios et al., Biochem. 49:591-600, 2010), 인독시모드, NLG919(Mautino et al., American Association For Cancer Research 104th Annual Meeting 2013; Apr 6-10, 2013), 1-메틸-트립토판(1-MT)-티라-파자민, 또는 이들의 임의의 조합과 결합하여 사용된다.

[0323] 특정 구현예에서, 본 발명의 항체, 항원-결합 단편, 또는 항체 접합체는 아르기나제 억제제, 예를 들어, N(ω)-니트로-L-아르기닌 메틸 에스테르(L-NAME), N-ω-하이드록시-노르-l-아르기닌(노르-NOHA), L-NOHA, 2(S)-아미노-6-보로노헥산산(ABH), S-(2-보로노에틸)-L-시스테인(BEC), 또는 이들의 임의의 조합과 결합하여 사용된다.

[0324] 특정 구현예에서, 본 발명의 항체, 항원-결합 단편, 또는 항체 접합체는 VISTA의 억제제, 예를 들어, CA-170(Curis, Lexington, Mass.)과 결합하여 사용된다.

[0325] 특정 구현예에서, 본 발명의 항체, 항원-결합 단편, 또는 항체 접합체는 TIGIT의 억제제, 예를 들어, COM902(Compugen, Toronto, Ontario Canada), CD155의 억제제, 예를 들어, COM701(Compugen), 또는 둘 다와 결합하여 사용된다.

[0326] 특정 구현예에서, 본 발명의 항체, 항원-결합 단편, 또는 항체 접합체는 PVRIG, PVRL2 또는 둘 다의 억제제와 결합하여 사용된다. 항-PVRIG 항체는, 예를 들어, PCT 공보 제WO 2016/134333호에 기재되어 있다. 항-PVRL2 항체는, 예를 들어, PCT 공보 제 WO 2017/021526호에 기재되어 있다.

[0327] 특정 구현예에서, 본 발명의 항체, 항원-결합 단편, 또는 항체 접합체는 LAIR1 억제제와 결합하여 사용된다,

[0328] 특정 구현예에서, 본 발명의 항체, 항원-결합 단편, 또는 항체 접합체는 CEACAM-1, CEACAM-3, CEACAM-5, 또는 이들의 임의의 조합의 억제제와 결합하여 사용된다.

[0329] 특정 구현예에서, 본 발명의 항체, 항원-결합 단편, 또는 항체 접합체는 자극성 면역 체크포인트 분자의 활성을 증가시키는 (즉, 작용제인) 제제와 결합하여 사용된다. 예를 들어, 본 발명의 항체, 항원-결합 단편, 또는 항체 접합체는 CD137(4-1BB) 작용제(예: 우렐루맙), CD134(OX-40) 작용제(예: MEDI6469, MEDI6383 또는 MEDI0562), 레날리도미드, 포말리도미드, CD27 작용제(예: CDX-1127), CD28 작용제(예: TGN1412, CD80, 또는 CD86), CD40 작용제(예: CP-870893, rhuCD40L, 또는 SGN-40), CD122 작용제(예: IL-2), GITR의 작용제(예: PCT 특허 공보 제WO 2016/054638호에 기재된 인간화 모노클로날 항체), ICOS(CD278)의 작용제(예: GSK3359609, mAb 88.2, JTX-2011, Icos 145-1, Icos 314-8, 또는 이들의 임의의 조합)와 결합하여 사용될 수 있다. 본원에 개시된 임의의 구현예에서, 방법은 본 발명의 항체, 항원-결합 단편, 또는 항체 접합체를 단독으로 또는 임의의 조합으로 상기 임의의 것을 포함하는, 자극성 면역 체크포인트 분자의 하나 이상의 작용제와 함께 투여하는 단계를 포함할 수 있다.

[0330] 특정 구현예에서, 병용 요법은 본 발명의 항체, 항원-결합 단편, 또는 항체 접합체, 및 다음 중 하나 이상을 포함하는 2차 요법을 포함한다: 암에 의해 발현된 암 항원(즉, 동일하거나 상이한 항원)에 특이적인 다른 항체, 이의 항원 결합 단편, 또는 항원 접합체, 방사선 치료, 수술, 화학요법제, 사이토카인, RNAi, 또는 이들의 임의의 조합.

[0331] 특정 구현예에서, 병용 치료 방법은 본 발명의 항체, 항원-결합 단편, 또는 항체 접합체를 투여하는 단계 및 방사선 치료 또는 수술을 추가로 투여하는 단계를 포함한다. 방사선 요법은 당업계에 익히 공지되어 있으며, X-선 요법, 예를 들어, 감마-조사 및 감마-조사와 같은 X-선 요법 및 방사성 의약적 요법을 포함한다. 대상체에서 소정의 암을 치료하는데 적합한 수술 및 외과적 기술은 당업자에게 익히 공지되어 있다. 양성자 요법은 문헌[참조: Thariat *et al.*, *Bull. Cancer* pii:S0007-4551(1)300001-8 (2018)]에서 검토된다.

[0332] 특정 구현예에서, 병용 치료 방법은 본 발명의 항체, 항원-결합 단편, 또는 항체 접합체를 투여하는 단계 및 화학요법제를 추가로 투여하는 단계를 포함한다. 화학요법제는 크로마린 기능의 억제제, 토포아이소머라제 억제제, 미소관 억제 약물, DNA 손상제, 항대사물질(예: 폴레이트 길항제, 피리미딘 유사체, 퓨린 유사체 및 당 변형 유사체), DNA 합성 억제제, DNA 상호작용 제제(예: 삽입제), 및 DNA 복구 억제제를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 예시적인 화학요법제는 제한 없이, 다음 그룹을 포함한다: 항대사물질/항암제, 예를 들어, 피리미딘 유사체(5-플루오로우라실, 플록수리딘, 카페시타빈, 겜시타빈 및 시타라빈) 및 퓨린 유사체, 폴레이트 길항제 및 관련 억제제(머캅토퓨린, 티오구아닌, 펜토스타틴 및 2-클로로데옥시아데노신(클라드리빈); 천연 생성물을 포함하는 항증식제/항유사분열제, 예를 들어, 빈카 알카로이드(빈블라스틴, 빈크리스틴, 및 비노렐빈), 미소관 교란제, 예를 들어, 탁산(파클리탁셀, 도세탁셀), 빈크리스틴, 빈블라스틴, 노코다졸, 에포틸론 및 나벨빈, 에피디포도필로톡신(에토포시드, 테니포시드), DNA 손상제(악티노마이신, 암사크린, 안트라사이클린, 블레오마이신, 부설판, 캄프토테신, 카르보플라틴, 클로람부실, 시스플라틴, 사이클로포스파미드, 사이톡산, 닥티노마이신, 다우노루비신, 독소루비신, 에피루비신, 헥사메틸멜라민옥살리플라틴, 이포스파미드, 멜팔란, 머클로레타민, 미토마이신, 미톡산트론, 니트로소우레아, 플리카마이신, 프로카바진, 탁솔, 탁소테레, 테모졸아미드, 테니포시드, 트리에틸렌티오포스포라미드 및 에토포시드(VP 16)); 항생제, 예를 들어, 닥티노마이신(악티노마이신 D), 다우노루비신, 독소루비신(아드리아마이신), 이다루비신, 안트라사이클린, 미톡산트론, 블레오마이신, 플리카마이신(미트라마이신) 및 미토마이신; 효소(L-아스파라긴을 전신적으로 대사하고 자체 아스파라긴을 합성할 능력을 갖지 않는 세포를 박탈하는 L-아스파라기나제); 형혈소판제; 항증식성/항유사분열 알킬화제, 예를 들어, 질소 머스타드(메클로레타민, 사이클로포스파미드 및 유사체, 멜팔란, 클로람부실), 에틸렌이민 및 메틸멜라민(헥사메틸멜라민 및 티오테파), 알킬 설포네이트-부설판, 니트로소우레아(카르무스틴(BCNU) 및 유사체, 스트렙토조신), 트라젠-다카바지닌(DTIC); 항증식성/항유사분열 항대사물질, 예를 들어, 엽산 유사체(메토트렉세이트); 백금 배위 착물(시스플라틴, 카보플라틴), 프로카바진, 하이드록시우레아, 미토탄, 아미노글루테티미드; 호르몬, 호르몬 유사체(에스트로겐, 타목시펜, 고세렐린, 바이칼루타미드, 닐루타미드) 및 아로마타제 억제제(레트로졸, 아나스트로졸); 항응고제(헤파린, 합성 헤파린 염 및 트롬빈의 다른 억제제); 섬유소

용해제(예: 조직 플라스미노겐 활성화제, 스트렙토키나제 및 유로키나제), 아스피린, 디피리다몰, 티클로피딘, 클로피도그렐, 압식시맙; 항이동제; 항분비제(브레벨딘); 면역억제제(사이클로스포린, 타크롤리무스(FK-506), 시롤리무스(라파마이신), 아자티오프린, 마이코페놀레이트 모페틸); 항-혈관신생 화합물(TNP470, 제니스테인) 및 성장 인자 억제제(혈관 내피 성장 인자(VEGF) 억제제, 섬유아세포 성장 인자(FGF) 억제제); 안지오텐신 수용체 차단제; 산화질소 공여체; 안티센스 올리고뉴클레오티드; 항생제(트라스투주맙, 리툭시맙); 키메라 항원 수용체; 세포 주기 억제제 및 분화 유도제(트레티노인); mTOR 억제제, 토포아이소머라제 억제제(독소루비신(아드리아마이신), 암사크린, 캄프토테신, 다우노루비신, 닥티노마이신, 에니포시드, 에피루비신, 에토포시드, 이다루비신, 이리노테칸(CPT-11) 및 미톡산트론, 토포테칸, 이리노테칸), 코르티코스테로이드(코르티손, 덱사메타손, 하이드로코르티손, 메틸페드니솔론, 프레드니손 및 프레니솔론); 성장 인자 신호 전달 키나제 억제제; 미토콘드리아 기능장애 유발제, 독소, 예를 들어, 콜레라 독소, 리신, 슈도모나스 외독소, 보르데텔라 퍼투시스 아데닐레이트 사이클라제 독소, 또는 디프테리아 독소, 및 카스파제 활성화제; 및 염색질 교란제.

[0333] 사이토카인은 항암 활성에 대한 숙주 면역 반응을 조작하는데 사용될 수 있다. 예를 들어, 문헌[Floros & Tarhini, *Semin. Oncol. 42*(4):539-548, 2015]을 참조한다. 면역 항암 또는 항종양 반응을 촉진하는데 유용한 사이토카인은, 예를 들어, IFN-α, IL-2, IL-3, IL-4, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IL-21, IL-24, 및 GM-CSF를 단독으로 또는 본 발명의 항체, 항원-결합 단편, 또는 항체 접합체와 임의의 조합으로 포함한다.

[0334] 암 항원에 특이적인 천연 또는 재조합 TCR 및 CAR을 발현하는 T 세포, NK 세포, NK-T 세포를 포함하고 이러한 세포를 수용자에게 입양 전달함을 포함하는 세포 면역요법은 암에 대한 새로운 치료 방식이다(참조: 예를 들어, Bonini and Mondino, *Eur. J. Immunol. 45*(9):2457-69 (2015) and Metha and Rezvani, *Front. Immunol. 9*:283 (2018)). 특정 구현예에서, 본 발명의 항체, 항원-결합 단편, 또는 항체 접합체(또는 약제학적 조성물)를 투여받은 대상체는 암을 표적으로 하는 세포 면역요법을 투여받았거나 (즉, 동시에, 동시에, 또는 순차적으로) 투여받고 있다.

[0335] 본원에 기재된 바와 같은 루이스 항원의 발현(예: 과발현)을 특징으로 하는 질환을 치료, 검출 또는 진단하는데 사용하기 위한 현재 개시된 항체, 항원-결합 단편, 항체 접합체, 폴리뉴클레오티드, 벡터, 숙주 세포 및 조성물 중 임의의 것이 또한 본원에 제공된다. 특정 구현예에서, 상기 질환은 본원에 개시된 임의의 암과 같은 암이다. 특정 구현예에서, 항체, 항원-결합 단편, 항체 접합체 또는 조성물은 본원에 기재된 바와 같은 임의의 병용 요법에 사용된다.

[0336] 본원에 기재된 바와 같은 루이스 항원의 발현(예: 과발현)을 특징으로 하는 질환 치료용 의약을 제조하는데 사용하기 위한 현재 개시된 항체, 항원-결합 단편, 항체 접합체, 폴리뉴클레오티드, 벡터, 숙주 세포 및 조성물 중 임의의 것이 또한 본원에 제공된다. 특정 구현예에서, 상기 질환은 본원에 개시된 임의의 암과 같은 암이다. 특정 구현예에서, 의약은 본원에 기재된 바와 같은 임의의 병용 요법을 포함하거나 이에 사용된다.

[0337] 본 명세서 및 첨부된 청구범위에 사용되는 바와 같이, 단수 형태들 "a", "an" 및 "the"는 내용이 명백하게 다르게 지시하지 않는 한 복수의 지시대상을 포함한다. 또한, 대안(예를 들어, "또는")의 사용은 대안들의 어느 하나, 둘 모두, 또는 이들의 임의의 조합을 의미하는 것으로 이해되어야 한다.

[0338] 본 명세서 전반에 걸쳐, 문맥이 달리 요구하지 않는 한, 단어 "포함하다", "갖는다", 또는 "갖는다", "갖는", "포함한다" 또는 "포함하는"과 같은 변형은 언급된 요소 또는 정수 또는 요소들 또는 정수들의 그룹을 포함하지만, 임의의 다른 요소 또는 정수 또는 요소들 또는 정수들의 그룹을 제외하지 않음을 의미하는 것으로 이해된다. 본 설명에서, 임의의 농도 범위, 백분율 범위, 비율 범위, 또는 정수 범위는, 달리 지시되지 않는 한, 인용된 범위 내의 임의의 정수 값 및 적절한 경우, 이의 분획(예를 들어, 정수의 1/10 및 1/100)을 포함하는 것으로 이해되어야 한다. 또한, 달리 지시되지 않는 한, 임의의 물리적 특징, 예를 들어, 중합체 서브유닛, 크기 또는 두께와 관련하여 본원에서 인용된 임의의 수 범위는 인용된 범위 내의 임의의 정수를 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

[0339] 본원에 사용된 용어 "약"은 달리 지시되지 않는 한, 지시된 범위, 값 또는 구조의 ± 20% 이하, 또는 특정 구현예에서는, 달리 지시되지 않는 한, 지시된 범위, 값 또는 구조의 ± 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 10, 9, 8, 7, 6 또는 5% 이하를 의미한다.

[0340] 또한, 본원에 기재된 구조 및 치환체의 다양한 조합으로부터 유도된 개별 화합물, 또는 화합물의 그룹은 각각의 화합물 또는 화합물의 그룹이 개별적으로 제시된 것과 동일한 정도로 본원에 의해 개시된다는 것이 이해되어야

한다. 따라서, 특정 구조 또는 특정 치환체의 선택은 본 발명의 범위 내에 있다.

[0341] 용어 "본질적으로 이루어지는"은 "포함하는"과 동등하지 않으며, 청구범위의 특정 물질 또는 단계, 또는 청구된 주제의 기본적인 특징에 실질적으로 영향을 미치지 않는 것들을 지칭한다.

[0342] 본 명세서에서 각각의 구현예는 명백하게 달리 명시되지 않는 한, 모든 다른 구현예에 준용된다.

[0343] 실시예

[0344] 실시예 1

[0345] 키메라 BBC 항체의 생성

[0346] 항체 가변 영역 cDNA의 단리

[0347] 서열번호 27에 제시된 아미노산 서열을 갖는 VL 도메인 및 서열번호 28에 제시된 아미노산 서열을 갖는 VH 도메인을 포함하는 뮤린 IMH2/BBC 항체를 발현하는 하이브리도마 세포는 문헌[참조: Dr. S. Hakomori (*Cancer Research 52*:3739-3745 (1992)]으로부터 입수하였다. cDNA 합성을 위한 RNA를 제조하기 위해, $9x10^6$ 하이브리도마 세포를 먼저 저속 원심분리(5분 동안 300g)에 이어, 제조자의 프로토콜에 따라 "총 RNA 미니프렙 정제 키트"™(GeneMark™, GMbiolab Co. Ltd., Taichung City, Taiwan, ROC)를 사용하는 RNA 분리에 의해 수확하였다. 이어서, IMH2를 인코딩하는 항체 유전자를 공급자의 권장된 프로토콜과 비교하여 최소 변형으로 SMART RACE cDNA 증폭 키트™(Takara/BD Biosciences-Clontech, Palo Alto, CA)를 사용하여 정제된 RNA로부터 클로닝하였다.

[0348] 요약하면, 제1 가닥 cDNA 합성 및 dC-테일링 후, IMH2의 경쇄 가변 영역을 특이적으로 인코딩하는 cDNA는 키트-공급 프라이머 및 불변 영역의 공지된 마우스 카파 쇄 서열에 기초하여 설계된 특이적 프라이머를 사용하여 두 라운드의 PCR에 의해 단리되었다. 제1 PCR은 94℃에서 30초 및 72℃에서 1분 동안의 5 사이클에 이어, 94℃에서 30초, 67℃에서 30초 및 72℃에서 1분 동안의 5 사이클 동안 수행되었다. 94℃에서 30초, 62℃에서 30초 및 72℃에서 1분을 포함하는 PCR 반응의 27회 추가 사이클을 첨가하여 성공적인 증폭을 보장하였다. 이어서, 94℃에서 5분 동안 예열 단계에 이어서, 94℃에서 30초, 54℃에서 30초 및 72℃에서 1분의 35 사이클 및 72℃에서 3분 동안 최종 연장 단계를 포함하는 제2 PCR을 수행하여 충실도를 더욱 개선시켰다.

[0349] 중쇄 유전자의 클로닝 전략은 약간 상이했다. 먼저, PCR 반응에 사용된 단일 가닥 cDNA 주형은 마우스 IgG3-특이적 프라이머를 갖는 RNA로부터 불변 도메인 1(CH1)로 제조하였다. 이어서, 유전자 단리는 다음과 같이 단일 라운드 PCR로 수행하였다: 94℃에서 5분 동안 예열하고, 94℃에서 30초, 62℃에서 30초, 72℃에서 1분 동안을 포함하는 PCR 반응 35 사이클에 이어, NUP 프라이머(SMART™ RACE 증폭 키트, Clontech, Palo Alto, CA) 및 마우스 CH1 도메인에 대한 중첩 프라이머의 존재하에 72℃에서 5분 동안 최종 연장 단계. 이어서, 경쇄 및 중쇄 단편 모두의 가변 영역을 인코딩하는 cDNA를 PCR 정제 키트(GeneMark™ GMbiolab Co. Ltd., ROC)를 사용하여 정제하고, 양성 클론 동정 및 서열 결정을 위해 yT&A 클로닝 벡터(Yeastern Biotech™, Taipei, Taiwan, ROC)에 도입하였다.

[0350] 항체 발현 플라스미드의 작제

[0351] 본원에서 "BBC" 항체로 지칭되는 항체를 생산하기 위한 발현 플라스미드를 구축하기 위해, 상기 기재된 yT&A 벡터에 클로닝된 항체 유전자 및 PCR 프라이머를 사용하여 성숙한(리더 펩티드 없이) 중쇄 및 경쇄 가변 영역을 인코딩하는 cDNA만을 제조하였다. PCR을 다음과 같이 수행되었다: 94℃에서 5분 동안 예열, 94℃에서 30초, 65℃에서 30초 및 72℃에서 60초를 포함하는 PCR 반응의 35 사이클, 및 72℃에서 3분 동안 최종 연장 단계. 제한 효소 인식 서열은 VH cDNA의 5'(NheI) 및 3'(ApaI) 말단 및 VL cDNA의 5'(NheI) 및 3'(BsiWI) 말단에 PCR 반응 동안 혼입되어 후속적 발현 플라스미드 조작을 용이하게 하였다. 이어서, 증폭된 cDNA 단편을 중쇄의 경우 제한 효소 ApaI/NheI 및 경쇄 유전자의 경우 NheI/BsiWI로 순차적으로 분해시켰다. 겔 정제 후, 회수된 VH 및 VL cDNA를 동일한 제한 효소 클로닝 부위에서 pGNX-RhcG1(VH) 또는 pGNX-Rhck 벡터(VL)에 결찰시켜, 각각 발현 벡터 pGNX-RhcG1-BBC 및 pGNX-Rhck-BBC를 수득했다. 삽입된 cDNA 서열은 다중 클로닝 부위의 상류에서 프라이머를 사용하여 확인되었다.

[0352] 항체의 일시적 생산

[0353] 키메라 BBC 항체의 일시적 생산을 위해, HEK293-c18 세포를 폴리에틸렌이민의 존재하에 중쇄 및 경쇄-인코딩 pGNX-RhcG1-BBC 및 pGNX-Rhck-BBC 발현 플라스미드로 공동-형질감염시켰다. 배양 상청액을 분석을 위해 형질감

염 7일 후에 수확하였다.

[0354] 실시예 2

[0355] 인간화 BBC 항체의 생성

[0356] 인간화된 형태의 BBC 항체(실시예 1에서 상술됨)를 생산하기 위해, 상동성 인간 항체 서열(인간 수용체)을 선택하여 CDR 그래프팅을 수행하였다. 간략하게, 잠재적인 인간 수용체 서열은 BBC 항체의 중쇄(서열번호 28) 및 경쇄(서열번호 27) 가변 영역에 대해 가장 높은 상동성을 나타내는 서열을 위치시키는 NCBI 단백질 데이터베이스를 검색함으로써 동정되었다. 인간 수용체 프레임워크 CAD89404.1(Vh) 및 AAS01771.1(VI)이 선택되었다(도 1). 그러나, 비-인간 CDR 서열을 인간 수용체 프레임워크에 직접 삽입하면 결합 친화도의 손실을 초래할 수 있다. 결합 친화도는 프레임워크 잔기를 인간 수용체로부터 비-인간 공여체 서열로 다시 옮긴 후 회복될 수 있다. 바람직한 복귀 돌연변이는 원래의 CDR 형태를 유지함으로써 결합 친화도를 회복한다.

[0357] CDR 그래프팅 후 결합 친화도를 회복하기 위해, 항체의 3-D 모델을 먼저, Accelrys Discovery Studio™(BIOVIA, San Diego, CA) 소프트웨어를 사용하여 BBC 결정 구조 데이터에 기초하여 구축하였다. 이어서, 임계 아미노산을 다음과 같이 구조를 조사함으로써 복귀 돌연변이에 대해 예측하였다:

[0358] 1. 인간화 프레임워크 상의 변화된 잔기의 돌연변이 에너지(안정성에 대를mf 계산하였다. 돌연변이 에너지의 양의 값은 돌연변이의 불안정화 효과에 상응하고, 그 반대도 마찬가지이다

[0359] 2. 프레임워크 잔기와 CDR 영역 사이의 공간적 거리를 조사하였다. CDR에 가장 가까운 잔기가 고려되었다(4Å 이내).

[0360] 3. 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역의 계면에 위치된 잔기를 조사하였다. 이들 잔기는 중쇄 및 경쇄의 조립에 기여하고, 따라서 항체 구조에 상당한 영향을 미칠 수 있다.

[0361] 예측 기준에 기초하여 10개의 영향력 있는 위치(경쇄에 3개 및 중쇄에 7개)를 초기에 복귀 돌연변이를 위해 선택하였다. 또한, 선택된 인간 중쇄 주형의 위치 70(카바트 넘버링에 따라)에서 메티오닌(M) 잔기는 드문 모티프인 것으로 나타났으며, 따라서 그 부위에서 고도로 보존된 이소류신(I)으로 대체되었다(도 1; 복귀 돌연변이된 잔기(인간 수용체 → hBBC.8)는 하기 표 3에서 밑줄치고; Met → IIe 잔기는 표 3에서 굵은 이탤릭체로 밑줄친 것으로 나타나고, 도 1에서 박스화된다). 이들 아미노산 전환은 "hBBC.8" 인간화 항체를 생성하였다.

[0362] 항체를 추가로 개선시키기 위해 추가의 변화를 도입하였다. 첫 째로, 마우스와 인간 서열 사이에서 변하는 hBBC.8 경쇄(R66 및 F71) 내의 2개의 위치가 돌연변이되어 "hBBC.9"(F71Y 돌연변이를 함유함) 및 "hBBC.10"(F71Y 및 R66G 돌연변이를 함유함)을 생성하였다(도 2a; 잔사는 표 3에서 밑줄 없이 굵고 이탤릭체화됨). BBC 및 생성된 인간화 변이체 hBBC.9 및 hBBC.10의 AGS 세포에의 결합은 도 2b에 도시되어 있다. 요약하면, AGS 인간 위암 세포주(ATCC CRL-1739; ATCC, Manassas, VA)를 F12 배지에서 규칙적으로 유지시키고, 10% 투석된 태아 소 혈청으로 보충하였다. 세포 결합 연구를 수행하기 위해, 100㎕의 PBS 중의 대략 3 x 10^5 세포를 동일한 용적의 희석된 항체와 혼합하였다. 실온에서 1시간 배양 후, 2ml의 PBS를 각 샘플에 첨가하여 결합되지 않은 항체를 세정했다. 원심분리 후, 회수된 세포 펠렛을 PBS에서 1:200으로 희석된 200㎕의 플루오레세인(FITC)-AffiniPure™ 염소 항-인간 IgG, Fcγ 단편 특이적(Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, Cat. 109-095-098)에 직접 재현탁시켰다. 실온에서 30분 동안 배양한 후, PBS 세척을 반복하여 결합되지 않은 2차 항체를 제거하였다. 수집된 세포를 200㎕의 PBS에 재현탁시키고, BD FACSanto™ 유동 세포 분석기 시스템(BD Biosciences, San Jose, CA) 상에서 분석하였다. 추가의 분석을 수행하여 잠재적 면역원성 서열을 동정하였다.

[0363] 중쇄 또는 경쇄에서 추가적 돌연변이는 추가의 변이체 "hBBC.9.1" 및 "hBBC.10.1"(하기 표 3에서 볼드화되고 밑줄친 잔사)을 생성하였다. 구체적으로, BBC 및 hBBC.8 항체의 결정 구조 및 모의 항원/항체 복합체의 결정 구조를 분석하였다. 경쇄 및 중쇄 CDR 영역(카바트 넘버링에 따라 특정된 위치)의 몇몇 잔기가 단일 부위 아미노산 치환을 위해 동정되었다. 항체 경쇄 또는 중쇄 유전자의 지정된 위치(들)에서의 아미노산 전환은 구체적으로 설계된 프라이머를 사용하는 2 라운드의 PCR 반응에 의해 수행되었다. 돌연변이된 항체 cDNA 단편의 발현 벡터로의 삽입을 용이하게 하기 위해, 제한 부위를 PCR 반응 동안 각각의 말단(cDNA 쇄의 경우 5'NheI 및 3'ApaI, 경쇄 cDNA의 경우 5'Nhel 및 3'BsiWI)에 혼입시켰다. 제2 PCR 반응 후 DNA 단편을 제조하고, NheI/ApaI 또는 Nhel/BsiWI로 절단하고, 각각 중쇄 및 경쇄 유전자 작제를 위한 pGNX-RhcG1 및 pGNX-Rhk 벡터의 동일한 부위에 결찰시켰다. 돌연변이된 부위 및 변화를 표 1에 나타낸다.

표 1

hBBC.8의 단일 부위 돌연변이

경쇄 위치	위치 및 원래 아미노산	변화된 아미노산
CDR1	E27	A
	Y30	A
	N31	A
	T34	S, V
CDR2	G50	A
	S53	A
CDR3	Q89	A
	T93	A, S, V, D
중쇄 위치	**위치 및 원래 아미노산**	**변화된 아미노산**
CDR1	S31	A
	Y33	A
CDR2	Y54	A
	S55	T
	N57	A, D, Q, Y, W
	S61	A
CDR3	Y104	A
	D105	A
	H106	A

[0364]

[0365] 다수의 돌연변이체는 AGS 세포 결합 검정에서 키메라 항체(BBC)의 1/2 활성 이상의 시험관내 결합 활성을 나타내었다(도 2c, 표 2 참조). 또한, 일부 돌연변이체는 표 2에 나타낸 바와 같이 ELISA 검정에서 1가 루이스 B 구조와의 감소된 교차-반응성(BBC와 비교하여 1/8 강도 이하)에 의해 특이성 개선을 나타내었다. 1가 루이스 B는 정상 인간 조직에서 발현되는 혈액 그룹 항원이다.

표 2

BBC CDR 돌연변이체의 결합 활성

경쇄 위치	원래 아미노산 및 위치	돌연변이된 아미노산	AGS 결합 활성	Le^B ELISA
CDR1	Y30	A	=	
	R32	A	-	
CDR2	G50	A	=	-
CDR3	W92	A	-	-
	T93	S	=	-
중쇄 위치	**원래 아미노산 및 위치**	**변화된 아미노산**	**AGS 결합 활성**	**Le^B ELISA**
CDR1	Y33	A	=	
	T34	A	-	
CDR2	S55	T	+	-
CDR3	Y104	A	=	-
	H106	A	=	-

(=) BBC에 비해 결합 활성의 변화 없음

(-) BBC에 비해 결합 활성의 감소

(+) BBC에 비해 결합 활성의 증가

[0366]

[0367] BBC와 비교하여 대략 1/3 AGS 세포 결합 활성을 나타냈으며(도 2b), 이종이식 마우스 모델에서 매우 우수한 종양 억제를 나타낸(실시예 6 참조) hBBC.8 때문에, 이들 단일 아미노산 대체된 항체 돌연변이체는 항종양 활성을 나타낼 잠재력을 갖는다. 이들 분석된 클론의 위치 및 아미노산 대체는 표 1에 요약되어 있다. 친화도 및/또는 특이성 개선에 대한 능력을 추가로 확인하기 위해, 총 7개의 단일 돌연변이 부위(표 2)를 선택하여 인간화 항체 주형을 평가했다. 이들에는 AGS 세포(도 2c)에 대한 항체 결합에 대한 이들의 효과에 대해 시험되었던 5개의 단일-잔기 치환(경쇄에 3개 및 중쇄에 2개), (정제된 Le^B와 비교하여 AGS 세포에 대한) 항체 결합 특이성에 대한 효과에 대해 시험되었던 2개의 중쇄 단일 잔기 치환, 및 유사하게 분석되었던(도 2d) 2개의 중쇄 이중 잔기 대체가 포함되었다.

[0368] 친화도(AGS 세포 결합 검정) 및 특이성(루이스 b ELISA 검정)과 관련하여 원래 키메라 형태로 작제된 다양한 인간화 BBC 버전의 추가 비교가 도 2e에 도시되어 있다.

[0369] hBBC.9의 Epibase 분석(Applied Protein Services, Lonza Biologics, Cambridge, UK)은 강한 면역원성 위험을 갖는 중쇄 영역의 영역을 예측하였다. 잠재적인 면역원성 문제를 최소화하기 위해, 중쇄의 프레임워크 3 영역(위치 78, 80, 82-84, 및 86)에서 6개의 추가의 아미노산 변화가 이들 위치에서 기준 인간화 항체를 일치시키기 위해 포함되었다(도 3). 이들 전환은 "hBBC.10.1FQ"에 대한 중쇄 프레임워크를 제공하였다. 본 실시예에 기재된 다양한 중쇄 및 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열은 표 3에 요약되어 있다.

표 3

항체 VH 및 VL 영역의 아미노산 서열

항체	경쇄 가변 영역	중쇄 가변 영역
IMH2/BBC	DIQMTQSSSSFSVSLGDRV TITC**TASEDIYNRLT**WYQQ KPGNVPRLLIS**GATSLDT**G VPSRFSGSRSGKDYALSIT SLQTEDVATYYC**QQYWTT PWT**FGGGTRLEIK (서열번호 27)	DVQLQESGPDLVKPSQSLSL TCTVTGYSIT**SGYTWH**WIRQ FPGNTLEWLG**YIHYSGNTKY SPSLKS**RLSVTRDTSKNQFF LQLNSVTTEDTATYYCGR**EA LRGYDHGFWFTY**WGQGTLV TV (서열번호 28)
인간 수용체	DIQMTQSPSSLSASVGDRV TITC**RASQGISNYLA**WYQQ KPGKVPKLLIY**AASTLQS**G VPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDVATYYC**QKYNSA PYT**FGQGTKLEIK (서열번호 29)	QVQLQESGPGLVKPSQTLSL TCTVSGGSIS**SGAYYWS**WIR QHPGKGLEWIG**YIYYSGTTY YNPSLKS**RLS***M***SRDTSKNQF SLKLSSVTAADTAVYYCA**RG PYYDSPRPFDP**WGQGTLVT V (서열번호 30)
hBBC.8	DIQMTQSPSSLSASVGDRV TITC**TASEDIYNRLT**WYQQ KPGKVPRLLIS**GATSLDT**G VPSRFSGSRSGTDFTLTISS LQPEDVATYYC**QQYWTTP WT**FGQGTKLEIK (서열번호 31)	QVQLQESGPGLVKPSQTLSL TCTVSGYSIT**SGYTWH**WIRQ HPGKGLEWLG**YIHYSGNTKY SPSLKS**RLS***I***SRDTSKNQFFL KLSSVTTEDTAVYYCGR**EAL RGYDHGFWFTY**WGQGTLVT V (서열번호 32)

[0370]

항체	경쇄 가변 영역	중쇄 가변 영역
hBBC.9	DIQMTQSPSSLSASVGDRV TITC**TASEDIYNRLT**WYQQ KPGKVPRLLIS**GATSLDT**G VPSRFSGSRSGTD***Y***TLTIS SLQPEDVATYYC**QQYWTT PWT**FGQGTKLEIK (서열번호 33)	(hBBC.8 중쇄 가변 영역 (서열번호 32))
hBBC.9.1	(hBBC.9 경쇄 가변 영역 (서열번호 33))	QVQLQESGPGLVKPSQTLSL TCTVSGYSIT**SGYTWH**WIRQ HPGKGLEWLG**YIHYTGNTKY SPSLKS**RLS***I***SRDTSKNQFFL KLSSVTTEDTAVYYCGR**EAL RGADHGFWFTY**WGQGTLVT V (서열번호 34)
hBBC.10	DIQMTQSPSSLSASVGDRV TITC**TASEDIYNRLT**WYQQ KPGKVPRLLIS**GATSLDT**G VPSRFSGS***G***SGTD***Y***TLTIS SLQPEDVATYYC**QQYWTT PWT**FGQGTKLEIK (서열번호 5)	(hBBC.8 중쇄 가변 영역 (서열번호 32))
hBBC.10.1	(hBBC.10 경쇄 가변 영역 (서열번호 5))	QVQLQESGPGLVKPSQTLSL TCTVSGYSIT**SGYTWH**WIRQ HPGKGLEWLG**YIHYTGNTKY SPSLKS**RLS***I***SRDTSKNQFFL KLSSVTTEDTAVYYCGR**EAL RGYDAGFWFTY**WGQGTLVT V (서열번호 35)
hBBC.10.1FQ	(hBBC.10 경쇄 가변 영역 (서열번호 5))	QVQLQESGPGLVKPSQTLSL TCTVSGYSIT**SGYTWH**WIRQ HPGKGLEWLG**YIHYTGNTKY SPSLKS**RLS***I***SRDTSKN***T***F***Y***L ***QMNSL***TTEDTAVYYCGR**EAL RGYDAGFWFTY**WGQGTLVT V (서열번호 1)

[0371]

[0372] 실시예 3

[0373] HBBC 에피토프의 특성화

[0374] BBC 및 본원에 기술된 변이체는 글리칸-결합 모노클로날 항체로서 설계되었다. 부모 IMH2(BBC) 항체의 공개된 특이성 데이터에 기초하여(참조: Ito et al., Cancer Res. 52:3739, 1992), 생성된 BBC 항체의 표적 에피토프는 Le^B 및 Le^Y 항원에 관련된 것으로 가정되었다. 다음의 에피토프 특성화 연구는 하기 실시예 및 참조된 도면에서 "hBBC"로 지칭되기도 하는 hBBC.10.1을 사용하여 수행되었다.

[0375] 면역 정제

[0376] 결장직장암 세포주 Colo-205로부터 GSL-유도 글리칸을 단리시키고 BBC를 사용하여 면역 정제하였다. 결합되지 않은 및 용출된 분획의 글리칸은 퍼메틸화되고, 도 4a 및 4b에 도시된 바와 같이, MALDI-MS 분석으로 프로파일링되었다. 결합되지 않은 분획의 글리칸 프로필은 입력 글리칸 프로필과 유사하였으며, 이는 COLO 205로부터의 대부분의 GSL-유도 글리칸이 BBC에 결합하지 않았음을 나타낸다. 그러나, 용출된(BBC-결합된) 분획에서, $Fuc_4(LacNAc)_3Lac$ 글리칸은 BBC에 의해 배타적으로 정제되었다. 구체적으로, 놀랍게도, hBBC-정제된 글리칸은 I-분지화 항원에 대한 MS/MS 실험에서 Le^B 및 Le^Y 지문 단편 둘 다의 관찰에 기초하여 바이안테나리 $Le^{B/Y}$(즉, Le^B/Le^B, Le^B/Le^Y, 또는 Le^Y/Le^Y)를 동반한 반면, 결합되지 않은 분획에서의 글리칸은 선형 구조, 잠재적으로

Le^{B}-Le^{A}-Le^{A}-Lac이었음이 밝혀졌다. 이 결과는 I 항원 상의 바이안테나리 $Le^{B/Y}$가 BBC의 에피토프이다는 것을 나타냈다.

[0377] 이 결과는 I 항원 상의 바이안테나리 $Le^{B/Y}$의 당지질 발현을 위해 선택된 세포주 NCI-N87 및 SW1116의 GSL-유도 글리칸으로부터 BBC-결합 글리칸의 면역 정제에 의해 추가로 지지되었다. 예상된 바와 같이, BBC는 모노-, 바이-, 및 트리-푸코실화 글리칸(도 5a-5b)보다는 테트라-푸코실화 GSL-유도 글리칸 $Fuc_4(LacNAc)_3Lac$ 에 결합된다. MSMS 서열분석을 통해, NCI-N87 및 SW1116 GSL의 BBC-결합 글리칸은 I 항원-동반 바이안테나리 $Le^{B/Y}$(도 6a 및 6b)인 것으로 확인되었다.

[0378] $Fuc_4(LacNAc)_3Lac$ 이외에, 다수의 푸코실화(BBC에 의한 결합을 위한 최소 요건인 4개의 푸코스 잔기)를 특징으로 하는 NCI-N87 및 SW1116으로부터의 GSL-유도 글리칸의 그룹이 정제되었다. NCI-N87 GSL의 2개의 우성 BBC 결합 글리칸, $Fuc_4(LacNAc)_4Lac$ 및 $Fuc_6(LacNAc)_{4\rightarrow5}Lac$는 MSMS를 사용하여 서열분석하고, 바이- 또는 트리-안테나리 Le^{Y}(도 7a 및 7b)를 갖는 I 항원-동반 글리칸인 것으로 결정되었다. 또한, AGS 세포주로부터 유도된 방출된 N-글리칸이 BBC로 면역 정제된 경우, 풍부한 N-글리칸은 바이- 또는 트리-안테나리 Le^{Y}(도 8a 및 8b)를 갖는 구조인 것으로 밝혀졌다. 이 결과는 풍부한 I 항원과 일치한다.

[0379] 이들 데이터는 $Le^{B/Y}$가 BBC의 결합 단위임을 나타낸다. 그러나, 모노안테나리 루이스$^{B/Y}$는 BBC와 강한 결합을 제공하기에 충분하지 않다. 완전한 말단 푸코실화를 갖는 고유한 I 항원 및 N-글리칸은 BBC의 강한 결합 에피토프인 것으로 표시되는 다가 $Le^{B/Y}$를 제공하였다. 또한, 필적할만한 면역 정제 연구를 hBBC 상에서 수행하였고, BBC와 유사한 글리칸 풍부 특이성을 나타내었으며(데이터는 제시되지 않음), 이는 hBBC 및 BBC가 유사한 에피토프를 공유함을 나타냈다.

[0380] 등온 적정 열량 측정법

[0381] 등온 적정 열량 측정법(ITC)을 hBBC와 Le^{Y}-Gal, Le^{B}-Gal, Le^{A}-Gal 및 Le^{X}-Gal의 선형 글리칸, 및 Le^{Y}/Le^{Y}-ASGP, Le^{X}/Le^{X}-ASGP, H-ASGP, Le^{Y}/Le^{Y}-I 항원, 및 Le^{Y}/Le^{B}-I 항원의 분지형 글리칸의 세트 사이의 결합 친화도를 분석하기 위해 수행하였다. BR96 항체(미국 특허 제5,491,088A호에 기재되어 있음; 미국 특허 제5,792,456A호에 기재된 변이체)는 대조군으로서 포함되었다. hBBC 면역 정제 실험으로부터 특성화된 글리칸이 제한된 양으로 존재하였기 때문에, 다양한 Le^{B} 및 Le^{Y}-관련 글리칸이 상업적 공급원(Elycityl SA, Crolles, France)으로부터 수득되었거나, 당업계에 확립된 방법론에 따라 인-하우스 효소적으로 합성되었다(예를 들어, Wu et al., 2011 *Glycobiology* 21(6): 727-733; Becker et al., 2003 *Glycobiology* 13(7): 41R-53R; de Vries et al., 2001 *Glycobiology* 11(10): 119R-128R).

[0382] 요약하면, 등온 적정 열량 측정법(ITC)에 대해, 여과된 PBS pH 7.2를 인-하우스 제조하였고, 동일한 배치의 완충액을 하나의 ITC 주입 라운드 내에서 사용하였다. mAb를 50 μM 의 단백질 농도를 갖는 여과된 PBS pH 7.2 완충액에서 예비-교환하였다. 글리칸 항원의 양은 계산 표준으로서 갈락토스를 사용하는 펄스화 전류측정 검출(HPAEC-PAD, 예를 들어, Rothenhofer et al., 2015 J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci. 988:106) 단당류 분석을 사용하는 고성능 음이온 교환으로 정량화했다. 정량화된 글리칸 항원을 여과된 PBS pH 7.2(mAb 용액 제조를 위한 것과 동일한 배치)에 용해시키고, 60 μL의 용액을 각각의 주사에 사용하였다.

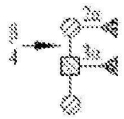
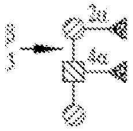
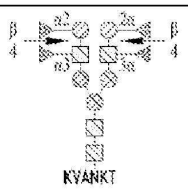
[0383] ITC 실험을 MicroCal iTC200 시스템(Malvern Instruments Ltd, Malvern, UK) 상에서 수행하였다. mAb 용액(50 μM)을 iTC200의 샘플 세포에 부하한 후, 시스템 온도를 25℃로 설정하였다. 시스템 온도가 25℃에 도달된 후, 주사기에 글리칸 항원 용액을 부하하고, mAb-충전된 샘플 세포로 서서히 하강시켰다. 실험 파라미터는 다음과 같다: 주사 #: 20; 세포 온도: 25℃; 기준 전력: 6 μcal/s; 초기 지연: 60초; 샘플 세포 농도: 50 μM; 교반 속도: 측정된 글리칸 항원 농도를 갖는 주사기 농도 입력과 함께 750rpm. 주사 파라미터는 다음과 같다: 주사 용적: 2 μL; 지속 시간: 4초; 간격: 150초; 충전제 기간: 5초; 및 제1 주사 용적은 1 μL로 조정되었다. 모든 설정이 확인되었을 때, 실험을 시작하였고, 생성된 데이터는 iTC200 에 대한 기원으로 처리되었다. 적정 곡선은 최적 피팅 결과를 수득하기 위해 100회 반복을 반복하는 사이트 피팅 모델의 한 세트로 피팅되었다. 따라서, K 및 K_D가 계산되었다.

[0384] hBBC 항체를 갖는 다양한 글리칸 항원의 ITC 적정 그래프는 도 9a, 9b, 10a 내지 10c 및 11a-11f에 도시되어 있

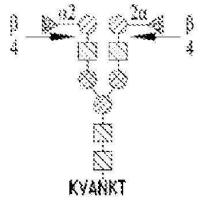
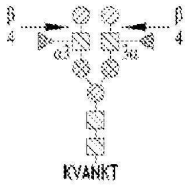
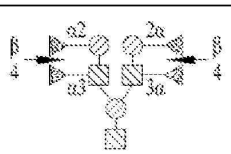
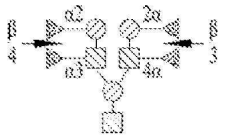
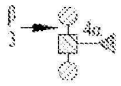
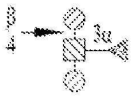
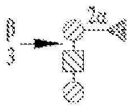
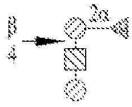
다. BR96 항체를 갖는 다양한 글리칸 항원의 ITC 적정 그래프는 도 12a 내지 도 12c에 도시되어 있다. 간략하게, ITC 분석은 hBBC가 Le^Y-Gal(KD = 80.6μM)보다 Le^B-Gal(KD = 26.2μM)에 대해 더 높은 특이적 결합 친화도를 갖는다는 것을 보여주었다. 또한, hBBC는 단일 쇄 Le^Y-Gal 항원에 대한 것보다 바이안테나리 구조(Le^Y/Le^Y-ASGP, Le^Y/Le^Y-I 항원, 및 Le^Y/Le^B-I 항원) 에 대해 더 강한 결합 친화도를 나타내었다. Le^Y/Le^Y-ASGP, Le^Y/Le^Y-I 항원 및 Le^B/Le^Y-I 항원에 대한 hBBC의 결합 친화도는 유사하게 나타났으며, 이는 바이안테나리 글리칸 에피토프에 대해, Le^Y 및 Le^B 측쇄가 특이적 결합에 필적할 만한 기여를 한다는 것을 시사한다. 또한, 도 11a-f에 도시된 바와 같이, 단일 쇄 또는 바이안테나리 형태(Le^X-Gal, Le^A-Gal, H-항원 타입 I, H 항원 타입 II, H-ASGP, 및 Le^X/Le^X-ASGP)에서, 테트라-푸코실화 LacNAc 잔기(들)가 결여된 글리칸 항원은 hBBC와의 특이적 결합을 나타내지 않았다. 이들 결과는 타입 I 또는 II 결합을 갖는 테트라-푸코실화 LacNAc가 hBBC에 의한 특이적 결합에 필요하다는 것을 나타낸다. 요약하면, 면역 정제 데이터와 일치하여, ITC 결과는 hBBC가 Le^Y 및/또는 Le^B를 함유하는 구조를 포함하는 에피토프에 결합한다는 것을 나타냈다(표 4; 글리칸은 다음과 같이 묘사된다: 개방 원 = Gal; 충전된 원 = Man; 충전된 사각형 = GlcNac; 폐쇄된 삼각형 = Fuc). BR96 대조군은 바이안테나리 Le^Y/Le^Y-I 항원 및 바이안테나리 Le^Y/Le^Y-ASGP(도 12a-12c)와 비교하여 단일 쇄 Le^Y-Gal에 대해 약간 더 높은 결합 친화도와 유사함을 보여주었고, 이는 BR96이 단일 쇄 및 바이안테나리 Le^Y 글리칸 사이에 특이적 선택성을 갖지 않음을 시사한다. 따라서, hBBC는 BR96과 비교하여 고유한 에피토프 특이성을 포함한다.

표 4

등온 적정 열량 측정 결과

항원 구조	항원 명칭	hBBC	BR96
	Le^Y-Gal	K_D = 80.6 μM	K_D = 5.68 μM
	Le^B-Gal	K_D = 26.2 μM	n/a
	Le^Y/Le^Y-ASGP	K_D = 25.9 μM	K_D = 10.66 μM

[0385]

항원 구조	항원 명칭	hBBC	BR96
	H-ASGP	검출된 특이적 결합 없음	n/a
	Le^X/Le^X-ASGP	검출된 특이적 결합 없음	n/a
	Le^Y/Le^Y-I 항원	K_D = 30.0 μM	K_D = 5.99 μM
	Le^Y/Le^B-I 항원	K_D = 40 μM	n/a
	Le^A-Gal	검출된 특이적 결합 없음	n/a
	Le^X-Gal	검출된 특이적 결합 없음	n/a
	H 항원 타입 I	검출된 특이적 결합 없음	n/a
	H 항원 타입 II	검출된 특이적 결합 없음	n/a

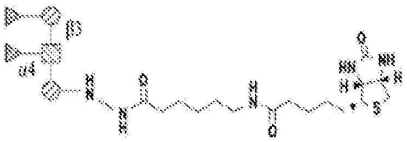
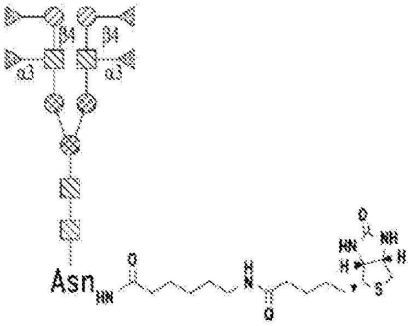
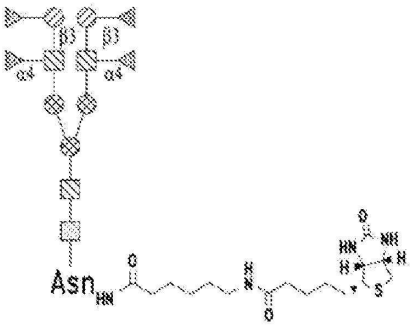
= Gal = GlcNAc = Fuc = Man

[0386]

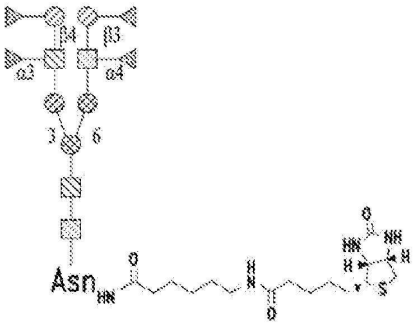
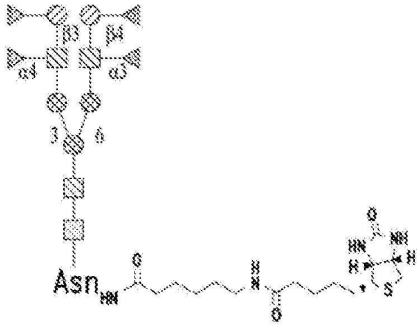
[0387] 이들 결과는 hBBC 에피토프를 부분적으로 특성화한다. 그러나, 자유-유동성 hBBC와 고정된 글리칸 사이의 상호작용은 에피토프에 대한 추가의 정보를 제공하고; 따라서, hBBC는 표면 플라스몬 공명(SPR) 및 ELISA 실험에서 일련의 고정된 글리칸으로 시험되었다. 표 5(표 4에서와 동일한 글리칸 설명)에 제시된 바와 같이, 스트렙타비딘-코팅된 분석 표면 및 비오틴-접합된 글리칸(SPR의 경우, Le^Y-Gal-비오틴, Le^B-Gal-비오틴, Le^Y/Le^Y-ASGA-비오틴, 및 Le^B/Le^B-ASGA-비오틴; ELISA의 경우, Le^Y-Gal-비오틴, Le^B-Gal-비오틴, Le^Y/Le^Y-ASGA-비오틴, Le^B/Le^B-ASGA-비오틴, 3-Le^Y/6-Le^B-ASGA-비오틴, 및 3-Le^B/6-Le^Y-ASGA-비오틴)이 사용되었다.

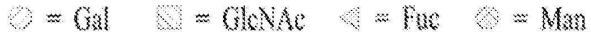
표 5

SPR 및 ELISA에 사용된 글리칸 항원의 구조 및 MW

항원	구조	분자량
Le^Y-Gal-sp3-비오틴		1361.4
Le^B-Gal-LC-비오틴		1191.25
Le^Y/Le^Y-ASGA-비오틴		2679.61
Le^B/Le^B-ASGA-비오틴		2679.61

[0388]

항원	구조	분자량
3-Le^{Y}/6-Le^{B}-ASGA-비오틴		2679.61
3-Le^{B}/6-Le^{Y}-ASGA-비오틴		2679.61



[0389]

[0390] 표면 플라스몬 공명

[0391] Le^{Y}-Gal-비오틴, Le^{B}-Gal-비오틴 및 Le^{Y}/Le^{Y}-ASGA-비오틴에 대한 hBBC의 결합 친화도는 스트렙타비딘 코팅된 칩 상의 표면 플라스몬 공명(SPR)에 의해 분석되었다. 요약하면, 비아코어 T100이 작동 완충액으로서 사용된 HBS-EP + 완충액(GE Healthcare)과 함께 사용되었다. 비오티닐화 글리칸을 10pM으로 희석하고, 표준 절차에 따라 센서 칩 SA(GE Healthcare)에 고정시켰다. 글리칸을 60초 동안 10 μL/분의 유속으로 고정시켰다. hBBC 또는 BR96을 제바 탈염 스핀 컬럼(7K MWCO, 0.5mL, ThermoFisher)을 사용하여 HBS-EP + 완충액으로 완충액 교환시키고, HBS-EP + 완충액으로 480, 240, 120, 60 및 30nM으로 연속 희석시켰다. 단일-사이클 운동 분석을 수행하였다. 항체를 150초 동안 30 μL/분의 유속으로 글리칸에 결합시키고, 300초 동안 해리시켰다. 칩을 120초 동안 50 μL/분의 유속으로 2M $MgCl_2$로 재생시켰다. 데이터를 Biacore T200 평가 소프트웨어(GE Healthcare)로 평가하였다. 2-상태 반응을 곡선-피팅(curve-fitting)에 사용하였고, ka, kd 및 KD의 최적합 값을 수득하였다(표 6). 다양한 글리칸 항원에 대한 hBBC 및 BR96의 결합을 나타내는 SPR 센서그램이 도 13a 및 13b에 제공된다.

[0392] [표 6]

SPR 결과의 요약

[0393]

항원 명칭	hBBC	BR96
Le^{Y}-Gal-비오틴	40~59 μM	270 nM
Le^{B}-Gal-비오틴	2.3~3.1 μM	n/a
Le^{Y}/Le^{Y}-ASGA-비오틴	2~3 μM	1 μM
Le^{B}/Le^{B}-ASGA-비오틴	1 μM	n/a

[0394] SPR은 바이안테나리 Le^{Y}/Le^{Y}-ASGA-비오틴이 단일 쇄 Le^{Y}-Gal-비오틴에 비해 hBBC에 대해 더 높은 친화도를 나타냈고, 이는 ITC 결과와 일치되었음을 보여주었다. 또한, 바이안테나리 Le^{B}/Le^{B}-ASGA-비오틴은 단일 쇄 Le^{B}-Gal-비오틴과 비교하여 hBBC에 대해 더 높은 친화도를 나타내었으며, 이는 또한 Le^{Y} 항원에 대해 관찰된 경향과 일

치한다. hBBC는 Le^B-Gal-비오틴 대 Le^Y-Gal-비오틴에 대해 더 높은 친화도를 나타내었으며, 이는 ITC 결과와 필적할 만하다. SPR은 또한 hBBC가 Le^Y/Le^Y-ASGA-비오틴보다 Le^B/Le^B-ASGA-비오틴에 대해 더 높은 결합 친화도를 갖는다는 것을 보여주었으며, 이는 hBBC가 Le^Y-기반 항원보다 Le^B-기반 항원에 대해 더 높은 친화도를 갖는다는 관찰과 일치했다. Le^B/Le^B-ASGA 및 Le^Y/Le^Y-ASGA로부터 수득된 hBBC의 필적할 만한 KD 값은 hBBC가 다중-푸코실화된, 즉 2가 루이스 B 또는 루이스 Y 구조와 특이적으로 연관된다는 것을 추가로 나타낸다. 특히, Le^B/Le^B-ASGA에 대한 hBBC 반응은 Le^B-Gal에 대한 반응보다 더 강했지만(센서그램), 유사한 KD 값이 2개의 항원으로부터 수득되었다. Le^B/Le^B-ASGA는 hBBC에 대한 가장 높은 친화도의 구조인 것으로 보인다.

[0395] 그에 비해, BR96은 Le^Y-Gal-비오틴 및 Le^Y/Le^Y-ASGA-비오틴에 대해 약간 더 높은 친화도를 나타내었으며, 이는 구조적으로 유사한 항원 Le^Y/Le^Y-ASGP으로부터 생성될 때 ITC의 결과와 필적할 만하다. 요약하면, SPR 데이터는 ITC 실험의 데이터와 매우 일치하였다.

[0396] 간접 ELISA

[0397] ELISA에 의한 항체 결합 친화도를 평가하기 위해, 비오티닐화 글리칸 항원을 PBS 완충액 중의 적절한 농도로 희석시켰다. 100㎕의 희석된 항원 용액을 스트렙타비딘-코팅된 96-웰 검정 플레이트에 적용하고, 37℃에서 3.5시간 동안 진탕기에서 배양하였다. 플레이트를 PBST(PBS 완충액 중의 0.05% 트윈-20)로 세척하여 과량의 글리칸 항원을 제거하였다. 희석제(PBS 완충액 중의 0.1% BSA)에서 연속 적정된 1차 항체를 검정 플레이트에 적용하고, 37℃에서 1시간 동안 진탕기에서 배양하였다. PBST 세척 후, 100㎕의 HRP-접합된 항-인간 IgG 항체 용액(SouthernBiotech, 희석제 중 1:15,000 희석)을 37℃에서 1시간 동안 진탕기에서 검정 플레이트 내에서 배양하였다. 과량의 2차 항체를 세척한 후, 100㎕의 TMB 시약을 적용하고, 37℃에서 15분 동안 배양한 후, 50㎕의 0.5N HCl로 급냉시켰다. OD 값을 450nm에서 검출하였고, VERSA max 마이크로플레이트 판독기(Molecular Devices)에서 650nm에서의 값을 공제하였다. 데이터는 Softmax Pro (Molecular Devices)에서 처리되었다.

[0398] Le^Y/Le^Y-ASGA 대 Le^Y-Gal

[0399] hBBC 및 BR96의 결합 활성은 Le^Y-Gal-비오틴 코팅된 및 Le^Y/Le^Y-ASGA-비오틴 코팅된 스트렙타비딘-코팅된 ELISA 플레이트 상에서 시험되었다. 코팅된 항원의 양은 도 14a 및 14b에 나타낸 바와 같았다. hBBC는 Le^Y-Gal보다 Le^Y/Le^Y-ASGA에 대해 훨씬 더 강한 결합을 나타내었다. BR96은 Le^Y/Le^Y-ASGA보다 Le^Y-Gal을 훨씬 더 잘 결합한다는 점에서 hBBC와 반대되는 패턴을 나타내었다. 요약하면, 간접 ELISA 는 ITC 및 SPR 실험과 유사한 결합 친화도 결과를 제공하였다.

[0400] Le^B/Le^B-ASGA 대 Le^Y/Le^Y-ASGA 및 Le^B-Gal

[0401] 다음으로, hBBC가 Le^B/Le^B-ASGA-비오틴, Le^Y/Le^Y-ASGA-비오틴 및 Le^B-Gal-비오틴-코팅된 스트렙타비딘-코팅된 ELISA 플레이트에 대한 결합에 대해 시험되었다. 코팅 항원의 양은 도 15에 지시된 바와 같았다. 간접 ELISA의 결과는 hBBC가 Le^Y/Le^Y-Gal 및 Le^B-Gal보다 Le^B/Le^B-ASGA에 대해 상당히 더 강한 결합을 보여주었다.

[0402] 항원-결합 ELISA

[0403] 항원-결합 ELISA를 개발하여 hBBC의 상이한 글리칸 항원에 대한 상대적 결합 친화도를 평가하였다. 간략하게, hBBC를 연속적으로 적정하고, 상이한 글리칸 항원으로 코팅된 스트렙타비딘-기능화된 96-웰 검정 플레이트에 적용하였다. 글리칸 항원에 대한 hBBC의 결합은 서양고추냉이 퍼옥시다제(HRP)와 접합된 인간 IgG-특이적 항체에 이어서, TMB 시약에서 발색으로 검출되었다. 마이크로플레이트 판독기를 사용하는 450nm에서의 흡광도는 그의 항원에 결합된 hBBC의 양에 비례하였다. 상대적 친화도는 hBBC 농도의 함수로서 OD를 플롯팅함으로써 결정되었다.

[0404] 항원 제조

[0405] 비오티닐화 루이스 Y 펜타오스, Le^Y-Gal-sp3-비오틴은 Elicityl(Crolles, France)로부터 구입하였다. 루이스 B 펜타오스는 Elicityl로부터 구입하였고, 추가로 인-하우스 비오티닐화하였다(Le^B-Gal-LC-비오틴). 다른 4개의

비오티닐화 글리칸: Le^Y/Le^Y-ASGA-비오틴, Le^B/Le^B-ASGA-비오틴 3-Le^Y/6-Le^B-ASGA-비오틴(Le^Y/Le^B-ASGA-비오틴), 및 3-Le^B/6-Le^Y-ASGA-비오틴(Le^B/Le^Y-ASGA-비오틴)은 일련의 효소 글리코실화에 이어, 화학적 비오티닐화를 통해 합성되었다(표 5). 비오티닐화 글리칸을 박층 크로마토그래피(TLC) 및 전기분무 이온화-질량 분광법(ESI-MS)에 의해 분석하여 순도가 적어도 95%에 도달하고 비접합된 비오틴이 없다는 것을 확인하였다. HPAEC-PAD 단당류 분석이 비오티닐화 글리칸의 정량화를 위해 적용되었다.

[0406] 항체

[0407] hBBC가 항원-결합 ELISA에서 사용되었다.

[0408] ELISA

[0409] 비오티닐화 글리칸 항원을 PBS 완충액에서 18.7nM로 희석시켰다. 100㎕의 희석된 항원 용액을 스트렙타비딘-코팅된 96-웰 검정 플레이트에 적용하고, 37℃에서 3.5시간 동안 진탕기에서 배양하였다. 플레이트를 PBST(PBS 완충액 중의 0.05% 트윈-20)로 세척하여 과량의 글리칸 항원을 제거하였다. 희석제(PBS 완충액 중의 0.1% BSA)에서 연속적으로 적정된 1차 항체를 검정 플레이트에 적용하고, 37℃에서 1시간 동안 진탕기에서 배양하였다. PBST 세척 후, 100㎕의 HRP-접합된 항-인간 IgG 항체 용액(SouthernBiotech, 희석제 중 1:10,000 희석)을 37℃에서 1시간 동안 진탕기에서 검정 플레이트 내에서 배양하였다. 과량의 2차 항체를 세척한 후, 100㎕의 TMB 시약을 적용하고, 37℃에서 15분 동안 배양한 후, 50㎕의 0.5N HCl로 급냉시켰다. OD 값을 450nm에서 검출시켰고, VERSA max 마이크로플레이트 판독기(Molecular Devices)에서 650nm에서의 값을 공제하였다. 데이터는 Softmax Pro(Molecular Devices)에서 처리되었다.

[0410] 결과

[0411] 데이터는 도 16a에 제시되어 있다. hBBC가 항원 결합 ELISA에서 Le^B/Le^B-ASGA, Le^Y/Le^Y-ASGA, 3-Le^Y/6-Le^B-ASGA-비오틴 및 3-Le^B/6-Le^Y-ASGA-비오틴에 결합된 경우, OD 값은 협소한 범위의 낮은 항체 농도(0.4 내지 4㎍/mL) 내에서 증가된 반면, hBBC의 결합은 Le^Y-Gal 및 Le^B-Gal로 명백하게 더 약했으며, 이는 하나의 글리칸에서 2가 Le^Y, Le^B, Le^B/Le^Y, 또는 Le^Y/Le^B가 단일 루이스 $^{Y/B}$ 잔기보다 hBBC에 더 높은 결합 친화도를 제공하였음을 나타낸다.

[0412] 항원-결합 친화도의 직접 비교: hBBC.10.1 대 BBC

[0413] 본 실험의 목적은 항원-결합 ELISA에 의해 hBBC.10.1의 항원 친화도를 선조 BBC 항체의 항원 친화도와 비교하는 것이었다.

[0414] 항원 제조

[0415] 비오티닐화 루이스 Y 펜타오스, Le^Y-Gal-sp3-비오틴은 Elicityl로부터 구입하였다. 루이스 B 펜타오스는 Elicityl로부터 구입하였고, 추가로 인-하우스 비오티닐화했다(Le^B-Gal-LC-비오틴). 다른 4개의 비오티닐화 글리칸: Le^Y/Le^Y-ASGA-비오틴, Le^B/Le^B-ASGA-비오틴 3-Le^Y/6-Le^B-ASGA-비오틴(Le^Y/Le^B-ASGA-비오틴), 및 3-Le^B/6-Le^Y-ASGA-비오틴(Le^B/Le^Y-ASGA-비오틴)이 일련의 효소 글리코실화에 이어, 화학적 비오티닐화를 통해 합성되었다(표 5). 비오티닐화 글리칸을 TLC 및 ESI-MS에 의해 분석하여 순도가 적어도 95%에 도달하고 비접합된 비오틴이 없다는 것을 확인하였다. HPAEC-PAD 단당류 분석이 비오티닐화 글리칸의 정량화용으로 적용되었다.

[0416] 항체

[0417] BBC 및 hBBC.10.1이 항원-결합 ELISA에서 사용되었다.

[0418] 항원-결합 ELISA

[0419] 96-웰 EvenCoat™ 스트렙타비딘 마이크로플레이트(R&D Biosystems, MN, Cat No. CP004)를 4℃에서 밤새 3.73pmol/웰의 양으로 PBS 중의 다양한 비오티닐화 글리칸과 함께 배양하였다. PBS/0.05% Tween 20(Sigma, Cat No P1379-500mL)으로 3회 세척한 후, 100㎕의 희석된 BBC 또는 hBBC.10.1 항체를 항원 코팅된 웰에 첨가한 다음, 37℃에서 1시간 동안 배양하였다. 웰을 PBS/0.05% Tween 20으로 3회 세척한 다음, 100㎕의 10000x 희석된 마우스 항-인간 IgG(Fc)-HRP(Southern Biotech, Cat No. 9040-05)를 사용하여 37℃에서 1시간 동안 배

양하였다. 세척 후, 100㎕의 SureBlue™ 역 TMB(KPL, Cat No. 53-00-03)를 37℃에서 15분 동안 발색용으로 첨가하였다. 0.5N HCl을 첨가하여 반응을 중지시켰다. 상기 흡광도는 VERSAMAX™ 마이크로플레이트 판독기(Molecular Devices, San Jose, CA) 상에서 650nm 기준으로 450nm의 파장에서 판독되었고, 데이터는 SoftmaxPro™ 소프트웨어(Molecular Devices)에 의해 처리되었다

[0420] 결과:

[0421] BBC(도 16b) 및 hBBC.10.1(도 16c)의 항원-결합 ELISA는 BBC와 비교하여 hBBC.10.1이 단일 쇄 글리칸 항원(Le^B-Gal 및 Le^Y-Gal)에 대해 더 낮은 친화도를 가졌고, 두 항체가 바이안테나리 글리칸 항원(Le^B/Le^B-ASGA, Le^Y/Le^Y-ASGA, 3-Le^Y/6 -Le^B-ASGA, 및 3-Le^B/6-Le^Y-ASGA)에 대해 높은 친화도를 가졌음을 보여주었다. 이러한 데이터는 hBBC.10.1이 BBC보다 단일 쇄와 바이안테나리 항원 사이에 더 나은 결합 선택도를 가졌음을 시사했다.

[0422] 요약

[0423] 본 실시예에서 기재된 에피토프 특성화 실험은 hBBC가 암 세포주-유도된 바이 및 트리-안테나리 $Le^{Y/B}$ I 항원; 및 또한 바이- 및 트리-안테나리 Le^Y N-글리칸에 특이적으로 결합되었음을 나타내었다. 또한, hBBC에 의해 인식된 에피토프는 디-푸코실화 LacNAc 백본(들)을 포함하였다. 바이안테나리 Le^B/Le^B-ASGA는 hBBC와 가장 강한 결합 친화도를 갖는 항원이었다. 바이안테나리 Le^Y/Le^Y-ASGA, Le^Y/Le^B-ASGA, 및 Le^B/Le^Y-ASGA는 또한 단일 쇄 Le^B-Gal 및 Le^Y-Gal 항원과 비교하여 hBBC에 대해 높은 친화도를 나타내었다. 또한, 항원이 단일 쇄이든 또는 바이안테나리 구조이든, 단독 Le^B-기반 항원은 단독 Le^Y-기반 항원보다 hBBC에 대해 더 높은 친화도를 나타내었다. 최종적으로, hBBC의 결합 거동(동역학) 및 에피토프는 BR96과 상이했다.

[0424] 실시예 4

[0425] 표적 세포에서 $_H$BBC의 내재화

[0426] 항체는 목적하는 부위에 기능적 페이로드를 전달하기 위한 담체로서 사용될 수 있다. 예를 들어, 일부 암 요법은 항원 특이적 항체를 사용하여 세포 독성 약물(즉, 항체-약물 접합체 또는 ADC)을 내재화로서 공지되기도 하는 세포내 섭취를 통해 종양 세포로 전달한다. 일부 현재 ADC는 리소좀 구획에서 절단되는 절단성 링커를 포함하여 내재화 후 약물을 선택적으로 방출하며, 혈청내 약물의 안정성을 증가시키는 추가 이점을 갖는다.

[0427] hBBC가 암 세포에 효과적으로 내재화되었는지 여부를 시험하기 위해 다음과 같은 실험이 수행되었다. 먼저, 통상적인 내재화 검정에서, hBBC 항체를 배양물 중 AGS 위암 세포에 첨가하였고, 결합을 4℃에서 1시간 동안 수행하여 특이적 항체/수용체 상호작용을 가능하게 하지만, 세포내 섭취를 중지시켰다. 이어서, 비-특이적으로 결합된 항체를 세척하고, 세포를 37℃로 옮겨 정상적인 세포내 섭취를 허용하였다. 0분 및 30분에 세포를 고정시키고, Alexa488-접합된 항-인간 IgG 항체(도 17, 좌측 패널)를 사용하여 hBBC를 검출시켰다. F-액틴을 팔로이딘 로다민(우측 패널; 공분산 염색은 황색 형광 신호로서 나타남)으로 표지하였다. 도 17에 도시된 바와 같이, hBBC는 0분에 세포 막을 염색한 다음, 내재화를 겪고 37℃ 배양 후(30분, 투과된 세포) 핵 주위의 세포질 소포에 국소화되었다. 세포질 신호는 희미한 막 신호만 검출될 수 있는 비투과 제어(30분, 비투과된 세포)에 의해 추가로 입증되었다. 이들 데이터는 hBBC가 30분 이내에 AGS 세포로 효과적으로 내재화됨을 보여준다.

[0428] 제2 실험에서, hBBC의 실시간 세포내 국소화를 조사하였다. 간략하게, hBBC 항체를 AGS 세포에 첨가하고 37℃에서 4 또는 8시간 동안 배양하여 내재화를 용이하게 하였다. 이어서, 세포를 고정시키고, Alexa488-접합된 항-인간 IgG 항체(도 18, 좌측 패널에 제시된 항-인간 IgG)를 사용하여 hBBC의 실시간 국소화를 조사하였다. 리소좀을 항-램프-1 항체에 이어, 표지된 항-토끼 IgG 항체(중간 패널에 제시됨)를 표지하였다. 도 18에 도시된 바와 같이, hBBC는 4 또는 8시간 배양 후에 램프-1(병합; 우측 패널)과 공동-국소화되고, 이는 내재화된 hBBC가 리소좀 구획에 국소화된다는 것을 나타낸다. 또한, hBBC는 적어도 8시간 동안 명백한 분해 없이 리소좀 구획에서 안정화될 수 있다. 이들 결과는 hBBC가 ADC와 같은 항원-표적화 접합체에서와 같이 사용하기 위한 유용성을 갖는다는 것을 나타낸다.

[0429] 실시예 5

[0430] 인간 조직 샘플에서 $_H$BBC의 면역염색

[0431] 건강한 조직 샘플 및 암성 조직 샘플을 수득하고, hBBC 10.1에 의한 면역 염색을 표준 프로토콜에 따라 포르말린-고정 파라핀-매립된 조직 절편에서 수행하였다. 건강한 조직 및 암성 조직에 대한 염색 결과는 각각 표 7 및 8에 요약되어 있다.

표 7

[0432] 다양한 인간 정상 조직의 hBBC.10.1 면역 염색

조직	**hBBC 10.1_2μg/ml**
췌장	**± (3/3)**
혀 (타액선 조직)	**+ (3/3)**
후두	**++ (3/3)**
식도	**± (3/3)**
위	**+ (3/3)**
소장	**+++ (3/3)**
결장	-
뇌하수체	-
유방	-
대뇌	-
소뇌	-
부신	-
부갑상선	-
난소	-
고환	-
비장	-
편도선	-
흉선	-
골수	-
폐	-
심장	-
간	-
신장	-
전립선	-
자궁	-
자궁경부	-
횡문근	-
피부	-
신경	-
대망막	-
자궁 내막	-

표 8

[0433] 인간 암성 조직에서 hBBC 면역 염색

기관	**병리 진단**	**유형**	**양성 비율**		
위	선암종	악성	57/175	32.6%	33.2%
	점액성 선암종		6/17	35.3%	
	미분화 선암종		1/2	50.0%	
	인환 세포 암종		1/2	50.0%	
결장	선암종	악성	11/23	47.8%	44.0%
	점액성 선암종		0/2	0.0%	
유방	침습성 유관 암종	악성	1/23	4.3%	4.2%

	혼합 소엽 및 관 암종		0/1	0.0%	
간	간세포 암종	악성	1/40	2.5%	2.5%
폐	선암종	악성	3/15	20.0%	20.0%
	편평 세포 암종		2/10	20.0%	
림프절	전이성 선암종	전이	13/40	32.5%	32.5%
난소	장액 선암종	악성	0/33	0.0%	5.0%
	점액성 선암종		2/6	33.3%	
	자궁 내막양 선암종		0/1	0.0%	
췌장	관 선암종	악성	11/24	45.8%	48.0%
	유두 선암종		1/1	100.0%	
전립선	선암종	악성	1/25	4.0%	4.0%
자궁	자궁 내막양 선암종	악성	10/40	25.0%	25.0%
기타	편평 세포 암종	악성	1/32	3.1%	3.1%

[0434] 또한, 다양한 인간 암 세포주를 hBBC.10.1로 염색하여 에피토프 발현 패턴을 결정하였다. 결과는 표 9에 요약되어 있다.

표 9

[0435] 인간 암 세포주 상의 hBBC 에피토프 발현

유형	**세포주**	**hBBC.10.1 결합**
위암	AGS	+++
	TSGH9201	+
	NCI-N87	++
	KATO III	-
	MKN45	-
	MKN74	-
	MKN7	-
	LOVO	-
결장암	결장 205	-
	결장 201	+
	SW1116	+++
	DLD-1	++
	LS 174T	+
	HT-29	-
	T84	-
유방암	MCF-7	++
	MDA-MB231	-
	MDA-MB453	-
	T47D	-
난소암	NIH OVCAR-3	+
	SW626	+
	SK-OV-3	-
	ES-2	-
췌장암	SU.86.86	-
	EBC-1	-
	PABC-1	-
폐암	NCI-H146	+
	NCI-H209	-
피부암	A431	-

[0436] 실시예 6

[0437] 결장암의 이종이식 모델에서 hBBC의 항종양 활성

[0438] 위암 세포주 AGS, TSGH9201로부터, 및 결장암 세포주 COLO 201, COLO 205, DLD-1로부터 인간 암 세포를 도입함을 포함하는 이종이식 SCID 모델에서 hBBC의 종양 억제 효과를 평가하기 위해 일련의 생체내 동물 연구를 수행하였다. hBBC.10.1은 COLO 205를 제외한 모든 세포주에 대한 강한 내지 중간 결합 수준을 나타내었다(실시예 5의 표 9). hBBC.10.1이 모든 이종이식 연구를 위해 사용되었고, BR96 은 대조군으로 사용되었다.

[0439] DLD-1 및 COLO 205 이종이식 모델에서 hBBC.10.1의 생체내 항종양 활성

[0440] 본 연구의 목적은 DLD-1 및 COLO 205 이종이식 모델에서 고용량의 hBBC.10.1의 종양 억제 효과를 조사하는 것이었다. 간략하게, 인간 결장암 세포주 DLD-1 및 COLO 205를 American Type Culture Collection(ATCC, Manassas, VA, USA)으로부터 얻었다. 세포를 10% 태아 소 혈청(FBS)으로 보충된 RPMI 1640 배지에서 성장시키고, 세포 배양물을 37℃에서 5% CO_2 대기하에 가습된 인큐베이터에서 유지시켰다. 계대 5 내지 8에서 세포가 종양 접종용으로 사용되었다.

[0441] 특이적 병원균 부재(SPF) 암컷 CB17 중증 조합된 면역결핍(SCID) 마우스를 BioLASCO(Taiwan)로부터 구입하였고, 임의의 실험 조작 전에 적어도 1주일 동안 순응시켰다. 마우스는 12:12시간 명-암 사이클(light-dark cycle)하에서 50 ± 10% 습도를 갖는 온도-제어 환경(22 ± 2℃)에서 개별적으로 환기된 케이지(IVC)에 수용되었다. 모든 실험은 대만 농업 위원회(Council of Agriculture, Taiwan)에 의해 규정된 규정 및 동물 보호법에 따라 수행되었다.

[0442] 암 세포를 50%의 BD 마트리겔(Cat. 354248)을 함유하는 빙냉 무혈청 배지에서 5 x 10^6/200㎕의 세포 밀도로 재현탁시키고, 6-8주령의 SCID 마우스의 옆구리 영역에 피하 주사하였다. 종양 크기는 버니어 캘리퍼(Laser Tools and Technics(LTT), Hsin Chu City, Taiwan, 150 x 0.05 ㎜)로 매주 측정되었고, 종양 중량은 "중량(mg)=(폭^2 x 길이)㎜^{3}/2"으로 추산되었다(참조: Ito et al. (1992) Cancer Res 52:3739). 종양 중량이 150 내지 200mg에 도달할 때, 마우스를 9개의 그룹(그룹당 n = 6)으로 무작위로 나누었으며, 각 그룹은 필적할 만한 종양 크기를 갖고, 항체 처리를 시작하였다. 종양-함유 SCID 마우스를 6주 동안 50mg/kg에서 1주일에 1회 hBBC.10.1(lot: 17001)로 복강내 주사하였다. 식염수를 복강내 주사한 종양-함유 SCID 마우스는 음성 대조군으로서 역할을 했다.

[0443] DLD-1 및 COLO 205 이종이식 실험의 결과는 각각 도 19a 및 19b에 도시되어 있다. hBBC.10.1은 대조군에 비해 DLD-1 종양 성장을 효과적으로 억제할 수 있지만, COLO 205 종양 성장은 억제하지 못했다. 이들 데이터는 DLD-1 세포에 결합하는 hBBC.10.1의 관찰된 능력과 일치하지만, COLO 205는 그렇지 않다.

[0444] 위 선암종 이종이식 모델에서 hBBC의 항종양 활성

[0445] 본 연구의 목적은 AGS 이종이식 모델에서 0.008 내지 1mg/kg 범위의 낮은 용량에서 hBBC.10.1 및 BR96의 항종양 효능을 비교하는 것이었다. 간략하게, 인간 위 선암종 세포주 AGS(CRL-1739)를 American Type culture Collection(ATCC, Manassas, VA, USA)으로부터 얻었다. AGS 세포를 10% 태아 소 혈청(FBS)으로 보충된 햄(Ham's) F-12K 배지에서 성장시키고, 세포 배양물을 37℃에서 5% CO_2 대기하에서 가습된 인큐베이터에서 유지시켰다. 계대 5-8에서 AGS 세포는 종양 접종용으로 사용되었다.

[0446] 특이적 병원균 부재(SPF) 암컷 CB17 중증 조합된 면역결핍(SCID) 마우스를 BioLASCO(Taiwan)로부터 구입하였고, 임의의 실험 조작 전에 적어도 1주일 동안 순응시켰다. 마우스는 12:12시간 명-암 사이클하에서 50 ± 10% 습도를 갖는 온도-제어 환경(22 ± 2℃)에서 개별적으로 환기된 케이지(IVC)에 수용되었다. 모든 실험은 대만 농업 위원회에 의해 규정된 규정 및 동물 보호법에 따라 수행되었다.

[0447] AGS 세포를 50%의 BD 마트리겔(Cat. 354248)을 함유하는 빙냉 무혈청 배지에서 5 x 10^6/200㎕의 세포 밀도로 재현탁시키고, 6-8주령의 SCID 마우스의 옆구리 영역에 피하 주사하였다. 종양 크기는 버니어 캘리퍼(Laser Tools and Technics(LTT), Hsin Chu City, Taiwan, 150 x 0.05 ㎜)로 매주 측정되었고, 종양 중량은 "중량(mg)=(폭^2 x 길이)㎜^{3}/2"으로 추산되었다(참조: Ito et al. (1992) Cancer Res 52:3739). 종양 중량이 150 내지 200mg에 도달할 때, 마우스를 9개의 그룹(그룹당 n = 6)으로 무작위로 나누었으며, 각 그룹은 필적할 만한 종양 크기를 갖고, 항체 처리를 시작하였다. 종양-함유 SCID 마우스를 6주 동안 1, 0.2, 0.04, 또는 0.008mg/kg에서

1주일에 1회 hBBC.10.1(lot: 17001) 또는 BR96(lot: 17001)으로 복강내 주사하였고, 제1 용량은 소정의 용량의 1.5배로 제공했다. 식염수를 복강내 주사한 종양-함유 SCID 마우스는 음성 대조군으로서 역할을 했다.

[0448] hBBC.10.1-처리된 및 BR96-처리된 마우스에 대한 결과를 각각 도 20a 및 20b에 제시되어 있다. 1 및 0.2mg/kg의 주간 용량으로 투여되는 경우, hBBC.10.1 및 BR96 모두는 대조군과 비교하여 종양 성장을 유의하게 억제하였다. 그러나, 두 항체는 낮은 용량(0.04 및 0.008mg/kg)에서 억제 효과를 나타내지 못하였다. 윤리적 고려로 인해, 종양 부담이 체중의 10% 초과일 때 마우스를 희생시켰다. 식염수 또는 더 낮은 용량의 항체를 투여받은 일부 마우스는 접종 후 60일째에 이 종점에 도달했고; 따라서, 통계적 분석은 60일까지 생성된 데이터에 대해서만 수행되었다. 대조적으로, 체중의 10%로의 종양 성장은 hBBC.10.1 또는 BR96의 더 높은 용량(1 및 0.2mg/kg)을 투여한 AGS 종양-함유 마우스에서 효과적으로 지연되었다. 이러한 용량-반응 연구는 hBBC.10.1이 AGS 종양-함유 마우스에서 BR96에 대해 필적할 만한 항종양 효능을 갖는다는 것을 나타낸다.

[0449] hBBC.10.1의 항종양 효능은 본 발명의 다른 생성된 hBBC 항체의 효능과 비교되었다. 한 실험에서, 수확된 AGS 세포를 PBS로 2회 세척하고, 25%의 BD 마트리겔™(BD Biosciences, Cat. 354248)을 함유하는 PBS에 5 x 10^6/200μL의 세포 밀도로 재현탁시켰다. 그 후, 200μL의 AGS 세포 현탁액을 암컷 SCID 마우스(6-8 주령)의 옆구리 영역에 피하 주사하였다(5 x 10^6 세포/마우스). 종양 크기는 버니어 캘리퍼(Laser 150 x 0.05mm)로 매주 측정하였고, 종양 중량은 "중량(mg) =(폭^2 x 길이)mm^3/2"으로 추산되었다[참조: Hisashi Ito *et al.* (1992)]. 종양 중량이 150 내지 200mg에 도달할 때, 마우스를 6개의 그룹(그룹당 n = 6)으로 무작위로 나누었으며, 각 그룹은 필적할 만한 종양 크기를 갖고, 항체 처리를 시작하였다. 종양-함유 SCID 마우스를 6주 동안 0.25mg/kg의 용량으로 1주일에 2회 hBBC.8 또는 돌연변이체(hBBC.9, hBBC.9.1, hBBC.10.1)로 복강내 주사하였다. 또한, hBBCb.8을 2mg/kg에서 더 높은 용량으로 시험하였다. 식염수를 복강내 주사한 종양-함유 SCID 마우스는 음성 대조군으로서 역할을 했다. 데이터는 도 20c에 도시되어 있다. 항종양 효과가 hBBC.8, hBBC.9, 및 hBBC.9.1로 관찰되었지만, 효과는 hBBC.10.1보다 다소 더 약했다. hBBC.10.1(0.25mg/kg)에 대한 필적할 만한 항종양 활성이 더 높은 용량(2mg/kg)에서 hBBC.8에 대해 관찰되었다.

[0450] hBBC.10.1이 또한 항종양 활성에 대해 hBBC.10.1FQ와 비교되었다. 간략하게, 수확된 AGS 세포를 PBS로 2회 세척하고, 25%의 BD 마트리겔™(Cat. 354248)을 함유하는 PBS에 5 x 10^6/200μL의 세포 밀도로 재현탁시켰다. 그 후, 200μL의 AGS 세포 현탁액을 암컷 SCID 마우스(6-8 주령)의 옆구리 영역에 피하 주사하였다(5 x 10^6 세포/마우스). 종양 크기는 버니어 캘리퍼(Laser 150 x 0.05mm)로 매주 측정하였고, 종양 중량은 "중량(mg) =(폭^2 x 길이)mm^3/2"으로 추산되었다[참조: Hisashi Ito *et al.* (1992)]. 종양 중량이 150 내지 200mg에 도달할 때, 마우스를 3개의 그룹(그룹당 n = 8)으로 무작위로 나누었으며, 각 그룹은 필적할 만한 종양 크기를 갖고, 항체 처리를 시작하였다. 종양-함유 SCID 마우스를 6주 동안 0.25mg/kg의 용량으로 1주일에 1회 hBBC.10.1 또는 hBBC.10.1FQ로 복강내 주사하였고, 제1 용량은 소정의 용량의 1.5배로 제공된다. 식염수를 복강내 주사한 종양-함유 SCID 마우스는 음성 대조군으로서 역할을 했다. 데이터(도 20d)는 hBBC.10.1FQ가 약간 더 강한 항종양 활성을 가졌음을 보여준다.

[0451] 후속 실험에서, AGS 이종이식 종양으로부터 단리된 이종이식 AGS(xAGS) 세포는 AGS 세포주 세포와 비교하여 적어도 2x hBBC 에피토프를 발현하는 것으로 나타났다(데이터는 제시되지 않음). xAGS 세포는 또한 부모 세포주와 비교하여 hBBC 에 의한 보다 강력한 ADCC 및 CDC 활성을 유도했다(데이터는 제시되지 않음). 도 21에 도시된 바와 같이, hBBC는 표적 xAGS 세포 대 BR96(PI 염색)에 대해 다소 더 약한 직접 사멸 효과를 가졌다.

[0452] 위 암종 이종이식 모델에서 hBBC의 항종양 활성

[0453] 본 연구의 목적은 TSGH 9201 이종이식 모델에서 0.04 내지 10mg/kg 범위의 낮은 용량에서 hBBC.10.1 및 BR96의 항종양 효능을 비교하는 것이었다. 간략하게, 인간 위 암종 세포주 TSGH 9201(Cat. 60146)은 식품 산업 연구 및 개발 연구소(FIRDI, Hsinchu, Taiwan)의 생물자원 수집 및 연구 센터(BCRC)로부터 얻었다. hBBC 에피토프의 더 높은 발현을 갖는 TSGH 9201 세포는 항-hBBC(lot: B24)에 이어 Fcγ 단편 특이적인 200배 희석된 플루오레세인(FITC)-AffiniPure™ 염소 항-인간 IgG(Jackson ImmunoResearch Inc, West Grove, PA, Cat. 109-095-098)로 후속 염색하여 형광 활성화된 세포 분류(FACS)(BD FACSJAZZ™ 세포 분류기, BD Biosciences, Singapore, Cat. 655486)의 2 라운드에 의해 풍부해졌다. 부모 TSGH 9201 세포와 비교하여, hBBC 에피토프의 발현 수준은 TSGH 9201(2s)(도시되지 않음)로 지정된 풍부한 세포에서 거의 4배 향상되었다. 부모 및 풍부한 세포를 모두 10% 태아 소 혈청(FBS) 및 1mM 나트륨 피루베이트가 보충된 RPMI-1640 배지(Gibco)에서

성장시켰다. 세포 배양물을 37℃에서 5% CO_2 대기하에 가습된 인큐베이터에서 유지시켰다. 계대 5-8에서 TSGH 9201(2s) 세포가 종양 접종용으로 사용되었다.

[0454] 특이적 병원균 부재(SPF) 암컷 CB17 중증 조합된 면역결핍(SCID) 마우스를 BioLASCO(Taiwan)로부터 구입하였고, 임의의 실험 조작 전에 적어도 1주일 동안 순응시켰다. 마우스는 12:12시간 명-암 사이클하에서 50 ± 10% 습도를 갖는 온도-제어 환경(22 ± 2℃)에서 개별적으로 환기된 케이지(IVC)에 수용되었다. 모든 실험은 대만 농업 위원회에 의해 규정된 규정 및 동물 보호법에 따라 수행되었다.

[0455] TSGH 9201(2s) 세포를 25%의 BD 마트리겔(Cat. 354248)을 함유하는 빙냉 무혈청 배지에서 5 x 10^6/200μL의 세포 밀도로 재현탁시키고, 200μL의 세포 현탁액을 6-8주령의 SCID 마우스의 옆구리 영역에 피하 주사하였다. 종양 크기는 버니어 캘리퍼(Laser Tools and Technics(LTT), Hsin Chu City, Taiwan, 150 x 0.05 mm)로 매주 측정되었고, 종양 중량은 "중량(mg) =(폭^2 x 길이)mm^3/2"으로 추산되었다(참조: Ito et al. (1992) Cancer Res 52:3739). 종양 중량이 150 내지 200mg에 도달할 때, 마우스를 3개의 그룹(그룹당 n = 5)으로 무작위로 나누었으며, 각 그룹은 필적할 만한 종양 크기를 갖고, 항체 처리를 시작하였다. hBBC.10.1 및 BR96의 생체내 효능을 평가하기 위해, 종양-함유 SCID 마우스를 6주 동안 10mg/kg에서 1주일에 1회 hBBC.10.1(lot: B24) 또는 BR96(lot: T05)으로 복강내 주사하였고, 제1 용량은 지시된 용량의 1.5배로 제공했다. 더 낮은 용량에서 hBBC.10.1 및 BR96의 항종양 활성을 비교하는 제2 연구에서, 종양-함유 SCID 마우스를 6주 동안 10, 1, 0.2, 또는 0.04mg/kg에서 1주일에 1회 hBBC.10.1(lot: 17001) 또는 BR96(lot: 17001)으로 복강내 주사하였고, 제1 용량은 지시된 용량의 1.5배로 제공했다. 식염수를 복강내 주사한 종양-함유 SCID 마우스는 음성 대조군으로서 역할을 했다.

[0456] 결과는 도 22에 제시되어 있다. hBBC.10.1 및 BR96은 모두 식염수 그룹과 비교하여 10mg/kg의 주간 투여량에서 종양 성장을 유의하게 억제하였다.

[0457] 결장직장 선암종 이종이식 모델에서 hBBC.10.1의 항종양 활성

[0458] 본 연구의 목적은 1) COLO 201 이종이식 종양 성장을 억제하는 hBBC.10.1의 능력을 시험하고; 2) COLO 201 이종이식 모델에서 0.008 내지 1mg/kg 범위의 용량으로 hBBC 및 BR96의 항종양 활성을 비교하는 것이었다.

[0459] 간략하게, 복수액으로부터 유도된 인간 결장직장 선암종 세포주 COLO 201(CCL-224)은 American Type Culture Collection(ATCC, Manassas, VA, USA)으로부터 입수했다. COLO 201 세포를 10% 태아 소 혈청(FBS) 및 1mM 나트륨 피루베이트로 보충된 RPMI-1640 배지(Gibco)에서 성장시켰다. 세포 배양물을 37℃에서 5% CO_2 대기하에 가습된 인큐베이터에서 유지시켰다. 계대 5-8에서 COLO 201 세포가 종양 접종용으로 사용되었다.

[0460] 특이적 병원균 부재(SPF) 암컷 CB17 중증 조합된 면역결핍(SCID) 마우스를 BioLASCO(Taiwan)로부터 구입하였고, 임의의 실험 조작 전에 적어도 1주일 동안 순응시켰다. 마우스는 12:12시간 명-암 사이클하에서 50 ± 10% 습도를 갖는 온도-제어 환경(22 ± 2℃)에서 개별적으로 환기된 케이지(IVC)에 수용되었다. 모든 실험은 대만 농업 위원회에 의해 규정된 규정 및 동물 보호법에 따라 수행되었다.

[0461] COLO 201 세포를 빙냉 무혈청 배지에 2 x 10^6/200μL의 세포 밀도로 재현탁시키고, 6-8주령의 SCID 마우스의 옆구리 영역에 피하 주사하였다. 종양 크기는 버니어 캘리퍼(Laser 150 x 0.05mm)로 매주 측정되었고, 종양 중량은 "중량(mg) =(폭^2 x 길이)mm^3/2"으로 추산되었다(참조: Ito et al. (1992) Cancer Res 52:3739). 종양 중량이 150 내지 200mg에 도달할 때, 마우스를 대조군 및 처리 그룹(그룹당 n = 6)으로 무작위로 나누었으며, 각 그룹은 필적할 만한 종양 크기를 갖고, 항체 처리를 시작하였다. 두 연구를 수행하여 COLO 201 종양 성장의 억제에 대한 hBBC의 생체내 효능을 평가했다.

[0462] 제1 연구에서, 종양-함유 SCID 마우스를 6주 동안 1주당 2회 2 내지 50mg/kg 범위의 용량으로 hBBC.10.1(lot: B26)로 복강내 주사하였고, 제1 용량은 지시된 용량의 1.5배로 제공된다. 제1 연구의 결과는 도 23에 도시되어 있다. 2-50mg/kg 에서 hBBC.10.1 처리는 식염수 그룹과 비교하여 종양 성장을 유의하게 억제하였다. 종양은 신속하게 줄어들었고, 결국에는 hBBC의 투여 후 단지 1주째, 즉 종양 접종 2주 후에 사라졌다.

[0463] 제2 연구에서, 더 낮은 용량에서 hBBC.10.1 및 BR96의 항종양 활성에 대한 추가의 비교를 수행하였다. 종양-함유 SCID 마우스를 6주 동안 1, 0.2, 0.04 및 0.008mg/kg에서 1주일에 1회 hBBC.10.1(lot: 17001) 또는 BR96(lot: 17001)으로 복강내 주사하였고, 제1 용량은 지시된 용량의 1.5배로 제공된다. 식염수를 복강내 주사한 종양-함유 SCID 마우스는 음성 대조군으로서 역할을 했다. 정제된 항체 hTKH2.2(lot: 1020429)는 음성 대조

군 항체로서 포함되는데, 이는 HEK293 세포에서 일시적인 발현에 의해 인-하우스 생성된 인간화 항-STn 항체이다. 제2 연구의 결과는 도 24a 및 24b에 도시되어 있다. 1 또는 0.2mg/kg의 주간 용량에서 hBBC.10.1 및 BR96은 모두 식염수 및 hTKH2.2 대조군과 비교하여 종양 성장을 유의하게 억제하였지만, 더 낮은 용량(0.04 및 0.008mg/kg hBBC.10.1; 0.04mg/kg BR96)은 종양 성장의 지연 효과를 나타내었다. 윤리적 고려로 인해, 종양 부담이 체중의 10% 초과일 때 마우스를 희생시켰다. 식염수 또는 더 낮은 용량의 hBBC.10.1 또는 BR96을 투여받은 일부 마우스는 접종 후 49일째에 이 종점에 도달하였고; 따라서, 통계적 분석은 49일까지 수득된 데이터에 대해서만 수행되었다.

[0464] 이러한 용량-반응 연구는 hBBC.10.1이 COLO 201 종양-함유 마우스에서 BR96 에 필적할 만한 항종양 효능을 갖는다는 것을 보여준다.

[0465] 실시예 7

[0466] 영장류 및 인간 조직에서 hBBC의 면역 염색

[0467] hBBC.10.1 면역 염색이 인간 및 사이노몰구스 원숭이(*Macaca fascicularis*) 로부터 상응하는 건강한 조직에 대해 수행되었다. 간략하게, 염색은 표준 프로토콜에 따라 2㎍/ml hBBC.10.1을 갖는 포르말린-고정 파라핀-매립 조직 절편을 사용하여 수행되었다. 결과를 표 10에 요약되어 있으며, 인간과 사이노몰구스 조직 사이에 유사한 염색 패턴을 나타내었다.

표 10

[0468] 인간 및 사이노몰구스 조직의 hBBC.10.1 면역 염색

조직	**인간**	**사이노몰구스**
췌장	± (3/3)	± (3/3)
혀(타액선 조직)	+ (3/3)	-
후두	++ (3/3)	+ (3/3)
식도	± (3/3)	-
위	+ (3/3)	+ (3/3)
소장	+++ (3/3)	+++ (3/3)
결장	-	-
뇌하수체	-	-
유방	-	-
대뇌	-	-
소뇌	-	-
부신	-	-
부갑상선	-	-
난소	-	-
고환	-	-
비장	-	-
편도선	-	-
흉선	-	-
골수	-	-
폐	-	-
심장	-	-
간	-	-
신장	-	-
전립선	-	-
자궁	-	-
자궁 경부	-	-
횡문근	-	-
피부	-	-
신경	-	-
대망막	-	-

자궁 내막	-	-

[0469] 실시예 8

[0470] 영장류 모델에서 hBBC.10.1의 안전성 및 내성 연구

[0471] 단일 정맥내(iv) 볼루스 주사 후 사이노몰구스 원숭이에서 hbbc.10.1의 내성 및 허용가능한 용량 범위를 평가하기 위해, 단일-용량 내성 및 용량-범위-발견 연구를 수행하였다(비-glp). 간략하게, 수컷 및 암컷 사이노몰구스 원숭이(*macaca fascicularis*)를 각 그룹에 수컷 1마리 및 암컷 1마리의 4개 그룹에 할당하였다. 그룹 1 내지 4의 동물은 각각 0, 50, 200 및 300mg/kg의 hBBC.10.1의 용량 수준을 투여받았다. 그룹 2 및 3의 동물은 적어도 5분의 지속기간 동안 느린 i.v. 볼루스 주사를 통해 1회 투여하였다. 그룹 1 및 4의 동물은 펌프 및 프라이밍된 주입 라인을 사용하여 20분(± 1분) i.v. 주입으로 1회 투여했다. 투여 약 24시간 후에, 부검을 수행하였다. 부검 동안, 총 관찰 및 기관 중량을 기록하고, 조직병리학을 위해 조직을 수집하였다. 수집된 조직의 일부를 슬라이드로 처리하고, 현미경으로 검사하였다.

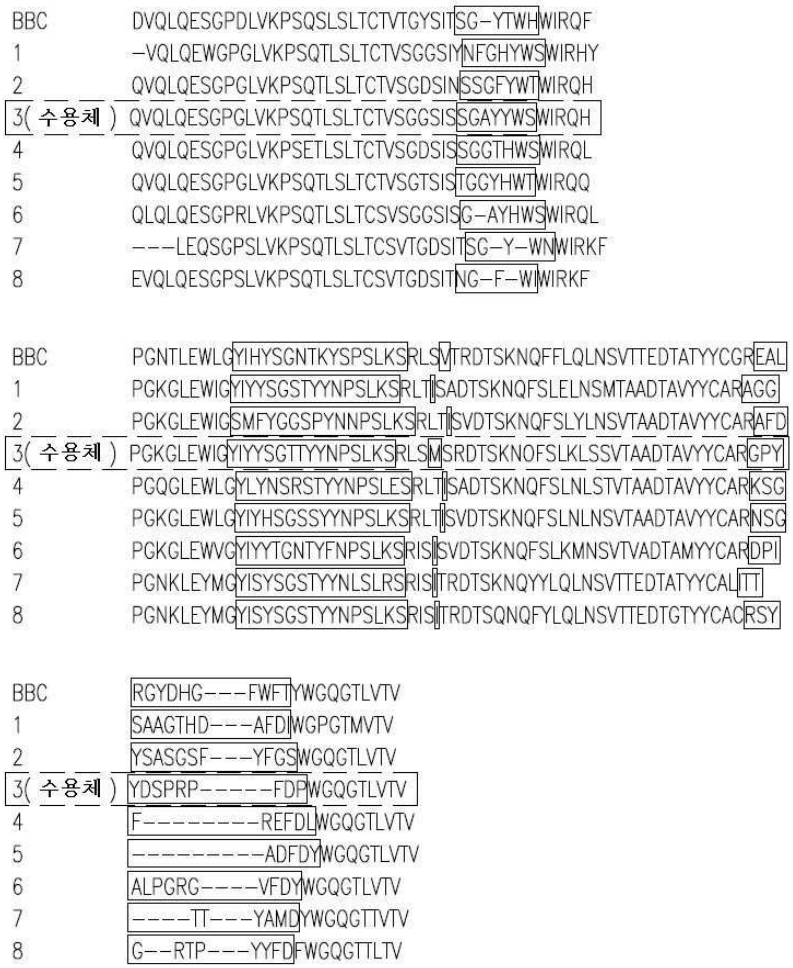
[0472] 결과는 hBBC.10.1이 50 내지 300mg/kg의 용량 범위로부터 사이노몰구스 원숭이에서 충분히 내성이었음을 나타냈다. 최소 출혈은 200 및 300mg/kg을 투여받은 동물의 맹장 및/또는 결장에서 관찰되었으며, 시험 품목과 관련된 것으로 보인다. 다른 가능한 시험 품목-관련 변화는 200mg/kg을 투여받은 한 동물의 위의 만성 및 급성 염증, 200mg/kg을 투여받은 한 동물의 십이지장 지와에 호중구의 침윤, 및 300mg/kg을 투여받은 한 동물의 회장의 융모 위축이다. 50mg/kg을 투여받은 동물(그룹 2)에서는 비정상적 소견이 관찰되지 않았다.

[0473] 상기 기재된 다양한 구현예는 추가의 구현예를 제공하기 위해 조합될 수 있다. 본 명세서에서 언급된 및/또는 출원 데이터 시트에 열거된 모든 미국 특허, 미국 특허 출원 공보, 미국 특허 출원, 외국 특허, 외국 특허 출원 및 비-특허 공보는 그 전문이 본원에 참고로 인용된다. 구현예의 측면은, 필요한 경우, 추가의 구현예를 제공하기 위해 다양한 특허, 출원 및 공보의 개념을 사용하도록 변형될 수 있다.

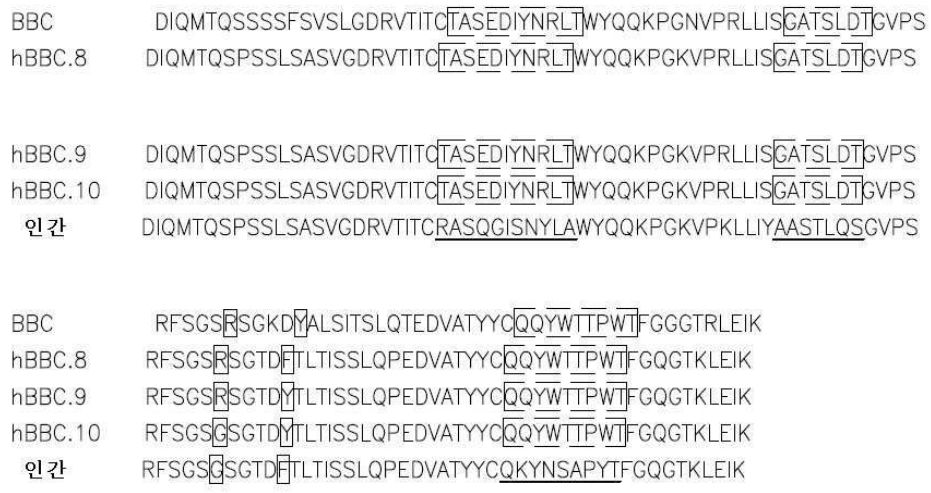
[0474] 이들 및 다른 변화가 상기 상세한 설명의 견지에서 구현예에 대해 이루어질 수 있다. 일반적으로, 하기 청구범위에서, 사용된 용어는 본 명세서 및 청구범위에 개시된 특정 구현예에 청구범위를 제한하는 것으로 해석되어서는 안되며, 이러한 청구범위가 자격이 되는 등가물의 전체 범위와 함께 모든 가능한 구현예를 포함하는 것으로 해석되어야 한다. 따라서, 청구범위는 본 개시에 의해 제한되지 않는다.

도면

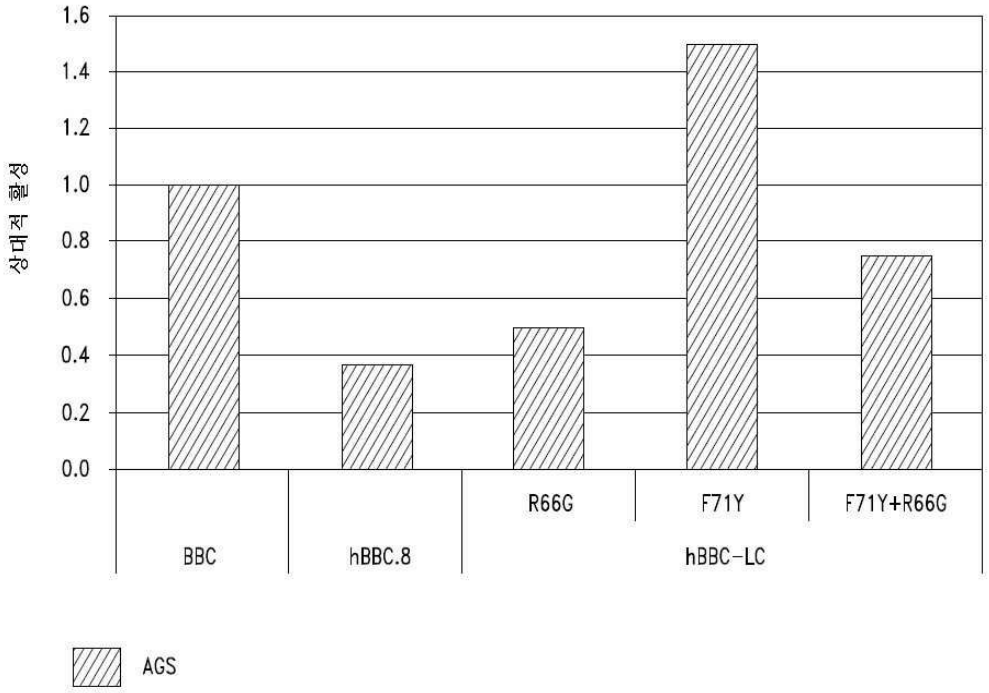
도면1


BBC DVQLQESGPDLVKPSQSLSLTCTVTGYSITSG-YTWHWIRQF
1 -VQLQEWGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSIYNFGHYWSWIRHY
2 QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGDSINSSGFYWTWIRQH
3(수용체) QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSISSGAYYWSWIRQH
4 QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGDSISSGGTHWSWIRQL
5 QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGTSISTGGYHWTWIRQQ
6 QLQLQESGPRLVKPSQTLSLTCSVSGGSISG-AYHWSWIRQL
7 ---LEQSGPSLVKPSQTLSLTCSVTGDSITSG-Y-WNWIRKF
8 EVQLQESGPSLVKPSQTLSLTCSVTGDSITNG-F-WIWIRKF
BBC PGNTLEWLGYIHYSGNTKYSPSLKSRLSVTRDTSKNQFFLQLNSVTTEDTATYYCGREAL
1 PGKGLEWIGYIYYSGSTYYNPSLKSRLTISADTSKNQFSLELNSMTAADTAVYYCARAGG
2 PGKGLEWIGSMFYGGSPYNNPSLKSRLTISVDTSKNQFSLYLNSVTAADTAVYYCARAFD
3(수용체) PGKGLEWIGYIYYSGTTYYNPSLKSRLSMSRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGPY
4 PGQGLEWLGYLYNSRSTYYNPSLESRLTISADTSKNQFSLNLSTVTAADTAVYYCARKSG
5 PGKGLEWLGYIYHSGSSYYNPSLKSRLTISVDTSKNQFSLNLNSVTAADTAVYYCARNSG
6 PGKGLEWVGYIYYTGNTYFNPSLKSRISISVDTSKNQFSLKMNSVTVADTAMYYCARDPI
7 PGNKLEYMGYISYSGSTYYNLSLRSRISITRDTSKNQYYLQLNSVTTEDTATYYCALITT
8 PGNKLEYMGYISYSGSTYYNPSLKSRISITRDTSQNQFYLQLNSVTTEDTGTYYCACRSY
BBC RGYDHG---FWFTYWGQGTLVTV
1 SAAGTHD---AFDIWGPGTMVTV
2 YSASGSF---YFGSWGQGTLVTV
3(수용체) YDSPRP-----FDPWGQGTLVTV
4 F---------REFDLWGQGTLVTV
5 ----------ADFDYWGQGTLVTV
6 ALPGRG----VFDYWGQGTLVTV
7 ----TT---YAMDYWGQGTTVTV
8 G--RTP---YYFDFWGQGTTLTV

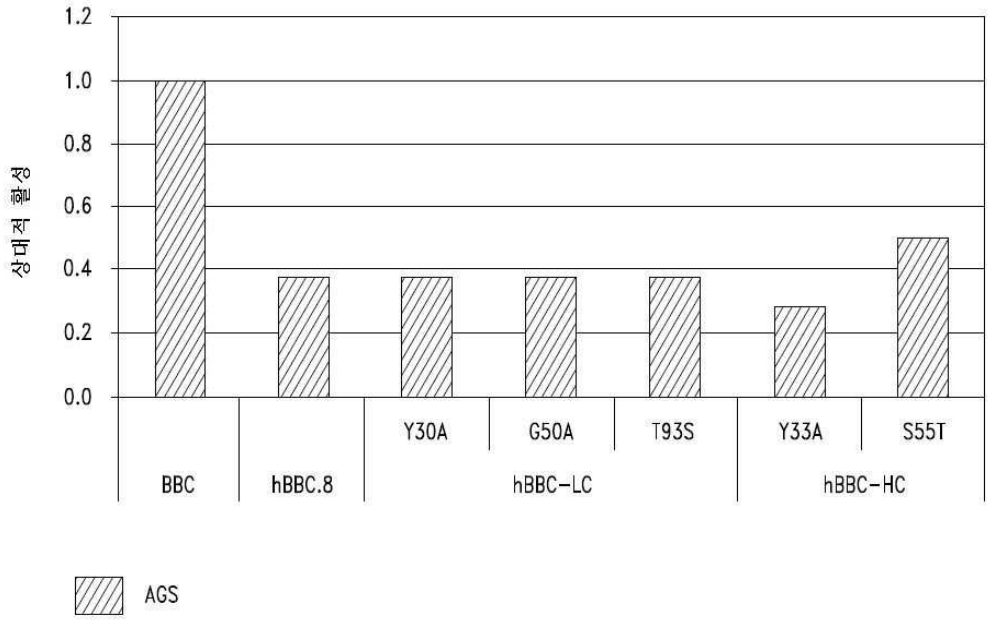
도면2a


BBC DIQMTQSSSSFSVSLGDRVTITCTASEDIYNRLTWYQQKPGNVPRLLISGATSLDTGVPS
hBBC.8 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCTASEDIYNRLTWYQQKPGKVPRLLISGATSLDTGVPS
hBBC.9 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCTASEDIYNRLTWYQQKPGKVPRLLISGATSLDTGVPS
hBBC.10 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCTASEDIYNRLTWYQQKPGKVPRLLISGATSLDTGVPS
인간 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNYLAWYQQKPGKVPKLLIYAASTLQSGVPS
BBC RFSGSRSGKDYALSITSLQTEDVATYYCQQYWTTPWTFGGGTRLEIK
hBBC.8 RFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCQQYWTTPWTFGQGTKLEIK
hBBC.9 RFSGSRSGTDYTLTISSLQPEDVATYYCQQYWTTPWTFGQGTKLEIK
hBBC.10 RFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDVATYYCQQYWTTPWTFGQGTKLEIK
인간 RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCQKYNSAPYTFGQGTKLEIK

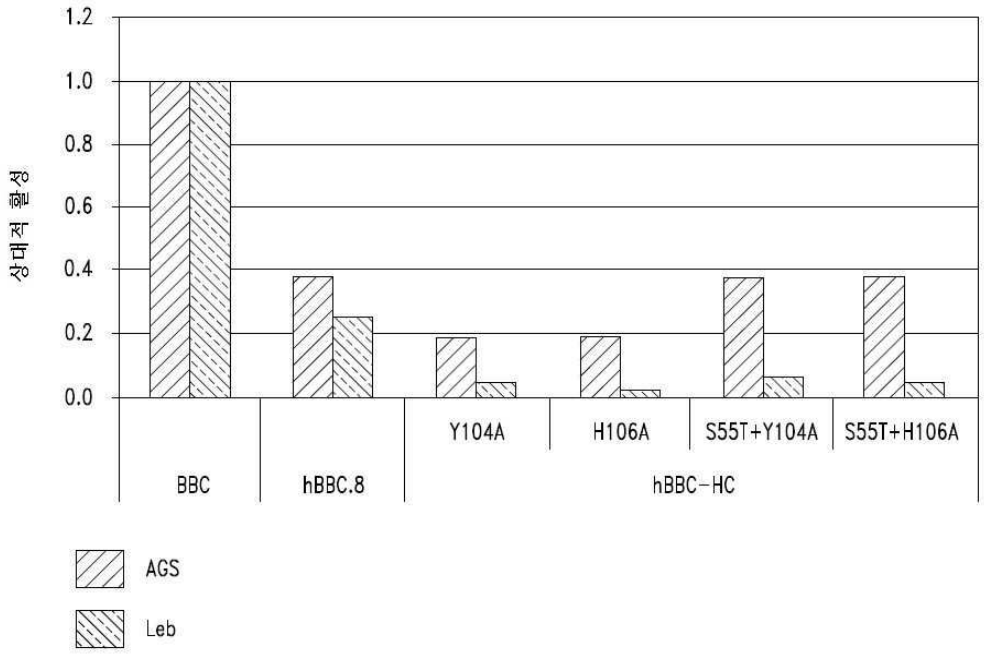
도면2b


1.6
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
상대적 활성
BBC
hBBC.8
R66G
F71Y
F71Y+R66G
hBBC-LC
AGS

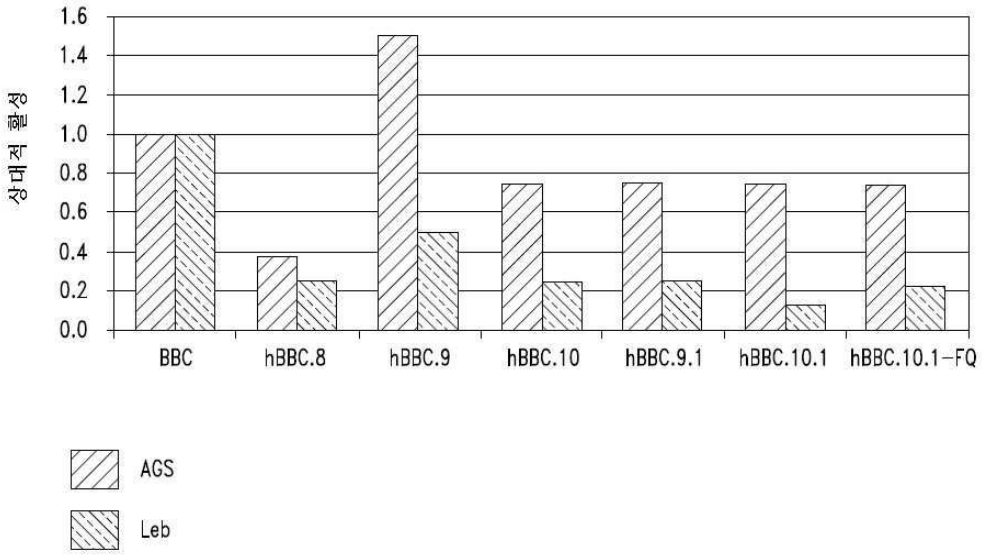
도면2c


1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
상대적 활성
BBC
hBBC.8
Y30A
G50A
T93S
Y33A
S55T
hBBC-LC
hBBC-HC
AGS

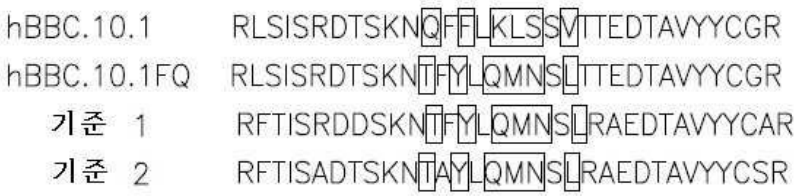
도면2d



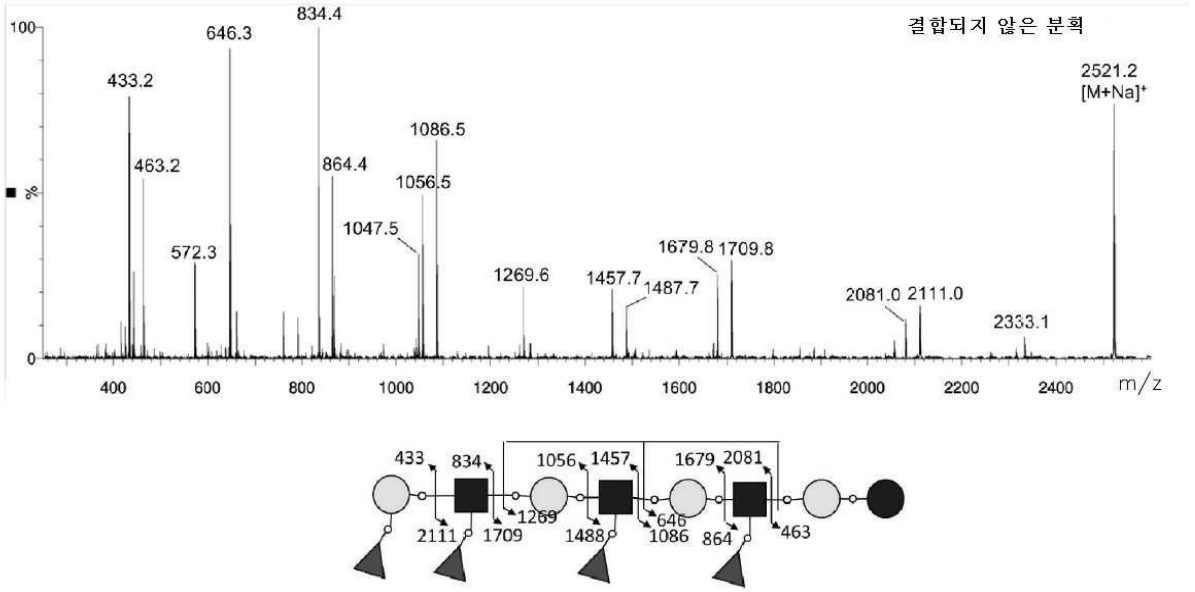
도면2e



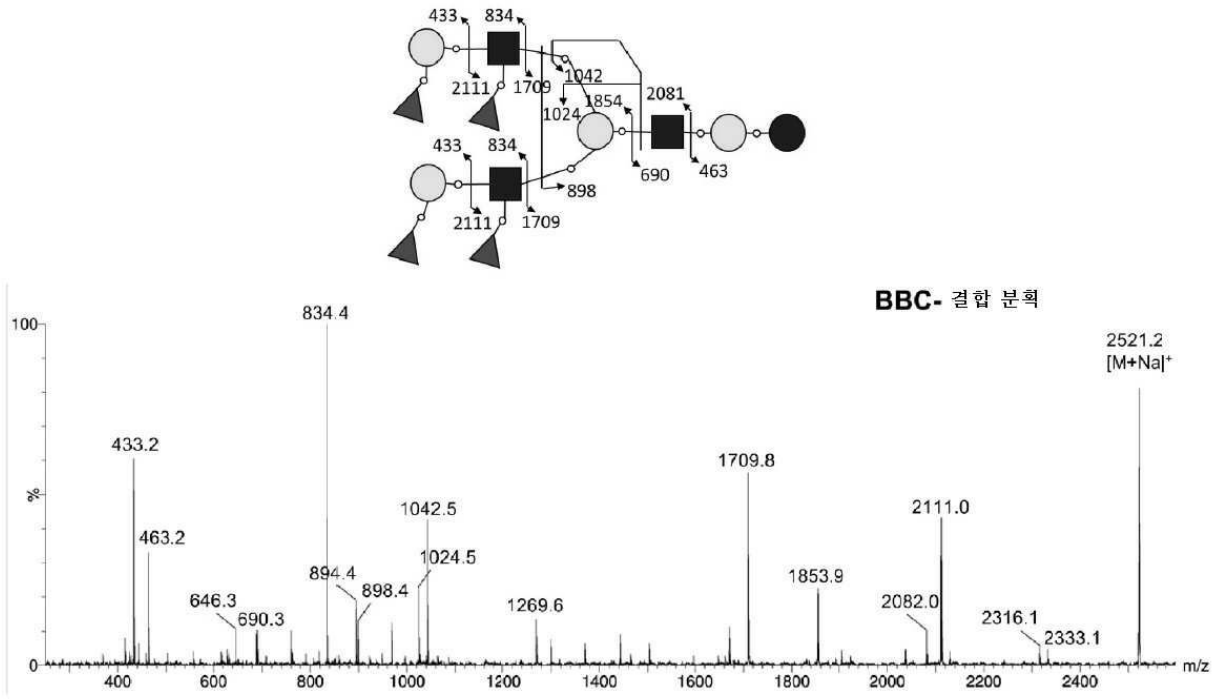
도면3



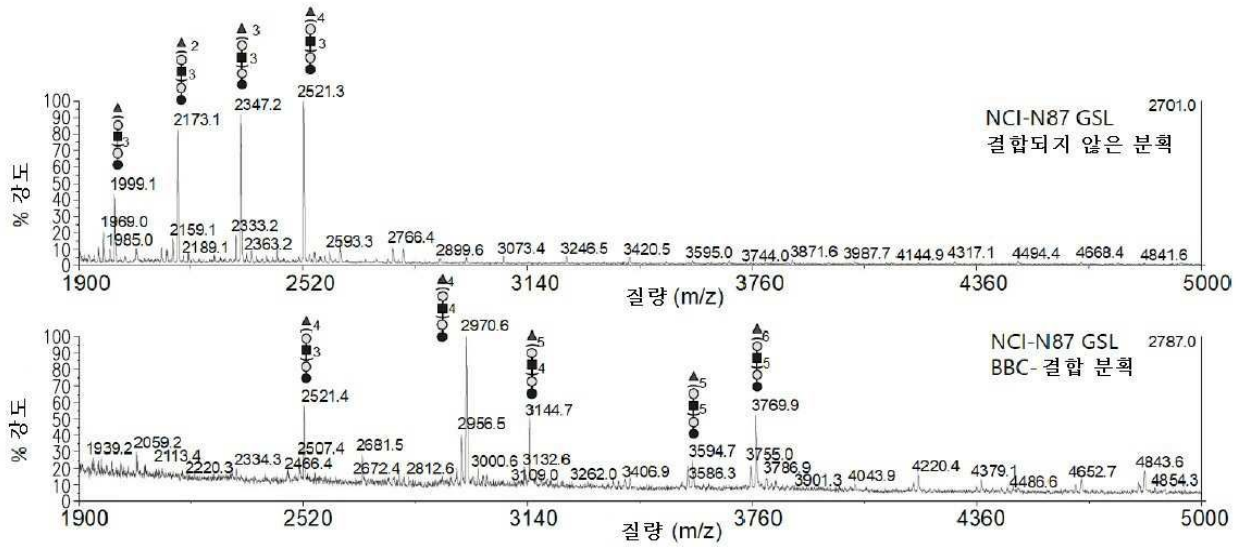
도면4a


결합되지 않은 분획
100
%
0
834.4
646.3
433.2
2521.2
[M+Na]+
1086.5
463.2
864.4
1056.5
1047.5
572.3
1679.8
1709.8
1269.6
1457.7
1487.7
2081.0
2111.0
2333.1
400
600
800
1000
1200
1400
1600
1800
2000
2200
2400
m/z
433
834
1056
1457
1679
2081
1269
646
2111
1709
1488
1086
864
463

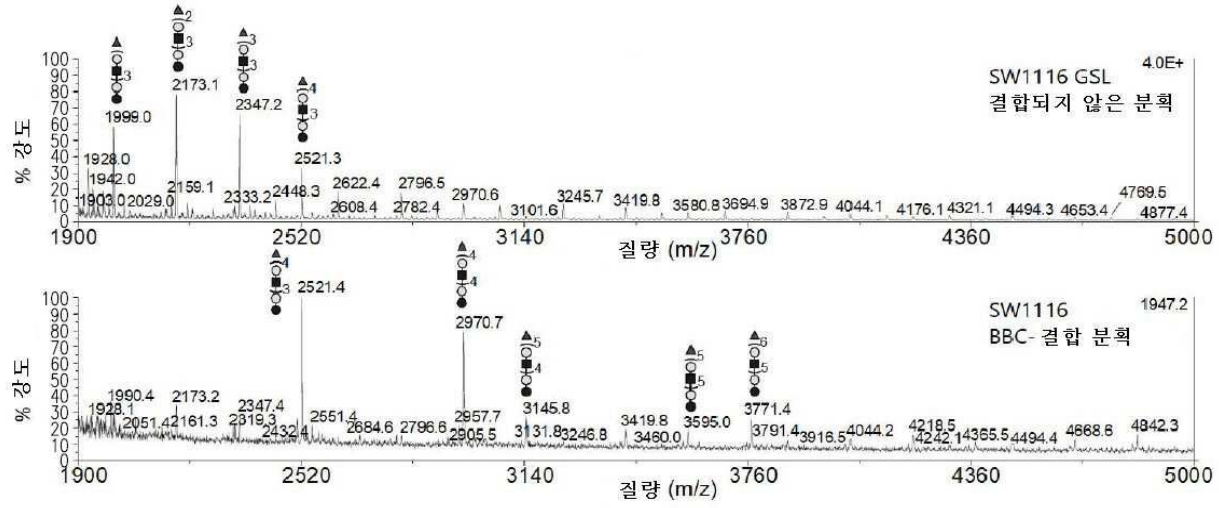
도면4b


433
834
1042
2111
1709
1854
2081
1024
433
834
690
463
898
2111
1709
BBC- 결합 분획
100
%
0
834.4
2521.2
[M+Na]+
433.2
1709.8
1042.5
2111.0
463.2
1024.5
894.4
1853.9
898.4
646.3
1269.6
2082.0
690.3
2316.1
2333.1
400
600
800
1000
1200
1400
1600
1800
2000
2200
2400
m/z

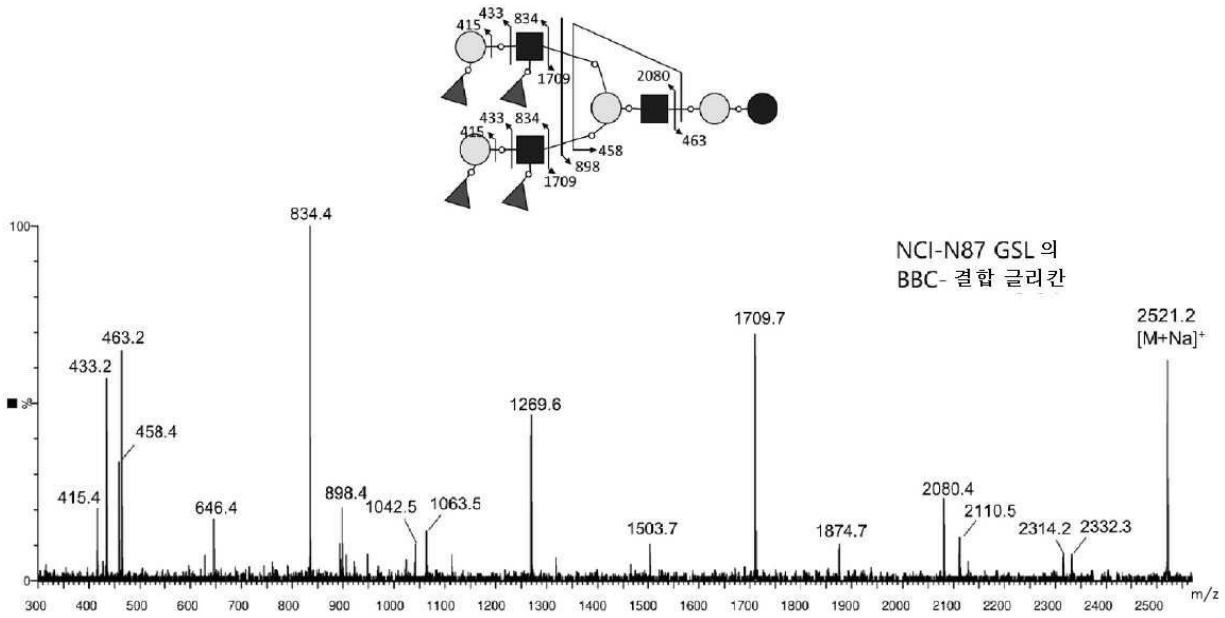
도면5a


NCI-N87 GSL
결합되지 않은 분획
2701.0
NCI-N87 GSL
BBC-결합 분획
2787.0
% 강도
질량 (m/z)
1900
2520
3140
3760
4360
5000

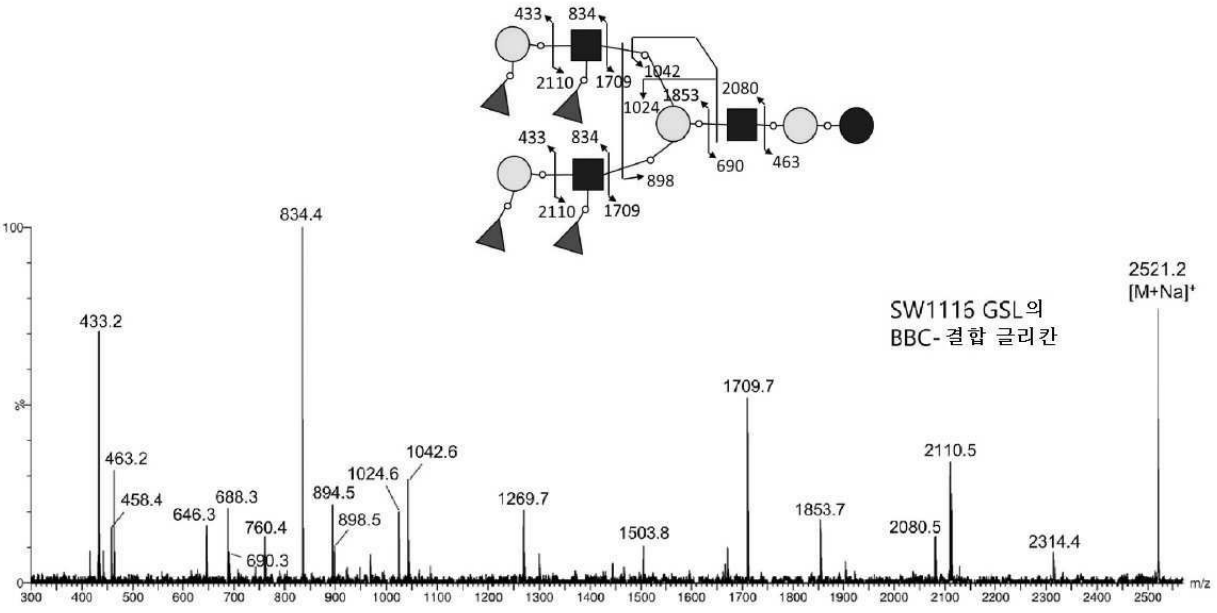
도면5b


SW1116 GSL
결합되지 않은 분획
4.0E+
SW1116
BBC-결합 분획
1947.2
% 강도
질량 (m/z)
1900
2520
3140
3760
4360
5000

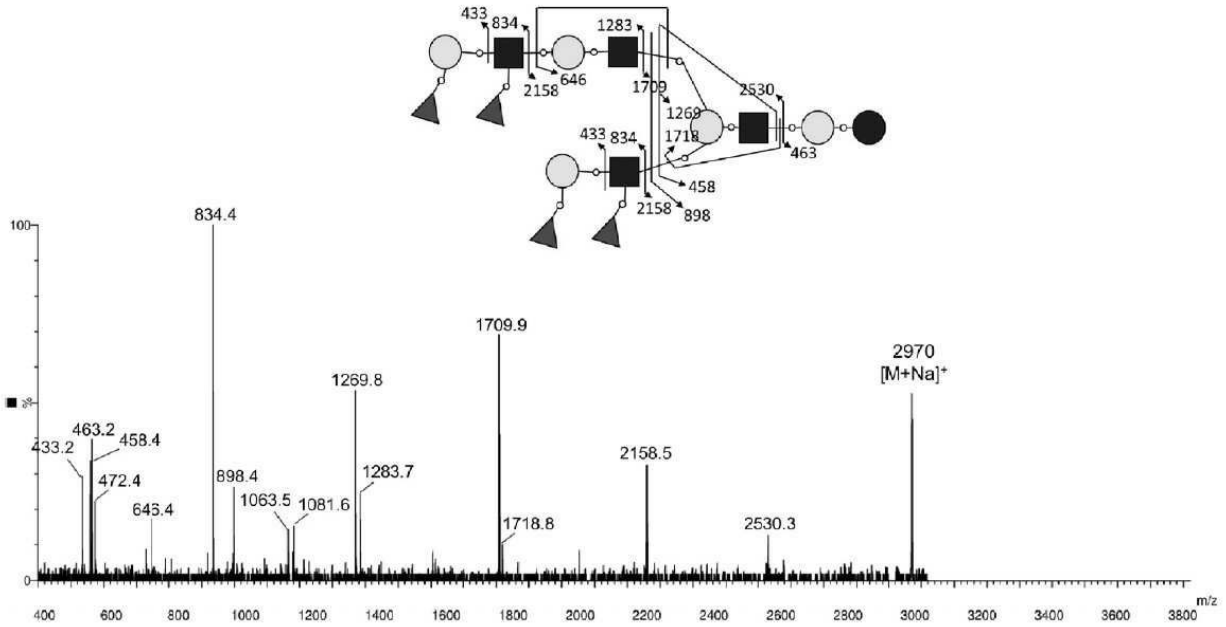
도면6a


NCI-N87 GSL의
BBC- 결합 글리칸
834.4
463.2
433.2
458.4
415.4
646.4
898.4
1042.5
1063.5
1269.6
1503.7
1709.7
1874.7
2080.4
2110.5
2314.2
2332.3
2521.2
[M+Na]+
m/z

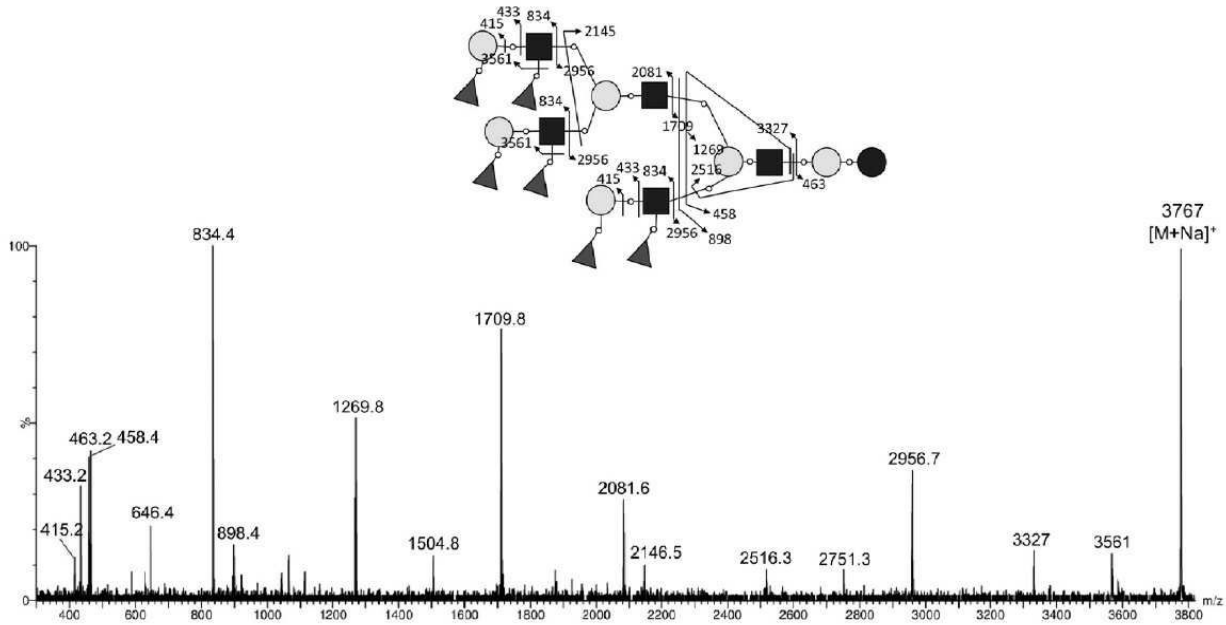
도면6b


SW1116 GSL의
BBC- 결합 글리칸
834.4
433.2
463.2
458.4
646.3
688.3
760.4
690.3
894.5
898.5
1024.6
1042.6
1269.7
1503.8
1709.7
1853.7
2080.5
2110.5
2314.4
2521.2
[M+Na]+
m/z

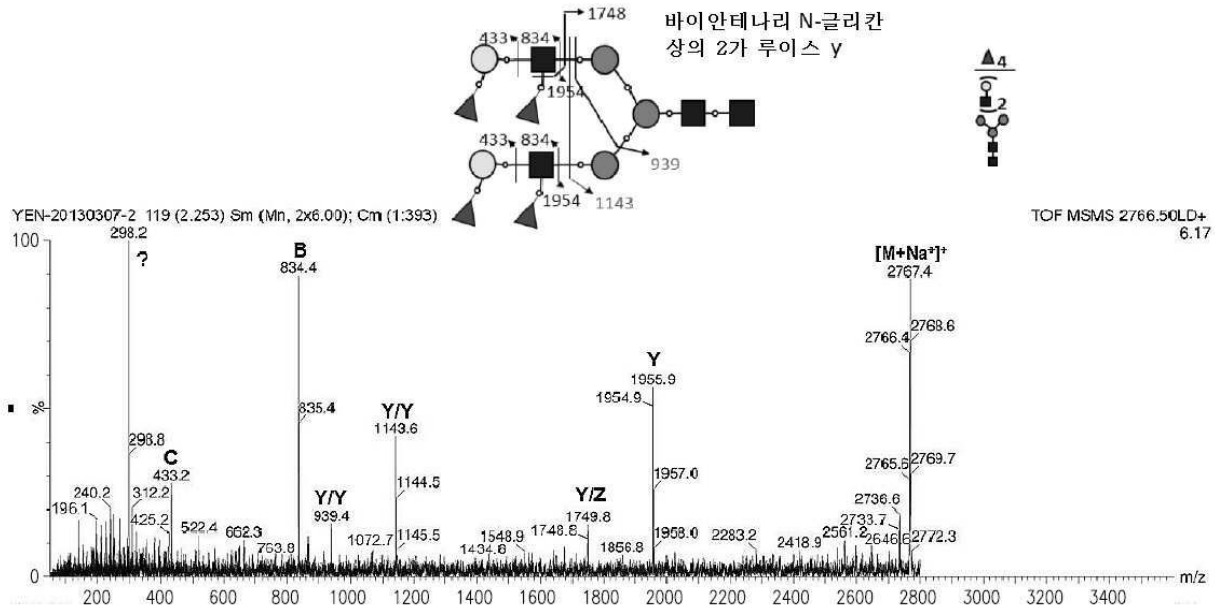
도면7a


433
834
1283
2158
646
1709
1269
2530
1718
463
458
898
834.4
1709.9
2970
[M+Na]+
1269.8
463.2
458.4
433.2
472.4
898.4
1283.7
1063.5
1081.6
645.4
1718.8
2158.5
2530.3
m/z

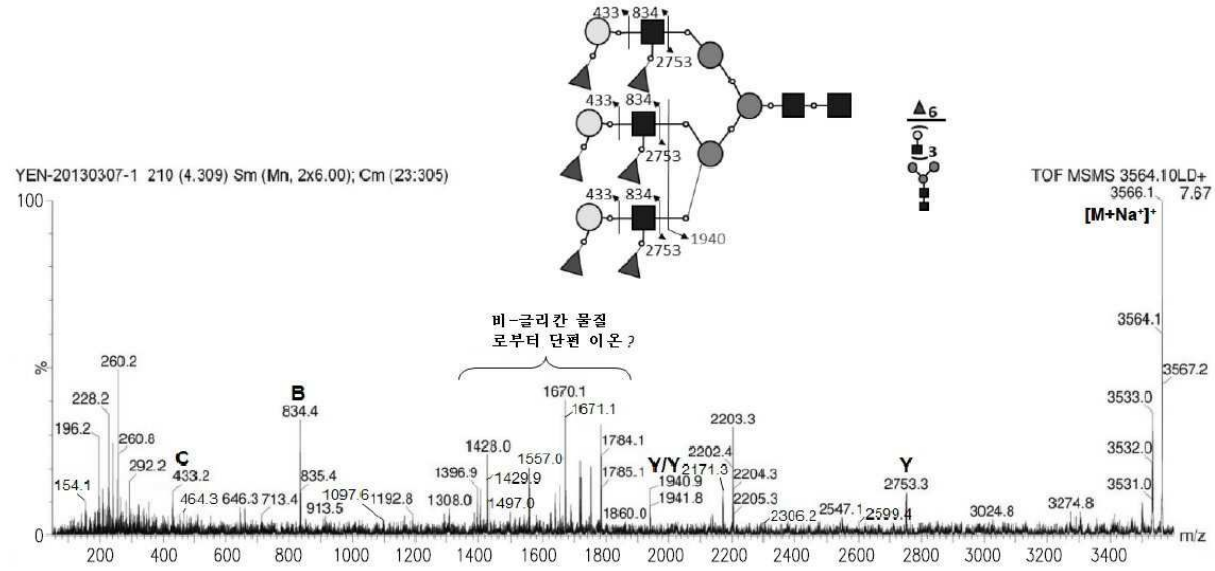
도면7b


433
834
415
2145
3561
2956
2081
1709
3327
1269
2516
463
458
898
3767
[M+Na]+
834.4
1709.8
1269.8
463.2
458.4
433.2
646.4
415.2
898.4
1504.8
2081.6
2146.5
2516.3
2751.3
2956.7
3327
3561
m/z

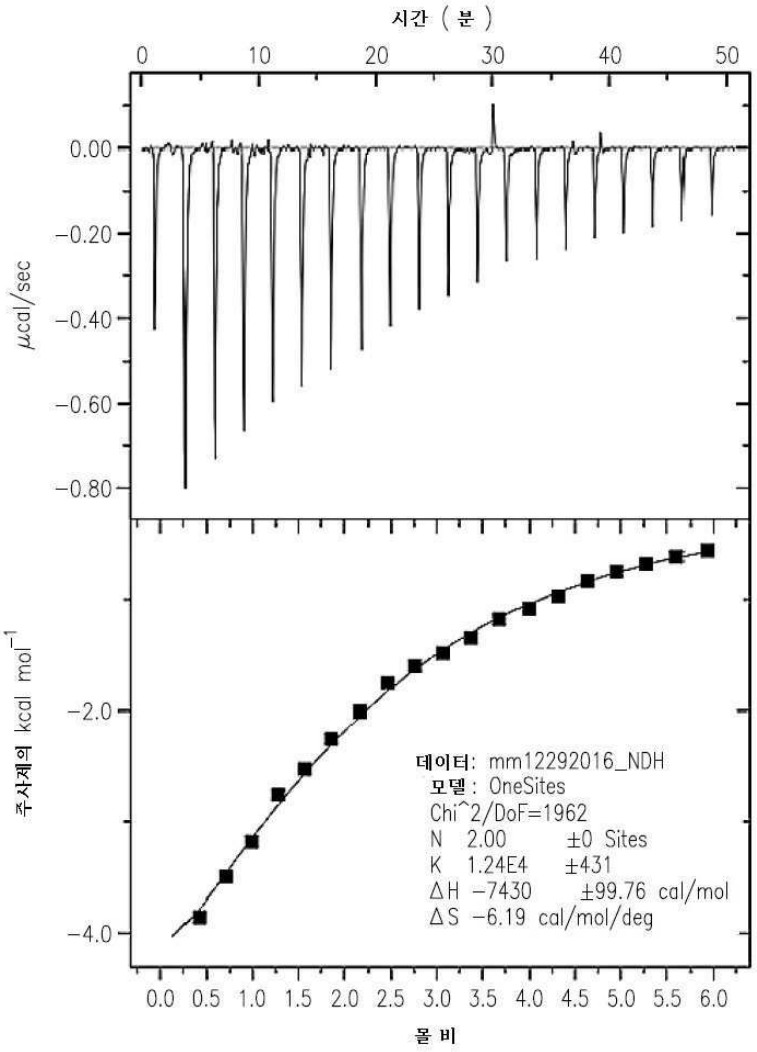
도면8a


바이안테나리 N-글리칸
상의 2가 루이스 y
YEN-20130307-2 119 (2.253) Sm (Mn, 2x6.00); Cm (1:393)
TOF MSMS 2766.50LD+
6.17
[M+Na+]+
2767.4
B
834.4
Y
1955.9
Y/Y
1143.6
Y/Z
C
433.2
m/z

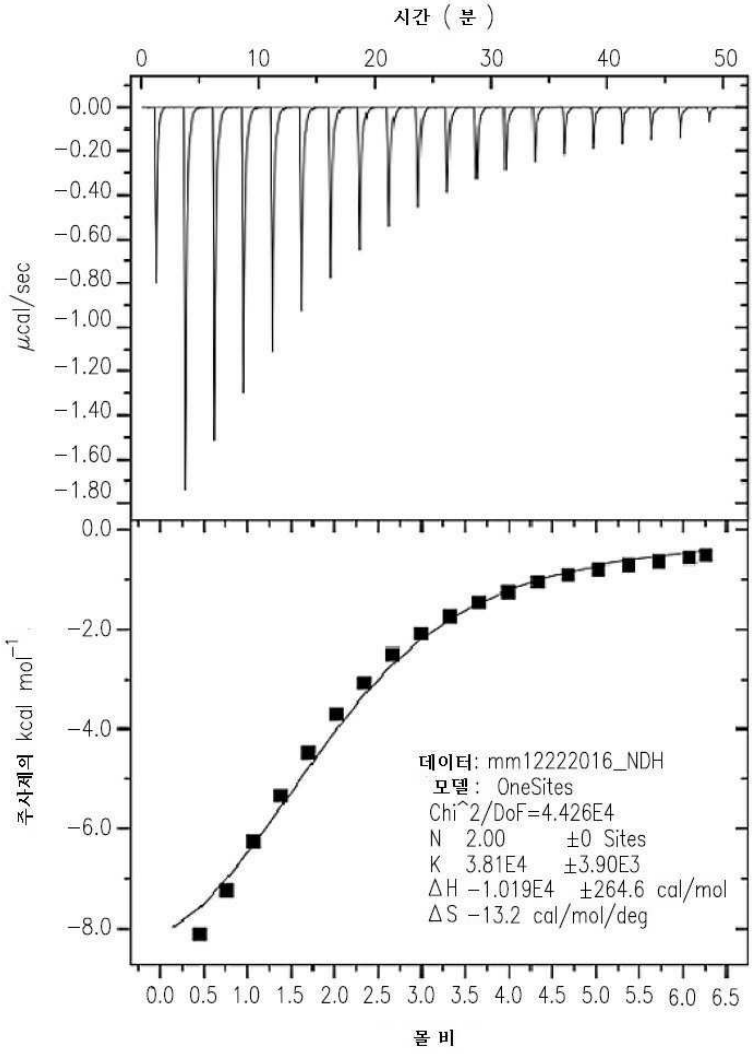
도면8b


YEN-20130307-1 210 (4.309) Sm (Mn, 2x6.00); Cm (23:305)
TOF MSMS 3564.10LD+
7.67
[M+Na+]+
3566.1
비-글리칸 물질
로부터 단편 이온?
B
834.4
C
433.2
Y/Y
Y
2753.3
m/z

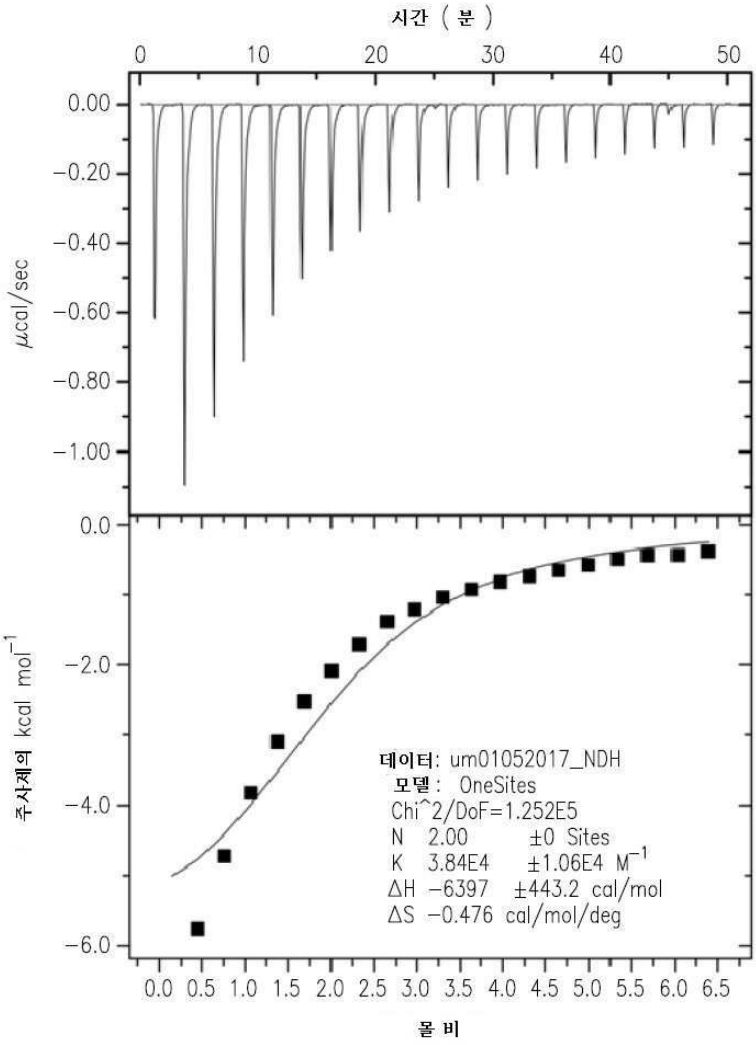
도면9a


시간 (분)
0
10
20
30
40
50
0.00
−0.20
−0.40
−0.60
−0.80
μcal/sec
−2.0
−4.0
주사체의 kcal mol−1
데이터: mm12292016_NDH
모델 : OneSites
Chi^2/DoF=1962
N 2.00 ±0 Sites
K 1.24E4 ±431
ΔH −7430 ±99.76 cal/mol
ΔS −6.19 cal/mol/deg
0.0 0.5 1.0 1.5 2.0 2.5 3.0 3.5 4.0 4.5 5.0 5.5 6.0
몰 비

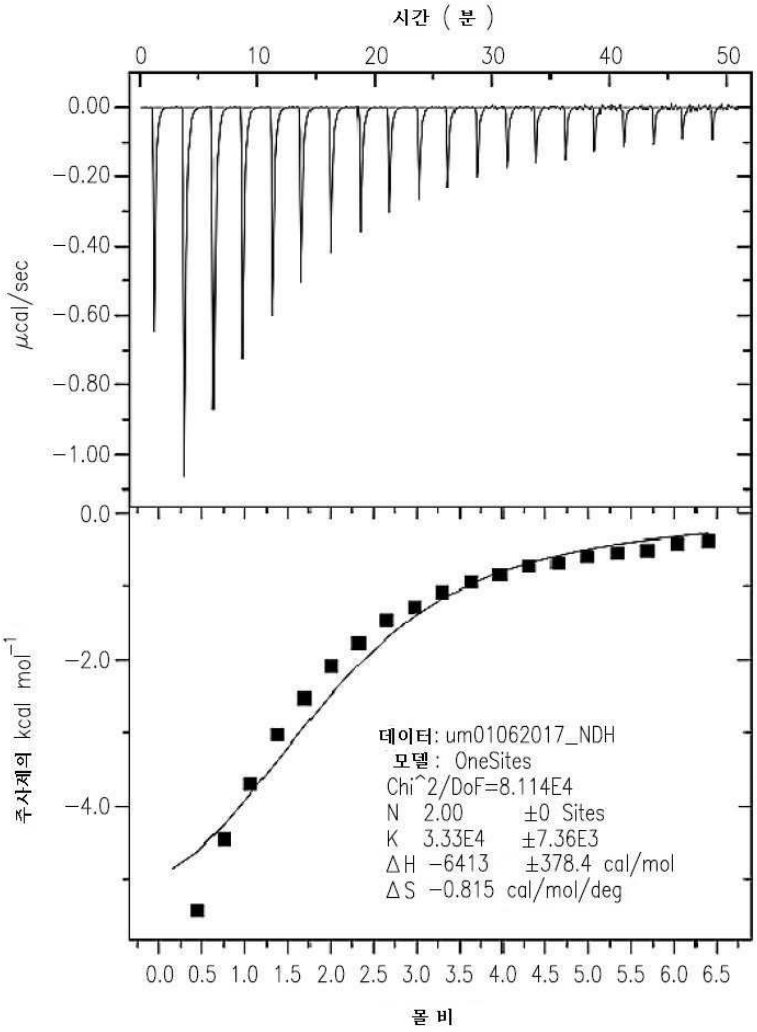
도면9b


시간 (분)
0
10
20
30
40
50
0.00
−0.20
−0.40
−0.60
−0.80
−1.00
−1.20
−1.40
−1.60
−1.80
μcal/sec
0.0
−2.0
−4.0
−6.0
−8.0
주사제의 kcal mol⁻¹
데이터: mm12222016_NDH
모델 : OneSites
Chi^2/DoF=4.426E4
N 2.00 ±0 Sites
K 3.81E4 ±3.90E3
ΔH −1.019E4 ±264.6 cal/mol
ΔS −13.2 cal/mol/deg
0.0 0.5 1.0 1.5 2.0 2.5 3.0 3.5 4.0 4.5 5.0 5.5 6.0 6.5
몰 비

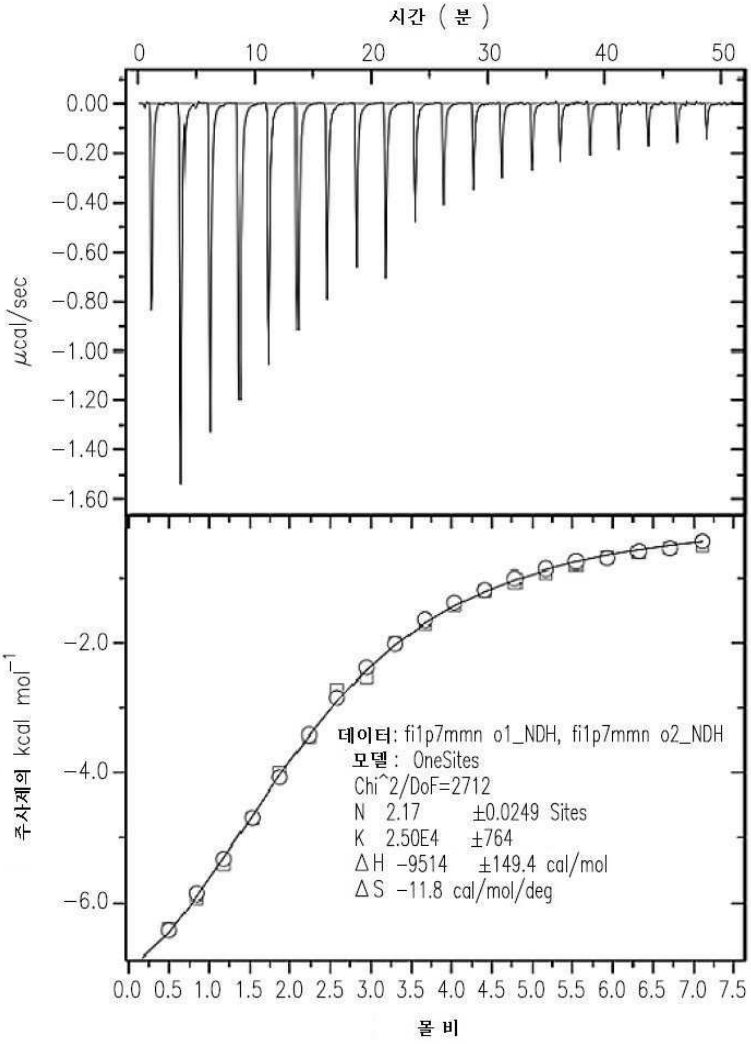
도면10a


시간 (분)
0
10
20
30
40
50
0.00
−0.20
−0.40
−0.60
−0.80
−1.00
μcal/sec
0.0
−2.0
−4.0
−6.0
주사제의 kcal mol−1
데이터: um01052017_NDH
모델: OneSites
Chi^2/DoF=1.252E5
N 2.00 ±0 Sites
K 3.84E4 ±1.06E4 M−1
ΔH −6397 ±443.2 cal/mol
ΔS −0.476 cal/mol/deg
0.0 0.5 1.0 1.5 2.0 2.5 3.0 3.5 4.0 4.5 5.0 5.5 6.0 6.5
몰 비

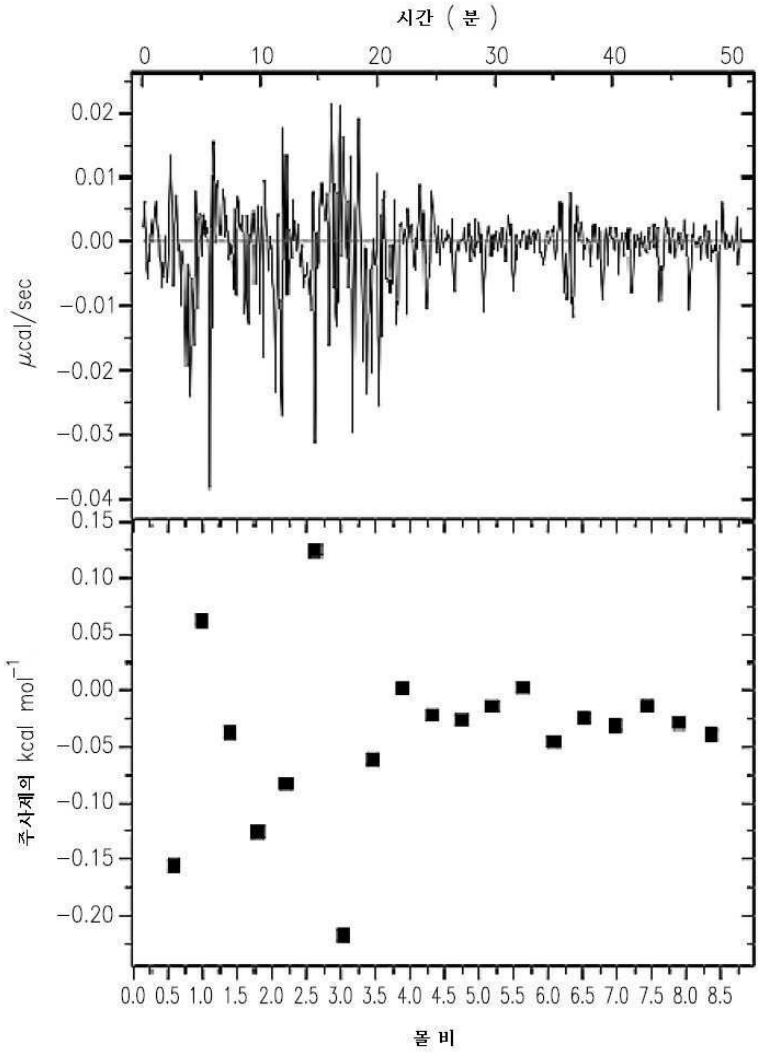
도면10b


시간 (분)
0
10
20
30
40
50
0.00
−0.20
−0.40
−0.60
−0.80
−1.00
μcal/sec
0.0
−2.0
−4.0
주사제의 kcal mol−1
데이터: um01062017_NDH
모델 : OneSites
Chi^2/DoF=8.114E4
N 2.00 ±0 Sites
K 3.33E4 ±7.36E3
ΔH −6413 ±378.4 cal/mol
ΔS −0.815 cal/mol/deg
0.0 0.5 1.0 1.5 2.0 2.5 3.0 3.5 4.0 4.5 5.0 5.5 6.0 6.5
몰 비

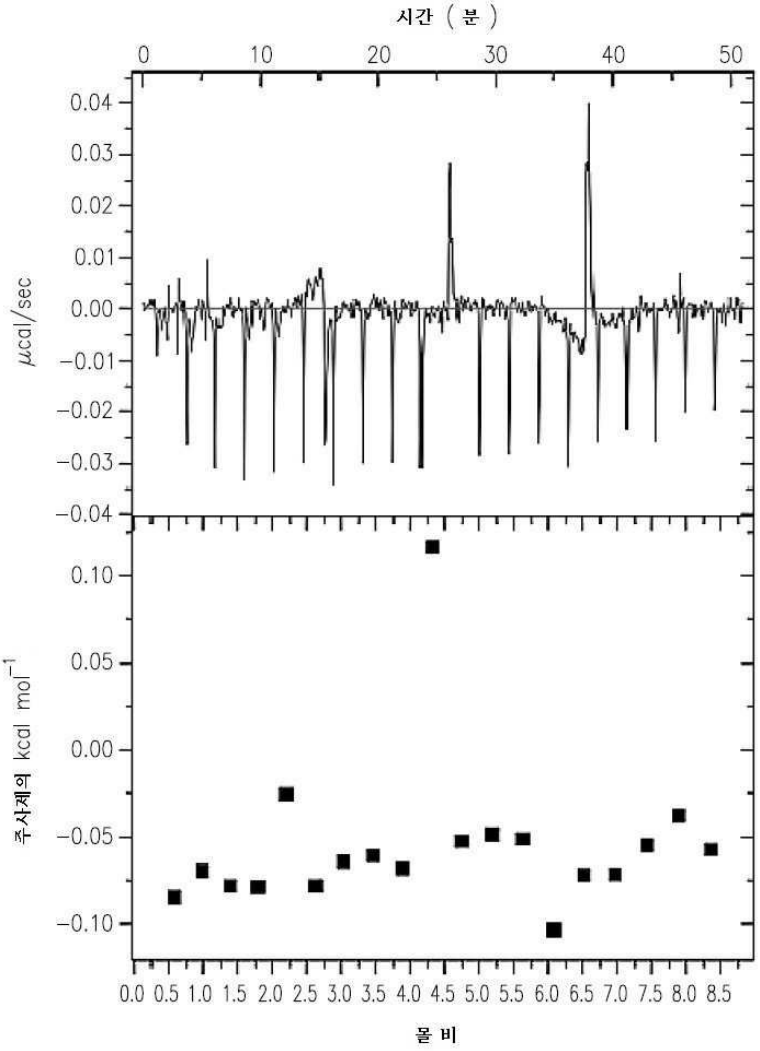
도면10c


시간 (분)
0
10
20
30
40
50
0.00
−0.20
−0.40
−0.60
−0.80
−1.00
−1.20
−1.40
−1.60
μcal/sec
−2.0
−4.0
−6.0
주사체의 kcal mol^{-1}
데이터: fi1p7mmn o1_NDH, fi1p7mmn o2_NDH
모델 : OneSites
Chi^2/DoF=2712
N 2.17 ±0.0249 Sites
K 2.50E4 ±764
ΔH −9514 ±149.4 cal/mol
ΔS −11.8 cal/mol/deg
0.0 0.5 1.0 1.5 2.0 2.5 3.0 3.5 4.0 4.5 5.0 5.5 6.0 6.5 7.0 7.5
몰 비

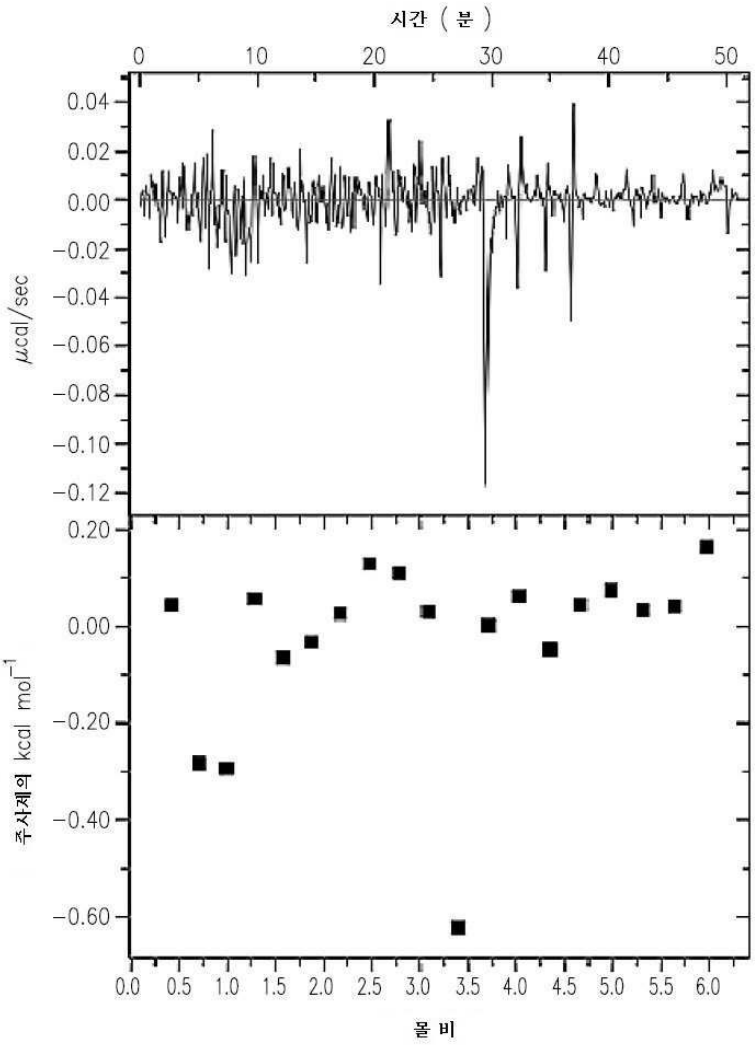
도면11a


시간 (분)
0
10
20
30
40
50
0.02
0.01
0.00
−0.01
−0.02
−0.03
−0.04
μcal/sec
0.15
0.10
0.05
0.00
−0.05
−0.10
−0.15
−0.20
주사제의 kcal mol−1
0.0 0.5 1.0 1.5 2.0 2.5 3.0 3.5 4.0 4.5 5.0 5.5 6.0 6.5 7.0 7.5 8.0 8.5
몰 비

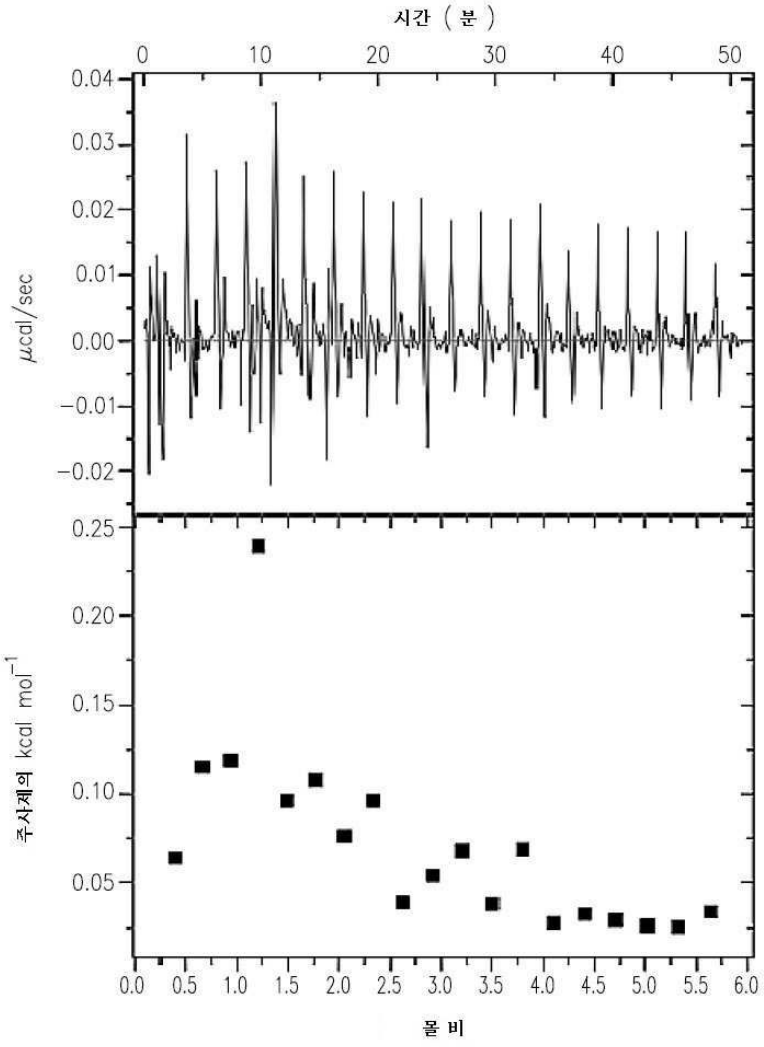
도면11b


시간 (분)
0
10
20
30
40
50
0.04
0.03
0.02
0.01
0.00
−0.01
−0.02
−0.03
−0.04
μcal/sec
0.10
0.05
0.00
−0.05
−0.10
주사체의 kcal mol^{-1}
0.0 0.5 1.0 1.5 2.0 2.5 3.0 3.5 4.0 4.5 5.0 5.5 6.0 6.5 7.0 7.5 8.0 8.5
몰 비

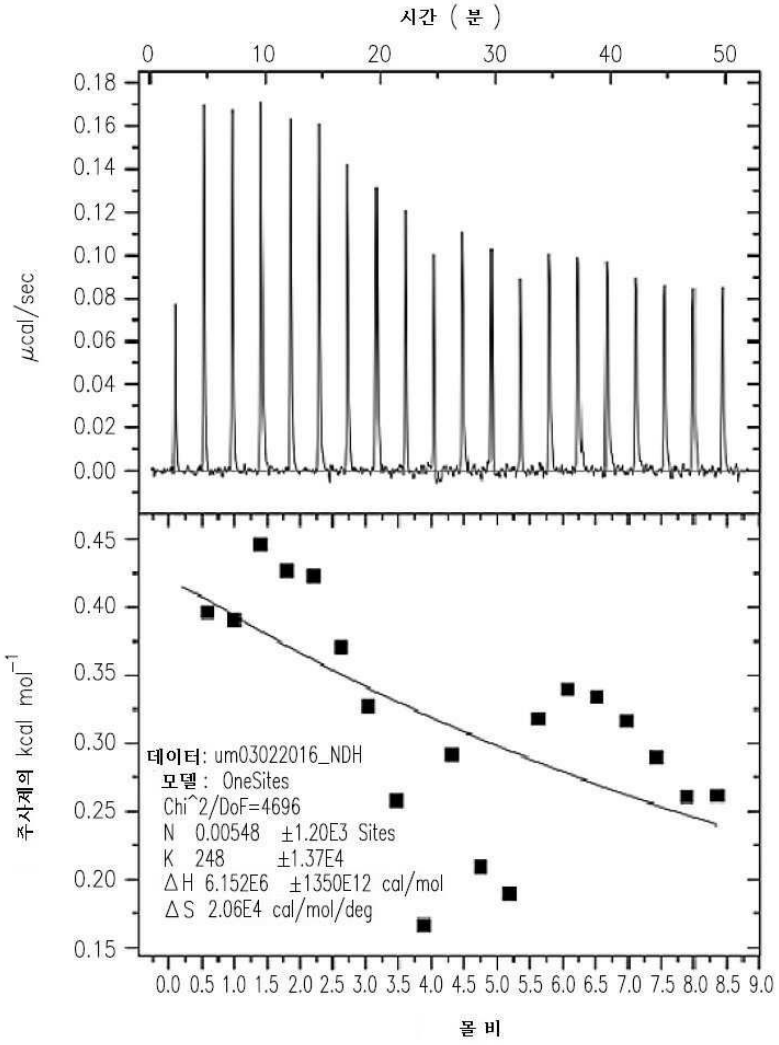
도면11c


시간 (분)
0
10
20
30
40
50
0.04
0.02
0.00
−0.02
−0.04
−0.06
−0.08
−0.10
−0.12
μcal/sec
0.20
0.00
−0.20
−0.40
−0.60
주사제의 kcal mol−1
0.0
0.5
1.0
1.5
2.0
2.5
3.0
3.5
4.0
4.5
5.0
5.5
6.0
몰 비

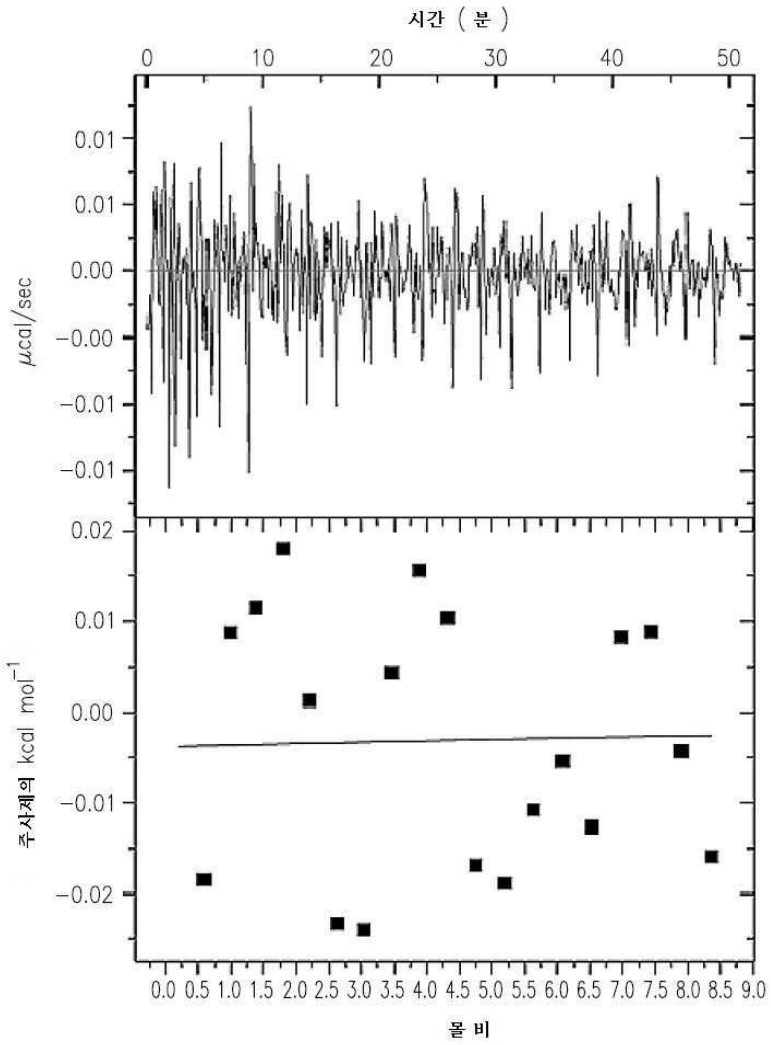
도면11d


시간 (분)
0
10
20
30
40
50
0.04
0.03
0.02
0.01
0.00
−0.01
−0.02
μcal/sec
0.25
0.20
0.15
0.10
0.05
주사제의 kcal mol^{-1}
0.0
0.5
1.0
1.5
2.0
2.5
3.0
3.5
4.0
4.5
5.0
5.5
6.0
몰 비

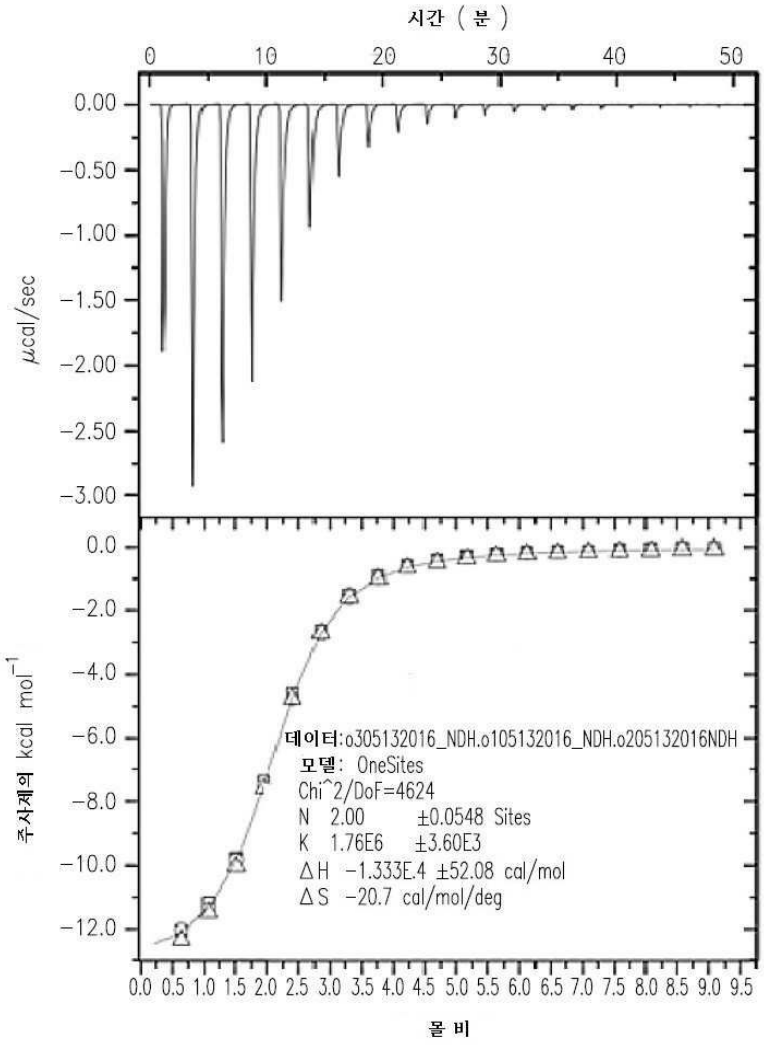
도면11e


시간 (분)
0
10
20
30
40
50
0.18
0.16
0.14
0.12
0.10
0.08
0.06
0.04
0.02
0.00
μcal/sec
0.45
0.40
0.35
0.30
0.25
0.20
0.15
주사제의 kcal mol-1
데이터: um03022016_NDH
모델 : OneSites
Chi^2/DoF=4696
N 0.00548 ±1.20E3 Sites
K 248 ±1.37E4
ΔH 6.152E6 ±1350E12 cal/mol
ΔS 2.06E4 cal/mol/deg
0.0 0.5 1.0 1.5 2.0 2.5 3.0 3.5 4.0 4.5 5.0 5.5 6.0 6.5 7.0 7.5 8.0 8.5 9.0
몰 비

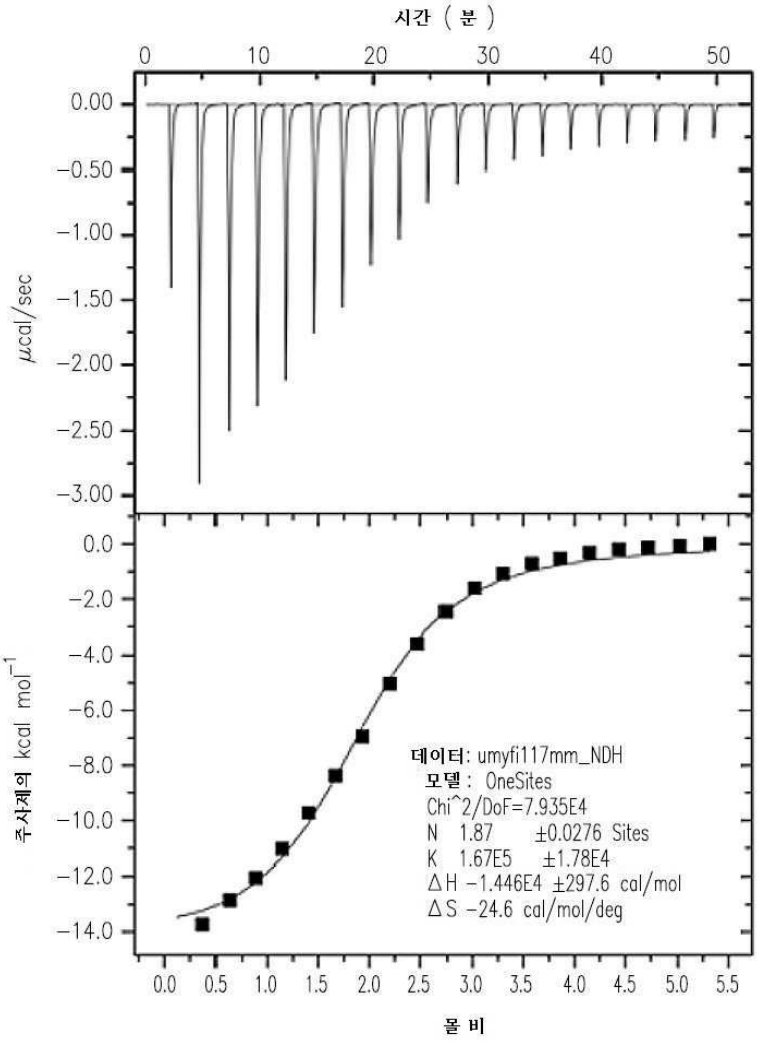
도면11f


시간 (분)
0
10
20
30
40
50
0.01
0.01
0.00
−0.00
−0.01
−0.01
μcal/sec
0.02
0.01
0.00
−0.01
−0.02
주사제의 kcal mol^{-1}
0.0 0.5 1.0 1.5 2.0 2.5 3.0 3.5 4.0 4.5 5.0 5.5 6.0 6.5 7.0 7.5 8.0 8.5 9.0
몰 비

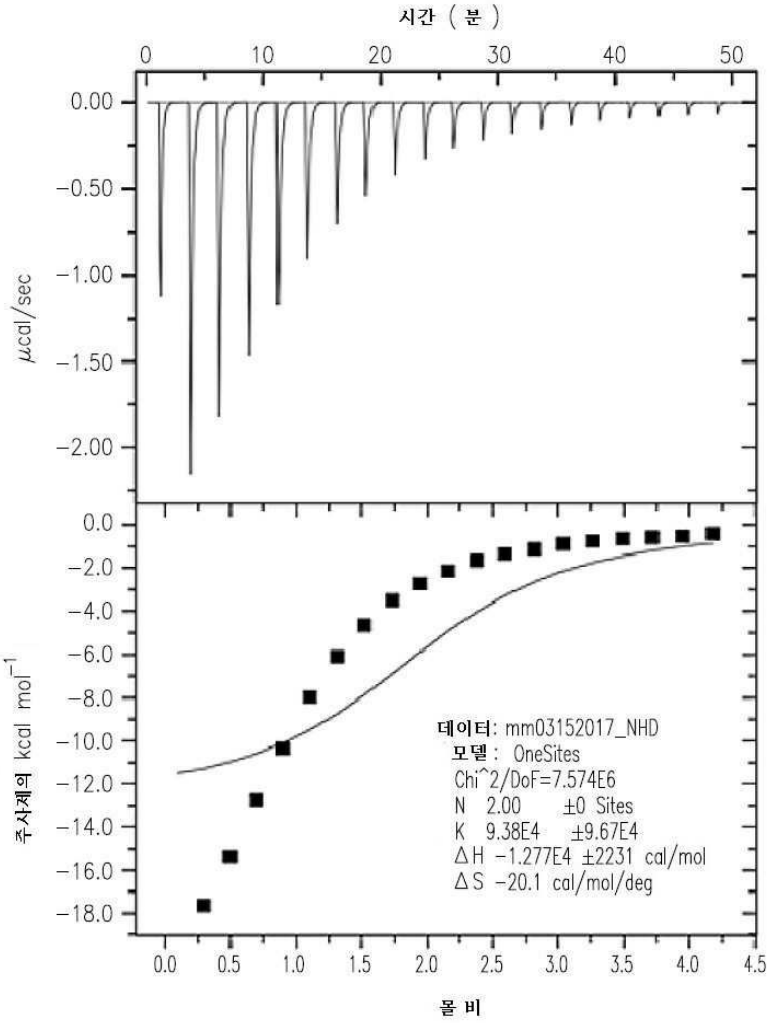
도면12a


시간 (분)
0
10
20
30
40
50
0.00
−0.50
−1.00
−1.50
−2.00
−2.50
−3.00
μcal/sec
0.0
−2.0
−4.0
−6.0
−8.0
−10.0
−12.0
주사제의 kcal mol-1
데이터:o305132016_NDH.o105132016_NDH.o205132016NDH
모델: OneSites
Chi^2/DoF=4624
N 2.00 ±0.0548 Sites
K 1.76E6 ±3.60E3
ΔH −1.333E.4 ±52.08 cal/mol
ΔS −20.7 cal/mol/deg
0.0 0.5 1.0 1.5 2.0 2.5 3.0 3.5 4.0 4.5 5.0 5.5 6.0 6.5 7.0 7.5 8.0 8.5 9.0 9.5
몰 비

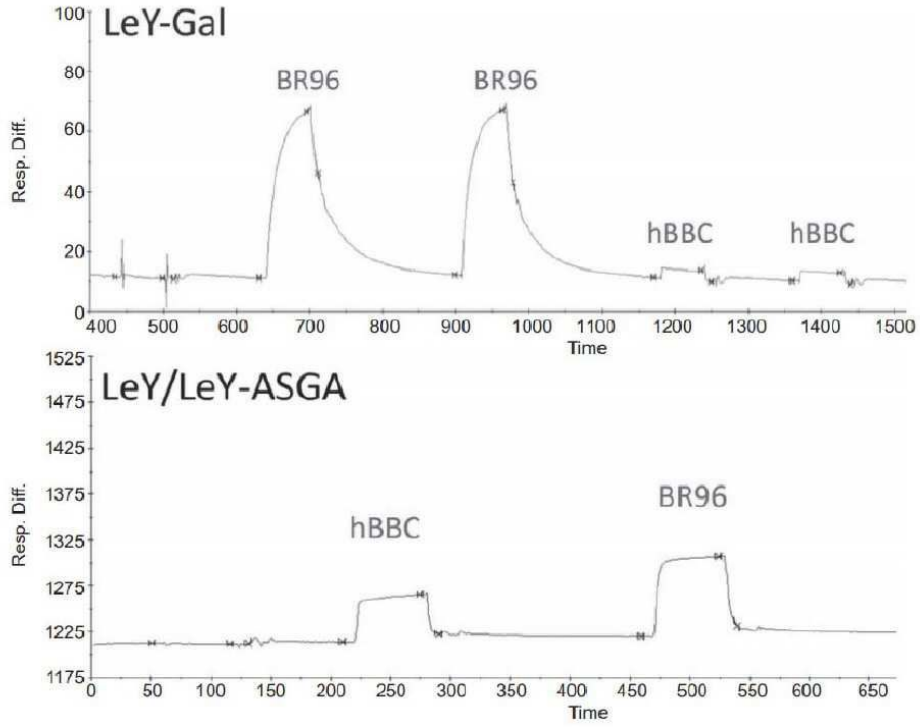
도면12b


시간 (분)
0
10
20
30
40
50
0.00
−0.50
−1.00
−1.50
−2.00
−2.50
−3.00
μcal/sec
0.0
−2.0
−4.0
−6.0
−8.0
−10.0
−12.0
−14.0
주사제의 kcal mol^{-1}
데이터: umyfi117mm_NDH
모델 : OneSites
Chi^2/DoF=7.935E4
N 1.87 ±0.0276 Sites
K 1.67E5 ±1.78E4
ΔH −1.446E4 ±297.6 cal/mol
ΔS −24.6 cal/mol/deg
0.0
0.5
1.0
1.5
2.0
2.5
3.0
3.5
4.0
4.5
5.0
5.5
몰 비

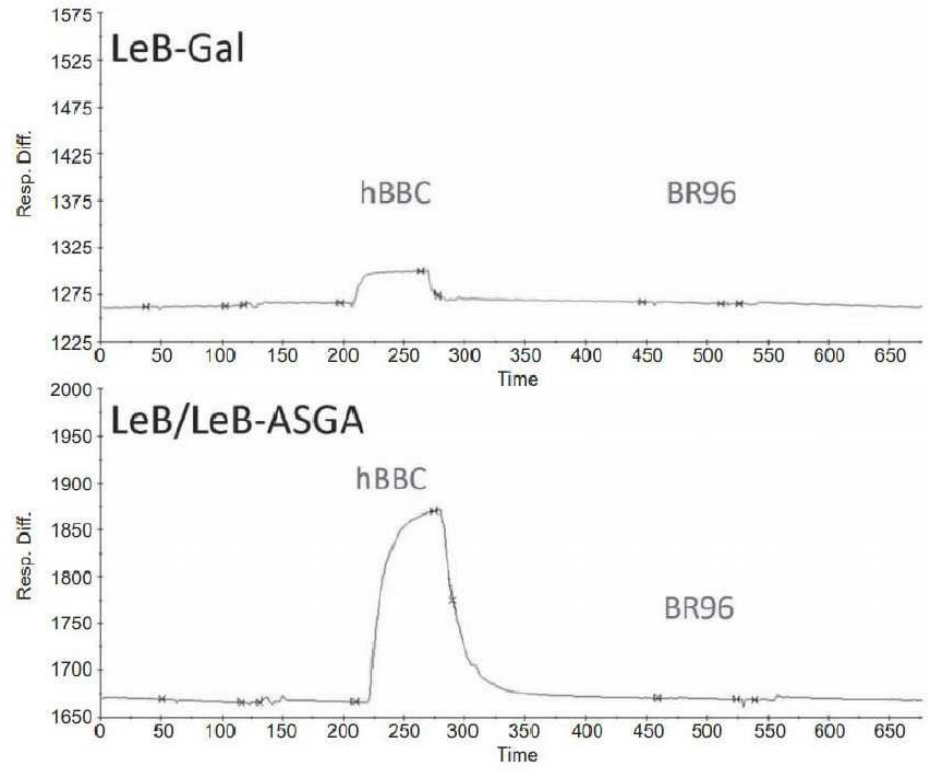
도면12c


시간 (분)
0
10
20
30
40
50
0.00
−0.50
−1.00
−1.50
−2.00
μcal/sec
0.0
−2.0
−4.0
−6.0
−8.0
−10.0
−12.0
−14.0
−16.0
−18.0
주사제의 kcal mol−1
데이터: mm03152017_NHD
모델 : OneSites
Chi^2/DoF=7.574E6
N 2.00 ±0 Sites
K 9.38E4 ±9.67E4
ΔH −1.277E4 ±2231 cal/mol
ΔS −20.1 cal/mol/deg
0.0
0.5
1.0
1.5
2.0
2.5
3.0
3.5
4.0
4.5
몰 비

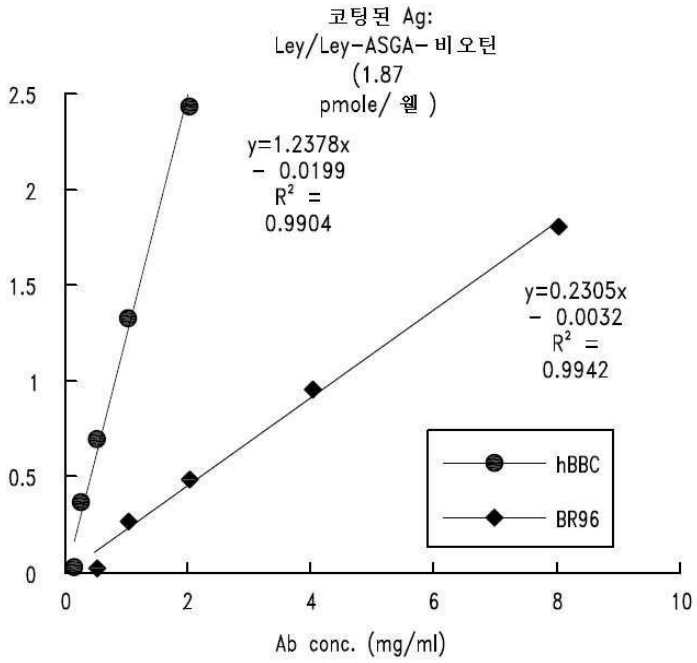
도면13a


LeY-Gal
BR96
BR96
hBBC
hBBC
Resp. Diff.
Time
LeY/LeY-ASGA
hBBC
BR96
Resp. Diff.
Time

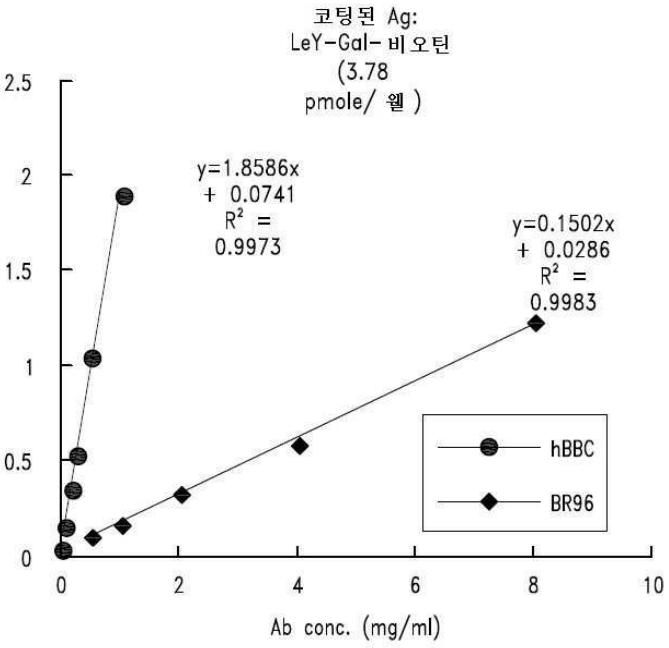
도면13b


LeB-Gal
hBBC
BR96
Resp. Diff.
Time
LeB/LeB-ASGA
hBBC
BR96
Resp. Diff.
Time

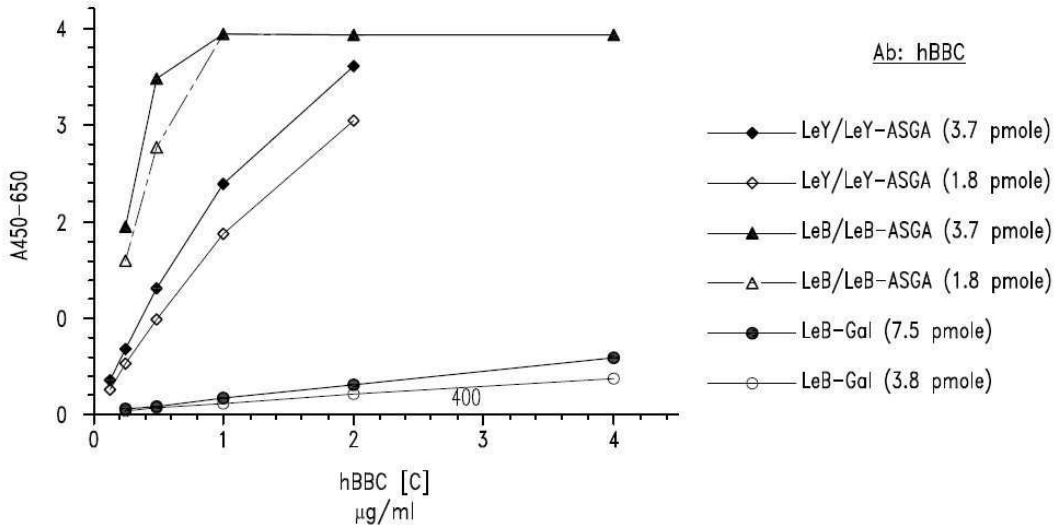
도면14a


코팅된 Ag:
Ley/Ley-ASGA-비오틴
(1.87
pmole/ 웰)
y=1.2378x
- 0.0199
R² =
0.9904
y=0.2305x
- 0.0032
R² =
0.9942
hBBC
BR96
2.5
2
1.5
1
0.5
0
0
2
4
6
8
10
Ab conc. (mg/ml)

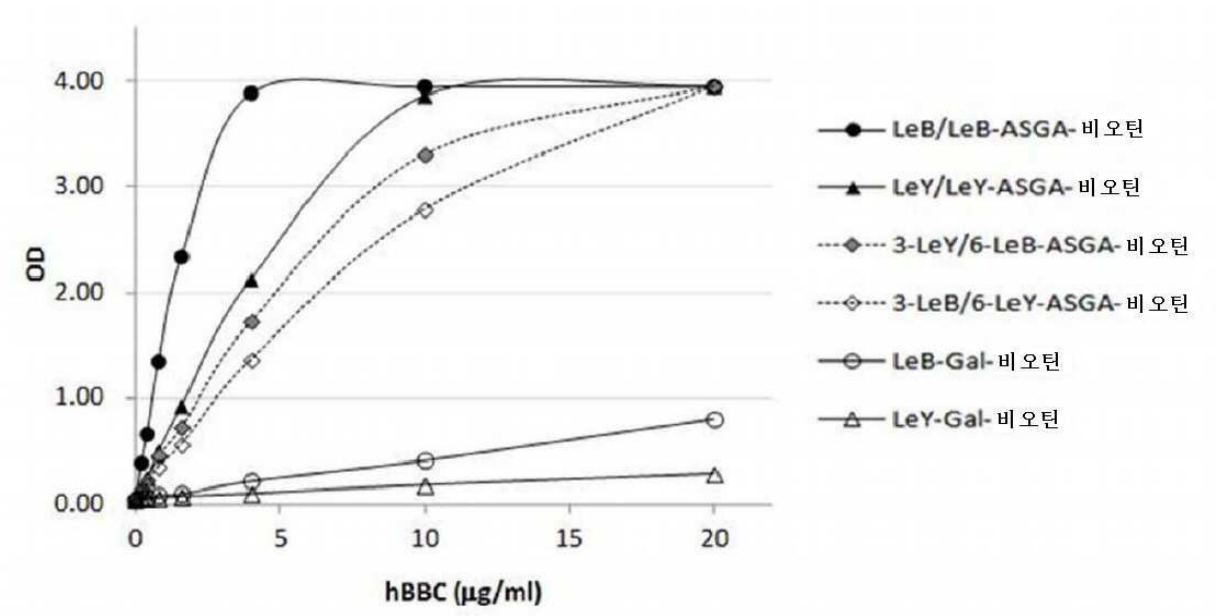
도면14b


코팅된 Ag:
LeY-Gal-비오틴
(3.78
pmole/ 웰)
y=1.8586x
+ 0.0741
R² =
0.9973
y=0.1502x
+ 0.0286
R² =
0.9983
hBBC
BR96
2.5
2
1.5
1
0.5
0
0
2
4
6
8
10
Ab conc. (mg/ml)

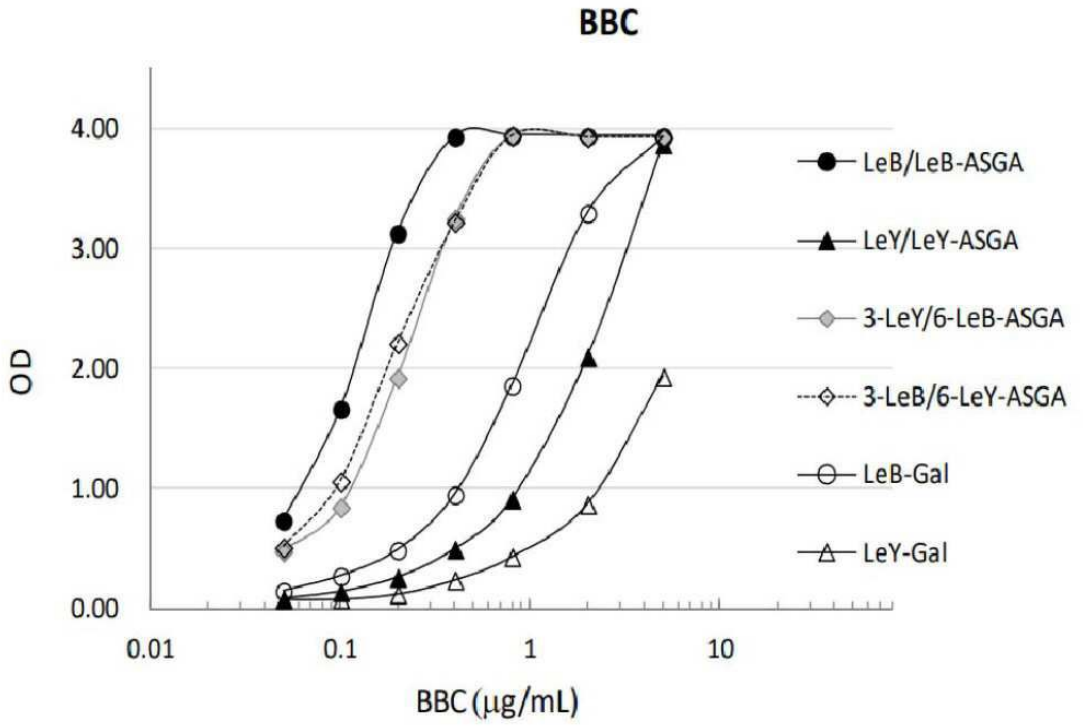
도면15


A450-650
hBBC [C]
µg/ml
400
Ab: hBBC
LeY/LeY-ASGA (3.7 pmole)
LeY/LeY-ASGA (1.8 pmole)
LeB/LeB-ASGA (3.7 pmole)
LeB/LeB-ASGA (1.8 pmole)
LeB-Gal (7.5 pmole)
LeB-Gal (3.8 pmole)

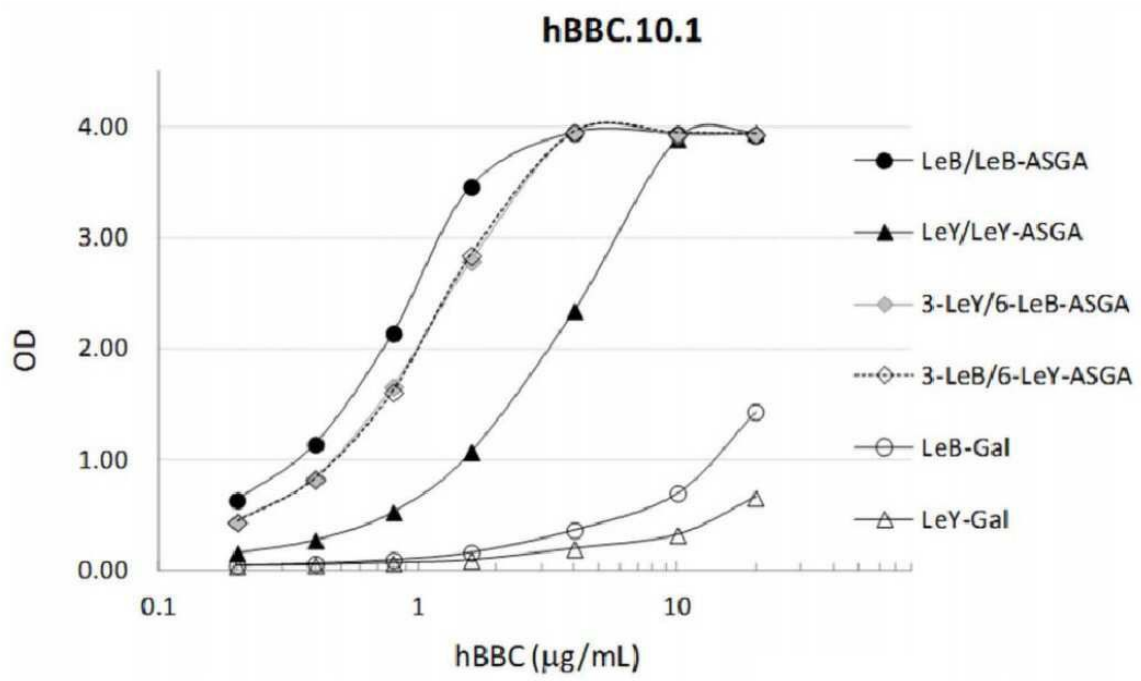
도면16a


OD
hBBC (µg/ml)
LeB/LeB-ASGA-비오틴
LeY/LeY-ASGA-비오틴
3-LeY/6-LeB-ASGA-비오틴
3-LeB/6-LeY-ASGA-비오틴
LeB-Gal-비오틴
LeY-Gal-비오틴

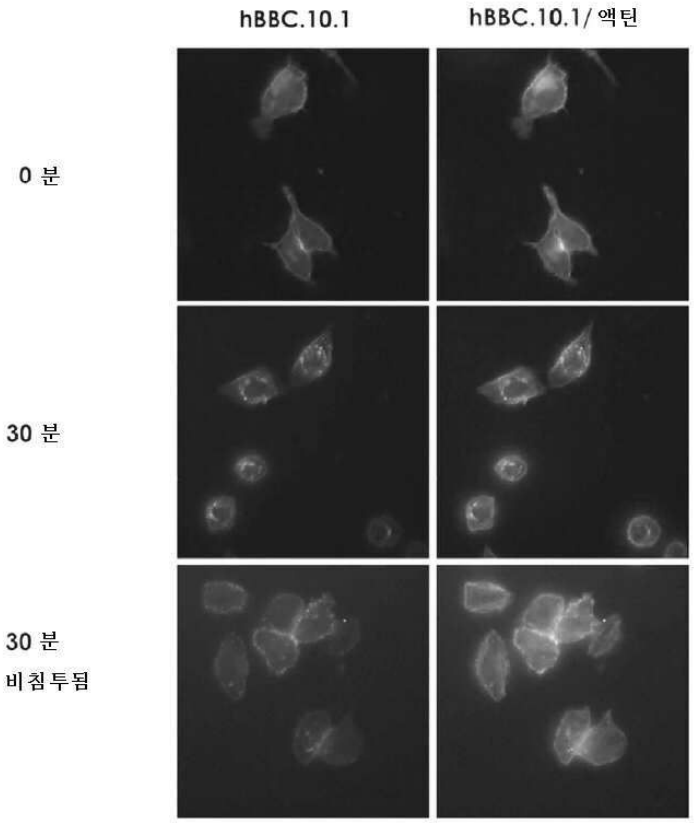
도면16b


BBC
4.00
3.00
2.00
1.00
0.00
OD
0.01
0.1
1
10
BBC (μg/mL)
LeB/LeB-ASGA
LeY/LeY-ASGA
3-LeY/6-LeB-ASGA
3-LeB/6-LeY-ASGA
LeB-Gal
LeY-Gal

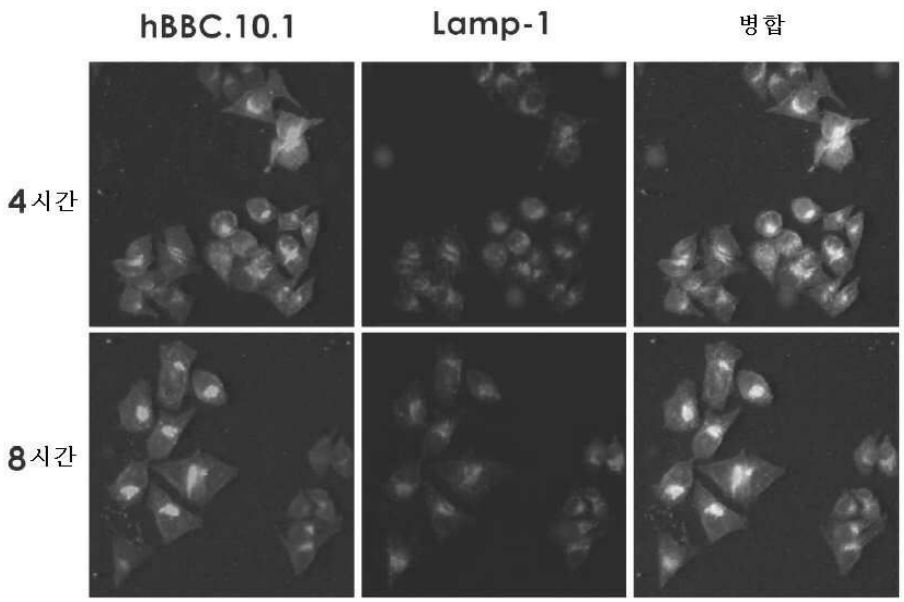
도면16c


hBBC.10.1
4.00
3.00
2.00
1.00
0.00
OD
0.1
1
10
hBBC (μg/mL)
LeB/LeB-ASGA
LeY/LeY-ASGA
3-LeY/6-LeB-ASGA
3-LeB/6-LeY-ASGA
LeB-Gal
LeY-Gal

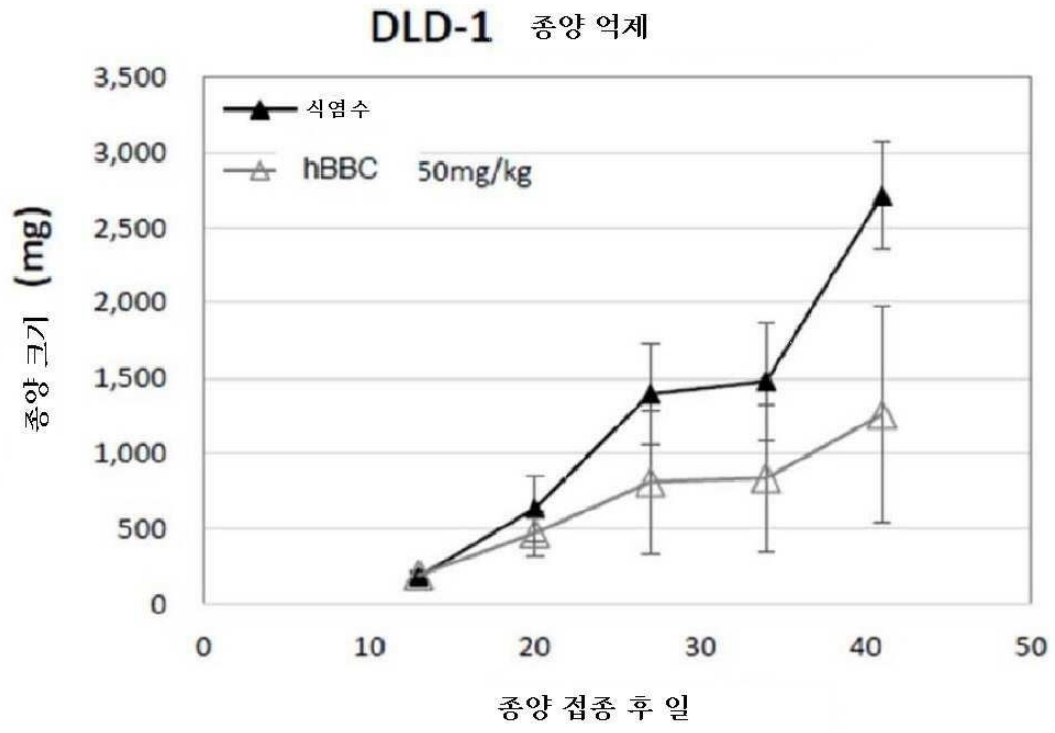
도면17



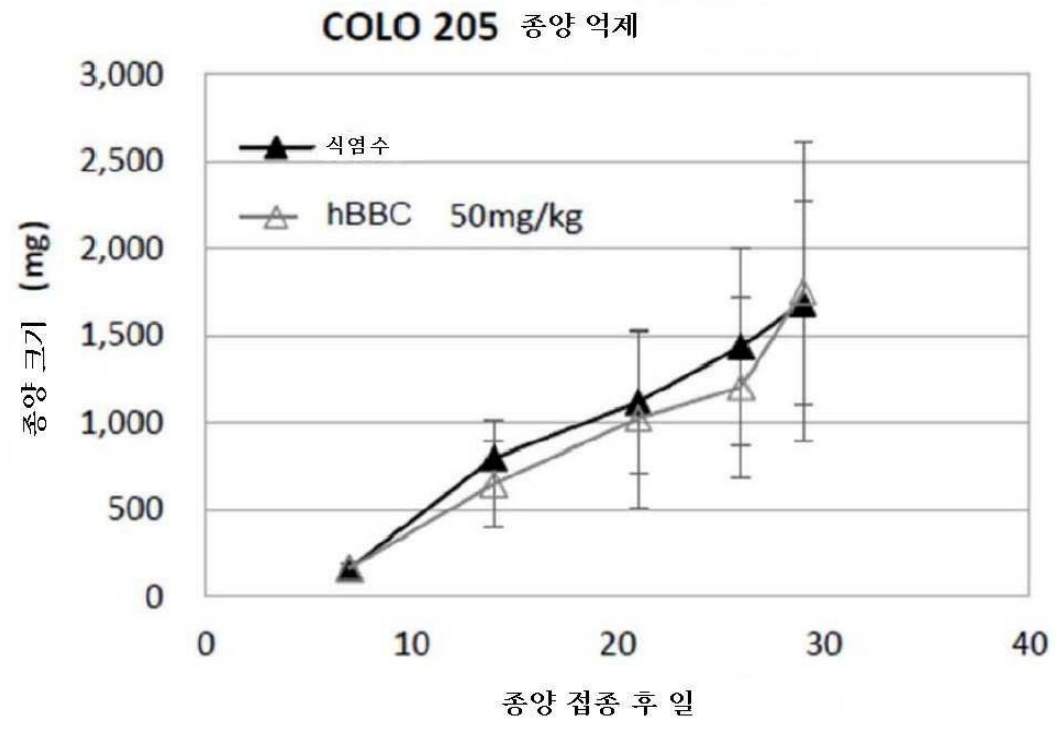
도면18



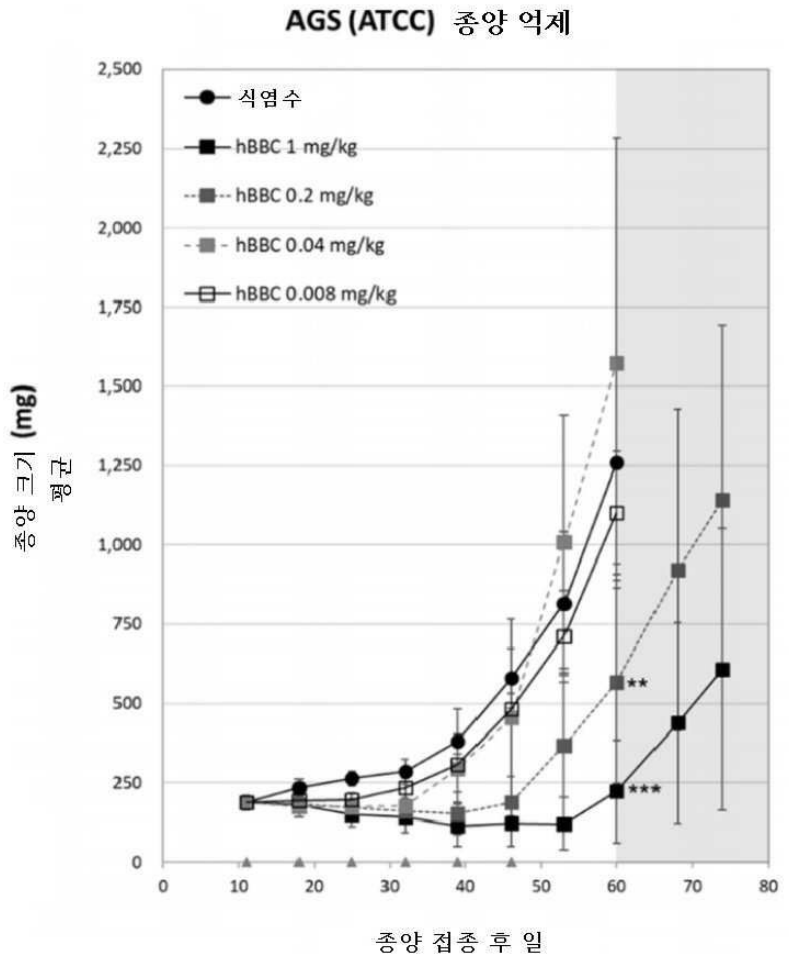
도면19a


DLD-1 종양 억제
3,500
3,000
2,500
2,000
1,500
1,000
500
0
식염수
hBBC 50mg/kg
종양 크기 (mg)
0
10
20
30
40
50
종양 접종 후 일

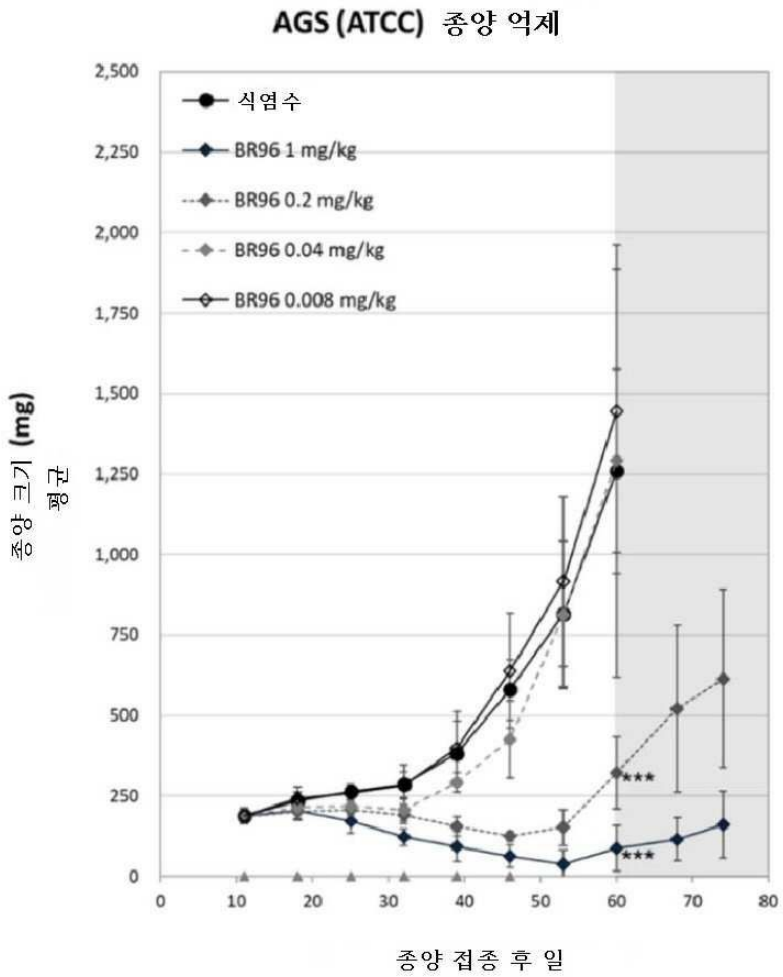
도면19b


COLO 205 종양 억제
3,000
2,500
2,000
1,500
1,000
500
0
식염수
hBBC 50mg/kg
종양 크기 (mg)
0
10
20
30
40
종양 접종 후 일

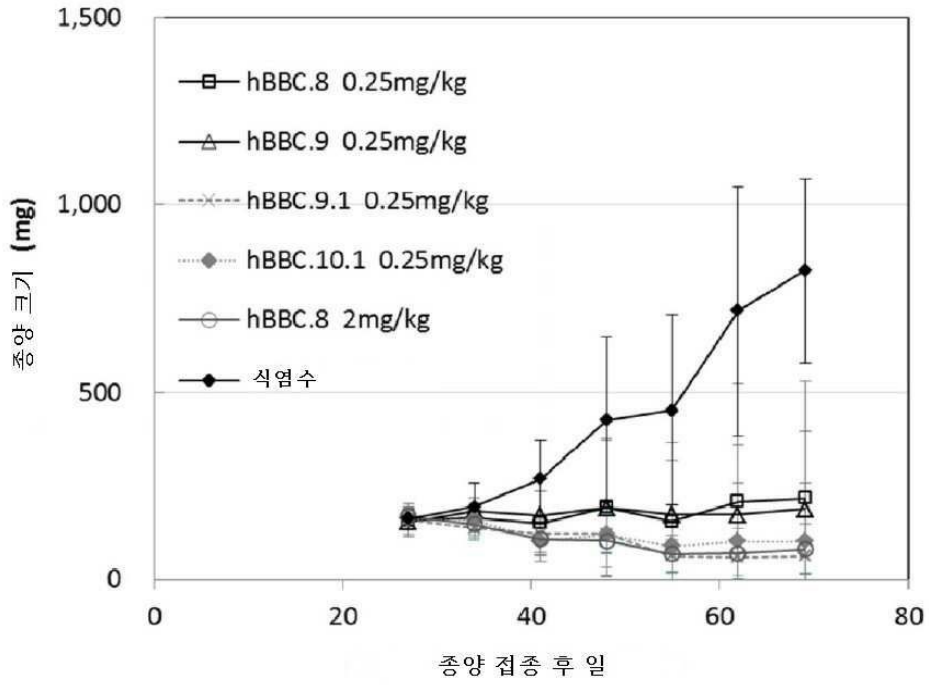
도면20a


AGS (ATCC) 종양 억제
식염수
hBBC 1 mg/kg
hBBC 0.2 mg/kg
hBBC 0.04 mg/kg
hBBC 0.008 mg/kg
종양 크기 (mg) 평균
종양 접종 후 일
2,500
2,250
2,000
1,750
1,500
1,250
1,000
750
500
250
0
0
10
20
30
40
50
60
70
80
**
***

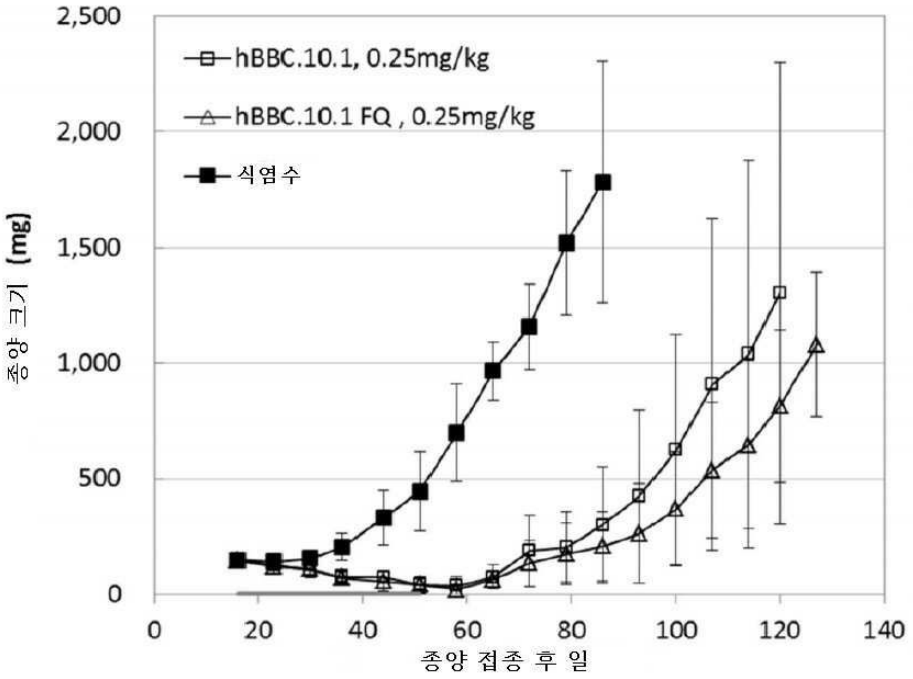
도면20b


AGS (ATCC) 종양 억제
식염수
BR96 1 mg/kg
BR96 0.2 mg/kg
BR96 0.04 mg/kg
BR96 0.008 mg/kg
종양 크기 (mg)
평균
2,500
2,250
2,000
1,750
1,500
1,250
1,000
750
500
250
0
0
10
20
30
40
50
60
70
80
***
***
종양 접종 후 일

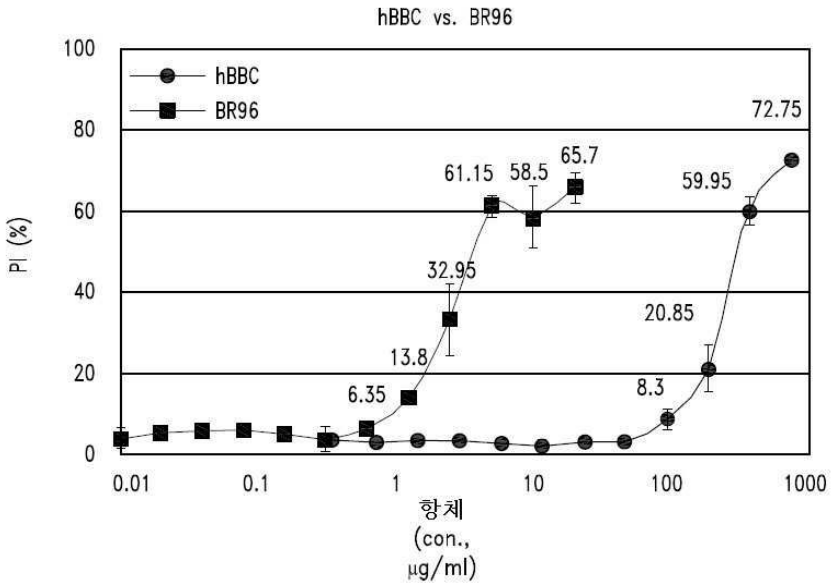
도면20c


1,500
1,000
500
0
종양 크기 (mg)
hBBC.8 0.25mg/kg
hBBC.9 0.25mg/kg
hBBC.9.1 0.25mg/kg
hBBC.10.1 0.25mg/kg
hBBC.8 2mg/kg
식염수
0
20
40
60
80
종양 접종 후 일

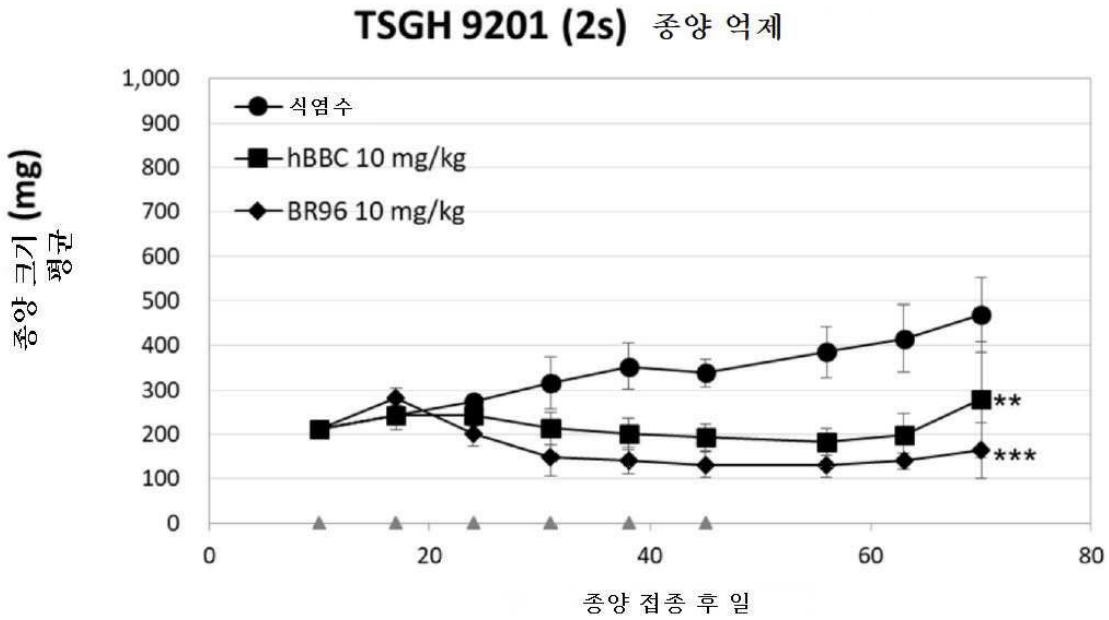
도면20d


2,500
2,000
1,500
1,000
500
0
종양 크기 (mg)
hBBC.10.1, 0.25mg/kg
hBBC.10.1 FQ , 0.25mg/kg
식염수
0
20
40
60
80
100
120
140
종양 접종 후 일

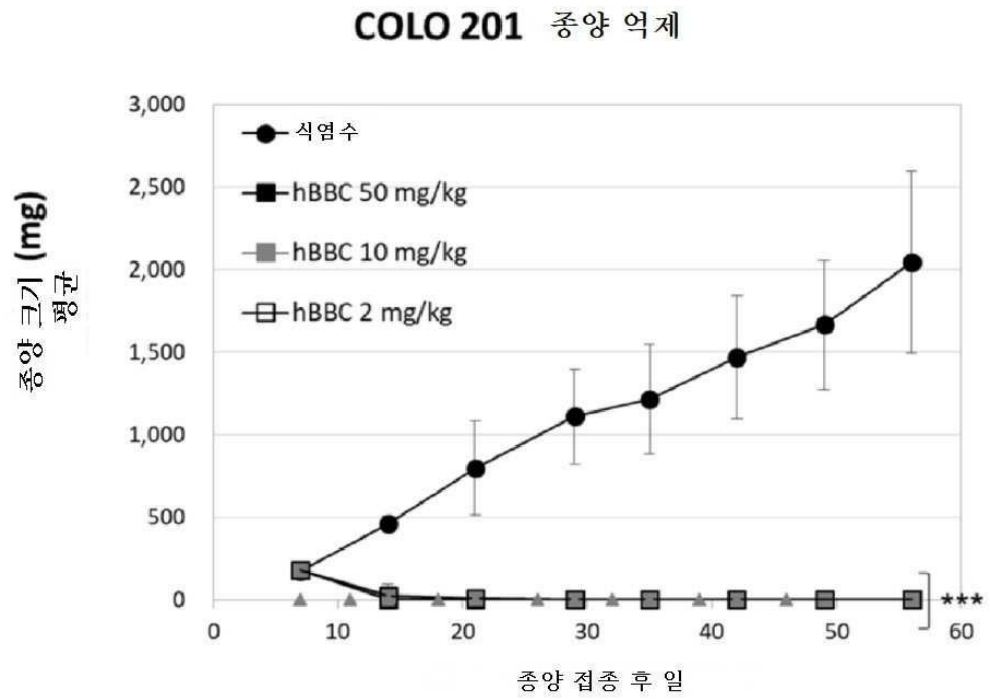
도면21


hBBC vs. BR96
hBBC
BR96
PI (%)
100
80
60
40
20
0
72.75
61.15
58.5
65.7
59.95
32.95
20.85
13.8
6.35
8.3
0.01
0.1
1
10
100
1000
항체
(con.,
μg/ml)

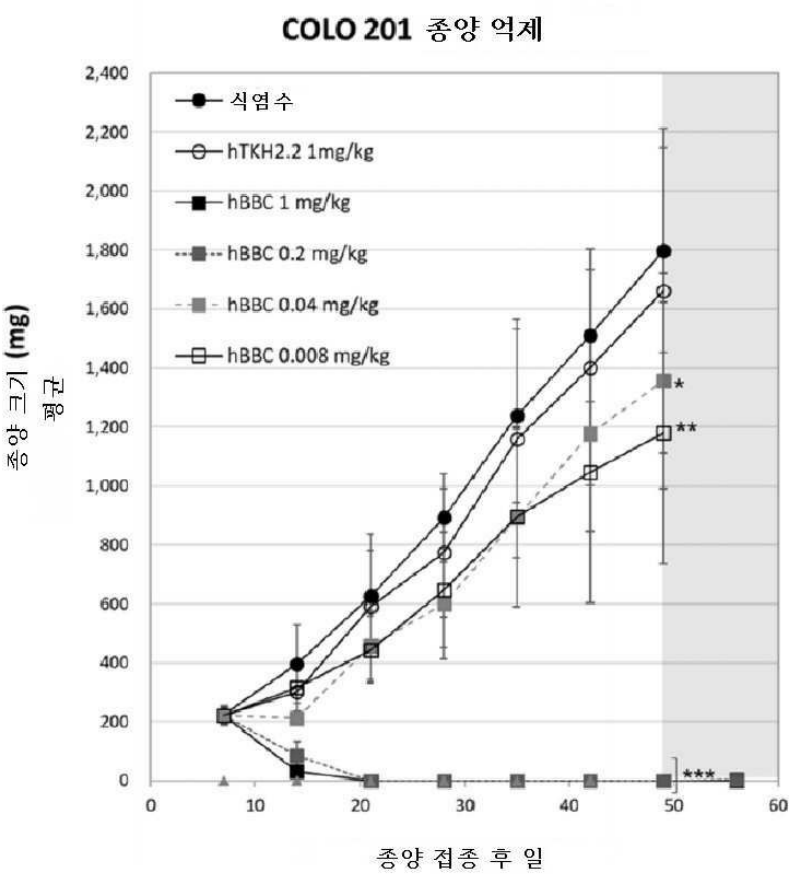
도면22


TSGH 9201 (2s) 종양 억제
종양 크기 (mg)
평균
1,000
900
800
700
600
500
400
300
200
100
0
식염수
hBBC 10 mg/kg
BR96 10 mg/kg
**
***
0
20
40
60
80
종양 접종 후 일

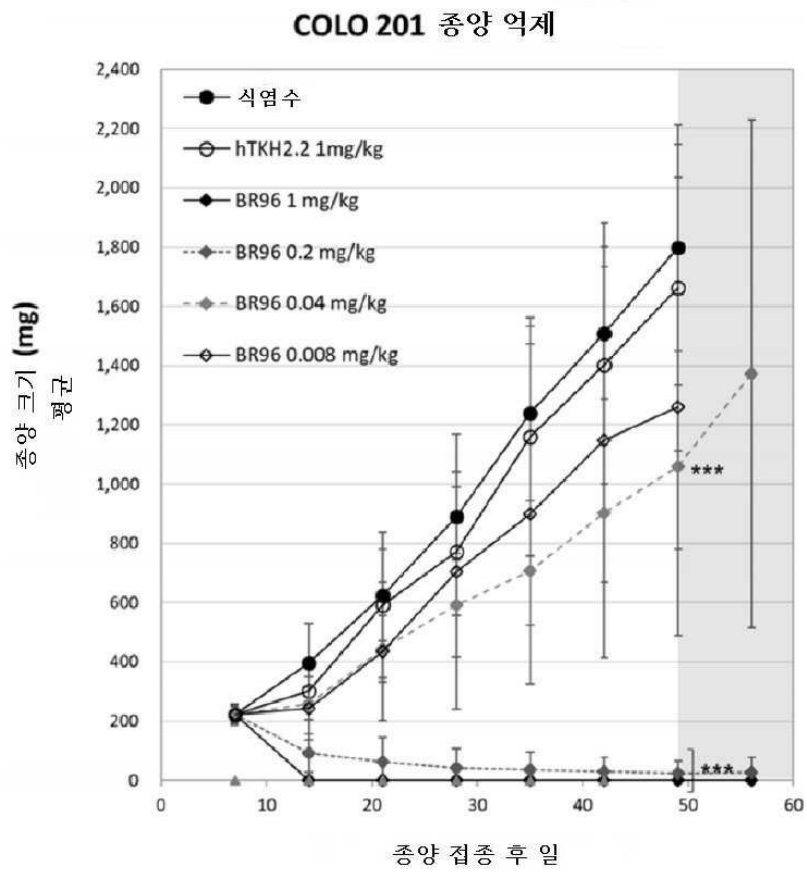
도면23


COLO 201 종양 억제
종양 크기 (mg) 평균
3,000
2,500
2,000
1,500
1,000
500
0
식염수
hBBC 50 mg/kg
hBBC 10 mg/kg
hBBC 2 mg/kg
***
0
10
20
30
40
50
60
종양 접종 후 일

도면24a


COLO 201 종양 억제
종양 크기 (mg) 평균
2,400
2,200
2,000
1,800
1,600
1,400
1,200
1,000
800
600
400
200
0
식염수
hTKH2.2 1mg/kg
hBBC 1 mg/kg
hBBC 0.2 mg/kg
hBBC 0.04 mg/kg
hBBC 0.008 mg/kg
*
**
***
0
10
20
30
40
50
60
종양 접종 후 일

도면24b



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> GlycoNex, Inc.

Chang, Tong-Hsuan

Yang, Mei-Chun

Liu, Liahng-Yirn

Ting, Jerry

Chang, Shu-Yen

Chen, Yen-Ying

Lin, Yu-Yu

Tang, Shu-Lun

<120> THERAPEUTIC ANTIBODIES

<130> IPA201277-US

<140> PCT

<141> 2019-05-30

<150> US 62/678,890

<151> 2018-05-31

<160> 51

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic sequence - heavy chain variable (VH)

domain of antibody hBBC.10.1FQ

<400> 1

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Gly
20 25 30

Tyr Thr Trp His Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
35 40 45

Leu Gly Tyr Ile His Tyr Thr Gly Asn Thr Lys Tyr Ser Pro Ser Leu
50 55 60

Lys Ser Arg Leu Ser Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Thr Phe Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Thr Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Gly Arg Glu Ala Leu Arg Gly Tyr Asp Ala Gly Phe Trp Phe Thr Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
115 120

<210> 2

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic sequence - heavy chain complementarity
determining region 1 (VH CDR1) of antibody
IMH2/BBC, antibody hBBC.8, antibody hBBC.9,
<400> 2
Ser Gly Tyr Thr Trp His
1 5
<210> 3
<211> 16
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic sequence - VH CDR2 of antibody hBBC.9.1,
antibody hBBC.10.1, and antibody hBBC.10.1FQ
<400> 3
Tyr Ile His Tyr Thr Gly Asn Thr Lys Tyr Ser Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 4
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic sequence - VH CDR3 of antibody
hBBC.10.1, and antibody hBBC.10.1FQ
<400> 4
Glu Ala Leu Arg Gly Tyr Asp Ala Gly Phe Trp Phe Thr Tyr
1 5 10
<210> 5
<211> 107
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic sequence - light chain variable (VL)
domain of antibody hBBC.10, antibody hBBC.10.1,
and antibody hBBC.10.1FQ

<400> 5

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 Thr Ala Ser Glu Asp Ile Tyr Asn Arg

20 25 30

Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Arg Leu Leu Ile

35 40 45

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

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Trp Thr Thr Pro Trp

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 6

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic sequence - light chain complementarity
determining region 1 (VL CDR1) of antibody
IMH2/BBC, antibody hBBC.8, antibody hBBC.9,

<400> 6

Thr Ala Ser Glu Asp Ile Tyr Asn Arg Leu Thr

1 5 10

<210> 7

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic sequence - VL CDR2 of antibody IMH2/BBC,

antibody hBBC.8, antibody hBBC.9, antibody
hBBC.9.1, antibody hBBC.10, antibody hBBC.10.1,
and antibody hBBC.10.1FQ

<400> 7

Gly Ala Thr Ser Leu Asp Thr
1 5

<210> 8

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic sequence - VL CDR3 of antibody IMH2/BBC,
antibody hBBC.8, antibody hBBC.9, antibody
hBBC.9.1, antibody hBBC.10, antibody hBBC.10.1,

and antibody hBBC.10.1FQ

<400> 8

Gln Gln Tyr Trp Thr Thr Pro Trp Thr
1 5

<210> 9

<211> 278

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic sequence - single chain fragment
variable (scFv) derived from antibody hBBC.10.1,
in the [VL-VH] orientation

<220><221> VARIANT

<222> (113)...(157)

<223> Any one or all of amino acids 113-157 can either
be present or absent

<400> 9

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 Thr Ala Ser Glu Asp Ile Tyr Asn Arg
20 25 30
Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45
Ser Gly Ala Thr Ser Leu Asp Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Trp Thr Thr Pro Trp
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser
100 105 110
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
115 120 125
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
130 135 140
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln

145 150 155 160
Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln Thr Leu Ser
165 170 175
Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Gly Tyr Thr Trp
180 185 190
His Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly Tyr
195 200 205
Ile His Tyr Thr Gly Asn Thr Lys Tyr Ser Pro Ser Leu Lys Ser Arg
210 215 220

Leu Ser Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Phe Leu Lys Leu
225 230 235 240
Ser Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Gly Arg Glu
245 250 255
Ala Leu Arg Gly Tyr Asp Ala Gly Phe Trp Phe Thr Tyr Trp Gly Gln
260 265 270

Gly Thr Leu Val Thr Val

275

<210> 10

<211> 453

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic sequence - full-length heavy chain (HC)

of antibody hBBC.10.1

<400> 10

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Gly
20 25 30

Tyr Thr Trp His Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
35 40 45

Leu Gly Tyr Ile His Tyr Thr Gly Asn Thr Lys Tyr Ser Pro Ser Leu
50 55 60

Lys Ser Arg Leu Ser Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Phe
65 70 75 80

Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Gly Arg Glu Ala Leu Arg Gly Tyr Asp Ala Gly Phe Trp Phe Thr Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
115 120 125

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

130 135 140

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
145 150 155 160

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
165 170 175

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
180 185 190
Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
195 200 205

Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys
210 215 220
Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
225 230 235 240
Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
245 250 255
Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
260 265 270
Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val

275 280 285
Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
290 295 300
Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
305 310 315 320
Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
325 330 335
Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
340 345 350

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
355 360 365
Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
370 375 380
Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
385 390 395 400
Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
405 410 415
Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser

420 425 430

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser

435 440 445

Leu Ser Pro Gly Lys

450

<210> 11

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic sequence - full-length light chain (LC) of antibody hBBC.10, antibody hBBC.10.1, and antibody hBBC.10.1FQ

<400> 11

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 Thr Ala Ser Glu Asp Ile Tyr Asn Arg

20 25 30

Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Arg Leu Leu Ile

35 40 45

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

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Trp Thr Thr Pro Trp

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu 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> 12
<211> 363
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic sequence - heavy chain variable (VH)

domain of antibody hBBC.10.1

<400> 12
caggtgcagc tgcaggaaag cggcccgggc ctggtgaaac cgagccagac cctgagcctg 60
acctgcaccg tgagcggcta tagcattacc agcggctata cctggcattg gattcgccag 120
catccgggca aaggcctgga atggctgggc tatattcatt ataccggcaa caccaaatat 180
agcccgagcc tgaaaagccg cctgagcatt agccgcgata ccagcaaaaa ccagttcttc 240
ctgaaactga gcagcgtgac caccgaagat accgcggtgt attattgcgg ccgcgaagcg 300
ctgcgcggct atgatgctgg cttctggttt acctattggg gccaaggcac cctggtgacc 360
gtg 363

<210> 13
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic sequence - heavy chain complementarity
determining region 1 (VH CDR1) of antibody
IMH2/BBC, antibody hBBC.8, antibody hBBC.9

<400> 13

agcggctata cctggcat 18

<210> 14

<211> 48

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic sequence - VH CDR2 of antibody hBBC.9.1,
antibody hBBC.10, and antibody hBBC.10.1FQ

<400> 14

tatattcatt ataccggcaa caccaaatat agcccgagcc tgaaaagc 48

<210> 15

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic sequence - VH CDR3 of antibody hBBC.10.1
and antibody hBBC.10.1FQ

<400> 15

gaagcgctgc gcggctatga tgctggcttc tggtttacct at 42

<210> 16

<211> 321

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic sequence - light chain variable (VL)
domain of antibody hBBC.10, antibody hBBC.10.1,
and antibody hBBC.10.1FQ

<400> 16

gatattcaga tgacccagag cccgagcagc ctgagcgcga gcgtgggcga tcgcgtgacc 60

attacctgca ccgcgagcga agatatttat aaccgcctga cctggtatca gcagaaaccg 120

ggcaaagtgc cgcgtctgct gatttctggc gcgaccagcc tggataccgg cgtgccgagc 180

cgctttagcg gcagcggcag cggcaccgat tacaccctga ccattagcag cctgcagccg 240

gaagatgtgg cgacctatta ttgccagcag tattggacca ccccgtggac ctttggccag 300

ggcaccaaac tggaaattaa a 321

<210> 17

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic sequence - light chain complementarity
determining region 1 (VL CDR1) of antibody

IMH2/BBC, antibody hBBC.8, antibody hBBC.9

<400> 17

accgcgagcg aagatattta taaccgcctg acc 33

<210> 18

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic sequence - VL CDR2 of antibody IMH2/BBC,
antibody hBBC.8, antibody hBBC.9, antibody
hBBC.9.1, antibody hBBC.10, antibody hBBC.10.1,
and antibody hBBC.10.1FQ

<400> 18

ggcgcgacca gcctggatac c 21

<210> 19

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic sequence - VL CDR3 of antibody antibody
IMH2/BBC, antibody hBBC.8, antibody hBBC.9,
antibody hBBC.9.1, antibody hBBC.10, antibody
hBBC.10.1, and antibody hBBC.10.1FQ

<400> 19

cagcagtatt ggaccacccc gtggacc 27

<210> 20

<211> 834

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic sequence - single chain fragment variable (scFv) in the [VL-(L)-VH] orientation

derived from antibody hBBC.10.1

<220><221> misc_feature

<222> (337)...(471)

<223> Any one or all of nucleotides 337-471 can either be present or absent.

<400> 20

gatattcaga tgacccagag cccgagcagc ctgagcgcga gcgtgggcga tcgcgtgacc 60

attacctgca ccgcgagcga agatatttat aaccgcctga cctggtatca gcagaaaccg 120

ggcaaagtgc cgcgtctgct gatttctggc gcgaccagcc tggataccgg cgtgccgagc 180

cgctttagcg gcagcggcag cggcaccgat tacaccctga ccattagcag cctgcagccg 240

gaagatgtgg cgacctatta ttgccagcag tattggacca ccccgtggac ctttggccag 300

ggcaccaaac tggaaattaa aggtggaggc ggttctggtg gaggcggttc tggtggaggc 360

ggttctggtg gaggcggttc tggtggaggc ggttctggtg gaggcggttc tggtggaggc 420

ggttctggtg gaggcggttc tggtggaggc ggttctggtg gaggcggttc tcaggtgcag 480

ctgcaggaaa gcggcccggg cctggtgaaa ccgagccaga ccctgagcct gacctgcacc 540

gtgagcggct atagcattac cagcggctat acctggcatt ggattcgcca gcatccgggc 600

aaaggcctgg aatggctggg ctatattcat ataccggca acaccaaata tagcccgagc 660

ctgaaaagcc gcctgagcat tagccgcgat accagcaaaa accagttctt cctgaaactg 720

agcagcgtga ccaccgaaga taccgcggtg tattattgcg gccgcgaagc gctgcgcggc 780

tatgatgctg gcttctggtt tacctattgg ggccaaggca ccctggtgac cgtg 834

<210> 21

<211> 1362

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic sequence - full-length heavy chain (HC)
of antibody hBBC.10.1

<400> 21

caggtgcagc tgcaggaaag cggcccgggc ctggtgaaac cgagccagac cctgagcctg 60

acctgcaccg tgagcggcta tagcattacc agcggctata cctggcattg gattcgccag 120

catccgggca aaggcctgga atggctgggc tatattcatt ataccggcaa caccaaatat 180

agcccgagcc tgaaaagccg cctgagcatt agccgcgata ccagcaaaaa ccagttcttc 240

ctgaaactga gcagcgtgac caccgaagat accgcggtgt attattgcgg ccgcgaagcg 300

ctgcgcggct atgatgctgg cttctggttt acctattggg gccaaggcac cctggtgacc 360

gtgtcgagcg cttccaccaa gggcccatcg gtcttccccc tggcaccctc ctccaagagc 420

acctctgggg gcacagcggc cctgggctgc ctggtcaagg actacttccc cgaaccggtg 480

acggtgtcgt ggaactcagg cgccctgacc agcggcgtgc acaccttccc ggctgtccta 540

cagtcctcag gactctactc cctcagcagc gtggtgaccg tgccctccag cagcttgggc 600

acccagacct acatctgcaa cgtgaatcac aagcccagca acaccaaggt ggacaagaaa 660

gttgagccca aatcttgtga caaaactcac acatgcccac cgtgcccagc acctgaactc 720

ctgggggggac cgtcagtctt cctcttcccc ccaaaaccca aggacaccct catgatctcc 780

cggacccctg aggtcacatg cgtggtggtg gacgtgagcc acgaagaccc tgaggtcaag 840

ttcaactggt acgtggacgg cgtggaggtg cataatgcca agacaaagcc gcgggaggag 900

cagtacaaca gcacgtaccg tgtggtcagc gtcctcaccg tcctgcacca ggactggctg 960

aatggcaagg agtacaagtg caaggtctcc aacaaagccc tcccagcccc catcgagaaa 1020

accatctcca aagccaaagg gcagccccga gaaccacagg tgtacaccct gcccccatcc 1080

cgggatgagc tgaccaagaa ccaggtcagc ctgacctgcc tggtcaaagg cttctatccc 1140

agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat gggcagccgg agaacaacta caagaccacg 1200

cctcccgtgc tggactccga cggctccttc ttcctctaca gcaagctcac cgtggacaag 1260

agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca tgctccgtga tgcatgaggc tctgcacaac 1320

cactacacgc agaagagcct ctccctgtct ccgggtaaat ga 1362

<210> 22

<211> 645

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic sequence - full-length light chain (LC)
of antibody hBBC.10.1 and antibody hBBC.10.1FQ

<400> 22

gatattcaga tgacccagag cccgagcagc ctgagcgcga gcgtgggcga tcgcgtgacc 60

attacctgca ccgcgagcga agatatttat aaccgcctga cctggtatca gcagaaaccg 120

ggcaaagtgc cgcgtctgct gatttctggc gcgaccagcc tggataccgg cgtgccgagc 180

cgctttagcg gcagcggcag cggcaccgat tacaccctga ccattagcag cctgcagccg 240

gaagatgtgg cgacctatta ttgccagcag tattggacca ccccgtggac ctttggccag 300

ggcaccaaac tggaaattaa acgtacggtg gctgcaccat ctgtcttcat cttcccgcca 360

tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat 420

cccagagagg ccaaagtaca gtggaaggtg gataacgccc tccaatcggg taactcccag 480

gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg 540

ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc 600

ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gttaa 645

<210> 23

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic sequence - illustrative spacer amino
acid sequence

<400> 23

Glu Gly Lys Ser Ser Gly Ser Gly Ser Glu Ser Lys Val Asp
1 5 10

<210> 24

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic sequence - illustrative spacer amino
acid sequence

<400> 24

Lys Glu Ser Gly Ser Val Ser Ser Glu Gln Leu Ala Gln Phe Arg Ser
1 5 10 15
Leu Asp

<210> 25
<211> 5

<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic sequence - flexible polylinker amino acid sequence
<400> 25
Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 26
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic sequence - flexible polylinker amino acid sequence
<400> 26
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

<210> 27
<211> 107
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic sequence - VL domain of antibody IMH2/BBC
<400> 27
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Ser Ser Ser Phe Ser Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Thr Ala Ser Glu Asp Ile Tyr Asn Arg

20 25 30

Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Asn Val Pro Arg Leu Leu Ile

35 40 45

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

50 55 60

Ser Arg Ser Gly Lys Asp Tyr Ala Leu Ser Ile Thr Ser Leu Gln Thr

65 70 75 80

Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Trp Thr Thr Pro Trp

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 28

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic sequence - VH domain of antibody

IMH2/BBC

<400> 28

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

1 5 10 15

Ser Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Gly

20 25 30

Tyr Thr Trp His Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Thr Leu Glu Trp

35 40 45

Leu Gly Tyr Ile His Tyr Ser Gly Asn Thr Lys Tyr Ser Pro Ser Leu

50 55 60

Lys Ser Arg Leu Ser Val Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Phe

65 70 75 80

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

85 90 95

Gly Arg Glu Ala Leu Arg Gly Tyr Asp His Gly Phe Trp Phe Thr Tyr
100 105 110
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
115 120

<210> 29
<211> 107
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic sequence - VL domain of human acceptor framework AAS01771.1

<400> 29
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 Ser Asn Tyr
20 25 30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val 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 Lys Tyr Asn Ser Ala Pro Tyr
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 30
<211> 120
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic sequence - VH domain of human acceptor framework CAD89404.1

<400> 30

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

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Gly

20 25 30

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

35 40 45

Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Thr Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser

50 55 60

Leu Lys Ser Arg Leu Ser Met Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe

65 70 75 80

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

85 90 95

Cys Ala Arg Gly Pro Tyr Tyr Asp Ser Pro Arg Pro Phe Asp Pro Trp

100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val

115 120

<210> 31

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic sequence - VL domain of antibody hBBC.8

<400> 31

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 Thr Ala Ser Glu Asp Ile Tyr Asn Arg

20 25 30

Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Arg Leu Leu Ile

35 40 45

Ser Gly Ala Thr Ser Leu Asp Thr 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 Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Trp Thr Thr Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 32

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic sequence - VH domain of antibody hBBC.8, antibody hBBC.9, and antibody hBBC.10

<400> 32

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Gly
20 25 30

Tyr Thr Trp His Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
35 40 45

Leu Gly Tyr Ile His Tyr Ser Gly Asn Thr Lys Tyr Ser Pro Ser Leu
50 55 60

Lys Ser Arg Leu Ser Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Phe
65 70 75 80

Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Gly Arg Glu Ala Leu Arg Gly Tyr Asp His Gly Phe Trp Phe Thr Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
115 120

<210> 33

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic sequence - VL domain of antibody hBBC.9
and antibody hBBC.9.1

<400> 33

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 Thr Ala Ser Glu Asp Ile Tyr Asn Arg
20 25 30

Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Ser Gly Ala Thr Ser Leu Asp Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Arg Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Trp Thr Thr Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 34

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic sequence - VH domain of antibody
hBBC.9.1

<400> 34

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Gly
20 25 30

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

100 105 110
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
115 120

<210> 35
<211> 121
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic sequence - VH domain of antibody
hBBC.10.1
<400> 35
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Gly
20 25 30

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

Gly Arg Glu Ala Leu Arg Gly Tyr Asp Ala Gly Phe Trp Phe Thr Tyr

100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val

115 120

<210> 36

<211> 278

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic sequence - single chain fragment variable (scFv) derived from antibody hBBC.10.1 in the [VH-VL] orientation

<220><221> VARIANT

<222> (127)...(171)

<223> Any one or all of amino acids 127-171 can either be present or absent.

<400> 36

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

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Gly

20 25 30

Tyr Thr Trp His Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp

35 40 45

Leu Gly Tyr Ile His Tyr Thr Gly Asn Thr Lys Tyr Ser Pro Ser Leu

50 55 60

Lys Ser Arg Leu Ser Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Phe

65 70 75 80

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

85 90 95

Gly Arg Glu Ala Leu Arg Gly Tyr Asp Ala Gly Phe Trp Phe Thr Tyr

100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly

115 120 125

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly

130 135 140

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly

145 150 155 160

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr

165 170 175

Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile

180 185 190

Thr Cys Thr Ala Ser Glu Asp Ile Tyr Asn Arg Leu Thr Trp Tyr Gln

195 200 205

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

210 215 220

Leu Asp Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr

225 230 235 240

Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Val Ala Thr

245 250 255

Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Trp Thr Thr Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly

260 265 270

Thr Lys Leu Glu Ile Lys

275

<210> 37

<211> 834

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic sequence - single chain fragment

variable (scFv) in the [VH-(L)-VL] orientation

derived from antibody hBBC.10.1

<220><221> misc_feature

<222> (393)...(513)

<223> Any one or all of nucleotides 393-513 can either

be present or absent.

<400> 37

caggtgcagc tgcaggaaag cggcccgggc ctggtgaaac cgagccagac cctgagcctg 60

acctgcaccg tgagcggcta tagcattacc agcggctata cctggcattg gattcgccag 120

catccgggca aaggcctgga atggctgggc tatattcatt ataccggcaa caccaaatat 180

agcccgagcc tgaaaagccg cctgagcatt agccgcgata ccagcaaaaa ccagttcttc 240

ctgaaactga gcagcgtgac caccgaagat accgcggtgt attattgcgg ccgcgaagcg 300

ctgcgcggct atgatgctgg cttctggttt acctattggg gccaaggcac cctggtgacc 360

gtgggtggag gcggttctgg tggaggcggt tctggtggag gcggttctgg tggaggcggt 420

tctggtggag gcggttctgg tggaggcggt tctggtggag gcggttctgg tggaggcggt 480

tctggtggag gcggttctgg tggaggcggt tctgatattc agatgaccca gagcccgagc 540

agcctgagcg cgagcgtggg cgatcgcgtg accattacct gcaccgcgag cgaagatatt 600

tataaccgcc tgacctggta tcagcagaaa ccgggcaaag tgccgcgtct gctgatttct 660

ggcgcgacca gcctggatac cggcgtgccg agccgcttta gcggcagcgg cagcggcacc 720

gattacaccc tgaccattag cagcctgcag ccggaagatg tggcgaccta ttattgccag 780

cagtattgga ccaccccgtg gacctttggc cagggcacca aactggaaat taaa 834

<210> 38

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic sequence - heavy chain framework region

3 hBBC.10.1

<400> 38

Arg Leu Ser Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Phe Leu Lys

1 5 10 15

Leu Ser Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Gly Arg

20 25 30

<210> 39

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic sequence - heavy chain framework region

3 hBBC.10.1FQ

<400> 39

Arg Leu Ser Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Thr Phe Tyr Leu Gln
1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Thr Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Gly Arg
20 25 30

<210> 40

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic sequence - heavy chain framework region

3 reference 1

<400> 40

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr Phe Tyr Leu Gln
1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

<210> 41

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic sequence - heavy chain framework region

3 reference 2

<400> 41

Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln
1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser Arg
20 25 30

<210> 42

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic sequence - of CDRH2 of IMH2/hBBC

<400> 42

Tyr Ile His Tyr Ser Gly Asn Thr Lys Tyr Ser Pro Ser Leu Lys Ser

1 5 10 15

<210> 43

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic sequence - of CDRH2 of IMH2/hBBC

<400> 43

Glu Ala Leu Arg Gly Tyr Asp His Gly Phe Trp Phe Thr

1 5 10

<210> 44

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic sequence - Human Acceptor VH 1

<400> 44

Val Gln Leu Gln Glu Trp Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln Thr

1 5 10 15

Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Tyr Asn Phe Gly

20 25 30

His Tyr Trp Ser Trp Ile Arg His Tyr Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp

35 40 45

Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu

50 55 60

Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Ala Gly Gly Ser Ala Ala Gly Thr His Asp Ala Phe Asp Ile

100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val

115 120

<210> 45

<211> 122

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic sequence - Human Acceptor VH 2

<400> 45

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

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Asp Ser Ile Asn Ser Ser

20 25 30

Gly Phe Tyr Trp Thr Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu

35 40 45

Trp Ile Gly Ser Met Phe Tyr Gly Gly Ser Pro Tyr Asn Asn Pro Ser

50 55 60

Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe

65 70 75 80

Ser Leu Tyr Leu Asn Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr

85 90 95

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

100 105 110

Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val

115 120

<210> 46

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic sequence - Human Acceptor VH 3

<400> 46

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Gly
20 25 30

Ala Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45

Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Thr Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Leu Ser Met Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Gly Pro Tyr Tyr Asp Ser Pro Arg Pro Phe Asp Pro Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
115 120

<210> 47

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic sequence - Human Acceptor VH 4

<400> 47

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Asp Ser Ile Ser Ser Gly
20 25 30

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

Cys Ala Arg Lys Ser Gly Phe Arg Glu Phe Asp Leu Trp Gly Gln Gly
100 105 110
Thr Leu Val Thr Val
115

<210> 48
<211> 116
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic sequence - Human Acceptor VH 5
<400> 48

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Thr Ser Ile Ser Thr Gly
20 25 30

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

100 105 110

Leu Val Thr Val

115

<210> 49

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic sequence - Human Acceptor VH 6

<400> 49

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

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Gly Ala

20 25 30

Tyr His Trp Ser Trp Ile Arg Gln Leu Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp

35 40 45

Val Gly Tyr Ile Tyr Tyr Thr Gly Asn Thr Tyr Phe Asn Pro Ser Leu

50 55 60

Lys Ser Arg Ile Ser Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser

65 70 75 80

Leu Lys Met Asn Ser Val Thr Val Ala Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Asp Pro Ile Ala Leu Pro Gly Arg Gly Val Phe Asp Tyr Trp

100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val

115 120

<210> 50

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic sequence - Human Acceptor VH 7

<400> 50

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

35 40 45
Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Leu Ser Leu Arg Ser Arg Ile
50 55 60
Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Tyr Tyr Leu Gln Leu Asn
65 70 75 80
Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Leu Ile Thr
85 90 95
Thr Thr Thr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr
100 105 110

Val

<210> 51

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic sequence - Human Acceptor VH 8

<400> 51

Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Ser Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Asp Ser Ile Thr Asn Gly
20 25 30
Phe Trp Ile Trp Ile Arg Lys Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Tyr Met
35 40 45
Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys

50 55 60
Ser Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Gln Asn Gln Phe Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Leu Asn Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Gly Thr Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95
Cys Arg Ser Tyr Gly Arg Thr Pro Tyr Tyr Phe Asp Phe Trp Gly Gln
100 105 110
Gly Thr Thr Leu Thr Val
115