



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0126078
(43) 공개일자 2021년10월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)
A61K 47/68 (2017.01) A61K 47/69 (2017.01)
A61P 3/10 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 16/2854 (2013.01)
A61K 47/6849 (2017.08)
(21) 출원번호 10-2021-7028886
(22) 출원일자(국제) 2020년02월12일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2021년09월08일
(86) 국제출원번호 PCT/US2020/017879
(87) 국제공개번호 WO 2020/167912
국제공개일자 2020년08월20일
(30) 우선권주장
62/804,797 2019년02월13일 미국(US)

(71) 출원인
더 브리검 앤드 우먼즈 하스피탈, 인크.
미국 02115 메사추세츠주 보스턴 프란시스 스트리트 75
(72) 발명자
압디, 레자
미국 02464 메사추세츠주 뉴턴 라운드우드 로드 128
(74) 대리인
양영준, 김영

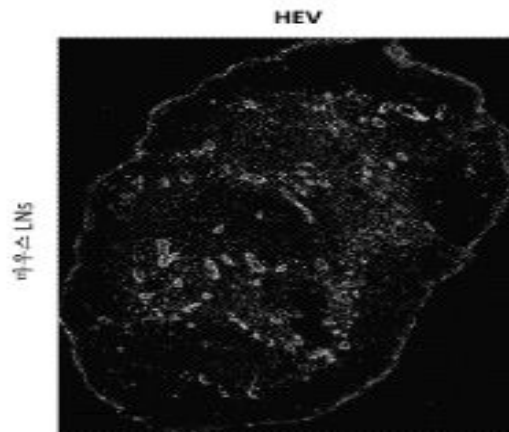
전체 청구항 수 : 총 48 항

(54) 발명의 명칭 항-말초 림프절 어드레신 항체 및 그의 용도

(57) 요약

본 개시내용은 그 중에서도 항-말초 림프절 어드레신 항체 및 그의 항원 결합 단편을 제공한다. 본 개시내용은 또한 생체내에서 림프구 이동을 모방하고, T-세포 활성화 및 T-세포 매개된 손상이 발생한 림프 조직 및 만성 염증 부위로 면역억제 또는 면역조절 약물을 특이적으로 전달할 수 있는 약물-함유 중합체 입자를 포함하는 조성물을 제공하며; 이러한 조성물은 본 개시내용에 기재된 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 포함한다. 본 개시내용은 또한 항체-약물 접합체, 및 항체-약물 접합체를 포함하는 조성물을 포함한다. 이들 항체, 그의 항원-결합 단편, 및 그의 조성물의 제조 및 사용 방법 또한 제공된다.

대표도



도 1A

(52) CPC특허분류

A61K 47/6929 (2017.08)

A61P 3/10 (2018.01)

A61P 35/00 (2018.01)

A61K 2039/505 (2013.01)

C07K 2317/24 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

하기를 포함하는 항-말초 림프절 어드레신 (PNAd) 항체 또는 그의 PNAd-결합 단편:

(a) 중쇄 가변 영역 (VH), 여기서 VH는 서열식별번호:3의 아미노산 서열을 포함하는 VH 상보성 결정 영역 1 (CDR1), 서열식별번호:4의 아미노산 서열을 포함하는 VH CDR2, 및 서열식별번호:5의 아미노산 서열을 포함하는 VH CDR3을 포함함; 및

(b) 경쇄 가변 영역 (VL), 여기서 VL은 서열식별번호:8의 아미노산 서열을 포함하는 VL CDR1, 서열식별번호:9의 아미노산 서열을 포함하는 VL CDR2, 및 서열식별번호:10의 아미노산 서열을 포함하는 VL CDR3을 포함함.

청구항 2

제1항에 있어서, VH가 서열식별번호:11에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 VH 프레임워크 영역 1 (FR1), 서열식별번호:12에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 VH FR2, 서열식별번호:13에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 VH FR3, 및 서열식별번호:14에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 VH FR4를 포함하는 것인 모노클로날 항체 또는 그의 PNAd-결합 단편.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, VL이 서열식별번호:15에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 VL FR1, 서열식별번호:16에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 VL FR2, 서열식별번호:17에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 VL FR3, 및 서열식별번호:18에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 VL FR4를 포함하는 것인 모노클로날 항체 또는 그의 PNAd-결합 단편.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, VH가 서열식별번호:2에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 것인 항체 또는 그의 PNAd-결합 단편.

청구항 5

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, VL이 서열식별번호:7에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 것인 항체 또는 그의 PNAd-결합 단편.

청구항 6

제1항에 있어서, VH가 서열식별번호:2에 제시된 아미노산 서열을 포함하고, VL이 서열식별번호:7에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 것인 항체 또는 그의 PNAd-결합 단편.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 모노클로날 항체인 항체 또는 그의 PNAd-결합 단편.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 무린 항체인 항체 또는 그의 PNAd-결합 단편.

청구항 9

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 키메라 항체인 항체 또는 그의 PNAd-결합 단편.

청구항 10

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 인간화 항체인 항체 또는 그의 PNAd-결합 단편.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 항체인 항체 또는 그의 PNAd-결합 단편.

청구항 12

제11항에 있어서, 인간-유래된 중쇄 및 경쇄 불변 영역을 포함하는 항체 또는 그의 PNAd-결합 단편.

청구항 13

제11항 또는 제12항에 있어서, 이소타입 면역글로불린 뮤 (IgM)의 중쇄 불변 영역을 포함하는 항체 또는 그의 PNAd-결합 단편.

청구항 14

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 항체의 PNAd-결합 단편인 항체 또는 그의 PNAd-결합 단편.

청구항 15

제14항에 있어서, PNAd-결합 단편이 단일 쇠 Fv 단편 (scFv), F(ab') 단편, F(ab) 단편, 및 F(ab')₂ 단편으로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 항체 또는 그의 PNAd-결합 단편.

청구항 16

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 작용제에 접합된 항체 또는 그의 PNAd-결합 단편.

청구항 17

제16항에 있어서, 작용제가 영상화제, 세포독성제 또는 약물인 항체 또는 그의 PNAd-결합 단편.

청구항 18

제16항에 있어서, 작용제가 약물-함유 중합체 입자인 항체 또는 그의 PNAd-결합 단편.

청구항 19

제18항에 있어서, 약물-함유 중합체 입자가 면역억제 또는 면역조절 약물을 포함하는 것인 항체 또는 그의 PNAd-결합 단편.

청구항 20

제16항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 접합이 공유 접합인 항체 또는 그의 PNAd-결합 단편.

청구항 21

제16항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 접합이 링커를 통한 것인 항체 또는 그의 PNAd-결합 단편.

청구항 22

제21항에 있어서, 링커가 폴리에틸렌 글리콜인 항체 또는 그의 PNAd-결합 단편.

청구항 23

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항의 항체 또는 그의 PNAd-결합 단편을 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 폴리뉴클레오타이드.

청구항 24

중쇄 가변 영역 (VH)을 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 폴리뉴클레오타이드이며, VH는 서열식별번호:2에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 것인 폴리뉴클레오타이드.

청구항 25

중쇄를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드이며, 중쇄는 중쇄 가변 영역 (VH)을 포함하고, VH는 서열식별번호:2에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 것인 폴리뉴클레오티드.

청구항 26

제24항 또는 제25항에 있어서, 서열식별번호:1에 제시된 핵산 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드.

청구항 27

경쇄 가변 영역 (VL)을 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드이며, VL은 서열식별번호:7에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 것인 폴리뉴클레오티드.

청구항 28

중쇄를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드이며, 중쇄는 중쇄 가변 영역 (VH)을 포함하고, VH는 서열식별번호:2에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 것인 폴리뉴클레오티드.

청구항 29

제27항 또는 제28항에 있어서, 서열식별번호:6에 제시된 핵산 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드.

청구항 30

프로모터에 작동가능하게 연결된 제24항 또는 제27항의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터.

청구항 31

프로모터에 작동가능하게 연결된 제25항의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터.

청구항 32

프로모터에 작동가능하게 연결된 제28항의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터.

청구항 33

제1 프로모터에 작동가능하게 연결된 제25항의 폴리뉴클레오티드 및 제2 프로모터에 작동가능하게 연결된 제28항의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터.

청구항 34

프로모터에 작동가능하게 연결된 제24항 또는 제27항의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 숙주 세포.

청구항 35

각각 프로모터에 작동가능하게 연결된 제25항 및 제28항의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 숙주 세포.

청구항 36

제30항의 벡터를 포함하는 숙주 세포.

청구항 37

제31항의 벡터 및 제32항의 벡터를 포함하는 숙주 세포.

청구항 38

제33항의 벡터를 포함하는 숙주 세포.

청구항 39

항-말초 림프절 어드레신 (PNAd) 항체 또는 그의 PNAd-결합 단편을 생성하는 방법이며, (a) 제35항, 제37항 및 제38항 중 어느 한 항의 숙주 세포를 배양하고; (b) 배양물로부터 항체를 분리하는 것을 포함하는 방법.

청구항 40

치료 유효량의 제1항 내지 제17항 중 어느 한 항의 항체 또는 그의 PNAd-결합 단편 및 제약상 허용가능한 담체를 포함하는 제약 조성물.

청구항 41

치료 유효량의 제18항 또는 제19항의 항체 또는 그의 PNAd-결합 단편 및 제약상 허용가능한 담체를 포함하는 제약 조성물.

청구항 42

림프구-매개된 면역 반응의 억제를 필요로 하는 대상체에게 치료 유효량의 제40항 또는 제41항의 제약 조성물을 투여하는 것을 포함하는, 상기 대상체에서 림프구-매개된 면역 반응을 억제하는 방법.

청구항 43

자가면역 당뇨병의 치료 또는 진행 지연을 필요로 하는 대상체에게 치료 유효량의 제40항 또는 제41항의 제약 조성물을 투여하는 것을 포함하는, 상기 대상체에서 자가면역 당뇨병을 치료하거나 또는 그의 진행을 지연시키는 방법.

청구항 44

림프구-매개된 염증의 치료를 필요로 하는 대상체에게 치료 유효량의 제40항 또는 제41항의 제약 조성물을 투여하는 것을 포함하는, 상기 대상체에서 림프구-매개된 염증을 치료하는 방법.

청구항 45

말초 림프절 어드레신 (PNAd)-발현 악성종양의 치료 또는 전이 감소를 필요로 하는 대상체에게 치료 유효량의 제40항 또는 제41항의 제약 조성물을 투여하는 것을 포함하는, 상기 대상체에서 말초 림프절 어드레신 (PNAd)-발현 악성종양을 치료하거나 또는 그의 전이를 감소시키는 방법.

청구항 46

제45항에 있어서, PNAd-발현 악성종양이 림프종인 방법.

청구항 47

약물 전달을 필요로 하는 대상체에게 치료 유효량의 제41항의 제약 조성물을 투여하는 것을 포함하는, 상기 대상체에게 약물을 전달하는 방법이며, 대상체에게 전달된 약물은 항체 또는 그의 PNAd-결합 단편에 접합된 약물-함유 중합체 입자의 약물인 방법.

청구항 48

제47항에 있어서, 약물을 대상체에서 하나 이상의 림프 조직 또는 하나 이상의 만성 염증 부위에 전달하는 것인 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

우선권 주장

[0002]

본 출원은 2019년 2월 13일에 출원한 미국 가특허 출원 일련 번호 62/804,797을 우선권으로 주장한다. 그의 전체 내용은 본원에 참고로 포함된다.

[0003]

기술분야

[0004]

본 발명은 항-말초 림프절 어드레신 (PNAd) 항체, 그의 항원-결합 단편, 및 그의 접합체, 및 그의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

- [0005] 말초 림프절 어드레신 (PNAd)은 마우스 및 인간 둘 다에서 높은 내피 세정맥 (HEV)에서 구성적으로 발현되는 조직-특이적인 내피 세포 항원이다. PNAd는 CD34, 포도칼릭신, 글리코실화-의존성 세포-부착 분자 1 (GlyCAM-1), 및 200 kDa의 시알화 당단백질 (sgp200) (모두 황산화된 시알릴-루이스X (sLeX)-유사 모티프를 포함함)인 내피 시알로뮤신의 그룹이다 (von Andrian, U.H. & Mackay, C.R., N Engl J Med 343: 1020-1034, 2000). PNAd는 말초 림프절, 편도선, 염증 또는 림프종 병변의 거의 모든 부위의 정맥 내피에서 발현되지만, 안구 부속기, 갑상선, 타액선 및 폐의 정상 조직에서는 발현되지 않는다 (Liu Y, J Clin Exp Hematopathol 44 (1): 33-37, 2004). PNAd는 이들 장기의 MALT 림프종 조직에서 염증 병변으로의 림프구 귀소 및 림프종 세포의 생물학적 거동에서 중요한 역할을 한다.
- [0006] 염증은 고전적인 면역-매개된 질환, 예컨대 류마티스성 관절염에서부터 암에 이르는 널리 퍼진 수많은 질환에서 주요 병리학적 과정이다. 백혈구가 이식된 장기를 침범하는 이식편 거부에서부터 림프구가 뇌를 침범하는 다발성 경화증, 백혈구가 지질 유도된 미세 및 거대 혈관 손상을 악화시키는 죽상경화관에 이르기까지, 면역 또는 염증 반응은 이들 질환의 발달에 중심이 된다. 지난 10년 동안 새로운 면역억제 약물의 개발에서 주요 발전이 있었다. 이들 약물은 장기 이식의 성공을 보장하는데 중추적인 역할을 하였고, 생명을 위협하는 면역-매개된 질환을 가진 환자의 결과를 크게 개선시켰다. 그러나, 면역억제제의 사용은 선택성의 결여 및 빈번히 관찰되는 주요 약물 부작용으로 인해 방해받고 있다.

발명의 내용

- [0007] 본 개시내용은 항-말초 림프절 어드레신 (PNAd) 항체 또는 그의 PNAd-결합 단편, 및 그를 사용하는 방법을 제공한다.
- [0008] 한 측면에서, 본 개시내용은 하기를 포함하는 항-말초 림프절 어드레신 (PNAd) 항체 또는 그의 PNAd-결합 단편을 특징으로 한다: (a) 중쇄 가변 영역 (VH), 여기서 VH는 서열식별번호(SEQ ID NO):3의 아미노산 서열을 포함하는 VH 상보성 결정 영역 1 (CDR1), 서열식별번호:4의 아미노산 서열을 포함하는 VH CDR2, 및 서열식별번호:5의 아미노산 서열을 포함하는 VH CDR3을 포함함; 및 (b) 경쇄 가변 영역 (VL), 여기서 VL은 서열식별번호:8의 아미노산 서열을 포함하는 VL CDR1, 서열식별번호:9의 아미노산 서열을 포함하는 VL CDR2, 및 서열식별번호:10의 아미노산 서열을 포함하는 VL CDR3을 포함함.
- [0009] 일부 실시양태에서, VH는 서열식별번호:11에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 VH 프레임워크 영역 1 (FR1), 서열식별번호:12에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 VH FR2, 서열식별번호:13에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 VH FR3, 및 서열식별번호:14에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 VH FR4를 포함한다.
- [0010] 일부 실시양태에서, VL은 서열식별번호:15에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 VL FR1, 서열식별번호:16에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 VL FR2, 서열식별번호:17에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 VL FR3, 및 서열식별번호:18에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 VL FR4를 포함한다.
- [0011] 일부 실시양태에서, VH는 서열식별번호:2에 제시된 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, VL은 서열식별번호:7에 제시된 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, VH는 서열식별번호:2에 제시된 아미노산 서열을 포함하고, VL은 서열식별번호:7에 제시된 아미노산 서열을 포함한다.
- [0012] 일부 실시양태에서, 항체는 모노클로날 항체이다. 일부 실시양태에서, 항체는 듀얼 항체이다. 일부 실시양태에서, 항체는 키메라 항체이다. 일부 실시양태에서, 항체는 인간화 항체이다.
- [0013] 일부 실시양태에서, 항체 또는 그의 PNAd-결합 단편은 인간-유래된 중쇄 및 경쇄 불변 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 그의 PNAd-결합 단편은 이소타입 면역글로불린 뮤 (IgM)의 중쇄 불변 영역을 포함한다.
- [0014] 일부 실시양태에서, PNAd-결합 단편은 단일 쇄 Fv 단편 (scFv), F(ab') 단편, F(ab) 단편, 및 F(ab')₂ 단편으로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0015] 일부 실시양태에서, 항체 또는 그의 PNAd-결합 단편은 작용제에 접합된다. 일부 실시양태에서, 작용제는 영양 화제, 세포독성제 또는 약물이다. 일부 실시양태에서, 작용제는 약물-함유 중합체 입자이다. 일부 실시양태에서, 약물-함유 중합체 입자는 면역억제 또는 면역조절 약물을 포함한다. 일부 실시양태에서, 작용제와의 접합은 공유 접합이다. 일부 실시양태에서, 작용제와의 접합은 링커를 통한 것이다. 일부 실시양태에서, 링커는

폴리에틸렌 글리콜이다.

- [0016] 상기 언급된 항체 또는 그의 PNAd-결합 단편을 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 폴리뉴클레오타이드 또한 본원에 제공된다.
- [0017] 추가로, 중쇄 가변 영역 (VH)을 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 폴리뉴클레오타이드가 본원에 제공되며, VH는 서열식별번호:2에 제시된 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 폴리뉴클레오타이드는 서열식별번호:1에 제시된 핵산 서열을 포함한다. 일부 예에서, 폴리뉴클레오타이드는 프로모터에 작동가능하게 연결된다.
- [0018] 추가로, 중쇄를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 폴리뉴클레오타이드가 제공되며, 중쇄는 중쇄 가변 영역 (VH)을 포함하고, VH는 서열식별번호:2에 제시된 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 폴리뉴클레오타이드는 서열식별번호:1에 제시된 핵산 서열을 포함한다. 일부 예에서, 폴리뉴클레오타이드는 프로모터에 작동가능하게 연결된다.
- [0019] 경쇄 가변 영역 (VL)을 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 폴리뉴클레오타이드 또한 본원에 제공되며, VL은 서열식별번호:7에 제시된 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 폴리뉴클레오타이드는 서열식별번호:6에 제시된 핵산 서열을 포함한다. 일부 예에서, 폴리뉴클레오타이드는 프로모터에 작동가능하게 연결된다.
- [0020] 경쇄를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 폴리뉴클레오타이드 또한 본원에 제공되며, 경쇄는 경쇄 가변 영역 (VL)을 포함하고, VL은 서열식별번호:7에 제시된 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 폴리뉴클레오타이드는 서열식별번호:6에 제시된 핵산 서열을 포함한다. 일부 예에서, 폴리뉴클레오타이드는 프로모터에 작동가능하게 연결된다.
- [0021] (i) 프로모터에 작동가능하게 연결된 서열식별번호:2에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 VH; 또는 (ii) 서열식별번호:7에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 VL을 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 상기 언급된 폴리뉴클레오타이드에 작동가능하게 연결된 프로모터를 포함하는 벡터 또한 본원에 제공된다.
- [0022] 서열식별번호:2에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 VH를 포함하는 중쇄를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 상기 언급된 폴리뉴클레오타이드에 작동가능하게 연결된 프로모터를 포함하는 벡터 또한 본원에 제공된다.
- [0023] 서열식별번호:7에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 VL을 포함하는 경쇄를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 상기 언급된 폴리뉴클레오타이드에 작동가능하게 연결된 프로모터를 포함하는 벡터 또한 본원에 제공된다.
- [0024] (i) 서열식별번호:2에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 VH를 포함하는 중쇄를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 상기 언급된 폴리뉴클레오타이드에 작동가능하게 연결된 제1 프로모터; 및 (ii) 서열식별번호:7에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 VL을 포함하는 경쇄를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 상기 언급된 폴리뉴클레오타이드에 작동가능하게 연결된 제2 프로모터를 포함하는 벡터 또한 본원에 제공된다.
- [0025] 프로모터(들)에 작동가능하게 연결된 상기 언급된 폴리뉴클레오타이드 중 하나 이상을 포함하는 숙주 세포 또한 본원에 제공된다.
- [0026] 상기 언급된 벡터 중 하나 이상을 포함하는 숙주 세포 또한 본원에 제공된다.
- [0027] 항-말초 림프절 어드레신 (PNAd) 항체 또는 그의 PNAd-결합 단편을 생성하는 방법이며, (a) 상기 언급된 숙주 세포를 배양하고; (b) 배양물로부터 항체를 분리하는 것을 포함하는 방법 또한 본원에 제공된다.
- [0028] 치료 유효량의 상기 언급된 항체 또는 그의 PNAd-결합 단편 및 제약상 허용가능한 담체를 포함하는 제약 조성물 또한 본원에 제공된다.
- [0029] 림프구-매개된 면역 반응의 억제를 필요로 하는 대상체에게 치료 유효량의 상기 언급된 제약 조성물을 투여하는 것을 포함하는, 상기 대상체에서 림프구-매개된 면역 반응을 억제하는 방법 또한 본원에 제공된다.
- [0030] 자가면역 당뇨병의 치료 또는 진행 지연을 필요로 하는 대상체에게 치료 유효량의 상기 언급된 제약 조성물을 투여하는 것을 포함하는, 상기 대상체에서 자가면역 당뇨병을 치료하거나 또는 그의 진행을 지연시키는 방법 또한 본원에 제공된다.
- [0031] 림프구-매개된 염증의 치료를 필요로 하는 대상체에게 치료 유효량의 상기 언급된 제약 조성물을 투여하는 것을 포함하는, 상기 대상체에서 림프구-매개된 염증을 치료하는 방법 또한 본원에 제공된다.
- [0032] 말초 림프절 어드레신 (PNAd)-발현 악성종양의 치료 또는 전이 감소를 필요로 하는 대상체에게 치료 유효량의 상기 언급된 제약 조성물을 투여하는 것을 포함하는, 상기 대상체에서 말초 림프절 어드레신 (PNAd)-발현 악성

종양을 치료하거나 또는 그의 전이를 감소시키는 방법 또한 본원에 제공된다. 일부 실시양태에서, PNAd-발현 악성종양은 림프종이다. 일부 실시양태에서, PNAd-발현 악성종양은 암이다. 일부 예에서, 암은 유방암이다.

[0033] 약물의 전달을 필요로 하는 대상체에게 치료 유효량의 상기 언급된 제약 조성물을 투여하는 것을 포함하는, 상기 대상체에게 약물을 전달하는 방법 또한 본원에 제공되며, 대상체에게 전달된 약물은 제약 조성물의 항체 또는 그의 PNAd-결합 단편에 접합된 약물-함유 중합체 입자의 약물이다. 일부 실시양태에서, 약물은 대상체에서 하나 이상의 림프 조직 또는 하나 이상의 만성 염증 부위에 전달된다.

[0034] 본 발명의 하나 이상의 실시양태의 상세한 내용은 하기 첨부한 도면 및 설명에 제시된다. 본 발명의 다른 특징, 목적 및 이점은 설명 및 도면으로부터 및 청구항으로부터 자명할 것이다.

도면의 간단한 설명

[0035] **도 1A-B:** MHA112 모노클로날 항체 (mAb)는 마우스 및 인간에서 높은 내피 세정맥 (HEV)을 인식한다. (**도 1A**) 면역형광 염색은 MHA112 mAb에 의해 염색한 HEV의 저배율 영상을 도시하였다. 축적 막대, 500 μm . (**도 1B**) 면역형광 염색은 마우스 림프절 (LN) 및 인간 편도선에서 MHA112 mAb에 의해 염색한 HEV의 고배율 영상을 도시하였다. 축적 막대, 100 μm .

도 2: MHA112 mAb 이소타이핑. MHA112 mAb 이소타입은 이소타이핑 효소-결합 면역흡착 검정 (ELISA)에 의해 결정되었다. 흡광도는 450 nm에서 기록되었다.

도 3A-B: LN으로의 MHA112 mAb 접합된 나노입자 (NP)의 이동. (**도 3A**) 형광 영상은 상이한 LN에서 MHA112 mAb 접합된 NP (MHA112-IR800-NP)의 분포를 도시하였다. NP (IR800-NP)만이 음성 대조군으로 사용되었고, MECA79-NP (MECA79-IR800-NP)가 양성 대조군으로 사용되었다. (**도 3B**) 거드랑이 LN에서 MECA79-NP 및 MHA112-NP 분포의 면역형광 분석. HEV는 녹색으로 염색되었고, NP에서 IR800 염료는 적색이었다. 축적 막대, 50 μm .

도 4: MHA112 mAb가 LN으로의 T 세포 귀소를 차단하였으나 MECA79 mAb는 그렇지 않았다. 대조군 (PBS, MECA79) 및 MHA112 mAb 처리 그룹에서 LN으로의 표지된 T 세포 귀소의 유세포 분석 프로파일링. 3 마리의 마우스/그룹 (n=3)으로부터의 데이터는 표지된 T 세포 백분율의 변화를 나타내었고, 막대 차트로 요약되었다. *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, t-test. n.s.: 유의하지 않음.

도 5: MHA112 서열. MHA112 중쇄 및 경쇄 가변 영역 (각각 VH 및 VL)의 서열이 도시되며, 프레임워크 영역 (FR1-FR4) 및 IMGT 상보성 결정 영역 (CDR1-CDR3)이 표시된다. VH = 서열식별번호:2; VH FR1-FR4 = 각각 서열식별번호:11-14; VH CDR1-3 = 각각 서열식별번호:3-5; VL = 서열식별번호:7; VL FR1-FR4 = 각각 서열식별번호:15-18; VL CDR1-3 = 각각 서열식별번호:3-5.

도 6: ELISA에 의한 MECA79 및 MHA112 mAb의 결합 친화도의 결정. 상이한 농도의 MECA79 및 MHA112를 CHO-PNAd 세포에 대해 시험하였다. Kd를 계산하였다. MHA112는 MECA79에 비해 더 양호한 결합 친화도를 갖는 것으로 확인되었다.

도 7: 유방 종양 성장 곡선은 PBS로 처리된 대조군 그룹 (n=12)에 비해 유리 탁솔 및 MHA112-탁솔 (이식 후 33 일 동안 격일로 160ng 유리 탁솔 i.v.와 동등함)로 처리된 BALB/c-WT 마우스 (n=12)에서 4T1 마우스 유방 종양의 유의하게 더 느린 성장을 입증한다. 데이터는 평균 $\pm$ SD로 표현된다. **P < 0.01, ***P < 0.001. x-축상의 삼각형은 주사 시점을 나타낸다. MHA112-탁솔 그룹은 유리 탁솔 및 비처리 그룹과 비교하여 유의하게 더 작은 크기의 종양을 가졌다.

도 8: 유방 종양 배액 림프절 (DLN)의 형광 현미경 사진은 HEV 및 LYVE1+ 림프관 (녹색)이 대조군 또는 유리 탁솔 그룹에 비해 MHA112-탁솔 그룹에서 덜 확장됨을 나타낸다. 베타-시토크라틴 (적색)은 TDLN에서 4T1 전이를 나타낸다. 축적 막대: 100 μm . MHA112-탁솔 그룹은 유리 탁솔 및 비처리 그룹과 비교하여 유의하게 더 적은 종양 전이 뿐만 아니라 림프 확장을 나타내었다.

도 9: 유방 종양 DLN의 형광 현미경 사진은 대조군 또는 유리 탁솔 그룹에 비해 MHA112-탁솔 그룹에서 덜 중증의 섬유증 (콜라겐 I, 콜라겐 IV 및 라미닌에 의해 나타남)을 나타낸다. 축적 막대: 100 μm . MHA112-탁솔 그룹은 유리 탁솔 및 비처리 그룹과 비교하여 유의하게 더 적은 림프절 섬유증을 나타내었다.

도 10: 생존 곡선은 대조군 및 유리 탁솔 그룹과 비교하여 MHA112-탁솔을 제공받은 4T1 유방 종양 간 문맥 정맥 전이 모델 (n=5)의 유의하게 더 긴 생존을 나타낸다. ***P < 0.001. 삼각형은 주사 일을 나타낸다.

도 11. 췌장에서 panc02 췌장 종양의 생존 곡선은 대조군 및 유리 탁솔 (n=5)에 비해 MHA112-탁솔 (n=5)의 유의

하게 더 긴 생존을 나타내었다. 삼각형은 주사 시점을 나타낸다. ***P < 0.001

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

I. 정의

단수 용어의 개체는 하나 이상의 해당 개체를 지칭하는 것임을 주목하며, 예를 들어 "항체"는 하나 이상의 항체를 나타내는 것으로 이해된다. 따라서, 단수 용어, "하나 이상" 및 "적어도 하나"는 본원에서 상호교환적으로 사용될 수 있다.

본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "폴리펩티드"는 단수형 "폴리펩티드" 뿐만 아니라 복수형 "폴리펩티드들"을 포함하는 것으로 의도되며, 아마이드 결합 (펩티드 결합으로도 공지됨)에 의해 선형으로 연결된 단량체 (아미노산)로 구성된 분자를 지칭한다. 용어 "폴리펩티드"는 2개 이상의 아미노산의 임의의 쇠 또는 쇠들을 지칭하며, 특정한 길이의 생성물을 지칭하지는 않는다. 따라서, 펩티드, 디펩티드, 트리펩티드, 올리고펩티드, "단백질", "아미노산 쇠", 또는 2개 이상의 아미노산의 임의의 쇠 또는 쇠들을 지칭하기 위해 사용된 임의의 다른 용어는 "폴리펩티드"의 정의 내에 포함되고, 용어 "폴리펩티드"는 임의의 이들 용어 대신에 또는 상호교환적으로 사용될 수 있다.

용어 "폴리펩티드"는 또한 폴리펩티드의 발현후 변형, 예컨대 비제한적으로 글리코실화, 아세틸화, 인산화, 아마이드화, 공지된 보호기/차단기에 의한 유도체화, 단백질 가수분해성 절단, 또는 비-천연 발생 아미노산에 의한 변형의 생성물을 지칭하는 것으로 의도된다. 폴리펩티드는 천연 생물학적 공급원으로부터 유래될 수 있거나 또는 재조합 기술에 의해 생성될 수 있지만, 반드시 지정된 핵산 서열로부터 번역되는 것은 아니다. 이는 화학적 합성에 의한 것을 비롯하여 임의의 방식으로 생성될 수 있다.

본원에 기재된 폴리펩티드는 약 3개 이상, 5개 이상, 10개 이상, 20개 이상, 25개 이상, 50개 이상, 75개 이상, 100개 이상, 200개 이상, 500개 이상, 1,000개 이상, 또는 2,000개 이상의 아미노산 크기일 수 있다. 폴리펩티드는 정의된 삼차원 구조를 가질 수 있지만, 이들이 반드시 이러한 구조를 가질 필요는 없다. 정의된 삼차원 구조를 갖는 폴리펩티드는 폴딩된 것으로 지칭될 수 있고, 정의된 삼차원 구조를 갖지 않지만 오히려 수많은 상이한 형태를 채택할 수 있는 폴리펩티드는 폴딩되지 않은 것으로 지칭된다. 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 당단백질은 아미노산 잔기, 예를 들어 세린 잔기 또는 아스파라긴 잔기의 산소-함유 또는 질소-함유 측쇄를 통해 단백질에 부착된 적어도 1개의 탄수화물 모이어티에 커플링된 단백질을 지칭한다.

"단리된" 폴리펩티드 또는 그의 단편, 변이체 또는 유도체는 그의 천연 환경에 있지 않는 폴리펩티드를 의도한다. 특정한 수준의 정제가 필요하지 않다. 예를 들어, 단리된 폴리펩티드는 그의 본래의 또는 천연 환경으로부터 제거될 수 있다. 숙주 세포에서 발현되는 재조합적으로 생성된 폴리펩티드 및 단백질은 임의의 적합한 기술에 의해 분리되거나, 분획화되거나, 또는 부분적으로 또는 실질적으로 정제된 본래의 또는 재조합 폴리펩티드와 마찬가지로 본원에 기재된 목적을 위해 단리된 것으로 고려된다.

폴리펩티드에는 상기 폴리펩티드의 단편, 유도체, 유사체 또는 변이체, 및 이들의 임의의 조합물 또한 포함된다. 용어 "단편", "변이체", "유도체" 및 "유사체"가 본원에 기재된 항체 또는 항체 폴리펩티드를 지칭할 때 이는 상응하는 본래의 결합 분자, 항체 또는 폴리펩티드의 항원-결합 성질 중 적어도 일부를 보유하는 임의의 폴리펩티드를 포함한다. 본원에 기재된 폴리펩티드의 단편에는 본원의 다른 곳에서 논의된 특이적인 항체 단편 외에도 단백질 가수분해성 단편 뿐만 아니라 결실 단편이 포함된다. 본원에 기재된 항체 및 항체 폴리펩티드의 변이체에는 상기 기재된 단편, 및 또한 아미노산 치환 (예를 들어, 보존적 또는 비-보존적 아미노산 치환), 결실 또는 삽입으로 인해 변경된 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드가 포함된다. 변이체는 천연 또는 비-천연 발생으로 발생할 수 있다. 비-천연 발생 변이체는 관련 기술분야에 공지된 돌연변이 유발 기술을 이용하여 생성될 수 있다. 변이체 폴리펩티드는 보존적 또는 비-보존적 아미노산 치환 (예를 들어, 보존적 또는 비-보존적 아미노산 치환), 결실 또는 부가를 포함할 수 있다. PNAid 특이적인 결합 분자, 예를 들어 본원에 기재된 항체 및 항체 폴리펩티드의 유도체는 본래의 폴리펩티드에서 발견되지 않는 추가의 특징을 나타내도록 변경된 폴리펩티드이다. 그 예에는 융합 단백질이 포함된다. 변이체 폴리펩티드는 본원에서 "폴리펩티드 유사체"로도 지칭될 수 있다. 본원에서 사용된 바와 같이, 결합 분자 또는 그의 단편, 항체 또는 항체 폴리펩티드의 "유도체"는 측면 관능기의 반응에 의해 화학적으로 유도체화될 수 있는 1개 이상의 잔기를 갖는 대상 폴리펩티드를 지칭한다. "유도체"에는 20가지 표준 아미노산의 1개 이상의 천연 발생 아미노산 유도체를 함유하는 이들 펩티드가 포함된다. 예를 들어, 4-히드록시프롤린은 프롤린을 대체할 수 있고; 5-히드록시리신은 리신을 대체할 수 있고; 3-메틸히스티딘은 히스티딘을 대체할 수 있고; 호모세린은 세린을 대체할 수 있고; 오르니틴은 리

신을 대체할 수 있다.

[0043] 용어 "폴리뉴클레오타이드"는 단일 핵산 뿐만 아니라 복수 핵산을 포함하는 것으로 의도되고, 단리된 핵산 분자 또는 구축물, 예를 들어 메신저 RNA (mRNA) 또는 플라스미드 DNA (pDNA)를 지칭한다. 폴리뉴클레오타이드는 통상적인 포스포디에스테르 결합 또는 비-통상적인 결합 (예를 들어, 펩티드 핵산 (PNA)에서 발견되는 것과 같은 아미드 결합)을 포함할 수 있다. 용어 "핵산"은 폴리뉴클레오타이드에 존재하는 임의의 1개 이상의 핵산 절편, 예를 들어 DNA 또는 RNA 단편을 지칭한다. "단리된" 핵산 또는 폴리뉴클레오타이드는 그의 천연 환경으로부터 제거된 핵산 분자, DNA 또는 RNA를 의도한다. 예를 들어, 벡터에 함유된 항체를 코딩하는 재조합 폴리뉴클레오타이드는 본원에 기재된 목적을 위해 단리된 것으로 고려된다. 단리된 폴리뉴클레오타이드의 추가의 예에는 이중성 숙주 세포에서 유지되는 재조합 폴리뉴클레오타이드 또는 용액 중의 정제된 (부분적으로 또는 실질적으로) 폴리뉴클레오타이드가 포함된다. 단리된 RNA 분자에는 본원에 기재된 폴리뉴클레오타이드의 생체내 또는 시험관내 RNA 전사체가 포함된다. 본원에 기재된 단리된 폴리뉴클레오타이드 또는 핵산에는 합성에 의해 생성된 이러한 분자가 추가로 포함된다. 또한, 폴리뉴클레오타이드 또는 핵산은 조절 요소, 예컨대 프로모터, 리보솜 결합 부위, 또는 전사 종결자일 수 있거나 또는 이를 포함할 수 있다.

[0044] 본원에서 사용된 바와 같이, "코딩 영역"은 아미노산으로 번역되는 코돈으로 이루어진 핵산의 일부분이다. "정지 코돈" (TAG, TGA, 또는 TAA)이 아미노산으로 번역되지 않지만, 이는 코딩 영역의 일부로 고려될 수 있으며, 그러나 임의의 플랜킹 서열, 예를 들어 프로모터, 리보솜 결합 부위, 전사 종결자, 인트론 등은 코딩 영역의 일부가 아니다. 본원에 기재된 2개 이상의 코딩 영역은 단일 폴리뉴클레오타이드 구축물에서, 예를 들어 단일 벡터 상에서 또는 별도의 폴리뉴클레오타이드 구축물에서, 예를 들어 별도의 (상이한) 벡터 상에서 존재할 수 있다. 추가로, 임의의 벡터는 단일 코딩 영역을 함유할 수 있거나, 또는 2개 이상의 코딩 영역을 포함할 수 있고, 예를 들어 단일 벡터는 번역글로불린 중쇄 가변 영역 및 번역글로불린 경쇄 가변 영역을 별도로 코딩할 수 있다. 또한, 본원에 기재된 벡터, 폴리뉴클레오타이드 또는 핵산은 결합 분자, 항체, 또는 그의 단편, 변이체 또는 유도체를 코딩하는 핵산에 융합되거나 또는 융합되지 않은 이중성 코딩 영역을 코딩할 수 있다. 이중성 코딩 영역에는 비제한적으로 특수 요소 또는 모티프, 예컨대 분비 신호 펩티드 또는 이중성 기능성 도메인이 포함된다.

[0045] 일부 실시양태에서, 폴리뉴클레오타이드 또는 핵산은 DNA이다. DNA의 경우, 폴리펩티드를 코딩하는 핵산을 포함하는 폴리뉴클레오타이드는 일반적으로 1개 이상의 코딩 영역과 작동가능하게 회합된 프로모터 및/또는 다른 전사 또는 번역 조절 요소를 포함할 수 있다. 작동가능한 회합은 조절 서열(들)의 영향 또는 제어하에 유전자 생성물의 발현이 일어나도록 하는 방식으로 유전자 생성물, 예를 들어 폴리펩티드에 대한 코딩 영역이 1개 이상의 조절 서열과 회합될 때이다. 프로모터 기능의 유도가 원하는 유전자 생성물을 코딩하는 mRNA의 전사를 일으키는 경우에, 및 두 DNA 단편 사이의 연결의 성질이 유전자 생성물의 발현을 지시하는 발현 조절 서열의 능력을 방해하지 않거나 또는 DNA 주형이 전사되는 능력을 방해하지 않는 경우에, 두 DNA 단편 (예컨대, 폴리펩티드 코딩 영역 및 그와 회합된 프로모터)은 "작동가능하게 회합된" 또는 "작동가능하게 연결된" 것이다. 따라서, 프로모터가 폴리펩티드를 코딩하는 핵산의 전사에 영향을 미칠 수 있는 경우에, 프로모터 영역은 해당 핵산과 작동가능하게 회합된 것이다. 프로모터는 예정된 세포에서만 DNA의 실질적인 전사를 지시하는 세포-특이적인 프로모터일 수 있다. 프로모터 이외의 다른 전사 조절 요소, 예를 들어 인핸서, 오퍼레이터, 리프레서 및 전사 종결 신호는 세포-특이적인 전사를 지시하도록 폴리뉴클레오타이드와 작동가능하게 회합될 수 있다. 적합한 프로모터 및 다른 전사 조절 영역은 본원에 개시된다.

[0046] 다양한 전사 조절 영역은 관련 기술분야의 기술자에게 공지되어 있다. 이들에는 비제한적으로 척추동물 세포에서 기능하는 전사 조절 영역, 예컨대 비제한적으로 시토메갈로바이러스 (급초기 프로모터, 인트론-A와 접합됨), 유인원 바이러스 40 (초기 프로모터), 및 레트로바이러스 (예컨대 라우스 육종 바이러스)로부터의 프로모터 및 인핸서 절편이 포함된다. 다른 전사 조절 영역에는 척추동물 유전자로부터 유래된 것들, 예컨대 액틴, 열 쇼크 단백질, 소 성장 호르몬 및 토끼 β -글로빈, 뿐만 아니라 진핵생물 세포에서 유전자 발현을 제어할 수 있는 다른 서열이 포함된다. 추가의 적합한 전사 조절 영역에는 조직-특이적인 프로모터 및 인핸서 뿐만 아니라 림포카인-유도성 프로모터 (예를 들어, 인터페론 또는 인터류킨에 의해 유도가능한 프로모터)가 포함된다.

[0047] 유사하게, 다양한 번역 조절 요소는 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지되어 있다. 이들에는 리보솜 결합 부위, 번역 개시 및 종결 코돈, 및 피코르나바이러스로부터 유래된 요소 (특히 CITE 서열로도 지칭되는 내부 리보솜 진입 부위 또는 IRES)가 포함되나 이로 제한되지 않는다.

[0048] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 폴리뉴클레오타이드는 예를 들어 메신저 RNA (mRNA) 형태의 RNA이다.

[0049] 본원에 기재된 폴리뉴클레오타이드 및 핵산 코딩 영역은 본원에 기재된 폴리뉴클레오타이드에 의해 코딩된 폴리펩티

드의 분비를 지시하는 분비 또는 신호 펩티드를 코딩하는 추가의 코딩 영역과 회합될 수 있다. 신호 가설에 따르면, 포유동물 세포에 의해 분비된 단백질은 조면 소포체를 가로질러 성장하는 단백질 쉘의 방출이 시작되었을 때 성숙한 단백질로부터 절단된 신호 펩티드 또는 분비 리더 서열을 갖는다. 관련 기술분야의 통상의 기술자는 척추동물 세포에 의해 분비된 폴리펩티드가 일반적으로 폴리펩티드의 N-말단에 융합된 신호 펩티드를 가지며, 이것이 완전한 또는 "전장" 폴리펩티드로부터 절단되어 분비된 또는 "성숙한" 형태의 폴리펩티드를 생성한다는 것을 알고 있다. 일부 실시양태에서, 본래의 신호 펩티드, 예를 들어 면역글로불린 중쇄 또는 경쇄 신호 펩티드, 또는 그와 작동가능하게 회합된 폴리펩티드의 분비를 지시하는 능력을 보유하는 해당 서열의 기능성 유도체가 사용된다. 대안적으로, 이중성 포유동물 신호 펩티드, 또는 그의 기능성 유도체가 사용될 수 있다. 예를 들어, 야생형 리더 서열은 인간 조직 플라스미노겐 활성화제 (TPA) 또는 마우스 β -글루쿠로니다제의 리더 서열로 치환될 수 있다.

[0050] 달리 명시되지 않는다면, 용어 "장애" 및 "결환"은 본원에서 상호교환적으로 사용된다.

[0051] 본원에서 사용된 바와 같이, "결합 분자"는 주로 항체 및 그의 단편에 관한 것이지만, 호르몬, 수용체, 리간드, 주요 조직적합성 복합체 (MHC) 분자, 샤페론, 예컨대 열 쇼크 단백질 (HSP), 뿐만 아니라 세포-세포 부착 분자, 예컨대 카드헤린의 구성원, 인테그린, C-유형 렉틴 및 면역글로불린 (Ig) 수퍼패밀리를 비롯하여 이로 제한되지 않는 PNAd에 결합하는 다른 비-항체 분자 또한 지칭할 수 있다. 따라서, 단지 명확성을 위해 본 개시내용의 범위를 제한하지 않고 대부분의 하기 실시양태는 치료제 및 진단제의 개발을 위한 결합 분자의 구체적인 실시양태를 나타내는 항체 및 항체-유사 분자와 관련하여 논의된다.

[0052] 용어 "항체" 및 "면역글로불린"은 본원에서 상호교환적으로 사용된다. 항체 또는 면역글로불린은 적어도 중쇄의 가변 도메인을 포함하는, 일반적으로 적어도 중쇄 및 경쇄의 가변 도메인을 포함하는 PNAd-결합 분자이다. 척추동물 시스템에서 염기성 면역글로불린 구조는 비교적 널리 이해되어 있으며; 예를 들어, [Harlow et al., Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988)]를 참고한다.

[0053] 하기에서 보다 상세하게 논의되는 바와 같이, 용어 "면역글로불린"은 생화학적으로 구별될 수 있는 다양한 광범위한 부류의 폴리펩티드를 포함한다. 관련 기술분야의 기술자는 중쇄가 감마, 뮤, 알파, 델타 또는 엡실론 (γ , μ , α , δ , ϵ)으로 분류되고, 그 중에서 일부 하위부류 (예를 들어, $\gamma 1$ - $\gamma 4$)가 있음을 이해할 것이다. 항체의 "부류"를 각각 IgG, IgM, IgA IgG 또는 IgE로 결정하는 것은 이 쉘의 성질이다. 면역글로불린 하위부류 (이소타입), 예를 들어 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 등은 널리 특징분석되어 있고, 기능적 전문화를 부여하는 것으로 공지되어 있다. 이들 각각의 부류 및 이소타입의 변형된 버전은 본 개시내용의 관점에서 관련 기술자에 의해 용이하게 식별가능하고, 따라서 본 개시내용의 범위 내에 있다. 모든 면역글로불린 부류는 명백히 본 개시내용의 범위 내에 있으며, 하기 논의는 일반적으로 면역글로불린 분자의 IgG 부류에 관한 것일 것이다. IgG와 관련하여, 표준 면역글로불린 분자는 분자량이 대략 23,000 달톤인 2개의 동일한 경쇄 폴리펩티드, 및 분자량이 53,000-70,000인 2개의 동일한 중쇄 폴리펩티드를 포함한다. 상기 4개의 쉘은 전형적으로 디설피드 결합에 의해 "Y" 형태로 연결되고, 경쇄는 "Y"의 입구에서 시작하여 가변 영역을 통해 이어지는 중쇄를 브래킷으로 묶는다.

[0054] 경쇄는 카파 또는 람다 (κ , λ)로 분류된다. 각각의 중쇄 부류는 카파 또는 람다 경쇄와 결합될 수 있다. 일반적으로, 경쇄 및 중쇄는 서로 공유 결합되고, 면역글로불린이 하이브리도마, B 세포 또는 유전자 조작된 숙주 세포에 의해 생성될 때 두 중쇄의 "꼬리" 부분은 공유 디설피드 연결 또는 비공유 연결에 의해 서로 결합된다. 중쇄에서, 아미노산 서열은 Y 형태의 갈라진 끝의 N-말단에서부터 각각의 쉘의 맨 아래의 C-말단으로 이어진다.

[0055] 경쇄 및 중쇄 둘 모두는 구조적 및 기능적 상동성 영역으로 나누어진다. 용어 "불변" 및 "가변"은 기능적으로 사용된다. 이와 관련하여, 경쇄 (VL) 및 중쇄 (VH) 부분 둘 다의 가변 도메인이 항원 인식 및 특이성을 결정한다는 것이 이해될 것이다. 대조적으로, 경쇄 (CL) 및 중쇄 (CH1, CH2 또는 CH3)의 불변 도메인은 중요한 생물학적 성질, 예컨대 분비, 경쇄 이동성, Fc 수용체 결합, 보체 결합 등을 부여한다. 통상적으로, 불변 영역 도메인의 넘버링은 항체의 항원-결합 부위 또는 아미노-말단으로부터 멀어질수록 증가한다. N-말단 부분은 가변 영역이고, C-말단 부분은 불변 영역이며; CH3 및 CL 도메인은 실제로 각각 중쇄 및 경쇄의 카르복시-말단을 포함한다.

[0056] 상기 나타난 바와 같이, 가변 영역은 항체가 항원 상의 에피토프를 선택적으로 인식하고 특이적으로 결합하는 것을 가능하게 한다. 즉, 항체의 VL 도메인 및 VH 도메인, 또는 상보성 결정 영역 (CDR)의 하위 집합은 합쳐져서 삼차원 항원-결합 부위를 정의하는 가변 영역을 형성한다. 이 사차 항체 구조는 Y의 각각의 암의 끝에 존재하는 항원-결합 부위를 형성한다. 더욱 구체적으로, 항원-결합 부위는 VH 및 VL 쉘 각각에 있는 3개의 CDR에

의해 정의된다. PNA에 특이적으로 결합하는데 충분한 구조를 함유하는 임의의 항체 또는 면역글로불린 단편은 본원에서 "결합 단편" 또는 "면역특이적인 단편"과 상호교환적으로 나타낸다.

[0057] 천연 발생 항체에서, 항체는 각각의 항원-결합 도메인에 존재하는 6개의 초가변 영역 (때때로 "상보성 결정 영역" 또는 "CDR"로 지칭됨)을 포함하며, 항체가 수성 환경에서 그의 삼차원 구조를 취하기 때문에 이는 항원-결합 도메인을 형성하도록 특이적으로 위치하는 아미노산의 짧은 비연속 서열이다. "CDR"은 더 적은 분자간 변동성을 나타내는 4개의 비교적 보존된 "프레임워크" 영역 또는 "FR"에 의해 플랭킹된다. 프레임워크 영역은 대부분 β-시트 형태를 채택하고, CDR은 β-시트 구조를 연결하는 루프를 형성하고, 일부 경우에는 β-시트 구조의 일부를 형성한다. 따라서, 프레임워크 영역은 쇄간 비공유 상호작용에 의해 정확한 배향으로 CDR을 위치시키는 것을 제공하는 스캐폴드를 형성하도록 작용한다. 위치된 CDR에 의해 형성된 항원-결합 도메인은 면역반응성 항원 상의 에피토프에 상보적인 표면을 정의한다. 이 상보적인 표면은 항체와 그의 동족 에피토프의 비공유 결합을 촉진시킨다. CDR 및 프레임워크 영역을 각각 포함하는 아미노산은 정확하게 정의되어 있기 때문에 관련 기술분야의 통상의 기술자에 의해 임의의 주어진 중쇄 또는 경쇄 가변 영역에 대해 용이하게 확인될 수 있으며; ["Sequences of Proteins of Immunological Interest," Kabat, E., et al., U.S. Department of Health and Human Services, (1983); 및 Chothia and Lesk, J. Mol. Biol., 196 (1987), 901-917]을 참고하고, 이들의 전문이 본원에 참고로 포함된다.

[0058] 관련 기술분야 내에서 사용되고/거나 허용되는 용어에 대해 2가지 이상의 정의가 있는 경우에는, 명확하게 대조적으로 명시되지 않는다면 본원에서 사용된 용어의 정의가 이러한 모든 의미를 포함하는 것으로 의도된다. 구체적인 예는 중쇄 및 경쇄 폴리펩티드 둘 다의 가변 영역 내에서 발견되는 비연속 항원 조합 부위를 기재하기 위한 용어 "상보성 결정 영역" ("CDR")의 사용이다. 이 특정한 영역은 [Kabat et al., U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequences of Proteins of Immunological Interest" (1983) 및 Chothia and Lesk, J. Mol. Biol., 196 (1987), 901-917] (본원에 참고로 포함됨)에 의해 기재되었고, 여기서 정의는 서로 비교할 때 아미노산 잔기의 중복 또는 하위 집합을 포함한다. 그럼에도 불구하고, 항체 또는 그의 변이체의 CDR을 지칭하기 위한 정의의 적용은 본원에서 정의되고 사용되는 용어의 범위 내에 있는 것으로 의도된다. 상기 인용된 참고문헌에 의해 정의되는 바와 같이 CDR을 포함하는 적절한 아미노산 잔기는 비교로서 하기 표 1에 제시된다. 특정한 CDR을 포함하는 정확한 잔기 번호는 CDR의 서열 및 크기에 따라 달라질 것이다. 관련 기술분야의 기술자는 어느 잔기가 항체의 가변 영역 아미노산 서열 하에서 항체의 인간 IgG 아형의 특정한 초가변 영역 또는 CDR을 포함하는지를 관례적으로 결정할 수 있다.

[0059] 표 1: CDR 정의¹

	카바트	코티아
VH CDR1	31-35	26-32
VH CDR2	50-65	52-58
VH CDR3	95-102	95-102
VL CDR1	24-34	26-32
VL CDR2	50-56	50-52
VL CDR3	89-97	91-96

[0060]

[0061] ¹표 1에서 모든 CDR 정의의 넘버링은 카바트 등에 의해 제시된 넘버링 규칙에 따른다 (하기 참고).

[0062] 카바트 등은 또한 임의의 항체에 적용가능한 가변 도메인 서열에 대한 넘버링 시스템을 정의하였다. 관련 기술분야의 통상의 기술자는 서열 자체를 넘어서는 임의의 실험 데이터에 의존하지 않고도 "카바트 넘버링"의 시스템을 임의의 가변 도메인 서열에 명확하게 배정할 수 있다. 본원에서 사용된 바와 같이, "카바트 넘버링"은 [Kabat et al., U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequence of Proteins of Immunological Interest" (1983)]에 제시된 넘버링 시스템을 지칭한다. 달리 명시되지 않는다면, 본원에 기재된 항체, 또는 그의 항원-결합 단편, 변이체 또는 유도체에서 특이적인 아미노산 잔기 위치의 넘버링에 대한 언급은 카바트 넘버링 시스템에 따른 것이지만, 이는 이론적인 것으로서 본원에 기재된 모든 항체에 동등하게 적용되지 않을 수 있다. 예를 들어, 제1 CDR의 위치에 따라 다음 CDR은 어느 방향으로든 이동될 수 있다.

[0063] 본원에 기재된 항체, 또는 그의 항원-결합 단편, 면역특이적인 단편, 변이체 또는 유도체에는 폴리클로날, 모노

클로날, 다중특이적인, 인간, 인간화, 영장류화, 뮤린화 또는 키메라 항체, 단일쇄 항체, 에피토프-결합 단편, 예를 들어 Fab, Fab' 및 F(ab')₂, Fd, Fv, 단일-쇄 Fv (scFv), 단일-쇄 항체, 디설파이드-연결된 Fvs (sdFv), VL 또는 VH 도메인을 포함하는 단편, Fab 발현 라이브러리에 의해 생성된 단편, 및 항-이디오타입 (항-Id) 항체 (예를 들어, 본원에 개시된 항체에 대한 항-Id 항체 포함)가 포함되나 이로 제한되지 않는다. ScFv 분자는 관련 기술분야에 공지되어 있으며, 예를 들어 미국 특허 5,892,019에 기재되어 있다. 본원에 기재된 면역글로불린 또는 항체 분자는 면역글로불린 분자의 임의의 유형 (예를 들어, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA, 및 IgY), 부류 (예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 및 IgA2) 또는 하위부류일 수 있다.

[0064] 일부 실시양태에서, 항체는 5가 구조를 갖는 IgM 또는 그의 유도체가 아니다. 특히, 구체적인 적용, 특히 치료적 사용에서, IgM이 그들의 5가 구조 및 친화도 성숙 결여로 인해 비특이적인 교차 반응성 및 매우 낮은 친화도를 나타내기 때문에, IgM은 IgG 및 다른 2가 항체 또는 상응하는 결합 분자에 비해 덜 유용하다.

[0065] 일부 실시양태에서, 항체는 5가 구조를 갖는 IgM 또는 그의 유도체이다.

[0066] 일부 실시양태에서, 항체는 폴리클로날 항체가 아니며, 즉, 이는 실질적으로 혈장 면역글로불린 샘플로부터 수득된 혼합물이기 보다는 하나의 특정한 항체 종으로 이루어진다.

[0067] 단일-쇄 항체를 비롯한 항체 단편은 가변 영역(들)을 단독으로 또는 힌지 영역, CH1, CH2, 및 CH3 도메인의 전체 또는 일부분과의 조합으로 포함할 수 있다. 가변 영역(들)과 힌지 영역, CH1, CH2 및 CH3 도메인의 임의의 조합물을 또한 포함하는 PNA-결합 단편 또한 본원에 제공된다. 본원에 기재된 항체 또는 그의 면역특이적인 단편은 조류 및 포유동물을 비롯한 임의의 동물 기원으로부터의 것일 수 있다. 일부 실시양태에서, 항체는 인간, 뮤린, 당나귀, 토끼, 염소, 기니 피그, 낙타, 라마, 말 또는 닭 항체이다. 또 다른 실시양태에서, 가변 영역은 연골상 기원 (예를 들어, 상어로부터)일 수 있다.

[0068] 일부 실시양태에서, 항체는 인간으로부터 단리된 인간 모노클로날 항체이다. 임의적으로, 인간 항체의 프레임워크 영역은 데이터베이스의 적절한 인간 생식 계열 가변 영역 서열에 따라 정렬되고 채택되며; 예를 들어 엠알씨 센터 포 프로테인 엔지니어링(MRC Centre for Protein Engineering, 영국 캄브릿지)에 의해 호스팅된 Vbase (vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk)를 참고한다. 예를 들어, 실제 생식 계열 서열로부터 잠재적으로 벗어나는 것으로 고려되는 아미노산은 클로닝 과정 동안에 혼입된 PCR 프라이머 서열 때문일 수 있다. 파지 디스플레이 항체 라이브러리 또는 이중 마우스로부터 인공적으로 생성된 인간-유사 항체, 예컨대 단일쇄 항체 단편 (scFvs)과 비교하여 본원에 기재된 인간 모노클로날 항체는 (i) 동물 대용물의 것이 아니라 인간 면역 반응을 이용하여 수득되고, 즉, 항체가 인체에서 그의 관련 구조에서 천연 PNA에 대한 반응으로 생성되었고, (ii) 개체를 보호하였거나 또는 PNA의 존재에 대해 적어도 유의하고, (iii) 항체가 인간 기원이기 때문에 자가-항원에 대한 교차 반응성의 위험이 최소화되는 것을 특징으로 한다. 따라서, 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "인간 모노클로날 항체", "인간 모노클로날 자가 항체", "인간 항체" 등은 인간 기원인, 즉, 인간 세포, 예컨대 B 세포 또는 그의 하이브리도마로부터 단리되거나 또는 인간 세포, 예를 들어 인간 기억 B 세포의 mRNA로부터 직접적으로 클로닝된 cDNA로부터 단리된 PNA 결합 분자를 지칭하기 위해 사용된다. 인간 항체는 예를 들어 결합 특성을 개선시키기 위해 항체에서 아미노산 치환이 이루어지더라도 여전히 "인간"이다.

[0069] 이후에 예를 들어 미국 특허 번호 5,939,598 (Kucherlapati 등)에 기재된 바와 같이 인간 면역글로불린 라이브러리로부터 또는 하나 이상의 인간 면역글로불린에 대해 트랜스제닉인 동물로부터 유래되고 내인성 면역글로불린을 발현하지 않는 항체는 이들을 본원에 기재된 실제 인간 항체와 구별하기 위한 인간-유사 항체를 지칭한다.

[0070] 예를 들어, 인간-유사 항체, 예컨대 전형적으로 파지 디스플레이로부터 단리된 합성 및 반합성 항체의 중쇄 및 경쇄의 쌍 형성은 원래의 인간 B 세포에서 발생하였기 때문에 반드시 원래의 쌍 형성을 반영하지는 않는다. 따라서, 선행 기술에서 일반적으로 사용되는 바와 같이 재조합 발현 라이브러리로부터 수득된 Fab 및 scFv 단편은 면역원성 및 안정성에 대한 가능한 모든 관련 효과를 갖는 인공적인 것으로 고려될 수 있다.

[0071] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "중쇄 부분"은 면역글로불린 중쇄로부터 유래된 아미노산 서열을 포함한다. 중쇄 부분을 포함하는 폴리펩티드는 다음 중 적어도 하나를 포함한다: CH1 도메인, 힌지 (예를 들어, 상부, 중간 및/또는 하부 힌지 영역) 도메인, CH2 도메인, CH3 도메인, 또는 그의 변이체 또는 단편. 예를 들어, 본원에 기재된 방법에서 사용하기 위한 결합 폴리펩티드는 CH1 도메인을 포함하는 폴리펩티드쇄; CH1 도메인, 힌지 도메인의 적어도 일부분, 및 CH2 도메인을 포함하는 폴리펩티드쇄; CH1 도메인 및 CH3 도메인을 포함하는 폴리펩티드쇄; CH1 도메인, 힌지 도메인의 적어도 일부분, 및 CH3 도메인을 포함하는 폴리펩티드쇄, 또는 CH1 도메인, 힌지 도메인의 적어도 일부분, CH2 도메인, 및 CH3 도메인을 포함하는 폴리펩티드쇄를 포함할 수 있다.

또 다른 실시양태에서, 본원에 기재된 폴리펩티드는 CH3 도메인을 포함하는 폴리펩티드쇄를 포함한다. 추가로, 본원에 기재된 방법에서 사용하기 위한 결합 폴리펩티드는 CH2 도메인의 적어도 일부분 (예를 들어, CH2 도메인 모두 또는 일부분)이 결합될 수 있다. 상기 제시된 바와 같이, 관련 기술분야의 통상의 기술자라면, 이들 도메인 (예를 들어, 중쇄 부분)은 아미노산 서열이 천연 발생 면역글로불린 분자로부터 변하도록 변형될 수 있음을 이해할 것이다.

[0072] 본원에 개시된 특정한 항체, 또는 그의 항원-결합 단편, 변이체 또는 유도체에서, 다합체 중 한 폴리펩티드쇄의 중쇄 부분은 다합체 중 제2 폴리펩티드쇄 상의 것들과 동일하다. 대안적으로, 본원에 기재된 중쇄 부분-함유 단량체는 동일하지 않다. 예를 들어, 각각의 단량체는 예를 들어 이중특이적인 항체 또는 디아바드를 형성하는 상이한 표적 결합 부위를 포함할 수 있다.

[0073] 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 항체, 또는 그의 항원-결합 단편, 변이체 또는 유도체는 단일 폴리펩티드쇄, 예컨대 scFv로 구성되고, 잠재적인 생체내 치료 및 진단 적용을 위해 세포내에서 (인트라바디) 발현되어야 한다.

[0074] 본원에 개시된 진단 및 치료 방법에서 사용하기 위한 결합 폴리펩티드의 중쇄 부분은 상이한 면역글로불린 분자로부터 유래될 수 있다. 예를 들어, 폴리펩티드의 중쇄 부분은 IgG1 분자로부터 유래된 CH1 도메인 및 IgG3 분자로부터 유래된 힌지 영역을 포함할 수 있다. 또 다른 예에서, 중쇄 부분은 부분적으로 IgG1 분자로부터 및 부분적으로 IgG3 분자로부터 유래된 힌지 영역을 포함할 수 있다. 또 다른 예에서, 중쇄 부분은 부분적으로 IgG1 분자로부터 및 부분적으로 IgG4 분자로부터 유래된 키메라 힌지를 포함할 수 있다.

[0075] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "경쇄 부분"은 면역글로불린 경쇄로부터 유래된 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 경쇄 부분은 VL 또는 CL 도메인 중 적어도 하나를 포함한다.

[0076] 항체에 대한 펩티드 또는 폴리펩티드 에피토프의 최소 크기는 약 4개 내지 5개의 아미노산인 것으로 생각된다. 펩티드 또는 폴리펩티드 에피토프는 적어도 7개, 적어도 9개 또는 적어도 약 15개 내지 약 30개의 아미노산을 함유할 수 있다. CDR이 항원 펩티드 또는 폴리펩티드를 그의 3차 형태로 인식하기 때문에, 에피토프를 포함하는 아미노산이 연속일 필요는 없으며, 일부 경우에는 심지어 동일한 펩티드쇄 상에 있지 않을 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항체에 의해 인식되는 펩티드 또는 폴리펩티드 에피토프는 PNA의 적어도 4, 적어도 5, 적어도 6, 적어도 7, 적어도 8, 적어도 9, 적어도 10, 적어도 15, 적어도 20, 적어도 25, 또는 약 5 내지 약 30, 약 10 내지 약 30 또는 약 15 내지 약 30개의 연속 또는 비연속 아미노산의 서열을 함유한다.

[0077] 본원에서 상호교환적으로 사용되는 "특이적으로 결합하는" 또는 "특이적으로 인식하는"은 일반적으로 결합 분자, 예를 들어 항체가 그의 항원-결합 도메인을 통해 에피토프에 결합하고, 결합이 항원-결합 도메인과 에피토프 사이의 일부 상보성을 수반한다는 것을 의미한다. 이 정의에 따라, 항체는 무작위의 관련이 없는 에피토프에 결합하는 것에 비해 그의 항원-결합 도메인을 통해 해당 에피토프에 더욱 용이하게 결합할 때 에피토프에 "특이적으로 결합한다"고 한다. 관련 기술자는 항체가 비연속 에피토프의 선형 부분에 상응하는 아미노산 잔기를 포함하거나 또는 그로 이루어진 단리된 폴리펩티드에 특이적으로 결합하거나 또는 그를 특이적으로 인식할 수 있음을 이해한다. 용어 "특이성"은 특정한 항체가 특정한 에피토프에 결합하는 상대적인 친화도를 한정하기 위해 본원에서 사용된다. 예를 들어, 항체 "A"는 항체 "B"에 비해 주어진 에피토프에 대해 더 높은 특이성을 갖는 것으로 고려될 수 있거나, 또는 항체 "A"는 관련된 에피토프 "D"에 대한 것에 비해 더 높은 특이성으로 에피토프 "C"에 결합한다고 할 수 있다.

[0078] 존재하는 경우, 용어 항체와 항원의 "면역학적 결합 특징" 또는 다른 결합 특징은 그의 모든 문법적 형태에서 항체의 특이성, 친화도, 교차 반응성, 및 다른 결합 특징을 지칭한다.

[0079] "우선적으로 결합하는"은 결합 분자, 예를 들어 항체가 관련된, 유사한, 상동성 또는 유사성 에피토프에 결합하는 것에 비해 에피토프에 더욱 용이하게 특이적으로 결합한다는 것을 의미한다. 따라서, 주어진 에피토프에 "우선적으로 결합하는" 항체는 비록 이러한 항체가 관련된 에피토프와 교차 반응할 수 있지만 관련된 에피토프에 비해 해당 에피토프에 결합할 가능성이 더 높다.

[0080] 비제한적인 예로서, 결합 분자, 예를 들어 항체가 제2 에피토프에 대한 항체의 해리 상수 (K_D)보다 낮은 K_D 로 제1 에피토프에 결합하는 경우에, 이는 상기 제1 에피토프에 우선적으로 결합하는 것으로 고려될 수 있다. 또 다른 비제한적인 예에서, 항체가 제2 에피토프에 대한 항체의 K_D 보다 적어도 1 자릿수 적은 친화도로 제1 에피토프에 결합하는 경우에, 이는 제1 항원에 우선적으로 결합하는 것으로 고려될 수 있다. 또 다른 비제한적인 예에

서, 항체가 제2 에피토프에 대한 항체의 K_D 보다 적어도 2 자릿수 적은 친화도로 제1 에피토프에 결합하는 경우에, 이는 제1 에피토프에 우선적으로 결합하는 것으로 고려될 수 있다.

[0081] 또 다른 비제한적인 예에서, 결합 분자, 예를 들어 항체가 제2 에피토프에 대한 항체의 오프 비율 ($k(off)$)보다 적은 $k(off)$ 로 제1 에피토프에 결합하는 경우에, 이는 제1 에피토프에 우선적으로 결합하는 것으로 고려될 수 있다. 또 다른 비제한적인 예에서, 항체가 제2 에피토프에 대한 항체의 $k(off)$ 보다 적어도 1 자릿수 적은 친화도로 제1 에피토프에 결합하는 경우에, 이는 제1 에피토프에 우선적으로 결합하는 것으로 고려될 수 있다. 또 다른 비제한적인 예에서, 항체가 제2 에피토프에 대한 항체의 $k(off)$ 보다 적어도 2 자릿수 적은 친화도로 제1 에피토프에 결합하는 경우에, 이는 제1 에피토프에 우선적으로 결합하는 것으로 고려될 수 있다.

[0082] 결합 분자, 예를 들어 항체가 주어진 에피토프에 대한 기준 항체의 결합을 어느 정도 차단하는 정도로 상기 에피토프에 우선적으로 결합하는 경우에, 이는 상기 에피토프에 대한 기준 항체의 결합을 경쟁적으로 억제한다고 한다. 경쟁적 억제는 관련 기술분야에 공지된 임의의 방법, 예를 들어 경쟁 ELISA 검정에 의해 결정될 수 있다. 항체는 주어진 에피토프에 대한 기준 항체의 결합을 적어도 90%, 적어도 80%, 적어도 70%, 적어도 60%, 또는 적어도 50%만큼 경쟁적으로 억제한다고 할 수 있다. 관련 기술자는 항체와 그의 에피토프의 결합 또한 항체가 아닌 결합 분자에 의해 경쟁적으로 억제될 수 있음을 이해한다.

[0083] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "친화도"는 개별 에피토프와 결합 분자, 예를 들어 면역글로불린 분자의 CDR의 결합 강도의 척도를 지칭하며; 예를 들어 [Harlow et al., Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. (1988) at pages 27-28]을 참고한다. 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "결합력(avidity)"은 면역글로불린 집단과 항원 사이의 복합체의 전반적인 안정성, 즉, 면역글로불린 혼합물과 항원의 기능적 조합 강도를 지칭하며; 예를 들어 [Harlow at pages 29-34]를 참고한다. 결합력은 집단 내의 개별 면역글로불린 분자와 특이적인 에피토프 사이의 친화도, 및 면역글로불린 및 항원의 원자가 둘 다와 관련이 있다. 예를 들어, 2가 모노클로날 항체와 중합체와 같이 고도로 반복되는 에피토프 구조를 갖는 항원 사이의 상호작용은 높은 결합력 중 하나이다. 항원에 대한 항체의 친화도 또는 결합력은 임의의 적합한 방법을 이용하여 실험적으로 결정될 수 있으며; 예를 들어 [Berzofsky et al., "Antibody-Antigen Interactions" In Fundamental Immunology, Paul, W. E., Ed., Raven Press New York, N Y (1984), Kuby, Janis Immunology, W. H. Freeman and Company New York, N Y (1992)] 및 그에 기재된 방법을 참고한다. 항원에 대한 항체의 친화도를 측정하기 위한 일반적인 기술에는 ELISA, RIA, 및 표면 플라즈몬 공명이 포함된다. 특정한 항체-항원 상호작용의 측정된 친화도는 상이한 조건하에, 예를 들어 염 농도, pH에서 측정되는 경우 달라질 수 있다. 따라서, 친화도 및 다른 항원-결합 파라미터, 예를 들어 K_D , IC50의 측정은 바람직하게는 항체 및 항원의 표준화된 용액, 및 표준화된 완충액에 의해 이루어진다.

[0084] 결합 분자, 예를 들어 본원에 기재된 항체, 또는 그의 항원-결합 단편, 변이체 또는 유도체는 그들의 교차 반응성의 관점에서 또한 기재되거나 또는 구체화될 수 있다. 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "교차 반응성"은 한 항원에 대해 특이적인 항체가 제2 항원과 반응하는 능력을 지칭하며; 두 상이한 항원 물질 사이의 관련성의 척도이다. 따라서, 항체가 그의 형성을 유도한 것 이외의 에피토프에 결합하는 경우에, 이는 교차 반응성이다. 교차 반응성 에피토프는 일반적으로 유도 에피토프와 동일한 여러 상보성 구조적 특징을 함유하며, 일부 경우에 실제로 원래보다 더 양호하게 잘 맞을 수 있다.

[0085] 예를 들어, 특정한 항체가 관련이 있지만 동일하지 않은 에피토프, 예를 들어 기준 에피토프와 적어도 95%, 적어도 90%, 적어도 85%, 적어도 80%, 적어도 75%, 적어도 70%, 적어도 65%, 적어도 60%, 적어도 55%, 및 적어도 50% 동일성 (관련 기술분야에 공지되고 본원에 기재된 방법을 이용하여 계산됨)을 갖는 에피토프에 결합한다는 점에서, 이들은 어느 정도의 교차 반응성을 갖는다. 항체가 기준 에피토프와 95% 미만, 90% 미만, 85% 미만, 80% 미만, 75% 미만, 70% 미만, 65% 미만, 60% 미만, 55% 미만, 및 50% 미만의 동일성 (관련 기술분야에 공지되고 본원에 기재된 방법을 이용하여 계산됨)을 갖는 에피토프에 결합하지 않는 경우에, 이는 교차 반응성을 거의 또는 전혀 갖지 않는다고 말할 수 있다. 항체가 특정한 에피토프의 임의의 다른 유사체, 병렬상동체 또는 동족체에 결합하지 않는 경우에, 이는 해당 에피토프에 대해 "고도로 특이적인" 것으로 고려될 수 있다.

[0086] 결합 분자, 예를 들어, 본원에 기재된 항체, 또는 그의 항원-결합 단편, 변이체 또는 유도체는 또한 PNA에 대한 그들의 결합 친화도의 관점에서 기재되거나 또는 구체화될 수 있다.

[0087] 이전에 나타난 바와 같이, 다양한 면역글로불린 부류의 불변 영역의 서브유닛 구조 및 삼차원 형태는 널리 공지되어 있다. 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "VH 도메인"은 면역글로불린 중쇄의 아미노 말단 가변 도메인을

포함하고, 용어 "CH1 도메인"은 면역글로불린 중쇄의 첫번째 (가장 아미노 말단) 불변 영역 도메인을 포함한다. CH1 도메인은 VH 도메인에 인접하고, 면역글로불린 중쇄 분자의 힌지 영역에 대해 아미노 말단이다.

[0088] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "CH2 도메인"은 통상적인 넘버링 방식을 이용하여 예를 들어 항체의 대략 잔기 244에서 잔기 360까지 (잔기 244 내지 360, 카바트 넘버링 시스템; 및 잔기 231-340, EU 넘버링 시스템; [Kabat EA et al. op. cit] 참고) 연장되는 중쇄 분자의 부분을 포함한다. CH2 도메인은 또 다른 도메인과 밀접하게 쌍을 형성하지 않는다는 점에서 독특하다. 오히려, 2개의 N-연결된 분지형 탄수화물 쇄가 무손상인 본래의 IgG 분자의 두 CH2 도메인 사이에 삽입된다. CH3 도메인이 CH2 도메인에서 IgG 분자의 C-말단까지 연장되고 대략 108개의 잔기를 포함한다는 것 또한 널리 입증되어 있다.

[0089] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "힌지 영역"은 CH1 도메인을 CH2 도메인에 연결하는 중쇄 분자의 부분을 포함한다. 이 힌지 영역은 대략 25개의 잔기를 포함하고, 유연성이어서, 2개의 N-말단 항원-결합 영역이 독립적으로 이동할 수 있게 한다. 힌지 영역은 3가지 별개의 도메인: 상부, 중간 및 하부 힌지 도메인으로 세분화될 수 있으며; [Roux et al., J. Immunol. 161 (1998), 4083]을 참고한다.

[0090] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "디설피드 결합"은 2개의 황 원자 사이에 형성된 공유 결합을 포함한다. 아미노산 시스테인은 제2 티올 기와 디설피드 결합 또는 가교를 형성할 수 있는 티올 기를 포함한다. 대부분의 천연 발생 IgG 분자에서, CH1 및 CL 영역은 디설피드 결합에 의해 연결되고, 두 중쇄는 카바트 넘버링 시스템을 이용하여 239 및 242에 상응하는 위치에서 (위치 226 또는 229, EU 넘버링 시스템) 2개의 디설피드 결합에 의해 연결된다.

[0091] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "연결된", "융합된" 또는 "융합"은 본원에서 상호교환적으로 사용된다. 이들 용어는 2개 초과 요소 또는 성분을 화학적 결합 또는 재조합 수단을 비롯한 수단에 의해 함께 결합시키는 것을 지칭한다. "프레임내 융합"은 원래의 ORF의 정확한 번역 리딩 프레임에 유지하는 방식으로 2개 이상의 폴리뉴클레오티드 오픈 리딩 프레임 (ORF)을 결합시켜 연속적인 더 긴 ORF를 형성하는 것을 지칭한다. 따라서, 재조합 융합 단백질은 원래의 ORF에 의해 코딩된 폴리펩티드에 상응하는 2개 이상의 절편을 함유하는 단일 단백질이다 (절편이 일반적으로 천연에서는 함께 결합되지 않음). 따라서, 리딩 프레임이 융합된 절편에 걸쳐 연속적으로 만들어지지만, 절편은 예를 들어 프레임내 링커 서열에 의해 물리적으로 또는 공간적으로 분리될 수 있다. 예를 들어, 면역글로불린 가변 영역의 CDR을 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 프레임내에서 융합될 수 있지만, "융합된" CDR이 연속 폴리펩티드의 일부로서 공동 번역될 수 있는 한, 적어도 1개의 면역글로불린 프레임워크 영역 또는 추가의 CDR 영역을 코딩하는 폴리뉴클레오티드에 의해 분리될 수 있다.

[0092] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "발현"은 유전자가 생화학 물질, 예를 들어 RNA 또는 폴리펩티드를 생성하는 과정을 지칭한다. 상기 과정은 비제한적으로 유전자 녹다운 뿐만 아니라 일시적인 발현 및 안정한 발현 둘 다를 비롯하여 세포 내에서 유전자의 기능적 존재의 임의의 징후를 포함한다. 이는 비제한적으로 유전자에서 메신저 RNA (mRNA), 전달 RNA (tRNA), 소형 헤어핀 RNA (shRNA), 소형 간섭 RNA (siRNA) 또는 임의의 다른 RNA 생성물로의 전사, 및 이러한 mRNA에서 폴리펩티드(들)로의 번역을 포함한다. 원하는 최종 생성물이 생화학 물질인 경우, 발현은 생화학 물질 및 임의의 전구체의 생성을 포함한다. 유전자의 발현은 "유전자 생성물"을 생성한다. 본원에서 사용된 바와 같이, 유전자 생성물은 핵산, 예를 들어 유전자의 전사에 의해 생성된 메신저 RNA, 또는 전사체로부터 번역된 폴리펩티드일 수 있다. 본원에 기재된 유전자 생성물에는 전사후 변형을 갖는 핵산, 예를 들어 폴리아데닐화, 또는 번역후 변형, 예를 들어 메틸화, 글리코실화, 지질 부가, 다른 단백질 서브유닛과의 회합, 단백질 가수분해성 절단 등을 갖는 폴리펩티드가 추가로 포함된다.

[0093] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "샘플"은 대상체 또는 환자로부터 수득된 임의의 생물학적 물질을 지칭한다. 한 측면에서, 샘플은 혈액, 혈장 또는 소변을 포함할 수 있다. 다른 측면에서, 샘플은 전혈, 혈장, 혈액 샘플로부터 농축된 B 세포, 및 배양된 세포 (예를 들어, 대상체로부터의 B 세포)를 포함할 수 있다. 샘플은 또한 신경 조직을 비롯한 생검 또는 조직 샘플을 포함할 수 있다. 여전히 다른 측면에서, 샘플은 전세포 및/또는 세포 용해물을 포함할 수 있다. 혈액 샘플은 관련 기술분야에 공지된 방법에 의해 수집될 수 있다. 한 측면에서, 펠렛은 4°C에서 200 μ l 완충제 (20 mM 트리스(Tris), pH. 7.5, 0.5% 노니덱(Nonidet), 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 0.1M NaCl, IX 시그마(Sigma) 프로테아제 억제제, 및 IX 시그마 포스파타제 억제제 1 및 2) 중에서 불텍싱함으로써 재현탁될 수 있다. 현탁액은 간헐적으로 불텍싱하면서 얼음 상에서 20 분 동안 유지시킬 수 있다. 15,000 x g에서 5 분 동안 약 4°C에서 회전시킨 후, 분취량의 상청액을 약 -70°C에서 보관하였다.

[0094] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "치료하다" 또는 "치료"는 치료적 처리 및 예방적 또는 예비적 조치 둘 다를 지칭하며, 목적은 본원에 기재된 원치 않는 생리학적 변화 또는 장애를 예방하거나 또는 늦추는 (줄이는)

것이다. 유익한 또는 원하는 임상 결과에는 검출가능하건 검출가능하지 않건 간에 증상의 경감, 질환 정도의 축소, 질환의 안정화된 (즉, 악화되지 않는) 상태, 질환 진행의 지연 또는 늦춤, 질환 상태의 개선 또는 완화, 및 관해 (완전하건 부분적이건 간에)가 포함되나 이로 제한되지 않는다. "치료"는 또한 치료를 제공받지 않은 경우에 예상된 생존과 비교하여 연장된 생존을 의미할 수 있다. 이러한 치료를 필요로 하는 것에는 상태 및 장애를 이미 가진 것들 뿐만 아니라 상태 또는 장애를 갖기 쉬운 것들, 또는 상태 또는 장애의 징후가 예방되어야 하는 것들이 포함된다.

[0095] "대상체" 또는 "개체" 또는 "동물" 또는 "환자" 또는 "포유동물"은 진단, 예후, 예방 또는 치료를 원하는 임의의 대상체, 특히 포유동물 대상체, 예를 들어 인간 환자를 의미한다.

[0096] 성분 또는 단계를 포함하는 본원에 기재된 조성물 또는 방법은 또한 이들 성분 또는 단계로 본질적으로 이루어질 수 있거나, 또는 이들로 이루어질 수 있다.

[0097] II. 항체

[0098] 항-말초 림프절 어드레신 (PNAd) 항체 및 그의 항원-결합 단편이 제공된다. 항-PNAd 항체 또는 그의 항원-결합 단편의 유도체 또는 변이체 또한 본원에 제공되고, 이러한 항체 또는 그의 PNAd-결합 단편 또는 그의 유도체 또는 변이체를 포함하는 접합체 또한 본원에 제공된다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항체 또는 그의 PNAd-결합 단편은 하기 실시예 섹션에 예시된 항체 MHA112에 대해 설명된 바와 같은 결합 특징 및/또는 생물학적 성질을 입증한다. 하기 실시예 섹션에서 기재된 바와 같이, 항-PNAd 항체 MHA112는 PNAd를 발현하는 세포에 대해 개선된 결합 친화도 (실시예 6) 및 림프절로의 T 세포 귀소를 차단하는 개선된 능력 (실시예 4)을 나타낸다. MHA112에 접합된 약물의 투여는 증가된 생존 시간 (실시예 8) 외에도 감소된 종양 성장, 감소된 종양 전이, 및 감소된 종양-배액 림프절 섬유증 (실시예 7)을 일으켰다. 더욱이, MHA112에 접합된 약물의 투여는 또한 체장 종양 모델에서 생존 시간을 증가시켰다 (실시예 9).

[0099] 항체 및 그의 항원-결합 단편은 그들의 가변 영역, 예를 들어 결합 도메인에서 도 5에 도시된 아미노산 서열 중 어느 하나를 포함하는 VH 및/또는 VL 가변 영역의 적어도 1개의 상보성 결정 영역 (CDR)을 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다. 상기 확인된 가변 영역을 코딩하는 상응하는 뉴클레오타이드 서열은 하기 표 4에 제시된다. VH 및/또는 VL 영역의 상기 아미노산 서열의 CDR의 예시적인 집합은 도 5 및 표 2에 도시된다. 표 2의 CDR에 대한 상응하는 프레임워크 영역은 표 3에 나타내었다. 그러나, 하기에서 논의되는 바와 같이 관련 기술분야의 기술자는 추가로 또는 대안적으로 CDR2 및 CDR3의 경우에 그들의 아미노산 서열이 도 5에 제시된 것들과 1개, 2개, 3개 또는 심지어 그 초과인 아미노산만큼 상이한 CDR이 사용될 수 있다는 사실을 잘 알고 있다.

[0100] 표 2: IMGT CDR 서열.

	CDR1	CDR2	CDR3
중쇄	GFSLTSY (SEQ ID NO: 3)	WGGS (SEQ ID NO: 4)	HSKGGYFDV (SEQ ID NO: 5)
경쇄	SASSSVSYMH (SEQ ID NO: 8)	EISKLAS (SEQ ID NO: 9)	QQWNYPLIT (SEQ ID NO: 10)

[0101]

[0102] 표 3: 프레임워크 영역 서열

	FR1	FR2	FR3	FR4
중쇄	QVQLKESGPGLV VAPSQSLTCT VS (SEQ ID NO:11)	GVDWVRQPPG KGLEWLGVI (SEQ ID NO:12)	TNYSALMSRL SISKDNSKSQVF LKMNSLQTDDT AMYCAK (SEQ ID NO:13)	WGTGTTVTVSS (SEQ ID NO:14)
경쇄	EIVLTQSPAITM SLGQKVTITC (SEQ ID NO:15)	WYQQKSGTSPK PWIY (SEQ ID NO:16)	GVPARFSGSGS GTSYSLTISSME AEDMIYYC (SEQ ID NO:17)	FGAGTKLELK (SEQ ID NO:18)

[0103]

[0104] 표 4: 가변 영역 서열

	뉴클레오타드	아미노산
중쇄	CAGGTGCAGCTGAAGGAGTCAGGACCTGG CCTGGTGGCGCCCTCACAGAGCCTGTCCAT CACTTGCAGTGTCTCTGGGTTTTTCATTAAC CAGCTATGGTGTAGACTGGGTTCGCCAGCC TCCAGGAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGGAG TAATATGGGGTGGTGAAGCACAAATTAT AATTCAGCTCTCATGTCCAGACTGAGCATC AGCAAAGACAACCTCCAAGAGCCAAGTTTT CTTAAAAATGAACAGTCTGCAAACTGATG ACACAGCCATGTACTACTGTGCCAAACAT AGTAAAGGGGGTACTTCGATGTCTGGGG CACAGGGACCACGGTCAACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO: 1)	QVQLKESGPGL VAPSQSLSTCT VSGFSLTSYGV DWVRQPPGKGL EWLGVIWGGGS TNYNSALMSRL SISKDNSKSQVF LKMNSLQTDDT AMYCAKHSK GGYFDVWGTG TTVTVSS (SEQ ID NO: 2)
경쇄	GAAATTGTGCTCACTCAGTCTCCAGCCATC ACAGCTGCATCTCTGGGGCAAAAGGTCAC CATCACCTGCAGTGCCAGCTCAAGTGTA GTTACATGCACTGGTACCAGCAGAAAGTCA GGCACCTCCCCAAACCATGGATTTATGAA ATATCCAAACTGGCTTCTGGAGTCCAGCT CGCTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACCTCT TACTCTCTACAATCAGCAGCATGGAGGCT GAAGATGCTGCCATTTATTACTGCCAGCAG TGGAATTATCCTCTTATCACGTTCCGTGCT GGGACCAAGCTGGAGCTGAAA (SEQ ID NO: 6)	EIVLTQSPAITM SLGQKVTITCSA SSSVSYMHWYQ QKSGTSPKPWIY EISKLASGVPAR FSGSGSGTSYSL TISSMEAEDMIY YCQQWNYPLIT FGAGTKLELK (SEQ ID NO: 7)

[0105]

[0106]

일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 서열식별번호: 3-5 및 8-10으로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하거나 또는 그로 이루어진 적어도 1개의 CDR을 포함한다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항체, 또는 그의 항원-결합 단편은 서열식별번호: 3-5 및 8-10으로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하거나 또는 그로 이루어진 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 CDR을 포함한다 (예를 들어, 표 2 참고).

[0107]

일부 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 서열식별번호:3의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 (VH) 상보성 결정 영역 1 (CDR1), 서열식별번호:4의 아미노산 서열을 포함하는 VH CDR2, 및 서열식별번호:5의 아미노산 서열을 포함하는 VH CDR3을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 그의 PNA-결합 단편은 서열식별번호:3의 아미노산 서열을 포함하는 VH CDR1, 서열식별번호:4의 아미노산 서열을 포함하는 VH CDR2, 및 서열식별번호:5의 아미노산 서열을 포함하는 VH CDR3을 포함하고, 서열식별번호:8의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역 (VL) CDR1, 서열식별번호:9의 아미노산 서열을 포함하는 VL CDR2, 및 서열식별번호:10의 아미노산 서열을 포함하는 VL CDR3을 추가로 포함한다.

[0108]

일부 실시양태에서, 항체 또는 그의 PNA-결합 단편은 서열식별번호:8의 아미노산 서열을 포함하는 VL CDR1, 서열식별번호:9의 아미노산 서열을 포함하는 VL CDR2, 및 서열식별번호:10의 아미노산 서열을 포함하는 VL CDR3을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 그의 PNA-결합 단편은 서열식별번호:8의 아미노산 서열을 포함하는 VL CDR1, 서열식별번호:9의 아미노산 서열을 포함하는 VL CDR2, 및 서열식별번호:10의 아미노산 서열을 포함하는 VL CDR3을 포함하고, 서열식별번호:3의 아미노산 서열을 포함하는 VH CDR1, 서열식별번호:4의 아미노산 서열을 포함하는 VH CDR2, 및 서열식별번호:5의 아미노산 서열을 포함하는 VH CDR3을 추가로 포함한다.

[0109]

일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 하기를 포함하는 VH를 포함할 수 있다: (i) 서열식별번호: 3의 아미노산 서열을 포함하는 VH CDR1; (ii) 서열식별번호: 4의 아미노산 서열을 포함하는 VH CDR2; 및 (iii) 서열식별번호: 5의 아미노산 서열을 포함하는 VH CDR3. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 하기를 포함하는 경쇄 가변 영역 (VL)을 포함할 수 있다: (i) 서열식별번호: 8의 아미노산 서열을 포함하는 VL CDR1; (ii) 서열식별번호: 9의 아미노산 서열을 포함하는 VL CDR2; 및 (iii) 서열식별번호: 10의 아미노산 서열을 포함하는 VL CDR3. 일부 실시양태에서, 항체 또는 그의 PNA-결합 단편은 서열식별번호: 3의 VH CDR1; 서열식별번호: 4의 VH CDR2; 및 서열식별번호: 5의 VH CDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역을 추가로 포함할 수 있고, 서열식별번호: 8의 VL CDR1; 서열식별번호: 9의 VL CDR2; 및 서열식별번호: 10의 VL CDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 추가로 포함할 수 있다.

- [0110] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 서열식별번호: 3을 포함하거나 또는 그로 이루어진 VH CDR1; 서열식별번호: 4를 포함하거나 또는 그로 이루어진 VH CDR2; 및 서열식별번호: 5를 포함하거나 또는 그로 이루어진 VH CDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함할 수 있다.
- [0111] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 서열식별번호: 8을 포함하거나 또는 그로 이루어진 VL CDR1; 서열식별번호: 9를 포함하거나 또는 그로 이루어진 VL CDR2; 및 서열식별번호: 10을 포함하거나 또는 그로 이루어진 VL CDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함할 수 있다.
- [0112] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 서열식별번호: 3을 포함하거나 또는 그로 이루어진 VH CDR1; 서열식별번호: 4를 포함하거나 또는 그로 이루어진 VH CDR2; 및 서열식별번호: 5를 포함하거나 또는 그로 이루어진 VH CDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역을 추가로 포함할 수 있고, 서열식별번호: 8을 포함하거나 또는 그로 이루어진 VL CDR1; 서열식별번호: 9를 포함하거나 또는 그로 이루어진 VL CDR2; 및 서열식별번호: 10을 포함하거나 또는 그로 이루어진 VL CDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 추가로 포함할 수 있다.
- [0113] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 서열식별번호:11에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 프레임워크 영역 1 (FR1), 서열식별번호:12에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 FR2, 서열식별번호:13에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 FR3, 및 서열식별번호:14에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 FR4를 포함하는 VH를 포함한다.
- [0114] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 서열식별번호:15에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 FR1, 서열식별번호:16에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 FR2, 서열식별번호:17에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 FR3, 및 서열식별번호:18에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 FR4를 포함하는 VL을 포함한다.
- [0115] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 서열식별번호: 3을 포함하거나 또는 그로 이루어진 VH CDR1; 서열식별번호: 4를 포함하거나 또는 그로 이루어진 VH CDR2; 및 서열식별번호: 5를 포함하거나 또는 그로 이루어진 VH CDR3을 포함하는 VH를 포함하며, 여기서 VH는 서열식별번호:2의 아미노산 서열과 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98%, 또는 100% 서열 동일성을 갖는다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 서열식별번호: 3을 포함하거나 또는 그로 이루어진 VH CDR1; 서열식별번호: 4를 포함하거나 또는 그로 이루어진 VH CDR2; 및 서열식별번호: 5를 포함하거나 또는 그로 이루어진 VH CDR3을 포함하는 VH를 포함하며, 여기서 VH는 서열식별번호:2의 아미노산 서열에 대해 1 내지 10개의 (예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개의) 아미노산 치환, 부가 또는 결실을 갖는다. 일부 예에서, 아미노산 치환은 보존적 아미노산 치환이다.
- [0116] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 서열식별번호: 8을 포함하거나 또는 그로 이루어진 VL CDR1; 서열식별번호: 9를 포함하거나 또는 그로 이루어진 VL CDR2; 및 서열식별번호: 10을 포함하거나 또는 그로 이루어진 VL CDR3을 포함하는 VL을 포함하며, 여기서 VL은 서열식별번호:7의 아미노산 서열과 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98%, 또는 100% 서열 동일성을 갖는다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 서열식별번호: 8을 포함하거나 또는 그로 이루어진 VL CDR1; 서열식별번호: 9를 포함하거나 또는 그로 이루어진 VL CDR2; 및 서열식별번호: 10을 포함하거나 또는 그로 이루어진 VL CDR3을 포함하는 VL을 포함하며, 여기서 VL은 서열식별번호:7의 아미노산 서열에 대해 1 내지 10개의 (예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개의) 아미노산 치환, 부가 또는 결실을 갖는다. 일부 예에서, 아미노산 치환은 보존적 아미노산 치환이다.
- [0117] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 하기를 포함한다: (a) 서열식별번호: 3을 포함하거나 또는 그로 이루어진 VH CDR1; 서열식별번호: 4를 포함하거나 또는 그로 이루어진 VH CDR2; 및 서열식별번호: 5를 포함하거나 또는 그로 이루어진 VH CDR3을 포함하는 VH, 여기서 VH는 서열식별번호:2의 아미노산 서열과 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98%, 또는 100% 서열 동일성을 가짐, 및 (b) 서열식별번호: 8을 포함하거나 또는 그로 이루어진 VL CDR1; 서열식별번호: 9를 포함하거나 또는 그로 이루어진 VL CDR2; 및 서열식별번호: 10을 포함하거나 또는 그로 이루어진 VL CDR3을 포함하는 VL, 여기서 VL은 서열식별번호:7의 아미노산 서열과 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98%, 또는 100% 서열 동일성을 가짐. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 하기를 포함한다: (a) 서열식별번호: 3을 포함하거나 또는 그로 이루어진 VH CDR1; 서열식별번호: 4를 포함하거나 또는 그로 이루어진 VH CDR2; 및 서열식별번호: 5를 포함하거나 또는 그로 이루어진 VH CDR3을 포함하는 VH, 여기서 VH는 서열식별번호:2의 아미노산 서열에 대해 1 내지 10개의 (예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개의)

아미노산 치환, 부가 또는 결실을 가짐; 및 (b) 서열식별번호: 8을 포함하거나 또는 그로 이루어진 VL CDR1; 서열식별번호: 9를 포함하거나 또는 그로 이루어진 VL CDR2; 및 서열식별번호: 10을 포함하거나 또는 그로 이루어진 VL CDR3을 포함하는 VL, 여기서 VL은 서열식별번호:7의 아미노산 서열에 대해 1 내지 10개의 (예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개의) 아미노산 치환, 부가 또는 결실을 가짐. 일부 실시양태에서, 치환은 보존적 치환이다. "보존적 아미노산 치환"은 아미노산 잔기가 유사한 전하를 갖는 측쇄를 가진 아미노산 잔기로 대체되는 것이다. 유사한 전하를 갖는 측쇄를 가진 아미노산 잔기의 패밀리는 관련 기술분야에 정의되어 있다. 이들 패밀리에겐 염기성 측쇄 (예를 들어, 리신, 아르기닌, 히스티딘), 산성 측쇄 (예를 들어, 아스파르트산, 글루탐산), 하전되지 않은 극성 측쇄 (예를 들어, 글리신, 아스파라긴, 글루타민, 세린, 트레오닌, 티로신, 시스테인), 비극성 측쇄 (예를 들어, 알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 프롤린, 페닐알라닌, 메티오닌, 트립토판), 베타-분지형 측쇄 (예를 들어, 트레오닌, 발린, 이소류신) 및 방향족 측쇄 (예를 들어, 티로신, 페닐알라닌, 트립토판, 히스티딘)를 가진 아미노산이 포함된다.

[0118] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항체의 변이체 (예를 들어, 각각 서열식별번호: 2 및 7에 제시된 아미노산 서열의 VH 및/또는 VL에 비해 아미노산 치환, 부가 또는 결실을 갖는 항체 또는 그의 항원-결합 단편)는 PNAd에 결합하는 능력을 보유하고/거나, 하기 실시예에서 기재된 항체 MHA112의 하나 이상의 특징을 보유한다.

[0119] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 서열식별번호: 2의 아미노산 서열을 포함하거나 또는 그로 이루어진 중쇄 가변 영역 (VH)을 포함한다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 서열식별번호: 7의 아미노산 서열을 포함하거나 또는 그로 이루어진 경쇄 가변 영역 (VL)을 포함한다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 서열식별번호: 2의 아미노산 서열을 포함하거나 또는 그로 이루어진 중쇄 가변 영역 (VH)을 포함하고, 서열식별번호: 7의 아미노산 서열을 포함하거나 또는 그로 이루어진 경쇄 가변 영역 (VL)을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 서열식별번호: 2의 VH 및 서열식별번호: 7의 VL을 포함한다.

[0120] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항체는 본원에 기재된 VH를 포함하는 중쇄를 포함한다. 일부 예에서, 중쇄는 IgM 불변 영역을 포함한다. 일부 예에서, 중쇄는 인간 IgM 불변 영역을 포함한다.

[0121] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항체는 본원에 기재된 VL을 포함하는 경쇄를 포함한다. 일부 예에서, 경쇄는 카파 불변 영역을 포함한다. 일부 예에서, 경쇄는 인간 카파 불변 영역을 포함한다. 일부 예에서, 경쇄는 람다 불변 영역을 포함한다. 일부 예에서, 경쇄는 인간 람다 불변 영역을 포함한다.

[0122] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 그의 항체는 본원에 기재된 VH를 포함하는 중쇄 및 본원에 기재된 VL을 포함하는 경쇄를 포함하고, 여기서 중쇄는 IgM (예를 들어, 인간 IgM) 불변 영역을 포함하고, 경쇄는 카파 (예를 들어, 인간 카파) 불변 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항체는 본원에 기재된 VH를 포함하는 중쇄 및 본원에 기재된 VL을 포함하는 경쇄를 포함하고, 여기서 중쇄는 IgM (예를 들어, 인간 IgM) 불변 영역을 포함하고, 경쇄는 람다 (예를 들어, 람다 카파) 불변 영역을 포함한다.

[0123] 대안적으로, 본원에 기재된 항체는 각각 서열식별번호:3-5에 제시된 VH CDR 1-3을 갖는 항체와 PNAd로의 결합에 대해 경쟁하는 항체 또는 그의 항원-결합 단편, 유도체 또는 변이체이다. 대안적으로, 본원에 기재된 항체는 서열식별번호: 8-10에 제시된 VL CDR 1-3을 갖는 항체와 PNAd로의 결합에 대해 경쟁하는 항체 또는 그의 항원-결합 단편, 유도체 또는 변이체이다. 대안적으로, 본원에 기재된 항체는 각각 서열식별번호: 3-5에 제시된 VH CDR 1-3 및 각각 서열식별번호: 8-10에 제시된 VL CDR 1-3을 갖는 항체와 PNAd로의 결합에 대해 경쟁하는 항체 또는 그의 항원-결합 단편, 유도체 또는 변이체이다. 대안적으로, 본원에 기재된 항체는 각각 서열식별번호: 2 및 7에 제시된 VH 및/또는 VL을 갖는 항체와 PNAd로의 결합에 대해 경쟁하는 항체 또는 그의 항원-결합 단편, 유도체 또는 변이체이다. 이들 항체는 특히 치료적 적용을 위해 인간, 설치류 (예를 들어, 쥐), 키메라 또는 인간화될 수 있다.

[0124] 대안적으로, 본원에 기재된 항체는 서열식별번호:2의 VH 및 서열식별번호:7의 VL을 포함하는 항-PNAd 항체와 동일한 에피토프에 결합하는 항체, 또는 그의 항원-결합 단편, 유도체 또는 변이체이다.

[0125] 항체들 사이의 경쟁은 시험하에서 면역글로불린이 공통 항원, 예컨대 PNAd에 대한 기준 항체의 특이적인 결합을 억제하는 검정에 의해 결정된다. 수많은 유형의 경쟁적 결합 검정이 공지되어 있다: 예를 들어, 고체상 직접 또는 간접 방사선 면역검정 (RIA), 고체상 직접 또는 간접 효소 면역검정 (EIA), 샌드위치 경쟁 검정; [Stahli et al., Methods in Enzymology 9 (1983), 242-253] 참고; 고체상 직접 비오틴-아비딘 EIA; [Kirkland et al., J. Immunol. 137 (1986), 3614-3619 및 Cheung et al., Virology 176 (1990), 546-552] 참고; 고체상 직접 효소

지된 검정, 고체상 직접 표지된 샌드위치 검정; [Harlow and Lane, Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press (1988)] 참고; I125 표지를 이용하는 고체상 직접 표지 RIA; [Morel et al, Molec. Immunol. 25 (1988), 7-15 및 Moldenhauer et al., Scand. J. Immunol. 32 (1990), 77-82] 참고. 전형적으로, 이러한 검정은 이들 비표지된 시험 면역글로불린 및 표지된 기준 면역글로불린, 즉, 본원에 기재된 인간 모노클로날 항체를 함유하는 고체 표면 또는 세포에 결합된 정제된 PNA_d 또는 그의 응집물의 사용을 수반한다. 경쟁적 억제 시험 면역글로불린의 존재하에 고체 표면 또는 세포에 결합된 표지의 양을 결정함으로써 측정된다. 일반적으로, 시험 면역글로불린은 과량으로 존재한다. 일부 실시양태에서, 경쟁적 결합 검정은 침부된 실시예에서 ELISA 검정에 대해 기재된 조건하에 수행된다. 경쟁 검정에 의해 확인된 항체 (경쟁 항체)에는 기준 항체와 동일한 에피토프에 결합하는 항체, 및 입체 장애가 발생하도록 기준 항체에 의해 결합된 에피토프에 충분히 근접하여 있는 인접한 에피토프에 결합하는 항체가 포함된다. 일반적으로, 경쟁 항체가 과량으로 존재하는 경우, 이는 공통 항원에 대한 기준 항체의 특이적인 결합을 적어도 50% 또는 75%만큼 억제할 것이다. 따라서, 본 발명은 추가로 서열식별번호:2의 VH 및 서열식별번호:7의 VL을 포함하는 기준 항체가 PNA_d에 결합하는 것을 경쟁적으로 억제하는 항체 또는 그의 항원-결합 단편, 변이체 또는 유도체에 관한 것이다.

[0126] 일부 실시양태에서, 면역글로불린 중쇄 가변 영역 (VH)을 포함하는 단리된 폴리펩티드가 본원에서 제공되며, 여기서 중쇄 가변 영역의 VH-CDR 중 적어도 1개 또는 중쇄 가변 영역의 VH-CDR 중 적어도 2개는 본원에 개시된 항체로부터의 기준 중쇄 VH-CDR1, VH-CDR2 또는 VH-CDR3 아미노산 서열과 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일하다 (예를 들어, VH CDR 서열에 대해 표 2 참고). 대안적으로, VH의 VH-CDR1, VH-CDR2 및 VH-CDR3 영역은 본원에 개시된 항체로부터의 기준 중쇄 VH-CDR1, VH-CDR2 및 VH-CDR3 아미노산 서열과 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일하다 (예를 들어, VH CDR 서열에 대해 표 2 참고). 따라서, 본원에 기재된 중쇄 가변 영역은 표 2의 서열과 관련된 VH-CDR1, VH-CDR2 및 VH-CDR3 폴리펩티드 서열 (즉, 서열식별번호:3-5)을 가질 수 있다. 표 2가 IMGT 시스템에 의해 정의된 VH-CDR을 나타내지만, 다른 CDR 정의, 예를 들어 카바트 또는 코티아 시스템에 의해 정의된 VH-CDR 또한 본 발명에 포함되며, 표 2-4에 나타난 서열을 이용하여 관련 기술분야의 통상의 기술자에 의해 용이하게 이해될 수 있다. 일부 실시양태에서, 기준 VH CDR1의 아미노산 서열은 서열식별번호:3이고; 기준 VH CDR2의 아미노산 서열은 서열식별번호: 4이고; 기준 VH CDR3의 아미노산 서열은 서열식별번호: 5이다.

[0127] 본원에 기재된 단리된 폴리펩티드는 VH-CDR1, VH-CDR2 및 VH-CDR3 영역이 표 2에 나타난 VH-CDR1, VH-CDR2 및 VH-CDR3 서열 (즉, 서열식별번호:3-5)과 동일한 폴리펩티드 서열을 갖는 것인 면역글로불린 중쇄 가변 영역 (VH)을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, VH CDR1의 아미노산 서열은 서열식별번호: 3이고; VH CDR2의 아미노산 서열은 서열식별번호: 4이고; VH CDR3의 아미노산 서열은 서열식별번호: 5이다.

[0128] 추가로, 단리된 폴리펩티드는 어느 하나의 VH-CDR에서 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개의 아미노산 치환을 제외하고는, VH-CDR1, VH-CDR2 및 VH-CDR3 영역이 표 2에 나타난 VH-CDR1, VH-CDR2 및 VH-CDR3 서열과 동일한 폴리펩티드 서열을 갖는 것인 면역글로불린 중쇄 가변 영역 (VH)을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 아미노산 치환은 보존적이다. 일부 실시양태에서, VH CDR1의 아미노산 서열은 서열식별번호: 3이고; VH CDR2의 아미노산 서열은 서열식별번호: 4이고; VH CDR3의 아미노산 서열은 서열식별번호: 5이다.

[0129] 단리된 폴리펩티드는 경쇄 가변 영역의 VL-CDR 중 적어도 1개 또는 경쇄 가변 영역의 VL-CDR 중 적어도 2개가 본원에 개시된 항체로부터의 기준 경쇄 VL-CDR1, VL-CDR2 또는 VL-CDR3 아미노산 서열과 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 것인 면역글로불린 경쇄 가변 영역 (VL)을 포함할 수 있다 (예를 들어, VL CDR 서열에 대해 표 2 참고). 대안적으로, VL의 VL-CDR1, VL-CDR2 및 VL-CDR3 영역은 본원에 개시된 항체로부터의 기준 경쇄 VL-CDR1, VL-CDR2 및 VL-CDR3 아미노산 서열과 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일할 수 있다 (예를 들어, VL CDR 서열에 대해 표 2 참고). 따라서, 경쇄 가변 영역은 표 2의 서열과 관련된 VL-CDR1, VL-CDR2 및 VL-CDR3 폴리펩티드 서열 (즉, 서열식별번호: 8-10)을 가질 수 있다. 표 2가 IMGT 시스템에 의해 정의된 VL-CDR을 나타내지만, 다른 CDR 정의, 예를 들어 카바트 또는 코티아 시스템에 의해 정의된 VL-CDR 또한 본 발명에 포함된다. 일부 실시양태에서, 기준 VL CDR1의 아미노산 서열은 서열식별번호:8이고; 기준 VL CDR2의 아미노산 서열은 서열식별번호:9이고; 기준 VL CDR3의 아미노산 서열은 서열식별번호:10이다.

[0130] VL-CDR1, VL-CDR2 및 VL-CDR3 영역이 표 2의 VL-CDR1, VL-CDR2 및 VL-CDR3 서열과 동일한 폴리펩티드 서열을 갖는 것인 면역글로불린 경쇄 가변 영역 (VL)을 포함하는 단리된 폴리펩티드 또한 본원에 제공된다. 일부 실시양태에서, VL CDR1의 아미노산 서열은 서열식별번호:8이고; VL CDR2의 아미노산 서열은 서열식별번호:9이고; VL

CDR3의 아미노산 서열은 서열식별번호:10이다.

- [0131] 단리된 폴리펩티드는 어느 하나의 VL-CDR에서 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개의 아미노산 치환을 제외하고는, VL-CDR1, VL-CDR2 및 VL-CDR3 영역이 표 2의 VL-CDR1, VL-CDR2 및 VL-CDR3 서열과 동일한 폴리펩티드 서열을 갖는 것인 면역글로불린 경쇄 가변 영역 (VL) 또한 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 아미노산 치환은 보존적이다. 일부 실시양태에서, VL CDR1의 아미노산 서열은 서열식별번호:8이고; VL CDR2의 아미노산 서열은 서열식별번호:9이고; VL CDR3의 아미노산 서열은 서열식별번호:10이다.
- [0132] 면역글로불린 또는 그의 코딩 cDNA는 변형될 수 있다. 따라서, 본원에 기재된 방법은 키메라 항체, 인간화 항체, 단일-쇄 항체, Fab-단편, 이중특이적인 항체, 융합 항체, 표지된 항체 또는 이들 중 어느 하나의 유사체를 생성하는 단계(들) 중 어느 하나를 포함할 수 있다. 상응하는 방법이 관련 기술분야의 기술자에게 공지되어 있으며, 예를 들어 [Harlow and Lane "Antibodies, A Laboratory Manual", CSH Press, Cold Spring Harbor (1988)]에 기재되어 있다. 상기 항체의 유도체가 파지 디스플레이 기술에 의해 획득될 때, BIAcore 시스템에서 사용되는 표면 플라즈몬 공명을 이용하여, 본원에 기재된 항체 중 어느 하나와 동일한 에피토프에 결합하는 파지 항체의 효율성을 증가시킬 수 있다 (Schier, Human Antibodies Hybridomas 7 (1996), 97-105; Malmborg, J. Immunol. Methods 183 (1995), 7-13). 키메라 항체의 생성은 예를 들어 국제 출원 WO89/09622에 기재되어 있다. 인간화 항체의 생성 방법은 예를 들어 유럽 출원 EP-A1 0 239 400 및 국제 출원 WO90/07861에 기재되어 있다. 본 발명에 따라 사용되는 항체의 추가의 공급원은 소위 이중 항체이다. 마우스에서 이중 항체, 예컨대 인간-유사 항체를 생성하기 위한 일반적인 원칙은 예를 들어 국제 출원 WO91/10741, WO94/02602, WO96/34096 및 WO 96/33735에 기재되어 있다. 상기에서 논의된 바와 같이, 본원에 기재된 항체는 완전 항체 외에도 다양한 형태; 예를 들어 Fv, Fab 및 F(ab)2, 뿐만 아니라 단일 쇠로 존재할 수 있으며; 예를 들어 국제 출원 WO88/09344를 참고한다. 이러한 방법에 의해 제조된 항체 또한 본원에 제공된다.
- [0133] 본원에 기재된 항체 또는 그들의 상응하는 면역글로불린 쇠(들)는 관련 기술분야에 공지된 통상적인 기술, 예를 들어 관련 기술분야에 공지된 아미노산 결실(들), 삽입(들), 치환(들), 부가(들) 및/또는 재조합(들) 및/또는 임의의 다른 변형(들)을 단독으로 또는 조합을 이용하여 추가로 변형될 수 있다. 면역글로불린 쇠의 아미노산 서열의 기초가 되는 DNA 서열에서 이러한 변형을 도입시키는 방법은 관련 기술분야의 기술자에게 널리 공지되어 있으며; 예를 들어 [Sambrook, Molecular Cloning A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1989) N.Y. and Ausubel, Current Protocols in Molecular Biology, Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y. (1994)]을 참고한다. 본원에 기재된 항체의 변형에는 하나 이상의 구성 아미노산에서의 화학적 및/또는 효소적 유도체화, 예컨대 측쇄 변형, 백본 변형, 및 N- 및 C-말단 변형, 예컨대 아세틸화, 히드록실화, 메틸화, 아미드화, 및 탄수화물 또는 지질 모이어티, 보조인자 등의 부착이 포함된다. 마찬가지로, 본 발명은 카복실 말단에서 이중성 분자, 예컨대 면역자극성 리간드에 융합된 아미노 말단에서 기재된 항체 또는 그의 일부 단편을 포함하는 키메라 단백질의 생성을 포함하며; 예를 들어 기술적 세부사항에 대해서는 국제 출원 WO00/30680을 참고한다.
- [0134] 추가로, 상기 기재된 결합 분자를 함유하는, 예를 들어 언급된 항체 중 어느 하나의 가변 영역의 CDR3 영역 (특히 중쇄의 CDR3, 이는 중쇄 CDR3 (HCDR3)이 더 큰 정도의 가변성 및 항원-항체 상호작용에서 우세한 참여를 갖는 영역인 것으로 빈번히 관찰되기 때문임)을 함유하는 것들을 포함하는 펩티드가 본원에 제공된다. 이러한 펩티드는 본원에 기재된 결합제를 생성하기 위한 재조합 수단에 의해 용이하게 합성되거나 또는 생성될 수 있다. 이러한 방법은 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 널리 공지되어 있다. 펩티드는 예를 들어 상업적으로 입수 가능한 자동화 펩티드 합성기를 사용하여 합성될 수 있다. 펩티드는 또한 펩티드를 발현하는 DNA를 발현 벡터에 도입시키고, 세포를 발현 벡터로 형질전환시켜 펩티드를 생성함으로써 재조합 기술에 의해 생성될 수 있다.
- [0135] 따라서, 본원에 기재된 인간 항-PNAd 항체와 결합하고 언급된 성질을 나타내는, 즉, PNAd를 특이적으로 인식하는 (그에 결합하는) 결합 분자, 예를 들어 항체 또는 그의 결합 단편이 본원에 기재된다. 이러한 항체 및 결합 분자는 본원에 기재된 ELISA 및 웨스턴 블롯 및 면역조직화학에 의해 그들의 결합 특이성 및 친화도에 대해 시험될 수 있으며, 예를 들어 실시예를 참고한다.
- [0136] 불멸화 B 세포 또는 B 기억 세포의 배양물로부터 직접적으로 면역글로불린을 획득하기 위한 대안으로서, 본원에 기재된 불멸화 세포는 후속적인 발현 및/또는 유전자 조작을 위한 재배열된 중쇄 및 경쇄 유전자좌의 공급원으로서 사용될 수 있다. 재배열된 항체 유전자는 적절한 mRNA로부터 역전사되어 cDNA를 생성할 수 있다. 원하는 경우, 중쇄 불변 영역은 상이한 이소타입의 것으로 교환될 수 있거나 또는 함께 제거될 수 있다. 가변 영역은 연결되어 단일 쇠 Fv 영역을 코딩할 수 있다. 다중 Fv 영역은 연결되어 1개 초과 표적에 대한 결합 능력을

부여할 수 있거나, 또는 키메라 중쇄 및 경쇄 조합물이 사용될 수 있다. 유전 물질이 이용가능한 경우, 원하는 표적과 결합하는 그들의 능력을 모두 보유하는 상기 기재된 유사체의 설계는 간단하다. 항체 가변 영역을 클로닝하고 재조합 항체를 생성하는 방법은 관련 기술분야의 기술자에게 공지되어 있으며, 예를 들어 [Gilliland et al., Tissue Antigens 47 (1996), 1-20; Doenecke et al., Leukemia 11 (1997), 1787-1792]에 기재되어 있다.

[0137] 적절한 유전 물질이 수득되고, 원하는 경우 유사체를 코딩하도록 변형된 후, 최소한 중쇄 및 경쇄의 가변 영역을 코딩하는 것들을 비롯하여 코딩 서열은 표준 재조합 숙주 세포에 형질감염될 수 있는 벡터에 함유된 발현 시스템에 삽입될 수 있다. 이러한 다양한 숙주 세포를 사용할 수 있지만, 효율적인 가공을 위해서는, 포유동물 세포가 고려될 수 있다. 이러한 목적에 유용한 전형적인 포유동물 세포주에는 CHO 세포, HEK 293 세포, 또는 NSO 세포가 포함되나 이로 제한되지 않는다.

[0138] 이어서, 항체 또는 유사체의 생성은 숙주 세포의 성장 및 코딩 서열의 발현에 적절한 배양 조건하에 변형된 재조합 숙주를 배양함으로써 수행된다. 이어서, 항체는 배양물로부터 이를 분리함으로써 회수된다. 생성된 항체가 배지로 분비되도록 신호 펩티드를 포함하는 발현 시스템이 설계되지만, 세포내 생성 또한 가능하다.

[0139] 상기에 따라, 본 발명은 또한 본원에 기재된 항체 또는 등가의 결합 분자를 코딩하는 폴리뉴클레오티드에 관한 것이다. 일부 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드는 적어도 상기 기재된 항체의 면역글로불린 쇄의 가변 영역을 코딩한다. 전형적으로, 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩된 상기 가변 영역은 상기 항체의 가변 영역의 VH 및/또는 VL의 적어도 1개의 상보성 결정 영역 (CDR)을 포함한다.

[0140] 관련 기술분야의 기술자는 상기 기재된 가변 도메인을 갖는 항체의 가변 도메인이 원하는 특이성 및 생물학적 기능을 갖는 다른 폴리펩티드 또는 항체의 구축을 위해 사용될 수 있음을 잘 이해할 것이다. 따라서, 상기 기재된 가변 도메인의 적어도 1개 이상의 CDR, 예를 들어 모든 CDR을 포함하고, 유리하게는 첨부된 실시예에 기재된 항체와 실질적으로 동일한 또는 유사한 결합 성질을 갖는 폴리펩티드 및 항체가 본원에 제공된다. 관련 기술분야의 기술자는 결합 친화도가 CDR 내에서 또는 초가변 루프 내에서 아미노산을 치환시킴으로써 개선될 수 있음을 알고 있으며 (Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196 (1987), 901-917), 이는 카바트에 의해 정의된 CDR과 부분적으로 중복되고; 예를 들어 [Riechmann, et al, Nature 332 (1988), 323-327]을 참고한다. 따라서, 언급된 CDR 중 1개 이상이 아미노산 치환을 1개 이상 또는 2개 이하로 포함하는 항체 또한 본원에 제공된다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항체는 그의 면역글로불린 쇄 중 하나 또는 둘 다에서 표 2에 제시된 가변 영역의 CDR 중 2개 또는 3개 모두를 포함한다.

[0141] 결합 분자, 예를 들어 본원에 기재된 항체, 또는 그의 항원-결합 단편, 변이체 또는 유도체는 관련 기술분야의 통상의 기술자에 의해 공지된 바와 같이 하나 이상의 이펙터 기능을 매개하는 불변 영역을 포함할 수 있다. 예를 들어, 항체 불변 영역에 대한 보체의 C1 성분의 결합은 보체계를 활성화시킬 수 있다. 보체의 활성화는 세포 병원체의 옵소닌화 및 용해에 중요하다. 보체의 활성화는 또한 염증 반응을 자극하고, 또한 자가면역 과민증에 관여할 수 있다. 추가로, 항체는 Fc 영역을 통해 다양한 세포 상의 수용체에 결합하고, 항체 Fc 영역 상의 Fc 수용체 결합 부위가 세포 상에 Fc 수용체 (FcR)에 결합한다. IgG (감마 수용체), IgE (엡실론 수용체), IgA (알파 수용체) 및 IgM (뮤 수용체)을 비롯한 상이한 부류의 항체에 대해 특이적인 수많은 Fc 수용체가 있다. 항체와 세포 표면 상의 Fc 수용체의 결합은 항체-코딩된 입자의 포식 및 파괴, 면역 복합체의 제거, 킬러 세포에 의한 항체-코딩된 표적 세포의 용해 (항체-의존성 세포-매개된 세포독성, 또는 ADCC로 지칭됨), 염증 매개인자의 방출, 태반 전달 및 면역글로불린 생성의 제어를 비롯한 수많은 중요하고 다양한 생물학적 반응을 촉발시킨다.

[0142] 따라서, 본원에 기재된 일부 실시양태는 적어도 불변 영역 도메인 중 하나 이상의 분획은 결실되었거나, 또는 원하는 생화학적 특징, 예컨대 대략 동일한 면역원성을 갖는 전체의 변경되지 않은 항체와 비교할 때 감소된 이펙터 기능, 비공유적으로 이합체화하는 능력, PNA 결합 부위에서 국소화하는 능력 증가, 감소된 혈청 반감기, 또는 증가된 혈청 반감기를 제공하도록 달리 변경된 항체 또는 그의 항원-결합 단편, 변이체 또는 유도체를 포함한다. 예를 들어, 본원에 기재된 진단 및 치료 방법에서 사용하기 위한 일부 항체는 면역글로불린 중쇄와 유사한 폴리펩티드 쇄를 포함하지만 1개 이상의 중쇄 도메인의 적어도 일부가 결여된 도메인 결실된 항체이다. 예를 들어, 특정한 항체에서, 변형된 항체의 불변 영역의 한 전체 도메인이 결실될 것이고, 예를 들어 모든 또는 일부의 CH2 도메인이 결실될 것이다. 다른 실시양태에서, 본원에 기재된 진단 및 치료 방법에서 사용하기 위한 특정한 항체는 글리코실화를 제거하도록 변경된 불변 영역, 예를 들어 IgM 중쇄 불변 영역을 가지며, 이는 본원에서 아글리코실화 또는 "agly" 항체로 지칭된다. 이러한 "agly" 항체는 효소적으로 뿐만 아니라 불변 영역에서 컨센서스 글리코실화 부위(들)을 조작함으로써 제조될 수 있다. 이론에 구애되지 않지만,

"agly" 항체가 개선된 생체내 안전성 및 안정성 프로파일을 가질 수 있는 것으로 믿어진다. 원하는 이펙터 기능을 갖는 아글리코실화 항체를 생성하는 방법은 예를 들어 국제 출원 W02005/018572에서 확인되며, 이는 그의 전문이 본원에 참고로 포함된다.

[0143] 본원에 기재된 특정한 항체, 또는 그의 항원-결합 단편, 변이체 또는 유도체에서, Fc 부분은 관련 기술분야에 공지된 기술을 이용하여 이펙터 기능을 감소시키도록 돌연변이될 수 있다. 예를 들어, 불변 영역 도메인의 결실 또는 불활성화 (점 돌연변이 또는 다른 수단을 통해)는 순환하는 변형된 항체의 Fc 수용체 결합을 감소시켜, PNAd 국소화를 증가시킬 수 있다. 다른 경우에, 본 발명과 일치하는 불변 영역 변형은 보체 결합을 조절하여, 접합된 세포독소의 혈청 반감기 및 비특이적인 회합을 감소시킬 수 있다. 불변 영역의 여전히 다른 변형을 이용하여, 증가된 항원 특이성 또는 항체 유연성으로 인해 개선된 국소화를 가능하게 하는 디설피드 연결 또는 올리고당류 모이어티를 변형시킬 수 있다. 변형으로 인한 생리학적 프로파일, 생체적합성 및 다른 생화학적 효과, 예컨대 PNAd 국소화, 생체분포 및 혈청 반감기는 과도한 실험없이도 널리 공지된 면역학적 기술을 이용하여 측정하고 정량화할 수 있다.

[0144] 본원에 기재된 일부 항체, 또는 그의 항원-결합 단편, 변이체 또는 유도체에서, Fc 부분을 돌연변이시키거나 또는 대안적인 단백질 서열로 교환하여, Fc γ 수용체, LRP 또는 Thy1 수용체를 통한 항체의 수용체-매개된 엔도시토시스를 개선시킴으로써 또는 '수퍼항체 기술' (이는 살아있는 세포를 손상시키지 않고 그 안으로 항체가 이동할 수 있게 하는 것임)에 의해 항체의 세포내 흡수를 증가시킬 수 있다 (Expert Opin. Biol. Ther. (2005), 237-241). 예를 들어, PNAd 뿐만 아니라 세포 표면 수용체에 결합하는 특이적인 서열을 갖는 세포 표면 수용체 또는 이중- 또는 다중-특이적인 항체의 항체-결합 영역 및 동족 단백질 리간드의 융합 단백질의 생성은 관련 기술분야에 공지된 기술을 이용하여 조작될 수 있다.

[0145] 본원에 기재된 일부 항체, 또는 그의 항원-결합 단편, 변이체 또는 유도체에서, Fc 부분을 돌연변이시키거나 또는 대안적인 단백질 서열로 교환할 수 있거나, 또는 항체를 화학적으로 변형시켜 그의 혈액 내 장벽 침투를 증가시킬 수 있다.

[0146] 본원에 기재된 항체, 또는 그의 항원-결합 단편, 변이체 또는 유도체의 변형된 형태는 관련 기술분야에 공지된 기술을 이용하여 전체 전구체 또는 모 항체로부터 제조될 수 있다. 예시적인 기술은 하기에서 보다 상세하게 논의된다. 본원에 기재된 항체, 또는 그의 항원-결합 단편, 변이체 또는 유도체는 관련 기술분야에 공지된 기술을 이용하여 제조되거나 또는 제작될 수 있다. 일부 실시양태에서, 항체 분자 또는 그의 단편은 "제조합적으로 생성되고", 즉, 제조합 DNA 기술을 이용하여 생성된다. 항체 분자 또는 그의 단편을 제조하기 위한 예시적인 기술은 본원의 다른 곳에서 더욱 상세하게 논의된다.

[0147] 본원에 기재된 항체, 또는 그의 항원-결합 단편, 변이체 또는 유도체에는 예를 들어 공유 부착에 의해 항체가 그의 동족 에피토프에 특이적으로 결합하는 것이 방지되지 않도록 임의의 유형의 분자와 항체의 공유 부착에 의해 변형된 유도체 또한 포함된다. 예를 들어 비제한적으로, 항체 유도체에는 예를 들어 글리코실화, 아세틸화, PEG화, 인산화, 아미드화, 공지된 보호기/차단기에 의한 유도체화, 단백질 가수분해성 절단, 세포 리간드 또는 다른 단백질과의 결합 등에 의해 변형된 항체가 포함된다. 임의의 수많은 화학적 변형이 특이적인 화학적 절단, 아세틸화, 포르밀화, 투니카마이신의 대사 합성 등을 비롯하여 이로 제한되지 않는 공지된 기술에 의해 수행될 수 있다. 추가로, 유도체는 1개 이상의 비고전적인 아미노산을 함유할 수 있다.

[0148] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항체, 또는 그의 항원-결합 단편, 변이체 또는 유도체는 처리될 동물에서, 예를 들어 인간에서 유해한 면역 반응을 유도하지 않을 것이다. 일부 실시양태에서, 결합 분자, 예를 들어 본원에 기재된 항체, 또는 그의 항원-결합 단편은 환자, 예를 들어 인간 환자로부터 유래되고, 후속적으로 그들이 유래된 동일한 종, 예를 들어 인간에서 사용되어, 유해한 면역 반응의 발생을 경감시키거나 또는 최소화시킨다.

[0149] 항체의 면역원성을 감소시키기 위해 탈면역화 또한 이용될 수 있다. 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "탈면역화"는 T 세포 에피토프를 변형시키기 위한 항체의 변형을 포함하며; 예를 들어 국제 출원 W098/52976 및 W000/34317을 참고한다. 예를 들어, 출발 항체로부터의 VH 및 VL 서열을 분석하고, 각각의 V 영역으로부터의 인간 T 세포 에피토프 "맵"은 서열 내의 상보성 결정 영역 (CDR) 및 다른 주요 잔기와 관련하여 에피토프의 위치를 나타낸다. T 세포 에피토프 맵으로부터 개별 T 세포 에피토프를 분석하여, 최종 항체의 활성을 변경시킬 위험이 낮은 대안적인 아미노산 치환을 확인한다. 아미노산 치환의 조합을 포함하는 광범위한 대안적인 VH 및 VL 서열을 설계하고, 이들 서열을 본원에 개시된 진단 및 치료 방법에서 사용하기 위해 후속적으로 광범위한 결합 폴리펩티드, 예를 들어 PNAd-특이적인 항체 또는 그의 면역특이적인 단편에 혼입시킨 다음, 기능에 대해 시험한다. 전형적으로, 12 내지 24개의 변이체 항체를 생성하고 시험한다. 이어서, 변형된 V 및 인간 C 영역을

포함하는 완전한 중쇄 및 경쇄 유전자를 발현 벡터에 클로닝하고, 후속적인 플라스미드를 전체 항체의 생성을 위해 세포주에 도입한다. 이어서, 항체를 적절한 생화학적 및 생물학적 검정에서 비교하고, 최적의 변이체를 확인한다.

[0150] 모노클로날 항체는 하이브리도마, 재조합, 및 파지 디스플레이 기술, 또는 이들의 조합의 사용을 비롯하여 관련 기술분야에 공지된 매우 다양한 기술을 이용하여 제조될 수 있다. 예를 들어, 모노클로날 항체는 관련 기술분야에 공지된 것들을 비롯한 하이브리도마 기술을 이용하여 생성될 수 있고, 이는 예를 들어 [Harlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. (1988); Hammerling et al., in: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* Elsevier, N.Y., 563-681 (1981)]에 교시되어 있으며, 상기 참고문헌은 그들의 전문이 본원에 참고로 포함된다. 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "모노클로날 항체"는 하이브리도마 기술을 통해 생성된 항체로 제한되지 않는다. 용어 "모노클로날 항체"는 그가 생성된 방법이 아니라 임의의 진핵생물, 원핵생물, 또는 파지 클론을 비롯한 단일 클론으로부터 유래된 항체를 지칭한다. 따라서, 용어 "모노클로날 항체"는 하이브리도마 기술을 통해 생성된 항체로 제한되지 않는다.

[0151] 널리 공지된 하이브리도마 절차에서 (Kohler et al., *Nature* 256 (1975), 495), 포유동물로부터의 비교적 수명이 짧은 또는 필멸의 림프구, 예를 들어 본원에 기재된 무린 대상체로부터 유래된 B 세포는 불멸의 종양 세포주 (예를 들어, 골수종 세포주)와 융합되고, 따라서 불멸이며 B 세포의 유전자 코딩된 항체를 생성할 수 있는 하이브리드 세포 또는 "하이브리도마"를 생성한다. 생성된 하이브리드는 선택, 희석 및 재성장애 의해 단일 유전자 균주로 분리되고, 각각의 개별 균주는 단일 항체의 형성을 위해 특이적인 유전자를 포함한다. 이들은 원하는 항원에 대해 동질성인 항체를 생성하고, 그들의 순수한 유전자 혈통과 관련하여 "모노클로날"로 지칭된다.

[0152] 이렇게 제조된 하이브리도마 세포를 시딩하고, 융합되지 않은 모 골수종 세포의 성장 또는 생존을 억제하는 하나 이상의 물질을 함유하는 적합한 배양 배지에서 성장시킨다. 관련 기술분야의 기술자는 하이브리도마의 형성, 선택 및 성장을 위한 시약, 세포주 및 배지가 수많은 공급원으로부터 상업적으로 입수가능하고, 표준 프로토콜이 널리 확립되어 있음을 잘 알 것이다. 일반적으로, 하이브리도마 세포가 성장하는 배양 배지는 원하는 항원에 대한 모노클로날 항체의 생성에 대해 검정된다. 하이브리도마 세포에 의해 생성된 모노클로날 항체의 결합 특이성은 본원에 기재된 시험관내 검정, 예컨대 면역침전, 방사선 면역검정 (RIA) 또는 효소-결합 면역흡착 검정 (ELISA)에 의해 결정된다. 원하는 특이성, 친화도 및/또는 활성을 갖는 항체를 생성하는 하이브리도마 세포를 확인한 후, 한계 희석 절차에 의해 클론을 서브클로닝하고, 표준 방법에 의해 성장시키며; 예를 들어 [Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academic Press, pp 59-103 (1986)]을 참고한다. 추가로, 서브클론에 의해 분비된 모노클로날 항체를 예를 들어 단백질-A, 히드록시아파타이트 크로마토그래피, 겔 전기영동, 투석 또는 친화도 크로마토그래피와 같은 통상적인 정제 절차에 의해 배양 배지, 복수 또는 혈청으로부터 분리할 수 있음을 이해할 것이다.

[0153] 일부 실시양태에서, 림프구를 미세 조작에 의해 선택하고, 가변 유전자를 분리할 수 있다. 예를 들어, 말초 혈액 단핵 세포를 면역화된 또는 자연 면역 포유동물, 예를 들어 인간으로부터 분리하고, 약 7 일 동안 시험관내에서 배양할 수 있다. 배양물을 스크리닝 기준을 충족하는 특이적인 면역글로불린에 대해 스크리닝할 수 있다. 양성 웰로부터의 세포를 분리할 수 있다. 개별 Ig-생성 B 세포를 FACS에 의해 또는 보체-매개된 용혈형 플라크 검정에서 이들을 확인함으로써 분리할 수 있다. Ig-생성 B 세포를 튜브로 미세조작할 수 있고, VH 및 VL 유전자를 예를 들어 RT-PCR을 이용하여 증폭시킬 수 있다. VH 및 VL 유전자를 항체 발현 벡터로 클로닝하고, 발현을 위해 세포 (예를 들어, 진핵생물 또는 원핵생물 세포)로 형질감염시킬 수 있다.

[0154] 대안적으로, 항체-생성 세포주를 관련 기술자에게 널리 공지된 기술을 이용하여 선택하고 배양할 수 있다. 이러한 기술은 다양한 실험실 매뉴얼 및 주요 간행물에 기재되어 있다. 이와 관련하여, 하기 기재된 방법 및 조성물에서 사용하기에 적합한 기술은 [Current Protocols in Immunology, Coligan et al., Eds., Green Publishing Associates and Wiley-Interscience, John Wiley and Sons, New York (1991)]에 기재되어 있으며, 보충자료를 비롯하여 그의 전문이 본원에 참고로 포함된다.

[0155] 특이적인 에피토프를 인식하는 항체 단편은 공지된 기술에 의해 생성될 수 있다. 예를 들어, Fab 및 F(ab')₂ 단편은 재조합적으로, 또는 효소, 예컨대 파파인 (Fab 단편을 생성하기 위해) 또는 펩신 (F(ab')₂ 단편을 생성하기 위해)을 사용하여 면역글로불린 분자의 단백질 가수분해성 절단에 의해 생성될 수 있다. F(ab')₂ 단편은 가변 영역, 경쇄 불변 영역 및 중쇄의 CH1 도메인을 함유한다. 이러한 단편은 예를 들어 면역글로불린의 면역 특이적인 부분을 검출 시약, 예컨대 방사성 동위원소에 커플링시키는 것을 수반하는 면역진단 절차에서 사용하기에 충분하다.

- [0156] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항체는 항체 분자의 적어도 1개의 중쇄 또는 경쇄 CDR을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 본원에 기재된 항체는 하나 이상의 항체 분자로부터의 적어도 2개의 CDR을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 본원에 기재된 항체는 하나 이상의 항체 분자로부터의 적어도 3개의 CDR을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 본원에 기재된 항체는 하나 이상의 항체 분자로부터의 적어도 4개의 CDR을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 본원에 기재된 항체는 하나 이상의 항체 분자로부터의 적어도 5개의 CDR을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 본원에 기재된 항체는 하나 이상의 항체 분자로부터의 적어도 6개의 CDR을 포함한다. 대상 항체에 포함될 수 있는 적어도 1개의 CDR을 포함하는 예시적인 항체 분자가 본원에 기재된다.
- [0157] 본원에 기재된 항체는 항체 합성을 위해 관련 기술분야에 공지된 임의의 방법에 의해, 특히 본원에 기재된 화학적 합성에 의해 또는 재조합 발현 기술에 의해 생성될 수 있다.
- [0158] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항체, 또는 그의 항원-결합 단편, 변이체 또는 유도체는 합성 불변 영역을 포함하며, 여기서 1개 이상의 도메인은 부분적으로 또는 완전히 결실된다 ("도메인-결실된 항체"). 일부 실시양태에서, 상용성인 변형된 항체는 도메인 결실된 구축물 또는 변이체를 포함할 것이고, 여기서 전체 CH2 도메인이 제거되었다. 다른 실시양태의 경우, 짧은 연결 펩티드가 결실된 도메인을 대체하여, 가변 영역에 대한 유연성 및 이동의 자유를 제공할 수 있다. 관련 기술분야의 기술자는 이러한 구축물이 항체의 이화작용 비율에 대한 CH2 도메인의 조절 성질로 인해 특히 바람직하다는 것을 알 것이다. 도메인 결실된 구축물은 IgG1 인간 불변 도메인을 코딩하는 벡터를 사용하여 유래될 수 있고, 예를 들어 국제 출원 WO02/060955 및 WO02/096948A2를 참고한다. 이 벡터는 CH2 도메인을 결실시키고, 도메인 결실된 IgG1 불변 영역을 발현하는 합성 벡터를 제공하도록 조작된다.
- [0159] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항체, 또는 그의 항원-결합 단편, 변이체 또는 유도체는 미니바디이다. 미니바디는 관련 기술분야에 기재된 방법을 이용하여 제조될 수 있으며, 예를 들어 미국 특허 5,837,821 또는 국제 출원 WO 94/09817을 참고한다.
- [0160] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항체, 또는 그의 항원-결합 단편, 변이체 또는 유도체는 단량체 서브유닛 사이의 회합을 허용하고 PNAd와의 결합을 보유하는 한 몇개의 또는 심지어 단일 아미노산의 결실 또는 치환을 갖는 면역글로불린 중쇄를 포함한다. 예를 들어, CH2 도메인의 선택된 영역에서 단일 아미노산의 돌연변이는 실질적으로 Fc 결합을 감소시켜 PNAd 국소화를 증가시키는데 충분할 수 있다. 유사하게, 조절될 이펙터 기능 (예를 들어 보체 결합)을 제어하는 1개 이상의 불변 영역 도메인의 해당 부분을 간단히 결실시키는 것이 바람직할 수 있다. 불변 영역의 이러한 부분 결실은 대상 불변 영역 도메인과 연관된 다른 바람직한 기능을 손상시키지 않고 항체의 선택된 특징 (혈청 반감기)을 개선시킬 수 있다. 더욱이, 상기 언급된 바와 같이, 개시된 항체의 불변 영역은 생성된 구축물의 프로파일을 개선시키는 1개 이상의 아미노산의 돌연변이 또는 치환을 통해 합성될 수 있다. 이와 관련하여, 변형된 항체의 형태 및 면역원성 프로파일을 실질적으로 유지하면서 보존된 결합 부위 (예를 들어, Fc 결합)에 의해 제공된 활성을 방해하는 것이 가능할 수 있다. 여전히 다른 실시양태는 바람직한 특징, 예컨대 이펙터 기능을 개선시키기 위해 또는 더 많은 세포독소 또는 탄수화물 부착을 제공하기 위해 불변 영역에 1개 이상의 아미노산의 부가를 포함한다. 이러한 실시양태에서, 선택된 불변 영역 도메인으로부터 유래된 특정한 서열을 삽입하거나 또는 복제하는 것이 바람직할 수 있다.
- [0161] 본 발명은 또한 본원에 기재된 항체 분자 (예를 들어, VH 영역 및/또는 VL 영역)의 변이체 (예컨대 유도체)를 포함하거나, 그로 본질적으로 이루어지거나 또는 그로 이루어지는 항체를 제공하며, 항체 또는 그의 단편은 PNAd에 면역특이적으로 결합한다. 관련 기술분야의 기술자에게 공지된 표준 기술을 이용하여, 아미노산 치환을 일으키는 부위-지정 돌연변이 유발 및 PCR-매개된 돌연변이 유발을 비롯하여 이로 제한되지 않는, 항체를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열에서의 돌연변이를 도입시킬 수 있다. 일부 실시양태에서, 변이체 (예컨대 유도체)는 기준 VH 영역, VH-CDR1, VH-CDR2, VH-CDR3, VL 영역, VL-CDR1, VL-CDR2, 또는 VL-CDR3에 대해 50개 미만의 아미노산 치환, 40개 미만의 아미노산 치환, 30개 미만의 아미노산 치환, 25개 미만의 아미노산 치환, 20개 미만의 아미노산 치환, 15개 미만의 아미노산 치환, 10개 미만의 아미노산 치환, 5개 미만의 아미노산 치환, 4개 미만의 아미노산 치환, 3개 미만의 아미노산 치환, 또는 2개 미만의 아미노산 치환을 코딩한다. 대안적으로, 돌연변이는 코딩 서열의 전체 또는 일부에 걸쳐 무작위로, 예컨대 포화 돌연변이 유발에 의해 도입될 수 있고, 생성된 돌연변이체는 활성 (예를 들어, PNAd와 결합하는 능력)을 보유하는 돌연변이체를 확인하기 위해 생물학적 활성에 대해 스크리닝될 수 있다.
- [0162] 예를 들어, 항체 분자의 프레임워크 영역에서만 및 CDR 영역에서만 돌연변이를 도입시키는 것이 가능하다. 도입된 돌연변이는 침묵 또는 중립 미스센스 돌연변이일 수 있고, 예를 들어 항체가 항원에 결합하는 능력에 전혀

또는 거의 영향을 미치지 않으며, 실제로 이러한 일부 돌연변이는 아미노산 서열을 전혀 변경시키지 않는다. 이들 유형의 돌연변이는 코돈 사용을 최적화하거나 또는 하이브리도마의 항체 생성을 개선시키는데 유용할 수 있다. 본원에 기재된 항체를 코딩하는 코돈-최적화된 코딩 영역은 본원의 다른 곳에 개시되어 있다. 대안적으로, 비중립 미스센스 돌연변이는 항체가 항원에 결합하는 능력을 변경시킬 수 있다. 대부분의 침묵 및 중립 미스센스 돌연변이의 위치는 프레임워크 영역에 있을 가능성이 높고, 대부분의 비중립 미스센스 돌연변이는 CDR에 있을 가능성이 높지만, 이것이 절대적인 요건은 아니다. 관련 기술분야의 기술자는 원하는 성질을 갖는, 예컨대 항원-결합 활성에서의 변경이 없는 또는 결합 활성에서의 변경이 있는 (예를 들어, 항원-결합 활성에서의 개선 또는 항체 특이성에서의 변화) 돌연변이체 분자를 설계하고 시험할 수 있다. 돌연변이 유발 후에, 코딩된 단백질은 일상적으로 발현될 수 있고, 코딩된 단백질의 기능성 및/또는 생물학적 활성 (예를 들어, PNAd의 적어도 1개의 에피토프에 면역특이적으로 결합하는 능력)은 본원에 기재된 기술을 이용하여 또는 관련 기술분야에 공지된 기술을 일상적으로 변형시킴으로써 결정될 수 있다.

[0163] PNAd-결합제, 예를 들어 비제한적으로 본원에 기재된 PNAd-결합 항체는 임의의 생체내 또는 시험관내 모델을 이용하여 특징분석될 수 있다. 관련 기술자는 본원에 기재된 PNAd 결합제 (예를 들어, 항체)가 본원에 기재된 마우스 모델에서 특징분석될 수 있음을 용이하게 이해한다.

[0164] III. 항체를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드

[0165] 본원에 기재된 항체, 또는 그의 항원-결합 단편, 변이체 또는 유도체를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드 또한 본원에 제공된다. 항체 또는 그의 항원-결합 단편, 변이체 또는 유도체를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드는 비변형된 RNA 또는 DNA 또는 변형된 RNA 또는 DNA일 수 있는 임의의 폴리리보뉴클레오타이드 또는 폴리데옥시리보뉴클레오타이드로 구성될 수 있다. 예를 들어, 항체 또는 그의 항원-결합 단편, 변이체 또는 유도체를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드는 단일- 및 이중 가닥 DNA, 단일- 및 이중 가닥 영역의 혼합물인 DNA, 단일- 및 이중 가닥 RNA, 및 단일- 및 이중 가닥 영역의 혼합물인 RNA, 단일 가닥일 수 있거나 또는 더욱 전형적으로 이중 가닥 또는 단일- 및 이중 가닥 영역의 혼합물일 수 있는 DNA 및 RNA를 포함하는 하이브리드 분자로 구성될 수 있다. 또한, 항체 또는 그의 항원-결합 단편, 변이체 또는 유도체를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드는 RNA 또는 DNA, 또는 RNA 및 DNA 둘 다를 포함하는 삼중 가닥 영역으로 구성될 수 있다. 항체 또는 그의 항원-결합 단편, 변이체 또는 유도체를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드는 1개 이상의 변형된 염기, 또는 안정성 또는 다른 이유로 변형된 DNA 또는 RNA 백본을 또한 함유할 수 있다. "변형된" 염기에는 예를 들어 트리틸화 염기 및 특이한 염기, 예컨대 이노신이 포함된다. DNA 및 RNA에 대해 다양한 변형이 이루어질 수 있으며; 따라서, "폴리뉴클레오타이드"는 화학적으로, 효소적으로 또는 대사적으로 변형된 형태를 포함한다.

[0166] 면역글로불린 (예를 들어, 면역글로불린 중쇄 부분 또는 경쇄 부분)으로부터 유래된 폴리펩티드의 비천연 변이체를 코딩하는 단리된 폴리뉴클레오타이드는 1개 이상의 아미노산 치환, 부가 또는 결실이 코딩된 단백질에 도입되도록 면역글로불린의 뉴클레오타이드 서열에 1개 이상의 뉴클레오타이드 치환, 부가 또는 결실을 도입시킴으로써 생성될 수 있다. 돌연변이는 표준 기술, 예컨대 부위-지정 돌연변이 유발 및 PCR-매개된 돌연변이 유발에 의해 도입될 수 있다. 일부 실시양태에서, 보존적 아미노산 치환은 1개 이상의 비필수 아미노산 잔기에서 이루어진다.

[0167] 널리 공지된 바와 같이, RNA는 표준 기술, 예컨대 구아니디늄 이소티오시아네이트 추출 및 침전에 이어 원심분리 또는 크로마토그래피에 의해 원래의 B 세포, 하이브리도마 세포 또는 다른 형질전환된 세포로부터 단리될 수 있다. 바람직한 경우, mRNA는 표준 기술, 예컨대 올리고 dT 셀룰로스 상에서의 크로마토그래피에 의해 총 RNA로부터 단리될 수 있다. 적합한 기술은 관련 기술분야에서 익숙하다. 일부 실시양태에서, 항체의 경쇄 및 중쇄를 코딩하는 cDNA는 널리 공지된 방법에 따라 역전사효소 및 DNA 폴리머라제를 이용하여 동시에 또는 별도로 제조될 수 있다. PCR은 공개된 중쇄 및 경쇄 DNA 및 아미노산 서열을 기반으로 하여 컨센서스 불변 영역 프라이머에 의해 또는 더욱 특이적인 프라이머에 의해 개시될 수 있다. 상기 논의된 바와 같이, PCR은 또한 항체 경쇄 및 중쇄를 코딩하는 DNA 클론을 단리하기 위해 사용될 수 있다. 이러한 경우, 라이브러리는 컨센서스 프라이머 또는 더 큰 상동성 프로브, 예컨대 인간 불변 영역 프로브에 의해 스크리닝될 수 있다.

[0168] DNA, 전형적으로 플라스미드 DNA는 관련 기술분야에 공지된 기술을 이용하여 세포로부터 단리될 수 있고, 예를 들어 재조합 DNA 기술과 관련하여 상기 참고문헌에서 상세하게 제시된 널리 공지된 표준 기술에 따라 제한 맵핑되고 시퀀싱될 수 있다. 물론, DNA는 단리 과정 또는 후속적인 분석 동안에 임의의 시점에서 본 발명에 따라 합성될 수 있다.

[0169] 일부 실시양태에서, 면역글로불린 중쇄 가변 영역 (VH)을 코딩하는 핵산을 포함하거나, 그로 본질적으로 이루어

지거나 또는 그로 이루어지는 단리된 폴리뉴클레오티드가 본원에 제공되며, 여기서 중쇄 가변 영역의 CDR 중 적어도 1개 또는 중쇄 가변 영역의 VH-CDR 중 적어도 2개는 본원에 개시된 항체로부터의 기준 중쇄 VH-CDR1, VH-CDR2 또는 VH-CDR3 아미노산 서열과 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일하다. 대안적으로, VH의 VH-CDR1, VH-CDR2 또는 VH-CDR3 영역은 본원에 개시된 항체로부터의 기준 중쇄 VH-CDR1, VH-CDR2 및 VH-CDR3 아미노산 서열과 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일하다. 따라서, 이 실시양태에 따라 본원에 기재된 항체 또는 그의 항원-결합 단편의 중쇄 가변 영역은 도 5에 나타난 폴리펩티드 서열과 관련된 VH-CDR1, VH-CDR2 또는 VH-CDR3 폴리펩티드 서열을 갖는다. 일부 실시양태에서, 기준 VH CDR1의 아미노산 서열은 서열식별번호: 3이고; 기준 VH CDR2의 아미노산 서열은 서열식별번호: 4이고; 기준 VH CDR3의 아미노산 서열은 서열식별번호: 5이다.

[0170] 일부 실시양태에서, 면역글로불린 중쇄 가변 영역 (VH)을 코딩하는 핵산을 포함하거나, 그로 본질적으로 이루어지거나 또는 그로 이루어지는 단리된 폴리뉴클레오티드가 본원에 제공되며, 여기서 어느 하나의 VH-CDR에서 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개의 아미노산 치환을 제외하고는, VH-CDR1, VH-CDR2 및 VH-CDR3 영역은 도 5에 나타난 VH-CDR1, VH-CDR2 및 VH-CDR3 그룹과 동일한 폴리펩티드 서열을 갖는다. 일부 실시양태에서, 아미노산 치환은 보존적이다. 일부 실시양태에서, VH CDR1의 아미노산 서열은 서열식별번호: 3이고; VH CDR2의 아미노산 서열은 서열식별번호: 4이고; VH CDR3의 아미노산 서열은 서열식별번호: 5이다.

[0171] 또 다른 실시양태에서, 면역글로불린 경쇄 가변 영역 (VL)을 코딩하는 핵산을 포함하거나, 그로 본질적으로 이루어지거나 또는 그로 이루어지는 단리된 폴리뉴클레오티드가 본원에 제공되며, 여기서 경쇄 가변 영역의 VL-CDR 중 적어도 1개 또는 경쇄 가변 영역의 VL-CDR 중 적어도 2개는 본원에 개시된 항체로부터의 기준 경쇄 VL-CDR1, VL-CDR2 또는 VL-CDR3 아미노산 서열과 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일하다. 대안적으로, VL의 VL-CDR1, VL-CDR2 또는 VL-CDR3 영역은 본원에 개시된 항체로부터의 기준 경쇄 VL-CDR1, VL-CDR2 및 VL-CDR3 아미노산 서열과 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일하다. 따라서, 이 실시양태에 따라 본원에 기재된 항체 또는 그의 항원-결합 단편의 경쇄 가변 영역은 도 5에 나타난 폴리펩티드 서열과 관련된 VL-CDR1, VL-CDR2 또는 VL-CDR3 폴리펩티드 서열을 갖는다. 일부 실시양태에서, 기준 VL CDR1의 아미노산 서열은 서열식별번호: 8이고; 기준 VL CDR2의 아미노산 서열은 서열식별번호: 9이고; 기준 VL CDR3의 아미노산 서열은 서열식별번호: 10이다.

[0172] 또 다른 실시양태에서, 면역글로불린 경쇄 가변 영역 (VL)을 코딩하는 핵산을 포함하거나, 그로 본질적으로 이루어지거나 또는 그로 이루어지는 단리된 폴리뉴클레오티드가 본원에 제공되며, 여기서 어느 하나의 VL-CDR에서 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개의 아미노산 치환을 제외하고는, VL-CDR1, VL-CDR2 및 VL-CDR3 영역은 도 5에 나타난 VL-CDR1, VL-CDR2 및 VL-CDR3 그룹과 동일한 폴리펩티드 서열을 갖는다. 일부 실시양태에서 아미노산 치환은 보존적이다. 일부 실시양태에서, VL CDR1의 아미노산 서열은 서열식별번호: 8이고; VL CDR2의 아미노산 서열은 서열식별번호: 9이고; VL CDR3의 아미노산 서열은 서열식별번호: 10이다.

[0173] 또 다른 실시양태에서, 면역글로불린 중쇄 가변 영역 (VH)을 코딩하는 핵산을 포함하거나, 그로 본질적으로 이루어지거나 또는 그로 이루어지는 단리된 폴리뉴클레오티드가 본원에 제공되며, 여기서 VH-CDR1, VH-CDR2 및 VH-CDR3 영역은 도 5에 나타난 VH-CDR1, VH-CDR2 및 VH-CDR3 그룹과 동일한 폴리펩티드 서열을 갖는다. 일부 실시양태에서, VH CDR1의 아미노산 서열은 서열식별번호: 3을 포함하고; VH CDR2의 아미노산 서열은 서열식별번호: 4를 포함하고; VH CDR3의 아미노산 서열은 서열식별번호: 5를 포함한다. 일부 실시양태에서, VH CDR1의 아미노산 서열은 서열식별번호: 3으로 이루어지고; VH CDR2의 아미노산 서열은 서열식별번호: 4로 이루어지고, VH CDR3의 아미노산 서열은 서열식별번호: 5로 이루어진다.

[0174] 또 다른 실시양태에서, 면역글로불린 경쇄 가변 영역 (VL)을 코딩하는 핵산을 포함하거나, 그로 본질적으로 이루어지거나 또는 그로 이루어지는 단리된 폴리뉴클레오티드가 본원에 제공되며, 여기서 VL-CDR1, VL-CDR2 및 VL-CDR3 영역은 도 5에 나타난 VL-CDR1, VL-CDR2 및 VL-CDR3 그룹과 동일한 폴리펩티드 서열을 갖는다. 일부 실시양태에서, VL CDR1의 아미노산 서열은 서열식별번호: 8이고; VL CDR2의 아미노산 서열은 서열식별번호: 9이고; VL CDR3의 아미노산 서열은 서열식별번호: 10이다. 일부 실시양태에서, VL CDR1의 아미노산 서열은 서열식별번호: 8로 이루어지고; VL CDR2의 아미노산 서열은 서열식별번호: 9로 이루어지고, VL CDR3의 아미노산 서열은 서열식별번호: 10으로 이루어진다.

[0175] 관련 기술분야에 공지된 바와 같이, 두 폴리펩티드 또는 두 폴리뉴클레오티드 사이의 "서열 동일성"은 한 폴리펩티드 또는 폴리뉴클레오티드의 아미노산 또는 핵산 서열을 제2 폴리펩티드 또는 폴리뉴클레오티드의 서열과 비교함으로써 결정된다. 본원에서 논의될 때, 임의의 특정한 폴리펩티드가 또 다른 폴리펩티드와 적어도 약

40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% 또는 95% 동일한지 여부는 관련 기술분야에 공지된 방법 및 컴퓨터 프로그램/소프트웨어, 예컨대 비제한적으로 BESTFIT 프로그램 (위스콘신(Wisconsin) 서열 분석 패키지, 유닉스(Unix)에 대한 버전 8, 제네틱스 컴퓨터 그룹(Genetics Computer Group), 53711 위스콘신주 매디슨 사이언스 드라이브 575 유니버시티 리서치 파크)을 이용하여 결정될 수 있다. BESTFIT는 [Smith and Waterman, Advances in Applied Mathematics 2 (1981), 482-489]의 로컬 상동성 알고리즘을 사용하여, 두 서열 사이에 상동성을 갖는 최상의 절편을 찾는다. 특정한 서열이 예를 들어 본원에 기재된 기준 서열 (예를 들어, 본원에 기재된 항체 또는 그의 항원-결합 단편)과 95% 동일한지 여부를 결정하기 위해 BESTFIT 또는 임의의 다른 서열 정렬 프로그램을 사용할 때, 물론 동일성의 백분율이 기준 폴리펩티드 서열의 전장에 걸쳐 계산되고, 기준 서열에서 아미노산의 총 개수의 최대 5%의 상동성 갭이 허용되도록 파라미터가 설정된다.

[0176] 일부 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드는 표 4에 나타난 항-PNAd 항체의 VH 또는 VL 영역의 폴리뉴클레오티드 서열을 갖는 핵산을 포함하거나, 그로 본질적으로 이루어지거나 또는 그로 이루어진다. 이와 관련하여, 관련 기술분야의 기술자는 적어도 경쇄 및/또는 중쇄의 가변 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 번역글로불린쇄 둘 다 또는 하나만의 가변 도메인을 코딩할 수 있음을 잘 이해할 것이다. 추가로, 서열식별번호: 2 (예를 들어, 서열식별번호:1의 뉴클레오티드 서열) 및/또는 서열식별번호: 7 (예를 들어, 서열식별번호: 6의 뉴클레오티드 서열)의 아미노산 서열을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하거나 또는 그로 이루어진 폴리뉴클레오티드가 본원에 제공된다. 구체적인 실시양태에서, 서열식별번호: 2의 아미노산 서열을 코딩하는 뉴클레오티드 서열 (예를 들어, 서열식별번호:1의 뉴클레오티드 서열)을 포함하거나 또는 그로 이루어진 폴리뉴클레오티드가 본원에 제공된다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 서열식별번호: 7의 아미노산 서열을 코딩하는 뉴클레오티드 서열 (예를 들어, 서열식별번호:6의 뉴클레오티드 서열)을 포함하거나 또는 그로 이루어진 폴리뉴클레오티드가 본원에 제공된다.

[0177] 일부 실시양태에서, 기준 중쇄 VH와 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 또는 95% 동일한 번역글로불린 중쇄 가변 영역을 코딩하는 핵산을 포함하거나, 그로 본질적으로 이루어지거나 또는 그로 이루어진 단리된 폴리뉴클레오티드가 본원에 제공된다. 일부 실시양태에서, 기준 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열은 서열식별번호: 2이다.

[0178] 일부 실시양태에서, 기준 경쇄 VL과 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 또는 95% 동일한 번역글로불린 경쇄 가변 영역을 코딩하는 핵산을 포함하거나, 그로 본질적으로 이루어지거나 또는 그로 이루어진 단리된 폴리뉴클레오티드가 본원에 제공된다. 일부 실시양태에서, 기준 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열은 서열식별번호: 7이다.

[0179] 다른 곳에 기재된 바와 같이 본원에 기재된 폴리뉴클레오티드의 단편 또한 본원에 제공된다. 추가로, 본원에 기재된 융합 폴리뉴클레오티드, Fab 단편, 및 다른 유도체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 또한 고려된다.

[0180] 폴리뉴클레오티드는 관련 기술분야에 공지된 임의의 방법에 의해 생성되거나 또는 제작될 수 있다. 예를 들어, 항체의 뉴클레오티드 서열이 공지되어 있는 경우, 항체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 예를 들어 [Kutmeier et al., BioTechniques 17 (1994), 242]에 기재된 바와 같이 화학적으로 합성된 올리고뉴클레오티드로부터 조립될 수 있으며, 이는 간략히 항체를 코딩하는 서열의 부분을 함유하는 올리고뉴클레오티드를 중첩시키고, 어닐링하고, 이들 올리고뉴클레오티드를 라이게이션한 다음, 라이게이션된 올리고뉴클레오티드를 PCR에 의해 증폭시킴으로써 합성하는 것을 수반한다.

[0181] 대안적으로, 항체 또는 그의 항원-결합 단편, 변이체 또는 유도체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 적합한 공급원으로부터의 핵산으로부터 생성될 수 있다. 특정한 항체를 코딩하는 핵산을 함유하는 클론을 이용할 수는 없지만, 항체 분자의 서열이 공지되어 있는 경우, 항체를 코딩하는 핵산은 서열의 3' 및 5' 말단에 혼성화할 수 있는 합성 프라이머를 사용하여 PCR 증폭에 의해, 또는 예를 들어 항체를 코딩하는 cDNA 라이브러리로부터 cDNA 클론을 확인하기 위해 특정한 유전자 서열에 대해 특이적인 올리고뉴클레오티드 프로브를 사용하여 클로닝함으로써, 적합한 공급원 (예를 들어, 항체 cDNA 라이브러리, 또는 PNAd-특이적인 항체를 발현하는 임의의 조직 또는 세포, 예컨대 항체를 발현하기 위해 선택된 하이브리도마 세포로부터 생성된 cDNA 라이브러리, 또는 상기 세포로부터 단리된 핵산, 바람직하게는 폴리A+ RNA)으로부터 화학적으로 합성될 수 있거나 또는 수득될 수 있다. 이어서, PCR에 의해 생성된 증폭된 핵산을 관련 기술분야에 널리 공지된 임의의 방법을 이용하여 복제가능한 클로닝 벡터에 클로닝시킬 수 있다.

[0182] 항체, 또는 그의 항원-결합 단편, 변이체 또는 유도체의 뉴클레오티드 서열 및 상응하는 아미노산 서열이 결정되면, 뉴클레오티드 서열의 조작을 위해 관련 기술분야에 널리 공지된 방법, 예를 들어 재조합 DNA 기술, 부위

지정 돌연변이 유발, PCR 등을 이용하여 그의 뉴클레오티드 서열을 조작하여, 상이한 아미노산 서열을 갖는 항체를 생성할 수 있고, 예를 들어 아미노산 치환, 결실 및/또는 삽입을 생성할 수 있다 (예를 들어, [Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2d Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. (1990) 및 Ausubel et al., eds., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY (1998)]에 기재된 기술을 참고하며, 둘 다 그들의 전문이 본원에 참고로 포함됨).

[0183] IV. 항체 폴리펩티드의 발현

[0184] 본원에 기재된 항체, 또는 그의 항원-결합 단편, 변이체 또는 유도체를 제공하기 위해 단리된 유전 물질을 조작한 후, 항체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 전형적으로 원하는 양의 항체를 생성하기 위해 사용될 수 있는 숙주 세포로의 도입을 위한 발현 벡터에 삽입된다. 표적 분자에 결합하는 항체, 또는 그의 단편, 유도체 또는 유사체, 예를 들어 항체의 중쇄 또는 경쇄의 재조합 발현이 본원에 기재된다. 본원에 기재된 항체 분자, 또는 항체의 중쇄 또는 경쇄, 또는 그의 일부분 (바람직하게는 중쇄 또는 경쇄 가변 도메인을 함유함)을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 수득한 후, 관련 기술분야에 널리 공지된 기술을 이용하여 재조합 DNA 기술에 의해 항체 분자의 생성을 위한 벡터를 생성할 수 있다. 따라서, 뉴클레오티드 서열을 코딩하는 항체를 함유하는 폴리뉴클레오티드를 발현시킴으로써 단백질을 제조하는 방법이 본원에 기재된다. 관련 기술분야의 기술자에게 널리 공지된 방법을 이용하여, 항체 코딩 서열 및 적절한 전사 및 번역 제어 신호를 함유하는 발현 벡터를 구축할 수 있다. 이들 방법에는 예를 들어 시험관내 재조합 DNA 기술, 합성 기술, 및 생체내 유전자 재조합이 포함된다. 따라서, 본원에 기재된 항체 분자, 또는 그의 항원-결합 단편, 또는 그의 중쇄 또는 경쇄, 또는 중쇄 또는 경쇄 가변 도메인을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는, 프로모터에 작동가능하게 연결된 복제가능한 벡터가 본원에 기재된다. 이러한 벡터는 항체 분자의 불변 영역을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있고 (예를 들어, 국제 출원 WO 86/05807 및 WO 89/01036; 및 미국 특허 번호 5,122,464 참고), 항체의 가변 도메인을 전체 중쇄 또는 경쇄의 발현을 위해 이러한 벡터에 클로닝할 수 있다.

[0185] 용어 "벡터" 또는 "발현 벡터"는 숙주 세포에 도입되어 원하는 유전자를 발현하는 비히클로서 본원에 기재된 방법에 따라 사용되는 벡터를 의미하기 위해 본원에서 사용된다. 관련 기술분야의 기술자에게 공지된 바와 같이, 이러한 벡터는 플라스미드, 파지, 바이러스 및 레트로바이러스로 이루어진 군으로부터 용이하게 선택될 수 있다. 일반적으로, 본원에 기재된 벡터는 선택 마커, 원하는 유전자의 클로닝을 용이하게 하기 위한 적절한 제한 부위, 및 진핵생물 또는 원핵생물 세포에 진입하고/거나 복제하는 능력을 포함할 것이다. 수많은 발현 벡터 시스템이 사용될 수 있다. 예를 들어, 벡터의 한 부류는 동물 바이러스, 예컨대 소 유두종 바이러스, 폴리오마 바이러스, 아데노바이러스, 우두 바이러스, 바콜로바이러스, 레트로바이러스 (RSV, MMTV 또는 MOMLV) 또는 SV40 바이러스로부터 유래된 DNA 요소를 사용한다. 다른 것들은 내부 리보솜 결합 부위를 갖는 폴리시스트론 시스템의 사용을 수반한다. 추가로, DNA를 염색체에 통합시킨 세포는 형질감염된 숙주 세포의 선택을 가능하게 하는 하나 이상의 마커를 도입시킴으로써 선택될 수 있다. 마커는 영양요구성 숙주에 대한 원형양체, 살생물제 내성 (예를 들어, 항생제) 또는 중금속, 예컨대 구리에 대한 내성을 제공할 수 있다. 선택가능한 마커 유전자는 발현될 DNA 서열에 직접적으로 연결되거나, 또는 공동 형질전환에 의해 동일한 세포에 도입될 수 있다. mRNA의 최적의 합성을 위해 추가의 요소 또한 필요할 수 있다. 이들 요소에는 신호 서열, 스플라이스 신호, 뿐만 아니라 전사 프로모터, 인핸서, 및 종결 신호가 포함된다.

[0186] 특정한 실시양태에서, 클로닝된 가변 영역 유전자는 상기 논의된 바와 같이 중쇄 및 경쇄 불변 영역 유전자 (예를 들어, 인간 중쇄 및 경쇄 불변 영역 유전자)와 함께 발현 벡터에 삽입된다. 진핵생물 세포에서 발현을 유도할 수 있는 임의의 발현 벡터가 사용될 수 있다. 적합한 벡터의 예에는 플라스미드 pcDNA3, pHCMV/Zeo, pCR3.1, pEF1/His, pIND/GS, pRc/HCMV2, pSV40/Zeo2, pTRACER-HCMV, pUB6/V5-His, pVAX1, 및 pZeoSV2 (인비트로젠(Invitrogen, 캘리포니아주 샌디에고)로부터 입수가가능함), 및 플라스미드 pCI (프로메가(Promega, 위스콘신주 매디슨)로부터 입수가가능함)가 포함되나 이로 제한되지 않는다. 일반적으로, 면역글로불린 중쇄 및 경쇄인 경우 적합하게 높은 수준으로 발현하는 것들에 대해 수많은 형질전환된 세포를 스크리닝하는 것은 예를 들어 로봇 시스템에 의해 수행될 수 있는 일상적인 실험이다. 벡터 시스템은 미국 특허 번호 5,736,137 및 5,658,570에 교시되어 있으며, 이들 각각은 전문이 본원에 참고로 포함된다. 이 시스템은 높은 발현 수준, 예를 들어 > 30 pg/세포/일을 제공한다. 다른 예시적인 벡터 시스템은 예를 들어 미국 특허 번호 6,413,777에 개시되어 있다.

[0187] 다른 실시양태에서, 본원에 기재된 항체, 또는 그의 항원-결합 단편, 변이체 또는 유도체는 폴리시스트론 구축물, 예컨대 미국 특허 번호 2003-0157641 A1 (전문이 본원에 포함됨)에 개시된 것들을 이용하여 발현될 수 있다. 이들 발현 시스템에서, 관심 다중 유전자 생성물, 예컨대 항체의 중쇄 및 경쇄는 단일 폴리시스트

론 구축물로부터 생성될 수 있다. 이들 시스템은 유리하게는 비교적 높은 수준의 항체를 제공하기 위해 내부 리보솜 진입 부위 (IRES)를 사용한다. 상용성 IRES 서열은 미국 특허 번호 6,193,980에 개시되어 있으며, 이 또한 본원에 포함된다. 관련 기술분야의 기술자는 이러한 발현 시스템을 이용하여 본 출원에 개시된 전체 범위의 항체를 효과적으로 생성할 수 있음을 이해할 것이다.

[0188] 더욱 일반적으로, 항체의 단량체 서브유닛을 코딩하는 벡터 또는 DNA 서열을 제조한 후, 발현 벡터를 적절한 숙주 세포에 도입시킬 수 있다. 숙주 세포에 플라스미드의 도입은 관련 기술분야의 기술자에게 널리 공지된 다양한 기술에 의해 달성될 수 있다. 이들에는 예를 들어 퓨진(Fugene)® 또는 리포펙타민을 사용하는 트랜스펙션, 예컨대 리포트랜스펙션, 원형질체 융합, 인산칼슘 침전, 외피 DNA에 의한 세포 융합, 미량주사, 및 온전한 바이러스에 의한 감염이 포함되나 이로 제한되지 않는다. 전형적으로, 숙주로의 플라스미드 도입은 표준 인산칼슘 공침 방법을 통한 것이다. 발현 구축물을 보유하는 숙주 세포를 경쇄 및 중쇄의 생성에 적절한 조건하에 성장시키고, 중쇄 및/또는 경쇄 단백질을 합성에 대해 검정한다. 예시적인 검정 기술에는 효소-결합 면역흡착 검정 (ELISA), 방사선 면역검정 (RIA), 또는 형광-활성화된 세포 분류기 분석 (FACS), 면역조직화학 등이 포함된다.

[0189] 발현 벡터는 통상적인 기술에 의해 숙주 세포에 전달된 다음, 형질감염된 세포를 통상적인 기술에 의해 배양하여, 본원에 기재된 방법에서 사용하기 위한 항체를 생성한다. 따라서, 이중성 프로모터에 작동가능하게 연결된, 본원에 기재된 항체 또는 그의 항원 결합 단편, 또는 그의 중쇄 또는 경쇄를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 함유하는 숙주 세포 또한 본원에 제공된다. 특정한 실시양태에서, 이중-쇄 항체의 발현을 위해, 중쇄 및 경쇄 둘 다를 코딩하는 벡터를 하기에 상세하기 기재되는 바와 같이 전체 면역글로불린 분자의 발현을 위해 숙주 세포에서 공동 발현시킬 수 있다.

[0190] 숙주 세포는 본원에 기재된 2가지 발현 벡터, 중쇄 유래된 폴리펩티드를 코딩하는 제1 벡터 및 경쇄 유래된 폴리펩티드를 코딩하는 제2 벡터에 공동 형질감염될 수 있다. 두 벡터는 중쇄 및 경쇄 폴리펩티드의 동등한 발현을 가능하게 하는 동일한 선택가능한 마커를 함유할 수 있다. 대안적으로, 중쇄 및 경쇄 폴리펩티드 둘 다를 코딩하는 단일 벡터를 사용할 수 있다. 이러한 상황에서, 과량의 독성 유리 중쇄를 피하기 위해 유리하게는 경쇄가 중쇄 앞에 배치되며; [Proudfoot, Nature 322 (1986), 52; Kohler, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77 (1980), 2197]을 참고한다. 중쇄 및 경쇄에 대한 코딩 서열을 cDNA 또는 게놈 DNA를 포함할 수 있다.

[0191] 본원에서 사용된 바와 같이, "숙주 세포"는 재조합 DNA 기술을 이용하여 구축되고 적어도 하나의 이중성 유전자를 코딩하는 벡터를 보유하는 세포를 지칭한다. 재조합 숙주로부터 항체를 분리하는 과정에 대한 설명에서, 용어 "세포" 및 "세포 배양물"은 달리 명확하게 명시되지 않는다면 항체의 공급원을 지칭하기 위해 상호교환적으로 사용된다. 달리 말하면, "세포"로부터 폴리펩티드의 회수는 회전된 전세포로부터, 또는 배지 및 현탁된 세포 둘 다를 함유하는 세포 배양물로부터를 의미할 수 있다.

[0192] 다양한 숙주-발현 벡터 시스템을 이용하여, 본원에 기재된 방법에서 사용하기 위한 항체 분자를 발현시킬 수 있다. 이러한 숙주-발현 시스템은 관심 코딩 서열이 생성되고 후속적으로 정제될 수 있는 비히클을 나타내지만, 적절한 뉴클레오타이드 코딩 서열에 의해 형질전환 또는 형질감염될 때 동일계 내에서 본원에 기재된 항체 분자를 발현할 수 있는 세포를 나타낸다. 이들에는 항체 코딩 서열을 함유하는 재조합 박테리오파지 DNA, 플라스미드 DNA 또는 코스미드 DNA 발현 벡터에 의해 형질전환된 미생물, 예컨대 박테리아 (예를 들어, 이. 콜라이(E. coli), 비. 서브틸리스(B. subtilis)); 항체 코딩 서열을 함유하는 재조합 효모 발현 벡터에 의해 형질전환된 효모 (예를 들어, 사카로마이세스(Saccharomyces), 피치아(Pichia)); 항체 코딩 서열을 함유하는 재조합 바이러스 발현 벡터 (예를 들어, 바콜로바이러스)에 의해 감염된 곤충 세포 시스템; 항체 코딩 서열을 함유하는 재조합 바이러스 발현 벡터 (예를 들어, 콜리플라워 모자이크 바이러스, CaMV; 담배 모자이크 바이러스, TMV) 또는 재조합 플라스미드 발현 벡터 (예를 들어, Ti 플라스미드)에 의해 감염된 식물 세포 시스템; 또는 포유동물 세포의 게놈으로부터 유래된 프로모터 (예를 들어, 메탈로티오네인 프로모터) 또는 포유동물 바이러스로부터 유래된 프로모터 (예를 들어, 아데노바이러스 후기 프로모터; 우두 바이러스 7.5K 프로모터)를 함유하는 재조합 발현 구축물을 보유하는 포유동물 세포 시스템 (예를 들어, COS, CHO, NSO, BLK, 293, 3T3 세포)이 포함되나 이로 제한되지 않는다. 일부 실시양태에서, 특히 전체 재조합 항체 분자의 발현을 위한 박테리아 세포, 예컨대 에스케리키아 콜라이, 더욱 바람직하게는 진핵생물 세포가 재조합 항체 분자의 발현을 위해 사용된다. 예를 들어, 인간 시토크로마틴 바이러스로부터의 주요 중간 초기 유전자 프로모터 요소와 같은 벡터와 함께 포유동물 세포, 예컨대 중국 햄스터 난소 (CHO) 세포는 항체를 위한 효과적인 발현 시스템이며; 예를 들어 [Foecking et al., Gene 45 (1986), 101; Cockett et al., Bio/Technology 8 (1990), 2]를 참고한다.

[0193] 단백질 발현을 위해 사용되는 숙주 세포주는 종종 포유동물 기원이며; 관련 기술분야의 기술자는 원하는 유전자

생성물이 그 안에서 발현되기에 가장 적합한 특정한 숙주 세포주를 결정하는 능력이 있다. 예시적인 숙주 세포주에는 CHO (중국 햄스터 난소), DG44 및 DUXB11 (중국 햄스터 난소 라인, DHFR 마이너스), HELA (인간 자궁경부 암종), CVI (원숭이 신장 라인), COS (SV40 T 항원을 갖는 CVI의 유도체), VERY, BHK (베이비 햄스터 신장), MDCK, WI38, R1610 (중국 햄스터 섬유모세포) BALBC/3T3 (마우스 섬유모세포), HAK (햄스터 신장 라인), SP2/0 (마우스 골수종), P3x63-Ag3.653 (마우스 골수종), BFA-1c1BPT (소 내피 세포), RAJI (인간 림프구) 및 293 (인간 신장)이 포함되나 이로 제한되지 않는다. 구체적인 실시양태에서, 숙주 세포주는 CHO 또는 293 세포이다. 숙주 세포주는 전형적으로 상업적인 서비스, 어메리칸 티슈 컬처 콜렉션(American Tissue Culture Collection)으로부터 또는 공개된 문헌으로부터 입수가 가능하다.

[0194] 또한, 삽입된 서열의 발현을 조절하거나, 또는 특정한 원하는 방식으로 유전자 생성물을 변형하고 가공하는 숙주 세포 군주가 선택될 수 있다. 단백질 생성물의 이러한 변형 (예를 들어, 글리코실화) 및 가공 (예를 들어, 절단)은 단백질의 기능에 중요할 수 있다. 상이한 숙주 세포는 단백질 및 유전자 생성물의 번역후 가공 및 변형을 위한 특징적이고 특이적인 메카니즘을 갖는다. 적절한 세포주 또는 숙주 시스템은 발현된 외래 단백질의 정확한 변형 및 가공을 보장하기 위해 선택될 수 있다. 이를 위해, 일차 전사체의 적절한 가공, 글리코실화, 및 유전자 생성물의 인산화를 위한 세포 기구를 갖는 진핵생물 숙주 세포가 사용될 수 있다.

[0195] 재조합 단백질의 장기간 고수율 생성을 위해, 안정한 발현이 바람직하다. 예를 들어, 항체 분자를 안정하게 발현하는 세포주가 조작될 수 있다. 바이러스 복제 기점을 함유하는 발현 벡터를 사용하기 보다는, 숙주 세포를 적절한 발현 조절 요소 (예를 들어, 프로모터, 인핸서, 서열, 전사 종결자, 폴리아데닐화 부위 등), 및 선택가능한 마커에 의해 제어되는 DNA에 의해 형질전환시킬 수 있다. 외래 DNA의 도입 후에, 조작된 세포를 농축 배지에서 1-2 일 동안 배양시킬 수 있고, 이어서 선택성 배지로 전환시킨다. 재조합 플라스미드에서 선택가능한 마커는 선택에 대한 내성을 부여하고, 세포가 플라스미드를 그들의 염색체에 안정하게 통합시키고 성장하여 초점을 형성할 수 있게 하고, 이를 클로닝하고 세포주로 확장시킬 수 있다. 이 방법은 항체 분자를 안정하게 발현하는 세포주를 조작하기 위해 유리하게 사용될 수 있다.

[0196] 수많은 선택 시스템을 이용할 수 있으며, 예컨대 비제한적으로 단순 포진 바이러스 티미딘 키나제 (Wigler et al., Cell 11 (1977), 223), 히포크산틴-구아닌 포스포리보실트랜스퍼라제 (Szybalska & Szybalski, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48 (1992), 202), 및 아데닌 포스포리보실트랜스퍼라제 (Lowy et al., Cell 22 (1980), 817) 유전자는 각각 tk-, hgprrt- 또는 aprrt-세포에서 사용될 수 있다. 또한, 항대사물 내성은 하기 유전자에 대한 선택 기준으로서 이용될 수 있다: 메토타렉세이트에 대한 내성을 부여하는 dhfr (Wigler et al., Natl. Acad. Sci. USA 77 (1980), 357; O'Hare et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78 (1981), 1527); 미코페놀산에 대한 내성을 부여하는 gpt (Mulligan & Berg, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78 (1981), 2072); 아미노글리코시드 G-418에 대한 내성을 부여하는 neo (Goldspiel et al., Clinical Pharmacy 12 (1993), 488-505; Wu and Wu, Biotherapy 3 (1991), 87-95; Tolstoshev, Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32 (1993), 573-596; Mulligan, Science 260 (1993), 926-932; 및 Morgan and Anderson, Ann. Rev. Biochem. 62 (1993), 191-217; TIB TECH 11 (1993), 155-215); 및 히그로마이신에 대한 내성을 부여하는 hygrr (Santerre et al., Gene 30 (1984), 147). 이용될 수 있는 재조합 DNA 기술의 관련 기술분야에 일반적으로 공지된 방법은 [Ausubel et al. (eds.), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY (1993); Kriegler, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY (1990); 및 Chapters 12 and 13, Dracopoli et al. (eds), Current Protocols in Human Genetics, John Wiley & Sons, NY (1994); Colberre-Garapin et al., J. Mol. Biol. 150:1 (1981)]에 기재되어 있으며, 그들의 전문이 본원에 참고로 포함된다.

[0197] 항체 분자의 발현 수준은 벡터 증폭에 의해 증가될 수 있으며, 검토를 위해서는 [Bebington and Hentschel, The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning, Academic Press, New York, Vol. 3. (1987)]을 참고한다. 항체를 발현하는 벡터 시스템에서 마커가 증폭가능할 때, 숙주 세포의 배양물에 존재하는 억제제의 수준 증가는 마커 유전자의 카피 개수를 증가시킬 것이다. 증폭된 영역이 항체 유전자와 연관이 있기 때문에, 항체의 생성 또한 증가할 것이며; [Crouse et al., Mol. Cell. Biol. 3 (1983), 257]을 참고한다.

[0198] 시험관내 생성은 다량의 원하는 폴리펩티드를 제공하도록 규모 확대를 가능하게 한다. 조직 배양 조건하에 포유동물 세포를 배양하는 기술은 관련 기술분야에 공지되어 있으며, 예를 들어 에어리프트 반응기에서 또는 연속 교반 반응기에서 균질한 현탁액 배양, 또는 예를 들어 중공 섬유, 미세캡슐에서, 아가로스 마이크로비드 또는 세라믹 카트리지 상에서 고정된 또는 포획된 세포 배양이 포함된다. 필요한 및/또는 원하는 경우, 예를 들어 합성 힌지 영역 폴리펩티드의 우선적인 생합성 후에, 또는 본원에 기재된 HIC 크로마토그래피 단계 이전에 또는

이후에, 폴리펩티드의 용액을 통상적인 크로마토그래피 방법, 예를 들어 겔 여과, 이온-여과 크로마토그래피, DEAE-셀룰로스 상에서의 크로마토그래피 또는 (면역-)친화도 크로마토그래피에 의해 정제할 수 있다.

[0199] 본원에 기재된 항체, 또는 그의 항원-결합 단편, 변이체 또는 유도체를 코딩하는 유전자 또한 비-포유동물 세포, 예컨대 박테리아 또는 곤충 또는 효모 또는 식물 세포에서 발현될 수 있다. 핵산을 용이하게 흡수하는 박테리아에는 엔테로박테리아세아에(enterobacteriaceae)의 구성원, 예컨대 에스케리키아 콜라이 또는 살모넬라(Salmonella)의 균주; 바실라세아에(Bacillaceae), 예컨대 바실루스 서브틸리스(Bacillus subtilis); 뉴모코쿠스(Pneumococcus); 스트렙토코쿠스(Streptococcus), 및 헤모필루스 인플루엔자에(Haemophilus influenzae)가 포함된다. 추가로, 박테리아에서 발현될 때, 이중성 폴리펩티드는 전형적으로 봉입체의 일부가 되지 시작한다는 것을 이해할 것이다. 이중성 폴리펩티드는 단리되고, 정제된 다음, 기능성 분자로 조립되어야 한다. 4가 형태의 항체가 바람직한 경우, 서브유닛이 4가 항체로 자가 조립될 것이며; 예를 들어 국제 출원 W002/096948을 참고한다.

[0200] 박테리아 시스템에서, 발현될 항체 분자에 대해 의도된 용도에 따라 수많은 발현 벡터가 유리하게 선택될 수 있다. 예를 들어, 항체 분자의 제약 조성물의 생성을 위해 다량의 이러한 단백질이 생성되어야 하는 경우, 용이하게 정제되는 높은 수준의 융합 단백질 생성물의 발현을 지시하는 벡터가 바람직할 수 있다. 이러한 벡터에는 이. 콜라이 발현 벡터 pUR278 (Ruther et al., EMBO J. 2 (1983), 1791), (여기서, 항체 코딩 서열은 융합 단백질이 생성되도록 lacZ 코딩 영역과 프레임 내에서 벡터에 개별적으로 라이게이션될 수 있음); pIN 벡터 (Inouye & Inouye, Nucleic Acids Res. 13 (1985), 3101-3109; Van Heeke & Schuster, J. Biol. Chem. 24 (1989), 5503-5509) 등이 포함되나 이로 제한되지 않는다. 글루타티온 S-트랜스퍼라제 (GST)를 갖는 융합 단백질로서 외래 폴리펩티드를 발현시키기 위해 pGEX 벡터 또한 사용될 수 있다. 일반적으로, 이러한 융합 단백질은 가용성이고, 글루타티온-아گار로스 비즈의 매트릭스에 흡착 및 결합에 의해 용해된 세포로부터 용이하게 정제된 후, 유리 글루타티온의 존재하에 용해될 수 있다. pGEX 벡터는 클로닝된 표적 유전자 생성물이 GST 모이어티로부터 방출될 수 있도록 트롬빈 또는 인자 Xa 프로테아제 절단 부위를 포함하도록 설계된다.

[0201] 원핵생물 외에도, 진핵생물 미생물 또한 사용될 수 있다. 수많은 다른 균주, 예를 들어 피치아 파스토리스가 상업적으로 입수가 가능하지만, 사카로마이세스 세레비시아에 또는 일반적인 제빵 효모는 진핵생물 미생물 중에서 가장 흔하게 사용된다. 사카로마이세스에서의 발현을 위해, 예를 들어 플라스미드 YRp7 (Stinchcomb et al., Nature 282 (1979), 39; Kingsman et al., Gene 7 (1979), 141; Tschemper et al., Gene 10 (1980), 157)이 일반적으로 사용된다. 이 플라스미드는 트립토판에서 성장하는 능력이 결여된 효모의 돌연변이 균주, 예를 들어 ATCC 번호 44076 또는 PEP4-1에 대한 선택 마커를 제공하는 TRP1 유전자를 이미 함유한다 (Jones, Genetics 85 (1977), 12). 이어서, 효모 숙주 세포 계능의 특징으로서 trp1 병변의 존재는 트립토판의 부재하에 성장에 의한 형질전환을 검출하기에 효과적인 환경을 제공한다.

[0202] 곤충 시스템에서, 아우토그라파 칼리포니카(Autographa californica) 핵 다면체 바이러스 (AcNPV)는 전형적으로 외래 유전자를 발현하기 위해 벡터로서 사용된다. 바이러스는 스포도프테라 프루기페르다(Spodoptera frugiperda) 세포에서 성장한다. 항체 코딩 서열은 바이러스의 비필수 영역 (예를 들어 폴리헤드린 유전자)에 개별적으로 클로닝될 수 있고, AcNPV 프로모터 (예를 들어 폴리헤드린 프로모터)의 제어하에 배치될 수 있다.

[0203] 본원에 기재된 항체를 재조합적으로 발현한 후, 본원에 기재된 전체 항체, 그들의 이합체, 개별 경쇄 및 중쇄, 또는 다른 면역글로불린 형태를 관련 기술분야의 표준 절차에 따라, 예를 들어 크로마토그래피 (예를 들어, 이온 교환, 친화도, 특히 단백질 A 이후 특이적인 항원에 대한 친화도, 및 사이징 컬럼 크로마토그래피), 원심분리, 용해도 차이, 예를 들어 황산암모늄 침전에 의해, 또는 단백질 정제를 위한 임의의 다른 표준 기술에 의해 정제할 수 있으며; 예를 들어 [Scopes, "Protein Purification", Springer Verlag, N.Y. (1982)]를 참고한다. 대안적으로, 본원에 기재된 항체의 친화도를 증가시키기 위한 또 다른 방법이 미국 특허 공보 2002-0123057 A1에 개시된다.

[0204] V. 융합 단백질 및 접합체

[0205] 일부 실시양태에서, 항체 폴리펩티드는 항체와 일반적으로 회합되지 않는 아미노산 서열 또는 1개 이상의 모이어티를 포함한다. 예시적인 변형이 하기에 더욱 상세하게 기재된다. 예를 들어, 본원에 기재된 단일-쇄 fv 항체 단편은 가요성 링커 서열을 포함할 수 있거나, 또는 기능성 모이어티 (예를 들어, PEG, 약물, 독소, 또는 표지, 예컨대 형광, 방사성, 효소, 핵 자성, 중금속 등)를 포함하도록 변형될 수 있다.

[0206] 본원에 기재된 항체 폴리펩티드는 융합 단백질을 포함하거나, 그로 본질적으로 이루어지거나 또는 그로 이루어

질 수 있다. 융합 단백질은 예를 들어 적어도 1개의 표적 결합 부위, 및 적어도 1개의 이중성 부분, 즉, 천연에서는 자연적으로 연결되지 않는 부분을 갖는 면역글로불린 PNAd-결합 도메인을 포함하는 키메라 분자이다. 아미노산 서열은 일반적으로 융합 폴리펩티드로 함께 합쳐지는 별도의 단백질로 존재할 수 있거나, 또는 이들은 일반적으로 동일한 단백질로 존재할 수 있지만 융합 폴리펩티드에서 새로운 정렬로 배치된다. 융합 단백질은 예를 들어 화학적 합성에 의해, 또는 펩티드 영역이 원하는 관계로 코딩되는 폴리뉴클레오티드를 생성하고 번역함으로써 생성될 수 있다.

[0207] 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드에 적용되는 용어 "이중성"은 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드가 비교되는 나머지 개체의 것과 별개의 개체로부터 유래된 것을 의미한다. 예를 들어, 본원에서 사용된 바와 같이, 항체 또는 그의 항원-결합 단편, 변이체 또는 유사체에 융합된 "이중성 폴리펩티드"는 동일한 종의 비-면역글로불린 폴리펩티드, 또는 상이한 종의 면역글로불린 또는 비-면역글로불린 폴리펩티드로부터 유래된다.

[0208] 본원의 다른 곳에서 더욱 상세하게 논의되는 바와 같이, 본원에 기재된 항체, 또는 그의 항원-결합 단편, 변이체 또는 유도체는 추가로 N- 또는 C-말단에서 이중성 폴리펩티드에 재조합적으로 융합될 수 있거나 또는 폴리펩티드 또는 다른 조성물에 화학적으로 접합될 수 있다 (공유 및 비공유 접합 포함). 예를 들어, 항체는 검출 검정에서 표지로서 유용한 분자, 및 이펙터 분자, 예컨대 이중성 폴리펩티드, 약물, 방사성 핵종 또는 독소에 재조합적으로 융합되거나 또는 접합될 수 있으며; 예를 들어 국제 출원 W092/08495; W091/14438; W089/12624; 미국 특허 번호 5,314,995; 및 유럽 특허 출원 EP 0 396 387을 참고한다.

[0209] 일부 예에서, 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 약물에 접합된다. 이러한 약물 접합체를 생성하는 방법은 관련 기술분야에 공지되어 있고 본원에 기재되어 있다 (예를 들어, 하기 실시예 7-9 참고). 일부 예에서, 약물은 면역억제 약물이다 (예를 들어 면역억제 약물의 예에 대해서는 예를 들어 하기 섹션 "면역억제 또는 면역조절 약물" 참고). 일부 예에서, 약물은 탁솔이다. 일부 예에서, 약물은 항체 또는 그의 항원-결합 단편에 직접적으로 접합된다. 일부 예에서, 약물은 링커를 통해 항체 또는 그의 항원-결합 단편에 접합된다. 약물을 본원에 기재된 항체 또는 그의 항원-결합 단편에 접합시키기 위해 사용될 수 있는 링커의 예에는 숙신이미드 4-(N-말레이미도메틸)시클로헥산-1-카르복실레이트 (SMCC) 또는 말레이미도카프로일-발린-시트룰린-p-아미노벤조일옥시카르보닐 (mc-vc-PAB)이 포함된다. 일부 예에서, 약물은 항체 또는 그의 항원-결합 단편에 공유 접합된다. 약물과 항체 또는 그의 항원-결합 단편의 공유 접합은 하기 실시예 섹션에 기재된 바와 같이 수행될 수 있다. 예를 들어, 약물은 카르복실산기를 생성하기 위해 예를 들어 글루타르알데히드를 이용하여 화학적으로 변형될 수 있으며, 이어서 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필)카르보디이미드 히드로클로라이드 (EDC)/N-히드록시술포숙신이미드 (NHS) 화학을 이용하여 활성화되고; 생성된 약물은 우선적으로 항체 또는 그의 항원-결합 단편 상의 1급 아민 (예를 들어, 예컨대 리신 상의 것들)과 반응한다 (즉, 그에 접합한다).

[0210] 본원에 기재된 항체, 또는 그의 항원-결합 단편, 변이체 또는 유도체는 펩티드 결합 또는 변형된 펩티드 결합, 즉, 펩티드 동배체에 의해 서로 연결된 아미노산으로 구성될 수 있고, 20가지 유전자-코딩된 아미노산 이외의 아미노산을 함유할 수 있다. 항체는 천연 과정, 예컨대 번역후 가공에 의해, 또는 관련 기술분야에 널리 공지된 화학적 변형 기술에 의해 변형될 수 있다. 이러한 변형은 기본 교재 및 더욱 상세한 논문, 뿐만 아니라 방대한 연구 문헌에 널리 기재되어 있다. 변형은 펩티드 백본, 아미노산 측쇄 및 아미노 또는 카르복실 말단을 비롯한 항체의 어디에서나, 또는 모이어티, 예컨대 탄수화물 상에서 발생할 수 있다. 동일한 유형의 변형이 주어진 항체의 몇몇 부위에서 동일한 또는 다양한 정도로 존재할 수 있음을 이해할 것이다. 또한, 주어진 항체는 여러 유형의 변형을 함유할 수 있다. 항체는 예를 들어 유비퀴틴화의 결과로서 분지형일 수 있고, 이들은 분지가 있거나 없이 환형일 수 있다. 환형, 분지형, 및 분지형 환형 항체는 번역후 천연 과정으로부터 생성될 수 있거나 또는 합성 방법에 의해 제조될 수 있다. 변형에는 아세틸화, 아실화, ADP-리보실화, 아마이드화, 플라빈의 공유 부착, 헴 모이어티의 공유 부착, 뉴클레오티드 또는 뉴클레오티드 유도체의 공유 부착, 지질 또는 지질 유도체의 공유 부착, 포스파티딜이노시톨의 공유 부착, 가교, 환형화, 디설피드 결합형성, 탈메틸화, 공유 가교의 형성, 시스템인의 형성, 피로글루타메이트의 형성, 포르밀화, 감마-카르복실화, 글리코실화, GPI 앵커 형성, 히드록실화, 아이오딘화, 메틸화, 미리스토일화, 산화, PEG화, 단백질 가수분해성 가공, 인산화, 프레닐화, 라세미화, 셀레노일화, 황산화, 단백질로 아미노산의 전달-RNA 매개된 부가, 예컨대 아르기닐화, 및 유비퀴틴화가 포함되며; 예를 들어 [Proteins - Structure And Molecular Properties, T. E. Creighton, W. H. Freeman and Company, New York 2nd Ed., (1993); Posttranslational Covalent Modification Of Proteins, B. C. Johnson, Ed., Academic Press, New York, pgs. 1-12 (1983); Seifter et al., Meth. Enzymol. 182 (1990), 626-646; Rattan et al., Ann. NY Acad. Sci. 663 (1992), 48-62]을 참고한다.

[0211] 항체 또는 그의 항원-결합 단편, 변이체 또는 유도체, 및 이중성 폴리펩티드를 포함하는 융합 단백질 또한 본원

에 제공된다. 일부 실시양태에서, 융합 단백질은 본원에 기재된 항체의 VH 영역 중 임의의 하나 이상의 아미노산 서열 또는 본원에 기재된 항체 또는 그의 단편 또는 변이체의 VL 영역 중 임의의 하나 이상의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드, 및 이중성 폴리펩티드 서열을 포함하거나, 그로 본질적으로 이루어지거나 또는 그로 이루어진다. 또 다른 실시양태에서, 본원에 개시된 진단 및 치료 방법에서 사용하기 위한 융합 단백질은 항체 또는 그의 단편, 변이체 또는 유도체의 VH-CDR 중 임의의 1, 2, 3개의 아미노산 서열, 또는 항체 또는 그의 단편, 변이체 또는 유도체의 VL-CDR 중 임의의 1, 2, 3개의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드, 및 이중성 폴리펩티드 서열을 포함하거나, 그로 본질적으로 이루어지거나 또는 그로 이루어진다. 일부 실시양태에서, 융합 단백질은 본원에 기재된 항체 또는 그의 단편, 유도체 또는 변이체의 VH-CDR3의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드, 및 이중성 폴리펩티드 서열을 포함하며, 융합 단백질은 PNAd에 특이적으로 결합한다. 또 다른 실시양태에서, 융합 단백질은 본원에 기재된 항체의 적어도 1개의 VH 영역의 아미노산 서열 및 본원에 기재된 항체 또는 그의 단편, 유도체 또는 변이체의 적어도 1개의 VL 영역의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드, 및 이중성 폴리펩티드 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 융합 단백질의 VH 및 VL 영역은 PNAd에 특이적으로 결합하는 단일 공급원 항체 (또는 scFv 또는 Fab 단편)에 상응한다. 여전히 또 다른 실시양태에서, 본원에 개시된 진단 및 치료 방법에서 사용하기 위한 융합 단백질은 항체의 VH CDR 중 임의의 1, 2, 3개 또는 그 초과 아미노산 서열 및 항체 또는 그의 단편 또는 변이체의 VL CDR 중 임의의 1, 2, 3개 또는 그 초과 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드, 및 이중성 폴리펩티드 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, VH-CDR(들) 또는 VL-CDR(들) 중 2, 3, 4, 5, 6개 또는 그 초과는 본원에 기재된 단일 공급원 항체 (또는 scFv 또는 Fab 단편)에 상응한다. 이들 융합 단백질을 코딩하는 핵산 분자 또한 본원에 제공된다.

[0212] 문헌에 보고된 예시적인 융합 단백질에는 T 세포 수용체의 융합체 (Gascoigne et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84 (1987), 2936-2940); CD4 (Capon et al., Nature 337 (1989), 525-531; Traunecker et al., Nature 339 (1989), 68-70; Zettmeissl et al., DNA Cell Biol. USA 9 (1990), 347-353; 및 Byrn et al., Nature 344 (1990), 667-670); L-셀렉틴 (귀소 수용체) (Watson et al., J. Cell. Biol. 110 (1990), 2221-2229; 및 Watson et al., Nature 349 (1991), 164-167); CD44 (Aruffo et al., Cell 61 (1990), 1303-1313); CD28 및 B7 (Linsley et al., J. Exp. Med. 173 (1991), 721-730); CTLA-4 (Lisley et al., J. Exp. Med. 174 (1991), 561-569); CD22 (Stamenkovic et al., Cell 66 (1991), 1133-1144); TNF 수용체 (Ashkenazi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88 (1991), 10535-10539; Lesslauer et al., Eur. J. Immunol. 27 (1991), 2883-2886; 및 Peppel et al., J. Exp. Med. 174 (1991), 1483-1489 (1991)); 및 IgE 수용체 a (Ridgway and Gorman, J. Cell. Biol. 115 (1991), Abstract No. 1448)가 포함된다.

[0213] 본원의 다른 곳에서 논의된 바와 같이, 본원에 기재된 항체, 또는 그의 항원-결합 단편, 변이체 또는 유도체는 폴리펩티드의 생체내 반감기를 증가시키기 위해 또는 관련 기술분야에 공지된 방법을 이용하여 면역검정에서 사용하기 위해 이중성 폴리펩티드에 융합될 수 있다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, PEG는 그들의 생체내 반감기를 증가시키기 위해 본원에 기재된 항체에 접합될 수 있으며; 예를 들어 [Leong et al., Cytokine 16 (2001), 106-119; Adv. in Drug Deliv. Rev. 54 (2002), 531; 또는 Weir et al., Biochem. Soc. Transactions 30 (2002), 512]을 참고한다.

[0214] 더욱이, 본원에 기재된 항체, 또는 그의 항원-결합 단편, 변이체 또는 유도체는 그들의 정제 또는 검출을 용이하게 하기 위해 마커 서열, 예컨대 펩티드에 융합될 수 있다. 특정한 실시양태에서, 마커 아미노산 서열은 무엇보다도 헥사-히스티딘 펩티드 (HIS), 예컨대 pQE 벡터에 제공된 태그 (퀴아젠, 인크.(QIAGEN, Inc.), 91311 캘리포니아주 채츠워스 이튼 애비뉴 9259)이며, 여러 가지가 상업적으로 입수가능하다. [Gentz et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 (1989), 821-824]에 기재된 바와 같이, 예를 들어 헥사-히스티딘은 융합 단백질의 편리한 정제를 제공한다. 정제에 유용한 다른 펩티드 태그에는 "HA" 태그 (인플루엔자 헤마글루티닌 단백질로부터 유래된 에피토프에 상응함) (Wilson et al., Cell 37 (1984), 767) 및 "플래그" 태그가 포함되나 이로 제한되지 않는다.

[0215] 융합 단백질은 관련 기술분야에 널리 공지된 방법을 이용하여 제조될 수 있으며; 예를 들어 미국 특허 번호 5,116,964 및 5,225,538을 참고한다. 융합이 이루어지는 정확한 부위는 융합 단백질의 분비 또는 결합 특징을 최적화하기 위해 실험적으로 선택될 수 있다. 이어서, 융합 단백질을 코딩하는 DNA는 발현을 위해 숙주 세포에 형질감염된다.

[0216] 본원에 기재된 항체는 접합되지 않은 형태로 사용될 수 있거나, 또는 예를 들어 분자의 치료 성질을 개선시키기 위해, 표적 검출을 용이하게 하기 위해, 또는 환자의 영상화 또는 요법을 위해 적어도 1종의 다양한 분자에 접합될 수 있다. 본원에 기재된 항체, 또는 그의 항원-결합 단편, 변이체 또는 유도체는 정제가 수행되는 경우

정제 전에 또는 후에 표지되거나 또는 접합될 수 있다. 특히, 본원에 기재된 항체, 또는 그의 항원-결합 단편, 변이체 또는 유도체는 치료제, 전구약물, 펩티드, 단백질, 효소, 바이러스, 지질, 생물학적 반응 변형제, 치료제, 또는 PEG에 접합될 수 있다.

[0217] 통상적인 항체를 비롯하여 면역독소인 접합체는 관련 기술분야에 널리 기재되어 있다. 독소는 통상적인 커플링 기술에 의해 항체에 커플링될 수 있거나, 또는 단백질 독소 부분을 함유하는 면역독소가 융합 단백질로서 생성될 수 있다. 본원에 기재된 항체는 이러한 면역독소를 수득하기 위해 상응하는 방식으로 사용될 수 있다. 이러한 면역독소의 예는 [Byers, Seminars Cell. Biol. 2 (1991), 59-70 및 Fanger, Immunol. Today 12 (1991), 51-54]에 의해 기재된 것들이다.

[0218] 관련 기술분야의 기술자는 접합체가 또한 접합되는 선택된 작용제에 따라 다양한 기술을 이용하여 조립될 수 있음을 이해할 것이다. 예를 들어, 비오틴을 갖는 접합체는 예를 들어 PNAd 결합 폴리펩티드와 비오틴의 활성화된 에스테르, 예컨대 비오틴 N-히드록시숙신이미드 에스테르를 반응시킴으로써 제조된다. 유사하게, 형광 마커를 갖는 접합체는 커플링제, 예를 들어 본원에 나열된 것들의 존재하에, 또는 이소티오시아네이트 또는 플루오레세인-이소티오시아네이트와의 반응에 의해 제조될 수 있다. 본원에 기재된 항체, 또는 그의 항원-결합 단편, 변이체 또는 유도체의 접합체는 유사한 방식으로 제조된다.

[0219] 진단제 또는 치료제에 접합된 본원에 기재된 항체, 또는 그의 항원-결합 단편, 변이체 또는 유도체 또한 본원에 제공된다. 항체는 진단적으로, 예를 들어 PNAd-관련 질환의 존재를 입증하기 위해, PNAd-관련 질환을 가질 위험을 나타내기 위해, PNAd-관련 질환의 발달 또는 진행을 모니터링하기 위해, 즉, 예를 들어 주어진 치료 및/또는 예방 레지멘의 효능을 결정하기 위한 임상 시험 절차의 일부로서 사용될 수 있다. 검출은 항체 또는 그의 항원-결합 단편, 변이체 또는 유도체와 검출가능한 물질의 커플링에 의해 용이해질 수 있다. 검출가능한 물질의 예에는 다양한 효소, 보결 분자단, 형광 물질, 발광 물질, 생물발광 물질, 방사성 물질, 다양한 양전자 방출 단층촬영을 이용하는 양전자 방출 금속, 및 비방사성 상자성 금속 이온이 포함되며; 예를 들어 진단제로서 사용하기 위해 항체에 접합될 수 있는 금속 이온에 대해서는 미국 특허 번호 4,741,900을 참고한다. 적합한 효소의 예에는 서양고추냉이 퍼옥시다제, 알칼리성 포스파타제, β -갈락토시다제, 또는 아세틸콜린에스테라제가 포함되고; 보결 분자단 복합체의 적합한 예에는 스트렙타비딘/비오틴 및 아비딘/비오틴이 포함되고; 적합한 형광 물질의 예에는 옴벨리페론, 플루오레세인, 플루오레세인 이소티오시아네이트, 로다민, 디클로로트리아지닐아민 플루오레세인, 단실 클로라이드 또는 피코에리트린이 포함되고; 발광 물질의 예에는 루미놀이 포함되고; 생물발광 물질의 예에는 루시페라제, 루시페린 및 애쿼린이 포함되고; 적합한 방사성 물질의 예에는 ^{125}I , ^{131}I , ^{111}In 또는 ^{99}Tc 가 포함된다.

[0220] 항체 또는 그의 항원-결합 단편, 변이체 또는 유도체는 또한 화학발광 화합물에 커플링시킴으로써 검출가능하게 표지될 수 있다. 이어서, 화학발광-태그 부착된 항체의 존재는 화학 반응의 과정 동안에 발생하는 발광의 존재를 검출함으로써 결정된다. 화합물을 표지하는 특히 유용한 화학발광체의 예에는 루미놀, 이소루미놀, 테로마틱 아크리디늄 에스테르, 이미다졸, 아크리디늄 염 및 옥살레이트 에스테르가 포함된다.

[0221] 항체 또는 그의 항원-결합 단편, 변이체 또는 유도체가 검출가능하게 표지될 수 있는 방식 중 하나는 그를 효소에 연결시키고, 연결된 생성물을 효소 면역검정 (EIA)에서 사용하는 것이다 (Voller, A., "The Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)" Microbiological Associates Quarterly Publication, Walkersville, Md., Diagnostic Horizons 2 (1978), 1-7; Voller et al., J. Clin. Pathol. 31 (1978), 507-520; Butler, Meth. Enzymol. 73 (1981), 482-523; Maggio, E. (ed.), Enzyme Immunoassay, CRC Press, Boca Raton, Fla., (1980); Ishikawa, E. et al., (eds.), Enzyme Immunoassay, Kaku Shoin, Tokyo (1981)). 항체에 결합된 효소는 적절한 기질, 바람직하게는 발색 기질과 반응할 것이고, 이러한 방식으로 예를 들어 분광광도법, 형광측정법 또는 시각적 수단에 의해 검출될 수 있는 화학적 모이어티를 생성한다. 항체를 검출가능하게 표지하게 위해 사용될 수 있는 효소에는 말레이트 데히드로게나제, 스타필로코커스 뉴클레아제, 델타-5-스테로이드 이소머라제, 효모 알콜 데히드로게나제, 알파-글리세로포스페이트, 데히드로게나제, 트리오스 포스페이트 이소머라제, 서양고추냉이 퍼옥시다제, 알칼리성 포스파타제, 아스파라기나제, 글루코스 옥시다제, 베타-갈락토시다제, 리보뉴클레아제, 우레아제, 카탈라제, 글루코스-6-포스페이트 데히드로게나제, 글루코아밀라제 및 아세틸콜린에스테라제가 포함되나 이로 제한되지 않는다. 추가로, 검출은 효소에 대한 발색 기질을 사용하는 비색 방법에 의해 달성될 수 있다. 검출은 또한 유사하게 제조된 표준과 비교하여 기질의 효소 반응의 정도의 시각적 비교에 의해 달성될 수 있다.

[0222] 검출은 또한 임의의 다양한 다른 면역검정을 이용하여 달성될 수 있다. 예를 들어, 항체 또는 그의 항원-결합

단편, 변이체 또는 유도체를 방사성 표지시킴으로써, 방사선 면역검정 (RIA)을 이용하여 항체를 검출하는 것이 가능하다 (예를 들어, [Weintraub, B., Principles of Radioimmunoassays, Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques, The Endocrine Society, (March, 1986)]을 참고하며, 이는 본원에 참고로 포함됨). 방사성 동위원소는 감마 카운터, 섬광 카운터 또는 자가방사기록을 비롯하여 이로 제한되지 않는 수단에 의해 검출될 수 있다.

[0223] 항체 또는 그의 항원-결합 단편, 변이체 또는 유도체는 또한 형광 방출 금속, 예컨대 ^{152}Eu , 또는 란타니드 계열의 다른 것들을 이용하여 검출가능하게 표지될 수 있다. 이들 금속은 디에틸렌트리아민펜타아세트산 (DTPA) 또는 에틸렌디아민테트라아세트산 (EDTA)과 같은 금속 킬레이팅제를 사용하여 항체에 부착될 수 있다.

[0224] 다양한 모이어티를 항체 또는 그의 항원-결합 단편, 변이체 또는 유도체에 접합시키는 기술은 널리 공지되어 있고, 예를 들어 [Arnon et al., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", in Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeld et al. (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. (1985); Hellstrom et al., "Antibodies For Drug Delivery", in Controlled Drug Delivery (2nd Ed.), Robinson et al. (eds.), Marcel Dekker, Inc., pp. 623-53 (1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", in Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, Pinchera et al. (eds.), pp. 475-506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", in Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy, Baldwin et al. (eds.), Academic Press pp. 303-16 (1985), and Thorpe et al., "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", Immunol. Rev. 62 (1982), 119-158]을 참고한다.

[0225] 언급된 바와 같이, 일부 실시양태에서, 결합 분자, 예를 들어 결합 폴리펩티드, 예를 들어 항체 또는 그의 면역 특이적인 단편의 안정성 또는 효능을 개선시키는 모이어티가 접합될 수 있다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, PEG는 그들의 생체내 반감기를 증가시키기 위해 본원에 기재된 결합 분자에 접합될 수 있다. Leong et al., Cytokine 16 (2001), 106; Adv. in Drug Deliv. Rev. 54 (2002), 531; 또는 Weir et al., Biochem. Soc. Transactions 30 (2002), 512.

[0226] A. 약물-함유 중합체 입자

[0227] 본원에 기재된 항체, 또는 그의 항원-결합 단편에 접합된 나노- 또는 마이크로입자 또한 본원에 제공된다. 본원에 기재된 나노- 또는 마이크로입자는 (i) 생체적합성인, 즉, 약학적으로 관련된 양으로 사용될 때 살아있는 동물에서 유의한 유해 반응을 유발하지 않고; (ii) 림프구 귀소 부착 분자 또는 본원에 기재된 항체 또는 그의 항원-결합 단편이 공유 부착될 수 있는 관능기를 특징으로 하고, (iii) 다른 분자에 대해서는 낮은 비특이적인 결합을 나타내고, (iv) 용액 중에서 안정하고, 즉, 입자가 침전하지 않는 물질로 이루어질 수 있다. 입자는 단 분산성 (입자당 물질, 예를 들어 금속의 단일 결정) 또는 다분산성 (입자당 다수개, 예를 들어 2, 3 또는 4개의 결정)일 수 있다.

[0228] 수많은 생체적합성 입자, 예를 들어 유기 또는 무기 나노- 또는 마이크로입자는 관련 기술분야에 공지되어 있다. 리포솜, 덴드리머, 탄소 물질 및 중합체 미셀은 유기 입자의 예이다. 양자점 또한 사용될 수 있다. 무기 입자에는 금속 입자, 예를 들어 Au, Ni, Pt 및 TiO_2 나노- 또는 마이크로입자가 포함된다. 자성 입자, 예를 들어 텍스트란 또는 PEG 분자에 의해 둘러싸인 Fe^{2+} 및/또는 Fe^{3+} 코어가 있는 10-20 nm의 구형 나노 결정 또한 사용될 수 있다. 콜로이드성 금 나노입자는 예를 들어 [Qian et al., Nat. Biotechnol. 26(1):83-90 (2008)]; 미국 특허 번호 7060121; 7232474; 및 미국 P.G. 공개 번호 2008/0166706에 기재되어 있다. 적합한 나노입자, 및 다관능성 나노입자의 구축 및 사용 방법은 예를 들어 [Sanvicens 및 Marco, Trends Biotech., 26(8): 425-433 (2008)]에 논의되어 있다.

[0229] 일부 예에서, 입자는 중합체 입자이다. 본원에 기재된 중합체 입자의 생성에 사용하기에 적합한 수많은 생체적합성 중합체, 예를 들어 폴리(락트산-co-글리콜산) (PLGA), 폴리락티드, 및 폴리글리콜리드는 관련 기술분야에 공지되어 있다. 구체적인 실시양태에서, 중합체 입자는 PLGA 중합체를 포함한다. 구체적인 실시양태에서, 중합체 입자는 폴리락티드 중합체를 포함한다. 구체적인 실시양태에서, 중합체 입자는 폴리글리콜리드 중합체를 포함한다.

[0230] 일부 실시양태에서, 중합체 입자는 혈액 단백질 결합, 및/또는 간 및 비장 흡수를 감소시키기 위해 예를 들어 미국 특허 번호 7291598; 5145684; 6270806; 7348030 등에 기재된 바와 같이 폴리(에틸렌글리콜화) (PEG화)될

수 있다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 중합체 입자는 PEG화 PLGA 중합체를 포함한다. 또 다른 예에서, 중합체 입자는 PEG화 폴리락티드 중합체를 포함한다. 여전히 또 다른 예에서, 중합체 입자는 PEG화 폴리글리콜리드 중합체를 포함한다. PEG화는 대식세포에 의한 면역 이식을 우회하기 위해 스텔스-유사 구조를 생성하여, 순환에서 입자의 옅소닌화 억제 및 체류 개선을 달성한다. 이러한 간단한 표면 변형, 예를 들어 PEG화는 입자의 순환 반감기를 수분에서 수시간 또는 수십 시간으로 증가시킬 수 있다.

[0231] 일부 실시양태에서, 중합체 입자는 본원에 기재된 항체 또는 그의 항원-결합 단편에 부착된다 (연결되고, 예를 들어 공유 접합된다). 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 중합체 나노입자의 중합체의 관능기를 통해 중합체 입자에 부착될 수 있다. 예를 들어, 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 중합체 입자에 접합될 수 있다.

[0232] 나노- 또는 마이크로입자는 관능기(들)를 통해 본원에 기재된 항체 또는 그의 항원-결합 단편에 부착된다 (연결된다). 일부 실시양태에서, 나노- 또는 마이크로입자는 관능기(들)를 포함하는 중합체와 회합되고, 또한 금속 산화물이 서로 분산되도록 유지하는 역할을 한다. 중합체는 합성 중합체, 예컨대 비제한적으로 폴리에틸렌 글리콜 또는 실란, 천연 중합체, 또는 합성 또는 천연 중합체의 유도체 또는 이들의 조합물일 수 있다. 유용한 중합체는 친수성이다. 일부 실시양태에서, 중합체 "코팅"이 자성 금속 산화물 주변의 연속 필름은 아니지만, 금속 산화물에 부착되고 그를 둘러싸는 연장된 중합체 쉼의 "메쉬" 또는 "클라우스"이다. 중합체는 다당류 및 유도체, 예컨대 텍스트란, 폴라난, 카르복시텍스트란, 카르복스메틸 텍스트란, 및/또는 감소된 카르복시메틸 텍스트란을 포함할 수 있다. 금속 산화물은 서로 접촉하거나, 또는 중합체에 의해 개별적으로 포획되거나 또는 둘러싸인 하나 이상의 결정의 집합일 수 있다.

[0233] 다른 실시양태에서, 나노- 또는 마이크로입자는 비-중합체 관능기 조성물과 회합된다. 회합된 중합체없이 안정화되고 관능화된 나노- 또는 마이크로입자를 합성하는 방법이 공지되어 있으며, 이 또한 본 발명의 범위 내에 있다. 이러한 방법은 예를 들어 [Halbreich et al., Biochimie, 80 (5-6):379-90, 1998]에 기재되어 있다.

[0234] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 면역억제 또는 면역조절 약물은 예를 들어 나노- 또는 마이크로입자 내에 캡슐화될 수 있고, 예를 들어 그 안에서 혼합되거나 또는 그의 코팅하에 있을 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 면역억제 또는 면역조절 약물은 나노- 또는 마이크로입자와 접합될 수 있고, 예를 들어 그의 표면 외부에 있을 수 있다.

[0235] *i. 면역억제 또는 면역조절 약물*

[0236] 3가지 고전적인 면역억제 약물, 시클로스포린 A, 라파마이신, 및 타크롤리무스가 본원에 기재된 약물-함유 입자에 성공적으로 혼입되었고, 이는 시험관내에서 제어된 약물 방출 및 T 세포 활성화의 억제를 나타낸다 (Azzi, J., et al., FASEB J 24: 3927-3938, 2010; Tang, L., et al., J. Transplantation, 2012: 896141, 2012; Tong, R. & Cheng, J.J., Macromolecules 45: 2225-2232, 2012).

[0237] 일부 실시양태에서, 타크롤리무스 (TAC, FK-509, 또는 푸지미신으로도 공지됨)는 본원에 기재된 약물-함유 입자에 혼입된다. 타크롤리무스는 숙주의 면역 반응을 감소시키고 장기 거부의 위험을 저하시키기 위해 동종이계 이식 후에 주로 사용되는 면역억제 약물이다. 분자 수준에서, 타크롤리무스는 T-세포에 의한 인터류킨-2 (IL-2) 생성을 감소시킬 수 있는 마크롤리드 락톤이다 (Liu J, Farmer J, Lane W, Friedman J, Weissman I, Schreiber S, Cell 66 (4): 807-815, 1991). 본 발명의 전달 시스템에 혼입될 수 있는 다른 적합한 면역억제 또는 면역조절 약물에는 미코페놀레이트, 모페틸, 시클로스포린, 시롤리무스, 핑골리모드, 미리오신, 시클로포스파미드, 코르티코스테로이드 (예를 들어, 코르티솔, 코르티코스테론, 코르티손, 또는 알도스테론), 라파마이신, 미코페놀레이트, 모페틸, 체크포인트 억제제 (예를 들어, 항-CTLA-4 항체, 항-PD1 항체, 항-PDL1 항체), 항염증제 (예를 들어 항-TNF 약물, 예를 들어 아달리무맙), 화학요법제, 및 모노클로날 항체, 예를 들어 항-CD3 항체, 항-CD25 항체, 항-IL6 항체, CTLA-4-Ig, 아달리무맙, 항-CD52 항체 (예를 들어, 알렘투주맙)가 포함되거나 이로 제한되지 않는다. 일부 실시양태에서, 약물은 본원에 기재된 약물-함유 입자에 혼입된다. 일부 실시양태에서, 면역억제 또는 면역조절 약물은 1개 이상의 히드록실 기 또는 티올 기를 갖고, 특정한 촉매의 존재하에 중합 개시제로서 기능할 수 있다.

[0238] 일부 실시양태에서, 약물은 화학요법제이다. 화학요법은 예를 들어 세포에 유해한 세포독소 또는 세포독성제를 사용하는 것일 수 있다. 그 예에는 탁솔, 미토마이신, 에토포시드, 테노포시드, 빈크리스틴, 빈블라스틴, 콜히친, 독소루비신, 다우노루비신, 미톡산트론, 미트라마이신, 악티노마이신 D, 및 퓨로마이신 및 그의 유사체 또는 동족체가 포함된다. 치료제에는 항대사물 (예를 들어, 메토크세이트, 6-머캅토피린, 6-티오구아닌, 시타라빈, 5-플루오로우라실 데카르바진), 알킬화제 (예를 들어, 메클로레타민, 티오에프 클로람부실, 멜팔란, 카르

무스틴 (BSNU) 및 로무스틴 (CCNU), 시클로포스파미드, 부술판, 디브로모만니톨, 스트렙토조토신, 미토마이신 C, 및 시스-디클로로디아민 백금 (II) (DDP) 시스플라틴), 안트라시클린 (예를 들어, 다우노루비신 (이전에는 다우노마이신) 및 독소루비신), 항생제 (예를 들어, 닥티노마이신 (이전에는 악티노마이신), 블레오마이신, 미트라마이신, 및 안트라마이신 (AMC)), 및 유사분열 억제제 (예를 들어, 빈크리스틴 및 빈블라스틴)이 포함된다. 예를 들어, [Johnson and Win, Oncoimmunology. 2018 Mar 13;7(4):e1408744; Chowdhury et al., J Intern Med. 2018 Feb;283(2):110-120; Tang et al., Nature Reviews Drug Discovery 17:854-855 (2018)]을 참고한다.

[0239] ii. 약물-함유 중합체 입자의 합성

[0240] 약물-함유 나노- 또는 마이크로입자를 제조할 수 있는 다양한 방식이 있지만, 모든 방법에서 결과는 입자를 본원에 기재된 항체 또는 그의 항원-결합 단편에 연결시키기 위해 사용될 수 있는 관능기를 갖는 입자이어야 한다.

[0241] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 면역억제 또는 면역조절 약물은 나노- 또는 마이크로입자 내에 캡슐화될 수 있고, 예를 들어 그 안에서 혼합되거나 또는 그의 코팅하에 있을 수 있다. 이러한 약물-캡슐화된 입자는 예를 들어 [Tang, L., et al., J. Transplantation, 2012: 896141, 2012] (그의 내용은 본원에 참고로 포함됨)에 기재된 나노침전 방법을 이용하여 합성될 수 있다. 간략히, 전달될 약물 및 PEG화 중합체를 적합한 유기 용매에 용해시킬 수 있다. 생성된 용액을 강력 교반하에 비용매, 예를 들어 물에 적가하여, PEG화 약물-캡슐화된 중합체 입자를 형성할 수 있다. 이어서, 입자 현탁액을 실온에서 교반하여 유기 용매를 증발시킬 수 있다. 분취량의 입자 현탁액을 원심분리하고, 상청액을 예를 들어 역상 HPLC에 의해 분석하여, 입자로 약물의 혼입 효율 및 로딩을 결정할 수 있다. 입자는 예를 들어 한외여과에 의해 정제하고 수집할 수 있다. 임의적으로, 동결건조 보호제, 예를 들어 소 혈청 알부민 (BSA)을 입자 용액에 첨가할 수 있고, 이어서 동결건조시키고 -20℃에서 보관할 수 있다. 생성된 입자의 크기 및 다분산성은 동적 광 산란 (DLS) 및/또는 주사 전자 현미경 (SEM)에 의해 결정될 수 있다.

[0242] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 면역억제 또는 면역조절 약물은 나노- 또는 마이크로입자와 접합될 수 있고, 예를 들어 그의 표면 외부에 있을 수 있다. 이러한 약물-접합된 입자는 예를 들어 [Azzi, J., et al., FASEB J 24: 3927-3938, 2010], 또는 국제 출원 공보 WO 2008/109483 (이들의 내용은 본원에 참고로 포함됨)에 기재된 방법을 이용하여 합성될 수 있다. 간략히, 전달될 약물을 적합한 용매 중에서 하나 이상의 환형 단량체 및 촉매와 혼합할 수 있다. 약물은 개환 중합 반응에서 개시제로서 작용하여, 약물이 중합체에 공유 결합된 약물-중합체 접합체를 형성한다. 약물이 중합 개시제로서 사용되기 때문에, 중합체에 대한 약물의 접합 효율이 매우 높고, 약물-로딩 백분율은 단량체/개시제 비를 조정함으로써 제어될 수 있다. 이어서, 약물-중합체 접합체 및 PEG화 중합체를 강력 교반하에 비용매, 예를 들어 물에 적가하여, PEG화 약물-접합된 중합체 입자를 형성할 수 있다. 이어서, 입자 현탁액을 실온에서 교반하여 유기 용매를 증발시킬 수 있다. 입자를 예를 들어 한외여과에 의해 정제하고 수집할 수 있다. 임의적으로, 동결건조 보호제, 예를 들어 소 혈청 알부민 (BSA)을 입자 용액에 첨가할 수 있고, 이어서 동결건조하고 -20℃에서 보관할 수 있다. 생성된 입자의 크기 및 다분산성은 동적 광 산란 (DLS) 및/또는 주사 전자 현미경 (SEM)에 의해 결정될 수 있다.

[0243] 개환 중합에 적합한 단량체에는 다양한 환형 단량체, 예를 들어 환형 에스테르, 환형 카르보네이트, 환형 실록산, 환형 포스페이트, 환형 펩티드 또는 아미노산 유도체, 또는 환형 포스파잔이 포함된다. 예시된 환형 단량체에는 락티드 또는 글리콜리드가 포함된다.

[0244] 본원에 기재된 중합체 입자를 사용하여, 개환 중합 반응을 개시할 수 있는 적어도 1개의 관능기, 예를 들어 히드록실 기 또는 티올 기를 함유하는 임의의 소분자 약물을 전달할 수 있다. 약물은 다수개의 이러한 중합 개시기, 예를 들어 다수개의 히드록실 기 또는 티올 기를 함유할 수 있다. 일부 실시양태에서, 약물은 이러한 중합기 중 1개만을 함유한다. 히드록실 기는 1급, 2급 또는 3급 히드록실 기일 수 있다. 유사하게, 티올 기는 1급, 2급 또는 3급 티올 기일 수 있다. 히드록실 기는 또한 페놀성 히드록실 기일 수 있다. 일부 실시양태에서, 약물은 1개 이상의 비-페놀성 히드록실 기를 함유한다. 일부 실시양태에서, 약물은 1급 또는 2급 히드록실 기인 1개 이상의 비-페놀성 히드록실 기를 함유한다. 일부 실시양태에서, 약물은 단일 비페놀성 히드록실 기를 함유한다. 일부 실시양태에서, 약물은 단일 1급 또는 2급 히드록실 기를 함유한다. 일부 실시양태에서, 1개 이상의 히드록실 기 또는 티올 기를 갖는 면역억제 또는 면역조절 약물은 특정 촉매 존재하에 중합 개시제로서 기능한다.

[0245] 수많은 촉매는 약물-함유 중합체 입자의 형성을 용이하게 할 수 있다. 예시적인 촉매에는 환형 단량체의 제어된 리빙 중합을 위해 개발된 수많은 금속-산화물 (M-OR) 및 알콜-금속 산화물 (RO-M)이 포함된다 (O. Dechy-

Cabaret, B. Martin-Vaca, & D. Bourissou, Chemical Reviews 104: 6147-6176, 2004). 금속-산화물은 히드록실-함유 화합물을 활성 금속 착물, 예컨대 금속-아미도 화합물과 혼합함으로써 동일계 내에서 제조될 수 있다 (B. M. Chamberlain, M. Cheng, D. R. Moore, T. M. Ovitt, E. B. Lobkovsky, G. W. Coates, J. Am. Chem. Soc. 123: 3229, 2001). 예를 들어, 락티드의 중합에 대해 매우 활성인 촉매 (BDI)MgN(TMS)₂를 사용할 수 있다 (Chamberlain, 2001). 특정한 Zn 촉매, 예를 들어 (BDI)ZnN(TMS)₂는 신속한 개시 및 비교적 느린 쇄 전과를 용이하게 하고, 중합을 위한 촉매로서 사용될 수 있다. Zn-매개된 락티드 중합은 좁은 다분산성을 갖는 중합체를 생성할 수 있다. 다른 유용한 촉매에는 Ca 및 Fe 촉매가 포함된다. Mg, Zn, Ca 및 Fe가 인체에서 발견되는 요소이기 때문에, 이들 요소를 함유하는 촉매는 Al 및 Sn을 함유하는 다른 활성 촉매에 비해 더 양호한 안전성 프로파일을 갖는다. 예시적인 Zn, Mg, Ca 및 Fe 촉매에는 WO 2008/109483에 기재된 유기촉매가 포함된다. 일부 실시양태에서, Zn 촉매, 예를 들어 (BDI)ZnN(TMS)₂를 사용하여 약물-함유 중합체 입자를 개시한다.

[0246] 본원에 기재된 입자는 높은 약물 로딩 (약 50%) 및 로딩 효율 (98-100%), 폭발성 방출 효과없이 잘 제어된 약물 방출 동역학, 및 매우 낮은 크기 분포를 갖는 우수한 제어된 입자 크기를 나타내었다 (Tong, R. & Cheng, J., Angew. Chem., Int. Ed. 47: 4830-4834, 2008; Tong, R. & Cheng, J., J. Am. Chem. Soc. 131: 4744-4754, 2009).

[0247] 입자 크기는 예를 들어 미국 특허 번호 5,262,176에 기재된 바와 같이 온도를 변화시킴으로써 반응을 조정하여 제어될 수 있다. 균일한 입자 크기 물질은 또한 예를 들어 미국 특허 번호 5,492,814에 기재된 바와 같이 원심 분리, 한외여과, 또는 겔 여과를 이용하여 입자를 분획화함으로써 제조될 수 있다.

[0248] 본원에 기재된 약물-함유 중합체 입자의 크기는 약 2 nm 내지 약 500 μm 범위일 수 있다. 일부 실시양태에서, 약물-함유 중합체 입자는 약 0.01 μm 내지 약 10 μm, 예를 들어 약 0.05 μm 내지 약 5 μm, 약 0.1 μm 내지 약 3 μm, 약 1 μm 내지 약 2.5 μm 범위의 전반적인 크기를 갖는다. 일부 실시양태에서, 약물-함유 중합체 입자는 약 500 nm 내지 약 5 μm 범위의 전반적인 크기를 갖는다. 일부 실시양태에서, 약물-함유 중합체 입자는 약 1 μm 내지 약 2.5 μm 범위의 전반적인 크기를 갖는다. 일부 실시양태에서, 약물-함유 중합체 입자는 약 200 nm 내지 약 800 nm 범위의 전반적인 크기를 갖는다. 일부 실시양태에서, 약물-함유 중합체 입자는 2-20 nm 범위의 전반적인 크기를 갖고, 세포에 전달하기에 특히 유용하다.

[0249] 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 약물-함유 중합체 입자는 표면-변형되어, 입자를 본원에 기재된 항체 또는 그의 항원-결합 단편에 연결하기 위해 사용될 수 있는 관능기를 제공할 수 있다. 예를 들어, 입자는 [Albrecht et al., Biochimie, 80(5-6): 379-90, 1998]의 방법의 버전에 따라 관능화될 수 있다. 디머캡토-숙신산은 입자에 커플링될 수 있고, 카르복실 관능기를 제공한다. 관능화된 것은 원하는 모이어티를 입자에 부착시키기 위해 사용될 수 있는 아미노 또는 카르복실 또는 다른 반응성 기의 존재를 의미한다.

[0250] 카르복실 관능화된 나노- 또는 마이크로입자는 예를 들어 고먼(Gorman)의 방법에 따라 제조될 수 있다 (WO 00/61191 참고). 카르복실-관능화된 입자는 또한 카르복실 기를 부착시키기 위해 강염기 중에서 브로모 또는 클로로아세트산과 반응시킴으로써 다당류 코팅된 입자로부터 제조될 수 있다. 또한, 카르복실-관능화된 입자는 숙신산 무수물 또는 말레인 무수물과 같은 시약을 사용하여 아미노를 카르복실 기로 전환시킴으로써 아미노-관능화된 입자로부터 제조할 수 있다.

[0251] 또한, 입자를 피아이오테이트로 처리하여 알데히드 기를 형성할 수 있다. 이어서, 알데히드-함유 입자를 디아민 (예를 들어, 에틸렌 디아민 또는 헥산디아민)과 반응시킬 수 있고, 이는 쉬프 염기를 형성한 후, 수소화붕소 나트륨 또는 시아노수소화붕소나트륨에 의해 환원될 수 있다.

[0252] 텍스트란-코팅된 입자는 또한 예를 들어 에피클로로하이드린에 의해 제조되고 가교될 수 있다. 암모니아의 부가는 에폭시 기와 반응하여 아민 기를 생성할 것이고, [Hogemann et al., Bioconjug. Chem. 2000. 11(6):941-6, 및 Josephson et al., Bioconjug. Chem., 1999, 10(2):186-91]을 참고한다.

[0253] 카르복실-관능화된 입자는 수용성 카르보디이미드 및 디아민, 예컨대 에틸렌 디아민 또는 헥산 디아민의 사용에 의해 아미노-관능화된 자성 입자로 전환될 수 있다.

[0254] 아비딘 또는 스트렙타비딘은 비오틴화 결합 모이어티, 예컨대 올리고뉴클레오타이드 또는 폴리펩티드와 함께 사용하기 위해 입자에 부착될 수 있다. 예를 들어, [Shen et al., Bioconjug. Chem., 1996, 7(3):311-6]을 참고한다. 유사하게, 비오틴은 아비딘-표지된 결합 모이어티와 함께 사용하기 위해 입자에 부착될 수 있다.

[0255] 일부 실시양태에서, 약물-함유 중합체 입자는 혈액 단백질 결합 및/또는 간 및 비장 흡수를 감소시키기 위해 예를 들어 미국 특허 번호 7291598; 5145684; 6270806; 7348030 등에 기재된 바와 같이 PEG화될 수 있다. PEG화

는 대식세포에 의한 면역 이식을 우회하기 위해 스텔스-유사 구조를 생성하여, 순환에서 입자의 옅소닌화 억제 및 체류 개선을 달성한다. 이러한 간단한 표면 변형, 예를 들어 PEG화는 입자의 순환 반감기를 수분에서 수시간 또는 수십 시간으로 증가시킬 수 있다.

[0256] *iii. 접합 방법*

[0257] 본원에 기재된 약물-함유 중합체 입자는 본원에 기재된 항체 또는 그의 항원-결합 단편에 접합된다.

[0258] 일부 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 공유 부착을 통해, 예를 들어 분자 상의 관능기와 약물-함유 중합체 입자 상의 관능기 사이에 화학적 결합을 통해 약물-함유 중합체 입자에 연결될 수 있다. 관능기는 원하는 모이더를 입자, 예를 들어 항체 또는 그의 항원-결합 단편에 부착시키기 위해 사용될 수 있는 아미노 또는 카르복실 또는 다른 반응성 기일 수 있다.

[0259] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 링커 또는 결합제를 통해 약물-함유 중합체 입자에 부착될 수 있다. 링커 또는 결합제는 말단 아미노, 카르복시, 술폰히드릴 또는 포스페이트 기를 가질 수 있다. 유용한 링커 또는 결합제의 예시로는 유기 중합체, 예를 들어 폴리에틸렌 글리콜 (PEG) 및 그의 유도체, 단백질 및 소분자가 포함된다.

[0260] **VI. 사용 방법**

[0261] 상기 기재된 바와 같이, 본 개시내용은 적어도 부분적으로 PNAd를 발현하는 세포에 대해 개선된 결합 친화도 (실시예 6) 및 림프절로 T 세포 귀소를 차단하는 개선된 능력 (실시예 4)을 갖는 항-PNAd 항체의 개발을 기반으로 한다. 본원에 기재된 항-PNAd 항체에 접합된 약물의 투여는 증가된 생존 시간 (실시예 8) 외에도 감소된 종양 성장, 감소된 종양 전이, 및 감소된 종양-배액 림프절 섬유증 (실시예 7)을 일으켰다. 더욱이, 본원에 기재된 항-PNAd 항체에 접합된 약물의 투여는 또한 심장 이식 후 생존 시간을 증가시켰다 (실시예 9). 따라서, 본원 및 하기 실시예에 기재된 항체-약물 접합체는 원발성 종양 및 림프절에서의 국소 전이 및 원격 전이를 치료하기 위해 사용될 수 있고; 전이 병변이 HEV를 발현하는 것으로 공지되어 있지 않기 때문에 항체의 이러한 사용이 예상되지 않았다. 따라서, 본 개시내용은 림프구-매개된 면역 반응의 억제를 필요로 하는 대상체에서 림프구-매개된 면역 반응을 억제하기 위한, 자가면역 당뇨병의 치료 또는 진행 지연을 필요로 하는 대상체에서 자가면역 당뇨병을 치료하거나 또는 그의 진행을 지연시키기 위한, 림프구-매개된 염증의 치료를 필요로 하는 대상체에서 림프구-매개된 염증을 치료하기 위한, 및 말초 림프절 어드레신 (PNAd)-발현 악성종양의 치료 또는 전이 감소를 필요로 하는 대상체에서 말초 림프절 어드레신 (PNAd)-발현 악성종양을 치료하거나 또는 그의 전이를 감소시키기 위한 조성물 및 방법을 제공한다. 이들 방법은 치료가 필요한 대상체를 확인하고, 대상체에게 본원에 기재된 조성물 중 하나 이상을 투여하는 것을 포함할 수 있다. 치료가 필요한 대상체는 예를 들어 의사에 의해 확인될 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항체 또는 그의 항원-결합 단편 (또는 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 포함하는 조성물 또는 입자 (예를 들어, 약물-함유 입자))은 림프구-매개된 면역 반응의 억제를 필요로 하는 대상체에게 치료 유효량의 본원에 기재된 항체 또는 그의 항원-결합 단편 (또는 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 포함하는 조성물 또는 입자 (예를 들어, 약물-함유 입자))을 투여하는 것을 포함하는, 대상체에서 림프구-매개된 면역 반응을 억제하는 방법에서 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항체 또는 그의 항원-결합 단편 (또는 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 포함하는 조성물 또는 입자 (예를 들어, 약물-함유 입자))은 자가면역 당뇨병의 치료 또는 진행 지연을 필요로 하는 대상체에게 치료 유효량의 본원에 기재된 항체 또는 그의 항원-결합 단편 (또는 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 포함하는 조성물 또는 입자 (예를 들어, 약물-함유 입자))을 투여하는 것을 포함하는, 대상체에서 자가면역 당뇨병을 치료하거나 또는 그의 진행을 지연시키는 방법에서 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항체 또는 그의 항원-결합 단편 (또는 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 포함하는 조성물 또는 입자 (예를 들어, 약물-함유 입자))은 림프구-매개된 염증의 치료를 필요로 하는 대상체에게 치료 유효량의 본원에 기재된 항체 또는 그의 항원-결합 단편 (또는 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 포함하는 조성물 또는 입자 (예를 들어, 약물-함유 입자))을 투여하는 것을 포함하는, 대상체에서 림프구-매개된 염증을 치료하는 방법에서 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항체 또는 그의 항원-결합 단편 (또는 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 포함하는 조성물 또는 입자 (예를 들어, 약물-함유 입자))는 PNAd-발현 악성종양의 치료 또는 전이 감소를 필요로 하는 대상체에게 치료 유효량의 본원에 기재된 항체 또는 그의 항원-결합 단편 (또는 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 포함하는 조성물 또는 입자 (예를 들어, 약물-함유 입자))을 투여하는 것을 포함하는, 대상체에서 PNAd-발현 악성종양을 치료하거나 또는 그의 전이를 감소시키는 방법에서 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, PNAd-발현 악성종양은 림프종이다. 일부 실시양태에서, PNAd-발현 악성종양은 암이다. 일부 예에서, 암은 유방암이다. 일부 예에서, 암

은 원발성 종양이다. 일부 예에서, 암은 국소 전이이다. 일부 예에서, 암은 림프절에서의 국소 전이이다. 일부 예에서, 암은 원격 전이이다 (즉, 원발성 종양의 위치로부터 멀리 떨어져 있음).

[0262] 상기 기재된 바와 같이, 본원에 기재된 항체 및 그의 항원-결합 단편은 생체내 림프구 이동을 모방하고, 약물, 예를 들어 면역억제 또는 면역조절 약물을 T-세포 활성화 및 T-세포 매개된 손상이 발생한 림프 조직 및 만성 염증 부위에 특이적으로 전달할 수 있는 약물-함유 중합체 입자의 개발에 특이 유용하다. 따라서, 본 개시내용은 예를 들어 자가면역 또는 염증성 장애, 예컨대 제1형 당뇨병 또는 류마티스성 관절염의 경우 면역 억제; 및 예를 들어 심장 또는 다른 장기 이식에서 이식 후 면역 억제를 필요로 하는 대상체 (예를 들어, 인간)에서 질환을 치료하거나 또는 그의 진행을 지연시키는 조성물 및 방법을 제공한다. 본 개시내용은 또한 암 (예를 들어, 림프종 또는 유방암)을 가진 대상체 (예를 들어, 인간)에서 질환을 치료하거나 또는 그의 진행을 지연시키는 조성물 및 방법을 제공한다. 본 개시내용은 또한 악성종양, 예컨대 암, 예를 들어 림프종을 치료하거나 또는 그의 진행을 지연시키는 방법을 제공하며, 여기서 림프구 귀소 과정이 종양의 전파에서 소정의 역할을 하고/거나, 악성종양이 화학요법 약물을 림프 조직에 전달함으로써 PNAd를 발현한다.

[0263] 이들 방법은 치료가 필요한 대상체를 확인하고, 본원에 기재된 조성물 중 하나 이상을 대상체에게 투여하는 것을 포함할 수 있다. 치료를 필요로 하는 대상체는 예를 들어 의사에 의해 확인될 수 있다.

[0264] A. 자가면역 당뇨병의 치료 방법

[0265] 제1형 당뇨병 (T1D)은 자가반응성 T 세포에 의한 췌도의 인슐린-생성 β 세포의 자가면역 파괴를 특징으로 한다 (Hoglund, P., et al., J Exp Med 189: 331-339, 1999). 자가면역 당뇨병의 발병기전의 중심은 배액 췌장 림프절에서 항원-제시 세포에 의해 섬 항원이 T 세포에 제시되어, 자가반응성 T 세포를 활성화시키는 것이다 (Roncarolo, M.G. & Battaglia, M., Nat Rev Immunol 7: 585-598, 2007). 수많은 연구는 췌장 림프절이 자가면역 당뇨병의 발병기전에서 중요한 역할을 한다고 나타낸다 (Katz, J.D., Wang, B., Haskins, K., Benoist, C. & Mathis, D. Cell 74: 1089-1100, 1993; Hoglund, P., et al., J Exp Med 189, 331-339, 1999; Turley, S., Poirot, L., Hattori, M., Benoist, C. & Mathis, D., J Exp Med 198: 1527-1537, 2003; Turley, S.J., Lee, J.W., Dutton-Swain, N., Mathis, D. & Benoist, C., Proc Natl Acad Sci U S A 102: 17729-17733, 2005). 프라이밍 후에, 활성화된 자가반응성 T 세포는 췌장으로 동원되어 췌도염을 유발한다.

[0266] PNAd 경로는 NOD 마우스에서 림프 조직으로 림프구 이동을 조절하는 것으로 나타났다 (Hanninen, A., Salmi, M., Simell, O., Andrew, D. & Jalkanen, S., Blood 88: 934-944, 1996; Xu, B., et al., J Exp Med 197: 1255-1267, 2003; Xu, B., Cook, R.E. & Michie, S.A., J Autoimmun. 35: 124-129, 2010). 더욱이, PNAd는 염증성 상태 및 자가면역 질환, 예컨대 T1D에서 정맥 내피 상에서 상향조절된다 (Michie, S.A., Streeter, P.R., Bolt, P.A., Butcher, E.C. & Picker, L.J., Am J Pathol 143: 1688-1698, 1993; Mikulowska-Mennis, A., Xu, B., Berberian, J.M. & Michie, S.A., Am J Pathol 159: 671-681, 2001; Penaranda, C. & Bluestone, J.A., Immunity 31: 534-536, 2009). 췌도염 동안에 염증성 신호 및 내피 세포 활성화는 섬 내피 형태 및 특징을 PNAd를 발현하는 HEV에 부여하는 것으로 보고되었다. 따라서, 췌도염의 발병은 PNAd의 섬 발현과 연관된 것으로 보고된다 (Hanninen, A., Salmi, M., Simell, O., Andrew, D. & Jalkanen, S., Blood 88, 934-944, 1996; Faveeuw, C., Gagnerault, M.C., Kraal, G. & Lepault, F., Int Immunol 7: 1905-1913, 1995; Yang, X.D., et al., Proc Natl Acad Sci U S A 91: 12604-12608, 1994; Yang, X.D., et al., J Autoimmun 7: 859-864, 1994; Faveeuw, C., Gagnerault, M.C. & Lepault, F., J Immunol 152: 5969-5978, 1994; Hanninen, A., Salmi, M., Simell, O. & Jalkanen, S., Diabetes 45: 1173-1180, 1996; Dong, H., Burke, S.D. & Croy, B.A., Placenta 29: 201-209, 2008). 부착 분자를 통한 백혈구와 내피 세포의 상호작용은 백혈구의 이동을 표적화하는 억제제 또는 항체를 개발하는 것과 같은 다양한 전략을 설계하기 위한 큰 기회를 제공한다 (Mackay, C.R., Nat Immunol 9: 988-998, 2008).

[0267] 본원에 기재된 항체 또는 그의 항원-결합 단편, 또는 그의 접합체를 이용하여, 효율적으로 자가반응성 T 세포를 억제하기 위해 및 자가면역 당뇨병, 예컨대 제1형 당뇨병 (T1D)을 치료하거나 또는 그의 진행을 지연시키기 위해, 면역억제제를 췌장 림프절 및 췌장에 선택적으로 전달할 수 있다. 일부 췌장 β 세포 기능을 갖는 대상체는 본 발명의 치료 방법으로부터 이익을 얻을 가능성이 더 높다. 이러한 대상체는 예를 들어 대상체에서 C-펩티드 수준이 임계값보다 높은지를 결정함으로써 확인될 수 있다.

[0268] B. 이식 후 면역 억제

[0269] 조직 또는 장기 이식 후에, 면역 세포는 동종이식편 상에 존재하는 외인성 항원에 대해 활성화된다. 활성화된

면역 세포는 이식된 조직 또는 장기로 이동하여, 거기서 손상을 일으킬 수 있다. 면역 세포가 활성화된 부위로 소량의 면역억제 약물의 직접적인 전달은 그들의 활성화를 감소시킬 수 있고, 동종이식편 생존을 증가시킬 수 있다. 면역억제 약물의 이러한 표적화된 전달은 또한 다량의 면역억제제의 전신 투여에서 나타나는 독성을 감소시킨다. 본원에 기재된 조성물은 면역억제제를 장기 이식 부위로 직접적으로 전달하고 동종이식편 생존을 증가시키는데 유용한 비히클이다.

[0270] C. 림프종의 치료 방법

[0271] 본원에 기재된 조성물은 또한 림프종, 예를 들어 PNAd-발현 림프종을 치료하기 위해 사용될 수 있다. 림프구 귀소 과정은 일부 종양의 전파에서 소정의 역할을 하는 것으로 공지되어 있다. 예를 들어, 비-호지킨 림프종 (NHL)의 전파는 림프구 귀소 프로그램에 의해 매개된다 (Pals S.T., de Gorter D.J.J., and Spaargaren M, Blood 110(9): 3102-3111, 2007). 본원에 개시된 조성물에 의해 치료될 수 있는 다른 예시적인 림프종에는 소형 림프구성 림프종 (SLL), 만성 림프구성 백혈병 (CLL), 외투-세포 림프종 (MCL), 버킷(Burkitt) 림프종 (BL), 미만성 거대 B-세포 림프종 (DLBCL), 피부 림프종, 예를 들어 피부 T 세포 림프종 (CTCL), 장 림프종, 예를 들어 장 T-세포 림프종 (ITL), 결절 T-세포 림프종, 장-연관 림프 조직 또는 피부에서 발생하는 림프절외 림프종, 성인 T-세포 백혈병/림프종 (ATLL), 및 점막-연관 림프 조직 (MALT)의 B-세포 림프종, 원발성 여포성 림프종 (FL), B-세포 만성 림프구성 백혈병 (B-CLL), 및 털모양-세포 백혈병 (HCL)이 포함된다.

[0272] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항체 또는 그의 항원-결합 단편 접합체는 PNAd-발현 림프종을 치료하거나 또는 그의 진행을 지연시키기 위해 사용될 수 있다.

[0273] VII. 제약 조성물

[0274] 치료 유효량의 본원에 기재된 하나 이상의 항체 또는 그의 항원 결합 단편 또는 그의 접합체는 대상체, 예를 들어 인간에게 투여하기에 적합한 제약 조성물에 혼입될 수 있다. 이러한 조성물은 전형적으로 항체 또는 그의 항원 결합 단편, 또는 그의 접합체 및 제약상 허용가능한 담체를 포함한다. 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "제약상 허용가능한 담체"는 제약학적 투여에 상용성인 임의의 모든 용매, 분산 매질, 코팅, 항박테리아제 및 항진균제, 등장화제 및 흡수 지연제 등을 포함하는 것으로 의도된다. 제약학적 활성 물질을 위한 이러한 매질 및 작용제의 사용은 공지되어 있다. 임의의 통상적인 매질 또는 작용제가 활성 화합물과 비상용성인 경우를 제외하고는, 이러한 매질은 본원에 기재된 조성물에서 사용될 수 있다. 보조 활성 화합물, 예를 들어 리간드 분해 억제제 또한 조성물에 혼입될 수 있다.

[0275] 제약 조성물은 그의 의도된 투여 경로와 상용성하도록 제형화될 수 있다. 비경구, 피내 또는 피하 적용을 위해 사용되는 용액 또는 현탁액은 하기 성분을 포함할 수 있다: 멸균성 희석제, 예컨대 주사용수, 식염수 용액, 경화유, 폴리에틸렌 글리콜, 글리세린, 프로필렌 글리콜 또는 다른 합성 용매; 항박테리아제, 예컨대 벤질 알콜 또는 메틸 파라벤; 항산화제, 예컨대 아스코르브산 또는 아황산수소나트륨; 킬레이팅제, 예컨대 에틸렌디아민테트라아세트산; 완충제, 예컨대 아세테이트, 시트레이트 또는 포스페이트 및 장성 조절을 위한 작용제, 예컨대 염화나트륨 또는 텍스트로스. pH는 산 또는 염기, 예컨대 염산 또는 수산화나트륨에 의해 조정될 수 있다. 비경구 제제는 유리 또는 플라스틱으로 제조된 앰플, 일회용 시린지 또는 다중 용량 바이알에 동봉될 수 있다.

[0276] 주사가 가능한 사용에 적합한 제약 조성물은 멸균성 주사가 가능한 용액 또는 분산액의 즉석 제조를 위한 멸균성 수성 용액 (수용성인 경우) 또는 분산액 및 멸균성 분말을 포함한다. 정맥내 투여의 경우, 적합한 담체에는 생리 식염수, 정균수, 크레모포어 이엘(CREMOPHOR EL)TM (폴리에톡실화 피마자유; 바스프(BASF), 뉴저지주 파시패니) 또는 인산염 완충된 식염수 (PBS)가 포함된다. 모든 경우, 조성물은 멸균성이어야 하고, 용이한 주사가 가능성이 존재하는 정도로 유동성이어야 한다. 이는 제조 및 보관 조건하에 안정해야 하고, 박테리아 및 진균과 같은 미생물의 오염 작용에 대해 보존되어야 한다. 담체는 예를 들어 물, 에탄올, 폴리올 (예를 들어, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 및 액체 폴리에틸렌 글리콜 등), 및 이들의 적합한 혼합물을 함유하는 용매 또는 분산 매질일 수 있다. 적절한 유동성은 예를 들어 코팅, 예컨대 레시틴의 사용에 의해, 분산액의 경우 필요한 입자 크기의 유지에 의해, 및 계면활성제의 사용에 의해 유지될 수 있다. 미생물 작용의 예방은 다양한 항박테리아제 및 항진균제, 예를 들어 파라벤, 클로로부탄올, 페놀, 아스코르브산, 티메로살 등에 의해 달성될 수 있다. 여러 경우에, 조성물에 등장화제, 예를 들어 당, 폴리알콜, 예컨대 만니톨, 소르비톨, 염화나트륨을 포함시키는 것이 바람직할 것이다. 주사가 가능한 조성물의 연장된 흡수는 흡수를 지연시키는 작용제, 예를 들어 알루미늄 모노스테아레이트 및 젤라틴을 조성물에 포함시킴으로써 야기될 수 있다.

[0277] 멸균성 주사가 가능한 용액은 적절한 용매 중에서 필요에 따라 상기 열거된 성분들 중 하나 또는 조합물과 함께 필

요한 양으로 조성물 (예를 들어, 본원에 기재된 작용제)에 혼입시킨 후, 멸균 여과함으로써 제조될 수 있다. 일반적으로, 분산액은 염기성 분산 매질 및 상기 열거된 것들로부터 필요한 다른 성분을 함유하는 멸균성 비히클에 활성 화합물을 혼입시킴으로써 제조된다. 멸균성 주사가 가능한 용액의 제조를 위한 멸균성 분말의 경우, 바람직한 제조 방법은 진공 건조 및 냉동 건조이며, 이로써 활성 성분, 및 사전 멸균 여과된 그의 용액으로부터의 임의의 추가의 원하는 성분의 분말을 수득한다.

[0278] 경구 조성물은 일반적으로 비활성 희석제 또는 식용 담체를 포함한다. 이들은 젤라틴 캡슐에 동봉되거나 또는 정제로 압축될 수 있다. 경구 치료 투여의 목적을 위해, 활성 화합물은 부형제와 함께 혼입될 수 있고, 정제, 트로키제 또는 캡슐의 형태로 사용될 수 있다. 경구 조성물은 또한 구강세정제로서 사용하기 위해 유체 담체를 사용하여 제조될 수 있으며, 유체 담체 중의 화합물은 경구로 적용되고, 행구고, 뱉어내거나 또는 삼켜진다. 제약상 상용성인 결합제 및/또는 아주반트 물질은 조성물의 일부로서 포함될 수 있다. 정제, 환제, 캡슐, 트로키제 등은 임의의 하기 성분, 또는 유사한 성질을 갖는 화합물을 함유할 수 있다: 결합제, 예컨대 미세결정질 셀룰로스, 검 트래거캔스 또는 젤라틴; 부형제, 예컨대 전분 또는 락토스, 붕해제, 예컨대 알긴산, 프리모겔 (PRIMOGE)™ (나트륨 카르복시메틸 전분), 또는 옥수수 전분; 윤활제, 예컨대 스테아르산마그네슘 또는 스테로테스(STEROTES)™; 활주제, 예컨대 콜로이드성 이산화규소; 감미제, 예컨대 수크로스 또는 사카린; 또는 향미제, 예컨대 페퍼민트, 메틸 살리실레이트, 또는 오렌지 향.

[0279] 전신 투여는 또한 경점막 또는 경피 수단에 의할 수 있다. 경점막 또는 경피 투여의 경우, 침투할 장벽에 대해 적절한 침투제가 제형에서 사용된다. 이러한 침투제는 일반적으로 공지되어 있으며, 예를 들어 경점막 투여의 경우 세제, 담즙산염, 및 푸시드산 유도체가 포함된다. 경점막 투여는 비측 스프레이 또는 좌제의 사용을 통해 달성될 수 있다. 경피 투여의 경우, 활성 화합물은 일반적으로 관련 기술분야에 공지된 바와 같이 연고, 고약, 겔 또는 크림으로 제형화된다.

[0280] 일부 실시양태에서, 활성 화합물 (예를 들어, 항체 또는 그의 항원 결합 단편, 또는 그의 접합체)은 이식편 및 미세캡슐화된 전달 시스템을 비롯한 제어된 방출 제형과 같이 신체로부터 신속한 제거에 대해 화합물을 보호하는 담체와 함께 제조된다. 생분해성 생체적합성 중합체, 예컨대 에틸렌 비닐 아세테이트, 폴리무수물, 폴리글리콜산, 콜라겐, 폴리오르토에스테르, 및 폴리락트산이 사용될 수 있다. 이러한 제형의 제조 방법은 관련 기술분야의 기술자에게 자명할 것이다. 상기 물질은 또한 알자 코퍼레이션(Alza Corporation) 및 노바 파마슈티컬즈, 인크.(Nova Pharmaceuticals, Inc.)로부터 상업적으로 입수될 수 있다. 리포솜 현탁액 또한 제약상 허용 가능한 담체로서 사용될 수 있다. 이들은 관련 기술분야의 기술자에게 공지된 방법에 따라, 예를 들어 미국 특허 번호 4,522,811에 기재된 바와 같이 제조될 수 있다.

[0281] 제약 조성물은 투여에 대한 지침서와 함께 용기, 팩 또는 디스펜서에 포함될 수 있다. 한 측면에서, 제약 조성물은 키트의 일부로서 포함될 수 있다.

[0282] 일반적으로, 제약 조성물을 투여하기 위해 사용되는 용량은 바람직하지 않은 부작용, 예컨대 독성, 자극 또는 알러지 반응이 없이 예방 및/또는 치료를 위한 의도된 목적을 용이하게 한다. 개별적인 요구가 달라질 수 있지만, 제형의 유효량에 대한 최적 범위의 결정은 관련 기술분야의 기술 내에 있다. 인간 용량은 동물 연구로부터 용이하게 외삽될 수 있다 (Katocs et al., Chapter 27 In: "Remington's Pharmaceutical Sciences", 18th Ed., Gennaro, ed., Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1990). 일반적으로, 제형의 유효량을 제공하기 위해 필요한 용량은 관련 기술분야의 기술자에 의해 조정될 수 있으며, 연령, 건강, 신체 상태, 체중, 수용자의 질환 또는 장애의 유형 및 정도, 치료 빈도, 필요한 경우 병용 요법의 성질, 및 원하는 효과(들)의 성질 및 범위에 따라 달라질 것이다 (Nies et al., Chapter 3, In: Goodman & Gilman's "The Pharmacological Basis of Therapeutics", 9th Ed., Hardman et al., eds., McGraw-Hill, New York, N.Y., 1996).

[0283] VIII. 투여

[0284] 치료 유효량의 본원에 기재된 하나 이상의 조성물은 표준 방법에 의해, 예를 들어 하나 이상의 투여 경로에 의해, 예를 들어 미국 식품의약국 (FDA; 예를 들어 월드 와이드 웹 주소 fda.gov/cder/dsm/DRG/drg00301.htm 참고)에 의해 현재 승인된 하나 이상의 투여 경로, 예를 들어 경구, 국소, 점막 또는 비경구, 예를 들어 정맥내 또는 근육내로 투여될 수 있다.

[0285] IX. 키트

[0286] 본 발명은 또한 본원에 기재된 방법에서 사용하기 위한 키트를 포함한다. 일부 실시양태에서, 키트는 본원에 기재된 조성물의 하나 이상의 용량을 포함한다. 유도 레지멘 및 유지 레지멘을 위한 투여 형태의 조성, 형태

및 유형은 대상체의 요건에 따라 달라질 수 있다. 예를 들어, 투여 형태는 비경구 투여 형태, 경구 투여 형태, 지연된 또는 제어된 방출 투여 형태, 국소 및 점막 투여 형태, 예컨대 이들의 임의의 조합일 수 있다.

[0287] 특정한 실시양태에서, 키트는 패키지 또는 용기에 하기 중 하나 이상을 함유할 수 있다: (1) 본원에 기재된 조성물의 하나 이상의 용량; (2) 1종 이상의 제약상 허용가능한 아주반트 또는 부형제 (예를 들어, 제약상 허용가능한 염, 용매화물, 수화물, 입체이성질체 또는 포접체); (3) 용량의 투여를 위한 1종 이상의 비히클; (5) 투여에 대한 지침서. 성분 (1)-(5) 중 2가지 이상, 예컨대 모두가 동일한 용기에서 발견되는 실시양태 또한 사용될 수 있다.

[0288] 키트가 제공되는 경우, 포함된 조성물의 상이한 성분들을 별도의 용기에 포장하고, 사용하기 직전에 혼합할 수 있다. 성분들의 이러한 포장은 활성 성분들의 기능을 상실하지 않고 장기 보관을 허용할 수 있다. 1종 초과와 생활성 작용제 (예를 들어, 항체 또는 그의 항원-결합 단편 또는 그의 접합체)가 특정 키트에 포함되는 경우, 생활성 작용제는 (1) 별도로 포장되고, 사용하기 직전에 적절한 (상이한 것은 유사하지만, 상용성인) 아주반트 또는 부형제와 별도로 혼합될 수 있거나, (2) 함께 포장되고, 사용하기 직전에 함께 혼합될 수 있거나, 또는 (3) 별도로 포장되고, 사용하기 직전에 함께 혼합될 수 있다. 선택된 화합물 (예를 들어, 항체 또는 그의 항원-결합 단편 또는 그의 접합체)이 혼합 후에 안정성을 유지하는 경우, 화합물을 사용하기 직전 이외의 사용전 시점, 예를 들어 수분, 수시간, 수일, 수개월, 수년, 및 제조 시점에 혼합될 수 있다.

[0289] 본 발명의 특정한 키트에 포함된 조성물은 상이한 성분의 반감기가 최적으로 보존되고, 용기의 물질에 의해 흡수되거나 또는 변경되지 않도록 임의의 종류의 용기에 제공될 수 있다. 이들 용기에 적합한 물질에는 예를 들어 유리, 유기 중합체 (예를 들어, 폴리카르보네이트 및 폴리스티렌), 세라믹, 금속 (예를 들어, 알루미늄), 합금, 또는 유사한 시약을 담기 위해 전형적으로 사용되는 임의의 다른 물질이 포함될 수 있다. 예시적인 용기에는 비제한적으로 시험 튜브, 바이알, 플라스크, 보틀, 시린지 등이 포함될 수 있다.

[0290] 상기 언급된 바와 같이, 키트에는 지침서 자료 또한 제공될 수 있다. 이들 지침서는 인쇄될 수 있고/거나, 비제한적으로 전자-기록 매체, 예컨대 플로피 디스크, CD-ROM, DVD, Zip 디스크, 비디오 카세트, 오디오테이프, 및 플래쉬 메모리 장치로서 제공될 수 있다. 대안적으로, 지침서는 인터넷 웹 사이트에 공개될 수 있거나, 또는 전자 메일로 사용자에게 배포될 수 있다.

[0291] 실시예

[0292] 본 발명은 하기 실시예에서 추가로 기재되며, 이는 청구항에 기재된 본 발명의 범위를 제한하지 않는다.

[0293] 실시예 1: MHA112 모노클로날 항체 (mAb)는 마우스 및 인간에서 HEV를 인식한다

[0294] 말초 림프절 혈관 어드레신 (PNAd)이 결여된 2 마리의 GlcNAc6ST1/2/4 삼중 녹아웃 (KO) 마우스를 시알릴 루이스^x (sLe^x)-유형 글리칸으로 수식된 CD34를 발현하는 중국 햄스터 난소 (CHO) 세포주로 면역화시켰다. MHA112 단일 하이브리도마 클론을 HEV 면역형광 염색에 의해 확인하였다. MHA112 하이브리도마 배양물의 상청액을 수집하고, 마우스 림프절 (LN) 및 인간 편도선 섹션을 염색하기 위해 사용하였다. 도 1A는 MHA112 하이브리도마 상청액에 의해 인식된 마우스 LN의 높은 내피 세정맥 (HEV) 구조의 지배율 영상을 도시한다. 더 고배율의 영상 (도 1B)은 MHA112가 마우스 및 인간 HEV 구조를 염색하였음을 입증한다.

[0295] 실시예 2: MHA112 mAb 이소타이핑

[0296] 다음으로, 이소타이핑 효소-결합 면역흡착 검정 (ELISA)을 수행하여, MHA112 mAb의 면역글로불린 (Ig) 형태를 확인하였다. 도 2A에 도시된 바와 같이, MHA112 상청액은 항-IgM 코팅된 웰에서 양성이었다. 이들 데이터는 MHA112 이소타입이 마우스 IgM임을 나타내었다.

[0297] 실시예 3: LN으로 MHA112 mAb 접합된 NP의 이동

[0298] MECA79는 내피 세정맥-PNAd 상의 모든 공지된 L-셀렉틴 리간드, 예컨대 CD34, GlyCAM-1, 및 MAdCAM-1 하위집합을 인식하는 모노클로날 항체이다 (Hemmerich, S., Butcher, E.C. & Rosen, S.D., J Exp Med 180, 2219-2226, 1994). MECA79는 면역원으로서 콜라게나제-분산된 장간막 및 말초 림프절 간질 요소를 사용하여 생성되었고, 말초 림프절 HEV의 선택적인 염색을 기반으로 하여 선택되었다 (Streeter et al., J. Cell. Biol. 107:1853-1862, 1988).

[0299] MHA112-접합된, MECA79-접합된 및 접합되지 않은 입자 (IR800 염료가 로딩됨)를 마우스에게 정맥내로 주사하였다. 주사 24 시간 후, 분석은 접합되지 않은 IR800-NP를 주사한 마우스와 비교하여 MHA112-NP 및 양성 대조군

MECA79-NP 그룹의 LN에서 높은 신호를 나타내었다 (도 3A). 이어서, 겨드랑이 LN의 섹션을 염색하여, 주사 24 시간 후 NP의 LN 내 분포를 평가하였다. 세포 핵을 DAPI (4',6-디아미디노-2-필린돌)에 의해 청색으로 염색하였다. PNAd는 MECA79 mAb를 사용하여 녹색으로 염색하였고, NP는 적색으로 시각화되었다. MECA79-NP 및 MHA112-NP는 24 시간 내에 HEV 주변에 국한되었다. 유의하게 더 적은 NP가 표적화되지 않은 NP를 주사한 마우스의 LN에서 검출되었다 (도 3 B). LN으로 MHA112-NP의 이동은 MECA79-NP와 비슷하였으며, 이는 LN으로 NP를 효과적으로 이동시키는데 있어서 MHA112 mAb의 특이성을 강조한다.

[0300] 실시예 4: MHA112 mAb는 LN으로 T 세포 귀소를 차단하였다

MHA112 mAb가 생체내에서 LN으로 T 세포 귀소를 차단할 수 있는지 여부를 시험하기 위해, T 세포를 플루오레세인 이소티오시아네이트 (FITC) 형광 염료로 표지하고, 나이브 마우스에 전달하고, 그들의 분포를 19 시간 후에 평가하였다. MHA112 (항-HEV)는 겨드랑이 (Axi), 서혜부 (Ing) 및 상완 (Bra) LN에 들어간 전달된 T 세포의 수를 25% 넘게 감소시켰다 (도 4). 더욱이, MHA112의 존재하에 장간막 LN에 들어간 T 세포의 개수는 PBS 대조군의 대략 12%만큼 감소하였다 (도 4). 대조적으로, MECA79는 겨드랑이, 서혜부, 상완 또는 장간막 LN에 들어간 전달된 T 세포의 개수를 감소시키지 않았다 (도 4). 비장에 들어간 표지된 T 세포는 세 그룹에서 변하지 않았다 (도 4). 이들 데이터는 MHA112 mAb가 HEV에서 T 세포와 결합 부위를 공유할 수 있고, 생체내에서 T 세포 귀소를 차단하였음을 나타내었다. MHA112 mAb는 MECA79 항체와 비교하여 T 세포 귀소를 차단하는데 유의하게 더 양호하였다.

[0302] 실시예 5: MHA112 mAb 서열

MHA112 중쇄 및 경쇄 가변 영역 (각각 VH 및 VL)의 서열은 도 5에 도시되고, 프레임워크 영역 (FR1-FR4) 및 IMGT 상보성 결정 영역 (CDR1-CDR3)이 표시된다.

[0304] 실시예 1 내지 5에서 사용된 물질 및 방법

[0305] 면역화 및 항체 단리

PNAd가 결여된 2 마리의 GlcNAc6ST1/2/4 삼중 KO 마우스를 sLeX-유형 글리칸으로 수식된 CD34를 발현하는 CHO 세포주로 면역화시켰다. 세번째 면역화 후에, 하이브리도마를 위해 마우스를 희생시켰다. 대략 500개의 단일 클론을 HEV 염색에 의해 스크리닝하였다. 마우스 및 인간 HEV에 대한 모노클로날 항체 MHA112를 확인하였다.

[0307] 면역조직화학

신선한 LN을 조직-냉동 배지에 매립하였다. 형광 공초점 현미경법에 의해 영상화하기 위해 저온 유지 장치 섹션 (8 μ m 두께)을 절단하였다. MHA112는 일차 항체로서 조직 염색을 위해 사용되었다. 알렉사 플루오르 488-접합된 항-마우스 IgM은 이차 항체로서 사용되었다. DAPI를 사용하여 세포 핵을 염색하였다.

[0309] ELISA

96-웰 ELISA 플레이트를 염소 항-마우스 IgM, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 (5 μ g/mL)으로 코팅하고, 밤새 4°C에서 인큐베이션하였다. 다음으로, 웰을 둘베코(Dulbecco) 인산염-완충된 식염수 (DPBS) 중에서 5% BSA로 차단시키고, DPBS + 0.05% 트윈(Tween)-20 (PBST)으로 3회 세척하였다. 이어서, 37°C에서 1 시간의 인큐베이션 기간 동안 MHA112 하이브리도마 상청액 (1:500)을 웰에 첨가하였다. 웰을 다시 PBST로 세척하고, 서양고추냉이 퍼옥시다제 (HRP)-접합된 염소 항-마우스 면역글로불린 (Ig) (인비트로젠)과 함께 37°C에서 1 시간 동안 인큐베이션하였다. PBST로 3회 세척한 후, 샘플을 3,3',5,5'-테트라메틸벤지딘으로 처리하고, 450 nm에서 베르사맥스 (VersaMax) 마이크로플레이트 판독기 (몰레큘라 디바이스즈 코퍼레이션(Molecular Devices Corp.))를 사용하여 흡광도를 기록하였다.

[0311] 림프절 이동

MECA79 및 MHA112 mAb를 티올-말레이미드 화학을 이용하여 나노입자 (NP)의 관능성 표면에 접합시켰다. MECA79 및 MHA112 mAb를 온화한 환원제 (트리스(2-카르복시틸)포스핀 (TCEP), 15 분, 실온)로 전처리하여 티올 기를 절단하였고, 즉시 NP 현탁액과 혼합하였다. NP 상의 말레이미드 기는 MECA79 및 MHA112 항체의 절단된 티올에 공유 접합한다. MECA79-NP 및 MHA112-NP를 사용하기 전에 4°C에서 보관하였다. 8-10 주령의 C57BL/6J (JAX#000664) 마우스를 생체분포 연구를 위해 사용하였다. 샘플을 안구 뒤 주사를 통해 정맥내로 투여하였다. 형광 MECA79-IR-NP 및 MHA112-IR-NP의 이동은 750-780 nm 여기 여파기 및 800 nm 긴 통과 방출 여파기를 구비한 UVP iBOX 익스플로러(Explorer) 영상화 현미경 (UVP)을 사용하여 연구하였다. 겨드랑이, 상완, 서혜부, 신

장 및 장간막을 비롯한 몇몇 LN을 수확하고, iBOX를 사용하여 영상화하였다.

[0313] **T 세포 차단**

[0314] 3 마리의 C57BL/6 마우스로부터 비장을 수확하였다. 단일 세포 현탁액을 제조하였고, 제조자의 지침에 따라 MACS 시약 및 컬럼을 사용하여 T 세포에 대해 양성으로 세포를 농축시켰다 (밀테니 바이오텍(Miltenyi Biotech), 독일 베르기쉬 글라트바하). 주사를 위해, T 세포를 셀트랙커 그린(CellTracker Green) (썬코 피셔(Thermo Fisher))으로 표지하고, 멸균성 식염수에 재현탁시키고, 5백만 개의 T 세포를 100 μ l로 각각의 마우스에게 주사하였다. T 세포 주사 2 시간 전에, 차단 항체 MHA112 및 MECA79를 마우스당 200 μ l에서 200 μ g으로 복강내로 (i.p.) 투여하였다. 전달 19 시간 후에, 마우스를 안락사시키고, 유세포 분석을 위해 LN을 가공하였다.

[0315] **실시예 6: MHA112 결합 친화도**

[0316] MHA112와 MECA79의 친화도를 비교하기 위해, 세포-기반 ELISA를 수행하였다. PNAd를 발현하는 CHO 세포 (CHO-PNAd) (2×10^4 개)를 96-웰 플레이트 상에 코팅하고, 밤새 37°C에서 인큐베이션하였다. 인산염 완충된 식염수 (PBS)로 5회 세척한 후에, 플레이트를 1% 파라포름알데히드 (PFA)로 고정시키고, 3% 소 혈청 알부민 (BSA)으로 차단하였다. MECA79 및 MHA112를 1 ng/ml에서 300 μ g/ml로 계열 희석하였다. PBST로 5회 세척한 후, 서양고 추냉이 퍼옥시다제-- (HRP-) 접합된 염소 항-마우스 및 항-랫트 이차 항체를 1:10,000 희석으로 첨가하고, 실온에서 1 시간 동안 인큐베이션하였다. 결합은 TMB (3,3',5,5'-테트라메틸벤지딘) 기질의 첨가에 의해 검출하였고, 반응은 TMB 정지 용액 (N600, 썬코 사이언티픽(Thermo Scientific))을 첨가하여 중단시켰다. 흡광도 신호를 450 nm에서 판독하였다. 도 6에 도시된 바와 같이, MECA79 및 MHA112의 결합 친화도에 대한 핏팅 곡선을 구축하였고, Kd 값은 각각 1.41 nM 및 0.97 nM이었다. 이 데이터는 MHA112의 결합 친화도가 MECA79보다 더 높음을 (30%) 나타내었다 (도 6).

[0317] **실시예 7: MHA112-약물 접합은 종양 성장, 섬유증, 및 전이를 감소시켰다**

[0318] 마우스를 이소플루란으로 마취시키고, 유선에서 4T1 유방 종양 세포 (마우스당 1×10^5 개 세포)를 피하 주사하였다. 이식 후 9 일째에 시작하여, 유리 탁솔 또는 MHA112-탁솔을 24 일 동안 격일로 복강내로 투여하였다. 종양 성장을 디지털 캘리퍼스로 주당 2회 모니터링하였다. MHA112-탁솔 그룹의 종양 크기는 이식 후 5 주째에 각각 대조군 그룹 (인산염-완충된 식염수-처리) 및 유리 탁솔 그룹에 비해 ~3배 및 ~2배 더 작았다 ($p=0.0001$) (도 7). 이들 결과는 유방 종양의 무린 모델을 치료하는데 있어서 MHA112-탁솔의 우수성을 나타내었다. LN에서 약물 전달의 동역학은 크게 알려지지 않았다. 배액 림프절은 전이의 원발성 부위이다. 림프절에서 이들 전이 좌위는 심지어 화학요법 약물의 고용량 전신 투여에도 치료하기 극히 어려우며, 이는 종종 환자 측에서 유의한 독성 및 불내성을 일으킨다.

[0319] MHA112는 LN의 숨겨진 전이 틈새를 표적화하기 위한 독특한 전제를 갖고 있다. 따라서, LN의 종양 집단에서 MHA112의 LN 전달 효과를 연구하였다. LN의 전반적인 구조를 복원하는 MHA112의 능력의 정도 또한 연구하였다. 종양은 섬유성 환경을 생성하는 것으로 공지되어 있다. 4T1 종양-배액 림프절 (TDLN)을 저온 절편화에 의해 절단하였고, 항-HEV (sc-19602, SCBT), 항-LYVE1 (ab14917, 아브캄(Abcam)), 항-범-시토케라틴 (C2931, 시그마), 항-콜라겐 I (ab34710, 아브캄), 항-콜라겐 IV (ab6586, 아브캄), 및 항-라미닌 (ab11575, 아브캄)으로 염색하였다. DAPI (벡타셴드(VECTASHIELD), 벡터 레버러토리즈(Vector Laboratories))를 사용하여 세포 핵을 대조 염색하였다. 염색된 조직 섹션을 EVOSTM FL 오토 2 영상화 시스템을 사용하여 시각화하였다. 도 8의 영상은 대조군 그룹 및 유리 탁솔 그룹의 TDLN이 HEV 및 림프 (LYVE1) 영역에서 확장되었음을 도시한다. MHA112-탁솔 TDLN에서 HEV 및 림프관의 확장은 다른 그룹에 비해 적었다. 더욱이, 범-시토케라틴은 MHA112-탁솔 그룹의 TDLN에서 원발성 종양 전이 또한 다른 그룹과 비교하여 유의하게 감소되었음을 나타내었다. TDLN의 구조 변화 또한 실험하였다. 도 9에 도시된 바와 같이, 콜라겐 I, IV 및 라미닌 발현 수준은 MHA112-탁솔에서 더 낮았다. 이 데이터는 MHA112-탁솔의 TDLN 섬유증이 개선되었음을 나타내었다.

[0320] **실시예 8: MHA112-약물 접합은 생체내 전이 암 모델에서 생존을 증가시켰다**

[0321] 종양 전이에 대한 MHA112-탁솔의 효과를 연구하기 위해, 4T1 종양 세포주를 마우스 간의 문맥에 부드럽게 주사하였다 (마우스 당 1×10^4 개 세포). 이식 후 4 시간째에 시작하여, 160 ng의 유리 탁솔 또는 MHA112-탁솔을 20 일 동안 격일로 복강내로 투여하였다. 생존을 매일 모니터링하였다. 도 10의 생존 곡선은 대조군 그룹 및 유리 탁솔 그룹의 중간 생존 시간 (MST)이 각각 36 일 및 37 일이었음을 도시한다. MHA112-탁솔 그룹에서 MST는

유의하게 더 길었다 ($p < 0.0001$), MST=58.

[0322] **실시예 9: MHA112-약물 접합은 pan02 췌장암 모델의 생존을 증가시켰다**

[0323] 마우스를 이소플루란으로 마취시키고, Panc02 췌장 종양 세포를 마우스의 췌장에 부드럽게 주사하였다. Panc02 종양 모델의 경우 마우스당 2백만 개의 세포 (2×10^6 개 세포)를 주사하였다. 이식 후 4 시간째에 시작하여, 160 ng의 유리 탁솔 또는 MHA112-탁솔을 20 일 동안 격일로 복강내로 투여하였다. 생존을 매일 모니터링하였다. 도 11의 생존 곡선은 대조군 그룹 및 유리 탁솔 그룹의 중간 생존 시간 (MST)이 각각 30 일 및 32 일이었음을 도시한다. MHA112-탁솔 그룹에서 MST는 유의하게 더 길었다 ($p < 0.001$), MST=45.

[0324] **실시예 7 내지 9에서 사용된 물질 및 방법**

[0325] **항체-약물 접합체**

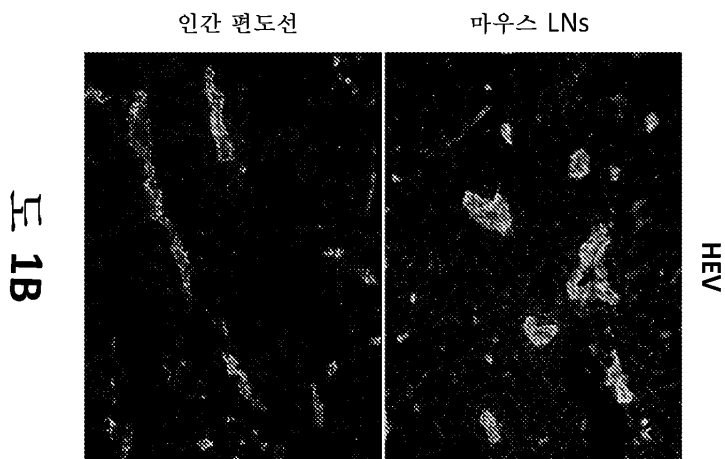
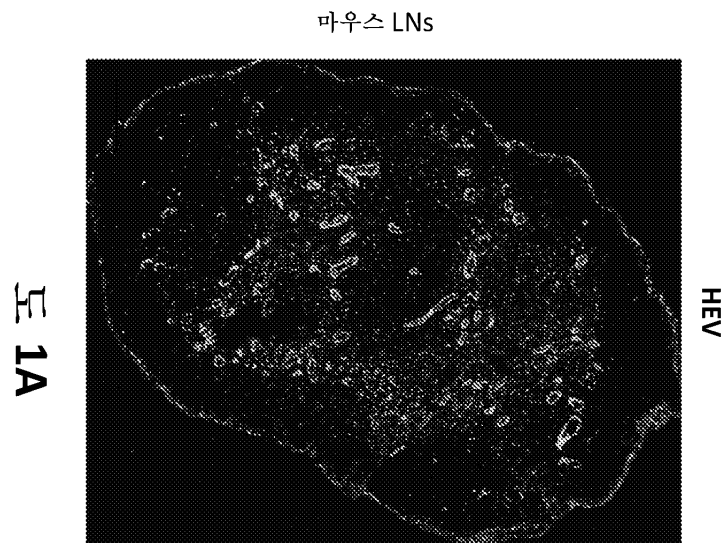
[0326] 글루타르산 무수물 (100 mg, 시그마-알드리치(시그마-Aldrich)) 및 탁솔 (33 mg, 엘씨 래버러토리즈(LC laboratories))을 4 mL 바이알에서 제조하였고, 고진공하에 24 시간 동안 건조시키고, 1 mL의 피리딘 중에 용해시켰다. 용액을 실온에서 Ar 분위기하에 2 시간 동안 교반하였다. 고진공하에 2 시간 동안 용매를 제거함으로써 반응을 쉐킹시켰다. 2'-글루타릴 탁솔을 구배 용매 시스템 (40 분 동안 15% 내지 75% ACN/0.1% 포름산을 갖는 H2O)을 이용하여 역상 HPLC (페노메넥스 루나(Phenomenex Luna) 5 μ m C18 250 x 10.0 mm, 유량 2 mL/min, UV 250 nm 검출)에 의해 정제하였다. DMSO (썬모 사이언티픽 피셔(Thermo Scientific Fisher))에 용해된 2'-글루타릴 탁솔 (0.2 mg)을 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필)카르보디이미드 히드로클로라이드 (EDC, 0.4 mg, 시그마-알드리치) 및 술포-NHS (N-히드록시술포숙신이미드) (1.1 mg, 썬모 사이언티픽 피셔)에 의해 실온에서 15 분 동안 MES 완충제 (pH 6.0, 썬모 사이언티픽 피셔) (최종 용액; 10% DMSO 중 ~1 mL) 중에서 활성화시켰다. EDC를 2-머캅토에탄올 (1.4 μ L, 시그마-알드리치)에 의해 10 분 동안 쉐킹시켰다. 즉시, 용액의 pH를 Na_2CO_3 (0.1 M, 시그마-알드리치)에 의해 ~8로 증가시켰다. PBS에 용해된 MHA112 (pH 7.4, 코닝(Corning))를 활성화된 2'-글루타릴 탁솔과 실온에서 2 시간 동안 혼합하였다 (MHA112 대 탁솔의 1:20 몰비, 최종 용액; 10% DMSO). 원심분리 여과기 (아미콘(Amicon)®, 10 kD MWCO, 시그마-알드리치)에 의해 10,000 rpm에서 15 분 동안 2회 투석하여, 유리 탁솔을 제거하였다. 탈염 컬럼 (제바(Zeba)™, 7 kD MWCO, 썬모 사이언티픽 피셔)에 의해 용액을 추가로 정제하였다.

[0327] **다른 실시양태**

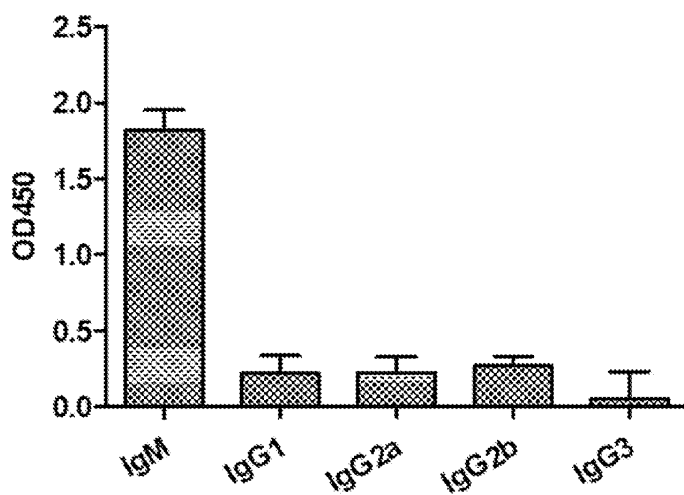
[0328] 본 발명이 그의 상세한 설명과 함께 기재되었지만, 상기 설명은 예시적으로 의도된 것이며, 첨부된 청구항의 범위에 의해 정의되는 본 발명의 범위를 제한하지 않음을 이해해야 한다. 다른 측면, 이점 및 변형은 하기 청구 범위 내에 있다.

도면

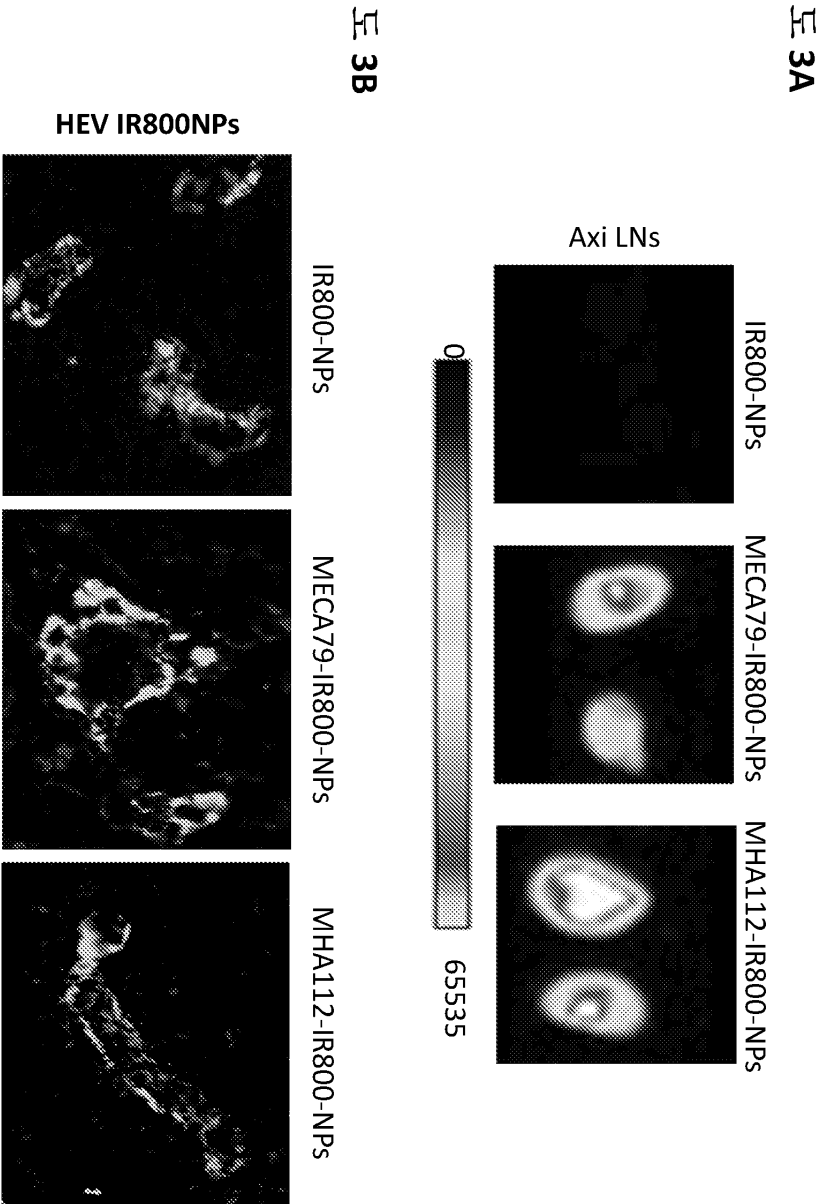
도면1



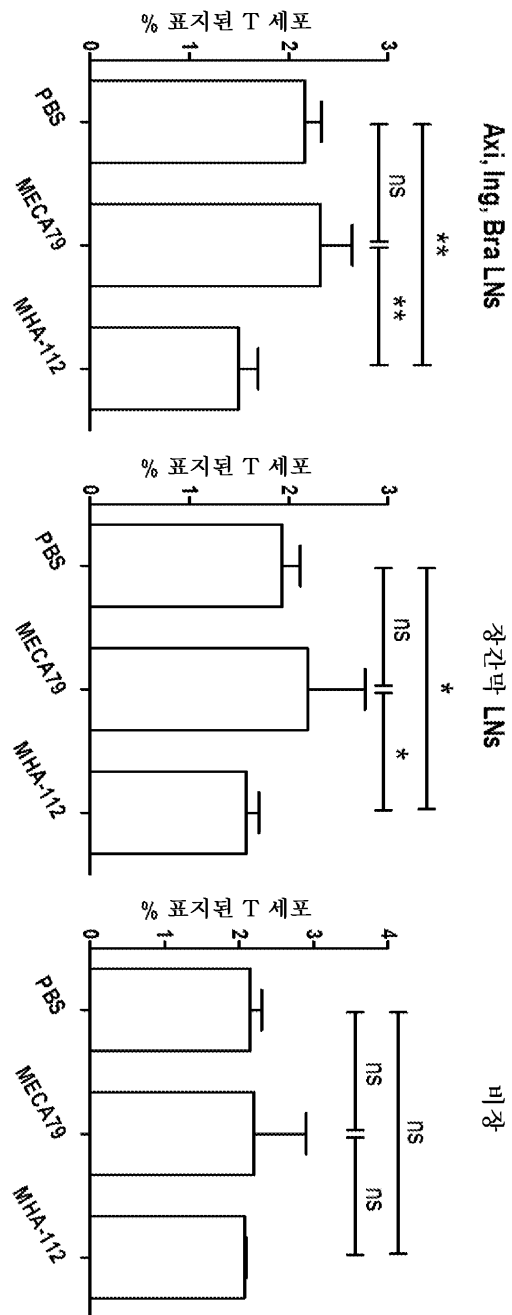
도면2



도면3



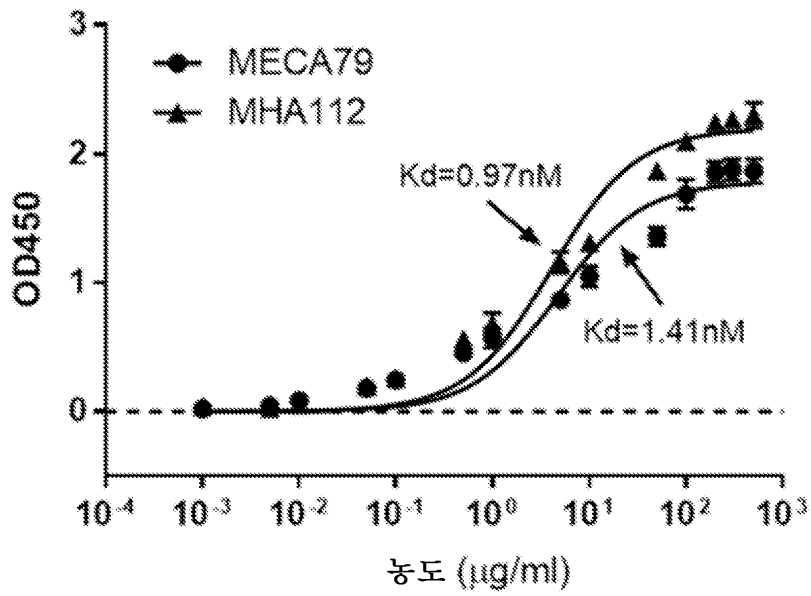
도면4



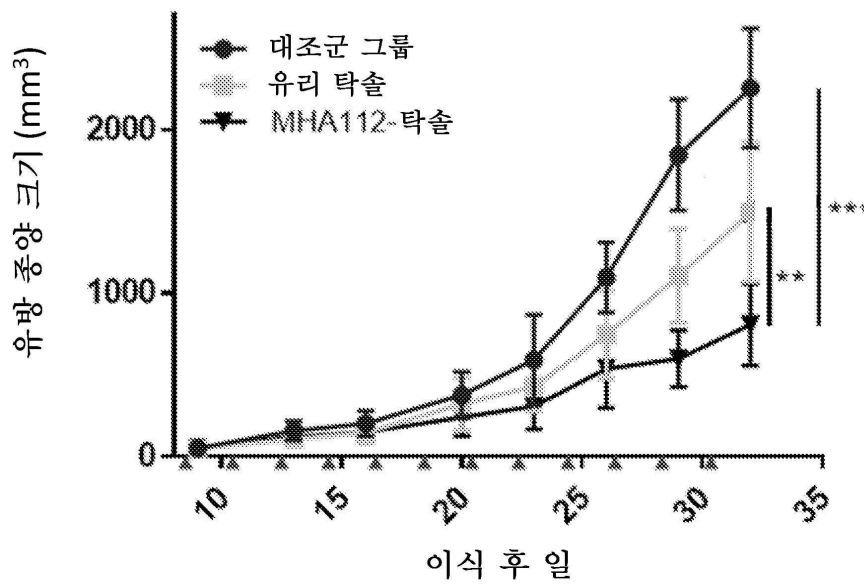
도면5

	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
MHA112 VH	QVQLKESGPGIIVAPSOSSITCVS	GFSLTSY	GVDDWVRQPPGKGLEWLGVI	WGGS	TPNNSALMSRLSKNSKSD	HSKGGTFDY	WGTTTVVSS
					VFLKMSLQTDITAMTCAK		
MHA112 VL	EVLTSPAITASLGQKVTTC	SASSSVSMH	WYQDKSGTSPKPIWY	EISKLAS	GVPARFSGSGSTSLTSSM	QQMNPPIIT	FGAGTKLEK
					EAEDAIVYC		

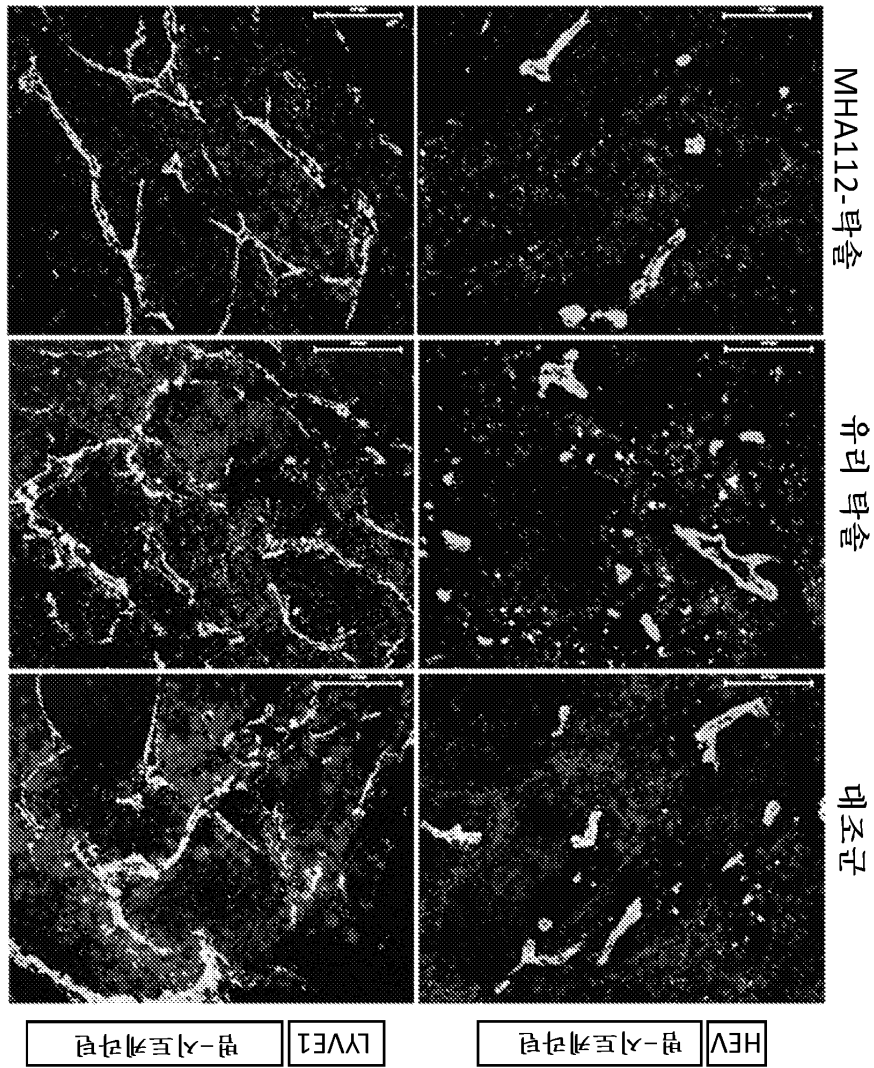
도면6



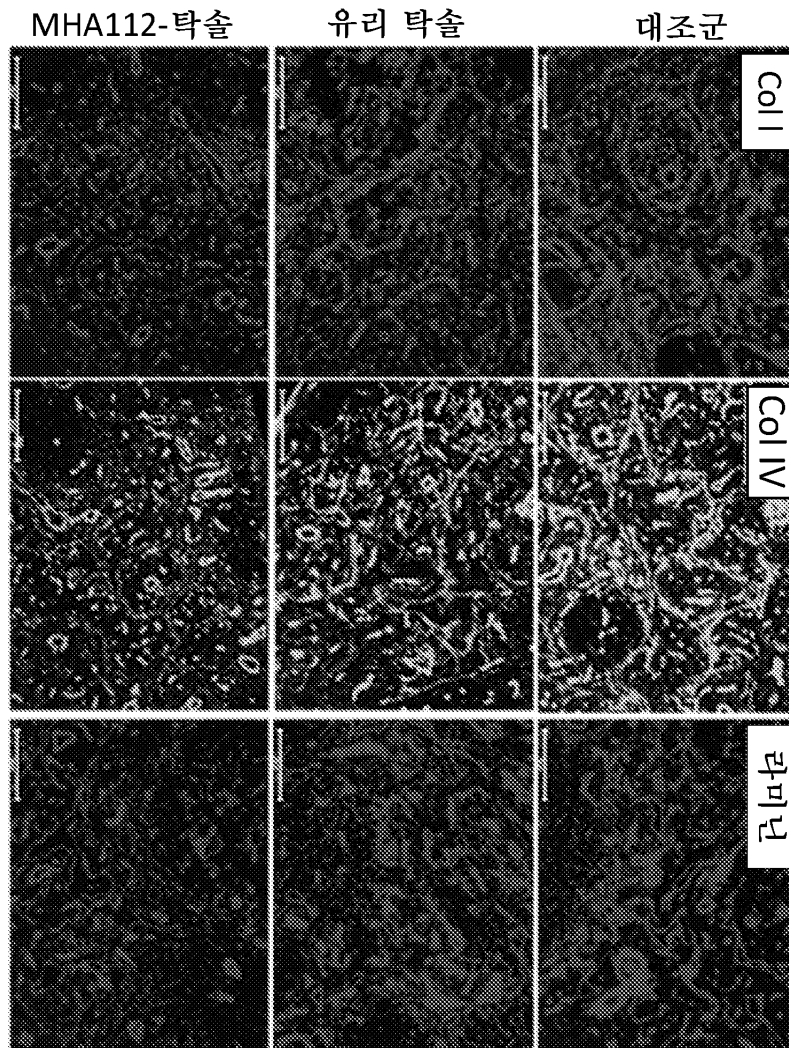
도면7



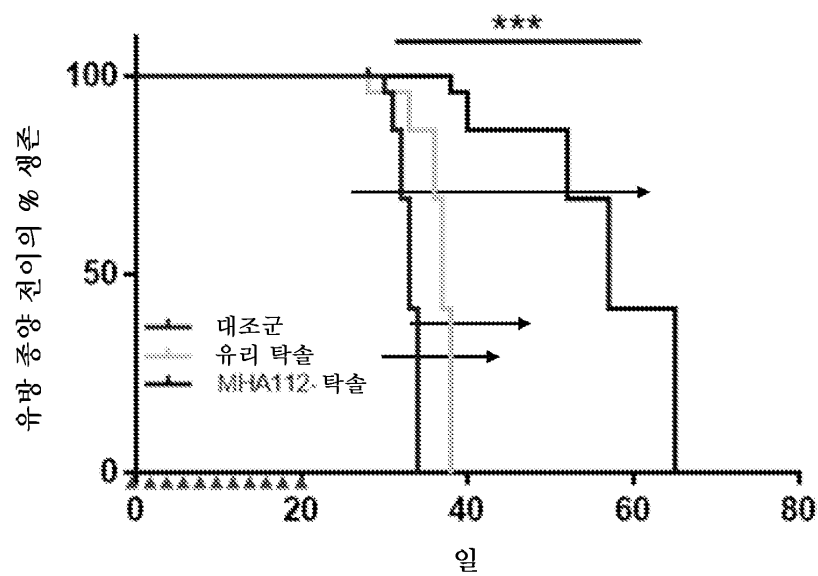
도면8



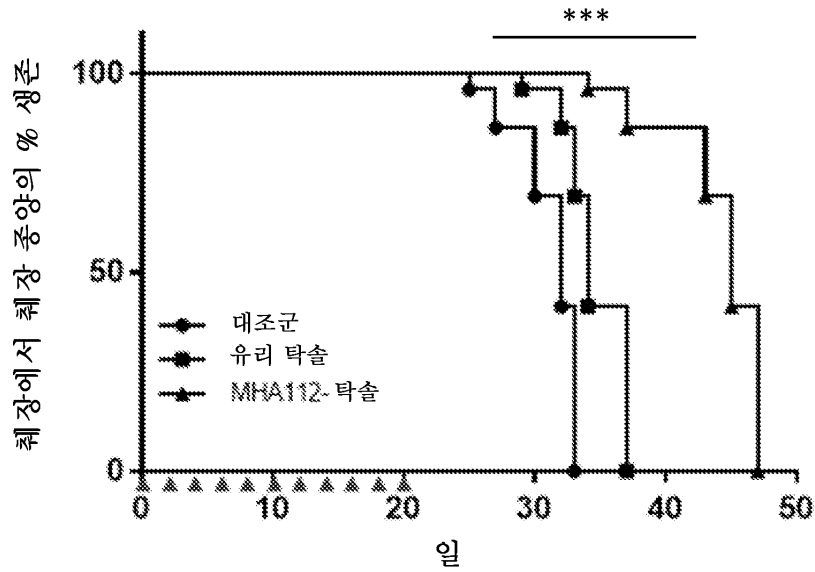
도면9



도면10



도면11



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> The Brigham and Women's Hospital, Inc.

<120> ANTI-PERIPHERAL LYMPH NODE ADDRESSIN ANTIBODIES AND USES THEREOF

<130> 29618-0208W01

<140> PCT/US2020/017879

<141> 2020-02-12

<150> 62/804,797

<151> 2019-02-13

<160> 18

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 351

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Sequence encoding MHA112 Heavy Chain

<400> 1

cagggtgcagc tgaaggagtc aggacctggc ctggtggcgc cctcacagag cctgtccatc 60

acttgactgt tctctgggtt ttcatatacc agctatgggtg tagactgggt tcgccagcct 120

ccaggaaagg gtctggagtg gctgggagta atatggggtg gtggaagcac aaattataat 180

tcagctctca tgtccagact gagcatcagc aaagacaact ccaagagcca agttttctta 240
 aaaatgaaca gtctgcaaac tgatgacaca gccatgtact actgtgcca acatagtaaa 300
 ggggggtact tcgatgtctg gggcacaggg accacggtca ccgtctctc a 351

<210> 2

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> MHA112 Heavy chain

<400> 2

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Gly Val Asp Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu

35 40 45

Gly Val Ile Trp Gly Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Ser Ala Leu Met

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Lys His Ser Lys Gly Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Thr Gly Thr Thr

100 105 110

Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 3

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> MHA112 Heavy chain CDR1

<400> 3

Gly Phe Ser Leu Thr Ser Tyr

1 5

<210> 4

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> MHA112 Heavy chain CDR2

<400> 4

Trp Gly Gly Gly Ser

1 5

<210> 5

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> MHA112 Heavy chain CDR3

<400> 5

His Ser Lys Gly Gly Tyr Phe Asp Val

1 5

<210> 6

<211> 318

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Sequence encoding MHA112 light Chain

<400> 6

gaaattgtgc tcaactcagtc tccagccatc acagctgcat ctctggggca aaagtcacc 60

atcacctgca gtgccagctc aagtgttaagt tacatgcact ggtaccagca gaagtcaggc 120

acctccccc aaccatggat ttatgaaata tccaaactgg cttctggagt cccagctcgc 180

ttcagtgcca gtgggtctgg gacctcttac tctctcacia tcagcagcat ggaggctgaa 240

gatgtgccca ttattactg ccagcagtgg aattatcttc ttatcacgtt cgggtgctggg 300

accaagctgg agctgaaa 318

<210> 7

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> MHA112 Light chain

<400> 7

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

1 5 10 15
Gln Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30
His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr
35 40 45
Glu Ile Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60
Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu

65 70 75 80
Asp Ala Ala Ile Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asn Tyr Pro Leu Ile Thr
85 90 95
Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys

100 105

<210> 8

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> MHA112 Light chain CDR1

<400> 8

Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His

1 5 10

<210> 9

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> MHA112 Light chain CDR2

<400> 9

Glu Ile Ser Lys Leu Ala Ser

1 5

<210> 10

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> MHA112 Light chain CDR3

<400> 10

Gln Gln Trp Asn Tyr Pro Leu Ile Thr

1 5

<210> 11

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> MHA112 Heavy chain framework region 1

<400> 11

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

1 5 10 15

Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser

20 25

<210> 12

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> MHA112 Heavy chain framework region 2

<400> 12

Gly Val Asp Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu

1 5 10 15

Gly Val Ile

<210> 13

<211> 41

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> MHA112 Heavy chain framework region 3

<400> 13

Thr Asn Tyr Asn Ser Ala Leu Met Ser Arg Leu Ser Ile Ser Lys Asp

1 5 10 15

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

20 25 30

Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Lys

35 40

<210> 14

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> MHA112 Heavy chain framework

<400> 14

Trp Gly Thr Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 15

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> MHA112 Light chain framework region 1

<400> 15

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

1 5 10 15

Gln Lys Val Thr Ile Thr Cys

20

<210> 16

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> MHA112 Light chain framework region 2

<400> 16

Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr

1 5 10 15

<210> 17

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> MHA112 Light chain framework region 3

<400> 17

Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser

1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Ile Tyr Tyr Cys

20 25 30

<210> 18

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> MHA112 Light chain framework region 4

<400> 18

Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys

1 5 10