



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2023년11월30일

(11) 등록번호 10-2608763

(24) 등록일자 2023년11월28일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/30 (2006.01) **A61K 39/00** (2006.01)
G01N 33/574 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C07K 16/3092 (2013.01)
C07K 16/30 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2020-7014390
- (22) 출원일자(국제) 2017년10월24일
 심사청구일자 2020년10월23일
- (85) 번역문제출일자 2020년05월20일
- (65) 공개번호 10-2020-0067885
- (43) 공개일자 2020년06월12일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2017/058036
- (87) 국제공개번호 WO 2019/083506
 국제공개일자 2019년05월02일
- (56) 선행기술조사문헌
 US20150005474 A1*
 *는 심사관에 의하여 인용된 문헌

- (73) 특허권자
 고 테라퓨틱스, 인크.
 미국 02142 매사추세츠주 캠브리지 브로드웨이 1
- (72) 발명자
 화이트, 세이어
 미국 01920 매사추세츠주 북스포드 탑스필드 로드 63비
- (74) 대리인
 양영준, 이상남

전체 청구항 수 : 총 34 항

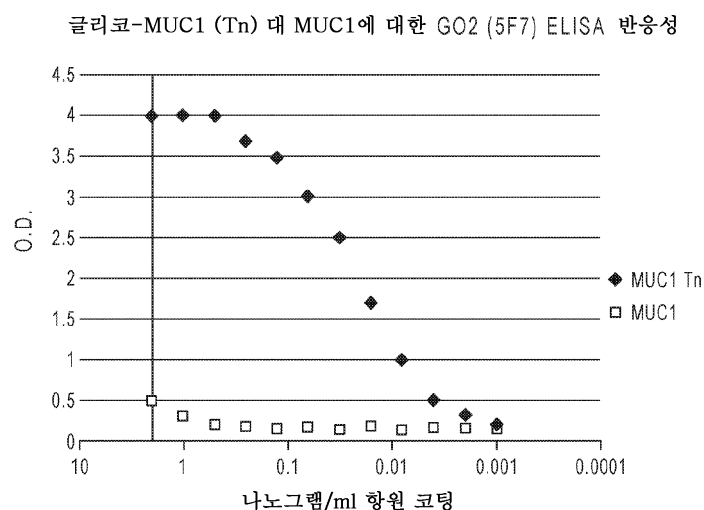
심사관 : 김정아

(54) 발명의 명칭 항-글리코-MUC1 항체 및 이의 용도

(57) 요약

본 개시내용은 MUC1의 암-특이적 글리코실화 변이체에 특이적으로 결합하는 항-글리코-MUC1 항체 및 이의 항원 결합 단편, 및 관련된 융합 단백질 및 항체-약물 접합체, 뿐만 아니라 이러한 생체분자를 코딩하는 핵산에 관한 것이다. 추가로 본 개시내용은 암 요법을 위한 항체, 항원-결합 단편, 융합 단백질, 항체-약물 접합체 및 핵산의 용도에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

G01N 33/57492 (2013.01)

A61K 2039/505 (2013.01)

C07K 2317/33 (2013.01)

C07K 2317/92 (2013.01)

G01N 2333/4725 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

서열식별번호: 33의 아미노산 서열을 포함하는 상보성 결정 영역 (CDR) H1,
 서열식별번호: 29의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H2,
 서열식별번호: 25의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H3,
 서열식별번호: 8의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L1,
 서열식별번호: 9의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L2, 및
 서열식별번호: 31의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L3
 을 포함하는, 항-글리코-MUC1 항체 또는 항원-결합 단편.

청구항 2

제1항에 있어서,

(a) (i) 정상 세포와 비교하여 암 세포에서 과발현되는 글리코-MUC1 에피토프에 우선적으로 결합하거나,

(ii) 정제된 재조합 인간 글리코실트랜스퍼라제 GalNAc-T1, GalNAc-T2, 및 GalNAc-T4를 사용하여 시험관 내 글리코실화시킨 MUC1 일련 반복물 (VTSAPDTRPAPGSTAPPAHG)₃ (서열식별번호: 47)에 결합하거나, 또는

(iii) 상기 (i) 및 (ii) 둘 다이고,

(b) 유방암 세포주 MCF7 또는 T47D와의 결합에 대해

서열식별번호: 3의 중쇄 가변 (VH) 서열 및

서열식별번호: 4의 경쇄 가변 (VL) 서열

을 포함하는 항체 또는 항원-결합 단편과 경쟁하는

항-글리코-MUC1 항체 또는 항원-결합 단편.

청구항 3

제1항에 있어서, 키메라 또는 인간화 항체인 항-글리코-MUC1 항체 또는 항원-결합 단편.

청구항 4

제1항에 있어서,

(a) CDR-H1은 서열식별번호: 5, 서열식별번호: 23, 서열식별번호: 28, 또는 서열식별번호: 32의 아미노산 서열을 포함하거나,

(b) CDR-H2는 서열식별번호: 6 또는 서열식별번호: 24의 아미노산 서열을 포함하거나,

(c) CDR-H3은 서열식별번호: 7의 아미노산 서열을 포함하거나,

(d) CDR-L1은 서열식별번호: 30 또는 서열식별번호: 26의 아미노산 서열을 포함하거나,

(e) CDR-L2는 서열식별번호: 27의 아미노산 서열을 포함하거나,

(f) CDR-L3은 서열식별번호: 10의 아미노산 서열을 포함하거나, 또는

(g) CDR-H1 내지 H3 및 CDR-L1 내지 L3 중 하나 이상이 상기 (a) 내지 (f)에서 정의된 바와 같은 것인

항-글리코-MUC1 항체 또는 항원-결합 단편.

청구항 5

제1항에 있어서,

VH 및 VL을 포함하고,

- (a) VH는 서열식별번호: 5-7의 상보성 결정 영역 (CDR)을 포함하고,
VL은 서열식별번호: 8-10의 CDR을 포함하거나,
- (b) VH는 서열식별번호: 23-25의 CDR을 포함하고,
VL은 서열식별번호: 26, 27, 및 10의 CDR을 포함하거나, 또는
- (c) VH는 서열식별번호: 28, 29, 및 25의 CDR을 포함하고,
VL은 서열식별번호: 30, 9, 및 31의 CDR을 포함하는 것인

항-글리코-MUC1 항체 또는 항원-결합 단편.

청구항 6

제1항에 있어서,

VH 및 VL을 포함하고,

- (a) VH는 서열식별번호: 3에 대한 서열 동일성이 적어도 95%인 아미노산 서열을 포함하고,
VL은 서열식별번호: 4에 대한 서열 동일성이 적어도 95%인 아미노산 서열을 포함하거나,
- (b) VH는 서열식별번호: 3에 대한 서열 동일성이 적어도 97%인 아미노산 서열을 포함하고,
VL은 서열식별번호: 4에 대한 서열 동일성이 적어도 97%인 아미노산 서열을 포함하거나,
- (c) VH는 서열식별번호: 3에 대한 서열 동일성이 적어도 99%인 아미노산 서열을 포함하고,
VL은 서열식별번호: 4에 대한 서열 동일성이 적어도 99%인 아미노산 서열을 포함하거나, 또는
- (d) VH는 서열식별번호: 3에 대한 서열 동일성이 100%인 아미노산 서열을 포함하고,
VL은 서열식별번호: 4에 대한 서열 동일성이 100%인 아미노산 서열을 포함하는 것인

항-글리코-MUC1 항체 또는 항원-결합 단편.

청구항 7

제1항에 있어서,

- (a) 다가이거나,
- (b) 단일쇄 가변 단편 (scFv)의 형태이거나, 또는
- (c) 다중특이적 항체의 형태인

항-글리코-MUC1 항체 또는 항원-결합 단편.

청구항 8

제7항에 있어서,

scFv의 형태이고,

- (i) scFv이 경쇄 가변 단편의 N-말단의 중쇄 가변 단편을 포함하거나,
- (ii) scFv 중쇄 가변 단편 및 경쇄 가변 단편이 아미노산 4-15개의 링커 서열에 공유 결합된 것이거나,
- (iii) 상기 (i) 및 (ii) 둘 다인

항-글리코-MUC1 항체 또는 항원-결합 단편.

청구항 9

제7항에 있어서, 다중특이적 항체의 형태이고, 이것이 글리코-MUC1 에피토프 (이하 "제1 에피토프"로 지칭됨) 및 제1 에피토프와는 상이한 제2 에피토프에 결합하는 이중특이적 항체인 항-글리코-MUC1 항체 또는 항원-결합 단편.

청구항 10

제9항에 있어서, 이중특이적 항체가 크로스맵(CrossMap), Fab-아암 교환 항체, 이중특이적 T-세포 인게이지 (engager) (BiTE), 또는 이중-친화성 재표적화 분자 (DART)인 항-글리코-MUC1 항체 또는 항원-결합 단편.

청구항 11

제10항에 있어서,

이중특이적 항체가 크로스맵이고,

크로스맵이 크로스맵^{FAB}, 크로스맵^{VH-VL}, 또는 크로스맵^{CH1-CL}인 항-글리코-MUC1 항체 또는 항원-결합 단편.

청구항 12

제9항에 있어서, 제2 에피토프가 정상 세포와 비교하여 암 세포에서 과발현되는 MUC1 에피토프인 항-글리코-MUC1 항체 또는 항원-결합 단편.

청구항 13

제9항에 있어서, 제2 에피토프가 T-세포 에피토프인 항-글리코-MUC1 항체 또는 항원-결합 단편.

청구항 14

제13항에 있어서, T-세포 에피토프가 CD3 에피토프, CD8 에피토프, CD16 에피토프, CD25 에피토프, CD28 에피토프, 또는 NKG2D 에피토프인 항-글리코-MUC1 항체 또는 항원-결합 단편.

청구항 15

제14항에 있어서, T-세포 에피토프가 CD3 감마 에피토프, CD3 델타 에피토프, CD3 엡실론 에피토프, 또는 CD3 제타 에피토프인 인간 CD3 에피토프인 항-글리코-MUC1 항체 또는 항원-결합 단편.

청구항 16

제1항에 있어서, 검출가능한 모이어티에 접합된 항-글리코-MUC1 항체 또는 항원-결합 단편.

청구항 17

제16항에 있어서, 검출가능한 모이어티가 효소, 방사성동위원소, 또는 형광 표지인 항-글리코-MUC1 항체 또는 항원-결합 단편.

청구항 18

적어도 제2의 아미노산 서열에 작동가능하게 연결된 제1항의 항-글리코-MUC1 항체 또는 항원-결합 단편의 아미노산 서열을 포함하는 융합 단백질.

청구항 19

제18항에 있어서, 제2 아미노산 서열이

- (a) 4-1BB, CD3-제타, 또는 이의 단편의 것이거나,
- (b) 융합 펩티드의 것이거나,
- (c) T 세포 활성화의 조정인자 또는 이의 단편의 것인

융합 단백질.

청구항 20

제19항에 있어서, 제2 아미노산 서열이 융합 펩티드이고, 이것이 CD28-CD3-제타 또는 4-1BB (CD137)-CD3-제타 융합 펩티드인 융합 단백질.

청구항 21

제19항에 있어서, 제2 아미노산 서열이 T 세포 활성화의 조정인자 또는 이의 단편이고, T 세포 활성화의 조정인자가 IL-15 또는 IL-15Ra인 융합 단백질.

청구항 22

제7항에 기재된 scFv의 형태의 항-글리코-MUC1 항체 또는 항원-결합 단편을 포함하는 키메라 항원 수용체 (CAR).

청구항 23

제22항에 있어서, 아미노-말단에서 카르복시-말단의 순서로 인간 CD8 리더 펩티드, scFv, 인간 CD8 힌지 도메인, 인간 CD8 막횡단 도메인, 및 CD3-제타 신호전달 도메인을 포함하는 키메라 항원 수용체 (CAR).

청구항 24

세포독성제에 접합된 제1항의 항-글리코-MUC1 항체 또는 항원-결합 단편을 포함하는 항체-약물 접합체.

청구항 25

제24항에 있어서,

- (a) 세포독성제가 오리스타틴, DNA 마이너 그루브 결합제, 알킬화제, 엔다이인, 렉시트롭신, 듀오카르마이신, 타산, 둘라스타틴, 메이탄시노이드, 또는 빈카 알칼로이드이거나,
- (b) 항-글리코-MUC1 항체 또는 항원-결합 단편이 링커를 통해 세포독성제에 접합되거나, 또는
- (c) 상기 (a) 및 (b) 둘 다인

항체-약물 접합체.

청구항 26

제25항에 있어서,

항-글리코-MUC1 항체 또는 항원-결합 단편이 링커를 통해 세포독성제에 접합되고,

- (i) 상기 링커는 세포내 프로테아제에 의해 절단가능하거나,
- (ii) 상기 링커는 5.5 미만의 pH에서 가수분해가능하거나,
- (iii) 상기 링커는 디설피드 링커인

항체-약물 접합체.

청구항 27

- (a) 제1항 내지 제17항 중 어느 한 항의 항-글리코-MUC1 항체 또는 항원-결합 단편,
- (b) 제18항 내지 제21항 중 어느 한 항의 융합 단백질, 또는
- (c) 제22항 또는 제23항의 CAR

에 대한 코딩 영역을 포함하는 핵산.

청구항 28

제27항의 핵산을 포함하는 벡터.

청구항 29

- (a) (i) 제1항 내지 제17항 중 어느 한 항의 항-글리코-MUC1 항체 또는 항원-결합 단편,
 - (ii) 제18항 내지 제21항 중 어느 한 항의 융합 단백질, 또는
 - (iii) 제22항 또는 제23항의 CAR
- 에 대한 코딩 영역을 포함하는 핵산을 발현하도록 조작되거나, 또는
- (b) 상기 핵산을 포함하는 벡터를 포함하는
- 숙주 세포.

청구항 30

제29항에 있어서, 상기 CAR을 발현하도록 조작된 인간 T-세포인 숙주 세포.

청구항 31

- (a) (i) 제1항 내지 제17항 중 어느 한 항의 항-글리코-MUC1 항체 또는 항원-결합 단편,
 - (ii) 제18항 내지 제21항 중 어느 한 항의 융합 단백질,
 - (iii) 제22항 또는 제23항의 CAR,
 - (iv) 제24항 내지 제26항 중 어느 한 항의 항체-약물 접합체,
 - (v) (1) 제1항 내지 제17항 중 어느 한 항의 항-글리코-MUC1 항체 또는 항원-결합 단편,
 - (2) 제18항 내지 제21항 중 어느 한 항의 융합 단백질, 또는
 - (3) 제22항 또는 제23항의 CAR
- 에 대한 코딩 영역을 포함하는 핵산,
- (vi) 상기 핵산을 포함하는 벡터, 또는
 - (vii) 상기 핵산을 발현하도록 조작되거나 또는 상기 벡터를 포함하는 숙주 세포, 및
- (b) 생리학상 적절한 완충제, 아주반트 또는 희석제
- 를 포함하는, 암 치료용 제약 조성물.

청구항 32

암 치료용 의약의 제조에 사용하기 위한,

- (a) 제1항 내지 제17항 중 어느 한 항의 항-글리코-MUC1 항체 또는 항원-결합 단편,
 - (b) 제18항 내지 제21항 중 어느 한 항의 융합 단백질,
 - (c) 제22항 또는 제23항의 CAR,
 - (d) 제24항 내지 제26항 중 어느 한 항의 항체-약물 접합체,
 - (e) (i) 제1항 내지 제17항 중 어느 한 항의 항-글리코-MUC1 항체 또는 항원-결합 단편,
 - (ii) 제18항 내지 제21항 중 어느 한 항의 융합 단백질, 또는
 - (iii) 제22항 또는 제23항의 CAR
- 에 대한 코딩 영역을 포함하는 핵산,
- (f) 상기 핵산을 포함하는 벡터, 또는
 - (g) 상기 핵산을 발현하도록 조작되거나 또는 상기 벡터를 포함하는 숙주 세포

를 포함하는 제약 조성물.

청구항 33

제32항에 있어서, 상기 암이 유방암, 비-소세포 폐암, 전립선암, 췌장암, 식도암 또는 결장직장암인 제약 조성물.

청구항 34

(a) 생물학적 샘플을 제1항 내지 제17항 중 어느 한 항의 항-글리코-MUC1 항체 또는 항원-결합 단편과 접촉시키는 단계, 및

(b) 상기 항-글리코-MUC1 항체 또는 항원-결합 단편의 결합을 검출하는 단계

를 포함하는, 생물학적 샘플에서 암을 검출하는 방법.

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

청구항 58

삭제

청구항 59

삭제

청구항 60

삭제

청구항 61

삭제

청구항 62

삭제

청구항 63

삭제

청구항 64

삭제

청구항 65

삭제

청구항 66

삭제

청구항 67

삭제

청구항 68

삭제

청구항 69

삭제

청구항 70

삭제

청구항 71

삭제

청구항 72

삭제

청구항 73

삭제

청구항 74

삭제

청구항 75

삭제

청구항 76

삭제

청구항 77

삭제

발명의 설명

기술 분야

1. 서열 목록

본 출원은 ASCII 양식으로 전자 제출되고 이에 의해 전문이 참고로 포함되는 서열 목록을 함유한다. 2017년 10월 24일에 생성된 상기 ASCII 사본은 파일명이 GOT-001WO_Sequence_Listing.txt이고, 크기는 33,265 바이트이다.

배경 기술

2. 배경

인간 뮤신 MUC1은 단층 및 샘 상피의 침단부 표면에서 발현되는 다형성 막횡단 당단백질이다 (Taylor-Papadimitriou et al., 1999). MUC1은 선암종에서 고도로 과발현되고, 비정상적으로 O-글리코실화된다. 뮤신의 세포외 도메인은 O-글리코실화를 위한 5개의 잠재적인 부위가 있는 아미노산 잔기 20개의 일렬 반복물 (TR)을 가변적인 개수로 함유한다 (25-125개). O-글리칸은 암세포에서 불완전하게 프로세싱되어 범-암종 탄수화물 항원 Tn (GalNAc α 1-O-Ser/Thr)의 발현을 초래한다 (Springer, 1984). 단순한 뮤신-유형 O-글리칸인 Tn은 선암종 (유방암 및 난소암 포함)에서 광범위하게 발현되고, 정상적인 성인 조직에서는 제한된 분포를 나타낸다 (Springer, 1984). 암에서의 이러한 O-글리칸의 발현은 불량한 예후와 상관되고, 이러한 탄수화물 합텐에 대한 천연 항체가 암 환자에서 증가한다 (Miles et al., 1995; Soares et al., 1996; Werther et al., 1996). 암세포에서 과발현되는 글리코-MUC1 에피토프를 이용하는 치료 양식이 관련 분야에서 요구된다.

발명의 내용

3. 요약

본 개시내용은 글리코-MUC1의 암-특이적 에피토프에 대해 선택적인 항체 및 항원 결합 단편을 기초로 하는 치료 및 진단 작용제를 제공하는 것에 의해 글리코펩티드 변이체의 종양 특이성을 포착한다.

본 개시내용은 MUC1의 암-특이적 글리코실화 변이체에 결합하는 항-글리코-MUC1 항체 및 이의 항원 결합 단편을 제공한다. 추가로 본 개시내용은 항-글리코-MUC1 항체 및 항원 결합 단편을 포함하는 융합 단백질 및 항체-약물 접합체, 및 항-글리코-MUC1 항체, 항원 결합 단편 및 융합 단백질을 코딩하는 핵산을 제공한다.

본 개시내용은 암 요법을 위해 항-글리코-MUC1 항체, 항원-결합 단편, 융합 단백질, 항체-약물 접합체 및 핵산을 사용하는 방법을 추가로 제공한다.

특정 측면에서, 본 개시내용은 MUC1의 암-특이적 글리코실화 변이체 및 제2 에피토프에 결합하는 이중특이적 및 기타 다중특이적 항-글리코-MUC1 항체 및 항원 결합 단편을 제공한다. 제2 에피토프는 MUC1 자체, MUC1과 함께 암세포 상에 공동-발현된 또 다른 단백질, 또는 상이한 세포, 예컨대 활성화된 T 세포 상에 제시된 또 다른 단백질 상에 있을 수 있다. 추가로, 코돈-최적화 코딩 영역을 포함하는 핵산 및 특정 숙주 세포에서의 발현에 대해 코돈-최적화되지 않은 코딩 영역을 포함하는 핵산을 포함하여, 이러한 항체를 코딩하는 핵산이 또한 개시된다.

항-글리코-MUC1 항체 및 결합 단편은 융합 파트너를 함유하는 융합 단백질의 형태일 수 있다. 융합 파트너는 제2 기능, 예컨대 T 세포 신호전달 단백질의 신호전달 도메인의 신호전달 기능, T 세포 활성화의 펩티드 조정인자 또는 표지화 시스템의 효소 성분을 제공하는데 유용할 수 있다. 예시적인 T 세포 신호전달 단백질은 4-1BB, CD3, 및 융합 펩티드, 예를 들어, CD28-CD3-제타 및 4-1BB-CD3-제타를 포함한다. 4-1BB, 또는 CD137은 T 세포의 공동-자극 수용체이고, CD3-제타는 T-세포 항원 수용체의 신호-전달 성분이다. 제2 기능을 제공하는 모이 어티는 T 세포 활성화의 조정인자, 예컨대 IL-15, IL-15Ra, 또는 IL-15/IL-15Ra 융합물일 수 있거나, 또는 생체 내에서 또는 시험관 내에서 결합의 정도 및/또는 위치를 모니터링하는데 유용한 표지화 시스템의 표지 또는 효소 성분을 코딩할 수 있다. T 세포, 예컨대 자가 T 세포의 환경에 놓인 이러한 예방적 및 치료적으로 활성화된 생체분자를 코딩하는 구축물은 본 개시내용의 일부 실시양태에서 다양한 암을 예방 또는 치료하기 위해 입양으로 전달된 T 세포를 동원하기 위한 강력한 플랫폼을 제공한다.

특정 측면에서, 본 개시내용의 항-글리코-MUC1 항체 또는 항원-결합 단편은 표 1에 기재된 (또는 표 1에 기재된 뉴클레오타이드 서열에 의해 코딩되는) 중쇄 및/또는 경쇄 가변 서열을 포함한다. 명확하게 하기 위해, 용어 "항-글리코-MUC1 항체"가 본 문서에서 사용되는 경우, 문맥적으로 달리 지시되지 않는 한, 단일특이적 및 다중특이

적 (이중특이적 포함) 항-글리코-MUC1 항체, 단일특이적 및 다중특이적 항체의 항원-결합 단편, 및 항체 및 이의 항원-결합 단편을 함유하는 융합 단백질 및 접합체를 포함하는 것이 의도된다. 유사하게, 용어 "항-글리코-MUC1 항체 또는 항원-결합 단편"이 사용되는 경우, 문맥적으로 달리 지시되지 않는 한, 단일특이적 및 다중특이적 (이중특이적 포함) 항-글리코-MUC1 항체 및 이의 항원-결합 단편을 이러한 항체 및 항원-결합 단편을 함유하는 융합 단백질 및 접합체와 함께 포함하는 것이 또한 의도된다.

[0012] 다른 측면에서, 본 개시내용의 항-글리코-MUC1 항체 또는 항원-결합 단편은 표 1-3에 기재된 (또는 표 1-3에 기재된 뉴클레오타이드 서열에 의해 코딩되는) 중쇄 및/또는 경쇄 CDR 서열을 포함한다. 표 1에 기재된 CDR 서열은 CDR 경계를 정의하기 위한 IMGT (Lefranc et al., 2003, Dev Comparat Immunol 27:55-77), 카바트(Kabat) (Kabat et al., 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md.), 및 코티아(Chothia) (Al-Lazikani et al., 1997, J. Mol. Biol 273:927-948) 체계에 따라 정의된 CDR 서열을 포함한다. 표 2에 기재된 CDR 서열은 표 1에 제시된 CDR 서열에 대한 조합된 중첩 영역이고, IMGT, 카바트 및 코티아 서열이 밑줄친 볼드체로 제시된다. 표 3에 기재된 CDR 서열은 표 1에 제시된 CDR 서열에 대한 공통적인 중첩 영역이다. 이러한 항-글리코-MUC1 항체 및 항원-결합 단편에 대한 프레임워크 서열은 표 1의 천연 뮤린 프레임워크 서열일 수 있거나, 또는 비-천연 (예를 들어, 인간화 또는 인간) 프레임워크 서열일 수 있다.

[0013] <표 1>

표 1		
설명	서열	서열식별번호
VH 아미노산 서열 (신호 서열 포함)	MGWSGIFLFFLSVTTGVHSQVQLQQSDAELVKPGASVKI SCKAS GYTFTDHAHWKQRPEQGLEWIGYFSPGNDDI HYNEKFEGKATLTADKSSSTAYMQLNSLTSEDSAVYFC KRSYDKDFDCWQGTTTLTVSS	1
VL 아미노산 서열 (신호 서열 포함)	MVLILLLLWVSGTCGDIVMSQSPSSLGVSVEKVTMSCK SSQSLLYSTNQKNYQSLLYSTNQKNYLAWYQQKPGQSP KLLIYWWSNRKSGVPDRFTGSGSGTDFTLTISVKAEDL AVYYC QQYYRYPLTFGAGTKLELK	2
VH 아미노산 서열 (예상되는 성숙형)	QVQLQQSDAELVKPGASVKISCKASGYTFTDHAHWK QRPEQGLEWIGYFSPGNDDIHYNEKFEGKATLTADKSS STAYMQLNSLTSEDSAVYFCRYSYDKDFDCWQGTTLT VSS	3
VL 아미노산 서열 (예상되는 성숙형)	DIVMSQSPSSLGVSVEKVTMSCKSSQSLLYSTNQKNY QSLLYSTNQKNYLAWYQQKPGQSPKLLIYWWSNRKSGV PDRFTGSGSGTDFTLTISVKAEDLAVYYC QQYYRYPLTFGAGTKLELK	4
CDR-H1 아미노산 서열 (IMGT 정의)	GYTFTDHA	5
CDR-H2 아미노산 서열 (IMGT 정의)	FSPGNDDI	6
CDR-H3 아미노산 서열 (IMGT 정의)	KRSYDKDFDC	7
CDR-L1 아미노산 서열 (IMGT 정의)	QSLLYSTNQKNY	8
CDR-L2 아미노산 서열 (IMGT 정의)	WVS	9
CDR-L3 아미노산 서열 (IMGT 정의)	QQYYRYPLT	10
VH 뉴클레오타이드 서열 (신호 서열 포함)	ATGGGATGGAGCGGGATCTTTCTCTTCTTCCTGTCAG TAACTACAGGTGTCCACTCCCAGGTTTCAGCTGCAGCA GTCTGACGCGGAGTTGGTGAAACCTGGGGCTTCAGT GAAGATATCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACTTTCCT GACCATGCTATTCCTGCGGTGAAGCAGAGGCCTGAAC	11

[0014]

표 1		
설명	서열	서열식별번호
	AGGGCCTGGAATGGATTGGATATTTTTCTCCCGAAA TGATGACATTCACTACAATGAGAAGTTCGAGGGCAAG GCCACACTGACTGCAGACAAATCCTCCAGCACTGCCT ACATGCAGCTCAACAGCCTGACATCTGAAGATTCTGC AGTGTATTTCTGTAAAAGATCTTACGACAAGGACTTTG ACTGCTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTC A	
VL 뉴클레오티드 서열 (신호 서열 포함)	ATGGTTCTTATCTTACTGCTGCTATGGGTATCTGGTAC CTGTGGGGACATTGTGATGTCACAGTCTCCATCCTCC CTAGGTGTGTCAGTTGGAGAGAAGGTTACTATGAGCT GCAAGTCCAGTCAGAGCCTTTTATACAGTACCAATCAA AAGAACTACCTGGCCTGGTACCAGCAGAAACCAGGG CAGTCTCCTAAGTTGCTGATTTACTGGGTATCTAATAG GAAATCTGGGGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGTGGA TCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGTAGTGTA AGGCTGAAGACCTGGCAGTTTATTACTGTCAGCAATA TTATAGGTATCCGCTCACGTTCCGGTGCTGGGACCAAG CTGGAGCTGAAA	12
VH 뉴클레오티드 서열 (신호 서열 제외)	CAGGTTCACTGTCAGCAGTCTGACGCGGAGTTGGTG AAACCTGGGGCTTCAGTGAAGATATCCTGCAAGGCTT CTGGCTACACTTTCACTGACCATGCTATTCACTGGGT GAAGCAGAGGCCTGAACAGGGCCTGGAATGGATTGG ATATTTTTCTCCCGAAAATGATGACATTCACTACAATG AGAAGTTCGAGGGCAAGGCCACACTGACTGCAGACA AATCCTCCAGCACTGCCTACATGCAGCTCAACAGCCT GACATCTGAAGATTCTGCAGTGTATTTCTGTAAAAGAT CTTACGACAAGGACTTTGACTGCTGGGGCCAAGGCAC CACTCTCACAGTCTCCTCA	13
VL 뉴클레오티드 서열 (신호 서열 제외)	GACATTGTGATGTCACAGTCTCCATCCTCCCTAGGTG TGTCAGTTGGAGAGAAGGTTACTATGAGCTGCAAGTC CAGTCAGAGCCTTTTATACAGTACCAATCAAAAGAACT ACCTGGCCTGGTACCAGCAGAAACCAGGGCAGTCTC CTAAGTTGCTGATTTACTGGGTATCTAATAGGAAATCT GGGGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGTGGATCTGGG ACAGATTTCACTCTCACCATCAGTAGTGTAAGGCTG AAGACCTGGCAGTTTATTACTGTCAGCAATATTATAGG	14

[0015]

표 1		
설명	서열	서열식별번호
	TATCCGCTCACGTTTCGGTGCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAA	
FR-H1	QVQLQQSDAELVKPGASVKISCKAS	15
FR-H2	IHWVKQRPEQGLEWIGY	16
FR-H3	HYNEKFEGKATLTADKSSSTAYMQLNSLTSEDSAVYFC	17
FR-H4	WGQGTTTLTVSS	18
FR-L1	DIVMSQSPSSLGVSVEKVTMSCKSS	19
FR-L2	LAWYQQKPGQSPKLLIY	20
FR-L3	NRKSGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVKAEDLAVYYC	21
FR-L4	FGAGTKLELK	22
CDR-H1 아미노산 서열 (카바트 정의)	DHAIH	23
CDR-H2 아미노산 서열 (카바트 정의)	YFSPGNDDIHYNEKFEG	24
CDR-H3 아미노산 서열 (카바트 정의)	SYDKDFDC	25
CDR-L1 아미노산 서열 (카바트 정의)	KSSQSLLYSTNQKNYLA	26
CDR-L2 아미노산 서열 (카바트 정의)	WVSNRKS	27
CDR-L3 아미노산 서열 (카바트 정의)	QQYYRYPLT	10
CDR-H1 아미노산 서열 (코티아 정의)	GYTFTDH	28
CDR-H2 아미노산 서열 (코티아 정의)	SPGNDD	29
CDR-H3 아미노산 서열 (코티아 정의)	SYDKDFDC	25
CDR-L1 아미노산 서열 (코티아 정의)	SQSLLYSTNQKNY	30

[0016]

표 1		
설명	서열	서열식별번호
CDR-L2 아미노산 서열 (코티아 정의)	WVS	9
CDR-L3 아미노산 서열 (코티아 정의)	YYRYPLT	31

[0017]

[0018] <표 2>

표 2		
설명	서열	서열식별번호
CDR-H1 아미노산 서열 (조합된 중첩부)	<u>GYTFTHAIH</u> (IMGT) GYTFTHAIH (카바트) GYTFTHAIH (코티아)	32
CDR-H2 아미노산 서열 (조합된 중첩부)	<u>YFSPGNDDIHYNEKFEG</u> (IMGT) YFSPGNDDIHYNEKFEG (카바트) YFSPGNDDIHYNEKFEG (코티아)	24
CDR-H3 아미노산 서열 (조합된 중첩부)	<u>KRSYDKDFDC</u> (IMGT) KRSYDKDFDC (카바트) KRSYDKDFDC (코티아)	7
CDR-L1 아미노산 서열 (조합된 중첩부)	<u>KSSQSLLYSTNQKNYLA</u> (IMGT) KSSQSLLYSTNQKNYLA (카바트) KSSQSLLYSTNQKNYLA (코티아)	26
CDR-L2 아미노산 서열 (조합된 중첩부)	<u>WVSNRKS</u> (IMGT) WVSNRKS (카바트) WVSNRKS (코티아)	27
CDR-L3 아미노산 서열 (조합된 중첩부)	<u>QYYRYPLT</u> (IMGT) QYYRYPLT (카바트) QYYRYPLT (코티아)	10

[0019]

[0020] <표 3>

표 3		
설명	서열	서열식별번호
CDR-H1 아미노산 서열 (공통 서열)	DH	33
CDR-H2 아미노산 서열 (공통 서열)	SPGNDD	29
CDR-H3 아미노산 서열 (공통 서열)	SYDKDFDC	25
CDR-L1 아미노산 서열 (공통 서열)	QSLLYSTNQKNY	8
CDR-L2 아미노산 서열 (공통 서열)	WVS	9
CDR-L3 아미노산 서열 (공통 서열)	YYRYPLT	31

[0021]

[0022] 특정 측면에서, 본 개시내용의 항-글리코-MUC1 항체 또는 항원-결합 단편은 번호가 매겨진 실시양태 3 내지 17에 기재된 CDR 조합 중 임의의 것의 아미노산 서열을 포함하는 CDR을 포함한다. 따라서, 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 항-글리코-MUC1 항체 또는 항원-결합 단편은 서열식별번호(SEQ ID NO): 33의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H1, 서열식별번호: 29의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H2, 서열식별번호: 25의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H3, 서열식별번호: 8의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L1, 서열식별번호: 9의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L2, 및 서열식별번호: 31의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L3을 포함한다. 일부 실시양태에서, CDR-H1은 서열식별번호: 5, 23, 28, 또는 32의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, CDR-H2는 서열식별번호: 6 또는 24의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, CDR-H3은 서열식별번호: 7의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, CDR-L1은 서열식별번호: 30 또는 26의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, CDR-L2는 서열식별번호: 27의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, CDR-L3은 서열식별

번호: 10의 아미노산 서열을 포함한다. 다른 측면에서, 본 개시내용의 항-글리코-MUC1 항체 또는 항원-결합 단편은 서열식별번호: 5-7의 중쇄 CDR 및 서열식별번호: 8-10의 경쇄 CDR을 포함한다. 다른 측면에서, 본 개시내용의 항-글리코-MUC1 항체 또는 항원-결합 단편은 서열식별번호: 23-25의 중쇄 CDR 및 서열식별번호: 26, 27, 및 10의 경쇄 CDR을 포함한다. 다른 측면에서, 본 개시내용의 항-글리코-MUC1 항체 또는 항원-결합 단편은 서열식별번호: 28, 29, 및 25의 중쇄 CDR 및 서열식별번호: 30, 9, 및 31의 경쇄 CDR을 포함한다. 다른 측면에서, 본 개시내용의 항-글리코-MUC1 항체 또는 항원-결합 단편은 서열식별번호: 32, 24, 및 7의 중쇄 CDR 및 서열식별번호: 26, 27, 및 10의 경쇄 CDR을 포함한다. 다른 측면에서, 본 개시내용의 항-글리코-MUC1 항체 또는 항원-결합 단편은 서열식별번호: 33, 29, 및 25의 중쇄 CDR 및 서열식별번호: 8, 9, 및 31의 경쇄 CDR을 포함한다. 항체 또는 항원-결합 단편은 무린, 키메라, 인간화 또는 인간 항체 또는 항원-결합 단편일 수 있다.

[0023] 추가 측면에서, 본 개시내용의 항-글리코-MUC1 항체 또는 항원 결합 단편은 각각 서열식별번호: 3 및 4의 중쇄 및 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체 또는 항원 결합 단편과 경쟁한다. 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 각각 서열식별번호: 3 및 4와의 서열 동일성이 적어도 95%, 98%, 99%, 또는 99.5%인 중쇄 및 경쇄 가변 영역을 갖는 항-MUC1 항체 또는 항원 결합 단편을 제공한다.

[0024] 또 다른 측면에서, 본 개시내용의 항-글리코-MUC1 항체 또는 항원-결합 단편은 단일쇄 가변 단편(scFv)이다. 예시적인 scFv는 경쇄 가변 단편의 N-말단의 중쇄 가변 단편을 포함한다. 일부 실시양태에서, scFv 중쇄 가변 단편 및 경쇄 가변 단편은 아미노산 4-15개의 링커 서열에 공유 결합된다. scFv는 이중특이적 T-세포 인게이저(engager)의 형태일 수 있거나 또는 키메라 항원 수용체(CAR) 내에 있을 수 있다.

[0025] 항-글리코-MUC1 항체 및 항원-결합 단편은 단일쇄 가변 단편의 다량체, 이중특이적 단일쇄 가변 단편 및 이중특이적 단일쇄 가변 단편의 다량체의 형태일 수 있다. 일부 실시양태에서, 단일쇄 가변 단편의 다량체는 2가 단일쇄 가변 단편, 트리바디(tribody) 또는 테트라바디(tetrabody)로부터 선택된다. 이러한 실시양태 중 일부에서, 이중특이적 단일쇄 가변 단편의 다량체는 이중특이적 T-세포 인게이저이다.

[0026] 본 개시내용의 다른 측면은 본 개시내용의 항-글리코-MUC1 항체 및 항체-결합 단편을 코딩하는 핵산에 관한 것이다. 일부 실시양태에서, 항-글리코-MUC1 항체 또는 항원-결합 단편을 코딩하는 핵산의 일부분은 인간 세포에서의 발현에 대해 코돈-최적화된다. 특정 측면에서, 본 개시내용은 서열식별번호: 11 또는 서열식별번호: 13에 대한 서열 동일성이 적어도 95%, 98%, 99%, 또는 99.5%인 중쇄 뉴클레오타이드 서열 및 서열식별번호: 12 또는 서열식별번호: 14에 대한 서열 동일성이 적어도 95%, 98%, 99%, 또는 99.5%인 경쇄 뉴클레오타이드 서열에 의해 코딩되는 중쇄 및 경쇄 가변 영역을 갖는 항-글리코-MUC1 항체 또는 항원 결합 단편을 제공한다. 이러한 핵산을 포함하는 벡터(예를 들어, 바이러스 벡터 예컨대 렌티바이러스 벡터) 및 숙주 세포 또한 본 개시내용의 범주 내에 속한다. 중쇄 및 경쇄 코딩 서열은 단일 벡터 상에 또는 별개의 벡터 상에 존재할 수 있다.

[0027] 본 개시내용의 또 다른 측면은 본 개시내용에 따른 항-글리코-MUC1 항체, 항원-결합 단편, 핵산(또는 핵산 쌍), 벡터(벡터 쌍) 또는 숙주 세포, 및 생리학상 적절한 완충제, 아주반트 또는 희석제를 포함하는 제약 조성물이다.

[0028] 본 개시내용의 또 다른 측면은 본 개시내용에 따른 핵산 또는 벡터를 포함하는 세포를 코딩 영역의 발현에 적절한 조건 하에 인큐베이션하고, 키메라 항원 수용체를 수집하는 것을 포함하는, 키메라 항원 수용체를 제조하는 방법이다.

[0029] 본 개시내용의 또 다른 측면은 세포 또는 조직 샘플을 본 개시내용의 항-글리코-MUC1 항체 또는 항원-결합 단편과 접촉시키고, 항체가 세포 또는 조직 샘플에 결합되는지 여부를 검출하는 것을 포함하는, 암을 검출하는 방법이다.

[0030] 본 개시내용의 또 다른 측면은 예방적 또는 치료적 유효량의 본 개시내용에 따른 항-글리코-MUC1 항체, 항원-결합 단편, 핵산, 벡터, 숙주 세포 또는 제약 조성물을 암 치료를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 암을 치료하는 방법이다.

도면의 간단한 설명

[0031] 4. 도면의 간단한 설명

도 1: MUC1에 비교하여 글리코-MUC1에 대한 G02의 결합의 특이성을 나타내는 ELISA 검정법의 결과.

도 2: 결장암 조직에 대한 G02의 결합. mAb G02를 사용한 침습성 결장 암종 조직 및 인접한 건강한 조직의 면

역조직화학 표지화. mAb G02는 암세포 상에서 세포내 및 표면 구조 양쪽 모두와의 높은 반응성으로 결장암 조직에 대한 명료한 결합을 나타낸다. 대조적으로, 건강한 결장 세포 상의 표면 구조에 대해서는 반응성이 보이지 않는다.

도 3: 췌장암 조직에 대한 G02의 결합. mAb G02를 사용한 췌장암 조직의 면역조직화학 표지화. mAb G02는 췌장암 세포에 대한 명료한 결합을 나타낸다. 대조적으로, 주변의 건강한 조직에 대해서는 반응성이 보이지 않거나 또는 제한된다.

도 4: 유방암 조직에 대한 G02의 결합. mAb G02를 사용한 유방암 조직의 면역조직화학 표지화. mAb G02는 침습성 유방암 세포에 대한 명료한 결합을 나타냈다.

도 5: 항체 G02 및 항-튜불린 작용제 모노메틸 오리스타틴 F (MMAF)에 접합된 2차 항체로의 항체 의존적 세포형 세포독성 검정법의 결과.

도 6: G02를 사용하여 순환 종양 세포를 정량하는 ELISA 검정법의 결과. X-축은 세포의 수를 나타내고, Y-축은 OD450 값을 나타낸다.

도 7a-e: MUC1 양성 TMA 종양 코어의 대표적인 영상. 도 7a: 유방암; 도 7b: 비-소세포 폐암; 도 7c: 난소암; 도 7d: 결장직장암; 도 7e: 전립선암.

도 8: 예시적인 항-글리코-MUC1 및 항-CD3 T-세포 이중특이적 항체 (TCB)의 개략도.

도 9a-b: 소화되지 않은 환자-유래 종양 샘플 (기관지 및 폐의 악성 신생물: 중간엽, 기관지 또는 폐, 편평 세포 암종) 및 50 nM (도 9a) 또는 5 nM (도 9b)의 상이한 TCB들로의 저켓(Jurkat)-NFAT 활성화 검정법.

도 10: 소화되지 않은 환자-유래 종양 샘플 (기관지 및 폐의 악성 신생물; 하엽, 기관지 또는 폐, 비-각화 편평 세포 암종) 및 50 nM의 상이한 TCB들로의 저켓-NFAT 활성화 검정법.

도 11: 소화되지 않은 환자-유래 종양 샘플 (기관지 및 폐의 악성 신생물; 상엽, 기관지 또는 폐, 파리 유형의 선암종) 및 50 nM의 상이한 TCB들로의 저켓-NFAT 활성화 검정법.

도 12a-12b: 유동 세포측정법에 의해 측정된 MCF7 cs (도 12a) 및 T3M4 pzfV (도 12b) 세포 상에서 발현된 MUC1에 대한 G02 TCB의 결합.

도 13a-x: 2명의 건강한 공여자 (공여자 1 도 13a-13i; 공여자 2 도 13m-13x)로부터의 PBMC의 존재 하의 T3M4 pzfV 상에서의 G02 TCB로의 종양 세포 살해의 유도, 및 CD4 T 세포 및 CD8 T 세포 상에서의 CD25 및 CD69의 상향조절에 의해 측정된 T 세포 활성화, 뿐만 아니라 IL6, IL8, IL10, IFN γ , TNF α 및 그랜자임(Granzyme) B의 방출. 도 13a-13x 각각에 대해 동일한 범례.

도 14a-14f: PBMC의 존재 하의 MCF7 cs 상에서의 G02 TCB로의 종양 세포 살해의 유도 (도 14a-14b) 및 CD8 T 세포 및 CD4 T 세포 상에서의 CD25 및 CD69의 상향조절에 의해 측정된 T 세포 활성화 (각각 도 14c-14f). 도 14a-14f 각각에 대해 동일한 범례.

도 15a-b: MCF10A (인간 비-종양원성 유방 상피 세포주) (도 15a) 및 HBEpiC (인간 기관지 상피 세포) (도 15b)에 대한 G02 TCB 및 HMFG1 TCB의 결합.

도 16a-c: PBMC의 존재 하의 MCF10A 세포 상에서의 G02 TCB 및 HMFG1 TCB로의 종양 세포 살해의 유도 (도 16a) 및 CD4 T 세포 (도 16b) 및 CD8 T 세포 (도 16c) 상에서의 CD25의 상향조절에 의해 측정된 T 세포 활성화.

도 17: 글리코펩티드가 커플링된 유동 셀을 관류하는 G02 및 G02 TCB의 도해.

도 18a-b: 인간 및 시노물구스 글리코펩티드에 대한 G02 (도 18a) 및 G02 TCB (도 18b)의 결합을 나타내는 센서 그래프.

도 19a-d: 인간 및 시노물구스 글리코펩티드에 대한 G02 항체 (도 19a-19b) 및 G02 TCB (도 19c-19d)의 결합 (결합력), 및 "겉보기" KD의 추정치.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

5. 상세한 설명

5.1 항체

[0032]

[0033]

- [0034] 본 발명가들은 종양 세포 상에 존재하는 글리코형태의 MUC1에 대해 지시된 신규 항체를 개발하였다. 이는 본원에서 "G02"로 지칭되는 항체 5F7에 의해 예시된다. 종양 세포 상에 존재하는 MUC1의 글리코실화 패턴을 모방하도록 정제된 재조합 인간 글리코실트랜스퍼라제 폴리펩티드 GalNAc-T2, GalNAc-T4, 및 GalNAc-T1로 글리코실화된, MUC1에 존재하는 일련 반복물 중 하나인 VTSAPDTRPAPGSTAPPAHG (서열식별번호: 50)의 3개의 사본을 나타내는 글리코실화 60량체에 결합하는 항체에 대한 스크린에서 G02가 확인되었다.
- [0035] 항체 G02로 예시되는 본 개시내용의 항-글리코-MUC1 항체는 암 진단 및 요법에서 도구로서 유용하다.
- [0036] 따라서, 특정 측면에서, 본 개시내용은 종양 세포 상에 존재하는 글리코형태의 MUC1 (본원에서 "글리코-MUC1"으로 지칭됨), 바람직하게는 미국 특허 번호 6,465,220에 기술된 바와 같이 GalNAc-T2, GalNAc-T4, 및 GalNAc-T1로 글리코실화된 60량체 펩티드 (VTSAPDTRPAPGSTAPPAHG)₃ (서열식별번호: 47)에 결합하는 항체 및 항원 결합 단편을 제공한다.
- [0037] 본 개시내용의 항-글리코-MUC1 항체는 키메라 항체, 인간화 항체, 인간 항체, 영장류화 항체, 단일쇄 항체, 이중특이적 항체, 이중-가변 도메인 항체 등을 포함하지만 이에 제한되지 않는, 폴리클로날 항체, 모노클로날 항체, 유전자 조작 항체, 및/또는 다른 식으로 성질이 변형된 항체일 수 있다. 다양한 실시양태에서, 항체는 항체의 불변 영역 전체 또는 이의 일부분을 포함한다. 일부 실시양태에서, 불변 영역은 IgA (예를 들어, IgA₁ 또는 IgA₂), IgD, IgE, IgG (예를 들어, IgG₁, IgG₂, IgG₃ 또는 IgG₄), 및 IgM으로부터 선택된 아이소형이다. 구체적인 실시양태에서, 본 개시내용의 항-글리코-MUC1 항체는 IgG₁ 불변 영역 아이소타입을 포함한다.
- [0038] 본원에서 사용된 바와 같은 용어 "모노클로날 항체"는 하이브리도마 기술을 통해 생산된 항체에 제한되지 않는다. 모노클로날 항체는 관련 분야에서 이용가능하거나 또는 공지되어 있는 임의의 수단에 의해 임의의 진핵생물, 원핵생물 또는 파지 클론을 포함하는 단일 클론으로부터 유래된다. 본 개시내용에 유용한 모노클로날 항체는 하이브리도마, 재조합, 및 파지 디스플레이 기술, 또는 이의 조합을 사용하는 것을 포함하여, 관련 분야에 공지되어 있는 광범위한 기술을 사용하여 제조될 수 있다. 인간에서의 항-글리코-MUC1 항체의 생체내 용도를 포함하는 다수의 본 개시내용의 용도에서, 키메라, 영장류화, 인간화 또는 인간 항체가 적절하게 사용될 수 있다.
- [0039] 본원에서 사용된 바와 같은 용어 "키메라" 항체는 비-인간 면역글로불린, 예컨대 래트 또는 마우스 항체로부터 유래된 가변 서열, 및 인간 면역글로불린 불변 영역, 전형적으로는 인간 면역글로불린 주형으로부터 선택된 것이 있는 항체를 지칭한다. 키메라 항체를 생산하는 방법이 관련 분야에 공지되어 있다. 예를 들어, 문헌 [Morrison, 1985, Science 229(4719):1202-7]; [Oi et al., 1986, BioTechniques 4:214-221]; [Gillies et al., 1985, J. Immunol. Methods 125:191-202]; 미국 특허 번호 5,807,715; 4,816,567; 및 4,816,397을 참조하고, 이들은 전문이 본원에 참조로 포함된다.
- [0040] 비-인간 (예를 들어, 무린) 항체의 "인간화" 형태는 비-인간 면역글로불린으로부터 유래된 최소 서열을 함유하는 키메라 면역글로불린이다. 일반적으로, 인간화 항체는 적어도 1개, 전형적으로는 2개의 가변 도메인을 실질적으로 모두 포함할 것이고, 여기서 모든 또는 실질적으로 모든 CDR 영역은 비-인간 면역글로불린의 것에 상응하고, 모든 또는 실질적으로 모든 FR 영역은 인간 면역글로불린 서열의 것이다. 인간화 항체는 면역글로불린 불변 영역 (Fc)의 적어도 일부분, 전형적으로는 인간 면역글로불린 컨센서스 서열의 것을 또한 포함할 수 있다. 항체 인간화 방법이 관련 분야에 공지되어 있다. 예를 들어, 문헌 [Riechmann et al., 1988, Nature 332:323-7]; 미국 특허 번호 5,530,101; 5,585,089; 5,693,761; 5,693,762; 및 6,180,370 (퀸(Queen) 등); EP239400; PCT 공개 WO 91/09967; 미국 특허 번호 5,225,539; EP592106; EP519596; [Padlan, 1991, Mol. Immunol., 28:489-498]; [Studnicka et al., 1994, Prot. Eng. 7:805-814]; [Roguska et al., 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. 91:969-973]; 및 미국 특허 번호 5,565,332를 참조하고, 이들 모두는 이에 의해 전문이 참조로 포함된다.
- [0041] "인간 항체"는 인간 면역글로불린의 아미노산 서열을 갖는 항체를 포함하고, 인간 면역글로불린 라이브러리로부터 또는 하나 이상의 인간 면역글로불린에 대해 트랜스제닉이고 내인성 면역글로불린을 발현하지 않는 동물로부터 단리된 항체를 포함한다. 인간 항체는 인간 면역글로불린 서열로부터 유래된 항체 라이브러리를 사용하는 파지 디스플레이 방법을 포함하여, 관련 분야에 공지되어 있는 다양한 방법에 의해 제조될 수 있다. 미국 특허 번호 4,444,887 및 4,716,111; 및 PCT 공개 WO 98/46645; WO 98/50433; WO 98/24893; WO 98/16654; WO 96/34096; WO 96/33735; 및 WO 91/10741을 참조하고, 이들 각각은 전문이 본원에 참조로 포함된다. 인간 항체는 기능성의 내인성 면역글로불린을 발현할 수 없지만, 인간 면역글로불린 유전자를 발현할 수 있는 트랜스제닉 마우스를 사용하여 또한 생산될 수 있다. 예를 들어, PCT 공개 WO 98/24893; WO 92/01047; WO 96/34096; WO

96/33735; 미국 특허 번호 5,413,923; 5,625,126; 5,633,425; 5,569,825; 5,661,016; 5,545,806; 5,814,318; 5,885,793; 5,916,771; 및 5,939,598을 참조하고, 이들은 전문이 본원에 참조로 포함된다. "유도 선택"으로 지칭되는 기술을 사용하여, 선택된 에피토프를 인식하는 완전히 인간형인 항체가 생성될 수 있다. 이러한 접근법에서, 선택된 비-인간 모노클로날 항체, 예를 들어, 마우스 항체가 동일한 에피토프를 인식하는 완전히 인간형 항체의 선택을 유도하는데 사용된다 (문헌 [Jespers et al., 1988, Biotechnology 12:899-903]을 참조한다).

[0042] "영장류화 항체"는 원숭이 가변 영역 및 인간 불변 영역을 포함한다. 영장류화 항체를 생산하는 방법이 관련 분야에 공지되어 있다. 예를 들어, 미국 특허 번호 5,658,570; 5,681,722; 및 5,693,780을 참조하고, 이들은 전문이 본원에 참조로 포함된다.

[0043] 본 개시내용의 항-글리코-MUC1 항체는 전장 (무손상) 항체 분자, 뿐만 아니라 글리코-MUC1에 결합할 수 있는 항원-결합 단편 양쪽 모두를 포함한다. 항원-결합 단편의 예는, 예를 들어, 그리고 비제한적으로, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv 단편, 단일쇄 Fv 단편 및 단일 도메인 단편을 포함한다.

[0044] Fab 단편은 경쇄의 불변 도메인 (CL) 및 중쇄의 제1 불변 도메인 (CH1)을 함유한다. Fab' 단편은 항체 힌지 영역으로부터의 하나 이상의 시스테인을 포함하여 중쇄 CH1 도메인의 카르복실 말단에서 소수의 잔기가 부가되는 것에 의해 Fab 단편과 상이하다. F(ab') 단편은 F(ab')₂ 캡신 소화 생성물의 힌지 시스테인의 디설피드 결합의 절단에 의해 생산된다. 항체 단편의 추가적인 화학적 커플링이 관련 분야의 통상의 기술자에게 공지되어 있다. Fab 및 F(ab')₁ 단편은 무손상 항체의 Fc 단편이 결여되어, 동물의 순환으로부터 더욱 신속하게 소거되고, 무손상 항체보다 비-특이적 조직 결합이 더 적을 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Wahl et al., 1983, J. Nucl. Med. 24:316]을 참조한다).

[0045] "Fv" 단편은 완전한 표적 인식 및 결합 부위를 함유하는 항체의 최소 단편이다. 이러한 영역은 단단하게 비-공유 회합된 1개의 중쇄 및 1개의 경쇄 가변 도메인의 이량체로 이루어진다 (V_H-V_L 이량체). 이러한 형상에서, 각각의 가변 도메인의 3개의 CDR이 상호작용하여 V_H-V_L 이량체의 표면 상의 표적 결합 부위를 규정한다. 종종, 6개의 CDR이 항체에 표적 결합 특이성을 부여한다. 그러나, 일부 경우에, 단일 가변 도메인 (또는 표적에 대해 특이적인 3개의 CDR만 포함하는 Fv의 절반)조차도, 비록 전체 결합 부위보다는 더 낮은 친화력이지만, 표적을 인식하고 이에 결합하는 능력을 가질 수 있다.

[0046] "단일쇄 Fv" 또는 "scFv" 항원-결합 단편은 항체의 V_H 및 V_L 도메인을 포함하고, 여기서 이러한 도메인들은 단일 폴리펩티드 사슬 내에 존재한다. 일반적으로, Fv 폴리펩티드는 V_H 도메인과 V_L 도메인 사이에 scFv가 표적 결합을 위한 원하는 구조를 형성할 수 있게 하는 폴리펩티드 링커를 추가로 포함한다.

[0047] "단일 도메인 항체"는 글리코-MUC1에 대한 충분한 친화력을 나타내는 단일한 V_H 또는 V_L 도메인으로 구성된다. 구체적 실시양태에서, 단일 도메인 항체는 낙타화 항체이다 (예를 들어, 문헌 [Riechmann, 1999, Journal of Immunological Methods 231:25-38]을 참조한다).

[0048] 본 개시내용의 항-글리코-MUC1 항체는 또한 이중특이적 및 기타 다중특이적 항체일 수 있다. 이중특이적 항체는 동일한 또는 상이한 항원 상의 2개의 상이한 에피토프에 대한 결합 특이성이 있는 모노클로날 항체이고, 종종 인간 또는 인간화 항체이다. 본 개시내용에서, 결합 특이성 중 하나는 글리코-MUC1을 향해 지시될 수 있고, 나머지는 임의의 다른 항원, 예를 들어, 세포-표면 단백질, 수용체, 수용체 서브유닛, 조직-특이적 항원, 바이러스에서 유래된 단백질, 바이러스에 의해 코딩되는 외피 단백질, 박테리아에서 유래된 단백질, 또는 박테리아 표면 단백질 등에 대한 것일 수 있다. 특정한 바람직한 실시양태에서, 이중특이적 및 기타 다중특이적 항-글리코-MUC1 항체 및 항원 결합 단편은 제2 MUC1 에피토프, 암세포 상에서 MUC1과 함께 공동-발현된 또 다른 단백질 상의 에피토프, 또는 상이한 세포, 예컨대 활성화된 T 세포 상에 제시된 또 다른 단백질 상의 에피토프에 특이적으로 결합한다. 본 개시내용의 이중특이적 항체는 IgG 양식 이중특이적 항체 및 단일쇄-기반 이중특이적 항체를 포함한다.

[0049] 본 개시내용의 IgG 양식 이중특이적 항체는 관련 분야에 공지된 다양한 유형의 IgG 양식 이중특이적 항체 중 임의의 것, 예컨대 쿼드로마(quadroma) 이중특이적 항체, "노브-인-홀(knobs-in-holes)" 이중특이적 항체, 크로스맵((CrossMab)) 이중특이적 항체, 전하-쌍 이중특이적 항체, 통상적인 경쇄 이중특이적 항체, 1-아암 단일쇄 Fab-면역글로불린 감마 이중특이적 항체, 디설피드 안정화 Fv 이중특이적 항체, 듀엣맵(DuetMab), 제어형 Fab-

아암 교환 이중특이적 항체, 가닥-교환 조작 도메인 바디 이중특이적 항체, 2-아암 류신 지퍼 이중이량체성 모노클로날 이중특이적 항체, $\kappa\lambda$ -바디 이중특이적 항체, 이중 가변 도메인 이중특이적 항체, 및 교차 이중 가변 도메인 이중특이적 항체일 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Koehler and Milstein, 1975, Nature 256:495-497]; [Milstein and Cuello, 1983, Nature 305:537-40]; [Ridgway et al., 1996, Protein Eng. 9:617-621]; [Schaefer et al., 2011, Proc Natl Acad Sci USA 108:11187-92]; [Gunasekaran et al., 2010, J Biol Chem 285:19637-46]; [Fischer et al., 2015 Nature Commun 6:6113]; [Schanzer et al., 2014, J Biol Chem 289:18693-706]; [Metz et al., 2012 Protein Eng Des Sel 25:571-80]; [Mazor et al., 2015 MAbs 7:377-89]; [Labriijn et al., 2013 Proc Natl Acad Sci USA 110:5145-50]; [Davis et al., 2010 Protein Eng Des Sel 23:195-202]; [Wranik et al., 2012, J Biol Chem 287:43331-9]; [Gu et al., 2015, PLoS One 10(5):e0124135]; [Steinmetz et al., 2016, MAbs 8(5):867-78]; [Klein et al., 2016, mAbs, 8(6):1010-1020]; [Liu et al., 2017, Front. Immunol. 8:38]; 및 [Yang et al., 2017, Int. J. Mol. Sci. 18:48]을 참조하고, 이들은 전문이 본원에 참조로 포함된다.

[0050] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 이중특이적 항체는 크로스맵이다. 크로스맵 기술이 WO 2009/080251, WO 2009/080252, WO 2009/080253, WO 2009/080254, WO 2013/026833, WO 2016/020309, 및 문헌 [Schaefer et al., 2011, Proc Natl Acad Sci USA 108:11187-92]에 상세하게 기술되어 있고, 이들은 전문이 본원에 참조로 포함된다. 간략하게, 크로스맵 기술은 올바른 사슬 회합을 촉진하는, 이중특이적 IgG의 1개의 Fab-아암 내의 중쇄와 경쇄 사이의 도메인 교차를 기초로 한다. 본 개시내용의 크로스맵 이중특이적 항체는 이중특이적 IgG 항체의 1개의 아암의 Fab 부분의 중쇄 및 경쇄가 교환된 "크로스맵^{FAB}" 항체일 수 있다. 다른 실시양태에서, 본 개시내용의 크로스맵 이중특이적 항체는 이중특이적 IgG 항체의 1개의 아암의 Fab 부분의 중쇄 및 경쇄의 가변 도메인만 교환된 "크로스맵^{VH-VL}" 항체일 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 본 개시내용의 크로스맵 이중특이적 항체는 이중특이적 IgG 항체의 1개의 아암의 Fab 부분의 중쇄 및 경쇄의 불변 도메인만 교환된 "크로스맵^{CH1-CL}" 항체일 수 있다. 크로스맵^{CH1-CL} 항체는, 크로스맵^{FAB} 및 크로스맵^{VH-VL}과 대조적으로, 예상되는 부산물이 없고, 따라서, 일부 실시양태에서 크로스맵^{CH1-CL} 이중특이적 항체가 바람직하다. 문헌 [Klein et al., 2016, mAbs, 8(6):1010-1020]을 참조한다. 본 개시내용의 크로스맵의 추가 실시양태가 하기 섹션 5.2에서 기술된다.

[0051] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 이중특이적 항체는 제어형 Fab-아암 교환 이중특이적 항체이다. Fab-아암 교환 이중특이적 항체를 제조하는 방법이 전문이 본원에 참조로 포함된 PCT 공개 번호 WO2011/131746 및 문헌 [Labriijn et al., 2014 Nat Protoc. 9(10):2450-63]에 기술되어 있다. 간략하게, CH3 도메인 내에 단일한 매칭되는 점 돌연변이를 함유하는 2개의 모체 IgG1을 별개로 발현시키고, 모체 IgG1을 시험관 내에서 산화환원 조건 하에 혼합하여 절반-분자의 재조합을 가능하게 하고, 환원제를 제거하여 사슬간 디설피드 결합의 재산화를 허용함으로써, 이중특이적 항체를 형성시키는 것에 의해 제어형 Fab-아암 교환 이중특이적 항체가 제조될 수 있다.

[0052] 본 개시내용의 이중특이적 항체는 제1 및 제2 서브유닛으로 구성된 Fc 도메인을 포함할 수 있다. 한 실시양태에서, Fc 도메인은 IgG Fc 도메인이다. 특정한 실시양태에서, Fc 도메인은 IgG₁ Fc 도메인이다. 또 다른 실시양태에서, Fc 도메인은 IgG₄ Fc 도메인이다. 더욱 구체적인 실시양태에서, Fc 도메인은 위치 S228 (카바트 EU 인덱스 번호매김)의 아미노산 치환, 특히 아미노산 치환 S228P를 포함하는 IgG₄ Fc 도메인이다. 이러한 아미노산 치환은 생체 내에서 IgG₄ 항체의 Fab 아암 교환을 감소시킨다 (문헌 [Stubenrauch et al., 2010, Drug Metabolism and Disposition 38:84-91]을 참조한다). 추가의 특정한 실시양태에서, Fc 도메인은 인간 Fc 도메인이다. 더욱 더 특정한 실시양태에서, Fc 도메인은 인간 IgG₁ Fc 도메인이다. 인간 IgG₁ Fc 영역의 예시적인 서열이 서열식별번호: 42에서 제공된다.

[0053] 특정 실시양태에서, Fc 도메인은 Fc 도메인의 제1 및 제2 서브유닛의 회합을 촉진하는 변형을 포함한다. 인간 IgG Fc 도메인의 2개의 서브유닛 사이의 가장 광범위한 단백질-단백질 상호작용의 부위는 CH3 도메인 내에 있다. 따라서, 한 실시양태에서, 상기 변형은 Fc 도메인의 CH3 도메인 내에 있다.

[0054] 구체적 실시양태에서, Fc 도메인의 제1 및 제2 서브유닛의 회합을 촉진하는상기 변형은 Fc 도메인의 2개의 서브유닛 중 하나 내의 "노브" 변형 및 Fc 도메인의 2개의 서브유닛 중 다른 하나 내의 "홀" 변형을 포함하는 소위 "노브-인투-홀(knob-into-hole)" 변형이다. 노브-인투-홀 기술이, 예를 들어, US 5,731,168; US 7,695,936; 문헌 [Ridgway et al., 1996, Prot Eng 9:617-621], 및 [Carter, J, 2001, Immunol Meth 248:7-15]에 기술되

어 있다. 일반적으로, 이러한 방법은 이종이량체 형성을 촉진하고 동종이량체 형성을 방해하도록 용기가 공동 내에 위치할 수 있도록 제1 폴리펩티드의 계면에서의 용기 ("노브") 및 제2 폴리펩티드의 계면 내의 상응하는 공동 ("홀")을 도입하는 것을 수반한다. 용기는 제1 폴리펩티드의 계면으로부터의 소형 아미노산 측쇄를 더 큰 측쇄 (예를 들어, 타이로신 또는 트립토판)로 교체함으로써 구축된다. 대형 아미노산 측쇄를 더 작은 것 (예를 들어 알라닌 또는 트레오닌)으로 교체함으로써 용기와 동일하거나 더 작은 크기의 보상적인 공동이 제2 폴리펩티드의 계면에서 생성된다.

[0055] 따라서, 일부 실시양태에서, Fc 도메인의 제1 서브유닛의 CH3 도메인 내의 아미노산 잔기가 측쇄 부피가 더 큰 아미노산 잔기로 교체되고, 이에 의해 제2 서브유닛의 CH3 도메인 내의 공동에 위치할 수 있는 제1 서브유닛의 CH3 도메인 내의 용기가 생성되며, Fc 도메인의 제2 서브유닛의 CH3 도메인 내의 아미노산 잔기가 측쇄 부피가 더 작은 아미노산 잔기로 교체되고, 이에 의해 제1 서브유닛의 CH3 도메인 내의 용기가 내부에 위치할 수 있는 제2 서브유닛의 CH3 도메인 내의 공동이 생성된다. 바람직하게는, 측쇄 부피가 더 큰 상기 아미노산 잔기는 아르기닌 (R), 페닐알라닌 (F), 타이로신 (Y), 및 트립토판 (W)으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 바람직하게는, 측쇄 부피가 더 작은 상기 아미노산 잔기는 알라닌 (A), 세린 (S), 트레오닌 (T), 및 발린 (V)으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 용기 및 공동은 예를 들어 부위-특이적 돌연변이유발에 의해 폴리펩티드를 코딩하는 핵산을 변경시킴으로써, 또는 펩티드 합성에 의해 이루어질 수 있다. 예시적인 치환은 Y470T이다.

[0056] 구체적인 이러한 실시양태에서, Fc 도메인의 제1 서브유닛에서 위치 366의 트레오닌 잔기가 트립토판 잔기로 교체되고 (T366W), Fc 도메인의 제2 서브유닛에서 위치 407의 타이로신 잔기가 발린 잔기로 교체되며 (Y407V), 임의적으로 위치 366의 트레오닌 잔기가 세린 잔기로 교체되고 (T366S), 위치 368의 류신 잔기가 알라닌 잔기로 교체된다 (L368A) (카바트 EU 인덱스에 따른 번호매김). 추가 실시양태에서, Fc 도메인의 제1 서브유닛에서 추가적으로 위치 354의 세린 잔기가 시스테인 잔기로 교체되거나 (S354C) 또는 위치 356의 글루탐산 잔기가 시스테인 잔기로 교체되고 (E356C) (특히 위치 354의 세린 잔기가 시스테인 잔기로 교체됨), Fc 도메인의 제2 서브유닛에서 추가적으로 위치 349의 타이로신 잔기가 시스테인 잔기로 교체된다 (Y349C) (카바트 EU 인덱스에 따른 번호매김). 특정한 실시양태에서, Fc 도메인의 제1 서브유닛은 아미노산 치환 S354C 및 T366W를 포함하고, Fc 도메인의 제2 서브유닛은 아미노산 치환 Y349C, T366S, L368A 및 Y407V를 포함한다 (카바트 EU 인덱스에 따른 번호매김).

[0057] 일부 실시양태에서, 정전기 스테어링 (예를 들어, 문헌 [Gunasekaran et al., 2010, J Biol Chem 285(25):19637-46]에 기술된 바와 같음)이 Fc 도메인의 제1 및 제2 서브유닛의 회합을 촉진하는데 사용될 수 있다.

[0058] 일부 실시양태에서, Fc 도메인은 Fc 수용체에 결합하는 것 및/또는 이펙터 기능을 감소시키는 하나 이상의 아미노산 치환을 포함한다.

[0059] 특정한 실시양태에서, Fc 수용체는 Fc γ 수용체이다. 한 실시양태에서, Fc 수용체는 인간 Fc 수용체이다. 한 실시양태에서, Fc 수용체는 활성화 Fc 수용체이다. 구체적인 실시양태에서, Fc 수용체는 활성화 인간 Fc γ 수용체, 더욱 구체적으로는 인간 Fc γ RIIIa, Fc γ RI 또는 Fc γ RIIa, 가장 구체적으로는 인간 Fc γ RIIIa이다. 한 실시양태에서, 이펙터 기능은 보체 의존적 세포독성 (CDC), 항체-의존적 세포-매개 세포독성 (ADCC), 항체-의존적 세포성 포식작용 (ADCP), 및 시토카인 분비의 군으로부터 선택된 하나 이상이다. 특정한 실시양태에서, 이펙터 기능은 ADCC이다.

[0060] 전형적으로, 동일한 하나 이상의 아미노산 치환이 Fc 도메인의 2개의 서브유닛 각각 내에 존재한다. 한 실시양태에서, 하나 이상의 아미노산 치환은 Fc 수용체에 대한 Fc 도메인의 결합 친화력을 감소시킨다. 한 실시양태에서, 하나 이상의 아미노산 치환은 Fc 수용체에 대한 Fc 도메인의 결합 친화력을 적어도 2배, 적어도 5배 또는 적어도 10배만큼 감소시킨다.

[0061] 한 실시양태에서, Fc 도메인은 E233, L234, L235, N297, P331 및 P329의 군으로부터 선택된 위치에서의 아미노산 치환을 포함한다 (카바트 EU 인덱스에 따른 번호매김). 더욱 구체적인 실시양태에서, Fc 도메인은 L234, L235 및 P329의 군으로부터 선택된 위치에서의 아미노산 치환을 포함한다 (카바트 EU 인덱스에 따른 번호매김). 일부 실시양태에서, Fc 도메인은 아미노산 치환 L234A 및 L235A를 포함한다 (카바트 EU 인덱스에 따른 번호매김). 한 이러한 실시양태에서, Fc 도메인은 IgG₁ Fc 도메인, 특히 인간 IgG₁ Fc 도메인이다. 한 실시양태에서, Fc 도메인은 위치 P329에서의 아미노산 치환을 포함한다. 더욱 구체적인 실시양태에서, 아미노산 치환은 P329A 또는 P329G, 특히 P329G이다 (카바트 EU 인덱스에 따른 번호매김). 한 실시양태에서, Fc 도메인은 P329에서의 아미노산 치환 및 E233, L234, L235, N297 및 P331로부터 선택된 위치에서의 추가의 아미노산 치환

을 포함한다 (카바트 EU 인덱스에 따른 번호매김). 더욱 구체적인 실시양태에서, 추가의 아미노산 치환은 E233P, L234A, L235A, L235E, N297A, N297D 또는 P331S이다. 특정 실시양태에서, Fc 도메인은 위치 P329, L234 및 L235에서의 아미노산 치환을 포함한다 (카바트 EU 인덱스에 따른 번호매김). 더욱 특정한 실시양태에서, Fc 도메인은 아미노산 돌연변이 L234A, L235A 및 P329G ("P329G LALA", "PGLALA" 또는 "LALAPG")를 포함한다. 구체적으로, 특정 실시양태에서, Fc 도메인의 각각의 서브유닛은 아미노산 치환 L234A, L235A 및 P329G를 포함하고 (카바트 EU 인덱스 번호매김), 즉, Fc 도메인의 제1 및 제2 서브유닛 각각에서, 위치 234의 류신 잔기는 알라닌 잔기로 교체되고 (L234A), 위치 235의 류신 잔기는 알라닌 잔기로 교체되며 (L235A), 위치 329의 프롤린 잔기는 글리신 잔기로 교체된다 (P329G) (카바트 EU 인덱스에 따른 번호매김). 한 이러한 실시양태에서, Fc 도메인은 IgG₁ Fc 도메인, 특히 인간 IgG₁ Fc 도메인이다.

[0062] 본 개시내용의 단일쇄-기반 이중특이적 항체는 관련 분야에 공지되어 있는 다양한 유형의 단일쇄-기반 이중특이적 항체, 예컨대 이중특이적 T-세포 인계이저 (BiTE), 디아바디, 일렬 디아바디 (탠답(tandab)), 이중-친화성 재표적화 분자 (DART), 및 이중특이적 킬러 세포 인계이저 중 임의의 것일 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Loeffler et al., 2000, Blood 95:2098-103]; [Holliger et al., 1993, Proc Natl Acad Sci USA, 90:6444-8]; [Kipriyanov et al., 1999, Mol Biol 293:41-56]; [Johnson et al., 2010, Mol Biol 399:436-49]; [Wiernik et al., 2013, Clin Cancer Res 19:3844-55]; [Liu et al., 2017, Front. Immunol. 8:38]; 및 [Yang et al., 2017, Int. J. Mol. Sci. 18:48]을 참조하고, 이들은 전문이 본원에 참조로 포함된다.

[0063] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 이중특이적 항체는 이중특이적 T-세포 인계이저 (BiTE)이다. BiTE는 하나는 T-세포 항원에 결합하고 두번째 것은 표적의 표면 상에 존재하는 항원에 결합하는 2개의 항원-결합 도메인을 갖는 단일 폴리펩티드 사슬 분자이다 (전문이 본원에 참조로 포함된 PCT 공개 WO 05/061547; 문헌 [Baeuerle et al., 2008, Drugs of the Future 33: 137-147]; [Bargou, et al., 2008, Science 321:974-977]을 참조한다). 따라서, 본 개시내용의 BiTE는 T-세포 항원에 결합하는 항원 결합 도메인, 및 글리코-MUC1에 대해 지시된 제2 항원 결합 도메인을 갖는다.

[0064] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 이중특이적 항체는 이중-친화성 재표적화 분자 (DART)이다. DART는 동일하거나 또는 상이한 에피토프를 인식할 수 있는 적어도 2개의 에피토프 결합 부위를 형성하도록 (특히 공유 상호작용을 통해) 회합되는 적어도 2개의 폴리펩티드 사슬을 포함한다. DART의 각각의 폴리펩티드 사슬은 면역글로불린 경쇄 가변 영역 및 면역글로불린 중쇄 가변 영역을 포함하지만, 이러한 영역들은 에피토프 결합 부위를 형성하도록 상호작용하지 않는다. 그보다는, DART 폴리펩티드 사슬 중 하나 (예를 들어, 제1 사슬)의 면역글로불린 중쇄 가변 영역이 상이한 (예를 들어, 제2) DART™ 폴리펩티드 사슬의 면역글로불린 경쇄 가변 영역과 상호작용하여 에피토프 결합 부위를 형성한다. 유사하게, DART 폴리펩티드 사슬 중 하나 (예를 들어, 제1 사슬)의 면역글로불린 경쇄 가변 영역이 상이한 (예를 들어, 제2) DART 폴리펩티드 사슬의 면역글로불린 중쇄 가변 영역과 상호작용하여 에피토프 결합 부위를 형성한다. DART는 단일특이적, 이중특이적, 삼중특이적 등일 수 있고, 따라서 1개, 2개, 3개 또는 이를 초과하는 개수의 상이한 에피토프 (이는 동일한 항원 또는 상이한 항원의 것일 수 있다)에 동시에 결합할 수 있다. DART는 추가적으로 1가, 2가, 3가, 4가, 5가, 6가 등일 수 있고, 따라서 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개 또는 이를 초과하는 개수의 분자에 동시에 결합할 수 있다. 예를 들어 4가 (즉, 4 셋트의 에피토프에 결합할 수 있음)인 이중특이적 항체 (즉, 2가지 에피토프에 결합할 수 있음) 등이 생산되도록, DART의 이러한 2가지 속성 (즉, 특이성 및 결합가의 정도)가 조합될 수 있다. PCT 공개 WO 2006/113665, WO 2008/157379, 및 WO 2010/080538에 DART 분자가 개시되어 있고, 이들은 전문이 본원에 참조로 포함된다.

[0065] 본 개시내용의 이중특이적 항체의 일부 실시양태에서, 결합 특이성 중 하나는 글리코-MUC1에 대해 지시되고, 나머지는 면역 이펙터 세포 상에서 발현되는 항원에 대해 지시된다. 본원에서 사용된 바와 같은 용어 "면역 이펙터 세포" 또는 "이펙터 세포"는 표적 세포의 생존율에 영향을 미치도록 활성화될 수 있는 포유동물 면역계 내의 천연 세포 레퍼토리 내의 세포를 지칭한다. 면역 이펙터 세포는 림프 계통의 세포 예컨대 천연 킬러 (NK) 세포, 세포독성 T 세포를 포함하는 T 세포, 또는 B 세포를 포함하지만, 골수 계통의 세포, 예컨대 단핵구 또는 대식세포, 수지상 세포 및 호중성 과립구 또한 면역 이펙터 세포로서 간주될 수 있다. 따라서, 상기 이펙터 세포는 바람직하게는 NK 세포, T 세포, B 세포, 단핵구, 대식세포, 수지상 세포 또는 호중성 과립구이다. 이펙터 세포가 이상 세포에 동원되는 것은 이펙터 세포가 자신이 동원된 이상 세포를 직접적으로 살해할 수 있거나 또는 간접적으로 이의 살해를 개시할 수 있도록 면역 이펙터 세포가 이상 표적 세포에 근접하게 되는 것을 의미한다. 비-특이적 상호작용을 피하기 위해, 본 개시내용의 이중특이적 항체가 신체 내의 다른 세포에 비교하여 면역 이펙터 세포에 의해 적어도 과발현되는 면역 이펙터 세포 상의 항원을 특이적으로 인식하는 것이 바람직하다. 면역 이펙터 세포 상에 존재하는 표적 항원은 CD3, CD8, CD16, CD25, CD28, CD64, CD89, NKG2D

및 Nkp46을 포함할 수 있다. 바람직하게는, 면역 이펙터 세포 상의 항원은 T 세포 상에서 발현된 CD3이다.

[0066] 본원에서 사용된 바와 같이, "CD3"은 달리 지시되지 않는 한 포유동물 예컨대 영장류 (예를 들어 인간), 비-인간 영장류 (예를 들어 시노물구스 원숭이) 및 설치류 (예를 들어 마우스 및 래트)를 포함하는 임의의 척추동물 공급원으로부터의 임의의 천연 CD3를 지칭한다. 이러한 용어는 "전장"의 프로세싱되지 않은 CD3, 뿐만 아니라 세포에서의 프로세싱으로부터 초래되는 임의 형태의 CD3를 포괄한다. 이러한 용어는 CD3의 천연 발생 변이체, 예를 들어, 스플라이스 변이체 또는 대립유전자 변이체를 또한 포괄한다. 면역 이펙터 세포 상의 가장 바람직한 항원은 CD3 엡실론 사슬이다. 이러한 항원은 T 세포를 이상 세포로 동원시키는데 매우 효과적인 것으로 나타났다. 따라서, 바람직하게는 본 개시내용의 이중특이적 항체는 CD3 엡실론을 특이적으로 인식한다. 인간 CD3 엡실론의 아미노산 서열이 UniProt (www.uniprot.org) 수탁 번호 P07766 (버전 144), 또는 NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/) RefSeq NP_000724.1에서 제시된다. 시노물구스 [마카카 파시쿨라리스(*Macaca fascicularis*)] CD3 엡실론의 아미노산 서열이 NCBI 진뱅크(GenBank) 번호 BAB71849.1에서 제시된다. 인간 치료 용도의 경우, CD3-결합 도메인이 인간 CD3 (예를 들어, 인간 CD3 엡실론 사슬)에 특이적으로 결합하는 이중 특이적 항체가 사용된다. 비-인간 동물 및 세포주에서의 임상전 테스트의 경우, CD3-결합 도메인이 임상전 테스트에 이용되는 종에서의 CD3 (예를 들어, 영장류 테스트의 경우 시노물구스 CD3)에 특이적으로 결합하는 이중 특이적 항체가 사용될 수 있다.

[0067] 본원에서 사용된 바와 같이, 특정 종으로부터의 표적 항원에 "특이적으로 결합하는" 또는 이를 "특이적으로 인식하는" 결합 도메인은 다른 종으로부터의 항원에 결합하는 것 또는 이의 인식을 배제하지 않고, 따라서 결합 도메인 중 하나 이상이 중간 교차반응성을 갖는 항체를 포괄한다. 예를 들어, 인간 CD3에 "특이적으로 결합하는" 또는 이를 "특이적으로 인식하는" CD3-결합 도메인이 또한 시노물구스 CD3에 결합하거나 이를 인식할 수 있고, 반대도 마찬가지이다.

[0068] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 이중특이적 항체는 CD3의 에피토프에 결합하는 것에 대해 모노클로날 항체 H2C (PCT 공개 번호 W02008/119567에 기술됨)와 경쟁할 수 있다. 다른 실시양태에서, 본 개시내용의 이중특이적 항체는 CD3의 에피토프에 결합하는 것에 대해 모노클로날 항체 V9 (문헌 [Rodrigues et al., 1992, Int J Cancer Suppl 7:45-50] 및 미국 특허 번호 6,054,297에 기술됨)와 경쟁할 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 본 개시내용의 이중특이적 항체는 CD3의 에피토프에 결합하는 것에 대해 모노클로날 항체 FN18 (문헌 [Nooij et al., 1986, Eur J Immunol 19:981-984]에 기술됨)와 경쟁할 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 본 개시내용의 이중특이적 항체는 CD3의 에피토프에 결합하는 것에 대해 모노클로날 항체 SP34 (문헌 [Pessano et al., 1985, EMBO J 4:337-340]에 기술됨)와 경쟁할 수 있다.

[0069] 본 개시내용의 항-글리코-MUC1 항체는 유도체화 항체를 포함한다. 예를 들어, 그러나 비제한적으로, 유도체화 항체는 전형적으로 글리코실화, 아세틸화, PEG화, 인산화, 아마이드화, 공지된 보호/차단 기에 의한 유도체화, 단백질분해성 절단, 세포성 리간드 또는 다른 단백질에 연결되는 것에 의해 변형된다. 다수의 화학적 변형 중 임의의 것이 특정한 화학적 절단, 아세틸화, 포르밀화, 투니카마이신의 대사성 합성 등을 포함하지만 이에 제한되지 않는 공지된 기술에 의해 수행될 수 있다. 추가적으로, 예를 들어, 앰브릭스(ambrx) 기술을 사용하여, 유도체는 하나 이상의 비-천연 아미노산을 함유할 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Wolfson, 2006, Chem. Biol. 13(10):1011-2]을 참조한다).

[0070] 항-글리코-MUC1 항체 또는 결합 단편은 적어도 하나의 불변 영역-매개 생물학적 이펙터 기능을 변경시키도록 서열이 변형된 항체 또는 단편일 수 있다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 항-글리코-MUC1 항체는 미변형 항체에 비해 적어도 하나의 불변 영역-매개 생물학적 이펙터 기능을 감소시키도록, 예를 들어, Fc 수용체 (FcγR)에 결합하는 것을 감소시키도록 변형될 수 있다. FcγR 결합은 FcγR 상호작용에 필요한 특정 영역에서 항체의 면역 글로불린 불변 영역 분절을 돌연변이시킴으로써 감소될 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Canfield and Morrison, 1991, J. Exp. Med. 173:1483-1491]; 및 [Lund et al., 1991, J. Immunol. 147:2657-2662]을 참조한다). 항체의 FcγR 결합 능력의 감소는 FcγR 상호작용에 의존하는 다른 이펙터 기능, 예컨대 옵소닌화, 포식작용 및 항원-의존적 세포형 세포독성 ("ADCC")을 또한 감소시킬 수 있다.

[0071] 본원에 기술된 항-글리코-MUC1 항체 또는 결합 단편은 미변형 항체에 비교하여 적어도 하나의 불변 영역-매개 생물학적 이펙터 기능을 획득하거나 개선시키도록, 예컨대 FcγR 상호작용을 강화하도록 변형된 항체 및/또는 결합 단편을 포함한다 (예를 들어, US 2006/0134709를 참조한다). 예를 들어, 본 개시내용의 항-글리코-MUC1 항체는 상응하는 야생형 불변 영역보다 더 큰 친화력으로 FcγRIIA, FcγRIIB 및/또는 FcγRIIIA에 결합하는 불변 영역을 가질 수 있다.

- [0072] 따라서, 본 개시내용의 항체는 옅소닌화, 포식작용, 또는 ADCC 증가 또는 감소를 초래하는 생물학적 활성의 변경이 있을 수 있다. 이러한 변경은 관련 분야에 공지되어 있다. 예를 들어, ADCC 활성을 감소시키는 항체의 변형이 미국 특허 번호 5,834,597에 기술되어 있다. 예시적인 ADCC 저하 변이체는 잔기 236이 결실되고 잔기 234, 235 및 237 (EU 번호해감을 사용함)이 알라닌으로 치환된 "돌연변이체 3" (미국 특허 번호 5,834,597의 도 4에 제시됨)에 상응한다
- [0073] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 항-글리코-MUC1 항체는 푸코스 수준이 낮거나 또는 푸코스가 결여된다. 푸코스가 결여된 항체는, 특히 낮은 용량의 항체에서, 강화된 ADCC 활성과 상호관련되었다. 문헌 [Shields et al., 2002, J. Biol. Chem. 277:26733-26740]; [Shinkawa et al., 2003, J. Biol. Chem. 278:3466-73]을 참조한다. 푸코스가 없는 항체를 제조하는 방법은 래트 골수종 YB2/0 세포 (ATCC CRL 1662)에서의 성장을 포함한다. YB2/0 세포는 낮은 수준의 FUT8 mRNA를 발현하고, 이는 폴리펩티드의 푸코실화에 필요한 효소인 α -1,6-푸코실트랜스퍼라제를 코딩한다.
- [0074] 또 다른 측면에서, 항-글리코-MUC1 항체 또는 결합 단편은, 예를 들어, FcRn 상호작용에서 수반되는 특정 영역에서 면역글로불린 불변 영역 분절을 돌연변이시키는 것에 의해, 태아 Fc 수용체, FcRn에 대한 결합 친화력을 증가 또는 감소시키는 변형을 포함한다 (예를 들어, WO 2005/123780을 참조한다). 특정 실시양태에서, IgG 클래스의 항-글리코-MUC1 항체는 중쇄 불변 영역의 아미노산 잔기 250, 314, 및 428 중 적어도 하나가 단독으로 또는 이의 임의의 조합으로, 예컨대 위치 250 및 428에서, 또는 위치 250 및 314에서, 또는 위치 314 및 428에서, 또는 위치 250, 314 및 428에서 치환되도록 돌연변이되고, 위치 250 및 428이 구체적 조합이다. 위치 250의 경우, 치환 아미노산 잔기는 알라닌, 시스테인, 아스파르트산, 글루탐산, 페닐알라닌, 글리신, 히스티딘, 이소류신, 라이신, 류신, 메티오닌, 아스파라긴, 프롤린, 글루타민, 아르기닌, 세린, 발린, 트립토판, 또는 타이로신을 포함하지만 이제 제한되지 않는, 트레오닌 이외의 임의의 아미노산 잔기일 수 있다. 위치 314의 경우, 치환 아미노산 잔기는 알라닌, 시스테인, 아스파르트산, 글루탐산, 페닐알라닌, 글리신, 히스티딘, 이소류신, 라이신, 메티오닌, 아스파라긴, 프롤린, 글루타민, 아르기닌, 세린, 트레오닌, 발린, 트립토판, 또는 타이로신을 포함하지만 이제 제한되지 않는, 류신 이외의 임의의 아미노산 잔기일 수 있다. 위치 428의 경우, 치환 아미노산 잔기는 알라닌, 시스테인, 아스파르트산, 글루탐산, 페닐알라닌, 글리신, 히스티딘, 이소류신, 라이신, 류신, 아스파라긴, 프롤린, 글루타민, 아르기닌, 세린, 트레오닌, 발린, 트립토판, 또는 타이로신을 포함하지만 이제 제한되지 않는, 메티오닌 이외의 임의의 아미노산 잔기일 수 있다. 적절한 아미노산 치환의 구체적인 조합이 본원에 참조로 포함된 미국 특허 번호 7,217,797의 표 1에서 확인된다. 이러한 돌연변이는 FcRn에 결합하는 것을 증가시키고, 이는 분해로부터 항체를 보호하고 이의 반감기를 증가시킨다.
- [0075] 또 다른 측면에서, 본 개시내용의 항-글리코-MUC1 항체 또는 항원-결합 단편은, 예를 들어 문헌 [Jung and Pluckthun, 1997, Protein Engineering 10:9, 959-966]; [Yazaki et al., 2004, Protein Eng. Des. Sel. 17(5):481-9. Epub 2004 Aug. 17]; 및 미국 특허 출원 번호 2007/0280931에 기술된 바와 같이, 하나 이상의 아미노산이 이의 추가변 영역 중 하나 이상 내로 삽입된다.
- [0076] 특히 진단 용도에 유용한 또 다른 측면에서, 본 개시내용의 항-글리코-MUC1 항체 또는 항원-결합 단편은 검출가능한 모이어티에 부착된다. 검출가능한 모이어티는 방사성 모이어티, 비색측정 분자, 형광 모이어티, 화학발광 모이어티, 항원, 효소, 검출가능한 비드 (예컨대 자기 또는 전자코밀도 (예를 들어, 금) 비드), 또는 또 다른 분자 (예를 들어, 비오틴 또는 스트렙타비딘)에 결합하는 분자를 포함한다.
- [0077] 방사성동위원소 또는 방사성 핵종은 ^3H , ^{14}C , ^{15}N , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I 를 포함할 수 있다.
- [0078] 형광 표지는 로다민, 란타늄 인, 플루오레세인 및 이의 유도체, 플루오로크로姆, GFP (GFP: "녹색 형광 단백질"), 단실, 옴벨리페론, 피코에리트린, 피코시아닌, 알로피코시아닌, o-프탈알데히드, 및 형광아민을 포함할 수 있다.
- [0079] 효소 표지는 양고추냉이 퍼옥시다제, β 갈락토시다제, 루시퍼라제, 알칼리성 포스파타제, 글루코스-6-포스페이트 데히드로게나제 ("G6PDH"), 알파-D-갈락토시다제, 글루코스 옥시다제, 글루코스 아밀라제, 탄산 안하이드라제, 아세틸콜린에스테라제, 라이소자임, 말레이트 데히드로게나제 및 퍼옥시다제를 포함할 수 있다.
- [0080] 화학발광 표지 또는 화학발광제, 예컨대 이소루미놀, 루미놀 및 디옥세탄
- [0081] 다른 검출가능한 모이어티는 비오틴, 디옥시게닌 또는 5-브로모데옥시우리딘과 같은 분자를 포함한다.
- [0082] 특정 측면에서, 본 개시내용의 항-글리코-MUC1 항체 또는 항원 결합 단편은 G02 또는 G02의 중쇄 및 경쇄 가변

영역 (각각 서열식별번호: 3 및 4)을 포함하는 항체 또는 항원 결합 단편과 경쟁한다.

- [0083] G02에 의해 결합되는 글리코-MUC1 에피토프를 발현하는 세포 상에서 또는 G02에 의해 결합되는 에피토프를 함유하는 글리코실화 MUC1 펩티드, 예를 들어, 미국 특허 번호 6,465,220에 기술된 바와 같은 GalNAc-T2, GalNAc-T4 및 GalNAc-T1로 글리코실화된 60량체 펩티드 (VTSAPDTRPAPGSTAPPAHG)₃ 상에서 경쟁을 검정할 수 있다. 에피토프를 발현하지 않는 세포 또는 글리코실화되지 않은 펩티드가 대조군으로서 사용될 수 있다.
- [0084] 경쟁 검정법이 수행될 수 있는 세포는 유방암 세포주 MCF7 또는 T47D, 및 글리코-MUC1 에피토프를 발현하도록 조작된 재조합 세포를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 한 비제한적 예에서, UDP-Gal/GalNAc 에피머라제가 결여되고, GalNAc 및 Gal의 외인성 부가의 부재 하에 각각 GalNAc O-글리코실화 및 갈락토실화가 부족한 CHO IdID 세포가 MUC1을 발현하도록 조작되고, GalNAc의 부재 또는 존재 하에 성장되며, 후자는 G02가 결합하는 MUC1의 Tn 글리코형태를 발현하는 세포를 산출시킨다. 글리코실화되지 않은 형태의 MUC1을 발현하는 세포가 음성 대조군으로서 사용될 수 있다.
- [0085] 경쟁에 대한 검정법은 방사성 물질 표지 면역검정법 (RIA), 효소-결합 면역흡착 검정법 (ELISA), 샌드위치 ELISA 형광 활성화 세포 분류 (FACS) 검정법 및 비아코어(Biacore) 검정법을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.
- [0086] 기준 항체와 테스트 항체 (중 또는 아이소타입과 상관 없음) 사이의 항체 경쟁 검정법을 수행하는 것에서, 먼저 기준물을 후속 확인을 가능하게 하도록 검출가능한 표지, 예컨대 형광단, 비오틴 또는 효소성 (또는 심지어 방사성) 표지로 표지할 수 있다. 이러한 경우에, 글리코-MUC1을 발현하는 세포를 표지되지 않은 테스트 항체와 함께 인큐베이션하고, 표지된 기준 항체를 첨가하고, 결합된 표지의 강도를 측정한다. 중첩 에피토프에 결합하는 것에 의해 테스트 항체가 표지된 기준 항체와 경쟁하면, 테스트 항체 없이 수행된 대조군 반응에 비교하여 강도가 감소될 것이다.
- [0087] 이러한 검정법의 구체적 실시양태에서, 검정법 조건 (예를 들어, 특정한 세포 밀도) 하에 최대 결합의 80%를 산출하는 표지된 기준 항체의 농도 ("conc_{80%}")를 먼저 결정하고, 10×conc_{80%}의 표지되지 않은 테스트 항체 및 conc_{80%}의 표지된 기준 항체로 경쟁 검정법을 수행한다.
- [0088] 억제 상수, 또는 K_i로 억제가 표현될 수 있고, 이는 하기 식에 따라 계산된다:
- [0089] $K_i = IC_{50} / (1 + [\text{기준 Ab 농도}] / K_d)$
- [0090] [식 중, IC₅₀은 기준 항체의 결합에서 50% 감소를 산출하는 테스트 항체의 농도이고, K_d는 글리코-MUC1에 대한 친화력의 척도인 기준 항체의 해리 상수이다]. 본원에 개시된 항-글리코-MUC1 항체와 경쟁하는 항체는 본원에 기술된 검정법 조건 하에 K_i가 10 pM 내지 10 nM일 수 있다.
- [0091] 다양한 실시양태에서, 테스트 항체는 사용된 특정한 검정법 조건 하에서의 최대 결합의 80%인 기준 항체 농도 및 기준 항체 농도보다 10배 더 높은 테스트 항체 농도에서 기준 항체의 결합을 적어도 약 20% 이상만큼, 예를 들어, 적어도 약 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% 이상만큼, 또는 상기 값 중 임의의 것 사이의 범위인 백분율만큼 감소시키면 기준 항체와 경쟁하는 것으로 간주된다.
- [0092] 경쟁 검정법의 한 예에서, 플레이트를 펩티드의 용액과 (예를 들어, 4°C에서 철야로 PBS 내의 1 μg/mL의 농도로) 접촉시킴으로써, 글리코실화 MUC1 60량체 펩티드를 고체 표면, 예를 들어, 마이크로웰 플레이트 상에 부착시킨다. 플레이트를 세정하고 (예를 들어, PBS 내의 0.1% 트윈(Tween) 20), 차단한다 (예를 들어, 슈퍼블럭(Superblock), 써모 사이언티픽(Thermo Scientific), 일리노이주 록포드). ELISA 완충제 (예를 들어, PBS 내의 1% BSA 및 0.1% 트윈 20) 내의 준-포화량의 비오틴화 G02 (예를 들어, 80 ng/mL의 농도) 및 표지되지 않은 G02 ("기준" 항체) 또는 계단 희석된 경쟁 항-글리코-MUC1 항체 ("테스트" 항체) 항체 (예를 들어, 2.8 μg/mL, 8.3 μg/mL, 또는 25 μg/mL의 농도)의 혼합물을 웰에 첨가하고, 플레이트를 부드럽게 진탕시키면서 1시간 동안 인큐베이션한다. 플레이트를 세정하고, ELISA 완충제에 희석된 1 μg/mL HRP-결합 스트렙타비딘을 각각의 웰에 첨가하고, 플레이트를 1시간 동안 인큐베이션한다. 플레이트를 세정하고, 결합된 항체를 기질 (예를 들어, TMB, 바이오에프엑스 래버러토리즈 인크.(Biofx Laboratories Inc.), 메릴랜드주 오웬스 밀스) 첨가에 의해 검출하였다. 정지 완충제 (예를 들어, 바이오 에프엑스(Bio FX) 정지 시약, 바이오에프엑스 래버러토리즈 인크., 메릴랜드주 오웬스 밀스)를 첨가하여 반응을 종결시키고, 마이크로플레이트 판독기 (예를 들어, 베르사맥스(VERSAmax), 몰레큘러 디바이시스(Molecular Devices), 캘리포니아주 서니베일)를 사용하여 650 nm에서 흡광도

를 측정한다.

- [0093] 이러한 경쟁 검정법에서의 변동을 G02와 또 다른 항-글리코-MUC1 항체 사이의 경쟁을 테스트하는데 또한 사용할 수 있다. 예를 들어, 특정 측면에서, 항-글리코-MUC1 항체가 기준 항체로서 사용되고, G02가 테스트 항체로서 사용된다. 추가적으로, 글리코실화 MUC1 60량체 펩티드 대신, 배양 중인 세포 표면 상에서 (예를 들어 상기 언급된 세포 유형 중 하나의 표면 상에서) 발현된 막-결합 글리코-MUC1가 사용될 수 있다. 일반적으로, 약 10^4 내지 10^6 개의 형질전환체, 예를 들어, 약 10^5 개의 형질전환체가 사용된다. 경쟁 검정법에 대한 다른 양식이 관련 분야에 공지되어 있고, 사용될 수 있다.
- [0094] 다양한 실시양태에서, 항-글리코-MUC1 항체가 0.08 $\mu\text{g/mL}$, 0.4 $\mu\text{g/mL}$, 2 $\mu\text{g/mL}$, 10 $\mu\text{g/mL}$, 50 $\mu\text{g/mL}$, 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도 또는 상기 값 중 임의의 것 사이의 범위의 농도 (예를 들어, 2 $\mu\text{g/mL}$ 내지 10 $\mu\text{g/mL}$ 범위의 농도)로 사용되는 경우에 본 개시내용의 항-글리코-MUC1 항체는 표지된 G02의 결합을 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 또는 상기 값 중 임의의 것 사이의 범위의 백분율만큼 감소시킨다 (예를 들어, 본 개시내용의 항-글리코-MUC1 항체는 표지된 G02의 결합을 50% 내지 70%만큼 감소시킨다).
- [0095] 다른 실시양태에서, G02가 0.4 $\mu\text{g/mL}$, 2 $\mu\text{g/mL}$, 10 $\mu\text{g/mL}$, 50 $\mu\text{g/mL}$, 250 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도 또는 상기 값 중 임의의 것 사이의 범위의 농도 (예를 들어, 2 $\mu\text{g/mL}$ 내지 10 $\mu\text{g/mL}$ 범위의 농도)로 사용되는 경우에 G02는 표지된 본 개시내용의 항-글리코-MUC1 항체의 결합을 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 또는 상기 값 중 임의의 것 사이의 범위의 백분율만큼 감소시킨다 (예를 들어, G02는 표지된 본 개시내용의 항-글리코-MUC1 항체의 결합을 50% 내지 70%만큼 감소시킨다).
- [0096] 상기 검정법에서, G02 항체는 G02의 CDR 또는 중쇄 및 경쇄 가변 영역을 포함하는 임의의 항체 또는 항원-결합 단편, 예컨대 G02의 인간화 또는 키메라 대응물로 교체될 수 있다.
- [0097] 특정 측면에서, 본 개시내용의 항-글리코-MUC1 항체 또는 항원-결합 단편은 표 1에 기재된 (또는 표 1에 기재된 뉴클레오타이드 서열에 의해 코딩되는) 중쇄 및/또는 경쇄 가변 서열을 포함한다. 다른 측면에서, 본 개시내용의 항-글리코-MUC1 항체 또는 항원-결합 단편은 표 1에 기재된 (또는 표 1에 기재된 뉴클레오타이드 서열에 의해 코딩되는) 중쇄 및/또는 경쇄 CDR 서열을 포함한다. 이러한 항-글리코-MUC1 항체 및 항원-결합 단편에 대한 프레임워크 서열은 표 1의 천연 뮤린 프레임워크 서열일 수 있거나, 또는 비-천연 (예를 들어, 인간화 또는 인간) 프레임워크 서열일 수 있다.
- [0098] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 각각 서열식별번호: 3 및 4에 대한 서열 동일성이 적어도 95%, 98%, 99%, 또는 99.5%인 중쇄 및 경쇄 가변 영역을 갖는 항-MUC1 항체 또는 항원 결합 단편을 제공한다.
- [0099] 또 다른 측면에서, 본 개시내용의 항-글리코-MUC1 항체 또는 항원-결합 단편은 단일쇄 가변 단편 (scFv)이다. 예시적인 scFv는 경쇄 가변 단편의 N-말단의 중쇄 가변 단편을 포함한다. 일부 실시양태에서, scFv 중쇄 가변 단편 및 경쇄 가변 단편은 아미노산 4-15개의 링커 서열에 공유 결합된다. scFv는 이중특이적 T-세포 인게이지의 형태일 수 있거나 또는 키메라 항원 수용체 (CAR) 내에 있을 수 있다.
- [0100] **5.2 항-글리코-MUC1 및 항-CD3 이중특이적 항체**
- [0101] 일부 측면에서, 본 개시내용의 이중특이적 항체는 CD3에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 도메인 (예를 들어, 표 4에 기재된 CDR 또는 VH 및 VL을 포함함), 및 글리코-MUC1에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 도메인을 포함할 수 있다. 제2 항원 결합 도메인은 상기에서 글리코-MUC1 항체에 대해 기술된 특색을 단독으로 또는 조합하여 포함할 수 있다 (예를 들어, 표 1-3에서 확인되는 CDR의 조합, 예를 들어, 하기의 번호가 매겨진 실시양태 3 내지 17에 기재된 CDR 조합 중 임의의 것의 아미노산 서열을 포함하는 CDR, 또는 표 1에서 확인되는 VH 및 VL 서열을 포함할 수 있다).

[0102] <표 4>

표 4		
설명	서열	서열 식별 번호
CD3 CDR-H1 (카바트)	TYAMN	34
CD3 CDR-H2 (카바트)	RIRSKYNNYATYYADSVKGG	35
CD3 CDR-H3 (카바트)	HGNFGNSYVSWFAY	36
CD3 CDR-L1 (카바트)	GSSTGAVTTSNYAN	37
CD3 CDR-L2 (카바트)	GTNKRAP	38
CD3 CDR-L3 (카바트)	ALWYSNLWV	39
CD3 VH	EVQLLESQGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVSRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTLLVTVSS	40
CD3 VL	QAVVTQEPSTLVSPGGTVTLTCSSTGAVTTSNYANWVQKEPQAFRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVL	41
hlgG1 Fc 영역	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	42
MUC1 VL-CL(RK)	DIVMSQSPSLGVSVEKVTMSCKSSQSLLYSTNQKNYQSLLYSTNQKNYLAWYQQKPGQSPKLLIYWVSNRKGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVKAEDLAVYYC QQYYRYPLTFGAGTKLELKRVAAPSVEFIPPSDRKLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWVKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNREGC	43
CD3 VH-CL	EVQLLESQGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVSRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTLLVTVSSASVAAPSVEFIPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWVKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNREGC	44
MUC1 VH-CH1(EE)-Fc (호, P329G LALA)	QVQLQQSDAELVKPGASVKISCKASGYTFTDHAHWVKQRPEQGLEWIGYFSPGNDIDHYNEKFEGKATLTADKSSSTAYMQLNSLTSEDSAVYFCKRSYDKDFDCWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	45

[0103]

MUC1 VH-CH1(EE)-CD3 VL-CH1-Fc (호, P329G LALA)	QVQLQQSDAELVKPGASVKISCKASGYTFTDHAHWVKQRPEQGLEWIGYFSPGNDIDHYNEKFEGKATLTADKSSSTAYMQLNSLTSEDSAVYFCKRSYDKDFDCWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	46
---	---	----

[0104]

[0105] 일부 실시양태에서, 제1 항원 결합 도메인은 서열식별번호: 34의 중쇄 CDR-H1, 서열식별번호: 35의 CDR-H2, 및 서열식별번호: 36의 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 서열식별번호: 37의 경쇄 CDR-L1, 서열식별번호: 38의 CDR-L2 및 서열식별번호: 39의 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.

[0106] 일부 실시양태에서, 제2 항원 결합 도메인은, 예를 들어, 번호가 매겨진 실시양태 3 내지 17에 기재된 CDR 조합 중 임의의 것의 아미노산 서열을 포함하는 CDR, 예를 들어 (i) 서열식별번호: 5의 중쇄 CDR-H1, 서열식별번호:

6의 CDR-H2, 및 서열식별번호: 7의 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 서열식별번호: 8의 경쇄 CDR (CDR-L) 1, 서열식별번호: 9의 CDR-L2 및 서열식별번호: 10의 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.

[0107] 특정한 실시양태에서, 이중특이적 항체는 하기를 포함한다:

[0108] (i) CD3에 특이적으로 결합하고, 서열식별번호: 34의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H1, 서열식별번호: 35의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H2, 및 서열식별번호: 36의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 서열식별번호: 37의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L1, 서열식별번호: 38의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L2 및 서열식별번호: 39의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 제1 항원 결합 도메인; 및

[0109] (ii) 글리코-MUC1에 특이적으로 결합하고, (i) 서열식별번호: 33의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H1, 더욱 바람직하게는 서열식별번호: 5의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H1, 서열식별번호: 29의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H2, 더욱 바람직하게는 서열식별번호: 6의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H1, 및 서열식별번호: 25의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H3, 더욱 바람직하게는 서열식별번호: 7의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 서열식별번호: 8의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L1, 서열식별번호: 9의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L2 및 서열식별번호: 31의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L3, 더욱 바람직하게는 서열식별번호: 10의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 제2 항원 결합 도메인.

[0110] 일부 실시양태에서, 제1 항원 결합 도메인은 서열식별번호: 40의 아미노산 서열에 대해 적어도 약 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 중쇄 가변 영역 서열, 및 서열식별번호: 41의 아미노산 서열에 대해 적어도 약 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 경쇄 가변 영역 서열을 포함한다.

[0111] 일부 실시양태에서, 제1 항원 결합 도메인은 서열식별번호: 40의 중쇄 가변 영역 서열 및 서열식별번호: 41의 경쇄 가변 영역 서열을 포함한다.

[0112] 일부 실시양태에서, 제2 항원 결합 도메인은 서열식별번호: 3의 아미노산 서열에 대해 적어도 약 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 중쇄 가변 영역 서열, 및 서열식별번호: 4의 아미노산 서열에 대해 적어도 약 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 경쇄 가변 영역 서열을 포함한다.

[0113] 일부 실시양태에서, 제2 항원 결합 도메인은 서열식별번호: 3의 중쇄 가변 영역 서열 및 서열식별번호: 4의 경쇄 가변 영역 서열을 포함한다.

[0114] 일부 실시양태에서, 제1 및/또는 제2 항원 결합 도메인은 Fab 분자이다. 일부 실시양태에서, 제1 항원 결합 도메인은 Fab 경쇄 및 Fab 중쇄의 가변 또는 불변 영역이 교환된 교차 Fab 분자이다. 이러한 실시양태에서, 제2 항원 결합 도메인은 바람직하게는 통상적인 Fab 분자이다.

[0115] 이중특이적 항체의 제1 및 제2 항원 결합 도메인이 양쪽 모두 Fab 분자이고, 항원 결합 도메인 중 하나 (특히 제1 항원 결합 도메인)에서, Fab 경쇄 및 Fab 중쇄의 가변 도메인 VL 및 VH가 서로 교환된 일부 실시양태에서,

[0116] i) 제1 항원 결합 도메인의 불변 도메인 CL에서, 위치 124의 아미노산이 양으로 하전된 아미노산에 의해 치환되고 (카바트에 따른 번호매김), 제1 항원 결합 도메인의 불변 도메인 CH1에서, 위치 147의 아미노산 또는 위치 213의 아미노산이 음으로 하전된 아미노산에 의해 치환되거나 (카바트 EU 인덱스에 따른 번호매김); 또는

[0117] ii) 제2 항원 결합 도메인의 불변 도메인 CL에서, 위치 124의 아미노산이 양으로 하전된 아미노산에 의해 치환되고 (카바트에 따른 번호매김), 제2 항원 결합 도메인의 불변 도메인 CH1에서, 위치 147의 아미노산 또는 위치 213의 아미노산이 음으로 하전된 아미노산에 의해 치환된다 (카바트 EU 인덱스에 따른 번호매김).

[0118] 이중특이적 항체는 i) 및 ii) 하에 언급된 양쪽 모두의 변형을 포함하지 않는다. VH/VL 교환이 있는 항원 결합 도메인의 불변 도메인 CL 및 CH1은 서로 교환되지 않는다 (즉, 이들은 교환되지 않은 상태로 유지된다).

[0119] 더욱 구체적인 실시양태에서,

[0120] i) 제1 항원 결합 도메인의 불변 도메인 CL에서, 위치 124의 아미노산이 독립적으로 라이신 (K), 아르기닌 (R) 또는 히스티딘 (H)에 의해 치환되고 (카바트에 따른 번호매김), 제1 항원 결합 도메인의 불변 도메인 CH1에서, 위치 147의 아미노산 또는 위치 213의 아미노산이 독립적으로 글루탐산 (E), 또는 아스파르트산 (D)에 의해 치환되거나 (카바트 EU 인덱스에 따른 번호매김); 또는

[0121] ii) 제2 항원 결합 도메인의 불변 도메인 CL에서, 위치 124의 아미노산이 독립적으로 라이신 (K), 아르기닌 (R)

또는 히스티딘 (H)에 의해 치환되고 (카바트에 따른 번호매김), 제2 항원 결합 도메인의 불변 도메인 CH1에서, 위치 147의 아미노산 또는 위치 213의 아미노산이 독립적으로 글루탐산 (E), 또는 아스파르트산 (D)에 의해 치환된다 (카바트 EU 인덱스에 따른 번호매김).

[0122] 한 이러한 실시양태에서, 제2 항원 결합 도메인의 불변 도메인 CL에서, 위치 124의 아미노산이 독립적으로 라이신 (K), 아르기닌 (R) 또는 히스티딘 (H)에 의해 치환되고 (카바트에 따른 번호매김), 제2 항원 결합 도메인의 불변 도메인 CH1에서, 위치 147의 아미노산 또는 위치 213의 아미노산이 독립적으로 글루탐산 (E), 또는 아스파르트산 (D)에 의해 치환된다 (카바트 EU 인덱스에 따른 번호매김).

[0123] 추가 실시양태에서, 제2 항원 결합 도메인의 불변 도메인 CL에서, 위치 124의 아미노산이 독립적으로 라이신 (K), 아르기닌 (R) 또는 히스티딘 (H)에 의해 치환되고 (카바트에 따른 번호매김), 제2 항원 결합 도메인의 불변 도메인 CH1에서, 위치 147의 아미노산이 독립적으로 글루탐산 (E), 또는 아스파르트산 (D)에 의해 치환된다 (카바트 EU 인덱스에 따른 번호매김).

[0124] 특정한 실시양태에서, 제2 항원 결합 도메인의 불변 도메인 CL에서, 위치 124의 아미노산이 독립적으로 라이신 (K), 아르기닌 (R) 또는 히스티딘 (H)에 의해 치환되고 (카바트에 따른 번호매김), 위치 123의 아미노산이 독립적으로 라이신 (K), 아르기닌 (R) 또는 히스티딘 (H)에 의해 치환되며 (카바트에 따른 번호매김), 제2 항원 결합 도메인의 불변 도메인 CH1에서, 위치 147의 아미노산이 독립적으로 글루탐산 (E), 또는 아스파르트산 (D)에 의해 치환되고 (카바트 EU 인덱스에 따른 번호매김), 위치 213의 아미노산이 독립적으로 글루탐산 (E), 또는 아스파르트산 (D)에 의해 치환된다 (카바트 EU 인덱스에 따른 번호매김).

[0125] 더욱 특정한 실시양태에서, 제2 항원 결합 도메인의 불변 도메인 CL에서, 위치 124의 아미노산이 라이신 (K)에 의해 치환되고 (카바트에 따른 번호매김), 위치 123의 아미노산 라이신 (K)에 의해 치환되며 (카바트에 따른 번호매김), 제2 항원 결합 도메인의 불변 도메인 CH1에서, 위치 147의 아미노산의 글루탐산 (E)에 의해 치환되고 (카바트 EU 인덱스에 따른 번호매김), 위치 213의 아미노산이 글루탐산 (E)에 의해 치환된다 (카바트 EU 인덱스에 따른 번호매김).

[0126] 더욱 더 특정한 실시양태에서, 제2 항원 결합 도메인의 불변 도메인 CL에서, 위치 124의 아미노산이 라이신 (K)에 의해 치환되고 (카바트에 따른 번호매김), 위치 123의 아미노산이 아르기닌 (R)에 의해 치환되며 (카바트에 따른 번호매김), 제2 항원 결합 도메인의 불변 도메인 CH1에서, 위치 147의 아미노산이 글루탐산 (E)에 의해 치환되고 (카바트 EU 인덱스에 따른 번호매김), 위치 213의 아미노산이 글루탐산 (E)에 의해 치환된다 (카바트 EU 인덱스에 따른 번호매김).

[0127] 특정 실시양태에서, 상기 실시양태에 따른 아미노산 치환은 제2 항원 결합 도메인의 불변 도메인 CL 및 불변 도메인 CH1에서 이루어지고, 제2 항원 결합 도메인의 불변 도메인 CL은 카파 아이소타입이다.

[0128] 일부 실시양태에서, 제1 및 제2 항원 결합 도메인은, 임의적으로는 펩티드 링커를 통해, 서로 융합된다.

[0129] 일부 실시양태에서, 제1 및 제2 항원 결합 도메인은 각각 Fab 분자이고, (i) 제2 항원 결합 도메인이 Fab 중쇄의 C-말단에서 제1 항원 결합 도메인의 Fab 중쇄의 N-말단에 융합되거나, 또는 (ii) 제1 항원 결합 도메인이 Fab 중쇄의 C-말단에서 제2 항원 결합 도메인의 Fab 중쇄의 N-말단에 융합된다.

[0130] 일부 실시양태에서, 이중특이적 항체는 CD3에 대한 1가 결합을 제공한다.

[0131] 특정 실시양태에서, 이중특이적 항체는 CD3에 특이적으로 결합하는 단일 항원 결합 도메인, 및 글리코-MUC1에 특이적으로 결합하는 2개의 항원 결합 도메인을 포함한다. 따라서, 일부 실시양태에서, 이중특이적 항체는 글리코-MUC1에 특이적으로 결합하는 제3 항원 결합 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제3 항원 모이어티는 제1 항원 결합 도메인과 동일하다 (예를 들어, 또한 Fab 분자이고, 동일한 아미노산 서열을 포함한다).

[0132] 특정 실시양태에서, 이중특이적 항체는 제1 및 제2 서브유닛으로 구성된 Fc 도메인을 추가로 포함한다. 한 실시양태에서, Fc 도메인은 IgG Fc 도메인이다. 특정한 실시양태에서, Fc 도메인은 IgG₁ Fc 도메인이다. 또 다른 실시양태에서, Fc 도메인은 IgG₄ Fc 도메인이다. 더욱 구체적인 실시양태에서, Fc 도메인은 위치 S228에서의 아미노산 치환 (카바트 EU 인덱스 번호매김), 특히 아미노산 치환 S228P를 포함하는 IgG₄ Fc 도메인이다. 추가의 특정한 실시양태에서, Fc 도메인은 인간 Fc 도메인이다. 더욱 더 특정한 실시양태, Fc 도메인은 인간 IgG₁ Fc 도메인이다. 인간 IgG₁ Fc 영역의 예시적인 서열이 서열식별번호: 42에서 제공된다.

[0133] 제1, 제2, 및 존재하는 경우의 제3 항원 결합 도메인이 각각 Fab 분자인 일부 실시양태에서, (a) (i) 제2 항원

결합 도메인이 Fab 중쇄의 C-말단에서 제1 항원 결합 도메인의 Fab 중쇄의 N-말단에 융합되고, 제1 항원 결합 도메인이 Fab 중쇄의 C-말단에서 Fc 도메인의 제1 서브유닛의 N-말단에 융합되거나, 또는 (ii) 제1 항원 결합 도메인이 Fab 중쇄의 C-말단에서 제2 항원 결합 도메인의 Fab 중쇄의 N-말단에 융합되고, 제2 항원 결합 도메인이 Fab 중쇄의 C-말단에서 Fc 도메인의 제1 서브유닛의 N-말단에 융합되며; (b) 존재하는 경우의 제3 항원 결합 도메인이 Fab 중쇄의 C-말단에서 Fc 도메인의 제2 서브유닛의 N-말단에 융합된다.

- [0134] 특정 실시양태에서, Fc 도메인은, 예를 들어, 섹션 5.1에 기술된 바와 같이, Fc 도메인의 제1 및 제2 서브유닛의 회합을 촉진하는 변형을 포함한다.
- [0135] 일부 실시양태에서, Fc 도메인은, 예를 들어, 섹션 5.1에 기술된 바와 같이, Fc 수용체에 결합하는 것 및/또는 이펙터 기능을 감소시키는 하나 이상의 아미노산 치환을 포함한다.
- [0136] 특정한 실시양태에서, 이중특이적 항체는
- [0137] (i) 제1 항원 결합 도메인이 Fab 경쇄 및 Fab 중쇄의 가변 또는 불변 영역, 특히 가변 영역이 교환된 교차 Fab 분자인, CD3에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 도메인;
- [0138] (ii) 서열식별번호: 5의 중쇄 CDR-H1, 서열식별번호: 6의 CDR-H2, 및 서열식별번호: 7의 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 서열식별번호: 8의 경쇄 CDR-L1, 서열식별번호: 9의 CDR-L2 및 서열식별번호: 10의 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는, 글리코-MUC1에 특이적으로 결합하는 제2 및 제3 항원 결합 도메인이고, 제2 및 제3 항원 결합 도메인이 각각 Fab 분자, 특히 통상적인 Fab 분자인 제2 및 제3 항원 결합 도메인;
- [0139] (iii) 안정적으로 회합할 수 있는 제1 및 제2 서브유닛으로 구성된 Fc 도메인
- [0140] 을 포함하고,
- [0141] 여기서 제2 항원 결합 도메인은 Fab 중쇄의 C-말단에서 제1 항원 결합 도메인의 Fab 중쇄의 N-말단에 융합되고, 제1 항원 결합 도메인은 Fab 중쇄의 C-말단에서 Fc 도메인의 제1 서브유닛의 N-말단에 융합되며, 제3 항원 결합 도메인은 Fab 중쇄의 C-말단에서 Fc 도메인의 제2 서브유닛의 N-말단에 융합된다.
- [0142] 한 실시양태에서, 제1 항원 결합 도메인은 서열식별번호: 34의 중쇄 CDR-H1, 서열식별번호: 35의 CDR-H2, 및 서열식별번호: 36의 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 서열식별번호: 37의 경쇄 CDR-L1, 서열식별번호: 38의 CDR-L2 및 서열식별번호: 39의 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0143] 한 실시양태에서, 제1 항원 결합 도메인은 서열식별번호: 40의 아미노산 서열에 대해 적어도 약 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 중쇄 가변 영역 서열 및 서열식별번호: 41의 아미노산 서열에 대해 적어도 약 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 경쇄 가변 영역 서열을 포함한다.
- [0144] 한 실시양태에서, 제1 항원 결합 도메인은 서열식별번호: 40의 중쇄 가변 영역 서열 및 서열식별번호: 41의 경쇄 가변 영역 서열을 포함한다.
- [0145] 한 실시양태에서, 제2 및 제3 항원 결합 도메인은 서열식별번호: 3의 아미노산 서열에 대해 적어도 약 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 중쇄 가변 영역 서열 및 서열식별번호: 4의 아미노산 서열에 대해 적어도 약 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 경쇄 가변 영역 서열을 포함한다. 바람직하게는, 항원 결합 도메인은 번호가 매겨진 실시양태 3 내지 17에 기재된 CDR 조합 중 임의의 것의 아미노산 서열을 포함하는 CDR을 포함한다. 한 실시양태에서, 제2 및 제3 항원 결합 도메인은 서열식별번호: 3의 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 4의 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0146] 상기 실시양태에 따른 Fc 도메인은 Fc 도메인과 관련하여 상기에서 기술된 모든 특색을 단독으로 또는 조합하여 포함할 수 있다.
- [0147] 일부 실시양태에서, 항원 결합 도메인 및 Fc 영역은 펩티드 링커, 예를 들어, 서열식별번호: 45 및 서열식별번호: 46에서와 같은 펩티드 링커에 의해 서로 융합된다.
- [0148] 한 실시양태에서, (ii)의 제2 및 제3 Fab 분자의 불변 도메인 CL에서, 위치 124의 아미노산이 라이신 (K)에 의해 치환되고 (카바트에 따른 번호매김), 위치 123의 아미노산이 라이신 (K) 또는 아르기닌 (R), 특히 아르기닌 (R)에 의해 치환되며 (카바트에 따른 번호매김), (ii)의 제2 및 제3 Fab 분자의 불변 도메인 CH1에서, 위치 147의 아미노산이 글루탐산 (E)에 의해 치환되고 (카바트 EU 인덱스에 따른 번호매김), 위치 213의 아미노산이 글루탐산 (E)에 의해 치환된다 (카바트 EU 인덱스에 따른 번호매김).

- [0149] 한 실시양태에서, 이중특이적 항체는 서열식별번호: 43의 서열에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일한 (바람직하게는 서열식별번호: 8의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L1, 서열식별번호: 9의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L2, 및 서열식별번호: 31의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L3을 포함하는) 서열을 포함하는 폴리펩티드, 서열식별번호: 44의 서열에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일한 (바람직하게는, 표 4에 기재된 CD3 중쇄 및 경쇄 CDR서열을 포함함) 서열을 포함하는 폴리펩티드, 서열식별번호: 45의 서열에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일한 (바람직하게는, 서열식별번호: 33의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H1, 서열식별번호: 29의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H2, 서열식별번호: 25의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H3을 포함하는) 서열을 포함하는 폴리펩티드, 및 서열식별번호: 46의 서열에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일한 (바람직하게는 서열식별번호: 33의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H1, 서열식별번호: 29의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H2, 서열식별번호: 25의 아미노산 서열의 CDR-H3, 서열식별번호: 37의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L1, 서열식별번호: 38의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L2, 및 서열식별번호: 39의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L3을 포함하는) 서열을 포함하는 폴리펩티드를 포함한다.
- [0150] 한 실시양태에서, 이중특이적 항체는 서열식별번호: 43의 서열을 포함하는 폴리펩티드 (특히 2개의 폴리펩티드), 서열식별번호: 44의 서열을 포함하는 폴리펩티드, 서열식별번호: 45의 서열을 포함하는 폴리펩티드, 및 서열식별번호: 46의 서열을 포함하는 폴리펩티드를 포함한다.
- [0151] **5.3 항체-약물 접합체**
- [0152] 본 개시내용의 또 다른 측면은 본 개시내용의 항-글리코-MUC1 항체 및 항원-결합 단편을 포함하는 항체 약물 접합체 (ADC)에 관한 것이다. 일반적으로 ADC는 하나 이상의 링커에 의해 하나 이상의 세포독성 및/또는 세포정지성 작용제가 연결되어 있는 본원에 기술된 바와 같은 항-글리코-MUC1 항체 및/또는 결합 단편을 포함한다. 구체적 실시양태에서, ADC는 구조식 (I)에 따른 화합물 또는 이의 염이다:
- [0153] $[D-L-XY]_n-Ab$
- [0154] [식 중, 각각의 "D"는 서로 독립적으로 세포독성 및/또는 세포정지성 작용제 ("약물")을 나타내고; 각각의 "L"은 서로 독립적으로 링커를 나타내고; "Ab"는 항-글리코-MUC1 항원 결합 도메인, 예컨대 본원에 기술된 항-글리코-MUC1 항체 또는 결합 단편을 나타내고; 각각의 "XY"는 링커 상의 관능기 R^x 와 항체 상의 "상보적" 관능기 R^y 사이에 형성된 연결을 나타내며, n은 ADC의 연결된 약물의 수 또는 약물-대-항체 비 (DAR)를 나타낸다].
- [0155] ADC를 이룰 수 있는 다양한 항체 (Ab)의 구체적인 실시양태는 상기 기술된 항-글리코-MUC1 항체 및/또는 결합 단편의 다양한 실시양태를 포함한다.
- [0156] 구조식 (I)의 ADC 및/또는 염의 일부 구체적 실시양태에서, 각각의 D는 동일하고/하거나 각각의 L은 동일하다.
- [0157] 본 개시내용의 항-글리코-MUC1 ADC를 이룰 수 있는 세포독성 및/또는 세포정지성 작용제 (D) 및 링커 (L)의 구체적인 예, 뿐만 아니라 ADC에 연결된 세포독성 및/또는 세포정지성 작용제의 수가 하기에서 더욱 상세하게 기술된다.
- [0158] **5.3.1. 세포독성 및/또는 세포정지성 작용제**
- [0159] 세포독성 및/또는 세포정지성 작용제는 세포, 특히 암 및/또는 종양 세포의 성장 및/또는 복제를 억제하고/하거나 이를 살해하는 것으로 공지된 임의의 작용제일 수 있다. 세포독성 및/또는 세포정지성 성질을 갖는 다수의 작용제가 문헌에 공지되어 있다. 세포독성 및/또는 세포정지성 작용제의 클래스의 비제한적인 예는, 예를 들어, 그리고 비제한적으로, 방사성 핵종, 알킬화제, 토포이소머라제 I 억제제, 토포이소머라제 II 억제제, DNA 인터칼레이팅제 (예를 들어, 그루브 결합 작용제 예컨대 마이너 그루브 결합제), RNA/DNA 항대사물질, 세포 주기 조정인자, 키나제 억제제, 단백질 합성 억제제, 히스톤 데아세틸라제 억제제, 미토콘드리아 억제제, 및 항유사분열제를 포함한다.
- [0160] 이러한 다양한 클래스 중 몇몇 내의 구체적인 비제한적인 예가 하기에서 제공된다.
- [0161] 알킬화제: 아살리 ((L-류신, N-[N-아세틸-4-[비스-(2-클로로에틸)아미노]-DL-페닐알라닐]-, 에틸에스테르; NSC 167780; CAS 등록 번호 3577897)); AZQ ((1,4-시클로헥사디엔-1,4-디카르복산, 2,5-비스(1-아지리디닐)-3,6-디옥소-, 디에틸 에스테르; NSC 182986; CAS 등록 번호 57998682)); BCNU ((N,N'-비스(2-클로로에틸)-N-니트로소우레아; NSC 409962; CAS 등록 번호 154938)); 부술판 (1,4-부탄디올 디메탄술포네이트; NSC 750; CAS 등록 번

호 55981); (카르복시프탈라토)플래티넘 (NSC 27164; CAS 등록 번호 65296813); CBDCA ((시스-(1,1-시클로부탄 디카르복실라토)디아민플래티넘(II)); NSC 241240; CAS 등록 번호 41575944); CCNU ((N-(2-클로로에틸)-N'-시클로헥실-N-니트로소우레아; NSC 79037; CAS 등록 번호 13010474); CHIP (이프로플라틴; NSC 256927); 클로람부실 (NSC 3088; CAS 등록 번호 305033); 클로로조토신 ((2-[[[(2-클로로에틸) 니트로소아미노]카르보닐]아미노]-2-데옥시-D-글루코피라노스; NSC 178248; CAS 등록 번호 54749905)); 시스-플래티넘 (시스플라틴; NSC 119875; CAS 등록 번호 15663271); 클로메손 (NSC 338947; CAS 등록 번호 88343720); 시아노모르폴리노독소루비신 (NCS 357704; CAS 등록 번호 88254073); 시클로디손 (NSC 348948; CAS 등록 번호 99591738); 디안히드로갈락티톨 (5,6-디에폭시톨; NSC 132313; CAS 등록 번호 23261203); 플루오로도판 ((5-[(2-클로로에틸)-(2-플루오로에틸)아미노]-6-메틸-우라실; NSC 73754; CAS 등록 번호 834913); 헵술판 (NSC 329680; CAS 등록 번호 96892578); 하이칸톤 (NSC 142982; CAS 등록 번호 23255938); 멜팔란 (NSC 8806; CAS 등록 번호 3223072); 메틸 CCNU ((1-(2-클로로에틸)-3-(트랜스-4-메틸시클로헥산)-1-니트로소우레아; NSC 95441; 13909096); 미토마이신 C (NSC 26980; CAS 등록 번호 50077); 미토졸라미드 (NSC 353451; CAS 등록 번호 85622953); 질소 머스타드 ((비스(2-클로로에틸)메틸아민 히드로클로라이드; NSC 762; CAS 등록 번호 55867); PCNU ((1-(2-클로로에틸)-3-(2,6-디옥소-3-피페리딘)-1-니트로소우레아; NSC 95466; CAS 등록 번호 13909029)); 피페라진 알킬화제 ((1-(2-클로로에틸)-4-(3-클로로프로필)-피페라진 디히드로클로라이드; NSC 344007)); 피페라진디온 (NSC 135758; CAS 등록 번호 41109802); 피포브로만 ((N,N-비스(3-브로모프로피오닐) 피페라진; NSC 25154; CAS 등록 번호 54911)); 포르피로마이신 (N-메틸미토마이신 C; NSC 56410; CAS 등록 번호 801525); 스피로히단토인 머스타드 (NSC 172112; CAS 등록 번호 56605164); 테록시론 (트리글리시딜이소시아 누레이트; NSC 296934; CAS 등록 번호 2451629); 테트라플라틴 (NSC 363812; CAS 등록 번호 62816982); 티오-테파 (N,N',N"-트리-1,2-에탄디일티오 포스포라미드; NSC 6396; CAS 등록 번호 52244); 트리에틸렌멜라민 (NSC 9706; CAS 등록 번호 51183); 우라실 질소 머스타드 (데스메틸도판; NSC 34462; CAS 등록 번호 66751); 요시(Yoshi)-864 ((비스(3-메실옥시 프로필)아민 히드로클로라이드; NSC 102627; CAS 등록 번호 3458228).

[0162] 토포이소머라제 I 억제제: 캄프토테신 (NSC 94600; CAS 등록 번호 7689-03-4); 다양한 캄프토테신 유도체 및 유사체 (예를 들어, NSC 100880, NSC 603071, NSC 107124, NSC 643833, NSC 629971, NSC 295500, NSC 249910, NSC 606985, NSC 74028, NSC 176323, NSC 295501, NSC 606172, NSC 606173, NSC 610458, NSC 618939, NSC 610457, NSC 610459, NSC 606499, NSC 610456, NSC 364830, 및 NSC 606497); 모르폴린이속소루비신 (NSC 354646; CAS 등록 번호 89196043); SN-38 (NSC 673596; CAS 등록 번호 86639-52-3).

[0163] 토포이소머라제 II 억제제: 독소루비신 (NSC 123127; CAS 등록 번호 25316409); 아모나피드 (벤즈이소퀴놀린디 온; NSC 308847; CAS 등록 번호 69408817); m-AMSA ((4'-(9-아크리딘아미노)-3'-메톡시메탄술폰아닐리드; NSC 249992; CAS 등록 번호 51264143)); 안트라피라졸 유도체 ((NSC 355644); 에토포시드 (VP-16; NSC 141540; CAS 등록 번호 33419420); 피라졸로아크리딘 ((피라졸로[3,4,5-k1]아크리딘-2(6H)-프로판아민, 9-메톡시-N, N-디메틸-5-니트로-, 모노메탄술폰네이트; NSC 366140; CAS 등록 번호 99009219); 비스안트렌 히드로클로라이드 (NSC 337766; CAS 등록 번호 71439684); 다우노루비신 (NSC 821151; CAS 등록 번호 23541506); 데옥시독소루비 신 (NSC 267469; CAS 등록 번호 63950061); 미톡산트론 (NSC 301739; CAS 등록 번호 70476823); 메노가릴 (NSC 269148; CAS 등록 번호 71628961); N,N-디벤질 다우노마이신 (NSC 268242; CAS 등록 번호 70878512); 옥산트라 졸 (NSC 349174; CAS 등록 번호 105118125); 루비다존 (NSC 164011; CAS 등록 번호 36508711); 테니포시드 (VM-26; NSC 122819; CAS 등록 번호 29767202).

[0164] DNA 인터칼레이팅제: 안트라마이신 (CAS 등록 번호 4803274); 키카마이신 A (CAS 등록 번호 89675376); 토메이 마이신 (CAS 등록 번호 35050556); DC-81 (CAS 등록 번호 81307246); 시비로마이신 (CAS 등록 번호 12684332); 피롤로벤조디아제핀 유도체 (CAS 등록 번호 945490095); SGD-1882 ((S)-2-(4-아미노페닐)-7-메톡시-8-(3-4(S)-7-메톡시-2-(4-메톡시페닐))-5-옥소-5,11a-디히드로-1H-벤조[e]피롤로[1,2-a][1,4]디아제핀-8-일)옥시)프로폭 시)-1H-벤조[e]피롤로[1,2-a][1,4]디아제핀-5(11aH)-온); SG2000 (SJG-136; (11aS,11a'S)-8,8'-(프로판-1,3-디 일비스(옥시))비스(7-메톡시-2-메틸렌-2,3-디히드로-1H-벤조[e]피롤로[1,2-a][1,4]디아제핀-5(11aH)-온); NSC 694501; CAS 등록 번호 232931576).

[0165] RNA/DNA 항대사물질: L-알라노신 (NSC 153353; CAS 등록 번호 59163416); 5-아자시티딘 (NSC 102816; CAS 등록 번호 320672); 5-플루오로우라실 (NSC 19893; CAS 등록 번호 51218); 아시비신 (NSC 163501; CAS 등록 번호 42228922); 아미노프테린 유도체 N-[2-클로로-5-[(2,4-디아미노-5-메틸-6-퀴나졸리닐)메틸]아미노]벤조일- JL-아스파르트산 (NSC 132483); 아미노프테린 유도체 N-[4-[(2,4-디아미노-5-에틸-6-퀴나졸리닐)메틸]아미노]벤조 일]L-아스파르트산 (NSC 184692); 아미노프테린 유도체 N-[2-클로로-4-[(2,4-디아미노-6-프테리디닐)메틸]아미

노]벤조일]-L-아스파르트산 일수화물 (NSC 134033); 안티포 ((N^a-(4-아미노-4-데옥시프테로일)-N⁷-헤미프탈로일-L-오르니틴; NSC 623017)); 베이커 가용성 안티폴 (NSC 139105; CAS 등록 번호 41191042); 디클로로알릴 로손 ((2-(3,3-디클로로알릴)-3-히드록시-1,4-나프토크논; NSC 126771; CAS 등록 번호 36417160); 브레퀴나르 (NSC 368390; CAS 등록 번호 96201886); 프토라푸르 ((전구약물; 5-플루오로-1-(테트라히드로-2-푸릴)-우라실; NSC 148958; CAS 등록 번호 37076689); 5,6-디히드로-5-아자시티딘 (NSC 264880; CAS 등록 번호 62402317); 메토틱렉세이트 (NSC 740; CAS 등록 번호 59052); 메토틱렉세이트 유도체 (N-[[4-[(2,4-디아미노-6-프테리디닐)메틸]메틸아미노]-1-나프탈레닐]카르보닐]-L-글루탐산; NSC 174121); PALA ((N-(포스포노아세틸)-L-아스파르테이트; NSC 224131; CAS 등록 번호 603425565); 피라조푸린 (NSC 143095; CAS 등록 번호 30868305); 트리메트렉세이트 (NSC 352122; CAS 등록 번호 82952645).

[0166] DNA 항대사물질: 3-HP (NSC 95678; CAS 등록 번호 3814797); 2'-데옥시-5-플루오로우리딘 (NSC 27640; CAS 등록 번호 50919); 5-HP (NSC 107392; CAS 등록 번호 19494894); α-TGDR (α-2'-데옥시-6-티오구아노신; NSC 71851 CAS 등록 번호 2133815); 아피디콜린 글리시네이트 (NSC 303812; CAS 등록 번호 92802822); 아라 C (시토신 아라비노시드; NSC 63878; CAS 등록 번호 69749); 5-아자-2'-데옥시시티딘 (NSC 127716; CAS 등록 번호 2353335); β-TGDR (β-2'-데옥시-6-티오구아노신; NSC 71261; CAS 등록 번호 789617); 시클로시티딘 (NSC 145668; CAS 등록 번호 10212256); 구아나졸 (NSC 1895; CAS 등록 번호 1455772); 히드록시우레아 (NSC 32065; CAS 등록 번호 127071); 이노신 글리코다알데히드 (NSC 118994; CAS 등록 번호 23590990); 막베신 II (NSC 330500; CAS 등록 번호 73341738); 피라졸로이미다졸 (NSC 51143; CAS 등록 번호 6714290); 티오구아닌 (NSC 752; CAS 등록 번호 154427); 티오피린 (NSC 755; CAS 등록 번호 50442).

[0167] 세포 주기 조정인자: 실리비닌 (CAS 등록 번호 22888-70-6); 에피갈로카테킨 갈레이트 (EGCG; CAS 등록 번호 989515); 프로시아니딘 유도체 (예를 들어, 프로시아니딘 A1 [CAS 등록 번호 103883030], 프로시아니딘 B1 [CAS 등록 번호 20315257], 프로시아니딘 B4 [CAS 등록 번호 29106512], 아레카타닌 B1 [CAS 등록 번호 79763283]); 이소플라본 (예를 들어, 제니스테인 [4%, 7-트리히드록시이소플라본; CAS 등록 번호 446720], 다이드제인 [4', 7-디히드록시이소플라본, CAS 등록 번호 486668]; 인돌-3-카르비놀 (CAS 등록 번호 700061); 퀘르세틴 (NSC 9219; CAS 등록 번호 117395); 에스트라무스틴 (NSC 89201; CAS 등록 번호 2998574); 노코다졸 (CAS 등록 번호 31430189); 포도필로톡신 (CAS 등록 번호 518285); 비노렐빈 타르트레이트 (NSC 608210; CAS 등록 번호 125317397); 크립토파이신 (NSC 667642; CAS 등록 번호 124689652).

[0168] 키나제 억제제: 아파티닙 (CAS 등록 번호 850140726); 악시티닙 (CAS 등록 번호 319460850); ARRY-438162 (비니메티닙) (CAS 등록 번호 606143899); 보수티닙 (CAS 등록 번호 380843754); 카르보자티닙 (CAS 등록 번호 1140909483); 세리티닙 (CAS 등록 번호 1032900256); 크리조티닙 (CAS 등록 번호 877399525); 다브라페닙 (CAS 등록 번호 1195765457); 다사티닙 (NSC 732517; CAS 등록 번호 302962498); 에를로티닙 (NSC 718781; CAS 등록 번호 183319699); 에베롤리무스 (NSC 733504; CAS 등록 번호 159351696); 포스타마티닙 (NSC 745942; CAS 등록 번호 901119355); 제피티닙 (NSC 715055; CAS 등록 번호 184475352); 이브루티닙 (CAS 등록 번호 936563961); 이마티닙 (NSC 716051; CAS 등록 번호 220127571); 라파티닙 (CAS 등록 번호 388082788); 렌바티닙 (CAS 등록 번호 857890392); 뎀브리티닙 (CAS 366017096); 닐로티닙 (CAS 등록 번호 923288953); 닌테다닙 (CAS 등록 번호 656247175); 팔보시클립 (CAS 등록 번호 571190302); 파조파닙 (NSC 737754; CAS 등록 번호 635702646); 폐갑타닙 (CAS 등록 번호 222716861); 포나티닙 (CAS 등록 번호 1114544318); 라파마이신 (NSC 226080; CAS 등록 번호 53123889); 레고라페닙 (CAS 등록 번호 755037037); AP 23573 (리다포롤리무스) (CAS 등록 번호 572924540); INCB018424 (록솔리티닙) (CAS 등록 번호 1092939177); ARRY-142886 (셀루메티닙) (NSC 741078; CAS 등록 번호 606143-52-6); 시롤리무스 (NSC 226080; CAS 등록 번호 53123889); 소라페닙 (NSC 724772; CAS 등록 번호 475207591); 수니티닙 (NSC 736511; CAS 등록 번호 341031547); 토파시티닙 (CAS 등록 번호 477600752); 템시롤리무스 (NSC 683864; CAS 등록 번호 163635043); 트라메티닙 (CAS 등록 번호 871700173); 반데타닙 (CAS 등록 번호 443913733); 베무라페닙 (CAS 등록 번호 918504651); SU6656 (CAS 등록 번호 330161870); CEP-701 (레사우르티닙) (CAS 등록 번호 111358884); XL019 (CAS 등록 번호 945755566); PD-325901 (CAS 등록 번호 391210109); PD-98059 (CAS 등록 번호 167869218); PI-103 (CAS 등록 번호 371935749), PP242 (CAS 등록 번호 1092351671), PP30 (CAS 등록 번호 1092788094), 토린(Torin) 1 (CAS 등록 번호 1222998368), LY294002 (CAS 등록 번호 154447366), XL-147 (CAS 등록 번호 934526893), CAL-120 (CAS 등록 번호 870281348), ETP-45658 (CAS 등록 번호 1198357797), PX 866 (CAS 등록 번호 502632668), GDC-0941 (CAS 등록 번호 957054307), BGT226 (CAS 등록 번호 1245537681), BEZ235 (CAS 등록 번호 915019657), XL-765 (CAS 등록 번호 934493762)을 포함하는 ATP-경쟁적 TORC1/TORC2 억제제.

[0169] 단백질 합성 억제제: 아크리플라빈 (CAS 등록 번호 65589700); 아미카신 (NSC 177001; CAS 등록 번호 39831555); 아르베카신 (CAS 등록 번호 51025855); 아스트로마이신 (CAS 등록 번호 55779061); 아지트로마이신 (NSC 643732; CAS 등록 번호 83905015); 베카나마이신 (CAS 등록 번호 4696768); 클로르테트라사이클린 (NSC 13252; CAS 등록 번호 64722); 클라리트로마이신 (NSC 643733; CAS 등록 번호 81103119); 클린다마이신 (CAS 등록 번호 18323449); 클로모시클린 (CAS 등록 번호 1181540); 시클로헥시미드 (CAS 등록 번호 66819); 닥티노마이신 (NSC 3053; CAS 등록 번호 50760); 달포프리스틴 (CAS 등록 번호 112362502); 데메클로시클린 (CAS 등록 번호 127333); 디베카신 (CAS 등록 번호 34493986); 디히드로스트렙토마이신 (CAS 등록 번호 128461); 디리트로마이신 (CAS 등록 번호 62013041); 독시사이클린 (CAS 등록 번호 17086281); 에메틴 (NSC 33669; CAS 등록 번호 483181); 에리트로마이신 (NSC 55929; CAS 등록 번호 114078); 플루리트로마이신 (CAS 등록 번호 83664208); 프라미세틴 (네오마이신 B; CAS 등록 번호 119040); 젠타마이신 (NSC 82261; CAS 등록 번호 1403663); 글리실시클린, 예컨대 티게시클린 (CAS 등록 번호 220620097); 히그로마이신 B (CAS 등록 번호 31282049); 이세파마이신 (CAS 등록 번호 67814760); 조사마이신 (NSC 122223; CAS 등록 번호 16846245); 카나마이신 (CAS 등록 번호 8063078); 케틀리드 예컨대 텔리트로마이신 (CAS 등록 번호 191114484), 세트로마이신 (CAS 등록 번호 205110481), 및 솔리트로마이신 (CAS 등록 번호 760981837); 린코마이신 (CAS 등록 번호 154212); 라임시클린 (CAS 등록 번호 992212); 메클로시클린 (NSC 78502; CAS 등록 번호 2013583); 메타시클린 (론도마이신; NSC 356463; CAS 등록 번호 914001); 미데카마이신 (CAS 등록 번호 35457808); 미노시클린 (NSC 141993; CAS 등록 번호 10118908); 미오카마이신 (CAS 등록 번호 55881077); 네오마이신 (CAS 등록 번호 119040); 네틸마이신 (CAS 등록 번호 56391561); 올레안드로마이신 (CAS 등록 번호 3922905); 옥사졸리디논, 예컨대 에페레졸리드 (CAS 등록 번호 165800044), 리네졸리드 (CAS 등록 번호 165800033), 포시졸리드 (CAS 등록 번호 252260029), 라테졸리드 (CAS 등록 번호 869884786), 란베졸리드 (CAS 등록 번호 392659380), 수테졸리드 (CAS 등록 번호 168828588), 테디졸리드 (CAS 등록 번호 856867555); 옥시테트라사이클린 (NSC 9169; CAS 등록 번호 2058460); 파로모마이신 (CAS 등록 번호 7542372); 페니메피시클린 (CAS 등록 번호 4599604); 펩티딜 트랜스퍼라제 억제제, 예를 들어, 클로람페니콜 (NSC 3069; CAS 등록 번호 56757) 및 유도체 예컨대 아지담페니콜 (CAS 등록 번호 13838089), 플로르페니콜 (CAS 등록 번호 73231342), 및 티암페니콜 (CAS 등록 번호 15318453), 및 플레우로무틸린 예컨대 레타파몰린 (CAS 등록 번호 224452668), 티아몰린 (CAS 등록 번호 55297955), 발네몰린 (CAS 등록 번호 101312929); 피롤리마이신 (CAS 등록 번호 79548735); 퓨로마이신 (NSC 3055; CAS 등록 번호 53792); 퀴누프리스틴 (CAS 등록 번호 120138503); 리보스타마이신 (CAS 등록 번호 53797356); 로키타마이신 (CAS 등록 번호 74014510); 울리테트라사이클린 (CAS 등록 번호 751973); 록시트로마이신 (CAS 등록 번호 80214831); 시소마이신 (CAS 등록 번호 32385118); 스펙티노마이신 (CAS 등록 번호 1695778); 스피라마이신 (CAS 등록 번호 8025818); 스트렙토그라민 예컨대 프리스티나마이신 (CAS 등록 번호 270076603), 퀴누프리스틴/달포프리스틴 (CAS 등록 번호 126602899), 및 버지니아마이신 (CAS 등록 번호 11006761); 스트렙토마이신 (CAS 등록 번호 57921); 테트라사이클린 (NSC 108579; CAS 등록 번호 60548); 토브라마이신 (CAS 등록 번호 32986564); 트롤레안도마이신 (CAS 등록 번호 2751099); 티로신 (CAS 등록 번호 1401690); 베르다마이신 (CAS 등록 번호 49863481).

[0170] 히스톤 데아세틸라제 억제제: 아벡시노스탯 (CAS 등록 번호 783355602); 벨리노스탯 (NSC 726630; CAS 등록 번호 414864009); 키다미드 (CAS 등록 번호 743420022); 엔티노스탯 (CAS 등록 번호 209783802); 기비노스탯 (CAS 등록 번호 732302997); 모세티노스탯 (CAS 등록 번호 726169739); 파노비노스탯 (CAS 등록 번호 404950807); 퀴시노스탯 (CAS 등록 번호 875320299); 레스미노스탯 (CAS 등록 번호 864814880); 로미렙신 (CAS 등록 번호 128517077); 숄포라판 (CAS 등록 번호 4478937); 티오우레이도부티로니트릴 (케벳트린(Kevetrin)TM; CAS 등록 번호 6659890); 발프로산 (NSC 93819; CAS 등록 번호 99661); 보리노스탯 (NSC 701852; CAS 등록 번호 149647789); ACY-1215 (로실리노스탯; CAS 등록 번호 1316214524); CUDC-101 (CAS 등록 번호 1012054599); CHR-2845 (테피노스탯; CAS 등록 번호 914382608); CHR-3996 (CAS 등록 번호 1235859138); 4SC-202 (CAS 등록 번호 910462430); CG200745 (CAS 등록 번호 936221339); SB939 (프라시노스탯; CAS 등록 번호 929016966).

[0171] 미토콘드리아 억제제: 판크라티스타틴 (NSC 349156; CAS 등록 번호 96281311); 로다민-123 (CAS 등록 번호 63669709); 에텔포신 (NSC 324368; CAS 등록 번호 70641519); d-알파-토코페롤 숙시네이트 (NSC 173849; CAS 등록 번호 4345033); 화합물 11 β (CAS 등록 번호 865070377); 아스피린 (NSC 406186; CAS 등록 번호 50782); 엘립티신 (CAS 등록 번호 519233); 베르베린 (CAS 등록 번호 633658); 세룰레인 (CAS 등록 번호 17397896); GX015-070 (오바토클렉스(Obatoclox)[®]; 1H-인돌, 2-(2-((3,5-디메틸-1H-피롤-2-일)메틸렌)-3-메톡시-2H-피롤-5-일)-; NSC 729280; CAS 등록 번호 803712676); 셀라스트롤 (트립테린; CAS 등록 번호 34157830); 메트포르민 (NSC 91485; CAS 등록 번호 1115704); 브릴리언트 그린(Brilliant green) (NSC 5011; CAS 등록 번호 633034);

ME-344 (CAS 등록 번호 1374524556).

[0172] 항유사분열제: 알로콜치신 (NSC 406042); 오리스타틴, 예컨대 MMAE (모노메틸 오리스타틴 E; CAS 등록 번호 474645-27-7) 및 MMAF (모노메틸 오리스타틴 F; CAS 등록 번호 745017-94-1; 할리콘드린 B (NSC 609395); 콜치신 (NSC 757; CAS 등록 번호 64868); 콜치신 유도체 (N-벤조일-데아세틸 벤즈아미드; NSC 33410; CAS 등록 번호 63989753); 돌라스타틴 10 (NSC 376128; CAS 등록 번호 110417-88-4); 메이탄신 (NSC 153858; CAS 등록 번호 35846-53-8); 로족신 (NSC 332598; CAS 등록 번호 90996546); 탁술 (NSC 125973; CAS 등록 번호 33069624); 탁술 유도체 ((2'-N-[3-(디메틸아미노)프로필]글루타라메이트 탁술; NSC 608832); 티오콜치신 (3-데메틸티오콜치신; NSC 361792); 트리틸 시스테인 (NSC 49842; CAS 등록 번호 2799077); 빈블라스틴 술페이트 (NSC 49842; CAS 등록 번호 143679); 빈크리스틴 술페이트 (NSC 67574; CAS 등록 번호 2068782).

[0173] 항체에 대한 부착 부위를 포함하거나 또는 이를 포함하도록 변형될 수 있는 임의의 이러한 작용제가 본원에 개시된 ADC에 포함될 수 있다.

[0174] 구체적 실시양태에서, 세포독성 및/또는 세포정지성 작용제는 항유사분열제이다.

[0175] 또 다른 구체적 실시양태에서, 세포독성 및/또는 세포정지성 작용제는 오리스타틴, 예를 들어, 모노메틸 오리스타틴 E ("MMAE") 또는 모노메틸 오리스타틴 F ("MMAF")이다.

[0176] 5.3.2. 링커

[0177] 본 개시내용의 항-글리코-MUC1 ADC에서, 세포독성 및/또는 세포정지성 작용제가 링커에 의해 항체에 연결된다. 세포독성 및/또는 세포정지성 작용제를 ADC의 항체에 연결시키는 링커는 짧거나, 길거나, 소수성이거나, 친수성이거나, 가요성이거나 또는 강직성일 수 있거나, 또는 링커가 상이한 성질을 갖는 분절들을 포함하도록 각각 독립적으로 상기 언급된 성질 중 하나 이상을 갖는 분절들로 구성될 수 있다. 링커는 1개를 초과하는 작용제를 항체 상의 단일 부위에 공유 연결하도록 다가일 수 있거나, 또는 단일 작용제를 항체 상의 단일 부위에 공유 연결하도록 1가일 수 있다.

[0178] 통상의 기술자가 이해할 바와 같이, 링커는 한 위치에서 세포독성 및/또는 세포정지성 작용제에 대한 공유 연결을, 또 다른 위치에서 항체에 대한 공유 연결을 형성함으로써 세포독성 및/또는 세포정지성 작용제를 항체에 연결시킨다. 공유 연결은 링커 상의 관능기와 작용제 및 항체 상의 관능기 사이의 반응에 의해 형성된다. 본원에서 사용된 바와 같이, "링커"라는 표현은 (i) 링커를 세포독성 및/또는 세포정지성 작용제에 공유 연결시킬 수 있는 관능기 및 링커를 항체에 공유 연결시킬 수 있는 관능기를 포함하는 미접합 형태의 링커; (ii) 링커를 항체에 공유 연결시킬 수 있는 관능기를 포함하고, 세포독성 및/또는 세포정지성 작용제에 공유 연결되어 있거나, 또는 그 반대인 부분적으로 접합된 형태의 링커; 및 (iii) 세포독성 및/또는 세포정지성 작용제 및 항체 양쪽 모두에 공유 연결된 완전히 접합된 형태의 링커를 포함하도록 의도된다. 본 개시내용의 링커 및 항-글리코-MUC1 ADC, 뿐만 아니라 링커-작용제를 항체에 접합시키는 사용된 실험의 일부 구체적 실시양태에서, 링커 상의 관능기를 포함하는 모이어티 및 링커와 항체 사이에 형성된 공유 연결이 각각 R_x 및 XY로 표현된다.

[0179] 링커는 바람직하게는 세포 외부의 환경에서 화학적으로 안정적이지만, 반드시 그렇지는 않고, 세포 내부에서 절단되고/되거나, 파괴되고/되거나, 다른 방식으로 특이적으로 분해되도록 디자인될 수 있다. 대안적으로, 세포 내부에서 특이적으로 절단 또는 분해되도록 디자인되지 않은 링커가 사용될 수 있다. 안정적 대 불안정 링커의 선택은 세포독성 및/또는 세포정지성 작용제의 독성에 의존적일 수 있다. 정상 세포에 독성인 작용제의 경우, 안정적 링커가 바람직하다. 선택적이거나 표적화되고, 정상 세포에 대한 독성이 낮은 작용제를 이용할 수 있고, 세포외 환경에 대한 링커의 화학적 안정성은 덜 중요하다. ADC의 맥락에서 약물을 항체에 연결시키는데 유용한 광범위한 링커가 관련 분야에 공지되어 있다. 이러한 링커 중 임의의 것, 뿐만 아니라 다른 링커가 세포독성 및/또는 세포정지성 작용제를 본 개시내용의 항-글리코-MUC1 ADC의 항체에 연결시키는데 사용될 수 있다.

[0180] 다수의 세포독성 및/또는 세포정지성 작용제를 단일 항체 분자에 연결시키는데 사용될 수 있는 예시적인 다가 링커가, 예를 들어, WO 2009/073445; WO 2010/068795; WO 2010/138719; WO 2011/120053; WO 2011/171020; WO 2013/096901; WO 2014/008375; WO 2014/093379; WO 2014/093394; WO 2014/093640에 기술되어 있고, 이들의 내용은 전문이 본원에 참조로 포함된다. 예를 들어, 머사나(Mersana) 등이 개발한 플렉시머(Fleximer) 링커 기술이 물리화학적 성질이 우수한 고-DAR ADC를 가능하게 하는 잠재력이 있다. 하기 제시된 바와 같이, 머사나 기술은 에스테르 결합의 서열을 통해 약물 분자를 가용화 폴리-아세탈 백본 내로 혼입시키는 것을 기초로 한다.

이러한 방법은 우수한 물리화학적 성질을 유지하면서 고도로 로딩된 ADC (최대 20의 DAR)를 제공한다.

[0181] 수지상 유형 링커의 추가적인 예를 US 2006/116422; US 2005/271615; 문헌 [de Groot et al. (2003) Angew. Chem. Int. Ed. 42:4490-4494]; [Amir et al. (2003) Angew. Chem. Int. Ed. 42:4494-4499]; [Shamis et al.(2004) J. Am. Chem. Soc. 126:1726-1731]; [Sun et al.(2002) Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 12:2213-2215]; [Sun et al.(2003) Bioorganic & Medicinal Chemistry 11:1761-1768]; [King et al.(2002) Tetrahedron Letters 43:1987-1990]에서 확인할 수 있고, 이들 각각은 본원에 참조로 포함된다.

[0182] 사용될 수 있는 예시적인 1가 링커가, 예를 들어, 문헌 [Nolting, 2013, Antibody-Drug Conjugates, Methods in Molecular Biology 1045:71-100]; [Kitson et al., 2013, CROs/CMOs--Chemica Oggi--Chemistry Today 31(4):30-38]; [Ducry et al., 2010, Bioconjugate Chem. 21:5-13]; [Zhao et al., 2011, J. Med. Chem. 54:3606-3623]; 미국 특허 번호 7,223,837; 미국 특허 번호 8,568,728; 미국 특허 번호 8,535,678; 및 WO2004010957에 기술되어 있고, 이들 각각은 본원에 참조로 포함된다.

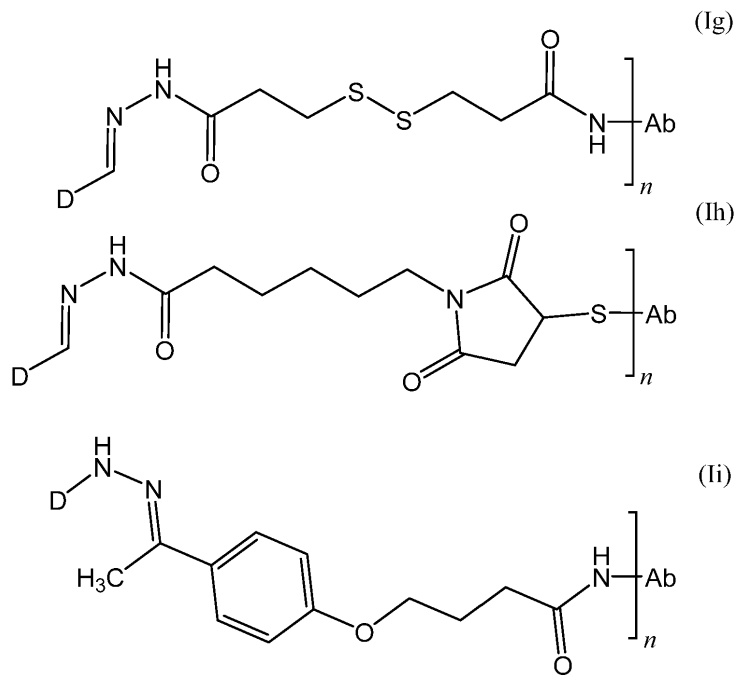
[0183] 예를 들어, 그리고 비제한적으로, 본 개시내용의 항-글리코-MUC1 ADC에 포함될 수 있는 일부 절단가능한 링커 및 절단가능하지 않은 링커가 하기에서 기술된다.

[0184] 5.3.3. 절단가능한 링커

[0185] 특정 실시양태에서, 선택된 링커는 생체 내에서 절단가능하다. 절단가능한 링커는 화학적으로 또는 효소적으로 불안정하거나 분해가능한 연결을 포함할 수 있다. 일반적으로, 절단가능한 링커는 약물을 유리시키기 위한 세포 내부의 프로세스, 예컨대 세포질에서의 환원, 라이소솜 내의 산성 환경에 대한 노출, 또는 세포 내부의 특이적 프로테아제 또는 기타 효소에 의한 절단에 의존적이다. 절단가능한 링커에는 화학적으로 또는 효소적으로 절단될 수 있는 하나 이상의 화학 결합이 혼입되는 한편, 링커의 나머지는 절단가능하지 않다. 특정 실시양태에서, 링커는 화학적으로 불안정한 기 예컨대 히드라존 및/또는 디설피드 기를 포함한다. 화학적으로 불안정한 기를 포함하는 링커는 혈장과 일부 세포질 구획 사이의 차별적인 성질을 이용한다. 히드라존 함유 링커의 경우 약물 방출을 용이하게 하는 세포내 조건은 엔도솜 및 라이소솜의 산성 환경인 한편, 디설피드 함유 링커는 고농도의 티올, 예를 들어, 글루타티온을 함유하는 세포질액에서 환원된다. 특정 실시양태에서, 화학적으로 불안정한 기 근처에 치환기를 사용하여 입체 장애를 도입함으로써 화학적으로 불안정한 기를 포함하는 링커의 혈장 안정성이 증가될 수 있다.

[0186] 산-불안정 기, 예컨대 히드라존은 전신 순환 동안 혈액의 중성 pH 환경 (pH 7.3-7.5)에서 무손상으로 유지되고, ADC가 중도로 산성인 세포의 엔도솜 (pH 5.0-6.5) 및 라이소솜 (pH 4.5-5.0) 구획 내로 내재화되면 가수분해를 겪고 약물을 방출한다. 이러한 pH 의존적 방출 메커니즘은 약물의 비-특이적 방출과 연관되었다. 링커의 히드라존 기의 안정성을 증가시키기 위해, 링커가 화학적 변형, 예를 들어, 치환에 의해 바뀔 수 있고, 이는 순환에서의 손실을 최소화하면서 라이소솜 내에서의 더욱 효율적인 방출을 달성하는 조정을 허용한다.

[0187] 히드라존-함유 링커는 추가적인 절단가능한 부위, 예컨대 추가적인 산-불안정한 절단가능한 부위 및/또는 효소적으로 불안정한 절단가능한 부위를 함유할 수 있다. 예시적인 히드라존-함유 링커를 포함하는 ADC는 하기 구조를 포함한다:



[0188]

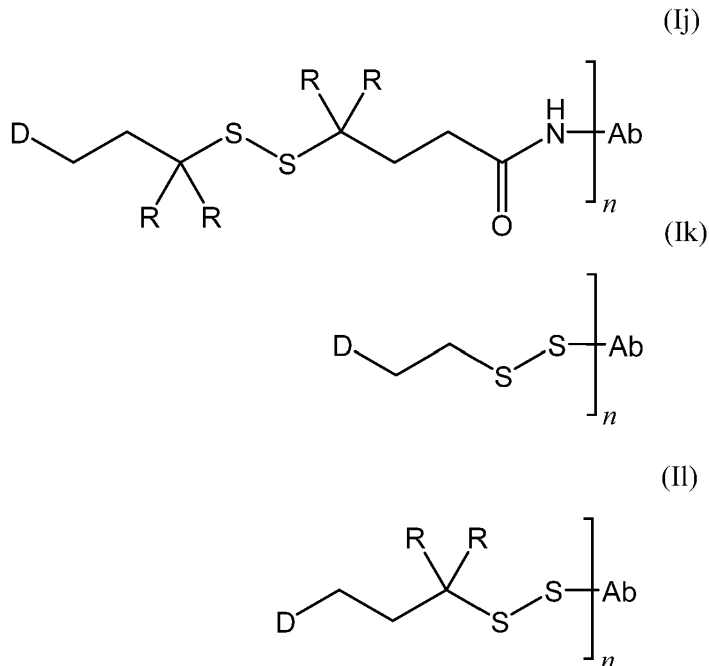
[0189] [식 중, D 및 Ab는 각각 세포독성 및/또는 세포정지성 작용제 (약물) 및 Ab를 나타내고, n은 항체에 연결된 약물-링커의 수를 나타낸다]. 링커 (Ig)와 같은 특정 링커에서, 링커는 2개의 절단가능한 기인 디설피드 및 히드라존 모이어티를 포함한다. 이러한 링커의 경우, 미변형 유리 약물의 효과적인 방출은 산성 pH 또는 디설피드 환원 및 산성 pH를 필요로 한다. (Ih) 및 (Ii)와 같은 링커는 단일 히드라존 절단 부위로 효과적인 것으로 나타났다.

[0190] 전신 순환 동안 무손상으로 유지되고, ADC가 산성 세포 구획 내로 내재화되었을 때 가수분해를 겪고 약물을 방출하는 추가적인 링커는 카르보네이트를 포함한다. 이러한 링커는 세포독성 및/또는 세포정지성 작용제가 산소를 통해 공유 부착될 수 있는 경우에 유용할 수 있다.

[0191] 링커에 포함될 수 있는 다른 산-불안정 기는 시스-아코니틸-함유 링커를 포함한다. 시스-아코니틸 화학은 산성 환경 하에 아마이드 가수분해를 가속화하도록 아마이드 결합에 병치된 카르복실산을 이용한다.

[0192] 절단가능한 링커는 디설피드 기를 또한 포함할 수 있다. 디설피드는 생리학적 pH에서 열역학적으로 안정적이고, 세포 내부에서의 내재화 시 약물을 방출하도록 디자인되며, 여기서 세포질액은 세포외 환경에 비교하여 유의하게 더 환원성인 환경을 제공한다. 디설피드-함유 링커가 순환에서 합리적으로 안정적이어서, 선택적으로 세포질액에서 약물을 방출하도록, 일반적으로 디설피드 결합의 분열은 세포질 티올 보조인자, 예컨대 (환원된) 글루타티온 (GSH)의 존재를 필요로 한다. 세포내 효소 단백질 디설피드 이소머라제, 또는 디설피드 결합을 절단할 수 있는 유사한 효소 또한 세포 내부에서의 디설피드 결합의 우선적인 절단에 기여할 수 있다. 약 5의 순환 내의 GSH 또는 시스테인 (가장 풍부한 저분자량 티올)의 유의하게 더 낮은 농도에 비교하여, GSH는 0.5-10 mM의 농도 범위로 세포 내에 존재하는 것으로 보고된다. 불규칙한 혈류가 저산소 상태에 이르는 종양 세포는 환원성 효소의 활성 강화를 초래하고, 따라서 더욱 더 높은 글루타티온 농도를 초래한다. 특정 실시양태에서, 링커의 화학적 변형, 예를 들어, 디설피드 결합에 인접한 입체 장애의 사용에 의해 디설피드-함유 링커의 생체내 안정성이 강화될 수 있다.

[0193] 예시적인 디설피드-함유 링커를 포함하는 ADC는 하기 구조를 포함한다:



[0194]

[0195] [식 중, D 및 Ab는 각각 약물 및 항체를 나타내고, n은 항체에 연결된 약물-링커의 수를 나타내며, R은 각각의 경우에, 예를 들어, 수소 또는 알킬로부터 독립적으로 선택된다]. 특정 실시양태에서, 디설피드 결합에 인접한 입체 장애를 증가시키는 것은 링커의 안정성을 증가시킨다. (Ij) 및 (II)과 같은 구조는 하나 이상의 R 기가 저급 알킬 예컨대 메틸로부터 선택되었을 때 증가된 생체내 안정성을 나타낸다.

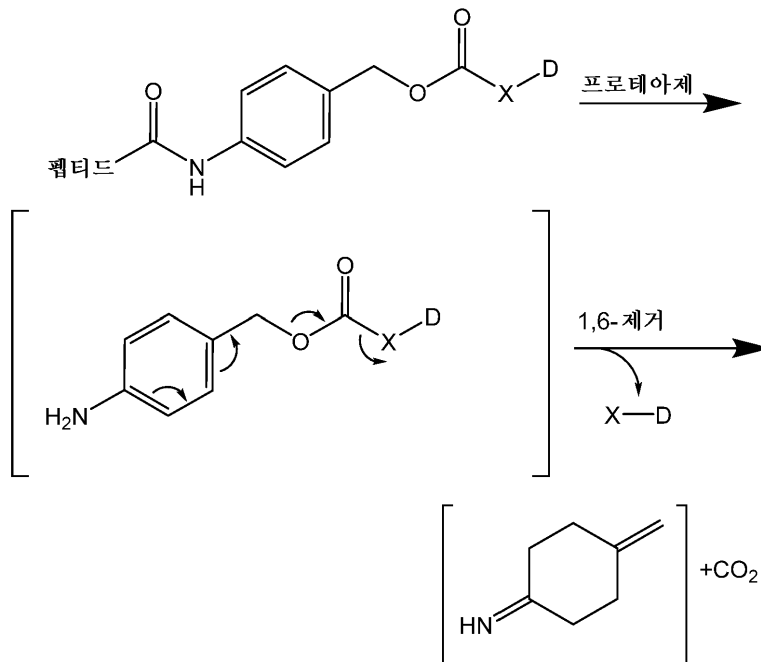
[0196] 사용될 수 있는 또 다른 유형의 절단가능한 링커는 효소에 의해 특이적으로 절단되는 링커이다. 이러한 링커는 전형적으로 펩티드-기반이거나 또는 효소에 대한 기질로서 작용하는 펩티드 영역을 포함한다. 펩티드 기반 링커는 화학적으로 불안정한 링커보다 혈장 및 세포외 환경에서 더욱 안정적인 경향이 있다. 라이소솜 단백질분해 효소는 내인성 억제제 및 라이소솜에 비교하여 혈액의 불리하게 높은 pH 값으로 인해 혈액에서의 활성이 매우 낮기 때문에, 펩티드 결합은 일반적으로 혈장 안정성이 우수하다. 항체로부터의 약물 방출은 라이소솜 프로테아제, 예를 들어, 카텝신 및 플라스민의 작용으로 인해 특이적으로 발생한다. 이러한 프로테아제들은 특정 종양 세포에서 상승된 수준으로 존재한다.

[0197] 예시적 실시양태에서, 절단가능한 펩티드는 테트라펩티드 예컨대 Gly-Phe-Leu-Gly (서열식별번호: 128), Ala-Leu-Ala-Leu (서열식별번호: 129) 또는 디펩티드 예컨대 Val-Cit, Val-Ala, Met-(D)Lys, Asn-(D)Lys, Val-(D)Asp, Phe-Lys, Ile-Val, Asp-Val, His-Val, NorVal-(D)Asp, Ala-(D)Asp 5, Met-Lys, Asn-Lys, Ile-Pro, Me3Lys-Pro, PhenylGly-(D)Lys, Met-(D)Lys, Asn-(D)Lys, Pro-(D)Lys, Met-(D)Lys, Asn-(D)Lys, AM Met-(D)Lys, Asn-(D)Lys, AW Met-(D)Lys, 및 Asn-(D)Lys로부터 선택된다. 특정 실시양태에서, 더 긴 펩티드의 소수성으로 인해 디펩티드가 더 긴 폴리펩티드에 비해 바람직하다.

[0198] 약물 예컨대 독소루비신, 미토마이신, 캄프토테신, 피롤로벤조디아제핀, 탈리소마이신 및 오리스타틴/오리스타틴 패밀리 구성원을 항체에 연결시키는데 유용한 다양한 디펩티드-기반의 절단가능한 링커가 기술되어 있다 (문헌 [Dubowchik et al., 1998, J. Org. Chem. 67:1866-1872]; [Dubowchik et al., 1998, Bioorg. Med. Chem. Lett. 8(21):3341-3346]; [Walker et al., 2002, Bioorg. Med. Chem. Lett. 12:217-219]; [Walker et al., 2004, Bioorg. Med. Chem. Lett. 14:4323-4327]; [Sutherland et al., 2013, Blood 122: 1455-1463]; 및 [Francisco et al., 2003, Blood 102:1458-1465]을 참조하고, 이들 각각은 본원에 참조로 포함된다). 이러한 디펩티드 링커, 또는 이러한 디펩티드 링커의 변형된 버전 모두가 본 개시내용의 항-글리코-MUC1 ADC에서 사용될 수 있다. 사용될 수 있는 다른 디펩티드 링커는 시애틀 제네틱스(Seattle Genetics)의 브렌투시맵 벤도틴 (Brentuximab Vendotin) SGN-35 (애드세트리스(Adcetris)TM), 시애틀 제네틱스 SGN-75 (항-CD-70, Val-Cit-모노메틸 오리스타틴 F(MMAF)), 시애틀 제네틱스 SGN-CD33A (항-CD-33, Val-Ala-(SGD-1882)), 셀렉스 쉐라퓨틱스 (Celldex Therapeutics) 글렘바투무맵 (CDX-011) (항-NMB, Val-Cit-모노메틸 오리스타틴 E (MMAE)), 및 사이토젠(Cytogen) PSMA-ADC (PSMA-ADC-1301) (항-PSMA, Val-Cit-MMAE)와 같은 ADC에서 발견되는 것들을 포함한다.

[0199] 효소적으로 절단가능한 링커는 약물을 효소 절단 부위로부터 공간적으로 분리하기 위해 자가-파괴성 스페이서를 포함할 수 있다. 약물이 펩티드 링커에 직접적으로 부착되는 것은 약물의 아미노산 부가물의 단백질분해성 방출을 초래함으로써 이의 활성을 손상시키는 것을 초래할 수 있다. 자가-파괴성 스페이서를 사용하는 것은 아미드 결합 가수분해시 완전히 활성인, 화학적으로 변형되지 않은 약물의 제거를 허용한다.

[0200] 한 자가-파괴성 스페이서는 이관능성 파라-아미노벤질 알콜 기이고, 이는 아미노 기를 통해 펩티드에 연결되어 아미드 결합을 형성하는 한편, 아민-함유 약물은 카르바메이트 관능성을 통해 링커의 벤질 히드록실 기에 부착될 수 있다 (PABC). 생성된 전구약물이 프로테아제-매개 절단 시 활성화되어, 미변형 약물, 이산화탄소 및 링커 기의 나머지를 방출하는 1,6-제거 반응에 이른다. 하기 도식이 p-아미노벤질 에테르의 단편화 및 약물 방출을 도시한다:

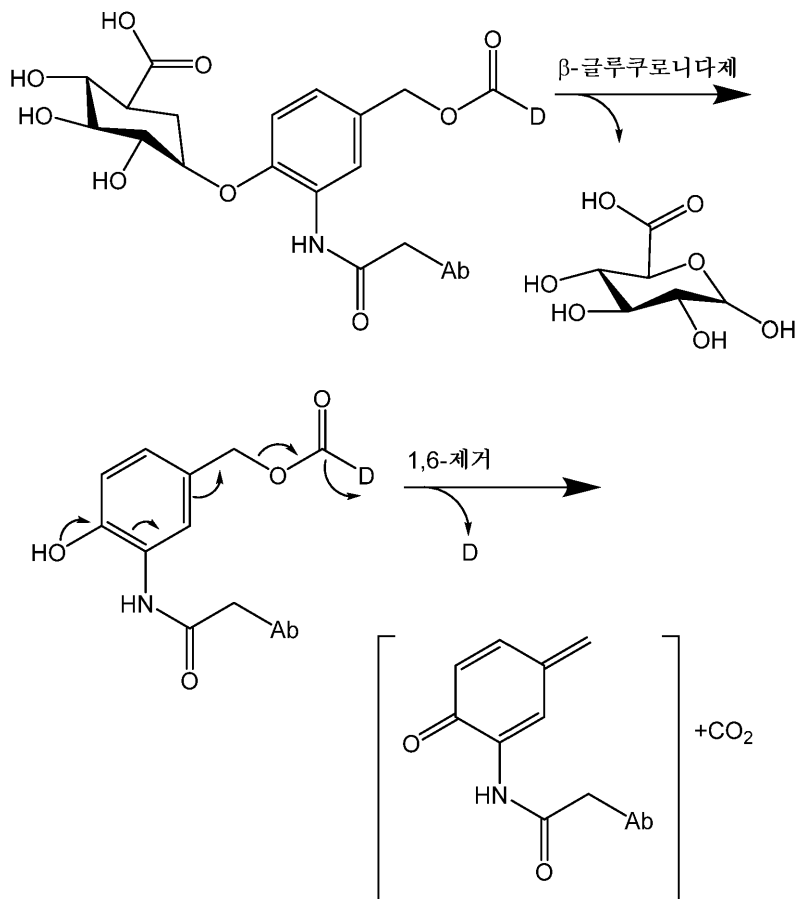


[0201]

[0202] [식 중, X-D는 미변형 약물을 나타낸다].

[0203] 이러한 자가-파괴성 기의 헤테로고리형 변이체가 또한 기술되었다. 예를 들어, 본원에 참조로 포함된 미국 특허 번호 7,989,434를 참조한다.

[0204] 일부 실시양태에서, 효소적으로 절단가능한 링커는 β-글루쿠론산-기반 링커이다. 리소솜 효소 β-글루쿠로니다제에 의한 β-글루쿠로니다 글리코시드 결합의 절단을 통해수월한 약물 방출이 실현될 수 있다. 이러한 효소는 리소솜 내에 풍부하게 존재하고, 일부 중앙 유형에서 과발현되는 한편, 세포 외부에서의 효소 활성은 낮다. β-글루쿠론산-기반 링커는 β-글루쿠로니다의 친수성 성질로 인해 ADC가 응집을 겪는 경향을 우회하는데 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, β-글루쿠론산-기반 링커는 소수성 약물에 연결된 ADC에 대한 링커로서 바람직하다. 하기 도식은 β-글루쿠론산-기반 링커를 함유하는 ADC로부터의 약물 방출을 도시한다:



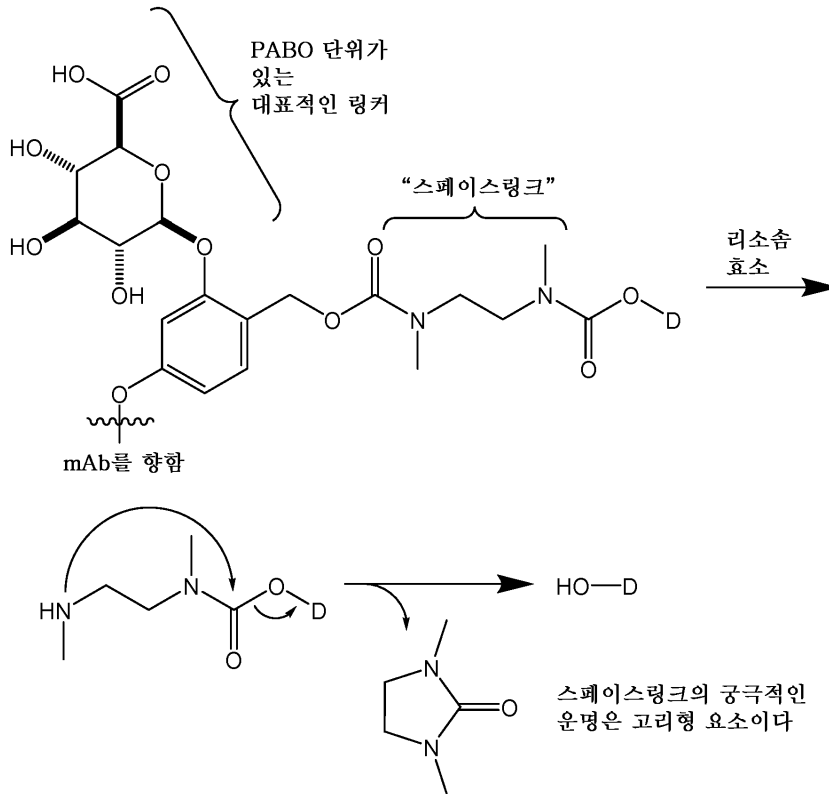
[0205]

[0206]

약물 예컨대 오리스타틴, 캄프토테신 및 독소루비신 유사체, CBI 마이너-그루브 결합체, 및 심베린을 항체에 연결시키는데 유용한 다양한 절단가능한 β -글루쿠론산-기반 링커가 기술되어 있다 (문헌 [[Nolting, Chapter 5 "Linker Technology in Antibody-Drug Conjugates", In: Antibody-Drug Conjugates: Methods in Molecular Biology, vol. 1045, pp. 71-100, Laurent Ducry (Ed.), Springer Science & Business Media, LLC, 2013]; [Jeffrey et al., 2006, Bioconjug. Chem. 17:831-840]; [Jeffrey et al., 2007, Bioorg. Med. Chem. Lett. 17:2278-2280]; 및 [Jiang et al., 2005, J. Am. Chem. Soc. 127:11254-11255]을 참조하고, 이들 각각은 본원에 참조로 포함된다). 이러한 β -글루쿠론산-기반 링커 모두가 본 개시내용의 항-글리코-MUC1 ADC에서 사용될 수 있다.

[0207]

추가적으로, 페놀 기를 함유하는 세포독성 및/또는 세포정지성 작용제가 페놀성 산소를 통해 링커에 공유 결합될 수 있다. WO 2007/089149에 기술된 한 이러한 링커는 디아미노-에탄 "스페이스링크(SpaceLink)"가 전통적인 "PABO"-기반 자가-파괴성 기와 함께 사용되어 페놀을 전달하는 방법에 의존한다. 링커의 절단이 하기에서 도식적으로 도시되고, 여기서 D는 페놀성 히드록실 기가 있는 세포독성 및/또는 세포정지성 작용제를 나타낸다.



[0208]

[0209]

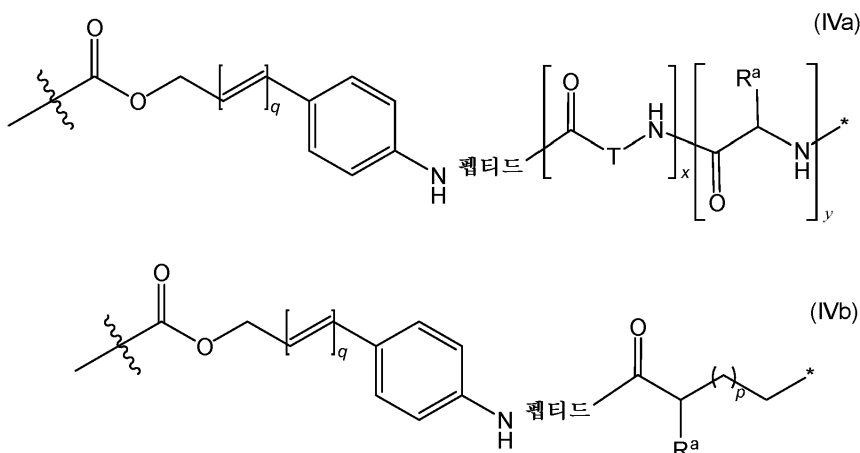
절단가능한 링커가 절단가능하지 않은 부분 또는 분절을 포함할 수 있고/있거나, 절단가능한 분절 또는 부분이 다른 경우에는 절단가능하지 않은 링커 내에 포함되어 이를 절단가능하게 만들 수 있다. 단지 예로서, 폴리에틸렌 글리콜 (PEG) 및 관련된 중합체가 중합체 백본 내에 절단가능한 기를 포함할 수 있다. 예를 들어, 폴리에틸렌 글리콜 또는 중합체 링커가 하나 이상의 절단가능한 기 예컨대 디설피드, 히드라존 또는 디펩티드를 포함할 수 있다.

[0210]

링커에 포함될 수 있는 다른 분해될 수 있는 결합은 PEG 카르복실산 또는 활성화된 PEG 카르복실산과 생물학적으로 활성인 작용제 상의 알콜 기의 반응에 의해 형성된 에스테르 연결이고, 여기서 이러한 에스테르 기는 일반적으로 생리학적 조건 하에 가수분해되어 생물학적으로 활성이 작용제를 방출한다. 가수분해에 의해 분해될 수 있는 연결은 카르보네이트 연결; 아민 및 알데히드의 반응으로부터 초래되는 이민 연결; 알콜과 포스페이트 기를 반응시킴으로써 형성되는 포스페이트 에스테르 연결; 알데히드 및 알콜의 반응 생성물인 아세탈 연결; 포르메이트 및 알콜의 반응 생성물인 오르토에스테르 연결; 및 중합체의 끝부분의 것을 포함하지만 이에 제한되지 않는 포스포아미드 기 및 올리고뉴클레오타이드의 5' 히드록실 기에 의해 형성되는 올리고뉴클레오타이드 연결을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0211]

특정 실시양태에서, 링커, 예를 들어, 구조식 (IVa) 또는 (IVb), 또는 이의 염을 포함하는 링커는 효소적으로 절단가능한 펩티드 모이어티를 포함한다:

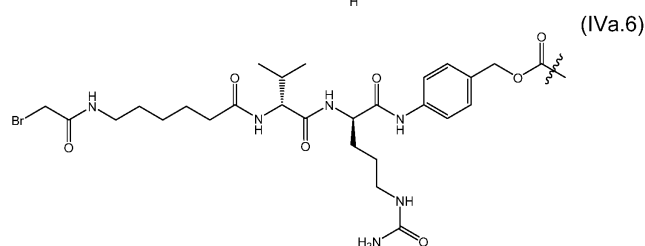
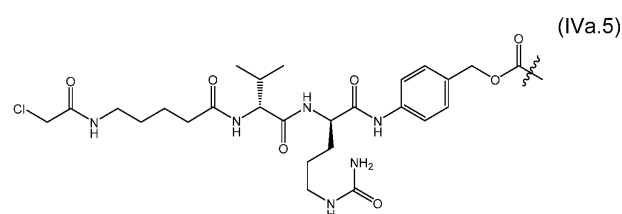
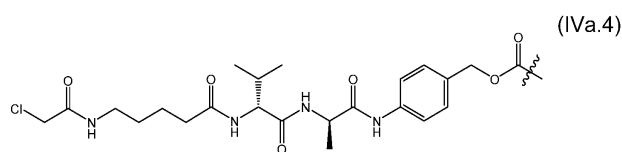
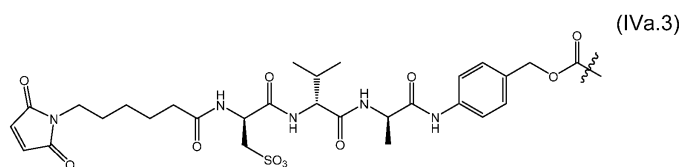
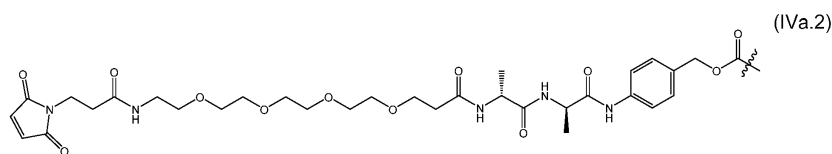
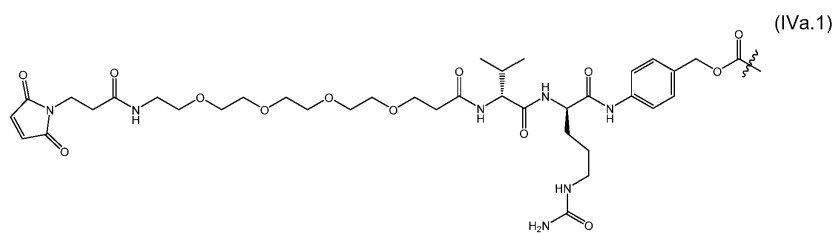


[0212]

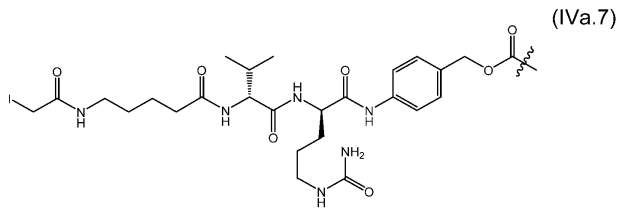
[0213] [식 중, 펩티드는 리소솜 효소에 의해 절단가능한 펩티드 (C→N으로 도해되고, 카르복시 및 아미노 "말단"을 나타내지 않음)를 나타내고; T는 하나 이상의 에틸렌 글리콜 단위를 포함하는 중합체 또는 알킬렌 사슬, 또는 이의 조합을 나타내고; R^a는 수소, 알킬, 술포네이트 및 메틸 술포네이트로부터 선택되고; p는 0 내지 5 범위의 정수이고; q는 0 또는 1이고; x는 0 또는 1이고; y는 0 또는 1이고;  는 링커가 세포독성 및/또는 세포정지성 작용제에 부착되는 지점을 나타내며; *는 나머지 링커의 부착 지점을 나타낸다].

[0214] 특정 실시양태에서, 펩티드는 트리펩티드 또는 디펩티드로부터 선택된다. 특정 실시양태에서, 디펩티드는 Val-Cit; Cit-Val; Ala-Ala; Ala-Cit; Cit-Ala; Asn-Cit; Cit-Asn; Cit-Cit; Val-Glu; Glu-Val; Ser-Cit; Cit-Ser; Lys-Cit; Cit-Lys; Asp-Cit; Cit-Asp; Ala-Val; Val-Ala; Phe-Lys; Val-Lys; Ala-Lys; Phe-Cit; Leu-Cit; Ile-Cit; Phe-Arg; 및 Trp-Cit로부터 선택된다. 특정 실시양태에서, 디펩티드는 Cit-Val; 및 Ala-Val 으로부터 선택된다.

[0215] 본 개시내용의 항-글리코-MUC1 ADC에 포함될 수 있는 구조식 (IVa)에 따른 링커의 구체적인 예시적 실시양태는 하기에 도해된 링커를 포함한다 (도해된 바와 같이, 링커는 링커를 항체에 공유 연결시키는데 적절한 기를 포함한다):



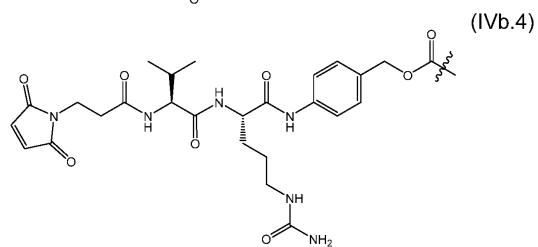
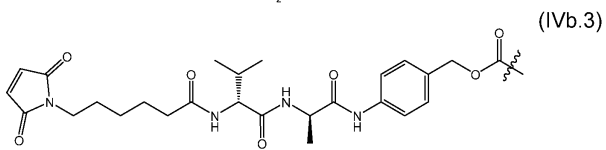
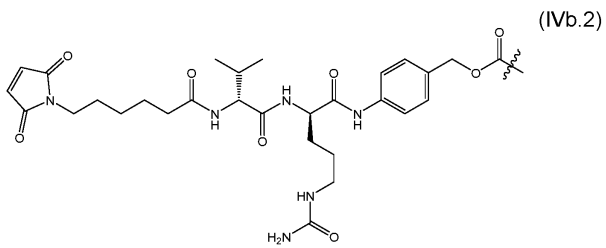
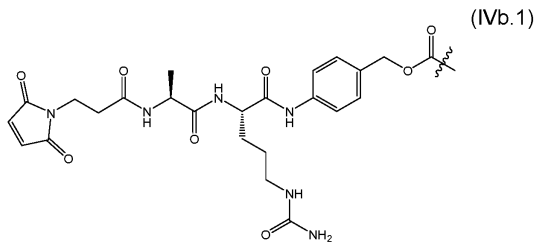
[0216]



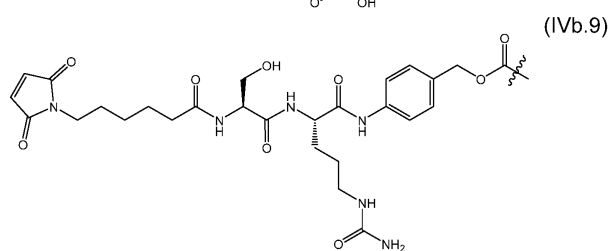
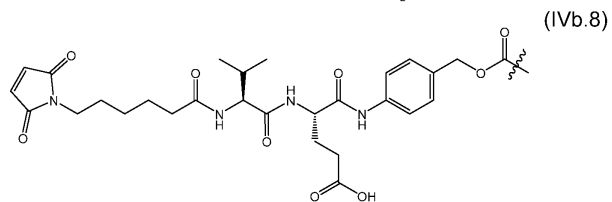
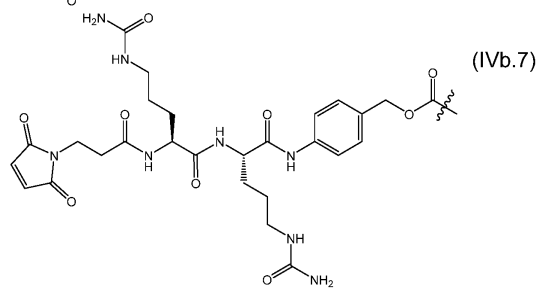
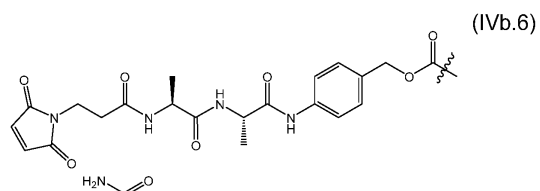
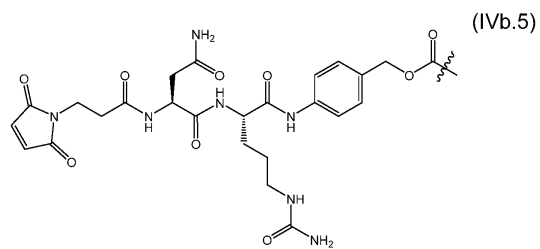
[0217]

[0218]

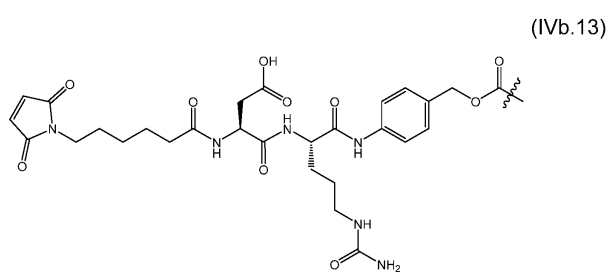
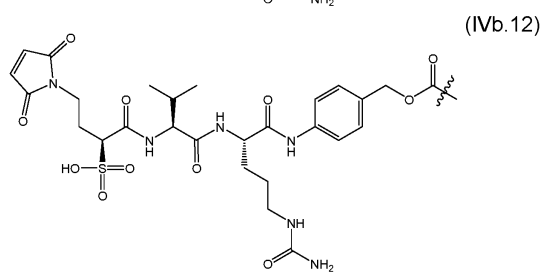
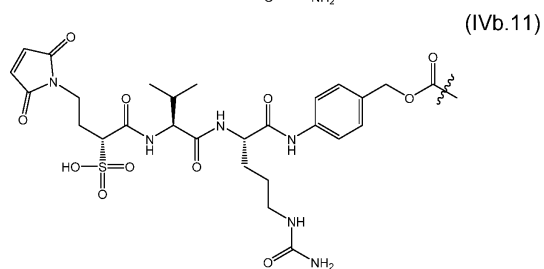
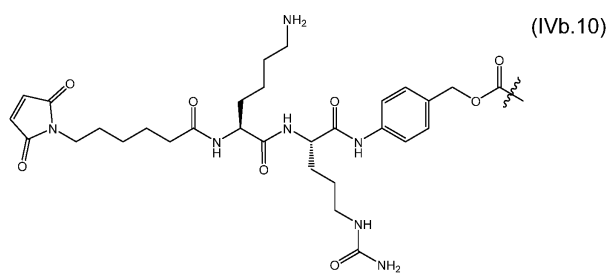
본 개시내용의 항-글리코-MUC1 ADC에 포함될 수 있는 구조식 (IVb)에 따른 링커의 구체적인 예시적 실시양태는 하기에 도해된 링커를 포함한다 (도해된 바와 같이, 링커는 링커를 항체에 공유 연결시키는데 적절한 기를 포함한다):



[0219]

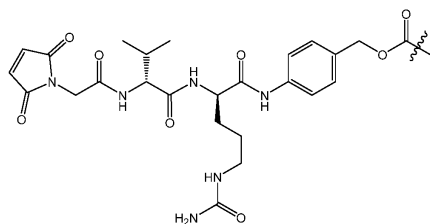


[0220]

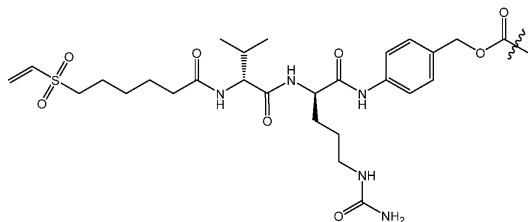


[0221]

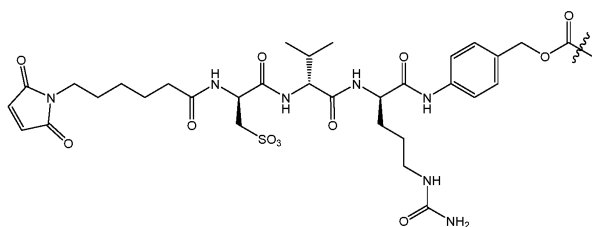
(IVb.14)



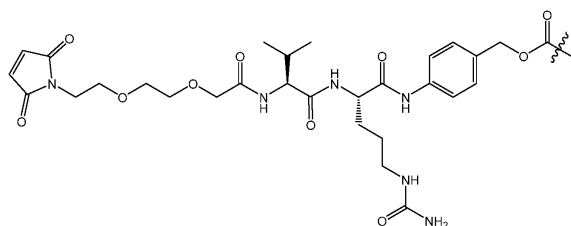
(IVb.15)



(IVb.16)

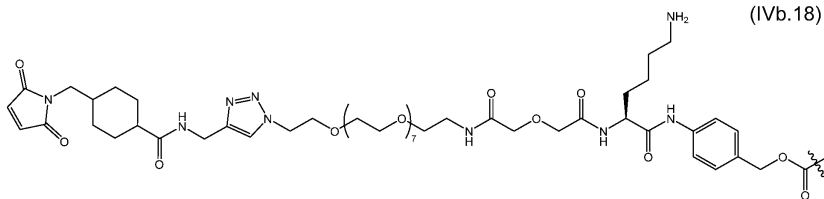


(IVb.17)

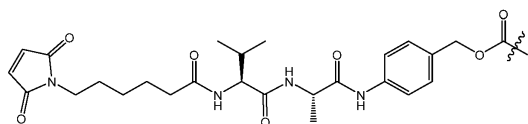


[0222]

(IVb.18)



(IVb.19)

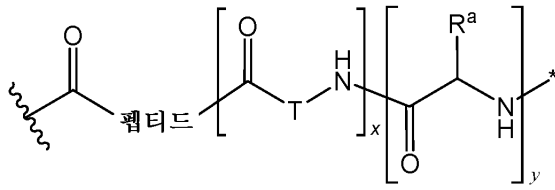


[0223]

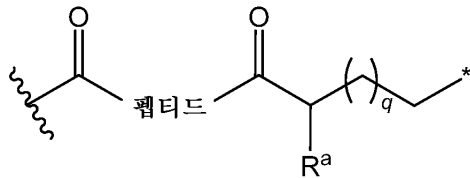
[0224]

특정 실시양태에서, 링커, 예를 들어, 구조식 (IVc) 또는 (IVd), 또는 이의 염을 포함하는 링커는 효소적으로 절단가능한 펩티드 모이어티를 포함한다:

(IVc)



(IVd)



[0225]

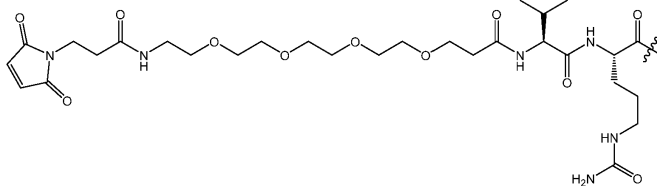
[0226]

[식 중, 펩티드는 리소솜 효소에 의해 절단가능한 펩티드 (C→N으로 도해되고, 카르복시 및 아미노 "말단"을 나타내지 않음)를 나타내고; T는 하나 이상의 에틸렌 글리콜 단위를 포함하는 중합체 또는 알킬렌 사슬, 또는 이의 조합을 나타내고; R^a는 수소, 알킬, 술포네이트 및 메틸 술포네이트로부터 선택되고; p는 0 내지 5 범위의 정수이고; q는 0 또는 1이고; x는 0 또는 1이고; y는 0 또는 1이고; 는 링커가 세포독성 및/또는 세포정지성 작용제에 부착되는 지점을 나타내며; *는 나머지 링커의 부착 지점을 나타낸다].

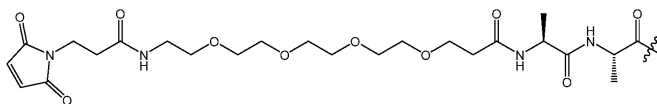
[0227]

본 개시내용의 항-글리코-MUC1 ADC에 포함될 수 있는 구조식 (IVc)에 따른 링커의 구체적인 예시적 실시양태는 하기에 도해된 링커를 포함한다 (도해된 바와 같이, 링커는 링커를 항체에 공유 연결시키는데 적절한 기를 포함한다):

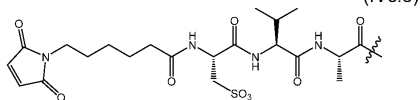
(IVc.1)



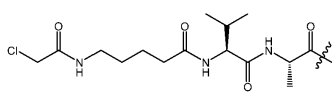
(IVc.2)



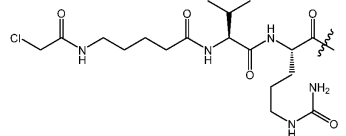
(IVc.3)



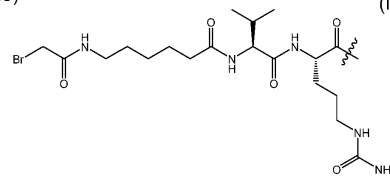
(IVc.4)



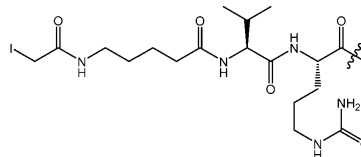
(IVc.5)



(IVc.6)



(IVc.7)

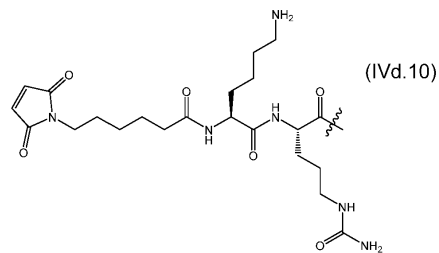
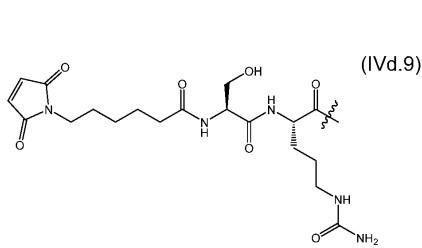
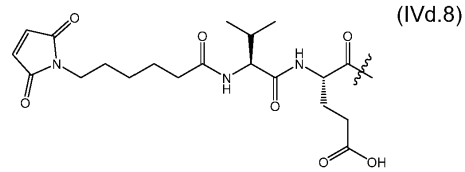
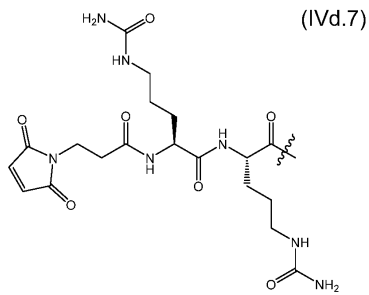
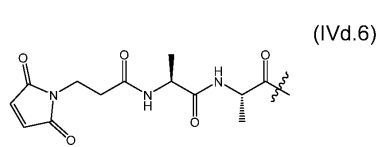
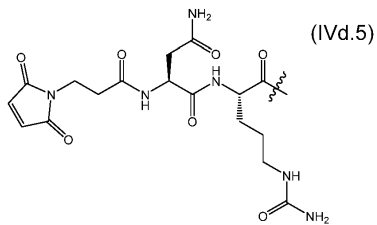
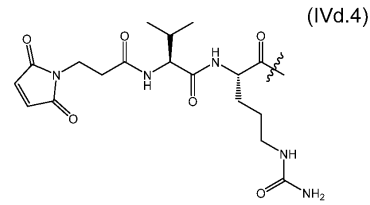
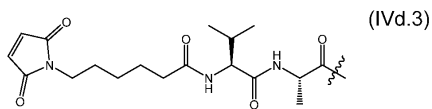
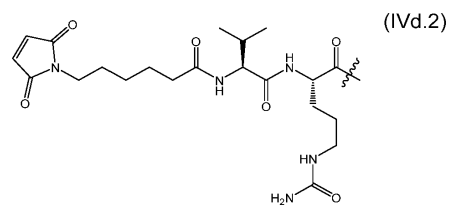
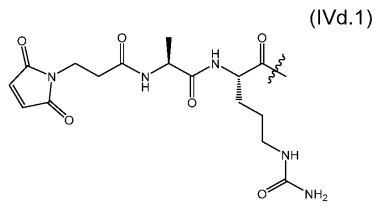


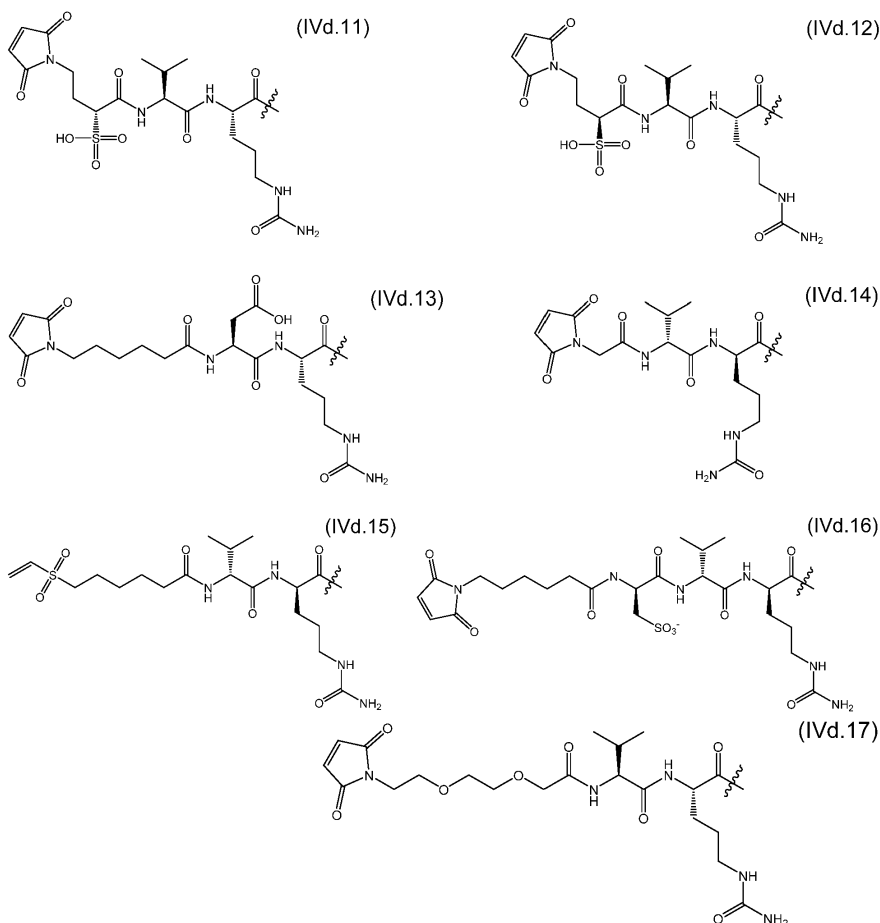
[0228]

[0229]

본 개시내용의 항-글리코-MUC1 ADC에 포함될 수 있는 구조식 (IVd)에 따른 링커의 구체적인 예시적 실시양태는

하기에 도해된 링커를 포함한다 (도해된 바와 같이, 링커는 링커를 항체에 공유 연결시키는데 적절한 기를 포함한다):





[0232]

[0233]

특정 실시양태에서, 구조식 (IVa), (IVb), (IVc), 또는 (IVd)를 포함하는 링커는 산성 매질에 노출되는 것에 의해 절단가능한 카르보네이트 모이어티를 추가로 포함한다. 특정 실시양태에서, 링커는 산소를 통해 세포독성 및/또는 세포정지성 작용제에 부착된다.

[0234]

5.3.4. 절단가능하지 않은 링커

[0235]

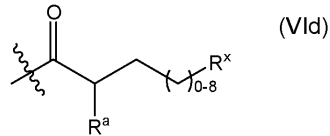
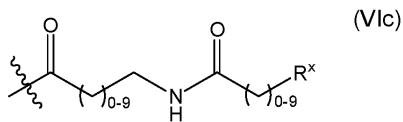
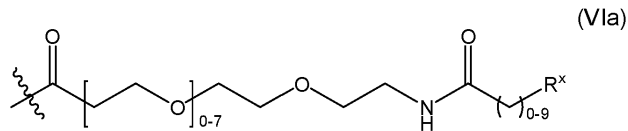
절단가능한 링커가 특정한 장점을 제공할 수 있지만, 본 개시내용의 항-글리코-MUC1 ADC를 이루는 링커는 절단가능할 필요가 없다. 절단가능하지 않은 링커의 경우, 약물 방출은 혈장과 일부 세포질 구획 사이의 차별적인 성질에 의존적이지 않다. 항원-매개 세포내이입을 통한 ADC의 내재화 및 리소솜 구획으로의 전달 후에 약물 방출이 발생할 것으로 가정되고, 여기서 항체는 세포내 단백질분해성 분해를 통해 아미노산 수준으로 분해된다. 이러한 프로세스로 약물 유도체가 방출되고, 이는 약물, 링커, 및 링커가 공유 부착된 아미노산 잔기에 의해 형성된다. 절단가능한 링커가 있는 집합체에 비교하여, 절단가능하지 않은 링커가 있는 집합체로부터의 아미노산 약물 대사산물은 더욱 친수성이고, 일반적으로 막 투과성이 더 적으며, 이는 더 적은 방관자 효과 및 더 적은 비-특이적 독성에 이른다. 일반적으로, 절단가능하지 않은 링커가 있는 ADC는 절단가능한 링커가 있는 ADC보다 순환에서의 안정성이 더 크다. 절단가능하지 않은 링커는 알킬렌 사슬일 수 있거나, 또는 성질 면에서 중합체 성일 수 있고, 예를 들어, 폴리알킬렌 글리콜 중합체, 아마이드 중합체를 기초로 할 수 있거나, 또는 알킬렌 사슬, 폴리알킬렌 글리콜 및/또는 아마이드 중합체의 분절을 포함할 수 있다.

[0236]

약물을 항체에 연결시키는데 사용되는 다양한 절단가능하지 않은 링커가 기술되어 있다. 문헌 [Jeffrey et al., 2006, Bioconjug. Chem. 17; 831-840]; [Jeffrey et al., 2007, Bioorg. Med. Chem. Lett. 17:2278-2280]; 및 [Jiang et al., 2005, J. Am. Chem. Soc. 127:11254-11255]를 참조하고, 이들 각각은 본원에 참조로 포함된다. 이러한 링커 모두가 본 개시내용의 항-글리코-MUC1 ADC에 포함될 수 있다.

[0237]

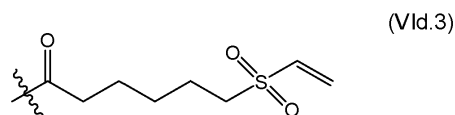
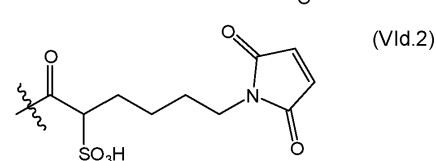
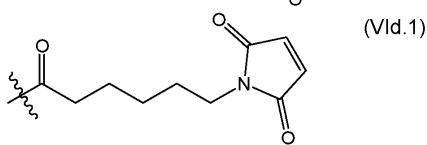
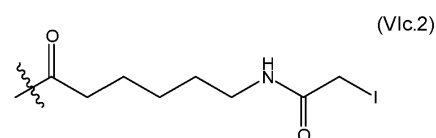
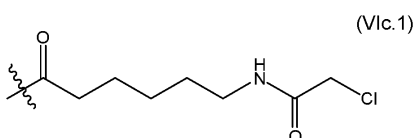
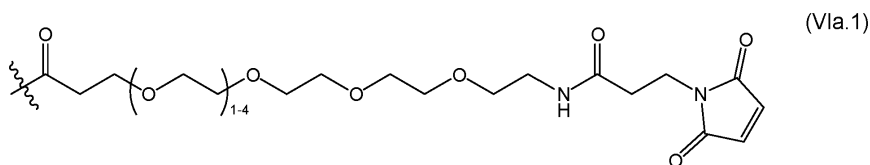
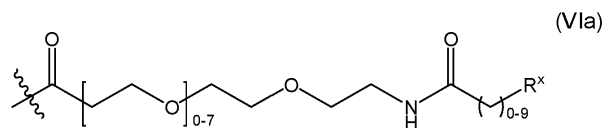
특정 실시양태에서, 링커, 예를 들어, 구조식 (VIa), (VIb), (VIc) 또는 (VId) 또는 이의 염에 따른 링커는 생체 내에서 절단가능하지 않다 (도해된 바와 같이, 링커는 링커를 항체에 공유 연결시키는데 적절한 기를 포함한다):



[0238]

[0239] [식 중, R^a는 수소, 알킬, 술포네이트 및 메틸 술포네이트로부터 선택되고; R^x는 링커를 항체에 공유 연결시킬 수 있는 관능기를 포함하는 모이어티이며; 는 링커가 세포독성 및/또는 세포정지성 작용제에 부착되는 지점을 나타낸다].

[0240] 본 개시내용의 항-글리코-MUC1 ADC에 포함될 수 있는 구조식 (VIa)-(VIId)에 따른 링커의 구체적인 예시적 실시양태는 하기에 도해진 링커를 포함한다 (도해진 바와 같이, 링커는 링커를 항체에 공유 연결시키는데 적절한 기를 포함하고, 는 세포독성 및/또는 세포정지성 작용제에 부착되는 지점을 나타낸다):



[0241]

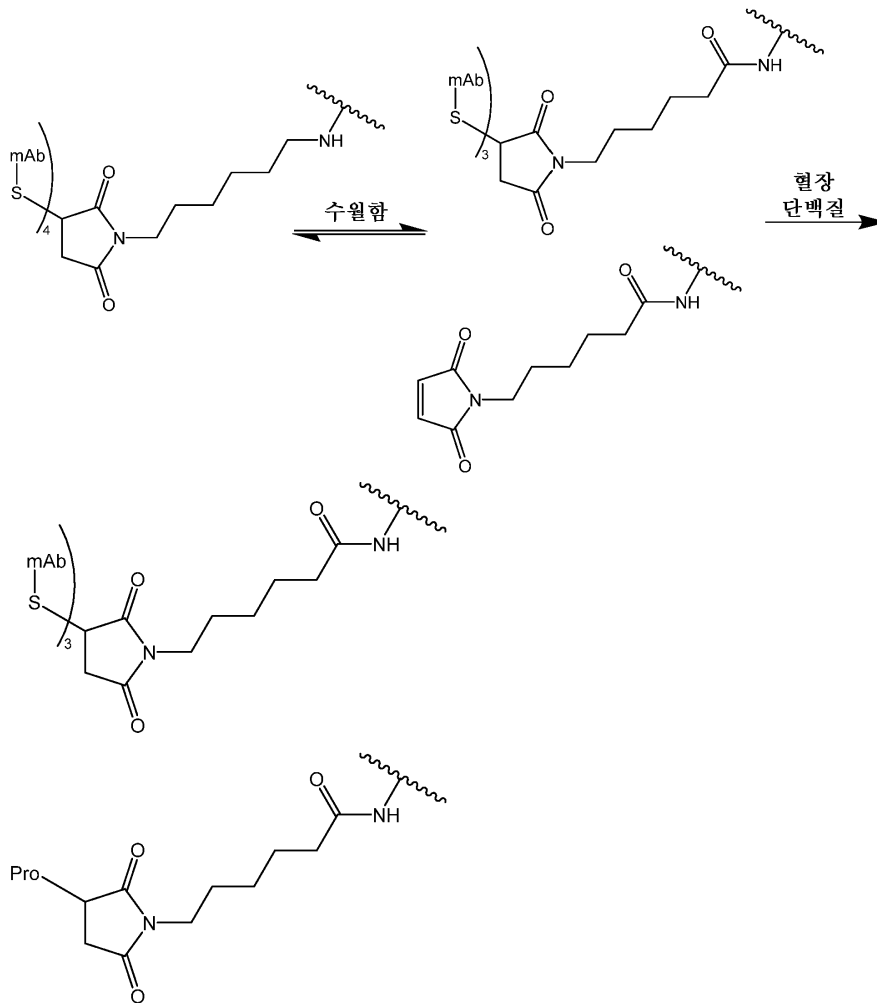
[0242] 5.3.5. 링커를 항체에 부착시키는데 사용되는 기

[0243] 다양한 기가 링커-약물 신통을 항체에 부착시켜 ADC를 산출하는데 사용될 수 있다. 부착 기는 성질 면에서 친전자성일 수 있고, 말레이미드 기, 활성화된 디설피드, 활성 에스테르 예컨대 NHS 에스테르 및 HOBt 에스테르, 할로포르메이트, 산 할라이드, 알킬 벤질 할라이드 예컨대 할로아세트아미드를 포함한다. 하기 논의된 바와 같이, 본 개시내용에 따라 사용될 수 있는 "자가-안정화" 말레이미드 및 "가교 디설피드"에 관련된 기술이 또한 부상 중이다. 사용된 구체적인 기는, 부분적으로, 항체에 부착되는 부위에 의존적일 것이다.

[0244]

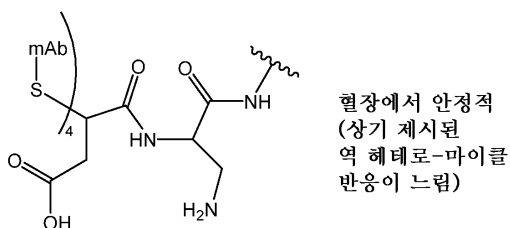
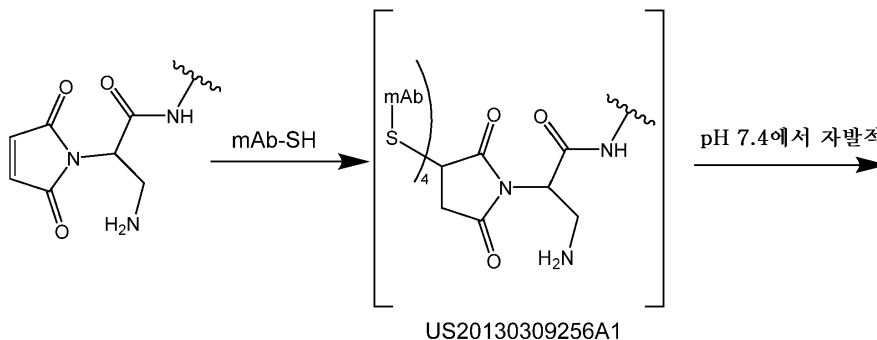
항체 접합 조건 하에 자발적으로 가수분해되어 안정성이 개선된 ADC 종을 제공하는 "자가-안정화" 말레이미드 기의 한 예가 하기 하기 도식에서 도시된다. US20130309256 A1을 참조하고; 문헌 [Lyon et al., Nature Biotech published online, doi:10.1038/nbt.2968]을 또한 참조한다.

일반적인 시스템:



[0245]

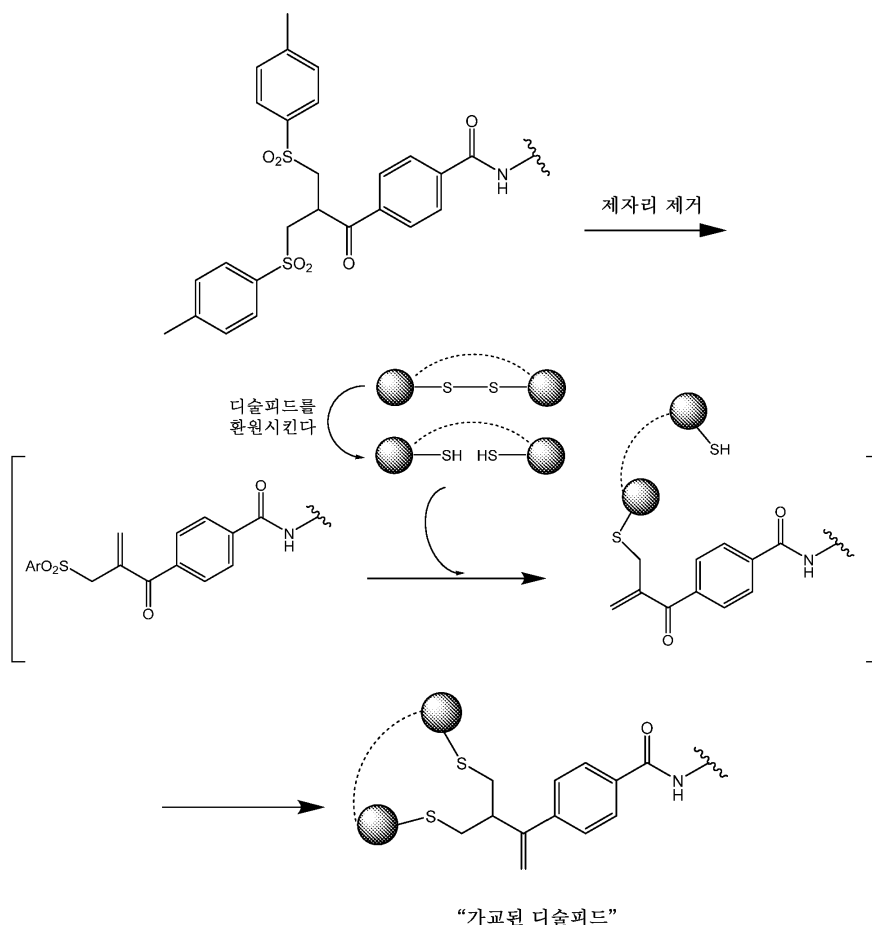
SGN MalDPR (말레이미도 디프로필아미노) 시스템:



[0246]

[0247]

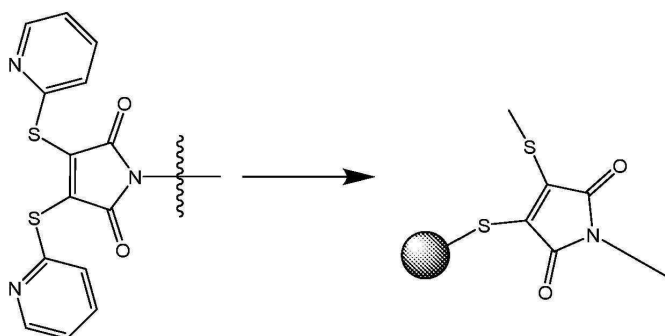
폴리쉴릭스(Polytherics)가 천연 힌지 디설피드 결합의 환원으로부터 유도된 한 쌍의 술포히드릴 기를 가교시키는 방법을 개시하였다. 문헌 [Badescu et al., 2014, Bioconjugate Chem. 25:1124-1136]을 참조한다. 하기 도식에서 반응이 도시된다. 이러한 방법의 장점은 IgG의 완전한 환원 (4쌍의 술포히드릴을 제공함)에 이어지는 4 당량의 알킬화제와의 반응에 의해 농축된 DAR4 ADC를 합성하는 능력이다. 가교된 "디설피드"를 함유하는 ADC 또한 안정성이 증가된 것으로 주장된다.



[0248]

[0249]

유사하게, 하기 도시된 바와 같이, 한 쌍의 술포히드릴 기를 가교시킬 수 있는 말레이미드 유도체 (1, 하기)가 개발되었다. W02013/085925를 참조한다.



[0250]

[0251]

5.3.6. 링커 선택 고려사항

[0252]

통상의 기술자에게 공지된 바와 같이, 특정 ADC용으로 선택된 링커는 항체에 부착되는 부위 (예를 들어, lys, cys 또는 다른 아미노산 잔기), 약물의 약물작용발생단의 구조적 제약 및 약물의 친지성을 포함하지만 이에 제한되지 않는 다양한 요인에 의해 영향을 받을 수 있다. ADC용으로 선택된 구체적인 링커는 구체적인 항체/약물 조합에 대해 이러한 상이한 요인들을 균형잡는 것을 추구하여야 한다. ADC에서의 링커 선택에 의해 영향을 받는 요인의 리뷰를 위해, 문헌 [Nolting, Chapter 5 "Linker Technology in Antibody-Drug Conjugates," In: Antibody-Drug Conjugates: Methods in Molecular Biology, vol. 1045, pp. 71-100, Laurent Ducry (Ed.),

Springer Science & Business Medica, LLC, 2013]을 참조한다.

[0253] 예를 들어, ADC는 항원-양성 종양 세포에 인접하여 존재하는 방관자 항원-음성 세포의 살해를 초래하는 것으로 관찰되었다. ADC에 의한 방관자 세포 사멸의 메커니즘은 ADC의 세포내 프로세싱 동안 형성된 대사 생성물이 역할을 할 수 있다는 것을 나타냈다. 항원-양성 세포에서 ADC의 대사에 의해 생성된 중성 세포독성 대사산물이 방관자 세포 살해에서 역할을 하는 것으로 보이는 한편, 하전된 대사산물은 막을 가로질러 매질 내로 확산되는 것이 방지될 수 있고, 따라서 방관자 살해에 영향을 미칠 수 없다. 특정 실시양태에서, 링커는 ADC의 세포성 대사산물에 의해 야기되는 방관자 살해 효과를 약화시키도록 선택된다. 특정 실시양태에서, 링커는 방관자 살해 효과를 증가시키도록 선택된다.

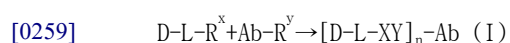
[0254] 링커의 성질은 사용 및/또는 보관 조건 하에서 ADC의 응집에 또한 영향을 미칠 수 있다. 전형적으로, 문헌에서 보고된 ADC는 항체 분자 당 3-4개 이하의 약물 분자를 함유한다 (예를 들어, 문헌 [Chari, 2008, Acc Chem Res 41:98-107]을 참조한다). 더 높은 약물-대-항체 비 ("DAR")를 획득하려는 시도가, 특히 약물 및 링커 양쪽 모두가 친수성인 경우에, ADC의 응집으로 인해 종종 실패하였다 (King et al., 2002, J Med Chem 45:4336-4343; Hollander et al., 2008, Bioconjugate Chem 19:358-361; Burke et al., 2009 Bioconjugate Chem 20:1242-1250). 다수의 경우에, 3-4보다 높은 DAR이 효능을 증가시키는 수단으로서 이로울 수 있다. 세포독성 및/또는 세포정지성 작용제가 성질 면에서 소수성인 경우, 비교적 친수성인 링커를 ADC 응집을 감소시키는 수단으로서 선택하는 것이 바람직할 수 있고, 3-4를 초과하는 DAR을 원하는 경우에 특히 그러하다. 따라서, 특정 실시양태에서, 보관 및/또는 사용 동안 ADC의 응집을 감소시키는 화학 모이어티가 링커에 혼입된다. 극성 또는 친수성기 예컨대 하전된 기 또는 생리학적 pH 하에 하전되는 기가 링커에 혼입되어 ADC의 응집을 감소시킬 수 있다. 예를 들어, 하전된 기 예컨대 생리학적 pH에서 탈양성자화시키는 염 또는 기, 예를 들어, 카르복실레이트, 또는 양성자화시키는 염 또는 기, 예를 들어, 아민이 링커에 혼입될 수 있다.

[0255] 다수의 세포독성 및/또는 세포정지성 작용제를 항체에 연결시키는데 사용될 수 있는 20만쯤 높은 DAR을 산출하는 것으로 보고된 예시적인 다가 링커가 WO 2009/073445; WO 2010/068795; WO 2010/138719; WO 2011/120053; WO 2011/171020; WO 2013/096901; WO 2014/008375; WO 2014/093379; WO 2014/093394; WO 2014/093640에 기술되어 있고, 이들의 내용은 전문이 본원에 참조로 포함된다.

[0256] 특정 실시양태에서, 보관 또는 사용 동안의 ADC의 응집은 크기-배제 크로마토그래피 (SEC)에 의해 결정 시 약 10% 미만이다. 특정 실시양태에서, 보관 또는 사용 동안의 ADC의 응집은 크기-배제 크로마토그래피 (SEC)에 의해 결정 시 10% 미만, 예컨대 약 5% 미만, 약 4% 미만, 약 3% 미만, 약 2% 미만, 약 1% 미만, 약 0.5% 미만, 약 0.1% 미만이거나, 또는 심지어 이보다 더 낮다.

[0257] 5.3.7. 항-글리코-MUC1 ADC를 제조하는 방법

[0258] 본 개시내용의 항-글리코-MUC1 ADC를 널리 공지되어 있는 화학을 사용하여 합성할 수 있다. 선택된 화학은, 특히, 세포독성 및/또는 세포정지성 작용제(들), 링커, 및 링커를 항체에 부착시키는데 사용된 기의 신원에 의존적일 것이다. 일반적으로, 화학식 (I)에 따른 ADC가 하기 도식에 따라 제조될 수 있다:



[0260] [식 중, D, L, Ab, XY 및 n은 이전에 정의된 바와 같고, R^x 및 R^y 는 상기 논의된 바와 같이 서로 공유 연결을 형성할 수 있는 상보적인 기를 나타낸다].

[0261] R^x 및 R^y 기의 신원은 신톤 D-L- R^x 를 항체에 연결시키는데 사용된 화학에 의존적일 것이다. 일반적으로, 사용된 화학은 항체의 온전성, 예를 들어, 이의 표적에 결합하는 능력을 변경시키지 않아야 한다. 바람직하게는, 접합된 항체의 결합 성질은 접합되지 않은 항체의 것과 매우 유사할 것이다. 분자를 생물학적 분자 예컨대 항체에 접합시키기 위한 다양한 화학 및 기술이 관련 분야에 공지되어 있고, 특히 항체에 대해 널리 공지되어 있다. 예를 들어, 문헌 [Amon et al., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy," in: Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeld et al. Eds., Alan R. Liss, Inc., 1985]; [Hellstrom et al., "Antibodies For Drug Delivery," in: Controlled Drug Delivery, Robinson et al. Eds., Marcel Dekker, Inc., 2nd Ed. 1987]; [Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review," in: Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, Pinchera et al., Eds., 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, 1985]; [Thorpe *et al.*, 1982, Immunol. Rev. 62:119-58]; PCT 공개 WO 89/12624를 참조한다. 이러한 화학 중 임의 것을 신포를 항체에 연결시키는데 사용할 수 있다.

[0262] 신포를 접근가능한 라이신 잔기에 연결시키는데 유용한 다수의 관능기 R^x 및 화학이 공지되어 있고, 예를 들어, 그리고 비제한적으로 NHS-에스테르 및 이소티오시아네이트를 포함한다.

[0263] 신포를 시스테인 잔기의 접근가능한 유리 술폰히드릴 기에 연결시키는데 유용한 다수의 관능기 R^x 및 화학이 공지되어 있고, 예를 들어, 그리고 비제한적으로 할로아세틸 및 말레이미드를 포함한다.

[0264] 그러나, 접합 화학은 이용가능한 측쇄 기에 제한되지 않는다. 적합한 소형 분자를 아민에 연결시킴으로써, 아민과 같은 측쇄가 다른 유용한 기, 예컨대 히드록실로 전환될 수 있다. 이러한 전략을 사용하여, 다관능성 소형 분자를 항체의 접근가능한 아미노산 잔기의 측쇄에 접합시킴으로써 항체 상의 이용가능한 연결 부위의 수를 증가시킬 수 있다. 그 후, 신포를 이러한 "전환된" 관능기에 공유 연결시키는데 적절한 관능기 R^x 가 신포에 포함된다.

[0265] 접합을 위한 아미노산 잔기를 포함하도록 항체를 조작할 수도 있다. ADC의 맥락에서 약물을 접합시키는데 유용한 유전적으로 코딩되지 않는 아미노산 잔기를 포함하도록 항체를 조작하기 위한 접근법이 문헌 [Axup *et al.*, 2012, Proc Natl Acad Sci USA, 109(40):16101-16106]에서 기술되고, 신포를 코딩되지 않는 아미노산에 연결시키는데 유용한 화학 및 관능기도 그러하다.

[0266] 전형적으로, 신포는 접근가능한 라이신 잔기의 1차 아미노 기 또는 접근가능한 시스테인 잔기의 술폰히드릴 기를 예를 들어 포함하는, 항체의 아미노산 잔기의 측쇄에 연결된다. 사슬간 디설피드 결합을 환원시키는 것에 의해 유리 술폰히드릴 기가 수득될 수 있다.

[0267] R^y 가 술폰히드릴 기인 연결의 경우 (예를 들어, R^x 가 말레이미드일 때), 일반적으로 항체가 먼저 완전히 또는 부분적으로 환원되어 시스테인 잔기 사이의 사슬간 디설피드 다리가 파괴된다.

[0268] 디설피드 다리에 참여하지 않는 시스테인 잔기가 하나 이상의 코돈의 돌연변이에 의해 항체 내로 조작될 수 있다. 이러한 쌍을 이루지 않은 시스테인을 환원시키면 접합에 적절한 술폰히드릴 기가 산출된다. 조작된 시스테인을 혼입시키기 위한 바람직한 위치는, 예를 들어, 그리고 비제한적으로, 인간 IgG₁ 중쇄 상의 위치 S112C, S113C, A114C, S115C, A176C, 5180C, S252C, V286C, V292C, S357C, A359C, S398C, S428C (카바트 번호매김) 및 인간 Ig 카파 경쇄 상의 위치 V110C, S114C, S121C, S127C, S168C, V205C (카바트 번호매김)를 포함한다 (예를 들어, 미국 특허 번호 7,521,541, 미국 특허 번호 7,855,275 및 미국 특허 번호 8,455,622를 참조한다).

[0269] 통상의 기술자에게 명백할 바와 같이, 항체 분자에 연결된 세포독성 및/또는 세포정지성 작용제의 수가 다를 수 있어서, ADC의 선집이 성질 면에서 비균질성일 수 있고 여기서 일부 항체는 1개, 일부 항체는 2개, 일부 항체는 3개 등의 연결된 작용제를 함유한다 (일부는 함유하지 않는다). 비균질성의 정도는, 특히, 세포독성 및/또는 세포정지성 작용제를 연결시키는데 사용된 화학에 의존적일 것이다. 예를 들어, 항체가 부착을 위해 술폰히드릴 기가 산출되도록 환원되는 경우, 분자 당 0, 2, 4, 6 또는 8 개의 작용제가 연결된 항체의 비균질 혼합물이 종종 생산된다. 또한, 부착 화합물의 물비를 제한함으로써, 분자 당 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 또는 8개의 작용제가 연결된 항체가 종종 생산된다. 따라서, 맥락에 따라, 언급된 DAR은 항체 선집에 대한 평균일 수 있다는 것이 이해될 것이다. 예를 들어, "DAR4"는 특정한 DAR 피크를 단리하기 위한 정제에 적용되지 않았고, 항체 당 상이한 개수의 세포정지성 및/또는 세포독성 작용제 (예를 들어, 항체 당 0, 2, 4, 6, 8개의 작용제)가 부착된 ADC 분자의 비균질 혼합물을 포함할 수 있지만, 평균 약물-대-항체 비가 4인 ADC 제제를 지칭할 수 있다. 유사하게, 일부 실시양태에서, "DAR2"는 평균 약물-대-항체 비가 2인 비균질 ADC 제제를 지칭한다.

[0270] 농축된 제제를 원하는 경우, 한정된 개수의 세포독성 및/또는 세포정지성 작용제가 연결된 항체를 비균질 혼합물의 정제를 통해, 예를 들어, 칼럼 크로마토그래피, 예를 들어, 소수성 상호작용 크로마토그래피를 통해 수득할 수 있다.

[0271] 관련 분야에 공지되어 있는 바와 같은 다양한 방법에 의해 순도를 평가할 수 있다. 구체적인 예로서, ADC 제제를 HPLC 또는 다른 크로마토그래피에 의해 분석할 수 있고, 생성된 피크의 곡선하 면적을 분석함으로써 순도를 평가할 수 있다.

[0272] **5.4 키메라 항원 수용체**

- [0273] 본 개시내용은 본원에 기술된 항-글리코-MUC1 항체 또는 항원-결합 단편을 포함하는 키메라 항원 수용체 (CAR)를 제공한다.
- [0274] 전형적으로 본 개시내용의 CAR은 막횡단 도메인에 작동가능하게 연결된 세포의 도메인을 포함하고, 차례로 막횡단 도메인은 신호전달을 위한 세포내 도메인에 작동가능하게 연결된다.
- [0275] 본 개시내용의 CAR의 세포외 도메인은 항-글리코-MUC1 항체 또는 항원-결합 단편 (예를 들어, 섹션 5.1 또는 실시양태 1 내지 90에 기술된 바와 같음)의 서열을 포함한다.
- [0276] 예시적인 막횡단 도메인 서열 및 세포내 도메인 서열이 각각 섹션 5.4.1 및 5.4.2에서 기술된다.
- [0277] 본원에 기술된 여러 융합 단백질 (예를 들어, 실시양태 92 및 94-96)은 CAR이고, CAR-관련 개시내용이 이러한 융합 단백질에 적용된다.
- [0278] **5.4.1. 막횡단 도메인**
- [0279] 막횡단 도메인과 관련하여, CAR은 CAR의 세포외 도메인에 작동가능하게 연결된 (예를 들어, 융합된) 막횡단 도메인을 포함하도록 디자인될 수 있다.
- [0280] 막횡단 도메인은 천연 또는 합성 공급원으로부터 유래될 수 있다. 공급원이 천연인 경우, 도메인은 임의의 막-결합 또는 막횡단 단백질로부터 유래될 수 있다. 본 개시내용에서 특히 유용한 막횡단 영역은 T-세포 수용체의 알파, 베타 또는 제타 사슬, CD28, CD3 엡실론, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154로부터 유래될 수 있다 (즉, 적어도 이의 막횡단 영역(들)을 포함할 수 있다). 일부 경우에, 인간 Ig (면역글로불린) 힌지를 포함하여 다양한 인간 힌지가 또한 사용될 수 있다.
- [0281] 한 실시양태에서, 막횡단 도메인은 합성이다 (즉, 비-천연 발생이다). 합성 막횡단 도메인의 예는 류신 및 발린과 같이 우세하게 소수성인 잔기를 포함하는 펩티드이다. 바람직하게는, 페닐알라닌, 트립토판 및 발린의 삼중자가 합성 막횡단 도메인의 각각의 끝부분에서 발견될 것이다. 임의적으로, 짧은 올리고- 또는 폴리펩티드 링커, 바람직하게는 아미노산 2개 내지 10개 길이의 것이 CAR의 막횡단 도메인과 세포질 신호전달 도메인 사이의 연결을 형성할 수 있다. 글리신-세린 이중자가 특히 적절한 링커를 제공한다.
- [0282] 한 실시양태에서, 본 개시내용의 CAR 내의 막횡단 도메인은 CD8 막횡단 도메인이다. 한 실시양태에서, CD8 막횡단 도메인은 아미노산 서열 YLHLGALGRDLWGSPVTGYHPLL을 포함한다.
- [0283] 한 실시양태에서, 본 개시내용의 CAR 내의 막횡단 도메인은 CD28 막횡단 도메인이다. 한 실시양태에서, CD28 막횡단 도메인은 아미노산 서열 FWVLVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV를 포함한다.
- [0284] 일부 경우에, 본 개시내용의 CAR 내의 막횡단 도메인은 CD8a 힌지 도메인을 포함한다. 한 실시양태에서, CD8a 힌지 도메인은 아미노산 서열 TTPAPRPPTPTAPTASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFAC를 포함한다.
- [0285] **5.4.2. 세포내 도메인**
- [0286] 본 개시내용의 CAR의 세포내 신호전달 도메인은 CAR이 발현되는 면역 세포의 정상적인 이펙터 기능 중 적어도 하나의 활성화를 담당한다. 용어 "이펙터 기능"은 세포의 특수 기능을 지칭한다. T 세포의 이펙터 기능은, 예를 들어, 세포용해성 활성 또는 시토킨 분비를 포함하는 헬퍼 활성일 수 있다. 따라서, 용어 "세포내 신호전달 도메인"은 이펙터 기능 신호를 전달하고, 세포가 특수 기능을 수행하도록 지시하는 단백질의 부분을 지칭한다. 일반적으로 전체적인 세포내 신호전달 도메인이 사용될 수 있지만, 다수의 경우에 전체 사슬을 사용하는 것이 필수적이지 않다. 세포내 신호전달 도메인의 말단절단 부분이 사용되는 경우에, 이러한 말단절단 부분이 이펙터 기능 신호를 전달하는 한 이를 무손상 사슬 대신 사용할 수 있다. 따라서, 용어 세포내 신호전달 도메인은 이펙터 기능 신호를 전달하는데 충분한 세포내 신호전달 도메인의 임의의 말단절단 부분을 포함하도록 의도된다.
- [0287] 본 개시내용의 CAR에서 사용하기 위한 세포내 신호전달 도메인의 바람직한 예는 항원 수용체 맞물림 후에 신호전달을 개시하도록 협력하여 작용하는 T 세포 수용체 (TCR) 및 공동-수용체의 세포질 서열, 뿐만 아니라 이러한 서열의 임의의 유도체 또는 변이체, 및 동일한 기능성 능력을 갖는 임의의 합성 서열을 포함한다.
- [0288] TCR 단독을 통해 생성된 신호는 T 세포의 완전한 활성화에 불충분할 수 있고, 2차 또는 공동-자극 신호가 또한 요구된다. 따라서, T 세포 활성화는 2개의 별개의 클래스의 세포질 신호전달 서열에 의해 매개된다고 할 수 있다: TCR을 통해 항원-의존적 1차 활성화를 개시하는 것 (1차 세포질 신호전달 서열) 및 2차 또는 공동-자극 신

호를 제공하도록 항원-의존적 방식으로 작용하는 것 (2차 세포질 신호전달 서열).

[0289] 1차 세포질 신호전달 서열은 자극 방식 또는 억제 방식으로 TCR 복합체의 1차 활성화를 조절한다. 자극 방식으로 작용하는 1차 세포질 신호전달 서열은 면역수용체 타이로신-기반 활성화 모티프 또는 ITAM으로 공지된 신호 전달 모티프를 함유할 수 있다.

[0290] 본 개시내용의 CAR에서 특히 유용한 1차 세포질 신호전달 서열을 함유하는 ITAM의 예는 TCR 제타, FcR 감마, FcR 베타, CD3 감마, CD3 델타, CD3 엡실론, CD5, CD22, CD79a, CD79b, 및 CD66d로부터 유래되는 것을 포함한다. 본 개시내용의 CAR에서의 세포질 신호전달 분자가 CD3-제타로부터의 세포질 신호전달 서열을 포함하는 것이 특히 바람직하다.

[0291] 바람직한 실시양태에서, CAR의 세포질 도메인은 1차 세포질 신호전달 서열 도메인 (예를 들어, CD3-제타의 것) 을 독자적으로 또는 본 개시내용의 CAR의 맥락에서 유용한 임의의 다른 바람직한 세포질 도메인(들)과 조합하여 함유하는 ITAM을 포함하도록 디자인된다. 예를 들어, CAR의 세포질 도메인은 CD3 제타 사슬 부분 및 공동자극 신호전달 영역을 포함할 수 있다.

[0292] 공동자극 신호전달 영역은 공동자극 분자의 세포내 도메인을 포함하는 CAR의 일부분을 지칭한다. 공동자극 분자는 항원에 대한 림프구의 효율적인 반응에 요구되는 항원 수용체 또는 이의 리간드 이외의 세포 표면 분자이다. 이러한 분자의 예는 CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, 림프구 기능-연관 항원-1 (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, 및 CD83과 특이적으로 결합하는 리간드 등을 포함한다.

[0293] 본 개시내용의 CAR의 세포질 신호전달 부분 내의 세포질 신호전달 서열은 무작위로 또는 특정 순서로 서로 연결될 수 있다. 임의적으로, 짧은 올리고- 또는 폴리펩티드 링커, 바람직하게는 아미노산 2 내지 10개 길이의 것이 연결을 형성할 수 있다. 글리신-세린 이중자가 특히 적절한 링커를 제공한다.

[0294] 한 실시양태에서, 세포질 도메인은 CD3-제타의 신호전달 도메인 및 CD28의 신호전달 도메인을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 세포질 도메인은 CD3-제타의 신호전달 도메인 및 4-1BB의 신호전달 도메인을 포함한다.

[0295] 5.5 핵산, 재조합 벡터 및 숙주 세포

[0296] 본 개시내용은 항-글리코-MUC1 항체에 대한 면역글로불린 경쇄 및 중쇄 유전자를 코딩하는 핵산 분자, 이러한 핵산을 포함하는 벡터, 및 본 개시내용의 항-글리코-MUC1 항체를 생산할 수 있는 숙주 세포를 포함한다. 특정 측면에서, 핵산 분자는 본 개시내용의 항-글리코-MUC1 항체 및 항체-결합 단편 (예를 들어, 섹션 5.1 및 실시양태 1 내지 90에 기술된 바와 같음), 뿐만 아니라 이를 함유하는 융합 단백질 (예를 들어, 실시양태 91-96에 기술된 바와 같음) 및 키메라 항원 수용체 (예를 들어, 섹션 5.4 및 실시양태 97-98에 기술된 바와 같음)를 코딩하고, 숙주 세포는 이를 발현할 수 있다. 예시적인 본 개시내용의 벡터가 실시양태 111-113에서 기술되고, 예시적인 숙주 세포가 실시양태 114-117에서 기술된다.

[0297] 본 개시내용의 항-글리코-MUC1 항체는 숙주 세포에서의 면역글로불린 경쇄 및 중쇄 유전자의 재조합 발현에 의해 제조될 수 있다. 항체를 재조합으로 발현하기 위해, 숙주 세포가 항체의 면역글로불린 경쇄 및 중쇄를 코딩하는 DNA 단편을 보유하는 하나 이상의 재조합 발현 벡터로 형질감염되어, 경쇄 및 중쇄가 숙주 세포에서 발현되고, 임의적으로는 숙주 세포가 배양된 배지 내로 분비되며, 배지로부터 항체를 회수할 수 있다. 표준 재조합 DNA 방법, 예컨대 문헌 [Molecular Cloning; A Laboratory Manual, Second Edition (Sambrook, Fritsch and Maniatis (eds), Cold Spring Harbor, N.Y., 1989)], [Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel, F. M. et al., eds., Greene Publishing Associates, 1989)] 및 미국 특허 번호 4,816,397에 기술된 것들을 사용하여, 항체 중쇄 및 경쇄 유전자를 수득하고, 이러한 유전자들을 재조합 발현 벡터 내로 혼입시키고, 벡터를 숙주 세포 내로 도입한다.

[0298] 이러한 항-글리코-MUC1 항체를 코딩하는 핵산을 생성시키기 위해, 먼저 경쇄 및 중쇄 가변 영역을 코딩하는 DNA 단편을 수득한다. 이러한 DNA는, 예를 들어 증합효소 연쇄 반응 (PCR)을 사용하여, 경쇄 및 중쇄 가변 서열을 코딩하는 생식선 DNA 또는 cDNA의 증폭 및 변형에 의해 수득될 수 있다. 인간 중쇄 및 경쇄 가변 영역 유전자에 대한 생식선 DNA 서열이 관련 분야에 공지되어 있다 (예를 들어, "VBASE" 인간 생식선 서열 데이터베이스를 참조하고, 문헌 [Kabat et al., 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242]; [Tomlinson et al., 1992, J. Mol. Biol. 22T:116-198]; 및 [Cox et al., 1994, Eur. J. Immunol. 24:827-836]을 또한 참조하며, 이들 각각의 내용은 본원에 참조로 포함된다).

- [0299] 항-글리코-MUC1 항체-관련 V_H 및 V_L 분절을 코딩하는 DNA 단편이 수득되었으면, 예를 들어 가변 영역 유전자를 전장 항체 사슬 유전자, Fab 단편 유전자 또는 scFv 유전자로 전환시키기 위해, 이러한 DNA 단편을 표준 재조합 DNA 기술에 의해 추가로 조작할 수 있다. 이러한 조작에서, V_H - 또는 V_L -코딩 DNA 단편이 또 다른 단백질, 예컨대 항체 불변 영역 또는 가요성 링커를 코딩하는 또 다른 DNA 단편에 작동적으로 연결된다. 이러한 맥락에서 사용된 바와 같은 용어 "작동적으로 연결된"은 2개의 DNA 단편에 의해 코딩되는 아미노산 서열이 인-프레임으로 유지되도록 2개의 DNA 단편이 연결된다는 것을 의미하도록 의도된다.
- [0300] V_H -코딩 DNA를 중쇄 불변 영역 (CH_1 , CH_2 , CH_3 및 임의적으로 CH_4)을 코딩하는 또 다른 DNA 분자에 작동적으로 연결시킴으로써 V_H 영역을 코딩하는 단리된 DNA가 전장 중쇄 유전자로 전환될 수 있다. 인간 중쇄 불변 영역 유전자의 서열은 관련 분야에 공지되어 있고 (예를 들어, 문헌 [Kabat et al., 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health 및 Human Services, NIH Publication No. 91-3242]을 참조한다), 이러한 영역을 포함하는 DNA 단편을 표준 PCR 증폭에 의해 수득할 수 있다. 중쇄 불변 영역은 IgG_1 , IgG_2 , IgG_3 , IgG_4 , IgA , IgE , IgM 또는 IgD 불변 영역일 수 있지만, 특정 실시양태에서는 IgG_1 또는 IgG_4 불변 영역이다. Fab 단편 중쇄 유전자의 경우, V_H -코딩 DNA가 중쇄 CH_1 불변 영역만 코딩하는 또 다른 DNA 분자에 작동적으로 연결될 수 있다.
- [0301] V_L -코딩 DNA를 경쇄 불변 영역 CL을 코딩하는 또 다른 DNA 분자에 작동적으로 연결시킴으로써 V_L 영역을 코딩하는 단리된 DNA가 전장 경쇄 유전자 (뿐만 아니라 Fab 경쇄 유전자)로 전환될 수 있다. 인간 경쇄 불변 영역 유전자의 서열이 관련 분야에 공지되어 있고 (예를 들어, 문헌 [Kabat et al., 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health 및 Human Services, NIH Publication No. 91-3242]을 참조한다), 이러한 영역을 포함하는 DNA 단편을 표준 PCR 증폭에 의해 수득할 수 있다. 경쇄 불변 영역은 카파 또는 람다 불변 영역일 수 있지만, 특정 실시양태에서는 카파 불변 영역이다.
- [0302] scFv 유전자를 생성시키기 위해, V_H 및 V_L 영역이 가요성 링커에 의해 연결되면서 V_H 및 V_L 서열이 연속적인 단일쇄 단백질로서 발현될 수 있도록, V_H - 및 V_L -코딩 DNA 단편이 가요성 링커를 코딩하는, 예를 들어, 아미노산 서열 $(Gly4-Ser)_3$ 을 코딩하는 또 다른 단편에 작동적으로 연결될 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Bird et al., 1988, Science 242:423-426]; [Huston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883]; [McCafferty et al., 1990, Nature 348:552-554]를 참조한다).
- [0303] 본 개시내용의 항-글리코-MUC1 항체를 발현시키기 위해, 상기 기술된 바와 같이 수득된, 부분적 또는 전장 경쇄 및 중쇄를 코딩하는 DNA가 유전자가 전사 및 번역 제어 서열에 작동적으로 연결되도록 발현 벡터 내로 삽입된다. 이러한 맥락에서, 용어 "작동적으로 연결된"은 벡터 내의 전사 및 번역 제어 서열이 항체 유전자의 전사 및 번역을 조절하는 이들의 의도된 기능의 역할을 하도록 항체 유전자가 벡터 내로 결찰된다는 것을 의미하도록 의도된다. 발현 벡터 및 발현 제어 서열은 사용된 발현 숙주 세포와 상용성이도록 선택된다. 항체 경쇄 유전자 및 항체 중쇄 유전자는 별개의 벡터 내로 삽입될 수 있거나, 또는, 더욱 전형적으로는, 양쪽 모두의 유전자가 동일한 발현 벡터 내로 삽입된다.
- [0304] 표준 방법 (예를 들어, 항체 유전자 단편 및 벡터의 상보적 제한 부위의 결찰, 또는 제한 부위가 존재하지 않는 경우 평할 말단 결찰)에 의해 항체 유전자가 발현 벡터 내로 삽입된다. 항-글리코-MUC1 항체-관련 경쇄 또는 중쇄 서열의 삽입 전에, 발현 벡터가 항체 불변 영역 서열을 이미 보유할 수 있다. 예를 들어, 항-글리코-MUC1 모노클로날 항체-관련 V_H 및 V_L 서열을 전장 항체 유전자로 전환시키는 한 접근법은 이들을 V_H 분절이 벡터 내의 C_H 분절(들)에 작동적으로 연결되고, V_L 분절이 벡터 내의 CL 분절에 작동적으로 연결되도록 각각 중쇄 불변 및 경쇄 불변 영역을 이미 코딩하는 발현 벡터 내로 삽입하는 것이다. 추가적으로 또는 대안적으로, 재조합 발현 벡터는 숙주 세포로부터의 항체 사슬의 분비를 용이하게 하는 신호 펩티드를 코딩할 수 있다. 신호 펩티드가 항체 사슬 유전자의 아미노 말단에 인-프레임으로 연결되도록 항체 사슬 유전자가 벡터 내로 클로닝될 수 있다. 신호 펩티드는 면역글로불린 신호 펩티드 또는 이중성 신호 펩티드 (즉, 비-면역글로불린 단백질로부터의 신호 펩티드)일 수 있다.
- [0305] 항체 사슬 유전자에 더하여, 본 개시내용의 재조합 발현 벡터는 숙주 세포에서의 항체 사슬 유전자의 발현을 제어하는 조절 서열을 보유한다. 용어 "조절 서열"은 항체 사슬 유전자의 전사 또는 번역을 제어하는 프로모터, 인핸서 및 기타 발현 제어 요소 (예를 들어, 폴리아데닐화 신호)를 포함하도록 의도된다. 이러한 조절 서열이,

예를 들어, 문헌 [Goeddel, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, Calif., 1990]에 기술되어 있다. 관련 분야의 기술자는 조절 서열의 선택을 포함하는 발현 벡터의 디자인이 형질전환될 숙주 세포의 선택, 원하는 단백질의 발현 수준 등과 같은 인자에 의존적일 수 있다는 것을 이해할 것이다. 포유동물 숙주 세포 발현을 위한 적절한 조절 서열은 포유동물 세포에서의 높은 수준의 단백질 발현을 지시하는 바이러스 요소, 예컨대 사이토메갈로바이러스 (CMV) (예컨대 CMV 프로모터/인핸서), 시미안 바이러스 40 (SV40) (예컨대 SV40 프로모터/인핸서), 아데노바이러스, (예를 들어, 아데노바이러스 주요 후기 프로모터 (AdMLP)) 및 폴리오마로부터 유래된 프로모터 및/또는 인핸서를 포함한다. 바이러스성 조절 요소, 및 이의 서열에 관한 추가 설명을 위해, 예를 들어, 스타스키(Stinski)의 미국 특허 번호 5,168,062, 벨(Bell) 등의 미국 특허 번호 4,510,245, 및 스카프너(Schaffner) 등의 미국 특허 번호 4,968,615를 참조한다.

[0306] 항체 사슬 유전자 및 조절 서열에 더하여, 본 개시내용의 재조합 발현 벡터는 추가적인 서열, 예컨대 숙주 세포에서의 벡터의 복제를 조절하는 서열 (예를 들어, 복제 기원) 및 선별가능한 마커 유전자를 보유할 수 있다. 선별가능한 마커 유전자는 벡터가 도입된 숙주 세포의 선별을 용이하게 한다 (예를 들어, 미국 특허 번호 4,399,216, 4,634,665 및 5,179,017 (모두 악셀(Axel) 등)을 참조한다). 예를 들어, 전형적으로, 선별가능한 마커 유전자는 벡터가 도입된 숙주 세포에 약물, 예컨대 G418, 히드로마이신 또는 메토틱세이트에 대한 저항성을 부여한다. 적절한 선별가능한 마커 유전자는 디히드로폴레이트 환원효소 (DHFR) 유전자 (메토틱세이트 선별/중폭으로 DHFR^r 숙주 세포에서 사용하기 위한 것) 및 neo 유전자 (G418 선별용)를 포함한다. 경쇄 및 중쇄의 발현을 위해, 중쇄 및 경쇄를 코딩하는 발현 벡터(들)이 표준 기술에 의해 숙주 세포 내로 형질도입된다. 다양한 형태의 용어 "형질도입"은 외인성 DNA를 원핵생물 또는 진핵생물 숙주 세포 내로 도입하는데 통상적으로 사용되는 광범위한 기술, 예를 들어, 전기천공, 리포펙션, 인산칼슘 침전, DEAE-덱스트란 형질감염 등을 포함하도록 의도된다.

[0307] 본 개시내용의 항체를 원핵생물 또는 진핵생물 숙주 세포에서 발현시킬 수 있다. 특정 실시양태에서, 항체의 발현은 정확하게 폴딩되고 면역학적으로 활성인 항체가 최적으로 분비되는 진핵생물 세포, 예를 들어, 포유동물 숙주 세포에서 수행된다. 본 개시내용의 재조합 항체를 발현시키기 위한 예시적인 포유동물 숙주 세포는 차이니즈 햄스터 난소 (CHO 세포) (예를 들어, 문헌 [Kaufman and Sharp, 1982, Mol. Biol. 159:601-621]에 기술된 바와 같이, DHFR 선별가능한 마커와 함께 사용되는, 문헌 [Urlaub and Chasin, 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-4220]에 기술된 DHFR^r CHO 세포를 포함함), NSO 골수종 세포, COS 세포 및 SP2 세포를 포함한다. 항체 유전자를 코딩하는 재조합 발현 벡터가 포유동물 숙주 세포 내로 도입되는 경우, 숙주 세포에서의 항체의 발현 또는 숙주 세포가 성장된 배양 배지 내로의 항체의 분비를 허용하는데 충분한 기간 동안 숙주 세포를 배양함으로써 항체가 생산된다. 표준 단백질 정제 방법을 사용하여 배양 배지로부터 항체를 회수할 수 있다. 숙주 세포는 무손상 항체의 일부분, 예컨대 Fab 단편 또는 scFv 분자를 생산하는데 또한 사용될 수 있다. 상기 절차의 변형이 본 개시내용의 범주 내에 속하는 것으로 이해된다. 예를 들어, 숙주 세포를 본 개시내용의 항-글리코-MUC1 항체의 경쇄 또는 중쇄 (그러나 양쪽 모두는 아님)를 코딩하는 DNA로 형질감염시키는 것이 바람직할 수 있다.

[0308] 예를 들어 섹션 5.4 및 실시양태 97 및 98에서 기술된 바와 같은 본 개시내용의 CAR의 발현을 위해, 숙주 세포가 T 세포, 바람직하게는 인간 T 세포인 것이 바람직하다. 일부 실시양태에서, 숙주 세포는 세포가 종양 세포상의 MUC1과 가교되었을 때 항-종양 면역을 나타낸다. 본 개시내용의 T 세포를 생산하는 상세한 방법이 섹션 5.5.1에서 기술된다.

[0309] 재조합 DNA 기술을 사용하여, 글리코-MUC1에 결합하는데 필수적이지 않은 경쇄 및 중쇄 중 하나 또는 양쪽 모두를 코딩하는 DNA 중 일부 또는 전체를 제거할 수도 있다. 이러한 말단절단 DNA 분자로부터 발현된 분자 또한 본 개시내용의 항체에 포함된다.

[0310] 본 개시내용의 항-글리코-MUC1 항체의 재조합 발현을 위해, 숙주 세포를 중쇄 유래 폴리펩티드를 코딩하는 제1 벡터 및 경쇄 유래 폴리펩티드를 코딩하는 제2 벡터인 2개의 발현 벡터로 공동-형질감염시킬 수 있다. 2개의 벡터는 동일한 선별가능 마커를 함유할 수 있거나, 또는 각각 별개의 선별가능 마커를 함유할 수 있다. 대안적으로, 중쇄 및 경쇄 폴리펩티드 양쪽 모두를 코딩하는 단일 벡터가 사용될 수 있다.

[0311] 항-글리코-MUC1 항체의 하나 이상의 부분을 코딩하는 핵산이 생성되었으면, 예를 들어 상이한 CDR 서열을 갖는 항체, Fc 수용체에 대한 친화력이 감소된 항체 또는 상이한 서브클래스의 항체를 코딩하는 핵산을 생성시키기 위해, 추가의 변경 또는 돌연변이가 코딩 서열 내로 도입될 수 있다.

- [0312] 본 개시내용의 항-글리코-MUC1 항체는 화학적 합성에 의해 (예를 들어, 문헌 [Solid Phase Peptide Synthesis, 2nd ed., 1984] (더 피어스 케미컬 컴퍼니(The Pierce Chemical Co) (일리노이주 록포드))에 기술된 방법에 의해) 생산될 수도 있다. 무세포 플랫폼을 사용하여 변이체 항체가 생성될 수도 있다 (예를 들어, 문헌 [Chu et al., Biochemia No. 2, 2001] (로슈 분자생물학 바이올로지컬스(Roche Molecular Biologicals)) 및 [Murray et al., 2013, Current Opinion in Chemical Biology, 17:420-426]을 참조한다).
- [0313] 본 개시내용의 항-글리코-MUC1 항체가 재조합 발현에 의해 생산되었으면, 면역글로불린 분자의 정제를 위해 관련 분야에 공지되어 있는 임의의 방법에 의해, 예를 들어, 크로마토그래피 (예를 들어, 이온 교환, 친화력, 및 사이징 칼럼 크로마토그래피), 원심분리, 차별적 용해도, 또는 단백질 정제를 위한 임의의 다른 표준 기술에 의해 이를 정제할 수 있다. 추가로, 본 개시내용의 항-글리코-MUC1 항체 및/또는 결합 단편이 정제를 용이하게 하기 위해 본원에 기술된 또는 다른 식으로 관련 분야에 공지된 이중성 폴리펩티드 서열에 융합될 수 있다.
- [0314] 단리되었으면, 원하는 경우, 예를 들어, 고성능 액체 크로마토그래피에 의해 (예를 들어, 문헌 [Fisher, Laboratory Techniques In Biochemistry And Molecular Biology, Work and Burdon, eds., Elsevier, 1980]을 참조한다), 또는 수퍼덱스(Superdex)TM 75 칼럼 (파마시아 바이오테크 AB(Pharmacia Biotech AB), 스웨덴 옉살라) 상에서의 겔 여과 크로마토그래피에 의해, 항-글리코-MUC1 항체를 추가로 정제할 수 있다.
- [0315] **5.5.1. T 세포에서의 CAR의 재조합 생산**
- [0316] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 항-글리코-MUC1 CAR을 코딩하는 핵산이 레트로바이러스 또는 렌티바이러스 벡터를 사용하여 세포 내로 전달된다. CAR-발현 레트로바이러스 및 렌티바이러스 벡터는 상이한 유형들의 진핵 생물 세포 내로, 뿐만 아니라 담체로서의 형질도입된 세포 또는 캡슐화, 결합 또는 네이키드 벡터의 무세포 국소 또는 전신 전달을 사용하여 조직 및 전체 생물 내로 전달될 수 있다. 사용된 방법은 안정적인 발현이 요구되거나 또는 충분한 임의의 목적을 위한 것일 수 있다.
- [0317] 다른 실시양태에서, CAR 서열은 시험관 내에서 전사된 mRNA를 사용하여 세포 내로 전달된다. 시험관 내에서 전사된 mRNA CAR은 상이한 유형들의 진핵 생물 세포 내로, 뿐만 아니라 담체로서의 형질도입된 세포 또는 캡슐화, 결합 또는 네이키드 mRNA의 무세포 국소 또는 전신 전달을 사용하여 조직 및 전체 생물 내로 전달될 수 있다. 사용된 방법은 일시적인 발현이 요구되거나 또는 충분한 임의의 목적을 위한 것일 수 있다.
- [0318] 또 다른 실시양태에서, 원하는 CAR는 트랜스포존에 의해 세포에서 발현될 수 있다.
- [0319] 본 개시내용의 RNA 형질감염 방법의 한 장점은 RNA 형질감염이 본질적으로 일시적이고, 무-벡터라는 것이다: 임의의 추가적인 바이러스 서열을 필요로 하지 않으면서 최소 발현 카세트로서, RNA 트랜스진이 림프구로 전달될 수 있고, 거기에서 간단한 시험관내 세포 활성화 후에 발현될 수 있다. 이러한 조건 하에, 숙주 세포 게놈 내로의 트랜스진의 통합은 거의 불가능하다. RNA의 형질감염의 효율 및 전체 림프구 집단을 균일하게 변형시키는 이의 능력으로 인해 세포 클로닝이 필요하지 않다.
- [0320] 시험관내-전사 RNA (IVT-RNA)로의 T 세포의 유전자 변형은 양쪽 모두 다양한 동물 모델에서 연속적으로 테스트된 2가지 상이한 전략을 사용한다. 리포펙션 또는 전기천공에 의해 세포가 시험관내-전사 RNA로 형질감염된다. 바람직하게는, 전달된 IVT-RNA의 장기 발현을 달성하기 위해 다양한 변형을 사용하여 IVT-RNA를 안정화시키는 것이 바람직하다.
- [0321] 표준화된 방식으로 시험관내 전사를 위한 주형으로서 사용되고, 안정화된 RNA 전사체가 생산되는 방식으로 유전자 변형된 일부 IVT 벡터가 문헌에 공지되어 있다. 현재 관련 분야에서 사용되는 프로토콜은 하기 구조의 플라스미드 벡터를 기초로 한다: RNA 전사를 가능하게 하는 5' RNA 중합효소 프로모터, 이어서 3' 및/또는 5'에 미번역 영역 (UTR)이 플랭킹된 관심 유전자, 및 50-70개의 A 뉴클레오티드를 함유하는 3' 폴리아데닐 카세트. 시험관내 전사 전에, 원형 플라스미드가 폴리아데닐 카세트의 하류에서 II형 제한 효소에 의해 선형화된다 (인식 서열이 절단 부위에 상응한다). 따라서 폴리아데닐 카세트가 이후의 전사체 내의 폴리(A) 서열에 상응한다. 이러한 절차의 결과로서, 일부 뉴클레오티드가 선형화 후에 효소 절단 부위의 일부로서 유지되고, 3' 끝부분에서 폴리(A) 서열을 연장하거나 또는 마스킹한다. 이러한 비-생리학적 오버행이 이러한 구축물로부터 세포 내에서 생산되는 단백질의 양에 영향을 미치는지 여부는 명확하지 않다.
- [0322] RNA는 전통적인 플라스미드 또는 바이러스 접근법에 비해 몇몇 장점이 있다. RNA 공급원으로부터의 유전자 발현은 전사를 필요로 하지 않고, 형질감염 후에 단백질 생성물이 신속하게 생산된다. 추가로, RNA는 핵보다는 세포질에 접근하여야 할 뿐이기 때문에, 따라서 전형적인 형질감염 방법은 극도로 높은 비율의 형질감염을 초래

한다. 추가적으로, 플라스미드 기반 접근법은 관심 유전자의 발현을 구동시키는 프로모터가 연구 중인 세포에서 활성인 것을 요구한다.

[0323] 또 다른 측면에서, RNA 구축물은 전기천공에 의해 세포 내로 전달될 수 있다. 예를 들어, US 2004/0014645, US 2005/0052630A1, US 2005/0070841A1, US 2004/0059285A1, US 2004/0092907A1에 교시된 바와 같은 핵산 구축물의 제형 및 포유동물 세포 내로의 전기천공을 참조한다. 임의의 공지된 세포 유형의 전기천공에 요구되는 전기장 강도를 포함하는 다양한 파라미터가 관련된 연구 문헌, 뿐만 아니라 관련 분야의 다수의 특허 및 출원에 일반적으로 공지되어 있다. 예를 들어, 미국 특허 번호 6,678,556, 미국 특허 번호 7,171,264, 및 미국 특허 번호 7,173,116을 참조한다. 전기천공의 치료적 적용을 위한 장치, 예를 들어, 메드펄서™ DNA 전기천공 요법 시스템 (MedPulser™ DNA Electroporation Therapy System) (이노바이오/제네트로닉스(Inovio/Genetronics), 캘리포니아주 샌디에고)가 상업적으로 입수가능하고, 미국 특허 번호 6,567,694; 미국 특허 번호 6,516,223, 미국 특허 번호 5,993,434, 미국 특허 번호 6,181,964, 미국 특허 번호 6,241,701, 및 미국 특허 번호 6,233,482와 같은 특허에 기술되어 있다; 전기천공은 예를 들어 US20070128708A1에 기술된 바와 같이 시험관 내에서의 세포의 형질감염에 또한 사용될 수 있다. 전기천공은 시험관 내에서 핵산을 세포 내로 전달하는데 또한 이용될 수 있다. 따라서, 관련 분야의 기술자에게 공지된 다수의 이용가능한 장치 및 전기천공 시스템 중 임의의 것을 사용하는 발현 구축물을 포함하는 핵산의 세포 내로의 전기천공-매개 투여는 관심 RNA를 표적 세포에 전달하기 위한 흥미로운 새로운 수단을 제시한다.

[0324] 5.5.1.1 T 세포의 공급원

[0325] 확장 및 유전자 변형 전에, T 세포의 공급원이 대상체로부터 획득된다. 용어 "대상체"는 면역 반응이 유발될 수 있는 살아 있는 생물 (예를 들어, 포유동물)을 포함하도록 의도된다. 대상체의 예는 인간, 개, 고양이, 마우스, 래트, 및 이의 트랜스제닉 종을 포함한다. 바람직하게는, 대상체는 인간이다.

[0326] 말초혈 단핵 세포, 골수, 림프절 조직, 제대혈, 흉선 조직, 감염 부위로부터의 조직, 복수, 흉막 삼출물, 지라 조직 및 종양을 포함하는 다수의 공급원으로부터 T 세포를 획득할 수 있다. 본 개시내용의 특정 실시양태에서, 관련 분야에서 이용가능한 다수의 T 세포주가 사용될 수 있다. 본 개시내용의 특정 실시양태에서, 통상의 기술자에게 공지된 다수의 기술, 예컨대 피콜(Ficoll)™ 분리를 사용하여 대상체로부터 수집된 혈액 단위로부터 T 세포를 획득할 수 있다. 한 바람직한 실시양태에서, 개체로부터의 순환 혈액으로부터의 세포가 성분채집술에 의해 획득된다. 전형적으로 성분채집술 생성물은 T 세포를 포함하는 림프구, 단핵구, 과립구, B 세포, 기타 유핵 백혈구, 적혈구, 및 혈소판을 함유한다. 한 실시양태에서, 성분채집술에 의해 수집된 세포를 세정하여, 혈장 분획을 제거하고, 세포를 후속 프로세싱 단계를 위한 적합한 완충제 또는 배지 내에 놓을 수 있다. 본 개시내용의 한 실시양태에서, 세포를 포스페이트 완충 염수 (PBS)로 세정한다. 대안적 실시양태에서, 세정 용액은 칼슘이 결여되고, 마그네슘이 결여될 수 있거나 또는 모두는 아니더라도 다수의 2가 양이온이 결여될 수 있다. 또 다시, 놀랍게도, 칼슘의 부재 하의 초기 활성화 단계는 활성화 확대에 이른다. 관련 분야의 통상의 기술자가 쉽게 이해할 바와 같이, 관련 분야의 기술자에게 공지된 방법에 의해, 예컨대 반-자동화 "관류" 원심분리기 (예를 들어, 코브(Cobe) 2991 세포 프로세서, 박스터 사이토메이트(Baxter CytoMate), 또는 헤모네틱스 셀 세이버(Haemonetics Cell Saver) 5)를 제조사의 설명서에 따라 사용함으로써 세정 단계가 달성될 수 있다. 세정 후, 세포를 다양한 생체적합성 완충제, 예를 들어, Ca-프리, Mg-프리 PBS, 플라스마라이트(PlasmaLyte) A, 또는 완충제가 있는 또는 없는 기타 염수 용액에 재현탁시킬 수 있다. 대안적으로, 성분채집술 샘플의 바람직하지 않은 성분을 제거할 수 있고, 세포를 배양 배지에 직접 재현탁시킬 수 있다.

[0327] 또 다른 실시양태에서, 예를 들어, 퍼콜(PERCOLL)™ 구배를 통한 원심분리에 의해 또는 역류 원심분리 정화에 의해, 적혈구를 용해시키고 단핵구를 고갈시킴으로써 말초혈 림프구로부터 T 세포를 분리할 수 있다. T 세포의 특정한 하위집단, 예컨대 CD3⁺, CD28⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD45RA⁺ 및 CD45RO⁺ T 세포를 양성 또는 음성 선별 기술에 의해 추가로 분리할 수 있다. 예를 들어, 한 실시양태에서, 원하는 T 세포의 양성 선별에 충분한 기간 동안 항-CD3/항-CD28 (즉, 3 × 28)-접합 비드, 예컨대 DYNABEADS® M-450 CD3/CD28 T와 함께 인큐베이션함으로써 T 세포가 분리된다. 한 실시양태에서, 기간은 약 30분이다. 추가 실시양태에서, 기간은 30분 내지 36시간 이상 및 이들 사이의 모든 정수 값의 범위이다. 추가 실시양태에서, 기간은 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 또는 6시간이다. 또 다른 바람직한 실시양태에서, 기간은 10 내지 24시간이다. 한 바람직한 실시양태에서, 인큐베이션 기간은 24시간이다. 백혈병 환자로부터의 T 세포의 분리를 위해, 더 긴 인큐베이션 시간, 예컨대 24시간을 사용하는 것이 세포 수율을 증가시킬 수 있다. 다른 세포 유형에 비해 T 세포가 적은 임의의 상황에서, 예컨대 종양 조직 또는 면역손상 개체로부터 종양 침윤 림프구 (TIL)를 분리하는 경우에, 더 긴 인큐베이션 시간이 T 세포를

단리하는데 사용될 수 있다. 추가로, 더 긴 인큐베이션 시간을 사용하는 것은 CD8⁺ T 세포의 포착 효율을 증가시킬 수 있다. 따라서, 간단히 T 세포가 CD3/CD28 비드에 결합하도록 허용되는 시간을 단축하거나 연장함으로써 및/또는 비드 대 T 세포의 비를 증가시키거나 또는 감소시킴으로써 (본원에 추가로 기술된 바와 같음), 배양 초기에 또는 프로세스 동안의 다른 시점에 우선적으로 T 세포의 하위집단을 선별할 수 있거나 또는 이에 대항하여 선별할 수 있다. 추가적으로, 비드 또는 다른 표면 상의 항-CD3 및/또는 항-CD28 항체의 비를 증가시키거나 또는 감소시킴으로써, 배양 초기에 또는 다른 원하는 시점에 우선적으로 T 세포의 하위집단을 선별할 수 있거나 또는 이에 대항하여 선별할 수 있다. 통상의 기술자는 본 개시내용의 맥락에서 다중 선별 라운드가 또한 사용될 수 있다는 것을 인지할 것이다. 특정 실시양태에서, 선별 절차를 수행하고, "선별되지 않은" 세포를 활성화 및 확장 프로세스에서 사용하는 것이 바람직할 수 있다. "선별되지 않은" 세포를 추가의 선별 라운드에 적용할 수도 있다.

[0328] 음성으로 선별되는 세포에 고유한 표면 마커에 대해 지시된 항체의 조합으로 음성 선별에 의한 T 세포 집단의 강화를 달성할 수 있다. 한 방법은 음성으로 선별되는 세포 상에 존재하는 세포 표면 마커에 대해 지시된 모노클로날 항체의 콕테일을 사용하는 음성 자기 면역흡착 또는 유동 세포측정법을 통한 세포 분류 및/또는 선별이다. 예를 들어, 음성 선별에 의해 CD4⁺ 세포를 강화하기 위해, 모노클로날 항체 콕테일은 전형적으로 CD14, CD20, CD11b, CD16, HLA-DR, 및 CD8에 대한 항체를 포함한다. 특정 실시양태에서, CD4⁺, CD25⁺, CD62L^{hi}, GITR⁺, 및 FoxP3⁺를 전형적으로 발현하는 조절 T 세포에 대해 강화하거나 또는 양성으로 선별하는 것이 바람직할 수 있다. 대안적으로, 특정 실시양태에서, 항-C25 접합 비드 또는 다른 유사한 선별 방법에 의해 T 조절 세포가 고갈된다.

[0329] 양성 또는 음성 선별에 의한 원하는 세포 집단의 단리를 위해, 세포 및 표면 (예를 들어, 입자 예컨대 비드)의 농도가 다양할 수 있다. 특정 실시양태에서, 비드 및 세포가 함께 혼합되는 부피를 유의하게 감소시켜 (즉, 세포의 농도를 증가시켜), 세포 및 비드의 최대 접촉을 확실하게 하는 것이 바람직할 수 있다. 예를 들어, 한 실시양태에서, 20억개의 세포/ml의 농도가 사용된다. 한 실시양태에서, 10억개의 세포/ml의 농도가 사용된다. 추가 실시양태에서, 1억개 초과인 세포/ml가 사용된다. 추가 실시양태에서, 천만, 천5백만, 2천만, 2천5백만, 3천만, 3천5백만, 4천만, 4천5백만 또는 5천만개의 세포/ml의 세포 농도가 사용된다. 또 다른 실시양태에서, 7천5백만, 8천만, 8천5백만, 9천만, 9천5백만, 또는 1억개의 세포/ml의 세포 농도가 사용된다. 추가 실시양태에서, 1억 2천5백만 또는 1억 5천만개의 세포/ml의 농도가 사용될 수 있다. 높은 농도를 사용하면 세포 수율, 세포 활성화 및 세포 확장 증가가 초래될 수 있다. 추가로, 높은 세포 농도를 사용하는 것은 관심 표적 항원을 약하게 발현할 수 있는 세포, 예컨대 CD28-음성 T 세포의 더욱 효율적인 포착 또는 다수의 종양 세포가 존재하는 샘플 (예를 들어, 백혈병 혈액, 종양 조직 등)로부터의 더욱 효율적인 포착을 허용한다. 이러한 세포 집단은 치료적 가치가 있을 수 있고, 수득하는 것이 바람직할 것이다. 예를 들어, 높은 농도의 세포를 사용하는 것은 일반적으로 CD28 발현이 더 약한 CD8⁺ T 세포의 더욱 효율적인 선별을 허용한다.

[0330] 관련된 실시양태에서, 더 낮은 농도의 세포를 사용하는 것이 바람직할 수 있다. T 세포 및 표면 (예를 들어, 입자 예컨대 비드)의 혼합물을 유의하게 희석함으로써, 입자와 세포 사이의 상호작용이 최소화된다. 이는 입자에 결합될 원하는 항원을 높은 양으로 발현하는 세포를 선별한다. 예를 들어, CD4⁺ T 세포는 더 높은 수준의 CD28을 발현하고, 희석 농도에서 CD8⁺ T 세포보다 더욱 효율적으로 포착된다. 한 실시양태에서, 사용된 세포의 농도는 5×10^6 개/ml이다. 다른 실시양태에서, 사용된 세포의 농도는 약 1×10^5 개/ml 내지 1×10^6 개/ml, 및 이들 사이의 임의의 정수 값일 수 있다.

[0331] 다른 실시양태에서, 다양한 길이의 시간 동안 다양한 속도로 2-10°C 또는 실온에서 회전기 상에서 세포를 인큐베이션할 수 있다.

[0332] 자극용 T 세포를 세정 단계 후에 동결시킬 수도 있다. 이론에 의해 제한되기를 원치 않으면서, 동결 및 후속 해동 단계는 세포 집단 내의 과립구 및 어느 정도의 단핵구를 제거함으로써 더욱 균일한 생성물을 제공한다. 혈장 및 혈소판을 제거하는 세정 단계 후, 세포를 동결 용액에 현탁시킬 수 있다. 다수의 동결 용액 및 파라미터가 관련 분야에 공지되어 있고, 이러한 맥락에서 유용할 것이지만, 한 방법은 20% DMSO 및 8% 인간 혈청 알부민을 함유하는 PBS, 또는 10% 텍스트란 40 및 5% 텍스트로스, 20% 인간 혈청 알부민 및 7.5% DMSO, 또는 31.25% 플라즈마라이트-A, 31.25% 텍스트로스 5%, 0.45% NaCl, 10% 텍스트란 40 및 5% 텍스트로스, 20% 인간 혈청 알부민, 및 7.5% DMSO를 함유하는 배양 배지, 또는 헵산(Hespan) 및 플라즈마라이트 A를 예를 들어 함유하

는 다른 적절한 세포 동결 배지를 사용하는 것을 수반하고, 그 후, 세포를 분당 1°의 속도로 -80℃로 동결시키고, 액체 질소 보관 탱크의 기체 상에서 보관한다. 다른 제어 동결 방법, 뿐만 아니라 즉각적으로 -20℃에서 또는 액체 질소에서의 비-제어 동결을 사용할 수 있다.

[0333] 특정 실시양태에서, 냉동보존 세포를 본원에 기술된 바와 같이 해동 및 세정하고, 1시간 동안 실온에서 휴지시킨 후, 본 개시내용의 방법을 사용하여 활성화시킨다.

[0334] 본원에 기술된 바와 같은 확장된 세포가 필요할 수 있을 때 이전에 대상체로부터 혈액 샘플 또는 성분채집술 생성물을 수집하는 것이 본 개시내용의 맥락에서 또한 구상된다. 이와 같이, 확장된 세포의 공급원이 임의의 필요한 시점에 수집될 수 있고, 원하는 세포, 예컨대 T 세포가 T 세포 요법이 이로울 다수의 질환 또는 병태, 예컨대 본원에 기술된 것에 대한 T 세포 요법에서 추후에 사용하기 위해 단리 및 동결된다. 한 실시양태에서, 일반적으로 건강한 대상체로부터 혈액 샘플 또는 성분채집술을 취한다. 특정 실시양태에서, 질환이 발달될 위험이 있지만, 아직 질환이 발달되지 않은 일반적으로 건강한 대상체로부터 혈액 샘플 또는 성분채집술을 취하고, 추후의 사용을 위해 관심 세포를 단리하고 동결시킨다. 특정 실시양태에서, 추후에 T 세포가 확장, 동결 및 사용될 수 있다. 특정 실시양태에서, 본원에 기술된 바와 같은 특정 질환의 진단 직후이지만 임의의 치료 전인 환자로부터 샘플을 수집한다. 추가 실시양태에서, 나탈리주맙, 에팔리주맙, 항바이러스제, 화학요법, 방사선 조사, 면역억제제, 예컨대 시클로스포린, 아자티오프린, 메토트렉세이트, 미코페놀레이트, 및 FK506, 항체, 또는 기타 면역억제제 예컨대 CAMPATH, 항-CD3 항체, 시톡산, 플루다라빈, 시클로스포린, FK506, 라파마이신, 미코페놀산, 스테로이드, FR901228, 및 방사선 조사와 같은 작용제로의 치료를 포함하지만 이에 제한되지 않는 다수의 관련된 치료 양식 전에 대상체로부터의 혈액 샘플 또는 성분채집술로부터 세포가 단리된다. 이러한 약물들은 칼슘 의존적 포스포타제 칼시뉴린을 억제하거나 (시클로스포린 및 FK506) 또는 성장 인자 유도 신호전달에 중요한 p70S6 키나제를 억제한다 (라파마이신). (Liu et al., Cell 66:807-815, 1991; Henderson et al., Immun. 73:316-321, 1991; Bierer et al., Curr. Opin. Immun. 5:763-773, 1993). 추가 실시양태에서, 세포가 환자로부터 단리되고, 골수 또는 줄기 세포 이식, 또는 화학요법제 예컨대 플루다라빈, 외부-방사선 조사 요법 (XRT), 시클로포스파미드를 사용한 T 세포 제거 요법과 함께 (예를 들어, 전에, 함께 또는 후에) 추후에 사용하기 위해 동결된다.

[0335] 본 개시내용의 추가 실시양태에서, 치료 직후에 환자로부터 T 세포가 수득된다. 이와 관련하여, 특정 암 치료, 특히 면역계를 손상시키는 약물로의 치료 후에, 환자가 정상적으로 치료로부터 회복되고 있을 기간 동안의 치료 직후에, 수득된 T 세포의 품질이 생체 외에서 확장되는 능력에 대해 최적일 수 있거나 또는 개선될 수 있다는 것이 관찰되었다. 마찬가지로, 본원에 기술된 방법을 사용하는 생체의 조작 후에, 이러한 세포가 생체 및 생체 내 확장 강화를 위한 바람직한 상태일 수 있다. 따라서, T 세포, 수지상 세포 또는 조혈 계통의 다른 세포를 포함하는 혈액 세포를 이러한 회복기 동안 수집하는 것이 본 개시내용의 맥락에서 구상된다. 추가로, 특정 실시양태에서, 특히 요법 이후의 한정된 시간 창 동안, 특정 세포 유형의 재증식, 재순환, 재생 및/또는 확장이 선호되는 대상체 내의 상태를 생성시키도록 동원 (예를 들어, GM-CSF로의 동원) 및 컨디셔닝 요법이 사용될 수 있다. 예시적인 세포 유형은 T 세포, B 세포, 수지상 세포, 및 면역계의 기타 세포를 포함한다.

[0336] 5.5.1.2 T 세포의 활성화 및 확장

[0337] 예를 들어, 미국 특허 번호 6,352,694; 6,534,055; 6,905,680; 6,692,964; 5,858,358; 6,887,466; 6,905,681; 7,144,575; 7,067,318; 7,172,869; 7,232,566; 7,175,843; 5,883,223; 6,905,874; 6,797,514; 6,867,041; 및 미국 특허 출원 공개 번호 20060121005에 기술된 바와 같은 방법을 일반적으로 T 세포가 활성화 및 확장된다.

[0338] 일반적으로, CD3/TCR 복합체 연관 신호를 자극하는 작용제 및 T 세포 표면 상의 공동-자극 분자를 자극하는 리간드가 부착되어 있는 표면과의 접촉에 의해 본 개시내용의 T 세포가 확장된다. 특히, 본원에 기술된 바와 같이, 예컨대 표면에 고정된 항-CD3 항체 또는 이의 항원-결합 단편, 또는 항-CD2 항체와의 접촉에 의해, 또는 칼슘 이온운반체와 함께 단백질 키나제 C 활성화제 (예를 들어, 브리오택틴)와의 접촉에 의해 T 세포 집단이 자극될 수 있다. T 세포 표면 상의 보조 분자의 공동-자극을 위해, 보조 분자에 결합하는 리간드가 사용된다. 예를 들어, T 세포 집단이 T 세포의 증식을 자극하는데 적합한 조건 하에 항-CD3 항체 및 항-CD28 항체와 접촉될 수 있다. CD4⁺ T 세포 또는 CD8⁺ T 세포의 증식을 자극하기 위해, 항-CD3 항체 및 항-CD28 항체가 사용된다. 항-CD28 항체의 예는 9.3, B-T3, XR-CD28 (다이아클론(Diaclone), 프랑스 브장송)를 포함하고, 관련 분야에 통상적으로 공지된 다른 방법과 같이 사용될 수 있다 (Berg et al., Transplant Proc. 30(8):3975-3977, 1998; Haanen et al., J. Exp. Med. 190(9):1319-1328, 1999; Garland et al., J. Immunol Meth. 227(1-2):53-63, 1999).

- [0339] 특정 실시양태에서, T 세포에 대한 1차 자극 신호 및 공동-자극 신호가 상이한 프로토콜에 의해 제공될 수 있다. 예를 들어, 각각의 신호를 제공하는 작용제가 용액 내에 있을 수 있거나 또는 표면에 커플링될 수 있다. 표면에 커플링되는 경우, 작용제들은 동일한 표면에 (즉, "시스" 대형으로) 또는 별개의 표면에 (즉, "트랜스" 대형으로) 커플링될 수 있다. 대안적으로, 한 작용제는 표면에 커플링될 수 있고, 다른 작용제는 용액에 있을 수 있다. 한 실시양태에서, 공동-자극 신호를 제공하는 작용제는 세포 표면에 결합되고, 1차 활성화 신호를 제공하는 작용제는 용액 내에 있거나 또는 표면에 커플링된다. 특정 실시양태에서, 양쪽 모두의 작용제가 용액 내에 있을 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 작용제는 가용성 형태일 수 있고, 그 후, 작용제에 결합할 Fc 수용체 또는 항체 또는 기타 결합제를 발현하는 세포와 같은 표면에 가교될 수 있다. 이와 관련하여, 본 개시내용의 T 세포를 활성화 및 확장시키는데 사용하기 위해 구상되는 인공 항원 제시 세포 (aAPC)에 대해, 예를 들어, 미국 특허 출원 공개 번호 20040101519 및 20060034810을 참조한다.
- [0340] 한 실시양태에서, 2개의 작용제가 동일한 비드 상에, 즉 "시스"로, 또는 별개의 비드에, 즉 "트랜스"로 고정된다. 예를 들어, 1차 활성화 신호를 제공하는 작용제는 항-CD3 항체 또는 이의 항원-결합 단편이고, 공동-자극 신호를 제공하는 작용제는 항-CD28 항체 또는 이의 항원-결합 단편이며, 양쪽 모두의 작용제가 등물량으로 동일한 비드에 공동-고정된다. 한 실시양태에서, $CD4^+$ T 세포 확장 및 T 세포 성장을 위해 비드에 결합된 1:1 비의 각각의 항체가 사용된다. 본 개시내용의 특정 측면에서, 1:1의 비를 사용하여 관찰되는 확장에 비교하여 T 세포 확장의 증가가 관찰되도록 비드에 결합된 항 CD3:CD28 항체의 비가 사용된다. 한 특정한 실시양태에서, 1:1의 비를 사용하여 관찰되는 확장에 비교하여 약 1 내지 약 3배의 증가가 관찰된다. 한 실시양태에서, 비드에 결합된 CD3:CD28 항체의 비는 100:1 내지 1:100 및 이들 사이의 모든 정수 값의 범위이다. 본 개시내용의 한 측면에서, 항-CD3 항체보다 더 많은 항-CD28 항체가 입자에 결합되고, 즉, CD3:CD28의 비가 1 미만이다. 본 개시내용의 특정한 실시양태에서, 비드에 결합된 항 CD28 항체 대 항 CD3 항체의 비는 2:1을 초과한다. 한 특정 실시양태에서, 비드에 결합된 1:100 CD3:CD28 비의 항체가 사용된다. 또 다른 실시양태에서, 비드에 결합된 1:75 CD3:CD28 비의 항체가 사용된다. 추가 실시양태에서, 비드에 결합된 1:50 CD3:CD28 비의 항체가 사용된다. 또 다른 실시양태에서, 비드에 결합된 1:30 CD3:CD28 비의 항체가 사용된다. 한 바람직한 실시양태에서, 비드에 결합된 1:10 CD3:CD28 비의 항체가 사용된다. 또 다른 실시양태에서, 비드에 결합된 1:3 CD3:CD28 비의 항체가 사용된다. 또 다른 실시양태에서, 비드에 결합된 3:1 CD3:CD28 비의 항체가 사용된다.
- [0341] 1:500 내지 500:1 및 이들 사이의 임의의 정수 값의 입자 대 세포의 비가 T 세포 또는 다른 표적 세포를 자극하는데 사용될 수 있다. 관련 분야의 통상의 기술자가 쉽게 이해할 바와 같이, 입자 대 세포의 비는 표적 세포에 상대적인 입자 크기에 좌우될 수 있다. 예를 들어, 소형 크기의 비드는 적은 세포에만 결합할 수 있는 한편, 더 큰 비드는 다수에 결합할 수 있다. 특정 실시양태에서, 세포 대 입자의 비는 1:100 내지 100:1 및 이들 사이의 임의의 정수 값의 범위이고, 추가 실시양태에서 1:9 내지 9:1 및 이들 사이의 임의의 정수 값을 포함하는 비가 T 세포를 자극하는데 또한 사용될 수 있다. T 세포 자극을 초래하는 항-CD3- 및 항-CD28-커플링 입자 대 T 세포의 비는 상기 언급된 바와 같이 다를 수 있지만, 특정한 바람직한 값은 1:100, 1:50, 1:40, 1:30, 1:20, 1:10, 1:9, 1:8, 1:7, 1:6, 1:5, 1:4, 1:3, 1:2, 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, 및 15:1을 포함하고, 한 바람직한 비는 적어도 1:1의 입자/T 세포이다. 한 실시양태에서, 1:1 이하의 입자 대 세포의 비가 사용된다. 한 특정 실시양태에서, 바람직한 입자:세포 비는 1:5이다. 추가 실시양태에서, 입자 대 세포의 비는 자극일에 따라 변할 수 있다. 예를 들어, 한 실시양태에서, 입자 대 세포의 비는 제1일에는 1:1 내지 10:1이고, 그 후 1:1 내지 1:10 (첨가일의 세포수를 기초로 함)의 최종 비로 매일 또는 격일로 10일까지 추가적인 입자가 세포에 첨가된다. 한 특정 실시양태에서, 입자 대 세포의 비는 제1 자극일에는 1:1이고, 제3 제5 자극일에 1:5로 조정된다. 또 다른 실시양태에서, 제1 자극일의 1:1 및 제3 및 제5 자극일의 1:5의 최종 비로 매일 또는 격일 기반으로 입자가 첨가된다. 또 다른 실시양태에서, 입자 대 세포의 비는 제1 자극일에는 2:1이고, 제3 및 제5 자극일에 1:10으로 조정된다. 또 다른 실시양태에서, 제1 자극일의 1:1 및 제3 및 제5 자극일의 1:10의 최종 비로 매일 또는 격일 기반으로 입자가 첨가된다. 관련 분야의 기술자는 다양한 다른 비가 본 개시내용에서 사용하기에 적절할 수 있다는 것을 이해할 것이다. 특히, 입자 크기 및 세포 크기 및 유형에 따라 비가 변할 것이다.
- [0342] 본 개시내용의 추가 실시양태에서, 세포, 예컨대 T 세포가 작용제-코팅 비드와 조합되고, 이어서 비드 및 세포가 분리된 후, 세포가 배양된다. 대안적 실시양태에서, 배양 전에, 작용제-코팅 비드 및 세포가 분리되지 않지만, 함께 배양된다. 추가 실시양태에서, 힘, 예컨대 자기력의 적용에 의해 비드 및 세포가 먼저 농축되어, 세포 표면 마커의 결찰 증가를 초래하고, 이에 의해 세포 자극을 유도한다.
- [0343] 예를 들어, 항-CD3 및 항-CD28이 부착되어 있는 상자성 비드 (3×28 비드)가 T 세포와 접촉되도록 허용함으로써

세포 표면 단백질이 결합될 수 있다. 한 실시양태에서, 세포 (예를 들어, 10^4 내지 10^9 개의 T 세포) 및 비드 (예를 들어, 1:1 비의 DYNABEADS® M-450 CD3/CD28 T 상자성 비드)가 완충제, 바람직하게는 PBS (2가 양이온 예컨대 칼슘 및 마그네슘이 없음)에서 조합된다. 또 다시, 관련 분야의 통상의 기술자는 임의의 세포 농도가 사용될 수 있다는 것을 이해할 것이다. 예를 들어, 표적 세포가 샘플 내에서 매우 드물 수 있고, 샘플의 0.01% 만을 이룰 수 있거나, 또는 전체 샘플 (즉, 100%)이 관심 표적 세포를 포함할 수 있다. 따라서, 임의의 세포 수가 본 개시내용의 맥락 내에 속한다. 특정 실시양태에서, 세포 및 입자의 최대 접촉을 확실하게 하기 위해, 입자 및 세포가 함께 혼합되는 부피를 유의하게 감소시키는 (즉, 세포 농도를 증가시키는) 것이 바람직할 수 있다. 예를 들어, 한 실시양태에서, 약 20억개의 세포/ml의 농도가 사용된다. 또 다른 실시양태에서, 1억개 초과 세포/ml가 사용된다. 추가 실시양태에서, 천만, 천5백만, 2천만, 2천5백만, 3천만, 3천5백만, 4천만, 4천5백만 또는 5천만개의 세포/ml의 세포 농도가 사용된다. 또 다른 실시양태에서, 7천5백만, 8천만, 8천5백만, 9천만, 9천5백만, 또는 1억개의 세포/ml의 세포 농도가 사용된다. 추가 실시양태에서, 1억 2천5백만 또는 1억 5천만개의 세포/ml의 농도가 사용될 수 있다. 높은 농도를 사용하면 세포 수율, 세포 활성화 및 세포 확장 증가가 초래될 수 있다. 추가로, 높은 세포 농도를 사용하는 것은 관심 표적 항원을 약하게 발현할 수 있는 세포, 예컨대 CD28-음성 T 세포의 더욱 효율적인 포착을 허용한다. 이러한 세포 집단은 치료적 가치가 있을 수 있고, 특정 실시양태에서, 이를 수득하는 것이 바람직할 것이다. 예를 들어, 높은 농도의 세포를 사용하는 것은 일반적으로 CD28 발현이 더 약한 CD8+ T 세포의 더욱 효율적인 선별을 허용한다.

[0344] 본 개시내용의 한 실시양태에서, 혼합물을 수시간 (약 3시간) 내지 약 14일 또는 이들 사이의 임의의 시간 정수 값 동안 배양할 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 혼합물을 21일 동안 배양할 수 있다. 본 개시내용의 한 실시양태에서, 비드 및 T 세포를 약 8일 동안 함께 배양한다. 또 다른 실시양태에서, 비드 및 T 세포를 2-3일 동안 함께 배양한다. T 세포의 배양 시간이 60일 이상일 수 있도록 수회의 자극 사이클이 또한 바람직할 수 있다. T 세포 배양에 적합한 조건은 증식 및 생존에 필요한 인자를 함유할 수 있는 적합한 배지 (예를 들어, 최소 필수 배지 또는 RPMI 배지 1640 또는 엑스-비보(X-vivo) 15 (론자(Lonza)))를 포함하고, 상기 인자는 혈청 (예를 들어, 인간 또는 소 태아 혈청), 인터루킨-2 (IL-2), 인슐린, IFN- γ , IL-4, IL-7, GM-CSF, IL-10, IL-12, IL-15, TGF β , 및 TNF- α 또는 기술자에게 공지된 세포 성장을 위한 임의의 기타 첨가제를 포함한다. 세포 성장을 위한 기타 첨가제는 계면활성제, 플라즈마네이트, 및 환원제 예컨대 N-아세틸-시스테인 및 2-메르캅토에탄올을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 배지는 무혈청이거나 또는 적합한 양의 혈청 (또는 혈장) 또는 한정된 세트의 호르몬 및/또는 T 세포의 성장 및 활장에 충분한 양의 시토카인이 보충된, 아미노산, 피루브산나트륨 및 비타민이 첨가된 RPMI 1640, AIM-V, DMEM, MEM, α -MEM, F-12, 엑스-비보 15, 및 엑스-비보 20, 옵티마이저(Optimizer)를 포함할 수 있다. 항생제, 예를 들어, 페니실린 및 스트렙토마이신은 실험 배양물에만 포함되고, 대상체 내로 주입될 세포 배양물에는 포함되지 않는다. 성장을 지지하는데 필요한 조건, 예를 들어, 적합한 온도 (예를 들어, 37°C) 및 대기 (예를 들어, 공기 + 5% CO₂) 하에 표적 세포가 유지된다.

[0345] 다양한 자극 시간에 노출된 T 세포는 상이한 특성들을 나타낼 수 있다. 예를 들어, 전형적인 혈액 또는 성분채 집술 말초혈 단핵 세포 생성물은 헬퍼 T 세포 집단 (T_H, CD4⁺)이 세포독성 또는 억제인자 T 세포 집단 (T_C, CD8⁺)보다 더 많다. CD3 및 CD28 수용체를 자극하는 것에 의한 T 세포의 생체외 확장으로 대략적으로 제8일-제9일 전에는 T_H 세포로 우세하게 구성되는 T 세포 집단이 생산되는 한편, 대략적으로 제8일-제9일 후에는 T 세포 집단이 점점 더 많은 T_C 세포 집단을 포함한다. 따라서, 치료 목적에 따라, T_H 세포를 우세하게 포함하는 T 세포 집단을 대상체에게 주입하는 것이 유리할 수 있다. 유사하게, T_C 세포의 항원-특이적 서브세트가 단리되었으면, 이러한 서브세트를 더 크게 확장시키는 것이 유리할 수 있다.

[0346] 추가로, CD4 및 CD8 마커에 더하여, 세포 확장 프로세스의 과정 동안 다른 표현형 마커가 유의하게, 그러나 대부분 재현가능하게 변한다. 따라서, 이러한 재현성은 활성화된 T 세포 생성물을 특정 목적에 맞춤화하는 능력을 가능하게 한다.

[0347] 5.6 조성물

[0348] 본 개시내용의 항-글리코-MUC1 항체 및/또는 항-글리코-MUC1 ADC는 항-글리코-MUC1 항체 및/또는 ADC 및 하나 이상의 담체, 부형제 및/또는 희석제를 포함하는 조성물의 형태일 수 있다. 조성물은 특정 용도를 위해, 예컨대 수의학 용도 또는 인간에서의 제약 용도를 위해 제형될 수 있다. 조성물의 형태 (예를 들어, 건조 분말, 액체 제형 등) 및 부형제, 희석제 및/또는 담체는 항체 및/또는 ADC의 의도되는 용도에, 그리고 치료 용도의 경우

에는 투여 방식에 좌우될 것이다.

- [0349] 치료 용도를 위해, 조성물은 제약상 허용되는 담체를 포함하는 무균성 제약 조성물의 일부로서 공급될 수 있다. 이러한 조성물은 임의의 적절한 형태일 수 있다 (이를 환자에게 투여하는 원하는 방법에 좌우됨). 제약 조성물은 다양한 경로에 의해 예컨대 경구, 경피, 피하, 비강내, 정맥내, 근육내, 종양내, 경막내, 국부 또는 국소 경로에 의해 환자에게 투여될 수 있다. 임의의 소정의 경우에서의 가장 적절한 투여 경로는 특정 항체 및/또는 ADC, 대상체, 및 대상체의 질환 및 신체 상태의 성질 및 중증도에 좌우될 것이다. 전형적으로, 제약 조성물은 정맥내 또는 피하 투여될 것이다.
- [0350] 제약 조성물은 용량 당 미리 정해진 양의 본 개시내용의 항-글리코-MUC1 항체 및/또는 항-글리코-MUC1 ADC를 함유하는 단위 투약 형태로 편리하게 제시될 수 있다. 단위 용량 내에 포함되는 항체 및/또는 ADC의 양은 치료 중인 질환, 뿐만 아니라 관련 분야에 널리 공지되어 있는 바와 같은 다른 요소에 좌우될 것이다. 이러한 단위 투여량은 단일 투여에 적절한 양의 항체 및/또는 ADC를 함유하는 동결건조된 건조 분말의 형태 또는 액체의 형태일 수 있다. 건조 분말 단위 투여량 형태는 주사기, 적절한 양의 희석제 및/또는 투여에 유용한 다른 성분이 있는 키트 내에 포장될 수 있다. 액체 형태의 단위 투여량은 단일 투여에 적절한 양의 항체 및/또는 ADC가 미리 충전된 주사기의 형태로 편리하게 공급될 수 있다.
- [0351] 제약 조성물은 다중 투여에 적절한 양의 ADC를 함유하는 벌크 형태로 공급될 수도 있다.
- [0352] 원하는 정도의 순도를 갖는 항체 및/또는 ADC를 관련 분야에서 전형적으로 사용되는 임의적인 제약상 허용되는 담체, 부형제 또는 안정화제 (모두 본원에서 "담체"로 지칭됨), 즉, 완충제, 안정화제, 보존제, 등장화제, 비이온성 세제, 항산화제, 및 기타 다양한 첨가제와 혼합함으로써 동결건조 제형 또는 수성 용액으로서 보관하기 위해 제약 조성물을 제조할 수 있다. 문헌 [Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition (Osol, ed. 1980)]을 참조한다. 이러한 첨가제들은 사용된 투여량 및 농도에서 수용자에게 비독성이어야 한다.
- [0353] 완충제는 pH를 생리학적 조건에 근접하는 범위에서 유지하는 것을 돕는다. 이는 광범위한 농도로 존재할 수 있지만, 전형적으로는 약 2 mM 내지 약 50 mM 범위의 농도로 존재할 것이다. 본 개시내용과 함께 사용하기 위한 적절한 완충제는 유기산 및 무기산 양쪽 모두 및 이의 염 예컨대 시트레이트 완충제 (예를 들어, 시트르산나트륨-시트르산2나트륨 혼합물, 시트르산-시트르산3나트륨 혼합물, 시트르산-시트르산1나트륨 혼합물 등), 숙시네이트 완충제 (예를 들어, 숙신산-숙신산1나트륨 혼합물, 숙신산-수산화나트륨 혼합물, 숙신산-숙신산2나트륨 혼합물 등), 타르테이트 완충제 (예를 들어, 타르타르산-타르타르산나트륨 혼합물, 타르타르산-타르타르산칼륨 혼합물, 타르타르산-수산화나트륨 혼합물 등), 푸마레이트 완충제 (예를 들어, 푸마르산-푸마르산1나트륨 혼합물, 푸마르산-푸마르산2나트륨 혼합물, 푸마르산1나트륨-푸마르산2나트륨 혼합물 등), 글루코네이트 완충제 (예를 들어, 글루콘산-글루콘산나트륨 혼합물, 글루콘산-수산화나트륨 혼합물, 글루콘산-글루콘산칼륨 혼합물 등), 옥살레이트 완충제 (예를 들어, 옥살산-옥살산나트륨 혼합물, 옥살산-수산화나트륨 혼합물, 옥살산-옥살산칼륨 혼합물 등), 락테이트 완충제 (예를 들어, 락트산-락트산나트륨 혼합물, 락트산-수산화나트륨 혼합물, 락트산-락트산칼륨 혼합물 등) 및 아세테이트 완충제 (예를 들어, 아세트산-아세트산나트륨 혼합물, 아세트산-수산화나트륨 혼합물 등)을 포함한다. 추가적으로, 포스페이트 완충제, 히스티딘 완충제, 트리메틸아민 염 예컨대 트리스(Tris)가 사용될 수 있다.
- [0354] 방부제는 미생물 성장을 지연시키기 위해 첨가될 수 있고, 약 0.2%-1% (w/v) 범위의 양으로 첨가될 수 있다. 본 개시내용과 함께 사용하기 위한 적절한 방부제는 페놀, 벤질 알코올, 메타-크레졸, 메틸 파라벤, 프로필 파라벤, 옥타데실디메틸벤질 암모늄 클로라이드, 벤즈알코늄 할라이드 (예를 들어, 클로라이드, 브로마이드, 아이오다이드), 헥사메토늄 클로라이드, 알킬 파라벤 예컨대 메틸 또는 프로필 파라벤, 카테콜, 레조르시놀, 시클로헥사놀, 및 3-펜타놀을 포함한다. 때로는 "안정화제"로 알려진 등장화제는 본 개시내용의 액체 조성물의 등장성을 확실히 하기 위해 첨가될 수 있고, 다가 당 알코올, 예를 들어 3가 이상의 당 알코올, 예컨대 글리세린, 에리트리톨, 아라비톨, 자일리톨, 소르비톨 및 만니톨을 포함한다. 안정화제는, 기능 면에서, 중량제부터 치료제를 가용화시키거나 또는 변성되거나 용기 벽에 부착되는 것을 방지하는 것을 돕는 첨가제까지의 범위에 이를 수 있는 광범위한 카테고리의 부형제를 지칭한다. 전형적인 안정화제는 다가 당 알코올 (상기 열거됨); 아미노산 예컨대 아르기닌, 라이신, 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 히스티딘, 알라닌, 오르니틴, L-류신, 2-페닐알라닌, 글루탐산, 트레오닌 등; 유기 당 또는 당 알코올, 예컨대 락토스, 트레할로스, 스타키오스, 만니톨, 소르비톨, 자일리톨, 리비톨, 마이오이니시톨, 갈락티톨, 글리세롤 등 (사이클리톨 예컨대 이노시톨 포함); 폴리에틸렌 글리콜; 아미노산 중합체; 황-함유 환원제, 예컨대 요소, 글루타티온, 티옥트산, 소듐 티오글리콜레이트, 티오글리세롤, α-모노티오글리세롤 및 소듐 티오 술페이트; 저분자량 폴리펩티드 (즉, 잔기 10개 이하의 펩티드)

드); 단백질 예컨대 인간 혈청 알부민, 소 혈청 알부민, 젤라틴 또는 면역글로불린; 친수성 중합체, 예컨대 폴리비닐피롤리돈; 당당류, 예컨대 자일로스, 만노스, 프룩토스, 글루코스; 이당류 예컨대 락토스, 말토스, 수크로스 및 트레할로스; 및 삼당류 예컨대 라피노스; 및 다당류 예컨대 텍스트란일 수 있다. 안정화제는 ADC 중량당 0.5 내지 10 중량% 범위의 양으로 존재할 수 있다.

[0355] 비-이온성 계면활성제 또는 세제 (또한 "습윤화제"로 알려짐)는 당단백질을 가용화시키는 것을 돕기 위해, 뿐만 아니라 당단백질을 진탕-유도 응집에 대해 보호하기 위해 첨가될 수 있고, 또한 이는 제형이 단백질의 변성을 야기하지 않으면서 압력이 가해진 진단 표면에 노출되도록 허용한다. 적절한 비-이온성 계면활성제는 폴리소르베이트 (20, 80 등), 폴리옥사머 (184, 188 등), 플루로닉 폴리올을 포함한다. 비-이온성 계면활성제는 약 0.05 mg/mL 내지 약 1.0 mg/mL, 예를 들어 약 0.07 mg/mL 내지 약 0.2 mg/mL의 범위로 존재할 수 있다.

[0356] 추가적인 다양한 부형제는 증량제 (예를 들어, 전분), 킬레이팅제 (예를 들어, EDTA), 항산화제 (예를 들어, 아스코르브산, 메티오닌, 비타민 E), 및 공용매를 포함한다.

[0357] 5.7 사용 방법

[0358] 본원에 기술된 항-글리코-MUC1 항체 또는 결합 단편은 다양한 진단 검정법에서 사용될 수 있다. 예를 들어, 이러한 항체 및 결합 단편을 면역검정법, 예컨대 경쟁적 결합 검정법, 직접 및 간접 샌드위치 검정법, 및 면역조직화학, 효소-결합 면역흡착 검정법 (ELISA), 형광-활성화 세포 분류 (FACS) 및 웨스턴 블롯을 포함하는 면역침전 검정법에서 사용할 수 있다.

[0359] 본원에 기술된 항-글리코-MUC1 항체 또는 결합 단편은 검출가능한 모이어티 예컨대 방사선-비투과 작용제 또는 방사성동위원소로 표지된 항체가 대상체에게, 바람직하게는 혈류 내로 투여되고, 숙주 내의 표지된 항체의 존재 및 위치를 검정하는 방사선 생체내 영상화에 또한 유용하다. 이러한 영상화 기술은 악성종양의 병기 결정 및 치료에서 유용하다.

[0360] 본원에 기술된 항-글리코-MUC1 항체 또는 결합 단편, ADC 및 CAR은 글리코-MUC1 발현 암, 특히 상피암 예컨대 유방암, 난소암, 췌장암, 및 폐암의 치료에 유용하다.

[0361] 본 개시내용의 CAR을 요법용으로 사용하는 경우, 본 개시내용의 치료 방법은 글리코-MUC1-발현 종양이 있는 대상체에게 본 개시내용의 CAR (예를 들어 섹션 5.4 또는 실시양태 97 또는 실시양태 98에 기술된 바와 같음)을 발현하도록 조작된 유전자 변형 세포를 유효량으로 투여하는 것을 포함한다. CAR을 발현하도록 세포, 특히 T 세포를 변형하는 방법이 섹션 5.5.1에 기술되어 있다.

[0362] 6. 실시예

[0363] 6.1 실시예 1: 항-글리코-Muc1 항체의 확인

[0364] 6.1.1. 개관

[0365] 상이한 O-글리칸 밀도 및 Tn (GalNAc α 1-O-Ser/Thr) 글리코형태의 다중-반복 MUC1 글리코펩티드의 화학효소적 합성이 재조합 글리코실트랜스퍼라제를 사용하여 개발되었다. 상이한 폴리펩티드 GalNAc-트랜스퍼라제 아이소형이 O-글리칸 점유 부위를 지시하는데 사용되었다 (Bennett et al., 1998). 최적의 백신 디자인은 O-글리칸 밀도가 높은 Tn 글리코형태인 것으로 확인되었고, KLH에 접합된 글리코펩티드가 내성을 극복하는 것으로 확인되었다. 야생형 Balb/c 마우스에서, 완전한 O-글리칸 점유의 글리코펩티드가 유방암 세포주에서 발현된 MUC1과 반응하는 가장 강한 항체 반응을 유발하였고, 따라서 가장 효과적인 백신 디자인을 나타낸다. 유발된 체액성 면역 반응은 암세포에 대한 현저한 특이성을 나타냈다.

[0366] 6.1.2. 물질 및 방법

[0367] 6.1.2.1 다량체성 Tn MUC1 글리코펩티드의 화학효소적 합성

[0368] 문헌 [Fontenot et al., 1993]에서 원래 보고된 바와 같이, MUC1 60량체 (VTSAPDTRPAGSTAPPAHG)_n = 3 (서열식별번호: 47) 펩티드를 합성하였다. 사용된 대조군 펩티드는 MUC2 (PTTPISTTTMTPTPTPTC) (서열식별번호: 51) 및 MUC4 (CPLPVTDTSSASTGHATPLPV) (서열식별번호: 52)의 일렬 반복물 (TR)로부터 유도되었다. 미국 특허 번호 6,465,220에 기술된 바와 같이, 정제된 재조합 인간 글리코실트랜스퍼라제인 폴리펩티드 GalNAc-T2, GalNAc-T4, 및 GalNAc-T1 (Bennett et al., 1998; Schwientek et al., 2002)를 사용하여 시험관 내에서 펩티드를 글리코실화시켰다. 25 mM 카코딜레이트 완충제 (pH 7.4), 10 mM MnCl₂, 0.25% 트리톤(Triton) X-100, 및 2 mM UDP-GalNAc를 함유하는 반응 혼합물 (1 mg 펩티드/mL)에서 펩티드의 GalNAc 글리코실화를 수행하였다. GalNAc-T1을

사용하여 TR 당 2개의 GalNAc (MUC160Tn6)로의 1 mg 60량체 펩티드의 글리코실화를 수득하였다. GalNAc-T2를 사용하여 TR 당 3개의 GalNAc의 혼입 (MUC160Tn9)을 수득하였다. GalNAc-T4와의 반응에서 MUC160Tn9를 기질로서 사용하여 MUC1 TR 내의 5개 모두의 추정 O-글리코실화 부위의 치환 (MUC160Tn15)을 수행하였다. 나노-규모 역상 칼럼 (포로스(Poros) R3, 퍼셉티브 바이오시스템즈(PerSeptive Biosystems), 매사추세츠주 프레이밍햄) 및 MALDI-TOF 질량분광법을 사용하여 글리코실화를 모니터링하였다. 0.1% 트리플루오로아세트산 (TFA) 및 0-80% 아세토니트릴의 구배를 사용하여 1100 휴렛 팩커드(Hewlett Packard) 시스템 (펜실베이니아주 아본데일)에서 조르박스(Zorbax) 300SB-C3 칼럼 (9.4 mm × 25 cm) (애질런트 테크놀로지스(Agilent Technologies), 캘리포니아주 팔로알토) 상에서 고성능 액체 크로마토그래피 (HPLC)에 의해 글리코펩티드를 정제하였다. 10 µg 중량의 펩티드를 표준물질로서 사용하여 UV 210 흡광도에 의한 HPLC 피크의 비교에 의해 글리코실 반응의 정량 및 수율 추정을 수행하였다. 펩티드의 GalNAc 글리코실화는 일반적으로 80-90% 회수를 산출하였다. 정제된 글리코펩티드를 지연 추출이 장착된 보야지 DE(Voyager DE) 또는 보야지 DE 프로(Voyager DE Pro) MALDI-TOF 질량 분광기 (퍼셉티브 바이오시스템즈) 상에서의 MALDI-TOF 질량 분광법에 의해 특성화하였다. MALDI 매트릭스는 30% 수성 아세토니트릴 내의 0.1% TFA의 2:1 혼합물에 용해된 2,5-디히드록시벤조산 10 g/L (알드리치, 위스컨신주 밀워키)였다. 1 µl의 샘플 용액을 프로브 팁 상에 놓은 후 1 µl의 매트릭스를 놓음으로써 0.1% TFA에 ~1 pmol/µl의 농도로 용해된 샘플을 분석용으로 제조하였다. 모든 질량 스펙트럼은 선형 모드로 수득되었다. GRAMS/386 소프트웨어 (갈락틱 인더스트리즈(Galactic Industries), 뉴햄프셔주 세일럼)를 사용하여 데이터 프로세싱을 수행하였다.

[0369] **6.1.2.2 면역화 프로토콜**

[0370] 글루타르알데히드를 사용하여 글리코펩티드를 KLH (피어스(Pierce), 일리노이주 록포드)에 커플링시켰다. 분획들의 항-MUC1 ELISA를 사용하여 PD-10 칼럼 상에서의 크기 배제 크로마토그래피에 의해 반응을 분석함으로써 접합 효율을 평가하였다. 본질적으로 모든 반응성이 배제 분획으로 확인되었고, 펩티드를 함유할 것으로 예상되는 포함 분획에서의 유의하지 않은 반응성이 확인되었다. 추가 평가는 ELISA에서의 상응하는 글리코펩티드와 KLH 접합체의 비교 적정 분석을 포함하였다. 양쪽 모두의 분석이 접합이 거의 완전하였음을 나타냈고, 이는 1:300의 KLH 대 글리코펩티드 비를 초래하여야 한다. 암컷 Balb/c 야생형 마우스에 200 µl의 총 부피의 10 또는 15 µg의 (글리코)펩티드 (프로인트 아주반트 (시그마(Sigma)와의 1:1 혼합물)를 피하 주사하였다. 마우스에게 14일 간격으로 4회의 면역화를 제공하였고, 제3 및 제4 면역화 1주일 후에 꼬리 또는 눈 출혈에 의해 혈액 샘플을 수득하였다.

[0371] **6.1.2.3 마우스 MAb 항-Tn-MUC1의 생성**

[0372] KLH에 커플링된 완전히 GalNAc-글리코실화된 60량체 MUC1 글리코펩티드로 면역화된 야생형 Balb/c 마우스로부터 MAb가 생산되었다. 스크리닝은 글리코펩티드 ELISA 후의 유방암 세포주 (MCF7 및 T47D)로의 면역세포학 및 암 조직으로의 면역조직학을 기초로 하였다. 선별은 동일한 마우스의 전체 혈청과 유사한 반응성 패턴을 기초로 하였다.

[0373] **6.1.2.4 ELISA**

[0374] 96웰 맥시소프(MaxiSorp) 플레이트 (눈크(Nunc), 덴마크)를 사용하여 ELISA를 수행하였다. 플레이트를 철야로 4°C에서 바이카르보네이트-카르보네이트 완충제 (pH 9.6) 내의 1 µg/mL의 글리코펩티드로 코팅하고, 포스페이팅-완충 염수 (PBS) 내의 5% 소 혈청 알부민 (BSA)로 차단한 후, 혈청 (PBS에 희석됨) 또는 MAb와 함께 2시간 동안 실온에서 인큐베이션하였다. 결합된 항체를 퍼옥시다제-접합 토끼 항-마우스 면역글로불린 (다코사이토메이션(DakoCytomation), 덴마크 글로스트럽) 또는 아이소타입-특이적 항체인 퍼옥시다제-접합 염소 항-마우스 IgM, IgG1, IgG2a, IgG2b, 또는 IgG3 (서던 바이오테크놀로지 어소시에이츠(Southern Biotechnology Associates), 앨라배마주 버밍햄)으로 검출하였다. 플레이트를 0-페닐렌디마인 정제 (DakoCytomation)로 발색시키고, 492 nm에서 판독하였다. 대조군 항체는 항-MUC1 항체 HMFG2 및 SM3 (Burchell et al., 1987) 및 항-탄수화물 항체 5F4 (Tn) 및 3F1 (STn) (Mandel et al., 1991)을 포함하였다. 대조군 혈청은 KLH에 연결된 MUC4 뮤신 펩티드로 면역화된 마우스를 포함하였다.

[0375] **6.1.3. 결과**

[0376] KLH에 접합된 GalNAc-MUC1 60량체 글리코펩티드를 면역원으로서 사용하여 GalNAc-MUC1에 대해 글리코펩티드 특이적 mAb가 생산되었다. ELISA 검정법을 사용하여, 생성된 mAb G02 (5F7)가 정제된 재조합 인간 글리코실트랜스퍼라제 GalNAc-T1, GalNAc-T2, 및 GalNAc-T4를 사용하여 시험관 내에서 글리코실화된 MUC1 일련 반복물

(VTSAPDTRPAPGSTAPPAHG)₃ (서열식별번호: 47)과 특이적으로 반응하였고, GalNAc-잔기가 없는 상응하는 MUC1 펩티드 또는 동일한 유형의 Tn 글리코형태의 관련된되지 않은 글리코펩티드와는 반응이 없었다. ELISA 검정법의 결과가 도 1에서 제시된다.

[0377] 6.2 실시예 2: 항-글리코-Muc1 항체의 특성화

[0378] 6.2.1. 개관

[0379] 모노클로날 항체 G02 (5F7)를 암세포와 연관된 MUC1의 Tn 글리코형태에 결합하는 이의 특이성에 대해 특성화하였다.

[0380] 6.2.2. 물질 및 방법

[0381] 6.2.2.1 면역세포화학

[0382] 세포주를 10분 동안 빙냉 아세톤에서 또는 메탄올:아세톤에서 고정시켰다. 고정된 세포를 철야로 5℃에서 마우스 혈청 (1:200/1:400/1:800) 또는 MAb와 함께 인큐베이션한 후, 45분 동안 실온에서 플루오레세인 이소티오시아네이트 (FITC)-접합 토끼 항-마우스 면역글로불린 (다코사이토메이션)과 함께 인큐베이션하였다. 슬라이드를 p-페닐렌디아민을 함유하는 글리세롤에 마운팅하고, 자이스(Zeiss) 형광 현미경 (플루오레스사이언스 (FluoresScience), 독일 할베르그모스)에서 검사하였다.

[0383] 6.2.2.2 면역조직화학

[0384] 유방 암종의 포르말린-고정, 파라핀 왁스-매립 조직을 수득하였다. 모든 사례는 조직학적 유형에 의해 통상적으로 분류되었다. 아비딘-비오틴 퍼옥시다제 복합체 방법을 면역염색에 사용하였다. 파라핀 절편에서 왁스를 제거하고, 재수화시키고, 30분 동안 메탄올 내의 0.5% H₂O₂로 처리하였다. 절편을 TBS에서 행구고, 20분 동안 토끼 비-면역 혈청과 함께 인큐베이션하였다. 절편을 행구고, 철야로 5℃에서 1차 항체와 함께 인큐베이션하였다. 절편을 행구고, TBS에서 1:200 희석된 비오틴-표지 토끼 항-마우스 혈청 (다코사이토메이션)과 함께 30분 동안 인큐베이션하고, TBS로 행구고, 1시간 동안 아비딘-비오틴 퍼옥시다제 복합체 (다코사이토메이션)와 함께 인큐베이션하였다. 절편을 TBS로 행구고, 0.1% H₂O₂를 함유하는 0.05 M TBS에서 신선하게 제조된 0.05% 3,3'-디아미노벤지딘 테트라히드로클로라이드로 발색시켰다. 절편을 헤마톡실린으로 염색하고, 탈수시키고, 마운팅하였다.

[0385] 6.2.3. 결과

[0386] 결장직장 암종, 췌장 암종 및 침습성 유방 선암종의 면역조직화학을 G02로 수행하였다. 결장직장암 조직의 염색 (도 2)은 대부분의 암세포 상에서 세포내 및 표면 구조가 강하게 표지되는 것을 입증하였다. 대조적으로, 건강한 원주 상피 세포에 대해서는 반응성이 보이지 않거나 또는 유의하게 더 낮았다. 건강한 세포에서의 표지화는 세포내 구조에 제한되었고, 이는 분비 능력이 높은 세포 예컨대 결장 원주 상피 내의 다량의 생합성 중간체 (GalNAc-변형 당단백질)의 존재에 기인하는 것으로 예상된다. 암세포와는 반응성이 높고, 주변의 건강한 상피 또는 결합 조직 세포 내의 세포내 구조와는 반응성이 없거나 제한되면서, 췌장 (도 3) 및 유방 암 조직 (도 4)으로 유사한 패턴이 관찰되었다.

[0387] 6.3 실시예 3: 항-글리코-Muc1 항체의 서열 분석

[0388] 모노클로날 항체 G02 (5F7)를 생산하는 하이브리도마로부터의 mRNA를 제조하고, 역전사시키고, 시퀀싱하였다.

[0389] 중쇄 및 경쇄 가변 영역을 이들의 신호 서열과 함께 코딩하는 뉴클레오타이드 서열이 각각 서열식별번호: 11 및 서열식별번호: 12에 기재된다. 서열식별번호: 11 및 서열식별번호: 12에 의해 코딩되는 중쇄 및 경쇄 가변 영역이 각각 서열식별번호: 1 및 서열식별번호: 2에 기재된다. 예상되는 성숙형 가변 영역 서열 (신호 펩티드의 말단절단 후)이 각각 서열식별번호: 3 및 서열식별번호: 4에 기재되고, 각각 서열식별번호: 13 및 서열식별번호: 14에 의해 코딩된다. 예상되는 중쇄 CDR 서열 (IMGT 정의)이 각각 서열식별번호: 5-7에 기재되고, 예상되는 경쇄 CDR 서열 (IMGT 정의)이 각각 서열식별번호: 8-10에 기재된다.

[0390] 6.4 실시예 4: 항-글리코-Muc1 항체로의 암세포로의 약물 전달

[0391] 6.4.1. 개관

[0392] 모노클로날 항체 G02 (5F7)를 세포독성제를 표적 세포에 전달하는 이의 능력에 대해 테스트하였다.

6.4.2. 물질 및 방법

OVCaR 인간 난소 암종 세포를 24웰 세포 배양 플레이트에 1,000개의 세포/웰로 첨가하였다. 하기의 농도 ($\mu\text{g}/\text{ml}$ 단위)의 GO2 및 ADC를 제공하도록 모노클로날 항체 GO2 및 항-튜블린 작용제 모노메틸 오리스타틴 F (MMAF)에 접합된 2차 항체 (항-mFc-NC-MMAF) (모라텍(Moradec) 카탈로그 번호 AM-101-AF)를 플레이트에 첨가하였다:

<표 2>

열 행	표 2					
	1	2	3	4	5	6
A	GO2: 5 ADC: 2.0	GO2: 1 ADC: 2.0	GO2: 0.2 ADC: 2.0	GO2: 0.04 ADC: 2.0	GO2: 0.008 ADC: 2.0	GO2: 0 ADC: 2.0
B	GO2: 5 ADC: 0.6	GO2: 1 ADC: 0.6	GO2: 0.2 ADC: 0.6	GO2: 0.04 ADC: 0.6	GO2: 0.008 ADC: 0.6	GO2: 0 ADC: 0.6
C	GO2: 5 ADC: 0.2	GO2: 1 ADC: 0.2	GO2: 0.2 ADC: 0.2	GO2: 0.04 ADC: 0.2	GO2: 0.008 ADC: 0.2	GO2: 0 ADC: 0.2
D	GO2: 5 ADC: 0	GO2: 1 ADC: 0	GO2: 0.2 ADC: 0	GO2: 0.04 ADC: 0	GO2: 0.008 ADC: 0	GO2: 0 ADC: 0

플레이트를 37℃에서 48시간 동안 인큐베이션하였다. 48시간 인큐베이션 후, 알라마르블루(AlamarBlue)® (인비트로젠(Invitrogen))를 각각의 웰에 첨가하고, 600 nm에서의 형광을 측정하였다.

6.4.3. 결과

결과가 도 5에서 제시된다. 결과는 세포 독성이 1차 항체 (GO2) 농도 및 항체의 존재, 및 2차 ADC 접합 항체 농도 및 존재에 의존적이라는 것을 나타낸다. 달리 말하면, 세포독성제 MMAF를 보유하는 2차 항체와 커플링된 경우 GO2가 이러한 암 세포주의 세포 독성을 유도한다.

6.5 실시예 5: 항-Muc1 항체로의 순환 종양 세포 정량

6.5.1. 개관

모노클로날 항체 GO2 (5F7)를 순환 종양 세포를 정량하는데 사용될 이의 능력에 대해 테스트하였다.

6.5.2. 물질 및 방법

GO2를 자기 분리 비드에 접합시키고, 상이한 농도의 종양 세포의 샘플들과 상호작용하도록 허용하였다. 세포 및 비드를 자석으로 용액으로부터 빼내고, 결합되지 않은 물질을 제거하도록 여러번 세정하였다. 그 후, 양고 추냉이 퍼옥시다제에 접합된 GO2를 결합된 암세포를 함유하는 자기 분리 비드에 적용하고, 인큐베이션한 후, 결합되지 않은 접합된 GO2를 세정해냈다. TNB를 기질로 사용하여 비색 반응을 수행하였다. 황산으로 반응을 종결시킨 후, 샘플에서 OD 450 판독값을 취했다.

6.5.3. 결과

결과가 도 6에서 제시된다. 검정법 결과는 종양 세포의 GO2 결합을 입증하였다.

6.6 실시예 6: 항-글리코-Muc1 항체를 사용한 종양 조직의 면역조직화학 염색

6.6.1. 물질 및 방법

6개의 포르말린 고정, 파라핀 매립 (FFPE) 조직 마이크로어레이 (TMA)로부터의 절편을 2.5 μm 두께로 절단하였다. 유방암 (BC), 결장직장암 (CRC), 난소암 (OVC), 비-소세포 폐암 (NSCLC) 및 전립선암 (PrC) 종양으로부터의 TMA가 연구에 사용되었다. TMA 당 25-47개의 종양 조직 코어가 평가용으로 이용가능하였다. 코어 크기는 TMA에 따라 1 mm, 2 mm 또는 3 mm였다. 각각의 조직 코어는 1명의 환자를 나타냈다.

[0410] 디스커버리(Discovery) XT 자동염색기 (벤타나 메디컬 시스템즈(Ventana Medical Systems))에서 염색을 수행하였다. 세포 컨디션 1 (CC1) 용액 (벤타나 메디컬 시스템즈)으로의 항원 회복 후, G02를 다코(Dako) 녹색 배지 항체 희석제 내의 1 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 적용하고, 60분 동안 37°C에서 인큐베이션하였다. DAB (갈색 침전물)에서 가시화된 옵티뷰(Optiview) DAB IHC 검출 키트 (벤타나 메디컬 시스템즈)를 사용하여 종양 세포에 대한 G02의 결합을 검출하였다.

[0411] 6.6.2. 결과

[0412] MUC1 양성 TMA 종양 코어의 대표적인 영상이 도 7에서 제시된다. BC 및 OVC TMA에서, 대부분의 스팟 (> 90%)이 G02가 종양 세포에 중등도로 또는 강하게 결합하는 것을 나타냈다. NSCLC 및 CRC 사례의 70% 및 51%가 항체가 종양 세포에 중등도로 또는 강하게 결합하는 것을 각각 나타냈다. 전립선암에서는, 항원이 더 적게 발현된 것으로 보였다. G0-2을 적용할 때, TMA 1 내의 스팟의 28%만 중등도이거나 또는 강한 염색 강도를 나타냈다. 염색 패턴은 항상 세포질이었으며, 다수의 경우에 막-결합이었다. 몇몇 코어에서 침단부 막 염색 패턴이 관찰되었다.

[0413] 6.7 실시예 7: T-세포 이중특이적 (TCB) 양식의 항-MUC1 항체의 생산 및 정제

[0414] 6.7.1. 물질 및 방법

[0415] 6.7.1.1 발현 벡터 생산

[0416] Fc 영역에서의 노브-인트루-홀 및 P329G/L234A/L235A ("PGLALA") 돌연변이 및 MUC1 CH1 (147E/213E; "EE") 및 CL (123R/124K; "RK") 영역에서의 하전된 잔기를 포함하여, G02 항체가 TCB 양식으로 전환되었다 (서열식별번호: 43-46 참조). TCB 항체가 도 8에서 도해된다. 간략하게, G02 mAb의 가변 중쇄 및 가변 경쇄를 합성하고 (진아트(Geneart), 독일 레겐스부르크), 적절한 발현 벡터 내로 삽입하였으며, 여기에서 이는 적합한 인간 불변 중쇄 또는 인간 불변 경쇄에 융합된다. 이러한 벡터 내의 발현 카세트는 CMV 프로모터, 5' UTR이 있는 인트론 A, 및 BGH 폴리아데닐화 부위로 이루어진다. 추가적으로, 플라스미드는 EBV 핵 항원 (EBNA)을 보유하는 HEK293 세포에서의 안정적인 유지를 위한 엡스타인 바 바이러스로부터의 oriP 영역을 함유한다.

[0417] 6.7.1.2 일시적 형질감염 및 생산

[0418] 하기와 같은 PEI 매개 형질감염 절차를 사용하여 HEK293 EBNA 세포에서 항체가 일시적으로 생산되었다. HEK293 EBNA 세포를 6 mM L-글루타민을 함유하는 엑셀(Excell) 배양 배지 내의 무혈청 현탁액에서 배양한다. 500 ml 진탕 플라스크에서의 항체 생산을 위해, 3억개의 HEK293 EBNA 세포를 형질감염 24시간 전에 시딩한다 (대안적인 규모를 위해, 모든 양이 그에 맞게 조정된다). 형질감염을 위해, 세포를 10분 동안 210×g에서 원심분리하고, 상청액을 미리 가온된 20 ml CD CHO 배지로 교체한다. 발현 벡터를 20 ml CD CHO 배지에서 200 μg DNA의 최종량으로 혼합한다. 540 μl PEI를 첨가한 후, 용액을 15초 동안 와동시키고, 이어서 10분 동안 실온에서 인큐베이션한다. 그 후, 세포를 DNA/PEI 용액과 혼합하고, 500 ml 진탕 플라스크로 옮기고, 5% CO₂ 대기의 인큐베이터에서 3시간 동안 37°C에서 인큐베이션한다. 인큐베이션 후, 6 mM 글루타민, 1.25 mM 발프로산 및 12.5% 펩소이(Pepsoy)를 함유하는 160 ml 엑스-셀(Ex-cell)® 배지 (시그마-알드리치(Sigma-Aldrich))를 첨가하고, 세포를 24시간 동안 인큐베이션한다. 형질감염 1일 후, 12% 피드(Feed) 7 (48 mL) + 3 g/L 글루코스를 첨가한다. 7일 후, 45분 동안 3000×g에서 원심분리함으로써 배양 상청액을 정제용으로 수집한다. 용액을 멸균 여과하고 (0.22 μm 필터), 최종 농도 0.01 % w/v의 아지드화나트륨을 첨가한다. 그 후, 용액을 4°C에서 보관한다.

[0419] 6.7.1.3 항체 정제

[0420] 분비된 단백질을 단백질 A를 사용하는 친화성 크로마토그래피에 이어서 크기 배제 크로마토그래피에 의해 정제하였다. 친화성 크로마토그래피의 경우, 상청액을 20 mM 인산나트륨, 20 mM 시트르산나트륨 pH 7.5으로 평형화된 단백질 A 맵셀렉트 슈어(MabSelect SuRe) 칼럼 (지이 헬스케어(GE Healthcare)) 상에 로딩하였다. 평형 완충제로 세정함으로써 미결합 단백질을 제거하였다. 결합된 단백질을 20 mM 시트르산나트륨, 100 mM 염화나트륨, 100 mM 글리신, pH 3.0으로 생성된 단계 (표준 IgG) 또는 구배 (이중특이적 항체) 용출을 사용하여 용출시켰다. 수집된 분획의 pH를 1/10 (v/v)의 0.5 M 인산나트륨 pH 8.0을 첨가함으로써 조정하였다. 단백질을 농축하고, 여과한 후, 20 mM 히스티딘, 140 mM 염화나트륨, pH 6.0으로 평형화된 하이로드 슈퍼덱스(HiLoad Superdex) 200 칼럼 (지이 헬스케어) 상에 로딩하였다.

[0421] 용출된 분획의 응집물 함량을 분석용 크기 배제 크로마토그래피에 의해 분석하였다. 그 후, 30 μl 의 각각의 분

획을 200 mM 아르기닌, 25 mM K₂PO₄, 125 mM 염화나트륨, 0.02% NaN₃, pH 6.7로 평형화된 TSK G3000 SWXL 칼럼 (TOSOH, 7.8 mm × 30 cm)에 적용하였다. 2% 미만의 올리고머를 함유하는 분획을 폴링하고, 원심분리 농축기 (밀리포어(Millipore), 아미콘® 울트라(Amicon® ULTRA) - 15, 30k MWC0)를 사용하여 1 - 1.5 mg/ml의 최종 농도로 농축하였다. 정제된 단백질을 -80℃에서 보관하였다.

6.7.2. 결과

G02 TCB 항체의 생산 수율 및 품질이 표 5에서 제시된다.

<표 5>

표 5					
분자	수율 [mg/L]	단량체 [%] SEC	HMW [%]	LMW [%]	순도 [%] CE-SDS
GO2 TCB	0.51	94.16	0.00	5.84	85.61

6.8 실시예 8: 소화되지 않은 환자-유래 샘플에서의 생체의 표적 발현을 모니터링하기 위한 저캐트-NFAT 리포터 검정법

6.8.1. 개관

저캐트 NFAT 리포터 검정법을 사용하여, 소화되지 않은 1차 인간 종양 샘플에서의 생체의 표적 발현 (글리코-MUC1)을 G02 TCB를 사용하여 모니터링하였다.

6.8.2. 물질 및 방법

6.8.2.1 물질

- G02 TCB (실시예 7 참조)
- DP47 TCB (비-표적화, 음성 대조군)
- 매트릭젤(Matrigel) (아이템 번호 734-1101, 코닝(Corning)/VWR, 스위스)
- 코닝® 코스타(Costar)® 울트라-로우(Ultra-Low) 부착 멀티웰 플레이트 (아이템 번호 CLS7007-24EA, 시그마)
- 세포 배양 마이크로플레이트, 96웰 (아이템 번호 655098, 그라이너 바이오-원(Greiner Bio-one), 스위스)
- RPMI1640 배지 (아이템 번호 42401-018, 피셔사이언티픽(FisherScientific), 스위스)
- 저캐트 배지: RPMI1640 배지 + 2 g/l D-글루코스, 2 g/l NaHCO₃, 10 % FCS, 25 mM HEPES, 2 mM L-글루타민, 1 × NEAA, 1× 피루브산나트륨, 200 µg/ml 히그로마이신 B
- 저캐트 NFAT 루시퍼라제 리포터 세포 (프로메가(Promega))
- 독일의 인디부메드 게엠베하(Indivumed GmbH)에서 종양 샘플을 받았다. 샘플을 철야로 운반 배지에서 운송하였다. 수술하고 나서 약 24시간 후에 샘플을 소형 조각으로 절단하였다.

6.8.2.2 방법

17 µl의 차가운 매트릭젤을 첨가함으로써 96웰 세포 배양 마이크로플레이트를 제조하였다. 플레이트를 2분 동안 37℃에서 인큐베이션한 후, 종양 조각을 첨가하였다 (3중). 웰 당 33 µl의 차가운 매트릭젤을 첨가하고, 플레이트를 다시 2분 동안 37℃에서 인큐베이션하였다. 웰 당 100 µl (50 nM 또는 5 nM)의 TCB 항체 희석물 (히그로마이신은 없지만 2× 페니실린/스트렙토마이신이 있는 저캐트 배지에 희석됨)을 첨가하였다. 저캐트-NFAT 리포터 세포를 수확하고, 바이셀(ViCell)을 사용하여 생존율을 평가하였다. 세포를 350×g 7분 동안 원심분리한 후, 히그로마이신이 없는 저캐트 배지에 재현탁시켰다. 웰 당 50 µl의 세포 현탁액을 첨가하였다 (50,000개의 세포/웰). 플레이트를 4 내지 5시간 동안 37℃에서 가습 인큐베이터에서 인큐베이션한 후, 발광 판독을 위해 꺼

냈다. 각각의 웰에 50 μ l의 원-글로(ONE-Glo) 용액을 첨가하고, 암실에서 10분 동안 실온에서 인큐베이션하였다. 5 초/웰 검출 시간으로 왈락 빅터3(WALLAC Victor3) ELISA 판독기 (퍼킨엘머2030(PerkinElmer2030))를 사용하여 발광을 검출하였다.

[0442] **6.8.3. 결과**

[0443] 3명의 환자로부터의 종양 샘플로부터의 결과가 도 9-11에서 제시된다. 도 9에 제시된 결과는 기관지 및 폐의 악성 신생물이 있는 환자로부터 수득된 종양 샘플로부터의 것이다: 중간엽, 기관지 또는 폐, 편평 세포 암종. 도 10에 제시된 결과는 기관지 및 폐의 악성 신생물이 있는 환자로부터 수득된 종양 샘플로부터의 것이다: 하엽, 기관지 또는 폐, 비-각화 편평 세포 암종. 도 11에 제시된 결과는 기관지 및 폐의 악성 신생물이 있는 환자로부터 수득된 종양 샘플로부터의 것이다: 상엽, 기관지 또는 폐, 파리 유형의 선암종. 도 9-11의 각각의 막대는 삼중물의 평균을 나타낸다. 오차 막대에 의해 표준 오차가 지시된다. 점선은 어떠한 TCB도 없이 종양 샘플과 함께 인큐베이션된 저넷 NFAT 세포에 대한 발광을 지시한다. 양측 비대응 t-검정을 통계 분석에 사용하였다. 0.05 미만의 P-값이 유의한 것으로 간주되었고, 별표로 지시된다 (* $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.001$; *** $P \leq 0.001$). 도 9-11 각각에서, G02 TCB와 함께 인큐베이션된 종양 샘플이 DP47 음성 대조군 TCB와 함께 인큐베이션된 샘플보다 유의하게 더 많은 발광을 나타냈다.

[0444] **6.9 실시예 9: G02 TCB의 시험관내 특성화**

[0445] **6.9.1. 개관**

[0446] 종양-특이적인 비정상적으로 글리코실화된 MUC1를 인식하는 G02 TCB (실시예 7)를 MUC1을 발현하는 종양 세포에서 기능적으로 특성화하였다.

[0447] **6.9.2. 물질 및 방법**

[0448] **6.9.2.1 세포주 및 PBMC**

[0449] T3M4 pfzv 및 MCF7 cs 조작 종양 세포주를 DMEM + 10% FCS 및 2 mM 글루타민에서 배양하였다. MCF10A는 인간의 비-종양형성성 유방 상피 세포주 (ATCC® CRL-10317)이다. HBEpiC는 인간의 기관지 상피 세포 (사이언셀 (Sciencell) #3210)이다. PBMC는 건강한 자원자로부터의 전혈을 사용하여 구매 원심분리에 의해 분리되었다.

[0450] **6.9.2.2 유동 세포측정법에 의한 표적 결합**

[0451] 지시된 바와 같은 표적 세포를 세포 해리 완충제로 수확하고, PBS로 세정하고, FACS 완충제에 재현탁시켰다. 96웰 둥근바닥 플레이트에서 항체 염색을 수행하였다. 웰 당 200,000개의 세포를 시딩하였다. 플레이트를 4분 동안 400g에서 원심분리하고, 상청액을 제거하였다. 테스트 항체를 FACS 완충제에 희석하고, 30 μ l의 항체 용액을 30분 동안 4°C에서 세포에 첨가하였다. 미결합 항체를 제거하기 위해, 세포를 FACS 완충제로 2회 세정한 후, 희석된 2차 항체 (PE-접합 어피니퓨어(AffiniPure) F(ab')₂ 단편 염소 항-인간 IgG Fc γ 단편 특이적, 잭슨 이뮤노리서치(Jackson ImmunoResearch) #109-116-170)를 첨가하였다. 4°C에서 30분 인큐베이션한 후, 미결합 2차 항체를 세정해냈다. 측정 전에, 세포를 200 μ l FACS 완충제에 재현탁시키고, BD 포르테사(BD Fortessa)를 사용하여 유동 세포측정법에 의해 분석하였다. 검정법을 삼중으로 수행하였다.

[0452] **6.9.2.3 T 세포 매개 종양 세포 살해 및 T 세포 활성화**

[0453] 표적 세포를 트립신/EDTA로 수확하고, 계수하고, 생존율을 점검하였다. 세포를 이의 각각의 배지에 300,000개의 세포/ml의 최종 농도로 재현탁시켰다. 그 후, 100 μ l의 표적 세포 현탁액을 96-편평바닥 플레이트의 각각의 웰 내로 옮겼다. 플레이트를 인큐베이터에서 철야로 37°C에서 인큐베이션하여 세포에 플레이트에 부착되게 하였다. 다음날, PBMC를 전혈로부터 분리하였다. 혈액을 PBS로 2:1 희석하고, 류코셉(Leucosep) 튜브 내의 15 ml 히스토파크(Histopaque)-1077 (# 10771, 시그마-알드리치) 상에 덮고, 제동 없이 30분 동안 450g에서 원심분리하였다. 원심분리 후, 세포를 함유하는 밴드를 10 ml 파이펫으로 수집하고, 50 ml 튜브 내로 옮겼다. 튜브를 50 ml까지 PBS로 채우고, 원심분리하였다 (400g, 10분, 실온). 상청액을 제거하고, 펠릿을 PBS에 재현탁시켰다. 원심분리 (300g, 10분, 실온) 후, 상청액을 폐기하고, 2개의 튜브를 풀링하고, 세정 단계를 반복하였다 (이번에는 350g, 10분, 실온의 원심분리). 그 후, 세포를 재현탁시키고, 세포 계수를 위해 펠릿을 50 ml PBS에 풀링하였다. 계수 후, 세포를 원심분리하고 (350g, 10분, 실온), RPMI + 2 % FCS 및 2 nM 글루타민 1 ml 당 6백만개의 세포로 재현탁시켰다. 플레이팅된 표적 세포로부터 배지를 제거하고, RPMI + 2% FCS 및 2 nM 글루타민에 희석된 테스트 항체를 첨가하였다. 300,000개의 세포의 이펙터 세포 용액을 각각의 웰로 옮겨서 10:1의 E:T 비를 생성시켰다. 최대 방출을 결정하기 위해, 표적 세포를 트리톤 X-100으로 용해시켰다. 24시간

및 48시간 후에 세포독성 검출 키트 (1644793, 로슈 어플라이드 사이언스(Roche Applied Science))를 사용하여 LDH 방출을 결정하였다. 종양 세포 살해 후의 T 세포 상에서의 활성화 마커 상향조절을 유동 세포측정법에 의해 측정하였다. 간략하게, PBMC를 수확하고, 96웰 둥근바닥 플레이트 내로 옮기고, FACS 완충제에 희석된 CD4 APC (300514, 바이오레전드(BioLegend)), CD8 FITC (344704, 바이오레전드), CD25 BV421 (302630, 바이오레전드), CD69 PE (310906, 바이오레전드) 항체로 염색하였다. 4℃에서 30분 인큐베이션한 후, 세포를 FACS 완충제로 2회 세정하였다. BD 포르테사 II를 사용하여 형광을 측정하기 전에, 세포를 200 μ l FACS 완충제에 재현탁시켰다. 검정법을 3중으로 수행하였다.

[0454] **6.9.2.4 세포측정 비드 어레이에 의한 시토카인/케모카인 방출**

[0455] 상청액 내의 시토카인/케모카인 분비를 제조사의 지침에 따라 세포측정 비드 어레이 (CBA)를 사용하여 유동 세포측정법에 의해 측정하였다. T 세포 매개 살해 검정법으로부터의 상청액을 수집하고, -20℃에서 보관하였다. 이어서 상청액을 해동하고, 제조사의 설명서에 따라 테스트하였다. 하기의 CBA 키트 (BD 바이오사이언시즈(BD Biosciences))를 사용하였다: CBA 인간 인터페론 감마 (IFN γ) 플렉스 세트(Flex Set) (E7), CBA 인간 그랜자임 B 플렉스 세트 (D7), CBA 인간 IL6 플렉스 세트 (A7), CBA 인간 IL8 플렉스 세트 (A9), CBA 인간 IL10 플렉스 세트 (B7) 및 CBA 인간 종양 괴사 인자 (TNF) 플렉스 세트 (D9). BD FACS 칸토(Canto) II를 사용하여 샘플을 측정하고, 디바 소프트웨어(Diva Software) (BD 바이오사이언시즈)를 사용하여 분석을 수행하였다. 검정법을 3중으로 수행하였다.

[0456] **6.9.3. 결과**

[0457] 양쪽 모두 비정상적으로 글리코실화된 MUC1을 발현하도록 조작된 유방암 세포주 MCF7 및 췌장암 세포주 T3M4에 대한 G02 TCB의 결합이 확인되었다 (도 12). 이어서, G02 TCB의 활성을 신선하게 분리된 PBMC를 사용하여 MCF7 및 T3M4 양쪽 모두의 종양 세포주에서 테스트하였다 (도 13 및 도 14). 양쪽 모두의 세포주의 종양 세포 살해가 24시간 후에 검출되었고, 48시간 후에 더욱 더 강했다. 이는 2개의 활성화 마커 CD25 및 CD69의 상향조절에 의해 결정된 CD4 T 세포 및 CD8 T 세포의 활성화, 및 상청액 내의 IL6, IL8, IL10, IFN γ , TNF α 및 그랜자임 B의 방출을 동반하였다. 음성 대조군으로서, 각각의 표적화되지 않은 TCB가 포함되었다.

[0458] G02 TCB가 상피 세포 상의 정상적으로 글리코실화된 MUC1에 결합하지 않는다는 것을 증명하기 위해, 인간의 비-종양형성성 유선 상피 세포주인 MCF10A 및 1차 인간 기관지 상피 세포인 HBEpiC에 대한 결합을 테스트하였다. 양성 대조군으로서, 정상 세포와 종양 세포 상에서 발현된 MUC1을 구별하지 않는 HMFG1 TCB가 포함되었다. HMFG1 TCB가 양쪽 모두의 테스트된 세포에 결합하는 것으로 확인되어, MUC1의 발현이 확인되었지만, G02 TCB는 이러한 세포에 결합할 수 없었다 (도 15). 추가적으로, MUC1을 발현하는 정상 상피 세포의 존재 하에 살해 또는 T 세포 활성화를 유도할 것인지 여부를 보기 위해 G02 TCB를 테스트하였다. 이는 MCF10A 세포 상에서 테스트되었고, G02 TCB로는 검출가능한 살해 또는 T 세포 활성화가 없었지만, HMFG1 TCB는 살해, 뿐만 아니라 T 세포 활성화를 유도하였다 (도 16).

[0459] **6.10 실시예 10: 표면 플라즈몬 공명에 의한 G02 및 G02 TCB 항체의 기능적 특성화**

[0460] **6.10.1. 개관**

[0461] G02 및 G02 TCB (실시예 7)를 표면 플라즈몬 공명에 의해 특성화하였다.

[0462] **6.10.2. 물질 및 방법**

[0463] **6.10.2.1 고정된 글리코펩티드에 대한 G02 및 G02 TCB의 결합**

[0464] 인간 및 시노물구스 글리코펩티드 (표 6)에 대한 G02 항체 및 G02 TCB의 결합을 표면 플라즈몬 공명 (SPR)에 의해 평가하였다. 모든 SPR 실험을 HBS-EP (0.01 M HEPES pH 7.4, 0.15 M NaCl, 3 mM EDTA, 0.005% 계면활성제 P20, 비아코어 (독일, 프라이부르크))를 러닝 완충제로 하여 25℃에서 비아코어(Biacore) T200에서 수행하였다.

<표 6>

표 6		
글리코펩티드	서열	PBS 내의 농도
인간 펩티드	PDTSAAPGSTAPPAHVVSAP (서열식별번호: 48)	0.9 mg/ml
시노몰구스 펩티드	PDTSAAPGSTGPPAHVVSAP (서열식별번호: 49)	1.8 mg/ml

비오틴화 글리코펩티드를 PBS에 용해시켰고, 최종 농도는 0.9 내지 1.8 mg/ml였다 (표 6). 비오틴화 글리코펩티드를 스트렙타비딘 (SA) 센서 칩의 유동 셀에 직접적으로 커플링시켰다. 최대 880 공명 단위 (RU)의 고정 수준이 사용되었다. G02 항체 또는 G02 TCB를 240초에 걸쳐 1000 nM의 농도로 유동 셀을 통해 30 μ l/분의 흐름으로 주입하였다 (도 17). 500초 동안 해리를 모니터링하였다. 단백질이 고정되지 않은 기준 유동 셀에서 수득된 반응을 차감함으로써 벌크 굴절률 차이를 보정하였다.

6.10.2.2 고정된 글리코펩티드에 대한 G02 및 G02 TCB의 결합력

G02 및 G02 TCB의 결합력을 표면 플라즈몬 공명 (SPR)에 의해 평가하였다. 모든 SPR 실험을 HBS-EP (0.01 M HEPES pH 7.4, 0.15 M NaCl, 3 mM EDTA, 0.005% 계면활성제 P20, 비아코어 (독일 프라이부르크))를 러닝 완충제로 하여 25°C에서 비아코어 T200에서 수행하였다. 비오틴화 글리코펩티드 (표 6)를 스트렙타비딘 (SA) 센서 칩의 유동 셀에 직접적으로 커플링시켰다. 최대 200 공명 단위 (RU)의 고정 수준이 사용되었다.

G02 항체 또는 G02 TCB를 120초에 걸쳐 3.9 내지 1000 nM (1:2 희석)의 농도로 유동 셀을 통해 30 μ l/분의 흐름으로 주입하였다. 400초 동안 해리를 모니터링하였다. 단백질이 고정되지 않은 기준 유동 셀에서 수득된 반응을 차감함으로써 벌크 굴절률 차이를 보정하였다. 비아이벨(Biaeval) 소프트웨어 (GE Healthcare)를 사용하여 곡선을 1:1 랭뮤어 결합에 피팅함으로써, 상호작용의 2가성에도 불구하고, KD가 유도되었다. 따라서, "겉보기" KD를 비교 목적으로만 사용할 수 있다.

6.10.3. 결과

도 18의 센서그램에서 볼 수 있듯이, G02 항체 (도 18a) 및 G02 TCB (도 18b)가 인간 및 시노몰구스 글리코펩티드 양쪽 모두에 결합한다. G02 항체 및 G02 TCB는 인간 글리코펩티드보다 시노몰구스에 더 높은 결합력으로 결합한다.

도 19에서 볼 수 있듯이, 2가 G02 결합제 (IgG, TCB)가 인간 글리코펩티드에 결합하는 것은 세자리 나노몰인 반면 (도 19a 및 19c), 시노몰구스 글리코펩티드에 결합하는 것은 두자리 나노몰이다 (도 19b 및 19d).

6.11 실시예 11: 시노몰구스 원숭이에서의 G02 TCB의 탐색적 단일 용량 약동학 및 내성 연구

6.11.1. 개관

본 연구의 목적은 시노몰구스 원숭이에게 단일 정맥내 주사에 의해 제공되었을 때의 실시예 7에 기술된 G02 TCB의 약동학 및 내성을 결정하는 것이다.

6.11.2. 물질 및 방법

6.11.2.1 G02 TCB의 제조

G02 TCB (2.12 mg/mL) 및 제형 완충제 (20 mM 히스티딘, 140 mM NaCl, 0.01% 트윈 20; pH 6.0)의 동결 모액을 4°C로 유지되도록 설정된 냉장고에서 철야로 해동시킨다. 제형 완충제로의 희석에 의해 용량 수준 요건을 충족시키는 적합한 농도에서 멸균 조건 하에 테스트 물품 투약 제형을 제조한다.

주사하기 2시간 전 이내에 투약 제형을 제조하고, 사용할 때까지 실온에서 보관한다. 흡착을 방지하기 위해 투약 제형의 제조 및 보관을 위해 폴리프로필렌 용기를 사용한다. 투약 제형을 여과하거나, 교반하거나 또는 진탕시키지 않아야 한다. 모든 혼합은 부드러운 파이펫팅 또는 용기의 부드러운 스윙에 의해 행해진다.

6.11.2.2 동물

2-4세이고 체중이 4 kg 미만인 시노몰구스 원숭이 (마카카 파시쿨라리스)가 연구에서 사용된다. 투여 개시 전

에 적어도 6주 동안 동물을 테스트 설비 영장류 독성학 수용시설에 적응하게 허용한다.

[0483] 투약 개시 전주 동안, 만족스러운 수의학 검사 (도착 직후 수행됨), 임상 관찰 기록, 체중 프로파일 및 임상 병리학 조사를 기초로 동물이 실험 참가에 대해 승인된다.

[0484] 연구용으로 선택된 동물을 제공된 군 상용성 정보를 기초로 무작위로 우리에게 배정한 후, 개별적인 연구 번호를 할당한다. 동물을 최대 5마리의 군으로 우리에게 배정한다.

[0485] **6.11.2.3 사육**

[0486] 동물을 가능한 경우 성별로 최대 5마리의 군으로 1층 1.61×1.66×2.5 m 및 2층 1.61×1.66× 2.03 m 치수의 2층 집단 울타리에서 사회적으로 거주시킨다. 침구 물질은 나무 부스러기이다. 침구에는 연구 목표를 방해할 공지된 오염물질이 없다.

[0487] 동물실 환경의 표적 조건은 하기와 같다:

[0488] 온도: 18 - 24℃

[0489] 습도: 40 - 70%

[0490] 환기: 시간 당 최소 10회의 공기 교환

[0491] 조명 주기: 12시간 밝음 및 12시간 어두움 (연구 절차/활동에 의해 중단되는 경우를 제외함).

[0492] 온도 및 습도가 자동으로 제어되고, 이를 지속적으로 모니터링하고 기록한다. 조명 주기가 자동으로 제어된다.

[0493] 특별식 서비스 (SDS) MP(E) 단기 SQC 식이가 연구 전반에 걸쳐 일일 배급으로서 제공된다. 동물 당 약 200 그램의 사료 배급이 하루에 한번 제공된다. 사료에는 연구 목표를 방해할 공지된 오염물질이 없다. 동물은 공설 급수에 자유롭게 접근한다. 물에는 연구 목표를 방해할 공지된 오염물질이 없다.

[0494] 동물의 가정 환경은 사회적 상호작용, 놀이 및 탐험을 촉진하도록 강화된다. 농어, 및 플라스틱 장난감, 공, 클라이밍 프레임 및 스테인레스 스틸 거울과 같은 물질이 동물에게 있다. 친숙성을 감소시키기 위해 이들을 자주 교환한다. 교환 전에, 모든 장난감 및 클라이밍 프레임을 철저히 세척하여 교차-오염을 방지한다. 또한 다양한 다른 대접물 예컨대 먹이 혼합물, 채소, 견과류, 비스킷 및 과일을 일반적으로 매일 동물에게 제공한다.

[0495] 연구 과정 전반에 걸쳐 수의학 관리가 이용가능하고, 임상 징후 또는 다른 변화에 의해 보증되는 바와 같이 수의학 직원에 의해 동물을 검사한다.

[0496] **6.11.2.4 실험 디자인**

[0497] 수컷 1마리 및 암컷 1마리 동물에 G02 TCB를 투여한다.

[0498] <표 7>

표 7			
군 번호	용량 수준 (μg/kg)	용량 부피 (mL/kg)	용량 농도 (μg/kg)
1 (수컷 1마리 및 암컷 1마리)	100	1	100
2 (수컷 1마리 및 암컷 1마리)	300	1	300

[0499]

[0500] G02 TCB를 적합한 동물에게 적어도 8일 간격으로 복제 정맥 또는 꼬리 정맥에서의 단일 정맥내 저속 볼루스 주사 (1-2분)에 의해 투여한다. 수컷 1마리 및 암컷 1마리에만 임의의 단일한 날에 새로운 용량 수준이 제공되도록 엇갈린다. 이전 용량 수준으로부터의 관찰 (임상 병리학 데이터 포함)을 기초로, 다음 용량 군에 대해 용량이 증가 또는 감소된다. 나일브 동물이 각각의 용량 수준에 대해 사용된다. 바이곤(Vygon) 주입 바늘이 부착된 주사기를 사용하여 용량이 제공된다.

[0501] 투약하고 나서 약 72시간 후에 (마지막으로 예정된 샘플을 취한 후에) 동물을 피사시킨다. 중증 임상 증상으로 인해 예정일 이전에 종료해야하는 모든 동물의 경우, 완전한 패널의 임상 병리 (실현가능하다면 종료 전의 추가적인 샘플 채취) 및 조직병리가 분석된다.

[0502] 정맥내 주사 투여 경로는 이러한 경로가 가능한 임상 적용 경로이기 때문에 이러한 연구에 선택되었다. 임상적

으로 관련된 용량 범위를 커버하고, 동물에 대한 잠재적인 피해를 최소화하기 위해 저용량 및 고용량 수준이 선택되었다. 저용량은 유사한 효능의 유사한 T-세포 이중특이적 항체로의 시노물구스 원숭이에서의 경험을 기초로 선택되었고, 고용량은 이의 3배 증분을 나타낸다.

[0503] 6.11.3. 결과

[0504] 테스트된 용량에서 G02 TCB가 허용된다.

[0505] 7. 구체적 실시양태, 참고문헌 언급

[0506] 다양한 구체적인 실시양태가 설명 및 기술되었지만, 본 개시내용(들)의 취지 및 범주를 벗어나지 않으면서 다양한 변화가 이루어질 수 있다는 것이 이해될 것이다. 하기에 기재된 번호가 매겨진 실시양태에 의해 본 개시내용이 예시된다.

[0507] 1. a. 정상 세포에 비교하여 암세포에서 과발현되는 글리코-MUC1 에피토프에 우선적으로 결합하고;

[0508] b. 유방암 세포주 MCF7 또는 T47D에 결합하는 것에 대해 서열식별번호: 3의 중쇄 가변 (VH) 서열 및 서열식별번호: 4의 경쇄 가변 (VL) 서열을 포함하는 항체 또는 항원 결합 단편과 경쟁하는

[0509] 항-글리코-MUC1 항체 또는 항원 결합 단편.

[0510] 2. a. 정제된 재조합 인간 글리코실트랜스퍼라제 GaINAc-T1, GaINAc-T2, 및 GaINAc-T4를 사용하여 시험관 내에서 글리코실화된 MUC1 일련 반복물 (VTSAPDTRPAPGSTAPPAHG)₃ (이하 "제1 에피토프"로 지칭됨)에 결합하고;

[0511] b. 유방암 세포주 MCF7 또는 T47D에 결합하는 것에 대해 서열식별번호: 3의 중쇄 가변 (VH) 서열 및 서열식별번호: 4의 경쇄 가변 (VL) 서열을 포함하는 항체 또는 항원 결합 단편과 경쟁하는

[0512] 항-글리코-MUC1 항체 또는 항원 결합 단편.

[0513] 3. 실시양태 1 또는 실시양태 2에 있어서, 서열식별번호: 33의 아미노산 서열을 포함하는 상보성 결정 영역 (CDR) H1, 서열식별번호: 29의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H2, 서열식별번호: 25의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H3, 서열식별번호: 8의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L1, 서열식별번호: 9의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L2, 및 서열식별번호: 31의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L3을 포함하는 항-글리코-MUC1 항체 또는 항원-결합 단편.

[0514] 4. 실시양태 3에 있어서, CDR-H1이 서열식별번호: 5의 아미노산 서열을 포함하는 항-글리코-MUC1 항체 또는 항원-결합 단편.

[0515] 5. 실시양태 3에 있어서, CDR-H1이 서열식별번호: 23의 아미노산 서열을 포함하는 항-글리코-MUC1 항체 또는 항원-결합 단편.

[0516] 6. 실시양태 3에 있어서, CDR-H1이 서열식별번호: 28의 아미노산 서열을 포함하는 항-글리코-MUC1 항체 또는 항원-결합 단편.

[0517] 7. 실시양태 3에 있어서, CDR-H1이 서열식별번호: 32의 아미노산 서열을 포함하는 항-글리코-MUC1 항체 또는 항원-결합 단편.

[0518] 8. 실시양태 3 내지 7 중 어느 하나에 있어서, CDR-H2가 서열식별번호: 6의 아미노산 서열을 포함하는 항-글리코-MUC1 항체 또는 항원-결합 단편.

[0519] 9. 실시양태 3 내지 7 중 어느 하나에 있어서, CDR-H2가 서열식별번호: 24의 아미노산 서열을 포함하는 항-글리코-MUC1 항체 또는 항원-결합 단편.

[0520] 10. 실시양태 3 내지 9 중 어느 하나에 있어서, CDR-H3이 서열식별번호: 7의 아미노산 서열을 포함하는 항-글리코-MUC1 항체 또는 항원-결합 단편.

[0521] 11. 실시양태 3 내지 10 중 어느 하나에 있어서, CDR-L1이 서열식별번호: 30의 아미노산 서열을 포함하는 항-글리코-MUC1 항체 또는 항원-결합 단편.

[0522] 12. 실시양태 3 내지 10 중 어느 하나에 있어서, CDR-L1이 서열식별번호: 26의 아미노산 서열을 포함하는 항-글리코-MUC1 항체 또는 항원-결합 단편.

[0523] 13. 실시양태 3 내지 12 중 어느 하나에 있어서, CDR-L2가 서열식별번호: 27의 아미노산 서열을 포함하는 항-글

리코-MUC1 항체 또는 항원-결합 단편.

- [0524] 14. 실시양태 3 내지 13 중 어느 하나에 있어서, CDR-L3이 서열식별번호: 10의 아미노산 서열을 포함하는 항-글리코-MUC1 항체 또는 항원-결합 단편.
- [0525] 15. 실시양태 1 또는 실시양태 2에 있어서, VH가 서열식별번호: 5-7의 상보성 결정 영역 (CDR)을 포함하고, VL이 서열식별번호: 8-10의 CDR을 포함하는 항-글리코-MUC1 항체 또는 항원-결합 단편.
- [0526] 16. 실시양태 1 또는 실시양태 2에 있어서, VH가 서열식별번호: 23-25의 상보성 결정 영역 (CDR)을 포함하고, VL이 서열식별번호: 26, 27, 및 10의 CDR을 포함하는 항-글리코-MUC1 항체 또는 항원-결합 단편.
- [0527] 17. 실시양태 1 또는 실시양태 2에 있어서, VH가 서열식별번호: 28, 29, 및 25의 상보성 결정 영역 (CDR)을 포함하고, VL이 서열식별번호: 30, 9, 및 31의 CDR을 포함하는 항-글리코-MUC1 항체 또는 항원-결합 단편.
- [0528] 18. 실시양태 1 내지 17 중 어느 하나에 있어서, 키메라 또는 인간화 항체인 항-글리코-MUC1 항체 또는 항원-결합 단편.
- [0529] 19. 실시양태 1 내지 18 중 어느 하나에 있어서, VH가 서열식별번호: 3에 대한 서열 동일성이 적어도 95%인 아미노산 서열을 포함하고, VL이 서열식별번호: 4에 대한 서열 동일성이 적어도 95%인 아미노산 서열을 포함하는 항-글리코-MUC1 항체 또는 항원-결합 단편.
- [0530] 20. 실시양태 1 내지 18 중 어느 하나에 있어서, VH가 서열식별번호: 3에 대한 서열 동일성이 적어도 97%인 아미노산 서열을 포함하고, VL이 서열식별번호: 4에 대한 서열 동일성이 적어도 97%인 아미노산 서열을 포함하는 항-글리코-MUC1 항체 또는 항원-결합 단편.
- [0531] 21. 실시양태 1 내지 18 중 어느 하나에 있어서, VH가 서열식별번호: 3에 대한 서열 동일성이 적어도 99%인 아미노산 서열을 포함하고, VL이 서열식별번호: 4에 대한 서열 동일성이 적어도 99%인 아미노산 서열을 포함하는 항-글리코-MUC1 항체 또는 항원-결합 단편.
- [0532] 22. 실시양태 1 또는 실시양태 2 중 어느 하나에 있어서, VH가 서열식별번호: 3의 아미노산 서열을 포함하고, VL이 서열식별번호: 4의 아미노산 서열을 포함하는 항-글리코-MUC1 항체 또는 항원-결합 단편.
- [0533] 23. 실시양태 1 내지 22 중 어느 하나에 있어서, 다가인 항-글리코-MUC1 항체 또는 항원-결합 단편.
- [0534] 24. 실시양태 1 내지 22 중 어느 하나에 있어서, 단일쇄 가변 단편 (scFv)의 형태인 항-글리코-MUC1 항체 또는 항원-결합 단편.
- [0535] 25. 실시양태 24에 있어서, scFv가 경쇄 가변 단편의 N-말단의 중쇄 가변 단편을 포함하는 항-글리코-MUC1 항체 또는 항원-결합 단편.
- [0536] 26. 실시양태 24에 있어서, scFv 중쇄 가변 단편 및 경쇄 가변 단편이 아미노산 4-15개의 링커 서열에 공유 결합된 항-글리코-MUC1 항체 또는 항원-결합 단편.
- [0537] 27. 실시양태 1 내지 22 중 어느 하나에 있어서, 다중특이적 항체의 형태인 항-글리코-MUC1 항체 또는 항원-결합 단편.
- [0538] 28. 실시양태 27에 있어서, 다중특이적 항체가 제1 에피토프와 상이한 제2 에피토프에 결합하는 이중특이적 항체인 항-글리코-MUC1 항체 또는 항원-결합 단편.
- [0539] 29. 실시양태 28에 있어서, 이중특이적 항체가 크로스맵, Fab-아암 교환 항체, 이중특이적 T-세포 인게이지 (BiTE), 또는 이중-친화성 재표적화 분자 (DART)인 항-글리코-MUC1 항체 또는 항원-결합 단편.
- [0540] 30. 실시양태 29에 있어서, 이중특이적 항체가 크로스맵인 항-글리코-MUC1 항체 또는 항원-결합 단편.
- [0541] 31. 실시양태 30에 있어서, 이중특이적 항체가 크로스맵^{FAB}인 항-글리코-MUC1 항체 또는 항원-결합 단편.
- [0542] 32. 실시양태 30에 있어서, 이중특이적 항체가 크로스맵^{VH-VL}인 항-글리코-MUC1 항체 또는 항원-결합 단편.
- [0543] 33. 실시양태 30에 있어서, 이중특이적 항체가 크로스맵^{CH1-CL}인 항-글리코-MUC1 항체 또는 항원-결합 단편.
- [0544] 34. 실시양태 29에 있어서, 이중특이적 항체가 Fab-아암 교환 항체인 항-글리코-MUC1 항체 또는 항원-결합 단편.

- [0545] 35. 실시양태 29에 있어서, 이중특이적 항체가 이중-친화성 재표적화 분자 (DART)인 항-글리코-MUC1 항체 또는 항원-결합 단편.
- [0546] 36. 실시양태 29에 있어서, 이중특이적 항체가 이중특이적 T-세포 인게이지 (BiTE)인 항-글리코-MUC1 항체 또는 항원-결합 단편.
- [0547] 37. 실시양태 28 내지 35 중 어느 하나에 있어서, 제2 에피토프가 MUC1 에피토프인 항-글리코-MUC1 항체 또는 항원-결합 단편.
- [0548] 38. 실시양태 28 내지 35 중 어느 하나에 있어서, 제2 에피토프가 정상 세포에 비교하여 암세포에서 과발현되는 MUC1 에피토프인 항-글리코-MUC1 항체 또는 항원-결합 단편.
- [0549] 39. 실시양태 28 내지 36 중 어느 하나에 있어서, 제2 에피토프가 T-세포 에피토프인 항-글리코-MUC1 항체 또는 항원-결합 단편.
- [0550] 40. 실시양태 39에 있어서, T-세포 에피토프가 CD3 에피토프, CD8 에피토프, CD 16 에피토프, CD25 에피토프, CD28 에피토프, 또는 NKG2D 에피토프를 포함하는 항-글리코-MUC1 항체 또는 항원-결합 단편.
- [0551] 41. 실시양태 40에 있어서, T-세포 에피토프가 CD3 에피토프를 포함하고, 임의적으로 이는 인간 CD3에 존재하는 에피토프인 항-글리코-MUC1 항체 또는 항원-결합 단편.
- [0552] 42. 실시양태 41에 있어서, CD3 에피토프가 CD3 감마 에피토프, CD3 델타 에피토프, CD3 엡실론 에피토프, 또는 CD3 제타 에피토프를 포함하는 항-글리코-MUC1 항체 또는 항원-결합 단편.
- [0553] 43. 실시양태 1 내지 42 중 어느 하나에 있어서, 검출가능한 모이어티에 접합된 항-글리코-MUC1 항체 또는 항원-결합 단편.
- [0554] 44. 실시양태 43에 있어서, 검출가능한 마커가 효소, 방사성동위원소, 또는 형광 표지인 항-글리코-MUC1 항체 또는 항원 결합 단편.
- [0555] 45. CD3 (임의적으로는 인간 CD3)에 결합하는 제1 항원 결합 도메인 및 글리코-MUC1에 결합하는 제2 항원 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 항체이고, 여기서 이중특이적 항체가 유방암 세포주 MCF7 또는 T47D에 결합하는 것에 대해 서열식별번호: 3의 중쇄 가변 (VH) 서열 및 서열식별번호: 4의 경쇄 가변 (VL) 서열을 포함하는 항체 또는 항원 결합 단편과 경쟁하고, 제1 항원 결합 도메인이 서열식별번호: 34의 중쇄 CDR-H1, 서열식별번호: 35의 CDR-H2, 및 서열식별번호: 36의 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 서열식별번호: 37의 경쇄 CDR-L1, 서열식별번호: 38의 CDR-L2 및 서열식별번호: 39의 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 이중특이적 항체.
- [0556] 46. 실시양태 45에 있어서, 제2 항원 결합 도메인이 (i) 서열식별번호: 5의 CDR-H1, 서열식별번호: 6의 CDR-H2, 및 서열식별번호: 7의 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 서열식별번호: 8의 경쇄 CDR-L1, 서열식별번호: 9의 CDR-L2 및 서열식별번호: 10의 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 이중특이적 항체.
- [0557] 47. 실시양태 45 또는 실시양태 46에 있어서, 제1 항원 결합 도메인이 서열식별번호: 40의 아미노산 서열에 대해 적어도 약 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 중쇄 가변 영역 서열, 및 서열식별번호: 41의 아미노산 서열에 대해 적어도 약 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 경쇄 가변 영역 서열을 포함하는 이중특이적 항체.
- [0558] 48. 실시양태 47에 있어서, 제1 항원 결합 도메인이 서열식별번호: 40의 중쇄 가변 영역 서열 및 서열식별번호: 41의 경쇄 가변 영역 서열을 포함하는 이중특이적 항체.
- [0559] 49. 실시양태 45 내지 48 중 어느 하나에 있어서, 제2 항원 결합 도메인이 서열식별번호: 3의 아미노산 서열에 대해 적어도 약 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 중쇄 가변 영역 서열, 및 서열식별번호: 4의 아미노산 서열에 대해 적어도 약 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 경쇄 가변 영역 서열을 포함하는 이중특이적 항체.
- [0560] 50. 실시양태 49에 있어서, 제2 항원 결합 도메인이 서열식별번호: 3의 중쇄 가변 영역 서열 및 서열식별번호: 4의 경쇄 가변 영역 서열을 포함하는 이중특이적 항체.
- [0561] 51. 실시양태 45 내지 50 중 어느 하나에 있어서, 제1 및/또는 제2 항원 결합 도메인이 Fab 분자인 이중특이적 항체.

- [0562] 52. 실시양태 51에 있어서, 제1 항원 결합 도메인이 Fab 경쇄 및 Fab 중쇄의 가변 또는 불변 영역이 교환된 교차 Fab 분자인 이중특이적 항체.
- [0563] 53. 실시양태 52에 있어서, 이중특이적 항체의 제1 및 제2 항원 결합 도메인이 양쪽 모두 Fab 분자이고, 항원 결합 도메인 중 하나 (특히 제1 항원 결합 도메인)에서, Fab 경쇄 및 Fab 중쇄의 가변 도메인 VL 및 VH가 서로 교환되며, 여기서
- [0564] a. 제1 항원 결합 도메인의 불변 도메인 CL에서, 위치 124의 아미노산이 양으로 하전된 아미노산에 의해 치환되고 (카바트에 따른 번호매김), 제1 항원 결합 도메인의 불변 도메인 CH1에서, 위치 147의 아미노산 또는 위치 213의 아미노산이 음으로 하전된 아미노산에 의해 치환되거나 (카바트 EU 인덱스에 따른 번호매김); 또는
- [0565] b. 제2 항원 결합 도메인의 불변 도메인 CL에서, 위치 124의 아미노산이 양으로 하전된 아미노산에 의해 치환되고 (카바트에 따른 번호매김), 제2 항원 결합 도메인의 불변 도메인 CH1에서, 위치 147의 아미노산 또는 위치 213의 아미노산이 음으로 하전된 아미노산에 의해 치환되며 (카바트 EU 인덱스에 따른 번호매김),
- [0566] VH/VL 교환이 있는 항원 결합 도메인의 불변 도메인 CL 및 CH1이 서로 교환되지 않는
- [0567] 이중특이적 항체.
- [0568] 54. 실시양태 53에 있어서,
- [0569] a. 제1 항원 결합 도메인의 불변 도메인 CL에서, 위치 124의 아미노산이 독립적으로 라이신 (K), 아르기닌 (R) 또는 히스티딘 (H)에 의해 치환되고 (카바트에 따른 번호매김), 제1 항원 결합 도메인의 불변 도메인 CH1에서, 위치 147의 아미노산 또는 위치 213의 아미노산이 독립적으로 글루탐산 (E), 또는 아스파르트산 (D)에 의해 치환되거나 (카바트 EU 인덱스에 따른 번호매김); 또는
- [0570] b. 제2 항원 결합 도메인의 불변 도메인 CL에서, 위치 124의 아미노산이 독립적으로 라이신 (K), 아르기닌 (R) 또는 히스티딘 (H)에 의해 치환되고 (카바트에 따른 번호매김), 제2 항원 결합 도메인의 불변 도메인 CH1에서, 위치 147의 아미노산 또는 위치 213의 아미노산이 독립적으로 글루탐산 (E), 또는 아스파르트산 (D)에 의해 치환되는 (카바트 EU 인덱스에 따른 번호매김)
- [0571] 이중특이적 항체.
- [0572] 55. 실시양태 54에 있어서, 제2 항원 결합 도메인의 불변 도메인 CL에서, 위치 124의 아미노산이 독립적으로 라이신 (K), 아르기닌 (R) 또는 히스티딘 (H)에 의해 치환되고 (카바트에 따른 번호매김), 제2 항원 결합 도메인의 불변 도메인 CH1에서, 위치 147의 아미노산 또는 위치 213의 아미노산이 독립적으로 글루탐산 (E), 또는 아스파르트산 (D)에 의해 치환된 (카바트 EU 인덱스에 따른 번호매김) 이중특이적 항체.
- [0573] 56. 실시양태 55에 있어서, 제2 항원 결합 도메인의 불변 도메인 CL에서, 위치 124의 아미노산이 독립적으로 라이신 (K), 아르기닌 (R) 또는 히스티딘 (H)에 의해 치환되고 (카바트에 따른 번호매김), 제2 항원 결합 도메인의 불변 도메인 CH1에서, 위치 147의 아미노산이 독립적으로 글루탐산 (E), 또는 아스파르트산 (D)에 의해 치환된 (카바트 EU 인덱스에 따른 번호매김) 이중특이적 항체.
- [0574] 57. 실시양태 55에 있어서, 제2 항원 결합 도메인의 불변 도메인 CL에서, 위치 124의 아미노산이 독립적으로 라이신 (K), 아르기닌 (R) 또는 히스티딘 (H)에 의해 치환되고 (카바트에 따른 번호매김), 위치 123의 아미노산이 독립적으로 라이신 (K), 아르기닌 (R) 또는 히스티딘 (H)에 의해 치환되며 (카바트에 따른 번호매김), 제2 항원 결합 도메인의 불변 도메인 CH1에서, 위치 147의 아미노산이 독립적으로 글루탐산 (E), 또는 아스파르트산 (D)에 의해 치환되고 (카바트 EU 인덱스에 따른 번호매김), 위치 213의 아미노산이 독립적으로 글루탐산 (E), 또는 아스파르트산 (D)에 의해 치환된 (카바트 EU 인덱스에 따른 번호매김) 이중특이적 항체.
- [0575] 58. 실시양태 57에 있어서, 제2 항원 결합 도메인의 불변 도메인 CL에서, 위치 124의 아미노산이 라이신 (K)에 의해 치환되고 (카바트에 따른 번호매김), 위치 123의 아미노산 라이신 (K)에 의해 치환되며 (카바트에 따른 번호매김), 제2 항원 결합 도메인의 불변 도메인 CH1에서, 위치 147의 아미노산의 글루탐산 (E)에 의해 치환되고 (카바트 EU 인덱스에 따른 번호매김), 위치 213의 아미노산이 글루탐산 (E)에 의해 치환된 (카바트 EU 인덱스에 따른 번호매김) 이중특이적 항체.
- [0576] 59. 실시양태 57에 있어서, 제2 항원 결합 도메인의 불변 도메인 CL에서, 위치 124의 아미노산이 라이신 (K)에 의해 치환되고 (카바트에 따른 번호매김), 위치 123의 아미노산이 아르기닌 (R)에 의해 치환되며 (카바트에 따른 번호매김), 제2 항원 결합 도메인의 불변 도메인 CH1에서, 위치 147의 아미노산이 글루탐산 (E)에 의해 치환

되고 (카바트 EU 인덱스에 따른 번호매김), 위치 213의 아미노산이 글루탐산 (E)에 의해 치환된 (카바트 EU 인덱스에 따른 번호매김) 이중특이적 항체.

- [0577] 60. 실시양태 53 내지 59 중 어느 하나에 있어서, 제2 항원 결합 도메인의 불변 도메인 CL이 카파 아이소타입인 이중특이적 항체.
- [0578] 61. 실시양태 45 내지 60 중 어느 하나에 있어서, 제1 및 제2 항원 결합 도메인이, 임의적으로는 펩티드 링커를 통해, 서로 융합된 이중특이적 항체.
- [0579] 62. 실시양태 61에 있어서, 제1 및 제2 항원 결합 도메인이 각각 Fab 분자이고, (i) 제2 항원 결합 도메인이 Fab 중쇄의 C-말단에서 제1 항원 결합 도메인의 Fab 중쇄의 N-말단에 융합되거나, 또는 (ii) 제1 항원 결합 도메인이 Fab 중쇄의 C-말단에서 제2 항원 결합 도메인의 Fab 중쇄의 N-말단에 융합된 이중특이적 항체.
- [0580] 63. 실시양태 45 내지 62 중 어느 하나에 있어서, 이중특이적 항체가 CD3에 대한 1가 결합을 제공하는 이중특이적 항체.
- [0581] 64. 실시양태 63에 있어서, 글리코-MUC1에 특이적으로 결합하는 2개의 항원 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 항체.
- [0582] 65. 실시양태 64에 있어서, 글리코-MUC1에 특이적으로 결합하는 2개의 항원 결합 도메인이 동일한 아미노산 서열을 포함하는 이중특이적 항체.
- [0583] 66. 실시양태 45 내지 65 중 어느 하나에 있어서, 이중특이적 항체가 제1 및 제2 서브유닛으로 구성된 Fc 도메인을 추가로 포함하는 이중특이적 항체.
- [0584] 67. 실시양태 66에 있어서, Fc 도메인이 IgG Fc 도메인인 이중특이적 항체.
- [0585] 68. 실시양태 67에 있어서, Fc 도메인이 IgG₁ Fc 도메인인 이중특이적 항체.
- [0586] 69. 실시양태 67에 있어서, Fc 도메인이 IgG₄ Fc 도메인인 이중특이적 항체.
- [0587] 70. 실시양태 69에 있어서, IgG₄ Fc 도메인이 위치 S228에서의 아미노산 치환 (카바트 EU 인덱스 번호매김), 바람직하게는 아미노산 치환 S228P를 포함하는 이중특이적 항체.
- [0588] 71. 실시양태 66에 있어서, Fc 도메인이 인간 Fc 도메인인 이중특이적 항체.
- [0589] 72. 실시양태 71에 있어서, Fc 도메인이 인간 IgG₁ Fc 도메인이고, 이는 임의적으로 서열식별번호: 42를 포함하는 이중특이적 항체.
- [0590] 73. 실시양태 66 내지 72 중 어느 하나에 있어서, 제1, 제2, 및 존재하는 경우의 제3 항원 결합 도메인이 각각 Fab 분자이고, (a) (i) 제2 항원 결합 도메인이 Fab 중쇄의 C-말단에서 제1 항원 결합 도메인의 Fab 중쇄의 N-말단에 융합되고, 제1 항원 결합 도메인이 Fab 중쇄의 C-말단에서 Fc 도메인의 제1 서브유닛의 N-말단에 융합되거나, 또는 (ii) 제1 항원 결합 도메인이 Fab 중쇄의 C-말단에서 제2 항원 결합 도메인의 Fab 중쇄의 N-말단에 융합되고, 제2 항원 결합 도메인이 Fab 중쇄의 C-말단에서 Fc 도메인의 제1 서브유닛의 N-말단에 융합되며; (b) 존재하는 경우의 제3 항원 결합 도메인이 Fab 중쇄의 C-말단에서 Fc 도메인의 제2 서브유닛의 N-말단에 융합되는 이중특이적 항체.
- [0591] 74. 실시양태 66 내지 73 중 어느 하나에 있어서, Fc 도메인이 Fc 도메인의 제1 및 제2 서브유닛의 회합을 촉진하는 변형을 포함하는 이중특이적 항체.
- [0592] 75. 실시양태 66 내지 74 중 어느 하나에 있어서, Fc 도메인이 Fc 수용체에 결합하는 것 및/또는 이펙터 기능을 감소시키는 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하는 이중특이적 항체.
- [0593] 76. 실시양태 45에 있어서,
- [0594] a. 제1 항원 결합 도메인이 Fab 경쇄 및 Fab 중쇄의 가변 또는 불변 영역, 바람직하게는 가변 영역이 교환된 교차 Fab 분자인, CD3에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 도메인;
- [0595] b. 서열식별번호: 5의 중쇄 CDR-H1, 서열식별번호: 6의 CDR-H2, 및 서열식별번호: 7의 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 서열식별번호: 8의 경쇄 CDR-L1, 서열식별번호: 9의 CDR-L2 및 서열식별번호: 10의 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는, 글리코-MUC1에 특이적으로 결합하는 제2 및 제3 항원 결합 도메인이고, 제2

및 제3 항원 결합 도메인이 각각 Fab 분자인 제2 및 제3 항원 결합 도메인;

- [0596] c. 안정적으로 회합할 수 있는 제1 및 제2 서브유닛으로 구성된 Fc 도메인
- [0597] 을 포함하고,
- [0598] 여기서 제2 항원 결합 도메인은 Fab 중쇄의 C-말단에서 제1 항원 결합 도메인의 Fab 중쇄의 N-말단에 융합되고, 제1 항원 결합 도메인은 Fab 중쇄의 C-말단에서 Fc 도메인의 제1 서브유닛의 N-말단에 융합되며, 제3 항원 결합 도메인은 Fab 중쇄의 C-말단에서 Fc 도메인의 제2 서브유닛의 N-말단에 융합된
- [0599] 이중특이적 항체.
- [0600] 77. 실시양태 77에 있어서, 제1 항원 결합 도메인이 서열식별번호: 34의 중쇄 CDR-H1, 서열식별번호: 35의 CDR-H2, 및 서열식별번호: 36의 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 서열식별번호: 37의 경쇄 CDR-L1, 서열식별번호: 38의 CDR-L2 및 서열식별번호: 39의 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 이중특이적 항체.
- [0601] 78. 실시양태 77에 있어서, 제1 항원 결합 도메인이 서열식별번호: 40의 아미노산 서열에 대해 적어도 약 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 중쇄 가변 영역 서열 및 서열식별번호: 41의 아미노산 서열에 대해 적어도 약 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 경쇄 가변 영역 서열을 포함하는 이중특이적 항체.
- [0602] 79. 실시양태 78에 있어서, 제1 항원 결합 도메인이 서열식별번호: 40의 중쇄 가변 영역 서열 및 서열식별번호: 41의 경쇄 가변 영역 서열을 포함하는 이중특이적 항체.
- [0603] 80. 실시양태 76 내지 79 중 어느 하나에 있어서, 제2 및 제3 항원 결합 도메인이 서열식별번호: 3의 아미노산 서열에 대해 적어도 약 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 중쇄 가변 영역 서열 및 서열식별번호: 4의 아미노산 서열에 대해 적어도 약 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 경쇄 가변 영역 서열을 포함하는 이중특이적 항체.
- [0604] 81. 실시양태 80에 있어서, 제2 및 제3 항원 결합 도메인이 서열식별번호: 3의 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 4의 경쇄 가변 영역을 포함하는 이중특이적 항체.
- [0605] 82. 실시양태 76 내지 81 중 어느 하나에 있어서, Fc 도메인이 Fc 도메인과 관련하여 섹션 5.1 및 5.2에서 기술된 모든 특색을 단독으로 또는 조합하여 포함하는 이중특이적 항체.
- [0606] 83. 실시양태 76 내지 82 중 어느 하나에 있어서, 항원 결합 도메인 및 Fc 영역이 펩티드 링커에 의해 서로 융합된 이중특이적 항체.
- [0607] 84. 실시양태 83에 있어서, 펩티드 링커가 서열식별번호: 45 및/또는 서열식별번호: 46에서와 같은 펩티드 링커를 포함하는 이중특이적 항체.
- [0608] 85. 실시양태 76 내지 84 중 어느 하나에 있어서, 제2 및 제3 Fab 분자의 불변 도메인 CL에서, 위치 124의 아미노산이 라이신 (K)에 의해 치환되고 (카바트에 따른 번호매김), 위치 123의 아미노산이 라이신 (K) 또는 아르기닌 (R), 바람직하게는 아르기닌 (R)에 의해 치환되며 (카바트에 따른 번호매김), (ii)의 제2 및 제3 Fab 분자의 불변 도메인 CH1에서, 위치 147의 아미노산이 글루탐산 (E)에 의해 치환되고 (카바트 EU 인덱스에 따른 번호매김), 위치 213의 아미노산이 글루탐산 (E)에 의해 치환된 (카바트 EU 인덱스에 따른 번호매김) 이중특이적 항체.
- [0609] 86. 실시양태 76 내지 85 중 어느 하나에 있어서, 서열식별번호: 43의 서열에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일한 서열을 포함하는 폴리펩티드, 서열식별번호: 44의 서열에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일한 서열을 포함하는 폴리펩티드, 서열식별번호: 45의 서열에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일한 서열을 포함하는 폴리펩티드, 및 서열식별번호: 46의 서열에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일한 서열을 포함하는 폴리펩티드를 포함하는 이중특이적 항체.
- [0610] 87. 실시양태 86에 있어서, 이중특이적 항체가 서열식별번호: 43의 서열을 포함하는 폴리펩티드, 서열식별번호: 44의 서열을 포함하는 폴리펩티드, 서열식별번호: 45의 서열을 포함하는 폴리펩티드, 및 서열식별번호: 46의 서열을 포함하는 폴리펩티드를 포함하는 이중특이적 항체.
- [0611] 88. 실시양태 87에 있어서, 서열식별번호: 43의 서열을 포함하는 2개의 폴리펩티드를 포함하는 이중특이적 항체.

- [0612] 89. 실시양태 45 내지 88 중 어느 하나에 있어서, 검출가능한 모이어티에 접합된 이중특이적 항체.
- [0613] 90. 실시양태 89에 있어서, 검출가능한 마커가 효소, 방사성동위원소, 또는 형광 표지인 이중특이적 항체.
- [0614] 91. 적어도 제2의 아미노산 서열에 작동가능하게 연결된 실시양태 1 내지 44 중 어느 하나의 항-글리코-MUC1 항체 또는 항원-결합 단편 또는 실시양태 45 내지 90 중 어느 하나의 이중특이적 항체의 아미노산 서열을 포함하는 융합 단백질.
- [0615] 92. 실시양태 91에 있어서, 제2 아미노산 서열이 4-1BB, CD3-제타, 또는 이의 단편의 것인 융합 단백질.
- [0616] 93. 실시양태 91에 있어서, 제2 아미노산 서열이 융합 펩티드의 것인 융합 단백질.
- [0617] 94. 실시양태 93에 있어서, 융합 펩티드가 CD28-CD3-제타 또는 4-1BB (CD137)-CD3-제타 융합 펩티드인 융합 단백질.
- [0618] 95. 실시양태 91에 있어서, 제2 아미노산 서열이 T 세포 활성화의 조정인자 또는 이의 단편의 것인 융합 단백질.
- [0619] 96. 실시양태 95에 있어서, T 세포 활성화의 조정인자가 IL-15 또는 IL-15Ra인 융합 단백질.
- [0620] 97. 실시양태 24 내지 26 중 어느 하나의 scFv를 포함하는 키메라 항원 수용체 (CAR).
- [0621] 98. 실시양태 97에 있어서, 아미노-말단에서 카르복시-말단의 순서로 인간 CD8 리더 펩티드, scFv, 인간 CD8 힌지 도메인, 인간 CD8 막횡단 도메인, 및 CD3-제타 신호전달 도메인을 포함하는 CAR.
- [0622] 99. 세포독성제에 접합된 실시양태 1 내지 44 중 어느 하나의 항-글리코-MUC1 항체 또는 항원-결합 단편 또는 실시양태 45 내지 90 중 어느 하나의 이중특이적 항체 또는 실시양태 91 내지 96 중 어느 하나의 융합 단백질을 포함하는 항체-약물 접합체.
- [0623] 100. 실시양태 99에 있어서, 세포독성제가 오리스타틴, DNA 마이너 그루브 결합제, 알킬화제, 엔다이인, 렉시트롭신, 듀오카르마이신, 타산, 돌라스타틴, 메이탄시노이드, 또는 빈카 알칼로이드인 항체-약물 접합체.
- [0624] 101. 실시양태 100에 있어서, 항-글리코-MUC1 항체 또는 항원-결합 단편 또는 이중특이적 항체가 링커를 통해 세포독성제에 접합된 항체-약물 접합체.
- [0625] 102. 실시양태 101에 있어서, 링커가 세포내 조건 하에 절단가능한 항체-약물 접합체.
- [0626] 103. 실시양태 102에 있어서, 절단가능한 링커가 세포내 프로테아제에 의해 절단가능한 항체-약물 접합체.
- [0627] 104. 실시양태 103에 있어서, 링커가 디펩티드를 포함하는 항체-약물 접합체.
- [0628] 105. 실시양태 104에 있어서, 디펩티드가 val-cit 또는 phe-lys인 항체-약물 접합체.
- [0629] 106. 실시양태 102에 있어서, 절단가능한 링커가 5.5 미만의 pH에서 가수분해가능한 항체-약물 접합체.
- [0630] 107. 실시양태 106에 있어서, 가수분해가능한 링커가 히드라존 링커인 항체-약물 접합체.
- [0631] 108. 실시양태 102에 있어서, 절단가능한 링커가 디설피드 링커인 항체-약물 접합체.
- [0632] 109. 실시양태 1 내지 44 중 어느 하나의 항-글리코-MUC1 항체 또는 항원-결합 단편 또는 실시양태 45 내지 90 중 어느 하나의 이중특이적 항체, 실시양태 91 내지 96 중 어느 하나의 융합 단백질, 또는 실시양태 97 또는 실시양태 98의 CAR에 대한 코딩 영역을 포함하는 핵산.
- [0633] 110. 실시양태 109에 있어서, 코딩 영역이 인간 세포에서의 발현에 대해 코돈-최적화된 핵산.
- [0634] 111. 실시양태 109 또는 실시양태 110의 핵산을 포함하는 벡터.
- [0635] 112. 실시양태 111에 있어서, 바이러스 벡터인 벡터.
- [0636] 113. 실시양태 112에 있어서, 바이러스 벡터가 렌티바이러스 벡터인 벡터.
- [0637] 114. 실시양태 109 또는 실시양태 110의 핵산을 발현하도록 조작된 숙주 세포.
- [0638] 115. 실시양태 114에 있어서, 실시양태 97 또는 실시양태 98의 CAR을 발현하도록 조작된 인간 T-세포인 숙주 세포.

- [0639] 116. 실시양태 111 내지 113 중 어느 하나의 벡터를 포함하는 숙주 세포.
- [0640] 117. 실시양태 116에 있어서, T-세포이고, 벡터가 실시양태 97 또는 실시양태 98의 CAR을 코딩하는 숙주 세포.
- [0641] 118. (a) 실시양태 1 내지 44 중 어느 하나의 항-글리코-MUC1 항체 또는 항원 결합 단편, 실시양태 45 내지 90 중 어느 하나의 이중특이적 항체, 실시양태 91 내지 96 중 어느 하나의 융합 단백질, 실시양태 97 또는 실시양태 98의 CAR, 실시양태 99 내지 108 중 어느 하나의 항체-약물 접합체, 실시양태 109 또는 실시양태 110의 핵산, 실시양태 111 내지 113 중 어느 하나의 벡터, 또는 실시양태 114 내지 117 중 어느 하나의 실시양태의 숙주 세포, 및 (b) 생리학상 적절한 완충제, 아주반트 또는 희석제를 포함하는 제약 조성물.
- [0642] 119. 암 치료를 필요로 하는 대상체에게 유효량의 실시양태 1 내지 44 중 어느 하나의 항-글리코-MUC1 항체 또는 항원 결합 단편, 실시양태 45 내지 90 중 어느 하나의 이중특이적 항체, 실시양태 91 내지 96 중 어느 하나의 융합 단백질, 실시양태 97 또는 실시양태 98의 CAR, 실시양태 99 내지 108 중 어느 하나의 항체-약물 접합체, 실시양태 109 또는 실시양태 110의 핵산, 실시양태 111 내지 113 중 어느 하나의 벡터, 실시양태 114 내지 117 중 어느 하나의 실시양태의 숙주 세포, 또는 실시양태 118의 제약 조성물을 투여하는 것을 포함하는, 암을 치료하는 방법.
- [0643] 120. 실시양태 119에 있어서, 대상체가 유방암, 비-소세포 폐암, 전립선암, 췌장암, 식도암 또는 결장직장암을 앓고 있는 방법.
- [0644] 121. 샘플을 실시양태 1 내지 44 중 어느 하나에 따른 항-글리코-MUC1 항체 또는 항원-결합 단편과 접촉시키고, 항-글리코-MUC1 항체 또는 항원-결합 단편의 결합을 검출하는 것을 포함하는, 생물학적 샘플에서 암을 검출하는 방법.
- [0645] 122. 실시양태 121에 있어서, 항-글리코-MUC1 항체 또는 항원-결합 단편의 결합을 정량하는 것을 추가로 포함하는 방법.
- [0646] 123. 실시양태 121 또는 실시양태 122에 있어서, 결합이 음성/기준선 대조군으로서의 정상 조직 대조군 및/또는 양성 대조군으로서의 양성 조직 대조군에 비교되는 방법.
- [0647] 본 출원에서 인용된 모든 간행물, 특히, 특허 출원 및 기타 문서는 각각의 개별적인 간행물, 특히, 특허 출원 또는 기타 문서가 모든 목적을 위해 참조로 포함되는 것으로 개별적으로 지시된 것과 동일한 정도로 모든 목적을 위해 이에 의해 전문이 참조로 포함된다. 본원에 포함된 참고문헌 중 하나 이상과 본 개시내용의 교시내용 사이에 불일치가 있는 경우, 본 명세서의 교시내용이 의도된다.

[0648] 8. 참고문헌

1. Bennett, E.P., Hassan, H., Mandel, U., Mirgorodskaya, E., Roepstorff, P., Burchell, J., Taylor-Papadimitriou, J., Hollingsworth, M.A., Merks, G., van Kessel, A.G., and others. (1998) Cloning of a human UDP-N- acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyl- transferase that complements other GalNAc-transferases in complete O-glycosylation of the MUC1 tandem repeat. J. Biol. Chem., 273, 30472–30481.
2. Fontenot, J.D., Finn, O.J., Dales, N., Andrews, P.C., and Montelaro, R.C. (1993) Synthesis of large multideterminant peptide immunogens using a poly-proline beta-turn helix motif. Pept. Res., 6, 330–336.
3. Mandel, U., Petersen, O.W., Sorensen, H., Vedtofte, P., Hakomori, S.I., Clausen, H., and Dabelsteen, E. (1991) Simple mucin-type carbohydrates in oral stratified squamous and salivary-gland epithelia. J. Invest. Dermatol., 97, 713–721.
4. Miles, D.W., Linehan, J., Smith, P., and Filipe, I. (1995) Expression of sialyl-Tn in gastric cancer: correlation with known prognostic factors. Br. J. Cancer., 71, 1074–1076.

[0649]

5. Schwientek, T., Bennett, E.P., Flores, C., Thacker, J., Hollmann, M., Reis, C.A., Behrens, J., Mandel, U., Keck, B., Schafer, M.A., and others. (2002) Functional conservation of subfamilies of putative UDP-N- acetylgalactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferases in *Drosophila*, *Caenorhabditis elegans*, and mammals. One subfamily composed of I(2)35Aa is essential in *Drosophila*. *J. Biol. Chem.*, 277, 22623–22638.

6. Soares, R., Marinho, A., and Schmitt, F. (1996) Expression of Sialyl-Tn in breast cancer. Correlation with prognostic parameters. *Pathol. Res. Pract.*, 192, 1181–1186.

7. Springer, G.F. (1984) T and Tn, general carcinoma auto-antigens. *Science*, 224, 1198–1206.

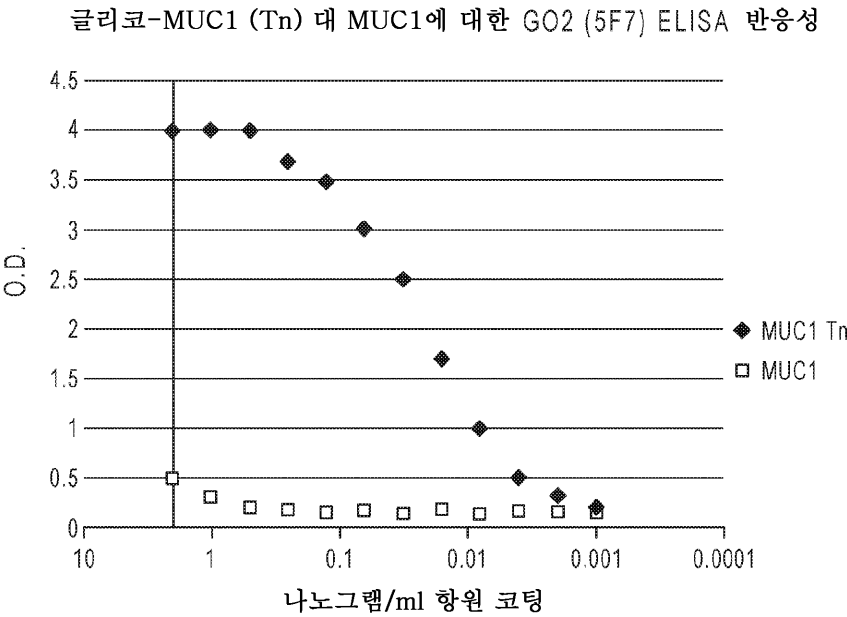
8. Werther, J.L., Tatematsu, M., Klein, R., Kurihara, M., Kumagai, K., Llorens, P., Guidugli, N.J., Bodian, C., Pertsemidis, D., Yamachika, T., and others. (1996) Sialosyl-Tn antigen as a marker of gastric cancer progression: an international study. *Int. J. Cancer.*, 69, 193–199.

9. Taylor-Papadimitriou, J., Burchell, J., Miles, D.W., and Dalziel, M. (1999) MUC1 and cancer. *Biochim. Biophys. Acta*, 1455, 301–313.

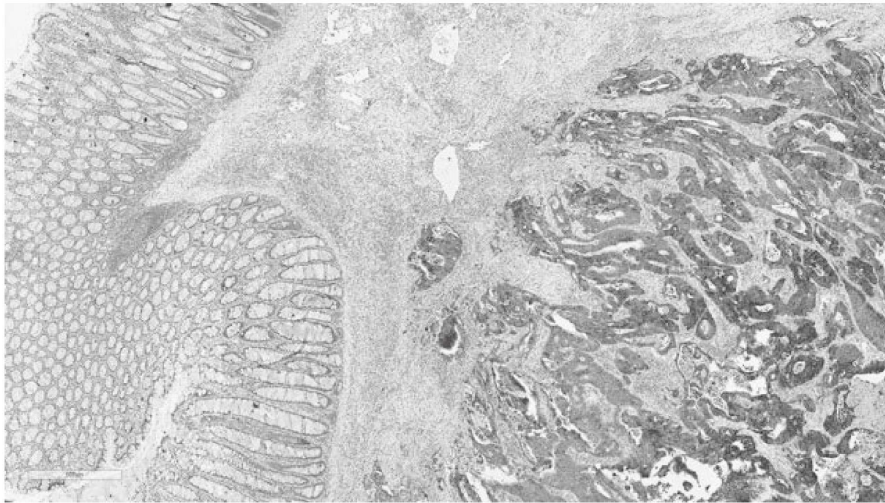
[0650]

도면

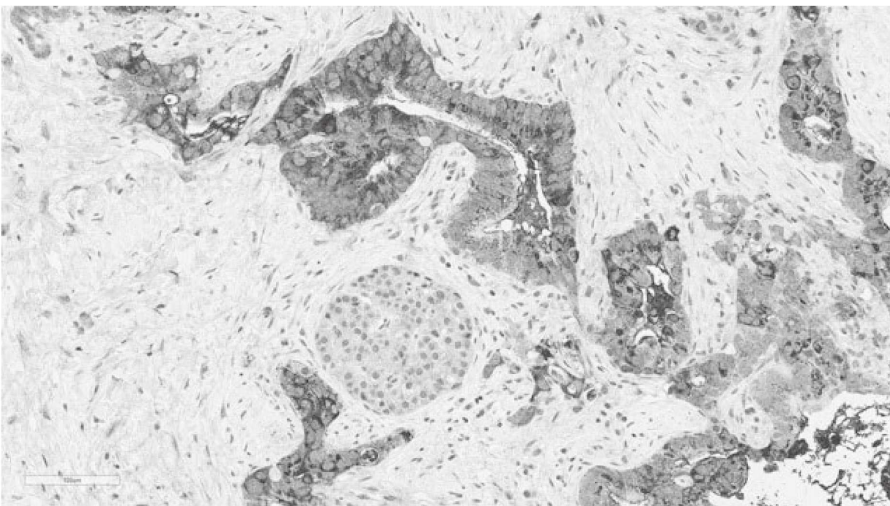
도면1



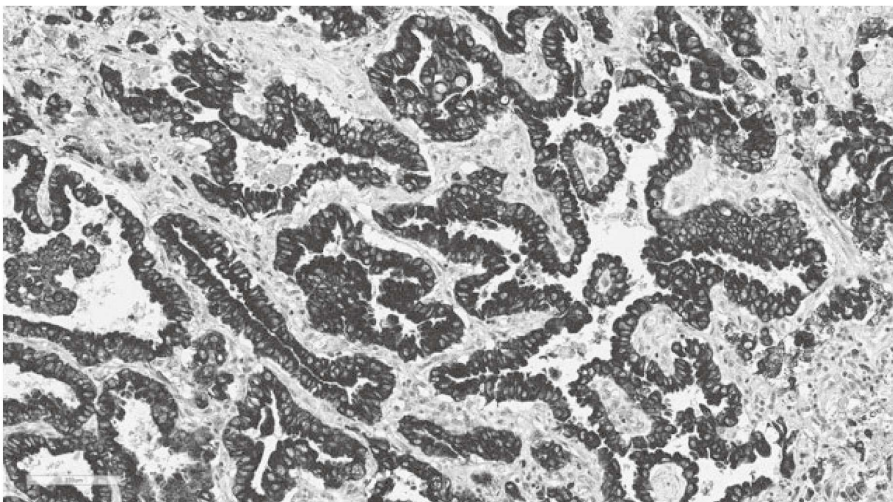
도면2



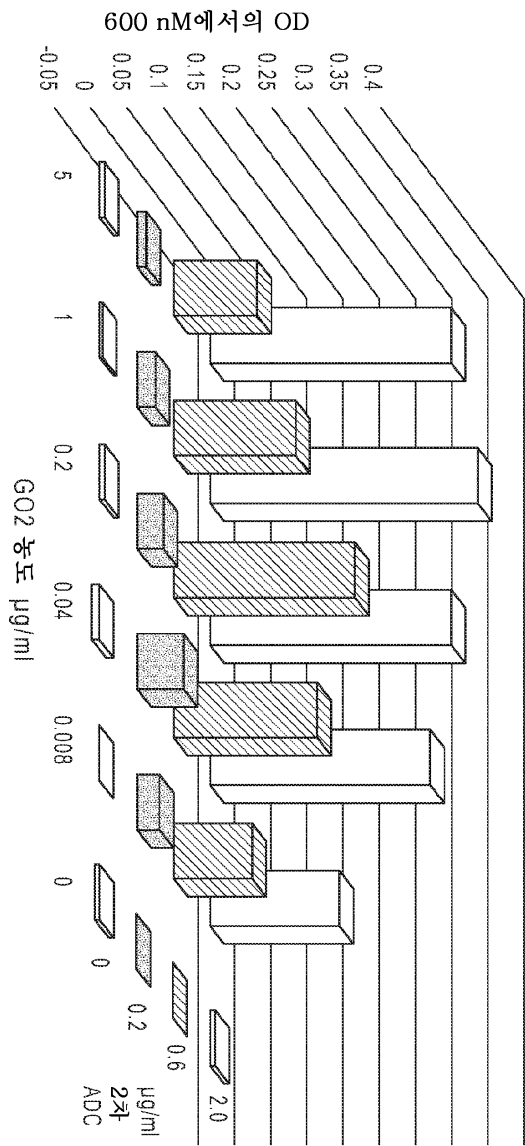
도면3



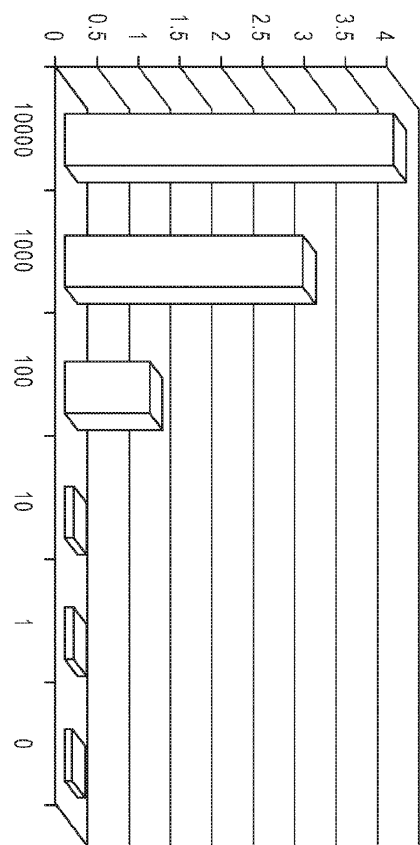
도면4



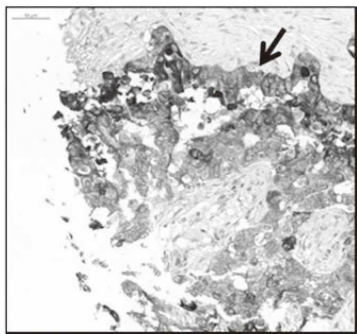
도면5



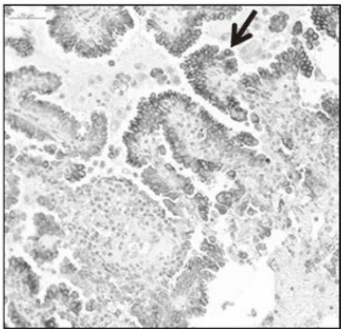
도면6



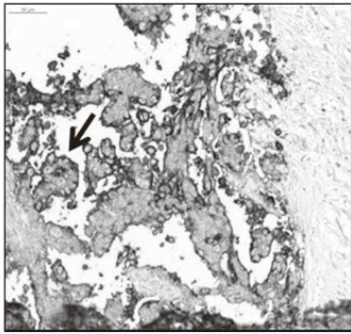
도면7a



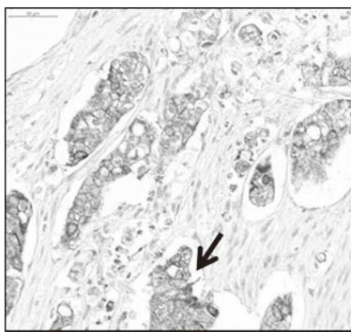
도면7b



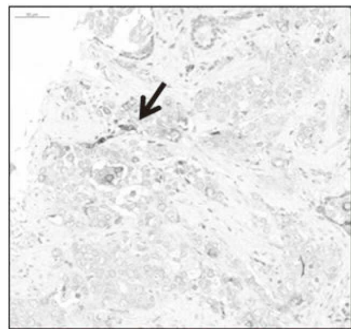
도면7c



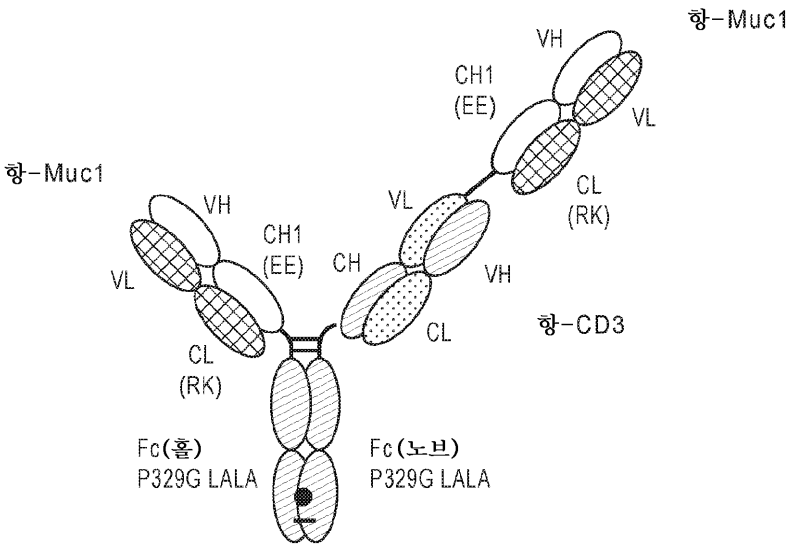
도면7d



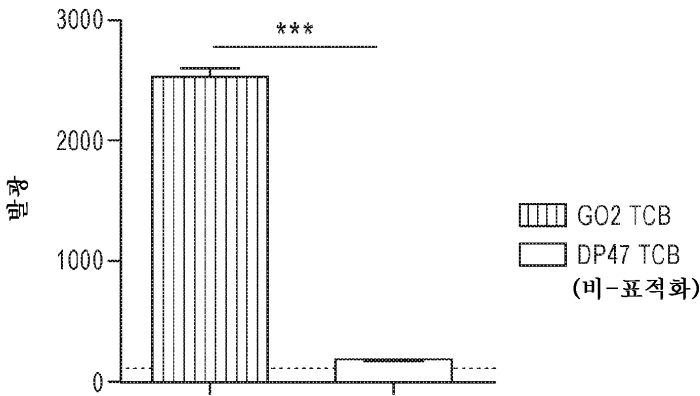
도면7e



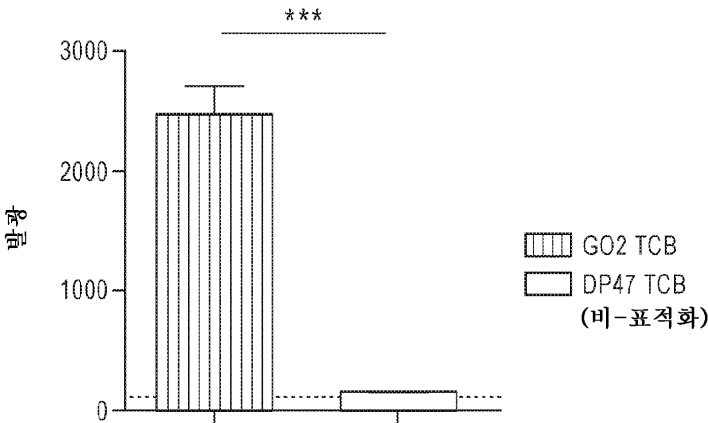
도면8



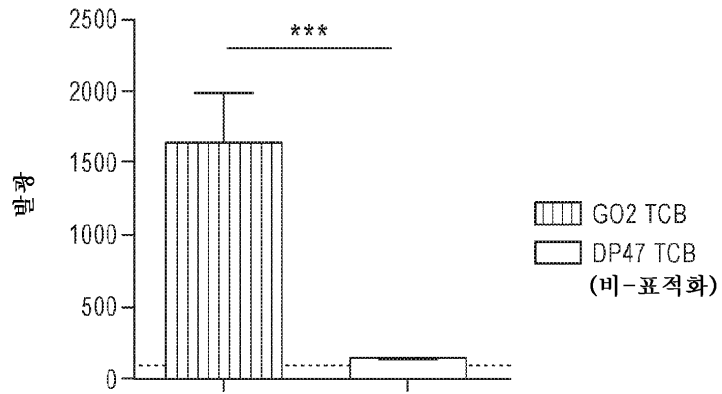
도면9a



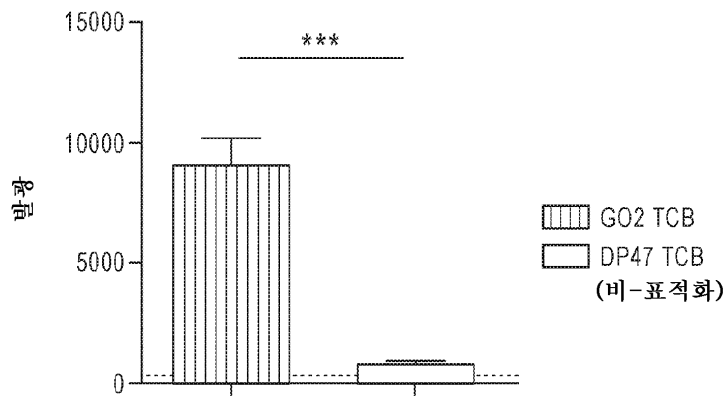
도면9b



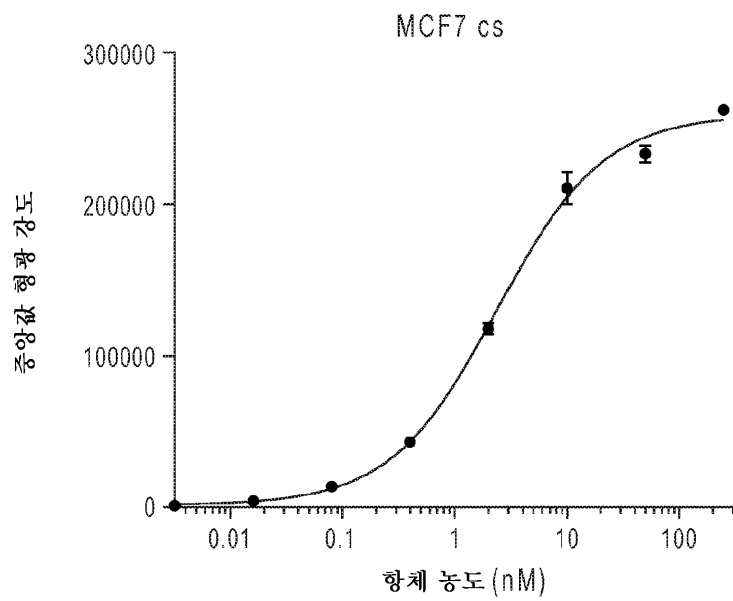
도면10



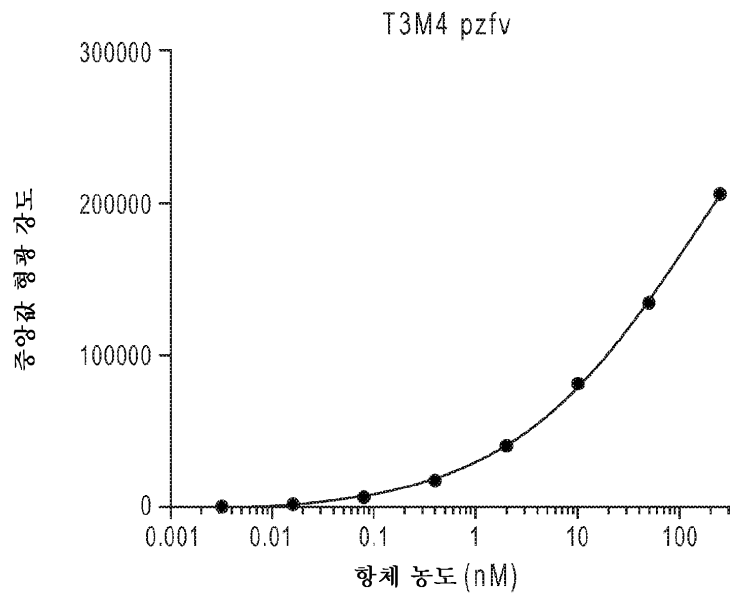
도면11



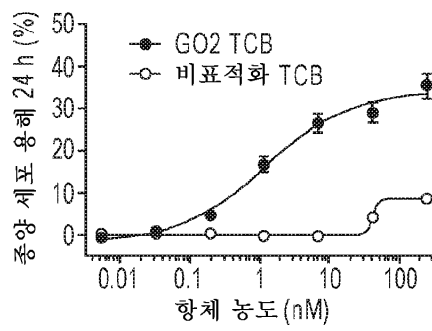
도면12a



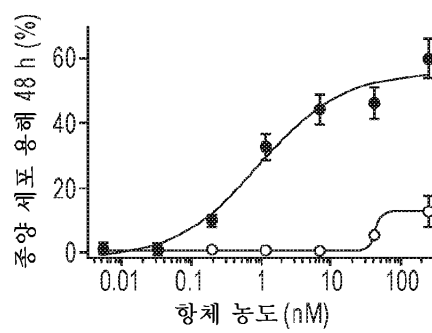
도면12b



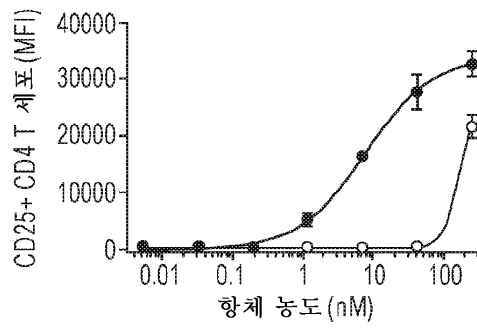
도면13a



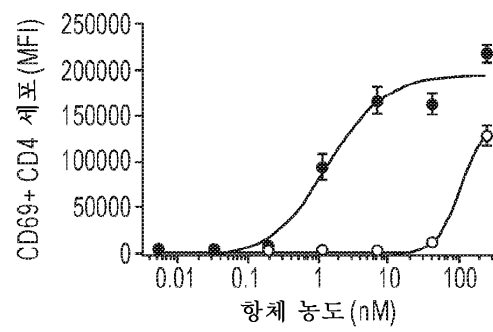
도면13b



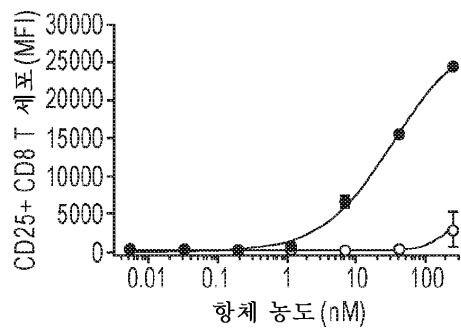
도면13c



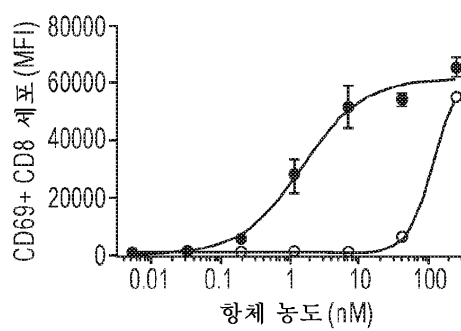
도면13d



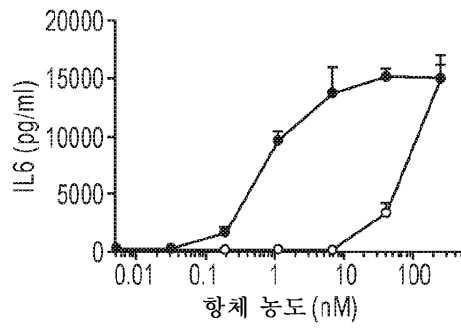
도면13e



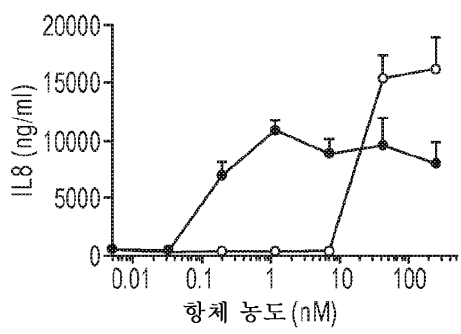
도면13f



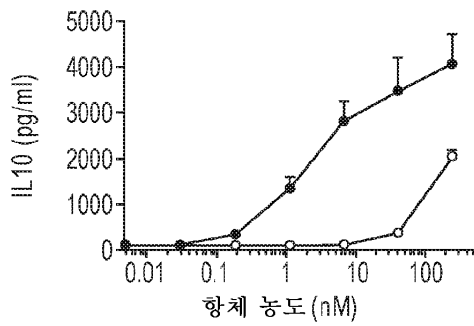
도면13g



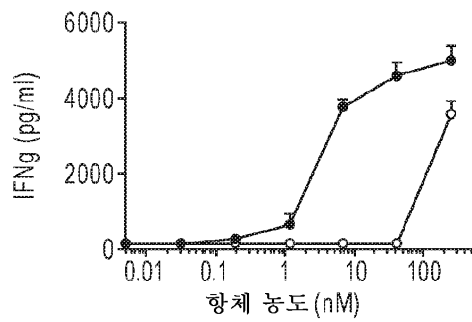
도면13h



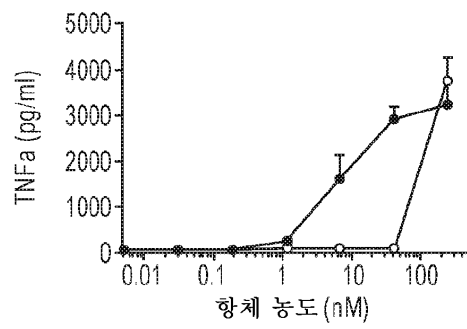
도면13i



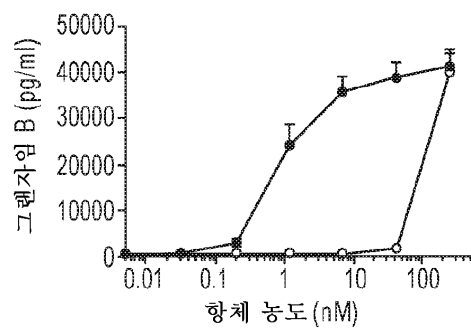
도면13j



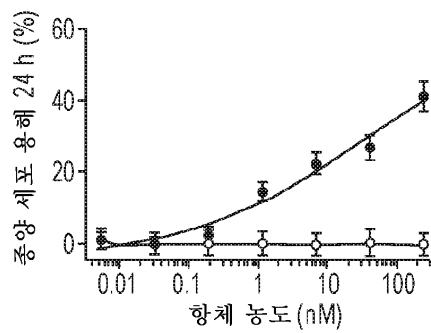
도면13k



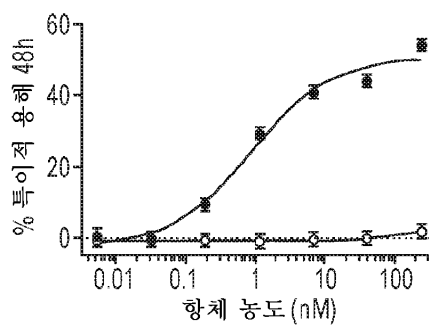
도면13l



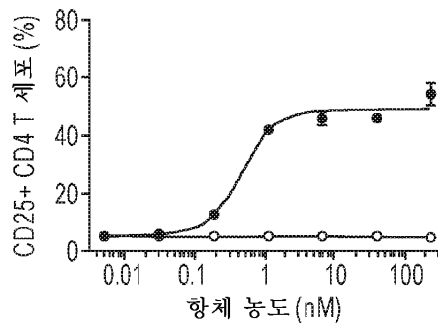
도면13m



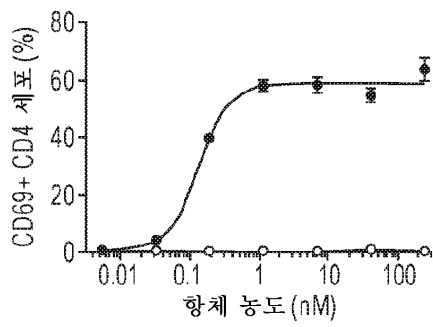
도면13n



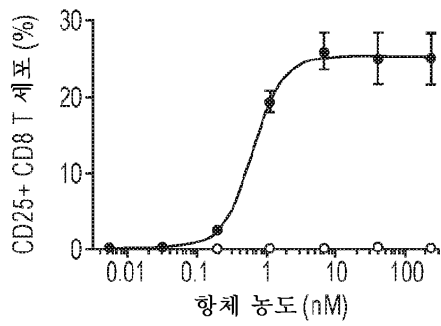
도면13o



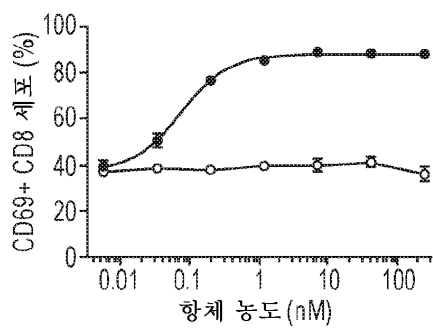
도면13p



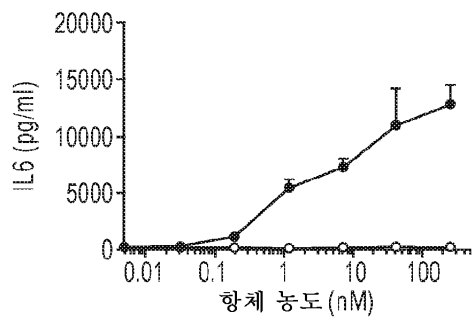
도면13q



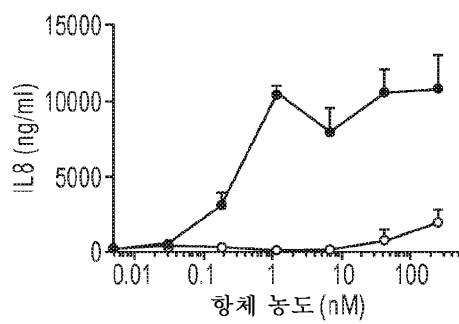
도면13r



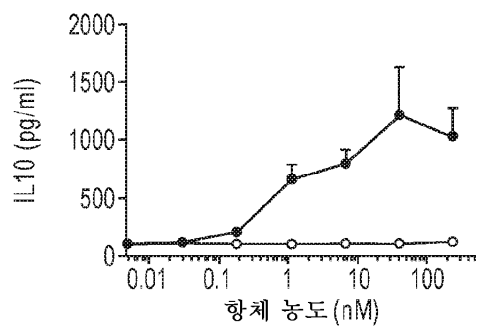
도면13s



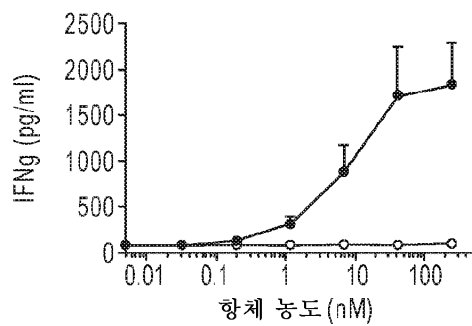
도면13t



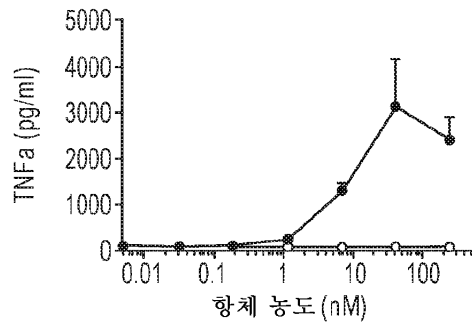
도면13u



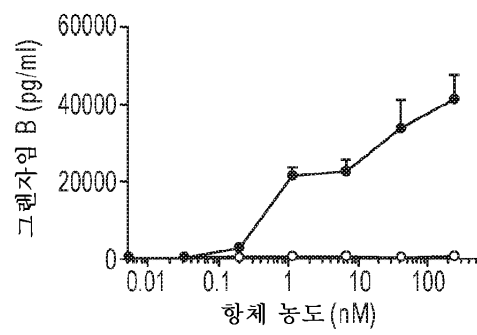
도면13v



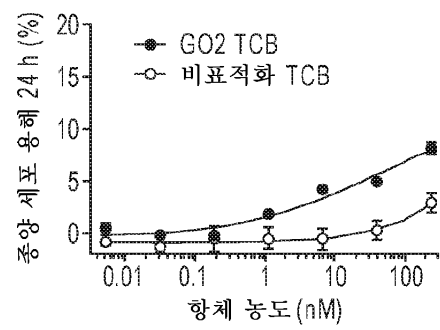
도면13w



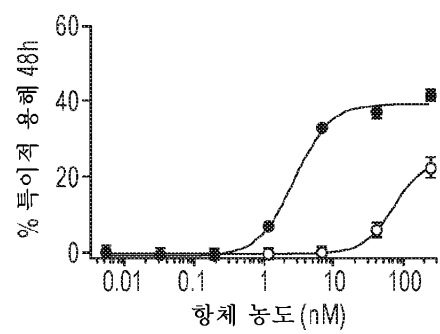
도면13x



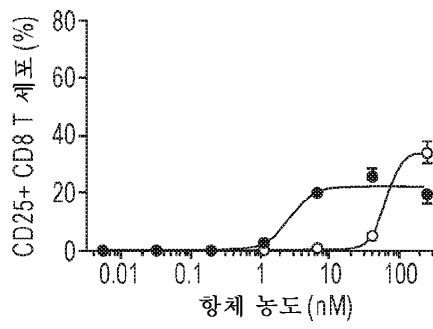
도면14a



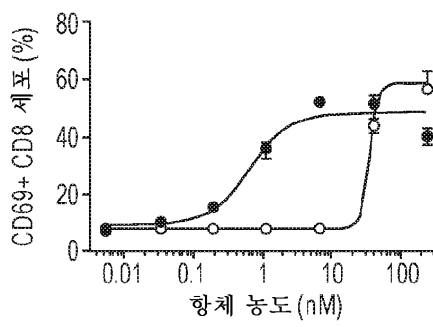
도면14b



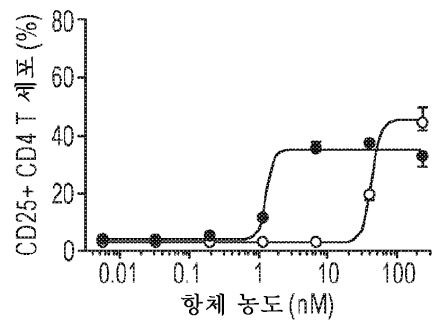
도면14c



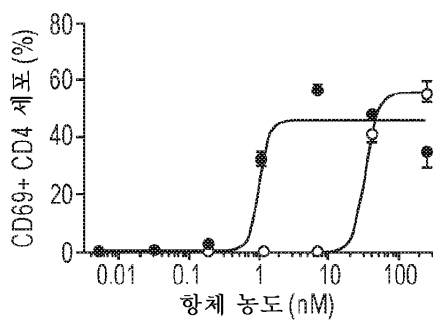
도면14d



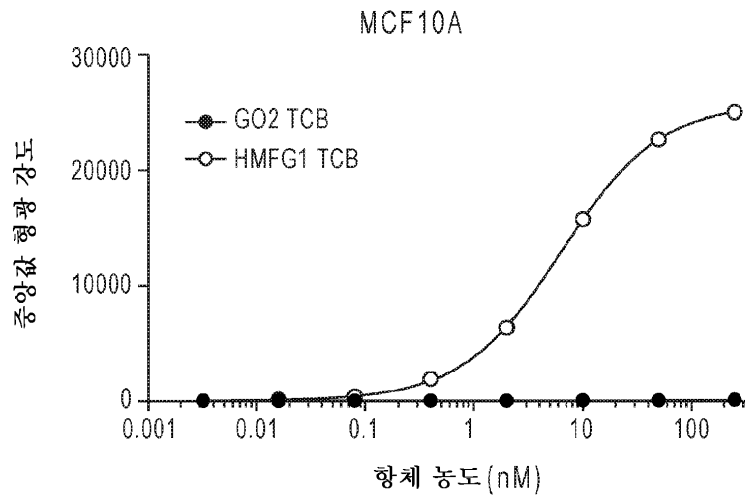
도면14e



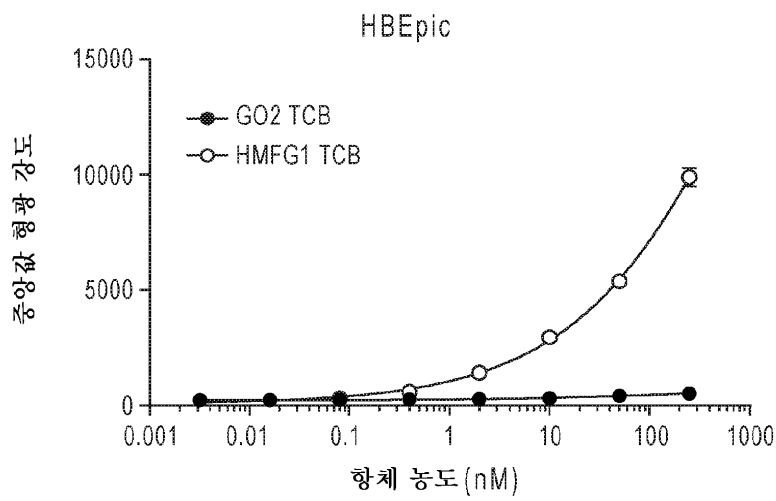
도면14f



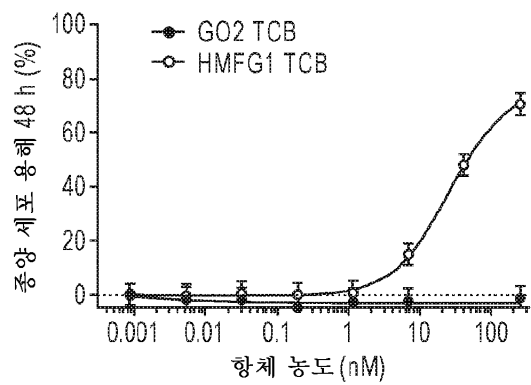
도면15a



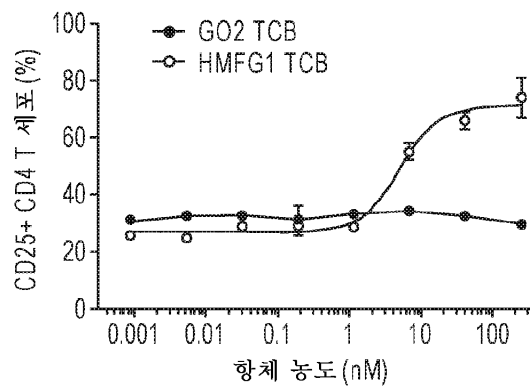
도면15b



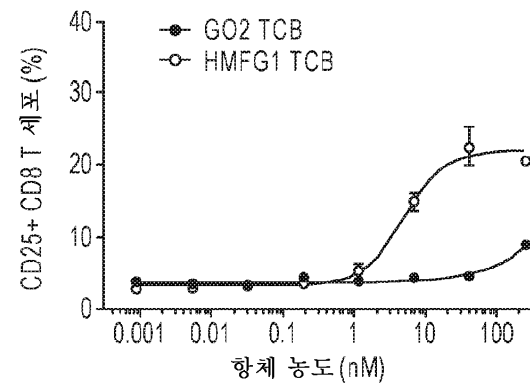
도면16a



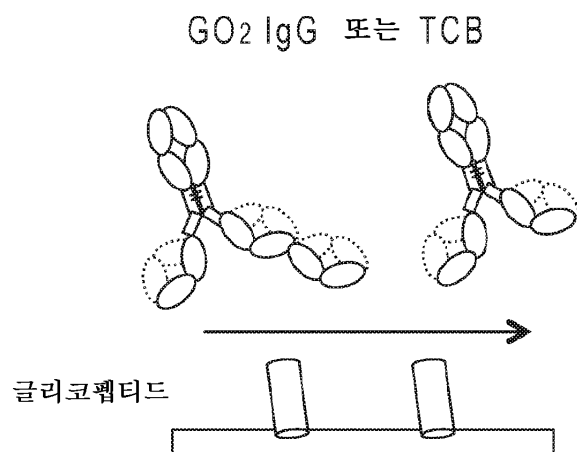
도면16b



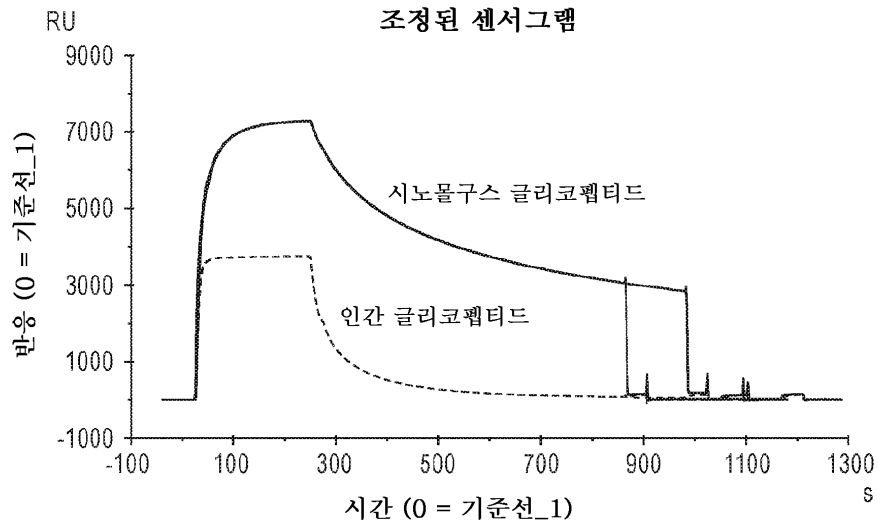
도면16c



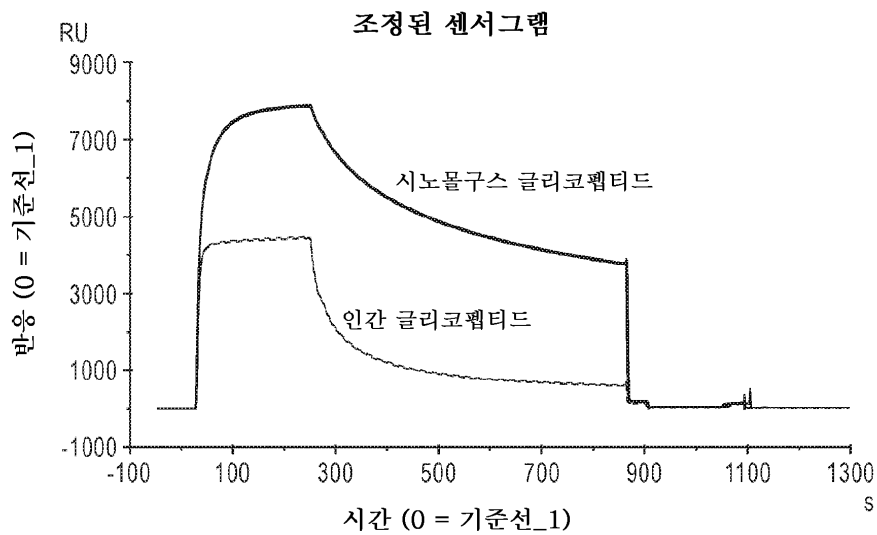
도면17



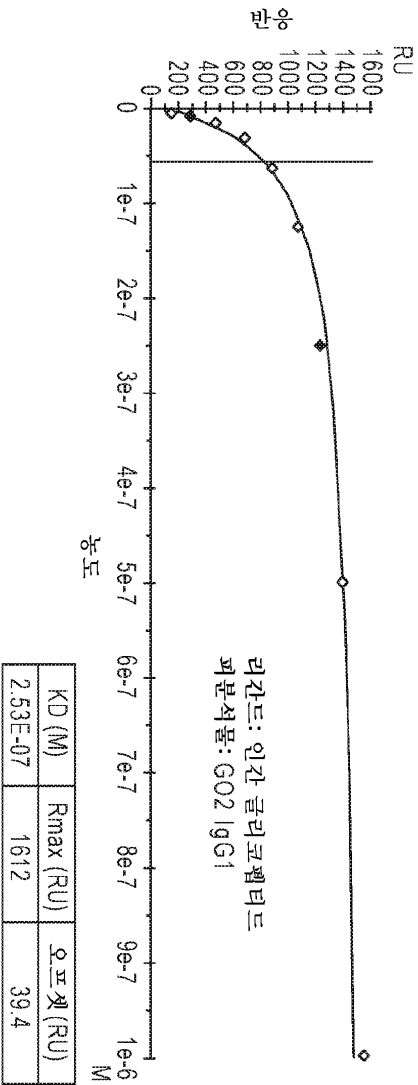
도면18a



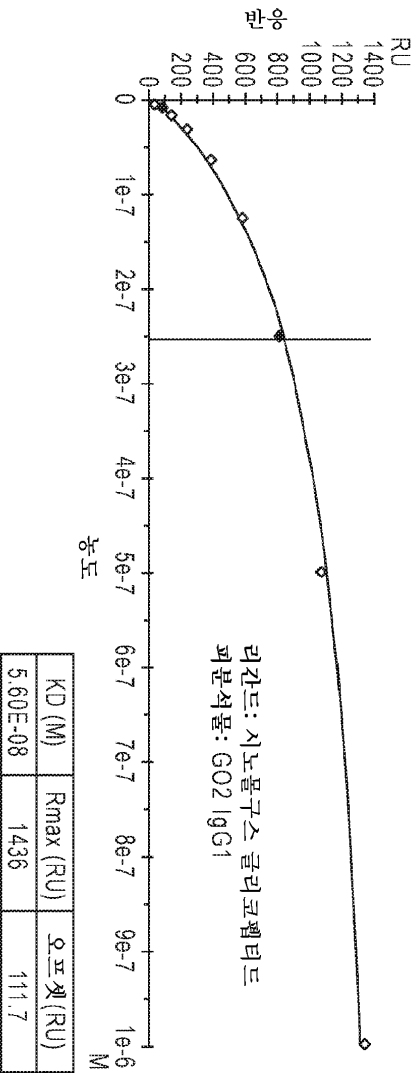
도면18b



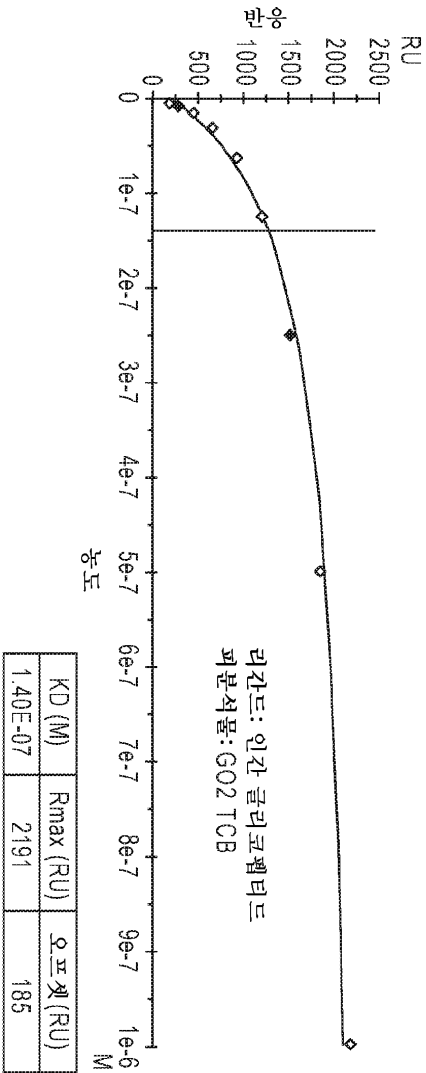
도면19a



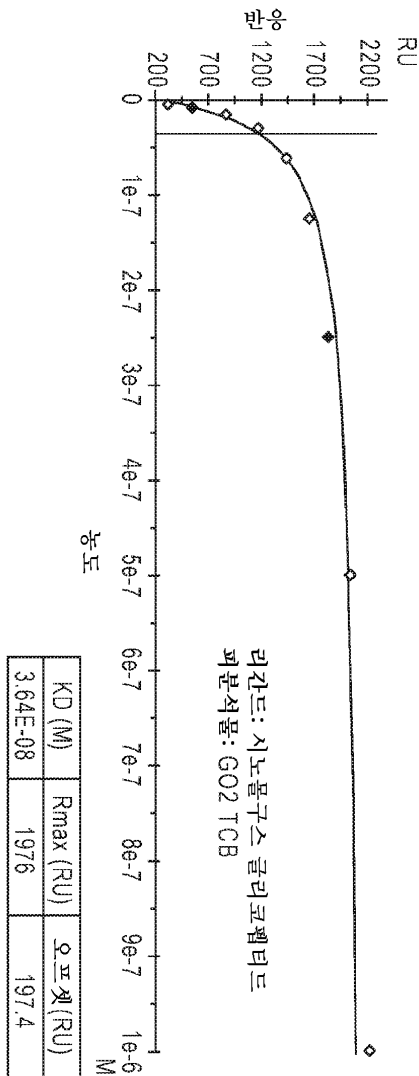
도면19b



도면19c



도면19d



서열목록

SEQUENCE LISTING

- <110> GO Therapeutics, Inc.
- <120> ANTI-GLYCO-MUC1 ANTIBODIES AND THEIR USES
- <130> GOT-001WO
- <160> 52
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
- <211> 136
- <212> PRT
- <213> Mus musculus

<400> 1

Met Gly Trp Ser Gly Ile Phe Leu Phe Phe Leu Ser Val Thr Thr Gly
1 5 10 15

Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Asp Ala Glu Leu Val Lys
20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
35 40 45

Thr Asp His Ala Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Ile Gly Tyr Phe Ser Pro Gly Asn Asp Asp Ile His Tyr Asn
65 70 75 80

Glu Lys Phe Glu Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser
85 90 95

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

100 105 110
Tyr Phe Cys Lys Arg Ser Tyr Asp Lys Asp Phe Asp Cys Trp Gly Gln
115 120 125

Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
130 135

<210> 2

<211> 140

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 2

Met Val Leu Ile Leu Leu Leu Leu Trp Val Ser Gly Thr Cys Gly Asp
1 5 10 15

Ile Val Met Ser Gln Ser Pro Ser Ser Leu Gly Val Ser Val Gly Glu

20 25 30
Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser Thr

35 40 45
Asn Gln Lys Asn Tyr Gln Ser Leu Leu Tyr Ser Thr Asn Gln Lys Asn

50 55 60

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu
 65 70 75 80
 Ile Tyr Trp Val Ser Asn Arg Lys Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr

85 90 95
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Lys
 100 105 110

Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Arg Tyr Pro
 115 120 125
 Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys

130 135 140

<210> 3

<211> 117

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 3

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

1 5 10 15
 Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp His
 20 25 30

Ala Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Tyr Phe Ser Pro Gly Asn Asp Asp Ile His Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

Glu Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80
 Met Gln Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95

Lys Arg Ser Tyr Asp Lys Asp Phe Asp Cys Trp Gly Gln Gly Thr Thr
 100 105 110
 Leu Thr Val Ser Ser

115

<210> 4

<211> 125

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 4

Asp Ile Val Met Ser Gln Ser Pro Ser Ser Leu Gly Val Ser Val Gly

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

65	70	75	80
Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val			
	85	90	95
Lys Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Arg Tyr			
	100	105	110
Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys			
	115	120	125

<210> 5

<211> 8

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 5

Gly Tyr Thr Phe Thr Asp His Ala

1	5
---	---

<210> 6

<211> 8

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 6

Phe Ser Pro Gly Asn Asp Asp Ile

1 5

<210> 7

<211> 10

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 7

Lys Arg Ser Tyr Asp Lys Asp Phe Asp Cys

1 5 10

<210> 8

<211> 12

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 8

Gln Ser Leu Leu Tyr Ser Thr Asn Gln Lys Asn Tyr

1 5 10

<210> 9

<211> 3

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 9

Trp Val Ser

1

<210> 10

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 10

Gln Gln Tyr Tyr Arg Tyr Pro Leu Thr

1 5

<210> 11

<211> 408

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 11

atgggatgga gcgggatctt tctcttcttc ctgtcagtaa ctacaggtgt ccactcccag 60

gttcagctgc agcagctctga cgcggagtgt gtgaaacctg gggcttcagt gaagatatcc 120

tgcaaggctt ctggctacac ttctactgac catgctattc actgggtgaa gcagaggcct 180

gaacagggcc tggaatggat tggatatatt tctcccggaa atgatgacat tcactacaat 240

gagaagtctg agggcaaggc cacactgact gcagacaaat cctccagcac tgcctacatg 300

cagctcaaca gcctgacatc tgaagattct gcagtgtatt tctglaaaag atcttacgac 360

aaggactttg actgctgggg ccaaggcacc actctcacag tctctca 408

<210> 12

<211> 384

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 12

atggttctta tcttactgct gctatgggta tctggtacct gtggggacat tgtgatgtca 60

cagtctccat cctccctagg tgtgtcagtt ggagagaagg ttactatgag ctgcaagtcc 120

agtcagagcc ttttatacag taccaatcaa aagaactacc tggcctggta ccagcagaaa 180

ccagggcagt ctctaagtt gctgatctac tgggtatcta ataggaaatc tggggtcct 240

gacgcttca caggcagttg atctgggaca gatttcactc tcaccatcag tagtgtgaag 300

gctgaagacc tggcagttta ttactgtcag caatattata ggtatccgct cacgttcggt 360

gctgggacca agctggagct gaaa 384

<210> 13

<211> 351

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 13

caggttcagc tgcagcagtc tgacgcggag ttggtgaaac ctggggcttc agtgaagata 60

tcctgcaagg cttctggcta cactttcact gaccatgcta ttactgggt gaagcagagg 120

cctgaacagg gcctggaatg gattggatat ttttctcccg gaaatgatga cattcactac 180

aatgagaagt tcgagggcaa ggccacactg actgcagaca aatcctccag cactgcctac 240

atgcagctca acagcctgac atctgaagat tctgcagtgt atttctgtaa aagatcttac 300

gacaaggact ttgactgctg gggccaaggc accactctca cagtctctc a 351

<210> 14

<211> 339

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 14

gacattgtga tgtcacagtc tccatcctcc ctaggtgtgt cagttggaga gaaggttact 60

atgagctgca agtccagtc gagcctttta tacagtacca atcaaaagaa ctacctggcc 120

tgggtaccagc agaaaccagg gcagtcctct aagttgctga tttactgggt atctaatagg 180

aaatctgggg tccctgatcg cttcacaggc agtggatctg ggacagattt cactctcacc 240

atcagtagtg tgaaggctga agacctggca gtttattact gtcagcaata ttataggtat 300

ccgctcacgt tcggtgctgg gaccaagctg gagctgaaa 339

<210> 15

<211> 25

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 15

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

1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser

20 25

<210> 16

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 16

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

1 5 10 15

Tyr

<210> 17

<211> 38

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 17

His Tyr Asn Glu Lys Phe Glu Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys

1 5 10 15

Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp

20 25 30

Ser Ala Val Tyr Phe Cys

35

<210> 18

<211> 11

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 18

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 19

<211> 26

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 19

Asp Ile Val Met Ser Gln Ser Pro Ser Ser Leu Gly Val Ser Val Gly

1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser

20 25

<210> 20

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 20

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile

1 5 10 15

Tyr

<210> 21

<211> 36

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 21

Asn Arg Lys Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly

1 5 10 15

Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Lys Ala Glu Asp Leu Ala

20 25 30

Val Tyr Tyr Cys

35

<210> 22

<211> 10

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 22

Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys

1 5 10

<210> 23

<211> 5

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 23

Asp His Ala Ile His

1 5

<210> 24

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 24

Tyr Phe Ser Pro Gly Asn Asp Asp Ile His Tyr Asn Glu Lys Phe Glu

1 5 10 15

Gly

<210> 25

<211> 8

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 25

Ser Tyr Asp Lys Asp Phe Asp Cys

1 5

<210> 26

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 26

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser Thr Asn Gln Lys Asn Tyr Leu

1 5 10 15

Ala

<210> 27

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 27

Trp Val Ser Asn Arg Lys Ser

1 5

<210> 28

<

211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 28

Gly Tyr Thr Phe Thr Asp His

1 5

<210> 29

<211> 6

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 29

Ser Pro Gly Asn Asp Asp

1 5

<210> 30

<211> 13

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 30

Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser Thr Asn Gln Lys Asn Tyr

1 5 10

<210> 31

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 31

Tyr Tyr Arg Tyr Pro Leu Thr

1 5

<210> 32

<211> 10

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 32

Gly Tyr Thr Phe Thr Asp His Ala Ile His

1 5 10

<210> 33

<211> 2

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 33

Asp His

1

<210> 34

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic CD3 CDR-H1 peptide

<400> 34

Thr Tyr Ala Met Asn

1 5

<210> 35

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220

><223> synthetic CD3 CDR-H2 peptide

<400> 35

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

1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 36

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic CD3 CDR-H3 peptide

<400> 36

His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr

1 5 10

<210> 37

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic CD3 CDR-L1 peptide

<400> 37

Gly Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser Asn Tyr Ala Asn

1 5 10

<210> 38

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic CD3 CDR-L2 peptide

<400> 38

Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro

1 5

<210> 39

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic CD3 CDR-L2 peptide

<400> 39

Ala Leu Trp Tyr Ser Asn Leu Trp Val

1 5

<210> 40

<211> 125

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic CD3 VH

<400> 40

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe

100 105 110

Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120 125

<210> 41

<211> 109

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic CD3 VL

<400> 41

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Gly Gln Ala Phe Arg Gly

35 40 45

Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Thr Pro Ala Arg Phe

50 55 60

Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Leu Ser Gly Ala

65 70 75 80

Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn

85 90 95

Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu

100 105

<210>

42

<211> 225

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic hIgG1 Fc region

<400> 42

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly

1 5 10 15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met

20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
65 70 75 80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
85 90 95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
100 105 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
115 120 125

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
130 135 140

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

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
165 170 175

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
180 185 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
195 200 205

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
210 215 220

Pro

225

<210> 43

<211> 232

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic MUC1 VL-CL(RK)

<400> 43

Asp Ile Val Met Ser Gln Ser Pro Ser Ser Leu Gly Val Ser Val Gly
1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser
20 25 30

Thr Asn Gln Lys Asn Tyr Gln Ser Leu Leu Tyr Ser Thr Asn Gln Lys
35 40 45

Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu
50 55 60

Leu Ile Tyr Trp Val Ser Asn Arg Lys Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
65 70 75 80

Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val
85 90 95

Lys Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Arg Tyr
100 105 110

Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Thr Val
115 120 125

Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Arg Lys Leu Lys
130 135 140

Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg
145 150 155 160

Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn
165 170 175

Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser
180 185 190

Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys
195 200 205

Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr
210 215 220

Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230

<210> 44

<211> 232

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic CD3 VH-CL

<400> 44

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

1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr

20 25 30
Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45
Ser Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp

50 55 60
Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr

65 70 75 80
Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr

85 90 95
Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe

100 105 110
Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Val

115 120 125
Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys

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

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

165 170 175
Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser

180 185 190
Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys

195 200 205

Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr
210 215 220

Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230

<210> 45
<211> 447
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> MUC1 VH-CH1(EE)-Fc (hole, P329G LALA)
<400> 45

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

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp His
20 25 30

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

Gly Tyr Phe Ser Pro Gly Asn Asp Asp Ile His Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Glu Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Lys Arg Ser Tyr Asp Lys Asp Phe Asp Cys Trp Gly Gln Gly Thr Thr
100 105 110

Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
115 120 125

Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys
130 135 140

Leu Val Glu Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
145 150 155 160

Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
165 170 175

Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
180 185 190

Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn
195 200 205

Thr Lys Val Asp Glu Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
210 215 220

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val
225 230 235 240

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
245 250 255

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
260 265 270

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
275 280 285

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
290 295 300

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
305 310 315 320

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
325 330 335

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro
340 345 350

Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala
355 360 365

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
370 375 380

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
385 390 395 400

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
405 410 415

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu

420 425 430
 His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440 445
 <210> 46
 <211> 672
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic MUC1 VH-CH1(EF)-CD3 VL-CH1-Fc (knob, P329G LALA)

<400> 46
 Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Asp Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp His
 20 25 30
 Ala Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Tyr Phe Ser Pro Gly Asn Asp Asp Ile His Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

Glu Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Gln Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95
 Lys Arg Ser Tyr Asp Lys Asp Phe Asp Cys Trp Gly Gln Gly Thr Thr
 100 105 110
 Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
 115 120 125

Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys
 130 135 140
 Leu Val Glu Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
 145 150 155 160
 Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
 165 170 175
 Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser

180	185	190	
Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn			
195	200	205	
Thr Lys Val Asp Glu Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Gly Gly Gly			
210	215	220	
Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser			
225	230	235	240
Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Ser Ser			
245	250	255	
Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys			
260	265	270	
Pro Gly Gln Ala Phe Arg Gly Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala			
275	280	285	
Pro Gly Thr Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala			
290	295	300	
Ala Leu Thr Leu Ser Gly Ala Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr			
305	310	315	320
Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys			
325	330	335	
Leu Thr Val Leu Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro			
340	345	350	
Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly			
355	360	365	
Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn			
370	375	380	
Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln			
385	390	395	400
Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser			
405	410	415	
Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser			
420	425	430	

Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
435 440 445

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser
450 455 460

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
465 470 475 480

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
485 490 495

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
500 505 510

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
515 520 525

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
530 535 540

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr
545 550 555 560

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
565 570 575

Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys
580 585 590

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
595 600 605

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
610 615 620

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
625 630 635 640

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
645 650 655

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
660 665 670

<210> 47

<211> 60

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 47

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

1 5 10 15

Pro Ala His Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr Arg Pro Ala Pro Gly

20 25 30

Ser Thr Ala Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr Arg

35 40 45

Pro Ala Pro Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala His Gly

50 55 60

<210> 48

<211> 21

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 48

Pro Asp Thr Ser Ala Ala Pro Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala His Val

1 5 10 15

Val Thr Ser Ala Pro

20

<210> 49

<211> 21

<212> PRT

<213> Macaca fascicularis

<400> 49

Pro Asp Thr Ser Ala Ala Pro Gly Ser Thr Gly Pro Pro Ala His Val

1 5 10 15

Val Thr Ser Ala Pro

20

<210> 50

<211> 20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 50

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

1 5 10 15

Pro Ala His Gly

20

<210> 51

<211> 20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 51

Pro Thr Thr Thr Pro Ile Ser Thr Thr Thr Met Val Thr Pro Thr Pro

1 5 10 15

Thr Pro Thr Cys

20

<210> 52

<211> 21

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 52

Cys Pro Leu Pro Val Thr Asp Thr Ser Ser Ala Ser Thr Gly His Ala

1 5 10 15

Thr Pro Leu Pro Val

20