



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0009592
(43) 공개일자 2025년01월17일

- | | |
|--|--|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 <i>A61K 47/68</i> (2017.01) <i>A61P 35/00</i> (2006.01)
 <i>C07K 16/28</i> (2006.01) <i>C07K 16/30</i> (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
 <i>A61K 47/6851</i> (2017.08)
 <i>A61K 47/68031</i> (2023.08)</p> <p>(21) 출원번호 10-2024-7037115</p> <p>(22) 출원일자(국제) 2023년04월11일
 심사청구일자 없음</p> <p>(85) 번역문제출일자 2024년11월07일</p> <p>(86) 국제출원번호 PCT/US2023/065637</p> <p>(87) 국제공개번호 WO 2023/201234
 국제공개일자 2023년10월19일</p> <p>(30) 우선권주장
 63/330,277 2022년04월12일 미국(US)</p> | <p>(71) 출원인
 미네르바 바이오테크놀로지 코포레이션
 미국 메사추세츠주 02451, 월섬, 40 베어 힐가</p> <p>(72) 발명자
 밤다드 신시아
 미국 메사추세츠주 02451, 월섬, 40 베어 힐가
 스마그헤 브누아
 미국 메사추세츠주 02451, 월섬, 40 베어 힐가
 (뒷면에 계속)</p> <p>(74) 대리인
 김진희, 김태홍</p> |
|--|--|

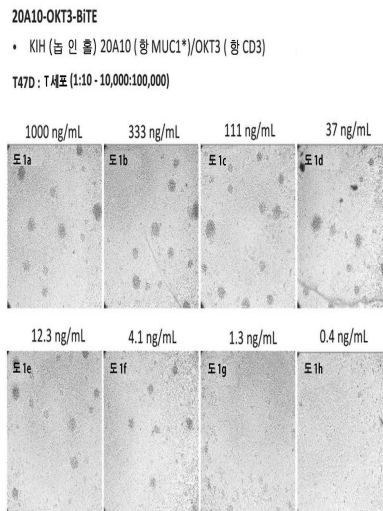
전체 청구항 수 : 총 67 항

(54) 발명의 명칭 항-가변 MUC1* 항체 및 그의 용도

(57) 요약

본원에서는 치료제, 및 MUC1*에 대한 결합 도메인 및 CD3에 대한 결합 도메인을 포함하는 다중특이적 항체 또는 항체 단편의 표적화된 전달을 위한 방법 및 조성물을 기술한다. 본 개시내용은 또한 항체를 포함하는 조성물, 및 질환 및 장애, 예컨대, 암을 치료하는 방법을 제공한다.

대표도



(52) CPC특허분류

A61K 47/68033 (2023.08)

A61K 47/68035 (2023.08)

A61K 47/6879 (2017.08)

A61P 35/00 (2018.01)

C07K 16/2809 (2013.01)

C07K 16/3092 (2013.01)

C07K 2317/24 (2013.01)

C07K 2317/31 (2013.01)

C07K 2317/56 (2013.01)

(72) 발명자

모에 스콧

미국 메사추세츠주 02451, 월섬, 40 베이 힐가

전 토마스

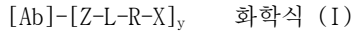
미국 메사추세츠주 02451, 월섬, 40 베이 힐가

명세서

청구범위

청구항 1

하기 화학식 (I)에 대한 접합체:



상기 식에서,

X는 토포이소머라제 I을 억제할 수 있는 화합물 또는 튜블린 형성을 억제할 수 있는 화합물로부터 유래된 모이어티이고;

R은 커플링 모이어티이고;

L은 N-말단에 Z가 결합되어 있고 C-말단에 R이 결합되어 있는, 디- 또는 트리- 또는 테트라-펩티드 연결 모이어티이고;

[Ab]는 3개의 중쇄(HC) 상보성 결정 영역(CDR): MUC1* HC-CDR1, MUC1* HC-CDR2, 및 MUC1* HC-CDR3을 포함하는 항MUC1* 결합 도메인을 포함하는 항체이고; 여기서, MUC1* 결합 도메인의 MUC1* HC-CDR1, MUC1* HC-CDR2, 및 MUC1* HC-CDR3은 표 1에 기재된 것으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하고;

여기서, MUC1* 결합 도메인은 3개의 경쇄(LC) 상보성 결정 영역(CDR): MUC1* LC-CDR1, MUC1* LC-CDR2, 및 MUC1* LC-CDR3을 포함하고; 여기서, MUC1* 결합 도메인의 MUC1* LC-CDR1, MUC1* LC-CDR2, 및 MUC1* LC-CDR3은 표 1에 기재된 것으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하고;

Z는 시스테인 잔기의 황 원자와 공유 결합을 형성할 수 있는 접합 모이어티이고;

여기서, y는 1 내지 10의 정수이다.

청구항 2

제1항에 있어서, L이 발린 및 시트룰린을 포함하는 접합체.

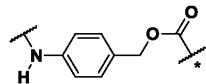
청구항 3

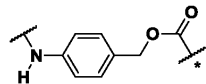
제1항에 있어서, L이 글리신 및 페닐알라닌을 포함하는 접합체.

청구항 4

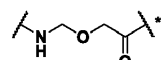
제1항에 있어서, R이 파라-아미노벤질을 포함하는 접합체.

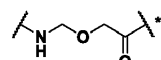
청구항 5



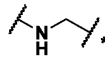
제1항에 있어서, R이 의 구조를 포함하는 모이어티를 포함하고, 여기서, *는 X 기에 대한 부착 지점을 나타내는 접합체.

청구항 6

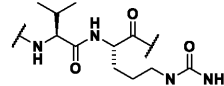


제1항에 있어서, R이 의 구조를 포함하는 모이어티를 포함하고, 여기서, *는 X 기에 대한 부착 지점을 나타내는 접합체.

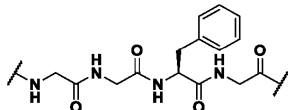
청구항 7

제1항에 있어서, R이 의 구조를 포함하는 모이어티를 포함하고, 여기서, *는 X 기에 대한 부착 지점을 나타내는 접합체.

청구항 8

제1항에 있어서, L이 의 구조를 포함하는 디펩티드 연결 모이어티인 접합체.

청구항 9

제1항에 있어서, L이 의 구조를 포함하는 테트라-펩티드 연결 모이어티인 접합체.

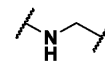
청구항 10

제1항에 있어서, X가 MMAE 또는 MMAF인 접합체.

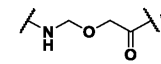
청구항 11

제1항에 있어서, X가 엑사테칸 또는 Dxd인 접합체.

청구항 12

제1항에 있어서, R이 의 구조를 포함하는 모이어티를 포함하고, 여기서, *는 X 기에 대한 부착 지점을 나타내고, 여기서, X는 Dxd인 접합체.

청구항 13

제1항에 있어서, R이 의 구조를 포함하는 모이어티를 포함하고, 여기서, *는 X 기에 대한 부착 지점을 나타내고, 여기서, X는 엑사테칸인 접합체.

청구항 14

제1항에 있어서, 항체가 이소타입 IgG1 또는 IgG2인 접합체.

청구항 15

제1항에 있어서, 항체가 이소타입 IgG2b인 접합체.

청구항 16

제1항에 있어서, 항MUC1* 결합 도메인이 서열 번호 38 또는 44로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 약 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 서열을 포함하는 중쇄를 포함하는 접합체.

청구항 17

제1항에 있어서, 항MUC1* 결합 도메인이 서열 번호 39 또는 45로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 약 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 서열을 포함하는 중쇄 가변 도메인을 포함하는 접합체.

청구항 18

제1항에 있어서, 항MUC1* 결합 도메인이 서열 번호 41 또는 47로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 약 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 서열을 포함하는 경쇄를 포함하는 접합체.

청구항 19

제1항에 있어서, 항MUC1* 결합 도메인이 서열 번호 42 또는 48로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 약 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함하는 접합체.

청구항 20

제1항에 있어서, 항MUC1* 결합 도메인이 서열 번호 129 또는 130으로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 약 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 서열을 포함하는 단일쇄 가변 단편(scFv)을 포함하는 접합체.

청구항 21

항MUC1* 결합 도메인을 포함하는 항체를 포함하는 항체 접합체로서, 여기서, 항체는 말레이미드-시스테인 결합을 통해 페이로드(payload)에 접합되고, 여기서, 페이로드는 링커 및 세포독성 화합물을 포함하고, 여기서, 세포독성 화합물은 튜블린 억제제 또는 토포이소머라제 I 억제제를 포함하는 항체 접합체.

청구항 22

제21항에 있어서, 링커가 발린을 포함하는 항체 접합체.

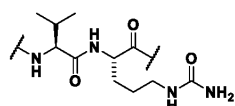
청구항 23

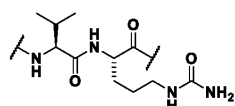
제21항에 있어서, 링커가 시트룰린을 포함하는 항체 접합체.

청구항 24

제21항에 있어서, 링커가 발린 및 시트룰린을 포함하는 항체 접합체.

청구항 25



제21항에 있어서, 링커가 의 구조를 포함하는 디펩티드 연결 모이어티인 항체 접합체.

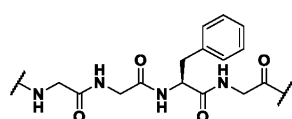
청구항 26

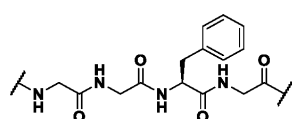
제21항에 있어서, 링커가 적어도 하나의 글리신을 포함하는 항체 접합체.

청구항 27

제21항에 있어서, 링커가 적어도 하나의 글리신 및 페닐알라닌을 포함하는 항체 접합체.

청구항 28

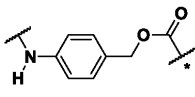


제21항에 있어서, 링커가 의 구조를 포함하는 항체 접합체.

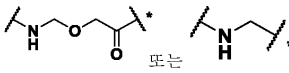
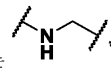
청구항 29

제21항에 있어서, 링커가 파라-아미노벤질을 포함하는 항체 접합체.

청구항 30

제21항에 있어서, 링커가 구조 의 기를 포함하고, 여기서, *는 세포독성 기에 대한 부착 지점을 나타내는 항체 접합체.

청구항 31

제21항에 있어서, 링커가 구조  또는 의 기를 포함하고, 여기서, *는 세포독성 기에 대한 부착 지점을 나타내는 항체 접합체.

청구항 32

제21항에 있어서, 튜블린 억제제가 MMAE 또는 MMAF인 항체 접합체.

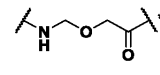
청구항 33

제21항에 있어서, 토포이소머라제 I 억제제가 엑사테칸 또는 데록스테칸, 또는 그의 유도체인 항체 접합체.

청구항 34

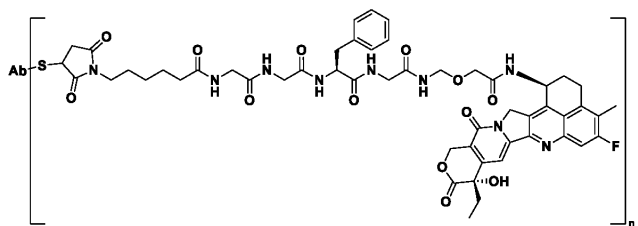
제21항에 있어서, 링커가 의 구조를 포함하는 기를 포함하고, 여기서, *는 세포독성 기에 대한 부착 지점을 나타내고, 여기서, 토포이소머라제 I 억제제는 Dxd인 항체 접합체.

청구항 35

제21항에 있어서, 링커가 의 구조를 포함하는 기를 포함하고, 여기서, *는 세포독성 기에 대한 부착 지점을 나타내고, 여기서, 토포이소머라제 I 억제제는 엑사테칸인 항체 접합체.

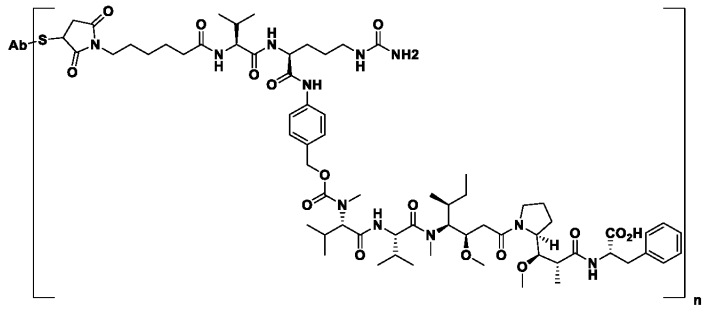
청구항 36

제21항에 있어서, 하기 제공되는 구조를 포함하고, 여기서, n은 1 내지 10인 항체 접합체:



청구항 37

제21항에 있어서, 하기 제공되는 구조를 포함하고, 여기서, n은 1 내지 10인 항체 접합체:



청구항 38

제21항에 있어서, 항체 이소타입이 IgG1 또는 IgG2인 항체 접합체.

청구항 39

제21항에 있어서, 항체 이소타입이 IgG2b인 항체 접합체.

청구항 40

제21항에 있어서, 항체가 적어도 2개의 페이로드에 접합되는 항체 접합체.

청구항 41

제21항에 있어서, 항체가 적어도 3개의 페이로드에 접합되는 항체 접합체.

청구항 42

제21항에 있어서, 항체가 적어도 4개의 페이로드에 접합되는 항체 접합체.

청구항 43

제21항에 있어서, 항체가 적어도 5개의 페이로드에 접합되는 항체 접합체.

청구항 44

제21항에 있어서, 항체가 적어도 6개의 페이로드에 접합되는 항체 접합체.

청구항 45

제21항에 있어서, 항체가 적어도 7개의 페이로드에 접합되는 항체 접합체.

청구항 46

제21항에 있어서, 항체가 적어도 8개의 페이로드에 접합되는 항체 접합체.

청구항 47

제21항에 있어서, 항MUC1* 결합 도메인이 3개의 경쇄(LC) 상보성 결정 영역(CDR): LC-CDR1, LC-CDR2, 및 LC-CDR3을 포함하고; 여기서, MUC1* 결합 도메인의 LC-CDR1, LC-CDR2, 및 LC-CDR3은 표 1에 기재된 것으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하고; 여기서, LC-CDR1, LC-CDR2 및 LC-CDR3 중 적어도 하나는 0-2개의 아미노산 변형(들)을 포함하는 항체 접합체.

청구항 48

제21항에 있어서, 항MUC1* 결합 도메인이 3개의 중쇄(HC) 상보성 결정 영역(CDR): HC-CDR1, HC-CDR2, 및 HC-CDR3을 포함하고; 여기서, MUC1* 결합 도메인의 HC-CDR1, HC-CDR2, 및 HC-CDR3은 표 1에 기재된 것으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하고; 여기서, HC-CDR1, HC-CDR2 및 HC-CDR3 중 적어도 하나는 0-2개의 아미노산 변형(들)을 포함하는 항체 접합체.

택되는 아미노산 서열을 포함하고; 여기서, HC-CDR1, HC-CDR2 및 HC-CDR3 중 적어도 하나는 0-2개의 아미노산 변형(들)을 포함하는 항체 접합체.

청구항 49

제21항에 있어서, 항MUC1* 결합 도메인이 표 2에 기재된 서열과 적어도 약 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 서열을 포함하는 중쇄 가변 도메인을 포함하는 항체 접합체.

청구항 50

제21항에 있어서, 항MUC1* 결합 도메인이 표 2에 기재된 서열과 적어도 약 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함하는 항체 접합체.

청구항 51

제21항에 있어서, 항MUC1* 결합 도메인이 표 3에 기재된 서열과 적어도 약 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 서열을 포함하는 단일쇄 가변 단편(scFv)을 포함하는 항체 접합체.

청구항 52

MUC1* 결합 도메인 및 CD3 결합 도메인을 포함하는 항체로서,

여기서, MUC1* 결합 도메인은 3개의 중쇄(HC) 상보성 결정 영역(CDR): MUC1* HC-CDR1, MUC1* HC-CDR2, 및 MUC1* HC-CDR3을 포함하고; 여기서, MUC1* HC-CDR1은 서열 번호 1의 아미노산 서열을 포함하고, MUC1* HC-CDR2는 서열 번호 2의 아미노산 서열을 포함하고, MUC1* HC-CDR3은 서열 번호 3의 아미노산 서열을 포함하고;

여기서, MUC1* 결합 도메인은 3개의 경쇄(LC) 상보성 결정 영역(CDR): MUC1* LC-CDR1, MUC1* LC-CDR2, 및 MUC1* LC-CDR3을 포함하고; 여기서, MUC1* LC-CDR1은 서열 번호 13의 아미노산 서열을 포함하고, MUC1* LC-CDR2는 서열 번호 14의 아미노산 서열을 포함하고, MUC1* LC-CDR3은 서열 번호 15의 아미노산 서열을 포함하고;

여기서, CD3 결합 도메인은 3개의 중쇄(HC) 상보성 결정 영역(CDR): CD3 HC-CDR1, CD3 HC-CDR2, 및 CD3 HC-CDR3을 포함하고; 여기서, CD3 결합 도메인의 CD3 HC-CDR1, CD3 HC-CDR2, 및 CD3 HC-CDR3은 표 2에 기재된 것으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하고;

여기서, CD3 결합 도메인은 3개의 경쇄(LC) 상보성 결정 영역(CDR): CD3 LC-CDR1, CD3 LC-CDR2, 및 CD3 LC-CDR3을 포함하고; 여기서, CD3 결합 도메인의 CD3 LC-CDR1, CD3 LC-CDR2, 및 CD3 LC-CDR3은 표 4에 기재된 것으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 항체.

청구항 53

제52항에 있어서, 항체가 Fc 도메인을 포함하는 항체.

청구항 54

제52항에 있어서, Fc 도메인이 이종이량체(heterodimeric) Fc 도메인인 항체.

청구항 55

제52항에 있어서, 이종이량체 Fc 도메인이 낚(knob) 쇠 및 홀(hole) 쇠를 포함하여 낚-인투-홀(KiH) 구조를 형성하는 항체.

청구항 56

제55항에 있어서, 낚 쇠가 서열 번호 121, 122, 123 또는 124로부터 선택되는 서열과 적어도 약 95%의 동일성을 갖는 서열을 포함하는 항체.

청구항 57

제55항에 있어서, 홀 쇠가 서열 번호 125, 126, 127, 또는 128로부터 선택되는 서열과 적어도 약 95%의 동일성을 갖는 서열을 포함하는 항체.

청구항 58

제52항에 있어서, MUC1* 결합 도메인이 표 2로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 약 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 서열을 포함하는 중쇄 가변 도메인을 포함하는 항체.

청구항 59

제52항에 있어서, MUC1* 결합 도메인이 표 2로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 약 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함하는 항체.

청구항 60

제52항에 있어서, MUC1* 결합 도메인이 표 3으로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 약 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 서열을 포함하는 단일 쇠 가변 단편(scFv)을 포함하는 항체.

청구항 61

제52항에 있어서, CD3 결합 도메인이 서열 번호 26 또는 31로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 약 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 서열을 포함하는 중쇄를 포함하는 항체.

청구항 62

제52항에 있어서, CD3 결합 도메인이 서열 번호 29 또는 35로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 약 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 서열을 포함하는 경쇄를 포함하는 항체.

청구항 63

제52항에 있어서, CD3 결합 도메인이 서열 번호 131 또는 132로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 약 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 서열을 포함하는 단일 쇠 가변 단편(scFv)을 포함하는 항체.

청구항 64

제52항에 있어서, 서열 번호 50, 52, 54, 58, 62, 66, 70, 74, 78, 82, 86, 90, 94, 98, 102, 106, 110, 또는 114로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 약 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 서열을 포함하는 항체.

청구항 65

암 치료를 필요로 하는 피험체에게 제1항 내지 제64항 중 어느 한 항의 항체 또는 항체 접합체를 투여하는 단계를 포함하는, 암을 치료하는 방법.

청구항 66

제65항에 있어서, 암이 MUC1*을 발현하는 방법.

청구항 67

제65항에 있어서, 암이 유방암, 결장암, 전립선암, 췌장암, 또는 폐암인 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 상호 참조

[0002] 본원은 2022년 4월 12일 출원된 미국 가출원 63/330,277의 이익을 주장하며, 상기 가출원의 전문이 본원에서 참조로 포함된다.

[0003] 서열 목록

[0004] 본원은 ASCII 포맷으로 전자적으로 제출된 서열 목록을 포함하고, 그의 전문이 본원에서 참조로 포함된다. 2023년 4월 4일에 작성된 상기 ASCII 사본의 명칭은 56699-751.601_SL.xml이고, 크기는 230 킬로바이트이다.

[0005] 참조에 의한 인용

[0006] 본 명세서에서 언급된 모든 간행물, 특허 및 특허 출원은 마치 각각의 개별 간행물, 특허 및 특허 출원이 참조로 포함되는 것으로 구체적으로 및 개별적으로 명시된 것과 같은 정도로 본원에서 참조로 포함된다. 참조로 포함된 간행물 및 특허 또는 특허 출원이 본 명세서에 포함된 개시내용과 모순되는 경우, 본 명세서는 임의의 상기 모순되는 자료를 대체하고/거나, 그보다 우선하는 것으로 의도된다.

[0007] 기술분야

[0008] 본원에서는 MUC1* 결합 도메인 및 CD3 결합 도메인을 포함하는 다중특이적 항체를 제공한다. 본원에서는 또한 치료제(예컨대, 토포이소머라제 I 억제제, 튜블린 형성 억제제)로부터 유래된 하나 이상의 모이어티를 포함하는, 본원에 기술된 화학식의 항체 접합체로서, 여기서, 접합체는 관심 표적에 결합하는 항체(예컨대, MUC1*를 표적화하는 항체)와 같은 폴리펩티드를 추가로 포함하는 항체 접합체를 제공한다. 상기 다중특이적 항체 및 항체-약물 접합체는 질환 또는 장애, 예를 들어, 증식성 질환, 예컨대, 암 치료에 유용하다. 또한 본원에서는 상기 다중특이적 항체 및 항체 접합체를 사용하여 질환 및 장애를 치료하기 위한 용도 및 방법을 제공한다.

발명의 내용

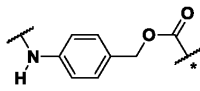
[0009] 요약

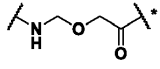
[0010] 본원에서는 하기 화학식 (I)에 대한 접합체를 개시하며:

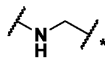
[0011] $[Ab]-[Z-L-R-X]_y$ 화학식 (I)

[0012] 상기 식에서, X는 토포이소머라제 I을 억제할 수 있는 화합물 또는 튜블린 형성을 억제할 수 있는 화합물로부터 유래된 모이어티이고; R은 커플링 모이어티이고; L은 N-말단에 Z가 결합되어 있고 C-말단에 R이 결합되어 있는, 디- 또는 트리- 또는 테트라-펩티드 연결 모이어티이고; [Ab]는 3개의 중쇄(HC: heavy chain) 상보성 결정 영역(CDR: complementarity determining region): MUC1* HC-CDR1, MUC1* HC-CDR2, 및 MUC1* HC-CDR3을 포함하는 항MUC1* 결합 도메인을 포함하는 항체이고; 여기서, MUC1* 결합 도메인의 MUC1* HC-CDR1, MUC1* HC-CDR2, 및 MUC1* HC-CDR3은 표 1에 기재된 것으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하고; 여기서, MUC1* 결합 도메인은 3개의 경쇄(LC: light chain) 상보성 결정 영역(CDR): MUC1* LC-CDR1, MUC1* LC-CDR2, 및 MUC1* LC-CDR3을 포함하고; 여기서, MUC1* 결합 도메인의 MUC1* LC-CDR1, MUC1* LC-CDR2, 및 MUC1* LC-CDR3은 표 1에 기재된 것으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하고; Z는 시스테인 잔기의 황 원자와 공유 결합을 형성할 수 있는 접합 모이어티이고; 여기서, y는 1 내지 10의 정수이다.

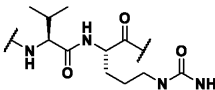
[0013] L은 발린 및 시트룰린을 포함할 수 있다. L은 글리신 및 페닐알라닌을 포함할 수 있다. R은 파라-아미노벤질을

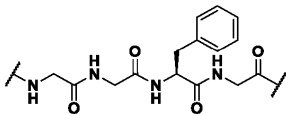
포함할 수 있다. R은 의 구조를 포함하는 모이어티를 포함할 수 있고, 여기서, *는 X 기에

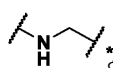
대한 부착 지점을 나타낸다. R은 의 구조를 포함하는 모이어티를 포함할 수 있고, 여기서, *는 X

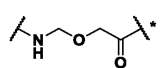
기에 대한 부착 지점을 나타낸다. R은 의 구조를 포함하는 모이어티를 포함할 수 있고, 여기서, *는 X

기에 대한 부착 지점을 나타낸다.

[0014] L은 의 구조를 포함하는 디펩티드 연결 모이어티일 수 있다. L은

의 구조를 포함하는 테트라-펩티드 연결 모이어티일 수 있다.

[0015] X는 MMAE 또는 MMAF일 수 있다. X는 엑사테칸 또는 Dxd일 수 있다. R은 의 구조를 포함하는 모이어티를 포함할 수 있고, 여기서, *는 X 기에 대한 부착 지점을 나타내고, 여기서, X는 Dxd이다. R은

의 구조를 포함하는 모이어티를 포함할 수 있고, 여기서, *는 X 기에 대한 부착 지점을 나타내고, 여기서, X는 엑사테칸이다.

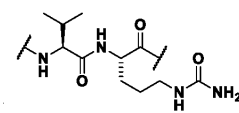
[0016] 항체는 이소타입 IgG1 또는 IgG2일 수 있다. 항체는 이소타입 IgG2b일 수 있다.

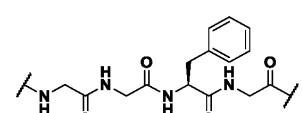
[0017] 항MUC1* 결합 도메인은 서열 번호 38 또는 44로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 약 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 서열을 포함하는 중쇄를 포함할 수 있다. 항MUC1* 결합 도메인은 서열 번호 39 또는 45로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 약 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 서열을 포함하는 중쇄 가변 도메인을 포함할 수 있다.

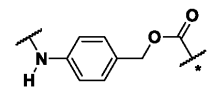
[0018] 항MUC1* 결합 도메인은 서열 번호 41 또는 47로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 약 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 서열을 포함하는 경쇄를 포함할 수 있다. 항MUC1* 결합 도메인은 서열 번호 42 또는 48로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 약 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함할 수 있다.

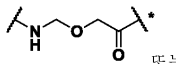
[0019] 항MUC1* 결합 도메인은 서열 번호 129 또는 130으로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 약 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 서열을 포함하는 단일 쇠 가변 단편(scFv: single-chain variable fragment)을 포함할 수 있다.

[0020] 본원에서는 항MUC1* 결합 도메인을 포함하는 항체를 포함하는 항체 접합체로서, 여기서, 항체는 말레이미드-시스테인 결합을 통해 페이로드에 접합되고, 여기서, 페이로드는 링커 및 세포독성 화합물을 포함하고, 여기서, 세포독성 화합물은 튜블린 억제제 또는 토포이소머라제 I 억제제를 포함하는 항체 접합체를 개시한다. 링커는 발린을 포함할 수 있다. 링커는 시트룰린을 포함할 수 있다. 링커는 발린 및 시트룰린을 포함할 수 있다. 링커

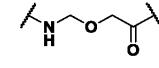
는 의 구조를 포함하는 디펩티드 연결 모이어티일 수 있다. 링커는 적어도 하나의 글리신을 포함할 수 있다. 링커는 적어도 하나의 글리신 및 페닐알라닌을 포함할 수 있다. 링커는

의 구조를 포함할 수 있다. 링커는 파라-아미노벤질을 포함할 수 있다. 링커는 구조

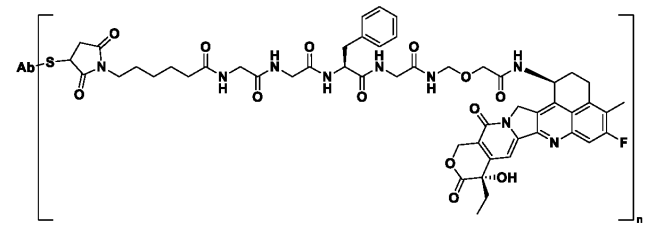
의 기를 포함할 수 있고, 여기서, *는 세포독성 기에 대한 부착 지점을 나타낸다. 링커는 구

조  또는  의 기를 포함할 수 있고, 여기서, *는 세포독성 기에 대한 부착 지점을 나타낸다. 튜블린 억제제는 MMAE 또는 MMAF일 수 있다. 토포이소머라제 I 억제제는 엑사테칸 또는 데록스테칸, 또는

그의 유도체일 수 있다. 링커는  의 구조를 포함하는 기를 포함할 수 있고, 여기서, *는 세포독성 기에

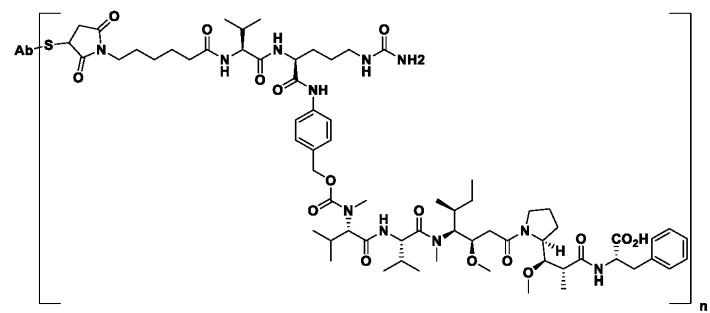
대한 부착 지점을 나타내고, 여기서, 토포이소머라제 I 억제제는 Dxd이다. 링커는  의 구조를 포함하는 기를 포함할 수 있고, 여기서, *는 세포독성 기에 대한 부착 지점을 나타내고, 여기서, 토포이소머라제 I 억제제는 엑사테칸이다.

[0021] 항체 접합체는 하기 제공되는 구조를 포함할 수 있고, 여기서, n은 1 내지 10이다:



[0022]

[0023] 항체 접합체는 하기 제공되는 구조를 포함할 수 있고, 여기서, n은 1 내지 10이다:



[0024]

[0025] 항체 이소타입은 IgG1 또는 IgG2일 수 있다. 항체 이소타입은 IgG2b일 수 있다. 항체는 적어도 2개의 페이로드에 접합될 수 있다. 항체는 적어도 3개의 페이로드에 접합될 수 있다. 항체는 적어도 4개의 페이로드에 접합될 수 있다. 항체는 적어도 5개의 페이로드에 접합될 수 있다. 항체는 적어도 6개의 페이로드에 접합될 수 있다. 항체는 적어도 7개의 페이로드에 접합될 수 있다. 항체는 적어도 8개의 페이로드에 접합될 수 있다. 항MUC1* 결합 도메인은 3개의 경쇄(LC) 상보성 결정 영역(CDR): LC-CDR1, LC-CDR2, 및 LC-CDR3을 포함할 수 있고; 여기서, MUC1* 결합 도메인의 LC-CDR1, LC-CDR2, 및 LC-CDR3은 표 1에 기재된 것으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함할 수 있고; 여기서, LC-CDR1, LC-CDR2 및 LC-CDR3 중 적어도 하나는 0-2개의 아미노산 변형(들)을 포함할 수 있다. 항MUC1* 결합 도메인은 3개의 중쇄(HC) 상보성 결정 영역(CDR): HC-CDR1, HC-CDR2, 및 HC-CDR3을 포함할 수 있고; 여기서, MUC1* 결합 도메인의 HC-CDR1, HC-CDR2, 및 HC-CDR3은 표 1에 기재된 것으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함할 수 있고; 여기서, HC-CDR1, HC-CDR2 및 HC-CDR3 중 적어도 하나는 0-2개의 아미노산 변형(들)을 포함할 수 있다. 항MUC1* 결합 도메인은 표 2에 기재된 서열과 적어도 약 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 서열을 포함하는 중쇄 가변 도메인을 포함할 수 있다. 항MUC1* 결합 도메인은 표 2에 기재된 서열과 적어도 약 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함할 수 있다. 항MUC1* 결합 도메인은 표 3에 기재된 서열과 적어도 약 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 서열을 포함하는 단일 체 가변 단편(scFv)을 포함할 수 있다.

[0026] 본원에서는 MUC1* 결합 도메인 및 CD3 결합 도메인을 포함하는 항체로서, 여기서, MUC1* 결합 도메인은 3개의 중쇄(HC) 상보성 결정 영역(CDR): MUC1* HC-CDR1, MUC1* HC-CDR2, 및 MUC1* HC-CDR3을 포함할 수 있고;

여기서, MUC1* HC-CDR1은 서열 번호 1의 아미노산 서열을 포함할 수 있고, MUC1* HC-CDR2는 서열 번호 2의 아미노산 서열을 포함할 수 있고, MUC1* HC-CDR3은 서열 번호 3의 아미노산 서열을 포함할 수 있고; 여기서, MUC1* 결합 도메인은 3개의 경쇄(LC) 상보성 결정 영역(CDR): MUC1* LC-CDR1, MUC1* LC-CDR2, 및 MUC1* LC-CDR3을 포함할 수 있고; 여기서, MUC1* LC-CDR1은 서열 번호 13의 아미노산 서열을 포함할 수 있고, MUC1* LC-CDR2는 서열 번호 14의 아미노산 서열을 포함할 수 있고, MUC1* LC-CDR3은 서열 번호 15의 아미노산 서열을 포함할 수 있고; 여기서, CD3 결합 도메인은 3개의 중쇄(HC) 상보성 결정 영역(CDR): CD3 HC-CDR1, CD3 HC-CDR2, 및 CD3 HC-CDR3을 포함할 수 있고; 여기서, CD3 결합 도메인의 CD3 HC-CDR1, CD3 HC-CDR2, 및 CD3 HC-CDR3은 표 2에 기재된 것으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함할 수 있고; 여기서, CD3 결합 도메인은 3개의 경쇄(LC) 상보성 결정 영역(CDR): CD3 LC-CDR1, CD3 LC-CDR2, 및 CD3 LC-CDR3을 포함할 수 있고; 여기서, CD3 결합 도메인의 CD3 LC-CDR1, CD3 LC-CDR2, 및 CD3 LC-CDR3은 표 4에 기재된 것으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함할 수 있는 항체를 개시한다.

[0027] 항체는 Fc 도메인을 포함할 수 있다. Fc 도메인은 이종이량체 Fc 도메인일 수 있다. 이종이량체 Fc 도메인은 노스 및 홀쇄를 포함할 수 있고, 노스-인트-홀(KiH: knob-into-hole) 구조를 형성한다. 노스쇄는 서열 번호 121, 122, 123 또는 124로부터 선택되는 서열과 적어도 약 95%의 동일성을 갖는 서열을 포함할 수 있다. 홀쇄는 서열 번호 125, 126, 127, 또는 128로부터 선택되는 서열과 적어도 약 95%의 동일성을 갖는 서열을 포함할 수 있다. MUC1* 결합 도메인은 표 2로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 약 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 서열을 포함하는 중쇄 가변 도메인을 포함할 수 있다. MUC1* 결합 도메인은 표 2로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 약 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함할 수 있다. MUC1* 결합 도메인은 표 3으로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 약 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 서열을 포함하는 단일쇄 가변 단편(scFv)을 포함할 수 있다. CD3 결합 도메인은 서열 번호 26 또는 31로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 약 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 서열을 포함하는 중쇄를 포함할 수 있다. CD3 결합 도메인은 서열 번호 29 또는 35로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 약 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 서열을 포함하는 경쇄를 포함할 수 있다. CD3 결합 도메인은 서열 번호 131 또는 132로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 약 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 서열을 포함하는 단일쇄 가변 단편(scFv)을 포함할 수 있다. 항체는 서열 번호 50, 52, 54, 58, 62, 66, 70, 74, 78, 82, 86, 90, 94, 98, 102, 106, 110, 또는 114로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 약 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 서열을 포함할 수 있다.

[0028] 본원에서는 암 치료를 필요로 하는 피험체에게 제1항 내지 제64항 중 어느 한 항의 항체를 투여하는 단계를 포함하는, 암을 치료하는 방법을 개시한다. 일부 실시양태에서, 암은 MUC1*을 발현한다. 암은 유방암, 결장암, 전립선암, 췌장암, 또는 폐암일 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0029] 도 1a-1p는 다양한 농도의 이중특이적 항체 20A10-OKT3-BiTE가 첨가된 배양물 중의, 인간 T 세포와 함께 배양된 MUC1* 양성 유방암 세포 T47D의 사진을 보여주는 것이다. 20A10은 인간화 항-MUC1* 항체이고, OKT3은 인간 T 세포에 존재하는 CD3에 결합하는 항체이다. 도면에서 알 수 있는 바와 같이, 이중특이적 항체 첨가는 여기서, T 세포 CD3과 암 세포 MUC1* 사이의 이중특이적 브릿지에 의해 지시되는 활성화 신호인 T 세포 클러스터링으로 보여지는 T 세포와 암 세포의 연결을 매개한다. 도 1a에서, 이중특이적 항체의 농도는 1,000 ng/mL이다. 도 1b에서, 농도는 333 ng/mL이다. 도 1c에서, 농도는 111 ng/mL이다. 도 1d에서, 농도는 37 ng/mL이다. 도 1e에서, 농도는 12.3 ng/mL이다. 도 1f에서, 농도는 4.1 ng/mL이다. 도 1g에서, 농도는 1.3 ng/mL이다. 도 1h에서, 농도는 0.4 ng/mL이다. 도 1i에서, 농도는 0.15 ng/mL이다. 도 1j에서, 농도는 0.05 ng/mL이다. 도 1k는 T 세포 및 암 세포, 둘 모두 존재하지만, 이중특이적 항체는 첨가되지 않은 대조군 웰이다. 도 1l은 오직 암 세포만이 존재하는 대조군 웰이다. 도 1m은 LDH 세포독성 측정법이 작동하는 방식을 도시한 카툰을 보여주는 것으로, 여기서, A490에서의 더 높은 측정값은 더 높은 세포 사멸을 나타낸다. 도 1n은 20A10-OKT3, 항MUC1*/항CD3 이중특이적 항체의 농도의 함수로서의 세포 사멸 그래프를 보여주는 것이다. 도 1o는 첨가된 항MUC1*/항CD3 이중특이적 항체의 함수로서 T 세포에 의해 분비되는, 분비된 인터페론-감마의 그래프를 보여주는 것으로, 여기서, 항

MUC1* 항체는 20A10이고, 항CD3 항체는 OKT3이다. 도 1p는 첨가된 항MUC1*/항CD3 이중특이적 항체의 함수로서 T 세포에 의해 분비되는, 분비된 TNF-알파의 그래프를 보여주는 것으로, 여기서, 항MUC1* 항체는 20A10이고, 항CD3 항체는 OKT3이다.

도 2a-2p는 다양한 농도의 이중특이적 항체 20A10-12F6-BiTE가 첨가된 배양물 중의, 인간 T 세포와 함께 배양된 MUC1* 양성 유방암 세포, T47D의 사진을 보여주는 것이다. 20A10은 인간화 항MUC1* 항체이고, 12F6은 인간 T 세포에 존재하는 CD3에 결합하는 항체이다. 도면에서 알 수 있는 바와 같이, 이중특이적 항체 첨가는 여기서, T 세포 CD3과 암 세포 MUC1* 사이의 이중특이적 브릿지에 의해 지시되는 활성화 신호인 T 세포 클러스터링으로 보여지는 T 세포와 암 세포의 연결을 매개한다. 도 2a에서, 이중특이적 항체의 농도는 1,000 ng/mL이다. 도 2b에서, 농도는 333 ng/mL이다. 도 2c에서, 농도는 111 ng/mL이다. 도 2d에서, 농도는 37 ng/mL이다. 도 2e에서, 농도는 12.3 ng/mL이다. 도 2f에서, 농도는 4.1 ng/mL이다. 도 2g에서, 농도는 1.3 ng/mL이다. 도 2h에서, 농도는 0.4 ng/mL이다. 도 2i에서, 농도는 0.15 ng/mL이다. 도 2j에서, 농도는 0.05 ng/mL이다. 도 2k는 T 세포 및 암 세포, 둘 모두 존재하지만, 이중특이적 항체는 첨가되지 않은 대조군 웰이다. 도 2l은 오직 암 세포만이 존재하는 대조군 웰이다. 도 2m은 LDH 세포독성 검정법이 작동하는 방식을 도시한 카툰을 보여주는 것으로, 여기서, A490에서의 더 높은 측정값은 더 높은 세포 사멸을 나타낸다. 도 2n은 20A10-OKT3, 항MUC1*/항CD3 이중특이적 항체의 농도의 함수로서의 세포 사멸 그래프를 보여주는 것이다. 도 2o는 첨가된 항MUC1*/항CD3 이중특이적 항체의 함수로서 T 세포에 의해 분비되는, 분비된 인터페론-감마의 그래프를 보여주는 것으로, 여기서, 항MUC1* 항체는 20A10이고, 항CD3 항체는 12F6이다. 도 2p는 첨가된 항MUC1*/항CD3 이중특이적 항체의 함수로서 T 세포에 의해 분비되는, 분비된 TNF-알파의 그래프를 보여주는 것으로, 여기서, 항MUC1* 항체는 20A10이고, 항CD3 항체는 12F6이다.

도 3a-3l은 다양한 농도의 이중특이적 항체 20A10-OKT3-BiTE가 첨가된 배양물 중의, 인간 T 세포와 함께 배양된 HCT-MUC1* 형질도입된 암 세포의 사진을 보여주는 것이다. 20A10은 인간화 항MUC1* 항체이고, OKT3은 인간 T 세포에 존재하는 CD3에 결합하는 항체이다. 도면에서 알 수 있는 바와 같이, 이중특이적 항체 첨가는 여기서, 세포 클러스터링으로 보여지는 T 세포와 암 세포의 연결을 매개한다. 도 3a에서, 이중특이적 항체의 농도는 1,000 ng/mL이다. 도 3b에서, 농도는 333 ng/mL이다. 도 3c에서, 농도는 111 ng/mL이다. 도 3d에서, 농도는 37 ng/mL이다. 도 3e에서, 농도는 12.3 ng/mL이다. 도 3f에서, 농도는 4.1 ng/mL이다. 도 3g에서, 농도는 1.3 ng/mL이다. 도 3h에서, 농도는 0.4 ng/mL이다. 도 3i에서, 농도는 0.15 ng/mL이다. 도 3j에서, 농도는 0.05 ng/mL이다. 도 3k는 T 세포 및 암 세포, 둘 모두 존재하지만, 이중특이적 항체는 첨가되지 않은 대조군 웰이다. 도 3l은 오직 암 세포만이 존재하는 대조군 웰이다.

도 4a-4l은 다양한 농도의 이중특이적 항체 20A10-12F6-BiTE가 첨가된 배양물 중의, 인간 T 세포와 함께 배양된 HCT-MUC1* 형질도입된 암 세포의 사진을 보여주는 것이다. 20A10은 인간화 항MUC1* 항체이고, 12F6은 인간 T 세포에 존재하는 CD3에 결합하는 항체이다. 도면에서 알 수 있는 바와 같이, 이중특이적 항체 첨가는 여기서, 세포 클러스터링으로 보여지는 T 세포와 암 세포의 연결을 매개한다. 도 4a에서, 이중특이적 항체의 농도는 1,000 ng/mL이다. 도 4b에서 농도는 333 ng/mL이다. 도 4c에서 농도는 111 ng/mL이다. 도 4d에서 농도는 37 ng/mL이다. 도 4e에서 농도는 12.3 ng/mL이다. 도 4f에서 농도는 4.1 ng/mL이다. 도 4g에서 농도는 1.3 ng/mL이다. 도 4h에서 농도는 0.4 ng/mL이다. 도 4i에서 농도는 0.15 ng/mL이다. 도 4j에서 농도는 0.05 ng/mL이다. 도 4k는 T 세포 및 암 세포, 둘 모두 존재하지만, 이중특이적 항체는 첨가되지 않은 대조군 웰이다. 도 4l은 이중특이적 항체가 암 세포에 첨가되었지만, T 세포는 존재하지 않는 대조군 웰이다.

도 5a-5f는 MUC1 및 MUC1*에 대해 음성인 HCT-WT 암 세포의 사진을 보여주는 것이다. 암 세포를 MNC2-ADC와 함께 72시간 동안 인큐베이션시켰다. 이러한 구체적인 경우에서, 독성 MMAE(모노메틸 아우리스타틴)를, MUC1*에 결합하는 테글리코실화된 MNC2에 공유적으로 커플링시켰다. 도면에서 알 수 있는 바와 같이, MNC2-ADC를 첨가해도 이러한 HCT, MUC1 음성 세포의 생존능에는 어떤 영향도 미치지 않았다. 도 5a에서, MNC2-ADC의 농도는 100 nM이다. 도 5b에서, MNC2-ADC의 농도는 10 nM이다. 도 5c에서, MNC2-ADC의 농도는 0.1 nM이다. 도 5d에서, MNC2-ADC의 농도는 0.01 nM이다. 도 5e에서, MNC2-ADC의 농도는 0.001 nM이다. 도 5f에서, MNC2-ADC의 농도는 0 nM이다.

도 6a-6g는 HCT-MUC1* 암 세포의 사진을 보여주는 것이다. 상기 HCT 세포는 항체 MNC2의 표적인 MUC1*을 발현하도록 형질도입시켰다. 암 세포를 72시간 동안 MNC2-ADC와 함께 인큐베이션시켰다. 이러한 구체적인 경우에서, 독성 MMAE(모노메틸 아우리스타틴)는 MUC1*에 결합하는 테글리코실화된 MNC2에 공유적으로 커플링시켰다. 도면에서 알 수 있는 바와 같이, 본원에서 시험된 최고 농도인 100 nM의 MNC2-ADC를 첨가하였을 때, 세포 사멸의 지표인 세포 클럼핑이 유도되었다. 도 6a에서, MNC2-ADC의 농도는 100 nM이다. 도 6b에서, MNC2-ADC의 농도는 10

nM이다. 도 6c에서, MNC2-ADC의 농도는 1.0 nM이다. 도 6d에서, MNC2-ADC의 농도는 0.1 nM이다. 도 6e에서, MNC2-ADC의 농도는 0.01 nM이다. 도 6f에서, MNC2-ADC의 농도는 0.001 nM이다. 도 6g에서, MNC2-ADC의 농도는 0 nM이다.

도 7a-7g는 MUC1 및 MUC1*에 대해 음성인 K562-WT 세포의 사진을 보여주는 것이다. 세포를 72시간 동안 MNC2-ADC와 함께 인큐베이션시켰다. 이러한 구체적인 경우에서, 독성 MMAE(모노메틸 아우리스타틴)는 MUC1*에 결합하는 테글리코실화된 MNC2에 공유적으로 커플링시켰다. 도면에서 알 수 있는 바와 같이, MNC2-ADC를 첨가해도 상기 MUC1 음성 세포의 생존능에는 어떤 영향도 미치지 않았다. 도 7a에서, MNC2-ADC의 농도는 100 nM이다. 도 7b에서, MNC2-ADC의 농도는 10 nM이다. 도 7c에서, MNC2-ADC의 농도는 1.0 nM이다. 도 7d에서, MNC2-ADC의 농도는 0.1 nM이다. 도 7e에서, MNC2-ADC의 농도는 0.01 nM이다. 도 7f에서, MNC2-ADC의 농도는 0.001 nM이다. 도 7g에서, MNC2-ADC의 농도는 0 nM이다.

도 8a-8g는 K562-MUC1* 세포의 사진을 보여주는 것이다. 상기 MUC1* 음성 세포는 MUC1*을 발현하도록 형질도입시켰다. 세포를 72시간 동안 MNC2-ADC와 함께 인큐베이션시켰다. 이러한 구체적인 경우에서, 독성 MMAE(모노메틸 아우리스타틴)는 MUC1*에 결합하는 테글리코실화된 MNC2에 공유적으로 커플링시켰다. 도면에서 알 수 있는 바와 같이, 본원에서 시험된 더 높은 농도인 10 nM 및 100 nM의 MNC2-ADC를 첨가하였을 때, 세포 사멸의 지표인 세포 클럼핑이 유도되었다. 도 8a에서, MNC2-ADC의 농도는 100 nM이다. 도 8b에서, MNC2-ADC의 농도는 10 nM이다. 도 8c에서, MNC2-ADC의 농도는 1.0 nM이다. 도 8d에서, MNC2-ADC의 농도는 0.1 nM이다. 도 8e에서, MNC2-ADC의 농도는 0.01 nM이다. 도 8f에서, MNC2-ADC의 농도는 0.001 nM이다. 도 8g에서, MNC2-ADC의 농도는 0 nM이다.

도 9a-9b는 세포 생존능 검정법의 그래프를 보여주는 것으로, 여기서, 프레스토블루(PrestoBlue)를 사용하여 세포 사멸을 측정하였다. 본 그래프는 K562-WT 세포 대 K562-MUC1* 세포에 대해 MNC2-ADC가 미치는 효과를 비교하는, MNC2-ADC 농도의 함수로서의 세포 생존능을 보여주는 것이다. 알 수 있는 바와 같이, MNC2-ADC 항체는 10 nM 및 100 nM 농도에서 MUC1* 발현 세포에서만 사멸을 유도하였다. 도 9b는 HCT-WT 세포 대 HCT-MUC1* 세포에 대해 MNC2-ADC가 미치는 효과를 비교하는, MNC2-ADC 농도의 함수로서의 세포 생존능을 보여주는 것이다. 알 수 있는 바와 같이, MNC2-ADC 항체는 고농도에서 MUC1* 발현 세포에서만 사멸을 유도하였다.

도 10a-10g는 MNC2가 결합하지 않는 전장 MUC1, 및 MNC2가 결합하는 MUC1*, 둘 모두를 발현하는 T47D-WT 유방암 세포의 그래프를 보여주는 것이다. 세포를 72시간 동안 MNC2-ADC와 함께 인큐베이션시켰다. 이러한 구체적인 경우에서, 독성 MMAE(모노메틸 아우리스타틴)는 MUC1*에 결합하는 테글리코실화된 MNC2에 공유적으로 커플링시켰다. 도 10a에서, MNC2-ADC의 농도는 100 nM이다. 도 10b에서, MNC2-ADC의 농도는 10 nM이다. 도 10c에서, MNC2-ADC의 농도는 1.0 nM이다. 도 10d에서, MNC2-ADC의 농도는 0.1 nM이다. 도 10e에서, MNC2-ADC의 농도는 0.01 nM이다. 도 10f에서, MNC2-ADC의 농도는 0.001 nM이다. 도 10g에서, MNC2-ADC의 농도는 0 nM이다.

도 11a-11g는 더욱더 많은 MUC1*을 발현하도록 형질도입된 T47D-MUC1* 세포의 사진을 보여주는 것이다. 세포를 72시간 동안 MNC2-ADC와 함께 인큐베이션시켰다. 이러한 구체적인 경우에서, 독성 MMAE(모노메틸 아우리스타틴)는 MUC1*에 결합하는 테글리코실화된 MNC2에 공유적으로 커플링시켰다. 도면에서 알 수 있는 바와 같이, 본원에서 시험된 더 높은 농도인 10 nM 및 100 nM의 MNC2-ADC를 첨가하였을 때, 세포 사멸의 지표인 세포 클럼핑이 유도되었다. 도 11a에서, MNC2-ADC의 농도는 100 nM이다. 도 11b에서, MNC2-ADC의 농도는 10 nM이다. 도 11c에서, MNC2-ADC의 농도는 1.0 nM이다. 도 11d에서, MNC2-ADC의 농도는 0.1 nM이다. 도 11e에서, MNC2-ADC의 농도는 0.01 nM이다. 도 11f에서, MNC2-ADC의 농도는 0.001 nM이다. 도 11g에서, MNC2-ADC의 농도는 0 nM이다. 도 12는 세포 생존능 검정법의 그래프를 보여주는 것으로, 여기서, 프레스토블루를 사용하여 죽은 세포를 검출하였다. 본 그래프는 T47D-WT 세포 대 T47D-MUC1* 세포에 대해 MNC2-ADC가 미치는 효과를 비교하는, MNC2-ADC 농도의 함수로서의 세포 생존능을 보여주는 것이다. 알 수 있는 바와 같이, MNC2-ADC 항체는 10 nM 및 100 nM 농도에서 MUC1* 발현 세포의 사멸을 유도하였다.

도 12는 세포 생존능 검정법의 그래프를 보여주는 것으로, 여기서, 프레스토블루를 사용하여 세포 사멸을 측정하였다. 본 그래프는 T47D-WT 세포 대 T47D-MUC1* 세포에 대해 MNC2-ADC가 미치는 효과를 비교하는, MNC2-ADC 농도의 함수로서의 세포 생존능을 보여주는 것이다. 알 수 있는 바와 같이, MNC2-ADC 항체는 10 nM 및 100 nM 농도에서 MUC1* 발현 세포의 사멸을 유도하였다.

도 13a-13j는 MNC2가 결합하지 않는 전장 MUC1, 및 MNC2가 결합하는 MUC1*, 둘 모두를 발현하는 T47D-WT 유방암 세포의 그래프를 보여주는 것이다. 세포를 72시간 동안 MNC2-ADC와 함께 인큐베이션시켰다. 이러한 구체적인 경우에서, 독성 MMAE(모노메틸 아우리스타틴)는 MUC1*에 결합하는 테글리코실화된 MNC2에 공유적으로 커플링시켰다.

켰다. 알 수 있는 바와 같이, MNC2-ADC 항체는 MNC2-ADC의 최고 농도인 1000 nM에서 T47D-WT 세포의 사멸을 유도하였다. 도 13a에서, MNC2-ADC의 농도는 0 nM이다. 도 13b에서, MNC2-ADC의 농도는 0.1 nM이다. 도 13c에서, MNC2-ADC의 농도는 0.39 nM이다. 도 13d에서, MNC2-ADC의 농도는 1.0 nM이다. 도 13e에서, MNC2-ADC의 농도는 3.9 nM이다. 도 13f에서, MNC2-ADC의 농도는 10 nM이다. 도 13g에서, MNC2-ADC의 농도는 39 nM이다. 도 13h에서, MNC2-ADC의 농도는 100 nM이다. 도 13i에서, MNC2-ADC의 농도는 393 nM이다. 도 13j에서, MNC2-ADC의 농도는 1000 nM이다.

도 14a-14j는 더욱더 많은 MUC1*을 발현하도록 형질도입된 T47D-MUC1* 세포의 사진을 보여주는 것이다. 세포를 72시간 동안 MNC2-ADC와 함께 인큐베이션시켰다. 이러한 구체적인 경우에서, 독성 MMAE(모노메틸 아우리스타틴)는 MUC1*에 결합하는 테글리코실화된 MNC2에 공유적으로 커플링시켰다. 도면에서 알 수 있는 바와 같이, 본원에서 시험된 더 높은 농도인 10 nM, 39 nM, 100 nM, 393 nM 및 1000 nM의 MNC2-ADC를 첨가하였을 때, 세포 사멸의 지표인 세포 클럼핑이 유도되었다. 도 14a에서, MNC2-ADC의 농도는 0 nM이다. 도 14b에서, MNC2-ADC의 농도는 0.1 nM이다. 도 14c에서, MNC2-ADC의 농도는 0.39 nM이다. 도 14d에서, MNC2-ADC의 농도는 1.0 nM이다. 도 14e에서, MNC2-ADC의 농도는 3.9 nM이다. 도 14f에서, MNC2-ADC의 농도는 10 nM이다. 도 14g에서, MNC2-ADC의 농도는 39 nM이다. 도 14h에서, MNC2-ADC의 농도는 100 nM이다. 도 14i에서, MNC2-ADC의 농도는 393 nM이다. 도 14j에서, MNC2-ADC의 농도는 1000 nM이다.

도 15a-15b는 세포 생존능 측정법의 그래프를 보여주는 것으로, 여기서, 프레스토블루를 사용하여 세포 사멸을 측정하였다. 본 그래프는 T47D-WT 세포 대 T47D-MUC1* 세포에 대해 MNC2-ADC가 미치는 효과를 비교하는, MNC2-ADC 농도의 함수로서의 세포 생존능을 보여주는 것이다. 알 수 있는 바와 같이, MNC2-ADC 항체는 최고 농도인 1000 nM의 MNC2-ADC에서 T47D-WT 세포의 사멸을 유도한 반면, T47D-MUC1* 세포는 10 nM, 39 nM, 100 nM, 393 nM 및 1000 nM 농도에서 사멸되었다.

도 16a-16f는 다양한 농도 범위에서 MNC2-ADC가 첨가된 암 세포의 확대 사진을 보여주는 것이다. 여기서, 항체에 접합된 독소는 MMAE이다. 도 16a는 MNC2-ADC를 500 ng/mL에서 0.1 ng/mL의 농도 범위로 첨가한 유방암 세포 T47D 야생형의 사진을 보여주는 것이다. 대조군으로 MNC2-ADC를 첨가하지 않았다. 사진은 MNC2-ADC를 암 세포에 첨가한 후 72시간 후에 촬영하였다. 도 16b는 MNC2-ADC를 500 ng/mL에서 0.1 ng/mL의 농도 범위로 첨가한 유방암 세포 T47D-MUC1*(이는 세포가 자연적으로 발현하는 것보다 더욱더 많은 MUC1*로 안정적으로 형질감염되었다는 것을 의미)의 사진을 보여주는 것이다. 대조군으로 MNC2-ADC를 첨가하지 않았다. 사진은 MNC2-ADC를 암 세포에 첨가한 후 72시간 후에 촬영하였다. 도 16c는 MNC2-ADC를 500 ng/mL 내지 0.1 ng/mL의 농도 범위로 첨가한 유방암 세포 T47D 야생형의 사진을 보여주는 것이다. 대조군으로 MNC2-ADC를 첨가하지 않았다. 이러한 경우, 16시간 후에 MNC2-ADC를 제거하고, 배지를 교체하였다. 사진은 MNC2-ADC를 암 세포에 처음 첨가한 후 72시간 후에 촬영하였다. 도 16d는 MNC2-ADC를 500 ng/mL에서 0.1 ng/mL의 농도 범위로 첨가한 유방암 세포 T47D-MUC1*(이는 세포가 자연적으로 발현하는 것보다 더욱더 많은 MUC1*로 안정적으로 형질감염되었다는 것을 의미)의 사진을 보여주는 것이다. 대조군으로 MNC2-ADC를 첨가하지 않았다. 이러한 경우, 16시간 후에 MNC2-ADC를 제거하고, 배지를 교체하였다. 사진은 MNC2-ADC를 암 세포에 처음 첨가한 후 72시간 후에 촬영하였다. 도 16e는 72시간 동안 1 μ M 탁솔을 첨가한 T47D-wt 세포의 확대 사진을 보여주는 것이다. 도 16f는 72시간 동안 1 μ M 탁솔을 첨가한 T47D-MUC1* 세포의 확대 사진을 보여주는 것이다.

도 17은 72시간 또는 16시간 동안 세포 배양 배지에 첨가된 MNC2-ADC MMAE의 농도의 함수로서의 암 세포 사멸 그래프를 보여주는 것이다. 후자의 경우, 배지를 16시간 후에 MNC2-ADC를 포함하지 않는 배지로 교체하고, 암 세포에 MNC2-ADC를 처음 첨가한 후 72시간째까지 실험을 계속할 수 있다. 세포 생존능은 프레스토블루를 사용하여 측정한다. 세포 사멸은 최종 농도 1 μ M로 첨가된 탁솔에 대해 정규화되는 반면, 72시간째의 생존가능한 세포의 비율(%)은 0% 생존율(%)에 대해 정규화된다.

도 18a-18f는 다양한 농도 범위에서 20A10-ADC가 첨가된 암 세포의 확대 사진을 보여주는 것이다. 여기서, 항체에 접합된 독소는 MMAE이다. 도 18a는 20A10-ADC를 500 ng/mL에서 0.1 ng/mL의 농도 범위로 첨가한 유방암 세포 T47D 야생형의 사진을 보여주는 것이다. 대조군으로 20A10-ADC를 첨가하지 않았다. 사진은 20A10-ADC를 암 세포에 첨가한 후 72시간 후에 촬영하였다. 도 18b는 20A10-ADC를 500 ng/mL에서 0.1 ng/mL의 농도 범위로 첨가한 유방암 세포 T47D-MUC1*(이는 세포가 자연적으로 발현하는 것보다 더욱더 많은 MUC1*로 안정적으로 형질감염되었다는 것을 의미)의 사진을 보여주는 것이다. 대조군으로 20A10-ADC를 첨가하지 않았다. 사진은 20A10-ADC를 암 세포에 첨가한 후 72시간 후에 촬영하였다. 도 18c는 20A10-ADC를 500 ng/mL 내지 0.1 ng/mL의 농도 범위로 첨가한 유방암 세포 T47D 야생형의 사진을 보여주는 것이다. 대조군으로 20A10-ADC를 첨가하지 않았다. 이러한 경우, 16시간 후에 20A10-ADC를 제거하고, 배지를 교체하였다. 사진은 20A10-ADC를 암 세포에 처음 첨가한

후 72시간 후에 촬영하였다. 도 18d는 20A10-ADC를 500 ng/mL에서 0.1 ng/mL의 농도 범위로 첨가한 유방암 세포 T47D-MUC1*(이는 세포가 자연적으로 발현하는 것보다 더욱더 많은 MUC1*로 안정적으로 형질감염되었다는 것을 의미)의 사진을 보여주는 것이다. 대조군으로 20A10-ADC를 첨가하지 않았다. 이러한 경우, 16시간 후에 20A10-ADC를 제거하고, 배지를 교체하였다. 사진은 20A10-ADC를 암 세포에 처음 첨가한 후 72시간 후에 촬영하였다. 도 18e는 72시간 동안 1 μ M 탁솔을 첨가한 T47D-wt 세포의 확대 사진을 보여주는 것이다. 도 18f는 72시간 동안 1 μ M 탁솔을 첨가한 T47D-MUC1* 세포의 확대 사진을 보여주는 것이다.

도 19는 72시간 또는 16시간 동안 세포 배양 배지에 첨가된 20A10-ADC MMAE의 농도의 함수로서의 암 세포 사멸 그래프를 보여주는 것이다. 후자의 경우, 배지를 16시간 후에 20A10-ADC를 포함하지 않는 배지로 교체하고, 암 세포에 20A10-ADC를 처음 첨가한 후 72시간째까지 실험을 계속할 수 있다. 세포 생존능은 프레스토블루를 사용하여 측정한다. 세포 사멸은 최종 농도 1 μ M로 첨가된 탁솔에 대해 정규화되는 반면, 72시간째의 생존가능한 세포의 비율(%)은 0% 생존율(%)에 대해 정규화된다.

도 20a-20b는 IC50을 측정하기 위한 피팅된 데이터 그래프 및 표 형식의 데이터를 보여주는 것이다. 도 20a는 MNC2-ADC 또는 20A10-ADC에 의해 매개되는 암 세포 사멸의 IC50 피팅된 데이터 그래프를 보여주는 것이며, 여기서, 암 세포는 T47D-wt 또는 T47D-MUC1*이고, ADC는 표적 암 세포와 함께 16시간 또는 72시간 동안 인큐베이션된다. 도 20b는 각 세포 타입 및 인큐베이션 조건에 대한 각 ADC에 대한 IC50을 열거한 표를 보여주는 것이다.

도 21a-21c는 MN20A10-OKT3 농 인 홀 포맷을 보여주는 것이다. 도 21a는 다양한 농도의 이중특이적 항체 20A10-OKT3-BiTE가 첨가된 배양물 중의, 인간 T 세포와 함께 배양된 MUC1* 양성 유방암 세포의 사진을 보여주는 것이다. 20A10은 인간화 항MUC1* 항체이고, OKT3은 인간 T 세포에 존재하는 CD3에 결합하는 항체이다. 도면에서 알 수 있는 바와 같이, 이중특이적 항체 첨가는 여기서 T 세포 CD3과 암 세포 MUC1* 사이의 이중특이적 브릿지에 의해 지시되는 활성화 신호인 T 세포 클러스터링으로 보여지는 T 세포와 암 세포의 연결을 매개한다. 도 21b는 첨가된 항MUC1*/항CD3 이중특이적 항체의 함수로서 T 세포에 의해 분비되는, 분비된 인터페론-감마의 그래프를 보여주는 것으로, 여기서, 항MUC1* 항체는 20A10이고, 항CD3 항체는 OKT3이다. 도 21c는 20A10-OKT3, 항MUC1*/항CD3 이중특이적 항체의 농도의 함수로서의 세포 사멸 그래프를 보여주는 것이다.

도 22a-22h는 다양한 이중특이적 포맷의 MN20A10-OKT3 또는 MN20A10-12F6을 보여주는 것이다. 본 도면은 상이한 포맷의 이중특이적 항체에 의한 T47D-wt 또는 T47D-MUC1*의 사멸 곡선을 보여주는 것이다. 도 22b는 12F6-MN20A10 이중특이적인 것의 존재하의 T 세포 매개 암 세포 사멸의 그래프를 보여주는 것이다. 도 22a는 도 22b에서 사용된 12F6-MN20A10N 이중특이적 포맷의 카툰이다. 도 22d는 MN20A10-12F6 KiH 이중특이적인 것의 존재하의 T 세포 매개 암 세포 사멸의 그래프를 보여주는 것이다. 도 22c는 도 22d에서 사용된 KiH 이중특이적 포맷의 카툰이다. 도 22f는 OKT3-MN20A10 이중특이적인 것의 존재하의 T 세포 매개 암 세포 사멸의 그래프를 보여주는 것이다. 도 22e는 도 22f에서 사용된 OKT3-MN20A10 이중특이적 포맷의 카툰이다. 도 22h는 MN20A10-12F6 화학적으로 커플링된 이중특이적인 것의 존재하의 T 세포 매개 암 세포 사멸의 그래프를 보여주는 것이다. 도 22g는 도 22h에서 사용된 MN20A10-12F6 이중특이적 포맷의 카툰이다.

도 23은 다양한 이중특이적 포맷의 MN20A10-OKT3 또는 MN20A10-12F6의 IC50을 보여주는 것이다.

도 24는 다양한 이중특이적 포맷의 MN20A10-OKT3 또는 MN20A10-12F6의 IC50을 보여주는 것이다.

도 25a-25b는 항-MUC1* 항체 MNC2로 염색된 인간 암 세포의 확대 사진을 보여주는 것으로, 여기서, 세포의 핵은 DAPI로 청색으로 염색되고, MNC2 항체는 적색으로 형광을 낸다. 도 25a는 시점 0에서 항체가 세포 표면에 부착되었음을 보여주는 것이다. 도 25b는 45분 후에 항체가 내재화되어 세포질 전역에서 관찰된다는 것을 보여주는 것이다. 항체 내재화는 ADC가 작동하기 위해 요구된다.

도 26은 항체에 접합되어 ADC로도 공지된 항체-약물-접합체를 형성할 수 있는 독성 페이로드 MMAE를 포함하는 화학적 엔티티의 화학 구조를 보여주는 것이다. MC는 항체 상의 시스테인에의 커플링을 촉진시키는 말레이미도 카프로일(MC) 부분을 나타낸다. VC는 발린-시트룰린(VC) 부분을 나타내고, PAB는 파라-아미노벤질(PAB) 부분을 나타내며, 둘 모두 리소솜 효소인 카텡신 B에 의한 암 세포 내부의 효소적 절단을 촉진시킨다. MMAE는 튜불린의 중합화를 차단하여 세포 분열을 억제하는 독성 페이로드이자, 세포 내재화 및/또는 비독성 부분의 절단 이후 독성 페이로드인 모노메틸 아우리스타틴 E(MMAE) 부분을 나타낸다.

도 27은 항체에 접합되어 ADC로도 공지된 항체-약물-접합체를 형성할 수 있는 독성 페이로드 MMAF를 포함하는 화학적 엔티티의 화학 구조를 보여주는 것이다. MC는 항체 상의 시스테인에의 커플링을 촉진시키는 말레이미도 카프로일(MC) 부분을 나타낸다. VC는 발린-시트룰린(VC) 부분을 나타내고, PAB는 파라-아미노벤질(PAB) 부분을

나타내며, 둘 모두 리소솜 효소인 카텡신 B에 의한 암 세포 내부의 독성 페이로드의 효소적 절단을 촉진시킨다. MMAE는 세포 내재화 및/또는 비독성 부분의 절단 이후 독성 페이로드인 모노메틸 아우리스타틴 E(MMAF) 부분을 나타낸다. MMAF 페이로드는 카복실산을 함유하는데, 이는 불가능하지 않다면, 페이로드가 항체로부터 절단된 후, 세포막을 빠져나가는 것을 어렵게 만든다.

도 28은 항체에 접합될 준비가 된 테루스테칸으로 명명되는 반응성 구성에 도입된 엑사테칸 유도체 Dxd의 화학 구조를 보여주는 것이다. MC는 항체 상의 시스테인에의 커플링을 촉진시키는 말레이미도카프로일(MC) 부분을 나타낸다. GGFG는 가요성 링커를 제공하는 글리신-글리신-페닐알라닌-글리신(GGFG) 부분을 나타낸다. 커플러는 에테르-디아마이드 커플러를 통해 링커와 페이로드를 연결하는 커플러(HN-CH₂-O-CH₂-CO) 부분을 나타낸다. 엑사테칸은 세포 내재화 및/또는 비독성 부분의 절단 이후 독성 페이로드인 Dxd 부분을 나타낸다.

도 29는 항체에의 접합을 촉진시키는 상이한 화학적 엔티티에 도입된 엑사테칸 유도체의 화학 구조를 보여주는 것이다. MC는 항체 상의 시스테인에의 커플링을 촉진시키는 말레이미도카프로일(MC) 부분을 나타낸다. VC는 발린-시트룰린(VC) 부분을 나타내고, PAB는 파라아미노벤질(PAB)을 나타내며, 둘 모두 리소솜 효소인 카텡신 B에 의한 암 세포 내부의 독성 페이로드의 효소적 절단을 촉진시킨다. 엑사테칸은 세포 내재화 및/또는 비독성 부분의 절단 이후 독성 페이로드인 엑사테칸 부분을 나타낸다.

도 30은 MMAE에 커플링된 MNC2의 소수성 상호작용 크로마토그래피(HIC: : Hydrophobic interaction chromatography) 크로마토그램을 보여주는 것이다. MNC2와 같은 IgG1 항체는 유리 티올을 통해 독소 또는 프로토신에 접합될 수 있는 유리 티올을 갖는 최대 여덟(8) 개의 시스테인을 가진다. 따라서, 각 항체에 최대 여덟(8) 개의 독소 또는 페이로드가 부착될 수 있다. MNC2의 HIC 크로마토그램 분석 결과 평균 약물-항체-비(DAR: drug-antibody ratio)는 4.10이었다.

도 31은 MMAE에 커플링된 MNC2의 소수성 상호작용 크로마토그래피(HIC) 크로마토그램을 보여주는 것이다. MNC2-MMAE의 평균 DAR은 3.65로 결정되었다.

도 32a-32b는 테루스테칸 또는 엑사테칸에 커플링된 MNC2의 소수성 상호작용 크로마토그래피(HIC) 크로마토그램을 보여주는 것이다. **도 32a** **32b**는 테루스테칸에 커플링된 MNC2의 소수성 상호작용 크로마토그래피(HIC) 크로마토그램을 보여주는 것이다. MNC2-테루스테칸의 DAR은 7.7로 결정되었다. **도 32b**는 엑사테칸에 커플링된 MNC2의 소수성 상호작용 크로마토그래피(HIC) 크로마토그램을 보여주는 것이다. MNC2-엑사테칸의 DAR은 8.2로 결정되었다.

도 33은 MMAE에 커플링된 MN20A10의 소수성 상호작용 크로마토그래피(HIC) 크로마토그램을 보여주는 것이다. MN20A10-MMAE의 평균 DAR은 2.96이었다.

도 34는 MMAE에 커플링된 MN20A10의 소수성 상호작용 크로마토그래피(HIC) 크로마토그램을 보여주는 것이다. MN20A10-MMAE에 대한 평균 DAR은 3.79였다.

도 35는 테루스테칸에 커플링된 MN20A10의 소수성 상호작용 크로마토그래피(HIC) 크로마토그램을 보여주는 것이다. MN20A10-테루스테칸에 대한 평균 DAR은 4.6이다.

도 36a-36d는 MMAE 커플링 이전, 이어서, 그 이후 MNC2가 암 세포를 인식하는 능력을 측정하는 유세포 분석법 그래프를 보여주는 것이다. **도 36a**는 MMAE에의 접합 이전 및 접합 이후 MNC2에 의해 인식되는 T47D 유방암 세포의 비율(%)을 보여주는 것이다. **도 36b**는 MMAE에의 접합 이후에 MNC2에 의해 인식되는 T47D 유방암 세포의 비율(%)을 보여주는 것이다. **도 36c**는 MMAE에의 접합 이전 및 접합 이후 MNC2에 의해 인식되는 HCT-116, MUC1 음성 세포의 비율(%)을 보여주는 것이다. **도 36d**는 MMAE에의 접합 이후에 MNC2에 의해 인식되는 NCI-H1975 폐암 세포의 비율(%)을 보여주는 것이다.

도 37a-37d는 MMAE 커플링 이전, 이어서, 그 이후 MN20A10이 암 세포를 인식하는 능력을 측정하는 유세포 분석법 그래프를 보여주는 것이다. **도 37a**는 MMAE에의 접합 이전 및 접합 이후 MN20A10에 의해 인식되는 T47D 유방암 세포의 비율(%)을 보여주는 것이다. **도 37b**는 MMAE에의 접합 이후에 MN20A10에 의해 인식되는 T47D 유방암 세포의 비율(%)을 보여주는 것이다. **도 37c**는 MN20A10에의 접합 이전 MNC2에 의해 인식되는 HCT-116, MUC1 음성 암 세포의 비율(%)을 보여주는 것이다. **도 37d**는 MMAE에의 접합 이후에 MN20A10에 의해 인식되는 NCI-H1975 폐암 세포의 비율(%)을 보여주는 것이다.

도 38a-38f는 플레이트 리더 검정법의 그래프를 보여주는 것으로, 여기서, 표적 암 세포의 생존능은 첨가된 MNC2-ADC의 농도의 함수로 측정되고, 여기서, 생존능은 프레스토블루를 사용하여 측정된다. 측정 전 72시간 동

안 실험을 진행할 수 있었다. 도 38a는 MNC2-MMAE 또는 MNC2-MMAF 첨가 후 T47D 야생형 유방암 세포의 생존능을 보여주는 것이다. 도 38b는 MNC2-MMAE 또는 MNC2-MMAF 첨가 후 더 많은 MUC1*을 발현하도록 조작된 T47D 유방암 세포인 T47D-MUC1*의 생존능을 보여주는 것이다. 도 38c는 MNC2-MMAE 또는 MNC2-MMAF 첨가 후 HPAF II 야생형 췌장암 세포의 생존능을 보여주는 것이다. 도 38d는 MNC2-MMAE 또는 MNC2-MMAF 첨가 후 더 많은 MUC1*을 발현하도록 조작된 HPAF II 췌장암 세포인 HPAF II-MUC1*의 생존능을 보여주는 것이다. 도 38e는 낮은 수준의 표적 항원인 MUC1*을 발현하는 유방암 세포 또는 췌장 세포에 첨가된 MNC2-MMAE 또는 MNC2-MMAF의 사멸 능력에 대한 계산된 IC50의 표를 보여주는 것이다. 도 38f는 높은 수준의 표적 항원인 MUC1*을 발현하는 유방암 세포 또는 췌장 세포에 첨가된 MNC2-MMAE 또는 MNC2-MMAF의 사멸 능력에 대한 계산된 IC50의 표를 보여주는 것이다.

도 39a-39f는 플레이트 리더 검정법의 그래프를 보여주는 것으로, 여기서, 표적 암 세포의 생존능은 첨가된 MN20A10-ADC의 농도의 함수로 측정되고, 여기서, 생존능은 프레스토블루를 사용하여 측정된다. 측정 전 72시간 동안 실험을 진행할 수 있었다. 도 39a는 MN20A10-MMAE 또는 MN20A10-MMAF 첨가 후 T47D 야생형 유방암 세포의 생존능을 보여주는 것이다. 도 39b는 MN20A10-MMAE 또는 MN20A10-MMAF 첨가 후 더 많은 MUC1*을 발현하도록 조작된 T47D 유방암 세포인 T47D-MUC1*의 생존능을 보여주는 것이다. 도 39c는 MN20A10-MMAE 또는 MN20A10-MMAF 첨가 후 HPAF II 야생형 췌장암 세포의 생존능을 보여주는 것이다. 도 39d는 MN20A10-MMAE 또는 MN20A10-MMAF 첨가 후 더 많은 MUC1*을 발현하도록 조작된 HPAF II 췌장암 세포인 HPAF II-MUC1*의 생존능을 보여주는 것이다. 도 39e는 낮은 수준 내지 중간 수준의 표적 항원인 MUC1*을 발현하는 유방암 세포 또는 췌장 세포에 첨가된 MN20A10-MMAE 또는 MN20A10-MMAF의 사멸 능력에 대한 계산된 IC50의 표를 보여주는 것이다. 도 39f는 높은 수준의 표적 항원인 MUC1*을 발현하는 유방암 세포 또는 췌장 세포에 첨가된 MN20A10-MMAE 또는 MN20A10-MMAF의 사멸 능력에 대한 계산된 IC50의 표를 보여주는 것이다.

도 40a-40c는 플레이트 리더 검정법의 그래프를 보여주는 것으로, 여기서, 표적 암 세포의 생존능은 첨가된 MNC2-ADC 또는 MN20A10-ADC의 농도의 함수로 측정되고, 여기서, 생존능은 프레스토블루를 사용하여 측정된다. 측정 전 각각 MMAE 또는 테루스테칸 접합체에 대해 72 또는 120시간 동안 실험을 진행할 수 있었다. 도 40a는 MNC2-MMAE, MNC2-테루스테칸, MN20A10-MMAE 또는 MN20A10-테루스테칸 첨가 후 T47D 야생형 유방암 세포의 생존능을 보여주는 것이다. 도 40b는 MNC2-MMAE, MNC2-테루스테칸, MN20A10-MMAE 또는 MN20A10-테루스테칸 첨가 후 더 많은 MUC1*을 발현하도록 조작된 T47D 유방암 세포인 T47D-MUC1*의 생존능을 보여주는 것이다. 도 40c는 중간 내지 낮은 MUC1* 발현 T47D 유방암 세포 또는 높은 MUC1* T47D-MUC1* 유방암 세포에 첨가된 MNC2-MMAE, MNC2-테루스테칸, MN20A10-MMAE 또는 MN20A10-테루스테칸의 사멸 능력에 대한 계산된 IC50의 표를 보여주는 것이다.

도 41a-41b는 플레이트 리더 검정법의 그래프를 보여주는 것으로, 여기서, 표적 암 세포의 생존능은 프레스토블루를 사용하여, 첨가된 MNC2-ADC 또는 MN20A10-ADC의 농도의 함수로 측정된다. 측정 전 72시간 동안 실험을 진행할 수 있었다. 도 41a는 MNC2-MMAE 또는 MN20A10-MMAE 첨가 후 DU145 야생형 호르몬 불응성 전립선암 세포의 생존능을 보여주는 것이다. 도 41b는 상기 전립선암 세포에 대한 MNC2-MMAE 및 MN20A10-MMAE의 사멸 능력에 대한 계산된 IC50의 표를 보여주는 것이다.

도 42a-42b는 플레이트 리더 검정법의 그래프를 보여주는 것으로, 여기서, 표적 암 세포의 생존능은 프레스토블루를 사용하여, 첨가된 MNC2-ADC 또는 MN20A10-ADC의 농도의 함수로 측정된다. 측정 전 72시간 동안 실험을 진행할 수 있었다. 도 42a는 MNC2-MMAE 또는 MN20A10-MMAE 첨가 후 NCI-H1975 비소세포 폐암 세포의 생존능을 보여주는 것이다. 도 42b는 상기 폐암 세포에 대한 MNC2-MMAE 및 MN20A10-MMAE의 사멸 능력에 대한 계산된 IC50의 표를 보여주는 것이다.

도 43a-43c는 플레이트 리더 검정법의 그래프를 보여주는 것으로, 여기서, 표적 암 세포의 생존능은 MNC2-MMAE 또는 MN20A10-MMAE 첨가 후 측정된다. 측정 전 72시간 동안 실험을 진행할 수 있었다. 도 43a는 MNC2-MMAE 또는 MN20A10-MMAE 첨가 후 T47D 야생형 유방암 세포의 생존능을 보여주는 것이다. 도 43b는 MNC2-MMAE 또는 MN20A10-MMAE 첨가 후 더 많은 MUC1*을 발현하도록 조작된 T47D 유방암 세포인 T47D-MUC1*의 생존능을 보여주는 것이다.

도 44a-44b는 플레이트 리더 검정법의 그래프를 보여주는 것으로, 여기서, MN20A10-MMAE 또는 IgG2b-MMAE인 이소타입 대조군 항체 첨가 후, MUC1* 발현 암 세포인 HCT-MUC1*의 생존능을 MUC1* 음성 암 세포, HCT-116-wt와 비교한다. 유세포 분석법에 의해 측정하기 전 72시간 동안 실험을 진행할 수 있었다.

도 45a-45d는 플레이트 리더 검정법의 그래프를 보여주는 것으로, 여기서, MUC1* 발현 암 세포의 생존능은 MN20A10(비접합), 또는 MN20A10-MMAE 첨가 후 측정된다. 도 45a는 NCI H1975 비소세포 폐암 세포에 대한

MN20A10-MMAE의 사멸 효과를 보여주는 것이다. 도 45b는 DU145 호르몬 불응성 전립선암 세포에 대한 MN20A10-MMAE의 사멸 효과를 보여주는 것이다. 도 45c는 야생형 HPAF II 췌장암 세포, 또는 더 많은 MUC1*을 발현하도록 조작된 HPAF II-MUC1* 암 세포에 대한 MN20A10-MMAE의 사멸 효과를 보여주는 것이다. 도 45d는 IC50의 표를 보여주는 것이다.

도 46a-46j는 MNC2-MMAE 또는 MNC2-테록스테칸과 함께 인큐베이션된 T47D-MUC1* 유방암 세포의 확대 촬영 사진을 보여주는 것이다. 도 46a 4x 배율로 촬영된 사진은 120시간 후 유방암 세포에 대한 500 nM의 MNC2-MMAE의 사멸 효과를 보여주는 것이다. 도 46b 4x 배율로 촬영된 사진은 120시간 후 유방암 세포에 대한 6.2 nM의 MNC2-MMAE의 사멸 효과를 보여주는 것이다. 도 46c 4x 배율로 촬영된 사진은 대조군으로서 비치리된 T47D 유방암 세포를 보여주는 것이다. 도 46d는 120시간 후 유방암 세포에 대한 500 nM의 MNC2-테록스테칸의 사멸 효과를 보여주는 것이다. 도 46e는 120시간 후 유방암 세포에 대한 6.2 nM의 MNC2-테록스테칸의 사멸 효과를 보여주는 것이다. 도 46f는 대조군으로서 비치리된 T47D 유방암 세포를 보여주는 것이다. 도 46g 20x 배율로 촬영된 사진은 120시간 후 유방암 세포에 대한 6.2 nM의 MNC2-MMAE의 사멸 효과를 보여주는 것이다. 도 46h 20x 배율로 촬영된 사진은 대조군으로서 비치리된 유방암 세포를 보여주는 것이다. 도 46i 20x 배율로 촬영된 사진은 120시간 후 유방암 세포에 대한 6.2 nM의 MNC2-테록스테칸의 사멸 효과를 보여주는 것이다. 도 46j는 20x 배율로 촬영된 사진은 대조군으로서 비치리된 유방암 세포를 보여주는 것이다. 사멸 효과는 세포수의 유의적인 감소, 원형화로의 세포 형태 변화, 및 세포 리프팅 오프로 쉽게 볼 수 있다. 반대로, 대조군 웰은 평평하고, 퍼지는 형태를 가진 조밀한 세포로 이루어진 전면생장 단층으로, 죽은 부유 세포 없이 나타난다.

도 47a-47d는 120시간 후, MNC2-MMAE 또는 MNC2-테록스테칸과 함께 인큐베이션된 DU145 전립선암 세포의 4X 배율로 촬영된 사진을 보여주는 것이다. 도 47a 확대 사진은 500 nM의 MNC2-MMAE의 사멸 효과를 보여주는 것이다. 도 47b 확대 사진은 정상적인 형태 및 전면생장을 나타내는 비치리된 세포를 보여주는 것이다. 도 47c 확대 사진은 500 nM의 MNC2-테록스테칸의 사멸 효과를 보여주는 것이다. 도 47d 확대 사진은 정상적인 형태 및 전면생장을 나타내는 비치리된 세포를 보여주는 것이다.

도 48a-48n은 MN20A10-MMAE 또는 MN20A10-테록스테칸과 함께 인큐베이션된 T47D-MUC1* 유방암 세포의 확대 촬영 사진을 보여주는 것이다. 도 48a 4x 배율로 촬영된 사진은 120시간 후 유방암 세포에 대한 500 nM의 MN20A10-MMAE의 사멸 효과를 보여주는 것이다. 도 48b 4x 배율로 촬영된 사진은 120시간 후 유방암 세포에 대한 56 nM의 MN20A10-MMAE의 사멸 효과를 보여주는 것이다. 도 48c 4x 배율로 촬영된 사진은 대조군으로서 비치리된 T47D 유방암 세포를 보여주는 것이다. 도 48d는 120시간 후 유방암 세포에 대한 500 nM의 MN20A10-테록스테칸의 사멸 효과를 보여주는 것이다. 도 48e는 120시간 후 유방암 세포에 대한 56 nM의 MN20A10-테록스테칸의 사멸 효과를 보여주는 것이다. 도 48f는 대조군으로서 비치리된 T47D 유방암 세포를 보여주는 것이다. 도 48g 20x 배율로 촬영된 사진은 120시간 후 유방암 세포에 대한 56 nM의 MN20A10-MMAE의 사멸 효과를 보여주는 것이다. 도 48h 20x 배율로 촬영된 사진은 대조군으로서 비치리된 유방암 세포를 보여주는 것이다. 도 48i 20x 배율로 촬영된 사진은 120시간 후 유방암 세포에 대한 56 nM의 MN20A10-테록스테칸의 사멸 효과를 보여주는 것이다. 도 48j는 20x 배율로 촬영된 사진은 대조군으로서 비치리된 유방암 세포를 보여주는 것이다. 도 48k 20x 배율로 촬영된 사진은 500 nM MN20A10-MMAE, DAR 5.8로 처리된 DU145 전립선암 세포를 보여주는 것이다. 처리된 세포는 원형화 및 죽은 세포를 나타낸다. 도 48l 20x 배율로 촬영된 사진은 비치리된 대조군 DU145 전립선암 세포를 보여주는 것이다. 도 48m 20x 배율로 촬영된 사진은 500 nM MN20A10-테록스테칸, DAR 4.6으로 처리된 DU145 전립선암 세포를 보여주는 것이다. 처리된 세포는 원형화 및 죽은 세포를 나타낸다. 도 48n 20x 배율로 촬영된 사진은 비치리된 대조군 DU145 전립선암 세포를 보여주는 것이다.

도 49a-49j는 xCELLigence 기기에서 수행한 실시간 사멸 검정법으로부터의 트레이스를 보여주는 것이다. 본 검정법에서, 임피던스는 실시간으로 측정된다. 부착된 암 세포가 사멸되어 전극 표면에서 떨어지면, 임피던스(절연)가 감소한다. T47D 야생형 유방암 세포를 웰당 5,000개 세포로 다중 전극 웰 플레이트에 플레이팅하고, ADC를 첨가하기 전에 24시간 동안 부착 및 성장시켰다. 이어서, MNC2-MMAE, DAR 4.1, MN20A10-MMAE, DAR 5.8, MNC2-MMAF, DAR 3.7, MN20A10-MMAF, DAR 3.8, MNC2-테록스테칸, DAR 7.2, 또는 MN20A10-테록스테칸, DAR 4.6을 암 세포에 첨가하였다. 도 49a는 MNC2-MMAE를 최종 농도 500 nM, 167 nM 또는 2 nM으로 첨가한 것을 보여주는 것이며, 실험 관독은 ADC를 첨가한 후 40시간째에 이루어진다. 탁솔 및 트리톤을 양성 사멸 대조군으로서 첨가한다. 도 49b는 MN20A10-MMAE를 최종 농도 167 nM, 56 nM 또는 2 nM으로 첨가한 것을 보여주는 것이며, 실험 관독은 ADC를 첨가한 후 40시간째에 이루어진다. 도 49c는 MNC2-MMAF를 최종 농도 500 nM, 167 nM 또는 2 nM으로 첨가한 것을 보여주는 것이며, 실험 관독은 ADC를 첨가한 후 40시간째에 이루어진다. 탁솔 및 트리톤을 양성 사멸 대조군으로서 첨가한다. 도 49d는 MN20A10-MMAF를 최종 농도 500 nM, 167 nM 또는 2 nM으로 첨가한 것을

보여주는 것이며, 실험 판독은 ADC를 첨가한 후 40시간째에 이루어진다. 도 49e는 MNC2-MMAE를 최종 농도 500 nM, 167 nM 또는 2 nM으로 첨가한 것을 보여주는 것이며, 실험 판독은 ADC를 첨가한 후 120시간째에 이루어진다. 제시된 바와 같이, 본질적으로 모든 종양 세포는 167 nM의 MNC2-MMAE 농도에서 사멸되었다. 도 49f는 MNC2-MMAF를 최종 농도 500 nM, 167 nM 또는 2 nM으로 첨가한 것을 보여주는 것이며, 실험 판독은 ADC를 첨가한 후 120시간째에 이루어진다. 제시된 바와 같이, 본질적으로 모든 종양 세포는 167 nM의 MNC2-MMAF 농도에서 사멸되었다. 도 49g는 MNC2-테루스테칸을 최종 농도 500 nM, 167 nM 또는 2 nM으로 첨가한 것을 보여주는 것이며, 실험 판독은 ADC를 첨가한 후 120시간째에 이루어진다. 제시된 바와 같이, 유의적인 종양 세포 사멸은 MNC2-MMAE 또는 -MMAF보다 늦게 일어나지만, 100시간이 지나면 167 nM의 MNC2-테루스테칸 농도에서 거의 동일한 수준의 사멸에 도달한다. 도 49h는 MN20A10-MMAE를 다양한 농도에 걸쳐 첨가한 것을 보여주는 것이며, 실험 판독은 ADC를 첨가한 후 120시간째에 이루어진다. 제시된 바와 같이, 본질적으로 모든 종양 세포는 56 nM의 MN20A10-MMAE 농도에서 사멸되었다. 도 49i는 MN20A10-MMAF를 다양한 농도에 걸쳐 첨가한 것을 보여주는 것이며, 실험 판독은 ADC를 첨가한 후 120시간째에 이루어진다. 제시된 바와 같이, 본질적으로 모든 종양 세포는 167 nM의 MN20A10-MMAF 농도에서 사멸되었다. 도 49j는 MN20A10-테루스테칸을 다양한 농도에 걸쳐 첨가한 것을 보여주는 것이며, 실험 판독은 ADC를 첨가한 후 120시간째에 이루어진다. 제시된 바와 같이, 종양 세포 사멸은 MN20A10-MMAE 또는 -MMAF보다 늦게 일어나지만, 120시간이 지나면 167 nM의 MN20A10-테루스테칸 농도에서 유의적인 사멸이 이루어진다.

도 50a-50j는 xCELLigence 기기에서 수행한 실시간 사멸 검정법으로부터의 트레이스를 보여주는 것이다. 본 검정법에서, 임피던스는 실시간으로 측정된다. 부착된 암 세포가 사멸되어 전극 표면에서 떨어지면, 임피던스(절연)가 감소한다. 더 많은 MUC1*을 발현하도록 조작된 T47D-MUC1* 유방암 세포를 웰당 5,000개 세포로 다중 전극 웰 플레이트에 플레이팅하고, ADC를 첨가하기 전에 24시간 동안 부착 및 성장시켰다. 이어서, MNC2-MMAE, DAR 4.1, MN20A10-MMAE, DAR 5.8, MNC2-MMAF, DAR 3.7, MN20A10-MMAF, DAR 3.8, MNC2-테루스테칸, DAR 7.2, 또는 MN20A10-테루스테칸, DAR 4.6을 암 세포에 첨가하였다. 도 50a는 MNC2-MMAE를 최종 농도 19 nM, 6 nM 또는 0.69 nM으로 첨가한 것을 보여주는 것이며, 실험 판독은 ADC를 첨가한 후 40시간째에 이루어진다. 알 수 있는 바와 같이, 본질적으로 모든 종양 세포는 19 nM에서 사멸되었다. 탁솔 및 트리톤을 양성 사멸 대조군으로서 첨가한다. 도 50b는 MN20A10-MMAE를 최종 농도 19 nM, 6 nM 또는 2 nM으로 첨가한 것을 보여주는 것이며, 실험 판독은 ADC를 첨가한 후 40시간째에 이루어진다. 알 수 있는 바와 같이, 본질적으로 모든 종양 세포는 19 nM에서 사멸되었다. 도 50c는 MNC2-MMAF를 최종 농도 6 nM, 2 nM 또는 0.69 nM으로 첨가한 것을 보여주는 것이며, 실험 판독은 ADC를 첨가한 후 40시간째에 이루어진다. 알 수 있는 바와 같이, 본질적으로 모든 종양 세포는 6 nM에서 사멸되었다. 탁솔 및 트리톤을 양성 사멸 대조군으로서 첨가한다. 도 50d는 MN20A10-MMAF를 최종 농도 56 nM, 19 nM 또는 2 nM으로 첨가한 것을 보여주는 것이며, 실험 판독은 ADC를 첨가한 후 40시간째에 이루어진다. 알 수 있는 바와 같이, 본질적으로 모든 종양 세포는 56 nM에서 사멸되었다. 도 50e는 MNC2-MMAE를 다양한 농도에 걸쳐 첨가한 것을 보여주는 것이며, 실험 판독은 ADC를 첨가한 후 120시간째에 이루어진다. 제시된 바와 같이, 본질적으로 모든 T47D-MUC1* 종양 세포는 6 nM의 MNC2-MMAE 농도에서 사멸되었다. 도 50f는 MNC2-MMAF를 다양한 농도에 걸쳐 첨가한 것을 보여주는 것이며, 실험 판독은 ADC를 첨가한 후 120시간째에 이루어진다. 제시된 바와 같이, 본질적으로 모든 T47D-MUC1* 종양 세포는 2 nM의 MNC2-MMAF 농도에서 사멸되었다. 도 50g는 MNC2-테루스테칸을 다양한 농도에 걸쳐 첨가한 것을 보여주는 것이며, 실험 판독은 ADC를 첨가한 후 120시간째에 이루어진다. 제시된 바와 같이, 유의적인 T47D-MUC1* 종양 세포 사멸은 MNC2-MMAE 또는 -MMAF보다 늦게 일어나지만, 120시간이 지나면 6 nM의 MNC2-테루스테칸 농도에서 거의 동일한 수준의 사멸에 도달한다. 도 50h는 MN20A10-MMAE를 다양한 농도에 걸쳐 첨가한 것을 보여주는 것이며, 실험 판독은 ADC를 첨가한 후 120시간째에 이루어진다. 제시된 바와 같이, 본질적으로 모든 종양 세포는 19 nM의 MN20A10-MMAE 농도에서 사멸되었다. 도 50i는 MN20A10-MMAF를 다양한 농도에 걸쳐 첨가한 것을 보여주는 것이며, 실험 판독은 ADC를 첨가한 후 120시간째에 이루어진다. 제시된 바와 같이, 본질적으로 모든 종양 세포는 19 nM의 MN20A10-MMAF 농도에서 사멸되었다. 도 50j는 MN20A10-테루스테칸을 다양한 농도에 걸쳐 첨가한 것을 보여주는 것이며, 실험 판독은 ADC를 첨가한 후 120시간째에 이루어진다. 제시된 바와 같이, T47D-MUC1* 종양 세포 사멸은 MN20A10-MMAE 또는 -MMAF보다 늦게 일어나지만, 120시간이 지나면 본질적으로 모든 종양 세포가 167 nM의 MN20A10-테루스테칸 농도에서 사멸되었다.

도 51a-51i는 xCELLigence 기기에서 수행한 실시간 사멸 검정법으로부터의 트레이스를 보여주는 것이다. 본 검정법에서, 임피던스는 실시간으로 측정된다. 부착된 암 세포가 사멸되어 전극 표면에서 떨어지면, 임피던스(절연)가 감소한다. NCI-H1975 폐암 세포를 웰당 5,000개 세포로 다중 전극 웰 플레이트에 플레이팅하고, ADC를 첨가하기 전에 24시간 동안 부착 및 성장시켰다. 이어서, MNC2-MMAE, DAR 4.1, MN20A10-MMAE, DAR 5.8, MNC2-

MMAF, DAR 3.7, MN20A10-MMAF, DAR 3.8, MNC2-테루스테칸, DAR 7.2, 또는 MN20A10-테루스테칸, DAR 4.6을 암 세포에 첨가하였다. 도 51a는 MNC2-MMAE를 다양한 농도에 걸쳐 첨가한 것을 보여주는 것이며, 실험 판독은 40시간째에 이루어진다. 제시된 바와 같이, 본질적으로 모든 폐 종양 세포는 167 nM 농도에서 사멸되었다. 탁솔 및 트리톤을 양성 사멸 대조군으로서 첨가한다. 도 51b는 MN20A10-MMAE를 다양한 농도에 걸쳐 첨가한 것을 보여주는 것이며, 실험 판독은 40시간째에 이루어진다. 제시된 바와 같이, 본질적으로 모든 폐 종양 세포는 167 nM 농도에서 사멸되었다. 도 51c는 MNC2-MMAF를 다양한 농도에 걸쳐 첨가한 것을 보여주는 것이며, 실험 판독은 40시간째에 이루어진다. 제시된 바와 같이, 본질적으로 모든 폐 종양 세포는 167 nM 농도에서 사멸되었다. 도 51d는 MN20A10-MMAF를 다양한 농도에 걸쳐 첨가한 것을 보여주는 것이며, 실험 판독은 40시간째에 이루어진다. 제시된 바와 같이, 본질적으로 모든 폐 종양 세포는 167 nM 농도에서 사멸되었다. 도 51e는 MNC2-MMAE를 다양한 농도에 걸쳐 첨가한 것을 보여주는 것이며, 실험 판독은 ADC를 첨가한 후 120시간째에 이루어진다. 제시된 바와 같이, 본질적으로 모든 폐 종양 세포는 167 nM의 MNC2-MMAE 농도에서 사멸되었다. 도 51f는 MNC2-MMAF를 다양한 농도에 걸쳐 첨가한 것을 보여주는 것이며, 실험 판독은 ADC를 첨가한 후 120시간째에 이루어진다. 제시된 바와 같이, 본질적으로 모든 종양 세포는 56 nM의 MNC2-MMAF 농도에서 사멸되었다. 도 51g는 MNC2-테루스테칸을 다양한 농도에 걸쳐 첨가한 것을 보여주는 것이며, 실험 판독은 ADC를 첨가한 후 120시간째에 이루어진다. 도 51h는 MN20A10-MMAE를 다양한 농도에 걸쳐 첨가한 것을 보여주는 것이며, 실험 판독은 ADC를 첨가한 후 120시간째에 이루어진다. 제시된 바와 같이, 본질적으로 모든 종양 세포는 56 nM - 19 nM의 MN20A10-MMAE 농도에서 사멸되었다. 도 51i는 MN20A10-MMAF를 다양한 농도에 걸쳐 첨가한 것을 보여주는 것이며, 실험 판독은 ADC를 첨가한 후 120시간째에 이루어진다. 제시된 바와 같이, 본질적으로 모든 종양 세포는 56 nM의 MN20A10-MMAF 농도에서 사멸되었다.

도 52a-52i는 xCELLigence 기기에서 수행한 실시간 사멸 검정법으로부터의 트레이스를 보여주는 것이다. 본 검정법에서, 임피던스는 실시간으로 측정된다. 부착된 암 세포가 사멸되어 전극 표면에서 떨어지면, 임피던스(절연)가 감소한다. HPAF II 야생형(WT: wild-type) 췌장암 세포를 웰당 5,000개 세포로 다중 전극 웰 플레이트에 플레이팅하고, ADC를 첨가하기 전에 24시간 동안 부착 및 성장시켰다. 이어서, MNC2-MMAE, DAR 4.1, MN20A10-MMAE, DAR 5.8, MNC2-MMAF, DAR 3.7, MN20A10-MMAF, DAR 3.8, MNC2-테루스테칸, DAR 7.2, 또는 MN20A10-테루스테칸, DAR 4.6을 암 세포에 첨가하였다. 도 52a는 MNC2-MMAE를 다양한 농도에 걸쳐 첨가한 것을 보여주는 것이며, 실험 판독은 40시간째에 이루어진다. 탁솔 및 트리톤을 양성 사멸 대조군으로서 첨가한다. 도 52b는 MN20A10-MMAE를 다양한 농도에 걸쳐 첨가한 것을 보여주는 것이며, 실험 판독은 40시간째에 이루어진다. 도 52c는 MNC2-MMAF를 다양한 농도에 걸쳐 첨가한 것을 보여주는 것이며, 실험 판독은 40시간째에 이루어진다. 탁솔 및 트리톤을 양성 사멸 대조군으로서 첨가한다. 도 52d는 MN20A10-MMAF를 다양한 농도에 걸쳐 첨가한 것을 보여주는 것이며, 실험 판독은 40시간째에 이루어진다. 도 52e는 MNC2-MMAE를 다양한 농도에 걸쳐 첨가한 것을 보여주는 것이며, 실험 판독은 ADC를 첨가한 후 120시간째에 이루어진다. 제시된 바와 같이, 본질적으로 모든 췌장 종양 세포는 56 nM의 MNC2-MMAE 농도에서 사멸되었다. 도 52f는 MNC2-MMAF를 다양한 농도에 걸쳐 첨가한 것을 보여주는 것이며, 실험 판독은 ADC를 첨가한 후 120시간째에 이루어진다. 제시된 바와 같이, 본질적으로 모든 종양 세포는 56 nM의 MNC2-MMAF 농도에서 사멸되었다. 도 52g는 MNC2-테루스테칸을 다양한 농도에 걸쳐 첨가한 것을 보여주는 것이며, 실험 판독은 ADC를 첨가한 후 120시간째에 이루어진다. 120시간째 약 56 nM의 농도에서 유의적인 사멸이 측정된다. 도 52h는 MN20A10-MMAE를 다양한 농도에 걸쳐 첨가한 것을 보여주는 것이며, 실험 판독은 ADC를 첨가한 후 120시간째에 이루어진다. 제시된 바와 같이, 본질적으로 모든 종양 세포는 56 nM - 19 nM의 MN20A10-MMAE 농도에서 사멸되었다. 도 52i는 MN20A10-MMAF를 다양한 농도에 걸쳐 첨가한 것을 보여주는 것이며, 실험 판독은 ADC를 첨가한 후 120시간째에 이루어진다. 제시된 바와 같이, 본질적으로 모든 종양 세포는 56 nM의 MN20A10-MMAF 농도에서 사멸되었다.

도 53a-53i는 xCELLigence 기기에서 수행한 실시간 사멸 검정법으로부터의 트레이스를 보여주는 것이다. 본 검정법에서, 임피던스는 실시간으로 측정된다. 부착된 암 세포가 사멸되어 전극 표면에서 떨어지면, 임피던스(절연)가 감소한다. 더 많은 MUC1*을 발현하도록 조작된 HPAF II-MUC1* 췌장암 세포를 웰당 5,000개 세포로 다중 전극 웰 플레이트에 플레이팅하고, ADC를 첨가하기 전에 24시간 동안 부착 및 성장시켰다. 이어서, MNC2-MMAE, DAR 4.1, MN20A10-MMAE, DAR 5.8, MNC2-MMAF, DAR 3.7, MN20A10-MMAF, DAR 3.8, MNC2-테루스테칸, DAR 7.2, 또는 MN20A10-테루스테칸, DAR 4.6을 암 세포에 첨가하였다. 도 53a는 MNC2-MMAE를 다양한 농도에 걸쳐 첨가한 것을 보여주는 것이며, 실험 판독은 40시간째에 이루어진다. 탁솔 및 트리톤을 양성 사멸 대조군으로서 첨가한다. 도 53b는 MN20A10-MMAE를 다양한 농도에 걸쳐 첨가한 것을 보여주는 것이며, 실험 판독은 40시간째에 이루어진다. 도 53c는 MNC2-MMAF를 다양한 농도에 걸쳐 첨가한 것을 보여주는 것이며, 실험 판독은 40시간째에 이루어진다. 탁솔 및 트리톤을 양성 사멸 대조군으로서 첨가한다. 도 53d는 MN20A10-MMAF를 다양한 농도에 걸쳐 첨

가한 것을 보여주는 것이며, 실험 판독은 40시간째에 이루어진다. 도 53e는 MNC2-MMAE를 다양한 농도에 걸쳐 첨가한 것을 보여주는 것이며, 실험 판독은 ADC를 첨가한 후 120시간째에 이루어진다. 제시된 바와 같이, 본질적으로 모든 췌장 종양 세포는 56 nM의 MNC2-MMAE 농도에서 사멸되었다. 도 53f는 MNC2-MMAF를 다양한 농도에 걸쳐 첨가한 것을 보여주는 것이며, 실험 판독은 ADC를 첨가한 후 120시간째에 이루어진다. 제시된 바와 같이, 본질적으로 모든 췌장 세포는 56 nM의 MNC2-MMAF 농도에서 사멸되었다. 도 53g는 MNC2-테록스테칸을 다양한 농도에 걸쳐 첨가한 것을 보여주는 것이며, 실험 판독은 ADC를 첨가한 후 120시간째에 이루어진다. 도면에서 알 수 있는 바와 같이, 시간이 지나면, 167 nM 농도에서 거의 모든 췌장암 세포가 사멸된다. 도 53h는 MN20A10-MMAE를 다양한 농도에 걸쳐 첨가한 것을 보여주는 것이며, 실험 판독은 ADC를 첨가한 후 120시간째에 이루어진다. 제시된 바와 같이, 본질적으로 모든 췌장 세포는 56 nM - 19 nM의 MN20A10-MMAE 농도에서 사멸되었다. 도 53i는 MN20A10-MMAF를 다양한 농도에 걸쳐 첨가한 것을 보여주는 것이며, 실험 판독은 ADC를 첨가한 후 120시간째에 이루어진다. 제시된 바와 같이, 본질적으로 모든 췌장 세포는 56 nM의 MN20A10-MMAF 농도에서 사멸되었다.

도 54a-54d는 xCELLigence 기기에서 수행한 실시간 사멸 검정법으로부터의 트레이스를 보여주는 것이다. 본 검정법에서, 임피던스는 실시간으로 측정된다. 부착된 암 세포가 사멸되어 전극 표면에서 떨어지면, 임피던스(절연)가 감소한다. 여기서 낮은 수준 내지 중간 수준의 MUC1*을 발현하는 T47D-wt 유방암 세포를 웰당 5,000개 세포로 다중 전극 웰 플레이트에 플레이팅하고, ADC를 첨가하기 전에 24시간 동안 부착 및 성장시켰다. 이어서, MNC2-엑사테칸, DAR 8.2, MNC2-테록스테칸, DAR 4.0, MNC2-MMAE, DAR 4.1, 또는 유리 엑사테칸(50 μ M)을 암 세포에 첨가하였다. xCELLigence 판독은 0 내지 120시간째에 이루어진다. 도 54a는 다양한 ADC를 500 nM 농도로 첨가한 것을 보여주는 것이다. 도 54b는 다양한 ADC를 167 nM 농도로 첨가한 것을 보여주는 것이다. 도 54c는 다양한 ADC를 56 nM 농도로 첨가한 것을 보여주는 것이다. 도 54d는 다양한 ADC를 19 nM 농도로 첨가한 것을 보여주는 것이다. 도 54e는 각 ADC의 트레이스 색상 뿐만 아니라, 각 ADC의 DAR을 열거한 키를 보여주는 것이다. 도면에서 알 수 있는 바와 같이, MNC2-엑사테칸은 56 nM만큼 낮은 농도에서도 표적 암 세포를 강력하게 사멸시킨다.

도 55a-55d는 xCELLigence 기기에서 수행한 실시간 사멸 검정법으로부터의 트레이스를 보여주는 것이다. 본 검정법에서, 임피던스는 실시간으로 측정된다. 부착된 암 세포가 사멸되어 전극 표면에서 떨어지면, 임피던스(절연)가 감소한다. 여기서 높은 수준의 MUC1*을 발현하도록 조작된 T47D-MUC1* 유방암 세포를 웰당 5,000개 세포로 다중 전극 웰 플레이트에 플레이팅하고, ADC를 첨가하기 전에 24시간 동안 부착 및 성장시켰다. 이어서, MNC2-엑사테칸, DAR 8.2, MNC2-테록스테칸, DAR 4.0, MNC2-MMAE, DAR 4.1, 또는 유리 엑사테칸(50 μ M)을 암 세포에 첨가하였다. xCELLigence 판독은 0 내지 120시간째에 이루어진다. 도 55a는 다양한 ADC를 19 nM 농도로 첨가한 것을 보여주는 것이다. 도 55b는 다양한 ADC를 6.2 nM 농도로 첨가한 것을 보여주는 것이다. 도 55c는 다양한 ADC를 2.1 nM 농도로 첨가한 것을 보여주는 것이다. 도 55d는 다양한 ADC를 0.69 nM 농도로 첨가한 것을 보여주는 것이다. 도 55e는 각 ADC의 트레이스 색상 뿐만 아니라, 각 ADC의 DAR을 열거한 키를 보여주는 것이다. 도면에서 알 수 있는 바와 같이, MNC2-엑사테칸 및 MNC2-테록스테칸은 6.2 nM 만큼 낮은 농도, 심지어, 2.1 nM만큼 낮은 농도에서도 높은 수준의 표적 항원을 발현하는 암 세포를 강력하게 사멸시킨다.

도 56a-56f는 xCELLigence 기기에서 수행한 실시간 사멸 검정법으로부터의 트레이스를 보여주는 것이다. 본 검정법에서, 임피던스는 실시간으로 측정된다. 부착된 암 세포가 사멸되어 전극 표면에서 떨어지면, 임피던스(절연)가 감소한다. 여기서 매우 낮은 수준의 MUC1*을 발현하는 NCI-H1975 비소세포 폐암 세포를 웰당 5,000개 세포로 다중 전극 웰 플레이트에 플레이팅하고, ADC를 첨가하기 전에 24시간 동안 부착 및 성장시켰다. 이어서, MNC2-엑사테칸, DAR 8.2, MNC2-테록스테칸, DAR 4.0, MNC2-MMAE, DAR 4.1, 또는 유리 엑사테칸(50 μ M)을 암 세포에 첨가하였다. xCELLigence 판독은 0 내지 120시간째에 이루어진다. 도 56a는 다양한 ADC를 500 nM 농도로 첨가한 것을 보여주는 것이다. 도 56b는 다양한 ADC를 167 nM 농도로 첨가한 것을 보여주는 것이다. 도 56c는 다양한 ADC를 56 nM 농도로 첨가한 것을 보여주는 것이다. 도 56d는 다양한 ADC를 19 nM 농도로 첨가한 것을 보여주는 것이다. 도 56e는 각 ADC의 트레이스 색상 뿐만 아니라, 각 ADC의 DAR을 열거한 키를 보여주는 것이다. 도면에서 알 수 있는 바와 같이, MNC2-엑사테칸은 167 nM만큼 낮은 농도에서도 매우 낮은 수준의 표적 항원을 발현하는 암 세포를 강력하게 사멸시킨다.

도 57a-57f는 90일 에스트로겐 펠릿을 이식받은 후, 이어서, 낮은 수준 내지 중간 수준의 MUC1*을 발현하는 T47D 야생형 세포 또는 더 많은 MUC1*을 발현하도록 조작된 T47D-MUC1* 세포인 1 M 인간 유방암 세포를 오른쪽 옆구리에 이식받은 암컷 NOD/SCID/GAMMA(NSG) 마우스의 생물발광 사진을 보여주는 것이다. 종양 이식 후 7일째, 동물에 MNC2-MMAE, DAR 3.9를 5 mg/kg으로 주사하였지만, 14일째 및 20일째 주사에는 10 mg/kg으로 증가시켰다. 도 57a는 T47D-wt 종양 세포를 이식받았지만, PBS를 모의 주사 맞은 대조군 동물을 보여주는 것이

다. 도 57b는 T47D-wt 세포를 이식받은 후, MNC2-MMAE를 주사 맞은 동물을 보여주는 것이다. 도 57c는 T47D-MUC1* 종양 세포를 이식받았지만, PBS를 모의 주사 맞은 대조군 동물을 보여주는 것이다. 도 57d는 T47D-MUC1* 세포를 이식받은 후, MNC2-MMAE를 주사 맞은 동물을 보여주는 것이다. 도 57e는 T47D 야생형 유방암 세포를 이식받은 마우스에 대한 종양 이식 후 경과일수의 함수로서 생물발광(라디언스 포톤/cm²)의 IVIS 측정 그래프를 보여주는 것이다. 도 57f는 T47D-MUC1* 유방암 세포를 이식받은 마우스에 대한 종양 이식 후 경과일수의 함수로서 생물발광(라디언스 포톤/cm²)의 IVIS 측정 그래프를 보여주는 것이다.

도 58a-58f는 90일 에스트로겐 펠릿을 이식받은 후, 이어서, 낮은 수준 내지 중간 수준의 MUC1*을 발현하는 T47D 야생형 세포 또는 더 많은 MUC1*을 발현하도록 조작된 T47D-MUC1* 세포인 1 M 인간 유방암 세포를 오른쪽 옆구리에 이식받은 암컷 NOD/SCID/GAMMA(NSG) 마우스의 생물발광 사진을 보여주는 것이다. 종양 이식 후 7일째, 동물에 MN20A10-MMAE, DAR 3.0을 5 mg/kg으로 주사하였지만, 14일째 및 20일째 주사에는 10 mg/kg으로 증가시켰다. 도 58a는 T47D-wt 종양 세포를 이식받았지만, PBS를 모의 주사 맞은 대조군 동물을 보여주는 것이다. 도 58b는 T47D-wt 세포를 이식받은 후, MN20A10-MMAE를 주사 맞은 동물을 보여주는 것이다. 도 58c는 T47D-MUC1* 종양 세포를 이식받았지만, PBS를 모의 주사 맞은 대조군 동물을 보여주는 것이다. 도 58d는 T47D-MUC1* 세포를 이식받은 후, MN20A10-MMAE를 주사 맞은 동물을 보여주는 것이다. 도 58e는 T47D 야생형 유방암 세포를 이식받은 마우스에 대한 종양 이식 후 경과일수의 함수로서 생물발광(라디언스 포톤/cm²)의 IVIS 측정 그래프를 보여주는 것이다. 도 58f는 T47D-MUC1* 유방암 세포를 이식받은 마우스에 대한 종양 이식 후 경과일수의 함수로서 생물발광(라디언스 포톤/cm²)의 IVIS 측정 그래프를 보여주는 것이다.

도 59a-59c는 낮은 수준 내지 중간 수준의 MUC1*을 발현하는 1 M 인간 NCI-H1975 비소세포 폐암 세포를 오른쪽 옆구리에 이식받은 암컷 nu/nu 마우스의 생물발광 사진을 보여주는 것이다. 종양 이식 후 7일째, 동물에 MNC2-MMAE를 명시된 바와 같이 5 mg/kg 또는 10 mg/kg으로 주사하였다. 생물발광 사진에서 알 수 있는 바와 같이, 19일째 및 27일째에 MNC2-MMAE, DAR 3.9의 용량을 10 mg/kg으로 증가시켰을 때, 종양 세포의 사멸이 증가하였다. 도 59a는 NCI-H1975 비소세포 폐암 세포를 이식받았지만, PBS를 모의 주사 맞은 대조군 동물을 보여주는 것이다. 도 59b는 NCI-H1975 비소세포 폐암 세포를 이식받은 후, MNC2-MMAE를 주사 맞은 동물을 보여주는 것이다. 도 59c는 종양 이식 후 경과일수의 함수로서 생물발광(라디언스 포톤/sec/cm²)의 IVIS 측정 그래프를 보여주는 것이다.

도 60a-60d는 낮은 수준 내지 중간 수준의 MUC1*을 발현하는 1 M 인간 NCI-H1975 비소세포 폐암 세포를 오른쪽 옆구리에 이식받은 암컷 nu/nu 마우스의, IVIS 기기에서 촬영된 생물발광 사진을 보여주는 것이다. 종양 이식 후 7일째 및 14일째, 동물에 MN20A10-MMAE, DAR 3.0을 5 mg/kg으로 주사하였다. 19일째, 용량을 10 mg/kg으로 증가시키고, 복강내(ip) 주사하였다. 사진 및 그래프에서 알 수 있는 바와 같이, 용량 증가가 종양 세포의 사멸을 크게 증가시켰다. 도 60a는 NCI-H1975 비소세포 폐암 세포를 이식받았지만, PBS를 모의 주사 맞은 대조군 동물을 보여주는 것이다. 도 60b는 NCI-H1975 비소세포 폐암 세포를 이식받은 후, MN20A10-MMAE를 주사 맞은 동물을 보여주는 것이다. 도 60c는 26일째 대조군 동물로부터 절제된 종양의 사진 및 중량을 보여주는 것이다. 도 60d는 종양 이식 후 경과일수의 함수로서 생물발광(라디언스 포톤/sec/cm²)의 IVIS 측정 그래프를 보여주는 것이다.

도 61a-61v는 낮은 수준 내지 중간 수준의 MUC1*을 발현하는 HPAF II 야생형(wt) 세포, 또는 더 많은 MUC1*을 발현하도록 조작된 HPAF II-MUC1* 세포인 0.5 M 인간 췌장암 세포를 오른쪽 옆구리에 이식받은 암컷 nu/nu 마우스의, IVIS 기기에서 촬영된 생물발광 사진을 보여주는 것이다. 종양 이식 후 7일째, 동물에 대조군으로서 PBS를 또는 MNC2-MMAE, DAR 4.1을 10 mg/kg으로 주사하였다. 도 61a는 HPAF II-wt 췌장암 세포를 이식받았지만, PBS를 모의 주사 맞은 대조군 동물의 IVIS 생물발광 사진을 보여주는 것이다. 도 61b는 HPAF II-wt 췌장암 세포를 이식받은 후, MNC2-MMAE를 주사 맞은 동물의 IVIS 생물발광 사진을 보여주는 것이다. 도 61c는 HPAF II-MUC1* 췌장암 세포를 이식받았지만, PBS를 모의 주사 맞은 대조군 동물의 IVIS 생물발광 사진을 보여주는 것이다. 도 61d는 HPAF II-MUC1* 췌장암 세포를 이식받은 후, MNC2-MMAE를 주사 맞은 동물의 IVIS 생물발광 사진을 보여주는 것이다. 도 61e는 과도한 종양 부담으로 인해 희생되어야 했던 HPAF II-wt 대조군 동물로부터 절제된 종양의 사진을 보여주는 것이다. 도 61f는 과도한 종양 부담으로 인해 희생되어야 했던 HPAF II-MUC1* 대조군 동물로부터 절제된 종양의 사진을 보여주는 것이다. 도 61g는 대조군 및 MNC2-MMAE 처리된 마우스, 둘 모두에 대한 종양 이식 후 경과일수의 함수로서 생물발광(라디언스 포톤/sec/cm²)의 IVIS 측정의 오버레이 그래프를 보여주는 것이다. 25일째 IVIS 데이터 점은 기기 오작동에 기인하여 생략하였다. 도 61h는 25일째 종양의 캘리퍼 측정값의 막대 그래프를 보여주는 것이다. 캘리퍼 측정은 HPAF II-wt 세포주 대 HPAF II-MUC1* 세포주에서의 루시페라제 발현 수준의 차이를 제거한다. 도 61i는 HPAF II-wt 췌장암 세포를 이식받았지만, PBS를 모의 주사 맞

은 대조군 동물의 11일째 사진을 보여주는 것이다. 도 61j는 HPAF II-wt 췌장암 세포를 이식받았지만, PBS를 모의 주사 맞은 대조군 동물의 18일째 사진을 보여주는 것이다. 도 61k는 HPAF II-wt 췌장암 세포를 이식받았지만, PBS를 모의 주사 맞은 대조군 동물의 25일째 사진을 보여주는 것으로, 오른쪽 옆구리의 종양은 점점 더 크게 증가하는 것으로 보인다. 도 61l은 HPAF II-wt 췌장암 세포를 이식받은 후, MNC2-MMAE를 주사 맞은 동물의 11일째 사진을 보여주는 것이다. 도 61m은 HPAF II-wt 췌장암 세포를 이식받은 후, MNC2-MMAE를 주사 맞은 동물의 18일째 사진을 보여주는 것이다. 도 61n은 HPAF II-wt 췌장암 세포를 이식받은 후, MNC2-MMAE를 주사 맞은 동물의 25일째 사진을 보여주는 것으로, 여기서, 마우스 중 3마리는 거의 보이지 않는 작은 종양이 있다. 도 61o는 HPAF II-MUC1* 췌장암 세포를 이식받았지만, PBS를 모의 주사 맞은 대조군 동물의 11일째 사진을 보여주는 것이다. 도 61p는 HPAF II-MUC1* 췌장암 세포를 이식받았지만, PBS를 모의 주사 맞은 대조군 동물의 18일째 사진을 보여주는 것이다. 도 61q는 HPAF II-MUC1* 췌장암 세포를 이식받았지만, PBS를 모의 주사 맞은 대조군 동물의 25일째 사진을 보여주는 것으로, 오른쪽 옆구리에 큰 종양을 보인다. 도 61r은 HPAF II-MUC1* 췌장암 세포를 이식받은 후, MNC2-MMAE를 주사 맞은 동물의 11일째 사진을 보여주는 것이다. 도 61s는 HPAF II-MUC1* 췌장암 세포를 이식받은 후, MNC2-MMAE를 주사 맞은 동물의 18일째 사진을 보여주는 것이다. 도 61t는 HPAF II-MUC1* 췌장암 세포를 이식받은 후, MNC2-MMAE를 주사 맞은 동물의 25일째 사진을 보여주는 것으로, 여기서, 육안상 관찰가능한 종양도 측지가능한 종양도 없다.

도 62a-62f는 더 많은 MUC1*을 발현하도록 조작된 HPAF II-MUC1* 세포인 0.5 M 인간 췌장암 세포를 오른쪽 옆구리에 이식받은 암컷 nu/nu 마우스의, IVIS 기기에서 촬영된 생물발광 사진을 보여주는 것이다. 종양 이식 후 7일째, 동물에 대조군으로서 PBS를 또는 MNC2-MMAE, DAR 4.1을 10 mg/kg으로 주사하였다. 도면에서 알 수 있는 바와 같이, 처리된 마우스는 66일째까지 종양 또는 잔류 종양 알갱이는 없다. HPAF II 세포주는 루시페라제를 잘 발현하지 않기 때문에, 생물발광은 약하다. 이러한 이유로, 본 발명자들은 또한 종양의 실제 크기를 기록하는 캘리퍼 측정도 수행하였다. 도 62a는 HPAF II-MUC1* 췌장암 세포를 이식받았지만, PBS를 모의 주사 맞은 대조군 동물의 IVIS 생물발광 사진을 보여주는 것이다. 도 61b는 HPAF II-MUC1* 췌장암 세포를 이식받은 후, MNC2-MMAE를 10 mg/kg으로 주사 맞은 동물의 IVIS 생물발광 사진을 보여주는 것이다. 도 62c는 MNC2-MMAE 처리군의 종양 알갱이 또는 남아있는 종양이 없는 것과 비교하여 과도한 종양 부담으로 인해 희생되어야 했던 HPAF II-MUC1* 대조군 동물로부터 절제된 종양의 사진을 보여주는 것이다. 도 62d는 대조군 및 MNC2-MMAE 처리된 마우스, 둘 모두에 대한 종양 이식 후 경과일수의 함수로서 생물발광(래디언스 포톤/sec/cm²)의 IVIS 측정의 오버레이 그래프를 보여주는 것이다. 도 62e는 대조군 대 처리된 마우스의 카플란-마이어(Kaplan-Meier) 생존 플롯을 보여주는 것이다. 도 62f는 대조군 동물 대 처리된 동물의 캘리퍼 측정값의 막대 그래프를 보여주는 것이다.

도 63a-63h는 90일 에스트로겐 펠릿을 이식받은 후, 이어서, 낮은 수준 내지 중간 수준의 MUC1*을 발현하는 T47D 야생형 세포 또는 더 많은 MUC1*을 발현하도록 조작된 T47D-MUC1* 세포인 1 M 인간 유방암 세포를 오른쪽 옆구리에 이식받은 암컷 NOD/SCID/GAMMA(NSG) 마우스의 생물발광 사진을 보여주는 것이다. 종양 이식 6일 후, 동물에 MNC2-테록스테칸, DAR 4.2를 10 mg/kg으로 주사하였지만, T47D-wt 처리된 마우스의 경우, 20 mg/kg으로 증가시켰다. T47D-MUC1* 처리된 마우스의 처리는 10 mg/kg으로 일정하게 유지되었다. 도 63a는 T47D-wt 종양 세포를 이식받았지만, PBS를 모의 주사 맞은 대조군 동물을 보여주는 것이다. 도 63b는 T47D-wt 세포를 이식받은 후, MNC2-테록스테칸을 주사 맞은 동물을 보여주는 것이다. 도 63c는 T47D-MUC1* 종양 세포를 이식받았지만, PBS를 모의 주사 맞은 대조군 동물을 보여주는 것이다. 도 63d는 T47D-MUC1* 세포를 이식받은 후, MNC2-테록스테칸을 주사 맞은 동물을 보여주는 것이다. 도 63e는 T47D 야생형 유방암 세포를 이식받은 마우스에 대한 종양 이식 후 경과일수의 함수로서 생물발광(래디언스 포톤/cm²)의 IVIS 측정의 그래프를 보여주는 것이다. 도 63f는 T47D-wt 유방암 세포를 이식받은 동물에 대한 각 마우스의 생물발광 측정값을 일별로 나타낸 막대 그래프로 보여주는 것이다. 도 63g는 T47D-MUC1* 유방암 세포를 이식받은 마우스에 대한 종양 이식 후 경과일수의 함수로서 생물발광(래디언스 포톤/cm²)의 IVIS 측정의 그래프를 보여주는 것이다. 도 63h는 T47D-MUC1* 유방암 세포를 이식받은 동물에 대한 각 마우스의 생물발광 측정값을 일별로 나타낸 막대 그래프로 보여주는 것이다.

도 64a-64t는 4일째부터 30일째까지의 개별 마우스의 IVIS 발광 측정값의 선 그래프를 보여주는 것이다. NOD/SCID/GAMMA 마우스에 T47D-wt 유방암 세포 또는 더 많은 MUC1*을 발현하는 T47D-MUC1* 세포를 이식하였다. 두 마우스 군 모두 PBS로 모의 처리하거나, 또는 MNC2-테록스테칸으로 처리하였다. 종양 이식 6일째, 동물에 MNC2-테록스테칸, DAR 4.2를 10 mg/kg으로 주사하였지만, T47D-wt 처리된 마우스의 경우 20 mg/kg으로 증가시켰다. T47D-MUC1* 처리된 마우스의 처리는 10 mg/kg으로 일정하게 유지되었다. 도 64a는 대조군 중 마우스 #1에서의 T47D-wt 종양 성장을 보여주는 것이다. 도 64b는 대조군 중 마우스 #2에서의 T47D-wt 종양 성장을 보여주는 것이다. 도 64c는 대조군 중 마우스 #3에서의 T47D-wt 종양 성장을 보여주는 것이다. 도 64d는 대조군 중 마우스 #4에서의 T47D-wt 종양 성장을 보여주는 것이다. 도 64e는 대조군 중 마우스 #5에서의 T47D-wt 종양 성장

을 보여주는 것이다. 도 64f는 MNC2-테록스테칸으로 처리된 군 중 마우스 #1에서의 T47D-wt 종양 성장을 보여주는 것이다. 도 64g는 MNC2-테록스테칸으로 처리된 군 중 마우스 #2에서의 T47D-wt 종양 성장을 보여주는 것이다. 도 64h는 MNC2-테록스테칸으로 처리된 군 중 마우스 #3에서의 T47D-wt 종양 성장을 보여주는 것이다. 도 64i는 MNC2-테록스테칸으로 처리된 군 중 마우스 #4에서의 T47D-wt 종양 성장을 보여주는 것이다. 도 64j는 MNC2-테록스테칸으로 처리된 군 중 마우스 #5에서의 T47D-wt 종양 성장을 보여주는 것이다. 도 64k는 대조군 중 마우스 #1에서의 T47D-MUC1* 종양 성장을 보여주는 것이다. 도 64l은 대조군 중 마우스 #2에서의 T47D-MUC1* 종양 성장을 보여주는 것이다. 도 64m은 대조군 중 마우스 #3에서의 T47D-MUC1* 종양 성장을 보여주는 것이다. 도 64n은 대조군 중 마우스 #4에서의 T47D-MUC1* 종양 성장을 보여주는 것이다. 도 64o는 대조군 중 마우스 #5에서의 T47D-MUC1* 종양 성장을 보여주는 것이다. 도 64p는 MNC2-테록스테칸으로 처리된 군 중 마우스 #1에서의 T47D-MUC1* 종양 성장을 보여주는 것이다. 도 64q은 MNC2-테록스테칸으로 처리된 군 중 마우스 #2에서의 T47D-MUC1* 종양 성장을 보여주는 것이다. 도 64r은 MNC2-테록스테칸으로 처리된 군 중 마우스 #3에서의 T47D-MUC1* 종양 성장을 보여주는 것이다. 도 64s는 MNC2-테록스테칸으로 처리된 군 중 마우스 #4에서의 T47D-MUC1* 종양 성장을 보여주는 것이다. 도 64s는 MNC2-테록스테칸으로 처리된 군 중 마우스 #5에서의 T47D-MUC1* 종양 성장을 보여주는 것이다.

도 65a-65d는 종양 세포의 이미지를 보여주는 것이다. 0일째 세포 염색은 세포가 MUC1*보다 더 많은 전장 MUC1을 발현하고, 염색 강도가 약하여 MUC1* 수용체 개수가 적다는 것을 나타내며, 이는 초기 암이라는 것을 시사하는 것이다. 인간 시간으로 대략 7년과 같은, 종양 이식 후 육십이일째(62), 발현 정도와 발현 강도 측면에서 MUC1* 발현이 낮은 발현에서 후기 종양의 높은 발현으로 극적으로 이동한 것을 쉽게 알 수 있다. 그에 반해, 일련의 종양 절편의 염색은 표면 발현 후 MUC1*로 절단되기 때문에 예상대로 전장 MUC1이 발현되었음을 보여준다. 그러나, 염색 강도는 증가하지 않았는데, 이는 발현된 MUC1의 대부분이 후기 종양에서 성장 인자 수용체 형태인 MUC1*로 절단되었음을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0030]

발명의 상세한 설명

[0031]

본원은 항MUC1* 다중특이적 항체 및 항MUC1* 항체 접합체 및 이를 제조하고, 사용하는 방법에 관한 것이다. MUC1 막관통 단백질의 절단된 형태는 모든 인간 암 중 75% 초과 암의 성장을 구동시키는 성장 인자 수용체이다. MUC1의 절단된 형태인 MUC1*(muc 1 스타로 발음)은 성장 인자 수용체이다. MUC1의 세포외 도메인 벌크의 절단 및 방출은 리간드인 이량체 NME1, NME6, NME7, NME7AB, NME7-X1 또는 NME8을 활성화하기 위한 결합 부위를 차폐 해제시킨다. 이는 모든 암 중 75% 초과 암에서 비정상적으로 발현되고, 훨씬 더 높은 비율로 전이성 암에서 과발현될 수 있는 가능성이 있는 바, 암 약물에 대한 이상적인 표적이 된다(문헌 [Mahanta et al. (2008) A Minimal Fragment of MUC1 Mediates Growth of Cancer Cells. PLoS ONE 3(4): e2054. doi:10.1371/journal.pone.0002054]; [Fessler et al. (2009), "MUC1* is a determinant of trastuzumab (Herceptin) resistance in breast cancer cells," Breast Cancer Res Treat. 118(1):113-124]). MUC1이 절단된 후, 세포의 도메인의 대부분이 세포 표면에서 떨어져 나간다. 나머지 부분인 MUC1*은 주요 성장 인자 수용체 서열인 PSMGFR (서열 번호 133)의 대부분 또는 그 모두로 구성되는 말단절단된 세포의 도메인을 가지고 있다.

[0032]

현재 환자에게 비경구적으로 투여되는 다수의 작용제는 표적화되지 않음에 따라 불필요하고, 종종 바람직하지 않은 신체의 세포 및 조직에 작용제를 전신 전달한다. 이로 인해 유해한 약물 부작용이 발생할 수 있으며, 종종 투여될 수 있는 약물(예컨대, 화학요법제, 세포독성제, 효소 억제제 및 항바이러스제 또는 항미생물제)의 용량을 제한한다.

[0033]

주요 목표는 치료제를 세포 및 조직에 특이적으로 표적화하는 방법을 개발하는 것이었다. 이러한 치료의 이점으로는 상기 작용제를 다른 세포 및 조직에 부적절하게 전달함으로써 발생하는 일반적인 생리적 효과를 회피하는 것을 포함한다. 이러한 한계 및 문제점 및 과거의 다른 한계 및 문제점은 본 개시내용을 통해 해결된다.

[0034]

특정 용어

[0035]

달리 정의되지 않는 한, 본원에서 사용된 모든 기술 및 과학 용어는 청구된 주제가 속하는 기술 분야의 당업자가 일반적으로 이해하는 것과 동일한 의미를 가진다. 본 개시내용 전역에 걸쳐 언급된 모든 특허, 특허 출원, 공개된 출원 및 간행물, GENBANK 서열, 웹사이트 및 다른 공개 자료는 달리 언급되지 않는 한, 그 전문이 참조로 포함된다. 일반적으로, 세포 배양, 세포 감염, 항체 생산 및 분자 생물학 방법에 대한 절차는 당업계에서 일반적으로 사용되는 방법이다. 상기 표준 기술은 예컨대, 예를 들어, 문헌 [Sambrook et al. (2000)] 및

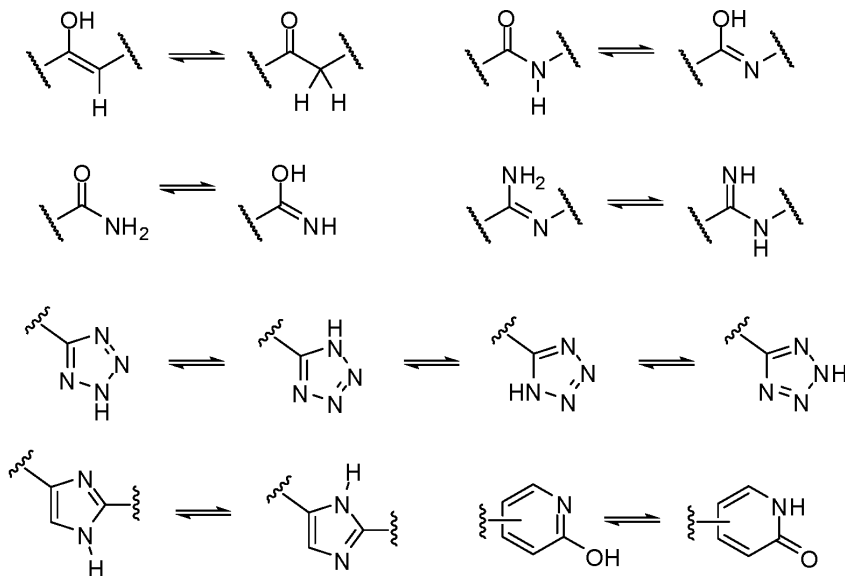
[Ausubel et al. (1994)]와 같은 참고 매뉴얼에서 살펴볼 수 있다.

- [0036] 본원에서 사용되는 바, "하나"("a," "an") 및 "그"라는 단수 형태는 맥락상 명백하게 언급되지 않는 한, 복수의 지시대상을 포함한다. 본원에서, 단수 사용은 구체적으로 달리 언급되지 않는 한, 복수를 포함한다. 본원에서 사용되는 바, "또는"의 사용은 달리 명시되지 않는 한 "및/또는"을 의미한다. 추가로, "포함하는"이라는 용어 뿐만 아니라, 다른 형태(예컨대, "포함하다(include)," "포함하다(includes)" 및 "포함된")의 사용은 제한적이지 않다.
- [0037] "포함하는(including)," "함유하는(containing)," 또는 "~을 특징으로 하는"이라는 것과 동의어인, "포함하는(comprising)"이라는 전환 용어는 포괄적이거나, 또는 개방적이며, 추가적인 언급되지 않은 요소 또는 방법 단계를 배제하지 않는다. "~로 구성된"이라는 전환 어구는 청구범위에서 언급되지 않은 임의의 요소, 단계 또는 성분을 배제한다. "본질적으로 ~로 구성된"이라는 전환 어구는 청구범위의 범주를 지정된 물질 또는 단계 및 청구된 발명의 기본적인고, 신규한 특징(들)에 실질적으로 영향을 미치지 않는 것으로 제한한다.
- [0038] 본원에서 사용되는 바, 범위 및 양은 특정 값 또는 범위에 대해 "약"으로 표현될 수 있다. 약이라는 것은 또한 정확한 양도 포함한다. 예를 들어, "약 1mg"은 "약 1mg" 및 "1 mg"도 의미한다. "약" 및 "대략"이라는 용어는 일반적으로 실험 오차 범위 내에 있을 것으로 예상되는 양을 포함한다.
- [0039] "개체," "환자" 또는 "피험체"라는 용어는 상호교환적으로 사용된다. 본원에서 사용되는 바, 이는 임의의 포유 동물(즉, 분류학상의 분류 동물계: 척삭동물: 척추동물: 포유동물 내의 임의의 목, 과 및 속의 종)를 의미한다. 일부 실시양태에서, 포유동물은 인간이다. 용어 중 어느 것도 의료 종사자(예컨대, 의사, 등록 간호사, 간호사, 의사 보조원, 간병인 또는 호스피스 종사자)의 감독(예컨대, 상시적 또는 간헐적)을 특징으로 하는 상황을 요구하거나, 또는 이에 제한되지 않는다.
- [0040] 용어 "폴리펩티드," "펩티드" 및 "단백질"은 아미노산 잔기의 중합체를 지칭하는 것으로 본원에서 상호교환적으로 사용된다. 본 용어는 자연적으로 발생된 아미노산 중합체 뿐만 아니라, 하나 이상의 아미노산 잔기가 비자연적으로 발생된 아미노산(예컨대, 아미노산 유사체)인 아미노산 중합체에 적용된다. 본 용어는 아미노산 잔기가 공유 펩티드 결합에 의해 연결된 것인, 전장 단백질(즉, 항원)을 비롯한, 임의 길이의 아미노산 쇄를 포함한다.
- [0041] 본원에서 아미노산 서열이 제공되는 경우, 서열의 L-, D- 또는 베타 아미노산 버전과 역(retro), 역위(inversion) 및 역-역위 이소폼도 고려된다. 펩티드는 또한 하나 이상의 아미노산 잔기가 상응하는 자연적으로 발생된 아미노산의 인공 화학적 유사체인 아미노산 중합체와 자연적으로 발생된 아미노산 중합체도 포함된다. 추가로, 본 용어는 펩티드 결합 또는 다른 변형된 결합(예컨대, 펩티드 결합이 α -에스테르, β -에스테르, 티오아미드, 포스포나미드, 카바메이트, 하이드록실레이트 등으로 대체되는 경우(예컨대, 문헌 [Spatola, (1983) *Chem. Biochem. Amino Acids and Proteins* 7: 267-357] 참조), 아미드가 포화 아민으로 대체되는 경우(예컨대, 미국 특허 제4,496,542호(Skiles et al.)(본원에서 참조로 포함), 및 문헌 [Kaltenbronn et al., (1990) Pp. 969-970 in *Proc. 11th American Peptide Symposium*, ESCOM Science Publishers, The Netherlands] 등 참조)에 의해 연결된 아미노산에 적용된다.
- [0042] 용어 "아미노산"은 자연적으로 발생된 아미노산 및 합성 아미노산 뿐만 아니라, 자연적으로 발생된 아미노산과 유사한 방식으로 작용하는 아미노산 유사체 및 아미노산 모방체를 지칭한다. 자연적으로 발생된 아미노산은 유전자 코드에 의해 코딩된 아미노산 뿐만 아니라, 추후 변형되는 아미노산, 예컨대, 하이드록시프롤린, γ -카복시글루타메이트 및 O-포스포세린이다. 아미노산은 소수성 아미노산, 극성 아미노산, 비극성 아미노산 및 하전된 아미노산으로 그룹화된다. 소수성 아미노산은 작은 소수성 아미노산 및 큰 소수성 아미노산을 포함한다. 작은 소수성 아미노산은 글리신, 알라닌, 프롤린 및 그의 유사체일 수 있다. 큰 소수성 아미노산은 발린, 류신, 이소류신, 페닐알라닌, 메티오닌, 트립토판 및 그의 유사체일 수 있다. 극성 아미노산은 세린, 트레오닌, 아스파라긴, 글루타민, 시스테인, 티로신 및 그의 유사체일 수 있다. 비극성 아미노산은 글리신, 알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 메티오닌, 페닐알라닌, 트립토판, 프롤린 및 그의 유사체일 수 있다. 하전된 아미노산은 리신, 아르기닌, 히스티딘, 아스파테이트, 글루타메이트 및 그의 유사체일 수 있다. 아미노산 유사체는 자연적으로 발생된 아미노산과 동일한 기본 화학 구조, 즉, 수소에 결합된 α 탄소, 카복실기, 아미노기 및 R 기를 갖는 화합물, 예컨대, 호모세린, 노르류신, 메티오닌 술폰시드를 지칭한다. 상기 유사체는 변형된 R 기(예컨대, 노르류신) 또는 변형된 펩티드 백본을 갖지만, 자연적으로 발생된 아미노산과 동일한 기본 화학 구조를 유지한다. 아미노산 모방체는 아미노산의 일반 화학 구조와 다른 구조를 갖지만, 자연적으로 발생된 아미노산과 유사한 방식으로 작용하는 화학 화합물을 지칭한다. 아미노산은 D 아미노산 또는 L 아미노산이다.

[0043] 본 명세서 및 첨부된 청구범위에서 사용되는 바, 달리 명시되지 않는 한, 하기 용어는 하기 명시되는 의미를 가진다.

[0044] 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 화합물은 하나 이상의 비대칭 중심을 포함하는 바, 절대 입체화학의 관점에서 (R)- 또는 (S)-로 정의되는 거울상 이성질체, 부분입체이성질체 및 다른 입체이성질체 형태를 생성한다. 달리 언급되지 않는 한, 본원에 개시된 화합물의 모든 입체이성질체 형태가 본 개시내용에 의해 고려되는 것으로 의도된다. 본원에 기술된 화합물이 알켄 이중 결합이 포함하는 경우, 달리 언급되지 않는 한, 본 개시내용은 E 및 Z 기하 이성질체(예컨대, 시스 또는 트랜스), 둘 모두 포함하는 것으로 의도된다. 따라서, 본원에 제공된 화합물은 거울상 이성질체적으로 순수하거나, 입체이성질체 또는 부분입체이성질체 혼합물일 수 있다. 본원에 제공된 화합물은 키랄 중심을 포함할 수 있다. 상기 키랄 중심은 (R) 또는 (S) 구성이거나, 그의 혼합물일 수 있다. 본원에 제공된 화합물의 키랄 중심은 생체내에서 에피머화를 될 수 있다. 따라서, 당업자는 생체내에서 에피머화된 화합물의 경우, (R) 형태의 화합물을 투여하는 것이 (S) 형태의 화합물을 투여하는 것과 동일하다는 것을 인식할 것이다. 유사하게, 모든 가능한 이성질체 뿐만 아니라, 그의 라세미체 및 광학적으로 순수한 형태, 및 모든 호변이성질체 형태도 포함되는 것으로 의도된다. 용어 "기하 이성질체"는 알켄 이중 결합의 E 또는 Z 기하 이성질체(예컨대, 시스 또는 트랜스)를 지칭한다. 용어 "위치 이성질체"는 벤젠 고리 주변의 오르토-, 메타-, 파라-이성질체와 같은 중심 고리 주변의 구조 이성질체를 지칭한다.

[0045] "호변이성질체"는 분자의 한 원자에서 같은 분자의 또 다른 원자로 양성자가 이동할 수 있는 분자를 지칭한다. 특정 실시양태에서, 본원에 제시된 화합물은 호변이성질체로 존재한다. 호변이성질체가 가능한 상황에서, 호변이성질체의 화학적 평형이 존재할 것이다. 호변이성질체의 정확한 비는 물리적 상태, 온도, 용매 및 pH를 비롯한 여러 인자에 따라 달라진다. 호변이성질체 평형의 몇 가지 예로는 하기를 포함한다:



[0046]

[0047] "약학적으로 허용되는 염"은 산 및 염기 부가염, 둘 모두 포함한다. 본원에서 기술된 화합물 또는 접합체 중 어느 하나의 약학적으로 허용되는 염은 염의 모든 약학적으로 적합한 염 형태를 포함하는 것으로 의도된다. 본원에 기술된 화합물의 바람직한 약학적으로 허용되는 염은 약학적으로 허용되는 산 부가염 및 약학적으로 허용되는 염기 부가염이다.

[0048] 본원에서 사용되는 바, 용어 "항체" 및 "면역글로불린"은 당업계의 용어이며, 본원에서 상호교환적으로 사용될 수 있으며, 항원에 특이적으로 결합하는 항원 결합 부위를 갖는 분자를 지칭한다. 특정 실시양태에서, 본원에 기술된 단리된 항체(예컨대, 단일클론 항체) 또는 그의 항원 결합 단편은 관심 단백질에 특이적으로 결합한다.

[0049] 항체는 예를 들어, 단일클론 항체, 재조합적으로 생산된 항체, 단일특이적 항체, 다중특이적 항체(이중특이적 항체 포함), 인간 항체, 인간화 항체, 키메라 항체, 합성 항체, 2개의 중쇄 및 2개의 경쇄 분자를 포함하는 사량체 항체, 항체 경쇄 단량체, 항체 중쇄 단량체, 항체 경쇄 이량체, 항체 중쇄 이량체, 항체 경쇄/항체 중쇄 쌍, 2개의 경쇄/중쇄 쌍(예컨대, 동일한 쌍)을 갖는 항체, 인트라바디, 이중접합체 항체, 단일 도메인 항체, 1가 항체, 2가 항체(단일특이적 또는 이중특이적 2가 항체 포함), 단일 쇄 항체, 또는 단일 쇄 가변 단편(scFv), 카멜화된 항체, 아피바디, Fab 단편, F(ab') 단편, F(ab')₂ 단편, 디설파이드 연결된 Fv(sdFv), 항이디오타입(항

Id) 항체(예컨대, 항항Id 항체 포함), 및 상기 중 임의의 것의 에피토프 결합 단편을 포함할 수 있다.

- [0050] 항체는 임의 타입(예컨대, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA 또는 IgY), 임의 클래스(예컨대, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 또는 IgA2) 또는 임의 서브클래스(예컨대, IgG2a 또는 IgG2b)의 면역글로불린 분자일 수 있다. 특정 실시양태에서, 본원에 기술된 항체는 IgG 항체(예컨대, 인간 IgG) 또는 클래스(예컨대, 인간 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4) 또는 그의 서브클래스이다.
- [0051] 본원에 개시된 항체에 대한 CDR 서열(들), 또는 본원에 개시된 항MUC1* 또는 항CD3 결합 도메인 서열은 (i) Kabat 넘버링 체계(문헌 [Kabat et al. (197) Ann. NY Acad. Sci. 190:382-391] 및 [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]); 또는 (ii) Chothia 넘버링 체계(이는 본원에서 "Chothia CDR"로 지칭될 것이다)(예컨대, [Chothia and Lesk, 1987, J. Mol. Biol., 196:901-917]; [Al-Lazikani et al., 1997, J. Mol. Biol., 273 :927-948]; [Chothia et al., 1992, J. Mol. Biol., 227:799-817]; [Tramontano A et al., 1990, J. Mol. Biol. 215(1): 175-82]; 및 미국 특허 제7,709,226호 참조); 또는 (iii) 예를 들어, 문헌 [Lefranc, M.-P., 1999, The Immunologist, 7: 132-136] 및 [Lefranc, M.-P. et al, 1999, Nucleic Acids Res., 27:209-212 ("IMGT CDRs")]에 기술된 바와 같은, ImMunoGeneTics (IMGT) 넘버링 체계; 또는 (iv) 문헌 [MacCallum et al, 1996, J. Mol. Biol., 262:732-745]에 따라 정의되거나, 또는 결정될 수 있다. 또한, 예컨대, 문헌 [Martin, A., "Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable Domains," in Antibody Engineering, Kontermann and Diibel, eds., Chapter 31, pp. 422-439, Springer-Verlag, Berlin (2001)]을 참조한다.
- [0052] Kabat 넘버링 체계와 관련하여, 항체 중쇄 분자 내의 CDR은 전형적으로 아미노산 위치 31 내지 35에 존재하며, 이는 임의적으로 35(Kabat 넘버링 체계에서 35A 및 35B로 지칭)(CDR1), 아미노산 위치 50 내지 65(CDR2), 및 아미노산 위치 95 내지 102(CDR3)에 이어지는 1 또는 2개의 추가 아미노산을 포함할 수 있다. Kabat 넘버링 체계를 사용하면, 항체 경쇄 분자 내의 CDR은 전형적으로 아미노산 위치 24 내지 34(CDR1), 아미노산 위치 50 내지 56(CDR2), 아미노산 위치 89 내지 97(CDR3)에 존재한다. 당업자에게 널리 공지된 바와 같이, Kabat 넘버링 체계를 사용하면, 항체 가변 도메인의 실제 선형 아미노산 서열은 FR 및/또는 CDR의 단축 또는 연장으로 인해 더 적거나, 또는 더 많은 아미노산을 포함할 수 있으며, 따라서, 아미노산의 Kabat 번호는 반드시 선형 아미노산 번호와 동일한 것은 아니다.
- [0053] 용어 "키메라" 항체는 중쇄 및/또는 경쇄의 일부가 특정 공급원 또는 종에서 유래하는 반면, 나머지 중쇄 및/또는 경쇄는 다른 공급원 또는 종에서 유래하는 항체를 지칭한다.
- [0054] "다중특이적"이라는 용어는 항체가 2개 이상의 별개의 항원 결정기에 특이적으로 결합할 수 있다는 것, 예를 들어, 항체 중쇄 가변 도메인(VH)과 항체 경쇄 가변 도메인(VL) 쌍에 의해 형성된 2개의 결합 부위가 각각 상이한 항원에 결합할 수 있다는 것을 의미한다.
- [0055] 본원에서 사용되는 바, 용어 "인간 항체" 또는 "인간화 항체"는 인간 생식세포 계열 면역글로불린 서열로부터 유래된 가변 및 불변 영역을 갖는 항체를 포함하는 것으로 의도된다. 인간 항체는 최신 기술 분야에 널리 공지되어 있다(문헌 [van Dijk, M.A., and van de Winkel, J.G., Curr. Opin. Chem. Biol. 5 (2001) 368-374]). 일부 경우에서, 인간 항체 또한 면역화시 내인성 면역글로불린 생산 부재하에서 전체 레퍼토리 또는 선택된 인간 항체를 생산할 수 있는 트랜스제닉 동물(예컨대, 마우스)에서 생산된다. 상기 생식세포 계열 돌연변이체 마우스에 인간 생식세포 계열 면역글로불린 유전자 어레이를 전이시키면 항원 챌린지시 인간 항체가 생성될 것이다(예컨대, 문헌 [Jakobovits, A., et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 (1993) 2551-2555]; [Jakobovits, A., et al, Nature 362 (1993) 255-258]; [Bruggemann, M., et al, Year Immunol. 7 (1993) 33-40] 참조). 추가 경우에서, 인간 항체는 또한 파지 디스플레이 라이브러리에서 생산된다(문헌 [Hoogenboom, H.R., and Winter, G., J. Mol. Biol. 227 (1992) 381-388]; [Marks, J.D., et al, J. Mol. Biol. 222 (1991) 581-597]). (Cole et al.) 및 (Boerner et al.)의 기술 또한 인간 단일클론 항체를 제조하는 데 이용가능하다(문헌 [Cole, et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, p. 77 (1985)]; 및 [Boerner, P., et al, J. Immunol. 147 (1991) 86-95]).
- [0056] 본원에서 사용되는 바, "항원"은 항체가 특이적으로 결합할 수 있는 에피토프를 포함하는 moiety 또는 분자이다. 따라서, 항원은 항체에 의해 특이적으로 결합된다. 특정 실시양태에서, 본원에 기술된 항체가 결합하는 항원은 관심 단백질, 예를 들어, MUC1*, CD3, 또는 그의 단편이다.

- [0057] 본원에서 사용되는 바, 항체와 관련하여 사용될 때 용어 "중쇄"는 불변 도메인의 아미노산 서열에 기초하여, 임의의 별개의 타입, 예컨대, 알파(α), 델타(δ), 엡실론(ϵ), 감마(γ) 및 뮤(μ)를 지칭할 수 있으며, 이는 각각 IgA, IgD, IgE, IgG 및 IgM 클래스의 항체를 생성하며, 이는 IgG의 서브클래스, 예컨대, IgG₁, IgG₂, IgG₃ 및 IgG₄를 포함한다.
- [0058] 본원에서 사용되는 바, 항체와 관련하여 사용될 때 용어 "경쇄"는 임의의 별개의 타입, 예컨대, 불변 도메인의 아미노산 서열에 기초하여, 카파(κ) 또는 람다(λ)를 지칭할 수 있다. 경쇄 아미노산 서열은 당업계에 널리 공지되어 있다. 구체적인 실시양태에서, 경쇄는 인간 경쇄이다.
- [0059] 본원에서 사용되는 바, 서열과 관련하여 용어 "아미노산 서열 동일성(%)" 또는 "서열 동일성"은 서열을 정렬하고, 필요한 경우, 최대 서열 동일성(%)을 달성하도록 갭을 도입한 후, 보수적 치환을 서열 동일성의 일부로서 간주하지 않으면서, 특정 서열 중 아미노산 잔기와 동일한 후보 서열 중의 아미노산 잔기의 백분율로 정의된다. 아미노산 서열 동일성(%)을 결정하기 위한 정렬은 예컨대, EMBOSS MATCHER, EMBOSS WATER, EMBOSS STRETCHER, EMBOSS NEEDLE, EMBOSS ALIGN, BLAST, BLAST-2, ALIGN 또는 Megalign (DNASTAR) 소프트웨어와 같은 공개적으로 이용가능한 컴퓨터 소프트웨어를 사용하는 것과 같이, 당업계의 기술 범위 내에 있는 다양한 방법으로 달성할 수 있다. 당업자는 비교되는 서열 전장에 걸쳐 최대 정렬을 달성하는 데 필요한 임의의 알고리즘을 포함하여 정렬을 측정하는 데 적합한 파라미터를 결정할 수 있다.
- [0060] ALIGN-2가 아미노산 서열 비교에 사용되는 상황에서, 주어진 아미노산 서열 A의 주어진 아미노산 서열 B에 대한, 주어진 아미노산 서열 B와, 또는 주어진 아미노산 서열 B 대비의 아미노산 서열 동일성(%) (이는 대안적으로 주어진 아미노산 서열 B에 대한, 주어진 아미노산 서열 B와, 또는 주어진 아미노산 서열 B 대비의 특정 아미노산 서열 동일성(%)을 갖거나, 또는 포함하는 주어진 아미노산 서열 A로 표현될 수 있다)은 하기와 같이 계산된다: $100 \times X/Y$ 분율(여기서, X는 A 및 B의 해당 프로그램 정렬에서 서열 정렬 프로그램 ALIGN-2에 의해 동일한 매치로 점수화된 아미노산 잔기 개수이고, 여기서, Y는 B 중 아미노산 잔기의 총 개수이다). 아미노산 서열 A의 길이가 아미노산 서열 B의 길이와 같지 않은 경우, B 대비 A의 아미노산 서열 동일성(%)은 A 대비 B의 아미노산 서열 동일성(%)과 같지 않다는 것을 이해할 것이다. 달리 구체적으로 언급하지 않는 한, 본원에 사용된 모든 아미노산 서열 동일성(%) 값은 바로 앞 단락에 기술된 바와 같이 ALIGN-2 컴퓨터 프로그램을 사용하여 구한다.
- [0061] 용어 "전장 항체," "무손상 항체" 및 "전체 항체"는 실질적으로 무손상인 항체를 지칭하는 것으로 본원에서 상호교환적으로 사용되며, 하기 정의되는 항체 단편은 아니다. 본 용어는 특히 Fc 영역을 포함하는 중쇄를 갖는 항체를 지칭한다.
- [0062] "항체 단편"은 은 무손상 항체의 일부만을 포함하며, 여기서, 상기 부분은 무손상 항체에 존재할 때 해당 부분과 일반적으로 연관된 기능 중 적어도 1, 2, 3개 및 대부분 또는 그 모두를 유지한다. 한 측면에서, 항체 단편은 무손상 항체의 항원 결합 부위를 포함하는 바, 항원에 결합하는 능력을 유지한다.
- [0063] 본원에서 사용되는 바, "에피토프"는 당업계에 공지된 용어이며, 항체가 특이적으로 결합할 수 있는 항원의 국재화된 영역을 지칭한다. 에피토프는 연속 아미노산의 선형 에피토프일 수 있거나, 또는 항원의 2개 이상의 비연속 영역으로부터의 아미노산을 포함할 수 있다.
- [0064] 본원에서 사용되는 바, 항체 결합의 맥락에서 "결합하다," "~에 결합하다," "특이적으로 결합하다" 또는 "특이적으로 ~에 결합하다"라는 용어는 항체가 항원(예컨대, 에피토프)에 결합하는 것을 지칭하며, 상기 결합은 당업자가 이해하는 바와 같다. 특정 실시양태에서, 항원에 특이적으로 결합하는 분자는 분자가 또 다른 항원에 결합할 때의 K_d보다 적어도 2 로그, 2.5 로그, 3 로그, 4 로그 더 낮은(더 높은 친화도) 친화도(K_d)로 항원에 결합한다. 또 다른 특정 실시양태에서, 항원에 특이적으로 결합하는 분자는 다른 단백질과 교차 반응하지 않는다.
- [0065] "연결 모이어티" 또는 "링커"(예컨대, L로 표시)는, 하나는 접합 모이어티 Y를 통해 폴리펩티드(예컨대, 항체)에의 접합을 위한 것이고, 나머지 다른 하나는 연결 모이어티(SP로 표시) 또는 SP 부재시, 모이어티 T에의 접합을 위한 것인, 2개의 반응성 말단을 갖는 분자이다. 링커의 폴리펩티드 접합 반응성 말단은 전형적으로 폴리펩티드(예컨대, 항체) 상의 시스테인 티올 기를 통해 폴리펩티드(예컨대, 항체)에 접합될 수 있는 부위이며, 따라서, 전형적으로 티올 반응성 기, 예컨대, 말레이미드 또는 디브로모말레이미드이거나, 또는 본원에 정의된 바와 같다.
- [0066] 본원에서 사용되는 바, "치료" 또는 "치료하는" 또는 "완화시키는" 또는 "호전시키는"이라는 것은 상호교환적으

로 사용된다. 본 용어는 치료적 이점 및/또는 예방적 이점을 포함하나, 이에 제한되지 않는, 유익하거나, 또는 원하는 결과를 얻기 위한 접근법을 지칭한다. "치료적 이점"이란 치료 중인 기저 장애의 근절 또는 호전을 의미한다. 또한, 치료적 이점은 기저 장애 연관된 하나 이상의 생리적 증상을 근절 또는 호전시켜 환자가 여전히 기저 장애를 앓고 있음에도 불구하고, 환자에서 개선이 관찰되는 것을 통해 달성된다. 예방적 이점을 위해, 일부 실시양태에서, 조성물은 질환 진단이 내려지지 않았더라도, 특정 질환이 발생할 위험이 있는 환자, 또는 질환의 하나 이상의 생리적 증상을 보고하는 환자에게 투여된다.

[0067] **MUC1* 결합 도메인**

[0068] 일부 실시양태에서, 본원에서는 항MUC1* 결합 도메인을 포함하는 항체를 개시한다. 일부 실시양태에서, MUC1* 결합 도메인은 항체 또는 그의 항원 결합 단편 또는 변이체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원 결합 단편 또는 변이체는 단일클론 항체이다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원 결합 단편 또는 변이체는 인간 항체, 무인 항체, 인간화 항체, 또는 키메라 항체이다. 일부 실시양태에서, MUC1* 결합 도메인은 1가 Fab, 2가 Fab'2, 단일 쇠 가변 단편(scFv), 또는 그의 기능성 단편 또는 변이체를 포함한다. 일부 실시양태에서, MUC1* 결합 도메인은 IgG1, IgG2, IgG3, 또는 IgG4 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, MUC1* 결합 도메인은 IgG1 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, MUC1* 결합 도메인은 IgG2 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, MUC1* 결합 도메인은 IgG3 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, MUC1* 결합 도메인은 IgG4 도메인을 포함한다.

[0069] 일부 실시양태에서, MUC1*에 특이적으로 결합하는 항체, 또는 그의 기능성 단편 또는 기능성 변이체는 항MUC1* 중쇄 및 항MUC1* 경쇄를 포함한다.

[0070] 일부 실시양태에서, 항MUC1* 중쇄는 항MUC1* 중쇄 가변 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항MUC1* 중쇄 가변 도메인은 IgG1, IgG2, IgG3, 또는 IgG4 중쇄의 가변 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항MUC1* 경쇄는 항MUC1* 경쇄 가변 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항MUC1* 경쇄 가변 도메인은 카파 또는 람다 경쇄의 가변 도메인을 포함한다.

[0071] 일부 실시양태에서, 항MUC1* 중쇄 가변 도메인은 IgG1 중쇄의 가변 도메인을 포함하고, 항MUC1* 경쇄 가변 도메인은 카파 또는 람다 경쇄의 가변 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항MUC1* 중쇄 가변 도메인은 IgG2 중쇄의 가변 도메인을 포함하고, 항MUC1* 경쇄 가변 도메인은 카파 또는 람다 경쇄의 가변 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항MUC1* 중쇄 가변 도메인은 IgG3 중쇄의 가변 도메인을 포함하고, 항MUC1* 경쇄 가변 도메인은 카파 또는 람다 경쇄의 가변 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항MUC1* 중쇄 가변 도메인은 IgG4 중쇄의 가변 도메인을 포함하고, 항MUC1* 경쇄 가변 도메인은 카파 또는 람다 경쇄의 가변 도메인을 포함한다.

[0072] 일부 실시양태에서, 항MUC1* 중쇄 가변 도메인은 IgG1 중쇄의 가변 도메인을 포함하고, 항MUC1* 경쇄 가변 도메인은 카파 경쇄의 가변 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항MUC1* 중쇄 가변 도메인은 IgG2 중쇄의 가변 도메인을 포함하고, 항MUC1* 경쇄 가변 도메인은 카파 경쇄의 가변 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항MUC1* 중쇄 가변 도메인은 IgG3 중쇄의 가변 도메인을 포함하고, 항MUC1* 경쇄 가변 도메인은 카파 경쇄의 가변 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항MUC1* 중쇄 가변 도메인은 IgG4 중쇄의 가변 도메인을 포함하고, 항MUC1* 경쇄 가변 도메인은 카파 경쇄의 가변 도메인을 포함한다.

[0073] 일부 실시양태에서, 항MUC1* 중쇄 가변 도메인은 IgG1 중쇄의 가변 도메인을 포함하고, 항MUC1* 경쇄 가변 도메인은 람다 경쇄의 가변 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항MUC1* 중쇄 가변 도메인은 IgG2 중쇄의 가변 도메인을 포함하고, 항MUC1* 경쇄 가변 도메인은 람다 경쇄의 가변 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항MUC1* 중쇄 가변 도메인은 IgG3 중쇄의 가변 도메인을 포함하고, 항MUC1* 경쇄 가변 도메인은 람다 경쇄의 가변 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항MUC1* 중쇄 가변 도메인은 IgG4 중쇄의 가변 도메인을 포함하고, 항MUC1* 경쇄 가변 도메인은 람다 경쇄의 가변 도메인을 포함한다.

[0074] 일부 실시양태에서, MUC1*에 특이적으로 결합하는 항체, 또는 그의 기능성 단편 또는 기능성 변이체는 단일 쇠 가변 단편(scFv) 또는 항원 결합 단편(Fab)을 포함한다. 일부 실시양태에서, MUC1*에 특이적으로 결합하는 항체, 또는 그의 기능성 단편 또는 기능성 변이체는 단일 쇠 가변 단편을 포함한다. 일부 실시양태에서, MUC1*에 특이적으로 결합하는 항체, 또는 그의 기능성 단편 또는 기능성 변이체는 항원 결합 단편(Fab)을 포함한다.

[0075] 일부 실시양태에서, 항MUC1* 중쇄 가변 도메인은 상보성 결정 영역(CDR): HC-CDR1, HC-CDR2, 및 HC-CDR3을 포함하고, 여기서, 항MUC1* 중쇄 가변 도메인의 HC-CDR1, HC-CDR2, 및 HC-CDR3은 HC-CDR1: 서열 번호 1 또는 4; HC-CDR2: 서열 번호 2 또는 5; HC-CDR3: 서열 번호 3 또는 6에 따른 아미노산 서열을 포함하고; 여기서, CDR은

HC-CDR1, HC-CDR2, 또는 HC-CDR3 중 적어도 하나에 0-2개의 아미노산 변형(들)(예컨대, 0 또는 1개의 아미노산 변형(들))을 포함한다.

[0076] 일부 실시양태에서, 항MUC1* 경쇄 가변 도메인은 상보성 결정 영역(CDR): LC-CDR1, LC-CDR2, 및 LC-CDR3을 포함하고, 여기서, 항MUC1* 경쇄 가변 도메인의 LC-CDR1, LC-CDR2, 및 LC-CDR3은 LC-CDR1: 서열 번호 13 또는 16; LC-CDR2: 서열 번호 14 또는 17; LC-CDR3: 서열 번호 15 또는 18에 따른 아미노산 서열을 포함하고; 여기서, CDR은 LC-CDR1, LC-CDR2, 또는 LC-CDR3 중 적어도 하나에 0-2개의 아미노산 변형(들)(예컨대, 0 또는 1개의 아미노산 변형(들))을 포함한다.

[0077] 일부 실시양태에서, 항MUC1* 중쇄는 서열 번호 38 또는 44와 적어도 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항MUC1* 경쇄는 서열 번호 41 또는 47과 적어도 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.

표 1

표 1. MUC1* 결합 도메인 CDR 서열

구성물	서열 번호	MUC1* HC-CDR1	서열 번호	MUC1* HC-CDR2	서열 번호	MUC1* HC-CDR3
항MUC1* 20A10	1	TYAMS	2	SIGRAGSTYYSDSVKG	3	GPIYNDYDEFAY
항MUC1* MNC2	4	GYAMS	5	TISSGGTYIYPDSVKG	6	LGGDNYEYFDV
구성물	서열 번호	MUC1* LC-CDR1	서열 번호	MUC1* LC-CDR2	서열 번호	MUC1* LC-CDR3
항MUC1* 20A10	13	KSSQSVLYSSNQKNYLA	14	WASTRES	15	HQYLSSLT
항MUC1* MNC2	16	RASKSVSTSGYSYMH	17	LASNLES	18	QHSRELPFT

[0078]

표 2

표 2: 항MUC1* 결합 도메인의 예시적인 중쇄 서열, 중쇄 가변 도메인 서열, 경쇄 서열, 및 경쇄 가변 도메인 서열

구성물	서열 번호	서열
항 MUC1* MNC2 HC DNA	37	gaggtgcagctggtggagctctgggggaggccctggtcaagcctgggggtccctgagac tc tcctgtgcagccctctggtattcaccttcagtggctatgccatgagctgggtccgaggt ccagggaagggtgctggagtggtctcaaccattagtagtgcggaacctacatafactac ccgactcagtgaaaggccggtattcacatctccagagacaacgccaagaactcactgtat ctgcaaatgaacagcctgagagccgagggacacggccgtgtattactgtgcgagacttgg g ggggataattactacgaatacttcgafgtctggggcaaggaccaggtcaccgtctcc tcgcctccacaaagggtccatcggtcttccctggcgccctgctccaggagcacctcc gagagcacagccgcccgtggctgctgctgaaggacttcccgaaacgggtgacggt g tcgtggaaactcaggcgctctgaccagcggtgacacaccttccagctgtcctacagtcc tcaggactctactccctcagcagctgtgtgaccgtgccctccagcaacttcggcacccag acctacacctgcaacgtagatcacaagcccagcaacaccaagggtggacaagacagtga g cgcaaatgtgtgtcgtggtgcccaccgtgccagcacacctgtggcaggaccgtcagtc ttctcttcccccaaaaccaaggacacctcatgatctccgggacccctgaggtcacg tgcgtgtgtgtgtgacgtgagccacgaagaccccgaggtccagttcaactgtgtacgtgga c ggctgtggaggtgcataatgccaaagacaagccacgggaggagcagttcaacagcacgt tc cgtgtgtgtcagcgtctcaccgttctgaccaggactggctgaacggcaaggagtacaa g tgcagggtctccaacaaggcctccagccccatcgagaaacctctcaaaacca a gggcagccccgagaaccacaggtgtacacctgccccatccgggaggagatgacca ag aaccagggtcagccctgacctgctgtgcaaggcttctaccccgacatcgccgtggag

[0079]

		tgggagagcaatgggagcgggagagaacaactacaagaccacacccatgctggactcc gacgggctccttctctctacagcaagctcaccgtggagagagcaggtaggagcagggg g aacgtcttctcatgctcctgtagcatgaggtctgcacaaccactacacgcagaagagc ctctccctgtctccgggtaaatagtaa
항 MUC1* MNC2 HC 아미노산	38	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSGYAMSWVR QAPGKGLEWVSTISSGGTYIYYPDSVKGRFTISRDNKNS LYLQMNSLRAEDTAVYYCARLGGDNYEYFDVWGKGT TVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCP APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
항 MUC1* MNC2 HC 가변 도메인	39	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSGYAMSWVR QAPGKGLEWVSTISSGGTYIYYPDSVKGRFTISRDNKNS LYLQMNSLRAEDTAVYYCARLGGDNYEYFDVWGKGT TVTVSS
항 MUC1* MNC2 LC DNA	40	gacattgtgtgaccagttccagcctccttggccgtgtctccagacagagggccacc atcacctgcagagccagtaagagtgtcagtaccagcgatacctctacatgcactggtatc agcagaaccagagacaactcctaaactcctgattacctgcatccaatctggagagcg gggtccagccaggttcagcggcagtggtctgggaccgattcacccctacaattaatcc tgtggaagctaatactgatactgcaaatattactgtcagcacagtggagctgccttcacatt cggcggaggggaccaaggtggagatcaaacgaactgtacgggtgctgcaccatctgtct tcattctcccgccatctgtagcaggtgaaatctgggaactgcctctgttgtgtgctgctga ataactctatccagagaggccaagtacagtgtgctgtgataacgcccctcaatcgg gtaactccagagagagttgcacagagcagcagcaagacagcacctacagcctcag cagcaccctgacgtgagcaagcagactacgagaaacacaaagtctacgctgcgaa gtacccatcagggcctgagctgcccgtcacaagagcttcaacaggggagagtggtta g
항 MUC1* MNC2 LC 아미노산	41	DIVLTQSPASLAVSPGQRATITCRASKSVSTSGYSYMHW YQQKPGQPPKLLIYLASNLESGVPARFSGSGSGTDFTLTI NPVEANDTANYYCQHSRELPTFGGGTKVEIKRTRTVAA PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWCVD NALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTSLSKADYEKHK VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC*
항 MUC1* MNC2 LC 가변 도메인	42	DIVLTQSPASLAVSPGQRATITCRASKSVSTSGYSYMHW YQQKPGQPPKLLIYLASNLESGVPARFSGSGSGTDFTLTI NPVEANDTANYYCQHSRELPTFGGGTKVEIKRT
항 MUC1* 20A10 HC DNA	43	CAGGTGCAGCTGGTTGAATCTGGCGCGGCACTTGTGA AGCCTGGCGGATCTCTGAGACTGAGCTGTGCCGCCAG CGGCTTACCTTTAGCACATACGCCATGAGCTGGATCA GACAGGCCCTGGCAAAGGCCTGGAATGGGTGgcgTCT ATTGGCAGAGCCGGCAGCACCTACTACAGCGACTCTG TGAAGGGCAGATTACCATCAGCCGGGACAACGCCAA GAACAGCCTGTACCTGCAGATGAACCTCCCTGAGAGCC GAGGACACCGCCGTGTACTATTGTGCCAGAGGACCCA TCTACAACGACTACGACGAGTTCGCCTATTGGGGCCA GGGCACACTGGTCACAGTTTCTAGCGCTAGCACCAG GGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCTCCAAGAG

[0080]

		CACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTC AAGGACTACTTCCCCGAGCCGGTGACGGTGTCTGTGGA ACTCAGGCGCCCTGACCAGCGCGTGACACCTTCCC GGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCA GCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCA GACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAAC ACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTG ACAAAACTCACATGCCCCACCGTGCCCAGCACCTGA ACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCCTTCCCCCAA AACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGACCCCTGA GGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGAC CCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGG AGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGC AGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCTAC CGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTAC AAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCCA TCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCG AGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAG GAGATGACCAAGAACCAGGTACGCTGACCTGCCTGG TCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTG GGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAATAACAAGC CACGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTCC TCTACAGCAAGCTACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCA GCAGGGGAACGTCTTCTCATGTCCGTGATGCATGAG GCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCC TGTCTCCGGGTAAA
항 MUC1* 20A10 HC 아미노산	44	QVQLVESGGGLVPGGSLRLSCAASGFTTFSTYAMSWIRQ APGKGLEWVASIGRAGSTYYSDSVKGRFTISRDNAKNSL YLQMNSLRAEDTAVYYCARGPIYNDYDEFAYWGQGT LTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCTPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTKSKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
항 MUC1* 20A10 HC 가변 도메인	45	QVQLVESGGGLVPGGSLRLSCAASGFTTFSTYAMSWIRQ APGKGLEWVASIGRAGSTYYSDSVKGRFTISRDNAKNSL YLQMNSLRAEDTAVYYCARGPIYNDYDEFAYWGQGT LTVSS
항 MUC1* 20A10 LC DNA	46	Gaaattgtctgacacagagccccgccacactgtcatttctccaggcgaagagccac actgagctgcaagagcagccagagcgtgctgtactccagcaaccagaagaactacctgg cctggatcagcagaagcccgccaagctctcggctgctgatctattggccagcaca gagagagcggcatccctgccaagatttctggcagcggctctggcaccgatttcaccctgac cataagcagcctggaacctgaggaacttgcctgtattactgccaccagtacctgagcag cctgaccttggcggaggcaccgaagtggaatcaagcggctgacggctgctgaccat ctgtcttctctcccgccatctgatgagcagtggaatctggaactgcctgtgtgtgct gctgaataacttctatccagagaggccaagtacagtggtgctggataacgcctcca atcgggtaactccagagaggtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagc ctcagcagcaccctgacgctgagcaagcagactacgagaacacaaagtctacgcctg cgaagtcacccatcagggcctgagctgcccgtcacaagagcttcaacaggggagagt gttag

[0081]

항 MUC1* 20A10 LC 아미노산	47	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCKSSQSVLYSSNQKNYLA WYQQKPGQAPRLLIYWASTRESGIPARFSGSGSGTDFTLT ISSLEPEDFAVYYCHQYLSLTFGGGTKVEIKRRTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWCVDNA LQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVY ACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC-
항 MUC1* 20A10 LC 가변 도메인	48	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCKSSQSVLYSSNQKNYLA WYQQKPGQAPRLLIYWASTRESGIPARFSGSGSGTDFTLT ISSLEPEDFAVYYCHQYLSLTFGGGTKVEIKR

[0082]

표 3

표 3: 항MUC1* 단일쇄 가변 단편(scFv) 서열

구성물	서열 번호	서열
항 MUC1* 20A10 scFv	129	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFTSTYAMSWIRQ APGKGLEWVASIGRAGSTYYSDSVKGRFTISRDNAKNSL YLQMNSLRAEDTAVYYCARGPIYNDYDEFAYWGQGT LTVTVSSGGGGSGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERAT LSCKSSQSVLYSSNQKNYLAWYQQKPGQAPRLLIYWAS TRESGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFAVYYCHQYLS SLTFGGGGTKVEIKR
항 MUC1* MNC2 scFv	130	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFTSGYAMSWVR QAPGKGLEWVSTISSGGTYIYYPDVSKGRFTISRDNAKNS LYLQMNSLRAEDTAVYYCARLGGDNYEYFDVWGKGT TQSPATLSLSPGERATLTVTVSSGGGGSGGGSGGGGSDIVLT QSPASLAVSPGQRATITCRASKSVSTSGYSYMHWYQQKPGQPPKLLIY LASNLESQVTPARFSGSGSGTDFTLTINPVEANDTANYYCQHSRE LPFTFGGGGTKVEIKRT

[0083]

[0084] CD3 결합 도메인

[0085] 일부 실시양태에서, 본원에서는 항CD3 결합 도메인을 포함하는 항체를 개시한다. 일부 실시양태에서, CD3 결합 도메인은 항체 또는 그의 항원 결합 단편 또는 변이체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원 결합 단편 또는 변이체는 단일클론 항체이다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원 결합 단편 또는 변이체는 인간 항체, 무인 항체, 인간화 항체, 또는 키메라 항체이다. 일부 실시양태에서, CD3 결합 도메인은 1가 Fab, 2가 Fab'2, 단일쇄 가변 단편(scFv), 또는 그의 기능성 단편 또는 변이체를 포함한다.

[0086] 일부 실시양태에서, CD3 결합 도메인은 IgG1, IgG2, IgG3, 또는 IgG4 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, CD3 결합 도메인은 IgG1 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, CD3 결합 도메인은 IgG2 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, CD3 결합 도메인은 IgG3 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, CD3 결합 도메인은 IgG4 도메인을 포함한다.

[0087] 일부 실시양태에서, CD3에 특이적으로 결합하는 항체, 또는 그의 기능성 단편 또는 기능성 변이체는 항CD3 중쇄 및 항CD3 경쇄를 포함한다.

[0088] 일부 실시양태에서, 항CD3 중쇄는 항CD3 중쇄 가변 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항CD3 중쇄 가변 도메인은 IgG1, IgG2, IgG3, 또는 IgG4 중쇄의 가변 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항CD3 경쇄는 항CD3 경쇄 가변 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항CD3 경쇄 가변 도메인은 카파 또는 람다 경쇄의 가변 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항CD3 중쇄 가변 도메인은 IgG1 중쇄의 가변 도메인을 포함하고, 항CD3 경쇄 가변 도메인은 카파 또는 람다 경쇄의 가변 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항CD3 중쇄 가변 도메인은 IgG2 중쇄의 가변 도메인을 포함하고, 항CD3 경쇄 가변 도메인은 카파 또는 람다 경쇄의 가변 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항CD3 중쇄 가변 도메인은 IgG3 중쇄의 가변 도메인을 포함하고, 항CD3 경쇄 가변 도메인은 카파 또는 람다 경쇄의 가변 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항CD3 중쇄 가변 도메인은 IgG4 중쇄의 가변 도메인을 포함하고, 항CD3 경쇄 가변 도메인은 카파 또는 람다 경쇄의 가변 도메인을 포함한다.

[0089] 일부 실시양태에서, CD3에 특이적으로 결합하는 항체, 또는 그의 기능성 단편 또는 기능성 변이체는 단일쇄 가변 단편(scFv) 또는 항원 결합 단편(Fab)을 포함한다. 일부 실시양태에서, CD3에 특이적으로 결합하는 항체, 또는 그의 기능성 단편 또는 기능성 변이체는 단일쇄 가변 단편(scFv)을 포함한다. 일부 실시양태에서, CD3에 특이적으로 결합하는 항체, 또는 그의 기능성 단편 또는 기능성 변이체는 항원 결합 단편(Fab)을 포함한다.

[0090] 일부 실시양태에서, 항CD3 중쇄 가변 도메인은 상보성 결정 영역(CDR): HC-CDR1, HC-CDR2, 및 HC-CDR3을 포함하고, 여기서, 항CD3 중쇄 가변 도메인의 HC-CDR1, HC-CDR2, 및 HC-CDR3은 HC-CDR1: 서열 번호 7 또는 10; HC-CDR2: 서열 번호 8 또는 11; HC-CDR3: 서열 번호 9 또는 12에 따른 아미노산 서열을 포함하고; 여기서, CDR은 HC-CDR1, HC-CDR2, 또는 HC-CDR3 중 적어도 하나에 0-2개의 아미노산 변형(들)(예컨대, 0 또는 1개의 아미노산 변형(들))을 포함한다.

[0091] 일부 실시양태에서, 항CD3 경쇄 가변 도메인은 상보성 결정 영역(CDR): LC-CDR1, LC-CDR2, 및 LC-CDR3을 포함

하고, 여기서, 항CD3 경쇄 가변 도메인의 LC-CDR1, LC-CDR2, 및 LC-CDR3은 LC-CDR1: 서열 번호 19 또는 22; LC-CDR2: 서열 번호 20 또는 23; LC-CDR3: 서열 번호 21 또는 24에 따른 아미노산 서열을 포함하고; 여기서, CDR은 LC-CDR1, LC-CDR2, 또는 LC-CDR3 중 적어도 하나에 0-2개의 아미노산 변형(들)(예컨대, 0 또는 1개의 아미노산 변형(들))을 포함한다.

[0092] 일부 실시양태에서, 항CD3 중쇄는 서열 번호 26 또는 32와 적어도 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.

[0093] 일부 실시양태에서, 항CD3 중쇄는 서열 번호 30 또는 33과 적어도 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.

[0094] 일부 실시양태에서, 항CD3 중쇄는 표 5의 임의의 아미노산 서열과 적어도 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.

[0095] 일부 실시양태에서, 항CD3 경쇄는 표 5의 임의의 아미노산 서열과 적어도 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.

표 4

표 4: 항CD3 CDR

구성물	서열 번호	CD3 HC-CDR1	서열 번호	CD3 HC-CDR2	서열 번호	CD3 HC-CDR3
항 CD3 OKT3	7	RYTMH	8	YINPSRGYTNYN QKVKD	9	YYDDHY
항 CD3 12F6	10	SYTMH	11	YINPSSGYTKYNQ KFKD	12	WQDYDVYFDY
구성물	서열 번호	CD3 LC-CDR1	서열 번호	CD3 LC-CDR2	서열 번호	CD3 LC-CDR3
항 CD3 OKT3	19	SASSSVSYMN	20	DTSKLAS	21	QQWSSNPFT
항 CD3 12F6	22	RASSSVSYMH	23	YATSNLAS	24	QQWSSNPPT

[0096]

표 5

표 5: 항CD3 결합 도메인의 예시적인 중쇄 서열, 중쇄 가변 도메인 서열, 경쇄 서열, 및 경쇄 가변 도메인 서열

구성물	서열 번호	서열
항 CD3 OKT3 HC DNA	25	cagggtcaactgggtcagagcgggtggaggtgtggttcagcctggtcgtagcctgagact gagctgcaaggcctcgggtacacctttacaagatacactatgcactgggtcagacagg ccctggcaaggcctggaatggattggctacatcaaccctagccggggatataccaa ctacaaccagaaagtgaaggacagattcaccatcagcacagataagtccaagtcacc gctttctgcagatggactccctgcgtccagaggacacagctgtgtactactgcgccg gtactacgacgaccattactgtctggtactgggtcagggaaccaccctgaccgttag

[0097]

		cagtgctagcaccaggcccatcggtcttccccctggcaccctctccaagagcacct ctgggggcacagcggccctgggctgcctgtcaaggactacttcccagcgggtga cgggtgtctggaactcagggccctgaccagcggcgtgcacaccttccggctgtctca cagtcctcaggactctactcctcagcagcgtgtgacgtgcccctccagcagcttggg caccagacctatctgcaacgtgaatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaag aaagttgagcccaatcttgtgacaaaactcacacatgccaccgtgccagcacctga actcctggggggaccgtcagctcttcttcccccaaaacccaaggacaccctcatgat ctcccgaccctgaggtcacatgcgtgtgtgtgacgtgagccacgaagacctgag gtcaagttcaactgtacgtggacggcgtggaggtgcataatccaagacaaagccgc gggaggagcagtagacaacagcacgtaccgtgtgtgagcgtctcaccgtctgcacca ggactggctgaatggcaaggagtagaagtgcaaggtctccaaagaagccctccagcc cccatcgagaaaaccatctccaaagccaagggcagcccgagaaaccacaggtgtac acctgcccccatccgggacgagctgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctg gtcaaggccttctatccagcgacatcgccgtggagtgaggagcaatggcagccg gagaaactacaagaccacgcctccgtgtggactccgacggctccttctctctac agcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccg tgatgcatgaggctctgcacaaccactacgcagaagagcctctccctgtctccgggt aatga
항 CD3 OKT3 HC 아미노산	26	QVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCKASGYTFTRYTMHWV RQAPGKGLEWIGYINPSRGYTNYNQVKVDRFTISTDKS KSTAFQMDSLRLPEDTAVYYCARYYDDHYCLDYWGQ GTTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT CPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPPVLDSGSEFFLYSKLTVDKSRW QQGNVVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
항 CD3 OKT3 HC 가변 도메인	27	QVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCKASGYTFTRYTMHWV RQAPGKGLEWIGYINPSRGYTNYNQVKVDRFTISTDKS KSTAFQMDSLRLPEDTAVYYCARYYDDHYCLDYWGQ GTTLTVSS
항 CD3 OKT3 LC DNA	28	Cagatgaccagagcccttctcttatctgccagcgtggcgatagagtaccatcac atgcagcggccagctcttctgttagctacatgaactggtaccagcaaacacctggaagg ccctaaaagatggatctacgacaccagcaagctggcctctggcgtgccctctagattca ggcgtctgtgctcggcaccgactacacctttacaattagctccctgcagcccaggat atgccacctactactgccagcagtgagcagcaaccccttcacattcggccagggca caaagctgcaaatcaccagacgtacgggtgctgcaccatctgttcttcttcccgccatc tgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgtgtgtgctgctgaataactctatcca gagagggcaaaagtacagtggtgctgtgataacggcctccaatcgggtaactcccagga gagtggtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcacctgac gctgagcaagcagactacgagaacacaaagtctacgctgcgaagtcacccatcag ggcctgagctcggcgtcacaaagagctcaacaggggagagtgtag
항 CD3 OKT3 LC 아미노산	29	QMTQSPSSLSASVGDRTVITCSASSSVSYMNWYQTPG KAPKRWIYDTSKLASGVPSRFSGSGSGTDYFTISSLQPE DIATYYCQQWSSNPFTFGQGTKLQITRRVAAPSVFIFPP SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWCVDNALQSG NSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACE VTHQGLSPVTKSFNRGEC-
항 CD3 OKT3 LC 가변 도메인	30	QMTQSPSSLSASVGDRTVITCSASSSVSYMNWYQTPG KAPKRWIYDTSKLASGVPSRFSGSGSGTDYFTISSLQPE DIATYYCQQWSSNPFTFGQGTKLQITRR

[0098]

항 CD3 12F6 HC DNA	31	caagtgcagctggtgcagtcgagcgaggagcgctgctgagcctggaagaagcctccggc tgagctgcaaggccagcggtatatacattcaccagctacacacatgacatgggtgcgag gccccctggcaaaagcctggaatgafcgctacatcaacccttcagcgctacaccaa gtacaacagaaattcaaggaccggtttaccattagcgccgataagagcaagagcacag cctttctgcagatggacagcctgagaccagaggacaccggcgtgtacttctgcgccgct ggcaggaactacgactgttttttgcactactggggccaggggcaccctctgacagtgcag gcgctagcaccaaggcccatcgctctccctggcaccctcctcaagagcacctctg ggggccacagcgccctgggctgctgctcaaggactacttcccagcggtgacggt gtcgtggaactcaggcgccctgaccagcgcggtgcacacctcccggctgctacagtc ctcaggactctactcctcagcagcggtgacggtgcccctccagcagctgggacacca gacctacatctgcaacgtgaatcaagcccagcaacaccaagtggaagaagaagtgg agcccaaatctgtgacaaaactcacacatgccaccgtgccagcacctgaactcctgg ggggaccgtcagctctctctctcccccacaaacccaaggacaccctcatgctccggac ccctgaggtcacatcgctggtggtgacgtgagccaggaagacccctgaggtcaagtca actgtgacgtggacgctggtgaggtgcatatgccaagacaagccggcgagagagca gtacaacagcacgtacgtgtggtcagcgtctcaccgtcctgcaccaggactggctgaa tggcaaggagtagaagtgcaaggtctcacaacaaagccctccagcccccatcgagaaaa ccatctcaaaagccaaggcgagcccgagaaacacaggtgtacacccctgccccatcc cgggacgagctgaccaagaaccagggtacgctgacgtgctgctcaaggcttctatccc agcgacatcgccgtgagtggtgagagcaatggcgagccggagaaacatacaagacc acgctcctccgtgctgagctcggacggtctctctctctacagcaagctcacggtgcaga agagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggtctgcaca accactacacgcagaagagcctctcctgctctccgggtaaatga
항 CD3 12F6 HC 아미노산	32	QVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCKASGYTFTSYTMHWVR QAPGKGLEWIGYINPSSGYTKYNQKFKDRFTISADKSKST AFLQMDSLRLPEDTGVYFCARWQDYDVFYDWGQGPV TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPAP ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
항 CD3 12F6 HC 가변 도메인	33	QVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCKASGYTFTSYTMHWVR QAPGKGLEWIGYINPSSGYTKYNQKFKDRFTISADKSKST AFLQMDSLRLPEDTGVYFCARWQDYDVFYDWGQGPV TVSS
항 CD3 12F6 LC DNA	34	gataccagatgacacagagccccagctctctctgcttctggtggcgacagatgacca tgacctgtagagcctcctcaagcgtgtcctacatgactgtaccagcaaacctggcaa ggccccaaagccttgatctacgccacctatactgcccagcggtgcttctagatc agcggcagcgggatctggcaccgattacacctgacatcagcagcctgcagcccagg atategccacatactactgcccagcagtgagctcgaatcctctactctgcccagggcac caagctgcagatcacaaagcgtacgggtgctgcacatctgtctctctccgccatctg atgagcagttgaaatctgggaactcctctgtgtgtgctggaataactcttccagag aggccaagtacagtggtgctggtgataacgcccctcaatcggtgaactccagagagt gtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcaccctgacgctga gcaagcagactacgagaacacaaagtctacgctgcgaagtcaccatcagggcctg agctgccccgtcacaaagagcttcaacaggggagagtgtag
항 CD3 12F6 LC 아미노산	35	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTMTCRASSSVSYMHWYQQT PGKAPKPWIYATSNLASGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQ PEDIATYYCQQWSSNPPTFGQGTKLQITRRTVAAPSVFIF

[0099]

		PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWCVDNALQS GNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACE VTHQGLSSPVTKSFNRGEC-
항 CD3 12F6 LC 가변 도메인	36	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTMTCRASSSVSYMHWYQQT PGKAPKPWIYATSNLASGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQ PEDIATYYCQQWSSNPPTFGQGTKLQITRR

[0100]

표 6

표 6: 항CD3 단일 체 가변 단편(scFv) 서열

구성물	서열 번호	서열
항 CD3 12F6 scFv	131	QVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCKASGYTFTSYTMH WVRQAPGKGLEWIGYINPSSGYTKYNQKFKDRFTIS ADKSKSTAFQLQMDSLRPEDTGVYFCARWQDYDVYF DYWGQGTPTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQS PSSLSASVGDRTMTCRASSSVSYMHWYQQTPGKA PKPWYIATSNLASGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPE DIATYYCQQWSSNPFTFGQGTKLQITR
항 CD3 OKT3 scFv	132	QVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCKASGYTFTTRYTMH WVRQAPGKGLEWIGYINPSRGYTNYNQKVKDRFTI STDKSKSTAFQLQMDSLRPEDTAVYYCARYYDDHYC LDYWGQGTTLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQ SPSSLSASVGDRTITCSASSSVSYMNWYQQTPGKA PKRWIYDTSKLASGVPSRFSGSGSGTDYTFITSLQP EDIATYYCQQWSSNPFTFGQGTKLQITR

[0101]

[0102]

MUC1* 및 CD3에 결합하는 항체

[0103]

일부 실시양태에서, MUC1*에 특이적으로 결합하는 항체, 또는 그의 기능성 단편 또는 기능성 변이체는 Fab를 포함하고, CD3에 특이적으로 결합하는 항체, 또는 그의 기능성 단편 또는 기능성 변이체는 scFv를 포함한다.

[0104]

일부 실시양태에서, 항MUC1* 중쇄는 서열 번호 38 또는 44와 적어도 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, 항MUC1* 경쇄는 서열 번호 41 또는 47과 적어도 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고; scFv는 서열 번호 131 또는 132와 적어도 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.

[0105]

일부 실시양태에서, MUC1*에 특이적으로 결합하는 항체, 또는 그의 기능성 단편 또는 기능성 변이체는 scFv를 포함하고, CD3에 특이적으로 결합하는 항체, 또는 그의 기능성 단편 또는 기능성 변이체는 Fab를 포함한다.

[0106]

일부 실시양태에서, 항CD3 중쇄는 서열 번호 26, 27, 32, 또는 33과 적어도 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, 항CD3 경쇄는 서열 번호 29, 30, 35, 또는 36과 적어도 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고; scFv는 서열 번호 129 또는 130과 적어도 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.

[0107]

일부 실시양태에서, 항체는 서열 번호 1, 2, 3, 4, 5, 6, 13, 14, 15, 16, 17, 또는 18 중 어느 하나로부터 선택되는 항MUC1* 결합 도메인의 적어도 3개의 CDR 및 그의 0-2개의 아미노산 변형(들)(예컨대, 0-1 아미노산 변형(들)); 및 서열 번호 7, 8, 9, 10, 11, 12, 19, 20, 21, 22, 23, 또는 24 중 어느 하나로부터 선택되는 항CD3 결합 도메인의 적어도 3개의 CDR 및 그의 0-2개의 아미노산 변형(들)(예컨대, 0-1 아미노산 변형(들))을 포함한다.

[0108]

일부 실시양태에서, MUC1*에 특이적으로 결합하는 항체 또는 그의 기능성 단편 또는 기능성 변이체는 scFv를 포함하고, CD3에 결합하는 항체, 또는 그의 기능성 단편 또는 기능성 변이체는 scFv를 포함한다.

[0109]

일부 실시양태에서, 항MUC1* scFv는 서열 번호 129 또는 130과 적어도 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항CD3 scFv는 서열 번호 131 또는 132와 적어도 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.

표 7

표 7: MUC1* 및 CD3에 결합하는 항체의 예시적인 서열

구성물	서열 번호	서열
항 CD3 12F6 scFV-Fc DNA	49	caagtgcagctggtgcagtcggagggagggcgtcgtgcagcctggaagaagcctccgg ctgagctgcaaggccagcggctatacattcaccagctacacatgcactgggtgcggc agggccctggcaaaaggcctggaatggatcggctacatcaaccttccagcggctacac caagtacaaccagaaattcaaggaccggtttaccattagcggcgataagagcaagagc acagcctttctgcagatggacagcctgagaccagaggacaccggcgtgtacttctgcgc ccgctggcaggactacgacgtttatttcgactactggggccagggcacccctgtgacag ttagcagcggcggcggaggctcggcggagggtggcagcggcggcggcggcgtctga tatccagatgacacagagccccagctctctgtctgtcttctgtggcgacagagtaccat gacctgtagagcctcctcaagcgtgtcctacatgcactgtgtaccagcaaacacctggca agggcccaagccttgatctacgccaccttaatctggccagcggcgtgccttctagat tcagcggcagcggatctggcaccgattacacctgacctcagcagcctgcagcccga ggatattgccacatactactgcagcagtgagctccaatcctctaccttggccagg gcaccaagctgcagatcacaagagagcccaaatcttgtgacaaaactcacacatgcc accgtgcccagcacctgaactcctggggggaccgtcagtccttcttcccccaaac ccaaggacacctcatgatctccggacccctgaggtcacatgcgtgtgtgtggacgtg agccacgaagaccctgaggtcaagtcaactgtgtacgtggacggcgtggaggtgcata atgccaagacaaagccggggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtgtgtcagcg

[0110]

		tcttcaccgtctctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtagaagtgcaaggctctcc aacaaagccctccagcccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaaggcagccc cgagaaccacaggtgtacaccctgccccatccggggagagatgaccaagaaccag gtcagcctgacctgctgtcaaaagctctatccagcgcacatcgccgtggagtgga gagcaatgggcagccggagaaactacaagaccacgcctccctgctggactccga cggctccttctctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcagggg aacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgagaagagc ctctccctgtctccgggtaaa
항 CD3 12F6 scFV-Fc 아미노산	50	QVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCKASGYTFTSYTMHWV RQAPGKGLEWIGYINPSSGYTKYNQKFKDRFTISADKSK STAFLLQMDSLRPEDTGVYFCARWQDYDVYFDYWGQG TPVTVSSGGGGSGGGSGGGSDIQMTQSPSSLSASV DRVTMTCRASSSVSYMHWYQQTGKAPKPKWIYATSNL ASGVPSRFGSGSGTDYTLTISSLPEDIAITYYCCQWSS NPPTFGQGTKLQITREPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNATKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTKSKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGK
항 CD3 OKT3 scFV Fc DNA	51	caggtgcaactggtgagtcggcgaggcggtggtgagcctggcggagcctgaga ctgagctgcaaggcctccggctacacctttacaagatacactatgactgggtcagaca ggcccctggcaaggcctgggaatgattggctacatcaaccctagccggggatatacc aactacaaccagaaagtgaaggacagattcaccatcagcacagataagtccaagtcca ccgcttctctgagatggactccctgctgcagaggacacagctgtgtactactgcgccc ggtactacgacgacctactgtctgactactggggcaggggaaccacctgacctg cagctctggcggcgaggctccggcgagggtggcagcggcgggcgggcgtctgata tccagatgaccagagcccttctctctatctgcagcgtggcgatagagtgaccatca catgcaagcggcagctcttctgttagctacatgaactggtaccagcaaacacctggaag gcccctaaaagatggatctacgacacagcaagctgctctgctgctgctctagatt cagcggctctgctccggcaccgactacacctttacaattagctccctgagccggagg atategccactactactgcccagctggagcagcaaccccttcacattcgccagggc acaagctgcaaatcaccagagagcccaatctgtgacaaaactcacatgcccacc gtgcccagcacctgaactcctgggggacgcgtcgtctctctctcccccacccca aggacacccctcatgctccgggacccctgaggtcacatgctgtgtgtgagcgtgag ccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataat gccaaagacaaagccggggaggagcagtagacagcacgtaccgtgtgtcagcgtc ctaccgtctgacaccaggactgctgaatggcaaggagtagaagtgcaaggtctcca acaaaagccctccagcccccatcgagaaaacatctccaaagccaaaggcagcccc gagaaccacaggtgtacaccctgccccatccgggagagatgaccaagaaccagg tcagcctgacctgctgtgcaaaaggcttctatccagcgacatccggtggagtgagg agcaatgggcagccgggagaaactacaagaccacgcctccctgctgactccgac ggctccttctctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcagggga acgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgagaagagcc tctccctgtctccgggtaaa
항 CD3 OKT3 scFV Fc 아미노산	52	QVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCKASGYTFTTRYTMHWV RQAPGKGLEWIGYINPSRGYTNYNQKVKDRFTISTDKS KSTAFLLQMDSLRPEDTAVYYCARYYDDHYCLDYWGQ GTTLTVSSGGGGSGGGSGGGSDIQMTQSPSSLSASV GDRVITITCSASSSVSYMNWYQQTGKAPKRWIYDTSKL ASGVPSRFGSGSGTDYTFITSSLPEDIAITYYCCQWSSN PFTFGQGTKLQITREPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYV

[0111]

		DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEHA LHNHYTQKSLSLSPGK
OKT3 scFV-Fc L1 hMN20A10N scFV DNA	53	caggctgcaactggtgagtcgctcgccggcggaggcgtggtgagcctggtggcggagcctgaga ctgagctgcaaggcctccggtacacotftacaagatacactatgactggtgagcagaca ggccccctggcaaggcctgggaatggtgctacatcaaccctagccgggataatacc aactacaaccagaaagtgaaggacagattaccatcagcacagataagtcgaagtcca ccgcttctctgagatggactccctgctgctcagagagacacagctgtgtactactgccc ggtactacgacgaccactactgtctggtactactggggacagggaaccacccctgaccgt cagctctggtggcggaggctccggcggagggtggcagcggcggcggcgtctgata tccagatgaccagagcccttcttcttctgctccagcgtgggctgatagagtgaccatca catgagcggcagctcttctgttagctacatgaactggtaccagcaaacactggaag gccccctaaaagatggatctacgacaccagcaagctggcctctggcgtgcccctagatt cagcggcctggtcctggcaccgactacacotftacaattagctccctgagcccagg atatgcccactactactgcccagctggagcagcaaccccttcatttggccaggc acaaagctgcaaatcaccagagagcccaatctgtgacaaaactcacatgcccacc gtgcccagcacctgaactcctgggggaccgtcagcttctcttcccccaaaaccca aggacacccctcatgctccggacccctgaggtgacatgctgtgtgtgagcgtgag ccacgaagaccctgaggtcaagttcaactgtgtacgtggcggcgtggtgagtgataat gccaagacaaagccggggaggagcagtaacacagcagctaccgtgtgtgagcgtg ctcaccgtctgaccagagctggtgtaagtgcaaggtgataagtgcaaggtctcca acaaagccctccagcccccacgagaaaacatctccaaagccaaaggcagcccc gagaaccacaggtgtacacccctgcccccatccggaggagatgaccaagaaccagg tcagcctgacctgctgctcaaggcttctatccagcagacatgcccgtgagtgaggag agcaatggcagcggggaacactacaagaccacgctccctgctgactctgagc ggctccttctctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcagggga acgtcttctcatgctccgtgagcagtggtctgacacactacacgcagaagagcc tctccctgtctccgggtaaggcgggggtggcgttctgtgtgtgtgctgtgaggga ggaaaccgtgaggtgagctggtgaatctggcggcggactgtgaagcctggcggat ctctgagactgagctgtgcccagcggcttcacctttagcacatacccatgagctgga tcagacaggcccttgcaaaagcctggaatgggtgctgtattgagagccggca gcacactactacagcactctgtgaaggcagattcaccatcagccgggacaaagccaa gaacagcctgtactctgagatgaactccctgagagccgaggacaccgctgtactatt gtgacagagaccatctacaacgactacgacaggttcgctattgggcccagggcac actgtgcacagtttctagcggcgggtggcgaagcggaggcggctccggtggcgg aggcagcgaatgtgctgacacagagccccccacactgtcacttctcaggcga aggccacactgagctgcaagagcagccagagcgtgctgtactccagcaaccagaaga actacctgctggtatcagcagaagcccggccaagctcctcggctgctgattattgg gccagcacaagagagagcggcatcctgagatttctgagcggcgtctggcaccg atttcacctgaccataagcagcctggaaactgaggaacttcgctgtattactgccacc agtacctgagcagcctgaccttggcggaggccaccaaggtggaatcaagcgtgata a
OKT3 scFV-Fc L1 hMN20A10N scFV 아미노산	54	QVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCKASGYTFTRYTMHWV RQAPGKGLEWIGYINPSRGYTNYNQKVKDRFTISDKS KSTAFLLQMDSLRPEDTAVYYCARYYDDHYCLDYWGQ GTTLTVS SGGGGSGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASV GDRVITITCSASSSVSYMNWYQQTGPKAPKRWIYDTSKL ASGVPSRFSGSGSGTDYFTISSLPEDIATYYCQQWSSN PFTFGQGTKLQITREPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKISKAKGQPREPQVYTLPPSR

[0112]

		EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSGDGFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPGKGGGGGSGGGGSGGGTGTQVQLV ESGGGLVKGPGSLRLSCAASGFTTFSTYAMSWIRQAPGK GLEWVASIGRAGSTYYSDSVKGRFTISRDNANKNSLYLQ MNSLRAEDTAVYYCARGPIYNDYDEFAYWGQGTLLVTV SSGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLS CKSSQSVLYSSNQKNYLAWYQQKPGQAPRLLIYWAST RESGIPARFSGSGSGTDFTLTISLLEPEDFAVYYCHQYLS SLTFGGGTKVEIKR
OKT3 scFV-Fc L1 hMNC2 scFV DNA	55	caggctgcaactggtgagtcagtcggcgagcggtggtgagcctgcccggagcctgaga ctgagctgcaaggcctccggctacacctttacaagatacactatgcactgggtcagaca ggcccctggcaaggcctcggaatggattggtacatcaaccctagccgggatatacc aactacaaccagaagtgaaaggacagattcacatcagcacagataagtcgaagtcga cggctttctgagatggaactccctgctgcagaggacacagctgtgtactactgccc ggtactacgacgacctactgtctgactactgggacagggaaccacccctgacctg cagctctggcgcgaggtcctcgcgaggtgagcgagcgcgcgcgcgctctgata tcagatgacccagagcccttctcttatctgcccgtggtgagtagagtagaccatca catgcaagcgcagctcttctgttagctacatgaactgtaccagcaaacacctggaaag gcccctaaaagatggtatctacacaccagcaagctggcctctgctgccccttagatt cagcggctctggtctccggcaccgactacacctttacaattagctccctgagccggag atatcgccacctactgctcagcagtgagcagcaaccccttcattcgccaggc acaaagctgcaaatcaccagagagcccaatctgtgacaaaactcacatgcccacc gtgcccagcacctgaactcctgggggagcgtcagttctcttcccccaaaaccca aggacaccctcatgctcccggacctgaggtcacatgctggtggtgagcgtgag ccacgaagacctgaggtcaagtcaactgtacgtgacggcggtgaggtgcataat gccaagacaaagccggcgagggagcagtagaacagcagtagctgtgtgagcgtc ctcaccgtctgcccagcaggtggtggaatggcaaggagtacaagtgcaaggtctcca acaaagccctccagcccccatcgagaaaaccatctcacaagccaaaggcgagcccc gagaaccacaggtgtacaccctgcccccatccgggagggagtagacaaagaccagg tcagcctgacctgctgtgcaaggcttctatccagcagatcgccgtgaggtggag agcaatggcgagcggagagaacaactacaagcacgcctccgtgctggaactccgac ggctctcttctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcagggga acgtcttctcatgctcctgtagcatgaggtctgcacaaactacacgcagaagagcc tctcctgtctccgggtaaggcggggtggtggtggtggtggtggtggtggtggtggtg ggaaccggtgaggtgagctggtgaggtctgggggagcctggtcaagcctggggg gtccctgagactctctgtgagcctctggtgattcaccttcagtggtatgcatgagctgg gtccgaggtctcaggaagggtggtgaggtggttcaaccattagtagtggtgggaa ctacataatactacccgactcagtgaaaggccgattcacatctccagagacaacgcc aagaactcactgtatctgcaaatgaacagcctgagagccgagggacacggccgtgtatta ctgtgcgagactgggggggataaattactacgaatactcgtatggtgggcaaggga ccacggtcaccgtctctccggcggtggcggtatccggcggtggcgatccggcggtg gcggatccgacattgtgctgaccagctctcagcctcttggccgtgtctcagagaga gggccaccatcacctgagagccagtaagaggtgtagtaccagcggtatctctacatg cactggtatcagcagaaccaggaacaacctcctaactcctgattacgtggcatccaat ctggagagcggggtccagccaggttcagcggcagtggtgtctggaccgatttcaccc tcacaattaatcctgtggaagctaatactgcaattattactgtcagcacagtaggga gctgcctttacattcgcgaggaggaccaaggtggagatcaaacgaacttgataa
OKT3 scFV-Fc L1 hMNC2 scFV 아미노산	56	QVQLVQSGGCVVQPGKSLRLSCKASGYTFTRYTMHWV RQAPGKGLEWIGYINPSRGYTNYNQKVDRFTISTDKS KSTAFQMDSLRLPEDTAVYYCARYYDDHYCLDYWGQ GTTTLTVSSGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLASV GDRVITITCSASSSVSYMNWYQQTPGKAPKRWIYDTSKL ASGVPSRFSGSGSGTDYFTISLQPEDIAITYYCQQWSSN PFTFGQGTSLQITREPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF

[0113]

[illegible]

		GTTLTVSSGGGGSGGGSGGGSDIQMTQSPSSLSASV GDRVTTITCSASSSVSYMNWYQQTPGKAPKRWIYDTSKL ASGVPSRFSGSGSDYTFITISLQPEDATYYCQWSSN PFTFGQGTCLQITREPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGSGTQVQLVESGG GLVKGPGSLRLSCAASGFTSTYAMSWEIRAPGKGLEW VASIGRAGSTYYSDSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSL RAEDTAVYYCARGPIYNDYDEFAYWGQGLVTVSSGG GGSGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCKSS QSVLYSSNQKNYLAWYQQKPGQAPRLLIYWASTRESGI PARFSGSGSTDFLTISLLEPEDFAVYYCHQYLSLTFG GGTKVEIKR--
OKT3 scFV-Fc L2 hMNC2 scFV DNA	59	caggctgcaactgctgagctccggcgagcgctgctgagcctgcccggagcctgaga ctgagctgcaagcctccgctacacctttacaagatacactatgcaactgctgagcaga ggcccctgcaagggcctggaatgattgctacatcaaccctagccgggataacc aactacaaccagaagtgaggacagattcacatcagcacagataagtcgaagtcga ccgcttctctgagatggactccctgctccagaggacacagctgtgtactactgcgccc ggtactacgacgaccactactgtctgactactgggacaggggaaccacctgacgt cagctctgcccggcgagcctccggcgaggtgagcagcggcgcgcgctctgata tccagatgaccagagcccttctcttctatctgacagcgtggcgatagtgacatca catgagcggccagctctctgttactacatgaactggtaccagcaaacctggaag ggcccctaaagatgagatctacgacaccagcaagctggcctctgctgcccctagatt cagcggctctgctccggcaccgactacacctttacaattagctccctgagcccagg atatcgcacactactactgcccagctggagcagcaacccttcaattgcccaggcgc acaaagctgcaaatcaccagagagcccaatctgtgacaaaactcacatgcccacc gtgcccagcactgaactctggtggggaccgtcagcttctcttcccccaaaccca aggacaccctcatgctctccgacccctgaggtcactgctgctggtgagcgtgag ccacgaagaccctgaggtcaagttaactgtacgtgacggcgtgaggtgcataat gccaaagacaaagccgcccggagggagcagtaaacagcacgtaccgtgtgctcagctc ctcaccgtctctgaccagagctggctgaatggcaaggagtacaagtgcaaggtctcca acaaagccctcccagccccatcgagaaaaccatctcaaaagccaaaggcgagcccc gagaaccacaggtgtacaccctgccccatcccgaggagagatgaccaagaaccagg tcagcctgacctgctgctcaaggtctctatcccagcgacatcgccgtggagtggag agcaatgggagcgggagaaactacaagaccacgctccctgctgactccgac ggctccttctctctacagcaagctcaccgtgacaagagcaggtggcagcagggga acgtctctcatgctcctgtagcaggtctgcacaaactacacgcagaagagcc tctccctgtctccgggtaaaaggcgccggggggagcgtgtgtgctgtagcaccgtg agggtgagctggtgaggtctggtggggagcctggtcaagcctggtgggtgctcctgagac tctcctgtgagcctctggattcacctcagtggtctatgcatgagctgggtcccgaggc tccagggaagggtgctgaggtggtctcaaccattagtagtgcggaacctacatatact accctgactcagtgaaaggccgattcacatctccagagacaacgccaagaactcact gtatctgcaaatgaacagcctgagagccgaggaacggccgtgtattactgtcgagac ttgggggggataattactacgaatacttctgctgtggggcaaaaggaccacgtcacc gtctcctccggcggtgctgacccggcggtgctgacccggcggtgctgacccgac attgtgctgaccagctctccagcctctgtggcggtgtctccagacagaggccaccatc acctgagagccagtaagaggtcagttaccagcggtatctcctacatgcaactgtatca gcagaaccaggacaacctctaaactcctgattacctgcatccaatctgagagcg gggtcccaagggttccagcgcgagtggtgtgggaccgatttcacctcacaattaat cctgtggaagctaatgatactgcaattattactgtcagcacagtagggagctgcttca cattcggcgaggagcaaggtggagatcaaacgaactgataa

[0115]

OKT3 scFV-Fc L2 hMNC2 scFV 아미노산	60	QVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCKASGYTFTRYTMHWV RQAPGKGLEWIGYINPSRGYTNYNQKVKDRFTISTDKS KSTAFQLQMDSLRPEDTAVYYCARYYDDHYCLDYWGQ GTTLTVSSGGGGSGGGSGGGSDIQMTQSPSSLSASV GDRVITITCSASSSVSYMNWYQQTPGKAPKRWIYDTSKL ASGVPSRFRSGSGSGTDYFTISSLQPEDIATYYCQWSSN PFTFGQGTLQITREPKSCDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTSKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSTGEVQLVESGGG LVKPGGSLRLSCAASGFTFSGYAMSWVRQAPGKGLEW VSTISSGGTYIYYPDSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSL RAEDTAVYYCARLGGDNYYEYFDVWGKGTITVTVSSG GGGSGGGSGGGSDIVLTQSPASLAVSPGQRATITCRA SKSVSTSGYSYMHWYQKPGQPPKLLIYLASNLESGVP ARFSGSGSGTDFTLTINPVEANDTANYYCQHSRELPTF GGGTKVEIKRT**
hMN20A10N scFV-Fc L1 OKT3 scFV DNA	61	caggctgcagctggtgaatcggcgcgactgtgaagcctggcgatctctgagact gagctggtccgagcggcttcacctttgacacatccagcctgagctgagcagcagc ccctgcaaaaggcctggaatgggtgcgtctattggcagagcggcagcactacta cagcgactctgtgaaggcagattcacatcagccgggacaacgccaagaacagcct gtacctgcagatgaactcctgcagagccgagacaccgctgtactattgtccagag gacctatctacaagactacgacaggttcgctattggcgccagggcacactgtcaca gtttctagcggcggtggcggaaaggcggagcgggtggctccgggtggcggagcagcga aatgtgtctgacacagagcccgccacactgtcactttccaggcgaagagccacac tgagctgcaagagcagccagagcgtgctgtactccagcaacagaaactactgtgc ctggtatcagcagaagccggccaagctcctcggctgtgctatattggccagcaca gagagagcggcatccctgcccagattttctgagcggcctgtgacccgtttcacctg accataagcagcctggaacctgaggacttcgctgtgtactgtccacagctactgag cagcctgaccttggcgaggcaccaggtggaatcaagcgggagcccaactctgt gacaaaactcacatgcccacgtgcccagcactgaaactctgggggacgctcag tcttctcttcccccaaacccaaggacacctcatgctcctcgggacccctgaggtca catgctgtgtgtgacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtg gacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgcgaggagcaggtacaacag cacgtaccgtgtgtgacgtgctcctcaccgtcctgaccaggaactggctgaatgcaagg agfacaaggtgcaaggtctccaacaaagccctccagccccatcgagaaaaccatctcc aaagccaaggcgcagcccgagaaacacaggtgtacacccctgccccatcccgga ggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctgtgcaaaaggcttctatccagc gacatgccgtgtgagtgaggagcaatggcgagccggagaaacactacaagaccac gctcctcgtgtgactccgacggctccttctctctacagcaagctcaccgtggacaa gagcaggtggcagcagggggaacgtcttctcatgctcctgtatgaggtctctgcaca accactacacgcagaagagcctctcctgtctcctgggtaaaaggcggggtggtgcttc tggtgtgtgtgctctgagagggaaccgtcaggtgcaactgtgtcagtcggcggtg aggcgtgtgtgagcctggcgagcctgagactgagctgcaaggcctcggctacac ctttacaagatacactatgcaactgggtcagacagccctggcgaaggcctggaatgga ttgctacatcaaccctagccgggataatacaactacaaccagaaagtgaaggacag attcaccatcagcacagataaagtcgaagtccaccgctttctgagatggaactcctgct ccagaggacacagctgtgtactactgcgcccgtactacgacgaccactactgtctgga ctactgggacagggaaaccacctgacctgctgtgcggcgaggctcggcggtg agggtgagcggcggtggtgctgtatcagatgaccagagcccttctctctat ctgcccagctggcgatagagtgaccatcacatgagcggccagctcttctgttagctaca tgaaactgtaccagcaaacactggaaggccctaaagatggaatctacgacaccag caagctggcctctggcgtgccccttagattcagcggctgtgctcggcaccgactaca

[0116]

		ctttacaattagctccctgcagcccgaggatcgccacactactgcccagcagtgga gcagcaacccttcacattcggccagggcacaaagctgcaaatcaccagatgataa
hMN20A10N scFV-Fc L1 OKT3 scFV 아미노산	62	QVQLVESGGGLVPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMSWIR QAPGKGLEWVASIGRAGSTYYSDSVKGRFTISRDNAK SLYLQMNSLRRAEDTAVYYCARGPIYNDYDEFAYWGQG TLVTSSGGGSGGGSGGGSGGGSEIVLTQSPATLSLSPGE RATLSCKSSQSVLYSSNQKNYLAWYQQKPGQAPRLLIY WASTRESGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCH QYLSSTLFGGGTKVEIKREPKSCDKTHTCPPCPAPELLG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVY TLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGSGGGGTG QVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCKASGYTFTRYTMHWV RQAPGKGLEWIGYINPSRGYTNYNQKVKDRFTISTDKS KSTAFLLQMDSLRPEDTAVYYCARYYDDHYCLDYWGQ GTTTLTVSSGGGSGGGSGGGSGGGSDIQMTQSPSSLSASV GDRVITITCSASSSVSYMNWYQQTPGKAPKRWIYDTSKL ASGVPSRFSGSGSGTDYFTISSLQPEDIAITYYCQQWSSN PFTFGQGTKLQITR—
hMNC2 scFV-Fc L1 OKT3 scFV DNA	63	gaggtgcagctgggtgagctctgggggagggcctgggtcaagcctgggggtccctgaga ctctcctgtgcagcctctggtattcaccttcagtggtatgcatgagctgggtcgcgcagg ctccagggaagggtgctgggtggtctcaaccattagtagtgccggaacctacatatac taccctgactcagtgaaaggccggtaccatctccagagacaaccaagaactcact gtatctgcaaatgaacagcctgagagccgagggacacgcccgtgtattactgtgcagac ttgggggggataaattactacgaatacttcgatgtctggggcaagggaaccacgtcacc gtctcctcgcgggtgctgcggtaccggtgctgcggtaccggtgctgcggtgctgcggtaccgac attgtgctgaccagctctccagcctcctggtgctgctcctcagagacagagggccaccatc acctgcagagccagtaagagtgctagaccagcggtatctcctacatgcactggtatca gcagaaccaggacaacctcctaaactcctgatttacctggtcatcctgagagcgg gggtcccagccaggttcagcggcagtggtctgggaccgatttcacccacaaftaat cctgtggaagctaatactgcaattattactgtcagcacagtagggagctgctttca cattcggcggaggggaccaaggtggagatcaaacgaactgagcccaaatctgtgacaa aactcacacatgccaccgtgcccagcacctgaactcctgggggaccgtcagctctcc tcttcccccaaaacccaaggacacctcatgatctccgggaccctgaggtcacatgc gtggtggtggtgacgtgagccacgaagacctgaggtcaagttcaactggtacgtggtgacg gcgtggtggtgataatgccaagacaaagccgggagggagcagttacaacagcacg taccgtgtggtgacgtgctcaccgtcctgaccagagctggtgaatggcaaggagta caagtgcaaggtctccaacaaagccctccagcccccacgagaaaacatctccaaa gccaaggggcagccccgagaaccacaggtgtacacctgcccccatccgggagga gatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgctgtgcaaggcttctatccagcgaca tcgcccgtggagtgaggagcaatggcgagccggagaaactacaagaccacgcctc ccgtgctggtactccgacggctccttctctctacagcaagctcaccgtggacaagagc agggtgagcaggggaacgtctctctatgctccgtgatgcatgaggtctgtcacaacca ctacacgcagaagagcctcctgtctcctgggtaaaggcgggggtggcggttctggt gggtggtggtcctgaggggaaccgggtcaggtgcaactggtgagtcggcgagggc gtggtgagcctgcccggagcctgagactgagctgcaaggcctccggtacacattta caagatacactatgactgggtcagacagggccctggaaggcctggaatggattgg ctacatcaaccctagccgggataatacaactacaaccagaagtgaaaggacagattca ccatcagcacagataagtcgaagtcaccgcttctcgtcagatggactccctgctccag aggacacagctgtgtactactgcgccggtactacgacacactactgtctgactact ggggacagggaaccacctgacctcagctctgctggcgaggaggtccggcgagggt

[0117]

		ggcagcggcgccggcgctctgataccagatgaccagagcccttcttctatctgc cagcgtggcgatagagtgaccatcacatgcagcggccagctctctgttagctacatgaa ctgtaccagcaaacacctggaaggccctaaagatgatctacacacagcaag ctggcctctggcgctgcctctagattcagcggctctgctcggcaccgactacaccttt acaattagctccctgcagcccaggatgcacccactactctgcccagcagtgagcag caacccttcacattcgccagggcacaaagctgcaaatcaccagatgataa
hMNC2 scFV-Fc L1 OKT3 scFV 아미노산	64	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSGYAMSWVR QAPGKGLEWVSTISSGGTYIYYPDSVKGRFTISRDN SLYLQMNSLR AEDTAVYYCARLGGDNYEYFDVWGK GTTVTVSSGGGSGGGSGGGSDIVLTQSPASLAVSP GQRATITCRASKSVSTSGYSYMHWYQKPGQPPKLLIY LASNLESGVPARFSGSGSGTDFLTINPVEANDTANYYC QHSRELPTFTGGGKTVEIKRTEPKSCDKTHTCPPCPAPEL LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGSGGG TGQVQLVQSGGQVVPGRSLRLSCKASGYTFTRYTMH WVRQAPGKLEWIGYINPSRGYTNYNQKVKDRFTISTD KSKSTAFLQMDSLRPEDTAVYYCARYYDDHYCLDYWG QGTTLTVSSGGGSGGGSGGGSDIQMTQSPSSLSAS VGDRVITTCASSSVSYMNWYQQTPGKAPKRWIYDTSK LASGVPSRFSGSGTDYTFITISLQPEDIAITYYCQQWSS NPFTFGQGTKLQITR**
hMN20A10N scFv-Fc L2 OKT3 scFv DNA	65	caggtgcagctggtgaatctggcgccgactgtgaagcctggcggaatctctgagact gagctgtgcggccagcggcttcacctttagcacatagcctgagctggaatcagacagg ccctctggcaagcctggaatgggtgctgtctattggcagagcggcagcacactacta cagcgaactctgtgaaggcagattcaccatcagccgggacaacgccaagaacagcct gtacctgcagatgaactccctgagagccgaggacaccgctgtactattgtccagag gacctatcacaacgactacgacaggttcgctattggggccagggcacactggtcaca gtttctagcggcggtgcggaagcggaggcggtggtcctcgggtgcgaggcagcga aattgtgtgacacagagcccggccactgtcactttctccaggcgaaagagccacac tgagctgcaagagcagccagagcgtgtgtactccagcaaccagaagaactacctggc ctggtatcagcagaagcccggccaagctcctcgtgctgctgatttggccagcaca gagagagcggcatccctgccaattttctggcagcggctctggcacgatttcacccctg accataagcagcctggaacctgaggaacttcgctgtattactgcccacagctacctgag cagcctgacctttggcgaggcaccgaaggtggaatcaagcgggagcccaatctgt gacaaaactcacatgcccaccgtgcccagcactgaactctgggggagccgtcag tcttctcttcccccaaacccaaggacacctcatgctcctccggaccctgaggtca catgctgtgtgtggagctgagccacgaagacctgaggtcaagttcaactggtacgtg gacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgcgaggagcagtaacaacag cacgtaccgtgtgtcagcgtctcaccgtctgcaccaggactggctgaatggcaagg agtacaagtgaaggtctccaacaaagccctccagcccccatcgagaaaacctctcc aaagccaaaggcgagccccgagaaccacaggtgtacacccgtcccccatccggga ggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgctgtgcaaaaggcttctatccagc gacatcgcctggagtgaggagcaatggcagccggagaaactacaagaccac gcctccctgctgactccgacggctccttctctctacagcaagctcacctgggacaa gagcaggtggcagcagggggaacgtcttctcatgctcctgcatgaggtctgcaca accactacacgcagaagagcctctcctgtctcgggtaaaggcggcgggggagcg gtgtgtggcgtgacccggcaggtgcaactggtgagtcagtcggcgaggcgtgtgtc agcctgcccggagcctgagactgagctgcaaggcctcggctacacctttacaagata cactatgactgggtcagacagggccctggcaaggcctgggaatggattggctacatca

		accctagccgggafataccaactacaaccagaaagtgaaggacagattcacatcag cacagataagtcgaagtcaccgcttctcgcagatggactcctgcgtccagaggaca cagctgtgtactactgcgcccgtactacgacaccactactgtctgactactggggac agggaaaccacctgaccgtcagctctggcggcggaggctccggcggaggtggcagc ggcggcggcggcgtctgataccagatgaccagagcccttctctatctgacagcgtg ggcgatagagtgaccatcacatgcagcggcagctctcttcttagctacatgaactgtac cagcaaacacctggaaggccctaaaagatggatctacgacaccagcaagctgcct ctggcgtgcccctagattcagcggcctggtcggcaccgactacacctttacaattag ctccctgcagcccgaggatgacgacacactactctgacagcagtgaggcagcaacccc ttcattcggccagggcacaaagctgcaaatcaccagatgataa
hMN20A10N scFv-Fc L2 OKT3 scFv 아미노산	66	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFTSTYAMSWIR QAPGKGLEWVASIGRAGSTYYSDSVKGRFTISRDAKN SLYQLQMNSLRAEDTAVYYCARGPIYNDYDEFAYWGQG TLVTVSSGGGGSGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGE RATLSCKSSQSVLYSSNQKNYLAWYQQKPGQAPRLLIY WASTRESGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFAVYYCH QYLSSTLTFGGGTKEIKREPKSCDKTHTCPPCPAPPELLG GPSVFLFPPKPKDITLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSGTQVQL VQSGGGVVPGRSLRLSCKASGYTFTRYTMHWVRQAP GKGLEWIGYINPSRGYTNYNQKVKDRFTISTDKSKSTAF LQMDSLRPEDTAVYYCARYYDDHYCLDYWGQGTTLT VSSGGGGSGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTI TCSASSSVSYMNWYQQTPGKAPKRWIYDTSKLASGVPS RFGSGSGTDYFTISSLQPEDATYYCQWSSNPFTFGQ GTKLQITR--
hMNC2 scFv-Fc L2 OKT3 scFv DNA	67	gagggtgcagctggtgagtgctgggggagcctggtcaagcctggggggtccctgaga ctctcctgtgcagcctctggtattcacttcagtggtatgcatgagctgggtccgccagg ctccagggaagggtggtgagtggtctcaaccattagtagtgccggaacctacatatac taccggactcagtgaaaggccggtattcaccatctccagagacaacgccaagaactcact gtatctgcaaatgaacagcctgagagccgaggacacgcccgtgtattactgtgcgagac ttgggggggataaattactacgaatacttcgatgtctgggcaaaaggaccacggtcacc gtctcctcggcgggtgcccgatccggcgggtggcgatccggcgggtgcccgatccgac attgtgctgaccagtgctccagcctctgtggcgtgtctccagagacagggccaccatc acctgcagagccagtaagagtgctcagtagcagcgatactcctacatgactggtatca gcagaaccaggacaacctcctaactcctgatttacctggcatccaatctggagagcg gggtcccagccaggttcagcggcagtggtctgaggaccgattcacctcacaattaat cctgtggaagctaatactgatactgcaaatattactgtcagcacagtagggagctgcccattca cattcggcggagggaaccaagtgaggatcaaacgaactgagcccaatctgtgacaa aactcacatgcccaccgtgcccagcacctgaactcctggggggaccgtcagttctcc tcttcccccaaaaccaggacacctcatgatctccggaccctgaggtcacatgc gtgggtgtggtgacgtgagccacgaagacctgaggtcaagttcaactggtacgtggacg gcgtggaggtgcataatgccaagacaagccggggagagcagtagacaacagcacg taccgtgtgtgacggtctcaccgtctctgaccaggactggctgaatggcaaggagta caagtgcaaggtctccaagaagccctccagccccatcgagaaaacctctccaaa gccaaaggggcagccccgagaaccacaggtgtacacctgccccatccccgggagga gatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgctgtgcaaaagcttctatccagcgaca tcgccgtggagtgaggagcaatggcagccggagagaacaactacaagaccacgcctc ccgtgtgactccgacggctcctctctctacagcaagctcaccgtggacaagagc agggtgcagcaggggaacgtctctcatgctcgtgtagcatgaggctctgcacaacca

		ctacacgcagaagagcctctcctctgtctccgggtaagcgcgcgggggagcgggtgg tggcggtagcaccgggtcaggtgcaactggtgcagtccggcgaggcgtggtgcagcc tggcggagcctgagactgagctgcaaggcctcggctacacctttacaagatacacta tgactgtggtcagacagggcccttgcaaggccttggaatggtgctacatcaaccct agccgggataaccactacaaccagaagtgaggacagattcaccatcagcacag ataagccaagtccaccgctttctgcagatggactcctgctccagaggacacagct gtgtactactgcggcgtactacgacacactactgtctgactactggggacaggg aaccaccctgaccgtcagctctgcgcgaggctcggcgagggtgcagcggcg gcgcggtctgatatccagatgaccagagcccttctcttactgccaagcgtggcg atagagtgaccatcacatgcagcgccagctcttctgttagctacatgaactgtaccagc aaacacctggaaggccctctaaagatggatctacgacaccagcaagctggcctctgg cgtgccctctagattcagcggctctggtccggcaccgactacacctttacaattagctcc ctgcagcccagagatatgccacactactgtccagcagtgagcagcaacccttca cattcggccagggcacaaagctgcaaatcaccagatgataa
hMNC2 scFv-Fc L2 OKT3 scFv 아미노산	68	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSGYAMSWVR QAPGKGLEWVSTISSGGTYIYYPDSVKGRFTISRDNAKN SLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLGGDNYEYFDVWGK GTTTVTVSSGGGSGGGSGGGSDIVLTQSPASLAVSP GQRATITCRASKSVSTSGYSYMHWYQQKPGQPPLLIY LASNLESGVPARFSGSGSGTDFLTINPVEANDTANYYC QHSRELPTFTGGGTKVEIKRTEPKSCDKTHTCPPCPAPEL LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGSGTGQV QLVQSGGGVQVQGRSLRLSCKASGYTFTRYTMHWVRQ APGKGLEWIGYINPSRGYTNYNQKVKDRFTISTDKSKST AFLQMDSLRPEDTAVYYCARYYDDHYCLDYWGQGT LTVSSGGGSGGGSGGGSDIQMTQSPSSLASVQDR VTITCSASSSVSYMNWYQQTGKAPKRWIYDTSKLASG VPSRFSGSGSDYFTFTISSLQPEDIATYYCQQWSSNPFT FGQGTKLQITR**
hMN20A10N scFv-Fc L1 12F6 scFv DNA	69	caggtgcagctggtgaatctggcgcgactgtgaagcctggcgatctctgagact gagctgtgcccgagcggcttaccctttgacatacgcctgagctggatcagacagg cccctggcaaaaggcctggaatgggtggcgtctattggcagagcggcgacactacta cagcgactctgtgaaggcgagattcaccatcagccgggacaacgccaagaacagcct gtacctgcagatgaactccctgagagccgagacaccgctgtactattgtccagag gacctatctacaacgactacgacgagttcgcctattggggccagggcacactgttcaca gtttctagcggcggtggcggaagcggaggcgggtgctccgggtggcgagcagcga aattgtgtgacacagagcccgcacactgtcactttctccaggcgaagagccacac tgagctgcaagagcagccagagcgtgtgtactccagcaaccagaagaactacctgac ctggtatcagcagaagcccggccaagctcctcggctgctgctatctattggccagcaca gagagagcggcatccctgccagattttctggcagcggctctggcacgatttaccctg accataagcagccttgaacctgagagacttgcggtgtattactgccaccagtacctgag cagcctgacctttggcgaggcaccaaggtggaatcaagcggagcccaatctgt gacaaaactcacatgccaccgtgccagcacctgaactctggggggaccgtcag tcttcttctccccaaaacccaaggacacctcatgctcgggacccctgaggtca catgctgtgtgtggagctgagccacgaagacctgaggtcaagttcaactggtacgtg gacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgggagggagcagttacaacag caggtaccgtgtgtgctcctcaccgtctgcaccagactggtgaatggcaagg agtacaagtgcaaggtctccaacaagccctccagcccccatcgagaaaaccttcc aaagccaagggcagccccgagaaccacaggtgtacaccctgcccccatccggga

[0120]

		ggagatgaccaagaaccaggctcagcctgacctgctgctcaaaaggcttctatccagc gacatcgccgtggagtgaggagcaatgggagcagccggagaaactacaagaccac gcctcccgctgctgactccgagcggctcctctctctacagcaagctaccgtggacaa gagcaggtggcagcaggggaacgtctctcatgctcgtgatgcatgagctctgcaca accactacacgcagaagagcctctccctgtctcgggtaaaggcgggggtggcggttc tggtgtgtgtgctctgaggagggaaccggtcaagtgcagctggtcagtcggagg aggcgtctgctcagcctggaaagcctcggctgagctgcaaggccagcggctatc attcaccagctacaccatgactgggtgcggcagccctggcaaaaggcctggaatgg atcggctacatcaaccctccagcggctacaccaagtacaaccagaattcaaggaccg gtttaccattagcggcataagagcaagagcacagccttctgcatagtgacagcctga gaccagaggacaccggctgtactctgcggcgtgagcagactacgacgtttatttc gactactggggccagggcacccctgtgacagttagcagcggcgggaggcctcgg cggagggtggcagcggcgggcggtctctgatcagatgacacagagcccgagctc ctgtctgtctgtgtggcgacagagtacacagctgtagagcctcctcaagctgtcc tacatgactgtgtacagcaaacacgtgcaaggcccaaaaggccttgatctacggcac ctctaactgtgacagcggcgtgcttctagattcagcggcagcggatctgacaggatta caccctgaccatcagcagcctgagcccaggatctgacacatactgacagcagct ggagctccaatcctcactctcggccagggcaccaagctgcatgacaaagatgataa
hMN20A10N scFv-Fc L1 12F6 scFv 아미노산	70	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFTSYAMSWIR QAPGKGLEWVASIGRAGSTYYSDSVKGRFTISRDNAKN SLYLQMNSLRRAEDTAVYYCARGPIYNDYDEFAYWGQG TLVTVSSGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGE RATLSCKSSQSVLYSSNQKNYLAWYQQKPGQAPRLLIY WASTRESGIPARFSGSGSGTDFTLTISLEPEDFAVYYCH QYLSLTFGGGTKEIKREPKSCDKTHTCPPCPAPELLG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTSKAKGQPREPQVY TLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTTPPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSS VMHEALHNHYTQKLSLSLSPGKGGGGSGGGGSGGGTG QVQLVQSGGQVVPGRSLRLSCKASGYTFTSYTMHWV RQAPGKGLEWIGYINPSSGYTKYNQKFKDRFTISADKSK STAFQMDSLRPEDTGVYFCARWQDYDVFYFDYWGQG TPVTVSSGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVG DRVVTMTCRASSSVSYMHWYQQTPGKAPKPWIYATSNL ASGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDIATYYCQQWSS NPPTFGQGTKLQITR—
hMNC2 scFv-Fc L1 12F6 scFv DNA	71	gaggtgcagctggtgagctctggggaggcctggcagcctgggggctcctgaga ctctcctgtgcagcctctgattcacctcagtgctatgcatgagctgggtccgacagg ctccagggaagggtgagtggtctcaaccattagtagtgcggaacctacatatac taccctgactcagtggaaggccgattcacctctcagagacaacgccaagaactcact gtatctgcaaatgaacagcctgagagccgagacacggcgtgtattactgtgcgagac tgggggggataattactacgaatactctgatgtctggggcaagggaaccaggtcacc gtctcctccggcgtgagcgtccgggtggcggtatccggcgtgagcgtgagcgtgac attgtgtgacccagctctccagcctcctgtggtgtctccagacagaggccaccatc acctgcagagccagtaagagtgctcagttaccagcggaactcctacatgactgtatca gcagaaaaccaggacaacctcctaactcctgattacctggcatccaatctggagagcg gggtcccagccaggttcagcggcagtggtgtggaccgatttcacctcacaattaat cctgtggaagctaatactgcaaaattactgtcagcacagtagggagctgctttca cattcggcgaggggaccaaggtggagatcaaacgaactgagcccaaatctgtgacaa aactcacatgcccaccgtgcccagacctgaactcctgggggacgctgagctctcc tctccccccaaaaccagacacccctcatgatctccggacccctgaggtcagatgc gtggtgtgtgagctgagccacgaagacctgaggtcaagttcaactggtacgtggagc

[0121]

		gctgtgagggtgcataatgccaagacaagccgctggaggagcagtacaacagcacg taccgtgtggtcagcgtctcaccgtctctcaccaggactggctgaatggcaaggagta caagtgcagggtctccaacaaagccctccagcccccctcagagaaaaccatctccaaa gccaaggaggcagcccgagaaccacaggtgtacaccctgccccatccggggaggga gatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgctgtcaaggcttctatccagcgaca tcgctgtgagggtggagagcaatgggagcgggagaaactacaagaccacgcctc ccgtgctggactccgacggctccttctctctacagcaagctcaccgtggacaagagc agggtgcagcagggggaacgtcttctcatgctcctgtatgcatgaggtctgcacacca ctacacgcagaagagcctctcctgtctcgggtaaaggcgggggtggcggttctgtg gtgtgtgtgtgtgtgaggaggaaccgtgcaagtgcagctgtgtgagtcggaggaggc gtctgtgagcctggagaagcctccggctgagctgcaagccagcggctatatactca ccagctacacatgcactgggtgctggcagggccctggcaaaaggcctgggaatggatcg gctacatcaacccttccagcggctacaccaagtacaaccagaaaatcaaggaccggttta ccattagcgcgataagagcaagagcacagccttctgagatggacagcctgagacc agaggacacggcggtgtactctgctgcccgtggcaggactacgactgtatttctgacta ctggggccagggcacccctgtgacagtgagcagcggcgagggtcctcggcgga gggtggcagcggcgggcggtctgtatccagatgacacagagccccagctctctgt ctgtctgtgtggcgacagagtgacatgacctgtagagcctctcaagcgtgtcttaca tgactgtgtaccagcaaacacgtgcaaggccccaaagcctgtgactacgacacctct aatctggcagcggcggtccttctagatgacggcagcggatctgacacgattacac cctgacatcagcagcctgagcccgaggatagccacatactactgacagcagttgg agctccaatctctcactctcgccaggccaccaagctgcagatcacagatgataa
hMNC2 scFv-Fc L1 12F6 scFv 아미노산	72	EVQLVESGGGLVPGGSLRLSCAASGFTFSGYAMSVVR QAPGKGLEWVSTISSGGTYIYYPDSVKGRFTISRDNAK SLYLQMNSLR AEDTAVYYCARLGGDNYYEYFDVWGK GTTVTYSSGGGGSGGGSGGGGSDIVLTQSPASLAVSP GQRATITCRASKSVSTSGYSYMHWYQQKPGQPPKLLIY LASNLESGVPARFSGSGSGTDFTLTINPVEANDTANYYC QHSRELPTFGGGTKVEIKRTEPKSCDKTHTCPPCPAPEL LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKLSLSPGKGGGGSGGGGSGGG TGQVQLVQSGGTVVQPGSRSLRLSCKASGYTFTSYTMH WVRQAPGKGLEWIGYINPSSGYTKYNQKFKDRFTISAD KSKSTAFLQMDSLRPEDTGYYFCARWQDYDYFDYW GQGTPTVTYSSGGGGSGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSA SVGDRVTMTCRASSSVSYMHWYQQTPGKAPKRWIYAT SNLASGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDATYYCQQ WSSNPPTFGQGTKLQITR**
hMN20A10N scFv-Fc L2 12F6 scFv DNA	73	cagggtgcagctggttgaaatctggcggcgactgtgaagcctggcgatctctgagact gagctgtgcccagcgggttcacctttagcacatagccatgagctgcatcagacagg cccctggcaagcctgggaatgggtggcgtctattgfcagagccggcagcacctacta cagcgactctgtgaagggcagattcaccatcagccgggacaacccaagaacagcct gtacctgcagatgaactccctgagagccgagacacccgctgtactattgtccagag gacccatctacaacgactacgacaggttcctattggggccaggggcacactgtgtaca gtttctagcggcggtggcggaagcggagggcggtggctccgggtggcgaggcagcga aatgtgtgtgacacagagccccccacactgtcactttctccaggcgaaagagccacac tgagctgcaagagcagccagagcgtgtgtactccagcaaccagaagaactacgtgctc ctggtatcagcagaagcccggccaagctcctcggctgtgtatgtattggccagcaca gagagagcggcatccctgacagatttctgagcgggtctgtgacagcatttaccctg accataagcagcctggaacctgaggacttcggctgtattactgcccacagttacctgag

[0122]

		cagcctgaccttggcggaggcacaaggtggaatcaagcgggagcccaatctgt gacaaaactcacatgccaccgtgccagcacctgaactcctgggggaccgtcag tcttctcttcccccaaaccaaggacaccctcatctcgggaccctgagggtca catgctgtggtggtgacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactgtacgtg gacggcgtgagggtgcataatccaagacaagccgcggggaggagcagtacaacag cacgtaccgtgtggtcagcgtctcacctgtctgaccaggactgctgaatggcaagg agtacaagtgcaaggtctccaacaaagcctccagcccccatcgagaaaacatctcc aaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacaccctgcccccatccggga ggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgctgctcaaggcttctatccagc gacatcgcctgtgagtgaggagcaatgggcagccggagaaactacaagaccac gcctccgtgtggtgactcgcagcgtctcttctctctacagcaagctcaccgtggaca gagcaggtggcagcaggggagcgtcttctcatgctcctgtagcatgaggtctgcaca accactacacgcagaagagcctctcctgtctcgggtaaaggcggcggggaggcg gtgtgtgctgtagcaccggtcaagtgacgtgtgtagtccggaggagcgtctgtc agcctggaagaagcctcggctgagctgcaagccagcggctatactaccagcta accatgcactgggtgcggcaggccccgtgcaaaaggcctggaatgtagcgtctac aaccttccagcggctacaccaagtacaaccagaatcaagaccggtttaccattagc gccgataagagcaagagcacagccttctgcatgagtcagcctgagaccagaggac accggcgtgtacttctgccccgtgacaggactacgacgtttattctgactctgggc cagggcacccctgtgacagtgcagcagcggcggagggtctccggcggagggtggca gcggcggcggcgtctgatatccagatgacacagagccccagctctctgtctcttct gtggcgacagagtgaccatgacctgtagagcctctcaagcgtgtctacatgactg gtaccagcaaacactggcaaggccccaaagccttgatctacccacctaatctgg ccagcggcgtgctcttagattcagcggcagcgtgtagcaccgattacaccctgacc atcagcagcctgcagcccgaggatatcgccacatactactccagcagtgagctcca atcctctaccctggccaggcaccgaagctgcagatcacaagatgataa
hMN20A10N scFv-Fc L2 12F6 scFv 아미노산	74	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTSTYAMSWIR QAPGKGLEWVVASIGRAGSTYYSDSVKGRFTISRDNANK SLYLQMNSLR AEDTAVYYCARGPIYNDYDEFAYWGQG TLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGE RATLSCKSSQSVLYSSNQKNYLAWYQKPGQAPRLIY WASTRESGIPARFSGSGGTDFLTISLLEPEDFAVYYCH QYLSLSTFGGGTKVEIKREP KSCDKTHTCPPCPAPELLG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVY TLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGSGGGGSGTQVQL VQSGGGVVPGRSLRLSCKASGYTFTSYTMHWVRQAP GKGLEWIGYINPSSGYTKYNQKFKDRFTISADKSKSTAF LQMDSLRPEDTGYYFCARWQDYDVYFDYWGQGTPTV VSSGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSLSASVGDRT MTCRASSSVSYMHWYQTPGKAPKPIWYATSNLASGV PSRFSGSGSGTDYTLTISLQPEDATYYCQQWSSNPPTF GQGTKLQITR--
hMNC2 scFv-Fc L2 12F6 scFV DNA	75	gaggtgcagctggtgagctgtggggaggcctggtcaagcctgggggtccctgaga ctctctgtgcagcctctggttacccttcagtggtctatgcatgagctgggtccgccaagg ctccagggaagggtggtgagtggtgtcaacattagtagtggtgggaacctacataac taccctgactcagtgaaaggccggttaccatctcagagacaacccaagaactcact gtatctgcaaatgaacagcctgagagccgagacacggcgtgtattactgtgcgagac ttgggggggataattactacgaatacttgatgtctggggcaaaaggaccacggtcacc gtctctccggcgtggtgcggtatccgggtggtggtatccggcgtgtggtggtatccgac attgtgtgaccagctctcagcctccttggcgtgtctcaggacagaggccaccatc

[0123]

		acctgcagagccagtaagagtgctcagtagccagcgatcctacatgcactggtatca gcagaaccagggacaaacctcctaactcctgatttacctggcattccaaatctggagagcg gggtcccagccaggttcagcggcagtggtctgggacgatttaccctcacaattaat cctgtgggaagctaatactgcaaatattactgtcagcacagtagggagctgcctttca cattcggcgaggggaccaggtggagatcaaacgaactgagcccaaatctgtgacaa aactcacatgcccaccgtgccagcacctgaactcctggggggaccgtcagtcctcc tcttcccccaaaaccagagacacctcatgatctccggaccctcaggtgcacatgc gtgtgtgtggacgtgagccacgaagacctgaggtcaagttaactgtgtacgtggagc gcgtggaggtgcataatgccaaagacaagccggcgaggagcagtagacaacagcacg taccgtgtgtgcagcgtcctcaccgtcctgcaccagtagctggctgaatggcaaggagta caagtgcagaggtctccaacaagccctccagcccccctcagagaaaacatctccaaa gccaaaggcgagccccgagaaccacaggtgtacacctgcccccatccgggagga gatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgctgggtcaaaaggcttctatccagcgaca tcgccgtggagtgaggagcaatggcgagccgggagacaactacaagaccagccctc ccgtgtgtgactccgagcgtccttctctctacagcaagctcaccgtgacaaagagc agggtggcagcaggggaaagcttctctatgctcctgctgcatgaggtcctgcacaacca ctacacgcagaaagcctctcctgctcctgggttaaaggcgcggggggagcggtgg tggcggtgtagcaccggtcaagtgcagctgtgtgcagtcgggagggagcgctgtgcagcc tggaaagaagcctccggctgagctgcaaggccagcggtatatacttaccagctacacc atgcactgggtgcggcagccctgccaaggcctggaatggatcggtacatcaacc cttccagcggtacaccaagtagaaccaagaattcaaggaccggtttaccattagcgcc gataaagcagagacagccttctgcatgagacagcctgagaccagagacacc ggcggtgtactctgcgcccgtggcaggactacgacgtttatttgcactactggggccag ggcaccctgtgacagtgagcagcgcgcgaggaggtcggcgagggtggcagcg ggcgcgcggtctgatafcagatgacacagagccccagctctctgtctgtcttctgtg gcgacagagtgacatgacctgtagacctcctcaagcgtgtctacatgcactgtgtac cagcaaacacctggcaaggccccaaagccttgatctacgccacctctaattctggccag cggcggtgcttctagattcagcgcgagcgatctggcaccgattacacccctgaccatca gcagcctgcagcccagagatatgccacatactctccagcagtgagctcctaactct cctaccttggccaggccaccaagctgcagatcacaagatgataa
hMNC2 scFv-Fc L2 12F6 scFV 아미노산	76	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSGYAMSWVR QAPGKGLEWVSTISSGGTYIYYPDSVKGRFTISRDNKN SLYLQMNSLR AEDTAVYYCARLGGDNYEYFDVWGK GTTVTVSSGGGSGGGGSGGGGSDIVLTQSPASLAVSP GQRATITCRASKSVSTSGYSYMHWYQQKPGQPPKLLIY LASNLESGVPARFSGSGSGTDFTLTINPVEANDTANYYC QHSRELPTFTGGGKVEIKRTEPKSCDKTHTCPPCPAPEL LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQV YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSGTQV QLVQSGGGVVPGRSLRLSCKASGYTFTSYTMHWVRQ APGKGLEWIGYINPSSGYTKYNQKFKDRFTISADKSKST AFLQMDSLRLPEDTGVYFCARWQDYDVYFDYWGQGT VTVSSGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDR VTMTCRASSSVSYMHWYQQTPGKAPKRWIYATSNLAS GVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDATYYCQQWSSNPP TFGQGTKLQITR**
12F6 scFv-Fc L1 hMN20A10N scFv DNA	77	Caagtgcagctgtgtcagtcggaggagcgctgtgcagcctggaagaagcctccg gtgagctgcgaaggccagcggtatatacttaccagctacacatgcactgggtgcgg caggcccttggcaaaagcctggaatgagctgcatcatcaaccttccagcggtaca ccaagtacaaccagaattcaaggaccggtttaccattagcggcgataagagcaagag

[0124]

12F6 scFv-Fc L1 hMN20A10N scFv 아미노산	78	cacagccttctfcagatggacagcctgagaccagagacacggcgctgtaacttctgcg cccgctggcaggatactacgacgtttattcgaactacttggggccaggcgacccctgtgaca gtgagacagcggcgccggcgaggctccggcgagggtggcagcggcgccggcggtctgtg atactcagatgacacagagcccccagctctctgtctgtcttcttggggcgacagagtgcaca tgacctgtagagcctctcaagcgtgttcctacatgctcgtgtaccagcaaacacctggca aggcccccgaagccttggatctacgcacactctaattctggccagcggcgctgctctttagat ctacgcggcagcggatctgtgcaccgattacacccctgacctacgacgctgcagccga ggatattgcacataactactgtccagcagtgagctccaatcctctactcttggccagg gcaccaagctgcagatcacaaagagcccgaattctgtgacaaaactcacatgccc accgtgcccagcacctgaactcctgtgggggaccgtcagttctctcttcccccaaaac ccaaggacacccctcatgctccgggacccctgaggtcacatgctgtgtgtgtgacgtg agccacgaagacccttgagggtcaagttaactgtgactgtggaccgctgtgaggtgcata atgccaaagacaaagcccgcgaggagcaggtacaaacagcagctaccgtgtgtgtcagcg tctctaccgtctgtcaccaggactgtgctgaatggcaaggagtacaagtgcgaaggtctcc aacaagccctcccgagccccatcgagaaaacatctccaaagccaaaggcgagccc cgagaaacacagcgtgtgtacacccgtcccccatcccgggaggagatgacaaagaaacag gtcagctgtgacctgtcctgtcaagggcttctatcccgagcgacatgcctgtggagtggga gagcaatggcgagcgggagaaacactacaagaccacgctcccgtgtgtgactcga cggctctcttctctctacagcaagctcacccgtggacaagagcaggtggcagcaggggg aacgttctctcatgtctcgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagaagc ctctccctgtctccgggttaaggcggggggtggcggttctgtgtgtgtgtggtctgtggagg aggaacgtgtgtcaggtgtcagctgtgtgaatctggcgcgacctgtgtgaagcctgtgcga tactgtgagtgcgtgtgtgtccgcagcgccgttcaccttttagcacatagccatgagctgtg atcagacaggccctgtgcaaggccctggaatgggtgtgcgtctattgtgcagagccggc agcacctactacagcgactctgtgaaggcgagattccatcagccggggacaacgccca agacacagcctgtcagctgtgcacagatgaactccctagagccgagagacacgcgctgtactat tgtgcagaggaccatctacaacgactacgacgagttccctattggggccaggggca cactgtgtcagagtttatcgcggcggtgtggcggaagcgggagcggtgtgctcgggtgtgcg gaggcagcgaagaattgtgtgcacacagagccccgcacacgtgtacatttctccaggcgaa agagccacactgtagctgcgaagagcagccagagcgtgtgtacttcagcaacagagaag aactactctggcctgtgtatcagcagaagccgggccaagctcctcggctgtgtatctattgg gccagcacaagagagagcgcatccctgcagatfttctgtgcagcggcctgtgaccgc atttcaccctgacataagcagcctggaaacctgaggacttgcctgtgtattactgccacc agflactcgtgagcagcctgaccttggcgggaggcacaagggtggaatatcaagcgggtgata a QVQLVQSGGSGVVQPGRLRLSCKASGYTFTSYTMHWV RQAPGKGLIEWIGYNIPSSGYTKYNQKFKDRFTISADKSK STAFQLQMSDLRPEDTGVYFCARWQDYDVFYFDYWGQG TPVTYSSGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVQ DRVVTMTCRASSVSVMHWYQQTPGKAPKPIWYATSNL ASGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDIATYYCQQWSS NPPTFGQGTKLQITREPKSCDTHTCPPCPAPELLGGPSV FLFPKPKDITLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGQVEVHNAAKTPREEQYNSTYRVVSVLTVTLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYITLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLLTVDGSRWQGNVFCSCVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGGGGGGGGGGGGGTQGVQL VESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFTSYAMSWIRQAPG KGLEWVASIGRAGSTYYSDVKGRFTISRDNKAKNSLYL QMNSLRAEDTAVYYCARGPIYNDYDEFAVYWGQGTLT VSSGGGGSGGGGGGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATL SCKSSQSVLYSSNQKNYLAWYQQKPGQAPRLLIYWAST RESGIPARFSGSGSGTDFTLTISLLEPEDFAVYYCHQYLS SLTFGGGTKVEIKR--
--	-----------	--

[illegible]

		NLESGVPARFSGSGTDFLTINPVEANDTANYYCQHS RELPTFGGGTKVEIKRT**
12F6 scFv-Fc L2 hMN20A10N scFv DNA	81	caagtgcagctggtgcagtcgagggagggcgctgcagcctggagaagcctccg ctgagctgcaagccagcggctatacattaccagctacacatgcaactgggtgcggc aggcccttgcaaaaggctgggaatggtcgtacatcaaccttccagcggctacac caagtacaacagaaattcaaggaccggtttaccattagcgcgataagagcaagagc acagcctttctgcagatggacagcctgagaccagaggacacggcgtgtacttctgcgc ccgctggcaggaactacgactgtttatctgactactggggccaggccacccctgtgacag tgagcagcggcggcggagcctccggcggaggtggcagcggcggcggcggcctctga tatccagatgacacagagcccagctctctgctgtcttctgtggcgcagagagtgacat gacctgtagagcctcctcaagcgtgtctacatgactgtgtaccagcaaacacctggca aggcccaagccttgatctacgacaccttaattctggccagcggcgtgcttctagat tcagcggcagcggatctggcaccgattacacctgacacatcagcagcctgcagcccg ggatctgcccatactactgcccagcagtgaggctccaatcctctactctggccagg gcaccaagctgcagatcacaaagagagcccaaatctgtgacaaaactcacatgcc accgtgcccagcactgaactcctggggggagcgtcagttctcttcccccaaac ccaagacacccatgatctcccggaccctgaggtcactcgtgtgtgtgtgacgtg agccacgaaagaccctgaggtcaagttcaactgtgtacgtggacggcgtgtgtgtgata atgccaagacaaagcggcgggagggagcagtaacacagcagctacgtgtgtgtgacg tctcaccgtctgcccagcagcgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgt aacaagccctccagccccatcgagaaacacatctcaaaagccaaaggcagccc cgagaaccacaggtgtacacccctgccccatccgggagggagatgaccaagaaccag gtcagcctgacctgctgtcaaaaggctctatccagcagacatcgccgtgtgtgtgtg gagcaatgggcagccggagagaacaactacaagaccagcctccgtgtgtgtgtgtgt cggtctcttctctctacagcaagcctcaccgtgtgacaagagcaggtgtgtgtgtgtgt aacgtcttctcatgctcgt cgtcctgtctcgggtaagcggcgggggagcgggtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgt caggtgtcagctgt gagctgt cccctgtgcaagcgt cagcgt gtacctgcagatgaactccctgagagccgaggaaccccggtgtgtgtgtgtgtgtgtgt gacctatcaaacgactacgaggtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgt gtttctagcggcgggt aattgt tgagctgcaagagcagccagcgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgt ctgggtatcagcagaagcccggccaagctcctcggctgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgt gagagagcggcatccctgcagatttctggcagcggctgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgt accataagcagcctggaacctgaggacttcggtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgt cagcctgaccttggcggaggcaccgaaggtgggaatcaagcgggtgataa
12F6 scFv-Fc L2 hMN20A10N scFv 아미노산	82	QVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCKASGYTFTSYTMHWV RQAPGKGLEWIGYINPSSGYTKYNQKFKDRFTISADKSK STAFLLQMDSLRPEDTGVYFCARWQDYDVYFDYWGQG TPVTVSSGGGGSGGGSGGGSDIQMTQSPSSLSASVG DRVMTTCRASSSVSYMHWYQTPGKAPKPWIYATSNL ASGVPSRFSGSGSDYTLTISSLQPEDIATYYCQWSS NPPTFGQGTKLQITREPKSCDKTHTCPPCPAPPELLGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKISKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSTGQVQLVESG GGLVKPGGSLRLSAAAGFTFTSTYAMSWIRQAPGKGLE

– 59 –

– 60 –

		VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTKSKAK GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSG GGSGGGGTGQVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTF STYAMSWIRQAPGKGLEWVASIGRAGSTYYSDSVKGRF TISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGPIYNDYD EFAYWGQGTLLVTVSSGGGGSGGGSGGGGSEIVLTQSP ATLSLSPGERATLSCKSSQSVLYSSNQKNYLAWYQQKP GQAPRLLIYWASTRESGIPARFSGSGSTDFTLTISLEPE DFAVYYCHQYLSLTFTGGGTKVEIKR--
인간 IgG1 중쇄 OKT3 L1 hMNC2 scFv	87	caggttcaactggttcagagcgggtgaggtgtgttcagcctggtcgtgactgagact gagctgcaaggcctcggctacacctttacaagatacactatgcactgggtcagacagg cccttgcaaggccttggaatggatggctacatcaacctagcgggataataccaa ctacaaccagaaagtgaaggacagattccatcagcacagataagtccaagtccacc gcttctctgagatggactccctgctccagagggacacagctgtgtactactgccccg gtactacgacgacctactgtctgtgattactgggtcaggggaaccacacctgaccttag cagtgctagcaccaggcccatcggtcttccccctggcaccctctccaagagcacct ctgggggacagcggcctggtggtgctggtcaaggactacttccccgagcgggtga cgggtgtgtggaaactcagcgccctgaccagcgggtgcacaccttccggctgtctta cagtcctcagactctactcctcagcagcgtggtgaccgtgccccccagcagcttggg caccagacctacatctgcaacgtgaatcaagcccagcaaaccaagggtggacaag aaagttgagcccaaatctgtgacaaaactcacatgccaccgtgccagcacctga actcctggggggacgtcagttctctctccccccaaacccaaggacacctcatgat ctccccgacctgaggtcactgctgtgtgtgtgtgacgtgagccacgaagacctgag gtcaagttaactgtactgtggacggtggtggtggtgataatgccaagacaaagccgc gggaggagcagtaacaacagcagctacgtgtgtgtcagcgtctcacgtctctgacca ggactggtgaatggcaaggagtacaagtgaaggtctccaacaaagccctccagcc cccatcgagaaaacatctccaagccaaaggcagccccgagaaacacaggtgtac acctgcccccatccccggaggagatgaccaagaacaggtcagctgacctgctgt gtcaaaaggcttctatccagcgacatgccgtggagtgggagagcaatgggagccg gagaacaactacaagaccgacctccgtgctgactcgcagggctctcttctctctac agcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaaccttctctatgctcgc tgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctcctgtctccgggt aaaggcgggggtggt cagctgt gtgcagcctctgtgattacacctcagtggtatgcatgagctgggtccgcaaggctccag ggaaagggt gactcagtgaaaggccgattcaccatctccagagacaacgccaagaactcactgtatct gcaaatgaaacagcctgagagccgagggacacggccgtgtattactgtgcgagactggg ggggataattactacgaatactctgatgtctgtgggcaagggaaccaggtcacctgtc ctccggcggtggcgatccggcggtggcggtatccggcggtggcggtatccgacattgt gctgaccagttctcagcctcctgtggtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgt gcagagccagtaagagtgctcagtagcagcgatactctacatgcactggtatcagcag aaaccaggaacactcctaactcctgattacatggcatccaatctggagagcggggtc ccagccaggttcagcggcagtggtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgt gaagctaatactgcaaatattactgtcagcacagtagggagctgcttccacattcg gcggagggaaccaaggtggagatcaaacgaacttgataa
인간 IgG1 중쇄 OKT3 L1 hMNC2 scFv	88	QVQLVQSGGTVVQPGRLRLSCKASGYTFTRYTMHWV RQAPGKGLEWIGYINPSRGYTNYNQKVKDRFTISTDKS KSTAFLQMDSLRPEDTAVYYCARYYDDHYCLDYWGQ GTTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT

[0130]

		VPSSSLGTQTYICNVNHNKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYCKKVSNAKALPAIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGGSG GGGSGGGTGGEVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTF SGYAMSWVRQAPGKGLEWVSTISSGGTYIYYPDSVKGR FTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLGGDNY YEYFDVWGKGTITVTVSSGGGSGGGGSGGGGSDIVLT QSPASLAVSPGQRATITCRASKSVSTSGYSYMHWYQQK PGQPPKLLIYLASNLESGVPARFSGSGSGTDFTLTNPVE ANDTANYYCQHSRELPFTFGGGTKVEIKRT**
인간 IgG1 중쇄 OKT3 L2 hMN20A10N scFv	89	cagggttcaactgggtcagagcgggtggaggtggttcagcctgctgtagcctgagact gagctgcaagcctcggctacacctttacaagatacactatgaggtggtcagacagg cccctggcaaggcctgggaatggtggtacatcaacccctagccgggtatatacaaa ctacaaccagaaaagtgaaggacagattccatcagcacagataagtcgaagtcacc gcttctctgcagatggactccctgctgctcagagacacagctgtgtactactgctgccc gtactacgacgacattactgtctggtgattaggggtcagggaaacacccctgacgttag cagtgctagcaccaggcccatcgtctctccctggcaccctctccaagagcacct ctgggggacagcggccctgggtgctgctgcaaggactacttcccagagcgggtga cgggtgctgtggaactcaggcggcctgaccagcggcgtgacaccttcccggctgtctca cagtcctcaggactctactcctcagcagcgtggtgaccgtgcccctcagcagcttggg caccagacctacatctgcaacgtgaatcacaagccagcaacccaagtgagacaag aaagttagcacaatctgtgacaacatcacacatgccaccgtgccacgacctga actcctgggggacgtgacttctctctctctcccccacacccaagacacccctatgat ctcccggacccctgaggtcacatgctgtggtggtgacgtgagccagcaagacctgag gtcaagttaactgtgtacgtgacgctggtgaggtgcataatccaagacaagcgc gggagggagcagtaacacagcacgtaccgtgtgtgacgtctcaccgtctctgaccca ggactggctgaatggcaaggagtaacaggtcgaaggtctcaacaaagccctccagcc cccacagagaaaacacatctccaaagccaaaggcagccccgagaaccacaggtgtac accctgccccatcccgggagggagatgaccaagaacaggtcagcctgacctgctg gtcaaaagccttctatcccagcagatcgccgtgagtgaggagacaatggcgagccg gagaacaactacaagaccagcctcccgtgtgctgactccgacggctctctctctctac agcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccg tgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctcctgtctccgggt aaaggcggcggggggagcgggtggtggtgtagcaccgggtcaggtgagctggtgga atctggcggcggactgtgaagcctggcggatctctgagactgagctgtgcccagac ggcttcacctttagcacatagccatgagctgagacagcggcctgcaaaagcct ggaaatgggtggcgtctattggcagagccggcagcacctactacagcactctgtgaag ggcagattcaccatcagccgggacaacgccaagaacagcctgtactctgagatgaact ccctgagagccgagacaccccggtgtactattgtgacagagacccatctacaacga ctacgacgagttcgctattggggccagggcacactgtcacagtcttagcggcgggtg gcggaaagcggagcgggtgctccgggtggcggagggcagcgaattgtgctgacacag agccccccacactgtcacttctcaggcgaaagagccacactgagctgcaagagca gcccagagcgtgctgtactcagcaaccagaagaactactgctgctgtatcagcagaa gccccgccaagctcctcggctgtgactattggccagcacaagagagagcggcatc cctgcccagatttctgagcggcctctggcacggatttaccctgaccataagcagcctg gaacctgaggacttgcgggtgtattactgcccacagtaacctgagcagcctgaccttggc ggaggccaccaaggtggaatcaagcgggtgataa
인간 IgG1 중쇄 OKT3 L2 hMN20A10N scFv	90	QVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCKASGYTFTRYTMHWV RQAPGKGLEWIGYINPSRGYTNYNQVKDKRFISTDKS KSTAFLLQMDSLRPEDTAVYYCARYYDDHYCLDYWGQ

[0131]

		GTTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT CPPCPAPELLEGPSVFLPPKPKDLMISRTPPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGSGG GGSTGQVQLVESGGGLVKPGGSLRLSAAAGFTFTYA MSWIRQAPGKGLEWVASIGRAGSTYYSDSVKGRFTISR DNAKNSLYLQMNSLRADTAVYYCARGPIYNDYDEFA YWGQGTLLTVSSGGGSGGGSGGGGSEIVLTQSPATL SLSPGERATLSCKSSQSVLYSSNQKNYLAWYQQKPGQA PRLIIYWASTRESGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFA VYYCHQYLSLTFGGGTKVEIKR--
인간 IgG1 중쇄 OKT3 L2 hMNC2 scFv	91	cagggttcaactggtcagagcgggtgaggtgtgttcagcctgtcgtagcctgagact gaggctgcaagcctcggctacacctttacaagatacactatgactggtcagacagg cccctggcaaggcctgggaatgattggctacatcaaccctagcggggatatacaa ctacaaccagaaagtgaaggacagattaccatcagcacagataagtcgaagtcacc gcttctctgagatgactcctgtcgtccagaggacacagctgtgtactactgccc gtactacgacgaccattactgtctgattactgggtcagggaaccacctgaccgttag cagtgctagcaccaggcccatcgtctccctggtgaccctcctccaagagcacct ctgggggacagcggccctgggtgctgtgcaaggactcttcccagcgggtga cgggtgtcgtggaactcagcggccctgaccagcggcgtgacaccttcccgtgtccta cagtcctcaggaacttactcctcagcagcgtgtgaccgtgcccctcagcagcttggg caccagacctacatctgcaacgtgaatcacaaagccagcaacacaaagtggaaga aaagttgagcccaatctgtgacaaaactcacacatgcccacgtgcccagcacctga actcctgggggaccgtcagttcttcttcccccaaaacccaaggacacctcatgat ctcccggaccctgaggtcacatgctgtgtgtgtgacgtgagccacgaagaccctgag gtcaagttcaactgtgtacgtgacggtgtgaggtgcataatgccaagacaaagccgc gggagagagcagtaaacagcacgtaccgtgtgtgagcgtcctcaccgtcctgaccca ggactggtgaaatggcaaggagtacaagtgcaaggtctccaacaaagccctccagcc cccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtac accctgcccccatccgggagagatgaccaagaaccaggtcagcctgactgctgtg gtcaaaagccttctatccagcgacatgcctgtgagtgaggagcaatgggcagccg gagaacaactacaagaccacgcccctccgtgtggaactccgacggctccttctctctac agcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagagggaacgtcttctcatgctccg tgaatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggt aaaggcggcggggggagcgggtgtgtgtagcaccgtgaggtgacgtgtgtgtg agtctgtggggagggcctgtgcaagcctgggggtccctgagactctcctgtgagcctct ggattcaccttcagtgctatgcatgagctgggtccgcccaggtctcagggaaagggct ggagtggtgtcaccattagtagtggtggaaacctacatactaccccagactcagtgaa gggccgattcacatctccagagacaacccaagaactcactgtatctgcaaatgaaca gcctgagagccgaggacacggccgtgtattactgtgagagacttggggggataatta ctacgaatacttctgtgtgtgggcaaggagacacgggtcaccgtctcctccggcgggtg gcggatccggcgggtgcggtatccggcgggtggcggtatccgacattgtgtgacccagt ctccagcctcctgtgcccgtgtctccagagagaggccacatcacctgacagccagt aagaggtgtagtacacgggtatctcctacatgactgtgtatcagcagaacacaggaca acctcctaaactcgtgatttactgtgcatcgaatctggagagcgggtccagccaggtt cagcggcagtggtgtgtggaccgatttaccctcacaattaatcctgtggaagctaafga tactgcaaatattactgtcagcacagtagggagctgcttccatctcggcggaggagac caaggtggagatcaaacgaacttgataa

[0132]

[illegible]

인간 IgG1 중쇄 12F6 L1 hMN20A10N scFv	94	QVQLVQSGGGVVPQGRSLRLSCKASGYTFTSYTMHWV RQAPGKGLEWIGYNPSSGYTKYNQKFKDRFTISADKSK STAFLOQMSDLRPEDTGVYFCARWQDYDYVFDYWGQK TPVTVSSASTGKPSVFLPASPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGQTQYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQ PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMEALHNHYTQKLSLSLSPGKGGGGGGSGGG GSGGGGTQVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFTS YAMSWIRQAPGKGLEWVASIGRAGSTYYSDSVKGRFTI SRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVVYCARGPINNDYDE FAYWAGQGLTIVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPA TSLSPGERATLSCKSSQSVLYSSNQKNYLAWYQQKPG QAPRLLIYWASTRESGIPARFSGSGSGTDFTLTISISLEPED FAVYYCHQYLLSLTFGGGTKEVIKR--
인간 IgG1 중쇄 12F6 L1 hMNC2 scFv	95	caagtgfcagctgfcgagtcgagcggagggcgtcgtgfcagcctggagaagcctccgg ctgagctgcaagggccagcggctatacattaccagctacacatgcaactggtgfcggc aggccctggcgaaggcctggaatgcatgctacatcaacccctccagcggctacac caagtacaaccagaaattcaaggaccgggttaccattagcggcgaataagagcaagagc acagcctttctgcatagtgacagcgtcgagaccagagacacccggcgtgtaactctgccc ccgtggcagactacagcaggtttatttcgactactggggccaggggcacccctgtgacag tgagcagcgtctagcaccaggggcccatcggtcttcccctggcacccctctccaagag cacctctggggggcacagcggccctgggctcgctcggtcgaaggactacttcccagcgg gtgacgggtgctgtggaaactcaggcgccctgaccagcggcgtgacacacttcccggctg tctctacgtctcaggactctactccctcagcagcgtggtgacgtgcttcccctcagcagct tgggcacccagcactcatctgcaacgtgaaatcaaaagccagcaaaccaagtggtga caagaagaagttagcggccaactctgtgacaaaactcaacatgccacgtgcccgagcag ctgaactctggggggaccgtcagcttctctcttcccccaaaaacccaaggacaccctc atgatctcccggaccctcgaggctacatgctggtggtggtgacgtgtagccaggaagacc ctgaggtcaggtcactgaactgctgacgtggcagcggcgtggaggtgcataaagccaagacaaa ggccggggaggagcaggtacaaagcacgtacaggtggtgctgacgtctctcaccgtgctg caccagagactgctgtaagtgccgaaggcaaggtacaaagtcgaaggtctcacaagaagccctcc cagccccactcgagaaaaactctcctcaaaagccaaaggccagccccgagaaccacag gtgtacacccctgccccactccggggaggagatgacaagaacacaggttcagcctgacct gctgtgtcaaaagctttatccacgcgacatcccgctggagtgaggagagcaatggggca gccggagagaacaactacaagaccacgcctcccgtgctggaactcgcagcggctcttcttc tctacagcaagctcacctgtaggaagaagcaggtggcagcaggggaaagcttctctatg ctccgtgatgcatgagggtctgtgcacaaccactacacagagaagagccttccctgtctcc gggttaaaagggggggtggcgggttctggtggtggtgctgctggaggaggaacccggtga ggtgctgagctggtggagctgtggggaggccgtgtgaagcctgggggttccctgagact ctcctgtgacagcctctgattacccttcagtgtgctatgccaatgagctgggtcggcaggct ccaggggaggggcgtgagtggtggtctcaaccattagtagtgccggaaacctacatatcta ccccagcagagcaacactcctaactcctcaacttattactctgcatcccaactctgagaagcgg atctgtcaaatgaacagcctgagagccgagagacacggccgtgtattactgtgctgagact gggggggataattactacgaataactctgattctggggcaaaaggaccacgggtacacct ctctccggcgggtgaggaatctggcgagggtgagatccggcgggtgctggcagatctgacat gtgctgacccagcttccagcctcttggccgtgtctcaggacagaggggccacatcac ctgacagccagtaagaggtgctagtagcagcggataactctcatatgcaactgtagtagc agaagaacagagcaacactcctaactcctcaacttattactctgcatcccaactctgagaagcgg

		gtccagccaggttcagcggcagtggtctgggaccgattccacctcacaattaatcct gtggagcctaatactgcaaatattactgtcagcacagtagggagctgctttcacatt cggcggaggaccaaggtggagatcaaacgaactgataa
인간 IgG1 중쇄 12F6 L1 hMNC2 scFv	96	QVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCKASGYTFTSYTMHWV RQAPGKGLEWIGYINPSSGYTKYNQKFKDRFTISADKSK STAFLQMDSLRLPEDTGVYFCARWQDYDVYFDYWGQG TPVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTYSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTTPPVLDSGGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGG GSGGGTGVEQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSG YAMSWVRQAPGKLEWVSTISSGGTYIYPDSVKGRFT ISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVVYCARLGGDNYE YFDVWGKGTTTVTVSSGGGGSGGGSGGGSDIVLTQSP ASLAVSPGQRATITCRASKSVSTSGYSYMHWYQKPGQ PPKLLIYLASNLESGVPARFSGSGSGTDFTLTINPVEAND TANYYCQHSRELPTFGGGTKVEIKRT**
인간 IgG1 중쇄 12F6 L2 hMN20A10N scFv	97	caagtgacgtggtgagtcagtcggaggaggcgtgagcctggaagaagcctccg ctgagctgcaaggccagcggctatacattaccagctacaccatgactggtgctggc aggcccttgcaaaaggcctgaatgagtcgctacatcaaccttcagcggctacac caagtacaaccagaatacagaccggtttaccattagcggcgaagaagcaagagc acagcctttctgacagatgacagcctgagaccagaggacacggcgtgtacttctg ccgctggcaggactacgacgtttattgactactgggccaaggccacccctgtgacag tgagcagcgtacagcaaaaggccatcggtcttccccctggcaccctctccaagag cacctctgggggcacagcggccctggcgtgctgtaaggactacttccccgagcgg gtgacggtgtctgtgaactcaggcggccctgaccagcggcgtgacaccttccccctg tctacagtctcaggacttactcctcagcagcgtggtgaccgtgccccagcagct tgggcaccagaccctacatctgcaacgtgaatcaaacagccagcaacccaagtgga caagaaagttagcccaaatctgtgacaaaactcacacatgcccaccgtgcccagcac ctgaactcctgggggaccgtgactcttctctcccccaaaccaagacacccctc atgatctccggaccctgaggtcacatgctgtgtgtgagcgtgagccacgaagacc ctgaggtcaagttaactgtgtgtgacggcgtgtgaggtgcataatgccaagacaaa gcccggaggaggagcagtaacacagcagtgaccgtgtgtgacgctcctaccgtcctg caccaggactgctgaatggcaaggagtaacagtgcaaggtctccaacaaagccctcc cagccccatcgagaaaaccatctcacaagccaaggcagccccgagaaccacag gtgtacacccctgcccccatccggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacct gcctgtcaaaagccttctatccagcgacatgcctgtgagtgaggagcaatgggca gcccggagaaactacaagaccacgcctccgtgtgactcgcagcgtcctcttctcc tctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatg ctcgtgatgcatgagcctgcaacaactacacgcagaagagcctctccctgtctcc gggtaaaggcggcggggggagcgtgtgtggtgtagcaccggtcaggtgacgtg gttgaatctggcgggactgtgaagcctggcgatctctgagactgagctgtgcccgc cagcggcttcaccttttagcacatagccatgagctggatcagacagcccctggcaaa gcctggaatgggtgctgtatttgagagccggcagcacctactacagcgactctgtg aagggcagattcaccatcagccgggacaacgccaagaacagcctgtacctgagatg aactccctgagagccgaggacaccgctgtactattgtgacagagaccatctacaa cgactacgacagttcgttattgggccaaggcacactgtgacagtttctagcggcg gtggcggaagcggagcgggtgctccgtggcgagcagcgaaattgtgtgaca cagagccccccacactgtcactttctccaggcgaaagagccacactgagctgcaaga

		gcagccagagcgtgctgtactccagcaaccagaagaactacctggcctggtatcagca gaagcccgccaagctcctcggctgctgatctattggccagcacaagagagagcgg catccctgcccagattttctggcagcggcctctggcaccgatttcacccctgaccataagcag cctggaacctgaggacttcgcccgtgtattactgcccaccagtacctgagcagcctgaccttt ggcggaggcaccagggtggaatcaagcgggtataa
인간 IgG1 중쇄 12F6 L2 hMN20A10N scFv	98	QVQLVQSGGQVVPGRSLRLSCKASGYTFTSYTMHWV RQAPGKGLEWIGYINPSSGYTKYNQKFKDRFTISADKSK STAFLLQMDSLRPEDTGVYFCARWQDYDVYFDYWGQG TPVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGSGGGG STGQVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFTSTYAMS WIRQAPGKLEWVASIGRAGSTYYSDSVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGPIYNDYDEFAYW QGGLTLVTSSGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSL PGERATLSCKSSQSVLYSSNQKNYLAWYQQKPGQAPRL LIYWASTRESGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFAVY YCHQYLLSLTFGGGKVEIKR--
인간 IgG1 중쇄 12F6 L2 hMNC2 scFv	99	caagtgcagctgtgctgagtcggagggagcgtgctgagcctggaagaagcctcgg ctgagctgcaaggccagcggctatactaccagctacacatgcaactgggtgcggc aggccctcggcaaggcctggaatggatcggctacatcaaccctccagcggctacac caagtacaaccagaattcaaggaccggtttaccattagcggcgataagagcaagagc acagcctttctgagatggagacccctgagaccagagacacggcgtgtactctgcgc ccgctgagcagactacgacttttttactactggggccagggcacccctgtgacag tgagcagcgtagcaccaggcccatcggtcttccccctggcacccctcctcaagag cacctctggggcacagcggccctgggctgctggtcaaggactattccccgagcgg gtgacggtgtcgtggaactcaggcggccctgaccagcggcgtgacaccttccccgtg tctacagtctcaggacttactcctcagcagcgtggtgacgtgcccctcagcagct tgggcacccagacctacatctgcaactggaatcaagcccagcaacaccaaggtgga caagaaagttagcccaatctgtgacaaactcacatgcccaccgtgcccagcac ctgaactcctgggggagcgtcagttctcttcccccaaaacccaaggacacccctc atgatctccggaccctgaggtcacatgctggtgtgtgagcgtgagccacgaagacc ctgaggtcaagtcaactgtgtacgtgacggcgtgaggtgcataatgccaagacaaa gccgcccggagagcagtagacaagcacgtaccgtgtgtgagcgtctcctaccgtctg caccaggactggctaatggcaaggagtacaagtgcgaaggtctcacaagaagccctcc cagccccatcgagaaaacatctcacaagccaaggcagccccgagaacacag gtgtacaccctgccccatccccgggagagatgaccaagaaccaggtcagcctgacct gcctggtcaaggcttctatccagcagacatgcggtgagtgaggagcaatgggca gccggagacaactacaaagaccagcctcccgctgctgactccgacggctcttctcc tctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgttctctcatg ctcgtgatgcatgaggtctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctcc gggtaaaggcggcggggggagcgggtgtggtgtagcaccgggtgaggtgcagctg gtggaggtctggggagggcctgtgaagcctgggggtccctgagactctcctgtgcag cctctgattcaccttcagtggtatgcatgagctgggtccgccagggtccagggaag gggctggagtggtgtcaaccattagtagtgcggaacctacatactacccgactca gtgaagggccgattcacatctccagagacaacccaagaactcactgtatctgcaaat gaacagcctgagagccgagacacggccgtgtattactgtgcgagacttgggggggat aattactacgaatacttcgagctctggggcgaaggagaccaggtcacctgtctctccggc

[0136]

[illegible]

- 69 -

		ccccctggcaaggcgctgggaatggattggctacatcaaccctagccggggatataccaa ctacaaccagaaagtgaaggacagattccatcagcacagataagtccaagtccacc gcttctctgcagatggactccctgctgcagaggacacagctgtgtactactgcgcccg gtactacgacgaccactactgtctggactactggggacagggaaacacctgacctca gctctggcggcgaggctcggcgagggtggcagcggcgcgcgctctgafatc cagatgaccagagcccttctcttatctgcagcgtggcgatagagtgaccatcaca tgacgcccagctcttctgttagctacatgaactgtaccagaaacacctggaaaggc ccctaaagatgatctacgacaccagcaagctggcctctggcgtgccccttagattca gggctctggctccggcaccgactacaccttacaattagctccctgcagcccgaggat atgccacctactactgccagcagtgaggcagcaaccccttcacattcggccaggcgca caaagctgcaaatcaccagatgataa
인간 IgG1 중쇄 hMNC2 L1 OKT3 scFv	104	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSGYAMSWVR QAPGKGLEWVSTISSGGTYIYPDSVKGRFTISRDNAKN SLYLQMNSLRRAEDTAVYYCARLGGDNYEYFDVWVK GTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTWSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAK GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDSGFSFLYSLKTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGGGSG GGGSGGGTGQVQLVQSGGQVVPGRSLRLSCKASGYT FTRYTMHWVRQAPGKGLEWIGYINPSRGYTNYNQKVK DRFTISTDKSKSTAFLQMDSLRPEDTAVYYCARYYDDH YCLDYWGQGFTLTVSSGGGGSGGGSGGGGSDIQMTQ SPSSLSASVGDRTITCSASSSVSYMNWYQQTPGKAPKR WIYDTSKLASGVPSRFSGSGSGTDYFTISSLQPEDIATY YCQQWSSNPFTFGQGTKLQITR**
인간 IgG1 중쇄 hMN20A10N L2 OKT3 scFv	105	caggtgcagctggtgaatctgcccggcgactgtgaagcctggcggatctctgagact gagctgtgccgacagcggcttcaccttagcacatacgccatgagctgacacagagg ccccctgcaaaaggcctgggaatgggtgctctattggcagagccggcagcacctacta cagcgactctgtgaaggcgagattcaccatcagccgggacaacgccaagaacagcct gtacctgcagatgaactccctgagagccgaggacaccccggtgtactatgtgccagag gacctatcacaacgactacgaggttcgctattggggccagggcacactggtcaca gtttctagcgttagcaccaggcccatcggtcttccctggcaccctctccaagagc acctctggggcacagcggccctggctgctgggtcaaggactacttcccagcggg tgacgggtgctggaactcagcgccctgaccagcggcgtgcacacctcccggctgt cctacagtctcaggactctactccctcagcagcgtggtgacgtgcccctcagcagctt gggcacccagacctacatctgcaacgtgaatcacaagccagcaacaccaaggtgga caagaaagttagcccaatctgtgacaaaactcacatgccaccgtgccagcac ctgaactctgggggacgtcagttctctcttcccccaaaacccaagacaccctc atgatctccggaccctgaggtcacatgctgtgtgtgagctgagccacgaagacc ctgaggtcaagtcaactgtgtacgtgacggcgtgtgaggtgcataatgccaagacaaa ggcgaggagagcagtagacaacagcaggtaccgtgtgtgagcgtctctaccgtctctg caccaggactggtgaatgcaaggagtacaagtgcaaggtctcacaagaagccctcc cagccccatcgagaaaacatctcacaagccaaggcgagcccgagaaaccacag gtgtacaccctgccccatccgggacgagctgaccaagaaccaggtcagcctgacct gcctgtgtaaaaggcttctatccagcgacatgcggtgagtgaggagcaatgggca ggcgagaaactacaagaccagcctcccggtgtgactccgacggtcctcttctcc tctacagaagctcaccgtgacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatg ctcgtgatgcatgaggtctctgcacaaccactacacgagaagagcctctccctgtctcc gggtaaaaggcggcggggggagcgtgtgtgtggcgtagcaccggtcaggtgcaactgg

		tgcatgctcggcgaggcggtggtgagcctggccggagcctgagactgagctgcaagg cctccggctacacctttacaagatacactatgcactgggtcagacaggccctggcaag ggcctggaatggattggctacatcaaccctagccgggatataccaactacaaccagaa agtgaaggacagattcaccatcagcacagataagtccaagtcacccgttctcagat ggactccctgctccagaggacacagctgtgtactactgcccggctactacgacgac cactactgtctggactactggggacagggaaccacctgaccgtcagctctggcgcg gaggctcggcgagggtggcagcgcgcgcggtctgtatccagatgaccag agcccttcttctatctccagcgtggcgatagagtgaccatcacatgagcgccagc tctctgttagctacatgaactgtaccagcaaacacctggaaaggcccctaaagatgg atctacgacaccagcaagctggcctctggtggtccctctagattcagcggtctgctcc ggcaccgactacacctttacaattagctcctgagcccgaggatctgcccactactac tgccagcagtgaggagcagcaaccccttcacattcggccagggcacaaagctgcaaatca ccagatgataa
인간 IgG1 중쇄 hMN20A10N L2 OKT3 scFv	106	QVQLVESGGGLVKGPGSLRLSCAASGFTTFSTYAMSWIR QAPGKGLEWVVASIGRAGSTYYSDSVKGRFTISRDNAKN SLYLQMNSLRATEDAVYYCARGPIYNDYDEFAYWGQG TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTWSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQ PREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGSGGGG STGQVQLVQSGGQVVPGRSLRLSCKASGYTFTRYTM HWVRQAPGKGLEWIGYINPSRGYTNYNQKVKDRFTIST DKSKSTAFLQMDSLRPEDTAVYYCARYYDDHYCLDYW GQGTTLTVSSGGGSGGGSGGGSGGSDIQMTQSPSSLSA SVGDRVTITCSASSSVYMNWYQQTPGKAPKRWIYDTS KLASGVPSRFSGSGSGTDYFTISSLQPEDIAITYYCQQW SSNPFTFGQGTKLQITR--
인간 IgG1 중쇄 hMNC2 L2 OKT3 scFv	107	gaggtgagctgggtgagctctgggggagcctgggtcaagcctggggggtcctgaga ctctcctgagcagcctctggattcacctcagtggtatgcatgagctgggtcggccagg ctccagggaagggtggtgagtggtctcaaccattagtagtggtggaaacctacatatac taccctgactcagtgaaaggccgattcacctctcagagacacgccaagaactcact gtatctgcaaatgaacagcctgagagccgagacacggcgtgtattactgtgagagac ttgggggggataattactacgaatacttcgatgtctgggcaagggaaccaggtcacc gtctcctccgtagcaccagggtccatcggtcttccccctggcaccctctccaagag cacctctgggggcacagcggccctgggtgctgctcaaggactacttccccgagccg gtgacgggtgtctggaaactcagggcgcctgaccagcggcgtgcacacctccccgtg tcctacagtctcaggaactctactccctcagcagcgtgtgacgtgcccctcagcagct tgggcaccagacctacatctgcaacgtgaatcacaagcccagcaacacaaaggtgga caagaaagttagcccaatcttggacaaaactcacatgcccaccgtgcccagcac ctgaactcttgggggacgtcagttctcttccccccaaaaccaggaacacctc atgatctccggacccctgaggtcacatgctgtgtgtgacgtgagccacgaagacc ctgaggtcaagtcaactgtgtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaa gcccggggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtgtcagcgtctcaccgtcctg caccagactggtgtaattgcaaggagtacaagtcaagggtctccaacaagccctcc cagccccatcgagaaaacctctccaagccaagggcagccccgagaaccacag gtgtacacctgccccatccgggaggagatgacaaagaccaggtcagcctgacct gctgtgcaaaagcttctatccagcgacatcccggtgagtgaggagcaatgggca gcccggagacaactacaagaccacgctcccggtgtgactccgacggtctcttctcc tctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcagggaacgtcttctcatg

[0140]

		ctcctgcatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctcc gggtaaaaggcggcggggggagcgggtggtggcggtagcaccggtcaggtgcaactgg tgagtcgcggcgaggcgtggtgagcctggccggagcctgagactgagctgcaagg cctccggctacacctttacaagatacactatgactgggtcagacagggccctggcaag ggcctgggaatggattggctacatcaaccctagccggggatataccaactacaaccagaa agtgaaggacagattaccatcagcacagataagtccaagtcaccgctttctctgagat ggactccctgctgctcagaggacacagctgtgtactactgcccgggtactacgacgac cactactgtctgactactggggacagggaaccacctgaccgtcagctctggcgcg gaggtctccggcgagggtggcagcggcgcgcgctctgataccagatgacccag agccctctctcttctgagccagcgtggcgatagagtgcacatcacatgagcgccagc tctctgttagctacatgaactgtaccagcaaacacctggaagggccctaaaagatgg atctacgacaccagcaagctggcctctgctgctgcccctctagattcagcggctctggtcc ggcaccgactacacctttacaattagctcctgagcccaggatatacgccacctactac tgccagcagtgagcagcaaccctctcacattggccagggcacaaagctgcaaatca ccagatgataa
인간 IgG1 중쇄 hMNC2 L2 OKT3 scFv	108	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSGYAMSWVR QAPGKGLEWVSTISSGGTYIYYPDSVKGRFTISRDNAKN SLYLQMNSLR AEDTAVYYCARLGGDNYEYFDVWGK GTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSQSVMEALHNHYTQKLSLSLSPGKGGGGSGG GGSTGQVQLVQSGGQVVPGRSLRLSCKASGYTFTRYT MHWVRQAPGKLEWIGYINPSRGYTNYNQKVKDRFTI STDKSKSTAFQLQMSLRPEDTAVYYCARYYDDHYCLD YWGQGTTLTVSSGGGGSGGGSGGGSDIQMTQSPSSL SASVGDRTVITCSASSSVSYMNWYQQTPGKAPKRWIYD TSKLASGVPSRFSGSGSGTDYTFITSSLPEDIATYYCQQ WSSNPFTFGQGTKLQITR**
인간 IgG1 중쇄 hMN20A10N L1 12F6 scFv	109	cagggtgcagctggttgaatctggcgcgactgtgaagcctggcggtctctgagact gagctgtgcccagcggcttcacctttgacacatagccatgagctggtatcagacagg cccctggcaaggcctgggaatgggtggcgtctattggcagagccggcagcacctacta cagcgactctgtgaaggcgagattcacatcagccgggacaacgccaagaacagcct gtacctgcagatgaactccctgagagccgagacaccgctgtactattgtgccagag gacctatctaacgactacgagaggttgcctattggggccagggcacactgtgtaca gtttctagcgtagcaccaaggggccatcggtcttccccctggcacctctccaagagc acctctgggggcacagcgccctgggtgctgctgaaggactacttcccagcgcg tgacgtgtctgtgaactcaggcgccctgaccagcggtgcacacctcccggctgt ctacagtcctcaggactctactcctcagcagcgtgtgaccgtgcccctcagcagctt gggcacccagacctacatctgcaacgtgaatcacaagccagcaacccaaggtgga caagaaaagttgagcccaatctgtgacaaaactcacacatgccaccgtgccagcac ctgaactcctgggggacgtcagcttctcttcccccaaaacccaagacacctc atgatctccggaccctgaggtcacatgctgtgtgtggtgacgtgagccagaagacc ctgaggtcaagttcaactgtgtgtgacggcggtggaggtgcataatgccaagacaaa gccgcgggagagcagtaacaacagcacgtaccgtgtgtgtcagcgtctctcaccgtctctg caccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcagggtctccaacaaagccctcc cagccccatcgagaaaaccatctcacaagccaaggcgagccccgagaaccacag gtgtacacctgccccatccgggacgagctgaccaagaaccaggtcagcctgacct gcctgtgcaaggcttctatccagcgacatgccgtgagtgaggagagcaatgggca

[0141]

[illegible]

- 74 -

		caccaggactggctgaatggcaaggagfacaagtgcaaggctccaacaaagccctcc cagccccatcgagaaaaccatctcaagccaaaggcagccccgagaaccacag gtgtacaccctgccccatccgggacgagctgaccaagaaccaggtcagcctgacct gcttggtcaaaaggcttctatccagcgacatcgccgtggagtgaggagcaatgggca gcccggagaaactacaagaccacgctcccgctgctgactccgacgctccttctcc tctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaaacttctctatg ctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctcc gggtfaaaggcggcggggggaggcgggtggcggtagcacccgtcaagtgacgtgg tgcagtccggaggagcgctctgtagcagctggagaagcctccgctgagctgcaagg ccagcggctatactaccagctacacatgactgggtggcggcagccctgggcaa aggcctggaatggatcgctacatcaaccctccagcggctacaccaaagtacaaccag aaattcaaggaccgggtttaccattagcggcgaataagcaagagcacagcctttctgca gatggacagcctgagaccagaggacaccggcggtgacttctgcccggctggcagga ctacgacgtttatttgactactggggccaggccacccctgtgacagtggcagcggcg gcccggaggtccggcggagggtggcagcggcgggcggtctgatatccagatgaca cagagccccagctctgtctgtctgtggcgacagagtgacatgacctgttagagc ctcctcaagcgtgtctacatgactggtaccagcaaacctggcgaaggccccaaagc cttgatctacgccacctctaattggccagcggcggtgcttctagattcagcggcagcg gatctggcaccgattacacctgacctacagcagcctgcagcccgaggatatgccac atactactgccagcagtgagctccaatcctcctacctcggccaggggcaccaagctgc agatcacaaagtataa
인간 IgG1 중쇄 hMN20A10N L2 12F6 scFv	114	QVQLVESGGGLVPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMSWIR QAPGKGLEWVASIGRAGSTYYSDSVKGRFTISRDNKN SLYLQMNSLR AEDTAVYYCARGPIYNDYDEFAYWGQG TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGLVKDY FPEPVTWSN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYCKKVSNAKALPAIEKTIKAKGQ PREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGG STGQVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCKASGYTFTSYTMH WVRQAPGKGLEWIGYINPSSGYTKYNQKFKDRFTISAD KSKSTAF LQMDSLRPEDTG VYFCARWQDYDVYFDYW GQGTPVTVSSGGGGSGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSA SVGDRVTMTCRASSSVSYMHWYQQTGKAPKPWIYAT SNLASGVPSRFSGSGSDTDYTLTISSLQPEDIATYYCQQ WSSNPPTFGQGTKLQITR--
인간 IgG1 중쇄 hMNC2 L2 12F6 scFv	115	gaggtgcagctgggtgagtgctggggaggcctggtcaagcctgggggtccctgaga ctctcctgtgcagcctctggattaccttcagtggtatgccaatgagctgggtccgcccagg ctccagggaagggtgctggagtggtctcaaccattagtagtgccggaacctacatatac taccggactcagtgaaaggccgattcaccatctccagagacaacccaagaactcact gtatctgcaaatgaacagcctgagagccgaggacacggccgtgtattactgtgcgagac ttgggggggataattactacgaatacttcgatgtctggggcaaaaggaccacgggtcacc gtctctcctcgctagcaccaggcccatcggtcttccccctggcacccctctccaagag cacctctgggggcacagcggccctgggtgctgctgcaaggactacttccccgagccg gtgacggtgtctgtggaactcaggcgccctgaccagcggctgcacacctccccgctg tctacagtctcaggactctactcctcagcagcgtgtgacgtgacctccagcagct tgggcacccagacctacatctgcaacgtgaatcacaagccagcaacccaaggtgga caagaagtgtgagcccaatctgtgacaaaactcacatgcccaccgtgcccagcac ctgaactcctgggggaccgtcagttcttcttcccccaaaacccaaggacacctc atgatctccggaccctgaggtcacatgcgtgtgtgtgacgtgagccaggaagacc

[0144]

		ctgaggtcaagttcaactgtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaa gcccggggaggagcagtaacaacagcacgtacgtgtggtcagcgtctcaccgtctcgt caccagactgtgctgaatggcaaggagtacaagtgcagggtctccaaagaagccctcc cagccccatcagaaaacatctccaaagccaaaggcagccccgagaaccacag gtgtacacctgccccatcccgggaggagatgaccaagaacaggtcagcctgacct gcctgtcaaaaggcttctatcccagcgcacatcccggtgagtgaggagcaatgggca gcccggagaacaactacaagaccacgctcccggtgctgactccgacggctcctcttcc tctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcagggaacgtcttctcatg ctccgtgctgcatgaggctctgcacaacctacacgcagaagagcctctccctgtctcc gggtaaaggcggcggggaggcgggtggtgtagcacgggtcaagtgtagctggtg tgtagtcggaggagcgtgctgtagcctgggaagcctccggctgtagctgcaagg ccagcggctatacattcaccagctacacatgcaactgggtgtagcaggccccggcaa aggcctggatgtagcgtacatcaacctccagcggctacaccaagtacaaccag aaattcaaggaccggtttacattagcgcgataagagcaagagcacagccttctgca gatggacagcctgagaccagagcagccggcgtgtacttctgtagcccgctggcagg ctacgacgtttattctgactactggggccaggcaccctgtgacagttagcagcggcg gaggaggtctccggcggagggtgtagcggcggcggcgtctgataccagatgaca cagagcccagctctctgctgcttctgtggcagacaggtgacatgacctgtagagc ctcctcaagcgtgctacatgcactgtaccagcaaacacctgcaaggccccaaagc cttgatctacgccaccttaactgtgtagcggcgtgcttcttagattcagcggcagcg gatctggcaccgattacacctgacatcagcagcctgtagcccgaggatagccac atactactgtagcaggtgtagctccaatctcctaccttgcggcaggccaccaagctgc agatcacaaagtataa
인간 IgG1 중쇄 hMNC2 L2 12F6 scFv	116	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSGYAMSWVR QAPGKGLEWVSTISSGGTYIYYPDSVKGRFTISRDAK SLYLQMNSLRLEDTAIVYYCARLGGDNYEYFDVWGK GTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTWSNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGSGG GGSTGQVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCKASGYFTSYT MHWVRQAPGKLEWIGYINPSSGYTKYNQKFKDRFTIS ADKSKSTAFQMDSLRPEDTGYYFCARWQDYDYFDY WGQGTPTVTVSSGGGSGGGSGGGSDIQMTQSPSSLS ASVGDRVTMTCRASSSVSYMHWYQQTPGKAPKRWIYA TSNLAGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDIAITYCQQ WSSNPPTFGQGTKLQITR**
hMNC2 scFv-Fc 유전자	117	gagggtgagctgggtgaggtctggggaggcctggtcaagcctggggggtccctgaga ctctcctgtgagcctctgtgattcaccttcagtggtctatgcatgagctgggtccgccaagg ctccagggaaggggctggagtggtctcaaccattagtagtggtgggaacctacatatac taccctgactcagtgaaaggccgattcacatctccagagacaacccaagaactcact gtatctgcaaatgaacagcctgagagccgaggacacggccgtgtattactgtgtagagac ttgggggggataattactacgaatacttcgatgtctggggcaaaaggaccacggcacc gtctcctccggcgggtgtagcgtggtgtagcggatccggcgggtgtagcggatccgac attgtgctgaccagctcctcagcctcctggcgtgtctcagagacagaggccaccatc acctgtagagccagtaagaggtgtagtaccagcgatactctacatgcactgtatca gcagaacaggacaacctcctaactcctgattacctgtagcatcaatctgtagagcgg gggtcccagccaggttcagcggcagtggtgtgtagcggatctacacctcaataat cctgtggaagctaatactgcaaatattactgtcagcacagtaaggagctgcttctca

[0145]

		cattcggcggaggaccaggtggagatcaaacgaactgagcccaatctgtgacaa aactcacatgcccaccgtgccagcacctgaactcctgggggaccgtcagttctc tcttccccaaaaccagacacccatgatctccggaccctgaggtcacatgc gtgtgtgtggagcgtgagccacgaagacctgaggtcaagttcaactgtacgtggacg gcgtggagggtgataatgccaagacaaagccggggaggagcagtacaacagcacg taccgtgtgtcagcgtctcaccgtctgtcaccaggactggtgaatggcaaggagta caagtgcaaggtctccaacaaagccctcccagccccatcgagaaaacatctccaaa gccaaaggcagccccgagaaccacaggtgtacaccctgccccatccgggaggga gatgaccaagaaccaggtcagcctgtgtgctgtgcaaaaggcttctatccagcgaca tcgccgtggagtgaggagcaatggcgagccggagacaactacaagaccagcctc ccgtgctggactccgagcgtccttctctctacagcaagctcaccgtggacaagagc aggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggtctgcaaca ctacacgcagaagagcctctcctgtctccgggtaaatgataa
hMNC2 scFv-Fc hMNC2	118	EVQLVESGGGLVKGPGSLRLSQAASGFTFSGYAMSWVR QAPGKGLEWVSTISSGTYIYYPDSVKGRFTISRDNKN SLYLQMNSLRAREDYVYYCARLGSDNYEYFDVWGK GTTVTVSSTGGGGSGGGSGGGSDIVLTQSPASLAVSP GQRATITCRASKSVSTSGYSYMHWYQQKPGQPPKLLIY LASNLESGVVPARFSGSGSGTDFTLTINPVEANDTANYYC QHSRELPTFTGGGKVEIKRTEPKSCDKTHTCPPCPAPEL LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSREEMTKNQVSLWLVKGFPYSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK--
hMNC2 scFv-Fc hMNC2 HIS	119	gaggtgcagctgtgtgagctgtggggaggcctgtcaagcctgggggtccctgaga ctctcctgtgcagcctctgtgattcacctcagtggtatgcatgagctgggtccgagc ctccaggggaagggtgtgtgagtggtctcaaccattagtagtgcggaacctacatatac taccctgactcagtgaaaggccgattcacatctcagagacaacgcgaagaactcact gtatctgcaaatgaacagcctgagagccgaggacacggccgtgtattactgtgcgagac ttgggggggataattactacgaatactcgtatgtctgggcaaaaggaccacgggtcacc gtctcctccggcgggtgcggatccggcgggtggcgatccggcgggtgcggatccgac attgtgctgaccagctccagcctcctgtgcccgtgtctcagacagaggccaccatc acctgcagagccagtaagagtgatcagtagcagcgatactctcatgcaactggtatca gcagaaccaggaacaacctcctaactcctgattacctggcatccaatctggagagcg gggtccagccaggttcagcggcagtggtgtgtggaccgattcacctcacaattaat cctgtggaagctaatactgcaaatattactgtcagcacagtagggagctgctttca cattcggcggaggggaccaaggtggagatcaaacgaactgagcccaatctgtgacaa aactcacatgcccaccgtgccagcacctgaactcctgggggaccgtcagttctc tcttccccaaaaccagacacccatgatctccggaccctgaggtcacatgc gtgtgtgtggagcgtgagccacgaagacctgaggtcaagttcaactgtacgtggacg gcgtggagggtgataatgccaagacaaagccggggaggagcagtacaacagcacg taccgtgtgtcagcgtctcaccgtctgtcaccaggactggtgaatggcaaggagta caagtgcaaggtctccaacaaagccctcccagccccatcgagaaaacatctccaaa gccaaaggcagccccgagaaccacaggtgtacaccctgccccatccgggaggga gatgaccaagaaccaggtcagcctgtgtgctgtgcaaaaggcttctatccagcgaca tcgccgtggagtgaggagcaatggcgagccggagacaactacaagaccagcctc ccgtgctggactccgagcgtccttctctctacagcaagctcaccgtggacaagagc aggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggtctgcaaca ctacacgcagaagagcctctcctgtctccgggtaaacgggtcatcatcaccatcaca ttgataa

[0146]

hMNC2 scFv-Fc His	120	EVQLVESGGGLVPGGSLRLSAAAGFTFSGYAMSWVR QAPGKGLEWVSTISSGGTYIYYPDVSKGRFTISRDN SLYLQMNSLRADTAVYYCARLGGDNYEYFDVWGK GTTTVTVSSGGGGSGGGSGGGSDIVLTQSPASLAVSP GQRATITCRASKSVSTSGYSYMHWYQKPGQPPKLLIY LASNLESGVPARFSGSGSGTDFTLTINPVEANDTANYYC QHSRELPTFTGGGKVEIKRTEPKSCDKTHTCPPCPAPEL LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKTHHHHHH--
hMN20A10N scFv-Fc His	121	caggctgcagctggtgaatctggcggcgactgtgaagcctggcggatctctgagact gagctgtgcccgccagcggcttcaccttagcacatagccatgagctgagcagcagg ccctctggcaaaaggcctggaaatgggtgctgtatgtggcagagccggcagcactacta cagcgactctgtgaaggcagattcaccatcagccgggacacgccaagaacagcct gtacctgcagatgaactccctgagagccgagacacggcctgtactatgtgcccagag gacccatctacaacgactacgacgaggttcctattggggccagggcacactgtgcaca gtttctagcggcgggtggcgaagcgggagcgggtggcgggtggcggagcagcga aatgtgtctgacacagagccccccacactgtcatttctccaggcgaagagccacac tgagctgcaagagcagccagagcgtgtctgtactccagcaaccagaagaactacctggc ctgtatcagcagaagccggccaagctcctcgtgctgtatctattggccagcaca gagagagcggcatccctgccaagatttctggcagcggctgtgcccagcatttcacccctg accataagcagcctggaaactgaggacttcgctgtattactgcccagcagctacctgag cagcctgacctttggcggagcaccaggtggaaatcaagcgggagcccaaatctgtg gacaaaactcacatgcccacgtgcccagcactggaactctggggggaccgtcag tcttctcttcccccaaaacccaagacacccctcatgtatctccggaccctgaggtca catgctgtgtgtgacgtgagccacgaagaccctgagctgaagtcaactgtgtacgtg gacggcgtgtgaggtgcataatgccaaagacaaagccgcccgggagcagctacaacag cacgtaccgtgtgtgacgtgtcctcaccgtctgcaccagcactgtgtaattggcaagg agtacaagtcaaggtctccaacaagccctccagcccccatcgagaaaacacatctcc aaagccaaaggcagccccgagaaccacaggtgtacacccctgccccatccccggga ggagatgaccaagaaccaggtcagcctgtgtgtcctgtcaaaaggcttctatccagcg acatgccctgtgaggtgggagcaatggcagccgggagaacaactacaagaccacg cctccgtgtgtgactccgacggctctcttctctctacagcaagctcaccgtggacaag agcaggtggcagcaggggaacgtctctcatgtcctcgtgatgcatgaggtctgtcaca ccactacacgcagaagcctctcctgtctccgggtaaatgataa
hMN20A10N scFv-Fc His	122	QVQLVESGGGLVPGGSLRLSAAAGFTFSTYAMSWIR QAPGKGLEWVASIGRAGSTYYSDSVKGRFTISRDN SLYLQMNSLRADTAVYYCARGPIYNDYDEFAYWGGQ TLVTVSSGGGGSGGGSGGGSEIVLTQSPATLSLSPGE RATLSCKSSQSVLYSSNQKNYLAWYQKPGQAPRLLIY WASTRESGIPARFSGSGSGTDFTLTISLEPEDFAVYYCH QYLSLTFGGGKVEIKREPCKSCDKTHTCPPCPAPELLG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NFWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK--
hMN20A10N scFv-Fc His	123	caggctgcagctggtgaatctggcggcgactgtgaagcctggcggatctctgagact gagctgtgcccgccagcggcttcaccttagcacatagccatgagctgagcagcagg

[0147]

		ccccctggcaaaagccctgggaatgggtggcgctctattggcagagccggcagcacctacta cagcgcactctgtgaaggcagattcacatcagccgggacaacgccaagaacagcct gtacctgcagatgaactccctgagagccgagacaccccgctgtactattgtgccagag gacccatctacaacgactacgacgagttcgctattggggccagggcacactgtctaca gtttctagcggcgggtggcggaagcggagggcggtggctccggtggcgaggcagcga aattgtgctgacacagagccccccacactgtcactttctcaggcgaaagagccacac tagctgcaagagcagccagagcgtgctgtactccagcaaccagaagaactacctggc ctggtatcagcagaagcccggccaagctcctcgctgctgatctattggccagcacaa gagagagcggcatccctgccagattttctggcagcggctctggcaccgatttcaccctg accataagcagcctggaacctgaggacttcgctgtattactgccaccagtactgag cagcctgacctttggcggaggcaccgaaggtggaatcaagcgggagcccaatcttgt gacaaaactcacatgcccaccgtgcccagcacctgaactcctggggggacgctcag tcttctcttccccccaaacccaaggacacctcatgctcccgacccctgaggfca catgctgtgtgtggagctgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactgtgtacgtg gacggcgtggaggtgcataatgccaagacaagccgcgaggaggcaggtacaacag caggtaccgtgtgtgtagcgtctcaccgtctgacacagagctggctgaatggcaagg agtacaagtgaaggtctccaacaagccctccagcccccatcgagaaaacatctcc aaagccaaaggcagccccgagaacacagagtgtaaccctgccccatccccggga ggagatgaccaagaacaggtcagcctgtgtgctgtgcaaaagcttctatccagcg acatcgccgtggagtgaggagcaatgggcagccgggagaacaactacaagaccag cctcccgtgtggaactccgacggtcctctctctctacagcaagctcaccgtggacaag agcaggtggcagcaggggaaactctctcatgctccgtgatgcatgaggtctgtcaca ccactacgcagaagagcctctcctgtctccgggtaaaaccggtcatcatcacatca ccattgataa
hMN20A10N scFv-Fc 접합-HIS	124	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFTSTYAMSWIR QAPGKGLEWVASIGRAGSTYYSDSVKGRFTISRDNANK SLYLQMNSLRADETA VYYCARGPIYNDYDEFAYWGQG TLVTVSSGGGGSGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGE RATLSCKSSQSVLYSSNQKNYLAWYQQKPGQAPRLLIY WASTRESGIPARFSGSGSGTDFLTITSSLEPEDFAVYYCH QYLSSLTFGGGTKVEIKREPKSCDKTHTCPPCPAPELLG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVY TLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKTGHHHHHHH--
OKT3 scFv-Fc 접합-STREPTAG	125	caggtgcaactggtgtagtccggcggaggcgtgtgtagcagcctggccggagcctgaga ctgagctgcaaggcctccggctacacctttacaagatacactatgactgggtcagaca ggccctggcgaaggcctgggaatggaattgctacatcaaccctagccggggaataacc aactacaaccagaaggtgaaggacagattcacatcagcacagataagtccaagtcca ccgcttctcgtcagatggactccctgctgctcagaggacacagctgtgtactactgcgcc ggtactacgacgaccactactgtctgactactggggacagggaaccacctgaccgt cagctctggcggcggaggctccggcggagggtgtagcggcggcggcggcgtctgata tccagatgaccagagcccttctcttcttctgocagcgtgggcgatagagtgacctca catgtagcggccagctcttctgttagctacatgaactggtaccagcaaacacctggaag gcccctaaaagatggatctacgacaccagcaagctggcctctggcgtgcccttagatt cagcggctctgtgctccggcaccgactacacctttacaattagctccctgtagccggagg atatgcccactactactgcccagcagtgtagcagcaaccccttcacattggccagggc acaaagctgcaaatcaccagagagcccaatctgtgacaaaactcacatgcccacc gtgccagcacctgaactcctggggggaccgtcagttcttcttcccccaaaacca aggacacctcatgactctccggacccctgagggtacatgctgtgtgtgtagcgtgag ccacgaagaccctgaggtcaagttcaactgtacgtgtagcggcgtgtaggtgcataat gccaaagacaagccgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtgtgtagcgtg

[0148]

		ctcaccgtctctgaccaggactggctgaatggcaggaggtacagtgcaaggtctcca acaaagccctccagcccccacgagaaaacatctccaaagccaaaggcagccccc gagaaaccaggtgtacaccctgccccatcccgaggagatgaccaaagaccagg tcagcctgagctgcgcgtcaaaagctctatccacgacatcgctggagtgga gagcaatggcagccggagaaactacaagacacgcctccctgctggactccga cggctctctctctgtagcagctcaccgtggacaagagcagctggcagcagggg aacgtctctcatgctcgtgtagcatgagcctctgcacaaactacacgcagaagagc ctctccctgtctcgggtaaaacgggttgagccatctcagttcgaagtgataa
OKT3 scFv-Fc 홈- STREPTAG	126	QVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCKASGYTFTRYTMHV RQAPGKGLEWIGYINPSRGYTNYNQKVKDRFTISTDKS KSTAFLOMDSLRLPEDTAVYYCARYDDHYCLDYWGQ GTTLTVSSGGGGSGGGSGGGSDIQMTQSPSSLSASV GDRVTITCSASSSVSYMNWYQQTGPKAPKRWIYDTSKL ASGVPSRFSGSGSDYTFITSLQPEDATYYCQWSSN PFTFGQGTKLQITREPKSCDKTHTCPPCPAPPELLGSPSVF LFPKPKDITLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTKSKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSVSMHEA LHNHYTQKSLSLSPGKTGWSHPQFEK--
12F6 scFv-Fc 홈- STREPTAG	127	caagtgacgtggtgagtcggaggaggcgtgctgagcctggaagaagccctcgg ctgagctgcaagccagcggctatacatcaccagctacacatgctggtgctggc aggccctggaagggcctgggaatgagctgctacacacccctccagcggctacac caagtacaaccagaattcaagaccggtttaccattagccggataagagcaagagc acagcctttctgagatgagacgctgagacagagacacggcgtgacttctgctgc cggctggcaggactacgagctttatttctgactactggccaggcaccctgtgacag tgagcagcggcggcggagctcctggcggaggctggcagcggcggcggcgtctga tatccagatgacacagagcccgagctctctgctgctgctggcgacagagtaccat gacctgtagagcctctcaagcgtgtctcatgctgactgtaccagcaaacacctggca aggccccaagccttgatctacgcccactctaactggtccagcggctgctctgagat tcagcggcagcggatctggcaccgattacacccctgaccatcagcagcctgagccga ggatctgcccatactactgcccagcagtgagctccaatctctactctggccagg gcaccaagctgagatcacagaagagcccaatctgtgacaaaactcacatgccc accgtgcccagcacctgaactctggtggggacggctgactctctctcccccaaac ccaaggacacccctatgctcgggacccctgaggtcacatgctggtggtgagctg agccacgaagaccctgaggtcaagttcaactgtgacgtggacggcgtggagtgata atgccaagacaaagccggggaggagcagtagacaagcagctacgtgtgtgacg tctcaccgtctgcaaccagactgctgaatggcagagtagtaagtgcaaggtctcc aacaagccctccagcccccacgagaaaacatctccaaagccaaaggcagccc cgagaaccagaggtgtacacccctgccccatccgggagagatgaccaagaaccag gtcagcctgagctgcccgtcaaaagcttctatccagcgacatcgctggagtgagg agagcaatgggcagccggagaaactacaagaccgcctccgctgctgactcgg acggctctcttctctgtagcagcctcaccgtggacaagagcaggtggcagcagg gaacgtctctcatgctcgtgtagcagaggtctgcacaaactacacgcagaaga gcctctccctgtctcgggtaaaacgggttgagccatctcagttcgaagtgataa
12F6 scFv-Fc 홈- STREPTAG	128	QVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCKASGYTFTRYTMHV RQAPGKGLEWIGYINPSSGYTKYNQKFKDRFTISADKSK STAFLOMDSLRLPEDTGVYFCARWQDYDVYFDYWGQG TPVTVSSGGGGSGGGSGGGSDIQMTQSPSSLSASV GDRVTMTCRASSSVSYMHWYQQTGPKAPKRWIYATSNL ASGVPSRFSGSGSDYTLTISLQPEDATYYCQWSSN NPFTFGQGTKLQITREPKSCDKTHTCPPCPAPPELLGSPSVF LFPKPKDITLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTKSKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSVSMHEA ALHNHYTQKSLSLSPGKTGWSHPQFEK--

[0149]

[0150]

일부 실시양태에서, 항체는 단편 결정화가능한(Fc) 영역을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, Fc 영역은 IgG CH2 도메인 및 IgG CH3 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, Fc 영역은 이종이량체 Fc 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, 이종이량체 Fc 영역은 (예컨대, 인간) IgG1, IgG2, IgG3, 또는 IgG4 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 이종이량체 Fc 영역은 (예컨대, 인간) IgG1 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 이종이량체 Fc 영역은 (예컨대, 인간) IgG2 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 이종이량체 Fc 영역은 (예컨대, 인간) IgG3 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 이종이량체 Fc 영역은 (예컨대, 인간) IgG4 도메인을 포함한다.

[0151]

일부 실시양태에서, 이종이량체 Fc 영역, 여기서, 이종이량체 Fc 영역은 낚 채 및 홀 채를 포함하여 낚-인투-홀(KIH) 구조(문헌 [Spiess et al. Molecular Immunology 67, 95-106 (2015)]) 포맷을 형성한다. 일부 실시양태에서, 낚 채는 (예컨대, 인간) IgG1, IgG2, IgG3, 또는 IgG4 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 낚 채는 (예컨대, 인간) IgG1 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 낚 채는 (예컨대, 인간) IgG2 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 낚 채는 (예컨대, 인간) IgG3 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 낚 채는 (예컨대, 인간) IgG4 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 홀 채는 (예컨대, 인간) IgG1, IgG2, IgG3, 또는 IgG4 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 홀 채는 (예컨대, 인간) IgG1 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 홀 채는 (예컨대, 인간) IgG2 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 홀 채는 (예컨대, 인간) IgG3 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 홀 채는 (예컨대, 인간) IgG4 도메인을 포함한다.

- [0152] 일부 실시양태에서, 표적 세포는 암 세포이다. 일부 실시양태에서, 암은 유방암, 결장암, 전립선암, 췌장암, 또는 폐암이다.
- [0153] 일부 실시양태에서, 항체는 표면 상에 MUC1*을 발현하는 암 세포에 결합한다.
- [0154] 본 발명의 항체가 이중특이적 항체에 어떻게 도입될 수 있는지에 대한 예로서, KIH(문헌 [Spiess et al. Molecular Immunology 67, 95-106 (2015)])로도 공지된, 노-인-홀 포맷을 사용하는 이중특이적 항체를 구성하였다. 상기 예에서, 항체의 제1 아암은 14616 인간 프레임워크 영역을 갖는 인간화 항MUC1* 항체 20A10(hu20A10으로도 공지)이고; 항체의 제2 아암은 항CD3 항체 OKT3 또는 12F6이며, 둘 모두 인간 T 세포의 동일한 에피토프에 결합한다. 생성된 이중특이적 항체는 본원에서 20A10-OKT3-BiTE 및 20A10-12F6-BiTE로 지칭된다. 기능의 시연에서, 이중특이적 항체는 인간 T 세포 및 MUC1* 양성 암 세포, 둘 모두 존재하는 배양물 중 세포에 다양한 농도로 첨가된다. 한 경우에서, 암 세포는 T47D 유방암 세포이고, 나머지 다른 경우에서, MUC1* 음성 세포주 HCT-116 결장암 세포는 MUC1*을 발현하도록 형질도입되었으며, 이는 HCT-MUC1*로 명명된다. 도 1a-1l, 도 2a-2l, 도 3a-3l 및 도 4a-4l에 제시된 사진에서 알 수 있는 바와 같이, 이중특이적 항체 중 하나를 첨가하였을 때, 이는 이중특이적 용량 의존적 세포 클러스터링으로 입증되는 바와 같이, T 세포와 MUC1* 양성 암 세포를 함께 연결하는 것을 매개하였다. 2가지 대조군 실험을 수행하였다. 한 대조군에서는 이중특이적 항체를 첨가하지 않는다. 또 다른 대조군에서, MUC1* 암 세포만 존재한다. 클러스터링은 관찰되지 않는다. 또 다른 대조군에서, MUC1* 양성 암 세포에 이중특이적 항체를 첨가하지만, T 세포는 존재하지 않는다. 추가로, 암 세포 사멸을 정량화하였다. 20A10이 종양 세포 표면의 MUC1*의 세포외 도메인에 결합하고, OKT3으로 명명되는 항CD3 항체인 항MUC1* 표적화 이중특이적 항체의 세포독성 측정은 LDH 세포독성 검정법을 사용하여 측정하였다. LDH 세포독성 검정법이 작동하는 방식을 도시한 카툰이 제시되어 있으며(도 1m), 여기서, A490에서의 더 높은 측정값은 더 높은 세포 사멸을 나타낸다. 도 1n은 20A10-OKT3, 항MUC1*/항CD3 이중특이적 항체의 농도의 함수로서의 세포 사멸 그래프를 보여주는 것이다. 그래프에서 알 수 있는 바와 같이, 제2 아암은 T 세포 상의 CD3 또는 다른 표면 분자에 결합하는 항체 또는 항체 단편인 이중특이적 항체에 도입된 20A10은 MUC1* 양성 종양 세포의 강력한 킬러이다. 표적 암 세포를 분석하는 것 외에도, T 세포도 분석하였다. 널리 공지된 바와 같이, 활성화된 CD8 양성 세포독성 T 세포는 활성화되고, 사멸시킬 수 있도록 프라이밍되었을 때, 인터페론 감마(IFN- γ)를 분비한다. T 세포에서 조건화된 배지로의 IFN- γ 분비는 ELISA 검정법으로 측정하였다(도 1o). 도면에서 알 수 있는 바와 같이, IFN- γ 의 반 최고치 분비는 12.3 ng/mL의 낮은 이중특이적 농도에서 달성된다. 활성화된 T 세포는 또한 조건화된 배지로 TNF-알파를 분비한다. TNF- α 의 ELISA 측정은 20A10-CD3 이중특이적 항체의 매우 낮은 농도인 12.3 ng/mL에서 반 최고치 분비를 나타낸다(도 1p).
- [0155] 추가의 또 다른 예에서, 항MUC1*/항CD3 이중특이적 항체는 MUC1* 양성 암 세포의 세포외 도메인에의 결합을 위해 20A10 및 T 세포에의 결합을 위해 항CD3 항체 12F6을 이용하여 구성한다. 도 2a-2l에 제시된 사진에서 알 수 있는 바와 같이, 이중특이적 항체 중 하나를 첨가하였을 때, 이는 이중특이적 용량 의존적 세포 클러스터링으로 입증되는 바와 같이, T 세포와 MUC1* 양성 암 세포를 함께 연결하는 것을 매개하였다. 2가지 대조군 실험을 수행하였다. 한 대조군에서는 이중특이적 항체를 첨가하지 않는다. 또 다른 대조군에서, MUC1* 암 세포만 존재한다. 클러스터링은 관찰되지 않는다. 또 다른 대조군에서, MUC1* 양성 암 세포에 이중특이적 항체를 첨가하지만, T 세포는 존재하지 않는다. 추가로, 암 세포 사멸을 정량화하였다. 20A10이 종양 세포 표면의 MUC1*의 세포외 도메인에 결합하고, 12F6으로 명명되는 항CD3 항체인 항MUC1* 표적화 이중특이적 항체의 세포독성 측정은 LDH 세포독성 검정법을 사용하여 측정하였다. LDH 세포독성 검정법이 작동하는 방식을 도시한 카툰이 제시되어 있으며(도 2m), 여기서, A490에서의 더 높은 측정값은 더 높은 세포 사멸을 나타낸다. 도 2n은 20A10-12F6, 항MUC1*/항CD3 이중특이적 항체의 농도의 함수로서의 세포 사멸 그래프를 보여주는 것이다. 그래프에서 알 수 있는 바와 같이, 제2 아암은 T 세포 상의 CD3 또는 다른 표면 분자에 결합하는 항체 또는 항체 단편인 이중특이적 항체에 도입된 20A10은 MUC1* 양성 종양 세포의 강력한 킬러이다. 표적 암 세포를 분석하는 것 외에도, T 세포도 분석하였다. 널리 공지된 바와 같이, 활성화된 CD8 양성 세포독성 T 세포는 활성화되고, 사멸시킬 수 있도록 프라이밍되었을 때, 인터페론 감마(IFN- γ)를 분비한다. T 세포에서 조건화된 배지로의 IFN- γ 분비는 ELISA 검정법으로 측정하였다(도 2o). 도면에서 알 수 있는 바와 같이, IFN- γ 의 반 최고치 분비는 50 ng/mL의 낮은 이중특이적 농도에서 달성된다. 활성화된 T 세포는 또한 조건화된 배지로 TNF-알파를 분비한다. TNF- α 의 ELISA 측정은 20A10-CD3 이중특이적 항체의 매우 낮은 농도인 200 ng/mL에서 반 최고치 분비를 나타낸다(도 2p). 12F6과 비교하여 OKT3과 쌍을 형성한 20A10 사이의 효능 차이는 항MUC1*/항T 세포의 효능이 두 항체 각각의 친화성과 특이성에 의해 조정된다는 것을 입증한다.
- [0156] 추가의 또 다른 예에서, 항MUC1* 항체 20A10을 항CD3 항체 단편과 쌍을 형성하고, MUC1*을 발현하도록 형질도입

된 MUC1* 음성 세포주인 HCT-116 결장암 세포(HCT-MUC1*로 명명)의 사멸에 대해 시험하였다. 한 경우에서, T 세포와의 결합을 위한 항체 단편은 OKT3이다. 또 다른 경우에서, 항CD3 항체는 12F6이다. 도 3a-3l(OKT3) 및 도 4a-4l(12F6)에 제시된 사진에서 알 수 있는 바와 같이, 이중특이적 항체 중 하나를 첨가하였을 때, 이는 이중특이적 용량 의존적 세포 클러스터링으로 입증되는 바와 같이, T 세포와 MUC1* 양성 암 세포를 함께 연결하는 것을 매개하였다. 2가지 대조군 실험을 수행하였다. 한 대조군에서는 이중특이적 항체를 첨가하지 않지만, T 세포 및 MUC1* 암 세포, 둘 모두 존재한다. 클러스터링은 관찰되지 않는다. 또 다른 대조군에서, MUC1* 양성 암 세포에 이중특이적 항체를 첨가하지만, T 세포는 존재하지 않는다. 추가로, 암 세포 사멸을 정량화하였다.

[0157] **항체-약물 접합체**

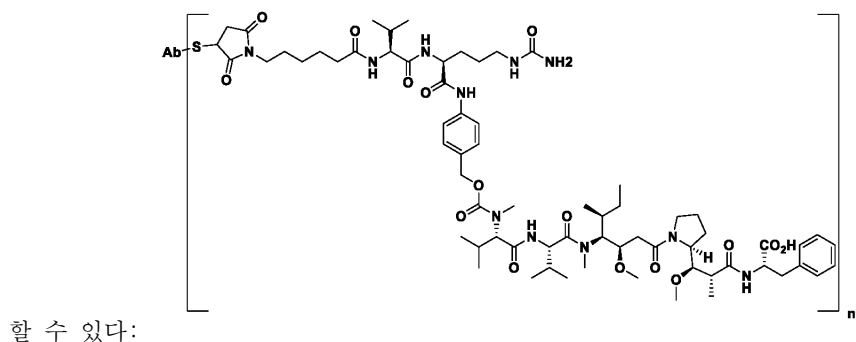
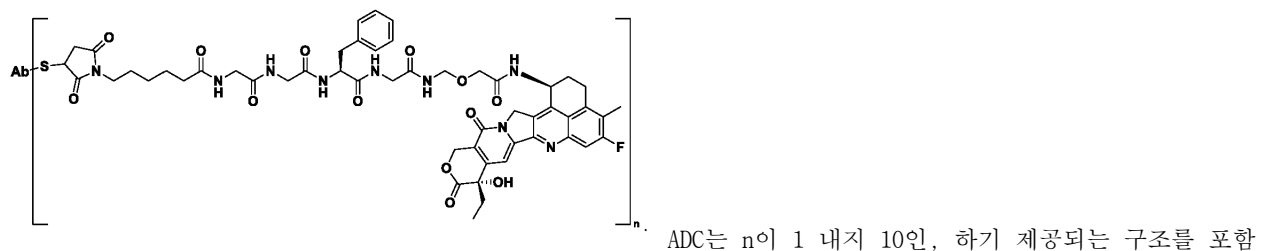
[0158] 항체-약물 접합체(ADC: antibody-drug conjugate)를 통해 특정 세포 및/또는 조직으로 치료제(들)를 표적화된 방식으로 전달할 수 있다. 특정 실시양태에서, ADC는 토포이소머라제(예컨대, 토포이소머라제 I(TopoI))를 억제할 수 있거나, 또는 튜불린 생산을 억제할 수 있는 작용제(예컨대, 치료제)를 포함한다.

[0159] 또 다른 측면에서, 본원에서는 접합체, 예컨대, 항체-약물 접합체를 제공한다. ADC는 치료제(X로 표시); 연결 모이어티(L로 표시); 커플링 모이어티(R로 표시); 및 시스테인의 티올기에 의한 친핵성 공격에 의한 항체

(로 표시)에의 접합 모이어티(Z로 표시)를 포함한다. 일부 실시양태에서, L 링커의 세포내 절단을 통해 로부터 치료제 X를 분리할 수 있으며, 이를 통해 치료제 X가 세포 또는 조직에 흡수되거나, 또는 유지되는 것을 촉진시킬 수 있다.

[0160] 특정 실시양태에서, ADC는 화학식 (I): $[Ab]-[Z-L-R-X]_y$ 를 포함하고, 상기 식에서, X는 토포이소머라제 I을 억제할 수 있는 화합물 또는 튜불린 형성을 억제할 수 있는 화합물로부터 유래된 모이어티이고; R은 커플링 모이어티이고; L은 N-말단에는 Z가 결합되어 있고, C-말단에는 R이 결합되어 있는, 디- 또는 트리- 또는 테트라-펩티드 연결 모이어티이고; [Ab]는 3개의 중쇄(HC) 상보성 결정 영역(CDR): MUC1* HC-CDR1, MUC1* HC-CDR2, 및 MUC1* HC-CDR3을 포함하는 항MUC1* 결합 도메인을 포함하는 항체이고; 여기서, MUC1* 결합 도메인의 MUC1* HC-CDR1, MUC1* HC-CDR2, 및 MUC1* HC-CDR3은 표 1에 기재된 것으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하고; 여기서, MUC1* 결합 도메인은 3개의 경쇄(LC) 상보성 결정 영역(CDR): MUC1* LC-CDR1, MUC1* LC-CDR2, 및 MUC1* LC-CDR3을 포함하고; 여기서, MUC1* 결합 도메인의 MUC1* LC-CDR1, MUC1* LC-CDR2, 및 MUC1* LC-CDR3은 표 1에 기재된 것으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하고; Z는 시스테인 잔기의 황 원자와 공유 결합을 형성할 수 있는 접합 모이어티이고; 여기서, y는 1 내지 10의 정수이다.

[0161] ADC는 n이 1 내지 10인, 하기 제공되는 구조를 포함할 수 있다:



[0162] ADC의 효능은 부분적으로 약물 대 항체 비 또는 DAR에 의해 결정된다. 기본적으로, 항체에 독소를 많이 부착할

수록, 더 많은 세포 사멸이 이루어진다. 그러나, 항체에 너무 많은 독소를 부착시키면 항체는 불안정해지거나, 또는 항체와 표적 항원 간의 상호작용이 입체적으로 방해받을 수 있다. 소수성 상호작용 크로마토그래피(HIC)는 항체-약물-접합체(ADC)의 약물-항체 비(DAR)를 결정하는 데 사용되는 생물분석 기술이다. 고압 액체 크로마토그래피(HPLC: high-pressure liquid chromatography) 시스템의 HIC 컬럼은 염 구배 완충제를 사용하여 ADC를 분석하고, 특징화하는 데 사용된다. HIC는 표면 소수성의 차이에 따라 단백질을 분리하며, 항체에 결합된 약물이 많을수록 머무름 시간은 길어진다. 도 30-35는 여러 독성 페이로드에 접합된 MNC2 배치 및 MN20A10 배치에 대한 HIC 크로마토그램 및 각각에 대한 상응하는 계산된 DAR을 보여주는 것이다.

[0163] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 접합체에 대한 DAR은 1 내지 20 범위이다. 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 접합체에 대한 DAR은 1 내지 15 범위이다. 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 접합체에 대한 DAR은 1 내지 10 범위이다. 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 접합체에 대한 DAR은 1 내지 8 범위이다. 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 접합체에 대한 DAR은 1 내지 7 범위이다. 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 접합체에 대한 DAR은 1 내지 6 범위이다. 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 접합체에 대한 DAR은 1 내지 5 범위이다. 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 접합체에 대한 DAR은 1 내지 4 범위이다.

[0164] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 접합체에 대한 DAR은 약 1, 약 2, 약 3, 약 4, 약 5, 약 6, 약 7, 약 8, 약 9, 약 10, 약 11, 또는 약 12이다. 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 접합체에 대한 DAR은 약 3.1, 약 3.2, 약 3.3, 약 3.4, 약 3.5, 약 3.6, 약 3.7, 약 3.8, 또는 약 3.9이다. 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 접합체에 대한 DAR은 약 7.1, 약 7.2, 약 7.3, 약 7.4, 약 7.5, 약 7.6, 약 7.7, 약 7.8, 약 7.9, 또는 약 8.0이다.

[0165] 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 접합체에 대한 DAR은 약 1이다. 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 접합체에 대한 DAR은 약 2이다. 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 접합체에 대한 DAR은 약 3이다. 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 접합체에 대한 DAR은 약 4이다. 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 접합체에 대한 DAR은 약 3.8이다. 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 접합체에 대한 DAR은 약 5이다. 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 접합체에 대한 DAR은 약 6이다. 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 접합체에 대한 DAR은 약 7이다. 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 접합체에 대한 DAR은 약 8이다.

[0166] 특정 실시양태에서, 접합 반응 동안 이론적 최대 단위보다 적은 단위가 폴리펩티드, 예컨대, 항체에 접합된다.

[0167] 특정 실시양태에서, 단위에 부착되는 아미노산은 항체의 중쇄에 있다. 특정 실시양태에서, 단위에 부착되는 아미노산은 항체의 경쇄에 있다. 특정 실시양태에서, 단위에 부착되는 아미노산은 항체의 힌지 영역에 있다. 특정 실시양태에서, 단위에 부착되는 아미노산은 항체의 Fc 영역에 있다. 특정 실시양태에서, 단위에 부착되는 아미노산은 항체의 불변 영역(예컨대, 중쇄의 CH1, CH2 또는 CH3 또는 경쇄의 CH1)에 있다. 또 다른 실시양태에서, 단위 또는 약물 단위에 부착되는 아미노산은 항체의 VH 프레임워크 영역에 있다. 또 다른 실시양태에서, 단위에 부착되는 아미노산은 항체의 VL 프레임워크 영역에 있다.

[0168] 본원에 기술된 접합체 제조를 통해 예를 들어, 항체와 같은 폴리펩티드에 부착된 하나 이상의 단위가 분포되어 있는(즉, 이질성) 접합체 혼합물을 수득할 수 있다는 것을 이해하여야 한다. 개별 접합체 분자는 질량 분광법에 의해 혼합물에서 확인되고, 당업계에 공지된 방법을 비롯한, HPLC, 예컨대 소수성 상호작용 크로마토그래피에 의해 분리될 수 있다. 특정 실시양태에서, 단일 DAR(로딩) 값을 갖는 균질한 접합체는 전기영동 또는 크로마토그래피에 의해 접합 혼합물로부터 분리될 수 있다.

[0169] 본 개시내용은 세포독소에 접합된 MUC1*에 대한 단일클론 항체, 또는 항원 결합 단편을 포함하는 항체-약물 접합체(ADC)를 제공한다. 본원에서 사용되는 바, 용어 "항체-약물 접합체"는 화학적 링커를 통해 세포독성제(일반적으로 전신 독성이 높은 소분자 약물)에 부착된 단일클론 항체(mAb)를 포함하는 화합물을 지칭한다. 일부 실시양태에서, ADC는 링커를 포함하도록 화학적으로 변형된 소분자 세포독소를 포함할 수 있다. 이어서, 링커를 사용하여 세포독소를 항체 또는 그 항원 결합 단편에 접합시킨다. 세포 표면의 표적 항원에 결합하면 ADC는 내재화되어 리소솜으로 운반되고, 리소솜에서 (예컨대, 리소솜에서 발견되는 카텡신 B에 의한) 절단가능한 링커의 단백질분해에 의해, 또는 절단불가능한 링커를 통해 세포 독소에 부착된 경우에는 항체의 단백질 분해에 의해 세포 독소가 유리된다. 이어서, 세포 독소는 리소솜에서 세포질 또는 핵으로 이동하여 작용 메커니즘에 따라 그 표적에 결합할 수 있다.

[0170] 본원에 기술된 항체-약물 접합체는 전체 항체 또는 항체 단편을 포함할 수 있다. 모체 항체는 무린, 토끼, 인간, 인간화, 카멜리드 또는 다른 종 항체일 수 있다.

[0171] ADC는 항체의 항원 결합 단편을 포함할 수 있다. 용어 "항체 단편," "항원 결합 단편," "항체의 기능성 단편"

및 "항원 결합 부분"은 본원에서 상호교환적으로 사용되며, 항원에 특이적으로 결합하는 능력을 유지하는 항체의 하나 이상의 단편 또는 부분을 지칭한다(일반적으로, 문헌 [Holliger et al., Nat. Biotech., 23(9): 1126-1129 (2005)] 참조). 항체 단편은 예를 들어, 하나 이상의 CDR, 가변 영역(또는 그의 일부분), 불변 영역(또는 그의 일부분), 또는 그의 조합을 포함할 수 있다. 항체 단편의 예로는 (i) VL, VH, CL, 및 CH1 도메인으로 구성된 1가 단편인 Fab 단편; (ii) 힌지 영역에서 디설파이드 브릿지로 연결된 2개의 Fab 단편을 포함하는 2가 단편인 F(ab')₂ 단편; (iii) 항체의 단일 아암의 VL 및 VH 도메인으로 구성된 Fv 단편; (iv) 두 도메인이 단일 폴리펩티드 쇠로 합성될 수 있도록 하는 합성 링커에 의해 연결되는 Fv 단편의 두 도메인(즉, VL 및 VH)으로 구성된 1가 분자인 단일 쇠 Fv(scFv: single chain Fv)(예컨대, 문헌 [Bird et al., Science, 242: 423-426 (1988)]; [Huston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85: 5879-5883 (1988)]; 및 [Osbourn et al., Nat. Biotechnol., 16: 778 (1998)] 참조) 및 (v) 각 폴리펩티드 쇠가, 동일한 폴리펩티드 쇠 상의 VH와 VL 사이의 쌍 형성을 허용하기에는 너무 짧은 바, 이에 상이한 VH-VL 폴리펩티드 쇠 상의 상보적인 도메인 사이의 쌍 형성을 구동시켜 2개의 기능성 항원 결합 부위를 갖는 이량체 분자를 형성하는 펩티드 링커에 의해 VL에 연결된 VH를 포함하는 것인, 폴리펩티드 쇠의 이량체인 디아바티드를 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[0172] 용어 "세포독소" 및 "세포독성제"는 세포의 기능을 억제하거나, 방해하고/거나, 세포 파괴(세포 사멸)를 유발하고/거나, 항증식 효과를 발휘하는 임의의 분자를 지칭한다. ADC의 세포독소 또는 세포독성제는 또한 당업계에서 ADC의 "페이로드"로 지칭된다는 것도 이해할 것이다. ADC 분자에서 잠재적인 유용성을 갖는 다수의 세포독성제 부류가 당업계에 공지되어 있으며, 본원에 기술된 ADC에서 사용될 수 있다. 상기 부류의 세포독성제로는 예를 들어, 항미세소관제(예컨대, 아우리스타틴 및 메이탄시노이드), 피롤로벤조디아제핀(PBD), RNA 폴리머라제 II 억제제(예컨대, 아마톡신), 및 DNA 알킬화제(예컨대, 인돌리노벤조디아제핀 슈도이량체)를 포함한다. 본원에 기술된 ADC에서 사용될 수 있는 구체적인 세포독성제의 예로는 아마니틴, 아우리스타틴, 칼리케아미신, 다우노마이신, 독소루비신, 두오카마이신, 돌라스타틴, 엔다이인, 렉시트루핀, 탁산, 푸로마이신, 메이탄시노이드, 빈카알칼로이드, 튜불리신, 및 피롤로벤조디아제핀(PBD)을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 더욱 구체적으로, 세포독성제는 예를 들어 AFP, MMAF, MMAE, AEB, AEBV, 아우리스타틴 E, 파클리탁셀, 도세탁셀, CC-1065, SN-38, 토포테칸, 모르폴리노-독소루비신, 리조신, 시아노모르폴리노-독소루비신, 돌라스타틴-10, 에키노마이신, 콤브레타트스타틴, 칼리케아미신, 메이탄신, DM1, DM4, 빈블라스틴, 메토티렉세이트, 네트루핀, 또는 그의 유도체 또는 유사체일 수 있다.

[0173] 아우리스타틴은 내약성이 우수한 용량에서 상당한 임상전 활성을 보인 고도로 강력한 항유사분열제 부류를 나타낸다. 본원에 기술된 ADC와 관련하여 사용될 수 있는 아우리스타틴의 예로는 모노메틸 아우리스타틴 E(MMAE) 및 관련 분자인 모노메틸 아우리스타틴 F(MMAF)를 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[0174] 한 실시양태에서, 세포독성제는 피롤로벤조디아제핀(PBD) 또는 PBD 유도체일 수 있다. PBD는 핵으로 이동하여 DNA를 가교시켜 세포 분열 동안 복제를 방해하고, 단일 가닥 파단을 유도하여 DNA를 손상시키고, 이어서, 세포 사멸을 유도한다. 일부 PBD는 또한 특정 DNA 서열을 인식하고, 결합하는 능력을 가진다.

[0175] 본원에 기술된 항MUC1* 단일클론 항체는 그에 접합된 적어도 하나의 세포독소 분자를 포함하지만; 항MUC1* 단일클론 항체는 원하는 치료 효과를 달성하기 위해 그에 접합된 임의의 적절한 개수의 세포독소 분자(예컨대, 1, 2, 3, 4 또는 그 초과)의 세포독소 분자)를 포함할 수 있다.

[0176] 본 개시내용은 또한 상기 기술된 항체 또는 항체-약물 접합체 및 약학적으로 허용되는(예컨대, 생리학적으로 허용되는) 담체를 포함하는 조성물을 제공한다. 본 발명의 맥락 내에서 당업계 공지된 임의의 적합한 담체가 사용될 수 있다. 담체 선택은 부분적으로 조성물이 투여될 수 있는 특정 부위 및 조성물을 투여하는 데 사용된 특정 방법에 의해 결정될 것이다. 조성물은 임의적으로 멸균될 수 있다. 조성물은 예컨대, 문헌 [Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21st Edition, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, Pa. (2001)]에 기술된 종래 기술에 따라 생성될 수 있다.

[0177] 조성물은 바람직하게는 MUC1* 발현 암을 치료하거나, 또는 예방하는 데 효과적인 양으로 항체 또는 항체-약물 접합체를 포함한다. 따라서, 본 개시내용은 MUC1*을 발현하는 세포를 본원에 기술된 항체 또는 항체-약물 접합체, 또는 본원에 기술된 항체 또는 ADC를 포함하는 조성물과 접촉시키고, 이로써, 항체 또는 항체-약물 접합체는 세포 상의 MUC1*에 결합하여 세포를 사멸시키는 것인 단계를 포함하는, MUC1* 양성 세포를 사멸시키는 방법을 제공한다.

[0178] 본 개시내용은 또한 MUC1* 양성 암을 치료하기 위한 약물의 제조에서의 본원에 기술된 항체 또는 ADC, 또는 항체 또는 ADC를 포함하는 조성물의 용도를 제공한다.

- [0179] 본원에서 입증된 바와 같이, MUC1*은 다양한 암 유형에서 발현된다. 따라서, 본 개시내용은 MUC1*을 발현하는 암 세포를 본원에 기술된 항체-약물 접합체, 또는 본원에 기술된 ADC를 포함하는 조성물과 접촉시키고, 이로써, 항체-약물 접합체는 세포 상의 MUC1*에 결합하여 세포를 사멸시키는 것인 단계를 포함하는, 상기 암 세포를 사멸시키는 방법을 제공한다.
- [0180] 본원에 기술된 항체-약물 접합체, 또는 항체-약물 접합체를 포함하는 조성물을 MUC1*을 발현하는 세포 집단과 생체의, 생체내 또는 시험관내, 바람직하게, 생체내에서 접촉시킬 수 있다.
- [0181] 본원에서 사용되는 바, "치료," "치료하는"이라는 용어 등은 원하는 약리학적 및/또는 생리학적 효과를 얻는 것을 지칭한다. 바람직하게, 효과는 치료 효과이고, 즉, 효과는 질환 및/또는 장애에 기인하는 부작용을 부분적으로 또는 완전히 치유한다. 이를 위해, 본 발명의 방법은 항체 또는 ADC, 또는 항체 또는 ADC 및 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 조성물을 "치료 유효량"으로 투여하는 단계를 포함한다. "치료 유효량"은 원하는 치료 결과를 달성하기 위해 필요한 투여량 및 기간 동안 효과적인 양을 지칭한다. 치료 유효량은 예컨대, 개체의 질환 상태, 연령, 성별 및 체중, 및 항체 또는 ADC가 개체에서 원하는 반응을 이끌어내는 능력에 따라 달라질 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 ADC의 치료 유효량은 MUC1* 양성 세포의 MUC1*에 결합하여 이를 파괴시키는 양이다.
- [0182] 대안적으로, 약리학적 및/또는 생리학적 효과는 예방적 효과일 수 있고, 즉, 효과는 질환 또는 그 증상을 완전히 또는 부분적으로 예방한다. 이와 관련하여, 본 발명의 방법은 MUC1*을 발현하는 암에 걸리기 쉬운 포유동물에게 ADC 또는 ADC를 포함하는 조성물을 "예방 유효량"으로 투여하는 단계를 포함한다. "예방 유효량"은 원하는 예방 결과(예컨대, 질환 발병 예방)를 달성하기 위해 필요한 투여량 및 기간 동안 효과적인 양을 지칭한다.
- [0183] 치료 또는 예방 효능은 치료받은 환자를 주기적으로 평가함으로써 모니터링할 수 있다. 한 실시양태에서, 본원에 기술된 ADC는 MUC1* 발현 세포의 증식을 적어도 약 10%(예컨대, 적어도 약 20%, 적어도 약 30%, 적어도 약 40%, 적어도 약 50%, 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 적어도 약 80%, 적어도 약 90%, 또는 적어도 약 100%)만큼 억제하거나, 또는 저해한다. 세포 증식은 당업계에서 공지된 임의의 적합한 방법을 사용하여, 예컨대, 표지된 뉴클레오타이드(예컨대, 3H-티미딘 또는 브로모데옥시우리딘 Brd(U))의 게놈 DNA로의 도입을 측정하는 것을 사용하여 측정할 수 있다(예컨대, 문헌 [Madhavan, H. N., J. Stem Cells Regen. Med., 3(1): 12-14 (2007)] 참조).
- [0184] 본원에 기술된 항체 또는 ADC, 또는 항체 ADC를 포함하는 조성물은 예를 들어, 정맥내, 복강내, 피하를 포함하는, 표준 투여 기술을 사용하여 포유동물(예컨대, 인간)에게 투여될 수 있다. 더욱 바람직하게, 항체 또는 ADC, 또는 이를 포함하는 조성물은 정맥내 주사에 의해 포유동물에게 투여된다.
- [0185] 본원에 기술된 항체 또는 ADC, 또는 항체 또는 ADC를 포함하는 조성물은 포유동물에게 공동 투여될 수 있는 하나 이상의 추가 치료제와 함께 투여될 수 있다. 본원에서 사용되는 바, "공동투여하는"이라는 용어는 항체 또는 ADC가 하나 이상의 추가 치료제의 효과를 증진시킬 수 있도록, 또는 그 반대의 경우도 마찬가지로 이루어질 수 있도록 시간상 충분히 가깝게 하나 이상의 추가 치료제 및 본원에 기술된 항체 또는 ADC, 또는 항체 또는 ADC 함유 조성물을 투여하는 것을 지칭한다. 이와 관련하여, 항체 또는 ADC 또는 이를 포함하는 조성물이 먼저 투여될 수 있고, 하나 이상의 추가 치료제가 두 번째로 투여될 수 있거나, 또는 그 반대의 경우도 마찬가지이다. 예를 들어, 항체 또는 ADC 또는 이를 포함하는 조성물은 MUC1* 양성 암의 치료 또는 예방을 위해 다른 작용제(예컨대, 애주번트)와 함께 투여될 수 있다. 이와 관련하여, 항체 또는 ADC 또는 항체 또는 ADC 함유 조성물은 예를 들어, 당업계에 공지된 임의의 적합한 화학요법제, 이온화 방사선, 소분자 항암제, 암 백신, 생물학적 요법(예컨대, 다른 단일클론 항체, 암 사멸 바이러스, 유전자 요법, 및 입양 T 세포 전달) 및/또는 수술을 비롯한 적어도 하나의 다른 항암제와 함께 조합하여 사용될 수 있다.
- [0186] MUC1* 양성 암 치료를 위해 본 발명의 항체를 ADC, 항체 약물 접합체에 도입할 수 있는 방법의 한 예로서, 독소를 항MUC1* 항체 MNC2에 부착시켰다. 상기 특정 예에서, 독소는 MMAE, 모노메틸 아우리스타틴이지만, 표적 세포, 특히, 암 세포의 ADC 지향성 사멸을 촉진시키는 다양한 독소 및 기능성 링커가 당업자에게 공지되어 있다. 상기 예에서, MNC2를 테글리코실화시킨 후, 이어서, MMAE의 공유 부착을 촉진시키는 링커와 반응시켰고, 이는 본원에서 MNC2-ADC로 지칭된다. 다양한 농도의 MNC2-ADC를 다양한 기간 동안 표적 세포와 함께 인큐베이션시켰다. 이어서, 세포를 사진 촬영하고, 프레스토블루™(Thermo Fisher Scientific: 미국 매사추세츠주 월섬 소재)로 명명되는 세포 사멸 지표를 사용하여 세포 생존율을 측정하였다. MUC1 및 MUC1* 음성 세포주인 HCT와 함께 인큐베이션된 MNC2-ADC는 어느 농도에서도 세포 사멸을 유도하지 않았다(도 5a-5f). 그러나, HCT 세포가 MUC1*을 발현하도록 형질도입되어 HCT-MUC1*을 생성하였을 때에는 MNC2-ADC는 용량에 의존하는 방식으로 세포

사멸을 유도하였다(도 6a-6g). 측정된 세포 생존능 손실 그래프는 도 9b에 제시되어 있다. 유사하게, MNC2-ADC는 MUC1* 음성 세포인 K562 세포에서 세포 사멸을 유도하지 않았다(도 7a-7g). 다시 말하면, 세포가 MUC1*을 발현하도록 형질도입되어 K562-MUC1*을 생성하였을 때, MNC2-ADC는 농도에 의존하는 방식으로 세포 사멸을 유도할 수 있었다(도 8a-8g). 측정된 세포 생존능 손실 그래프는 도 9a에 제시되어 있다.

[0187] T47D 세포는 MNC2가 결합하지 않는 전장 MUC1 뿐만 아니라, MNC2가 결합하는 MUC1*, 둘 모두 발현하는 자연적으로 발생된 유방암 세포주이다. T47D-MUC1*은 T47D 세포가 더 많은 MUC1*을 발현하도록 형질도입된 세포주이다. MNC2-ADC를 T47D-WT 세포(도 10a-10g) 또는 T47D-MUC1* 세포(도 11a-11g)와 함께 인큐베이션시켰다. 측정된 세포 생존능의 그래프(도 12)에서 알 수 있는 바와 같이, 시험된 최고 농도에서 T47D-MUC1* 세포만 사멸시켰다. 첨가된 MNC2-ADC의 농도를 크게 증가시킨 또 다른 실험을 수행하였다. 이 경우, T47D-WT 세포는 1000 nM에서 MNC2-ADC에 의해 사멸되었고(도 13a-13j), T47D-MUC1* 세포는 10 nM, 39 nM, 100 nM, 393 nM, 1000 nM에서 사멸되었다(도 14a-14j). T47D 및 T47D-MUC1*에 대한 MNC2-ADC에 의해 유도된 측정된 세포 사멸 그래프는 도 15a에 제시되어 있다. 이러한 실험은 단지 한 예로서만 제시되어 있다. ADC가 작동하려면 ADC와 표적 세포의 결합이 수용체 내재화를 유도하여야 하며, 이 일련의 예가 이를 입증한다. 항MUC1* 항체에 부착된 독소는 당업자에게 공지된 여러 독소 중 하나일 수 있다. 유사하게, MNC2는 인간 또는 인간화 항체일 수 있다.

[0188] 그러나, 독소 커플링 화학의 최적화는 MNC2-ADC에 대한 결과를 크게 개선시켰다. 다음 실험에서, 발린-시트룰린 p-아미노벤질카바메이트(VC-PAB) 링커를 사용하여 테글리코실화 항체와 독소를 연결하였다. 링커는 별개로 한쪽 말단에서는 MMAE에 커플링된 후, 나머지 다른 한쪽 말단은 말레이미드와 반응한 후, 알킬화를 통해 환원된 후 항체에 커플링된다. MMAE는 튜블린의 중합화를 차단하여 세포 분열을 억제한다. 세포 외부에서 안정적인 링커는 카텝신 B에 의해 절단되고, ADC는 내재화되어 MMAE를 활성화시킨다. 0.1 ng/mL에서 500 ng/mL의 농도 범위의 상기 최적화된 MNC2-ADC를 T47D 야생형(-WT)(도 16a 및 16c) 또는 더 많은 MUC1*을 발현하도록 형질도입된 T47D 세포(T47D-MUC1*)(도 16b 및 16d)와 함께 인큐베이션시켰다. 한 경우에서, MNC2-ADC를 96 웰 플레이트의 웰당 5,000개의 표적 MUC1* 양성 세포와 함께 72시간 동안 인큐베이션시켰다(도 16a-16b). 대안적으로, MNC2-ADC를 표적 MUC1* 양성 세포와 단독으로 16시간 동안 인큐베이션시킨 후, 배지를 교체하고, 세포를 추가로 54시간 동안 그대로 배양하였다(도 16c-16d). 비교를 위해, 널리 공지된 암 약물 탁솔을 72시간 동안 T47D-wt 또는 T47D-MUC1* 세포에 첨가하였다(도 16e-16f). 프레스토블루™(Thermo Fisher Scientific: 미국 매사추세츠주 월섬 소재)로 명명되는 세포 사멸 지표를 사용하여 72시간 공동 배양물의 생존능을 측정하였다(도 17). 도면에서 알 수 있는 바와 같이, 항원 밀도가 높은 세포는 더 빠르게, 및 더 낮은 MNC2-ADC 농도에서 사멸한다. 높은 MUC1* 세포 중 90%는 72시간 인큐베이션시 100 nM의 MNC2-ADC 농도에서 사멸하였다.

[0189] MUC1* 양성 암 치료를 위해 본 발명의 항체를 ADC, 항체 약물 접합체에 도입할 수 있는 방법의 또 다른 예로서, 독소를 또 다른 항MUC1* 항체, 20A10에 부착시켰다. 20A10-ADC와 72시간 공동 배양한 후 남은 암 세포의 확대 사진을 촬영하였다(도 18a-18f). 상기 특정 예에서, 독소는 MMAE, 모노메틸 아우리스타틴이지만, 표적 세포, 특히, 암 세포의 ADC 지향성 사멸을 촉진시키는 다양한 독소 및 기능성 링커가 당업자에게 공지되어 있다. 20A10을 테글리코실화시킨 후, 이어서, MMAE의 공유 부착을 촉진시키는 링커와 반응시켰고, 이는 본원에서 20A10-ADC 또는 20A10-MMAE로 지칭된다. 0.1 ng/mL에서 500 ng/mL의 농도 범위의 20A10-ADC를 T47D 야생형(-WT)(도 18a 및 18c) 또는 더 많은 MUC1*을 발현하도록 형질도입된 T47D 세포(T47D-MUC1*)(도 18b 및 18d)와 함께 인큐베이션시켰다. 한 경우에서, 20A10-ADC를 전체 72시간 검정 기간 동안 표적 MUC1* 양성 세포와 함께 인큐베이션시켰다(도 18a-18b). 대안적으로, 20A10-ADC를 표적 MUC1* 양성 세포와 단독으로 16시간 동안 인큐베이션시킨 후, 배지를 교체하고, 세포를 추가로 54시간 동안 그대로 배양하였다(도 18c-18d). 비교를 위해, 널리 공지된 암 약물 탁솔을 72시간 동안 T47D-wt 또는 T47D-MUC1* 세포에 첨가하였다(도 18e-18f). 프레스토블루™(Thermo Fisher Scientific: 미국 매사추세츠주 월섬 소재)로 명명되는 세포 사멸 지표를 사용하여 72시간 공동 배양물의 생존능을 측정하였다(도 19). 도면에서 알 수 있는 바와 같이, 항원 밀도가 높을수록 더 많은 암 세포가 사멸된다. 심지어 16시간 인큐베이션시킨 경우에도 높은 MUC1* 세포 중 80% 초과인 세포가 사멸되었고, 72시간 인큐베이션시킨 경우, 10 nM 미만의 농도에서 100%가 사멸되었다. 더 적은 양의 MUC1*을 발현하는 세포는 100% 세포 사멸을 달성하기 위해서는 더 높은 20A10-ADC 농도 및 더 장기간의 인큐베이션 기간을 필요로 하였다.

[0190] 도 20a의 그래프는 상기 실험에 대한 IC50을 플롯팅한 것이다. 데이터는 또한 도 20b에 표 형태로 제시되어 있다.

[0191] 상기 실험은 최적화된 커플링 화학 뿐만 아니라, 신규의 개선된 독소 및 링커를 사용하여 항MUC1* 항체를 많은 ADC 포맷으로 성공적으로 도입할 수 있다는 것을 입증한다.

[0192] 각 ADC를 특정화하기 위한 시험관내 방법 중 하나는 항체에 독소를 커플링하기 전과 후에 항체가 표적 항원에 결합하는 능력을 측정하는 것이다. 항체의 특이성은 여러 독소를 항체에 화학적으로 접합하는 프로세스에 의해 손상될 수 있다. 이러한 현상은 커플링 프로세스의 요소 때문이라기보다는 각 항체의 본질적인 안정성 또는 불안정성 때문이다. 많은 경우에서, 페이로드는 디설피드 결합을 파괴시키거나, 또는 환원시켜 생성되는 유리 티올에 결합하여 항체에 커플링된다. 디설피드 결합은 2개의 중쇄를 함께 유지하고, 항체 인식 단위인 가변 영역의 구조를 지원한다. 중요한 과제는 중요한 항체 구조를 유지하는 디설피드 결합을 파괴시키지 않으면서 여러 독소를 부착할 수 있을 만큼 충분한 디설피드 결합을 환원시키는 것이다. 예상 밖으로, MNC2는 항체 구조를 손상시키거나, 표적 항원을 인식하는 능력을 변경하지 않으면서, 많은 독소를 부착할 수 있는 매우 안정적이고, 우수한 항체이다. 페이로드를 항체 MN20A10에 부착할 때 붕착하게 되는 과제는 디설피드 환원과 독소의 접합 타이밍을 포함하였다. ADC 커플링을 위한 대부분의 프로토콜은 반복적인 디설피드 환원, 이어서, 유리 티올 개수에 대한 시험을 필요로 한다. 프로세스가 장기간 진행된다면, 유리 티올은 재산화될 수 있으며, 이는 원래 구조를 재생성하거나, 항체 표적 특이성을 상실하는 결과를 초래하는 새로운 구조를 생성할 수 있다. 이러한 상황은 IgG2b 이소타입인 항체 MN20A10에 독소를 접합시키고자 할 때 발생하였다. 이 문제는 1) MN20A10을 환원시키는 데 필요한 몰 당량수를 실험적으로 결정하고; 2) 그 수의 환원 당량을 한 번에 모두 추가하고, 3) 수조에서 반응을 수행하여 원하는 온도에 도달하는 시간을 줄이는 승온에서 커플링 시약을 추가하고, 반응 기간 동안 간헐적으로 진탕시켜 반응 시간을 추가로 가속화함으로써 극복되었다. 도 36a-36d는 MMAE의 커플링 이전에, 이어서, 그 이후에 MNC2가 유방암 세포와 폐암 세포를 인식하는 능력을 측정하는 유세포 분석법의 그래프를 보여주는 것이다. 도 37a-37d는 MMAE의 커플링 이전에, 이어서, 그 이후에 MN20A10이 유방암 세포와 폐암 세포를 인식하는 능력을 측정하는 유세포 분석법의 그래프를 보여주는 것이다. MN20A10에 비해 MNC2는 MMAE의 커플링 후 암 세포를 인식하는 능력이 더 작은 보인다. 본 실험에서 MNC2-MMAE의 약물-항체-비(DAR)가 20A10-MMAE의 DAR보다 더 높았고, MNC2-MMAE가 동물에서 동일한 종양을 근절하는 능력이 더 뛰어나다는 점이 조합되었다는 사실을 감안할 때, 여러 독소를 MNC2 항체에 부착시키면 2차 항체의 결합을 입체적으로 방해할 수 있다.

[0193] 연구자들이 달성하고자 하는 주요 목표 중 하나는 표적 항원을 낮은 수준으로 발현하는 초기 암 세포를 인식하고, 사멸시킬 수 있는 항암 치료제를 개발하는 것이다. 통계적으로 암 환자는 암을 매우 초기에서 치료하면 생존 가능성이 더 크다. 현재까지는 항원 발현이 낮은 초기 암 세포를 사멸시킬 수 있는 표적화된 암 치료제는 있어도 아주 적다. 더욱 최근의 표적화된 요법은 전형적으로 표적 항원의 발현이 특정 임계값 초과로 상승한 경우에만 암 세포를 사멸시킬 수 있다. 예를 들어, 유방암 약물인 허셉틴(Herceptin)은 환자의 표적 HER2 발현이 비교적 높은 경우에만 처방될 수 있다. 그런 경우에도 허셉틴으로 치료받는 환자의 약 20%는 허셉틴에 대한 내성을 갖게 되며, 이는 종종 다른 항암 치료제에 대한 내성을 수반한다. 현재 종양 재발은 치료제로 사멸되지 않는 항원 발현이 낮은 세포로 인해 자주 발생하는 것으로 이해되고 있다. 표적 항원이 성장 인자 수용체인 경우, 이때 후기의 종양은 성장 인자 수용체를 더 높은 수준으로 발현하지만, 이러한 더 높은 수준은 또한 성장 인자 수용체를 더 낮은 수준으로 발현하는 세포보다 더 빠른 속도로 종양 성장을 촉진한다.

[0194] 따라서, 드물게 수행되기는 하지만, 항원 발현이 낮은 초기 암 세포 및 표적화된 항원을 높은 수준으로 발현하는 후기 암 세포, 둘 모두에 대해 항암 치료제를 시험하는 것이 매우 중요하다. 도 38a-45d에서, 다중 암 서브타입을 사멸시키는 MNC2-ADC 및 MN20A10-ADC 능력을 시험하였고, 여기서, 종양은 항원 발현이 저-중간인 암 세포 또는 항원 발현이 높은 암 세포였다. 놀랍게도, MNC2-ADC 및 MN20A10-ADC는 항원 발현이 낮은 암 세포 및 항원 발현이 높은 암 세포, 둘 모두를 사멸시키는 놀라운 능력을 보였다. 발현이 낮은 암 세포는 약물가능성이 있는 것으로 간주되는 ADC의 높은 나노몰 범위에서 MNC2-ADC 또는 MN20A10-ADC로 처리하여 사멸되었다. MUC1*을 높은 수준으로 발현하는 암 세포는 한 자릿수의 나노몰 범위에서 IC50으로 사멸되었다. 마이크로몰 이하인 수준의 항체는 약물가능성이 있는 것으로 간주된다. 또한, MNC2 및 MN20A10은 암 특이성 정도가 높기 때문에, 상기 투여 범위는 고도의 내약성을 보일 것이다. ADC 사멸의 시험관내 측정은 종종 ADC의 생체내 사멸 잠재력을 과소평가한다. 생체내에서 "방관자" 효과로 인한 사멸이 일반적으로 관찰된다. 이는 종양내 세포 사멸이 사멸을 크게 증가시키는 사이토카인, 대식세포 등의 숙주 방출을 유발할 때이다. 이러한 효과는 시험관내에서는 발생하지 않는다.

[0195] 예를 들어, MNC2-MMAE, MNC2-MMAF, MN20A10-MMAE 및 MN20A10-MMAF를 낮은 수준의 MUC1*을 발현하는 T47D 야생형 유방암 세포 및 더 많은 MUC1*을 발현하도록 조작된 T47D-MUC1* 세포 또한 시험관내에서 사멸시키는 능력에 대해 시험하였다. 유사하게, 항MUC1*-ADC는 낮은 수준의 MUC1*을 발현하는 HPAF II 야생형 췌장암 세포 뿐만 아니라, 더 많은 MUC1*을 발현하도록 조작된 HPAF II-MUC1* 세포를 사멸시키는 능력에 대해 시험하였다(도 38a-38f). 본 실험에서 MNC2-MMAE 및 MNC2-MMAF의 DAR은 4.1 대 3.7로 유사하다. MN20A10-MMAE와 MN20A10-MMAF의

DAR 사이에는 각각 5.8과 3.8로 약간의 차이가 있었으며, 이는 사멸 효능에 반영된다. 도면에서 알 수 있는 바와 같이, 야생형 세포, 항원 발현이 낮은 세포, 둘 모두 마이크로몰 이하인 용량의 ADC로 처리될 때 사멸되며, 이는 약물가능성이 있는 것으로 간주된다. 예상 밖으로, MUC1*은 성장 인자 수용체이지만, 발현되는 MUC1*이 많을수록 ADC 매개 사멸은 더 커진다. 더 많은 MUC1*을 발현하도록 조작된 유방암 세포 및 췌장암 세포, 둘 모두 매우 낮은 나노몰 농도에서 MNC2-MMAE, MNC2-MMAF, MN20A10-MMAE 및 MN20A10-MMAF에 의해 쉽게 사멸되었다. MNC2-테루스테칸 또는 MN20A10-테루스테칸에 의한 표적 세포 사멸을 MNC2-MMAE, MNC2-MMAF, MN20A10-MMAE 및 MN20A10-MMAF와 비교하였다(도 40a - 40c). 본 시험관내 검정법에서, 5개의 항MUC1* ADC 모두 유사한 사멸 효능을 가진 것으로 보이지만, 본 검정법에서 방관자 세포의 사멸은 확인할 수 없다. 항MUC1*-ADC 또한 MUC1* 양성 전립선암 세포(도 41a-41b) 및 비소세포 폐암 세포(도 42a-42b)의 강력한 킬러인 것으로 나타났다.

[0196] 유세포 분석법 실험 세트에서, MNC2-MMAE 또는 MN20A10-MMAE의 특정 사멸 효과는 MUC1*-ADC를 첨가한 후 표적 암 세포의 생존능을 측정함으로써 결정된다. 여기서, 표적 세포는 T47D 야생형 유방암 세포, 또는 T47D-MUC1*로 명명되는, 더 많은 MUC1*을 발현하도록 조작된 T47D 유방암 세포이다. 도 43에서 알 수 있는 바와 같이, MN20A10-MMAE 및 MNC2-MMAE, 둘 모두 야생형 유방암 세포 및 더 많은 MUC1*을 발현하도록 조작된 세포, 둘 모두 효과적으로 사멸시킨다. 그러나, 두 MUC1*-ADC 모두 세포가 표적 항원을 과다발현할 때 사멸 효능이 더 크다. 낮은 수준의 MUC1*을 발현하는 암 세포는 초기 암과 일치하는 반면, 높은 수준의 MUC1*을 발현하는 세포는 후기 암과 일치한다.

[0197] MUC1*을 발현하는 임의의 세포가 본원에 기술된 MUC1*-ADC에 의해 사멸될 것이라는 것을 입증하기 위해, 본 발명자들은 MUC1 음성 대장암 세포주인 HCT-116을 MUC1*을 발현하도록 조작하였다(예컨대, HCT-MUC1*). 도 44의 세포 생존능 검정법에서 알 수 있는 것은 MUC1*을 발현하는 세포만 사멸된다는 것이다. MUC1*을 발현하는 암 세포의 생존능은 MN20A10(비접합), 또는 MN20A10-MMAE를 첨가한 후 측정하였다. 도 45에서 알 수 있는 바와 같이, MN20A10-MMAE는 비소세포 폐암 세포, DU145 호르몬 불응성 전립선암 세포 및 췌장암 세포를 효과적으로 사멸시켰다.

[0198] 도 46 - 도 48은 MNC2-ADC 또는 MN20A10-ADC로 처리한 후 다양한 유형의 암 세포의 확대 사진을 보여주는 것이다. 사멸 효과는 세포수의 유의적인 감소, 특징적인 평평하고, 퍼진 형태에서 둥글게 원형화되는 형태로의 세포 형태 변화, 및 세포 리프팅 오프로 쉽게 볼 수 있다. 반대로, 대조군 웰은 정상적인 평평하고, 퍼지는 형태를 가진 조밀한 세포로 이루어진 전면생장 단층으로, 죽은 부유 세포 없이 나타난다. 도 46a-46c 및 도 46g-46f는 MNC2-MMAE로 처리된 T47D-MUC1* 유방암 세포를 보여주는 것이다. 도 46d-46f 및 도 46g-46j는 MNC2-테루스테칸으로 처리된 T47D-MUC1* 유방암 세포를 보여주는 것이다. 도 47a-47b는 MNC2-MMAE로 처리된 DU145 호르몬 저항성 전립선암 세포를 보여주는 것이다. 도 47c-47d는 MNC2-테루스테칸으로 처리된 DU145 호르몬 저항성 전립선암 세포를 보여주는 것이다. 도 48a-48b 및 도 48g-48h는 MN20A10-MMAE로 처리된 T47D-MUC1* 유방암 세포를 보여주는 것이다. 도 48c-48d 및 도 48i-48j는 MN20A10-테루스테칸으로 처리된 T47D-MUC1* 유방암 세포를 보여주는 것이다. 도 48k-48l은 MN20A10-MMAE로 처리된 DU145 호르몬 저항성 전립선암 세포를 보여주는 것이다. 도 48m-48n은 MN20A10-테루스테칸으로 처리된 DU145 호르몬 저항성 전립선암 세포를 보여주는 것이다. 시각적으로 알 수 있는 바와 같이, 도 46-48에 제시된 항MUC1*-ADC의 사멸 효과는 도 38-45에 제시된 유세포 분석법으로 측정된 사멸과 일치한다.

[0199] MNC2-ADC 및 MN20A10-ADC 또한 xCELLigence 기기를 사용하여 실시간으로 사멸을 모니터링함으로써 MUC1* 발현이 높은 세포 및 MUC1* 발현이 낮은 세포, 둘 모두 사멸시키는 능력에 대해서도 검정하였다(도 53-56). xCelligence 시스템에서, 부착성인 표적 암 세포를 전극 어레이 96 웰 플레이트에 플레이팅한다. 부착성 세포는 전극을 절연하고, 임피던스를 증가시킨다. 부착성 암 세포 개수는 임피던스에 정비례한다. 항체 및 항체-약물 접합체는 훨씬 더 작고, 임피던스에 크게 기여하지 않다. 따라서, 임피던스 증가는 암 세포의 성장을 반영하고, 임피던스 감소는 암 세포의 사멸을 반영한다.

[0200] 유방암 세포주 T47D-wt는 낮은 수준 내지 저-중간 수준으로 MUC1*을 발현한다. 췌장암 세포주 HPAF II-wt는 더욱더 낮은 수준으로 MUC1*을 발현하고, 폐암 세포주 NCI-H1975는 더욱더 낮은 수준으로 MUC1*을 발현한다. MMAE, MMAF, 테루스테칸, 또는 엑사테칸에 접합된 MNC2 및 MN20A10, 둘 모두 저발현 T47D-wt 유방암 세포(도 49 및 도 54), 비소세포 폐암 세포(도 51 및 도 56) 및 췌장암 세포(도 52)를 효율적으로 사멸시킨다. 저수준의 MUC1*을 발현하는 암 세포는 초기 암 세포와 일치하며, 중간 나노몰 용량으로 투여될 때, MNC2-ADC 및 MN20A10-ADC에 의해 효과적으로 사멸된다. 도 54 및 도 56에서 명확히 알 수 있는 바와 같이, MNC2-엑사테칸(DAR 8.2)을 MNC2-테루스테칸(DAR 4.0) 및 MNC2-MMAE(DAR 4.1)와 비교하였을 때, MNC2-엑사테칸은 낮은 MUC1* 발현 암 세포

를 더욱 강력하게 사멸시키는 것으로 나타났으며, 이는 그에 부착된 독소의 개수가 더 많기 때문일 수 있다.

[0201]

다음 실험 세트에서, MNC2-ADC 및 MN20A10-ADC를 MUC1*을 높은 수준으로 발현하는 암 세포를 사멸시키는 능력에 대해 시험한다. MUC1* 수준이 높을수록, MUC1*이 상기 세포의 성장을 구동시키는 성장 인자 수용체이기 때문에 세포를 사멸시키는 것은 더 어려울 것으로 예상된다. 예상 밖으로, 실험은 MUC1*이 많이 발현될수록, 세포를 사멸시키는 것은 더 쉽다는 것을 보여준다. xCELLigence 실시간 사멸 검정법 또한 사용하여 MMAE, MMAF, 데루스테칸, 또는 엑사테칸에 접합된 MNC2 및 MN20A10을 더 높은 수준으로 MUC1*을 발현하는 암 세포 사멸에 대하여 비교하였다. 유방암 세포주 T47D-MUC1* 및 HPAF II-MUC1*은 후기 암과 일치하는 높은 수준으로 MUC1*을 발현하도록 조작하였다. 도 50, 도 53, 및 도 55에서 알 수 있는 바와 같이, 높은 수준으로 MUC1*을 발현하는 암 세포는 매우 낮은 나노몰 용량인 6 nM - 19 nM에서 완전히 사멸된다.

[0202]

시험관내 검정법 외에도, 생체내 실험 또한 수행하였으며, 여기서는 MMAE, MMAF, 데루스테칸 또는 엑사테칸에 접합된 항MUC1* 항체 MNC2 및 MN20A10을 MUC1* 발현이 높거나, 또는 낮은 유방, 폐 또는 췌장 종양을 이식받은 시험 마우스에 투여하였다. 상기 실험은 실험 18에서 더 상세하게 설명된다. 한 예에서, NOD/SCID/GAMMA 마우스에 야생형인 T47D 유방암 세포, 또는 더 많은 MUC1*을 발현하도록 조작된 T47D 유방암 세포를 이식하였다. 동물에게 초기 용량 5 mg/kg으로 MNC2-MMAE, DAR 3.85를 3회 주사한 후, 이어서, 10 mg/kg으로 증가시켰다. 도 57에서 알 수 있는 바와 같이, 후기 암과 일치하는 높은 수준으로 MUC1*을 발현하는 종양을 보유하는 마우스는 26 일째까지 효율적으로 제거되었다. 초기 암과 일치하는 낮은 MUC1* 발현 세포가 있는 종양을 이식받은 마우스는 완전히 제거되지는 않았지만, 대조군과 비교하였을 때 종양 부피는 작았다. 비교해보면(도 58), 동일한 용량의 MN20A10-MMAE, DAR 2.96을 받은 동물은 가능하게는 부착된 독소의 개수가 적었기 때문에 종양이 완전히 제거되지 않았다. 동일한 투여량의 MNC2-MMAE(도 59) 또는 MN20A10-MMAE(도 60)를 비소세포 폐암 종양을 이식받은 동물에게 제공하였다. MNC2-MMAE, DAR 4.1은 높은 또는 낮은 MUC1* 발현자인 췌장 종양을 이식받은 시험 마우스에서 종양을 제거하는 데 매우 효과적이었다(도 61). 도 62는 도 61에 제시된 실험의 업데이트를 보여주는 것이다. 66일 후, MNC2-MMAE로 처리된 동물은 18일째부터 종양이 없었고, 종양이 재발하지 않았다. MNC2-데루스테칸은 MUC1*을 낮거나, 높은 수준으로 발현하는 인간 유방암 세포를 이식받은 마우스에 제공하였다(도 63 및 도 64). 높은 MUC1*을 발현하는 종양은 26일째까지 본질적으로 제거되었다. 낮은 MUC1* 발현 세포를 이식받은 마우스는 대조군에 비해 크게 감소했지만, 더 높은 용량 또는 반복 주사를 필요로 할 수 있다.

[0203]

동물 모델에서, 본 발명자들은 종양이 후기로 진행됨에 따라, MUC1*의 발현이 증가한다는 것을 보여 주었다. 도 65a-65d는 종양 세포의 이미지를 보여주는 것이다. 0일째 세포 염색은 세포가 MUC1*보다 더 많은 전장 MUC1을 발현하고, 염색 강도가 약하여 MUC1* 수용체 개수가 적다는 것을 나타내며, 이는 초기 암이라는 것을 시사하는 것이다. 인간 시간으로 대략 7년과 같은, 종양 이식 후 육십이일째(62), 발현 정도와 발현 강도 측면에서 MUC1* 발현이 낮은 발현에서 후기 종양의 높은 발현으로 극적으로 이동한 것을 쉽게 알 수 있다. 그에 반해, 일련의 종양 절편의 염색은 표면 발현 후 MUC1*로 절단되기 때문에 예상대로 전장 MUC1이 발현되었음을 보여준다. 그러나, 염색 강도는 증가하지 않았는데, 이는 발현된 MUC1의 대부분이 후기 종양에서 성장 인자 수용체 형태인 MUC1*로 절단되었음을 나타낸다.

[0204]

항체

[0205]

관심 폴리펩티드에 결합하는 항체(Ab)는 이 맥락에서 "결합"으로서 결합하는 것으로 당업자에 의해 이해된다. 예를 들어, 항체 또는 상기 Ab를 포함하는 본원에 기술된 접합체는 일반적으로 예컨대, 면역검정법 또는 당업계에 공지된 다른 검정법에 의해 측정된 바와 같이 더 낮은 친화도로 다른 폴리펩티드 또는 단백질에 결합할 수 있다. 특정 실시양태에서, 관심 폴리펩티드에 특이적으로 결합하는 Ab, 또는 상기 Ab를 포함하는 본원에 기술된 접합체는 Ab 또는 접합체가 또 다른 폴리펩티드에 결합할 때의 친화도보다 적어도 2 로그, 2.5 로그, 3 로그, 4 로그 또는 그 초과인 친화도로 관심 폴리펩티드에 결합한다. 또 다른 특정 실시양태에서, Ab, 또는 상기 Ab를 포함하는 본원에 기술된 접합체는 관심 폴리펩티드 이외의 다른 폴리펩티드에 특이적으로 결합하지 않는다. 특정 실시양태에서, Ab, 또는 Ab를 포함하는 본원에 기술된 접합체는 관심 폴리펩티드에 20 mM 이하의 친화도(Kd)로 특이적으로 결합한다. 특정 실시양태에서, 상기 결합은 약 20 mM, 약 10 mM, 약 1 mM, 약 100 μ M, 약 10 μ M, 약 1 μ M, 약 100 nM, 약 10 nM, 또는 약 1 nM 이하의 친화도(Kd)로 이루어진다. 달리 언급되지 않는 한, 이 맥락에서 "결합하다," "~에 결합하다," "특이적으로 결합하다" 또는 "~에 특이적으로 결합하다"는 상호교환적으로 사용된다.

[0206]

일부 실시양태에서, 표적 세포는 암 세포이다. 일부 실시양태에서, 암은 유방암, 결장암, 전립선암, 췌장암, 또는 폐암이다.

- [0207] 일부 실시양태에서, 항체는 표면 상에 MUC1*을 발현하는 암 세포에 결합한다.
- [0208] 특정 실시양태에서, 항체는 약 10, 약 20, 약 30, 약 40, 약 50, 약 100, 약 150, 약 200, 약 250, 약 300, 약 350, 약 400, 약 450, 약 500, 약 550, 약 600, 약 650, 약 700, 약 750, 약 800, 약 850, 약 900, 또는 약 950개의 아미노산을 포함한다.
- [0209] 특정 실시양태에서, 항체는 약 10-50, 약 50-100, 약 100-150, 약 150-200, 약 200-250, 약 250-300, 약 300-350, 약 350-400, 약 400-450, 약 450-500, 약 500-600, 약 600-700, 약 700-800, 약 800-900, 또는 약 900-1000개의 아미노산을 포함한다.
- [0210] 특정 실시양태에서, 접합체는 항체, Ab를 포함한다. 특정 실시양태에서, Ab는 단일클론 항체이다. 특정 실시양태에서, Ab는 인간 항체이다. 특정 실시양태에서, Ab는 인간화 항체이다. 특정 실시양태에서, Ab는 키메라 항체이다. 특정 실시양태에서, Ab는 2개의 중쇄 및 2개의 경쇄를 포함하는 전장 항체이다. 특정 실시양태에서, Ab는 IgG 항체이고, 예컨대, IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 항체이다. 특정 실시양태에서, Ab는 단일 쇄 항체이다. 또 다른 실시양태에서, Ab는 항체의 항원 결합 단편, 예컨대, Fab 단편이다.
- [0211] 특정 실시양태에서, Ab는 IgG1 항체이다. 특정 실시양태에서, Ab는 IgG2b 항체이다.
- [0212] 특정 실시양태에서, 항체는 세포 표면 단백질에 특이적으로 결합한다. 특정 실시양태에서, 항체는 세포 표면 수용체에 특이적으로 결합한다. 특정 실시양태에서, 항체는 세포 표면 수용체 리간드에 특이적으로 결합한다.
- [0213] 일부 실시양태에서, 항체, 또는 그의 기능성 단편 또는 기능성 변이체는 MUC1*에 특이적으로 결합한다. 일부 실시양태에서, 항체는 항MUC1* 중쇄 및 항MUC1* 경쇄를 포함한다.
- [0214] 일부 실시양태에서, 항MUC1* 중쇄는 항MUC1* 중쇄 가변 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항MUC1* 중쇄 가변 도메인은 IgG1, IgG2, IgG3, 또는 IgG4 중쇄의 가변 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항MUC1* 경쇄는 항MUC1* 경쇄 가변 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항MUC1* 경쇄 가변 도메인은 카파 또는 람다 경쇄의 가변 도메인을 포함한다.
- [0215] 일부 실시양태에서, 항MUC1* 중쇄 가변 도메인은 IgG1 중쇄의 가변 도메인을 포함하고, 항MUC1* 경쇄 가변 도메인은 카파 또는 람다 경쇄의 가변 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항MUC1* 중쇄 가변 도메인은 IgG2 중쇄의 가변 도메인을 포함하고, 항MUC1* 경쇄 가변 도메인은 카파 또는 람다 경쇄의 가변 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항MUC1* 중쇄 가변 도메인은 IgG3 중쇄의 가변 도메인을 포함하고, 항MUC1* 경쇄 가변 도메인은 카파 또는 람다 경쇄의 가변 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항MUC1* 중쇄 가변 도메인은 IgG4 중쇄의 가변 도메인을 포함하고, 항MUC1* 경쇄 가변 도메인은 카파 또는 람다 경쇄의 가변 도메인을 포함한다.
- [0216] 일부 실시양태에서, 항MUC1* 중쇄 가변 도메인은 IgG1 중쇄의 가변 도메인을 포함하고, 항MUC1* 경쇄 가변 도메인은 카파 경쇄의 가변 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항MUC1* 중쇄 가변 도메인은 IgG2 중쇄의 가변 도메인을 포함하고, 항MUC1* 경쇄 가변 도메인은 카파 경쇄의 가변 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항MUC1* 중쇄 가변 도메인은 IgG3 중쇄의 가변 도메인을 포함하고, 항MUC1* 경쇄 가변 도메인은 카파 경쇄의 가변 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항MUC1* 중쇄 가변 도메인은 IgG4 중쇄의 가변 도메인을 포함하고, 항MUC1* 경쇄 가변 도메인은 카파 경쇄의 가변 도메인을 포함한다.
- [0217] 일부 실시양태에서, 항MUC1* 중쇄 가변 도메인은 IgG1 중쇄의 가변 도메인을 포함하고, 항MUC1* 경쇄 가변 도메인은 람다 경쇄의 가변 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항MUC1* 중쇄 가변 도메인은 IgG2 중쇄의 가변 도메인을 포함하고, 항MUC1* 경쇄 가변 도메인은 람다 경쇄의 가변 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항MUC1* 중쇄 가변 도메인은 IgG3 중쇄의 가변 도메인을 포함하고, 항MUC1* 경쇄 가변 도메인은 람다 경쇄의 가변 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항MUC1* 중쇄 가변 도메인은 IgG4 중쇄의 가변 도메인을 포함하고, 항MUC1* 경쇄 가변 도메인은 람다 경쇄의 가변 도메인을 포함한다.
- [0218] 일부 실시양태에서, MUC1*에 특이적으로 결합하는 항체, 또는 그의 기능성 단편 또는 기능성 변이체는 단일 쇄 가변 단편(scFv) 또는 항원 결합 단편(Fab)을 포함한다. 일부 실시양태에서, MUC1*에 특이적으로 결합하는 항체, 또는 그의 기능성 단편 또는 기능성 변이체는 단일 쇄 가변 단편을 포함한다. 일부 실시양태에서, MUC1*에 특이적으로 결합하는 항체, 또는 그의 기능성 단편 또는 기능성 변이체는 항원 결합 단편(Fab)을 포함한다.
- [0219] 일부 실시양태에서, 항MUC1* 중쇄 가변 도메인은 상보성 결정 영역(CDR): HC-CDR1, HC-CDR2, 및 HC-CDR3을 포함하고, 여기서, 항MUC1* 중쇄 가변 도메인의 HC-CDR1, HC-CDR2, 및 HC-CDR3은 HC-CDR1: 서열 번호 1 또는 4; HC-CDR2: 서열 번호 2 또는 5; HC-CDR3: 서열 번호 3 또는 6에 따른 아미노산 서열을 포함하고; 여기서, CDR은

HC-CDR1, HC-CDR2, 또는 HC-CDR3 중 적어도 하나에 0-2개의 아미노산 변형(들)(예컨대, 0 또는 1개의 아미노산 변형(들))을 포함한다.

[0220] 일부 실시양태에서, 항MUC1* 경쇄 가변 도메인은 상보성 결정 영역(CDR): LC-CDR1, LC-CDR2, 및 LC-CDR3을 포함하고, 여기서, 항MUC1* 경쇄 가변 도메인의 LC-CDR1, LC-CDR2, 및 LC-CDR3은 LC-CDR1: 서열 번호 13 또는 16; LC-CDR2: 서열 번호 14 또는 17; LC-CDR3: 서열 번호 15 또는 18에 따른 아미노산 서열을 포함하고; 여기서, CDR은 LC-CDR1, LC-CDR2, 또는 LC-CDR3 중 적어도 하나에 0-2개의 아미노산 변형(들)(예컨대, 0 또는 1개의 아미노산 변형(들))을 포함한다.

[0221] 일부 실시양태에서, 항MUC1* 중쇄는 서열 번호 38 또는 44와 적어도 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항MUC1* 경쇄는 서열 번호 41 또는 47과 적어도 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.

[0222] 항체 약물 접합체(ADC)는 항체 부분의 가변 영역이 암 세포 외부에 발현된 분자를 인식할 때 작동한다. 항체가 표적 항원에 결합한 후, 전체 ADC가 내재화된다. 항체 내재화는 ADC 세포 사멸 기능에 필요한 요건이다. 종종 ADC의 세포 내재화는 독소를 생화학적으로 변경시켜 일부 경우에는 더욱 강력하게 만들고, 다른 경우에서, 변경은 독소를 세포 내부에 포획하여 표적의 독성을 감소시킨다. 모든 수용체가 리간드 결합 후 또는 특히 항체 결합 후에 내재화되는 것은 아니며, 항체 결합 후에는 수용체가 이량체화되어 내재화가 더 어렵거나 불가능할 수 있다. 모든 수용체가 리간드 결합 후 또는 특히 항체 결합 후에 내재화되는 것은 아니며, 항체 결합 후에는 수용체가 이량체화되어, 불가능하지 않다면 그로 인해 내재화는 더 어려워질 수 있다. 도 25a-25d는 공초점 현미경으로 촬영한 사진을 보여주는 것으로, 이는 항MUC1* 항체, 예컨대, MNC2가 MUC1* 수용체의 세포외 도메인에 결합한 후 내재화된다는 것을 입증한다.

[0223] 페이로드

[0224] 항체 약물 접합체(ADC)는 항체(예컨대, 단일클론 항체)의 표적 특이성을 소분자 약물(페이로드 또는 세포독성 기로 공지)의 효능을 조합하는데, 이는 상기 두 특성을 모두 유지하는 단일 ADC 분자로 연결함으로써 이루어진다. ADC의 개선된 선택성 및 효능은 우수한 안전성과 효능으로 이어져 종래 화학요법 약물에 비해 더 넓은 치료창을 제공한다. 용어 "페이로드" 및 "세포독성 기"는 본원에서 상호교환하여 사용된다.

[0225] 일부 실시양태에서, 페이로드는 토포이소머라제 억제제이다. 일부 실시양태에서, 토포이소머라제 억제제는 토포이소머라제 I 억제제이다. 일부 실시양태에서, 토포이소머라제 억제제는 엑사테칸 또는 그의 유도체이다. 일부 실시양태에서, 토포이소머라제 억제제는 데루스테칸 또는 그의 유도체이다.

[0226] 일부 실시양태에서, 페이로드는 튜블린 형성 억제제이다. 일부 실시양태에서, 튜블린 형성 억제제는 모노메틸아우리스타틴 E(MMAE) 또는 모노메틸아우리스타틴 F(MMAF)이다.

[0227] ADC 포맷으로 사용되는 더욱 최근의 독성 페이로드 중 일부, 예컨대, 데루스테칸은 토포이소머라제 I 억제제의 엑사테칸 패밀리에 속한다. ADC 포맷으로 사용되는 상기 최근의 페이로드 커플러 구성 중 하나는 도 28에 제시되어 있는 데루스테칸이다. 여기서, 말레이미도카프로일(MC) 부분은 항체 상의 시스테인에의 커플링을 촉진시킨다. 말레이미도카프로일은 글리신 페닐알라닌 링커인 GGFG, Dxd에 연결되는 커플러 HN-CH2-를 통해 독성 페이로드인 Dxd에 연결된다. Dxd는 토포이소머라제 I 억제제로, 세포 분열을 억제하는 메커니즘이다. 도 29에 제시되어 있는 또 다른 예에서, 엑사테칸 페이로드는, 발린-시트룰린(VC) 부분에 연결되고, 이는 차례로 항체 상의 시스테인에의 커플링을 촉진시키는 말레이미도카프로일(MC) 부분에 연결되는 파라-아미노벤질(PAB) 부분을 통해 항체에 부착되었다.

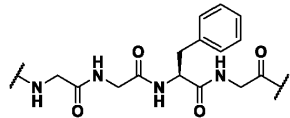
[0228] 엑사테칸은 높은 수준의 방관자 효과를 가지고 있는데, 이는 이웃 세포를 사멸시킬 수 있다는 것을 의미하는 것이다. HER2+ 유방암을 표적화하는 새로운 ADC인 엔허투(Enhertu)에 대한 임상 시험은 예컨대, 폐렴과 같은 심각한 효과, 생명을 위협하는 부작용으로 어려움을 겪었다. 엔허투 환자 중 최대 16%가 치료로 인한 폐렴을 겪었다고 보고되었다. 그러나, 엔허투는 전이성 유방암 환자의 생존을 거의 2년 연장시켰다고 보고되었는 바, FDA 승인을 받았다. 상기 부작용이 페이로드 때문인지, 또는 정상 폐 및 정상 심장에도 발현되는 표적 HER2 때문인지는 완전히 명확하지 않다. HER2를 표적화하는 CAR T 세포 생성물로 치료받은 최초의 두 환자가 주입 직후 사망하였다는 점을 기억한다. 후속 연구에 따르면, 사망자는 HER2에 대해 친화도가 매우 높은 항체를 사용한 것이 원인이었다. 더 최근에는 상이한 HER2 표적화 ADC로 치료받은 후 추가의 또 다른 환자가 사망하였다. 이러한 결과는

생명을 위협하는 독성을 피하기 위해 우수한 암 선택성을 가진 항체를 선택하는 것의 중요성을 강조한다. MNC2 및 MN20A10은 예상치 못하게도 매우 높은 수준의 암 특이성을 가지고 있으며, 각 항체가 여러 ADC 포맷으로 통합된 동물 연구에서 독성을 유발하지 않았다.

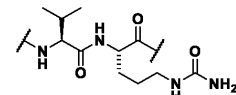
[0229] **링커**

[0230] 특정 실시양태에서, 링커 -L-은 탄소 원자, 질소 원자, 황 원자, 산소 원자, 및 그의 조합 중 하나 이상의 것을 포함한다. 특정 실시양태에서, 링커 -L-은 하나 이상의 아미노산을 포함한다. 특정 실시양태에서, 링커 -L-은 에테르 결합, 티오에테르 결합, 아민 결합, 아마이드 결합, 탄소-탄소 결합, 탄소-질소 결합, 탄소-산소 결합, 탄소-황 결합, 및 그의 조합 중 하나 이상의 것을 포함한다. 특정 실시양태에서, 링커 -L-은 선형 구조를 포함한다. 특정 실시양태에서, 링커 -L-은 디-, 트리-, 또는 테트라-펩티드 연결 모이어티를 포함한다.

[0231] 링커는 적어도 하나의 글리신을 포함할 수 있다. 링커는 적어도 하나의 글리신 및 페닐알라닌을 포함할 수

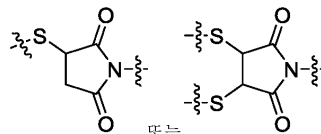


있다. 링커는 의 구조를 포함할 수 있다. 링커는 발린을 포함할 수 있다. 링커는 시

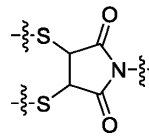
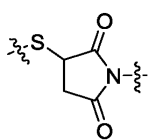


트룰린을 포함할 수 있다. 링커는 발린 및 시트룰린을 포함할 수 있다. 링커는 갖는 디펩티드 연결 모이어티일 수 있다.

[0232] 특정 실시양태에서, Z는 폴리펩티드의 아미노산과 공유 결합을 형성할 수 있는 접합 모이어티이다. Z는 링커의 N-말단에 결합할 수 있다. Z는 말레이미드를 포함할 수 있다. 구체적인 실시양태에서, 아미노산은

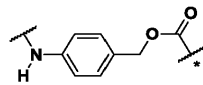


시스테인이다. 특정 실시양태에서, Z는 또는 이다. 특정 실시양태에서, Z는

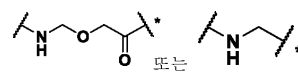


이다. 특정 실시양태에서, Z는 이다.

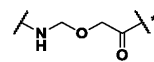
[0233] 링커는 커플링 모이어티, R을 포함할 수 있다. 특정 실시양태에서, R은 링커의 C-말단에 페이로드를 결합시킬



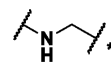
수 있는 커플링 모이어티이다. R은 의 구조를 갖는 모이어티를 포함할 수 있고, 여기서, *는



페이로드에 대한 부착 지점을 나타낸다. R은 구조 의 기를 포함할 수 있고,



여기서, *는 페이로드에 대한 부착 지점을 나타낸다. R은 의 구조를 갖는 기를 포함할 수 있고,



여기서, *는 페이로드(예컨대, 세포독성 기)에 대한 부착 지점을 나타낸다. R은 의 구조를 갖는 기를 포함할 수 있고, 여기서, *는 페이로드에 대한 부착 지점을 나타낸다.

[0234] 도 26은 페이로드인 모노메틸 아우리스타틴 E 뿐만 아니라, 편리한 링커 분자 및 페이로드의 항체에의 화학적 커플링을 촉진시키는 반응성 분자의 화학 구조를 보여주는 것이다. 이 경우, MMAE는, 발린-시트룰린(VC) 부분에 연결되고, 이는 차례로 항체 상의 시스테인에의 커플링을 촉진시키는 말레이미도카프로일(MC) 부분에 연결되는 파라-아미노벤질(PAB) 부분을 통해 항체에 연결된다. 일단 ADC가 내재화되고 나면, 카텝신 B는 항체로부터 페이

로드를 효소적으로 절단하는데, 이는 PAB 및 VC, 둘 모두에 의해 촉진된다. 페이로드인 모노메틸 아우리스타틴 E(MMAE)는 튜불린의 중합화를 차단하여 세포 분열을 억제한다.

[0235] MMAF로 명명되는 모노메틸 아우리스타틴 F는 튜불린의 중합화를 차단하여 세포 분열을 억제하는 독성 페이로드의 또 다른 예이다. 도 27에 제시된 예에서, 페이로드 MMAF는, 발린-시트룰린(VC) 부분에 연결되고, 이는 차례로 항체 상의 시스템인에의 커플링을 촉진시키는 말레이미도카프로일(MC) 부분에 연결되는 파라-아미노벤질(PAB) 부분을 통해 항체에 연결된다. 일단 ADC가 내재화되고 나면, 카텝신 B는 항체로부터 페이로드를 효소적으로 절단한다. MMAE와 달리, MMAF는 카복실산을 함유하는데, 이는 페이로드가 항체로부터 절단된 후 페이로드가 세포에서 빠져나가는 것을 어렵게 만든다.

[0236] ADC 포맷으로 사용되는 더욱 최근의 독성 페이로드 중 일부, 예컨대, 데록스테칸은 토포이소머라제 I 억제제의 엑사테칸 패밀리에 속한다. ADC 포맷으로 사용되는 상기 최근의 페이로드 커플러 구성 중 하나는 도 28a - 28e에 제시되어 있는 데록스테칸이다. 여기서, 말레이미도카프로일(MC) 부분은 항체 상의 시스템인에의 커플링을 촉진시킨다. 말레이미도카프로일은 글리신 페닐알라닌 링커인 GGFG, Dxd에 연결되는 커플러 HN-CH₂-를 통해 독성 페이로드인 Dxd에 연결된다. Dxd는 토포이소머라제 I 억제제로, 세포 분열을 억제하는 메커니즘이다. 도 29a - 29e에 제시되어 있는 또 다른 예에서, 본 발명자들은 엑사테칸 페이로드를, 발린-시트룰린(VC) 부분에 연결되고, 이는 차례로 항체 상의 시스템인에의 커플링을 촉진시키는 말레이미도카프로일(MC) 부분에 연결되는 파라-아미노벤질(PAB) 부분을 통해 본 발명자들의 항체에 부착시켰다.

[0237] 약학 조성물

[0238] 또 다른 측면에서, 본원에서는 본원에 개시된 접합체(예컨대, ADC) 및 다중특이적 항체를 포함하는 약학 조성물을 제공한다. 일부 실시양태에서, 약학 조성물은 화학식(I)의 접합체 및 약학적으로 허용되는 담체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 약학 조성물은 본원에 개시된 바와 같은 다중특이적 항체 및 약학적으로 허용되는 담체를 포함한다.

[0239] 본원의 약학 조성물은 활성제를 약학적으로 사용되는 제제로 프로세싱하는 것을 촉진시키는 부형제 및 보조제를 포함하는 하나 이상의 생리학적으로 허용되는 담체를 사용하여 제제화된다. 적절한 제제는 선택된 투여 경로에 따라 달라진다.

[0240] 특정 실시양태에서, 본원에 개시된 약학 조성물은 약학적으로 허용되는 희석제(들), 부형제(들), 또는 담체(들)를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 약학 조성물은 다른 의약제 또는 약학적 제제, 담체, 애주번트, 예컨대, 보존제, 안정화제, 습윤화제 또는 유화제, 용해 촉진제, 삼투압을 조절하기 위한 염 및/또는 완충제를 포함한다.

[0241] 특정 실시양태에서, 본원에 개시된 약학 조성물은 비경구적(정맥내, 피하, 복강내, 근육내, 혈관내, 척추강내, 유리체내, 주입, 또는 국소) 투여를 포함하나, 이에 제한되지 않는 임의의 적합한 투여 경로에 의해 피험체에게 투여된다.

[0242] 근육내, 피하, 종양 주변 또는 정맥내 주사에 적합한 제제는 생리학적으로 허용되는 멸균 수성 또는 비수성 용액, 분산액, 현탁액 또는 에멀전, 및 멸균 주사 용액 또는 분산액으로 재구성하기 위한 멸균 분말을 포함한다. 적합한 수성 및 비수성 담체, 희석제, 용매 또는 비히클의 예로는 물, 에탄올, 폴리올(프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 글리세롤, 크레모포르 등), 그의 적합한 혼합물, 식물성 오일(예컨대, 올리브 오일 등) 및 주사용 유기 에스테르, 예컨대, 에틸 올레이트를 포함한다. 적절한 유동성은 예를 들어, 코팅, 예컨대, 레시틴을 사용하고, 분산액인 경우, 필요한 입자 크기를 유지하고, 계면활성제를 사용함으로써 유지된다. 피하 주사에 적합한 제제는 또한 임의의 첨가제, 예컨대, 보존제, 습윤화제, 유화제 및 분배제를 포함한다.

[0243] 정맥내 주사의 경우, 활성제는 임의적으로 수용액, 바람직하게, 예컨대, 행크 용액, 링거 용액과 같은 생리학적으로 호환되는 완충제, 또는 생리식염수 완충제에서 제제화된다.

[0244] 비경구 주사는 임의적으로 볼러스 주사 또는 연속 주입을 포함한다. 주사용 제제는 임의적으로 단위 투여 형태, 예컨대, 앰플 또는 보존제가 첨가된 다회 투여 용기로 제공된다. 일부 실시양태에서, 본원에 기술된 약학 조성물은 오일성 또는 수성 비히클 중 멸균 현탁액, 용액 또는 에멀전으로서 비경구 주사에 적합한 형태이며, 예컨대, 현탁화제, 안정화제 및/또는 분산제와 같은 제제화제를 함유한다. 비경구 투여용 약학적 제제는 수용성 형태의 활성제의 수용액을 포함한다. 추가로, 현탁액은 임의적으로 적절한 오일성 주사 현탁액으로 제조된다.

[0245] 일부 실시양태에서, 본원에 기술된 약학 조성물은 정확한 투여량의 단일 투여에 적합한 단위 투여 형태이다. 단

위 투여 형태에서, 제제는 본원에 개시된 활성제를 적절한 양으로 함유하는 단위 투여로 나뉜다. 일부 실시양태에서, 단위 투여량은 제제의 개별적인 양을 함유하는 패키지 형태이다. 비제한적인 예로는 패키지된 정제 또는 캡슐, 바이알 또는 앰플 중 분말이 있다. 일부 실시양태에서, 수성 현탁 조성물은 단일 투여 비재밀폐 용기에 패키지된다. 대안적으로, 다회 투여 재밀폐 용기가 사용되는데, 이 경우 조성물에 보존제를 포함하는 것이 전형적이다. 단지 예로서, 비경구 주사용 제제는 앰플을 포함하나, 이에 제한되지 않는 단위 투여 형태, 또는 보존제가 첨가된 다회 투여 용기로 제공된다.

[0246] **실시예**

[0247] **실시예 1. 항MUC1* 내재화 실험**

[0248] MNC2 내재화를 입증하였다(도 25a-25b).

[0249] 8 웰 챔버 슬라이드(Nunc™ Lab-Tek™ II Chamber Slide™ System Thermo 카탈로그 번호 154534PK 또는 Ibidi™ 8웰 μ -슬라이드 ibiTreat: #1.5 중합체 커버슬립, 조직 배양 처리, 살균)를 콜라겐(Sigma #C3867)으로 코팅하였고, 여기서, 웰당 콜라겐 300 μ l를 첨가하고, 4℃에서 밤새도록 인큐베이션시킨 후, PBS로 1회, 물로 1회 세척한 후, 이어서, 생물안전(Biosafety) 후드에서 대기 건조시켰다. 후드 아래에서 웰을 건조시킨다.

[0250] T47D 유방암 세포를 10% RPMI 중 웰당 30,000-50,000개의 세포로 플레이팅하고, 48 h 동안 또는 전면생장률이 ~70%가 될 때까지 배양하였다. 배지를 제거하고, 세포는 2% RPMI 중에서 24시간 동안 혈청을 고갈시켰다. 세포를 냉 PBS로 세척하였다.

[0251] 항체를 냉 PBS + 2% FBS 중에 최종 농도가 300 ug/mL이 되도록 희석하였다. 항체 용액 200 μ l를 각 웰에 첨가하고, 속도 6의 왕복식 플랫폼 진탕기에서 암실에서 4℃에서 2시간 동안 인큐베이션시켰다. 이어서, 세포를 냉 PBS로 3회 세척하였다.

[0252] 10 ug/mL의 항마우스 알렉사(Alexa) 488 항체 또는 항인간 알렉사 555 항체를 2% FBS를 포함하는 PBS 중에서 1:200으로 희석하고, 진탕시키면서, 암실에서 4℃에서 1시간 동안 인큐베이션시켰다. 세포를 냉 PBS로 3회 세척하였다.

[0253] 내재화를 위해, 따뜻한 10% RPMI + 75 nM 리소트래커(lysotracker) 암적색(1/13,333)을 첨가하고, CO₂ 인큐베이터에서 37℃에서 2시간 동안 인큐베이션시켰다. 세포를 냉 PBS로 3회 세척하였다.

[0254] 세포를 실온에서 15분 동안 PBS 중 신선한 4% 포름알데히드로 고정시킨 후, 냉 PBS로 3회 세척하였다. PBS 중 핵색소(Hoescht) 염료 33342를 1 ug/mL로 첨가하고, 실온에서 10분 동안 인큐베이션시킨 후, 세척 단계 없이 배지를 제거하였다. Nunc™ Lab-Tek™의 경우, 봉입체(Prolong Diamond 안티페이드)로 커버 유리(#1.5)를 챔버 슬라이드 상에 마운팅하여 기포를 회피하였다. 이어서, 슬라이드를 평평한 표면에서 실온에서 24시간 동안 보관하였다. 장기 보관은 암실에서 4℃에서 이루어졌다. Ibidi 슬라이드의 경우, Ibidi 봉입체를 추가한다.

[0255] 사진은 공초점 현미경으로 촬영하였다.

[0256] **실시예 2. MNC2-ADC 또는 MN20A10-ADC(항체-약물-접합체)의 소규모(3mg) 제조에 대한 일반적인 설명**

[0257] 비접합된 MNC2인 IgG1 항체, 또는 MN20A10인 IgG2b 항체의 용액을 pH 8.0 보레이트 완충제에서 과량의 디티오프레이톨(DTT)로 환원시켰다. 37℃에서 2시간 동안 환원시킨 후, 엘만(Elman) 티올 시험을 사용하여 분취량을 유리 티올의 존재량에 대해 시험하였다. 항체 이소타입에 따라, 유리 티올 개수가 다르다. 엘만 시약을 사용하여 유리 티올을 분석한 결과, 유리 티올 개수가 충분하지 않은 것으로 나타났다면, 이때는 DTT를 더 첨가하고, 37℃에서 추가 시간 동안 인큐베이션시켰다. 유리 티올 결정 및 더 많은 환원제 첨가 프로세스는 충분한 개수의 유리 티올을 획득할 때까지 반복하였다. MN20A10은 MNC2보다 더 많은 환원제를 필요로 하였고, MNC2보다 더 긴 환원 시간을 필요로 하였다. 이어서, 환원된 항체를 pH 6.0 2-(N-모르폴리노)에탄숴숴산(MES) 완충제에 넣고, 유리 시스테인을 11몰 당량의 말레이미드-연결-독성제로 약 1시간 동안 알킬화하였다. 이어서, 조 ADC를 탈염 컬럼을 통해 정제하여 예컨대, 과도한 독성제, DMSO 및 다른 저분자량 오염물질 같은 저분자량 오염물질을 제거하였다. 약물-항체-비(DAR)는 248 nm에서의 독소 UV 흡광도(또는 데록스테칸의 경우, 370 nm) 대 280 nm에서의 항체 흡광도로부터 계산하였다. 약물-항체-비(DAR), 즉, [약물:mAb] 몰비를 결정하기 위한 접합체 분석은 문헌상의 방법에 따라 소수성 상호작용 크로마토그래피-고성능 액체 크로마토그래피에 의해 달성하였다(문헌 [Effects of drug loading on the antitumor activity of a monoclonal antibody drug conjugate. Hamblett, K.J., Senter, P.D., Chace, D.F., Sun, M.M.C., Lenox, J., Cervený, C.G., Kissler, K.M., Bernhardt,

S.X., Kopcha, A.K., Zabinski, R.F., Meyer, D.L., and Francisco, J.A. Clin Cancer Res. 2004 Oct 15;10(20):7063-70. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-04-0789]].

[0258] 상기 절차에 따라 MNC2-MMAE, MNC2-MMAF, MNC2-테루스테칸, MNC2-엑사테칸, MN20A10-MMAE, MN20A10-MMAF, MN20A10-테루스테칸 및 MN20A10-엑사테칸을 소규모로 제조하였다.

[0259] **실시예 3: MNC2-테루스테칸의 소규모(3 mg) 프렙 생성에 대한 상세한 예**

[0260] IgG1 MNC2 항체(3.00 mg, 1.578 mL, 1.9 mg/mL, 20 nM)를 37°C 수조에서 1분 동안 -80°C로부터 해동시켰다. 단백질 농도는 마우스 IgG1 항체에 대해 14,000 L/g-cm의 흡광 계수를 사용하여 나노드롭으로 결정하였다. 항체 용액은 원심분리 필터(Amicon Ultra 0.5 mL 50,000 mw 컷오프(카탈로그 번호 UFC505024))를 사용하여 농축시켜 (4°C에서 8 min 동안 14,000 x g) 100 µL 이하의 부피를 수득하였다. 이어서, 완충제를 < 100 µL로 농축시키고, 대략 300 µL 신선한 완충제 중에 재현탁시켜 pH 8.0 보레이트 완충제(25 mM 사붕산나트륨, 25 mM NaCl, 1 mM EDTA)로 교체하였다. 상기 프로세스를 총 3회 반복되었다. 농축된 항체(~100 uL)를 0.5 mL 스크류 캡 원심분리 관으로 옮기고, pH 8.0 보레이트 완충제(25 mM 사붕산나트륨, 25 mM 염화나트륨, 1 mM EDTA)를 이용하여 300 µL 가 되도록 하여 10 mg/mL 항체 용액을 제조하였다.

[0261] DTT(5 mg, 32.4 mmol)를 칭량하여 5 mL의 pH 8.0 보레이트 완충제(25 mM 사붕산나트륨, 25 mM 염화나트륨, 1 mM EDTA) 중에 용해시켜 디티오프레이톨(DTT)(6.48 mM) 용액을 제조하였다. DTT 용액(6.48 mM, 30.9 uL, 200 nmol, 10 당량)을 항체 용액에 첨가하고, 튜브를 37°C 수조에서 2 hr 동안 가열하였다. 따뜻한 반응 혼합물을 15분마다 주기적으로 와동시켰다. 2시간 후, 분취량의 반응 혼합물(6 uL)을 취하여 엘만 티올 분석을 실시한 결과, IgG1에 대하여 가능한 총 8개의 티올 중 항체당 7.68개의 유리 티올을 보였다.

[0262] 항체 환원 혼합물을 빙조에서 4°C로 냉각시키고, 용액을 원심분리 필터(Amicon Ultra 0.5 mL 50,000 mw 컷오프)로 옮기고, 완충제를 pH 6.0 MES 완충제(50 mM)로 3회 교체하였다. [4°C에서 8 min 동안 14,000 x g). 농축된 환원된 항체를 pH 6.0 MES 완충제(50 mM)를 이용하여 640 µL로 희석하였다.

[0263] 1.80 mg, 1.74 µMole을 칭량하여 DMSO(180 uL) 중에 용해시켜 DMSO 중 테루스테칸(10 mg/mL, 9.7 mM) 스톡 용액을 제조하였다. 테루스테칸 용액(22.8 uL, DMSO 중 10 mg/mL)을 DMSO(32.3 uL)로 희석한 후, 이어서, 50 mM MES pH 6.0(50 mM, 55.1 uL)으로 추가로 희석하여 50% DMSO/50% pH 6.0 MES 완충제(50 mM) 중 2 mM 테루스테칸 용액을 만들어 50% DMSO/pH 6.0 MES 완충제(50 mM) 중 테루스테칸(2 mM, 110.2 uL, 220 nmole) 용액을 제조하였다. 테루스테칸 용액(110.1 uL, 50% DMSO/50% pH 6.0 MES 완충제, 2 mM, 73.4 nmole, 11 equiv)을 환원된 항체 640 µL가 들어 있는 튜브에 첨가하였다. 반응물을 실온에서 1시간 동안 수직 회전기에서 천천히 혼합하고, 미반응 항체가 남아 있는지 여부를 나타내는 소수성 상호작용 크로마토그래피(HIC) HPLC로 모니터링하였다. 미량의 미반응 항체의 머무름 시간을 반응 생성물과 비교하여 미반응 항체가 남아 있는지 여부를 확인하고, 남아 있다면, 반응을 계속 진행시킨다. 소규모인 경우, 시간은 전형적으로 1-2시간이다. 대규모로 제조하는 경우, 반응은 8-12시간 동안 진행시켜야 할 수 있다.

[0264] ~1시간 후, 반응물을 탈염 컬럼(Cytiva PD 미디트랩 g-25 중간, 카탈로그 번호 28918008)에서 정제하였다. 컬럼 상단의 캡을 열고, 패킹 완충제를 폐기하였다. 컬럼 하단의 캡을 열고, 중력 유통에 의해 컬럼을 기브코(Gibco) PBS pH 7.4(Ref# 10010-023)(3 x 5 mL)로 조절하였다. 항체 용액(750 uL)을 컬럼에 로딩하고, 수지 층에 완전히 들어가도록 한 후, PBS(250 uL)를 로딩하였다. 이어서, 정제된 ADC는 pH 7.4 PBS(1.25 mL)로 컬럼에서 용출시켰다. 나노드롭 단백질 농도 측정 결과, 1.25 mL PBS에서 1.76 mg/mL의 항체, 또는 초기 3.0 mg의 비접합된 항체로부터 회수된 2.2 mg(수율 73%)의 접합된 항체가 나타났다. 정제된 ADC는 370 nm 및 280 nm에서 UV-VIS 분광법으로 분석하여 약물-항체 비(DAR) 6.7을 얻었다.

[0265] **실시예 4: MN20A10-테루스테칸**

[0266] MN20A10-테루스테칸을 유사한 방식으로 제조하되, 단, 20 당량의 DTT를 이용함으로써 항체당 4.77개의 유리 티올을 얻었다. 테루스테칸과의 커플링 후, 정제된 ADC는 370 nm 및 280 nm에서 UV-VIS 분광법에 의하면 DAR은 4.60이었다.

[0267] **실시예 5: MNC2-MC-VC-PAB-MMAE**

[0268] MNC2-MC-VC-PAB-MMAE를 유사한 방식으로 제조하되, 단, 5 당량의 DTT를 이용함으로써 항체당 6.12개의 유리 티올을 얻었다. MC-VC-PAB-MMAE와의 커플링 후, 정제된 ADC는 HIC-HPLC에 의하면, DAR은 4.39이고, 248 nm 및 280 nm에서 UV-VIS 분광법에 의하면 5.12였다.

[0269] **실시예 6: MNC2-MC-VC-PAB-MMAF**

[0270] MNC2-MC-VC-PAB-MMAF를 유사한 방식으로 제조하되, 단, 5 당량의 DTT를 이용함으로써 항체당 4.53개의 유리 티올을 얻었다. MC-VC-PAB-MMAF와의 커플링 후, 정제된 ADC는 HIC-HPLC에 의하면 DAR은 3.65였다.

[0271] **실시예 7: MNC2-MC-VC-PAB-엑사테칸**

[0272] MNC2-MC-VC-PAB-엑사테칸을 유사한 방식으로 제조하되, 단, 10 당량의 DTT를 이용함으로써 항체당 6.20개의 유리 티올을 얻었다. MC-VC-PAB-엑사테칸과의 커플링 후, 정제된 ADC는 370 및 280 nm에서 UV-VIS 분광법에 의하면 DAR은 8.40이었다.

[0273] **실시예 8: MN20A10-MC-VC-PAB-MMAE**

[0274] MN20A10-MC-VC-PAB-MMAE를 유사한 방식으로 제조하되, 단, 7.5 당량의 DTT를 이용함으로써 항체당 4.08개의 유리 티올을 얻었다. MC-VC-PAB-MMAE와의 커플링 후, 정제된 ADC는 HIC-HPLC에 의하면, DAR은 3.81이고, 248 nm 및 280 nm에서 UV-VIS 분광법에 의하면 DAR은 4.11이었다.

[0275] **실시예 9: MN20A10-MC-VC-PAB-MMAF**

[0276] MN20A10-MC-VC-PAB-MMAF를 유사한 방식으로 제조하되, 단, 15 당량의 DTT를 이용함으로써 항체당 3.87개의 유리 티올을 얻었다. MC-VC-PAB-MMAF와의 커플링 후, 정제된 ADC는 HIC-HPLC에 의하면 DAR은 3.79였다.

[0277] **실시예 10. MNC2-ADC 또는 MN20A10-ADC 항체-약물-접합체의 대규모(30 mg) 제조**

[0278] 소규모 ADC 제조와 유사한 방식으로, 비접합된 항체 용액을 pH 8.0 보레이트 완충제에서 과량의 디티오프레이톨(DTT)로 환원시켰다. 2시간 동안 환원시킨 후, 엘만 티올 시험을 사용하여 분취량을 유리 티올의 존재량에 대해 시험하였다. 이어서, 환원된 항체를 pH 6.0 MES 완충제에 넣고, 유리 시스테인을 11몰 당량의 말레이미드-연결-독성제로 배합하도록 알킬화하였다. 이어서, 조 ADC를 탈염 컬럼을 통해 정제하였다.

[0279] IgG1 MNC2 항체 분취물(15.7 mL의 1.92 mg/mL, 30.1 mg, 200 nmole)을 37°C 수조에서 1분 동안 -80°C로부터 해동시켰다. 부피를 통합하고, 배경을 감소하는 작동은 오프로 설정하여 마우스 IgG1 항체를 이용하여 나노드롭으로 농도를 결정하였다. 16.17 mL 중 30 mg 항체(1.9 mg/mL 200 nmol). 용액을 3개의 원심분리 필터(Amicon Ultra 4 mL 30,000 mw 컷오프 (Ref# UFC803024))를 이용하여 농축시키고, 스윙 버킷 로터가 있는 에펜도르프(Eppendorf) 5804R 원심분리기에서 15-25분 동안 4000 g로 회전시키면서, 완충제를 pH 8.0 보레이트 완충제(25 mM 사붕산나트륨, 25 mM NaCl, 1 mM EDTA)로 3회 교체하였다. 농축된 항체를 5 mL 스크류 캡 튜브로 옮기고, pH 8.0 보레이트 완충제(25 mM 사붕산나트륨, 25 mM 염화나트륨, 1 mM EDTA)를 이용하여 3 mL가 되도록 하여 10 mg/mL 항체 용액을 제조하였다.

[0280] DTT(5 mg)를 칭량하여 pH 8.0 보레이트 완충제(5 mL)(25 mM 사붕산나트륨, 25 mM 염화나트륨, 1 mM EDTA) 중 용해시켜 DTT(6.48 mM) 용액을 제조하였다. DTT 용액(6.48 mM, 617 μ L, 4000 nmoles, 20 equiv)을 항체 용액에 첨가하고, 튜브를 37°C 진탕기 인큐베이터에서 2 hr 동안 가열하였다. 2시간 후, 엘만 티올 분석을 위해 분취량의 반응 혼합물(6 μ L)을 취하였다. 상기 분석 결과, 항체 1 mole당 7.12 mole의 유리 티올을 보였다.

[0281] 유사한 방식으로 MN20A10을 3시간 동안 총 20 당량의 DTT로 환원시키고, 유리 티올 시험을 수회 반복하였다.

[0282] 이어서, 환원된 항체의 튜브를 빙조에서 4°C로 냉각시키고, 용액을 3개의 원심분리 필터(Amicon Ultra 4 mL 30,000 mw 컷오프(Ref# UFC803024))로 동일하게 옮기고, 완충제를 pH 6.0 MES(50 mM) 완충제로 3회 교체한 후, 에펜도르프 5804R 원심분리기에서 4000 g로 15-25분 동안 회전시켰다. 농축액을 15 mL 팔콘 튜브로 옮기고, 농축기를 완충제로 2회 세정하여 pH 6.0 MES(50 mM) 완충제로 최종 부피가 6400 μ L가 되도록 만들었다.

[0283] 테루스테칸(3.4 mg, 3.29 μ Mol)을 칭량하여 DMSO(340 μ L) 중에 용해시켜 DMSO 중 테루스테칸(10 mg/mL, 9.67 mM) 스톡 용액을 제조하였다. DMSO 스톡 테루스테칸 용액(227.5 μ L의 9.67 mM, 2.22 μ Mole)을 DMSO(322.5 μ L)로 희석한 후, pH 6.0 MES(50 mM, 550 μ L)로 추가로 희석하여 50% DMSO/50 % pH 6.0 MES(50 mM) 중 1100 μ L의 2.068 mg/mL(2 mM) 테루스테칸을 만들어 50% DMSO/pH 6.0 MES(50 mM) 중 2 mM 테루스테칸 용액 1100 μ L를 제조하였다. 테루스테칸 용액(2 mM, 1000 μ L, 2200 nmole, 11 equiv)을 환원된 항체 640 μ L가 들어 있는 튜브에 첨가하였다. 반응물을 실온에서 18시간 동안 수직 회전기에서 혼합하고, 1시간 후 및 다음 날 HIC HPLC에 의해 모니터링하였다.

[0284] 18시간 후, 반응물을 탈염 컬럼(Cytiva Sephadex G-25 중간 카탈로그 번호 17003301)에서 정제하였다. 세파덱스

(Sephadex) g-25 중간 등급 겔(10.13 g)을 둥근 바닥 플라스크 중 기브코 PBS pH 7.4(Gibco 카탈로그 번호 10010-023, 50 mL)에서 실온하에 3시간 동안 팽윤시켰다. 25 g 텔레다인 이스코 레디-셉 샘플 로드 카트리지(Teledyne Isco Redi-Sep Sample Load Cartridge)(Isco 카탈로그 번호 693873240)를 링 스탠드에 부착하고, PBS를 바닥을 통해 주입하여 카트리지를 프라이밍하였다. 3시간 동안 수지를 팽윤시킨 후, 플라스크를 아르곤/진공으로 3번 진공 탈기하였다. 이어서, 팽윤된 수지를 카트리지에 붓고, 바닥의 뚜껑을 열어 PBS가 용출되도록 하였다. 둥근 바닥 플라스크를 PBS로 세척하여 모든 수지를 카트리지로 옮겼다. 폐기물 용기를 컬럼 아래에 두었다. 컬럼은 중력 유통에 의해 기브코 PBS pH 7.4(Ref# 10010-023) 3 x 50 mL로 조절하였다. 필터를 카트리지 위에 놓고, 겔을 약간만 압축하도록 주의하면서 컬럼 패키징 도구로 밀어 넣었다. 컬럼 높이는 대략 74 mm였다. 항체 용액(7500 μ L)을 컬럼에 로딩하고, 수지 베드에 완전히 들어가도록 하였다. PBS(2500 μ L)를 컬럼에 첨가하였다. 새 50 mL 팔콘 튜브를 컬럼 아래에 놓고, 정제된 ADC를 PBS pH 7.4(14 mL)로 용출시켰다. 컬럼 효율을 위해, 총 50 mL가 컬럼을 통과할 때까지, 1 mL 분획을 컬럼을 통해 통과시켰다. 수집된 용액을 나노드롭으로 분석한 결과, 항체 농도 17.5 mL PBS 중 1 mg/mL, 또는 항체 17.5 mg이고, 비접합된 MNC2로부터의 수율은 58%인 것으로 나타났다.

[0285] **실시예 11: MNC2-MMAE**

[0286] MNC2-MMAE를 유사한 방식으로 제조하되, 단, 10 당량의 DTT를 이용함으로써 항체당 6.32개의 유리 티올을 얻었다. MC-VC-PAB-MMAE와의 커플링 후, 정제된 ADC는 HIC-HPLC에 의하면, DAR은 4.10이고, 248 nm 및 280 nm에서 UV-VIS 분광법에 의하면 5.20이었다.

[0287] **실시예 12: MN20A10-MMAE**

[0288] MN20A10-MMAE를 유사한 방식으로 제조하되, 단, 20 당량의 DTT를 이용함으로써 항체당 3.67개의 유리 티올을 얻었다. MC-VC-PAB-MMAE와의 커플링 후, 정제된 ADC는 HIC-HPLC에 의하면, DAR은 2.96이고, 248 nm 및 280 nm에서 UV-VIS 분광법에 의하면 3.57이었다.

표 8

표 8: ADC DAR

실시예	ADC 설명	HIC HPLC 방법에 의한 DAR	분광법 방법에 의한 DAR	당량 DTT	유리 티올
2	MNC2- 테루스테칸 (3 mg)	-	6.7 (370/280 nm)	10	7.68
3	MN20A10- 테루스테칸 (3	-	4.6 (370/280 nm)	20	4.77
4	MNC2-MC- VC-PAB- MMAE (3 mg)	4.39	5.12 (248/280 nm)	5	6.12
5	MNC2-MC- VC-PAB- MMAF (3 mg)	3.65	-	5	4.53
6	MNC2-MC- VC-PAB- 엑사테칸 (3 mg)	-	8.40 (370/280 nm)	10	6.2
7	MN20A10- MC-VC-PAB- MMAE (3 mg)	3.81	4.11 (370/280 nm)	7.5	4.08
8	MN20A10- MC-VC-PAB- MMAF (3 mg)	3.79	-	15	3.87
9	MNC2- 테루스테칸 (30 mg)	-	4.5 (370/280 nm)	20	7.12
10	MNC2-MC- VC-PAB- MMAE (30 mg)	4.10	5.20 (248/280 nm)	10	6.32
11	MN20A10- MC-VC-PAB- MMAE (30 mg)	2.96	3.57 (248/280 nm)	20	3.67

[0289]

[0290] 일반적으로, MN20A10은 MNC2 항체와 비교하여 동일한 개수의 유리 티올을 수득하기 위해 예상치 못하게 더 많은 양의 환원제(DTT)가 필요하였다.

[0291] MN20A10은 3.67-4.2개의 유리 티올을 얻기 위해 20 당량의 DTT가 필요하였다(실시예 11 및 3).

[0292] 20 당량의 DTT로 MN20A10을 확장하였을 때, 소규모(4.2)보다 더 적은 유리 티올(3.67)이 생성되었다.

[0293] 실시예 7 및 8은 MN20A10을 환원시키는 것과 관련된 과제를 보여준다.

[0294] 실시예 7에서 7.5 당량의 DTT는 4.08개의 유리 티올을 제공한 반면, 실시예 8에서는 더 많은 DTT(15 당량)를 사용하여 유사하거나, 더 낮은 환원(3.87개의 유리 티올)을 일으켰다.

[0295] 그에 반해, MNC2는 4.5-6.1개의 유리 티올을 얻기 위해 5 당량만큼 적은 DTT가 필요하였다(실시예 5 및 4).

[0296] 반응이 최고 가능한 DAR로 이루어질 수 있도록 하기 위해 20 당량의 DTT를 MNC2-테루스테칸(3 mg 및 30 mg)에 사용하였다(실시예 2 및 9).

[0297] 결과를 실시예 2와 직접 비교하기 위해 MNC2-MC-VC-PAB-엑사테칸(실시예 6)을 10 당량의 DTT로 환원시켰다.

[0298] 실시예 13: ADC 환원에서 유리 티올 개수를 결정하기 위한 엘만 티올 시험

[0299] 40 mL의 2 mM 엘만 시약 용액을 제조하고, 31.7 mg의 엘만 시약(5,5'-디티오비스(2-니트로벤조산, ThermoScientific 카탈로그 번호 22582) 및 164 mg의 아세트산 나트륨을 40 mL의 물 중에 용해시킨다. 스톡 엘만 용액을 4°C에서 보관한다.

[0300] 환원된 항체 분취물 탈염: 스핀 컬럼(Zeba 스핀 탈염 컬럼 Ref#89882) 2개를 취하고, 바닥을 분리시키고, 캡을 푼다. 스핀 원심분리관에 넣는다. 마이크로원심분리기(Spectrafuge 24D)에서 1.5 x g로 1분 동안 회전시켜 완충제를 제거한다. 용출된 완충제를 폐기한다. 400 μ L의 완충제(pH 8.0 보레이트 완충제, 25 mM 사붕산나트륨, 25 mM NaCl, 1 mM EDTA로 구성)를 첨가하고, 5분 동안 조절한 후, 1.5 x g로 1분 동안 원심분리하여 컬럼을 조절한다. 회전 사이에 용출액을 폐기한다. 조절 및 원심분리를 반복한다.

[0301] 엘만 시약 제조: 엘만 시약 1 mL를 제조하기 위해 850 μ L의 물을 튜브에 피펫팅한다. 1 M 트리스-HCl pH 8.0 100 μ L를 첨가한 후, 상기 제조된 엘만 스톡 50 μ L를 첨가한다. 2개의 새 원심분리관(Protein LoBind Tube, Eppendorf 카탈로그 번호 022431102) 바닥에 70 μ L를 첨가하고, 하나는 샘플로, 나머지 다른 하나는 대조군으로 표지화하였다. 일단 컬럼이 조절되고 나면, 샘플 및 대조군으로 표지된 깨끗한 새 원심분리관으로 옮긴다.

[0302] 샘플 및 대조군 프랩: 희석 후 티올의 최종 농도는 10-50 μ M 범위여야 한다. 항체 환원 반응은 10 mg/mL 또는 66.7 μ M에서 실행한다. 희석은 농도를 13.3 μ M으로 만드는 5배 희석이다. 과거 데이터를 기준으로 ~0.24 mAu의 관독값은 대조군이 ~0.03일 때 항체당 ~4개의 티올에 상응할 것이다. 더 많은 당량의 환원제를 첨가한다면, 다음 티올 시험에 새 농도가 반영되어야 한다.

[0303] 시험을 실행하기 직전에 대조군 용액을 제조한다. 대조군은 항체가 없는 반응물과 동일한 농도로 DTT 또는 TCEP를 가져야 한다. 24 μ L의 보레이트 완충제(또는 적절한 완충제)를 샘플 프랩 및 대조군 프랩으로 표지된 두 튜브에 피펫팅한다. 각각의 튜브에 환원된 항체 용액 6 μ L 및 대조군 용액 6 μ L를 첨가한다. 각 튜브로부터 30 μ L를 탈염 컬럼이 있는 각각의 튜브에 천천히 로딩한다. 측면을 만지지 않고 탈염 수지의 중앙까지 액체를 분배하도록 한다. 튜브를 1.5 g로 2분 동안 회전시키고, 분광 광도계에서 412 nm에서 100 μ L 큐벳에서 통과액을 분석한다.

[0304] 티올 시험에서 항체의 농도는 $C1 \times V1 = MNC2 \times V2$ 를 사용하여 계산한다. 여기서 C1은 초기 농도(66.7 μ M)이고, V1은 샘플에서 채취한 6 μ L이며, V2는 희석된 30 μ L이다. MNC2에 대해 풀이하여 티올 검정법에서 항체 농도를 구하고, 여기서는 13.34 μ M이다. 412 nm에서의 흡광도를 사용하여 샘플 중 유리 티올 농도를 결정한다. 먼저, 대조군의 흡광도를 샘플에서 감산한다. 이어서, 대조군 감산된 흡광도를 비어스 법칙 $A=ebc$ 에 대입하고, 여기서 A는 흡광도, e는 항체의 몰 흡광도, b는 큐벳의 경로 길이, 및 c는 몰 농도이다. 엘만 시약의 몰 흡광도는 14,150 L/mol-cm이다. 큐벳의 경로 길이는 1 cm이다. 샘플에서 유리 티올의 몰 농도를 계산한다.

[0305] 일단 농도가 결정되면, 컬럼을 통과하는 30 μ L에서 엘만 시약 70 μ L로 희석물은 3.333이 된다. 희석물로 조정된 티올 농도를 항체의 농도로 나누어 항체당 유리 티올 개수를 계산한다.

[0306] 실시예 14: UV에 의한 약물-항체 비(DAR) 결정

[0307] DAR을 추정하기 위해, ADC의 UV 흡광도 비(R)를 석영 큐벳에서 248 nm 및 280 nm에서 측정한다. $R = (248 \text{ nm에서의 흡광도}) / (280 \text{ nm에서의 흡광도})$.

[0308] R의 값을 하기 방정식에 대입하고, DAR을 계산한다: $DAR = (21 \times R - 9) / (1.615 - 0.1425 \times R)$.

[0309] 실시예 15: HIC-HPLC에 의한 약물-항체 비(DAR) 결정

[0310] ADC의 DAR을 추정하는 데 사용할 수 있는 또 다른 방법은 HIC-HPLC 분석을 사용하는 것이다. 간단하면, ADC 샘플 및 비접합된 항체를 HPLC에 주입한다. 상이한 머무름 시간에서 관찰된 피크는 상이한 약물-항체 비에 상응한다. HPLC 머무름 시간과 피크 면적은 스프레드시트에서 분석되며, 여기서, 피크는 처음에 임의로 IgG1의 경우, DAR 1-8, IgG2의 경우, DAR 1-10으로 설정된다. 피크 사이의 시간은 상기 피크를 항체에 결합된 특정 개수의 약물에 상응하는 정수에 피팅하고자 하는 애널리스트와 조합하여 사용된다. 상기 프로세스는 각 DAR에 대해 수개의 상이한 ADC가 존재한다는 사실에 의해 혼동된다. 예를 들어, DAR이 1인 경우 8개의 가능한 ACD(말레이미드 결합 부위)가 있다. 일반적으로, 상이한 DAR 간의 머무름 시간의 차이는 DAR이 동일한 ACD 군 내의 머무름 시간 차이보다 크다. 애널리스트가 각 피크에 대한 DAR을 설정한 후, 피크 면적을 합산하고, 각 DAR 피크 면적의 기여도를 계산한다. 이어서, 모든 피크를 기반으로 샘플에 대한 평균 DAR을 결정한다.

- [0311] 소수성 상호 작용 크로마토그래피 및 역상 고성능 액체 크로마토그래피에 의한 약물 대 항체 비(DAR) 및 약물 로드 분포(문헌 [Jun Ouyan, Methods Mol. Biol. 2013;1045:275-83]).
- [0312] **실시예 16. xCELLigence 검정법을 통한 MNC2-ADC 또는 MN20A10-ADC에 의한 표적 세포 사멸 측정**
- [0313] 유방암 세포(T47D), 비소세포 폐암 세포(NCI-H1975) 및 췌장암 세포(HPAF II) 를 포함한 표적 암 세포의 실시간 사멸을 평가하기 위, xCELLigence RTCA MP 기기(Agilent)에서 검정법을 수행하였다. 표적 암 세포를 다중 전극 웰 플레이트에 5000개의 세포/웰(50,000개의 세포/mL 스탁 100 μ l)의 밀도로 시딩하고, 37°C/5% CO₂ 인큐베이터에서 24 hr 동안 인큐베이션시켰다. mAb MNC2 ADC 또는 mAb MN20A10-ADC를 상응하는 성장 배지에서 2X 용액으로 제조하고, 각 농도로 100 μ l씩 표적 세포에 첨가하였다. 양성 대조군(100% 세포 사멸)으로 세포를 ADC 대신 1% 트리톤 또는 1 μ M 탁솔로 처리하였다. 37°C/5% CO₂ 인큐베이터에서 40-120시간 인큐베이션시킨 후, 세포 사멸을 평가하였다. 본 검정법에서, 임피던스는 실시간으로 측정된다. 부착된 암 세포가 사멸되어 전극 표면에서 떨어지면, 임피던스(절연)가 감소한다.
- [0314] MNC2-ADC 및 MN20A10-ADC 또한 xCELLigence 기기를 사용하여 실시간으로 사멸을 모니터링함으로써 MUC1* 발현이 낮은 세포 및 MUC1* 발현이 높은 세포, 둘 모두 사멸시키는 능력에 대해서도 검정하였다. xCelligence 시스템에서, 부착성인 표적 암 세포를 전극 어레이 96 웰 플레이트에 플레이팅한다. 부착성 세포는 전극을 절연하고, 임피던스를 증가시킨다. 부착성 암 세포 개수는 임피던스에 정비례한다. 항체 및 항체-약물 접합체는 훨씬 더 작고, 임피던스에 크게 기여하지 않다. 따라서, 임피던스 증가는 암 세포의 성장을 반영하고, 임피던스 감소는 암 세포의 사멸을 반영한다.
- [0315] 유방암 세포주 T47D-wt는 낮은 수준 내지 저-중간 수준으로 MUC1*을 발현한다. 췌장암 세포주 HPAF II-wt는 더욱더 낮은 수준으로 MUC1*을 발현하고, 폐암 세포주 NCI-H1975는 더욱더 낮은 수준으로 MUC1*을 발현한다. 도 24, 도 26 및 도 27에서 알 수 있는 바와 같이, 초기 암 세포와 일치하는 낮은 수준의 MUC1*을 발현하는 상기 암 세포는 중간 나노물 용량으로 투여될 때, MNC2-ADC 및 MN20A10-ADC에 의해 효과적으로 사멸된다. 유방암 세포주 T47D-MUC1* 및 HPAF II-MUC1*은 후기 암과 일치하는 높은 수준의 MUC1*을 발현하도록 조작되었다. 도 25 및 도 28에서 알 수 있는 바와 같이, 높은 수준의 MUC1*을 발현하는 암 세포는 매우 낮은 나노물 용량에서 완전히 사멸된다. **도 49a-49d**는 낮은 수준 내지 중간 수준의 MUC1*을 발현하는 T47D 유방암 세포에서 MNC2-MMAE, MN20A10-MMAE, MNC2-MMAF 및 MN20A10-MMAF의 사멸 효능을 보여주는 것이다. 도면에서 알 수 있는 바와 같이, 항MUC1* 항체인 MNC2 및 MN20A10, 둘 모두 40시간의 시간프레임 내에 500 nM의 농도로 투여하면 표적 세포를 효과적으로 사멸시킨다. **도 49e-49j**에서 알 수 있는 바와 같이, 120시간 후에는 167 nM만큼 낮은 농도에서도 강력한 사멸이 관찰된다. 사실, MN20A10-MMAE는 56 nM에서 효과적인 사멸을 보인다. 여기서, MNC2-테루스테칸 및 MN20A10-테루스테칸을 비교하면 MNC2-MMAE, MNC2-MMAF, MN20A10-MMAE 및 MN20A10-MMAF와 동일한 농도인 167 nM에서 유사한 사멸을 나타낸다.
- [0316] 다음 실험 세트에서, MNC2-ADC 및 MN20A10-ADC를 MUC1*을 높은 수준으로 발현하는 암 세포를 사멸시키는 능력에 대해 시험한다. MUC1* 수준이 높을수록, MUC1*이 상기 세포의 성장을 구동시키는 성장 인자 수용체이기 때문에 세포를 사멸시키는 것은 더 어려운 것으로 예상된다. 예상 밖으로, 실험은 MUC1*이 많이 발현될수록, 세포를 사멸시키는 것은 더 쉽다는 것을 보여준다. **도 50a-50d**는 후기 암을 나타내는 높은 수준의 MUC1*을 발현하도록 조작된 T47D 유방암 세포가 19 nM, 심지어 6 nM의 낮은 농도에서도 MNC2-MMAE, MNC2-MMAF 및 MN20A10-MMAE에 의해 효율적으로 사멸된다는 것을 보여준다. 도 N25e-N25j에서 입증되는 바와 같이, 실험을 120시간 동안 진행하면, MNC2-MMAE, MNC2-MMAF 및 MNC2-테루스테칸의 경우, 6 nM의 낮은 농도에서도 높은 수준의 MUC1*을 발현하는 암 세포가 거의 완전히 사멸되는 것을 볼 수 있다. 더 적은 개수의 MMAF 및 테루스테칸이 부착될 수 있는 MN20A10의 경우, 19 nM 내지 167 nM의 높은 농도에서 암 세포 사멸이 관찰되었다.
- [0317] 낮은 수준의 MUC1*을 발현하는 유방암 세포와 유사하게, 훨씬 낮은 수준의 MUC1*을 발현하는 NCI-H1975 비소세포 폐암 세포는 MNC2-MMAE, MNC2-MMAF, MNC2-테루스테칸, MN20A10-MMAE, 또는 MN20A10-MMAF로 처리되었을 때, 40시간에서 정체를 겪지만, 120시간에서는 사멸한다(**도 51a-도 51i**). 낮은 수준이지만, H1975 폐암 세포보다 높은 MUC1*을 발현하는 HPAF II-wt 췌장암 세포는 40시간째에 167 nM 내지 500 nM 농도의 MNC2-MMAE, MNC2-MMAF, MN20A10-MMAE 및 MN20A10-MMAF에 의해 사멸되고, 120시간 후에는 56 nM 농도에서 사멸이 개선된다(**도 52a-도 52i**). 그러나, 췌장 세포가 높은 수준의 MUC1*을 발현하도록 조작된 경우, MNC2-ADC 및 MN20A10-ADC는 암 세포를 사멸하는 데 훨씬 더 강력하다. 약 40시간 후, 167 nM 내지 56 nM 사이의 농도에서 암 세포의 거의 완전한 사멸이 관찰되고, 120시간 후, 19 nM 내지 56 nM 사이의 농도에서 거의 완전한 사멸이 달성된다(**도 53a-도 53i**).

- [0318] 이어서, 독소 엑사테칸은 도 N4e-N4h에 제시된 바와 같이, 말레이미도카프로일, 발린-시트룰린, 및 파라-아미노벤질을 포함하는 링커를 통해 MNC2에 접합되었다. 추가로, 접합은 프로필렌 글리콜 MES pH 6.0 완충제를 포함하는 용액 중에서 수행되었다.
- [0319] 도 65a-65d에서 입증된 바와 같이, 동물에 이식된 종양 세포는 종양이 초기에서 후기로 발달함에 따라 MUC1* 발현을 크게 증가시킨다. 이식된 종양 세포는 T47D-wt 유방암 세포로, 수십 년 전에 사망한 유방암 환자로부터 유래한 세포주이다. ATCC가 제공한 이 세포주는 수백만 번이 아니라면 수천 번 확장된 것이다. 본질적으로 모든 T47D 세포는 동일한다. 0일째 세포 염색은 세포가 MUC1*보다 더 많은 전장 MUC1을 발현하고, 더 많은 전장 MUC1을 발현하고, 염색 강도가 약하여 MUC1* 수용체 개수가 적다는 것을 나타내며, 이는 초기 암이라는 것을 시사하는 것이다. 인간 시간으로 대략 7년과 같은, 종양 이식 후 육십이일째(62), 발현 정도와 발현 강도 측면에서 MUC1* 발현이 낮은 발현에서 후기 종양의 높은 발현으로 극적으로 이동한 것을 쉽게 알 수 있다. 그에 반해, 일련의 종양 절편의 염색은 표면 발현 후 MUC1*로 절단되기 때문에 예상대로 전장 MUC1이 발현되었음을 보여준다. 그러나, 염색 강도는 증가하지 않았는데, 이는 발현된 MUC1의 대부분이 후기 종양에서 성장 인자 수용체 형태인 MUC1*로 절단되었음을 나타낸다.
- [0320] 암 임상의 및 병리학자에게 공지된 바와 같이, 환자에서 발생하는 종양은 세포주와 같이 단일 클론의 균질한 집단이 아니다. 실제 종양은 항원 발현이 낮은 세포 뿐만 아니라, 항원 발현이 높은 세포로 구성되어 있다는 점에서 다소 이질적이다. 그러나, 초기 암은 대다수의 세포가 낮은 발현자인 것을 특징으로 하는 반면, 후기 암은 대다수의 세포가 높은 발현자인 것을 특징으로 한다는 것도 공지되어 있다.
- [0321] **실시예 17. 프레스토블루 생/죽은 세포 검정법을 통한 MNC2-ADC 또는 MN20A10-ADC에 의한 표적 세포 사멸 측정**
- [0322] 47D 유방암 세포 NCI-H1975 비소세포 폐암 세포 및 HPAFII 췌장암 세포를 비롯한 표적 암 세포에 대한 mAb MNC2-ADC 및 mAb MN20A10-ADC의 사멸 활성을 측정하는 또 다른 방법은 프레스토블루 생/죽은 세포 검정법(ThermoFisher)을 사용하는 것이다. 표적 암 세포를 검은 벽, 투명 바닥 96 웰 조직 배양 플레이트에 5000개의 세포/웰(50,000개의 세포/mL 스톱 100 μ L)의 밀도로 시딩하고, 37°C/5%CO₂ 인큐베이터에서 밤새도록 동안 인큐베이션시켰다. MNC2 ADC 및 MN20A10 ADC를 상응하는 암 세포 성장 배지에서 2X 용액으로 제조하고, 각 농도로 100 μ L씩 표적 암 세포에 첨가하였다. 양성 대조군(100% 사멸)으로 암 세포를 ADC 대신 1 μ M 탁솔로 처리하였다. 37°C/5% CO₂ 인큐베이터에서 72시간 - 120시간 인큐베이션시킨 후, 프레스토블루 HS 검정법(ThermoFisher)을 사용하여 형광으로 세포 생존능을 측정하였다. 간략하면, 인큐베이션 기간 후, 20 μ L의 프레스토블루 HS 용액을 첨가하였다. 형광(Ex 560 nm/Em 590 nm)은 30-90 min. 인큐베이션 후에 테칸(Tecan) 플레이트 리더를 사용하여 기록하였다. 프레스토블루 HS 염색으로 생존능(%)을 결정하고, 1 μ M 탁솔 처리된 세포에 대해 정규화하였다.
- [0323] 정규화된 형광 값을 그래프 프로그램인 Sigma Plot으로 불러오고, 데이터는 MNC2-ADC 또는 MN20A10-ADC 농도 대 정규화된 형광 신호로 플롯팅하고, 4-파라미터 Hill 방정식: $f = y_0 + a \cdot x^b / (c^b + x^b)$ 를 사용하여 곡선을 피팅하였다.
- [0324] IC50 값은 표적 암 세포에 대한 MNC2-ADC 및 MN20A10-ADC의 사멸 능력에 대한 피팅된 데이터로부터 계산하였고, nM 단위로 기록된다.
- [0325] 표적 세포 사멸 또는 암 세포 형태의 변화를 시각적으로 평가하기 위해, T47D 유방암 세포, NCI-H1975 비소세포 폐암 세포 및 HPAFII 췌장암 세포를 비롯한 표적 암 세포의 명시야 이미지를 명시된 MNC2-ADC 또는 MN20A10-ADC 농도에서 120시간 인큐베이션시킨 후 올림푸스(Olympus) IX-71 현미경에서 4x 또는 20x 배율로 촬영하였다.
- [0326] **도 46a - 도 48n**은 MNC2-ADC 또는 MN20A10-ADC로 처리한 후 다양한 유형의 암 세포의 확대 사진을 보여주는 것이다. 사멸 효과는 세포수의 유의적인 감소, 특징적인 평평하고, 퍼진 형태에서 둥글게 원형화되는 형태로의 세포 형태 변화, 및 세포 리프팅 오프로 쉽게 볼 수 있다. 반대로, 대조군 웰은 정상적인 평평하고, 퍼지는 형태를 가진 조밀한 세포로 이루어진 전면생장 단층으로, 죽은 부유 세포 없이 나타난다. **도 46a-46c** 및 **도 46g-46f**는 MNC2-MMAE로 처리된 T47D-MUC1* 유방암 세포를 보여주는 것이다. **도 46d-46f** 및 **도 46g-46j**는 MNC2-테루스테칸으로 처리된 T47D-MUC1* 유방암 세포를 보여주는 것이다. **도 47a-47b**는 MNC2-MMAE로 처리된 DU145 호르몬 저항성 전립선암 세포를 보여주는 것이다. **도 47c-47d**는 MNC2-테루스테칸으로 처리된 DU145 호르몬 저항성 전립선암 세포를 보여주는 것이다. **도 48a-48b** 및 **도 48g-48h**는 MN20A10-MMAE로 처리된 T47D-MUC1* 유방암 세포를 보여주는 것이다. **도 48c-48d** 및 **도 48i-48j**는 MN20A10-테루스테칸으로 처리된 T47D-MUC1* 유방암 세포를 보여주는 것이다. **도 48k-48l**은 MN20A10-MMAE로 처리된 DU145 호르몬 저항성 전립선암 세포를 보여주는 것이다. **도**

48m-48n은 MN20A10-테록스테칸으로 처리된 DU145 호르몬 저항성 전립선암 세포를 보여주는 것이다. 시각적으로 알 수 있는 바와 같이, 도 46a-48n에 제시된 항MUC1*-ADC의 사멸 효과는 도 38a-45d에 제시된 유세포 분석법으로 측정된 사멸과 일치한다.

[0327] 실시예 18. 동물 연구: MNC2-ADC 또는 MN20A10-ADC에 의한 생체내 표적 세포 사멸 측정

[0328] MNC2-ADC 또는 MN20A10-ADC에 의한 이중이식 표적 암 세포 사멸을 측정하기 위해 생체내 실험을 수행하였다.

[0329] 유방암 이중이식의 경우, 이전에 90일 방출 에스트로젠 펠릿(Innovative Research Laboratories)을 이식받은 암컷 NOD/SCID 마우스(체중 18-22 g, 6-8주령, Charles River Laboratories)에 이소플루란 마취(ISOTHEsia, 250 ml(HENRY SCHEN, NDC: 11695-6776-2))하에 분리형 바늘을 포함하는 BD 26G 인슐린 시린지(BD 26G Insulin Syringes with Detachable Needle)(Fisher 카탈로그: 329652) 또는 BD 28G 저용량 U-100 인슐린 시린지(BD 28G Lo-Dose U-100 Insulin Syringes)(Fisher 카탈로그: 329461)를 사용하여 MUC1*을 중간 수준 내지 높은 수준으로 발현하는 100만 개의 루시페라제-mCherry 양성 T47D 유방암 세포(ATCC)를 피하 주사하였다.

[0330] 폐암 이중이식 또는 췌장암 이중이식의 경우, 암컷 NU/NU 마우스(체중 18-22 g, 6-8주령, Charles River Laboratories)에 이소플루란 마취(ISOTHEsia, 250 ml(HENRY SCHEN, NDC: 11695-6776-2))하에 낮은 수준 내지 중간 수준의 MUC1*을 발현하는 100만 개의 100만 개의 루시페라제-mCherry 양성 NCI-H1975 비소세포 폐암 세포(ATCC) 또는 100만 개의 루시페라제-mCherry 양성 HPAFII 췌장암 세포(ATCC)를 주사하였다.

[0331] 이중이식 후 4-6일 후, 마우스의 목덜미에 150 μ l, 30 mg/mL, D-루시페린(XenoLight™ D-Luciferin Potassium Salt; PerkinElmer P/N 122799)을 복강내 주사한 후, 제노젠 IVIS-스펙트럼(Xenogen IVIS-Spectrum) 시스템(Perkin Elmer)을 사용하여 생물발광 이미지 획득 전에 이소플루란으로 마취하였다. 모의 처리군 및 ADC 처리군의 초기 종양 크기가 동일하도록 하기 위해 이중이식 마우스가 고르게 분포하도록 군 선택을 수행하였다.

[0332] 이중이식 후 5-7일 후, 마우스에 포스페이트 완충처리된 염수(PBS: phosphate-buffered saline) 또는 5-10 mg/kg MNC2-ADC 또는 5-10 mg/kg MN20A10-ADC를 복강내 주사하였다. 그 후 마우스에 주 1회 주사하여 총 4회에 걸쳐 MNC2-ADC 또는 MN20A10-ADC를 주사하였다.

[0333] 생물발광 이미지화를 주 1회 수행하여 실시간으로 비침습적으로 종양 성장을 측정하였다. 데이터는 종양 이식 후 경과일수의 함수로 래디언스(포톤/sec)로 그래픽으로 표현하였다.

[0334] 종양 성장의 일부 측정에서, 마우스의 종양을 캘리퍼 측정하였다. 2명의 독립 관찰자가 각 이중이식 종양의 x/y 평면에서 가장 긴 두 수직 축을 0.1 mm까지 측정하였다. 깊이는 y로 정의된 수직 축 중 가장 짧은 축과 동일하다고 가정하였다. 마우스가 의식이 있는 동안 디지털 버니어 캘리퍼를 사용하여 측정하고, 하기 방정식에 따라 계산하였다. 이중이식편 부피 = $xy^2/2$.

[0335] 안락사에 대한 인도적 기준은 하기와 같았다: 종양 부담이 직경 20 mm에 도달하거나, 또는 그를 초과한 경우(IACUC 정책에 따라), 종양이 궤양화되거나, 또는 종양 위치가 정상적인 보행, 수유/음용/또는 배설에 방해가 되는 경우; 신체 상태 점수가 2 또는 이중이식 전 체중 대비 체중 감소가 >15%인 경우.

[0336] 일부는 낮은 수준의 MUC1*을 발현하고, 나머지는 높은 수준의 MUC1*을 발현한 여러 상이한 타입의 인간 암을 이식받은 면역이 손상된 마우스에서 MNC2-ADC 및 MN20A10-ADC의 사멸 효능을 평가하기 위해 생체내 실험 또한 수행하였다. 모든 경우에서, 인간 암 세포주는 mCherry 및 루시페라제 또한 발현하도록 조작되었고, 이로써 생물발광에 의해 종양을 측정할 수 있었다. 종양 부피를 광학적으로 측정하기 위해, 루시페라제 기질인 루시페린을 동물에 주사하고, 루시페린 주사 후 10분 이내에 IVIS 기기에서 생물발광을 사진 촬영한다. 일부 경우에는 루시페라제의 발현 수준이 크게 달랐고, 이에 상이한 세포주 간에 종양 크기를 비교하기는 어려웠다. 이러한 경우, 종양을 캘리퍼 측정하여 세포주 간의 종양 크기를 비교할 수 있었다. 추가로, 이러한 경우 동물을 사진 촬영하여 세포주 간의 종양 크기를 육안으로 비교할 수 있도록 하였다.

[0337] 한 실험에서, 90일 에스트로젠 방출 펠릿을 보유하는 암컷 NOD/SCID/GAMMA(NSG) 마우스에 MNC2-MMAE를 투여한 후, 이어서, 낮은 수준 내지 중간 수준의 MUC1*을 발현하는 (초기 암 시사) 1 M T47D-wt 유방암 세포, 또는 높은 수준의 MUC1*을 발현하도록 조작된 1 M T47D-MUC1* 세포 (후기 암 시사)를 이식하였다. 종양은 5 mg/kg의 용량으로 MNC2-MMAE를 처음 주사하기 전에 칠일(7) 동안 이식되도록 하였다. 14일째 및 20일째 용량을 10 mg/kg으로 증가시켰다. 먼저, 낮은 수준의 MUC1*을 발현하는 T47D-wt 종양을 마우스에 이식하였다. 도 57a의 대조군 마우스를 도 57b의 MNC2-MMAE 처리된 마우스와 비교하면, 처리된 마우스는 실험이 종료되는 56일째까지 종양 부담이 거의 없이 생존하였다는 것을 쉽게 알 수 있다. 그에 반해, 비처리된 대조군 마우스에서의 종양은 과도한 종

양 부담으로 인해 56일째에 희생되어야 할 때까지 계속 성장하였다. 이어서, 높은 수준의 MUC1*을 발현하는 T47D-MUC1* 종양을 이식받은 마우스를 리뷰하였다. T47D-wt를 이식받은 대조군 동물(도 57a 및 도 57e)의 생물 발광을 T47D-MUC1*을 이식받은 동물(도 57c 및 도 57f)의 생물발광과 비교하였을 때, T47D-MUC1* 세포주는 T47D-wt 세포주보다 루시페라제를 약간 적게 발현한다. 그러나, 종양을 시각적으로 검사한 결과, 두 세포주 간에 종양 크기는 유사한 것으로 나타났다. T47D-wt 종양을 보유하는 동물과 동일한 스케줄에 따라 T47D-MUC1* 종양을 보유하는 동물에 MNC2-MMAE를 투여하였다. 그러나, 도 57d를 보면, MNC2-MMAE 처리된 동물은 34일째부터, 대조군 마우스는 종양 부담이 너무 커서 희생시켜야 했기 때문에 시험을 종료한 시점인 56일째까지 종양이 없는 것이 분명하다. 이 동일한 실험을 병행하여 수행하였지만, 동물에 MN20A10-MMAE를 투여하였다(도 58a-58f). MN20A10-MMAE 결과는 MNC2-MMAE 결과와 동일한 추세를 따르되, 단, 여기서는 MNC2-MMAE가 MN20A10보다 더 효과적이다. 이러한 차이에 대한 한 가지 가능한 설명은 MNC2 항체에 부착된 독소 개수(DAR 3.85)와 MN20A10에 부착된 독소 개수(DAR 2.96)의 차이이다.

[0338] 또 다른 실험에서, 암컷 nu/nu 마우스에 낮은 수준 내지 중간 수준의 MUC1*을 발현하는 (초기 암 시사) 1 M 인간 NCI-H1975 비소세포 폐암 세포를 이식하였다. 종양 이식 후 7일째 및 14일째, 동물에 MNC2-MMAE를 5 mg/kg으로 주사하였다. 19일째, 용량을 10 mg/kg으로 증가시켰다. 생물발광 사진에 따르면, 19일째 및 27일째 MNC2-MMAE 용량을 10 mg/kg으로 증가시키기에 따라 종양 세포 사멸이 증가하였다는 것을 명백히 알 수 있다(도 5a-59c). 대조군에서 희생된 동물의 종양 중량과 처리군의 종양 중량을 비교하면 MNC2-MMAE 치료의 효능을 알 수 있다. 대조군 동물은 종양 크기가 생명을 위협하였기 때문에, 이식 후 20일째에 희생시켜야 했으며, 여기서, 종양 중량은 0.82, 0.3, 0.49, 0.41 및 0.5 g이었다. 그에 반해, 54일째 처리군에서 희생시켜야 하는 동물에서의 종양은 0.28 및 0.4 g이었다. 처리군에서 2마리 마우스는 실험을 임의대로 종료한 시점인 67일째 종양이 없는 상태를 유지하였다. 동물을 MN20A10-MMAE로 처리한 병행 실험의 결과(도 60a-60d)는 동일한 경향을 보였지만, MN20A10-MMAE는 MNC2-MMAE보다 지대한 영향을 미치는 정도는 더 작았는데, 그 이유는 아마도 MN20A10-MMAE의 DAR이 더 낮기 때문일 수 있다. 또한, 생물발광 사진 뿐만 아니라, 26일째 희생시켜야 했던 대조군 동물로부터 절제된 종양 중량에서 알 수 있는 바와 같이, 처리가 종양 성장을 시켰다. 종양 중량 범위는 2.2 g 내지 0.65 g이었다. 도 60d의 그래프는 19일째 용량을 10 mg/kg으로 증가시킨 후 종양 부피가 극적으로 하향 감소하였다는 것을 보여준다. 본 데이터는 발병 시 용량이 더 높았다면, 종양 성장이 더 극적으로 감소했을 것임을 시사한다.

[0339] 추가의 또 다른 실험에서, 낮은 수준 내지 중간 수준의 MUC1*을 발현하는 (초기 암 시사) 0.5 M HPAF II-wt 췌장암 세포, 또는 높은 수준의 MUC1*을 발현하도록 (후기 암 시사) 조작된 0.5 M HPAF II-MUC1* 췌장암 세포를 이식받은 암컷 nu/nu(NSG) 마우스에 MNC2-MMAE를 투여하였다. 종양은 5일째, 12일째, 및 19일째 10 mg/kg의 용량으로 MNC2-MMAE를 삼회(3) 주사하기 전에 오일(5) 동안 이식되도록 하였다. 먼저, 낮은 수준의 MUC1*을 발현하는 HPAF II-wt 종양을 이식받은 마우스를 시험하였다. 도 61a의 대조군 마우스를 도 61b의 MNC2-MMAE를 MNC2-MMAE 처리된 마우스와 비교하면, 18일째, 처리된 마우스의 종양이 대조군 마우스보다 작다는 것을 쉽게 알 수 있다. 25일째 IVIS 기기가 오작동함에 따라 대조군 동물의 판독값이 인위적으로 낮아졌다. 이러한 이유로 25일째에 캘리퍼 측정도 수행하였다. 도 61h에서 알 수 있는 바와 같이, 캘리퍼로 측정한 평균 종양 부피는 대조군 동물과 HPAF II-wt 종양을 이식받은 처리된 동물 사이에 큰 차이가 있다.

[0340] 이어서, 높은 수준의 MUC1*을 발현하는 T47D-MUC1* 종양을 이식받은 마우스를 시험하였다. T47D-wt를 이식받은 대조군 동물(도 57a 및 도 57e)의 생물발광을 T47D-MUC1*을 이식받은 동물(도 57c 및 도 57f)의 생물발광과 비교하였을 때, T47D-MUC1* 세포주는 T47D-wt 세포주보다 루시페라제를 약간 적게 발현한다. 그러나, 종양을 시각적으로 검사한 결과, 두 세포주 간에 종양 크기는 유사한 것으로 나타났다. T47D-wt 종양을 보유하는 동물과 동일한 스케줄에 따라 T47D-MUC1* 종양을 보유하는 동물에 MNC2-MMAE를 투여하였다. 그러나, 도 57d를 보면, MNC2-MMAE 처리된 동물은 34일째부터, 대조군 마우스는 종양 부담이 너무 커서 희생시켜야 했기 때문에 시험을 종료한 시점인 56일째까지 종양이 없는 것이 분명하다.

[0341] 실시양태

[0342] 실시양태 1. 하기 화학식 (I)에 대한 집합체:

[0343] $[Ab]-[Z-L-R-X]_y$ 화학식 (I)

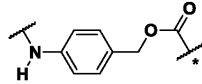
[0344] 상기 식에서, X는 토포이소머라제 I을 억제할 수 있는 화합물 또는 튜불린 형성을 억제할 수 있는 화합물로부터 유래된 모이어티이고; R은 커플링 모이어티이고; L은 N-말단에 Z가 결합되어 있고 C-말단에 R이 결합되어 있는, 디- 또는 트리- 또는 테트라-펩티드 연결 모이어티이고; [Ab]는 3개의 중쇄(HC) 상보성 결정 영역(CDR): MUC1*

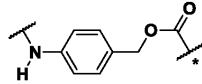
HC-CDR1, MUC1* HC-CDR2, 및 MUC1* HC-CDR3을 포함하는 항MUC1* 결합 도메인을 포함하는 항체이고; 여기서, MUC1* 결합 도메인의 MUC1* HC-CDR1, MUC1* HC-CDR2, 및 MUC1* HC-CDR3은 표 1에 기재된 것으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하고; 여기서, MUC1* 결합 도메인은 3개의 경쇄(LC) 상보성 결정 영역(CDR): MUC1* LC-CDR1, MUC1* LC-CDR2, 및 MUC1* LC-CDR3을 포함하고; 여기서, MUC1* 결합 도메인의 MUC1* LC-CDR1, MUC1* LC-CDR2, 및 MUC1* LC-CDR3은 표 1에 기재된 것으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하고; Z는 시스테인 잔기의 황 원자와 공유 결합을 형성할 수 있는 접합 모이어티이고; 여기서, y는 1 내지 10의 정수이다.

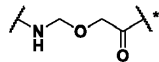
[0345] 실시양태 2. 실시양태 1에 있어서, L이 발린 및 시트룰린을 포함하는 접합체.

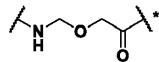
[0346] 실시양태 3. 실시양태 1에 있어서, L이 글리신 및 페닐알라닌을 포함하는 접합체.

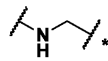
[0347] 실시양태 4. 실시양태 1에 있어서, R이 파라-아미노벤질을 포함하는 접합체.

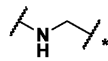


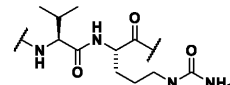
[0348] 실시양태 5. 실시양태 1에 있어서, R이 의 구조를 포함하는 모이어티를 포함하고, 여기서, *는 X 기에 대한 부착 지점을 나타내는 접합체.

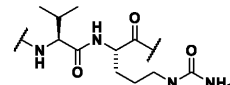


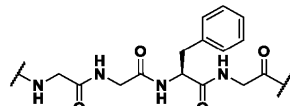
[0349] 실시양태 6. 실시양태 1에 있어서, R이 의 구조를 포함하는 모이어티를 포함하고, 여기서, *는 X 기에 대한 부착 지점을 나타내는 접합체.

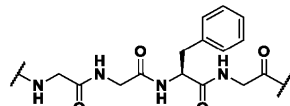


[0350] 실시양태 7. 실시양태 1에 있어서, R이 의 구조를 포함하는 모이어티를 포함하고, 여기서, *는 X 기에 대한 부착 지점을 나타내는 접합체.



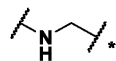
[0351] 실시양태 8. 실시양태 1에 있어서, L이 의 구조를 포함하는 디펩티드 연결 모이어티인 접합체.

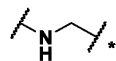


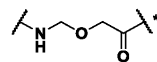
[0352] 실시양태 9. 실시양태 1에 있어서, L이 의 구조를 포함하는 테트라-펩티드 연결 모이어티인 접합체.

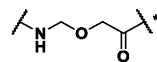
[0353] 실시양태 10. 실시양태 1에 있어서, X가 MMAE 또는 MMAF인 접합체.

[0354] 실시양태 11. 실시양태 1에 있어서, X가 엑사테칸 또는 Dxd인 접합체.



[0355] 실시양태 12. 실시양태 1에 있어서, R이 의 구조를 포함하는 모이어티를 포함하고, 여기서, *는 X 기에 대한 부착 지점을 나타내고, 여기서, X는 Dxd인 접합체.



[0356] 실시양태 13. 실시양태 1에 있어서, R이 의 구조를 포함하는 모이어티를 포함하고, 여기서, *는 X 기에 대한 부착 지점을 나타내고, 여기서, X는 엑사테칸인 접합체.

[0357] 실시양태 14. 실시양태 1에 있어서, 항체가 이소타입 IgG1 또는 IgG2인 접합체.

[0358] 실시양태 15. 실시양태 1에 있어서, 항체가 이소타입 IgG2b인 접합체.

[0359] 실시양태 16. 실시양태 1에 있어서, 항MUC1* 결합 도메인이 서열 번호 38 또는 44로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 약 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%,

97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 서열을 포함하는 중쇄를 포함하는 접합체.

[0360] 실시양태 17. 실시양태 1에 있어서, 항MUC1* 결합 도메인이 서열 번호 39 또는 45로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 약 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 서열을 포함하는 중쇄 가변 도메인을 포함하는 접합체.

[0361] 실시양태 18. 실시양태 1에 있어서, 항MUC1* 결합 도메인이 서열 번호 41 또는 47로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 약 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 서열을 포함하는 경쇄를 포함하는 접합체.

[0362] 실시양태 19. 실시양태 1에 있어서, 항MUC1* 결합 도메인이 서열 번호 42 또는 48로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 약 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함하는 접합체.

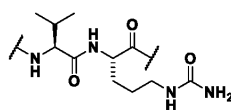
[0363] 실시양태 20. 실시양태 1에 있어서, 항MUC1* 결합 도메인이 서열 번호 129 또는 130으로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 약 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 서열을 포함하는 단일 쇄 가변 단편(scFv)을 포함하는 접합체.

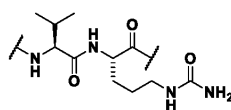
[0364] 실시양태 21. 항MUC1* 결합 도메인을 포함하는 항체를 포함하는 항체 접합체로서, 여기서, 항체는 말레이미드-시스테인 결합을 통해 페이로드에 접합되고, 여기서, 페이로드는 링커 및 세포독성 화합물을 포함하고, 여기서, 세포독성 화합물은 튜블린 억제제 또는 토포이소머라제 I 억제제를 포함하는 것인, 항체 접합체.

[0365] 실시양태 22. 링커가 발린을 포함하는 항체 접합체.

[0366] 실시양태 23. 링커가 시트룰린을 포함하는 항체 접합체.

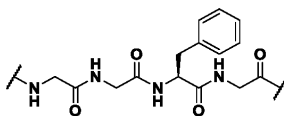
[0367] 실시양태 24. 실시양태 21에 있어서, 링커가 발린 및 시트룰린을 포함하는 항체 접합체.

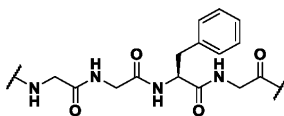


[0368] 실시양태 25. 실시양태 21에 있어서, 링커가 의 구조를 포함하는 디펩티드 연결 모이어티인 항체 접합체.

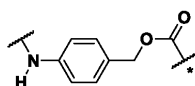
[0369] 실시양태 26. 실시양태 21에 있어서, 링커가 적어도 하나의 글리신을 포함하는 항체 접합체.

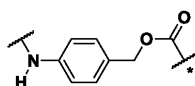
[0370] 실시양태 27. 실시양태 21에 있어서, 링커가 적어도 하나의 글리신 및 페닐알라닌을 포함하는 항체 접합체.

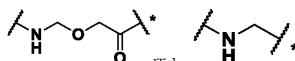


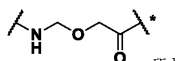
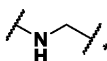
[0371] 실시양태 28. 실시양태 21에 있어서, 링커가 의 구조를 포함하는 항체 접합체.

[0372] 실시양태 29. 실시양태 21에 있어서, 링커가 파라-아미노벤질을 포함하는 항체 접합체.



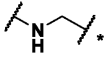
[0373] 실시양태 30. 실시양태 21에 있어서, 링커가 구조 의 기를 포함하고, 여기서, *는 세포독성 기에 대한 부착 지점을 나타내는 항체 접합체.

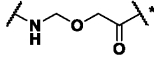


[0374] 실시양태 31. 실시양태 21에 있어서, 링커가 구조  또는 의 기를 포함하고, 여기서, *는 세포독성 기에 대한 부착 지점을 나타내는 항체 접합체.

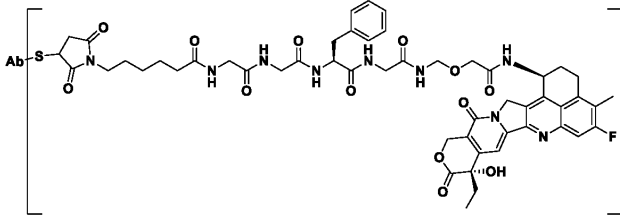
[0375] 실시양태 32. 실시양태 21에 있어서, 튜블린 억제제가 MMAE 또는 MMAF인 항체 접합체.

[0376] 실시양태 33. 실시양태 21에 있어서, 토포이소머라제 I 억제제가 엑사테칸 또는 데루스테칸, 또는 그의 유도체인 항체 접합체.

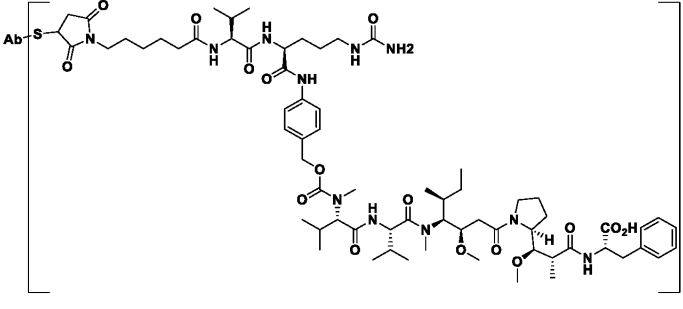
[0377] 실시양태 34. 실시양태 21에 있어서, 링커가 의 구조를 포함하는 기를 포함하고, 여기서, *는 세포독성 기에 대한 부착 지점을 나타내고, 여기서, 토포이소머라제 I 억제제는 Dxd인 항체 접합체.

[0378] 실시양태 35. 실시양태 21에 있어서, 링커가 의 구조를 포함하는 기를 포함하고, 여기서, *는 세포독성 기에 대한 부착 지점을 나타내고, 여기서, 토포이소머라제 I 억제제는 엑사테칸인 항체 접합체.

[0379] 실시양태 36. 실시양태 21에 있어서, 하기 제공되는 구조를 포함하고, 여기서, n은 1 내지 10인 항체 접합체:

[0380] 

[0381] 실시양태 37. 실시양태 21에 있어서, 하기 제공되는 구조를 포함하고, 여기서, n은 1 내지 10인 항체 접합체:

[0382] 

[0383] 실시양태 38. 실시양태 21에 있어서, 항체 이소타입이 IgG1 또는 IgG2인 항체 접합체.

[0384] 실시양태 39. 실시양태 21에 있어서, 항체 이소타입이 IgG2b인 항체 접합체.

[0385] 실시양태 40. 실시양태 21에 있어서, 항체가 적어도 2개의 페이로드에 접합되는 항체 접합체.

[0386] 실시양태 41. 실시양태 21에 있어서, 항체가 적어도 3개의 페이로드에 접합되는 항체 접합체.

[0387] 실시양태 42. 실시양태 21에 있어서, 항체가 적어도 4개의 페이로드에 접합되는 항체 접합체.

[0388] 실시양태 43. 실시양태 21에 있어서, 항체가 적어도 5개의 페이로드에 접합되는 항체 접합체.

[0389] 실시양태 44. 실시양태 21에 있어서, 항체가 적어도 6개의 페이로드에 접합되는 항체 접합체.

[0390] 실시양태 45. 실시양태 21에 있어서, 항체가 적어도 7개의 페이로드에 접합되는 항체 접합체.

[0391] 실시양태 46. 실시양태 21에 있어서, 항체가 적어도 8개의 페이로드에 접합되는 항체 접합체.

[0392] 실시양태 47. 실시양태 21에 있어서, 항MUC1* 결합 도메인이 3개의 경쇄(LC) 상보성 결정 영역(CDR): LC-CDR1, LC-CDR2, 및 LC-CDR3을 포함하고; 여기서, MUC1* 결합 도메인의 LC-CDR1, LC-CDR2, 및 LC-CDR3은 표 1에 기재된 것으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하고; 여기서, LC-CDR1, LC-CDR2 및 LC-CDR3 중 적어도 하나는 0-2개의 아미노산 변형(들)을 포함하는 항체 접합체.

[0393] 실시양태 48. 실시양태 21에 있어서, 항MUC1* 결합 도메인이 3개의 중쇄(HC) 상보성 결정 영역(CDR): HC-CDR1, HC-CDR2, 및 HC-CDR3을 포함하고; 여기서, MUC1* 결합 도메인의 HC-CDR1, HC-CDR2, 및 HC-CDR3은 표 1에 기재된 것으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하고; 여기서, HC-CDR1, HC-CDR2 및 HC-CDR3 중 적어도 하나는 0-2개의 아미노산 변형(들)을 포함하는 항체 접합체.

[0394] 실시양태 49. 실시양태 21에 있어서, 항MUC1* 결합 도메인이 표 2에 기재된 서열과 적어도 약 80%, 81%, 82%,

83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 서열을 포함하는 중쇄 가변 도메인을 포함하는 항체 접합체.

[0395] 실시양태 50. 실시양태 21에 있어서, 항MUC1* 결합 도메인이 표 2에 기재된 서열과 적어도 약 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함하는 항체 접합체.

[0396] 실시양태 51. 실시양태 21에 있어서, 항MUC1* 결합 도메인이 표 3에 기재된 서열과 적어도 약 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 서열을 포함하는 단일 쇠 가변 단편(scFv)을 포함하는 항체 접합체.

[0397] 실시양태 52. MUC1* 결합 도메인 및 CD3 결합 도메인을 포함하는 항체로서,

[0398] 여기서, MUC1* 결합 도메인은 3개의 중쇄(HC) 상보성 결정 영역(CDR): MUC1* HC-CDR1, MUC1* HC-CDR2, 및 MUC1* HC-CDR3을 포함하고; 여기서, MUC1* HC-CDR1은 서열 번호 1의 아미노산 서열을 포함하고, MUC1* HC-CDR2는 서열 번호 2의 아미노산 서열을 포함하고, MUC1* HC-CDR3은 서열 번호 3의 아미노산 서열을 포함하고; 여기서, MUC1* 결합 도메인은 3개의 경쇄(LC) 상보성 결정 영역(CDR): MUC1* LC-CDR1, MUC1* LC-CDR2, 및 MUC1* LC-CDR3을 포함하고; 여기서, MUC1* LC-CDR1은 서열 번호 13의 아미노산 서열을 포함하고, MUC1* LC-CDR2는 서열 번호 14의 아미노산 서열을 포함하고, MUC1* LC-CDR3은 서열 번호 15의 아미노산 서열을 포함하고; 여기서, CD3 결합 도메인은 3개의 중쇄(HC) 상보성 결정 영역(CDR): CD3 HC-CDR1, CD3 HC-CDR2, 및 CD3 HC-CDR3을 포함하고; 여기서, CD3 결합 도메인의 CD3 HC-CDR1, CD3 HC-CDR2, 및 CD3 HC-CDR3은 표 2에 기재된 것으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하고; 여기서, CD3 결합 도메인은 3개의 경쇄(LC) 상보성 결정 영역(CDR): CD3 LC-CDR1, CD3 LC-CDR2, 및 CD3 LC-CDR3을 포함하고; 여기서, CD3 결합 도메인의 CD3 LC-CDR1, CD3 LC-CDR2, 및 CD3 LC-CDR3은 표 4에 기재된 것으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 항체.

[0399] 실시양태 53. 실시양태 52에 있어서, 항체가 Fc 도메인을 포함하는 항체.

[0400] 실시양태 54. 실시양태 52에 있어서, Fc 도메인이 이중이량체 Fc 도메인인 항체.

[0401] 실시양태 55. 실시양태 52에 있어서, 이중이량체 Fc 도메인이 좁 쇠 및 홀 쇠를 포함하여 좁-인투-홀(KiH) 구조를 형성하는 항체.

[0402] 실시양태 56. 실시양태 55에 있어서, 좁 쇠가 서열 번호 121, 122, 123 또는 124로부터 선택되는 서열과 적어도 약 95%의 동일성을 갖는 서열을 포함하는 항체.

[0403] 실시양태 57. 실시양태 55에 있어서, 홀 쇠가 서열 번호 125, 126, 127, 또는 128로부터 선택되는 서열과 적어도 약 95%의 동일성을 갖는 서열을 포함하는 항체.

[0404] 실시양태 58. 실시양태 52에 있어서, MUC1* 결합 도메인이 표 2로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 약 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 서열을 포함하는 중쇄 가변 도메인을 포함하는 항체.

[0405] 실시양태 59. 실시양태 52에 있어서, MUC1* 결합 도메인이 표 2로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 약 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함하는 항체.

[0406] 실시양태 60. MUC1* 결합 도메인이 표 3으로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 약 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 서열을 포함하는 단일 쇠 가변 단편(scFv)을 포함하는 항체.

[0407] 실시양태 61. 실시양태 52에 있어서, CD3 결합 도메인이 서열 번호 26 또는 31로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 약 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 서열을 포함하는 중쇄를 포함하는 항체.

[0408] 실시양태 62. 실시양태 52에 있어서, CD3 결합 도메인이 서열 번호 29 또는 35로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 약 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 서열을 포함하는 경쇄를 포함하는 항체.

[0409] 실시양태 63. 실시양태 52에 있어서, CD3 결합 도메인이 서열 번호 131 또는 132로부터 선택되는 아미노산 서열

과 적어도 약 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 서열을 포함하는 단일쇄 가변 단편(scFv)을 포함하는 항체.

[0410] 실시양태 64. 실시양태 52에 있어서, 서열 번호 50, 52, 54, 58, 62, 66, 70, 74, 78, 82, 86, 90, 94, 98, 102, 106, 110, 또는 114로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 약 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 서열을 포함하는 항체.

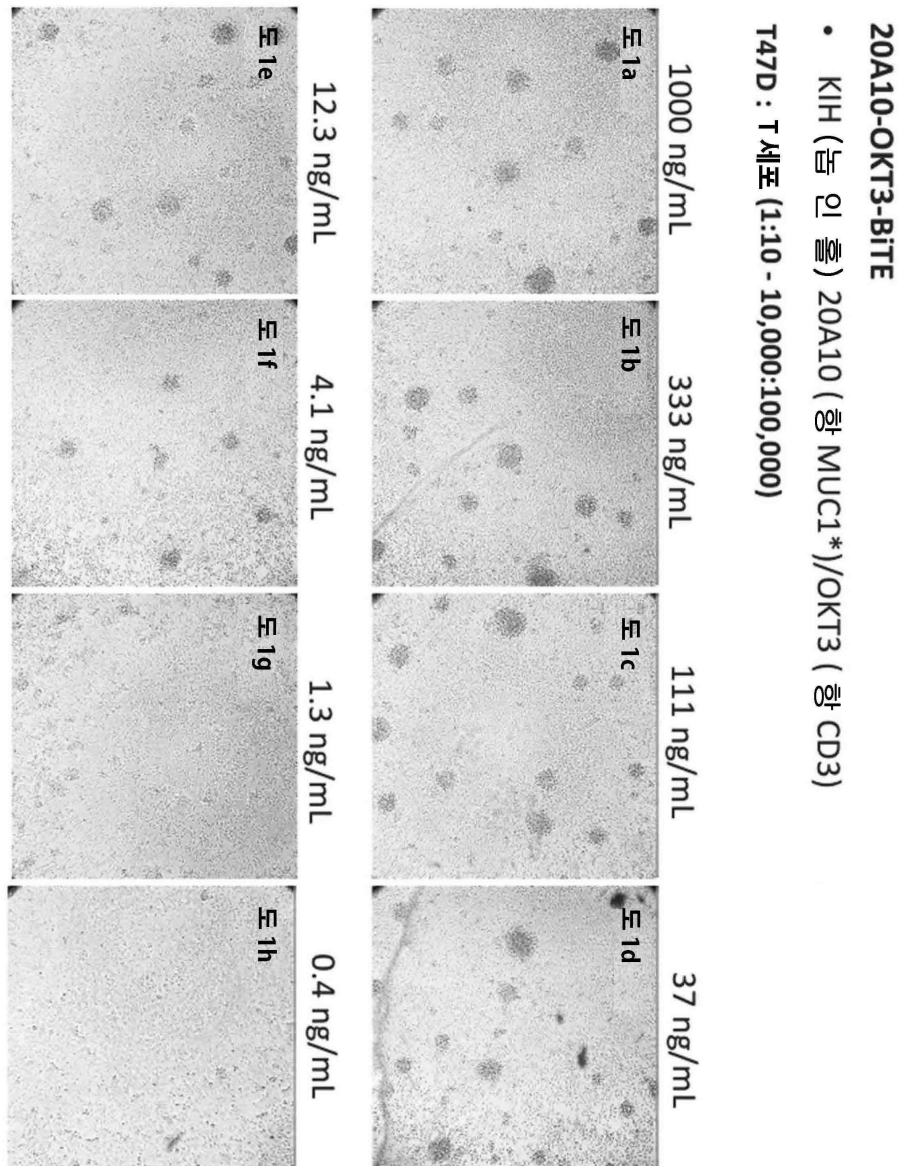
[0411] 실시양태 65. 암 치료를 필요로 하는 피험체에게 실시양태 1-64 중 어느 하나의 항체 또는 항체 접합체를 투여하는 단계를 포함하는, 암을 치료하는 방법.

[0412] 실시양태 66. 실시양태 65에 있어서, 암이 MUC1*을 발현하는 것인 방법.

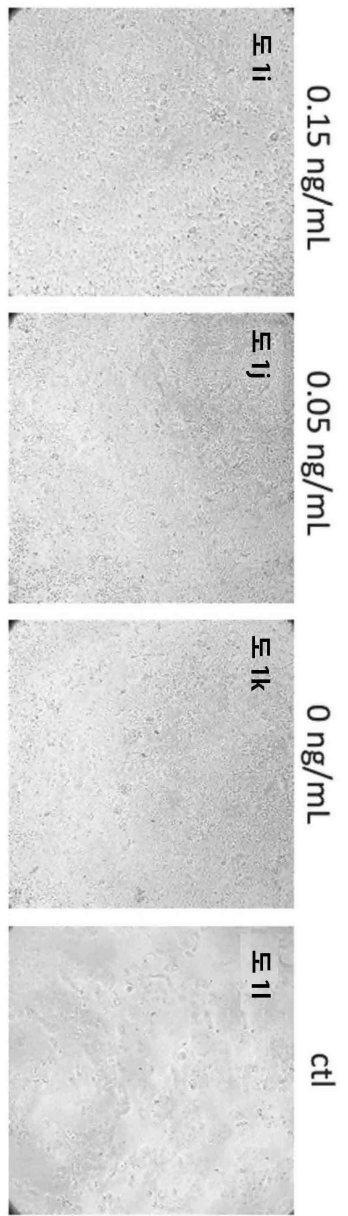
[0413] 실시양태 67. 실시양태 65에 있어서, 암이 유방암, 결장암, 전립선암, 췌장암, 또는 폐암인 것인 방법.

도면

도면1ah



도면1i1

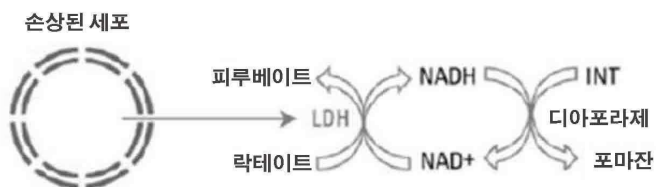


20A10-OKT3-BITE

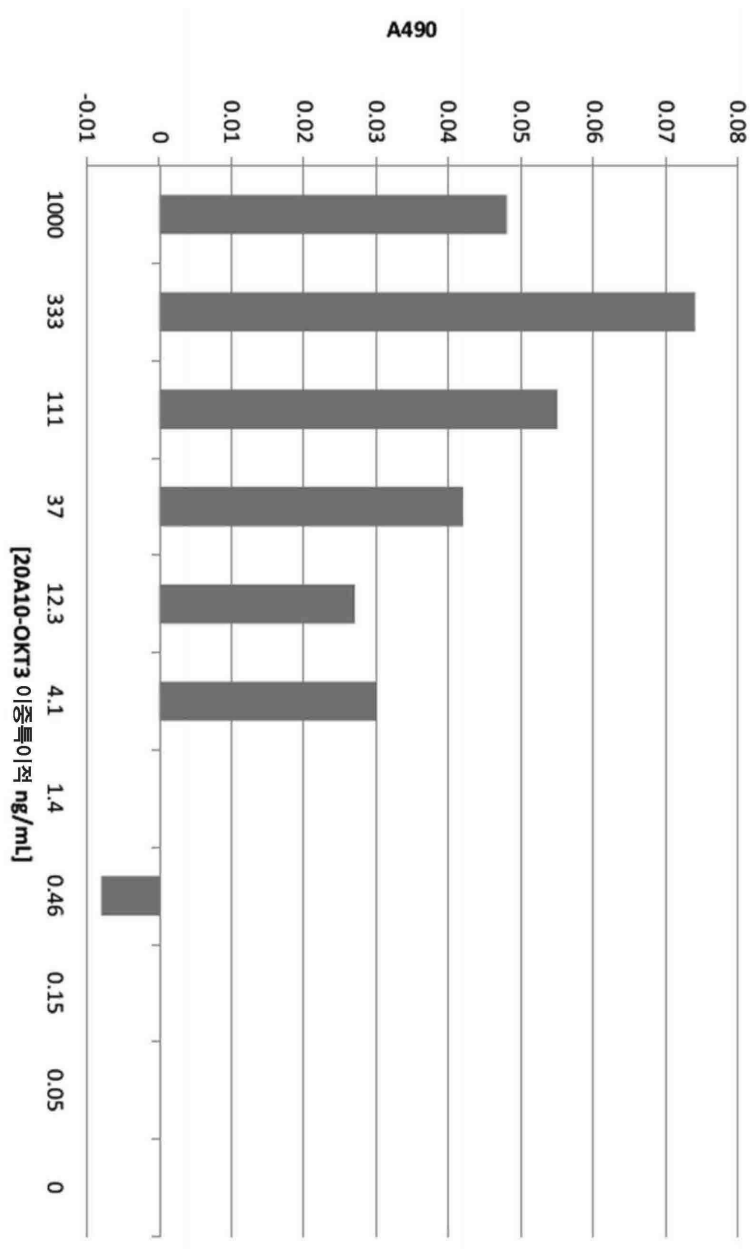
- KIH (농 인 흘) 20A10 (항 MUC1*)/OKT3 (항 CD3)

T47D : T 세포 (1:10 - 10,000:100,000)

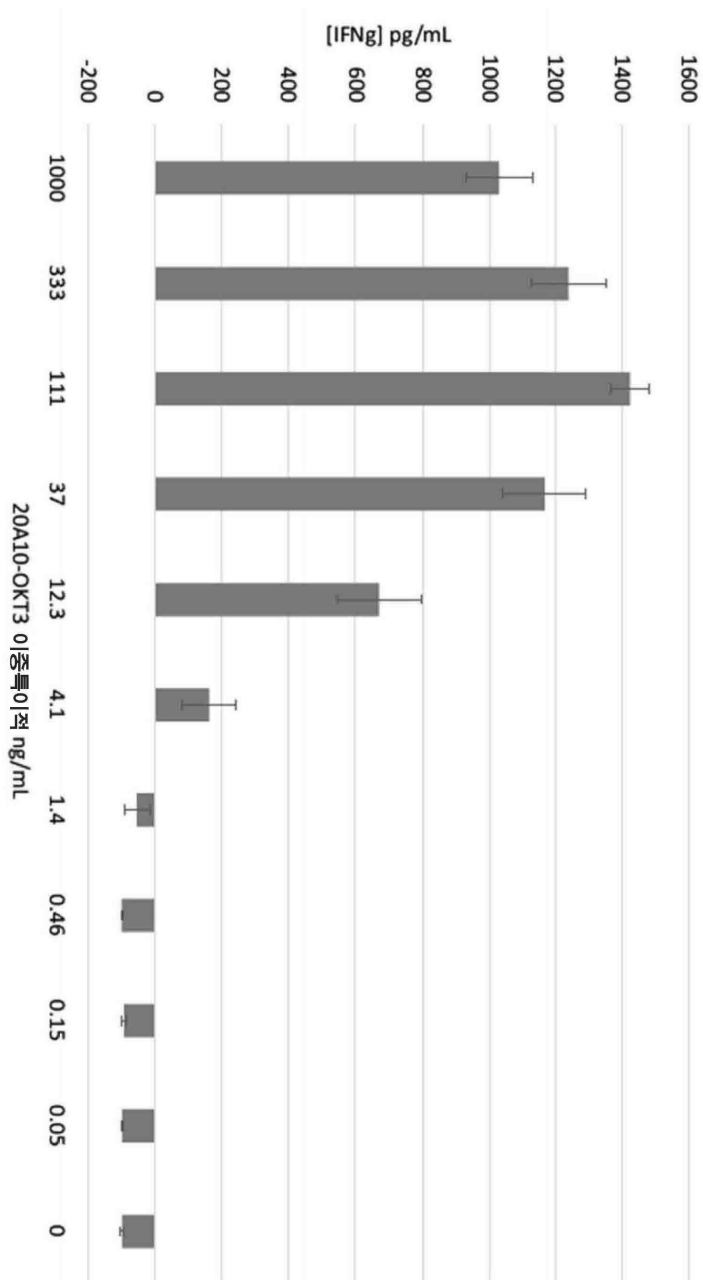
도면1m



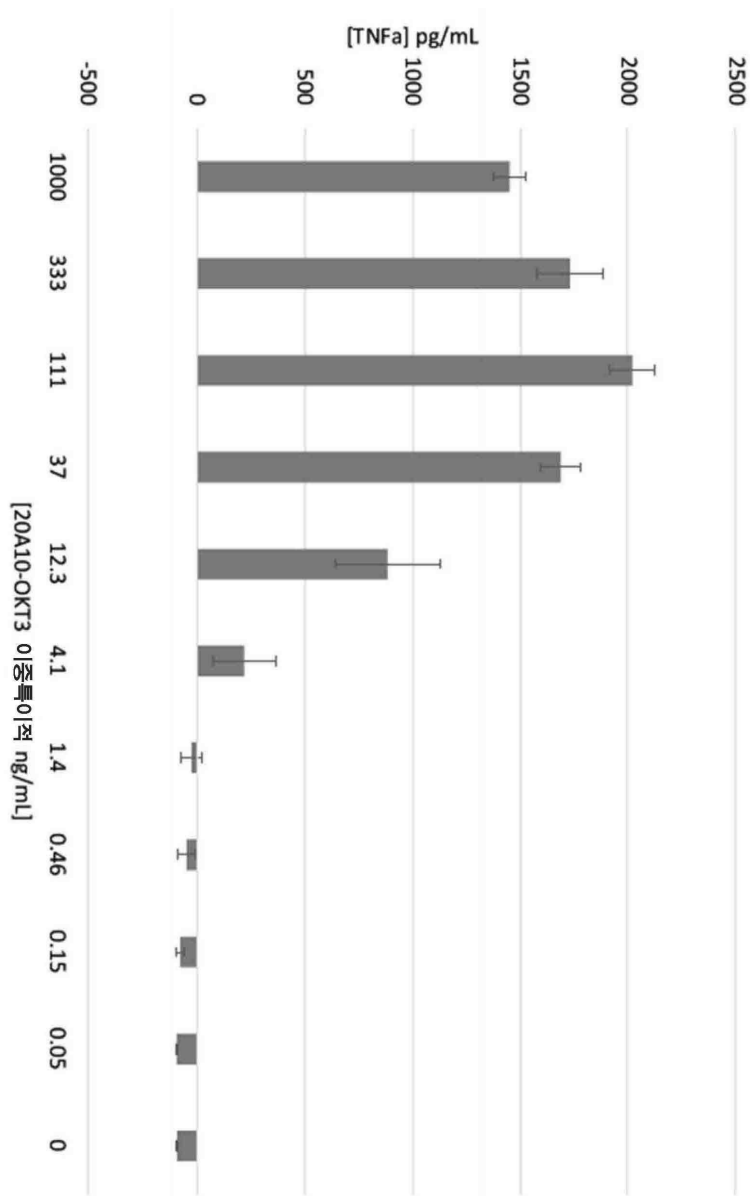
도면1n



도면10

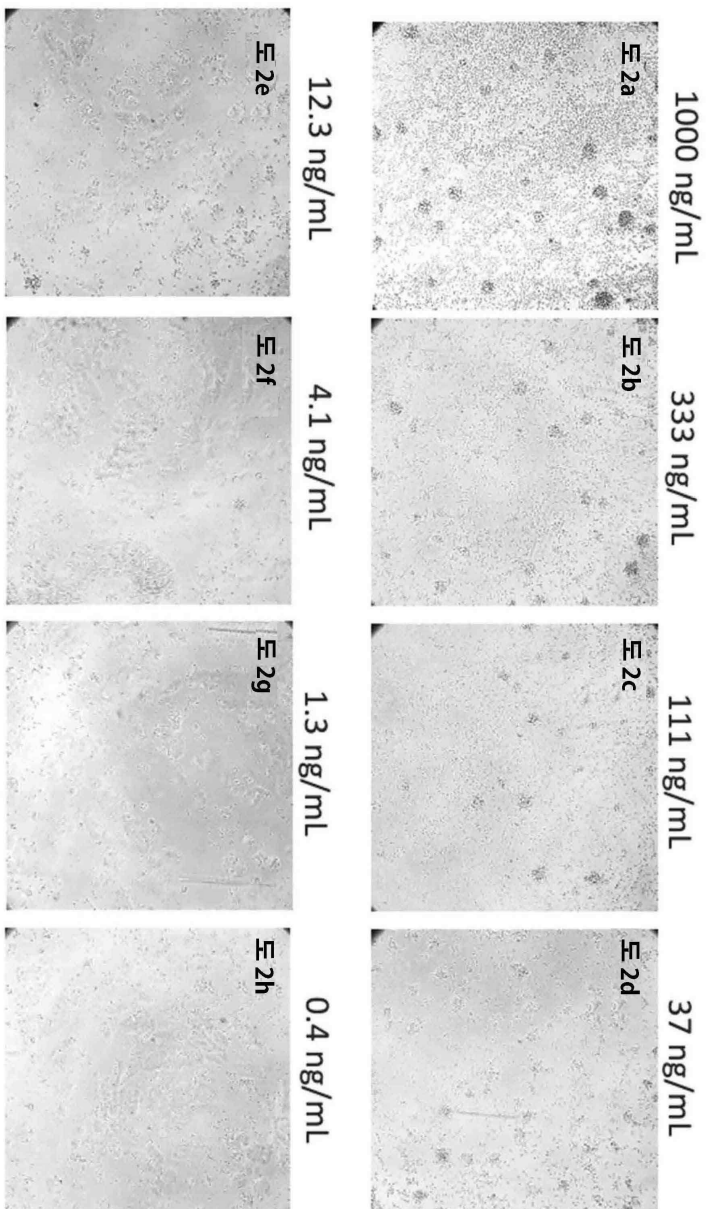


도면1p



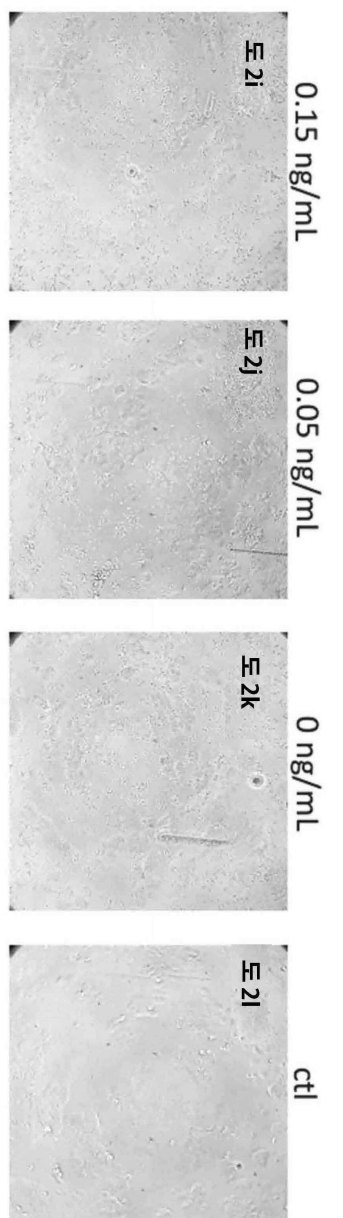
20A10-12F6-BITE

- KIH (녹 인 홀) 20A10 (항 MUC1*)/OKT3 (항 CD3)
T47D : T 세포 (1:10 - 5,000:50,000)



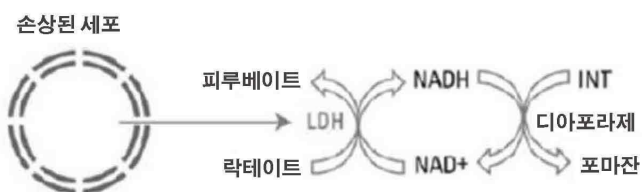
도면2ah

도면2i1

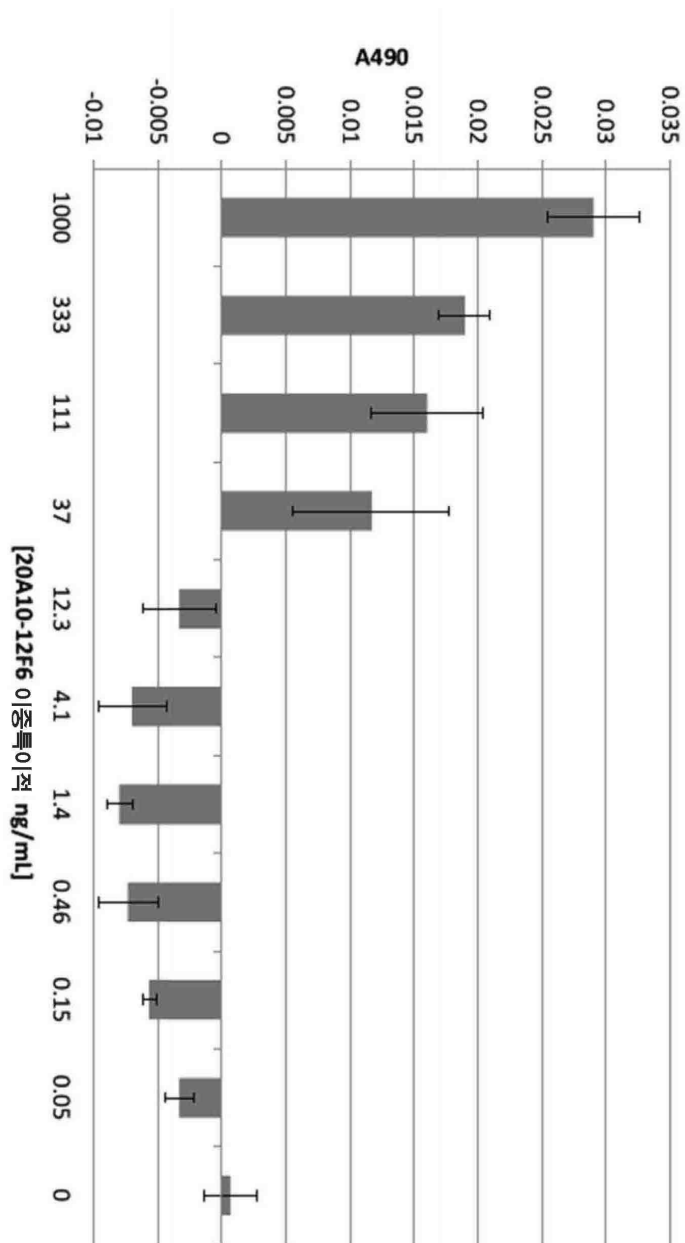


- 20A10-12F6-BITE**
- KIH (농 인 홀) 20A10 (항 MUC1*)/OKT3 (항 CD3)
T47D : T 세포 (1:10 - 5,000:50,000)

도면2m

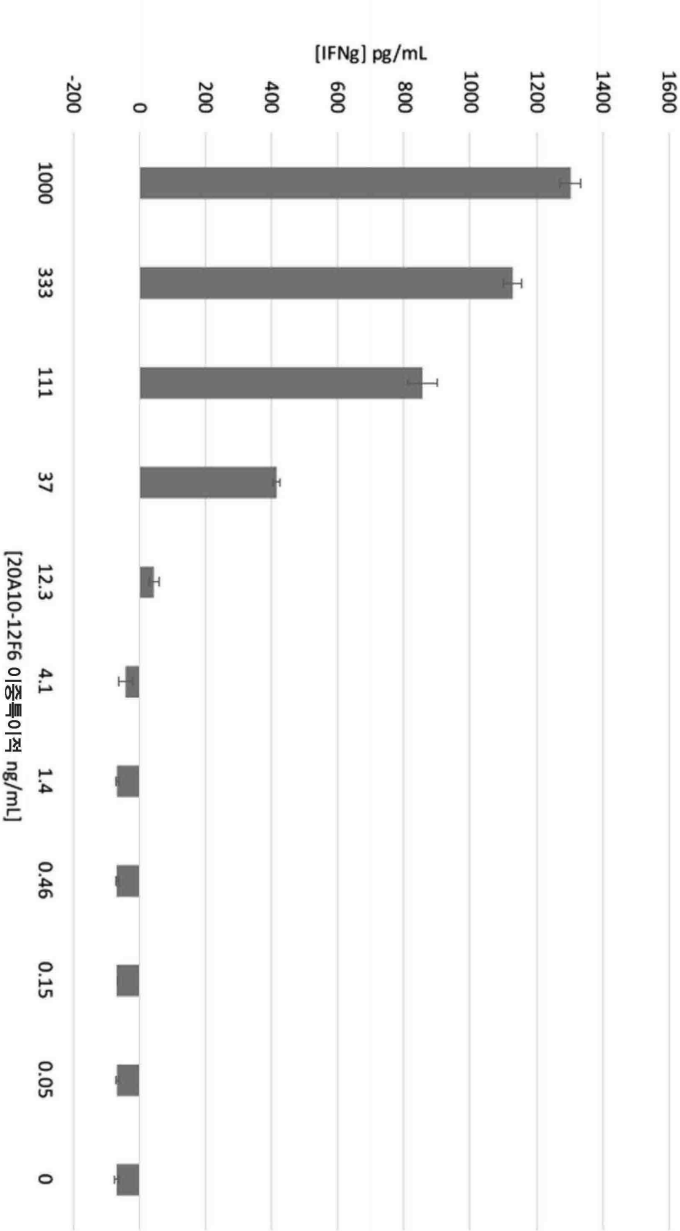


도면2n



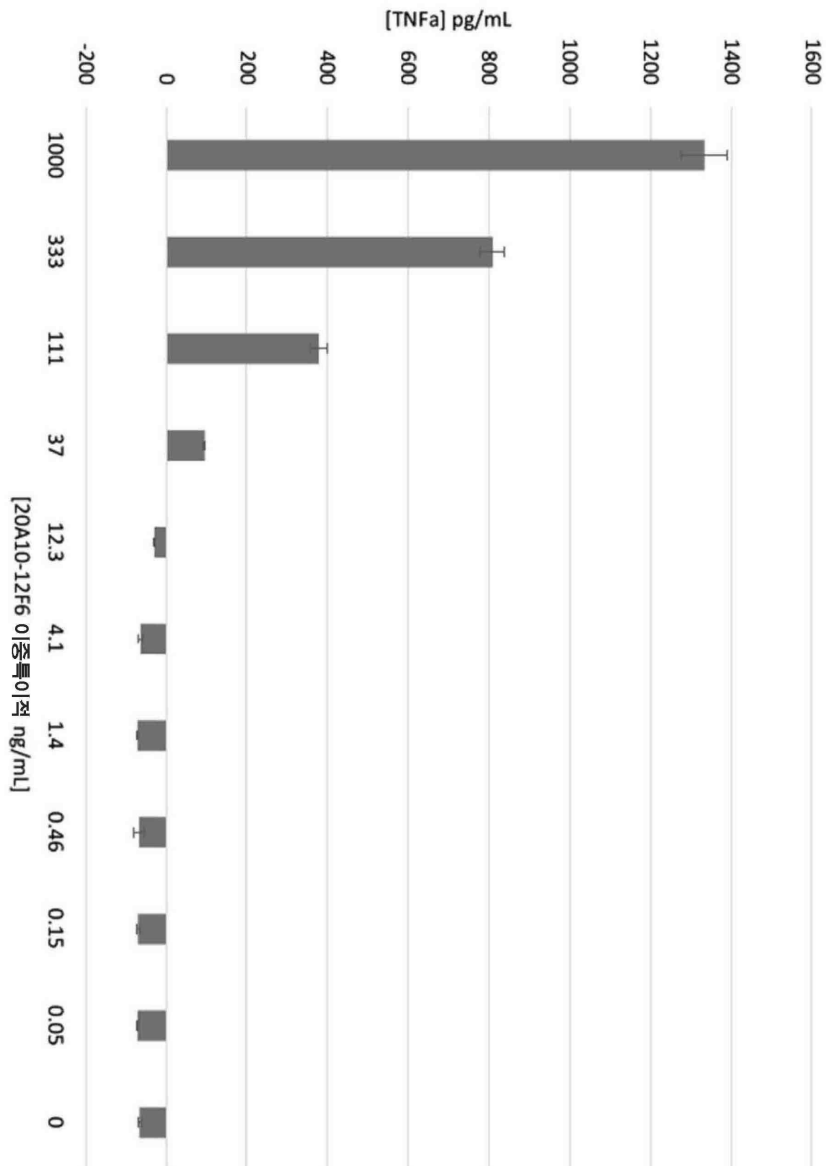
ELISA - IFN γ 정량화

- 이중특이적 농도의 함수로서 T 세포 반응



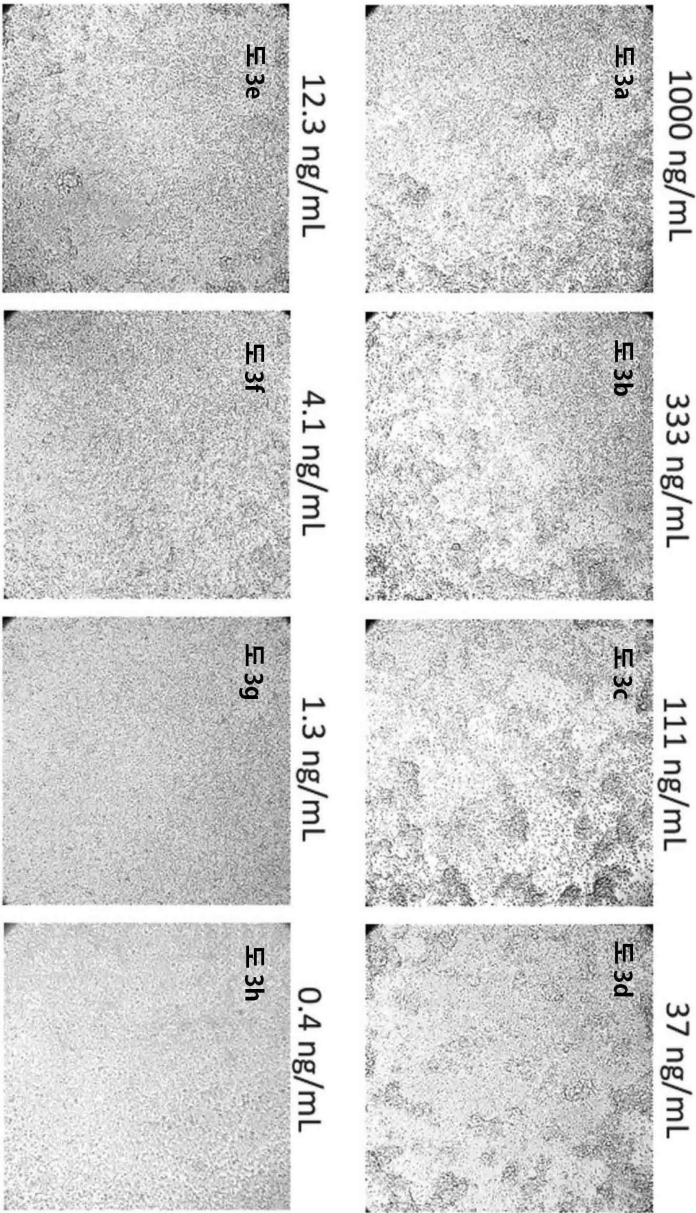
도면20

도면2p



20A10-OKT3-BITE

- KIH (농 인 흘) 20A10 (항 MUC1*)/OKT3 (항 CD3)
HCT-MUC1* : T세포 (1:10 - 10,000:100,000)

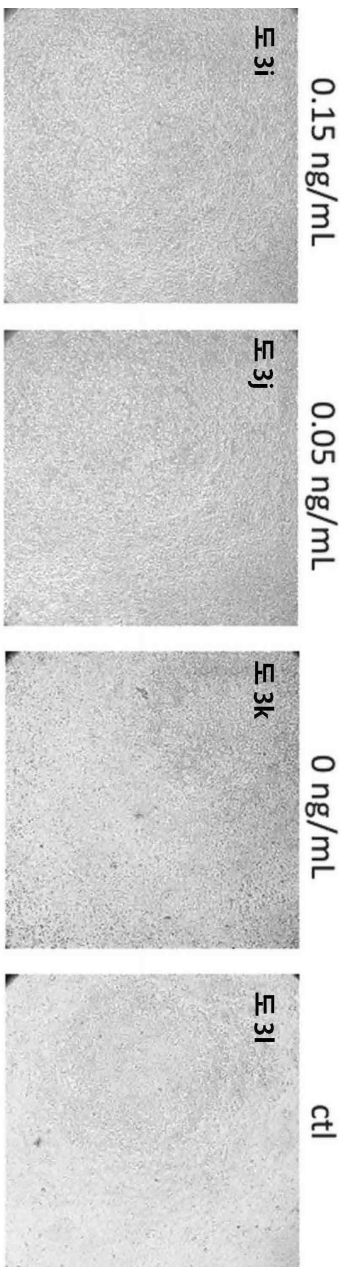


도면3ah

20A10-OKT3-BITE

- KIH (늑 인 흘) 20A10 (항 MUC1*)/OKT3 (항 CD3)

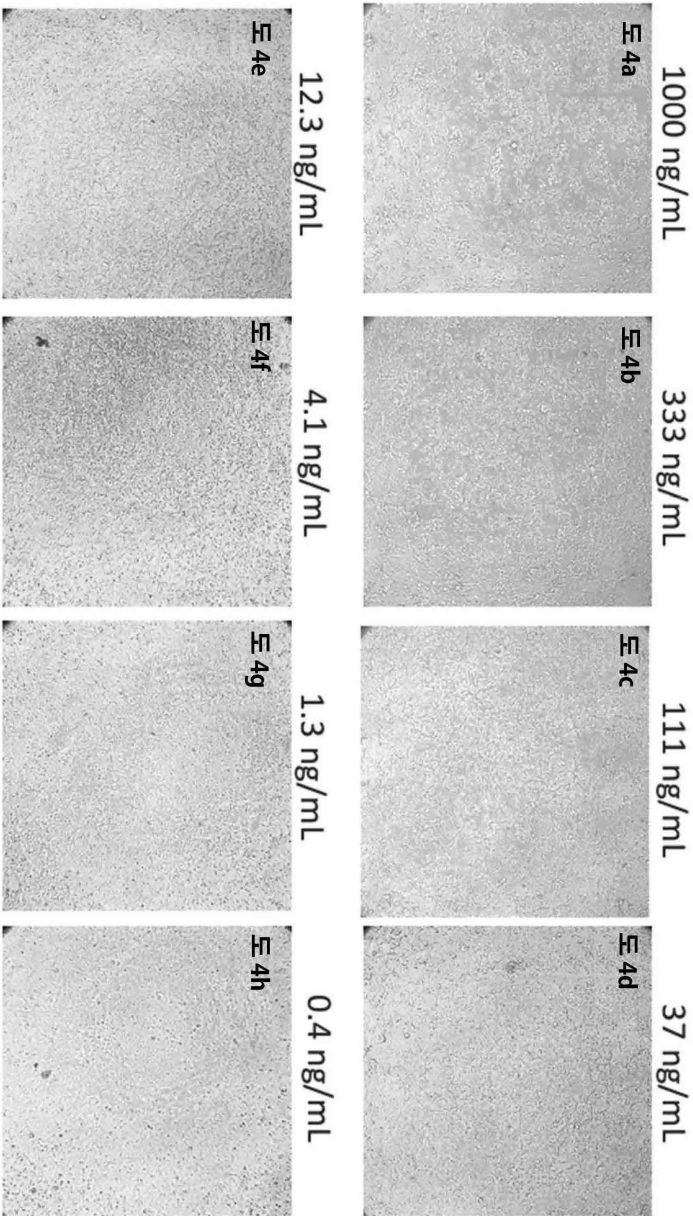
HCT-MUC1* : T 세포 (1:10 - 10,000:100,000)



도면3i1

20A10-12F6-BITE

- KIH (농 인 홀) 20A10 (항 MUC1*)/OKT3 (항 CD3)
HCT-MUC1* : T 세포 (1:10 - 5,000:50,000)

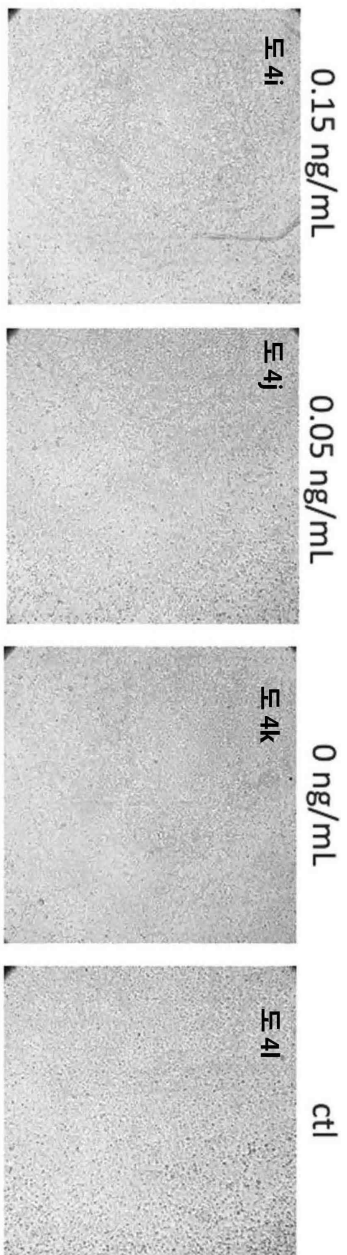


도면4ah

20A10-12F6-BITE

- KIH (농 인 홀) 20A10 (항 MUC1*)/OKT3 (항 CD3)

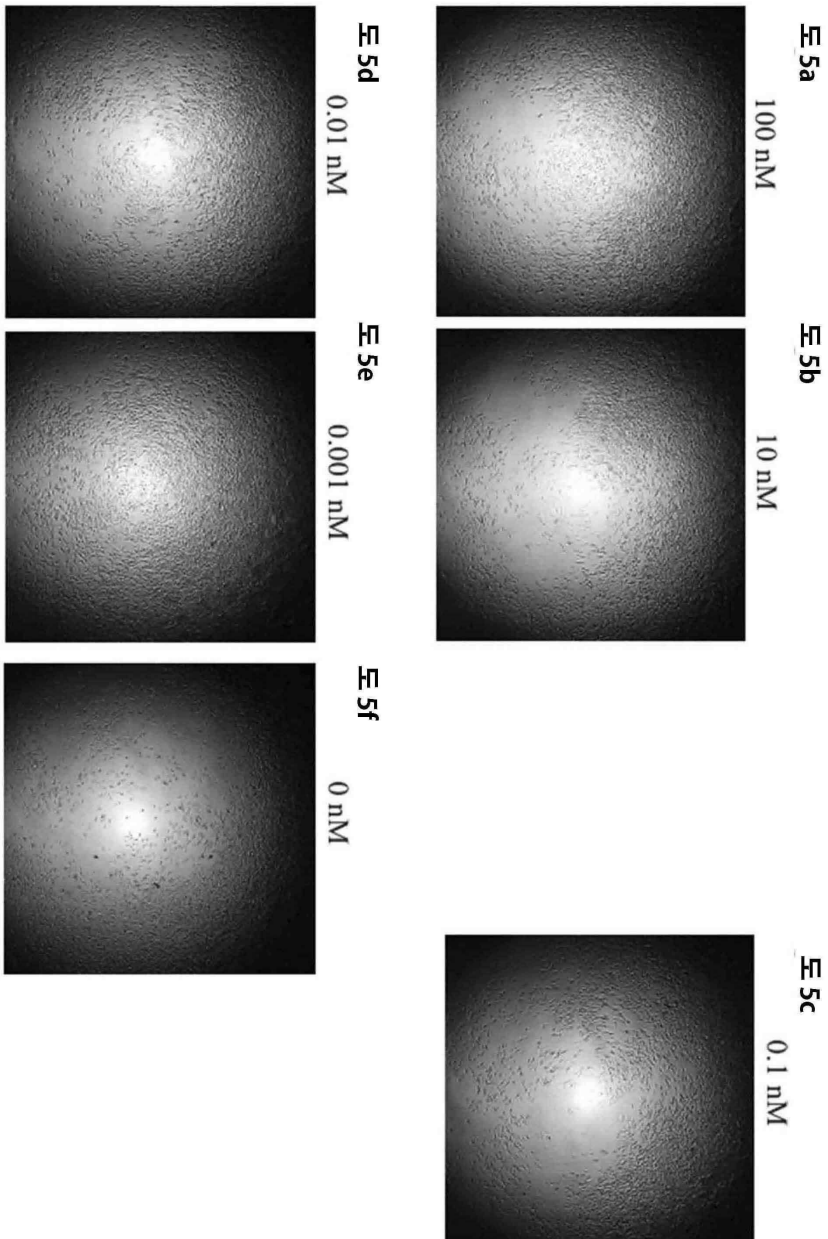
HCT-MUC1* : T 세포 (1:10 - 5,000:50,000)



도면4i1

HCT-WT 음성 대조군

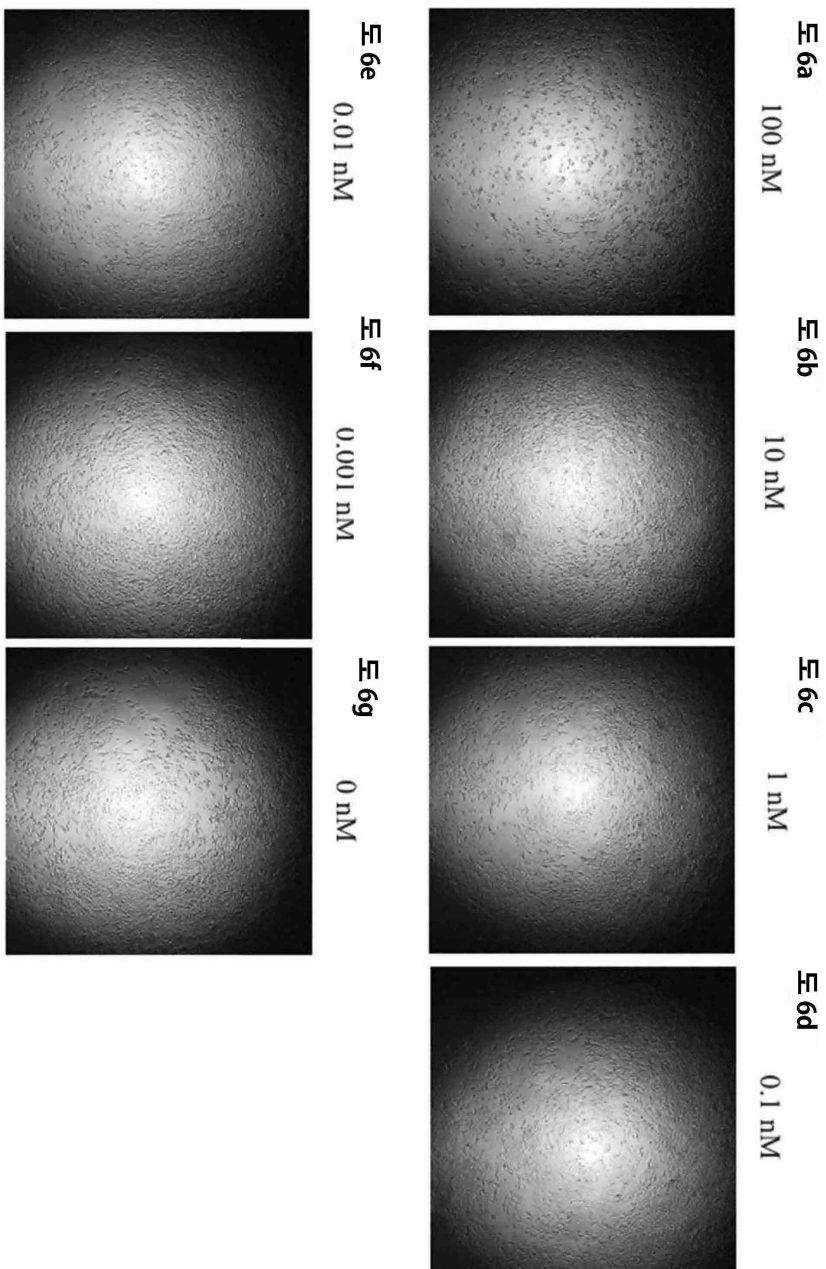
세포(10,000개/웰)를 MNC2-ADC와 혼합하고, 72 h 동안 인큐베이션시켰다.



도면5

HCT-MUC1 * 양성

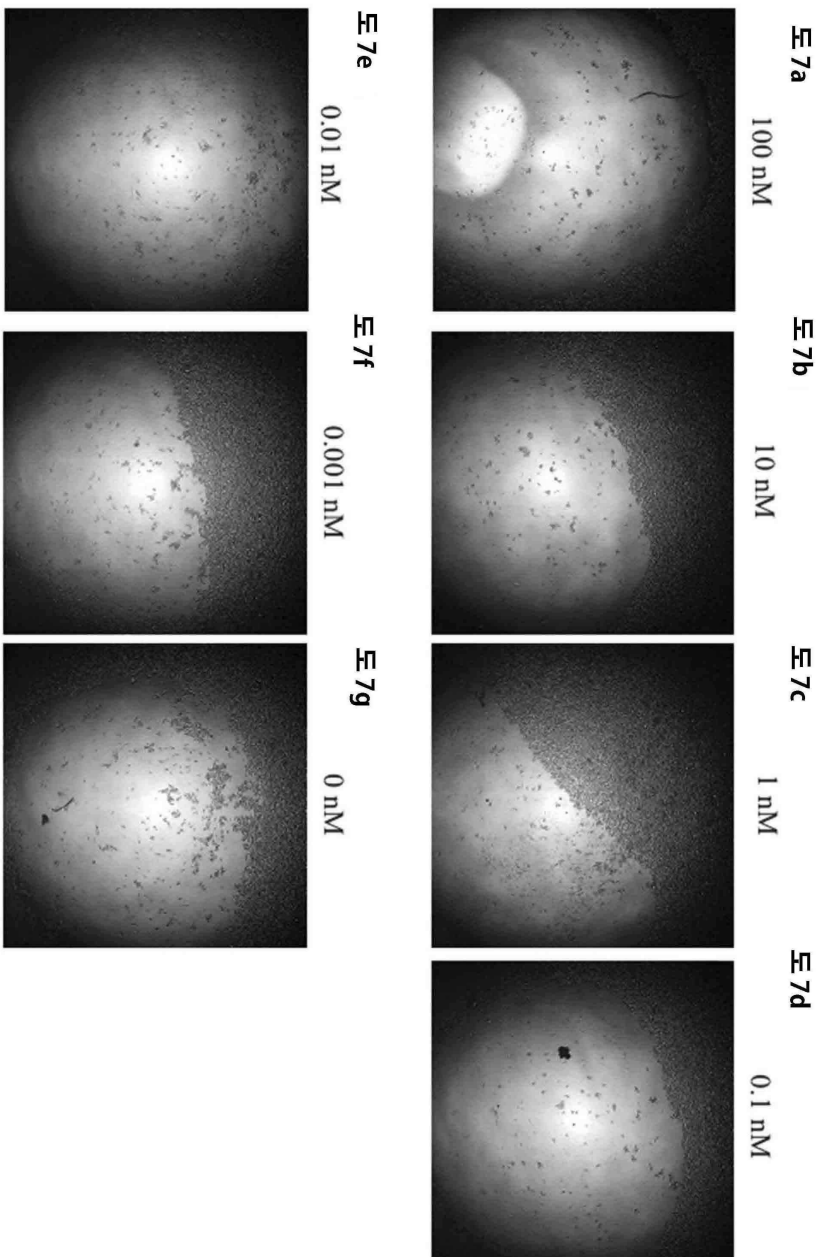
세포(10,000개/웰)를 MNC2-ADC와 혼합하고, 72 h 동안 인큐베이션시켰다.



도면6

K562-WT 음성 대조군

세포(10,000개/웰)를 MNC2-ADC와 혼합하고, 72 h 동안 인큐베이션시켰다.

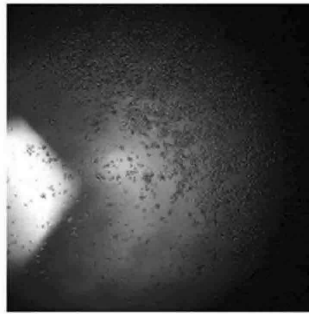


도면7

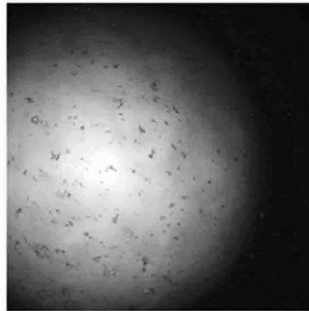
K562-MUC1* 양성

세포(10,000개/웰)를 MNC2-ADC와 혼합하고, 72 h 동안 인큐베이션시켰다.

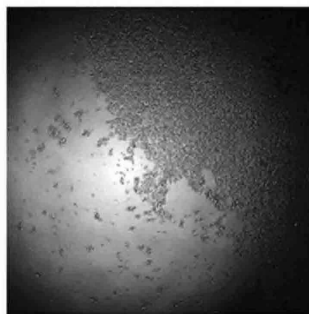
도 8a
100 nM



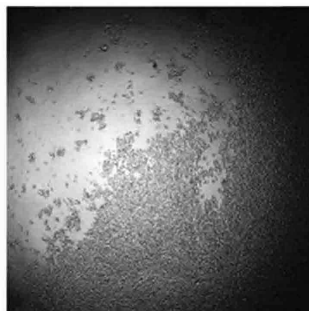
도 8b
10 nM



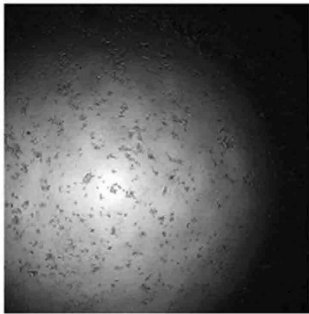
도 8c
1 nM



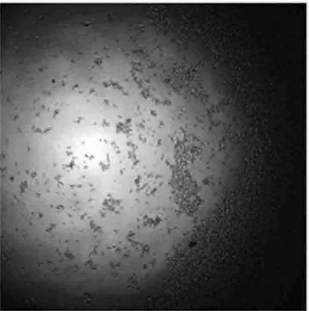
도 8d
0.1 nM



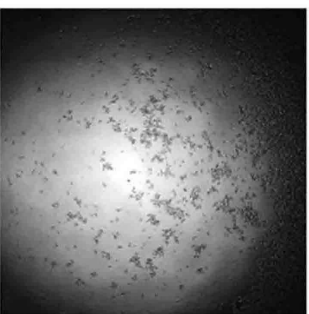
도 8e
0.01 nM



도 8f
0.001 nM



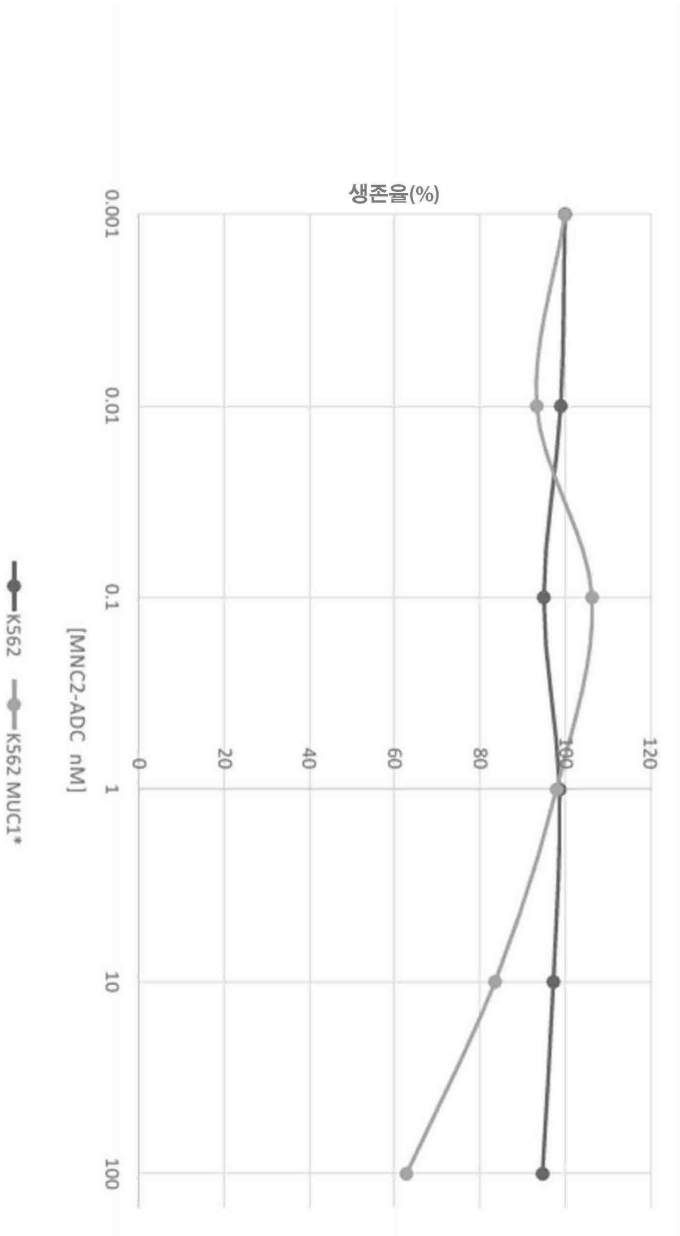
도 8g
0 nM



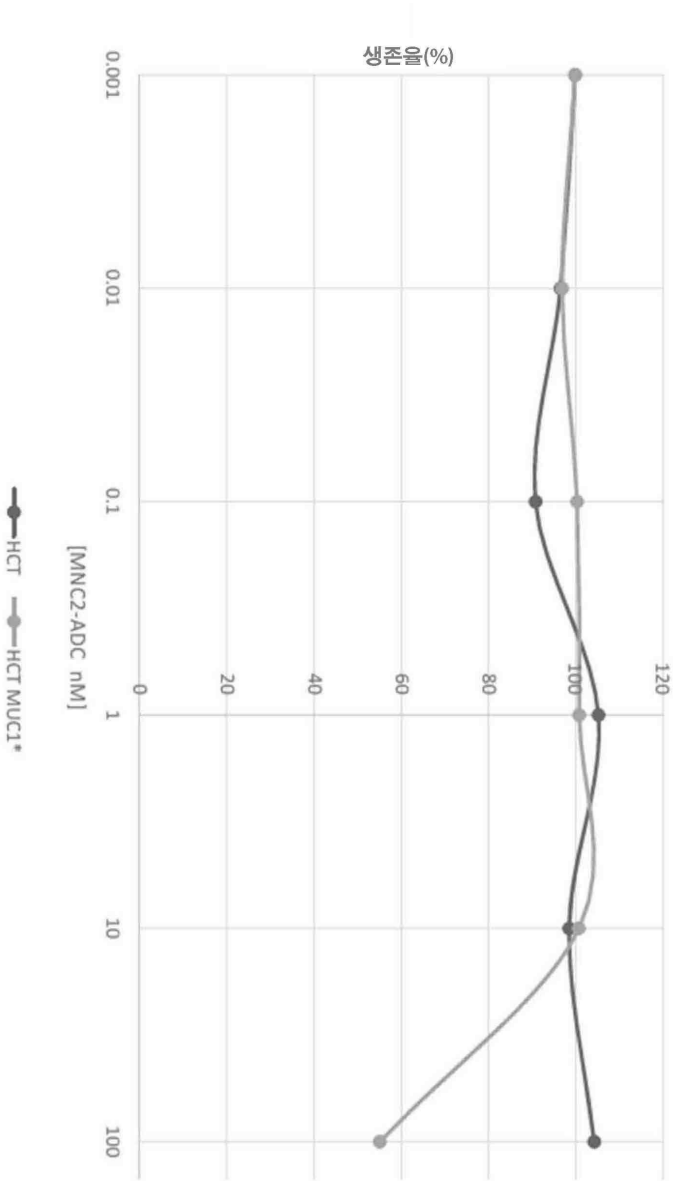
도면8

72 h 후의 세포 생존능

도면9a

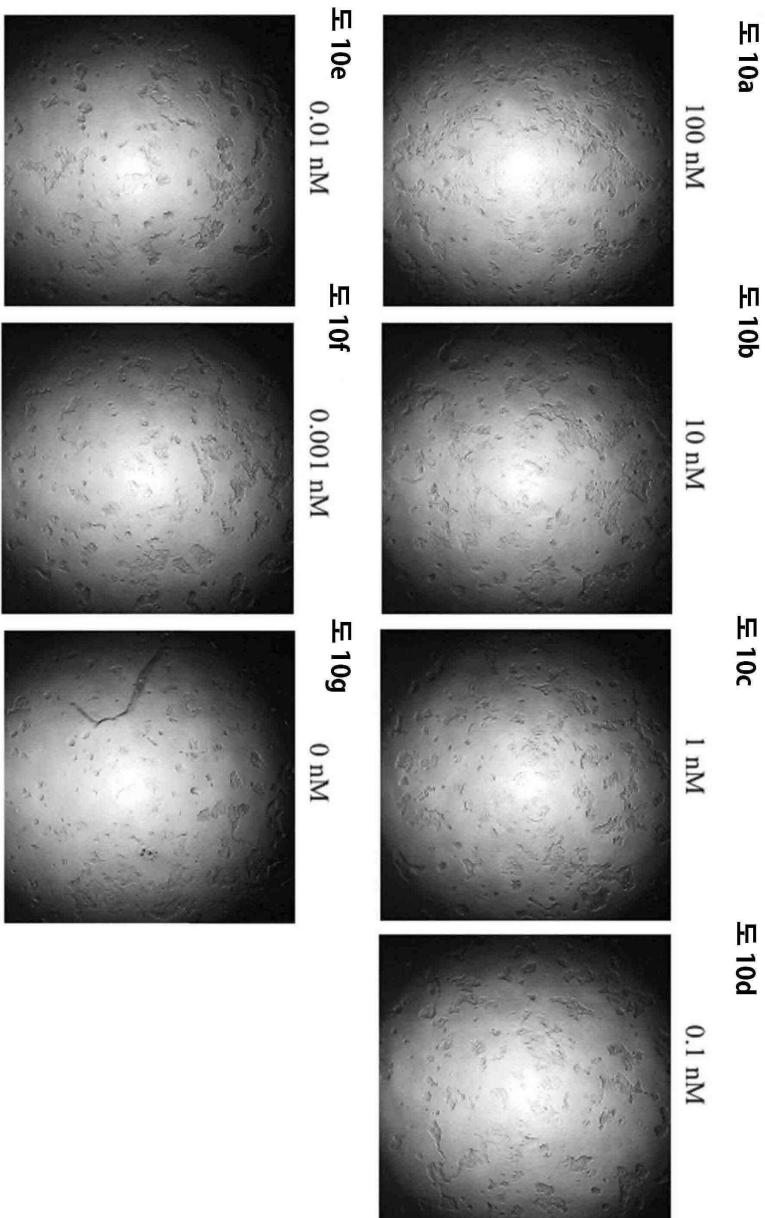


72 h 후의 세포 생존능



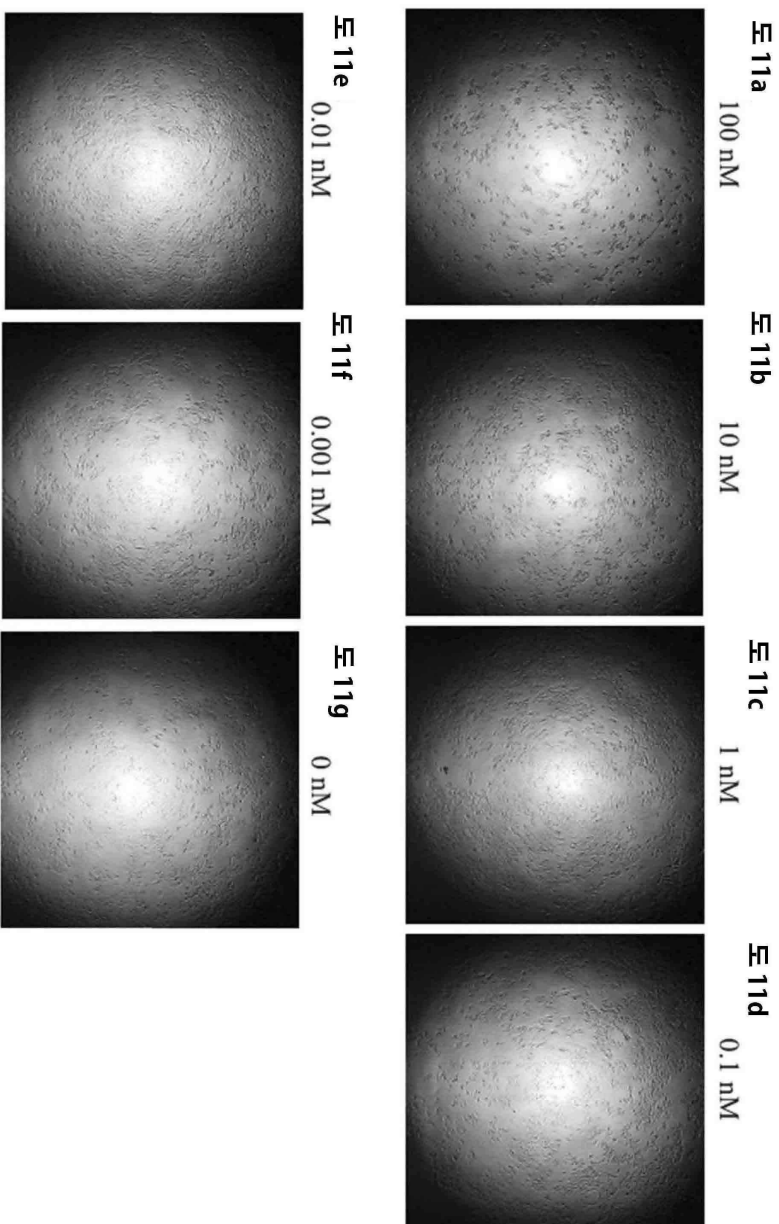
147D-wt 유방암 세포주는 (항체에 의해 인식되지 않는) 전장 MUC1 및 MUC1*(표적), 둘 모두를 발현한다.

세포(10,000개/웰)를 MNC2-ADC와 혼합하고, 72 h 동안 인큐베이션시켰다.



도면10

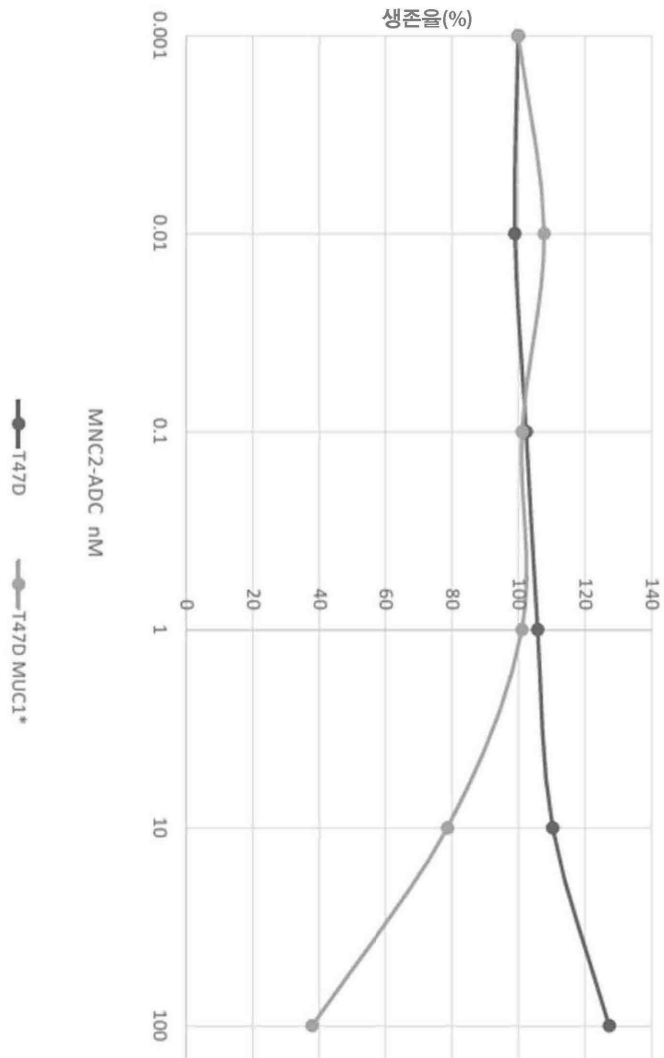
더욱더 많은 MUC1*를 발현하도록 형질도입된 T47D-MUC1* T47D 세포(10,000개/웰)를 MNC2-ADC와 혼합하고, 72 h 동안 인큐베이션시켰다.



도면11

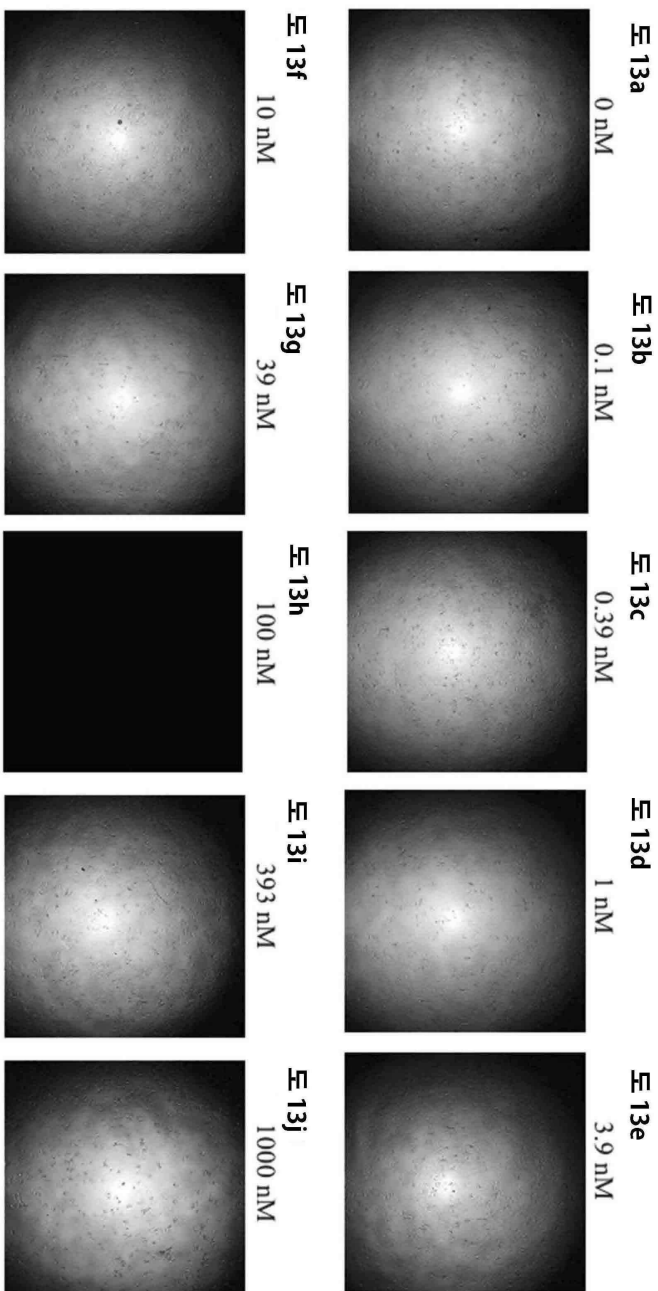
도면12

72 h 후의 세포 생존능



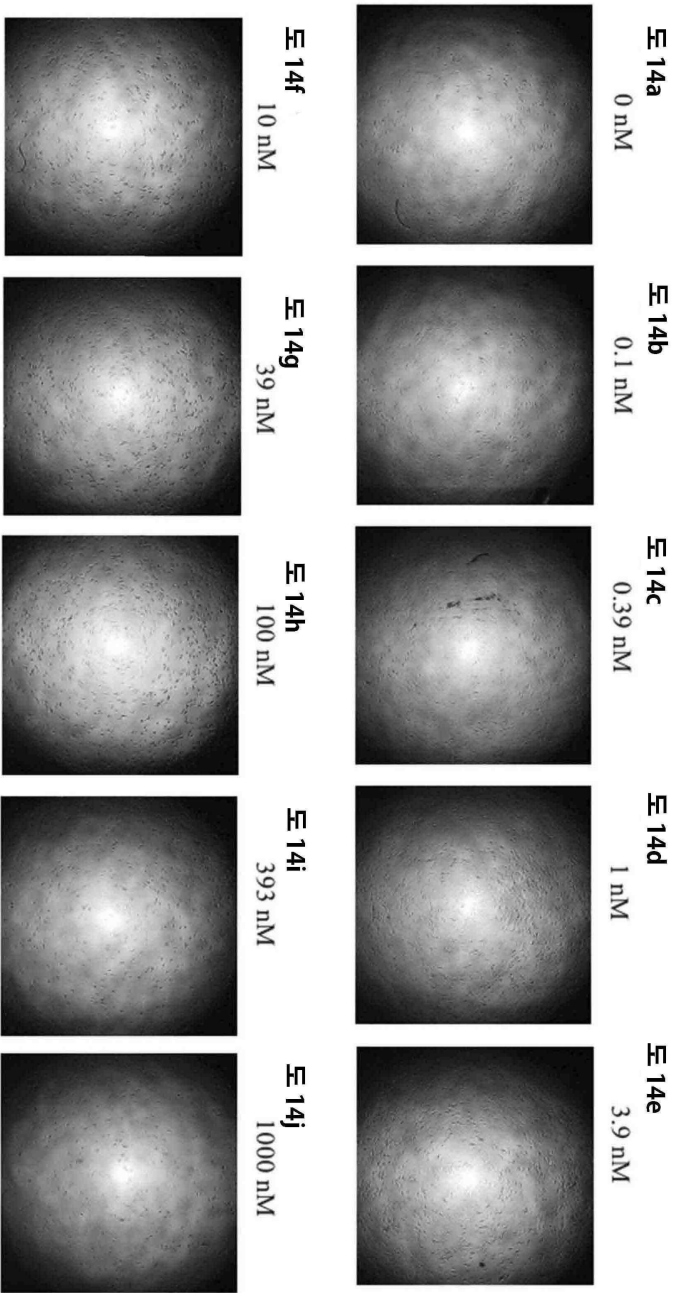
T47D-wt 유방암 세포주는 (항체에 의해 인식되지 않는) 전장 MUC1 및 MUC1*(표적), 둘 모두를 발현한다.

세포 (10,000개/웰)를 MNC2-ADC와 혼합하고, 72 h 동안 인큐베이션시켰다.



도면13

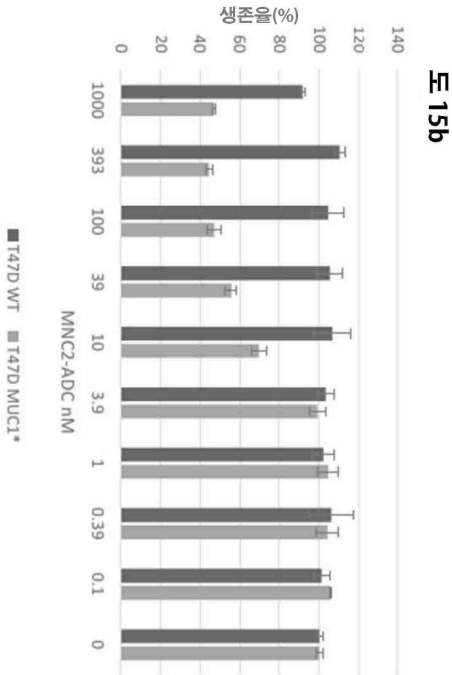
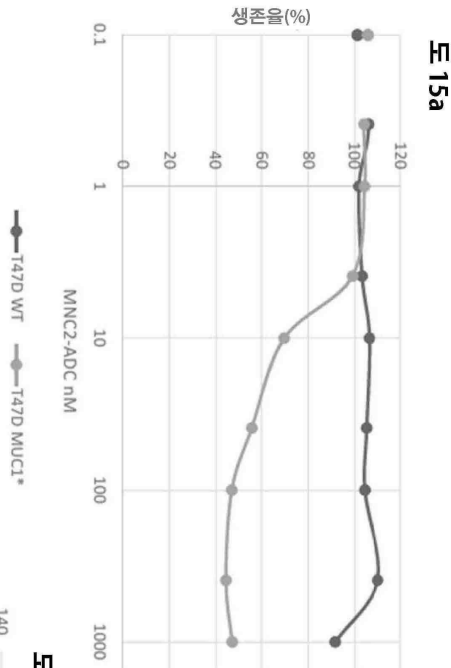
더욱더 많은 MUC1*을 발현하도록 형질도입된 T47D-MUC1* T47D
세포(10,000개/웰)를 MNC2-ADC와 혼합하고, 72 h 동안 인큐베이션시켰다.



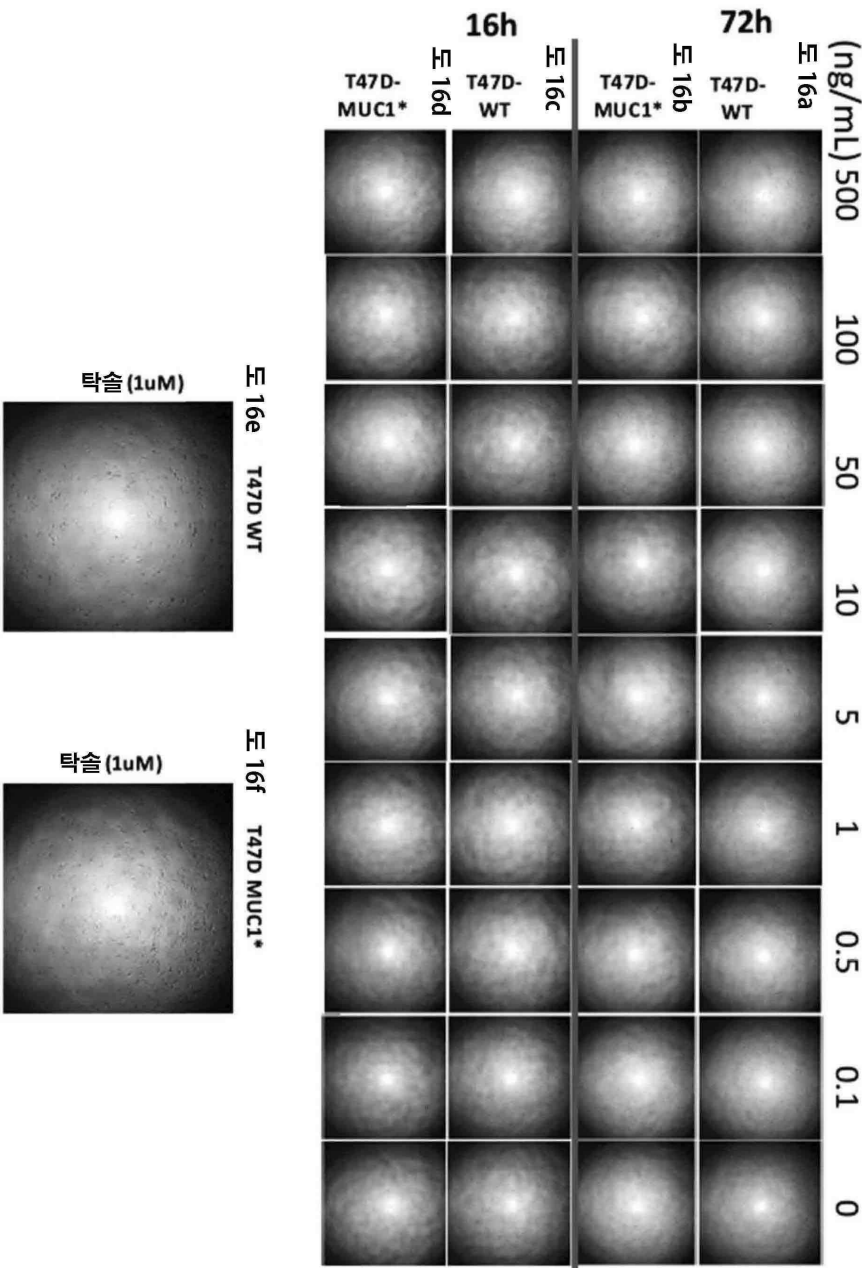
도면14

도면15

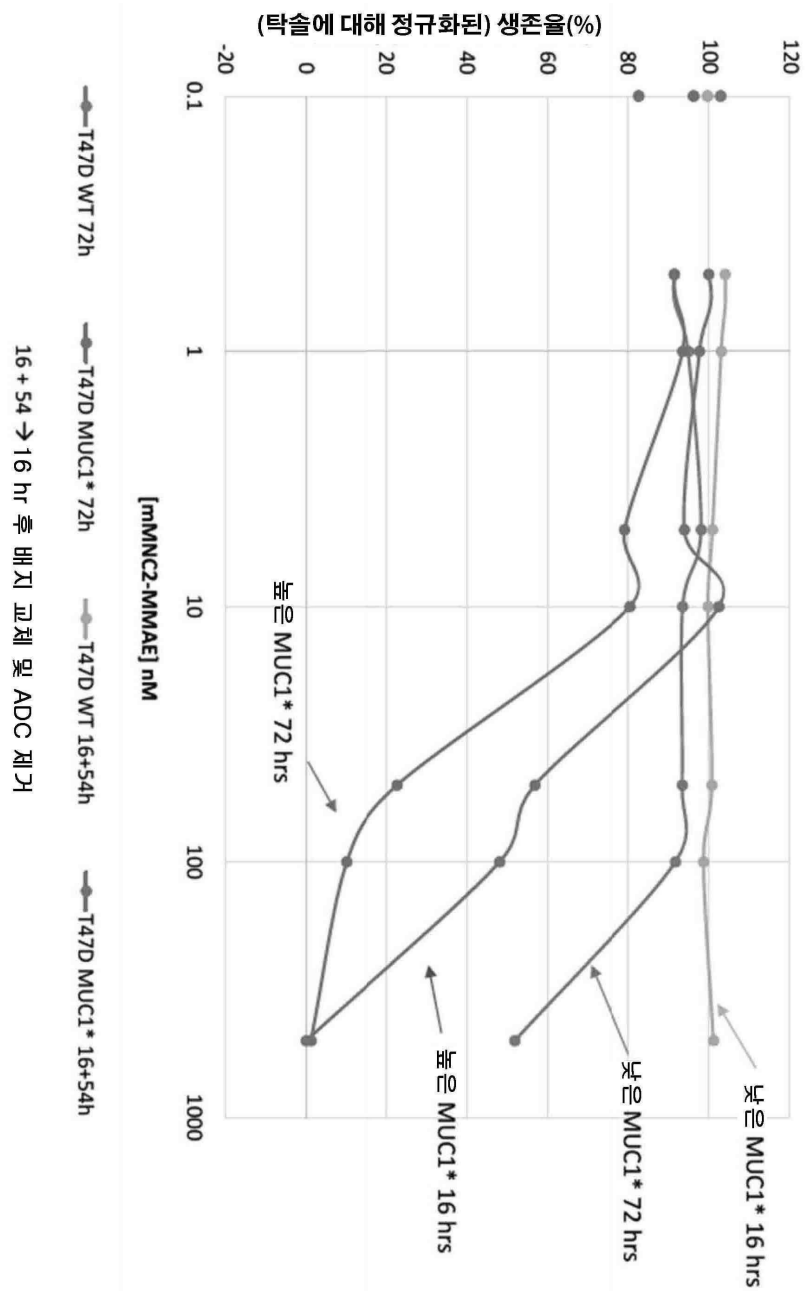
72 h 후의 세포 생존능



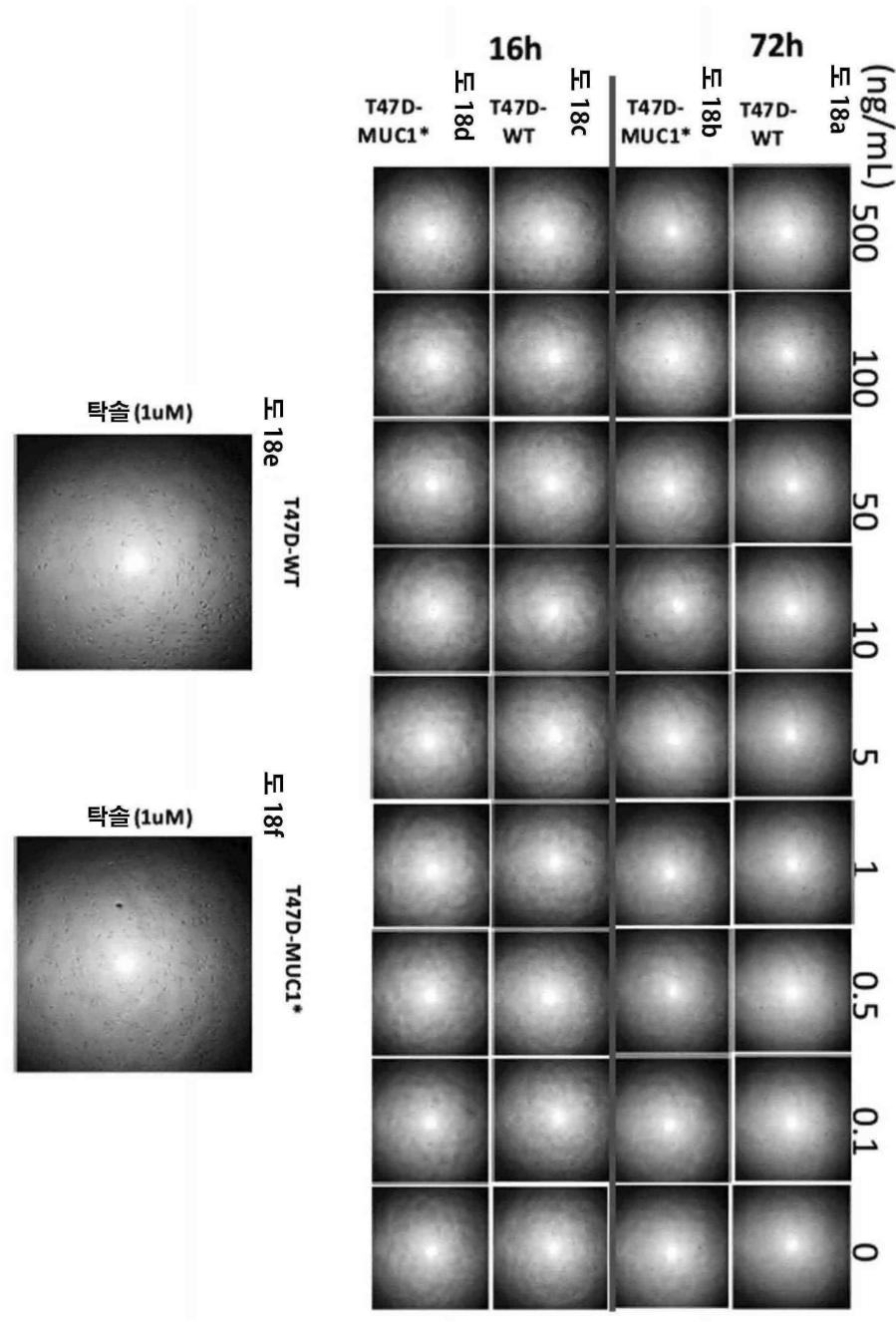
도면16



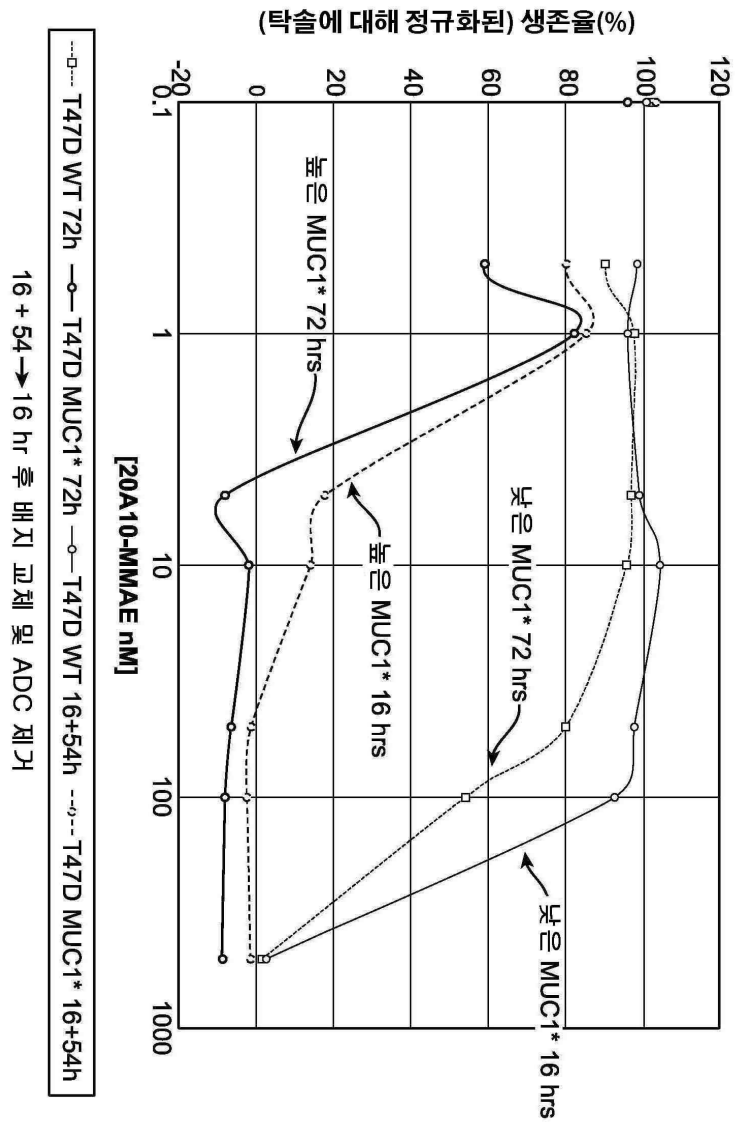
도면17



도면18



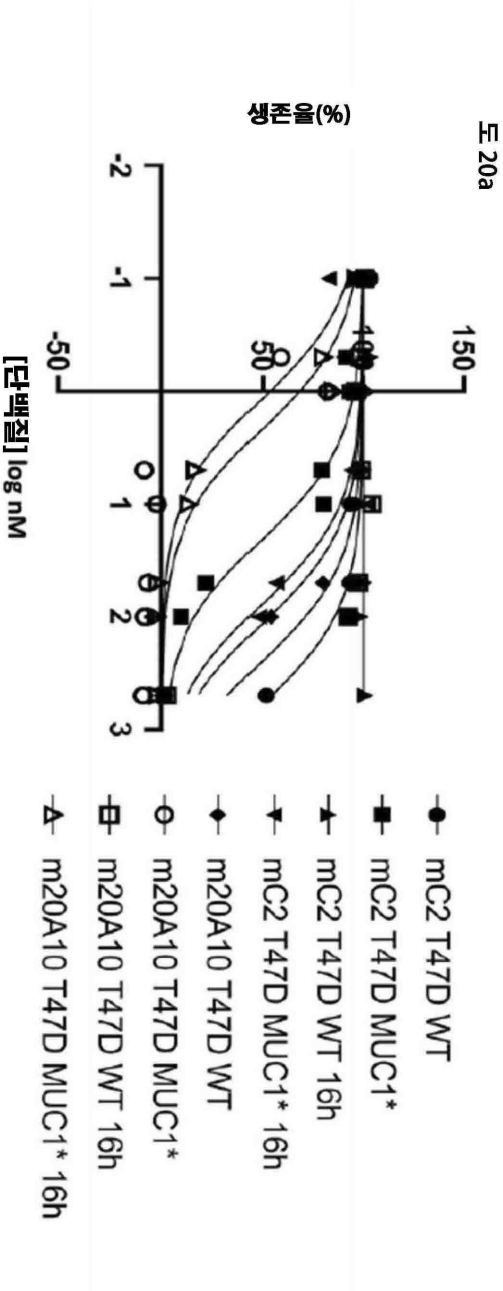
도면19



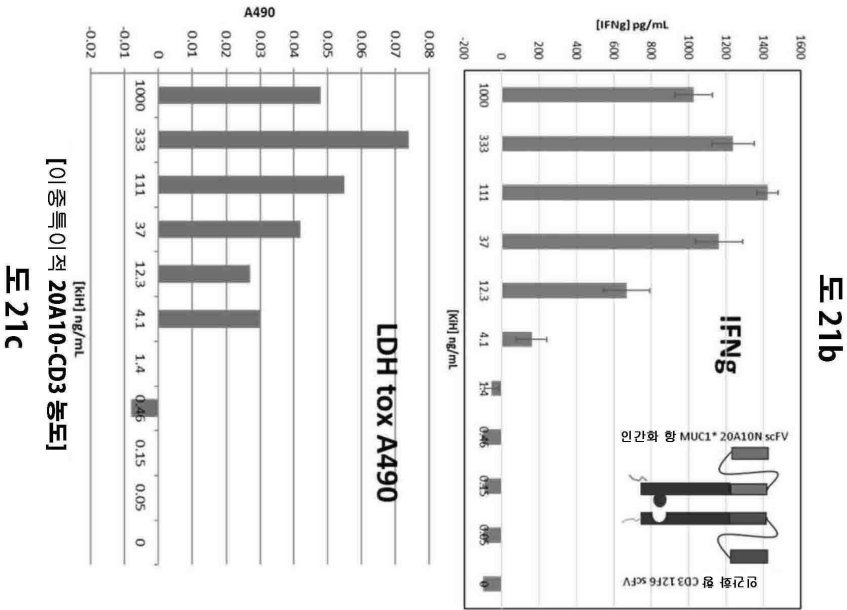
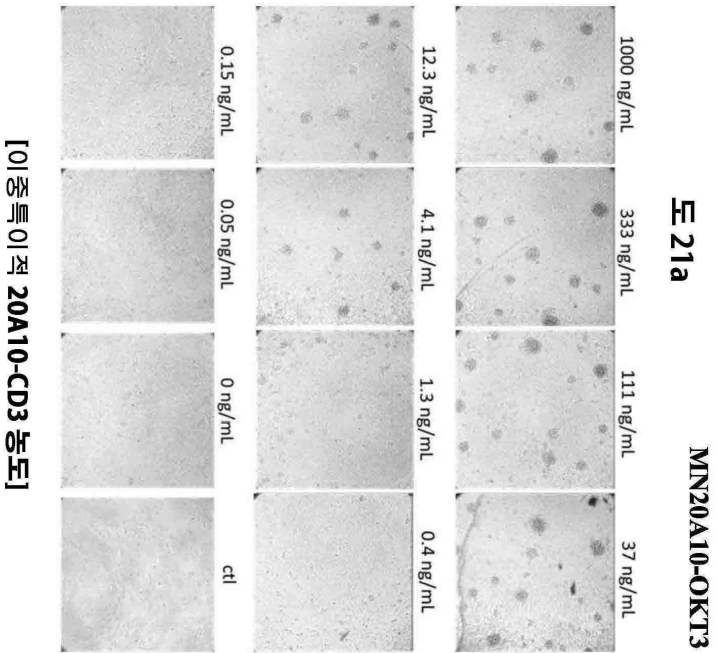
도면20

1h	mC2 T47D WT	mC2 T47D MUC1*	mC2 T47D WT 16h	mC2 T47D MUC1* 16h	m20A10 T47D WT	m20A10 T47D MUC1*	m20A10 T47D WT 16h	m20A10 T47D MUC1* 16h
IC50 (nM)	599.8	20.54	ND	77.03	115.1	1.16	247.5	2.168
R ²	0.8993	0.9716	-0.2981	0.9206	0.9384	0.86	0.7932	0.9611

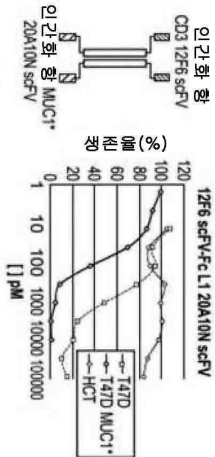
도 20b



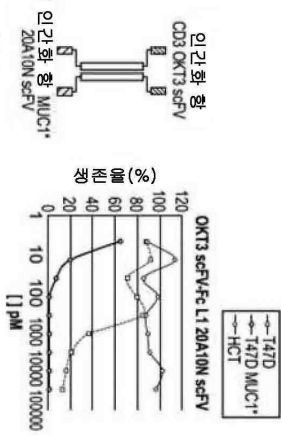
도면21



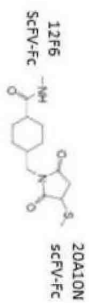
도면22



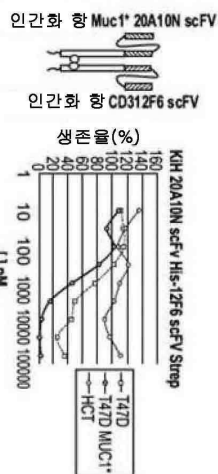
Fr 22a



Fr 22e

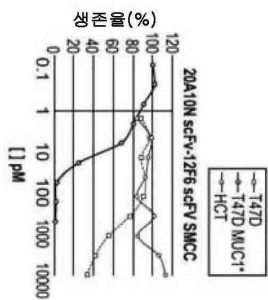


E 229



E 22c

Fr 22d

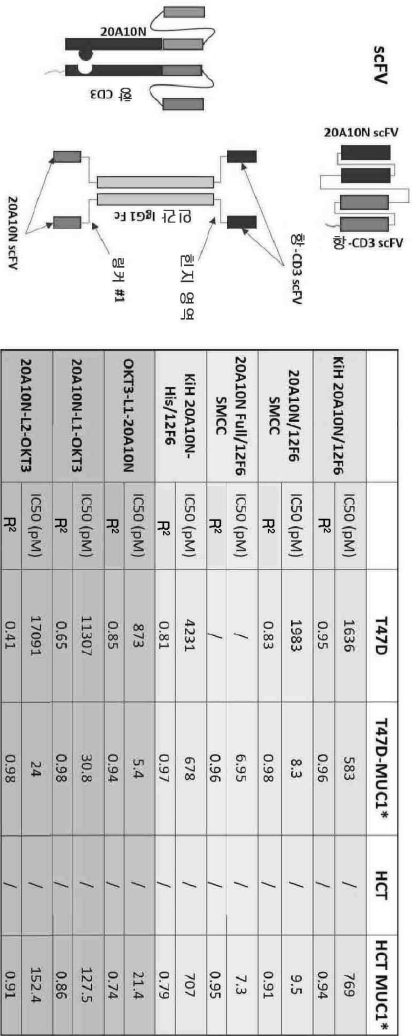


Fr 22h

다양한 이중특이적 포맷의 MN20A10-OKT3 또는 MN20A10-12F6의 IC50

항MUC1* 이중특이적 T 세포 인계이저: 다중 포맷

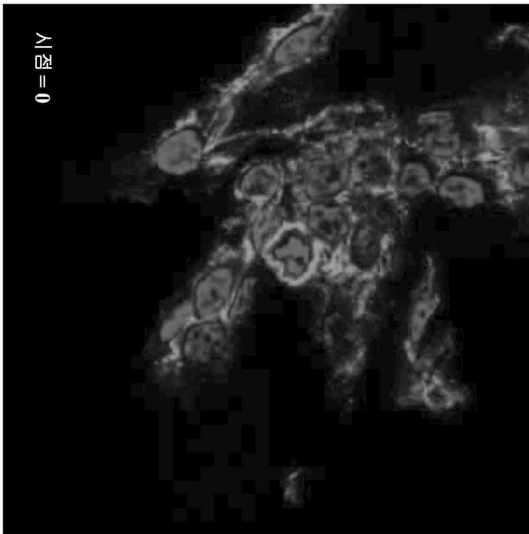
MN20A10은 MUC1* 양성 암 세포를 사멸시킨다: 항CD3 항체 OKT3 및 12F6으로 입증



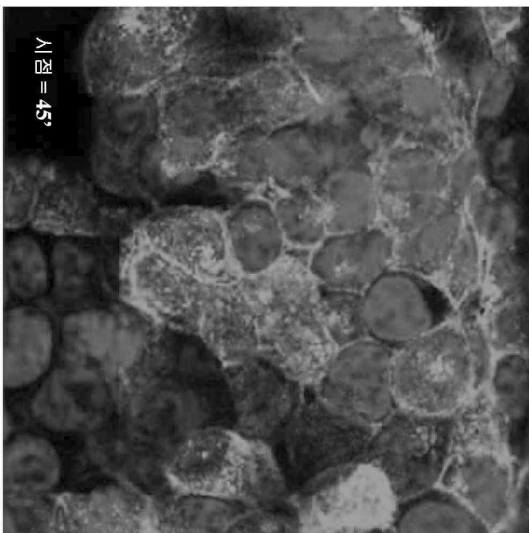
도면24

도면25

도 25a

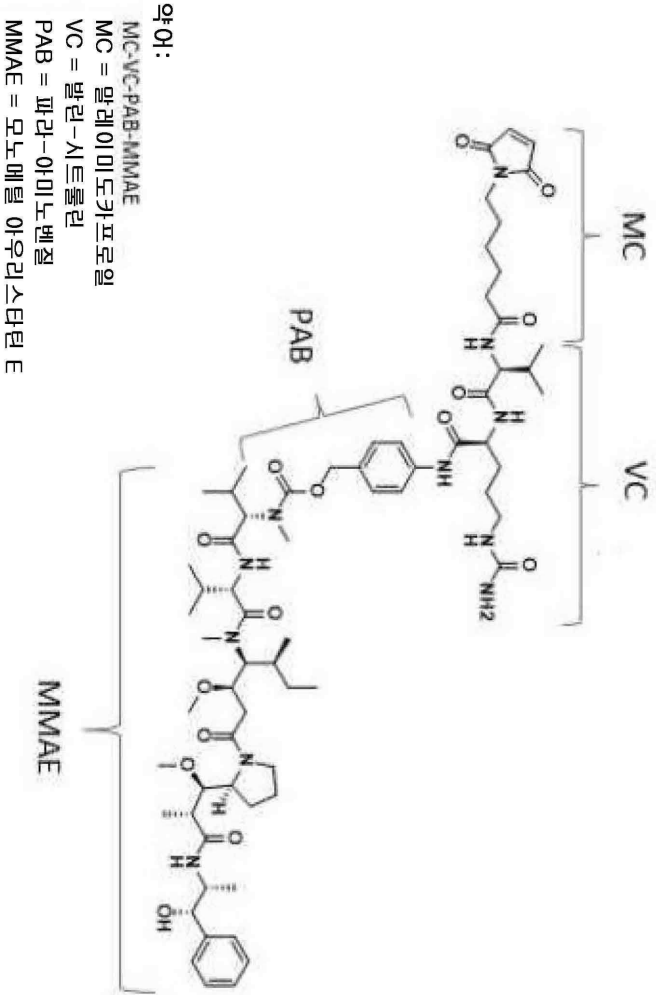


도 25b

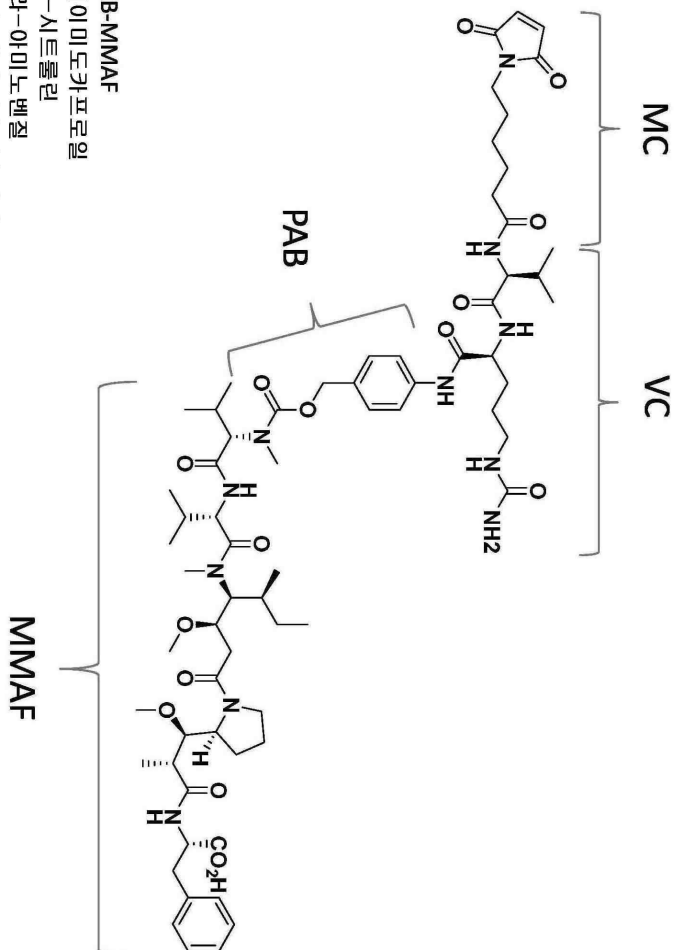


MC-VC-PAB-MMAE의 화학 구조

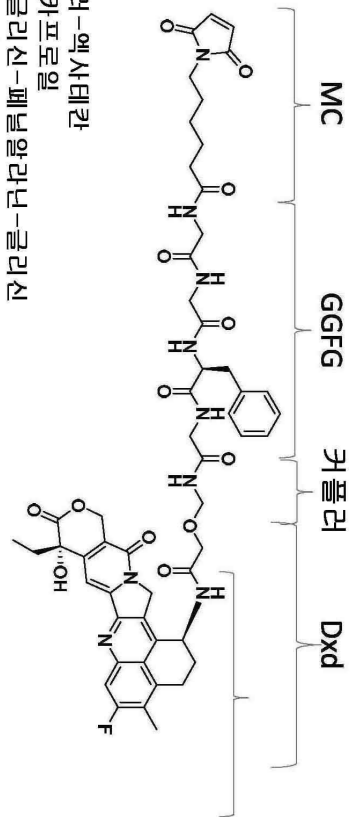
도면26



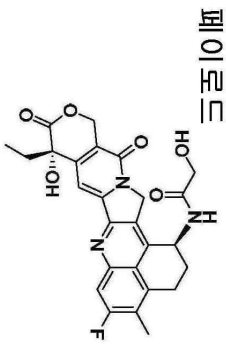
MC-VC-PAB-MMAF의 화학 구조



데록스테칸의 화학 구조

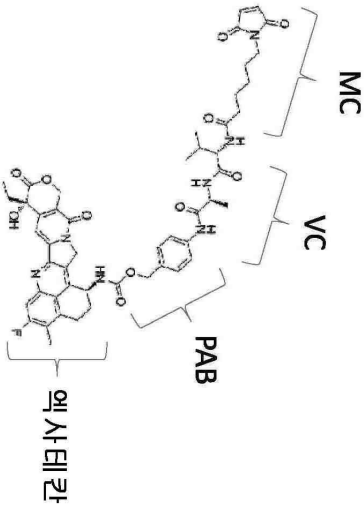


약어:
 MC-GGFG-커플러-엑사테칸
 MC = 말레이미도카프로일
 GGFG = 글리신-글리신-페닐알라닌-글리신
 커플러 = -HN-CH₂-
 Dxd = HO-CH₂CO-엑사테칸
 엑사테칸



엑사테칸의 화학 구조

MC-VC-PAB-엑사테칸



약어:

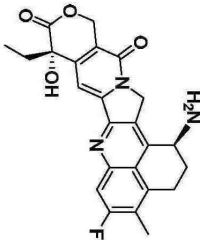
MC = 말레이미도카프로일

VC = 발린-시트롤린

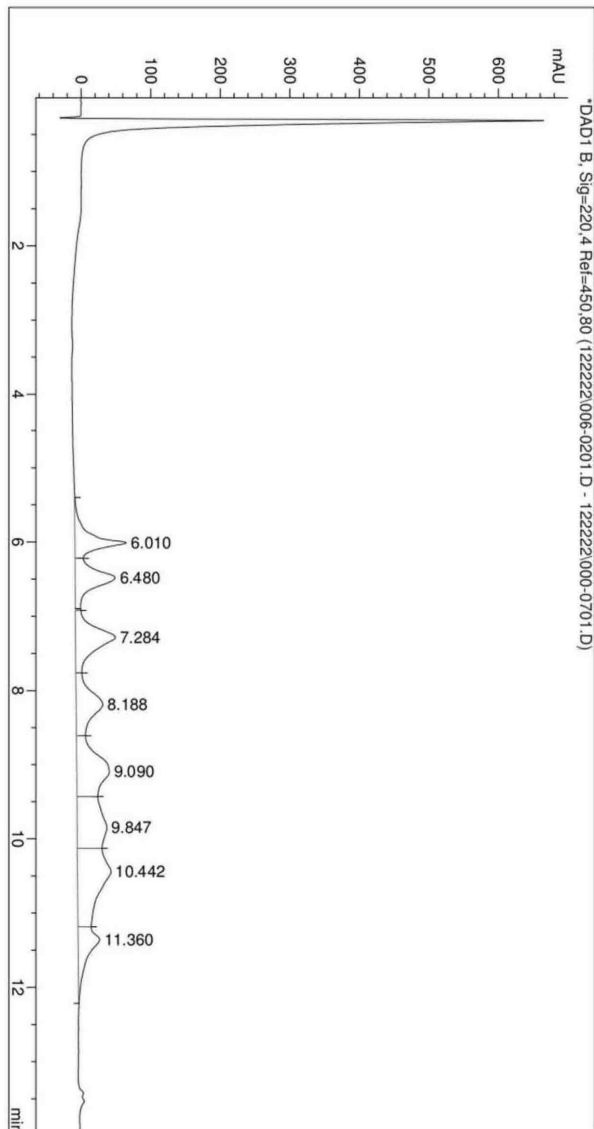
PAB = 파라-아미노벤젠

엑사테칸

페이로드



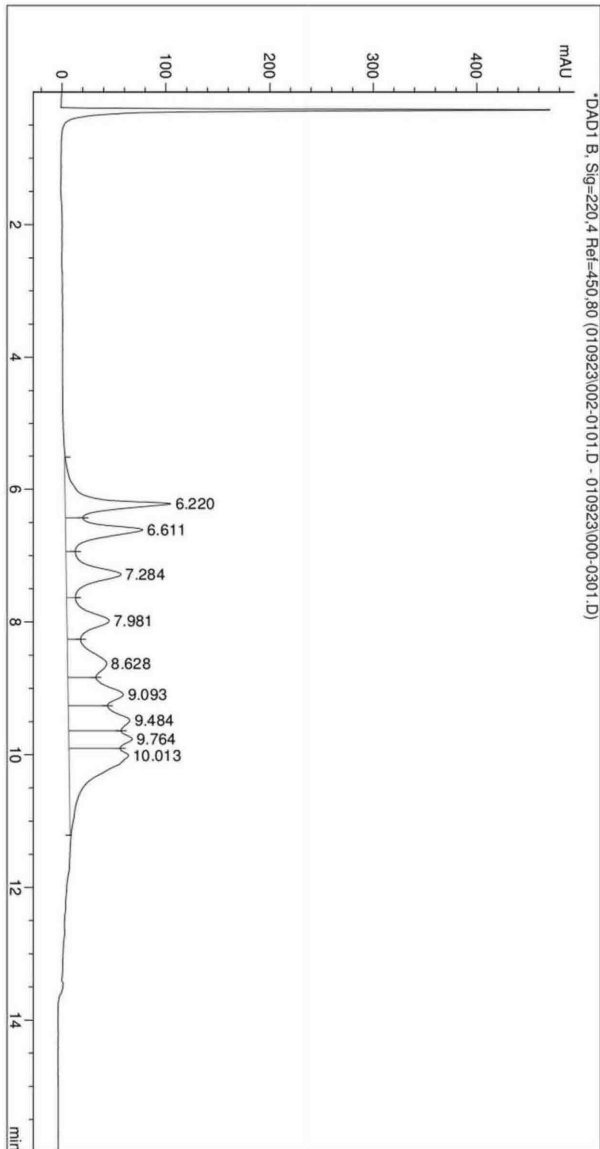
도면30



MNC2-MMAE: HIC 크로마토그램

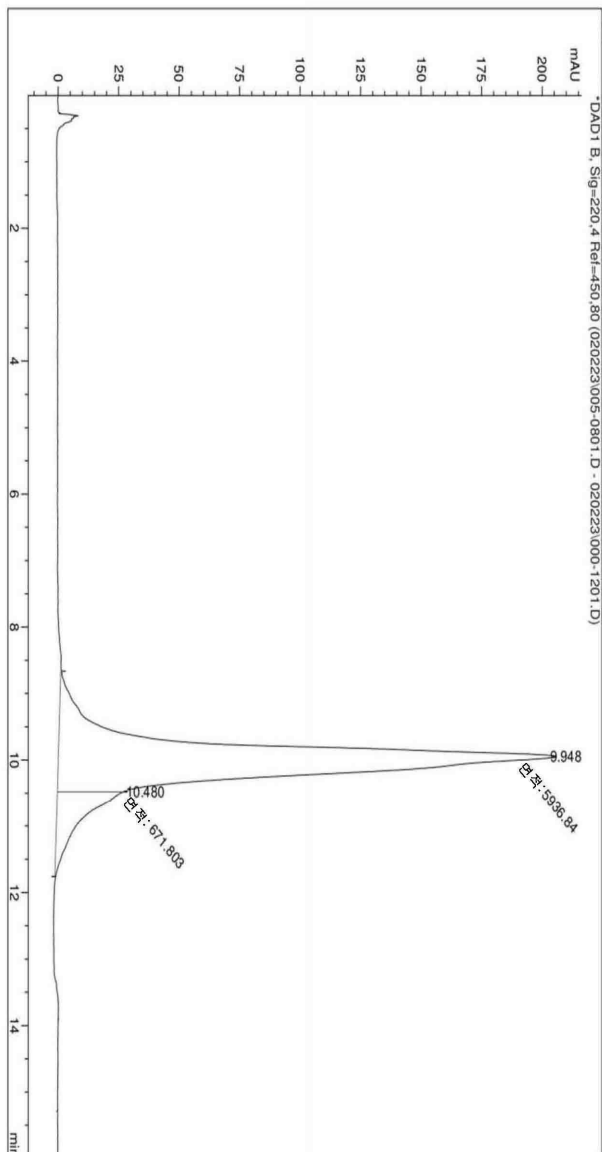
MNC2-MMAF HIC 크로마토그램

도면31

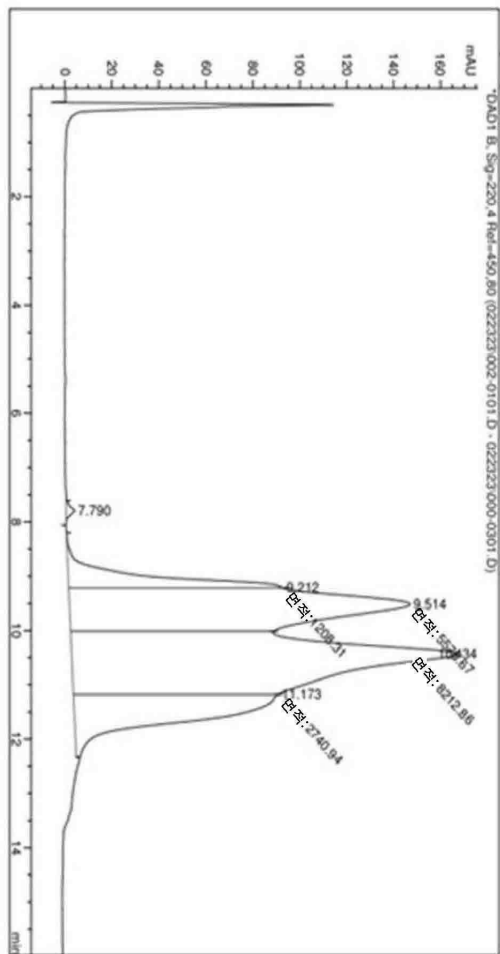


MNC2-대륙스테판 HIC 크로마토그램

도면32a



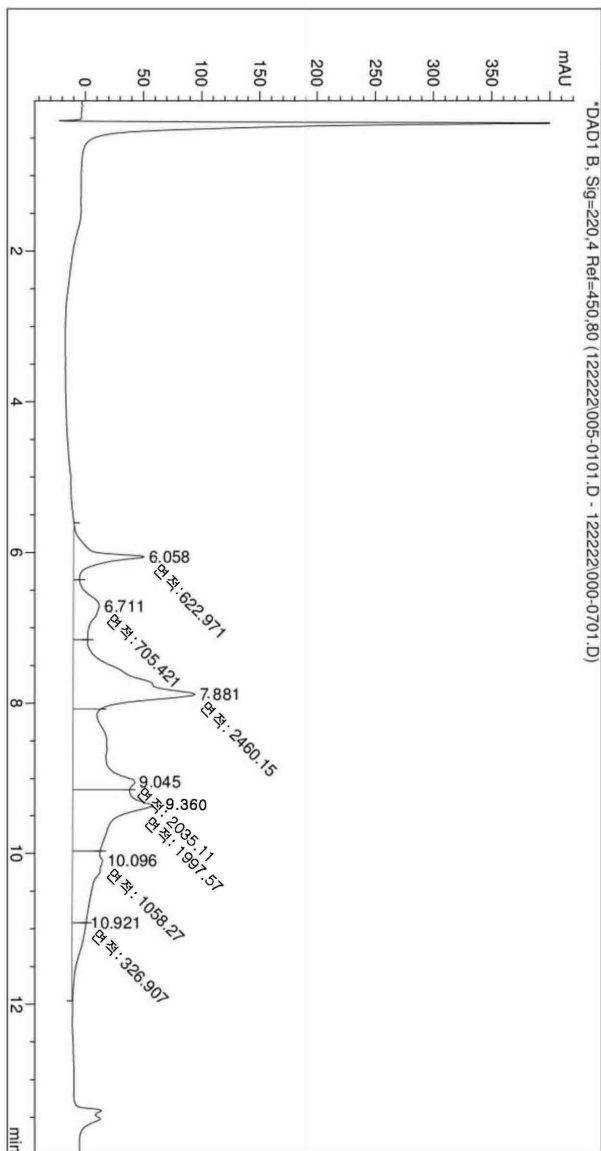
도면32b



MNC2-MC-VC-PAB-엑시테칸 HIC 크로마토그램

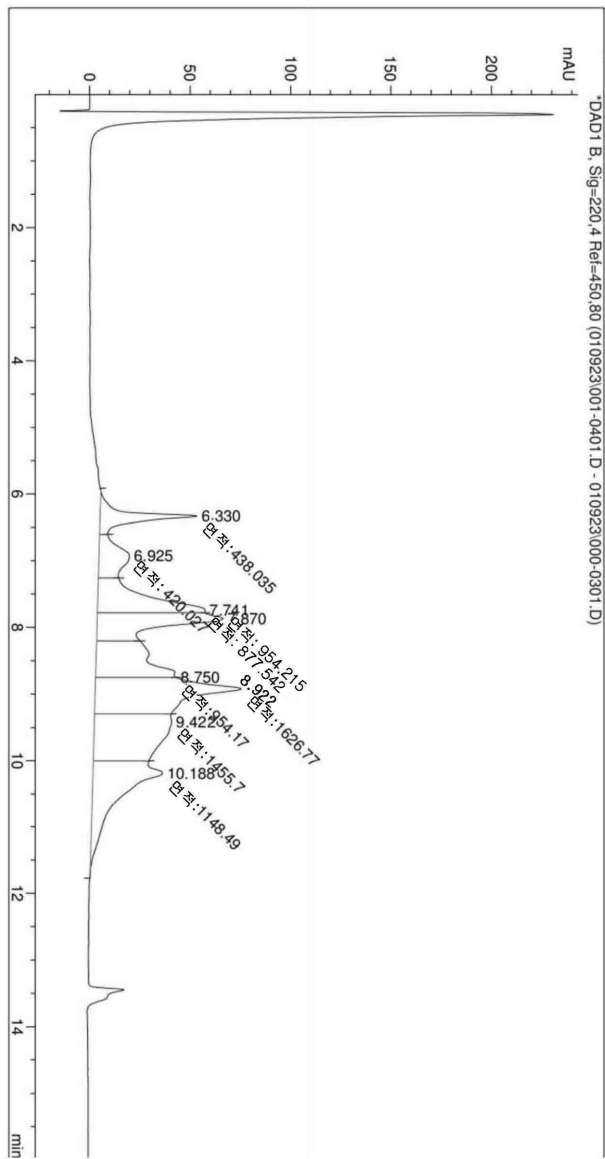
MN20A10-MMAE: HIC 크로마토그램

도면33



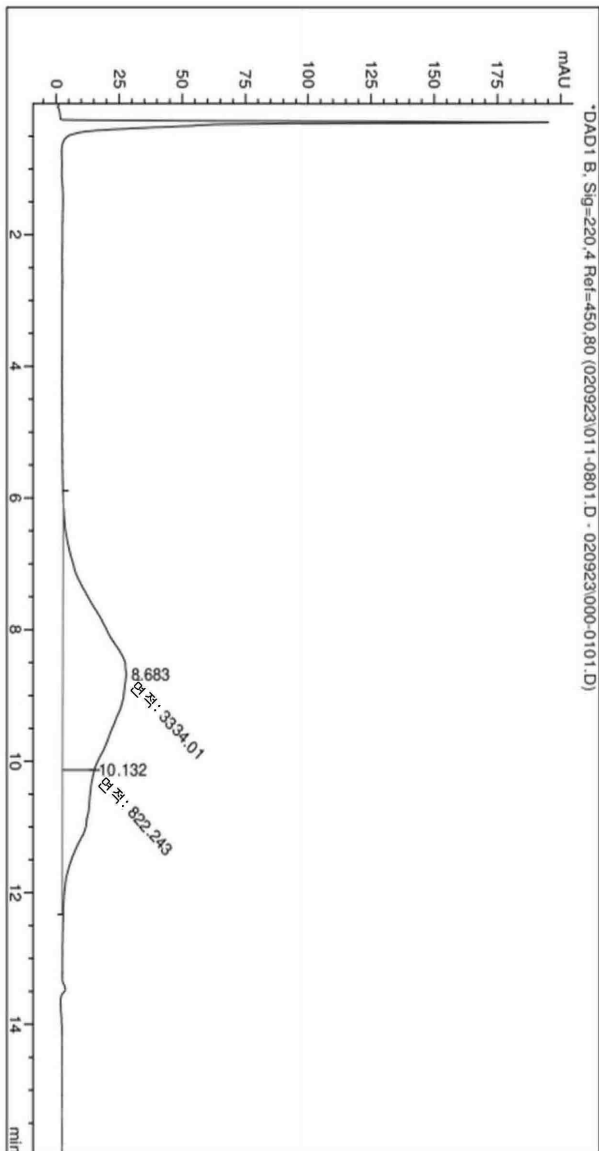
도면34

MN20A10-MMAF HIC 크로마토그램

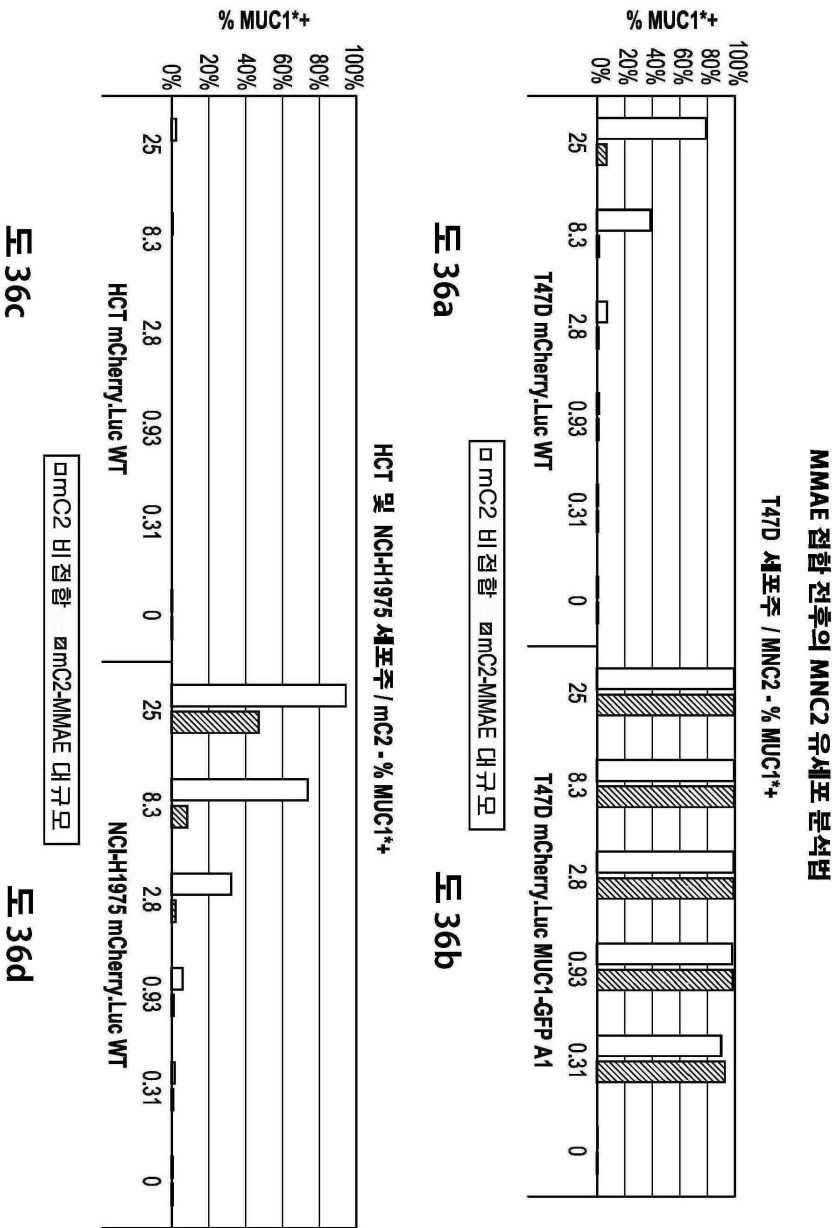


MN20A10-데옥스테칸 HIC 크로마토그램

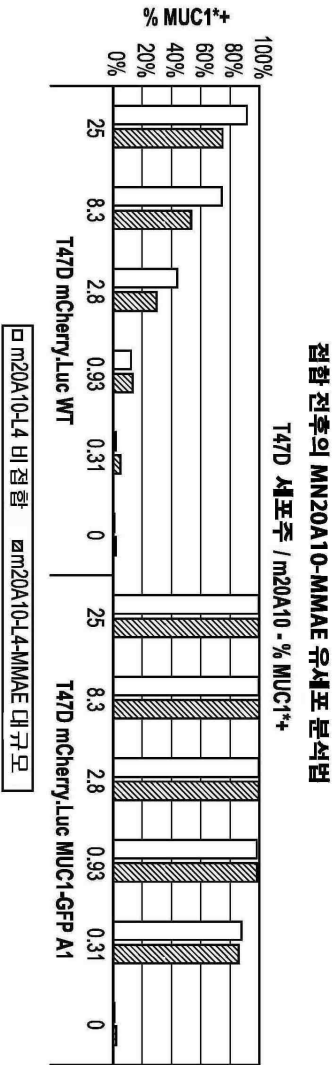
도면35



도면36

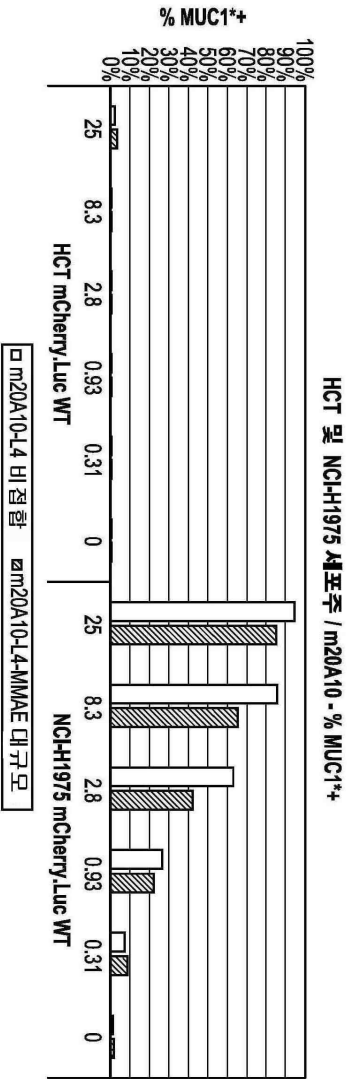


도면37



도 37a

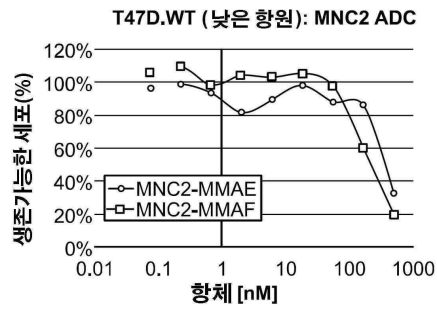
도 37b



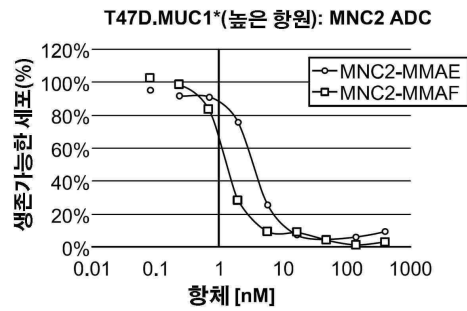
도 37c

도 37d

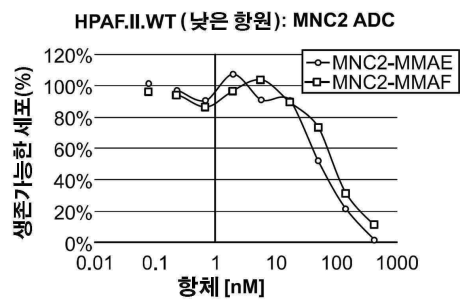
도면38



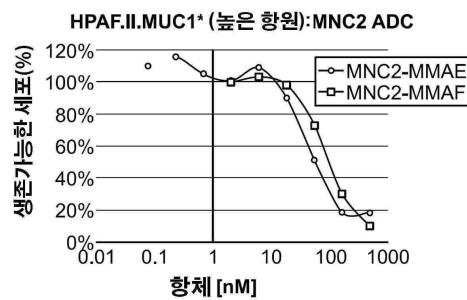
도 38a



도 38b



도 38c



도 38d

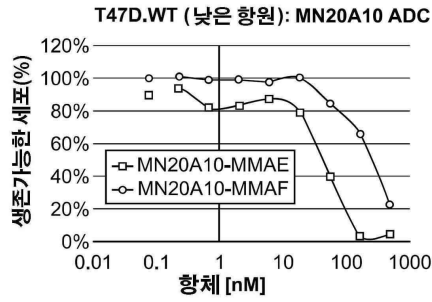
	DAR	IC50 nM	R ²
T47D WT_MNC2-MMAE	4.1	>150	0.93
T47D WT_MNC2-MMAF	3.7	>150	0.99
HPAF-II WT_MNC2-MMAE	4.1	66.62	0.981
HPAF-II WT_MNC2-MMAF	3.7	100.31	0.980

도 38e

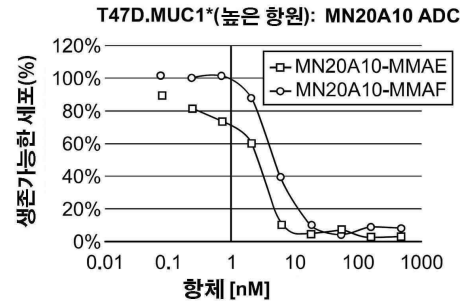
	DAR	IC50 nM	R ²
T47D MUC1*_MNC2-MMAE	4.1	3.62	0.999
T47D MUC1*_MNC2-MMAF	3.7	1.28	0.998
HPAF-II MUC1*_MNC2-MMAE	4.1	41.58	0.988
HPAF-II MUC1*_MNC2-MMAF	3.7	89.61	0.998

도 38f

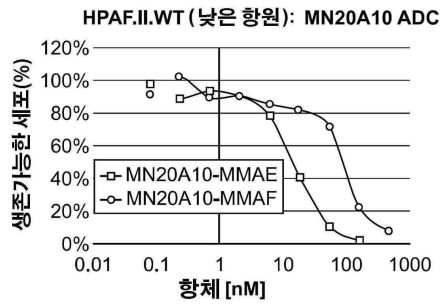
도면39



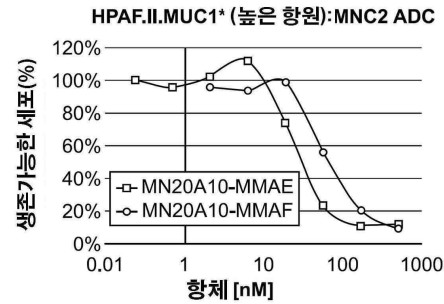
도 39a



도 39b



도 39c



도 39d

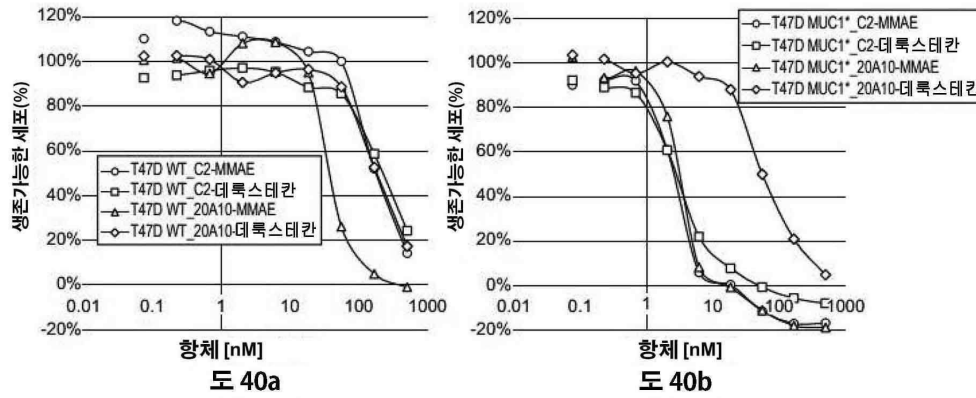
	DAR	IC50 nM	R ²
T47D WT_MN20A10-MMAE	5.8	50.88	0.99
T47D WT_MN20A10-MMAF	3.8	>150	0.99
HPAF-II WT_MN20A10-MMAE	5.8	17.32	0.997
HPAF-II WT_MN20A10-MMAF	3.8	93.49	0.976

도 39e

	DAR	IC50 nM	R ²
T47D MUC1*_MN20A10-MMAE	5.8	2.81	0.991
T47D MUC1*_MN20A10-MMAF	3.8	4.62	0.999
HPAF-II MUC1*_MN20A10-MMAE	5.8	25.25	0.99
HPAF-II MUC1*_MN20A10-MMAF	3.8	58.35	0.99

도 39f

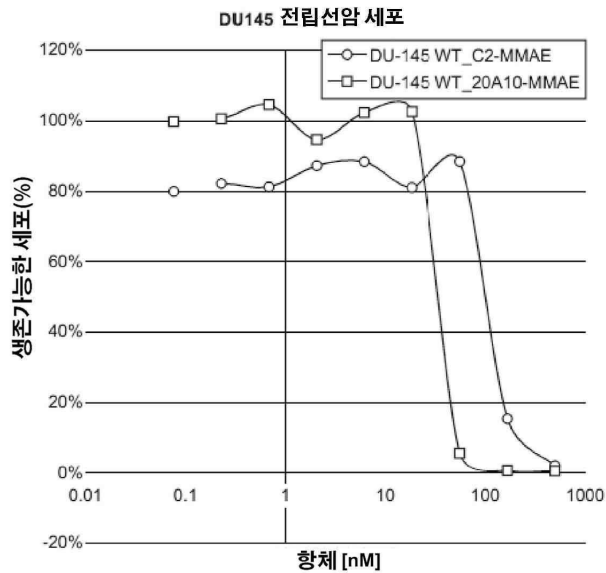
도면40



	DAR	IC50 nM	R ²
T47D WT_MNC2-MMAE	4.1	149.17	0.9911
T47D WT_MNC2-데옥스테칸	7.2	239.12	0.9934
T47D WT_MN20A10-MMAE	5.8	39.52	0.9913
T47D WT_MN20A10-데옥스테칸	4.6	166.79	0.9834
T47D MUC1*_MNC2-MMAE	4.1	3.09	0.9915
T47D MUC1*_MNC2-데옥스테칸	7.2	5.27	0.9976
T47D MUC1*_MN20A10-MMAE	5.8	3.57	0.9909
T47D MUC1*_MN20A10-데옥스테칸	4.6	57.12	0.9943

도 40c

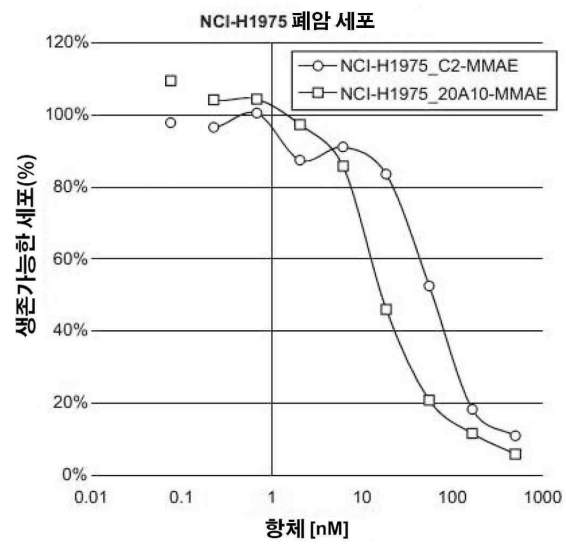
도면41



	DAR	IC50 nM	R ²
DU-145 WT_C2-MMAE	4.1	86.82	0.9930
DU-145 WT_20A10-MMAE	5.8	36.47	0.9975

도 41b

도면42

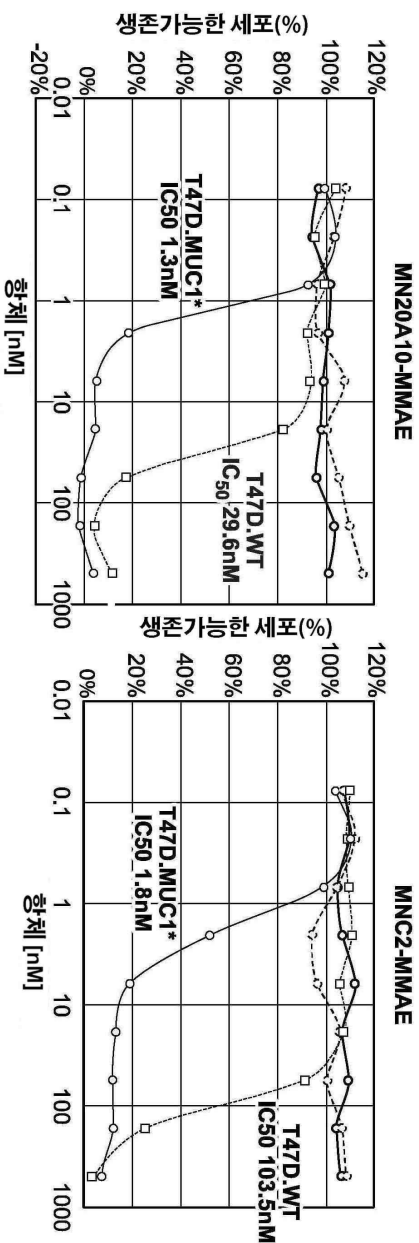


도 42a

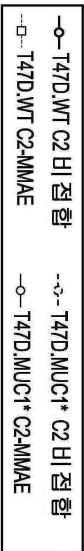
	DAR	IC50 nM	R ²
NCI-H1975_C2-MMAE	4.3	55.85	0.9898
NCI-H1975_20A10-MMAE	4.9	14.42	0.9974

도 42b

도면43



도 43a

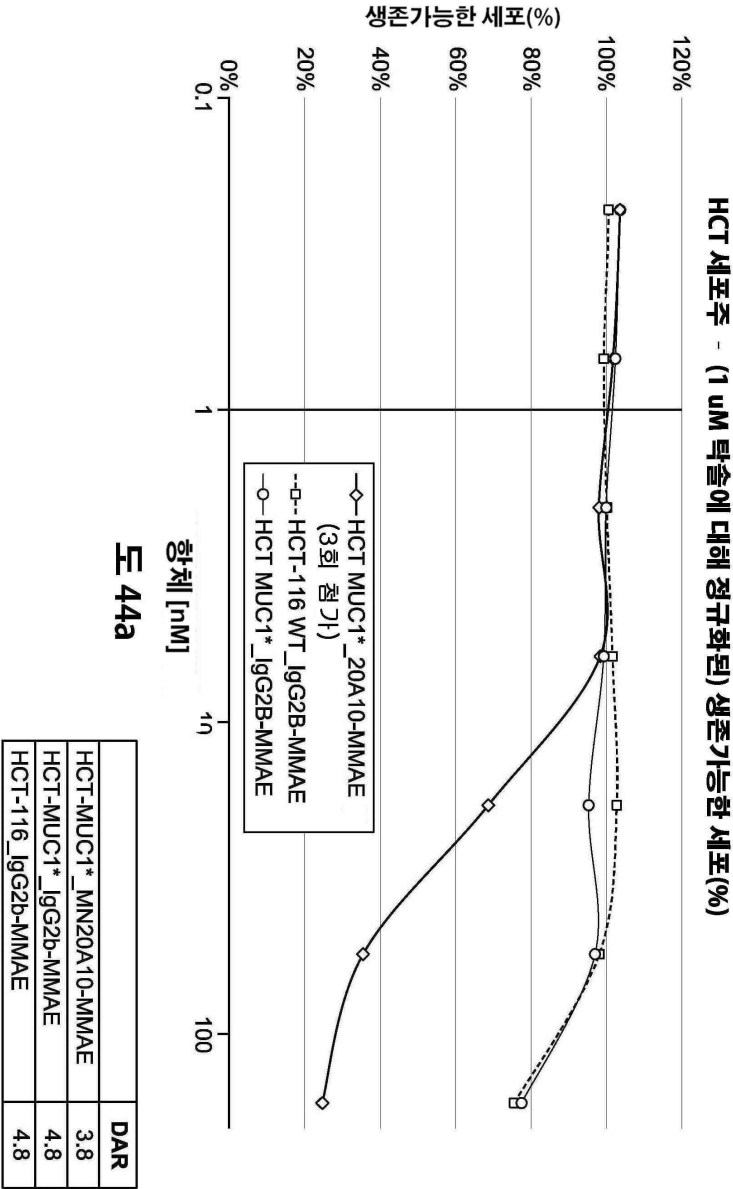


도 43b

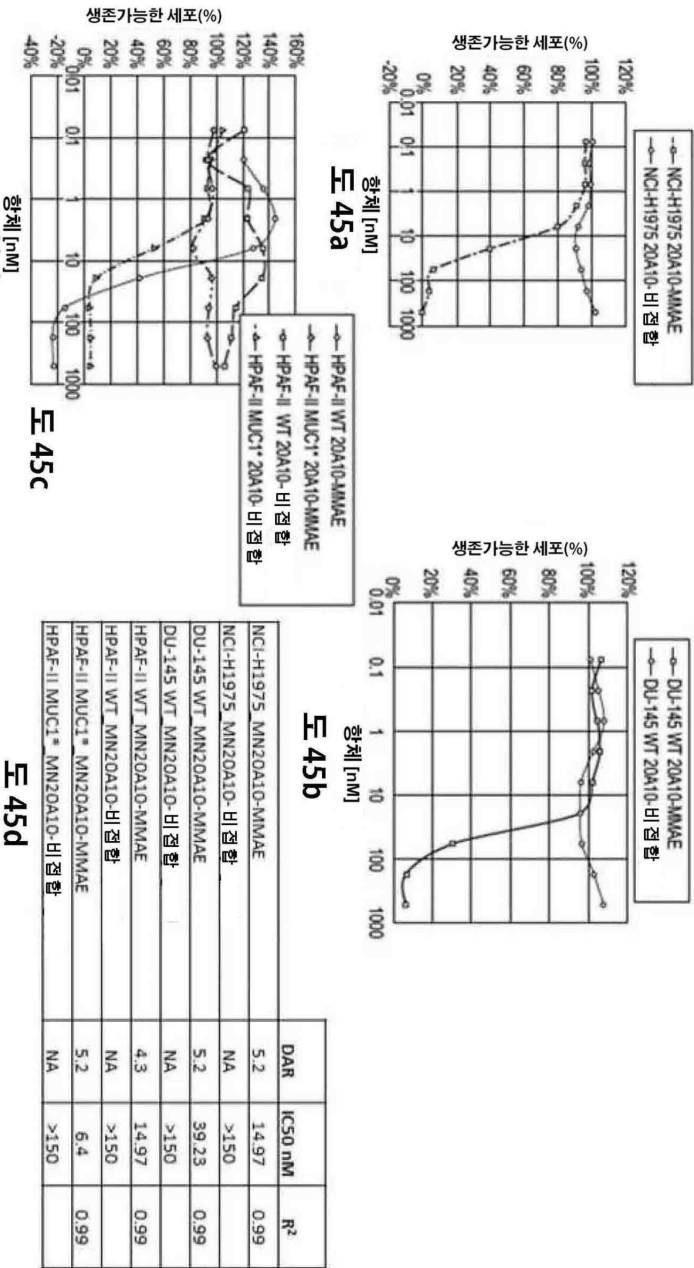
	DAR	IC ₅₀ nM	R ²
T47D.WT_MN20A10-MMAE	5.2	29.6	
T47D.MUC1*_MN20A10-MMAE	5.2	1.3	
T47D.WT_MNC2-MMAE	4.3	103.5	
T47D.MUC1*_MNC2-MMAE	4.3	1.8	

도 43c

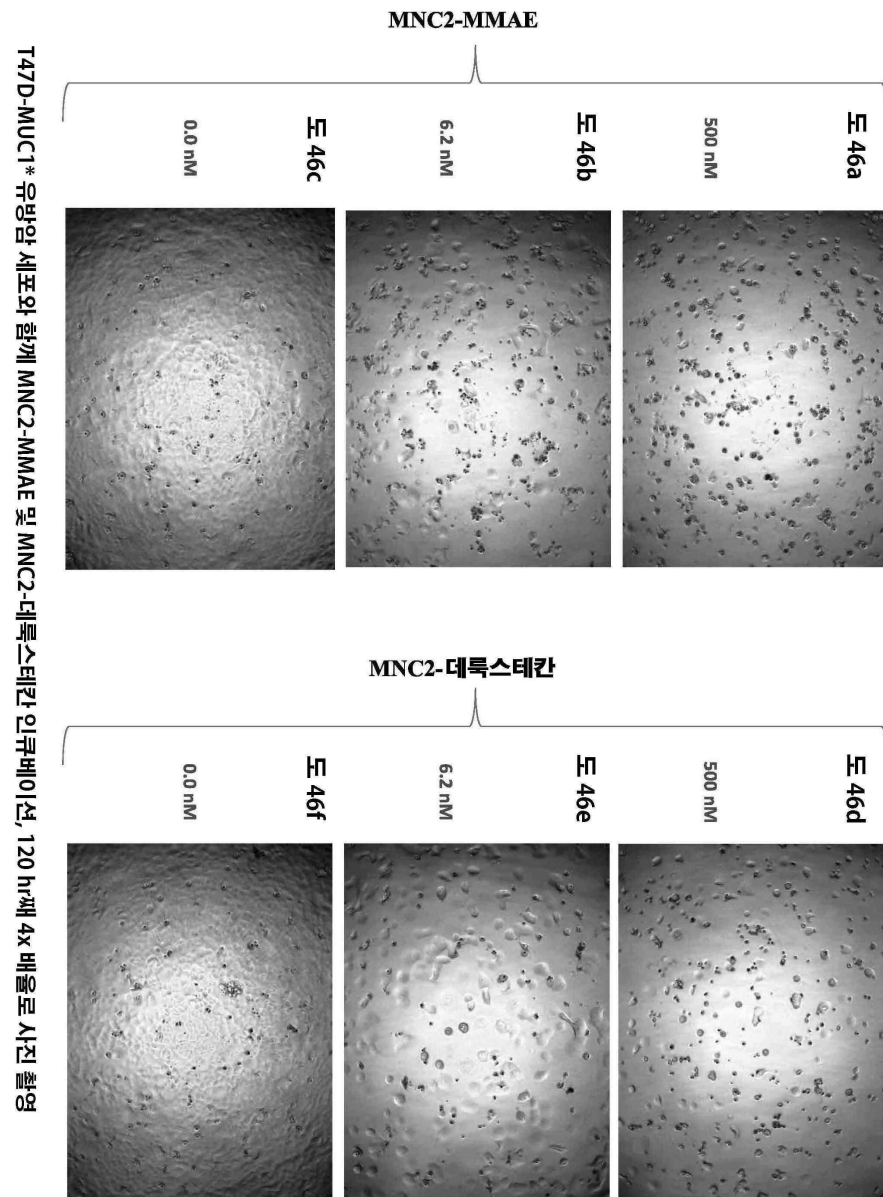
도면44



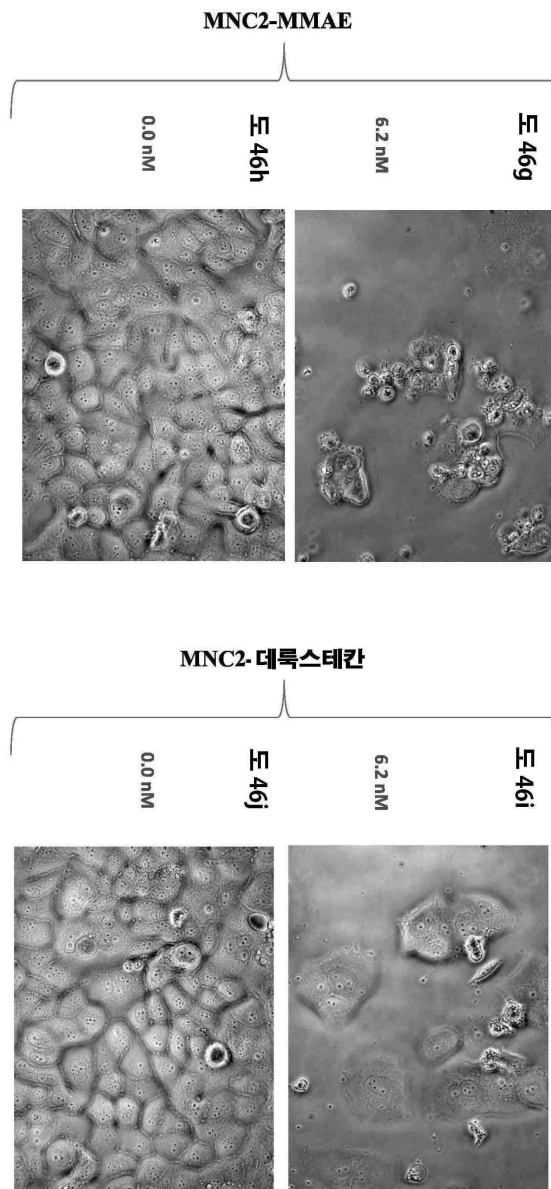
도면45



도면46af

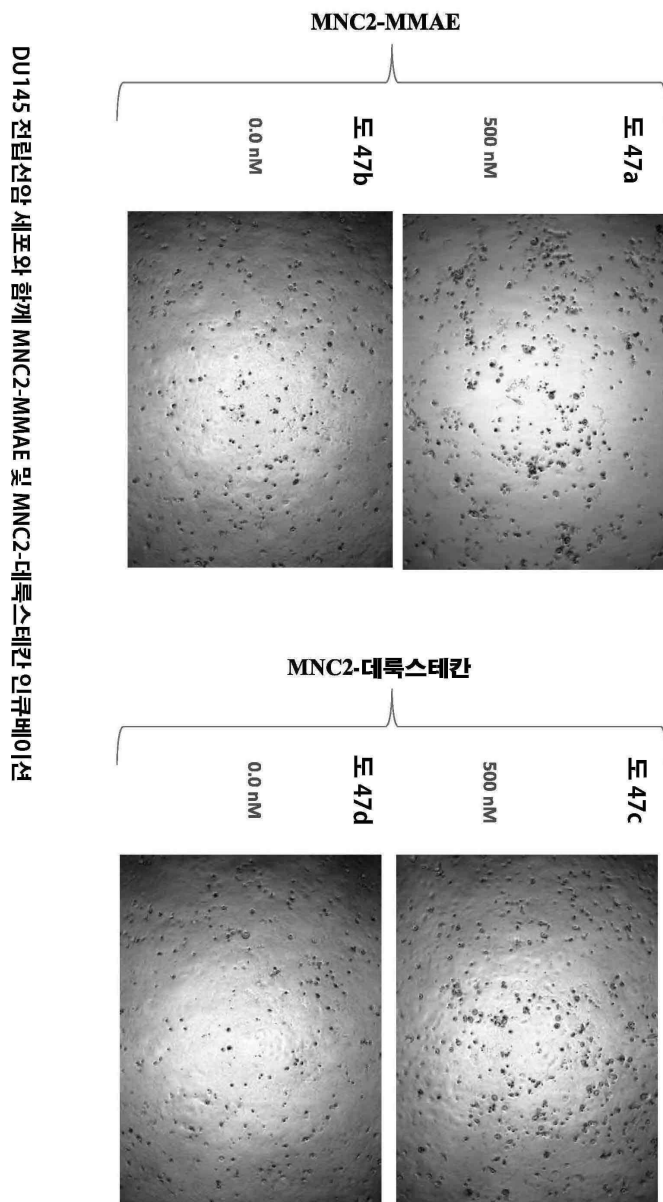


도면46gj

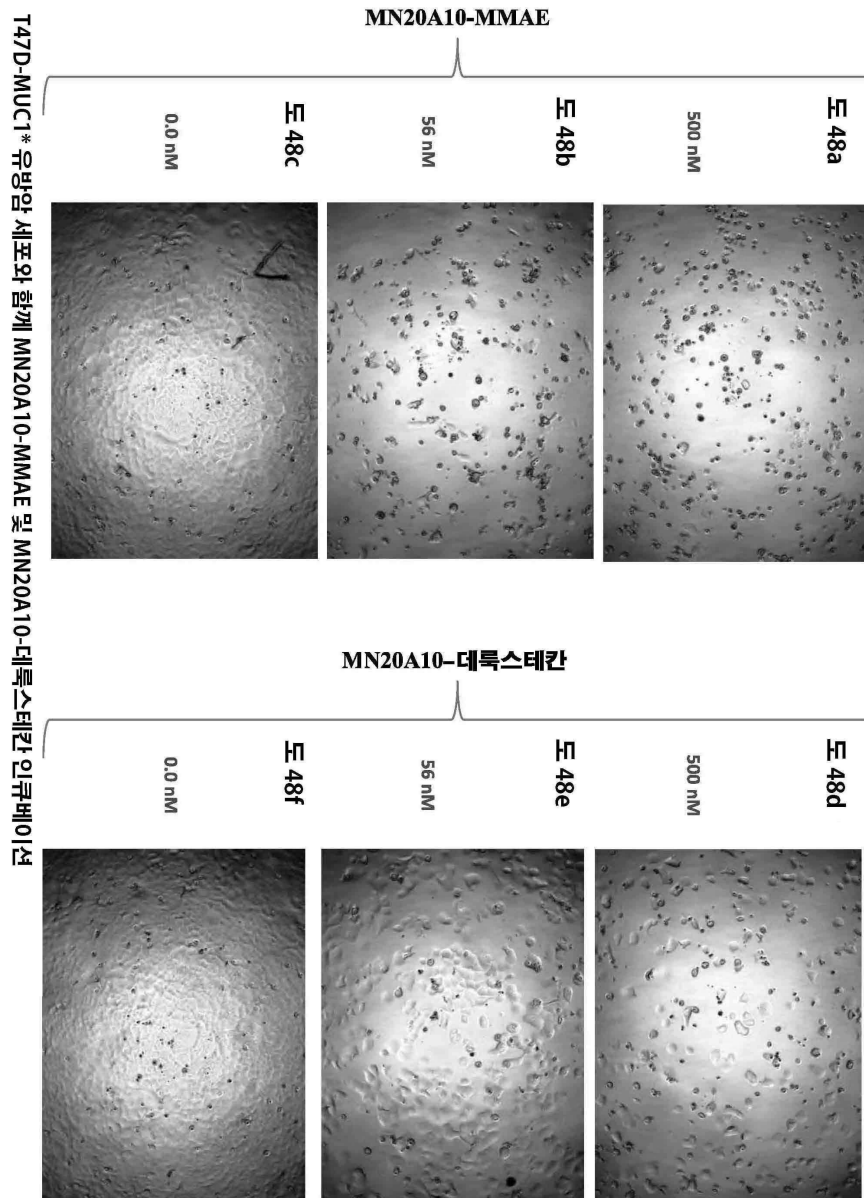


T47D-MUC1 * 유방암 세포와 함께 MNC2-MMAE 및 MNC2-데옥스테칸 인큐베이션, 120 hr째 20x 배율

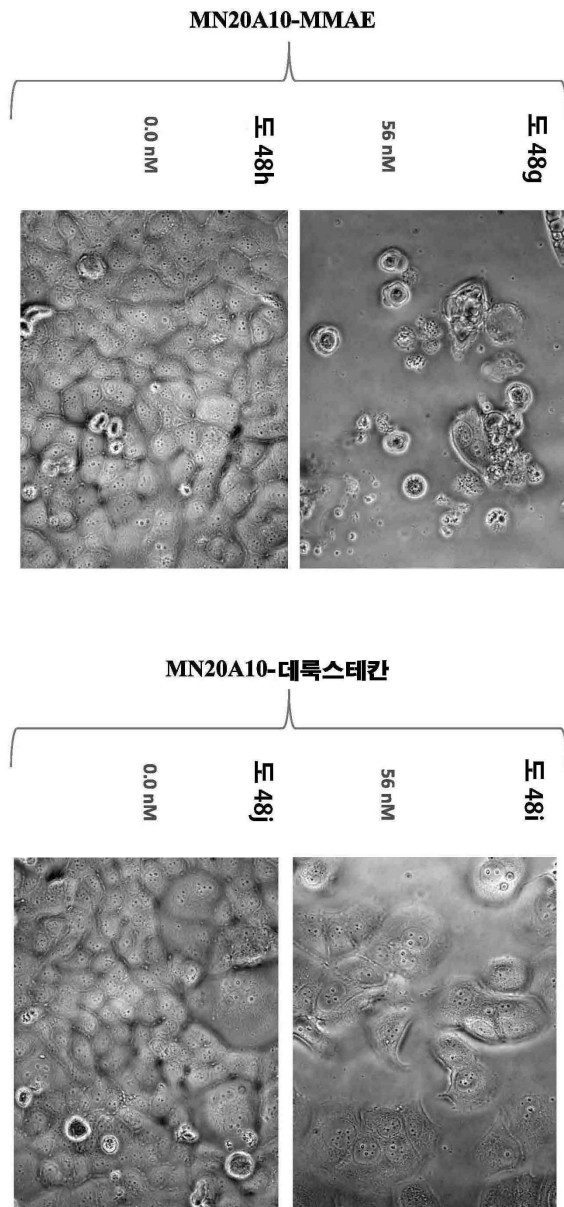
도면47



도면48af



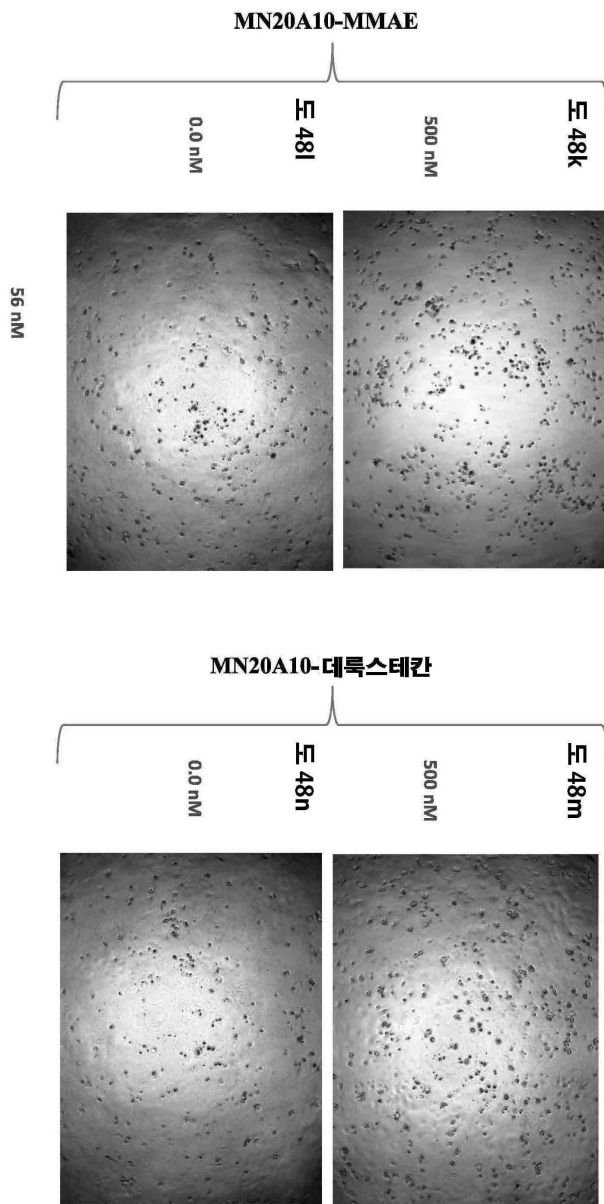
도면48g,j



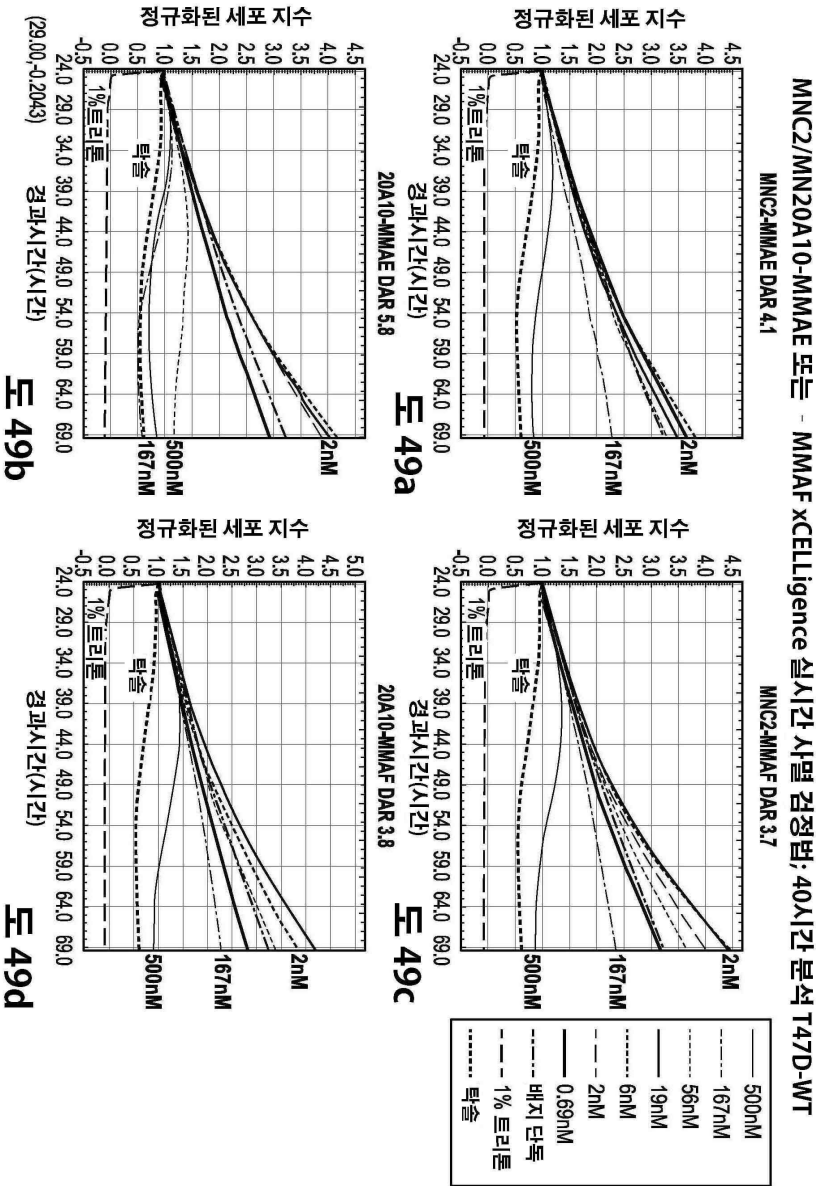
T47D-MUC1* 유방암 세포와 함께 MN20A10-MMAE 및 MN20A10-데록스테칸 인큐베이션

도면 48kn

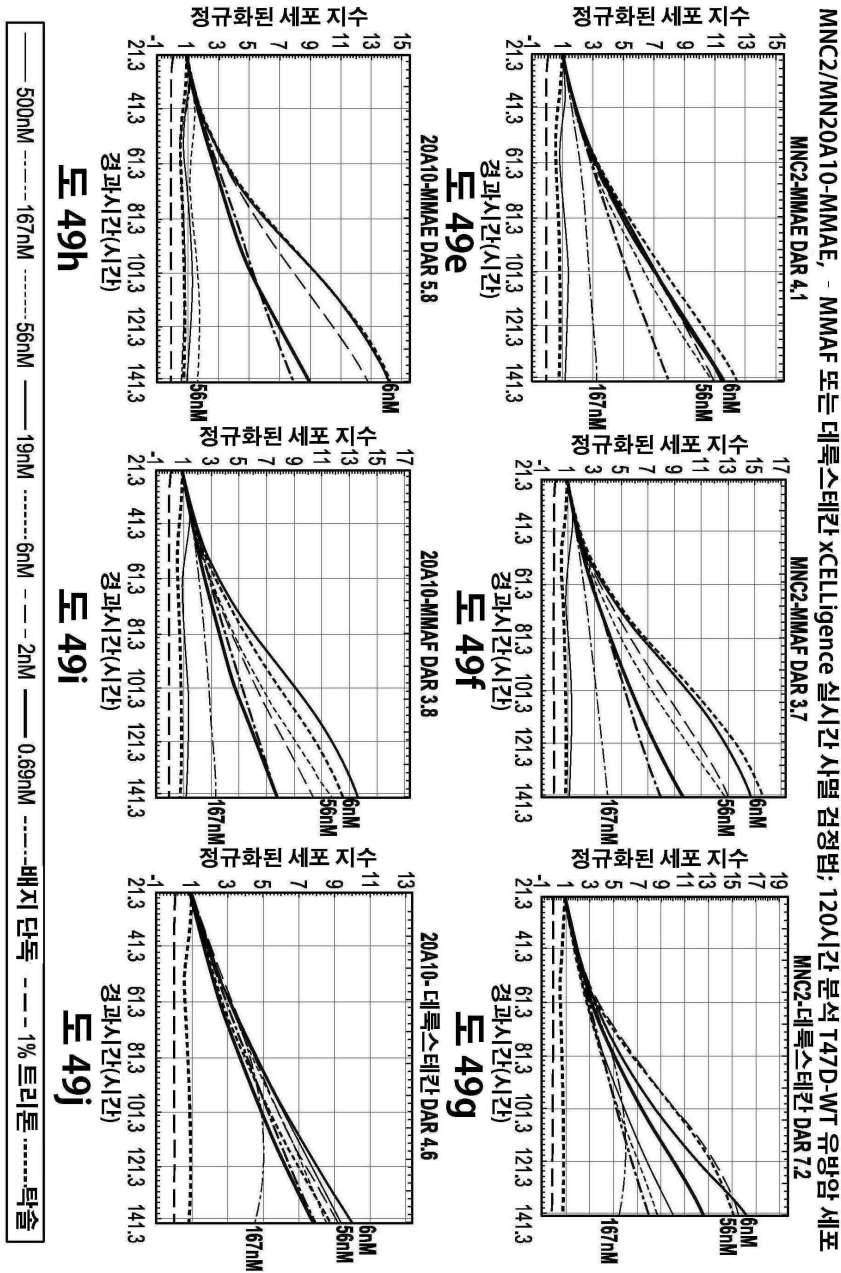
DU145 전립선암 세포와 함께 MN20A10-MMAE 및 MN20A10-데록스테칸 인큐베이션, 120 hr째 4x 배율



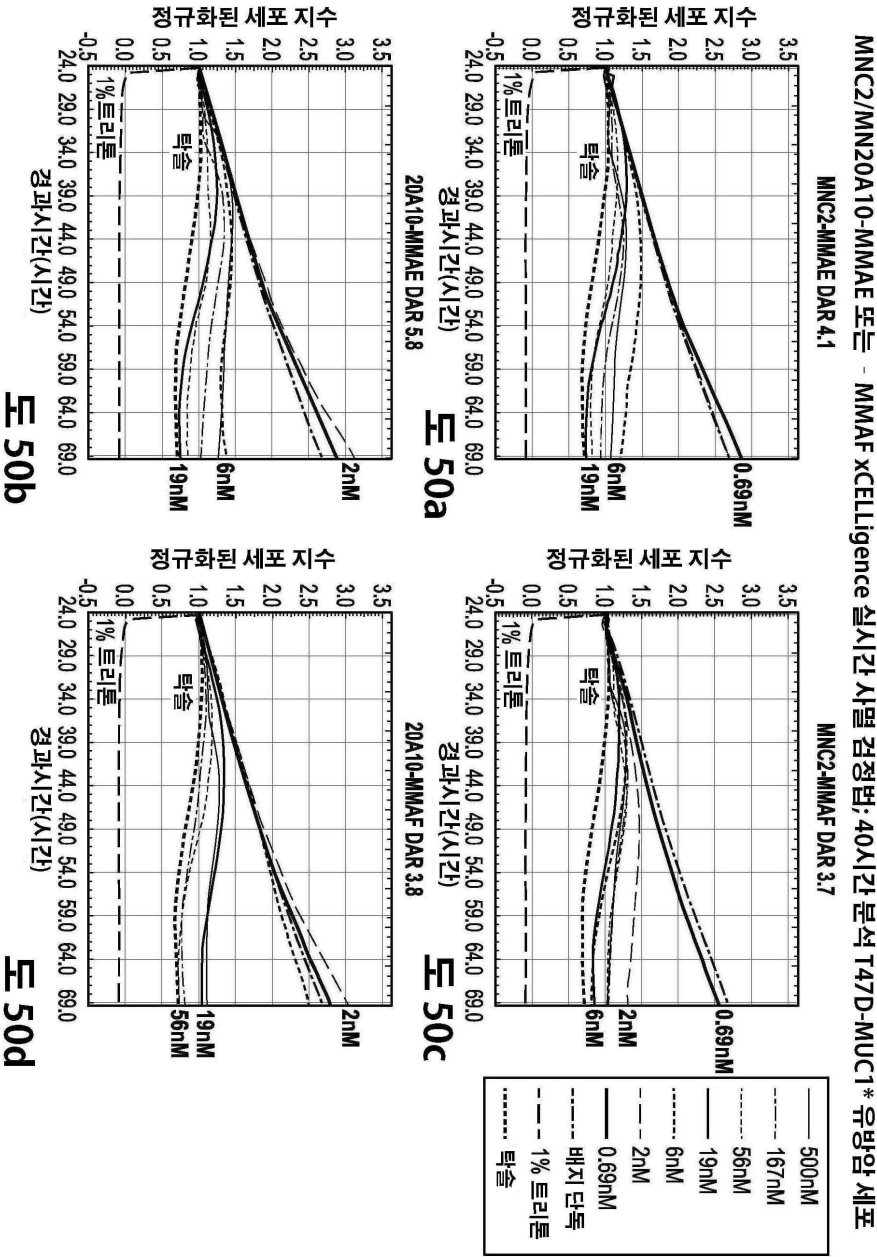
도면49ad



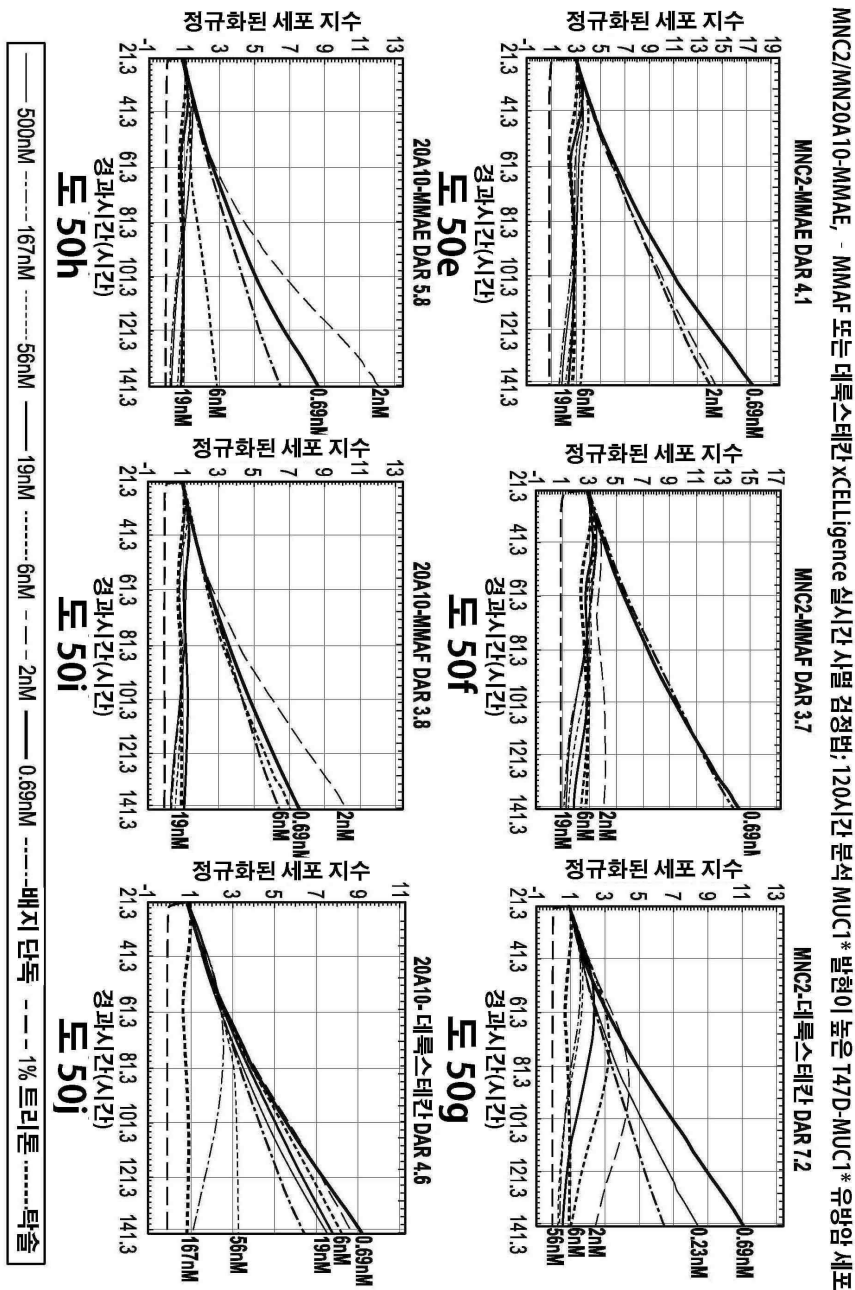
도면49ej



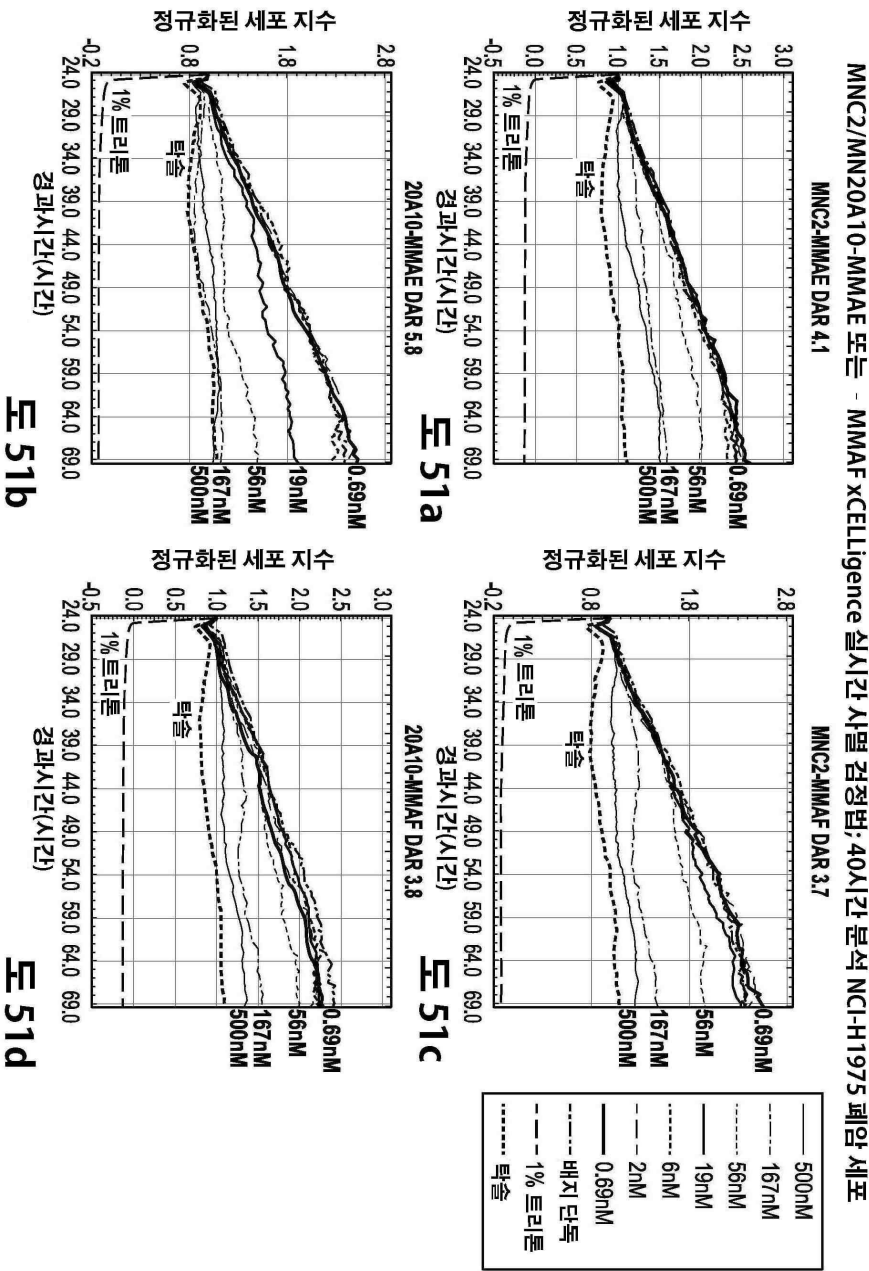
도면50ad



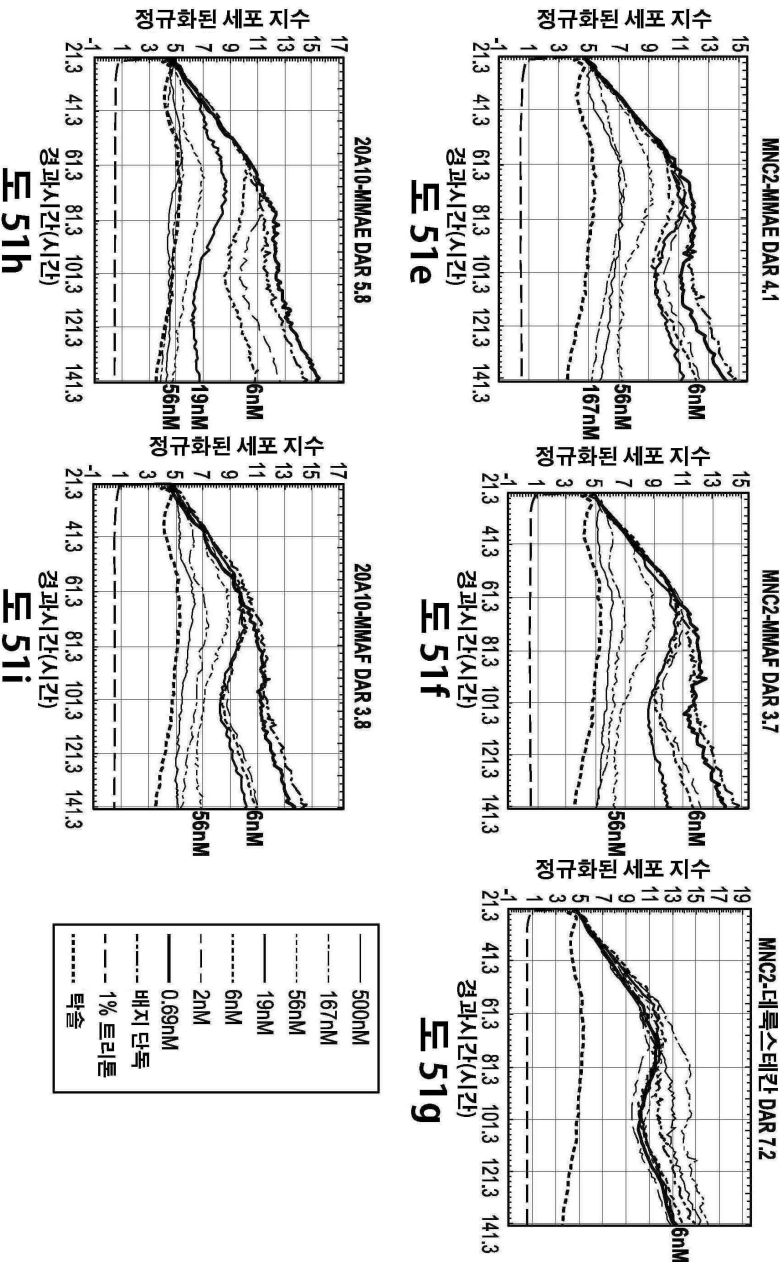
도면50ej



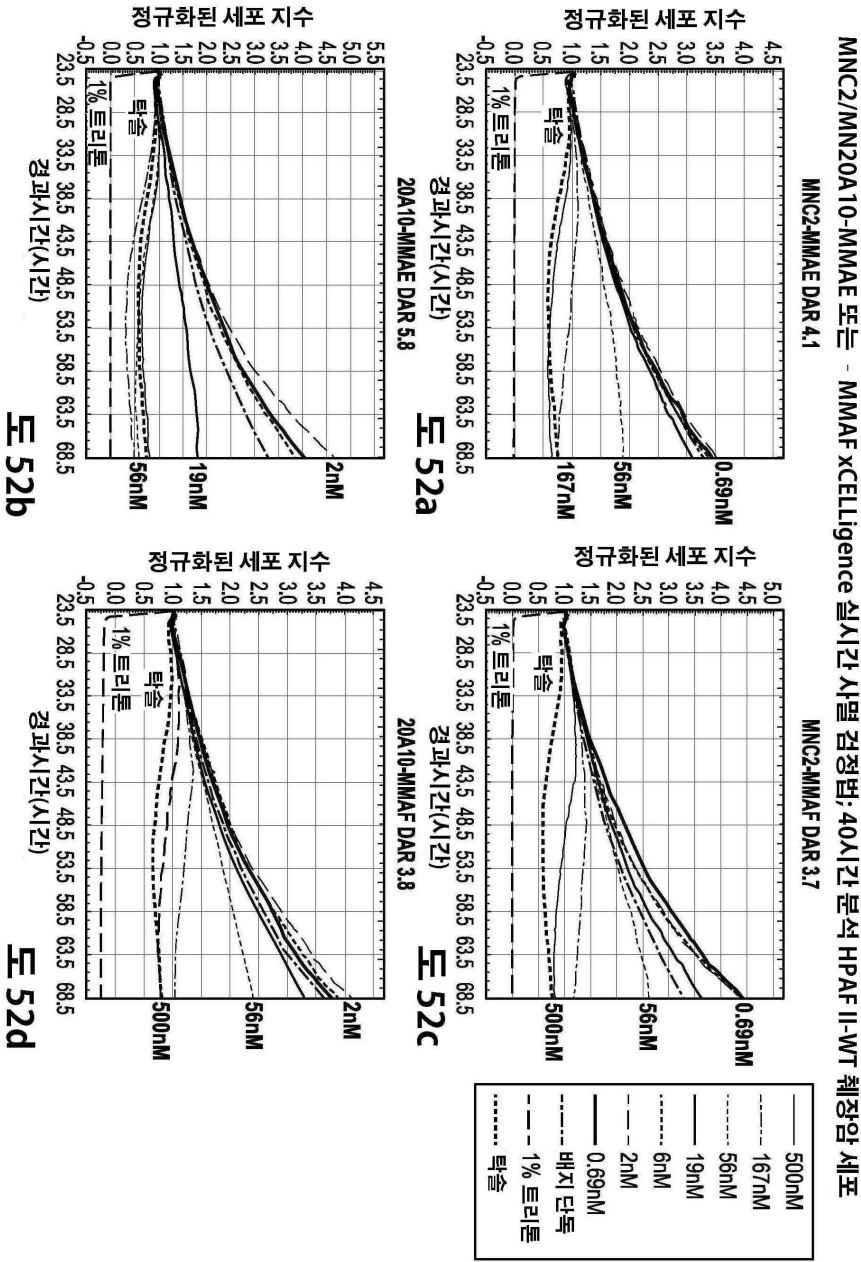
도면51ad



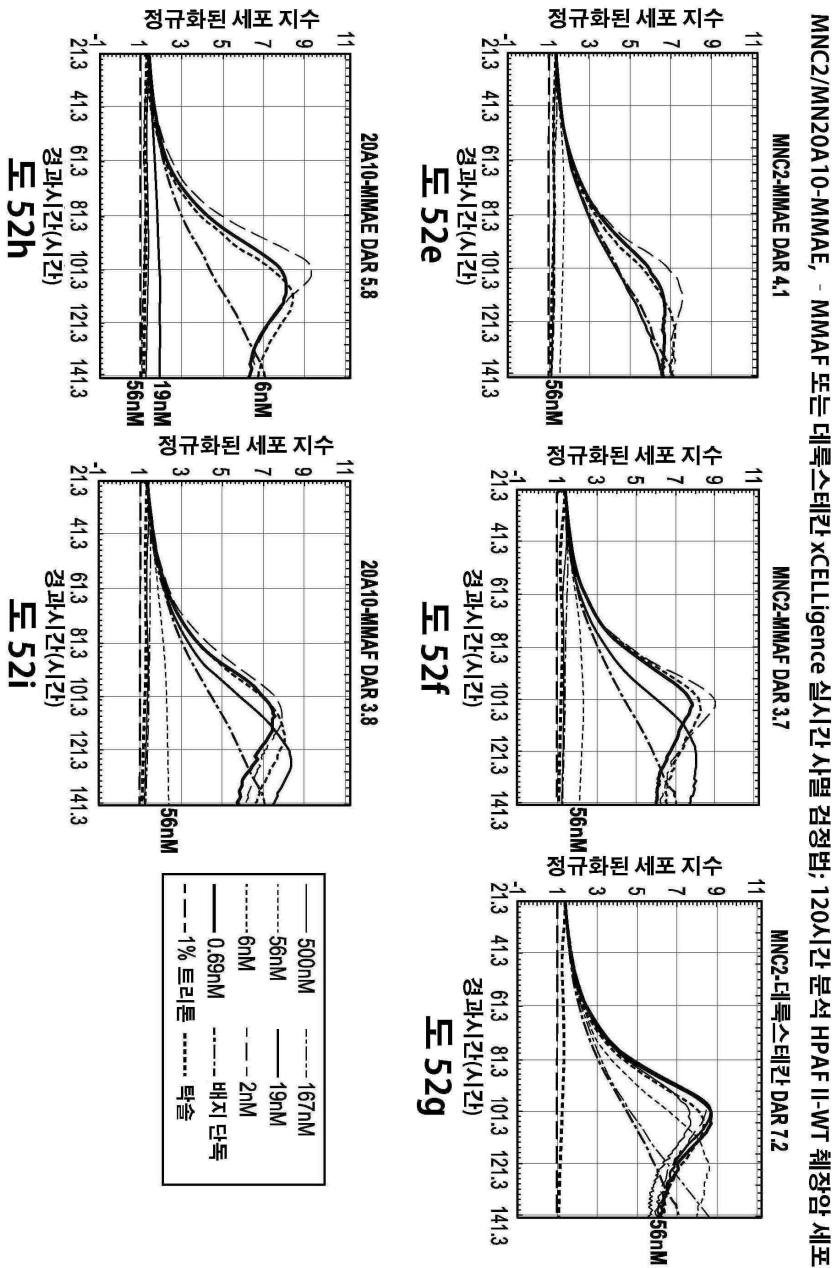
도면51e



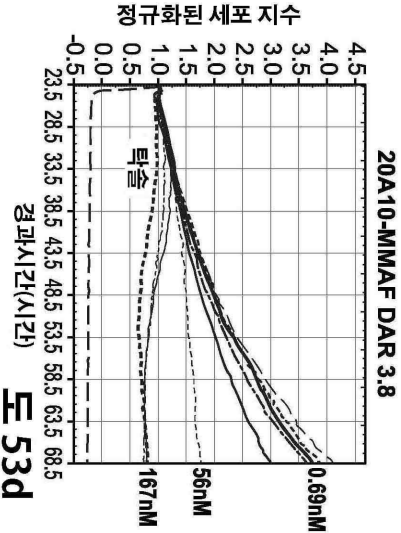
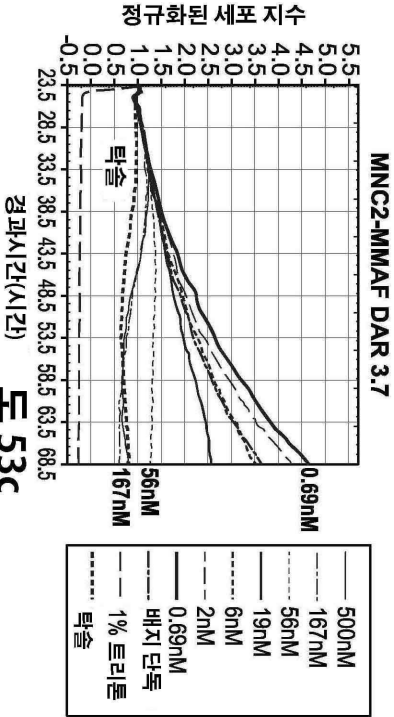
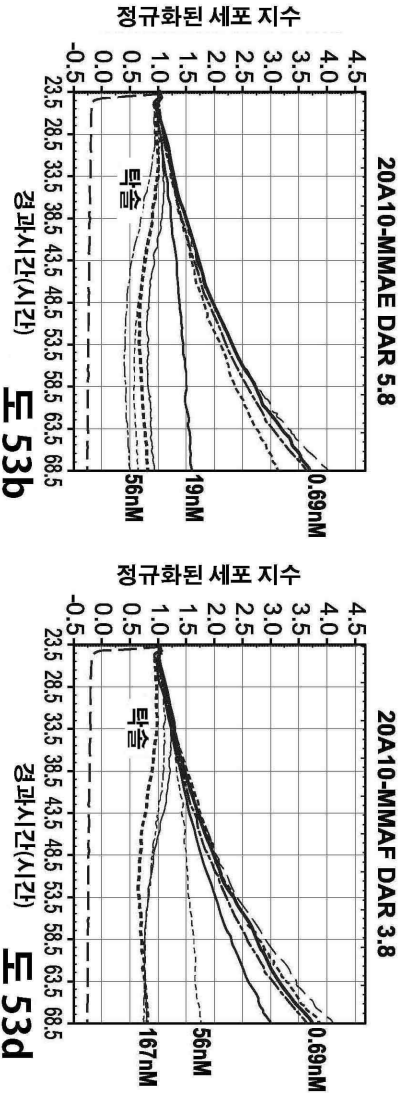
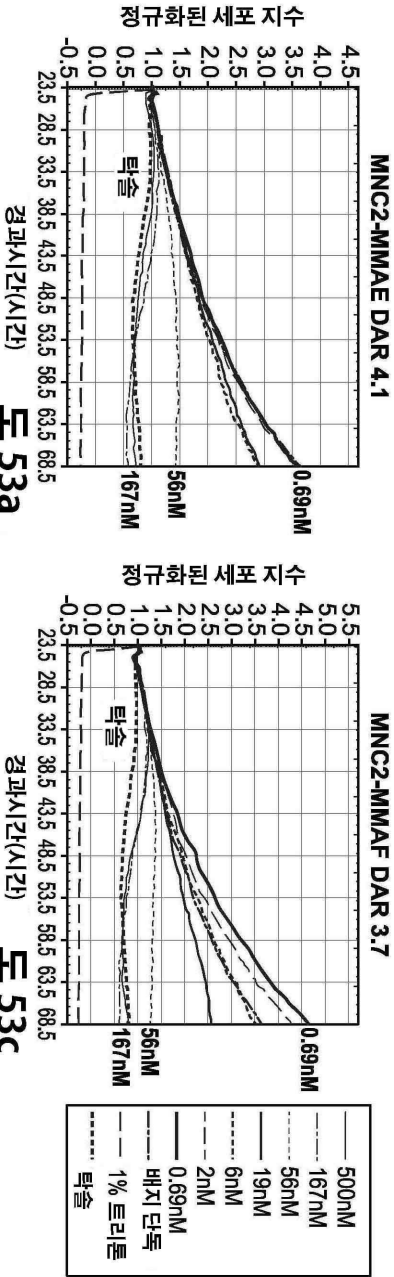
도면52ad



도면52e*i*

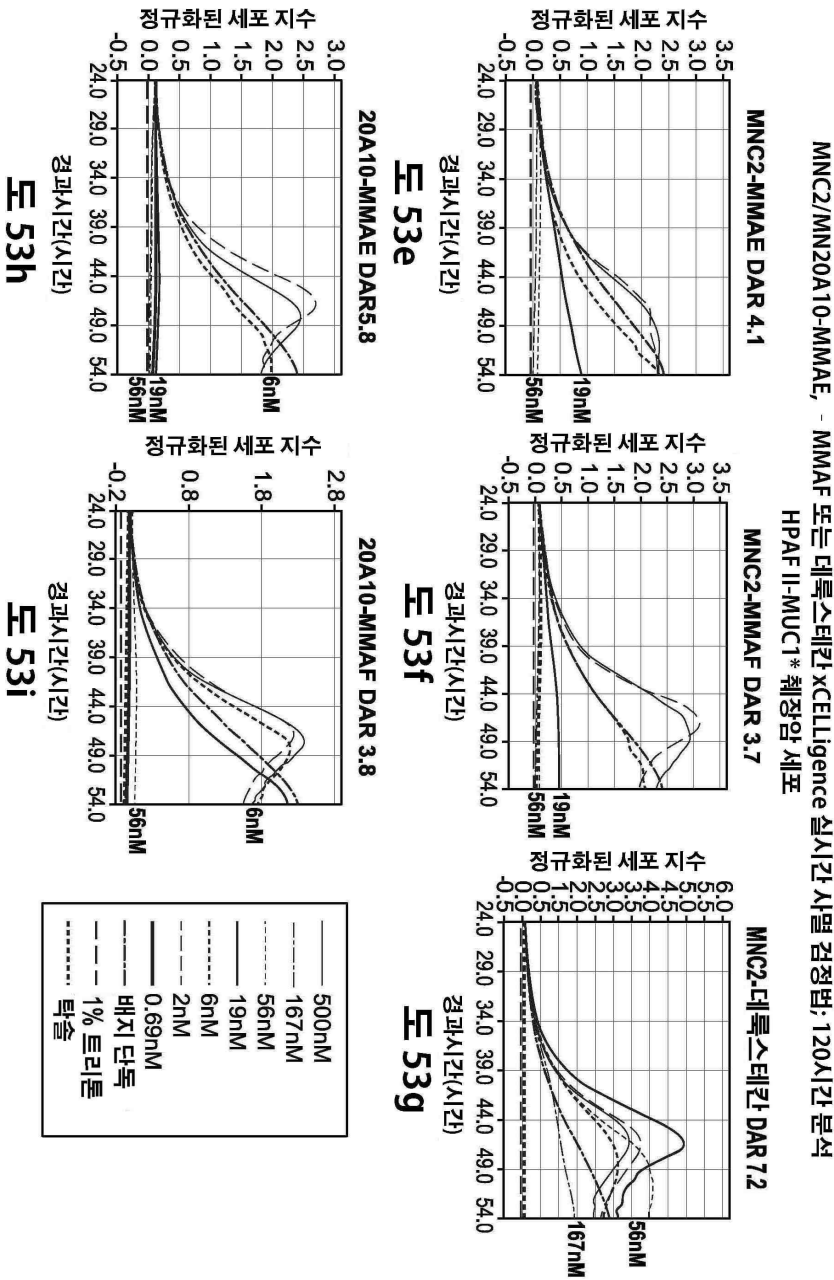


MNC2/MN20A10-MMAE 또는 MMAF xCelligence 실시간 시멸 검정법; 40시간 분석 HPAF II-MUC1* 취급암 세포

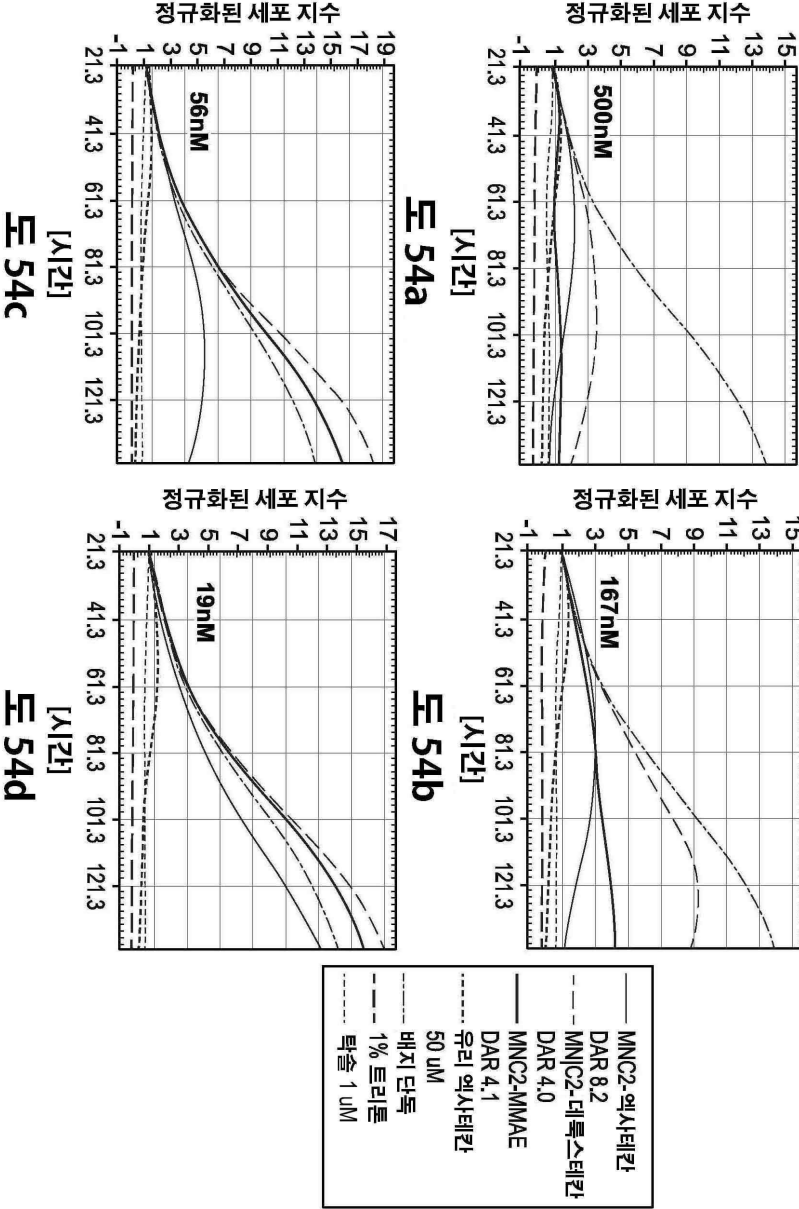


도면53ad

도면53e

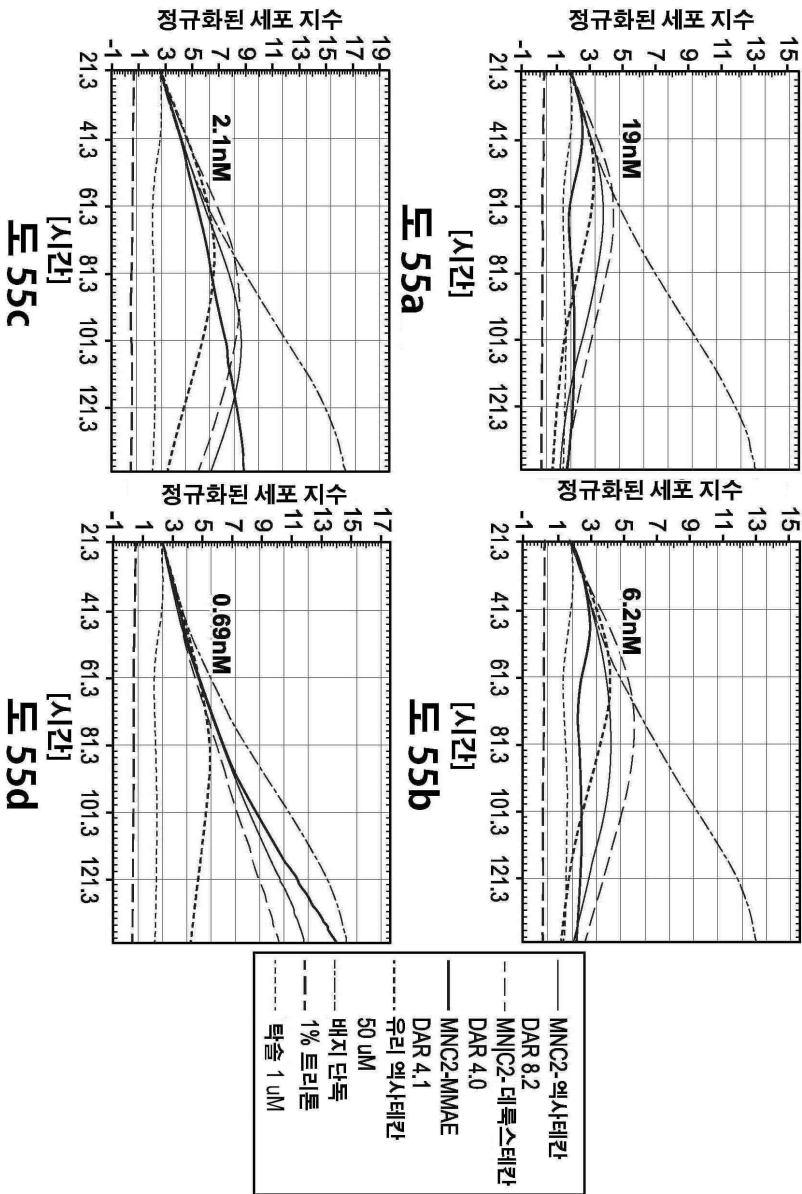


MNC2-MMAE, MNC2-테루스테킨, 또는 MNC2-엑사테킨으로 처리된 T47D-wt 유방암 세포
xCELLigence 실시간 사멸 측정법; 120시간

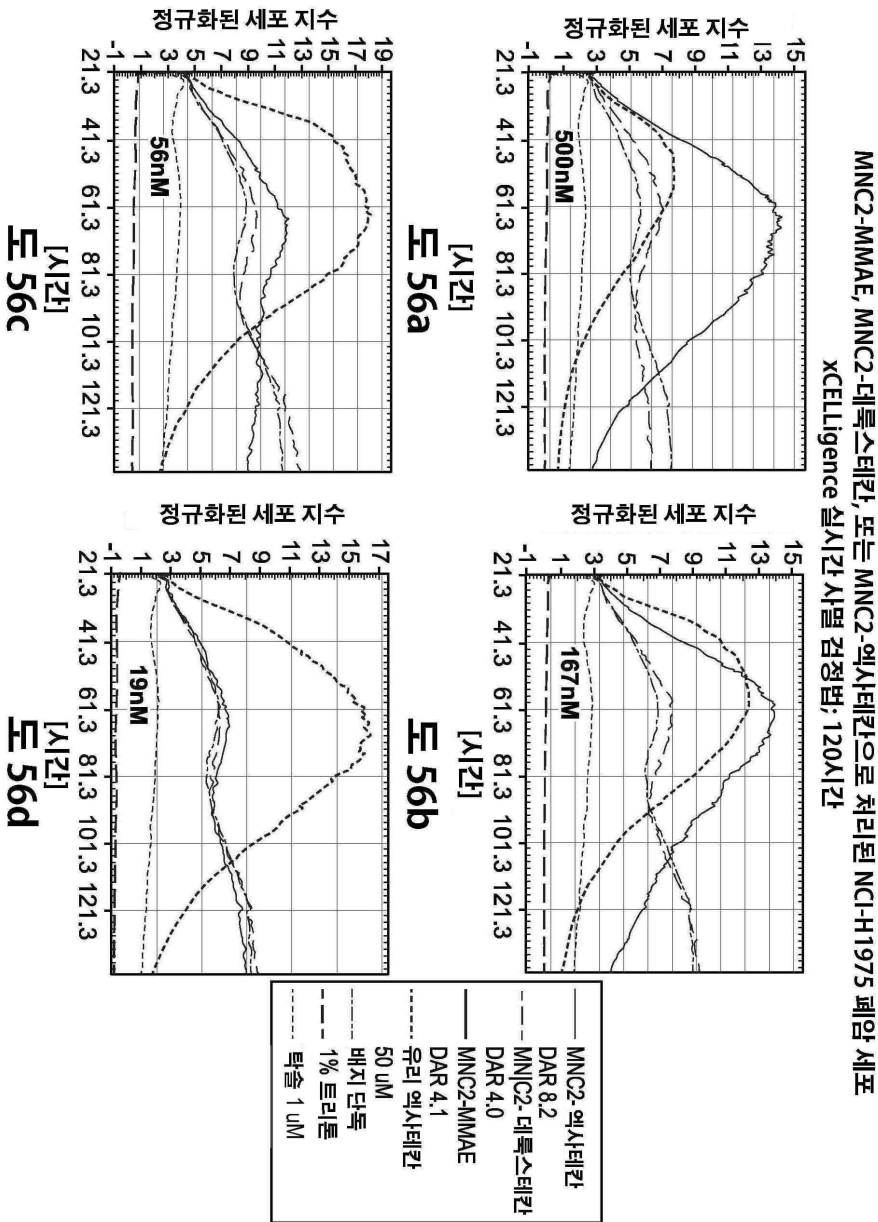


도면54

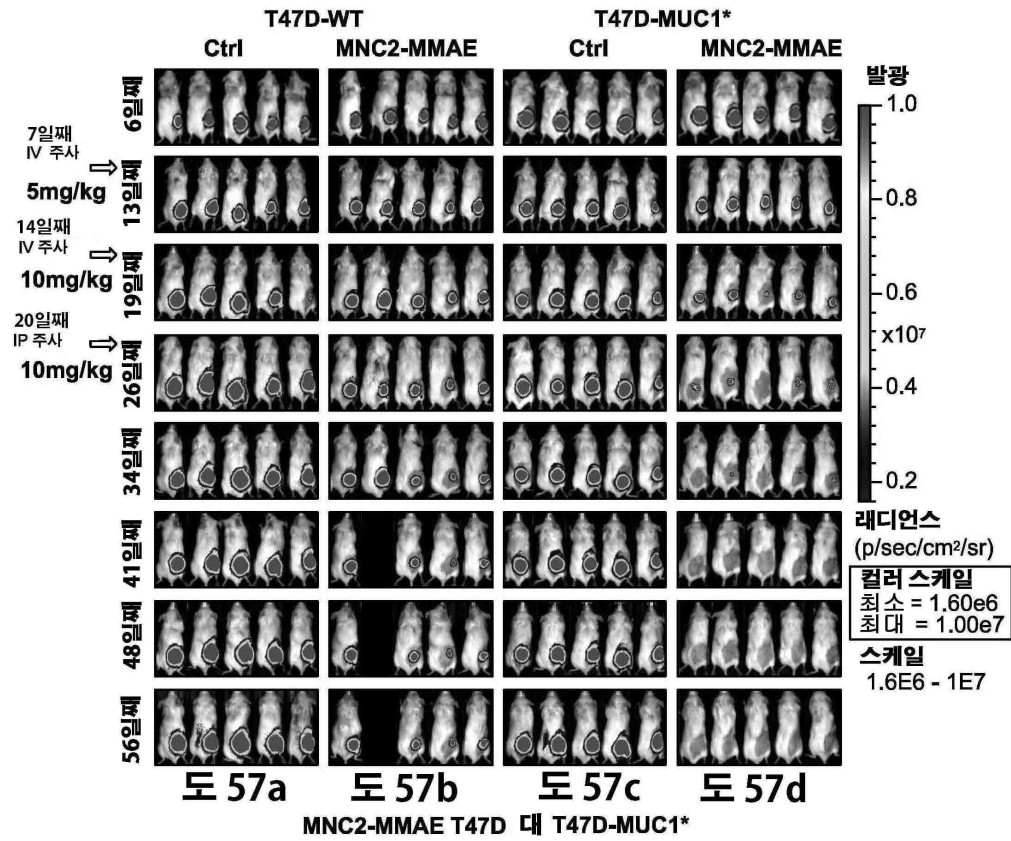
MNC2-MMAE, MNC2-테록스테킨, 또는 MNC2-엑사테킨으로 처리된 T47D-MUC1* 유방암 세포
xCELLigence 실시간 사멸 측정법; 120시간



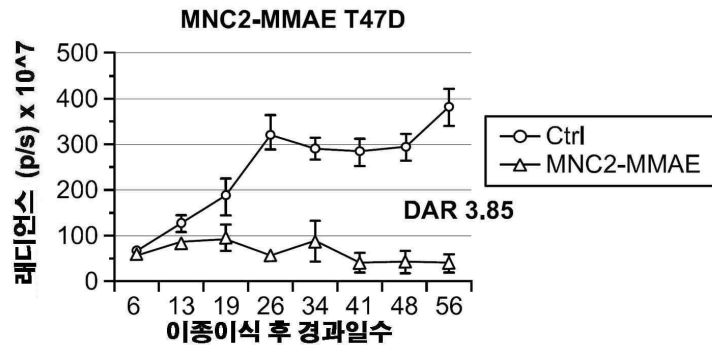
도면56



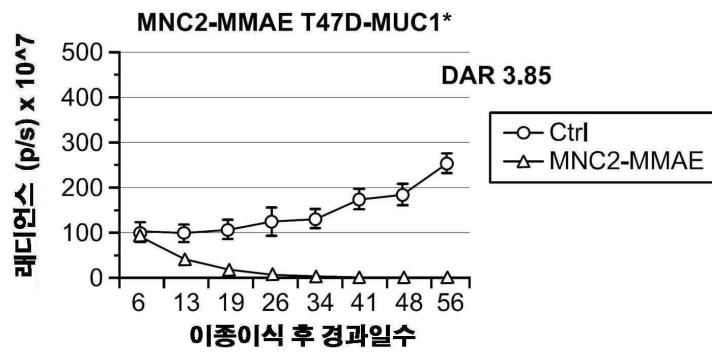
도면57ad



도면57ef

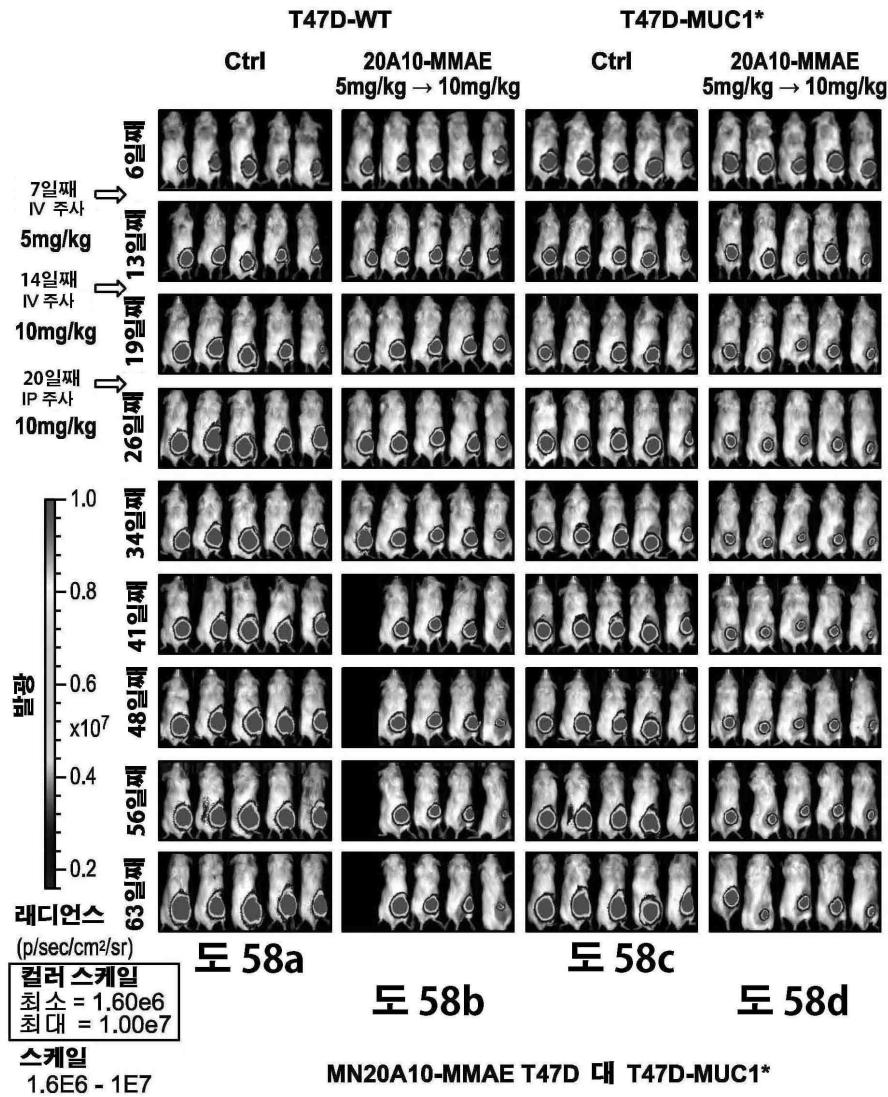


도 57e



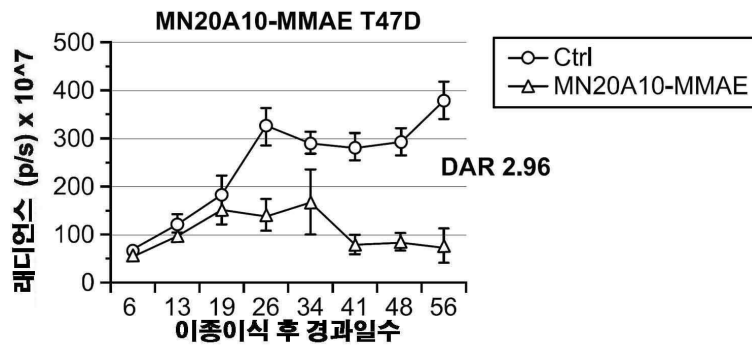
도 57f

도면58ad

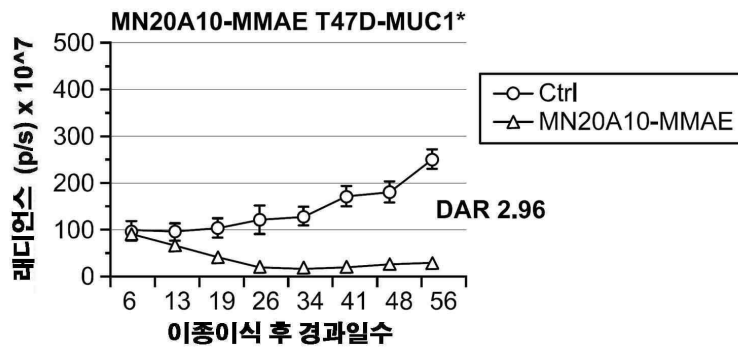


도면58ef

MN20A10-MMAE 동물 데이터

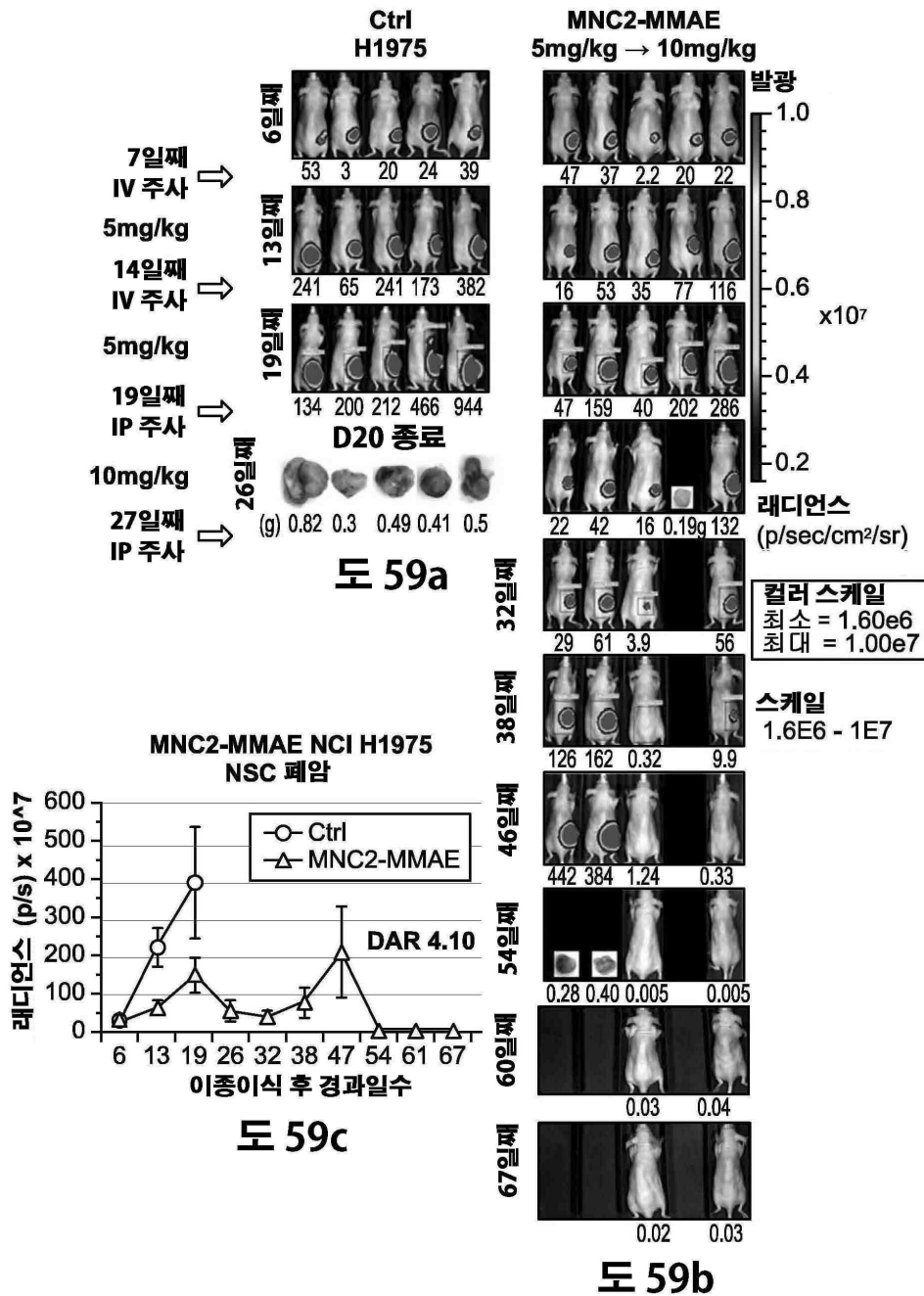


도 58e

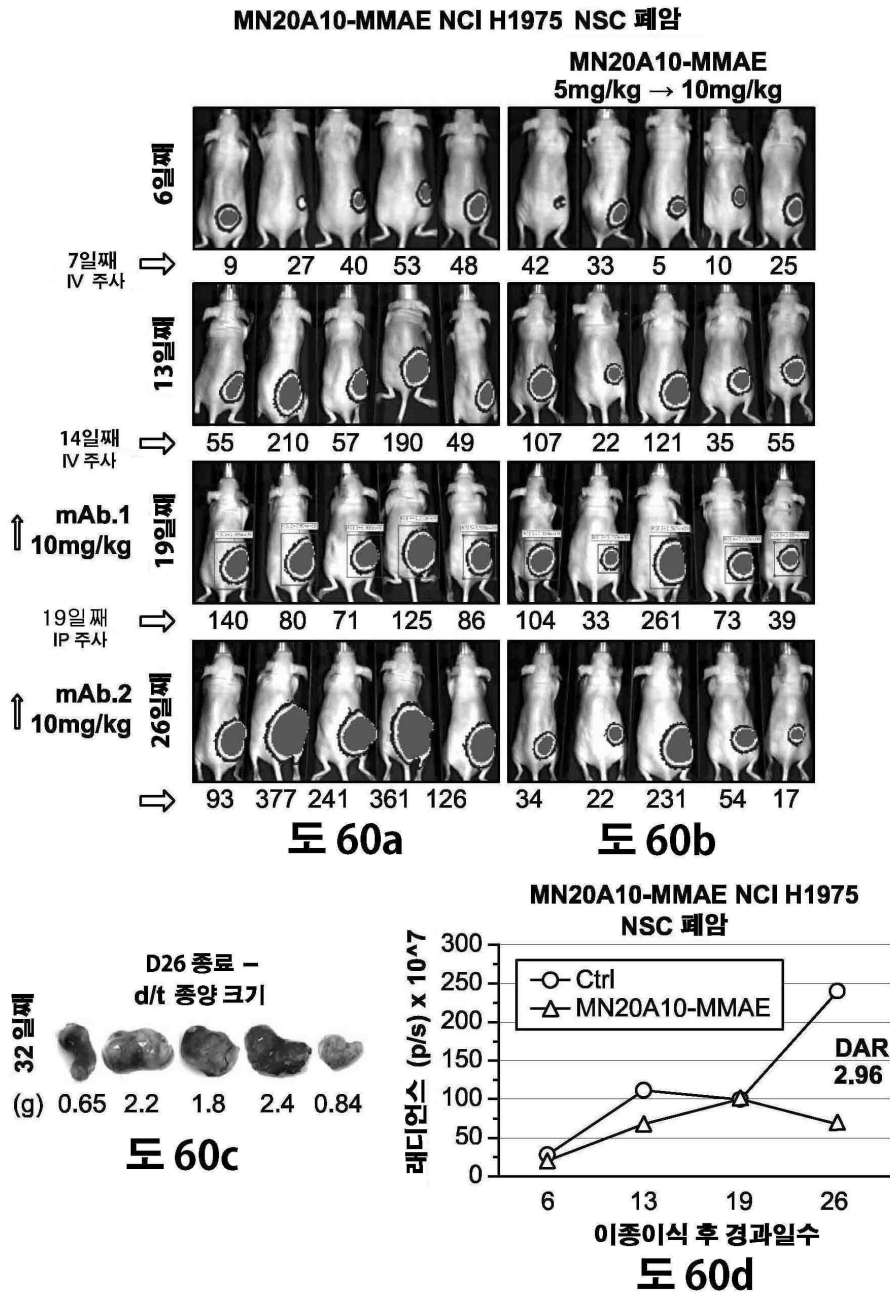


도 58f

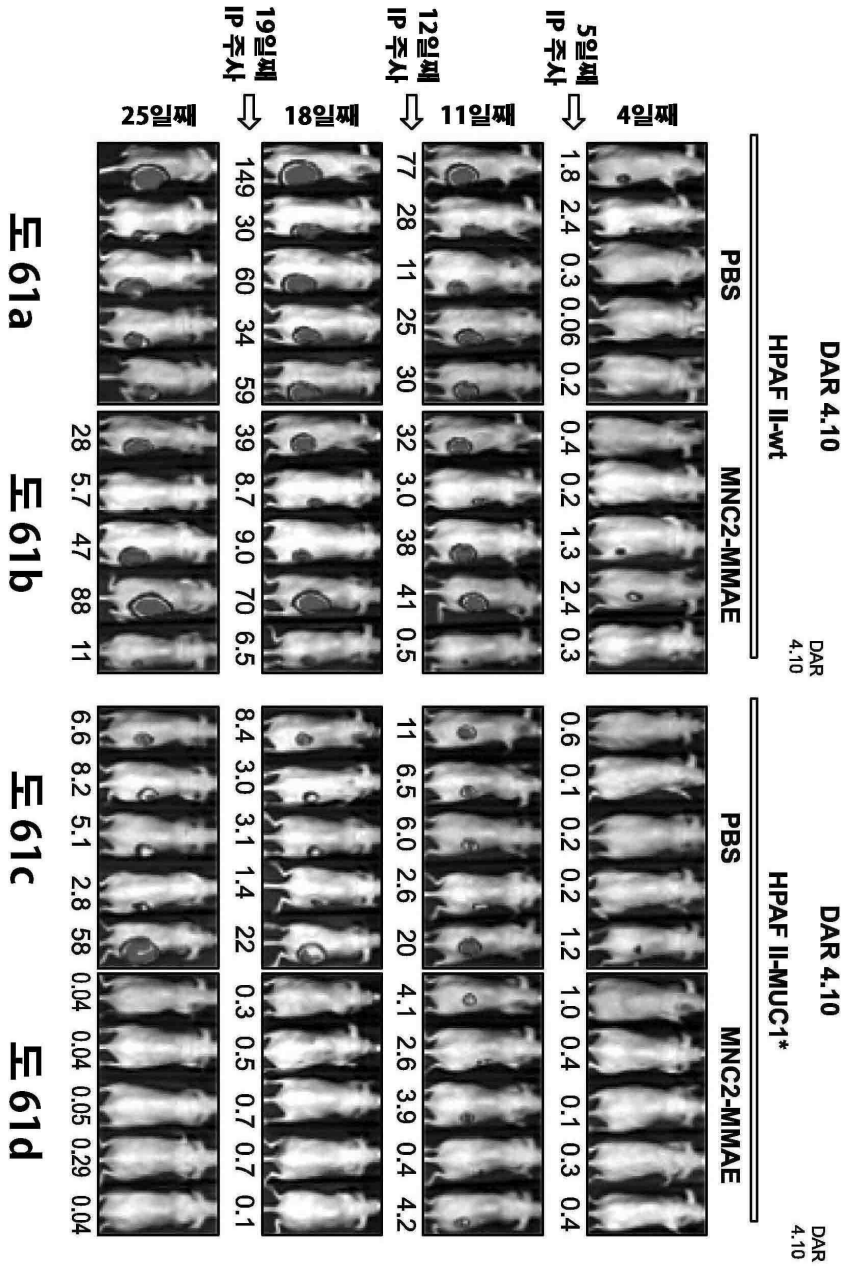
도면59



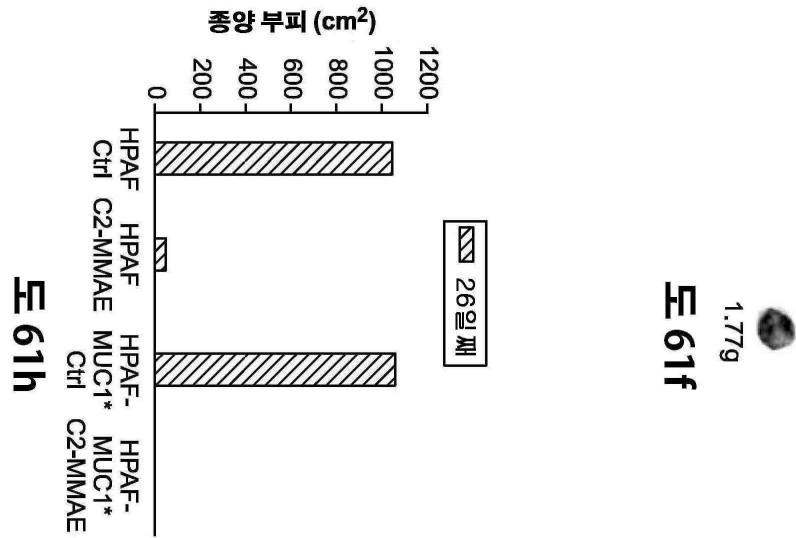
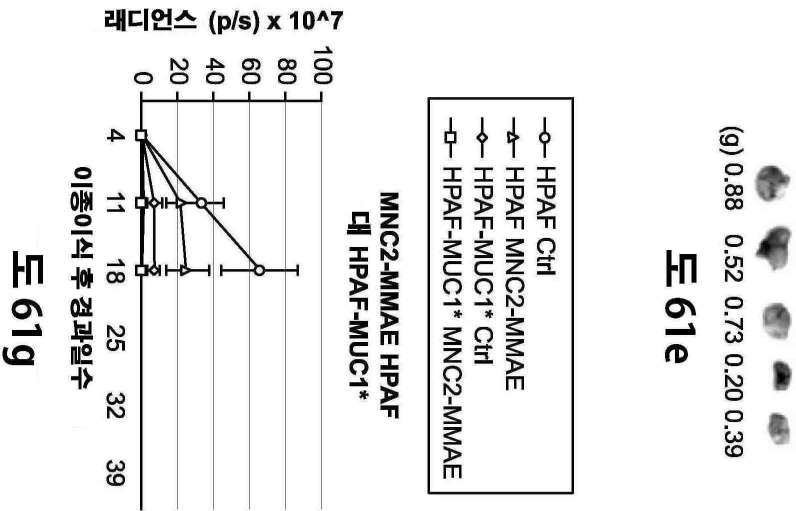
도면60



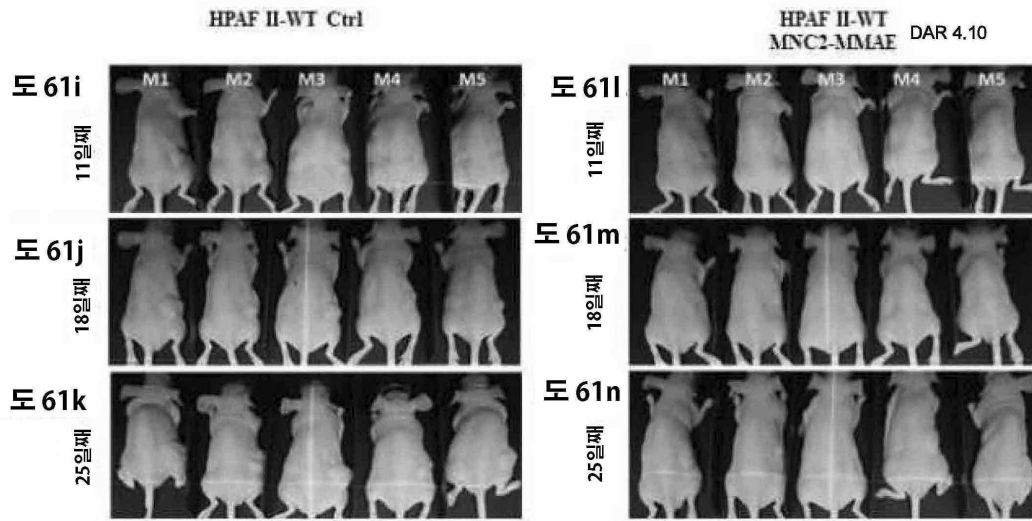
도면61ad



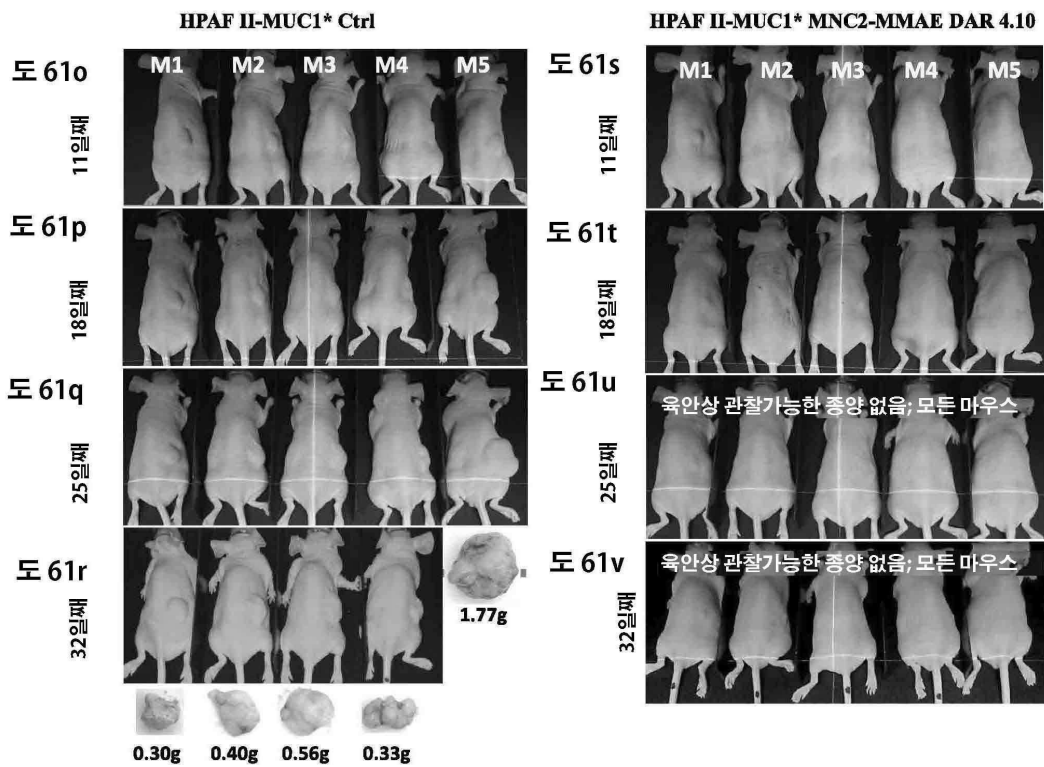
도면61eh



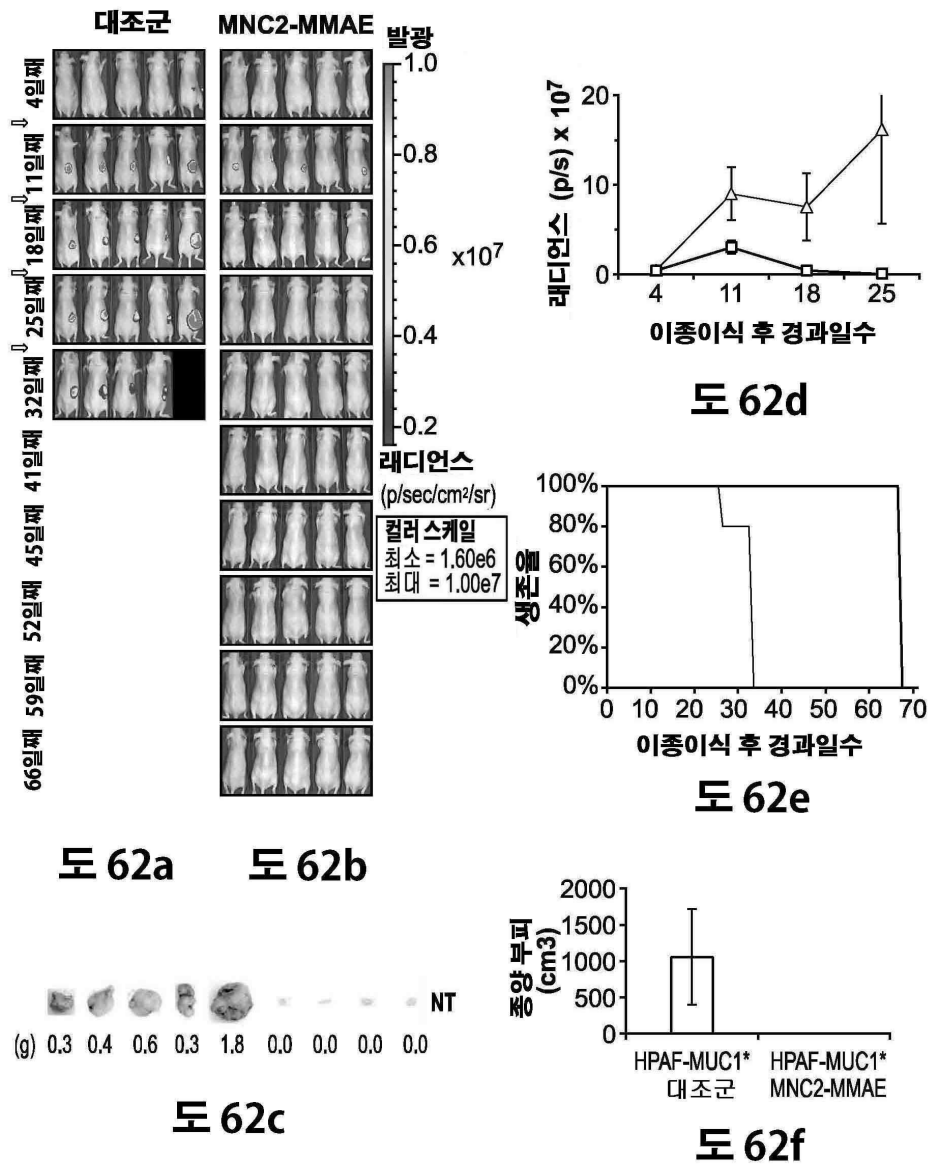
도면61in



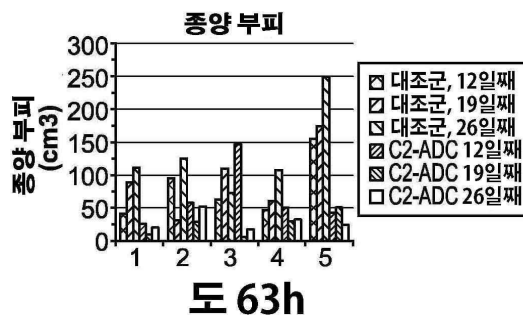
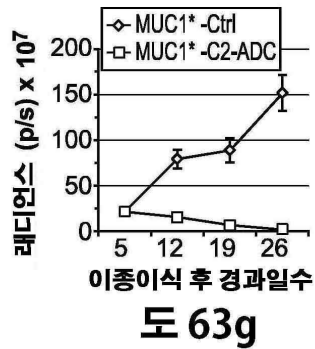
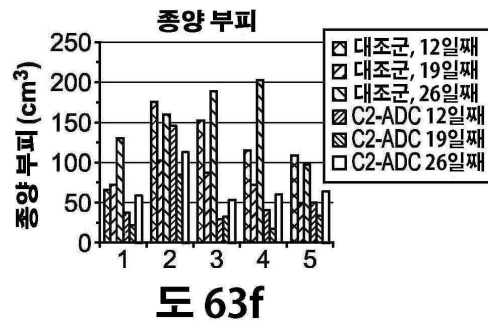
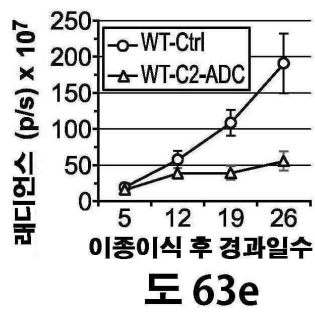
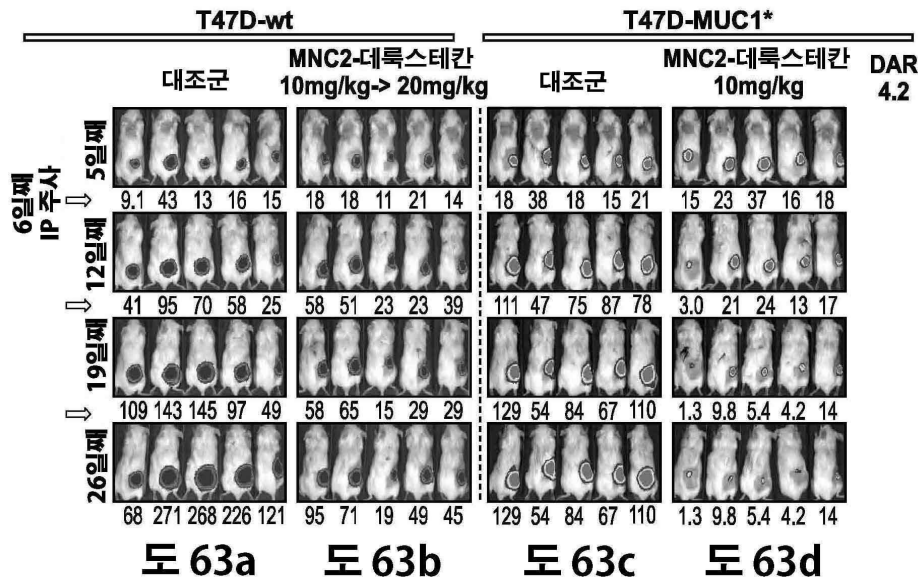
도면61ov



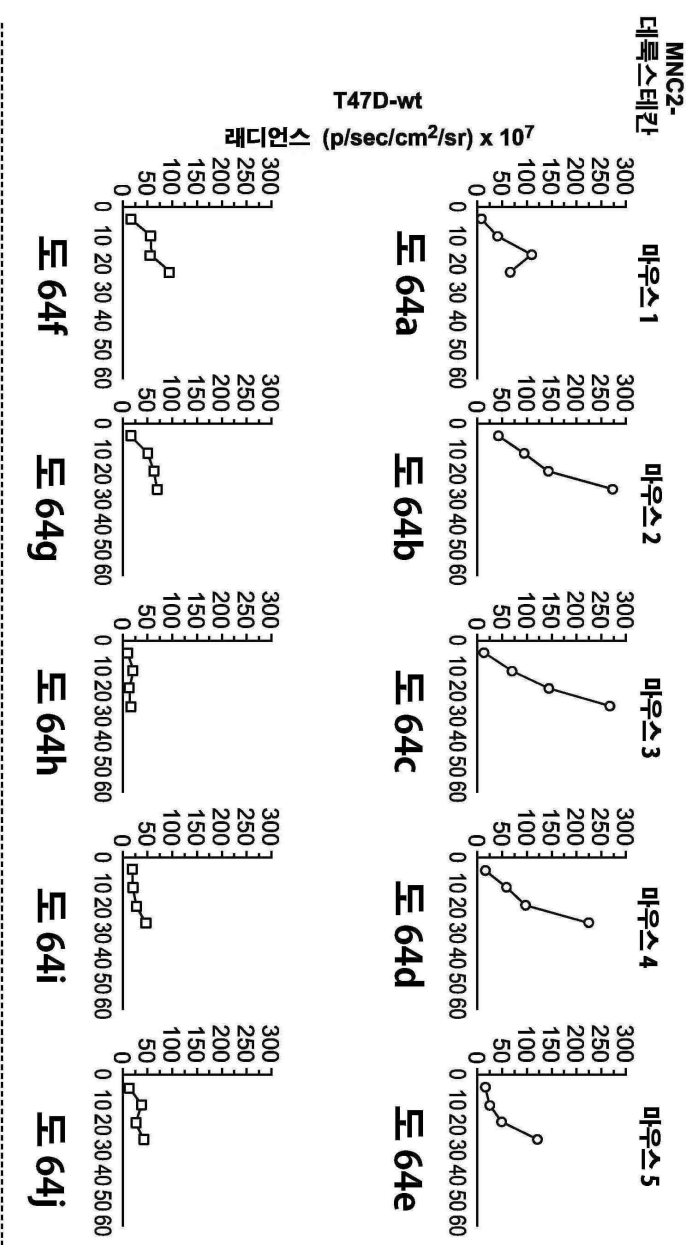
도면62



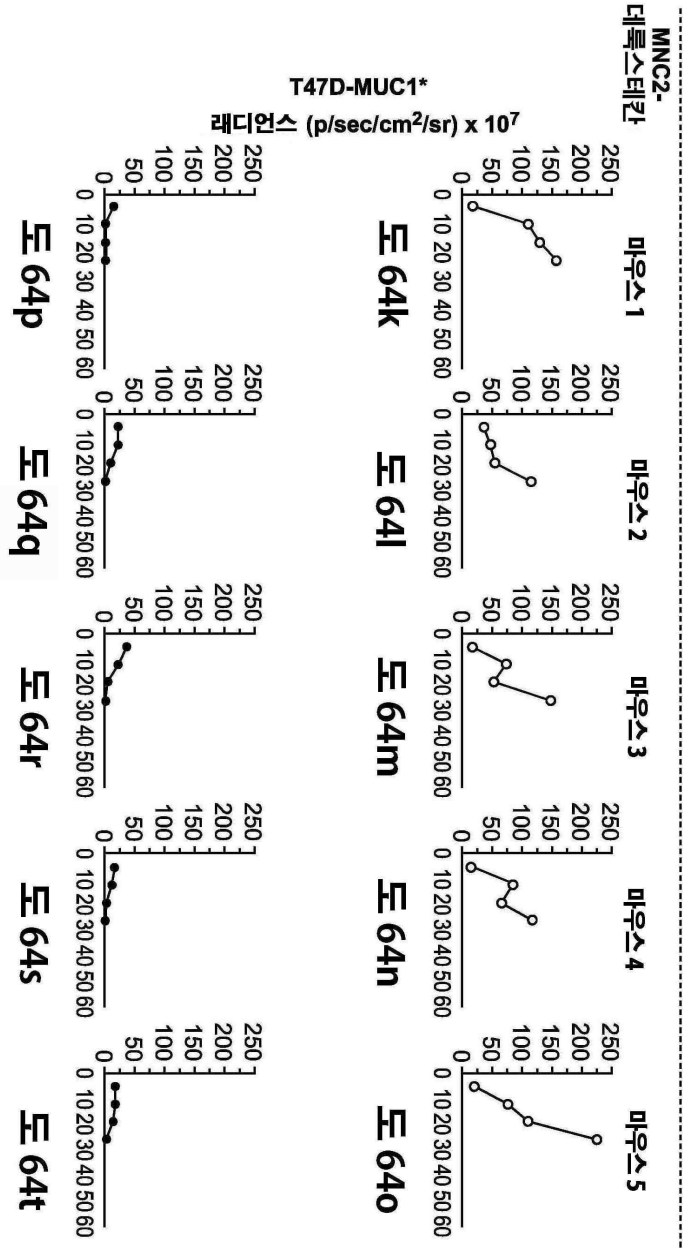
도면63



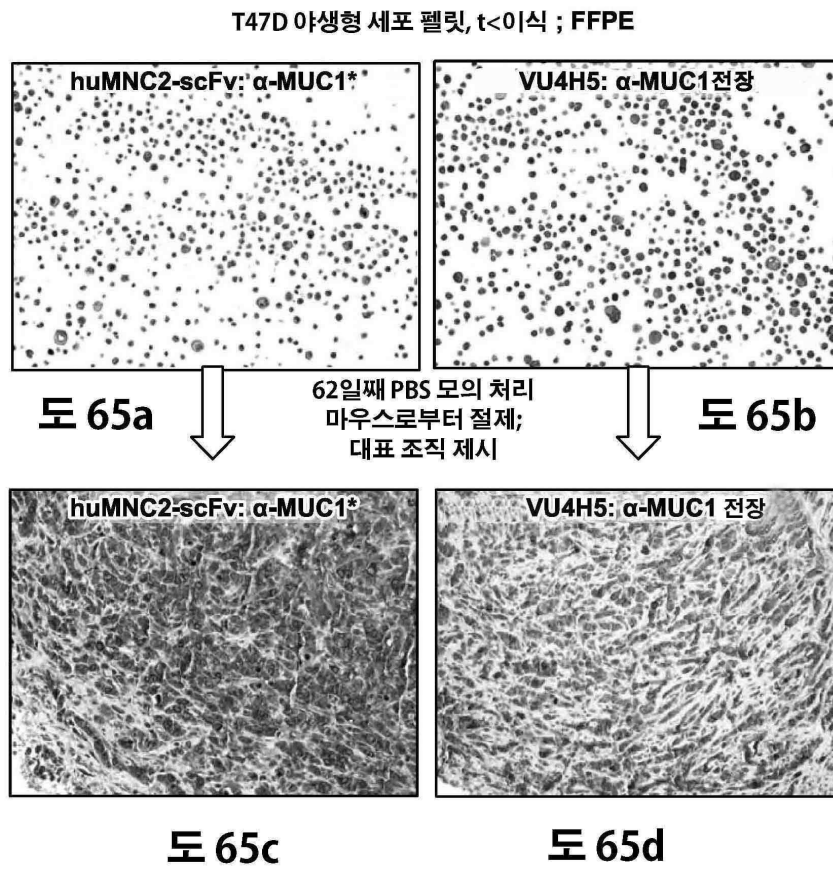
도면64aj



도면64kt



도면65



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

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