



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0099103
(43) 공개일자 2025년07월01일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)
A61K 40/33 (2025.01) A61P 35/00 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C07K 16/28 (2013.01)
A61K 40/33 (2025.01)
- (21) 출원번호 10-2025-7008618
- (22) 출원일자(국제) 2023년08월15일
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2025년03월14일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2023/030265
- (87) 국제공개번호 WO 2024/039670
국제공개일자 2024년02월22일
- (30) 우선권주장
63/398,075 2022년08월15일 미국(US)

- (71) 출원인
다나-파버 캔서 인스티튜트 인크.
미국 메사추세츠 02215 보스턴 브룩클린 애비뉴 450
- (72) 발명자
마라스코, 웨인 에이.
미국 02214 매사추세츠주 보스턴 브루클라인 애비뉴 450 씨/오 다나-파버 캔서 인스티튜트 인크.
창, 매튜
미국 02214 매사추세츠주 보스턴 브루클라인 애비뉴 450 씨/오 다나-파버 캔서 인스티튜트 인크.
- (74) 대리인
박영우

전체 청구항 수 : 총 37 항

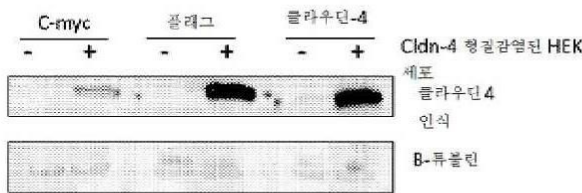
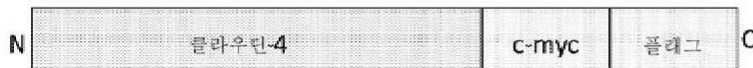
(54) 발명의 명칭 CLDN4에 대한 항체 및 이의 사용 방법

(57) 요약

본 발명은 클라우딘 4 도메인(CLDN4) 단백질에 결합하는 인간 항체를 포함한다. 항체는 암을 치료하는 데 사용될 수 있다.

대표도

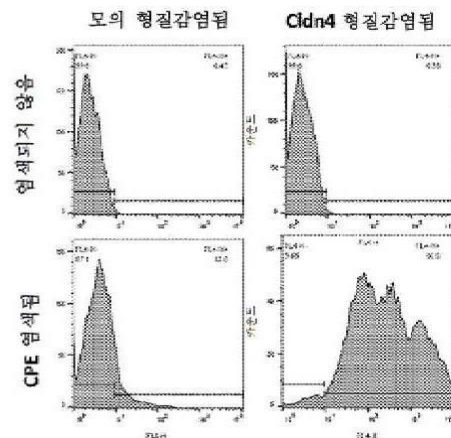
CPE-FC 틀의 검증



20171206
C-myc 1:2000
플래그 1:4000
Cldn4- 1:1000
B-튜블린-1:3000

2 차: 항-마우스/항-토끼 1:10,000

20171217



(52) CPC특허분류

A61P 35/00 (2018.01)

A61K 2039/505 (2013.01)

C07K 2317/31 (2013.01)

C07K 2317/52 (2013.01)

C07K 2317/55 (2013.01)

C07K 2317/569 (2013.01)

C07K 2317/622 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

클라우딘 4(CLDN4) 단백질 또는 이의 단편에 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편으로서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 중쇄, 경쇄, 또는 중쇄와 경쇄 둘 다를 포함하고,

중쇄는

GFTFNYYA(서열 번호 9), GFTFGGYA(서열 번호 12), GGTFSSYA(서열 번호 15), 또는 GGTFNYYA(서열 번호 18)를 포함하는 HCDR1,

IRDSGGST(서열 번호 10), LSNSGSNA(서열 번호 13), 또는 IIPVDIA(서열 번호 16)를 포함하는 HCDR2,

ARRGYSSSWYGDGYYYGMDV(서열 번호 11), ARAVMSSSWYMRYYYYYMDV(서열 번호 14), 또는 ARGGSQAYYMDV(서열 번호 17)를 포함하는 HCDR3,

또는 이들의 CDR의 조합을 포함하고;

경쇄는

SGSIASSF(서열 번호 19), RSNIGSNT(서열 번호 22), SGSIASNY(서열 번호 25), 또는 QSVSNY(서열 번호 28)를 포함하는 LCDR1,

ENN(서열 번호 20), SNN(서열 번호 23), EDN(서열 번호 26), 또는 GAS(서열 번호 29)를 포함하는 LCDR2,

QSYDSTSHV(서열 번호 21), AAWDDSLNGLYV(서열 번호 24), QSYDDSNRVV(서열 번호 27), 또는 HQYGLPQT(서열 번호 30)를 포함하는 LCDR3,

또는 이들의 CDR의 조합을 포함하는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 2

제1항에 있어서, 서열 번호 1, 3, 5 및 7로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열, 또는 이와 적어도 90% 동일한 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및 서열 번호 2, 4, 6 및 8로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열, 또는 이와 적어도 90% 동일한 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는, 항체.

청구항 3

본원에 기술된 바와 같은 항체.

청구항 4

클라우딘 4(CLDN4)에 결합하는 치료용 항체로서, 항체는 가변 도메인 및 불변 도메인을 포함하고, 불변 도메인은 IgG이고, 가변 도메인은 프레임워크 영역 및 클라우딘 4에 결합하기 위한 상보성 결정 수단을 포함하는, 항체.

청구항 5

제4항에 있어서, 불변 영역은 IgG1 또는 IgG4인, 항체.

청구항 6

인간 클라우딘 4 단백질에 결합하고 다음을 포함하는 단리된 항체 또는 이의 단편:

(a) 서열 번호 9의 아미노산 서열을 포함하는 VH CDR1, 서열 번호 10의 아미노산 서열을 포함하는 VH CDR2, 서열 번호 11의 아미노산 서열을 포함하는 VH CDR3, 서열 번호 19의 아미노산 서열을 포함하는 VL CDR1, 서열 번호 20의 아미노산 서열을 포함하는 VL CDR2, 및 서열 번호 21의 아미노산 서열을 포함하는 VL CDR3; 또는

(b) 서열 번호 12의 아미노산 서열을 포함하는 VH CDR1, 서열 번호 13의 아미노산 서열을 포함하는 VH CDR2, 서

열 번호 14의 아미노산 서열을 포함하는 VH CDR3, 서열 번호 22의 아미노산 서열을 포함하는 VL CDR1, 서열 번호 23의 아미노산 서열을 포함하는 VL CDR2, 및 서열 번호 24의 아미노산 서열을 포함하는 VL CDR3; 또는

(c) 서열 번호 15의 아미노산 서열을 포함하는 VH CDR1, 서열 번호 16의 아미노산 서열을 포함하는 VH CDR2, 서열 번호 17의 아미노산 서열을 포함하는 VH CDR3, 서열 번호 25의 아미노산 서열을 포함하는 VL CDR1, 서열 번호 26의 아미노산 서열을 포함하는 VL CDR2, 및 서열 번호 27의 아미노산 서열을 포함하는 VL CDR3; 또는

(d) 서열 번호 18의 아미노산 서열을 포함하는 VH CDR1, 서열 번호 16의 아미노산 서열을 포함하는 VH CDR2, 서열 번호 17의 아미노산 서열을 포함하는 VH CDR3, 서열 번호 28의 아미노산 서열을 포함하는 VL CDR1, 서열 번호 29의 아미노산 서열을 포함하는 VL CDR2, 및 서열 번호 30의 아미노산 서열을 포함하는 VL CDR3.

청구항 7

인간 클라우딘 4 단백질에 결합하고 다음을 포함하는 단리된 scFv 항체:

(a) 서열 번호 9의 아미노산 서열을 포함하는 VH CDR1, 서열 번호 10의 아미노산 서열을 포함하는 VH CDR2, 서열 번호 11의 아미노산 서열을 포함하는 VH CDR3, 서열 번호 19의 아미노산 서열을 포함하는 VL CDR1, 서열 번호 20의 아미노산 서열을 포함하는 VL CDR2, 및 서열 번호 21의 아미노산 서열을 포함하는 VL CDR3; 또는

(b) 서열 번호 12의 아미노산 서열을 포함하는 VH CDR1, 서열 번호 13의 아미노산 서열을 포함하는 VH CDR2, 서열 번호 14의 아미노산 서열을 포함하는 VH CDR3, 서열 번호 22의 아미노산 서열을 포함하는 VL CDR1, 서열 번호 23의 아미노산 서열을 포함하는 VL CDR2, 및 서열 번호 24의 아미노산 서열을 포함하는 VL CDR3; 또는

(c) 서열 번호 15의 아미노산 서열을 포함하는 VH CDR1, 서열 번호 16의 아미노산 서열을 포함하는 VH CDR2, 서열 번호 17의 아미노산 서열을 포함하는 VH CDR3, 서열 번호 25의 아미노산 서열을 포함하는 VL CDR1, 서열 번호 26의 아미노산 서열을 포함하는 VL CDR2, 및 서열 번호 27의 아미노산 서열을 포함하는 VL CDR3; 또는

(d) 서열 번호 18의 아미노산 서열을 포함하는 VH CDR1, 서열 번호 16의 아미노산 서열을 포함하는 VH CDR2, 서열 번호 17의 아미노산 서열을 포함하는 VH CDR3, 서열 번호 28의 아미노산 서열을 포함하는 VL CDR1, 서열 번호 29의 아미노산 서열을 포함하는 VL CDR2, 및 서열 번호 30의 아미노산 서열을 포함하는 VL CDR3.

청구항 8

인간 클라우딘 4 단백질에 결합하고, 서열 번호 1, 3, 5 및 7로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열, 또는 이와 적어도 90% 동일한 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및 서열 번호 2, 4, 6 및 8로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열, 또는 이와 적어도 90% 동일한 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 단리된 항체 또는 이의 단편.

청구항 9

인간 클라우딘 4 단백질에 결합하고, 서열 번호 1, 3, 5 및 7로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열, 또는 이와 적어도 90% 동일한 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및 서열 번호 2, 4, 6 및 8로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열, 또는 이와 적어도 90% 동일한 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 단리된 scFv.

청구항 10

클라우딘 4에 결합하고 다음을 포함하는 F(ab):

(a) 서열 번호 9의 아미노산 서열을 포함하는 VH CDR1, 서열 번호 10의 아미노산 서열을 포함하는 VH CDR2, 서열 번호 11의 아미노산 서열을 포함하는 VH CDR3, 서열 번호 19의 아미노산 서열을 포함하는 VL CDR1, 서열 번호 20의 아미노산 서열을 포함하는 VL CDR2, 및 서열 번호 21의 아미노산 서열을 포함하는 VL CDR3; 또는

(b) 서열 번호 12의 아미노산 서열을 포함하는 VH CDR1, 서열 번호 13의 아미노산 서열을 포함하는 VH CDR2, 서열 번호 14의 아미노산 서열을 포함하는 VH CDR3, 서열 번호 22의 아미노산 서열을 포함하는 VL CDR1, 서열 번호 23의 아미노산 서열을 포함하는 VL CDR2, 및 서열 번호 24의 아미노산 서열을 포함하는 VL CDR3; 또는

(c) 서열 번호 15의 아미노산 서열을 포함하는 VH CDR1, 서열 번호 16의 아미노산 서열을 포함하는 VH CDR2, 서열 번호 17의 아미노산 서열을 포함하는 VH CDR3, 서열 번호 25의 아미노산 서열을 포함하는 VL CDR1, 서열 번호

호 26의 아미노산 서열을 포함하는 VL CDR2, 및 서열 번호 27의 아미노산 서열을 포함하는 VL CDR3; 또는

(d) 서열 번호 18의 아미노산 서열을 포함하는 VH CDR1, 서열 번호 16의 아미노산 서열을 포함하는 VH CDR2, 서열 번호 17의 아미노산 서열을 포함하는 VH CDR3, 서열 번호 28의 아미노산 서열을 포함하는 VL CDR1, 서열 번호 29의 아미노산 서열을 포함하는 VL CDR2, 및 서열 번호 30의 아미노산 서열을 포함하는 VL CDR3.

청구항 11

클라우딘 4에 결합하고 다음을 포함하는 V_{hH}:

(a) 서열 번호 9의 아미노산 서열을 포함하는 VH CDR1, 서열 번호 10의 아미노산 서열을 포함하는 VH CDR2, 서열 번호 11의 아미노산 서열을 포함하는 VH CDR3; 또는

(b) 서열 번호 12의 아미노산 서열을 포함하는 VH CDR1, 서열 번호 13의 아미노산 서열을 포함하는 VH CDR2, 서열 번호 14의 아미노산 서열을 포함하는 VH CDR3; 또는

(c) 서열 번호 15의 아미노산 서열을 포함하는 VH CDR1, 서열 번호 16의 아미노산 서열을 포함하는 VH CDR2, 서열 번호 17의 아미노산 서열을 포함하는 VH CDR3; 또는

(d) 서열 번호 18의 아미노산 서열을 포함하는 VH CDR1, 서열 번호 16의 아미노산 서열을 포함하는 VH CDR2, 서열 번호 17의 아미노산 서열을 포함하는 VH CDR3.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항의 단편 및 면역 세포 상의 분자에 대해 특이성을 갖는 제2 항원 결합 단편을 포함하는 단리된 이중특이성 항체.

청구항 13

제12항에 있어서, 분자는 CCR4, B7H3, B7H4, CD27, CD28, CD40, CD40L, CD47, CD122, CTLA-4, GITR, GITRL, ICOS, ICOSL, LAG-3, LIGHT, OX-40, OX40L, PD-1, TIM3, 4-1BB, TIGIT, VISTA, HEVM, BTLA, 및 KIR로 이루어진 군으로부터 선택되는, 이중특이성 항체.

청구항 14

제12항에 있어서, 상기 단편 및 상기 제2 단편은 각각 독립적으로 Fab 단편, 단일-쇄 가변 단편(scFv), 또는 단일-도메인 항체로부터 선택되는, 이중특이성 항체.

청구항 15

제12항에 있어서, Fc 단편을 추가로 포함하는, 이중특이성 항체.

청구항 16

인간 클라우딘 4 단백질에 결합하고 다음을 포함하는 이중특이성 T 세포 인계이저(BiTE):

(a) 서열 번호 9의 아미노산 서열을 포함하는 VH CDR1, 서열 번호 10의 아미노산 서열을 포함하는 VH CDR2, 서열 번호 11의 아미노산 서열을 포함하는 VH CDR3, 서열 번호 19의 아미노산 서열을 포함하는 VL CDR1, 서열 번호 20의 아미노산 서열을 포함하는 VL CDR2, 및 서열 번호 21의 아미노산 서열을 포함하는 VL CDR3; 또는

(b) 서열 번호 12의 아미노산 서열을 포함하는 VH CDR1, 서열 번호 13의 아미노산 서열을 포함하는 VH CDR2, 서열 번호 14의 아미노산 서열을 포함하는 VH CDR3, 서열 번호 22의 아미노산 서열을 포함하는 VL CDR1, 서열 번호 23의 아미노산 서열을 포함하는 VL CDR2, 및 서열 번호 24의 아미노산 서열을 포함하는 VL CDR3; 또는

(c) 서열 번호 15의 아미노산 서열을 포함하는 VH CDR1, 서열 번호 16의 아미노산 서열을 포함하는 VH CDR2, 서열 번호 17의 아미노산 서열을 포함하는 VH CDR3, 서열 번호 25의 아미노산 서열을 포함하는 VL CDR1, 서열 번호 26의 아미노산 서열을 포함하는 VL CDR2, 및 서열 번호 27의 아미노산 서열을 포함하는 VL CDR3; 또는

(d) 서열 번호 18의 아미노산 서열을 포함하는 VH CDR1, 서열 번호 16의 아미노산 서열을 포함하는 VH CDR2, 서열 번호 17의 아미노산 서열을 포함하는 VH CDR3, 서열 번호 28의 아미노산 서열을 포함하는 VL CDR1, 서열 번호 29의 아미노산 서열을 포함하는 VL CDR2, 및 서열 번호 30의 아미노산 서열을 포함하는 VL CDR3.

청구항 17

인간 클라우딘 4 단백질에 결합하고, 서열 번호 1, 3, 5 및 7로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열, 또는 이와 적어도 90% 동일한 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및 서열 번호 2, 4, 6 및 8로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열, 또는 이와 적어도 90% 동일한 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 이중 특이성 T 세포 인계이저(BiTE).

청구항 18

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 90% 서열 동일성을 갖는, 항체.

청구항 19

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항의 항체를 코딩하는 핵산으로서,

HCDR1을 코딩하는 핵산 서열은 서열 번호 62, 서열 번호 65, 서열 번호 68 또는 서열 번호 71, 또는 이의 축퇴성 변이체이고;

HCDR2를 코딩하는 핵산 서열은 서열 번호 63, 서열 번호 66, 서열 번호 69 또는 서열 번호 72, 또는 이의 축퇴성 변이체이고;

HCDR3을 코딩하는 핵산 서열은 서열 번호 64, 서열 번호 67, 서열 번호 70 또는 서열 번호 73, 또는 이의 축퇴성 변이체이고;

LCDR1을 코딩하는 핵산 서열은 서열 번호 74, 서열 번호 77, 서열 번호 80 또는 서열 번호 83, 또는 이의 축퇴성 변이체이고;

LCDR2를 코딩하는 핵산 서열은 서열 번호 75, 서열 번호 78, 서열 번호 81 또는 서열 번호 84, 또는 이의 축퇴성 변이체이고;

LCDR3을 코딩하는 핵산 서열은 서열 번호 76, 서열 번호 79, 서열 번호 82 또는 서열 번호 85, 또는 이의 축퇴성 변이체인, 제1항 내지 제11항 중 어느 한 항의 항체를 코딩하는 핵산.

청구항 20

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항의 항체를 코딩하는 핵산으로서,

HCVR을 코딩하는 핵산 서열은 서열 번호 86, 서열 번호 87, 서열 번호 88 또는 서열 번호 89, 또는 이의 축퇴성 변이체이고;

LCVR을 코딩하는 핵산 서열은 서열 번호 90, 서열 번호 91, 서열 번호 92 또는 서열 번호 93, 또는 이의 축퇴성 변이체인, 제1항 내지 제11항 중 어느 한 항의 항체를 코딩하는 핵산.

청구항 21

다음을 포함하는 제약 조성물: 제1항 내지 제11항 중 어느 한 항의 항체, 및 하나 이상의 제약상 허용되는 담체, 희석제, 또는 부형제.

청구항 22

제21항에 있어서, 다음을 포함하는, 제약 조성물:

(a) 서열 번호 9의 아미노산 서열을 포함하는 VH CDR1, 서열 번호 10의 아미노산 서열을 포함하는 VH CDR2, 서열 번호 11의 아미노산 서열을 포함하는 VH CDR3, 서열 번호 19의 아미노산 서열을 포함하는 VL CDR1, 서열 번호 20의 아미노산 서열을 포함하는 VL CDR2, 및 서열 번호 21의 아미노산 서열을 포함하는 VL CDR3; 또는

(b) 서열 번호 12의 아미노산 서열을 포함하는 VH CDR1, 서열 번호 13의 아미노산 서열을 포함하는 VH CDR2, 서열 번호 14의 아미노산 서열을 포함하는 VH CDR3, 서열 번호 22의 아미노산 서열을 포함하는 VL CDR1, 서열 번호 23의 아미노산 서열을 포함하는 VL CDR2, 및 서열 번호 24의 아미노산 서열을 포함하는 VL CDR3; 또는

(c) 서열 번호 15의 아미노산 서열을 포함하는 VH CDR1, 서열 번호 16의 아미노산 서열을 포함하는 VH CDR2, 서열 번호 17의 아미노산 서열을 포함하는 VH CDR3, 서열 번호 25의 아미노산 서열을 포함하는 VL CDR1, 서열 번

호 26의 아미노산 서열을 포함하는 VL CDR2, 및 서열 번호 27의 아미노산 서열을 포함하는 VL CDR3; 또는

(d) 서열 번호 18의 아미노산 서열을 포함하는 VH CDR1, 서열 번호 16의 아미노산 서열을 포함하는 VH CDR2, 서열 번호 17의 아미노산 서열을 포함하는 VH CDR3, 서열 번호 28의 아미노산 서열을 포함하는 VL CDR1, 서열 번호 29의 아미노산 서열을 포함하는 VL CDR2, 및 서열 번호 30의 아미노산 서열을 포함하는 VL CDR3.

청구항 23

제21항에 있어서, 상기 제약 조성물은 중쇄 가변 영역(HCVR) 및 경쇄 가변 영역(LCVR)을 포함하고, HCVR의 아미노산 서열은 서열 번호 1, 서열 번호 3, 서열 번호 5 또는 서열 번호 7이고, LCVR의 아미노산 서열은 서열 번호 2, 서열 번호 4, 서열 번호 6 또는 서열 번호 8인, 제약 조성물.

청구항 24

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 따른 항체 또는 단편을 코딩하는 핵산.

청구항 25

제12항 내지 제15항 중 어느 한 항에 따른 이중특이성 항체를 코딩하는 핵산.

청구항 26

제16항 또는 제17항에 따른 BiTE를 코딩하는 핵산.

청구항 27

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체, 단편 또는 이중특이성 항체는 클라우딘 4에 결합하는 것보다 적어도 5배, 10배, 25배, 50배, 100배 또는 1000배 더 적은 결합 친화도로 클라우딘 3에 결합하는, 항체 또는 단편, 이중특이성 항체, 또는 BiTE.

청구항 28

키메라 항원 수용체를 포함하는 조작된 세포로서, 키메라 항원 수용체는 암 세포의 표면 상의 항원에 특이적인 세포의 리간드 결합 도메인을 포함하고, 항원은 클라우딘 4를 포함하고, 세포의 리간드 결합 도메인은 항체 또는 이의 단편을 포함하고, 항체 또는 이의 단편은 다음을 포함하는, 조작된 세포:

(a) 서열 번호 9의 아미노산 서열을 포함하는 VH CDR1, 서열 번호 10의 아미노산 서열을 포함하는 VH CDR2, 서열 번호 11의 아미노산 서열을 포함하는 VH CDR3, 서열 번호 19의 아미노산 서열을 포함하는 VL CDR1, 서열 번호 20의 아미노산 서열을 포함하는 VL CDR2, 및 서열 번호 21의 아미노산 서열을 포함하는 VL CDR3; 또는

(b) 서열 번호 12의 아미노산 서열을 포함하는 VH CDR1, 서열 번호 13의 아미노산 서열을 포함하는 VH CDR2, 서열 번호 14의 아미노산 서열을 포함하는 VH CDR3, 서열 번호 22의 아미노산 서열을 포함하는 VL CDR1, 서열 번호 23의 아미노산 서열을 포함하는 VL CDR2, 및 서열 번호 24의 아미노산 서열을 포함하는 VL CDR3; 또는

(c) 서열 번호 15의 아미노산 서열을 포함하는 VH CDR1, 서열 번호 16의 아미노산 서열을 포함하는 VH CDR2, 서열 번호 17의 아미노산 서열을 포함하는 VH CDR3, 서열 번호 25의 아미노산 서열을 포함하는 VL CDR1, 서열 번호 26의 아미노산 서열을 포함하는 VL CDR2, 및 서열 번호 27의 아미노산 서열을 포함하는 VL CDR3; 또는

(d) 서열 번호 18의 아미노산 서열을 포함하는 VH CDR1, 서열 번호 16의 아미노산 서열을 포함하는 VH CDR2, 서열 번호 17의 아미노산 서열을 포함하는 VH CDR3, 서열 번호 28의 아미노산 서열을 포함하는 VL CDR1, 서열 번호 29의 아미노산 서열을 포함하는 VL CDR2, 및 서열 번호 30의 아미노산 서열을 포함하는 VL CDR3.

청구항 29

제28항에 있어서, 항체 또는 이의 단편은 서열 번호 1, 3, 5 및 7로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열, 또는 이와 적어도 90% 동일한 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및 서열 번호 2, 4, 6 및 8로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열, 또는 이와 적어도 90% 동일한 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는, 조작된 세포.

청구항 30

제28항에 있어서, 세포는 T 세포, NK 세포, NKT 세포, iPS 세포, iPS-유래 세포, 세포주, 또는 B 세포를 포함하는, 조작된 세포.

청구항 31

제28항에 있어서, 세포는 CD4+, CD8+, CD3+ 범 T 세포, 또는 이들의 임의의 조합을 포함하는, 조작된 세포.

청구항 32

암을 치료하는 방법으로서, 암의 치료를 필요로 하는 대상체에게 유효량의 (a) 제1항 내지 제11항 중 어느 한 항의 항체, 또는 (b) 제21항의 제약 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 33

대상체에서 클라우딘 4를 억제하는 방법으로서, 대상체에게 유효량의 (a) 제1항 내지 제11항 중 어느 한 항의 항체, 또는 (b) 제21항의 제약 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 34

제33항에 있어서, 서열 번호 1, 3, 5 및 7로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열, 또는 이와 적어도 90% 동일한 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및 서열 번호 2, 4, 6 및 8로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열, 또는 이와 적어도 90% 동일한 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는, 방법.

청구항 35

암을 치료하기 위한, (a) 제1항 내지 제11항 중 어느 한 항의 항체, 또는 (b) 제21항의 제약 조성물의 용도.

청구항 36

치료법에 사용하기 위한, 제1항 내지 제11항 중 어느 한 항의 항체, 또는 (b) 제21항의 제약 조성물.

청구항 37

암을 치료하는 데 사용하기 위한, 제1항 내지 제11항 중 어느 한 항의 항체, 또는 (b) 제21항의 제약 조성물.

발명의 설명

기술분야

- [0001] 본 출원은 2022년 8월 15일에 출원된 미국 가특허출원 번호 63/398,075호로부터 우선권을 주장하는 국제 출원이며, 상기 출원의 전체 내용은 본원에 참조로 포함된다.
- [0002] 본원에 인용된 모든 특허, 특허 출원, 및 간행물은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다. 이들 간행물의 개시내용은 본원에 기술되고 청구된 발명의 일자로서 당업자에게 알려진 바와 같은 관련 기술분야의 상태를 보다 충분히 설명하기 위해 본 출원에 참조로 포함된다.
- [0003] 본 특허 개시내용은 저작권 보호의 대상이 되는 자료를 포함한다. 저작권 소유자는 미국 특허 상표청 특허 파일 또는 기록에 나오는 바와 같이 특허 문서 또는 특허 개시내용에 의한 팩스 복제에 대해 이의를 제기하지 않지만, 그 외에는 임의의 및 모든 저작권 권리를 보유한다.
- [0004] **서열 목록**
- [0005] 본 출원은 ASCII 형식으로 전자 제출되었고, 그 전문이 본원에 참조로 포함되는 서열 목록을 포함한다. []에 생성된 상기 ASCII 사본은 명칭이 []이고 크기가 [] 바이트이다.
- [0006] **기술분야**
- [0007] 본 발명은 클라우딘 4(CLDN4)에 대한 항체 및 이의 사용 방법을 포함한다.

배경기술

- [0008] 클라우딘은 밀착 연결의 테트라스팬 막관통 단백질이다. 클라우딘 4 단백질은 CLDN4 유전자에 의해 코딩된다.

발명의 내용

- [0009] 본 발명의 양태는 클라우딘 4(CLDN4) 단백질 또는 이의 단편에 결합하고 중쇄, 경쇄, 또는 중쇄와 경쇄 둘 다를 포함하는 단리된 단클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편에 관한 것이다.
- [0010] 실시형태에서, 중쇄는 GFTFNYYA(서열 번호 9), GFTFGGYA(서열 번호 12), GGTFSSYA(서열 번호 15), 또는 GGTFNYYA(서열 번호 18)를 포함하는 CDR1, IRDSGGST(서열 번호 10), LSNSGSNA(서열 번호 13), 또는 IPIVDIA(서열 번호 16)를 포함하는 CDR2, ARRGYSSSWYGDGYYYGMDV(서열 번호 11), ARAVMSSSWYMRYYYYYMDV(서열 번호 14), 또는 ARGGSQGAYYMDV(서열 번호 17)를 포함하는 CDR3, 또는 이들의 CDR의 조합을 포함하고; 경쇄는 SGSIASSF(서열 번호 19), RSNIGSNT(서열 번호 22), SGSIASNY(서열 번호 25), 또는 QSVSNY(서열 번호 28)를 포함하는 CDR1, ENN(서열 번호 20), SNN(서열 번호 23), EDN(서열 번호 26), 또는 GAS(서열 번호 29)를 포함하는 CDR2, QSYDSTSHV(서열 번호 21), AAWDDSLNGLYV(서열 번호 24), QSYDSSNRVV(서열 번호 27), 또는 HQYGLPQT(서열 번호 30)를 포함하는 CDR3, 또는 이들의 CDR의 조합을 포함한다. 실시형태에서, 항체 서열은 IMGT 넘버링 체계에 따라 결정되었다.
- [0011] 실시형태에서, 클라우딘 4 단백질은 인간 클라우딘 4 단백질이다.
- [0012] 실시형태에서, 항체는 완전 인간 또는 인간화된다.
- [0013] 실시형태에서, 항체는 단일특이성, 이중특이성, 또는 다중특이성이다.
- [0014] 실시형태에서, 항체는 IgG이다. 예를 들어, 항체는 IgG₁, IgG₂, IgG₃ 또는 IgG₄ 항체이다.
- [0015] 실시형태에서, 항체는 단일-쇄 항체이다.
- [0016] 실시형태에서, 항체는 적어도 1.0×10^{-9} M의 결합 친화도를 갖는다
- [0017] 실시형태에서, 항체 또는 단편은 중쇄 불변 영역, 경쇄 불변 영역, Fc 영역, 및 Fc 변이체, 또는 이들의 조합을 포함한다.
- [0018] 실시형태에서, 항체는 Gly1-2-F4, Gly1-4-G3, Gly1-1-H9, 또는 Gly1-1-B2를 포함한다.
- [0019] 실시형태에서, 항체는 Gly1-2-F4, Gly1-4-G3, Gly1-1-H9, 또는 Gly1-1-B2의 결합과 경쟁한다.
- [0020] 실시형태에서, 항체 또는 단편은 치료제에 연결된다.
- [0021] 실시형태에서, 항체는 단일-쇄 단편이다.
- [0022] 본 발명의 양태는 또한 인간 클라우딘 4 단백질에 결합하는 단리된 항체 또는 이의 단편에 관한 것이다.
- [0023] 실시형태에서, 항체는 다음을 포함한다: (a) 서열 번호 9의 아미노산 서열을 포함하는 VH CDR1, 서열 번호 10의 아미노산 서열을 포함하는 VH CDR2, 서열 번호 11의 아미노산 서열을 포함하는 VH CDR3, 서열 번호 19의 아미노산 서열을 포함하는 VL CDR1, 서열 번호 20의 아미노산 서열을 포함하는 VL CDR2, 및 서열 번호 21의 아미노산 서열을 포함하는 VL CDR3; 또는 (b) 서열 번호 12의 아미노산 서열을 포함하는 VH CDR1, 서열 번호 13의 아미노산 서열을 포함하는 VH CDR2, 서열 번호 14의 아미노산 서열을 포함하는 VH CDR3, 서열 번호 22의 아미노산 서열을 포함하는 VL CDR1, 서열 번호 23의 아미노산 서열을 포함하는 VL CDR2, 및 서열 번호 24의 아미노산 서열을 포함하는 VL CDR3; 또는 (c) 서열 번호 15의 아미노산 서열을 포함하는 VH CDR1, 서열 번호 16의 아미노산 서열을 포함하는 VH CDR2, 서열 번호 17의 아미노산 서열을 포함하는 VH CDR3, 서열 번호 25의 아미노산 서열을 포함하는 VL CDR1, 서열 번호 26의 아미노산 서열을 포함하는 VL CDR2, 및 서열 번호 27의 아미노산 서열을 포함하는 VL CDR3; 또는 (d) 서열 번호 18의 아미노산 서열을 포함하는 VH CDR1, 서열 번호 16의 아미노산 서열을 포함하는 VH CDR2, 서열 번호 17의 아미노산 서열을 포함하는 VH CDR3, 서열 번호 28의 아미노산 서열을 포함하는 VL CDR1, 서열 번호 29의 아미노산 서열을 포함하는 VL CDR2, 및 서열 번호 30의 아미노산 서열을 포함하는 VL CDR3. 실시형태에서, 항체 서열은 IMGT 넘버링 체계에 따라 결정되었다.
- [0024] 본 발명의 양태는 또한 인간 클라우딘 4 단백질에 결합하고 다음을 포함하는 단리된 scFv 항체에 관한 것이다. (a) 서열 번호 9의 아미노산 서열을 포함하는 VH CDR1, 서열 번호 10의 아미노산 서열을 포함하는 VH CDR2, 서열 번호 11의 아미노산 서열을 포함하는 VH CDR3, 서열 번호 19의 아미노산 서열을 포함하는 VL CDR1, 서열 번호 20의 아미노산 서열을 포함하는 VL CDR2, 및 서열 번호 21의 아미노산 서열을 포함하는 VL CDR3; 또는 (b) 서열 번호 12의 아미노산 서열을 포함하는 VH CDR1, 서열 번호 13의 아미노산 서열을 포함하는 VH CDR2, 서열

번호 14의 아미노산 서열을 포함하는 VH CDR3, 서열 번호 22의 아미노산 서열을 포함하는 VL CDR1, 서열 번호 23의 아미노산 서열을 포함하는 VL CDR2, 및 서열 번호 24의 아미노산 서열을 포함하는 VL CDR3; 또는 (c) 서열 번호 15의 아미노산 서열을 포함하는 VH CDR1, 서열 번호 16의 아미노산 서열을 포함하는 VH CDR2, 서열 번호 17의 아미노산 서열을 포함하는 VH CDR3, 서열 번호 25의 아미노산 서열을 포함하는 VL CDR1, 서열 번호 26의 아미노산 서열을 포함하는 VL CDR2, 및 서열 번호 27의 아미노산 서열을 포함하는 VL CDR3; 또는 (d) 서열 번호 18의 아미노산 서열을 포함하는 VH CDR1, 서열 번호 16의 아미노산 서열을 포함하는 VH CDR2, 서열 번호 17의 아미노산 서열을 포함하는 VH CDR3, 서열 번호 28의 아미노산 서열을 포함하는 VL CDR1, 서열 번호 29의 아미노산 서열을 포함하는 VL CDR2, 및 서열 번호 30의 아미노산 서열을 포함하는 VL CDR3. 실시형태에서, 항체 서열은 IMGT 넘버링 체계에 따라 결정되었다.

- [0025] 본 발명의 양태는 인간 클라우딘 4 단백질에 결합하고, 서열 번호 1, 3, 5 및 7로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열, 또는 이와 적어도 90% 동일한 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하는 단리된 항체 또는 이의 단편에 관한 것이다.
- [0026] 본 발명의 양태는 인간 클라우딘 4 단백질에 결합하고, 서열 번호 2, 4, 6 및 8로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열, 또는 이와 적어도 90% 동일한 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 단리된 항체 또는 이의 단편에 관한 것이다.
- [0027] 본 발명의 양태는 인간 클라우딘 4 단백질에 결합하고, 서열 번호 1, 3, 5 및 7로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열, 또는 이와 적어도 90% 동일한 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및 서열 번호 2, 4, 6 및 8로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열, 또는 이와 적어도 90% 동일한 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 단리된 항체 또는 이의 단편에 관한 것이다.
- [0028] 본 발명의 양태는 인간 클라우딘 4 단백질에 결합하고, 서열 번호 1, 3, 5 및 7로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열, 또는 이와 적어도 90% 동일한 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하는 단리된 scFv에 관한 것이다.
- [0029] 본 발명의 양태는 인간 클라우딘 4 단백질에 결합하고, 서열 번호 2, 4, 6 및 8로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열, 또는 이와 적어도 90% 동일한 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 단리된 scFv에 관한 것이다.
- [0030] 본 발명의 양태는 인간 클라우딘 4 단백질에 결합하고, 서열 번호 1, 3, 5 및 7로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열, 또는 이와 적어도 90% 동일한 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및 서열 번호 2, 4, 6 및 8로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열, 또는 이와 적어도 90% 동일한 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 단리된 scFv에 관한 것이다.
- [0031] 본 발명의 실시형태는 인간 클라우딘 4 단백질에 결합하고 중쇄, 경쇄, 또는 이들의 조합을 포함하는 단리된 단클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하며, 여기서 중쇄는 서열 번호 1과 약 95% 동일한 아미노산 서열을 포함하고, 경쇄는 서열 번호 2와 약 95% 동일한 아미노산 서열을 포함한다.
- [0032] 본 발명의 실시형태는 인간 클라우딘 4 단백질에 결합하고 중쇄, 경쇄, 또는 이들의 조합을 포함하는 단리된 scFv를 포함하며, 여기서 중쇄는 서열 번호 1과 약 95% 동일한 아미노산 서열을 포함하고, 경쇄는 서열 번호 2와 약 95% 동일한 아미노산 서열을 포함한다.
- [0033] 본 발명의 실시형태는 인간 클라우딘 4 단백질에 결합하고 중쇄, 경쇄, 또는 이들의 조합을 포함하는 단리된 단클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하며, 여기서 중쇄는 서열 번호 3과 약 95% 동일한 아미노산 서열을 포함하고, 경쇄는 서열 번호 4와 약 95% 동일한 아미노산 서열을 포함한다.
- [0034] 본 발명의 실시형태는 인간 클라우딘 4 단백질에 결합하고 중쇄, 경쇄, 또는 이들의 조합을 포함하는 단리된 scFv 항체를 포함하며, 여기서 중쇄는 서열 번호 3과 약 95% 동일한 아미노산 서열을 포함하고, 경쇄는 서열 번호 4와 약 95% 동일한 아미노산 서열을 포함한다.
- [0035] 본 발명의 실시형태는 인간 클라우딘 4 단백질에 결합하고 중쇄, 경쇄, 또는 이들의 조합을 포함하는 단리된 단클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하며, 여기서 중쇄는 서열 번호 5와 약 95% 동일한 아미노산 서열을 포함하고, 경쇄는 서열 번호 6과 약 95% 동일한 아미노산 서열을 포함한다.
- [0036] 본 발명의 실시형태는 인간 클라우딘 4 단백질에 결합하고 중쇄, 경쇄, 또는 이들의 조합을 포함하는 단리된 scFv를 포함하며, 여기서 중쇄는 서열 번호 5와 약 95% 동일한 아미노산 서열을 포함하고, 경쇄는 서열 번호 6

과 약 95% 동일한 아미노산 서열을 포함한다.

- [0037] 본 발명의 실시형태는 인간 클라우딘 4 단백질에 결합하고 중쇄, 경쇄, 또는 이들의 조합을 포함하는 단리된 단클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하며, 여기서 중쇄는 서열 번호 7과 약 95% 동일한 아미노산 서열을 포함하고, 경쇄는 서열 번호 8과 약 95% 동일한 아미노산 서열을 포함한다.
- [0038] 본 발명의 실시형태는 인간 클라우딘 4 단백질에 결합하고 중쇄, 경쇄, 또는 이들의 조합을 포함하는 단리된 scFv를 포함하며, 여기서 중쇄는 서열 번호 7과 약 95% 동일한 아미노산 서열을 포함하고, 경쇄는 서열 번호 8과 약 95% 동일한 아미노산 서열을 포함한다.
- [0039] 본 발명의 양태는 본원에 기술된 바와 같은 항체 단편 및 면역 세포 상의 분자에 대해 특이성을 갖는 제2 항원 결합 단편을 포함하는 단리된 이중특이성 항체에 관한 것이다. 실시형태에서, 분자는 CCR4, CXCR4, B7H3, B7H4, CD27, CD28, CD40, CD40L, CD47, CD122, CTLA-4, GITR, GITRL, ICOS, ICOSL, LAG-3, LIGHT, OX-40, OX40L, PD-1, TIM3, 4-1BB, TIGIT, VISTA, HEVM, BTLA, 및 KIR로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0040] 실시형태에서, 단편 및 제2 단편은 각각 독립적으로 Fab 단편, 단일-쇄 가변 단편(scFv), 또는 단일-도메인 항체로부터 선택된다.
- [0041] 본 발명의 양태는 추가로, 인간 클라우딘 4 단백질에 결합하는 이중특이성 T 세포 인게이지(BiTE)에 관한 것이다. 실시형태에서, BiTE는 다음을 포함한다: (a) 서열 번호 9의 아미노산 서열을 포함하는 VH CDR1, 서열 번호 10의 아미노산 서열을 포함하는 VH CDR2, 서열 번호 11의 아미노산 서열을 포함하는 VH CDR3, 서열 번호 19의 아미노산 서열을 포함하는 VL CDR1, 서열 번호 20의 아미노산 서열을 포함하는 VL CDR2, 및 서열 번호 21의 아미노산 서열을 포함하는 VL CDR3; 또는 (b) 서열 번호 12의 아미노산 서열을 포함하는 VH CDR1, 서열 번호 13의 아미노산 서열을 포함하는 VH CDR2, 서열 번호 14의 아미노산 서열을 포함하는 VH CDR3, 서열 번호 22의 아미노산 서열을 포함하는 VL CDR1, 서열 번호 23의 아미노산 서열을 포함하는 VL CDR2, 및 서열 번호 24의 아미노산 서열을 포함하는 VL CDR3; 또는 (c) 서열 번호 15의 아미노산 서열을 포함하는 VH CDR1, 서열 번호 16의 아미노산 서열을 포함하는 VH CDR2, 서열 번호 17의 아미노산 서열을 포함하는 VH CDR3, 서열 번호 25의 아미노산 서열을 포함하는 VL CDR1, 서열 번호 26의 아미노산 서열을 포함하는 VL CDR2, 및 서열 번호 27의 아미노산 서열을 포함하는 VL CDR3; 또는 (d) 서열 번호 18의 아미노산 서열을 포함하는 VH CDR1, 서열 번호 16의 아미노산 서열을 포함하는 VH CDR2, 서열 번호 17의 아미노산 서열을 포함하는 VH CDR3, 서열 번호 28의 아미노산 서열을 포함하는 VL CDR1, 서열 번호 29의 아미노산 서열을 포함하는 VL CDR2, 및 서열 번호 30의 아미노산 서열을 포함하는 VL CDR3. 실시형태에서, 항체 서열은 IMGT 넘버링 체계에 따라 결정되었다.
- [0042] 본 발명의 양태는 인간 클라우딘 4 단백질에 결합하고, 서열 번호 1, 3, 5 및 7로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열, 또는 이와 적어도 90% 동일한 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하는 이중특이성 T 세포 인게이지(BiTE)를 추가로 포함한다.
- [0043] 본 발명의 양태는 인간 클라우딘 4 단백질에 결합하고, 서열 번호 2, 4, 6 및 8로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열, 또는 이와 적어도 90% 동일한 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 이중특이성 T 세포 인게이지(BiTE)를 추가로 포함한다.
- [0044] 본 발명의 양태는 인간 클라우딘 4 단백질에 결합하고, 서열 번호 1, 3, 5 및 7로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열, 또는 이와 적어도 90% 동일한 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및 서열 번호 2, 4, 6 및 8로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열, 또는 이와 적어도 90% 동일한 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 이중특이성 T 세포 인게이지(BiTE)를 추가로 포함한다.
- [0045] 본원에 기술된 바와 같은 실시형태는 Fc 단편을 추가로 포함할 수 있다.
- [0046] 본 발명의 양태는 또한 본원에 기술된 바와 같은 항체 또는 단편을 코딩하는 핵산에 관한 것이다.
- [0047] 또한, 본 발명의 양태는 본원에 기술된 바와 같은 항체 또는 이의 단편, 및 제약상 허용되는 담체 또는 부형제를 포함하는 제약 조성물에 관한 것이다.
- [0048] 실시형태에서, 제약 조성물은 적어도 하나의 추가 치료제를 추가로 포함할 수 있다. 예를 들어, 치료제는 독소, 방사성 표지, siRNA, 소분자, 또는 사이토카인일 수 있다.
- [0049] 본 발명의 양태는 본원에 기술된 바와 같은 항체 또는 단편을 코딩하는 하나 이상의 폴리뉴클레오티드(들)를 포함하는 단리된 세포에 관한 것이다.

- [0050] 또한, 본 발명의 양태는 본원에 기술된 바와 같은 핵산을 포함하는 벡터에 관한 것이다.
- [0051] 또한, 본 발명의 양태는 본원에 기술된 바와 같은 벡터를 포함하는 세포에 관한 것이다.
- [0052] 본 발명의 양태는 키메라 항원 수용체를 포함하는 조작된 세포에 관한 것이다. 실시형태에서, 키메라 항원 수용체는 암 세포의 표면 상의 항원에 특이적인 세포외 리간드 결합 도메인을 포함하고, 항원은 클라우딘 4를 포함하고, 세포의 리간드 결합 도메인은 항체 또는 이의 단편을 포함하고, 항체 또는 이의 단편은 다음을 포함한다: (a) 서열 번호 9의 아미노산 서열을 포함하는 VH CDR1, 서열 번호 10의 아미노산 서열을 포함하는 VH CDR2, 서열 번호 11의 아미노산 서열을 포함하는 VH CDR3, 서열 번호 19의 아미노산 서열을 포함하는 VL CDR1, 서열 번호 20의 아미노산 서열을 포함하는 VL CDR2, 및 서열 번호 21의 아미노산 서열을 포함하는 VL CDR3; 또는 (b) 서열 번호 12의 아미노산 서열을 포함하는 VH CDR1, 서열 번호 13의 아미노산 서열을 포함하는 VH CDR2, 서열 번호 14의 아미노산 서열을 포함하는 VH CDR3, 서열 번호 22의 아미노산 서열을 포함하는 VL CDR1, 서열 번호 23의 아미노산 서열을 포함하는 VL CDR2, 및 서열 번호 24의 아미노산 서열을 포함하는 VL CDR3; 또는 (c) 서열 번호 15의 아미노산 서열을 포함하는 VH CDR1, 서열 번호 16의 아미노산 서열을 포함하는 VH CDR2, 서열 번호 17의 아미노산 서열을 포함하는 VH CDR3, 서열 번호 25의 아미노산 서열을 포함하는 VL CDR1, 서열 번호 26의 아미노산 서열을 포함하는 VL CDR2, 및 서열 번호 27의 아미노산 서열을 포함하는 VL CDR3; 또는 (d) 서열 번호 18의 아미노산 서열을 포함하는 VH CDR1, 서열 번호 16의 아미노산 서열을 포함하는 VH CDR2, 서열 번호 17의 아미노산 서열을 포함하는 VH CDR3, 서열 번호 28의 아미노산 서열을 포함하는 VL CDR1, 서열 번호 29의 아미노산 서열을 포함하는 VL CDR2, 및 서열 번호 30의 아미노산 서열을 포함하는 VL CDR3. 실시형태에서, 항체 서열은 IMGT 넘버링 체계에 따라 결정되었다.
- [0053] 실시형태에서, 항체 또는 이의 단편은 서열 번호 1, 3, 5 및 7로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열, 또는 이와 적어도 90% 동일한 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0054] 실시형태에서, 항체 또는 이의 단편은 서열 번호 2, 4, 6 및 8로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열, 또는 이와 적어도 90% 동일한 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0055] 실시형태에서, 항체 또는 이의 단편은 서열 번호 1, 3, 5 및 7로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열, 또는 이와 적어도 90% 동일한 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및 서열 번호 2, 4, 6 및 8로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열, 또는 이와 적어도 90% 동일한 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0056] 실시형태에서, 세포는 T 세포, NK 세포, NKT 세포, iPS 세포, iPS-유래 세포, 세포주, 또는 B 세포를 포함한다. 예를 들어, 세포는 CD4+, CD8+, CD3+ 범 T 세포, 또는 이들의 임의의 조합을 포함한다.
- [0057] 본 발명의 양태는 추가로 키트에 관한 것이다. 실시형태에서, 키트는 제36항 또는 제39항의 적어도 하나의 제약 조성물; 적어도 하나의 항체를 대상체에게 투여하기 위한 주사기, 바늘, 또는 어플리케이터; 및 사용 지침서를 포함한다.
- [0058] 또한, 본 발명의 양태는 샘플에서 클라우딘 4의 존재를 검출하는 방법에 관한 것이다. 실시형태에서, 방법은 샘플을 본원에 기술된 바와 같은 단리된 단클론 항체 또는 이의 단편과 접촉시키고, 항체-항원 복합체의 존재 또는 부재를 검출함으로써 샘플 중의 클라우딘 4의 존재를 검출하는 단계를 포함한다. 실시형태에서, 접촉은 면역조직화학을 포함한다. 예를 들어, 면역조직화학은 침전, 면역형광, 웨스턴 블롯, 또는 ELISA를 포함한다. 실시형태에서, 샘플은 전혈, 혈액 성분, 체액, 생검체, 조직, 혈청 또는 하나 이상의 세포이다.
- [0059] 실시형태에서, 샘플은 정상 샘플 또는 암성 샘플을 포함한다. 예를 들어, 암은 클라우딘 4를 발현한다. 예를 들어, 암은 담도암, 유방암, 자궁경부암, 결장직장암, 식도암, 장암, 폐암, 췌장암, 전립선암, 신장암, 직장암, 위암, 갑상선암 또는 자궁암을 포함한다.
- [0060] 실시형태에서, 하나 이상의 세포는 시험관내 배양물을 포함한다.
- [0061] 실시형태에서, 하나 이상의 세포는 클라우딘 4-발현 세포를 포함한다.
- [0062] 실시형태에서, 샘플은 시험관내 샘플이다.
- [0063] 실시형태는 대상체로부터 샘플을 얻는 단계를 추가로 포함할 수 있다.
- [0064] 추가로 본 발명의 양태는 본원에 기술된 바와 같은 제약 조성물을 대상체에게 투여함으로써 대상체에서 암을 치료하는 방법에 관한 것이다. 예를 들어, 암은 클라우딘 4를 발현한다. 예를 들어, 암은 담도암, 유방암, 자궁경부암, 결장직장암, 식도암, 장암, 폐암, 췌장암, 전립선암, 신장암, 직장암, 위암, 갑상선암 또는 자궁암을 포

함한다. 실시형태에서, 본원에 기술된 바와 같은 항체 또는 단편은 항체, 단편 또는 이중특이성 항체가 클라우딘 4에 결합하는 것보다 적어도 5배, 10배, 25배, 50배, 100배 또는 1000배 더 적은 결합 친화도로 클라우딘 3에 결합한다.

[0065] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 이어지는 설명으로부터 용이하게 명백하다.

도면의 간단한 설명

- [0066] 도 1은 세포변성 효과 유세포 분석을 검증하는 비제한적인 예시적인 데이터를 보여준다.
- 도 2는 클라우딘-4에 대한 패닝의 비제한적인 예시적 개략도를 보여준다.
- 도 3은 곤충 세포에서 발현된 가용화된 클라우딘-4를 사용한 파지 패닝에 의한 클라우딘-4 표적화 scFv(들)의 비제한적인 예시적 데이터의 차트를 보여준다.
- 도 4는 가용성 클라우딘-4에 특이적으로 결합하는 EK01(WO 2019/178359 참조) 파지의 비제한적인 예시적 데이터의 그래프를 보여준다.
- 도 5는 클라우딘-4에 결합하는 F4의 비제한적인 예시적 데이터의 그래프를 보여준다.
- 도 6은 비제한적인 예시적 유세포 분석 데이터의 히스토그램을 보여준다.
- 도 7은 단백질 정제로부터의 비제한적인 예시적 웨스턴 블롯을 보여준다.
- 도 8은 EK01(WO 2019/178356 참조) 미니바디 결합 데이터의 비제한적인 예시적 데이터를 보여준다.
- 도 9는 상자성 프로테오리포솜(PMPL) 패닝의 비제한적인 예시적 개략도를 보여준다. 실시형태에서, 가용성 클라우딘-4에 대해 3라운드 패닝을 수행하고 클라우딘-4로 스크리닝하였다. 가용성 클라우딘-4에 대한 ELISA 및 희석 시리즈의 확인 후 하나의 히트가 처음에 확인되었다. 처음에는 PMPL에서 패닝이 실패하였다. 이어서, 새로운 PMPL이 만들어졌다.
- 도 10은 PMPL 생성의 비제한적인 예시적 데이터를 보여준다.
- 도 11은 패닝의 비제한적인 예시적 개략도를 보여준다.
- 도 12는 도 11의 패닝의 재-구제로부터의 6개 플레이트의 비제한적인 예시적 결과를 보여준다.
- 도 13은 도 11의 패닝의 라운드 1 및 2로부터의 클론 및 빈도의 비제한적인 예시적 결과를 보여준다.
- 도 14는 도 11의 라운드 1 및 라운드 2의 차세대 시퀀싱(NGS)의 비제한적인 예시적 데이터를 보여준다.
- 도 15는 파지 결합 가용화 클라우딘-4 ELISA의 비제한적인 예시적 데이터를 보여준다.
- 도 16은 클라우딘-4 양성 세포 및 형질감염되지 않은 세포에서의 파지 결합의 비제한적인 예시적 데이터를 보여준다.
- 도 17은 형질도입되지 않은 세포 상에 파지가 결합하는 것에 대한 비제한적인 예시적 데이터를 보여준다.
- 도 18은 비제한적인 예시적 ELISA 데이터를 보여준다.
- 도 19는 비제한적인 예시적 미니바디 결합 데이터를 보여준다.
- 도 20은 비제한적인 예시적 미니바디 결합 데이터를 보여준다.
- 도 21은 클라우딘-4 전체 세포 패닝 경로의 비제한적인 예시적 개략도를 보여준다.
- 도 22는 비제한적인 예시적 정제 파지 결합 곡선(CLDN-4)을 보여준다.
- 도 23은 MB231 CLDN-4의 비제한적인 예시적 CLDN-4 미니바디 결합을 보여준다. 이 예에서, KM은 US 8,076,458로부터 합성되고 대조군으로서 본 발명자들의 scFv-Fc 벡터에 클로닝된 항-CLDN4 항체이다. Miltenyi 및 R&D를 구매하여 그대로 사용하였다.
- 도 24는 CLDN 단백질 구조의 비제한적인 예시적 개략도를 보여준다. 실시형태에서, CLDN-3 및 CLDN-4의 구조 및 발현은 유사할 수 있다. 실시형태에서, 발현 수준은 또한 암 조직에서 유사할 수 있다.
- 도 25는 인간 CLDN-3 및 CLDN-4 세포의 도메인의 비제한적인 예시적 개략도를 보여준다. 일부 실시형태에서, 세

포외 도메인의 상동성을 사용하여 CLDN-4 특이적 항체를 발견할 수 있다. 상동성: ECL1 98%, ECL2 79%, 둘 다 93%.

도 26은 상업적 항체 안정성의 예를 보여준다.

도 27은 세포주 염색의 비제한적인 예시적 정량화 데이터를 보여준다.

도 28은 aCLDN-4 미니바디의 CLDN-3 결합의 비제한적인 예시적 데이터를 보여준다.

도 29는 클라우딘 항체의 특이성의 비제한적인 예시적 데이터를 보여준다. 0.1 mg/ml에서 유사한 결과가 관찰되었다.

도 30은 MB231을 KO와 유사한 aCXCR4로 염색한 것의 비제한적인 예시적 데이터를 보여준다.

도 31은 CLDN-4 발현 MB231 세포에 대한 CD8+ 항-CLDN-4 CART 살해의 비제한적인 예시적 그래프를 보여준다. 양성 대조군 KM3900 및 CPE는 종양을 비특이적으로 살해하였고 aC4-G3 및 aC4-F4는 CLDN+ 종양을 특이적으로 인식하고 살해하였다(9배 더 높음). 음성 대조군 배경 살해율은 낮다(<10%). 본 발명자들의 항-CLDN-4 CART는 높은 수준의 CLDN-4를 발현하는 종양 세포를 특이적으로 살해한다.

도 32는 2:1의 E:T 비의 CD8+ 항-CLDN-4 CART 살해의 동역학에 대한 비제한적인 예시적 데이터의 그래프를 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

0067] 약어 및 정의

0068] 하나 이상의 실시형태에 대한 상세한 설명이 본원에 제공된다. 그러나, 본 발명은 다양한 형태로 구현될 수 있음이 이해되어야 한다. 따라서, 본원에 개시된 구체적인 세부사항은 제한적인 것으로 해석되는 것이 아니라, 청구범위에 대한 근거로서, 그리고 임의의 적절한 방식으로 본 발명을 이용하도록 당업자에게 교시하기 위한 대표적인 근거로서 해석되어야 한다.

0069] 단수 형태는 문맥에서 명백하게 달리 지시하지 않는 한 복수의 언급 대상을 포함한다. 청구범위 및/또는 명세서에서 "포함하는(comprising)"이라는 용어와 함께 사용될 때 단수 형태 단어의 사용은 "하나"를 의미할 수 있지만, "하나 이상", "적어도 하나" 및 "하나 또는 하나 초과"의 의미와도 일치한다.

0070] "예를 들어", "예컨대", "포함하는" 등의 어구 중 임의의 것이 본원에서 사용되는 경우 어디에서든지, 명시적으로 달리 언급되지 않는 한 "그리고 제한 없이"라는 어구가 이어지는 것으로 이해된다. 유사하게, "예", "예시적인" 등은 비제한적인 것으로 이해된다.

0071] 용어 "실질적으로"는 의도된 목적에 부정적으로 영향을 미치지 않는 기술어로부터의 편차를 허용한다. 기술적 용어는 "실질적으로"라는 단어가 명시적으로 언급되지 않더라도 "실질적으로"라는 용어에 의해 수식되는 것으로 이해된다.

0072] "포함하는(comprising)" 및 "포함하는(including)" 및 "갖는(having)" 및 "수반하는(involving)"(및 유사하게 "포함하다", "갖다" 및 "수반하다") 등의 용어는 상호교환가능하게 사용되며 동일한 의미를 갖는다. 구체적으로, 각각의 용어는 "포함하는"의 통상적인 미국 특허법 정의와 일치하게 정의되며, 따라서 "적어도 하기"를 의미하는 개방형 용어인 것으로 해석되고, 또한 추가 특징, 제한, 양태 등을 배제하지 않는 것으로 해석된다. 따라서, 예를 들어, "단계 a, b, 및 c를 수반하는 공정"은 상기 공정이 적어도 단계 a, b, 및 c를 포함함을 의미한다. 단수 형태가 사용되는 어디에서든지, 문맥상 무의미한 해석이 아닌 한, "하나 이상"이 이해된다.

0073] 용어 "약"은 본원에서 대략적으로, 대강, 가량, 또는 ~정도를 의미하기 위해 사용된다. 용어 "약"이 수치 범위와 함께 사용되는 경우, 이는 제시된 수치 값의 위와 아래로 경계를 확장함으로써 그 범위를 수식한다. 일반적으로, 용어 "약"은 본원에서 언급된 값의 위와 아래로 20 퍼센트 위 또는 아래의(더 높은 또는 더 낮은) 변량만큼 수식하기 위해 사용된다.

0074] 고유한 제조합 단클론 클라우딘 4(CLDN4) 항체가 본원에 기술된다. 폴리펩티드(예컨대 항체) 또는 폴리뉴클레오티드에 관한 경우 "제조합"은 자연적으로 존재하지 않는 폴리펩티드 또는 폴리뉴클레오티드의 형태를 지칭할 수 있으며, 이의 비제한적인 예는 통상적으로 함께 발생할 수 없는 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드를 조합함으로써 생성될 수 있다.

[0075] 단클론 CLDN4 항체의 아미노산 서열은 본원에 제공된 VH 및 VL 서열과 조합으로 유용한 예시적인 야생형 IgG 불변 영역에 추가적으로 본원에 제공되며(표 1~4 참조); CLDN4 항체의 중쇄 및 경쇄 상보성 결정 영역 CDR의 아미노산 서열은 하기에서 밑줄(CDR1), 밑줄 및 볼드체(CDR2), 또는 밑줄, 이탤릭체 및 볼드체(CDR3)로 표시된다:

[0076] [표 1]

Gly1-2-F4 PeIB-F 2019-12-08 C03 Ab 가변 영역 아미노산 서열
Gly1-2-F4의 V_H쇄
QVQLVQSGGGLVQPGGSLRSLSCAASGFTFN NY AMSWVRQAPGKGLEWVST IRDSGGST YYT DSVKGRFTISRDSKNTLYLQMN SL RADDTAVYYC <u>ARRGYSSSWYGDGYYYGMDV</u> WGQGT VTVS (서열 번호 1)
Gly1-2-F4의 V_L쇄
NFMLTQPHSVSESPGETVTISCARSSGSIASSFVQWYQORPGASPTTVIY ENN QRPSGVPD RFSGSIDSSSNSASLTISGLKPEDEADYYC <u>QSYDSTSHV</u> FGTGTQVTVL (서열 번호 2)

[0077]

[0078] [표 2]

Gly1-4-G3 PeIB-F 2019-12-08 H03 Ab 가변 영역 아미노산 서열
Gly1-4-G3의 V_H쇄
EVQLVESGGGVVQGRSLRSLSCAASGFTFGGYAMHWVRQAPGKLEWVAE LSNSGSNA FYA DSVRGRFTISRDN SKNT MYLQMN SL RAEDTAVYYC <u>CARAVMSSSWYMRYYYYYMDV</u> WGKGT T TV TVS (서열 번호 3)
Gly1-4-G3의 V_L쇄
LPVLTQPPSASGTPGQRVTMSCSGRSNIGSNTVNWYQQLPGTAPKLLIY SNN QRPSGVPD RFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYC <u>AAWDDSLNGLYV</u> FGTGTKVVNL (서열 번호 4)

[0079]

[0080] [표 3]

Gly1-1-H9 PeIB-F 2019-12-08 B03 Ab 가변 영역 아미노산 서열
Gly1-1-H9의 V_H쇄
QVQLQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYATISWVRQAPGQPEWMGR IIPIVDI ANYA QRFQGRVTITADESTTTAYMELSSLRSDDTAVYYC <u>ARGGSQGAYYMDV</u> WGKGTVTVS (서열 번호 5)
Gly1-1-H9의 V_L쇄
NFMLTQPHSVSESPGKTVTISCTRSSGSIASNYVQWYQORPGSAPTTVIY EDN QRPSGVPD RFSGSIDSSSNSASLTISGLKTEDEADYYC <u>QSYDDSNRVV</u> FGGKTKLTVL (서열 번호 6)

[0081]

[0082] [표 4]

Gly1-1-B2 PeIB-F 2019-12-08 A03 Ab 가변 영역 아미노산 서열
Gly1-1-B2의 V_H쇄
QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFN NY AVSWVRQAPGQPEWMGR IIPIVDI ANYA QRFQGRVTITADESTNTAYMELSSLRSEDTAVYYC <u>ARGGSQGAYYMDV</u> WGKGTMTVTS (서열 번호 7)
Gly1-1-B2의 V_L쇄
ETTLTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSNYLAWYRQKPGQAPRLLIY GAS TRATGIPDR FSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYFC <u>HOYGS</u> LPQTFGQGTKVEIK (서열 번호 8)

[0083]

[0084] CLDN4 항체의 중쇄 및 경쇄 상보성 결정 영역의 아미노산 서열은 하기 표 5A~5B에 제시된다:

[0085] [표 5A]

[0086] CLDN4 항체의 중쇄(V_H) 상보성 결정 영역(CDR)

서열 ID	V _H CDR1	V _H CDR2	V _H CDR3
Gly1-2-F4	GFTFNNYA (서열 번호 9)	IRDSGGST (서열 번호 10)	ARRGYSSSWYGDGYYGMDV (서열 번호 11)
Gly1-4-G3	GFTFGGYA (서열 번호 12)	LSNSGSNA (서열 번호 13)	ARAVMSSSWYMRYYYYYMDV (서열 번호 14)
Gly1-1-H9	GGTFSSYA (서열 번호 15)	IIPIVDIA (서열 번호 16)	ARGGSQGAYYMDV (서열 번호 17)
Gly1-1-B2	GGTFNNYA (서열 번호 18)	IIPIVDIA (서열 번호 16)	ARGGSQGAYYMDV (서열 번호 17)

[0087]

[0088]

[표 5B]

[0089]

CLDN4 항체의 경쇄(V_L) 상보성 결정 영역(CDR)

서열 ID	V _L CDR1	V _L CDR2	V _L CDR3
Gly1-2-F4	SGSIASSF (서열 번호 19)	ENN (서열 번호 20)	QSYDSTSHV (서열 번호 21)
Gly1-4-G3	RSNIGSNT (서열 번호 22)	SNN (서열 번호 23)	AAWDDSLNGLYV (서열 번호 24)
Gly1-1-H9	SGSIASNY (서열 번호 25)	EDN (서열 번호 26)	QSYDDSNRVV (서열 번호 27)
Gly1-1-B2	QSVSNY (서열 번호 28)	GAS (서열 번호 29)	HQYGSLPQT (서열 번호 30)

[0090]

[0091]

CLDN4 항체의 중쇄 및 경쇄 프레임워크 영역의 아미노산 서열은 하기 표 6A~6B에 제시된다:

[0092]

[표 6A]

[0093] CLDN4 항체의 중쇄(V_H) 프레임워크 영역(FR)

서열 ID	VH FR1	VH FR2	VH FR3	VH FR4
Gly1-2-F4	QVQLVQSGGGL VQPGGSLRLSC AAS (서열 번호 31)	MSWVRQAPGK GLEWVST (서열 번호 32)	YYTDSVKGRFTI SRDSSKNTLYLQ MNSLRADDTAVY YC (서열 번호 33)	WGQGTIVTVS (서열 번호 34)
Gly1-4-G3	EVQLVESGGGV VQPGRSLRLSC AAS (서열 번호 35)	MHWVRQAPGK GLEWVAE (서열 번호 36)	FYADSVRGRFTI SRDNSKNTMYLQ MNSLRAEDTAVY YC (서열 번호 37)	WGKGTIVTVS (서열 번호 38)
Gly1-1-H9	QVQLQQSGAEV KKPGSSVKVSC KAS (서열 번호 39)	ISWVRQAPGQ GPEWMGR (서열 번호 40)	NYAQKFKQGRVTI TADESTTTAYME LSSLRSDDTAVY YC (서열 번호 41)	WGKGTIVTVS (서열 번호 38)
Gly1-1-B2	QVQLVQSGAEV KKPGSSVKVSC KAS (서열 번호 42)	VSWVRQAPGQ GPEWMGR (서열 번호 43)	NYAQRFKQGRVTI TADESTNTAYME LSSLRSED TAVY YC (서열 번호 44)	WGKGMTVTVS (서열 번호 45)

[0094]

[0095] [표 6B]

[0096] CLDN4 항체의 경쇄(V_L) 프레임워크 영역(FR)

서열 ID	VL FR1	VL FR2	VL FR3	VL FR4
Gly1-2-F4	NEMLTQPHSVS ESPGETVTISC ARS (서열 번호 46)	VQWYQQRPGA SPTTVIY (서열 번호 47)	QRPSGVPDRFSG SIDSSNSASLT ISGLKPEDEADY YC (서열 번호 48)	FGTGTQVTVL (서열 번호 49)
Gly1-4-G3	LPVLTQPPSAS GTPGQRVTMSC SGS (서열 번호 50)	VNWWYQQLPGT APKLLIY (서열 번호 51)	QRPSGVPDRFSG SKSGTSASLAIS GLQSEDEADYYC (서열 번호 52)	FGTGTKVNVL (서열 번호 53)
Gly1-1-H9	NEMLTQPHSVS ESPGKTVTISC TRS (서열 번호 54)	VQWYQQRPGS APTTVIY (서열 번호 55)	QRPSGVPDRFSG SIDSSNSASLT ISGLKTEDEADY YC (서열 번호 56)	FGGGTKLTVL (서열 번호 57)

[0097]

서열 ID	VL FR1	VL FR2	VL FR3	VL FR4
Gly1-1-B2	ETTLTQSPATL SVSPGERATLS CRAS (서열 번호 58)	LAWYRQKPGQ APRLLIY (서열 번호 59)	TRATGIPDRFSG SGSGTDFILTIS RLEPEDFAVYFC (서열 번호 60)	FGQGTKVEIK (서열 번호 61)

[0098]

[0099] 단클론 CLDN4 항체의 핵산 서열이 본원에 제공되며; CLDN4 항체의 중쇄 및 경쇄 상보성 결정 영역 CDR의 핵산 서열은 하기에서 밑줄(CDR1), 밑줄 및 볼드체(CDR2), 또는 밑줄, 이탤릭체 및 볼드체(CDR3)로 표시된다:

[0100] [표 7A]

[0101] CLDN4 항체의 중쇄(V_H) 상보성 결정 영역(CDR)

서열 ID	VH CDR1	VH CDR2	VH CDR3
Gly1-2-F4	GGATTCACCTTTAA CAACTATGCC (서열 번호 62)	ATTCGTGATAGTGGT GGIAGCACA (서열 번호 63)	GCGAGGCGCGGGTATAG CAGCAGCTGGIATGGTG ATGGCTACTACTACGGT ATGGACGTC (서열 번호 64)
Gly1-4-G3	GGATTCACCTTCGG TGGCTATGCT (서열 번호 65)	CTATCAAATAGTGGG AGCAATGCC (서열 번호 66)	GCGAGAGCGGTTATGAG CAGCAGCTGGTACATGA GAAGTACTACTACTAC TACATGGACGTC (서열 번호 67)
Gly1-1-H9	GGAGGCACCTTCAG CAGCTATGCT (서열 번호 68)	ATCATCCCTATTGTT GACATAGCA (서열 번호 69)	GCGAGAGGGGGGTCCCA GGGGGCATACTACATGG ACGTC (서열 번호 70)
Gly1-1-B2	GGAGGCACCTTCAA CAACTATGCT (서열 번호 71)	ATCATCCCTATCGTT GATATCGCA (서열 번호 72)	GCCAGAGGGGGGTCCCA GGGGGCATATTACATGG ACGTC (서열 번호 73)

[0102]

[0103] [표 7B]

[0104] CLDN4 항체의 중쇄(V_H) 상보성 결정 영역(CDR)

서열 ID	VL CDR1	VL CDR2	VL CDR3
Gly1-2-F4	AGTGGCAGCATTGC CAGCAGCTTT (서열 번호 74)	GAGAATAAC (서열 번호 75)	CAGTCTTATGATAGTAC CTCTCATGTC (서열 번호 76)
Gly1-4-G3	CGCTCCAACATCGG AAGTAATACT	AGTAATAAT (서열 번호 78)	GCAGCATGGGATGACAG CCTGAATGGCCTTTATG TC

[0105]

서열 ID	VL CDR1	VL CDR2	VL CDR3
	(서열 번호 77)		(서열 번호 79)
Gly1-1-H9	AGTGGCAGCATTGC CAGCAACTAT (서열 번호 80)	GAGGATAAC (서열 번호 81)	CAGTCTTATGATGACAG TAATCGTGTGGTC (서열 번호 82)
Gly1-1-B2	CAGAGTGTAAGCAA CTAC (서열 번호 83)	GGCGCATCC (서열 번호 84)	CACCAGTATGGAAGTTT ACCTCAGACG (서열 번호 85)

[0106]

[0107] [표 8A]

[0108] CLDN4 항체의 V-D-J-영역

서열 ID	V-D-J-영역
Gly1-2-F4 (서열 번호 86)	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGG GTCCCTGAGACTCTCCTGTGCCGCTCTGGATTACCTTTAACT ATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGG GTCTCAACTATTCGTGATAGTGGTGGTAGCACATACTACACAGACTC CGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAGTTCCAAGAACACGT TGTATCTGCAAAATGAACAGCCTGAGAGCCGACGACACGGCCGTGTAT TACTGTGCGAGGCGCGGGTATAGCAGCAGCTGGTATGGTGA TGGCTA <u>CTACTACGGTATGGACGTC</u> TGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCT CC
Gly1-4-G3 (서열 번호 87)	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAG GTCCCTGAGACTCTCCTGCGCAGCCTCTGGATTACCTTCGGTGGCT ATGCTATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTAGAGTGG GTGGCAGAACTATCAAAATAGTGAAGCAATGCCTTCTACGCAGACTC CGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGA TGTATCTGCAAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTGTAT TACTGTGCGAGAGCGGTTATGAGCAGCAGCTGGTACATGAGAAGGTA <u>CTACTACTACTACATGGACGTC</u> TGGGGCAAAGGGACCACGGTCACCG TCTCC
Gly1-1-H9 (서열 번호 88)	CAGGTACAGCTGCAGCAGTCAGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTC CTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGAGGCACCTTCAGCAGCT ATGCTATCAGTTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCCTGAGTGG ATGGGAAGAATCATCCCTATTGTTGACATAGCAAACCTACGCACAGAA GTTCCAGGGCAGAGTCACGATTACCGCGGACGAATCCACGACCACAG CCTACATGGAAGTGAAGCAGCCTGAGATCTGACGACACGGCCGTGTAT TACTGTGCGAGAGGGGGTCCAGGGGGCATACTACATGGACGTCG GGGCAAAGGGACCACGGTCACCGTCTCC
Gly1-1-B2 (서열 번호 89)	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTC CTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTCTGGAGGCACCTTCAACA ATGCTGTCAGCTGGGTGCGGCAGGCCCTGGACAAGGGCCTGAGTGG ATGGGAAGGATCATCCCTATCGTTGATATCGCAAATTAACGCACAGAG GTTCCAGGGCAGAGTCACGATTACCGCGGACGAATCCACGAACACAG CCTACATGGAGCTGAGCAGTCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTATAT TATTGTGCCAGAGGGGGTCCAGGGGGCATATTACATGGACGTCG GGGCAAAGGGACAATGGTCAACCGTCTCC

[0109]

[0110] [표 8B]

[0111] CLDN4 항체의 V-J-영역

서열 ID	V-J-영역
Gly1-2-F4 (서열 번호 90)	<p>AATTTTATGCTGACGCAGCCCCACTCTGTGTGGAGTCTCCGGGGGA GACGGTAACCATCTCCTGCGCCCGCAGCAGTGGCAGCATTGCCAGCA <u>GCTTTGTGCAGTGGTACCAGCAGCGCCCGGGCGCTTCCCCACCACT</u> GTTATCTATGAGAATAACCAAAGACCCTCTGGGGTCCCTGATCGGTT CTCTGGCTCCATCGACAGCTCCTCCAACTCTGCCTCCCTCACCATCT CTGGACTGAAGCCTGAGGACGAGGCTGACTACTACTGTCAGTCTTAT <u>GATAGTACCTCTCATGTCT</u>TTCGGAACTGGGACCCAGGTCAACCGTCT AG</p>
Gly1-4-G3 (서열 번호 91)	<p>CTGCCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCGGGCA GAGGGTCACCATGTCTTGTCTGGAAGCCGCTCCAACATCSGAAGTA ATACTGTAACCTGGTACCAGCAGCTCCCAGGAACGGCCCCAAACTC CTCATCTATAGTAATAATCAGCGGCCCTCAGGGTCCCTGACCGATT CTCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCCCIGGCCATCAGTGGGC TCCAGTCTGAGGATGAGGCTGATTATTACTGTGCAGCATGGGATGAC <u>AGCCTGAATGGCCTTTATGTCT</u>TTCGGAACTGGGACCAAGGTCAACGT CCTAT</p>
Gly1-1-H9 (서열 번호 92)	<p>AATTTTATGCTGACTCAGCCCCACTCTGTGTGGAGTCTCCGGGGAA GACGGTAACCATCTCCTGCAACCCGACAGCAGTGGCAGCATTGCCAGCA ACTATGTGCAGTGGTACCAGCAGCGCCCGGGCAGTGCCTCCACCACT GTGATCTATGAGGATAACCAAAGACCCTCTGGGGTCCCTGATCGGTT CTCTGGCTCCATCGACAGCTCCTCCAACTCTGCCTCCCTCACCATCT CTGGACTGAAGACTGAGGACGAGGCTGACTACTACTGTCAGTCTTAT <u>GATGACAGTAATCGTGTGGTC</u>TTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGT CCTGG</p>
Gly1-1-B2 (서열 번호 93)	<p>GAAACGACACTCACGCAGTCTCCCGCCACTCTGTGTGTCTCCAGG GGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCGAGGGCCAGTCAGAGTGTAAAGCAACT <u>ACTTAGCCTGGTATCGACAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTC</u> ATCTATGGCGCATCCACCAGGGCCACTGGCATCCAGACAGGTTCAG TGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCAACATCAGCAGACTGG AGCCTGAAGATTTTGCAGTGTATTTCTGTCACCAGTATGGAAGTTTA <u>CCTCAGACGT</u>TTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAGATCAAAC</p>

[0112]

[0113]

본원에 기술된 CLDN4 항체는 CLDN4에 결합한다. 한 실시형태에서, CLDN4 항체는 CLDN4에 대해 높은 친화도 및 높은 특이성을 갖는다. 일부 실시형태는 또한 본원에 기술된 항-CLDN4 항체의 아미노산 또는 뉴클레오티드 서열과 특정된 동일성 또는 유사성 백분율을 갖는 항체를 특징으로 한다. 예를 들어, "상동성" 또는 "동일성" 또는 "유사성"은 2개의 펩티드 사이 또는 2개의 핵산 분자 사이의 서열 유사성을 지칭한다. 상동성은 비교 목적으로 정렬될 수 있는 각각의 서열 내의 위치를 비교함으로써 결정될 수 있다. 비교되는 서열 내의 위치가 동일한 염기 또는 아미노산에 의해 점유될 경우, 분자는 그 위치에서 상동성이다. 서열 사이의 상동성 정도는 서열에 의해 공유된 일치하거나 상동성인 위치의 수의 함수이다. 예를 들어, 항체는 본원에 기술된 항-CLDN4 항체 중 어느 하나의 특정된 영역 또는 전체 길이와 비교할 경우 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상의 아미노산 서열 동일성을 가질 수 있다. 예를 들어, 항체는 본원에 기술된 항-CLDN4 항체 중 어느 하나의 특정된 영역 또는 전체 길이와 비교할 경우 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상의 핵산 동일성을 가질 수 있다. 본 발명의 핵산 및 단백질에 대한 서열 동일성 또는 유사성은 당업계에 알려진 방법, 예를 들어 문헌[Ausubel et al. eds. (2007) Current Protocols in Molecular Biology]에 기술된 것과 같은 당업계에 알려진 소프트웨어 프로그램을 사용하여 서열 비교 및/또는 정렬에 의해 결정될 수 있다. 예를 들어, 서열 비교 알고리즘(즉, BLAST 또는 BLAST 2.0), 수동 정렬 또는 육안 검사를 이용하여 본 발명의 핵산 및 단백질에 대한 서열 동일성 또는 유사성 백분율을 결정할 수 있다.

[0114]

본원에서 사용되는 바와 같이 "폴리펩티드"는 단수의 "폴리펩티드" 및 복수의 "폴리펩티드들"을 포괄할 수 있고, 아미드 결합(펩티드 결합으로도 알려져 있음)에 의해 선형으로 연결되는 단량체(아미노산)로 구성된 분자를 지칭할 수 있다. 용어 "폴리펩티드"는 2개 이상의 아미노산의 임의의 쇠 또는 쇠들을 지칭할 수 있고, 특정 길이의 산물을 지칭하지는 않는다. 따라서, 펩티드, 디펩티드, 트리펩티드, 올리고펩티드, "단백질", "아미노산 쇠", 또는 임의의 다른 용어는 2개 이상의 아미노산의 쇠 또는 쇠들을 지칭하기 위해 사용될 수 있고, 본원의 "폴리펩티드"를 지칭할 수 있으며, 용어 "폴리펩티드"는 이들 용어 중 임의의 것 대신에, 또는 이와 상호 교환 가능하게 사용될 수 있다. "폴리펩티드"는 또한 비제한적으로 글리코실화, 아세틸화, 인산화, 아미드화, 알려진 보호기/차단기에 의한 유도체화, 단백질분해적 절단, 또는 비-자연 발생 아미노산에 의한 변형을 비롯한, 폴리펩티드의 발현후 변형의 산물을 지칭할 수 있다. 폴리펩티드는 자연적인 생물학적 공급원으로부터 유래되거나

재조합 기술에 의해 생성될 수 있지만, 반드시 핵산 서열로부터 번역되지는 않는다. 이는 화학적 합성을 비롯한 임의의 방식으로 생성될 수 있다. 아미노산 서열에 대해, 당업자는 코딩된 서열에서 단일 아미노산 또는 적은 백분율의 아미노산을 변경하거나, 부가하거나, 결실시키거나, 치환하는 핵산, 펩티드, 폴리펩티드, 또는 단백질 서열에 대한 개별 치환, 결실 또는 부가는 본원에서 "보존적으로 변형된 변이체"로 총칭됨을 용이하게 인식할 것이다. 일부 실시양태에서, 변경은 아미노산을 화학적으로 유사한 아미노산으로 치환시킨다. 기능적으로 유사한 아미노산을 제공하는 보존적 치환 표는 당업계에 잘 알려져 있다. 본원에 개시된 항-CLDN4 항체의 이러한 보존적으로 변형된 변이체는 변형되지 않은 CLDN4 항체와 비교하여 CLDN4에 대한 증가된 교차-반응성을 나타낼 수 있다.

[0115] 예를 들어, "보존적 아미노산 치환"은 아미노산 잔기가 유사한 측쇄를 갖는 아미노산 잔기로 대체되는 것이다. 염기성 측쇄(예를 들어, 리신, 아르기닌, 히스티딘), 산성 측쇄(예를 들어, 아스파르트산, 글루탐산), 비하전 극성 측쇄(예를 들어, 글리신, 아스파라긴, 글루타민, 세린, 트레오닌, 티로신, 시스테인), 비극성 측쇄(예를 들어, 알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 프롤린, 페닐알라닌, 메티오닌, 트립토판), 베타-분지 측쇄(예를 들어, 트레오닌, 발린, 이소류신) 및 방향족 측쇄(예를 들어, 티로신, 페닐알라닌, 트립토판, 히스티딘)를 비롯한 유사한 측쇄를 갖는 아미노산 잔기의 패밀리는 당업계에서 정의되었다. 따라서, 면역글로불린 폴리펩티드에서 비필수 아미노산 잔기는 동일한 측쇄 패밀리로부터의 또 다른 아미노산 잔기로 대체된다. 또 다른 실시양태에서, 아미노산의 스트링은 측쇄 패밀리 구성원의 순서 및/또는 조성이 상이한 구조적으로 유사한 스트링으로 대체될 수 있다.

[0116] **항체**

[0117] 본원에서 사용되는 바와 같이, "항체" 또는 "항원 결합 폴리펩티드"는 항원을 특이적으로 인식하고 이에 결합하는 폴리펩티드 또는 폴리펩티드 복합체를 지칭할 수 있다. 항체는 전체 항체 및 이의 임의의 항원 결합 단편 또는 단일-쇄일 수 있다. 예를 들어, "항체"는 항원에 대한 결합의 생물학적 활성을 갖는 면역글로불린 분자의 적어도 일부를 포함하는 임의의 단백질 또는 펩티드 함유 분자를 포함할 수 있다. 비제한적인 예는 중쇄 또는 경쇄의 상보성 결정 영역(CDR) 또는 이의 리간드 결합 부분, 중쇄 또는 경쇄 가변 영역, 중쇄 또는 경쇄 불변 영역, 프레임워크(FR) 영역, 또는 이의 임의의 부분, 또는 결합 단백질의 적어도 하나의 부분이다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "항체"는 면역글로불린 분자 및 면역글로불린(Ig) 분자의 면역학적으로 활성인 부분, 즉, 항원에 특이적으로 결합하는(항원과 면역반응하는) 항원 결합 부위를 함유하는 분자를 지칭할 수 있다. "특이적으로 결합한다" 또는 "~와 면역반응한다"는 항체가 항원의 하나 이상의 항원 결정자와 반응하고 다른 폴리펩티드와는 반응하지 않음을 의미한다.

[0118] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "항체 단편" 또는 "항원 결합 단편"은 항체의 일부, 예컨대 $F_{(ab')_2}$, $F_{(ab)_2}$, F_{ab}' , F_{ab} , F_v , $scFv$ 등이다. 항체 단편은 구조에 관계없이 온전한 항체에 의해 인식되는 동일한 항원과 결합한다. 용어 "항체 단편"은 압타머(예컨대 스피겔머), 미니바디, 및 디아바디를 포함할 수 있다. 용어 "항체 단편"은 또한 특이적 항원에 결합하여 복합체를 형성함으로써 항체와 같이 작용하는 임의의 합성 또는 유전자 조작된 단백질을 포함할 수 있다. 본원에 기술된 항체, 항원 결합 폴리펩티드, 변이체, 또는 유도체는 다클론, 단클론, 다중특이성, 인간, 인간화 또는 키메라 항체, 단일-쇄 항체, 에피토프-결합 단편, 예를 들어 F_{ab} , F_{ab}' 및 $F_{(ab')_2}$, F_d , F_v , 단일-쇄 $F_v(scFv)$, 단일-쇄 항체, dAb (도메인 항체), 미니바디, 디솔피드-연결된 $F_v(sdFv)$, VL 또는 VH 도메인을 포함하는 단편, F_{ab} 발현 라이브러리에 의해 생성된 단편, 및 항-이디오타입(항-Id) 항체를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0119] "단일-쇄 가변 단편" 또는 "scFv"는 면역글로불린의 중쇄(V_H) 및 경쇄(V_L)의 가변 영역의 융합 단백질을 지칭한다. 단일-쇄 $F_v(scFv)$ 폴리펩티드 분자는 공유 연결된 $VH:VL$ 이중이량체이며, 이는 펩티드-코딩 링커에 의해 연결된 VH - 및 VL -코딩 유전자를 포함하는 유전자 융합체로부터 발현될 수 있다. (문헌[Huston et al. (1988) Proc Nat Acad Sci USA 85(16):5879-5883] 참조). 일부 양태에서, 영역은 10개 내지 약 25개의 아미노산의 짧은 링커 펩티드와 연결된다. 링커는 가요성을 위해 글리신뿐만 아니라 용해성을 위해 세린 또는 트레오닌이 풍부할 수 있고, V_H 의 N-말단을 V_L 의 C-말단과 연결할 수 있거나, 그 반대의 경우도 마찬가지이다. 이 단백질은 불변 영역의 제거 및 링커의 도입에도 불구하고 원래의 면역글로불린의 특이성을 보유한다. 항체 V 영역으로부터의 자연적으로 응집되지만 화학적으로 분리된 경쇄 및 중쇄 폴리펩티드 쌍을 scFv 분자로 전환시키기 위한 화학 구조를 식별하기 위해 다수의 방법이 기술되었으며, 이는 항원 결합 부위의 구조와 실질적으로 유사한 3차원 구조로 폴딩될 것이다. 예를 들어, 미국 특허 번호 5,091,513; 번호 5,892,019; 번호 5,132,405; 및 번호

4,946,778을 참조하며, 이들 각각은 그 전문이 참조로 포함된다.

- [0120] 매우 큰 나이브 인간 scFv 라이브러리는 과도한 표적 분자에 대한 재배열된 항체 유전자의 큰 공급원을 제공하도록 생성되었으며, 생성될 수 있다. 감염성 질환을 갖는 개체로부터 작은 라이브러리를 구축하여 질환-특이적 항체를 단리할 수 있다. (문헌[Barbas et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:9339-43 (1992)]; [Zebedee et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:3 175-79 (1992)] 참조).
- [0121] 인간으로부터 수득된 항체 분자는 5가지 부류의 면역글로불린: IgG, IgM, IgA, IgE 및 IgD로 나뉘며, 이들은 분자에 존재하는 중쇄의 성질에 의해 서로 상이하다. 당업자는 중쇄가 감마, 뮤, 알파, 델타, 또는 엡실론(γ , μ , α , δ , ϵ)과 함께 이들 중 일부 하위부류(예를 들어, $\gamma 1\sim\gamma 4$)로 분류됨을 인지할 것이다. 또한, 특정 부류는 IgG₁, IgG₂, IgG₃ 및 IgG₄ 등과 같은 하위부류를 갖는다. 면역글로불린 하위부류(이소형), 예를 들어, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgG₅ 등은 잘 특성화되어 있으며, 기능적 특수화를 부여하는 것으로 알려져 있다. IgG에 대해, 표준 면역글로불린 분자는 대략 23,000 달톤의 분자량의 2개의 동일한 경쇄 폴리펩티드, 및 분자량 53,000~70,000의 2개의 동일한 중쇄 폴리펩티드를 포함한다. 상기 4개의 쇠는 "Y" 구성으로 디설피드 결합에 의해 연결되며, 여기서 경쇄는 "Y"의 입구에서 시작하여 가변 영역까지 계속되는 중쇄를 브라켓(bracket)한다. 본원에 기술된 면역글로불린 또는 항체 분자는 면역글로불린 분자의 임의의 유형(예를 들어, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA, 및 IgY), 부류(예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 및 IgA2) 또는 하위부류를 포함한다.
- [0122] 경쇄는 카파 또는 람다(κ , λ)로서 분류된다. 각각의 중쇄 부류는 카파 또는 람다 경쇄와 결합될 수 있다. 일반적으로, 경쇄 및 중쇄는 서로 공유 결합되고, 2개의 중쇄의 "꼬리" 부분은 면역글로불린이 하이브리도마, B 세포, 또는 유전자 조작된 숙주 세포에 의해 생성되는 경우 공유 디설피드 결합 또는 비-공유 결합에 의해 서로 결합된다. 중쇄에서, 아미노산 서열은 Y 구성의 포크형 단부의 N-말단으로부터 각각의 쇠의 하부의 C-말단으로 진행된다.
- [0123] 경쇄 및 중쇄는 둘 다 구조적 및 기능적 상동성의 영역으로 나누어진다. 용어 "불변" 및 "가변"은 기능적으로 사용된다. 경쇄(VL) 및 중쇄(VH) 부분 둘 다의 가변 도메인은 항원 인식 및 특이성을 결정한다. 반대로, 경쇄의 불변 도메인(CL) 및 중쇄의 불변 도메인(CH1, CH2 또는 CH3)은 분비, 태반경유 이동성, Fc 수용체 결합, 보체 결합 등과 같은 중요한 생물학적 특성을 부여한다. 용어 "항원 결합 부위", 또는 "결합 부분"은 항원 결합에 참여하는 면역글로불린 분자의 부분을 지칭할 수 있다. 항원 결합 부위는 중쇄("H") 및 경쇄("L")의 N-말단 가변("V") 영역의 아미노산 잔기에 의해 형성된다. "초가변 영역"으로 지칭되는 중쇄 및 경쇄의 V 영역 내의 3개의 고도로 발산적인 신장부는 "프레임워크 영역" 또는 "FR"로 알려진 보다 보존된 측접 신장부 사이에 개재된다. 따라서, 용어 "FR"은 면역글로불린의 초가변 영역 사이에서 자연적으로 발견되고 이에 인접한 아미노산 서열을 지칭할 수 있다. 항체 분자에서, 경쇄의 3개의 초가변 영역 및 중쇄의 3개의 초가변 영역은 3차원 공간에서 서로에 대해 배치되어 항원 결합 표면을 형성한다. 항원 결합 표면은 결합된 항원의 3차원 표면에 상보적이며, 중쇄 및 경쇄 각각의 3개의 초가변 영역은 "상보성 결정 영역" 또는 "CDR"로 지칭된다. CLDN4 항체의 CDR을 함유하는 VH 및 VL 영역뿐만 아니라 프레임워크(FR)는 표 1~표 4에 제시된다.
- [0124] 각각의 항원 결합 도메인에 존재하는 6개의 CDR은 특이적으로 배치되어 항체가 수성 환경에서 이의 3차원 구성을 취함에 따라 항원 결합 도메인을 형성하는 짧은, 비연속적인 아미노산 서열이다. 항원 결합 도메인 내의 나머지 아미노산인 FR 영역은 더 적은 분자간 가변성을 나타낸다. 프레임워크 영역은 주로 β -시트 형태를 채택하며, CDR은 β -시트 구조를 연결하고, 일부 경우에 그의 일부를 형성하는 루프를 형성한다. 프레임워크 영역은 쇠간, 비-공유 상호작용에 의해 정확한 배향으로 CDR의 배치를 제공하는 스캐폴드를 형성하는 작용을 한다. 배치된 CDR에 의해 형성된 항원 결합 도메인은 면역반응성 항원 상의 에피토프에 상보적인 표면을 제공하며, 이는 그의 동중체 에피토프에 대한 항체의 비-공유 결합을 촉진시킨다. 각각 CDR 및 프레임워크 영역을 포함하는 아미노산은 이들이 이전에 정의되었기 때문에(문헌["Sequences of Proteins of Immunological Interest," Kabat, E., et al., U.S. Department of Health and Human Services, (1983)]; 및 [Chothia and Lesk, *J. Mol. Biol.*, 196:901-917 (1987)] 참조), 당업자에 의해 중쇄 또는 경쇄 가변 영역에 대해 용이하게 확인될 수 있다.
- [0125] 당업계 내에서 사용되고/되거나 허용되는 용어의 2개 이상의 정의가 존재하는 경우, 본원에서 사용되는 바와 같은 용어의 정의는 명시적으로 반대로 언급되지 않는 한, 이러한 의미를 포함하는 것으로 의도된다. 구체적인 예는 중쇄 및 경쇄 폴리펩티드 둘 다의 가변 영역 내에서 발견되는 비-인접한 항원 조합 부위를 기술하기 위한 "상보성 결정 영역"("CDR")이라는 용어의 사용이다. 이 영역은 문헌[Kabat et al., U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequences of Proteins of Immunological Interest" (1983)] 및 [Chothia et al., *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)]에 의해 기술되었으며, 이들은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다. 카바트(Kabat) 및

코티아(Chothia)에 따른 CDR 정의는 서로에 대해 비교되는 경우 아미노산 잔기의 중첩 또는 하위세트를 포함한다. 그럼에도 불구하고, 항체 또는 이의 변이체의 CDR을 지칭하기 위한 정의의 적용은 본원에서 정의되고 사용되는 바와 같은 용어의 범주 내인 것으로 의도된다. 상기 인용된 참고문헌 각각에 의해 정의되는 CDR을 포괄하는 적절한 아미노산 잔기를 비교로서 하기 표에 제시한다. CDR을 포괄하는 정확한 잔기 번호는 CDR의 서열 및 크기에 따라 달라질 것이다. 당업자는 항체의 가변 영역 아미노산 서열에 따라 어느 잔기가 CDR을 구성하는지를 일상적으로 결정할 수 있다.

CDR	카바트 넘버링	코티아 넘버링	IMGT 넘버링
VH CDR1	31-35	26-32	27-38
VH CDR2	50-65	52-58	56-65
VH CDR3	95-102	95-102	105-117
VL CDR1	24-34	26-32	27-38
VL CDR2	50-56	50-52	56-65
VL CDR3	89-97	91-96	105-117

[0126]

[0127]

문헌[Kabat et al.]은 임의의 항체에 적용가능한 가변 도메인 서열에 대한 넘버링 시스템을 정의한다. 당업자는 서열 자체를 넘어서는 임의의 실험 데이터에 의존하지 않으면서, 이 "카바트 넘버링" 시스템을 임의의 가변 도메인 서열에 대해 명료하게 할당할 수 있다. 본원에서 사용되는 바와 같이, "카바트 넘버링"은 문헌[Kabat et al., U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequence of Proteins of Immunological Interest" (1983)]에 의해 제시된 넘버링 시스템을 지칭한다.

[0128]

상기 표에 추가적으로, 카바트 번호 시스템은 다음과 같은 CDR 영역을 기술한다: CDR-H1은 대략 아미노산 31(즉, 첫 번째 시스테인 잔기 후 대략 9개의 잔기)에서 시작하여, 대략 5~7개의 아미노산을 포함하고, 다음 트립토판 잔기에서 끝난다. CDR-H2는 CDR-H1 종료 후 15번째 잔기에서 시작하여, 대략 16~19개의 아미노산을 포함하고, 다음 아르기닌 또는 리신 잔기에서 끝난다. CDR-H3은 CDR-H2 종료 후 대략 33번째 아미노산 잔기에서 시작하여; 3~25개의 아미노산을 포함하고; 서열 W-G-X-G에서 끝나며, 여기서 X는 임의의 아미노산이다. CDR-L1은 대략 잔기 24(즉, 시스테인 잔기 뒤)에서 시작하여; 대략 10~17개의 잔기를 포함하고; 다음 트립토판 잔기에서 끝난다. CDR-L2는 CDR-L1 종료 후 대략 16번째 잔기에서 시작하여, 대략 7개의 잔기를 포함한다. CDR-L3은 CDR-L2 종료 후(즉, 시스테인 잔기 뒤) 대략 33번째 잔기에서 시작하여; 대략 7~11개의 잔기를 포함하고, 서열 F 또는 W-G-X-G에서 끝나며, 여기서 X는 임의의 아미노산이다.

[0129]

특정 양태에서, 항체의 CDR은 IMGT 넘버링 시스템에 따라 결정될 수 있다. IMGT 고유의 넘버링은 항원 수용체, 쇠 유형 또는 종과 관계없이 가변 도메인을 비교하기 위해 정의되었다[Lefranc M.-P., Immunology Today 18, 509 (1997)/Lefranc M.-P., The Immunologist, 7, 132-136 (1999)/Lefranc, M.-P., Pommié, C., Ruiz, M., Giudicelli, V., Foulquier, E., Truong, L., Thouvenin-Contet, V. and Lefranc, Dev. Comp. Immunol., 27, 55-77 (2003)]. IMGT 고유의 넘버링에서, 보존된 아미노산은 항상 동일한 위치, 예를 들어 시스테인 23(첫 번째 -CYS), 트립토판 41(보존된-TRP), 소수성 아미노산 89, 시스테인 104(두 번째-CYS), 페닐알라닌 또는 트립토판 118(J-PHE 또는 J-TRP)을 갖는다. IMGT 고유의 넘버링은 프레임워크 영역(FR1-IMGT: 위치 1 내지 26, FR2-IMGT: 39 내지 55, FR3-IMGT: 66 내지 104 및 FR4-IMGT: 118 내지 128) 및 상보성 결정 영역: CDR1-IMGT: 27 내지 38, CDR2-IMGT: 56 내지 65 및 CDR3-IMGT: 105 내지 117의 표준화된 경계를 제공한다. 겹은 비점유된 위치를 나타내므로, CDR-IMGT 길이(괄호 사이에 제시되고 점에 의해 분리됨, 예를 들어 [8.8.13])는 중요한 정보가 된다. IMGT 고유의 넘버링은 IMGT Colliers de Perles로 지정된 2D 그래프 표현([Ruiz, M. and Lefranc, M.-P., Immunogenetics, 53, 857-883 (2002)/Kaas, Q. and Lefranc, M.-P., Current Bioinformatics, 2, 21-30 (2007)], 및 IMGT/3D구조-DB에서 3D 구조[Kaas, Q., Ruiz, M. and Lefranc, M.-P., T cell receptor and MHC structural data. Nucl. Acids. Res., 32, D208-D210 (2004)]에 사용된다.

[0130]

본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "에피토프"는 면역글로불린, scFv, 또는 T 세포 수용체에 특이적으로 결합할 수 있는 임의의 단백질 결정자를 포함할 수 있다. 가변 영역은 항체가 항원 상의 에피토프를 선택적으로 인식하고 특이적으로 결합하는 것을 가능하게 한다. 예를 들어, 항체의 VL 도메인 및 VH 도메인, 또는 상보성 결정 영역(CDR)의 서브세트가 조합되어 3차원 항원 결합 부위를 정의하는 가변 영역을 형성한다. 이러한 4차 항체 구조는 Y의 각각의 아암 단부에 존재하는 항원 결합 부위를 형성한다. 에피토프 결정자는 아미노산 또는 당 측쇄와 같은 분자의 화학적으로 활성인 표면 그룹화(grouping)로 이루어질 수 있으며, 특이적인 3차원 구조적 특징뿐만 아니라 특이적인 전하 특징을 가질 수 있다. 예를 들어, 항체는 폴리펩티드의 N-말단 또는 C-말단 펩티

드에 대해 생성될 수 있다. 보다 구체적으로, 항원 결합 부위는 VH 및 VL 쇠 각각에서 3개의 CDR(즉, CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3)에 의해 정의된다. 한 실시형태에서, 항체는 다음의 아미노산 서열을 포함하는, UniProtKB ID: 014493 CLD4_HUMAN (209개 아미노산 잔기의 길이)을 갖는 클라우딘 4(CLDN4)에 대해 유도될 수 있다:

```
MASMGQLQVMGIALAVLGLAVMLCCALPMWRVTAFIGSNIVTSQTIWEG
LWMNCVVQSTGQMCKVYDSLALPQDLQAARALV I I S I I V A A L G V L L S
VVGKCTNCLEDESAAKATMIVAGVVFLLAGLMVIVPVSWTAHNI IQDF
YNPLVASGQKREMGASLYVGWAASGLLLLGGGLLCCNCPPRTDKPYSAK
YSAARSAASNYV (서열 번호 94)
```

[0131]

[0132]

본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "면역학적 결합" 및 "면역학적 결합 특성"은 면역글로불린 분자와 면역글로불린이 특이적인 항원 사이에 발생하는 유형의 비공유적 상호작용을 지칭할 수 있다. 면역학적 결합 상호작용의 강도 또는 친화도는 상호작용의 해리 상수(K_d)의 관점에서 표현될 수 있으며, 여기서 더 작은 K_d 는 더 큰 친화도를 나타낸다. 선택된 폴리펩티드의 면역학적 결합 특성은 당업계에 잘 알려진 방법을 사용하여 정량화될 수 있다. 한 가지 이러한 방법은 항원 결합 부위/항원 복합체 형성 및 해리의 속도를 측정하는 것을 수반하며, 여기서 이들 속도는 복합체 파트너의 농도, 상호작용의 친화도, 및 양쪽 방향으로 속도에 동일하게 영향을 미치는 기하학적 파라미터에 의존한다. 따라서, "온 레이트 상수"(K_{on}) 및 "오프 레이트 상수"(K_{off}) 둘 다는 농도 및 실제 결합 및 해리 속도의 계산에 의해 결정될 수 있다. (문헌[Nature 361: 186-87 (1993)] 참조). K_{off}/K_{on} 의 비는 친화도와 관련되지 않은 파라미터의 해제를 허용하고, 평형 결합 상수 K_D 와 같다. (문헌[Davies et al. (1990) Annual Rev Biochem 59:439-473] 참조). 본 발명의 항체는 동역학 검정, 예컨대 방사성 리간드 결합 검정 또는 당업자에게 알려진 유사한 검정, 예컨대 BIAcore 또는 Octet(BLI)에 의해 측정 시, 평형 결합 상수(K_D)가 $\leq 1 \mu M$, $\leq 10 \mu M$, $\leq 10 nM$, $\leq 10 pM$, 또는 $\leq 100 pM$ 내지 약 $1 pM$ 일 때 CLDN4 에피토프에 특이적으로 결합할 수 있다. 예를 들어, 일부 실시형태에서, K_D 는 약 $1E-12 M$ 내지 K_D 약 $1E-11 M$ 이다. 일부 실시형태에서, K_D 는 약 $1E-11 M$ 내지 K_D 약 $1E-10 M$ 이다. 일부 실시형태에서, K_D 는 약 $1E-10 M$ 내지 K_D 약 $1E-9 M$ 이다. 일부 실시형태에서, K_D 는 약 $1E-9 M$ 내지 K_D 약 $1E-8 M$ 이다. 일부 실시형태에서, K_D 는 약 $1E-8 M$ 내지 K_D 약 $1E-7 M$ 이다. 일부 실시형태에서, K_D 는 약 $1E-7 M$ 내지 K_D 약 $1E-6 M$ 이다. 예를 들어, 일부 실시형태에서, K_D 는 약 $1E-12 M$ 인 반면, 다른 실시 형태에서, K_D 는 약 $1E-11 M$ 이다. 일부 실시형태에서, K_D 는 약 $1E-10 M$ 인 반면, 다른 실시 형태에서, K_D 는 약 $1E-9 M$ 이다. 일부 실시형태에서, K_D 는 약 $1E-8 M$ 인 반면, 다른 실시 형태에서, K_D 는 약 $1E-7 M$ 이다. 일부 실시형태에서, K_D 는 약 $1E-6 M$ 인 반면, 다른 실시 형태에서, K_D 는 약 $1E-5 M$ 이다. 일부 실시 형태에서, 예를 들어, K_D 는 약 $3 E-11 M$ 인 반면, 다른 실시 형태에서, K_D 는 약 $3E-12 M$ 이다. 일부 실시형태에서, K_D 는 약 $6E-11 M$ 이다. "특이적으로 결합한다" 또는 "~에 대해 특이성을 갖는다"는 항원 결합 도메인을 통해 에피토프에 결합하는 항체를 지칭할 수 있으며, 결합은 항원 결합 도메인과 에피토프 사이의 일부 상보성을 수반한다. 예를 들어, 항체는 이것이 무작위, 관련되지 않은 에피토프에 결합할 수 있는 것보다 더 용이하게 그의 항원 결합 도메인을 통해 에피토프에 결합할 때, 에피토프에 "특이적으로 결합한다"고 언급된다.

[0133]

예를 들어, CLDN4 항체는 1가 또는 2가일 수 있고/있거나 단일 또는 이중 쇠를 포함할 수 있다. 기능적으로, CLDN4 항체의 결합 친화도는 $10^{-5} M$ 내지 $10^{-12} M$ 의 범위 내에 있다. 예를 들어, CLDN4 항체의 결합 친화도는 $10^{-6} M$ 내지 $10^{-12} M$, $10^{-7} M$ 내지 $10^{-12} M$, $10^{-8} M$ 내지 $10^{-12} M$, $10^{-9} M$ 내지 $10^{-12} M$, $10^{-5} M$ 내지 $10^{-11} M$, $10^{-6} M$ 내지 $10^{-11} M$, $10^{-7} M$ 내지 $10^{-11} M$, $10^{-8} M$ 내지 $10^{-11} M$, $10^{-9} M$ 내지 $10^{-11} M$, $10^{-10} M$ 내지 $10^{-11} M$, $10^{-5} M$ 내지 $10^{-10} M$, $10^{-6} M$ 내지 $10^{-10} M$, $10^{-7} M$ 내지 $10^{-10} M$, $10^{-8} M$ 내지 $10^{-10} M$, $10^{-9} M$ 내지 $10^{-10} M$, $10^{-5} M$ 내지 $10^{-9} M$, $10^{-6} M$ 내지 $10^{-9} M$, $10^{-7} M$ 내지 $10^{-9} M$, $10^{-8} M$ 내지 $10^{-9} M$, $10^{-5} M$ 내지 $10^{-8} M$, $10^{-6} M$ 내지 $10^{-8} M$, $10^{-7} M$ 내지 $10^{-8} M$, $10^{-5} M$ 내지 $10^{-7} M$, $10^{-6} M$ 내지 $10^{-7} M$, 또는 $10^{-5} M$ 내지 $10^{-6} M$ 이다.

[0134]

CLDN4 단백질, 또는 이의 유도체, 단편, 유사체, 동족체 또는 오르소로그는 이들 단백질 성분에 면역특이적으로 결합하는 항체의 생성에서 면역원으로서 이용될 수 있다. 프로테오리포좀에 커플링된 CLDN4 단백질 또는 이의

유도체, 단편, 유사체, 동족체, 또는 오르소로그는 이들 단백질 성분에 면역특이적으로 결합하는 항체의 생성에서 면역원으로서 이용될 수 있다.

- [0135] 당업자는 과도한 실험 없이, 인간 단클론 항체가, 본 발명의 인간 단클론 항체가 CLDN4에 결합하는 것을 방지하는지 여부를 확인함으로써, 인간 단클론 항체가 본 발명의 인간 단클론 항체와 동일한 특이성을 갖는지를 결정할 수 있음을 인식할 것이다. 예를 들어, 시험되는 인간 단클론 항체가, 본 발명의 인간 단클론 항체에 의한 결합의 감소에 의해 나타난 바와 같이, 본 발명의 인간 단클론 항체와 경쟁하는 경우, 2개의 단클론 항체는 동일한, 또는 밀접하게 관련된 에피토프에 결합한다.
- [0136] 인간 단클론 항체가 본 발명의 인간 단클론 항체의 특이성을 갖는지 여부를 결정하는 또 다른 방법은 본 발명의 인간 단클론 항체를 그것이 통상적으로 반응성인 CLDN4 단백질과 함께 사전-인큐베이션한 후, 시험되는 인간 단클론 항체를 첨가하여, 시험되는 인간 단클론 항체가 CLDN4에 결합하는 그의 능력이 억제되는지를 결정하는 것이다. 시험되는 인간 단클론 항체가 억제되는 경우, 이는 본 발명의 단클론 항체와 동일하거나 기능적으로 동등한 에피토프 특이성을 가질 수 있다. 본 발명의 인간 단클론 항체의 스크리닝은 또한 CLDN4를 이용하고 시험 단클론 항체가 CLDN4를 중화시킬 수 있는지 여부를 결정함으로써 수행될 수 있다.
- [0137] 본 발명의 단백질에 대해, 또는 이의 유도체, 단편, 유사체, 동족체 또는 오르소로그에 대해 유도된 다클론 또는 단클론 항체의 생성을 위해 당업계에 알려진 다양한 절차가 사용될 수 있다. (예를 들어, 본원에 참조로 포함되는 문헌[Antibodies: A Laboratory Manual, Harlow E, and Lane D, 1988, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY] 참조).
- [0138] 항체는 주로 면역 혈청의 IgG 분획을 제공하는 단백질 A 또는 단백질 G를 사용하는 친화도 크로마토그래피와 같은 잘 알려진 기법에 의해 정제될 수 있다. 후속적으로, 또는 대안적으로, 추구하는 면역글로불린의 표적 특이적 항원 또는 이의 에피토프는 면역친화도 크로마토그래피에 의해 면역 특이적 항체를 정제하기 위해 컬럼에 고정화될 수 있다. 면역글로불린의 정제는 예를 들어 문헌[D. Wilkinson (The Scientist, published by The Scientist, Inc., Philadelphia PA, Vol. 14, No. 8 (April 17, 2000), pp. 25-28)]에 의해 논의되어 있다.
- [0139] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "단클론 항체" 또는 "mAb" 또는 "Mab" 또는 "단클론 항체 조성물"은 고유한 경쇄 유전자 산물 및 고유한 중쇄 유전자 산물로 이루어진 항체 분자의 하나의 분자 종만을 함유하는 항체 분자의 집단을 지칭할 수 있다. 단클론 항체의 상보성 결정 영역(CDR)은 집단의 분자에서 동일하다. mAb는 이에 대해 고유한 결합 친화도를 특징으로 하는 항원의 에피토프와 면역반응할 수 있는 항원 결합 부위를 함유한다.
- [0140] 단클론 항체는 문헌[Kohler and Milstein, Nature, 256:495 (1975)]에 의해 기술된 것과 같은 하이브리도마 방법을 사용하여 제조될 수 있다. 하이브리도마 방법에서, 마우스, 햄스터 또는 다른 적절한 숙주 동물은 면역화제로 면역화되어, 면역화제에 특이적으로 결합할 항체를 생성하거나 생성할 수 있는 림프구를 유도한다. 대안적으로, 림프구는 시험관내에서 면역화될 수 있다.
- [0141] 면역화제는 단백질 항원, 이의 단편, 또는 이의 융합 단백질을 포함할 수 있다. 예를 들어, 인간 기원의 세포가 바람직한 경우 말초 혈액 림프구가 사용될 수 있거나, 비인간 포유류 공급원이 바람직한 경우 비장 세포 또는 림프절 세포가 사용될 수 있다. 그 후, 림프구는 폴리에틸렌 글리콜과 같은 적합한 융합제를 사용하여 불멸화 세포주와 융합되어 하이브리도마 세포를 형성한다(문헌[Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, (1986) pp. 59-103] 참조). 불멸화 세포주는 형질전환된 포유류 세포, 예컨대 설치류, 소 및 인간 기원의 골수종 세포일 수 있다. 예를 들어, 래트 또는 마우스 골수종 세포주가 이용된다. 하이브리도마 세포는 융합되지 않은 불멸화 세포의 성장 또는 생존을 억제하는 하나 이상의 물질을 함유하는 적합한 배양 배지에서 배양될 수 있다. 예를 들어, 모세포에 효소 하이포크산틴 구아닌 포스포리보실 트랜스퍼라제(HGPRT 또는 HPRT)가 결합되어 있는 경우, 하이브리도마를 위한 배양 배지는 하이포크산틴, 아미노프테린 및 티미딘("HAT 배지")을 포함할 것이며, 이 물질은 HGPRT-결핍 세포의 성장을 방지한다.
- [0142] 유용한 불멸화 세포주는 효율적으로 융합하고, 선택된 항체-생성 세포에 의한 항체의 안정적인 고수준 발현을 지지하고, HAT 배지와 같은 배지에 민감한 것들이다. 예를 들어, 불멸화 세포주는 뮤린 골수종 세포주일 수 있으며, 이는 예를 들어 Salk Institute Cell Distribution Center(미국 캘리포니아주 샌 디에고 소재) 및 American Type Culture Collection(미국 버지니아주 머내서스 소재)으로부터 획득될 수 있다. 인간 골수종 및 마우스-인간 이종골수종 세포주는 또한 인간 단클론 항체의 생성에 대해 기술되었다. (문헌[Kozbor, J. Immunol, 133:3001 (1984)]; [Brodeur et al, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, Marcel Dekker, Inc., New York, (1987) pp. 51-63] 참조).

- [0143] 이어서, 하이브리도마 세포가 배양되는 배양 배지는 항원에 대해 유도된 단클론 항체의 존재에 대해 검정될 수 있다. 예를 들어, 하이브리도마 세포에 의해 생성된 단클론 항체의 결합 특이성은 면역침전에 의해 또는 시험관 내 결합 검정, 예컨대 방사면역검정(RIA) 또는 효소-결합 면역흡착 검정(ELISA)에 의해 결정된다. 이러한 기술 및 검정은 당업계에 알려져 있다. 단클론 항체의 결합 친화도는 예를 들어 문헌[Scatchard analysis of Munson and Pollard, *Anal. Biochem.*, 107:220 (1980)]에 의해 결정될 수 있다. 더욱이, 단클론 항체의 치료적 적용에서, 표적 항원에 대해 높은 정도의 특이성 및 높은 결합 친화도를 갖는 항체를 확인하는 것이 중요하다.
- [0144] 하이브리도마 세포를 확인한 후, 클론을 제한 희석 절차에 의해 서브클로닝하고 표준 방법에 의해 성장시킬 수 있다. (문헌[Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academic Press, (1986) pp. 59-103] 참조). 이 목적을 위해 적합한 배양 배지는 예를 들어 돌베코 변형 이글 배지(Dulbecco's Modified Eagle's Medium) 및 RPMI-1640 배지를 포함한다. 대안적으로, 하이브리도마 세포를 포유류에서 복수로서 생체내에서 성장시킬 수 있다.
- [0145] 서브클론에 의해 분비되는 단클론 항체는 예를 들어 단백질 A-세파로스, 히드록실아파타이트 크로마토그래피, 겔 전기영동, 투석, 또는 친화도 크로마토그래피와 같은 통상적인 면역글로불린 정제 절차에 의해 배양 배지 또는 복수액으로부터 단리되거나 정제될 수 있다.
- [0146] 단클론 항체는 또한 미국 특허 번호 4,816,567(그 전문이 본원에 참조로 포함됨)에 기술된 것과 같은 재조합 DNA 방법에 의해 제조될 수 있다. 본 발명의 단클론 항체를 코딩하는 DNA는 통상적인 절차를 사용하여(예를 들어, 무린 항체의 중쇄 및 경쇄를 코딩하는 유전자에 특이적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오타이드 프로브를 사용함으로써) 용이하게 단리되고 서열분석될 수 있다. 본 발명의 하이브리도마 세포는 이러한 DNA의 공급원으로서 역할을 한다. 일단 단리되면, DNA는 발현 벡터 내에 정지될 수 있고, 이어서 이를 숙주 세포, 예컨대 시미안 COS 세포, 중국 햄스터 난소(CHO) 세포, 또는 면역글로불린 단백질을 달리 생성하지 않는 골수종 세포 내로 형질감염시켜, 재조합 숙주 세포에서 단클론 항체의 합성을 얻는다. DNA는 또한 예를 들어 상동성 무린 서열 대신 인간 중쇄 및 경쇄 불변 도메인에 대한 코딩 서열을 치환함으로써(미국 특허 4,816,567; 문헌[Morrison, *Nature* 368, 812-13 (1994)] 참조), 또는 비-면역글로불린 폴리펩티드에 대한 코딩 서열의 전부 또는 일부를 면역글로불린 코딩 서열에 공유 결합시킴으로써 변형될 수 있다. 이러한 비-면역글로불린 폴리펩티드는 본 발명의 항체의 불변 도메인을 치환할 수 있고/있거나, 본 발명의 항체의 하나의 항원 조합 부위의 가변 도메인을 치환하여 키메라 2가 항체를 생성할 수 있다.
- [0147] 예를 들어, 완전 인간 항체는 CDR을 포함하는 경쇄 및 중쇄 둘 모두의 전체 서열이 인간 유전자로부터 발생한 항체 분자이다. 이러한 항체는 "인간 항체" 또는 "완전 인간 항체"로 지칭된다. 인간 단클론 항체, 예컨대 완전 인간 및 인간화 항체는 트리오마 기법; 인간 B 세포 하이브리도마 기법(문헌[Kozbor, et al, 1983 *Immunol Today* 4: 72] 참조); 및 인간 단클론 항체를 생성하기 위한 EBV 하이브리도마 기법(문헌[Cole, et al, 1985 In: *MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY*, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96] 참조)에 의해 제조될 수 있다. 인간 단클론 항체가 이용될 수 있고, 인간 하이브리도마를 사용함으로써(문헌[Cote, et al, 1983. *Proc Natl Acad Sci USA* 80: 2026-2030] 참조), 또는 시험관내에서 앵스타인 바 바이러스로 인간 B 세포를 형질전환 시킴으로써(문헌[Cole, et al., 1985 In: *MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY*, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96] 참조) 생성될 수 있다.
- [0148] "인간화 항체"는 인간에서 생성된 항체 변이체에 대한 이의 유사성을 증가시키도록 (예를 들어, CDR 영역 내의) 아미노산 서열이 변형된 비인간 종(예컨대 마우스)으로부터의 항체일 수 있다. 항체는 CDR-그래프팅과 같은 당업계에 알려진 방법에 의해 인간화될 수 있다. 또한, 문헌[Safdari et al., (2013) *Biotechnol Genet Eng Rev.*; 29:175-866]을 참조한다. 또한, 인간화 항체는 기존의 포유류 시스템에 대한 저렴한 생성 대안으로서 트랜스제닉 식물에서 생성될 수 있다. 예를 들어, 트랜스제닉 식물은 담배 식물, 즉, 니코티아니아 벤타미아나 (*Nicotiana benthamiana*) 및 니코티아니아 타바쿰(*Nicotiana tabacum*)일 수 있다. 항체는 식물 잎으로부터 정제된다. 식물의 안정한 형질전환은 아그로박테리움 투메파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*) 또는 유전자 포격의 사용을 통해 달성될 수 있다. 예를 들어, 적어도 중쇄 및 경쇄 서열을 함유하는 핵산 발현 벡터는 형질전환을 통해 박테리아 배양, 즉, 에이. 투메파시엔스 균주 BLA4404에서 발현된다. 식물의 침윤은 주사를 통해 달성될 수 있다. 가용성 잎 추출물은 막자사발에서 잎 조직을 분쇄하고 원심분리에 의해 제조될 수 있다. 항체의 단리 및 정제는 당업자에게 알려진 많은 방법에 의해 수행될 수 있다. 식물에서의 항체 생성을 위한 다른 방법은 예를 들어 문헌[Fischer et al., *Vaccine*, 2003, 21:820-5]; 및 [Ko et al, *Current Topics in Microbiology and Immunology*, Vol. 332, 2009, pp. 55-78]에 기술되어 있다. 따라서, 본 발명은 본 발명의 항체를 코딩하

나 본 발명의 항체를 생성하는 벡터를 포함하는 임의의 세포 또는 식물을 추가로 제공한다.

[0149] 항체는 예를 들어 CDR-그래프팅(EP 239,400; PCT 공개 WO 91/09967; 미국 특허 번호 5,225,539; 5,530,101; 및 5,585,089), 베니어링(veneering) 또는 재표면화(resurfacing)(EP 592,106; EP 519,596; 문헌[Padlan, *Molecular Immunology* 28(4/5):489-498 (1991)]; [Studnicka et al., *Protein Engineering* 7(6):805-814 (1994)]; [Roguska. et al., *Proc. Natl. Sci. USA* 91:969-973 (1994)], 및 쇠 셔플링(미국 특허 번호 5,565,332(이는 그 전문이 참조로 포함됨))을 비롯한 당업계에서 알려진 다양한 기법을 사용하여 인간화될 수 있다. "인간화"(재성형 또는 CDR-그래프팅으로도 불림)는 이중 공급원(예컨대 설치류)으로부터 단클론 항체(mAb)의 면역원성을 감소시키고 인간 면역계의 활성화를 개선시키기 위한 당업자가 이해하는 잘 확립된 기법이다(예를 들어, 문헌[Hou S, Li B, Wang L, Qian W, Zhang D, Hong X, Wang H, Guo Y (July 2008). "Humanization of an anti-CD34 monoclonal antibody by complementarity-determining region grafting based on computer-assisted molecular modeling". *J Biochem.* **144** (1): 115-20] 참조).

[0150] 또한, 항체(예컨대 인간 항체)는 또한 과거 디스플레이 라이브러리를 비롯한 다른 기법을 사용하여 생성될 수 있다. (문헌[Hoogenboom and Winter, *J. Mol. Biol.*, 227:381 (1991)]; [Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222:581 (1991)] 참조). 유사하게, 인간 항체는 인간 면역글로불린 유전자좌를 트랜스제닉 동물, 예를 들어, 내인성 면역글로불린 유전자가 부분적으로 또는 완전히 불활성화된 마우스 내로 도입함으로써 제조될 수 있다. 켈린지시, 유전자 재배열, 어셈블리, 및 항체 레퍼토리를 포함하여, 모든 면에서 인간에서 나타나는 것과 가깝게 닮은 인간 항체 생성이 관찰된다. 이 접근법은 예를 들어 미국 특허 번호 5,545,807; 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; 5,661,016, 및 문헌[Marks et al., *Bio/Technology* 10, 779-783 (1992)]; [Lonberg et al., *Nature* 368 856-859 (1994)]; [Morrison, *Nature* 368, 812-13 (1994)]; [Fishwild et al, *Nature Biotechnology* 14, 845-51 (1996)]; [Neuberger, *Nature Biotechnology* 14, 826 (1996)]; 및 [Lonberg and Huszar, *Intern. Rev. Immunol.* 13: 65-93 (1995)]에 기술되어 있다.

[0151] 인간 항체는 추가로, 항원에 의한 켈린지에 반응하여 동물의 내인성 항체보다는 완전 인간 항체를 생성하도록 변형된 트랜스제닉 비인간 동물을 사용하여 생성될 수 있다. (PCT 공개 번호 W094/02602 및 미국 특허 번호 6,673,986 참조). 비인간 숙주에서 중쇄 및 경쇄 면역글로불린을 코딩하는 내인성 유전자는 무능화되었고, 인간 중쇄 및 경쇄 면역글로불린을 코딩하는 활성 유전자좌는 숙주의 게놈 내로 삽입된다. 인간 유전자는 예를 들어 필요한 인간 DNA 절편을 함유하는 효모 인공 염색체를 사용하여 혼입된다. 이어서 바람직한 변형을 제공하는 동물은 변형의 완전 상보체보다 더 적은 것을 함유하는 중간 트랜스제닉 동물을 교배함으로써 자손으로서 수득된다. 이러한 비인간 동물의 비제한적인 예는 마우스이고, PCT 공개 번호 W096/33735 및 W096/34096에 개시된 바와 같은 Xenomouse™로 지칭된다. 이 동물은 완전 인간 면역글로불린을 분비하는 B 세포를 생성한다. 항체는 예를 들어 단클론 항체의 제조와 같이, 관심 면역원을 이용한 면역화 후에 동물로부터 직접적으로 수득될 수 있거나, 대안적으로 동물로부터 유래된 불멸화 B 세포, 예컨대 단클론 항체를 생성하는 하이브리도마로부터 수득될 수 있다. 추가로, 인간 가변 영역을 갖는 면역글로불린을 코딩하는 유전자를 회수하고 발현시켜 직접적으로 항체를 수득할 수 있거나, 추가로 변형시켜 예를 들어 단일-쇄 Fv(scFv) 분자와 같은 항체 유사체를 수득할 수 있다.

[0152] 따라서, 이러한 기법을 사용하면 치료적으로 유용한 IgG, IgA, IgM 및 IgE 항체를 생성할 수 있다. 인간 항체를 생성하는 이 기술의 개요에 대해서는, 문헌[Lonberg and Huszar *Int. Rev. Immunol.* 73:65-93 (1995)]을 참조한다. 인간 항체 및 인간 단클론 항체를 생성하는 이 기술 및 이러한 항체를 생성하는 프로토콜에 대한 상세한 논의에 대해서는, 예를 들어 PCT 공개 번호 WO 98/24893; WO 96/34096; WO 96/33735; 미국 특허 번호 5,413,923; 5,625,126; 5,633,425; 5,569,825; 5,661,016; 5,545,806; 5,814,318; 및 5,939,598을 참조하며, 이들은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다. 또한, Creative BioLabs(미국 뉴욕주 셸리)와 같은 회사는 본원에 기술된 것과 유사한 기술을 사용하여 선택된 항원에 대해 유도된 인간 항체를 제공하는 데 관여될 수 있다.

[0153] 내인성 면역글로불린 중쇄의 발현이 결여된, 마우스로 예시되는 비인간 숙주를 생성하는 방법의 예는 미국 특허 번호 5,939,598에 개시되어 있다. 이는 유전자좌의 재배열을 방지하고 재배열된 면역글로불린 중쇄 유전자좌의 전사체의 형성을 방지하기 위해 배아 줄기 세포 내의 적어도 하나의 내인성 중쇄 유전자좌로부터 J 절편 유전자를 결실시키는 단계로서, 결실은 선택가능한 마커를 코딩하는 유전자를 함유하는 표적화 벡터에 의해 달성되는, 단계; 및 배아 줄기 세포로부터, 체세포 및 배 세포가 선택가능한 마커를 코딩하는 유전자를 함유하는 트랜스제닉 마우스를 생성하는 단계를 포함하는 방법에 의해 수득될 수 있다.

[0154] 인간 항체와 같은 관심 항체를 생성하는 하나의 방법은 미국 특허 번호 5,916,771에 개시되어 있다. 이 방법은

중쇄를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 함유하는 발현 벡터를 배양물 중 하나의 포유류 숙주 세포 내로 도입하는 단계, 경쇄를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 함유하는 발현 벡터를 또 다른 포유류 숙주 세포 내로 도입하는 단계, 및 두 세포를 융합시켜 하이브리드 세포를 형성하는 단계를 포함한다. 하이브리드 세포는 중쇄 및 경쇄를 함유하는 항체를 발현한다.

[0155] 이 절차에 대한 추가 개선에서, 면역원 상에서 임상적으로 관련된 에피토프를 확인하기 위한 방법 및 관련 에피토프에 고친화도로 면역특이적으로 결합하는 항체를 선택하기 위한 상관적 방법이 PCT 공개 번호 W099/53049에 개시되어 있다.

[0156] 관심 항체는 또한 본원에 기술된 단일-쇄 항체를 코딩하는 DNA 절편을 함유하는 벡터에 의해 발현될 수 있다. 벡터는 표적화 모이어티(예를 들어 세포 표면 수용체에 대한 리간드) 및 핵산 결합 모이어티(예를 들어 폴리리신)를 갖는 WO 93/64701에 기술된 바와 같은 화학 접합체, 바이러스 벡터(예를 들어 DNA 또는 RNA 바이러스 벡터), 표적 모이어티(예를 들어 표적 세포에 특이적인 항체) 및 핵산 결합 모이어티(예를 들어 프로타민)를 함유하는 융합 단백질인 PCT/US 95/02140(WO 95/22618)에 기술된 것과 같은 융합 단백질, 플라스미드, 파지, 바이러스 벡터 등을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 벡터는 염색체성, 비-염색체성 또는 합성일 수 있다. 레트로 바이러스 벡터가 또한 사용될 수 있으며, 몰로니 뮤린 백혈병 바이러스를 포함한다. DNA 바이러스 벡터가 또한 사용될 수 있으며, 폭스 벡터, 예컨대 오르토폭스 또는 아비포스 벡터, 헤르페스바이러스 벡터, 예컨대 단순 헤르페스 I 바이러스(HSV) 벡터(문헌[Geller, A. I. et al, J. Neurochem, 64:487 (1995)]; [Lim, F., et al, in DNA Cloning: Mammalian Systems, D. Glover, Ed. (Oxford Univ. Press, Oxford England) (1995)]; [Geller, A. I. et al, Proc Natl. Acad. Sci.: U.S.A. 90:7603 (1993)]; [Geller, A. I., et al, Proc Natl. Acad. Sci USA 87: 1149 (1990) 참조], 아데노바이러스 벡터(문헌[LeGal LaSalle et al, Science, 259:988 (1993)]; [Davidson, et al, Nat. Genet 3 :219 (1993)]; [Yang, et al, J. Virol. 69:2004 (1995)] 참조) 및 아데노 연관 바이러스 벡터(문헌[Kaplitt, M. G. et al, Nat. Genet. 8:148 (1994)] 참조)를 포함한다.

[0157] 폭스 바이러스 벡터는 유전자를 세포의 세포질 내로 도입한다. 아비포스 바이러스 벡터는 단지 핵산의 단기 발현만을 초래한다. 아데노바이러스 벡터, 아데노 연관 바이러스 벡터, 및 단순 헤르페스 바이러스(HSV) 벡터는 핵산을 신경 세포 내로 도입하기 위해 사용될 수 있다. 아데노바이러스 벡터는 아데노 연관 바이러스(약 4개월)보다 더 짧은 기간의 발현(약 2개월)을 초래하며, 이는 결국 HSV 벡터보다 더 짧다. 선택되는 벡터는 표적 세포 및 치료되는 병태에 따라 달라질 것이다. 도입은 표준 기법, 예를 들어 감염, 형질감염, 형질도입 또는 형질전환에 의해 이루어질 수 있다. 유전자 전달 방식의 예는 예를 들어 나이키드 DNA, CaPO₄ 침전, DEAE 텍스트란, 전기천공, 원형질체 융합, 리포펙션, 세포 미세주사, 및 바이러스 벡터를 포함한다.

[0158] 벡터는 본질적으로 임의의 표적 세포를 표적화하기 위해 이용될 수 있다. 예를 들어, 입체공간적 주사는 벡터(예를 들어, 아데노바이러스, HSV)를 바람직한 위치로 지향시키기 위해 사용될 수 있다. 추가로, 입자는 SynchroMed 주입 시스템과 같은 미니펌프 주입 시스템을 사용하여 뇌실내(icv) 주입에 의해 전달될 수 있다. 대류로 지칭되는 벌크 흐름에 기반한 방법은 또한 뇌의 연장된 영역에 거대 분자를 전달하는 데 효과적인 것으로 입증되었고, 표적 세포에 벡터를 전달하는 데 유용할 수 있다. (문헌[Bobo et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91 :2076-2080 (1994)]; [Morrison et al, Am. J. Physiol. 266:292-305 (1994)] 참조). 사용될 수 있는 다른 방법은 카테터, 정맥내, 비경구, 복강내 및 피하 주사, 및 경구 또는 다른 알려진 투여 경로를 포함한다.

[0159] 이들 벡터는 다양한 방식으로 사용될 수 있는 다량의 항체를 발현시키는 데 사용될 수 있다. 예를 들어, 샘플 중의 CLDN4의 존재를 검출하기 위해. 항체는 또한 CLDN4에 결합하고 그의 활성을 방해하려고 시도하기 위해 사용될 수 있다.

[0160] 한 실시형태에서, 본원에 기술된 항체는 Fc 수용체에 결합하는 야생형 Fc 영역과 유사한 Fc 영역을 함유하는 것들을 포함하는 전장 항체일 수 있다.

[0161] 기법은 본 발명의 항원 단백질에 특이적인 단일-쇄 항체의 생성을 위해 개조될 수 있다(예를 들어, 미국 특허 번호 4,946,778 참조). 또한, 방법은 단백질 또는 이의 유도체, 단편, 유사체 또는 동족체에 대한 바람직한 특이성을 갖는 단클론 F_{ab} 단편의 신속하고 효과적인 확인을 가능하게 하기 위해 F_{ab} 발현 라이브러리의 구축(예를 들어, 문헌[Huse, et al, 1989 Science 246: 1275-1281] 참조)을 위해 개조될 수 있다. 단백질 항원에 대한 이 디오타입을 함유하는 항체 단편은 다음을 포함하지만 이에 제한되지 않는 당업계에 알려진 기법에 의해 생성될 수 있다: (i) 항체 분자의 펩신 소화에 의해 생성된 F_{(ab')₂} 단편; (ii) F_{(ab')₂} 단편의 디술폰드 가교를 환원시킴으로써 생성된 F_{ab} 단편; (iii) 파파인 및 환원제를 이용한 항체 분자의 처리에 의해 생성된 F_{ab} 단편 및 (iv) F_v

단편.

[0162] 이중접합체 항체는 또한 본 발명의 범주 내이다. 이중접합체 항체는 2개의 공유 연결된 항체로 구성된다. 이러한 항체는 예를 들어 면역계 세포를 원하지 않는 세포에(미국 특허 번호 4,676,980 참조), 및 HIV 감염의 치료를 위해(PCT 공개 번호 W091/00360; W092/20373) 표적화할 수 있다. 항체는 가교체를 수반하는 방법을 포함하는 합성 단백질 화학에서 알려진 방법을 이용하여 시험관내에서 제조될 수 있다. 예를 들어, 면역독소는 디설피드 교환 반응을 사용하거나 티오에테르 결합을 형성함으로써 구축될 수 있다. 이러한 목적을 위한 적합한 시약의 예는 이미노티올레이트 및 메틸-4-메르캅토부티르이미데이트 및 예를 들어 미국 특허 번호 4,676,980에 개시된 것들을 포함한다.

[0163] 본 발명의 항체는 예를 들어 암을 치료하는 데 있어서의 항체의 유효성을 향상시키기 위해 이펙터 기능에 관하여 변형될 수 있다. 예를 들어, 시스템인 잔기(들)가 Fc 영역 내로 도입될 수 있고, 이에 의해 이 영역에 쇠간 디설피드 결합 형성이 가능할 수 있다. 이렇게 생성된 동종이량체 항체는 개선된 내재화 능력 및/또는 증가된 보체 매개 세포 살해 및 항체 의존적 세포성 세포독성(ADCC)을 가질 수 있다. (문헌[Caron et al, J. Exp Med., 176: 1 191-1 195 (1992)] 및 [Shopes, J. Immunol., 148: 2918-2922 (1992)] 참조). 대안적으로, 이중 Fc 영역을 갖고 이에 의해 향상된 보체 용해 및 ADCC 능력을 가질 수 있는 항체가 조작될 수 있다. (문헌 [Stevenson et al, Anti-Cancer Drug Design, 3: 219-230 (1989)] 참조). 한 실시형태에서, 본 발명의 항체는 Fc 영역이 Fc 수용체에 결합하지 않도록 Fc 영역의 변형을 갖는다. 예를 들어, Fc 수용체는 Fc γ 수용체이다. Fc 영역이 Fc γ 에는 결합하지 않지만 신생아 Fc 수용체에는 여전히 결합하도록 Fc 영역이 변형된 항체는 본원에 기술된 바와 같이 유용하다.

[0164] 실시형태에서, 본 발명의 항체는 Fc 변이체를 포함할 수 있다. 예를 들어, 항체 매개 수용체 신호전달을 증강시키기 위한 Fc 변이체 조성물을 제공하는 W02018/145075 및 W02019/183362를 참조한다. 실시형태에서, Fc 변이체는 항체의 항원 독립적 이펙터 기능, 예컨대 항체의 순환 반감기를 변경시키는 아미노산 치환을 포함할 수 있다. 이러한 항체는 이들 치환이 결여된 항체와 비교할 경우 FcRn에 대한 증가되거나 감소된 결합을 나타내며, 따라서, 혈청에서 각각 증가되거나 감소된 반감기를 갖는다. FcRn에 대한 친화도가 개선된 Fc 변이체는 더 긴 혈청 반감기를 가질 것으로 예상되며, 이러한 분자는 투여되는 항체의 긴 반감기가 바람직한 포유류를 치료하는 방법, 예를 들어 만성 질환 또는 장애를 치료하는 방법에 유용하게 적용된다. 반대로, FcRn 결합 친화도가 감소된 Fc 변이체는 더 짧은 반감기를 가지며, 이러한 분자는 또한 예를 들어 단축된 순환 시간이 유리할 수 있는 포유류에의 투여, 예를 들어, 생체내 진단 영상화 또는 출발 항체가 연장된 기간 동안 순환계에 존재하는 경우 독성 부작용을 갖는 상황에 유용하다. FcRn 결합 친화도가 감소된 Fc 변이체는 또한 태반을 가로지르는 가능성도 적으므로, 임산부의 질환 또는 장애를 치료하는 데 또한 유용하다. 또한, 감소된 FcRn 결합 친화도가 바람직할 수 있는 다른 적용은 뇌, 신장 및/또는 간으로의 국체화가 바람직한 적용을 포함한다. 한 실시형태에서, Fc 변이체 함유 항체는 혈관으로부터 신장 사구체의 상피를 가로지르는 수송의 감소를 나타낼 수 있다. 또 다른 실시형태에서, Fc 변이체-함유 항체는 뇌로부터 혈관 공간으로 뇌혈관 장벽(BBB)을 가로지르는 수송의 감소를 나타낼 수 있다. 한 실시형태에서, 변경된 FcRn 결합을 갖는 항체는 Fc 도메인의 "FcRn 결합 루프" 내에 하나 이상의 아미노산 치환을 갖는 Fc 도메인을 포함한다. FcRn 결합 루프는 아미노산 잔기 280~299(EU 넘버링에 따름)로 구성된다. 변경된 FcRn 결합 활성을 갖는 예시적인 아미노산 치환은 PCT 공개 번호 W005/047327(이는 본원에 참조로 포함됨)에 개시되어 있다. 예시적인 특정 실시형태에서, 본 발명의 항체 또는 이의 단편은 다음 치환 중 하나 이상을 갖는 Fc 도메인을 포함한다: V284E, H285E, N286D, K290E 및 S304D (EU 넘버링).

[0165] 일부 실시형태에서, 돌연변이는 mAb의 항체 의존적 세포 매개 세포독성(ADCC) 활성이 변경되도록 mAb의 불변 영역에 도입된다. 예를 들어, 돌연변이는 CH2 도메인에서의 LALA 돌연변이이다. 한 실시형태에서, 항체(예를 들어, 인간 mAb, 또는 이중특이성 Ab)는 이중이량체성 mAb의 하나의 scFv 단위 상에 돌연변이를 함유하며, 이는 ADCC 활성을 감소시킨다. 또 다른 실시형태에서, mAb는 이중이량체성 mAb의 둘 다의 쇠 상에 돌연변이를 함유하며, 이는 ADCC 활성을 완전히 제거한다. 예를 들어, mAb의 하나 또는 둘 다의 scFv 단위 내로 도입된 돌연변이는 CH2 도메인에서의 LALA 돌연변이이다. 가변적인 ADCC 활성을 갖는 이들 mAb는, mAb가 mAb에 의해 인식되는 하나의 항원을 발현하는 세포에 대해 최대의 선택적 살해를 나타내지만, mAb에 의해 인식되는 제2 항원에 대해서는 최소의 살해를 나타내도록 최적화될 수 있다.

[0166] 다른 실시형태에서, 본원에 기술된 진단 및 치료 방법에 사용하기 위한 본 발명의 항체는 글리코실화를 감소시키거나 제거하기 위해 변경될 수 있는 불변 영역, 예를 들어, IgG₁ 또는 IgG₄ 중쇄 불변 영역을 갖는다. 예를 들어, 본 발명의 항체는 또한 항체의 글리코실화를 변경시키는 아미노산 치환을 포함하는 Fc 변이체를 포함할 수

이다. 예를 들어, Fc 변이체는 감소된 글리코실화(예를 들어, N- 또는 O-결합 글리코실화)를 가질 수 있다. 일부 실시형태에서, Fc 변이체는 통상적으로 아미노산 위치 297(EU 넘버링)에서 발견되는 N-연결 글리칸의 글리코실화의 감소를 포함한다. 또 다른 실시형태에서, 항체는 글리코실화 모티프, 예를 들어, 아미노산 서열 NXT 또는 NXS를 함유하는 N-연결 글리코실화 모티프 부근에 또는 내에 아미노산 치환을 갖는다. 한 실시형태에서, 항체는 아미노산 위치 228 또는 299(EU 넘버링)에 아미노산 치환을 갖는 Fc 변이체를 포함한다. 또 다른 실시형태에서, 항체는 S228P 및 T299A 돌연변이(EU 넘버링)를 포함하는 IgG1 또는 IgG4 불변 영역을 포함한다.

[0167] 감소되거나 변경된 글리코실화를 부여하는 예시적인 아미노산 치환은 PCT 공개 번호 W005/018572에 기술되어 있으며, 이는 그 전문이 본원에 참조로 포함된다. 일부 실시형태에서, 본 발명의 항체 또는 이의 단편은 글리코실화를 제거하도록 변형된다. 이러한 항체 또는 이의 단편은 "어글리(agly)" 항체 또는 이의 단편(예를 들어, "어글리" 항체)으로 지칭될 수 있다. 이론에 구애되지 않되, "어글리" 항체 또는 이의 단편은 생체 내에서 개선된 안전성 및 안정성 프로파일을 가질 수 있다. 예시적인 어글리 항체 또는 이의 단편은 Fc-이펙터 기능이 결여된 IgG₄ 항체의 비글리코실화 Fc 영역을 포함하며, 이에 의해 정상 필수 조직 및 CLDN4를 발현하는 세포에 대한 Fc 매개 독성의 잠재성을 제거한다. 또 다른 실시형태에서, 본 발명의 항체 또는 이의 단편은 변경된 글리칸을 포함한다. 예를 들어, 항체는 Fc 영역의 Asn297의 N-글리칸 상에 감소된 수의 푸코스 잔기를 가질 수 있으며, 즉, 비푸코실화된다. 또 다른 실시형태에서, 항체는 Fc 영역의 Asn297에서 N-글리칸 상에 변경된 수의 시알산 잔기를 가질 수 있다.

[0168] 본 발명은 또한 세포독성제, 예컨대 독소(예를 들어, 박테리아, 진균, 식물 또는 동물 기원의 효소적으로 활성인 독소 또는 이의 단편) 또는 방사성 동위원소(즉, 방사성접합체)에 접합된 항체를 포함하는 면역접합체에 관한 것이다.

[0169] 사용될 수 있는 효소적으로 활성인 독소 및 이의 단편은 디프테리아 A 쉐, 디프테리아 독소의 비결합 활성 단편, 외독소 A 쉐(슈도모나스 에루기노사(*Pseudomonas aeruginosa*) 유래), 리신 A 쉐, 아브린 A 쉐, 모덱신 A 쉐, 알파-사르신, 알레우리테스 포르디이(*Aleurites fordii*) 단백질, 디안틴 단백질, 피톨라카 아메리카나(*Phytolaca americana*) 단백질(PAPI, PAPII 및 PAP-S), 모모르디카 카란티아(*Momordica charantia*) 억제제, 쿠르신, 크로틴, 사파오나리아 오피시날리스(*Saponaire officinalis*) 억제제, 켈로닌, 미토켈린, 레스트릭토신, 페노마이신, 에노마이신, 및 트리코테센을 포함한다. 다양한 방사성 핵종이 방사성접합된 항체의 생성을 위해 이용가능하다. 비제한적인 예는 ²¹²Bi, ¹³¹I, ¹³¹In, ⁹⁰Y, 및 ¹⁸⁶Re를 포함한다.

[0170] 항체 및 세포독성제의 접합체는 다양한 이관능성 단백질 커플링제, 예컨대 N-숙신이미딜-3-(2-피리디디티올)프로피오네이트(SPDP), 이미노티올란(IT), 이미노에스테르의 이관능성 유도체(예컨대 디메틸 아디프이미데이트 HCL), 활성 에스테르(예컨대 디숙신이미딜 수베레이트), 알데히드(예컨대 글루타르알데히드), 비스-아지도 화합물(예컨대 비스(p-아지도벤조일 헥사디아민), 비스-디아조늄 유도체(예컨대 비스-(p-디아조늄벤조일)-에틸렌디아민), 디이소시아네이트(예컨대 톨리엔 2,6-디이소시아네이트), 및 비스-활성 플루오르 화합물(예컨대 1,5-디플루오로-2,4-디니트로벤젠)을 사용하여 제조된다. 예를 들어, 문헌[Vitetta et al, Science 238: 1098 (1987)]에 기술된 바와 같이 리신 면역독소가 제조될 수 있다. 탄소-14-표지된 1-이소티오시아네이트벤젠-3-메틸디에틸렌 트리아민펜타아세트산(MX-DTPA)은 방사성 뉴클레오티드를 항체에 접합시키기 위한 예시적인 킬레이팅제이다. (PCT 공개 번호 W094/11026, 및 미국 특허 번호 5,736,137 참조).

[0171] 당업자는 매우 다양한 가능한 모이어티가 생성된 항체 또는 본 발명의 다른 분자에 커플링될 수 있음을 이해한다. (예를 들어, 문헌["Conjugate Vaccines", Contributions to Microbiology and Immunology, J. M. Cruse and R. E. Lewis, Jr (eds), Carger Press, New York, (1989)] 참조, 이의 전체 내용은 본원에 참조로 포함됨).

[0172] 커플링은 항체 및 다른 모이어티가 그들의 각각의 활성을 보유하는 한, 두 분자에 결합할 임의의 화학 반응에 의해 달성될 수 있다. 이 연결은 많은 화학적 메커니즘, 예를 들어 공유 결합, 친화성 결합, 인터칼레이션, 배위 결합 및 복합체화를 포함할 수 있다. 한 실시형태에서, 결합은 공유 결합이다. 공유 결합은 기존의 측쇄의 직접적 축합에 의해 또는 외부 가교 분자의 혼입에 의해 달성될 수 있다. 많은 2가 또는 다가 연결체는 단백질 분자, 예컨대 본 발명의 항체를 다른 분자에 커플링시키는 데 유용하다. 예를 들어, 대표적인 커플링제는 유기 화합물, 예컨대 티오에스테르, 카르보디이미드, 숙신이미드 에스테르, 디이소시아네이트, 글루타르알데히드, 디아조벤젠 및 헥사메틸렌 디아민을 포함할 수 있다. 이 목록은 당업계에 알려진 다양한 부류의 커플링제를 총망라하고자 하는 것은 아니며, 오히려 보다 많은 통상적인 커플링제의 예시이다. (문헌[Killen and Lindstrom, Jour. Immun. 133: 1335-2549 (1984)]; [Jansen et al., Immunological Reviews 62: 185-216 (1982)]; 및

[Vitetta et al, Science 238: 1098 (1987)] 참조). 링커의 비제한적인 예는 문헌에 기술되어 있다. (예를 들어, MBS(M-말레이미도벤조일-N-히드록시숙신이미드 에스테르)의 사용을 기술하고 있는 문헌[Ramakrishnan, S. et al., Cancer Res. 44:201-208 (1984)] 참조). 또한, 올리고펩티드 링커에 의해 항체에 커플링된 할로젠화 아세틸 히드라지드 유도체의 용도를 기술하고 있는 미국 특허 번호 5,030,719를 참조한다. 본 발명의 항체와 함께 사용될 수 있는 유용한 링커의 비제한적인 예는 다음을 포함한다: (i) EDC(1-에틸-3-(3-디메틸아미노-프로필) 카르보디이미드 히드로클로라이드; (ii) SMPT(4-숙신이미딜옥시카르보닐-알파-메틸-알파-(2-프리딜-디티오)-톨루엔(Pierce Chem. Co., Cat. (21558G); (iii) SPDP(숙신이미딜-6 [3-(2-피리딜디티오)프로피온아미도]헥사노에이트(Pierce Chem. Co., Cat # 21651G); (iv) 솔포-LC-SPDP(솔포숙신이미딜 6 [3-(2-피리딜디티오)-프로피안아미드]헥사노에이트(Pierce Chem. Co. Cat. # 2165-G); 및 (v) 솔포-NHS-(히드록시솔포-숙신이미드: Pierce Chem. Co., Cat. # 24510)(EDC에 접합됨).

[0173] 본원에 기술된 링커는 상이한 속성을 갖는 성분을 함유하므로, 상이한 물리화학적 특성을 갖는 접합체를 초래한다. 예를 들어, 알킬 카르복실레이트의 솔포-NHS 에스테르는 방향족 카르복실레이트의 솔포-NHS 에스테르보다 더 안정하다. NHS-에스테르 함유 링커는 솔포-NHS 에스테르보다 덜 가용성이다. 또한, 링커 SMPT는 입체 장애된 디설피드 결합을 함유하고, 안정성이 증가된 접합체를 형성할 수 있다. 디설피드 결합은 일반적으로 다른 연결보다 덜 안정한데, 이는 디설피드 연결이 시험관내에서 절단되어, 더 적은 접합체를 이용가능하게 하기 때문이다. 솔포-NHS는 카르보디이미드 커플링의 안정성을 향상시킬 수 있다. 카르보디이미드 커플링(예컨대 EDC)은 솔포-NHS와 함께 사용되는 경우, 카르보디이미드 커플링 반응 단독보다 가수분해에 더 내성인 에스테르를 형성한다.

[0174] 본원에 개시된 항체는 또한 면역리포솜으로 제형화될 수 있다. 항체를 함유하는 리포솜은 문헌[Epstein et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 3688 (1985)]; [Hwang et al, Proc. Natl Acad. Sci. USA, 77: 4030 (1980)]; 및 미국 특허 번호 4,485,045 및 4,544,545에 기술된 바와 같이 당업계에 알려진 방법에 의해 제조된다. 향상된 순환 시간을 갖는 리포솜은 미국 특허 번호 5,013,556에 개시되어 있다.

[0175] 유용한 리포솜의 비제한적인 예는 포스파티딜콜린, 콜레스테롤, 및 PEG-유도체화된 포스파티딜에탄올아민(PEG-PE)을 포함하는 지질 조성물을 이용한 역상 증발 방법에 의해 생성될 수 있다. 리포솜은 바람직한 직경을 갖는 리포솜을 수득하기 위해 정의된 기공 크기의 필터를 통해 압출된다. 본 발명의 항체의 Fab' 단편은 디설피드-상호교환 반응을 통해 문헌[Martin et al, J. Biol. Chem., 257: 286-288 (1982)]에 기술된 바와 같이 리포솜에 접합될 수 있다.

[0176] 다중특이성 항체(이중특이성 및 삼중특이성)

[0177] 본원에 기술된 바와 같은 실시형태는 단일특이성 항체 또는 다중특이성 항체를 포함할 수 있다.

[0178] 단일특이성 항체는 단일 항원에 특이적으로 결합하는 하나 이상의 결합 부위를 갖는 항체이다.

[0179] 다중특이성 항체는 2개 이상의 상이한 항원을 인식할 수 있는 항체이다. 예를 들어, 이중특이성 항체(bsAb)는 생성된 항체가 2개의 상이한 항원을 인식하도록 2개의 가변 도메인 또는 scFv 단위를 포함하는 항체이다. 예를 들어, 삼중특이성 항체(tsAb)는 생성된 항체가 3개의 상이한 항원을 인식하도록 2개의 가변 도메인 또는 scFv 단위를 포함하는 항체이다. 본 발명은 CLDN4 및 제2 항원 및/또는 제3 항원을 인식하는 다중특이성 항체, 예컨대 이중특이성 및 삼중특이성 항체를 제공한다. 한 실시형태에서, 다중특이성 항체(예를 들어, 이중특이성 항체 및 삼중특이성 항체)는 본원에 기술된 항체를 포함하는 CLDN4 특이적 융합 단백질을 포함할 수 있다. 예시적인 제2 및 또는 제3 항원은 중앙 연관 항원(예를 들어, LINGO1), 사이토카인(예를 들어, IL-12(NCBI 참조 번호 NP_000873.2를 갖는 IL-12A(p35 서브유닛) 단백질 서열; NCBI 참조 번호 NP_002178.2를 갖는 IL-12B(p40 서브유닛) 단백질 서열); IL-18(NCBI 참조 번호 NP_001553.1을 갖는 단백질 서열); IL-15(NCBI 참조 번호 NP_000576.1을 갖는 단백질 서열); IL-7(NCBI 참조 번호 NP_000871.1을 갖는 단백질 서열); IL-2(NCBI 참조 번호 NP_000577.2를 갖는 단백질 서열); 및 IL-21(NCBI 참조 번호 NP_068575.1을 갖는 단백질 서열)), 사이토카인 동중체 수용체(예를 들어, IL-12R), 및 세포 표면 수용체를 포함한다. 제2 및/또는 제3 항원의 비제한적인 예는 CTLA-4, CXCR4, LAG-3, CD28, CD122, 4-1BB, TIM3, OX-40, OX40L, CD40, CD40L, LIGHT, ICOS, ICOSL, GITR, GITRL, TIGIT, CD27, VISTA, B7H3, B7H4, HEVM(또는 BTLA), CD47 및 CD73을 포함한다. 한 실시형태에서, 이중특이성 및 삼중특이성 항체는 CLDN4 융합 단백질을 포함한다. 예를 들어, 융합 단백질은 본원에 기술된 바와 같은 가변 도메인 또는 scFv 단위 및 리간드 또는 항원 및/또는 제3 리간드 또는 항원을 포함하는 항체를 포함하며, 이에 의해 생성된 항체는 항원을 인식하고 리간드-특이적 수용체에 결합한다. 본원에 기술된 바와 같은 CLDN4 융합 단백질의 설계에 유용한 예시적인 항체 조성물(예를 들어, VH 및/또는 VL 서열 또는 이의 단편)은 PCT/US2006/046350 및 PCT/US2015/067178에 기술된 항-CAIX 항체; PCT/US2006/005691 및 PCT/US2019/022272

에 기술된 항-CXCR4 항체; PCT/US2008/088435, PCT/US2013/039744, 및 PCT/US2015/054202에 기술된 항-CCR4 항체; PCT/US2008/088435 및 PCT/US2020/062815에 기술된 항-PD-L1 항체; PCT/US2020/037791 및 PCT/US2020/037781에 기술된 항-PD-1 항체; PCT/US2017/043504에 기술된 항-GITR 항체; PCT/US2019/022272에 기술된 항-클라우딘-4 항체; 및 PCT/US2020/037783에 기술된 항-MUC1 항체(각각의 출원들은 그 전문이 참조로 포함됨)를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 한 실시형태에서, 융합 단백질은 본원에 기술된 바와 같은 불변 영역 및/또는 링커를 추가로 포함한다. 상이한 형식의 다중특이성 항체(예를 들어, 이중특이성 항체 및 삼중특이성 항체, 예컨대 융합 단백질은 CLDN4 및 리간드를 인식하는 항체를 포함함)가 본원에 기술되어 있다. 리간드는 종양 연관 항원(예를 들어, LINGO1, ErbB2(HER2/neu), 암배아 항원(CEA), 상피 세포 부착 분자(EpCAM), 표피 성장 인자 수용체(EGFR), MUC1, MSLN, CD19, CD20, CD30, CD40, CD22, RAGE-1, MN-CA IX, RET1, RET2(AS), 전립선 특이적 항원(PSA), TAG-72, PAP, p53, Ras, 프로스테인, PSMA, 서비빈, 9D7, 전립선 암종 종양 항원-1(PCTA-1), GAGE, MAGE, 메소텔린, β -카테닌, TGF- β RII, BRCA1/2, SAP-1, HPV-E6, HPV-E7(또한, 추가의 종양 연관 표면 항원에 대해서는 그 전문이 참조로 포함되는 PCT/US2015/067225 및 PCT/US2019/022272 참조); 사이토카인(예를 들어, IL-12(NCBI 참조 번호 NP_000873.2를 갖는 IL-12A(p35 서브유닛) 단백질 서열; NCBI 참조 번호 NP_002178.2를 갖는 IL-12B(p40 서브유닛) 단백질 서열); IL-18(NCBI 참조 번호 NP_001553.1을 갖는 단백질 서열); IL-15(NCBI 참조 번호 NP_000576.1을 갖는 단백질 서열); IL-7(NCBI 참조 번호 NP_000871.1을 갖는 단백질 서열); IL-2(NCBI 참조 번호 NP_000577.2를 갖는 단백질 서열); 및 IL-21(NCBI 참조 번호 NP_068575.1을 갖는 단백질 서열)); CTLA-4, LAG-3, CD28, CD122, 4-1BB, TIM3, OX-40, OX40L, CD40, CD40L, LIGHT, ICOS, ICOSL, GITR, GITRL, TIGIT, CD27, VISTA, B7H3, B7H4, HEVM(또는 BTLA), CD47 및 CD73일 수 있다. 상이한 형식의 이중특이성 또는 삼중특이성 항체가 또한 본원에 제공된다. 일부 실시형태에서, 각각의 항-CLDN4 단편 및 제2 항원 특이성 단편 및/또는 제3 항원 특이성 단편은 각각 독립적으로 Fab 단편, 단일-쇄 가변 단편(scFv), 또는 단일 도메인 항체로부터 선택된다. 일부 실시형태에서, 이중특이성 또는 삼중특이성 항체는 (예를 들어, PCT/US2015/021529 및 PCT/US2019/023382(각각은 그 전문이 참조로 포함됨)에 기술된 바와 같은) Fc 단편을 추가로 포함한다. 본 발명의 이중특이성 또는 삼중특이성 항체는 본원에 기술된 CLDN4 항체의 중쇄 및 경쇄 조합 또는 scFv를 포함할 수 있다.

[0180] 본 발명의 다중특이성 항체(예를 들어, 이중특이성 항체 및 삼중특이성 항체)(예를 들어, 항-CLDN4-scFv 융합 단백질)는 당업계에 알려진 방법을 사용하여 구축될 수 있다. 일부 실시형태에서, 이중특이성 항체는 2개의 scFv 단위 사이의 분자 내 회합을 허용하여 항체를 형성하는 데 충분한 길이의 긴 링커 폴리펩티드에 의해 2개의 scFv 단편이 연결된 단일 폴리펩티드이다. 다른 실시형태에서, 이중특이성 항체는 공유 또는 비공유 결합에 의해 연결된 하나 초과 폴리펩티드이다. 일부 실시형태에서, 본원에 도시된 아미노산 링커(GGGGSGGGG; "(G4S)2")는 가요성을 개선시키기 위해 더 긴 G4S 링커에 의해 생성될 수 있다. 예를 들어, 링커는 또한 다음일 수 있다:

[0181] "(G₄S)₃"(예를 들어, GGGGSGGGGSGGGG);

[0182] "(G₄S)₄"(예를 들어, GGGGSGGGGSGGGGSGGGG);

[0183] "(G₄S)₅"(예를 들어, GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG);

[0184] "(G₄S)₆"(예를 들어, GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG);

[0185] "(G₄S)₇"(예를 들어, GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG); 등. 예를 들어, (G4S)₅ 링커의 사용은 본원에 기술된 리간드에 더 많은 가요성을 제공할 수 있고, 발현을 개선시킬 수 있다. 일부 실시형태에서, 링커는 또한 (GS)_n, (GGS)_n, (GGGS)_n, (GGSG)_n, (GGSGG)_n, 또는 (GGGS)_n일 수 있으며, 여기서 n은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10이다. 본원에 기술된 융합체를 구축하는 데 사용될 수 있는 당업자에게 알려진 링커의 비제한적인 예는 미국 특허 번호 9,708,412; 미국 특허 출원 공개 번호 US 20180134789 및 US 20200148771; 및 PCT 공개 번호 WO 2019051122(이들 각각은 그 전문이 참조로 포함됨)에서 발견될 수 있다.

[0186] 또 다른 실시형태에서, 다중특이성 항체(예를 들어, 이중특이성 항체 및 삼중특이성 항체, 예컨대 항-CLDN4-scFv 융합체)는 "눅 인투 홀" 방법(문헌[Ridgway et al, Protein Eng 7:617-621 (1996)])을 사용하여 구축될 수 있다. 이 방법에서, 2개의 상이한 가변 도메인의 Ig 중쇄는 중쇄-경쇄 쌍형성을 유지하면서 중쇄 쌍형성을 선택적으로 파괴하도록 환원된다. 2개의 상이한 항원/리간드 또는 3개의 상이한 항원/리간드를 인식하는 2개의 중쇄-경쇄 이중이량체가 혼합되어 CH3 도메인의 조작된 "눅 인투 홀"을 통해 매개되는 이중결합 쌍형성을 촉진

시킨다.

[0187] 또 다른 실시형태에서, 다중특이성 항체(예를 들어, 이중특이성 항체 및 삼중특이성 항체, 예컨대 항-CLDN4-scFv 융합체)는 하이브리드 항체를 생성하기 위해 2개 이상의 상이한 항체로부터의 중쇄-경쇄 이량체의 교환을 통해 구축될 수 있으며, 여기서 제1 중쇄-경쇄 이량체는 CLDN4를 인식하고 제2 중쇄-경쇄 이량체는 제2 항원 및/또는 제3 항원을 인식한다. 중쇄-경쇄 이량체에 대한 메커니즘은 이중특이성 분자라도 기능하는 인간 IgG₄의 형성과 유사하다. IgG 중쇄의 이량체화는 각각의 중쇄의 CH3 도메인 및 디설피드 가교의 쌍형성과 같은 분자내 힘에 의해 유도된다. CH3 도메인(R409)에서 특정 아미노산의 존재는 IgG₄ 분자의 이량체 교환 및 구축을 촉진시키는 것으로 나타났다. 중쇄 쌍형성은 또한 항체의 힌지 영역에서 중쇄간 디설피드 가교에 의해 추가로 안정화된다. 구체적으로, IgG₄에서, 힌지 영역은 아미노산 226-230에서 (서열 Cys-Pro-Pro-Cys를 함유하는 안정한 힌지 영역과 비교하여) 아미노산 서열 Cys-Pro-Ser-Cys를 함유한다. 위치 229에서 세린의 이러한 서열 차이는 힌지 영역에서 쇠내 디설피드를 형성하는 IgG₄의 경향성과 관련되었다(문헌[Van der Neut Kofschoten, M. et al, 2007, Science 317: 1554-1557] 및 [Labrijn, A.F. et al, 2011, Journal of Immunol 187:3238-3246]).

[0188] 본 발명의 다중특이성 항체(예를 들어, 이중특이성 항체 및 삼중특이성 항체, 예컨대 항-CLDN4-scFv 융합체)는, 중쇄-경쇄 이량체가 교환되어 CLDN4를 인식하는 하나의 중쇄-경쇄 이량체 및 제2 및/또는 제3 항원을 인식하는 제2 중쇄-경쇄 이량체를 갖는 항체 분자를 생성하도록, CH3 도메인 내의 R409 잔기, 및 CLDN4 또는 제2 및/또는 제3 항원을 인식하는 항체의 힌지 영역 내의 Cys-Pro-Ser-Cys 서열의 도입을 통해 생성될 수 있으며, 여기서 제2 및/또는 제3 항원(또는 리간드)은 본원에 개시된 임의의 항원(또는 리간드)이다. 알려진 IgG₄ 분자는 또한 중쇄 및 경쇄가 본원에 개시된 바와 같은 CLDN4 또는 제2 및/또는 제3 항원을 인식하도록 변경될 수 있다. 본 발명의 다중특이성 항체(예를 들어, 이중특이성 항체 및 삼중특이성 항체, 예컨대 항-CLDN4-scFv 융합체)를 구축하기 위한 이러한 방법의 사용은 IgG₄ 분자의 고유한 특성으로 인해 유익할 수 있으며, 여기서 Fc 영역은 면역 반응의 이펙터 시스템, 예컨대 특정 백혈구에 의해 발현되는 보체 및 Fc 수용체와 불량하게 상호작용한다는 점에서 다른 IgG 하위유형과 상이하다. 이러한 특정 특성은 이들 IgG₄ 기반 다중특이성 항체(예를 들어, 이중특이성 항체 및 삼중특이성 항체, 예컨대 항-CLDN4-scFv 융합체)를, 항체가 표적(들)에 결합하여 표적(들)과 연관된 신호전달 경로를 기능적으로 변경시키는데 요구되지만 이펙터 활성을 촉발시키지는 않는 치료 적용에 매력적이게 만든다.

[0189] 본원에 기술된 다중특이성 항체(예를 들어, 이중특이성 항체 및 삼중특이성 항체, 예컨대 항-CLDN4-scFv 융합체)는 비-고갈 중쇄 이소형, 예컨대 IgG1-LALA 또는 안정화된 IgG4, 또는 다른 비-고갈 변이체 중 하나로 조작될 수 있다. 일부 실시형태에서, 돌연변이는 bsAb의 항체 의존적 세포-매개 세포독성(ADCC) 활성이 변경되도록 bsAb의 불변 영역에 도입된다. 예를 들어, 돌연변이는 CH2 도메인에서의 LALA 돌연변이이다. 한 양태에서, 다중특이성 항체(예를 들어, 이중특이성 항체 및 삼중특이성 항체, 예컨대 항-CLDN4-scFv 융합체)는 이중이량체성 다중특이성 항체의 하나의 scFv 단위 상에 돌연변이를 함유하며, 이는 ADCC 활성을 감소시킨다. 또 다른 양태에서, 다중특이성 항체(예를 들어, 이중특이성 항체 및 삼중특이성 항체, 예컨대 항-CLDN4-scFv 융합체)는 이중이량체성 다중특이성 항체의 둘 다의 쇠 상에 돌연변이를 함유하며, 이는 ADCC 활성을 완전히 제거한다. 예를 들어, 다중특이성 항체(예를 들어, 이중특이성 항체 및 삼중특이성 항체, 예컨대 항-CLDN4-scFv 융합체)의 하나 또는 둘 다의 scFv 단위에 도입된 돌연변이는 CH2 도메인에서의 LALA 돌연변이이다. 가변 ADCC 활성을 갖는 이들 다중특이성 항체(예를 들어, 이중특이성 항체 및 삼중특이성 항체, 예컨대 항-CLDN4-scFv 융합체)는 다중특이성 항체가 다중특이성 항체에 의해 인식되는 하나의 항원을 발현하는 세포에 대한 최대의 선택적 살해를 나타내지만, 다중특이성 항체에 의해 인식되는 제2 항원에 대해서는 최소의 살해를 나타내도록 최적화될 수 있다.

[0190] 본원에 기술된 다중특이성 항체(예를 들어, 이중특이성 항체)는 모듈식 사량체성 이중특이성 항체(tBsAb)로서 조작될 수 있다. 예를 들어, 그 전문이 본원에 참조로 포함되는 WO 2018/071913을 참조한다. 예를 들어, 4가 항체는 제1 항원에 대한 제1 결합 부위, 및 제2 항원에 대한 제2 결합 부위를 포함하는 이중특이성 scFv 단편의 이량체일 수 있다. 실시형태에서, 항-CLDN4 항체는 제1 항원에 대한 제1 결합 부위일 수 있다. 실시형태에서, 항-CLDN4 항체는 제2 항원에 대한 제2 결합 부위일 수 있다. 2개의 결합 부위는 링커 도메인을 통해 함께 연결될 수 있다. 실시형태에서, scFv 단편은 탠덤 scFv이고, 링커 도메인은 면역글로불린 힌지 영역(예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3, 또는 IgG4 힌지 영역) 아미노산 서열을 포함한다. 실시형태에서, 면역글로불린 힌지 영역 아미노산 서열은 예를 들어 링커 아미노산 서열 (GGGS)_{x1-6}, (GGGG)_{x1-6}, 또는 GSAGSAAGSGEF를 갖는 가요성 링커 아미노산 서열이 측정할 수 있다. 실시형태에서, 링커 도메인은 면역글로불린 Fc 도메인, 예를 들어 IgG1,

IgG2, IgG3, 또는 IgG4 Fc 도메인의 적어도 일부를 포함한다. 실시형태에서, 면역글로불린 Fc 도메인의 적어도 일부는 CH2 도메인을 포함하지 않는다. 실시형태에서, 면역글로불린 Fc 도메인의 적어도 일부는 CH2 도메인일 수 있다. 예시적인 CH2 도메인 아미노산 서열은APELLGGPDVFLF(서열 번호 95)를 포함한다. Fc 도메인은 면역글로불린 힌지 영역(예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3, 또는 IgG4 힌지 영역) 아미노산 서열의 C-말단에 연결될 수 있다. 링커 도메인은 하나의 말단 또는 둘 다의 말단에 가요성 링커 아미노산 서열(예를 들어, (GGGS)_{x1-6}, (GGGG)_{x1-6}, 또는 GSAGSAAGSGEF)을 포함할 수 있다.

[0191] 실시형태에서, tBsAb는 CLDN4, 및 또한 B7H3, B7H4, CD27, CD28, CD40, CD40L, CD47, CD122, CCR4, CXCR4, CTLA-4, GITR, GITRL, ICOS, ICOSL, LAG-3, LIGHT, OX-40, OX40L, PD-L1, PD-1, TIM3, 4-1BB, TIGIT, VISTA, HEVM, BTLA, 및 KIR로 이루어진 군으로부터 선택되는 표적에 특이적일 수 있다.

[0192] 실시형태에서, 다중특이성 항체는 이중특이성 T 세포 인게이지(BiTE)일 수 있다. 용어 "BiTE"(이중특이성 T 세포 인게이지)는 2개의 항원 결합 도메인을 갖는 단일 폴리펩티드 쇠 분자를 지칭하며, 이들 중 하나는 T 세포 항원에 결합한다. 예를 들어, BiTE는 본원에 개시된 CLDN4 항체 또는 이의 기능적 단편, 및 T 세포 항원에 결합하는 항체 또는 이의 단편을 포함할 수 있다. 예를 들어, T 세포 항원에 결합하는 항체 또는 이의 단편은 CD3에 특이적일 수 있다.

[0193] 실시형태에서, 다중특이성 항체는 삼중특이성 T 세포 인게이지(TriTE)일 수 있다. 용어 "TriTE"(삼중특이성 T 세포 인게이지)는 3개의 항원 결합 도메인을 갖는 단일 폴리펩티드 쇠 분자를 지칭할 수 있으며, 이들 중 하나 이상은 T 세포 항원에 결합한다. 예를 들어, TriTE는 본원에 개시된 CLDN4 항체 또는 이의 기능적 단편, 및 T 세포 항원에 결합하는 항체 또는 이의 단편을 포함할 수 있다. 예를 들어, T 세포 항원에 결합하는 항체 또는 이의 단편은 CD3, CD28, 또는 둘 다에 특이적일 수 있다.

[0194] 본원에 개시된 다중특이성 항체(예를 들어, 이중특이성 항체 및 삼중특이성 항체, 예컨대 항-CLDN4-scFv 융합체)는 만성 감염, 질환, 또는 의학적 병태, 예를 들어 암의 치료에 유용할 수 있다.

[0195] **융합 단백질**

[0196] 본 발명은 제2 단백질에 작동가능하게 연결된, 본원에 개시된 CLDN4 항체 또는 이의 기능적 단편을 함유하는 융합 단백질을 제공한다. 제2 단백질은 예를 들어 사이토카인 또는 성장 인자일 수 있다. 실시형태에서, 사이토카인은 IL-2 또는 TGF-베타 및 이들의 변이체이다. 일부 다른 실시형태에서, 제2 단백질은 치료제, 예컨대 독소, 검출가능한 모이어티, 예컨대 검출용 형광 단백질, 또는 생물학적 작용제, 예컨대 T 세포를 자극하는 작용제(즉, CD3)일 수 있다. 일부 실시형태에서, 본 발명의 CLDN4 항체는 하나 초과 추가 단백질 또는 펩티드, 예를 들어 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10개의 추가 단백질 또는 펩티드 서열에 작동가능하게 연결될 수 있다.

[0197] 일부 실시형태에서, 본원에 개시된 CLDN4 항체 또는 이의 기능적 단편은 제2 단백질에 직접적으로 연결된다. 다른 실시형태에서, CLDN4 항체 또는 이의 기능적 단편은 링커, 예컨대 가요성 폴리펩티드 쇠를 통해 제2 단백질에 연결된다. 링커는 임의의 길이의 임의의 적합한 링커일 수 있지만, 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 또는 30개 아미노산 길이일 수 있다. 한 실시형태에서, 링커는 숙주의 면역글로불린 분자에 자연적으로 존재하는 아미노산 서열이므로, 링커의 존재는 포유류에 의해 링커 서열에 대한 면역 반응을 초래할 수 없다. CLDN4 항체에 하나 초과 추가 단백질을 포함하는 본 발명의 융합 단백질은 각각의 추가 단백질 또는 펩티드 서열을 연결하는 다수의 링커 서열을 가질 수 있다.

[0198] 본 발명의 융합 단백질은 당업자에게 알려진 재조합 방법에 의해 구축될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 CLDN4 항체를 코딩하는 핵산 서열을 함유하는 발현 벡터는 제2 단백질을 코딩하는 핵산 서열에 작동가능하게 연결될 수 있고, 융합 단백질을 번역하고 생성하기 위해 발현 시스템에 도입될 수 있다. 대안적으로, 당업자는 본원에 기술된 융합 단백질을 생성하기 위해 드 노바(de nova) 단백질 합성 기법을 용이하게 이용할 수 있다.

[0199] CLDN4에 대한 항체의 용도

[0200] CLDN4 단백질 또는 이의 단편에 특이적으로 결합하는 본 발명의 항체는 CLDN4 연관 질환 또는 장애의 치료를 위해 투여될 수 있다. "CLDN4 연관 질환 또는 장애"는 증가된 수준의 CLDN4 및/또는 CLDN4와 연관된 세포 신호전달 경로의 활성화가 발견되는 질환 상태 및/또는 질환 상태와 연관된 증상을 포함한다. 예시적인 CLDN4 연관 질환 또는 장애는 T 세포가 억제되는 질환, 예컨대 암 및 감염성 질환을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 일부 실시형태에서, 암은 폐암, 신장암, 난소암, 전립선암, 결장암, 유방암, 자궁경부암, 자궁암, 뇌암, 피부암, 간

암, 췌장암, 또는 위암일 수 있다. 실시형태에서, 암은 CLDN4 연관 암일 수 있다. 실시형태에서, CLDN-4 연관 암은 삼중 음성 유방암일 수 있다.

[0201] 이중특이성, 다클론, 단클론, 인간화 및 완전 인간 항체를 포함하는 본 발명의 항체는 치료제로서 사용될 수 있다. 이러한 작용제는 대상체에서 암을 치료하거나, 백신 효율을 증가시키거나, 자연적인 면역 반응을 증강시키기 위해 이용될 수 있다. 항체 제제, 예를 들어 표적 항원에 대해 높은 특이성 및 높은 친화도를 갖는 것이 대상체에게 투여되며, 표적과의 결합으로 인해 효과를 가질 것이다. 항체의 투여는 CLDN4 단백질의 활성을 무효화시키거나, 억제하거나 방해할 수 있다.

[0202] 제약 조성물

[0203] CLDN4 단백질 또는 이의 단편에 특이적으로 결합하는 본 발명의 항체는 제약 조성물의 형태로 암의 치료를 위해 투여될 수 있다. 항체를 포함하는 치료적 제약 조성물의 제조에 관여된 원리 및 고려사항뿐만 아니라 성분 선택에서의 지침은 예를 들어 문헌[Remington: The Science And Practice Of Pharmacy 20th ed. (Alfonso R. Gennaro, et al, editors) Mack Pub. Co., Easton, Pa., 2000]; [Drug Absorption Enhancement: Concepts, Possibilities, Limitations, And Trends, Harwood Academic Publishers, Langhorne, Pa., 1994]; 및 [Peptide And Protein Drug Delivery (Advances In Parenteral Sciences, Vol. 4), 1991, M. Dekker, New York]에 제공된다.

[0204] 임의의 환자에 대한 구체적 투여량 및 치료 요법은 사용된 특정 항체, 이의 변이체 또는 유도체, 환자의 연령, 체중, 일반적 건강, 성별, 및 식이, 및 투여 시간, 배설 속도, 약물 조합, 및 치료 중인 질환의 중증도를 비롯한 다양한 인자에 따라 달라질 것이다. 의료 간병인에 의한 이러한 인자의 판단은 당업계의 통상의 기술 범위 내이다. 양은 또한 치료될 개별 환자, 투여 경로, 제형의 유형, 사용된 화합물의 특성, 질환의 중증도, 및 바람직한 효과에 따라 달라질 것이다. 사용되는 양은 당업계에 잘 알려진 약리학적 및 약동학적 원리에 의해 결정될 수 있다.

[0205] 본 발명의 항체의 치료적 유효량은 치료 목적을 달성하는 데 필요한 양일 수 있다. 본원에 언급된 바와 같이, 이는 특정 경우에 표적의 기능을 방해하는 항체와 이의 표적 항원 사이의 결합 상호작용일 수 있다. 투여될 양은 더욱이 그의 특이적 항원에 대한 항체의 결합 친화도에 따라 달라질 것이며, 또한 투여된 항체가 그것이 투여되는 다른 대상체의 자유 부피로부터 고갈되는 속도에 따라 달라질 것이다. 본원에 기술된 항원 결합 폴리펩티드의 대상체(예를 들어, 환자)에게 투여되는 투여량은 환자 체중 kg당 약 0.1 mg 내지 100 mg, 환자 체중 kg당 0.1 mg 내지 20 mg, 또는 환자 체중 kg당 1 mg 내지 10 mg이다. 외래 폴리펩티드에 대한 면역 반응으로 인해 인간 항체는 인체 내에서 다른 종으로부터의 항체보다 더 긴 반감기를 갖는다. 따라서, 더 낮은 투여량의 인간 항체 및 덜 빈번한 투여가 종종 가능하다. 추가로, 본 발명의 항체의 투여량 및 투여 빈도는 예를 들어 지질화 와 같은 변형에 의해 항체의 흡수 및 조직 투과(예를 들어, 뇌 내로)를 향상시킴으로써 감소될 수 있다. 본 발명의 항체 또는 항체 단편의 치료적 유효 투약에 대한 통상적인 범위는 비제한적인 예로서 약 0.1 mg/kg 체중 내지 약 50 mg/kg 체중일 수 있다. 통상적인 투약 빈도는 예를 들어 1일 2회 내지 1주 1회의 범위일 수 있다.

[0206] 항체 단편이 사용되는 경우, 표적 단백질의 결합 도메인에 특이적으로 결합하는 최소 억제 단편이 바람직하다. 예를 들어, 항체의 가변 영역 서열에 기반하여, 표적 단백질 서열에 결합하는 능력을 보유하는 펩티드 분자가 설계될 수 있다. 이러한 펩티드는 화학적으로 합성되고/되거나 재조합 DNA 기술에 의해 생성될 수 있다. (예를 들어, 문헌[Marasco et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 7889-7893 (1993)] 참조). 제형은 또한 치료 중인 적응증, 예를 들어 서로 유해하게 영향을 미치지 않는 상보적 활성을 갖는 것을 위해 필요한 바와 같은 하나 초과 활성 화합물을 함유할 수 있다. 대안적으로 또는 추가적으로, 조성물은 예를 들어 세포독성제, 사이토카인(예를 들어, IL-15), 화학치료제, 또는 성장 억제제와 같은 그의 기능을 향상시키는 작용제를 포함할 수 있다. 이러한 분자는 의도된 목적을 위해 효과적인 양으로 조합되어 적합하게 존재한다.

[0207] 활성 성분은 또한 콜로이드 약물 전달 시스템(예를 들어, 리포솜, 알부민 미소구, 마이크로에멀전, 나노입자, 나노캡슐)에서 또는 마크로에멀전에서, 예를 들어 코아세르베이션 기법에 의해 또는 계면 중합에 의해 제조된 마이크로캡슐, 예를 들어 각각 히드록시메틸셀룰로스 또는 젤라틴-마이크로캡슐 및 폴리(메틸메타크릴레이트) 마이크로캡슐에 포집될 수 있다.

[0208] 생체내 투여에 사용되는 제형은 멸균성이어야 한다. 이는 멸균 여과막을 통한 여과에 의해 용이하게 달성된다.

[0209] 서방형 제제가 제조될 수 있다. 서방형 제제의 적합한 예는 항체를 함유하는 고체 소수성 중합체의 반투과성 매트릭스를 포함하며, 이 매트릭스는 성형품, 예를 들어 필름 또는 마이크로캡슐의 형태이다. 서방형 매트릭스의

예는 폴리에스테르, 히드로겔(예를 들어, 폴리(2-히드록시에틸-메타크릴레이트), 또는 폴리(비닐알코올)), 폴리락티드(미국 특허 번호 3,773,919), L-글루탐산과 γ 에틸-L-글루타메이트의 공중합체, 비분해성 에틸렌-비닐 아세테이트, 분해성 락트산-글리콜산 공중합체, 예컨대 LUPRON DEPOT™(락트산-글리콜산 공중합체 및 류프롤리드 아세테이트로 구성된 주사용 미소구), 및 폴리-D(-)-3-히드록시부티르산을 포함한다. 에틸렌-비닐 아세테이트 및 락트산-글리콜산과 같은 중합체는 100일 초과 동안 분자의 방출을 가능하게 하는 반면, 특정 히드로겔은 더 짧은 기간 동안 단백질을 방출한다.

[0210] 본 발명의 항체 또는 작용제(본원에서 "활성 화합물"로도 지칭됨), 및 이의 유도체, 단편, 유사체 및 동족체는 투여에 적합한 제약 조성물 내로 혼입될 수 있다. 이러한 제약 조성물은 항체 또는 작용제 및 제약상 허용되는 담체를 포함할 수 있다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "제약상 허용되는 담체"는 제약 투여와 상용성인 임의의 그리고 모든 용매, 분산 매질, 코팅, 항균제 및 항진균제, 등장화제 및 흡수 지연제 등을 포함할 수 있다. 적합한 담체는 본원에 참조로 포함되는 당업계의 표준 참조 텍스트인 문헌[Remington's Pharmaceutical Sciences]의 가장 최신판에 기술되어 있다. 이러한 담체 또는 희석제의 비제한적인 예는 물, 식염수, 링거 용액, 텍스트로스 용액, 및 5% 인간 혈청 알부민을 포함한다. 리포솜 및 비수성 비히클, 예컨대 고정유가 또한 사용될 수 있다. 제약상 활성 물질을 위한 이러한 매질 및 작용제의 사용은 당업계에 잘 알려져 있다. 임의의 통상적인 매질 또는 작용제가 활성 화합물과 비상용성인 경우를 제외하고, 이를 조성물에서 사용하는 것이 의도된다. 보충 활성 화합물이 또한 조성물 내에 혼입될 수 있다.

[0211] 본 발명의 제약 조성물은 의도된 투여 경로와 상용성하도록 제형화된다. 투여 경로의 예는 비경구, 예를 들어 정맥내, 피내, 피하, 경구(예를 들어, 흡입), 경피(즉, 국소), 경점막, 및 직장 투여를 포함한다. 비경구, 피내 또는 피하 적용에 사용되는 용액 또는 현탁액은 다음 성분을 포함할 수 있다: 멸균 희석제, 예컨대 주사용수, 염수 용액, 고정유, 폴리에틸렌 글리콜, 글리세린, 프로필렌 글리콜 또는 다른 합성 용매; 항균제, 예컨대 벤질알코올 또는 메틸 파라벤; 항산화제, 예컨대 아스코르브산 또는 중아황산나트륨; 킬레이팅제, 예컨대 에틸렌디아민테트라아세트산(EDTA); 완충제, 예컨대 아세테이트, 시트레이트 또는 포스페이트, 및 긴장성 조절을 위한 작용제, 예컨대 염화나트륨 또는 텍스트로스. pH는 산 또는 염기, 예컨대 염산 또는 수산화나트륨으로 조절될 수 있다. 비경구 제제는 유리 또는 플라스틱으로 제조된 앰플, 일회용 주사기 또는 다회 용량 바이알에 봉입될 수 있다.

[0212] 주사용 용도에 적합한 제약 조성물은 멸균 수용액(수용성인 경우) 또는 분산액 및 멸균 주사용 용액 또는 분산액의 즉석 제조를 위한 멸균 분말을 포함할 수 있다. 정맥내 투여를 위해, 적합한 담체는 생리 식염수, 정균수, Cremophor EL™(BASF, 미국 뉴저지주 파시파니 소재) 또는 인산염 완충 식염수(PBS)를 포함한다. 실시형태에서, 조성물은 멸균성이고, 용이한 주사가능성이 존재하는 정도의 유체이다. 이는 제조 및 보관 조건 하에서 안정할 수 있고, 박테리아 및 진균과 같은 미생물의 오염 작용에 대해 보존될 수 있다. 담체는 예를 들어 물, 에탄올, 폴리올(예를 들어, 글리세롤, 프로필렌 글리콜 및 액체 폴리에틸렌 글리콜 등), 및 이들의 적합한 혼합물을 함유하는 용매 또는 분산 매질일 수 있다. 적절한 유동성은 예를 들어 코팅, 예컨대 레시틴의 사용에 의해, 분산액의 경우에 필요한 입자 크기의 유지에 의해 및 계면활성제의 사용에 의해 유지될 수 있다. 미생물의 작용의 방지는 다양한 항균제 및 항진균제, 예를 들어 파라벤, 클로로부탄올, 페놀, 아스코르브산, 티메로살 등에 의해 달성될 수 있다. 많은 경우에, 등장화제, 예를 들어 당, 폴리알코올, 예컨대 만니톨, 소르비톨, 염화나트륨이 조성물에 포함될 수 있다. 주사용 조성물의 흡수 지연은 조성물 내에 흡수를 지연시키는 작용제, 예를 들어 알루미늄 모노스테아레이트 및 젤라틴을 포함시킴으로써 발생될 수 있다.

[0213] 필요에 따라 상기 열거된 성분 중 하나 또는 이들의 조합과 함께, 필요한 양의 활성 화합물을 적절한 용매에 혼합한 후, 여과 멸균함으로써 멸균 주사용 용액이 제조될 수 있다. 예를 들어, 분산액은 기본 분산 매질 및 상기 열거된 것들로부터의 필요한 다른 성분을 함유하는 멸균 비히클 내로 활성 화합물을 혼입시킴으로써 제조된다. 멸균 주사용 용액의 제조를 위한 멸균 분말의 경우, 제조 방법은 이의 미리 멸균-여과된 용액으로부터 활성 성분과 임의의 추가적인 성분의 분말을 생성하는 진공 건조 및 동결-건조이다.

[0214] 경구 조성물은 불활성 희석제 또는 식용 담체를 포함할 수 있다. 이들은 젤라틴 캡슐에 봉입되거나 정제로 압축될 수 있다. 경구 치료적 투여의 목적을 위해, 활성 화합물은 부형제와 함께 혼입되고 정제, 트로키, 또는 캡슐의 형태로 사용될 수 있다. 경구 조성물은 또한 구강 세척제로서의 사용을 위해 유체 담체를 사용하여 제조될 수 있으며, 여기서 유체 담체 중 화합물은 구강에 적용되고 행구어서 빨거나 삼켜진다. 제약상 상용성인 결합제, 및/또는 보조제 물질은 조성물의 일부로서 포함될 수 있다. 정제, 환제, 캡슐, 트로키 등은 다음 성분 또는 유사한 성질의 화합물 중 임의의 것을 함유할 수 있다: 결합제, 예컨대 미세결정질 셀룰로스, 트라칸트 겔 또는 젤라틴; 부형제, 예컨대 전분 또는 락토스, 붕해제, 예컨대 알긴산, 프리모겔(Primogel), 또는 옥수수 전

분; 윤활제, 예컨대 스테아르산마그네슘 또는 스테로테스(Sterotes); 활택제, 예컨대 콜로이드성 이산화규소; 감미제, 예컨대 수크로스 또는 사카린; 또는 향미제, 예컨대 페퍼민트, 메틸 살리실레이트, 또는 오렌지 향미제.

[0215] 흡입에 의한 투여를 위해, 화합물은 적합한 추진제, 예컨대 기체, 예컨대 이산화탄소를 함유하는 가압 용기 또는 분배기, 또는 분무기로부터 에어로졸 스프레이의 형태로 전달될 수 있다.

[0216] 전신 투여는 또한 경점막 또는 경피 수단에 의할 수 있다. 경점막 또는 경피 투여를 위해, 투과될 장벽에 적절한 침투제가 제형에 사용된다. 이러한 침투제는 당업계에 알려져 있으며, 예를 들어 경점막 투여를 위해, 세정제, 담즙산염, 및 푸시드산 유도체를 포함한다. 경점막 투여는 비강 스프레이 또는 좌제의 사용을 통해 달성될 수 있다. 경피 투여를 위해, 활성 화합물은 당업계에 알려진 바와 같은 연고, 납고, 젤 또는 크림으로 제형화된다.

[0217] 화합물은 또한 좌제(예를 들어, 코코아 버터 및 다른 글리세리드와 같은 통상적인 좌제 베이스를 사용함) 또는 직장 전달을 위한 정제 관장제의 형태로 제조될 수 있다.

[0218] 한 실시형태에서, 활성 화합물은 임플란트 및 마이크로캡슐화된 전달 시스템을 비롯한 제어 방출 제형과 같이, 신체로부터의 신속한 제거에 대해 화합물을 보호할 담체로 제조된다. 생체분해성, 생체적합성 중합체, 예컨대 에틸렌 비닐 아세테이트, 폴리무수물, 폴리글리콜산, 콜라겐, 폴리오르토에스테르, 및 폴리락트산이 사용될 수 있다. 이러한 제형의 제조 방법은 당업자에게 명백하다. 재료는 또한 Alza Corporation 및 Nova Pharmaceuticals, Inc.로부터 상업적으로 취득될 수 있다. 리포솜 현탁액(바이러스 항원에 대한 단클론 항체로 감염된 세포에 표적화된 리포솜을 포함함)이 또한 제약상 허용되는 담체로서 사용될 수 있다. 이들은 예를 들어 미국 특허 번호 4,522,811에 기술된 바와 같이 당업자에게 알려진 방법에 따라 제조될 수 있다.

[0219] 경구 또는 비경구 조성물은 투여의 용이성 및 투여량의 균일성을 위해 투여량 단위 형태로 제형화될 수 있다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 투여량 단위 형태는 치료받을 대상체를 위해 단위 투여량으로서 맞춰진 물리적으로 별개인 단위를 지칭하며; 각각의 단위는 필요한 제약 담체와 함께 바람직한 치료 효과를 생성하도록 계산된 소정량의 활성 화합물을 함유한다. 본 발명의 투여량 단위 형태에 대한 사양은 활성 화합물의 독특한 특성 및 달성될 치료 효과, 및 개체의 치료를 위한 이러한 활성 화합물의 배합 분야에 고유한 한계에 의해 좌우되고 이들에 직접적으로 의존할 수 있다.

[0220] 제약 조성물은 투여 지침과 함께 용기, 팩, 또는 분배기에 포함될 수 있다.

[0221] 진단

[0222] 본 발명에 따른 항체는 샘플 내에서 CLDN4(또는 이의 단백질 단편)의 존재를 검출하기 위한 작용제로서 사용될 수 있다. 예를 들어, 샘플은 암 샘플 또는 암에 걸릴 위험이 있는 대상체로부터의 샘플일 수 있다. 예를 들어, 암은 폐암, 신장암, 난소암, 전립선암, 결장암, 유방암, 자궁경부암, 자궁암, 뇌암, 피부암, 간암, 췌장암, 또는 위암일 수 있다. 예를 들어, 항체는 검출가능한 표지를 함유할 수 있다. 항체는 다클론성 또는 단클론성일 수 있다. 온전한 항체 또는 이의 단편(예를 들어, F_{ab}, scFv, 또는 F_{(ab)₂})이 사용될 수 있다. 프로브 또는 항체와 관련하여 용어 "표지된"은 프로브 또는 항체에 검출가능한 물질을 커플링시킴(즉, 물리적으로 연결함)으로써 프로브 또는 항체를 직접 표지하는 것뿐만 아니라, 직접 표지되는 또 다른 시약과의 반응성에 의한 프로브 또는 항체의 간접적 표지화를 포괄할 수 있다. 간접적 표지화의 예는 형광 표지된 2차 항체를 사용한 1차 항체의 검출 및 형광 표지된 스트렙타비딘으로 검출될 수 있도록 비오틴을 이용한 DNA 프로브의 말단-표지화를 포함한다. 용어 "생물학적 샘플"은 대상체로부터 단리된 조직, 세포 및 생물학적 유체뿐만 아니라 대상체 내에 존재하는 조직, 세포 및 유체를 포함할 수 있다. 따라서, 용어 "생물학적 샘플"의 사용법 내에는, 혈액, 및 혈청, 혈장, 또는 림프를 비롯한 혈액의 분획 또는 성분이 포함된다. 즉, 본 발명의 검출 방법은 시험관내에서뿐만 아니라 생체내에서 생물학적 샘플 내의 피분석물 mRNA, 단백질, 또는 게놈 DNA를 검출하는 데 사용될 수 있다. 예를 들어, 피분석물 mRNA의 검출을 위한 시험관내 기법은 노던 혼성화 및 게놈 혼성화를 포함한다. 피분석물 단백질의 검출을 위한 시험관내 기법은 효소 결합 면역흡착 검정(ELISA), 웨스턴 블롯, 면역침전, 및 면역형광을 포함한다. 피분석물 게놈 DNA의 검출을 위한 시험관내 기법은 서던 혼성화를 포함한다.

[0223] 면역검정을 수행하기 위한 절차는 예를 들어 문헌["ELISA: Theory and Practice: Methods in Molecular Biology", Vol. 42, J. R. Crowther (Ed.) Human Press, Totowa, NJ, 1995]; ["Immunoassay", E. Diamandis and T. Christopoulos, Academic Press, Inc., San Diego, CA, 1996]; 및 ["Practice and Theory of Enzyme Immunoassays", P. Tijssen, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 1985]에 기술되어 있다. 또한, 피분석

물 단백질의 검출을 위한 생체내 기법은 표지된 항-피분석물 단백질 항체를 대상체 내로 도입하는 단계를 포함한다. 예를 들어, 항체는 대상체에서의 존재 및 위치가 표준 영상화 기법에 의해 검출될 수 있는 방사성 마커로 표지될 수 있다.

[0224] CLDN4 단백질(또는 이의 단편)에 대해 유도된 항체는 CLDN4 단백질의 국제화 및/또는 정량화와 관련하여 당업계에 알려진 방법에 사용될 수 있다(예를 들어, 적절한 생리학적 샘플 내의 CLDN4 단백질의 수준을 측정하는 데 사용하기 위해, 진단 방법에 사용하기 위해, 단백질의 영상화에 사용하기 위해 등). 주어진 실시형태에서, 항체 유래 항원 결합 도메인을 함유하는, CLDN4 단백질, 또는 이의 유도체, 단편, 유사체 또는 동족체에 특이적인 항체가 제약 활성 화합물(본원에서 "치료제"로 지칭됨)로서 이용된다.

[0225] CLDN4 단백질에 특이적인 본 발명의 항체는 면역침화성, 크로마토그래피 또는 면역침전과 같은 표준 기법에 의해 CLDN4 폴리펩티드를 단리하기 위해 사용될 수 있다. CLDN4 단백질(또는 이의 단편)에 대해 유도된 항체는 임상 평가 절차의 일부로서 조직 내의 단백질 수준을 모니터링하기 위해, 예를 들어 주어진 치료 요법의 효능을 결정하기 위해 진단적으로 사용될 수 있다.

[0226] 검출은 항체를 검출가능한 물질에 커플링시킴(즉, 물리적으로 연결함)으로써 용이하게 될 수 있다. 검출가능한 물질의 예는 다양한 효소, 보결분자단, 형광 물질, 발광 물질, 생물발광 물질, 및 방사성 물질을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 적합한 효소의 비제한적인 예는 홀스래디쉬 퍼옥시다제, 알칼리성 포스파타제, β-갈락토시다제, 또는 아세틸콜린에스테라제를 포함하고; 적합한 보결분자단 복합체의 예는 스트렙타비딘/비오틴 및 아비딘/비오틴을 포함하고; 적합한 형광 물질의 예는 움벨리페론, 플루오레세인, 플루오레세인 이소티오시아네이트, 로다민, 디클로로트리아지닐아민 플루오레세인, 단실 클로라이드 또는 피코에리트린을 포함하고; 발광 물질의 예는 루미놀을 포함하고; 생물발광 물질의 예는 루시페라제, 루시페린, 및 에쿠오린을 포함하고, 적합한 방사성 물질의 예는 ¹²⁵I, ¹³¹I, ³⁵S, ³²P 또는 ³H를 포함한다.

[0227] 스크리닝 방법

[0228] 본 발명은 CLDN4 활성을 조정하거나 달리 방해하는 조정제, 즉, 후보 또는 시험 화합물 또는 작용제(예를 들어, 펩티드, 펩티드모방체, 소분자 또는 다른 약물)를 확인하기 위한 방법(본원에서 "스크리닝 검정"으로도 지칭됨)을 제공한다. 또한, 암을 치료하는 데 유용한 화합물을 확인하는 방법이 제공된다. 본 발명은 또한 본원에 기술된 스크리닝 검정을 사용하여 확인된 화합물을 포함한다.

[0229] 예를 들어, 본 발명은 CLDN4 발현 및/또는 활성을 조정하는 후보 또는 시험 화합물을 스크리닝하기 위한 검정을 제공한다. 본 발명의 시험 화합물은 다음을 포함하지만 이에 제한되지 않는, 당업계에 알려진 조합적 라이브러리 방법에서 다수의 접근법 중 임의의 것을 사용하여 수득될 수 있다: 생물학적 라이브러리; 공간적으로 다루어질 수 있는 병렬 고체 상 또는 용액 상 라이브러리; 디콘블루션을 필요로 하는 합성 라이브러리 방법; "1-비드 1-화합물" 라이브러리 방법; 및 친화도 크로마토그래피 선택을 사용한 합성 라이브러리 방법. 생물학적 라이브러리 접근법은 펩티드 라이브러리에 제한되는 반면, 다른 4가지 접근법은 펩티드, 비-펩티드 올리고머 또는 화합물의 소분자 라이브러리에 적용가능하다. (예를 들어, 문헌[Lam, 1997. Anticancer Drug Design 12: 145] 참조).

[0230] 본원에서 사용되는 바와 같이 "소분자"는 약 5 kD 미만, 가장 바람직하게는 약 4 kD 미만의 분자량을 갖는 조성을 지칭할 수 있다. 소분자는 예를 들어 핵산, 펩티드, 폴리펩티드, 펩티드모방체, 탄수화물, 지질 또는 다른 유기 또는 무기 분자일 수 있다. 진균, 박테리아, 또는 조류 추출물과 같은 화학적 및/또는 생물학적 혼합물의 라이브러리는 당업계에 알려져 있으며, 본 발명의 임의의 검정으로 스크리닝될 수 있다.

[0231] 분자 라이브러리의 합성을 위한 방법의 예는 당업계에서, 예를 들어 문헌[DeWitt, et al., 1993. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90: 6909]; [Erb, et al., 1994. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 91: 11422]; [Zuckermann, et al., 1994. J. Med. Chem. 37: 2678]; [Cho, et al., 1993. Science 261: 1303]; [Carrell, et al., 1994. Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 33: 2059]; [Carell, et al., 1994. Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 33: 2061]; 및 [Gallop, et al., 1994. J. Med. Chem. 37: 1233]에서 발견될 수 있다.

[0232] 화합물의 라이브러리는 용액 중에서(예를 들어, 문헌[Houghten, 1992. Biotechniques 13: 412-421] 참조), 또는 비드 상에서(문헌[Lam, 1991. Nature 354: 82-84] 참조), 칩(문헌[Fodor, 1993. Nature 364: 555-556] 참조), 박테리아(미국 특허 번호 5,223,409 참조), 포자(미국 특허 번호 5,233,409 참조), 플라즈미드(문헌[Cull, et al., 1992. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 1865-1869] 참조) 상에서 또는 파지 상에서(문헌[Scott and Smith, 1990. Science 249: 386-390]; [Devlin, 1990. Science 249: 404-406]; [Cwirla, et al., 1990.

Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87: 6378-6382]; [Felici, 1991. J. Mol. Biol. 222: 301-310]; 및 미국 특허 번호 5,233,409 참조.) 제시될 수 있다.

- [0233] 한 실시형태에서, 후보 화합물은 항체-항원 복합체에 도입되고, 후보 화합물이 항체-항원 복합체를 파괴하는지의 여부를 결정하며, 여기서 이 복합체의 파괴는 후보 화합물이 CLDN4 활성을 조정함을 나타낸다.
- [0234] 또 다른 실시형태에서, 적어도 하나의 단클론 항체에 노출된 적어도 하나의 CLDN4 단백질이 제공된다. 항체-항원 복합체의 형성이 검출되고, 하나 이상의 후보 화합물이 복합체에 도입된다. 항체-항원 복합체가 하나 이상의 후보 화합물의 도입 후에 파괴되는 경우, 후보 화합물은 암 또는 증식성 질환 또는 장애를 치료하는 데 유용하다.
- [0235] 항체-항원 복합체를 방해하거나 파괴하는 시험 화합물의 능력의 결정은, 예를 들어 시험 화합물을 방사성 동위원소 또는 효소 표지와 커플링시켜 항원 또는 이의 생물학적 활성 부분에 대한 시험 화합물의 결합이 복합체에서 표지된 화합물을 검출함으로써 결정될 수 있도록 함으로써 달성될 수 있다. 예를 들어, 시험 화합물은 125r, 35 S, 14C, 또는 3H로 직접적으로 또는 간접적으로 표지될 수 있으며, 방사성 동위원소는 방사성방출의 직접적 카운팅 또는 섬광 계수에 의해 검출된다. 대안적으로, 시험 화합물은 예를 들어 홀스래디쉬 퍼옥시다제, 알칼리성 포스파타제, 또는 루시페라제로 효소적으로 표지될 수 있고, 효소 표지는 적절한 기질이 산물로 전환되는 것을 결정함으로써 검출된다.
- [0236] 한 실시형태에서, 검정은 항체-항원 복합체를 시험 화합물과 접촉시키는 단계 및 항원과 상호작용하거나 달리 기존의 항체-항원 복합체를 파괴하는 시험 화합물의 능력을 결정하는 단계를 포함한다. 이 실시형태에서, 항원과 상호작용하고/하거나 항체-항원 복합체를 파괴하는 시험 화합물의 능력을 결정하는 단계는 항체와 비교하여 항원 또는 이의 생물학적으로 활성인 부분에 우선적으로 결합하는 시험 화합물의 능력을 결정하는 단계를 포함한다.
- [0237] 또 다른 실시형태에서, 검정은 항체-항원 복합체를 시험 화합물과 접촉시키는 단계 및 항체-항원 복합체를 조정하는 시험 화합물의 능력을 결정하는 단계를 포함한다. 항체-항원 복합체를 조정하는 시험 화합물의 능력의 결정은 예를 들어 시험 화합물의 존재 하에서 항체에 결합하거나 항체와 상호작용하는 항원의 능력을 결정함으로써 달성될 수 있다.
- [0238] 당업자는 본원에 개시된 스크리닝 방법 중 임의의 것에서, 항체는 CLDN4 항체일 수 있음을 인식할 것이다. 추가로, 항원은 CLDN4 단백질 또는 이의 부분일 수 있다.
- [0239] 본원에 개시된 스크리닝 방법은 세포-기반 검정 또는 무세포 검정으로서 수행될 수 있다. CLDN4 단백질의 막-결합된 형태를 포함하는 무세포 검정의 경우, 단백질의 막-결합된 형태가 용액 중에 유지되도록 가용화제를 이용하는 것이 바람직할 수 있다. 이러한 가용화제의 예는 비이온성 세정제, 예컨대 n-옥틸글루코시드, n-도데실글루코시드, n-도데실말토시드, 옥타노이 1-N-메틸글루카미드, 데카노일-N-메틸글루카미드, Triton® X-100, Triton® X-114, Thesit®, 이소트리데시폴리(에틸렌 글리콜 에테르)n, N-도데시 1--N,N-디메틸 1-3-암모니오-1-프로판 술포네이트, 3-(3-콜라미도프로필)디메틸암미니올-1-프로판 술포네이트(CHAPS), 또는 3-(3-콜라미도프로필)디메틸암미니올-2-히드록시-1-프로판 술포네이트(CHAPSO)를 포함한다.
- [0240] 하나 초과 실시형태에서, 후보 화합물의 도입 후 하나 또는 둘 다의 복합체화되지 않은 형태로부터의 복합체화된 형태의 분리를 용이하게 하기 위해뿐만 아니라 검정의 자동화를 수용하기 위해 항체 또는 항원을 고정화하는 것이 바람직할 수 있다. 후보 화합물의 존재 및 부재 하에서 항체-항원 복합체의 관찰은 반응물을 함유하기에 적합한 임의의 용기에서 달성될 수 있다. 이러한 용기의 예는 마이크로타이터 플레이트, 시험관, 및 미세원심분리기 튜브를 포함한다. 한 실시형태에서, 단백질 중 하나 또는 둘 다가 기질에 결합되도록 하는 도메인을 추가하는 용합 단백질이 제공될 수 있다. 예를 들어, GST-항체 용합 단백질 또는 GST-항원 용합 단백질을 글루타티온 세파로스 비드(Sigma Chemical, 미국 미주리주 세인트루이스 소재) 또는 글루타티온 유도체화된 마이크로타이터 플레이트 상에 흡착한 후, 이를 시험 화합물과 조합할 수 있고, 혼합물을 복합체 형성에 도움이 되는 조건 하에서(예를 들어, 염 및 pH에 대해 생리학적 조건에서) 인큐베이션한다. 인큐베이션 후, 비드 또는 마이크로타이터 플레이트 웰을 세척하여 임의의 결합되지 않은 성분을 제거하고, 비드의 경우 매트릭스는 고정되고 복합체는 직접적으로 또는 간접적으로 결정된다. 대안적으로, 복합체는 매트릭스로부터 분리될 수 있고, 항체-항원 복합체 형성 수준은 표준 기법을 사용하여 결정될 수 있다.
- [0241] 매트릭스 상에 단백질을 고정화하기 위한 다른 기법은 또한 본 발명의 스크리닝 검정에서 사용될 수 있다. 예를 들어, 항체 또는 항원(예를 들어, CLDN4 단백질)은 비오틴과 스트렙타비딘의 접합을 이용하여 고정화될 수

있다. 비오틴닐화 항체 또는 항원 분자는 당업계에 잘 알려진 기법(예를 들어, 비오틴닐화 키트, Pierce Chemicals, 미국 일리노이주 록포드 소재)을 사용하여 비오틴-NHS(N-히드록시-숙신이미드)로부터 제조되고, 스트렙타비딘-코팅된 96 웰 플레이트(Pierce Chemical)의 웰에 고정화될 수 있다. 대안적으로, 관심 항체 또는 항원과 반응성이지만 관심 항체-항원 복합체의 형성을 방해하지 않는 다른 항체가 플레이트의 웰로 유도체화될 수 있고, 결합되지 않은 항체 또는 항원은 항체 접합에 의해 웰에 포획될 수 있다. GST-고정화된 복합체에 대해 본원에 기술된 것 외에도, 이러한 복합체를 검출하는 방법은 항체 또는 항원과 반응성인 이러한 다른 항체를 사용한 복합체의 면역검출을 포함한다.

[0242] 본 발명은 추가로 본원에 기술된 스크리닝 검정 중 임의의 것에 의해 확인된 새로운 작용제 및 본원에 기술된 바와 같은 치료를 위한 이의 용도에 관한 것이다.

[0243] 키메라 항원 수용체(CAR) 세포 치료법

[0244] 세포 치료법, 예컨대 키메라 항원 수용체(CAR) 세포 치료법이 또한 본원에 제공된다. 예를 들어, 세포는 CAR T 세포 또는 CAR NK 세포일 수 있다.

[0245] CAR 세포 치료법은 예를 들어 T 세포 또는 NK 세포 상의 CAR의 외인성 발현에 의해 종양 세포를 살해하도록 환자의 T 세포 및/또는 NK 세포를 재지시한다. CAR은 항체의 항원 인식 도메인을 T 세포 수용체 및 공동수용체 또는 NK 세포 수용체의 세포내 신호전달 도메인에 연결하는 막 스페닝 융합 단백질일 수 있다.

[0246] 한 실시형태에서, 단일특이성 CAR 세포가 제공된다. 예를 들어, 본원에 기술된 항-CLDN4 항체는 CAR 세포에 대한 표적화 모이어티로서 사용될 수 있다. 예를 들어, CLDN4 항체는 그의 항원에 대해 낮은 친화도를 갖지만 높은 결합력을 가질 수 있다. 또 다른 예에서, CLDN4 항체는 그의 항원에 대해 높은 친화도를 갖지만 낮은 결합력을 가질 수 있다. 더 적은 결합 부위를 갖는 항체는 높은 친화도 및 낮은 결합력을 가질 수 있는 반면, 더 큰 결합 부위를 갖는 항체는 낮은 친화도 및 높은 결합력을 가질 수 있다.

[0247] 또 다른 실시형태에서, 이중특이성(또는 이중 표적화) CAR 세포가 제공된다. 또 다른 실시형태에서, CAR 세포는 키메라 항원 수용체를 포함하는 조작된 세포이며, 여기서 키메라 항원 수용체는 제1 항원에 특이적인 세포외 리간드 결합 도메인 및 암 세포의 표면 상의 제2 항원을 포함하고, 제1 항원은 CLDN4가 아닌 항원을 포함하고, 제2 항원은 CLDN4를 포함한다.

[0248] 실시형태에서, 본원에 기술된 항-CLDN4 항체 또는 CLDN4 융합 단백질은 강화된 CAR 세포 치료법을 위한 페이로드로서 사용될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 항-CLDN4 항체를 분비할 수 있는(또는 대안적으로 분비될 본원에 기술된 항-CLDN4 항체를 발현하도록 조작된) 적합한 세포가 사용될 수 있다. 분비될 항-CLDN4 "페이로드"는 예를 들어 미니바디, scFv, IgG 분자, 이중특이성 융합 분자, 및 본원에 기술된 바와 같은 다른 항체 단편일 수 있다. 접촉 또는 조작 시에, 본원에 기술된 세포는 이어서 당업자에게 알려진 주입 치료법에 의한 치료를 필요로 하는 환자에게 도입될 수 있다.

[0249] 실시형태에서, 환자는 암과 같은 본원에 기술된 바와 같은 CLDN4 연관 질환 또는 장애를 가질 수 있다. 세포(예를 들어, T 세포)는 예를 들어 T 림프구, CD4+ T 세포, CD8+ T 세포, 또는 이들의 조합일 수 있지만, 이에 제한되지 않는다. 본 발명의 양태에서 유용한 예시적인 CAR 및 CAR 팩토리는 예를 들어 PCT/US2015/067225 및 PCT/US2019/022272(이들 각각은 그 전문이 본원에 참조로 포함됨)에 개시된 것들을 포함한다. 한 실시형태에서, 본원에서 논의된 CLDN4 항체는 다중특이성 항체의 구축에, 또는 CAR-T 세포 또는 CAR NK 세포에 대한 페이로드로서 사용될 수 있다. 예를 들어, 한 실시형태에서, 본원에서 논의된 항-CLDN4 항체는 CAR의 표적화를 위해(즉, 표적화 모이어티로서) 사용될 수 있다. 또 다른 실시형태에서, 본원에서 논의된 항-CLDN4 항체는 표적화 모이어티로서 사용될 수 있고, 상이한 에피토프를 표적화하는 상이한 CLDN4 항체가 페이로드로서 사용될 수 있다. 또 다른 실시형태에서, 페이로드는 면역조절 항체 페이로드일 수 있다.

[0250] 고품 종양은 CAR-T 치료법에 대한 고유한 난제를 제공한다. 고품 종양에서 CAR-T 유효성에 대한 일부 장벽은 이중 항원 발현, 불충분한 조직 귀소, 활성화, 지속성, 및 면역억제성 종양 미세환경을 포함한다. 혈액암과는 달리, 종양 연관 표적 단백질은 종양과 건강한 조직 사이에서 과발현되어 건강한 조직의 온-타겟/오프-종양 T 세포 살해를 초래한다. 또한, 종양 미세환경(TME)에서의 면역 억제는 종양의 살해를 향한 CAR-T 세포의 활성화를 제한한다. 이러한 접촉 또는 조작 시에, 세포는 이어서 당업자에게 알려진 주입 치료법에 의한 치료를 필요로 하는 암 환자에게 도입될 수 있다. 암 환자는 본원에 개시된 바와 같은 임의의 유형의 암을 가질 수 있다. 세포(예를 들어, T 세포)는 예를 들어 종양-침윤 T 림프구, CD4+ T 세포, CD8+ T 세포, 또는 이들의 조합일 수 있지만, 이에 제한되지 않는다.

[0251]

실시형태에서, CAR 세포(즉, CAR T 세포 또는 CAR NK 세포)는 렌티바이러스 시스템(형질도입을 통해), 레트로바이러스 시스템(형질감염(전기천공)을 통해), 및 트랜스포존 시스템(PiggyBac을 통해)을 사용하여 당업계에 알려진 방법에 따라 생성될 수 있다. CAR-T의 생성에 사용될 수 있는 페이로드에 대한 프로모터에 유용한 것은 예를 들어 구성적 프로모터(여기서 프로모터는 CAR-T에 대한 것과 동일함, 예컨대 EF1a 이어서 IRES 또는 2A); 유도성 프로모터(여기서 프로모터는 CAR-T에 대한 프로모터와 상이함, 예컨대 NFAT, IL-2 prom); 및 유전자 조작된 프로모터(예컨대 사이토카인의 "넉 인" CLDN4 유전자좌 및/또는 내인성 프로모터의 제어 하에 있는 프로모터)를 포함한다. 한 실시형태에서, 본원에서 논의된 CLDN4 항체 또는 CLDN4 융합 단백질은 다중특이성 항체의 구축에 또는 CAR 세포에 대한 페이로드로서 사용될 수 있다. 예를 들어, 한 실시형태에서, 본원에서 논의된 항-CLDN4 항체 또는 CLDN4 융합 단백질은 CAR의 표적화를 위해(즉, 표적화 모이어티로서) 사용될 수 있다. 한 실시형태에서, 본원에서 논의된 항-CLDN4 항체 또는 CLDN4 융합 단백질은 CAR 세포에 의해 분비될 페이로드로서 사용될 수 있다. 또 다른 실시형태에서, 본원에서 논의된 항-CLDN4 항체 또는 CLDN4 융합 단백질은 표적화 모이어티로서 사용될 수 있으며, 상이한 에피토프를 표적화하는 상이한 CLDN4 항체가 페이로드로서 사용될 수 있다. 또 다른 실시형태에서, 페이로드는 면역조절 항체 페이로드일 수 있다. 일부 실시형태에서, CAR-T 조성물에 사용하기 위한 본원에 기술된 바와 같은 CLDN4 항체 또는 CLDN4 융합 단백질은 고친화도 CLDN4 항체가 아니다(예를 들어, 따라서 항체는 그의 CLDN4 표적에 강하게 결합하지 않는다). 예를 들어, 본원에 기술된 CLDN4 항체 또는 CLDN4 융합 단백질은 CAR 세포에 의해 분비되는 페이로드로서 사용될 수 있으며, 2개의 표적화 모이어티(예를 들어, 종양 연관 표면 항원)가 특정 암에 대해 선택된다. 종양 연관 표면 항원의 비제한적인 예는 ErbB2(HER2/neu), 암배아 항원(CEA), 상피 세포 부착 분자(EpCAM), 표피 성장 인자 수용체(EGFR), MUC1, CLDN4, CD19, CD20, CD30, CD40, CD22, RAGE-1, MN-CAIX, RET1, RET2(AS), 전립선 특이적 항원(PSA), TAG-72, PAP, p53, Ras, 프로스테인, PSMA, 서비린, 9D7, 전립선 암종 종양 항원-1(PCTA-1), GAGE, MAGE, 메소텔린, β-카테닌, TGF-β RII, BRCA1/2, SAP-1, HPV-E6, HPV-E7을 포함한다(또한, 추가의 종양 연관 표면 항원에 대해, 그 전문이 참조로 포함되는 PCT/US2015/067225 및 PCT/US2019/022272 참조). 예시적인 강화된 CAR-T 세포는 하기 표에 열거되어 있다.

CART	페이로드	형식	프로모터	간행물
PSMA	DN-TGFb			Molecular Therapy 26: 1855 (2018)
GD2	cJun	cDNA		Nature 576: 293(2019)
페브로넥틴 PD-L1	CD47 PD-L1 CTLA-4	VHH		Cancer Immunol Res. 8:518-529 (2020)
GPC3	IL-12			J Immunol 2019; 203:198
CD20	PD-1			Cancer Science. 2019;110:3079
CD19 Muc16	PD-1			nature biotechnology 36:847 (2018)
CD19 Muc16	IL-18			Cell Reports 23:2130 (2018)
CD19 Muc16	IL-12	융합	IRES	Scientific REPOrTS 7: 10541 (2017)
CD19	PD-1	scFv	P2A	Clin Cancer Res 23:6982 (2017)
CAE	IL-18 IL-12		NFAT IL-2	Cell Reports 21:3205 (2017)
VEGF2	IL-12			Clin Cancer Res 18:1672 (2012)

[0252]

[0253]

당업자는 CAR 세포가 당업자에게 알려진 세포 공급원으로부터 생성될 수 있음을 인식할 것이다. 비제한적인 예는 T 세포, NK 세포, iPSC-유래 세포(예를 들어, iPSC-유래 T 세포 및/또는 iPSC-유래 NK 세포), 말초 혈액 세포(예를 들어, 말초 혈액 단핵 세포), 제대혈 세포, 세포주(예를 들어, NK92 세포주), 인간 배아 줄기 세포(hESC) 및 CD34+ 조혈 전구 세포(HPC)를 포함한다. 예를 들어, 문헌[Lu, Hui, et al. "From CAR-T cells to

CAR-NK cells: a developing immunotherapy method for hematological malignancies." *Frontiers in Oncology* (2021): 3151]을 참조한다.

- [0254] 키메라 B 세포 수용체
- [0255] 키메라 B 세포 수용체로 불리는 변형된 B 세포 수용체, 예컨대 특정 질환 연관 항원에 대한 높은 친화도에 의해 이전에 선택된 항체 또는 항체 단편을 함유하는 B 세포 수용체는 질환에 대한 강력한 새로운 접근법이다. B 세포는 전문적인 항원 제시 세포로서 역할을 하기 때문에, 이들은 MHC 부류 II 분자 상에 항원을 프로세싱하고 제시하여, 종양의 면역 세포 인식을 향상시키고 신생항원 확산을 보조할 수 있다. 면역 기억, 키메라 항체 신호전달 및 분비(CASS) B 세포의 핵심 성분은 동시에 광범위한 면역 세포를 동원하고 종양 침윤 림프구 고갈을 방지시켜, 종양 전이 및 재발에 대해 보호하는 강력한 평생 동안의 감시 프로그램을 제공할 것이다. 실시형태에서, B 세포는 키메라, 비-천연이고, 적어도 부분적으로 인간에 의해 조작된 수용체를 포함할 수 있다. 특정한 경우에, 조작된 키메라 B 세포 수용체는 1, 2, 3, 4개 이상의 성분을 가지며, 일부 실시형태에서, 하나 이상의 성분은 하나 이상의 항원-포함 세포에 대한 B 세포의 표적화 또는 결합을 용이하게 한다.
- [0256] 본 발명의 양태는 표면 상에 키메라 B 세포 수용체를 발현하고 보유하도록 변형된 유전자 조작된 B 세포를 포함한다. 실시형태에서, 유전자 변형된 B 세포는 CLDN4와 같은 하나의 항원을 표적화하는 단일 키메라 B 세포 수용체, 또는 2개 이상의 항원을 표적화하는 단일 키메라 B 세포 수용체(예를 들어, 이중특이성 키메라 B 세포 수용체, 또는 다중특이성 키메라 B 세포 수용체)를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 세포는 분할 키메라 B 세포 수용체, 예컨대 상이한 공동자극 도메인을 갖는 B 세포 표면 상에 발현되는 2개의 상이한 scFv를 포함한다. 추가로, 일부 실시형태는 미세-조정된 키메라 B 세포 수용체를 포함한다.
- [0257] 실시형태에서, 키메라 B 세포 수용체는 세포외 도메인, 막횡단 도메인, 및 세포내 신호전달 도메인을 포함하며; 이에 의해 폴리펩티드는 함께 어셈블리되어 키메라 B 세포 수용체를 형성한다.
- [0258] 예를 들어, 세포외 리간드 결합 도메인은 질환 상태와 연관된 표적 세포 상의 세포 표면 마커로서 작용하는 CLDN4와 같은 리간드를 인식하도록 선택될 수 있다. 예를 들어, 질환 상태는 암일 수 있고, 표적 리간드는 암 연관 항원, 예컨대 CLDN4일 수 있다.
- [0259] 실시형태에서, 세포외 리간드 결합 도메인은 표적의 항원에 대한 항체, 예컨대 본원에 기술된 항-CLDN4 항체로부터 유래된 항원 결합 도메인 또는 항원 인식 도메인을 포함할 수 있다. 실시형태에서, 세포외 리간드 결합 도메인은 본원에 기술된 항체 또는 이의 단편을 포함할 수 있다.
- [0260] 실시형태에서, 막횡단 도메인은 줄기 영역을 포함한다. 줄기 영역은 자연 발생 분자의 전부 또는 일부로부터, 예컨대 CD8, CD4 또는 CD28의 세포외 영역의 전부 또는 일부로부터, 또는 항체 불변 영역의 전부 또는 일부(예컨대 IgG 항체에 대해 CH1, CH2, CH3, 또는 CH2와 CH3 둘 다, 또는 IgM 항체에 대해 CH1, CH2, CH3, CH4, 또는 이들의 임의의 조합)로부터 유래될 수 있다. 다른 실시형태에서, 줄기 영역은 자연 발생 줄기 서열에 상응하는 합성 서열일 수 있거나, 전적으로 합성 줄기 서열일 수 있다. 한 실시형태에서, 상기 줄기 영역은 인간 CD8 알파쇄의 일부이다.
- [0261] 본 발명의 키메라 B 세포 수용체의 신호 전달 도메인 또는 세포내 신호전달 도메인은 세포외 리간드 결합 도메인이 표적에 결합한 후 면역 세포의 활성화 및 면역 반응을 초래하는 세포내 신호전달을 담당한다. 달리 말하면, 신호 전달 도메인은 키메라 B 세포 수용체가 발현되는 B 세포의 정상적인 기능 중 적어도 하나의 활성화를 담당한다. 따라서, 용어 "신호 전달 도메인"은 세포가 특수화된 기능, 예컨대 예로서 Lyn 및 Syk의 조기 활성화 및 NFAT 및 NF- κ B의 후기 활성화를 수행하도록 유도하는 단백질의 부분을 지칭할 수 있다.
- [0262] 키메라 B 세포 수용체는 천연 막횡단 및 세포내 도메인을 포함할 수 있다. 천연 B 세포에서, B 세포 수용체의 결속은 세포내 도메인의 신속한 티로신 인산화 및 칼슘 이온 분극을 초래하여, NFAT 및 NF- κ B의 하류 활성화를 초래한다. 본 발명자들은 분비 단백질의 발현을 유도하기 위해 NFAT/NF- κ B 반응 요소를 사용하여 암과 같은 질환 상태와 연관된 항원에 의해 활성화될 유도성 발현 시스템을 설계하였다.
- [0263] 적절한 막횡단 폴리펩티드의 구별되는 특징은 B 세포와 같은 면역 세포의 표면에서 발현되는 능력, 및 미리 정의된 표적 세포에 대한 면역 세포의 세포 반응을 유도하기 위해 함께 상호작용하는 능력을 포함한다. 세포외 리간드 결합 도메인 및/또는 신호 전달 도메인을 포함하는 키메라 B 세포 수용체의 상이한 막횡단 폴리펩티드는 함께 상호작용하여 표적 리간드와의 결합 후 신호 전달에 참여하고 면역 반응을 유도한다. 막횡단 도메인은 자연으로부터 또는 합성 공급원으로부터 유래될 수 있다. 막횡단 도메인은 임의의 막-결합된 또는 막횡단 단백질

로부터 유래될 수 있다.

치료 방법

- [0264] 치료 방법
- [0265] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "치료하다" 또는 "치료"는 치료적 처치 및 예방적 또는 방지적 조치 둘 다를 지칭하며, 여기서 목적은 원하지 않는 생리학적 변화 또는 장애, 예컨대 암의 진행을 예방하거나 지연시키는 (경감시키는) 것이다. 유리한 또는 바람직한 임상 결과는 검출가능하든지 검출불가능하든지 관계없이, 증상의 완화, 질환 정도의 감소, 질환의 안정화된(즉, 악화되지 않는) 상태, 질환 진행의 지연 또는 둔화, 질환 상태의 개선 또는 경감, 및 (부분적이든지 전체적이든지) 관해를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. "치료"는 치료를 받지 않는 경우 예상되는 생존과 비교하여 연장된 생존을 지칭할 수 있다. 치료를 필요로 하는 대상체는 병태 또는 장애를 이미 갖는 대상체뿐만 아니라 병태 또는 장애를 갖기 쉬운 대상체 또는 병태 또는 장애가 예방되어야 하는 대상체를 포함한다.
- [0266] 본 발명은 암(예를 들어, 조기 검출 암 바이오마커가 이러한 대상체에서 확인되는 경우), 또는 다른 세포 증식 관련 질환 또는 장애의 위험이 있는(또는 이에 감수성인) 대상체를 치료하는 예방적 및 치료적 방법 둘 다를 제공한다. 이러한 질환 또는 장애는 예를 들어 CLDN4의 비정상적 발현 및/또는 CLDN4와 관련된 세포 신호전달 경로의 비정상적 활성화와 연관된 질환 또는 장애를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 이러한 질환 또는 장애는 CLDN 연관 질환 또는 장애에 포함된다. 예를 들어, 상기 방법은 암의 증상을 치료, 예방 또는 완화하기 위해 사용된다. 실시형태에서, 상기 방법은 고형 종양의 증상을 치료, 예방 또는 완화하기 위해 사용된다. 본원에 기술된 조성물에 의해 치료될 수 있는 다른 종양의 비제한적인 예는 폐암, 신장암, 난소암, 전립선암, 결장암, 자궁경부암, 자궁암, 뇌암, 피부암, 간암, 췌장암, 또는 위암을 포함한다. 추가로, 본 발명의 방법은 백혈병 및 림프종과 같은 혈액암을 치료하는 데 사용될 수 있다. 대안적으로, 상기 방법은 전이된 암의 증상을 치료, 예방 또는 완화하기 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, 치료 또는 예방될 수 있거나 증상이 완화될 수 있는 암은 B 세포 만성 림프구성 백혈병(CLL), 비소세포 폐암, 흑색종, 난소암, 림프종, 또는 신세포암을 포함한다. 또한 치료 또는 예방될 수 있거나 증상이 완화될 수 있는 암은 여과액 중 돌연변이 부담 및 WBC가 높은 고형 종양을 포함한다.
- [0267] 따라서, 한 양태에서, 본 발명은 본 발명의 단클론 항체, scFv 항체 또는 이중특이성 항체를 대상체에게 투여함으로써 대상체에서 증상 암 또는 세포 증식성 질환 또는 장애를 예방, 치료, 또는 완화하는 방법을 제공한다. 예를 들어, 항-CLDN4 항체는 치료적 유효량으로 투여될 수 있다.
- [0268] 암 또는 세포 증식 관련 질환 또는 장애에 대한 위험이 있는 대상체는 암의 가족력을 갖는 환자 또는 알려진 또는 의심되는 암 유발제에 노출된 대상체를 포함할 수 있다. 예방제의 투여는 질환이 예방되거나, 대안적으로, 이의 진행이 지연되도록 암이 발현되기 전에 일어날 수 있다.
- [0269] 또 다른 양태에서, 종양 세포 성장은 세포를 본 발명의 항-CLDN4 항체와 접촉시킴으로써 억제된다. 세포는 CLDN4를 발현하는 임의의 세포일 수 있다.
- [0270] 본 발명은 또한 만성 또는 급성 바이러스, 박테리아 또는 기생충 감염의 위험이 있는(또는 이에 감수성인) 대상체를 치료하는 예방적 및 치료적 방법 둘 다를 제공한다. 본 발명은 또한 T 세포 고갈과 연관된 질환 또는 장애 또는 병태의 위험 또는 T 세포 고갈의 발병 위험이 있는 대상체를 치료하는 예방적 및 치료적 방법 둘 다를 위한 치료적 방법을 제공한다. 본 발명은 또한 T 세포 고갈과 연관된 질환 또는 장애 또는 병태의 위험 또는 T 세포 고갈의 발병 위험이 있는 대상체를 치료하는 예방적 및 치료적 방법 둘 다를 위한 치료적 방법을 제공한다. 이러한 질환 또는 장애는 HIV, AIDS, 및 만성 또는 급성 박테리아, 바이러스 또는 기생충 감염을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 다른 이러한 만성 감염은 예를 들어 B형 간염 바이러스(HBV), C형 간염 바이러스(HCV), 단순 헤르페스 바이러스 1(HSV-1), 에이치. 파일로리(*H. pylori*), 또는 톡소플라스마 곤디이(*Toxoplasma gondii*)에 야기되는 것들을 포함한다. 포함되는 다른 급성 감염은 예를 들어 본원에 기술된 바와 같은, 그람-양성 박테리아, 그람-음성 박테리아, 원생동물, 또는 진균과 같은 미생물에 의해 야기되는 것들이다.
- [0271] 또한, 항원에 대한 면역 반응을 증가시키거나 향상시키는 방법이 본 발명에 포함된다. 면역 반응은 대상체에게 본 발명의 단클론 항체, scFv 항체, 또는 이중특이성 항체를 투여함으로써 증가되거나 향상된다. 면역 반응은 예를 들어 항원 특이적 T 이펙터 기능을 증강시킴으로써 증강된다. 항원은 바이러스(예를 들어, HIV), 박테리아, 기생충 또는 종양 항원이다. 면역 반응은 자연 면역 반응이다. 자연 면역 반응은 감염의 결과인 면역 반응을 의미한다. 감염은 만성 감염이다. 항원에 대한 면역 반응의 증가 또는 향상은 당업계에 알려진 다수의 방법에 의해 측정될 수 있다. 예를 들어, 면역 반응은 다음 중 어느 하나를 측정함으로써 측정될 수 있다: T 세

포 활성화, T 세포 증식, T 세포 활성화, 이펙터 사이토카인의 생성, 및 T 세포 전사 프로파일. 대안적으로, 면역 반응은 백신접종으로 인해 유도된 반응이다.

[0272] 따라서, 또 다른 양태에서, 본 발명은 본 발명의 단클론 항체 또는 scFv 항체 및 백신을 대상체에 투여함으로써 백신 효능을 증가시키는 방법을 제공한다. 항체 및 백신은 순차적으로 또는 공동으로 투여된다. 백신은 종양 백신, 박테리아 백신 또는 바이러스 백신이다.

[0273] 조합적 방법

[0274] 본원에 기술된 바와 같은 본 발명의 조성물은 화학치료제와 조합으로 투여될 수 있다. 본 발명의 조성물과 함께 투여될 수 있는 화학치료제는 항생제 유도제(예를 들어, 독소루비신, 블레오마이신, 다우노루비신, 및 닥티노마이신); 항에스트로겐(예를 들어, 타목시펜); 항대사물(예를 들어, 플루오로우라실, 5-FU, 메토틱세이트, 플록수리딘, 인터페론 알파-2b, 글루탐산, 폴리카마이신, 메르캅토피린, 및 6-티오구아닌); 세포독성제(예를 들어, 카르무스틴, BCNU, 로무스틴, CCNU, 시토신 아라비노시드, 시클로포스파미드, 에스트라무스틴, 히드록시우레아, 프로카르바진, 미토마이신, 부솔판, 시스-플라틴, 및 빈크리스틴 술페이트); 호르몬(예를 들어, 메드록시프로게스테론, 에스트라무스틴 포스페이트 나트륨, 에티닐 에스트라디올, 에스트라디올, 메게스트롤 아세테이트, 메틸테스토스테론, 디에틸stil베스트롤 디포스페이트, 클로로트리아니센, 및 테스토라톤); 질소 머스타드 유도제(예를 들어, 메팔렌, 코람부실, 메클로레타민(질소 머스타드) 및 티오테파); 스테로이드 및 조합(예를 들어, 베타메타손 나트륨 포스페이트); 및 기타(예를 들어, 디카르바진, 아스파라기나제, 미토탄, 빈크리스틴 술페이트, 빈블라스틴 술페이트, 및 에토포시드)를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0275] 추가 실시형태에서, 본원에 기술된 바와 같은 본 발명의 조성물은 사이토카인과 조합으로 투여될 수 있다. 조성물과 함께 투여될 수 있는 사이토카인은 IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, 항-CD40, CD40L, 및 TNF- α 를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0276] 추가 실시형태에서, 본원에 기술된 조성물은 예를 들어 방사선 치료법과 같은 다른 치료적 또는 예방적 요법과 조합으로 투여될 수 있다.

[0277] 일부 실시형태에서, 본원에 기술된 조성물은 다른 면역치료제와 조합으로 투여될 수 있다. 면역치료제의 비제한적인 예는 심투주막, 아바코보막, 아데카투무막, 아푸투주막, 알렘투주막, 알투모막, 아마투시막, 아나투모막, 아르시투모막, 바비투시막, 백투모막, 베바시주막, 비바투주막, 블리나투모막, 브렌투시막, 칸투주막, 카투막소막, 세투시막, 시타투주막, 식수투무막, 클리바투주막, 코나투무막, 다라투무막, 드로지투막, 돌리고투막, 두시기투막, 테투모막, 다세투주막, 달로투주막, 에크로백시막, 엘로투주막, 엔시투시막, 에르투막소막, 에타라시주막, 파를레투주막, 피클라투주막, 피기투무막, 플란보투막, 푸투시막, 가니투막, 쟈투주막, 기렌투시막, 글렘바투무막, 이브리투모막, 이고보막, 임가투주막, 인다투시막, 이노투주막, 인테투무막, 이필리무막, 이라투무막, 라베투주막, 렉사투무막, 린투주막, 로르보투주막, 루카투무막, 마파투무막, 마투주막, 밀라투주막, 민레투모막, 미투모막, 목세투모막, 나르나투막, 나프투모막, 네시투무막, 니모투주막, 노페투모막, 오카라투주막, 오파투무막, 올라라투막, 오나투주막, 오포르투주막, 오레고보막, 파니투무막, 파르사투주막, 파트리투막, 켈투모막, 페르투주막, 핀투모막, 프리투무막, 라코투모막, 라드레투막, 릴로투무막, 리투시막, 로바투무막, 사투모막, 시브로투주막, 실투시막, 솔리토막, 타카투주막, 타플리투모막, 테나투모막, 테프로투무막, 티가투주막, 토시투모막, 트라스투주막, 투코투주막, 우블리투시막, 벨투주막, 보르세투주막, 보투무막, 잘루투무막, CC49, 및 3F8을 포함한다.

[0278] 본 발명은 CLDN4 단백질의 동일한 에피토프 또는, 대안적으로, CLDN4 단백질의 2개의 상이한 에피토프에 결합하는 2개의 항체를 투여함으로써 환자에서 암을 치료하는 방법을 제공한다. 대안적으로, 암은 CLDN4에 결합하는 제1 항체 및 CLDN4 이외의 단백질에 결합하는 제2 항체를 투여함으로써 치료될 수 있다. 다른 실시형태에서, 암은 CLDN4에 결합하고 CLDN4 이외의 단백질에 결합하는 이중특이성 항체를 투여함으로써 치료될 수 있다. 예를 들어, CLDN4 이외의 다른 단백질은 IIL-12, IL-12R, IL-2, IL-2R, IL-15, IL-15R, IL-7, IL-7R, IL-21, 또는 IL-21R을 포함할 수 있지만, 이에 제한되지 않는다. 예를 들어, CLDN4 이외의 다른 단백질은 종양 연관 항원이 고; CLDN4 이외의 다른 단백질은 또한 사이토카인일 수 있다. CLDN4 이외의 다른 단백질의 비제한적인 예는 CTLA-4, CXCR4, LAG-3, CD28, CD122, 4-1BB, TIM3, OX-40, OX40L, CD40, CD40L, LIGHT, ICOS, ICOSL, GITR, GITRL, TIGIT, CD27, VISTA, B7H3, B7H4, HEVM(또는 BTLA), CD47 및 CD73을 포함한다.

[0279] 일부 실시형태에서, 본 발명은 단독으로 또는 CLDN4 이외의 또 다른 단백질을 인식하는 추가 항체와 조합으로 항-PD-1 항체를 면역 반응을 일으키거나 증강시킬 수 있는 세포와 함께 투여하는 것을 제공한다. 예를 들어, 이

들 세포는 말초 혈액 단핵 세포(PBMC), 또는 PBMC에서 발견되는 임의의 세포 유형, 예를 들어 세포독성 T 세포, 대식세포, 및 자연 킬러(NK) 세포일 수 있다.

- [0280] 추가로, 본 발명은 CLDN4 단백질에 결합하는 항체, 및 항-신생물제, 예컨대 소분자, 성장 인자, 사이토카인, 또는 생체분자, 예컨대 펩티드, 펩티드모방체, 펩토이드, 폴리뉴클레오티드, 지질 유래 매개체, 소형 생물발생 아민, 호르몬, 신경펩티드, 및 프로테아제를 비롯한 다른 치료제의 투여를 제공한다. 소분자는 무기 분자 및 소형 유기 분자를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 적합한 성장 인자 또는 사이토카인은 IL-2, GM-CSF, IL-12, 및 TNF-알파를 포함한다. 소분자 라이브러리는 당업계에 알려져 있다. (문헌[Lam, Anticancer Drug Des., 12: 145, 1997] 참조.)
- [0281] 진단 결정
- [0282] 항-CLDN4 항체는 예를 들어 주어진 치료 및/또는 예방 요법의 효능을 결정하기 위한 임상 시험 절차의 일부로서 암의 발달 또는 진행을 모니터링하기 위해 진단적으로 사용될 수 있다.
- [0283] 일부 실시형태에서, 진단 목적을 위해, 본 발명의 항-CLDN4 항체는 예를 들어 암을 앓을 위험이 있거나 앓고 있는 대상체에서 암 세포를 검출하는 방법을 제공하기 위해, 검출가능한 모이어티에 연결된다.
- [0284] 검출가능한 모이어티는 항체 또는 단편에 직접적으로, 또는 예를 들어 형광 2차 항체를 사용하여 간접적으로 접합될 수 있다. 직접적 접합은 항체 또는 항체 단편에 대한, 예를 들어 형광단의 표준 화학적 커플링에 의해, 또는 유전자 조작을 통해 달성될 수 있다. 형광 또는 생물발광 단백질에 커플링된 항체 또는 항체 단편을 함유하는 키메라, 또는 융합 단백질이 구축될 수 있다. 예를 들어, 문헌[Casadei, et al, (Proc Natl Acad Sci U S A. 1990 Mar ;87(6):2047-51)]은 포유류 세포에서 에쿠오린의 융합 단백질과 항체 유전자를 발현할 수 있는 벡터 구축물을 제조하는 방법을 기술한다.
- [0285] 프로브 또는 항체와 관련하여 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "표지된"은 프로브 또는 항체에 검출가능한 물질을 커플링시킴(즉, 물리적으로 연결함)으로써 프로브 또는 항체를 직접 표지하는 것뿐만 아니라, 직접 표지되는 또 다른 시약과의 반응성에 의한 프로브 또는 항체의 간접적 표지화를 포괄할 수 있다. 간접적 표지화의 예는 형광 표지된 2차 항체를 사용한 1차 항체의 검출 및 형광 표지된 스트렙타비딘으로 검출될 수 있도록 비오틴을 이용한 DNA 프로브의 말단-표지화를 포함한다. 용어 "생물학적 샘플"은 대상체로부터 분리된 조직, 세포 및 생물학적 유체(예컨대, 생검)뿐만 아니라 대상체 내에 존재하는 조직, 세포 및 유체를 포함하는 것으로 의도된다. 즉, 본 발명의 검출 방법은 시험관내에서만 아니라 생체내에서 생물학적 샘플에서 CLDN4를 발현하는 세포를 검출하는 데 사용될 수 있다. 예를 들어, CLDN4의 검출을 위한 시험관내 기법은 효소 결합 면역흡착 검정(ELISA), 웨스턴 블롯, 면역침전, 및 면역형광을 포함한다. 또한, CLDN4의 검출을 위한 생체내 기법은 표지된 항-CLDN4 항체를 대상체 내로 도입하는 단계를 포함한다. 예를 들어, 항체는 대상체에서의 존재 및 위치가 표준 영상화 기법에 의해 검출될 수 있는 방사성 마커로 표지될 수 있다.
- [0286] "표적화된" 접합체, 즉, 표적화 모이어티(특정 부위 또는 부위들에서 대상체 또는 동물 내에서 접합체를 국제화하도록 설계된 분자 또는 특징)를 함유하는 접합체의 경우, 국제화는 대상체 내의 결합된, "국제화된", 및 결합되지 않은 "유리" 엔티티 사이의 평형이 본질적으로 달성된 상태를 지칭할 수 있다. 이러한 평형이 달성되는 속도는 투여 경로에 따라 달라진다. 예를 들어, 정맥내 주사에 의해 투여되는 접합체는 주사 수 분 이내에 국제화를 달성할 수 있다. 다른 한편, 경구로 투여되는 접합체는 국제화를 달성하는 데 수 시간이 걸릴 수 있다. 대안적으로, 국제화는 단순히 엔티티가 투여된 후 선택된 기간에서 대상체 또는 동물 내의 엔티티의 위치를 지칭할 수 있다. 또 다른 예로서, 국제화는 투여 후 모이어티가 분포될 때 달성된다.
- [0287] 국제화를 달성하는 시간의 합리적인 추정치는 당업자에 의해 이루어질 수 있다. 또한, 시간의 함수로서의 국제화 상태는 광검출기 장치와 같은 본 발명의 방법에 따라 검출가능한 모이어티(예를 들어, 발광 접합체)를 영상화하는 것으로 이어질 수 있다. 사용되는 "광검출기 장치"는 합리적인 시간 내에 포유류 내에서 희미한 광의 영상화를 가능하게 하고, 이러한 장치로부터의 신호를 사용하여 이미지를 구축할 수 있을 정도로 충분히 높은 감도를 가질 수 있다.
- [0288] 극도로 밝은 발광 모이어티를 사용하고/하거나 영상화되는 대상체 또는 동물의 표면 부근에 국제화된 발광 융합 단백질을 검출할 수 있는 경우, 한 쌍의 "나이트-비전" 고감도 또는 표준 고감도 비디오 카메라, 예컨대 실리콘 강화 튜브(SIT) 카메라(예를 들어, Hamamatsu Photonic Systems, 미국 뉴저지주 브릿지워터 소재)가 사용될 수 있다. 그러나, 더 민감한 광 검출 방법이 필요하다.
- [0289] 조도가 극도로 낮은 경우, 단위 면적당 광자 유속이 너무 낮아져 영상화 중인 화면이 더 이상 연속적이지 않게

나타난다. 대신, 이는 시간적으로 및 공간적으로 서로 구별되는 개별적인 광자에 의해 표현된다. 모니터에서 볼 때, 이러한 이미지는 빛의 섬광 지점으로 나타나며, 각각 검출된 단일 광자를 나타낸다. 시간 경과에 따라 디지털 이미지 프로세서에 이러한 검출된 광자를 축적함으로써, 이미지가 획득되고 구축될 수 있다. 각각의 이미지 지점에서 신호에 강도 값이 할당되는 통상적인 카메라와는 대조적으로, 광자 카운팅 영상화에서 신호의 진폭은 중요하지 않다. 목적은 단순히 신호(광자)의 존재를 검출하고 시간 경과에 따라 그의 위치에 대한 신호의 발생을 카운팅하는 것이다.

[0290] 본원에 기술된 적어도 2가지 유형의 광검출기 장치는 개별 광자를 검출할 수 있고, 이미지 프로세서에 의해 분석될 수 있는 신호를 생성할 수 있다. 노이즈가 감소된 광검출 장치는 광자 신호를 증폭시키는 것과 반대로, 광자 검출기에서 배경 노이즈를 감소시킴으로써 감도를 달성한다. 노이즈는 주로 검출기 어레이를 냉각함으로써 감소된다. 소자는 "후방박형(backthinned)" 냉각된 CCD 카메라로 지칭되는 전하 결합 소자(CCD) 카메라를 포함한다. 보다 민감한 기구에서, 냉각은 예를 들어 CCD 어레이의 온도를 대략 -120°C 로 만드는, 액체 질소를 사용하여 달성된다. "후방박형"은 광자가 검출되기 위해 따르는 경로 길이를 감소시킴으로써 양자 효율을 증가시키는 초박형 후방판을 지칭한다. 민감한 후방박형 극저온 CCD 카메라는 Photometries, Ltd.(미국 아리조나주 투손 소재)로부터 입수가 가능한 시리즈 200 카메라인 "TECH 512"이다.

[0291] "광자 증폭 장치"는 검출 스크린을 히트하기 전에 광자를 증폭시킨다. 이 부류는 마이크로채널 증강기와 같은 증강기가 있는 CCD 카메라를 포함한다. 마이크로채널 증강기는 카메라의 검출 스크린과 수직을 이루며 동시에 연장되는 채널의 금속 어레이를 함유한다. 마이크로채널 어레이는 영상화될 샘플, 대상체, 또는 동물과 카메라 사이에 배치된다. 어레이의 채널에 들어가는 대부분의 광자는 빠져나가기 전에 채널의 측면에 접촉한다. 어레이에 걸쳐 인가된 전압은 각각의 광자 충돌로부터 많은 전자의 방출을 초래한다. 이러한 충돌로부터의 전자는 "샷건" 패턴으로 기원 채널을 빠져나가 카메라에 의해 검출된다.

[0292] 제1 단계에서 생성된 전자가 결과적으로 제2 단계에서 전자의 증폭된 신호를 초래하도록, 증강 마이크로채널 어레이를 직렬로 배치함으로써, 훨씬 더 큰 감도가 달성될 수 있다. 그러나, 감도의 증가는 공간 해상도를 희생하여 달성되며, 이는 증폭 단계가 추가될 때마다 감소된다. 예시적인 마이크로채널 증강기 기반 단일 광자 검출 장치는 Hamamatsu로부터 입수가 가능한 C2400 시리즈이다.

[0293] 이미지 프로세서는 예를 들어 모니터 상에 디스플레이되거나 비디오 프린터를 통해 인쇄될 수 있는 이미지를 구축하기 위해 광자를 카운팅하는 광검출기 장치에 의해 생성된 신호를 프로세싱한다. 이러한 이미지 프로세서는 본원에 기술된 감응성 광자 카운팅 카메라를 포함하는 시스템의 일부로서 판매되고, 따라서, 동일한 공급원으로부터 입수가 가능하다. 이미지 프로세서는 구매한 영상화 시스템의 일부로서 포함될 수 있거나 포함될 수 없는 IBM 호환 PC 또는 Apple Macintosh(Apple Computer, 미국 캘리포니아주 쿠퍼티노 소재)와 같은 개인용 컴퓨터에 연결된다. 이미지가 디지털 파일의 형태로 되면, 이들은 다양한 이미지 프로세싱 프로그램(예컨대 "ADOBE PHOTOSHOP", Adobe Systems, Adobe Systems, 미국 캘리포니아주 마운틴 뷰 소재)에 의해 조작될 수 있다.

[0294] 실시형태에서, 생물학적 샘플은 시험 대상체로부터의 단백질 분자를 함유한다. 한 예시적인 생물학적 샘플은 대상체로부터 통상적인 수단에 의해 단리된 말초 혈액 백혈구 샘플이다.

[0295] 본 발명은 또한 생물학적 샘플에서 CLDN4 또는 TIGIT-발현 세포의 존재를 검출하기 위한 키트를 포함한다. 예를 들어, 키트는 다음을 포함할 수 있다: 생물학적 샘플에서 암 또는 종양 세포를 검출할 수 있는 표지된 화합물 또는 작용제(예를 들어, 항-CLDN4 scFv 또는 단클론 항체); 샘플 중의 CLDN4의 양을 결정하기 위한 수단; 및 샘플 중의 CLDN4의 양을 표준물과 비교하기 위한 수단. 일부 실시형태에서, 표준물은 비암 세포 또는 이의 세포 추출물이다. 화합물 또는 작용제는 적합한 용기에 패키징될 수 있다. 키트는 샘플에서 암을 검출하기 위한 키트의 사용 지침서를 추가로 포함할 수 있다.

[0296] 다른 실시형태

[0297] 본 발명을 이의 상세한 설명과 함께 기술하였지만, 상기 설명은 첨부된 청구범위의 범주에 의해 한정되는 본 발명의 범주를 예시하기 위한 것이지 제한하기 위한 것이 아니다. 다른 양태, 이점, 및 변형은 하기 청구범위의 범주 내에 있다.

[0298] 본 발명은 하기 실시예에서 추가로 설명되며, 이는 청구범위에 기술된 본 발명의 범주를 제한하지 않는다.

[0299] 실시예

[0300] 본 발명의 보다 완전한 이해를 용이하게 하기 위해 하기에 실시예를 제공한다. 하기 실시예는 본 발명을 만들고

실시하는 예시적인 방식을 예시한다. 그러나, 본 발명의 범주는 단지 예시의 목적을 위한 이들 실시예에 개시된 구체적인 실시형태에 제한되지 않는데, 이는 유사한 결과를 얻기 위해 대안적인 방법이 이용될 수 있기 때문이다.

[0301] **실시예 1 - 치료적 표적으로서의 클라우딘 4**

[0302] 전체 세포 패닝을 통해 2가지의 항-클라우딘4 scFv(Gly1-4-G3 및 Gly1-2-F4)를 확인하였다. CLDN4를 안정적으로 발현하도록 형질도입된 293T와 Cf2Th 세포를 교대로 3라운드 패닝을 수행하였다. 상기 scfv들은 구조적으로 관련된 단백질 클라우딘3과 최소한의 교차 반응성을 나타낸다.

[0303] 클라우딘 4는 삼중 음성 유방암, 췌장암, 및 담도암을 포함한 다수의 암의 치료적 표적이다. 상기 scFv는 CLDN4를 특이적으로 표적화할 수 있으며 CAR T 세포의 표적화에 사용될 수 있다.

[0304] 이들 scFv는 치료 또는 진단 목적을 위한 단클론 항체로서 개발될 수 있다. 추가로, 이들은 CLND4를 과발현하는 암에 대한 CAR T 세포에 대한 표적화 모이어티로서 사용될 수 있다.

[0305] **실시예 2**

[0306] - CLDN-3 플라스미드로 293T 세포를 일시적으로 형질감염시켰다

[0307] - CLDN-3 또는 CLDN-4를 사용하지 않는 경우 293T에 대한 항체의 배경 결합은 낮거나 전혀 없었다

[0308] - CLDN-3 항체는 CLDN-3 세포주만을 특이적으로 인식하였다

[0309] - CDLN-4 항체는 CLDN-3 세포주에 약하게 결합하였다

[0310] - 일부 293T CLDN-4 세포에서는 CLDN-4 발현이 손실되었을 수 있다

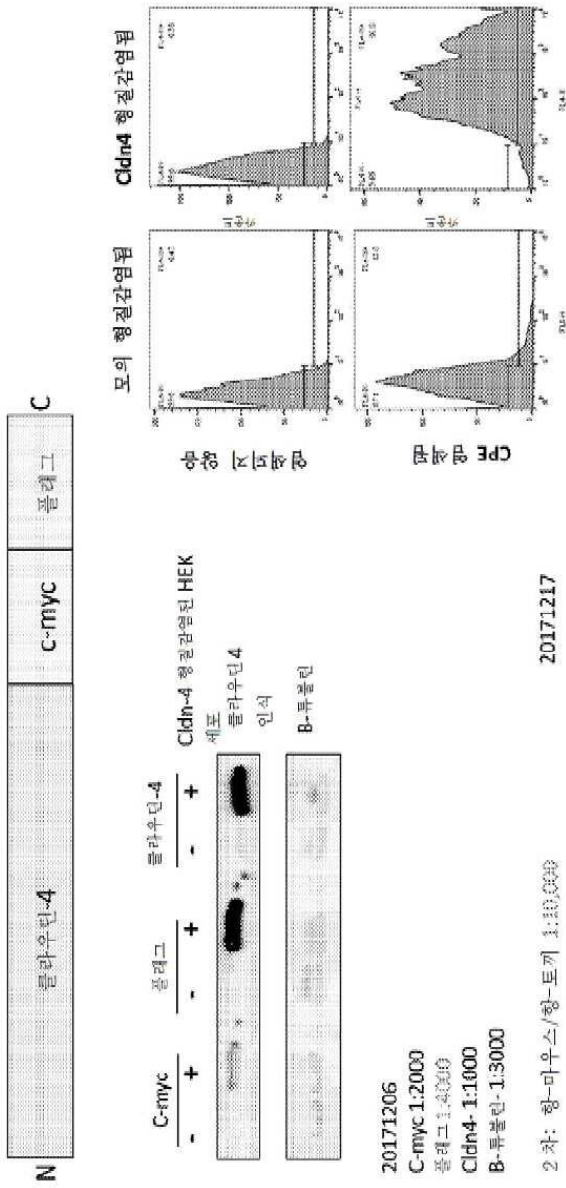
[0311] - CLDN-3 발현 세포주에 대한 CLDN-4 미니바디의 결합의 검정을 수행할 수 있다

[0312] **등가물**

[0313] 당업자는 일상적인 실험 이하를 사용하여 본원에 기술된 구체적인 물질 및 절차에 대한 다수의 등가물을 인식하거나 확인할 수 있을 것이다. 이러한 등가물은 본 발명의 범주 내에 있는 것으로 간주되며 하기 청구범위에 의해 커버된다.

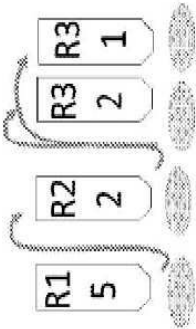
도면
도면1

CPE-FC 틀의 검증

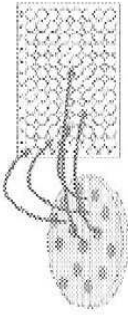


도면2

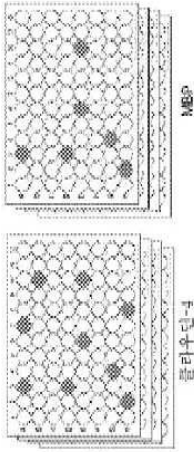
단계 1: 파지 선택



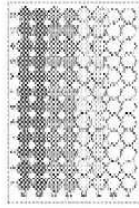
단계 2: 개별 콜로니를 글라 넘 파지를 성장시킴



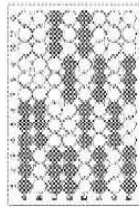
단계 3: Cld-4 및 MBP에 대한 파지를 이용한 Elisa (음성)



단계 6: 파지 제조, 파지의 희석물을 이용한 Elisa



고유한 서열을 확인함



단계 7: 파지가 세포에 결합함

단계 8: 미니바디가 세포에 결합함

도면3

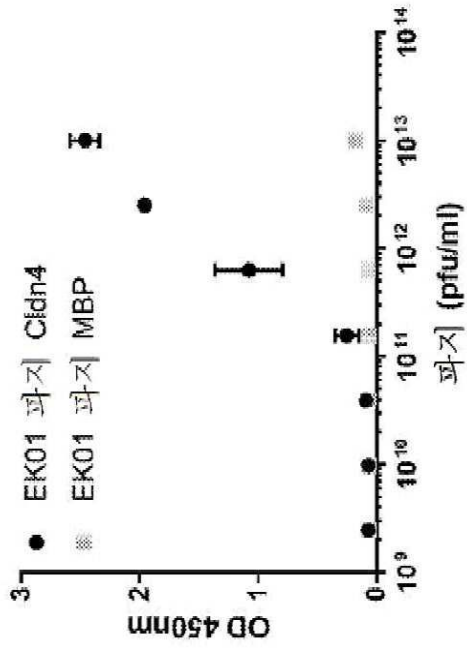
곤충 세포에서 발현된 가용화된 클라우딘-4를 사용한 파지 패닝에 의한 클라우딘-4-표적화 scFv의 발견

시도	항원	선택의 라운드 수 코팅 ng/ul (R1,R2,R3)	스크리닝된 클로니 수 클라우딘-4 및 MBP (음성 대조군)	서열분석된 클로니 수	고유한 서열	삼중으로 반복된 Elisa	파지 생성 Elisa 회색 곡선	고유한 서열 재검검
1	Sol. FL Cld-4	5, 2, 2+1	720	88 (양호함 75)	4	2	2	1
2	Sol. FL Cld-4	5, 2, 2+1	768	73 (양호함 73)	17	7	1	시도와 동일한 서열 1

서열 ID	V-부조각 및 대립유전자	D-부조각 및 대립유전자	FRL-INGT	CDRL1-INGT	CDRL2- INGT	FR1-INGT	FR2-INGT	CDRL3- INGT	FR3-INGT	FR4-INGT
IE2_FH_RV3-53*01.F	EVCWQDGGGGLTPGGSLRLGFV...SRN	MSVWVRCAPGKSLK	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
RV3-53*01.F	RV3-53*01.F	RV3-53*01.F	RV3-53*01.F	RV3-53*01.F	RV3-53*01.F	RV3-53*01.F	RV3-53*01.F	RV3-53*01.F	RV3-53*01.F	RV3-53*01.F

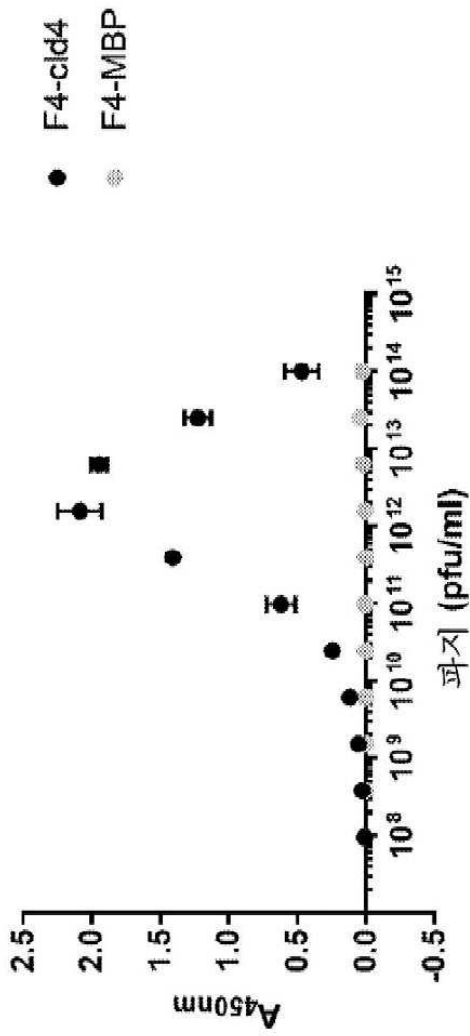
도면4

EKO1 파지는 가용성 클라우딘-4에 특이적으로 결합한다



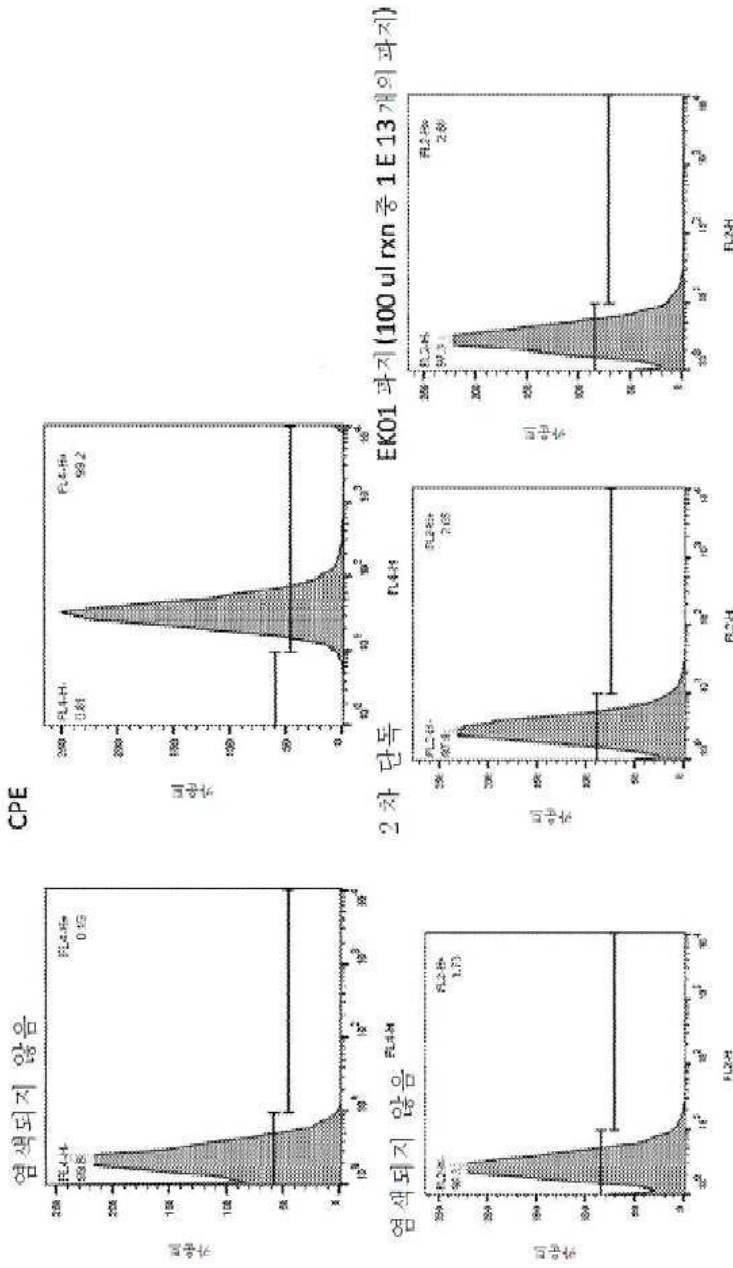
도면5

F4는 고유한 벨-형상 곡선으로 클라우딘-4에 특이적으로 결합한다 F4는 EK01이 되었음



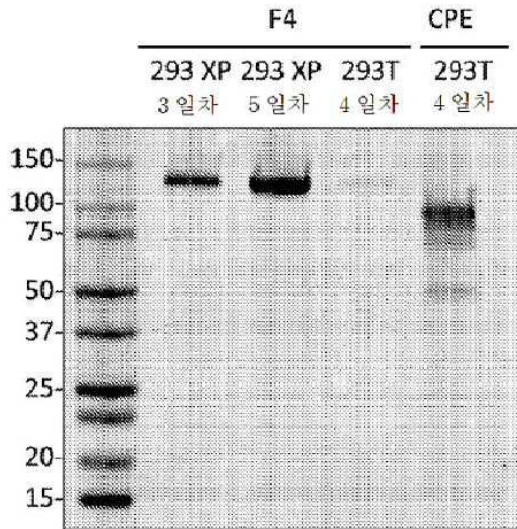
도면6

EK01 파지는 HCC38 TNBC 세포주에 결합하지 않는다
 CPE

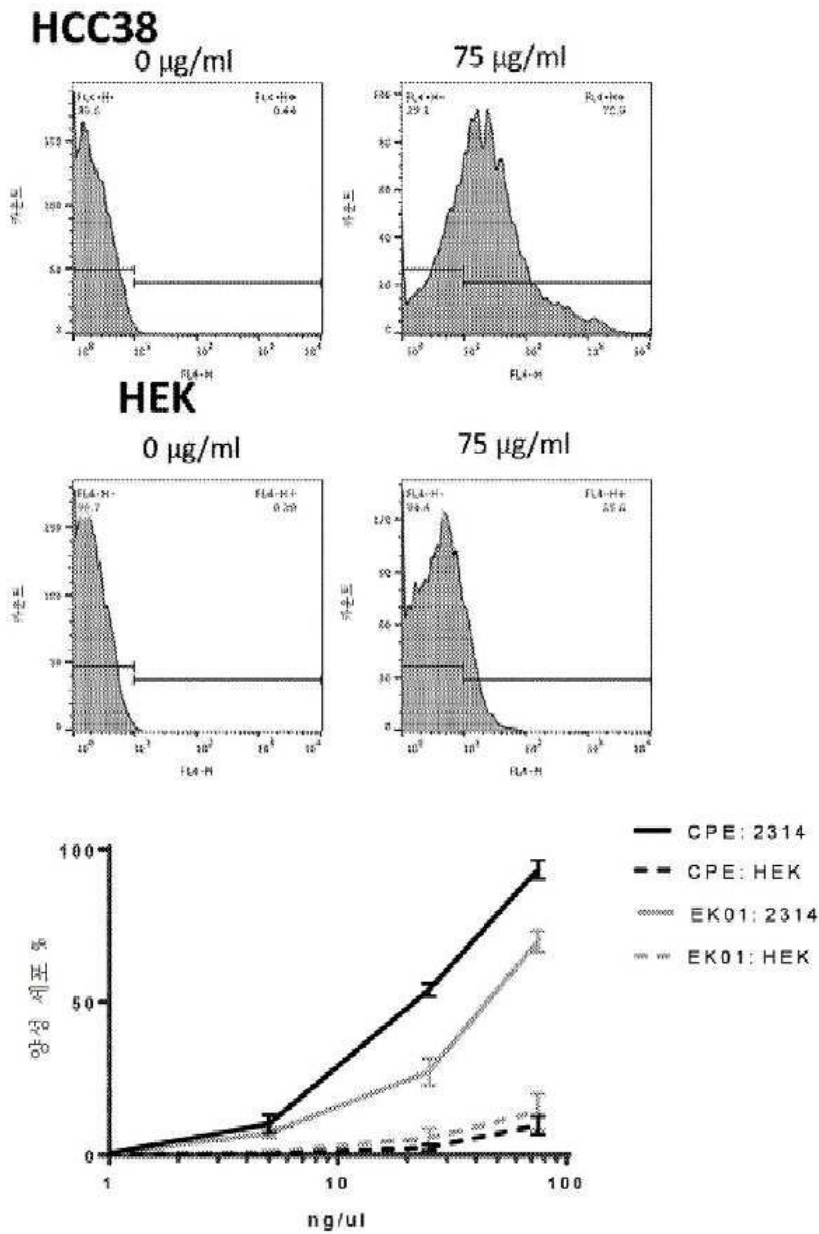


도면7

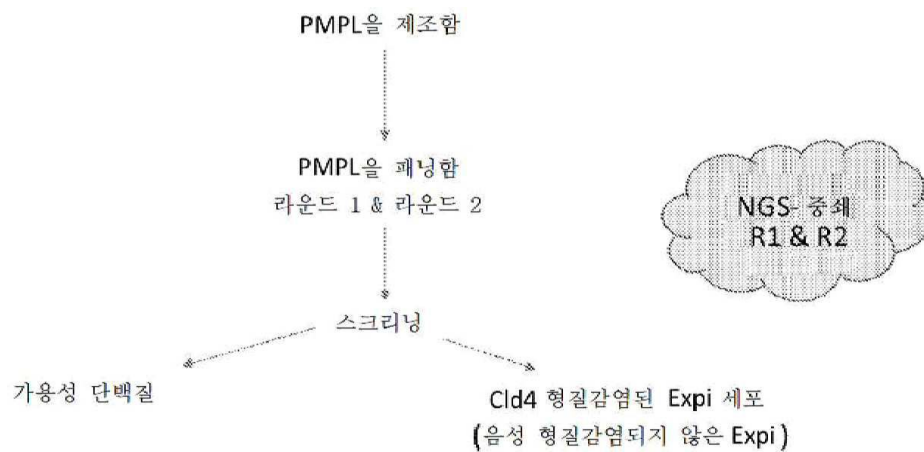
EK01 미니바디(scFv-Fc) 단백질 A 정제



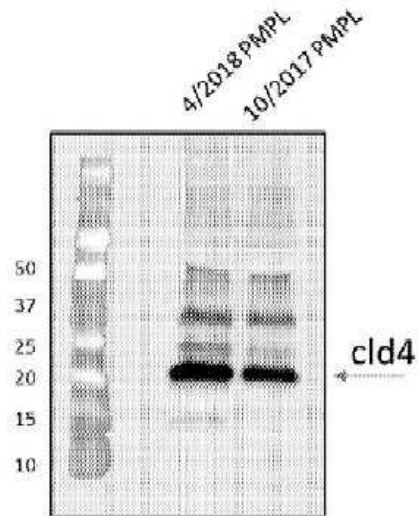
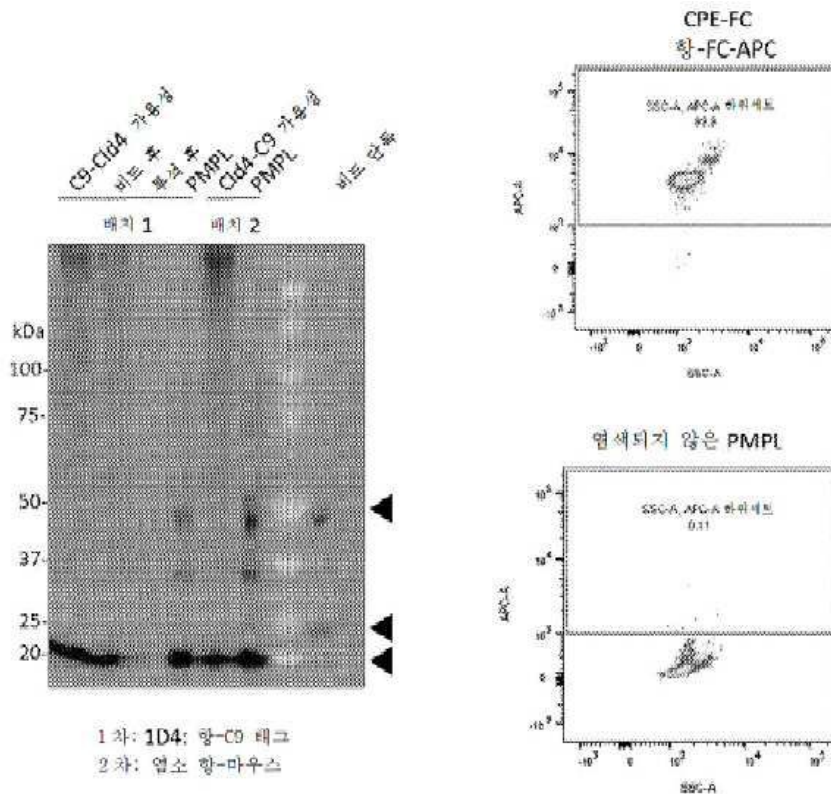
도면8



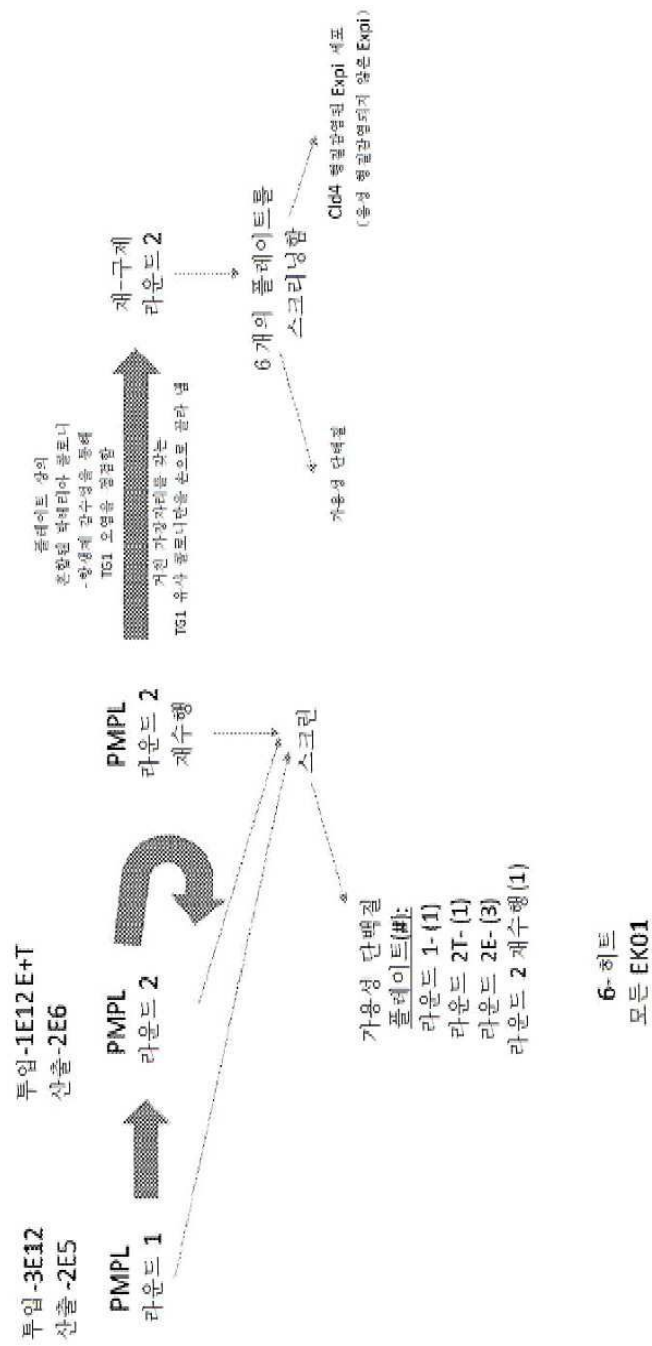
도면9



도면10



도면11



도면12

라운드 2의 재구제로부터의 6개의 플레이트

가용성 스크리닝

		OD			OD (비특이적 세포 사멸)		
1	P1_A7	2.36	EK01	1	P1_F4	서열 없음	
2	P1_G1	0.23	정크	2	F1_G3	0.33	정지, 고유
3	P2_B8	3.6	EK01	3	F1_G5		서열 없음
4	P2_C11	3.2	EK01	4	F1_B3		정크 SCFV 아님
5	P2_D1	0.278	서열 없음	5	P1_D12	0.1	고유 myc 없음
6	P3_A12	0.353	고유, 정지	6(A)	P2_G8	0.25	고유
7	P3_B11	0.42	고유-다량 정지	7	P2_G12		서열 없음
8	P3_B12	0.442	EK01	8(B)	P3_A7	0.215	고유
9	P3_F12	2.02	EK01	9(C)	F4_B4	0.39	고유
10	P4_C3	2.75	EK01	10(D)	P4_B5	0.324	고유
11	P5_B9	2.24	EK01	11	P5_A3		정크
12	P5_D5	3.59	EK01	12	P5_A12		서열 없음
13	P5_F11	0.589	고유-다량 정지	13	P5_B8	0.21	EK01
14	P5_F11	2.6	EK01	14	P5_G5		서열 없음
15 (H)	P6_A4	0.25	고유, 정지 없음	15	P5_C10		고유, 정지
16	P6_B3	0.5	고유, 다량 정지	16 (E)	P5_D5	0.21	고유
17	P6_C10	0.2	서열 없음	17	P5_D12		서열 없음
18 (I)	P6_D8	0.373	고유, 정지 없음	18 (F)	P5_E1	0.22	고유
19	P6_E5	0.22	서열 없음	19 (G)	P5_G5	0.258	고유
20	P6_F2	0.654	서열 없음	20	P6_B6		서열 없음
				21	P6_F3	2.37	정지,
				22	P6_F8		서열 없음
				23	P6_F10	0.26	고유, 정지

전체 세포 스크리닝

가용성 스크리닝:
 9/20 EK01= 45%
 9/16 서열- EK01 = 56%

서열 없음-4
 정크-1
 Scfv 다량 정지-4
 고유 정지 없음-2

전체 세포 스크리닝:
 서열 없음-8
 정크-2
 고유 정지-3
 고유(정방향)-7

도면13

클론	빈도 R1	빈도 R2	클론	빈도 R1	빈도 R2
1	5317	5045	11	52	422
2	178	3778	12	50	292
3	148	1570	13	45	275
4	81	781	14	45	271
5	63	763	15	43	267
6	62	660	16	43	230
7	61	603	17	43	192
8	59	590	18	42	185
9	54	490	19	42	152
10	53	444	20	42	140

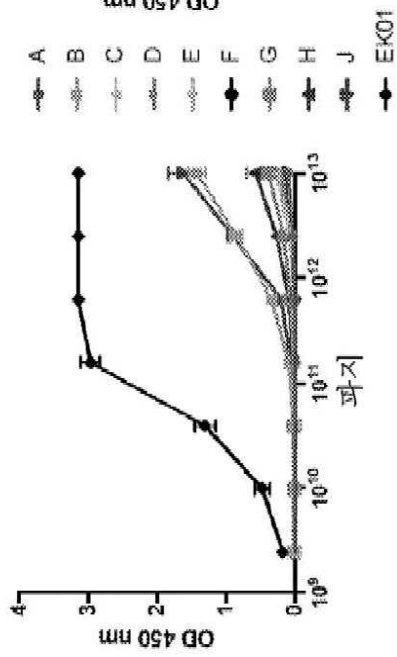
도면14

클론	상위 빈도 R1	상위 빈도 R2
A	5317	5045
B	2	275
C	1	46
D	4	55
E	6	6
F	5317	5045
G	1	1570
H	2	444
J	50	422
EK01	5	590

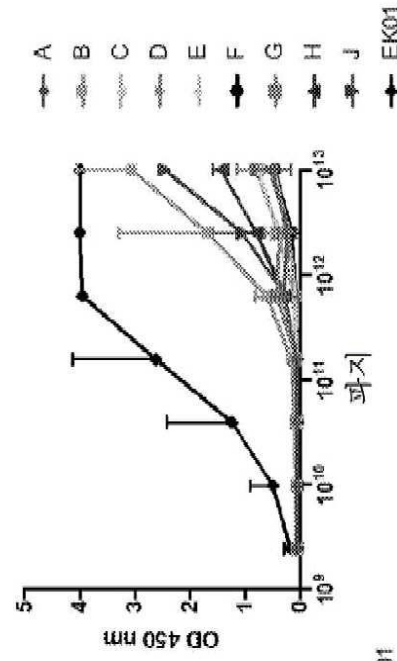
도면15

파지 결합 가능화된 클라우딘-4
1.5 ng/ul 로 코팅된 ELISA

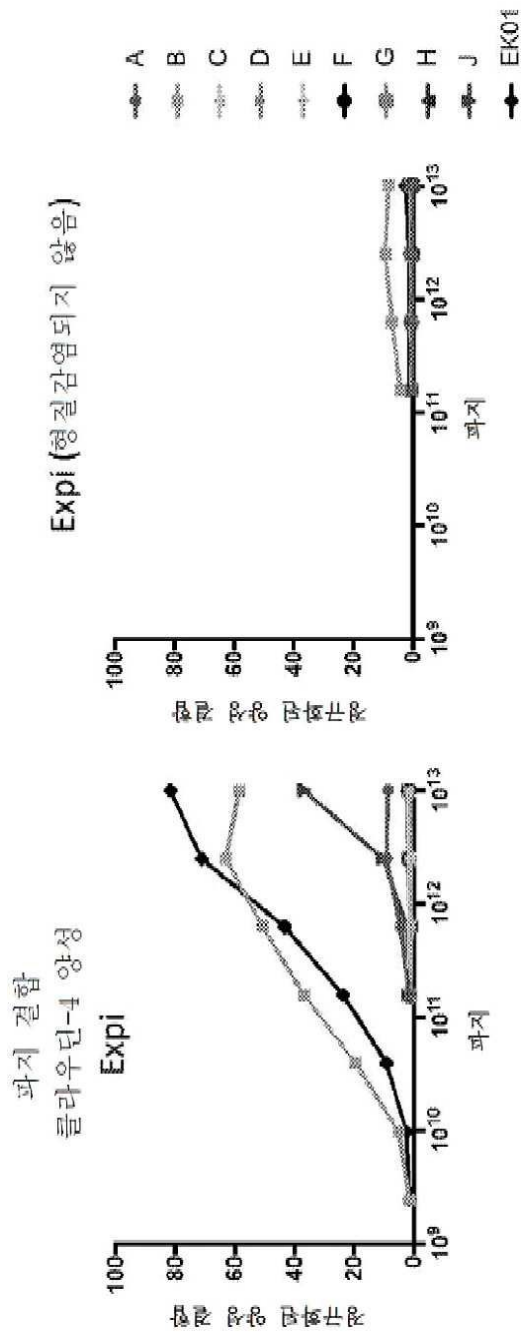
중복실험 1



중복실험 2



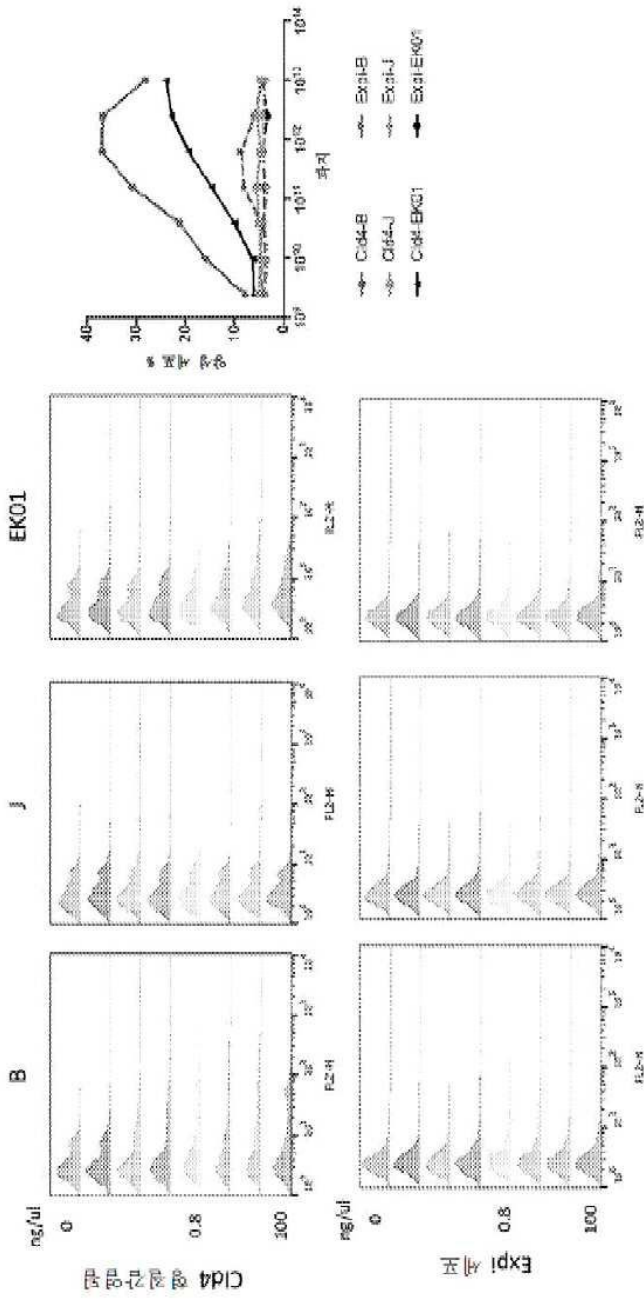
도면16



형질감염 효능을 검출하기 위해
양성 대조군 (CPEFC) 에 대해 정규화됨. N=1

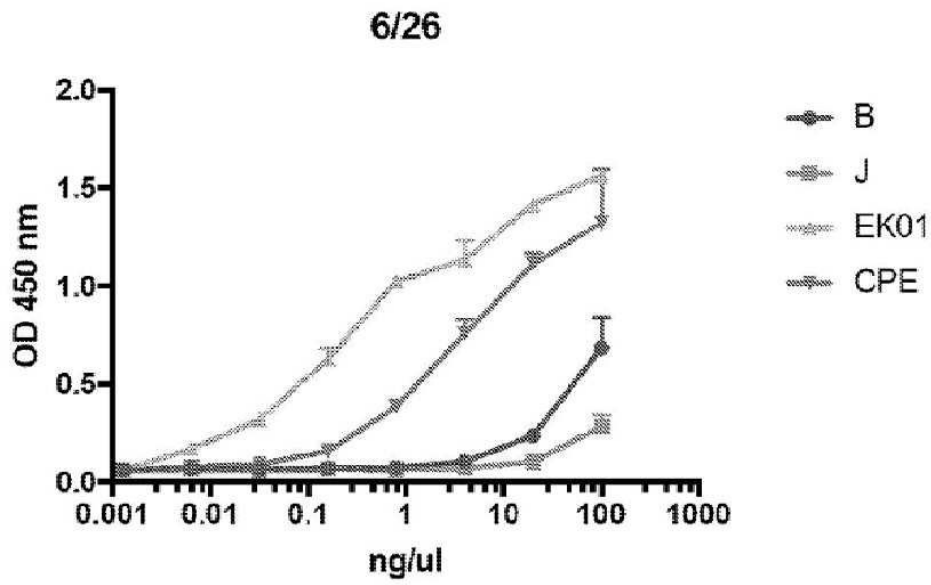
도면17

표지 결합 형질도입된 expi 세포, 중복실험 2

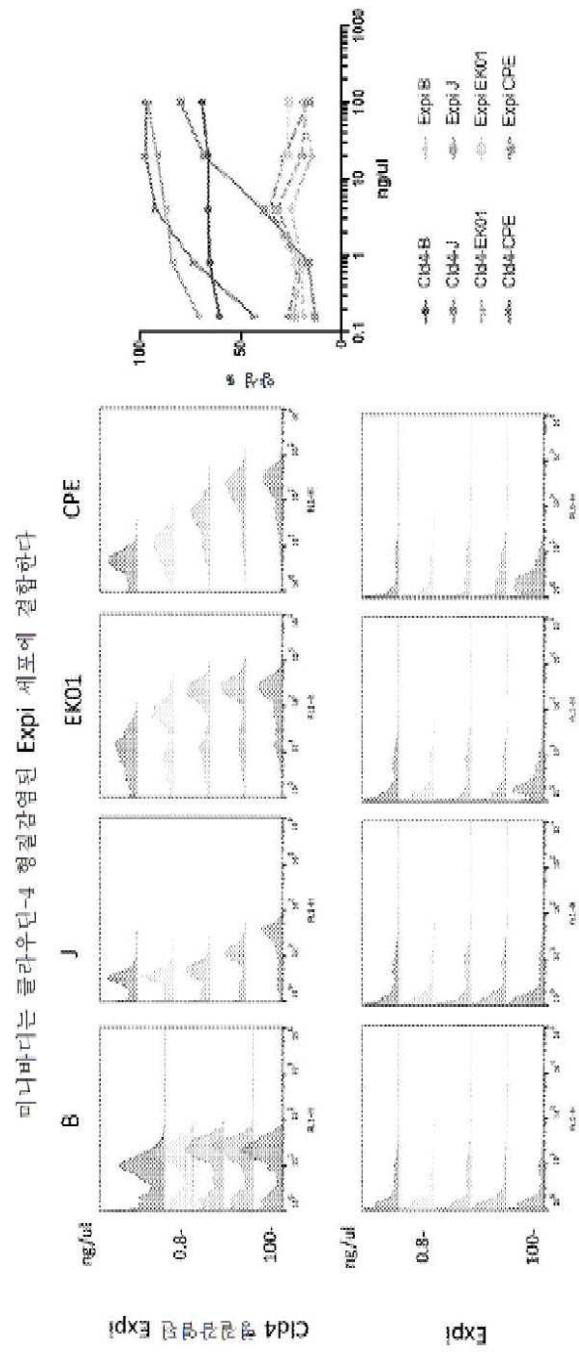


도면18

가용성 cld4 ELISA 에 대한 미니바디

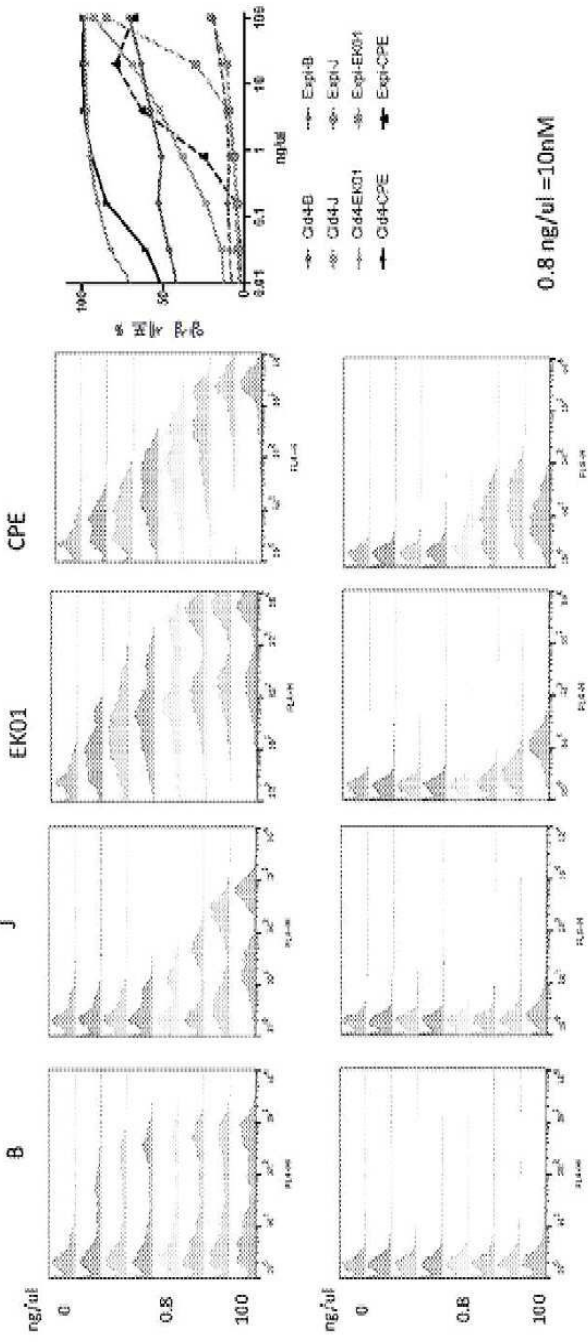


도면19



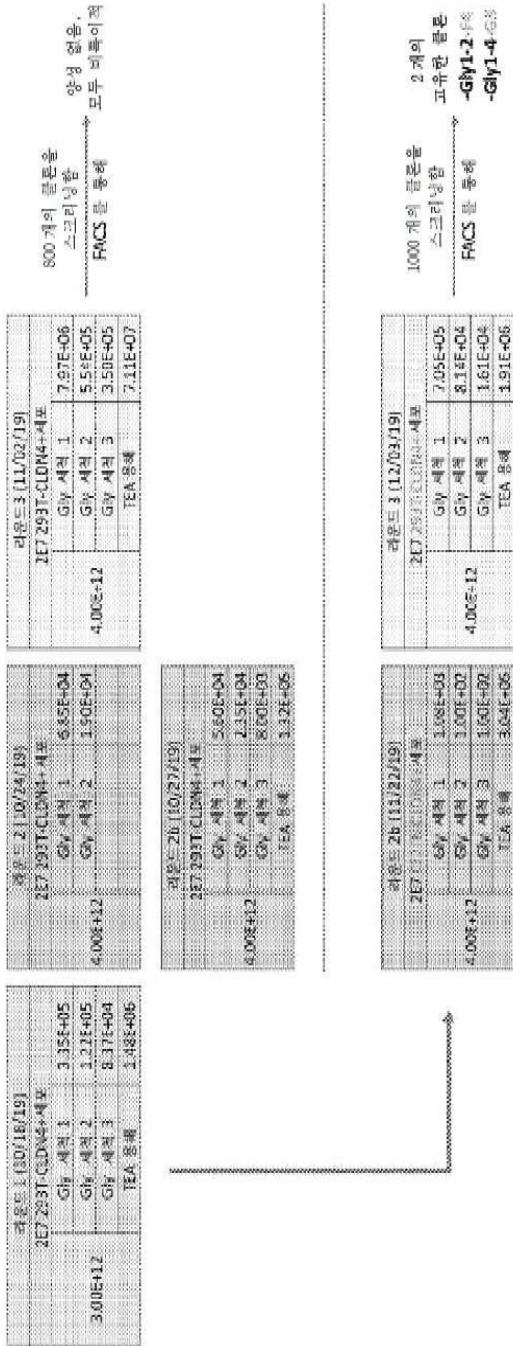
도면20

미니바디는 플라우딘-4 형질감염된 Exip 세포에 결합한다



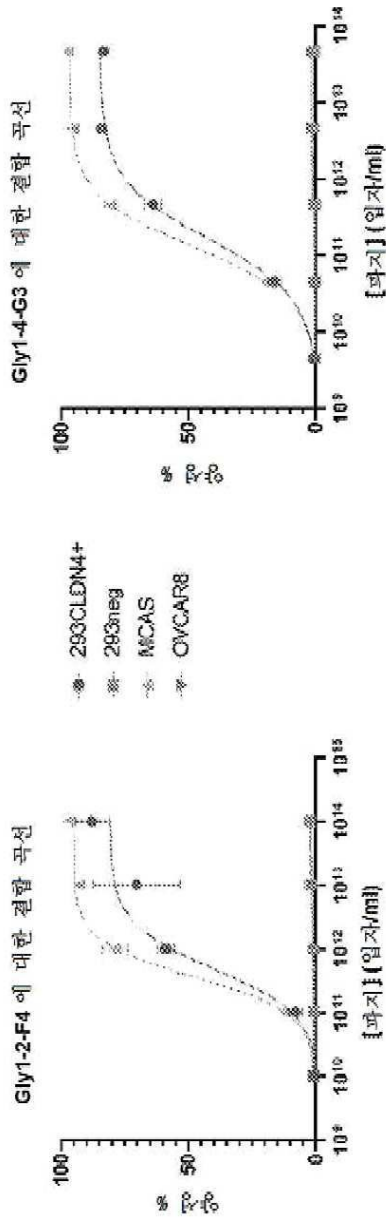
도면21

클라우딩-4 전체 세로 패닝 경로



도면22

정제된 파지 결합 곡선 (CLDN-4)

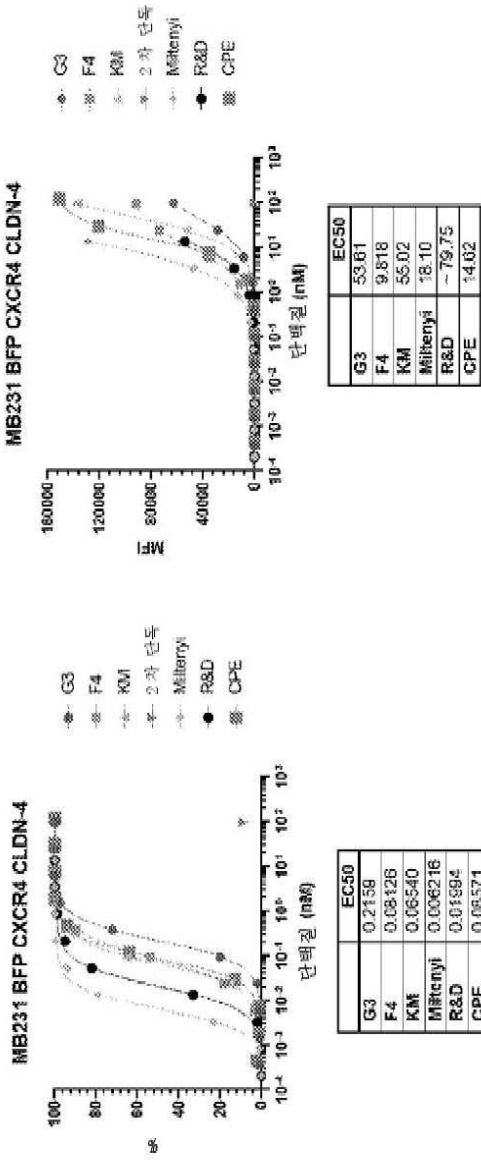


Gly1-2-F4: IGHV3-23*04/IGLV6-57*01

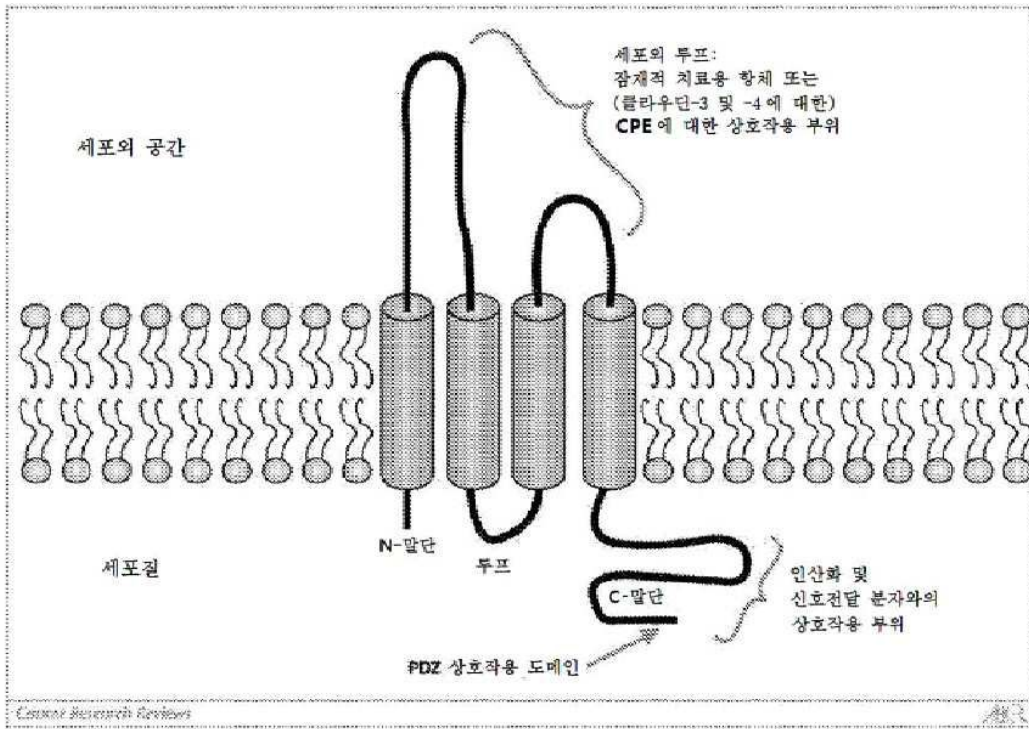
Gly1-4-G3: IGHV3-30*07/IGLV1-44*01

도면23

MB231 CXCR4 CLDN-4의 미니바디 결합



도면24



도면25

인간 CLDN-3 대 CLDN-4 세포외 도메인

CLDN-3 SMGLEITCTALAVLGLGTLVCCALIMNRVSAFIGSNIITSQNIWEGLWNCVVSQSTGQM
 SMGL++ G ALAVLGLL ++CCALIMNRV+AFIGSNI+FSQ IWEGLWNCVVSQSTGQM
 CLDN-4 SMGLQVMGIALAVLGLGLAVMLCCALIMNRVTAFIGSNIIVTSQTIWEGLWNCVVSQSTGQM
 CLDN-3 QCKVYDSLLALPQDLQAAALIVVAIILAAFGLLVALVGAOCTNCVQDDYAKAKITIVAG
 QCKVYDSLLALPQDLQAAAL+++I++AA G+L+++VG +CTNC++D++AKAK IVAG
 CLDN-4 QCKVYDSLLALPQDLQAAALVVIISIIVAALGVLLSVVGGKCTNCLEDESAKAKTIVAG
 CLDN-3 VLFLLAALLTLVPVSM+SANTIIIRDFYINPVVPERQREMAGLYVGVAAAALQLLGGALLC
 V+FLLA L+ +VPVSM+A+ II+DFYNP+V QKREMGALYVGVAAA+ L LLGG LLC
 CLDN-4 VVFLLAGLMVIVPVSM+TAHNI IQDFYINPLVASGQKREMGASLYVGVAAAAGLLLLGGCLLC
 CLDN-3 CSCPPREKK

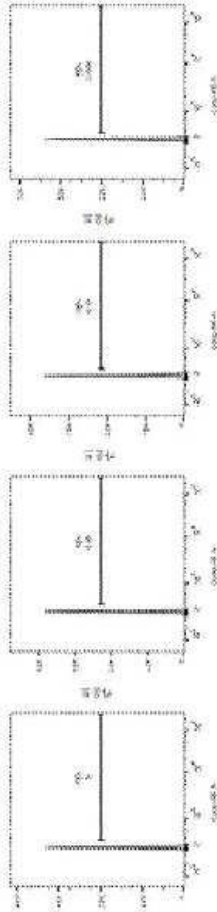
상동성 52/53
동일성 50/53

상동성 15/19
동일성 11/19

도면26

염색 없음 CLDN-4 (Mil) CLDN-4 (R&D) CLDN-3 (R&D)

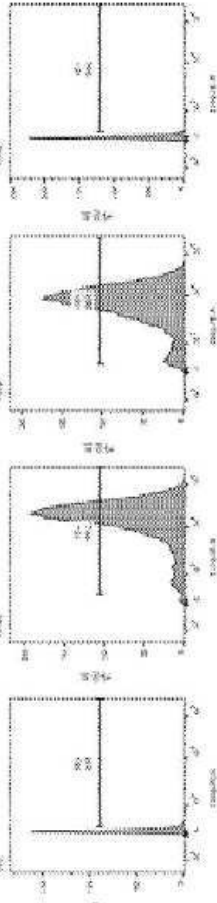
293T



CLDN-4 (Mil) 293T 염색 없음

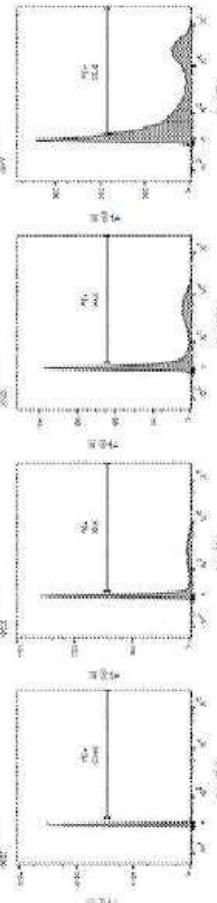
CLDN-4 (R&D) 293T 염색 없음

293T MC
CLDN-4



CLDN-4 293T MC 염색 없음

293T
CLDN-3



CLDN-3 293T 염색 없음

일시적
형질감염

CLDN-4 (Mil) 293T 일시적 형질감염

CLDN-4 (R&D) 293T 일시적 형질감염

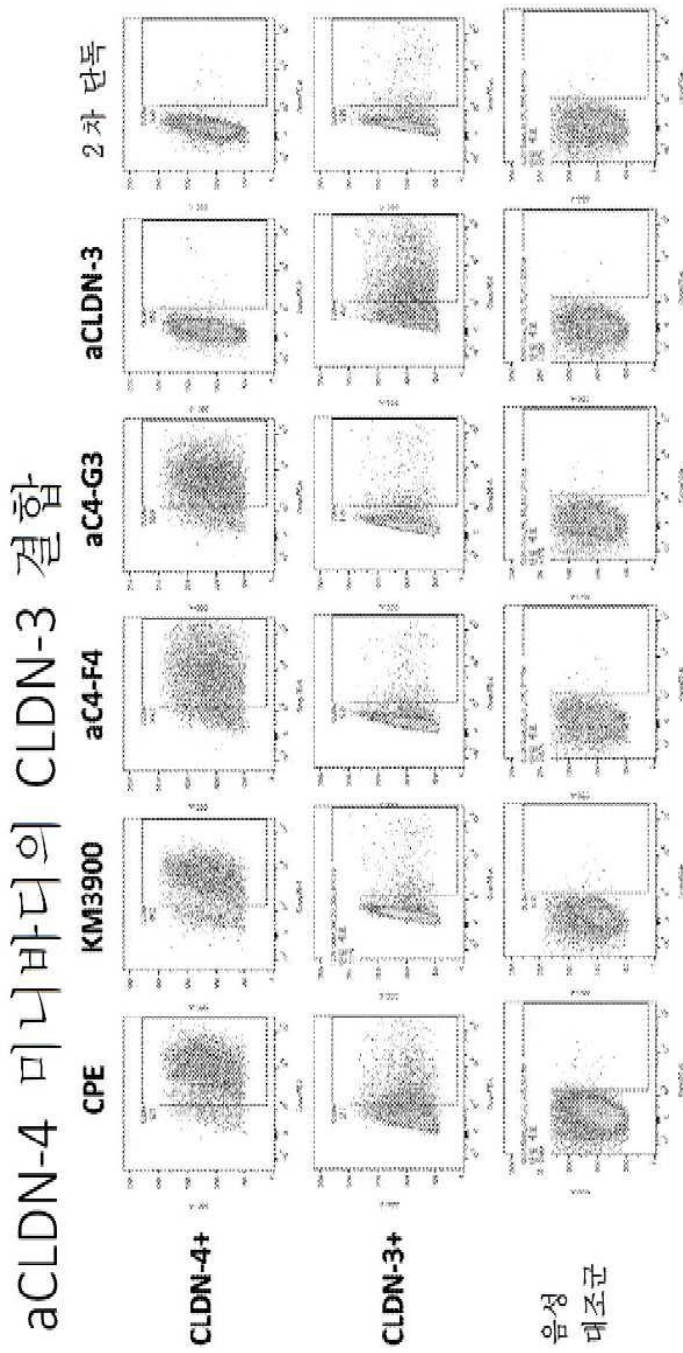
CLDN-3 (R&D) 293T 일시적 형질감염

도면27

세포주	항체			
	염색 없음	aCLDN-4 (Miltenyi)	aCLDN-4 (R&D)	aCLDN-3 (R&D)
293T	0	1	0	0
293T MC CLDN-4	2	99	99	1
293T CLDN-3	0	31	44	66
MB231 BFP	0	30	1	0
MB231 BFP CLDN-4	0	97	94	0

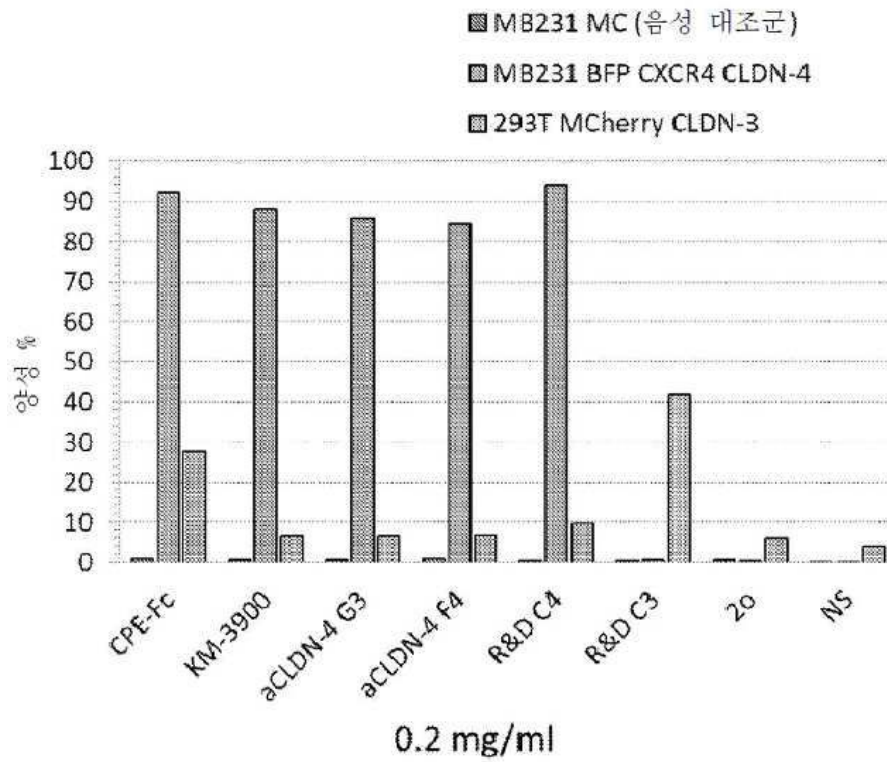
세포주	평균 FI			
	염색 없음	aCLDN-4 (Miltenyi)	aCLDN-4 (R&D)	aCLDN-3 (R&D)
293T	22	25	23	24
293T MC CLDN-4	80	20439	8829	64
293T CLDN-3	30	842	2027	6074
MB231 BFP	34	198	74	50
MB231 BFP CLDN-4	34	15337	5270	100

도면28



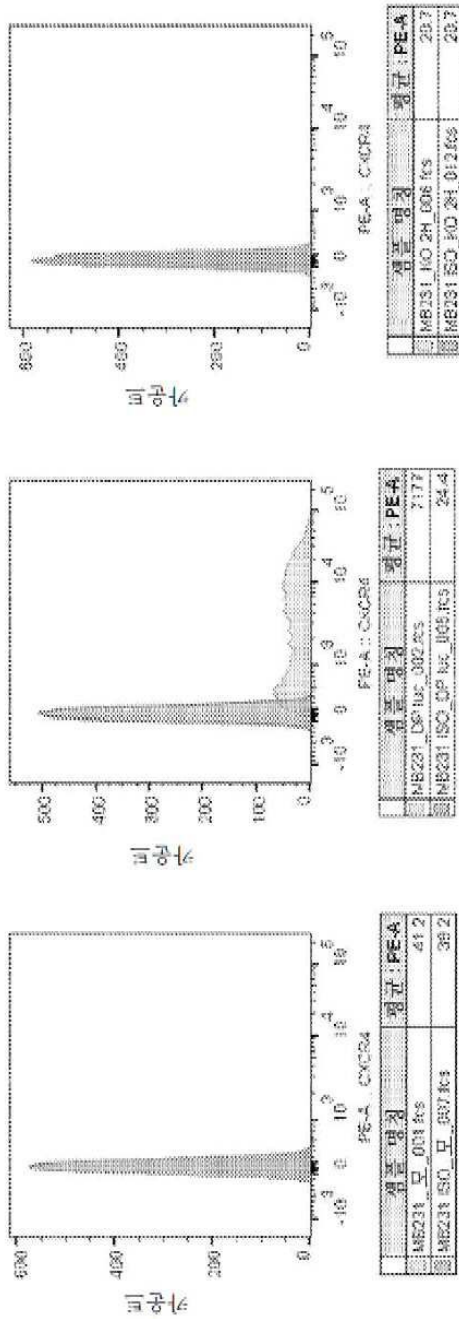
도면29

클라우딘 항체의 특이성

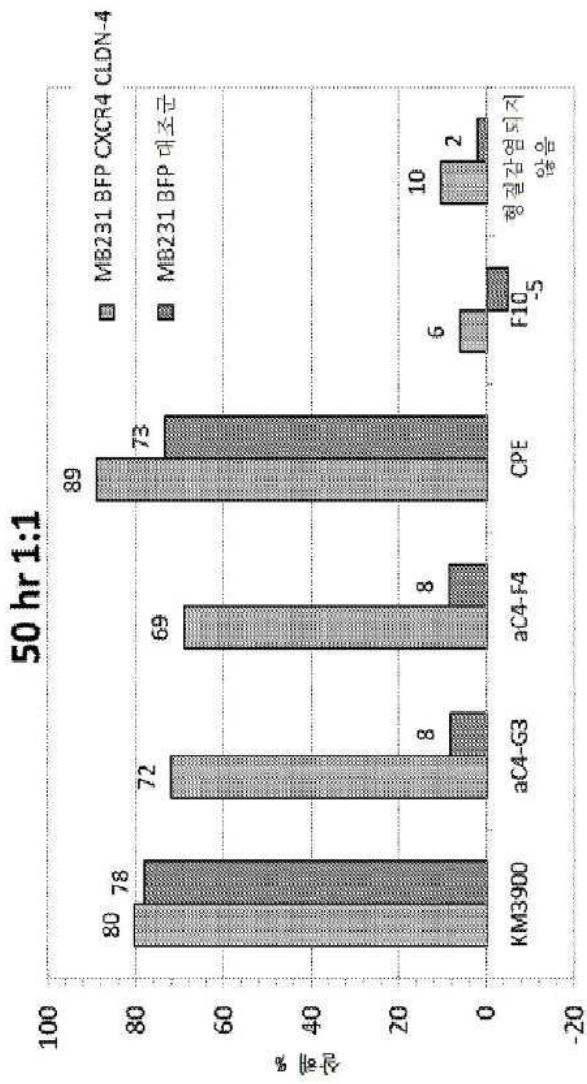


도면30

KO와 유사한 aCXCR4를 이용한 MB231의 염색

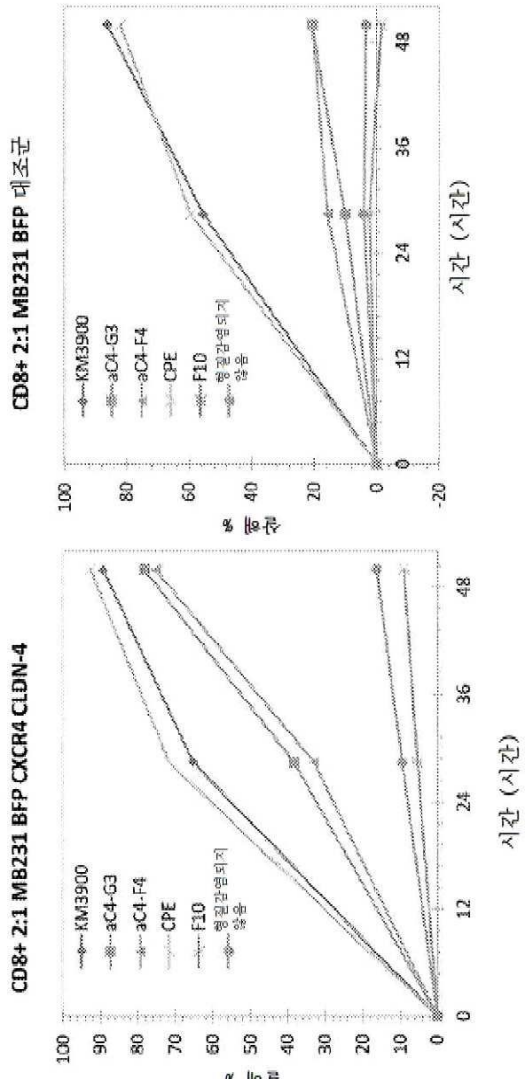


도면31



하나의 시점 및 하나의 E:T 비
 상이한 CART의 비교
 살해 % = (NoT-Exp)/(NoT)*100

도면32



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.